

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Ana JAZBEC

**RAZVOJ ANALITSKE AFINITETNE
KROMATOGRAFIJE ZA ŠTUDIJ ASOCIACIJE IN
DISOCIACIJE PODENOT DEJAVNIKA TUMORSKE
NEKROZE ALFA**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Ana JAZBEC

**RAZVOJ ANALITSKE AFINITETNE KROMATOGRAFIJE ZA ŠTUDIJ
ASOCIACIJE IN DISOCIACIJE PODENOT DEJAVNIKA TUMORSKE
NEKROZE ALFA**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**DEVELOPMENT OF ANALYTICAL AFFINITY
CHROMATOGRAPHY FOR STUDYING ASSOCIATION AND
DISSOCIATION OF TUMOR NECROSIS FACTOR SUBUNITS**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje – Biotehnologija. Opravljeno je bilo v podjetju Lek d.d., Biofarmacevtika, Mengeš.

Komisija za študij 1. in 2.stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Romano Marinšek-Logar, za somentorja dr. Tadeja Čepeljnika in za recenzenta prof. dr. Aleša Podgornika.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: dr. Tadej ČEPELJNIK
Lek d.d., Biofarmacevtika

Član: prof. dr. Aleš PODGORNIK
Center odličnosti za biosenzoriko, instrumentacijo in procesno
kontrolu, Laboratorij za bioanalitiko, Ajdovščina

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je magistrsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam,
da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno,
prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski
obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na
svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Ana Jazbec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA PRAKSA

ŠD Du2
DK UDK 602:543.544.5HPLC (043.2)
KG HPLC/IMAC/TNF- α /razvoj metode/kvalifikacija/izmenjava podenot
AV JAZBEC, Ana
SA MARINŠEK-LOGAR, Romana (mentor)/ČEPELJNIK, Tadej (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2016
IN RAZVOJ ANALITSKE AFINITETNE KROMATOGRAFIJE ZA ŠTUDIJ
ASOCIACIJE IN DISOCIACIJE PODENOT DEJAVNIKA TUMORSKE
NEKROZE
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP XVI, 78 str., 37 pregl., 47 sl., 10 pril., 41 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Tekočinska kromatografija je v zadnjih letih postala ena izmed najpomembnejših analitskih tehnik, s katerimi lahko določimo lastnosti številnih molekul. Z afinitetno kromatografsko metodo IMAC lahko preučujemo proteine z izpostavljenimi histidini na površini molekule. Zato je ta metoda primerna za preučevanje kinetike disociacije in reasocijacije podenot TNF- α z dodanimi histidinskimi podaljški. Razvoj metode je potekal v smeri optimizacije mobilnih faz, izbora in nastavitev detektorja in optimizacije separacije. Ugotovili smo, da je pri metodi IMAC pomembna uporaba imidazola čistosti $\geq 99,5\%$ ter da je za elucijo vseh, na kolono vezanih analogov TNF, treba uporabiti mobilno fazo z 0,6 M imidazolom, saj nižja molarnost ne zadostuje za elucijo vseh komponent. Med optimizacijo detektorskih nastavitev smo ugotovili, da je optimalna vzorčna valovna dolžina 280 nm ter da na obliko kromatograma močno vpliva tudi nastavitev vzorčne pasovne širine in referenčne valovne dolžine. Optimizirali smo tudi elucijski gradient tako, da smo dobili ustrezno ločene vse štiri vrhove po izmenjavi podenot med nativno molekulo TNF (LK800) in analogom H7dN6-TNF. Metodo smo po končanem razvoju kvalificirali in ugotovili, da je linear, ponovljiva in specifična ter tako ustrezna za uporabo v razvojne namene. Na koncu smo spremljali izmenjavo podenot med LK800 in H7dN6-TNF ter ugotovili, da na izmenjavo podenot vplivajo različni pogoji kot so pH vrednost pufra, v katerem se vzorec nahaja, ter dodatek NaCl v pufer. V magistrskem delu smo pokazali, da z razvito in kvalificirano metodo IMAC lahko ustrezno spremljamo izmenjavo podenot v raztopini.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDK 602:543.544.5HPLC (043.2)
CX HPLC/IMAC/TNF- α /method development/qualification/exchange of subunits
AU JAZBEC, Ana
AA MARINŠEK-LOGAR, Romana (supervisor)/ČEPELJNIK, Tadej (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study in Biotechnology
PY 2016
TI DEVELOPMENT OF ANALYTICAL AFFINITY CHROMATOGRAPHY FOR STUDYING ASSOCIATION AND DISSOCIATION OF TUMOR NECROSIS FACTOR SUBUNITS
DT M. Sc. thesis (Academic Study Programmes)
NO XVI, 78 p., 37 tab., 47 fig., 10 ann., 41 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Liquid chromatography has recently become one of the most frequently used analytical technique for determining molecular properties. Affinity chromatography IMAC is used for studying proteins that contain surface-exposed histidine residues. Association and dissociation of subunits between native TNF- α and its histidine-tagged recombinant analog can therefore be well studied by using this method. The method development started with optimization of mobile phases, with selection of detector and adjusting properties of detector and elution optimization. During mobile phases optimization we have found that the purity of the imidazole used should be $\geq 99,5\%$. In our experiment adjustment of imidazole molarity from 0,5 to 0,6 M had to be made for adequate elution of all TNF- α analogs. We determined optimal sample wavelength at 280 nm during optimisation of detector properties. The shape of chromatogram is affected by the width of sample bandwidth and the use of reference wavelength which reduces baseline drift. During elution optimization we were changing gradient until we found four separated peaks on chromatogram after the exchange of subunits between native TNF (LK800) and its analog H7dN6-TNF was finished. The suitability of new developed method was afterwards demonstrated by a method qualification, where the linearity, repeatability and specificity of method have been confirmed. Purpose of development this method was to observe the exchange of subunits. We found that several different conditions as buffer pH or ionic strength of buffers can affect the process of subunit exchange between LK800 and H7dN6-TNF. Developed and qualified IMAC method is in this thesis shown to be able to monitor subunit exchange.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA PRAKSA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XIV
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XV
1 UVOD	1
1.1 CILJI DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 TNF- α	3
2.1.1 TNF-α kot citokin	3
2.1.2 Zgradba gena in proteina TNF-α	4
2.1.3 Signalne poti TNF	5
2.1.4 Biološka vloga TNF v telesu	7
2.2 ZAVIRALCI TNF- α	8
2.3 IZMENJAVA PODENOT	10
2.3.1 Modeli izmenjave podenot TNF	11
2.3.2 Uporaba izmenjave podenot TNF	11
2.4 KROMATOGRAFIJA	12
2.4.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)	13
2.4.1.1 Črpalni sistem	13
2.4.1.2 Injektor	14
2.4.1.3 Kromatografska kolona in stacionarna faza	14
2.4.1.4 Detektorji	14
2.4.2 Kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija	15
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 POTEK DELA	17
3.2 MATERIALI	18
3.2.1 Vzorci	18
3.2.2 Kemikalije	18
3.2.3 Raztopine	19
3.2.3.1 Mobilne faze	19
3.2.3.2 Pufri za pripravo vzorcev	19
3.2.4 Oprema in laboratorijski material	21
3.3 METODE	21
3.3.1 Razvoj metode HPLC za študij asociacije in disociacije podenot TNF	21

3.3.1.1 Vzpostavljanje metode	22
3.3.1.2 Optimizacija sestave mobilnih faz	23
3.3.1.3 Optimizacija detektorskih nastavitev	24
3.3.1.4 Optimizacija HPLC separacije	25
3.3.2 Kvalifikacija metode	26
3.3.2.1 Preverjanje linearnosti metode	27
3.3.2.2 Preverjanje ponovljivosti metode znotraj natančnosti	28
3.3.2.3 Preverjanje specifičnosti metode	28
3.3.3 Spremljanje izmenjave podenot TNF	30
4 REZULTATI	33
4.1 REZULTATI RAZVOJA METODE	33
4.1.1 Rezultati optimizacije sestave mobilnih faz	33
4.1.2 Rezultati optimizacije detekcije	38
4.1.3 Rezultati optimizacije separacije	41
4.2 REZULTATI KVALIFIKACIJE METODE	51
4.2.1 Rezultati preverjanja linearnosti metode	51
4.2.2 Rezultati preverjanja ponovljivosti metode	55
4.2.3 Rezultati preverjanja specifičnosti metode	56
4.3 REZULTATI SPREMLJANJA IZMENJAVE PODENOT	60
5 RAZPRAVA	67
6 SKLEPI	72
7 POVZETEK	73
8 VIRI	75
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Tabela trenutno dostopnih anti-TNF zdravil in njihove odobrene indikacije (povzeto po Sedger in McDermott, 2014)	9
Preglednica 2: Pregled in opis uporabljenih kemikalij.....	18
Preglednica 3: Pregled priprave pufrov za testiranje izmenjave podenot TNF pri različnih pH vrednostih ter v primeru dodatka NaCl.....	20
Preglednica 4: Pregled in opis uporabljenne opreme za izvedbo eksperimentalnega dela. ..	21
Preglednica 5: Pregled časa spiranja z določeno mobilno fazo v primeru nasičenja kolone s kovinskimi. ioni.....	22
Preglednica 6: Prikaz prvotno uporabljenega gradiента, s katerim smo testirali vezavo vzorca H7dN6-TNF in LK800.....	23
Preglednica 7: Prikaz gradiента, ki smo ga uporabili za testiranje razlike med HEPES in K-fosfatnim pufrnim sistemom.....	23
Preglednica 8: Pregled testiranih vzorčnih valovnih dolžin.....	25
Preglednica 9: Pregled testiranih vzorčnih pasovnih širin ter referenčnih valovnih dolžin in pasovnih širin, pri vzorčni valovni dolžini 280 nm.	25
Preglednica 10: Analitaski parametri, ki jih testiramo pri validaciji (kvalifikaciji) različnih analitskih postopkov (International..., 2005).	27
Preglednica 11: Prikaz priprave in volumna nanosa različnih tipov vzorcev, ki smo jih testirali z metodo SDS-PAGE.....	29
Preglednica 12: Pregled zaporedja injiciranja in čas inkubacije vzorcev.....	32
Preglednica 13: Prilagoditev gradienta instrumentalne metode IMAC_2_BIO_HPLC_2 tako, da je največja molarnost imidazola 0,6 M.	36
Preglednica 14: Prikaz uporabe komercialno dostopnih imidazolov različnih čistosti.....	37
Preglednica 15: Prikaz detektorskih parametrov, katerih nastavitev nismo spreminali, ampak smo privzeli samodejne nastavitev v programu Empower 3.	40
Preglednica 16: Tabelarni prikaz instrumentalne metode IMAC_4_BIO_HPLC_2 in vpliv na separacijo združenih vzorcev LK800 in H7dN6-TNF. V tabeli smo z »M imidazola*« označili zapis za končno koncentracijo imidazola v mobilni fazi (M).	42
Preglednica 17: Tabelarni prikaz instrumentalne metode IMAC_5_BIO_HPLC_2 in vpliv na separacijo združenih vzorcev LK800 in H7dN6-TNF. V tabeli smo z »M imidazola*« označili zapis za končno koncentracijo imidazola v mobilni fazi (M).	43
Preglednica 18: Tabelarni prikaz instrumentalne metode IMAC_6_BIO_HPLC_2 in vpliv na separacijo združenih vzorcev LK800 in H7dN6-TNF. V tabeli smo z »M imidazola*« označili zapis za končno koncentracijo imidazola v mobilni fazi (M).	44

Preglednica 19: Tabelarni prikaz instrumentalne metode IMAC_7_BIO_HPLC_2 in vpliv na separacijo združenih vzorcev LK800 in H7dN6-TNF. V tabeli smo z »M imidazola*« označili zapis za končno koncentracijo imidazola v mobilni fazi (M)	45
Preglednica 20: Tabelarni prikaz instrumentalne metode IMAC_8_BIO_HPLC_2 in vpliv na separacijo združenih vzorcev LK800 in H7dN6-TNF. V tabeli smo z »M imidazola*« označili zapis za končno koncentracijo imidazola v mobilni fazi (M)	46
Preglednica 21: Tabelarni prikaz instrumentalne metode IMAC_10_BIO_HPLC_2 in vpliv na separacijo združenih vzorcev LK800 in H7dN6-TNF. V tabeli smo z »M imidazola*« označili zapis za končno koncentracijo imidazola v mobilni fazi (M)	47
Preglednica 22: Tabelarni prikaz instrumentalne metode IMAC_10b_BIO_HPLC_2 in vpliv na separacijo združenih vzorcev LK800 in H7dN6-TNF. V tabeli smo z »M imidazola*« označili zapis za končno koncentracijo imidazola v mobilni fazi (M)	48
Preglednica 23: Tabelarni prikaz instrumentalne metode IMAC_11_BIO_HPLC_2 in vpliv na separacijo združenih vzorcev LK800 in H7dN6-TNF. V tabeli smo z »M imidazola*« označili zapis za končno koncentracijo imidazola v mobilni fazi (M)	49
Preglednica 24: Tabelarni prikaz instrumentalne metode IMAC_11b_BIO_HPLC2 in vpliv na separacijo združenih vzorcev LK800 in H7dN6-TNF. V tabeli smo z »M imidazola*« označili zapis za končno koncentracijo imidazola v mobilni fazi (M)	50
Preglednica 25: Prikaz površin in višin vrhov vzorcev pri preverjanju linearnosti.....	52
Preglednica 26: Izračun parametrov za prikaz linearnosti metode v območju nanosa vzorca na kolono od 5 do 100 µg	53
Preglednica 27: Prikaz površin vrhov vzorcev pri preverjanju linearnosti v območju nanosa vzorca na kolono od 12,5 do 400 µg, ter seštevek predhodno eluiranih vrhov in glavnih vrhov	55
Preglednica 28: Prikaz površin in višin vrhov vzorcev pri preverjanju ponovljivosti metode ter izračun RSD in povprečja.....	56
Preglednica 29: Razmerje površin kromatografskih vrhov vseh štirih trimer pred in po koncu inkubacije pri pH=7,0	62
Preglednica 30: Razmerje površin kromatografskih vrhov vseh štirih trimer pred in po koncu inkubacije pri pH=7 in dodanem NaCl	63
Preglednica 31: Razmerje površin kromatografskih vrhov vseh štirih trimer pred in po koncu inkubacije pri pH=5.	65
Preglednica 32: Razmerje vseh štirih trimer pred in po koncu inkubacije pri pH=5 in dodanem NaCl	66

Preglednica 33: V preglednici je prikazana izmenjava podenot z naraščanjem površine nastalih podenot (LK(2) + H7(1) ter LK(1) + H7(2)) ter manjšanjem površine vzorcev LK800 in H7dN6-TNF pri pH=7. Prikazani so tudi odstotki površine vseh štirih vrhov v vseh časovnih meritvah, kar omogoča lažje spremeljanje spremenjanja razmerja vrhov. Stolpec »Vsota površin vrhov« služi za preverjanje količine celotne vsebnosti mešanice vzorcev.

Preglednica 34: V preglednici je prikazana izmenjava podenot z naraščanjem površine nastalih podenot (LK(2) + H7(1) ter LK(1) + H7(2)) ter manjšanjem površine vzorcev LK800 in H7dN6-TNF pri pH=7 ob dodatku NaCl. Prikazani so tudi odstotki površine vseh štirih vrhov v vseh časovnih meritvah, kar omogoča lažje spremeljanje spremenjanja razmerja vrhov. Stolpec »Vsota površin vrhov« služi za preverjanje količine celotne vsebnosti mešanice vzorcev.

Preglednica 35: V preglednici je prikazana izmenjava podenot z naraščanjem površine nastalih podenot (LK(2) + H7(1) ter LK(1) + H7(2)) ter manjšanjem površine vzorcev LK800 in H7dN6-TNF pri pH=5. Prikazani so tudi odstotki površine vseh štirih vrhov v vseh časovnih meritvah, kar omogoča lažje spremeljanje spremenjanja razmerja vrhov. Stolpec »Vsota površin vrhov« služi za preverjanje količine celotne vsebnosti mešanice vzorcev.

Preglednica 36: V preglednici je prikazana izmenjava podenot z naraščanjem površine nastalih podenot (LK(2) + H7(1) ter LK(1) + H7(2)) ter manjšanjem površine vzorcev LK800 in H7dN6-TNF pri pH=5 z dodatkom NaCl. Prikazani so tudi odstotki površine vseh štirih vrhov v vseh časovnih meritvah, kar omogoča lažje spremeljanje spremenjanja razmerja vrhov. Stolpec »Vsota površin vrhov« služi za preverjanje količine celotne vsebnosti mešanice vzorcev.

Preglednica 37: V preglednici so prikazane resolucije med vsemi eluiranimi vrhovi pri različnih instrumentalnih metodah, ki smo jih pridobili s pomočjo računalniškega programa Empower 3. Kadar eluirani vrhovi niso bili ustrezeno ločeni med njimi ni izračunane resolucije, kar pomeni, da instrumentalne metode niso primerne za uporabo. Pri izboru najbolj ustrezne instrumentalne metode smo se odločali predvsem na podlagi resolucij med vrhovoma LK(1) + H7(2) ter H7dN6-TNF, saj se vrhova eluirata pri zelo podobni molarnosti imidazola. Poleg resolucij pa smo upoštevali tudi obliko vrhov ter možnost ustrezne integracije. 10

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz trimerne strukture TNF od zgoraj (levo) in prikaz iz strani (desno), pri čemer je vsak monomer obarvan z drugo barvo (Locksley in sod., 2001).	5
Slika 2: Prikaz celičnega odziva pri vezavi TNF na receptorja TNFR-1 in TNFR-2 (podrobnosti so opisane v besedilu). DD – letalna domena; TNFR1 - receptor TNF 1; TRADD – z receptorjem dejavnika tumorske nekroze 1 povezana letalna domena; RIP-1 - serinska/treoninska kinaza, ki vsebuje svojo letalno domeno; TRAF2 – z družino receptorjev za dejavnike tumorske nekroze povezani dejavnik, ubikvitinska ligaza; FADD – s Fas povezana letalna domena; ASK1 – kinaze, ki usmerjajo apoptozo; MEKs – kinaze, aktivirane z mitogeni; p38MAPK – p38 kinaze, aktivirane z mitogeni; JNK – c-Jun N-terminalna kinaza; AP1 - aktivacijski protein 1; NF-κB - jedrni dejavnik κB; IκB – inhibitor jedrnega dejavnika κB; IKK - IκB kinazni kompleks; TNFR-2 - receptor TNF 2; VEGFR – receptor za žilni endotelijski rastni dejavnik; Etk – endotelijска/epitelijска тирозин kinaza (Bradley, 2008).....	6
Slika 3: TNF ima v zdravem organizmu pomembno vlogo pri obrambi telesa pred mikrobi. V primeru lokalnega povišanja koncentracije TNF pri določenih boleznih uporabljamo zaviralce TNF, s katerimi skušamo znižati raven TNF. Medtem ko v primeru tumorskih obolenj skušamo zvišati koncentracijo TNF, ker ima ta pri določenih pogojih dokazano protitumorsko delovanje (Jalen, 2015).	8
Slika 4: Prikaz izmenjave podenot dveh analogov TNF-α, (A in B) pri čemer ima vsak po tri podenote (A ₃ in B ₃) (Jalen, 2015).	11
Slika 5: Shematski prikaz delitve kromatografskih metod (povzeto po Kočevar in sod., 2007).....	12
Slika 6: Shematski prikaz v magistrski raziskavi uporabljenega sistema HPLC z vsemi potrebnimi moduli (Agilent 1100..., 2004).	13
Slika 7: Potek eksperimentalnega dela, ki zajema razvoj metode za razvoj analitske afinitetne kromatografije za študij asociacij in disociacij podenot dejavnika TNF-α, kvalifikacijo metode in spremljanje izmenjave podenot TNF.....	17
Slika 8: Prikaz priprave vzorcev za spremljanje izmenjave podenot.....	31
Slika 9: Prikaz kromatogramov vzorca H7dN6-TNF in MFA za primerjavo elucije vrhov pri uporabljenih mobilnih fazah na osnovi HEPES in K-fosfatnega pufrnega sistema. Različne barve kromatogramov predstavljajo različne MFA. Z modro črto je ponazorjen gradient naraščanja MFB (glej tudi poglavje 3.3.1.).	33
Slika 10: Primerjava različnih pufrnih sistemov pri eluciji vzorca LK801. Različne barve kromatogramov predstavljajo različne MFA. Z modro črto je ponazorjen gradient naraščanja MFB (tudi poglavje 3.3.1.).....	34

Slika 11: Preverjanje ustreznosti elucije vzorcev LK800 in H7dN6-TNF s pripravljeno mobilno fazo B, ki vsebuje 0,5 M imidazol. Različne barve kromatogramov predstavljajo injiciranja v legendi naštetih vzorcev.	35
Slika 12: Preverjanje ustreznosti MFB z 0,5 M imidazolom za elucijo vrha H7dN6-TNF.	35
Slika 13: Prikaz neznanega vrha pri 32,7 minutu, ki se je z vsakim injiciranjem manjšal (povečano izbrano območje kromatograma). Različne barve kromatogramov predstavljajo injiciranja v legendi naštetih vzorcev.	37
Slika 14: Primerjava različnih čistosti imidazola. Različne barve kromatogramov predstavljajo injiciranja v legendi naštetih vzorcev.	38
Slika 15: Primerjava vzorčnih valovnih dolžin 214 in 280 nm. Prikaz razlike v posnetih kromatogramih istočasno posnetega vzorca ter v višini vrha. Različne barve kromatogramov predstavljajo različne valovne dolžine.	39
Slika 16: Testiranje različnih vzorčnih pasovnih širin in referenčnih valovnih dolžin in pasovnih širin ter vpliv na kromatograme. Različne barve kromatogramov predstavljajo kombinacijo različnih nastavitev, kot našteto v legendi.	40
Slika 17: Kromatogram, posnet pri uporabi instrumentalne metode IMAC_4_BIO_HPLC_2, katere gradient je prikazan v preglednici 16.	41
Slika 18: Kromatogram, posnet pri uporabi instrumentalne metode IMAC_5_BIO_HPLC_2, katere gradient je prikazan v preglednici 17.	43
Slika 19: Kromatogram, posnet pri uporabi instrumentalne metode IMAC_6_BIO_HPLC_2, katere gradient je prikazan v preglednici 18.	44
Slika 20: Kromatogram, posnet pri uporabi instrumentalne metode IMAC_7_BIO_HPLC_2, katere gradient je prikazan v preglednici 19.	45
Slika 21: Kromatogram, posnet pri uporabi instrumentalne metode IMAC_8_BIO_HPLC_2, katere gradient je prikazan v preglednici 20.	46
Slika 22: Kromatogram, posnet pri uporabi instrumentalne metode IMAC_10_BIO_HPLC_2, katere gradient je prikazan v preglednici 21.	47
Slika 23: Kromatogram, posnet pri uporabi instrumentalne metode IMAC_10b_BIO_HPLC_2, katere gradient je prikazan v preglednici 22.	48
Slika 24: Kromatogram, posnet pri uporabi instrumentalne metode IMAC_11_BIO_HPLC_2, katere gradient je prikazan v preglednici 23.	49
Slika 25: Kromatogram, posnet pri uporabi instrumentalne metode IMAC_11b_BIO_HPLC_2, katere gradient je prikazan v preglednici 24.	50
Slika 26: Preverjanje linearnosti v območju nanosa na kolono od 5 do 100 µg. Različne barve kromatogramov predstavljajo različne nanose vzorca, kot navedeno v legendi.	52
Slika 27: Prikaz linearne premice pri preverjanju linearnosti v območju nanosa vzorca na kolono od 5 do 100 µg.	53

Slika 28: Preverjanje linearnosti v območju nanosa vzorca na kolono od 12,5 do 400 µg. Različne barve kromatogramov predstavljajo različne nanose vzorca, kot navedeno v legendi.	54
Slika 29: Preverjanje ponovljivosti metode pri injiciraju 50 µl vzorca H7dN6-TNF v 6 ponovitvah. Različne barve kromatogramov predstavljajo različna injiciranja, kot je napisano v legendi.	55
Slika 30: Prikaz kromatograma vzorca LK800, prek katerega smo spremljali pojav vrhov ter se odločili, katere frakcije bomo testirali z SDS-PAGE. Navpične črte so bile v pomoč, da smo lažje določili čas, pri katerem se je pojavil posamezen vrh.	57
Slika 31: Pregled zbranih frakcij, ki smo jih analizirali z reducirajočo različico SDS-PAGE in prikaz gela za reducirani vorec LK800. V jamici 10 je separacija proteinskega standarda z znanimi masami (v kDa), ki so prikazane na desni strani slike (Marker).	57
Slika 32: Pregled zbranih frakcij, ki smo jih analizirali z nedreducirajočo različico SDS-PAGE in prikaz gela za nereducirani vorec LK800. V jamici 10 je separacija proteinskega standarda z znanimi masami (v kDa), ki so prikazane na desni strani slike (Marker).	58
Slika 33: Prikaz kromatograma vzorca H7dN6-TNF, prek katerega smo spremljali pojav vrhov ter se odločili, katere frakcije bomo testirali z SDS-PAGE. Navpične črte so bile v pomoč, da smo lažje določili čas, pri katerem se je pojavil posamezen vrh.	59
Slika 34: Pregled zbranih frakcij, ki smo jih analizirali z SDS-PAGE in prikaz gela za reducirani vorec H7dN6-TNF. V jamici 10 je separacija proteinskega standarda z znanimi masami (v kDa), ki so prikazane na desni strani slike (Marker).	59
Slika 35: Pregled zbranih frakcij, ki smo jih analizirali z SDS-PAGE in prikaz gela za nereducirani vorec H7dN6-TNF.	60
Slika 36: Prikaz manjšanja površin vzorcev LK800 in H7dN6-TNF in večanja površin vzorcev LK(2) + H7(1) in LK(1) + H7(2) tekom inkubacije vzorcev pri 4 °C in pH=7,0.	61
Slika 37: Odstotkovni prikaz manjšanja površin vzorcev LK800 in H7dN6-TNF in večanja površin vzorcev LK(2) + H7(1) in LK(1) + H7(2) tekom inkubacije vzorcev pri 4 °C in pH=7,0.	61
Slika 38: Prikaz manjšanja površin vzorcev LK800 in H7dN6-TNF in večanja površin vzorcev LK(2) + H7(1) in LK(1) + H7(2) tekom inkubacije vzorcev pri 4 °C in pH=7 ob dodatku NaCl.	62
Slika 39: Odstotkovni prikaz manjšanja površin vzorcev LK800 in H7dN6-TNF in večanja površin vzorcev LK(2) + H7(1) in LK(1) + H7(2) tekom inkubacije vzorcev pri 4 °C in pH=7 ob dodatku NaCl.	63

- Slika 40: Prikaz manjšanja površin vzorcev LK800 in H7dN6-TNF in večanja površin vzorcev LK(2) + H7(1) in LK(1) + H7(2) tekom inkubacije vzorcev pri 4 °C in pH=5 64
- Slika 41: Odstotkovni prikaz manjšanja površin vzorcev LK800 in H7dN6-TNF in večanja površin vzorcev LK(2) + H7(1) in LK(1) + H7(2) tekom inkubacije vzorcev pri 4 °C in pH=5 64
- Slika 42: Prikaz manjšanja površin vzorcev LK800 in H7dN6-TNF in večanja površin vzorcev LK(2) + H7(1) in LK(1) + H7(2) tekom inkubacije vzorcev pri 4 °C in pH=5 ob dodatku NaCl 65
- Slika 43: Odstotkovni prikaz manjšanja površin vzorcev LK800 in H7dN6-TNF in večanja površin vzorcev LK(2) + H7(1) in LK(1) + H7(2) tekom inkubacije vzorcev pri 4 °C in pH=5 ob dodatku NaCl 65
- Slika 44: Tekom spremeljanja izmenjave podenot smo v času 0h zaporedno injicirali vzorce, ki so bili izpostavljeni različnim pogojem (različne pH vrednosti ter dodatek NaCl), kot je razvidno iz legende pod kromatogrami (različne barve kromatogramov predstavljajo različna injiciranja). V času 0h lahko pri pH=5 vidimo prve izmenjane podenote, medtem ko pri pH=7 ni vidnih izmenjav podenot
- Slika 45: Tekom spremeljanja izmenjave podenot smo po šestih urah zaporedno injicirali vzorce, ki so bili izpostavljeni različnim pogojem (različne pH vrednosti ter dodatek NaCl), kot je razvidno iz legende pod kromatogrami (različne barve kromatogramov predstavljajo različna injiciranja). V času po šestih urah lahko je pri pH=5 jasno vidna izmenjava podenote, medtem ko pri pH=7 komaj zaznamo izmenjavo.
- Slika 46: Tekom spremeljanja izmenjave podenot smo po 36. urah zaporedno injicirali vzorce, ki so bili izpostavljeni različnim pogojem (različne pH vrednosti ter dodatek NaCl), kot je razvidno iz legende pod kromatogrami (različne barve kromatogramov predstavljajo različna injiciranja). Pri pH=5 brez dodatka NaCl je izmenjava podenot v času po 36 urah zaključena, medtem ko se pri pH=7 izmenjava podenot šele začenja. Pri pH=5 z dodatkom NaCl vidimo, da izmenjava podenot poteka, ni pa še zaključena.
- Slika 47: Tekom spremeljanja izmenjave podenot smo po 144. urah zaporedno injicirali vzorce, ki so bili izpostavljeni različnim pogojem (različne pH vrednosti ter dodatek NaCl), kot je razvidno iz legende pod kromatogrami (različne barve kromatogramov predstavljajo različna injiciranja). Ob koncu inkubacije vidimo, da so se podenote pri pH=5 izmenjale. Tudi pri pH=7 jasno vidimo izmenjavo podenot, vendar so vrhovi izmenjanih podenot nižji kot pri pH=5.

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Kromatogrami vzorcev H7dN6-TNF + LK800 tekom spremljanja izmenjave podenot v času 0h
- Priloga B: Kromatogrami vzorcev H7dN6-TNF + LK800 tekom spremljanja izmenjave podenot v času 6h
- Priloga C: Kromatogrami vzorcev H7dN6-TNF + LK800 tekom spremljanja izmenjave podenot v času 36h
- Priloga D: Kromatogrami vzorcev H7dN6-TNF + LK800 tekom spremljanja izmenjave podenot v času 144h
- Priloga E: Prikaz izmenjave podenot s spreminjanjem površin pri pH=7
- Priloga F: Prikaz izmenjave podenot s spreminjanjem površin pri pH=7 ob dodatku NaCl
- Priloga G: Prikaz izmenjave podenot s spreminjanjem površin pri pH=5
- Priloga H: Prikaz izmenjave podenot s spreminjanjem površin pri pH=5 ob dodatku NaCl
- Priloga I: Prikaz resolucij med vsemi eluiranimi vrhovi tekom optimizacije gradienta

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

a	ločljivost kolone
A	absorbanca
AP-1	aktivacijski protein 1 (angl. activating protein 1)
b	odsek na osi y
C	koncentracija
cDNA	komplementarna DNA
d	premer delcev
DAD	detektor z diodno matriko (angl. Diode array detector)
DD	letalna domena (angl. death domain)
EDTA	etylendiaminetraocetna kislina (angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA	encimska imunoadsorpcijska analiza (angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
H7dN6-TNF	analog TNF- α , pripravljen z delecijo 6 aminokislin na N-terminalnem koncu molekule in dodatek 7 histidinov na N-terminalnem koncu
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. high-performance liquid chromatography)
IDA	iminodiocetna kislina (angl. iminodiacetic acid)
IMAC	kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija (angl. immobilized-metal affinity chromatography)
k	naklon premice
K'	kapacitivnost kolone
L	dolžina kolone
LK800	nativni TNF- α
LK801	analog TNF- α , pripravljen z zamenjavo glutaminske kisline s histidinom na mestu 107 ter z zamenjavo glicina s histidinom na mestu 108
MFx	mobilna faza x (kjer x predstavlja ustrezen kanal na sistemu HPLC)
MHC	poglavitni histokompatibilnostni kompleks (angl.: major histocompatibility complex)
N	učinkovitost kolone, ki jo izražamo s številom SDS teoretičnih podov
NF- κ B	jedrni dejavnik κ B (angl. nuclear factor κ B)
NTA	nitrilotriocetna kislina (angl. nitrilotriacetic acid)
PBS	fosfatni pufer s soljo (angl. phosphate-buffered saline)
PLAD	domena, ki pomaga pri trimerizaciji receptorjev (angl. pre-ligand assembly domain)
RIP-1	serinska/treoninska kinaza, ki vsebuje svojo letalno domeno (angl. receptor interacting protein-1)
r	polmer kolone

R_s	resolucija
s	standardna deviacija
s_k	standardna deviacija naklona
s_b	standardna deviacija odseka na osi y
SDS	natrijev dodecil sulfat
SDS-PAGE	poliakrilamidna elektroforeza v prisotnosti SDS
SELDI	(angl. surface-enhanced laser desorption/ionization)
SODD	protein, ki preprečuje interakcijo drugih proteinov s TNFR-1 (angl. silencer of death domain)
TACE	metaloproteinaza, ki uravnava odcepitev topne oblike TNF- α z membranskega površja (angl. TNF- α converting enzyme)
TNF	dejavnik tumorske nekroze (angl. tumore necrosis factor)
TNFR	receptor TNF
t_{R1}, t_{R2}	retencijska časa kromatografskih vrhov 1 in 2
TRADD	z receptorjem dejavnika tumorske nekroze 1 povezana letalna domena (angl. TNFR-associated DD protein)
TRAF-2	z družino receptorjev za dejavnike tumorske nekroze povezani dejavnik, ubikvitinska ligaza (angl. TNFR-associated factor-2)
v	hitrost pretoka
V_e	elucijski volumen
V_K	volumen kolone
$W_{1,h/1}, W_{2,h/2}$	širina kromatografskih vrhov na polovični višini vrhov 1 in 2
ϵ	molarni ekstinkcijski koeficient
μ	viskoznost mobilne faze

1 UVOD

Dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- α) so odkrili leta 1975 (Carswell in sod., 1975) in od takrat naprej so številne raziskovalne skupine po svetu že le definirati zgradbo, vlogo in uporabnost TNF. TNF- α je homotrimerni glikoprotein, ki se nahaja v transmembranski ali topni obliki (Black in sod., 1997). Prvotno so odkrili, da je TNF- α povzročil tumorsko nekrozo pri miših in ga zato tako tudi poimenovali (Carswell in sod., 1975), kasneje pa so ugotovili, da ima poleg citotoksičnega tudi številne druge učinke (Bradley, 2008). V različnih raziskavah so potrdili, da je TNF- α vnetni citokin z močnim pleiotropnim delovanjem in je tako udeležen v številnih procesih pri zdravem in bolnem organizmu (Dinarello, 2000, Horiuchi in sod., 2010). Pomembno vlogo ima TNF- α pri obrambi zdravega organizma pred mikrobi, saj povišane koncentracije povzročijo proliferacijo in produkcijo drugih citokinov in tako zaščitijo organizem. Po drugi strani pa dlje časa lokalno povišano koncentracijo TNF- α povezujejo z nastankom avtoimunskih bolezni (luskavica, Kronova bolezen, revmatoidni artritis itd.), kar je pripeljalo do razvoja številnih zaviralcev TNF.

V sklopu raziskav so Menart in sod. (1996) odkrili, da v raztopini prihaja do izmenjave podenot med molekulami TNF- α , kar je sprožilo nadaljne raziskave. V doktorski disertaciji je Jalen (2015) predstavila nove možnosti za razvoj zaviralcev TNF, kjer bi z izkoriščanjem te lastnosti lahko inhibirali delovanje TNF- α . Konjugate z izničenim citotoksičnim delovanjem bi zaradi boljših permeabilnostnih sposobnosti aplicirali na mesto lokalno povišane koncentracije TNF, kjer bi konjugati izmenjali podenote z nativno molekulo in tako izničili delovanje nativne TNF- α . Razviti konjugati bi lahko postali kandidati za razvoj novih zaviralcev TNF, s katerimi bi lahko zdravili povišano koncentracijo nativne TNF v črevesju, ki vodi do nastanka Kronove bolezni.

S kromatografskimi metodami lahko učinkovito in hitro ločimo med seboj številne substance. V zadnjem času je najširše in najpogosteje uporabljenata tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl.: High-performance liquid chromatography, HPLC) (Kregar, 1996). Eden izmed pogosto uporabljenih principov separacije pri metodah HPLC je na podlagi afinitete, kot deluje tudi kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija (angl.: Immobilized-metal affinity chromatography, IMAC). IMAC omogoča ločevanje na principu lovljenja kovinskih ionov na spojine vezane na kromatografski nosilec. Kovinski ioni nato služijo kot ligandi za proteine, ki s kovinskimi ioni tvorijo koordinativne vezi. Zato je ločevanje proteinov z metodo IMAC primerno za proteine z izpostavljenimi ustreznimi aminokislinskimi ostanki, kot npr. stranske skupine histidinov ali za proteine, ki imajo dodane histidinske značke in se tako močno vežejo na kovinske ione (Gaberc-Porekar in Menart, 2001).

1.1 CILJI DELA

Razvoj kovinsko-kelatne afinitetno kromatografske metode (IMAC) s katero bi lahko opazovali asociacijo in disociacijo podenot dejavnikov tumorske nekroze alfa (TNF- α) ter laboratorijske študije, s katerimi potrdimo, da karakteristike metode ustrezajo zahtevam za željene aplikacije (kvalifikacija).

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pred začetkom eksperimentalnega dela smo postavili naslednje hipoteze:

- IMAC metodo lahko ustrezeno razvijemo in optimiramo, da je primerna za študij asociacije in disociacije podenot dejavnikov tumorske nekroze alfa (TNF-a).
- IMAC je primerna metoda za rutinsko uporabo in jo je moč kvalificirati.
- Z razvito in optimirano metodo IMAC lahko proučujemo dinamiko in razmere za izmenjavo podenot TNF-a.

2 PREGLED OBJAV

2.1 TNF- α

TNF- α so prvič opisali Carswell in sod. (1975) v serumu miši, ki so jih okužili z bacilom Calmette-Guerin (BCG, *M. tuberculosis*) in endotoksinom. Identificirali so ga kot glikoprotein, ki povzroča hemoragično nekrozo sarkoma ter ga poimenovali dejavnik tumorske nekroze. Leta 1980 so potekale raziskave karakterizacije TNF ter postopki čiščenja molekule pri kuncih (Matthews in sod., 1980). Človeški in glodalski dejavnik tumorske nekroze so prvič klonirali leta 1985 (Shirai in sod., 1985; Pennica in sod., 1985), s čimer se je začela doba razvijanja anti-TNF zdravil (zaviralci TNF). Od takrat naprej je bil TNF vpleten pri preučevanju raznolikih vnetnih, nalezljivih in malignih stanj. Spremljali so učinkovitost protiteles proti TNF ali uporabo topnih TNF receptorjev pri kontroliranju aktivnosti bolezni pri revmatoidnem artritu in ostalih vnetnih stanj (Bradley, 2008).

