

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Maja JELENC

**PREUČEVANJE VPLIVA ULTRAFILTRACIJE IN
DIAFILTRACIJE NA TVORBO PROTEINSKIH
AGREGATOV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Maja JELENC

**PREUČEVANJE VPLIVA ULTRAFILTRACIJE IN DIAFILTRACIJE
NA TVORBO PROTEINSKIH AGREGATOV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**INFLUENCE OF ULTRAFILTRATION AND DIAFILTRATION ON
THE FORMATION OF PROTEIN AGGREGATES**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrska naloga je zaključek Magistrskega študijskega programa študija – 2. stopnja Biotehnologija. Opravljeno je bilo v podjetju Lek d.d.

Po sklepu Komisije 1. in 2. stopnje je bil za mentorja imenovan prof. dr. Aleš Podgornik, za somentorja dr. Maja Kenig in za recenzenta prof. dr. Gregor Anderluh.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Aleš PODGORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,

Član: dr. Maja KENIG
Lek farmacevtska družba d.d.

Član: prof. dr. Gregor ANDERLUH
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 08.12.2016

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.

Maja Jelenc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 606:615.011(043.2)
KG	biološka zdravila/ultrafiltracija/diafiltracije/monoklonsko protitelo
AV	JELENC, Maja
SA	PODGORNIK, Aleš (mentor)/KENIG, Maja (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2016
IN	PREUČEVANJE VPLIVA ULTRAFILTRACIJE IN DIAFILTRACIJE NA TVORBO PROTEINSKIH AGREGATOV
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	X,77 str., 20 pregl., 29 sl., 51 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Proteinski agregati ostajajo ena izmed večjih preprek v razvoju zdravilnih učinkovin. Skoraj na vseh stopnjah razvoja zdravilne učinkovine obstaja tveganje za njihov nastanek. Agregati lahko zmanjšajo biološko aktivnost zdravilne učinkovine ali povzročijo imunski odziv pri bolnikih. V magistrski nalogi smo se osredotočili na ultrafiltracijo in diafiltracijo, ki sta zadnja koraka pred končno formulacijo zdravilne učinkovine in lahko vplivata na tvorbo agregatov. Med ultrafiltracijo in diafiltracijo so proteini izpostavljeni različnim oblikam stresa, ki lahko spodbudijo proces agregacije. V nalogi smo želeli raziskati vpliv različnih tipov črpalk in procesnih parametrov, ki lahko vodijo v agregacijo proteinov. Raziskali smo vpliv peristaltične, zobniške, tlačne in membranske črpalke. Količino agregatov smo določali s tremi analitskimi metodami: DLS (dinamično sipanje svetlobe), SEC (kromatografija z ločevanjem po velikosti) in MFI (pretočno slikanje delcev). Najnižjo vsebnost agregatov smo določili na vzorcih peristaltične in membranske črpalke. V nadaljevanju smo z uporabo peristaltične črpalke testirali tri ključne procesne parametre: tlak, temperaturo in mešanje. Največji vpliv na tvorbo agregatov imata mešanje in temperatura. Rezultati poskusov kažejo, da lahko na tvorbo agregatov vplivajo posamezni procesni parametri ali pa je njihov vpliv relevanten le v kombinaciji z drugimi procesnimi parametri. Nadalje lahko določen procesni parameter vpliva le na agregate določenega velikostnega razreda. Zaradi raznolikosti terapevtskih protiteles je potrebno tekom razvoja novih protiteles vrednosti procesnih parametrov eksperimentalno potrditi za vsako protitelo posebej.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2

DC UDK 606:615.011(043.2)

CX biopharmaceuticals/ultrafiltration/diafiltration/monoclonal antibody

AU JELENC, Maja

AA PODGORNIK, Aleš (supervisor)/KENIG, Maja (co-advisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology

PY 2016

TI STUDYING THE INFLUENCE OF ULTRAFILTRATION AND DIAFILTRATION ON THE FORMATION OF PROTEIN AGGREGATES

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)

NO X,77 p., 20 tab., 29 fig., 51 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Protein aggregation is the most common reason for protein instability, encountered in almost all stages of protein drug development. Protein aggregation remains to be one of the major road barriers hindering rapid development of potential protein drug candidates. Aggregates can decrease biological activity of the drug product or cause an immune response in patients. In this work we focus on ultrafiltration / diafiltration which is the last step before formulation and could have a major contribution to aggregate formation. During ultrafiltration /diafiltration proteins are exposed to various forms of stress which can cause protein aggregation. The objective of the present study was to investigate the effect of different pump types and process parameter settings which can lead to protein aggregation. The influence of various pumps such as peristaltic, rotary lobe, piston and membrane pump were investigated. The level of protein aggregation was determined by three analytical methods: DLS (dynamic light scattering), SEC (size exclusion chromatography) and MFI (micro flow imaging). The lowest amount of aggregates was detected on the peristaltic and membrane pump. Furthermore, process parameters such as pressure, temperature and agitation were tested using peristaltic pump. Agitation and temperature have a major impact on aggregate formation. We have shown that process parameters can induce aggregation alone or in correlation with other process parameters. Furthermore, induction of aggregates within a specific molecular size range is the result of changes in a single process parameter. Furthermore, certain process parameters seem to influence aggregation predominantly in a specific molecular size range. Due to diversity of the therapeutic antibodies all discussed process parameters should be experimentally confirmed during development of a new therapeutic antibody.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 CILJ NALOGE.....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 UPORABA MONOKLONSKIH PROTITELES ZA ZDRAVLJENJE	4
2.1.1 Struktura monoklonskih protiteles.....	5
2.1.2 Proizvodnja in čiščenje monoklonskih protiteles	6
2.2 ULTRAFILTRACIJA/DIAFILTRACIJA.....	7
2.2.1 Sistem.....	8
2.2.2 Membrane	9
2.3 ČRPALKE.....	9
2.3.1 Peristaltična črpalka	9
2.3.2 Membranska črpalka	9
2.3.3 Tlačna črpalka	10
2.3.4 Zobniška črpalka	10
2.4 PROTEINSKI AGREGATI	10
2.4.1 Delitev proteinskih agregatov glede na strukturo	10
2.4.2 Delitev proteinskih agregatov glede na pot nastanka.....	11
2.4.3 Dejavniki, ki vplivajo na nastanek agregatov	12
2.5 KARAKTERIZACIJA PROTEINSKIH AGREGATOV	17
2.5.1 Analitske metode	18
2.6 VPLIV AGREGATOV NA KAKOVOST, VARNOST IN UČINKOVITOST	22
3 MATERIALI IN METODE	24
3.1 MATERIALI	24
3.1.1 Kemikalije in reagenti	24

3.1.2	Pufri in raztopine.....	26
3.1.3	Membrana	27
3.1.4	Laboratorijska oprema	27
3.1.5	Programska oprema	29
3.2	METODE	30
3.2.1	Sterilizacija opreme	31
3.2.2	Priprava pufrov in raztopin	31
3.2.3	Merjenje pH in prevodnosti	31
3.2.4	Merjenje koncentracije proteina v vzorcu	31
3.2.5	Kromatografija	32
3.2.6	Virusna inaktivacija in filtracija	32
3.2.7	Ultrafiltracija/diafiltracija	32
3.2.8	Meritve agregatov	37
3.2.9	Načrtovanje poskusov in statistična obdelava podatkov	39
4	REZULTATI.....	40
4.1	REZULTATI PRVEGA SKLOPA POSKUSOV – IZBIRA NAJUSTREZNEJŠE ČRPALKE	40
4.1.1	Procesni parametri in koncentracije vzorcev	40
4.1.2	Vsebnost agregatov	41
4.2	REZULTATI DRUGEGA SKLOPA POSKUSOV – TESTIRANJE PROCESNIH PARAMETROV NA IZBRANI ČRPALKI	49
4.2.1	Vpliv procesnih parametrov na tvorbo delcev, določenih z MFI.....	52
4.2.2	Vpliv procesnih parametrov na tvorbo agregatov, določenih s SEC.....	57
4.2.3	Optimizacija	58
5	RAZPRAVA.....	62
5.1	VPLIV ČRPALK.....	62
5.2	VPLIV PROCESNIH PARAMETROV.....	65
5.2.1	Vpliv procesnih parametrov na tvorbo agregatov določenih z MFI.....	65
5.2.2	Vpliv procesnih parametrov na tvorbo agregatov, določenih s SEC.....	68
6	SKLEPI	70
7	POVZETEK.....	71
8	VIRI	73

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Najpogosteje uporabljena monoklonska protitelesa (Štrukelj in sod., 2015:10)	4
Preglednica 2: Kemikalije	24
Preglednica 3: Standardi	25
Preglednica 4: Reagenti	25
Preglednica 5: Pufri in raztopine	26
Preglednica 6: Specifikacije TFF membrane.....	27
Preglednica 7: Laboratorijska oprema	27
Preglednica 8: Programska oprema	29
Preglednica 9: Procesni parametri prvega sklopa eksperimentov	34
Preglednica 10: Procesni parametri drugega sklopa eksperimentov	34
Preglednica 11: Preglednica poskusov drugega sklopa eksperimentov s pripadajočimi procesnimi parametri	35
Preglednica 12: Procesni parametri in koncentracije proteina v vzorcih med ultrafiltracijo	40
Preglednica 13: Procesni parametri in koncentracije proteina v vzorcih med diafiltracijo.....	40
Preglednica 14: Popvpredno število delcev v posameznih velikostnih razredih določenih z metodo MFI	44
Preglednica 15: Polidisperzni indeks vzorcev na membranski in peristaltični črpalki	45
Preglednica 16: Povprečni hidrodinamski premeri delcev v vzorcih na membranski in peristaltični črpalki	46
Preglednica 17: Ocena površin agregatov in proteinov določenih z metodo SEC.....	48
Preglednica 18: Vrednosti odzivov po ultrafiltraciji v vzorcih retentatnega toka izbranega eksperimenta	50
Preglednica 19: Vrednosti odzivov po diafiltraciji v vzorcih retentatnega toka izbranega eksperimenta	51
Preglednica 20: Pregled izmerjenih odzivov s pripadajočimi evaluacijskimi modeli.....	52

KAZALO SLIK

Slika 1: Sheman monoklonskega protitelesa (CH-1, CH-2, CH-3: konstantne regije, VH: variabilna težka regija, CL in HL: konstantne variabilne lahka regije) (Shukla in sod., 2007: 29).....	6
Slika 2: Princip filtracije s tangencialnim tokom (Houp, 2009: 43).....	8
Slika 3: Detekcijsko območje različnih analitskih metod (Mahler in sod., 2009: 2915)	19
Slika 4: Shematični prikaz merjenja vzorca z metodo DLS (Liu in sod., 2015: 907).....	20
Slika 5: Shematični prikaz merjenja vzorca z metodo MFI (Sharma in sod., 2010: 456).....	22
Slika 6: Potek eksperimentalnega dela	30
Slika 7: Shematski prikaz UD/DF sistema	33
Slika 8: Shema vzorčenja	36
Slika 9: Vzorci, nastali pri poskusih na zobniški črpalki	42
Slika 10: Vzorci, nastali pri poskusih na tlačni črpalki	42
Slika 11: Primer slike pridobljene z MFI metodo. (a) in (b): agretati, (c): zračni mehurček, (d): vlakno in dva zračna mehurčka.....	43
Slika 12: Število delcev glede na velikostni razred delcev v začetnem materialu, nanosu, permeatu in retentatu.....	44
Slika 13: PDI vzorcev na membranski in peristaltični črpalki	46
Slika 14: Odstotek agregiranosti vzorcev na membranski in peristaltični črpalki	47
Slika 15: Vpliv mešanja na število delcev (ECD 2,0 – 6,5 μm) po ultrafiltraciji	53
Slika 16: Vpliv hitrosti mešanja in temperature na število delcev (ECD 2,0 – 6,5 μm) po ultrafiltraciji	53
Slika 17: Vpliv mešanja in temperature na število delcev (ECD 6,5 - 10,0 μm) po ultrafiltraciji	54
Slika 18: Vpliv UF TMP in temperature na tvorbo delcev v velikostnem območju ECD 6,5 -10,0 μm	54
Slika 19: Vpliv temperature na tvorbo delcev (ECD 6,5 – 10,0 μm) med diafiltracijo	55
Slika 20: Vpliv TMP in temperature na tvorbo delcev (ECD 6,5 -10,0 μm) med diafiltracijo.....	56
Slika 21: Vpliv temperature na število delcev (ECD 10,0 – 25,0 μm) med diafiltracijo	56
Slika 22: Vpliv temperature na število delcev (ECD 10,0 – 25,0 μm) med ultrafiltracijo..	57
Slika 23: Vpiv TMP na odstotek agregiranosti med ultrafiltracijo	57
Slika 24: Vpiv mešanja na odstotek agregiranosti med ultrafiltracijo.....	58
Slika 25: Vpliv temperature na odstotek agregiranosti med diafiltracijo.....	58
Slika 26: Optimalna območja vrednosti procesnih parametrov med ultrafiltracijo za vsak velikostni razred delcev	59

Slika 27: Optimalna območja vrednosti procesnih parametrov med diafiltracijo za vsak velikostni razred delcev.....	60
Slika 28: Optimalna območja vrednosti procesnih parametrov med ultrafiltracijo.....	61
Slika 29: Optimalna območja vrednosti procesnih parametrov med diafiltracijo	61

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ALC	Afinitetna kromatografija
APS	Avtomatski vzorčevalnik (ang.: auto plate sample)
CH	Konstantna regija težke verige (ang.: constant region of heavy chain)
CL	Konstanta regija lahke verige (ang.: constant region of light chain)
DF	Diafiltracija
DFF	Filtracija z direktnim tokom
DLS	Dinamično sipanje svetlobe (ang.: dynamic light scattering)
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
DSP	Zaključni procesi (angl.: down-stream processing)
ECE	Ekvivalentni cirkularni diameter
Fab	Regija za vezavo antigena (ang.: fragment, antigen binding)
FC	Regija za vezavo na ostale elemente imunskega sistema(ang.: fragment, crystallizable)
FDA	Zvezni urad za hrano in zdravila (ang.: food and drug administration)
HCP	Proteini gostiteljske celice (ang.: host cell protein)
HPLC	Visoko tlačna tekočinska kromatografija
Ig	Imunoglobulini
IM	Intramuskularno
IV	Intravenozno
LO	Zamreženje svetlobe (angl.: light obscuration)
LPLC	Nizko tlačna tekočinska kromatografija
MFI	Pretočno slikanje delcev (ang.: micro flow imaging)
SC	Subkutano
SEC	Kromatografija z ločevanjem po velikosti (ang.: size exclusion chromatography)
TFF	Filtracija s tangencialnim tokom
UF	Ultrafiltracija
USP	Pripravljalni procesi (angl.: up-stream processing)
UV	Ultraviolično
VH	Variabilna regija težke verige (ang.: variable region of heavy chain)
VL	Variabilna regija lahke verige (ang.: variable region of light chain)

1 UVOD

Biološko zdravilo kot učinkovina vsebuje biološko snov ali snov, pridobljeno s postopki, ki vključujejo biološke sisteme. Biološka zdravila lahko razdelimo v več razredov: zdravila, pridobljena z izolacijo (živalski hormoni, kri, krvni proizvodi), zdravila pridobljena s sintezo (sintezni proteini) in rekombinantna zdravila (rekombinantni hormoni, rekombinantni filgrastim, faktorji strjevanja krvi, rekombinantna monoklonska protitelesa). Porast v razvoju bioloških zdravil sovpada z razvojem rekombinantne tehnologije DNA, ki temelji na vnosu gena, ki kodira željeno učinkovino v primerno gostiteljsko celico. Najbolj zastopana in tudi najhitreje rastoča skupina rekombinantnih zdravil so monoklonska protitelesa, ki izkazujejo najnižjo stopnjo imunogenosti (Štrukelj in sod., 2015).

Prvo monoklonsko protitelo, ki je bilo v celoti mišje, so naredili s pomočjo hibridomske tehnologije. Kmalu se je izkazalo, da takšna monoklonska protitelesa v človeškem organizmu sprožijo imunski odziv. Rekombinantna tehnologija je omogočila produkcijo himernih monoklonskih protiteles, ki imajo konstantno regijo iz človeškega aminokislinskega zaporedja, variabilno pa iz mišjega. Razvoj se je nato usmeril v zmanjšanje mišjega zaporedja v protitelesih, kar je vodilo v nastanek humaniziranih monoklonskih protiteles. Izdelava popolnega humanega protitelesa pa je kasneje omogočila tehnologija bakteriofagnega prikaza oziroma transgenih miši (Štrukelj in sod., 2015).

Prednost uporabe mAb je njihova specifičnost. Na tarčo se namreč vežejo z visoko afiniteto in selektivnostjo. Uporabljajo se za zdravljenje številnih bolezni, kot so različne oblike rakastih obolenj, multipla skleroza in imunske bolezni, kot so revmatoidni artritis in psoriaze (Shukla in sod., 2007).

Proizvodnja biološkega zdravila je v primerjavi s klasičnimi zdravili veliko bolj zahtevna, zapletena in dolgotrajna. Zaradi visokih zahtev po varnosti, učinkovitosti in kakovosti je potrebno kvaliteto produkta spremljati skozi celoten proces (Štrukelj in sod., 2015).

Monoklonska protitelesa se tipično proizvajajo v sesalskih celicah pod strogo definiranimi pogoji. Produkciji monoklonskih protiteles v celicah sledijo postopki izolacije in čiščenja, ki se lahko, glede na specifiko mAb, razlikujejo. Najpogosteje se v ta namen uporabljajo metode centrifugiranja, različni kromatografski koraki in filtracija ali precipitacija. Izolaciji in čiščenju pa pred končno filtracijo sledi še zamenjava raztopine, v kateri se nahaja zdravilna učinkovina s pufrom, ki predstavlja izbrano končno formulacijo. Dominantni tehnologiji, ki se v industriji uporabljata za koncentriranje in zamenjavo raztopine sta,

ultrafiltracija in diafiltracija s tangencialnim pretokom (Shukla in sod., 2007; Rea in sod., 2012).

Eden izmed glavnih izzivov produkcije mAb ostaja agregacija proteinov in posledično razvoj postopkov, ki preprečujejo nastajanje agregatov ob razvoju tehnik, s katerimi lahko nastale agregate odstranimo. Postopki, ki jih uporabljamo za proizvodnjo in čiščenje monoklonskih protiteles, zagotavljajo produkte visoke čistosti, vendar pa so proteini tekom proizvodnje izpostavljeni številnim kemijskim in fizikalnim vplivom, ki lahko vodijo v delno ali popolno razvitje proteinov in posledično do nastanka manjših topnih ali večjih topnih pa tudi netopnih agregatov. Agregacija proteinov je proces, ki pretvori nativne topne monomerne proteine v topne ali netopne multimerne skupke. Majhne količine agregatov (majhen odstotek agregatov na celotno maso proteina, z minimalnimi spremembami na določeni časovni skali) so v zdravilni učinkovini lahko prisotne, vendar mora biti vsebnost agregatov znotraj specifikacij, ki so določene s strani regulatornih agencij. Povečana vsebnost agregatov lahko pri pacientih povzroči imunsko toleranco, ki je pri terapevtskih proteinih še posebno nezaželena, saj na trgu ni veliko kompetitorskih učinkovin (Roberts, 2014b). Agregacija terapevtskih proteinov lahko vodi v zmanjšano biološko aktivnost, povečano imunogenost in druge stranske učinke, zato je raven agregatov v biološki učinkovini eden ključnih faktorjev za določanje kvalitete (Ahrer in sod., 2006).

V magistrski nalogi smo poskušali določiti vplive, ki v procesu ultrafiltracije in diafiltracije vodijo v nastanek agregatov. V prvem sklopu smo testirali štiri najpogosteje uporabljene tipe črpalk in izbrali tisto, pri kateri je bila tvorba agregatov najmanjša. V drugem sklopu smo na izbrani črpalki testirali vpliv tlaka, mešanja in temperature na tvorbo agregatov. Poskušali smo določiti optimalno območje za izbrane parametre, da bi zagotovili čim manjšo tvorbo agregatov med ultrafiltracijo in diafiltracijo.

1.1 CILJ NALOGE

Namen naloge je izbor najustreznjšega tipa črpalke in določitev ter optimizacija parametrov, ki lahko med ultrafiltracijo in diafiltracijo vplivajo na tvorbo proteinskih agregatov. Kot modelni protein za izvedbo poskusov smo izbrali monoklonsko protitelo.

Nalogo smo razdelili v dva sklopa. Poskusi prvega sklopa naloge so namenjeni testiranju vpliva različnih tipov črpalk na nastanek agregatov. V ta namen sta bili ultrafiltracija in diafiltracija izvedeni pri enakih nastavitvah na štirih različnih tipih črpalk: peristaltična, membranska, tlačna in zobniška. Izbrali smo tip črpalke, pri kateri je raven agregatov najnižja.

V drugem sklopu naloge smo na izbrani črpalki testirali vpliv različnih parametrov na nastanek agregatov. Na podlagi literature smo se odločili, da kot parametre testiramo vpliv tlaka, temperature in mešanja.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Med ultrafiltracijo in diafiltracijo je mAb izpostavljen različnemu fizikalnemu stresu, ki lahko vpliva na nastanek agregatov. Pred izvedbo eksperimentalnega dela smo postavili naslednje hipoteze.

Hipoteza 1: Raven agregatov bo po ultrafiltraciji in diafiltraciji na različnih tipih črpalk različna. Predvidevamo, da bo raven agregatov najnižja pri uporabi peristaltične črpalke in najvišja pri uporabi batne črpalke. Protein je pri uporabi batne črpalke v primerjavi z drugimi tipi črpalk najbolj izpostavljen gibajočim delom črpalke.

Hipoteza 2: Predvidevamo, da bo raven agregatov višja, če bo med ultrafiltracijo in diafiltracijo raztopina proteina izpostavljena najvišji hitrosti mešanja (5 obratov na minuto).

Hipoteza 3: Predvidevamo, da bo raven agregatov višja pri višjih tlakih. Največ agregatov pričakujemo pri visokih tlakih. Vpliv tlaka bo izrazitejši med diafiltracijo zaradi višje koncentracije proteina v raztopini.

Hipoteza 4: Predvidevamo, da bo tvorba agregatov najnižja pri sobni temperaturi (24 °C). Največ agregatov pa pričakujemo pri 5 °C.

2 PREGLED OBJAV

2.1 UPORABA MONOKLONSKIH PROTITELES ZA ZDRAVLJENJE

Biološka zdravila predstavljajo skoraj polovico novih zdravil, odobrenih s strani FDA (Filipe in sod., 2013), med njimi prevladujejo monoklonska protitelesa. Uporabljajo jih predvsem pri zdravljenju številnih bolezni, za katere je še do nedavnega veljalo prepričanje, da jih ni mogoče zdraviti, to so na primer različne oblike rakavih obolenj in avtoimunih bolezni (Roberts, 2014a).

Za razliko od manjših molekul, ki jih lahko zaužijemo peroralno, monoklonska protitelesa injiciramo v obliki tekočine, in sicer intravenozno (IV), intramuskularno (IM) ali subkutano (SC). Peroralna aplikacija zaradi proteinske narave teh zdravil ni mogoča. Zdravljenje z monoklonskimi protitelesi navadno zahteva vnos velikega odmerka zdravilne učinkovine (masa proteina glede na telesno težo pacienta). Maksimalen volumen učinkovine, ki jo lahko bolnik prejme IM ali SC, je 1 mL, medtem ko je lahko tarčni odmerek proteina na pacienta tudi do 200 mg. Monoklonska protitelesa morajo biti zato pripravljena v dovolj koncentrirani obliki, ki omogoča aplikacijo ustreznih odmerkov.

Najpogosteje uporabljena monoklonska protitelesa z glavnimi indikacijami so predstavljena v spodnji tabeli.

Preglednica 1: Najpogosteje uporabljena monoklonska protitelesa (Štrukelj in sod., 2015:10)

Monoklonsko protitelo	Glavna indikacija
Abcixumab	Preprečitev strdkov
Rituximab	Ne-Hodgkinov limfom
Baziliximab	Imunosupresija
Daclizumab	Imunosupresija
Palivizumab	Preprečitev virusnih okužb
Infliximab	Kronične vnetne bolezni
Trastuzumab	Rak dojke
Gemtuzumab ozogamicin	Akutna mieloidna levkemija
Alemtuzumab	Kronična mieloidna levkemija
Adalimumab	Kronične vnetne bolezni
Tositumomab	Ne- Hodgkinov limfom
Certolizumab pegol	Kronična mieloidna levkemija
Golimumab	Kronična mieloidna levkemija

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice 1 Najpogosteje uporabljena monoklonska protitelesa«

Monoklonsko protiteleso	Glavna indikacija
Belimumab	Sistemski lupus
Raxibacumab	Okužba z antraksom
Ipilimumab	Metastatski melanoma
Efalizumab	Luskavica
Cetuximab	Kolorektalni rak
Bevacizumab	Kolorektalni rak
Natalizumab	Multipla skleroza
Ranibizumab	Makularna degeneracija
Panitumumab	Kolorektalni rak
Eculizumab	Hemoglobinurija
Ibrizumomab tiuxetan	Ne- Hodgkinov limfom
Canakinumab	Muckle-wells sindrom
Catumaxomab	Maligni ascites
Ustekinumab	Kronična vnetja
Ofatumumab	Kronična levkemija
Denosumab	Osteopenija
Brentuxumab vedotin	Hodgkinov limfom

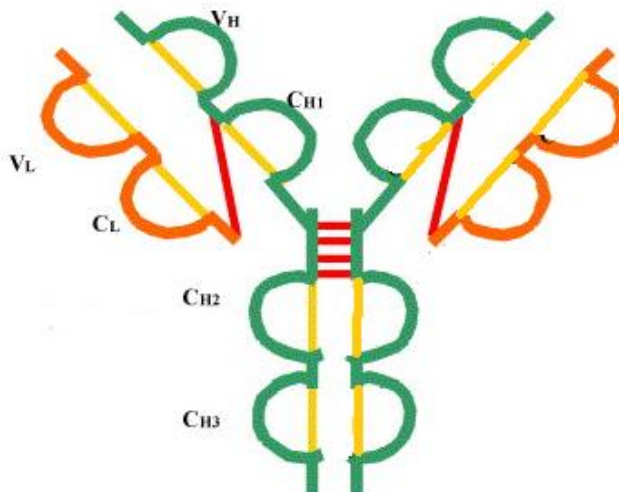
2.1.1 Struktura monoklonskih protiteles

Monoklonska protitelesa so glikozilirani globularni proteini, ki jih uvrščamo v skupino imunoglobulinov (Ig) (Shukla in sod., 2007).

