

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TOMAŽ KAJTNA

MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017 / 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TOMAŽ KAJTNA

**OPTIMIZACIJA IN KVALIFIKACIJA METODE Z GELSKO IZKLJUČITVENO
KROMATOGRAFIJO ZA ANALIZO IZBRANIH TERAPEVTSKIH PROTEINOV**

**OPTIMIZATION AND QUALIFICATION OF A SIZE EXCLUSION
CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE ANALYSIS OF SELECTED
THERAPEUTIC PROTEINS**

MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017 / 2018

Magistrsko delo sem opravljal v podjetju Lek d.d. na oddelku razvojne analitike, ki je del organizacije Tehničnega razvoja in proizvodnje bioloških zdravil v Mengšu, pod mentorstvom doc. dr. Jurija Trontlja, mag. farm. in somentorstvom dr. Tilna Vidmarja, univ. dipl. biokem.

ZAHVALA

Zahvaljujem se oddelku razvojne analitike podjetja Lek d.d. v Mengšu, da so mi omogočili izvajanje magistrskega dela. Zahvala gre mentorju doc. dr. Juriju Trontlju za pomoč in prilagodljivost ter za strokovno vodenje pri pisanju magistrske naloge. Hvala dr. Tilnu Vidmarju za posvečen čas in potrpežljivost pri magistrskem delu; za umirjeno soočanje s težavami, za strokovne (in življenske) nasvete. Prav tako se za strokovno in osebno pomoč zahvaljujem ostalim sodelavcem (zdaj prijateljem) razvojne analitike, predvsem dr. Mihi Miklju in ostalim analitikom na tehniki SEC; delo je bilo zaradi vas veliko lažje in zabavno. Posebna zahvala gre vsem, ki so me v privatnem življenju nenehno spodbujali in mi stali ob strani. Na koncu hvala družini in Bogu, za podporo in pogoje, da sem uspel doseči to, kar sem.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja doc. dr. Jurija Trontlja, mag. farm. in somentorja dr. Tilna Vidmarja, univ. dipl. biokem.

VSEBINA

POVZETEK.....	VIII
ABSTRACT	IX
1. UVOD.....	1
1.1. TERAPEVTSKI PROTEINI – SEDANJOST IN PRIHODNOST	1
1.2. IMUNOGENOST TERAPEVTSKIH PROTEINOV	3
1.3. AGREGATI TERAPEVTSKIH PROTEINOV.....	4
1.3.1. Reverzibilni agregati.....	5
1.3.2. Irreverzibilni agregati.....	5
1.3.3. Vpliv agregatov na varnost in učinkovitost.....	5
1.4. TEHNIKE ZA DETEKCIJO AGREGATOV	6
1.4.1. Vizualni pregled	7
1.4.2. Gelska izključitvena kromatografija – SEC	7
1.4.3. Kapilarna elektroforeza z natrijevim dodecilsulfatom – CE-SDS.....	7
1.4.4. Dinamično sisanje svetlobe – DLS	8
1.4.5. Analitsko ultracentrifugiranje – AUC	8
1.4.6. Pretočni sistem z asimetričnim prečnim pretokom – AF4	9
1.4.7. Pretočno mikroskopsko slikanje – MFI.....	10
1.5. GELSKA IZKLUČITVENA KROMATOGRAFIJA (SEC)	12
1.5.1. Teoretične osnove	12
1.5.2. Detekcija in sklopitve	13
1.5.3. Parametri gelske izključitvene kromatografije in njihov vpliv na ločbo	13
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	18
3.1. MATERIALI.....	18
3.1.1. Kemikalije	18
3.1.2. Voda.....	18
3.1.3. Pufri in raztopine	18
3.1.4. Vzorci	19
3.1.5. Kontrolni vzorci.....	20
3.2. OPREMA.....	23
3.2.1. Naprave in pribor.....	23
3.2.2. Kromatografske kolone	24

3.2.3. Programska oprema za obdelavo podatkov	24
3.3. METODE.....	24
3.3.1. Gelska izkjučitvena kromatografija.....	24
3.3.2. Pogoji in inštrumentalne nastavitev.....	25
3.3.3. Optimizacija in razvoj metode.....	26
3.3.4. Prenosljivost metode.....	30
3.3.5. Kvalifikacija (zgodnja validacija) metode.....	31
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	35
4.1. EKSPERIMENTI MODIFIKACIJE NOVE METODE	35
4.1.1. Temperatura ločbe (temperatura kolone)	35
4.1.2. Čas analize vzorca	36
4.1.3. Nanos vzorca na kolono, koncentracija injiciranega vzorca, volumen injiciranja.....	36
4.1.4. Nasičevanje kolone.....	39
4.1.5. Izbira mobilne faze	41
4.2. PRENOSLJIVOST NOVE METODE.....	44
4.3. KVALIFIKACIJA (ZGODNJA VALIDACIJA) METODE.....	47
4.3.1. Specifičnost	47
4.3.2. Linearnost in točnost	48
4.3.3. Določitev LOQ (meje določljivosti).....	50
4.3.4. Natančnost (znotraj-analizna ponovljivost) in med-analizna ponovljivost ...	51
5. SKLEP	52
6. LITERATURA	53

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Povzetek najpomembnejših tehnik za določanje agregatov terapevtskih proteinov.....	11
Preglednica II: Kemikalije uporabljene pri magistrskem delu.....	18
Preglednica III: Raztopine uporabljene pri eksperimentalnem delu.....	19
Preglednica IV: Naprave uporabljene pri magistrskem delu.....	23
Preglednica V: Pribor uporabljen pri magistrskem delu.....	24
Preglednica VI: Priprava LOQ vzorcev za testiranje nanosa na kolono.....	27
Preglednica VII: Priprava vzorcev za test vpliva končne koncentracije in volumna injiciranja na rezultat.....	28
Preglednica VIII: Priprava vzorcev za primerjavo med izhodno in novo metodo.....	28
Preglednica IX: Priprava vzorcev za preverjanje vpliva nasičevanja kolone.....	29
Preglednica X: Priprava vzorcev za test vpliva mobilne faze.....	29
Preglednica XI: Priprava vzorcev za test detektorja TUV.....	30
Preglednica XII: Priprava vzorcev za test prenosljivosti metode na modificiran HPLC sistem.....	31
Preglednica XIII: Priprava vzorcev za testiranje specifičnosti.....	32
Preglednica XIV: Priprava vzorcev za test linearnosti in točnosti.....	32
Preglednica XV: Priprava vzorcev za določitev LOQ.....	33
Preglednica XVI: Priprava vzorcev testiranih v poskusih ponovljivosti.....	34
Preglednica XVII: Rezultati meritev vzorca MWM pri volumnih injiciranju 3,0 in 0,75 µl.....	36
Preglednica XVIII: Rezultati testiranja volumna injiciranja na vzorcih LOQ pripravljenih iz molekul IgG1 in IgG2. Volumen injiciranja je bil 0,75 µl.....	37
Preglednica XIX: Rezultati testa vpliva volumna injiciranja in končne koncentracije vzorcev na rezultate.....	38
Preglednica XX: Primerjava rezultatov vzorcev analiziranih z izhodno metodo in novo metodo – razlike med njima so bile v dolžini in temperaturi kolone, času analize in nanosom na kolono.....	39
Preglednica XXI: Rezultati testa ustreznosti nasičevanja kolone.....	40
Preglednica XXII: Primerjava rezultatov po analizi z izhodno in testirano mobilno fazo..	41
Preglednica XXIII: Primerjava rezultatov pridobljenih z različnima mobilnima fazama z rezultati AUC.....	42

Preglednica XXIV: Povzetek razlik med izhodno in novo metodo.....	44
Preglednica XXV: Rezultati meritev s PDA in TUV detektorjem.....	45
Preglednica XXVI: Primerjava resolucije na UHPLC in modificiranem HPLC sistemu. ..	46
Preglednica XXVII: Rezultati meritev na UHPLC in modificiranem HPLC sistemu.	47
Preglednica XXVIII: Rezultati regresijske analize.	48
Preglednica XXIX: Rezultati testa LOQ.	50
Preglednica XXX: Rezultati testa linearnosti za molekuli IgG1 in IgG2.....	57
Preglednica XXXI: Znotraj-analizna ponovljivost v 1. analizi.	59
Preglednica XXXII: Znotraj-analizna ponovljivost v 2. analizi.....	60
Preglednica XXXIII: Med-analizna ponovljivost 1. in 2. analize.	62

SEZNAM SLIK

Slika 1: Shematski prikaz zgradbe molekule IgG in fuzijskega proteina.....	2
Slika 2: Princip delovanja SEC.	7
Slika 3: Shematski prikaz potovanja delcev pri CE-SDS po kapilari.....	8
Slika 4: Princip delovanja DLS.	8
Slika 5: Shematski prikaz delovanja tehnike AUC.	9
Slika 6: Shematski prikaz ločevanja delcev z tehniko AF4.....	10
Slika 7: Shematski prikaz naprave za pretočno mikroskopsko slikanje (MFI).	10
Slika 8: Shematski prikaz poteka magistrske naloge.....	17
Slika 9: Primer kromatograma referenčnega vzorca (pripravljenega iz molekule IgG1) analiziranega z izhodno metodo.	21
Slika 10: Primer kromatograma kontrolnega vzorca MWM analiziranega z izhodno metodo.	22
Slika 11: Primer kromatograma kontrolnega vzorca LOQ (pripravljenega iz molekule IgG1) analiziranega z izhodno metodo.....	23
Slika 12: Shematski prikaz delovanja sistema HPLC.	25
Slika 13: Prekrita kromatograma vzorcev MWM pri volumnih injiciranja 3,00 μ l in 0,75 μ l.....	37
Slika 14: Prekrita kromatograma nativnega (nestresnega) vzorca IgG2. Posneli smo ju z detektorjema PDA in TUV.	45

Slika 15: Prekrita kromatograma stresnega vzorca IgG2. Posneli smo ju z detektorjema PDA in TUV.....	46
Slika 16: Prekrita kromatograma vzorca MWM. Posneli smo ju na UHPLC in modificiranem HPLC sistemu.	46
Slika 17: Prekriti kromatogrami nativnega vzorca IgG2, stresnega vzorca IgG2 in pufra omenjenih vzorcev (matriksa).	48
Slika 18: Graf odvisnosti odziva od koncentracije za molekulo IgG1 pri testirani metodi. Enačba premice: $y = 1502329x - 11344.$	49
Slika 19: Graf odvisnosti odziva od koncentracije za molekulo IgG2 pri testirani metodi. Enačba premice: $y = 1560573x - 6805.$	50

SEZNAM ENAČB

Enačba 1: Kriterij ustreznosti za koncentracijsko območje vzorcev.....	20
Enačba 2: Izračun razmerja med signalom in šumom.....	22
Enačba 3: Pearsonov korelacijski koeficient.....	58
Enačba 4: Absolutna vrednost presečišča kot delež odziva nominalnega nanosa.....	58

POVZETEK

Biološka zdravila (predvsem monoklonska protitelesa in fuzijski proteini) so eno najhitreje razvijajočih se področij farmacevtske industrije, saj omogočajo zdravljenje in terapijo na področjih, ki znanosti predstavljajo največje izzive: rakava obolenja, avtoimunske bolezni, genetske motnje in podobno. Zaradi zagotavljanja varnih bioloških zdravil moramo med drugim kontrolirati raven njihovih agregacijskih produktov, saj lahko ti privedejo do negativnih imunskih reakcij bolnikov. V farmacevtski industriji zato pozorno spremljamo raven aggregatov, pri čemer velja gelska izključitvena kromatografija za referenčno tehniko njihovega določanja.

V okviru magistrske naloge smo optimirali izhodno metodo gelske izključitvene kromatografije v hitrejšo in bolj točno metodo. Eksperimentalno delo je vključevalo zamejavo tipa kromatografske kolone s polovico krajsimi kolonami enake zgradbe, s čimer smo dosegli krajsi čas analize. Preverili smo vpliv volumna injiciranja in končne koncentracije analiziranega vzorca na rezultate ter ju modificirali. Ustreznost vseh modifikacij smo preverili s testom primerljivosti rezultatov z izhodno metodo. V nadaljevanju smo z namenom preprečevanja sekundarnih interakcij vzorcev z matriksom kolone vpeljali nasičevanje kolone. Z enakim namenom smo testirali tudi novo mobilno fazo z dodanim natrijevim perkloratom in večjo ionsko močjo, kot jo ima izhodna mobilna faza. Pravilnost rezultatov smo preverili s tehniko analitskega ultracentrifugiranja, ki velja za alternativno tehniko določanja aggregatov. Tehnika je pokazala večjo podobnost z rezultati nove mobilne faze in ovrgla sum o dodatno ustvarjenih aggregatih v mobilni fazi z natrijevim perkloratom.

Testirali smo prenosljivost metode z analizami na drugih tipih detektorjev in drugih analitskih sistemih. Rezultati so obetavni in nakazujejo možnost razširjene uporabe metode ob dodatnih potrditvenih testih. Na koncu smo metodo kvalificirali. Potrdili smo specifičnost, linearost in točnost, znotraj-analizno in med-analizno ponovljivost ter določili območje linearnosti in mejo določljivosti.

Če povzamemo, smo uspešno razvili in kvalificirali visoko zmogljivo metodo za določanje aggregacijskih produktov bioloških zdravil. Poleg tega je lahko naše delo koristna opora vsem, ki se soočajo s podobnimi izzivi pri razvoju metod.

ABSTRACT

Biopharmaceuticals (especially monoclonal antibodies and fusion proteins) are currently among the fastest growing fields of pharmaceutical industry, since they enable treatment and therapy in areas most challenging to science: cancer, autoimmune diseases, genetic disorders, etc. To provide safe biopharmaceuticals, it is necessary to control the level of their aggregation products, as they can cause negative immune responses in patients. We are therefore carefully monitoring the level of aggregates in the pharmaceutical industry, where size-exclusion chromatography is accepted as reference technique for aggregate determination.

In master's thesis, we developed the existing method of size-exclusion chromatography into a faster and more accurate method. Experiments included replacing the column type with columns half the length of the original columns and the same internal structure, thus achieving a shorter analysis time. The effect of the injection volume and the final concentration of the analysed sample was checked and modified. The suitability of all modifications was checked by a comparison of the results with an initial method. The saturation of the column was introduced, in order to prevent secondary interaction of the samples with the column matrix. For the same purpose, we also tested a new mobile phase with addition of sodium perchlorate and higher ionic strength than the initial mobile phase. The correctness of the results was checked by the technique of analytical ultracentrifugation, which is considered as an alternative technique for determining aggregates. The technique showed greater similarity with the results of the new mobile phase and denied the suspicion of additionally created aggregates in the mobile phase with sodium perchlorate.

We tested transferability of the method with analysis on other types of detectors and analytical systems. The results are promising and suggest the possibility of broader use of the method with additional confirmatory tests. In the end, the method was qualified. We have confirmed the specificity, linearity and accuracy, repeatability and intermediate precision; and determined the linear range and the limit of quantification.

To conclude, we successfully developed and qualified the high-throughput method for determination of aggregation products of biopharmaceuticals. Furthermore, our work can be a useful support to all who face similar challenges in method development.

Ključne besede: gelska izključitvena kromatografija, biološka zdravila, agregati, optimizacija metode, kvalifikacija metode

Key words: size-exclusion chromatography, biopharmaceuticals, aggregates, method optimization, method qualification

SEZNAM OKRAJŠAV

ADA	protitelesa usmerjena proti biološkemu zdravilu (<i>angl. anti-drug antibody</i>)
AF4	pretočni sistem z asimetričnim prečnim pretokom (<i>angl. asymmetrical flow field-flow fractionation</i>)
AP	agregacijski produkti
AUC	analitsko ultracentrifugiranje (<i>angl. analytical ultracentrifugation</i>)
BSA	goveji serumski albumin (<i>angl. bovine serum albumin</i>)
C	koncentracija
CE-SDS	kapilarna elektroforeza z natrijevim dodecilsulfatom (<i>angl. capillary electrophoresis with sodium dodecyl sulfate</i>)
CHO	epitelijkska celična linija ovarija kitajskega hrčka (<i>angl. chinese hamster ovary</i>)
DLS	dinamično sisanje svetlobe (<i>angl. dynamic light scattering</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DP	degradacijski produkti
EIP	<i>European Immunogenicity Platform</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>The Food and Drug Administration</i>
FP	fuzijski protein
GV	glavni vrh
HPLC	tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (<i>angl. high performance liquid chromatography</i>)
ICH	<i>The International Council for Harmonisation</i>
IgG	imunoglobulin razreda G
IgG1	imunoglobulin razreda G podrazreda 1
IgG2	imunoglobulin razreda G podrazreda 2
LOD	meja zaznavnosti (<i>angl. limit of detection</i>)
LOQ	meja določljivosti (<i>angl. limit of quantitation</i>)
mAb	monoklonsko protitelo (<i>angl. monoclonal antibody</i>)
MALS	sisanje svetlobe merjeno pod različnimi koti (<i>angl. multiangle light scattering</i>)

MF	mobilna faza
MFI	pretočno mikroskopsko slikanje (<i>angl. micro-flow imaging</i>)
MWM	raztopina različnih proteinov (<i>angl. molecular weight marker</i>)
nat	kratica v imenu vzorca, ki označuje nativni vzorec
PCS	<i>Protein Characterization Subcommittee</i>
PDA	detektor s fotodiodnim nizom (<i>angl. photodiode array detector</i>)
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
PLOQ	vrednost nižja od LOQ, pod mejo določljivosti
QbD	razvoj z vgrajeno kakovostjo (<i>angl. quality by design</i>)
QC	kontrola kakovosti (<i>angl. quality control</i>)
RD	referenčni vzorec (<i>angl. reference dilution</i>)
RSD	relativni standardni odklon
s/n	razmerje med signalom in šumom
SD	absolutni standardni odklon
SDS	natrijev dodecilsulfat (<i>angl. sodium dodecyl sulfate</i>)
SEC	gelska izključitvena kromatografija (<i>angl. size-exclusion chromatography</i>)
str	kratica v imenu vzorca, ki označuje stresni vzorec
TUV	nastavljiv ultravijolični detektor (<i>angl. tunable ultraviolet detector</i>)
UHPLC	tekočinska kromatografija zelo visoke zmogljivosti (<i>angl. ultra-high performance liquid chromatography</i>)
UV	ultravilojični del elektromagnetnega spektra
V	volumen
VWD	detektor s spremenljivo valovno dolžino (<i>angl. variable wavelength detector</i>)

1. UVOD

1.1. TERAPEVTSKI PROTEINI – SEDANJOST IN PRIHODNOST

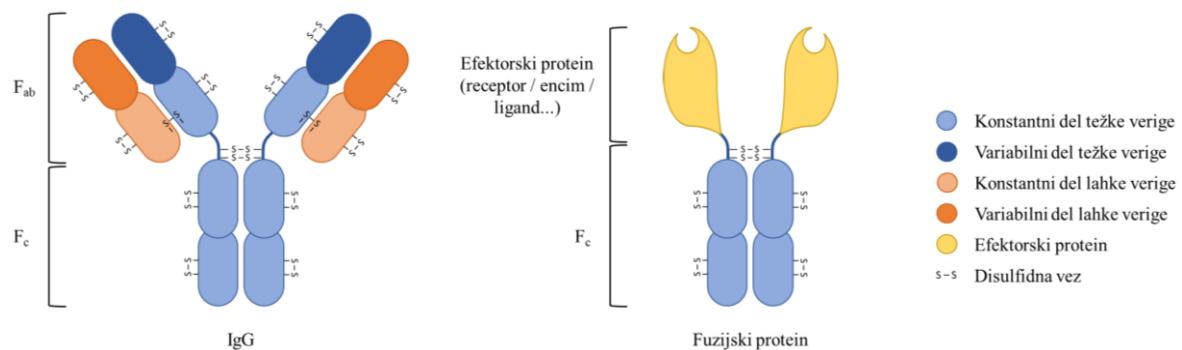
Terapevtski proteini zajemajo majhen delež velike nadskupine bioloških zdravil, vendar hkrati predstavlјajo eno najhitreje rastočih farmacetskih panog, saj odpirajo možnosti terapije na področjih, ki znanosti trenutno predstavlјajo velik izziv: rakava obolenja, avtoimunske bolezni, infekcije, genetske motnje in ostalo [1,2]. Poleg razvoja novih terapevtskih proteinov so v zadnjem času raziskave usmerjene v modifikacije in izboljšave obstoječih bioloških zdravil z namenom zagotavljanja večje varnosti in učinkovitosti [2,3].

Terapevtske proteine lahko razvrstimo glede na farmakološko aktivnost (nadomeščanje funkcije, nova funkcija, dostava snovi idr.), tip molekule (protitelesa, encimi, fuzijski proteini, hormoni, koagulacijski faktorji idr.) ali mehanizem delovanja (imunska reakcija, encimska reakcija idr.). Iz biokemijskega stališča je za pridobivanje bioloških zdravil skoraj izključno pomembna razvrstitev na tip molekule, saj je od tega odvisen celoten princip proizvodnega procesa v biofarmacevtskih podjetjih, medtem ko npr. razvrstitev glede na farmakološko aktivnost na pridobivanje ne vpliva bistveno. V nadaljevanju bomo zato terapevtske proteine razvrščali predvsem po tipu molekule [1,4,5].

Rekombinantna monoklonska protitelesa (mAb) in Fc-fuzijska protitelesa predstavlјajo največji delež terapevtskih proteinov glede na dobičkonosnost in vlaganje v razvoj. V povprečju pridobijo farmacevtska podjetja s strani regulatornih institucij (FDA, EMA) dovoljenja za prodajo 4 novih protiteles na leto. Leta 2010 je prodaja protiteles zajemala polovico celotne prodaje terapevtskih proteinov (52 od 108 milijard \$), trenuten delež pa zajema 2/3 celotnih prihodkov (141,5 milijard \$). Za leto 2025 biološkim zdravilom napovedujejo 315,9 milijard \$ prodaje. Velik pomen na trgu zdravil imajo tudi farmacevtska podjetja, ki proizvajajo podobna biološka zdravila (*angl. »biosimilars«*). Gre za biološke analoge inovativnim biološkim zdravilom. Podobna biološka zdravila predstavlјajo konkurenco na trgu zdravil in s tem zmanjšujejo razmeroma visoko ceno inovativnih bioloških zdravil, posledično so stroški zdravljenja nižji in terapije bolj dostopne bolnikom [6, 7].