Tekom raziskav so odkrivali vedno več molekul, ki so bile podobne TNF in tako je TNF- α postal predstavnik naraščajoče družine dejavnikov tumorske nekroze, ki povzročajo apoptozo. Prva dva člana so odkrili sočasno in sicer z odkritjem TNF- α še TNF- β oz. limfotoksin α (LT- α). Ko so klonirali cDNA obej molekul, so ugotovili, da sta si molekuli izjemno podobni in postalo je jasno, da sta člana iste genske družine. Po pričakovanjih so ugotovili, da receptorji za te proteine (receptorji TNF, TNFR) prav tako predstavljajo svojo gensko družino (Locksley in sod., 2001).

2.1.1 TNF- α kot citokin

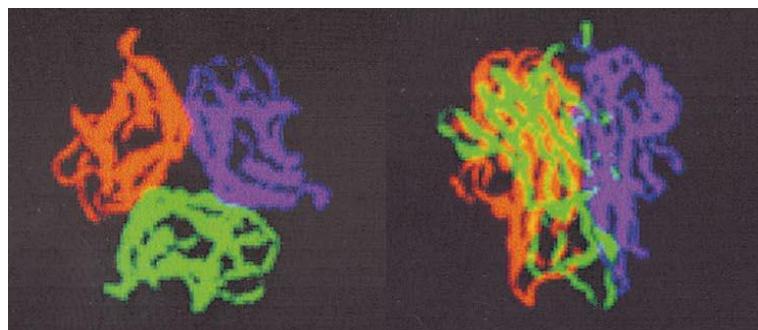
Na osnovi številnih raziskav je znano, da je TNF- α pomemben vnetni citokin z izrazitim pleiotropnim delovanjem na različne celične tipe kar pomeni, da lahko nekateri citokini izzovejo vnetje, medtem ko ga drugi zatrejo (Dinarello, 2000, Horiuchi in sod., 2010). Citokini so majhni signalni proteini z molekulsko maso od 8 do 30000 Da in lahko delujejo na celico, ki jih je proizvedla (avtokrino), na sosednje celice (parakrino) ali redkeje na daljše razdalje (parakrino) (Cannon, 2000). Citokine razvrščamo v skupine glede na njihovo biološko aktivnost, saj ne obstaja značilno aminokislinsko zaporedje ali značilna tridimenzionalna struktura prek katere bi jih lahko povezali. Aktivno sodelujejo pri odzivu organizma na bolezen ali okužbo (Dinarello, 2000). Mnogi primerjajo citokine s hormoni, vendar se od njih razlikujejo v več pogledih. Citokini se nahajajo v telesu v pikomolarnih koncentracijah in njihova koncentracija naraste tudi do tisočkrat v primeru okužb, medtem ko se hormoni nahajajo v nanomolarnih koncentracijah in njihova koncentracija niha za manj kot en velikostni razred. Hormone enakomerno izražajo visoko specializirana tkiva, medtem ko citokine lahko sintetizira skoraj vsaka celica v telesu, še posebej pa endo/epitelijске celice in aktivirani makrofagi. Hormoni se izražajo kot odgovor na stanje

homeostatskega sistema in so velikokrat povezani z dnevnim ciklom, medtem ko se citokini ne izražajo, če niso stimulirani z dogodki, ki so škodljivi za organizem (ultraviolična svetloba, topotni šok, hiperosmoralnost itd.) (Cannon, 2000; Dinarello, 2000). TNF- α igra pomembno vlogo pri vzpodbuditvi imunskega sistema tekom obrambe gostitelja pred vnetji in po prvotnih predvidevanjih tudi pri boju gostitelja z malignimi tumorji. Po drugi strani povečano izražanje TNF- α lahko pripelje do nevarne sistemske toksičnosti, tudi smrti, saj je TNF- α lahko vzrok za nastanek septičnega šoka po okužbi s po Gramu negativnimi bakterijami, sodeluje pri patogenezi nekaterih avtoimunskih bolezni itd. (Vilček in Lee, 1991).

2.1.2 Zgradba gena in proteina TNF- α

TNF- α je transmembranski protein, z molekulsko maso 26 kDa. Najpogosteje ga izločajo aktivirani monociti oz. makrofagi, aktivirane celice naravne ubijalke, celice T ter številne celice, ki niso imunske celice, kot npr. endotelijske celice in fibroblasti (Atzeni in sod., 2013). Topna oblika nastane s cepitvijo membranske oblike, pri čemer nastane protein z molekulsko maso 17 kDa. Obe obliki (membranska in topna) sta aktivni kot trimera, imata pa lahko različne biološke aktivnosti. Odcepitev topne oblike TNF- α z membranskega površja uravnava metaloproteinaza TACE (angl.:TNF- α converting enzyme) (Black in sod., 1997), ki lahko uravnava tudi odcepitev nekaterih drugih membranskih proteinov, vključno z receptorji TNF (TNFR). Topni TNFR lahko nevtralizirajo delovanje topnih molekul TNF zaradi česar je delovanje TNFR lahko dvojno in sicer lahko delujejo pri nastanku vnetja ali pa delujejo protivnetno (Wang in sod., 2003).

Transmembranska oblika TNF- α je izražena kot protein tipa 2 in je sestavljena iz 233 aminokislin. Po cepitvi encima TACE med aminokislinama alanin⁷⁶ in valin⁷⁷ nastane topna oblika TNF- α , ki je sestavljena iz 157 aminokislin (Horiuchi in sod., 2010). Jedro predstavlja antiparalelne beta-ravnine, ki tvorijo dve plasti, ki sta zlepljeni kot sendvič, takšni strukturi rečemo »jelly-roll motiv«. TNF monomer je torej beta-sandvič, sestavljen iz petih notranjih, ravnih in petih zunanjih, zavitih verig. Notranje verige so pomembne pri povezovanju vseh treh monomernih podenot, zunanje verige pa dajejo molekuli zunano obliko. Zanka, ki jo tvorita edina prisotna cisteina na mestih 69 in 101 tvorita disulfidno vez, ki povezuje obe plasti. Podenote se med seboj povežejo prek hidrofobnih ostankov (Eck in Sprang, 1989).



Slika 1: Prikaz trimerne strukture TNF od zgoraj (levo) in prikaz iz strani (desno), pri čemer je vsak monomer obarvan z drugo barvo (Locksley in sod., 2001).

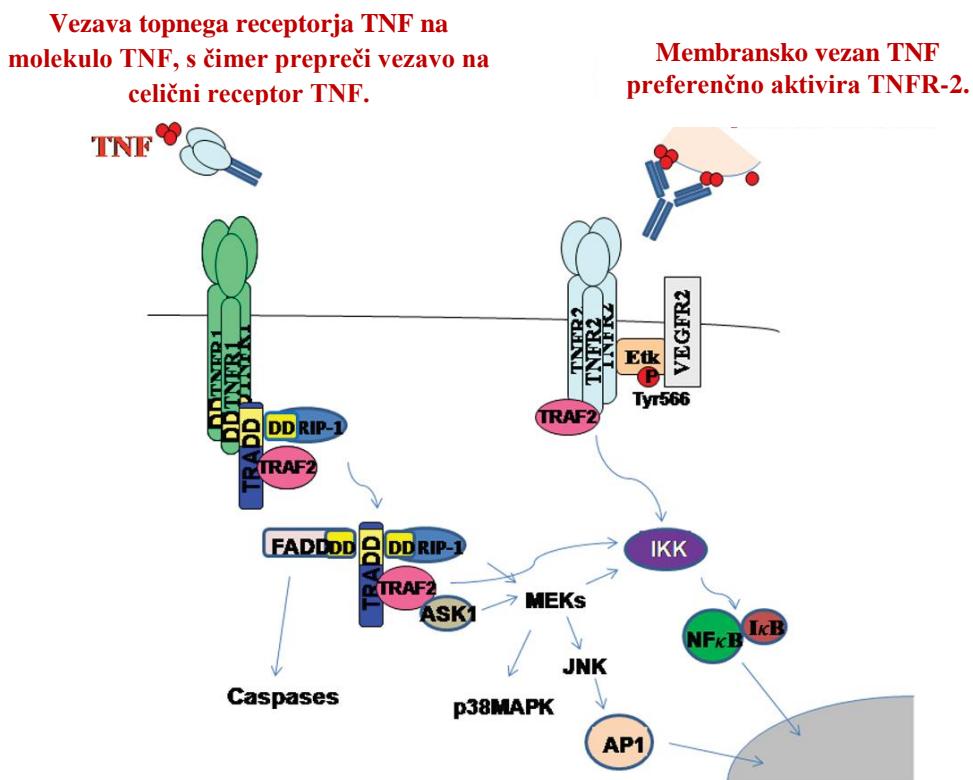
Geni molekul TNF- α in TNF- β so locirani na krajši ročici 6. človeškega kromosoma in sicer znotraj lokusa z geni, ki določajo poglavitni histokompatibilnostni kompleks (angl.: major histocompatibility complex, MHC). Lega genov je za molekuli TNF- α in TNF- β izjemno pomembna, saj lahko predpostavimo, da sta gena podvržena mehanizmom za uravnavanje izražanja MHC. Tako geni TNF- α kot tudi TNF- β so dolgi približno 3 kilobazne pare, s štirimi eksoni in tremi introni, kar je značilna citokinska zgradba (Nedwin in sod., 1985).

2.1.3 Signalne poti TNF

Vsi do sedaj poznani odzivi organizma na TNF so posledice, ki jih sproži pripenjanje TNF na enega od dveh receptorjev, in sicer TNFR-1 ali TNFR-2. Na oba receptorja se lahko vežeta tako TNF- α (topna in netopna oblika) kot TNF- β . Biološka aktivnost membranskega TNF- α je večinoma uravnavana prek TNFR-2. Zunajcelična domena obeh membranskih TNFR, kamor se veže ligand, je v zgradbi enaka in vsebuje štiri s cisteini bogate motive, kar je značilno za vse člane genske družine TNFR. Na zunanjicelični domeni se nahaja domena PLAD (angl.:pre-ligand assembly domain), ki pomaga pri trimerizaciji receptorjev, po vezavi TNF. Znotrajcelična domena receptorjev TNFR-1 in TNFR-2 pa ne kaže homologije in zato po stimulaciji različnih receptorjev pride do različnih celičnih odgovorov (Bradley, 2008; Horiuchi in sod., 2010).

TNFR-1 ima proti C-koncu 80 aminokislin dolgo letalno domeno (angl.: death domain, DD), ki ob aktivaciji receptorja lahko sproži apoptozo (Tartaglia in sod., 1993). Na to domeno se veže protein SODD (angl.: silencer of death domain), ki preprečuje interakcijo drugih proteinov s TNFR-1 in s tem preprečuje konstantno signaliziranje receptorja. Ob vezavi TNF na TNFR-1 se SODD odcepi z receptorja, zaradi česar se lahko različni citoplazmatski proteini, ki vsebujejo DD domeno vežejo nanj (angl.: TNFR-associated DD protein, TRADD). TRADD sproži nadaljnjo signalizacijo, ko se nanj pritrđita dva proteina in sicer serinska/treoninska kinaza, ki vsebuje svojo DD (angl.: receptor interacting protein-1, RIP-1) ter ubikvitinska ligaza, brez DD (angl.: TNFR-associated factor-2, TRAF-2). Čez nekaj minut se kompleks TRADD-RIP-1-TRAF2 odcepi od TNFR-1

(Bradley, 2008). Sproži se kaskada reakcij, ki omogoči, da lahko jedrni dejavnik κB (angl.: nuclear factor κB, NF-κB) in aktivacijski protein 1 (angl.: activating protein 1, AP-1) vstopita v jedro celice in omogočita transkripcijo, ki vodi do celične proliferacije, apoptoze ali nastajanje novih citokinov (Horiuchi in sod., 2010).



Slika 2: Prikaz celičnega odziva pri vezavi TNF na receptorja TNFR-1 in TNFR-2 (podrobnosti so opisane v besedilu). DD – letalna domena; TNFR1 - receptor TNF 1; TRADD – z receptorjem dejavnika tumorske nekroze 1 povezana letalna domena; RIP-1 - serinska/treoninska kinaza, ki vsebuje svojo letalno domeno; TRAF2 – z družino receptorjev za dejavnike tumorske nekroze povezani dejavnik, ubikvitinska ligaza; FADD – s Fas povezana letalna domena; ASK1 – kinaze, ki usmerjajo apoptozo; MEKs – kinaze, aktivirane z mitogeni; p38MAPK – p38 kinaze, aktivirane z mitogeni; JNK – c-Jun N-terminalna kinaza; AP1 – aktivacijski protein 1; NF-κB – jedrni dejavnik κB; IκB – inhibitor jedrnega dejavnika κB; IKK - IκB kinazni kompleks; TNFR-2 - receptor TNF 2; VEGFR – receptor za žilni endotelijski rastni dejavnik; Etk – endotelijsko/epitelijsko tirozin kinaza (Bradley, 2008).

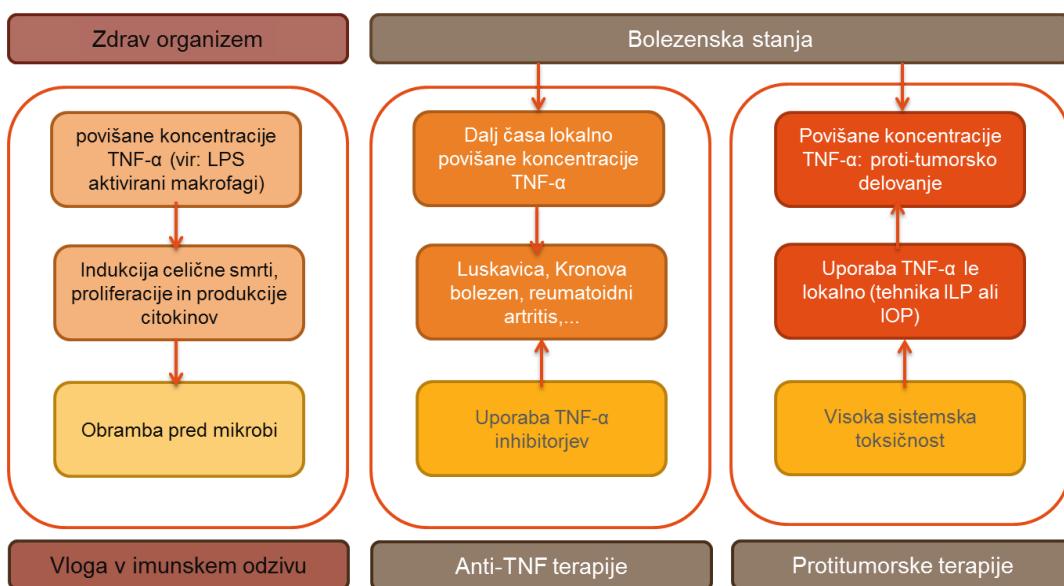
Signalna pot, ki jo sproži vezava TNF na receptor TNFR-2 ni tako preučena in poznana kot signalna pot, ki jo sproži vezava TNF na receptor TNFR-1, lahko pa sproži enake ali nasprotne odzive kot TNFR-1. Receptor TNFR-2 nima znotrajcelične letalne domene, lahko pa sodeluje s proteini TRAF. Zatem se sproži podobna reakcija kot pri TNFR-1, kar privede do tega, da lahko NF-κB in AP-1 vstopita iz citoplazme v celično jedro.

2.1.4 Biološka vloga TNF v telesu

Ob odkritju TNF so Carswell in sod. (1975) glikoprotein, ki je povzročil tumorsko nekrozo pri miših poimenovali po njegovem do tedaj znanem delovanju, zaradi česar se je te molekule oprijelo ime dejavnik tumorske nekroze. Zaradi njegovega citotoksičnega delovanja je ta citokin postajal vedno pomembnejši predmet raziskav, s čimer so ugotovili, da ima poleg citotoksičnega učinka lahko tudi drugačne, včasih celo popolnoma nasprotne učinke (Bradley, 2008). Zaradi vezave TNF- α na receptorja TNFR-1 in TNFR-2 prihaja do aktivacije različnih signalnih poti, kar vodi do, za TNF- α , značilne pleiotropne funkcije.

Z vezavo na TNFR-1 pride do aktivacije NF- κ B in posledično do prepisovanja velikega števila genov, ki so povezani z nastankom vnetja, lahko pa tudi do prepisovanja genov za proteine, ki zavirajo apoptozo. Po drugi stvari pa lahko vezava TNF- α na TNFR-1 privede do aktivacije kaspaze 8 in 3 kar vodi do apoptoze. V kakšnem primeru pri vezavi TNF- α na TNFR-1 pride do apoptoze in v kakšnem primeru do vnetja, še ni popolnoma znano (Caminero in sod., 2011), vendar do apoptoze navadno prihaja le pri transformiranih, rakastih celicah (Sedger in McDermott, 2014). Funkcija TNFR-2 pri vezavi TNF- α je v primerjavi z TNFR-1 manj raziskana. Znano je, da vezava TNF- α na TNFR-2 spodbudi celično aktivacijo, migracijo in proliferacijo. Pod določenimi pogoji lahko TNFR-2 pomaga tudi pri apoptizi in sicer tako, da ulovi TNF- α in ga preda TNFR-1 (po t.i. hipotezi predaje liganda) (Bradley, 2008).

Biološka vloga TNF- α je izrazito pleiotropna, saj je TNF- α pomemben pri vzdrževanju zdravega stanja organizma, medtem ko je po drugi strani vpletен v različna bolezenska stanja.

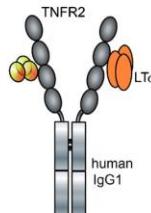
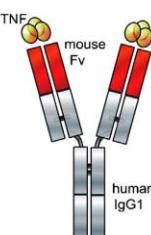
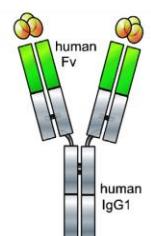
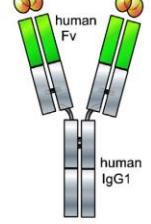
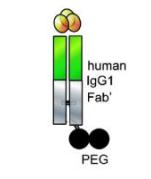


Slika 3: TNF ima v zdravem organizmu pomembno vlogo pri obrambi telesa pred mikrobi. V primeru lokalnega povišanja koncentracije TNF pri določenih boleznih uporabljamo zaviralce TNF, s katerimi skušamo znižati raven TNF. Medtem ko v primeru tumorskih obolenj skušamo zvišati koncentracijo TNF, ker ima ta pri določenih pogojih dokazano protitumorsko delovanje (Jalen, 2015).

2.2 ZAVIRALCI TNF- α

Ob odkritju TNF- α so raziskave največ potekale v smeri razvoja rekombinantnega TNF- α , ki bi učinkoval protitumorsko. Vendar so kasneje ugotovili, da sistemski aplikacija TNF- α povzroča hude neželene učinke in je tako manj primerna za razvoj protitumorskih terapij. Raziskave so se nato bolj usmerile v preučavanje vloge TNF- α pri vnetnih stanjih. Posledično se je pričel razvoj zaviralcev TNF (monoklonska protitelesa proti TNF) in upravljanje s topnimi TNFR, s čimer bi lahko kontrolirali bolezenske aktivnosti pri kroničnih vnetnih boleznih kot so na primer Kronova bolezen, reumatoidni artritis, ulcerativni kolitis itd. (Bradley, 2008; Atzeni in sod., 2013). Danes je na voljo več, za TNF specifičnih monoklonskih protiteles ter rekombinantnih fuzijskih proteinov.

Preglednica 1: Tabela trenutno dostopnih anti-TNF zdravil in njihove odobrene indikacije (povzeto po Sedger in McDermott, 2014).

Učinkovina in struktura	Ime zdravila (podjetje in datum prve odobritve zdravila)	Aplikacija zdravila/ razpolovni čas/ sočasna terapija	Odobrene indikacije zdravila	Struktura
Etanercept rekombinantni fuzijski protein: človeški TNFR2:IgG1-Fc	Enbrel® (Immunex/danes Amgen (US) in Pfizer (UK)) Registracija (FDA): Nov.1998	subkutano injiciranje/2-4 tedne/monoterapija	reumatoidni artritis juvenilni idiopatski artritis psoriatični artritis ankilozirajoči spondilitis psoriaza v plakah	
Infliximab himerno IgG1κ mAb	1.Remicade® (Janssen Biotech Inc.(US) in Janssen-Cilag Pty Ltd. (UK)) Registracija (FDA): Avg.1998	intravenozno injiciranje/4 tedne/monoterapija ali sočasna terapija z metotaksatom*	reumatoidni artritis* psoriatični artritis* ankilozirajoči spondilitis psoriaza v plakah kronova bolezen otroški RA in otroška kronova bolezen	
	2.Remsima® (Celltrion Inc. (Koreja) in Hospira (US)) Registracija (EMA): Sep.2013			
	Humira® (ABBVRIE Inc.)			
	Registracija (FDA): Dec.2002			
	Simponi® (Janssen Biotech Inc. (US)) Registracija (FDA): Apr.2009			
Adalimumab človeški IgG1κ mAb		subkutano injiciranje/2-4 tedne/monoterapija ali sočasna terapija z metotaksatom*	reumatoidni artritis* psoriatični artritis* psoriaza v plakah ankilozirajoči spondilitis kronova bolezen juvenilni idiopatski artritis	
Golimumab človeški IgG1κ mAb		subkutano injiciranje/2 tedna/monoterapija ali sočasna terapija z metotaksatom*	reumatoidni artritis* psoriatični artritis* psoriaza v plakah ulcerativni kolitis	
Certolizumab Pegol pegiliran-Fab' fragment humaniziranega IgG1κ mAb	Cimzia® (UCB Pharma SA) Registracija (FDA): Apr.2008	subkutano injiciranje/monoterapija ali sočasna terapija z metotaksatom*	reumatoidni artritis* psoriatični artritis* ankilozirajoči spondilitis kronova bolezen	

Vsi zgoraj opisani zaviralci TNF obsegajo visoko afinitetna TNF-specifična mAb ali IgFc del mAb z dodanim ekstracelularnim delom TNFR, ki so visoko specifični za človeški TNF. Tako so vsi zgoraj našteti zaviralci sposobni preprečiti vezavo TNF na TNFR-1 ali TNFR-2 prek sterične ovire saj epitop protitelesa prekrije mesta interakcije med TNF in

TNFR ter posledično nevtralizirajo citotoksično delovanje TNF tako *in vitro* kot tudi *in vivo* (Sedger in McDermott, 2014).

Kljub vsem pozitivnim lastnostim zaviralcev TNF se je v več kot desetletju uporabe nabralo nekaj neželenih stranskih učinkov. Predvsem gre za manjše dogodke kot na primer reakcija na mestu injiciranja, razvoj protiteles proti zaviralcem, ki lahko izničijo klinično delovanje (terapija v kombinaciji z metotreksatom). Sistemska aplikacija zaviralcev TNF je zaradi imunosupresivnega učinka pogosto povezana z okužbami, kot npr. tuberkoloza, latentna virusna okužba (npr. herpes zoster). Zaradi povečanega tveganja okužb, so tveganja večja pri cepljenju s cepivi, ki vsebujejo žive mikroorganizme, npr. rumena mrzlica. (Sedger in McDermott, 2014).

2.3 IZMENJAVA PODENOT

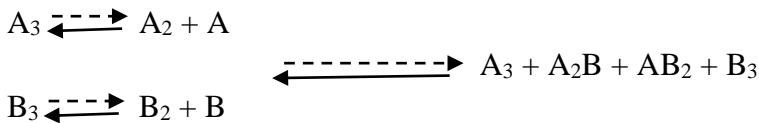
Dinamično izmenjavo podenot med TNF trimerami so prvič odkrili in opisali znotraj raziskovalne skupine, ki so jo sestavljali raziskovalci iz Leka, d.d. (Sandoz Biofarmacevtika) in Kemijskega inštituta (Menart in sod., 1996; Menart, 2000). V literaturi so TNF vedno opisovali kot kompaktno trimero, ki pri nizkih koncentracijah razpada na biološko neaktivne monomere. V okviru zgoraj navedene raziskovalne skupine so pri testiranju mišjih monoklonskih protiteles, specifičnih za TNF in topne TNFR dobili protiteesa, ki so kazala specifičnost na histidinske epitope v konici TNF trimere. Zato so pripravili hibridne trimere s koekspresijo TNF in analoga LK801 (ki ima epitop His107His108) v bakteriji *Escherichia coli*. Ustvarili so dva plazmidna konstrukta in po transformaciji z obema plazmidoma s selekcijskim pritiskom vzdrževali hkratno ekspresijo TNF in analoga LK801. Tako so se sintetizirale zmesi TNF (A_3), analoga LK801 (B_3) in hibridnih trimer A_2B in AB_2 . Ugotovili so torej, da se v primeru, ko skupaj zmešamo analoga TNF v razmerju 1 : 1 po določenem času podenote izmenjajo. Takšno izmenjavo podenot so nato potrdili z metodo izoelektričnega fokusiranja in kasneje še z metodo IMAC (Menart in sod., 1996; Menart, 2000).

Tekom raziskav so ugotavliali vplive na kinetiko izmenjave podenot. Poskuse z izoelektričnim fokusiranjem so opravili v fosfatnem pufru, pH=7 pri 4 °C in pri denzitometriji gelov sklepali da je molarno razmerje izmenjanih podenot $A_3 : A_2B : AB_2 : B_3 = 1 : 2 : 2 : 1$. Opazili so tudi korelacijo med hitrostjo izmenjave podenot in pH vrednostjo, saj so pri pH=7,0 dosegli ravnotežje v 4-5 dneh, pri pH=5 pa že po 10-15 urah. Nižja kot je pH vrednost, hitrejša je izmenjava podenot, vendar se pri pH vrednosti nižji od 5 signali za vse oblike zmanjšujejo, saj TNF pri nizki pH vrednosti izgublja biološko aktivnost zaradi denaturacije molekule (Menart, 2000).

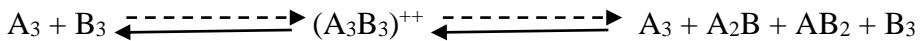
2.3.1 Modeli izmenjave podenot TNF

Menart (2000) opisuje izmenjavo podenot pri TNF z dvema različnima modeloma. In sicer:

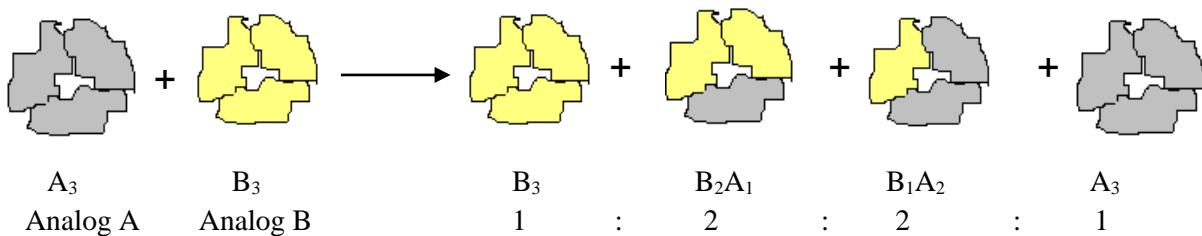
- Disociacija / asociacija



- Tvorba kompleksa dveh trimer



Predpostavlja, da je pri nizkih koncentracijah model asociacije / disociacije prevladujoč.



Slika 4: Prikaz izmenjave podenot dveh analogov TNF- α , (A in B) pri čemer ima vsak po tri podene (A₃ in B₃) (Jalen, 2015).

2.3.2 Uporaba izmenjave podenot TNF

Izmenjavo podenot bi potencialno lahko uporabili v terapevtske namene, zato je to odkritje postalo zanimivo iz farmacevtskega vidika.

Na tržišču trenutno že obstaja biološko zdravilo v predkliničnih fazah testiranja, ki izkorišča princip izmenjave podenot. Z zdravilom XPro®1595 podjetja Xencor, so razvili TNF s tremi mutacijami in s tem izničili vezavna mesta na receptorja TNFR-1 in TNFR-2 ter uvedli mesto za pegilacijo, s čimer bi podaljšali razpolovni čas molekule v krvi. Zaradi izmenjave podenot nativne TNF in mutirane TNF bi izničili delovanje nativne TNF v telesu, saj nastajajo neaktivne heterotrimerne molekule TNF (Steed in sod., 2003; Zalevsky in sod., 2007).

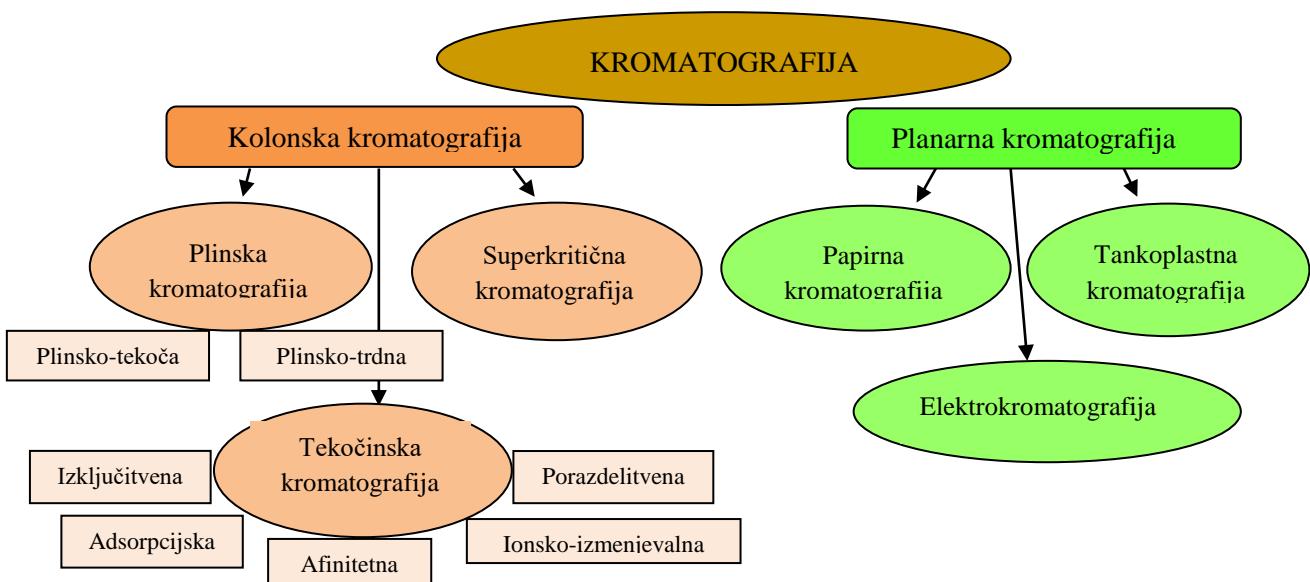
V doktorski disertaciji je Jalen (2015) opisala tudi morebitne nove možnosti, s katerimi bi lahko z uporabo učinka izmenjave podenot razvili nove generacije biofarmacevtikov, ki bi

bili primerni za peroralno uporabo. Pripravili so konjugate TNF, ki imajo izničeno citotoksično učinkovitost, ampak ohranjeno možnost izmenjave podenot z nativnim TNF. Zaradi izboljšanih permeabilnostnih lastnosti so novo razviti konjugati lahko zanimivi kandidati za razvoj zaviralca TNF, ki bi bil primeren za peroralno uporabo, namenjen zdravljenju Kronove bolezni. V okviru testiranja izmenjave podenot med konjugati z izničeno biološko aktivnostjo in nativnim TNF smo v magistrski nalogi razvili metodo IMAC, s katero lahko preverimo ali pride do ustrezne disociacije in reasocijacije podenot TNF v raztopini, kar nam pove, ali bi na takšen način lahko izničili delovanje nativnega TNF v črevesju.

2.4 KROMATOGRAFIJA

Kromatografske tehnike sodijo med zelo učinkovite metode ločevanja substanc. Primerne so za ločevanje na veliki in manjši skali, zato jih lahko uporabimo kot preoperativno ali kot analitsko tehniko (Kregar, 1996).

So večstopenjske ločevalne metode, kjer se komponente razdelijo med stacionarno in mobilno fazo. Stacionarna faza je lahko trdna ali tekoča, nahaja se znotraj kolone, je razširjena v obliki plasti, porazdeljena kot obloga ali je nanešena z drugačnimi tehnikami. Mobilna faza je lahko plinska, tekoča ali se nahaja kot superkritični fluid. Princip ločevanja je lahko na podlagi adsorpcije, porazdelitve mas, izmenjave ionov ali pa na podlagi fizikalno-kemijskih razlik med molekulami (npr. velikost, masa, volumen). Za namene kvalitativne in kvantitativne analize se uporablja kolonska, plinska, papirna, tankoplastna in visokotlačna tekočinska kromatografija (United ..., 2014).



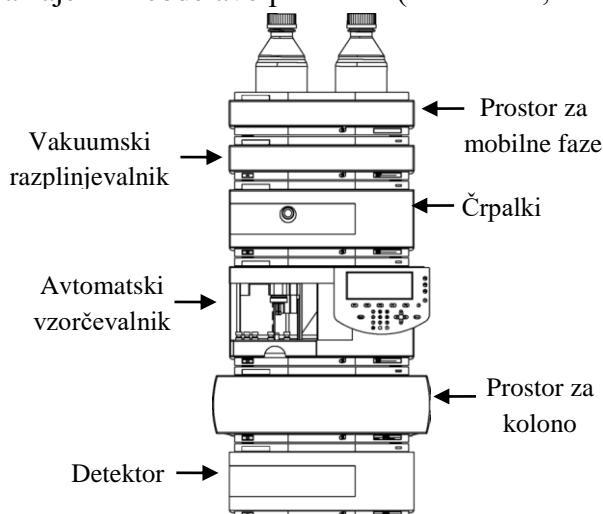
Slika 5: Shematski prikaz delitve kromatografskih metod (povzeto po Kočevar in sod., 2007).

V magistrski nalogi smo se osredotočili na tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (ang.: High performance liquid chromatography, HPLC). V USP termina tekočinska kromatografija in tekočinska kromatografija visoke ločljivosti obravnavajo kot sinonima, zato smo tudi mi privzeli tak način poimenovanja.

2.4.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

HPLC je v zadnjem času najširše in najpogosteje uporabljena kromatografska metoda. Gre za zelo učinkovito, hitro tehniko, z visoko stopnjo ločljivosti, primerno tako za preparativne kot tudi za kvalitativne in kvantitativne analitske namene. S HPLC lahko ločujemo snovi na podlagi adsorbcije, porazdelitve, ionske izmenjave, afinitete in velikosti molekul. Je tehnika, ki temelji na trdni stacionarni fazni, ki je navadno zapakirana v koloni iz nerjavečega jekla, in tekoči mobilni fazi. Tekom razvoja HPLC tehnike je bilo tako med drugim treba razviti primerne kolone z ustreznimi stacionarnimi fazami, ki dajejo dobre ločitve in prenesejo visoke tlake. Najpogosteje uporabljeni stacionarne faze so silikati ali polimerne kroglice, katerim so velikokrat dodane dolge verige ogljikovodikov (Kregar, 1996; United ..., 2014)

Sistem HPLC sestavlja črpalki, injektor, kromatografska kolona, povezovalne cevke, detektor in naprave za zajem in obdelavo podatkov (računalnik, integrator ali snemalnik).



Slika 6: Shematski prikaz v magistrski raziskavi uporabljenega sistema HPLC z vsemi potrebnimi moduli (Agilent 1100 ..., 2004).

2.4.1.1 Črpalni sistem

Črpalni sistem je pomemben del sistema, saj mora dovajati točno določeno količino mobilne faze pri stalnem pretoku. Pomembno je, da so nihanja v tlaku čim manjša, cevke in tesnila pa morajo vzdržati tlak, ki ga ustvarjajo črpalke. Črpalni sistemi lahko preko računalniškega vodenja dovajajo stalno (izokratska separacija) ali spreminjačo

(gradientna separacija) sestavo mobilnih faz. Zaradi takšnih zahtev danes obstajajo binarne in kvartarne črpalke (WHO, 2014; Kregar, 1996).

2.4.1.2 Injektor

Raztopino vzorca v bližini začetka kolone uvedemo v mobilno fazo, ki z ustreznim pretokom teče skozi sistem HPLC. Vzorec se injicira z injekcijsko iglo in se v injekcijskem ventilu zmeša z mobilno fazo (WHO, 2014).

2.4.1.3 Kromatografska kolona in stacionarna faza

Kromatografska kolona je najpomembnejši del sistema HPLC. Navadno je narejena iz nerjavvečega jekla, dolžine med 50 in 300 mm, z notranjim premerom od 2 do 5 mm. Manjši kot so delci polnila, večja je ločljivost kolone, vendar se poveča upor, ki se kaže kot povratni tlak kolone (Kregar, 1996):

$$\Delta P = \mu \cdot L \cdot v / (a \cdot d^2) \quad \dots (1)$$

- ΔP - sprememba tlaka kolone (bar)
- μ - viskoznost mobilne faze ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
- L - dolžina kolone (cm)
- v - hitrost pretoka ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$)
- a - ločljivost kolone
- d - premer delcev (μm)

Kolone so navadno polnjene s stacionarno fazo, katere delci merijo 3-10 μm . Najbolje je, če je temperatura mobilne faze in kolone tekom analize stalna. Največ separacij poteka pri sobni temperaturi, vendar lahko kolono segrevamo ali ohlajamo, da dosežemo večjo učinkovitost (WHO, 2014).

Kadar pri HPLC separacijah uporabljam polarno stacionarno fazo in nepolarno mobilno fazo, tak sistem imenujemo kromatografija na normalni fazi, medtem ko gre pri obrnjeni sestavi stacionarne in mobilne faze za kromatografijo na reverzni fazi. Najpomembnejša lastnost kolone je sposobnost ločevanja snovi, ki je odvisna od:

- učinkovitosti (angl.: efficiency) N – sposobnost kolone, da po njej potujejo snovi v ozkih in ostrih pasovih. Izražamo jo s številom teoretičnih podov,
- kapacitivnosti K' – merilo zadrževanja snovi na koloni,
- ločljivosti a – ki odraža sposobnost kolone, da loči med sabo zelo podobne komponente, ki se eluirajo blizu skupaj (Kregar, 1996).

2.4.1.4 Detektorji

Detektorji zaznajo snovi, ki se eluirajo iz kolone in tako posredno merijo njihovo količino. Meritve potekajo kontinuirano, saj ravno čas zadrževanja določene snovi na koloni (V_e)

pove največ o njenih lastnostih. Detektorji so največkrat narejeni tako, da merijo lastnosti topljenca prek spremeljanja absorpcije svetlobe ali fluorescence. Absorpcijski spektrofotometri, ki delujejo v ultravijoličnem ali vidnem območju so najpogosteje uporabljeni detektorji in merijo absorpcijo UV-svetlobe (160-375 nm). V določenih primerih se uporabljajo fluorescenčni spektrofotometri, refraktometri, elektrokemični detektorji in drugi. Podatki, ki prihajajo iz detektorja, se shranjujejo v računalniškem programu v obliki elucijskega diagrama oz. kromatograma (WHO, 2014; Kregar, 1996).