So velike molekule (cca.150 kDa) s simetrično strukturo in so sestavljene iz štirih peptidnih verig: dve enaki težki verigi in dve enaki lahki verigi. Težki in lahki verigi se med seboj povezujejo z disulfidnimi vezmi (Štrukelj in sod., 2007). Glede na vrsto težke verige, razdelimo protitelesa na pet razredov: G, M, D, A in E. Monoklonska protitelesa, ki se uporabljajo kot terapije, najpogosteje uvrščamo v razred imunoglobulinov G (IgG) in podrazreda IgG1 in IgG2 (Shukla in sod., 2007).

Težki in lahki verigi sta sestavljeni iz konstantnih in variabilnih regij, ki se razlikujeta v stopnji ohranjenosti aminokislinske sestave med različnimi protitelesi iste vrste. Težka veriga je sestavljena iz treh konstantnih (CH-1, CH-2, CH-3) in ene variabilne regije (VH). Lahka veriga je sestavljena iz ene konstantne (CL-1) in ene variabilne regije (LH). Konstantna področja imajo podobno aminokislinsko sestavo in so pomembna predvsem za interakcijo protiteles z drugimi elementi imunskega sistema (npr. vezava na receptorje).

Variabilna regija, kjer je raznolikost aminokislinskega zaporedja večja, predstavlja specifično prepoznavno mesto za vezavo z antigenom (Štrukelj in sod., 2007).



Slika 1: Shema monoklonskega protitelesa (CH-1, CH-2, CH-3: konstantne regije, VH: variabilna težka regija, CL in HL: konstantne variabilne lahke regije) (Shukla in sod., 2007: 29)

2.1.2 Proizvodnja in čiščenje monoklonskih protiteles

Za zdravljenje uporabljamo monoklonska protitelesa rekombinantnega izvora. Njihovo proizvodnjo lahko v grobem razdelimo na pripravljalne procese (up-stream processing, USP) in zaključne procese (down-stream processing, DSP).

2.1.2.1 Pripravljalni procesi

Pripravljalni procesi so namenjeni nastajanju (sintezi) monoklonskih protiteles v izbrani celici. Monoklonska protitelesa se ponavadi proizvajajo v sesalskih celicah. Najpogosteje uporabljen sistem za proizvodnjo monoklonskih protiteles so CHO celice. Celično linijo izberemo glede na produktivnost, posttranslacijske modifikacije, rastne pogoje in stabilnost. Izbiri celične linije sledi izbira plazmidnega vektorja, transfekcijske in selekcijske metode. Slednja nam omogoči izbiro najprimernejših klonov za proizvodnjo izbranih protiteles. Izbira klonov je eden izmed najpomembnejših korakov USP razvojnega procesa. Izbrane celice se nato shranijo v celičnih bankah vse do začetka produkcije (Gronemeyer in sod., 2014).

Prvi korak proizvodnje monoklonskih protiteles je nacepitev manjšega bioreaktorja z izbranimi celicami iz celične banke. Celična kultura se nato postopno prenaša v vse večje bioreaktorje do velikosti bioreaktorja, ki zadostuje potrebam proizvodnje. Volumni

proizvodnih bioreaktorjev so lahko zelo različni, tudi do 24 000 litrov. V izbranem bioreaktorju nato celice pod kontroliranimi pogoji gojimo od nekaj dni do nekaj tednov. Ker se med procesom monoklonska protitelesa naravno izločajo iz sesalskih celic, lahko po končanem procesu s centrifugiranjem ločimo celice od bioprocenjske brozge, v kateri se nahajajo monoklonska protitelesa (Kelley in sod., 2008).

2.1.2.2 Zaključni procesi

Zaključni procesi so namenjeni izolaciji monoklonskega protitelesa in odstranjevanju procesnih in s produktom povezanih nečistot. Procesne nečistote predstavljajo ostanki celičnih kultur kot so proteini gostiteljske celice (HCP) in deoksiribonukleinska kislina (DNA), ostanki medija (hranila, rastni hormoni) in procesni reagenti (inorganske soli, topila). Agregirana, deamidirana, oksidirana ali kako drugače spremenjena protitelesa predstavljajo nečistote, povezane s produktom, in so lahko v končnem produktu prisotne le znotraj natančno določenih mej.

Na voljo je mnogo metod, ki nam omogočajo izolacijo in čiščenje. Izbira metod in določitev njihovega zaporedja je odvisna od lastnosti monoklonskega protitelesa, ki ga želimo izolirati (Rea in sod., 2012).

Izolacija in čiščenje vključujeta centrifugiranje, dve ali več kromatografskih stopenj (afinitetna kromatografija, anionska ali kationska izmenjevalna kromatografija in hidrofbna kromatografija), zamenjavo pufra in končno filtracijo (Rea in sod., 2012).

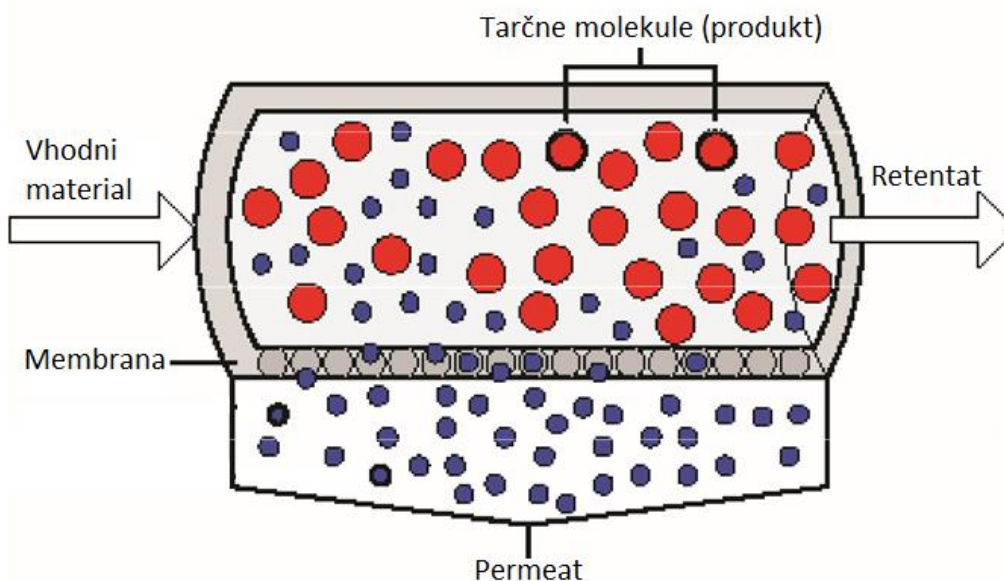
Po zadnji kromatografski stopnji je treba pufersko raztopino, v kateri se produkt nahaja, zamenjati s formulacijsko raztopino. Ultrafiltracija in diafiltracija sta metodi, ki se v industriji najpogosteje uporabljata za koncentriranje produkta in menjavo pufra. Po procesu ultrafiltracije in diafiltracije produkt filtriramo in po potrebi zamrznemo do končnega polnjenja zdravilne učinkovine (Rea in sod., 2012).

2.2 ULTRAFILTRACIJA/DIAFILTRACIJA

Ultrafiltracija in diafiltracija sta najpogosteje uporabljeni metodi v procesu koncentriranja in končnega formuliranja monoklonskih protiteles. Največji izziv, s katerim se spopadajo pri načrtovanju UF/DF procesa, je visoka koncentracija proteina. Monoklonska protitelesa se dozirajo SC, zaradi česar je volumen za aplikacijo omejen, hkrati pa je treba aplicirati visok odmerek učinkovine, zato moramo zagotoviti visoko koncentracijo proteina (tudi do 200 mg/mL ali več) (Binabaji in sod., 2015).

UF/DF je filtracijski proces, ki omogoča ločevanje delcev glede na molekulsko maso in velikost. S procesom ultrafiltracije produkt skoncentriramo do željene koncentracije. Polprepustna membrana zadrži delce, ki so večji od membranskih por (retentatni tok), manjši delci pa lahko prosto prehajajo skozi membrano (permeatni tok). Med diafiltracijo v sistem dovajamo končni pufer z enako hitrostjo kot odvajamo permeatni tok in tako ohranjamo konstantni volumen raztopine v sistemu (Liu in sod., 2010).

UF/DF lahko izvajamo na dva načina: filtracija z direktnim tokom (DFF) in filtracija s tangencialnim tokom (TFF). V DFF načinu procesno tekočino pod tlakom usmerimo pravokotno na površino membrane. Delci, ki so večji od por v membrani, se akumulirajo na površini membrane ali se zadržijo v filtrnem mediju, medtem ko manjši delci prehajajo skozi membrano v permeat. V TFF načinu procesno tekočino dovajamo tangencialno, glede na površino membrane. Tlak, ki pri tem nastaja, potiska tekočino proti površini membrane. Z ustrezno tlačno razliko del tekočine, ki vsebuje delce, manjše od membranskih por, potuje skozi membrano v permeat, preostanek (retentat) pa se vrača v dovodni rezervoar. Prednost TFF pred DFF je preprečevanje nalaganja materiala na površino membrane.



Slika 2: Princip filtracije s tangencialnim tokom (Houp, 2009: 43)

2.2.1 Sistem

Osnovne komponente UF/DF sistema so filtracijski modul, črpalka, tlačni ventil, senzor in cevi. Sistemi se med seboj razlikujejo po velikosti, po tipu črpalke in tipu membran. Membrana je prek cevi povezana s črpalko, ki dovaja procesno tekočino do membrane.

Uporabimo lahko samostojne membrane ali membrane z nosilci. Na dovodni strani membrane sta nameščena tlačni ventil in senzor.

2.2.2 Membrane

Uporabimo lahko membrane iz različnih materialov. Membrane iz sintetičnih polimerov zaradi odpornosti na kisline, baze in visoke temperature omogočajo učinkovito čiščenje, vendar lahko povzročajo razvitje proteinov. Razvitje proteinov je manj pogosto pri uporabi membran iz regenerirane celuloze. V zadnjih letih so proizvajalci precej izboljšali učinkovitost čiščenja membran iz regenerirane celuloze, kar je bila v preteklosti ena glavnih omejitev pri njihovi uporabi v proizvodnji (Liu in sod., 2010).

Na voljo so membrane z različnimi površinami in velikostmi por (od 5 do 1000 kDa). Velikost por določimo glede na lastnosti tarčne molekule. Površino membrane izberemo glede na količino produkta, ki ga želimo filtrirati. Razmerje med površino in volumnom produkta mora biti natančno določeno, saj lahko premajhna površina povzroči mašenje membrane, prevelika površina pa podaljša čas, poveča stroške procesa, lahko pa tudi negativno vpliva na izkoristek procesne stopnje (Houp, 2009).

2.3 ČRPALKE

2.3.1 Peristaltična črpalka

Peristaltična črpalka omogoča, da se tekočina v cevi giblje kot posledica krčenja in raztezanja dela cevi, ki je v stiku z rotirajočo glavo črpalke (Tripathi in Bég, 2014). Proizvajalci navajajo, da je vpliv strižnih sil na tekočine pri uporabi peristaltične črpalke minimalen.

2.3.2 Membranska črpalka

Gibanje tekočine v membranski črpalki je posledica spreminjanja prostornine v komori. Prostornina v komori se spreminja zaradi gibanja membrane. Ko se membrana pomakne navzdol, v komori nastane podtlak. Podtlak omogoči atmosferskemu tlaku, da potisne tekočino proti dovodni zaklopki, ta se odpre in tekočina napolni komoro. Ko v komori tlak naraste, se membrana pomakne navzgor. Nadtlak zapre dovodno zaklopko in odpre izhodno zaklopko, tekočina steče iz komore (Mimmi in Pennacchi, 2001).

2.3.3 Tlačna črpalka

Gibanje tekočine pri tlačni črpalki je posledica spreminjanja položaja bata. Z gibanjem bata se spreminja prostornina v komori črpalke. Ko se bat pomakne navzven, se ustvari vakuum, ki poseša tekočino v komoro. Ko je komora napolnjena s tekočino, se začne bat pomikati proti tekočini in potiska tekočino iz komore (Changbin in sod., 2014).

2.3.4 Zobniška črpalka

Gibanje tekočine pri zobniški črpalki je posledica vrtenja zobnikov, nameščenih v komori črpalke. Zaradi vrtenja zobnikov se na vhodni ali sesalski strani črpalke ustvari vakuumski prostor, ki povleče tekočino v komoro črpalke. Z nadaljnjim vrtenjem se tekočina ob steni komore prenese na drugo stran komore. Prazni prostori med zobniki se večajo in manjšajo ter tako omogočajo premik tekočine (Mucchi in sod., 2010).

2.4 PROTEINSKI AGREGATI

Agregati so vse proteinske vrste v nenativni obliki (Modler in sod., 2003). Agregat je torej univerzalni izraz za vse multimerne proteinske skupke, kjer so proteini povezani s kovalentnimi ali nekovalentnimi vezmi (Mahler in sod., 2009).

Monoklonska protitelesa so aktivna v monomerni obliki. Enake sile, ki so odgovorne za pravilno zvijte proteinov, pa lahko hkrati sodelujejo tudi pri tvorbi agregatov, saj omogočajo interakcijo proteina z aminokislinami sosednjih proteinov (Roberts, 2014a).

Na raven agregiranosti vplivajo številni dejavniki, ki jih lahko razdelimo na intrinzične (primarna, sekundarna, terciarna in kvartalna struktura) in ekstrinzične (okolje, v katerem se protein nahaja) (Wang in sod., 2010).

Nastanek proteinskih agregatov je posledica delovanja različnih mehanizmov. Zaradi raznolikosti poti nastanka agregatov se tudi nastali agregati med seboj razlikujejo. Proteinske aggregate lahko okarakteriziramo glede na njihovo strukturo ali glede na način nastanka.

2.4.1 Delitev proteinskih agregatov glede na strukturo

Agregate razlikujemo po vezeh med proteini, po velikosti in strukturi.

Glede na vez ločimo: nekovalentne agregate (nastanejo zaradi delovanja šibkih elektrostatskih vezi) in kovalentne agregate (vsebujejo di sulfidne ali drug tip kovalentnih vezi).

Glede na reverzibilnost ločimo: reverzibilne agregate (v določenih pogojih se lahko povrnejo v monomerno obliko) in ireverzibilne agregate (vrnitev v monomerno obliko ni mogoča).

Glede na velikost ločimo: manjše topne agregate (20 nm do 1 μ m), večje topne agregate (1 μ m do 25 μ m) in velike netopne agregate (ti so vidni s prostim očesom).

Glede na proteinsko strukturo ločimo: agregate s prevladujočo nativno strukturo in agregate s prevladujočo nenativno strukturo (sem spadajo npr. delno razvite multimerne strukture) (Mahler in sod., 2009).

2.4.2 Delitev proteinskih agregatov glede na pot nastanka

Agregati lahko nastanejo po različnih poteh:

Nastanek agregatov prek delno razvitih proteinskih intermediatov

V normalnih okoliščinah so nativni proteini v ravnovesju z majhno količino delno razvitih intermediatov. Delno razviti intermedii so zelo fleksibilni in imajo v primerjavi s popolnoma zviti proteini bolj izpostavljene hidrofobne dele. Interakcije proteinov s takšnimi intermedii lahko pod določenimi pogoji vodijo v agregacijo proteinov (Wang in sod., 2010).

Nastanek agregatov prek samozdruževanja proteinov

Samozdruževanje proteinov je posledica delovanja elektrostatskih, hidrofobnih ali šibkejših Van der Walsovih sil. Katere sile bodo pri združevanju sodelovale, je odvisno od okolja, v katerem se protein nahaja. Strukturne spremembe niso vedno posledica samo združevanja. Raziskave so pokazale, da lahko samozdruževanje povzroči nastanek reverzibilnih agregatov, ti pa so lahko prekursorji za tvorbo ireverzibilnih agregatov (Weiss in sod., 2009).

Nastanek agregatov z neposredno kemijsko vezavo

Agregacijo proteinov lahko sproži tudi zamreženje proteinskih verig, to je posledica kovalentne povezave med stranskimi verigami aminokislin. Najpogostejša je tvorba novih disulfidnih vezi ali pa vzpostavitev napačnih disulfidnih povezav. Manj pogosta so nedi sulfidna zamreženja, na primer tvorba kovalentnih vezi med dvema tirozinoma ali oksidacija (Wang in sod., 2010).

Nastanek agregatov zaradi kemijske razgradnje

Številne oblike kemijske razgradnje, kot so oksidacija, deamidacija, dimerizacija in hidroliza, povečajo nagnjenost proteinov k agregiranju. Kemijska razgradnja vpliva na fiziološke lastnosti proteina (npr. hidrofobnost) in na samo strukturo proteinov (sekundarno in terciarno) (Wang in sod., 2010).

2.4.3 Dejavniki, ki vplivajo na nastanek agregatov

Agregati lahko nastajajo med celotnim proizvodnim procesom, ki vključuje fermentacijo/ekspresijo, čiščenje, zamrzovanje in odtaljevanje, mešanje in formuliranje (Cromwell in sod., 2006).

Interakcije, ki vodijo v agregacijo proteinov, so posledica številnih dejavnikov, kot so: koncentracija proteina, pH in ionska moč raztopine, v kateri se protein nahaja, temperatura, tlak, izpostavljenost zraku.

2.4.3.1 Vpliv procesnih dejavnikov med UF/DF

UF/DF je del zaključnih procesov proizvodnje monoklonskih protiteles in lahko izrazito vpliva na kvaliteto končnega produkta. Med UF/DF je protein izpostavljen različnim oblikam stresa, ki lahko vodijo v nastanek agregatov in tako zmanjšajo kvaliteto produkta. Številni parametri, ki jih lahko med procesom spreminjamo, lahko bodisi vzpodbudijo, bodisi zmanjšajo tvorbo agregatov. Parametri UF/DF, ki lahko vplivajo na tvorbo agregatov, so: črpanje, mešanje, temperatura, tlak in koncentracija. Črpanje in mešanje predstavljata mehanski stres (stres zaradi gibanja) in lahko inducirata strižne sile, tvorbo medfaz, kavitacijo in lokalne termalne efekte.

Mešanje

Mešanje je proces, s katerim med UF/DF zagotovimo homogenost procesne raztopine. Mešanje predstavlja stres za proteine, tako med samim proizvodnim procesom, pa tudi kasneje v času transporta. Vpliv na produkt je odvisen od intenzitete in časa izpostavitve mešanju. Mešanje povzroči tudi nastanek interfaz tekočina/zrak. Zaradi hidrofobnosti zraka protein v območju interfaz izpostavi hidrofobna območja (hidrofobne aminokisline, ki so v nativni strukturi skrite v notranjosti). Izpostavljenost hidrofobnega dela proteina spodbudi hidrofobne interakcije med aminokislinami, kar lahko vodi v nastanek multimernih agregatov (Jayaraman in sod., 2014). Študije so pokazale, da mešanje ob prisotnosti interfaz tekočina/zrak povzroča agregacijo imunoglobulinov. Protitelesa IgG1 se lahko zaradi omenjenih interfaz poškodujejo (Vázquez-Rey in Lang, 2011). Kljub vsemu pa nekatere

raziskave kažejo, da rahlo mešanje še ne predstavlja tveganja za nastanek agregatov (Wang in sod., 2010).

Vpliv mešanja na agregacijo je odvisen tudi od koncentracije proteina. Študije so pokazale, da mešanje pri visokih koncentracijah proteina povzroča agregacijo v manjši meri kot mešanje pri nizkih koncentracijah. Medfaza tekočina/zrak tvori t.i. denaturacijsko površino, na kateri nastajajo agregati. Razmerje med proteini in interfazo tekočina/zrak je pri večjih koncentracijah nižje, kar pomeni, da je na voljo manj površin za tvorbo agregatov. Agregacija, ki jo povzroči mešanje, je tako obratno sorazmerna koncentraciji proteina (Treuheit in sod., 2002).

Črpanje

Med UF/DF procesom je procesna raztopina izpostavljena stresu zaradi črpanja (Cromwell in sod., 2006). Študije nakazujejo, da uporaba različnih tipov črpalk različno vpliva na nastanek agregatov (Rosenberg in sod., 2009). Med procesom črpanja je procesna raztopina izpostavljena različnim pojavom, kot so kavitacija, stres zaradi stiga in izpostavljenost različnim interfazam (tekočina/zrak ali tekočina/trdna površina).

Strižna napetost (τ) je posledica delovanja strižne hitrosti (γ) in viskoznosti raztopine (μ).

$$\tau = \gamma \times \mu \quad \dots (1)$$

In povzroča strižno silo (F), ki je produkt strižne napetosti (τ) in površine, na katero deluje (A).

$$F = \tau \times A \quad \dots (2)$$

Študije so pokazale, da jakost strižnih sil in čas izpostavljenosti strižnim silam sama po sebi ne vplivajo na pojav agregatov. Pri izvajanju standardnih procesnih operacij je protein izpostavljen strižnim silam < 0.06 pN, medtem ko je za mehansko razvitje proteina potrebna sila od 20 do 150 pN (Bee in sod., 2009).

Večji vpliv na tvorbo agregatov med črpanjem imajo kavitacija, pojav interfaz in izpostavitve trdnim površinam (Vázquez-Rey in Lang, 2011).

Kavitacija je proces s katerim opisujemo izgradnjo, rast in implozijo mehurčkov v raztopini. Ko tlak v sistemu pade pod parni tlak tekočine, se tvorijo mehurčki. Implozijo mehurčkov lahko opazimo kot nihanja tlaka in temperature. Nastali mehurči lahko vsebujejo plin ali paro ali mešanico obojega. Poznamo različne tipe kavitacije. Hidrodinamska kavitacija je

posledica sprememb hitrosti gibanja tekočine v sistemu in se odraža v nihanju tlaka. Akustična kavitacija je posledica ultrazvočnega valovanja, kateremu je tekočina izpostavljena in se prav tako odraža v tlačnem nihanju. Optična kavitacija je posledica presvetljevanja tekočine s svetlobo ali lasarjem. Kavitacija zaradi delcev je posledica trkov tekočine z osnovnimi delci (Shah in sod. 1999).

Med procesom črpanja je raztopina izpostavljena hidrodinamski kavitaciji. Za določanje kavitacijskega potenciala lahko izračunamo kavitacijsko število, ki je odvisno od tlaka (P_f) v sistemu, parnega tlaka raztopine (P_v), gostote raztopine (ρ) in hitrosti pretoka (U).

$$\sigma = \frac{P_f - P_v}{\frac{1}{2} \times \rho \times U^2} \quad \dots (3)$$

Preko kavitacijskega števila določimo verjetnost kavitacije. Večje kot je število, večja je verjetnost za nastanek kavitacije. Kavitacijsko število lahko zmanjšamo z znižanjem tlaka ali povečanjem hitrosti pretoka (Shah in sod. 1999).

Merjenje kavitacije z direktnimi metodami, ki vključujejo vizualizacijo mehurčkov je v številnih primerih oteženo zaradi same narave uporabljene naprave v kateri želimo izmeriti kavitacijo. Za določanje kavitacije so primernješe indirektne metode. S tlačnimi senzorji lahko določimo nihanja v tlaku, ki so posledica kavitacije. Poleg tlačnih nihanj se ob impanziji mehurčkov tvori visoko frekvenčni akustični signal, ki ga lahko zajamemo z uporabo primernih hidrifonov. Kavitacijo lahko izmerimo tudi s pomočjo ultrazvočnih senzorjev ali optično z uporabo visoko zmogljivih kamer (Koivula in sod. 2000).

Proteini so površinko aktivne molekule in kot takšne imajo težnjo po vezavi na hidrofobne interfeze. Prisotnost interfaz lahko določamo posredno preko merjenja hidrofobnosti ali površinek napetosti raztopine. Adsorpcija proteina na interfazo povzroči strukturne spremembe proteina, kar lahko vodi v nastanek agregatov. Hidrofobnost, ki jo povzroči strukturna sprememba proteina ob vezavi na interfazo, lahko izmerimo s pomočjo Nil Red barvila. Barvilo flourescira v hidrofobnih okoljih in se tako uporablja za detekcijo agregatov. Hidrofobnost proteina se ob prisotnosti interfaz poveča, zaradi izpostavljenosti hidrofobnih območij, kar se odraza v večji flouescenci. (Leiske in sod.2016).

Adsorpcija proteina na interfeze se odraža tudi v zmanjšanju površinske napetosti raztopine. Omenjen pojav lahko izmerimo s pomočjo konfokalnega mikroskopa ali z rentgenskimi žarki. Vpliv interfaz je odvisen od stabilnosti in hidrofobnosti proteina. Njihov vpliv lahko v nekaterih primerih zmanjšamo z dodajanjem surfaktantov (Tripp in sod. 1995).

Tlak

Na agregacijo vplivajo predvsem visoki tlaki, ki vzpodbudijo hidrofobne interakcije in vplivajo na izpostavitve reaktivnih skupin proteina, ki so pri atmosferskem tlaku dobro zaščitene (Wang in sod. 2010).

Med UF/DF spremljamo tlak na dovodni in izhodni strani membrane. Na podlagi omenjenih tlakov lahko izračunamo trans-membranski tlak.