Razlogi za takšno rast (predvsem monoklonskih protiteles) so številni. Največja prednost mAb pred ostalimi terapevtskimi proteini ali klasičnimi sinteznimi zdravili s sistemskim

delovanjem je visoka afiniteta in specifičnost do izbrane tarče (tipično so tarče citokini, receptorji, topni in površinski antigeni; odvisno od zdravljene bolezni). Zaradi njihove velikosti in Fc regije (slika 1) je njihova razpolovna doba v krvi daljša od ostalih proteinov. Poleg tega jih bolniki dobro prenašajo, saj so različni imunoglobulini v visoki koncentraciji naravno prisotni v človeški krvi. Protitelesa imajo prednost pred ostalimi terapevtskimi proteini tudi v lažjem razvoju in proizvodnji. Zaradi dolgoletnih raziskav na področju imunskih reakcij so takšna zdravila čedalje bolj uspešna in v večjem deležu prestanejo klinične raziskave [3,4].



Slika 1: Shematski prikaz zgradbe molekule IgG in fuzijskega proteina.

Terapija s protitelesi je relativno uspešna, vendar deleži ozdravljenih nihajo in so odvisni od posamezne bolezni in njenega stadija. Podatki o uspešnosti zdravljenja akutne limfoblastne levkemije so npr. zbrani v članku Kantarjian H in sod. [8]. Da je razvoj nujno potreben, potrjujejo tudi določeni primeri, ko terapija ni učinkovita ali pa je aplicirano zdravilo imunogeno. Imunogenost ni edina pomankljivost protiteles; slabost predstavlja tudi slabša dostopnost učinkovine do tarčne celice, ki je posledica velikosti molekule. Imunoglobulini tipa IgG imajo molekulsko maso okoli 150 kDa, zaradi česar niso sposobni prehajati krvno-možganske bariere, torej je zdravljenje z njimi na tem predelu onemogočeno. Prav tako njihova velikost v določenih primerih sterično ovira njihovo vezavo na določena vezavna mesta (antigene), kar s pridom izkoriščajo virusi (npr. virus HIV, ki tako skrije svoje epitope pred imunskega sistema) [1, 3].

Zaradi omenjenih problemov potencialne imunogenosti in oteženega dostopa do antigenov raziskovalci zmanjšujejo molekulske mase različnih terapevtskih proteinov s krajanjem regij in načrtovanjem zgradbe, ki ohranja le efektorske dele proteinov. Prav tako se trenutno razvijajo metodologije za dalšanje razpolovne dobe terapevtskih proteinov v krvi (npr. fuzija

efektorskih proteinov s Fc regijo protiteles, pripenjanje polietilenglikola ali albumina), kar ugodno vpliva na farmakokinetski profil zdravila in odmerjanje. Prihodnost napoveduje posotopen umik klasičnih nemodificiranih mAb in razvoj v izboljšana terapevtska protitelesa oz. proteine (*angl. »Biobetters«*). Pri slednjih gre za izboljšano učinkovitost, spremenjene lastnosti vezave ali zmanjšane negativne stranske učinke, kar dosežejo preko modificiranja glikozilacije proteinov in pripenjanja signalnih peptidov ali zdravilnih učinkovin [2, 3, 9].

1.2. IMUNOGENOST TERAPEVTSKIH PROTEINOV

Razlog za veliko pozornosti namenjene imunogenosti leži v njenih posledicah za varnost, kot tudi za učinkovitost terapevtskih proteinov. Pri varnosti moramo biti pozorni predvsem na akutne reakcije kot odziv na aplikacijo zdravila, ki lahko privedejo do smrti bolnika (anafilaktični šok; preobčutljivost tipa 1), in zapoznele reakcije preobčutljivosti (preobčutljivost tipa 4). Eden od možnih neželenih učinkov je razvoj protiteles proti zdravilu (*angl. ADA = anti-drug antibody*), ki vplivajo tako na učinkovitost, kot tudi na varnost terapije. Če se ADA vežejo na aktivno mesto terapevtskega proteina (nevtralizirajoča protitelesa), preprečijo njegovo delovanje in je terapija neuspešna. ADA, ki se vežejo na terapevtski protein, vendar ga ne nevtralizirajo, prav tako pomembno vplivajo na terapijo: omenjenemu kompleksu se zaradi velikosti spremeni farmakokitetika, zaradi steričnega oviranja pa potencialno tudi farmakodinamika. Poleg tega se lahko zaradi širjenja epitopov (*angl. »epitope spreading«*) iz nenevtralizirajočih razvijejo nevtralizirajoča ADA. Najnevarnejša so navzkrižno reaktivna ADA, ki reagirajo z endogenimi proteini zaradi podobnosti epitopov. Njihova razširitev vodi do avtoimunskeih bolezni. Zato skušamo negativne imunske odzive bolnikov na biološka zdravila preprečiti [10, 11, 12, 13, 14, 15, 16].

Na imunogenost zdravila lahko vplivajo dejavniki, ki so odvisni od bolnika in bolezni: genetski dejavniki, ki vplivajo na imunski odziv; genetski dejavniki, ki vplivajo na samo tarčo terapije; starost (različen imunski odziv v različnih starostnih obdobjih); ostale soprisotne bolezni in terapije, ki vplivajo na imunski odziv; predhodna izpostavljenost in senzibilizacija s podobnimi proteini idr. Zaradi številnih vplivov in variabilnosti med različnimi pacienti morajo farmacevtska podjetja kontrolirati in zmanjšati vse ostale vplive na imunogenost, ki so odvisni od samega terapevtskega izdelka [10, 11, 12]:

- Izvor in narava terapevtskih proteinov (vrsta ekspresijskega sistema, strukturna in posttranslacijska podobnost z naravno prisotnim proteinom).
- Večje spremembe v strukturi terapevtskega proteina (fuzijski proteini, bispecifični proteini, humanizirana protitelesa, konjugacija proteina z albuminom, polietilenglikolom, kemično oz efektorsko funkcionalno spojino).
- Nečistote povezane s terapevtskim izdelkom (degradacijski produkti, agregati, nečistote), proizvodnim procesom (proteini ekspresijskega sistema, DNA, lipidi, deli bakterij), formulacijo in vsebnikom (pomožne snovi, nečistote).
- Načrtovano odmerjanje terapevtskih proteinov (velikost odmerka, interval in način aplikacije).

V tem magistrskem delu se bomo osredotočili na agregacijske produkte terapevtskih proteinov, ki so bili kot dejavnik imunogenosti in kazalec stabilnosti večkrat raziskovani in vzeti pod drobnogled, zato so tudi eden izmed najbolj spremljanih in kontroliranih parametrov med razvojem terapevtskih proteinov.

1.3. AGREGATI TERAPEVTSKIH PROTEINOV

Agregate oz. skupke terapevtskih proteinov težko ovrednotimo kot celoto, saj so heterogena skupina molekul različnih velikosti (velikostnega razreda od nm do mm), oblike, nastanka, pomena in kliničnih posledic. Zavedati se moramo, da tvorbo agregatov ženejo enake interakcije, kot osnovno zvijanje proteinov (ločimo kovalentne in nekovalentne interakcije; med slednje uvrščamo geometrijske omejitve zaradi kotov med vezmi atomov, sterično oviranje stranskih skupin in verig, van der Walls-ove interakcije, elektrostatske interakcije, hidrofobne efekte in vodikove vezi). Osnovna oblika proteina je ponavadi monomerna, tipični agregati pa zajemajo oblike dimerov, trimerov ali oligomernih stanj; redkeje najdemo tudi velike aggregate višjih redov [17, 18].

Na aggregate poleg zgradbe samega proteina pomembno vpliva tudi okolica, ki obdaja proteine. Z ustrezno izbiro formulacije biološke učinkovine (okolice oz. pufra, v katerem se protein nahaja), lahko vplivamo na povečano stabilnost proteina in zmanjšamo nastanek agregacijskih produktov. Glede na obstojnost agregatov in interakcije med njimi ločimo 2 skupini: reverzibilne in ireverzibilne aggregate [17, 18].

1.3.1. Reverzibilni agregati

Proteini po svoji naravi niso izjemno stabilni, ampak prehajajo med različnimi oblikami - ravnotežnimi stanji. Tvorba agragatov bo v primerem okolju vedno možna, ne glede na kemijsko sestavo proteina. Običajno velja, da višja kot je koncentracija proteinov, večji bo delež aggregatov. V teh primerih aggregati večinoma razпадajo z ustrezeno spremembjo okolja (redčenjem, spremembom pH, spremembom ionske moči idr.). Pri mAb in ostalih terapevtskih proteinih, na katere se osredotočamo, reverzibilni aggregati nastajajo šele pri visokih koncentracijah, ali pa se omenjeni proteini že pred nastankom aggregatov obarjajo oz. precipitirajo [18].

1.3.2. Irevverzibilni aggregati

Za razliko od reverzibilnih aggregatov poznamo tudi aggregate, ki se pojavijo le v ekstremnih pogojih: visoke koncentracije denaturantov, visoke temperature in tlaki; v takšnih pogojih proteini izgubijo sekundarno in terciarno strukturo (torej izgubijo funkcijo). Največkrat so razlog za tako veliko stabilnost ireverzibilnih aggregatov močni hidrofobni efekti med delno razvitimi proteinimi, včasih pa ireverzibilne aggregate sestavljajo tudi nativno zviti proteini [14, 18].

Razlogi za delno razvitje proteinov ali močno asociacijo normalnih oz. nativnih proteinov so fizikalni (pH, temperatura, tlak, ionska moč, stiki med različnimi površinami, stresanje, ostali topljenci v formulaciji idr.) ali kemijski (oksidacije in deamidacije), zato lahko na njihov nastanek vsaj delno vplivamo preko primernega medija v celični kulturi, ustrezne formulacije terapevtskih proteinov, ustreznega shranjevanja, transporta in načina aplikacije in podobnim [14, 17, 18].

1.3.3. Vpliv aggregatov na varnost in učinkovitost

Reverzibilni aggregati po aplikaciji v bolnika disociirajo nazaj v monomerno obliko, zato s stališča imunogenosti niso preveč zaskrbljujoči (vplivajo predvsem način aplikacije in pogostost odmerjanja). Na drugi strani imamo ireverzibilne aggregate, ki v krvnem obtoku ne razpadajo in kot taki predstavljajo nečistoto (neželeno snov v odmerku) ter morajo biti zato kontrolirani. Bolj zaskrbljujoč je negativen vpliv ireverzibilnih aggregatov na imunski sistem, farmakokinetiko in farmakodinamiko biološkega zdravila. Pri tem so se za pomembne poleg topnosti aggregatov izkazale tudi njihove ostale lastnosti kot so velikost, kompleksnost (število agregiranih monomerov), ohranjenost prvtatega zvita proteinov v aggregatu idr. [14, 15, 18].

Agregati lahko zaradi svoje imunogenosti predstavljajo pomembno oviro pri razvoju terapevtskih proteinov, zato moramo že v zgodnjih stopnjah razvoja procesa z ustreznimi separacijskimi metodami znižati njihov delež v končni formulaciji. Njihovo pravilno in točno določanje na vseh kritičnih stopnjah procesa je torej velikega pomena [14, 18].

1.4. TEHNIKE ZA DETEKCIJO AGREGATOV

Zaradi velike heterogenosti agregatov je bilo razvitih več analitskih tehnik, s katerimi jih lahko ovrednotimo. Vendar različne tehnike ne dajejo vedno istega tipa rezultatov, ki bi jih lahko primerjali, saj se med seboj razlikujejo v osnovnih principih delovanja in vrsti detekcije. Zato je skupina Protein Characterization Subcommittee (PCS) znotraj organizacije European Immunogenicity Platform (EIP) predstavila smernice oz. strategijo za ovrednotenje agregatov terapevtskih proteinov v različnih fazah od razvoja do proizvodnje le-teh [19].

PCS je razdelila analitske tehnike v 2 skupini, ki ju ločuje predvsem namembnost oz. področje uporabe. Tehnike, ki se jih enostavno validira, so visoko zmogljive (omogočajo hitro analizo večjega števila vzorcev) in robustne, so t.i. QC (kontrola kakovosti, *angl. quality control*) tehnike in so primerne za poznejše faze razvoja terapevtskih proteinov oz. za spremeljanje kakovosti med samo proizvodnjo. V drugo skupino sodijo tehnike, ki so namenjene dodatni karakterizaciji oz. vrednotenju in so časovno zamudne, manj natančne, točne in robustne; ter jih je posledično težje validirati po ICH smernicah. Različnih nadaljnjih variacij teh tehnik je veliko, zato lahko z njimi pridobimo zelo specifične podatke o vzorcih, kar predstavlja prednost pred QC tehnikami. Običajno dajejo te tehnike kvalitativne rezultate in so posledično uporabne pri odpravljanju težav in preverjanju rezultatov, ob dodatnih testiranjih (npr. ob spremembah v proizvodnem procesu) ter pri razvoju QC tehnik; zato so primerne za zgodnje faze razvoja bioloških učinkovin [19].

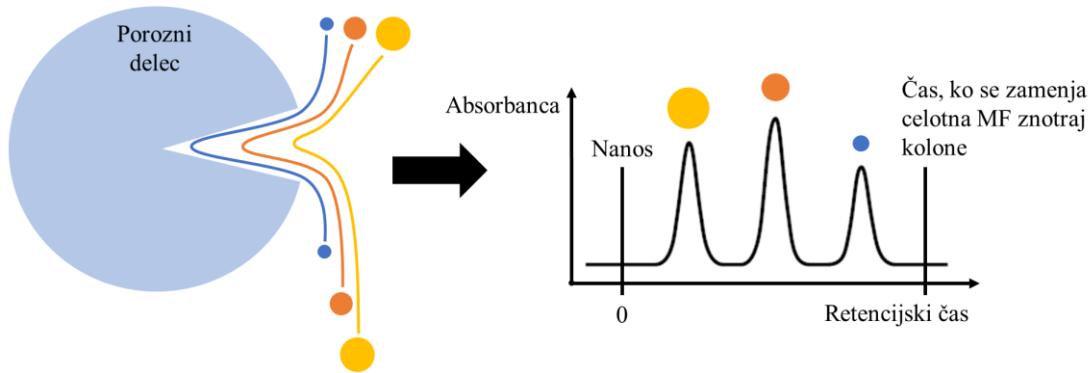
Trenutno najpomembnejše tehnike za analizo agregatov so vizualni pregled, gelska izključitvena kromatografija, kapilarna elektroforeza z natrjevim dodecilsulfatom, dinamično sipanje svetlobe, analitsko ultracentrifugiranje, pretočni sistem z asimetričnim prečnim pretokom in pretočno mikroskopsko slikanje. Tehnike so bolj podrobno opisane v naslednjih podpoglavljih.

1.4.1. Vizualni pregled

Namen te analize je bil prvotno usmerjen v zaznavanje delcev embalaže ali ostankov proizvodnega procesa. V primeru proteinov pa lahko postanejo s prostim očesom vidni tudi večji agregati (velikosti okoli $50 \mu\text{m}$). Čeprav se zdi tehnika enostavna, njena izvedba v resnici zahteva izkušenega operaterja. Tudi v primeru avtomatske analize validacija vključuje človeški faktor. Največja slabost tehnike je prav subjektivnost; meja zaznavanja zavisi od vrste naprave, osvetljenosti, časa in načina opazovanja, narave delcev idr. [19]

1.4.2. Gelska izključitvena kromatografija – SEC (angl. »Size Exclusion Chromatography«)

Gre za kromatografsko tehniko, kjer se delci porazdeljujejo med stacionarno in mobilno fazo na podlagi hidrodinameskega premera analita. Vzorec potuje skozi matriks kolone (slika 2). Manjše molekule potujejo globje v matriks, zato se v koloni zadržijo dlje časa. Značilnost in glavna prednost SEC je njen majhen vpliv na vzorec med analizo, zato ji lahko sledi dodatna analizna tehnik (t.i. dvodimensionalna kromatografija). V končnem lahko proteine zaznavamo z vrsto različnih detektorjev. Možnosti sklopitev in prilagoditev je torej pri SEC veliko [19, 20].

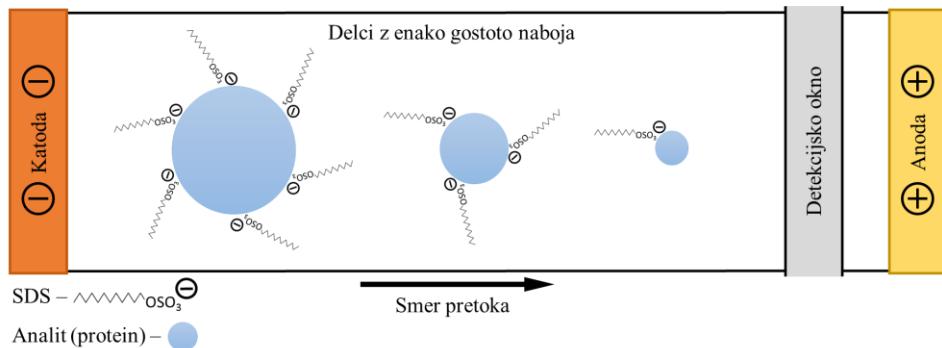


Slika 2: Princip delovanja SEC. Slika je prirejena po izobraževalnem gradivu »Size exclusion chromatography for biomolecule analysis« proizvajalca analizne opreme Agilent [21].

1.4.3. Kapilarna elektroforeza z natrijevim dodecilsulfatom – CE-SDS (angl. »Capillary Electrophoresis with Sodium Dodecyl Sulfate«)

Pri klasični elektroforezi se delci ločujejo v gelu po naboju in velikosti. Elektroforeza v kapilari ima pred klasično veliko prednosti (npr. avtomatizacija, občutljivost, učinkovitost in hitrost). V primeru, ko želimo le ločevanje po velikosti, se vzorcem doda SDS (natrijev dodecilsulfat). Ta je po svoji zgradbi anionski detergent, zato se proporcionalno glede na molekulsko maso veže na analite. S tem dosežemo enako gostoto naboja analitov. V

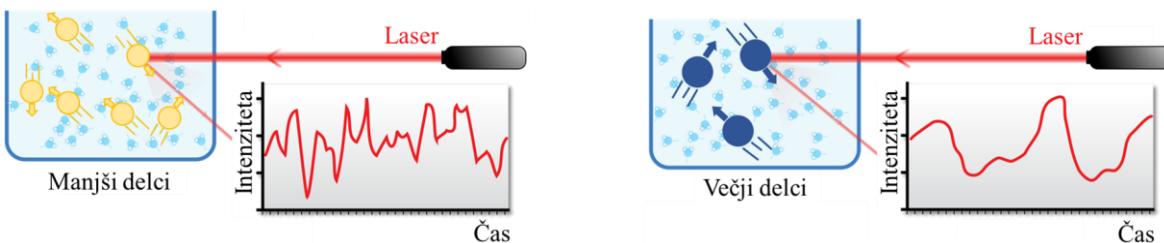
električnem polju gibanje delcev zato ovira le njihova velikost (slika 3). Hkrati vezava SDS povzroči tudi razpad nekovalentnih agregatov, torej lahko opazujemo le kovalentne aggregate, kar je glavna pomanjkljivost CE-SDS [19].



Slika 3: Shematski prikaz potovanja delcev pri CE-SDS po kapilari (osnovano na podlagi teoretične razlage).

1.4.4. Dinamično sisanje svetlobe – DLS (angl. »Dynamic Light Scattering«)

Pri DLS merimo nihanja v intenziteti sipane svetlobe, ki so odvisna od Brownovega gibanja delcev, le-to pa je odvisno od velikosti delcev (slika 4). Informacije, ki jih pridobimo s to tehniko, so kompleksne, saj je sisanje odvisno tudi od oblike in tipa nastalih agregatov. Tehnika je zato primerna za kvalitativno identifikacijo agregatov, saj lahko med seboj loči različne tipe agregatov podobnih velikosti [22].

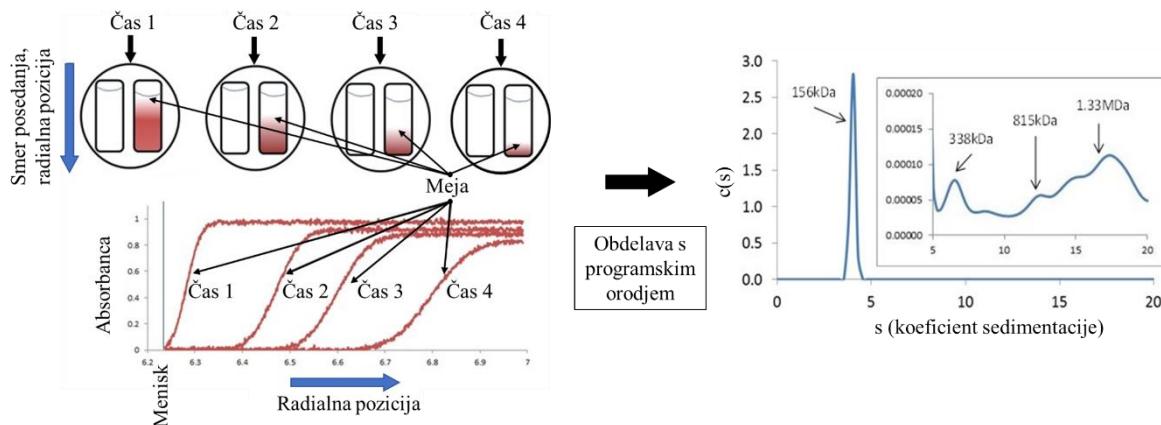


Slika 4: Princip delovanja DLS. Prirejeno po sliki v članku »Dynamic light scattering« (Wikipedia) [23].

1.4.5. Analitsko ultracentrifugiranje – AUC (angl. »Analytical Ultracentrifugation«)

Značilnost te tehnike in njena glavna prednost je možnost analize proteinov v njihovem naravnem oz. končnem okolju brez dodatnih vplivov reagentov ali pufrov, zato jo pogosto uporabljajo kot alternativno tehniko za primerjavo rezultatov ob razvoju SEC in ostalih tehnik. Preko časovnega profila meritev absorbance po celotni dolžini kivete določimo hitrost sedimentacije in velikost molekule (večja molekula ima večjo maso in hitreje sedimentira) – slika 5. Analiziramo lahko torej aggregate širokega velikostnega razpona. AUC

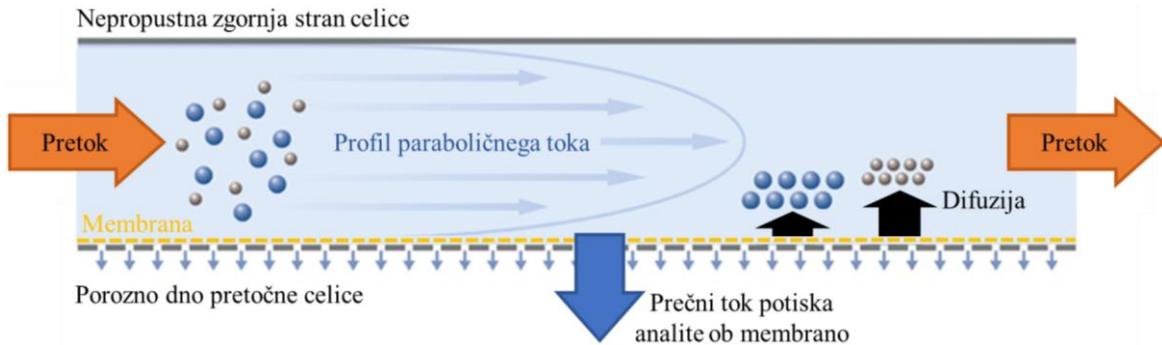
je bolj primerna za relativno kot za absolutno določanje agregatov, saj trenutno tehnika omejuje slaba ponovljivost (predvsem pri nižjih deležih agregatov) in visoka mejo določljivosti (LOQ, *angl. limit of quantitation*). Glavni vzrok za omenjeni slabosti so aparature, zato se z njihovim razvojem in optimizacijami metode pomanjkljivosti že izboljšujejo [19, 24].



