

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANITA BAVDEK

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ INDUSTRISKE FARMACIJE

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANITA BAVDEK

RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA METODE ALPHALISA ZA DOLOČANJE NEČISTOT V
PROCESNIH VZORCIH TERAPEVTSKEGA MONOKLONSKEGA PROTITELESA
DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF ALPHALISA FOR DETERMINATION
OF IMPURITIES IN THE PROCESS SAMPLES CONTAINING THERAPEUTIC
MONOCLONAL ANTIBODY

INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko naložko sem opravljala v farmacevtskem podjetju Lek d.d., Biofarmacevtika Mengeš pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča in somentorstvom dr. Lee Bojič.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Tomažu Bratkoviču in somentorici dr. Lei Bojič za možnost opravljanja magistrske naloge na področju analitike podobnih bioloških zdravil. Prav tako se zahvaljujem vsem na oddelku Razvojne analitike. Posebna zahvala velja Ireni Zore, Tanji Bizimoska Sedeljšak in Tomažu Bauu.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča in somentorstvom dr. Lee Bojič.

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. dr.h.c. Stanko Srčič

Član diplomske komisije: doc. dr. Stane Pajk

KAZALO

POVZETEK	I
ABSTRACT	II
SEZNAM OKRAJŠAV	III
1 UVOD	1
1.1 BIOLOŠKA ZDRAVILA	1
1.2 TERAPEVTSKA MONOKLONSKA PROTITELESA	1
1.3 PROTEINSKE NEČISTOTE	2
1.3.1 HCP	4
1.3.2 RAZVOJ PROTITELES ZA DETEKCIJO HCP	5
1.3.3 DETEKCIJA PROTEINSKIH NEČISTOT	6
1.4 ALPHALISA	7
1.5 SENDVIČ ELISA	9
2. NAMEN DELA	11
3. MATERIALI IN METODE	12
3.1 Materiali	12
3.1.1 Reagenti in topila	12
3.1.1 Vzorci	12
3.1.3 Standard	13
3.1.4 Pufri in raztopine	13
3.2 Razvoj metode	14
3.2.1 Testiranje linearnosti detektorja	15
3.2.2 Priprava standardov za umeritveno krivuljo	16
3.2.3 Priprava akceptorskih in donorskih kroglic ter biotiniliranih protiteles oziroma biotiniliranega fragmenta Fab2 iz protiteles, specifičnih za naš proces	17
3.2.4 Določevanje vpliva matriksa	19
3.2.5 Postopek dela	19
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	22
4.1 Razvoj metode	22
4.2 Optimizacija izbranega testa	27
4.2.1 Vpliv spremenjanja koncentracije biotiniliranih protiteles na odziv testa	27

4.2.2	Vpliv spreminjanja koncentracije akceptorskih kroglic na odziv testa	29
4.2.3	Vpliv spreminjanja koncentracije donorskih kroglic na odziv testa	30
4.2.4	Vpliv spreminjanja koncentracije biotiniliranega protitelesa na odziv testa (drugi poskus)	33
4.3	Model standardne krivulje	34
4.4	Testiranje linearnosti odziva detektorja z uporabo kroglic Omni	35
4.5	Določevanje vpliva matriksa oziroma preverjanje vpliva sestave procesnega pufra na odziv in določanje najnižjega faktorja redčitve (MDF)	37
4.6	Primerjava testa AlphaLISA s testom ELISA	44
5	SKLEP	48
6.	LITERATURA	50

KAZALO SLIK

Slika 1 Shema domenske zgradbe monoklonskega protitelesa: lahka veriga (LC), težka veriga (HC), variabilni del (Fv), variabilna domena težke (VH) in lahke (VL) verige, regija Fc (<i>fragment crystallizable</i> ; dimer CH2-CH3), regija fd (<i>fragment difficult</i> ; VH-CH1), konstantne domene težke (CH 1-3) in lahke (CL) verige, vezišče za antigen (Fab) (5)	2
Slika 2 Princip delovanja metode AlphaLISA (13).....	8
Slika 3: Potek metode sendvič ELISA (27).....	9
Slika 4: Primerjava izvedb metod ELISA in AlphaLISA (20).....	10
Slika 5: Grafični prikaz testiranja formata z akceptorskimi in donorskimi kroglicami iz komercialnega generičnega testa in biotiniliranega fragmenta Fab2, razvitega za naš proces čiščenja	24
Slika 6: Grafični prikaz primerjave uporabe biotiniliranega protitelesa in biotiniliranega fragmenta Fab2	26
Slika 7: Grafični prikaz vpliva različnih koncentracij biotiniliranih protiteles na odziv testa AlphaLISA	29
Slika 8: Grafični prikaz vpliva različnih koncentracij akceptorskih kroglic na odziv testa AlphaLISA	30
Slika 9: Grafični prikaz vpliva različnih koncentracij donorskih kroglic na odziv testa AlphaLISA	31
Slika 10: Grafični prikaz vpliva različnih koncentracij donorskih kroglic – drugi poskus na odziv testa AlphaLISA	32
Slika 11: Grafični prikaz vpliva različnih koncentracij biotiniliranih protiteles na odziv testa AlphaLISA	33
Slika 12: Grafični prikaz modela standarde krivulje	35
Slika 13: Graf odvisnosti signala od koncentracije kroglic Omni	36
Slika 14: Grafični prikaz primerjave standardov HCP različnih koncentracij v gojišču ali AlphaLISA HiBlock	38
Slika 15: Grafični prikaz primerjave odzivov standardov HCP, izmerjenih v gojišču, redčenem v pufer AlphaLISA (10x, 50x in 100x redčitev).....	40
Slika 16: Grafični prikaz primerjave odzivov standardov HCP različnih koncentracij, posnetimi v pufru AlphaLISA in pufri po prvi, drugi in tretji kromatografski stopnji ter po virusni inaktivaciji (petkratna redčitev).....	42
Slika 17: Grafični prikaz primerjave odzivov standardov HCP različnih koncentracij, posnetimi v pufru AlphaLISA in pufri po prvi, drugi in tretji kromatografski stopnji ter po virusni inaktivaciji (dvakratna redčitev).....	43

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Prikaz priprave suspenzije kroglic Omni.....	16
Preglednica 2: Priprava in koncentracije standardov za umeritveno krivuljo	17
Preglednica 3: Koncentracije HCP v procesnih vzorcih, določene s testom HCP ELISA..	20
Preglednica 4: Priprava vzorcev žetev.....	20
Preglednica 5: Priprava vzorcev po prvi kromatografski stopnji	21
Preglednica 6: Priprava vzorcev po drugi kromatografski stopnji	21
Preglednica 7: Priprava vzorcev po tretji kromatografski stopnji	21
Preglednica 8: Testiranje formata z akceptorskimi kroglicami z generičnimi protitelesi (komercialni generični test) in donorskimi kroglicami ter biotiniliranimi fragmenti Fab2, razvitimi za naš proces čiščenja.....	23
Preglednica 9: Testiranje formata z akceptorskimi kroglicami z generičnimi protitelesi (komercialni generični test) in donorskimi kroglicami ter biotiniliranimi protitelesi, razvitimi za naš proces čiščenja.....	25
Preglednica 10: Testiranje formata z akceptorskimi kroglicami (ki so bile konjugirane s protitelesi, razvitimi za naš proces čiščenja), specifičnim biotiniliranimi protitelesi in donorskimi kroglicami.....	27
Preglednica 11: Vpliv različnih koncentracij biotiniliranih protiteles na odziv testa AlphaLISA	28
Preglednica 12: Vpliv različnih koncentracij akceptorskih kroglic na odziv testa AlphaLISA	29
Preglednica 13: Vpliv različnih koncentracij donorskih kroglic na odziv testa AlphaLISA	31
Preglednica 14: Vpliv različnih koncentracij donorskih kroglic – drugi poskus na odziv testa AlphaLISA	32
Preglednica 15: Vpliv različnih koncentracij biotiniliranih protiteles na odziv testa AlphaLISA	33
Preglednica 16: Prikaz meritev za konstrukcijo standardne krivulje pri koncentraciji akceptorskih kroglic 0,2 mg/ml, biotiniliranih protiteles 5 nM in streptavidinskih donorskih kroglic 0,08 mg/ml	34
Preglednica 17: Prikaz meritev testiranja linearnosti detektorja s kroglicami Omni.	36
Preglednica 18: Standardi HCP različnih koncentracij v gojišču ali pufru AlphaLISA HiBlock.....	37
Preglednica 19: Primerjava odzivov standardov HCP različnih koncentracij, izmerjenih v pufru AlphaLISA in v 10-krat redčenem gojišču	39

Preglednica 20: Primerjava odzivov standardov HCP različnih koncentracij, izmerjenih v 50- in 100-krat redčenem gojišču	39
Preglednica 21: Primerjava odzivov standardov HCP različnih koncentracij, izmerjenih v petkrat redčenih pufru po prvi kromatografski stopnji in po virusni inaktivaciji.....	41
Preglednica 22: Primerjava odzivov standardov HCP različnih koncentracij, izmerjenih v petkrat redčenih pufrih po drugi in tretji kromatografski stopnji	41
Preglednica 23: Primerjava odzivov standardov HCP različnih koncentracij, izmerjenih v dvakrat redčenih pufru po prvi kromatografski stopnji in po virusni inaktivaciji.....	42
Preglednica 24: Primerjava odzivov standardov HCP različnih koncentracij, izmerjenih v dvakrat redčenih pufru po drugi in tretji kromatografski stopnji	43
Preglednica 25: Prikaz rezultatov primerjave AlphaLISA z obstoječim testom ELISA za vzorce žetev	45
Preglednica 26: Prikaz rezultatov primerjave AlphaLISA z obstoječo ELISA za vzorce po prvi kromatografski stopnji (vzorec 1)	45
Preglednica 27: Prikaz rezultatov primerjave AlphaLISA z obstoječo ELISA za vzorce po drugi kromatografski stopnji (vzorec 2)	46
Preglednica 28: Prikaz rezultatov primerjave metode AlphaLISA z obstoječo ELISA za vzorce po tretji kromatografski stopnji.....	46

POVZETEK

Biološka zdravila so zelo učinkovita in predstavljajo najhitreje rastočo vejo farmacevtske industrije. Večinoma so ta zdravila proteini ali nukleinske kisline, ki so pridobljeni z biotehnološkimi postopki, s pomočjo tehnologije rekombinantne DNA. Največkrat kot ekspresijski sistem uporabljamo sesalske celične kulture, njihov proizvod pa je zelo heterogen. Heterogenost proizvoda izhaja iz genetskih in fizioloških lastnosti celične linije ter vplivov proizvodnega procesa na celično kulturo. Med razvojem proizvodnega procesa in proizvodnjo podobne biološke učinkovine lahko dejavnike, ki povzročajo heterogenost, nadziramo. S tem lahko dosežemo višjo stopnjo podobnosti referenčni (originatorjevi) učinkovini. Glavni cilj procesa proizvodnje bioloških učinkovin je pridobitev zdravila z zahtevano stopnjo čistote. Za določanje proteinskih nečistot, kar je tudi predmet te magistrske naloge, najpogosteje uporabljamo kromatografske, elektroforezne in imunokemijske metode.

V okviru magistrske naloge smo vzpostavili novo imunokemijsko metodo za določanje nečistot, ki izvirajo iz gostiteljskih celic HCP (*Host Cell Proteins*), v procesnih vzorcih, imenovano Alpha(*Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay*)LISA, s katero bi lahko nadomestili obstoječi encimskoimunski test (ELISA). AlphaLISA je osnovana na vezavi dveh protiteles na posamezno molekulo analita (podobno kot »sendvič«-ELISA), pri čemer sta protitelesi konjugirani na različni kroglici submikrometrskih dimenzij. Ena (donorska) ob vzbujanju proizvaja singletni kisik, ki difundira do druge (akceptorske), kjer sproži luminiscenčni odziv. Preizkusili smo več različic testa in na izbranem formatu izvedli optimizacijo količine reagentov, nato pa z razvitim testom AlphaLISA izmerili koncentracijo HCP v procesnih vzorcih. Rezultate smo primerjali z določitvijo HCP z obstoječim testom ELISA. Rezultati obeh metod so bili sicer primerljivi, a se je izkazalo, da je vpliv procesnih raztopin, v katerih so spojine, ki delujejo kot lovilci singletnega kisika, s čimer motijo signal pri detekciji, tako močan, da je minimalni redčitveni faktor, ki je potreben, da lahko količino HCP v vzorcu točno izmerimo, zelo visok. Tako kljub širšemu območju linearnosti testa AlphaLISA (10–1000 ng/ml) tega ni smiselno nadomestiti z obstoječim testom ELISA (območje linearnosti 1–32 ng/ml).

ABSTRACT

Biopharmaceuticals are very effective and represent the fastest growing branch of the pharmaceutical industry. Biopharmaceuticals mostly include proteins or nucleic acids, obtained by biotechnological processes, using recombinant DNA technology. In a vast majority of cases, mammal cell cultures are used as the expression system, while their product is very heterogeneous. This arises from the genetic and physiological characteristics of the cell line and the production process influences on the cell culture. During the development of the production process and the production of a similar biological substance, we can control the factors causing heterogeneity and thereby achieve a higher level of similarity with the reference (originator) substance. The main goal of producing biological substances is to obtain a medicinal product with the required degree of purity. To determine protein impurities, which is the topic of this master's thesis, chromatographic, electrophoretic and immunochemical methods are frequently used.

We introduced a new immunochemical method for determining impurities from host cell proteins in process samples, called Alpha(*Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay*)LISA which is an alternative to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). AlphaLISA is based on the binding of two antibodies to a single analyte molecule (similar to the sandwich ELISA), whereby the two antibodies are conjugated to different beads of submicrometer dimensions. Upon excitation, the donor bead produces singlet oxygen, which diffuses to the acceptor bead, where it triggers a luminescent response. We compared several variants of the assay, performed an optimization of the reagent amount on the selected format, and then measured the HCP concentration in the process samples by using the developed AlphaLISA assay. The results were compared with those obtained with ELISA assay for determining HCP. The results of both methods were comparable, we did, however, observe that the influence of process liquids, which contain compounds that function as singlet oxygen scavengers and thereby disturb the signal during detection, is so strong that the minimal dilution factor needed to accurately measure the HCP quantity in the sample is very high. Therefore, despite a wider linearity range of the AlphaLISA assay (10–1000 ng/ml), it would not be sensible to use it in place of the existing ELISA test (linearity range 1–32 ng/ml).

SEZNAM OKRAJŠAV

1D elektroforeza – enodimenzionalna elektroforeza

2D elektroforeza – dvodimenzionalna elektroforeza

AlphaLISA – homogeni test z ojačitvijo luminiscence na bližino (*Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay*)

BSA – goveji serumski albumin

cps – število (dogodkov) na sekundo (*counts per seconds*)

CV – koeficient variance

CZE – kapilarna conska elektroforeza (*Capillary Zone Electrophoresis*)

DNA – deoksiribonukleinska kislina

ELISA – encimskoimunski test (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

EMA – Evropska agencija za zdravila (*European Medicines Agency*)

FDA – Ameriški urad za hrano in zdravila (*Food and Drug Administration*)

Fc – konstantni del protitelesa IgG, sestavljen iz druge in tretje konstantne domene oben težkih verig

Fv – variabilni del protitelesa

HC – težka veriga protitelesa

HCP – proteini ekspresijskega sistema (*Host Cell Proteins*)

HEPES – 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (*High Performance Liquid Chromatography*)

HPLC-MS – tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo (*High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

CE-SDS – kapilarna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (*Capillary Electrophoresis-Sodium Dodecyl Sulfate*)

LC – lahka veriga protitelesa

MDF – najnižji faktor redčenja (*Minimal Dilution Factor*)

R – korelacijski koeficient

RE – relativna napaka

RSD – relativna standardna deviacija

SEC – gelska izključitvena kromatografija (*Size-Exclusion Chromatography*)

SD – standardna deviacija

SDS PAGE – poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata

(*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

STD – standard

VH – variabilna domena težke verige protitelesa

VL – variabilna domena lahke verige protitelesa

1 UVOD

1.1 BIOLOŠKA ZDRAVILA

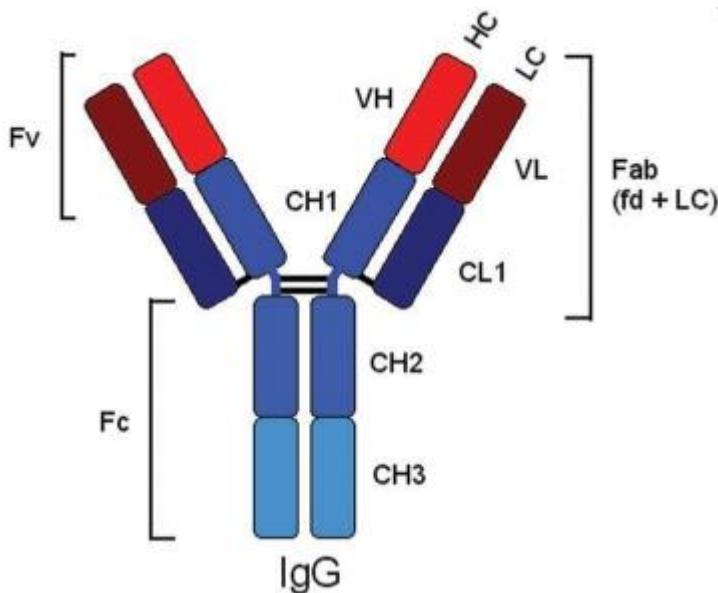
Biološka zdravila so zdravila, ki kot učinkovino vsebujejo biološko snov ali snov, pridobljeno s postopkom, ki vključuje biološke sisteme. Trenutno veljajo za najhitreje rastočo vejo v farmacevtski industriji in imajo največji delež med novoregistriranimi zdravili. Za biološka zdravila je značilna kompleksna prostorska struktura, velika molekulska masa in tarčno delovanje (1, 2).