2.4.2 Kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija

Kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija (angl.: Immobilized-metal affinity chromatography, IMAC) je tehnika ločevanja, ki temelji na lovljenju kovinskih ionov na kelatne spojine, ki so kovalentno vezane na trdni kromatografski nosilec. Ko se vanje ujame kovinski ion, ta služi kot afinitetni ligand za številne proteine, ki lahko zaradi izpostavljenih ustreznih aminokislinskih ostankov s kovinskimi ioni tvorijo koordinativne vezi. Najpogosteje uporabljeni kovinski ioni so Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , ki so akceptorji elektronskega para. S koordinativnimi vezmi se vežejo z elektron-donorskimi skupinami (N, S, O), ki so prisotne na kelatnih spojinah, vezanih na kromatografski nosilec in tako tvorijo kovinske kelate. Preostala mesta kovinskih ionov so ponavadi zasedena z molekulami vode, vendar jih ustrezna elektron-donorska skupina proteina lahko zamenja. Nekatere aminokisline so zaradi elektron-donorskih atomov v njihovih stranskih verigah še posebej primerne za vezavo na kovinski kation. Za vezavo so tako najpomembnejše stranske skupine histidinov, sodelujejo pa lahko tudi stranske verige Glu, Asp, Cys, Arg, Lys in Met. K vezavi lahko prispevajo tudi aromatske stranske verige, kot so Trp, Phe, Tyr kadar so v bližini histidinov (Gaberc-Porekar in Menart, 2001; Arnold, 1991).

Kot prvi uporabljeni kelirajoči ligand za pritrditev kovinskih ionov so Porath in sod. (1975) uporabili iminodiocetno kislino (angl.: iminodiacetic acid, IDA), ki je še vedno najpogosteje uporabljen kelirajoči ligand. Razvoj je potekal tudi v smeri drugih kelatorjev, od katerih se je najbolj uveljavila nitrilotriocetna kislina (angl.: nitrilotriacetic acid, NTA), ki je za razliko od IDA, teradentatni ligand. Pri vezavi z Ni^{2+} vzpostavi štiri koordinativne vezi in ima tako večjo afiniteto vezave kovinskih ionov kot IDA, vendar ima kation le še dve prosti mesti za interakcijo z imidazolnim obročem histidinskih ostankov. Kovinski ioni se na NTA vežejo močneje, kar pomeni, da se na koloni lahko po nasičenju zadržijo dlje časa, vendar pa imajo slabšo afiniteto za vezavo proteinov kot IDA (Block in sod., 2009).

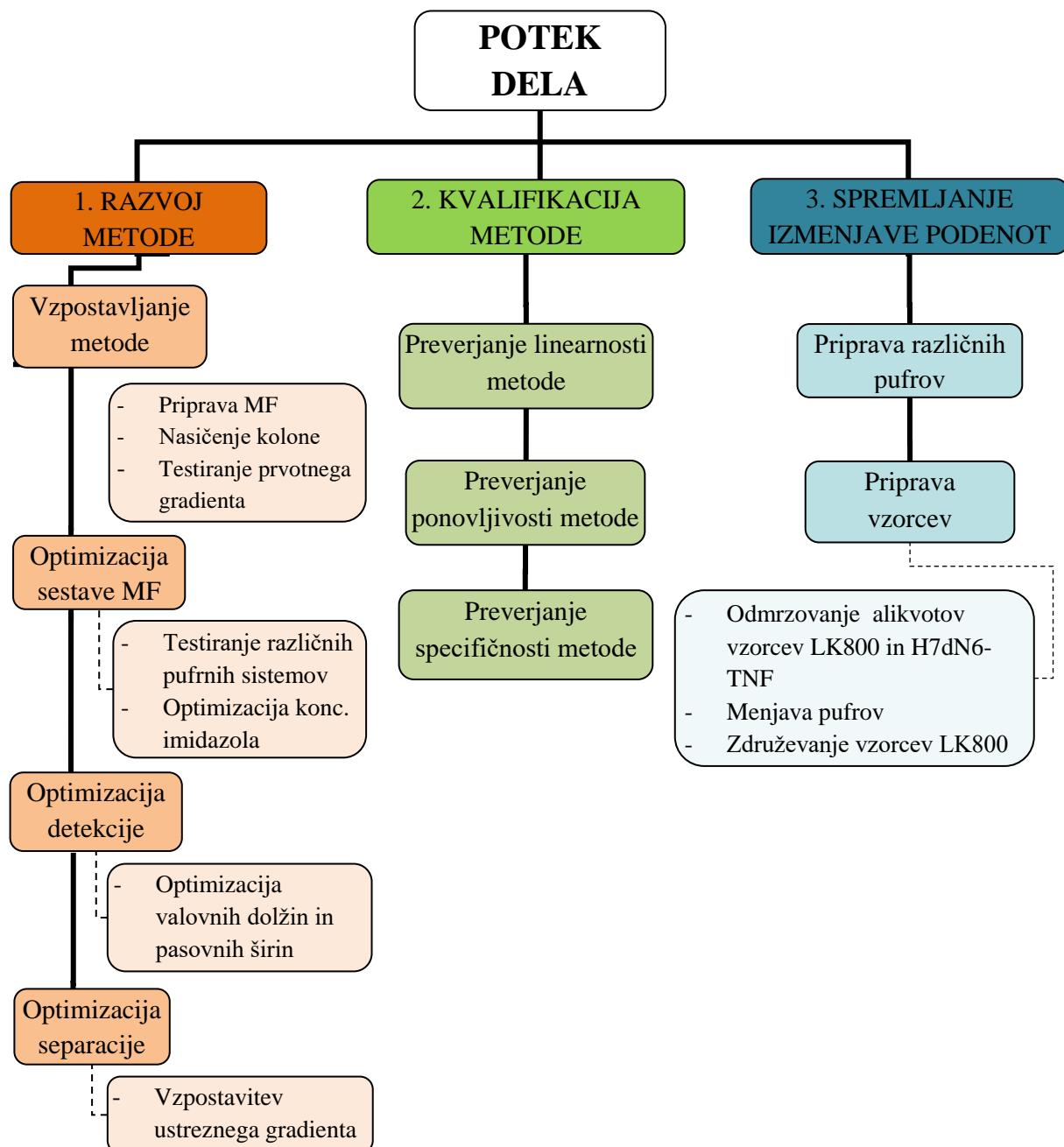
Absorpcija proteina na nosilec IMAC se lahko zgodi le v primeru, kadar so imidazolni dušiki v stranski verigi histidinov v neprotonirani obliki, kar se zgodi v nevtralnem ali rahlo bazičnem okolju. Da bi preprečili nespecifične elektrostatske interakcije ponavadi uporabljamo pufre, ki vsebujejo precej visoko koncentracijo soli (od 0,1 do 1,0 M NaCl), pri čemer je pomembno, da se pufri ne veže na kovinske ione s koordinativnimi vezmi.

Elucijo proteina iz kolone lahko dosežemo s protonacijo, izmenjavo liganda ali z uporabo močnejšega kelatorja. Protonacijo histidinov dosežemo z znižanjem pH vrednosti, zaradi česar ni več prostih elektronskih parov za vezavo na kovinski ion. Za proteine, ki so občutljivi na znižanje pH vrednosti uporabimo princip izmenjave liganda npr. z imidazolom, ki tekmuje s histidini za vezavo na kovinski ion in izpodrine proteine iz kolone. Kadar za elucijo proteinov uporabimo močnejši kelator kot je npr. EDTA, ta povzroči elucijo vseh proteinov, vendar je v tem primeru potrebno pred novo separacijo kolono ponovno nasititi s kovinskimi ioni (Gaberc-Porekar in Menart, 2001).

Metoda IMAC se je prvotno uporabljala za čiščenje nativnih proteinov, ki imajo afiniteto do kovinskih ionov, vendar se je kasneje izkazalo, da se IMAC lahko uporablja tudi v številne druge namene. Število proteinov, primernih za kromatografsko čiščenje z IMAC se je povečalo iz metaloproteinov na protitelesa, fosforilirane proteine in rekombinantne proteine z dodanimi histidinskimi podaljški. Metoda se danes najpogosteje uporablja ravno za izolacijo proteinov s histidinskimi podaljški. Kljub temu pa se zaradi specifične vezave proteinov s histidinskimi podaljški na imobilizirane kovinske ione lahko uporablja pri aplikacijah kjer so pomembne interakcije med dvema proteinoma, kot npr. pri diagnostični metodi ELISA ali pri tehnologiji čipov (npr. pri površinski plazmonskej resonanci). Uporablja se tudi pri proteomske raziskavah proteinskih celičnih frakcij, npr. vezava kovine na matriks čipa SELDI (angl.: surface-enhanced laser desorption/ionization) (Block in sod., 2009). IMAC se lahko uporablja tudi v analitske namene, kar smo v tej magistrski nalogi tudi že leli prikazati. Obstajajo tudi številne druge uporabe metode IMAC, ki pa so manj razširjene.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 7: Potek eksperimentalnega dela, ki zajema razvoj metode za razvoj analitske afinitetne kromatografije za študij asociacij in disociacij podenot dejavnika TNF- α , kvalifikacijo metode in spremljanje izmenjave podenot TNF.

3.2 MATERIALI

3.2.1 Vzorci

Za namene razvoja metode IMAC, kvalifikacijo metode ter za proučevanje dinamike vezave različnih podenot TNF- α smo uporabili nativno molekulo TNF- α ter analoge humanega rekombinantnega TNF- α . Analogi humanega rekombinantnega TNF- α so bili pripravljeni z rekombinantno bakterijo *Escherichia coli*, ki so jih načrtovali in pripravili v mešani raziskovalni skupini, sestavljeni iz raziskovalcev farmacevtske družbe Lek d.d. (Sandoz Biofarmacevtika) in Kemijskega inštituta v Ljubljani (Oddelek za biosintezo in biotransformacije, L-11).

Pregled uporabljenih vzorcev:

- TNF- α (LK-800) → nativni TNF- α ,
- H7dN6-TNF → analog, pripravljen z delecijo 6 aminokislin na N-koncu molekule in dodatek 7 histidinov na N-koncu.
- LK-801 → analog, pripravljen z zamenjavo glutaminske kisline s histidinom na mestu 107 ter z zamenjavo glicina s histidinom na mestu 108.

3.2.2 Kemikalije

Preglednica 2: Pregled in opis uporabljenih kemikalij.

Ime kemikalije	Opis kemikalije (proizvajalec, kataloška številka, serija)
HEPES (2-[4-(2-hidroksietil) piperazin-1-il] etanesulfonska kislina)	Sigma, Kat.št.:H-7523, Lot: 091M54251V
Natrijev klorid (NaCl)	Sigma, Kat.št.: S-6191, Lot: 031K01142 ter Merck, Kat.št.: 1.06404.0500, Lot: K44165104 308
Imidazol	Sigma, Kat.št.: 56749, Lot: BCBH9736V
Bakrov sulfat pentafidrat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	Sigma, Kat.št.: 209198-250g, Lot: BCBF1591V
Etilendiamintetraocetna kislina (EDTA)	Sigma, Kat.št.: E-5134, Lot: 041M0133V
Kalijev klorid (KCl)	Merck, Kat.št.: 1.04933.0500, Lot: A0119133007
Dinatrijev hidrogenfosfa (Na_2KPO_4)	Merck, Kat.št.: 1.06586.0500, Lot: A0119133007
Kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4)	Merck, Kat.št.: 1.04873.1000, Lot: A0263573 12
Kalijev klorid (KCl)	Merck, Kat.št.: 1.09057.1000, Lot: HC142134
Dikalijev hidrogenfosfat (K_2HPO_4)	Merck, Kat.št.: 1.05104.1000, Lot: AM0419904327
Natrijev hidroksid (NaOH)	Sigma, Kat.št.: S5881, Lot: BCBH9037V
MES SDS Running Bufer	Thermo Fisher Scientific, Kat.št.: NP0002, Lot: 988407
NuPAGE Novex Bis-Tris Mini Gels, 12% Bis-Tris Gel (1.0mm x 10well)	Thermo Fisher Scientific, Kat.št.: NP0341BOX, Lot: 9080475
Novex Sharp, Upstained Protein Standard Simply blue SafeStain	Thermo Fisher Scientific, Kat.št.: LC5801, Lot: S04329 Invitrogen, Kat.št.: LC6060, Lot: 1254258

3.2.3 Raztopine

3.2.3.1 Mobilne faze

- Mobilna faza A1: 20 mM HEPES, 0,5 M NaCl, 2 mM imidazol, pH=7,5
- Mobilna faza A2: 20 mM K-fosfat, 0,5 M NaCl, 2 mM imidazol, pH=7,5
- Mobilna faza B1: 20 mM HEPES, 0,5 M NaCl, 0,5 M imidazol, pH=7,5
- Mobilna faza B2: 20 mM K-fosfat, 0,5 M NaCl, 0,5 M imidazol, pH=7,5
- Mobilna faza B3: 20 mM HEPES, 0,5 M NaCl, 1 M imidazol, pH=7,5
- Mobilna faza B4: 20 mM HEPES, 0,5 M NaCl, 0,6 M imidazol, pH=7,5
- Mobilna faza C1: 50 mM CuSO₄·5H₂O, 0,5 M NaCl, pH=4,0
- Mobilna faza D1: 50 mM EDTA, 0,5 M NaCl, pH=7,0

Vsem mobilnim fazam smo umerili pH vrednost z dodatkom HCl oz. NaOH do željene končne pH vrednosti. Mobilne faze smo dobro premešali, jih prefiltrirali skozi 0,22 µm filter ter jih v ultrazvočni kopeli pri sobni temperaturi razplinjali približno 10 minut.

3.2.3.2 Pufri za pripravo vzorcev

- Priprava 1x fosfatnega pufra (PBS) (Phosphate-buffered ..., 2006):

Za pripravo 1 l 1x fosfatnega pufra smo zatehtali:

- 8 g NaCl do končne koncntracije 137 mM
- 0,2 g KCl do končne koncntracije 2,7 mM
- 1,44 g Na₂HPO₄ do končne koncntracije 10 mM
- 0,24 g KH₂PO₄ do končne koncntracije 1,8 mM

Vse zatehtane kemikalije smo raztopili v 800 ml ultra čiste vode (Milli-Q), ki smo jo pridobili s sistemom za pripravo ultra čiste vode, nato smo umerili pH vrednost na 7,4 z 1 M raztopino HCl, nato v merilni bučki dopolnili z Milli-Q vodo do oznake ter na koncu prefiltrirali skozi 0,22 µm filter.

PBS smo tekom poskusov uporabljali za redčenje vzorcev do željene koncentracije.

- Priprava štirih kalijev-fosfatnih pufrov za testiranje izmenjave podenot pri različnih pH vrednostih ter v primeru dodatka NaCl

Priprava 0,1 M K-fosfatnih pufrov je potekala v več fazah:

a) Priprava 1 M KH_2PO_4 in 1 M K_2HPO_4

Za pripravo 0,5 l raztopine 1 M KH_2PO_4 z molsko maso $136,09 \text{ g mol}^{-1}$ smo zatehtali 68,045 g KH_2PO_4 .

Za pripravo 0,5 l raztopine 1 M K_2HPO_4 z molsko maso $174,18 \text{ g mol}^{-1}$ smo zatehtali 87,09 g K_2HPO_4 .

Vsako zatehtano kemikalijo smo v svoji 500 ml meritni bučki dopolnili z Milli-Q vodo do oznake ter nato prelili v čašo in dobro premešali z magnetom in magnetnim mešalom.

b) Redčenje 1 M KH_2PO_4 in 1 M K_2HPO_4

Oba pufra smo razredčili do 0,1 M in pripravili:

- 0,1 M KH_2PO_4 : 200 ml 1 M pufra KH_2PO_4 + 1800 ml Milli-Q vode
- 0,1 M K_2HPO_4 : 200 ml 1 M pufra K_2HPO_4 + 1800 ml Milli-Q vode
- 0,1 M KH_2PO_4 + 0,5 M NaCl: 200 ml 1 M pufra KH_2PO_4 + 58,44 g NaCl + 1800 ml Milli-Q vode
- 0,1 M K_2HPO_4 + 0,5 M NaCl: 200 ml 1 M pufra K_2HPO_4 + 58,44 g NaCl + 1800 ml Milli-Q vode

Vsek pripravljen pufer smo dobro premešali z magnetnim mešalom.

c) Priprava 0,1 M K-fosfatnih pufrov

Z različnimi razmerji mešanja 0,1 M pufrov, katerih priprava je opisana pod točko b), smo pripravili 4 različne pufrne raztopine.

Preglednica 3: Pregled priprave pufrov za testiranje izmenjave podenot TNF pri različnih pH vrednostih ter v primeru dodatka NaCl.

Pufrna raztopina	Uporabljeni pufri	pH
0,1 M K-fosfat, pH=5	0,1 M KH_2PO_4 + 0,1 M K_2HPO_4	5
0,1 M K-fosfat, pH=7	0,1 M KH_2PO_4 + 0,1 M K_2HPO_4	7
0,1 M K-fosfat, 0,5 M NaCl pH=5	(0,1 M KH_2PO_4 + 0,5 M NaCl) + (0,1 M K_2HPO_4 + 0,5 M NaCl)	5
0,1 M K-fosfat, 0,5 M NaCl pH=7	(0,1 M KH_2PO_4 + 0,5 M NaCl) + (0,1 M K_2HPO_4 + 0,5 M NaCl)	7

Pri pripravi pufrov smo »in-line« spremljali spremembe pH vrednosti ter pripravili pufre v takšnem razmerju, da smo pripravili pufre željenih pH vrednosti. Vse pufrne raztopine smo nato prefiltrirali skozi $0,22 \mu\text{m}$ filter.

0,1 M K-fosfatne pufre smo uporabili tekom testiranja pogojev izmenjave podenot med nativnim TNF- α in njegovimi analogi. S pufri smo testirali hitrost izmenjave podenot pri različnih pH vrednostih ter vpliv dodane soli.

3.2.4 Oprema in laboratorijski material

Preglednica 4: Pregled in opis uporabljene opreme za izvedbo eksperimentalnega dela.

Oprema	Opis opreme (Proizvajalec, opis)
sistem HPLC	Agilent 1100 serija HPLC sistem, komponente: - vakuumski razplinjevalnik, model G1379A - binarna črpalka, model G1312A - detektor DAD, model G1315B - grelec kolone, model G1316A - avtomatski vzorcevalnik, model G1329A
Centrifuga	Eppendorf 5415R, tip rotorja: F45-24-11
Avtomatske pipete	BIOHIT, - 5000 ml: e5000, 4082225, - 1000 ml: e1000, EP34843, - 100 ml: e120, 8064571, - 10 ml: e10, 4092369
Zamrzovalnik	Sanyo, Ultra-low Temperature Freezer MDF-U74V, -80 °C
Ultrazvočna kopel	Sonis, Ultrasonic Cleanser 65080
Vakuumska črpalka	Millipore, št. modela: WP6122050
pH meter	Metrohm 780, serijska št.: 1780001025293 elektroda: kataloška št.:60258600, LOT: 00262038
Analitska tehnika	Mettler Toledo XP205DR, serijska št.: 11282805094
Sistem za pripravo ultra čiste vode	Millipore, MilliQ Advantage A10, serijska št.: F3CA51240E
Magnetni mešalnik	Velp scientifica, kataloška št.: F202A0175, serijska št.: 247519
Programska oprema za obdelavo kromatogramov	Waters, Empower 3
Kromatografska kolona	- Dionex, ProPac™ IMAC-10 (4x250mm), Lot: 2008-22-185, št.proizvoda: 063278, serijska št.: 001083

3.3 METODE

3.3.1 Razvoj metode HPLC za študij asocijacije in disocijacije podenot TNF

Za opazovanje izmenjave podenot homotrimernega proteina TNF- α je primernih več analitskih metod, vendar smo se zaradi razširjenosti in natančnosti odločili za razvoj metode HPLC.

Pri razvoju nove analitske metode HPLC smo najprej pregledali navodila in priporočila proizvajalca kolon (ProPac™ ..., 2012) ter pripravili mobilne faze, ki jih priporočajo v navodilih za kolono ProPac™ IMAC-10. V primeru, ko je kelirajoči ligand IDA, velja, da afiniteta proteinov pada v naslednjem vrstnem redu kelatnih ionov: $Cu^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+} \geq Co^{2+}$ (Gaberc-Porekar in Menart, 2001). Zadrževanje proteina na koloni (t.i. retencijski

čas) je premosorazmerno z afiniteto proteinov do kelatnih ionov na koloni. Za razvoj metode za izmenjavo podenot je pomembno, da se protein čim dlje zadrži na koloni, zato smo se sprva odločili za nasičenje kolone z bakrovimi ioni.

3.3.1.1 Vzpostavljanje metode

Sprva smo uporabili MFA1, MFB1, MFC1, MFD1 (priprava mobilnih faz je prikazana v poglavju 3.2.3.1.). Izbrali smo kromatografsko kolono z interno oznako 65A ter po vzpostavljivosti sistema HPLC kolono nasitili z bakrovimi ioni po sledečem zaporedju:

- spiranje kolone z 10 volumni kolone MFD1: EDTA spere morebitne ostanke kovinskih ionov iz kolone,
- spiranje kolone z 10 volumni kolone MFB1: spiranje ostankov EDTA reagenta iz kolone,
- nasičenje kolone z 10 ml MFC1: vezava Cu^{2+} na kolono za vezavo proteinov,
- spiranje kolone s 30 volumni kolone MFB1: nasičenje kolone z imidazolom,
- kondicioniranje kolone s 5 volumni kolone MFA1: nasičenje in vzpostavljanje delovnih pogojev na koloni.

Glede na podatke o koloni smo izračunali volumen kolone po naslednji formuli:

$$\begin{aligned} V_K &= \pi \cdot r^2 \cdot L \\ &= \pi \cdot 0,2^2 \text{ cm}^2 \cdot 25 \text{ cm} \\ &= 3,14 \text{ cm}^3 = 3,14 \text{ ml} \end{aligned} \quad \dots (2)$$

V_K - volumen kolone (ml)

r - polmer kolone (cm)

L - dolžina kolone (cm)

Preglednica 5: Pregled časa spiranja z določeno mobilno fazo v primeru nasičenja kolone s kovinskimi ioni.

Pretok (ml/min)	Oznaka mobilne faze	Čas spiranja (min)
0,5	D1	63
0,5	B1	63
0,5	C1	63
0,5	B1	188
0,5	A1	31

Po končani nasičevalni sekvenci smo na tako pripravljeni koloni na sistemu HPLC z uporabo preprostega gradiента testirali vezavo vzorca s histidinskim podaljškom (H7dN6-TNF) ter nesposobnost vezave vrha brez histidinskega podaljška (LK800).

Preglednica 6: Prikaz prvotno uporabljenega gradiента, s katerim smo testirali vezavo vzorca H7dN6-TNF in LK800.

Instrumentalna metoda: IMAC_1_BIO_HPLC2			
Čas (min)	Pretok (ml/min)	%MFA	%MFB
0,0	0,5	100	0
22,0	0,5	100	0
38,0	0,5	30	70
38,5	0,5	0	100
47,0	0,5	0	100
47,5	0,5	100	0
58,0	0,5	100	0

Za tem smo se lotili optimizacije sestave mobilnih faz, načina detekcije ter optimizacije separacije.

3.3.1.2 Optimizacija sestave mobilnih faz

Pri optimizaciji sestave mobilnih faz uporabljenih za razvoj metode, smo najprej testirali uporabo različnih pufrnih sistemov in vpliv na elucijo vrhov na kromatogramu. Pripravili smo mobilne faze A in B z enako molarnostjo vseh komponent, spremenili smo le uporabo reagenta HEPES s K-fosfatom.

Preglednica 7: Prikaz gradiента, ki smo ga uporabili za testiranje razlike med HEPES in K-fosfatnim pufrnim sistemom.

Instrumentalna metoda			
Čas (min)	Pretok (ml/min)	%MFA	%MFB
0,0	0,5	100	0
22,0	0,5	100	0
37,5	0,5	30	70
38,0	0,5	0	100
47,0	0,5	0	100
47,5	0,5	15	85
47,7	0,5	100	0
57,0	0,5	100	0

Po pregledu kromatogramov, posnetih z uporabo HEPES in K-fosfatnega pufrnega sistema, smo optimirali sestavo mobilne faze, potrebne za elucijo analoga H7dN6-TNF. Spremenili smo koncentracijo imidazola v mobilni fazi B, ki je ključnega pomena, da se molekule, ki se vežejo na Cu^{2+} , eluirajo iz kolone. Princip vezave namreč poteka tako, da se proteini z elektron-donorsko skupino prek koordinativnih vezi vežejo na imobiliziran kovinski ion. Proteini se po vezavi lahko eluirajo iz kromatografske kolone s protonacijo, z izmenjavo liganda ali z močnejšim kelatorjem (Gaberc-Porekar in Menart, 2001). Za elucijo analogov TNF- α smo uporabili postopek z izmenjavo liganda, saj protonacija privede do znižanja pH vrednosti (nižje od pH=5) in s tem do izgube biološke aktivnosti molekule TNF- α in njenih analogov zaradi delne denaturacije (Menart, 2000), z močenjšim

kelatorjem (EDTA) pa bi iz kolone eluirali tudi kovinske ione. Zato smo pri optimizaciji vsebnosti imidazola v MFB pripravili različno molarne raztopine imidazola (0,5 M, 0,6 M in 1 M).

3.3.1.3 Optimizacija detektorskih nastavitev

Detektor je pomemben del sistema HPLC. Izbor detektorja poteka na podlagi kemijske strukture analita, morebitnih interferenc (ozadje, druge komponente v vzorcu) ter razpoložljivost in cene detektorja. Za začetne poskuse smo se odločili uporabiti najbolj vsestranski UV/VIS detektor, ki ima območje absorpcije v UV-vidnem delu spektra. Optimizacija detektorskih nastavitev pri instrumentih HPLC obsega več različnih parametrov: dolžina poti pretočne celice, širina vrha (odzivni čas), vzorčna in referenčna valovna dolžina ter pasovna širina, širina reže in drugo.

Pri optimizaciji dolžine poti pretočne celice smo se oprli na Beer-Lambertov zakon, ki prikazuje linearno povezavo med dolžino poti pretočne celice in absorbanco.

Beer-Lambertov zakon:

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l \quad \dots (3)$$

- A - absorbanca
- ϵ - molarni ekstinkcijski koeficient ($l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)
- C - koncentracija ($g \cdot l^{-1}$ ali $mg \cdot l^{-1}$)
- l - dolžina poti pretočne celice (mm)

Iz tega vidimo, da celice z daljšo dolžino poti oddajo večje signale, hkrati pa se z daljšo dolžino poti veča tudi šum. Zato je pomembno, da pri optimizaciji dolžine poti pretočne celice spremljamo razmerje signal/šum (angl.: signal to noise ratio) (Agilent 1100 ..., 2004).

Pri optimizaciji detektorskih nastavitev je najpomembnejša optimizacija vzorčnih in referenčnih valovnih dolžin in pasovnih širin. Vzorčna valovna dolžina je središče valovne dolžine območja, katerega širina predstavlja vzorčna pasovna širina, medtem ko velja, da je referenčna valovna dolžina središče valovne dolžine območja, katerega širina predstavlja referenčna pasovna širina. Signal obsega serije podatkov v nekem časovnem obdobju s povprečno absorbancijo območja vzorčne valovne dolžine od katerega se odšteje povprečno absorbancijo območja referenčne valovne dolžine (Agilent 1100 ..., 2004). Pri optimizaciji smo sprva poskušali najti najbolj optimalno valovno dolžino, uporabili smo valovni dolžini 214 in 280 nm. Pri 214 nm absorbira peptidna vez, medtem ko pri 280 nm absorbirajo aromatske aminokisline, kot so fenilalanin, tirozin in triptofan, ki jih najdemo znotraj molekule TNF- α . Referenčno valovno dolžino smo nastavili na 360 nm, saj pri tej valovni

dolžini ne absorbirajo komponente uporabljenega vzorca, hkrati pa je takšna referenčna valovna dolžina pogosto uporabljena pri analizi proteinskih vzorcev.

Preglednica 8: Pregled testiranih vzorčnih valovnih dolžin.

Kanal	Vzorčna		Referenčna	
	valovna dolžina [nm]	pasovna širina [nm]	valovna dolžina [nm]	pasovna širina [nm]
1	280	100	360	100
2	214	16	360	100

Zatem smo uporabili različne vzorčne pasovne širine in različne referenčne valovne dolžine ter referenčne pasovne širine. V preglednici 9 so prikazane vse testirane kombinacije.

Preglednica 9: Pregled testiranih vzorčnih pasovnih širin ter referenčnih valovnih dolžin in pasovnih širin, pri vzorčni valovni dolžini 280 nm.

Kanal	Vzorčna		Referenčna	
	valovna dolžina [nm]	pasovna širina [nm]	valovna dolžina [nm]	pasovna širina [nm]
1	280	100	360	100
2	280	10	360	100
3	280	10	450	100
4	280	10	/	/
5	280	32	450	100

3.3.1.4 Optimizacija HPLC separacije

Princip separacije je lahko izokratski ali gradientni. Izokratski način pomeni, da tekom celotne separacije znotraj kolone vladajo ravnotežni pogoji zaradi stalne sestave eluenta in zato je hitrost pomikanja analita znotraj kolone stalna. Prav tako so stalne interakcije med analitom in eluentom ter analitom in stacionarno fazo. Ravno zato je izokratska separacija bolj predvidljiva, vendar lahko s takšnim načinom ločimo majhno število komponent. Gradientna separacija po drugi strani omogoča, da zmanjšamo širino kromatografskega vrha in povečamo učinkovitost separacije, lahko preučujemo vzorce z več komponentami ter z uvedbo strmega ali plitvega gradiента opazujemo razlike v selektivnosti (Gupta in sod., 2012). Zaradi izmenjave podenot med nativnimi TNF- α in konjugati s pripetimi tremi histidinskimi podaljški (en His-tag na vsaki podenoti) pričakujemo, da bomo v raztopini dobili nativne TNF- α , ki se ne bodo vezali na kovinske ione, TNF- α z izmenjano eno podenoto, ki se bo šibko vezala na kolono, TNF- α z dvema podenotama s histidinskim podaljškom ter konjugate, ki imajo na vseh treh podenotah histidinski podaljšek in se na kolono vežejo najmočneje. Zato smo se odločili, da izberemo gradientni pristop, ki omogoča vpeljavo različnih koncentracij imidazola, da se eluira vsaka od teh različic TNF- α . Za najoptimalnejši gradient smo preverili različne strmine gradiента, gradientne skoke,

dolžino časa elucije ter pretoke mobilne faze. Različni gradienti so prikazani skupaj s kromatogrami v poglavju 4.1.3 Rezultati optimizacije separacije.

3.3.2 Kvalifikacija metode

Po opravljenem razvoju metode smo se za namene potrditve ustreznosti metode odločili za validacijo oz. kvalifikacijo metode. Validacija analitske metode je definirana kot proces, s katerim z laboratorijskimi študijami potrdimo, da izvedbene karakteristike metode ustrezano zahtevam za predvidene aplikacije (United ..., 2014). Validacijo je treba izvesti preden metodo uporabimo za analitiko v laboratorijih, ki delujejo v skladu z dobro proizvodnjo prakso (angl.: good manufacturing practice, GMP). Obseg validacije je odvisen od namena uporabe analitske metode in od razvojne stopnje produkta. Ustrezost novo razvite analitske metode lahko v določenih primerih dokažemo tudi s kvalifikacijo metode. Kvalifikacijo metode izvedemo v primeru, ko metodo uporabljam v razvojne namene in ne v okolju GMP, zaradi česar nam rezultati kvalifikacije podajo zgolj informativno oceno ustreznosti in bi v primeru uporabe metode v okolju GMP morali ponovno opravljati poizkuse natančno po farmakopejskih določilih. Postopki kvalifikacije se razlikujejo glede na namen uporabe metode. Zaradi uporabe metode IMAC za preučevanje asociacije in disociacije podenot dejavnika TNF- α v razvojne namene, smo se odločili izvesti kvalifikacijo metode. Tekom kvalifikacije smo se opirali na smernice ICH (International ..., 2005) v katerih so zbrani izrazi in njihove definicije, ki so pomembni za validacijo oz. kvalifikacijo metode.

V smernicah ICH so predstavljeni širje tipi najpogosteje uporabljenih analitskih postopkov:

- identifikacijski testi,
- kvantitativne določitve vsebnosti nečistoč,
- limitni testi za kontrolo nečistoč,
- kvantitativni testi za določitev vsebnosti glavne sestavine v učinkovini ali izdelku oz. vsebnosti drugih izbranih komponent izdelka (International ..., 2005).

Preglednica 10: Analitski parametri, ki jih testiramo pri validaciji (kvalifikaciji) različnih analitskih postopkov (International ..., 2005).

Analitski parametri	Identifikacija	Analize nečistoč		Vsebnost
		Kvantitativna določitev	Limitni test	
Točnost	-	+	-	+
Natančnost				
-Ponovljivost	-	+	-	+
-Vmesna natančnost	-	+ ⁽¹⁾	-	+ ⁽¹⁾
Specifičnost ⁽²⁾	+	+	+	+
Meja zaznavnosti	-	- ⁽³⁾	+	-
Meja kvantifikacije	-	+	-	-
Linearnost	-	+	-	+
Območje	-	+	-	+

- parameter se običajno ne preverja

+ parameter se običajno preverja

⁽¹⁾ Kadar se izvede obnovljivost (»reproducibility«), ta parameter ni potreben

⁽²⁾ Če ena metoda ni specifična, se ta parameter lahko preveri z drugim analitskim postopkom

⁽³⁾ Ta parameter je včasih potreben za nekatere teste

Odločili smo se, da bomo testirali parametre za skrajšano obliko analize vsebnosti proteina TNF- α in njenih analogov v vzorcih LK800, H7dN6-TNF ter LK800 + H7dN6-TNF, ki je namenjena za merjenje prisotnosti preiskovane substance v vzorcu. Metoda za vsebnost predstavlja kvantitativno merjenje glavnih sestavin v učinkovini. Skrajšano obliko analize vsebnosti smo izvedli zato, ker smo želeli s kvalifikacijo le potrditi, da je razvita metoda ustrezna za uporabo v razvojne namene. Zato smo se kvalifikacije lotili s preučevanjem naslednjih parametrov:

- Linearnost
- Natančnost:
 - Ponovljivost
- Specifičnost

3.3.2.1 Preverjanje linearnosti metode

Linearnost analitske metode je sposobnost pridobiti rezultate, ki so na definiranem območju direktno proporcionalni koncentraciji analizirane snovi v vzorcih (International ..., 2005). Pripravili smo dve različni redčini vzorca H7dN6-TNF ter nato prilagajali volumen injiciranja na sistem HPLC tako, da smo imeli 3 različne volumne injiciranja vzorca pri vsaki koncentraciji oz. 6 različnih nanosov na kolono. Vzorec smo najprej redčili iz začetne koncentracije 2,37 mg/ml do končne koncentracije 1 mg/ml.

$$V_v \cdot c_v = V_k \cdot c_k \quad \dots (4)$$

$$\begin{aligned}V_k &= c_v \cdot V_v / c_k \\V_v &= 900 \mu\text{l} \\c_v &= 2,37 \mu\text{g} / \mu\text{l} \\c_k &= 1 \mu\text{g} / \mu\text{l} \\V_k &= 2133 \mu\text{l}\end{aligned}$$

Redčenje vzorca do koncentracije 1 mg/ml:
 900 μl H7dN6-TNF [2,37 mg/ml] + 1233 μl PBS.

Nato smo vzorec s koncentracijo 1 mg/ml redčili do koncentracije 0,5 mg/ml in sicer:
 100 μl H7dN6-TNF [1 mg/ml] + 100 μl PBS.

Linearnost metode smo zatem ponovno testirali, saj smo želeli preveriti linearnost metode pri višjih koncentracijah in tako določiti območje linearnosti metode. Uporabili smo neredčen vzorec H7dN6-TNF s koncentracijo 2,37 mg/ml in vzorec redčen do koncentracije 1 mg/ml (redčenje je prikazano v enačbi 4).

3.3.2.2 Preverjanje ponovljivosti metode znotraj natančnosti

Natančnost je stopnja ujemanja posameznih rezultatov, če izvedemo analizo z več paralelkami homogenega vzorca. Natančnost analitske metode je lahko merilo stopnje ponovljivosti, obnovljivosti analitske metode pri normalnih delovnih pogojih ali določanje natančnosti med različnimi laboratoriji (International ..., 2005). Preverjanje ponovljivosti metode smo izvedli s 6-kratnim injiciranjem vzorca H7dN6-TNF s koncentracijo 1 mg/ml, znotraj iste kromatografske sekvence. Vzorec H7dN6-TNF s koncentracijo 2,37 mg/ml smo po enačbi 4 redčili do končne koncentracije 1 mg/ml.

3.3.2.3 Preverjanje specifičnosti metode

Specifičnost analitske metode je sposobnost nedvoumno oceniti analizirano snov v prisotnosti sestavin, ki jih v vzorcu lahko pričakujemo. Te sestavine so lahko nečistoče, razkrojni produkti in komponente placebo (International ..., 2005). Specifičnost metode smo potrdili z metodo poliakrilamid gelske elektroforeze v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS-PAGE).

Princip delovanja SDS-PAGE temelji na ločitvi molekul na osnovi njihove mase. Poliakrilamidni gel deluje kot sito v katerem se majhne molekule gibljejo hitreje, velike počasneje, tiste, ki so večje od por v gelu pa ne morejo potovati. Poliakrilamidni gel je gosto premrežen in zato primeren za ločevanje proteinov. V takšnem sistemu poznamo zgornji koncentracijski gel, ki je manj zamrežen in spodnji separacijski gel, s čimer omogočamo enak začetni položaj vsem molekulam. Strjen gel, ki ga navadno vlijemo med dve stekleni plošči, oblijemo z ustreznim pufrom ter priključimo na električno napetost. Po priključitvi začnejo ioni iz koncentracijskega gela in pufrov potovati proti ustreznim

elektrodam in sicer anioni proti anodi ter kationi proti katodi. Pri potovanju skozi koncentracijski gel se vsi proteini skoncentrirajo v ozkem pasu nato se ob prehodu v separacijski gel njihovo potovanje upočasni in začne se ločevanje na osnovi mase (Kočevar in sod., 2007).

Preverjanja specifičnosti metode smo se lotili tako, da smo ob injiciranju vzorca LK800 in H7dN6-TNF s pomočjo računalniškega programa Empower 3 opazovali pojavnost vseh vrhov na kromatogramu ter jih z metodo zbiranja frakcij zbrali. Ko je vzorec potoval iz detektorske celice v odpad, smo prestregli vsebino ter zbirali frakcije vzorca v mikrocentrifugirke, ki smo jih menjavali na eno minuto. Na koncu smo imeli zbrane frakcije na mestih, kjer se je v kromatogramih pojavit kakršnikoli vrh. Frakcije smo ustrezno označili po minutah vzorčenja, zato smo se lahko odločili katere frakcije bomo testirali z metodo SDS-PAGE.

