



Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
«Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία
«Έλεγχος Ποιότητας Βιοφαρμάκων»

Άτσου Ευμορφία

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Λαμπροπούλου Δήμητρα

Πάτρα, Ιούνιος 2024

Πάτρα, Ιούνιος 2024

© Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο, 2017

Η παρούσα Εργασία καθώς και τα αποτελέσματα αυτής, αποτελούν συνιδιοκτησία του ΕΑΠ και του φοιτητή, ο καθένας από τους οποίους έχει το δικαίωμα ανεξάρτητης χρήσης, αναπαραγωγής και αναδιανομής τους (στο σύνολο ή τμηματικά) για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, σε κάθε περίπτωση αναφέροντας τον τίτλο και το συγγραφέα της Εργασίας καθώς και το όνομα του ΕΑΠ όπου εκπονήθηκε.



«Έλεγχος Ποιότητας Βιοφαρμάκων»

Άτσου Ευμορφία

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:
Λαμπροπούλου Δήμητρα
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια,
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Πάτρα, Ιούνιος 2024

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσοι με βοήθησαν στην ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Αρχικά, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, την κα Δήμητρα Λαμπροπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, για την αμέριστη υποστήριξή της, τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας. Η εμπειρία και οι γνώσεις της ήταν πολύτιμες για την επιτυχία αυτής της διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην οικογένεια και τους φίλους μου για τη συνεχή υποστήριξη, κατανόηση και ενθάρρυνση που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια της συγγραφής της παρούσας εργασίας. Η παρουσία τους υπήρξε πηγή δύναμης και έμπνευσης για μένα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσοι συμμετείχαν και με βοήθησαν με οποιονδήποτε τρόπο. Η συνεισφορά σας ήταν πολύτιμη και αναντικατάστατη.

Περίληψη

Τα βιοφάρμακα αποτελούν ξεχωριστή κατηγορία από τα φάρμακα και περιλαμβάνουν κάθε βιολογικό προϊόν που παράγεται από ζωντανούς οργανισμούς με τη χρήση τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA, συμπεριλαμβανομένων των εμβολίων και των κυτταρικών και γονιδιακών θεραπειών. Είναι ένας αναπτυσσόμενος κλάδος, ο οποίος έχει αντίκτυπο κυρίως στην υγεία και κατ' επέκταση και στην οικονομία. Τα παραγόμενα προϊόντα/φάρμακα θα πρέπει να ελέγχονται ποιοτικώς καθώς και ποσοτικώς καθ' όλη τη διάρκεια, από τον σχεδιασμό μέχρι την λήψη του από τον ασθενή. Η εξασφάλιση για την ποιότητά τους γίνεται με τις οδηγίες από το Διεθνές Συνέδριο για την Εναρμόνιση- ICH, με οδηγίες που συνεχώς ενημερώνονται, ανακαλούνται ή/και βελτιώνονται ώστε να ακολουθούνται από της φαρμακοβιομηχανίες. Η ποιότητα των προϊόντων ελέγχεται με μεθόδους όπως: i) η φασματοσκοπία μάζας, από την οποία λαμβάνουμε πληροφορίες για τη μάζα και τη δομή πρωτεϊνών που περιέχουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η γλυκοζυλίωση. Έτσι, οι αναλυτικές μέθοδοι είναι απαραίτητες από την ανακάλυψη φαρμάκων έως τις κλινικές δοκιμές, ακόμη και μετά την έγκριση των ρυθμιστικών αρχών. ii) η υγρή χρωματογραφία που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, τον χαρακτηρισμό, και την ποσοτικοποίηση συστατικών ενός δείγματος. iii) η μέθοδος πολλαπλών χαρακτηριστικών, η οποία παρουσιάζει αυξανόμενο ενδιαφέρον και εφαρμογή στη βιομηχανία βιοφαρμάκων, όπως η μέθοδος χαρτογράφησης πεπτιδίων με βάση την υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS). iv) οι ηλεκτροφορητικές μέθοδοι όπως η SDS-PAGE και η καπαλαριτική ηλεκτροφόρηση (CE), που είναι ουσιαστικές για την ανάλυση καθαρότητας, τη μελέτη των μορφολογιών και την ανίχνευση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (PTMs) των πρωτεϊνών. v) οι ανοσολογικές δοκιμές όπως η ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) που χρησιμοποιούνται ευρέως για την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών και ακαθαρσιών λόγω της υψηλής ευαισθησίας και της εξειδίκευσής τους. Αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούνται για να διασφαλιστεί ότι το βιοφάρμακο είναι καθαρό, σταθερό και λειτουργικά ενεργό.

Λέξεις – Κλειδιά

Έλεγχος ποιότητας, Βιοφάρμακα, Φασματομετρία Μάζας, Υγρή Χρωματογραφία, Μέθοδος Πολλαπλών Χαρακτηριστικών, Ηλεκτροφορητικές μέθοδοι, ELISA

Abstract

Biopharmaceuticals are a separate category from drugs and include any biological product produced by living organisms using recombinant DNA technology, including vaccines and cell and gene therapies. It is a growing industry, which has an impact mainly on health and, by extension, on the economy. The produced products/medicines should be qualitatively as well as quantitatively controlled throughout, from planning to receiving by the patient. Their quality is ensured by the instructions from the International Conference on Harmonization - ICH, with instructions that are constantly updated, recalled and/or improved so that they can be followed by the pharmaceutical industry. The quality of the products is controlled by methods such as: i) mass spectroscopy, from which we obtain information on the mass and structure of proteins containing post-translational modifications such as glycosylation. Thus, analytical methods are essential from drug discovery to clinical trials and even after regulatory approval. ii) liquid chromatography used to separate, characterize, and quantify components of a sample. iii) the multi-feature method, which is of increasing interest and application in the biopharmaceutical industry, such as the liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)-based peptide mapping method. iv) electrophoretic methods such as SDS-PAGE and kappalaritic electrophoresis (CE), which are essential for purity analysis, studying morphologies and detecting post-translational modifications (PTMs) of proteins. v) immunological tests such as ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) which are widely used for the quantification of specific proteins and impurities due to their high sensitivity and specificity. These methods are used to ensure that the biopharmaceutical is pure, stable and functionally active.

Keywords

Quality Control, Biopharmaceuticals, Mass Spectrometry, Liquid Chromatography, Multi-Attribute Method, Electrophoretic methods, ELISA

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	vi
Abstract	vii
Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων	ix
Κατάλογος Πινάκων	ix
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια.....	ix
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
2 Ποιότητα	2
2.1 DEMING	2
2.2 JURAN	3
2.3 CROSBY	4
2.4 FEIGENBAUM	4
2.5 TAGUCHI	5
2.6 ISHIKAWA.....	5
3 ΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΑ.....	6
3.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΩΝ	6
3.2 ΣΥΓΚΡΙΣΗ	7
3.3 ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΩΝ	9
3.4 ΕΙΔΗ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΩΝ	10
3.4.1 ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ.....	10
3.4.2 ΈΝΖΥΜΑ.....	10
3.4.3 ΟΡΜΟΝΕΣ.....	11
3.4.4 ΕΜΒΟΛΙΑ	11
3.4.5 ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	11
3.4.6 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ	13
3.5 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΩΝ	13
3.5.1 ΘΕΡΑΠΕΙΑ	13
3.5.2 ΠΡΟΛΗΨΗ	13
3.5.3 ΔΙΑΓΝΩΣΗ	14
3.6 ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗ	14
4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ.....	16
4.1 ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ	17
4.1.1 ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΩΝ- BCS	18
4.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ	19
4.2.1 ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΟΥ	19
4.3 INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION- ICH.....	21
5 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	25
5.1 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ- MS.....	26
5.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ - LC.....	35
5.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	51
5.4 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ	56
Βιβλιογραφία.....	62

Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων

Εικόνα 1.2.1: Deming	3
Εικόνα 3.1: Δομή αντισωμάτων (ανοσοσφαιρίνη G, IgG)	12
Εικόνα 5.1 Γεωμετρίες MS.	29
Εικόνα 5.2: Όργανα IM-MS. Ένα φασματόμετρο κινητικότητας ιόντων ηλεκτροστατικού σωλήνα μετατόπισης (DTIMS) συνδεδεμένο με ένα τετραπολικό φασματόμετρο μάζας χρόνου πτήσης (QTOF).....	33
Εικόνα 5.3: Ηλεκτροδυναμικό φασματόμετρο κινητικότητας ιόντων κινουμένων κυμάτων (TWIMS) σε συνδυασμό με ένα τετραπολικό φίλτρο μάζας και ένα όργανο QTOF.	33
Εικόνα 5.4: Απεικόνιση τρόπου διαχωρισμού πρωτεϊνών στη SEC. [72].....	37
Εικόνα 5.5: Διάγραμμα αναπαράστασης εφαρμογών τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης χαρακτηρισμού CQAs των βιοφαρμάκων.....	52
Σχήμα 5.1: Διάγραμμα ροής εργασιών για ανάλυση γλυκοζυλίωσης βιοφαρμακευτικών. Επιλογές αναλυτικών μεθόδων (λευκά) εκχωρούνται σε διαφορετικά δείγματα (γκρι) που προέρχονται από διαφορετικά στάδια επεξεργασίας (σκούρα).	31
Σχήμα 5.2: Η HILIC ως συμπλήρωμα σε διαχωρισμούς κανονικής φάσης και LC αντίστροφης φάσης	43
Σχήμα 5.3: Η HILIC ως συμπλήρωμα σε διαχωρισμούς κανονικής φάσης και LC αντίστροφης φάσης	43
Σχήμα 5.4: Ροή εργασιών Multi-Attribute Method.	46

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 4.1: ICH, Οδηγίες για σταθερότητα φαρμάκου	20
Πίνακας 4.2: Κατευθυντήριες γραμμές του ICH για πιστοποίηση/επικύρωση μεθόδου ..	24
Πίνακας 5.1: Τεχνικές IMMS και εφαρμογές.....	34
Πίνακας 5.2: Διαφορετικοί τρόποι διαχωρισμού LC που χρησιμοποιούνται συνήθως στην ανάλυση πρωτεϊνών.	41
Πίνακας 5.3: Σύγκριση HILIC και IPC για Στρεπτομυκίνη και Διϋδροστρεπτομυκίνη. [97]	49
Πίνακας 5.4: Αποτελέσματα επικύρωσης ICH της μεθόδου CGE για μονοκλωνικό αντίσωμα [106]	55
Πίνακας 5.5: Αποτελέσματα ELISA για Bevacizumab, cetuximab, trastuzumab [109].....	61

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

ΠΟΥ	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
FDA	Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων
ICH	Διεθνής Συνδιάσκεψη για την Εναρμόνιση, International Conference on Harmonization
GMP	Ορθή πρακτική παραγωγής, Good Manufacturing Practice
mAbs	Μονοκλωνικά αντισώματα
PTMs	Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις
EPO	Ερυθροποιητίνη
QbD	Ποιότητα στο σχεδιασμό, Quality by Design
MS	Φασματοσκοπία Μάζας
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
CE	Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση
MALDI	Φασματοσκοπία υποβοηθούμενης από μήτρα εκρόφησης/ιοντισμού λέιζερ
QC	Έλεγχος Ποιότητας
QA	Διασφάλιση Ποιότητας
QMS	Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας
BCS	Σύστημα Ταξινόμησης Βιοφαρμάκων
ODS	Octadecylsilane
PGC	Porous Graphitic Carbon
HILIC	Υγρή Χρωματογραφία Υδρόφιλης Αλληλεπίδρασης
MAM	Μέθοδος πολλαπλών χαρακτηριστικών
CEX	Χρωματογραφία ανταλλαγής κατιόντων
IEX	Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων
CQA	Κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας
NPD	Ανίχνευση νέας αιχμής
CV	Coefficient of Variation

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα βιοφάρμακα αντιπροσωπεύουν μια διαφορετική κατηγορία φαρμακευτικών προϊόντων που περιλαμβάνει οποιοδήποτε βιολογικό προϊόν που παράγεται από ζωντανούς οργανισμούς χρησιμοποιώντας τεχνολογία ανασυνδιασμένου DNA, συμπεριλαμβανομένων εμβολίων, κυτταρικών και γονιδιακών θεραπειών κλπ. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων τεσσάρων δεκαετιών, περισσότερα από 300 βιοφάρμακα έχουν φτάσει στην αγορά, με περισσότερες από 100 εγκρίσεις προϊόντων μεταξύ του διαστήματος 2015 - 2018.[1] Η βιομηχανία των βιοφαρμάκων αποτελεί έναν τεράστιο κλάδο και είναι πολλά υποσχόμενη, συνεισφέρει σημαντικά στα οικονομικά των χωρών και αποδίδει σημαντικά κέρδη. Σύμφωνα με τα στοιχεία του La Merie [2] , οι πωλήσεις στον τομέα των βιοφαρμάκων έφθασαν πάνω από τα 300 δισεκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ το 2023. Αυτό δείχνει την εξαιρετική ανάπτυξη και την οικονομική σημασία του κλάδου. Ως εκ τούτου, είναι πολύ σημαντικό να διασφαλιστεί η υψηλή ποιότητα των προϊόντων που παράγονται σε αυτήν τη βιομηχανία, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητά τους.

Ο έλεγχος ποιότητας στην παραγωγή βιοφαρμάκων περιλαμβάνει αυστηρές δοκιμές και παρακολούθηση των διαδικασιών παραγωγής ώστε να διασφαλιστεί ότι το τελικό προϊόν πληροί τα απαιτούμενα πρότυπα. Αυτό περιλαμβάνει τη χρήση προηγμένων τεχνολογιών για τον ακριβή έλεγχο και την παρακολούθηση της διαδικασίας παραγωγής τους, την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας να προκύψουν σφάλματα (πχ μόλυνση των βιοφαρμάκων) αλλά και ελαττωματικά προϊόντα και τη διασφάλιση της παραγωγής φαρμάκων υψηλής ποιότητας. Η συμμόρφωση με αυστηρές κανονιστικές οδηγίες και πρότυπα ποιότητας, όπως αυτά που ορίζονται από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA), είναι επίσης απαραίτητη για τη διασφάλιση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας των βιοφαρμάκων, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ). Εάν και η εφαρμογή αυστηρών μέτρων στον έλεγχο ποιότητας αυξάνει το κόστος και το χρόνο που απαιτείται για την παραγωγή βιοφαρμάκων, οι επιπτώσεις αν δεν εφαρμοστούν τα μέτρα ελέγχου μπορεί να είναι καταστροφικές τόσο για την εταιρεία όσο και για την δημόσια υγεία. Ως εκ τούτου, τα οφέλη από την εφαρμογή αξιόπιστων μέτρων ποιοτικού ελέγχου υπερτερούν κατά πολύ της αύξησης του κόστους παραγωγής.

Η σημασία του ποιοτικού ελέγχου δεν μπορεί να υποτιμηθεί επειδή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας και της αξιοπιστίας των βιοφαρμάκων. Η συνεχής πρόοδος και η εφαρμογή μέτρων ποιοτικού ελέγχου είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη και την επιτυχία του κλάδου αυτού. Γι' αυτό οι κατασκευαστές και οι ρυθμιστικές αρχές δίνουν μεγάλη έμφαση στον ποιοτικό έλεγχο στην παραγωγή βιοφαρμάκων για να εξασφαλίσουν την υγεία των ασθενών και την εμπιστοσύνη τους.

2 Ποιότητα

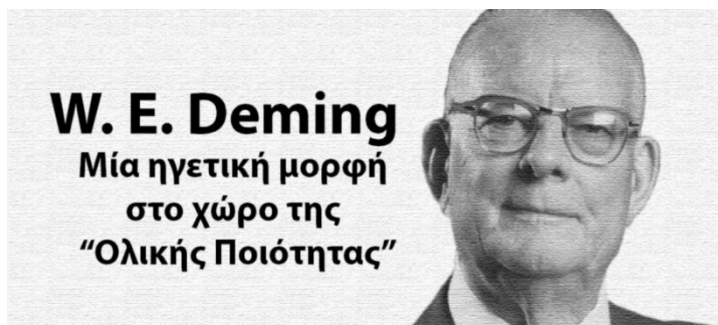
Η έννοια της ποιότητας ορίζεται με πολλούς διαφορετικούς τρόπους, αλλά είναι συχνά δύσκολο να κατανοηθεί λόγω της πολυπλοκότητάς της. Η 'ποιότητα μέσω σχεδιασμού' (Quality by Design- QbD) είναι ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη ενός προϊόντος και των συναφών διαδικασιών κατασκευής όπου θα χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη του προϊόντος έτσι ώστε να εξασφαλίσουν ότι αυτό επιτυγχάνει συνεχώς μια προκαθορισμένη ποιότητα στο τέλος της διαδικασίας κατασκευής. Η ποιότητα μέσω σχεδιασμού, σε συνδυασμό με ένα σύστημα ποιότητας, παρέχει ένα ακριβές πλαίσιο για τη μεταφορά της γνώσης προϊόντος και της κατανόησης της διαδικασίας από την ανάπτυξη φαρμάκου στις εμπορικές διαδικασίες κατασκευής και για τις μεταγενέστερες αλλαγές και βελτιώσεις μετά την ανάπτυξη.[3] Ο ορισμός της ποιότητας φαρμάκου της FDA - ICH (Διεθνούς Συνδιάσκεψης για την Εναρμόνιση) είναι ως εξής: "Η καταλληλότητα είτε μιας φαρμακευτικής ουσίας είτε ενός φαρμακευτικού προϊόντος για την προοριζόμενη χρήση του. Αυτός ο όρος περιλαμβάνει τα χαρακτηριστικά όπως η ταυτότητα, η δύναμη και η καθαρότητα."[4]

Υπάρχουν πολλοί που έχουν μιλήσει για την ποιότητα, έχουν δώσει τον ορισμό από διαφορετικές οπτικές και έχουν ορίσει προϋποθέσεις ή/και οδηγίες για την επίτευξη της ποιότητας ενός προϊόντος. Ο Deming (1986), ο Juran (1988), ο Feigenbaum, ο Ishikawa, ο Taguchi και ο Crosby (1979), θεωρούνται από πολλούς ως οι κύριοι γκουρού της ποιότητας.

2.1 DEMING

Ο Deming θεωρείται ευρέως ως ο άνθρωπος που βοήθησε να προκληθεί η ιαπωνική επανάσταση στην ποιότητα. Ακόμη συνδέεται με τον στατιστικό έλεγχο διαδικασιών (SPC) όπως και άλλες τεχνικές επίλυσης προβλημάτων για την αξιολόγηση της απόδοσης σε όλες τις διαδικασίες. Η έννοια της ποιότητας είναι η "ικανοποίηση του πελάτη, όχι μόνο για να ανταποκριθεί στις προσδοκίες του, αλλά για να τις υπερβεί".

Αυτό σημαίνει να επικεντρώνεται στις ανάγκες του πελάτη, εκτός από τις απαιτήσεις του, όπως εκφράζονται από την αποτελεσματική ζήτηση στην αγορά. Ο Deming έχει επισημάνει την ανάγκη να προηγούνται οι επιχειρήσεις του πελάτη, να αντιμετωπίζουν τις ανάγκες αλλά και τις απαιτήσεις του. Ο στόχος είναι να προστεθεί αξία που ο πελάτης επιθυμεί. Τα μέσα ώστε να βελτιωθεί η ποιότητα, βρίσκονται στην ικανότητα ελέγχου και της διαχείρισης των συστημάτων και των διαδικασιών με τον σωστό τρόπο, καθώς και στο χαρακτήρα των διοικητικών ευθυνών για την επίτευξή τους.



Εικόνα 1.2.1: Deming

<https://worktime.gr/w-e-deming-%CE%BC%CE%AF%CE%B1-%CE%B7%CE%B3%CE%B5%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%AE-%CE%BC%CE%BF%CF%81%CF%86%CE%AE-%CF%83%CF%84%CE%BF-%CF%87%CF%8E%CF%81%CE%BF-%CF%84%CE%B7%CF%82-%CE%BF%CE%BB%CE%B9%CE%BA%CE%AE/>

2.2 JURAN

Ο Juran ορίζει την ποιότητα ως την "καταλληλότητα για σκοπό ή χρήση". Αυτός ο ορισμός είναι εφαρμόσιμος σε όλους τους τομείς, είτε πρόκειται για κατασκευές, υπηρεσίες, κερδοσκοπικές επιχειρήσεις, είτε για μη κερδοσκοπικές. Η ποιότητα κρίνεται από τον χρήστη ή τον πελάτη. Επομένως, αυτή είναι μια προσέγγιση που εστιάζει στον πελάτη, η οποία οδηγείται από τις ανάγκες του. Είναι αρκετά διαφορετική από μια προσέγγιση "συμμόρφωσης προς τις απαιτήσεις ή προδιαγραφές". Ένα προϊόν ή μια υπηρεσία μπορεί να συμμορφώνεται με τις προδιαγραφές του, αλλά να αποτυγχάνει να είναι κατάλληλο για τον σκοπό του.

Η καταλληλότητα για σκοπό ή χρήση περιλαμβάνει πέντε κύριες διαστάσεις ή χαρακτηριστικά ποιότητας. Αυτές αναφέρονται ως εξής:

1. **Ποιότητα Σχεδιασμού:** Η σχεδιαστική έννοια και οι προδιαγραφές του προϊόντος.
2. **Ποιότητα Συμμόρφωσης:** Η αντιστοιχία μεταξύ του πραγματικού προϊόντος και της αρχικής σχεδιαστικής πρόθεσης.
3. **Διαθεσιμότητα:** Περιλαμβάνει την αξιοπιστία και τη συντήρηση του προϊόντος. Αυτά τα χαρακτηριστικά εστιάζουν στον χρόνο.
4. **Ασφάλεια:** Αναφέρεται στον κίνδυνο τραυματισμού λόγω ενδεχόμενων κινδύνων που σχετίζονται με το προϊόν.
5. **Χρήση στον Τομέα:** Συμμόρφωση του προϊόντος και η κατάστασή του μετά την παράδοσή του στον πελάτη.

Ο Juran, όπως και ο Deming, θεωρεί ότι τα περισσότερα προβλήματα ποιότητας οφείλονται στη διοίκηση και όχι στους εργαζομένους. Η ανώτερη διοίκηση χρειάζεται εκπαίδευση στην ποιότητα όσο και στις οικονομικές πτυχές. Η προσέγγιση προς την ποιότητα πρέπει να είναι διακομματική, κάτι που η ανώτερη διοίκηση μπορεί να εξασφαλίσει. Όπως ο Deming, έτσι και ο Juran αντιτίθεται στις "εκστρατείες" προτροπής και κινητοποίησης για την επίτευξη της "τέλειας εργασίας" ή του "μηδενικού ελαττώματος", καθώς μια τέτοια προσέγγιση δεν είναι ρεαλιστική ή εφικτή και αποτυγχάνει να θέσει συγκεκριμένους στόχους. Προτείνει τους κύκλους ποιότητας ως έναν τρόπο

προώθησης της βελτίωσης της ποιότητας και της βελτίωσης της επικοινωνίας μεταξύ διοίκησης και υπαλλήλων.

2.3 CROSBY

Ο Crosby έχει ως στόχο να αλλάξει τις αντιλήψεις και τις στάσεις της ανώτερης διοίκησης σχετικά με την ποιότητα. Ορίζει την ποιότητα ως "συμμόρφωση με τις απαιτήσεις", μια ορισμένη από την προσφορά, κάνοντας έτσι την ποιότητα διαχειρίσιμη και μετρήσιμη. Οι απαιτήσεις ενός προϊόντος πρέπει να ορίζονται και να προσδιορίζονται με σαφήνεια ώστε να κατανοούνται σωστά. Η ποιότητα μετριέται από το κόστος της ποιότητας. Αυτός ο ορισμός τον ορίζει ως το "έξοδο της μη συμμόρφωσης, το κόστος του να κάνεις πράγματα λάθος. Ο στόχος είναι το μηδενικό ελάττωμα, αυτό απαιτεί έμφαση στην πρόληψη αντί του ελέγχου μετά την παραγωγή, η διαφορά μεταξύ διασφάλισης ποιότητας και ελέγχου ποιότητας.

