

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

METKA URANKAR

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

METKA URANKAR

**RAZVOJ IN VALIDACIJA METODE KAPILARNE GELSKE
ELEKTROFOREZE V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA DODECILSULFATA ZA
DOLOČANJE NEČISTOT V TERAPEVTSKIH PROTEINIH**

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF CAPILLARY SODIUM
DODECILSULFATE GEL ELECTROPHORESIS METHOD FOR THE
DETERMINATION OF IMPURITIES IN THE THERAPEUTIC PROTEINS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala v podjetju Lek d.d. Mengeš, organizacija Tehničnega razvoja in proizvodnje bioloških zdravil, oddelek razvojna analitika, pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom dr. Urške Kristan.

Zahvala

Zahvaljujem se podjetju Lek d.d. Mengeš, oddelku razvojna analitika, da so mi omogočili pisanje in izvajanje eksperimentalnega dela magistrske naloge.

Zahvala gre dr. Mariji Sollner Dolenc za kritičen pregled magistrske naloge ter dr. Urški Kristan za nasvete med izvajanjem laboratorijskega dela in koristne napotke za izboljšanje vsebine magistrske naloge.

Posebna zahvala gre moji družini in fantu, ki so me tekom celotnega šolanja vedno spodbujali, verjeli vame in mi stali ob strani.

Iskreno se zahvaljujem vsem sodelavcem razvojne analitike, ki so mi kakorkoli pomagali pri pisanju ali izvajanju magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag.farm. in somentorstvom dr. Urške Kristan.

VSEBINA

1 UVOD	1
1.1 BIOLOŠKA ZDRAVILA	1
1.2 TERAPEVTSKI PROTEINI	2
1.2.1 Protitelesa	3
1.2.1.1 Protitelesa razreda IgG	3
1.2.2 Fuzijski proteini.....	5
1.2.3 Uporaba terapevtskih proteinov	6
1.2.3.1 Uporaba monoklonskih protiteles.....	7
1.2.3.2 Uporaba fuzijskih proteinov	7
1.3 IMUNOTOKSIČNOST TERAPEVTSKIH PROTEINOV.....	9
1.4 IDENTIFIKACIJA IN KARAKTERIZACIJA ČISTOSTI PROTEINOV	11
1.4.1 Kromatografija	11
1.5 ELEKTROFOREZA.....	12
1.5.1 Gelska elektroforeza.....	12
1.5.2 Kapilarna elektroforeza	13
1.5.2.1 Kapilarna gelska elektroforeza	14
2 NAMEN DELA	16
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 MATERIALI	18
3.1.1 Kemikalije	18
3.1.2 Pufri in raztopine.....	18
3.1.3 Voda	19
3.1.4 Vzorci	19
3.2 OPREMA.....	19
3.2.1 Naprave in pribor	19
3.2.2 Program za obdelavo podatkov	20
3.3 EKSPERIMENTALNO DELO	20
3.3.1 Priprava vzorcev.....	21
3.3.1.1 Priprava vzorcev za LIF detekcijo.....	21

3.3.2 Alkilacija	22
3.3.3 Redukcija.....	23
3.3.4 pH denaturacijskega pufra.....	24
3.3.5 Pogoji inkubacije.....	24
3.4 METODE.....	24
3.4.1 Kapilarna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata.....	24
3.4.2 Instrumentalne nastavitve.....	26
3.4.2.1 Detekcija.....	27
3.4.2.2 Velikost detekcijskega okna	28
3.4.2.3 Polarnost metode in mesto injiciranja	29
3.4.2.4 Napetost in čas injiciranja	29
3.4.2.5 Napetost in čas separacije.....	29
3.4.3 Validacija CE-SDS metode	30
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	37
4.1 KAPILARNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA DODECILSULFATA V NEREDUCIRAJOČIH POGOJIH	37
4.2 KAPILARNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA DODECILSULFATA V REDUCIRAJOČIH POGOJIH.....	40
4.3 PRIPRAVA VZORCEV PRI nrCE-SDS	42
4.4 PRIPRAVA VZORCEV PRI rCE-SDS	44
4.5 INSTRUMENTALNE NASTAVITVE.....	50
4.5.1 Detekcija.....	50
4.5.2 Polarnost metode in mesto injiciranja	52
4.5.3 Velikost detekcijskega okna.....	53
4.5.4 Napetost in čas injiciranja	54
4.5.5 Napetost in čas separacije	56
4.6 VALIDACIJA CE-SDS METODE	57
4.6.1 Linearnost in točnost	58
4.6.2 Meja zaznavnosti in meja določljivosti.....	60
4.6.3 Specifičnost	62
4.6.4 Natančnost.....	64
4.6.5 Robustnost.....	66

5 SKLEP	67
6 LITERATURA	69

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Terapevtski Fc-fuzijski proteini, ki imajo dovoljenje za promet. Povzeto po (12, 18).	8
Preglednica II: Uporabljene kemikalije	18
Preglednica III: Uporabljeni pufri in raztopine za pripravo vzorcev.....	18
Preglednica IV: Uporabljene naprave.....	19
Preglednica V: Uporabljen pribor.....	20
Preglednica VI: Pregled priprave vzorcev pri nereducirajočih pogojih CE-SDS metode z UV detekcijo.....	23
Preglednica VII: Pregled priprave vzorcev pri reducirajočih pogojih CE-SDS metode z UV detekcijo	23
Preglednica VIII: Koncentracije uporabljene pri določevanju linearnosti in točnosti CE-SDS metode v nereducirajočih in reducirajočih pogojih.....	31
Preglednica IX: Analizirani vzorci za določevanje specifičnosti CE-SDS metode	33
Preglednica X: Parametri testiranja pri določanju natančnosti CE-SDS metode	34
Preglednica XI: Poimenovanje vrhov pri nrCE-SDS	38
Preglednica XII: Poimenovanje vrhov pri rCE-SDS pri vzorcih z mAb.....	40
Preglednica XIII: Poimenovanje vrhov pri rCE-SDS pri vzorcih s fuzijskimi proteini.....	41
Preglednica XIV: Zbrani rezultati % TCA mAb in HMW vrhov protitelesa IgG ₁	42
Preglednica XV: Zbrani rezultati pri spreminjanju inkubacijskih pogojev nereducirajoče CE-SDS metode.....	44
Preglednica XVI: % TCA vseh vrhov pri vzorcih z 15 mM in 50 mM DTT reducentom...	47
Preglednica XVII: % TCA vrhov pri eksperimentu inkubacije vzorcev IgG ₁ protitelesa...	48
Preglednica XVIII: Zbrani rezultati protitelesa IgG ₂ pri optimizaciji mesta injiciranja	52
Preglednica XIX: Primerjava % čistosti vseh treh terapevtskih proteinov pri različnem času injiciranja nereducirajoče CE-SDS metode	55
Preglednica XX: Povprečje TCA glavnega vrha protitelesa IgG ₂ pri nereducirajoči CE-SDS metodi	58

Preglednica XXI: Povprečje TCA težke in lahke verige protitelesa IgG ₂ ter njune vsote pri rCE-SDS metodi.....	59
Preglednica XXII: Zbrani rezultati linearne regresije protitelesa IgG ₂ pri nereducirajoči CE-SDS metodi	60
Preglednica XXIII: Zbrani rezultati linearne regresije protitelesa IgG ₂ pri reducirajoči CE-SDS metodi.....	60
Preglednica XXIV: Rezultati natančnosti LOQ vrednosti	61
Preglednica XXV: Rezultati ponovljivosti IgG ₂ protitelesa kot učinkovine (DS vzorec) pri nereducirajoči CE-SDS metodi	74
Preglednica XXVI: Rezultati ponovljivosti IgG ₂ protitelesa kot formulacijske oblike (DP vzorec) pri nereducirajoči CE-SDS metodi.....	74
Preglednica XXVII: Rezultati ponovljivosti IgG ₂ protitelesa kot stresnega vzorca pri nereducirajoči CE-SDS metodi	74
Preglednica XXVIII: Rezultati ponovljivosti IgG ₂ protitelesa kot učinkovine (DS vzorec) pri reducirajoči CE-SDS metodi.....	75
Preglednica XXIX: Rezultati ponovljivosti IgG ₂ protitelesa kot formulacijske oblike (DP vzorec) pri reducirajoči CE-SDS metodi.....	75
Preglednica XXX: Rezultati ponovljivosti IgG ₂ protitelesa kot stresnega vzorca pri reducirajoči CE-SDS metodi	75
Preglednica XXXI: Rezultati rigidnosti IgG ₂ protitelesa kot učinkovine (DS vzorec) nereducirajoči CE-SDS metodi	77
Preglednica XXXII: Rezultati rigidnosti IgG ₂ protitelesa kot formulacijske oblike (DP vzorec) pri nereducirajoči CE-SDS metodi	77
Preglednica XXXIII: Rezultati rigidnosti IgG ₂ protitelesa kot stresnega vzorca pri nrCE-SDS metodi.....	77
Preglednica XXXIV: Rezultati rigidnosti IgG ₂ protitelesa kot učinkovine (DS vzorec) pri reducirajoči CE-SDS metodi	78
Preglednica XXXV: Rezultati rigidnosti IgG ₂ protitelesa kot formulacijske oblike (DP vzorec) pri reducirajoči CE-SDS metodi.....	78
Preglednica XXXVI: Rezultati rigidnosti IgG ₂ protitelesa kot stresnega vzorca pri reducirajoči CE-SDS metodi	78
Preglednica XXXVII: Rezultati stabilnosti (% TCA) IgG ₂ protitelesa kot učinkovine (DS vzorec) pri nereducirajoči CE-SDS metodi.....	80

Preglednica XXXVIII: Rezultati stabilnosti (% TCA) IgG ₂ protitelesa kot formulacijske oblike (DP vzorec) pri nereducirajoči CE-SDS metodi.....	80
Preglednica XXXIX: Rezultati stabilnosti (% TCA) IgG ₂ protitelesa kot stresnega vzorca pri nereducirajoči CE-SDS metodi.....	80
Preglednica XL: Rezultati stabilnosti (% TCA) IgG ₂ protitelesa kot učinkovine (DS vzorec) pri reducirajoči CE-SDS metodi.....	80
Preglednica XLI: Rezultati stabilnosti (% TCA) IgG ₂ protitelesa kot formulacijske oblike (DP vzorec) pri reducirajoči CE-SDS metodi	81
Preglednica XLII: Rezultati stabilnosti (% TCA) IgG ₂ protitelesa kot stresnega vzorca pri reducirajoči CE-SDS metodi	81

SEZNAM SLIK

Slika 1: Zvijanje proteina. Povzeto po (5).....	2
Slika 2: Struktura protitelesa IgG: težka veriga (HC), lahka veriga (LC), variabilni del (Fv) težke (VH) in lahke (VL) verige, konstantni del (Fc) težke (CH) in lahke (CL) verige, vezišče za antigen (Fab) Povzeto po (9).....	4
Slika 3: Prikaz nastanka fuzijskega gena. Povzeto po (10)	5
Slika 4: Struktura rekombinantnega Fc-fuzijskega proteina. Povzeto po (12).....	6
Slika 5: Tehnična izvedba gelske elektroforeze. Povzeto po (24).....	13
Slika 6: Potovanje nabitih delcev v kapilari. Povzeto po (27).....	14
Slika 7: Instrument za kapilarno elektroforezo. Povzeto po (30).....	15
Slika 8: NAP-5 kolone (<i>levo</i>) in centrifugalni filtri (<i>desno</i>). Povzeto po (32).....	21
Slika 9: Prikaz spiranja NAP-5 kolon in zbiranja eluata v zadnji fazi. Povzeto po (31).....	22
Slika 10: Postopek dela s cetrifugalnimi filtri. Povzeto po (33).....	22
Slika 11: Prikaz reakcije alkilacije z IAM (S _N 2 reakcija). Povzeto po (36).....	25
Slika 12: Prikaz reakcije alkilacije z NEM (konjugacijska adicija). Povzeto po (37).....	25
Slika 13: Redukcija disulfidnih vezi z 2-ME. Povzeto po (38).....	26
Slika 14: Redukcija disulfidnih vezi z DTT. Povzeto po (39).....	26
Slika 15: Redukcija disulfidnih vezi s TCEP. Povzeto po (40).....	26
Slika 16: Površina kapilare pred (A) in po (B) hidrolizi z NaOH. Povzeto po (26).....	27
Slika 17: Deli celotnega seta kapilare (levo) in prikaz nastavka (ang. »aperture«) za detekcijsko okno (desno). Povzeto po (42).	28

Slika 18: Pregled vseh korakov razvoja CE-SDS metode.....	36
Slika 19: Elektroferogram protitelesa IgG ₁ (A), protitelesa IgG ₂ (B) in fuzijskega proteina (C) pri nereducirajočih pogojih CE-SDS metode.....	39
Slika 20: Elektroferogram IgG ₁ (A), IgG ₂ (B) in fuzijskega proteina (C) pri reducirajočih pogojih CE-SDS metode	41
Slika 21: Grafični prikaz % čistosti in % HMW protitelesa IgG ₁	43
Slika 22: Prikaz vrhov pri različnih reducirajočih pogojih CE-SDS metode.....	45
Slika 23: Grafični prikaz % TCA posameznega vrha pri reducirajoči CE-SDS metodi.....	45
Slika 24: Primerjava vrhov pri redukciji z 15 mM in 50 mM DTT reducentom	46
Slika 25: Prikaz vrha v slepem vzorcu (označeno s puščico) v primerjavi z redukcijo s 15 mM DTT reagentom.....	47
Slika 26: Redukcija protitelesa s TCEP.....	48
Slika 27: Grafični prikaz % TCA posameznega vrha pri inkubaciji različnih temperatur vzorca z IgG ₁ protitelesom	49
Slika 28: Prikaz neuspele (zgoraj)in uspele (spodaj) detekcije protitelesa IgG ₁ z lasersko inducirano fluorescenco.....	51
Slika 29: Prikaz vrhov protitelesa IgG ₂ pri injiciranju iz »inlet« strani (A) in injiciranju »outlet« strani kapilare (B) pri nrCE-SDS metodi	52
Slika 30:Prikaz rezultatov vseh terapevtskih proteinov pri primerjavi različne velikosti detekcijskega okna.....	53
Slika 31:Prikaz primerjave različnega časa injiciranja fuzijskega proteina pri nereducirajočih pogojih CE-SDS metode	54
Slika 32: Prikaz primerjave različnega časa injiciranja fuzijskega proteina pri reducirajočih pogojih CE-SDS metode	54
Slika 33: Grafična primerjava % TCA vrhov pri vseh treh terapevtskih proteinih pri različnem času injiciranja reducirajoče CE-SDS metode.....	55
Slika 34: Primerjava vrhov pri različni napetosti separacije protitelesa IgG ₁ pri nereducirajoči CE-SDS metodi	56
Slika 35: Primerjava vrhov pri različni napetosti separacije fuzijskega proteina pri reducirajoči CE-SDS metodi	57
Slika 36: Linearna odvisnost med površino vrhov in koncentracijo vzorca pri nereducirajoči CE-SDS metodi	58

Slika 37: Linearna odvisnost med površino vrhov in koncentracijo vzorca pri rCE-SDS metodi.....	59
Slika 38: Prikaz elektroferograma različnih pufrov in LOQ koncentracije IgG ₂ protitelesa pri nereducirajoči CE-SDS metodi.....	62
Slika 39: Prikaz elektroferograma različnih pufrov in LOQ koncentracije IgG ₂ protitelesa pri reducirajoči CE-SDS metodi.....	62
Slika 40: Prikaz elektroferograma IgG ₂ protitelesa kot DS vzorca (A), DP vzorca (B) in stresnega vzorca (C) pri nereducirajoči CE-SDS metodi	63
Slika 41: Prikaz elektroferograma IgG ₂ protitelesa kot DS vzorca (A), DP vzorca (B) in stresnega vzorca (C) pri reducirajoči CE-SDS metodi.....	64

SEZNAM ENAČB

Enačba 1: Izračun presečišča z ordinato.....	31
Enačba 2: Izračun LOD in LOQ vrednosti.....	32
Enačba 3: Izračun relativne standardne deviacije.....	32
Enačba 4: Izračun razmerja med signalom in šumom (s/n).....	32
Enačba 5: Izračun absolutne razlike (levo) in relativne razlike (desno).....	34
Enačba 6: Enačba za izračun relativnega migracijskega časa pri nrCE-SDS.....	38
Enačba 7: Enačba za izračun deleža posameznega vrha	39
Enačba 8: Enačba za izračun čistosti pri nrCE-SDS	39
Enačba 9: Enačba za izračun relativnega migracijskega časa pri rCE-SDS pri mAb (levo) in enačba za izračun RTM pri rCE-SDS pri fuzijskem proteinu (desno).....	40
Enačba 10: Enačba za izračun deleža neglikozilirane težke verige.....	42

POVZETEK

Zdravljenje s sodobnimi biološkimi zdravili, ki lahko zdravijo kompleksnejše bolezni, kot so npr. rak in avtoimunske bolezni, se je v zadnjih letih povečalo in močno napredovalo. Ključna slabost bioloških zdravil ostaja imunotoksičnost, saj jih telo lahko prepozna kot tujke in razvije močan imunski odgovor.

Namen magistrske naloge je bil razviti metodo kapilarne gelske elektroforeze v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata v reducirajočih in nereducirajočih pogojih, ki bo sposobna zaznati tri različna terapevtska protitelesa hkrati. Pri tem smo spremljali čistost protiteles oz. razgradne produkte protiteles, ki predstavljajo potencialne nečistote in lahko vplivajo na imunotoksičnost.

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili terapevtska rekombinantna monoklonska protitelesa IgG₁, IgG₂ ter terapevtski fuzijski protein vezan na Fc domeno IgG₁ protitelesa. Pri pripravi vzorcev smo nereducirajoče pogoje zagotovili z alkilantom N-etilmaleimidom (NEM) in jodacetamidom (IAM). Izkazalo se je, da je NEM boljši in stabilnejši alkilant. Razvijanju CE-SDS metode v reducirajočih pogojih smo posvetili več časa, saj smo iskali ustrezen reducent, ki bo popolno reduciral protitelo ter podal razmerje med lahko in težko verigo. Za glavni reducent reducirajoče CE-SDS metode smo se odločili za 2-merkaptotanol, kljub njegovim slabim organoleptičnim lastnostim. Pri testiranju inkubacije vzorcev rezultati različnih aparatov, ki jih lahko uporabljamo pri inkubaciji in različne temperature niso pokazale bistvenih razlik. Zadovoljive in ustrezne rezultate smo dobili pri uporabi 50 mM acetat/ 1 % SDS pufra s pH 5,5 pri nereducirajoči in 50 mM TRIS-HCl/ 1 % SDS pufra pH 9,0 pri reducirajoči metodi.

Z namenom pridobiti ustrezno ločljivost in obliko elektroferogramov, predvsem pa optimizacijo metode za vse tri terapevtske proteine, smo spreminjali ter določili instrumentalne nastavitve, ki so potrebne za ustrezno ločbo vrhov. Prvotni cilj magistrske naloge je bil razviti metodo z detekcijo laserske inducirane fluorescence (LIF detekcija), vendar smo zaradi dolgotrajne priprave vzorcev in dobljenih rezultatov, ki so bili povsem primerljivi z detekcijo ultravijolične svetlobe (UV detekcija), analizo in razvoj metode nadaljevali na UV detektorju. Izbrane instrumentalne nastavitve, ki so ustrezale vsem trem proteinom, so bile 30 minutna separacija pri napetosti 12 kV za nereducirajoče pogoje ter 30 minutna separacija pri napetosti 10 kV za reducirajoče pogoje. Stabilno in ravno bazno

linijo smo dosegli z normalno polarnostjo, kjer električni tok poteka od pozitivne anode proti negativni katodi. Injiciranje vzorca pa je potekalo iz strani kapilare, kjer analit prepotuje krajšo pot do detektorja. Z uporabo večje velikosti detekcijskega okna pa nismo uspeli izboljšati meje kvantifikacije.

V razvojni fazi projekta je potrebno preveriti, če se dobljeni rezultati metode ujemajo oz. ali daje razviti analitski postopek ponovljive rezultate. To smo dokazali tako, da smo metodo delno validirali oz. kvalificirali. Izvedli smo določene eksperimente po ICH in FDA smernicah, kjer smo dokazali, da je metoda linearna, točna, specifična in natančna. Določili smo mejo zaznavnosti (0,1 %) in mejo določljivosti (0,3 %) za obe CE-SDS metodi. Robustnost metode smo dokazali z 48 urno stabilnostjo vzorcev pri 10 °C v instrumentu za kapilarno elektroforezo.

Ključne besede: biološka zdravila, monoklonsko protitelo, fuzijski protein, kapilarna gelska elektroforeza, validacija

ABSTRACT

Treatment with biopharmaceuticals, which can treat complex diseases such as cancer and autoimmune diseases, has increased and progressed in last decade. Main disadvantage of biological agents remains immunotoxicity, because the body can recognize them as foreign body and develop a strong immune response.

The purpose of master's thesis was to develop capillary sodium dodecylsulfate gel electrophoresis method for purity and impurity analysis of therapeutic monoclonal antibodies and fusion proteins. This method was optimized under reduced and non-reduced conditions.

We used a therapeutic recombinant monoclonal antibodies (IgG₁, IgG₂) and fusion protein bound to the Fc domain of IgG₁ antibody. Sample preparation parameters included sample alkylation conditions with iodoacetamide (IAM) and N-ethylmaleimid (NEM) and reduction conditions with 2-mercaptoethanol (2-ME), dithiotreitol (DTT) and tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP). It was observed that NEM is better and more stable as alkylation agent and 2-ME as reducing agent. Under slightly acidic conditions (pH 5.5) the thermally induced fragmentation of non-reduced mAb was greatly decreased. 50 mM TRIS-HCl/ 1 % SDS buffer at pH 9.0 was used for reduced sample preparation.

Optimisation of instrumental settings of capillary instrument is necessary for optimal resolution and detection of peaks at electropherograms. The aim of master's thesis was to develop a method with LIF detection, but due to long term preparation of samples and obtained results that were entirely comparable with UV detection, development of the method continued with UV detector. The optimal instrumental settings conditions were found to be as follows: 30 minutes separations at 12 kV for non-reducing condition and 30 minutes separation at 10 kV for reducing condition. Different place of sample injection and using a larger size of window detection in capillary was also tested.

During the development phase of the project we have to check if developed analytical procedure gives reproducible results. The method was qualified by evaluating linearity, specificity, accuracy, precision, limit of detection (0, 1 %), and limit of quantification (0, 3 %). The method exhibited no interference from sample buffer matrix. In addition, some aspects of sample stability were examined during qualification. Samples were found to be stable for 48 hours at 10 °C in capillary electrophoresis instrument. All tested parameters

of qualification were confirmed and demonstrated that the method is appropriate to its purpose.

Key words: biopharmaceuticals, monoclonal antibody, fusion proteins, capillary gel electrophoresis, validation

SEZNAMOKRAJŠAV

2-ME	2-merkptoetanol
5-TAMRA.SE	5-karboksitetrametilrodamin sukcinimidil ester
AP	nastavek za detekcijsko okno, <i>ang. »aperture«</i>
CE	kapilarna elektroforeza
CE-SDS	kapilarna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata
CGE	kapilarna gelska elektroforeza
CHO	ovarijske celice kitajskega hrčka
DMSO	dimetilsulfoksid
DP	formulacija učinkovine, <i>ang. »drug product«</i>
DS	učinkovina, <i>ang. »drug substance«</i>
DTT	ditiotreitol (<i>treo</i> -1,4-dimerkaptobutan-2,3-diol)
HC	glikozilirana težka veriga protitelesa
HC-NG	neglikozilirana težka veriga protitelesa
HH	dve težki verigi protitelesa
HHL	dve težki in ena lahka veriga protitelesa
HL	ena težka in ena lahka veriga protitelesa
HMW	strukture z večjo molekulsko maso (npr. dimeri, agregati)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
i.d.	notranji premer kapilare
IAM	jodacetamid
Ig	imunoglobulin

LC	lahka veriga protitelesa
LIF	lasersko inducirana fluorescenca, <i>ang. »laser induced fluorescence«</i>
LOD	meja zaznavnosti, <i>ang. »limit of detection«</i>
LOQ	meja določljivosti, <i>ang. »limit of quantitation«</i>
mAb	monoklonsko protitelo
MT	migracijski čas
NEM	N-etilmaleimid (1-etil-1 <i>H</i> -pirol-2,5-dion)
nrCE-SDS	kapilarna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata pri nereducirajočih pogojih
QC	kontrola kakovosti
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
rCE-SDS	kapilarna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata pri reducirajočih pogojih
RMT	relativni migracijski čas
SDS	natrijev dodecilsulfat (natrijev lavril sulfat)
s/n	razmerje med signalom in šumom
ST	sobna temperatura
TCA	časovno korigirana površina, <i>ang. »Time Corrected Area«</i>
TCEP	tris (2-karboksietil) fosfin
UNK	neznani vrhovi, <i>ang. »unknown peaks«</i>
UV	ultravijolična svetloba

1 UVOD

1.1 BIOLOŠKA ZDRAVILA

V zadnjem desetletju je biotehnologija ena najhitreje razvijajočih se področij novih tehnologij. Dosežki sodobne biotehnologije ne segajo samo na področje rastlinske biotehnologije, živalske pridelave, okoljevarstvene in mikrobne biotehnologije, ampak se je uveljavila tudi kot sodobna farmacevtska biotehnologija. V zadnjih tridesetih letih se je močno razvilo zdravljenje z biološkimi zdravili. Biološka zdravila predstavljajo kompleksne proteinske ali DNA molekule, ki so usmerjene proti različnim terapevtskim podočjem. Rekombinantne učinkovine in gensko zdravljenje so kvalitativno in kvantitativno odprli nove možnosti zdravljenja in preprečevanja bolezni (1).

Biološka zdravila se lahko pridobivajo z izolacijo (1). V to skupino bioloških zdravil spadajo človeški in živalski hormoni, kri in krvni proizvodi (npr. izolirani imunoglobulini, albumin, dejavniki strjevanja krvi). Prav tako v skupino bioloških zdravil uvrščamo sintezno pridobljene peptide. Predstavniki te skupine so: kalcitonin, vazopresin, oksitocin in drugi. Podskupina bioloških zdravil so tudi genska zdravila, npr. terapevtski geni, učinkovine RNAi, protismiselne molekule DNA. Monoklonska mišja protitelesa pridobljena s hibridomsko biotehnologijo so tudi ena izmed petih vej bioloških zdravil. Največjo skupino bioloških zdravil pa predstavljajo rekombinantna biološka zdravila. Primer takih bioloških zdravil so rekombinantni eritropoetin, inzulin, rastni hormon, filgrastim, monoklonska protitelesa in cepiva (2).

Prednost bioloških zdravil je njihova specifičnost delovanja, saj so bolj usmerjena proti terapevtski tarči. Ključna slabost bioloških zdravil je imunotoksičnost, zato se razvijajo novi pristopi k načrtovanju in proizvodnji človeku prijaznejših oblik bioloških zdravil. Poleg hormonov in citokinov se najhitreje razvija skupina rekombinantnih monoklonskih protiteles, popolnoma humanih monoklonskih protiteles, ki izkazujejo najnižjo stopnjo imunogenosti (1).

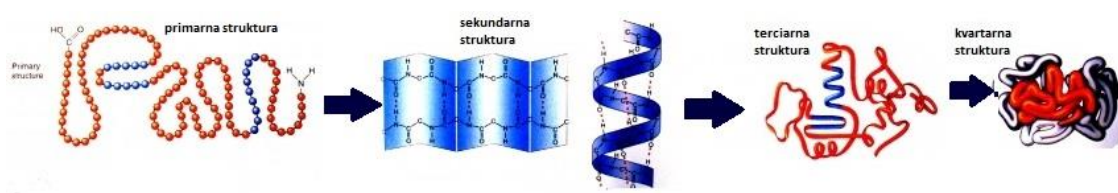
Od leta 2007 se na tržišču pojavljajo biološko podobna zdravila, ki predstavljajo alternativo inovativnim (originalnim) biološkim zdravilom. Biološko podobna zdravila že vsebujejo podobno učinkovino za zdravljenje določenih bolezni v enaki farmacevtski obliki in jakosti, kot jo ima inovativno biološko zdravilo. Morajo biti primerljive

kakovosti, varnosti in učinkovitosti kot inovativno zdravilo. Predloženi morajo biti dokazi, da je to zdravilo bistveno podobno zdravilu, ki že ima dovoljenje za promet. Tako za inovativna biološka zdravila kot tudi za biološko podobna zdravila je potrebno izpeljati raziskave, s katerimi dokažemo varnost, učinkovitost in kakovost (3).

1.2 TERAPEVTSKI PROTEINI

Molekule, ki sestavljajo živa bitja, so zelo velike v primerjavi z molekulami, s katerim se ukvarjata anorganska in organska kemija. Tako imenovane biološke makromolekule lahko razdelimo v tri večje skupine: nukleinske kisline, proteini in polisaharidi. Čeprav se makromolekule strukturno in funkcionalno precej razlikujejo, jih družijo skupna značilnost, da so polimeri sestavljeni iz več sto, tisoč ali včasih tudi iz milijonov manjših monomernih molekul (4).