Za testiranje specifičnosti smo uporabili štiri predpripravljene gele, primerne za optimalno ločevanje in resolucijo majhnih do srednje velikih proteinov (1-200 kDa). Za vzorec LK800 smo uporabili dva gela, in sicer za reducirane in nereducirane vzorce, ter prav tako dva gela za vzorec H7dN6-TNF. V nereducirajoči različici SDS-PAGE proteine tretiramo le z SDS, ki je močan detergent in povzroči razvitje nativnih proteinov v posamezne polipeptide, medtem ko pri reducirajoči različici proteine dodatno denaturiramo z dodatkom reducenta ditiotreitol (DTT), ki reducira disulfidne povezave. Z dodatkom DTT se izognemo nastanku nekaterih oblik terciarnega zvijanja proteinov, ki bi se v primeru nereducirajoče metode lahko pojavile, in povzročimo razpad kvartarnih proteinskih struktur. Uporabili smo gel z 12% poliakrilamidnim deležem in z 10 žepki za nanašanje vzorca.

Po končanem zbiranju frakcij in izboru ustreznih gelov smo po postopku, ki ga predpisuje proizvajalec predpripravljenih gelov pripravili vzorce, kar je opisano v preglednici 11 (NuPAGE ..., 2013).

Preglednica 11: Prikaz priprave in volumena nanosa različnih tipov vzorcev, ki smo jih testirali z metodo SDS-PAGE.

Tip vzorca	Priprava	Nanos [μl]
Reducirani vzorci	26 μl vzorca + 4 μl reducenta + 10 μl 4x LDS nalagalni pufer	35
Nereducirani vzorci	26 μl vzorca + 4 μl MilliQ vode + 10 μl 4x LDS nalagalni pufer	35
Kontrola (reduciran TNF-α)	5 μl TNF-α + 15 μl MilliQ vode + 5 μl reducenta + 25 μl 4x LDS nalagalni pufer	35
Kontrola (nereduciran TNF-α)	5 μl TNF-α + 20 μl MilliQ vode + 25 μl 4x LDS nalagalni pufer	35

Vzorce smo nato inkubirali 10 minut pri 70 °C. Zatem smo pripravili ustrezeno količino pufra, potrebnega za pripravo 4 gelov:

$$1520 \text{ ml MilliQ} + 80 \text{ ml MES SDS ločevalni pufer (20x)} = 1600 \text{ ml ločevalni pufer (1x)}$$

Gele smo pred začetkom elektroforeze pripravili tako, da smo žepke vsakega gela 3x sprali z ločevalni pufer (1x). Nato smo gele namestili v elektroforezno kadičko, žepke zapolnili z ločevalni pufer (1x) ter v žepke nanesli ustrezeno količino vzorca (priprava vzorcev in nanos sta opisana v preglednici 11).

Elektroforeza je potekala pri napetosti 200 V, toku 125 mA/gel približno 35 minut. Sledilo je barvanje z barvilm Comassie modro, ki omogoča hitro in občutljivo zaznavanje proteinov (SimplyBlue™SafeStain), po postopku, opisanem na proizvajalčevi spletni strani (SimplyBlue™ ..., 2012). Postopek:

- spiranje gelov 3-krat po 5 minut s 100 ml Milli-Q vode, s čimer smo odstranili SDS in soli v pufru, saj vplivajo na vezavo barvila na proteine,
- barvanje gelov v toliko barvila, da so bili geli popolnoma prekriti. Barvanje je potekalo 1 uro pri sobni temperaturi, na mešalniku,
- spiranje gelov s 100 ml Milli-Q vode 1 uro.

Pobarvane gele smo fotografsko dokumentirali.

3.3.3 Spremljanje izmenjave podenot TNF

Po končani kvalifikaciji metode smo metodo uporabili za spremljanje izmenjave podenot med nativnim TNF- α (LK800) ter analogom TNF- α (H7dN6-TNF). Analog H7dN6-TNF se prek koordinativnih vezi zaradi vpeljave histidinskih značk na vse tri podenote TNF- α dobro veže na kovinske ione, s katerimi smo nasitili kolono, medtem ko se nativni TNF- α , ki nima vpeljanih histidinskih značk, na kovinske ione ne veže.

Izmenjava podenot je proces, ki je odvisen od pH vrednosti raztopine v kateri izmenjava poteka ter temperature inkubacije vzorcev (Menart, 2000), na stabilnost proteina pa naj bi imela vpliv tudi prisotnost oz. odsotnost soli (Dominy in sod., 2002). Zato smo se odločili, da te parametre vključimo v poskus spremljanja izmenjave podenot.

Ker smo želeli spremljati vpliv pH vrednosti in prisotnost soli v pufru, smo z ultrafiltracijo zamenjali raztopine, v kateri se nahajajo vzorci. Pri ultrafiltraciji uporabimo membrane s porami določene dimenzije, ki prepuščajo le molekule in ione topila in topljencev z manjšo molekulsko maso. Lahko se uporablja za koncentriranje raztopin proteinov ali za izmenjavo pufrov, ki jo dosežemo z večkratnim postopkom koncentriranja in redčenja z želenim pufrom. Pretok skozi membrano lahko pri vzorcih z manjšim volumnom (do 20

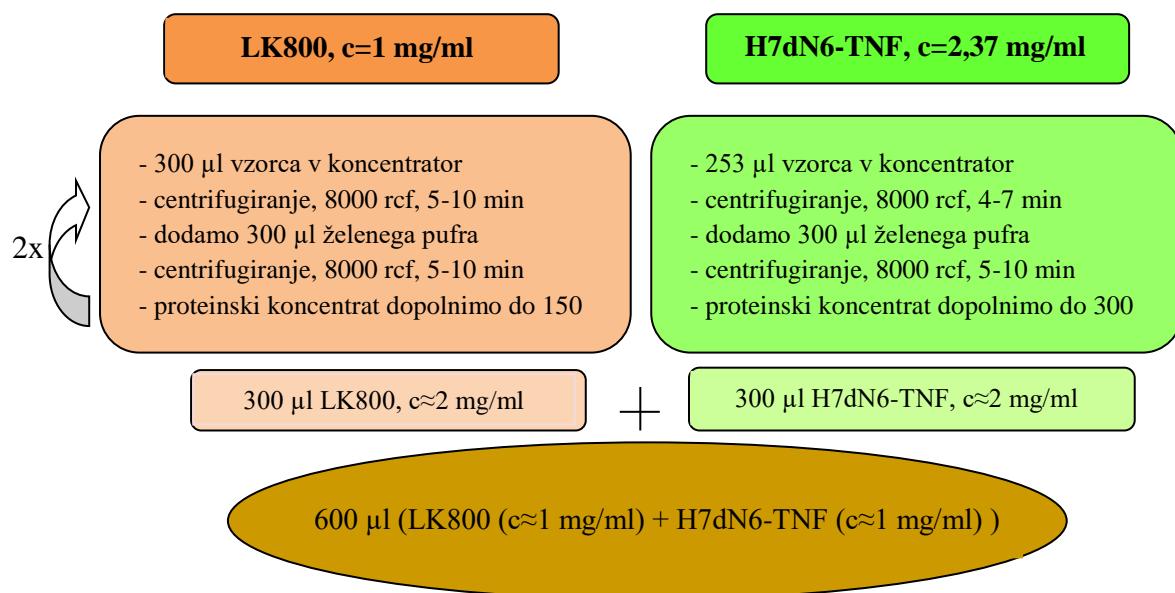
ml) dosežemo s centrifugalno silo v posebnih filternih enotah, t.i koncentratorjih (Voet in sod., 1999).

Za zamenjavo pufra v vzorcih smo sprva pripravili pufrne raztopine:

- 0,1 M K-fosfat, pH=5,
- 0,1 M K-fosfat, pH=7,
- 0,1 M K-fosfat, 0,5 M NaCl pH=5,
- 0,1 M K-fosfat, 0,5 M NaCl pH=7,

kot je opisano pod točko 3.2.3.2 Pufri za pripravo vzorcev. Za izmenjavo pufrov smo porabili filtrne enote Microcon YM-10 (Millipore, Amicon), katerih največji volumen je 500 µl in prepuščajo delce, ki so manjši od 10000 Da.

Pripravljeni alikvoti vzorcev so bili shranjeni zamrznjeni pri -80 °C, zato smo alikvote vzorcev LK800 najprej odmrznili in nato združili (s koncentracijo 1 mg/ml) ter na enak način združili alikvote vzorcev H7dN6-TNF (s koncentracijo 2,37 mg/ml). Nato smo vsakemu vzorcu zamenjali pufer z želenim pufrom (prikaz na sliki 8).



Slika 8: Prikaz priprave vzorcev za spremljanje izmenjave podenot.

Cel postopek smo ponovili 4-krat, saj smo imeli štiri različne pufre. Pazili smo, da smo vzorca LK800 in H7dN6-TNF vedno zmešali tik pred injiciranjem, da je bil čas injiciranja vedno enak času inkubacije, torej t0.

Pripravili smo kromatografsko sekvenco, kjer smo vzorce, pripravljene na zgoraj opisan način, inkubirali pri 4 °C, t.j. v avtomatskem vzorčevalniku na sistemu HPLC. Nižja

temperatura zmanjša hitrost izmenjave podenot med molekulami TNF- α , zato smo kromatografsko sekvenco prilagodili tako, da smo vzorce inkubirali daljše časovno obdobje. Vzorce smo vedno v enakem zaporedju injicirali tako, kot prikazuje preglednica 12.

Preglednica 12: Pregled zaporedja injiciranja in čas inkubacije vzorcev.

Ime vzorca	Čas injiciranja/čas inkubacije vzorca
H7dN6-TNF+LK800[K-fosf.pH=7]	0h, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h
H7dN6-TNF+LK800[K-fosf.+NaCl_pH=7]	0h, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h
H7dN6-TNF+LK800[K-fosf.pH=5]	0h, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h
H7dN6-TNF+LK800[K-fosf.+NaCl_pH=5]	0h, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h

Med različnimi časi injiciranja smo preračunali, da je od injiciranja prvega vzorca pri t0 in injiciranja prvega vzorca pri t1 minilo ustrezno število ur.

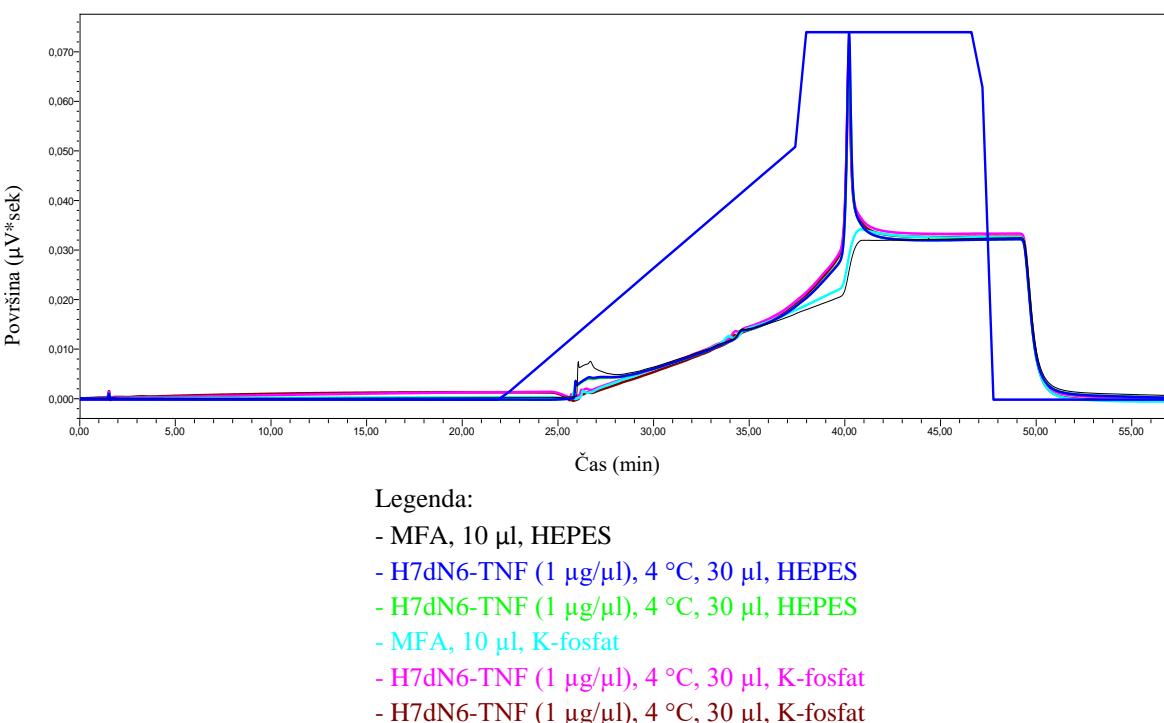
4 REZULTATI

Namen magistrske naloge je bil razvoj analitske metode, ki bo primerna za spremljanje izmenjave podenot TNF- α med molekulami nativne TNF- α in njenim analogom z dodanimi histidinskimi značkami na vsako podenoto. Za doseganje cilja smo najprej metodo razvili, nato metodo kvalificirali ter na koncu preverili uspešnost razvoja metode na modelu asociacije in disociacije podent v raztopini med obema vzorcema.

4.1 REZULTATI RAZVOJA METODE

4.1.1 Rezultati optimizacije sestave mobilnih faz

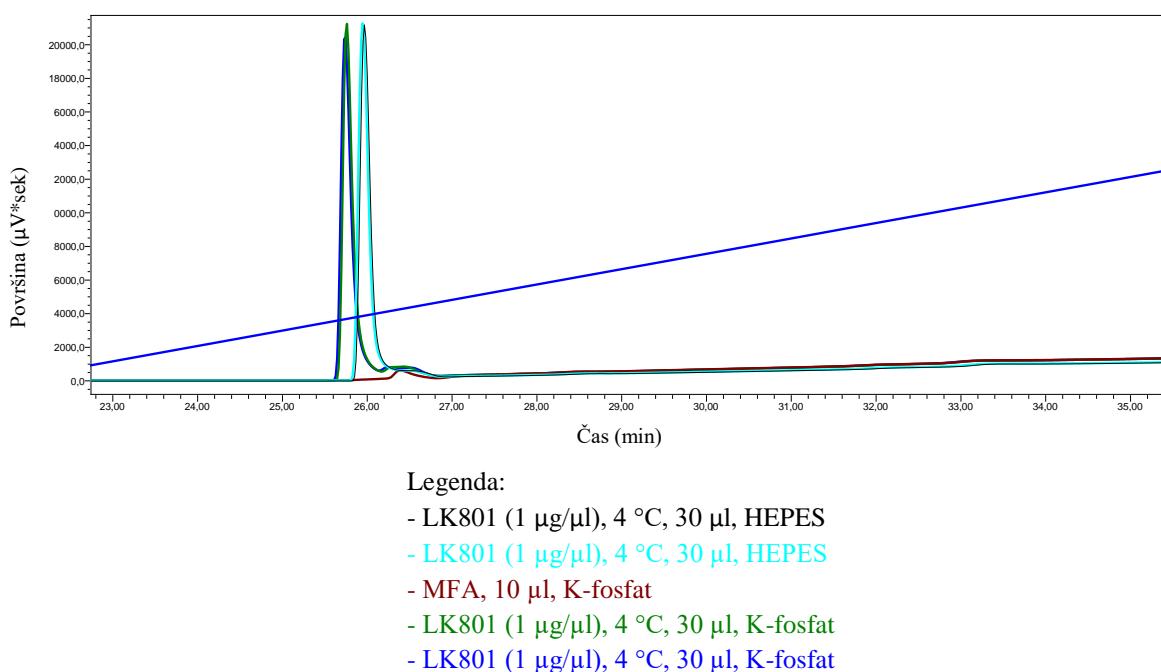
Najprej smo se lotili primerjave različnih mobilnih faz na osnovi dveh različnih pufrnih sistemov. Pripravili smo mobilne faze MFA1, MFA2, MFB1 in MFB2 na osnovi HEPES in K-fosfatnega pufrnega sistema ter primerjali elucijo vrhov na kromatogramih vzorca H7dN6-TNF, dobljenih pri enakem gradientu, isti koloni ter enakih pogojih.



Slika 9: Prikaz kromatogramov vzorca H7dN6-TNF in MFA za primerjavo elucije vrhov pri uporabljenih mobilnih fazah na osnovi HEPES in K-fosfatnega pufrnega sistema. Različne barve kromatogramov predstavljajo različne MFA. Z modro črto je ponazorjen gradient naraščanja MFB (glej tudi poglavje 3.3.1.).

Na prikazanih kromatogramih na sliki 9 vidimo, da ni bistvenih razlik med uporabo HEPES ali K-fosfatnih pufrnih sistemov za analiziranje analogov z vpeljanimi 6 histidini na vsaki podenoti. Iz tega sklepamo, da sta oba pufrna sistema primerna za uporabo pri metodi IMAC kadar analiziramo vzorce s histidinskimi značkami.

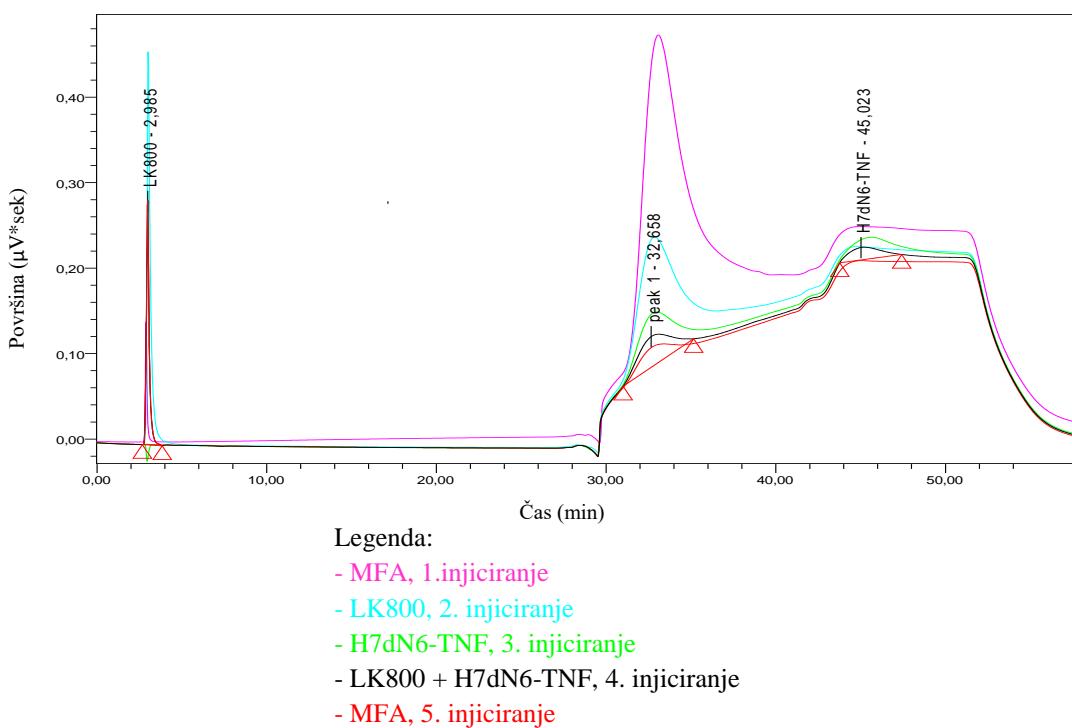
Preverili smo, kako na elucijo vrhov vplivata različna pufrna sistema v primeru analoga LK801, ki ima vpeljana le dva dodatna histidina in ima tako manjšo afiniteto do kovinskih ionov kot H7dN6-TNF.



Slika 10: Primerjava različnih pufrnih sistemov pri eluciji vzorca LK801. Različne barve kromatogramov predstavljajo različne MFA. Z modro črto je ponazorjen gradient naraščanja MFB (tudi poglavje 3.3.1.).

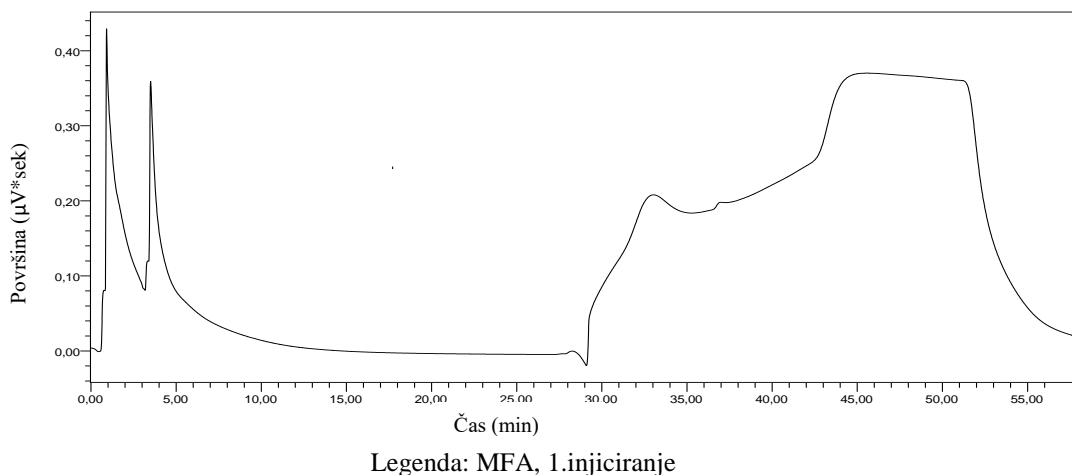
Po primerjavi retencijskih časov smo ugotovili, da se LK801 hitreje eluira iz kolone pri uporabi K-fosfatnega kot HEPES pufrnega sistema. Pri izmenjavi podenot med LK800 in H7dN6-TNF nastanejo proteini, ki imajo histidinske podaljške na dveh ali le na eni podenoti TNF- α in se zato na kovinske ione vežejo šibkeje kot analog H7dN6-TNF. To bi lahko privedlo do podobnega učinka kot v primeru analoga LK801, zato smo se v nadaljevanju odločili, da bomo uporabljali mobilne faze na podlagi HEPES pufrnega sistema.

Po izboru pufrnega sistema smo se lotili optimizacije MFB, saj je ustrezna molarnost imidazola ena izmed najpomembnejših optimizacij pri pripravi mobilnih faz za metodo IMAC. Najprej smo upoštevali navodila proizvajalca kolone in smo zato pripravili mobilno fazo MFB1 z 0,5 M imidazolom. Dobili smo kromatograme, ki so prikazani na sliki 11.



Slika 11: Preverjanje ustreznosti elucije vzorcev LK800 in H7dN6-TNF s pripravljenou mobilno fazou B, ki vsebuje 0,5 M imidazol. Različne barve kromatogramov predstavljajo injiciranja v legendi naštetih vzorcev.

Vrh LK800 se je po pričakovanjih eluiral na začetku, medtem ko se vrh H7dN6-TNF praktično ni pojavil. Iz tega smo sklepali, da je bila molarnost imidazola v MFB1 prenizka, zaradi česar se močno vezani analogi niso eluirali iz kolone. Zato smo pripravili mobilno fazou MFB3 z 1 M imidazolom. Z injiciranjem MFA ter prilagojeno instrumentalno metodo s 100 % MFB3 smo preverili ali se je H7dN6-TNF pri prejšnjih injiciranjih zadržal na koloni zaradi prenizke molarnosti imidazola.



Slika 12: Preverjanje ustreznosti MFB z 0,5 M imidazolom za elucijo vrha H7dN6-TNF.

Izkazalo se je, da je bila molarnost prenizka, saj smo na kromatogramu takoj po injiciranju v 4 min videli zduržen vrh H7dN6-TNF vzorcev H7dN6-TNF in LK800+H7dN6-TNF.

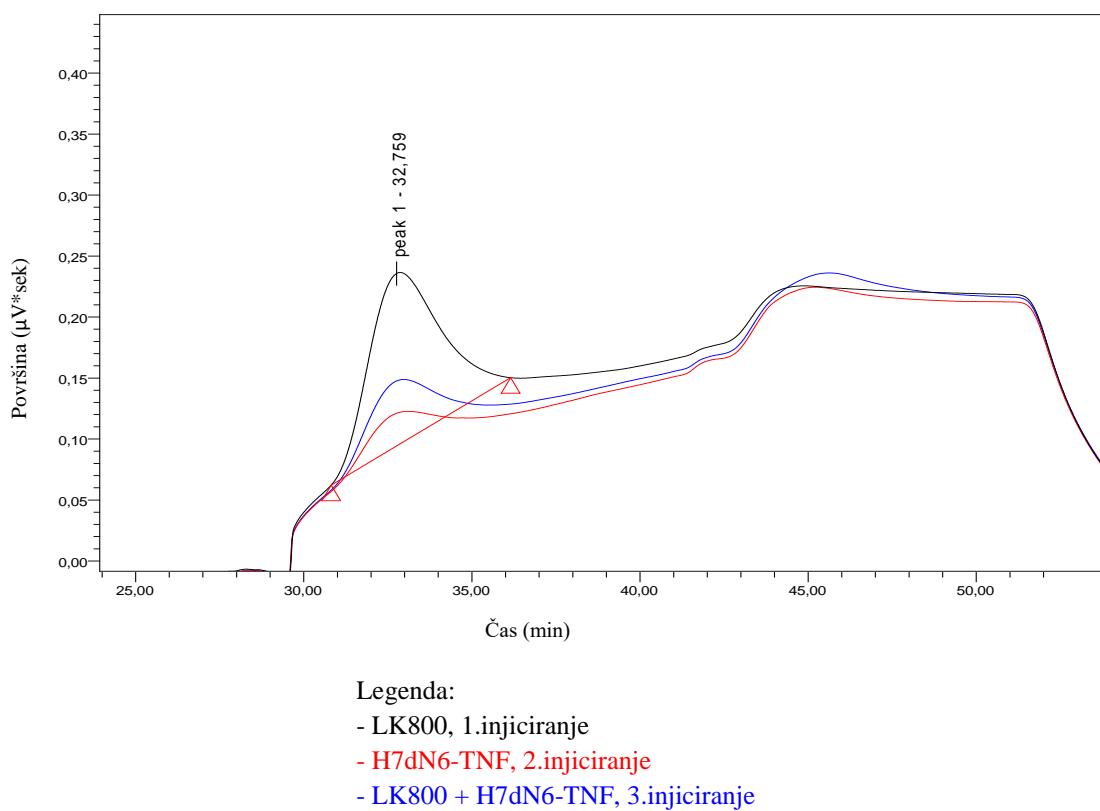
Večja kot je molarnost imidazola v MFB večja je absorbcijska imidazola pri valovni dolžini 280 nm, kar povzroči dvig bazne linije kromatograma. Zato smo zmanjšali molarnost imidazola na najnižjo molarnost, ki bi še omogočala ustreznou elucijo vzorca H7dN6-TNF. Prilagodili smo gradient instrumentalne metode tako, da je bila molarnost imidazola največ 0,6 M.

Preglednica 13: Prilagoditev gradiента instrumentalne metode IMAC_2_BIO_HPLC_2 tako, da je največja molarnost imidazola 0,6 M.

Instrumentalna metoda: IMAC_2_BIO_HPLC_2			
Čas (min)	Pretok (ml/min)	%MFA	%MFB
0,0	0,5	100	0
22,0	0,5	100	0
38,0	0,5	65	35
38,5	0,5	40	60
47,0	0,5	40	60
47,5	0,5	100	0
58,0	0,5	100	0

V naslednji kromatografski sekvenci smo potrdili, da je 0,6 M imidazol v MFB primeren za elucijo vseh vrhov, zato smo v prihodnje uporabljali le MFB z 0,6 M imidazolom ali pa smo uporabljali MFB z 1 M imidazolom in smo prilagodili gradient uporabljeni instrumentalne metode.

Na vseh kromatogramih (tudi na kromatogramu, kjer smo injicirali zgolj MFA) se je pojavil vrh pri 32,7 min, ki se je z vsakim injiciranjem manjšal. Po pregledu UV spektra vseh treh injiciranih vzorcev smo ugotovili, da vrha LK800 in H7dN6-TNF po pričakovanih absorbirata pri valovni dolžini 280 nm, medtem ko vidimo glavno absorbcijsko vrha, poimenovanega kot »peak 1«, pri 237 nm iz česar smo sklepali, da prisoten vrh ni vrh H7dN6-TNF. Končnega vzroka za pojav omenjenega vrha »peak 1« nismo ugotovili. Predvidevali smo, da gre za t.i. neidentificiran vrh, ki je omenjen tudi v navodilih za kolone (ProPac™ ..., 2012). Pojav takšnega vrha je lahko posledica kontaminacije kolone ali uvedbe gradienta z MFB, ki vsebuje imidazol, po tem ko smo kolono spirali z MFA, ki ne vsebuje imidazola.

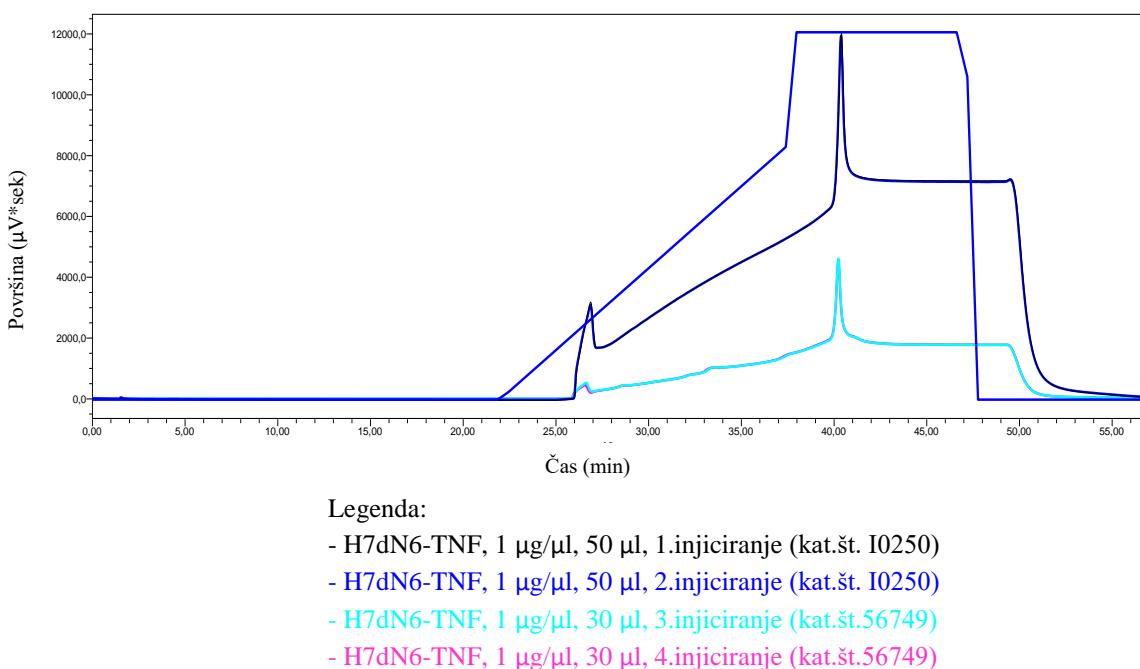


Slika 13: Prikaz neznanega vrha pri 32,7 minuti, ki se je z vsakim injiciranjem manjšal (povečano izbrano obomočje kromatograma). Različne barve kromatogramov predstavljajo injiciranja v legendi naštetih vzorcev.

Pri razvoju metode IMAC je pomemben tudi izbor imidazola, ki daje optimalne rezultate. Preizkusili smo uporabo dveh imidazolov različnih čistosti kot je prikazano v preglednici 14. Rezultati so prikazani na spodnjih kromatogramih (slika 14).

Preglednica 14: Prikaz uporabe komercialno dostopnih imidazolov različnih čistosti.

Čistost imidazola	Kataloška številka
Imidazol $\geq 99\%$	I0250
Imidazol $\geq 99,5\%$	56749

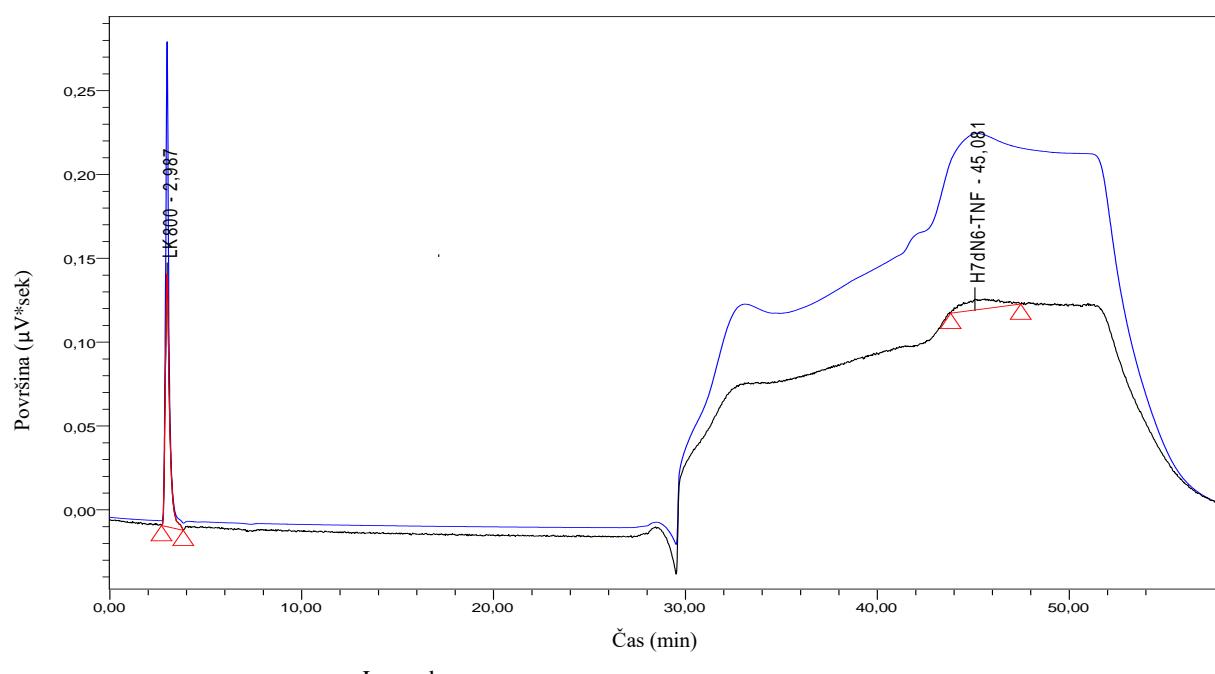


Slika 14: Primerjava različnih čistosti imidazola. Različne barve kromatogramov predstavljajo injiciranja v legendi naštetih vzorcev.

Pri uporabi imidazola proizvajalca Sigma s kataloško številko I0250 smo opazili občutno večji dvig bazne linije kot pri uporabi imidazola istega proizvajalca s kataloško številko 56749, kar lahko vpliva na interpretacijo rezultatov pri nadaljnih analizah. Do dviga bazne linije pri uporabi imidazola proizvajalca Sigma s kat.št. I0250 je prišlo zaradi absorpcije nečitot v uporabljenem imidazolu. Zato smo v nadaljnih analizah uporabljali imidazol proizvajalca Sigma s kat.št. 56749.

4.1.2 Rezultati optimizacije detekcije

Optimizacija detekcije zajema optimizacijo več komponent. Začeli smo s primerjavo valovnih dolžin 214 in 280 nm. Ker smo uporabili detektor z diodno matriko (angl.: DAD, diode array detector), smo lahko pri enkratnem injiciranju spremljali več valovnih dolžin hkrati.



Legenda:

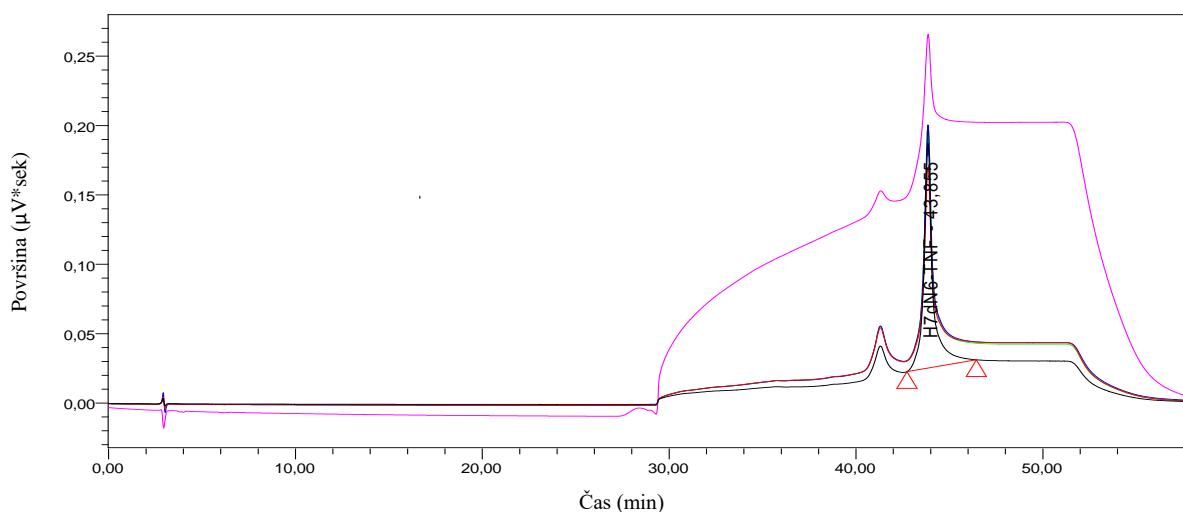
- LK800 + H7dN6-TNF, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 214 nm
- LK800 + H7dN6-TNF, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 280 nm

Ime vrha	LK800		H7dN6-TNF	
	214	280	214	280
Valovna dolžina (nm)	150687	286055	6534	14581
Višina vrha (μV)	1 : 1,9		1 : 2,2	
Razmerje višin vrhov				

Slika 15: Primerjava vzorčnih valovnih dolžin 214 in 280 nm. Prikaz razlike v posnetih kromatogramih istočasno posnetega vzorca ter v višini vrha. Različne barve kromatogramov predstavljajo različne valovne dolžine.

Po pregledu kromatogramov in po primerjavi višin vrhov smo ugotovili, da je višina obenih vrhov (LK800 in H7dN6-TNF) pri valovni dolžini 214 nm približno 2-krat nižja kot pri valovni dolžini 280 nm. Zaradi majhnih koncentracij analitov smo se odločili, da bomo, kljub višji bazni liniji pri večjih koncentracijah imidazola, analize izvajali pri 280 nm.

V naslednjem koraku smo optimirali vzorčno pasovno širino ter referenčno valovno dolžino in pasovno širino. V preglednici 10 (poglavlje 3.3.1.3) so prikazane vse testirane kombinacije.



Legenda:

- LK800 + H7dN6-TNF, 1 µg/µl, kanal 5, vzorčna 280, 32; referenčna 450, 100
- LK800 + H7dN6-TNF, 1 µg/µl, kanal 4, vzorčna 280, 10
- LK800 + H7dN6-TNF, 1 µg/µl, kanal 3, vzorčna 280, 10; referenčna 450, 100
- LK800 + H7dN6-TNF, 1 µg/µl, kanal 2, vzorčna 280, 10; referenčna 360, 100
- LK800 + H7dN6-TNF, 1 µg/µl, kanal 1, vzorčna 280, 100; referenčna 360, 100

Slika 16: Testiranje različnih vzorčnih širin in referenčnih valovnih dolžin in pasovnih širin ter vpliv na kromatograme. Različne barve kromatogramov predstavljajo kombinacijo različnih nastavitev, kot našteto v legendi.