Zaradi uporabe živih organizmov je proizvodnja bioloških zdravil kompleksen in zahteven proces, saj že majhne spremembe v procesu lahko privedejo do spremembe v strukturi molekule (glikozilacija, oksidacija, deamidacija, denaturacija in agregacija). Tako je praktično nemogoče razviti generično biološko zdravilo, ki bi bilo popolnoma identično referenčnemu (originatorjevemu) zdravilu. Z namenom poudarjanja neidentičnosti z originatorjevim proizvodom so oblikovali izraz podobna biološka zdravila (*biosimilars*), ki sta ga sprejeli tudi Evropska agencija za zdravila (EMA) in Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA). Učinkovina v podobnem biološkem zdravilu je zgolj podobna tisti v referenčnem biološkem zdravilu, zdravili pa se z vidika učinkovitosti in varnosti bistveno ne razlikujeta (1, 2, 3, 4).

1.2 TERAPEVTSKA MONOKLONSKA PROTITELESA

Terapevtska monoklonska protitelesa predstavljajo največjo skupino med biološkimi učinkovinami. Protitelesa so glikozilirani globularni proteini, ki so sestavljeni iz dveh enako težkih in lahkih polipeptidnih verig, med seboj povezanih z disulfidnimi vezmi (slika 1). Glede na vrsto težke verige razdelimo protitelesa na pet razredov: G, M, A, D in E. Na vsaki verigi ločimo konstantni in variabilni del. Konstantni del ima podobno aminokislinsko sestavo, razlike pa določata razred in podrazred protiteles. Variabilni del je na N-koncu, kjer so aminokislinska zaporedja zelo raznolika, in predstavljajo vezavno mesto – (paratop) za antigen (1, 5).

Terapevtska monoklonska protitelesa so monospecifična in monoafinitetna, usmerjena proti enemu antigenu in enemu epitopu, kar je ključna lastnost za uporabo v terapevtske namene, saj omogoča ciljano zdravljenje (5).



Slika 1 Shema domenske zgradbe monoklonskega protitelesa: lahka veriga (LC), težka veriga (HC), variabilni del (Fv), variabilna domena težke (VH) in lahke (VL) verige, regija Fc (*fragment crystallizable*; dimer CH2-CH3), regija fd (*fragment difficult*; VH-CH1), konstantne domene težke (CH 1-3) in lahke (CL) verige, vezišče za antigen (Fab) (5)

Terapevtska monoklonska protitelesa med drugim uporabljamo za zdravljenje raznih rakavih obolenj in avtoimunskih bolezni ter za preprečevanje akutnih zavrnitev presajenih organov. Na biološko aktivnost terapevtskih monoklonskih protiteles vpliva več dejavnikov, med drugim izvor in način priprave molekul (mišja, himerna, humanizirana in človeška protitelesa ter fragmenti protiteles), razred, podrazred, afiniteta, specifičnost za tarčni antigen in avidnost protitelesa (6).

Glavni mehanizmi delovanja terapevtskih monoklonskih protiteles so: neposredna inhibicija rasti (blokada receptorjev za rastne dejavnike in mitogene citokine ali nevtralizacija topnih signalnih molekul, s čimer je prav tako preprečeno signaliziranje), citotoksičnost, povzročena s komplementom, in s protitelesi povzročena celična citotoksičnost. Isto protitelo ima lahko več različnih mehanizmov delovanj. Pri nekaterih terapevtskih protitelesih način delovanja še ni povsem pojasnjen (1, 6).

1.3 PROTEINSKE NEČISTOTE

Biološka zdravila praviloma apliciramo parenteralno. Zahtevana stopnja čistote učinkovine v končnem proizvodu je več kot 99-odstotna. Proteinske nečistote prav tako vplivajo na stabilnost terapevtskega proteina in spremenijo specifično aktivnost proteina. Odstranimo jih med procesi izolacije in čiščenja biotehnoloških proizvodov, ki zajamejo predvsem

kromatografske metode. Nečistote namreč lahko vplivajo na biološko aktivnost, stabilnost in imunogenost (1).

Glede na izvor nečistot ločimo:

- Nečistote, povezane s proizvodnjo:

- nečistote, ki izhajajo iz ekspresijskega sistema:

V to skupino spadajo proteini iz gostiteljskih celic (HCP), nukleinske kisline (fragmetni DNA), katerih količina v končnem izdelku ne sme presegati od 100 pg do 10 ng na dnevni odmerek (7). Zaradi nepravilnosti pri nastajanju proteina v ekspresijskem sistemu lahko dobimo proizvode, ki se razlikujejo na N-koncu. Lahko je prisoten dodaten metionin na N-koncu ali pa je proteinu spremenjeno število aminokislin, kar pa vpliva na sekundarno in terciarno zgradbo proteina in posoledično na stabilnost, biološko aktivnost in imunogenost. Lahko so prisotni virusi, ki jih z inaktivacijo (toplota, radiacija, dehidracija, kemična sredstva, nevtralizacija), filtracijo ali precipitacijo odstranimo. Bakterije odstranujemo z uporabo sterilne filtracije z velikostjo por 0,2 µm. Sposobnost proizvodnega procesa, da odstrani in/ali inaktivira viruse, je treba dokazati v skladu z Mednarodno organizacijo za harmonizacijo (ICH) (8, 9);

- nečistote, ki so povezane s tehnologijo proizvodnje in čiščenja (komponente gojišč, starostjo celic in vrste fizikalno-kemijskih dejavnikov v bioreaktorju, reagenti pri čiščenju (npr. cianogen bromid, gvanidin, oksidirane in reducirane snovi), kovinski ioni, materiali iz kolon, anorganske soli (npr. težke kovine, arzen, nekovinski ion), topila) (10).

- Nečistote, povezane s proizvodom, vključno s proizvodi razgradnje

Proizvodi razgradnje, ki nastanejo pri proizvodnji in/ali skladiščenju v visokih koncentracijah, so naslednji:

- skrajšane oblike: hidrolitični encimi ali kemikalije lahko katalizirajo cepitev peptidnih vezi. Te je mogoče zaznati s pomočjo metod HPLC z obrnjeno fazo (rpHPLC; peptidno kartiranje) ali SDS-PAGE;

- druge modificirane oblike: deamidirane, izomerizirane, neskladno S-S povezane, oksidirane ali spremenjene konjugirane oblike (glikozilacija, fosforilacija) lahko zaznamo in jih karakteriziramo s kromatografskimi, elektroforeznimi in/ali drugimi ustreznimi analiznimi metodami (rpHPLC, kapilarna elektroforeza, masna spektrometrija);
- agregati: nastanek agregatov je posledica fizikalne nestabilnosti proteina (sprememba temperature, ionske moči, strižne sile). So slabše topni in imunogeni, zato je njihova prisotnost v produktu strogo omejena. Določamo jih z ustreznimi analiznimi metodami, kot sta gelska izključitvena kromatografija (SEC) in kapilarna elektroforeza (6,7,8).

1.3.1 HCP

HCP so gostiteljevi lastni proteini, ki kljub čiščenju še ostanejo v proizvodu. Gre za zelo heterogeno mešanico različnih proteinov, vsaj 70 % najpogostejših in najbolj nevarnih pa mora biti identificiranih in kvantificiranih, saj so v proizvodu lahko glavni sprožilec imunskega odziva, ali pa lahko zmanjšajo učinkovitost zdravila. Sestava in številčnost vrst HCP, ki ostanejo v očiščenem proizvodu monoklonskega protitelesa je odvisna od številnih dejavnikov. Izvor HCP je ekspresijski sistem. Stopnja očiščenosti HCP je odvisna tudi od vrst kromatografskih tehnik, ki jih uporabljamo v proizvodnem procesu. Afinitetna kromatografija je zaradi svoje specifičnosti učinkovita metoda za odstranitev velikega dela HCP. Proizvod zadrži, večina HCP pa se izpere (11, 12).

HCP običajno določamo z imunokemijskimi testi, kjer kot reagente uporabimo preparat antigenov HCP ali referenčni standard HCP in ustrezna poliklonska protitelesa (protiserume). Protiserumi morajo pokrivati širok spekter HCP, ki so značilni za določen proizvod. Za kvantifikacijo HCP najpogosteje uporabljamо t.i. »sendvič« encimskoimunski test (ELISA). Čeprav ni natančnih specifikacijskih mej za skupno vsebnost HCP v končnih biofarmacevtskih pripravkih, je zahteva regulativnih organov za vsebnost HCP do 100 ppm (100 ng HCP na mg terapevtskega proteina) (13).

Komercialno dostopne teste za detekcijo HCP običajno imenujemo generični testi, ki pa morajo biti dovolj specifični, da jih lahko uporabimo za več različnih proizvodov, izraženih v enakem ekspresijskem sistemu. Občutljivost je odvisna od rezultata izmerjenih kumulativnih odzivov številnih individualnih HCP v primerjavi z odzivom referenčnega

standarda HCP. Razvoj in izbor imunskega testa je dobro podpreti z uporabo analiznih metod (npr. 2D-PAGE, 2D-DIGE, rpHPLC, prenos western, masna spektrometrija), s katerimi karakteriziramo različne HCP v produktu. Zaradi raznolikosti HCP nobena tehnologija ne zmora detektirati in nadzorovati vseh prisotnih HCP v proizvodu.

Pri izboru testa za določanje HCP je treba upoštevati več dejavnikov, med drugim stopnjo razvoja izdelka, naravo gostiteljskih celic in imunogenost proteinov, način izražanja in proizvodni proces. Na voljo so komercialni generični kompleti za detekcijo HCP, ki so namenjeni proizvodom, ki uporabljajo isto vrsto celic kot ekspresijski sistem (12, 13).

1.3.2 RAZVOJ PROTITELES ZA DETEKCIJO HCP

Proteine ekspresijskega sistema pridobivamo iz enakih celic, kot so tiste, ki izražajo želeni rekombinantni protein, le da so brez gena za produkt (t.i. *mock run*). Tako celično linijo ustvarimo s transfekcijo gostiteljske celične linije s praznim plazmidom – s plazmidom, uporabljenim za proizvodnjo celične linije, le da ta ne vsebuje gena za rekombinantni protein. Celice namnožimo v bioreaktorju, jih požanjemo s centrifugiranjem ali filtriranjem fermentacijske brozge ter liziramo. S sproščenimi proteini imuniziramo ustreznega sesalca, ki proizvede zadostno količino in širok spekter različnih specifičnih protiteles proti HCP. Takšna protitelesa so primerna za razvoj t.i. generičnih testov. Nasprotno moramo pri pripravi t.i. produktno specifičnih testov za imunizacijo uporabiti material, sproščen iz gostiteljskih celic, ki je prešel določeno število stopenj izolacije in čiščenja (*enakih*, kot jih uporabljamo pri proizvodnji rekombinantnega produkta). Tako ustvarjena protitelesa prepoznajo reprezentativne predstavnike HCP (torej takšne, ki jih bomo z večjo verjetnostjo zasledili kot nečistote v končnem produktu) (14, 15).

Za doseganje največjega imunskega odziva je potrebnih več imunizacij, kar običajno traja 3–6 mesecev. Imunski odziv proti HCP med imunizacijo nadzorujemo z določanjem titra protiteles (s testom ELISA). Zmožnost prepoznavanja širokega spektra HCP analiziramo s primerjavo rezultatov 1D- (enodimensionalna) in 2D- (dvodimensionalna) elektroforeze, pri čemer za detekcijo uporabljamo nespecifično barvanje proteinov (Coomassie modro, barvanje s srebrom) in prenos western (16).

Ko sesalec izdela določeno količino protiteles, mu odvzamemo kri in shranimo krvni serum (t.i. antiserum). Serum očistimo z afinitetno kromatografijo, pri kateri so na inertnem nosilcu imobilizirane molekule HCP. Med ločevanjem se na antigen vežejo

tarčna protitelesa iz vzorca. Ostale komponente se ne vežejo in jih speremo iz kolone. S spremembo puferskih pogojev (pH, ionska jakost) dosežemo disociacijo kompleksa protitelo-antigen in elucijo protiteles iz kolone. Na koncu je treba dokazati specifičnost protiteles proti HCP. Za to uporabimo metode SDS-PAGE ali 2D-elektrofrezo in prenos western. Specifičnost protiteles je za testiranje rezidualnih HCP v končnem proizvodu zelo pomembna, saj morajo detektirati vsaj 70 % HCP, predvsem tiste najbolj nevarne, v dovolj nizkih koncentracijah (10 ppm), pri čemer pa ne smejo biti navzkrižno reaktivni na produkt. Če imamo dovolj specifičen reagent proti HCP, potem lahko to protitelo uporabimo v kateremkoli imunskem testu. Najpogosteje uporabimo test ELISA, v okviru te naloge pa smo se odločili, da reagent uporabimo za razvoj testa AlphaLISA (11).

1.3.3 DETEKCIJA PROTEINSKIH NEČISTOT

Kromatografske, elektroforezne in imunokemijske metode so najpogostejše metode za določanje proteinskih nečistot. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je najširše uporabljena tehnika za karakterizacijo in kvantifikacijo določenih komponent v vzorcu, med drugim tudi za detekcijo proteinskih nečistot (11).

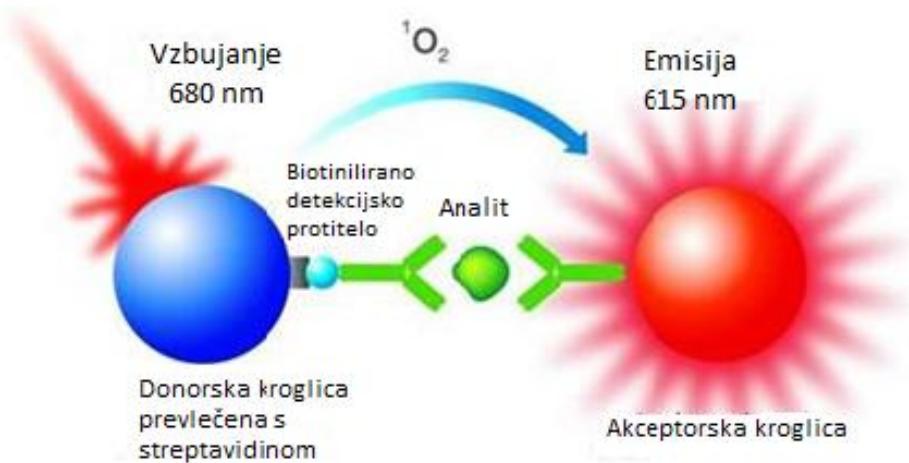
Elektroforezne metode so separacijske metode, pri katerih nabite molekule pod vplivom električnega polja potujejo v smeri elektrode z nasprotnim nabojem. Delimo jih na dve vrsti: elektroforeza na nosilcu (npr. SDS-PAGE) in brez nosilca – kapilarna elektroforeza, kjer vzorec potuje po stekleni kapilari, napoljeni z elektroforeznim pufom, pri visoki napetosti. Najpogosteje uporabljeni metodi za analizo proteinskih vzorcev sta kapilarna conska elektroforeza (CZE), kjer se proteini ločujejo glede na različno mobilnost, in kapilarna gelska elektroforeza (CE-SDS), kjer gel uporabimo kot molekularno sito, ki različno zadržuje komponente vzorca glede na njihovo velikost in obliko, pri čemer večje molekule potujejo počasneje kot manjše (11, 17, 18).

Princip imunokemijskih metode temelji na tvorbi imunskega kompleksa (kompleks antigen – protitelo). Najpogosteje uporabljena tehnika, predvsem zaradi občutljivosti testa in odsotnosti radioaktivnosti, je ELISA (11).

1.4 ALPHALISA

Imunokemijske metode sodijo med najbolj uporabne metode za detekcijo in kvantifikacijo bioloških molekul. Ena izmed takih metod je tudi AlphaLISA (*Amplified Luminiscence Proximity Homogeneous Assay*), ki jo odlikuje visoka občutljivost in je primerna za avtomatizacijo. Spada med homogene teste, kar pomeni, da nevezanih reagentov ni potrebno izpirati (13, 37, 32).

Pri testu AlphaLISA uporabimo donorsko in akceptorsko kroglico, ki sprožita kemijsko reakcijo ob vzbujanju z laserjem le, če sta dovolj blizu. To pa se zgodi, če se obe protitelesi, vezani na različni kroglici, vezeta na isto molekulo antiga. Pri »sendvič« obliki imunskega testa sta za vsak analit (npr. proteinsko nečistoto) potrebni dve protitelesi, ki prepoznavata različna (oddaljena) epitopa. Na biotinilirano detekcijsko protitelo, specifično za nečistoto, ki jo želimo detektirati, se vežejo donorske kroglice, ki so prevlečene s streptavidinom. Drugo protitelo, usmerjeno proti analitu je neposredno konjugirano na akceptorske kroglice. Če je analit prisoten v vzorcu, preko protiteles pritegne donorsko in akceptorsko kroglico v neposredno bližino (slika 1). Z lasersko svetlobo valovne dolžine 680 nm dosežemo z vzbujanjem donorskih kroglic pretvorbo atmosferskega kisika v singletno obliko, ki sproži kemijsko reakcijo v akceptorski kroglici. Posledica je emisija svetlobe, ki jo izmerimo z luminimetrijo. Pri metodi AlphaScreen je signal široko spektralen in manj specifičen (520-620 nm), pri metodi AlphaLISA pa je spekter ožji (615 nm) in zato bolj specifičen. Intenziteta svetlobe je v določenem koncentracijskem območju premosorazmerna količini analita. Glavna razlika med metodo AlphaLISA in metodo AlphaScreen je v sestavi akceptorskih kroglic. Akceptorska kroglica za test AlphaScreen je sestavljena iz treh barvil: tioksina, antracena in rubrena, akceptorska kroglica za test AlphaLISA pa iz kelata evropija. Donorska kroglica vsebuje na svetlobo občutljivo snov ftalocianin, ki je ključen za pretvorbo atmosferskega v singletni kisik. Kot ostale ekscitacijske molekule ima tudi singlet kisika omejeno življenjsko dobo, preden se spet pretvori v osnovno stanje. Deluje zelo kratek čas ($t_{1/2} = 4 \mu\text{s}$) in v zelo majhnem radiju (200 nm) (19, 20, 21, 22, 23).