Proteini se v svojem naravnem okolju zvijejo v določeno tridimenzionalno strukturo, ki jo imenujemo nativna konformacija (slika 1).



Slika 1: Zvijanje proteina. Povzeto po (5).

Na zvijanje proteinov ima najpomembnejši vpliv aminokislinska sestava in aminokislinsko zaporedje (**primarna struktura**), ki določa obliko in delovanje proteina. Informacija o zaporedju aminokislin je zapisana v nukleotidnem zaporedju gena proteina. Kadar se globularni proteini zvijejo tako, da v svojo notranjost skrijejo hidrofobne aminokislinske ostanke, se med posameznimi deli vzpostavijo vodikove vezi (stabilizirajoče interakcije), ki so ključne za stabilnost **sekundarnih struktur** proteina (4). Sekundarna struktura proteina se lahko nahaja v obliki α -vijačnice, ki jo tvori tesno ovito polipeptidno ogrodje, kjer se vodikove vezi vzpostavijo med amino skupino ene peptidne vezi in karboksilno skupino druge peptidne vezi. Prav tako se proteini lahko zvijejo v β -strukturo, kjer imajo polipeptidno verigo iztegnjeno, vodikove vezi pa se tvorijo med predeli iste ali med različnimi verigami (6). **Terciarno strukturo** proteina predstavlja kombinacija različnih sekundarnih struktur, ki se združijo v kompaktno strukturo in opiše trodimenzionalni

položaj vseh atomov v proteinu (4). Terciarna struktura se lahko stabilizira tako, da se protein zvije tako, da skrije nepolarne ostanke v svojo notranjost, pri tem pa polarni del na zunanji strani tvori vodikove vezi s polarnimi aminokislinskimi stranskimi verigami. Terciarna struktura je najbolj stabilna v nativni obliki (6). Združitev več podenot v funkcionalen protein pa predstavlja **kvartarna struktura** (4). Povezavo identičnih podenot imenujemo homotipična struktura, povezavo različnih podenot pa heterotipična struktura, kjer imajo proteini bolj kompleksnejšo biološko vlogo (6).

1.2.1 Protitelesa

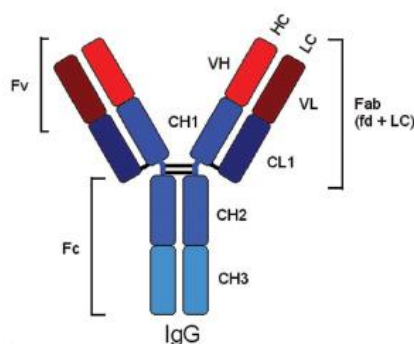
Protitelesa ali imunoglobulini so del humoralnega imunskega sistema sesalcev. So glikozilirani globularni proteini iz naddružine imunoglobulinov z molekulsko maso večjo od 150 kDa. Temeljno zgradbo protiteles je mogoče določiti s cepljenjem molekule imunoglobulina. Cepitev je možna s tremi pristopi: z reduktivnim cepljenjem, cepljenje s papainom in pepsinom. Pri tem dobimo posamezne fragmente, ki so pomembni za funkcijo protiteles. Po vdoru antigena v telo se sproži nastanek številnih protiteles, ki imajo različno afiniteto do antigena in različne biološke lastnosti (efektorske funkcije). Razlikujejo se po zgradbi, lastnostih in zaščitni vlogi pri obrambi organizma. Vsem protitelesom so skupne izotipske determinante, ki so na težkih in lahkih verigah. Na podlagi izotipskih determinant lahko protitelesa delimo v pet razredov: protitelesa IgG, IgM, IgA, IgD in IgE ter v podrazrede IgG₁-IgG₄ in IgA₁-IgA₂. Kateri razred protitelesa bo torej nastal ob vdoru antigena, je odvisno od načina imunizacije, od vrste antigena, od kraja vstopa antigena v telo in od odzivnosti gostitelja (7).

1.2.1.1 Protitelesa razreda IgG

Protitelesa razreda IgG so monomerne molekule. Nastajajo pri naravni infekciji ali pri imunizaciji z virusi, bakterijami ali njihovimi produkti. Ta protitelesa so približno enakomerno porazdeljena v krvi in tkivnih tekočinah. Njihova življenjska doba je od vseh imunoglobulinov najdaljša. Pri vezavi z antigenom se molekula IgG konformacijsko spremeni in odkrije se determinanta (na Fc domeni), ki aktivira prvo komponento sistema komplementa. Komplement ali komplementni sistem sestavlja približno 30 kemično in imunološko različnih serumskih beljakovin, kjer se sproži serija biokemijskih reakcij. Aktivacija komplementa se začne šele, ko se pritrdita na površino celice dve molekuli IgG tesno druga ob drugi. Analize aminokislinskega zaporedja so pokazale, da lahko protitelesa IgG razdelimo v štiri podrazrede: IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, ki se med seboj razlikujejo po

število disulfidnih vezi v gibljivem delu molekule. Ena molekula protitelesa IgG vsebuje približno od 20 do 25 disulfidnih vezi (7).

Celotno IgG protitelo je v obliki črke Y oblikovan kompleks z dvema identičnima lahkim in težkim verigama (slika 2). Lahka veriga vsebuje eno variabilno (VL) in eno konstantno regijo (CL-1), težka veriga pa eno variabilno regijo (VH) in tri konstantne regije (CH-1, CH-2, CH-3). Konstantna področja težkih verig, predvsem CH-2 in CH-3, predstavljajo Fc fragment, s katerim se protitelo veže na celice. Pomembna so za interakcije protiteles z ostalimi elementi imunskega sistema, kjer aktivirajo imunske celice in povzročijo klasično pot aktivacije komplementa. Večja raznolikost aminokislinskega zaporedja je v variabilnem področju protiteles na N-koncu lahke (VL) in težke (VH) polipeptidne verige. Ta določa specifičnost protitelesa in vezavno mesto za antigen. Vsaka težka veriga je na lahko verigo pripeta z disulfidnimi vezmi, obe težki verigi pa sta skupaj povezani še s tretjo disulfidno vezjo (1, 8).



Slika 2: Struktura protitelesa IgG: težka veriga (HC), lahka veriga (LC), variabilni del (Fv) težke (VH) in lahke (VL) verige, konstantni del (Fc) težke (CH) in lahke (CL) verige, vezišče za antigen (Fab) Povzeto po (9).

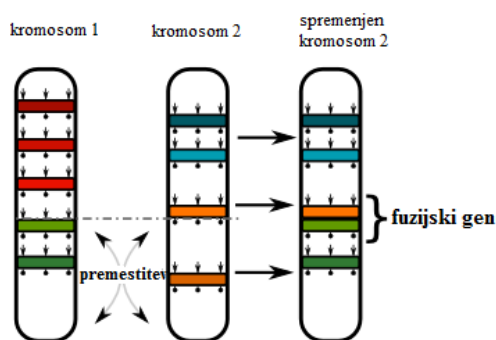
Receptorje za IgG molekule, na katere se vežejo s Fc fragmentom, najdemo na granulocitih, mononuklearnih fagocitih, naravnih celicah ubijalkah, limfocitih B in limfocitih T. Poznamo tri družine humanih receptorjev Fc γ : Fc γ RI, Fc γ RII in Fc γ RIII. Vezava na receptorje sproži različne odgovore: fagocitozo, povečano porabo kisika in nastajanje aktivnih kisikovih presnovkov, sintezo in sproščanje levkotrienov in prostaglandinov ter nevtralnih proteaz ter modulacijo izdelovanja protiteles (7).

IgG protitelesa so prilagojena za nevtralizacijo toksinov in pospešitev fagocitoze. Fagocitoza je pojav, kjer fagocitne celice (makrofagi in granulociti) uničijo različne celice.

Fagocitne celice to storijo veliko hitreje in učinkovitejše ob prisotnosti IgG protiteles. Glavna terapevtska področja uporabe monoklonskih IgG protiteles so okužbe, rakava, srčno-žilna in avtoimunska obolenja (1).

1.2.2 Fuzijski proteini

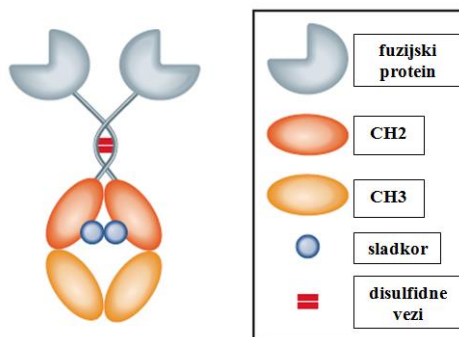
Fuzijski proteini so proteini, ki jih kodirajo fuzijski geni. Fuzijski geni nastajajo s premestitvijo dveh genov med kromosomi (slika 3). Fuzijski geni so naravno prisotni v organizmu, lahko pa nastanejo tudi v laboratoriju z združevanjem genov ali posameznih delov gena istega ali različnega organizma (10).



Slika 3: Prikaz nastanka fuzijskega gena. Povzeto po (10)

Sestava rekombinantnega fuzijskega proteina zahteva dva elementa: proteinsko komponento in povezovalac, imenovan tudi linker. Izbira proteinske komponente temelji na želeni funkciji produkta fuzijskega proteina, na drugi strani pa izbira povezovalca ni tako enostavna. Neposredna povezava funkcionalnih domen brez povezovalca lahko vodi do neželenih rezultatov, kot so motena biološka aktivnost ali manjši izkoristek pri proizvodnji proteinov. Zato je izbor ali racionalno načrtovanje povezovalca, ki se veže s proteinsko domeno, pomembno, vendar še neraziskano področje rekombinantne tehnologije fuzijskih proteinov (11).

Fuzijski proteini so običajno sestavljeni iz protitelesne Fc regije, ki je neposredno združena z drugim peptidom, delom receptorja za ciljni protein, proti kateremu so usmerjeni (slika 4).



Slika 4: Struktura rekombinantnega Fc-fuzijskega proteina. Povzeto po (12).

Fuzijski partner je lahko katerakoli druga proteinska molekula, kot je npr. ligand, ki se aktivira pri interakciji s površinskimi receptorji celice. Veliko proteinskih učinkovin se združi s Fc domeno protitelesa, npr. Fc domena protitelesa IgG (Fc-IgG₁) ali pa so proteini kot nosilci, npr. pri humanem serumskem albuminu (HSA) in s tem izboljšujejo terapevtske učinke ter podaljšujejo njihovo razpolovno dobo. Z genskim združevanjem dveh ali več proteinskih domen dobi fuzijski protein več različnih funkcij. Večina Fc-fuzijskih proteinov cilja na interakcije receptor-ligand, ki delujejo ali kot antagonisti, tako da blokirajo vezavo na receptor, ali pa kot agonisti, ki neposredno stimulirajo delovanje receptorjev in s tem zmanjšajo ali povečajo imunsko aktivnost (11, 12).

Poleg njihove široke uporabe v bioloških raziskavah, kot so čiščenje in slikanje proteinov, so rekombinantni fuzijski proteini postali pomembna kategorija v biofarmacevtiki (11).

1.2.3 Uporaba terapevtskih proteinov

Na področju raziskav proteinov je pomembna povezava med strukturo proteina in njegovo biološko vlogo. Proteini sodelujejo pri različnih procesih v organizmu, zato se terapevtski proteini namenjeni za različne indikacije. Lahko nadomestijo pomanjkanje naravnega proteina v organizmu pri endokrinih in metaboličnih boleznih (npr. rekombinantni inzulin ali rastni hormon), povečajo biološke procese, kot je hematopoeza (npr. rekombinantni eritropoetin ali hematopoetski rastni hormon), posegajo v imunsko urejenost v organizmu

(npr. rekombinantni citokini) ali določeno celično funkcijo, lahko pa se vežejo na točno določeno tarčo (npr. monoklonska protitelesa) (13).

1.2.3.1 Uporaba monoklonskih protiteles

Terapevtska monoklonska protitelesa predstavljajo najhitreje rastočo skupino novih bioloških zdravil. Pomembni so pri zdravljenju kompleksnih bolezni, kot so rak, kardiovaskularne bolezni, infekcijske in vnetne bolezni ter avtoimunske bolezni. Pomembno vlogo pa imajo tudi pri preprečevanju zavrnitve presadkov (1). Tako monoklonska protitelesa lahko razdelimo v skupine glede na njihovo uporabo (1):

- **Protitelesa za preprečevanje zavrnitve presadkov:** selektivno zavirajo imunski odziv gostitelja. Uporaba pri akutni zavrnitvi presajenih ledvic, srca ali jeter.
Predstavniki: *daclizumab, bazilksimab, efalizumab* (14)
- **Protitelesa proti infekcijskim dejavnikom:** ščitijo pred okužbo, tako da inhibirajo delovanje virusov in toksinov (npr. pred okužbo respiratornega sincicijskega virusa (RSV).
Predstavniki: *palivizumab* (1)
- **Protivnetna protitelesa:** inhibirajo škodljivo delovanje citokinov. Pogosta je njihova uporaba pri revmatoidnem artritisu, Chronovi bolezni, ulceroznem kolitisu, psoriaznem kolitisu ter kronični psoriazi s plaki.
Predstavniki: *infliksimab, adalimumab, efalizumab, omalizumab, natalizumab* (15)
- **Protitelesa za zdravljenje raka:** vežejo se na receptorje za rastne dejavnike ter tako zavirajo celično rast in diferenciacijo tumorskih celic, kar posledično zmanjša oz. zaustavi rast tumorja. Uporabljajo se pri najrazličnejših vrstah rakavih obolenj: metastatska oblika raka dojke, rak debelega črevesja in kosti, rak skvamoznih celic glave in vratu, folikularni limfom, limfocitna levkemija, itd.
Predstavniki: *trastuzumab, cetuksimab, rituksimab, pertuzumab, bevacizumab, denozumab* (16)

1.2.3.2 Uporaba fuzijskih proteinov

Rekombinanti fuzijski proteini se pogosto uporabljajo za ciljno usmerjenost učinkovin do določene tarče v organizmu. S kombinacijo proteinskih učinkovin s transportnimi deli, kot so penetracijski proteini, protitelesa ali transferin, lahko dosežemo učinkovit prehod učinkovine preko bioloških ovir: celične membrane, krvno možganske pregrade ali črevesnega epitelija. Fuzijski proteini, vezani na dele protiteles, so idealni pri diagnostiki

in terapiji raka, saj napadajo izključno rakave celice in jih nato izločijo, ne da bi poškodovali zdrave celice v organizmu (17).

Večina Fc-fuzijskih proteinov deluje kot antagonisti, ki blokirajo vezavo na receptor (npr. etanercept, aflibercept, rilonacept, balatacept, abatacept) ali kot agonisti, ki neposredno spodbujajo delovanje receptorjev za zmanjšanje (npr. alefacept) ali povečanje (npr. romiplostim) imunske aktivnosti. V preglednici I so prikazani terapevtski fuzijski proteini, ki sta jih odobrili Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA) ter Evropska agencija za zdravila (EMA) in imajo dovoljenje za promet (12, 18).

Preglednica I: Terapevtski Fc-fuzijski proteini, ki imajo dovoljenje za promet. Povzeto po (12, 18).

Učinkovina Lastniško ime	Opis	Indikacije	Leto odobritve
etanercept Enbrel	TNRF združen s Fc domeno humanega IgG ₁	revmatoidni artritis	1998
alefacept Amevive	LFA-3 združen s Fc domeno humanega IgG ₁	psoriza, zavrnitev presadkov	2003
abatacept Orencia	mutirani CTLA-4 združen s Fc domeno humanega IgG ₁	revmatoidni artritis	2005
rilonacept Arcalyst	IL-1R združen s Fc domeno humanega IgG ₁	kriopirinom	2008
romiplostim Nplate	trombopoetin vezani peptid združen s Fc domeno humanega IgG ₁	kronična imunska trombocitopenična purpura	2008
balatacept Nulojix	CTLA-4 združen s Fc domeno humanega IgG ₁	zavrnitve organa	2011
aflibercept Eylea	VEGFR1/VEGFR2 združen s Fc domeno humanega IgG ₁	starostna degeneracija rumene pege	2011
aflibercept Zaltrap	VEGFR1/VEGFR2 združen s Fc domeno humanega IgG ₁	metastatski kolorektalni rak	2012
Elocate*	faktor VIII združen s Fc domeno humanega IgG ₁	hemofilija A	2014
Alprolix*	faktor IX združen s Fc domeno humanega IgG ₁	hemofilija B	2014

* rekombinantni koagulacijski faktor, Fc fuzijski protein

Terapevtski učinki fuzijskih proteinov so še dokaj neraziskani, vendar pa ima zaradi hitrega napredka biotehnologije razvoj fuzijskih proteinov, kot nova in učinkovitejša proteinska terapija, vedno večji pomen.

1.3 IMUNOTOKSIČNOST TERAPEVTSKIH PROTEINOV

Biološka zdravila so ciljno usmerjena proti različnim tarčam (proteinom, receptorjem, ligandom, encimom), kar lahko poveča učinkovitost zdravljenja v primerjavi z majhnimi sinteznimi molekulami. Vendar pa je ena najpomembnejših varnostnih določil pri bioloških zdravilih odsotnost imunogenosti terapevtskega proteina. Popolno humana in humanizirana protitelesa prinašajo manjše tveganje za imunski odgovor kot mišja oz. himerna protitelesa. Imunski odgovor terapevtskega protitelesa lahko vpliva na varnost in farmakokinetične lastnosti, ki vplivajo na uporabnost in učinkovitost zdravila (19).

Imunogenost terapevtskih proteinov je lahko zelo kompleksna in obstajajo številni neraziskani dejavniki, zaradi česar je težko napovedati in z gotovostjo trditi, da bo neko protitelo povzročilo klinično pomemben imunski odziv (20). Že v samem začetku od nastanka celične linije in izolacije proizvoda, do oblikovanja in skladiščenja proteina, je potrebno optimizirati in validirati procese, saj se nativna oblika proteina lahko spremeni in po vnosu v organizem biološka zdravila lahko izzovejo imunski odziv (1). Kot zunanji dejavniki, ki lahko prispevajo k imunogenosti protiteles, so različni produkti oz. nečistote, ki izhajajo iz proizvodnega procesa. Zato je za pravilno zgradbo in delovanje terapevtskega proteina pomemben proces proizvodnje, pri katerem je potrebna najzahtevnejša bioprocesna tehnika (20). Prav tako se mora upoštevati dejavnike, kot so sočasno zdravljenje bolnika in bolnikovo imunološko stanje pri poročanju imunogenosti terapevtskih proteinov in protiteles (19). Več zunanjih dejavnikov, ki jih je težko izključiti, lahko po terapevtski uporabi protitelesa povzročijo sindrom sproščanja citokinov, kot je npr. anti-CD3. Sproščanje citokinov podpira humoralni imunski odziv s kratko potjo aktivacije celic T pomagalk. Ugotovljeno je bilo, da sočasno zdravljenje z metotreksatom oz. ustreznimi imunosupresivi zavira sproščanje citokinov ter zmanjša imunski odgovor na terapevtske proteine in protitelesa (19).

Na imunogenost prav tako vplivajo tudi intrizični faktorji, kot so ogljikovi hidrati, ki so vezani na lahko verigo konstantne regije protitelesa preko glikozilacijskih mest stranskih verig. Primer predstavlja prisotnost galaktoze alfa-1,3 sladkorja znotraj ogljikohidratne

strukture na Fab fragmentu cetuksimaba, kjer je bila kot posledica prisotnosti sladkorja ugotovljena povezanost z anafilaktično reakcijo protitelesa (19). Pri terapiji s podrazredi IgG protitelesa je imunski odziv običajno povezan z aktivacijo celic T pomagalk. CD4+ celice T pomagalk izločajo citokine, ki so pomembni za aktivacijo celic B, makrofagov in drugih celic, ki sodelujejo pri imunskem odgovoru. Prav tako ostale post-translacijske modifikacije protitelesa, kot so glikacija, deamidacija in oksidacija, pomembno vplivajo na imunogenost protitelesa (19).

Pomembna oblika kemične modifikacije je glikozilacija protitelesa (18). Monoklonska protitelesa so naravno prisotna v glikozilirani obliki. Spremenjena glikozilacija lahko zmanjša ali poveča imunogene lastnosti molekule. Prisotnost glikozilacije zagotavlja strukturno stabilnost proteina proti stresnim dejavnikom, kot so toplotni stres ter izboljša topnost proteina. Izguba glikozilacije pa ima lahko za posledico večjo nagnjenost k združevanju protiteles v nastanek netopnih agregatov, kar povzroči izgubo biološke aktivnosti in spremembe v konformaciji protitelesa. Pri terapevtskih protitelesih združevanje v agregate lahko vodi v potencialno toksičnost (18). Interakcijsko mesto na Fc regiji za FC γ R receptor in glikozilacijsko mesto v gibljivi regiji protitelesa sta pomembna za efektno funkcijo. Aktivacija FC γ R posledično aktivira različne vrste imunskih odgovorov: s protitelesi povzročeno fagocitozo (ADCC, ang. »antibody-mediated phagocytosis«) in izločanje vnetnih mediatorjev. Popolna deglikozilacija IgG₁ protiteles tako povzroči izgubo vezavne kapacitete FC γ R in efektno funkcijo (18).

Imunogenosti ne moremo povsem predvideti z analiznimi metodami v času razvoja, zato so nujne predklinične in klinične raziskave biološkega zdravila pred prihodom na trg (20). Predklinični del vsebuje predvsem podatke o farmakodinamiki, farmakokinetiki in toksičnosti (vpliv na reprodukcijske funkcije, teratogenost, mutagenost, rakotvornost, imunogenost) zdravila (1). Preliminarni podatki o imunogenosti iz zgodnjih kliničnih študij nam podajo informacije, ki so lahko koristne za nadaljnje študije in odkrivanje delovanja protitelesa. Po zaključenih prekliničnih raziskavah, so potrebne še klinične raziskave, ki jih mora odobriti Ameriška agencija za zdravila in hrano (FDA) ali Evropska agencija za zdravila (EMA). Klinični del vsebuje podatke o učinkovitosti zdravila (podatki o izvajanju in preizkušanju na ljudeh (1). Varnost zdravila med kliničnim preizkušanjem ter zdravila, ki je že na trgu, spremljamo s farmakovigilanco. Farmakovigilanca je neprekinjen proces, kjer se zbirajo podatki o varnosti zdravila z namenom identificiranja, ovrednotenja in

razumevanja neželenih učinkov zdravil in drugih, z zdravili povezanih, zapletov (21). Pred prihodom na trg se mora vedno natančno predstaviti identifikacija tveganj, ki v celoti upošteva naravo produkta skupaj z njegovo uporabo (20).

1.4 IDENTIFIKACIJA IN KARAKTERIZACIJA ČISTOSTI PROTEINOV

V biofarmacevtski industriji razvoj novih rekombinantnih terapevtskih proteinov, kot so monoklonska protitelesa, ki se uporabljajo v medicinske namene, pomembno narašča. Med pridobivanjem in uporabo terapevtskega proteina se lahko pojavijo različne post-translacijske modifikacije, kot so deamidacija, oksidacija, izoaspartatna izomerizacija in proteolitična razgradnja. S tem se poruši nativna oblika proteina, zato je pomembno nadzorovati in okarakterizirati s produktom povezane snovi (nečistote), ki nastanejo tekom modifikacij (22).

Kromatografske in elektroforezne metode so najpomembnejše in najpogostejše metode za karakterizacijo in identifikacijo bioloških zdravil. Ločijo posamezne komponente v vzorcu glede na različne fizikalno-kemijske lastnosti. Kromatografske tehnike izkoriščajo molekulsko maso, obliko, hidrofilitnost oz. lipofilitnost molekul ter specifično afiniteto do drugih substanc. Elektroforeza je separacijska tehnika, ki temelji na potovanju molekul v električnem polju. Ta metoda lahko temelji na ločevanju analitov preko bolj specifičnih lastnosti, kot je npr. izoelektrična točka proteina (1).

Za čim boljše razumevanje dobljenih sprememb v bioaktivnosti in varnosti biofarmacevtskega produkta in za določitev fizikalno-kemijske lastnosti terapevtskih proteinov je potreben razvoj analitskih tehnik, ki bodo to omogočale (22).

1.4.1 Kromatografija

Kromatografske tehnike se danes najpogosteje uporabljajo kot separacijske metode za analizo, izolacijo in čiščenje vzorcev. Njihova značilnost je porazdeljevanje komponent vzorca med stacionarno in mobilno fazo. Glede na vrsto mobilne faze razdelimo kolonsko kromatografske metode v tri osnovne skupine: tekočinsko, plinsko in superkritično kromatografijo.

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je ključna tehnika za karakterizacijo proteinov v biofarmaceutiki. V skupino tekočinskih kromatografskih metod spadajo porazdelitvena, adsorpcijska, ionsko izmenjevalna, izključitvena, afinitetna in kiralna

kromatografija. Stacionarno fazo običajno sestavlja organosiloksanjska porozna površina (agaroz, porozna steklena površina, dekstran, poliakrilamid, polistiren), na katero vežemo protitelesa, encime (*afinitetna kromatografija*), kovalentno vezane ionske izmenjevalce (*ionsko izključitvena kromatografija*), kot mobilna faza pa se uporabljajo vodne raztopine metanola, acetonitrila ali tetrahidrofurana. Ločevanje proteinov lahko poteka na osnovi njihove velikosti oz. oblike (*izključitvena kromatografija*), preko elektrostatskih interakcij med molekulami z nasprotnim nabojem (*ionsko izmenjevalna kromatografija*), večje afinitete analita do liganda na podlagi elektrostatskih, hidrofobnih ali vodikovih interakcij (*afinitetna kromatografija*) (1).

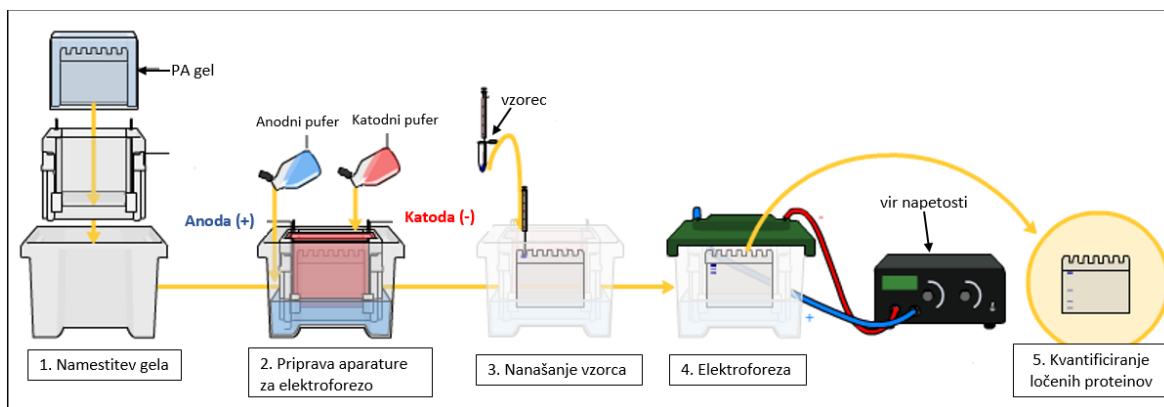
Zaradi podrobnejše obravnave kapilarne gelske elektroforeze v eksperimentalnem delu magistrske naloge je elektroforeza opisana v svojem poglavju.

1.5 ELEKTROFOREZA

Elektroforeza temelji na različni hitrosti potovanja komponent v polprevodnem mediju pod vplivom električnega polja, ki se ustvari zaradi razlike med elektrodama. V osnovi ločimo dve vrsti elektroforeze: elektroforezo na nosilcu in brez nosilca (23). Pri elektroforezi na nosilcu uporabimo gel, ki ga namestimo v aparaturo (npr. SDS-PAGE). Pri elektroforezi brez nosilca pa vzorec potuje po stekleni kapilari (kapilarna elektroforeza) (23).

1.5.1 Gelska elektroforeza

Pri gelski elektroforezi poteka vertikalna ločitev v gelu, ki deluje kot molekularno sito in se nahaja med dvema ploščama, ki je v stiku z elektroforeznim pufrom. Najpogostejša gelska elektroforezna tehnika je SDS-PAGE, kjer za ločevanje proteinov uporabljajo poliakrilamidni gel (1). SDS-PAGE metoda vključuje korake, ki jih prikazuje slika 5. Na začetku pripravimo gel in ga namestimo v aparaturo. Sledi priprava proteinskega vzorca v pufri, ki vsebuje SDS ter inkubacija na ustrezni temperaturi. Pripravljen vzorec nanese na gel ter z virom napetosti izvedemo elektroforezo. Na koncu sledi še pritrjevanje gela, barvanje in kvantificiranje ločenih proteinov (23).