Η συνολική πρόοδος στην οργάνωση μπορεί να αξιολογηθεί χρησιμοποιώντας ένα πλέγμα ωριμότητας διαχείρισης ποιότητας. Αυτό ορίζει πέντε στάδια ανάπτυξης προς μια πλήρως ώριμη προσέγγιση διαχείρισης ποιότητας, ξεκινώντας από την αβεβαιότητα, στη συνέχεια την επαγρύπνηση, την διαφώτιση, τη σοφία και, τέλος, τη βεβαιότητα. Αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αξιολογηθεί η πρόοδος σε αρκετές "κατηγορίες μέτρησης". Το πλέγμα ωριμότητας διαχείρισης ποιότητας και τα μέτρα κόστους ποιότητας είναι τα δύο κύρια εργαλεία για τη διοίκηση για να αξιολογήσουν το βαθμό σοβαρότητας των προβλημάτων ποιότητας τους. Αφού οι εταιρείες τοποθετηθούν στο πλέγμα, ο Crosby προσφέρει ένα πρόγραμμα 14 βημάτων για τη βελτίωση της ποιότητας. Τα 14 βήματα του Crosby υπογραμμίζουν ιδιαίτερα τη δέσμευση της διοίκησης, μια συμμετοχική οργανωτική κουλτούρα για την ανάπτυξη ευαισθητοποίησης και δράσης για την ποιότητα σε ολόκληρη την οργάνωση, έμφαση στην πρόληψη των ελαττωμάτων αντί του ελέγχου μετά το γεγονός και τη συνεχή φύση της διαδικασίας βελτίωσης της ποιότητας.

2.4 FEIGENBAUM

Ο Feigenbaum ορίζει την ποιότητα ως τα "συνολικά χαρακτηριστικά προϊόντος και της υπηρεσίας του μάρκετινγκ, της κατασκευής, της συντήρησης και της μηχανικής, μέσω των οποίων το προϊόν και η υπηρεσία σε χρήση θα ικανοποιήσουν τις προσδοκίες του πελάτη". Αυτός ο ορισμός αναγνωρίζει ότι η ποιότητα είναι ένα πολυδιάστατο φαινόμενο και υπάρχουν ανταλλαγές μεταξύ διαφόρων μεμονωμένων χαρακτηριστικών ποιότητας. Υποστηρίζει ότι η ποιότητα του προϊόντος/υπηρεσίας είναι δυναμική φύση επειδή οι προσδοκίες των πελατών υπόκεινται σε αλλαγές. Έτσι, είναι απαραίτητο για τη διοίκηση να αναγνωρίζει ότι η ισορροπία μεταξύ διαφόρων μεμονωμένων χαρακτηριστικών ποιότητας υπόκειται σε προσωρινές μεταβολές. Επιπλέον, η ποιότητα δεν μπορεί να διαχωριστεί από το κόστος του προϊόντος.

Ο Feigenbaum αναφέρει ότι η συνολική διαχείριση της ποιότητας (TQM) καλύπτει την πλήρη έκταση του "κύκλου ζωής" του προϊόντος και της υπηρεσίας από τη σύλληψη του προϊόντος έως την παραγωγή και την εξυπηρέτηση του πελάτη. Η αλυσίδα ποιότητα ξεκινά με την ταυτοποίηση όλων των απαιτήσεων των πελατών και τελειώνει μόνο όταν το προϊόν ή η υπηρεσία παραδίδεται στον πελάτη ο οποίος παραμένει ικανοποιημένος.

2.5 TAGUCHI

Ο Taguchi ορίζει την ποιότητα ως την "απώλεια που μεταφέρεται στην κοινωνία από τη στιγμή που ένα προϊόν αποστέλλεται". Παραδείγματα απώλειας περιλαμβάνουν:

- a) αποτυχία να επιτευχθεί η ιδανική απόδοση·
- b) αποτυχία να πληροί τις απαιτήσεις του πελάτη·
- c) βλάβες· και
- d) επιβλαβείς παρενέργειες που προκαλούνται από τα προϊόντα.

Έτσι, όσο μικρότερη είναι η απώλεια, τόσο πιο επιθυμητό είναι το προϊόν. Ο στόχος του ελέγχου ποιότητας είναι η μείωση του συνολικού κόστους για την κοινωνία, και η λειτουργία του ελέγχου ποιότητας είναι να ανακαλύπτει και να εφαρμόζει καινοτόμες τεχνικές που παράγουν καθαρά κέρδη για την κοινωνία. Υπονοείται στη φιλοσοφία του Taguchi η πρόταση ότι "σε μια ανταγωνιστική οικονομία, η συνεχής βελτίωση της ποιότητας και η μείωση του κόστους είναι απαραίτητες για την επιβίωση στην επιχειρηματικότητα".

Τα βασικά στοιχεία των έννοιών ποιότητας του Taguchi περιγράφονται σύντομα παρακάτω.

- i. Η βελτίωση της ποιότητας θα πρέπει να επικεντρώνεται στη μείωση της διακύμανσης των κύριων χαρακτηριστικών απόδοσης του προϊόντος γύρω από τις τιμές στόχους τους.
- ii. Η απώλεια που υφίσταται ένας πελάτης λόγω της διακύμανσης της απόδοσης ενός προϊόντος είναι συχνά περίπου ανάλογη με το τετράγωνο της απόκλισης των χαρακτηριστικών απόδοσης από την τιμή στόχο.
- iii. Η ποιότητα του τελικού προϊόντος, όπως και το κόστος των κατασκευασμένων προϊόντων ορίζονται σε μεγάλο βαθμό από τον μηχανικό σχεδιασμό του προϊόντος και την διαδικασία κατασκευής.
- iv. Η διακύμανση της απόδοσης ενός προϊόντος ή διαδικασίας μπορεί να μειωθεί εκμεταλλευόμενος τα μη γραμμικά εφέ των παραμέτρων του προϊόντος ή της διαδικασίας στα χαρακτηριστικά απόδοσης.

2.6 ISHIKAWA

Ο Ishikawa ορίζει την ποιότητα ως την "ανάπτυξη, σχεδίαση, παραγωγή και υπηρεσία ενός προϊόντος που είναι πιο οικονομικό, πιο χρήσιμο και πάντα ικανοποιητικό για τον καταναλωτή". Υποστηρίζει ότι ο έλεγχος ποιότητας εκτείνεται πέρα από το προϊόν και περιλαμβάνει την μεταπωλητική εξυπηρέτηση, την ποιότητα της διοίκησης, την ποιότητα των ατόμων και την ίδια την εταιρεία. Σε αυτή την έννοια, υπάρχει ισχυρή ομοιότητα μεταξύ της άποψής του και αυτών των Feigenbaum και Groocock. Ο Ishikawa υποστηρίζει ανεπιφύλακτα την χρήση των "κύκλων ποιότητας". Στο έργο του, όπως και όλοι οι άλλοι guru, τονίζει τη σημασία της εκπαίδευσης. Δηλώνει ότι η ποιότητα ξεκινά και τελειώνει με την εκπαίδευση. [5–12]

3 ΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΑ

3.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

Η εμφάνιση είναι ένα ορατό χαρακτηριστικό και περιλαμβάνει:

- **Φυσική κατάσταση**

η περιγραφή βασίζεται στην οπτική παρατήρηση από τον αναλυτή. Τα βιοφάρμακα είναι είτε στερεά, υγρά ή κατεψυγμένα υγρά.

- **Χρώμα**

η περιγραφή βασίζεται στην οπτική παρατήρηση από τον αναλυτή, μερικές φορές χρησιμοποιώντας ποιοτική ορατή σύγκριση με Πρότυπα Διαλύματα Χρώματος. Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες και τα μονοκλωνικά αντισώματα, εάν είναι λυοφιλοποιημένα, παίρνουν το χρώμα των συστατικών όγκου (που συνήθως είναι η σουκρόζη) στη σύνθεση (δηλαδή, συνήθως 'λευκό έως υπόλευκο'). Αν είναι υδατικά διαλύματα, αυτά τα βιοφάρμακα περιγράφονται συνήθως οπτικά ως 'άχρωμα' ή 'άχρωμα έως αχνά κίτρινα' (ή αν μετρηθούν ποιοτικά ως 'όχι περισσότερο από' ή 'μεταξύ' αριθμημένων Πρότυπων Διαλυμάτων αυξανόμενης ρωματικής έντασης). Τα κατεψυγμένα υγρά ή υδατικά διαλύματα γενετικά τροποποιημένων ιών περιγράφονται οπτικά ως 'άχρωμα'. Τα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα, λόγω του επιπέδου υπολειπόμενων μη Τ-κυττάρων, μπορούν να περιγραφούν οπτικά με χρώμα από λευκό έως πορτοκαλί έως κόκκινο.

- **Διαύγεια**

και πάλι η περιγραφή βασίζεται στην οπτική παρατήρηση από τον αναλυτή. Τα διαλύματα ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, μονοκλωνικών αντισωμάτων και γενετικά τροποποιημένων ιών περιγράφονται συνήθως οπτικά ως 'διαυγή' ή 'διαυγή με παρουσία πρωτεϊνικών σωματιδίων' (ή αν μετρηθούν ημι-ποσοτικά ως 'όχι περισσότερο από' ή 'μεταξύ' αριθμημένων Πρότυπων Αναρτημάτων αυξανόμενης θολότητας). Τα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα περιγράφονται οπτικά ως 'παρουσία συσσωματωμάτων'.

Για όλα τα ενέσιμα φαρμακευτικά προϊόντα, όταν η οπτική μέτρηση της διαύγειας περιλαμβάνει την παρουσία ορατών ουσιών («σωματιδίων»), αυτό εγείρει ένα σημαντικό ζήτημα ασφάλειας για τον ασθενή.

Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες αυτών των ορατών σωματιδίων:

- **Εξωγενή:** Αυτά είναι ορατά ξένα σωματίδια ρύπων που προέρχονται από έξω από τη διαδικασία παραγωγής. Μπορεί να προέρχονται από το περιβάλλον, τον εξοπλισμό διαδικασίας, την κύρια συσκευασία ή το προσωπικό (π.χ., ίνες, νιφάδες μπογιάς, μέρη εντόμων, ανθρώπινα μαλλιά κ.λπ.). Αυτά τα σωματίδια θεωρούνται νοθεία.

- **Ενδογενή:** Αυτά είναι ορατά σωματίδια που δημιουργούνται εντός της διαδικασίας παραγωγής. Μπορεί να προέρχονται είτε από τη διαδικασία παραγωγής (π.χ., σταγόνες σιλικονούχου ελαίου), είτε από τη σύνθεση ή από αλληλεπιδράσεις μεταξύ της σύνθεσης και της κύριας συσκευασίας που σχετίζονται με τη διαδικασία (π.χ., θραύσματα αποσάθρωσης γυάλινης φιάλης, σωματίδια αποσύνθεσης από το ελαστικό πώμα, σωματίδια λιπαρών οξέων από αποσύνθεση πολυσορβικών) ή από τη φύση του προϊόντος (π.χ., συσσωμάτωση πρωτεϊνών, συσσώρευση κυττάρων). Τα ενδογενή σωματίδια επίσης μπορούν να αυξηθούν με την πάροδο του χρόνου κατά τη διάρκεια ζωής του προϊόντος.[13]

3.2 ΣΥΓΚΡΙΣΗ

Τα βιοφάρμακα ορίζονται ως «φαρμακευτικά προϊόντα που αποτελούνται από (γλυκο)πρωτεΐνες και/ή νουκλεϊκά οξέα. Η κύρια διαφορά μεταξύ των βιοφαρμάκων και των φαρμακευτικών προϊόντων έγκειται στη διαδικασία παραγωγής τους. Τα πρώτα είναι βιολογικής προέλευσης και παράγονται από τα κυτταρικά σώματα μικροοργανισμών, φυτών, ζώων, θηλαστικών και εντόμων με τη χρήση βιοτεχνολογικών μεθόδων (εφαρμογή γενετικής μηχανικής). Σε γενικές γραμμές, η παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων διαρκεί περίπου 10-15 χρόνια από την αρχική ανακάλυψη έως την εισαγωγή στην αγορά και η επένδυση κεφαλαίου είναι δαπανηρή. Η μέση επένδυση κεφαλαίου στην έρευνα και ανάπτυξη βιολογικών φαρμάκων εκτιμάται σε περίπου 2,6 δισεκατομμύρια δολάρια.

Τα βιολογικά φάρμακα περιλαμβάνουν εμβόλια, αίμα, συστατικά αίματος, νουκλεϊκά οξέα, αλλεργιογόνα, σωματικά κύτταρα, συνδυασμούς πρωτεϊνών και ζωντανά κύτταρα που χρησιμοποιούνται στην κυτταρική θεραπεία. Τα βιολογικά φάρμακα αποτελούνται από σάκχαρα, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και σύνθετους συνδυασμούς αυτών των ουσιών. Οι πρωτεΐνες που λείπουν ή απουσιάζουν λόγω γενετικών ανωμαλιών ή ανοσολογικών επιπλοκών αντικαθίστανται με γενετική μηχανική χρησιμοποιώντας κατάλληλες και συμβατές ξένες πρωτεΐνες.

Τα φάρμακα βασίζονται σε χημικά συνθετικά θεραπευτικά μόρια. Αρχικά, τα φάρμακα εξήχθησαν από φαρμακευτικά φυτά, αλλά με την πάροδο του χρόνου αναπτύχθηκαν μέθοδοι χημικής σύνθεσης. Χρησιμοποιούνται για περιορισμένο χρονικό διάστημα ή για μακροπρόθεσμη χρήση για τη θεραπεία χρόνιων ασθενειών. Τα χημικά συνθετικά φάρμακα είναι μικρότερα σε μέγεθος με 20–100 άτομα (όπως η ασπιρίνη), ενώ τα μικρά βιολογικά φάρμακα όπως το Herceptin έχουν 200–3000 άτομα και τα μεγαλύτερα βιολογικά φάρμακα, όπως οι ορμόνες και τα αντισώματα, αποτελούνται από 5.000 έως 50.000 άτομα. Τα φαρμακευτικά φάρμακα λόγω του μικρότερου μεγέθους τους λαμβάνονται δια στόματος και μεταφέρονται εύκολα στα αιμοφόρα αγγεία. Αλλά, τα βιοφάρμακα λόγω του σημαντικά μεγαλύτερου μεγέθους τους χορηγούνται με ένεση στο αίμα.

Λόγω του μικρότερου μεγέθους, τα (φαρμακευτικά) φάρμακα είναι εύκολα να καθαριστούν, να κρυσταλλωθούν και να χαρακτηριστούν. Ωστόσο, η διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού των πιο μεγάλων σε μέγεθος πολύπλοκων βιολογικών φαρμάκων απαιτεί πολλά μηχανικά εργαλεία και τεχνικές. Η θεραπευτική επίδραση ενός βιολογικού φαρμάκου εξαρτάται από τη διαδικασία παραγωγής και τη δομική οργάνωση. [14,15]

Τα βιοφάρμακα είναι πολύπλοκα προϊόντα. Τα μόρια είναι μεγάλα και έχουν δευτερογενείς, τριτογενείς και μερικές φορές τεταρτογενείς δομές. Γενικά, η δομή υψηλότερης τάξης του βιοφαρμάκου δεν μπορεί να αξιολογηθεί επαρκώς μόνο με

φυσικοχημικές μεθόδους, επομένως απαιτείται τουλάχιστον μία ή περισσότερες βιολογικές δοκιμές για να συμπληρώσουν τις φυσικοχημικές αναλύσεις. Σε περισσότερες περιπτώσεις, απαιτείται τουλάχιστον μία "λειτουργική" βιολογική δοκιμή, δηλαδή μια δοκιμή όπου ενεργοποιείται μια βιολογική αντίδραση σε ένα βιολογικό σύστημα δοκιμής. Επιπλέον, η δέσμευση του προϊόντος σε συγκεκριμένους υποδοχείς και οι ανοσοαναλύσεις συνήθως περιλαμβάνονται στον έλεγχο ποιότητας.

Ιστορικά, τα βιολογικά φαρμακευτικά προϊόντα προέρχονται από φυσικές πηγές και συχνά ο θεραπευτικός παράγοντας ήταν δύσκολο να χαρακτηριστεί λεπτομερώς με διαθέσιμες αναλυτικές μεθόδους. Ωστόσο, έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στις δυνατότητες καθαρισμού των βιοφαρμάκων και μια άνοδος στη διαθεσιμότητα εξελιγμένων και αξιόπιστων αναλυτικών οργάνων, καθώς και εκτεταμένων και ευαίσθητων χρωματογραφικών, ανοσολογικών και φασματομετρικών μεθόδων ανάλυσης προϊόντος. Αυτές οι εξελίξεις συνεχίζουν να ωθούν τον ορισμό του "καλά χαρακτηρισμένου" για τα βιοφάρμακα. Ο χαρακτηρισμός προϊόντος όχι μόνο παρέχει μια ολοκληρωμένη κατανόηση των ιδιοτήτων του μορίου, αλλά καθοδηγεί επίσης το πρόγραμμα ποιότητας στην επιλογή των κατάλληλων μεθόδων δοκιμής που θα χρησιμοποιηθούν για την απελευθέρωση του προϊόντος και την παρακολούθηση της σταθερότητας. Σαφώς, αυτές οι ιδιότητες του μορίου που οδηγούν σε ετερογένεια, απώλεια ισχύος ή αλλαγή με την πάροδο του χρόνου πρέπει να αξιολογηθούν κατά την απελευθέρωση των παρτίδων προϊόντος. Οι προδιαγραφές θα πρέπει να επιλέγονται για να επιβεβαιώνουν, αντί να καθιερώνουν, τη μοριακή δομή και θα πρέπει να επικεντρώνονται σε εκείνα τα χαρακτηριστικά του προϊόντος που κρίνονται χρήσιμα για τη διασφάλιση της ασφάλειας και της κλινικής χρησιμότητας του βιοφαρμάκου.[16]

Η καθαρότητα του δραστικού συστατικού σε ένα φαρμακευτικό φάρμακο και η σύνθεση του τελικού προϊόντος μπορούν να επαληθευτούν σχετικά εύκολα. Οι εξαιρετικά καθαρές χημικές ουσίες από διάφορες πηγές, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που αποτελούνται από ένα μείγμα ισομερών, μπορούν γενικά να θεωρηθούν παρόμοιες ή ακόμη και πανομοιότυπες για πρακτικούς σκοπούς. Η κατάσταση είναι διαφορετική για τα βιοφάρμακα. Εξαιτίας των βιολογικών διαφορών μεταξύ των συστημάτων έκφρασης και των συνθηκών της εφαρμοζόμενης διαδικασίας παραγωγής, μπορεί να εμφανιστεί ένας ορισμένος βαθμός μεταβλητότητας, ακόμη και μεταξύ διαφορετικών παρτίδων του ίδιου προϊόντος. Επομένως, οι παραλλαγές από παρτίδα σε παρτίδα πρέπει να παρακολουθούνται για να διασφαλίζεται η συμμόρφωση εντός ενός συγκεκριμένου εύρους. Οι ιδιότητες των δραστικών φαρμακευτικών συστατικών στα βιοφάρμακαϊόντα, εκτός από την κύρια δομή τους (π.χ. την αλληλουχία αμινοξέων), εξαρτώνται σημαντικά από τη μέθοδο παρασκευής. Για το λόγο αυτό, θεωρείται ότι «η διαδικασία ορίζει το προϊόν» για τα βιοφάρμακαϊόντα.

Επίσης τα βιοφάρμακα έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην αποικοδόμηση στο πεπτικό σύστημα και περιορισμένη διεισδυτικότητα μέσω του εντερικού επιθηλίου. Ως αποτέλεσμα, συνήθως χορηγούνται παρεντερικά μέσω ένεσης και όχι από το στόμα. Τα βιοφάρμακαϊόντα απαιτούν επίσης πολύπλοκα συστήματα σταθεροποίησης λόγω της ευαισθησίας τους στη θερμοκρασία[17,18]

3.3 ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

Οι πρώτες θεραπείες βιοφαρμάκων μπορούν να θεωρηθούν ότι αναπτύχθηκαν στα τέλη του 19ου αιώνα, με την ανάπτυξη των πρώτων εμβολίων και την ασφαλή διεξαγωγή, επαναλαμβανόμενων μεταγγίσεων αίματος. Στις αρχές του 20ού αιώνα έγινε η ανακάλυψη και εφαρμογή προϊόντων όπως η ινσουλίνη, ένα από τα πιο σημαντικά γεγονότα στην ιστορία της ανακάλυψης φαρμάκων, προερχόμενη από πηγές ζώων, όπου υπήρχε και ο κίνδυνος αλλεργικών αντιδράσεων κατά την θεραπεία. Ο Φρέντερικ Μπάντινγκ και οι επιστήμονές του απομόνωσαν την ινσουλίνη από την παγκρεατική εκχύλιση σκύλων. Στη συνέχεια, το 1922 επετεύχθη ο πρώτος κλινικός επιτυχής πειραματισμός σε έναν 14χρονο αγόρι, που έπασχε από διαβήτη τύπου I.[14,19] Η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ινσουλίνη, η οποία εγκρίθηκε για θεραπευτικές χρήσεις και εμπορία στον άνθρωπο το 1982, αναμορφώνει την θεραπευτική προσέγγιση στον έλεγχο του σακχαρώδους διαβήτη. Αυτή η καινοτόμος ινσουλίνη, που προέκυψε από την τεχνολογία της γενετικής μηχανικής, αντιπροσωπεύει ένα ορόσημο στην ιστορία της ιατρικής, προσφέροντας βελτιωμένη διαχείριση του σακχαρώδους διαβήτη και καλύτερη ποιότητα ζωής σε εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως.[20,21]

Το δεύτερο μεγαλύτερο θαύμα στη φαρμακευτική επιστήμη είναι η παραγωγή πενικιλίνης από το *Penicillium notatum* από τον Αλεξάντερ Φλέμινγκ, τη δεκαετία του 1940. Αυτό το θαύμα φάρμακο παράγεται μέσω διαδικασίας ζύμωσης χρησιμοποιώντας το *Penicillium notatum* ως βιοκαταλυτικό παράγοντα. Αυτό το αντιβιοτικό β-λακτάμης (βLA) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά κατά λοιμώξεων που προκαλούνται από το *Staphylococcus* και άλλα βακτήρια. Η πενικιλίνη χρησιμοποιείται διαρκώς ως δημοφιλές φαρμακευτικό προϊόν για τον έλεγχο ευρέως φάσματος λοιμώξεων που προκαλούνται από βακτήρια και μύκητες. Αυτές οι υψηλά αξιοπρόσεκτες ανακαλύψεις έθεσαν τις βάσεις της βιομηχανίας βιοφαρμάκων στις αρχές του 19^{ου} αιώνα. Τα ευρήματα της δεκαετίας του 1950 ότι το DNA είναι το μόριο που κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες, οι οποίες ελέγχουν όλες τις κυτταρικές διεργασίες μέσα στον οργανισμό, έδωσαν ώθηση στην εποχή της βιοτεχνολογίας. Αυτό οδήγησε στην εμφάνιση της τεχνολογίας ανασυνδιασμένου DNA και της τεχνολογίας υβριδισμού στη δεκαετία του 1970, η οποία σηματοδότησε τη γέννηση της σύγχρονης ανάπτυξης της βιοφαρμακοβιομηχανίας. Όσον αφορά στην ανακάλυψη και την ανάπτυξη φαρμάκων, αυτό είναι ένα σημαντικό ορόσημο, καθώς κάποια μόρια είναι πολύπλοκα και δύσκολα να εξαχθούν και να καθαριστούν από ζωντανό οργανισμό, ή να συντεθούν χημικά. Η γενετική μηχανική παρέχει εναλλακτικά μέσα για την παραγωγή θεραπευτικών πρωτεϊνών μέσω της χρήσης βακτηρίων, μυκήτων, εντόμων, ζώων και φυτικών κυττάρων. Η παραγωγή βιοφαρμάκων μέσω των ανασυνδιασμένων τεχνολογιών οδήγησε σε νέα, καινοτόμα προϊόντα, καθώς και σε σημαντική βελτίωση της ποιότητας και της απόδοσης των υπαρχόντων προϊόντων. Είναι καλύτερα ορισμένα, με συνεπή ποιότητα και είναι απαλλαγμένα από μολυσματικούς παράγοντες λόγω των αυστηρών οδηγιών cGMP. [14,19]

Δύο ανακαλύψεις, που και οι δύο συνέβησαν στα μέσα της δεκαετίας του 1970, ξεπέρασαν τελικά τέτοιες δυσκολίες: η τεχνολογία υβριδώματος (η οποία διευκολύνει τη μεγάλης κλίμακας παραγωγή μονοκλωνικού αντισώματος που αναπτύσσεται εναντίον σχεδόν οποιουδήποτε αντιγόνου επιλογής) και η γενετική μηχανική (που διευκολύνει τη μεγάλης κλίμακας παραγωγή σχεδόν οποιαδήποτε πρωτεΐνη αφού προσδιοριστεί η αλληλουχία αμινοξέων της). Αυτές οι ανακαλύψεις οδήγησαν στην ίδρυση δεκάδων εταιρειών

βιοτεχνολογίας αφιερωμένες στην παραγωγή θεραπευτικών πρωτεϊνών με τέτοια μέσα. Στις αρχές της δεκαετίας του 1980. Η τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA είχε τριπλό αντίκτυπο στην παραγωγή θεραπευτικών πρωτεϊνών. Όχι μόνο έχει ξεπεράσει προβλήματα που σχετίζονται με τη διαθεσιμότητα της πηγής και την ασφάλεια των προϊόντων, αλλά έχει επίσης διευκολύνει την ανάπτυξη τροποποιημένων πρωτεϊνικών φαρμάκων μέσω της μηχανικής πρωτεϊνών. Τα προβλήματα διαθεσιμότητας της πηγής σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με την παραγωγή χαμηλού επιπέδου από την εγγενή πηγή. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ωστόσο, η διαθεσιμότητα περιπλέκεται περαιτέρω καθώς η συλλογή από την εγγενή πηγή είναι δύσκολη, μη ελκυστική ή ακόμη και εντελώς επικίνδυνη.