Slika 2 Princip delovanja metode AlphaLISA (13)

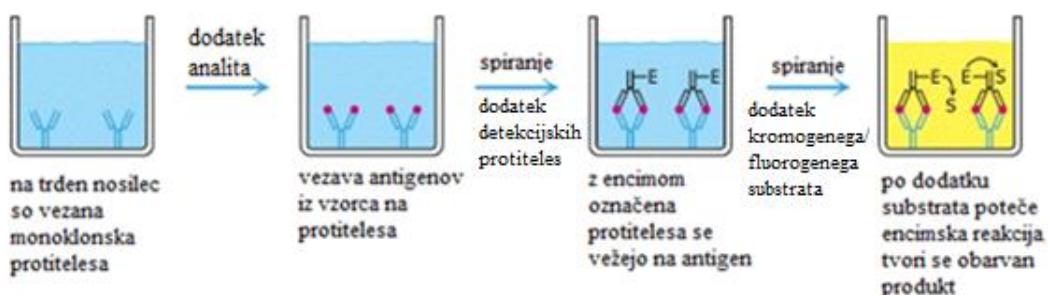
Metoda AlphaLISA zahteva specifičen čitalnik, ki omogoča detekcijo luminiscence. Luminiscenca je fizikalni pojav, ki temelji na emisiji svetlobe, kot posledica vračanja elektronov iz vzbujenega v osnovno energijsko stanje (19). Pri metodi AlphaLISA je za vzbujanje molekul potreben laser pri 680 nm (ksenonova bliskavica za to vrsto detekcije ne zadostuje). Za usmerjanje laserskega žarka naravnost v vdolbinico z vzorcem na mikrotitrski ploščici skrbi poseben zrcalni modul. Pot emisije svetlobe poteka tako, da luminiscenčna svetloba prehaja nazaj skozi zrcalni modul in nato skozi filter v fotopomnoževalno cev. Na tej poti je tudi zaslonka, ki je v fazi emisije odprta, med vzbujanjem pa zaprta, da zaščiti detektor pred lasersko svetlobo. Detektor se nahaja neposredno nad ploščo in odčitava signal ob vdolbinici, ki je bila vzbujena z laserjem. Svetloba nato skozi zaslонko potuje v detektor. Detektorji luminiscence so na rdečo svetlobo občutljive, temperaturno stabilizirane cilindrične fotopomnoževalne cevi (24).

Priporoča se le ena meritev na vdolbinico, saj se vzorec zaradi vzbujene svetlobe osvetli in s tem pride do aktivacije donorskih kroglic. Pri tem je treba upoštevati tudi medsebojni vpliv poti signala: osvetlitev, ki ga povzroči vzbujanje sosednjih vzorcev, prehod signala zaradi prej vzbujenega sosednjega vzorca in zajemanje signala iz sosednjih vdolbinic. Ta vpliv lahko izničimo s korekcijskim faktorjem, ki pa je del programske opreme (25, 26).

1.5 SENDVIČ ELISA

Encimskoimunski test ali ELISA (angleško: *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) je zaradi svoje enostavnosti in občutljivosti najpogosteje uporabljen imunokemijski test. Pri testu sendvič ELISA dodamo protitelesu (visoko specifičnem ali monoklonskem), ki je vezan na mikrotitrsko ploščico, vzorec (antigen, ki ga določamo). Nastane kompleks antigen-protitelo, ki mu nato dodamo sekundarno protitelo, označeno z encimom. Z dodanim kromogenim ali fluorogenim substratom se nato tvori obarvan produkt, ki mu izmerimo odziv (absorbenco ali fluorescenco) s spektrofotometrom ali spektrofluorimetrom. Pri našem delu bomo za kvantifikacijo HCP uporabljali metodo sendvič ELISA, kjer sta lovilna in detekcijska molekula protitelesi (slika 3) (27, 28).

Prednost testa AlphaLISA pred ELISA je predvsem v tem, da je test homogen (nevezanega materiala ni potrebno izpirati) in zaradi tega tudi krajsi (slika 4). Test ELISA pa je heterogen, pri katerem nevezana protitelesa odstranimo in za detekcijo ni potreben laser, kot je to pri AlphaLISA metodi, signal (absorbanca pri 450 nm) merimo obarvanemu produktu, ki nastane kot posledica encimske reakcije. Pri metodi AlphaLISA pa dobimo signal kot posledico bližine donorske in akceptorske kroglice z detekcijo luminiscence (29, 30).



Slika 3: Potek metode sendvič ELISA (27)

ELISA (4 - 8 ur)



AlphaLISA (2 uri)



Slika 4: Primerjava izvedb metod ELISA in AlphaLISA (20)

2. NAMEN DELA

AlphaLISA je imunokemijski test, ki ga uporabljam za določanje specifičnih makromolekul v raztopinah. Lahko ga uporabljam kot alternativo encimskoimunskim testom, ki spadajo med bolj uveljavljene teste za določanje proteinskih nečistot v biofarmacevtiki. Za razvoj testa AlphaLISA bomo uporabili enaka protitelesa, kot jih uporabljam pri testu ELISA, ki je razvit proti istim nečistotam, zato je njihova specifičnost že potrjena.

Namen našega dela je razviti hitro in zanesljivo metodo za določitev količine proteinskih nečistot (HCP) v zgodnjem razvoju podobnih bioloških zdravil. Za test AlphaLISA bomo uporabili komercialno dostopna protitelesa (generični test) in protitelesa, razvita specifično za naš proizvodni proces (produktno specifični test).

V okviru magistrske naloge bomo izvedli naslednje eksperimente:

- preizkusili bomo različne sendvič formate s ciljem, da dobimo odziv, ki je premo sorazmeren s koncentracijo HCP;
- optimizirali bomo količino reagentov (donorske kroglice, prekrite s streptavidinom, biotinilirana protitelesa, akceptorske kroglice, konjugirane s protitelesi), ki dajejo optimalne rezultate in najnižje ozadje; ocenili bomo ustreznost modela standardne krivulje;
- analizo več procesnih vzorcev in primerjavo rezultatov, dobljenih z AlphaLISA, z obstoječim testom ELISA (test, ki ga uporabljam za določanje procesnih oziroma proteinskih nečistot).

Vse analize bomo izvajali z robotom za avtomatizirano pripravo analiz s čitalcem mikrotitrskih ploščic. Uporabili bomo programsko opremo Magellan. Metodi, ki ju bomo uporabili za opisani namen, sta imunokemijski test (AlphaLISA in AlphaScreen) in spektroskopija (luminiscenca). Statistične parametre (povprečje odzivov, relativna standarda deviacija) bomo izračunali s pomočjo programa Excel.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Reagenti in topila

- Prečiščena voda (v nadaljevanju Milli Q); pridobljena s sistemom za pripravo ultra čiste vode Milli-Q Advantage A10, proizvajalca Millipore.
- AlphaLISA HiBlock pufer (Perkin Elmer; AL301C; 25 mM HEPES pH = 7,4, 0,1 % kazein, 1 mg/ml dekstrana – 500, 0,5 % triton – X-100, 0,5 % pufer za blokiranje, 0,5 % BSA in 0,05 % proclin – 300).
- Akceptorske kroglice, konjugirane z anti-CHO HCP; generična protitelesa proti HCP iz celične linije CHO (vzeto iz kompleta za komercialni generični test; AL301C; Perkin Elmer).
- Akceptorske kroglice, konjugirane z anti-CHO HCP (poliklonska protitelesa proti HCP, razvita specifično za naš proces, vezana na akceptorske kroglice; konjugacijo je opravil proizvajalec; Novartis/Perkin Elmer).
- Biotinilirana protitelesa (poliklonska protitelesa proti HCP, razvita specifično za naš proces, konjugirana z biotinom; Novartis).
- Biotinilirani fragmenti Fab2 (pripravljeni iz protiteles proti HCP, razvitih specifično za naš proces; konjugirani z biotinom; Novartis).
- Donorske kroglice s streptavidinom (Perkin Elmer 6760002); v nadaljevanju donorske kroglice.
- Kroglice Omni (Omnibeads; Perkin Elmer 6760626D).

3.1.1 Vzorci

- Vzorec žetve (fermentacijska brozga, iz katere smo odstranili celice in celične dele s centrifugiranjem)
- Vzorec po prvi kromatografski stopnji
- Vzorec po drugi kromatografski stopnji
- Vzorec po tretji kromatografski stopnji

3.1.2 Naprave in pribor

- Tecan Freedom EVO – robot za avtomatizirano pripravo analiz
- Čitalec mikrotitrskih ploščic Infinite M1000-PRO (Tecan), opremljen z laserjem in filtrom za luminimetrijo
- Mikropipete Biohit
- Nastavki za mikropipete
- Bele mikrotitrskie ploščice s 96 vdolbinicami polovične površine (Perkin Elmer 6005560)
- Bela mikrotitrskia ploščica s 384 vdolbinicami (Perkin Elmer 6005350).
- Vibracijski mešalnik (Tehnica; Vibromix)
- Mikrocentrifuga (Eppendorf, MiniSpin plus)

3.1.3 Standard

Interni standard HCP s koncentracijo 100 µg/ml

3.1.4 Pufri in raztopine

- Priprava pufra AlphaLISA HiBlock (v nadaljevanju pufer AlphaLISA). Za pripravo 25 ml pufra v 22,5 ml Milli Q dodamo 2,5 ml AlphaLISA HiBlock.
- Gojišče. Glavne sestavine gojišča: sladkorji (glukoza, laktoza, sukroza, maltoza, dekstrin), maščobe, aminokisline, elektroliti (kalcijevi, natrijevi, kalijevi, fosfatni ioni), vitamini (askorbinska kislina, α-tokoferol, tiamin, biotin, folna kislina), oligominerali (železovi, manganovi, bakrovi, kobaltovi, cinkovi ioni), hormoni.
- Pufer po prvi kromatografski stopnji: natrijev acetat
- Pufer po virusni inaktivaciji: H₃PO₄ / TRIS
- Pufer po drugi kromatografski stopnji: TRIS acetat / NaCl
- Pufer po tretji kromatografski stopnji: TRIS acetat / NaCl

3.1.5 Kemikalije

- Fosforna kislina (H₃PO₄; Merck; 100573)

- Natrijev hidroksid (NaOH, Sigma S 5881)
- Natrijev klorid (NaCl; Merck 106404)
- Ocetna kislina 96 % (Merck 100062)
- TRIS (tris(hidroksimetil)aminometan; Merck, 108382)

3.2 Razvoj metode

Testiranje različnih formatov:

Testiranje formata z akceptorskimi kroglicami z generičnimi protitelesi (komercialni generični test) in donorskimi kroglicami ter biotiniliranimi fragmenti Fab2 iz protiteles, razvitih specifično za naš proces čiščenja:

- spreminali smo koncentracijo biotiniliranih fragmentov Fab2 (5 nM, 7 nM in 9 nM) pri konstantni koncentraciji akceptorskih (0,05 mg/ml) in donorskih kroglic (0,08 mg/ml) iz komercialnega generičnega testa. Uporabili smo tehnologijo AlphaScreen.

Testiranje formata z akceptorskimi kroglicami z generičnimi protitelesi (komercialni generični test) in donorskimi kroglicami ter biotiniliranimi protitelesi:

- testirali smo standardno koncentracijo akceptorskih kroglic (0,05 mg/ml) iz komercialnega testa, biotinilirana protitelesa (5 nM) in donorske kroglice (0,08 mg/ml). Uporabili smo tehnologijo AlphaScreen.

Testiranje formata z akceptorskimi kroglicami (konjugiranimi s protitelesi, specifičnimi za naš proces čiščenja), biotiniliranimi protitelesi in donorskimi kroglicami:

- testirali smo akceptorske kroglice (0,05 mg/ml), ki so bile konjugirane s protitelesi, specifičnimi za naš proces čiščenja, biotiniliranimi protitelesi (5 nM) in donorskimi kroglicami (0,08 mg/ml). Akceptorske kroglice iz komercialnega generičnega testa smo zamenjali z akceptorskimi kroglicami, ki so konjugirane s protitelesi, specifičnimi za naš proces čiščenja. Uporabili smo tehnologijo AlphaLISA.

Optimizacija testa:

V nadaljevanju smo uporabljali samo akceptorske kroglice, ki so bile povezane s protitelesom, specifičnim za naš proces čiščenja, in tehnologijo AlphaLISA.

Vpliv spremenjanja koncentracije biotiniliranih protiteles na odziv testa:

- spreminjali smo koncentracijo biotiniliranih protitelesa (5 nM, 1 nM in 0,5 nM) pri konstantni končni koncentraciji akceptorskih (0,05 mg/ml) in donorskih kroglic (0,08 mg/ml).

Vpliv spreminjanja koncentracije akceptorskih kroglic na odziv testa:

- spreminjali smo koncentracije akceptorskih kroglic (0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml in 0,05 mg/ml) pri konstantni končni koncentraciji donorskih kroglic (0,08 mg/ml) in biotiniliranih protiteles (5 nM).

Vpliv spreminjanja koncentracije donorskih kroglic na odziv testa:

- spreminjali smo koncentracije donorskih kroglic (0,08 mg/ml, 0,2 mg/ml in 0,5 mg/ml) pri konstantni končni koncentraciji akceptorskih kroglic (0,05 mg/ml) in biotiniliranih protiteles (5 nM).

Vpliv spreminjanja koncentracije biotiniliranega protitelesa na odziv testa (drugi poskus):

- nadaljevali smo s preverjanjem vpliva višanja koncentracije biotiniliranega protitelesa (5 nM, 10 nM in 20 nM) pri konstantni končni koncentraciji akceptorskih (0,2 mg/ml) in donorskih kroglic (0,08 mg/ml).

3.2.1 Testiranje linearnosti detektorja

Testiranje linearnosti detektorja smo preverili z uporabo kroglic Omni. Kroglice Omni načeloma uporabljamo za testiranje variabilnosti signala, sami pa smo jih uporabili za testiranje linearnosti. To smo naredili zato, ker je bil naš detektor nadgrajen za detekcijo AlphaLISA, in smo želeli preveriti linearnost detektorja. Detektor mora zagotavljati linearen odziv po celotnem merilnem območju, ki ga uporabljamo v testu. Kroglice vsebujejo vse potrebne kemijske komponente za tvorbo močnega signala AlphaScreen (tj. ni potrebe po ločenih AlphaScreen-akceptorskih in -donorskih kroglicah). Suspenzije kroglic Omni smo pripravili s stopenjskim redčenjem, kot je prikazano v preglednici 1 (31).

Preglednica 1: Prikaz priprave suspenzije kroglic Omni

Koncentracija kroglic Omni ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Volumen kroglic Omni (μl)	Volumen pufra AlphaLISA (μl)	Skupen volumen (μl)
1000*	160	640	800
500	400	400	800
250	400	400	800
125	400	400	800
62,50	400	400	800
31,25	400	400	800
15,63	400	400	800
7,81	400	400	800
3,91	400	400	800
1,95	400	400	800
0,98	400	400	800
0,49	400	400	800
0,24	400	400	800
0,12	400	400	800
0,06	400	400	800
0,03	400	400	800

* kroglice Omni ($c = 5 \text{ mg/ml}$) petkratno redčimo do končne koncentracije $1000 \text{ }\mu\text{g/ml}$

Po $50 \text{ }\mu\text{l}$ tako pripravljenih suspenzij smo nanesli v vdolbinice mikrotitrsko ploščice v šestih paralelkah.

3.2.2 Priprava standardov za umeritveno krivuljo

Standarde za umeritveno krivuljo smo pripravili iz založne raztopine standarda HCP s koncentracijo $100 \text{ }\mu\text{g/ml}$. Gre za stopenjsko redčenje s pufrom AlphaLISA, kot je prikazano v preglednici 2.

Preglednica 2: Priprava in koncentracije standardov za umeritveno krivuljo

Oznaka	Volumen standarda HCP (μl)	Volumen pufra AlphaLISA (μl)	Končna koncentracija (ng/ml)
STD A	10	990	1000
STD B	120	280	300
STD C	120	240	100
STD D	120	280	30
STD E	120	240	10
STD F	120	280	3
STD G	120	240	1
BLK	0	120	0

* Volumen standarda HCP s koncentracijo 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

3.2.3 Priprava akceptorskih in donorskih kroglic ter biotiniliranih protiteles oziroma biotiniliranega fragmenta Fab2 iz protiteles, specifičnih za naš proces

Priprava akceptorskih kroglic (konjugirana s protitelesi, specifičnimi za naš proces čiščenja):

- končna koncentracija 0,05 mg/ml: akceptorske kroglice s koncentracijo 5 mg/ml smo 100-krat redčili s pufrom AlphaLISA.
- končna koncentracijo 0,1 mg/ml: akceptorske kroglice s koncentracijo 5 mg/ml smo 50-krat redčili s pufrom AlphaLISA.
- končna koncentracijo 0,2 mg/ml: akceptorske kroglice s koncentracijo 5 mg/ml smo 25-krat redčili s pufrom AlphaLISA.