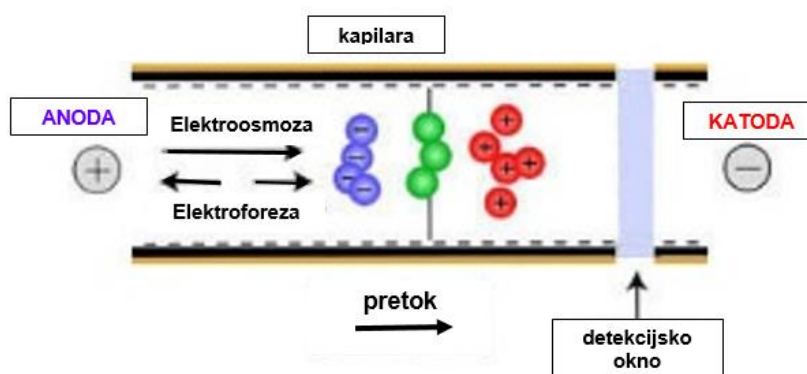
Slika 5: Tehnična izvedba gelske elektroforeze. Povzeto po (24).

1.5.2 Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza je separacijska tehnika, ki se pogosto uporablja pri raziskavah in razvoju, nadzoru kakovosti in študijah stabilnosti farmacevtskih izdelkov. Predstavlja pomembno tehniko za karakterizacijo biomolekul. Uporabljamo jo za separacijo peptidov, proteinov, karbohidratov, anorganskih ionov, kiralnih komponent ter druge možnosti farmacevtske aplikacije (25).

Ločitev proteinov pri kapilarni elektroforezi temelji na klasični elektroforezi, ki poteka v stekleni kapilari napolnjeni z elektroforeznim pufrom ob priključitvi visoke napetosti. Molekule že po svoji naravi na svoji površini lahko nosijo negativni ali pozitivni naboj. V prisotnosti električnega polja nabite molekule potujejo v smeri elektrode nasprotnega naboja. Kationi (pozitivno nabiti ioni) potujejo proti katodi (negativno nabita elektroda), anioni (negativno nabiti ioni) pa potujejo proti anodi (pozitivno nabita elektroda) (slika 6). Hitrost gibanja nabitih delcev pri elektroforezi je odvisna od naboja iona, velikosti iona in moči električnega polja. Na potovanje delcev vpliva tekočinski tok imenovan elektroosmozni tok (EOF). EOF je premik tekočine v kapilari, ki nastane kot posledica premikanja nabitih delcev topila v električnem polju. Nastane zaradi pojava električne dvoplasti ionov puфра ob steni kapilare in učinka električnega polja na to dvoplast. Zaradi EOF se molekule gibljejo neodvisno od naboja v isto smer (običajno proti katodi), saj je elektroosmozni tok močnejši od elektroforezne mobilnosti molekul. Najhitreje se zato gibljejo majhni delci s pozitivnim nabojem, nato nevtralni delci, ki potujejo s hitrostjo elektroosmoznega toka in nazadnje še delci z negativnim nabojem. Potovanju delcev proti elektrodi nasprotuje zavorna sila, ki jo določa zavorni koeficient in je odvisna od velikosti

in oblike delca, poroznosti medija, skozi katerega se giblje delec ter viskoznosti elektrolita (26).



Slika 6: Potovanje nabitih delcev v kapilari. Povzeto po (27).

CE tehnike, ki jih uporabljamo za elektroforetsko ločevanje, se med seboj razlikujejo po načinu ločitve in selektivnosti. Izbira ustrezne tehnike je odvisna od analitičnega problema oz. karakteristike proteina, ki ga želimo raziskati (26).

Najpogostejši CE tehniki sta kapilarna conska elektroforeza (CZE), kjer mehanizem ločevanja temelji na razlikah v razmerju naboja in mase proteina ter kapilarna gelska elektroforeza (CGE) (17). Ostale kapilarne tehnike, ki se prav tako uporabljajo v analitskih laboratorijih, so: kapilarno izoelektrično fokusiranje (cIEF), kapilarna izotahoforeza (cITP), micelarna elektroforeza (MEKC), kiralna elektroforeza, nevodna elektroforeza, kapilarna elektrokromatografija (CEC) (28).

1.5.2.1 Kapilarna gelska elektroforeza

Pri kapilarni gelski elektroforezi ločevanje proteinov temelji na viskoznem uporu, ki ga prispeva gel v kapilari. Proteini se v kapilari ločujejo glede na velikost molekule, tako da večje molekule potujejo počasneje kot manjše (26). Veliko let je bila poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS-PAGE) osnovna tehnika za spremljanje čistosti produkta, določitev hidrodinamske velikosti, za detekcijo manjših produktov ali s procesom povezane nečistote ter za potrditev konsistence med serijami proteinov in protiteles. Še danes se v večini bioloških raziskovalnih laboratorijev uporablja kot gonilna sila za ločevanje proteinov (23). Vendar pa ima metoda veliko omejitev, kot so pomanjkanje avtomatizacije, slabša ponovljivost, omejeno območje linearnosti ter ne

zagotavlja kvantitativnih rezultatov za določitev čistosti in nečistot (28). Sodobna metoda, ekvivalentna klasični SDS-PAGE, je kapilarna elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (CE-SDS). CE-SDS tehnika omogoča boljšo resolucijo, večje območje linearnosti in nizko porabo kemikalij ter najpomembneje, omogoča kvantitativno analizo. Z večjo ponovljivostjo in sposobnostjo sprotne detekcije v nekaterih primerih presega tudi druge tehnike, npr. HPLC (29).

Instrument, ki ga uporabljamo za CE-SDS tehniko, vsebuje samodejni vzorčevalnik, napajanje in UV/PDA detekcijski sistem, ki omogoča avtomatizacijo v kontroliranem okolju (slika 7).



Slika 7: Instrument za kapilarno elektroforezo. Povzeto po (30).

Celoten proces CE-SDS, ki vključuje kondicioniranje kapilare, injiciranje vzorca, separacijo, integriranje elektroferogramov in izdelavo poročil, je lahko popolnoma avtomatiziran (28).

2 NAMEN DELA

Pri uporabi terapevtskih proteinov želimo preprečiti neželene učinke, kot so imunogenost in alergijske reakcije, zato je potrebno zagotoviti čim bolj obstojen in čist proizvod. Pomembno je razviti analitske metode, s katerimi smo sposobni zaznati spremembe in nečistote takšnega proizvoda.

Primarni cilj magistrskega dela je razvoj metode kapilarne gelske elektroforeze v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata, kot analitskega postopka, s katerim bomo lahko detektirali in določevali čistost ter potencialne nečistote terapevtskih proteinov. Razvoj metode bo temeljil na merjenju treh različnih terapevtskih proteinov hkrati. Uporabili bomo protitelesa razreda IgG₁, IgG₂ in terapevtski fuzijski protein. Cilj je razviti takšno metodo, ki bo sposobna zaznati in ovrednotiti spremembe v produktu.

Razvijali bomo naslednje metode:

- a) CE-SDS metodo v nereducirajočih pogojih, kjer bomo spremljali čistost proteina in potencialne nečistote
- b) CE-SDS metodo v reducirajočih pogojih, kjer bomo spremljali delež neglikozilirane težke verige protiteles, ter razmerje med lahko in težko verigo.

Razvoj metod bo vključeval pripravo vzorcev, kjer bomo vzorce izpostavili različnim pogojem: spreminjali bomo vrsto in koncentracijo reducenta ter alkilanta, uporabili bomo različne inkubacijske pogoje (aparatura, temperatura in čas inkubacije), ter vzorce pripravili pri različnem pH denaturacijskega pufra.

Testirali bomo različne instrumentalne nastavitve z namenom, da dobimo čim boljše ločljivost vrhov ter določili končne parametre, s katerimi bomo lahko hkrati analizirali vse tri terapevtske proteine skupaj. Parametri, ki jih bomo spremljali, so napetost in čas separacije, napetost in čas injiciranja vzorca, mesto injiciranja vzorca ter velikost detekcijskega okna.

CE-SDS metodo bi radi razvili z detekcijo laserske inducirane fluorescence (LIF), saj novejši pristopi te detekcije zagotavljajo boljšo učinkovitost in občutljivost v primerjavi z ultravijolično (UV) detekcijo. Rezultate obeh načinov detekcij bomo tako primerjali ter poiskali njihove prednosti in slabosti.

Na koncu bomo potrdili ali metoda ustreza namenu njene uporabe. Določili in potrdili bomo najpomembnejše parametre potrebne za validacijo analitske metode. Da bo analitska metoda podala rezultate, ki natančno odražajo kakovostne značilnosti testiranega proizvoda, bomo določali linearnost, točnost, natančnost, specifičnost, robustnost metode ter mejo določljivosti in zaznavnosti (28).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

Vse uporabljene kemikalije so analizne čistosti večje od 98 %. Navedene so v preglednici II.

Preglednica II: Uporabljene kemikalije

Kemikalija	Proizvajalec, kataloška številka
jodacetamid	Sigma, I1149
2-merkaptoetanol	Sigma, M3148
ditiotreitol (DTT)	Sigma, 43815
tris (2-karboksietil)fosfin hidroklorid (TCEP)	Sigma, C4706
N-etilmaleimid (NEM)	Sigma, E3876
5-karboksitetrametilrodamin sukcinimidil ester (5-TAMRA.SE)	Sigma, 53048
dinatrijev hidrogen fosfat (Na_2HPO_4)	Merck, 106580
citronska kislina	Sigma, 251275
dinatrijev hidrogen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, 106580
natrijev dodecilsulfat (SDS)	Sigma, L3771
natrijev hidrogen karbonat (NaHCO_3)	Merck, 36486
SDS- Gel MW analitski komplet*	Beckman Coulter, 390953

*SDS- Gel MW analitski komplet vsebuje: gel (polimerni pufer, pH 8,0 z 0,2 % SDS, Beckman Coulter), pufer za redčenje vzorcev (100 mM TRIS/HCl pH 9,0 z 1 % SDS, Beckman Coulter), 0,1 M natrijev hidroksid (NaOH) in 0,1 M klorovodikova kislina (HCl).

3.1.2 Pufri in raztopine

Preglednica III prikazuje uporabljene pufre in pripravljene raztopine za eksperimentalno delo. Če ni drugače navedeno, so bili topljenci raztopljeni v deionizirani vodi.

Preglednica III: Uporabljeni pufri in raztopine za pripravo vzorcev

Pripravljene pufri	Sestava pufra
85 mM citrat fosfatni pufer, pH 6,5	0,2 M Na_2HPO_4 , 0,1 M citronska kislina
50 mM citrat fosfat / 1 % SDS, pH 6,2	1 % razt. SDS, 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 M citronska kislina
50 mM TRIS-HCl/ 1 % SDS, pH 9,0	Tris(hidroksimetil)-aminometan, 1 % SDS raztopina

Pripravljeni pufri	Sestava pufra
50 mM acetat/ 1%SDS, pH 5,5	Na(CH ₃ COO) x 3H ₂ O, 1 % SDS raztopina
100 mM TRIS-HCl/ 1% SDS, pH 9,0	Beckman Coulter komplet, kat.št.:390953
Pripravljene raztopine	
250 mM IAM	
0,4 mM TAMRA.SE	Raztopina pripravljena v topilu DMSO
15 mM in 50 mM DTT	
20 mM TCEP	
15 mM NEM	

3.1.3 Voda

Za pripravo raztopin in pufrov smo uporabili prečiščeno vodo pridobljeno s sistemom za pripravo ultra čiste vode Milli-Q Advantage, proizvajalca Millipore.

3.1.4 Vzorci

Pri eksperimentalnem delu smo testirali terapevtska monoklonska protitelesa in fuzijski protein. Uporabili smo IgG₁ in IgG₂ protitelo, pridobljena iz jajčnih celic kitajskega hrčka (CHO) z rekombinantno DNA tehnologijo. Za analizirani vzorec smo uporabili tudi rekombinantni terapevtski fuzijski protein vezan na Fc domeno IgG₁ protitelesa.

Protitelesa in fuzijski protein predstavljajo izolirano učinkovino po procesu čiščenja razvojnega procesa (ang. »*downstream processing*«). Vsi analizirani vzorci so očiščeni fermentacijskega medija ali drugih gostiteljskih celic.

3.2 OPREMA

3.2.1 Naprave in pribor

V preglednicah IV in V so predstavljene vse naprave in pribor, ki so se uporabljali pri eksperimentalnem delu.

Preglednica IV: Uporabljene naprave

Naprava	Tip naprave, proizvajalec
sistem za kapilarno elektroforezo	PA 800 plus, Beckman Coulter
UV detektor	P/ACE™ MDQ UV/Vis detector module, Beckman Coulter
LIF detektor	P/ACE™ MDQ single LIF detector, Beckman Coulter

Naprava	Tip naprave, proizvajalec
pH meter	Metrohm 780, Methrom
sistem za pripravo ultra čiste vode	Milli-Q Advantage A10, Millipore
termomešalo	Thermomixer Comfort, Eppendorf
vodna kopel	Precision™ General Purpose Bath, Thermo Scientific
centrifuga	Centrifuge 5415 R, Eppendorf
mikrocentrifuga	MiniSpin plus, Eppendorf
rotacijsko mešalo	Vortex mixer VELP, Scientifica
tehnica	XP205- Delta range, Mettler Toledo
zamrzovalnik ≤ -60 °C	MDF-U76V-PE (ultra low temperature), Panasonic

Preglednica V: Uporabljen pribor

Pribor	Proizvajalec, kataloška številka
viale 0,5 mL	Eppendorf, 022431064
mikro viala	Beckman Coulter, 144709
univerzalne plastične viala	Beckman Coulter, A62251
univerzalni gumijasti modri pokrovčki	Beckman Coulter, A62250
centrifugalni filtri 10kDa (0,5 mL)	Amicon Ultra, Millipore, UFC5010BK
centrifugalni filtri 30kDa (0,5 mL)	Amicon Ultra, Millipore, UFC5030BK
centrifugalne viala 1,5 mL	Amicon Ultra, Millipore, UFC50VL96
NAP-5 kolone	Illistra™ NAP Columns Sephadex™ G-25, GE Healthcare
kapilara za kapilarno gelsko elektroforezo (uncoated capillary, 30 cm x 50 µm)	Beckman Coulter, 390953

3.2.2 Program za obdelavo podatkov

Elektroferograme smo ovrednotili z avtomatsko integracijo v programu Empower proizvajalca Waters, ZDA.

3.3 EKSPERIMENTALNO DELO

Priprava vzorcev vključuje testiranje različnih koncentracij in vrst reducentov oz. alkilantov, spremembe pH pufru pri denaturaciji vzorca, vključuje tudi pogoje inkubacije (aparatura, temperatura in čas) v nereducirajočih (nrCE-SDS) in reducirajočih (rCE-SDS) pogojih kapilarne gelske elektroforeze v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata.

3.3.1 Priprava vzorcev

Za analizo proteinov z LIF detekcijo je potrebna posebna predpriprava vzorcev, s katero protitelesa označimo s fluorescenčnim barvilom ter odstranimo prebitek barvila.

Pri analizi z UV detekcijo razredčeni vzorec lahko direktno izpostavimo reducirajočim oz. nereducirajočim pogojem.

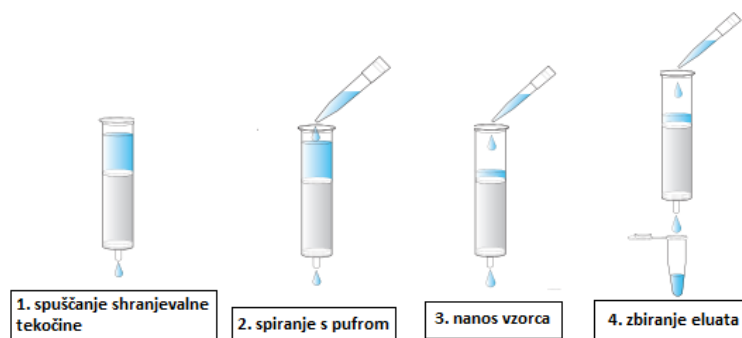
3.3.1.1 Priprava vzorcev za LIF detekcijo

Vzorci smo pripravili na dva načina: z NAP-5 Sephadex™ kolonami in centrifugalnimi filtri (slika 8). NAP-5 kolone in centrifugalni filtri so namenjeni za hitro čiščenje proteinskih vzorcev, za razsoljevanje in izmenjavo pufra (31). NAP-5 kolone vsebujejo navzkrižno vezan dekstranski gel ter delujejo po principu gelske filtracije s pomočjo gravitacijskega toka. Centrifugalni filtri so sestavljeni iz celulozne membrane, različnih velikosti por. Čiščenje in izmenjava poteka s pomočjo centrifugalne sile, ki jo povzročimo s centrifugo.



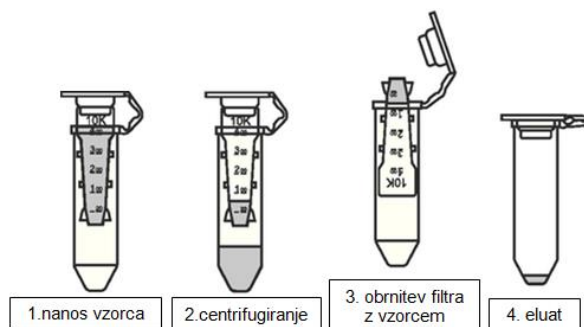
Slika 8: NAP-5 kolone (*levo*) in centrifugalni filtri (*desno*). Povzeto po (32).

Pri delu z NAP-5 kolonami je potrebno ustrezno pripraviti kolone. Pri tem smo se ravnali po navodilih proizvajalca (*GE Healthcare, illustra NAP-5 Columns*). Skozi kolono najprej spustimo primarno shranjevalno tekočino in nato 3-krat spiramo z izbranim pufrom. V našem primeru smo spirali z 0,1 M NaHCO₃. Po spiranju naneseemo določeno količino našega vzorca na kolono in počakamo, da le ta popolnoma preide v matriks. Vzorec (0,5 mg) izmenjamo s 1000 µL 0,1 M NaHCO₃. Rastopino barvila (0,17 mg/mL TAMRA.SE) dodamo k 190 µL izmenjanemu vzorcu s pufrom ter inkubiramo v termobloku pri 30 °C 30 minut. Prebitek barvila v vzorcu odstranimo s spiranjem s 85 mM citrat fosfatnim pufrom skozi kolono, ki smo jo predhodno ekvilibrirali s tem pufrom. Zbrani eluat uporabimo pri reakciji redukcije in alkilacije. Princip dela s kolonami je prikazan na sliki 9.



Slika 9: Prikaz spiranja NAP-5 kolon in zbiranja eluata v zadnji fazi. Povzeto po (31).

Vzorci smo pripravili tudi v 10 kDa in 30 kDa centrifugalnih filtrih. Filtre najprej omočimo z 0,1 M NaHCO₃ pri 12000 rcf obratih za 3 minute. V filter odpipetiramo raztopino vzorca z 0,1 M NaHCO₃ do koncentracije 0,5 mg/mL. Puffer spustimo skozi filter pri 12000 rcf obratih za 5 minut. Isti filter nato še 2-krat spiramo z 0,1 M NaHCO₃, da odstranimo vse prisotne soli in ione. Po spiranju z NaHCO₃ filter obrnemo in naš vzorec lovimo v epico (slika 10). Eluat redčimo do 500 µL z 0,1 M NaHCO₃. Raztopino barvila (0,17 mg/mL TAMRA.SE) dodamo k 190 µL izmenjanemu vzorcu s pufrom ter inkubiramo v termobloku pri 30 °C 30 minut. Prebitek barvila v vzorcu odstranimo s spiranjem s 85 mM citrat fosfatnim pufrom. Sledi postopek ponovnega centrifugiranja vzorca, ki je enak kot pri izmenjavi vzorca z 0,1 M NaHCO₃ pufrom. Zbrani eluat uporabimo pri reakciji redukcije in alkilacije.



Slika 10: Postopek dela s cetrifugalnimi filtri. Povzeto po (33).

3.3.2 Alkilacija

Pri analizi vzorcev z LIF detekcijo smo vzorce pripravili kot je opisano v poglavju 3.3.1.1 *Priprava vzorcev za LIF detekcijo*. Nato smo vzorcu dodali 100 µL denaturacijskega pufra

pH 9,0 ter 10 μ L 250 mM IAM. Vse skupaj smo inkubirali v termobloku pri 90 °C 3 minute. Končna koncentracija vzorca je bila 0,5 mg/mL.

Vzorci za analizo z UV detekcijo smo najprej z Milli-Q vodo redčili do koncentracije 5 mg/mL. Razredčeni vzorec smo dodali k 75 μ L denaturacijskega pufra ter dodali 5 μ L alkilanta. Vzorce smo inkubirali v termobloku pri 70 °C 3 in 10 minut. Končna koncentracija vzorca je bila 1,0 mg/mL. Pregled priprave vzorcev je prikazan v preglednici VI.

Preglednica VI: Pregled priprave vzorcev pri nereducirajočih pogojih CE-SDS metode z UV detekcijo

Vzorec	Denaturacijski pufer	Alkilant	Pogoji inkubacije
mAb	100 mM TRIS-HCl/ 1 % SDS pH 9,0	250 mM IAM	termoblok, 70 °C, 3 min
		100 mM NEM	termoblok, 70 °C, 10 min
	50 mM acetatni pufer/ 1 % SDS, pH 5,5	250 mM IAM 100 mM NEM	termoblok, 40 °C, 10 min

3.3.3 Redukcija

Pri analizi vzorcev z LIF detekcijo smo vzorce pripravili kot je opisano v poglavju 3.3.1.1 *Priprava vzorcev za LIF detekcijo*. Nato smo vzorcu dodali 100 μ L denaturacijskega pufra s pH 9,0 ter 20 μ L 2-ME. Inkubacija je potekala v termobloku pri 90 °C 3 minut. Končna koncentracija vzorca je bila 0,5 mg/mL.

Vzorci, ki smo jih analizirali z UV detekcijo, smo najprej z Milli-Q vodo redčili do koncentracije 5 mg/mL. Razredčeni vzorec smo dodali k 75 μ L denaturacijskega pufra ter dodali 5 μ L reducenta. Vzorce smo inkubirali pri določenih pogojih. Končna koncentracija vzorca je bila 1,0 mg/mL. Priprava vzorcev je predstavljena v preglednici VII.

Preglednica VII: Pregled priprave vzorcev pri reducirajočih pogojih CE-SDS metode z UV detekcijo

Vzorec	Denaturacijski pufer	Reducent	Pogoji inkubacije
mAb	100 mM TRIS-HCl/ 1 % SDS pH 9,0		termoblok, 70 °C in 90°C, 10 in 20 min
	50 mM citrat fosfat/ 1 % SDS, pH 6,2	15 mM DTT 50 mM DTT	
	50 mM TRIS-HCl/ 1 % SDS, pH 9,0		vodna kopel, 70 °C in 90 °C, 10 in 20 min

Vzorec	Denaturacijski pufer	Reducent	Pogoji inkubacije
mAb	100 mM TRIS-HCl/ 1 % SDS pH 9,0	40 mM TCEP	termoblok, 70 °C 10 min, 40 °C 10 min, ST 10 min
	50 mM citrat fosfat/ 1 % SDS, pH 6,2		
	50 mM TRIS-HCl/ 1 % SDS, pH 9,0		
mAb	100 mM TRIS/HCl z 1 % SDS, pH 9,0	2-ME	termoblok, 70 °C 10 min 90 °C 10 min
	50 mM citrat fosfat/ 1 % SDS, pH 6,2		
	50 mM TRIS-HCl/ 1 % SDS, pH 9,0		

3.3.4 pH denaturacijskega pufera

Uporabljali smo različne denaturacijske pufre, s katerim smo redčili in pripravljali vzorce. Pufri so predstavljeni v preglednici III.

3.3.5 Pogoji inkubacije

Pri pogojih inkubacije smo testirali vpliv vodne kopeli in termobloka, kjer smo spreminjali temperaturo: sobna temperatura (ST), 40 °C, 70 °C in 90 °C ter čas inkubacije: 5, 10 in 20 minut.

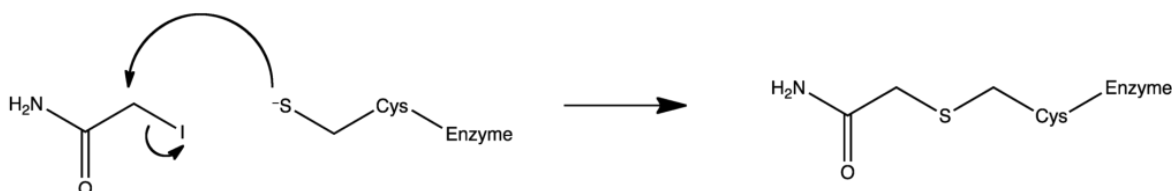
3.4 METODE

3.4.1 Kapilarna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata

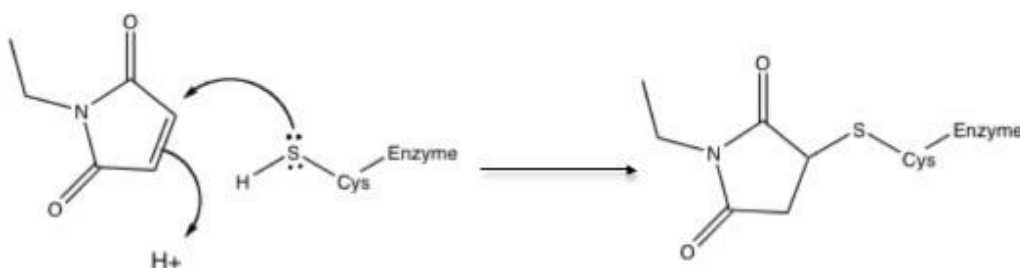
CE-SDS metodo uporabljamo za analizo monoklonskih protiteles pri nereducirajočih in reducirajočih pogojih. Pred analizo proteine izpostavimo anionskemu detergentu, natrijev dodecilsulfatu (SDS), ki se specifično veže na proteine in jih pri tem denaturira. Nastanejo kompleksi SDS-protein s hidrofobnimi povezavami, pri čemer se v povprečju vedno veže 1,4 g SDS na 1 g proteina. Prvotni naboj proteina se v glavnem prekrije z negativnim nabojem SDS-a, zato separacija kompleksa SDS-protein temelji na različni mobilnosti. Mobilnost kompleksa SDS-protein je obratno sorazmerna logaritmu efektivne molekulske mase: kompleksi SDS-protein bodo potovali proti anodi zaradi negativnega naboja, ki ga prispeva SDS (34).

Glavna naloga CE-SDS pri nereducirajočih pogojih je opaziti fragmentacijo protiteles. Proste tiolne (SH) skupine protiteles se lahko povezujejo v disulfidne vezi, kar vodi do fragmentacije protiteles ter posledično do nastanka dimerov ali agregatov. Dodatek alkilacijskega reagenta k SDS pufru pa prepreči reakcijo fragmentacije. Alkilacijski reagent se veže na proste SH skupine proteina, tako da protein ne more tvoriti disulfidnih vezi z ostalimi proteini. Kot primer alkilacijskega reagenta se v študijah najpogosteje uporabljata jodacetamid (IAM) in N-etilmaleimid (NEM) (35).

Kemijska reakcija proste SH skupine z NEM alkilantom je konjugacijska adicija, reakcija z IAM reagentom pa S_N2 reakcija. Spodnji sliki (slika 11 in 12) prikazujeta primer reakcije jodacetamida in N-etilmaleimida s SH skupino proteina.

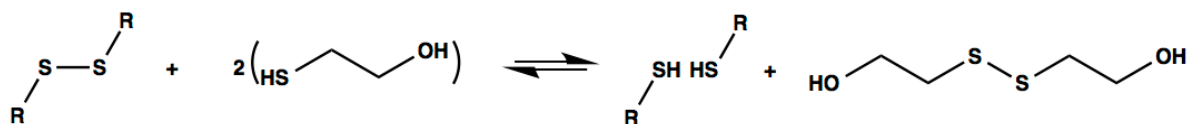


Slika 11: Prikaz reakcije alkilacije z IAM (S_N2 reakcija). Povzeto po (36).

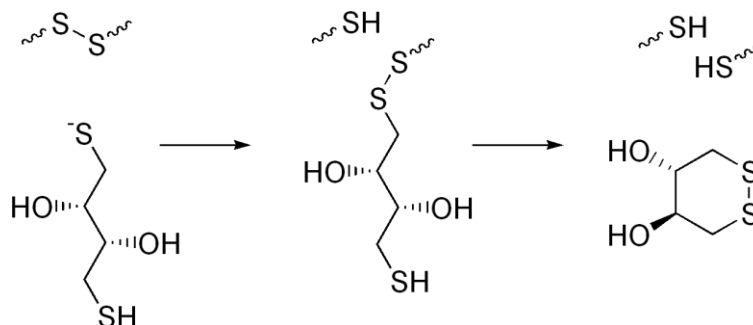


Slika 12: Prikaz reakcije alkilacije z NEM (konjugacijska adicija). Povzeto po (37).