Κατά την δεκαετία του 1980, η βιομηχανία χρησιμοποιούσε τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA απλώς για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων θεραπευτικών πρωτεϊνών που εμφανίζουν μια αλληλουχία αμινοξέων πανομοιότυπη με τη φυσική πρωτεΐνη. Τεχνικές όπως η κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση επέτρεψαν την παραγωγή πρωτεϊνών αλλαγμένης αλληλουχίας αμινοξέων και από τα τέλη της δεκαετίας του 80' και μετά, οι επιστήμονες άρχισαν να αναπτύσσουν και να αξιολογούν τέτοιες τροποποιημένες πρωτεΐνες. Αρκετά τέτοια προϊόντα έχουν στη συνέχεια κέρδισε ρυθμιστική έγκριση, πολλές στο δεύτερο μισό της δεκαετίας του 1990[22]

3.4 ΕΙΔΗ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

Τα βιοφάρμακαϊόντα αναπτύσσονται για την καταπολέμηση του καρκίνου, των ιογενών λοιμώξεων, του διαβήτη, της ηπατίτιδας και της σκλήρυνσης κατά πλάκας και αυτά μπορούν να ομαδοποιηθούν σε διάφορες κατηγορίες

3.4.1 ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ

Οι κυτοκίνες είναι μικρές εκκρινόμενες πρωτεΐνες που επιτρέπουν την επικοινωνία μέσω υποδοχέα μεταξύ των κυττάρων και δρουν ως βασικοί ρυθμιστές των ανοσολογικών αποκρίσεων ελέγχοντας την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την ενεργοποίηση διαφόρων τύπων κυττάρων. Έχουν εντοπιστεί εκατοντάδες κυτοκίνες και ορισμένες από αυτές τις πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται επί του παρόντος σε θεραπευτικά προϊόντα, κυρίως για τη θεραπεία του καρκίνου, των αυτοάνοσων και ιογενών ασθενειών. Η ιντερφερόνη είναι ισχυρή γλυκοπρωτεΐνη κυτοκίνη που δρα κατά των ιών και του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Οι ιντερλευκίνες λειτουργούν ως αγγελιοφόροι για διάφορα στάδια στη διαδικασία του ανοσοποιητικού. [23,24]

3.4.2 ΈΝΖΥΜΑ

Πρόκειται για σύνθετες πρωτεΐνες που προκαλούν μια συγκεκριμένη χημική αλλαγή σε άλλες ουσίες χωρίς να αλλάζουν οι ίδιες. Η βασική αρχή πίσω από τα ενζυμικά βιοφάρμακα είναι η αντικατάσταση ή η ενίσχυση της λειτουργίας των ελλειπών ή δυσλειτουργικών ενζύμων. Για παράδειγμα η Αλγλυκοσιδάση άλφα, χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της νόσου Pompe, μια κληρονομική διαταραχή που προκαλείται από την έλλειψη του ενζύμου όξινη αλφα-γλυκοσιδάση. Ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση των πολυμερών γλυκογόνου για τη γλυκόζη του όξινου περιβάλλοντος των λυσοσωμάτων.[23,25]

3.4.3 ΟΡΜΟΝΕΣ

Οι ορμόνες είναι βιολογικά δραστικές ουσίες που παράγονται από ενδοκρινείς αδένες και εκκρίνονται στην κυκλοφορία του αίματος για να ρυθμίσουν διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες και λειτουργίες σε μακρινά όργανα-στόχους. Παίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού, της ανάπτυξης, της αναπαραγωγής και άλλων ζωτικών λειτουργιών του σώματος.

Ο αρχικός ορισμός του Starling για μια ορμόνη το 1905 ήταν: «Η ορμόνη είναι μια ουσία που παράγεται από αδένες με εσωτερική έκκριση και χρησιμεύει για τη μεταφορά σημάτων μέσω του αίματος στα όργανα-στόχους». Σήμερα, αν και αυτός ο ορισμός θεωρείται ελλιπής, παραμένει σημαντικός. Οι σύγχρονοι ορισμοί προσπαθούν να αποτυπώσουν την πλήρη έννοια των ορμονών, αναγνωρίζοντας τη δυσκολία διαχωρισμού τους από άλλα μόρια σηματοδότησης, όπως οι κυτοκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες.[23,26]

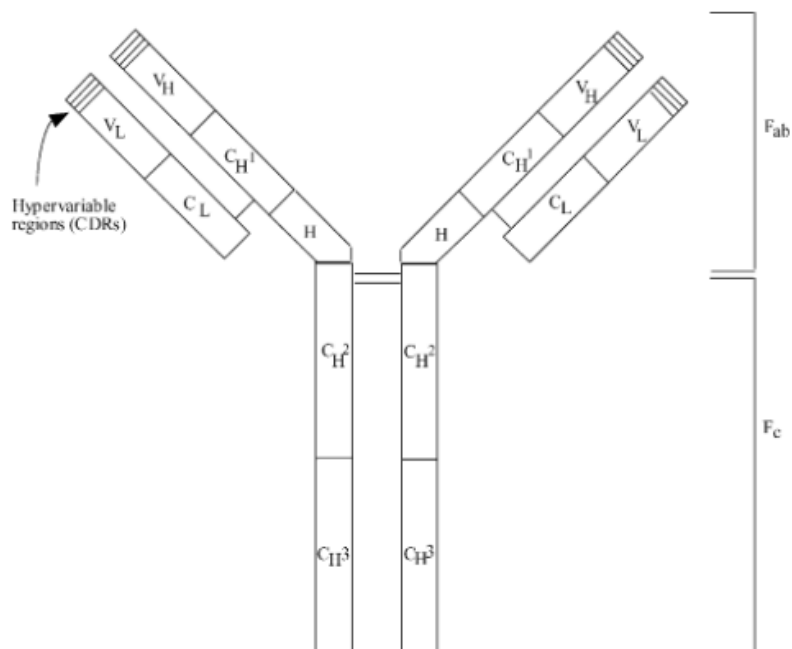
3.4.4 ΕΜΒΟΛΙΑ

Πρόκειται για μικροοργανισμούς ή υπομονάδες μικροοργανισμών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την τόνωση της αντίστασης σε έναν άνθρωπο σε συγκεκριμένες ασθένειες καθώς και για την τόνωση της ανοσοαπόκρισης. Οποιοδήποτε εμβόλιο μπορεί να ταξινομηθεί ως βιοφαρμάκωνβιοφάρμακο εάν χρησιμοποιούνται μέθοδοι μοριακής βιολογίας στην ανάπτυξή του. Ένα παράδειγμα θα μπορούσε να είναι τα ζωντανά εξασθενημένα εμβόλια όπου χρησιμοποιήθηκε τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA για την αλλαγή του γονιδιώματος του παθογόνου. Μια άλλη ομάδα εμβολίων που μπορούν να ταξινομηθούν ως βιοφάρμακα είναι εμβόλια υπομονάδας, τα οποία βασίζονται σε ειδικά, εξαιρετικά καθαρισμένα ανασυνδυασμένα πρωτεϊνικά αντιγόνα. Τα εμβόλια υπομονάδας περιέχουν μόνο καθορισμένα αντιγόνα αντί για ολόκληρα παθογόνα και ως εκ τούτου, η εφαρμογή τους δεν ενέχει τον κίνδυνο μόλυνσης. Ακόμη είναι τα εμβόλια επόμενης γενιάς, τα οποία αποτελούν τη βέλτιστη παρουσίαση του αντιγόνου στο ανοσοποιητικό σύστημα για την επίτευξη της επιθυμητής ανοσοαπόκρισης. Επίσης είναι τα συνθετικά εμβόλια, τα οποία αναπτύχθηκαν για να επιταχύνουν τη διαθεσιμότητα εμβολίων για μελλοντικές πανδημίες. Αυτή η τεχνολογία επιτρέπει την ταχεία δημιουργία ιών εμβολίων από δεδομένα αλληλουχίας. [17,23]

3.4.5 ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) είναι η μεγαλύτερη κατηγορία βιοφαρμάκων και χρησιμοποιούνται επί του παρόντος σε θεραπείες για καρκίνο, φλεγμονώδεις ασθένειες, καρδιαγγειακές παθήσεις, μεταμοσχεύσεις οργάνων, λοιμώξεις, αναπνευστικές ασθένειες και οφθαλμολογικές παθήσεις. Εκτός από τη θεραπευτική χρήση των mAbs, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διαγνωστικούς σκοπούς (βιοχημική ανάλυση, διαγνωστική απεικόνιση) και καθαρισμό πρωτεΐνης. Τα mAbs είναι πολύ ισχυροί βιολογικοί παράγοντες για την αξιολόγηση διαφόρων διαγνωστικών προσδιορισμών [17,23,27]

Εικόνα 3.1: Δομή αντισωμάτων (ανοσοσφαιρίνη G, IgG) [28]



Τα μονοκλωνικά αντισώματα αποτελούνται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες. δύο βαριές αλυσίδες (H) (~50 kDa η καθεμία) και δύο ελαφριές αλυσίδες (L) (~25 kDa η καθεμία) συνδεδεμένες μέσω δισουλφιδικών δεσμών. Κάθε αλυσίδα περιέχει μια σταθερή (C) και μια μεταβλητή περιοχή (V) - ενώ η αλληλουχία διατηρείται σε μεγάλο βαθμό στη σταθερή περιοχή, ένα μοναδικό σύνολο αμινοξέων σχηματίζει τη μεταβλητή περιοχή με την υψηλότερη ποικιλομορφία αλληλουχίας στις περιοχές που καθορίζουν τη συμπληρωματικότητα (CDRs), οι οποίες προσδίδουν τα mAbs μοναδική εξειδίκευση αντιγόνου. Το θραύσμα δέσμευσης αντιγόνου (Fab) είναι η περιοχή του αντισώματος που είναι υπεύθυνο για τη δέσμευση αντιγόνου και η κρυσταλλοποιήσιμη περιοχή του θραύσματος (Fc) είναι υπεύθυνη για τις λειτουργίες τελεστή. Πρόσθετες κατασκευασμένες κατηγορίες βιοθεραπευτικών περιλαμβάνουν διειδικά μονοκλωνικά αντισώματα (bsAb) που αποτελούνται από θραύσματα από δύο διαφορετικά mAbs, π.χ. δύο διαφορετικές ελαφριές και βαριές αλυσίδες ή δύο διαφορετικές βαριές αλυσίδες και πανομοιότυπες ελαφριές αλυσίδες. Τα διειδικά επιτρέπουν τη στόχευση πολλαπλών αντιγόνων. Τα συζεύγματα αντισώματος-φαρμάκου (ADCs) αποτελούνται από ένα αντίσωμα ειδικό για ένα αντιγόνο, έναν σταθερό συνδέτη και ένα κυτταροτοξικό ωφέλιμο φορτίο και οι πρωτεΐνες σύντηξης Fc αποτελούνται από ένα θραύσμα Fc συνδεδεμένο με ένα πεπτίδιο ή ένα μη mAb[28,29]

3.4.6 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

Η κυτταρική θεραπεία περιγράφει τη διαδικασία εισαγωγής νέων κυττάρων στους ιστούς για τη θεραπεία μιας ασθένειας. Πολλές θεραπείες με βλαστοκύτταρα χρησιμοποιούνται συνήθως για τη θεραπεία ασθενειών σήμερα. Η πιο γνωστή θεραπεία με βλαστοκύτταρα μέχρι σήμερα είναι η μεταμόσχευση μυελού των οστών, η οποία χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της λευχαιμίας και άλλων τύπων καρκίνου, καθώς και για διάφορες αιματολογικές διαταραχές.[23]

3.5 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

Τα βιοφάρμακαϊόντα έχουν πολλαπλές κλινικές εφαρμογές και διάφορα πλεονεκτήματα για την ασθένεια : θεραπεία, πρόληψη και διάγνωση.

3.5.1 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Οι θεραπευτικοί τύποι βιοφαρμάκων κυρίως περιλαμβάνουν τη θεραπεία με ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, αντισωματική θεραπεία, κυτταρική θεραπεία και γονιδιακή θεραπεία. Αυτά τα προϊόντα έχουν τη δυνατότητα να αντιμετωπίζουν ή να θεραπεύουν ασθένειες με ασφάλεια και αποτελεσματικότητα, επιδεικνύοντας βιολογική δραστηριότητα και επηρεάζοντας την παθοφυσιολογία της νόσου. Σε σύγκριση με τα χημικά φάρμακα, τα βιοφάρμακαϊόντα είναι πιο πολύπλοκα στην παραγωγή, έχουν ποικίλους τρόπους χορήγησης και διαφορετική φαρμακοκινητική. Μεταξύ των πλεονεκτημάτων τους είναι η υψηλή εκλεκτικότητα και η χαμηλή μη ειδική τοξικότητα. Ωστόσο, τα μειονεκτήματα περιλαμβάνουν το υψηλό κόστος και την επαγωγή αντισωμάτων κατά των φαρμάκων, που μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη αποτελεσματικότητα ή ανεπάρκεια στη βιοασφάλεια. Η θεραπεία μπορεί να βελτιστοποιηθεί μέσω της ανάπτυξης εφαρμογών δοσολογίας και πολλαπλών οδών διαχείρισης. Επιπλέον, με τη χρήση βιοομοιοποίησης, το κόστος μπορεί να μειωθεί.

Η χρήση βιομορίων, όπως πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα, ως βιοφαρμακευτικοί παράγοντες έχει αυξηθεί πρόσφατα, ειδικά στη θεραπεία του καρκίνου και γενετικών διαταραχών. Επιπλέον, η ταυτοποίηση μορίων έναντι οποιωνδήποτε στόχων αντιπροσωπεύει ένα νέο παράθυρο για την ανακάλυψη φαρμάκων και τη θεραπεία ασθενειών στην ιατρική.

3.5.2 ΠΡΟΛΗΨΗ

Τα εμβόλια αποτελούν τον πυρήνα της πρόληψης μολυσματικών ασθενειών. Συνήθως περιέχουν έναν βιολογικό παράγοντα που μιμείται το παθογόνο, κατασκευασμένο από αδρανοποιημένα μικρόβια, ζωντανά αλλά εξασθενημένα μικρόβια, τοξίνες ή μέρη από τα επιφανειακά αντιγόνα τους. Ο εμβολιασμός έχει σημαντικά μειώσει τον αριθμό πολλών

μολυσματικών ασθενειών, όπως η ιλαρά, ο τέτανος και η πολιομυελίτιδα, ενώ άλλες ακόμη έχουν ακόμη και εξαφανιστεί, όπως η ευλογιά.

Ωστόσο, η επιβάρυνση των μη μολυσματικών ασθενειών, όπως οι καρκίνοι, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, οι μεταβολικές ασθένειες και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, αυξάνεται σημαντικά. Επί του παρόντος, ορισμένα εμβόλια εφαρμόζονται με επιτυχία για την πρόληψη του καρκίνου. Για παράδειγμα, το εμβόλιο κατά του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) έχει εγκριθεί για την πρόληψη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Η εξέλιξη αυτή αντιπροσωπεύει μια σημαντική πρόοδο στον τομέα της ιατρικής και της δημόσιας υγείας.

3.5.3 ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Πέρα από τη θεραπευτική χρήση και την πρόληψη ασθενειών, ορισμένα βιοφάρμακα έχουν σημαντικές εφαρμογές στη διάγνωση ασθενειών. Για παράδειγμα, τα μονόκλωνά αντισώματα χρησιμοποιούνται επιτυχώς στη διάγνωση ορισμένων καρκίνων και μολυσματικών ασθενειών, με την έρευνα να προχωρά περαιτέρω σε αυτόν τον τομέα. Όταν παράγονται μονοκλωνικά αντισώματα που αντιδρούν με μια συγκεκριμένη ουσία, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση της παρουσίας αυτής της ουσίας στον οργανισμό. Είναι επίσης χρήσιμα στην ανοσοιστοχημεία για την ανίχνευση αντιγόνων σε ιστολογικά ή κυτταρικά δείγματα μέσω δοκιμών ανοσοφθορισμού. Αυτές οι εφαρμογές αποτελούν σημαντική πρόοδο στον τομέα της διαγνωστικής ιατρικής.[21,23,30]

3.6 ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗ

Η γλυκοζυλίωση είναι μια βιοχημική διαδικασία με την οποία γλυκάνες (σάκχαρα) προστίθενται σε πρωτεΐνες, λιπίδια και άλλα οργανικά μόρια, είναι μία από τις δομικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν κατά την παραγωγή πολλών φαρμάκων με βάση τις πρωτεΐνες και μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στις φαρμακολογικές τους ιδιότητες. Η τροποποίηση αυτή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δομή και τη λειτουργία των πρωτεϊνών, επηρεάζοντας την αναγνώριση από άλλα μόρια, τη σταθερότητα των πρωτεϊνών, την αποικοδόμηση και τη σηματοδότηση.

Λόγω της δομικής μεταβλητότητας των βιολογικών φαρμάκων ως συνέπεια της διαδικασίας παρασκευής σε ζωντανά κύτταρα και της εγγενούς δομικής πολυπλοκότητάς τους, η αξιολόγηση της ποιότητας και ο έλεγχος έχουν κόστος. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (PTMs) κατά τη διάρκεια της παραγωγής βιοφαρμάκων συμβάλλουν σημαντικά στη δομική ποικιλία. Επιπλέον, ο χειρισμός και ο χαρακτηρισμός των PTMs είναι δύσκολος, αλλά πολύ σημαντικός, καθώς τα PTMs μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τις φυσικοχημικές και φαρμακολογικές ιδιότητες του θεραπευτικού. Υπάρχουν διάφοροι τύποι γλυκοζυλίωσης:

- N-γλυκοζυλίωση: μια αλυσίδα σακχάρου συνδέεται με το άζωτο της αμινομάδας ασπαραγίνης. Η σύνθεση N-γλυκάνης του IgG (και των mAbs) έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει την αποτελεσματικότητα επηρεάζοντας τη συγγένεια των υποδοχέων του.[31]
- O-γλυκοζυλίωση: σύνδεση της αλυσίδας σακχάρου στην υδροξυλομάδα σερίνης ή θρεονίνης. Η επίδραση της O-γλυκοζυλίωσης σε βιοφάρμακα είναι, όπως η ερυθροποιητίνη (EPO) ή οι παράγοντες πήξης του αίματος, έχει διερευνηθεί λιγότερο καλά λόγω πολλών

εμποδίων στην ανάλυση της Ο-γλυκάνης, αλλά η Ο-γλυκοζυλίωση αναμένεται επίσης να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην ποιότητα του φαρμάκου.[32]

Τα κύρια εμπόδια που οφείλονται στη γλυκοζυλίωση, τα οποία εμποδίζουν την παρασκευή βιολογικών φαρμάκων, προκύπτουν από τις ακόλουθες πτυχές.

- Περιπλοκότητα.

Οι γλυκάνες είναι οι ίδιες ολιγομερή και οι πρωτεΐνες μπορεί να φέρουν πολλές διαφορετικές γλυκάνες, προσθέτοντας στη δομική πολυπλοκότητα της συνολικής γλυκοπρωτεΐνης.

- Μικροετερογένεια.

Διαφορετικές θέσεις γλυκοζυλίωσης σε μια πρωτεΐνη μπορεί να φέρουν διαφορετικές γλυκάνες. Η ειδική για τη θέση γλυκοζυλίωση μπορεί να συμβάλει στη λειτουργική διακύμανση και να επηρεάσει την κλινική ασφάλεια και αποτελεσματικότητα.

- Μεταβλητότητα.

Οι συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας καθορίζουν εν μέρει τον φαινότυπο γλυκοζυλίωσης. Οι αλλαγές στα πρότυπα γλυκοζυλίωσης λόγω ασυνέπειας των συνθηκών παραγωγής είναι η κύρια πηγή μεταβλητότητας από παρτίδα σε παρτίδα.

Για την αντιμετώπιση αυτών των προκλήσεων, η βιομηχανία βιοφαρμάκων χρησιμοποιεί νέα αναλυτικά μέσα τεχνολογίες για τη βελτίωση του χαρακτηρισμού της γλυκοζυλίωσης κατά το σχεδιασμό και την παρασκευή του φαρμάκου. Αντίστοιχα, οι οδηγίες από υγειονομικούς φορείς, συμπεριλαμβανομένης της Υπηρεσίας Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ, της Ευρωπαϊκής Υπηρεσίας Αξιολόγησης Φαρμάκων και της Διεθνούς Διάσκεψης για την Εναρμόνιση, περιέχουν προδιαγραφές για τη γλυκοζυλίωση των φαρμάκων.[33]

Η ποιότητα από τον σχεδιασμό(Quality by Design - QbD) προσφέρει λύσεις. Στην πράξη, αυτό συνεπάγεται τον εντοπισμό, τον χαρακτηρισμό και τη βελτιστοποίηση των κρίσιμων χαρακτηριστικών ποιότητας της γλυκοζυλίωσης ξεκινώντας από τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του φαρμάκου έως την απελευθέρωση παρτίδας μετά την έγκριση.

Η QbD στην ανάπτυξη γλυκοπρωτεϊνών-φαρμάκων υποστηρίζεται από μια σειρά ορθογώνιων μεθόδων για δομική και ποσοτική ανάλυση γλυκοζυλίωσης. Στην πράξη, αυτά προέρχονται κυρίως από τρεις συμπληρωματικές αναλυτικές πλατφόρμες:

- φασματομετρία μάζας (MS).
- υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).
- τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (CE)[34]

4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Σε αντίθεση με τα συνθετικά φάρμακα, τα ενεργά φαρμακευτικά συστατικά στα βιοφάρμακαϊόντα περιλαμβάνουν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Επί του παρόντος, η συντριπτική πλειοψηφία των εμπορικά διαθέσιμων βιοφαρμάκων περιέχουν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ως δραστικό φαρμακευτικό συστατικό τους. Αυτές οι πρωτεΐνες παράγονται σε προκαρυωτικά συστήματα, κυρίως *Escherichia coli*, ή ευκαρυωτικά συστήματα που βασίζονται σε μύκητες (*Saccharomyces cerevisiae* και *Pichia pastoris*), κύτταρα θηλαστικών ή κυτταρικές σειρές εντόμων. Η χρήση συστημάτων έκφρασης χωρίς κύτταρα (συστήματα *in vitro*), τα οποία διευκολύνουν σε μεγάλο βαθμό την τροποποίηση των συνθηκών σύνθεσης, έχει επίσης μελετηθεί. Η παραγωγή βιοφαρμάκων σε καθένα από τα προαναφερθέντα συστήματα έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Για αυτούς τους λόγους, χρησιμοποιούνται πολλά διαφορετικά συστήματα έκφρασης με βάση τις ειδικές ιδιότητες μιας δεδομένης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.[17]

Η διασφάλιση ποιότητας (Quality Assurance - QA) και ο έλεγχος ποιότητας (Quality Control - QC) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διασφάλιση της συμμόρφωσης προς τις τρέχουσες καλές πρακτικές κατασκευής (GMP) και στην εξασφάλιση της συνέπειας, ποιότητας και ασφάλειας του παραγόμενου φαρμακευτικού προϊόντος. Πολλά συστήματα QA και QC είναι κοινά σε διάφορες διαδικασίες κατασκευής, όπως η χημική σύνθεση, η απομόνωση βιολογικών ουσιών από φυσικές πηγές, και η παραγωγή βιοφαρμάκων μέσω τεχνολογίας DNA. Όλες περιλαμβάνουν τον έλεγχο των πρώτων υλών και των συστατικών, την υποστήριξη εγκαταστάσεων, τον έλεγχο εγγραφών παρτίδας, τον έλεγχο διαδικασίας, τις δοκιμές προϊόντων, και ελεγκτικές επιθεωρήσεις.