Priprava akceptorskih kroglic z generičnimi protitelesi proti HCP celic CHO iz komercialnega generičnega testa:

- končna koncentracija 0,05 mg/ml: akceptorske kroglice iz komercialnega generičnega testa s koncentracijo 5 mg/ml smo 100-krat redčili s pufrom AlphaLISA.

Priprava biotiniliranega fragmenta Fab2, iz protiteles razvitih specifično za naš proces čiščenja:

- končna koncentracija 5 nM (55 ng/ml): biotiniliran fragment Fab2 s koncentracijo 500 nM smo 100-krat redčili s pufrom AlphaLISA.
- končna koncentracija 7 nM (75 ng/ml): biotiniliran fragment Fab2 s koncentracijo 500 nM smo 71-krat redčili s pufrom AlphaLISA.
- končna koncentracija 9 nM (100 ng/ml): biotiniliran fragment Fab2 s koncentracijo 500 nM smo 56-krat redčili s pufrom AlphaLISA.

Priprava biotiniliranih protiteles:

- končna koncentracija 0,5 nM (80 ng/ml): biotinilarna protitelesa s koncentracijo 80 µg/ml (500 nM) smo 1000-krat redčili s pufrom AlphaLISA.
- končna koncentracija 1 nM (160 ng/ml): biotinilarna protitelesa s koncentracijo 80 µg/ml (500 nM) smo 500-krat redčili s pufrom AlphaLISA.
- končna koncentracija 5 nM (800 ng/ml): biotinilarna protitelesa s koncentracijo 80 µg/ml (500 nM) smo 100-krat redčili s pufrom AlphaLISA.
- končna koncentracija 10 nM (1600 ng/ml): biotinilarna protitelesa s koncentracijo 80 µg/ml (500 nM) smo 50-krat redčili s pufrom AlphaLISA.
- končna koncentracija 20 nM (3200 ng/ml): biotinilarna protitelesa s koncentracijo 80 µg/ml (500 nM) smo 25-krat redčili s pufrom AlphaLISA.

Priprava donorskih kroglic:

- končna koncentracija 0,05 mg/ml: donorske kroglice s koncentracijo 5 mg/ml smo 100-krat redčili s pufrom AlphaLISA.
- končna koncentracija 0,07 mg/ml: donorske kroglice s koncentracijo 5 mg/ml smo 71-krat redčili s pufrom AlphaLISA.
- končna koncentracija 0,08 mg/ml: donorske kroglice s koncentracijo 5 mg/ml smo 63-krat redčili s pufrom AlphaLISA.

- končna koncentracija 0,2 mg/ml: donorske kroglice s koncentracijo 5 mg/ml smo 25-krat redčili s pufom AlphaLISA.
- končna koncentracija 0,5 mg/ml: donorske kroglice s koncentracijo 5 mg/ml smo 10-krat redčili s pufom AlphaLISA.

3.2.4 Določevanje vpliva matriksa

S tem poskusom smo želeli določiti vpliv posameznih pufrov, v katerih je preiskovani analit, na intenziteto signala. Poskus smo opravili tako, da smo pripravili pet- in dvakratne redčitve pufra AlphaLISA s končnim procesnim pufom, značilnim za posamezno kromatografsko stopnjo, ter odzive primerjali z odzivi standardne krivulje (določenimi v pufu AlphaLISA). Po vsaki stopnji čiščenja se vzorec nahaja v drugem procesnem pufu. Uporabili smo pufre po prvi, po drugi in po tretji kromatografski stopnji ter po virusni inaktivaciji, ter vanje redčili standard HCP. Tako pripravljene redčitve smo nanesli na mikrotitrsko ploščico v dveh ponovitvah.

3.2.5 Postopek dela

Opis postopka izvedbe metode AlphaLISA:

1. nanos standarda HCP ozziroma vzorca: na mikrotitrsko ploščico smo s pomočjo robotskega sistema Tecan nanseli v vsako vdolbinico po 5 µl standarda HCP ali vzorca;
2. nanos akceptorskih kroglic: v vsako vdolbinico na mikrotitrski ploščici smo s pomočjo robotskega sistema Tecan nanesli po 10 µl suspenzije akceptorskih kroglic s koncentracijo 0,1 mg/ml;
3. inkubacija: 30 minut pri 23 °C;
4. nanos biotiniliranih protiteles: v vsako vdolbinico na mikrotitrski ploščici smo s pomočjo robotskega sistema Tecan nanesli po 10 µl raztopine biotiniliranih protiteles s koncentracijo 800 ng/ml;
5. inkubacija: 60 minut pri 23 °C;
6. nanos donorskih kroglic: v vsako vdolbinico na mikrotitrski ploščici smo s pomočjo robotskega sistema Tecan nanesli po 25 µl suspenzije donorskih kroglic s koncentracijo 0,08 mg/ml;
7. inkubacija 30 minut pri 23 °C v temi;
8. merjenje signala: s čitalcem mikrotitrskih ploščic smo izmerili intenziteto luminiscence pri 615 nm po vzbujanju;

3.1 Primerjava testa AlphaLISA z obstoječim (t.i. HCP-ELISA)

Za primerjavo testa AlphaLISA z obstoječo HCP-ELISA smo izvedli meritve nekaterih procesnih vzorcev. Procesne vzorce, katerih koncentracije HCP so bile že predhodno določene s testom HCP ELISA (preglednica 3), smo redčili s pufom AlphaLISA. Procesne vzorce smo redčili zaporedno do končnih koncentracij, ki so v merilnem območju testa, (preglednice 4–7), in jih po 5 µL nanesli na mikrotitrsko ploščico.

Preglednica 3: Koncentracije HCP v procesnih vzorcih, določene s testom HCP ELISA

Izhodni vzorec	Koncentracija (ng/ml)
Vzorec žetve	578940
Vzorec po prvi kromatografski stopnji	20492
Vzorec po drugi kromatografski stopnji	215
Vzorec po tretji kromatografski stopnji	9

Preglednica 4: Priprava vzorcev žetev

Oznaka vzorca	Končna (tarčna) koncentracija (ng/ml)	Volumen vzorca (µl)	Volumen pufra AlphalISA (µl)	Skupni volumen (µl)	Število paralelk	Redčitveni faktor izhodnega vzorca
Žetev	578940*	/	/	/	/	/
Žetev_1	28947	20	380	400	/	20
Žetev_2	1000	20	559	579	2	579
Žetev_3	300	120	280	400	2	1930
Žetev_4	100	120	240	360	2	5789
Žetev_5	30	120	280	400	2	19298
Žetev_6	10	120	240	360	2	57894
Žetev_7	3	120	280	400	2	192980
Žetev_8	1	120	240	360	2	578940

* začetna koncentracija HCP, ki je bila izmerjena s testom HCP-ELISA

Preglednica 5: Priprava vzorcev po prvi kromatografski stopnji

Oznaka vzorca	Končna (tarčna) koncentracija (ng/ml)	Volumen vzorca (µl)	Volumen pufra AlphaLISA (µl)	Skupni volumen (µl)	Število paralelk	Redčitveni faktor izhodnega vzorca
Vzorec 1	20492*	/	/	/	/	/
Vzorec 1_1	1000	20	390	410	2	21
Vzorec 1_2	207	120	280	400	2	99
Vzorec 1_3	62	120	240	360	2	330
Vzorec 1_4	21	120	280	400	2	989
Vzorec 1_5	6,2	120	240	360	2	3297
Vzorec 1_6	2,1	120	280	400	2	9890
Vzorec 1_7	0,6	120	240	360	2	32967

* začetna koncentracija HCP, ki je bila izmerjena s testom HCP-ELISA

Preglednica 6: Priprava vzorcev po drugi kromatografski stopnji

Oznaka vzorca	Končna (tarčna) koncentracija (ng/ml)	Volumen vzorca (µL)	Volumen pufra AlphaLISA (µl)	Skupni volumen (µl)	Število paralelk	Redčitveni faktor izhodnega vzorca
Vzorec 2_1	215*	200	0	200	2	1
Vzorec 2_2	108	70	220	290	2	2
Vzorec 2_3	36	120	240	360	2	6
Vzorec 2_4	4,0	120	240	360	2	54
Vzorec 2_5	1,3	120	240	360	2	162
Vzorec 2_6	0,4	120	240	360	2	486

* začetna koncentracija HCP, ki je bila izmerjena s testom HCP-ELISA

Preglednica 7: Priprava vzorcev po tretji kromatografski stopnji

Oznaka vzorca	Končna (tarčna) koncentracija (ng/ml)	Volumen vzorca (µl)	Volumen pufra AlphaLISA (µl)	Skupni volumen (µl)	Število paralelk	Redčitveni faktor izhodnega vzorca
Vzorec 3_1	9,0*	200	0	200	2	1
Vzorec 3_2	4,5	100	100	200	2	2
Vzorec 3_3	2,3	100	100	200	2	4
Vzorec 3_4	1,1	100	100	200	2	8
Vzorec 3_5	0,6	100	100	200	2	16

* začetna koncentracija HCP, ki je bila izmerjena s testom HCP-ELISA

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Razvoj metode

Z razvojem metode smo želeli razviti in optimizirati test AlphaLISA za določanje HCP v procesnih vzorcih.

Testiranje formatov

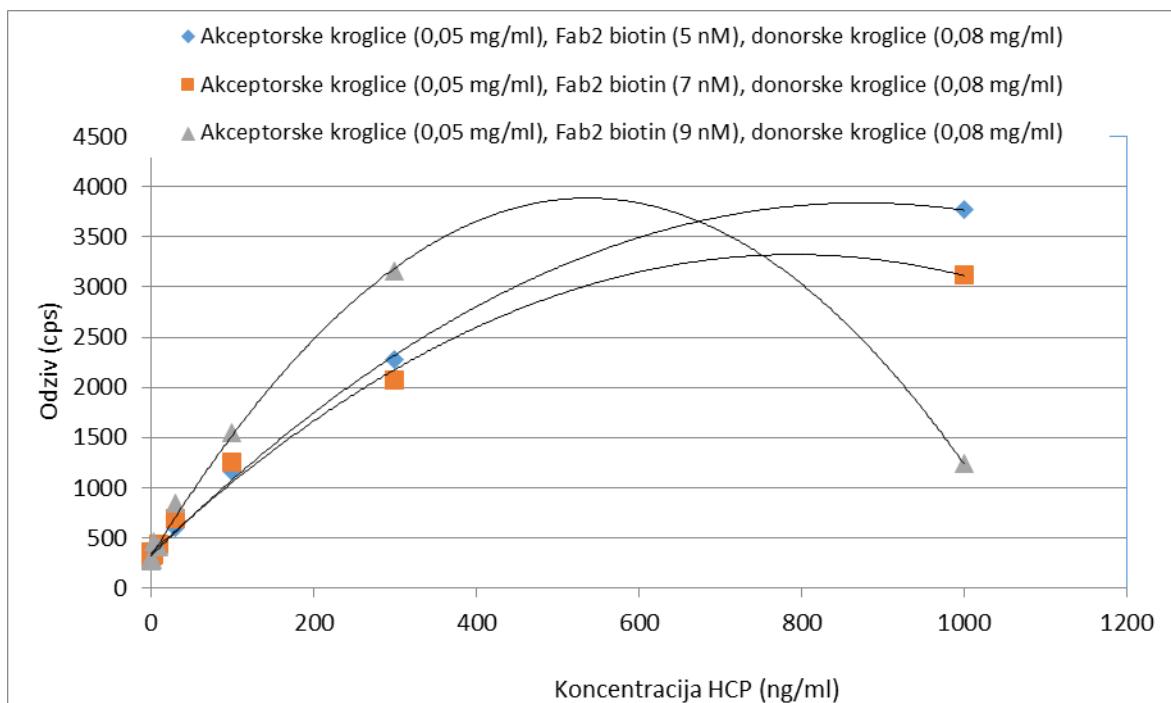
- Testiranje formata z akceptorskimi kroglicami z generičnimi protitelesi (komercialni generični test) in donorskimi kroglicami ter biotiniliranimi fragmenti Fab, razvitimi za nas proces čiščenja

V določenem območju je odziv testa premo sorazmeren s koncentracijo HCP. Tako je odziv monotono naraščajoč pri koncentraciji 5 nM biotiniliranega specifičnega fragmenta Fab2 v območju koncentracije HCP 30–1000 ng/ml, pri koncentraciji 7 nM v območju od 10–1000 ng/ml in za koncentracijo 9 nM v območju od 3–300 ng/ml (preglednica 8).

Pri najvišji koncentraciji (9 nM) biotiniliranega reagenta Fab2 smo opazili učinek kavlja zaradi previsokih koncentracij reagentov (slika 5). Visoke koncentracije biotiniliranega fragmenta Fab2 pripomorejo k večji občutljivosti testa, vendar pa zaradi steričnih ovir hitro pride do zasičenosti. Fragment Fab2 je namreč za tretjino manjši od celega protitelesa.

Preglednica 8: Testiranje formata z akceptorskimi kroglicami z generičnimi protitelesi (komercialni generični test) in donorskimi kroglicami ter biotiniliranimi fragmenti Fab2, razvitimi za naš proces čiščenja

Koncentracija (ng/ml)	Akceptorske kroglice (0,05 mg/ml), Fab2-biotin (5 nM), donorske kroglice (0,08 mg/ml)				Akceptorske kroglice (0,05 mg/ml), Fab2-biotin (7 nM), donorske kroglice (0,08 mg/ml)				Akceptorske kroglice (0,05 mg/ml), Fab2-biotin (9 nM), donorske kroglice (0,08 mg/ml)			
	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD %	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD %	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD %
1000	3803	3733	3768	1	3383	2859	3121	12	1232	1245	1239	1
300	2282	2272	2277	0	2549	1599	2074	32	3146	3176	3161	1
100	1205	1125	1165	5	1349	1165	1257	10	1522	1565	1544	2
30	668	542	605	15	722	662	692	6	922	778	850	12
10	402	428	415	4	385	485	435	16	442	385	413,5	10
3	358	305	332	11	368	298	333	15	468	452	460	2
1	328	312	320	4	285	365	325	17	285	275	280	3
0,3	285	358	322	16	285	342	314	13	262	348	305	20
0,1	358	292	325	14	322	328	325	1	268	325	297	14
0,03	285	322	304	9	348	248	298	24	265	295	280	8
0,01	288	288	288	0	295	425	360	26	252	288	270	9
0,003	245	302	274	15	275	288	282	3	282	262	272	5



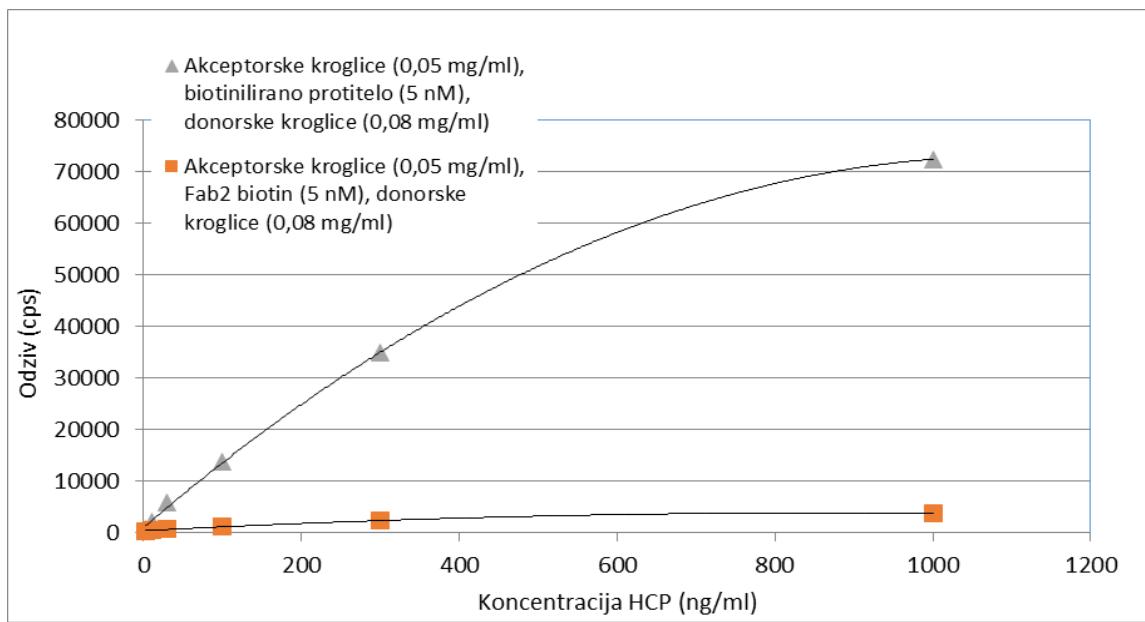
Slika 5: Grafični prikaz testiranja formata z akceptorskimi in donorskimi kroglicami iz komercialnega generičnega testa in biotiniliranega fragmenta Fab2, razvitega za naš proces čiščenja

- Testiranje formata z akceptorskimi kroglicami z generičnimi protitelesi (komercialni generični test) in donorskimi kroglicami ter biotiniliranimi protitelesi, razvitimi za naš proces čiščenja:

Z uporabo celotnega biotiniliranega protitelesa smo dobili dvajsetkrat višji signal (preglednica 9, slika 6), kot če smo uporabili biotinilirane fragmente Fab2 (preglednica 8) z enako specifičnostjo. Na celotnem protitelesu je konjugiranih več biotinskih molekul in manj steričnih ovir za donorsko kroglico. Glede na dobljene rezultate lahko postavimo meritno območje 10–1000 ng/ml, saj pri koncentracijah, nižjih od 10 ng/ml, ne dobimo monotono padajočih odzivov.