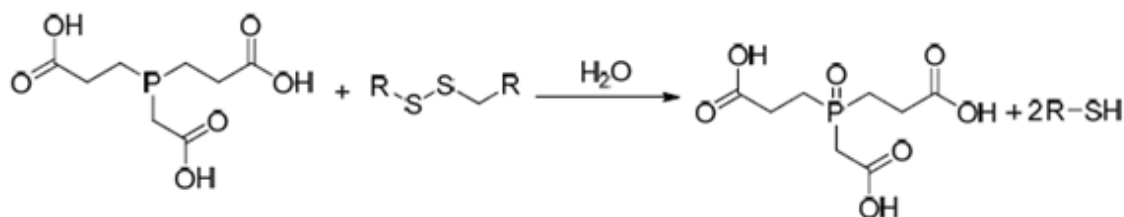
Pri reducirajočih pogojih CE-SDS metode se uporablja reagente, ki skrbijo za ohranjanje prostih tiolnih skupin v reducirajoči obliki ter za redukcijo disulfidnih vezi v proteinu (31). Za redukcijo disulfidnih vezi se najpogosteje uporabljata reducenta 2-merkaptoetanol (2-ME) in ditiotretol (DTT). Kot redukcijski reagent se lahko uporablja tudi triskarboksietilfosfin (TCEP). Spodnje slike (slika 13, 14 in 15) prikazujejo primer redukcije disulfidnih vezi pri vsakem od reducentov.



Slika 13: Redukcija disulfidnih vezi z 2-ME. Povzeto po (38).



Slika 14: Redukcija disulfidnih vezi z DTT. Povzeto po (39).

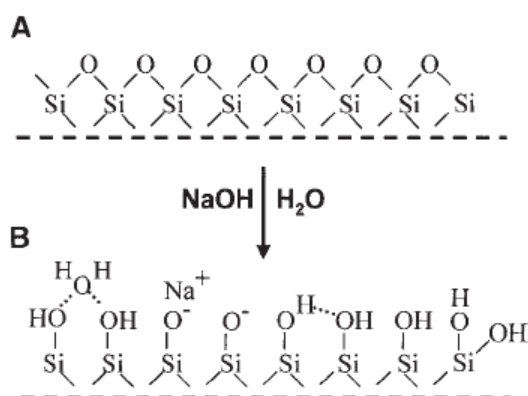


Slika 15: Redukcija disulfidnih vezi s TCEP. Povzeto po (40).

3.4.2 Instrumentalne nastavitve

Pri pripravi sistema za analizo naših vzorcev smo se ravnali po navodilih proizvajalca. Za ločbo proteinov smo uporabili 50 μm i.d. stekleno kapilaro celotne dolžine 30,2 cm. Pred injiciranjem vzorca najprej sledi nekaj minutno kondicioniranje kapilare, da se vzpostavi ustrezna separacijska površina v kapilari. S tem stabiliziramo EOF in omogočimo ponovljivost migracije vzorca. Kapilara se najprej spere z 0,1 M raztopino NaOH, kjer se siloksanse skupine v kapilari hidrolizirajo v silanolne skupine, ki ustvarijo EOF (slika 16). Sledi spiranje z 0,1 M raztopino HCl, s katero se odstranijo kationski ostanki in

spiranje z Milli-Q vodo. Na koncu se kapilara napolni z gelom, kjer se pripravi površina za separacijo vzorca. Sledi injiciranje vzorca (26).



Slika 16: Površina kapilare pred (A) in po (B) hidrolizi z NaOH. Povzeto po (26).

Instrumentalne nastavitve, kot so izbira detekcije, mesto injiciranja oz. polarnost metode, napetost in čas injiciranja ter separacije in velikost detekcijskega okna, smo tekom eksperimentov spreminjali ter poskušali določiti najbolj ustrezne nastavitve sistema, ki podajajo zadovoljive in zanesljive rezultate.

3.4.2.1 Detekcija

Da pridobimo informacije iz separacijske ločbe, je potrebna detekcija in merjenje našega analita. Na kapilari se nahaja detekcijsko okno, ki je povezano z detektorjem, ta pa zazna protein glede na energijo, ki jo oddaja, ko se premika skozi snop svetlobe (26). Pri CE metodah so možne štiri vrste detekcije: absorbanca, fluorescenca, elektrokemijska detekcija in detekcija lomnega količnika (41). V magistrski nalogi smo se osredotočili na absorpcijsko in fluorescenčno vrsto detekcije.

Absorpcijska detekcija je najpogosteje uporabljena detekcija pri CE metodah, vključno s kapilarno gelsko elektroforezo. Proteine zlahka zaznamo z detektorjem UV absorbanca, ker peptidne vezi med aminokislinami in aromatskimi skupinami absorbirajo svetlobo pri 200-220 nm (23). Ko pripotuje protein med vir svetlobe in detektor, ustvari sled, ki povzroči absorpcijo. Intenzivnost sledi proteina je proporcionalna količini proteina (26). Zaradi omejene dolžine optične poti je koncentracijska občutljivost UV absorpcije

običajno nizka, zlasti pri uporabi ozke kapilare, zato se v CGE lahko uporablja tudi LIF detekcija za izboljšanje občutljivosti (23).

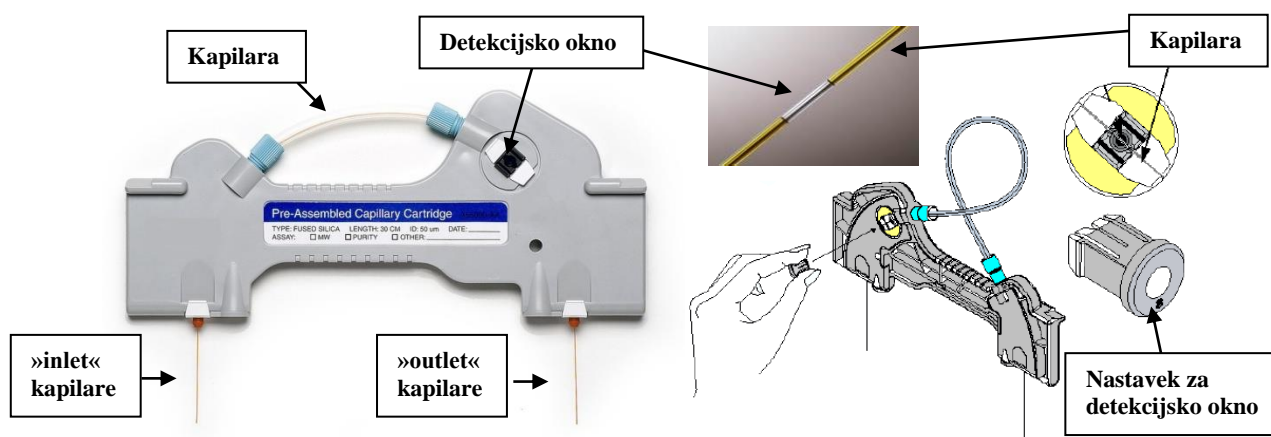
Pri naših poskusih smo uporabili UV detektor, kjer smo analizirali protitelesa pri valovni dolžini 214 nm.

Flourescenčna detekcija uporablja zunanji vir energije za vzbujanje molekule proteina iz normalnega stanja v višje energijsko stanje. Ko se vzbujene molekule vračajo v normalno stanje, oddajajo energijo, ki se lahko detektira in beleži kot prehod analita. Fluorescenčni detektorji pri CE uporabljajo laserje kot vir energije vzbujanja analita, ki prispevajo k intenzivnosti svetlobe na eni valovni dolžini. Intenzivnost svetlobe prispeva k učinkovitosti vzbujenosti molekul. Zaradi različne vzbujenosti molekul flourescenčni detektor ne zazna vseh komponent v vzorcu, zato je potrebno analite obarvati z barvili, ki fluorescirajo. Za analite, ki naravno fluorescirajo ali so kemijsko označeni s fluorescentnim barvilom, je ta vrsta detekcije 10-1000 krat bolj občutljiva kot absorpcijska detekcija (26).

Pri naših poskusih smo uporabili LIF detektor valovne dolžine 488 nm.

3.4.2.2 Velikost detekcijskega okna

Detekcijsko okno se nahaja na dolžini 20 cm od začetka (ang. »inlet«) strani kapilare (slika 17). Detekcija skozi kapilaro je lahko zapletena zaradi ukrivljenosti same kapilare. Ukrivljenost kapilare je potrebno upoštevati, saj želimo zbrati čim več svetlobe, s tem pa povečati razmerje med signalom in šumom (26). Zato lahko s posebnim nastavkom (ang. »aperture«) nastavljamo velikost detekcijskega okna, skozi katero prehaja svetloba.



Slika 17: Deli celotnega seta kapilare (levo) in prikaz nastavka (ang. »aperture«) za detekcijsko okno (desno). Povzeto po (42).

Naredili smo poskus, kjer smo vzorce merili na kapilari z nastavkom za detekcijsko okno velikosti 100 x 800 μm in nastavkom velikosti 100 x 200 μm .

3.4.2.3 Polarnost metode in mesto injiciranja

Običajno potovanje delcev po kapilari poteka po principu normalne polarnosti (opis v poglavju 1.5.2 *Kapilarna elektroforeza*), kjer apliciramo električni tok od anode proti katodi. Mesto injiciranja vzorcev pri normalni polarnosti je vedno pri anodi. Elektroforeza pa lahko poteka tudi po principu reverzne polarnosti, kjer električni tok poteka od katode proti anodi, vzorce pa injiciramo vedno pri katodi (43).

Vzorec pri CE lahko injiciramo na obeh straneh kapilare: »inlet« in »outlet« (slika 17). Pri injiciranju iz »inlet« strani kapilare vzorec prepotuje daljšo pot do detektorja (cca. 20 cm) v primerjavi z injiciranjem iz »outlet« strani kapilare. Tu vzorec prepotuje krajšo pot do detektorja (cca. 10 cm) (43).

V naših poskusih smo ločevanje vzorcev izvedli z normalno polarnostjo (od anode proti katodi), kjer smo vzorec injicirali iz »outlet« strani kapilare.

3.4.2.4 Napetost in čas injiciranja

Injiciranje vzorca pri CE metodah običajno poteka na dva načina: z razliko tlakov med obema koncema kapilare ali z apliciranjem napetosti. Injiciranje s tlačno razliko imenujemo *hidrodinamično injiciranje*. Volumen vbrizganega vzorca ni odvisen samo od časa in pritiska injiciranja, ampak tudi od viskoznosti separacijskega medija v kapilari, premera in dolžine kapilare (44).

Injiciranje z napetostjo pa predstavlja *elektrokinetično injiciranje*. Količina vbrizganega vzorca je odvisna od mobilnosti molekule, premera kapilare, uporabljenega električnega polja in časa injiciranja. Pri kapilarni gelski elektroforezi se uporablja elektrokinetično injiciranje predvsem zaradi viskoznega gela v kapilari in selektivnosti (44).

Pri obeh metodah, nrCE-SDS in rCE-SDS, smo izvedli elektrokinetično injiciranje 15, 30 in 35 sekund z napetostjo 2 kV in 5 kV.

3.4.2.5 Napetost in čas separacije

Hitrost elektroosmoze in elektroforeze sta odvisni od uporabljene napetosti, zato je napetost ena izmed pomembnih parametrov za optimizacijo ločljivosti pri razvoju metode. Napetost vpliva na hitrost separacije in ločljivost vrhov. Večjo napetost bomo uporabili,

hitreje bo potekalo ločevanje proteinov (28). Pri poskusih nrCE-SDS in rCE-SDS metod smo testirali napetosti 5 kV, 10 kV in 12 kV ter prilagajali ustrezen čas separacije.

3.4.3 Validacija CE-SDS metode

Validacija metode je dokumentiran postopek, ki z visoko stopnjo zanesljivosti zagotavlja, da bo določena analitska metoda podala rezultate, ki natančno odražajo kakovostne značilnosti testiranega proizvoda in ustrezala namenu uporabe (22). Pri razvoju in validaciji nove metode je potrebna določitev minimalnih kriterijev, katerim mora metoda zadostiti. Potrebno je preizkusiti pomembnejše parametre validacije: linearnost in točnost metode, natančnost in specifičnost metode, mejo zaznavnosti, mejo določljivosti, delovno območje, robustnost in ustreznost sistema (28).

Za potrebe razvoja smo pri CE-SDS metodi izvedli »začetno« validacijo metode (*ang. early validation*), oz. t.i. kvalifikacijo metode, kjer preverimo ustreznost novo razvitega postopka. Cilj razvoja je, da je analizni postopek ustrezen za svoj namen, zato ni potrebno testirati vseh parametrov. Testiramo samo parametre, s katerimi zagotovimo ustreznost naše analitske metode.

Začetno validacijo CE-SDS metode v nereducirajočih in reducirajočih pogojih smo izvedli samo na vzorcih, ki vsebujejo izolirano IgG₂ protitelo kot učinkovino po višji stopnji čiščenja razvojnega procesa (*ang. »downstream processing«*).

Za izvedbo vseh testiranih parametrov smo se ravnali po ICH Q2 (R1) smernicah (45) in FDA smernicah (46), ki prikazujejo priporočene pogoje za izvedbo analiz. Osredotočili smo se na naslednje parametre:

- ***Linearnost (ang. linearity) in točnost (ang. accuracy)***

Linearnost je sposobnost analitskega postopka, da dobimo rezultate, ki so sorazmerni s koncentracijo analita v vzorcu.

Točnost metode izraža ujemanje dobljene vrednosti s pravo vrednostjo in je od nje statistično nepomembno različna.

Rezultate smo ovrednotili z linearnim odzivom t.j. linearno regresijo, kjer smo določili korelacijski koeficient, presečišče z y-osjo ter naklon krivulje. Umeritveno premico smo narisali z uporabo matematične transformacije. Enačba linearne funkcije je $y = kx + n$, kjer

y predstavlja povprečno površino pod premico, n presečišče z ordinato, k naklon krivulje, x pa koncentracijo vzorca. Izračunano vrednost presečišča z y osjo predstavlja enačba 1.

$$y = \frac{n}{TCA(100\%)} x 100 \quad TCA(100\%) = k x 100 + n$$

(Enačba 1)

TCA...časovno korigirana površina pod krivuljo

Linearnost in točnost metod smo izvedli hkrati v eni analizi. Pri obeh metodah je poskus obsegal sedem različnih koncentracij analita (proteina) v območju od LOQ koncentracije (0,3 %) do 120 % nominalnega nanosa. Nominalna koncentracija je znašala 1,0 mg/mL. Vsako redčitev smo pripravili v treh paralelkah za določitev točnosti. Preglednica VIII prikazuje koncentracije, ki so bile merjene za določitev linearnosti in točnosti metode.

Preglednica VIII: Koncentracije uporabljene pri določevanju linearnosti in točnosti CE-SDS metode v nereducirajočih in reducirajočih pogojih

% nominalnega nanosa	Končna konc. (mg/mL)
0,3	0,003
0,6	0,006
1,0	0,01
10	0,1
50	0,5
100	1,0
120	1,2

- *Meja zaznavnosti (ang. limit of detection) in meja določljivosti (ang. limit of quantification)*

Meja zaznavnosti oz. meja detekcije (LOD) je najmanjša količina analita v vzorcu, ki jo lahko z metodo zaznamo, vendar ne nujno kvantitativno ovrednotimo.

Meja določljivosti oz. meja kvantifikacije (LOQ) je najmanjša količina analita v vzorcu, ki jo analiza metoda še zazna in jo kvantitativno ovrednoti z ustrezno točnostjo in natančnostjo.

LOD in LOQ lahko določamo na naslednje načine (22):

- vizualni pregled
- razmerje med signalom in šumom $\geq 3:1$ (za LOD) in $\geq 10:1$ (za LOQ)

- standardna deviacija odseka na ordinati in naklon umeritvene premice (enačba 2)

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times \sigma}{S}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

(Enačba 2)

σ ...standardna deviacija odseka na ordinati, izračunana iz umeritvene premice

S...naklon umeritvene premice

LOD vrednost smo določili glede na vizualni pregled ter upoštevali kriterij za $s/n \geq 3:1$.

LOQ vrednost smo določili po eksperimentu linearnosti metode ter prav tako upoštevali kriterij $s/n \geq 10:1$. Določeno vrednost LOQ smo validirali tako, da smo pripravili 6 enakih redčitev z enkratnim injiciranjem vsake priprave. Vrednosti smo nato preračunali z relativno standardno deviacijo (enačba 3) ter razmerjem s/n (enačba 4).

$$\text{RSD (\%)} = \frac{100}{\bar{X}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}{N-1}}$$

(Enačba 3)

X_i ...posamezna meritev

\bar{X} ...povprečna vrednost meritev

N...število meritev

$$\frac{S}{N} = \frac{h_s}{h_n}$$

(Enačba 4)

h_s ...višina signala

h_n ...višina šuma

- **Specifičnost (ang. specificity)**

Specifičnost oz. selektivnost je sposobnost metode, da nedvoumno loči posamezen analit v prisotnosti drugih komponent v vzorcu. Nobena druga motnja (nečistota, razpadni produkti, matriks, podobne komponente) ne sme motiti določitve učinkovine oz. glavnega vrha v vzorcu.

Za dokaz specifičnosti CE-SDS metode smo analizirali vzorce, ki vsebujejo:

- nativno IgG₂ protitelokot učinkovino (DS vzorec)
- formulacijsko obliko IgG₂ protitelesa (DP vzorec)
- IgG₂ protitelo izpostavljeno 3 mesece na 40 °C (stresni vzorec)

Vključili smo tudi placebo pufra, v katerem je pripravljeno protitelo IgG₂ kot učinkovina (pufer A) ter pufer formulacijske oblike protitelesa (pufer B), ki ne vsebujeta analiziranega protitelesa. Definicija placeba po farmacevtskem terminološkem slovarju (47): »Farmakodinamično neaktivna snov ali izdelek, po videzu enak zdravilu, ali indiferenten postopek, ki se uporablja zaradi sugestivnega učinka pri zdravljenju ali pri kontrolirani klinični raziskavi«.

V naših primerih s placebo pufri zagotovimo, da ne vsebujeta nobenih snovi, ki bi prispevale k površini vrhov in k rezultatom vsebnosti našega protitelesa. Preglednica IX prikazuje sestavo uporabljenih vzorcev.

Preglednica IX: Analizirani vzorci za določevanje specifičnosti CE-SDS metode

Vzorec	Sestava	Koncentracija (mg/mL)
DS vzorec	nativno IgG ₂ protitelo	70,0
DP vzorec	IgG ₂ potitelo	68,8
stresni vzorec	IgG ₂ potitelo, 3 mesece na 40 °C	68,8
pufer A	Na-acetat, sorbitol	/
pufer B	Na-acetat, sorbitol, polisorbitat 20	/

- **Natančnost (ang. precision)**

Natančnost metode izraža stopnjo ujemanja rezultatov med serijo injiciranj istega preiskovanega analita. Natančnost CE-SDS metode predstavlja ponovljivost (*ang. repeatability*), rigidnost (*ang. intermediate precision*) in reproducibilnost (*ang. reproducibility*).

Ponovljivost metode kaže natančnost znotraj postopka, ki ga opravlja ista oseba na isti opremi. Rigidnost zagotavlja, da bo metoda dajala enake in ponovljive rezultate znotraj istega laboratorija tudi po končanem razvoju metode v različnih dnevih, z drugo osebo in drugo opremo. Reproducibilnost pa izraža natančnost metode med različnimi laboratoriji z istim postopkom priprave vzorcev.

Pri analizi za določitev ponovljivosti nrCE-SDS in rCE-SDS metod smo analizirali enake vzorce kot so opisani v poglavju *Specifičnost*. Sestavo vzorcev prikazuje preglednica IX. Vsak vzorec smo pripravili v 6 paralelkah pri 100 % pričakovane koncentracije analita (1,0

mg/mL). Rezultate ponovljivosti smo ovrednotili z izračunom relativne standardne deviacije (enačba 3) za vrhove, ki so imeli % TCA večji kot LOQ vzorec.

Za dokaz rigidnosti metod pa je vzorce pripravila druga oseba, na drug dan in na drugem sistemu za kapilarno elektroforezo z uporabo druge kapilare. Preglednica X prikazuje celotno organiziranost analiz za potrditev natančnosti obeh CE-SDS metod.

Preglednica X: Parametri testiranja pri določanju natančnosti CE-SDS metode

	Vzorec	Priprava	Datum analize	Oseba	Instrument
Ponovljivost	DS vzorec	6x	23.9.2016 nrCE-SDS	Operater_1	BIO_CE_9
	DP vzorec	6x	7.10.2016 rCE-SDS		BIO_CE_11
	stresni vzorec	6x			
Rigidnost	DS vzorec	6x	30.9.2016 nrCE-SDS	Operater_2	BIO_CE_6
	DP vzorec	6x	13.10.2016 rCE-SDS		BIO_CE_5
	stresni vzorec	6x			

Rezultate rigidnosti smo predstavili z izračunom absolutne ali relativne razlike % TCA vrhov (enačba 5) med prvim in drugim operaterjem.

$$\Delta \text{ abs} = |X_1 - X_2| \quad \Delta \text{ rel} = \left| \frac{(X_1 - X_2)}{X_1} \right| \quad (\text{Enačba 5})$$

X_1 ...vrednost operaterja_1

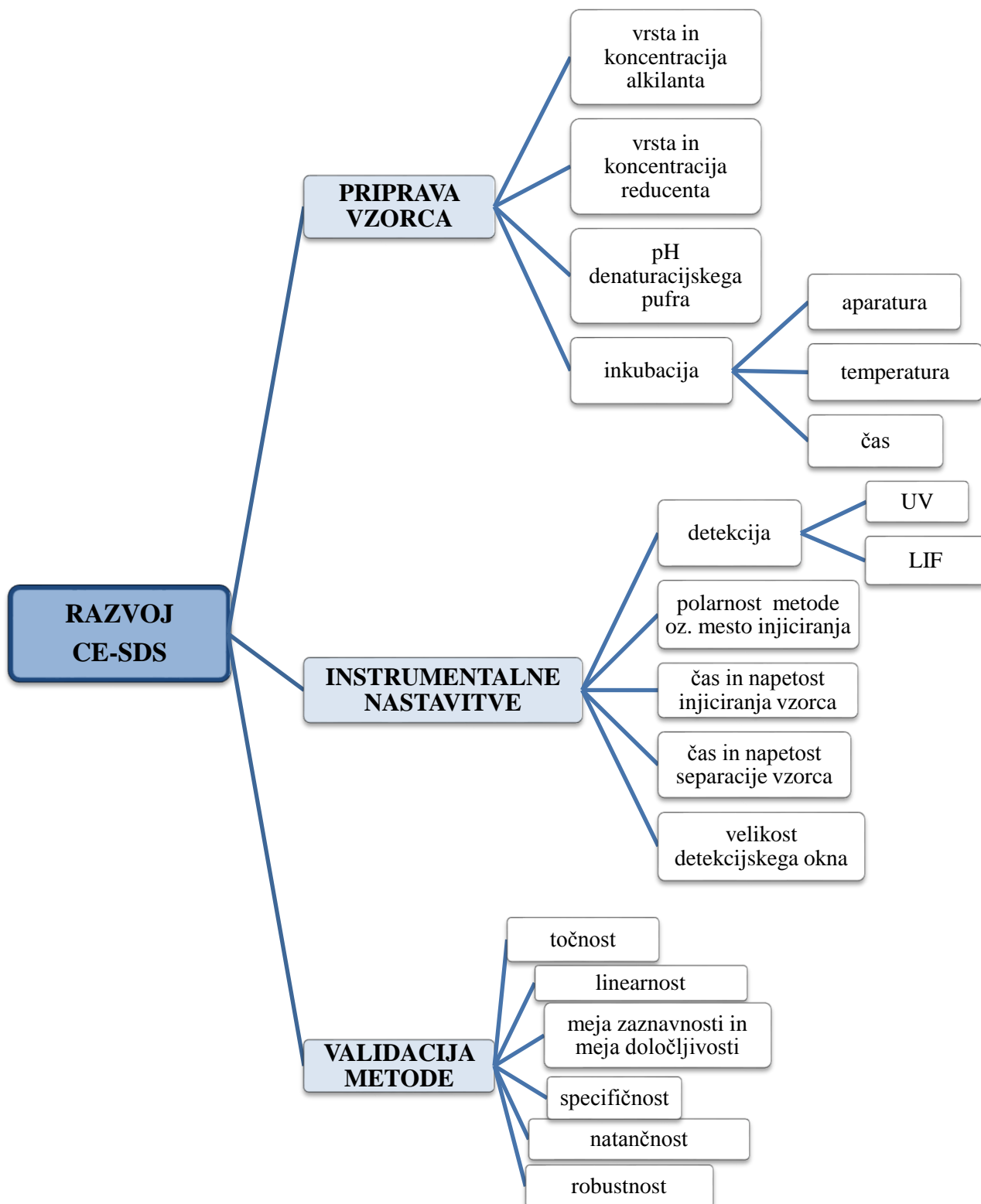
X_2 ...vrednost operaterja_2

- **Robustnost (ang. Robustness)**

Robustnost metode je njena sposobnost, da pokaže zanesljive in ponovljive rezultate zaradi majhnih, vendar namernih razlik v parametrih metode. Robustnost nam pove, kako sprememba različnih parametrov analize vpliva na rezultate, ter katere analize pogoje moramo ustrezno nadzorovati oziroma biti na njih pozorni.

V okviru robustnosti smo v okviru raziskovalnega dela magistrske naloge testirali samo stabilnost vzorcev. Drugi parametri, ki se lahko še testirajo za dokaz robustnosti metode, so: vpliv spremembe koncentracije vzorca, vpliv spremembe pH pufrja za pripravo vzorcev, sprememba temperature kapilare. Ti parametri se morajo v celoti testirati pri »pravi« validaciji (*ang. full validation*), kjer se potem metoda in analitski postopek priprave prenese na oddelek za nadzor kakovosti (QC okolje).

Za lažji pregled korakov pri razvoju in validaciji CE-SDS metode spodnji miselni vzorec prikazuje vse združene korake (slika 18).



Slika 18: Pregled vseh korakov razvoja CE-SDS metode

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Metodo kapilarne gelske elektroforeze v prisotnosti SDS reagenta smo razvijali v nereducirajočih in reducirajočih pogojih. V ta namen smo analizirali monoklonski protitelesi IgG₁, IgG₂ ter rekombinantni fuzijski protein vezan na Fc domeni IgG₁ protitelesa. Zaradi obsežne obdelave rezultatov vseh treh terapevtskih proteinov smo kvalitativne rezultate razvoja priprave vzorcev predstavili le na protitelesu IgG₁. Zaradi pomembnosti specifične detekcije posameznega protitelesa so rezultati instrumentalnih nastavitvev metode predstavljeni na vseh treh preiskovanih proteinih (IgG₁, IgG₂ in fuzijski protein). Da metoda ustreza njenemu namenu in daje ponovljive ter zanesljive rezultate, smo metodo validirali, kjer smo kot preiskovani analit uporabili monoklonsko protitelo IgG₂.

4.1 KAPILARNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA DODECILSULFATA V NEREDUCIRAJOČIH POGOJIH

Pri CE-SDS metodi v nereducirajočih pogojih vzorec izpostavimo alkilacijskemu reagentu, ki prepreči reakcijo fragmentacije protiteles. Spremljamo čistost (delež učinkovine) ter razgradne produkte protiteles (nečistote).

Elektroferogrami nereducirajoče metode kažejo en glavni vrh, ki predstavlja celoten, nativni protein. Slika 19 prikazuje tipične elektroferograme protiteles IgG₁ (elektroferogram A), IgG₂ (elektroferogram B) in fuzijskega proteina (elektroferogram C). Elektroferogram prikazuje nativno protitelo oz. glavni vrh (mAb) ter druge manjše vrhove, ki so lahko posledica slabše čistosti terapevtskega proteina ali pa slabe alkilacije protitelesa. Pri protitelesu IgG₂ vidimo razcepljen glavni vrh. Izoformi predstavljata karakteristiko protitelesa IgG₂ in nista posledica nepravilne priprave vzorca (48). Zato smo to lastnost ohranili in izoform nismo skušali odstraniti. Poleg glavnega vrha (mAb) pa smo ovrednotili in poimenovali tudi druge, manjše vrhove, ki niso bili prisotni v elektroferogramu slepega vzorca: lahka veriga (LC), težka veriga (HC), težka in lahka veriga (HL), dve težki verigi (HH), dve težki in ena lahka veriga (HHL). Visoko molekularne nečistote (HMW) se kot vrhovi pojavijo nekaj minut za glavnim vrhom. Ti vrhovi so širši in domnevno predstavljajo dimere. Vse druge neznane vrhove smo poimenovali s kratico UNK (*»ang. unknown peak«*).