Ο καθορισμός των ξεχωριστών ρόλων και ευθυνών της διασφάλισης ποιότητας (QA) και του ελέγχου ποιότητας (QC) δεν ήταν ποτέ εύκολος, ακόμα και σε 'παραδοσιακές' φαρμακευτικές εταιρείες. Μερικές εταιρείες έχουν ξεχωριστά τμήματα QA και QC, άλλες έχουν μόνο ένα τμήμα QA ή μόνο ένα τμήμα QC, ενώ άλλες αποφεύγουν τον καθορισμό εντελώς αποκτώντας απλώς ένα "Τμήμα Ποιότητας" ή ένα "Τμήμα Διαχείρισης Ποιότητας" ή ένα "Τμήμα Συστημάτων Ποιότητας". [16]

Τα βιοφάρμακαϊόντα είναι πολύπλοκα και για να διασφαλιστεί η συνέπειά τους από παρτίδα σε παρτίδα και η συνεχής ποιότητά τους, απαιτείται η χρήση μιας ποικίλων αναλυτικών δοκιμών που συμπληρώνουν η μία την άλλη. Σύμφωνα με τις οδηγίες, ορίζονται τα χαρακτηριστικά ποιότητας για διάφορες κατηγορίες προϊόντων που πρέπει να περιλαμβάνονται στις προδιαγραφές για την έκδοση του προϊόντος. Παρά την συνεχή ανάπτυξη πιο προηγμένων τεχνικών φυσικοχημικής ανάλυσης που βοηθούν στον καθορισμό της ταυτότητας, της ακεραιότητας και της καθαρότητας του προϊόντος, καθώς και της συνέπειας της διαδικασίας κατασκευής, τα αποτελέσματα αυτών των τεχνικών δεν είναι πάντα εύκολος ο συσχετισμός τους με τη βιολογική τους δραστηριότητα. Ως αποτέλεσμα, είναι συνήθως απαραίτητη η χρήση βιοδοκιμών στον ποιοτικό έλεγχο έτσι ώστε να καθοριστεί η δυνατότητα του προϊόντος.[35]

4.1 ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Το Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας (QMS) οργανώνεται γύρω από συνδεδεμένες διαδικασίες, οι οποίες εξασφαλίζουν τις απαιτήσεις των πελατών και των κανονισμών, καθώς και τη συνεχή βελτίωση των διεργασιών. Αυτά παρέχουν τη βάση για τις πολιτικές και τις διαδικασίες που υλοποιούν ένα ολοκληρωμένο σύστημα διαχείρισης ποιότητας. Οι διαδικασίες αυτές καθορίζουν τις δραστηριότητες που χρειάζονται άμεσα για την παραγωγή των προϊόντων ή των υπηρεσιών, καθώς και εκείνες που παρέχουν την υποστηρικτική υποδομή για να επιτρέψουν στις άμεσες διαδικασίες να λειτουργούν υπό τους απαιτούμενους ελέγχους και να βελτιώνονται συνεχώς. Ένα καλό σύστημα διαχείρισης ποιότητας, αφού εφαρμοστεί, αναπτύσσει αργά ή ανασχηματίζει μια αειφόρο οργανωτική κουλτούρα που αποδίδει γρήγορα. Το πλάνο για την διαχείριση ποιότητας του συστήματος πρέπει να συμβαδίζει με τους στρατηγικούς σχεδιασμούς του κατασκευαστή για να διασφαλιστεί ότι το σύστημα αποτελεί μέρος της αποστολής και των ποιοτικών στρατηγικών του. Σύμφωνα με το QMS, ένα προϊόν υψηλής ποιότητας προέρχεται από μια διαδικασία υψηλής ποιότητας, πράγμα που σημαίνει ότι η ποιότητα πρέπει να ενσωματώνεται στη διαδικασία. Η ποιότητα στο σχεδιασμό προβλέπει ότι είναι προτιμότερο να εντοπίζουμε την πηγή των προβλημάτων ποιότητας και να την διορθώνουμε παρά να απορρίπτουμε ελαττωματικά αντικείμενα μετά την παραγωγή.

Το Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας (QMS) περιλαμβάνει τρία κύρια μέρη:

- Σχεδιασμός Ποιότητας:

Είναι αναγκαίο για τις εταιρείες να αναγνωρίζουν τους πελάτες τους, τις απαιτήσεις των προϊόντων τους και τους κύριους επιχειρηματικούς τους στόχους. Πρέπει να θεσπίζονται διαδικασίες που εξασφαλίζουν την πλήρη συμμόρφωση με τα πρότυπα ποιότητας.

- Έλεγχος Ποιότητας

Τονίζει τη συχνή χρήση στατιστικών μεθόδων ελέγχου έτσι ώστε να διασφαλιστεί η τήρηση με τα πρότυπα ποιότητας και να εντοπιστούν οι αποκλίσεις από αυτά.

- Βελτίωση Ποιότητας

Σύμφωνα με τον Juran, οι βελτιώσεις ποιότητας πρέπει να είναι συνεχείς, καθώς και εκρηκτικές. Μαζί με τον Deming, ο Juran υπογράμμισε ότι για την εφαρμογή συνεχούς βελτίωσης, οι εργαζόμενοι πρέπει να έχουν εκπαίδευση σε κατάλληλες μεθόδους σε τακτική βάση.

Ένα σύστημα διαχείρισης ποιότητας μπορεί να περιγραφεί ως οι οργανωτικές δομές, οι διαδικασίες και οι πόροι που απαιτούνται για την εφαρμογή της διαχείρισης ποιότητας. Στα πρώιμα συστήματα εστίαζαν στα προβλέψιμα αποτελέσματα μιας γραμμής παραγωγής βιομηχανικών προϊόντων, χρησιμοποιώντας απλή στατιστική και τυχαία δειγματοληψία. Στον 20^ο αιώνα, οι εργατικές εισροές ήταν συνήθως οι πιο δαπανηρές εισροές στις περισσότερες βιομηχανικές κοινωνίες, οπότε η προσοχή μετατοπίστηκε στην ομαδική συνεργασία και τη δυναμική, ιδιαίτερα στην έγκαιρη σήμανση προβλημάτων μέσω ενός κύκλου συνεχούς βελτίωσης. Στον 21ο αιώνα, το QMS έχει τάση να συγκλίνει με

πρωτοβουλίες βιωσιμότητας και διαφάνειας, καθώς η ικανοποίηση των επενδυτών και των πελατών και η αντίληψη για την ποιότητα συνδέεται όλο και περισσότερο με αυτούς τους παράγοντες. Από όλα τα καθεστάτα ελέγχου ποιότητας, το ISO 9000, όπως και το ISO 14000 είναι πιθανώς οι πιο ευρέως υλοποιημένες παγκοσμίως - το καθεστώς ελέγχου ISO 19011 ισχύει και για τα δύο και ασχολείται με την ποιότητα και τη βιωσιμότητα και την ολοκλήρωσή τους.[3]

4.1.1 ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΩΝ- BCS

Το Βιοφάρμακο Σύστημα Ταξινόμησης (BCS) είναι ένα σύστημα που χρησιμοποιείται για να ταξινομήσει φαρμακευτικές ουσίες βάσει της δυσχέρειας διάλυσής τους στο γαστρεντερικό υγρό και της διαλυτότητάς τους σε αυτό. Το BCS είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για την πρόβλεψη της βιοδιαθεσιμότητας των φαρμάκων με βάση αυτές τις ιδιότητες.

Το BCS κατηγοριοποιεί τις φαρμακευτικές ουσίες σε τέσσερις κατηγορίες:

1. **Κατηγορία I:** Φαρμακευτικές ουσίες με υψηλή διαλυτότητα και υψηλή βιοδιαθεσιμότητα στο γαστρεντερικό υγρό. Αυτά τα φάρμακα συνήθως έχουν υψηλή βιοδιαθεσιμότητα και είναι πιο πιθανό να είναι αποτελεσματικά.
2. **Κατηγορία II:** Φαρμακευτικές ουσίες με χαμηλή διαλυτότητα και υψηλή βιοδιαθεσιμότητα στο γαστρεντερικό υγρό. Αυτά τα φάρμακα μπορεί να αντιμετωπίσουν προκλήσεις στην απορρόφηση τους, αλλά με κατάλληλες μορφές δόσης μπορούν να βελτιωθεί η βιοδιαθεσιμότητά τους.
3. **Κατηγορία III:** Φαρμακευτικές ουσίες με υψηλή διαλυτότητα και χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα στο γαστρεντερικό υγρό. Αυτά τα φάρμακα μπορεί να αντιμετωπίσουν προκλήσεις στην απορρόφηση τους λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς τους.
4. **Κατηγορία IV:** Φαρμακευτικές ουσίες με χαμηλή διαλυτότητα και χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα στο γαστρεντερικό υγρό. Αυτά τα φάρμακα συνήθως αντιμετωπίζουν σημαντικές προκλήσεις στη βιοδιαθεσιμότητά τους.

Το BCS είναι χρήσιμο για τον ποιοτικό έλεγχο των βιοφαρμάκων διότι μπορεί να προβλέψει την απόδοση των φαρμάκων βάσει της διάλυσής τους και της διαλυτότητάς τους. Αυτό μπορεί να βοηθήσει στον σχεδιασμό κατάλληλων μορφών δόσης και τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας των φαρμάκων, οδηγώντας σε βελτιωμένη απόδοση και αποτελεσματικότητα τους.[36,37]

4.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

4.2.1 ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΟΥ

Ένας θεμέλιος λίθος κάθε αξιολόγησης ποιότητας φαρμακευτικής ουσίας ή φαρμακευτικού προϊόντος είναι η σταθερότητα. Η διασφάλιση της σταθερότητας ενός βιολογικού (ή οποιουδήποτε φαρμακευτικού) δίνει στους ασθενείς την αυτοπεποίθηση ότι τα φάρμακά τους είναι αποτελεσματικά, λειτουργούν όπως αναμένεται και είναι διαθέσιμα όταν χρειάζονται. Η σταθερότητα εξασφαλίζει ότι οι ασθενείς λαμβάνουν το ίδιο υψηλής ποιότητας προϊόν καθ' όλη τη διάρκεια της ισχύος του προϊόντος.

Η σταθερότητα των φαρμάκων, τόσο φαρμακευτικών όσο και βιοφαρμάκων, μπορεί να οριστεί ως η ικανότητα μιας φαρμακευτικής ουσίας ή ενός προϊόντος να διατηρεί τις ίδιες ιδιότητες και χαρακτηριστικά, εντός καθορισμένων ορίων, που είχε στη στιγμή της κατασκευής του. Τα βιοφάρμακα είναι πολύπλοκα φάρμακα που αποτελούνται από χιλιάδες μόρια και μια πολύπλοκη αλυσίδα αμινοξέων που πτυσσόμενη σχηματίζει πολύπλοκες δομές. Η πολύπλοκη δομή επηρεάζει άμεσα τη λειτουργία των πρωτεϊνών. Επομένως, στη σταθερότητα των βιοφαρμάκων, αναζητείται η σωστή δομή ενός συγκεκριμένου πρωτεϊνικού θεραπευτικού, έτσι ώστε να επιτευχθεί η λειτουργία του ή η συγκεκριμένη θεραπευτική του επίδραση. Η διασφάλιση της σταθερότητας της φαρμακευτικής ουσίας ή του προϊόντος εξασφαλίζει ένα προϊόν υψηλής ποιότητας, ακριβή δοσολογία, αντιμετώπιση των ανεπιθύμητων γεγονότων που προκαλούνται από ακαθαρσίες και αύξηση της συμμόρφωσης του ασθενούς.

Οι πρωτεΐνες θέτουν συγκεκριμένες προκλήσεις στη σταθερότητά τους κατά την παραγωγή, αποθήκευση, μεταφορά ή/και χορήγηση. Οι υποχρεώσεις σταθερότητας περιλαμβάνουν τα ακόλουθα:

- 1) Χημική αστάθεια, όπως π.χ.
 - Οξειδωση
 - Αποαμίδωση και σχηματισμός ηλεκτριμιδίου
 - Κατακερματισμός/υδρόλυση
 - Ανακάτεμα δισουλφιδίου.
- 2) Φυσική αστάθεια, όπως π.χ.
 - α) Προσρόφηση
 - β) Μετουσίωσης
 - γ) Συσσωμάτωση
 - δ) Κατακρήμνιση (σχηματισμός σωματιδίων).[38]

Στην περίπτωση ενός βιοφαρμάκου, η αστάθεια αναφέρεται συνήθως σε αποσυνθετικά προϊόντα είτε θραύσματα είτε συσσωματώματα. Η αστάθεια του προϊόντος μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια αποτελεσματικότητας. Τα προϊόντα αποικοδόμησης μπορεί να οδηγήσουν σε ακαθαρσίες και ρύπους και ζητήματα ασφάλειας και τοξικότητας. Μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε προβλήματα με την ανοσογονικότητα, μια ανεπιθύμητη ανοσολογική απόκριση κατά του εαυτού μας. Επιπλέον, η αστάθεια του προϊόντος μπορεί

να επηρεάσει την εμφάνιση, την οσμή, την αίσθηση, τη γεύση και την κατακρήμνιση, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει τόσο την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια του προϊόντος.

Για να καθοριστεί η σταθερότητα τους, αναπτύσσεται και εφαρμόζεται ένα πρόγραμμα δοκιμών σταθερότητας κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του προϊόντος. Τα κύρια στοιχεία ενός προγράμματος δοκιμών σταθερότητας αποτελείται τις δοκιμές μακροπρόθεσμης σταθερότητας, τις επιταχυνόμενες δοκιμές σταθερότητας, τις ετήσιες (παρακολούθησης) δοκιμές σταθερότητας και δοκιμές ασυμφωνίας. Η μακροπρόθεσμη δοκιμή της φαρμακευτικής ουσίας ή του φαρμακευτικού προϊόντος λειτουργεί ως βάση των συνθηκών αποθήκευσης και της διάρκειας ζωής του προϊόντος. Οι επιταχυνόμενες δοκιμές σταθερότητας παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τις διαδικασίες αποσύνθεσης στις οποίες το προϊόν είναι πιο ευάλωτο. Οι ετήσιες δοκιμές παρέχουν πρόσθετες πληροφορίες για να καθοδηγήσουν τις συνθήκες μακροπρόθεσμης αποθήκευσης. Οι δοκιμές ασυμφωνίας μπορούν να επιβεβαιώσουν τη σταθερότητα συγκεκριμένων παρτίδων. Ένας από τους κύριους στόχους ενός προγράμματος δοκιμών σταθερότητας είναι ο καθορισμός της διάρκειας ζωής ή της λήξης υπό συγκεκριμένες συνθήκες, οι οποίες καθορίζονται για να υποστηρίξουν τη μέγιστη σταθερότητα του φαρμάκου με τον χρόνο. Το Υπουργείο Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (U.S. FDA) ορίζει τη λήξη ως "το χρονικό διάστημα κατά το οποίο το προϊόν γνωρίζεται ότι παραμένει σταθερό, πράγμα που σημαίνει ότι διατηρεί τη δύναμή του, την ποιότητά του και την καθαρότητά του όταν αποθηκεύεται σύμφωνα με τις συνθήκες αποθήκευσης που αναφέρονται στην ετικέτα του".

Κατά τα χρόνια, έχουν αναπτυχθεί αρκετές οδηγίες από διεθνείς συνασπισμούς προς μεμονωμένες φαρμακευτικές αρχές, τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) και άλλους. Οι οδηγίες που αναπτύχθηκαν από έναν από αυτούς τους διεθνείς συνασπισμούς, το Διεθνές Συμβούλιο για την Εναρμόνιση (ICH), συγκεκριμένα στη σειρά ICH Q1 φαίνονται στον παρακάτω πίνακα Πίνακας 4.1).

Πίνακας 4.1: ICH, Οδηγίες για σταθερότητα φαρμάκου

TABLE I: ICH Guidelines: international guidelines for drug stability

ICH Code	Guideline Title
Q1A(R2)	Stability Testing of New Drug Substances and Products
Q1B	Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products
Q1C	Stability Testing for New Dosage Forms
Q1D	Bracketing and Matrixing Designs for Stability Testing of New Drug Substances and Products
Q1E	Evaluation of Stability Data
Q1F	Stability Data Package for Registration Applications in Climatic Zones III and IV*
Q5C	Stability testing of Biotechnological/Biological Products

*Q1F was withdrawn at the Yokohama June 2006 ICH meeting and definitions of Climatic Zones III and IV to the respective regions and the WHO guidelines (9).

[39]

4.3 INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION- ICH

Η σειρά οδηγιών του International Conference on Harmonization (ICH) - ICH Q1, όπως και όλες οι οδηγίες του ICH, προωθεί μια βασισμένη στην επιστήμη και στον κίνδυνο αξιολόγηση των φαρμακευτικών ουσιών και προϊόντων σχετικά με τη σταθερότητα. Επιπλέον, επιτρέπουν την ευελιξία στην εφαρμογή τους έτσι ώστε να μπορούν να εφαρμοστούν ευρέως σε ολόκληρο τον κόσμο. Η ICH-Q1A(R2) (με το R2 να υποδεικνύει την αναθεώρηση 2 της οδηγίας) είναι η θεμελιώδης οδηγία του ICH που σχετίζεται με τη σταθερότητα των φαρμάκων. Ο σκοπός της ICH Q1A(R2) είναι να παρέχει βασικές κατευθυντήριες οδηγίες σχετικά με το πώς να διασφαλιστεί η ποιότητα μιας φαρμακευτικής ουσίας ή προϊόντος υπό τέσσερις γενικές κύριες προϋποθέσεις: επιλογή παρτίδων, σχεδιασμός μελέτης, αξιολόγηση και αποτέλεσμα, και δέσμευση σταθερότητας. Για την επιλογή παρτίδων, η ICH Q1A(R2) παρέχει κατευθυντήριες οδηγίες για το τι θεωρείται κύρια παρτίδα και παρτίδα παραγωγής, πώς να επιλέξετε παρτίδες για συγκεκριμένες δοκιμές και πώς να λάβετε υπόψη συνθήκες αποθήκευσης, όπως κλείσιμο του δοχείου. Παρέχει κατευθυντήριες γραμμές για επίσημες δοκιμές σταθερότητας, δεδομένα που πρέπει να ληφθούν υπόψη, πώς να διεξαγάγετε μελέτες άγχους και μελέτες συνθήκης αποθήκευσης (για παράδειγμα, θερμοκρασία και υγρασία), συμπεριλαμβανομένων των δοκιμών μακροπρόθεσμης, μεσοπρόθεσμης και επιταχυνόμενης δοκιμής και συχνότητας δοκιμών. Η ICH Q1A(R2) παρέχει κατευθυντήριες οδηγίες για τον τρόπο αξιολόγησης των δεδομένων σταθερότητας και των αποτελεσμάτων τους, συμπεριλαμβανομένων των προδιαγραφών και των σημαντικών αλλαγών. Επιπλέον, παρέχει κατευθυντήριες οδηγίες για την κατάλληλη δέσμευση σταθερότητας που προτείνεται και εφαρμόζεται. Η ICH Q1A(R2) αναφέρεται συγκεκριμένα σε φαρμακευτικά προϊόντα (μικρομοριακά φάρμακα).[39]

Οι υπόλοιπες οδηγίες του ICH Q1 αναπτύχθηκαν και εφαρμόστηκαν σε στήριξη του ICH Q1A(R2). Για παράδειγμα, η ICH Q1B αναπτύχθηκε για να αντιμετωπίσει το ενδεχόμενο ότι η έκθεση στο φως μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του προϊόντος. Συγκεκριμένα, η ICH Q1B παρέχει κατευθυντήριες οδηγίες για τη χαρακτηρισμό της εγγενούς φωτοσταθερότητας νέων φαρμακευτικών ουσιών και προϊόντων. Παρέχει επίσης κατευθυντήριες οδηγίες για την αξιολόγηση δεδομένων φωτοσταθερότητας προκειμένου η έκθεση στο φως να μην οδηγεί σε αλλαγές στη φαρμακευτική ουσία ή το προϊόν. Η ICH Q1C, μία από τις πιο σύντομες οδηγίες του ICH, επαναλαμβάνει την εφαρμογή της ICH Q1A(R2) για νέες μορφές δοσολογίας. Η ICH Q1D παρέχει κατευθυντήριες οδηγίες για τη χρήση της bracketing και της matrixing στις μελέτες σταθερότητας. Η bracketing ορίζεται ως η αξιολόγηση δειγμάτων στα άκρα ορισμένων σχεδιαστικών παραγόντων σε όλα τα χρονικά σημεία. Η matrixing ορίζεται ως η αξιολόγηση ενός υποσυνόλου του συνολικού αριθμού δυνατών δειγμάτων για όλους τους συνδυασμούς παραγόντων που ελέγχονται σε συγκεκριμένο χρονικό σημείο. Η ICH Q1E παρέχει κατευθυντήριες οδηγίες για τον τρόπο πραγματοποίησης της αξιολόγησης δεδομένων σταθερότητας και σε θέματα όπως η εκτίμηση (χρησιμοποιώντας ένα γνωστό σύνολο δεδομένων για να εισάγει πληροφορίες σχετικά με μελλοντικά σύνολα δεδομένων). Και τέλος, η ICH Q1F ανακλήθηκε τον Ιούνιο του 2006, και οι ορισμοί των κλιματικών ζωνών III και IV αφέθηκαν στις αντίστοιχες περιοχές και στις οδηγίες του ΠΟΥ.

Όπως και το ICH Q1A(R2), τα ICH Q1B έως ICH Q1E συντάχθηκαν με σκοπό τα φαρμακευτικά (μικρομοριακά) προϊόντα και είναι εφαρμόσιμα και στα βιοφάρμακα. Ωστόσο, υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ μικρομοριακών και μεγαλομοριακών φαρμάκων. Στα πιο παραδοσιακά φαρμακευτικά προϊόντα σπάνια υπάρχει βιολογική

μόλυνση, υπάρχουν ορισμένες προδιαγραφές και πρότυπα για τις ακαθαρσίες. Υπάρχουν ευαίσθητες, καλά ορισμένες προδιαγραφές και διακριτικές αναλυτικές μέθοδοι χαρακτηρισμού και προγράμματα σταθερότητας που είναι καλά ορισμένα και μπορούν να μοντελοποιηθούν. Από την άλλη πλευρά, τα βιοφάρμακα αποτελούνται από πολύπλοκες χημικές δομές που αποτελούνται από χιλιάδες άτομα, καθώς και από ομογενή μακρομόρια που παράγονται σε ζωντανά κύτταρα. Τα βιοφάρμακα είναι επιρρεπή σε βιολογική μόλυνση εξαιτίας της διαδικασίας παραγωγής χρησιμοποιώντας ζωντανά κύτταρα. Υπάρχουν επίσης προϊόντα που προκύπτουν από διαδικασίες και προϊόντα με συνδεδεμένες ακαθαρσίες χωρίς σταθερή αποδεκτή κατώτατη τιμή και πολλαπλές αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό. Τέλος, είναι ευάλωτα στην απώλεια σταθερότητας μέσω της θερμοκρασίας, της διάβρωσης και του φωτός. Αυτές οι διαφορές οδήγησαν στην ανάπτυξη συγκεκριμένων κατευθυντήριων οδηγιών, όπως το ICH Q5C, σχετικά με τη σταθερότητα των βιοφαρμάκων.

Το ICH Q5C παρέχει κατευθυντήριες οδηγίες για τις δοκιμές σταθερότητας των βιοτεχνολογικών και βιολογικών προϊόντων και ισχύει για καλά χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες και πολυπεπτίδια που απομονώνονται από ιστούς, σωματικά υγρά κλπ. Πολλά στοιχεία των δοκιμών σταθερότητας συμβάλλουν στα στοιχεία ενός καλά χαρακτηρισμένου βιολογικού προϊόντος, όπως προδιαγραφές, αναλυτικός χαρακτηρισμός, τάσεις προϊόντων, έλεγχοι διαδικασιών, παρακολούθηση και συμμόρφωση με τις τρέχουσες καλές πρακτικές παρασκευής (cGMP). Συγκεκριμένα, το ICH Q5C παρέχει συγκεκριμένες κατευθυντήριες οδηγίες για τα βιολογικά γύρω από την επιλογή δειγμάτων, το προφίλ που δείχνει σταθερότητα, τις συνθήκες αποθήκευσης, τη συχνότητα των δοκιμών, τις προδιαγραφές και την επισήμανση.

Για τον καθορισμό της σταθερότητας ενός βιοφαρμάκου, χρησιμοποιούνται αρκετές αναλυτικές τεχνικές τόσο για τη φαρμακευτική ουσία όσο και για το φαρμακευτικό προϊόν. Γενικά, αυτές οι τεχνικές παρακολούθησης της σταθερότητας πρέπει να είναι σε θέση να ανιχνεύουν αλλαγές στην ταυτότητα, την καθαρότητα και τη δυνατότητα.