Preglednica 9: Testiranje formata z akceptorskimi kroglicami z generičnimi protitelesi (komercialni generični test) in donorskimi kroglicami ter biotiniliranimi protitelesi, razvitimi za naš proces čiščenja

Koncentracija (ng/ml)	Akceptorske kroglice (0,05 mg/ml), biotinilirano protitelo (5 nM), donorske kroglice (0,08 mg/ml)				
	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Odziv 3 (cps)	Povprečje (cps)	RSD %
1000	80490	69243	67450	72394	10
300	38574	33833	31980	34796	10
100	15197	13723	12437	13786	10
30	6255	6151	4700	5702	15
10	2339	1795	1919	2018	14
3	875	732	758	788	10
1	555	415	545	505	15
0,3	572	572	465	536	12
0,1	878	602	565	682	25
0,03	608	445	405	486	22
0,01	412	345	415	391	10
0,003	432	372	418	407	8



Slika 6: Grafični prikaz primerjave uporabe biotiniliranega protitelesa in biotiniliranega fragmenta Fab2

- Testiranje formata z akceptorskimi kroglicami (konjugiranimi s protitelesi, razvitetimi za naš proces čiščenja), specifičnim biotiniliranim protitelesom in donorsko kroglico

Glede na dobljene rezultate (preglednica 10) lahko postavimo merilno območje 10–1000 ng/ml. Uporaba akceptorskih kroglic, ki so konjugirane s protitelesi, razvitetimi za naš proces čiščenja v primerjavi s komercialnim testom akceptorskih kroglic z generičnim protitelesom proti HCP, ne vpliva bistveno na merilno območje. Glede na prejšnje poskuse opazimo nižji odziv, kar je posledica drugačnih reagentov in uporabe tehnologije AlphaLISA, zato je bilo potrebno ta test še optimizirati, kar je opisano v nadaljevanju.

Preglednica 10: Testiranje formata z akceptorskimi kroglicami (ki so bile konjugirane s protitelesi, razvitimi za naš proces čiščenja), specifičnim biotiniliranimi protitelesi in donorskimi kroglicami

Koncentracija (ng/ml)	Akceptorske kroglice (0,05 mg/ml), biotinilirano protitelo (5 nM), donorske kroglice (0,08 mg/ml)			
	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD %
1000	35368	34607	34987	2
300	13105	13242	13173	1
100	4777	5094	4936	5
30	1945	2022	1984	3
10	988	1068	1028	6
3	692	815	754	12
1	838	692	765	13
0,3	805	765	785	4
0,1	645	695	670	5
0,03	672	715	694	4
0,01	588	635	612	5
0,003	612	638	625	3

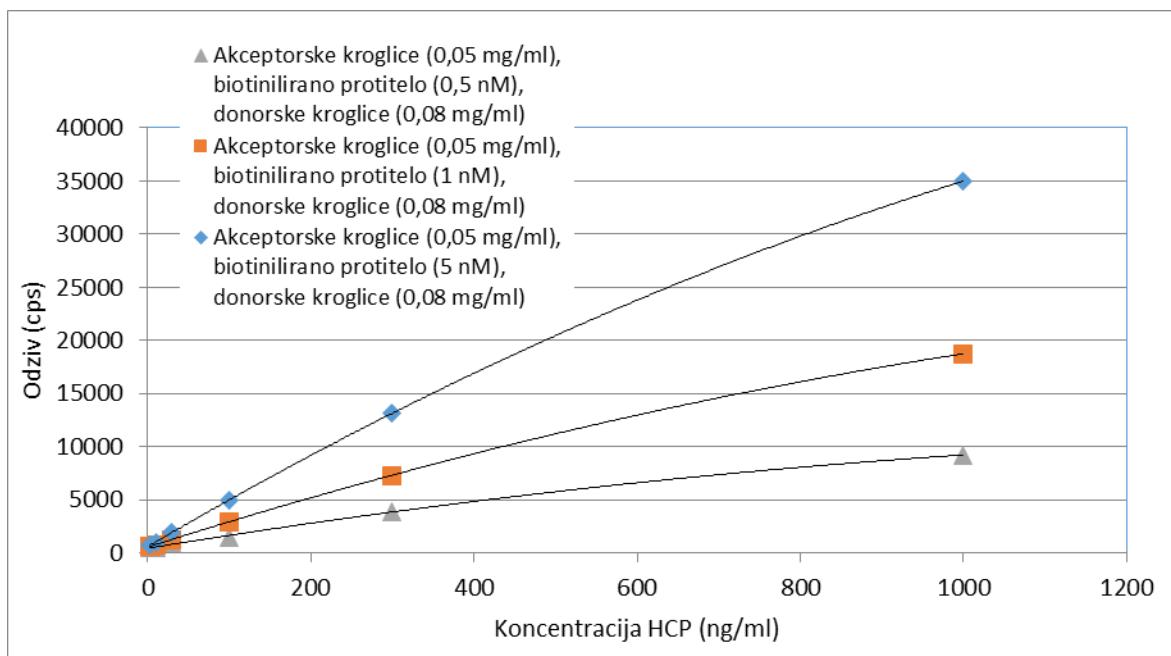
4.2 Optimizacija izbranega testa

4.2.1 Vpliv spremenjanja koncentracije biotiniliranih protiteles na odziv testa

Z višanjem koncentracije biotiniliranih protiteles v območju od 0,5 do 5 nM in pri konstantni končni koncentraciji akceptorskih (0,05 mg/ml) in streptavidinskih donorskih kroglic (0,08 mg/ml) se zvišuje tudi odziv (preglednica 11). Dobimo meritno območje od 10–1000 ng/ml. Z višanjem koncentracije biotiniliranih protiteles pride do višje stopnje vezave z donorskimi kroglicami, kar privede do višjega odziva (slika 7).

Preglednica 11: Vpliv različnih koncentracij biotiniliranih protiteles na odziv testa AlphaLISA

Konzentracija (ng/ml)	Akceptorske kroglice (0,05 mg/ml), biotinilirano protitelo (5 nM), donorske kroglice (0,08 mg/ml)				Akceptorske kroglice (0,05 mg/ml), biotinilirano protitelo (1 nM), donorske kroglice (0,08 mg/ml)				Akceptorske kroglice (0,05 mg/ml), biotinilirano protitelo (0,5 nM), donorske kroglice (0,08 mg/ml)			
	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD %	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD %	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD %
0,003	35368	34607	34987	2	19271	18225	18748	4	9219	8935	9077	2
0,01	13105	13242	13173	1	7129	7496	7313	4	3913	3679	3796	4
0,03	4777	5094	4936	5	2776	3136	2956	9	1482	1652	1567	8
0,1	1945	2022	1984	3	1235	1309	1272	4	952	505	729	43
0,3	988	1068	1028	6	805	725	765	7	472	538	505	9
1	692	815	754	12	668	592	630	9	552	535	544	2
3	838	692	765	13	585	592	588,5	1	595	468	532	17
10	805	765	785	4	642	728	685	9	598	668	633	8
30	645	695	670	5	642	568	605	9	645	625	635	2
100	672	715	694	4	658	635	647	3	448	552	500	15
300	588	635	612	5	552	602	577	6	465	535	500	10
1000	612	638	625	3	488	575	532	12	598	622	610	3

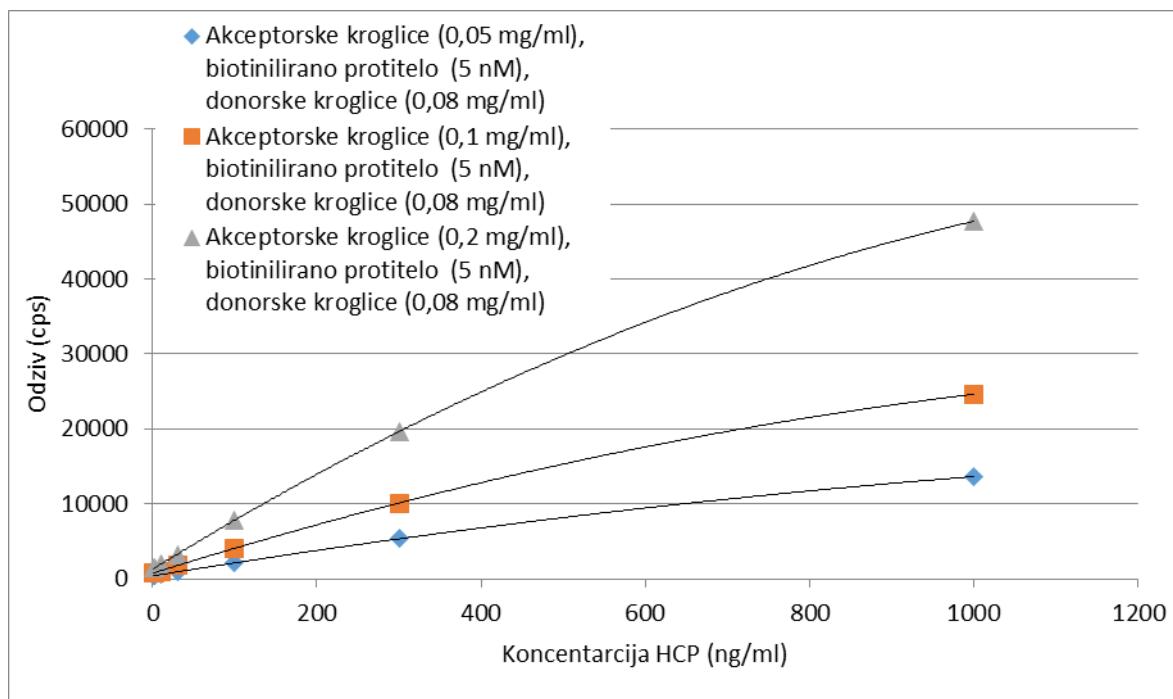


Slika 7: Grafični prikaz vpliva različnih koncentracij biotiniliranih protiteles na odziv testa AlphaLISA

4.2.2 Vpliv spremenjanja koncentracije akceptorskih kroglic na odziv testa
Z višanjem koncentracije akceptorskih kroglic (0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml in 0,2 mg/ml) in pri konstantni končni koncentraciji biotiniliranih protiteles (5 nM) in streptavidinskih donorskih kroglic (0,08 mg/ml) se zvišuje tudi odziv (preglednica 12, slika 8).

Preglednica 12: Vpliv različnih koncentracij akceptorskih kroglic na odziv testa
AlphaLISA

Koncentracija (ng/ml)	Akceptorske kroglice (0,05 mg/ml), biotinilirano protitelo (5 nM), donorske kroglice (0,08 mg/ml)				Akceptorske kroglice (0,1 mg/ml), biotinilirano protitelo (5 nM), donorske kroglice (0,08 mg/ml)				Akceptorske kroglice (0,2 mg/ml), biotinilirano protitelo (5 nM), donorske kroglice (0,08 mg/ml)			
	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD %	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD %	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD %
1000	13801	13461	13631	2	24337	24909	24623	2	48154	47288	47721	1
300	5415	5275	5345	2	10482	9717	10100	5	19821	19460	19641	1
100	2023	2110	2067	3	3827	4324	4076	9	8148	7594	7871	5
30	986	866	926	9	1986	1716	1851	10	3294	3204	3249	2
10	603	516	560	11	1060	956	1008	7	1903	1916	1910	0
3	456	403	430	9	806	716	761	8	1410	1450	1430	2
1	423	433	428	2	783	840	812	5	1373	1500	1437	6
0	376	406	391	5	626	823	725	19	1196	1366	1281	9



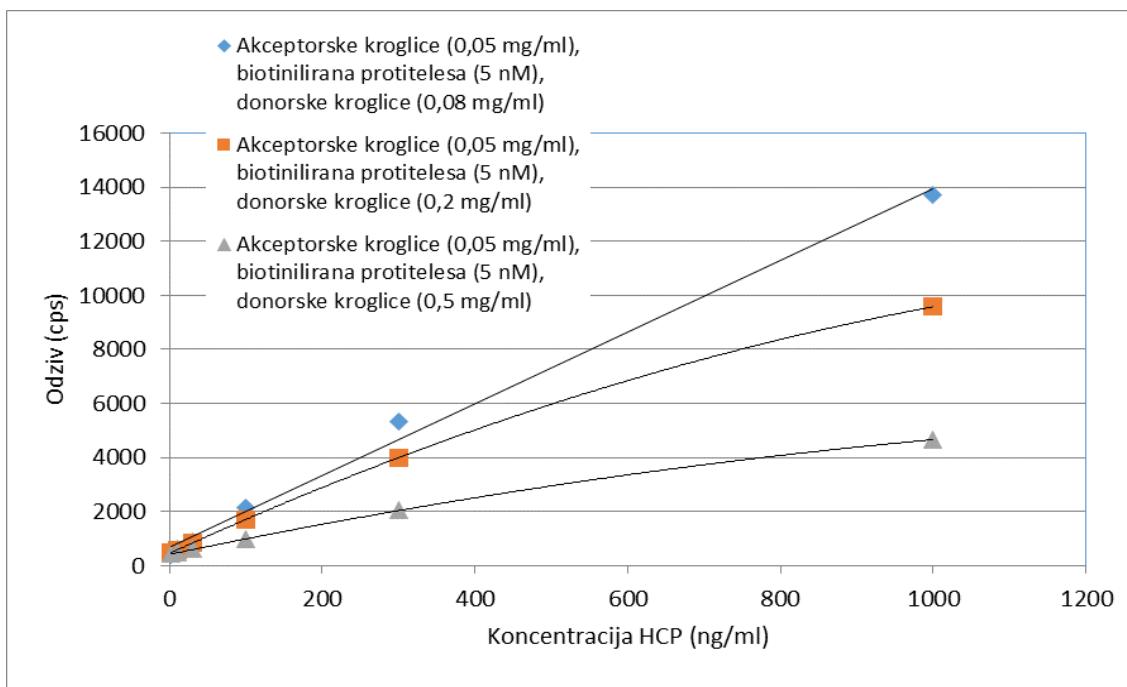
Slika 8: Grafični prikaz vpliva različnih koncentracij akceptorskih kroglic na odziv testa AlphaLISA

4.2.3 Vpliv spremenjanja koncentracije donorskih kroglic na odziv testa

Z zniževanjem koncentracije streptavidinskih donorskih kroglic (0,5 mg/ml, 0,2 mg/ml in 0,08 mg/ml) pri konstantni končni koncentraciji biotiniliranih protiteles (5 nM) in akceptorskih kroglic (0,05 mg/ml) se odziv zviša (preglednica 13, slika 9). Z višanjem koncentracije donorskih kroglic pride do zasičenja z reagentom in posledično do nižjega odziva.

Preglednica 13: Vpliv različnih koncentracij donorskih kroglic na odziv testa AlphaLISA

Konzentracija (ng/ml)	Akceptorske kroglice (0,05 mg/ml), biotinilirana protitelesa (5 nM), donorske kroglice (0,08 mg/ml)				Akceptorske kroglice (0,05 mg/ml), biotinilirana protitelesa (5 nM), donorske kroglice (0,2 mg/ml)				Akceptorske kroglice (0,05 mg/ml), biotinilirana protitelesa (5 nM), donorske kroglice (0,5 mg/ml)			
	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD %	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD %	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD %
1000	13594	13872	13733	1	8909	10248	9579	10	4878	4441	4660	7
500	5275	5365	5320	1	3814	4171	3993	6	2043	2040	2042	0
300	2047	2220	2134	6	1673	1723	1698	2	1060	870	965	14
200	880	896	888	1	870	856	863	1	613	590	602	3
100	663	553	608	13	543	600	572	7	463	496	480	5
50	380	440	410	10	523	436	480	13	470	390	430	13
30	423	430	427	1	383	413	398	5	383	433	408	9
10	380	373	377	1	360	480	420	20	423	443	433	3
0												

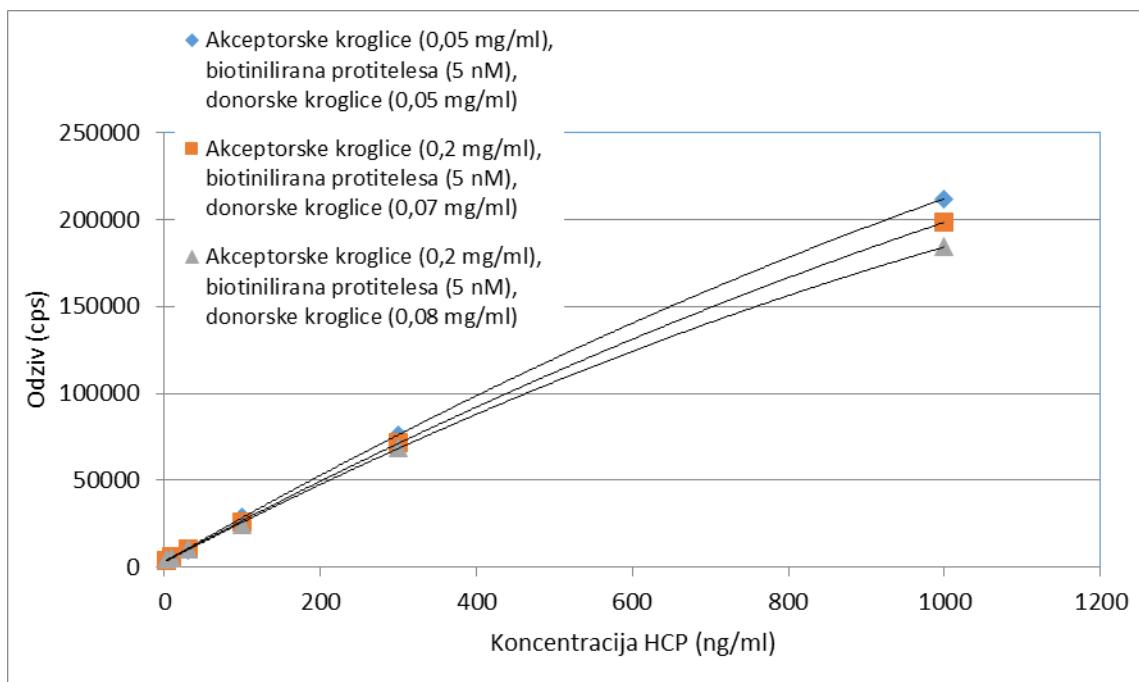


Slika 9: Grafični prikaz vpliva različnih koncentracij donorskih kroglic na odziv testa AlphaLISA

Z nadaljnji zniževanjem koncentracije donorskih kroglic (0,08 mg/ml, 0,07 mg/ml in 0,05 mg/ml) pri konstantni koncentraciji akceptorskih kroglic (0,2 mg/ml) in biotiniliranih protiteles (5 nM) se rezultati med seboj bistveno ne razlikujejo (preglednica 14, slika 10).