Slika 5: Shematski prikaz delovanja tehnike AUC; po analizi lahko s pomočjo računalniške obdelave podatkov razberemo deleže posameznih frakcij. Prirejeno po slikah s spletnih strani podjetja Coriolis Pharma [25].

1.4.6. Pretočni sistem z asimetričnim prečnim pretokom – AF4 (*angl. »Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation«*)

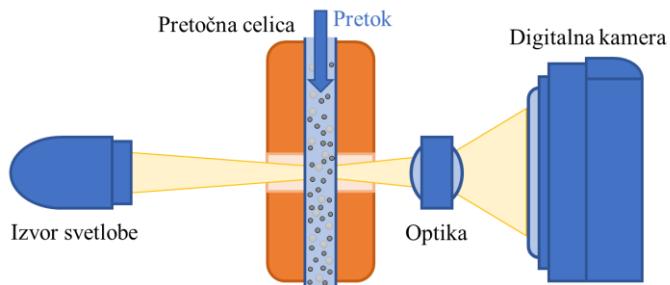
Princip ločevanja temelji na razlikah v difuzijskih koeficientih, ta pa je odvisen tudi od hidrodinamskega premora – večja kot je molekula, manjši difuzijski koeficient ima. V pretočni celici vzdolžno potuje vzorec s paraboličnim laminarnim tokom mobilne faze (v sredini celice tok teče hitreje kot ob robu). Ena stran celice je omejena s polpropustno membrano, skozi katero izhaja mobilna faza. Ob odtekanju mobilne faze se vzpostavi tudi prečni tok, ki potiska vzorec ob polpropustno membrano. Ta je za analite v vzorcu nepropustna. Molekule se z difuzijo iz roba vračajo globje v pretočno celico; manjša kot je molekula, dlje in večkrat se vrne. V sredini celice je vzdolžni tok hitrejši, zato se manjše molekule eluirajo hitreje kot velike. Ločba je prikazana na sliki 6. Interakcija vzorca z matriksom je pri AF4 manjša kot pri SEC, vseeno pa večja kot pri AUC, saj obstaja možnost vezave na polpropustno membrano. Zaradi milih pogojev ločbe vseeno velja za tehniko, kjer sama analiza ne vpliva na zgradbo proteina [19, 24].



Slika 6: Shematski prikaz ločevanja delcev z tehniko AF4. Prirejeno po Müller D in sod. [26].

1.4.7. Pretočno mikroskopsko slikanje – MFI (angl. »Micro-flow Imaging«)

Tehniki zaporednega mikroskopskega slikanja vzorca, ko ta potuje skozi pretočno celico, ob nadalnjem razvoju napovedujejo bolj razširjeno uporabo [27]. Razlog leži v absolutni določitvi koncentracije in oblike delcev v vzorcu, saj sistem neprekinjeno zajema slike in podatke računalniško obdeluje (slika 7). Optična narava tehnike je hkrati tudi njena omejitev – opazujemo lahko le delce, ki jih uporabljeni optika dovolj poveča. Zaenkrat so to agregati večjih dimenzij [27].



Slika 7: Shematski prikaz naprave za pretočno mikroskopsko slikanje (MFI). Prirejeno po Sharma DK in sod. [27].

Ključne lastnosti omenjenih tehnik so povzete v preglednici I. Gelska izključitvena kromatografija, ki v farmacevtski industriji velja za glavno tehniko določanja dimernih, trimernih in oligomernih agregatov, hkrati pa se uporablja tudi za določanje čistosti (homogenosti) farmacevtskih izdelkov, je podrobno opisana v nadaljevanju [20].

Preglednica I: Povzetek najpomembnejših tehnik za določanje agregatov terapevtskih proteinov [19].

Tehnika	Princip	Informacija, ki jo dobimo	Prednosti	Slabosti	Kvantifikacija	QC
Vizualni pregled	Ročni ali avtomatski pregled	Motnost vzorca, vidni delci	Enostavna, informacija o velikosti in obliki delcev	Slaba resolucija, subjektivna, trenirano osebje	Ne	Da
SEC	Porazdeljevanje med porozne delce	Hidrodinamski premer	Robustnost, občutljivost, možnost sklopitve z drugimi detektorji	Možne interakcije vzorca z matriksom, analizirani le delci določenih velikosti	Da	Da
CE-SDS	Ločevanje v kapilari v električnem polju po velikosti zaradi enake gostote naboja	Molekulska masa	Dobra resolucija, možnost sklopitve z drugimi detektorji	Možne interakcije vzorca s kapilaro, ne zazna nekovalentnih agregatov	Da	Da
AUC	Hitrost sedimentacije	Molekulska masa (in oblika)	Dobra resolucija, široko koncentracijsko območje	Slaba robustnost, kompleksnost pridobljenih podatkov	Da	Ne
DLS	Nihanja intenzitete sipane svetlobe zaradi Brownovega gibanja	Hidrodinamski premer	Občutljivost, analiza ne vpliva na vzorec, enostavna tehnika	Kompleksnost pridobljenih podatkov, slaba resolucija, občutljivost na kontaminacijo	Ne	Ne
AF4	Porazdeljevanje v hitrejši in počasnejši tok pretočne celice	Hidrodinamski premer (difuzijski koeficient)	široko koncentracijsko območje, možnost sklopitve z drugimi detektorji	Koncentriranje ali redčenje vzorca med analizo, slaba robustnost	Da	Ne
MFI	Mikroskopsko slikanje delcev	Koncentracija, velikost, oblika delcev	Informacija o obliki delcev, posledično detekcija izvora delcev	Kompleksnost pridobljenih podatkov, analiziran je le del vzorca	Da	Ne

1.5. GELSKA IZKLJUČITVENA KROMATOGRAFIJA (SEC)

1.5.1. Teoretične osnove

Ločevanje pri gelski izljučitveni kromatografiji poteka v koloni napolnjeni z okroglimi poroznimi delci. Med potovanjem vzorca lahko v pore matriksa (stacionarne faze) difundirajo analiti, ki so manjši od por, večji analiti pa potujejo vmes med posameznimi delci matriksa (ne da bi difundirali v njegove pore). Majhni analiti imajo torej večji volumen porazdelitve kot veliki analiti, zato se iz kolone izperejo kasneje. Velikost analita se določa posredno, saj v resnici dobimo informacijo o njegovem hidrodinamskem premeru. Na gibanje skozi pore namreč ne vpliva le velikost oz. masa (obe veličini na molekulske nivoje dobro kolelirata), ampak tudi oblika analita. Vsi analiti se iz kolone izperejo znotraj časa, ko mobilna faza preteče 1 volumen uporabljeni kolone [20, 28].

Kot smo že omenili, se analiti pri kromatografiji porazdeljujejo med mobilno in stacionarno fazo. SEC se od ostalih kromatografij razlikuje po inertni stacionarni fazi, ki – vsaj v teoriji – ne interagira z analitom. Edina gonilna sila separacije pri SEC je entropija, torej težnja vzorcev k povečevanju nereda. Praktično se to kaže kot difuzija delcev iz bolj v manj koncentrirana območja, torej v okoliško mobilno fazo; pri čemer manjši delci dodatno difundirajo v pore stacionarne faze. Ker vzorec le potuje skozi kolono, je ločba mogoča tudi pri milih pogojih oz. pogojih, ki čim bolje odražajo realno stanje sestave vzorca v formulaciji biološkega zdravila. Zaradi praktičnih omejitev in možnosti adsorbcije analitov na kolono moramo v resnici pogoje vseeno modificirati in prilagajati. Vplivi različnih parametrov so opisani v nadaljevanju [29, 30].

V sodobnih SEC kolonah običajno uporabljene stacionarne faze sestojijo iz silikatov, organskih polimerov ali raznih njenih modifikacij. Organsko modificirani silikati zagotavljajo bolj robusten matriks, ki je odporen na strižne sile tudi pri visokih tlakih; zaradi trdnejše strukture je omogočena tudi proizvodnja manjših krogelnih delcev. Bistvena je tudi večja inertnost matriksa, saj so silanolne skupine silikatov skrite oz. vezane z drugimi skupinami (verjetnost za morebitne elektrostatske interakcije s proteini je s tem manjša) [29].

Glede na to, da se delci ločujejo po velikosti, lahko pričakujemo, da je možno poleg deleža določene komponente vzorca (kot pri vsaki kromatografiji), analitu določiti tudi velikost (maso). Za takšno meritev potrebujemo umeritveno krivuljo z referenčnimi molekulami znane mase. Območje linearnosti in občutljivosti je odvisno od velikosti in homogenosti por.

Osredotočili se bomo na detekcijo in kvantifikacijo deleža agregatov, saj se za določanje točne velikosti uporablajo druge, bolj natančne tehnike (npr. masna spektrometrija) [20, 28].

1.5.2. Detekcija in sklopitve

Najpogosteje uporabljen način detektiranja proteinov je merjenje absorbance v ultravijoličnem (UV) delu spektra. Merimo jo lahko pri večih valovnih dolžinah: 214 nm (absorbcija peptidnih vezi) ali 280 nm (absorbcija aromatskih aminokislin: triptofan, tirozin, fenilalanin). Detekcija pri večjih valovnih dolžinah ima linearno območje pri višjih koncentracijah, medtem ko so meritve pri nižji valovni dolžini bolj občutljive in manj specifične. Iz razmerja absorbanc pri 260 in 280 nm lahko ocenimo čistost proteinov oz. soprisotnost DNA v vzorcu [20, 28].

Če želimo bolj občutljivo in specifično detekcijo od UV, imamo na voljo fluorescentno detekcijo. Zaznavamo lahko notranjo fluorescenco (triptofan lahko vzbudimo z valovno dolžino 280 nm in merimo emisijo med 300 in 370 nm – ta je odvisna od zgradbe proteina) ali zunanjou fluorescenco – pri slednji proteine označimo s fluorofori. Na celotno fluorescentno detekcijo vpliva tudi okolje, v katerem se protein nahaja (npr. bolj polarno okolje premakne območje emisije fluoroforov k daljšim valovnim dolžinam) [20, 28, 31].

Informacije o točni masi oz. velikosti proteinov dobimo z detektorji sisanja svetlobe, npr. »MALS« (*angl. multi-angle light scattering*). Za celostno oceno analita (informacije o koncentraciji in zgradbi) je zato primerna sklopitev večih detektorjev [20, 28].

Dokončno identifikacijo analitov bi lahko dosegli s sklopitvijo SEC in masne spektrometrije. Največji problem takšne detekcije je nekompatibilnost mobilnih faz (MF) obeh tehnik. Soli, ki so skoraj vedno sestavni del MF pri SEC, so namreč nehlapne, kar onemogoča direktno sklopitev. Možna rešitev je prilagoditev MF v hlapno MF, ki sicer ne denaturira proteinov, vendar vseeno ne predstavlja fizioloških pogojev (npr. MF iz amonijevega acetata in amonijevega formiata izhlapi v obliki amonijaka, ogljikovega dioksida in metana). Drugačna rešitev je menjava MF po končani SEC analizi (2D kromatografija) [20, 28].

1.5.3. Parametri gelske izključitvene kromatografije in njihov vpliv na ločbo

1.5.3.1. Dimenzija kolone

Velikost kolone in volumen, ki je na voljo analitom za ločbo, vplivata na mnogo spremenljivk. Daljšanje kolone v splošnem pomeni boljšo ločbo, torej izboljšanje resolucije.

Če zvečamo premer kolone, lahko povečamo nanos proteina. S tem zmanjšamo vpliv kromatografskega sistema na širjenje vrhov in zopet izboljšamo resolucijo. V mislih moramo imeti negativno plat takšnih ukrepov – daljšanje časa analize [20, 30, 32].

1.5.3.2. Zgradba in premer delcev matriksa

Sodobne stacionarne faze pri gelski izključitveni kromatografiji sestojijo iz delcev, ki niso popolnoma porozni, temveč imajo neporozno jedro pokrito s plaščem, v katerega lahko difundirajo delci. T.i. »core-shell« delci omogočajo hitrejšo izmenjavo med mobilno in stacionarno fazo, saj slednjo predstavlja le porozni plašč. S tem dosežemo manjše širjenje vrhov na račun vzdolžne difuzije in krajše čase zadrževanja na koloni [34]. Manjši premer kroglastih delcev matriksa (stacionarne faze) pomembno pripomore k večji učinkovitosti kolone, saj tako porozni material zavzame večji delež volumna kolone, kar pomeni boljšo resolucijo in učinkovitost kolone [30, 32].

1.5.3.3. Nanos vzorca

Na občutljivost in resolucijo vpliva tudi nanos vzorca, pri čemer sta pomembna tako končna koncentracija vzorca kot tudi volumen injiciranja. Preveliki nanosi vodijo v širjenje vrhov, kar zmanjša resolucijo; medtem ko premajhni nanosi predstavljajo tveganje premajhne občutljivosti metode oz. detekcijskega sistema za detekcijo analitov, ki so v nizkih deležih zastopani v vzorcih [28].

1.5.3.4. Pretok mobilne faze

Manjši kot je pretok mobilne faze skozi kolono, več časa bodo imeli analiti za porazdelitev in difundiranje v pore materiksa. Zaradi tega bosta ločba in resolucija boljša kot pri večjem pretoku. Hkrati manjši pretok pomeni tudi daljši čas analize, absolutno širše vrhove (relativno na celotno širino kromatograma so vrhovi ožji) in manjšo občutljivost [28].

1.5.3.5. Temperatura kolone

Višanje temeperature med ločbo ima pozitivno in negativno plat. Pri višji temperaturi se molekulam poveča prosta energija, kar pospeši difuzijo in poveča fluidnost mobilne faze, pri čemer se ločba izboljša (boljša resolucija, ponovljivost). V primeru, da je proste energije dovolj za prekinitev določenih vezi (predvsem vodikovih vezi in šibkejših van der Waalsovih ter elektrostatskih interakcij), lahko višanje temperature vpliva tudi na stabilnost proteinov. Ob previsoki temperaturi lahko agregati nastajajo ali razpadajo [34, 35].

1.5.3.6. Sestava mobilne faze (ionska moč, modifikatorji in pH)

Tipična mobilna faza pri SEC naj bi odražala pogoje, ki predstavljajo naravno okolje proteinu. Razlog za spremembo pogojev leži v stacionarni fazi, na katero se v majhnem deležu preko nespecifičnih interakcij vežejo proteini (nagnjenost k adsorpciji je še bolj izražena pri agregatih). V takšnem primeru določen del analita ne detektiramo, saj ostaja nekje na koloni (izkoristek ni 100%). Posledično so rezultati nepravilni (zaznamo manjši delež določene komponente, kot je je v resnici prisotne; ko se adsorbiran analit eluira, ga lahko napačno pripisemo drugemu vzorcu in podobno) in neponovljivi, prav tako se koloni zmanjša učinkovitost. Možen ukrep za preprečevanje vezave analiziranih proteinov na kolono je t.i. nasičevanje kolone, kjer pred pričetkom analize na kolono injiciramo proteine, ki naj bi zasedli prosta vezavna mesta. Nasičevalna raztopina je lahko mešanica proteinov, ali pa analizirani protein, ki ga pred analizo večkrat injiciramo [36]. Elektrostatske interakcije med proteini in stacionarno fazo najlažje preprečimo z večanjem ionske moči MF. Tipično so zato koncentracije soli v MF nad 150 mM (poleg tega visoke koncentracije soli zmanjšujejo možnost mikrobiološke kontaminacije MF). Večja ionska moč poveča simetrijo vrhov in izboljša ponovljivost časov zadrževanja analitov [37, 38].

Izbira soli ima lahko poleg vpliva na ionsko moč tudi druge vplive. Pri analitiki proteinov je večkrat uporabljen natrijev perklorat (NaClO_4), ki v dovolj visoki koncentraciji (0,2 – 0,4 M) še dodatno izboljša simetrijo, zmanjša adsorpcijo na stacionarno fazo in zmanjša potrebo po nasičevanju kolone. Ker ruši mrežo vodikovih vezi med molekulami vode, so potencialni hidrofobni efekti med proteini in matriksom kolone zmanjšani. Slaba stran omenjene soli je možnost dodatnega induciranja agregatov. Za preprečevanje sekundarnih interakcij lahko mobilni fazi dodajamo tudi razne modifikatorje: arginin, alkohol in acetonitril. Arginin preprečuje elektrostatske interakcije med analitom in stacionarno fazo, medtem ko organski modifikatorji izničujejo hidrofobne efekte [36, 37].

Spološno pravilo pri izbiri pH mobilne faze je, da se čim bolj približamo izoelektrični točki analiziranega proteina, saj bo imel protein v takšnem primeru neto naboj 0 in bodo možnosti za interakcije s stacionarno fazo zmanjšane. Skrajne vrednosti pH lahko proteine celo denaturirajo. Ponavadi se v praksi pH mobilnih faz giblje med 6 in 8 [37].

2. NAMEN DELA

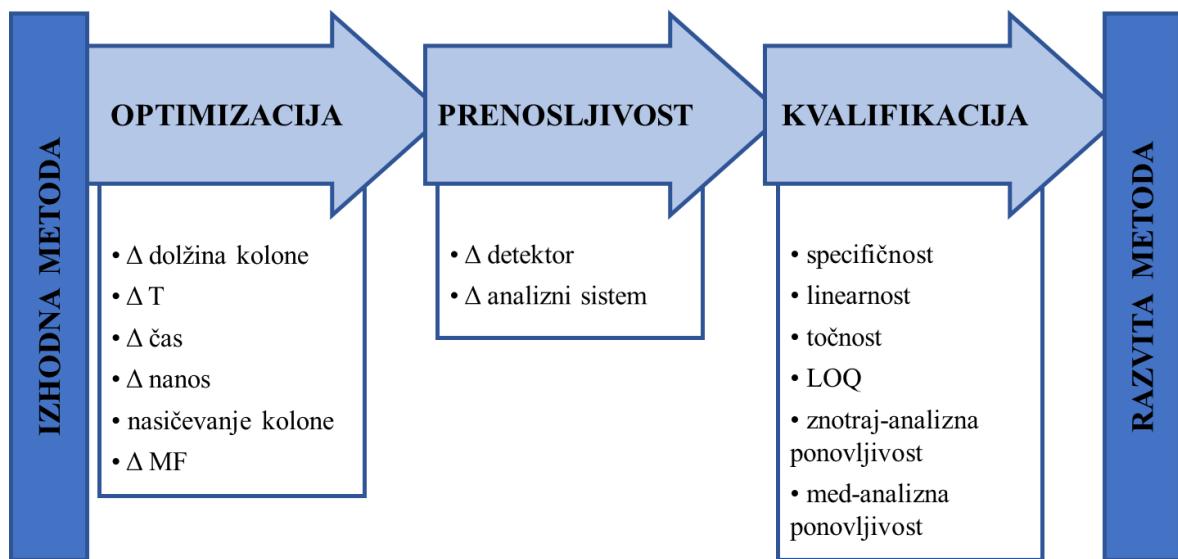
Eden izmed glavnih vzrokov za pojav alergij, avtoimunskih bolezni in ostalih negativnih imunskih odzivov pri uporabi terapevtskih proteinov so njihovi agregati, ki lahko nastanejo med proizvodnjo učinkovine in končnega produkta. Prav zaradi tega je treba ta pojav skrbno nadzorovati v vseh fazah razvoja ter ga ohranjati na nizki ravni. Referenčna tehnika, ki se uporablja za določevanje agregatov tako v fazi razvoja procesa izdelave kot tudi v kontroli kakovosti končne učinkovine in končnega produkta, je gelska izključitvena kromatografija.

Za podporo razvoja bioloških učinkovin se je s strani analitskega ovrednotenja kvalitete učinkovine pojavila potreba po optimizaciji metode gelske izključitvene kromatografije. Izhodna metoda je časovno zamudna, kar se težko sklada s trenutnimi trendi in razmahom v razvoju bioloških zdravil, saj težnje po številčnejših analizah in razvoju procesa v skladu s pristopom »QbD« (vključevanjem zagotavljanja kakovosti v razvoj proizvoda ali procesa) narekujejo potrebo po hitrejši in enostavnejši metodi. Pri izhodni metodi smo občasno opazili neželeno zadrževanje analita na koloni, kar zahteva dodatna spiranja kolone ter vpliva na krajšo življensko dobo kolone in višje stroške analize.

V okviru magistrskega dela bomo metodo razvijali na različnih modelnih terapevtskih proteinih (predvsem monoklonskih protitelesih). Glavni namen našega dela je torej prilagoditi in optimirati sedanjo metodo v visoko zmogljivo (*angl. high-throughput*) metodo, ki bo dajala točne in ponovljive rezultate pri krajšem času analize in bo uporabna za širok nabor terapevtskih protiteles. Pri delu se bomo osredotočili na meritve agregatov, ki so v našem primeru glavni iskani analit gelske izključitvene kromatografije.

Med samo optimizacijo izhodne metode bomo najprej uvedli krajšo kolono in testirali sposobnost ločevanja in določanja analita pri spremenjenem nanosu vzorca na kolono, spremenjeni končni koncentraciji vzorca in spremenjenem volumnu injiciranja vzorca pri že optimirani temperaturi in času analize. Da bi izboljšali točnost metode, bomo testirali vpliv nasičevanja kolone na adsorpcijo analita v analitskem sistemu ter modificirali mobilno fazo. Ustreznost modifikacij bomo preverili tudi z eno od alternativnih tehnik določanja agregatov. Sledilo bo preverjanje prenosljivosti metode med različnimi tipi detektorjev in kromatografskimi sistemi različnih proizvajalcev, kar bi omogočilo široko uporabnost metode.

Končno razvito metodo bomo kvalificirali (delno validirali) na proteinih tipa IgG1 in IgG2, kjer bomo preverjali specifičnost, točnost, linearost, znotraj-analizno in med-analizno ponovljivost ter mejo določljivosti in linearno območje metode. Slika 8 prikazuje glavne korake magistrske naloge.



Slika 8: Shematski prikaz poteka magistrske naloge.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. Kemikalije

Vse kemikalije, ki smo jih uporabili v eksperimentalnem delu naloge, so analizne čistosti. Navedene so v preglednici II.

Preglednica II: Kemikalije uporabljene pri magistrskem delu.