Zaradi zamika migracijskih časov vzorcev tekom sekvence lahko vrhove na elektroferogramu identificiramo na podlagi izračuna relativnega migracijskega časa (RMT) (preglednica XI). Izračun predstavlja enačba 6. RMT izračunamo glede na glavni vrh (mAb). Dobimo razmerje posameznega vrha glede na glavni vrh, pri čemer lahko posamezen vrh identificiramo, saj so razmerja ponovljiva.

$$\text{RMT} = \frac{\text{MT vrha}}{\text{MT mAb}}$$

(Enačba 6)

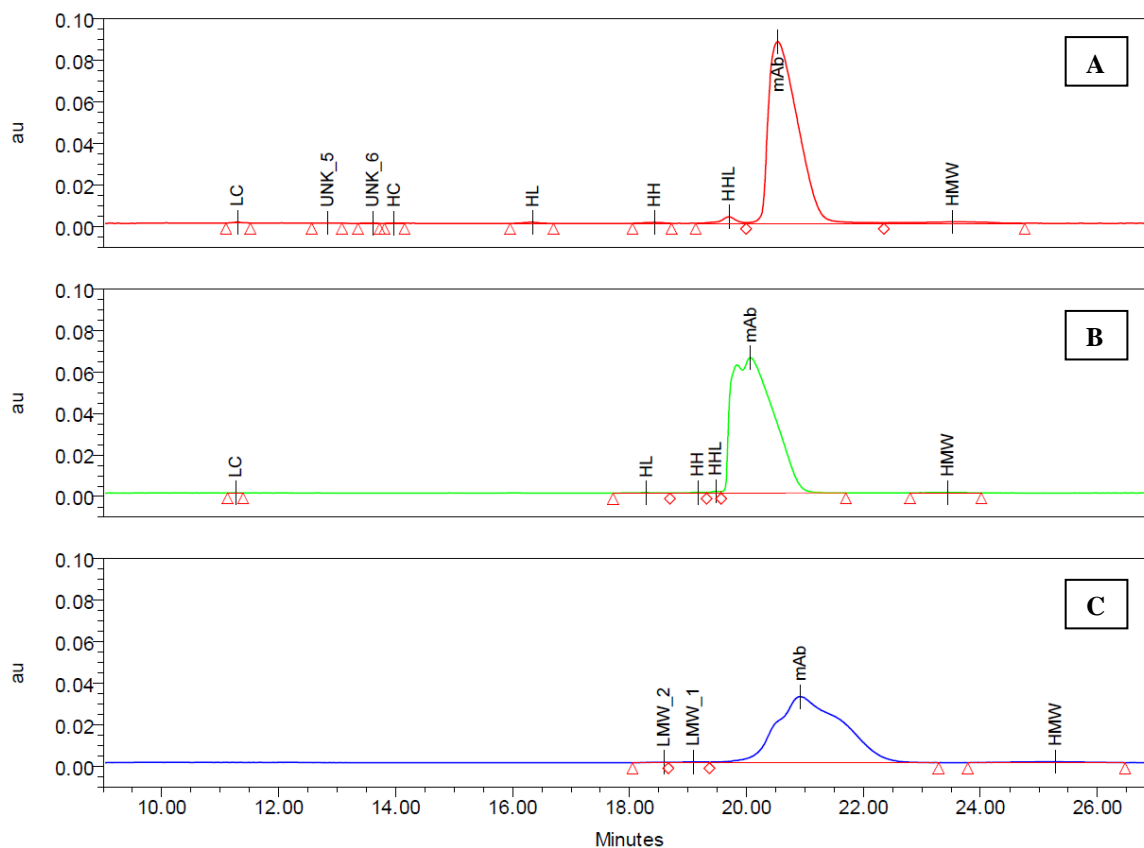
RMT...relativni migracijski čas

MT_{vrha}...migracijski čas posameznega vrha

MT_{mAb}...migracijski čas glavnega vrha

Preglednica XI: Poimenovanje vrhov pri nrCE-SDS

Vrh	RTM	Vrh	RTM
LC	0,55	HHL	0,96
HC	0,68	mAb	1,00
HL	0,79	HMW	1,15
HH	0,90		



Slika 19: Elektroferogramprotitelesa IgG₁ (A), protitelesa IgG₂ (B) in fuzijskega proteina (C) pri nereducirajočih pogojih CE-SDS metode

Pri nrCE-SDS določamo delež posameznih vrhov glede na vsoto časovno korigirane površinevseh vrhov (enačba 7).

$$[\%]\text{TCA} = \frac{\text{TCA}_{\text{posameznega vrha}} * 100\%}{\text{TCA}_{\text{vseh vrhov}}}$$

(Enačba 7)

TCA...časovno korigirana površina pod krivuljo

Spremljamo pa tudi čistost proteina, ki predstavlja delež glikoziliranih in neglikoziliranih protiteles glede na površino vseh integriranih vrhov v elektroferogramu. Izračun predstavlja enačba 8.

$$\text{Čistost } [\%] = \frac{(\text{TCA}_{\text{mAb}} + \text{TCA}_{\text{mAb-NG}})}{\text{TCA}_{\text{vseh vrhov}}} \times 100\%$$

(Enačba 8)

4.2 KAPILARNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA DODECILSULFATA V REDUCIRAJOČIH POGOJIH

Pri CE-SDS metodi v reducirajočih pogojih vzorec izpostavimo reducentu, ki ohranja proste tiolne skupine v reducirajoči obliki in cepi disulfidnih vezi v proteinu.

Pri reducirajoči metodi smo prav tako integrirali vse vrhove, ki niso bili prisotni v elektroferogramu slepega vzorca. Elektroferogrami reducirajočih vzorcev, ki spadajo v skupino monoklonskih protiteles (elektroferograma A in B na sliki 20), predstavljajo tri osnovne vrhove, ki smo jih poimenovali kot LC (lahka veriga), HC-NG (neglikozilirana težka veriga), HC (težka veriga). Ostale neznane vrhove, ki so se pojavili z nizko intenziteto med LC in HC smo poimenovali: Unk_1, Unk_2, Unk_3, Unk_4. Pri rezultatih jih vrednotimo kot vsoto ($LC < \mathbf{Unk} < HC$). Neznane vrhove, ki so se pojavili nekaj minut za HC, pa smo poimenovali z Unk_5, Unk_6 in Unk_7. Prav tako jih pri rezultatih obravnavamo kot skupno vsoto ($\mathbf{Unk} > HC$).

Pri vzorcih, ki so vsebovali terapevtski fuzijski protein (elektroferogram C na sliki 20), je poimenovanje pri reducirajoči metodi nekoliko drugačno. Glavni vrh se razcepi na dve komponenti, ki smo ju poimenovali HP1 in HP2, ostale manjše vrhove pa smo označili z LP1, LP2, LP3, LP4, LP5 in LP6.

Vrhove lahko identificiramo na podlagi izračuna relativnega migracijskega časa (enačba 9). Dobimo razmerje posameznega vrha glede na HC oz. HP2, pri čemer lahko posamezen vrh identificiramo, saj so razmerja ponovljiva (preglednica XII in XIII).

$$RTM = \frac{MT_{\text{posameznega vrha}}}{MT_{HC}}$$

$$RTM = \frac{MT_{\text{posameznega vrha}}}{MT_{HP2}}$$

(Enačba 9)

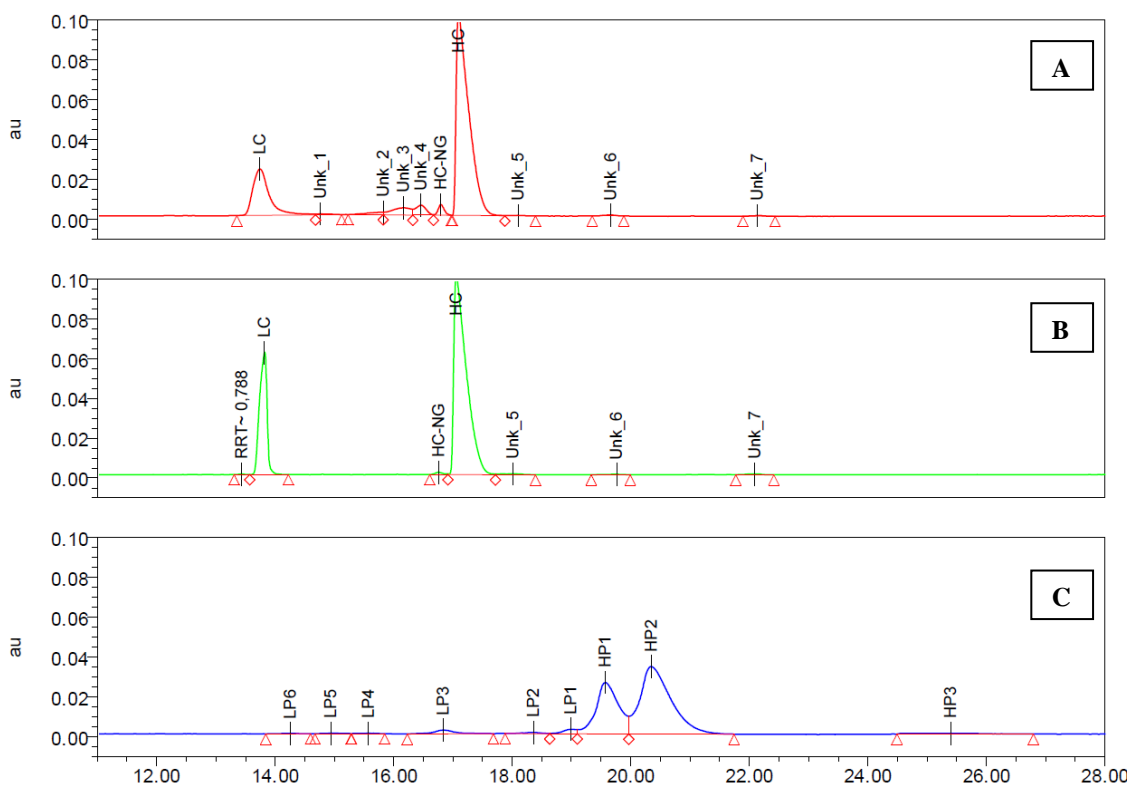
RTM...relativni migracijski čas MT...migracijski čas

Preglednica XII: Poimenovanje vrhov pri rCE-SDS pri vzorcih z mAb

Vrh	RTM	Vrh	RTM
LC	0,80	HC-NG	0,98
Unk_1	0,86	HC	1,00
Unk_2	0,93	Unk_5	1,05
Unk_3	0,95	Unk_6	1,14
Unk_4	0,96	Unk_7	1,28

Preglednica XIII: Poimenovanje vrhov pri rCE-SDS pri vzorcih s fuzijskimi proteini

Vrh	RTM	Vrh	RTM
HP2	1,00	LP3	0,83
HP1	0,96	LP4	0,77
LP1	0,93	LP5	0,73
LP2	0,90	LP6	0,70



Slika 20: Elektroferogram IgG₁ (A), IgG₂ (B) in fuzijskega proteina (C) pri reducirajočih pogojih CE-SDS metode

Tudi pri rCE-SDS določamo delež posameznih oblik vrhov glede na korigirano površino vrha vseh vrhov (enačba 7). Pri tej metodi pa spremljamo delež neglikoziliranega dela težke verige (enačba 10).

$$[\%]_{\text{HC-NG}} = \frac{\text{TCA}_{\text{HC-NG}} * 100\%}{\text{TCA}_{\text{HC-NG}} + \text{TCA}_{\text{HC}}}$$

(Enačba 10)

$\text{TCA}_{\text{HC-NG}}$...časovno korigirna površina neglikozilirane delca težke verige

TCA_{HC} ...časovno korigirana površina težke verige

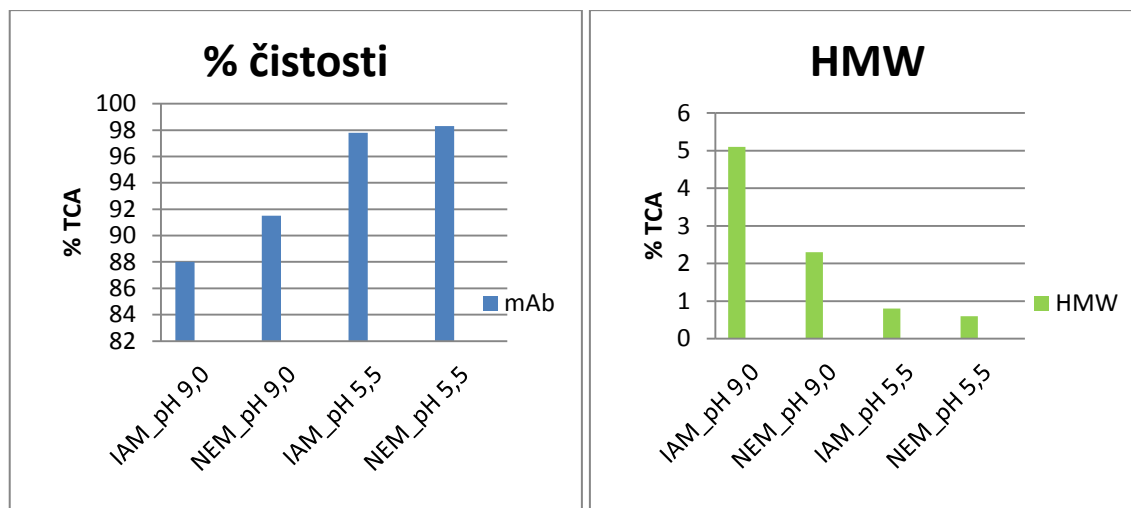
4.3 PRIPRAVA VZORCEV PRI nrCE-SDS

Pri nrCE-SDS smo testirali aktivnost IAM in NEM, kot alkilacijska reagent, pri enakih pogojih. Vzorce z reagentoma smo pripravili s 100 mM TRIS-HCl/ 1 % SDS, pH 9,0 pufrom in 50 mM acetat/ 1 % SDS, pH 5,0 pufrom. Analizirali smo vse tri terapevtske proteine, vendar so rezultati pogojev priprave vzorca predstavljeni samo na protitelesu IgG₁.

Spodnja preglednica (preglednica XIV) prikazuje zbrane rezultate, kjer je predstavljena čistost protitelesa IgG₁ in % TCA visoko molekularnih nečistot. Rezultati so tudi grafično predstavljeni (slika 21).

Preglednica XIV: Zbrani rezultati % TCA mAb in HMW vrhov protitelesa IgG₁

Oznaka vzorca	% čistosti mAb	HMW [% TCA]
IAM_100 mM TRIS-HCl/ 1 % SDS, pH 9,0	88,0	5,1
NEM_100 mM TRIS-HCl/ 1 % SDS, pH 9,0	91,5	2,3
IAM_50 mM acetat/ 1 % SDS pufer, pH 5,5	97,8	0,8
NEM_50 mM acetat/ 1 % SDS pufer, pH 5,5	98,3	0,6



Slika 21: Grafični prikaz % čistosti in % HMW protitelesa IgG₁

Rezultati kažejo, da sta oba reagenta primerna kot alkilanta, ki sta sposobna preprečevati vezavo prostih SH skupin v disulfidne vezi. Oblika vrhov pri obeh elektroferogramih se ne razlikuje bistveno. Tako pri reakciji z IAM, kot pri reakciji z NEM je bilo na elektroferogramu viden vrh, ki predstavlja celotno, nepoškodovano protitelo (mAb), ki se lepo loči od ostalih vrhov. Pri vzorcu z IAM dobimo večjo vrednost % TCA vrhov, ki potencialno predstavljajo visoko molekularne nečistote. Pri obeh vrstah pufru dobimo večji % čistosti protitelesa z NEM reagentom.

Večjo aktivnost pri preprečevanju fragmentacije opazimo pri NEM reagentu. To lahko pripisujemo vrsti kemijske reakcije med SH skupino in alkilantom. Pri S_N2 reakciji lažje pride do sterične oviranosti med SH skupino in ogljikom. Posledična nedostopnost do SH skupine protitelesa vodi v manjšo aktivnost IAM reagenta ter pospešeno reakcijo prostih SH skupin protitelesa v disulfidne vezi (35). Poleg vloge steričnega oviranja je pri IAM reducentu slabost tudi ta, da je v obliki raztopine na svetlobi nestabilen in postane zato neaktiven.

Pri primerjavi različnih pH pufrov se boljši rezultati (večji % čistosti mAb) kažejo pri pufru z nižjim pH. Proste SH skupine protitelesa hitreje tvorijo disulfidne vezi pri bazičnih pogojih. Inhibicija tvorbe disulfidnih vezi je zato uspešnejša pri nižjem pH, kjer protonirana SH oblika prevladuje glede na deprotonirane tiolate (34).

Pri nadaljnji optimizaciji priprave vzorcev za nrCE-SDS analizo smo testirali še inkubacijske pogoje, kjer smo NEM izpostavili različni temperaturi in času inkubacije (preglednica XV).

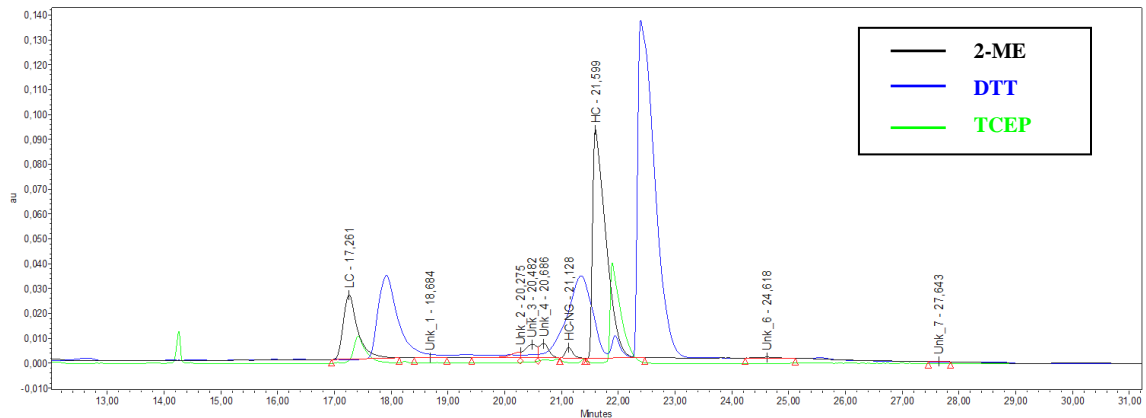
Preglednica XV: Zbrani rezultati pri spreminjanju inkubacijskih pogojih nereducirajoče CE-SDS metode

Oznaka vzorca	% čistosti mAb	% HMW
NEM_70 °C	98,1	0,5
NEM_60 °C	98,0	0,4
NEM_40 °C	98,3	0,6
NEM_10 min_40 °C	97,8	0,6
NEM_5 min_40 °C	97,3	0,7

Pri testiranju različnih temperatur inkubacije vzorca opazimo, da so rezultati zelo primerljivi, ter da višja temperatura tako ne vpliva na inhibicijo vezave SH skupin v disulfide. Tudi čas inkubacije nima vpliva ter je čistost protitelesa primerljiva pri različnih časih inkubacije.

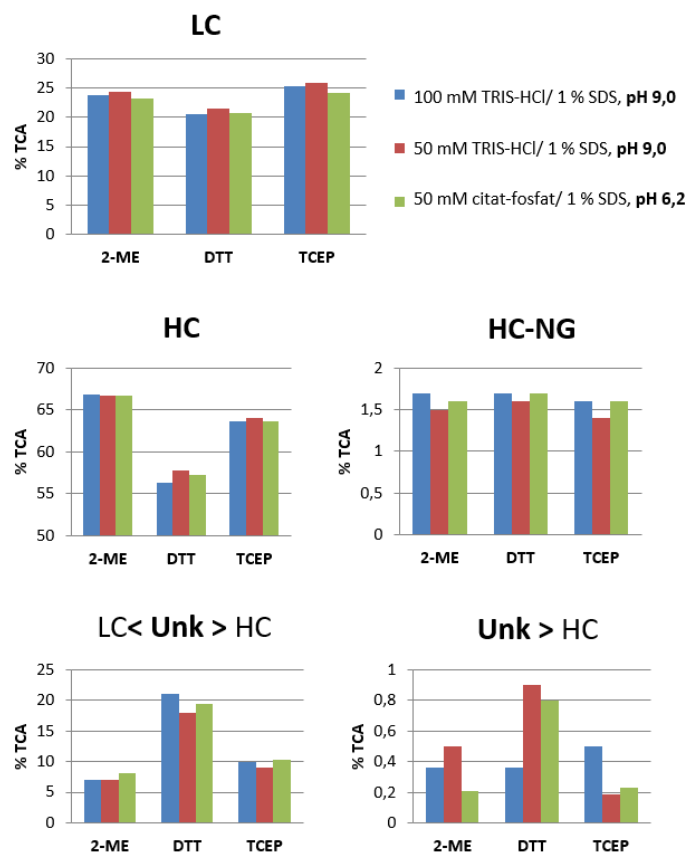
4.4 PRIPRAVA VZORCEV PRI rCE-SDS

Redukcijske pogoje rCE-SDS metode smo proučevali z uporabo treh najbolj pogostih reducentov: 2-merkaptoetanol (2-ME), ditiotreitrol (DTT) in tris (2-karboksietil) fosfin (TCEP). Vsak reducent smo pripravili v treh različnih pufrih različnih koncentracij ter med seboj primerjali rezultate. Pripravili smo vzorce, ki so vsebovali IgG₁ kot aktivno učinkovino. Vzorce z reducenti (2-ME, DTT in TCEP) smo pripravili v 100 mM in 50 mM TRIS/HCl pufru pH 9,0 z 1 % SDS in v 50 mM citrat fosfatnem pufru pH 6,2 z 1 % SDS. Spodnja slika (slika 22) prikazuje primerjavo vrhov pri redukciji protitelesa z vsemi tremi reducenti.



Slika 22: Prikaz vrhov pri različnih reducirajočih pogojih CE-SDS metode

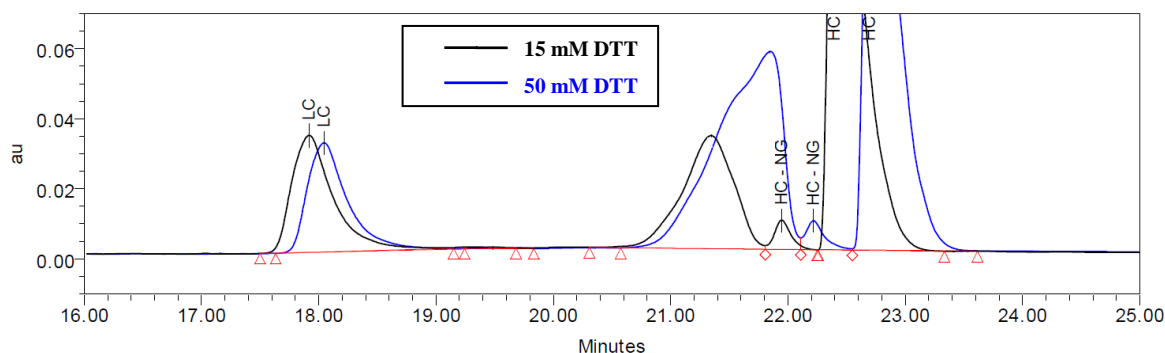
Slika 23 prikazuje grafični prikaz % površine vseh vrhov, ki so se pojavili v elektroferogramu po analizi reduciranega vzorca.



Slika 23: Grafični prikaz % TCA posameznega vrha pri reducirajoči CE-SDS metodi

2-merkaptoetanol (2-ME) je dober reducent, saj se ga uporablja že od samega začetka (od leta 1970), vendar pa ima to slabost, da ima zelo izrazit vonj ter je okolju in zdravju nevaren, zato mora biti delo z njim zelo previdno (49). V primerjavi s pogosto uporabljenim ditioneitolom (DTT), naj bi tudi nepopolno reducirala disulfidne vezi, zaradi njegovega nizkega redukcijskega potenciala (50). Vzorci, ki so bili izpostavljeni 2-ME, so pokazali primerljive rezultate z ostalima dvema reagentoma. pH pufru ni pokazal posebnega vpliva na redukcijo, saj deleži posameznih fragmentov ostajajo primerljivi (slika 23). Zaradi njegovega neprijetnega vonja, smo testirali še druga dva reducenta s katerima bi se temu izognili.

DTT ima večji redukcijski potencial, zato lahko hitro in z večjo učinkovitostjo reducira disulfidne vezi že pri nižjih koncentracijah kot 2-ME (51). Poskus z DTT je pokazal, da reagent dobro reducira disulfidne vezi tako pri pH 9,0, kot pri pH 6,2, saj je bil delež posameznih fragmentov primerljiv (slika 23). Zato lahko trdimo, da je optimalno pH območje v katerem DTT najbolje deluje 7,1-8,0, lahko pa se učinkovito uporablja v območju pH 6,5-9,0 (51). Iz elektroferograma in grafičnega prikaza pa je razvidno, da se pri DTT reducentu poveča delež neznanih vrhov, ter se posledično zmanjša delež LC in HC. Enake zaključke rezultatov smo dobili tudi pri poskusu, kjer smo protitelo reducirali s 15 mM in 50 mM DTT reagentom (slika 24 in preglednica XVI). Pri povečanju koncentracije DTT se je povečal % površine neznanega vrha pred vrhom HC (slika 24), prav tako pa je bil opažen tudi vrh v slepem vzorcu (označeno s puščico na sliki 25).

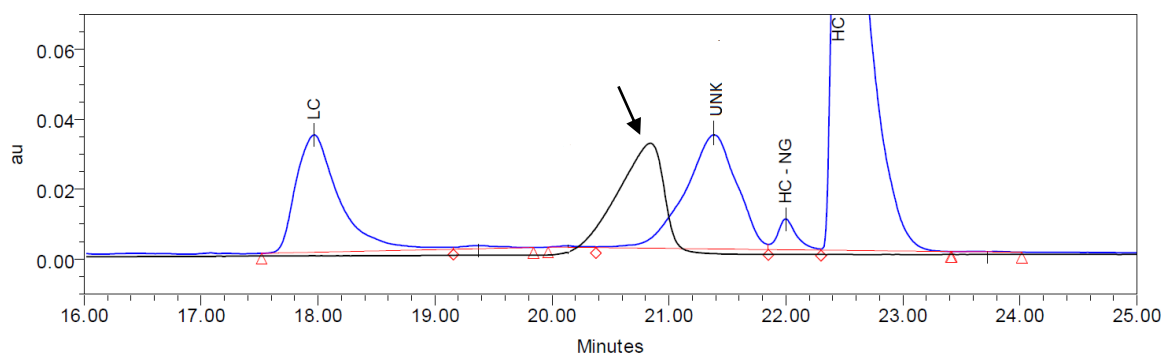


Slika 24: Primerjava vrhov pri redukciji z 15 mM in 50 mM DTT reducentom

Preglednica XVI: % TCA vseh vrhov pri vzorcih z 15 mM in 50 mM DTT reducentom

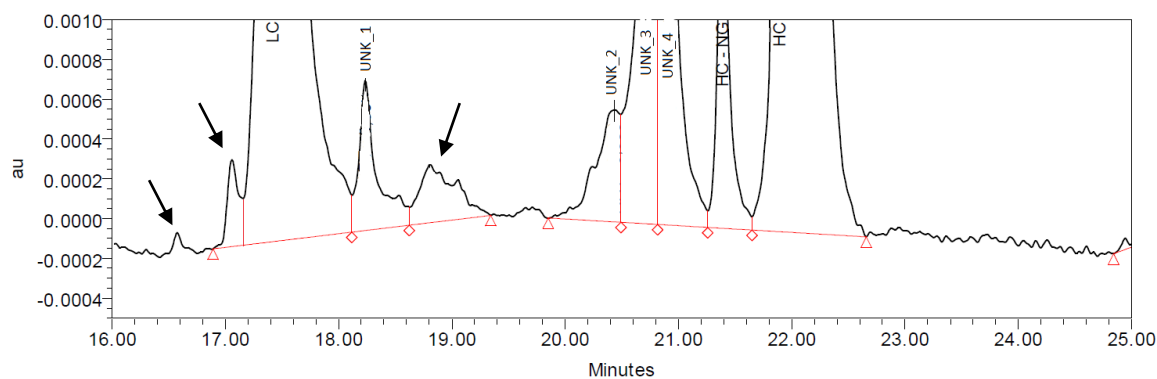
	LC	HC-NG	HC	LC < Unk < HC	Unk > HC
15 mM DTT	20,6	1,7	56,3	20,9	0,4
50 mM DTT	15,8	1,6	43,9	38,4	0,3

Sklepamo lahko, da je pri višji koncentraciji 50 mM DTT prišlo do prebitka reagenta, ki se je absorbiral pri UV valovni dolžini 214 nm (označeno s puščico na sliki 25). Iz literature je razvidno, da ima DTT reagent dobro absorpcijo že pri relativno kratki valovni dolžini okoli 200 nm (52). Oksidirana oblika DTT reagenta pa izraža močan absorpcijski vrh v ultravijoličnem spektru pri 260 nm valovni dolžini (39).



Slika 25: Prikaz vrha v slepem vzorcu (označeno s puščico) v primerjavi z redukcijo s 15 mM DTT reagentom

Kot alternativa DTT reducentu se lahko uporablja tudi tris (2-karboksietil) fosfin (TCEP). Je močan reducent, ki učinkovito in ireverzibilno cepi disulfidne vezi proteina. Za razliko od DTT reagenta je v obliki vodnih raztopin zelo stabilen in deluje v širokem pH območju od 1,5 do 8,5 (53). Iz vidika primerjave, v katerem območju pH učinkovitejše deluje TCEP, so rezultati pokazali najboljše vrednosti pri 50 mM TRIS-HCl/ 1 % SDS pH 9,0 pufri, saj je bil delež neznanih vrhov, ki so se pojavili nekaj minut za HC, najmanjši Slika 23(slika 23). Prav tako TCEP ni stabilen v fosfatnih pufrih (54). V primerjavi z ostalima reducentoma so se v elektroferogramu pri redukciji s TCEP pojavili dodatni vrhovi okoli LC (označeno s puščico na sliki 26). Prišli smo do zaključka, da tudi TCEP reagent ni ustrezen kot reducent pri rCE-SDS metodi protitelesa razreda IgG.