Preglednica 14: Vpliv različnih koncentracij donorskih kroglic – drugi poskus na odziv testa AlphaLISA

Koncentracija (ng/ml)	Akceptorske kroglice (0,2 mg/ml), biotinilirana protitelesa (5 nM), donorske kroglice (0,08 mg/ml)				Akceptorske kroglice (0,2 mg/ml), biotinilirana protitelesa (5 nM), donorske kroglice (0,07 mg/ml)				Akceptorske kroglice (0,05 mg/ml), biotinilirana protitelesa (5 nM), donorske kroglice (0,05 mg/ml)			
	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD %	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD %	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD %
1000	163590	204640	184115	16	177220	219480	198350	15	209170	214790	211980	2
300	52788	85061	68925	33	64315	78813	71564	14	72909	79060	75985	6
100	19002	29228	24115	30	24059	27543	25801	10	28595	29854	29225	3
30	9073	11557	10315	17	9473	11831	10652	16	10268	9857	10063	3
10	4378	6006	5192	22	5575	5996	5786	5	5519	5505	5512	0
3	4398	4431	4415	1	3494	4585	4040	19	4188	4071	4130	2
1	70	50	60	24	36	80	58	54	103	210	157	48
0	66	73	70	7	76	73	75	3	106	116	111	6



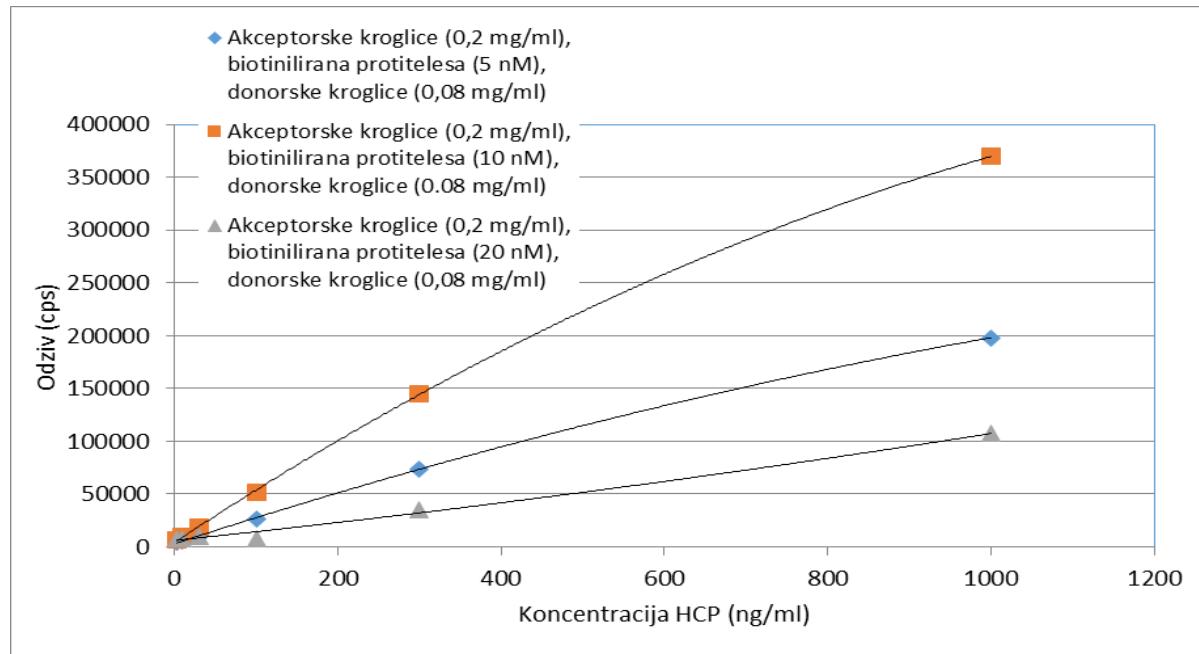
Slika 10: Grafični prikaz vpliva različnih koncentracij donorskih kroglic – drugi poskus na odziv testa AlphaLISA

4.2.4 Vpliv spremenjanja koncentracije biotiniliranega protitelesa na odziv testa (drugi poskus)

Nadaljnje zviševanje koncentracije biotiniliranih protiteles je smiselno le do 10 nM, potem pa odziv začne padati, ker pride do zasičenja z biotiniliranimi protitelesi (preglednica 15, slika 11).

Preglednica 15: Vpliv različnih koncentracij biotiniliranih protiteles na odziv testa AlphaLISA

Koncentracija (ng/ml)	Akceptorske kroglice (0,2 mg/ml), biotinilirana protitelesa (5 nM), donorske kroglice (0,08 mg/ml)				Akceptorske kroglice (0,2 mg/ml), biotinilirana protitelesa (10 nM), donorske kroglice (0,08 mg/ml)				Akceptorske kroglice (0,2 mg/ml), biotinilirana protitelesa (20 nM), donorske kroglice (0,08 mg/ml)			
	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD %	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD %	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD %
1000	199190	197050	198120	1	339310	400390	369850	12	124430	89901	107166	23
300	70195	77426	73810,5	7	135530	154670	145100	9	34649	34753	34701	0
100	27122	26224	26673	2	47906	56171	52039	11	7104	7951	7528	8
30	10498	9894	10196	4	18647	18988	18818	1	11627	8625	10126	21
10	5892	5709	5801	2	9704	10094	9899	3	7404	8355	7880	9
3	3831	4231	4031	7	6493	6790	6642	3	7507	8035	7771	5
1	83	76	80	6	66	53	60	15	53	86	70	34
0	53	50	52	4	63	50	57	16	66	56	61	12



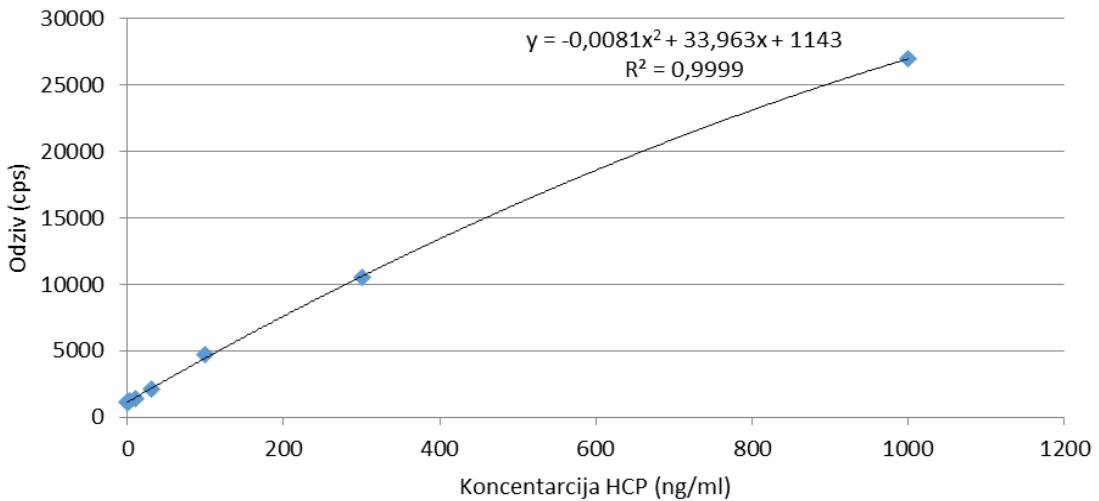
Slika 11: Grafični prikaz vpliva različnih koncentracij biotiniliranih protiteles na odziv testa AlphaLISA

4.3 Model standardne krivulje

Model standardne krivulje, ki smo ga uporabili, je logistična funkcija s štirimi parametri (4PL). Najprej smo testirali širši razpon standardne krivulje v območju 0,003–1000 ng/ml. Končen izbrani model standarde krivulje je v območju 0–1000 ng/ml (preglednica 16). Vsaka koncentracija je bila pripravljena v dveh paralelkah. Grafični prikaz modela standardne krivulje je prikazan na sliki 12. Ustreznost modela standardne krivulje prikazuje vrednost korelacijskega koeficienta, ki mora biti višji ali enak od 0,98, in relativno napako, ki mora biti znotraj 15 %. V našem primeru znaša korelacijski koeficient 0,9999, relativna napaka pa je v koncentracijskem območju 10–1000 ng/ml znotraj 11 %. Ustreznost modela standardne krivulje je s tem potrjena.

Preglednica 16: Prikaz meritev za konstrukcijo standardne krivulje pri koncentraciji akceptorskih kroglic 0,2 mg/ml, biotiniliranih protiteles 5 nM in streptavidinskih donorskih kroglic 0,08 mg/ml

Koncentracija (ng/ml)	Paralelka 1 (ng/ml)	Paralelka 2 (ng/ml)	Povprečje (ng/ml)	Relativna napaka (%)
1000	987	939	963	4
300	301	297	299	0
100	98	107	103	3
30	27	29	28	7
10	9	8	9	11
3	4	3	4	25
1	3	2	3	67



Slika 12: Grafični prikaz modela standarde krivulje

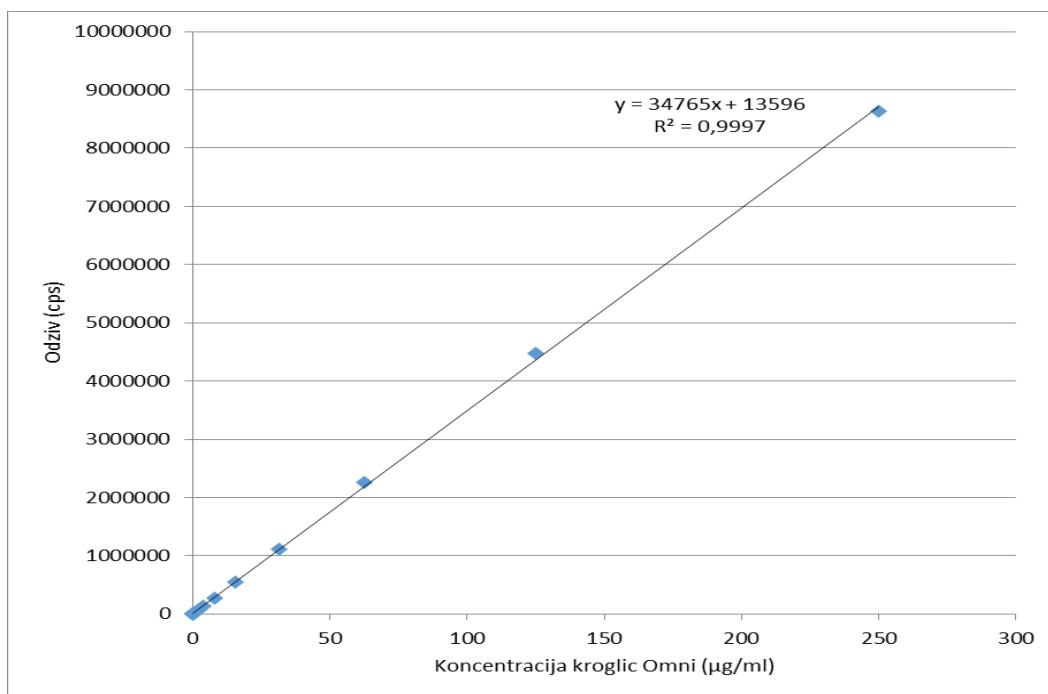
4.4 Testiranje linearnosti odziva detektorja z uporabo kroglic Omni

Kroglice Omni so kupljeni reagenti (Omnibeads), ki jih uporabljamo z namenom testiranja linearnosti odziva detektorja oziroma celotnega instrumenta. Izmerjene vrednosti za posamezno koncentracijo so prikazane v preglednici 17, grafično pa v sliki 13. Pri testiranju linearnosti odziva detektorja smo dobili najvišji merljiv signal luminiscence v vrednosti 8,5 milijona cps pri koncentraciji 250 µg/ml, s čimer je potrjena linearnost detektorja in instrumenta do te višine signala. Pri koncentracijah 1000 µg/ml in 500 µg/ml ni izmerjene vrednosti zaradi previsokega signala.

Preglednica 17: Prikaz meritev testiranja linearnosti detektorja s kroglicami Omni.

Koncentracija kroglic Omni ($\mu\text{g/ml}$)	Meritev 1	Meritev 2	Meritev 3	Meritev 4	Meritev 5	Meritev 6	Povprečje	RSD (%)
1000	/*	/*	/*	/*	/*	/*	/	/
500	/*	/*	/*	/*	/*	/*	/	/
250	8534600	8566100	8625000	8649500	8696600	8703200	8629167	1
125	4411700	4446700	4409300	4502300	4507100	4564600	4473617	1
62,5	2212600	2267900	2267300	2272900	2263900	2261700	2257717	1
31,25	1104200	1113300	1126100	1113900	1120900	1112200	1115100	1
15,63	547800	548780	553140	541590	552750	542460	547753	1
7,81	269810	270530	275590	271840	275480	279400	273775	1
3,91	139030	136560	138700	138930	137110	137920	138042	1
1,95	69074	68801	69124	68662	69947	69879	69248	1
0,98	34697	33802	34375	33537	34130	34264	34134	1
0,49	17191	17161	16860	17345	17201	16770	17088	1
0,24	8480	8483	8256	8486	8319	8173	8366	2
0,12	4205	4195	4399	4235	4355	4302	4282	2
0,06	2281	2124	2161	2168	2234	2131	2183	3
0,03	1127	1237	1197	1274	1254	1194	1214	4

* ni izmerjene vrednosti (previsok signal)



Slika 13: Graf odvisnosti signala od koncentracije kroglic Omni

4.5 Določevanje vpliva matriksa oziroma preverjanje vpliva sestave procesnega pufra na odziv in določanje najnižjega faktorja redčitve (MDF)

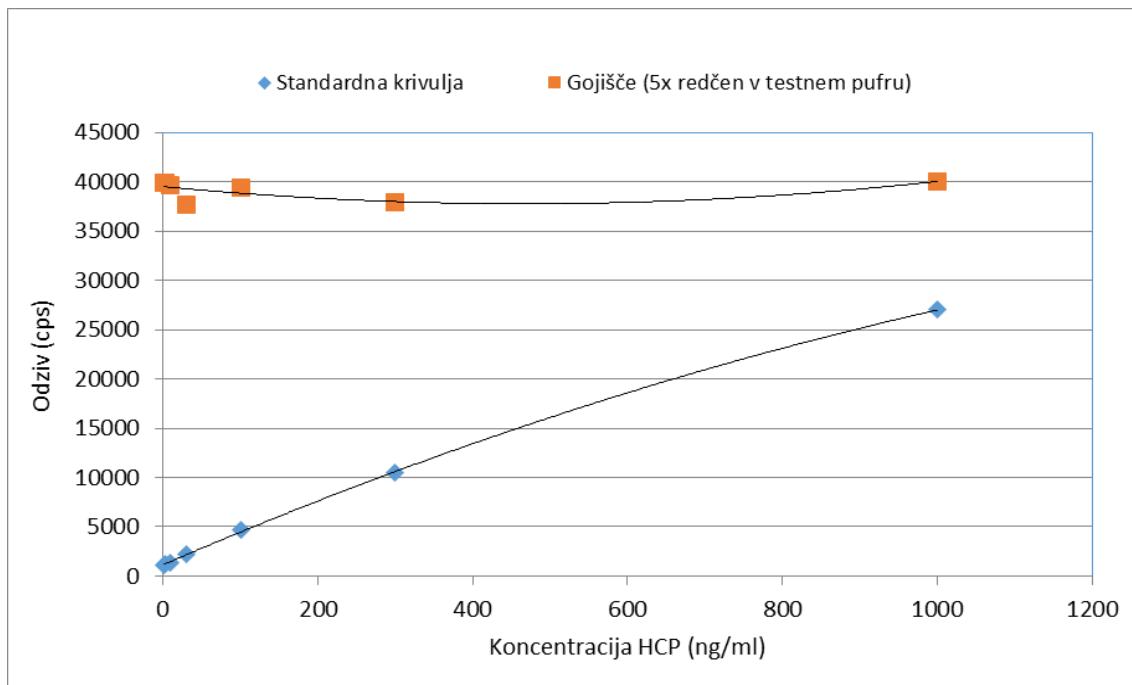
Z redčenjem procesnega vzorca zmanjšujemo tudi možni vpliv procesnega pufra na rezultat, saj se njegov delež z redčitvijo v testnem pufru zmanjšuje. Možen vpliv procesnega pufra moramo pri meritvi upoštevati. To lahko storimo z vpeljavo korekcijskega faktorja za določen procesni pufer ali pa ga z redčitvijo izničimo. V ta namen moramo določiti najnižji faktor redčenja. To je najnižji faktor redčitve vzorca, pri katerem prisoten pufer nima več vpliva na rezultat.