Kemikalija	Proizvajalec, kataloška številka
dikalijev hidrogen fosfat (K_2HPO_4)	Merck, #105104
kalijev dihidrogen fosfat (KH_2PO_4)	Merck, #104873
fosforna kislina (H_3PO_4)	Merck, #100573
1 M raztopina kalijevega hidroksida (KOH)	Merck, #105029
natrijev perklorat monohidrat ($\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Fluka, #89152
natrijev dihidrogen fosfat monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Merck, #106345
1 M raztopina natrijevega hidroksida (NaOH)	Merck, #109137
goveji serumski albumin (BSA)	Sigma, #A8531
natrijev klorid (NaCl)	Merck, #106404
tiroglobulin	Sigma, #T9145
imunoglobulin G (IgG)	Abcam, #ab198772
holo-transferin	Sigma, #T0665
ovalbumin	Sigma, #A5503
karbonska anhidraza	Sigma, #C7025
aprotinin	Pan Reac ApplChem, #A21320100
histidin	Sigma, #H8125

3.1.2. Voda

Za pripravo raztopin in pufrov smo uporabili prečiščeno vodo pridobljeno s sistemom MilliQ Advantage, proizvajalca Millipore.

3.1.3. Pufri in raztopine

Sestava raztopin in pufrov je navedena v preglednici III. Raztopino za redčenje vzorcev, mobilni fazi in raztopino za nasičevanje kolone smo pripravili z redčenjem topljencev v

prečiščeni vodi. Pri kontrolnem vzorcu »MWM« in raztopini aprotinina smo topljence redčili v raztopini za redčenje vzorcev.

Preglednica III: Raztopine uporabljene pri eksperimentalnem delu.

Raztopina	Sestava
Raztopina za redčenje vzorcev	150 mM K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ , pH 6,5
Izhodna mobilna faza - raztopina kalijevega fosfata	150 mM K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ , pH 6,5
Nova mobilna faza	50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 400 mM NaClO ₄ · H ₂ O, pH 6,0
Raztopina za nasičevanje kolone	1 mg/ml BSA; 1 mg/ml tiroglobulin; 1 mg/ml NaCl
Kontrolni vzorec »MWM«	0,5 mg/ml tiroglobulin, 0,2 mg/ml IgG, 0,25 mg/ml holo-transferin, 0,25 mg/ml ovalbumin, 0,2 mg/ml karbonska anhidraza, 0,2 mg/ml aprotinin, 0,16 mg/ml histidin
Raztopina aprotinina (za pripravo kontrolnega vzorca »LOQ«)	2 mg/ml aprotinin

3.1.4. Vzorci

Eksperimentalno delo je bilo opravljeno na modelnih proteinih tipa IgG1, IgG2 ter na terapevtskem fuzijskem proteinu (FP), ki je sestavljen iz proteinskega segmenta z določeno funkcijo, vezanega na Fc domeno IgG1 protitelesa. Uporabili smo terapevtske proteine, ki so jih pridobili s tehnologijo rekombinantne DNA v celicah ovarija kitajskega hrčka (CHO), in jih očistili ostankov proizvodnega procesa. Iz omenjenih vzorcev so pripravili tudi različne stresne vzorce, ki imajo višji delež agregatov v primerjavi z nativnimi (nestresnimi) vzorci. Poleg tega se lahko ti med seboj razlikujejo tudi v tem, da kažejo spremenjene interakcije z analiznim sistemom, kar bi lahko vplivalo na rezultate analize. Stresne vzorce so pripravili na različne načine: z daljšo izpostavitvijo povišanim temperaturam, s spremenjanjem pH, s spremenjanjem oksidacijsko-redukcijskega okolja, z mehanskim stresom ter z zaporednimi cikli zamrzovanja in odtaljevanja. S tako pripravljenimi vzorci preverjamo zmogljivosti metode v širšem koncentracijskem območju nečistot – agregacijskih produktov. Čeprav se bomo s takšnimi vzorci večinoma srečevali le med

razvojem bioloških zdravil, v rutinski kontroli kakovosti pa običajno ne, mora metoda tudi v takšnih primerih dajati točne in ponovljive rezultate.

Vse analizirane vzorce smo pred analizo redčili na enako končno koncentracijo z raztopino za redčenje vzorcev. S tem smo dosegli enake pogoje analize in detekcije pri vseh vzorcih. Imena vzorcev v nadaljevanju sestojijo iz oznake za tip molekule v vzorcu (IgG1 / IgG2 / FP), oznake za obliko oz. stanje vzorca (nativen – »nat« / stresiran – »str«) ter zaporedne številke vzorca, ki med seboj nadalje ločuje posamezne vzorce.

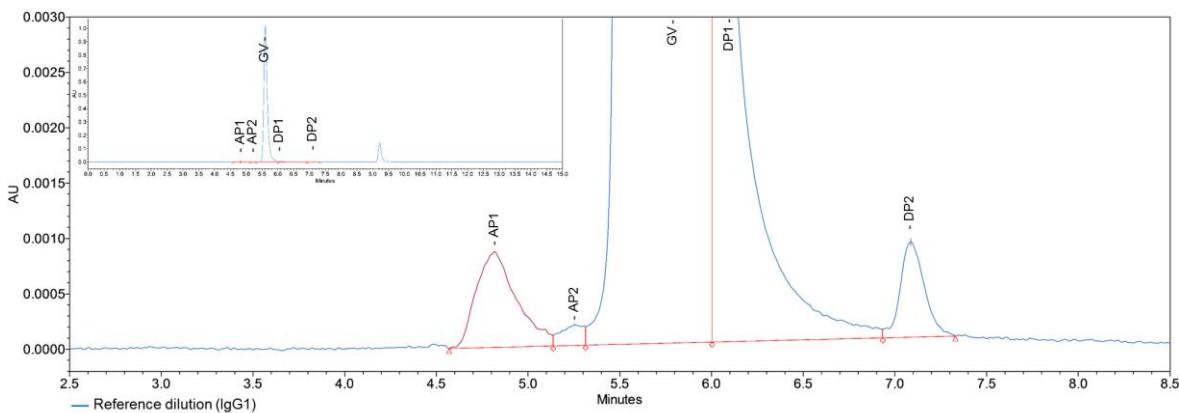
3.1.5. Kontrolni vzorci

Za namen potrjevanja ustreznosti analize in zanesljivosti rezultatov smo uporabili kontrolne vzorce, ki smo jih analizirali pred začetkom in po koncu vsake analize. Za vsakega od štirih kontrolnih vzorcev smo predpisali specifičen kriterij, ki mu mora biti zadoščeno, da je test veljaven. Kriteriji kontrolnih vzorcev, tako kot vsi ostali kriteriji, ki smo si jih zastavili med magistrskim delom in jih bomo srečali v nadaljevanju, izhajajo iz internega Novartisovega postopka, ki je oblikovan na podlagi smernic ICH, FDA ter ameriške in evropske farmakopeje, parametri kriterijev pa so izračunani s pomočjo programske opreme Empower in Microsoft Excel. Kontrolni vzorci s pripadajočimi kriteriji so opisani v nadaljevanju. Določeni parametri kontrolnih vzorcev so nas usmerjali tudi med razvojem nove metode, saj smo z njimi potrdili ustreznost modifikacij.

Referenčni vzorci (angl. reference dilution): To so bili obsežno analizirani in ovrednoteni alikvoti modelnih proteinov, ki jih med analitsko podporo procesa razvoja terapevtskih proteinov spremljamo v kontrolnih preglednicah in so posredni pokazatelj ustreznosti kromatografskega sistema. Primer kromatograma referenčnega vzorca je prikazan na sliki 9. Z analizo referenčnega vzorca kontroliramo tudi ustreznost redčenja vzorcev. Celotno površino kromatograma primerjamo s celotno površino kromatograma referenčnega vzorca. Kriterij za ustrezeno koncentacijsko območje (razmerje med obema površinama) je opisan v enačbi 1.

Enačba 1: Kriterij ustreznosti za koncentacijsko območje vzorcev.

$$0,8 < \frac{\text{celotna površina vzorca}}{\text{celotna površina referenčnega vzorca}} < 1,2$$



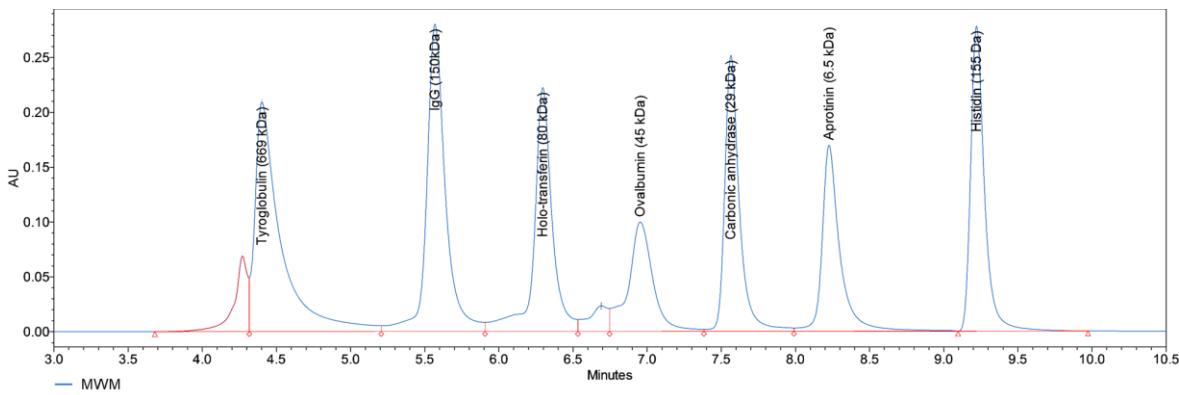
Slika 9: Primer kromatograma referenčnega vzorca (pripravljenega iz molekule IgG1) analiziranega z izhodno metodo (AP1 = 1. vrh agregacijskih produktov, AP2 = 2. vrh agregacijskih produktov, GV = glavni vrh, DP1 = 1. vrh degradacijskih produktov, DP2 = 2. vrh degradacijskih produktov).

Slepi vzorec: Gre za raztopino za redčenje vzorcev. Služi preverjanju neželenega prenašanja vzorcev v naslednja injiciranja (*angl. »carry-over«*), ki so posledica sekundarnih interakcij vzorca z matriksom ali z injektorskim sistemom. Rezultati so sprejemljivi, če v kromatogramih slepih vzorcev ne zaznamo vrhov večjih od vrednosti LOQ (takšen kriterij je sprejemljiv zaradi samega namena metode oz. končnih rezultatov metode).

Kontrolni vzorec »MWM« (*angl. molecular weight marker*): Gre za raztopino večih proteinov različne molekulske mase. Z MWM preverjamo, kako dobro metoda ločuje analite med seboj (specifičnost), zato spremljamo resolucijo med vrhovi določenih analitov:

- med IgG in holo-transferinom. Kriterij ustreznosti: resolucija $> 2,5$.
- med aprotininom in histidinom. Kriterij ustreznosti: resolucija $> 2,0$.

Največkrat nam resolucija kaže stanje kolone oz. njeno zmogljivost, ki se z večanjem števila injiciranj manjša. MWM bi nam lahko služil tudi za potrebe umeritvene krivulje, v primeru, da bi SEC uporabljali za določanje velikosti analitov. Primer kromatograma kontrolnega vzorca MWM je prikazan na sliki 10. Raztopino MWM smo pripravili v količini 50 ml in jo alikvotirali po 100 μl ter shranili pri $< -60^\circ\text{C}$. Alikvoti kontrolnega vzorca MWM so tako pripravljeni na injiciranje in pred analizo ne potrebujejo dodatne priprave. Sestava raztopine je opisana v preglednici III.



Slika 10: Primer kromatograma kontrolnega vzorca MWM analiziranega z izhodno metodo.

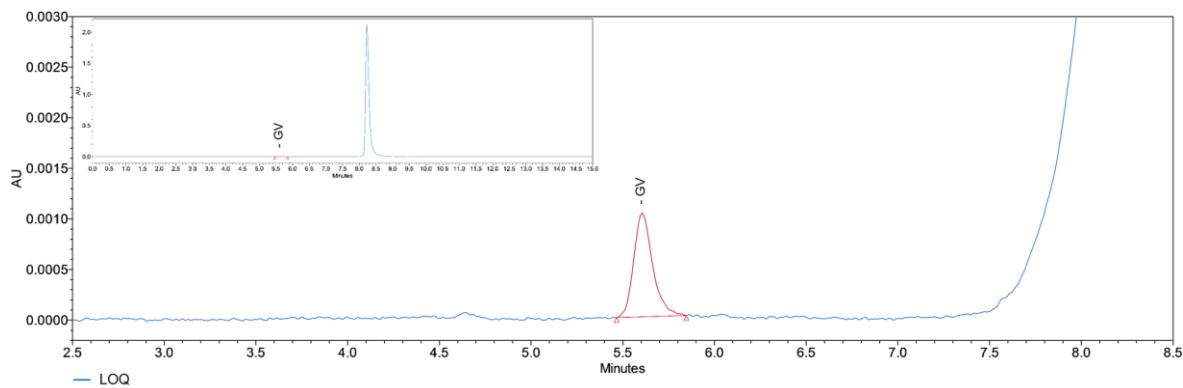
Kontrolni vzorec »LOQ«: Predstavlja 1000-kratno redčitev referenčnega vzorca, ki ga redčimo z raztopino aprotinina. Vloga aprotinina je preprečiti nespecifično vezavo analita na površino epruvet in vial, pri čemer bi se zmanjšala koncentracija analita v raztopini, meritve pa bi bile lažno prenizke. Ker je v vzorcu LOQ aprotinin v prebitku, se veže na viale namesto tarčnih analitov. Zaradi njegove majhne molekulske mase se eluira kasneje kot naši tarčni analiti, zato ne interferira z določanjem slednjih. Ustreznost aprotinina smo potrdili pred pričetkom eksperimentalnega dela. Z LOQ preverjamo ustreznost detektorja (občutljivost sistema). Kriterij sprejemljivosti pri odzivu LOQ je naslednji:

- razmerje med signalom in šumom (s/n) > 10 ; izračun razmerja s/n je opisan v enačbi 2.

Enačba 2: Izračun razmerja med signalom in šumom (H = višina glavnega vrha vzorca LOQ; h = razlika med največjo in najmanjšo višino vrhov ozadja (šuma) na območju okoli vrha LOQ, ki je 5-krat večje od širine vrha vzorca LOQ na polovici njegove višine).

$$s/n = \frac{2H}{h}$$

Vrh LOQ predstavlja spodnjo mejo kvatifikacije, zato vrhov manjših od LOQ kvantitativno (številčno) ne ovrednotimo. Primer kromatograma kontrolnega vzorca LOQ je prikazan na sliki 11.



Slika 11: Primer kromatograma kontrolnega vzorca LOQ (pripravljenega iz molekule IgG1) analiziranega z izhodno metodo (GV = glavni vrh vzorca LOQ).

3.2. OPREMA

3.2.1. Naprave in pribor

V preglednicah IV in V so naštete vse naprave in pribor, ki smo jih uporabljali pri eksperimentnem delu.

Preglednica IV: Naprave uporabljene pri magistrskem delu.

Naprava	Proizvajalec, tip
	Waters Acquity H-class Bio (notranji premer kapilar: 0,10 mm)
UHPLC sistemi	Agilent 1290 Infinity II (notranji premer kapilar: 0,12 mm) Agilent 1260 Infinity (notranji premer kapilar: 0,12 mm)
Detektorji	Waters Acquity UPLC PDA detector (celica: 5 mm, 1,5 µl) Waters Acquity UPLC TUV detector (celica: 10 mm, 0,5 µl) Agilent 1290 Infinity II VWD detector (celica: 3 mm, 2,0 µl) Agilent 1260 Infinity VWD detector (celica: 3 mm, 2,0 µl)
Analitska tehnica	Mettler Toledo XP205
Mešalna plošča	Tehnica, Rotamix 545 MM
Rotacijsko mešalo	Scientifica, Vortex mixer VELP
Centrifuga	Eppendorf 5415R
pH meter	Metrohm 780 pH meter
Črpalka za filtriranje	Millipore, WP6122050

Preglednica V: Pribor uporabljen pri magistrskem delu.

Pribor	Proizvajalec, kataloška številka
Polipropilenske mikrocentrifugirke 0,5 ml in 1,5 ml	Eppendorf, #003120086, #003120094
Pipete in nastavki za pipete	Sartorius BioHit, mLine
Viale in pokrovčki	Agilent, #9301-0978, #5182-0721, #5182-0716; Waters #186002639
Membranski filtri (velikost por: 0,22 µm)	Millipore Steritop, #SCGPS05RE

3.2.2. Kromatografske kolone

- Izhodna metoda: kolona dolžine **300 mm** (Waters UPLC BEH200 SEC, #186005226, premer delcev matriksa: 1,7 µm, velikost por: 200 Å, dimenzija kolone: 4,6 mm × 300 mm (premer × dolžina), volumen kolone: 5 ml).
- Nova metoda: kolona dolžine **150 mm** (Waters UPLC BEH200 SEC, #186005225, premer delcev matriksa: 1,7 µm, velikost por: 200 Å, dimenzija kolone: 4,6 mm × 150 mm (premer × dolžina), volumen kolone: 2,5 ml).

3.2.3. Programska oprema za obdelavo podatkov

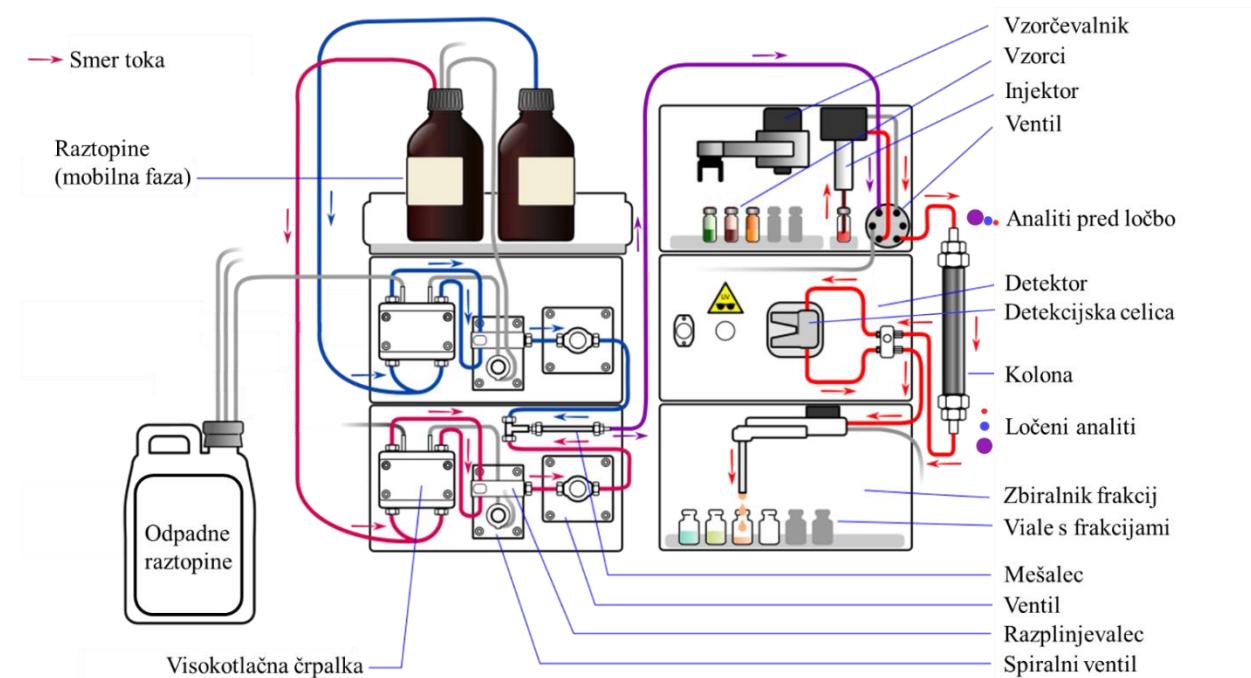
Kromatograme smo ovrednotili s kromatografsko programsко opremo Empower proizvajalca Waters. Del podatkov smo statistično analizirali v programu Microsoft Excel.

3.3. METODE

3.3.1. Gelska izklučitvena kromatografija

Za izvedbo gelske izključitvene kromatografije potrebujemo kromatografski sistem z naslednjimi osnovnimi komponentami: visokotlačna črpalka, samodejni injektor, vzorčevalnik, kolona in detektor (slika 12). Črpalka mora zagotoviti dovolj visok tlak, da lahko prečrpa mobilno fazo skozi sistem in kolono. Injektor pred kolono injicira vzorec iz vzorčevalnika, ki se na koloni loči in ga detektiramo na detektorju. Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali avtomatiziran kromatografski sistem, ki celoten proces (injiciranje, detekcijo, obdelavo podatkov, integracijo in vrednotenje kromatogramov) opravlja

samodejno. S tem je zagotovljen minimalen vpliv človeškega faktorja na potek analize. Na oddelku Razvojne analitike se izhodna metoda trenutno rutinsko uporablja za potrebe analitike vzorcev terapevtskih proteinov v razvoju; razvili pa smo tudi novo metodo, ki bo izhodno metodo nadomestila. Končni rezultat naše metode je določitev deleža posameznih komponent vzorca (konkretno agregatov in monomerov) v odstotkih.



Slika 12: Shematski prikaz delovanja sistema HPLC. V primeru SEC sistem uporablja le eno mobilno fazo, torej je med analizo aktivna le ena črpalka. Pritejeno po sliki v članku »Chromatography« (Wikipedia) [39].

3.3.2. Pogoji in inštrumentalne nastavitev

- **Uporabljena kolona:** Kolone imajo pore velikosti 200 Å in omogočajo ločevanje od 10 do 450 kDa velikih proteinov. Stacionarna faza sestoji iz polietoksisilana, ki je struktturna mešanica silikatov in organskih polimerov. Takšna stacionarna faza zagotavlja večjo stabilnost v bazičnih pogojih in zmanjša navzkrižne reakcije s proteinimi [38].
 - Izhodna metoda: »BEH SEC« (Waters) dolžine 300 mm
 - Nova metoda: »BEH SEC« (Waters) dolžine 150 mm
- **Pretok skozi kolono:** Pretok je pri obeh metodah enak največjemu pretoku, ki ga proizvajalec za optimalno življensko dobo kolone še priporoča: 0,4 ml/min [40].

- **Tlak na koloni:** Za omenjen pretok 0,4 ml/min je potreben tlak okoli 250 bar pri krajši koloni (150 mm) oz. 500 bar pri daljši koloni (300 mm).
- **Detekcija:** Tako pri novi kot pri izhodni metodi sta načina detekcije enaka. Proteinske komponente vzorca smo detektirali prek merjenja absorbance v UV območju pri 214 nm. Uporabljali smo detektor s fotodiodnim nizom (PDA detektor, *angl. photodiode array detector*) – zajem podatkov: 10 Hz; in detektor s spremenljivo valovno dolžino (VWD detektor, *angl. variable wavelength detector*) – zajem podatkov: 80 Hz.
- **Temperatura vzorcev v vzorčevalniku:** Pri obeh metodah želimo zagotoviti stabilnost vzorcev, zato smo njihovo temperaturo po pripravi ohranjali na 5 °C.