Για την αξιολόγηση της δραστηριότητας, η ICH Q5C προτείνει κυτταρικές βιοδοκιμές ή τη χρήση εξετάσεων δεσμεύσεως βάσει ενζύμων (ELISA) τόσο για φαρμακευτικές ουσίες όσο και για φαρμακευτικά προϊόντα. Για την παρακολούθηση της καθαρότητας, η ICH Q5C προτείνει την παρακολούθηση μεγέθους και φορτίου. Για την παρακολούθηση των φορτίων τόσο για τη φαρμακευτική ουσία όσο και για το φαρμακευτικό προϊόν, προτείνονται αρκετές μεθοδολογίες, συμπεριλαμβανομένης της χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης μέσω αποκλεισμού μεγέθους (SEC-HPLC), της ηλεκτροφόρησης σε πολυακρυλαμίδικό ζελέ με ακεταλτίδιο νατρίου (SDS-PAGE) και της κεφαλονικής ηλεκτροφόρησης (CE)-SDS. Παρατηρείται ότι η SEC-HPLC είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την παρακολούθηση της σταθερότητας διότι μπορεί να διαφοροποιήσει υψηλού μοριακού βάρους είδη, τα οποία είναι ενδεικτικά της ανοχής των πρωτεϊνών. Η κεφαλονική ανταλλαγή (IEX)-HPLC και η ισοηλεκτρική εστίαση συνιστώνται για την παρακολούθηση των εκδόσεων του φορτίου για φαρμακευτικές ουσίες και προϊόντα. Η ICH Q5C προτείνει επίσης την παρακολούθηση της εμφάνισης και της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης για την σταθερότητα της φαρμακευτικής ουσίας. [39]

Η ICH Q6B και όλες οι οδηγίες αναμένουν την πλήρη φυσικοχημική χαρακτηρισμό των προϊόντων πρωτεΐνης από ανασυνδυασμό DNA. Αυτό πρέπει να περιλαμβάνει την πρωτογενή και δευτερογενή δομή, τροποποιήσεις μετά τη μετάφραση (posttranslational modification - PTM). Ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός συμβάλλει συνέπεια της παραγωγής των προϊόντων. Θα πρέπει να αναπτυχθεί μια κατανόηση των φυσικοχημικών παραγόντων που σχετίζονται με τις αλλαγές στη βιολογική δραστηριότητα, ή με τη συνέπεια της παραγωγής. Αυτό θα υποδείξει στη συνέχεια ένα κατάλληλο υποσύνολο

δοκιμών κατάλληλο ως δοκιμές αποδέσμευσης για το συγκεκριμένο προϊόν, και τις αναμενόμενες τιμές για αυτά τα αποτελέσματα των δοκιμών - δηλαδή, τις προδιαγραφές του προϊόντος. Οι προδιαγραφές ορίζονται σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα για τη διακύμανση μεταξύ παρτίδων και τον ρόλο αυτών των παραγόντων στην ρύθμιση της δραστηριότητας του προϊόντος. Τυπικές οδηγίες για τον καθορισμό των προδιαγραφών για βιοφάρμακα βρίσκονται στην Οδηγία του ICH Q6B, Προδιαγραφές: Διαδικασίες Δοκιμής και Κριτήρια Αποδοχής για Βιοτεχνολογικά / Βιολογικά Προϊόντα. Ενώ το πεδίο εφαρμογής του ICH Q6B είναι "αρχικά περιορισμένο σε καλά χαρακτηρισμένα βιοτεχνολογικά προϊόντα", σημειώνεται ότι "οι έννοιες μπορεί να είναι εφαρμόσιμες και σε άλλα βιολογικά προϊόντα όπως είναι κατάλληλο".

Η οδηγία Q7, με τίτλο "Οδηγός Καλής Πρακτικής Κατασκευής για τα Δραστικά Φαρμακευτικά Συστατικά", ορίζει τον έλεγχο ποιότητας (QC) ως "Έλεγχος ή δοκιμή που ελέγχει αν οι προδιαγραφές πληρούνται." Οι προδιαγραφές, και επομένως οι διαδικασίες QC, είναι εφαρμόσιμες στα ενδιάμεσα προϊόντα, τα φάρμακα σε μεγάλη κλίμακα και τα τελικά προϊόντα, καθώς και στις προδιαγραφές σταθερότητας. Οι μέθοδοι QC για την αποδέσμευση παρτίδας αποτελούν ένα επικυρωμένο υποσύνολο των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τη χαρακτηρισμό του προϊόντος, επιλεγμένες για να επισημάνουν τις κρίσιμες παραμέτρους ποιότητας για το προϊόν ή να επισημάνουν τη συνέπεια της διαδικασίας κατασκευής. [35,40–43]

Η πιστοποίηση της μεθόδου βασίζεται σε κατευθυντήριες γραμμές επικύρωσης του ICH. Υπάρχουν διάφορες στρατηγικές για την πιστοποίηση και την επικύρωση της μεθόδου και βασίζονται στις ανάγκες, τους διαθέσιμους πόρους και το χρονοδιάγραμμα του έργου. Μια προσέγγιση είναι να εκτελεστεί ελάχιστη ανάπτυξη και πιστοποίηση, η οποία μπορεί να είναι απαραίτητη για έργα με μικρότερα χρονοδιαγράμματα, αλλά μπορεί να επιβαρύνει περισσότερο και να επιβαρύνει περισσότερο τις μελλοντικές δραστηριότητες επικύρωσης για δοκιμές ευρωστίας και μπορεί να οδηγήσει σε αποτυχία. Μια εναλλακτική προσέγγιση θα επένδυε περισσότερο χρόνο και πόρους στην ανάπτυξη μεθόδου, ακολουθούμενη από εκτεταμένες δοκιμές προσόντων και ευρωστίας για να καθοριστεί εάν απαιτείται περαιτέρω ανάπτυξη. Αυτή η στρατηγική απαιτεί περισσότερο χρόνο και πόρους στην αρχή της διαδικασίας, αλλά μειώνει τον όγκο εργασίας και το επίπεδο κινδύνου που εμπλέκονται κατά την επικύρωση. Ο σκοπός του χαρακτηρισμού της μεθόδου είναι να καθοριστεί η προβλεπόμενη χρήση της σε σχέση με τον τύπο του δείγματος. Η πιστοποίηση της μεθόδου παρέχει επίσης μια αξιολόγηση της μεθόδου που χρησιμοποιείται για τον καθορισμό των κριτηρίων αποδοχής για την επικύρωση της μεθόδου. Για μια μέθοδο προσδιορισμού καθαρότητας, οι ακόλουθες οκτώ παράμετροι/ιδιότητες μελετώνται κατά τον προσδιορισμό της μεθόδου: εύρος, γραμμικότητα, όριο λήψης/όριο ποσοτικοποίησης (LOD/LOQ), ακρίβεια/επαναληψιμότητα, ενδιάμεση ακρίβεια, ειδικότητα, ικανότητες ένδειξης σταθερότητας και ευρωστία. Για μια μέθοδο προσδιορισμού ταυτότητας, απαιτείται μόνο εξειδίκευση από το ICH. Ο Πίνακας 4.2 παραθέτει τις παραμέτρους πιστοποίησης/επικύρωσης μεθόδου με βάση τις κατευθυντήριες γραμμές ICH.

Πίνακας 4.2: Κατευθυντήριες γραμμές του ICH για πιστοποίηση/επικύρωση μεθόδου

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ
Ιδιαιτερότητα	Δοκιμή για παρεμβολές από όλες τις πιθανές πηγές
Γραμμικότητα/εύρος έγχυσης	Εύρος 50 -150% του ονομαστικού φορτίου. Τα δεδομένα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για προσδιορισμός LOD/LOQ
Γραμμικότητα/εύρος δείγματος συγκέντρωση	Εύρος 50-150% του ονομαστικού φορτίου. Τα δεδομένα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για προσδιορισμός LOD/LOQ
Ακρίβεια	Πολλαπλά όργανα, τριχοειδή αγγεία, αναλυτές και ημέρες για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας (ενδοδοκιμασία), της ενδιάμεσης ακρίβειας (ενδιάμεσης ανάλυσης) και της αναπαραγωγιμότητας (συνολικής) μεταβλητότητας της μεθόδου
Όριο ανίχνευσης/όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOD/LOQ)	Κατάλληλη μεθοδολογία που συνιστά το ICH
Σταθερότητα του συστήματος	Χρήση κατάλληλων ελέγχων ανάλυσης για να προσδιοριστεί εάν μια συγκεκριμένη εκτέλεση είναι έγκυρη. Μπορεί επίσης να περιλαμβάνει αξιολογήσεις κατάλληλων για τον σκοπό της ανάλυσης, όπως μεθόδους ένδειξης σταθερότητας κ.λπ

[44]

5 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Σε αντίθεση με τα συνθετικά φάρμακα, τα ενεργά φαρμακευτικά συστατικά στα βιοφάρμακα περιλαμβάνουν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Επί του παρόντος, η συντριπτική πλειοψηφία των εμπορικά διαθέσιμων βιοφαρμάκων περιέχουν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ως δραστικό φαρμακευτικό συστατικό τους. Αυτές οι πρωτεΐνες παράγονται σε προκαρυωτικά συστήματα, κυρίως *Escherichia coli*, ή ευκαρυωτικά συστήματα που βασίζονται σε μύκητες (*Saccharomyces cerevisiae* και *Pichia pastoris*), κύτταρα θηλαστικών ή κυτταρικές σειρές εντόμων. Η χρήση συστημάτων έκφρασης χωρίς κύτταρα (συστήματα *in vitro*), τα οποία διευκολύνουν σε μεγάλο βαθμό την τροποποίηση των συνθηκών σύνθεσης, έχει επίσης μελετηθεί. Η παραγωγή βιοφαρμάκων σε καθένα από τα προαναφερθέντα συστήματα έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Για αυτούς τους λόγους, χρησιμοποιούνται πολλά διαφορετικά συστήματα έκφρασης με βάση τις ειδικές ιδιότητες μιας δεδομένης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

Οι αναλυτικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία για να διασφαλίσουν την ποιότητα, την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια των φαρμακευτικών ουσιών και προϊόντων. Ένα από τα βασικά μέτρα της ποιότητας μιας φαρμακευτικής ουσίας ή ενός φαρμακευτικού προϊόντος, συμπεριλαμβανομένων των βιοφαρμάκων, είναι η σταθερότητα του ενεργού φαρμακευτικού συστατικού (API). Ο πρώτος οδηγός του Διεθνούς Συμβουλίου για την Εναρμόνιση (ICH) σχετικά με την ποιότητα, ο ICH Q1, αφορά τη σταθερότητα των φαρμάκων. Υπάρχουν αρκετές αναλυτικές μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, όπως είναι η χρωματογραφία και η φασματοσκοπία μαζών που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό της σταθερότητας του φαρμάκου. Η παρακολούθηση της σταθερότητας των βιοφαρμάκων απαιτεί αρκετές ορθογώνιες τεχνικές που περιλαμβάνουν LC και MS. Οι μεθοδολογίες LC έχουν εδραιωθεί για την παρακολούθηση της σταθερότητας, και οι μεθοδολογίες MS γίνονται όλο και πιο δημοφιλείς. Ανεξαρτήτως του προγράμματος σταθερότητας που εφαρμόζεται και των αναλυτικών τεχνολογιών που χρησιμοποιούνται σε αυτό, η σταθερότητα του φαρμάκου αποτελεί θεμέλιο πέτρα για τη διασφάλιση ότι οι ασθενείς λαμβάνουν τα φάρμακα που χρειάζονται όταν τα χρειάζονται. Οι πληροφορίες σχετικά με την περιεκτικότητα και τη σύνθεση μονοσακχαριτών, περιέχουν μόνο μέρος των πληροφοριών σχετικά με τη γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών. Όσον αφορά τις πληροφορίες σχετικά με τη δομή της γλυκάνης, συμπεριλαμβανομένης της διακλάδωσης και της κατάληψης θέσης, οι μέθοδοι HPLC και MS, και πάλι είναι οι πιο σημαντικές μέχρι σήμερα και χρησιμοποιούνται συχνά παράλληλα.

Ο συνδυασμός υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) με φασματομετρία μάζας διαδοχικής φάσης (LC-MS/MS) αποτελεί μια από τις πιο ισχυρές και αξιόπιστες μεθόδους για τον έλεγχο ποιότητας βιοφαρμάκων. Αυτή η προσέγγιση προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα, καθιστώντας την ιδανική για την ποσοτικοποίηση και χαρακτηρισμό βιομορίων, όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs). Η LC-MS/MS επιτρέπει την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση βιοφαρμάκων σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, με υψηλή ειδικότητα, καθώς ο συνδυασμός της χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μάζας μπορεί να διαχωρίσει και να ταυτοποιήσει συγκεκριμένα μόρια μέσα σε πολύπλοκα μείγματα. Ο συνδυασμός αυτών των τεχνικών επιτρέπει ταχύτερες αναλύσεις σε σύγκριση με παραδοσιακές μεθόδους, όπως η ELISA, μειώνοντας το χρόνο ανάλυσης και αυξάνοντας την αποδοτικότητα. Η HPLC διαχωρίζει τα συστατικά του δείγματος, ενώ η MS/MS ταυτοποιεί και ποσοτικοποιεί τα μόρια βάσει της μάζας τους και των χαρακτηριστικών τους θραυσμάτων, παρέχοντας λεπτομερείς πληροφορίες για τη δομή και την καθαρότητα των

βιοφαρμάκων. Η χρήση εσωτερικών προτύπων και η δυνατότητα πολλαπλών αναλύσεων ανά δείγμα εξασφαλίζουν υψηλή ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων.

Υπάρχει μια τάση προς τη χρήση υγρής χρωματογραφίας ενωμένης με (διαδοχική) φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS). Ένας από τους λόγους αυτής της τάσης είναι η δυνατότητα χρήσης εσωτερικών προτύπων για τη διόρθωση της αναλυτικής μεταβλητότητας και συνεπώς τη βελτίωση της ακρίβειας και της ακρίβειας των αποτελεσμάτων. Στη βιοανάλυση LC-MS/MS μικρών μορίων, η εσωτερική τυποποίηση είναι αρκετά απλή: χρησιμοποιείται είτε μια μορφή της αναλυόμενης ουσίας με σήμανση με σταθερό ισότοπο (SIL) είτε ένα δομικό ανάλογο. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των βιοφαρμακευτικών πρωτεϊνών, η κατάσταση είναι πιο περίπλοκη. Εφόσον η πρωτεΐνη που ενδιαφέρει χωνεύεται σε ένα μείγμα πεπτιδίων, ένα από τα οποία χρησιμοποιείται στη συνέχεια για ποσοτικοποίηση, υπάρχουν περισσότερες επιλογές για εσωτερική τυποποίηση. μια επισκόπηση των διαφορετικών επιλογών για εσωτερική τυποποίηση στον τομέα της απόλυτης στοχευμένης ποσοτικοποίησης των πρωτεϊνικών βιοφαρμακευτικών προϊόντων με χρήση LC-MS/MS,[45]

Ο ποιοτικός έλεγχος των βιοφαρμάκων περιλαμβάνει μια σειρά αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για να διασφαλιστεί η καθαρότητα, η δραστηριότητα, η σταθερότητα και η συνολική ποιότητα ενός βιολογικού παρασκευάσματος. Αυτές οι αναλυτικές μέθοδοι είναι κρίσιμες επειδή τα βιοφάρμακα είναι πολύπλοκα και ευαίσθητα.

Από τα πολλά κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας (CQAs) που παρακολουθούνται κατά την έγκριση βιοφαρμάκων, ένα είναι η δομική ανάλυση. Εάν η δομή δεν είναι σωστή, τότε η λειτουργία της πρωτεΐνης (mAb) δεν είναι αυτή που θα έπρεπε. Έτσι, στην περίπτωση ενός φαρμάκου, δεν θα λειτουργούσε.[28,46]

5.1 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ- MS

Από την εισαγωγή της πρώτης πρωτεϊνικής ινσουλίνης προερχόμενης από ανασυνδυασμένο DNA τη δεκαετία του 1980 και την κυκλοφορία ιντερφερονών και ιντερλευκινών τη δεκαετία του 1990, η MS έχει διαδραματίσει κεντρικό ρόλο στον θεραπευτικό χαρακτηρισμό πρωτεϊνών και έγινε μια από τις πιο διαδεδομένες αναλυτικές τεχνικές στη φαρμακευτική έρευνα και ανάπτυξη.[47] Η εφαρμογή της, είχε ως αποτέλεσμα την καλύτερη κατανόηση σε μοριακό επίπεδο των χαρακτηριστικών που είναι ζωτικής σημασίας για την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα πολύπλοκων βιοθεραπευτικών μορίων, καθώς και την αποσαφήνιση των μηχανισμών που σχετίζονται με την αποδόμηση. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της μοριακής μάζας, ταυτοποίηση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας, ανίχνευση μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (PTMs), στην ανάλυση πρωτεϊνών και γλυκοζυλίωσης.[47-49]

Ο χαρακτηρισμός και ο ποσοτικός προσδιορισμός των ιδιοτήτων του προϊόντος των γλυκοπρωτεϊνών γίνεται τυπικά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης σε επίπεδο πεπτιδίου ή γλυκάνης χρησιμοποιώντας διαδοχικά στάδια ενζυματικής πέψης, χημικής επισήμανσης, ηλεκτροφορητικού ή χρωματογραφικού διαχωρισμού. Όταν συνδυάζονται στο στάδιο του χαρακτηρισμού με πιο ισχυρές τεχνικές φασματομετρίας μάζας (MS), αυτές οι μέθοδοι παρέχουν λεπτομερείς δομικές πληροφορίες για τις θεραπευτικές γλυκοπρωτεΐνες και σημαντικές πληροφορίες για τον μηχανισμό δράσης. [39] Έχει τη δυνατότητα να παρέχει δομικές πληροφορίες για μικρές ποσότητες υλικού. Τα όρια ανίχνευσης έχουν φτάσει από femtomolar έως σε attomolar επίπεδα για τις γλυκάνες, ενώ το δυναμικό εύρος είναι συνήθως 4 ή 5 τάξεις μεγέθους.[50]

Στην ανάλυση ποιότητας των βιοφαρμάκων, υπάρχει μεγάλη ποικιλία από φασματομέτρα μάζας που χρησιμοποιούν διάφορους τύπους αναλυτών μάζας για τον διαχωρισμό και την επιλογή ιονισμένων μορίων, όπως οι αναλυτές που βασίζονται σε τετραπολικά και τα παράγωγά τους, φασματομέτρα μάζας υψηλής ανάλυσης με χρόνος πτήσης (TOF), Orbitrap αναλυτές, τα τριπλά τετράπολα (Triple Quadrupole), και είναι καθοριστικοί για την εξασφάλιση ακριβών και αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Κάθε τύπος αναλυτή προσφέρει μοναδικά πλεονεκτήματα που συμβάλλουν στην πλήρη αξιολόγηση των βιοφαρμάκων.

- **Triple Quadrupole (Τριπλός Τετραπολικός)**

Οι τριπλοί τετραπολικοί αναλυτές (Triple Quadrupole) είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι για την ποσοτική ανάλυση λόγω της υψηλής ευαισθησίας τους. Αυτοί οι αναλυτές επιτρέπουν την ανίχνευση αναλυτών σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, κάτι που είναι σημαντικό για την παρακολούθηση της καθαρότητας και τον εντοπισμό τυχόν προσμίξεων στα βιοφάρμακα.

- **Orbitrap**

Οι αναλυτές Orbitrap είναι γνωστοί για την υψηλή τους ανάλυση μάζας και ακρίβεια, καθιστώντας τους ιδανικούς για την ανάλυση σύνθετων βιολογικών δειγμάτων. Η ικανότητά τους να παρέχουν ακριβή δεδομένα μάζας είναι κρίσιμη για την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως η γλυκοζυλίωση και η φωσφορυλίωση, που μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα και τη σταθερότητα των βιοφαρμάκων. Η ακρίβεια του Orbitrap διασφαλίζει ότι ακόμη και μικρές διαφορές στη μάζα μπορούν να εντοπιστούν και να αναλυθούν λεπτομερώς.

- **Time-of-Flight (TOF)**

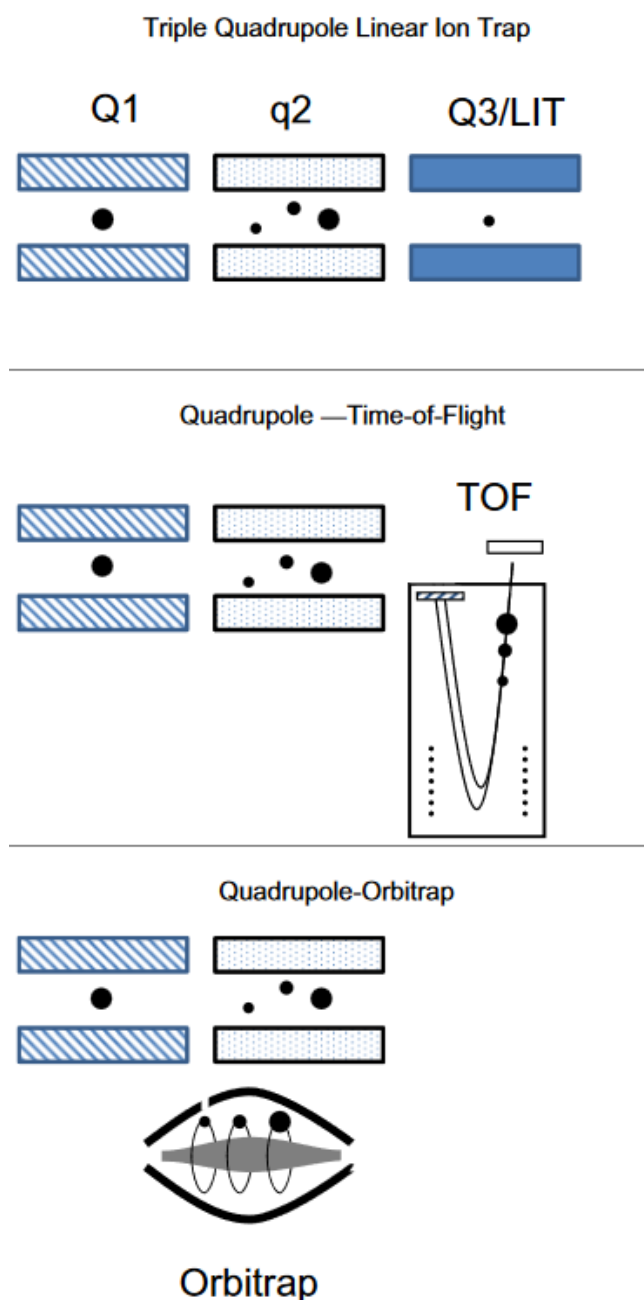
Οι αναλυτές TOF μπορούν να μετρήσουν μόρια σε ένα πολύ ευρύ φάσμα μάζας από ενώσεις μικρού μοριακού βάρους έως μεγάλες άθικτες πρωτεΐνες και ως εκ τούτου έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε διάφορους τομείς έρευνας. Το ευρύ φάσμα εφαρμογών για μη υβριδικούς αναλυτές TOF έχει επεκταθεί περαιτέρω με την ανάπτυξη ενός φασματομέτρου μάζας σε σειρά TOF (TOF/TOF). Η ταχύτητά τους και η δυνατότητα ανάλυσης ενός μεγάλου εύρους μαζών είναι ιδιαίτερα χρήσιμες κατά τη φάση ανάπτυξης των βιοφαρμάκων, όπου η γρήγορη ανάλυση πολλών δειγμάτων είναι απαραίτητη για την αξιολόγηση της ποιότητας και της σταθερότητας. Επιπλέον, η συνδυαστική χρήση της τεχνικής TOF με την υγρή χρωματογραφία (LC-TOF) ενισχύει την ευελιξία και την ευαισθησία της ανάλυσης.