Z izračunom relativne napake smo primerjali odzive standarda HCP različnih koncentracij, če je ta pripravljen v testnem pufru oziroma v petkratni redčitvi procesnega pufra s testnim pufrom. Prisotnost 20 % (v/v) procesnega pufra je simulacija petkrat redčenega vzorca. Glede na rezultate lahko trdimo, da je odziv večji od odziva standardne krivulje, če je standard HCP redčen v petkratni redčitvi gojišča s testnim pufrom (preglednica 18). Signal ni monotono naraščajoč v odvisnosti od koncentracije HCP, temveč je konstanten (slika 14). Le petkrat redčen vzorec gojišča ne bo dal želenega rezultata, saj je odmik od rezultata standardnega vzorca prevelik.

Preglednica 18: Standardi HCP različnih koncentracij v gojišču ali pufru AlphaLISA

HiBlock

Koncentracija standarda HCP ng/ml	Standardna krivulja				Gojišče (5x redčen v testnem pufru)				
	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD (%)	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje	RSD (%)	Relativna napaka (%)
1000	28250	25729	26990	7	38897	41175	40036	4	-48
300	10552	10462	10507	1	37297	38571	37934	2	-261
100	4541	4831	4686	4	37508	41389	39449	7	-742
30	2133	2187	2160	2	37207	38209	37708	2	-1646
10	1393	1383	1388	1	38803	40497	39650	3	-2757
3	1293	1190	1242	6	39410	40353	39882	2	-3112
1	1226	1066	1146	10	41178	38675	39927	4	-3384
0	1173	1076	1125	6	1320	1300	1310	1	-16



Slika 14: Grafični prikaz primerjave standardov HCP različnih koncentracij v gojišču ali AlphaLISA HiBlock

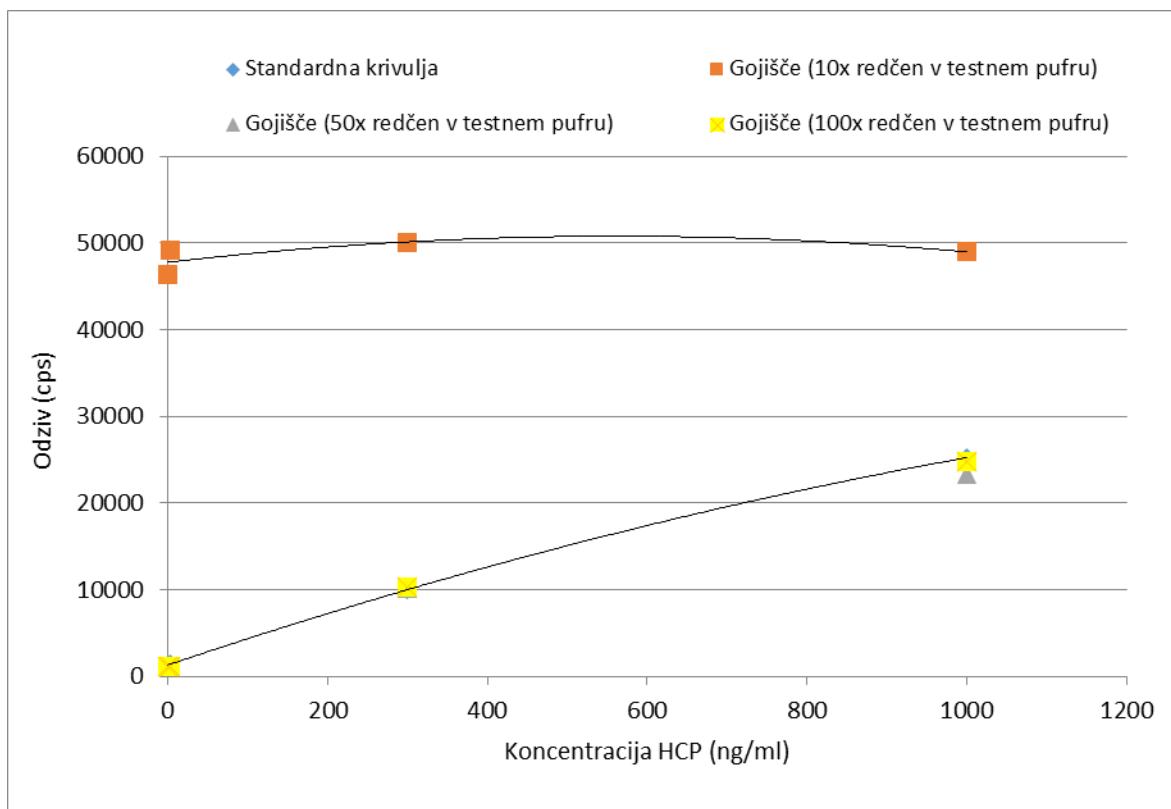
Vpliv gojišča smo poskusili izničiti še z 10-, 50- in 100-kratno redčitvijo in glede na rezultate (preglednici 19 in 20) lahko trdimo, da je odziv večji od odziva standardne krivulje, tudi če je standard HCP redčen v 10-kratni redčitvi gojišča, saj signal ni monotono naraščajoč v odvisnosti od koncentracije HCP, temveč je konstanten (slika 15). 50- in 100-kratna redčitev gojišča v testnem pufru pa ne vpliva več na rezultat, to pa lahko pomeni 50-kraten dvig spodnje detekcijske meje. Ker pa vmesnih redčitev nismo testirali (med 10- in 50-kratno redčenje) lahko iz rezultatov primerjave testa AlphaLISA s testom ELISA (preglednica 25) zaključimo, da 20-kratno redčenje nima več vpliva na signal. Prisotni vitamini (vitamin C, biotin) in oligominerali (železovi ioni) v gojišču, delujejo kot lovilci singletnega kisika oziroma tekmujejo za interakcijo med streptavidinom in biotinom ter s tem vplivajo na odziv.

Preglednica 19: Primerjava odzivov standardov HCP različnih koncentracij, izmerjenih v pufru AlphaLISA in v 10-krat redčenem gojišču

Koncentracija standarda HCP	Standardna krivulja				Gojišče (10x redčeno v testnem pufru)				
ng/ml	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD (%)	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD (%)	Relativna napaka (%)
1000	25148	25308	25228	0	47390	50490	48940	4	94
300	9928	10079	10004	1	49758	50406	50082	1	401
3	1321	1601	1461	14	48834	49513	49174	1	3266
0	1231	1297	1264	4	41944	50806	46375	14	3569

Preglednica 20: Primerjava odzivov standardov HCP različnih koncentracij, izmerjenih v 50- in 100-krat redčenem gojišču

Koncen tracija standar da HCP	Gojišče (50x redčeno v testnem pufru)					Gojišče (100x redčeno v testnem pufru)				
ng/ml	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD (%)	Relativ na napaka (%)	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povprečje (cps)	RSD (%)	Relativ na napaka (%)
1000	23745	22985	23365	2	13	25773	23828	24801	6	8
300	9844	10442	10143	4	3	10395	10161	10278	2	2
3	1183	1200	1192	1	4	1210	1163	1187	3	4
0	1096	1073	1085	1	4	1090	1066	1078	2	4



Slika 15: Grafični prikaz primerjave odzivov standardov HCP, izmerjenih v gojišču, redčenem v pufer AlphaLISA (10x, 50x in 100x redčitev)

Vplivi drugih procesnih pufrov niso tako izraziti. Vsi odmiki od standardne krivulje, posnete v pufru AlphaLISA, so nižji od 30 %. Izjema sta le dva rezultata v 5-krat redčenem pufru po drugi kromatografski stopnji. Sklepamo lahko, da sta ta dva rezultata naključna, saj je tudi sisanje v teh rezultatih preveliko.

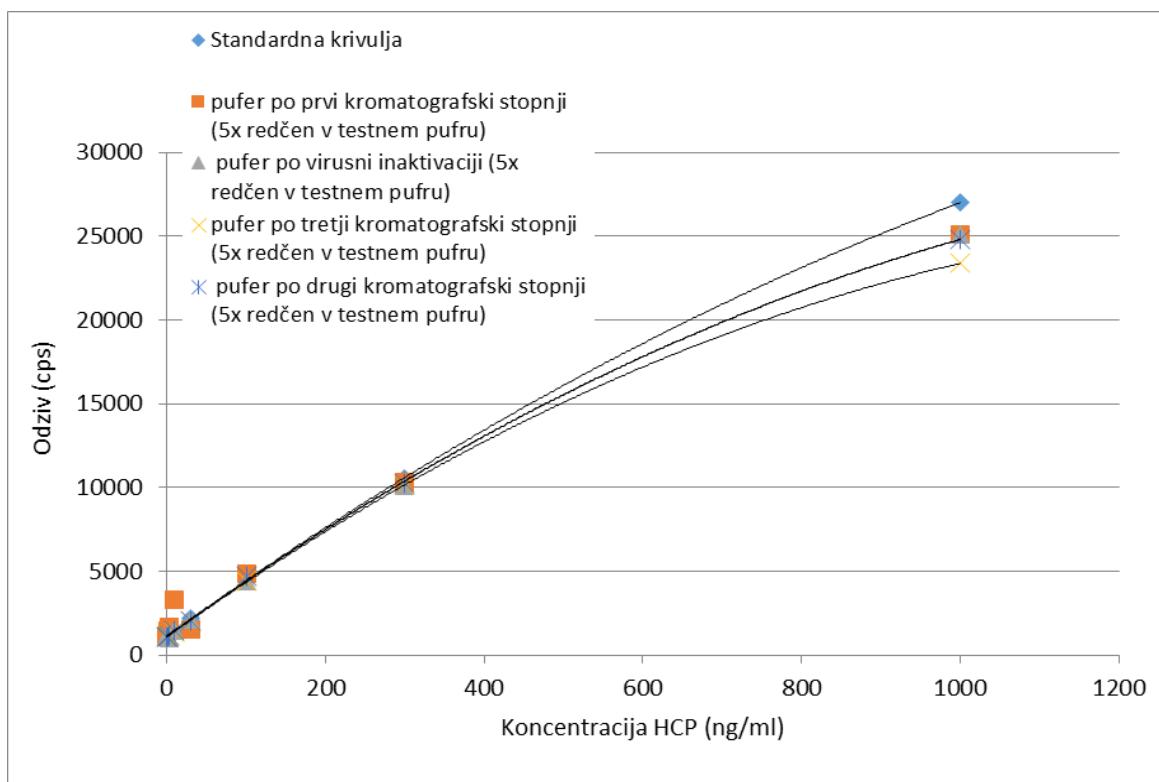
V testnem pufru petkrat redčeni pufri po prvi, drugi in tretji stopnji ter po virusni inaktivaciji ne vplivajo na rezultat (preglednici 21 in 22, slika 16). Ker si želimo, da bi bili vzorci redčeni čim manjkrat, saj skupaj z MDF vzorca pada meja kvantifikacije, smo preverili ali lahko MDF še znižamo na 2. Da smo znižali porabo reagentov, smo naredili poskus samo pri naslednjih koncentracijah: 1000 ng/ml, 300 ng/ml, 3 ng/ml in 0 ng/ml. Dvakratno redčitev pufrov po prvi, drugi in tretji stopnji ter po virusni inaktivaciji v testnem pufru vpliva na rezultat (preglednici 23 in 24, slika 17), saj smo dobili bistveno nižje odzive. 50-odstotna prisotnost procesnega pufra vpliva na odziv kot posledica prisotnosti višjih koncentracij soli (Na^+ , Cl^-), acetata in TRIS pufra. Lahko zaključimo, da je za te vzorce najnižji faktor redčitve med 2 in 5.

Preglednica 21: Primerjava odzivov standardov HCP različnih koncentracij, izmerjenih v petkrat redčenih pufru po prvi kromatografski stopnji in po virusni inaktivaciji

Koncen tracija standar da HCP	Pufer po prvi kromatografski stopnji (5x redčen v testnem pufru)					Pufer po virusni inaktivaciji (5x redčen v testnem pufru)				
	ng/ml	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povpreč je (cps)	RSD (%)	Relativ na napaka (%)	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povpreč je (cps)	RSD (%)
1000	25495	24671	25083	2	7	25856	24380	25118	4	7
300	9740	10936	10338	8	2	9854	10278	10066	3	4
100	4798	4928	4863	2	-4	4511	4264	4388	4	6
30	1360	1730	1545	17	28	2023	2173	2098	5	3
10	3891	2663	3277	26	-136	1416	1433	1425	1	-3
3	2043	1356	1700	29	-37	1040	1020	1030	1	17
1	1433	1453	1443	1	-26	1150	1090	1120	4	2
0	1130	1186	1158	3	-3	1230	1156	1193	4	-6

Preglednica 22: Primerjava odzivov standardov HCP različnih koncentracij, izmerjenih v petkrat redčenih pufrih po drugi in tretji kromatografski stopnji

Koncen tracija standar da HCP	Pufer po tretji kromatografski stopnji (5x redčen v testnem pufru)					Pufer po drugi kromatografski stopnji (5x redčen v testnem pufru)				
	ng/ml	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povpreč je (cps)	RSD (%)	Relativ na napaka (%)	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povpreč je (cps)	RSD (%)
1000	23745	22985	23365	2	13	25773	23828	24801	6	8
300	9844	10442	10143	4	3	10395	10161	10278	2	2
100	4528	4281	4405	4	6	4855	4534	4695	5	0
30	2070	2053	2062	1	5	2123	2000	2062	4	5
10	1373	1436	1405	3	-1	1523	1350	1437	9	-3
3	1183	1200	1192	1	4	1210	1163	1187	3	4
1	1086	1176	1131	6	1	1010	1186	1098	11	4
0	1096	1073	1085	1	4	1090	1066	1078	2	4



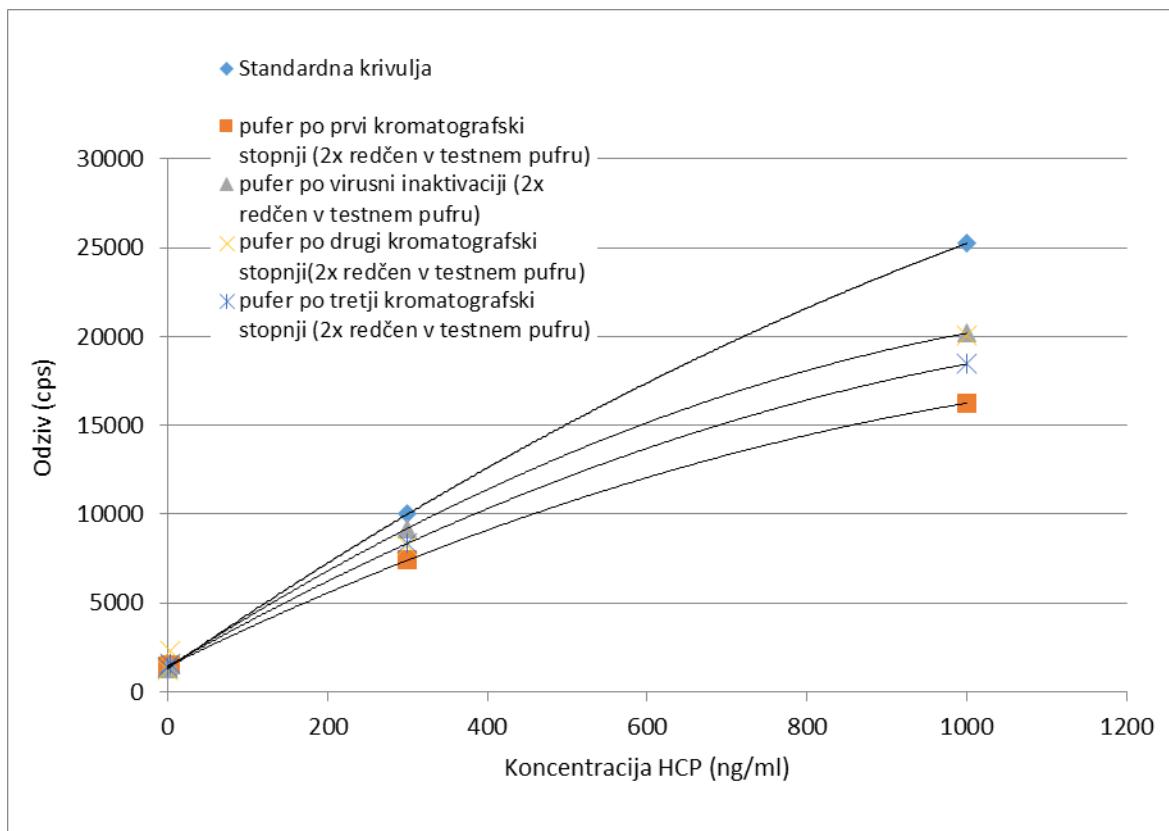
Slika 16: Grafični prikaz primerjave odzivov standardov HCP različnih koncentracij, posnetimi v pufru AlphaLISA in pufri po prvi, drugi in tretji kromatografski stopnji ter po virusni inaktivaciji (petkratna redčitev)

Preglednica 23: Primerjava odzivov standardov HCP različnih koncentracij, izmerjenih v dvakrat redčenih pufru po prvi kromatografski stopnji in po virusni inaktivaciji

Koncen tracija standar da HCP	Pufer po prvi kromatografski stopnji (2x redčen v testnem pufru)					Pufer po virusni inaktivaciji (2x redčen v testnem pufru)				
	ng/ml	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povpreč je (cps)	RSD (%)	Relativ na napaka (%)	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povpreč je (cps)	RSD (%)
1000	15503	16990	16247	6	-36	20387	19983	20185	1	-20
300	7722	7095	7409	6	-26	10029	8376	9203	13	-8
3	1524	1481	1503	2	3	1641	1434	1538	10	5
0	1374	1551	1463	9	16	1277	1391	1334	6	6

Preglednica 24: Primerjava odzivov standardov HCP različnih koncentracij, izmerjenih v dvakrat redčenih pufri po drugi in tretji kromatografski stopnji

Koncen tracija standar da HCP	Pufer po drugi kromatografski stopnji (2x redčen v testnem pufri)					Pufer po tretji kromatografski stopnji (2x redčen v testnem pufri)				
	ng/ml	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povpreč je (cps)	RSD (%)	Relativ na napaka (%)	Odziv 1 (cps)	Odziv 2 (cps)	Povpreč je (cps)	RSD (%)
1000	19180	20902	20041	6	-21	18598	18307	18453	1	-27
300	8173	8333	8253	1	-17	8056	8653	8355	5	-16
3	2351	2231	2291	4	57	1641	1564	1603	3	10
0	1174	1244	1209	4	-4	1401	1394	1398	0	11



Slika 17: Grafični prikaz primerjave odzivov standardov HCP različnih koncentracij, posnetimi v pufri AlphaLISA in pufri po prvi, drugi in tretji kromatografski stopnji ter po virusni inaktivaciji (dvakratna redčitev)

Metoda AlphaLISA je sicer manj občutljiva za motnje oziroma interference bodisi umetnih ali naravnih spojin, ki absorbirajo svetlobo med 500–600 nm. Spojine, ki lahko vplivajo na odziv, so lovilci singletnega kisika, snovi, ki tekmujejo za interakcijo med streptavidinom in biotinom ter spojine, ki delujejo kot notranji filter. Močni lovilci singleta so nekatere kovine prehoda (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Al^{2+}) v mikromolarnem območju, antioksidanti, kot so azid in askorbat, spojine s tiofenskim obročem (v koncentraciji 100 μM –10 mM) in snovi, ki vsebujejo hem. Spojine, ki so podobne biotinu, tekmujejo z biotinom za vezavo na streptavidin, notranji filtri pa so vse tiste spojine, ki absorbirajo svetlobo pri 520–620 nm (emisija) in/ali 680 ± 5 nm (vzbujanje) (19).