Glede na pregledane kromatograme smo se zaradi najmanjšega dviga in minimalnega šuma bazne linije odločili, da bomo nadaljne analize izvajali z nastavtvami detektorja, ki so definirane na kanalih 2 in 3.

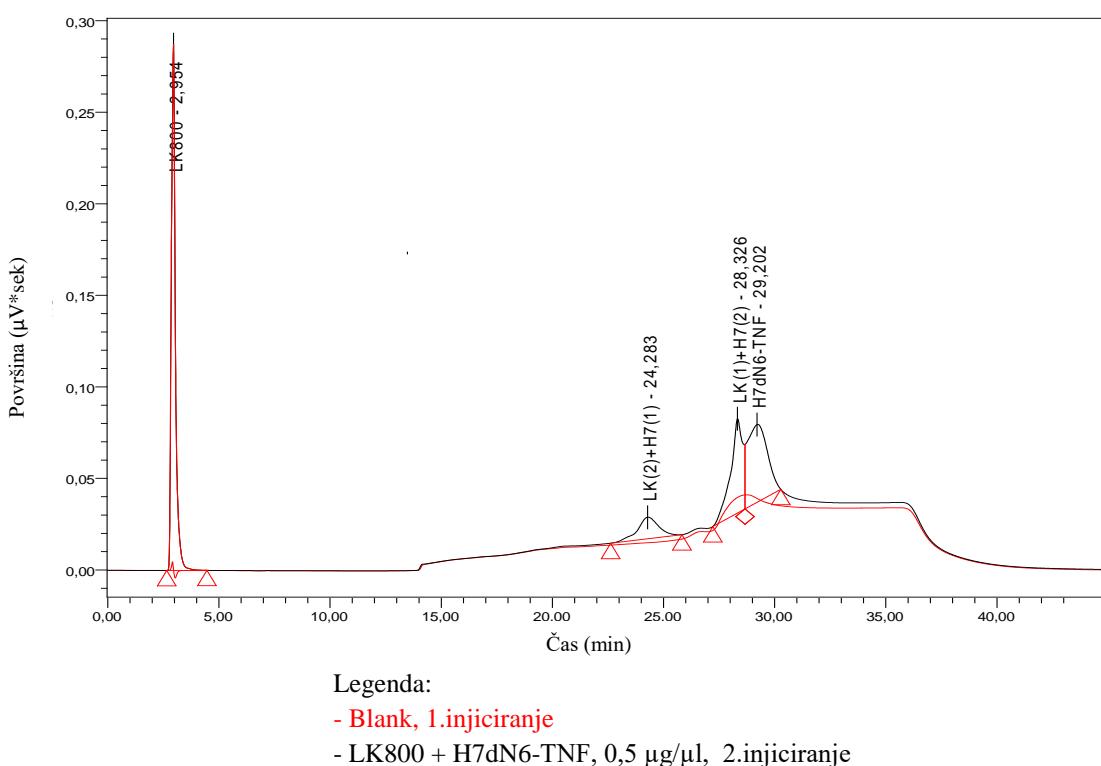
Poleg dejavnikov, ki smo jih v okviru optimizacije detekcije testirali, obstaja še vrsta drugih detektorskih nastavitev pri instrumentih HPLC, katerih vpliv na metodo nismo testirali. To so dolžina poti pretočne celice, širina vrha in odzivni čas, širina reže detektorske celice in drugo. Pri večini izmed njih smo privzeli nastavitev, ki so bile v računalniškem programu Empower 3 vnešene samodejno.

Preglednica 15: Prikaz detektorskih parametrov, katerih nastavitev nismo spremenjali, ampak smo privzeli samodejne nastavitev v programu Empower 3.

Parametri na detektorju	Nastavitev
Dolžina poti / volumen pretočne celice	10 nm / 13 µl
Širina vrha in odzivni čas	>0,1 min (2 s)
Širina reže detektorske celice	1 nm

4.1.3 Rezultati optimizacije separacije

Optimizacija separacije je v našem primeru predstavljala zadnjo stopnjo pri razvoju metode. Namen razvoja metode je bil, da vzpostavimo ustrezeno analitsko metodo, s katero bi lahko preučevali izmenjavo podenot med nativnim TNF- α in konjugati s pripetimi histidinskimi podaljški. Zaradi nastalih proteinov, ki se eluirajo pri različnih molarnostih imidazola smo predvidevali, da bomo morali vpeljati gradientno separacijo, ki bo omogočala prikaz vseh vmesnih stopenj pri izmenjavi podenot. Zato smo najprej vpeljali gradient IMAC_1_BIO_HPLC2 (prikaz gradiента v preglednici 7), s katerim smo preverili ustreznost elucije vrhov. Tekom optimizacije mobilnih faz in načina detekcije smo instrumentalno metodo še dodatno prilagodili, da bi zagotovili čim boljšo optimizacijo teh dveh parametrov. Optimizacija separacije se je začela s spremembami v različnih strminah gradienta, gradientnih skokih, s spremembami v dolžini časa elucije ter s spremembami pretoka mobilne faze (več podrobnosti v besedilu in slikah v nadaljevanju). Gradient smo pri instrumentalnih metodah od IMAC_4_BIO_HPLC2 do IMAC_7_BIO_HPLC2 prilagodili na največ 60% MFB, saj smo uporabljali MFB z 1 M imidazolom. Za nadaljnjo optimizacijo gradienta smo pripravili svežo MFB z 0,6 M imidazolom, zato smo gradient ponovno prilagodili na 100% MFB.

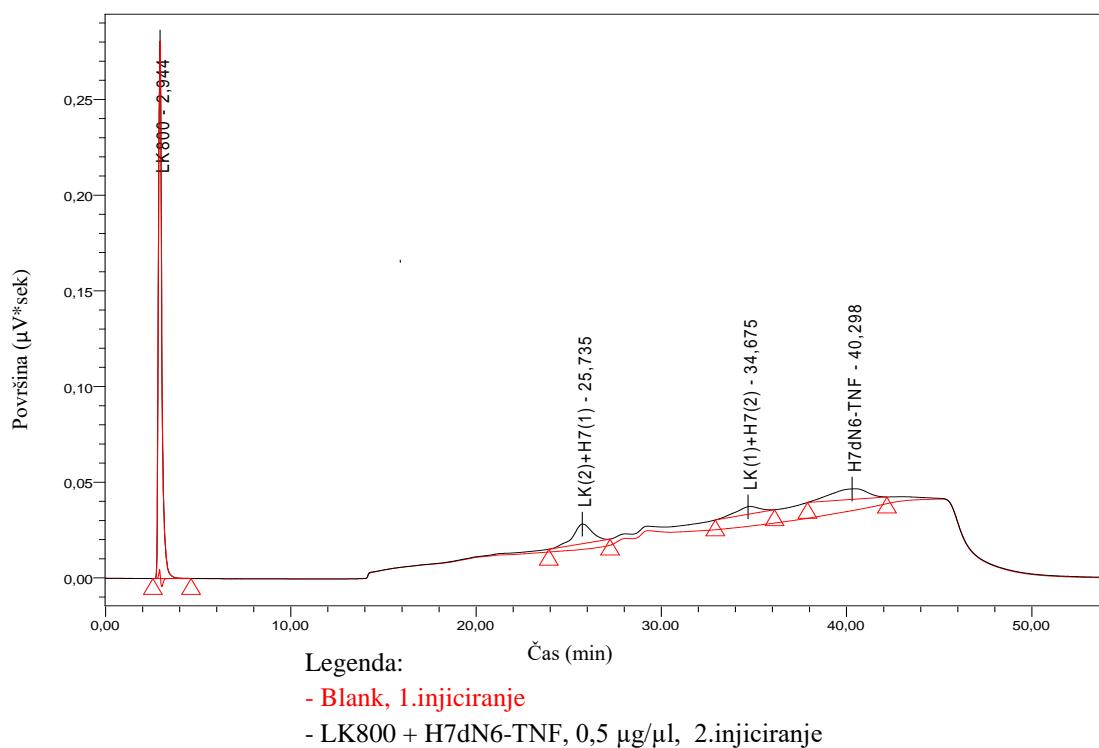


Slika 17: Kromatogram, posnet pri uporabi instrumentalne metode IMAC_4_BIO_HPLC_2, katere gradient je prikazan v preglednici 16.

Preglednica 16: Tabelarni prikaz instrumentalne metode IMAC_4_BIO_HPLC_2 in vpliv na separacijo združenih vzorcev LK800 in H7dN6-TNF. V tabeli smo z »M imidazola*« označili zapis za končno koncentracijo imidazola v mobilni fazi (M).

Instrumentalna metoda: IMAC_4_BIO_HPLC_2				
Čas (min)	Pretok (ml/min)	%MFA	%MFB	M imidazola*
0,0	0,5	100	0	0,00
6,5	0,5	100	0	0,00
22,5	0,5	65	35	0,35
23,0	0,5	40	60	0,60
31,5	0,5	40	60	0,60
32,0	0,5	100	0	0,00
42,0	0,5	100	0	0,00

Instrumentalno metodo IMAC_4_BIO_HPLC2 smo glede na gradient v metodi IMAC_2_BIO_HPLC2 spremenili tako, da smo skrajšali čas med začetnim vzpostavljanjem metode z MFA do časa vpeljave gradientna. Ta čas smo skrajšali iz 22,0 na 6,5 minute, saj smo na podlagi kromatogramov posnetih z instrumentalno metodo IMAC_2_BIO_HPLC2 videli, da je bazna linija pri 100 % MFA popolnoma ravna ter da se na začetku eluira samo nativna TNF- α medtem ko se ostali proteini z izmenjenimi podenotami eluirajo z vpeljavo gradienta. Oblika TNF- α z izmenjano eno podenoto, na katero je pripet histidinski podaljšek (na kromatogramu označeno kot LK(2) + H7(1)) se s to metodo ustreznno eluira, medtem ko se nativna TNF- α z dvema izmenjanima podenotama (na kromatogramu označeno kot LK(1) + H7(2)) ter analog H7dN6-TNF zaradi gradientnega skoka iz 0,35 M imidazola na 0,6 M imidazol eluirata hkrati.

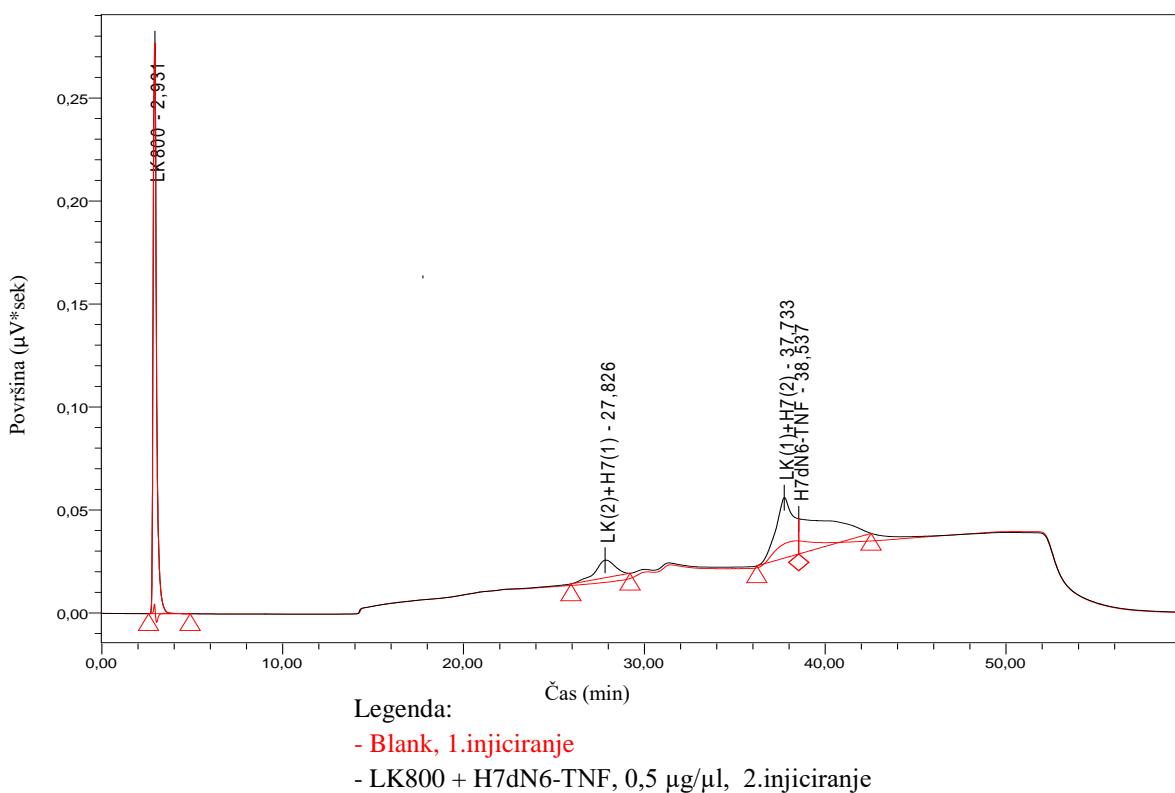


Slika 18: Kromatogram, posnet pri uporabi instrumentalne metode IMAC_5_BIO_HPLC_2, katere gradient je prikazan v preglednici 17.

Preglednica 17: Tabelarni prikaz instrumentalne metode IMAC_5_BIO_HPLC_2 in vpliv na separacijo združenih vzorcev LK800 in H7dN6-TNF. V tabeli smo z »M imidazola*« označili zapis za končno koncentracijo imidazola v mobilni fazi (M).

Instrumentalna metoda: IMAC_5_BIO_HPLC_2				
Čas (min)	Pretok (ml/min)	%MFA	%MFB	M imidazola*
0,0	0,5	100	0	0,00
6,5	0,5	100	0	0,00
37,9	0,5	40	60	0,60
41,0	0,5	40	60	0,60
41,5	0,5	100	0	0,00
54,0	0,5	100	0	0,00

Zaradi hkratne elucije vrhov LK(1) + H7(2) in H7dN6-TNF pri prejšnji instrumentalni metodi smo pri metodi IMAC_5_BIO_HPLC_2 vpeljali gradient brez gradientnih skokov da bi lahko preverili pri kakšni molarnosti se eluira vsak izmed teh vrhov. Dobili smo dobro ločene vse štiri vrhove, vendar oblika vrhov ni bila optimalna, saj so bili vrhovi prenizki in razpotegnjeni vzdolž kromatograma. Zato smo izračunali približek molarnosti, pri kateri se eluira določen vrh. S primerjavo kromatograma in gradiента smo ugotovili, da se vrh LK(2) + H7(1) eluira pri približno 0,20 M imidazolu, vrh LK(1) + H7(2) pri približno 0,35 M ter H7dN6-TNF pri približno 0,50 M imidazolu. Z naslednjimi metodami smo želeli gradient prilagoditi za čim bolj uspešno separacijo.

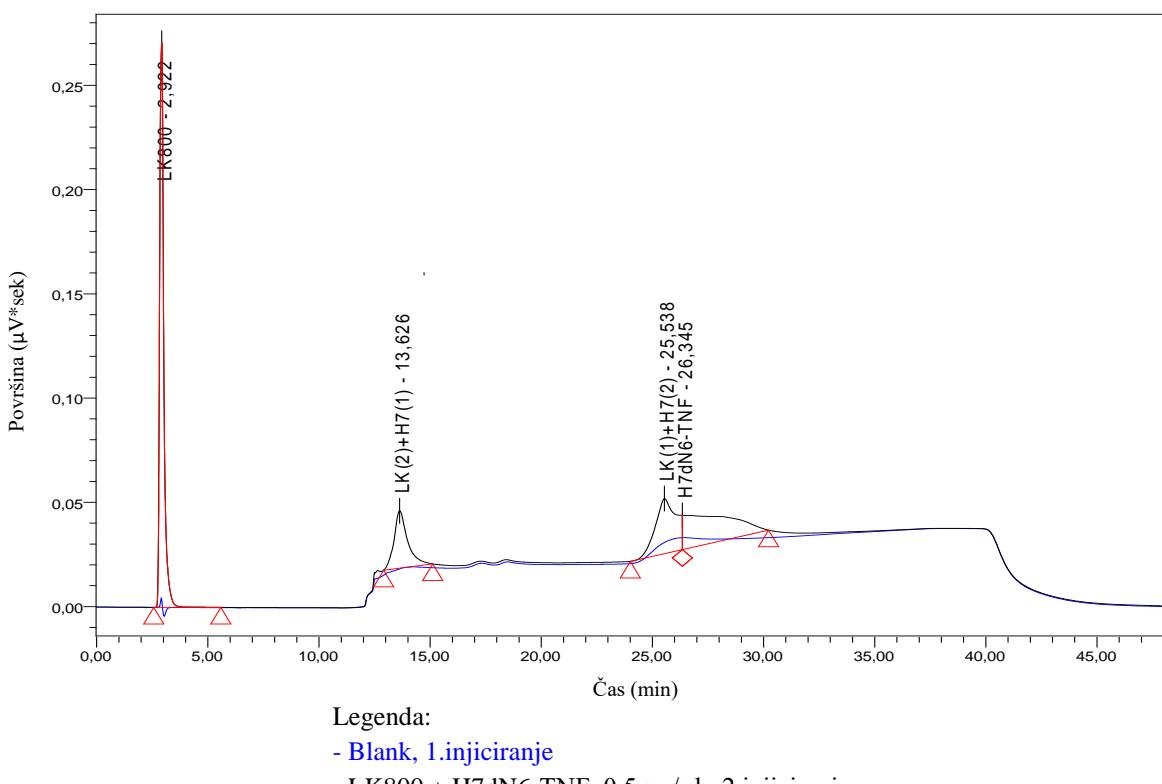


Slika 19: Kromatogram, posnet pri uporabi instrumentalne metode IMAC_6_BIO_HPLC_2, katere gradient je prikazan v preglednici 18.

Preglednica 18: Tabelarni prikaz instrumentalne metode IMAC_6_BIO_HPLC_2 in vpliv na separacijo združenih vzorcev LK800 in H7dN6-TNF. V tabeli smo z »M imidazola*« označili zapis za končno koncentracijo imidazola v mobilni fazi (M).

Instrumentalna metoda: IMAC_6_BIO_HPLC_2				
Čas (min)	Pretok (ml/min)	%MFA	%MFB	M imidazola*
0,0	0,5	100	0	0,00
6,5	0,5	100	0	0,00
25,3	0,5	70	30	0,30
31,6	0,5	65	35	0,35
32,0	0,5	50	50	0,50
44,6	0,5	40	60	0,60
47,7	0,5	40	60	0,60
48,0	0,5	100	0	0,00

Z izračunom molarnosti, pri kateri se eluirajo vrhovi LK(2) + H7 (1), LK(1) + H7(2) ter H7dN6-TNF, smo v metodi IMAC_6_BIO_HPLC_2 uvedli stopenjski gradient, ki bi omogočil separacijo zadnjih dveh vrhov. Na kromatogramih vidimo, da sta se zaradi gradientnega skoka iz 0,35 M na 0,50 M imidazol eluirala oba vrhova. Pri optimizaciji smo torej ugotovili, da se vrhova LK(1) + H7(2) ter H7dN6-TNF eluirata ravno v območju med 0,35 M in 0,50 M imidazolom, zato optimizacija separacije z uvedbo stopenjskega gradienata na tem območju ni bila ustrezna.

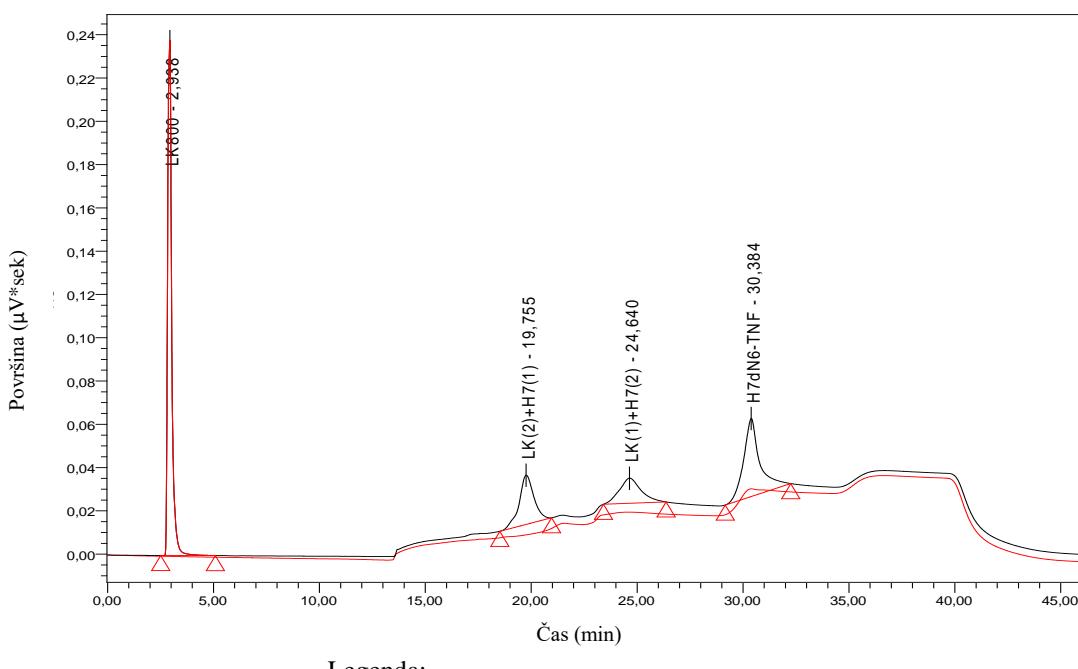


Slika 20: Kromatogram, posnet pri uporabi instrumentalne metode IMAC_7_BIO_HPLC_2, katere gradient je prikazan v preglednici 19.

Preglednica 19: Tabelarni prikaz instrumentalne metode IMAC_7_BIO_HPLC_2 in vpliv na separacijo združenih vzorcev LK800 in H7dN6-TNF. V tabeli smo z »M imidazola*« označili zapis za končno koncentracijo imidazola v mobilni fazi (M).

Instrumentalna metoda: IMAC_7_BIO_HPLC_2				
Čas (min)	Pretok (ml/min)	%MFA	%MFB	M imidazola*
0,0	0,5	100	0	0,00
6,5	0,5	100	0	0,00
7,0	0,5	70	30	0,30
19,5	0,5	65	35	0,35
20,0	0,5	50	50	0,50
32,5	0,5	40	60	0,60
35,7	0,5	40	60	0,60
36,0	0,5	100	0	0,00
48,5	0,5	100	0	0,00

Ker iz prejšnjega kromatograma (Slika 19) nismo natančno videli, pri kakšni molarnosti imidazola se je začela elucija zadnjih dveh vrhov, smo pri metodi IMAC_7_BIO_HPLC_2 najprej podaljšali gradient imidazola od 0,30 M do 0,35 M iz 6,3 minute na 12,5 minute. Ugotovili smo, da se v tem območju ne eluira noben vrh, ampak se vrha LK(1) + H7(2) ter H7dN6-TNF očitno eluirata v območju imidazola med 0,35 M ter 0,6 M.



Legenda:

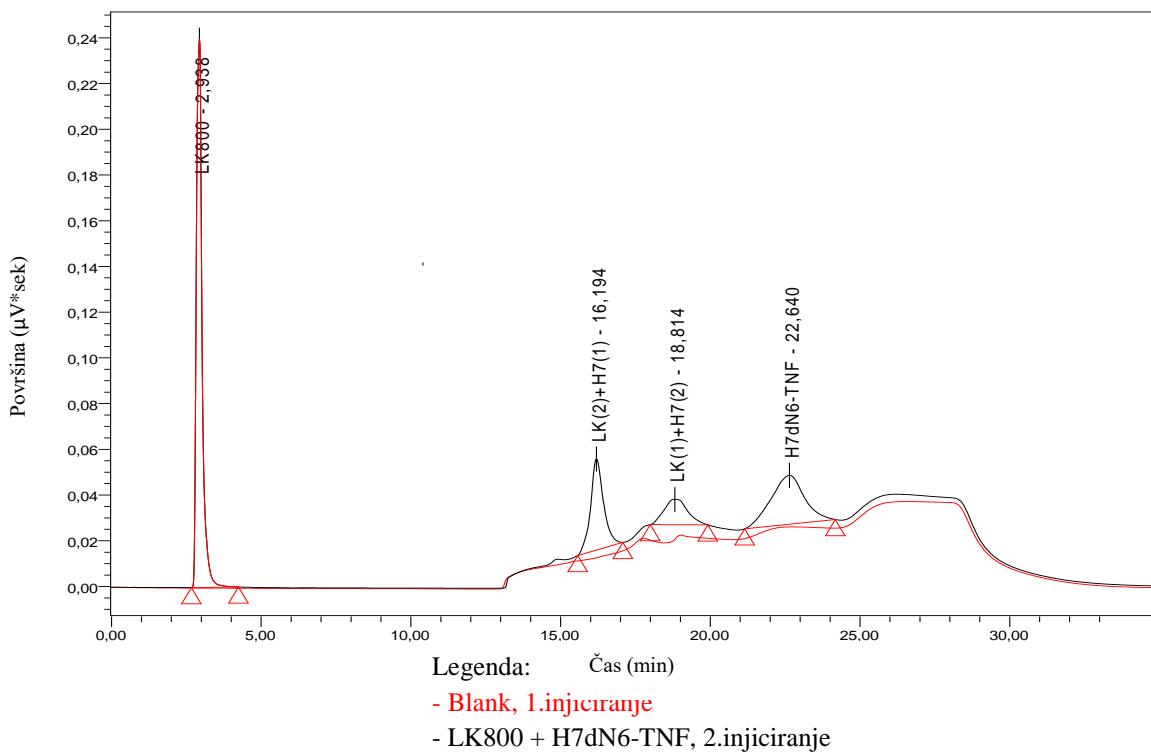
- Blank, 1.injiciranje
- LK800 + H7dN6-TNF, 0,5 µg/µl, 2.injiciranje

Slika 21: Kromatogram, posnet pri uporabi instrumentalne metode IMAC_8_BIO_HPLC_2, katere gradient je prikazan v preglednici 20.

Preglednica 20: Tabelarni prikaz instrumentalne metode IMAC_8_BIO_HPLC_2 in vpliv na separacijo združenih vzorcev LK800 in H7dN6-TNF. V tabeli smo z »M imidazola*« označili zapis za končno koncentracijo imidazola v mobilni fazi (M).

Instrumentalna metoda: IMAC_8_BIO_HPLC_2				
Čas (min)	Pretok (ml/min)	%MFA	%MFB	M imidazola*
0,0	0,5	100	0	0,00
6,5	0,5	100	0	0,00
19,5	0,5	40	60	0,36
24,5	0,5	40	60	0,36
25,0	0,5	15	85	0,51
30,0	0,5	15	85	0,51
30,5	0,5	0	100	0,60
35,5	0,5	0	100	0,60
36,0	0,5	100	0	0,00
46,0	0,5	100	0	0,00

Iz gradientnega skoka smo pri metodi IMAC_8_BIO_HPLC_2 podaljšali gradient imidazola od 0 M do 0,36 M, zaradi česar se je vrh LK(2) + H7(1) lepše eluiral. Vmesni gradientni skok do 0,30 M imidazola smo odstranili. Nato smo po dosegu 0,36 M imidazola 5 minut ohranjali stalno molarnost imidazola, zaradi česar se je vrh LK(1) + H7(2) ustrezno eluiral. Z gradientnim skokom iz 0,36 M do 0,51 M imidazola se je eluiral še zadnji vrh H7dN6-TNF. S takšno instrumentalno metodo in gradientom smo med seboj ustrezno ločili vse vrhove, zato je takšna metoda primerna za nadaljnjo uporabo.



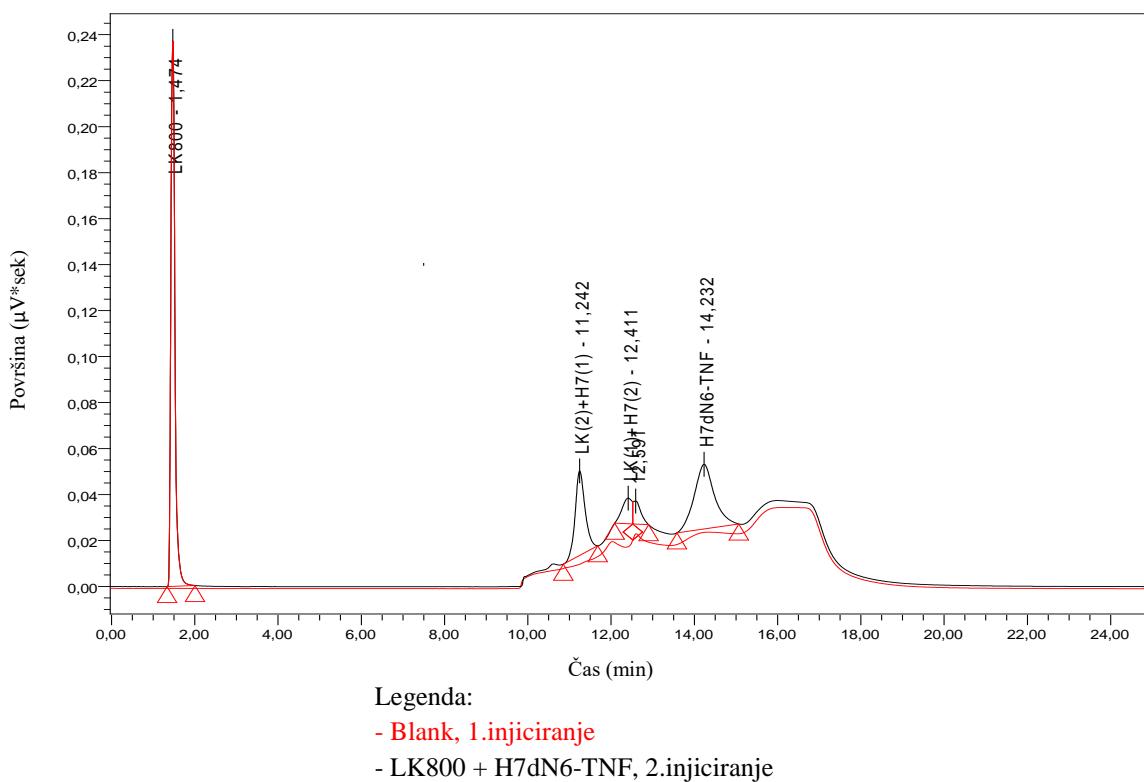
Slika 22: Kromatogram, posnet pri uporabi instrumentalne metode IMAC_10_BIO_HPLC_2, katere gradient je prikazan v preglednici 21.

Preglednica 21: Tabelarni prikaz instrumentalne metode IMAC_10_BIO_HPLC_2 in vpliv na separacijo združenih vzorcev LK800 in H7dN6-TNF. V tabeli smo z »M imidazola*« označili zapis za končno koncentracijo imidazola v mobilni fazi (M).

Instrumentalna metoda: IMAC_10_BIO_HPLC_2				
Čas (min)	Pretok (ml/min)	%MFA	%MFB	M imidazola*
0,0	0,5	100,0	0,0	0,00
6,5	0,5	100,0	0,0	0,00
13,0	0,5	40,0	60,0	0,36
16,5	0,5	40,0	60,0	0,36
16,6	0,5	25,0	75,0	0,45
20,0	0,5	25,0	75,0	0,45
20,1	0,5	0,0	100,0	0,60
24,0	0,5	0,0	100,0	0,60
24,1	0,5	100,0	0,0	0,00
35,0	0,5	100,0	0,0	0,00

Kljub temu, da je metoda IMAC_8_BIO_HPLC2 primerna za uporabo, smo poskusili elucijo vrha H7dN6-TNF še bolj optimirati. Zato smo pri metodi IMAC_10_BIO_HPLC_2 skok imidazola znižali iz 0,51 M na 0,45 M. Poleg tega smo skrajšali čas za elucijo vrhov LK(2) + H7(1) ter LK(1) + H7(2). Vrh H7dN6-TNF se je ustrezno eluiral, vendar je oblika vrha bolj ploščata kot pri prejšnji metodi. Metoda je prav tako ustrezna, vendar vidimo, da

se pri eluciji vrha LK(1) + H7(2) v mobilni fazi pojavijo dodatni vrhovi, kar oteži integracijo vrha.



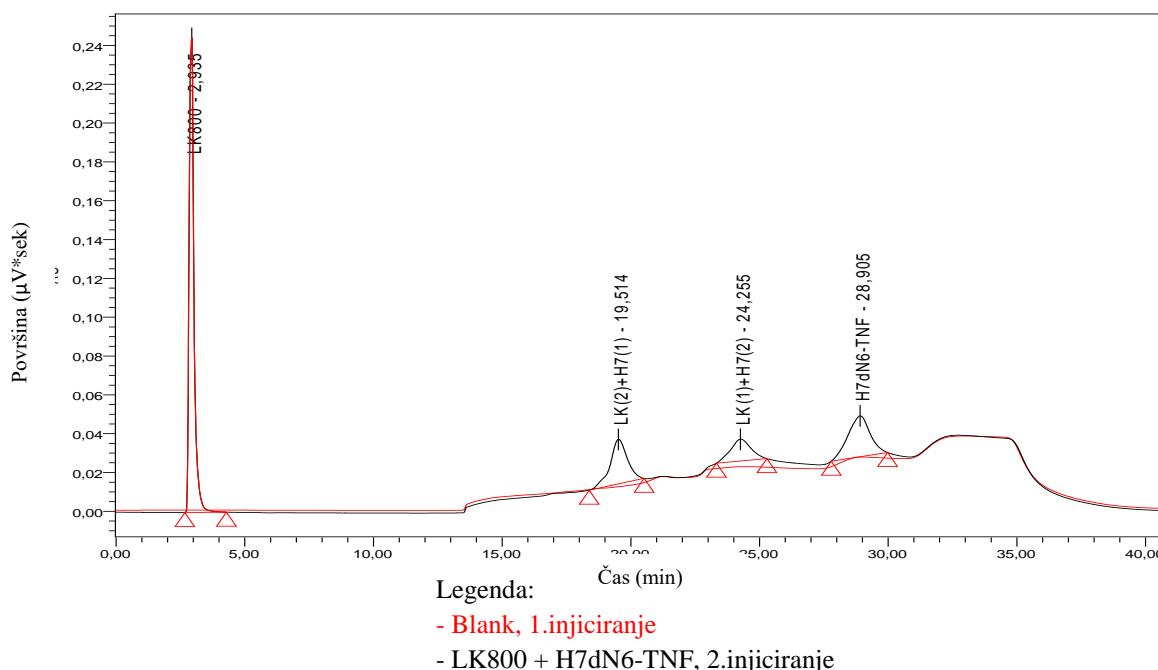
Slika 23: Kromatogram, posnet pri uporabi instrumentalne metode IMAC_10b_BIO_HPLC_2, katere gradient je prikazan v preglednici 22.

Preglednica 22: Tabelarni prikaz instrumentalne metode IMAC_10b_BIO_HPLC_2 in vpliv na separacijo združenih vzorcev LK800 in H7dN6-TNF. V tabeli smo z »M imidazola*« označili zapis za končno koncentracijo imidazola v mobilni fazi (M).

Instrumentalna metoda: IMAC_10b_BIO_HPLC2				
Čas (min)	Pretok (ml/min)	%MFA	%MFB	M imidazola*
0,0	1,0	100,0	0,0	0,00
6,5	1,0	100,0	0,0	0,00
9,6	1,0	40,0	60,0	0,36
11,2	1,0	40,0	60,0	0,36
11,3	1,0	25,0	75,0	0,45
12,9	1,0	25,0	75,0	0,45
13,0	1,0	0,0	100,0	0,60
14,6	1,0	0,0	100,0	0,60
14,7	1,0	100,0	0,0	0,00
25,0	1,0	100,0	0,0	0,00

Da bi metodo naredili čimkrajšo in tako analizo primernejšo za rutinsko uporabo, smo za metodo IMAC_10b_BIO_HPLC2 povečali pretok mobilne faze iz 0,5 ml/min na 1 ml/min.

Zaradi tega smo za polovico skrajšali dolžine gradientov in vmesnih stopenj stalne molarnosti imidazola prejšnje metode (slika 22). Od 6,5 minute do 14,7 minute smo opravili vse spremembe v gradientu (slika 23). Dobili smo kromatogram, kjer se je nihanje v mobilni fazi, ki je bilo opazno že pri prejšnji metodi povečalo in zato se je vrh LK(1) + H7(2) razcepil na dva dela. Vrh se je najverjetneje razcepil zaradi preveč strmega gradiента in hkrati prevelikega pretoka, zaradi česar je verjetno prišlo do oscilacije črpalke. Takšna metoda zato ni primerna za uporabo.

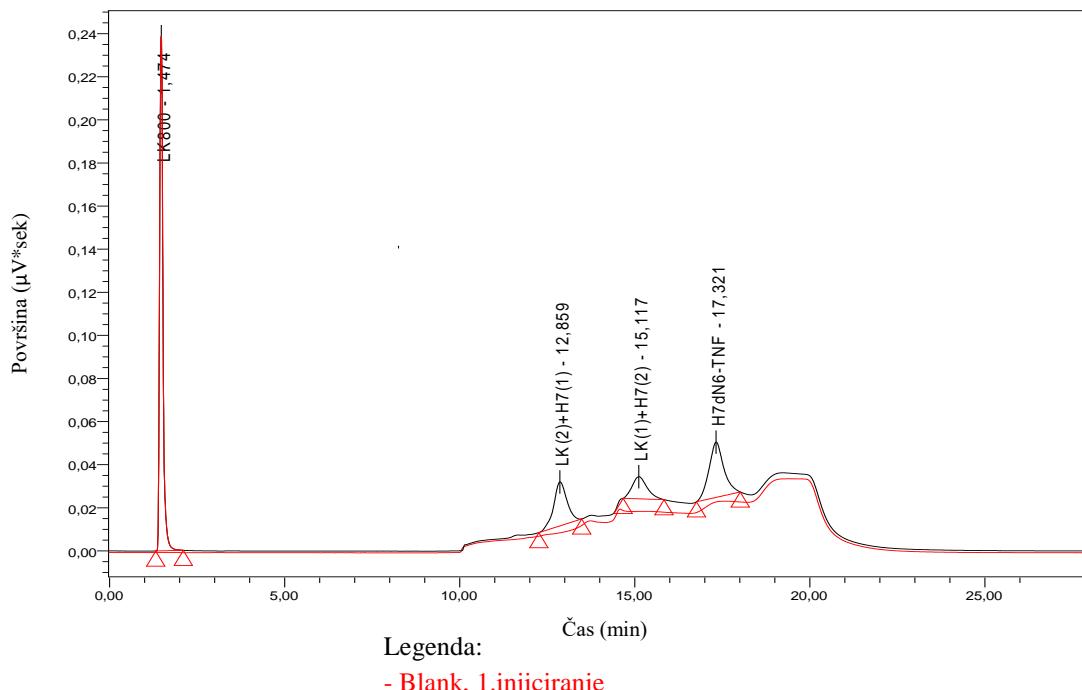


Slika 24: Kromatogram, posnet pri uporabi instrumentalne metode IMAC_11_BIO_HPLC_2, katere gradient je prikazan v preglednici 23.