3.3.3. Optimizacija in razvoj metode

3.3.3.1. Temperatura ločbe (temperatura kolone)

Temperaturo kolone pri novi metodi so na oddelku že testirali in optimirali pred pričetkom tega eksperimentalnega dela.

- Izhodna metoda: 30 °C
- Nova metoda: 40 °C

3.3.3.2. Čas analize vzorca

Čas analize smo določili na podlagi dolžine kolone in časa zadrževanja soli na koloni.

- Izhodna metoda: 15 min
- Nova metoda: 5 min; kontrolni vzorci LOQ in MWM: 5,5 min

3.3.3.3. Nanos vzorca na kolono, končna koncentracija injiciranega vzorca, volumen injiciranja

Na nanos vplivamo s končno koncentracijo injiciranega vzorca in z volumnom injiciranja. Nanos smo arbitrarno zmanjšali za petkrat (iz 3,75 µg na 0,75 µg) – to pomeni da smo na kolono injicirali 0,75 µl vzorca s koncentracijo 1,00 mg/ml (takšno končno koncentracijo smo izbrali arbitralno).

- Izhodna metoda:
 - nanos vzorca na kolono: 3,75 µg
 - končna koncentracija vzorca: 0,75 mg/ml
 - volumen injiciranja: 5,00 µl

- Nova metoda:
 - nanos vzorca na kolono: 0,75 µg
 - končna koncentracija vzorca: 1,00 mg/ml
 - volumen injiciranja: 0,75 µl

Vpliv zmanjšanja nanosa na resolucijo smo testirali s štirimi injiciranimi kontrolnimi vzorcev MWM. Ustreznost razmerja signal/šum smo preverili z injiciranimi LOQ pripravljenimi iz referenčnih vzorcev molekul IgG1 in IgG2 (nanos pri LOQ je 0,1 % nominalnega nanosa = 0,75 ng). V testu smo injicirali štiri ločene priprave LOQ. Vse priprave so bile pripravljene po postopku opisanem v preglednici VI (oznake fizikalnih veličin: C = koncentracija [mg/ml], V = volumen [µl]). Zaradi visokih izhodnih koncentracij vzorcev je bilo redčenje večstopenjsko, vmesnih redčitev nismo analizirali.

Preglednica VI: Priprava LOQ vzorcev za testiranje nanosa na kolono.

ime vzorca	C začetna [mg/ml]	V vzorca [µl]	V raztopine [µl]	V končen [µl]	C končna [mg/ml]
IgG1_nat_1 redcitev 1	64,41	10,9	689,1	700,0	1,000
IgG1_nat_1 redcitev 2	1,00	10,0	290,0*	300,0	0,033
IgG1_nat_1 LOQ	0,03	15,0	485,0*	500,0	0,001
IgG2_nat_1 redcitev 1	11,20	13,4	136,6	150,0	1,000
IgG2_nat_1 redcitev 2	1,00	10,0	290,0*	300,0	0,033
IgG2_nat_1 LOQ	0,03	15,0	485,0*	500,0	0,001

*Vzorcev nismo redčili z raztopino za redčenje vzorcev, temveč z raztopino aprotinina.

Pri konstantnem nanosu smo nato testirali vpliv končne koncentracije injicirane vzorcev in vpliv volumna injiciranja. Test smo izvedli na nativnem vzorcu tipa IgG1 in na dveh stresnih vzorcih molekul IgG1 in IgG2.

Enak nanos (0,75 µg) smo dosegli na dva načina. Vzorce smo redčili z raztopino za redčenje vzorcev na končno arbitralno določeno koncentracijo 1,00 mg/ml in na kolono injicirali 0,75 µl. Omenjeni nanos smo dosegli tudi z uravnavanjem volumna injiciranja neredčenih vzorcev (preglednica VII). Vpliv na rezultate smo preverjali preko deleža posameznih frakcij in preko koncentracijskega območja vrhov na kromatogramih (površine pod vrhovi).

Preglednica VII: Priprava vzorcev za test vpliva končne koncentracije in volumna injiciranja na rezultat. Nanos je bil pri vseh vzorcih konstanten (0,75 µg).

ime vzorca	C začetna [mg/ml]	V vzorca [µl]	V raztopine [µl]	V končen [µl]	C končna [mg/ml]	V injiciranja vzorca [µl]
IgG1_nat_2_0,75	54,80	10,95	589,05	600	1,00	0,75
IgG1_nat_2_0,20	54,80	13,69	186,31	200	3,75	0,20
IgG1_nat_2_0,10	54,80	13,69	86,31	100	7,50	0,10
IgG1_str_1_0,75	4,61	10,85	39,15	50	1,00	0,75
IgG1_str_1_0,16	4,61	50,00	0,00	50	4,61	0,16
IgG2_str_1_0,75	5,01	11,98	48,02	60	1,00	0,75
IgG2_str_1_0,15	5,01	30,00	0,00	30	5,01	0,15

Po končanem testiranju nanosa smo primerjali rezultate izhodne metode in nove metode (na tej stopnji optimizacije sta si bili metodi različni v dolžini kolone, temperaturi kolone, času analize in nanosu – vrednosti so prikazane v preglednici XXIV). Primerjali smo rezultate kontrolnega vzorca LOQ (iz IgG1), MWM in vzorca molekul IgG1 in IgG2. Priprava vzorcev je prikazana v preglednici VIII (zaradi visokih izhodnih koncentracij vzorcev je bilo redčenje večstopenjsko, vmesnih redčitev nismo analizirali).

Preglednica VIII: Priprava vzorcev za primerjavo med izhodno in novo metodo.

ime vzorca	C začetna [mg/ml]	V vzorca [µl]	V raztopine [µl]	V končen [µl]	C končna [mg/ml]
IgG1_nat_1	64,41	10,9	689,1	700,0	1,000
IgG1_nat_1 redcitev	1,00	10,0	290,0*	300,0	0,033
IgG1_nat_1 LOQ	0,03	15,0	485,0*	500,0	0,001
IgG2_nat_1	11,20	13,4	136,6	150,0	1,000

*Vzorcev nismo redčili z raztopino za redčenje vzorcev, temveč z raztopino aprotinina.

3.3.3.4. Nasičevanje kolone

Da bi zmanjšali potencialno zadrževanje proteinov na koloni zaradi nespecifičnih interakcij, smo testirali nisičevanje kolone z nisičevalno raztopino. Arbitrarno smo določili nisičevanje z desetimi injiciranimi nisičevalnimi raztopinami po 10 µl. Vzorce smo na kolono injicirali v dveh sekvenkah: pred in po nisičevanju kolone. Opazovali smo razlike v celotni površini pod vrhovi na kromatogramih vzorcev ter spremembe v deležu agregatov in

glavnega vrha določenih vzorcev. V preglednici IX je opisana priprava vzorcev, na katerih smo izvedli omenjeni test. Poleg vzorcev imunoglobulinov smo test izvedli tudi na vzorcih fuzijskega proteina.

Preglednica IX: Priprava vzorcev za preverjanje vpliva nasičevanja kolone.

ime vzorca	C začetna [mg/ml]	V vzorca [µl]	V raztopine [µl]	V končen [µl]	C končna [mg/ml]
IgG1_nat_3	59,38	16,8	983,2	1000	1,00
IgG1_str_2	1,00	100,0	0,0	100	1,00
IgG2_nat_2	70,10	14,3	985,7	1000	1,00
IgG2_str_2	4,97	20,1	79,9	100	1,00
FP_nat_1	25,00	20,0	480,0	500	1,00
FP_str_1	4,76	21,0	79,0	100	1,00

3.3.3.5. Izbira mobilne faze

Poleg testov nasičevanja kolone smo z namenom preprečevanja adsorpcije analitov na matriks kolone spremenili sestavo mobilne faze tako, da je imela večjo ionsko moč (glavna razlika je bil dodatek soli NaClO₄), pri čemer smo pH uravnali v nevtralne okvire.

- Izhodna metoda: 150 mM K₂HPO₄ / KH₂PO₄, pH 6,5
- Nova metoda: 50 mM NaH₂PO₄; 400 mM NaClO₄ · H₂O, pH 6,0

Preglednica X: Priprava vzorcev za test vpliva mobilne faze.

ime vzorca	C začetna [mg/ml]	V vzorca [µl]	V raztopine [µl]	V končen [µl]	C končna [mg/ml]
IgG1_nat_4	30,10	16,61	483,39	500	1,00
IgG1_str_3	29,80	16,78	483,22	500	1,00
IgG1_str_4	29,70	16,84	483,16	500	1,00
FP_nat_1	25,00	20,00	480,00	500	1,00
FP_str_2	2,74	36,50	63,50	100	1,00
FP_str_3	4,12	24,27	75,73	100	1,00
IgG2_nat_2	70,10	14,27	985,73	1000	1,00
IgG2_str_3	1,00	30,00	0,00	30	1,00

Ustreznost spremembe smo preverili z eksperimentom, v katerem smo iste vzorce, navedene v preglednici X, najprej analizirali z eno in nato z drugo mobilno fazo.

Vzorce smo za potrebe potrditve pravilnosti rezultatov testirali tudi z alternativno tehniko za določanje agregacijskih produktov, ki ne temelji na kromatografski ločbi: analitskim ultracentrifugiranjem. Analizo so izvedli v karakterizacijskem laboratoriju podjetja Sandoz v Nemčiji in nam posredovali rezultate.

3.3.4. Prenosljivost metode

Preverili smo, ali lahko pogoje metode z manjšimi spremembami prenesemo na drugačne tipe aparatur oz. sisteme drugih proizvajalcev. S testom prenosljivosti smo torej preverili tudi ta vidik robustnosti novo razvite metode.

S prvim testom smo na vzorcu nativne molekule IgG2 in stresnem vzorcu molekule IgG2 preverili ustreznost uporabe nastavljenega ultravijoličnega detektorja (TUV detektorja, *angl. tunable ultraviolet detector*), ki se od PDA detektorja razlikuje po principu delovanja (proizvajalec obeh detektorjev in sistemov je podjetje Waters). Priprava vzorcev za primerjavo detektorjev je prikazana v preglednici XI. Vsakega od vzorcev smo pripravili šestkrat.

Preglednica XI: Priprava vzorcev za test detektorja TUV.

ime vzorca	C začetna [mg/ml]	V vzorca [μl]	V raztopine [μl]	V končen [μl]	C končna [mg/ml]
IgG2_nat_3	117,60	12,8	1487,2	1500,0	1,00
IgG2_str_1	5,01	20,0	80,0	100,0	1,00

Pri drugem testu smo poskušali novo razvito metodo prenesti na HPLC sisteme, ki so bolj razširjeni med laboratoriji in cenejši od UHPLC aparatur. Prehod na sisteme, ki delujejo pri nižjem tlaku, je omogočila uporaba krajše kolone, saj ta doprinese manj upora v celoten sistem. Tako smo prišli v operativno območje običajnih HPLC sistemov. Dodatna ovira poleg doseganja nižjih tlakov so večji volumni, pri katerih obratujejo HPLC sistemi – mrtvi volumni vplivajo na širjenje vrhov in posledično slabšo ločbo. Za potrebe testa smo torej HPLC sistem (Agilent 1260 Infinity) prilagodili: standardno HPLC detekcijsko celico (volumen 14 μl, dolžina 10 mm) smo zamenjali z mikro-detekcijsko celico (volumen 2 μl,

dolžina 3 mm). HPLC sistem je detektiral analite z VWD detektorjem, ki v principu deluje enako kot TUV detektor. Poleg tega smo zamenjali kapilare sistema; na sistem smo namesto običajnih kapilar z notranjim premerom 0,17 mm namestili kapilare z manjšim notranjim premerom 0,12 mm. Test smo naredili na kontrolnih vzorcih MWM in na vzorcih v preglednici XII.

Preglednica XII: Priprava vzorcev za test prenosljivosti metode na modificiran HPLC sistem.

ime vzorca	C začetna [mg/ml]	V vzorca [µl]	V raztopine [µl]	V končen [µl]	C končna [mg/ml]
IgG1_nat_4	30,10	16,6	483,4	500	1,0
IgG1_str_2	1,00	100,0	0,0	100	1,0
IgG2_nat_1	11,20	44,6	455,4	500	1,0
IgG2_str_1	5,01	20,0	80,0	100	1,0
FP_nat_1	25,00	20,0	480,0	500	1,0
FP_str_3	4,12	24,3	75,7	100	1,0

3.3.5. Kvalifikacija (zgodnja validacija) metode

Razvoj analitske metode zaključimo s postopkom kvalifikacije oz. zgodnje validacije. Gre za proces preverjanja različnih parametrov z vnaprej določenimi minimalnimi kriteriji, ki jim mora metoda zadostiti.

Med kvalifikacijo smo na vzorcih molekul IgG1 in IgG2 preverili naslednje parametre: specifičnost, linearost in točnost (linearno območje), mejo določljivosti (*angl. Limit of quantification – LOQ*), natančnost (znotraj-analizno ponovljivost) in med-analizno ponovljivost. Parametre metode smo preverili v štirih sklopih:

3.3.5.1. Specifičnost

Specifičnost je sposobnost metode, da neodvisno od ostalih pričakovanih prisotnih snovi v vzorcu zazna in meri želeni analit. V našem primeru to pomeni jasno ločitev vrhov agregacijskih produktov in glavnega vrha. Prav tako moramo za specifičnost preveriti morebiten vpliv ostalih soprisotnih snovi v vzorcu na rezultat. Analizirali smo pufer, ki predstavlja formulacijo oz. matriks očiščenih vzorcev; nativen vzorec IgG2 in stresni vzorec IgG2. Priprava omenjenih vzorcev je opisana v preglednici XIII (zaradi visokih izhodnih koncentracij vzorcev je bilo redčenje večstopenjsko, vmesnih redčitev nismo analizirali).

Preglednica XIII: Priprava vzorcev za testiranje specifičnosti.

ime vzorca	C začetna [mg/ml]	V vzorca [µl]	V raztopine [µl]	V končen [µl]	C končna [mg/ml]
IgG2_nat_3 redcitev	117,60	12,8	137,2	150,0	10
IgG2_nat_3	10,00	50,0	450,0	500,0	1
IgG2_str_4 redcitev	117,40	12,8	137,2	150,0	10
IgG2_str_4	10,00	50,0	450,0	500,0	1

3.3.5.2. Linearnost in točnost

Linearna metoda izraža linearno zvezo med rezultatom metode oz. odzivom analita in njegovo koncentracijo v vzorcu (v določenem koncentracijskem območju). Z namenom preverjanja linearnosti smo analizirali vzorce tipa IgG1 in IgG2 pri sedmih različnih koncentracijah v območju od 0,1 – 125 % (1,0 – 1250 µg/ml) nominalne koncentracije (1,0 mg/ml) ter ocenili uspešnost z regresijsko analizo. Priprava omenjenih redčitev vzorcev je opisana v preglednici XIV.

Preglednica XIV: Priprava vzorcev za test linearnosti in točnosti.

ime vzorca	C začetna [mg/ml]	V vzorca [µl]	V raztopine [µl]	V končen [µl]	C končna [mg/ml]
IgG1_nat_1_0,1%	0,10	10,0	990,0*	1000,0	0,001
IgG1_nat_1_1%	1,00	30,0	270,0	300,0	0,010
IgG1_nat_1_25%	1,00	125,0	375,0	500,0	0,250
IgG1_nat_1_50%	1,00	250,0	250,0	500,0	0,500
IgG1_nat_1_75%	64,41	10,5	889,5	900,0	0,750
IgG1_nat_1_100%	64,41	10,9	689,1	700,0	1,000
IgG1_nat_1_125%	64,41	10,7	539,3	550,0	1,250
IgG2_nat_1_0,1%	0,10	10,0	990,0*	1000,0	0,001
IgG2_nat_1_1%	1,00	50,0	450,0	500,0	0,010
IgG2_nat_1_25%	11,20	11,2	488,8	500,0	0,250
IgG2_nat_1_50%	11,20	11,2	238,8	250,0	0,500
IgG2_nat_1_75%	11,20	10,0	140,0	150,0	0,750
IgG2_nat_1_100%	11,20	13,4	136,6	150,0	1,000
IgG2_nat_1_125%	11,20	11,2	88,8	100,0	1,250

* Vzorcev nismo redčili z raztopino za redčenje vzorcev, temveč z raztopino aprotinina.

Največjo redčitev vzorca – 0,1 % nominalnega nanosa smo redčili v raztopini aprotinina (njegov vpliv je opazen le pri nizkih koncentracijah proteina v vzorcu). Pri tem poskusu smo deloma preverjali tudi točnost metode (ta predstavlja odstopanje rezultata metode od prave vrednosti), zato smo vse redčitve na omenjene koncentracije pripravili v triplikatih. Del točnosti lahko dokažemo iz regresijske premice z zanemarljivim izračunanim odzivom pri nični teoretični koncentraciji analita (presečišče z y-osjo). Prav tako smo točnost in linearnost zagotovili z določenimi ukrepi (merjenje koncentracije založne raztopine vzorcev z drugo referenčno analizno tehniko, neodvisno redčenje vzorcev, validiranje kromatografskega sistema, meritve standardnih referenčnih materialov).

3.3.5.3. Določitev LOQ (meje določljivosti)

Mejo določljivosti (najmanjšo količino določenega analita v vzorcu, kjer je njegov odziv še dovolj ponovljiv in točen, da ga lahko kvantitativno ovrednotimo) smo preverjali pri koncentraciji 1,0 µg/ml, kar predstavlja 0,1 % nominalne koncentracije (1,0 mg/ml). Odziv smo preverjali s šestimi enakimi neodvisnimi pripravami vzorca testirane koncentracije (vsako pripravo smo injicirali enkrat). Rezultate za tri meritve smo pridobili pri testu linearnosti in točnosti, zato smo dodatno pripravili še tri redčitve po enakem postopku kot pri testu linearnosti in točnosti. V preglednici XV je opisana priprava vzorcev za določitev LOQ (zaradi visokih izhodnih koncentracij vzorcev je bilo redčenje večstopenjsko, vmesnih redčitev nismo analizirali).

Preglednica XV: Priprava vzorcev za določitev LOQ.

ime vzorca	C začetna [mg/ml]	V vzorca [µl]	V pufera [µl]	V končen [µl]	C končna [mg/ml]
IgG1_nat_1 redcitev 1	64,41	10,9	689,1	700,0	1,0
IgG1_nat_1 redcitev 2	1,00	30,0	270,0*	300,0	0,1
IgG1_nat_1 LOQ	0,10	10,0	990,0*	1000,0	0,001
IgG2_nat_1 redcitev 1	11,20	13,4	136,6	150,0	1,0
IgG2_nat_1 redcitev 2	1,00	30,0	270,0*	300,0	0,1
IgG2_nat_1 LOQ	0,10	10,0	990,0*	1000,0	0,001

* Vzorcev nismo redčili z raztopino za redčenje vzorcev, temveč z raztopino aprotinina.

3.3.5.4. Znotraj-analizna ponovljivost (natančnost) in med-analizna ponovljivost (robustnost)

Rezultati metode so zanesljivi, če metoda daje ponovljive in s tem primerljive rezultate pri vsaki analizi. Zato se metodo dolgoročno spremišča s kontrolnimi vzorci preko variacije njihovih rezultatov. V okviru kvalifikacije smo ponovljivost preverili z dvema analizama, ki sta si bili med seboj različni v določenih pogojih (operator, dan izvajanja analize, serija kolone). Razlika med obema testoma je bila tudi v samem kromatografskem sistemu in principu detekcije (analiza 1: Waters UPLC Acquity H-class Bio, PDA detektor; analiza 2: Agilent UHPLC 1290 Infinity II, VWD detektor). Najprej smo preverili znotraj-analizno ponovljivost vsake od analiz (preverili smo variacijo rezultatov pri šestih neodvisnih pripravah vzorcev), nato pa smo primerjali rezultate ene analize z rezultati druge analize (med-analizna ponovljivost). V preglednici XVI je prikazana priprava vzorcev za omenjene teste.

Preglednica XVI: Priprava vzorcev testiranih v poskusih ponovljivosti.

ime vzorca	C začetna [mg/ml]	V vzorca [µl]	V pufera [µl]	V končen [µl]	C končna [mg/ml]
IgG1_nat_1	64,41	10,1	639,9	650	1,0
IgG1_str_4	29,70	8,0	229,6	237,6	1,0
IgG1_str_5	30,30	11,0	322,3	333,3	1,0
IgG2_nat_4	67,1	14,9	985,1	1000	1,0
IgG2_str_4	117,4	12,8	1487,2	1500	1,0
IgG2_str_1	5,01	20,0	80,0	100	1,0

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Pri razvoju metode je bil glavni poudarek namenjen agregacijskim produktom, zato smo se osredotočali predvsem na rezultate določanja agregatov. Kljub temu smo preverili tudi uspešnost določanja glavnega vrha – monomerov za primer uporabe metode za določanje čistosti oz. homogenosti; medtem ko deleža degradacijskih produktov nismo vrednotili (slednje se določa z drugimi tehnikami).

4.1. EKSPERIMENTI MODIFIKACIJE NOVE METODE

Uspešna optimizacija v našem primeru pomeni, da optimirana metoda kaže enake ali bolj točne in ponovljive rezultate kot izhodna. Za preverjanje naše uspešnosti smo uporabili kriterije specifične za posamezni poskus. V testih, kjer smo primerjali posamezne rezultate, smo večkrat uporabili kriterije med-analizne ponovljivosti, ki so enaki kot pri validaciji metode: rezultati posameznih zvrsti so med analizama ponovljivi in s tem primerljivi, če so skladni s podkriterijem za ustrezno območje deleža celotne površine:

- A: absolutna razlika $\leq 0,1\%$ (analiziran vrh $\leq 0,5\%$ celotne površine)
- B: absolutna razlika $\leq 0,2\%$ (analiziran vrh $> 0,5\% - 2,0\%$ celotne površine)
- C: relativna razlika $\leq 10,0\%$ (analiziran vrh $\geq 2,0\%$ celotne površine)
- D: absolutna razlika $\leq 1,5\%$ (analiziran vrh je glavni vrh)

Ostali specifični kriteriji, ki smo jih upoštevali med optimizacijo, so opisani ob posameznih testih v nadaljevanju.