4.6 Primerjava testa AlphaLISA s testom ELISA

Za primerjavo AlphaLISA z obstoječo metodo HCP-ELISA smo koncentracije HCP v procesnih vzorcih, določene s posamezno metodo, primerjali s teoretičnimi koncentracijami. Koncentracija HCP je bila v izhodnih vzorcih izmerjena s testom ELISA. Teoretične koncentracije smo dobili iz redčitev izhodnih vzorcev. Rezultati za posamezne medprocesne vzorce so prikazani v preglednicah 23–26. Rezultati so prikazani tudi kot relativna napaka (%), ki je izračunana iz povprečja treh meritev in teoretične koncentracije.

S primerjavo metode AlphaLISA z obstoječo HCP ELISA smo pokazali, da AlphaLISA ni primerna za vzorce z nižjo koncentracijo – (pod 10 ng/ml), kjer dobimo previsoke vrednosti relativne napake. Vsebnost HCP po prvi, drugi in tretji stopnji čiščenja strmo pada. V vzorcu žetve je vsebnost HCP tako visoka, da dovoljuje visoko redčitev vzorca (več kot 1000x) in s tem je relativna napaka izmerjenih koncentracij HCP znotraj merilnega območja (10–1000 ng/ml) pod 10 % (preglednica 25).

Preglednica 25: Prikaz rezultatov primerjave AlphaLISA z obstoječim testom ELISA za vzorce žetev

Vzorec žetve	Teoretična koncentracija (ng/ml)	Paralelka 1 (ng/ml)	Paralelka 2 (ng/ml)	Paralelka 3 (ng/ml)	Povprečje (ng/ml)	RSD (%)	Relativna napaka (%)
Žetev_1	1000	969,7	961,9	981,2	970,9	1,0	-2,9
Žetev_2	300	308,9	318,6	332,9	320,1	3,8	6,7
Žetev_3	100	111,1	104,6	111,5	109,1	3,6	9,1
Žetev_4	10	9,0	10,1	8,1	9,1	11,1	-9,1
Žetev_5	3	1,9	2,0	2,3	2,0	10,1	-31,8
Žetev_6	1	1,6	1,2	1,7	1,5	18,6	46,0

Za meritve koncentracije HCP smo izhodni vzorec po prvi stopnji redčili 20x, in s tem izničili vpliv procesnega pufra na odziv, vendar dobimo visoko odstopanje pri vzorcih Vzorec 1_1, Vzorec 1_2 in Vzorec 1_7, katerega vzroka pa ne poznamo. Relativna napaka za druge vzorce po prvi stopnji je pod 20 % (preglednica 26).

Preglednica 26: Prikaz rezultatov primerjave AlphaLISA z obstoječo ELISA za vzorce po prvi kromatografski stopnji (vzorec 1)

Vzorec 1	Teoretična koncentracija (ng/ml)	Paralelka 1 (ng/ml)	Paralelka 2 (ng/ml)	Paralelka 3 (ng/ml)	Povprečje (ng/ml)	RSD (%)	Relativna napaka (%)
Vzorec 1_1	999,6	237,8	241,3	251,9	243,7	3,0	-75,6
Vzorec 1_2	207,2	121,7	118,6	125,5	121,9	2,8	-41,2
Vzorec 1_3	62,2	60,2	54,5	54,2	56,3	6,0	-9,5
Vzorec 1_4	20,7	16,9	17,7	15,5	16,7	6,7	-19,5
Vzorec 1_5	6,2	7,1	6,4	8,6	7,4	15,3	18,5
Vzorec 1_6	2,1	1,2	2,1	2,7	2,0	38,7	-3,8
Vzorec 1_7	0,6	1,1	Ni meritve	1,2	1,2	4,2	86,4

Vzorec 2_1 je neredčen, Vzorec 2_2 pa 2x redčen, zato dobimo višje vrednosti relativne napake, saj bi moral biti glede na določitev MDF redčen vsaj 5x. Vzorca 2_5 in 2_6 sta pod kvantifikacijsko mejo (preglednica 27).

Preglednica 27: Prikaz rezultatov primerjave AlphaLISA z obstoječo ELISA za vzorce po drugi kromatografski stopnji (vzorec 2)

Vzorec 2	Teoretična koncentracija (ng/ml)	Paralelka 1 (ng/ml)	Paralelka 2 (ng/ml)	Paralelka 3 (ng/ml)	Povprečje (ng/ml)	RSD (%)	Relativna napaka (%)
Vzorec 2_1	215,0	117,6	99,1	103,9	106,9	9,0	-50,3
Vzorec 2_2	107,5	75,8	70,6	70,6	72,3	4,1	-32,7
Vzorec 2_3	35,8	33,8	31,3	34,0	33,0	4,7	-7,8
Vzorec 2_4	4,0	2,9	3,5	3,0	3,1	10,7	-21,7
Vzorec 2_5	1,3	Ni meritve	Ni meritve	Ni meritve	/	/	/
Vzorec 2_6	0,4	Ni meritve	Ni meritve	1,6	1,6	/	264,2

V izhodnem vzorcu po tretji kromatografski stopnji (vzorec 3) je vsebnost HCP že pod 10 ng/ml in je tako vsebnost HCP izmerjena z ELISA že pod kvantifikacijsko mejo za test AlphaLISA. Kljub temu smo izvedli meritve neredčenega vzorca in na zaporednih redčitvah. Posledično imajo po pričakovanju vse meritve vzorca 3 preveliko odstopanje (preglednica 28).

Preglednica 28: Prikaz rezultatov primerjave metode AlphaLISA z obstoječo ELISA za vzorce po tretji kromatografski stopnji

Vzorec 3	Teoretična koncentracija (ng/ml)	Paralelka 1 (ng/ml)	Paralelka 2 (ng/ml)	Paralelka 3 (ng/ml)	Povprečje (ng/ml)	RSD (%)	Relativna napaka (%)
Vzorec 3_1	9,0	2,9	2,6	2,0	2,5	18,9	-72,1
Vzorec 3_2	4,5	Ni meritve	Ni meritve	1,2	1,2	/	-72,4
Vzorec 3_3	2,3	Ni meritve	1,1	Ni meritve	1,1	/	-51,9
Vzorec 3_4	1,1	Ni meritve	1,5	Ni meritve	1,5	/	33,2
Vzorec 3_5	0,6	1,1	1,3	1,2	1,2	11,0	113,7

Na splošno lahko trdimo, da je test AlphaLISA primeren za vzorce žetve in vzorce po prvi kromatografski stopnji, vendar pa je nujno potrebno testirati učinek kavlja z zaporedno redčitvijo, saj je pri imunskih testih velikokrat prisoten. Metoda AlphaLISA ni primerna za vzorce po drugi in tretji kromatografski stopnji zaradi interference s komponentami procesnih pufrov in zaradi prenizke koncentracije HCP.

5 SKLEP

V okviru magistrske naloge smo želeli razviti in optimizirati test AlphaLISA za določanje HCP v procesnih vzorcih. Da bi potrdili ustreznost metode, smo izvedli meritve koncentracije HCP v procesnih vzorcih in jih primerjali z meritvami, ki smo jih dobili z obstoječim testom ELISA.

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo:

- s tehniko AlphaScreen in AlphaLISA smo uspeli sestaviti format testa, ki daje v območju 10–1000 ng/ml odziv, ki je premo sorazmeren s koncentracijo HCP;
- uporaba enakega biotiniliranega fragmenta Fab2 iz protiteles, razvitih specifično za naš proces sproži dvajsetkrat nižji odziv, če ga uporabimo v enakih koncentracijah kot biotinilirano protitelo;
- v obstoječem formatu ne dobimo značilnih razlik, če uporabimo akceptorske kroglice AlphaLISA namesto kroglic AlphaScreen;
- kot najbolj optimalna koncentracija dodanih reagentov se je izkazala kombinacija: akceptorske kroglice 0,2 mg/ml, biotinilirana protitelesa 5 nM in donorske kroglice 0,08 mg/ml. Izbrana kombinacija temelji tudi na ekonomski sprejemljivosti;
- naš detekcijski sistem je primeren za aplikacijo AlphaScreen, če je dobljeni signal v testu v območju $2,2 \times 10^3$ – $8,6 \times 10^6$. Na tem območju je odziv detektorja linearen;
- analizno metodo smo se namenili uporabiti za določanje nečistote HCP v vzorcih, ki jih dobimo po posameznih stopnjah čiščenja. Območje koncentracij HCP v teh vzorcih je znano, so v točno določenem procesnem pufru. Glede na določitev MDF za vsak pufer, bi lahko z AlphaLISA analizirali vzorce po prvi stopnji čiščenja, če imajo te koncentracijo HCP vsaj 500 ng/ml, vzorce po drugih procesnih stopnjah pa, če imajo koncentracijo HCP vsaj 50 ng/ml;
- čeprav je merilno območje AlphaLISA širše od merilnega območja obstoječega testa ELISA, pa s tem testom ne bomo znižali meje kvantifikacije. Merilno območje produktno specifične ELISA je med 1–32 ng/ml, za AlphaLISA 10–1000 ng/ml. Merilno območje pri testu AlphaLISA pa še dodatno zvišuje vpliv MDF. Na

tej stopnji bomo zato testiranje ustavili. Reagenti AlphaLISA so predragi, da bi s testom AlphaLISA na tej stopnji zamenjali rutinske meritve.

6. LITERATURA

1. Obermajer N, Premzl A, Kos J: Terapevtska monoklonska protitelesa; v Biološka zdravila: od gena do učinkovine (ur. Štrukelj B & Kos J), 1. izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 532–546.
2. European Medicines Agency: Biosimilar medicines http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Medicine_QA/2009/12/WC500020062.pdf. Dostop: 31. 1. 2016.
3. Food and Drug Administration: Information on Biosimilars; <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/Biosimilars/> Dostop: 31. 1. 2016.
4. Scott AM, Wolchok JD, Old LJ: Antibody therapy of cancer, *Nature Reviews Cancer* 12, 278-287 (2012)
5. Nelson AL: Antibody fragments; *MAbs*; 2010, 2 (1): 77–83.
6. Goswami S, Wang W, Arakawa T, Ohtake S: Developments and Challenges for mAb-Based Therapeutics; *Antibodies* 2013; 2: 452–500.
7. Bracewell DG, Francis R, Smales, CM: The future of host cell protein (HCP) identification during process development and manufacturing linked to a risk-based management for their control. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(9), 1727–1737.
8. European Medicines Agency: ICH Topic Q 6 B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC50002824.pdf. Dostop: 15. 11. 2017.
9. Domagala T: Biological impurities & their analysis <https://www.raci.org.au/document/item/1751>. Dostop: 15. 11. 2017.
10. Lunder M: Izolacija bioloških učinkovin; v Biološka zdravila: od gena do učinkovine (ur. Štrukelj B & Kos J), 1. izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, 2007: 114–134.

11. European Pharmacopoeia 9th Edition (9.1); Host-cell protein assays; 4041–4045.
12. Mihara K, Ito Y, Hatano Y, Komurasaki Y, Sugimura A, Jones M, Liu H, Mai S, Lara-Valesco, Bai L, Ketkar A, Adams M, Hirato T, Ionescu R: Host Cell Proteins: The Hidden Side of Biosimilarity Assesment, Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015, 104: 3991–3996.
13. Chiverton LM, Evans C, Pandhal J, Landels AR., Reea BJ, Levison PR, Wright PC, Smales CM: Quantitative definition and monitoring of the host cell protein proteome using iTRAQ — a study of an industrial mAb producing CHO-S cell line; Article in Biotechnology Journal, 2016.
14. Aboulaich N, Chung WK, Thompson JH; Larkin C., Robbins D., Zhu M.; A novel approach to monitor clearance of host cell proteins associated with monoclonal antibodies. Biotehnol progress, 30: 1114-1124
15. Wang F, Richardson D, Shameem M: Host-Cell Protein Measurement and Control; BioPfarm International, 28, 6, 32–38.
16. Kikelj N: Preverjanje zmožnosti analiznih metod za zaznavo sprememb pri monoklonskem protitelesu, izpostavljenim stresnim razmeram; Magistrsko delo 2010; Univerza v Ljubljani; Fakulteta za farmacijo.
17. Zhu Z, Lu JJ, Liu S: Protein separation by Capillary Gel Electrophoresis: A Review; Analytica chimica acta; 2012; 709: 21–31.
18. European Medicines Agency: European public assesment report: Felten C, Solano O: Capillary Electrophoresis in Quality Control: PART II: CE-SDS: Method Development and Robustness; Beckman Coulter 2011.
19. Perkin Elmer: AlphaLISA: Assay Development Guide: http://www.perkinelmer.com/Content/manuals/GDE_AlphaLisaDevelopmentGuide.pdf. Dostop: 11. 1. 2016.
20. Perkin Elmer: ELISA to Alpha Immunoassay: Coversion guide https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/GDE_ELISA-to-AlphaLISA.pdf. Dostop: 11. 1. 2016.

21. Perkin Elmer: AlphaLISA and AlphaScreen No-wash Assays: <http://www.perkinelmer.com/Resources/TechnicalResources/ApplicationSupportKnowledgebase/AlphaLISA-AlphaScreen-no-washassays/AlphaLISA-AlphaScreen-no-wash-assays.xhtml>. Dostop: 11. 1. 2016.
22. Perkin Elmer: AlphaLISA FAQ: https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-73250FLY_AlphaLISAFAQs.pdf. Dostop: 1. 2. 2016.
23. Perkin Elmer: Handle large Biomolecular interactions with ease: https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-129937Bro_MECH_1110_ProteinProtein.pdf. Dostop: 9. 2. 2016.
24. Perkin Elmer: EnVision Multilabel Reader; Instrument manual <http://qb3.berkeley.edu/sscf-htsf/wp-content/uploads/2016/07/EnVision-Dual-Reading-manual-2104-9030-02.pdf>. Dostop: 1. 5. 2017.
25. Santoro M: Alpha Technology: From ELISA to Epigenetics, a FASTER, EASIER way to run complex assays: <http://hts.research.uiowa.edu/files/hts.research.uiowa.edu/files/University%20of%20Iowa%20October%203%202012.pdf>. Dostop: 31. 1. 2016.
26. Tecan: Infinite M1000 PRO – a future-proof multimode reader with AlphaScreen and AlphaLISA technology: http://ww3.tecan.com/mandant/files/doc/219/BR_InfiniteM1000_395360_5_1.pdf. Dostop: 8. 2. 2016.
27. Exploreable: ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay: <https://exploreable.wordpress.com/2011/05/25/elisa-enzyme-linked-immunosorbent-assay/>. Dostop 1. 5. 2017.
28. Vozelj M: Temelji biokemije, Enciklopedijski priročnik, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1996, 87-88
29. Beaudet L, Rodriguez-Suarez R, Venne MH, Caron M, Bedard J, Brechler V, Parent S, Bielefeld-Sevigny M: AlphaLISA immunoassays: the no-wash alternative to ELISAs for research and drug discovery: Nature Methods 5 (2008).

30. Chrisitan D. Peters, Bente Jesperens, Rikke Norregaard: AlphaLISA versus ELISA – based detection interleukin 18 in healthy subjects and patients with end – stage renal disease. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 2012; 72: 583–592.
31. Perkin Elmer: Using the AlphaScreen Kroglice Omni: http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-73451MAN_AlphaScreenKroglice_Omni.pdf. Dostop: 8. 2. 2016.
32. Yu ZT, Guan H, Cheung MK, McHugh WM, Cornell TT, Shanley TP, Kurabayashi K, Fu J: Rapid, automated, parallel quantitative immunoassays using highly integrated microfluidics and AlphaLISA, Scientific Reports, 5, 11339.
33. Dimitrow SD: Therapeutic antibodies, vaccines and antibodyomes. mAb 2010; 2: 347–356.
34. Haile LA, Puig M, Kelley Baker L, Verthelyi D: Detection of Innate Immune Response Modulating Impurities in Therapeutic Proteins. PLoS ONE 10(4).