Slika 26: Redukcija protitelesa s TCEP

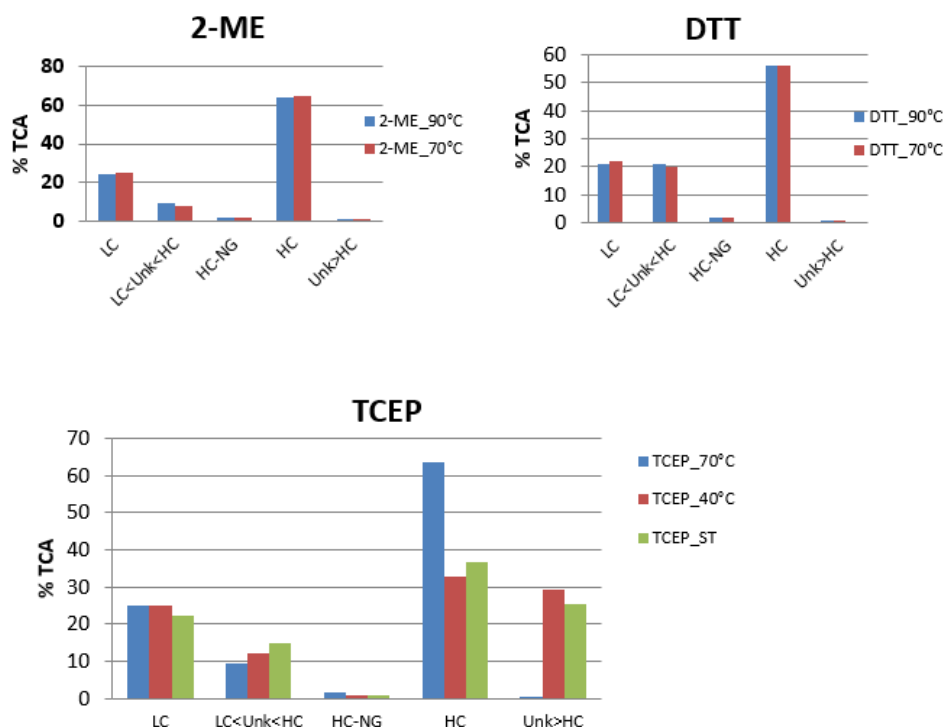
Pri nadaljnjem razvoju priprave vzorcev za rCE-SDS analizo smo optimizirali še pogoje inkubacije. Skušali smo ugotoviti ali so prisotne kakšne razlike, če vzorce inkubiramo v termomomešalu ali v vodni kopeli pri enaki temperaturi (90 °C). Poskus smo izvedli z reducentom DTT na protitelesu IgG₁. Rezultati so prikazani v spodnji preglednici (preglednica XVII).

Preglednica XVII: % TCA vrhov pri eksperimentu inkubacije vzorcev IgG₁ protitelesa

Vzorec	LC	HC-NG	HC	LC< Unk <HC	Unk>HC
15 mM DTT_vodna kopel	20,3	1,8	56,5	21,1	0,34
15 mM DTT_termomešalo	21,1	1,7	55,9	21,0	0,38
50 mM DTT_vodna kopel	15,6	1,6	43,9	38,4	0,5
50 mM DTT_termomešalo	16,6	1,7	43,5	37,8	0,4

Iz preglednice je razvidno, da aparatura ne vpliva na učinkovitost redukcije. Deleži posameznih vrhov so primerljivi med seboj tako pri vodni kopeli kot pri termomešalu. Tudi oblika vrhov na elektroferogramu je bila enaka pri obeh. Ni bilo opaženih nobenih dodatnih vrhov. Zaradi enostavne uporabe je torej bolj primerno termomešalo, kot aparatura za inkubacijo vzorcev. Pri vodni kopeli je potreben daljši čas, da se vzpostavi želena temperatura. Prav tako moramo epice z vzorci predhodno zaščititi s parafilmom, da voda ne prodre v notranjost ter jih namestiti tako, da mora biti celoten vzorec potopljen v vodo. Tudi iz vidika varnosti je termomešalo uporabniku bolj prijazen, saj zaradi vodne pare lahko pride tudi do poškodb.

Spodnja slika (slika 27) podaja grafične rezultate, ki prikazujejo vpliv temperature na redukcijo z izbranimi reducenti.



Slika 27: Grafični prikaz % TCA posameznega vrha pri inkubaciji različnih temperatur vzorca z IgG₁ protitelesom

Iz diagramov lahko vidimo, da testirana temperatura pri 2-ME in DTT nima vpliva na redukcijo, saj so vse vrednosti % TCA posameznih vrhov med seboj primerljive. Pri TCEP reducentu smo testirali tudi nižjo temperaturo, saj naj bi TCEP, kot močan reducent, reagiral že pri sobni temperaturi (54). Pri temperaturi 40 °C in sobni temperaturi je bila redukcija nepopolna, saj smo dobili manjši delež LC in HC kot pri temperaturi 70 °C. Tudi na elektroferogramu so bili vidni vrhovi nekaj minut za HC, ki bi lahko predstavljali celotno nereducirano protitelo.

Pri pripravi vzorcev rCE-SDS metode, lahko zaključimo, da je TCEP reducent kljub številnim dobrim lastnostim (brez vonja, ne oksidira na zraku, deluje v širokem pH območju, irreverzibilno cepi disulfidne vezi, učinkuje že pri sobni temperaturi itd.) v naših poskusih označen kor neprimeren reducent za protitelo IgG₁. Pri DTT reducentu smo skoraj povsod dobili primerljive rezultate kot pri 2-ME, vendar pa ima DTT edino to slabost, da absorbira pri UV valovni dolžini (52). Temu bi se lahko izognili tako, da bi izvedli poskus z manjšo koncentracijo DTT (npr. < 10 mM) ali pa presežek reducenta odstranili s tem namenjenimi tehnikami.

4.5 INSTRUMENTALNE NASTAVITVE

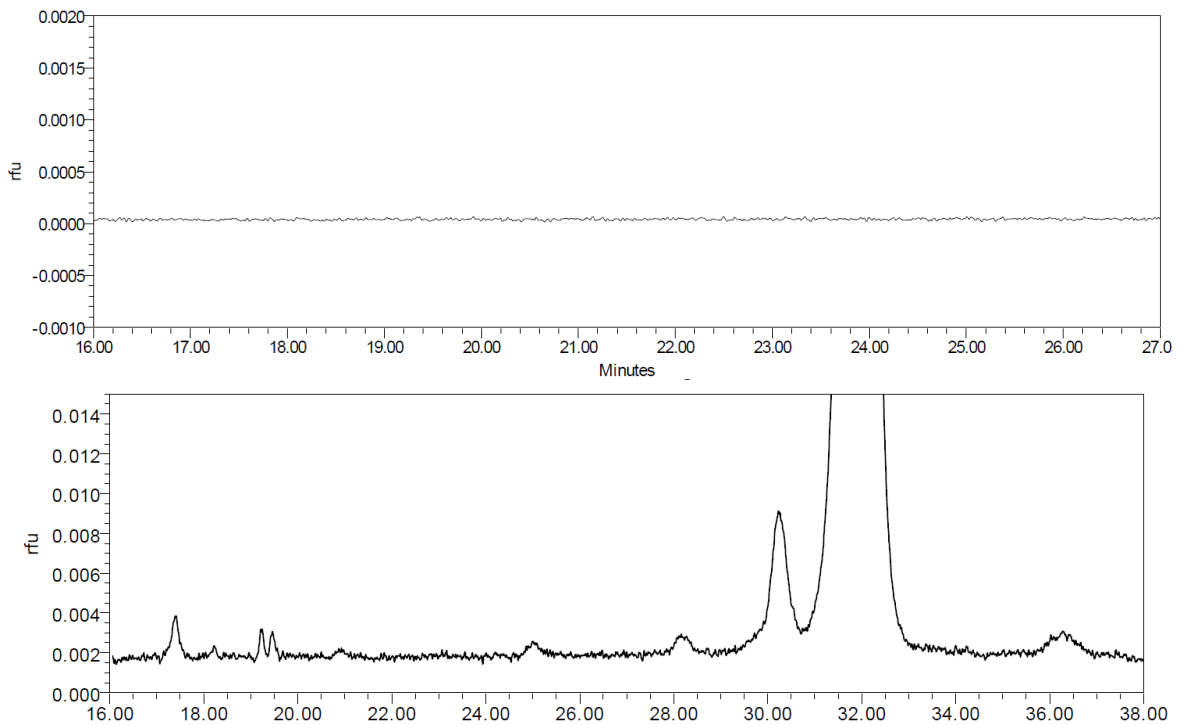
Pri razvoju in optimizaciji instrumentalnih nastavitvev nrCE-SDS in rCE-SDS metode smo kot vzorec uporabili vse tri preiskovane analite: protitelo IgG₁, protitelo IgG₂ in fuzijski protein vezan na Fc domeno protitelesa IgG₁ ter jih tudi vrednotili pri rezultatih. Instrumentalne nastavitve obeh CE-SDS metod smo poskušali določiti tako, da se vsi trije terapevtski proteini merijo in detektirajo hkrati pod istimi pogoji.

4.5.1 Detekcija

Pogosta vrsta detekcije, ki se uporablja pri kapilarni elektroforezi, je UV absorpcija. CE-SDS metodo smo poskušali razviti z LIF detekcijo, saj ima običajna UV detekcija nizko občutljivost zaradi kratke dolžine optične poti preko kapilare (55). LIF detekcija pa omogoča 100 krat večjo občutljivost z manjšo koncentracijo in volumnom vzorca (29).

Tekom priprave vzorcev smo več pozornosti za razvoj in validacijo namenili CE-SDS metodi z UV detekcijo. Eden izmed prvih razlogov je sama priprava vzorcev. LIF detekcija zahteva dolgotrajno (večurno) predpripravo vzorcev (opis v poglavju 3.3.1.1 *Priprava vzorcev za LIF detekcijo*), kjer moramo protitelesa označiti s fluorescenčnim barvilom. Takšna priprava vzorcev ne pride v poštev kot metoda za rutinsko analitsko merjenje terapevtskih proteinov v farmacevtski industriji, saj zahteva dodaten, časovno dolgotrajen korak. Pri razvoju zdravila je cilj, da čim hitreje in zanesljivo pridemo do rezultatov, pri tem pa še vedno zagotavljamo kakovosten in varen produkt.

Naslednja ovira pri uporabi je bila, da po večkratnih poskusih povezave LIF detektorja z računalniškim sistemom, ga ta ni zaznal in ni bilo mogoče analizirati naših vzorcev. Beckman Coulter sistem podpira računalniški program Karat 32. Zaradi uporabe drugačnega računalniškega sistema Empower je potrebna kalibracija LIF detektorja pred vsako analizo, kar pa predstavlja večjo časovno pripravo celotne analize. Pri uspeli vzpostavitvi povezave med detektorjem in računalniškim sistemom smo večkrat dobili elektroferogram, kjer ni bilo opaženih nobenih vrhov (slika 28 zgoraj).



Slika 28: Prikaz neuspele (zgoraj) in uspele (spodaj) detekcije protitelesa IgG₁ z lasersko inducirano fluorescenco

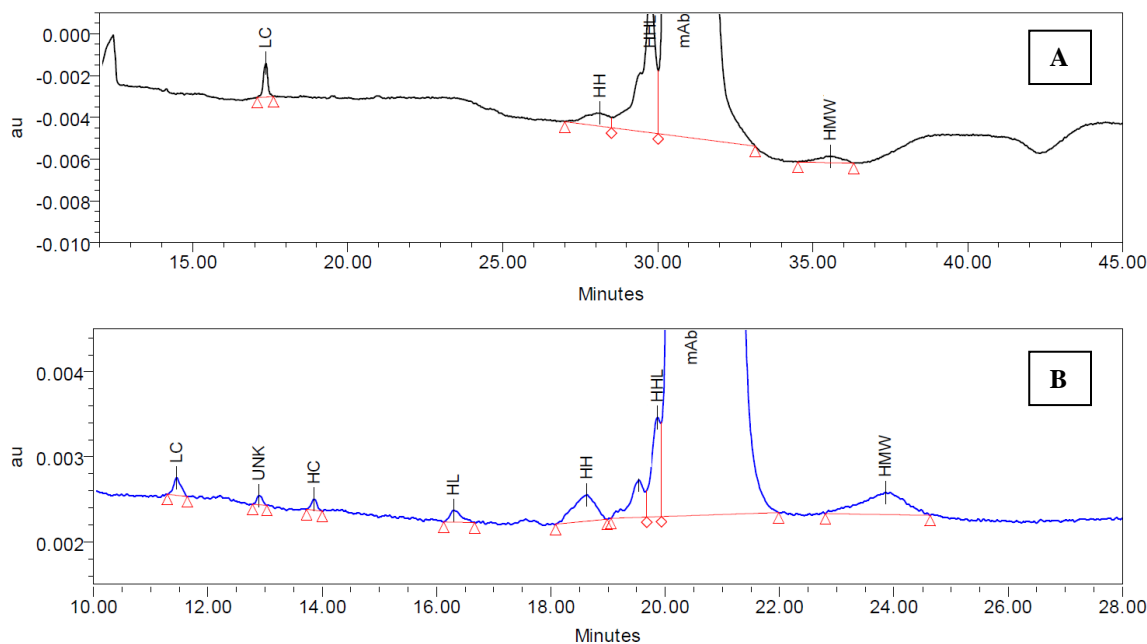
Eden izmed možnih dejavnikov, ki bi lahko vplivali, da na elektroferogramu ni bilo vidnih vrhov, je neuspešno obarvanje protitelesa (23). Molekule proteina imajo številna mesta, ki lahko z različnimi stopnjami reagirajo s fluorescentnim barvilom. Pri barvanju tako lahko dobimo zmes vzorca, kjer so proteini popolnoma ali delno označeni ali pa do obarvanja sploh ni prišlo. LIF detektor ne zazna proteine, tako pa posledično ne vidimo vrhov v elektroferogramu (23).

Kljub težavam pa nam je uspelo, da je analiza z LIF detektorjem potekla do konca (slika 28 spodaj). Dobili smo primerljive elektroferograme in rezultate % TCA posameznih vrhov tako pri nrCE-SDS kot pri rCE-SDS v primerjavi z UV detekcijo. Tako lahko potrdimo, da je LIF detektor res bolj občutljiv in zazna proteine v veliko manjši koncentraciji kot UV detektor.

Vendar pa bi LIF detekcija povzročila dolgotrajno pripravo vzorcev, težavno in uporabniku nepraktično instalacijo detektorja, vsakodnevno kalibracijo detektorja ter posledično tako povzročila preveč napak, zato smo eksperimente s to detekcijo opustili in vzorce analizirali z UV absorpcijo.

4.5.2 Polarnost metode in mesto injiciranja

Pri razvoju metode je ločevanje analitov potekalo z normalno polarnostjo elektroforeze, kjer apliciramo električni tok od anode proti katodi. Vzorce smo injicirali iz obeh strani kapilare: injiciranje iz »inlet« strani kapilare predstavlja elektroferogram A na sliki 29, injiciranje iz »outlet« strani kapilare pa elektroferogram B na sliki 29.



Slika 29: Prikaz vrhov protitelesa IgG₂ pri injiciranju iz »inlet« strani (A) in injiciranju »outlet« strani kapilare (B) pri nrCE-SDS metodi

Parametra, ki smo ju spremljali pri metodi, sta bila resolucija ter razmerje med signalom in šumom (s/n). Rezultati so prikazani v preglednici XVIII.

Preglednica XVIII: Zbrani rezultati protitelesa IgG₂ pri optimizaciji mesta injiciranja

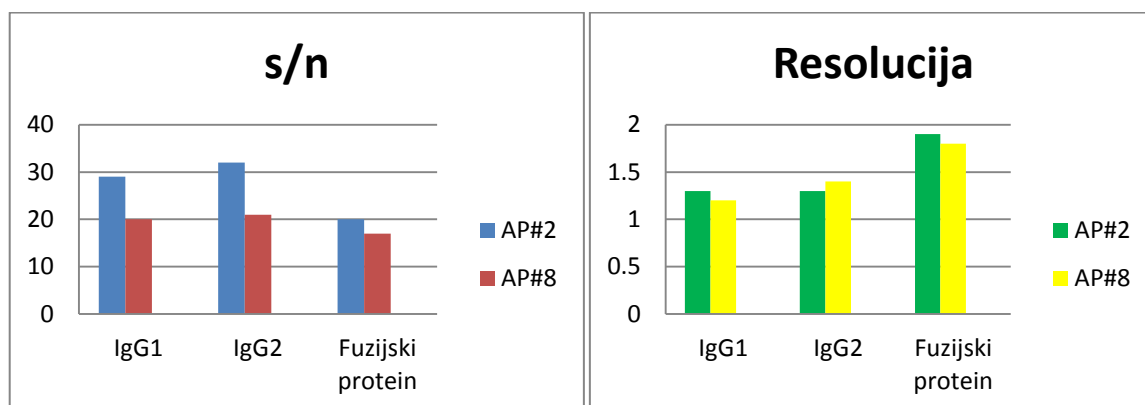
Vzorec	s/n nrCE-SDS	s/n rCE-SDS	Resolucija nrCE-SDS	Resolucija rCE-SDS
IgG ₂ _inlet	32	29	0,9	1,4
IgG ₂ _outlet	41	53	1,0	1,0

Iz zgornjega elektroferograma (slika 29) je razvidno, da dobimo bolj stabilno bazno linijo pri injiciranju iz »outlet« strani kapilare, kjer vzorec prepotuje krajšo pot do detektorja. Stabilna oz. bolj ravna bazna linija nam olajša integracijo vrhov, posledično pa vpliva na

večje razmerje med vrhom in šumom (s/n). Zaradi krajše poti potovanja protitelesa je lahko verjetnost, da se protitelo ne bo v celoti ločilo in na elektroferogramu ne bo vidnih vseh vrhov. Naše protitelo se je v celoti ločilo iz kapilare ter so vidni vsi vrhovi na elektroferogramu. Prav tako zaradi krajše poti vzorca do detektorja (10 cm) ohranimo krajši čas celotne analize. Nekoliko se je zmanjšala resolucija med HHL in glavnim vrhom (elektroferogram B na sliki 29), vendar nima velikega vpliva na končne rezultate. Zaradi bolj stabilne bazne linije je integracija vrhov lažja in bolj točna. Rezultati so pokazali ustrezno ter zadovoljivo resolucijo (preglednica XVIII).

4.5.3 Velikost detekcijskega okna

Pri testiranju različne vrste detekcijskega okna smo naredili poskuse samo pri nereducirajoči CE-SDS metodi ter prevzeli rezultate tudi za reducirajočo CE-SDS metodo. Uporabili smo nastavek z velikostjo detekcijskega okna 100 x 200 μm ter primerjali rezultate z velikostjo 100 x 800 μm . Želeli smo preveriti, kakšno razmerje s/n dobimo, če menjamo velikost detekcijskega okna (slika 30).



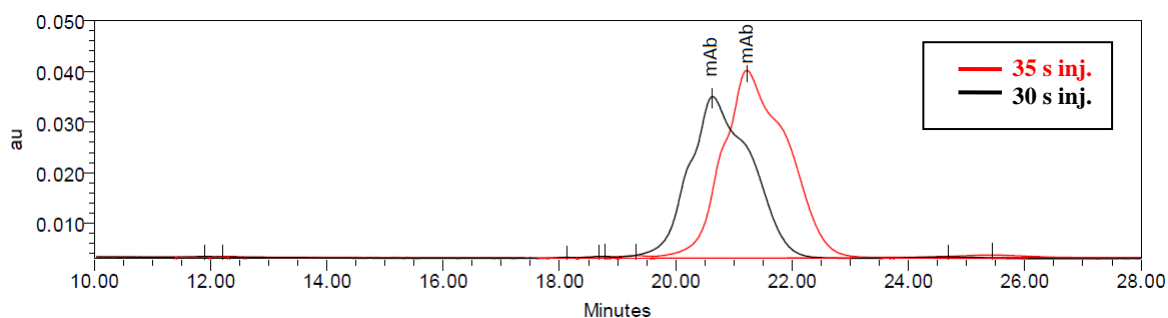
Slika 30: Prikaz rezultatov vseh terapevtskih proteinov pri primerjavi različne velikosti detekcijskega okna

V želji, da bo večja velikost detekcijskega okna povečala razmerje med signalom in šumom, rezultata z velikostjo 100 x 800 μm detekcijskega okna nismo uspeli izboljšati. Prav tako je bila resolucija elektroferograma boljša pri manjši velikosti detekcijskega okna. Tako smo se odločili uporabljati nastavek za detekcijsko okno velikosti 100 x 200 μm pri nrCE-SDS in rCE-SDS metodi, saj se lahko uporablja ista kapilara pri analizi z obema metodama.

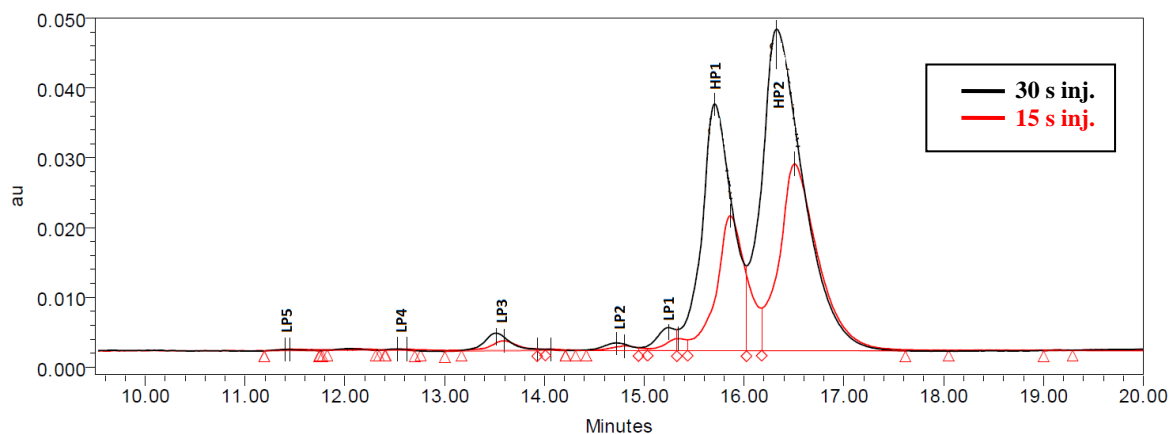
4.5.4 Napetost in čas injiciranja

Pri optimizaciji instrumentalnih nastavitvev CE-SDS metode smo poskušali najti čim boljši kompromis med izbiro napetosti in časa injiciranja vzorca za vse tri preiskovane analite.

Pri obeh metodah smo spreminjali napetost in čas injiciranja. Pri povečanju obeh parametrov se površina pod krivuljo vrha poveča ter dobimo večji odziv na elektroferogramu. To prikazujeta sliki 31 in 32 na primeru elektroferograma fuzijskega proteina. Pri spreminjanju parametrov smo spremljali % TCA vrednosti, vizualni pregled in ustrezno ločbo vrhov.



Slika 31: Prikaz primerjave različnega časa injiciranja fuzijskega proteina pri nereducirajočih pogojih CE-SDS metode



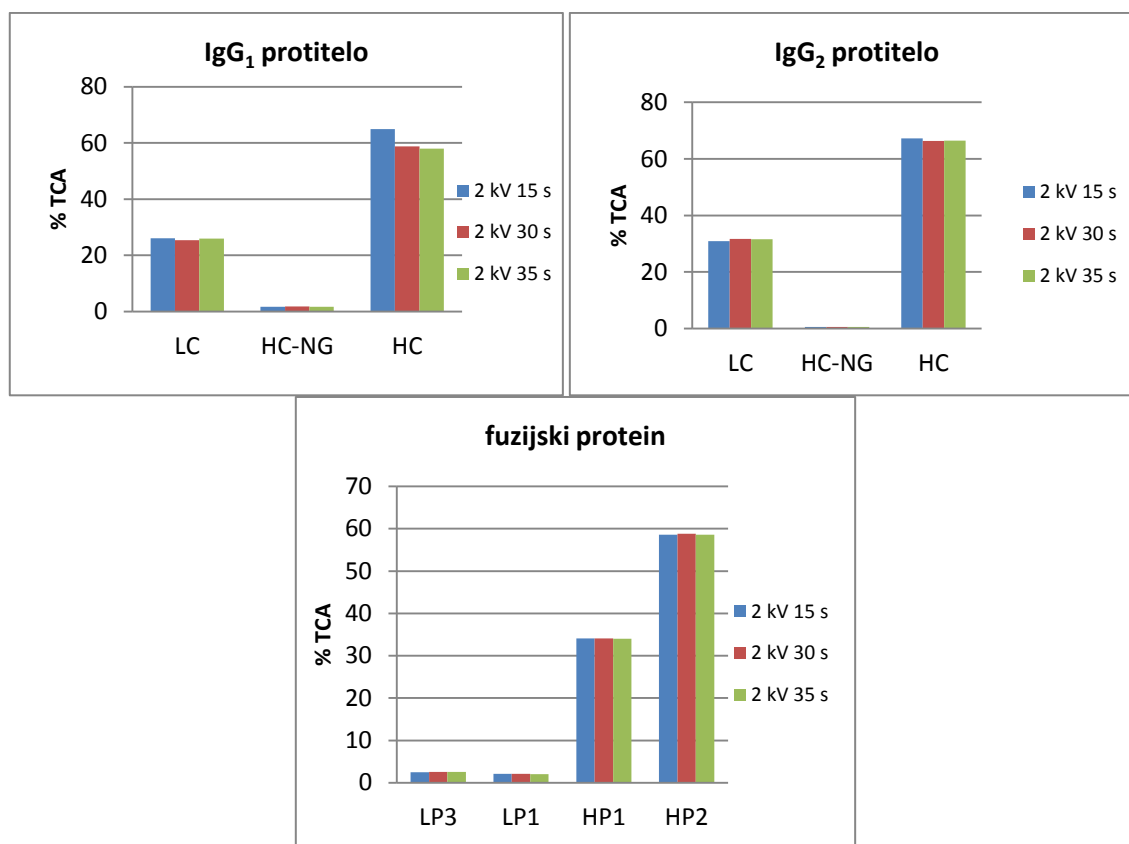
Slika 32: Prikaz primerjave različnega časa injiciranja fuzijskega proteina pri reducirajočih pogojih CE-SDS metode

Pri povečevanju napetosti injiciranja so rezultati pokazali primerljive vrednosti % čistosti pri vsakem od proteinov. Prišlo pa je do slabše ločljivosti med vrhovi pri apliciranju z

napetostjo 5 kV zaradi "overload-a" vzorca, zato smo spreminjali čas injiciranja pri napetosti 2 kV pri obeh CE-SDS metodah (preglednica XIX in slika 33).

Preglednica XIX: Primerjava % čistosti vseh treh terapevtskih proteinov pri različnem času injiciranja nereducirajoče CE-SDS metode

% čistosti mAb			
	2 kV 15 s	2 kV 30 s	2 kV 35 s
IgG₁	95,7	96,4	95,8
IgG₂	98,5	98,5	98,4
fuzijski protein	97,6	97,8	97,9



Slika 33: Grafična primerjava % TCA vrhov pri vseh treh terapevtskih proteinih pri različnem času injiciranja reducirajoče CE-SDS metode

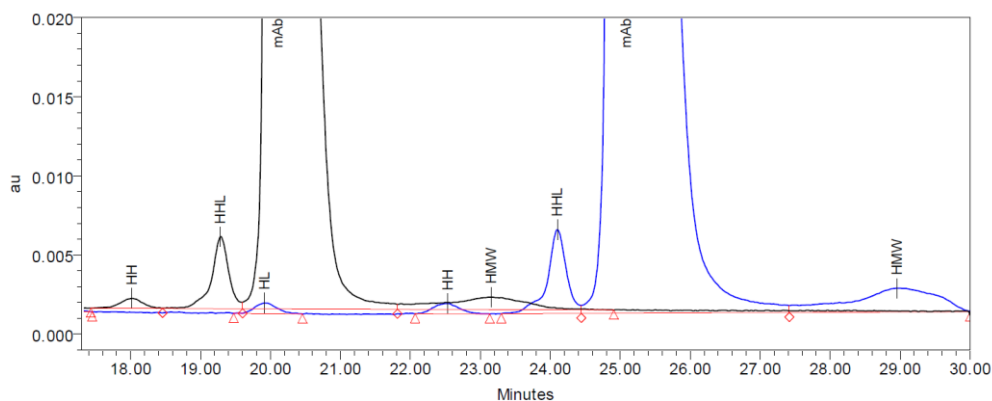
Iz preglednice XIX je razvidno, da dobimo pri vseh treh analitih primerljive rezultate. Pri fuzijskem proteinu zelo težko določimo resolucijo, saj imajo manjši vrhovi preveč nizek odziv in na elektroferogramu vidimo skoraj samo glavni vrh (slika 31). Zato smo predpostavili, da je najboljši kompromis med analiti, injiciranje vzorca z napetostjo 2 kV 35 sekund pri nrCE-SDS metodi.

Rezultati pri nrCE-SDS metodi (slika 33) so bili tudi zelo primerljivi, vendar nekoliko boljši, ko smo injicirali v krajšem času. Čeprav težav z resolucijo pri reducirajoči CE-SDS metodi nismo imeli, je bil najboljši kompromis med vsemi analiti 30 sekundno injiciranje z napetostjo 2 kV.