4.1.1. Temperatura ločbe (temperatura kolone)

Vpliv temperature na ločbo molekul pri gelski izključitveni kromatografiji so sodelavci na oddelku razvojne analitike testirali že pred začetkom našega eksperimentalnega dela, in sicer v temperturnem razponu od $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rezultati so pokazali, da se resolucija ločbe proteinov poveča z naraščajočo temperaturo (višja temperatura pomeni hitrejše gibanje molekul in hitrejšo difuzijo). Hkrati pa dvig temperature na samo stabilnost proteinov ne vpliva (delež agregatov in glavnega vrha se ni spremenil).

Prav zaradi navedene prednosti višje temperature ločbe smo vse kromatografske eksperimente v okviru magistrskega dela izvajali pri temperaturi $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.2. Čas analize vzorca

Trajanje analize smo določili z dolžino oz. volumnom kolone (časi analize daljši od časa, ko mobilna faza preteče celoten volumen uporabljene kolone - 15 min pri daljši in 7 min pri krajši koloni - niso smiseln). Prav tako smo upoštevali čas zadrževanja soli (najmanjših komponent vzorca). Tako smo končni čas analize skrajšali na 5 minut pri vzorcih terapevtskih proteinov in na 5,5 minute pri kontrolnih vzorcih MWM in LOQ.

4.1.3. Nanos vzorca na kolono, koncentracija injiciranega vzorca, volumen injiciranja

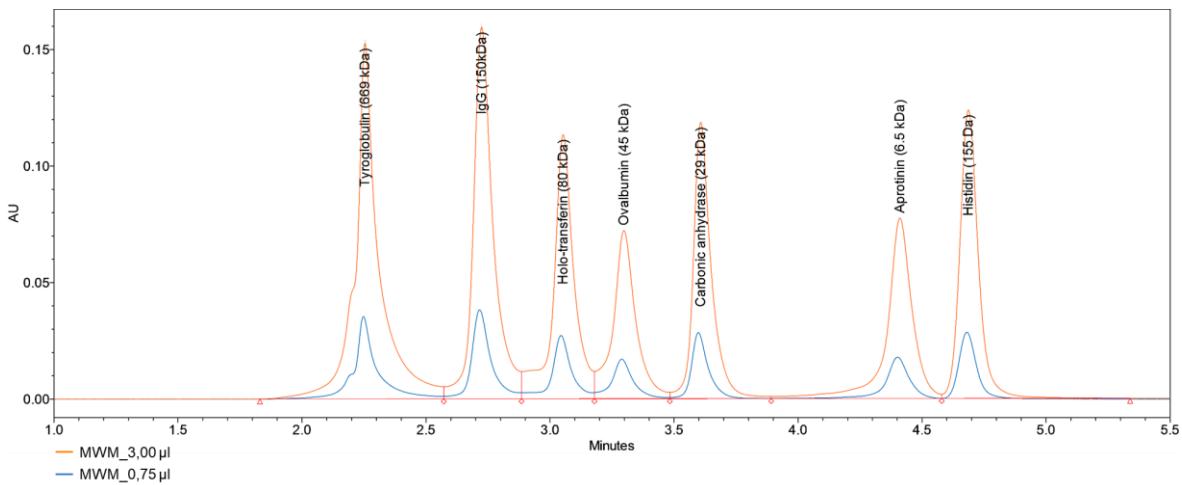
Za manjši nanos vzorca na kolono smo se odločili zaradi krajše testirane kolone in predhodnih izkušenj (velik signal pri analiziranih vzorcih). Predpostavljali smo, da bo spremenjen nanos vplival na resolucijo – zmogljivost ter na razmerje med signalom in šumom – občutljivost. Sprejemljivost arbitrarno določenega nanosa smo najprej preverili z vzorci MWM in LOQ.

Kvaliteto ločbe spremljamo z resolucijo med izbranimi vrhovi. IgG in holo-transferin se eluirata v območju določanja naših tarčnih analitov, zato z resolucijo med njima določamo zmogljivost ločbe običajno analiziranih vzorcev. Poškodbe same kolone se najprej kažejo v slabši ločbi malih analitov (trganje ali zamašitev manjših por), zato spremljamo tudi resolucijo med aprotininom in histidinom, ki se eluirata v območju malih molekul. Manjši volumen injiciranja MWM vpliva na boljšo resolucijo (preglednica XVII), saj so pri nižjem nanosu vrhovi nižji in ožji, s tem pa bolje ločeni med seboj (slika 13). Z znižanjem nanosa (zmanjšanjem volumna injiciranja) smo delno izničili poslabšanje resolucije zaradi manjšega števila teoretskih podov, ki so posledica krajšega časa analize in krajše kolone.

Preglednica XVII: Rezultati meritev vzorca MWM pri volumnih injiciranja 3,0 in 0,75 µl.

V injiciranja [µl]	Povprečna resolucija (IgG / holo-transferin) [-] (n = 4)	Povprečna resolucija (aprotinin / histidin) [-] (n = 4)
3,00	2,63 ± 0,02	1,99 ± 0,02
0,75	2,76 ± 0,01	2,08 ± 0,03

V preglednici so prikazana povprečja in absolutni standardni odkloni (SD) štirih meritev.



Slika 13: Prekrita kromatograma vzorcev MWM pri volumnih injiciranja 3,00 µl in 0,75 µl.

Če je znižanje nanosa po eni strani ugodno vplivalo na resolucijo in daljo življensko dobo kolone (manjša obremenitev s proteini), po drugi strani nižji vrhovi vplivajo na slabšo občutljivost. Vpliv nanjo smo preverili s kontrolnimi vzorci LOQ, vendar je razmerje med signalom in šumom (»s/n«) pri obeh tipih testiranih molekul kljub manjšemu nanosu še vedno ustrezno – nad 10. Preglednica XVIII z rezultati omenjenega testa je prikazana spodaj.

Preglednica XVIII: Rezultati testiranja volumna injiciranja na vzorcih LOQ pripravljenih iz molekul IgG1 in IgG2. Volumen injiciranja je bil 0,75 µl (s/n = razmerje med signalom in šumom).

Ime vzorca	Povprečno razmerje s/n [-] (n = 4)	Povprečna površina [$\mu\text{V}^*\text{sec}$] (n = 4)
IgG1_nat_1 LOQ	$36,97 \pm 13,12$	1570 ± 222
IgG2_nat_1 LOQ	$27,11 \pm 5,49$	1514 ± 95

V preglednici so prikazana povprečja in absolutni standardni odkloni (SD) štirih meritev.

Delo smo nadaljevali s testom vpliva volumna injiciranja in končne koncentracije analiziranih vzorcev. Enak nanos na kolono smo pri različnih koncentracijah vzorcev dosegli z uravnavanjem volumna injiciranja. Rezultati so zbrani v preglednici XIX. Koncentracijska območja (razmerja površin kromatogramov) analiziranih vzorcev so ustrezna (0,8 – 1,2), torej so bili končni nanosi vzorcev pri vseh injiciranjih primerljivi, kar je predpogoj za primerjavo rezultatov med seboj. Vsi preiskovani tipi vzorcev izpolnjujejo kriterije med-analizne ponovljivosti, torej volumen injiciranja vzorca in njegova končna koncentracija v testiranem območju ne vplivata na ločbo.

Preglednica XIX: Rezultati testa vpliva volumna injiciranja in končne koncentracije vzorcev na rezultate. Koncentracijsko območje je podano relativno glede na referenčni vzorec (AP = agregacijski produkti, GV = glavni vrh).

Ime vzorca	Absolutna / relativna* napaka			Kriterij ustreznosti	
IgG1_nat_2	V injiciranja vzorca [µl]	0,75	0,2		
	AP [%]	0,2	0,3	0,1	A: $\Delta \leq 0,1\%$ (abs.)
	GV [%]	99,8	99,7	0,1	D: $\Delta \leq 1,5\%$ (abs.)
	konc. območje [-]	0,79	0,86	/	DA
IgG1_nat_2	V injiciranja vzorca [µl]	0,75	0,1		
	AP [%]	0,2	0,3	0,1	A: $\Delta \leq 0,1\%$ (abs.)
	GV [%]	99,8	99,8	0	D: $\Delta \leq 1,5\%$ (abs.)
	konc. območje [-]	0,79	0,81	/	DA
IgG1_str_1	V injiciranja vzorca [µl]	0,75	0,16		
	AP [%]	0,3	0,4	0,1	A: $\Delta \leq 0,1\%$ (abs.)
	GV [%]	96,9	96,9	0	D: $\Delta \leq 1,5\%$ (abs.)
	konc. območje [-]	0,92	0,89	/	DA
IgG2_str_1	V injiciranja vzorca [µl]	0,75	0,15		
	AP [%]	20,2	21,3	5,5*	C: $\Delta \leq 10\%$ (rel.)
	GV [%]	79,5	78,4	1,1	D: $\Delta \leq 1,5\%$ (abs.)
	konc. območje [-]	0,75	0,88	/	DA

* – oznaka rezultata, kjer je namesto absolutne napake izračunana relativna napaka.

Rezultate nižjega nanosa pri novi metodi smo primerjali z rezultati izhodne metode (preglednica XX). Razlike med njima so bile v dolžini in temperaturi kolone, času analize in nanosu – volumnu injiciranja in končni koncentraciji vzorca.

Krajša kolona enake notranje sestave pomeni krajsi čas, ki je na voljo za ločbo, torej so analiti med seboj slabše ločeni; teoretično pa se sprememba dolžine kolone odraža v manjšem številu teoretskih podov, kar vpliva na zmanjšanje resolucije [20]. Resolucija pri vzorcu MWM torej pričakovano pade, vendar je še vedno dovolj visoka in ustreza zastavljenim kriterijem specifičnosti. Prav tako je nižje razmerje med signalom in šumom, vendar še vedno ustreza kriterijem. Tudi rezultati referenčnih vzorcev so si primerljivi med seboj, zato lahko zaključimo, da je novi nanos 0,75 µg ustrezen. Vsi nadaljnji eksperimenti

so prevzeli instrumentalne nastavitev volumna injiciranja ($0,75 \mu\text{l}$) in redčenje na končno koncentracijo vzorca 1 mg/ml .

Preglednica XX: Primerjava rezultatov vzorcev analiziranih z izhodno metodo in novo metodo – razlike med njima so bile v dolžini in temperaturi kolone, času analize in nanosom na kolono (s/n = razmerje med signalom in šumom, AP = agregacijski produkti, GV = glavni vrh).

MWM	Resolucija (IgG / holo-transferin) [-]	Resolucija (aprotinin / histidin) [-]
Izhodna metoda	3,94	6,71
Nova metoda	3,19	4,52
IgG1_nat_1 LOQ	Razmerje s/n [-]	Površina [$\mu\text{V}^*\text{sec}$]
Izhodna metoda	76,93	7218
Nova metoda	19,09	1452
IgG1_nat_1	delež AP [%]	delež GV [%]
Izhodna metoda	0,24	99,71
Nova metoda	0,23	99,74
Absolutna napaka	0,01	0,03
Kriteriji ustreznosti	A: $\Delta \leq 0,1 \%$ (abs.)	D: $\Delta \leq 1,5 \%$ (abs.)
IgG2_nat_1	delež AP [%]	delež GV [%]
Izhodna metoda	0,81	99,10
Nova metoda	0,83	98,84
Absolutna napaka	0,02	0,26
Kriteriji ustreznosti	B: $\Delta \leq 0,2 \%$ (abs.)	D: $\Delta \leq 1,5 \%$ (abs.)

4.1.4. Nasičevanje kolone

Nasičevalna raztopina vidno vpliva na rezultate. Celokupna površina se pri skoraj vseh vzorcih poveča za nekaj odstotkov. Deleži agregatov se povečini občutno povečajo. Pričakovano pri glavnih vrhovih opazimo zmanjšanje njihovih deležev, torej je trend nasproten kot pri agregatih (preglednica XXI). Iz rezultatov je razvidno, da so največje razlike v deležih komponent pri stresnih vzorcih, velika razlika se pokaže tudi pri nativnem vzorcu fuzijskega proteina. Stresnim vzorcem je skupna manjša stabilnost in spremenjena struktura. Posledično so lahko hidrofobne skupine proteinov, ki so sicer skrite v notranjosti proteina, bolj izpostavljene. Delna hidrofobnost proteinov potencialno razloži njihovo večjo adsorbcijo na določene dele ogrodja stacionarne faze (z etilenskimi mostički premreženih

silikatov), kjer je okolje bolj hidrofobno. Običajno je torej stacionarna faza zaščitena pred elektrostatskimi interakcijami z analitom, na določenih mestih pa lahko pride med analitom in stacionarno fazo do močnejših hidrofobnih efektov [37].

Preglednica XXI: Rezultati testa ustreznosti nasičevanja kolone (AP = agregacijski produkti, GV = glavni vrh).

Ime vzorca	Celokupna površina [$\mu\text{V}^*\text{sec}$]		Absolutna razlika [$\mu\text{V}^*\text{sec}$]	Relativna razlika [%]
	brez nasičevanja	z nasičevanjem		
IgG1_nat_3	1279268	1375298	96030	7,2%
IgG1_str_2	1019630	1051389	31759	3,1%
IgG2_nat_2	1478966	1478254	712	0,0%
IgG2_str_2	1295579	1405643	110064	8,1%
FP_nat_1	4104429	5450663	1346234	28,2%
FP_str_1	4641488	4844761	203273	4,3%
Ime vzorca	AP [%]		Absolutna razlika	Relativna
	brez nasičevanja	z nasičevanjem	[%]	razlika [%]
IgG1_nat_3	0,2	0,2	0,0	0,0%
IgG1_str_2	18,0	19,4	1,4	7,5%
IgG2_nat_2	0,8	0,7	0,1	13,3%
IgG2_str_2	0,3	1,1	0,8	109,1%
FP_nat_1	0,4	0,6	0,2	40,0%
FP_str_1	1,9	4,9	3,0	86,8%
Ime vzorca	GV [%]		Absolutna razlika	Relativna
	brez nasičevanja	z nasičevanjem	[%]	razlika [%]
IgG1_nat_3	99,5	99,6	0,1	0,1%
IgG1_str_2	81,6	80,4	1,2	1,5%
IgG2_nat_2	98,8	99,0	0,2	0,2%
IgG2_str_2	99,5	98,6	0,9	0,9%
FP_nat_1	98,2	97,9	0,3	0,3%
FP_str_1	95,5	93,1	2,4	2,5%

Zmožnost vezave proteinov se z večanjem števila injiciranj, ko se kolona stara in poškoduje, še poveča. Vloga nasičevalne raztopine je zasiliti potencialna vezavna mesta stacionarne faze, kamor bi se med analizo vezali proteini. Ko so mesta zasičena, se nadaljnji proteini, ki potujejo skozi kolono, nanjo ne vežejo več. Rezultati so posledično bolj točni in ponovljivi.

Sklepamo, da so bolj pravilni rezultati po nasičevanju kolone, zato smo v nadalje kolono pred analizo nasičevali.

4.1.5. Izbera mobilne faze

Z večanjem ionske moči in dodatkom NaClO₄ smo v testirani mobilni fazi žeeli zmanjšati adsorbcijo analita na stacionarno fazo, hkrati pa smo z visoko ionsko močjo zmanjšali tudi možnost mikrobiološke kontaminacije (posledično kolone po analizi ni treba shranjevati v 20% etanolu, kar prihrani kar nekaj časa). Vzorce smo na novi koloni testirali z uporabo obeh mobilnih faz. Preglednica XXII z rezultati je prikazana spodaj.

Preglednica XXII: Primerjava rezultatov po analizi z izhodno in testirano mobilno fazo (MF = mobilna faza, AP = agregacijski produkti, GV = glavni vrh).

Ime vzorca	Vrh	Izhodna MF	Nova MF	Absolutna / relativna* napaka	Kriterij ustreznosti
IgG1_nat_4	AP [%]	0,2	0,2	0,0	A: $\Delta \leq 0,1\%$ (abs.)
	GV [%]	99,1	99,1	0,0	D: $\Delta \leq 1,5\%$ (abs.)
IgG1_str_3	AP [%]	0,8	0,9	0,1	B: $\Delta \leq 0,2\%$ (abs.)
	GV [%]	95,3	95,1	0,2	D: $\Delta \leq 1,5\%$ (abs.)
IgG1_str_4	AP [%]	1,6	1,7	0,1	B: $\Delta \leq 0,2\%$ (abs.)
	GV [%]	97,9	98,2	0,3	D: $\Delta \leq 1,5\%$ (abs.)
FP_nat_1	AP [%]	1,7	2,3	26,1*	C: $\Delta \leq 10\%$ (rel.)
	GV [%]	97,9	97,5	0,4	D: $\Delta \leq 1,5\%$ (abs.)
FP_str_2	AP [%]	0,4	0,7	0,3	B: $\Delta \leq 0,2\%$ (abs.)
	GV [%]	99,3	98,9	0,4	D: $\Delta \leq 1,5\%$ (abs.)
FP_str_3	AP [%]	3,1	17,0	81,8*	C: $\Delta \leq 10\%$ (rel.)
	GV [%]	95,7	82,5	13,2	D: $\Delta \leq 1,5\%$ (abs.)
IgG2_nat_2	AP [%]	0,8	0,8	0,0	B: $\Delta \leq 0,2\%$ (abs.)
	GV [%]	98,9	99,0	0,1	D: $\Delta \leq 1,5\%$ (abs.)
IgG2_str_3	AP [%]	0,4	1,0	0,6	B: $\Delta \leq 0,2\%$ (abs.)
	GV [%]	99,3	98,9	0,4	D: $\Delta \leq 1,5\%$ (abs.)

* – oznaka rezultata, kjer je namesto absolutne napake izračunana relativna napaka.

Iz preglednice je razvidno, da metodi pri določenih manj stabilnih in strukturno spremenjenih vzorcih (FP_nat_1, FP_str_2, FP_str_3, IgG2_str_3) glede na kriterije med-analizne ponovljivosti nista primerljivi. Pri omenjenih vzorcih nova mobilna faza kaže više delež agregatov kot izhodna. Poleg preprečevanja sekundarnih interakcij z matriksom

kolone je ena od možnih razlag za višji delež agregatov v primeru nove mobilne faze ta, da lahko natrijev perklorat (NaClO_4) inducira nastanek agregatov iz monomerov zaradi svojega oksidativnega potenciala [37]. Rezultati so bili najmanj primerljivi pri vzorcih fuzijskih proteinov in stresnih vzorcih – omenjeni vzorci se strukturno razlikujejo od klasičnih IgG molekul; kar bi lahko bil potencialen vzrok za večjo dovetnost za oksidativno delovanje natrijevega perklorata.

Da bi preverili pravilnost rezultatov in ugotovili vzrok za razlike, smo vzorce, katerih rezultati med metodama niso bili primerljivi, poslali na analizo z tehniko analitskega ultracentrifugiranja (AUC) v karakterizacijski laboratorij podjetja Sandoz v Nemčiji. Manipulacija z vzorci (sprememba ionske moči in pH okolice, stresanje, sprememba tlaka, stik vzorca s površino, sprememba temperature in podobno) je lahko vzrok za nastanek agregatov. Pri AUC je manipulacija minimalna, zato je ta tehnika primerna za sekundarne analize in potrjevanje rezultatov pridobljenih z tehniko SEC. Izvedli so dve AUC analizi, pri čemer so vzorce redčili z novo in izhodno mobilno fazo. Rezultati med analizama niso pokazali statistično značilnih razlik v deležih agregatov in monomerov, torej sama mobilna faza pri pogojih analize ne spodbuja nastanka agregatov (vzorci so enako stabilni v obeh mobilnih fazah). Razlog oz. ugotovitev se skorda z raziskavo Majumdarja in sodelavcev, ki so pokazali, da se v prisotnosti kaotropnih soli delež agregatov pri temperaturah 5 °C in 25 °C v roku enega leta ne spremeni, medtem ko se pri temperaturi 40 °C učinek kaotropnih soli pozna šele po precej daljšem času, kot traja povprečna analiza [41]. Rezultate naših SEC metod (izhodne in testirane) smo zato primerjali s povprečjem rezultatov obeh analiz AUC. Opazimo lahko, da AUC pri večini vzorcev pokaže več agregatov kot obe SEC metodi (preglednica XXIII), hkrati pa vidimo, da nova MF kaže več agregatov kot izhodna MF.

Preglednica XXIII: Primerjava rezultatov pridobljenih z različnima mobilnima fazama z rezultati AUC (MF = mobilna faza, AP = agregacijski produkti, GV = glavni vrh).

Ime vzorca	Vrh	Izhodna MF	Nova MF	AUC (povprečje obeh meritev)
IgG2_str_3	AP [%]	0,4	1,0	3,0
	GV [%]	99,3	98,9	97,1
FP_str_2	AP [%]	0,4	0,7	3,7
	GV [%]	99,3	98,9	96,35
FP_str_3	AP [%]	3,1	17,0	19,8
	GV [%]	95,7	82,5	80,25

Naši rezultati se torej skladajo z ugotovitvami o primerjavi tehnik AUC in SEC, ki jih najdemo v literaturi [19, 24, 42, 43]. Vzrokov, zakaj prihaja do razlik med novo testirano metodo in AUC, je lahko več. Med njimi velja izpostaviti naslednje:

- Tehnika AUC ima visoko limito kvantifikacije in je relativno neponovljiva pri določitvi nižjega deleža agregatov (< 3 %).
- Tehniki se razlikujeta v principu delovanja in obdelavi podatkov po detekciji absorbance. Pri SEC se deleže komponent izračuna direktno iz merjene absorbance, medtem ko je pri AUC potrebna nadaljnja računalniška obdelava podatkov. To se lahko odrazi v odstopanju med rezultati.
- AUC določa aggregate v velikostnem razponu 1 – 100 nm, medtem ko ima SEC razpon 1 – 50 nm. Poleg tega se lahko pri SEC večji agregati zadržijo na friti pred kolono in jih ne analiziramo (največje razlike so ravno v deležih višjih oligomerov).
- Različni rezultati so lahko potencialno tudi posledica različnih pogojev oz. manipulacije z vzorci (sestava okoljskega pufra proteinov, redčenje, pretok, tlak, temperatura idr.).

Glede na to, da je v časovnih okvirih trajanja analize stabilnost vzorcev v obeh mobilnih fazah enaka, lahko domnevamo, da so razlike v rezultatih med metodama SEC posledica vezave vzorcev na polnilo kolone preko sekundarnih interakcij. Predvidevamo, da nova mobilna faza zaradi večje ionske moči in specifičnih lastnosti NaClO₄ prepreči vsaj del nespecifičnih interakcij s stacionarno fazo in tako kaže bolj realno sliko dejanskega stanja kot izhodna mobilna faza. Kljub razlikam med AUC in novo ter izhodno metodo SEC lahko zaključimo, da z novo mobilno fazo dobimo bolj točne rezultate kot z izhodno mobilno fazo.

Parametri, ki smo jih spremenili med optimizacijo, so prikazani v preglednici XXIV.

Preglednica XXIV: Povzetek razlik med izhodno in novo metodo.