Pri izračunu trans-membranskega tlaka (TMP) moramo upoštevati tlak pred membrano (P_{dohodni}), tlak na retentatni (P_{retentat}) in tlak na permeatni (P_{permeat}) strani (Christodoss, 2013):

$$\text{TMP} = \left(\frac{P_{\text{dohodni}} - P_{\text{retentat}}}{2} \right) - P_{\text{permet}} \quad \dots (4)$$

Temperatura

Temperatura ima velik vpliv na gibanje molekul. Sprememba temperature se odraža v spremembi vibracijskega stanja in difuzije molekul proteina. Dvig ali spust temperature lahko destabilizira protein in pripomore k agregaciji. Dvig temperature ima različne vplive na stanje proteina: zmanjša se aktivacijska energija, povečajo se hidrofobne interakcije, poveča se difuzija in frekvenca molekulskih trkov (Wang in sod., 2010). Sprememba aktivacijske energije lahko sproži proces agregacije preko razvitih intermediatov, direktnih kemijskih vezav ali preko kemijskih degradacij. Razviti intermediati predstavljajo prekursorje za agregacijski proces, saj imajo večjo izpostavljenost hidrofobnih delov in so bolj fleksibilni v primerjavi z zvitiimi proteini. Agregacija preko direktnih kemijskih vezi je posledica tvorbe ali menjave disulfidnih vezi znotraj proteina. V omenjenem procesu lahko sodelujejo tudi druge ne-disulfidne vezi, ki pa niso tako pogoste. Kemijske degradacijske poti kot so oksidacija, hidroliza in glikacija, ki spremenijo fizikalne lastnosti proteina, kot so hidrofobnost in sekundarna ali terciarna struktura proteina, lahko prav tako spodbudijo tvorbo agregatov. Tako kot visoka temperatura lahko tudi nizka temperatura destabilizira protein ali povzroči njegovo denaturacijo. Destabilizacija proteinov pri nizki temperaturi je posledica tvorbe razvitih intermediatov, ki lahko posledično spodbujajo tvorbo agregatov. Kljub temu pa je agregacija pri nizkih temperaturah manj pogosta. Vzrok za to so predvsem šibke hidrofobne interakcije, to pa je tudi razlog, da so agregati, nastali pri nizki temperaturi večino reverzibilni (Wang in sod., 2010).

Zamrzovanje in odtaljevanje

Agregacija je lahko tudi posledica zamrzovanja in odtaljevanja. Raven agregacije je odvisna od koncentracije proteina in aditivov, ki so dodani raztopini proteina. Med zamrzovanjem je protein izpostavljenosti nizki temperaturi izpostavljen številnim dodatnim stresom, kot so: formacija interfaz led/voda, interakcija protein-led, spremembe pH ... Vpliv lahko zmanjšamo z uravnavanjem pH in z uporabo surfaktantov, ki zmanjšajo interakcije protein-led. Na tvorbo agregatov so odpornejši bolj koncentrirani proteini, ker je tako manj prostora za tvorbo interfaz led/voda, proteini so stabilnejši, monomeri so združeni v aktivne in bolj stabilne dimere (Wang in sod., 2010).

2.4.3.2 Vpliv okoljskih dejavnikov na tvorbo agregatov

Raztopina, v kateri se protein nahaja

Na proces agregacije lahko vpliva okolje oz. raztopina, v kateri se protein nahaja. Lastnosti raztopine, ki vplivajo na nastanek agregatov, so pH, ionska moč in vrsta pufru. Največji vpliv ima pH raztopine, ker določa vrsto in porazdelitev nabojev na površini proteina. Naboj proteina vpliva na intramolekularne interakcije (zvitje proteina) in tudi na intermolekularne interakcije (protein-protein). Pri ekstremnih vrednostih pH je protein močno nabit, zato so intra in intermolekularne interakcije pogostejše (Wang in sod., 2010).

Koncentracija proteina

Visoka koncentracija proteina ima lahko pozitiven ali negativen vpliv na nastajanje agregatov. Zaradi visoke koncentracije lahko pride do pojava kopičenja; nastane kompaktnejša formulacija, ta pa preprečuje agregacijo. Visoka koncentracija pa hkrati spodbuja interakcije med sosednjimi molekulami proteina, kar privede do reverzibilnega razvitja proteinov in posledično do tvorbe netopnih agregatov. Pri koncentriranju moramo biti pozorni na mejo topnosti proteina. Če je meja topnosti presežena, pride do agregacije, precipitacije ali celo do kristalizacije (Wang in sod., 2010).

Med UF se koncentracija proteina na površini membrane povečuje. Visoka koncentracija proteina na membrani lahko sproži nastajanje agregatov (Cromwell in sod., 2006).

Mašenje membrane lahko povzroči adsorpcija proteinov pa tudi nalaganje soli in kemične reakcije membranskih materialov s komponentami raztopine. Tvorba gelske plasti raztopine (C_G) na membrani je v tesni korelaciji s pretokom. Permeabilnost membrane se zaradi tvorbe gelske plasti zmanjša, posledica je znižanje permeatnega toka (Sablani in sod., 2001).

Pretok na membrani (J) izračunamo po enačbi:

$$J = \frac{D}{\delta} \ln \frac{C_G}{C_B} \quad \dots (5)$$

kjer je D difuzijski koeficient, δ debelina gelske plasti, ki se med filtracijo tvori na membrani in C_B koncentracija proteina v izhodni raztopini.

Stik s površino

Proteini so nagnjeni k adsorpciji na površine. Takšna adsorpcija lahko povzroči nastanek agregatov s strukturnimi spremembami ali brez njih. Proteini imajo različno afiniteto vezave na različne tipe površin (Wang in sod., 2010). Adsorpcija proteina na površino črpalke, s katero je v stiku, lahko povzroči konformacijske spremembe proteinskih molekul in posledično agregacijo proteinov (Tyagi in sod., 2009). Adsorpcija je odvisna tudi od pH vrednosti, koncentracije soli in temperature. Adsorpcijo lahko zmanjšamo z uporabo različnih površinsko aktivnih snovi, ki imajo večjo afiniteto do površine kot protein. Zmanjšanje adsorpcije zaradi dodatka površinsko aktivnih snovi pa ni vedno učinkovito (Wang in sod. 2010).

Na tvorbo agregatov vplivajo tudi mikro in nanodelci, ki izhajajo iz materialov pri proizvodnji in skladiščenju terapevtskih proteinov. Ti delci lahko stimulirajo nastanek proteinskih agregatov in nastanek delcev. Vsak trden material, ki je v stiku z raztopino proteina, je potencialen vir tujih delcev (Tyagi in sod., 2009).

2.5 KARAKTERIZACIJA PROTEINSKIH AGREGATOV

Proteini so fizikalno in kemijsko nestabilne molekule in so podvrženi razgradnim procesom. Med proizvodnim procesom moramo spremljati potencialno razgradnjo proteinov z ustreznimi analitskimi metodami. (Filipe in sod., 2013).

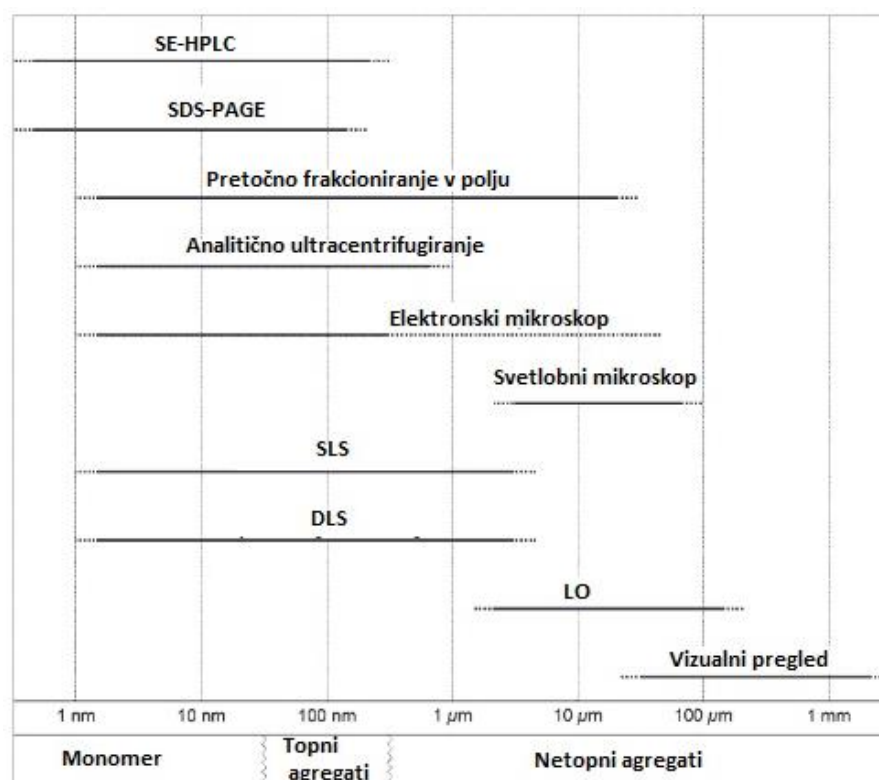
Med proizvodnjo in pripravo končne formulacije terapevtskih proteinov je treba spremljati vsebnost in strukturo proteina ter nastanek in količino agregatov (Mahler in sod., 2009). Meja sprejemljivosti za vsebnost vidnih in sub-vidnih delcev v zdravilnih učinkovinah je omejena z regulativami in določena v farmakopejah. Poleg števila delcev je treba navesti tudi podatke o velikosti delcev, saj farmakopeje predpisujejo meje za delce $\geq 10 \mu\text{m}$ in $\leq 25 \mu\text{m}$ (Zöls in sod., 2013). Ker trenutno še ni na voljo metode, ki bi omogočila določitev vseh parametrov hkrati, je treba uporabiti različne analitske metode (Mahler in sod., 2009).

2.5.1 Analitske metode

Proteinski agregati so pomembni kakovostni atributi pri proizvodnji in formulaciji terapevtskih proteinov. Da bi zadostili potrebam po varnosti in učinkovitosti terapevtskih proteinov, moramo med proizvodnjo spremljati, meriti in nadzorovati pojav agregatov in večjih delcev. Tako evropska kot ameriška farmakopeja zahtevata določitev sub-vidnih in vidnih delcev v proteinski učinkovini (Zöls in sod., 2013).

Za karakterizacijo proteinskih agregatov lahko uporabimo različne analitske metode. Standardne metode za določevanje delcev temeljijo na tehnologiji, ki velikost delcev določa na podlagi zatemnitve svetlobe (t.i. metode ang.: Light Obscuration). Določene lastnosti vzorcev, kot so viskoznost, barva in formulacija, onemogočajo uporabo metod LO. Alternativa tem metodam je ročna mikroskopija, ki pa je dolgotrajna in subjektivna. Kljub temu, da z ročno mikroskopijo lahko pridobimo zelo veliko informacij o najrazličnejših tipih vzorcev, pa je največja slabost metode slaba ponovljivost, saj je rezultat močno odvisen od izvajalca metode. Pomanjkljivosti ročne mikroskopije je mogoče odpraviti z uporabo pretočne mikroskopije, ki je v zadnjih letih postala nepogrešljiva metoda pri določanju sub-vidnih in vidnih delcev (Huang in sod., 2009). Poleg pretočne mikroskopije sta za karakterizacijo proteinskih agregatov največkrat uporabljeni metodi SEC (velikostno izključitvena kromatografija) in DLS (metoda dinamičnega sipanja svetlobe) (Mahler in sod., 2009).

Število metod za določanje karakteristik delcev iz leta v leto narašča. Različni principi merjenja nam omogočajo karakterizacijo delcev glede na velikost, obliko in strukturo. Kljub vsemu se lahko, zaradi različnih principov merjenja, rezultati različnih metod med seboj razlikujejo. Razliko lahko zmanjšamo, če namesto standardov s polistirenskimi kroglicami uporabimo proteinske standarde (Zöls in sod., 2013).



Slika 3: Detekcijsko območje različnih analitskih metod (Mahler in sod., 2009: 2915)

2.5.1.1 Kromatografija z ločevanjem po velikosti

Kromatografija z ločevanjem po velikosti (SEC) je ena izmed najpogostejše uporabljenih metod za detekcijo in kvantifikacijo proteinskih agregatov. Metoda temelji na uporabi tekočinske kromatografije, ki omogoča ločevanje makromolekul glede na njihovo obliko in velikost (Hong in sod., 2012). Delež agregatov in razgradnih produktov v vzorcu določimo na podlagi razmerja površin kromatografskih vrhov (Krayukhina in sod., 2013).

Poleg odstotka agregatov lahko določimo tudi maso agregatov. S pomočjo enačb, ki nam omogočajo izračun velikosti proteinov iz njihove mase, lahko izračunamo tudi velikost agregatov. Rezultati velikosti agregatov pa so, zaradi pomankanja informacij o zgradbi in gostoti agregatov zgolj ocene.

Rezultat o velikosti proteina temelji na predpostavki, da je gostota proteinov približno 1,37 g/cm³. Za izračun velikosti proteinov potrebujemo podatek o parcialnem specifičnem volumnu proteina, ki je recipročna vrednost gostote in variera od 0,7 do 0,76 cm³/g. Če kot parcialni volumen uporabimo njegovo povprečno vrednost (0,73 cm³/g) lahko izračunamo volumen (V), ki ga zavzema protein (Erickson, 2009).

$$V = \frac{\left(0,73 \frac{\text{cm}^3}{\text{g}} \times 10^{21} \frac{\text{nm}^3}{\text{cm}^3}\right)}{6,023 \times 10^{23} \frac{\text{Da}}{\text{g}}} \times M \text{ Da} \quad \dots (6)$$

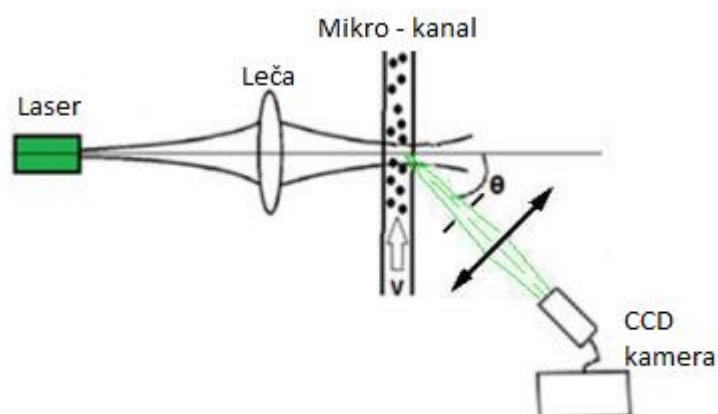
Ob predpostavki, da je proteini v obliki krogle, lahko iz volumna, ki ga protein zavzema izračunamo minimalen premer proteina (R_{min}) v nanometrih z določeno molsko maso (M) v Da (Erickson, 2009).

$$R_{min} = \left(\frac{3V}{4\pi}\right)^{1/3} = 0,066 \times M^{1/3} \quad \dots (7)$$

2.5.1.2 DLS (ang.: Dynamic light scattering)

DLS je neinvazivna, hitra in natančna metoda, ki omogoča merjenje proteinov in delcev v sub-vidnem območju, v velikostnem območju od 1 nm do 10 μ m. Velikostno območje delcev, ki jih lahko zaznamo z metodo DLS je odvisna od uporabljenega detektorja (Zöls in sod., 2013). Metoda temelji na merjenju Brownovega gibanja delcev v raztopini v mirujočem sistemu. Brownovo gibanje je naključno gibanje delcev, ki je posledica trkov molekul topljenca v raztopini. Večji kot so delci, počasnejše bo Brownovo gibanje (Liu in sod., 2015).

DLS sistem je sestavljen iz monokromatskega vira svetlobe (laser), merilne celice, detektorja in digitalnega korelatorja. Ko vpadna laserska svetloba zadane ob gibajoče se delce, to sproži sipanje svetlobe. Intenziteta sipanje svetlobe je ob stiku z manjšimi delci manjše kot pri stiku z večjimi delci. Z metodo DLS izmerimo časovno odvisno intenziteto sipanja svetlobe pod določenim kotom (najpogosteje 90°). Ker merimo časovno odvisnost intenzitete sipane svetlobe, lahko z njeno analizo pridobimo informacijo o dinamičnih in kinetičnih lastnostih delcev v vzorcu. Torej pridobimo informacije o hidrodinamski velikosti delcev in porazdelitvi delcev glede na velikost (Liu in sod., 2015). Hidrodinamski premer je premer krogle, ki ima enako difuzijo, kot izmerjen delec.



Slika 4: Shematični prikaz merjenja vzorca z metodo DLS (Liu in sod., 2015: 907)

Za določanje hidrodinamskega premera delca ($d(H)$), DLS metoda uporablja kumulativno analizo. Kumulativna analiza temelji na uporabi korelacijske funkcije prek katere z izbranim algoritmom določimo difuzijski koeficient. Velikost delca izračunamo iz difuzijskega koeficienta z uporabo Stokes - Einsteinove enačbe.

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad \dots (8)$$

kjer je D difuzijski koeficient, k Boltzmannova konstanta, T absolutna temperatura pri kateri izvajamo meritve in η viskoznost procesne raztopine (Liu in sod., 2015).

Glede na enačbo (8) vidimo, da je hidrodinamski premer odvisen od treh faktorjev:

- temperature: delci se pri višji temperaturi hitreje gibajo;
- viskoznosti raztopine: večja viskoznost raztopine upočasni gibanje delcev;
- velikosti delcev: večji delci se gibajo počasneje.

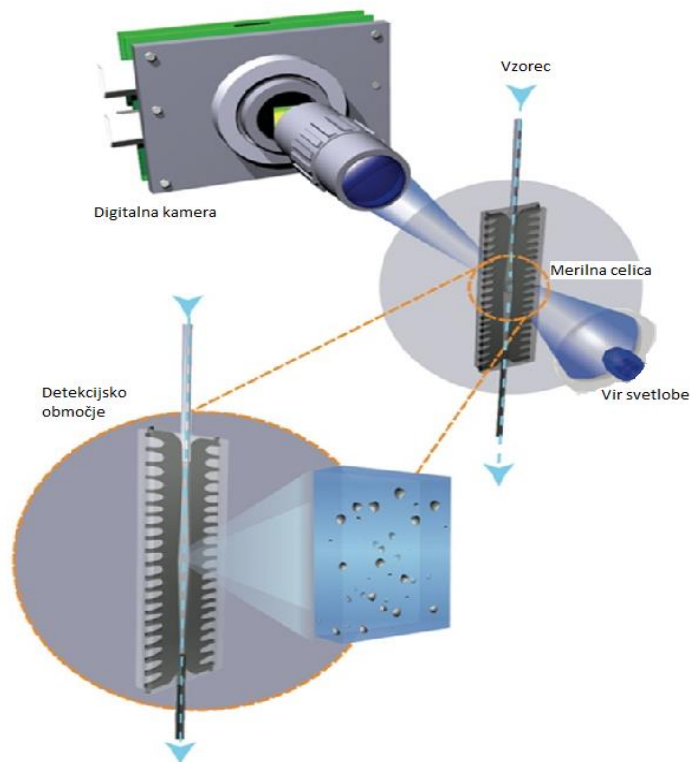
S kumulativno analizo lahko določimo tudi polidisperzni indeks (PdI) vzorca, ki nam poda informacije o velikostni porazdelitvi delcev v vzorcu. Programska oprema omogoča določanje PdI v območju od 0 do 1. O monodisperzni raztopini govorimo ko je PdI manjši od 0,1. Standardi, ki vsebujejo le delce ene velikosti, imajo PdI pod 0,05. Večji kot je PdI , večja je velikostna porazdelitev delcev v vzorcu. Če je PdI večji od 0,1, podatek o hidrodinamski velikosti ni reprezentativen, saj lahko večji delci prekrijejo gibanje manjših delcev (Malvern, 2011).

2.5.1.3 MFI (ang.: Micro flow imaging)

MFI deluje po principu pretočne mikroskopije. Sistem je sestavljen iz pretočne celice, vira svetlobe, optičnih čitalcev in digitalne kamere. MFI za svoje delovanje uporablja enostaven pretočni sistem, po katerem potuje injicirani vzorec. Vzorec lahko injiciramo neposredno v merilno celico s pipeto, pri večjih volumnih pa iz vsebnikov s peristaltično črpalko postopno dovajamo vzorec v merilno celico. Volumen injiciranega vzorca je od 0,25 do 10 mL. Injiciran vzorec potuje po pretočni celici. Optični sistem v detekcijskem območju pretočne celice, ki je osvetljeno z virom svetlobe, neprestano zajema sliko vzorca, kar nam omogoča spremljanje vzorca v realnem času. Povečevalni sistem in pot žarka določata natančnost meritve (Sharma. in sod., 2010).

Z metodo MFI analiziramo delce v velikostnem območju od 1 do 400 μm (Zöls in sod., 2013). Meritev je absolutna. Podatki o posameznem vzorcu zajemajo informacije o številu, velikosti, koncentraciji in obliki delcev v vzorcu. Programska oprema nam s pomočjo

histogramov omogoča uporabo filtrov, s katerimi lahko izmerjene delce v vzorcu porazdelimo v skupine po velikosti (Sharma. in sod., 2010).



Slika 5: Shematični prikaz merjenja vzorca z metodo MFI (Sharma in sod., 2010: 456)

2.6 VPLIV AGREGATOV NA KAKOVOST, VARNOST IN UČINKOVITOST

Agregacija proteinov je eden od glavnih izzivov pri proizvodnji monoklonskih protiteles, saj lahko vodi v zmanjšano ali v nekaterih primerih popolno izgubo biološke aktivnosti, povečano imunogenost in druge stranske učinke.

Reverzibilni agregati predstavljajo manjše tveganje kot ireverzibilni agregati. Reverzibilna agregacija proteinov lahko spremeni topnost in viskoznost terapevtskega proteina. Ker sta IM in SC injiciranji omejeni z volumnom dovedene učinkovine, je treba pripraviti visoko koncentrirano zdravilno učinkovino. Dovoljena količina agregatov, predpisana z regulativami, je le nekaj odstotkov mase proteina v zdravilni učinkovini (Roberts, 2014a).

Agregati v zdravilni učinkovini lahko sprožijo imunski odziv. Bolniki lahko postanejo tolerantni na zdravilo ali celo razvijejo avtoimunske bolezni (Roberts, 2014a).

Imunski odziv lahko povzroči nevtralizacijo zdravilne učinkovine. Kljub številnim raziskavam pa še ni znano, katere vrste agregatov povzročijo imunski odziv. Znanstveniki predvidevajo, da imunski odziv sprožijo veliki agregati, predvsem tisti, ki so sestavljeni iz proteinskih molekul, ki so po strukturi podobni nativni obliki terapevtskega proteina (Tyagi in sod., 2008).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije in reagenti

V preglednici 2,3 in 4 so našteje uporabljene kemikalije in reagenti.

Preglednica 2: Kemikalije

Kemikalija	Formula	Proizvajalec
100 % Ocetna kislina	CH_3COOH	Merck KGaA
96 % Etanol	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Merck KGaA
Acetonitril	CH_3CN	Merck KGaA
Di-kalijev hidrogen fosfat	K_2HPO_4	Merck KGaA
Di-natrijev fosfat	Na_2HPO_4	Merck KGaA
Kalijev di-hidrogen fosfat	KH_2PO_4	Merck KGaA
Kalijev hidroksid	KOH	Merck KGaA
Klorovodikova kislina	HCl	Merck KGaA
L-histidin	$\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$	Merck KGaA
L-histidin hidroklorid mono-hidrat	$\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2 \times \text{HCl} \times \text{H}_2\text{O}$	Merck KGaA
Natrijev acetat	CH_3COONa	Merck KGaA
Natrijev acetat tri-hidrat	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$	Merck KGaA
Natrijev di-hidrogen fosfat di-hidrat	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Merck KGaA
Natrijev hidroksid	NaOH	Merck KGaA
Natrijev klorid	NaCl	Merck KGaA
Orto-fosforna kislina	H_3PO_4	Merck KGaA
Saharoza	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Merck KGaA
Tri-flouro ocetna kislina	$\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$	Merck KGaA
Tris aminometan	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	Merck KGaA
Prečiščena voda	MilliQ	Merck KGaA
Tiroglobulin	Tg	Sigma Aldrich
Holo-transferin	n.a.	Sigma Aldrich
Ogljikov disulfid	CS_2	Sigma Aldrich
Aprotinin	$\text{C}_{284}\text{H}_{432}\text{N}_{84}\text{O}_{79}\text{S}_7$	USB corporation
32 % vodikov klorid	HCl	Merck KGaA
Goveji serumski albumin	BSA	Sigma Aldrich

Preglednica 3: Standardi

Standardi	Proizvajalec
Standard velikosti delcev	Thermo Scientific
Duke standard	Thermo Scientific
Referenčni standard za izbrano monoklonsko protitelo	n.a.