Οι σύγχρονοι αναλυτές TOF επιτυγχάνουν αναλύσεις σήματος έως και 20.000 FWHM (πλήρες πλάτος στο μισό μέγιστο) για ένα μεμονωμένο φορτισμένο μόριο 2000 Da. Η ακρίβεια μάζας είναι στην περιοχή περίπου 20–30 ppm με εξωτερική βαθμονόμηση και 5 ppm με εσωτερική βαθμονόμηση φάσματος. Το τελευταίο ισοδυναμεί με σφάλμα μάζας 0,01 Da για ένα μόριο 2000 Da. Παρά την υψηλή ανάλυση και την καλή ακρίβεια μάζας, η ανέπαφη μάζα ενός μοριακού ιόντος συχνά δεν είναι επαρκής για αναγνώριση. Ειδικότερα, η ανάλυση τροποποιημένων παραλλαγών ενώσεων ενδιαφέροντος απαιτεί λεπτομερείς δομικές πληροφορίες για τον προσδιορισμό της φύσης και της θέσης της τροποποίησης. Στη φασματομετρία μάζας, ο κατακερματισμός των ιόντων στην αέρια φάση μέσα στο

φασματόμετρο μάζας και η ανάλυση συγκεκριμένων προτύπων κατακερματισμού χρησιμοποιούνται ευρέως για την απόκτηση πιο λεπτομερών δομικών πληροφοριών

- **Συνδυαστική Χρήση**

Ο συνδυασμός των αναλυτών Triple Quadrupole, Orbitrap και TOF παρέχει μια ολοκληρωμένη προσέγγιση για την ανάλυση ποιότητας των βιοφαρμάκων. Οι Triple Quadrupole αναλυτές εξασφαλίζουν ακριβή ποσοτικοποίηση, ενώ οι Orbitrap προσφέρουν λεπτομερή χαρακτηρισμό των μοριακών δομών. Οι TOF αναλυτές, με την ταχύτητα και το ευρύ φάσμα ανάλυσης, συμπληρώνουν τις άλλες τεχνικές παρέχοντας γρήγορη και αξιόπιστη ταυτοποίηση. Μαζί, αυτές οι τεχνικές εξασφαλίζουν μια πλήρη και αξιόπιστη αξιολόγηση της ποιότητας των βιοφαρμάκων, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη ασφαλών και αποτελεσματικών φαρμακευτικών προϊόντων.[51–53]



Εικόνα 5.1 Γεωμετρίες MS. [54]

MALDI ΚΑΙ ESI

Η γλυκοζυλίωση είναι μία από τις δομικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν κατά την παραγωγή πολλών φαρμάκων με βάση τις πρωτεΐνες και μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στις φαρμακολογικές τους ιδιότητες. [55] Οι M.J. Oh et.al ανέπτυξαν μια πλατφόρμα για ποιοτική και ποσοτική γλυκομική ανάλυση ανασυνδυασμένων ερυθροποιητινών, για το προφίλ των φυσικών N-γλυκανών από τρεις παρτίδες παραγωγής darbepoetin alfa (επίσης γνωστή ως NESP), μια κοινή μορφή ανασυνδυασμένης

ερυθροποιητίνης. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί όχι μόνο ανασυνδυασμένης ερυθροποιητίνης, αλλά και άλλων πολύπλοκων, γλυκοζυλιωμένων βιοθεραπευτικών και βιοομοειδών.[56]

Η επιτυχία της MS μετά την εμφάνιση των τεχνικών ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI) και υποβοηθούμενης από μήτρα εκρόφησης/ιοντισμού λέιζερ (MALDI) την έθεσε στο προσκήνιο της βιοανάλυσης. Η MS έχει ήδη γίνει μια αναμφισβήτητη τεχνική επιλογής όσον αφορά την ανάλυση της ομοιοπολικής δομής πρωτεΐνης, συμπεριλαμβανομένων των θεραπευτικών πρωτεϊνών.[34,57] Η MALDI-TOF-MS και η ESI-MS έχουν φέρει επανάσταση στον χαρακτηρισμό των μακρομορίων, ιδιαίτερα των πολύπλοκων γλυκοπρωτεϊνών. Η Parr και η ομάδα της επισήμαναν ότι οι διάφορες γλυκομορφές τους μπορεί να οδηγήσουν σε μειωμένη αποτελεσματικότητα ιονισμού. Η MALDI-TOF-MS είναι κατάλληλη για να ληφθεί η ακριβής μάζα των μικρών γλυκοπρωτεϊνών (=40 kDa) με λίγο αριθμό τμημάτων υδατανθράκων. Ο Nicolardi και η ομάδα του χρησιμοποίησαν το σύστημα MALDI-FTICR-MS για χαρτογράφηση ισοτοπικά αναλυμένες ανέπαφες γλυκοπρωτεΐνες έως περίπου 17 kDa. [58] Οι εξαιρετικά γλυκοζυλιωμένες γλυκοπρωτεΐνες αναλύονται γενικά χρησιμοποιώντας όργανα ESI-TOF.[59]

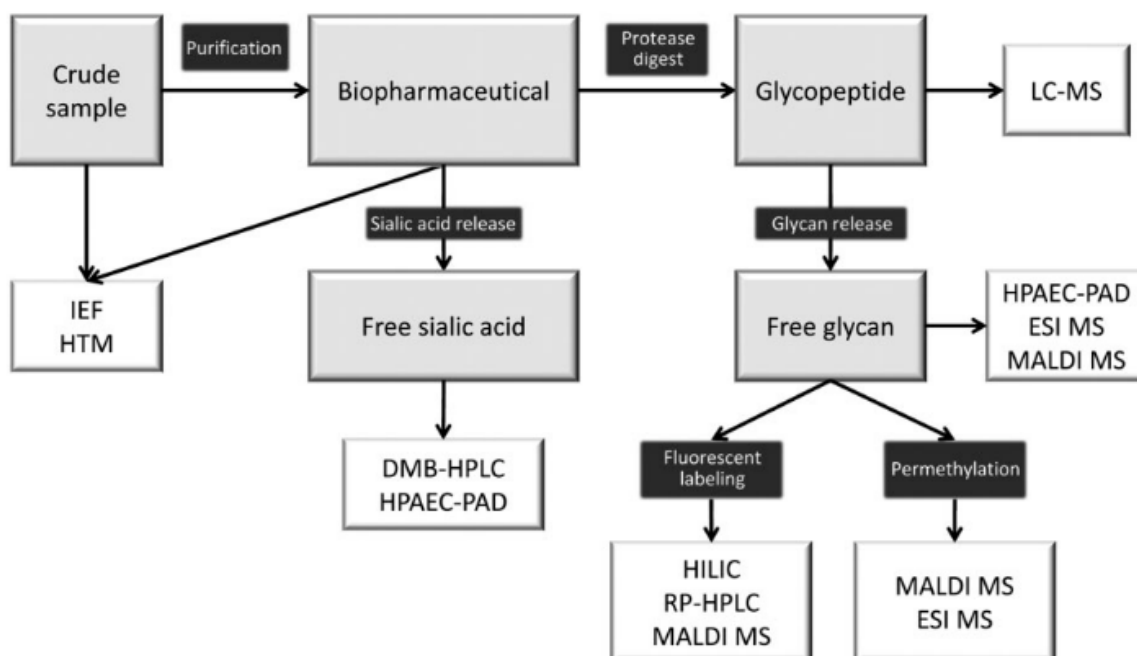
Η ESI μπορεί επίσης να συνδεθεί εύκολα με LC ή CE, επιτρέποντας πειράματα LC-MS ή CE-MS. Η προετοιμασία ανέπαφων ειδών γλυκοπρωτεΐνης συζευγμένων με MS έχει σημαντική δυνατότητα για τον σε βάθος χαρακτηρισμό και την ποσοτική ανάλυση των πρωτεομορφών. Αν και η μέτρηση της άθικτης μάζας της γλυκοπρωτεΐνης μπορεί να επιτευχθεί με άμεση έγχυση, η ανάλυση LC-MS με χρήση φυσιγγίου αφαλάτωσης επιτρέπει φάσματα καλύτερης ποιότητας με λιγότερα πρόσθετα αλάτων. Στην πραγματικότητα, η ανάλυση ESI-MS των γλυκοπρωτεϊνών με άμεση έγχυση συχνά απαιτεί αφαλάτωση ή ανταλλαγή ρυθμιστικού διαλύματος της γλυκοπρωτεΐνης προκειμένου να απορριφθούν άλατα που θέτουν σε κίνδυνο την αποτελεσματικότητα ιονισμού. Μια πρακτική εναλλακτική λύση είναι η ταχεία αφαλάτωση με LC-MS σε μια βραχείας χρωματογραφικής στήλης αφαλάτωσης αντίστροφης φάσης. Επιπλέον, ο συλλαβισμός ενός αναλυτή MS με τεχνικές διαχωρισμού είναι επίσης σημαντικός για τον ποσοτικό προσδιορισμό όλων των ισομορφών πρωτεϊνών με διαφορετικά PTM. Για να αποφευχθεί η χρονοβόρα και δαπανηρή κλασματοποίηση, είναι πολύ ελκυστικό να διαχωριστούν οι άθικτες πρωτεϊνικές ισομορφές με LC ή CE και στη συνέχεια να πραγματοποιηθούν αναλύσεις LC-/CE-MS για τον προσδιορισμό των προφίλ των γλυκομορφών σε μια σύντομη ανάλυση.[60]

Η καλύτερα καθιερωμένη τεχνική MS στη γλυκανάλυση βιοφαρμάκων είναι το MALDI-TOF-MS. Εφαρμόζεται εδώ και πολλά χρόνια στο προφίλ των ολιγοσακχαριτών, ιδιαίτερα στην πρόωμη ανάπτυξη φαρμάκων. Τα κύρια πλεονεκτήματα του MALDI-TOF-MS είναι η εξαιρετική του ταχύτητα, η χαμηλή κατανάλωση δείγματος και οι δυνατότητες υψηλής απόδοσης και αυτοματισμού.[55] Αν και είναι αποτελεσματικές, στο πλαίσιο πιθανών διαγνωστικών ή κλινικών εφαρμογών, αυτές οι στρατηγικές απαιτούν μακρά στάδια καθαρισμού, χημικής παραγωγοποίησης και διαχωρισμού που αποκλείουν την ανάλυση πολλών δειγμάτων σε εφικτό χρονικό πλαίσιο. Η ανάλυση MALDI-TOF MS είναι μια άλλη καθιερωμένη προσέγγιση[50]. Ενώ αυτό μειώνει τον χρόνο απόκτησης δεδομένων, οι περισσότερες αναλύσεις MALDI-TOF MS εξακολουθούν να απαιτούν μακρά βήματα καθαρισμού και παραγωγοποίησης πριν από την ανάλυση.[61]

Οι τρέχουσες αναλυτικές μεθόδους για σύγκριση σιαλυλίωσης, διαμόρφωση προφίλ γλυκάνης και ειδική για τοποθεσία ανάλυση γλυκοζυλίωσης. Η σιαλυλίωση είναι μια ειδική μορφή γλυκοζυλίωσης στην οποία ένα σιαλικό οξύ προστίθεται στα τελικά σάκχαρα των γλυκανίων μιας πρωτεΐνης ή λιπιδίου. Το σιαλικό οξύ είναι ένα μονοσακχαρίδιο που συχνά βρίσκεται στο τέλος των γλυκανίων αλυσίδων και μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στις βιολογικές ιδιότητες των πρωτεϊνών. Η σιαλυλίωση είναι ένας τελευταίος σταθμός στην πορεία της γλυκοζυλίωσης. Δηλαδή, τα γλυκάνια πρέπει πρώτα να συνδεθούν στις

πρωτεΐνες μέσω της γλυκοζυλίωσης, και στη συνέχεια μπορεί να προστεθεί το σιαλικό οξύ στα άκρα αυτών των γλυκανίων.

Προς το παρόν, καμία μεμονωμένη μέθοδος δεν μπορεί να καλύψει όλες τις αναλυτικές πτυχές που απαιτούνται κατά την ανάπτυξη, τη βελτιστοποίηση και την κατασκευή της διαδικασίας. Αντίθετα, απαιτούνται συχνά συνδυασμοί ορθογώνιων μεθόδων για διαφορετικά CQA και στάδια παραγωγής. Ένα παράδειγμα για την απόδειξη ενός τέτοιου συνδυασμού στο πλαίσιο της παραγωγής ανασυνδυασμένης EPO είναι οι αναλύσεις IEF και HTM για την ταχεία παρακολούθηση του βαθμού σιαλυλίσωσης σε ακατέργαστα μέσα καλλιέργειας, που ακολουθείται από προφίλ γλυκάνης μετά τον καθαρισμό από MALDI-MS και σχετική ποσοτικοποίηση του σιαλυλιωμένου γλυκομορφές από HPAEC-PAD. Το Σχήμα 5.1 δείχνει μια ολοκληρωμένη ροή εργασίας για μια ολοκληρωμένη ανάλυση της γλυκοζυλίωσης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.



Σχήμα 5.1: Διάγραμμα ροής εργασιών για ανάλυση γλυκοζυλίωσης βιοφαρμακευτικών.

Επιλογές αναλυτικών μεθόδων (λευκά) εκχωρούνται σε διαφορετικά δείγματα (γκρι) που προέρχονται από διαφορετικά στάδια επεξεργασίας (σκούρα).

[46]

Σε σύγκριση με εναλλακτικές μεθόδους ρόφησης/ιονισμού, όπως η ESI, η MALDI είναι πολύ πιο ισχυρή, χωρίς μεταφορά δείγματος σε δείγμα και με μεγαλύτερη αντοχή σε προσμίξεις όπως άλατα και απορρυπαντικά. Καθώς τα άλατα και τα απορρυπαντικά απαντώνται συνήθως στη darbepoetin alfa και σε άλλα εμπορικά σκευάσματα βιοφαρμάκων, η αντιμετώπιση αυτών των προσμίξεων είναι κρίσιμη για τον ακριβή χαρακτηρισμό των βιοφαρμάκων. Επιπλέον, η ανάλυση MALDI-MS είναι πολύ γρήγορη, με χρόνους δειγματοληψίας συνήθως σε δευτερόλεπτα, σε σύγκριση με συγκρίσιμες

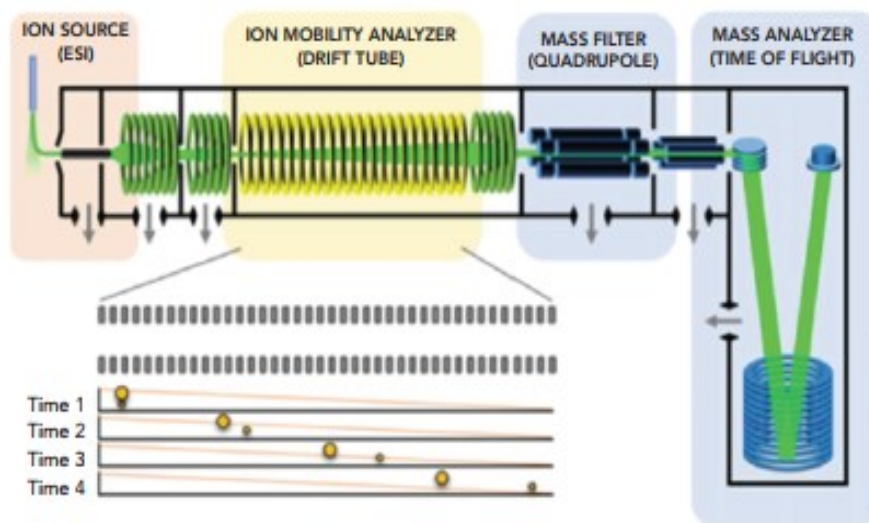
αναλύσεις με LC-ESI-MS ή ESI-MS άμεσης έγχυσης, οι οποίες μπορεί να διαρκέσουν από λεπτά έως ώρες. Η MALDI-MS είναι επίσης επιδεκτικό σε ορισμένες τεχνικές που εξοικονομούν χρόνο σε μια ροή εργασιών υψηλής απόδοσης, όπως η εκ των προτέρων εντοπισμός δειγμάτων και η αυτοματοποιημένη λήψη. Η ταχεία και ισχυρή φύση του MALDI-MS καθιστά αυτόν τον τύπο ανάλυσης απαραίτητο για τις στρατηγικές χαρακτηρισμού βιοφαρμάκων.[56] Η MALDI-MS παρέχει μεμονωμένα φορτισμένα γλυκοπεπτιδικά ιόντα, ενώ η ESI-MS έχει ως αποτέλεσμα πιο πολύπλοκες καταστάσεις φόρτισης. Η υψηλή ευαισθησία και η εύκολη ερμηνεία δεδομένων το καθιστούν μια ευνοϊκή τεχνική για χειροκίνητη ανάλυση. Ωστόσο, μόνο καλά διαχωρισμένα γλυκοπεπτιδικά κλάσματα θα πρέπει να εντοπίζονται από την MALDI.[59]

Για τα βιοφάρμακα, κυρίως τα μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs), οι μέθοδοι MS με ευαισθησία στη δομή έχουν γίνει πιθανώς κρίσιμοι για την ταχεία ανάλυση υψηλού μοριακού βάρους ειδών. Ορισμένες από αυτές τις τάσεις περιλαμβάνουν την MS με μεταβλητή θερμοκρασία. Οι πειραματισμοί με μεταβλητή θερμοκρασία μπορούν να παρακολουθήσουν τη σταθερότητα των πρωτεϊνών μέσω της παρακολούθησης των θερμοκρασιών τήξης, ενώ οι τεχνολογίες αερίου, όπως η MS, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό αλλαγών στις δομές των mAb στο αέριο φάση σε συνδυασμό με τις πειραματικές μεταβολές της θερμοκρασίας. Στις πειραματικές μεταβολές της θερμοκρασίας, δείγματα mAb MS θερμαίνονται εντός της πηγής ESI και η ανίχνευση προϊόντων αποδιάλυσης και μη φυσικών διοξειδίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να χαρακτηριστεί η σταθερότητα του mAb. [39]

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΙΟΝΤΩΝ -IMS

Η IMS διαχωρίζει τα ιόντα με βάση την κινητικότητά τους σε ένα αέριο μέσο υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Τα ιόντα με διαφορετικά σχήματα, μεγέθη και φορτία κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσω του αερίου. Είναι μια τεχνική διαχωρισμού, το IMS μπορεί να σταθεί μόνο του χωρίς να συνδεθεί με φασματομετρία μάζας, αλλά απαιτεί κάποιο είδος ανιχνευτή, ο οποίος τροφοδοτείται με πρόσφατα αναλυμένα ιόντα από το αρχικό δείγμα, που συχνά διαχωρίζονται μέσω ενός συρόμενου σωλήνα (DT). Σε αυτές τις διαμορφώσεις, υπάρχει ανάγκη για ένα φέρον αέριο για να σαρώσει τα ιόντα που προέρχονται από την πηγή ιόντων. Αυτό είναι σχεδόν πάντα ένα σύστημα ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI). Σε οποιαδήποτε από αυτές τις διαμορφώσεις οργάνων, η σύγχρονη διεπαφή βασίζεται σχεδόν πάντα σε κάποια όργανα MS. Η IMS είναι ένα όργανο διαχωρισμού και ανάλογα με το τι χρησιμοποιείται, παρέχει χαμηλές και υψηλές αναλύσεις ιόντων. Στην εικόνα 5.1 δείχνει την ανάλυση μέσω του συρόμενου σωλήνα του μητρικού ιόντος και κινούμενου, αδρανούς αερίου, καθώς και του απλού τετράπολου. Κάθε εναπομείναν θραύσμα αναλύεται με TOF-MS.

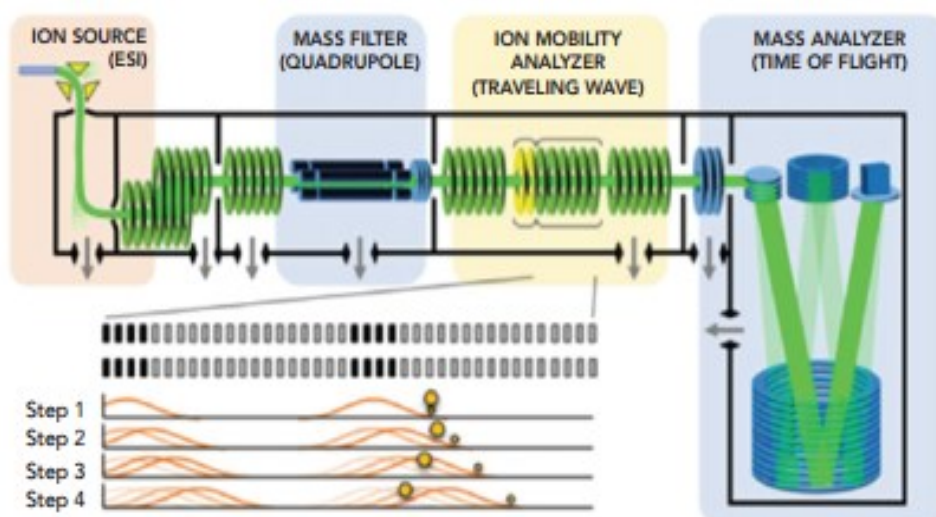
Temporally-Dispersive Ion Mobility Techniques



Εικόνα 5.2: Όργανα IM-MS. Ένα φασματόμετρο κινητικότητας ιόντων ηλεκτροστατικού σωλήνα μετατόπισης (DTIMS) συνδεδεμένο με ένα τετραπολικό φασματόμετρο μάζας χρόνου πτήσης (QTOF)

[62]

Στην εικόνα 5.2 είναι ένα φασματόμετρο κινητικότητας ιόντων διακινούμενου κύματος (TWIMS). Το TWIMS είναι συνήθως η μονάδα υψηλότερης ανάλυσης ή διαχωρισμού. Το DTIMS έχει ονομαστεί ως φασματομετρία ιόντων κινητικότητας υψηλού πεδίου, ασύμμετρης κυματομορφής (FAIMS)



Εικόνα 5.3: Ηλεκτροδυναμικό φασματόμετρο κινητικότητας ιόντων κινούμενων κυμάτων (TWIMS) σε συνδυασμό με ένα τετραπολικό φίλτρο μάζας και ένα όργανο QTOF.

[62]

Η δομική ανάλυση βιοφαρμάκων προϊόντων γίνεται με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό, αναλυτική υπερφυγοκέντρωση και κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. Καμία από αυτές τις τεχνικές, ωστόσο, δεν είναι εύκολη ή ισχυρή. Έτσι, με βάση τη χρήση του MS για ανάλυση ανέπαφης μάζας, χαρτογράφηση πεπτιδίων και ανάλυση γλυκάνης, προτείνουμε ότι το IMS χρησιμεύει ως μια ισχυρή, βελτιωμένη εναλλακτική λύση στις προαναφερθείσες τεχνικές. Είναι επίσης ταχύτερη και φθηνότερη από άλλες μεθόδους όπως το NMR και η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. Μπορεί να χρησιμεύσει για την παρακολούθηση των δομικών χαρακτηριστικών των βιοφαρμάκων, ειδικά όταν εξετάζονται τα βιοομοειδή. Η IMS είναι μια εναλλακτική και βιώσιμη προσέγγιση για την αποσαφήνιση δομικών πληροφοριών σχετικά με ένα βιοφάρμακο προϊόν. Αυτή η γνώση δίνει σιγουριά ότι το φάρμακο θα είναι ασφαλές, αποτελεσματικό και με τη σωστή δομή θα διασφαλίζει την ποιότητα.[62]

Η συμβατότητα του IMMS με τις υπάρχουσες ροές εργασίας MS το καθιστά ελκυστικό εργαλείο για εύκολη εφαρμογή σε ελεγχόμενες βιομηχανικές ρυθμίσεις. Οι υπάρχουσες ροές εργασίας όπως η χαρτογράφηση πεπτιδίων και η ανάλυση πρωτεΐνης κυττάρου ξενιστή (HCP) μπορούν να ωφεληθούν από την αυξημένη ταχύτητα διαχωρισμού αέριας φάσης στο IMMS έναντι των μεθόδων υγρής φάσης και της κλασμάτωσης εκτός σύνδεσης. Η βελτιωμένη ανάλυση του IMMS μπορεί επίσης να βοηθήσει στην επίλυση ισοβαρικών δομών συμπεριλαμβανομένων εκείνων που προέρχονται από ισομερείς γλυκάνες.[29]

Πίνακας 5.1: Τεχνικές IMMS και εφαρμογές.