Parameter	Izhodna metoda	Nova metoda
Dolžina kolone	300 mm	150 mm
Temperatura kolone	30 °C	40 °C
Čas trajanja analize	15 min	5 min / 5,5 min
Nanos vzorca na kolono	3,75 µg	0,75 µg
Končna koncentracija vzorca	0,75 mg/ml	1,00 mg/ml
Volumen injiciranja vzorca	5,00 µl	0,75 µl
Nasičevanje kolone	NE	DA
Mobilna faza	150 mM K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ , pH 6,5	50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 400 mM NaClO ₄ · H ₂ O, pH 6,0

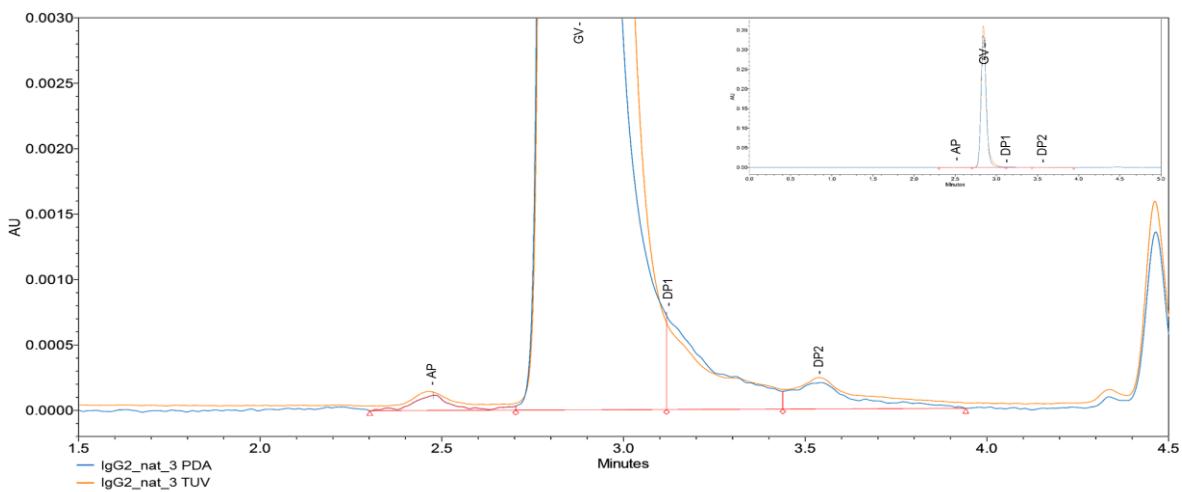
4.2. PRENOSLJIVOST NOVE METODE

Pri testiranju prenosljivosti metode smo se držali enakih kriterijev kot pri optimizaciji metode. Najprej smo preverili primerljivost rezultatov med detektorjem PDA in TUV. Pri prvem vzorec presvetli svetloba različnih valovnih dolžin, ki pada na diode občutljive na svetlobo (določena vrsta diode je občutljiva na določeno valovno dolžino), torej selektivnost pri PDA detektorju dosežemo preko diod. Na drugi strani TUV detektor vzorec presvetli le z želeno valovno dolžino. Prednost PDA detektorja je sposobnost spremeljanja absorbance valovnih dolžin celotnega UV območja spektra, medtem ko je prednost TUV večja detekcijska občutljivost in posledično nižji šum bazne linije. Rezultati šestih različnih priprav nativnega in stresnega vzorca, zbrani v preglednici XXV, ustrezajo kriterijem. Pri novo razviti metodi lahko namesto PDA detektorja uporabljamo tudi TUV detektor. Kromatogrami vzorcev so prikazani na slikah 14 in 15.

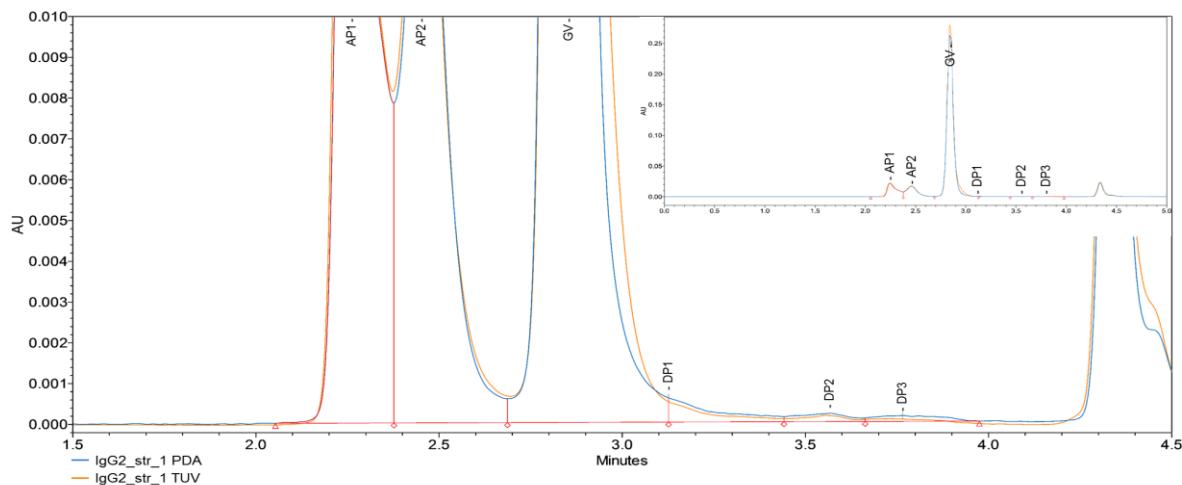
Preglednica XXV: Rezultati meritev s PDA in TUV detektorjem s pripadajočimi kriteriji (AP = agregacijski produkti, GV = glavni vrh).

Ime vzorca	AP [%]						GV [%]													
	PDA			TUV			Absolutna / relativna* napaka			PDA			TUV			Absolutna / relativna* napaka			kriterij ustreznosti	
IgG2_nat_3 A	PLOQ	PLOQ	n.a.	A: $\Delta \leq 0,1$ % (abs.)	99,4	99,5	0,1	D: $\Delta \leq 1,5$ % (abs.)												
IgG2_nat_3 B	PLOQ	PLOQ	n.a.		99,4	99,5	0,1													
IgG2_nat_3 C	PLOQ	PLOQ	n.a.		99,4	99,5	0,1													
IgG2_nat_3 D	PLOQ	PLOQ	n.a.		99,4	99,5	0,1													
IgG2_nat_3 E	PLOQ	PLOQ	n.a.		99,4	99,6	0,2													
IgG2_nat_3 F	PLOQ	PLOQ	n.a.		99,4	99,5	0,1													
IgG2_str_1 A	18,9	18,7	1,1*	C: $\Delta \leq 10$ % (rel.)	80,5	80,8	0,3	D: $\Delta \leq 1,5$ % (abs.)												
IgG2_str_1 B	18,9	18,4	2,7*		80,4	81,1	0,7													
IgG2_str_1 C	18,6	19,0	2,1*		80,8	80,4	0,4													
IgG2_str_1 D	19,2	19,5	1,5*		80,2	79,9	0,3													
IgG2_str_1 E	19,1	19,2	0,5*		80,2	80,3	0,1													
IgG2_str_1 F	19,0	19,1	0,5*		80,4	80,3	0,1													

* – oznaka rezultata, kjer je namesto absolutne napake izračunana relativna napaka.



Slika 14: Prekrita kromatograma nativnega (nestresnega) vzorca IgG2. Posneli smo ju z detektorjema PDA in TUV (AP = vrh agregacijskih produktov, GV = glavni vrh, DP1 = 1. vrh degradacijskih produktov, DP2 = 2. vrh degradacijskih produktov).

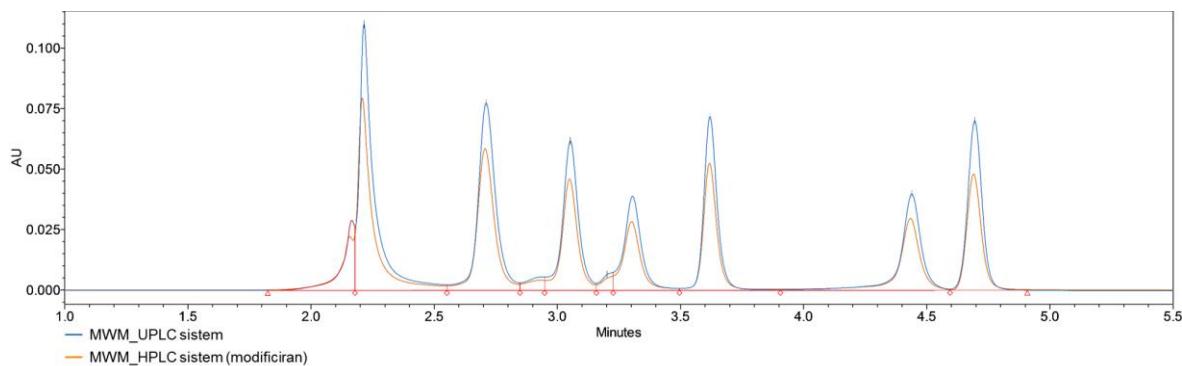


Slika 15: Prekrita kromatograma stresnega vzorca IgG2. Posneli smo ju z detektorjema PDA in TUV (AP1 = 1. vrh agregacijskih produktov, AP2 = 2. vrh agregacijskih produktov, GV = glavni vrh, DP1 = 1. vrh degradacijskih produktov, DP2 = 2. vrh degradacijskih produktov, DP3 = 3. vrh degradacijskih produktov).

Tudi rezultati testa prenosljivosti metode na HPLC sistem so obetavni. Z izjemo enega stresnega vzorca fuzijskega proteina so rezultati ostalih tipov molekul primerljivi (preglednici XXVI in XXVII ter slika 16). Sklepamo, da se lahko metoda izvaja tudi na ustrezno modificiranem HPLC sistemu. Omenjeni testi kažejo dobro robustnost metode in možnost njene razširjene uporabe.

Preglednica XXVI: Primerjava resolucije na UHPLC in modificiranem HPLC sistemu.

MWM	UHPLC	HPLC - modificiran
Resolucija (IgG / holo-transferin) [-]	3,0	3,1
Resolucija (aprotinin / histidin) [-]	2,2	2,2



Slika 16: Prekrita kromatograma vzorca MWM. Posneli smo ju na UHPLC in modificiranem HPLC sistemu.

Preglednica XXVII: Rezultati meritev na UHPLC in modificiranem HPLC sistemu s pripradajočimi kriteriji (AP = agregacijski produkti, GV = glavni vrh).

Ime vzorca	AP [%]				GV [%]				
	UHPLC	HPLC - modificiran	/	Absolutna relativna* napaka	UHPLC	HPLC - modificiran	/	Absolutna relativna* napaka	
IgG1_nat_4	0,2	0,2	/	0,0	A: $\Delta \leq 0,1$ % (abs.)	99,8	99,7	0,1	D: $\Delta \leq 1,5$ % (abs.)
IgG1_str_2	2,1	2,3	/	8,7*	C: $\Delta \leq 10$ % (rel.)	97,9	97,7	0,2	D: $\Delta \leq 1,5$ % (abs.)
IgG2_nat_1	PLOQ	PLOQ	/	n.a.	A: $\Delta \leq 0,1$ % (abs.)	99,8	99,7	0,1	D: $\Delta \leq 1,5$ % (abs.)
IgG2_str_1	20,2	18,6	/	7,2*	C: $\Delta \leq 10$ % (rel.)	79,5	80,8	1,3	D: $\Delta \leq 1,5$ % (abs.)
FP_nat_1	2,3	2,3	/	0,0*	C: $\Delta \leq 10$ % (rel.)	97,4	97,5	0,1	D: $\Delta \leq 1,5$ % (abs.)
FP_str_3	22,7	17,3	/	23,9*	C: $\Delta \leq 10$ % (rel.)	75,3	80,6	5,3	D: $\Delta \leq 1,5$ % (abs.)

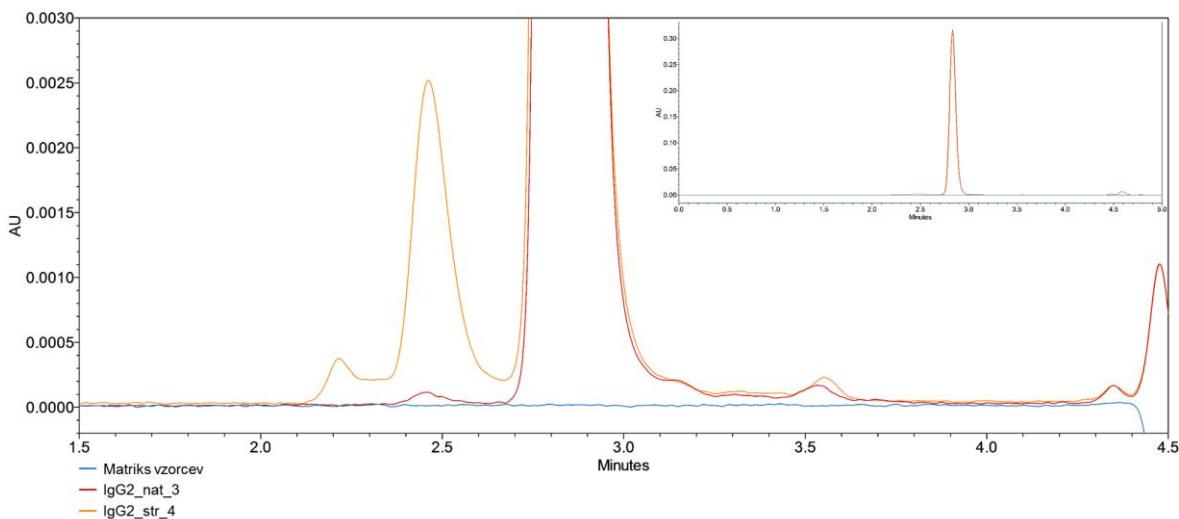
* – oznaka rezultata, kjer je namesto absolutne napake izračunana relativna napaka.

4.3. KVALIFIKACIJA (ZGODNJA VALIDACIJA) METODE

Kriteriji uspešnosti kvalifikacije oz. zgodnje validacije, ki smo si jih zastavili vnaprej, izhajajo iz internega Novartisovega postopka. Rezultati naših meritev, kriteriji in sklepi so zbrani v nadaljevanju.

4.3.1. Specifičnost

Za preverjanje specifičnosti smo prekrili kromatograme dveh vzorcev in njunega redčitvenega pufra - formulacije. Vrhovi agregatov in glavnega vrha na kromatogramih vzorcev morajo biti tako jasno ločeni med seboj, da jih programska oprema po avtomatskem procesiranju in integriraju zazna kot ločene vrhove, vendar pri tem ni zahtevana njihova razmejitve do bazne linije kromatograma. Prav tako puffer ne sme interferirati z detekcijo, zato na kromatogramu pufra ne smemo zaznati vrhov na območjih, kjer se iz kolone eluirajo naši proteini. Ocena obeh kriterijev je vizualna in kvalitativna. Kot lahko vidimo na prekritih kromatogramih (slika 17), je specifičnost dosežena.



Slika 17: Prekriti kromatogrami nativnega vzorca IgG2, stresnega vzorca IgG2 in pufrja omenjenih vzorcev (matriksa).

4.3.2. Linearnost in točnost

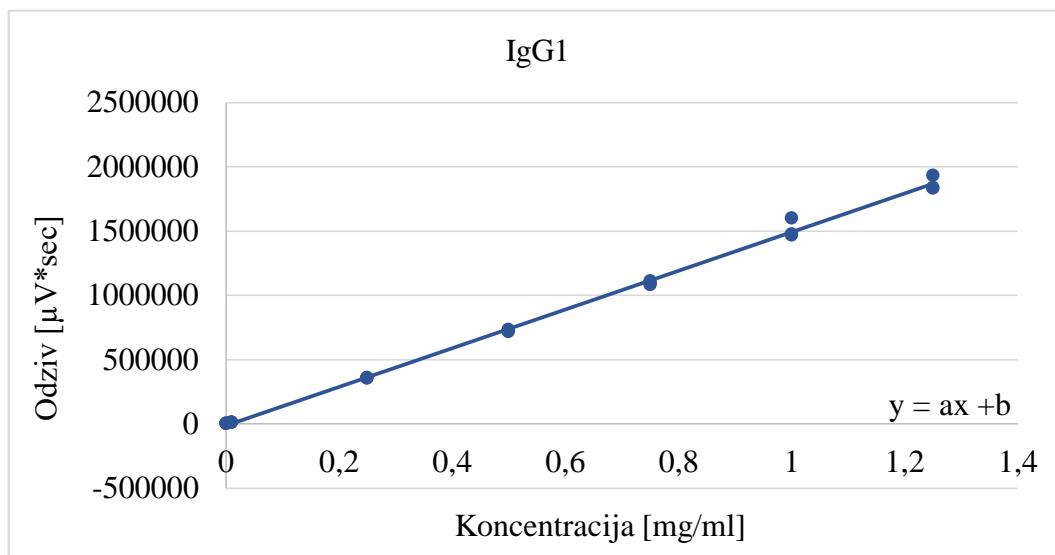
Metoda v testiranem območju izkazuje dobro linearost odziva, če je korelacijski koeficient regresijske premice: $r > 0,99$. Dodaten kriterij predstavlja vrednost presečišča premice z y-osjo. Absolutna vrednost presečišča mora biti manjša od 5 % z regresijo izračunane vrednosti nominalnega nanosa. Podoben kriterij velja tudi za preverjanje dela točnosti, le da mora biti tam vrednost manjša od 1 %. Iz odzivov glavnih vrhov pri določenih koncentracijah smo izvedli regresijsko analizo s pomočjo programske opreme »Excel« in izračunali linearno regresijsko premico ter po enačbah 3 in 4 za obe molekuli (IgG1 in IgG2) izračunali Pearsonov korelacijski koeficient in presečišče z y-osjo kot delež vrednosti pri nominalnem nanosu (enačbi sta navedeni v prilogi A). Rezultati regresijske analize so prikazani v preglednici XXVIII. Na slikah 18 in 19 sta prikazana grafa odvisnosti odziva od koncentracije za molekuli IgG1 in IgG2. Preglednica z odzivi glavnih vrhov pri določenih koncentracijah je priložena v prilogi A (preglednica XXX).

Preglednica XXVIII: Rezultati regresijske analize (r = Pearsonov korelacijski koeficient, A = absolutna vrednost presečišča premice z y-osjo kot delež odziva izračunanega nominalnega nanosa).

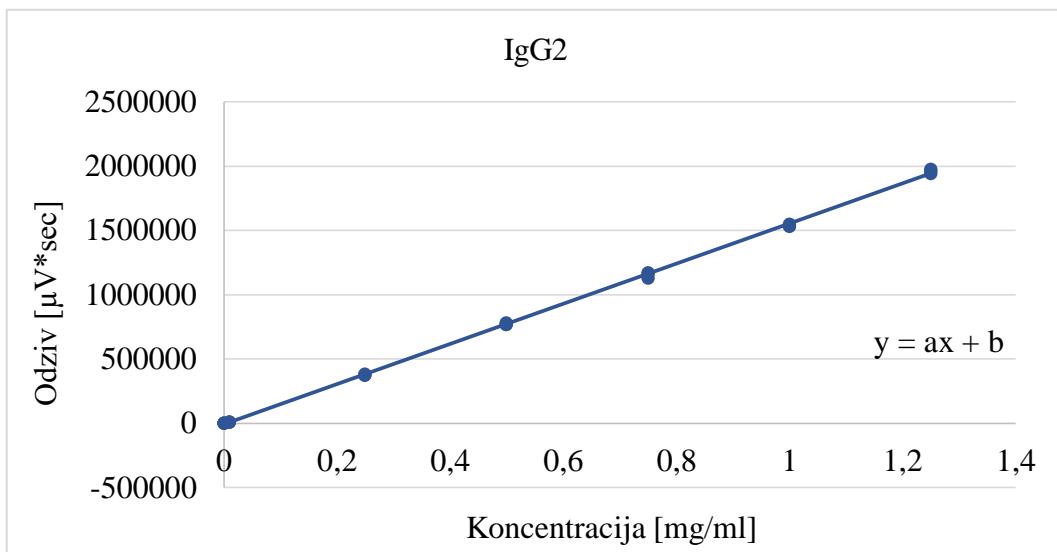
Molekula	Enačba premice	$r [-]$	$A [\%]$
IgG1_nat_1	$y = 1502329x - 11344$	0,9988	0,76
IgG2_nat_1	$y = 1560573x - 6805$	0,9998	0,44

Kriteriji ustreznosti ($r > 0,99$ – linearnost; $A < 5\%$ – linearnost; $A < 1\%$ – točnost) so izpolnjeni za oba vzorca. Metoda izkazuje dobro linearost odziva v testiranem območju za oba tipa molekul. Z izbranimi redčitvami smo določili tudi linearno območje metode (1 – 1250 µg/ml). Točnost in linearnost smo preverjali oz. zagotavljali tudi z naslednjimi testi in ukrepi:

- S kriterijem največjega dovoljenega odstopanja presečišča z ordinatno osjo smo preverili morebiten konstanten odmik regresijske premice v smeri y-osi. Z njegovo odsotnostjo smo zagotovili proporcionalnost odziva metode s koncentracijo analita. Linearnost odziva detektorskega sistema je bila preverjena in zagotovljena z redno validacijo UHPLC sistema s strani proizvajalca opreme.
- Morebitno napako v naklonu regresijske premice smo preverili na dva načina. Koncentracija izhodnih raztopin proteinov iz katerih smo pripravljali redčitve, je bila izmerjena z drugo referenčno analizno tehniko preko UV detekcije. Poleg tega smo pripravili ločene in neodvisne redčitve omenjenih vzorcev.
- Točnost je bila dodatno preverjena z meritvami standardnih referenčnih materialov z znano vsebnostjo analita, vendar ti podatki v okviru naloge niso zajeti.



Slika 18: Graf odvisnosti odziva od koncentracije za molekulo IgG1 pri testirani metodi. Enačba premice: $y = 1502329x - 11344$.



Slika 19: Graf odvisnosti odziva od koncentracije za molekulo IgG2 pri testirani metodi.
Enačba premice: $y = 1560573x - 6805$.

4.3.3. Določitev LOQ (meje določljivosti)

Preglednica XXIX: Rezultati testa LOQ (s/n = razmerje med signalom in šumom, SD = absolutni standardni odklon, RSD = relativni standardni odklon).