Preglednica 4: Reagenti

Reagenti/Standardi	Sestava	Proizvajalec
Pufrska raztopina pH4	citronska kislina, natrijev hidroksid, hidrogen klorid	Merck KGaA
Pufrska raztopina pH5	citronska kislina, natrijev hidroksid	Merck KGaA
Pufrska raztopina pH7	di-natrijev hidrogen fosfat, kalijev dihidrogen fosfat	Merck KGaA
Pufrska raztopina pH8	borova kislina, natrijev hidroksid, hidrogen klorid	Merck KGaA
Pufrska raztopina pH9	borova kislina, kalijev klorid, natrijev hidroksid	Merck KGaA

3.1.2 Pufri in raztopine

Preglednica 5: Pufri in raztopine

Pufer/ raztopina	Vrsta pufra	Območje pH	Območje Prevodnosti [mS/cm]	Temperatura hranjenja [°C]	Max čas Hranjenja [dni]
CIP	0,1 M NaOH	$\geq 10,0$	$18 \pm 10 \%$	2 – 8	90
CIP	0,5 M NaOH	$\geq 10,0$	$82 \pm 10 \%$	2 – 8	90
CIP	1 M NaOH	$\geq 10,0$	$150 \pm 10 \%$	2 – 8	90
DF	natrijev fosfat s saharozo	$7,2 \pm 0,2$	$0,5 \pm 10 \%$	2 – 8	60
EL	natrijev acetat	$3,6 \pm 0,2$	$0,3 \pm 10 \%$	2 – 8	60
EL	histidin	$7,0 \pm 0,1$	$0,4 \pm 10 \%$	2 – 8	60
EQ	natrijev fosfat	$7,0 \pm 0,2$	$4,8 \pm 10 \%$	2 – 8	60
EQ	natrijev acetat	$5,0 \pm 0,2$	$2,2 \pm 10 \%$	2 – 8	60
MF	natrijev fosfat z	$7,5 \pm 0,05$	/	/	90
(ALC)	natrijevim kloridom				
MF	vodikov klorid z	$2,0 \pm 0,2$	/	/	90
(ALC)	natrijevim kloridom				
MF	20 % (v/v) očetna kislina	/	/	/	90
(ALC)					
MF	kalijev fosfat	$6,5 \pm 0,2$	/	2 – 8	60
(SEC)					
MWM	označevalec molekulske mase	/	/	/	/
Redčitveni pufer	kalijev fosfat	$6,5 \pm 0,2$	/	/	30
REG	očetna kislina	$2,4 \pm 0,4$	$1,2 \pm 10 \%$	2 – 8	90
REG	natrijev acetat	$5,0 \pm 0,2$	$69 \pm 10 \%$	2 – 8	60
REG	očetna kislina	$2,9 \pm 0,3$	$0,44 \pm 10 \%$	2 – 8	60
ST	20 % EtOH (v/v)	/	/	2 – 8	90
UF	saharoza	/	/	2 – 8	60
W	natrijev fosfat	$7,0 \pm 0,2$	$71 \pm 10 \%$	2 – 8	60
ST	sistemski test ustreznosti	/	/	/	/
Pufer za Uravnavanje pH	1 M HCl	/	/	/	60

3.1.3 Membrana

V poskusih smo uporabili 30 kDa membrano (Minimate TFF Capsule, proizvajalec Pall).

Preglednica 6: Specifikacije TFF membrane

Specifikacije	Vrednosti
Površina filtracije	30 cm ²
Dimenzije	20 cm x 3,8 cm x 1,8 cm
Priporočen pretok	30 – 80 mL/min
Zadrževalni volumen	1,6 mL
Operativno delovno območje	5-50 °C
Maksimalen delovni tlak	4 Bar
pH območje	1 – 14
Forward Flow Air Integrity Value	< 7 mL/min @ 0,7 bar

3.1.4 Laboratorijska oprema

Preglednica 7: Laboratorijska oprema

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
Analitska tehnica Adventure Pro	Ohaus
Avtoklav	Belimed
Biofotometer	Eppendorf
Brezprašna komora LVF 18	Iskra Pro
Brizge	Henke Sass Wolf
Čase različnih velikosti	IsoLab
Digestorij	Kottermann
Filtri Opticap XL3	MerckMillipore
Filtri z nastavkom za brizgo Millex 0,22 µm	MerckMillipore
Filtri z nastavkom za brizgo Millex 0,45 µm	MerckMillipore
Flexboy puferske vreče	Sartorius
Gamma gold 0,22 µm filtri	MerckMillipore
HPLC vial	Agilent
HPLC vial	Waters
Digestorij	Kottermann
Filtri Opticap XL3	MerckMillipore
Igle	MerckMillipore
Kromatografska kolona BPG 100/500	Ge Healthcare
Kromatografska kolona Index 70/500	Ge Healthcare

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice 7 Laboratorijska oprema«

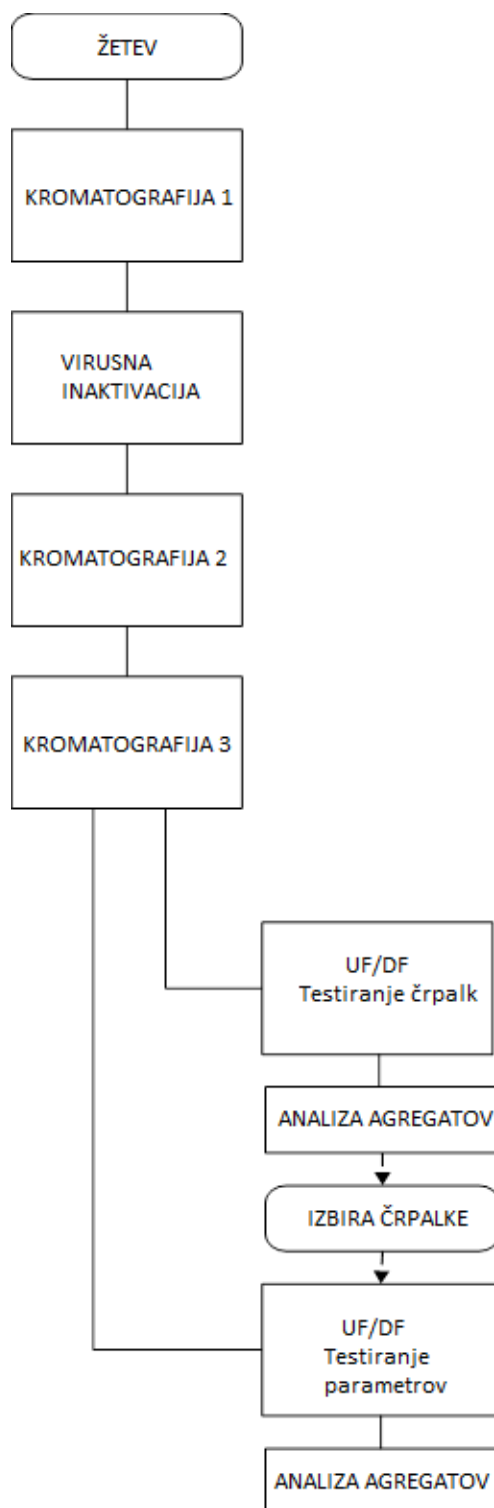
Laboratorijska oprema	Proizvajalec
Kromatografski sistem AKTA CrossFlow	Ge Healthcare
Kromatografski sistem AktaPilot LPLC	Ge Healthcare
Kromatografski sistem HPLC	Ge Healthcare
Kromatografski sistem HPLC	Agilent
Magnetno mešalo	Tehtnica
Membranska črpalka Quattro flow	PSG Dover
Merilni valj	Blue brand
Mikro flow imaging	Protein Simple
Peristaltična črpalka Masterflex L/S	Watson Marlow
pH meter Seven Multi	Mettler Toledo
Pipete	Eppendorf
Posode za pripravo pufrov	Lek
Precizna tehtnica CPA225D	Sartorius
Spektrofotometer	Eppendorf
Tehtnica CPA8201	Sartorius
Temperaturna sonda	Lek
TFF sistem Mini Lab	MerckMillipore
Toplotni izmenjevalec	Lek
Vakumska črpalka	Millipore
Vodna kopel WB-20 HP	Kambič
Mikrotiterske plošče	Nunc Thermo Scientific
Vorteks	VELP Scientifica
Zamrzovalnik - 60	Angelantonio Test Technologies
Zetasizer APS Dynamic light scattering	Malver
Zobniška črpalka Suction shue	Cole Palmer

3.1.5 Programska oprema

Preglednica 8: Programska oprema

Programska oprema	Namen uporabe
Stat-Ease Design-expert	Načrtovanje poskusa
Empower 3	SEC in ALC analiza
Microsoft Visio	Risanje shem
ParticleStudio	Ustvarjanje podatkovne baze podatkov
SciLog	Beleženje podatkov med UF/DF
Spotfile	Obdelava podatkov MFI analize
Unicorn 5.3.1	Izolacija monoklonskih protiteles

3.2 METODE



Slika 6: Potek eksperimentalnega dela

3.2.1 Sterilizacija opreme

Pred začetkom dela smo laboratorijsko opremo, ki smo jo uporabili pri pripravi puferskih raztopin, in laboratorijsko opremo, ki je med UF/DF procesom prišla v stik s produktom, sterilizirali. Sterilizacija je bila izvedena pri standardnih pogojih: 121 °C, 1,2 bar, 20 min.

3.2.2 Priprava pufrov in raztopin

Pufre in raztopine smo pripravili v dveh posodah za pripravo pufrov z delovnim volumnom 450 L in 150 L. Posodi smo pred uporabo sterilizirali z vročo paro pri 120 °C, 2,5 bar, 20 min. V zeleno količino WFI vode smo, glede na predhodno izdelane recepture, dodali ustrezne količine kemikalij. Pripravljene pufre in raztopine smo filtrirali skozi 0,2 µm filter v sterilne vreče za shranjevanje raztopin.

3.2.3 Merjenje pH in prevodnosti

Pufrom, raztopinam in vzorcem smo pomerili pH in prevodnost pri temperaturi $21,0 \pm 2,0$ °C.

3.2.4 Merjenje koncentracije proteina v vzorcu

Med izvajanjem ločevanj na kromatografskem sistemu in med procesom UF/DF smo informativno koncentracijo vzorcev določali spektrofotometrično pri valovni dolžini 280 nm. Izračun koncentracije temelji na Beer-Lambertovem zakonu. Po končanih poskusih smo na odmrznjenih vzorcih natančno koncentracijo določili z metodo afinitetne kromatografije (ALC).

ALC analizo smo izvedli na napravi HPLC z UV detektorjem. Na stacionarno fazo kromatografske kolone je kovalentno vezan protein A, ki ima visoko specifično afiniteto za Fc-regijo imunoglobulinov G. Vezava Fc-regije s proteinom A je najučinkovitejša pri pH vrednosti 7,5, elucija imunoglobulinov pa poteče pri vrednosti pH okoli 2,0. Vzorce smo pred analizo temperirali na sobni temperaturi (21 – 23 °C). Ker je delovno območje metode od 0,01 do 0,8 mg/mL proteina, smo nekatere vzorce pred injiciranjem redčili z mobilno fazo do primerne koncentracije. Koncentracijo proteina v vzorcih smo določili na podlagi umeritvene krivulje. Umeritveno krivuljo smo pripravili iz redčitev referenčnega standarda. Koncentracijo proteina (C_{mAb}) smo izračunali iz površine vrha redčenega vzorca (A_{mAb}) in naklona umeritvene krivulje. Pri računanju koncentracije smo upoštevali faktor redčenja (f).

$$c_{mAb} = \frac{A_{mAb} \times f}{a} \quad \dots (7)$$

3.2.5 Kromatografija

Izolacijo in čiščenje 150 L žetve z izbranim monoklonskim protitelesom smo izvedli na kromatografskem sistemu LPLC z uporabo treh različnih kromatografskih metod. Separacije smo izvajali pri maksimalnem nanosu na kolono. Na prvi kromatografski stopnji smo izvedli pet separacij, na drugi stopnji dve separaciji in na tretji stopnji tri separacije. Eluate posameznih kromatografskih stopenj smo združili in njihove karakteristike preverili z različnimi analitskimi metodami.

3.2.6 Virusna inaktivacija in filtracija

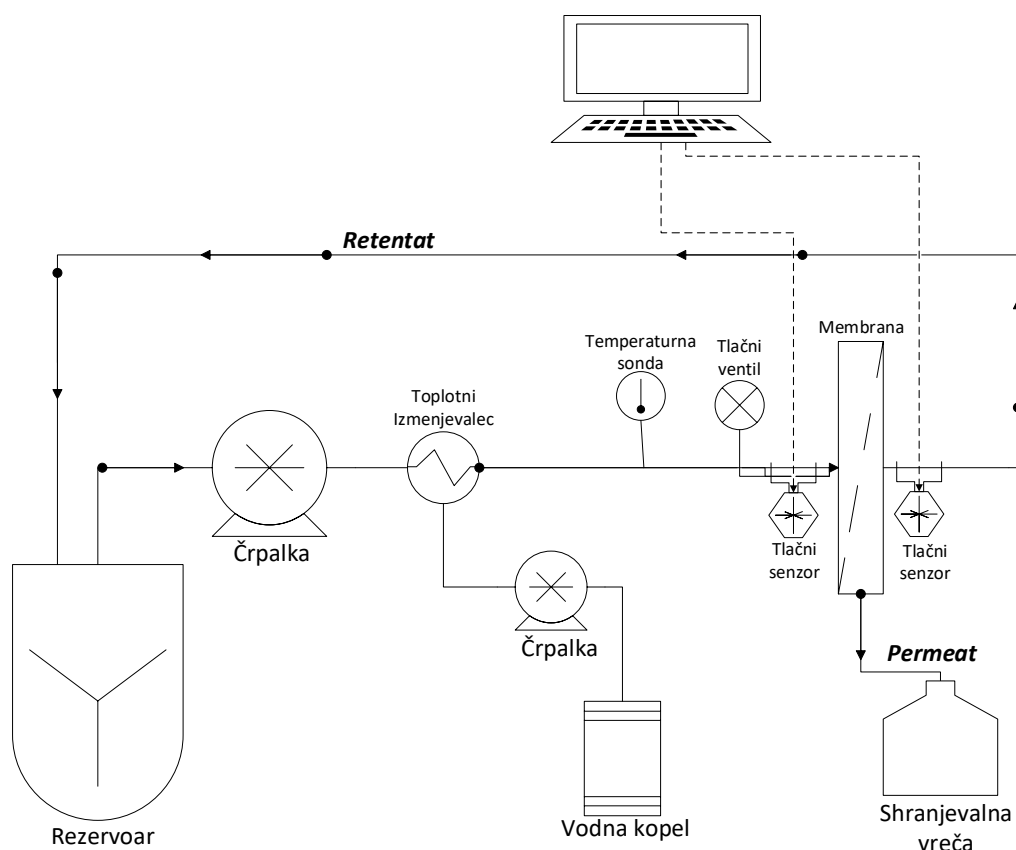
Po prvi kromatografski stopnji smo na združenih eluatih izvedli virusno inaktivacijo z zniževanjem pH. Po inkubaciji pri nizki vrednosti pH smo procesno raztopino nevtralizirali z dodatkom bazične raztopine. Nevtralizirano raztopino smo nato prefiltrirali skozi globinski in membranski filter.

3.2.7 Ultrafiltracija/diafiltracija

3.2.7.1 Sistem

Sistem TFF je sestavljen iz številnih komponent, ki nam omogočajo uravnavanje in spremljanje različnih parametrov. Glavne komponente sistema so: črpalka, membrana, rezervoar z magnetnim mešalom, tlačni in temperaturni senzor, vodna kopel, toplotni izmenjevalec, tehtnice in računalnik.

Tekočina iz rezervoarja se črpa preko toplotnega izmenjevalca do membrane. Vodna kopel je s cevjo povezana s toplotnim izmenjevalcem in omogoča hlajenje ali ogrevanje raztopine v sistemu. Spremljanje temperature procesne raztopine nam omogoča temperaturni senzor, ki je nameščen pred membrano. Pred in za membrano sta tlačna senzorja, ki merita tlak na dovodni in izhodni strani. Retentatni tok procesne raztopine se vrača v rezervoar, permeatni tok pa skozi membrano zapusti sistem. Količino permeata spremljamo na tehtnici. Celoten sistem je povezan z računalnikom, ki nam omogoča beleženje mase in tlaka.



Slika 7: Shematski prikaz UD/DF sistema

3.2.7.2 Izvedbeni načrt

Poskus smo razdelili na dva sklopa. V prvem sklopu smo testirali vpliv črpalk na nastajanje agregatov med ultrafiltracijo in diafiltracijo. Ultrafiltracijo in diafiltracijo smo izvedli pri vrednostih, ki se običajono uporabljajo v procesu, in sicer na štirih različnih tipih črpalk. Vsebnost agregatov smo določali s tremi analitskimi metodami. Na podlagi rezultatov smo izbrali črpalko, pri kateri je bila vsebnost agregatov najnižja.

V drugem sklopu smo na izbrani črpalki testirali vpliv nekaterih parametrov, ki bi lahko med UF/DF vplivali na vsebnost agregatov v končnem produktu. Na podlagi literature smo se odločili za testiranje štirih parametrov: mešanje, TMP med UF, TMP med DF in temperaturo. Glede na objavljene študije in lastne izkušnje smo določili območja parametrov za testiranje. Parametre smo testirali v treh točkah, in sicer pri minimalni, maksimalni in srednji vrednosti. Načrt poskusov smo pripravili s programom za načrtovanje poskusov (Design Expert).

3.2.7.3 Procesni parametri

Preglednica 9: Procesni parametri prvega sklopa eksperimentov

Parameter	Korak	Enote	Nastavljena vrednost	Delovno območje
Nanos	/	[g/m ²]	/	280 – 700
P in	UF	[bar]	2,6	≤ 2,8
	DF	[bar]	2,4	
P out (bar)	UF	[bar]	0,8	≤ 0,9
	DF	[bar]	0,5	
TMP (bar)	UF	[bar]	1,7	≤ 1,8
	DF	[bar]	1,5	
Koncentracija produkta	/	[mg/mL]	50	40 – 60
Število diavolumnov	/	/	/	≥ 7
Procesna temperatura	/	[°C]	/	18 – 25

Preglednica 10: Procesni parametri drugega sklopa eksperimentov

Parameter	Korak	Enote	Minimalna vrednost	Srednja vrednost	Maksimalna vrednost
Nanos	/	[g/m ²]	/	/	280 – 700
TMP (bar)	UF	[bar]	0,5	1,4	2,3
	DF	[bar]	0,5	0,9	1,3
Koncentracija produkta	/	[mg/mL]	40	/	60
Število diavolumnov	/	/	/	/	≥ 7
Procesna temperatura	/	[°C]	6	15	25
Mešanje	/	[rpm]	0	2,5	5

Preglednica 11: Preglednica poskusov drugega sklopa eksperimentov s pripadajočimi procesnimi parametri

Št. Poskusa	Factor 1: UF TMP	Factor 2: DF TMP	Factor 4: Mešanje	Factor 5: Temperatura
1	1,4	0,9	2,5	15
2	0,5	0,5	5	6
3	1,4	0,9	5	15
4	1,4	0,9	2,5	15
5	1,4	0,5	2,5	15
6	2,3	0,5	0	24
7	1,4	0,9	2,5	24
8	1,4	1,3	2,5	15
9	1,4	0,9	2,5	15
10	1,4	0,9	0	15
11	1,4	0,9	2,5	6
12	2,3	1,3	5	6
13	2,3	1,3	0	6
14	2,3	0,5	5	24
15	0,5	0,5	0	6
16	0,5	1,3	5	24
17	2,3	0,9	2,5	15
18	0,5	0,9	2,5	15
19	0,5	1,3	0	24

3.2.7.4 Izračuni

Volumen nanosa (V_{nanosa}) izračunamo po enačbi:

$$V_{\text{nanos}} = \frac{\text{nanos} \times \text{površina membrane}}{\text{koncentracija}} \quad \dots (8)$$

Koncentracijski faktor (CF) izračunamo po enačbi:

$$CF = \frac{\text{koncentracija končnega produkta}}{\text{koncentracija nanosa}} \quad \dots (9)$$

Volumen po koncentriranju (V_{DF}) izračunamo po enačbi:

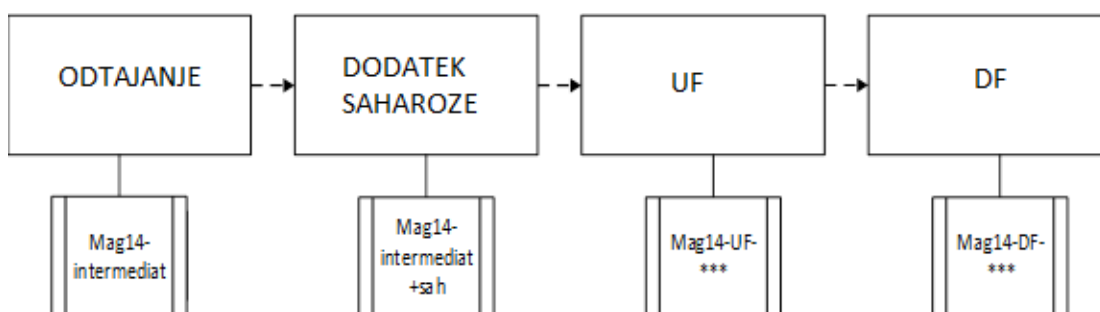
$$V_{\text{DF}} = \frac{V_{\text{nanos}}}{CF} \quad \dots (10)$$

Diavolumen (DV) izračunamo po enačbi:

$$DV = 7 \times V_{retentat} \quad \dots (11)$$

3.2.7.5 Vzorčenje

Vzorčenje smo izvajali po vsaki spremembi na procesni raztopini. Vzorce, namenjene za analize MFI in DLS, smo do meritev (1 dan) shranili v hladni sobi (8 – 10 °C). Vzorce, namenjene analizi SEC, smo do meritev zamrznili na -60 °C.



Slika 8: Shema vzorčenja

3.2.7.6 Opis procesa

Vsak poskus vključuje več stopenj: priprava nanosa, postavitve sistema, začetna sanitacija sistema in membrane, ultrafiltracija, diafiltracija in končna sanitacija sistema in membrane.

Izbrano črpalko smo s cevjo povezali na eni strani z rezervoarjem in na drugi strani z membrano. Pred in za membrano smo namestili tlačne senzorje. Za drug sklop poskusov smo uporabili toplotni izmenjevalec in temperaturno sondo. Toplotni izmenjevalec smo s cevjo povezali z vodno kopeljo. Pretok vode iz vodne kopeli do toplotnega izmenjevalca smo omogočili z uporabo sekundarne peristaltične črpalke. Med procesom ultrafiltracije smo permeatni tok zbirali ločeno v shranjevalnih vrečah, nameščenih na analitskih tehnicah, retentatni tok pa se je vračal v rezervoar.

Pripravljen sistem smo skupaj z membrano sanitirali. Sanitacijo smo naredili v treh korakih. V prvem koraku smo sistem in membrano 15 minut krožno spirali z 0,5 M NaOH, pri 45 °C. Po 15 min smo zamenjali raztopino 0,5 M NaOH in s svežo raztopino krožno spirali še 30 min. V zadnjem koraku smo sistem in membrano spirali z vodo od prevodnosti < 20 µS.

Intermediat, ki se je hranil v zamrzovalniku ($-60\text{ }^{\circ}\text{C}$), smo odmrznili pri sobni temperaturi ($21 - 23\text{ }^{\circ}\text{C}$) in ga do uporabe hranili v hladni sobi ($8 - 10\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nanos smo pripravili tako, da smo intermediatu dodali saharozo. Odmrznjen intermediat in nanos smo vzorčili.

Pripravljen nanos smo pretočili v rezervoar UF/DF sistema. Sledila je ultrafiltracija pri pogojih, ki smo jih predhodno določili za vsak posamezen poskus. Med ultrafiltracijo smo spremljali maso permeata in volumen retentata v rezervoarju. Koncentracijo retentata smo med koncentriranjem preverjali spektrofotometrično. Ko smo dosegli željeno koncentracijo retentata, smo proces ultrafiltracije ustavili. Retentat smo vzorčili.

Po končani ultrafiltraciji smo s sistema odklopili shranjevalno vrečo s permeatom in jo nadomestili z novo. Rezervoar smo s cevjo povezali s čašo z diafiltracijskim pufrom, ki smo jo namestili na analitsko tehtnico. Rezervoar smo neprodušno zaprli s pokrovom in tako ustvarili vakuum, ki je ob delovanju črpalke omogočal črpanje diafiltracijskega pufra v rezervoar. Sledila je diafiltracija pri pogojih, ki smo jih predhodno določili za vsak posamezen poskus. Med diafiltracijo smo spremljali maso permeata in maso diafiltracijskega pufra. Po končani diafiltraciji smo retentat vzorčili.

Med celotnim procesom smo s programsko opremo SciLog spremljali tlak na vhodni in izhodni strani membrane ter maso retentatnega in permeatnega toka. Da bi zagotovili željene vrednosti parametrov, smo med procesom uravnavali tlak in temperaturo. Tlak smo uravnavali s spreminjanjem hitrosti delovanja črpalke in s tlačnimi ventili. Temperaturo procesne raztopine smo uravnavali s spreminjanjem temperature vode v vodni kopeli in s pretokom vode iz kopeli do toplotnega izmenjevalca.

3.2.8 Meritve agregatov

3.2.8.1 DLS

Analizo DLS smo naredili na napravi Zetasizer APS, ki nam omogoča avtomatizirano merjenje vzorcev v mikrotitrskih ploščah.

Vzorci smo pred meritvijo temperirali na sobni temperaturi ($21 - 23\text{ }^{\circ}\text{C}$). V mikrotitrsko ploščo smo nanesti $100\text{ }\mu\text{L}$ vzorca v treh ponovitvah. Poleg vzorcev smo v mikrotitrsko ploščo na začetku in na koncu nanesti standarde z znano koncentracijo in velikostjo delcev.

3.2.8.2 MFI

Vsebnost delcev z analizo MFI smo določali na vzorcih, ki so bili en dan od nastanka shranjeni v hladni sobi (8 – 10 °C). Vzorce smo pred izvedbo meritev temperirali na sobni temperaturi (21 – 23 °C).

Pred analizo smo merilno celico in nastavek za brizge/tipse očistili z detergentom in vodo. Celico smo spirali tako dolgo, da na ekranu ni bilo vidnih delcev. Čistost celice smo preverili z merjenjem dveh zaporednih slepih vzorcev. Celica je očiščena, če je koncentracija delcev v vodi manjša od 80 delcev/mL. Natančnost metode smo preverili z merjenjem dveh različnih standardov z znano koncentracijo in velikostjo polistirenskih kroglic.