4.5.5 Napetost in čas separacije

Kot zadnji parameter pri instrumentalnih nastavitvah smo optimizirali napetost in čas separacije vzorca glede na vsa tri protitelesa hkrati. Povečevali smo napetost separacije, kjer smo izbrali napetost 5 kV, 10 kV ter 12 kV, pri tem pa prilagajali čas potovanja vzorca skozi kapilaro. Spremljali smo % TCA vrednosti vrhov, vizualni pregled in ustrezno ločbo vrhov. Elucija vzorca je bila hitrejša pri injiciranju z višjo napetostjo. Na elektroferogramu to vidimo kot zamik migracijskega časa v levo (slika 34).

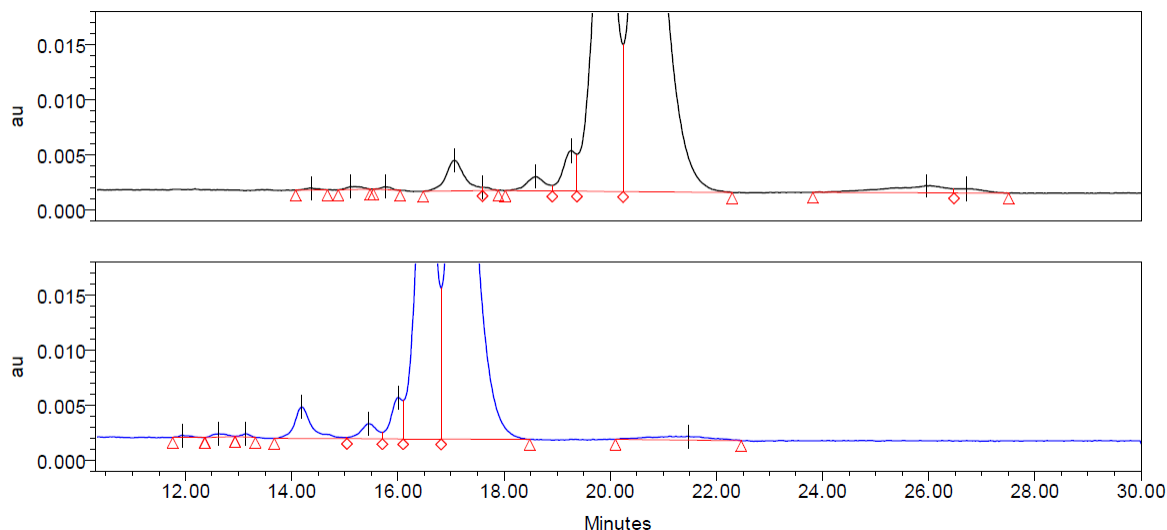
Pri nrCE-SDS metodi smo vzorec separirali 30 minut z napetostjo 5 kV, 10 kV ter 12 kV. Pri napetosti 5 kV ni bilo opaženih nobenih vrhov pri fuzijskem proteinu oz. opažen je bil samo začetek elektroferograma pri IgG vzorcih. Vzorci se niso eluirali v celoti, separacija ni potekla do konca zaradi prekratkega časa. Pri napetosti 10 kV so se vzorci počasi eluirali, zato na elektroferogramu ne vidimo HMW vrhov za glavnim vrhom.



Slika 34: Primerjava vrhov pri različni napetosti separacije protitelesa IgG₁ pri nereducirajoči CE-SDS metodi

Pri separaciji z 12 kV 30 minut vidimo celotne elektroferograme z zadovoljivo resolucijo in primerljivimi rezultati % čistosti mAb, kot v prejšnjih analizah. Najbolj primerni pogoji separacije nrCE-SDS metode za vse tri analite je 30 minutna separacija pri 12 kV napetosti.

Pri rCE-SDS metodi smo prav tako izbrali napetost 5 kV, 10 kV in 12 kV pri 40 minutnem času separacije. Pri separaciji z napetostjo 5 kV in 40 minut se vzorci niso eluirali do konca, zato ne vidimo celotnega elektroferograma. Slika 35 prikazuje elektroferogram, kjer smo primerjali vrhove fuzijskega proteina pri 40 minutni separaciji z napetostjo 10 kV in 30 minutno separacijo z napetostjo 12 kV.



Slika 35: Primerjava vrhov pri različni napetosti separacije fuzijskega proteina pri reducirajoči CE-SDS metodi

IgG₁ in IgG₂ protitelesa sta se pri separaciji z napetostjo 12 kV prehitro eluirala in s tem so se vrhovi slabo ločili med seboj, medtem ko smo pri fuzijskem proteinu dobili ustrezno in zadovoljivo ločbo vrhov. Namen našega razvoja metode je, da dosežemo takšno napetost in čas separacije, pri katerem se bojo vsi trije analiti separirali z istimi nastavitvami. Zato smo privzeli 10 kV separacijo, ki je ustrezna za vse tri preiskovane analite. Z namenom optimizacije metode smo pri isti napetosti testirali krajši čas separacije (30 minut namesto 40 minut). Pokazali smo, da se vsi vzorci eluirajo skozi kapilaro pri 30 minutni separaciji. Dobili smo zadovoljive in primerljive vrednosti % TCA vrhov, ustrezno resolucijo ter obliko elektroferograma.

4.6 VALIDACIJA CE-SDS METODE

Namen validacije je dokazati, da metoda ustreza njenemu namenu in daje točne ter ponovljive rezultate. Validacijo CE-SDS metode smo določali samo na IgG₂ protitelesu.

Vsi predpisani kriteriji so bili povzeti po internem Novartisovem postopku, kjer so združene vse zahteve različnih organizacij (ICH in FDA smernice, Evropska in Ameriška farmakopeja). Prav tako smo se orientirali po validacijskem postopku Agilent Technologies, kjer so prav tako zbrana priporočila in kriteriji (56).

4.6.1 Linearnost in točnost

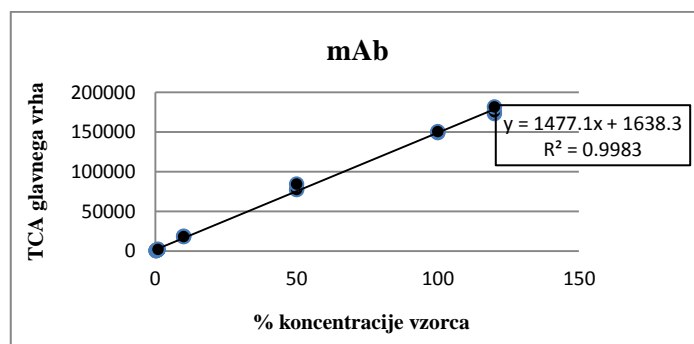
Z meritvijo sedmih različnih koncentracij preiskovanega analita smo poskušali dokazati linearnost in točnost CE-SDS metode.

Kriteriji, ki potrjujejo lineranost metode, predpisujejo, da mora biti absolutna vrednost y-presečišča premice $\leq 5\%$ od izračunane vrednosti za nominalno koncentracijo (100%) ter korelacijski koeficient $R \geq 0,98$. Da potrdimo točnost CE-SDS metode, pa morajo rezultati ustrezati kriteriju: presečišče premice z y-osjo $\leq 1\%$.

Preglednica XX prikazuje povprečje TCA glavnega vrha vseh treh meritev vsake od koncentracij pri nrCE-SDS metodi. Grafično linearno odvisnost prikazuje slika 36, kjer y os predstavlja površino glavnega vrha, x os pa % koncentracije vzorca.

Preglednica XX: Povprečje TCA glavnega vrha protitelesa IgG2pri nereducirajoči CE-SDS metodi

Koncentracija vzorca (%)	Povprečje TCA glavnega vrha
0.3	507
0.6	1114
1.0	1850
10	18274
50	79703
100	149726
120	176683

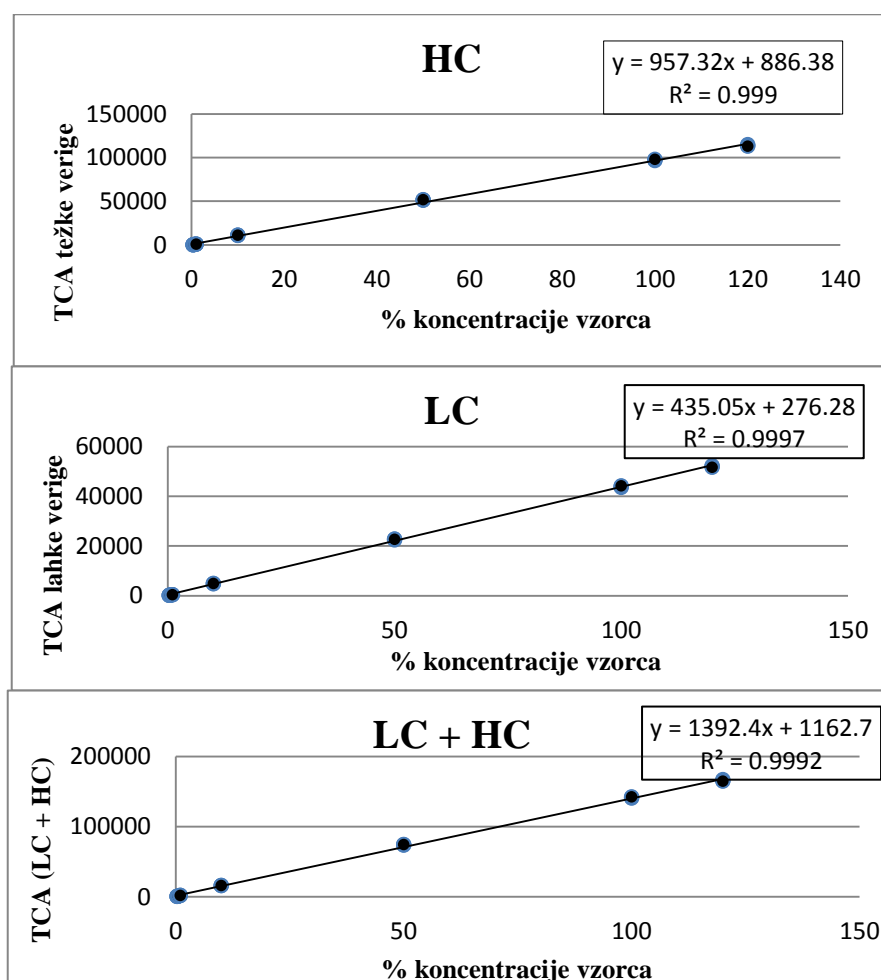


Slika 36: Linearna odvisnost med površino vrhov in koncentracijo vzorca pri nereducirajoči CE-SDS metodi

Preglednica XXI in slika 37 prikazujeta rezultate pri določanju linearnosti rCE-SDS metode.

Preglednica XXI: Povprečje TCA težke in lahke verige protitelesa IgG2ter njune vsote pri rCE-SDS metodi

Koncentracija vzorca (%)	Povprečje TCA		
	HC	LC	Vsota LC in HC
0.3	328	152	480
0.6	670	297	967
1.0	1131	520	1651
10	11146	4936	16082
50	51452	22670	74122
100	97479	43930	141409
120	113927	52070	165997



Slika 37: Linearna odvisnost med površino vrhov in koncentracijo vzorca pri rCE-SDS metodi

V preglednicah XXII in XXIII so zbrani rezultati in parametri, ki so pomembni, da lahko potrdimo linearnost in točnost metode.

Preglednica XXII: Zbrani rezultati linearne regresije protitelesa IgG₂ pri nereducirajoči CE-SDS metodi

	Vrednost	kriterij sprejemljivosti	ustreznost
Korelacijski koeficient	0,998	$R \geq 0,98$	DA
Izračunano presečišče z y-osjo	1 %	$\leq 5 \%$ za linearnost metode $\leq 1 \%$ za točnost metode	DA DA
Presečišče z y osjo*	1638	/	/
Naklon krivulje*	1477	/	/

* Vrednosti so prepisane iz enačbe na sliki 36.

Preglednica XXIII: Zbrani rezultati linearne regresije protitelesa IgG₂ pri reducirajoči CE-SDS metodi

	vrednost	kriterij sprejemljivosti	ustreznost
STATISTIČNI PODATKI ZA TEŽKO VERIGO			
Korelacijski koeficient	0,999	$R \geq 0,98$	DA
Izračunano presečišče z y-osjo	0,9 %	$\leq 5 \%$ za linearnost metode $\leq 1 \%$ za točnost metode	DA
Presečišče z y osjo*	886,3	/	/
Naklon krivulje*	957,3	/	/
STATISTIČNI PODATKI ZA LAHKO VERIGO			
Korelacijski koeficient	0,999	$R \geq 0,98$	DA
Izračunano presečišče z y-osjo	0,6 %	$\leq 5 \%$ za linearnost metode $\leq 1 \%$ za točnost metode	DA
Presečišče z y osjo*	276,2	/	/
Naklon krivulje*	435,0	/	/
STATISTIČNI PODATKI VSOTE LAHKE IN TEŽKE VERIGE			
Korelacijski koeficient	0,999	$R \geq 0,98$	DA
Izračunano presečišče z y-osjo	0,9 %	$\leq 5 \%$ za linearnost metode $\leq 1 \%$ za točnost metode	DA
Presečišče z y osjo*	1162	/	/
Naklon krivulje*	1392	/	/

* Vrednosti so prepisane iz enačbe na sliki 37.

Iz preglednic je razvidno, da so rezultati pokazali linearnost in točnost reducirajoče in nereducirajoče CE-SDS metode. Vrednosti vseh rezultatov so znotraj predpisanih kriterijev. S tem smo potrdili, da metodi dajeta točne in ponovljive rezultate.

4.6.2 Meja zaznavnosti in meja določljivosti

Za določitev meje zaznavnosti (LOD) smo pripravili 0,1 %, 0,3 % in 0,5 % nominalne koncentracije (1,0 mg/mL) raztopine IgG₂ protitelesa pri reducirajočih in nereducirajočih

pogojih. Kriteriji za določljivost LOD vrednosti za CE-SDS metodo predpisujejo, da LOD vrednost lahko določimo po potrebi, zato smo LOD vrednost samo vizualno ocenili ter upoštevali kriterij $s/n \geq 3:1$.

Pri vseh koncentracijah je bil na elektroferogramu opažen glavni vrh (nrCE-SDS) ter lahka in težka veriga pri rCE-SDS metodi. Prav tako so vse tri koncentracije dosegle kriterij $s/n \geq 3:1$. Naša vrednost za LOD tako znaša 0,1 % nominalne koncentracije (1,0 mg/mL).

Za določitev meje določljivosti (LOQ) pa smo izhajali iz predhodnega eksperimenta za linearnost (4.6.1. Linearnost in točnost). Iz eksperimenta smo vizualno ter glede na kriterij $s/n \geq 10:1$, določili LOQ vrednost. Da bi se prepričali, če manjše koncentracije prav tako dosegajo predpisan kriterij, smo še pripravili in injicirali 0,1 % raztopino protitelesa. Omenjena koncentracija ni dosegala kriterija $s/n \geq 10:1$, zato smo se odločili, da upoštevamo 0,3 % nominalne koncentracije za LOQ vrednost.

Določeno vrednost LOQ smo preverili tako, da smo pripravili 6 redčitev 0,3 % raztopin ter vsako enkrat injicirali z namenom, da dokažemo ponovljivost LOQ vrednosti. Kriterij določa, da mora biti $RSD \leq 30\%$ ter vrednost $s/n \geq 10:1$. Preglednica XXIV prikazuje rezultate s/n in površine pod krivuljo vsake priprave LOQ raztopine.

Preglednica XXIV: Rezultati natančnosti LOQ vrednosti

Vzorec	s/n (nrCE-SDS)	TCA (mAb) (nrCE-SDS)	s/n (rCE-SDS)	TCA(HC) (rCE-SDS)	TCA (LC) (rCE-SDS)
LOQ_1	17	310	49	159	334
LOQ_2	18	300	50	180	352
LOQ_3	13	325	49	164	353
LOQ_4	14	309	45	184	338
LOQ_5	13	317	46	191	327
LOQ_6	15	331	44	157	350
RSD (%)	/	3,6	/	8,3	3,2
Ustreznost	DA	DA	DA	DA	DA

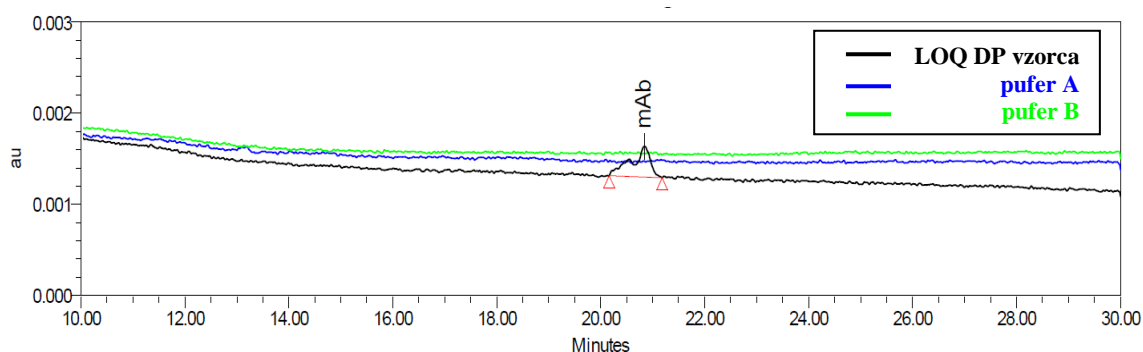
Iz preglednice je razvidno, da vse raztopine ustrezajo predpisanim kriterijem. Tako lahko za obe CE-SDS metodi potrdimo mejo določljivosti (0,003 mg/mL), ki jo metoda še zazna in s katero lahko kvantitativno ovrednotimo naše protitelo.

4.6.3 Specifičnost

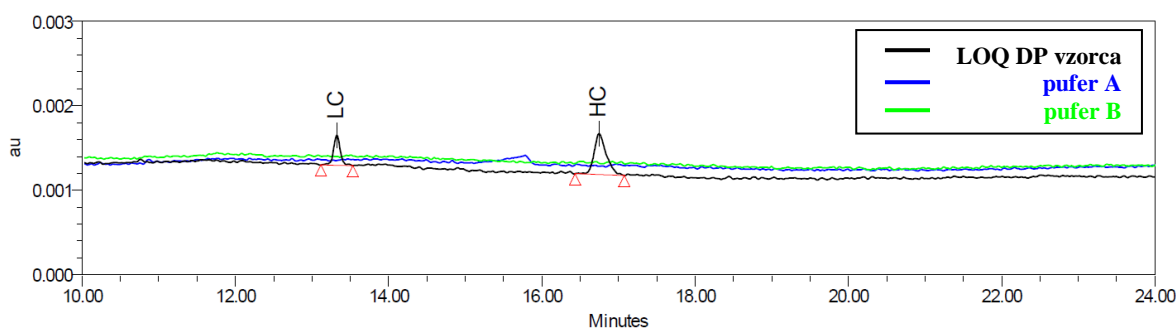
Za dokazovanje specifičnosti CE-SDS metode smo analizirali nativno protitelo IgG₁ skupaj s formulacijsko obliko protitelesa in stresnega vzorca, da bi dokazali ali je metoda sposobna ločevanja razgradnih produktov od glavnega vrha. Prav tako smo v analizo vključili obliki placebo pufra (pufer A in B), da bi potrdili odsotnost nečistot, ki bi lahko vplivale na končni rezultat glavnega vrha.

Kriterij za potrditev specifičnosti CE-SDS metode navaja vizualni pregled vrhov, ki se morajo razlikovati med nativnim in stresnim vzorcem, brez motenj vrhov iz placebo vzorcev. V obeh placebo pufrih prav tako ne sme biti prisotnih nobenih vrhov oz. vrhovi ne smejo biti večji od LOQ vrha.

Sliki 38 in 39 prikazujeta primerjavo elektroferogramov placebo pufera A in pufera B ter LOQ vzorca.



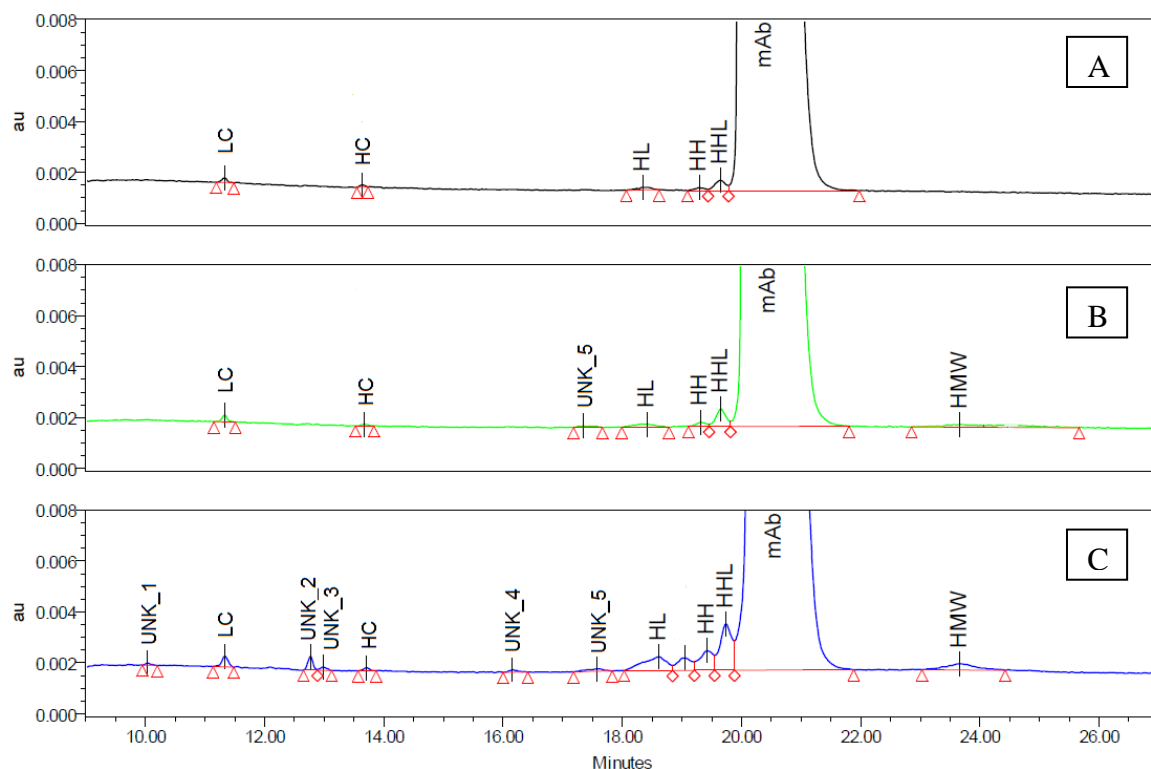
Slika 38: Prikaz elektroferograma različnih pufrov in LOQ koncentracije IgG₂ protitelesa pri nereducirajoči CE-SDS metodi



Slika 39: Prikaz elektroferograma različnih pufrov in LOQ koncentracije IgG₂ protitelesa pri reducirajoči CE-SDS metodi

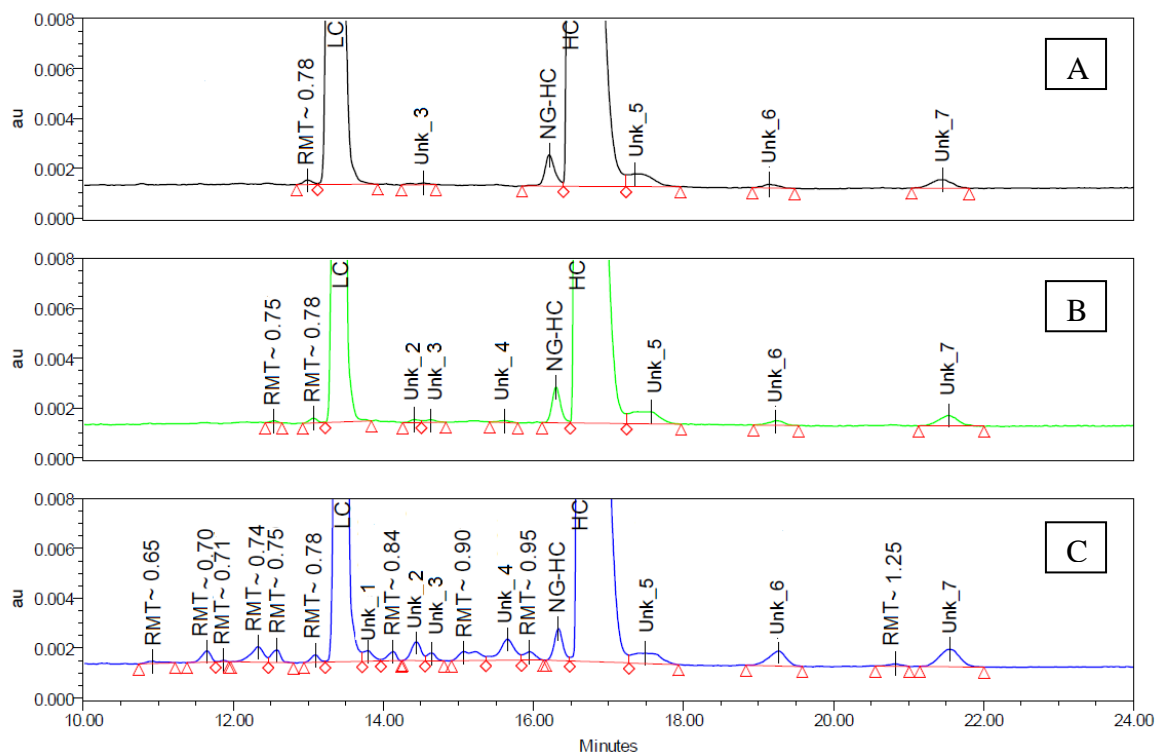
Iz zgornjih slik (slika 38 in 39) je razvidno, da pufera ne vsebujeta nečistot ali drugih snovi, ki bi lahko interferirale ter vplivale na rezultate preiskovanega analita in povečali površino pod krivuljo glavnega vrha.

Slika 40 prikazuje monoklonsko protitelo IgG₂ kot učinkovino (elektroferogram A), kot formulacijsko obliko (elektroferogram B) in kot stresni vzorec (elektroferogram C) pri CE-SDS metodi v nereducirajočih pogojih.



Slika 40: Prikaz elektroferograma IgG₂ protitelesa kot DS vzorca (A), DP vzorca (B) in stresnega vzorca (C) pri nereducirajoči CE-SDS metodi

Slika 41 prikazuje monoklonsko protitelo IgG₂ kot učinkovino (elektroferogram A), kot formulacijsko obliko (elektroferogram B) in kot stresni vzorec (elektroferogram C) pri CE-SDS metodi v reducirajočih pogojih. Pri reducirajoči CE-SDS metodi so se pri DP in stresnem vzorcu pojavili dodatni vrhovi, ki smo jih naknadno poimenovali kot RMT vrhovi.



Slika 41: Prikaz elektroferograma IgG₂ protitelesa kot DS vzorca (A), DP vzorca (B) in stresnega vzorca (C) pri reducirajoči CE-SDS metodi

Iz prikazanih slik (slika 40 in 41) je razvidno, da obe metodi, nrCE-SDS in rCE-SDS, ločita in zaznata razpadne produkte pri stresnem vzorcu. Opazne so razlike v obliki in številu vrhov stresnega vzorca. Metodi podajata ustrezno ločbo med komponentami, tako da lahko potrdimo specifičnost nrCE-SDS in rCE-SDS metode.

4.6.4 Natančnost

Natančnost metod smo ovrednotili s testiranjem ponovljivosti in rigidnosti.

Pri določevanju ponovljivosti CE-SDS metode smo analizirali nativno protitelo IgG₂ skupaj s formulacijsko obliko protitelesa in stresnim vzorcem. Vsak vzorec smo pripravili s šestimi ponovitvami ter enkratnim injiciranjem.

Kriterij sprejemljivosti navaja, da morajo vrhovi s % TCA < 0,5 %, dosežati RSD ≤ 40 %, za vrhove z ≥ 5 % TCA vrednosti, je kriterij za RSD ≤ 17 %. Pri nrCE-SDS metodi za glavni vrh (mAb) upoštevamo kriterij, kjer mora biti RSD ≤ 5 %.

Ponovljivost CE-SDS metode v nereducirajočih pogojih

Preglednice XXV, XXVI ter XXVII prikazujejo zbrane rezultate ponovljivosti nereducirajoče CE-SDS metode in izračune povprečne vrednosti ter RSD posameznega vrha, ki ima %TCA $\geq 0,3$ %. Preglednice se nahajajo v Prilogi A

Pri vseh vzorcih iz preglednic XXV, XXVI, XXVII vidimo, da so rezultati RSD znotraj predpisanih mej. Zato lahko potrdimo ponovljivost CE-SDS metode v nereducirajočih pogojih.

Ponovljivost CE-SDS metode v reducirajočih pogojih

Preglednice XXVIII, XXIX in XXX prikazujejo zbrane rezultate in izračune CE-SDS metode v reducirajočih pogojih za vrhove, ki so imeli $\geq 0,3\%$ TCA vrednosti. Pri tej metodi so kriteriji sprejemljivosti za ponovljivost metode enaki kot pri nrCE-SDS metodi. Preglednice se nahajajo v Prilogi B.