Preglednica 23: Tabelarni prikaz instrumentalne metode IMAC_11_BIO_HPLC_2 in vpliv na separacijo združenih vzorcev LK800 in H7dN6-TNF. V tabeli smo z »M imidazola*« označili zapis za končno koncentracijo imidazola v mobilni fazi (M).

Instrumentalna metoda: IMAC_11_BIO_HPLC_2				
Čas (min)	Pretok (ml/min)	%MFA	%MFB	M imidazola*
0,0	0,5	100,0	0,0	0,00
6,5	0,5	100,0	0,0	0,00
19,5	0,5	40,0	60,0	0,36
23,0	0,5	40,0	60,0	0,36
23,1	0,5	25,0	75,0	0,45
26,5	0,5	25,0	75,0	0,45
26,6	0,5	0,0	100,0	0,60
30,5	0,5	0,0	100,0	0,60
30,6	0,5	100,0	0,0	0,00
40,6	0,5	100,0	0,0	0,00

S predzadnjo optimizacijo gradiента (Slika 24) smo želeli združiti optimalne rezultate metod IMAC_8_BIO_HPLC2 ter IMAC_10_BIO_HPLC2. Metodo IMAC_8_BIO_HPLC2 smo skrajšali, vendar smo ohranili molarnosti imidazola, ki smo jih uporabili pri metodi IMAC_10_BIO_HPLC2. Z uporabo tako optimirane metode IMAC_11_BIO_HPLC_2 smo dobili kromatogram, kjer se ustrezno ločijo vsi štirje vrhovi.



Slika 25: Kromatogram, posnet pri uporabi instrumentalne metode IMAC_11b_BIO_HPLC_2, katere gradient je prikazan v preglednici 24.

Preglednica 24: Tabelarni prikaz instrumentalne metode IMAC_11b_BIO_HPLC2 in vpliv na separacijo združenih vzorcev LK800 in H7dN6-TNF. V tabeli smo z »M imidazola*« označili zapis za končno koncentracijo imidazola v mobilni fazi (M).

Instrumentalna metoda: IMAC_11b_BIO_HPLC2				
Čas (min)	Pretok (ml/min)	%MFA	%MFB	M imidazola*
0,0	1,0	100,0	0,0	0,00
6,5	1,0	100,0	0,0	0,00
12,8	1,0	40,0	60,0	0,36
14,4	1,0	40,0	60,0	0,36
14,5	1,0	25,0	75,0	0,45
16,1	1,0	25,0	75,0	0,45
16,2	1,0	0,0	100,0	0,60
17,8	1,0	0,0	100,0	0,60
17,9	1,0	100,0	0,0	0,00
28,0	1,0	100,0	0,0	0,00

V zadnji optimizaciji separacije (Slika 25) smo metodo IMAC_11b_BIO_HPLC2 spremenili tako, da smo povečali pretok mobilne faze iz 0,5 ml/min na 1 ml/min ter ustrezzo skrajšali gradientne postope. Opazili smo, da se tik pred elucijo vrha LK(1) + H7(2) pojavi strm skok bazne linije, kar vpliva na integracijo vrha.

Po pregledu vseh kromatogramov, ki so bili posledica optimizacije separacije, smo se odločili, da je najbolj ustrezena instrumentalna metoda IMAC_8_BIO_HPLC2 (Slika 21), saj so bili vrhovi najbolj simetrični z najboljšo resolucijo med njimi. Resolucijo smo pridobili s pomočjo računalniškega programa Empower 3 (prikaz vseh resolucij v Prilogi I), medtem ko bi jo ročno lahko izračunali s spodnjo enačbo (United ..., 2014).

$$R_S = 1,18 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (W_{1, h/2} + W_{2, h/2}) \quad \dots (5)$$

R_S - resolucija

t_{R1}, t_{R2} - retencijska časa kromatografskih vrhov 1 in 2 (min)

$W_{1, h/2}, W_{2, h/2}$ - širina kromatografskih vrhov na polovični višini vrhov 1 in 2 (min)

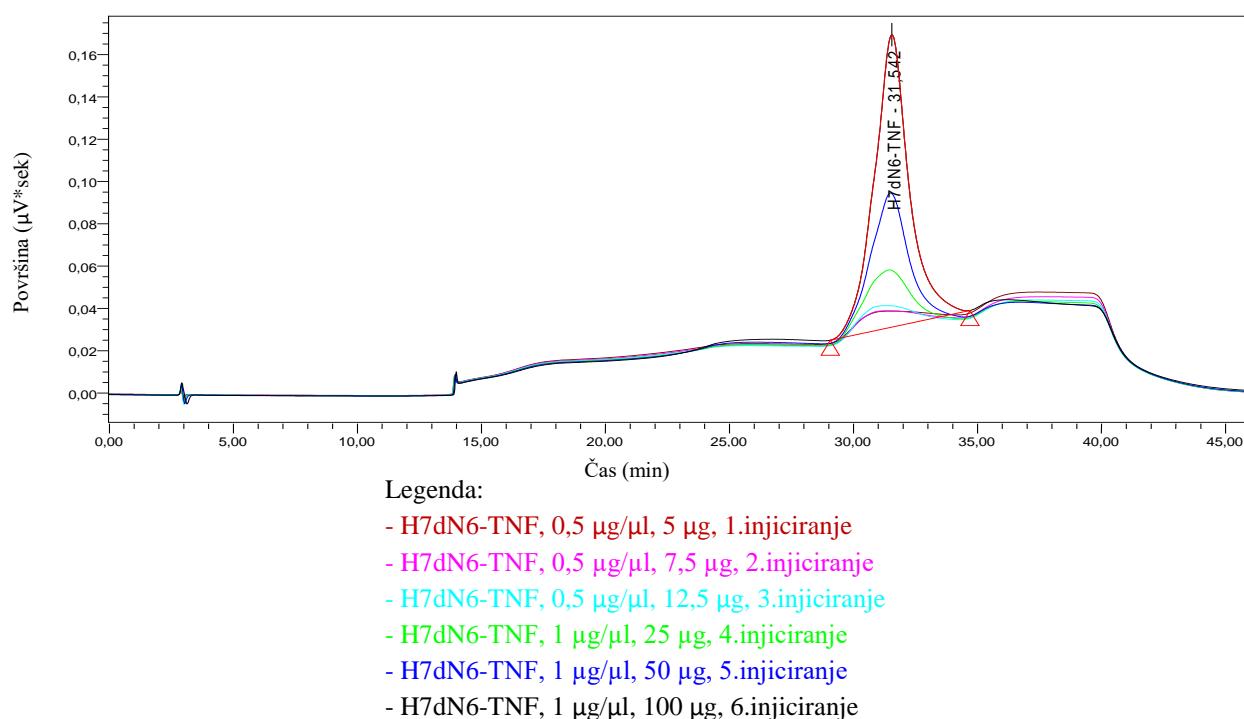
Kljub temu, da izbrana instrumentalna metoda ni najkrajša je za potrebe opazovanja izmenjave podenot najustreznejša.

4.2 REZULTATI KVALIFIKACIJE METODE

Po končanem razvoju metode smo izvedli krajšo obliko kvalifikacije metode IMAC_8_BIO_HPLC2 in sicer v smislu testiranja linearnosti, ponovljivosti in specifičnosti metode.

4.2.1 Rezultati preverjanja linearnosti metode

Preverjanje linearnosti metode smo izvajali s 6-kratnim injiciranjem vzorca H7dN6-TNF, pri čemer smo kot referenco uporabili vzorec s koncentracijo 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ z volumnom injiciranja 50 μl , kar pomeni 50 μg nanosa vzorca na kolono. Vzorec smo redčili iz prvotne koncentracije 2,37 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ na koncentracijo 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in nato na 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pri čemer smo volumen injiciranja spreminjali tako, da smo povečevali nanos na kolono od 5 do 100 μg . Glede na referenčni nanos na kolono smo izvedli testiranje linearnosti v obsegu od 10 do 200 % in s tem zajeli večje območje, kot je predpisano v smernicah ICH (70 % –130 %).



Slika 26: Preverjanje linearnosti v območju nanosa na kolono od 5 do 100 μg . Različne barve kromatogramov predstavljajo različne nanose vzorca, kot navedeno v legendi.

Preglednica 25: Prikaz površin in višin vrhov vzorcev pri preverjanju linearnosti.

Ime vzorca	V_{inj} (μl)	Nanos na kolono (μg)	Retencijski čas (min)	Površina ($\mu\text{V}^*\text{sec}$)	Višina (μV)
H7dN6/S3 [0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	10	5	30,926	1726891	10144
H7dN6/S3 [0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	15	7,5	30,940	1902093	11398
H7dN6/S3 [0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	25	12,5	30,945	2289544	14317
H7dN6/S3 [1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	25	25	31,396	4167169	30131
H7dN6/S3 [1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	50	50	31,484	7396157	65535
H7dN6/S3 [1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	100	100	31,542	13588651	138199

Po pregledu kromatogramov in površin vrhov glede na nanose proteina na kolono, smo izrisali premico ter izračunali naklon in odsek na osi y, standardno deviacijo in interval zaupanja za naklon in odsek na osi y ter korelacijski koeficient. Vrednosti x (nanos na kolono) in y (površina vrhov) so povezane z regresijsko premico v enačbi:

$$y = kx + b \quad \dots (6)$$

Izračun ostalih parametrov smo opravili s pomočjo spodnjih enačb v računalniškem programu Excel.

Naklon:

$$k = (n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i) / (n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2) \quad \dots (7)$$

Odsek na osi y:

$$b = (\sum y_i - a \sum x_i) / n \quad \dots (8)$$

Standardna deviacija (residual standard deviation):

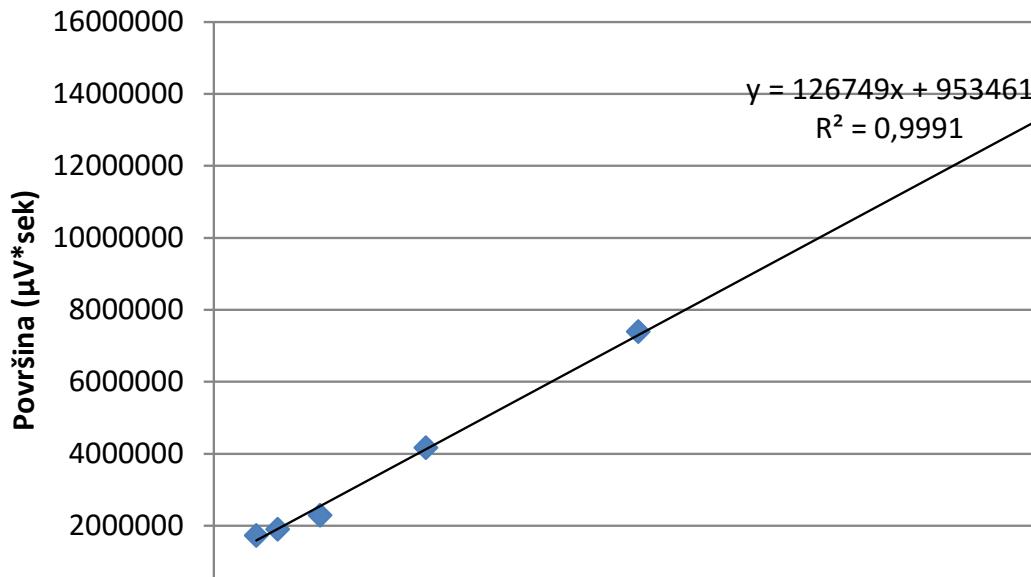
$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{(\sum y_i^2 - b \sum x_i - a \sum x_i y_i) / (n-2)} \quad \dots (9)$$

Standardna deviacija naklona:

$$S_k = \sqrt{s_b^2} = \sqrt{((n-s^2) / (n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2))} \quad \dots (10)$$

Standardna deviacija odseka na osi y:

$$s_b = \sqrt{s_b^2 / n} \sum x_i^2 \quad \dots (11)$$



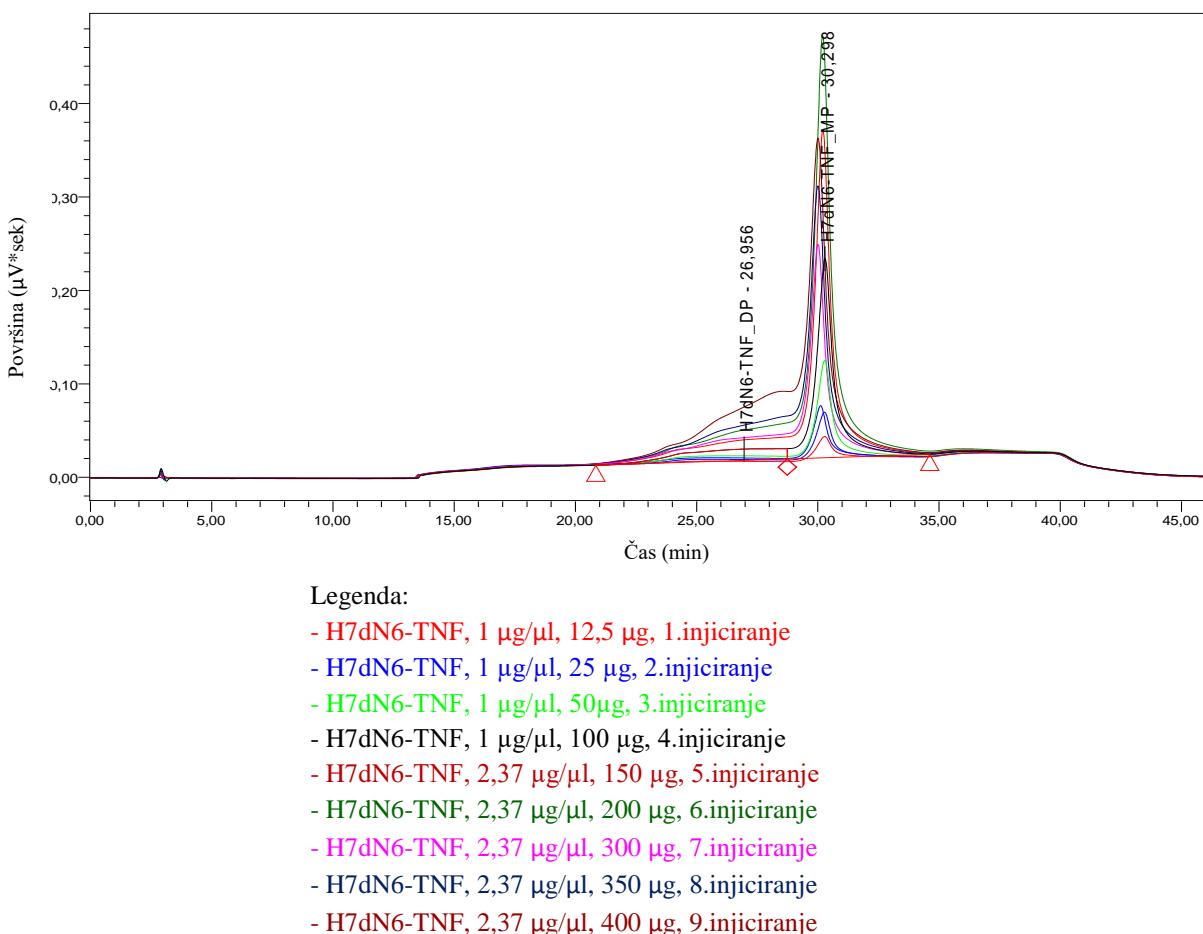
Slika 27: Prikaz linearne premice pri preverjanju linearnosti v območju nanosa vzorca na kolono od 5 do 100 µg.

Preglednica 26: Izračun parametrov za prikaz linearnosti metode v območju nanosa vzorca na kolono od 5 do 100 µg.

	Izračunana vrednost	Standardna deviacija	95% interval zaupanja
Naklon	126748,7	33311,5	34275,9 - 219221,5
Odsek na osi y	953461,0	2719874,4	-3410514,7 - 5317435,8
Korelacijski koeficient (r)	0,9996; r^2 = 0,9991		

Iz izračunanih parametrov vidimo, da je pri metodi odziv glede na nanos linearen v območju nanosa na kolono od 5 do 100 µg, saj je korelacijski koeficient $\geq 0,99$.

Zatem smo preverili kakšna je zgornja meja linearnosti metode, zato smo preverjanje linearnosti ponovno izvedli tako, da smo nanose na kolono povečevali od 12,5 do 400 µg.



Slika 28: Preverjanje linearnosti v območju nanosa vzorca na kolono od 12,5 do 400 µg. Različne barve kromatogramov predstavljajo različne nanose vzorca, kot navedeno v legendi.

Iz kromatogramov smo opazili, da pri nanosu na kolono, ki je večji od 100 µg, začne zaradi presežene kapacitete nastajati vrh pred glavnim vrhom, t.i. »rama«. Pri večjih koncentracijah površina glavnega vrha ostaja približno enaka kljub večjemu nanosu na kolono, medtem ko se površina t.i. »rame« pred vrhom H7dN6-TNF z večjim nanosom proteina na kolono veča. V Preglednici 18 je iz površin vrhov vidno, da so pri vzorcih, katerih nanos na kolono je večji od 200 µg, tako skupne kot posamezne površine vrhov nižje, kar je v nasprotju od pričakovanega. Med 6. in 7. injiciranjem vzorca (t.j. po nanosu 200 µg in pred nanosom 300 µg) smo injicirali dva slepa (t.i. »Blank«) vzorca, zaradi česar bi se lahko kovinski ioni na koloni sprali iz nje in bi se na kolono zato vezalo manj proteinov. Poleg tega so bila vsa injiciranja po 6. injiciraju vzorca opravljena iz viale 4, injiciranja prej pa iz viale 3, zatorej bi lahko bila opazna razlika med različnima vialama. Na podlagi prej opisanih rezultatov zaključujemo, da pri metodi IMAC ni priporočljivo povečevati nanosov na kolono nad 100 µg, saj v tem primeru pride do razcepa glavnega

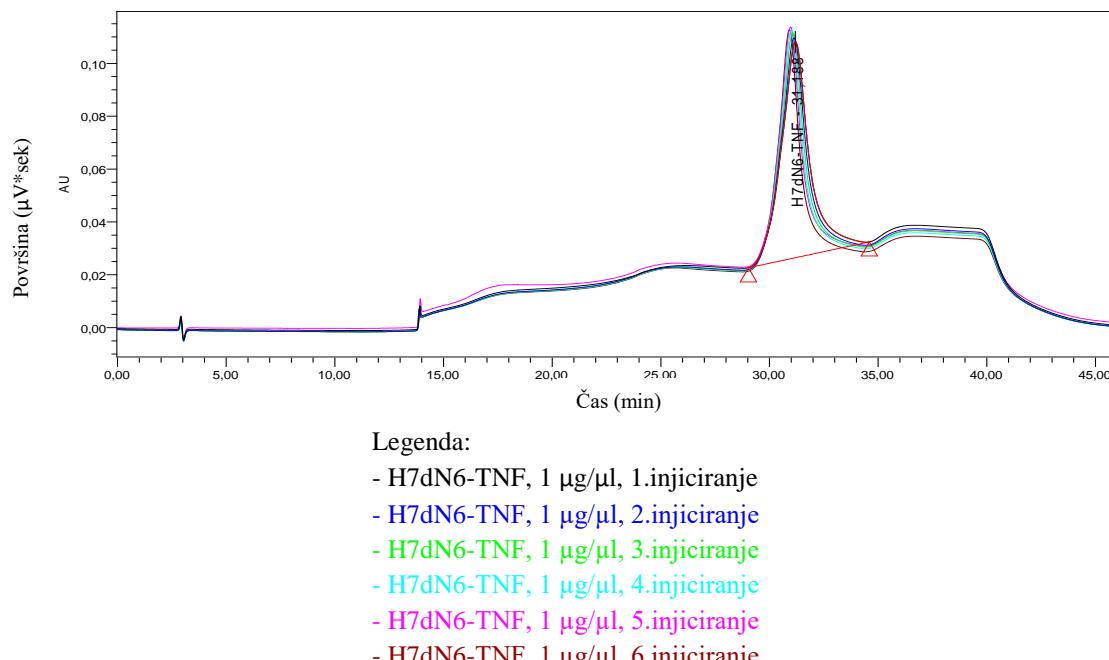
vrha. Zato opisanega preskoka nismo nadalje raziskovali. Območje metode smo opredelili od 5 µg do 100 µg nanosa proteina na kolono.

Preglednica 27: Prikaz površin vrhov vzorcev pri preverjanju linearnosti v območju nanosa vzorca na kolono od 12,5 do 400 µg, ter seštevek predhodno eluiranih vrhov in glavnih vrhov.

Ime vzorca	Površina vrha H7dN6-TNF_DP (µV*sec)	Površina vrha H7dN6-TNF_MP (µV*sec)	Seštevek obeh površin (µV*sec)
H7dN6/S3 [1 µg/µl]-12,5µg	466318	1685077	2151395
H7dN6/S3 [1 µg/µl]-25µg	743002	2848566	3591568
H7dN6/S3 [1 µg/µl]-50µg	1905332	5812766	7718098
H7dN6/S3 [1 µg/µl]-100 µg	3617043	11849732	15466775
H7dN6/S3 [2,37 µg/µl]-150µg	5998676	19271684	25270360
H7dN6/S3 [2,37 µg/µl]-200µg	8496634	25764354	34260988
H7dN6/S3 [2,37 µg/µl]-300µg	6839083	13065889	19904972
H7dN6/S3 [2,37 µg/µl]-350µg	10445766	17337808	27783574
H7dN6/S3 [2,37 µg/µl]-400µg	15173829	21946592	37120421

4.2.2 Rezultati preverjanja ponovljivosti metode

V okviru preverjanja natančnosti metode smo testirali ponovljivost metode IMAC_8_BIO_HPLC2. 6-krat smo injicirali 50 µl vzorca H7dN6-TNF s koncentracijo 1 µg/µl v okviru iste kromatografske sekvence in dobili spodnje kromatograme (Slika 29).



Slika 29: Preverjanje ponovljivosti metode pri injiciranju 50 µl vzorca H7dN6-TNF v 6 ponovitvah. Različne barve kromatogramov predstavljajo različna injiciranja, kot je napisano v legendi.

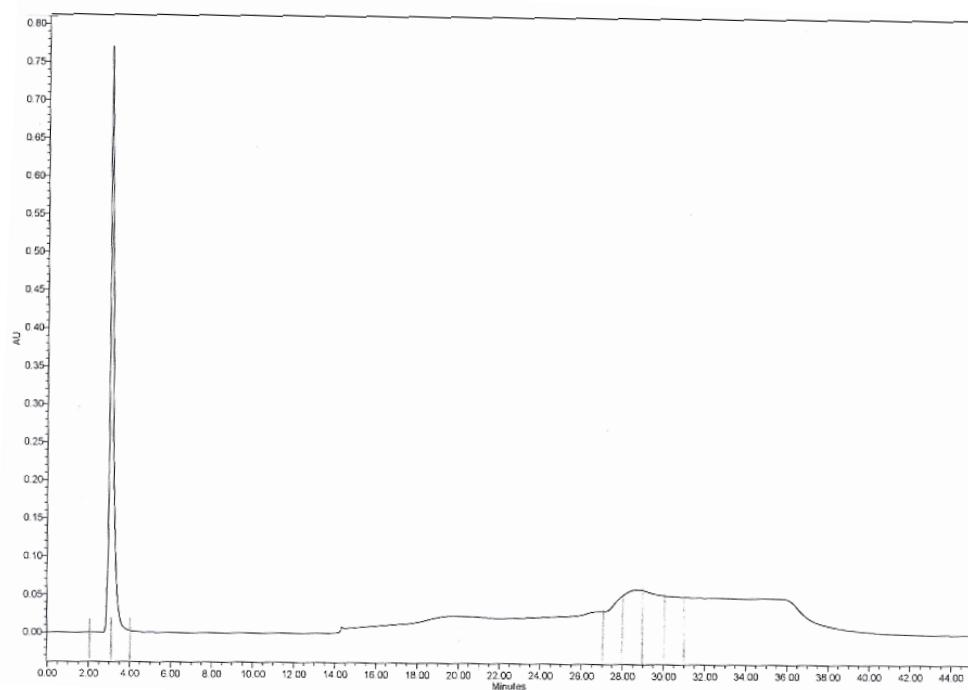
Preglednica 28: Prikaz površin in višin vrhov vzorcev pri preverjanju ponovljivosti metode ter izračun RSD in povprečja.

	Ime vzorca	Retencijski čas (min)	Površina vrha ($\mu\text{V}^*\text{sec}$)	Višina (μV)
1	H7dN6/S3 [1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	31,188	7409114	81681
2	H7dN6/S3 [1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	31,125	7334984	84108
3	H7dN6/S3 [1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	31,067	7247896	86523
4	H7dN6/S3 [1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	31,013	7104368	87993
5	H7dN6/S3 [1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	30,967	6894890	87905
6	H7dN6/S3 [1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	30,917	6740974	88890
Povprečje			7122038	86183
RSD			3,7	3,2

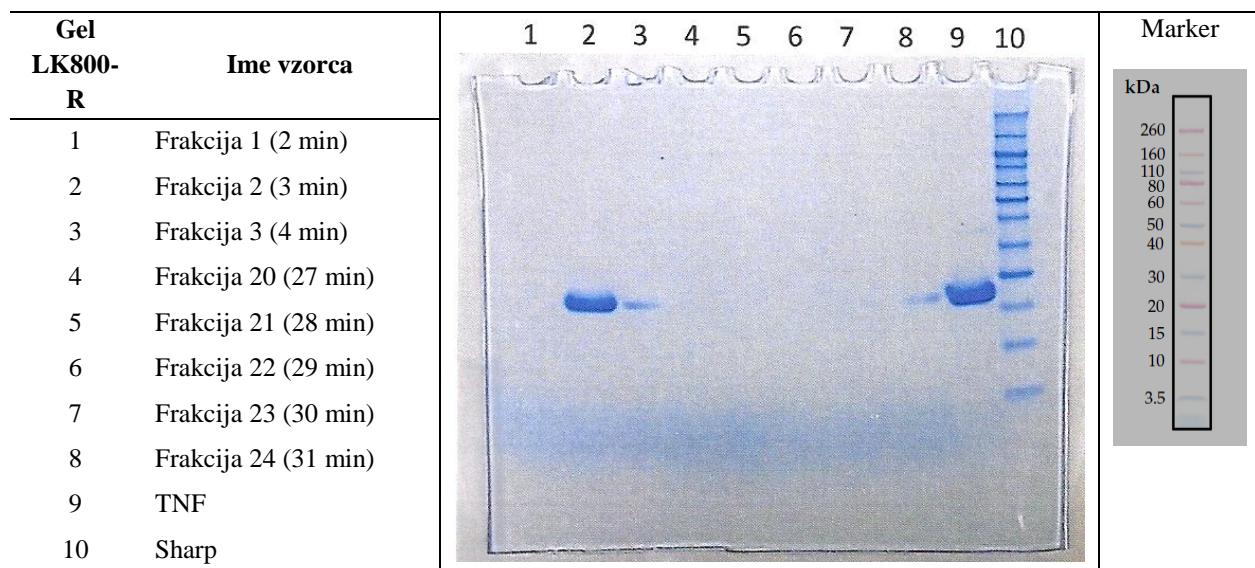
Pri pregledu rezultatov preverjanja ponovljivosti metode spremljamo relativni standardni odklon (angl.: relative standard deviation, RSD). Ponovljivost metode je v tem primeru zadovoljiva, vendar bi si v primeru celotne validacije želeli ta parameter ponovno testirati, saj je priporočljiva vrednost RSD za biofarmacevtske učinkovine pri šestih ponovitvah injiciranja istega vzorca $\leq 3,0\%$, česar v našem primeru nismo dosegli.

4.2.3 Rezultati preverjanja specifičnosti metode

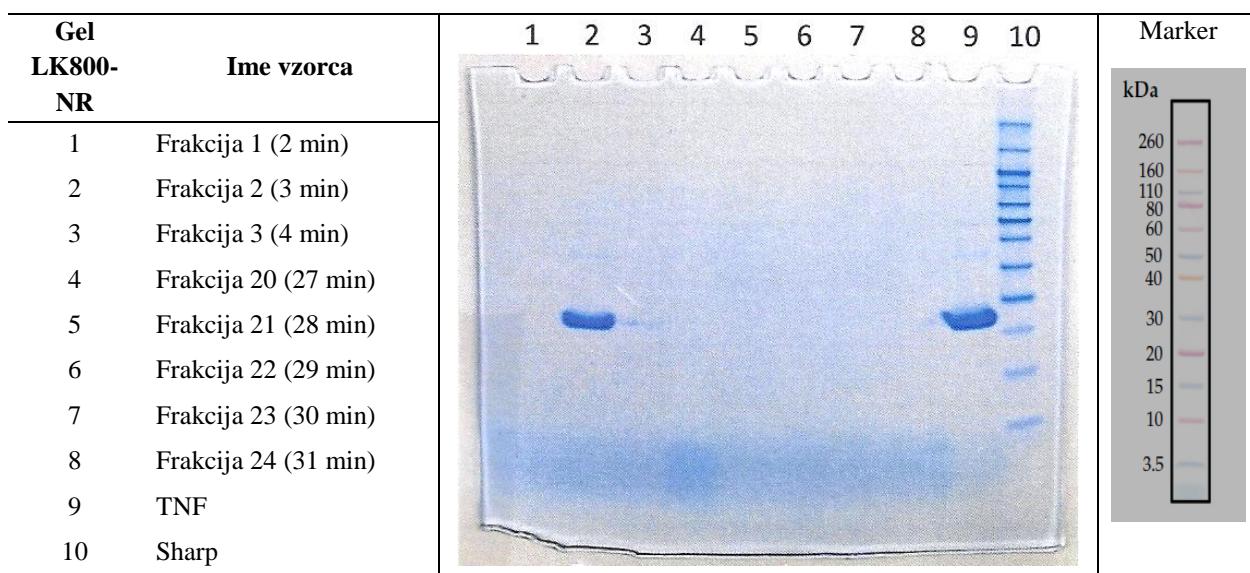
Specifičnost izbrane metode IMAC smo preverjali z analitsko metodo SDS-PAGE. Za ugotavljanje specifičnosti smo najprej injicirali vzorec LK800 ter na kromatogramu spremljali pojav vrhov. Takoj za tem smo injiciranje vzorca ponovili, le da smo tokrat zbirali frakcije vzorca, ki so se spirale s kolone, na vsako minuto, t.j. vsako frakcijo smo zbrali v svojo mikrocentrifugirko. Na enak način smo pri prvem injiciranju vzorca H7dN6-TNF spremljali pojav vrhov, pri drugem smo, kot opisano zgoraj, zbirali frakcije v ločene mikrocentrifugirke na vsako minuto. Po pregledu kromatogramov, smo se odločili, katere frakcije želimo podrobnejše proučiti z metodo SDS-PAGE. Pri obeh vzorcih smo izbrali mesta, kjer se je pojavil kakršenkoli vrh. Zbrane frakcije smo pripravili na dva načina, in sicer za reducirajočo in nereducirajočo metodo SDS-PAGE. Po končani analizi smo gele obarvali, pregledali in jih fotografirali.



Slika 30: Prikaz kromatograma vzorca LK800, prek katerega smo spremljali pojav vrhov ter se odločili, katerih frakcij bomo testirali z SDS-PAGE. Navpične črte so bile v pomoč, da smo lažje določili čas, pri katerem se je pojavil posamezen vrh.

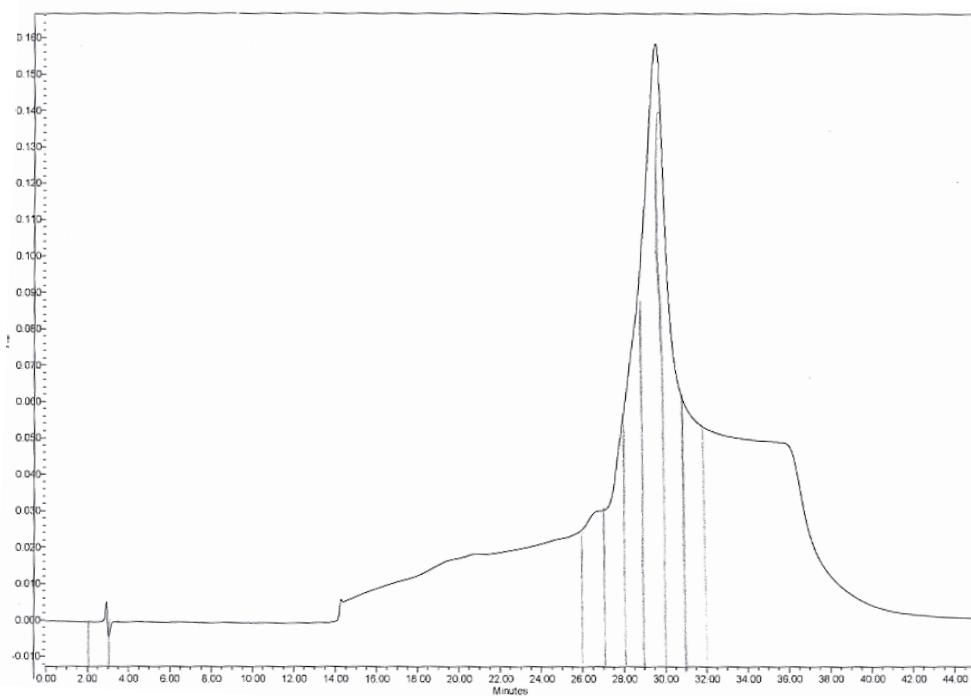


Slika 31: Pregled zbranih frakcij, ki smo jih analizirali z reducirajočo različico SDS-PAGE in prikaz gela za reducirani vorec LK800. V jamici 10 je separacija proteinskega standarda z znanimi masami (v kDa), ki so prikazane na desni strani slike (Marker).

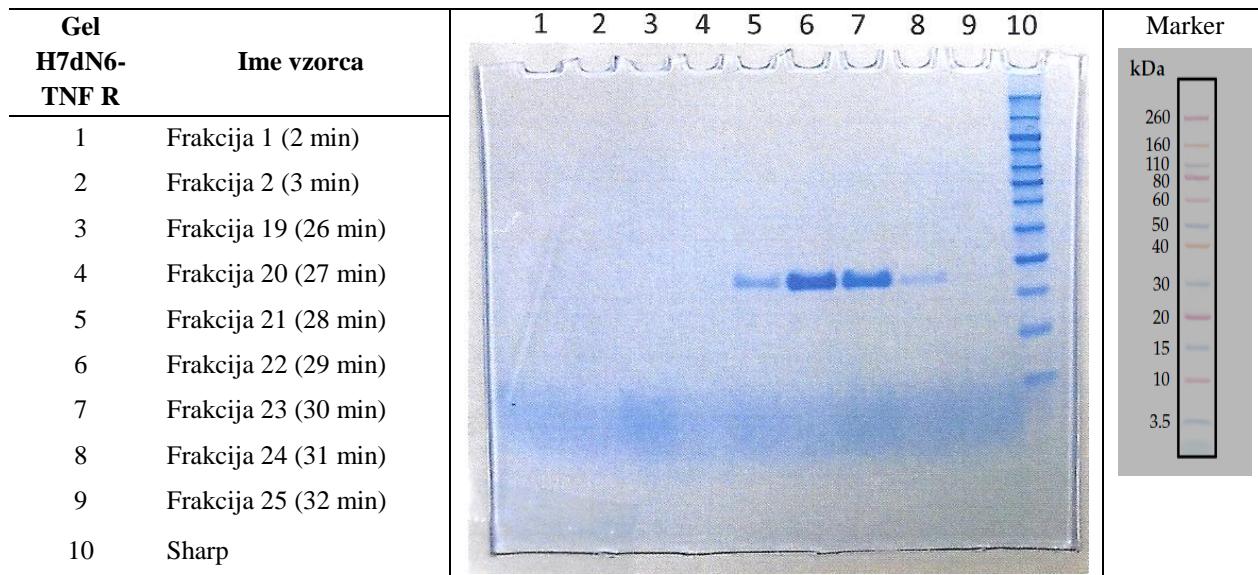


Slika 32: Pregled zbranih frakcij, ki smo jih analizirali z nedreducirajočo različico SDS-PAGE in prikaz gela za nereduciran vorec LK800. V jamici 10 je separacija proteinskega standarda z znanimi masami (v kDa), ki so prikazane na desni strani slike (Marker).

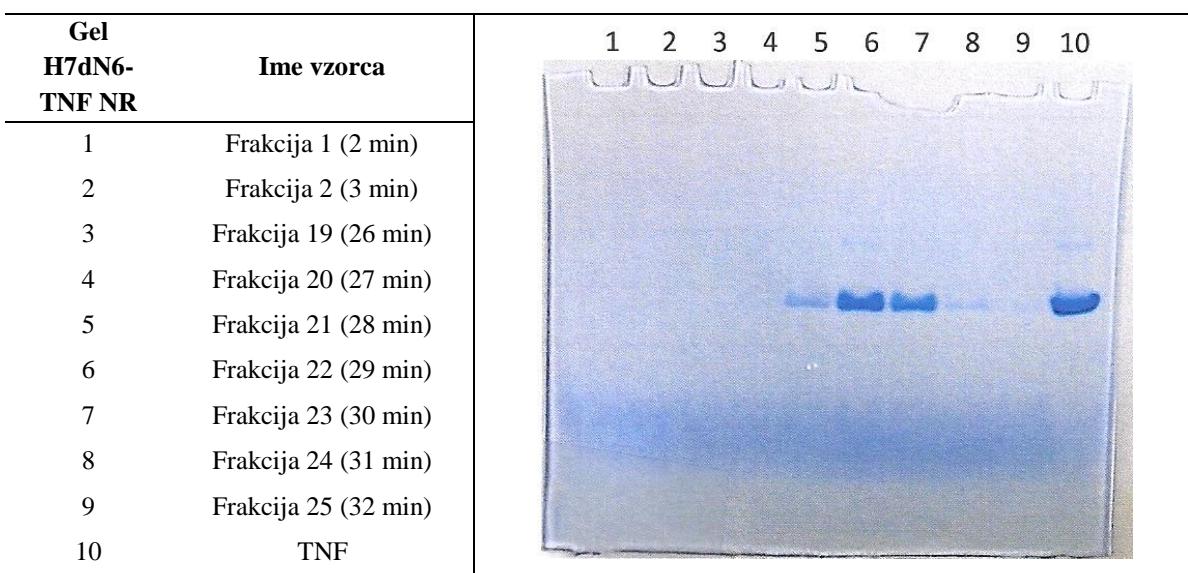
Pri spremljanju kromatograma v programu Empower 3 smo prve frakcije zbrali na začetku, saj se LK800 takoj eluira iz kolone (slika 30). Rezultat je močna lisa v primeru reducirane in nereducirane vzorce pri frakciji 2 (pri 3 min). Rahlo se opazi tudi lisa pri 4. minutu, ki je posledica še ne popolnoma zaključenega vrha iz 3 minute. Pri frakcijah od 20 do 24 se lise niso pojavile, kar pomeni, da so bili majhni vrhovi od 27 do 31 minute, ki so bili vidni na kromatogramu, verjetno posledica gradientne metode in ne elucije proteinov. Liso na gelu smo primerjali s pozicijami proteinov uporabljenega proteinskega standarda (t.i. marker) znanih molekulskih mas in tako ugotovili, da se lisa pojavi med 15 in 20 kDa. Po denaturaciji TNF razpade na tri enake podenote, velike po 17 kDa, zato je pojavnost lise v tem območju pričakovana. To potrjuje tudi lisa pri injiciranju TNF (jamica 9), ki se je pojavila na isti poziciji (Sliki 31 in 32).