Pred injiciranjem vzorca smo naredili optimizacijo merilne celice z vodo MQ. Vzorce smo homogenizirali s počasnim obračanjem vial. Meritev smo izvedli v 1,1 mL vzorca, ki smo ga s pomočjo sterilnega tipsa nanegli v nastavek na merilni celici. Meritve smo naredili v dveh paralelkah. Med meritvami smo merilno celico spirali z detergentom in vodo.

Analizo podatkov smo opravili s programom Particle Studio in Spotfile. S programom Particle Studio smo podatke o meritvah (o vsakem posameznem delcu v vzorcu) naložili v bazo podatkov. Program Spotfile pa nam je omogočal obdelavo podatkov.

3.2.8.3 SEC

Analizo SEC smo izvedli na UPLC sistemu z UV detektorjem, ki meri absorbanco pri 210 nm.

Vzorce smo pred analizo temperirali na sobni temperaturi (21 – 23 °C) in jih nato redčili z mobilno fazo do koncentracije približno 0,75 mg/ml. Zaporednje je poleg vzorcev vsebovala tudi referenčne standarde s katerimi smo preverili natančnost delovanja metode. Kromatografsko kolono smo pred injiciranjem vzorcev sanitirali in ekvilibrirali z mobilno fazo. V naslednjem koraku so bili vzorci z avtomatskim injektorskim sistemom nanešeni na kolono. Komponente v vzorcu se eluirajo izokratično, glede na razlike v velikosti. Rezultat analize je elucijski profil komponent v vzorcu. Agregati se eluirajo pred glavnim vrhom, razgradni produkti pa za glavnim vrhom.

Analizo podatkov smo izvedli s programsko opremo Empower. Količino agregatov smo določili kot delež celotne površine pikov.

$$\% \text{ agregatov} = \frac{\text{površina agregacijskega vrha}}{\text{skupna površina vseh vrhov}} \quad \dots (13)$$

3.2.9 Načrtovanje poskusov in statistična obdelava podatkov

Tako kot za načrtovanje eksperimentov, smo tudi za ovrednotenje rezultatov uporabili računalniški program Design Expert, ki nam omogoča statistično obdelavo podatkov. Rezultate analiz smo pripisali pripadajočim eksperimentom in s pomočjo programa izbrali statistični model, ki najbolje prikazuje vpliv izbranih procesnih parametrov na izmerjene odzive. Eksperimente smo ovrednotili na podlagi rezultatov, pridobljenih na retentatnih vzorcih, po ultrafiltraciji in diafiltraciji.

Odzivi, ki smo jih merili, so: koncentracija procense raztopine, določene z ALC metodo, odstotek agregiranosti tarčnega proteina, določen s SEC metodo, in število delcev določenih z MFI metodo.

Dobljeni model smo ovrednotili na podlagi različnih statističnih parametrov:

- prilagojen R^2 (Adj. R^2): vrednost, ki nakazuje, kako dobro se model prilega surovim podatkom;
- napovedan R^2 (Pred. R^2): vrednost, ki nakazuje, kako dobro lahko z modelom naredimo napovedi;
- razlika med prilagojenim in napovedanim R^2 (Adj. R^2 - Pred. R^2). Velika razlika nakazuje na neprimernost izbranega modela.
- pomanjkanje prileganja (p-value). Manjša kot je p-vrednost, bolj se model prilega rezultatom.

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI PRVEGA SKLOPA POSKUSOV – IZBIRA NAJUSTREZNEJŠE ČRPALKE

Na podlagi literature smo se odločili za testiranje štirih tipov črpalk, ki so v farmacevtski industriji najpogosteje uporabljene v procesu ultrafiltracije in diafiltracije. Ultrafiltracijske in diafiltracijske poskuse smo izvedli na membranski, peristaltični, tlačni in zobniški črpalki pri vrednostih parametrov, ki se v procesih najpogosteje uporabljajo.

4.1.1 Procesni parametri in koncentracije vzorcev

V preglednicah 12 in 13 so prikazani procesni parametri ter koncentracije vhodnih in izhodnih materialov ultrafiltracije in diafiltracije.

Med procesom smo v 30-sekundnih intervalih beležili tlak pred in za membrano. V preglednicah 12 in 13 so podane povprečne vrednosti tlakov celotnega poskusa. Transmembranski tlak smo izračunali na podlagi povprečnih vrednostih obeh tlakov.

Preglednica 12: Procesni parametri in koncentracije proteina v vzorcih med ultrafiltracijo

Korak	Črpalka	Procesni parametri [bar]			Koncentracija [mg/mL] ¹			
		P vstopni	P izstopni	TMP	Začetni material	Nanos	Retentat	Permeat
UF	Peristaltična	2,6	0,9	1,8	6,6	6,1	52,1	0,2
	Membranska	2,4	0,8	1,6	6,7	6,1	49,2	0,0
	Zobniška	2,5	0,9	1,7	6,7	6,1	n.a. ²	0,0
	Batna	2,5	0,9	1,7	6,8	6,2	40,4	0,1

¹Koncentracija določena z metodo ALC.

² Zaradi velike vsebnosti agregatov, vzorcev ni bilo mogoče pomeriti z metodo ALC.

Preglednica 13: Procesni parametri in koncentracije proteina v vzorcih med diafiltracijo

Korak	Črpalka	Procesni parametri [bar]			Koncentracija [mg/mL] ¹		
		P vstopni	P izstopni	TMP	Nanos	Retentat	Permeat
DF	Peristaltična	2,5	0,6	1,5	52,1	50,2	0,1
	Membranska	2,5	0,5	1,5	49,2	48,0	0,0
	Zobniška	2,4	0,6	1,5	n.a. ²	n.a. ²	0,1
	Batna	2,5	0,6	1,5	40,4	n.a. ²	0,0

¹Koncentracija določena z metodo ALC.

² Zaradi velike vsebnosti agregatov, vzorcev ni bilo mogoče pomeriti z metodo ALC.

Med UF/DF procesom je koncentracija procesne raztopine eden izmed pomembnejših faktorjev. Koncentracijo med procesom v retentatnem toku določamo, da zadostimo kriterijem predvidene koncentracije zdravilne učinkovine v končnem izdelku, hkrati pa z merjenjem koncentracije permeatnih vzorcih spremljamo učinkovitost membrane. Informativne vrednosti koncentracij smo med poskusom določali spektrofotometrično. Po končanem poskusu smo natančne vrednosti koncentracij določili z metodo ALC. Na podlagi rezultatov (preglednica 12 in 13) lahko vidimo, da se koncentracije začetnih materialov med seboj minimalno razlikujejo. Razlike v koncentracij so lahko posledica napak metode.

Zaradi dodatka saharoze začetnemu materialu je koncentracija nanosa nižja od koncentracije začetnega materiala.

Po končani ultrafiltraciji smo retentat uporabili v koraku diafiltracije. Koncentracija retentata po ultrafiltraciji je tako enaka koncentraciji nanosa za diafiltracijski korak. Koncentracije retentatov so bližje spodnji vrednosti predpisane meje (40 – 60 mg/ml).

Na podlagi rezultatov meritev koncentracij v permeatnih vzorcih lahko sklepamo, da protein med poskusom ni prehajal skozi membrano, saj so vrednosti koncentracije blizu 0 mg/ml.

Koncentracije treh vzorcev zaradi visoke vsebnosti agregatov ni bilo mogoče izmeriti z ALC metodo. Vrednosti smo določili z manj občutljivo metodo na spektrofotometru. Vse vrednosti koncentracij so znotraj predpisanih mej.

4.1.2 Vsebnost agregatov

Po definiciji je agregat univerzalen izraz, s katerim poimenujemo vse proteinske vrste v nenativni obliki. Zajema širok spekter tipov in velikosti proteinskih stanj npr. reverzibilni, ne-reverzibilni, kovalentni, nekovalentni, mali, veliki. Kljub temu pa lahko v literaturi poleg izraza agregati zasledimo tudi izraz delci.

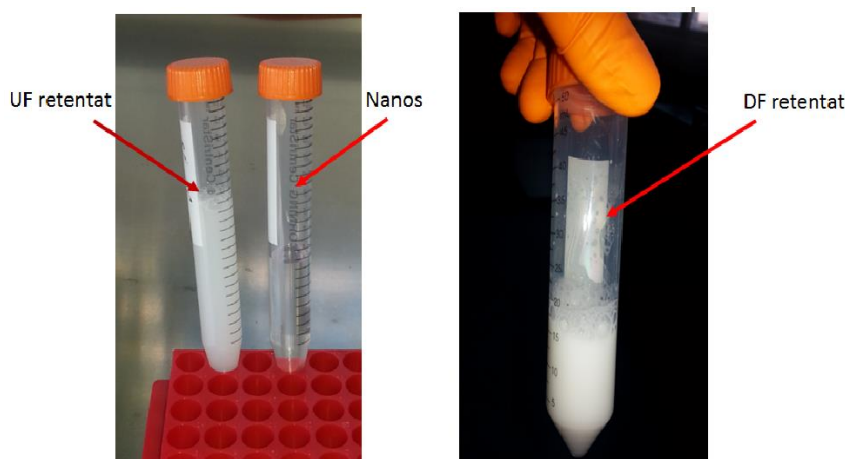
Ločimo pa med izrazom primarni delci in delci. Z združevanjem primarnih delcev v kristalne strukture se tvorijo agregati ali delci. Zaradi načina tvorbe agregatov je površina le-teh manjša kot vsota površin primarnih delcev (Waletr, 2013).

Izraz delec je enakovreden izrazu agregat, vendar pri določenih metodah zaradi enostavnejše interpretacije rezultatov uporabljamo le določen izraz.

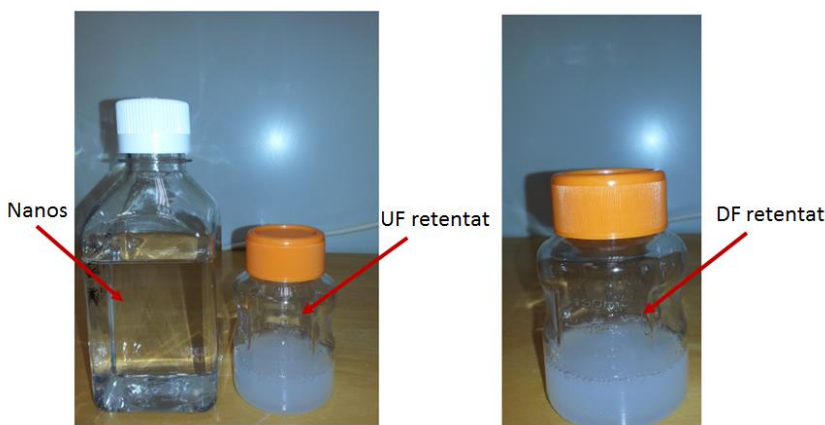
V nalogi smo pri razlagi rezultatov uporabljali izraze, ki so značilni za določeno metodo. Metodi MFI in DLS uporabljata izraz delci, metoda SEC pa izraz agregati.

4.1.2.1 Vizualni pregled vzorcev

Prve ocene vpliva črpalke na nastanek agregatov smo lahko določili že vizualno. Pri poskusih na tlačni in zobniški črpalki smo lahko s prostim očesom med procesom spremljali spreminjanje motnosti procesne raztopine. Procesna raztopina je že med ultrafiltracijo postajala opazno motnejša. Po diafiltraciji je procesna raztopina postala belo-sive barve (slika 8 in 9). Vsebnost agregatov in večjih razgradnih produktov je onemogočila, da bi vzorce brez predhodne obdelave (npr. filtracija, redčenje) pomerili s katero izmed izbranih metod. Rezultati razredčenih ali filtriranih vzorcev pa ne bi bil relevantni. S filtracijo bi namreč agregate fizično odstranili, redčenje vzorcev pa lahko povzroči raztapljanje agregatov.



Slika 9: Vzorci, nastali pri poskusih na zobniški črpalki

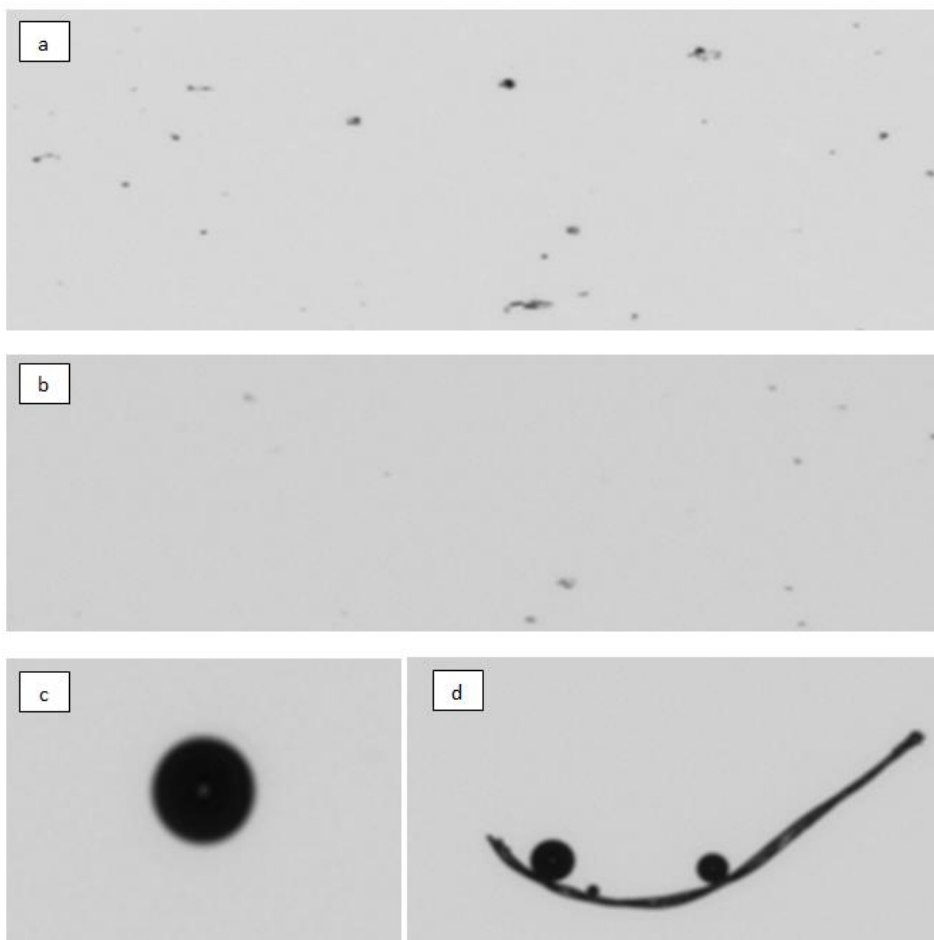


Slika 10: Vzorci, nastali pri poskusih na tlačni črpalki

4.1.2.2 Meritve delcev z metodo MFI

Pri vzorcih, nastalih na membranski in peristaltični črpalki, smo z metodo MFI določili število delcev v posameznih velikostnih razredih. Število delcev je določeno v mililitru izmerjene raztopine. Velikost delcev je določena na podlagi ekvivalentnega krožnega premera (ECD). ECD predstavlja premer kroga, ki ima enako projekcijsko območje kot delec. Rezultat meritev je povprečno število delcev dveh zaporednih meritev istega vzorca.

MFI metoda je ena izmed redkih metod, ki nam omogoča detekcijo tako proteinskih kot ne proteinskih delcev (npr. zračni mehurčki in procesne nečistote). Na podlagi slikovnega materiala smo določili, da je 90 % izmerjenih delcev proteinskega izvora.

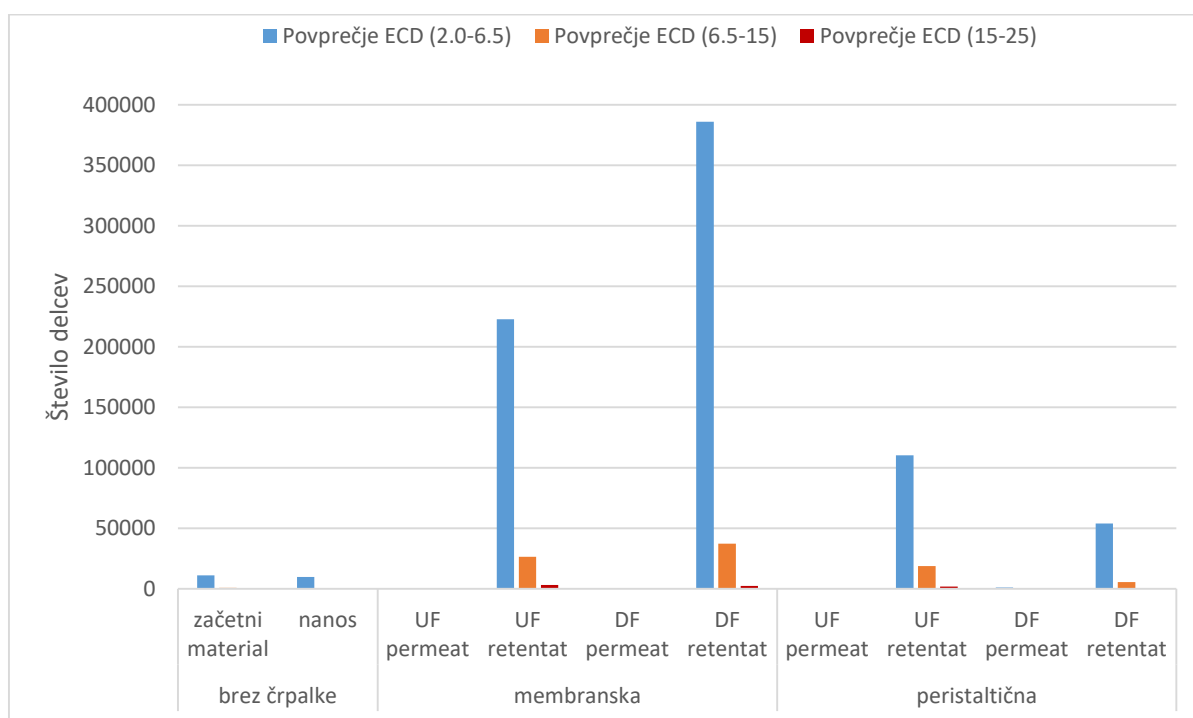


Slika 11: Primer slike pridobljene z MFI metodo. (a) in (b): agregati, (c): zračni mehurček, (d): vlakno in dva zračna mehurčka.

Preglednica 14: Povprečno število delcev v posameznih velikostnih razredih določenih z metodo MFI

Korak	Tip črpalke	Material	Povprečno število delcev	Povprečno število delcev	Povprečno število delcev
			ECD 2.0-6.5 μm	ECD 6.5-15 μm	ECD 15-25 μm
-	-	Začetni material	11066	880	119
-	-	Nanos	9723	559	132
UF	Membranska	Permeat	153	11	2
	Membranska	Retentat	222662	26434	524
	Peristaltična	Permeat	632	52	2
	Peristaltična	Retentat	110331	18865	180
	Membranska	Permeat	389	16	5
DF	Membranska	Retentat	386074	37414	123
	Peristaltična	Permeat	1154	73	1
	Peristaltična	Retentat	54073	5478	11

Na sliki 12 je prikazano število delcev posameznih velikostnih razredih v vzorcih začetnega materiala, nanosa, permeata in retentata.



Slika 12: Število delcev glede na velikostni razred delcev v začetnem materialu, nanosu, permeatu in retentatu

Na sliki 12 lahko vidimo, da je najmanj delcev v permeatnih vzorcih. Nekaj več delcev lahko opazimo v vzorcih začetnega materiala in nanosa. Število delcev v začetnem materialu se po

dotatku saharoze spremeni, in sicer lahko iz preglednice 14 največjo razliko opazimo v številu najmanjših delcev (ECD 2.0 – 6.5 μm), ki se poveča za faktor 2. Kljub temu pa je število delcev v začetnem materialu, v primerjavi s številom delcev v retentatnih vzorcih, veliko manjše. Glede na podatke lahko vidimo, da v vzorcih pridobljenih na različnih stopnjah, prevladujejo delci najmanjšega velikostnega razreda (ECD 2.0-6.5 μm).

Pri primerjavi retentatnih vzorcev lahko tako v koraku ultrafiltracije kot diafiltracije opazimo, da je število delcev v vzorcih, pridobljenih na membranski črpalki, višje kot v vzorcih, pridobljenih s peristaltično črpalko.

Trend v tvorbi delcev se med črpalkama razlikuje. Pri uporabi membranske črpalke se je število delcev med procesom povečevalo: število delcev je večje po diafiltraciji. Število delcev pri uporabi peristaltične črpalke se je med procesom zmanjšalo: število delcev je po diafiltraciji manjše. Pri uporabi obeh črpalk pa prevladujejo najmanjši delci (ECD 2.0 – 6.5 μm), sledijo delci velikostnega razreda ECD 6.5 – 15.0 μm , najmanj zastopani so delci, večjih od 25 μm .

4.1.2.3 Meritve delcev z metodo DLS

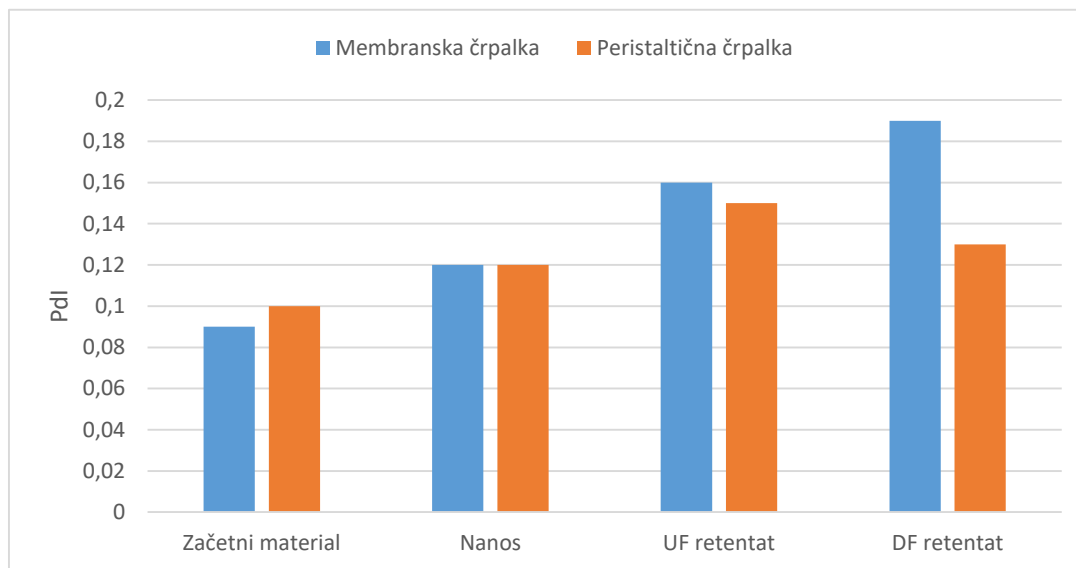
Z metodo DLS smo določili polidisperzni indeks vzorcev ter povprečni hidrodinamski premer delcev v velikostnem razredu od 1 nm do 1 μm . Hidrodinamski premer delca predstavlja premer krogle, ki se giba enako hitro, kot izmerjen delec.

V preglednici 15 so prikazani polidisperzni indeksi (PdI) posameznih vzorcev na membranski in peristaltični črpalki.

Preglednica 15: Polidisperzni indeks vzorcev na membranski in peristaltični črpalki

Ime vzorca	Polidisperzni indeks	
	Membranska črpalka	Peristaltična črpalka
Začetni material	0,09	0,10
Nanos	0,12	0,12
UF retentat	0,16	0,15
DF retentat	0,19	0,13

PdI med procesom narašča (slika 13). PdI v vzorcu intermediata kaže na monodisperznost začetnega vzorca. Že po dodatku saharoze PdI naraste nad 0,1, kar nakazuje na prisotnost delcev različnih velikosti. V vzorcih vseh retentatov so prisotni delci različnih velikosti.



Slika 13: PDI vzorcev na membranski in peristaltični črpalki

V preglednici 16 so prikazani povprečni hidrodinamski premeri delcev v vzorcih.

Preglednica 16: Povprečni hidrodinamski premeri delcev v vzorcih na membranski in peristaltični črpalki

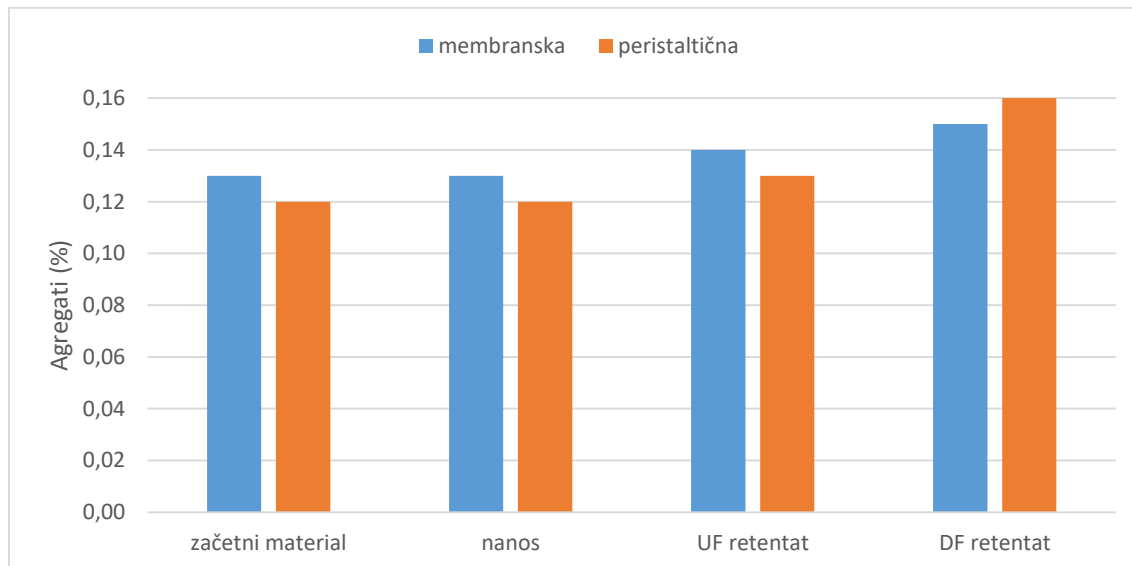
Ime vzorca	Hidrodinamični diameter (nm)	
	Membranska črpalka	Peristaltična črpalka
Začetni material	18	18
Nanos	18	18
UF retentat	35	34
DF retentat	49	53

Zaradi vrednosti PDI, ki nakazujejo polidisperznost izmerjenih raztopin, DLS ni primerna metoda za določanje delcev v naših vzorcih. Signal odbite svetlobe večjih delcev v omenjenih vzorcih je lahko dominanten in tako zasenči prisotnost manjših delcev, kar se lahko odraža v nepravilnih vrednostih povprečnih hidrodinamskih premerih delcev. Kljub temu pa lahko na podlagi rezultatov sklepamo, da se je vsebnost delcev v vzorcih povečevala. Vrednost povprečnega hidrodinamskega premera je lahko zaradi prisotnosti vse večjega števila delcev med procesom naraščala.