Ime vzorca	Razmerje s/n [-]	Površina [$\mu\text{V}^*\text{sec}$]	Povprečna površina [$\mu\text{V}^*\text{sec}$]	SD [$\mu\text{V}^*\text{sec}$]	RSD [%]
IgG1_nat_1 LOQ A	39,9	1346	1323	32,97	2,49
IgG1_nat_1 LOQ B	39,2	1362			
IgG1_nat_1 LOQ C	37,6	1327			
IgG1_nat_1 LOQ D	37,5	1287			
IgG1_nat_1 LOQ E	34,3	1280			
IgG1_nat_1 LOQ F	39,8	1338			
IgG2_nat_1 LOQ A	33,5	1297	1322	25,63	1,94
IgG2_nat_1 LOQ B	33,9	1313			
IgG2_nat_1 LOQ C	32,4	1292			
IgG2_nat_1 LOQ D	33,3	1326			
IgG2_nat_1 LOQ E	34,0	1355			
IgG2_nat_1 LOQ F	24,7	1346			

Kriteriji določitve LOQ so naslednji: razmerja med signalom in šumom posameznih odzivov (s/n) morajo biti večja od 10 (razmerja nam določi programska oprema samodejno), hkrati

pa mora biti relativni standardni odklon (RSD) odzivov manjši od 30 %. Rezulatati so zbrani v preglednici XXIX. Testirana koncentracija LOQ ustreza zastavljenim kriterijem: $s/n > 10$; $RSD < 30\%$. Molekule tipa IgG1 in IgG2 lahko kvantitativno ovrednotimo pri 0,1 % nominalne koncentracije.

4.3.4. Natančnost (znotraj-analizna ponovljivost) in med-analizna ponovljivost

Pri preverjanju ponovljivosti ločimo kriterije za preverjanje znotraj-analizne in med-analizne ponovljivosti. Pri obeh testih so podkriteriji odvisni od deleža površine vrednotenega vrha. Kriteriji za med-analizno ponovljivost so opisani na začetku tega poglavja (»Rezultati in razprava«), znotraj-analizno ponovljivost pa preverjamo z naslednjimi kriteriji:

- A: $RSD \leq 30\%$ (analiziran vrh $\leq 0,5\%$ glavnega vrha)
- B: $RSD \leq 10\%$ (analiziran vrh $> 0,5\%$ glavnega vrha)
- C: $RSD \leq 5\%$ (analiziran vrh je glavni vrh)

Testirana metoda je prestala vse zastavljene kriterije, torej daje ponovljive rezultate tako za nativne, kot tudi za stresne vzorce molekul tipa IgG1 in IgG2. Prav tako metoda ni občutljiva na manjše spremembe v pogojih, kar se sklada z našimi dosedanjimi ugotovitvami o robustnosti metode in je zato primerna za splošno rutinsko uporabo. Rezultati in primerjave s kriteriji so zbrani v prilogi B v preglednicah XXXI, XXXII in XXXIII.

5. SKLEP

V farmacevtski industriji bioloških zdravil je nadzor ravni agregacijskih produktov nujen, zato v laboratorijih redno izvajajo gelsko izključitveno kromatografijo, ki velja za referenčno tehniko določanja agregatov. Pri hitrem razvoju področja bioloških zdravil so potrebe po analizah čedalje večje. Posledično moramo analitske metode prilagajati in izpopolnjevati, hkrati pa morajo za izbrane analite nuditi točne in natančne rezultate.

V magistrskem delu smo optimirali eno izmed trenutno dostopnih metod za detekcijo agregatov terapevtskih proteinov v bolj točno in zmogljivo (procesivno) ter jo z namenom splošne uporabe za analitsko podporo razvoja terapevtskih proteinov razvijali na različnih tipih molekul (IgG1, IgG2 in fuzijskem proteinu). Poleg agregacijskih produktov smo spremeljali tudi deleže monomerov za primer uporabe metode za določanje čistosti.

V okviru optimizacije smo izbrali krajšo kolono in spremenili temperaturo kromatografske ločbe, pri čemer smo čas analize skrajšali za 3-krat. Testirali smo manjši nanos vzorca na kolono in preverili vpliv volumna in koncentracije injiciranega vzorca na rezultat. Vpeljali smo nasičevanje kolone in novo mobilno fazo, s čimer smo izničili problem adsorbcije analita na stacionarno fazo med kromatografsko ločbo.

Zaradi krajše kolone so za analizo potrebeni nižji tlaki, zato smo ustreznost delovanja razvite metode preverili tudi na običajnem HPLC sistemu, na katerem smo zaradi zmanjšanja mrtvih volumnov zamenjali detektorsko celico in povezovalne kapilare. Obetavni rezultati kažejo možnost prenosa tako razvite UHPLC metode tudi na običajne HPLC sisteme, kar velja v nadalje podpreti z dodatnimi testi. Omenjeni test in test alternativnega detektorja zaradi razširjenosti HPLC sistemov odpirata možnosti širši uporabi metode, hkrati pa skupaj z ostalimi testi optimizacije potrjujeta njeno robustnost.

V zadnjem sklopu magistrske naloge smo s kvalifikacijo oz. zgodnjo validacijo na molekulah tipa IgG1 in IgG2 potrdili, da je tako razvita metoda specifična, točna, linearna, ponovljiva in robustna. Potrdili smo tudi eksperimentalno določeno vrednost LOQ in linearno območje metode.

Rezultati optimizacije in končna kvalifikacija potrjujejo, da razvita metoda daje zanesljive rezultate. Dognanja in zaključki, do katerih nas je vodila optimizacija, lahko pomagajo vsem raziskovalcem, ki razvijajo kromatografske metode in se srečujejo s podobnimi problemi.

6. LITERATURA

- 1 – Štrukelj B, Kos J, et al. Biološka zdravila: od gena do učinkovine, 1. izdaja. Slovensko farmacevtsko društvo. Ljubljana. 2007: 4-24.
- 2 – Lagasse HAD, Alexaki A, Simhadri VL, Katagiri NH, Jankowski W, Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C. Recent advances in (therapeutic protein) drug development. F1000Research. 2017; 6(113): 1-17.
- 3 – Voynov V, Caravella JA. Therapeutic Proteins – Methods and Protocols, 2. izdaja. Humana Press. Združeno kraljestvo. 2012: 1-26.
- 4 – Carter PJ. Introduction to current and future protein therapeutics: A protein engineering perspective. Experimental cell research. 2011; 317: 1261-1269.
- 5 – Leader B, Baca QJ, Golan DE. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. Nature Reviews Drug Discovery. 2008; 7(1): 21-39.
- 6 – Ecker DM, Jones SD, Levine HL. The therapeutic monoclonal antibody market. mAbs. 2015; 7(1): 9-14.
- 7 – <https://www.researchandmarkets.com/research/2bgjgx/protein>, dostopano: 2017
- 8 - Kantarjian H, Thomas D, Wayne AS, O'Brien S. Monoclonal Antibody-Based Therapies: A New Dawn in the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. Journal of Clinical Oncology. 2012; 30(31): 3876-3883.
- 9 – Beck A, Wurch T, Bailly C, Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. Nature Reviews Immunology. 2010; 10: 345-352.
- 10 – EMEA. Guideline on Immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins. 2015: 1-23.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/10/WC500194507.pdf, dostopano: 2017
- 11 – De Groot AS, Scott DW. Immunogenicity of protein therapeutics. Trends in Immunology. 2007; 28(11): 482-490.

- 12 – FDA. Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products. 2014. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm338856.pdf>, dostopano: 2017
- 13 – Schellekens H. Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2005; 20: vi3-vi9.
- 14 – Amin S, Barnett GV, Pathak JA, Roberts CJ, Sarangapani PS. Protein aggregation, particle formation, characterization & rheology. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2004; 19: 438-449.
- 15 – Rosenberg AS. Effects of Protein Aggregates: An Immunologic Perspective. *The AAPS Journal*. 2006; 8(3): E501-E507.
- 16 – Moussa EM, Panchal JP, Moorthy BS, Blum JS, Joubert MK, Narhi LO, Topp EM. Immunogenicity of Therapeutic Protein Aggregates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016; 105: 417-430.
- 17 – Roberts CJ. Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control. *Trends and Biotechnology*. 2014; 32(7): 372-380.
- 18 – Roberts CJ. Protein aggregation and its impact on product quality. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014; 30: 211-217.
- 19 – Den Engelsman J, Garidel P, Smulders R, Koll H, Smith B, Bassarab S, Seidl A, Hainzl O, Jiskoot W. Strategies for the Assessment of Protein Aggregates in Pharmaceutical Biotech Product Development. *Pharmaceutical Research*. 2011; 28: 920-933.
- 20 – Fekete S, Beck A, Veuthey J, Guillarme D. Theory and Practice of Size Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Aggregates. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014; 101: 161-173.
- 21 – Agilent »How to« Guide for Size Exclusion Chromatography for Biomolecule Analysis. https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-3651EN_LR.pdf, dostopano: 2017
- 22 – Potechary M, Newey-Keane L."Critical to Quality " Measurements of Protein Aggregation in Biopharmaceuticals. *The Column*. 2013; 9(1): 14-17.
- 23 – https://en.wikipedia.org/wiki/Dynamic_light_scattering, dostopano: 2017

24 – Gabrielson JP, Brader ML, Pekar AH, Mathis KB, Winter G, Carpenter JF, Randolph TW. Quantitation of Aggregate Levels in a Recombinant Humanized Monoclonal Antibody Formulation by Size-Exclusion Chromatography, Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation, and Sedimentation Velocity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007; 96(2), 268-279.

25 – [http://www.coriolis-pharma.com/contract-analytical-services/analytical-ultracentrifugation-\(sv-auc\)/](http://www.coriolis-pharma.com/contract-analytical-services/analytical-ultracentrifugation-(sv-auc)/), dostopano: 2017

26 – Müller D, Cattaneo S, Meier F, Welz R, de Mello AJ. Nanoparticle separation with a miniaturized asymmetrical flow field-flow fractionation cartridge. *Frontiers in Chemistry*. 2015; 3:45.

27* – Sharma DK, King D, Oma P, Merchant C. Micro-Flow Imaging: Flow Microscopy Applied to Sub-visible Particulate Analysis in Protein Formulations. *The AAPS Journal*. 2010; 12(3):455-464.

28 – Hong P, Koza S, Bouvier ESP. Size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2012; 35: 2923-2950.

29 – Bouvier ESP, Koza SM. Advances in size-exclusion separations of proteins and polymers by UHPLC. *Trends in Analytical Chemistry*. 2014; 63: 85-94.

30 – Sepsey A, Bacsikay I, Felinger A. Molecular theory of size exclusion chromatography for wide pore size distributions. *Journal of Chromatography A*. 2014; 1331: 52-60.

31 – Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. izdaja. Springer. Boston, MA. 2006: 205-235.

32 – Fekete S, Ganzler K, Guillarme D. Critical evaluation of fast size exclusion chromatographic separations of protein aggregates, applying sub-2 μ m particles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013; 78-79: 141-149.

33 – Hayes R, Ahmed A, Edge T, Zhang H. Core–shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2014; 1357: 36-52

- 34 – Fakete S, Rudaz S, Veuthey JL, Guillarme D. Impact of mobile phase temperature on recovery and stability of monoclonal antibodies using recent reversed-phase stationary phases. *Journal of Separation Science*. 2012; 35(22): 3113-3123.
- 35 – Vermeer AWP, Norde W. The Thermal Stability of Immunoglobulin: Unfolding and Aggregation of a Multi-Domain Protein. *Biophysical Journal*. 2000; 78: 394-404.
- 36 – Higley TJ, Eksteen R. Mobile Phase Optimization for the Analysis of an Antibody-Based Fusion Protein and Aggregates using a TSKgel Super SW3000 Size-Exclusion Column. *LC-GC North America*. 2002; 20(8): 12.
- 37 – Arakawa T, Ejima D, Li T, Philo JS. The Critical Role of Mobile Phase Composition in Size Exclusion Chromatography of Protein Pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Science*. 2010; 99(4): 1674-1692.
- 38 – Goyon A, Beck A, Veuthey JL, Guillarme D, Fekete S. Comprehensive study on the effects of sodium and potassium additives in SEC separations of protein biopharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017; 144: 242-251.
- 39 – https://en.wikipedia.org/wiki/Chromatography#/media/File:Preparative_HPLC.svg, dostopano: 2017
- 40 – ACQUITY UPLC Protein BEH SEC Columns and Standards, Care and Use Manual, Waters. <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/720003385en.pdf>, dostopano: 2017
- 41 – Majumdar R, Manikwar P, Hickey JM, Samra HS, Sathish HA, Bishop SM, Middaugh CR, Volkin DB, Weis DD. Effects of Salts from the Hofmeister Series on the Conformational Stability, Aggregation Propensity, and Local Flexibility of an IgG1 Monoclonal Antibody. *Biochemistry*. 2013. 52: 3376–3389.
- 42 – Pekar A, Sukumar M. Quantitation of aggregates in therapeutic proteins using sedimentation velocity analytical ultracentrifugation: practical considerations that affect precision and accuracy. *Analytical Biochemistry*. 2007; 367(2): 225-237.
- 43 – Berkowitz SA. Role of Analytical Ultracentrifugation in Assessing the Aggregation of Protein Biopharmaceuticals. *The AAPS Journal*. 2006. 8(3): E590–E605.

PRILOGA A: Rezultati testiranja linearnosti.

Preglednica XXX: Rezultati testa linearnosti za molekuli IgG1 in IgG2.

Ime vzorca	Teoretična koncentracija [mg/ml]	Površina glavnega vrha [$\mu\text{V}^*\text{sec}$]	Ime vzorca	Teoretična koncentracija [mg/ml]	Površina glavnega vrha [$\mu\text{V}^*\text{sec}$]
IgG1_nat_1_0,1% A	0,001	1346	IgG2_nat_1_0,1% A	0,001	1297
IgG1_nat_1_0,1% B	0,001	1362	IgG2_nat_1_0,1% B	0,001	1313
IgG1_nat_1_0,1% C	0,001	1327	IgG2_nat_1_0,1% C	0,001	1292
IgG1_nat_1_1% A	0,010	11384	IgG2_nat_1_1% A	0,010	11556
IgG1_nat_1_1% B	0,010	10599	IgG2_nat_1_1% B	0,010	11323
IgG1_nat_1_1% C	0,010	11354	IgG2_nat_1_1% C	0,010	11291
IgG1_nat_1_25% A	0,250	356264	IgG2_nat_1_25% A	0,250	384375
IgG1_nat_1_25% B	0,250	359836	IgG2_nat_1_25% B	0,250	376814
IgG1_nat_1_25% C	0,250	355330	IgG2_nat_1_25% C	0,250	377016
IgG1_nat_1_50% A	0,500	732258	IgG2_nat_1_50% A	0,500	770777
IgG1_nat_1_50% B	0,500	714914	IgG2_nat_1_50% B	0,500	768632
IgG1_nat_1_50% C	0,500	720974	IgG2_nat_1_50% C	0,500	782793
IgG1_nat_1_75% A	0,750	1096235	IgG2_nat_1_75% A	0,750	1172058
IgG1_nat_1_75% B	0,750	1112231	IgG2_nat_1_75% B	0,750	1162950

IgG1_nat_1_75% C	0,750	1083162	IgG2_nat_1_75% C	0,750	1130760
IgG1_nat_1_100 % A	1,000	1599918	IgG2_nat_1_100 % A	1,000	1531497
IgG1_nat_1_100 % B	1,000	1476647	IgG2_nat_1_100 % B	1,000	1537326
IgG1_nat_1_100 % C	1,000	1466375	IgG2_nat_1_100 % C	1,000	1548032
IgG1_nat_1_125 % A	1,250	1931830	IgG2_nat_1_125 % A	1,250	1943352
IgG1_nat_1_125 % B	1,250	1831474	IgG2_nat_1_125 % B	1,250	1962949
IgG1_nat_1_125 % C	1,250	1837738	IgG2_nat_1_125 % C	1,250	1977636

Enačba 3: Pearsonov korelacijski koeficient.

$$r = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{\sqrt{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \sqrt{n \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2}}$$

- r = Pearsonov korelacijski koeficient
- x_i = koncentracija posamezne meritve
- y_i = odziv posamezne meritve
- n = število meritev

Enačba 4: Absolutna vrednost presečišča kot delež odziva nominalnega nanosa. Členi enačbe so vzeti iz izračuna regresijske premice: $y = ax + b$.

$$A [\%] = \left| \frac{b}{y(1)} \right| * 100$$

- A = vrednost presečišča kot delež odziva nominalnega nanosa
- b = začetna vrednost
- y = vrednost enačbe regresijske premice

PRILOGA B: Rezultati testiranja znotraj-analizne in med-analizne ponovljivosti.

Preglednica XXXI: Znotraj-analizna ponovljivost v 1. analizi (AP = agregacijski produkti, GV = glavni vrh, RSD = relativni standardni odklon).

Ime vzorca (N = 6)	Analiza 1						
	AP [%]	Povprečje AP (N = 6)	RSD [%]	Kriterij usterznosti	Povprečje GV [%] (N = 6)	RSD [%]	Kriterij usterznosti
IgG1_nat_1 A	0,2	0,2	0,0	A: (RSD ≤ 30 %)	99,8	0,1	C: (RSD ≤ 5 %)
IgG1_nat_1 B	0,2				99,7		
IgG1_nat_1 C	0,2				99,7		
IgG1_nat_1 D	0,2				99,7		
IgG1_nat_1 E	0,2				99,8		
IgG1_nat_1 F	0,2				99,8		
IgG1_str_4 A	1,1	1,1	3,7	B: (RSD ≤ 10 %)	95,0	0,0	C: (RSD ≤ 5 %)
IgG1_str_4 B	1,1				95,0		
IgG1_str_4 C	1,1				95,0		
IgG1_str_4 D	1,1				95,0		
IgG1_str_4 E	1,1				95,1		
IgG1_str_4 F	1,2				95,0		
IgG1_str_5 A	0,9	0,9	0,0	B: (RSD ≤ 10 %)	95,4	0,0	C: (RSD ≤ 5 %)
IgG1_str_5 B	0,9				95,3		
IgG1_str_5 C	0,9				95,4		
IgG1_str_5 D	0,9				95,4		
IgG1_str_5 E	0,9				95,4		
IgG1_str_5 F	0,9				95,4		
IgG2_nat_4 A	PLOQ	PLOQ	n.a.	A: (RSD ≤ 30 %)	99,7	0,1	C: (RSD ≤ 5 %)
IgG2_nat_4 B	PLOQ				99,7		
IgG2_nat_4 C	PLOQ				99,7		
IgG2_nat_4 D	PLOQ				99,8		
IgG2_nat_4 E	PLOQ				99,9		
IgG2_nat_4 F	PLOQ				99,7		
IgG2_str_4 A	1,5	1,5	8,3	B: (RSD ≤ 10 %)	98,4	0,2	C: (RSD ≤ 5 %)
IgG2_str_4 B	1,4				98,4		
IgG2_str_4 C	1,4				98,4		

IgG2_str_4 D	1,4			98,3		
IgG2_str_4 E	1,4			98,4		
IgG2_str_4 F	1,7			97,9		
IgG2_str_1 A	19,5			80,2		
IgG2_str_1 B	19,0			80,8		
IgG2_str_1 C	19,4			80,3		
IgG2_str_1 D	18,7			81,0	80,6	0,5
IgG2_str_1 E	18,7			81,0		
IgG2_str_1 F	19,4			80,3		

Preglednica XXXII: Znotraj-analizna ponovljivost v 2. analizi (AP = agregacijski produkti, GV = glavni vrh, RSD = relativni standardni odklon).

Ime vzorca (N = 6)	Analiza 2						
	AP [%]	Povprečje AP (N = 6)	RSD [%]	Kriterij usterznosti	Povprečje GV [%] (N = 6)	RSD [%]	Kriterij usterznosti
IgG1_nat_1 A	0,2				99,8		
IgG1_nat_1 B	0,2				99,8		
IgG1_nat_1 C	0,2				99,8		
IgG1_nat_1 D	0,3				99,7		
IgG1_nat_1 E	0,2				99,8		
IgG1_nat_1 F	0,2				99,7		
IgG1_str_4 A	1,3				95,2		
IgG1_str_4 B	1,3				95,2		
IgG1_str_4 C	1,3				95,2		
IgG1_str_4 D	1,3				95,2		
IgG1_str_4 E	1,3				95,2		
IgG1_str_4 F	1,5				95,0		
IgG1_str_5 A	0,9				95,6		
IgG1_str_5 B	0,9				95,6		
IgG1_str_5 C	0,9				95,8		
IgG1_str_5 D	0,9				95,7		
IgG1_str_5 E	0,9				95,7		
IgG1_str_5 F	1,0				95,5		

IgG2_nat_4 A	PLOQ				99,7			
IgG2_nat_4 B	PLOQ				99,7			
IgG2_nat_4 C	PLOQ				99,7			
IgG2_nat_4 D	PLOQ				99,7			
IgG2_nat_4 E	PLOQ				99,7			
IgG2_nat_4 F	PLOQ				99,7			
IgG2_str_4 A	1,5				98,3			
IgG2_str_4 B	1,5				98,2			
IgG2_str_4 C	1,5	1,5	0,0	B: (RSD ≤ 10 %)	98,3			
IgG2_str_4 D	1,5				98,3			
IgG2_str_4 E	1,5				98,3			
IgG2_str_4 F	1,5				98,3			
IgG2_str_1 A	18,8				80,8			
IgG2_str_1 B	18,6				80,9			
IgG2_str_1 C	18,7	18,8	1,0	B: (RSD ≤ 10 %)	80,9			
IgG2_str_1 D	19,1				80,4			
IgG2_str_1 E	18,8				80,8			
IgG2_str_1 F	19,0				80,6			

Preglednica XXXIII: Med-analizna ponovljivost 1. in 2. analize (1. analiza = #1, 2. analiza = #2, AP = agregacijski produkti, GV = glavni vrh).

Ime vzorca	Povprečje AP [%]				Povprečje GV [%]			
	#1	#2	Absolutna / relativna* napaka	kriterij ustreznosti	#1	#2	Absolutna / relativna* napaka	kriterij ustreznosti
IgG1_nat_1	0,2	0,2	0,0	A: $\Delta \leq 0,1\%$ (abs.)	99,8	99,8	0,0	D: $\Delta \leq 1,5\%$ (abs.)
IgG1_str_4	1,1	1,3	0,2	B: $\Delta \leq 0,2\%$ (abs.)	95,0	95,2	0,2	D: $\Delta \leq 1,5\%$ (abs.)
IgG1_str_5	0,9	0,9	0,0	B: $\Delta \leq 0,2\%$ (abs.)	95,4	95,7	0,3	D: $\Delta \leq 1,5\%$ (abs.)
IgG2_nat_4	PLOQ	PLOQ	n.a.	A: $\Delta \leq 0,1\%$ (abs.)	99,8	99,7	0,1	D: $\Delta \leq 1,5\%$ (abs.)
IgG2_str_4	1,5	1,5	0	B: $\Delta \leq 0,2\%$ (abs.)	98,3	98,3	0	D: $\Delta \leq 1,5\%$ (abs.)
IgG2_str_1	19,1	18,8	1,5*	C: $\Delta \leq 10\%$ (rel.)	80,6	80,7	0,1	D: $\Delta \leq 1,5\%$ (abs.)

* – oznaka rezultata, kjer je namesto absolutne napake izračunana relativna napaka.