ΤΕΧΝΙΚΗ IMMS	ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΜΑΖΑΣ	ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΑ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΑ
TWIMS $\leq \sim 45$ όπως ορίζεται $\Omega/\Delta\Omega$ με FWHM	TOF	Χαρακτηρισμός πρωτεϊνών (Χαρτογράφηση πεπτιδίων), ανάλυση γλυκάνης, φυσική MS και CIU/CID, ανάλυση μεταβολιτών
TWIMS $\leq \sim 750$ όπως ορίζεται $\Omega/\Delta\Omega$ με FWHM	TOF	Ανάλυση διαμόρφωσης πρωτεΐνης - MS και CIU/CID, ανάλυση γλυκάνης, ανάλυση πολυμερούς/έκδοχου, ανάλυση φυσικού προϊόντος
FAIMS	ORBITRAP/QQQ	Μεταβολομική/Λιπιδομική, πρωτεομική, χαρακτηρισμός πρωτεϊνών, αφαίρεση μήτρας/χημικής παρεμβολής στην ποσοτική ανάλυση,
DTIMS > 100 όπως ορίζεται $\Omega/\Delta\Omega$ με FWHM	TOF	Χαρακτηρισμός πρωτεϊνών (Χαρτογράφηση πεπτιδίων), ανάλυση γλυκάνης, ανάλυση μεταβολιτών
DMS > 100 όπως ορίζεται $\Omega/\Delta\Omega$ με FWHM	QQQ/TOF	Μεταβολομική / Λιπιδομική, αφαίρεση χημικών παρεμβολών στην ποσοτική ανάλυση

[29]

Η IMMS έχει αποδειχθεί μια ισχυρή τεχνική για ανάλυση γλυκάνης, που προσφέρει δομικές πληροφορίες με βάση τον διαχωρισμό κατά μέγεθος, φορτίο και σχήμα. Το IMMS των γλυκανών έχει επιτρέψει κάποιο διαχωρισμό ισομερών. Χρησιμοποιώντας το TWIMS, διαχωρίστηκαν γλυκάνες που διέφεραν κατά περισσότερες από μία μονάδες μονοσακχαρίτη. Υπάρχουν περιορισμοί στη χρήση του IMMS για τον διαχωρισμό των ισομερών γλυκάνης λόγω της ανάλυσης αυτών των οργάνων που είναι επί του παρόντος εμπορικά διαθέσιμα, επιπλέον των ισομερών γλυκάνης που έχουν μόνο μικρές διαφορές στη διατομή σύγκρουσης (CCS). Η CCS μετρά την αποτελεσματική επιφάνεια ενός ιόντος όταν αυτό συγκρούεται με τα μόρια του αερίου υποστήριξης κατά τη διάρκεια της ανάλυσης IMS. Η CCS είναι σημαντική για την κατανόηση της δομής και της διαμόρφωσης των ιόντων και μπορεί να παρέχει πληροφορίες για τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Η ικανότητα διάκρισης μεταξύ μεγαλύτερων ισομερών γλυκάνης μπορεί να γίνει δύσκολη, καθώς οι μικρές διαφορές στη δομή θα έχουν μικρό αντίκτυπο στο σχήμα μεγαλύτερων ανέπαφων πρόδρομων ουσιών και έτσι, σε σύγκριση με μικρότερες δομές γλυκάνης, οι πληροφορίες CCS τους θα παρέχουν περιορισμένη ικανότητα [63,64]

5.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ - LC

Η HPLC είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, τον χαρακτηρισμό και την ποσοτικοποίηση συστατικών ενός δείγματος. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι διαχωρισμού HPLC για την ανάλυση γλυκανών, [65] όπως και για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας και της καθαρότητας των βιοφαρμάκων, μια άλλη τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η HPLC αντίστροφης φάσης (RP-HPLC). Η αντίστροφη φάση, η προσρόφηση σε στήλες από πορώδη άνθρακα γραφίτη, οι υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις και η ιοντοανταλλαγή είναι χαρακτηριστικά παραδείγματα. Τα τελευταία χρόνια, η απόδοση των χρωματογραφικών στηλών έχει βελτιωθεί δραματικά. Ως αποτέλεσμα, οι χρόνοι ανάλυσης και οι χωρητικότητες διαχωρισμού έχουν βελτιωθεί σημαντικά.[60] Πέρα από αυτές τις αναλυτικές μεθόδους, η υγρή χρωματογραφία-μάζας (LC-MS) έχει γίνει όλο και πιο δημοφιλής για την παρακολούθηση βιοφαρμάκων και τη σταθερότητα τους. [39]

Μια άλλη ενδιαφέρουσα κατηγορία βιοφαρμάκων αντιπροσωπεύεται από θραύσματα αντισωμάτων (Fabs). Τρία Fabs έχουν ήδη γίνει δεκτά από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) και περισσότερα από 50 Fabs βρίσκονται σε εξέλιξη στην κλινική. Παρά το γεγονός ότι είναι μόνο μικρά θραύσματα, εξακολουθούν να καταφέρνουν να δεσμεύουν τα αντιγόνα. Επιπλέον, όντας μικρότερα από το πλήρες αντίσωμα, έχουν καλύτερη διείσδυση στους ιστούς. Μέχρι σήμερα, είναι δυνατή η χρήση μεθόδων που βασίζονται σε HPLC που χρησιμοποιούν στήλες ανταλλαγής ιόντων, εξαίρεση αντίστροφης φάσης ή διαστάσεων και μεθόδους που βασίζονται σε LC-MS για τον χαρακτηρισμό αυτών των θραυσμάτων. Ωστόσο, οι μέθοδοι που βασίζονται σε MS είναι ακριβές ενώ τα τρέχοντα πρωτόκολλα HPLC στερούνται ειδικότητας και αναπαραγωγιμότητας.

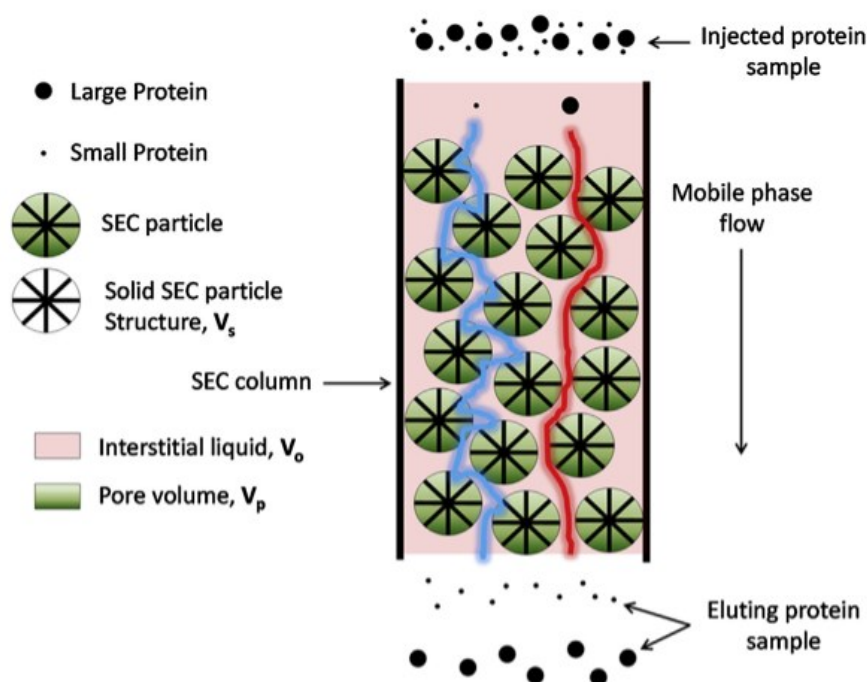
Οι Gundinger et al. επικύρωσαν την αναλυτική διαδικασία ποσοτικοποίησης Fab για την ειδικότητα, την ακρίβεια, τη γραμμικότητα, τα όρια ανίχνευσης και την ευρωστία της σύμφωνα με τις οδηγίες ICH Q2(R1). Τα αποτελέσματά τους τα επιβεβαίωσαν με ELISA και απέδειξαν ότι η αναπτυγμένη μέθοδος HPLC είναι επίσης κατάλληλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ανασυνδυασμένου εκφρασμένου Fab σε ακατέργαστο προϊόν λύσης E.

Coli. Με τη σχετική τυπική απόκλιση (RSD) μεταξύ των τριπλών δειγμάτων να είναι κάτω από 7% για όλες τις μετρήσεις. Όπως και το LOD προσδιορίστηκε με συγκέντρωση 15,0 $\mu\text{g/mL}$ και το LOQ με 45,6 $\mu\text{g/mL}$, δείχνοντας την υψηλή ευαισθησία της μεθοδολογίας.[66]

Το PGC (Porous Graphitic Carbon) αναφέρεται στον πορώδη άνθρακα γραφίτη, ο οποίος χρησιμοποιείται ως στατική φάση στην υγρή χρωματογραφία (HPLC) και σε άλλες χρωματογραφικές τεχνικές. Είναι μια στατική φάση μικτού τρόπου που αλληλεπιδρά με τις αναλυόμενες ουσίες με διάφορους τρόπους. Για τις γλυκάνες, αυτό ουσιαστικά μεταφράζεται σε διαχωρισμό με βάση το μέγεθος και την πολικότητα (ή το φορτίο). Η αλληλεπίδραση γλυκάνης-PGC επηρεάζεται επίσης σε μεγάλο βαθμό από την τρισδιάστατη δομή. Έτσι, ο διαχωρισμός PGC είναι δημοφιλής για ανάλυση γλυκάνης ειδική για ισομερή. Το PGC είναι ένα υλικό που αποτελείται από σωματίδια γραφίτη με πορώδη δομή, προσφέροντας μοναδικές χρωματογραφικές ιδιότητες. Το PGC έχει ισχυρή δομή σαν σφουγγάρι. Είναι 80% πορώδες και έχει ειδική επιφάνεια περίπου 150 m^2/g . Το PGC δρα ως πολύ ισχυρό υδρόφοβο προσροφητικό. Η υψηλότερη συνολική ισχύς διαχωρισμού του PGC επιτρέπει τον διαχωρισμό ισομερών ακόμη και για γλυκάνες EPO με υψηλή σιαλυλίωση. [67–69]

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ- SEC

Για τον χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών ως προς το μοριακό τους βάρος, η πιο αποτελεσματική τεχνική είναι η χρήση της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους (SEC). Αυτή η τεχνική διαχωρίζει τα μόρια ανάλογα με το μέγεθός τους: τα μόρια με υψηλό μοριακό βάρος εκκλύονται πρώτα επειδή αποκλείονται από τους πόρους και ταξιδεύουν με την κινητή φάση, ενώ τα μικρότερα μόρια, δηλαδή αυτά με το μικρότερο μοριακό βάρος, μπορούν να εισέλθουν στους πόρους και θα εκκλυθούν αργότερα. Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC) παραμένει στις μέρες μας μια από τις πιο συχνές μεθόδους για τον προσδιορισμό των μοριακών βαρών κατά την παραγωγή βιοφαρμάκων.[70] Σε αντίθεση με την RP-HPLC, η SEC πραγματοποιείται υπό συνθήκες διαχωρισμού οι οποίες αναμένεται να μην επηρεάσουν τη δομή ανώτερης τάξης της πρωτεΐνης.[71]



Εικόνα 5.4: Απεικόνιση τρόπου διαχωρισμού πρωτεϊνών στη SEC. [72]

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΝΑΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ - RP-HPLC

Η RP-HPLC διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση τις διαφορές στην υδροφοβικότητα. Επίσης, πρωτεΐνες που διαφέρουν για ένα μόνο υπόλειμμα αμινοξέος μπορούν συχνά να διαχωριστούν με αυτή τη μέθοδο [71]. Η HPLC ανάστροφης φάσης (RP-HPLC) είναι κατάλληλη για αυτό το σκοπό λόγω της υψηλής ανάλυσης της. Μικρές έως μεσαίου μεγέθους πρωτεΐνες (έως 25 kDa) που διαφέρουν από ένα μόνο υπόλειμμα αμινοξέος μπορούν συχνά να διαχωριστούν με αυτή τη μέθοδο. Ως εκ τούτου, η RP-HPLC χρησιμοποιείται συχνά για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαρμακευτικών πρωτεϊνών και για την ανάλυση στενά συγγενών παραλλαγών πρωτεΐνης ή προϊόντων αποδόμησης [71].

Η εισαγωγή ενός χρωμοφόρου στα μόρια του σακχάρου μέσω της παραγωγοποίησης και του διαχωρισμού του μίγματος σύνθετων σακχαριτών με HPLC ανάστροφης φάσης έχουν γίνει δημοφιλή από τη δεκαετία του 1980 [73]. Κοινές φθορίζουσες ουσίες που χρησιμοποιούνται για την επισήμανση των μονοσακχαριτών πριν από την ανάλυση RP-HPLC είναι: ανθρανιλικό οξύ (AA), 2-αμινοβενζαμίδιο, 2-αμινοπυριδίνη, ισοθειοκυανικός φαινυλεστέρας, 9-φθορενυλμεθοξυκαρβονυλ-υδραζίνη 4-μεθυλοκουμαρίνη, 7-αμινο-1,3-ναφθαλινο-δισουλφονικό. Μεταξύ των μεθόδων RP-HPLC, ο διαχωρισμός και η ανίχνευση βάσει AA αναφέρεται ότι παρέχουν την υψηλότερη ευαισθησία. Τα όρια ανίχνευσης περίπου 5 pmol για πρότυπα εξόξης μπορούν να εκτιμηθούν. Το κύριο πλεονέκτημα του AA είναι η καταλληλότητά του για τον ποσοτικό προσδιορισμό αμινο- και ουδέτερων μονοσακχαριτών χωρίς επανα-N-ακετυλίωση των αμινοεξόδων. Η επισήμανση με όλες τις άλλες φθορίζουσες ετικέτες απαιτεί ότι οι εξοζαμίνες πρέπει να είναι N-ακετυλιωμένες πριν από την επισήμανση με φθορισμό. [74] Μια ακόμα ιδιαίτερα δημοφιλής προσέγγιση είναι ο διαχωρισμός ανάστροφης φάσης των N-7 συνδεδεμένων γλυκανών που έχουν επισημανθεί με PA (πυριδυλαμίνη). [75] Τα παράγωγα διαχωρίζονται με βαθμιδωτή έκλυση χρησιμοποιώντας n-βουτανόλη, και αυτός ο τρόπος υποδεικνύει την ειδική ανάλυση της δομής των ολιγοσακχαριτών. Η κατακράτηση γλυκανών σημασμένων με PA

παραμετροποιείται και εφαρμόζεται για την πρόβλεψη της κατακράτησης γλυκανών άγνωστης δομής [60]. Η διατήρηση των ολιγοσακχαριτών στις στήλες ODS (Octadecylsilane, στήλες που είναι επικαλυμμένες με C18, δηλαδή αλκυλομάδες 18 ατόμων άνθρακα (οκταδεκυλομάδες), οι οποίες είναι δεσμευμένες στην επιφάνεια της σίλικα, του υλικού πλήρωσης της στήλης) εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την υδροφοβικότητα των ετικετών και των συστατικών μονοσακχαριτών, αλλά ο μηχανισμός συγκράτησης των γλυκανών στη στήλη ODS δεν είναι σαφής. [76]. Η RP-HPLC απαιτεί τη χρήση ενός οργανικού τροποποιητή (συνήθως ακετονιτριλίου (ACN)) και παράγοντα ζευγαρώματος ιόντων (συνήθως τριφθοροξικό οξύ (TFA)) για την επίτευξη βέλτιστων συνθηκών διαχωρισμού.[77]

Ένα πρόβλημα που έχει είναι ο τρόπος δημιουργίας κατακράτησης στο RP-HPLC για ενώσεις χωρίς ή πολύ χαμηλή εγγενή κατανομή σε συσκευασίες με συμβατική λειτουργικότητα RP. Σε εκείνες τις περιπτώσεις όπου παρατηρείται κάποια κατακράτηση, συνήθως απαιτούνται εκλουστικά με πολύ χαμηλές προσμίξεις οργανικών διαλυτών. Η ανεπαρκής διαβροχή φάσης και η αποβολή του υγρού έκλουσης από το χώρο των πόρων συχνά συνοδεύει τέτοιες προσπάθειες και επομένως τα υψηλά υδατικά διαλύματα έκλουσης συνδέονται συχνά με μη αναπαραγώγιμους χρόνους κατακράτησης και χαμηλές αποδόσεις διαχωρισμού. Έχουν γίνει πολυάριθμες προσπάθειες για να αντιμετωπιστεί αυτή η έλλειψη κατακράτησης, κυρίως από ομάδες με πολικές ενσωματωμένες ή πολικές ακραίες ομάδες που μειώνουν τον κίνδυνο αφυδάτωσης των φάσεων C 18. Ωστόσο, αυτές οι στατικές φάσεις παρέχουν χαμηλότερη κατακράτηση από τις τυπικές φάσεις C 18 και η προσέγγιση είναι επίσης ακατάλληλη για ενώσεις με χαμηλή υδατική διαλυτότητα. Οι πραγματικά πολικές ενώσεις δεν θα διατηρηθούν ακόμη και σε αυτές τις πιο πολικές στατικές φάσεις.

Σε εκείνες τις περιπτώσεις όπου η έλλειψη κατακράτησης οφείλεται σε μία ή περισσότερες φορτισμένες λειτουργικές ομάδες, η κατακράτηση επιτυγχάνεται εύκολα με μηχανισμούς κυκλομβικής αλληλεπίδρασης. Η ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία είναι μια προφανής επιλογή και μπορεί να χρησιμοποιηθεί πρακτικά για όλες τις φορτισμένες διαλυμένες ουσίες, από μικρά ανόργανα ιόντα έως πρωτεΐνες και άλλα βιολογικά μακρομόρια. Μια εναλλακτική λύση στην ανταλλαγή ιόντων είναι το ζεύγος ιόντων, το οποίο επιτρέπει τη χρήση στηλών RP που είναι λιγότερο δαπανηρές και συχνά έχουν καλύτερη απόδοση διαχωρισμού σε σύγκριση με αποκλειστικούς ιοντοανταλλάκτες. Η αυξημένη κατακράτηση προκαλείται από έναν παράγοντα ζευγαρώματος ιόντων, ο οποίος είναι μια ιοντική ένωση φορτίου αντίθετη προς τη διαλυμένη ουσία, ικανή να εισέλθει σε μια ισορροπία ιόντων ζευγαρώματος. Το ζεύγος ιόντων χρησιμοποιείται κυρίως σε περιπτώσεις όπου η ισορροπία διάστασης/πρωτονίωσης δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για τη μετατροπή της διαλυμένης ουσίας σε μη φορτισμένη μορφή εντός του εφαρμοστέου εύρους pH του υλικού της στήλης που χρησιμοποιείται. Η κατακράτηση μπορεί να θεωρηθεί είτε ως διαμερισμός αφόρτιστων ζευγών ιόντων στην υδρόφοβη στατική φάση είτε ως δυναμική επικάλυψη της στατικής φάσης με το αντιδραστήριο ζευγοποίησης ιόντων που οδηγεί σε μηχανισμό κατακράτησης τύπου ανταλλαγής ιόντων. [78]

Ο Shaligram et al χρησιμοποίησαν την RP-HPLC για τον διαχωρισμό της ερυθροποιητίνης παρουσίας HSA. Η HSA (Λευκοματίνη Ορού Ανθρώπου) είναι μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στο ανθρώπινο πλάσμα. Είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη στον ανθρώπινο ορό και παίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της οσμωτικής πίεσης του αίματος, καθώς και στη μεταφορά διαφόρων ουσιών, όπως λιπαρά οξέα, ορμόνες, φάρμακα και τοξίνες. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός έγινε επιτυχώς, επικυρώνοντας κιόλας την μέθοδό τους.[79]

Η ιονο-ζεύγους χρωματογραφία (Ion-Pair Chromatography - IPC) είναι μια σημαντική τεχνική στη χρωματογραφία υγρών υψηλής απόδοσης (HPLC) και έχει πολλές εφαρμογές στον ποιοτικό έλεγχο βιοφαρμάκων. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην προσθήκη ενός ιονικού ζεύγους (ion-pair reagent) στην κινητή φάση της χρωματογραφικής διαδικασίας, το οποίο συσχετίζεται με τα αναλύοντα μόρια και βελτιώνει τη διαχωριστική ικανότητα τους.

Η IPC χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και την ανίχνευση πρωτεϊνών και πεπτιδίων με διαφορετικές ιονικές ιδιότητες. Είναι κατάλληλη για την αξιολόγηση της καθαρότητας και της σταθερότητας των πρωτεϊνικών προϊόντων και των πεπτιδίων, διασφαλίζοντας την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Ακόμη είναι κρίσιμη για την επαλήθευση της συμμόρφωσης των βιοφαρμάκων με τις προδιαγραφές ποιότητας και ασφάλειας. Στην περίπτωση των αμινογλυκοσίδων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση προσμείξεων, παραπροϊόντων και υπολειμμάτων από τη διαδικασία παραγωγής, διασφαλίζοντας την καθαρότητα και την αποτελεσματικότητα του τελικού προϊόντος.

Ο συνδυασμός της ιονο-ζεύγους χρωματογραφίας (Ion-Pair Chromatography, IPC) με την ανάστροφη φάση χρωματογραφίας υγρών υψηλής απόδοσης (Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC) προσφέρει ένα ισχυρό εργαλείο για τον ποιοτικό έλεγχο βιοφαρμάκων. Αυτός ο συνδυασμός μπορεί να βελτιώσει την ανάλυση και την ποσοτικοποίηση ιονογενών και μη ιονογενών ενώσεων σε πολύπλοκα δείγματα, όπως φαρμακευτικά προϊόντα και βιολογικά δείγματα.

Η ιονο-ζεύγους χρωματογραφία είναι μια τεχνική στη χρωματογραφία υγρών υψηλής απόδοσης (HPLC) που χρησιμοποιεί την προσθήκη ενός ιονικού ζεύγους στην κινητή φάση για να ενισχύσει τη διαχωριστική ικανότητα ιονογενών ενώσεων. Από την άλλη πλευρά, η ανάστροφη φάση χρωματογραφίας (RP-HPLC) χρησιμοποιεί υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενώσεων και της στατικής φάσης για τον διαχωρισμό τους. Ο συνδυασμός αυτών των δύο τεχνικών μπορεί να προσφέρει καλύτερη ευαισθησία και επιλεκτικότητα στον ποιοτικό έλεγχο βιοφαρμάκων.[80]

Η παρουσία αμμωνίου κατά την παρασκευή βιοφαρμάκων / φαρμακευτικών ουσιών μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στην ποιότητα και τη σταθερότητα των τελικών προϊόντων. Το αμμώνιο μπορεί να προκύψει από διάφορες πηγές κατά τη βιοπαραγωγή, όπως από τη διάσπαση αζωτούχων ενώσεων ή από τη χρήση αμμωνιακών αλάτων σε καλλιέργειες κυττάρων. Μπορεί να προκαλέσει αποδόμηση πρωτεϊνών και πεπτιδίων, οδηγώντας σε αλλοιώσεις στη δομή και στη λειτουργικότητά τους. Οι αλλαγές στις γλυκοζυλιώσεις μπορούν να επηρεάσουν τη βιοδραστικότητα, την ημιζωή και την ανοσογονικότητά τους. Ακόμη είναι δυνατό να επηρεάσει το PH του καλλιεργητικού μέσου ή του τελικού προϊόντος. Η αλλαγή του PH μπορεί να οδηγήσει σε αποσταθεροποίηση των βιοφαρμάκων μορίων, επηρεάζοντας τη διαλυτότητα και τη σταθερότητά τους. Η παρακολούθηση και ο έλεγχος της συγκέντρωσης του αμμωνίου είναι κρίσιμοι για την παραγωγή υψηλής ποιότητας βιοφαρμάκων.

Οι He et. al χρησιμοποίησαν ένα αντιδραστήριο ανιονικού ζεύγους ιόντων (IPR) στην κινητή φάση για τον διαχωρισμό ιονικών ενώσεων με υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (RPLC). Τα IPR προστίθενται συνήθως στην κινητή φάση για να ρυθμίσουν τη συμπεριφορά κατακράτησης και διαχωρισμού των ιονικών μορίων. Η μέθοδος RPLC-UV χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση της έκλυσης του αμμωνίου κατά την Παρασκευή βιοφαρμάκων. Η απόδοση της αναλυτικής μεθόδου εκτιμήθηκε με την ποσοτικοποίηση του υπολειμματικού αμμωνίου στην καθαρισμένη φαρμακευτική ουσία. Δεν παρατηρήθηκε εμφανής αιχμή παρεμβολής στο χρόνο κατακράτησης του αμμωνίου. Η γραμμική ανάλυση κάλυψε το εύρος συγκεντρώσεων 1–20 ppm (g/ml), με συντελεστή συσχέτισης R^2 τουλάχιστον 0,995. Η ακρίβεια και η επαναληπτικότητα της μεθόδου αξιολογήθηκαν σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης από δύο αναλυτές κατά τη διάρκεια δύο

διαδοχικών ημερών ($n = 6$). Η ακρίβεια κυμάνθηκε στο εύρος 95,7–100,1%, ενώ η επαναληπτικότητα ήταν 1,5–2,1%. [81]

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ ΙΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΥΔΡΟΦΟΒΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ

Η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (IEC) χρησιμοποιείται συνήθως για τον χαρακτηρισμό βιοφαρμάκων και έχει αναδειχθεί ως η τυπική μέθοδος για τον προσδιορισμό της ετερογένειας φορτίου των μονοκλωνικών αντισωμάτων. Σε αυτή την τεχνική ο διαχωρισμός βασίζεται σε αλληλεπιδράσεις coulomb μεταξύ της στατικής φάσης που έχει ιοντικές λειτουργικές ομάδες και των φορτίων που υπάρχουν στα υπό εξέταση μόρια, συνήθως πρωτεΐνες. Η χρωματογραφία υδρόφοβης αλληλεπίδρασης (HIC) παίζει σημαντικό ρόλο στην ταξινόμηση των βιοφαρμάκων: σε αυτή τη μέθοδο η έκλυση των πρωτεϊνών βασίζεται στη διαφορά στην υδροφοβικότητα. [82]

Τα μονοκλωνικά αντισώματα τυπικά χαρακτηρίζονται από μια ποικιλία αναλυτικών/βιοαναλυτικών μεθόδων. Οι κατάλληλες τεχνικές πρέπει να επιτρέπουν την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση αυτών των βιοφαρμάκων. Η ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία χρησιμοποιείται ευρέως για τον χαρακτηρισμό μονοκλωνικών αντισωμάτων: σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται λόγω του επιφανειακού φορτίου των μορίων, που υπαγορεύεται από την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης με τη στατική φάση. Αυτός ο τρόπος επιτρέπει την ταυτοποίηση, τον καθαρισμό και τον χαρακτηρισμό προϊόντων. Όπως σε όλες τις αναλυτικές μεθόδους, διαφορετικές παράμετροι πρέπει επίσης να βελτιστοποιηθούν για μια μέθοδο ανταλλαγής ιόντων για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών: επιλογή στήλης, κινητή φάση, τιμές pH, συγκέντρωση άλατος κ.λπ. [83]

Μια αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιεί χρωματογραφία ανταλλαγής κατιόντων έχει αναπτυχθεί από τον Fekete και την ομάδα του, για τον προσδιορισμό 10 μονοκλωνικών αντισωμάτων, που έχουν εγκριθεί από τον EMA και τον FDA: Panitumumab, Natalizumab, Cetuximab, Bevacizumab, Trastuzumab, Rituximab, Palivizumab, Adalimumab, Denosumab και Ofatumumab. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με σύστημα χρωματογραφία ανταλλαγής κατιόντων.