4.1.2.4 Meritve agregatov z metodo SEC

Z metodo SEC smo določili odstotek agregiranosti tarčnega proteina. Metoda omogoča detekcijo agregatov do velikosti 100 nm.

Slika 15 prikazuje odstotek agregiranosti med procesom, izvedenim na membranski in peristaltični črpalki.



Slika 14: Odstotek agregiranosti vzorcev na membranski in peristaltični črpalki

Odstotek agregiranosti se po dodatku saharoze ni spremenil. Pri obeh tipih črpalk smo opazili, da se odstotek agregiranosti med procesom povečuje. Odstotek agregiranosti je med ultrafiltracijo večji pri uporabi membranske črpalke, medtem ko med diafiltracijo večji odstotek agregiranosti opazimo na vzorcih, pridobljenih na peristaltični črpalki.

S pomočjo enačbe (7) smo določili velikost proteinov in agregatov v vzorcih izmerjenih z metodo SEC. Ob predpostavki, da so tako proteini kot agregati kroglaste oblike smo iz molekulskih mas določili premer, ki predstavlja minimalen premer krogle, ki ga z dano molsko maso zavzema, in nato izračunali površino krogle. Izračunane velikosti na sliki 16 so zgolj ocene, saj so tako proteini kot agregati navadno nepravilnih oblik.

Preglednica 17: Ocena površin agregatov in proteinov določenih z metodo SEC

Korak	Tip črpalke	Material	Komponenta	Masa (kDa)	R _{min} (nm)	Površina (nm)
–	–	Začetni material	Agregacijski vrh 2	444,4	5,0	78,5
			Agregacijski vrh 1	335,8	4,6	66,4
			Glavni vrh	170,8	3,7	43,0
–	–	Nanos	Agregacijski vrh 2	444,4	5,0	78,5
			Agregacijski vrh 1	333,8	4,6	66,4
			Glavni vrh	170,4	3,7	43,0
UF	Peristaltična	Retentat	Agregacijski vrh 2	443,9	5,0	78,5
			Agregacijski vrh 1	341,4	4,6	66,4
			Glavni vrh	170,0	3,7	43,0
DF	Peristaltična	Retentat	Agregacijski vrh 1	449,7	5,1	81,7
			Glavni vrh	163,5	3,6	40,7
			Začetni material	446,0	5,0	78,5
–	–	material	Agregacijski vrh 2	446,0	5,0	78,5
			Agregacijski vrh 1	341,8	4,6	66,4
			Glavni vrh	170,4	3,7	43,0
–	–	Nanos	Agregacijski vrh 2	447,0	5,0	78,5
			Agregacijski vrh 1	337,4	4,6	66,4
			Glavni vrh	170,4	3,7	43,0
UF	Membranska	Retentat	Agregacijski vrh 2	446,5	5,0	78,5
			Agregacijski vrh 1	340,6	4,6	66,4
			Glavni vrh	170,4	3,7	43,0
DF	Membranska	Retentat	Agregacijski vrh 2	444,4	5,0	78,5
			Agregacijski vrh 1	338,6	4,6	66,4
			Glavni vrh	169,8	3,7	43,0

Uporabljene metode obravnavajo delce v različnih velikostnih razredih. Rezultati metode SEC, s katero lahko določimo le najmanjše agregate, niso pokazali razlik v odstotku agregiranosti med črpalkama. Rezultati metode DLS zaradi polidisperznosti raztopine niso relevantni. Odločitev o izboru najprimernejše črpalke smo sprejeli na podlagi rezultatov metode MFI. S slednjo smo namreč opazili razlike v številu različno velikih delcev.

4.2 REZULTATI DRUGEGA SKLOPA POSKUSOV– TESTIRANJE PROCESNIH PARAMETROV NA IZBRANI ČRPALKI

Na podlagi rezultatov prvega sklopa poskusov smo kot najprimernejšo izbrali peristaltično črpalko, na njej smo v drugem sklopu poskusov testirali procesne parametre.

Pri načrtovanju poskusov smo za vsak parameter določili tri vrednosti, ki smo jih želeli testirati. S programom Design Expert smo pripravili načrt poskusov, ki nam je omogočal preučevanje več različnih parametrov hkrati. Izmerjene odzive smo pripisali posameznim poskusom in s pomočjo statističnih orodij ovrednotili vplive posameznih parametrov. Poleg ovrednotenja vplivov parametrov s statističnimi modeli, smo rezultate prikazali tudi grafično. Uporabljeni program nam omogoča, da poleg vpliva parametrov v testiranih vrednostih napovemo tudi njihov vpliv pri vrednostih, ki jih nismo testirali in so znotraj testiranih vrednostih. Z barvno lestvico ponazarjamo vpliv parametrov na število delcev, kjer je največji vpliv prikazan z rdečo barvo in najmanjši z modro barvo.

Z uporabo peristaltične črpalke smo izvedli 19 ultrafiltracijskih in 19 diafiltracijskih eksperimentov. V vsakem eksperimentu smo spreminjali vrednosti treh procesnih parametrov: TMP, mešanje in temperaturo. Pridobljene vzorce smo analizirali s tremi metodami: ALC, SEC in MFI. Vzorce smo nato okarakterizirali na podlagi desetih različnih odzivov. V preglednicah 18 in 19 so prikazane vrednosti izmerjenih odzivov v posameznem poskusu po ultrafiltraciji in diafiltraciji.

Preglednica 18: Vrednosti odzivov po ultrafiltraciji v vzorcih retentatnega toka izbranega eksperimenta

Poskus	Parameter			Odziv				
	UF TMP [bar]	Mešanje [rpm]	Temperatura [°C]	R1	R3	R5	R7	R9
				Koncentracija ¹ [mg/ml]	% agregatov [%]	ECD 2,0 - 6,5 μm^2	ECD 6,5 - 10,0 μm^2	ECD 10,0 - 25,0 μm^2
1	1,4	2,5	15	47,4	0,16	389475	62034	61360
2	0,5	5,0	6	50,4	0,17	258523	52472	89370
3	1,4	5,0	15	46,3	0,29	336223	45822	37245
4	1,4	2,5	15	49,0	0,22	358999	37125	27716
5	1,4	2,5	15	44,0	0,18	318398	33102	24651
6	2,3	0,0	24	45,9	0,16	162861	26219	19461
7	1,4	2,5	24	50,1	0,19	368533	50020	42438
8	1,4	2,5	15	47,5	0,19	362464	69929	87945
9	1,4	2,5	15	47,6	0,20	273827	53965	77192
10	1,4	0,00	15	47,7	0,21	227974	25808	20812
11	1,4	2,5	6	48,4	0,19	432396	84940	117432
12	2,3	5,00	6	43,1	0,19	202548	40181	66114
13	2,3	0,00	6	46,9	0,18	221061	47156	82993
14	2,3	5,00	24	48,3	0,17	492316	52911	38030
15	0,5	0,00	6	45,0	n.a. ³	247067	51944	61495
16	0,5	5,00	24	44,6	0,17	353937	41971	28994
17	2,3	2,5	15	47,5	0,17	270575	32283	23993
18	0,5	2,5	15	48,57	0,17	376622	63645	68122
19	0,5	0,00	24	43,49	n.a. ³	122553	8974	7788

¹Koncentracijo smo med izvedbo poskusov določali, da zadostimo kritarijem predvidene konecentracije zdravilne učinkovine v končnem izdelku.

²Število delcev določenega velikostnega razreda.

³Zaradi napak pri izvajanju SEC analize vzorcema iz poskusov 15 in 19 nismo mogli določiti odstotka agregiranosti.

Preglednica 19: Vrednosti odzivov po diafiltraciji v vzorcih retentatnega toka izbranega eksperimenta

Poskus	Parameter			Odziv				
	DF TMP [bar]	Mešanje [rpm]	Temperatura [°C]	R2 Koncentracija ¹ [mg/ml]	R4 % agregatov [%]	R6 ECD 2,0 - 6,5 µm ²	R8 ECD 6,5 - 10,0 µm ²	R10 ECD 10,0 - 25,0 µm ²
1	0,9	2,5	15	50,33	0,19	391827	80725	140511
2	0,5	5,0	6	43,22	0,17	227417	45118	78154
3	0,9	5,0	15	46,02	0,23	331548	68418	115145
4	0,9	2,5	15	46,96	0,27	464196	94569	153776
5	0,5	2,5	15	45,54	0,19	330815	76342	127848
6	0,5	0,0	24	49,10	0,21	312763	98667	99344
7	0,9	2,5	24	46,22	0,22	245048	76616	129447
8	1,3	2,5	15	46,69	0,23	292487	57853	101868
9	0,9	2,5	15	45,98	0,22	188730	44418	77083
10	0,9	0,0	15	44,12	0,23	178504	36159	44534
11	0,9	2,5	6	47,37	0,19	202794	51833	91552
12	1,3	5,0	6	45,10	0,19	176746	37183	63873
13	1,3	0,0	6	45,60	0,19	164104	33774	58811
14	0,5	5,0	24	48,68	0,20	349928	86625	150529
15 ³	0,5	0,0	6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
16	1,3	5,0	24	44,37	0,20	173792	61905	121797
17	0,9	2,5	15	44,77	0,19	304282	79130	133758
18	0,9	2,5	15	44,64	0,18	108706	49073	95086
19	1,3	0,0	24	46,25	0,21	359978	96094	98901

¹Koncentracijo smo med izvedbo poskusov določali, da zadostimo kritarijem predvidene konecentracije zdravilne učinkovine v končnem izdelku.

²Število delcev določenega velikostnega razreda.

³Diafiltracije pri poskusu 15 ni bilo mogoče izvesti pri izbranih pogojih.

Koncentracije procesne raztopine določene, z ALC metodo, so tako po ultrafiltraciji kot diafiltraciji znotraj predpisanih vrednostih (40 – 60 mg/ml).

Vpliv parametrov na nastanek agregatov smo zaradi razlik v velikosti agregatov in detekcijskih mej izbranih analitskih metod analizirali z dvema metodama. S SEC metodo smo določili agregate v velikostnem območju 1 – 100 nm, z MFI metodo pa delce v velikostnem območju ECD 2,0 – 25,0 µm.

V preglednici 20 so prikazani odzivi z nekaterimi statističnimi vrednostmi in pripadajočimi evalvacijskimi modeli, na podlagi katerih smo določili vpliv parametrov na posamezen odziv.

Preglednica 20: Pregled izmerjenih odzivov s pripadajočimi evalvacijskimi modeli

Odziv	Ime odziva	Enote	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost	Standardna deviacija	Evaluacijski model
R1	ALC: UF	[mg/ml]	43,10	50,43	46,93	2,12	RQuadratic
R2	ALC: DF	[mg/ml]	43,22	50,33	46,16	1,83	Quadratic
R3	SEC - % AG: UF	[%]	0,16	0,29	0,19	0,03	RQuadratic
R4	SEC - % AG: DF	[%]	0,17	0,27	0,21	0,02	RQuadratic
R5	MFI (ECD 2,0 - 6,5 µm): UF	-	122553	492316	304018	94870	RQuadratic
R6	MFI (ECD 2,0 - 6,5): DF	-	108706	464195	266870	95476	Mean
R7	MFI (ECD 6,5 - 10,0 µm): UF	-	8974	84939	46342	17502	RQuadratic
R8	MFI (ECD 6,5 - 10,0 µm): DF	-	33773	98667	65249	21761	RLinear
R9	MFI (ECD 10,0 - 25,0 µm): UF	-	7788	117432	51744	30131	RLinear
R10	MFI (ECD 10,0 - 25,0 µm): DF	-	44534	153776	104556	31974	RLinear

4.2.1 Vpliv procesnih parametrov na tvorbo delcev, določenih z MFI

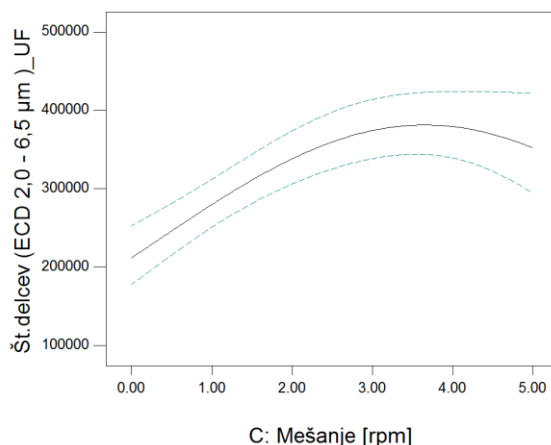
4.2.1.1 Meritve z metodo MFI med ultrafiltracijo

Po ultrafiltraciji smo vzorce pomerili z metodo MFI in dobili tri odzive (število delcev v treh velikostnih razredih, ECD 2,0 – 6,5 µm, ECD 6,5 – 10,0 µm in ECD 10,0 – 25,0 µm). Vsakega izmed odzivov smo ločeno statistično evalvirali.

Med ultrafiltracijo ima na tvorbo delcev največji vpliv hitrost mešanja in temperatura. Vpliv UF TMP je signifikanten samo v korelaciji s temperaturo. Procesni parametri imajo različno močan vpliv na delce posameznih velikostnih razredov. Mešanje in temperatura vplivata na

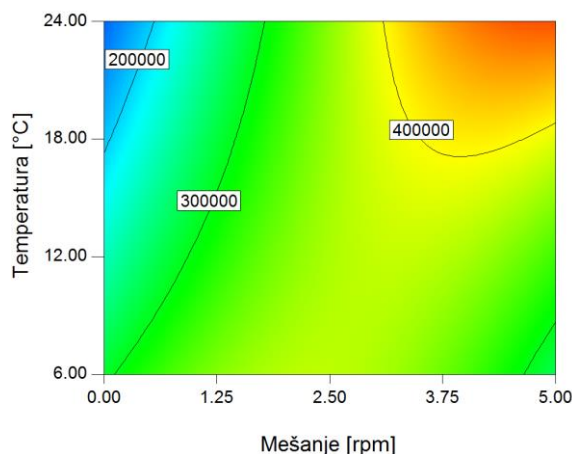
tvorbo najmanjših (ECD 2,0 – 6,5 μm), TMP in temperatura na malo večje delcev (ECD 6,5 – 10,0 μm). Na tvorbo velikih delcev (ECD 10,0 – 25,0 μm) vpliva le temperatura.

Tvorba manjših delcev (ECD 2,0 – 6,5 μm) z višjo intenziteto mešanja narašča vse do najvišje hitrosti mešanja, kjer lahko vidimo, da začne število delcev upadati (slika 17).



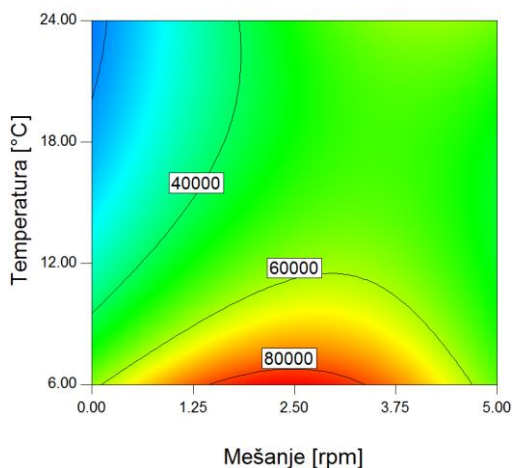
Slika 15: Vpliv mešanja na število delcev (ECD 2,0 – 6,5 μm) po ultrafiltraciji

Vpliv temperature na tvorbo delcev (ECD 2,0 – 6,5 μm) je opazen le v kombinaciji z mešanjem. Na sliki 18 lahko vidimo, da največ delcev nastane, ko proces izvajamo pri najvišji hitrosti mešanja in najvišji temperaturi, medtem ko je tvorba delcev najmanjša pri zelo nizki hitrosti mešanja oz. v odsotnosti mešanja in pri zelo visokih temperaturah.



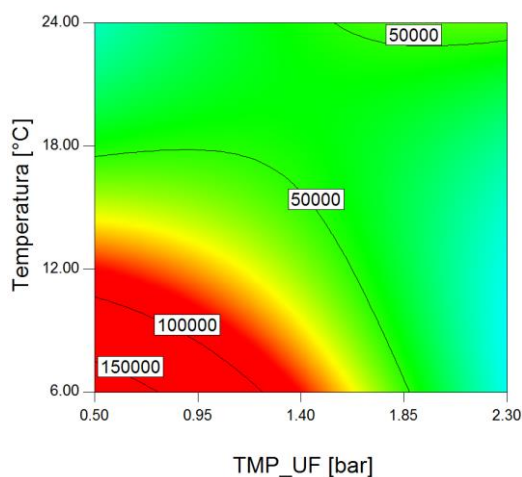
Slika 16: Vpliv hitrosti mešanja in temperature na število delcev (ECD 2,0 – 6,5 μm) po ultrafiltraciji

Tako kot pri tvorbi manjših delcev, ima mešanje v korelaciji s temperaturo največji vpliv tudi pri tvorbi večjih delcev (ECD 6,5 -10,0 μm) med ultrafiltracijo. Na sliki 19 lahko vidimo, da najmanj delcev nastane pri višjih temperaturah in nizki hitrosti mešanja. Pogoji, ki spodbujajo tvorbo delcev, so srednje hitrosti mešanja in nižje temperature.



Slika 17: Vpliv mešanja in temperature na število delcev (ECD 6,5 - 10,0 μm) po ultrafiltraciji

Vpliv na tvorbo delcev med ultrafiltracijo predstavlja tudi korelacija TMP in temperature. Največ večjih delcev (ECD 6,5 – 10,0 μm) nastane pri nižjih tlakih in nižji temperaturi. Idealne pogoje dosežemo, če proces vodimo pri nižjih do srednjih vrednostih temperature in visokem TMP ali pri zelo visokih temperaturah in zelo nizkem TMP (slika 20).



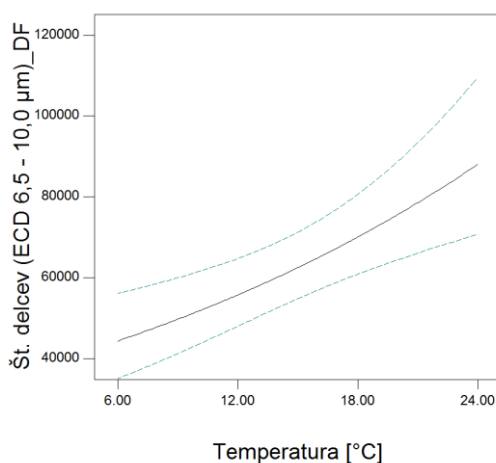
Slika 18: Vpliv UF TMP in temperature na tvorbo delcev v velikostnem območju ECD 6,5 -10,0 μm

4.2.1.2 Meritve z metodo MFI med diafiltracijo

Tudi med diafiltracijo smo z metodo MFI dobili tri odzive (število delcev v treh velikostnih razredih, ECD 2,0 – 6,5 μm , ECD 6,5 – 10,0 μm in ECD 10,0 – 25,0 μm). Vsakega izmed odzivov smo ločeno statistično evalvirali. S preučevanjem vpliva procesnih parametrov na tvorbo delcev v procesu diafiltracije in obdelavo rezultatov z izbranim programom smo ugotovili, da imata signifikanten vpliv na tvorbo delcev temperatura in transmembranski tlak.

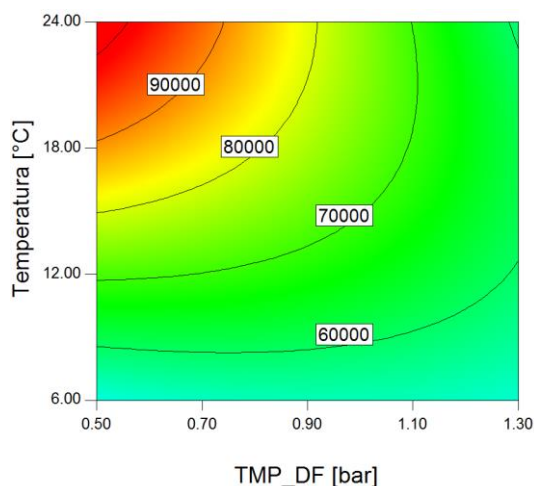
Omenjena parametra vplivata na tvorbo večjih delcev (ECD 6,5 – 25,0 μm). Obdelava podatkov z izbranim programom ni pokazala vpliva preučevanih procesnih parametrov na tvorbo najmanjših delcev (ECD 2,0 – 6,5 μm).

Na sliki 21 vidimo, da z višanjem temperature število delcev (ECD 6,5 – 10,0 μm) narašča.



Slika 19: Vpliv temperature na tvorbo delcev (ECD 6,5 – 10,0 μm) med diafiltracijo

Na tvorbo delcev (ECD 6,5 – 10,0 μm) vpliva tudi TMP v korelaciji s temperaturo. Na sliki 22 vidimo, da se največ delcev tvori pri visokem transmembranskem tlaku in nižjih temperaturah.

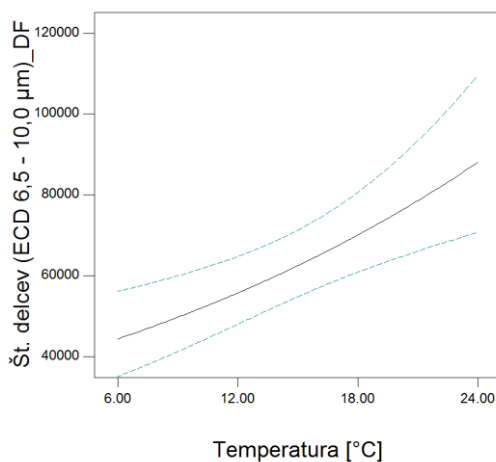


Slika 20: Vpliv TMP in temperature na tvorbo delcev (ECD 6,5 -10,0 μm) med diafiltracijo

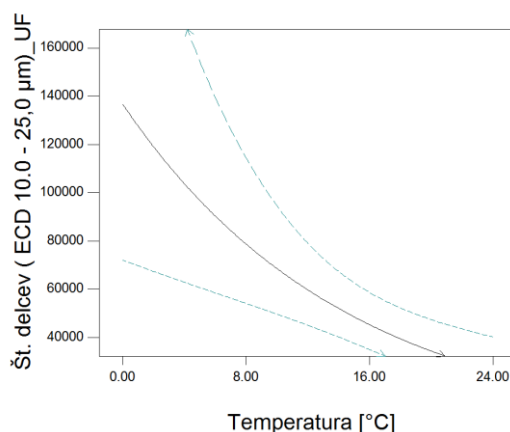
Temperatura je pomemben faktor tudi pri tvorbi večjih agregatov (ECD 10,0 – 25,0 μm). Z višanjem temperature število delcev narašča.

Na slikah 23 in 24 je prikazana primerjava vpliva temperature med ultrafiltracijo in med diafiltracijo. Nastajanje delcev je med ultrafiltracijo najbolj izrazito pri nizki temperaturi med ultrafiltracijo pa pri visoki temperaturi.

Rezultati so pokazali zanimivo razliko v vplivu temperature na tvorbo največjih delcev (ECD 10,0 – 25,0 μm) med ultrafiltracijo in diafiltracijo. Vpliv temperature med ultrafiltracijo je obraten vplivu temperature med diafiltracijo. Medtem ko med diafiltracijo več večjih delcev nastane pri visokih temperaturah (slika 23), je tvorba delcev med ultrafiltracijo višja pri nižjih temperaturah (slika 24).



Slika 21: Vpliv temperature na število delcev (ECD 10,0 – 25,0 μm) med diafiltracijo

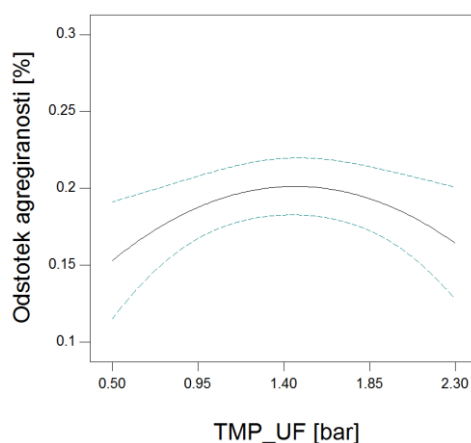


Slika 22: Vpliv temperature na število delcev (ECD 10,0 – 25,0 μm) med ultrafiltracijo

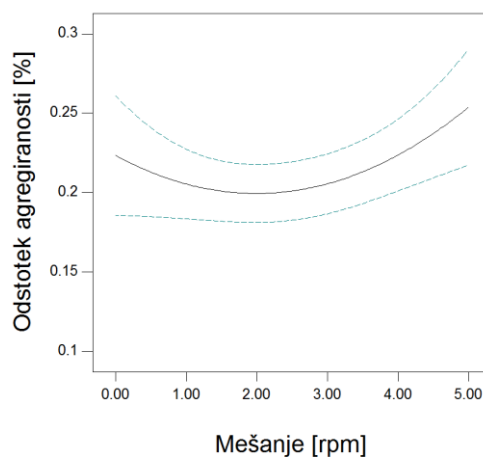
4.2.2 Vpliv procesnih parametrov na tvorbo agregatov, določenih s SEC

4.2.2.1 Meritve odstotka agregiranosti z metodo SEC med ultrafiltracijo

Na podlagi podatkov iz preglednic 18 in 19 vidimo, da je razlika v odstotkih agregiranosti med eksperimenti relativno majhna. Kljub temu pa je analiza pokazala, da na tvorbo najmanjših agregatov (do 100 nm) med ultrafiltracijo najbolj vplivajo srednje vrednosti TMP in mejne vrednosti intenzitete mešanja. Najmanj agregatov med ultrafiltracijo nastane pri mejnih vrednostih TMP (slika 25) in srednjih vrednostih intenzitet mešanja (slika 26).