Tudi pri reducirajoči CE-SDS metodi vidimo razliko v številu in velikosti posameznih vrhov pri DS in stresnemu vzorcu. Metoda ustrezno in nedvoumno loči različne vzorce. Rezultati v preglednicah XXVIII, XXIX in XXX ustrezajo kriterijem za ponovljivost metode, zato lahko potrdimo ponovljivost CE-SDS metode v reducirajočih pogojih.

Rigidnost CE-SDS metode v nereducirajočih in reducirajočih pogojih

V sklopu natančnosti pa smo testirali tudi rigidnost, kjer smo enako analizo ponovili z drugim operaterjem, na drugi dan in drugem CE instrumentu.

Vrhove, ki imajo vrednost TCA $\leq 0,5$ % oz. $> 0,5$ % - $2,0$ %, ovrednotimo z absolutno razliko (enačba 5). Dovoljeno odstopanje rezultatov je lahko $\leq 0,2$ %. Za vrhove, ki imajo $\geq 2,0\%$ TCA ovrednotimo z relativno razliko (enačba 5). Dovoljeno odstopanje rezultatov je lahko ≤ 10 %. Pri glavnem vrhu (mAb) nrCE-SDS metode pa je dovoljeno odstopanje rezultatov $\leq 1,5$ % absolutne razlike.

Preglednice XXXI, XXXII, XXXIII prikazujejo zbrane rezultate rigidnosti nrCE-SDS metode za vrhove, ki so imeli TCA vrednost večjo od LOQ vzorca ($\geq 0,3\%$). Preglednice se nahajajo v Prilogi C.

Preglednice XXXIV, XXXV in XXXVI prikazujejo zbrane rezultate rCE-SDS metode za vrhove, ki so imeli TCA vrednost večjo od LOQ vzorca ($\geq 0,3\%$). Preglednice se nahajajo v Prilogi C.

Iz preglednic XXXI- je razvidno, da obe metodi dajeta rigidne rezultate. Vsi rezultati so bili znotraj predpisanih kriterijev, kar pomeni, da je razvita CE-SDS metoda neodvisna od osebe in dneva priprave.

4.6.5 Robustnost

Pri testiranju robustnosti smo analizirali stabilnost vzorcev pri 10 °C v vzorčevalniku CE instrumenta, kjer smo iste vzorce po 24 in 48 urah še enkrat injicirali. Upoštevali smo vrednosti tistih vrhov, ki so imeli % TCA nad LOQ. Kriteriji za sprejemljivost rezultatov so enaki, kot smo jih navedli pri določanju rigidnosti (4.6.4 Natančnost).

Preglednice XXXVII, XXXVIII in XXXIX prikazujejo rezultate CE-SDS metode v nereducirajočih pogojih. Pri CE-SDS metodi v reducirajočih pogojih smo za izračun RSD vrednosti ter za določevanje stabilnosti upoštevali samo vrhove LC, HC-NG in HC, ki so ključni za namen metode (preglednice XL-). Vse preglednice se nahajajo v Prilogi D.

Iz preglednic je razvidno, da so vsi rezultati znotraj predpisanih kriterijev. Tako smo potrdili 48 urno stabilnost vzorcev v vzorčevalniku CE instrumenta pri 10 °C.

5 SKLEP

Pri razvoju in pregledovanju rezultatov CE-SDS metode smo ugotovili, da se kapilarna elektroforeza lahko uporablja kot zanesljiva separacijska tehnika pri analizi bioloških zdravil. V okviru raziskovalnega dela magistrske naloge smo prišli do naslednjih zaključkov:

- **Priprava vzorcev**

- pri nrCE-SDS metodi je bil NEM kot alkilacijski reagent uspešnejši in je pokazal boljšo čistost protitelesa kot IAM. Manj degradacijskih produktov je bilo opaženih v pufru s pH 5,5. Pri inkubaciji vzorca sprememba temperature in čas inkubacije nista pokazala večjih sprememb, zato smo se z namenom krajše metode odločili za nižje vrednosti. Prav tako je bolj uporabna aparatura za inkubacijo termomešalec. Končni pogoji priprave nereducirajočih vzorcev: alkilacija z NEM v 50 mM acetat/ 1 % SDS pufru, pH 5,5 pri 40 °C s 5 minutno inkubacijo v termobloku.
- pri rCE-SDS metodi smo najboljšo redukcijo (razmerje med LC in HC), kljub njegovim slabim lastnostim, dosegli z 2-merkaptetanolom v 50 mM TRIS-HCl/ 1 % SDS pufru s pH 9,0. Tudi pri tej metodi aparatura za inkubacijo vzorcev ne vpliva na rezultate, zato smo se odločili uporabljati termoblok. Dobro razmerje med LC in HC, ter nižji delež HC-NG smo dosegli že pri temperaturi 70 °C. Končni pogoji priprave reducirajočih vzorcev: redukcija z 2-merkaptetanol v 50 mM TRIS-HCl/ 1 % pufru s pH 9,0 pri 70 °C s 10 minutno inkubacijo v termobloku.

- **Instrumentalne nastavitve**

- V upanju na razvoj metode z LIF detekcijo nismo dobili pričakovanih rezultatov. Pri LIF detekciji je potrebna tehnično zahtevna in dolgotrajna priprava vzorcev ter instalacija samega detektorja v instrument. Ustrezne rezultate smo prav tako dobili pri UV detekciji 214 nm valovne dolžine.
- Pri injiciranju z normalno polarnostjo iz »outlet« strani kapilare, kjer vzorec prepotuje krajšo pot po kapilari, smo dobili stabilnejšo (bolj ravno) bazno linijo, ki vpliva na integracijo vrhov ter posledično na dobljene rezultate. Prav tako pri smo dobili večje razmerje med signalom in šumom (s/n).
- Boljšo resolucijo ter razmerje s/n smo dosegli pri velikosti detekcijskega okna 100 x 200 µm na kapilari.

- Najboljšo resolucijo, odziv elektroferograma, obliko vrhov ter razmerje s/n smo dobili pri 35 sekundnem injiciranju vzorca z napetostjo 2 kV in 30 minutno separacijo pri napetosti 12 kV (nrCE-SDS) ter pri 30 sekundnem injiciranju vzorca pri napetosti 2 kV in 30 minutno separacijo pri napetosti 10 kV (rCE-SDS).

- **Validacija metode**
 - Na podlagi rezultatov validacije lahko zaključimo, da sta obe metodi, tako nrCE-SDS kot rCE-SDS, specifični, linearni, točni in natančni. Vsi rezultati so ustrezali predpisanim kriterijem za potrditev, da metodi ustrezata njunemu namenu.
 - Izračun meje zaznavnosti in določljivosti je pokazal, da sta metodi sposobni zaznati 0,1 % in določiti 0,3 % nominalne koncentracije vzorca.
 - Pri robustnosti metode smo dokazali 48 urno stabilnost vzorcev pri 10 °C.

6 LITERATURA

1. Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: Od gena do učinkovine (prva izdaja), Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 4-24, 136-150, 532-578
2. Walsh G, Murphy B: Biopharmaceuticals and Industrial Perspective, Kluwer Academic Publisher 1999: 3, 8, 10-26
3. Kumar R, Singh J: Biosimilar drugs: Current status. International Journal of Applied and basic medical Research 2014; 4: 1-4
4. Rodney B: Temelji Biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 11-12, 95-112
5. <http://www.zdravstvena.info/vsznj/biokemija-od-vode-do-membranskih-proteinov/>, dostopano 3.1.2017
6. http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Ravni_proteinske_strukture, dostopano 28.1.2017
7. Vozelj, M: Temelji imunologije, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 2000:47-64
8. Nelson LA, Reichert MJ: Development trends for therapeutic antibody fragments. Nature Biotechnology 2009; 27: 331-337
9. Nelson A: Antibody fragments. mAbs 2010; 2: 78
10. https://en.wikipedia.org/wiki/Fusion_gene, dostopano 28.1.2017
11. Chen X, Zaro J, Shen WC: Fusion Protein Linkers: Property, design and Functionality. NIH Public Access 2013; 65: 1-32
12. Czajkowsky MD, Hu J, Shao Z, Pleass RJ: Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives. EMBO Molecular Medicine 2012; 4: 1015-1028
13. Descotes J, Gouraud A: Clinical immunotoxicity of therapeutic proteins. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology 2008; 4: 1537-1549
14. Kuypers D, Venreenterghem Y: Monoclonal antibodies in renal transplantation: old and new. Nephrology Dialysis Transplantation 2004; 19: 297-298
15. Kotsovilis S, Andreakos E.: Therapeutic monoclonal antibodies in inflammatory diseases. Method Mol Biol. 2014; 1060: 37-59

16. Dimitrow S D: Therapeutic antibodies, vaccines and antibodyomes. *mAbs* 2010;2: 347-356
17. Joosten V, Lokman C, AMJJ van den Hondel C, Punt JP: The production of antibody fragments and antibody fusion proteins. *Microbial Cell Factories* 2003; 2: 1-6
18. Goswami S, Wang W, Arakawa T, Ohtake S: Developments and Challenges for mAb-Based Therapeutics. *Antibodies* 2013; 2: 452-500
19. Harding, FA, Stickler, MM, Razo J, DuBridg e RB: The immunogenicity of humanized and fully human antibodies- Residual immunogenicity resides in the CDR regions. *Landes Bioscience* 2010; 2: 256-259
20.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/06/WC500128688.pdf, dostopano 20.11.2016
21. https://www.jazmp.si/zdravila_za_uporabov_humani_medicini/farmakovigilanca/, dostopano 28.1.2017
22. Salas-Solano O, Felten, C: Capillary electrophoresis and bioanalysis. Elsevier 2008; 9: 401-408, 418-423
23. Zhu Z, Lu JJ, Liu S: Protein Separation by Capillary Gel Electrophoresis. A Review, *Anal Chim Acta* 2012; 709: 21-31
24. https://en.wikipedia.org/wiki/Gel_electrophoresis, dostopano 3.1.2017
25. Ahuja S: Overview of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. Elsevier 2008; 9: 1-8
26. Whatley H: Basic principles and modes of capillary electrophoresis. *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis*, 2001: 21-31, 43-47, 51-56
27. <http://karsten.perso.libertysurf.fr/Work.html>, dostop 3.1.2017
28. Guo A, Camblin G, Han M, Meert C, Park, S: Role of CE in biopharmaceutical development and quality control, Elsevier 2008; 9: 357-372

29. Felten C, Salas Solano O: Capillary Electrophoresis in Quality Control PART II: CE-SDS: Method Development and Robustness. Beckman Coulter 2011
30. <https://www.laboratoryequipment.com/product-release/2013/04/ce-platform-designed-biopharmaceutical-analysis> , dostopano 3.1.2017
- <https://fischer-analytics.com/geraet/beckman-coulter-kapillarelektrophoresesystem-pa-800-plus/> , dostopano 3.1.2017
- 31.
- https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314774443672/litdoc17085301_20161014154720.pdf, dostopano 3.1.2017
32. <https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-buffer-exchange.html> , dostopano 3.1.2017
- <https://www.fishersci.com/shop/products/emd-millipore-amicon-ultra-0-5-centrifugal-filter-units-nmwl-30-000-sample-vol-0-5ml-final-vol-20-1-96-pk/ufc503096>, dostopano 3.1.2017
33. https://www.emdmillipore.com/US/en/product/Amicon-Ultra-0.5%C2%A0mL-Centrifugal-Filters-for-DNA-and-Protein-Purification-and-Concentration,MM_NF-C82301, dostopano 3.1.2017
34. Zhang, J, Burman, S, Gunturi, S, Foley, P: Method development and validation of capillary sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis for characterization of a monoclonal antibody. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*2010; 53: 1236-1243
35. Zhu, ZC, Chen, Y, Ackerman, MS, Wang, B, Wu, W, Li, B: Investigation of monoclonal antibody fragmentation artifacts in non-reducing SDS-PAGE. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2013; 83: 89-95
36. <https://en.wikipedia.org/wiki/Iodoacetamide>, dostopano 2.8.2016
37. <https://en.wikipedia.org/wiki/N-Ethylmaleimide>, dostopano 2.8.2016
38. <https://en.wikipedia.org/wiki/2-Mercaptoethanol>, dostopano 3.8.2016

39. <https://en.wikipedia.org/wiki/Dithiothreitol>, dostopano 3.8.2016
40. <http://www.biosyn.com/tew/instruction-of-reduction-reaction-using-tcep.aspx>, dostopano 3.8.2016
41. Swinney K, Bornhop DJ: Detection in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2000; 21: 1239, 1242-1244
42. <http://sciex.myshopify.com/products/pre-assembled-capillary-cartridge> , dostopano 3.1.2017
43. Landers J: Handbook of capillary electrophoresis (second edition), CRC Press LLC, 1997: 24
44. <https://www.sepscience.com/Techniques/CE/1352-/CE-Solutions-5-Injection-Precision-and-Sensitivity>, dostopano 10.9.2016
45. <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>, dostopano 20.11.2016
46. <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm386366.pdf>, dostopano 20.11.2016
47. <http://isjfr.zrc-sazu.si/sl/terminologisce/slovarji/farmaceutski#v>, dostopano 10.1.2017
48. Guo A, Han M, Martinez T, Ketchem RR, Novick S, Jochheim C, Balland A: Electrophoretic evidence for the presence of structural isoforms specific for the IgG2 isotype. *Electrophoresis* 2008; 29: 2550-2556
49. Konigsberg, W: Reduction of disulfide bonds in proteins with dithiothreitol. *Methods in Enzymology* 1972; 25: 185-188
50. Singh, R, Lamoureux, GV, Lees, WJ, Whitesides, GM: Reagents for rapid reduction of disulfide bonds. *Methods in enzymology* 1995; 251: 167-173
51. <http://www.interchim.fr/ft/0/054721.pdf>, dostopano 3.8.2016
52. Celland WW: Dithiothreitol, a new protective reagent for SH group. *Biochemistry* 1964; 3: 480-482

53. Burmeister Getz E, Xiao M, Chakrabarty T, Cooke R, Selvin RP: A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris(2-carboxyethyl)phosphine and Dithiothreitol for Use in Protein Biochemistry. *Analytical Biochemistry* 1999; 273: 73-80
54. <http://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/PCC/20490.pdf>, dostopano 5.8.2016
55. Salas-Solano O, Tomlinson B, Du S, Parker M, Strahan A, Ma S: Optimization and Validation of a Quantitative Capillary Electrophoresis Sodium Dodecyl Sulfate Method for Quality Control and Stability Monitoring of Monoclonal Antibodies. *Analytical Chemistry* 2006; 78: 6583-6594
56. <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990-5140EN.pdf>, dostopano 12.11.2016

Priloga A: Zbrani rezultati ponovljivosti CE-SDS metode v nereducirajočih pogojih

Preglednica XXV: Rezultati ponovljivosti IgG₂ protitelesa kot učinkovine (DS vzorec) pri nereducirajoči CE-SDS metodi

% TCA	
Vzorec (ponovitev)	mAb
1	99,56
2	99,53
3	99,52
4	99,49
5	99,49
6	99,45
povprečna vrednost	99,51
RSD	0
kriterij sprejemljivosti	RSD ≤ 5 %
ustreznost	DA

Preglednica XXVI: Rezultati ponovljivosti IgG₂ protitelesa kot formulacijske oblike (DP vzorec) pri nereducirajoči CE-SDS metodi

% TCA		
Vzorec (ponovitev)	HHL	mAb
1	0,36	98,94
2	0,35	98,88
3	0,37	98,87
4	0,36	99,03
5	0,39	99,01
6	0,36	99,01
povprečna vrednost	0,37	98,96
RSD	4	0
kriterij sprejemljivosti	RSD ≤ 40 %	RSD ≤ 5 %
ustreznost	DA	DA

Preglednica XXVII: Rezultati ponovljivosti IgG₂ protitelesa kot stresnega vzorca pri nereducirajoči CE-SDS metodi

% TCA					
Vzorec (ponovitev)	HL	HH	HHL	mAb	HMW
1	0,72	0,55	1,1	96,09	0,38
2	0,70	0,56	1,05	96,26	0,32
3	0,71	0,59	1,06	96,16	0,31
4	0,70	0,58	1,05	96,16	0,34
5	0,71	0,58	1,07	96,08	0,33
6	0,68	0,58	1,06	95,95	0,34
povprečna vrednost	0,70	0,57	1,07	96,12	0,34
RSD	2	3	3	0	7
kriterij sprejemljivosti	RSD ≤ 17 %	RSD ≤ 17 %	RSD ≤ 17 %	RSD ≤ 5 %	RSD ≤ 40 %
ustreznost	DA	DA	DA	DA	DA

Priloga B: Zbrani rezultati ponovljivosti CE-SDS metode v reducirajočih pogojih

Preglednica XXVIII: Rezultati ponovljivosti IgG₂ protitelesa kot učinkovine (DS vzorec) pri reducirajoči CE-SDS metodi

% TCA				
Vzorec (ponovitev)	LC	HC-NG	HC	Unk_5
1	30,13	0,44	68,57	0,46
2	30,11	0,44	68,54	0,53
3	30,10	0,45	68,61	0,43
4	30,16	0,45	68,50	0,50
5	30,16	0,50	68,42	0,53
6	30,16	0,49	68,47	0,46
povprečna vrednost	30,14	0,46	68,52	0,48
RSD	0	6	0	10
kriterij sprejemljivosti	RSD ≤ 17 %	RSD ≤ 40 %	RSD ≤ 17 %	RSD ≤ 17 %
ustreznost	DA	DA	DA	DA

Preglednica XXIX: Rezultati ponovljivosti IgG₂ protitelesa kot formulacijske oblike (DP vzorec) pri reducirajoči CE-SDS metodi

% TCA					
Vzorec (ponovitev)	LC	HC-NG	HC	Unk_5	Unk_7
1	30,18	0,53	68,14	0,66	0,26
2	30,04	0,56	68,30	0,63	0,26
3	30,13	0,53	68,20	0,65	0,27
4	30,12	0,53	68,21	0,64	0,28
5	30,16	0,52	68,21	0,62	0,26
6	30,12	0,53	68,20	0,66	0,26
povprečna vrednost	30,13	0,53	68,21	0,64	0,27
RSD	0	2	0	2	3
kriterij sprejemljivosti	RSD ≤ 17 %	RSD ≤ 17 %	RSD ≤ 17 %	RSD ≤ 17 %	RSD ≤ 40 %
ustreznost	DA	DA	DA	DA	DA

Preglednica XXX: Rezultati ponovljivosti IgG₂ protitelesa kot stresnega vzorca pri reducirajoči CE-SDS metodi

% TCA									
Vzorec (ponovitev)	LC	HC-NG	HC	RMT 0,74	Unk_1	Unk_4	Unk_5	Unk_6	Unk_7
1	30,20	0,48	64,77	0,46	0,38	0,59	0,48	0,37	0,48
2	30,20	0,49	64,76	0,47	0,37	0,56	0,53	0,40	0,48
3	30,22	0,48	64,65	0,46	0,37	0,56	0,51	0,42	0,49
4	30,22	0,46	64,71	0,49	0,37	0,54	0,49	0,43	0,47
5	30,24	0,48	64,76	0,46	0,35	0,56	0,49	0,41	0,48
6	30,27	0,48	64,61	0,47	0,39	0,57	0,52	0,42	0,47

	LC	HC- NG	HC	RMT 0,74	Unk_1	Unk_4	Unk_5	Unk_6	Unk_7
povprečna vrednost	30,22	0,48	64,71	0,47	0,37	0,56	0,50	0,41	0,48
RSD	0	2	0	3	4	3	4	5	2
kriterij sprejemljivosti	RSD ≤ 17 %	RSD ≤ 40 %	RSD ≤ 17 %	RSD ≤ 40 %	RSD ≤ 40 %	RSD ≤ 17 %	RSD ≤ 17 %	RSD ≤ 40 %	RSD ≤ 40 %
ustreznost	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA

Priloga C: Zbrani rezultati rigidnosti CE-SDS metode v nereducirajočih in reducirajočih pogojih

Preglednica XXXI: Rezultati rigidnosti IgG₂ protitelesa kot učinkovine (DS vzorec) nereducirajoči CE-SDS metodi

Vrh	Dan_1, operater_1 (povprečje % TCA)	Dan_2, operater_2 (povprečje % TCA)	Δ (%)	kriterij sprejemljivosti	ustreznost
mAb	99,50	99,48	0	$\Delta \leq 1,5$ % (absolutne razlike)	DA

Preglednica XXXII: Rezultati rigidnosti IgG₂ protitelesa kot formulacijske oblike (DP vzorec) pri nereducirajoči CE-SDS metodi

Vrh	Dan_1, operater_1 (povprečje % TCA)	Dan_2, operater_2 (povprečje % TCA)	Δ (%)	kriterij sprejemljivosti	ustreznost
mAb	98,86	98,95	0	$\Delta \leq 1,5$ % (absolutne razlike)	DA
HHL	0,36	0,36	0,0	$\Delta \leq 0,2$ % (absolutne razlike)	DA

Preglednica XXXIII: Rezultati rigidnosti IgG₂ protitelesa kot stresnega vzorca pri nereducirajoči CE-SDS metodi

Vrh	Dan_1, operater_1 (povprečje % TCA)	Dan_2, operater_2 (povprečje % TCA)	Δ (%)	kriterij sprejemljivosti	ustreznost
HL	0,69	0,70	0,0	$\Delta \leq 0,2$ % (absolutne razlike)	DA
HH	0,55	0,55	0,0	$\Delta \leq 0,2$ % (absolutne razlike)	DA
HHL	1,07	1,1	0,0	$\Delta \leq 0,2$ % (absolutne razlike)	DA
mAb	96,16	96,11	0	$\Delta \leq 1,5$ % (absolutne razlike)	DA
HMW	0,31	0,31	0	$\Delta \leq 0,2$ % (absolutne razlike)	DA

Preglednica XXXIV: Rezultati rigidnosti IgG₂ protitelesa kot učinkovine (DS vzorec) pri reducirajoči CE-SDS metodi

Vrh	Dan_1, operater_1 (povprečje % TCA)	Dan_2, operater_2 (povprečje % TCA)	Δ (%)	kriterij sprejemljivosti	ustreznost
LC	30,14	29,80	1	$\Delta \leq 10$ % (relativne razlike)	DA
HC-NG	0,46	0,46	0,0	$\Delta \leq 0,2$ % (absolutne razlike)	DA
HC	68,52	68,86	1	$\Delta \leq 10$ % (relativne razlike)	DA
Unk_5	0,49	0,47	0,0	$\Delta \leq 0,2$ % (absolutne razlike)	DA

Preglednica XXXV: Rezultati rigidnosti IgG₂ protitelesa kot formulacijske oblike (DP vzorec) pri reducirajoči CE-SDS metodi

Vrh	Dan_1, operater_1 (povprečje % TCA)	Dan_2, operater_2 (povprečje % TCA)	Δ (%)	kriterij sprejemljivosti	ustreznost
LC	30,13	29,82	1	$\Delta \leq 10$ % (relativne razlike)	DA
HC-NG	0,53	0,54	0,0	$\Delta \leq 0,2$ % (absolutne razlike)	DA
HC	68,21	68,49	0	$\Delta \leq 10$ % (relativne razlike)	DA
Unk_5	0,64	0,64	0,0	$\Delta \leq 0,2$ % (absolutne razlike)	DA
Unk_7	0,27	0,29	0,0	$\Delta \leq 0,2$ % (absolutne razlike)	DA

Preglednica XXXVI: Rezultati rigidnosti IgG₂ protitelesa kot stresnega vzorca pri reducirajoči CE-SDS metodi

Vrh	Dan_1, operater_1 (povprečje % TCA)	Dan_2, operater_2 (povprečje % TCA)	Δ (%)	kriterij sprejemljivosti	ustreznost
LC	30,23	29,86	1	$\Delta \leq 10$ % (relativne razlike)	DA
HC-NG	0,48	0,50	0,0	$\Delta \leq 0,2$ % (absolutne razlike)	DA
HC	64,71	64,97	0	$\Delta \leq 10$ % (relativne razlike)	DA
RMT~ 0,74	0,47	0,46	0,0	$\Delta \leq 0,2$ % (absolutne razlike)	DA
Unk_1	0,37	0,37	0,0	$\Delta \leq 0,2$ % (absolutne razlike)	DA

Vrh	Dan_1, operater_1 (povprečje % TCA)	Dan_2, operater_2 (povprečje % TCA)	Δ (%)	kriterij sprejemljivosti	ustreznost
Unk_4	0,56	0,57	0,0	$\Delta \leq 0,2\%$ (absolutne razlike)	DA
Unk_5	0,50	0,51	0,0	$\Delta \leq 0,2\%$ (absolutne razlike)	DA
Unk_6	0,41	0,42	0,0	$\Delta \leq 0,2\%$ (absolutne razlike)	DA
Unk_7	0,48	0,49	0,0	$\Delta \leq 0,2\%$ (absolutne razlike)	DA

Priloga D: Zbrani rezultati robustnosti CE-SDS metode v nereducirajočih in reducirajočih pogojih

Preglednica XXXVII: Rezultati stabilnosti (% TCA) IgG₂ protitelesa kot učinkovine (DS vzorec) pri nereducirajoči CE-SDS metodi

	mAb	Δ mAb (%)
DS vzorec_0h	99,58	/
DS vzorec_24h	99,53	0,1
DS vzorec_48h	99,49	0,1
kriterij sprejemljivosti	$\Delta \leq 1,5 \%$ (absolutne razlike)	
ustreznost	DA	

Preglednica XXXVIII: Rezultati stabilnosti (% TCA) IgG₂ protitelesa kot formulacijske oblike (DP vzorec) pri nereducirajoči CE-SDS metodi

	HHL	Δ(HHL)	mAb	Δ(mAb)
DP vzorec_0h	0,34	/	98,88	/
DP vzorec_24h	0,36	0,0	98,82	0,1
DP vzorec_48h	0,37	0,0	98,93	0,1
kriterij sprejemljivosti	$\Delta \leq 0,2 \%$ (absolutne razlike)		$\Delta \leq 1,5 \%$ (absolutne razlike)	
ustreznost	DA		DA	

Preglednica XXXIX: Rezultati stabilnosti (% TCA) IgG₂ protitelesa kot stresnega vzorca pri nereducirajoči CE-SDS metodi

	HL	HH	HHL	mAb	HMW
DP vzorec_0h	0,68	0,53	1,09	96,25	0,31
DP vzorec_24h	0,69	0,56	1,13	96,12	0,30
DP vzorec_48h	0,67	0,52	1,05	96,33	0,28
Δ_24 h	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
Δ_48 h	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
kriterij sprejemljivosti	$\Delta \leq 0,2 \%$ (absolutne razlike)	$\Delta \leq 0,2 \%$ (absolutne razlike)	$\Delta \leq 0,2 \%$ (absolutne razlike)	$\Delta \leq 1,5 \%$ (absolutne razlike)	$\Delta \leq 0,2 \%$ (absolutne razlike)
ustreznost	DA	DA	DA	DA	DA

Preglednica XL: Rezultati stabilnosti (% TCA) IgG₂ protitelesa kot učinkovine (DS vzorec) pri reducirajoči CE-SDS metodi

	LC	HC-NG	HC
DS vzorec_0h	30,52	0,51	68,04
DS vzorec_24h	30,68	0,52	67,80
DS vzorec_48h	30,66	0,56	67,55

	LC	HC-NG	HC
$\Delta_{24\text{ h}}$	1	0,0	0
$\Delta_{48\text{ h}}$	0	0,1	1
kriterij sprejemljivosti	$\Delta \leq 10\%$ (relativne razlike)	$\Delta \leq 0,2\%$ (absolutne razlike)	$\Delta \leq 10\%$ (relativne razlike)
ustreznost	DA	DA	DA

Preglednica XLI: Rezultati stabilnosti (% TCA) IgG₂ protitelesa kot formulacijske oblike (DP vzorec) pri reducirajoči CE-SDS metodi

	LC	HC-NG	HC
DP vzorec_0h	30,48	0,56	67,63
DP vzorec_24h	30,52	0,53	67,58
DP vzorec_48h	30,61	0,59	67,28
$\Delta_{24\text{ h}}$	0	0,0	0
$\Delta_{48\text{ h}}$	0	0,0	1
kriterij sprejemljivosti	$\Delta \leq 10\%$ (relativne razlike)	$\Delta \leq 0,2\%$ (absolutne razlike)	$\Delta \leq 10\%$ (relativne razlike)
ustreznost	DA	DA	DA

Preglednica XLII: Rezultati stabilnosti (% TCA) IgG₂ protitelesa kot stresnega vzorca pri reducirajoči CE-SDS metodi

	LC	HC-NG	HC
stresni vzorec_0h	30,46	0,55	67,71
stresni vzorec_24h	30,61	0,54	67,49
stresni vzorec_48h	30,54	0,58	67,33
$\Delta_{24\text{ h}}$	0	0,0	0
$\Delta_{48\text{ h}}$	0	0,0	1
kriterij sprejemljivosti	$\Delta \leq 10\%$ (relativne razlike)	$\Delta \leq 0,2\%$ (absolutne razlike)	$\Delta \leq 10\%$ (relativne razlike)
ustreznost	DA	DA	DA