Slika 33: Prikaz kromatograma vzorca H7dN6-TNF, prek katerega smo spremljali pojav vrhov ter se odločili, katerih frakcij bomo testirali z SDS-PAGE. Navpične črte so bile v pomoč, da smo lažje določili čas, pri katerem se je pojavil posamezen vrh.



Slika 34: Pregled zbranih frakcij, ki smo jih analizirali z SDS-PAGE in prikaz gela za reducirani vorec H7dN6-TNF. V jamici 10 je separacija proteinskega standarda z znanimi masami (v kDa), ki so prikazane na desni strani slike (Marker).



Slika 35: Pregled zbranih frakcij, ki smo jih analizirali z SDS-PAGE in prikaz gela za nereduciran vorec H7dN6-TNF.

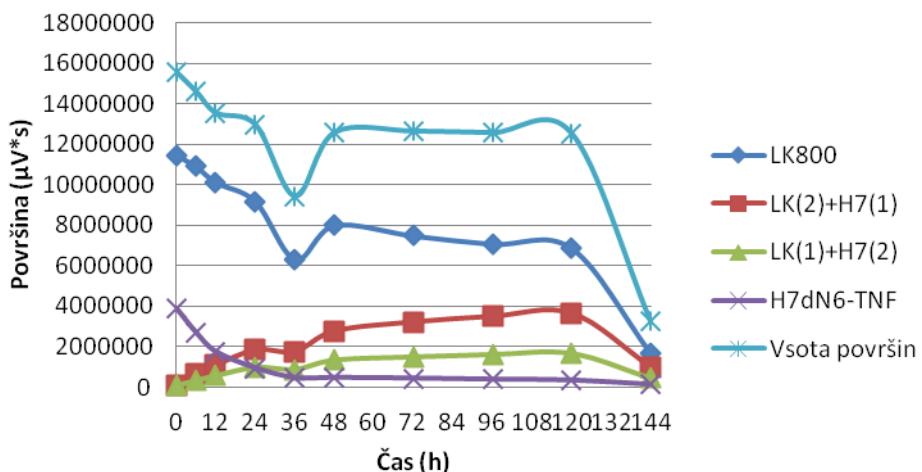
Pri nereduciranih in reduciranih vzorcih H7dN6-TNF smo proučili frakcije, zbrane v prvih minutah, saj se je na kromatogramu pojavil manjši vrh (glej Sliko 33). Ker se na gelih ni pokazala nobena lisa pri frakciji 1 in 2 sklepamo, da ne gre za proteinski vrh. Na gelih so vidne 4 lise in sicer od frakcije 21 do 24 (od 28 do 31 min), in sicer najmočneje v 29 minut. Na gelu, kjer smo testirali reducirane vzorce, smo dodali marker za primerjavo (Slika 34), pri nereduciranih vzorcih pa TNF (Slika 35). Vidimo, da se tudi pri vzorcu H7dN6-TNF pojavijo lise na mestih med 15 in 20 kDa, kar ustreza velikosti TNF.

4.3 REZULTATI SPREMLJANJA IZMENJAVE PODENOT

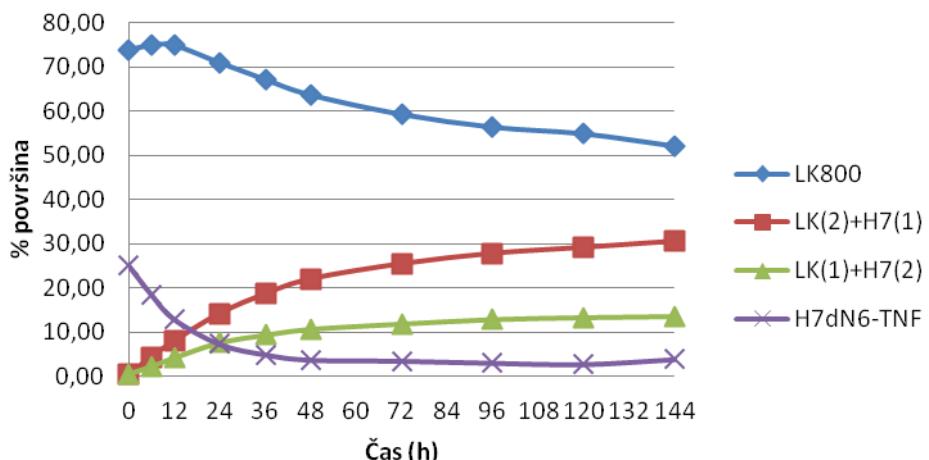
Izmenjavo podenot med nativnim TNF- α oz. LK800 ter konjugatom H7dN6-TNF, z vpeljanimi 6 histidinskimi značkami na vsaki podenoti, smo spremljali z razvito in delno kvalificirano metodo IMAC. Zaradi poskusov, ki jih je opravil Menart (2000), smo izmenjavo podenot izvajali pri pH=7 in pH=5 ter testirali izmenjavo pri doatku NaCl in pri vzorcih brez dodanega NaCl. Vzorce smo inkubirali od 0 h do 144 h pri 4 °C.

Kromatogrami so prikazani v prilogah A do D, preglednice površin integriranih vrhov pa v prilogi E do H. Iz kromatogramov vidimo, da razmerje, ki smo ga pridobili iz površin kromatogramov, med vrhom LK800 in H7dN6-TNF ni enako 1 : 1, kljub temu, da smo glede na oznako na vzorcu predvidevali, da bomo z ustreznim redčenjem dobili enake koncentracije nativnega TNF in analoga H7dN6-TNF in posledično primerljive površine vrhov. Zato smo se odločili, da bomo izmenjavo podenot primerjali le na vrh H7dN6-TNF oz. na zmanjšanje le-tega, saj se pri izmenjavi podenot ustrezno manjša vrh H7dN6-TNF.

- Izmenjava podenot pri pH=7



Slika 36: Prikaz manjšanja površin vzorcev LK800 in H7dN6-TNF in večanja površin vzorcev LK(2) + H7(1) in LK(1) + H7(2) tekom inkubacije vzorcev pri 4°C in $\text{pH}=7,0$.



Slika 37: Odstotkovni prikaz manjšanja površin površin vzorcev LK800 in H7dN6-TNF in večanja površin vzorcev LK(2) + H7(1) in LK(1) + H7(2) tekom inkubacije vzorcev pri 4°C in $\text{pH}=7,0$.

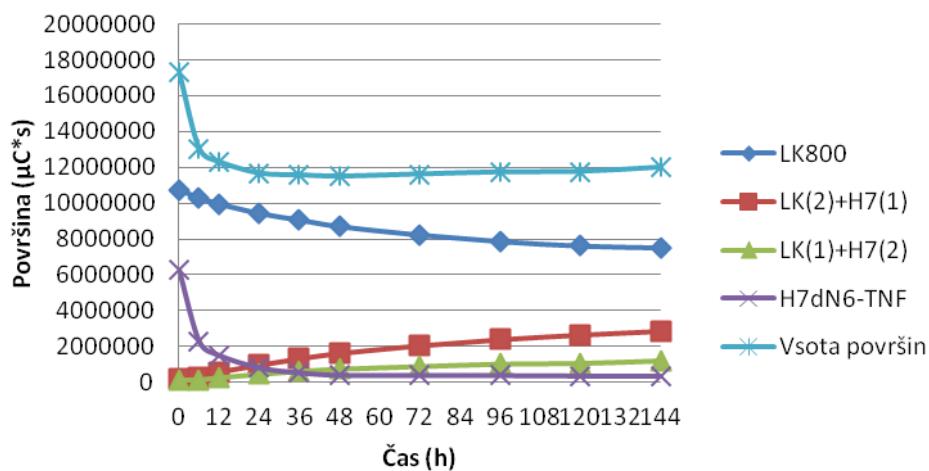
Na grafikonih (slika 36 in 37) je prikazana izmenjava podenot med LK800 in analogom H7dN6-TNF. Razmerje, preračunano iz površin v kromatogramu, med izhodnimi in hibridnimi trimerami ni enako molarnem razmerju $1 : 2 : 2 : 1$, saj že osnovno razmerje med površino kromatograma vzorca LK800 in analoga H7dN6-TNF ni enako $1 : 1$, ampak je bilo pri $\text{pH}=7,0$ enako $2,93 : 1$. Iz tega sledi, da razmerje novo nastalih trimer ne bo takšno, kot bi predvidevali, ampak je zaradi manjše koncentracije analoga H7dN6-TNF nastalo manj trimer LK(1) + H7(2) kot trimer LK(2) + H7(1).

Preglednica 29: Razmerje površin kromatografskih vrhov vseh štirih trimer pred in po koncu inkubacije pri pH=7,0.

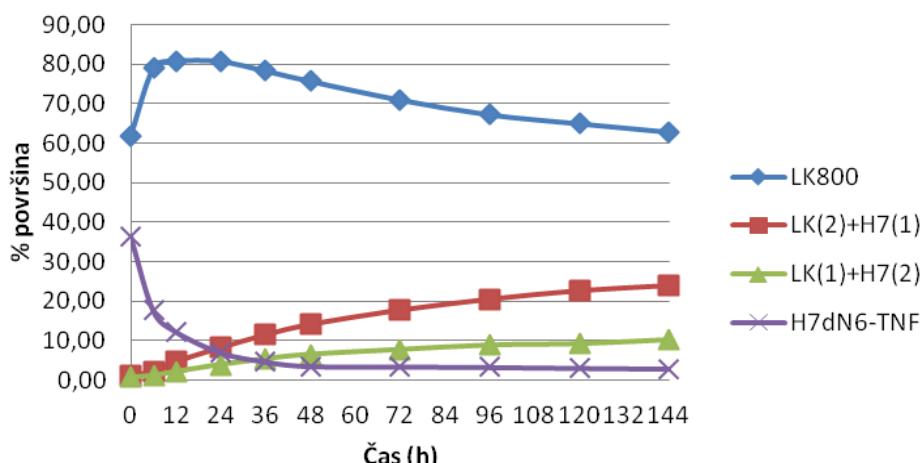
LK800 + H7dN6-TNF [K-fosf.pH=7]				
Čas (h)	LK800	LK(2) + H7(1)	LK(1) + H7(2)	H7dN6-TNF
0	1	0,01	0,01	0,34
144	1	0,59	0,26	0,07

V preglednici 29 je predstavljeno razmerje površin kromatografskih vrhov vseh štirih trimer pred in po koncu inkubacije iz česar vidimo, da je izmenjava podenot potekla, saj se odstotek analoga H7dN6-TNF po 144 h inkubacije zmanjša iz 0,34 % na 0,07 % medtem ko se poveča odstotek novonastalih trimer. Iz grafa, ki prikazuje površine (Slika 36), vidimo, da se po 36 h inkubacije zmanjšajo površine vseh štirih vrhov, vendar je iz grafa, ki prikazuje % površine (slika 37) razvidno, da ostane razmerje med vrhovi enako. Predpostavljamo, da je bil volumen injiciranja premajhen oz., da je bilo v HPLC viali premalo vzorca, saj smo vzorec zadnjič injicirali iz te HPLC viale, pri naslednjem injiciraju (pri 48 h inkubacije) smo isti vzorec injicirali iz druge HPLC viale. Prav tako je pri 144 h inkubacije seštevek vseh površin premajhen glede na ostale seštevke površin tega vzorca, vendar gre ponovno za zadnje injiciranje iz iste viale, zato je možno, da smo se pri preračunu volumna zmotili in v HPLC vialo odpipetirali premajhen volumen vzorca (t.j. neupoštevajoč »mrtni« volumen injiciranja).

- Izmenjava podenot pri pH=7 z dodatkom NaCl



Slika 38: Prikaz manjšanja površin vzorcev LK800 in H7dN6-TNF in večanja površin vzorcev LK(2) + H7(1) in LK(1) + H7(2) tekom inkubacije vzorcev pri 4 °C in pH=7 ob dodatku NaCl.



Slika 39: Odstotkovni prikaz manjšanja površin vzorcev LK800 in H7dN6-TNF in večanja površin vzorcev LK(2) + H7(1) in LK(1) + H7(2) tekom inkubacije vzorcev pri 4 °C in pH=7 ob dodatku NaCl.

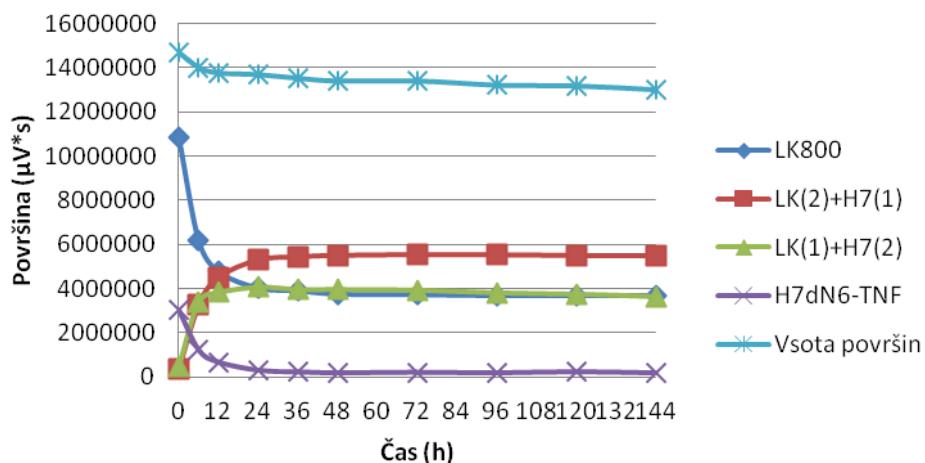
Izmenjava podenot pri pH=7 in pri dodatku NaCl bi morala po predvidevanjih potekati počasneje kot pri pufru brez dodanega NaCl. Iz grafov (sliki 38 in 39) vidimo, da je razmerje površin kromatografskih vrhov izmenjenih podenot ponovno drugačno od predvidenega, saj je razmerje med površinami kromatografskih vrhov LK800 in H7dN6-TNF pri 0 h enako 1,70 : 1. To razmerje je precej manjše kot pri vzorcih inkubiranih v pufru s pH=7 brez dodanega NaCl, vendar je površina vrha H7dN6-TNF v času 0 h skoraj 2-krat večja od površin vzorcev H7dN6-TNF pri ostalih pogojih v času 0 h. Ob injiciranju vzorca po 6 h inkubacije se razmerje med površinami vrhov vzorcev LK800 in H7dN6-TNF močno poveča na račun LK800, kar vidimo iz strmega padca krivulje pri vzorcu H7dN6-TNF. To se kaže tudi na grafu, kjer je prikazana vsota površin (slika 38), ki ob času 6 h močno pada in potem do konca ostaja primerljiva. Vzroka za skoraj dvakrat večjo površino ob prvem injiciranju ne moramo natančno določiti. Razmerje površin kromatografskih vrhov ostalih trimer je prikazano v preglednici 30.

Preglednica 30: Razmerje površin kromatografskih vrhov vseh štirih trimer pred in po koncu inkubacije pri pH=7 in dodanem NaCl.

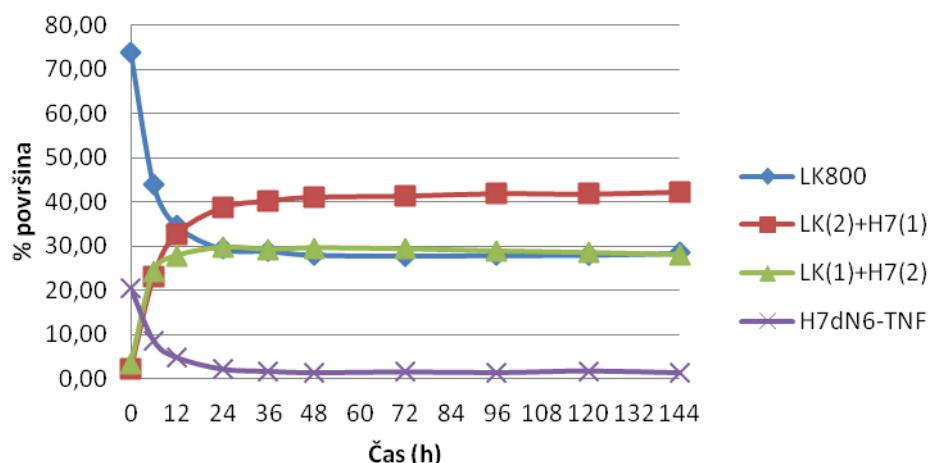
LK800 + H7dN6-TNF[K-fosf.+NaCl pH=7]				
Čas (h)	LK800	LK(2)+H7(1)	LK(1)+H7(2)	H7dN6-TNF
0	1	0,02	0,01	0,59
144	1	0,38	0,16	0,05

Iz zgoraj opisanega razmerja in površin vrhov prikazanih v Prilogi F lahko vidimo, da imata molekuli LK800 ter H7dN6-TNF ob dodatku NaCl večjo obstojnost povezav med trimeri oz. večjo stabilnost molekule, zato je po 144 h inkubacije manj nastalih vmesnih trimer z izmenjanimi podenotami.

- Izmenjava podenot pri pH=5



Slika 40: Prikaz manjšanja površin vzorcev LK800 in H7dN6-TNF in večanja površin vzorcev LK(2) + H7(1) in LK(1) + H7(2) tekom inkubacije vzorcev pri 4°C in $\text{pH}=5$.



Slika 41: Odstotkovni prikaz manjšanja površin vzorcev LK800 in H7dN6-TNF in večanja površin vzorcev LK(2) + H7(1) in LK(1) + H7(2) tekom inkubacije vzorcev pri 4°C in $\text{pH}=5$.

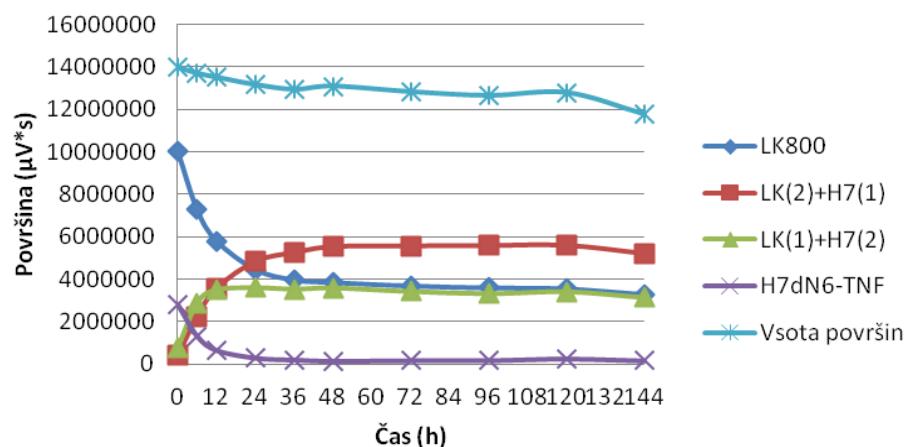
Pri inkubaciji vzorcev v pufru s $\text{pH}=5$ smo pričakovali hitrejšo izmenjavno podenot, kar se je tudi potrdilo. Iz grafov (slike 40 in 41) in ob pregledu površin vzorcev lahko razberemo, da so podenote dokončno izmenjane že po 36 h inkubacije, kasneje se površine vrhov ne spreminja več, ampak do konca inkubacije ostajajo stalne. Osnovno razmerje površin vrhov vzorcev LK800 in H7dN6-TNF je 3,58 : 1 in kot pri vseh ostalih pogojih ni enako 1 : 1, zaradi česar je drugačno tudi razmerje nastalih podenot.

Preglednica 31: Razmerje površin kromatografskih vrhov vseh štirih trimer pred in po koncu inkubacije pri pH=5.

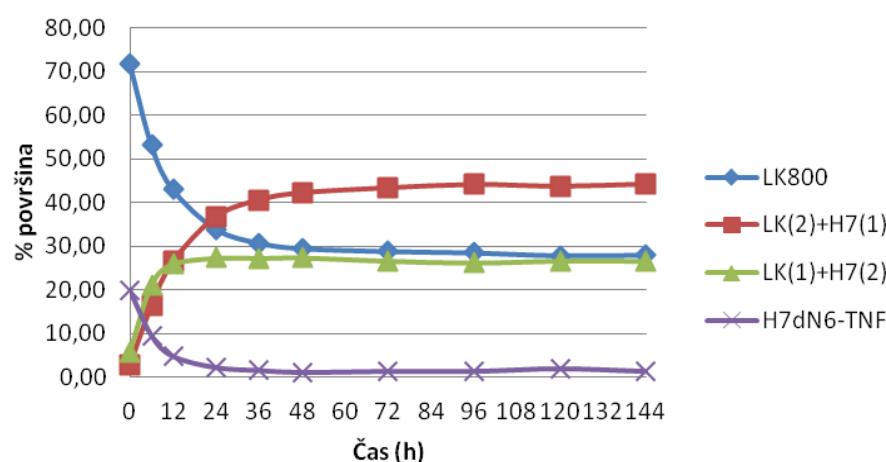
LK800 + H7dN6-TNF [K-fosf.pH=5]				
Čas (h)	LK800	LK(2)+H7(1)	LK(1)+H7(2)	H7dN6-TNF
0	1	0,03	0,05	0,28
144	1	1,49	0,99	0,05

Tudi v tem primeru vidimo, da ne nastane enaka količina hibridnih trimer, ampak zaradi manjše koncentracije analoga H7dN6-TNF v raztopini nastane več molekul LK(2) + H7(1) kot molekul LK(1) + H7(2).

- Izmenjava podenot pri pH=5 z dodatkom NaCl



Slika 42: Prikaz manjšanja površin vzorcev LK800 in H7dN6-TNF in večanja površin vzorcev LK(2) + H7(1) in LK(1) + H7(2) tekom inkubacije vzorcev pri 4 °C in pH=5 ob dodatku NaCl.



Slika 43: Odstotkovni prikaz manjšanja površin vzorcev LK800 in H7dN6-TNF in večanja površin vzorcev LK(2) + H7(1) in LK(1) + H7(2) tekom inkubacije vzorcev pri 4 °C in pH=5 ob dodatku NaCl.

Nižja pH vrednost povzroči hitrjšo izmenjavo podenot, vendar pa dodatek NaCl zmanjša hitrost izmenjave podenot, saj pripomore k večji stabilnosti molekule. Zato se je izmenjava podenot še vedno zgodila veliko hitreje kot pri pH=7, vendar se je izmenjava ustalila po 48 h inkubacije. Osnovno razmerje med molekulama LK800 in H7dN6-TNF je 3,61 : 1.

Preglednica 32: Razmerje vseh štirih trimer pred in po koncu inkubacije pri pH=5 in dodanem NaCl.

LK800 + H7dN6-TNF [K-fosf.+NaCl pH=5]				
Čas (h)	LK800	LK(2)+H7(1)	LK(1)+H7(2)	H7dN6-TNF
0	1	0,04	0,08	0,28
144	1	1,58	0,95	0,05

Ponovno vidimo, da je nastalo več molekul z dvema podenotama LK800 in eno H7dN6-TNF, kar je posledica enakega, že v predhodnjih točkah opisanega vzroka.

5 RAZPRAVA

TNF- α je dinamična molekula, ki lahko zaradi svojega pleiotropnega učinka v telesu opravlja zelo različne funkcije. Pri zdravem organizmu ima velik pomen pri obrambi pred mikrobi, saj povišane koncentracije TNF- α inducirajo celično smrt ter povzročijo proliferacijo in produkcijo citokinov, kar organizem zaščiti pred mikrobi. V bolezenskih stanjih organizma je TNF- α lahko v vlogi povzročitelja nastanka nekaterih avtoimunskih bolezni kot npr. luskavica, Kronova bolezen, revmatoidni artritis itd., lahko pa izkoristimo protitumorsko delovanje molekule in z lokalno aplikacijo TNF- α na mesto tumorja zavremo rast in razvoj tumornega tkiva. Razvoj novih zaviralcev TNF- α je zaradi številnih avtoimunskih bolezni, ki jih povzroča dlje časa lokalno povišana koncentracija TNF- α v današnjih dneh fokus številnih raziskovalnih skupin. Zaradi odkritja Menarta in sod. (1996), da je TNF- α dinamična homotrimerna molekula, ki v raztopini z drugimi TNF- α izmenjuje podenote, se je odprla možnost za potencialni razvoj novih zaviralcev TNF. Tako je Jalen (2015) v doktorski disertaciji prikazala potencialno uporabo novih konjugatov TNF- α z izničenim citotoksičnim delovanjem, ki bi inhibirali delovanje nativnega TNF v organizmu in bi zaradi izboljšanih permeabilnostnih lastnosti lahko postali kandidati za razvoj novih zaviralcev TNF za zdravljenje Kronove bolezni. Za prikaz izmenjave podenot smo razvili analitsko metodo, s katero bi lahko prikazali potek izmenjave podenot med konjugati in nativno TNF. Ker konjugati vsebujejo histidinske podaljške smo se odločili za razvoj analitske metode IMAC, pri čemer se histidini vežejo na kovinske ione, s katerimi je nasitena kolona. Magistrska naloga je tako sestavljena iz faze razvoja metode, ki ji je sledila kratka kvalifikacija metode ter na koncu spremljanje izmenjave podenot.

Razvoj metode smo pričeli z optimizacijo sestave mobilnih faz, pri čemer smo primerjali mobilne fazi na osnovi HEPES in K-fosfatnega pufrnega sistema. Zanimala nas je ustrezost uporabe K-fosfatnega pufrnega sistema za metodo IMAC, saj fosfati tvorijo koordinativne vezi s kovinskimi ioni in so zato primerni le za analite, ki imajo močno afiniteto do kovinskih ionov, kot npr. proteini s histidinsko značko (ProPac™ ..., 2012). Ugotovili smo, da v primeru analoga H7dN6-TNF zaradi močne vezave molekul na kovinske ione na koloni ni razlik pri uporabi navedenih pufrnih sistemov. Medtem ko pri analogu LK801, ki ima vpeljana le dva dodatna histidina na vsako podenoto, lahko pride do tvorbe koordinativnih vezi, ki jih s Cu²⁺ tvorijo fosfati v K-fosfatnem pufru in s tem zasedejo nekaj mest za vezavo analoga na kolono (ProPac™ ..., 2012), kar se kaže v hitrejši eluciji vzorca iz kolone. Zatem smo se lotili optimizacije koncentracije imidazola v MFB, ki je eden izmed najpomembnejših dejavnikov pri optimizaciji mobilnih faz za metodo IMAC. Imidazol namreč tekuje s histidinskimi ostanki za vezavo na kovinske ione in tako izpodrine proteine iz kolone zaradi česar je ključen pri eluciji proteinov (Gaberc-Porekar in Menart, 2001). Ugotovili smo, da 0,5 M imidazol ni ustrezen za elucijo

analoga H7dN6-TNF, saj je ta premočno vezan na kovinske ione. Zato smo testirali 0,6 M imidazol, s katerim smo iz kolone ustrezeno eluirali vse vzorce. Iskali smo čim manjšo molarnost imidazola, ki bi še zadostovala za elucijo vseh vzorcev, saj večja molarnost imidazola pomeni večjo absorbcojo imidazola, kar rezultira v dvigu bazne linije kromatograma. Pri pripravi mobilnih faz je treba upoštevati, da morajo biti pripravljene iz kemikalij, ki ne vsebujejo ionskih in spektrofotometričnih nečistot, pri čemer je še posebej pomembna izbira imidazola. Neustrezna čistost uporabljenega imidazola namreč vpliva na nivo absorbcije ozadja. Proizvajalci kolone priporočajo uporabo imidazola s čistostjo $\geq 99,5\%$ (ProPacTM ..., 2012), vendar smo zaradi priročnosti imidazola, ki smo ga že imeli v laboratoriju testirali razliko z imidazolom s čistostjo $\geq 99\%$. Ugotovili smo, da je čistost imidazola res izjemnega pomena, saj smo pri uporabi manj čistega imidazola zaznali dvig bazne linije na kromatogramu.

Nadaljevali smo z optimizacijo detekcije, pri čemer smo najprej primerjali različne valovne dolžine, saj smo želeli preveriti, katere komponente v TNF- α največ prispevajo k absorpciji. Zato smo testirali valovni dolžini 214 in 280 nm, saj pri 214 nm absorbirajo peptidne vezi, medtem ko pri 280 nm aromatske molekule znotraj TNF- α . Ugotovili smo, da k večji absorpciji bolj prispevajo aromatske aminokisline, ki so prisotne v TNF- α , saj je pri valovni dolžini 280 nm približno 2-krat večji odziv kot pri valovni dolžini 214 nm. Zaradi nizkih koncentracij novonastalih trimer v začetku izmenjave podenot smo se odločili, da bomo nadaljne analize izvajali pri valovni dolžini 280 nm. Tekom optimizacije detekcije smo iskali ustrezne vzorčne pasovne širine ter referenčne valovne dolžine in pasovne širine. Vzorčna pasovna širina vpliva na šum bazne linije, ki se poveča v primeru, kadar zmanjšamo pasovno širino. V primeru gradientne metode velja, da večja kot je vzorčna pasovna širina, večji je dvig bazne linije. Na šum bazne linije močno vpliva tudi izbor ustrezne referenčne valovne dolžine, ki mora biti izbrana v območju izven vzorčne valovne dolžine, na območju, kjer tudi druge komponente v vzorcu ne absorbirajo (Agilent 1100 ..., 2004). Glede na teoretično ozadje in pregledane kromatograme smo najprej izločili uporabo detektorskih nastavitev, kjer je bila zaradi prevelike vzorčne pasovne širine dvignjena bazna linija ter nastavitev, kjer sploh nismo določili referenčne valovne dolžine in pasovne širine. Ostala sta torej dva kanala s podobnimi nastavitvami, le z različnimi referenčnimi valovnimi dolžinami, pri čemer smo ugotovili, da sta obe izbrani valovni dolžini ustreznii. Zato smo nadaljne analize izvajali z nastavitvami na kanalih 2 in 3, kjer smo na obeh kanalih izbrali vzorčno valovno dolžino 280 nm ter vzorčno pasovno širino 10 nm, medtem ko je bila referenčna valovna dolžina na kanalu 2 nastavljena na 360 nm, na kanalu 3 pa na 450 nm. Ostalih detektorskih nastavitev nismo spremajali, ampak smo privzeli prednastavljenе vrednosti v programu Empower 3.

Zadnja stopnja v razvoju metode je bila optimizacija gradiента. Pri optimizaciji gradienta smo prvotno vzpostavljeno metodo spremenjali od instrumentalne metode IMAC_4_BIO_HPLC2 do IMAC_11b_HPLC2 (strmina in trajanje gradienta). Po vsaki

izvedeni spremembi smo iz posnetega kromatograma ocenili kako bi lahko metodo optimirali na način, da bi se vsi štirje vrhovi eluirali ločeno, da bi bila instrumentalna metoda kratka, da bi eluirani vrhovi imeli ustrezno obliko ter da bi bila integracija čim bolj enostavna. To smo pri vsaki naslednji instrumentalni metodi preizkusili in enkrat dobili bolj in drugič manj ustrezne kromatograme. Na koncu smo se odločili za metodo IMAC_8_BIO_HPLC2, saj smo na kromatogramu zaznali vse štiri vrhove ločene, simetrične, z možnostjo ustrezne integracije.

Po izboru primernih mobilnih faz, optimizacije detektorskih nastavitev in gradienta smo se odločili za krajšo obliko kvalifikacije metode, s čimer smo želeli potrditi linearnost v določenem območju, ponovljivost in specifičnost metode. Za referenčni vzorec smo tekom kvalifikacije uporabili vzorec H7dN6-TNF s koncentracijo $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ z volumnom injiciranjem $50 \mu\text{l}$, kar pomeni $50 \mu\text{g}$ nanosa vzorca na kolono. Tekom kvalifikacije smo se oprli na smernice ICH ter interne standarde družbe Lek d.d.. Linearnost metode smo izvajali v območju od 10 do 200 % koncentracije uporabljenega referenčnega vzorca. Z redčenjem in spremembami v volumnih injiciranja smo spreminjali nanos na kolono ter po integraciji rezultatov dokazali linearnost v območju od 10 do 200 %, saj je korelacijski koeficient v tem območju 0,9996. Ko smo obseg povečali do nanosa $400 \mu\text{g}$ vzorca na kolono, smo ugotovili, da metoda v tem območju ni več linearна, saj se zaradi prevelikega nanosa proteina na kolono višina glavnega vrha skoraj ne povečuje več, ampak se veča vrh pred glavnim vrhom oz. nastaja t.i. »rama«. V okviru testiranja natančnosti smo testirali ponovljivost metode. Ponovljivost smo skladno s smernicami ICH izvajali tako, da smo 6-krat injicirali vzorec pri 100 % koncentraciji in spremljali RSD, ki je bil 3,7 %. Ocenili smo, da je za razvojne namene takšna ponovljivost ustrezna, medtem ko bi v primeru validacije v polnem obsegu, ponovljivost ponavljali ter ponovno pregledali ustreznost obstoječe integracije ter iskali vzroke za $\text{RSD} > 3,0\%$. V okviru kvalifikacije metode smo testirali tudi specifičnost metode, kar smo preverjali z SDS-PAGE. Preverjali smo prisotnost drugih proteinskih komponent v vzorcih LK800 in H7dN6-TNF, ki bi jih z metodo IMAC lahko zaznali. Za oba vzorca smo izvajali reducirajočo in nereducirajočo obliko SDS-PAGE. Ugotovili smo, da tako pri vzorcu LK800 kot pri H7dN6-TNF zaznamo lise pri velikosti okoli 17 kDa, kar ustreza velikosti ene podenote TNF. Na nobenem gelu nismo zaznali nobene lise pri drugih velikostih, ki bi lahko predstavljale nespecifične proteine v vzorcu. Prav tako nismo opazili razlik pri vzorcih, ki so bili reducirani od nereduciranih, iz česar sklepamo, da so bili proteini v vzorcih zaradi dodatka SDS dokončno razviti v polipeptide in niso tvorili novonastalih terciarnih struktur. V kolikor bi želeli metodo uporabljati v laboratorijih, ki delujejo v skladu s predpisi GMP, bi morali izvesti polno validacijo metode. V takšnem primeru bi torej izvedli še nekaj dodatnih testov, ki jih predpisujejo smernice ICH, in sicer točnost metode, v okviru natančnosti bi izvedli tudi vmesno natančnost (primerjava npr. dveh izvajalcev, aparatur, serij kolone,...). Hkrati bi lahko poiskali razloge za slabšo ponovljivost in v okviru specifičnosti dodali še injiciranje MFA, s katero bi na enostaven način še drugače potrdili

specifičnost metode. Tekom polne validacije bi določili tudi območje, v katerem je metoda točna, natančna in linearna. Zaenkrat smo določili le območje, v katerem je metoda linearna (Intenational ..., 2005).

Končni namen razvoja in delne kvalifikacije metode je v njeni aplikaciji, pri čemer smo se osredotočili na spremljanje asociacije in disociacije podenot med nativnim TNF in analogom H7dN6-TNF. S to metodo smo želeli potrditi, da v raztopini pri ustreznih pogojih lahko pride do izmenjave podenot med različnimi oblikami TNF. To so prvotno pokazali že Menart in sod. (1996), ko so odkrili, da je med molekulami TNF prihajalo do izmenjave podenot. Kasneje je Menart (2000) v doktorski disertaciji podrobnejše raziskal izmenjavo podenot, kar nam je služilo kot izhodiščna raziskava za naše poskuse. V doktorski disertaciji je predstavil izmenjavo podenot z metodo izoelektričnega fokusiranja ter z metodo IMAC, pri čemer je obakrat dobil končno razmerje izmenjanih podenot med nativno obliko TNF (A_3) in LK-801 (B_3) $A_3 : A_2B : AB_2 : B_3 = 1 : 2 : 2 : 1$. Prav tako je raziskal vpliv pH vrednosti na izmenjavo podenot, zato smo se pri postavitvi poskusa oprli na njegove rezultate. V naših poskusih smo namesto analoga LK-801 uporabili analog H7dN6-TNF, ker se zaradi več vpeljanih histidinov (6 histidinov na vsaki podenoti) najmočneje veže na kovinske ione na koloni in pri izmenjavi podenot z LK800 dobimo molekule s 6 ali 12 dodatno vnešenih histidinov. Poleg pH=5 in pH=7 smo testirali tudi dodatek NaCl v pufer za pripravo vzorca, saj smo želeli testirati vpliv NaCl na večjo stabilnost molekul in posledično manjšo izmenjavo podenot. Dobljeni rezultati so se od rezultatov, ki jih je v doktorski disertaciji predstavil Menart (2000), precej razlikovali. Že pri pregledu kromatogramov smo opazili, da površini vzorcev LK800 in H7dN6-TNF nista v razmerju 1 : 1, ampak je bila površina vzorca H7dN6-TNF 2 do 3-krat manjša od vzorca LK800. Možen vzrok je predhodno napačno izmerjena koncentracija z drugimi analitskimi metodami za enega izmed vzorcev ali pa drugačna absorbacija nativne oblike in analoga pri 280 nm. Zaradi drugačnega razmerja LK800 in H7dN6-TNF je posledično tudi spremenjeno razmerje nastalih trimer in je tako nastalo več trimer LK(2) + H7(1) kot LK(1) + H7(2). Iz vseh štirih pogojev, ki smo jih preučevali (pH=7, pH=7 + NaCl, pH=5 in pH=5 + NaCl) lahko razberemo, da je pri vseh pogojih prišlo do izmenjave podenot med LK800 in H7dN6-TNF, saj se je povsod vrh H7dN6-TNF zmanjšal, medtem ko sta se povečala vmesna nastala vrhova. Prav tako lahko potrdimo, da je v primeru pH=5 prišlo do končne izmenjave podenot že po 36 h inkubacije, medtem ko pri pH=7 tudi po 144 h ne moramo z gotovostjo trditi, da so se izmenjale vse podenote, saj se grafi razmerja hibridnih trimer še vedno dvigajo. Funkcija dodatka NaCl se je pri pH=5 potrdila, saj je do končne izmenjave podenot prišlo po 48 in ne po 36 h kot v primeru pH=5 brez dodatka NaCl. Če bi želeli potrditi razmerje, ki ga je za izmenjavo podenot predpostavil Menart (2000), bi morali najprej ponovno izmeriti koncentraciji vzorcev LK800 in H7dN6-TNF z UV spektrofotometrom oz. s katero izmed drugih kromatografskih metod za določanje vsebnosti (npr. reverzno fazna kromatografska metoda). Ko bi z metodo IMAC po injiciraju obeh vzorcev dobili primerljivi površini vrhov LK800 in H7dN6-TNF bi lahko

izmenjavo pod enakimi pogoji ponovili in primerjali dobljeno razmerje. Prav tako bi lahko še preverili temperaturno odvisnost izmenjave podenot, saj predvidevamo, da bi pri višjih temperaturah prišlo do hitrejše izmenjave podenot kot pri temperaturi 4 °C.