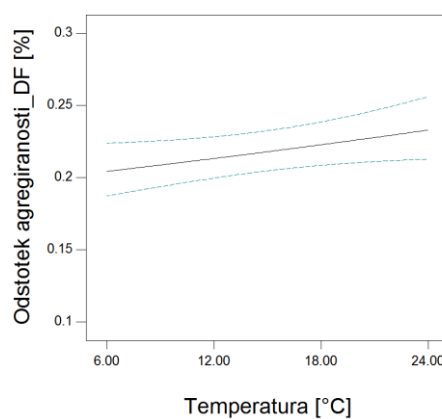
Slika 23: Vpiv TMP na odstotek agregiranosti med ultrafiltracijo



Slika 24: Vpiv mešanja na odstotek agregiranosti med ultrafiltracijo

4.2.2.2 Meritve odstotka agregiranosti z metodo SEC med diafiltracijo

Med diafiltracijo odstotek agregiranosti s temperaturo narašča (slika 27).



Slika 25: Vpliv temperature na odstotek agregiranosti med diafiltracijo

4.2.3 Optimizacija

Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko s pomočjo programa Design Expert določimo vrednosti parametrov pri katerih je tvorba agregatov čim manjša.

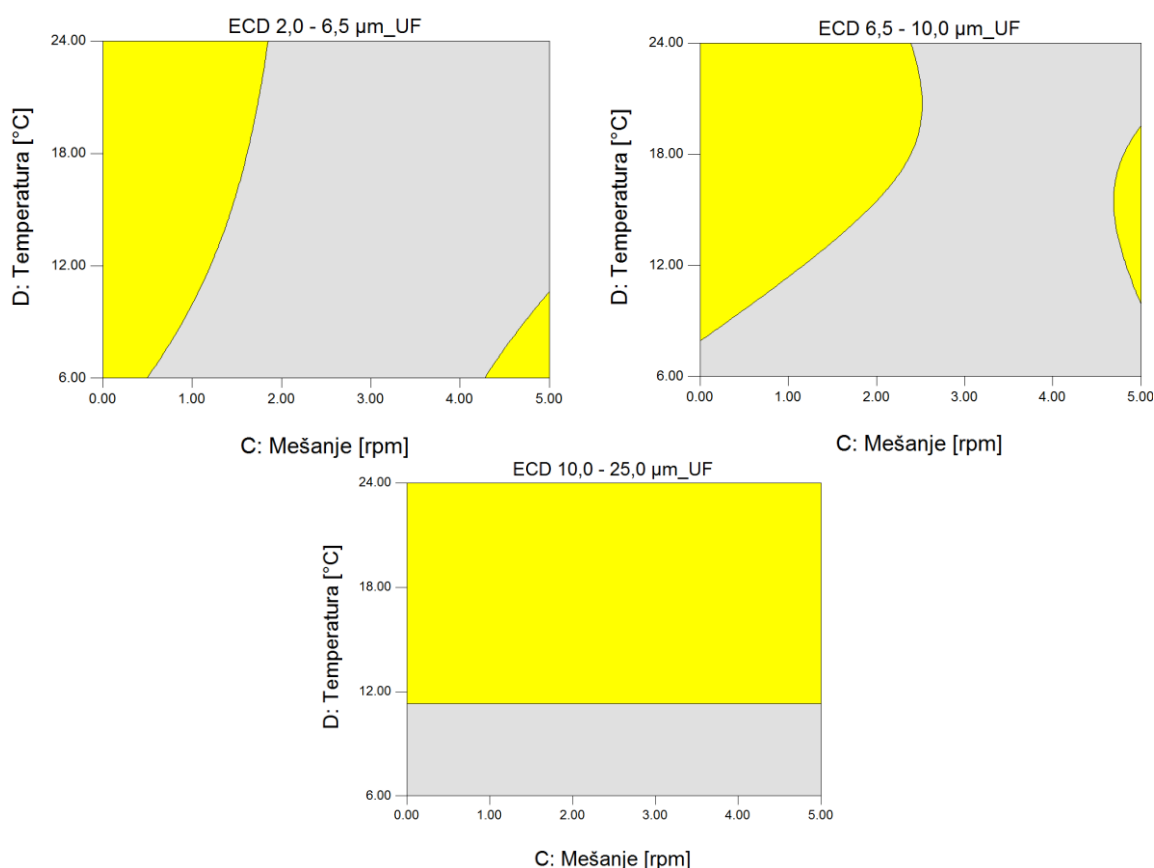
Kot najvplivnejša parametra, povezana z nastankom agregatov, sta bila prepoznana temperatura in hitrost mešanja.

Optimizacijo smo naredili na podlagi števila delcev, določenih z metodo MFI.

Rumeno obarvane površine na grafih označujejo območja vrednosti procesnih parametrov, pri katerih bi bilo število delcev enako srednji vrednosti št. delcev, ki smo jih z metodo MFI izmerili vzorcem iz izvedenih poskusov.

V primeru, ko imamo po UF/DF procesu na voljo dodatne tehnike čiščenja, npr. različne filtracije, s katerimi lahko odstranimo delce določene velikosti, lahko UF/DF proces vodimo pri pogojih, ki so optimalni za določeno velikost delcev. Na slikah 25 in 26 so prikazana optimalna območja vrednosti parametrov med ultrafiltracijo in diafiltracijo za vsak velikostni razred delca posebej.

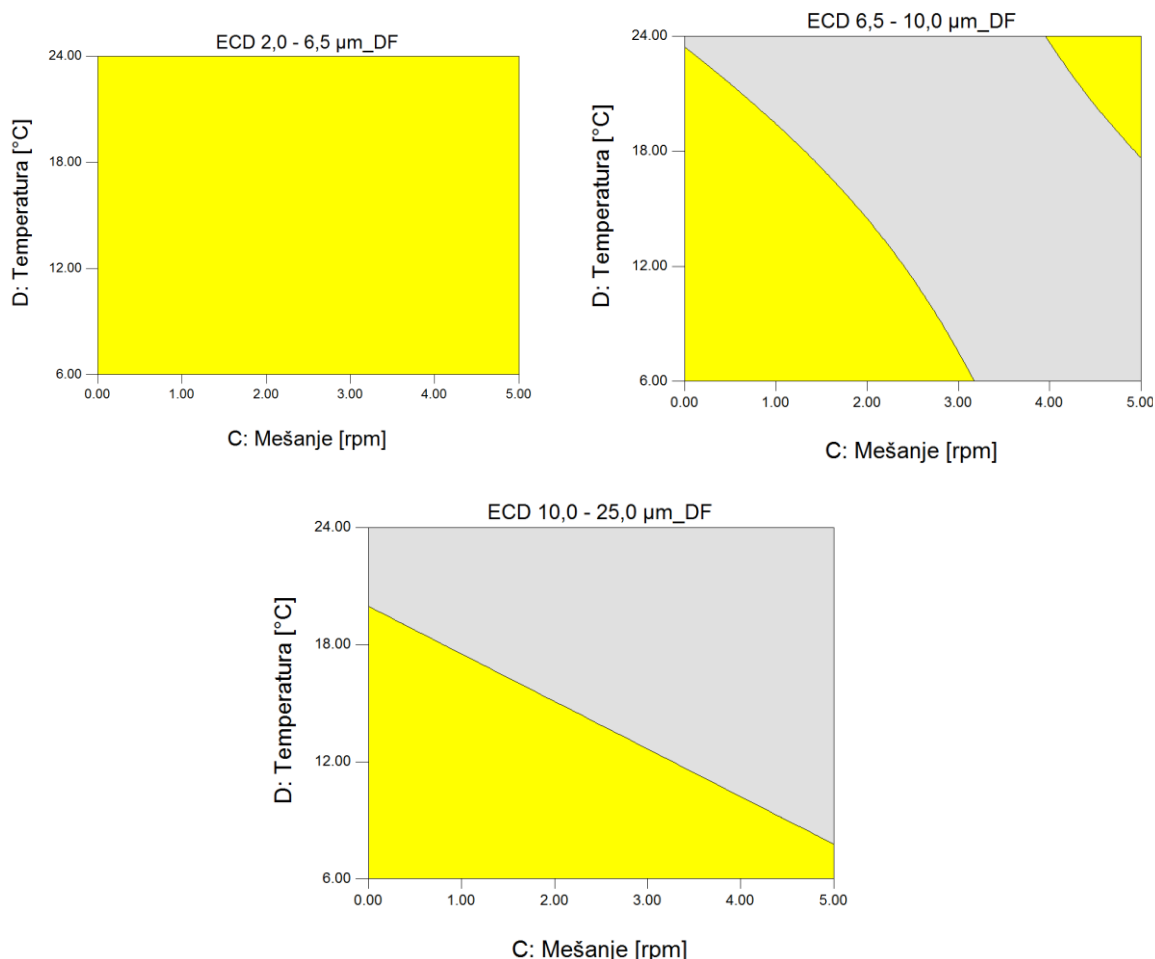
Optimalni območji vrednosti procesnih parametrov, pri katerih nastane najmanj delcev velikostnih razredov ECD 2,0 – 6,5 μm in ECD 6,5 – 10,0 μm , sta precej skladni. Na nastanek velikih delcev (ECD 10,0 – 25,0 μm) pa vpliva le temperatura (slika 26).



Slika 26: Optimalna območja vrednosti procesnih parametrov med ultrafiltracijo za vsak velikostni razred delcev

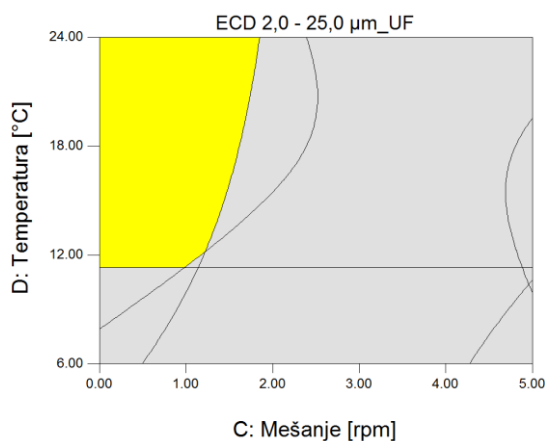
Na sliki 27 vidimo, da se optimalna območja za čim manjšo tvorbo različno velikih delcev med diafiltracijo med seboj precej razlikujejo. Temperatura in mešanje v območju testiranih vrednosti nimata vpliva na tvorbo najmanjših agregatov. Na tvorbo srednje velikih delcev

slabo vplivajo visoke temperature. Največ velikih delcev bo nastalo pri zelo visokih temperaturah in nizkih intenzitetah mešanja ali pri nižjih temperaturah in visokih hitrostih mešanja.

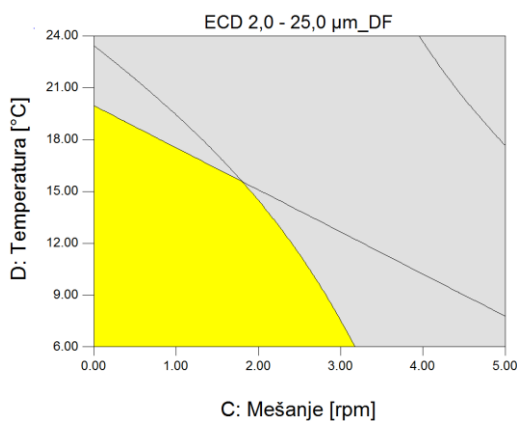


Slika 27: Optimalna območja vrednosti procesnih parametrov med diafiltracijo za vsak velikostni razred delcev

Proces ultrafiltracije in diafiltracije lahko vodimo pri pogojih, pri katerih bo tvorba delcev različnih velikostnih razredov čim manjša. Določili smo, da bo tvorba agregatov med ultrafiltracijo najnižja pri visokih temperaturah in nizkih hitrostih mešanja (slika 28), med diafiltracijo pa pri srednjih vrednostih temperature v kombinaciji z nizkimi hitrostmi mešanja ali pri nizkih temperaturah v kombinaciji z visokimi intenzitetami mešanja (slika 29).



Slika 28: Optimalna območja vrednosti procesnih parametrov med ultrafiltracijo



Slika 29: Optimalna območja vrednosti procesnih parametrov med diafiltracijo

Z optimizacijskim modelom lahko določimo vrednosti parametrov med UF/DF procesom, ki so optimalne za izbrano protitelo. Zaradi razlik med protitelesi lahko optimizacijske rezultate uporabimo le kot smernice ali izhodišče testiranja parametrov UF/DF procesa v razvoju novega protitelesa.

5 RAZPRAVA

5.1 VPLIV ČRPALK

V sklopu prvega dela raziskovanja smo s poskusi ultrafiltracije in diafiltracije poskušali določiti vpliv različnih tipov črpalk na tvorbo agregatov. Preizkusili smo naslednje tipe črpalk: zobniška, batna, membranska in peristaltična. Ker so bili poskusi na različnih tipih črpalk izvedeni pri enakih procesnih pogojih, lahko razlike v agregiranosti vzorcev pripišemo vplivu različnih mehanizmov črpanja. V poskusih smo uporabili črpalke s štirimi različnimi mehanizmi črpanja. Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko potrdimo hipotezo, da se raven agregatov pri uporabi različnih tipov črpalk razlikuje. Prav tako lahko potrdimo naše predvidevanja, da je raven agregatov nižja pri uporabi peristaltične črpalke.

Rezultati so pokazali, da je stopnja agregiranosti najvišja pri vzorcih iz poskusov, izvedenih na batni in zobniški črpalki. Vsebnost agregatov je bila tako visoka, da brez predhodne obdelave končne raztopine ni bilo mogoče natančno določiti vsebnosti agregatov s katero izmed izbranih metod. Tako tudi ni bilo mogoče določiti, katera izmed omenjenih črpalk ima večji vpliv na agregacijo. Najmanj agregatov smo izmerili na vzorcih iz poskusov, izvedenih na peristaltični črpalki in nekaj več na vzorcih iz poskusov na membranski črpalki.

Mehanizem črpanja posameznih črpalk vpliva na intenziteto stresa, kateremu je izpostavljen protein. Inkompatibilnost črpalke s procesno raztopino je lahko posledica mehanskega stresa zaradi gibanja črpalke ali različnih tujih materialov s katerimi protein med črpanjem pride v stik (Meyer, 2012). Na podlagi gibanja črpalke lahko identificiramo več vzrokov, ki povečujejo možnost za nastanek agregatov: produkt je ujet med gibajoče dele črpalke, povišana temperatura kot posledica gibanja črpalke, penjenje in stik produkta s črpalko (Nayak in sod., 2011).

Nekatere študije, izvedene na stopnji končnega polnjenja zdravilne učinkovine, so pokazale korelacijo med uporabo različnih tipov črpalk in tvorbo delcev. Nayak in sod. (2011) so s svojimi poskusi ugotovili, da največ subvidnih delcev nastane pri uporabi batne črpalke. Prav tako so Cromwell in sod. (2006) v svoji študiji preučevanje tvorbe delcev med polnjenjem vial z IgG opazili večjo tvorbo delcev pri uporabi batne črpalke kot pri uporabi membranske črpalke, vendar vzroka niso odkrili. Podobno študijo so opravili tudi Tyagi in sod. (2009), ki navajajo, da je tvorba delcev pri uporabi batne črpalke višja v primerjavi s tvorbo delcev pri uporabi peristaltične ali membranske črpalke.

V številnih študijah kot glavne razloge tvorbe agregatov med črpanjem navajajo prisotnost interfaz, ki nastanejo kot posledica kavitacije, stika s površino in kontaminacije s tujimi delci.

Kavitacija, ki jo povzroča lokalni padec tlaka, predstavlja vir interfaz voda/zrak. Zaradi stika s površino ali nečistočami, ki izhajajo iz mikro in nano delcev, kateri se sproščajo iz uporabljenih materialov, prihaja do nastanka interfaz voda/trdna snov. Razvitje proteina je zaradi hidrofobnega dela molekule ob prisotnosti interfaz energetsko ugodno stanje (Biddlecombe in sod., 2009).

Sklepamo lahko, da je pojav kavitacije najbolj izrazit pri uporabi črpalk, kjer je gibanje tekočine intenzivnejše. Gibanje tekočine pri batni in membranski črpalki je posledica spreminjanja prostornine v komori črpalke. Tekočina mora v prvi fazi napolniti komoro črpalke, ta pa se nato izprazni zaradi mehanskega gibanja delov črpalke. Pri membranski črpalki je to posledica membrane, ki s spreminjanjem pozicije potisne tekočino iz komore. Padec tlaka, ki povzroča kavitacijo, je torej prisoten tudi pri membranski črpalki, vendar je tu protein deloma zaščiten z elastomerno membrano. Precej večji vpliv na protein ima batna črpalka, pri kateri gibanje bata omogoči potisk tekočine iz komore. Padec tlaka na površini gibljivega bata lahko povzroči kavitacijo. Med samim delovanjem raztopina, ki napolni prostor med batom in cilindrom, služi kot mazivo premikajočemu batu, hkrati pa je izpostavljena tudi močnemu trenju. Zaradi interakcije hidrofobne površine bata in hidrofobnega dela molekule proteina lahko pride do razvitja proteina. Intenzivno gibanje tekočine je prisotno tudi pri uporabi zobniške črpalke. Tekočina je vse od vstopa do izstopa iz komore v neposrednem stiku z gibajočimi zobniki. Pri črpanju s peristaltično črpalko je stres na procesno raztopino veliko manjši, raztopina namreč ni v neposrednem stiku s komoro črpalke, saj potuje po silikonskih ceveh.

Poleg interfaz pa se kot vzrok tvorbe agregatov večkrat omenjajo tudi strižne sile. Kljub temu, da je raztopina med črpanjem izpostavljena strižnim silam, so mnogi znanstveniki mnenja, da strižne sile same po sebi ne vplivajo signifikantno na tvorbo agregatov. Kljub temu pa vpliva strižnih sil ne moremo popolnoma izključiti. Zaradi delovanja strižnih sil se lahko poveča vpliv interfaz, te namreč generirajo in rušijo interfeze voda/zrak ali pa služijo kot transport proteina na površino črpalke ali na trdne delce, prisotne v tekočini (Biddlecombe in sod., 2009).

Pomemben vpliv na tvorbo agregatov v procesu črpanja ima tudi stik raztopine s površino črpalke ali izpostavljenost različnim tujim delcem. Vse površine, s katerimi protein pride v

stik, so lahko vir izlužnin. Tyagi in sod. (2009) so v svoji študiji ugotovili, da absorpcija proteinov na mikro in nanodelce iz procesne opreme lahko sproži agregacijske procese.

Pri poskusih, izvedenih na vseh štirih tipih črpalk, so bile uporabljene enake komponente: cevi, povezovalni deli, rezervoar in membrana. Med poskusi smo vse sestavne dele sanitirali po enakem postopku: krožno spiranje z 1 M natrijevim hidroksidom, ki mu je sledilo spiranje z WFI vodo. Učinkovitost spiranja smo preverjali z merjenjem prevodnosti spiralne vode. Razlike v materialih, s katerimi je raztopina prišla v stik, torej izvirajo iz materialov uporabljenih črpalk.

Nerjaveče jeklo, steklo in celuloza so le nekateri izmed materialov s katerimi pride protein v stik med proizvodnim procesom. Bee in sod., (2009) so v študiji preučevali vpliv izpostavljenosti monoklonskih protiteles mikrodalcem stekla, nerjavečega jekla in celuloze. Rezultat adsorpcije proteinskih molekul na mikrodalce je lahko tvorba agregatov. V študiji so raztopine monoklonskih protiteles 30 dni inkubirali z mikrodalci omenjenih materialov. Rezultati nakazujejo, da inkubacija z mikrodalci stekla in celuloze ne vpliva signifikantno na agregacijo, medtem ko je inkubacija z mikrodalci nerjavečega jekla povzročila tvorbo topnih in netopnih agregatov. Do podobnih zaključkov sta prišla tudi Wang in Roberts (2010), ki formulacijo subvidnih delcev pripisujeta adsorpciji proteinskih molekul na nanodelce, ki izhajajo iz komor črpalk iz nerjavečega jekla.

Adsorpcija proteinov na delce je posledica elektrostatskih interakcij. Na nivo adsorpcije vpliva nabitost mikrodalcov, vendar to področje še ni raziskano. Adsorpcijo monoklonskih protiteles bi tako lahko v nekaterih primerih zmanjšali s spremembo pH raztopine (Bee in sod., 2009). Za določitev optimalne pH vrednosti raztopine bi bilo potrebno izvesti dodatne praktične študije s posameznim tipom proteina in uporabljene opreme.

Črpalke, pri katerih smo opazili največjo agregiranost (batna in zobniška črpalka), sta narejeni iz nerjavečega jekla. Raztopina je v komori črpalke v neposrednem stiku z nerjavečim jeklom. Najmanj agregatov smo detektirali v vzorcih iz membranske in peristaltične črpalke, kjer je izpostavljenost kritičnim materialom manjša. Membranska črpalka je sicer prav tako izdelana iz nerjavečega jekla, vendar je membrana tisti faktor, ki lahko deloma zaščiti protein in zmanjša izpostavljenost površini. Pri uporabi peristaltične črpalke raztopina skozi celoten proces potuje po elastični silikonski cevi in tako ne pride v stik z drugimi materiali.

Naša ugotovitev, da je peristaltična črpalka z vidika nastajanja agregatov najprimernejša za izvedbo ultrafiltracije in diafiltracije, je torej skladna z rezultati objavljenih študij. En od

razlogov je način delovanja te črpalke. Tekočina pri tej črpalki le relativno počasi potuje po cevi, se minimalno peni, nastajanje mehurčkov (kavitacija) je zanemarljivo. Poleg tega je raztopina proteina ves čas procesa v stiku le s površino silikonske cevi, ki je v primerjavi s površino iz nerjavečega jekla bolj ugodna za protein in povzroča nižjo stopnjo agregiranosti.

Na osnovi prvega sklopa poskusov smo torej kot optimalno izbrali peristaltična črpalko, s katero smo izvedli drugi sklop poskusov, v katerem smo testirali vpliv izbranih procesnih parametrov na nastajanje agregatov.

5.2 VPLIV PROCESNIH PARAMETROV

Drugi sklop poskusov smo namenili preučevanju vpliva procesnih parametrov na tvorbo delcev. Vse poskuse smo izvedli s peristaltično črpalko, spreminjali pa smo naslednje procesne parametre: UF TMP, DF TMP, mešanje in temperaturo. Območja testiranja parametrov smo določili na podlagi literature in v okviru proizvodnih zmožnosti. Vsak parameter smo testirali v treh točkah: na zgornji in spodnji meji izbranega območja ter pri srednji vrednosti. Zaradi razlik v velikosti delcev in detekcijskih mej izbranih metod smo vzorce testirali z dvema metodama, SEC in MFI.

Rezultati, pridobljeni z obema metodama, se lahko med samo razlikujejo. Razlogov za to je več. Poleg razlik v detekcijskih mejah je lahko odsotnost agregacijskih vrhov pri metodi SEC posledica tega, da netopni agregati ostanejo na friti SEC kolone. Topne agregate lahko iz vzorcev odstranimo z redčenjem in centrifugiranjem, ki ju uporabljamo v postopku priprave vzorca na SEC analizo (Sahin in sod., 2012).

5.2.1 Vpliv procesnih parametrov na tvorbo agregatov določenih z MFI

S testiranjem vpliva procesnih parametrov na tvorbo delcev med ultrafiltracijo in diafiltracijo smo pokazali, da se vpliv izbranih parametrov med korakoma razlikuje. Vpliv določenega parametra je tako lahko izrazit le v enem koraku, v drugem koraku pa je njegov vpliv zanemarljiv. V nekaterih primerih je vpliv določenega parametra signifikanten le v korelaciji z drugim parametrom. Poleg tega imajo lahko enake vrednosti parametrov različen vpliv na tvorbo delcev posameznih velikostnih razredov.

Razumevanje poti nastanka delcev je omejeno z analitskimi in biofizikalnimi metodami, ki nam omogočajo karakterizacijo delcev. Različne oblike stresa povzročajo konformacijske spremembe nativnega proteina, posledično ima takšen protein večjo tendenco po

agregiranju. Konformacijske spremembe torej povzročijo nastanek manjših topnih agregatov. Z združevanjem manjših agregatov se formirajo večji agregati, vse do vidnih agregatov, ki so navadno nereverzibilni. Kljub opisanemu mehanizmu tvorbe agregatov študije nakazujejo, da je pot nastanka velikokrat bolj zapletena in ne sledi nujno opisanemu zaporedju. Tvorba tako manjših kot večjih agregatov je proteinsko in formulacijsko specifična (Simler in sod., 2012).

Naši rezultati kažejo, da povprečno število delcev med procesom narašča. Opazili smo, da se tvori največ najmanjših delcev. Število delcev, ki smo jih uvrstili v skupino največjih delcev, pa je večje od števila srednje velikih delcev, tako med ultrafiltracijo kot med diafiltracijo. Med ultrafiltracijo procesni parametri signifikantno vplivajo na tvorbo manjših delcev (ECD 2 – 10 μm). Med diafiltracijo pa procesni parametri izrazito vplivajo le na tvorbo večjih delcev. Kljub temu vidimo, da se število najmanjših delcev po diafiltraciji zmanjša. Razlog je lahko to, da so manjši agregati reverzibilni in se med diafiltracijo raztopijo, nereverzibilni agregati pa se lahko združujejo v večje agregate.

5.2.1.1 Vpliv hitrosti mešanja na tvorbo agregatov

Mešanje ima podoben vpliv na tekočine kot gibanje tekočin zaradi delovanja črpalk. Pri intenzivnem mešanju lahko na raztopino delujejo strižne sile, ki pa so v primerjavi s strižnimi silami, ki nastanejo kot posledica delovanja nekaterih črpalk, precej manjše. Med mešanjem na tvorbo delcev vpliva tudi kavitacija, ki je še izrazitejša ob delovanju strižnih sil.

Mešanje lahko povzroči strukturne spremembe proteina zaradi nastajanja interfaz voda/zrak. Posledica strukturnih sprememb je lahko delna ali popolna izpostavljenost hidrofobnih aminokislin, ki so pri nativnem proteinu skrite v notranjosti. Izpostavitve hidrofobnih aminokislin vodi do različnih interakcij in posledično tvorbe agregatov. Manjši delci se lahko akumulirajo v večje (Jayaraman in sod., 2014).

S poskusi smo ugotovili, da hitrost mešanja izmed vseh testiranih procesnih parametrov najbolj vpliva na nastajanje agregatov. Med ultrafiltracijo smo opazili predvsem povečano nastajanje manjših delcev (do ECD 10 μm). Vpliv mešanja s časom narašča. Vpliv mešanja smo med ultrafiltracijo opazili tudi v korelaciji s temperaturo. Če vzamemo v obzir le temperaturo in mešanje, dobimo najboljše rezultate – najmanj agregatov, če proces izvajamo pri višji temperaturi (nad 15 °C) in v odsotnosti mešanja. Temperatura sama po sebi v okviru testiranih vrednostih nima izrazitega vpliva. Kljub temu pa so za večjo tvorbo agregatov pri nižjih temperaturah, ki vplivajo na večjo viskoznost raztopine, dovolj že srednje intenzitete mešanja.

Kljub temu, da mešanje v prvi vrsti vpliva na nastanek manjših agregatov, natančen mehanizem agregacije kot posledice mešanja še ni znan. Pomembno je zavedanje, da je vpliv mešanja odvisen od strukturnih in fizikalnih lastnosti proteina pa tudi od lastnosti raztopine, v kateri se protein nahaja, in se tako lahko razlikuje od proteina do proteina (Jayaraman in sod., 2014).

5.2.1.2 Vpliv temperature na tvorbo agregatov

Vpliv temperature smo opazili med ultrafiltracijo in med diafiltracijo. Večji vpliv smo opazili med diafiltracijo, vpliv temperature med ultrafiltracijo pa je izrazit v korelaciji z drugimi procesnimi parametri (npr. hitrostjo mešanja.).

Iz rezultatov lahko vidimo, da ima temperatura med ultrafiltracijo obraten vpliv kot med diafiltracijo. Vzroki za omenjeni pojav so v tesni korelaciji z lastnostmi vhodnega materiala, kot so pH in viskoznost raztopine. pH raztopine vpliva na topnost agregatov. Višja kot je pH vrednost raztopine, slabša je topnost agregatov. Literatura navaja, da raztopine z monoklonskimi protitelesi z nižjo pH vrednostjo (pod 4.5) niso odvisne od temperature, medtem ko je vpliv temperature izrazitejši pri višjih pH vrednostih. Na pojav agregatov vpliva tudi viskoznost raztopine (Sahin in sod., 2012).

S poskusi smo pokazali, da v koraku ultrafiltracije število delcev z nižanjem temperature narašča. Vzrok za to lahko pripišemo viskoznosti raztopine. Na viskoznost raztopine poleg pH, anorganskih soli, sladkorjev in ostalih nečistoč vpliva tudi temperatura. Z nižanjem temperature se viskoznost raztopin povečuje. Posledica viskoznosti raztopin so nekovalentne interakcije, ki spodbujajo tvorbo agregatov (Cheng in sod., 2013). Vhodni material za ultrafiltracijo vsebuje več različnih topljencev, ki vplivajo na viskoznost raztopine med procesom. V poskusih smo z nižanjem temperature povečali vpliv viskoznosti in posledično vplivali na večjo tvorbo agregatov.

Obratno kot v procesu ultrafiltracije, med diafiltracijo število delcev narašča z višanjem temperature. Vpliv na tvorbo delcev lahko pojasnimo z vplivom temperature na pH raztopine. Z višanjem temperature lahko okrepimo vpliv pH raztopine, ki se med diafiltracijo in približa pI molekule kar spodbudi elektrostatske interakcije in posledično spodbudi tvorbo agregatov (Cheng in sod., 2013). Poleg tega z višanjem temperature spodbudimo hidrofbne interakcije in strukturne spremembe proteina, ki posledično vodijo v agregacijo proteinov (Wang in sod., 2010).

5.2.1.3 Vpliv procesnih parametrov na tvorbo agregatov: transmembranski tlak

Transmembranski tlak med ultrafiltracijo in diafiltracijo v korelaciji s temperaturo vpliva le na srednje velike delce (ECD 6,5 -10,0 μm). Visoki tlaki destabilizirajo ionske in hidrofobne vezi, kar vodi do povečane agregacije. Temperatura in tlak vplivata na proteine tudi preko kemijske reaktivnosti, in sicer s spremembo reakcijskega ravnotežja (Rivalain, Roquain in Demazeau, 2010).

Območje transmembranskega tlaka, ki spodbuja tvorbo agregatov se med diafiltracijo zmanjša v primerjavi z območjem med ultrafiltracijo za 0,4 bara. Iz grafov lahko opazimo, da največ agregatov, znotraj omenjenega območja, nastane pri nižjih temperaturah (pod 9 $^{\circ}\text{C}$).

5.2.2 Vpliv procesnih parametrov na tvorbo agregatov, določenih s SEC

Iz rezultatov lahko vidimo, da je razlika v agregiranosti vzorcev, določenih z metodo SEC, med eksperimenti majhna. Razlike v nastajanju večjih delcev, ki smo jih detektirali z metodo MFI, so precej bolj izrazite. Simler in sod. (2012) so v svoji študiji pokazali, da nagnjenost k tvorbi majhnih delcev ni nujno sorazmerna nagnjenosti k tvorbi večjih delcev. Ugotovili so, da se pri IgG protitelesih zaradi stresa, ki ga povzroči mešanje, masa večjih delcev hitreje povečuje kot masa manjših delcev.

Osnovni mehanizem tvorbe agregatov sicer predvideva, da najprej nastanejo manjši agregati, z združevanjem teh pa nato nastajajo večji agregati. Kot že omenjeno, pa je proces tvorbe agregatov precej bolj zapleten in do sedaj še relativno neraziskan. Kljub temu, da se mehanizmi tvorbe agregatov med proteinskimi molekulami razlikujejo, pa imajo navadno faktorji, ki vplivajo na tvorbo manjših agregatov, pomembno vlogo tudi pri tvorbi večjih agregatov (Simler in sod., 2012).

Na nastanek agregatov, detektiranih z metodo SEC, med ultrafiltracijo vplivata transmembranski tlak in mešanje, vpliv temperature pa je opazen med diafiltracijo.

Pri izvedbi analize z metodo SEC moramo upoštevati, da večji agregati (nad 0,1 μm) ne morejo potovati skozi kromatografsko kolono in jih zato s to metodo ni mogoče detektirati (Cromwell in sod., 2006).

5.2.2.1 Vpliv procesnih parametrov na tvorbo agregatov: mešanje

Rezultati vpliva mešanja nakazujejo, da največji odstotek agregiranosti dosežemo ob odsotnosti mešanja in pri maksimalnem mešanju. Ob odsotnosti mešanja raztopina v rezervoarju ni homogena, zato prihaja do lokalnih razlik v viskoznosti materiala. Pri

močnem mešanju se vplivi mešanja, kot so kavitacija in strižne sile okrepijo, in še dodatno spodbujajo nastanek agregatov.

5.2.2.2 Vpliv procesnih parametrov na tvorbo agregatov: temperatura

Vpliv temperature na odstotek agregiranosti je izrazit med diafiltracijskim korakom. Do podobnih rezultatov, kot smo prišli pri analizi večjih delcev, je tudi tvorba najmanjših agregatov največja pri višjih temperaturah. Kot že omenjeno, višja temperatura spodbudi elektrostatske interakcije in posledično vpliva na konformacijske spremembe nativnega proteina.

5.2.2.3 Vpliv procesnih parametrov na tvorbo agregatov: transmembranski tlak

Tako kot tvorba večjih agregatov (ECD 2 -25 μm), je tudi tvorba manjših agregatov (pod 100 nm) najizrazitejša pri transmembranskem tlaku 1,3 bara. Odstotek agregiranosti se z višanjem transmembranskega tlaka zmanjšuje. Glede na podatke, pridobljene tako iz MFI kot SEC analize, lahko zaključimo, da ima območje okoli 1,3 bara transmembranskega tlaka največji vpliv na kemijsko reaktivnost proteinskih molekul.

6 SKLEPI

- Raven agregatov je po procesu ultrafiltracije in diafiltracije na različnih tipih črpalk različna. Naveč agregatov nastane pri uporabi tlačne in zobniške črpalke. Najmanj agregatov smo izmerili na vzorcih iz poskusov na peristaltični črpalki in nekaj več na vzorcih iz poskusov na membranski črpalki.
- Vpliv mešanja na tvorbo agregatov je izrazit med procesom ultrafiltracije. Ugotovili smo, da mešanje vpliva predvsem na nastanek manjših agregatov, vendar pa se lahko posledično ob daljši izpostavitvi mešanja manjši agregati akumulirajo v večje. Med procesom mešanja je pomemben faktor tudi temperatura. Pri nizki temperaturi je tvorba delcev povečana že pri nižjih intenzitetah mešanja. Najmanj delcev nastane pri nizkih intenzitetah mešanja ali v odsotnosti mešanja (če proces to dovoljuje) ob temperaturi nad 15 °C.
- Temperatura vpliva na tvorbo delcev tako v procesu ultrafiltracije kot diafiltracije. Njen vpliv je izrazitejši med diafiltracijo. Vpliv temperature je odvisen od karakteristik procesne raztopine kar se odraža v obratnem vplivu temperature med ultrafiltracijo in diafiltracijo. Ugotovili smo, da je za manjšo tvorbo agregatov ultrafiltracijo ugodneje izvajati pri višji temperaturi, saj tako zmanjšamo vpliv viskoznosti. Tvorba agregatov med diafiltracijo pa bo manjša pri nižjih temperaturah.
- Najmanj agregatov se tvori pri višjem transmembranskem tlaku (2 bara). Vpliv transmembranskega tlaka je opazen tako med ultrafiltracijo kot diafiltracijo. Ugotovili smo, da se njegov vpliv poveča pri nižji temperaturi.

7 POVZETEK

Agregati so vse proteinske vrste v nenativni obliki, ki nastajajo s pomočjo kovalentnih ali ne-kovalentnih vezi. Ker je tvorba agregatov prisotna na vseh stopnjah proizvodnje terapevtskih protiteles, znanstveniki poskušajo odkriti vzroke za tvorbo in določiti vrednosti procesnih parametrov pri katerih bo tvorba agregatov kar najmanjša. Raziskave vzrokov agregacije in odpravljanje le-teh so izredno pomembne, saj lahko prisotnost agregatov v zdravilni učinkovini sproži številne stranske učinke pri pacientu.

Ultrafiltracija in diafiltracija sta pomembna koraka v proizvodnji terapevtskih protiteles. Parametri, ki med ultrafiltracijo in diafiltracijo lahko vplivajo na raven agregatov so črpanje, mešanje, temperatura in transmembranski tlak. Z namenom, da bi določili kritične in posledično tudi optimalne vrednosti parametrov znotraj procesnih zmožnosti, smo s poskusi testirali različne vrednosti omenjenih parametrov.

Pred izvedbo ultrafiltracije in diafiltracije je eden najbolj kritičnih parametrov izbor črpalke. Na izbor črpalke ne vpliva le mehanizem črpanja, velik vpliv imajo tudi materiali, ki tekom procesa črpanja pridejo v stik s proteinom. Ugotovili smo, da je, glede na mehanizem črpanja, najprimernejša peristaltična črpalka. Poleg tega se ob uporabi peristaltične črpalke izognemo uporabi kritičnih materialov, ki bi lahko spodbujali agregacijo.

Poleg črpalke smo tekom procesa spreminjali vrednosti treh različnih parametrov: mešanja, temperature in tlaka. Znotraj testiranih vrednosti parametrov smo ugotovili, da je njihov vpliv opazen tako med ultrafiltracijo kot diafiltracijo. Njihov vpliv je lahko izrazit le v korelaciji z drugimi parametri ali pa pri določenih vrednostih vplivajo le na delce določenega velikostnega razreda. Pri preučevanju pogojev mešanja, katerega vpliv je sicer lahko odvisen tudi od procesne temperature, smo ugotovili, da je tvorba agregatov manjša pri nizkih intenzitetah mešanja. Na podlagi tega lahko sklepamo, da bi bile idealne razmere za protein popolna odsotnost mešanja, vendar pri takšnih procesnih nastavitvah prihaja do lokalnih razlik v koncentraciji procesne raztopine. Vpliv temperature je odvisen od lastnosti procesne raztopine. Med procesom ultrafiltracije in diafiltracije se lastnosti raztopine spreminjajo in posledično je tudi vpliv temperature različen. Temperaturno območje je zato potrebno prilagoditi vsakemu procesu posebej, glede na tip proteina in puferske raztopine, ki jih uporabljamo.

Med procesom proizvodnje terapevtskih protiteles je potrebno redno spremljanje vsebnosti agregatov v raztopini. Na voljo je sicer več metod, ki nam omogočajo detekcijo delcev, vendar je potrebno pred izborom ustrezne metode poleg prednosti poznati tudi njihove

omejitve. Vsebnost agregatov smo tekom poskusov določali s tremi metodami: DLS, SEC in MFI. Že po prvem sklopu eksperimentov smo ugotovili, da zaradi nehomogenosti v smislu prisotnosti delcev različnih velikosti rezultati metode DLS niso reprezentativni. Metodo bi lahko uporabili, če bi pridobljene vzorce pred izvedbo analize dodatno filtrirali ali redčili, v tem primeru pa rezultati za naše potrebe ne bi bili relevantni. Agregiranost smo tako v nadaljevanju določali s SEC in MFI metodo. Kljub temu, da je SEC dobro raziskana in najpogosteje uporabljena metoda za določevanje agregatov, pa nam njeni rezultati ne podajo celotne slike prisotnosti agregatov v vzorcih. V postopku priprave vzorca in med samo analizo se iz vzorcev odstranijo večji agregati. MFI metoda nam omogoča analizo delcev različnih velikosti. Njena največja prednost je vizualizacija delcev. Na sliki, ki jo metoda posname, lahko z uporabo različnih filtrov ločimo ne-proteinske od proteinskih delcev in jih analiziramo po željenem velikostnem razredu. Analiza z MFI je napram DLS in SEC analizi izredno dolgotrajna. Poleg izvedbe metode, kjer je potrebno vsak vzorec ročno injicirati, je pri MFI dolgotraja tudi sama obdelava podatkov.

Navkljub zaključkom, do katerih smo prišli na podlagi eksperimentov pa je pred znanstveniki še dolga pot. Četudi poznamo določene vzroke agregacije pa so v številnih primerih mehanizmi tvorbe agregatov le delno raziskani. Zaradi raznolikosti terapevtskih protiteles je potrebno vrednosti procesnih parametrov pred produkcijo novega protitelesa eksperimentalno potrditi.

8 VIRI

- Ahrer K., Buchacher A., Iberer G., Jungbauer A. 2006. Effects of ultra-/diafiltration conditions on present aggregates in human immunoglobulin G preparations. *Journal of Membrane Science*, 274, 1–2: 108-115
- Bee J.S., Stevenson J.L., Mehta B., Svitel J., Pollastrini J., Platz R., Freund E., Carpenter J.F., Randolph T.W. 2009. Response of a concentrated monoclonal antibody formulation to high shear. *Biotechnology and Bioengineering*, 103, 5: 936-943
- Biddlecombe J.G., Smith G., Uddin S., Mulot S., Spencer D., Gee C., Fish B.C., Bracewell D.G. 2009. Factors influencing antibody stability at solid–liquid interfaces in a high shear environment. *Biotechnology Progress*, 25, 5: 1499-1507
- Binabaji E., Ma J., Rao S., Zydney A.L. 2015. Theoretical analysis of the ultrafiltration behavior of highly concentrated protein solutions. *Journal of Membrane Science*, 494: 216-223
- Changbin G., Zongxia J., Shouzhan H. 2014. Theoretical study of flow ripple for an aviation axial-piston pump with damping holes in the valve plate. *Chinese Journal of Aeronautics* 27, 1: 169–181
- Cheng W., Joshi S.B., Jain N.K., He F., Kerwin B.A., Volkin D.B., Middaugh C.R. 2013. Linking the solution viscosity of an IgG2 monoclonal antibody to its structure as a function of pH and temperature. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102, 12: 4291-4304
- Christodoss D. 2013. Tangential flow membrane filtration to enable high solids concentration, improved process throughput, capacity and cost. <http://www.slideshare.net/njcnews777/tangential-flow-filtration-tff-membrane-design-for-industrial-and-municipal-applications> (27.8.2016)
- Cromwell M.E., Hilario E., Jacobson F. 2006. Protein aggregation and bioprocessing. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 8, 3: 572-579
- Erickson H.P. 2009. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biological Procedures Online*, 11: 32-51
- Filipe V., Hawe A., Carpenter J.F., Jiskoot W. 2013. Analytical approaches to assess the degradation of therapeutic proteins. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 49, 0: 118-125
- Gronemeyer P., Ditz R., Strube J. 2014. Trends in upstream and downstream process development for antibody manufacturing. *Bioengineering*, 1, 4: 188-212

- Hong P., Koza S., Bouvier E.S.P. 2012. Size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 35, 20: 2923-2950
- Houp R.C. 2009. Ultrafiltration and diafiltration. *Journal of Validation Technology*. 15, 4: 40-45
- Huang C.T., Sharma D., Oma P., Krishnamurthy R. 2009. Quantitation of protein particles in parenteral solutions using micro-flow imaging. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98, 9: 3058-3071
- Jayaraman M., Buck P.M., Alphonse Ignatius A., King K.R., Wang W. 2014. Agitation-induced aggregation and subvisible particulate formation in model proteins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 87, 2: 299-309
- Kelley B., Blank G., Lee A. 2008. Downstream processing of monoclonal antibodies: current practices and future opportunities V: Process Scale Purification of Antibodies. Gottschalk U. (ed.). John Wiley & Sons, Inc.:1-23
- Koivula T., Ellman A., Vilenius M. 2000. Experiences on cavitation detection methods. Proceedings, XVI IMEKO World congress, IMEKO 2000, Dunaj, 25-28 september 2000: 49-54
- Krayukhina E., Uchiyama S., Nojima K., Okada Y., Hamaguchi I., Fukui K. 2013. Aggregation analysis of pharmaceutical human immunoglobulin preparations using size-exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation sedimentation velocity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115, 1: 104-110
- Leiske D.L., Shieh I.C., Tse M.L. 2016. A method to measure protein unfolding at an air-liquid interface. *Langmuir*, 32, 39: 9930-9937
- Liu H.F., Ma J., Winter C., Bayer R. 2010. Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *MAbs*, 2, 5: 480-499
- Liu L., Cai X., Zhang J., Xu C. 2015. Particle-size measurements in a micro-channel with image dynamic light scattering method. *Procedia Engineering*, 102: 904-910
- Mahler H.C., Friess W., Grauschopf U., Kiese S. 2009. Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98, 9: 2909-2934
- Malvern. 2011. Dynamic light scattering common terms defined. http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2011/02/DLS_Terms_defined_Malvern.pdf (17.avg.2016)
- Meyer B.K. 2012. 4 - Material and process compatibility testing V: Therapeutic protein drug products. Meyer B.K. (ed.). Philadelphia, Woodhead Publishing: 67-82

- Mimmi G., Pennacchi P. 2001. Diaphragm design improvement for a metering pump. *Engineering Failure Analysis*, 8, 1: 1-13
- Modler A.J., Gast K., Lutsch G., Damaschun G. 2003. Assembly of amyloid protofibrils via critical oligomers—a novel pathway of amyloid formation. *Journal of Molecular Biology*, 325, 1: 135-148
- Mucchi E., Dalpiaz G., Fernández del Rincón A. 2010. Elastodynamic analysis of a gear pump. Part I: Pressure distribution and gear eccentricity. *mechanical systems and signal Processing*, 24, 7: 2160-2179
- Nayak A., Colandene J., Bradford V., Perkins M. 2011. Characterization of subvisible particle formation during the filling pump operation of a monoclonal antibody solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100, 10: 4198-4204
- Rea J.C., Wang Y.J., T.G. Moreno T.G., Parikh R., Lou Y., Farnan D. (2012). Monoclonal antibody development and physicochemical characterization by high performance ion exchange chromatography V: Innovations in biotechnology. Agbo E.C. (ed.). Rijeka, InTech: 439-464
- Rivalain N., Roquain J., Demazeau G. 2010. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies. *Biotechnology Adventure*, 28, 6: 659-672
- Roberts C.J. 2014a. Protein aggregation and its impact on product quality. *Current Opinion in Biotechnology*, 30: 211-217
- Roberts C.J. 2014b. Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control. *Trends in Biotechnology*, 32, 7: 372-380
- Rosenberg E., Hepbildikler S., Kuhne W., Winter G. 2009. Ultrafiltration concentration of monoclonal antibody solutions: Development of an optimized method minimizing aggregation. *Journal of Membrane Science*, 342, 1–2: 50-59
- Sablani S., Goosen M., Al-Belushi R., Wilf M. 2001. Concentration polarization in ultrafiltration and reverse osmosis: a critical review. *Desalination*, 141, 3: 269-289
- Sahin E., Weiss W.F.t., Kroetsch A.M., King K.R., Kessler R.K., Das T.K., Roberts C.J. 2012. Aggregation and pH-temperature phase behavior for aggregates of an IgG2 antibody. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101, 5: 1678-1687
- Shah Y.T., Pandit A.B., Moholkar V.S. 1999. Cavitation reaction engineering. V: Sources and types of cavitation. New York, Springer: 1-14
- Sharma D., King D., Oma P., Merchant C. 2010. Micro-flow imaging: flow microscopy applied to sub-visible particulate analysis in protein formulations. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 12, 3: 455-464

- Shukla A.A., Hubbard B., Tressel T., Guhan S., Low D. 2007. Downstream processing of monoclonal antibodies—application of platform approaches. *Journal of Chromatography B*, 848, 1: 28-39
- Simler B.R., Hui G., Dahl J.E., Perez-Ramirez B. 2012. Mechanistic complexity of subvisible particle formation: links to protein aggregation are highly specific. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101, 11: 4140-4154
- Štrukelj B., Kočevar Glavač N., Zvonar Pobirk A. 2015. Biološka zdravila spletni učbenik za študente farmacije. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 93 str.
- Štrukelj B., Kos J., Bozovicar K., Bratkovič T., Lunder M., Glavač I., Kristl J., Doljak B., Slanc P., Kočevar N. 2007. Biološka zdravila : od gena do učinkovine. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 673 str.
- Treuheit M.J., Kosky A.A., Brems D.N. 2002. Inverse relationship of protein concentration and aggregation. *Pharmaceutical research*, 19, 4: 511-516
- Tripathi D., Bég O.A. 2014. A study on peristaltic flow of nanofluids: application in drug delivery systems. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 70: 61-70
- Tripp B.C., Magda J.J., Andrade J.D. 1995. Adsorption of globular proteins at the air/water interface as measured via dynamic surface tension: concentration dependence, mass-transfer considerations, and adsorption kinetics. *Journal of Colloid and Interface Science*, 173, 1: 16-27
- Tyagi A.K., Randolph T.W., Dong A., Maloney K.M., Hitscherich C., Jr., Carpenter J.F. 2009. IgG particle formation during filling pump operation: a case study of heterogeneous nucleation on stainless steel nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98, 1: 94-104
- Vázquez-Rey M., Lang D.A. 2011. Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes. *Biotechnology and Bioengineering*, 108, 7: 1494-1508
- Walter D. 2013. Primary particles – agglomerates – aggregates V: Nanomaterials. Bonn, Wiley: 9-24
- Wang W., Roberts C.J., eds. 2010. Aggregation of therapeutic proteins New Jersey, John Wiley: 484 str.
- Wang W., Nema S., Teagarden D. 2010. Protein aggregation—pathways and influencing factors. *International Journal of Pharmaceutics*, 390, 2: 89-99
- Weiss W.F., Young T.M., Roberts C.J. 2009. Principles, approaches, and challenges for predicting protein aggregation rates and shelf life. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98, 4: 1246-1277

Zöls S., Weinbuch D., Wiggenhorn M., Winter G., Friess W., Jiskoot W., Hawe A. 2013. flow imaging microscopy for protein particle analysis—a comparative evaluation of four different analytical instruments. American Association of Pharmaceutical Scientists, 15, 4: 1200-1211

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Alešu Podgorniku in somentorici dr. Maji Kenig za strokovno pomoč, usmerjnaje in za natančen pregled magistrske naloge.

Prav tako se zahvaljujem recenzentu prof. dr. Gregorju Anderluhu za nasvete in popravke, ki so izboljšali magistrsko nalogo.

Zahvaljujem se tudi sodelavcem v podjetju Lek d.d. za nasvete in pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela naloge.

Velika zahvala gre tudi moji družini in fantu za spodbudo, potrpežljivost in pomoč skozi celotno študijsko obdobje.