Glede na izvedene teste lahko zaključimo, da bi bila metoda ustrezna za uporabo v analitskem laboratoriju, saj smo z enostavno pripravo mobilnih faz, komercialno dostopnimi kromatografskimi kolonami, opravljenimi optimizacijami gradiента in detekcije vzpostavili metodo, s katero lahko hitro preverimo, kakšna je kinetika izmenjave podenot TNF- α .

6 SKLEPI

- Razvili in kvalificirali smo metodo, ki je primerna za preučevanje disociacije in reasociacije podenot TNF- α .
- Pri razvoju metode je pomemben izbor ustrezeno čistih kemikalij, saj lahko le-te močno vplivajo na dvig bazne linije ter s tem zmanjšajo natančnost interpretacije kromatogramov.
- Metoda je linearна, ponovljiva in specifičна ter primerna za uporabo za razvojne namene. Če bi metodo želeli uporabljati v okolju, ki deluje skladno s smernicami GMP, bi morali izvesti polno validacijo in testirati še parametre za točnost, vmesno natančnost ter območje, v katerem je metoda linearна, točna in natančna.
- Na izmenjavo podenot TNF- α močno vplivajo različni dejavniki kot so pH vrednost, sestava pufrov ter temperatura inkubacije. Izmenjava podenot poteka v pH območju od 5 do 7, pri čemer nižja pH vrednost povzroči hitrejšo izmenjavo podenot. Pufri z dodatkom NaCl povečajo stabilnost trimerne molekule in tako zmanjšajo hitrost izmenjave podenot.
- Razmerje izmenjave podenot ni primerljivo z razmerjem v znanstveni literaturi zaradi različne koncentracije uporabljenih izhodnih molekul (LK800 in H7dN6-TNF). V primeru ponovnega testiranja razmerja bi bilo najprej potrebno izenačiti koncentraciji izhodnih molekul in enako koncentracijo preverili s primerjavo površine vrhov.
- Metoda je primerna za rutinsko uporabo v analitskih laboratorijih.

7 POVZETEK

TNF- α je pleiotropni homotrimerni citokin, ki opravlja številne vloge tako v zdravem kot tudi v bolnem organizmu. V primeru povišane lokalne koncentracije TNF- α v telesu pride do nastanka nekaterih avtoimunskih bolezni (kot npr. Kronova bolezen), zato so številne raziskovalne skupine začele razvijati zaviralce TNF (npr. Infliximab, Adalimumab, Certolizumab Pegol itd.). Z odkritjem izmenjave podenot molekule TNF- α v raztopini so se odprle možnosti za morebiten razvoj novih zaviralcev TNF. Bolniki s Kronovo boleznjijo imajo v črevesju dlje časa povišano koncentracijo TNF- α in v primeru če bi konjugate z izničenim citotoksičnim delovanjem dostavili do črevesja, bi z nativno molekulo TNF izmenjali podenote in tako inhibirali delovanje nativne TNF- α . Zato smo želeli razviti analitsko metodo, s katero bi lahko spremljali potek izmenjave podenot med različnimi konjugati in nativnimi TNF. Zaradi razvoja konjugatov s pripetimi histidinskimi značkami smo se odločili, da je najprimernejša metoda IMAC. Za spremljanje izmenjave podenot smo morali metodo najprej razviti, česar smo se prvotno lotili z optimizacijo mobilnih faz. Testirali smo razliko pri uporabi HEPES in K-fosfatnega pufrnega sistema ter ugotovili, da je zaradi nespecifičnih povezav, ki jih s Cu²⁺ lahko tvorijo K-fosfati bolj primerna uporaba HEPES pufrnega sistema. Nato smo optimizirali molarnost imidazola v MFB in ugotovili, da je optimalna molarnost imidazola v MFB 0,6 M. Prav tako smo se prepričali, da je za ustrezno pridobljene rezultate pomembna uporaba imidazola čistosti $\geq 99,5\%$, saj čistost imidazola vpliva na dvig bazne linije. Za tem smo se lotili optimizacije detekcije, kjer smo testirali vzorčni valovni dolžini pri 214 in 280 nm in ugotovili, da je absorbacija približno dvakrat večja pri 280 nm zato smo uporabili to vzorčno valovno dolžino. Optimirali smo tudi vzorčno pasovno širino in referenčno valovno dolžino in pasovno širino in sicer tako, da je bil šum bazne linije čim manjši. Ostale nastavitev detektorja smo pregledali in ugotovili, da ne vplivajo bistveno na kromatograme. Tekom razvoja metode smo se lotili tudi optimizacije gradiента, kjer smo spremljali strmino gradienta in gradientne skoke ter na koncu ugotovili, da za namene spremljanja izmenjave podenot najbolj ustreza metoda IMAC_8_BIO_HPLC2. Po končanem razvoju metode smo opravili kratko kvalifikacijo metode, s katero smo potrdili ustreznost razvoja metode za razvojne namene. Testirali smo linearnost, ponovljivost in specifičnost metode. Ugotovili smo, da je metoda linearna v območju nanosa na kolono od 5 do 100 µg, saj je korelacijski koeficient $> 0,99$. Metoda je za razvojne namene tudi ustrezno ponovljiva, pri čemer je RSD 3,7 %. V primeru polne validacije metode bi želeli preveriti kaj je vzrok, da ponovljivost metode ni večja, medtem ko je za razvojne namene metoda ustrezno ponovljiva. Specifičnost smo preverili z metodo SDS-PAGE, pri čemer smo dokazali, da z metodo IMAC lahko detektiramo le protein TNF- α in njegove analoge. Na koncu smo testirali še izmenjavo podenot med LK800 in H7dN6-TNF pri pH=5 in pH=7 ter izmenjavo ob dodatku NaCl k obema pH vrednostima. Ugotovili smo, da v vseh pogojih pride do izmenjave podenot med molekulama, kajti vrh H7dN6-TNF se s časom

zmanjša, medtem ko nastaneta dva nova vmesna vrha, ki prikazujeta TNF z izmenjanimi podenotami. Iz rezultatov je razvidno, da se pri pH=5 podenote hitreje izmenjejo kot pri pH=7 ter da dodatek NaCl upočasni izmenjavo podenot. Razmerje med izhodnimi in hibridnimi trimeri ob koncu izmenjave ne moramo definirati, saj površina vrhov LK800 in H7dN6-TNF nista v pričakovanem razmerju 1:1. V primeru, da bi želeli definirati nastalo razmerje med vsemi trimeri bi morali poskus ponoviti. Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko z razvito in delno kvalificirano metodo spremljamo kinetiko disociacije in reasocijacije podenot med nativno molekulo TNF in njеними analogi, s čimer bi lahko preučevali izmenjavo podenot v primeru novonastalih analogov.

8 VIRI

Agilent 1100 Series Diode Array and Multiple Wavelength Detectors. 2004. Agilent Technologies, Inc.

http://www.thm.de/ibva/images/stories/doku/agilent1100/g1315-90005_ebook.pdf
(october, 2013)

Arnold F.H. 1991. Metal-affinity separations: A new dimension in protein processing. *Biotechnology*, 9: 151-156

Atzeni F., Talotta R., Salaffi F., Cassinotti A., Varisco V., Battellino M., Ardizzone S., Pace F., Sarzi-Puttini P. 2013. Immunogenicity and autoimmunity during anti-TNF therapy. *Autoimmunity Reviews*, 12: 703-708

Black A.R., Rauch T.C., Kozlosky J.C., Peschon J.J., Slack L.J., Wolfson F.M., Castner J.B., Stocking L.K., Reddy P., Srinivasan S., Nelson N., Boiani N., Schooley A. K., Gerhart M., Davis R., Fitzner N.J., Johnson S.R., Paxton J.R., March J.C., Cerretti D.P. 1997. A metalloproteinase distegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature*, 385: 729-733

Block H., Maertens B., Spriestersbach A., Brinker N., Kubicek J., Fabis R., Labahn J., Schäfer F. 2009. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): A review. *Methods in Enzymology*, 463: 439-473

Bradley J.R. 2008. TNF-mediated inflammatory disease. *Journal of Pathology*, 214: 149-160

Caminero A., Comabella M., Montalban X. 2011. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), anti- TNF- α and demyelination revisited: An ongoing story. *Journal of Neuroimmunology*, 234: 1-6

Cannon G.J. 2000. Inflammatory cytokines in nonpathological states. *News in Physiological Science*, 15: 298-303

Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N., Williamson B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Immunology*, 72, 9: 3666-3670

Dinarello C.A. 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest Journal*, 188, 2: 503-508

- Dominy B.N., Perl D., Schmid F.X, Brooks III C.L. 2002. The effects of ionic strength on protein stability: The cold shock protein family. *Journal of Molecular Biology*, 319: 541-554
- Eck M.J., Sprang S.R. 1989. Structure of tumor necrosis factor- α at 2.6 Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 29: 17595-17605
- Gaberc-Porekar V., Menart V. 2001. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49: 335-360
- Gupta V., Jain A.D., Gill N.S., Gupta K. 2012. Development and validation of HPLC method – a review. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, 2, 4: 17-25
- Horiuchi T., Mitoma H., Harashima S., Tsukamoto H., Shimoda T. 2010. Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology*, 49: 1215-1228
- International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. 2005. Validation of analytical procedures: Text and tehnodology Q2(R1).
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf (december, 2013)
- Jalen Š. 2015. Priprava in opredelitev delovanja pegiliranih analogov dejavnika tumorske nekroze alfa (TNF- α). Ljubljana, Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 258 str.
- Kočevar N., Kreft S., Obermajer N. 2007. Identifikacija in karakterizacija bioloških zdravil ter analiza bioloških vzorcev. V: Biološka zdravila. Od gena do učinkovine. Štrukelj B, Kos J. (ur.). 1.izd. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 136-184
- Kregar I. 1996. Kromatografske metode. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 609-632
- Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell*, 104: 487-501
- Matthews N., Ryley H.C., Neale M.L. 1980. Tumour-necrosis factor from the rabbit. IV. Purification and chemical characterization. *British Journal of Cancer*, 24: 416-422
- Menart V. 2000. Novi analogi faktorja tumorske nekroze (TNF- α) – možnosti uporabe v molekularni biologiji ter pri zdravljenju in diagnostiki rakastih bolezni. Ljubljana,

Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 238 str.

Menart, V., Čurin-Šerbec, V., Gaberc-Porekar, V., Hribar, M., Kranjčevič, F., Miličić, S., Štalc A. 1996. Exchange of subunits among TNF-[alpha] trimers studied by isoelectric focusing and metal-affinity chromatography. European Cytokine Network. 7, 2: 172 str.

Nedwin E.G., Naylor S.L., Sakaguchi A.Y., Smith D., Jarrett-Nedwin J., P D., Goeddel D.V., Gray P.W. 1985. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. Nucleic Acids Research, 13, 17: 6361-6373

NuPAGE® Bis-Tris Mini Gel Electrophoresis Protocol. 2013. Life technologies.
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0007891_NuPAGE_BisTris_MiniGels.pdf (januar, 2014)

Pennica D., Hayflick J.S., Bringman T.S., Palladino M.A., Goeddel D.V. 1985. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. Proceedings of the National academy of sciences of the United states of America, 82: 6060-6064

Phosphate-buffered saline (PBS). 2006. Recipe: Phosphate-buffered saline (PBS). Cold Spring Harbor Protocols.
<http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec8247.full?sid=24c91f97-19b0-4b7eba04-5c760aef7605> (oktober, 2013)

Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G. 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. Nature, 258: 598-599

ProPac™ IMAC-10 Product manual. 2012. Thermo Scientific.
<http://www.dionex.com/en-us/webdocs/38384-Man-ProPac-IMAC-10-065090-05-Jul12.pdf> (oktober, 2013)

Sedger L.M., McDermott M.F. 2014. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future. Cytokine and Growth Factor Reviews, 25: 453-472

Shirai T., Yamaguchi H., Ito H., Todd W.C., Wallace B.R. 1985. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumour necrosis factor. Nature, 313: 803-806

SimplyBlue™ SafeStain. 2012. Life technologies.
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/simplyblue_man.pdf (januar, 2014)

Steed P. M., Tansey M. G., Zalevsky J., Zhukovsky E. A., Desjarlais J. R., Szymkowski D.E., Abbott C., Carmichael D., Chan C., Cherry L., Cheung P., Chirino A.J., Chung

H.H., Doberstein S.K., Eivazi A., Filikov A.V., Gao S.X., Hubert R.S., Hwang M., Hyun L., Kashi S., Kim A., Kim E., Kung J., Martinez S.P., Muchhal U.S., Nguyen D-H.T., O'Brien C., O'Keefe D., Singer K., Vafa O., Vielmetter J., Yoder S.C., Dahiyat B.I. 2003. Inactivation of TNF signaling by rationally designed dominant-negative TNF variants. *Science*, 301: 1895-1898

Tartaglia L.A., Ayres T.M., Wong G.H., Goeddel D.V. 1993. A novel domain within the 55kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, 74, 5: 845-53

United States Pharmacopeial Convention, USP 37. 2014. The United States of America.
<http://www.usp.org/about-usp> (junij, 2014)

Vilček J., Lee T.H. 1991. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 12: 7313-7316

Voet D., Voet J.G., Pratt C.W. 2013. Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level. 4th ed. New York. John Wiley & Sons: 1077 str.

Wang J., Al-Lamki S.R., Zhang H., Kirkiles-Smith N., Gaeta M.L., Thiru S., Pober S.J., Bradley R.J. 2003. Histamine antagonizes tumor necrosis factor (TNF) signaling by stimulating TNF receptor shedding from the cell surface and Golgi storage pool. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 24: 21751-21760

WHO. 2014. Methods of analysis: 1.Physical and Physicochemical methods: 1.14 Chromatography: 1.14.4 High-performance liquid chromatography. World Health Organization.
<http://apps.who.int/phint/en/p/docf/> (december, 2014)

Zalevsky J., Secher T., Ezhevsky,S. A., Janot L., Steed P. M., O'Brien C., Eivazi A., Kung J., Nguyen D-H.T., Doberstein S.K., Erard F., Ryffel B., Szymkowski D.E. 2007. Dominant-negative inhibitors of soluble TNF attenuate experimental arthritis without suppressing innate immunity to infection. *The Journal of Immunology*, 179: 1872-188

ZAHVALA

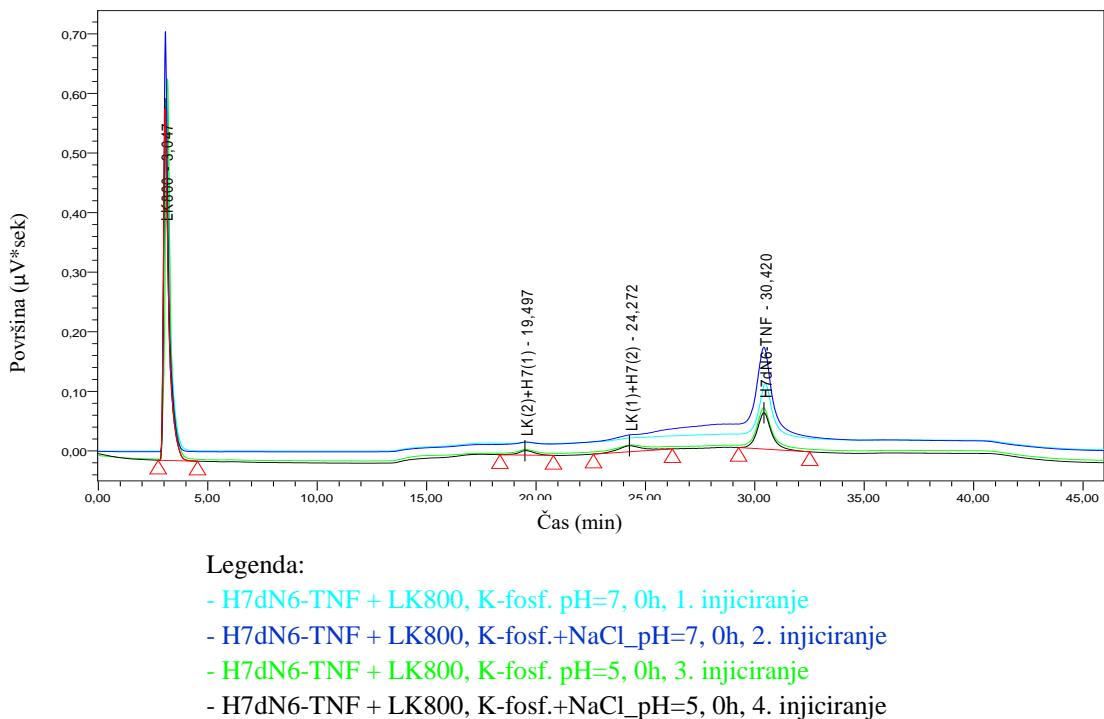
Največja zahvala gre mojim domačim (možu Žigu in staršema), saj sem, tako v času študija kot tudi pri pisanju magistrskega dela, imela polno podporo vseh in omogočene najboljše pogoje za delo. Hvala.

Za vso pomoč se pri izvajanju laboratorijskih analiz, usmerjanju pri pisanju ter vzpodbudi in pripravljenosti zahvaljujem somentorju dr.Tadeju Čepeljniku ter mentorici prof.dr. Romani Marinšek-Logar. Najlepša hvala.

Ker je izvajanje laboratorijskih analiz potekalo v laboratorijih Biofarmacevtike podjetja Lek d.d., se za prostore, materiale in uporabo vseh potrebnih aparatur zahvaljujem direktorju Biofarmacevtike Mengaš, dr.Matjažu Ovnu ter vodnjema oddelkov dr. Jerici Rozman-Pungerčar in Jelki Svetek. Za pomoč se prav tako zahvaljujem dr.Špeli Jalen, ki mi je večkrat priskočila na pomoč.

Priloga A

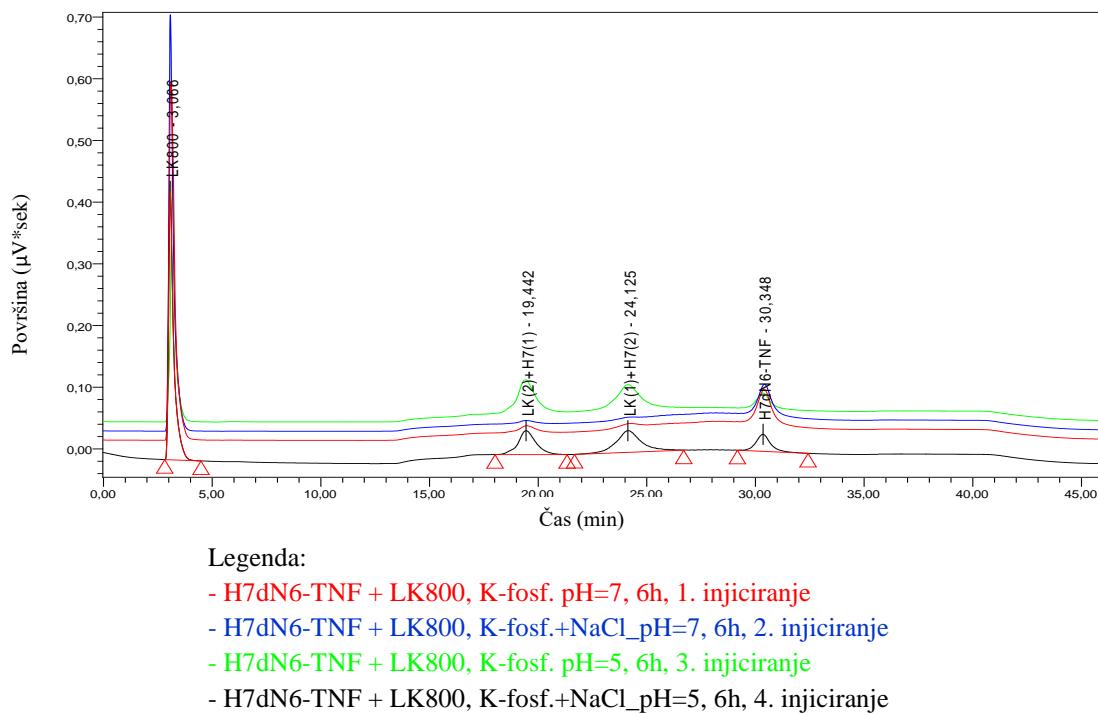
Kromatogrami vzorcev H7dN6-TNF + LK800 tekom spremljanja izmenjave podenot v času 0h



Slika 44: Tekom spremljanja izmenjave podenot smo v času 0h zaporedno injicirali vzorce, ki so bili izpostavljeni različnim pogojem (različne pH vrednosti ter dodatek NaCl), kot je razvidno iz legende pod kromatogrami (različne barve kromatogramov predstavljajo različna injiciranja). V času 0h lahko pri pH=5 vidimo prve izmenjane podenote, medtem ko pri pH=7 ni vidnih izmenjav podenot.

Priloga B

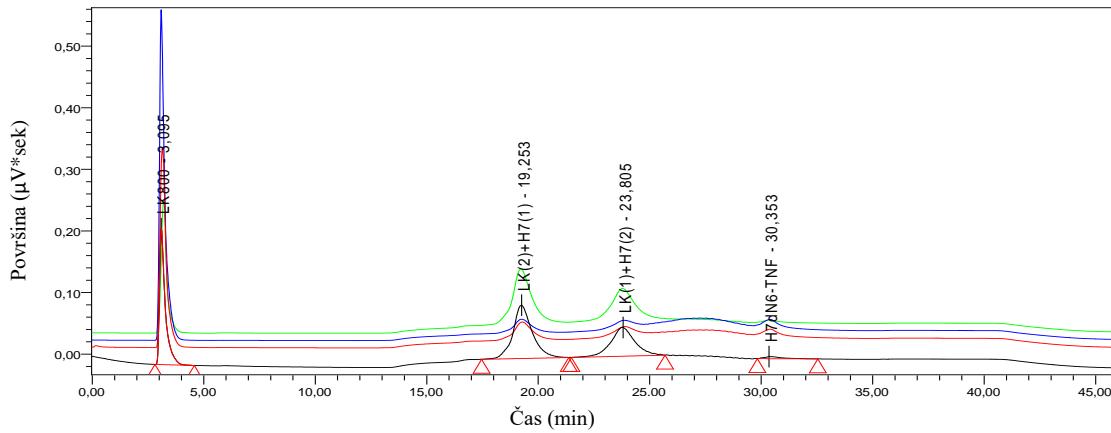
Kromatogrami vzorcev H7dN6-TNF + LK800 tekom spremljanja izmenjave podenot v času 6h



Slika 45: Tekom spremljanja izmenjave podenot smo po šestih urah zaporedno injicirali vzorce, ki so bili izpostavljeni različnim pogojem (različne pH vrednosti ter dodatek NaCl), kot je razvidno iz legende pod kromatogrami (različne barve kromatogramov predstavljajo različna injiciranja). V času po šestih urah lahko je pri pH=5 jasno vidna izmenjava podenote, medtem ko pri pH=7 komaj zaznamo izmenjavo.

Priloga C

Kromatogrami vzorcev H7dN6-TNF + LK800 tekom spremeljanja izmenjave podenot v času 36h



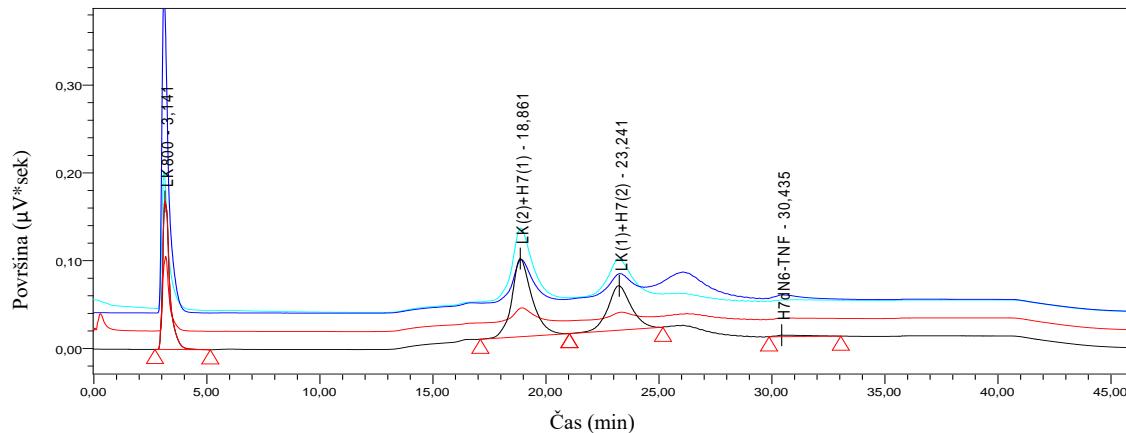
Legenda:

- H7dN6-TNF + LK800, K-fosf. pH=7, 36h, 1. injiciranje
- H7dN6-TNF + LK800, K-fosf.+NaCl_pH=7, 36h, 2. injiciranje
- H7dN6-TNF + LK800, K-fosf. pH=5, 36h, 3. injiciranje
- H7dN6-TNF + LK800, K-fosf.+NaCl_pH=5, 36h, 4. injiciranje

Slika 46: Tekom spremeljanja izmenjave podenot smo po 36. urah zaporedno injicirali vzorce, ki so bili izpostavljeni različnim pogojem (različne pH vrednosti ter dodatek NaCl), kot je razvidno iz legende pod kromatogrami (različne barve kromatogramov predstavljajo različna injiciranja). Pri pH=5 brez dodatka NaCl je izmenjava podenot v času po 36 urah zaključena, medtem ko se pri pH=7 izmenjava podenot šele začenja. Pri pH=5 z dodatkom NaCl vidimo, da izmenjava podenot poteka, ni pa še zaključena.

Priloga D

Kromatogrami vzorcev H7dN6-TNF + LK800 tekom spremljanja izmenjave podenot v času 144h



Legenda:

- H7dN6-TNF + LK800, K-fosf. pH=7, 144h, 1. injiciranje
- H7dN6-TNF + LK800, K-fosf.+NaCl_pH=7, 144h, 2. injiciranje
- H7dN6-TNF + LK800, K-fosf. pH=5, 144h, 3. injiciranje
- H7dN6-TNF + LK800, K-fosf.+NaCl_pH=5, 144h, 4. injiciranje

Slika 47: Tekom spremljanja izmenjave podenot smo po 144. urah zaporedno injicirali vzorce, ki so bili izpostavljeni različnim pogojem (različne pH vrednosti ter dodatek NaCl), kot je razvidno iz legende pod kromatogrami (različne barve kromatogramov predstavljajo različna injiciranja). Ob koncu inkubacije vidimo, da so se podenote pri pH=5 izmenjale. Tudi pri pH=7 jasno vidimo izmenjavo podenot, vendar so vrhovi izmenjanih podenot nižji kot pri pH=5.

Priloga E

Prikaz izmenjave podenot s spreminjanjem površin pri pH=7

Preglednica 33: V preglednici je prikazana izmenjava podenot z naraščanjem površine nastalih podenot ($LK(2) + H7(1)$ ter $LK(1) + H7(2)$) ter manjšanjem površine vzorcev LK800 in H7dN6-TNF pri pH=7. Prikazani so tudi odstotki površine vseh štirih vrhov v vseh časovnih meritvah, kar omogoča lažje spremeljanje spreminjanja razmerja vrhov. Stolpec »Vsota površin vrhov« služi za preverjanje količine celotne vsebnosti mešanice vzorcev.

Čas (h)	LK7dN6+LK800 [K-fosf,pH=7]								
	Površina vrha LK800 (μ V*sec)	% površine vrha LK800	Površina vrha LK(2)+ H7(1) (μ V*sec)	% površine vrha LK(2)+ H7(1)	Površina vrha LK(1)+ H7(2) (μ V*sec)	% površine vrha LK(1)+ H7(2)	Površina vrha H7dN6- TNF (μ V*sec)	% površine vrha H7dN6- TNF	Vsota površin vrhov (μ V*sec)
0	11468671	73,80	72908	0,47	84217	0,54	3914642	25,19	15540438
6	10908320	74,79	638535	4,38	331725	2,27	2706742	18,56	14585322
12	10126015	74,82	1082970	8,00	568192	4,20	1755774	12,97	13532951
24	9181153	70,89	1842932	14,23	981086	7,58	945454	7,30	12950625
36	6329185	67,10	1760457	18,66	878323	9,31	464229	4,92	9432194
48	8004354	63,62	2769849	22,02	1339053	10,64	467786	3,72	12581042
72	7489334	59,24	3217974	25,45	1496514	11,84	438558	3,47	12642380
96	7079850	56,35	3492585	27,80	1612062	12,83	378891	3,02	12563388
120	6876668	54,86	3652243	29,14	1664640	13,28	340727	2,72	12534278
144	1695946	52,07	994511	30,54	440567	13,53	125825	3,86	3256849

Priloga F

Prikaz izmenjave podenot s spreminjanjem površin pri pH=7 ob dodatku NaCl

Preglednica 34: V preglednici je prikazana izmenjava podenot z naraščanjem površine nastalih podenot (LK(2) + H7(1) ter LK(1) + H7(2)) ter manjšanjem površine vzorcev LK800 in H7dN6-TNF pri pH=7 ob dodatku NaCl. Prikazani so tudi odstotki površine vseh štirih vrhov v vseh časovnih meritvah, kar omogoča lažje spremeljanje spreminjanja razmerja vrhov. Stolpec »Vsota površin vrhov« služi za preverjanje količine celotne vsebnosti mešanice vzorcev.

Čas (h)	LK7dN6+LK800 [K-fosf.+NaCl_pH=7]								
	Površina vrha LK800 (μ V*sec)	% površine vrha LK800	Površina vrha LK(2)+ H7(1) (μ V*sec)	% površine vrha LK(2)+ H7(1)	Površina vrha LK(1)+ H7(2) (μ V*sec)	% površine vrha LK(1)+ H7(2)	Površina vrha H7dN6- TNF (μ V*sec)	% površine vrha H7dN6- TNF	Vsota površin vrhov (μ V*sec)
0	10695306	61,81	192377	1,11	123370	0,71	6291450	36,36	17302503
6	10292853	78,92	295581	2,27	150495	1,15	2303311	17,66	13042240
12	9944257	80,84	573183	4,66	264941	2,15	1518211	12,34	12300592
24	9423810	80,79	959561	8,23	460648	3,95	820368	7,03	11664387
36	9062258	78,36	1326150	11,47	629657	5,44	547503	4,73	11565568
48	8707815	75,75	1622250	14,11	752951	6,55	411877	3,58	11494893
72	8243492	70,99	2059669	17,74	906030	7,80	403095	3,47	11612286
96	7884324	67,22	2406269	20,51	1047756	8,93	391386	3,34	11729735
120	7638450	64,94	2668107	22,68	1089143	9,26	366872	3,12	11762572
144	7537606	62,81	2878297	23,98	1234273	10,28	350740	2,92	12000916

Priloga G

Prikaz izmenjave podenot s spremjanjem površin pri pH=5

Preglednica 35: V preglednici je prikazana izmenjava podenot z naraščanjem površine nastalih podenot (LK(2) + H7(1) ter LK(1) + H7(2)) ter manjšanjem površine vzorcev LK800 in H7dN6-TNF pri pH=5. Prikazani so tudi odstotki površine vseh štirih vrhov v vseh časovnih meritvah, kar omogoča lažje spremljanje spremjanja razmerja vrhov. Stolpec »Vsota površin vrhov« služi za preverjanje količine celotne vsebnosti mešanice vzorcev.

Čas (h)	LK7dN6+LK800 [K-fosf.pH=5]								
	Površina vrha LK800 (μ V*sec)	% površine vrha LK800	Površina vrha LK(2)+ H7(1) (μ V*sec)	% površine vrha LK(2)+ H7(1)	Površina vrha LK(1)+ H7(2) (μ V*sec)	% površine vrha LK(1)+ H7(2)	Površina vrha H7dN6- TNF (μ V*sec)	% površine vrha H7dN6- TNF	Vsota površin vrhov (μ V*sec)
0	10834516	73,72	344923	2,35	491769	3,35	3025804	20,59	14697011
6	6151556	43,89	3244523	23,15	3407559	24,31	1211493	8,64	14015131
12	4764570	34,62	4510175	32,77	3826006	27,80	662044	4,81	13762795
24	4022893	29,39	5303143	38,75	4067766	29,72	292374	2,14	13686176
36	3904450	28,87	5441869	40,24	3959893	29,28	217532	1,61	13523744
48	3755713	28,03	5504522	41,09	3960816	29,56	176021	1,31	13397072
72	3728234	27,83	5537977	41,33	3932541	29,35	199530	1,49	13398282
96	3688979	27,93	5532928	41,89	3811686	28,86	174820	1,32	13208413
120	3691837	28,03	5501121	41,77	3752131	28,49	225764	1,71	13170853
144	3694768	28,43	5488880	42,23	3644076	28,04	168420	1,30	12996144

Priloga H

Prikaz izmenjave podenot s spreminjanjem površin pri pH=5 ob dodatku NaCl

Preglednica 36: V preglednici je prikazana izmenjava podenot z naraščanjem površine nastalih podenot (LK(2) + H7(1) ter LK(1) + H7(2)) ter manjšanjem površine vzorcev LK800 in H7dN6-TNF pri pH=5 z dodatkom NaCl. Prikazani so tudi odstotki površine vseh štirih vrhov v vseh časovnih meritvah, kar omogoča lažje spremeljanje spreminjanja razmerja vrhov. Stolpec »Vsota površin vrhov« služi za preverjanje količine celotne vsebnosti mešanice vzorcev.

Čas (h)	LK7dN6+LK800 [K-fosf.+ NaCl_pH=5]								
	Površina vrha LK800 (μ V*sec)	% površine vrha LK800	Površina vrha LK(2)+ H7(1) (μ V*sec)	% površine vrha LK(2)+ H7(1)	Površina vrha LK(1)+ H7(2) (μ V*sec)	% površine vrha LK(1)+ H7(2)	Površina vrha H7dN6- TNF (μ V*sec)	% površine vrha H7dN6- TNF	Vsota površin vrhov (μ V*sec)
0	10017139	71,70	389880	2,79	786551	5,63	2777603	19,88	13971173
6	7261741	53,06	2235445	16,33	2882476	21,06	1306434	9,55	13686096
12	5794375	42,92	3570040	26,45	3493390	25,88	641431	4,75	13499236
24	4452721	33,85	4827606	36,70	3587831	27,28	285068	2,17	13153226
36	3966929	30,68	5243747	40,56	3525747	27,27	193208	1,49	12929631
48	3849331	29,42	5518576	42,18	3577522	27,35	136756	1,05	13082185
72	3685946	28,76	5553880	43,33	3413623	26,63	163162	1,27	12816611
96	3594148	28,44	5571201	44,08	3308881	26,18	163613	1,29	12637843
120	3551388	27,80	5579284	43,67	3403558	26,64	242048	1,89	12776278
144	3282160	27,93	5191336	44,17	3128299	26,62	150486	1,28	11752281

Priloga I

Prikaz resolucij med vsemi eluiranimi vrhovi tekom optimizacije gradiента

Preglednica 37: V preglednici so prikazane resolucije med vsemi eluiranimi vrhovi pri različnih instrumentalnih metodah, ki smo jih pridobili s pomočjo računalniškega programa Empower 3. Kadar eluirani vrhovi niso bili ustrezno ločeni med njimi ni izračunane resolucije, kar pomeni, da instrumentalne metode niso primerne za uporabo. Pri izboru najbolj ustrezne instrumentalne metode smo se odločali predvsem na podlagi resolucij med vrhovoma LK(1) + H7(2) ter H7dN6-TNF, saj se vrhova eluirata pri zelo podobni molarnosti imidazola. Poleg resolucij pa smo upoštevali tudi obliko vrhov ter možnost ustrezne integracije.

Instrumentalna metoda	Ime vrha	Retencijski čas (min)	Resolucija
IMAC_4_BIO_HPLC2	LK800	3,0	/
	LK(2)+H7(1)	24,3	2,53E+01
	LK(1)+H7(2)	28,3	/
	H7dN6-TNF	29,2	/
IMAC_5_BIO_HPLC2	LK800	2,9	/
	LK(2)+H7(1)	25,8	2,46E+01
	LK(1)+H7(2)	34,7	4,79E+00
	H7dN6-TNF	40,1	1,69E+00
IMAC_6_BIO_HPLC2	LK800	2,9	/
	LK(2)+H7(1)	27,8	2,23E+01
	LK(1)+H7(2)	37,7	/
	H7dN6-TNF	38,9	/
IMAC_7_BIO_HPLC2	LK800	2,9	/
	LK(2)+H7(1)	13,6	1,61E+01
	LK(1)+H7(2)	25,5	/
	H7dN6-TNF	26,3	/
IMAC_8_BIO_HPLC2	LK800	2,9	/
	LK(2)+H7(1)	19,8	2,10E+01
	LK(1)+H7(2)	24,6	2,54E+00
	H7dN6-TNF	30,4	3,12E+00
IMAC_10_BIO_HPLC2	LK800	2,9	/
	LK(2)+H7(1)	16,2	2,43E+01
	LK(1)+H7(2)	18,8	1,58E+00
	H7dN6-TNF	22,6	1,67E+00
IMAC_10b_BIO_HPLC2	LK800	1,5	/
	LK(2)+H7(1)	11,2	3,33E+01
	LK(1)+H7(2)	12,4	1,39E+00
	H7dN6-TNF	14,2	1,74E+00

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 37. V preglednici so prikazane resolucije med vsemi eluiranimi vrhovi pri različnih instrumentalnih metodah, ki smo jih pridobili s pomočjo računalniškega programa Empower 3. Kadar eluirani vrhovi niso bili ustrezno ločeni med njimi ni izračunane resolucije, kar pomeni, da instrumentalne metode niso primerne za uporabo. Pri izboru najbolj ustrezne instrumentalne metode smo se odločali predvsem na podlagi resolucij med vrhovoma LK(1) + H7(2) ter H7dN6-TNF, saj se vrhova eluirata pri zelo podobni molarnosti imidazola. Poleg resolucij pa smo upoštevali tudi obliko vrhov ter možnost ustrezne integracije.

Instrumentalna metoda	Ime vrha	Retencijski čas (min)	Resolucija
IMAC_11_BIO_HPLC2	LK800	2,9	/
	LK(2)+H7(1)	19,5	2,15E+01
	LK(1)+H7(2)	24,3	2,53E+00
	H7dN6-TNF	28,9	2,20E+00
IMAC_11b_BIO_HPLC2	LK800	1,5	/
	LK(2)+H7(1)	12,9	2,47E+01
	LK(1)+H7(2)	15,1	2,00E+00
	H7dN6-TNF	17,3	1,96E+00