Για τον χαρακτηρισμό των mAbs. Η χρωματογραφία ανταλλαγής κατιόντων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό εφαρμόζοντας μια βαθμίδα αυξανόμενης συγκέντρωσης άλατος ή εφαρμόζοντας μια βαθμίδα pH, διατηρώντας σταθερή την ιοντική ισχύ. [84]

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΔΡΟΦΙΛΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ- HILIC

Η HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, Υγρή Χρωματογραφία Υδρόφιλης Αλληλεπίδρασης) είναι μια τεχνική χρωματογραφίας υγρής φάσης που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό πολικών ενώσεων, ιδιαίτερα των πρωτεϊνικών γλυκανών [78]. Ο όρος «υδρόφιλος» αναφέρεται στη συγγένεια με το νερό. Η ιδέα της HILIC είναι ότι μια πολική στατική φάση διατηρεί πολικούς αναλύτες που εκλύονται από ένα μείγμα οργανικού διαλύτη (συνήθως ακετονιτρίλιου (ACN)) και νερού. Αποτελεί έναν εναλλακτικό τρόπο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) για τον διαχωρισμό πολικών ενώσεων. Καθώς ακόμη είναι μια παραλλαγή της αντίστροφης φάσης χρωματογραφίας, η οποία χρησιμοποιεί μια πολική στατική φάση και ένα λιγότερο πολικό κινητό φάσμα, συνήθως μείγμα νερού και οργανικών διαλυτών. Η λειτουργία της είναι

σημαντική στον διαχωρισμό των γλυκανών γλυκοπρωτεϊνών. Έχει υψηλή εκλεκτικότητα για τυπικές γλυκάνες αντισωμάτων και τα μη φουκοζυλιωμένα ανάλογα τους. Από την άλλη πλευρά, η χαμηλή εκλεκτικότητα για γλυκάνες με παρόμοια πολικότητα περιπλέκει τον διαχωρισμό δευτερευουσών παραλλαγών γλυκάνης, οι οποίες μπορεί να είναι σημαντικές για την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Οι Melmer et al με την επικυρωμένη αναλυτική μέθοδο για τον χαρακτηρισμό των γλυκανών που απελευθερώνονται από μονοκλωνικά αντισώματα και συνέκριναν τα αποτελέσματά τους με ανάλυση RP-HPLC-MS των γλυκοπεπτιδίων, όπου έδειξαν την ακρίβεια της μεθόδου και την καταλληλότητά της για συστηματικό σχετικό ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνικών N-γλυκανών. [85]

Στο πρώτο στάδιο του διαχωρισμού με τρόπο HILIC, στήλες αμιδίου ή NH_2 χρησιμοποιούνται συνήθως για διαχωρισμό μεγέθους παραγώγων σακχαρίτη. Για παράδειγμα, στη δισδιάστατη χαρτογράφηση χρησιμοποιώντας σήμανση PA, οι N-συνδεδεμένες γλυκάνες που έχουν επισημανθεί με PA διαχωρίζονται πρώτα στον βαθμό πολυμερισμού τους από μια στήλη αμιδίου με βαθμιδωτή έκλουση με ακετονιτρίλιο. Walker et al. [86] ανέφεραν τον διαχωρισμό στήλης αμιδίου των N-21 συνδεδεμένων γλυκανών από πρωτεΐνες ανθρώπινου πλάσματος με επισημάνση υδραζιδίου. Οι φάσεις HILIC προσφέρουν το πλεονέκτημα της προγνωστικής εκλεκτικότητας με την κατακράτηση να αυξάνεται με την αύξηση του μεγέθους της γλυκάνης και της υδροφιλικότητας.

Ο Πίνακας 5.2 συνοψίζει τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες λειτουργίες LC, τις αντίστοιχες προσωρινές ρυθμίσεις κινητής φάσης που χρησιμοποιούνται και τη συμβατότητα με την ανίχνευση MS [9]. Η υγρή χρωματογραφία αναστροφής φάσης (RPLC) και υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC) είναι η πλέον κατάλληλη για σύζευξη με ανίχνευση MS λόγω της συμβατότητάς τους με χαμηλής συγκέντρωσης, πτητικά ρυθμιστικά διαλύματα. Άλλοι τρόποι διαχωρισμού συνήθως χρησιμοποιούν μη πτητικά άλατα, συχνά σε υψηλή συγκέντρωση, και δεν μπορούν να συνδεθούν άμεσα με την ανίχνευση MS. Αυτές περιλαμβάνουν τη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC), τη χρωματογραφία ιοντικής ανταλλαγής (IEX), τη χρωματογραφία συγγένειας και τη χρωματογραφία υδροφοβικής αλληλεπίδρασης (HIC)

Πίνακας 5.2: Διαφορετικοί τρόποι διαχωρισμού LC που χρησιμοποιούνται συνήθως στην ανάλυση πρωτεϊνών.

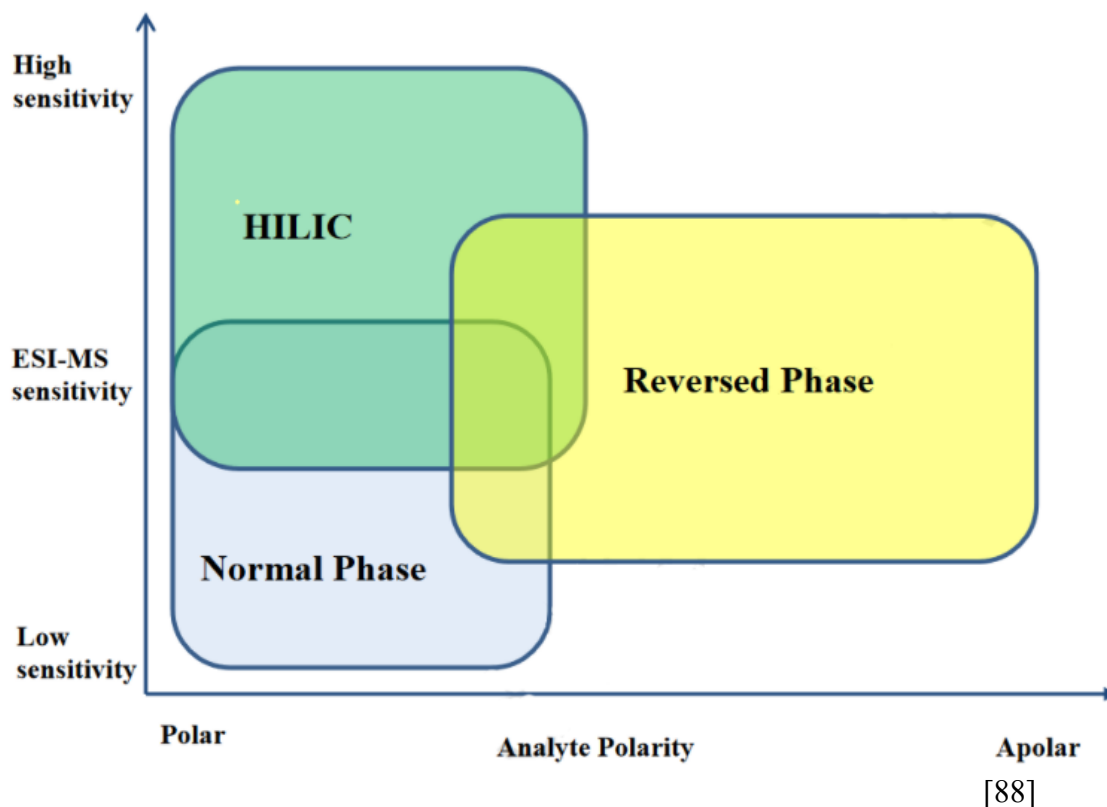
<u>ΕΙΔΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ</u>	<u>ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΙ ΑΝΑΛΥΤΕΣ</u>	<u>ΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑ MS</u>
RP-LC	ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ, ΠΕΠΤΙΔΙΑ, AMINOΞΕΑ	ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΗ
HILIC	ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ, ΓΛΥΚΑΝΕΣ	ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΗ
SEC	ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ, ΠΕΠΤΙΔΙΑ	ΧΑΜΗΛΗ
IEX	ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ, ΠΕΠΤΙΔΙΑ	ΧΑΜΗΛΗ

[87]

Το ενδιαφέρον για την τεχνική HILIC τα τελευταία χρόνια έχει εξελιχθεί από τις αυξανόμενες απαιτήσεις για ανάλυση πολικών φαρμάκων, μεταβολιτών και βιολογικά σημαντικών ενώσεων στην πρωτεομική, τη γλυκομική και την κλινική ανάλυση. Η HILIC επιτρέπει επίσης την ανάλυση φορτισμένων ουσιών, όπως στη χρωματογραφία ιόντων (IC). Ένας άλλος λόγος για την αυξανόμενη δημοτικότητα του HILIC είναι η εξαιρετική του καταλληλότητα για σύζευξη με φασματομετρία μάζας (MS). Το σχήμα 5.1 δείχνει πώς το HILIC συμπληρώνει άλλους τομείς της χρωματογραφίας και επεκτείνει το εύρος των επιλογών διαχωρισμού. Γενικά, τα πλεονεκτήματα της HILIC συνοψίζονται ως εξής:

- (i) μπορούν να ληφθούν καλά σχήματα κορυφής για βάσεις,
- (ii) Η ευαισθησία MS ενισχύεται λόγω της υψηλής οργανικής περιεκτικότητας στην κινητή φάση και της υψηλής απόδοσης των τεχνικών ψεκασμού και αποδιάλυσης,
- (iii) μπορεί συχνά να γίνει άμεση έγχυση εκχυλισμάτων που εκλύονται από στήλες εκχύλισης στερεάς φάσης C18 με διαλύτες υψηλής οργανικής περιεκτικότητας, καθώς αυτοί είναι ασθενείς διαλύτες στο HILIC,
- (iv) η σειρά έκλουσης των διαλυμένων ουσιών είναι διαφορετική και γενικά το αντίθετο από αυτό που βρίσκεται στους διαχωρισμούς RP,
- (v) επιτυγχάνεται καλή συγκράτηση των πολικών ενώσεων στο HILIC, ενώ πολύ κακή συγκράτηση επιτυγχάνεται συχνά στο RPLC και
- (vi) είναι δυνατοί υψηλότεροι ρυθμοί ροής λόγω της υψηλής οργανικής περιεκτικότητας και επομένως χαμηλότερου ιξώδους των τυπικών κινητές φάσεις.

Επιπλέον, τα πολικά δείγματα δείχνουν πάντα καλή διαλυτότητα στην κινητή φάση που περιέχει νερό που χρησιμοποιείται στο HILIC, η οποία υπερνικά τα μειονεκτήματα της κακής διαλυτότητας που συναντάται συχνά στο NPLC. Τα αντιδραστήρια ζευγών ιόντων δεν απαιτούνται στο HILIC και μπορούν εύκολα να συζευχθούν με MS, ειδικά στη λειτουργία ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI). Σε αντίθεση με το RPLC, η βαθμιδωτή έκλουση HILIC ξεκινά με έναν οργανικό διαλύτη χαμηλής πολικότητας και εκλύει πολικούς αναλυτές αυξάνοντας την περιεκτικότητα σε πολικό υδατικό



Σχήμα 5.2: Η HILIC ως συμπλήρωμα σε διαχωρισμούς κανονικής φάσης και LC αντίστροφης φάσης

[88]

ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ-MAM

Η μέθοδος πολλαπλών χαρακτηριστικών (MAM) χρησιμοποιεί έναν συνδυασμό δεδομένων MS υψηλής ακρίβειας μάζας / υψηλής ανάλυσης. Είναι μια ολοκληρωμένη προσέγγιση που συνδυάζει πολλαπλές αναλυτικές τεχνικές για την ταυτόχρονη αξιολόγηση πολλών χαρακτηριστικών ενός βιοφαρμάκου. Η MAM έχει τη δυνατότητα να αντικαταστήσει αρκετές συμβατικές ηλεκτροφορητικές και χρωματογραφικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος στον Ποιοτικό Έλεγχο για την απελευθέρωση θεραπευτικών μορίων. Αντιπροσωπεύει μια βελτιστοποιημένη αναλυτική λύση για την εστίαση στα χαρακτηριστικά του θεραπευτικού μορίου που είναι απαραίτητα για τη λειτουργία και την εφαρμογή των αρχών QbD σε όλη την ανάπτυξη της διαδικασίας, την κατασκευή και τη διάθεση φαρμάκων. Η μέθοδος πολλαπλών χαρακτηριστικών (MAM), έχει αποκτήσει αυξημένο ενδιαφέρον και εφαρμογές στη βιομηχανία. Μια μέθοδος χαρτογράφησης πεπτιδίων που βασίζεται σε γρήγη χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS), ή και για τον χαρακτηρισμό και τον σχετικό ποσοτικό προσδιορισμό των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων σε βιοθεραπευτικά μόρια. Αυτή η μέθοδος χαρτογράφησης πεπτιδίων χρησιμοποιεί έναν συνδυασμό δεδομένων MS υψηλής ακρίβειας μάζας / υψηλής ανάλυσης που παράγονται από την τεχνολογία Orbitrap και αυτοματοποιημένης αναγνώρισης και σχετικής ποσοτικοποίησης μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων με αποκλειστικό λογισμικό (Pinpoint). Το MAM μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαλογή κλώνων, ανάπτυξη διαδικασίας, συγκρισιμότητα και αξιολόγηση σταθερότητας. [89–91]

Ο Rathore et al [92] εξέτασαν τον ρόλο της φασματογραφίας μάζας τον χαρακτηρισμό των βιολογικών πρωτεϊνικών προϊόντων και συνόψισαν τη χρήση της MS σε έξι βασικούς τομείς ανάλυσης προϊόντων βιοτεχνολογίας: δοκιμή ταυτότητας προϊόντος, χαρακτηρισμός, αξιολόγηση συγκρισιμότητας, ανάλυση νοθείας, επίδειξη συνοχής κρίσιμης ποιότητας κατά τη διάρκεια του προϊόντος ανάπτυξη και σε φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές μελέτες. Ενώ η χαρτογράφηση πεπτιδίων με βάση το LC-MS χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια για τον χαρακτηρισμό βιοθεραπευτικών πρωτεϊνών σε αιτήσεις για χορήγηση άδειας βιολογικών προϊόντων, οι εταιρείες επιδιώκουν τώρα τη χρήση της μεθόδου χαρτογράφησης πεπτιδίων για δοκιμές ποιοτικού ελέγχου (QC).

Αν και η MAM ενσωματώνει όλες τις δυνατότητες της χαρτογράφησης πεπτιδίων LC-MS, προσφέρει επίσης βελτιωμένες δυνατότητες για ταυτόχρονη ανίχνευση, ταυτοποίηση, ποσοτικοποίηση και έλεγχου ποιότητας. Ως μέθοδος συστήματος ελέγχου, η MAM προσφέρει ιδιαίτερα πλεονεκτήματα όταν οι συμβατικές μέθοδοι δεν είναι κατάλληλες για συγκεκριμένες CQA, ειδικά με νέες μεθόδους και μορφές μορίων. Επιπλέον, η χρήση MAM ως αντικατάσταση πολλαπλών σχετικών συμβατικών τεχνολογιών (αντί για παράλληλες δοκιμές, όταν υπάρχει επαρκής εμπιστοσύνη στην MAM) μπορεί να επιταχύνει το προϊόν ανάπτυξη.

Η MAM που βασίζεται σε πεπτίδια μπορεί να είναι μια μέθοδος πλατφόρμας με πολλές εύκολες στην εκτέλεση επιλογές, όπως θρυψίνη, πέψη Lys-C ή εναλλακτικές λύσεις μη μειωμένου δείγματος. Άλλη επιλογή πρωτεάσης εξαρτάται από τον τύπο των βιοθεραπευτικών πρωτεϊνών που θα αναλυθούν και, σε ορισμένες περιπτώσεις, απαιτείται πολυενζυμική πέψη για να επιτευχθεί πλήρης κάλυψη αλληλουχίας και αξιόπιστη αξιολόγηση μετα-μεταφραστικής τροποποίησης (PTM). Για παράδειγμα, η θρυψίνη χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με Glu-C ή AspN για ορισμένες πρωτεΐνες σύντηξης.[91]

Η βιομηχανία βιοτεχνολογίας έχει χρησιμοποιήσει παραδοσιακούς προσδιορισμούς, συμπεριλαμβανομένης της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (CE), της χρωματογραφίας ανταλλαγής ιόντων, της υγρής χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) και της χρωματογραφίας κανονικής φάσης (NP) ή της υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC), για την παρακολούθηση τροποποιήσεων όπως η γλυκοζυλίωση, η αποκοπή, αποαμιδώσεις και οξειδώσεις. Ο παραδοσιακός προσδιορισμός για την παρακολούθηση των γλυκανών είναι η ανάλυση HILIC. Η HILIC συγκρινόμενη με την MAM, η δεύτερη έδειξε πολύ καλή συσχέτιση με τον προσδιορισμό γλυκάνης HILIC.

Τα θεραπευτικά μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) υπόκεινται σε διάφορες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις (PTMs) κατά τη διάρκεια της διαδικασίας κυτταροκαλλιέργειας, του καθαρισμού, της σύνθεσης και της μακροχρόνιας αποθήκευσης. Αυτές οι τροποποιήσεις μπορεί να επηρεάσουν τη βιολογική δραστηριότητα, τη φαρμακοκινητική και τη φαρμακοδυναμική, την ανοσογονικότητα και την ασφάλεια του φαρμακευτικού προϊόντος και ως εκ τούτου μπορεί να ταξινομηθούν ως πιθανά κρίσιμα ποιοτικά χαρακτηριστικά (CQAs). Οι παράμετροι της διαδικασίας που επηρεάζουν τα πιθανά CQAs πρέπει να αναγνωρίζονται, να χαρακτηρίζονται και να ελέγχονται.[89]

Ο Rogers και η ομάδα του[90] στην μελέτη τους ανέπτυξαν την μέθοδο πολλαπλών χαρακτηριστικών (MAM) για την παρακολούθηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό πολλαπλών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (PTMs) βιοθεραπευτικών μορίων. Η μέθοδος περιλάμβανε μια μέθοδο χαρτογράφησης πεπτιδίων χρησιμοποιώντας έναν συνδυασμό δεδομένων MS υψηλής ακρίβειας μάζας / υψηλής ανάλυσης που δημιουργούνται από την τεχνολογία Orbitrap (φασματόμετρο μάζας Thermo Scientific Exactive Plus) και αυτοματοποιημένη αναγνώριση και σχετική ποσοτικοποίηση μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων με αποκλειστικό λογισμικό (Thermo Scientific Pinpoint). Η μέθοδος Multi-Attribute Method (MAM) παρουσιάζει τα χαρακτηριστικά μιας καθολικής

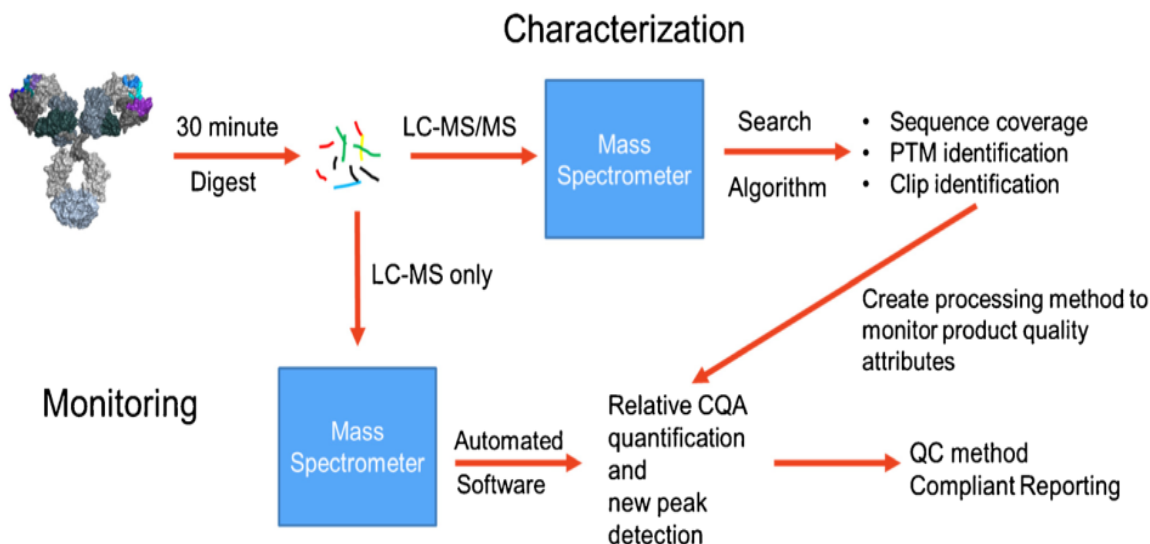
πλατφόρμας που μπορεί να εφαρμοστεί σε διάφορα μόρια και διαδικασίες, από την Ανάπτυξη Διαδικασιών έως την απελευθέρωση φαρμακευτικών προϊόντων από το εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου. Η υψηλή ευαισθησία της MAM επιτρέπει τον λεπτομερή χαρακτηρισμό των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (PTMs) σε ένα μόριο. Αυτή η μέθοδος παρέχει έναν λεπτομερή χάρτη των PTMs που βρίσκονται σε ένα μόριο, ενώ η δημιουργία ενός βιβλίου εργασίας για την παρακολούθηση πολλαπλών PTMs επιτρέπει την ακριβή και αποτελεσματική παρακολούθησή τους με πλήρως αυτοματοποιημένο τρόπο. Η MAM θα επιτρέψει στις εταιρείες βιοφαρμάκων να κατανοήσουν καλύτερα κάθε τροποποίηση σε ένα μόριο μέσω της διαδικασίας παραγωγής, σύνθεσης και αξιολόγησης σταθερότητας και κάθαρσης. Κοιτάζοντας προς το μέλλον, η μέθοδος MAM παρουσιάζει τα χαρακτηριστικά που επιτρέπουν τις εφαρμογές αναλυτικής τεχνολογίας διεργασιών (PAT) και θα πρέπει να γίνει το κατάλληλο εργαλείο για την προώθηση της παρακολούθησης των κρίσιμων ποιοτικών χαρακτηριστικών (CQAs) σε πραγματικό χρόνο. Ο βελτιωμένος χαρακτηρισμός και η παρακολούθηση των θεραπευτικών μορίων με την MAM θα οδηγήσει σε πιο αποτελεσματικές και καλύτερα ελεγχόμενες διαδικασίες και τελικά θα οδηγήσει σε ασφαλέστερα και ανώτερα φαρμακευτικά προϊόντα.

Για τη θεραπεία πρωτεϊνών, η MAM περιλαμβάνει μια μεγάλης κλίμακας, στοχευμένη αναζήτηση των δεδομένων χαρτογράφησης πεπτιδίου χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμο λογισμικό και προκαθορισμένες παραμέτρους που προέρχονται από τη εις βάθος εργασία χαρακτηρισμού που εκτελείται κατά την ανάπτυξη του προϊόντος. (Σχήμα 5.3). Περαιτέρω, η MAM χρησιμοποιεί ποσοτικοποίηση ειδικής θέσης, όπου για μια συγκεκριμένη τροποποίηση αμινοξέος, η ανάγνωση είναι επί τοις εκατό τροποποιημένη (σε σχέση με το μη τροποποιημένο πεπτίδιο, αθροίζοντας όλες τις σχετικές μορφές του τροποποιημένου πεπτιδίου). Μια πρόσθετη λειτουργία επεξεργασίας δεδομένων που ονομάζεται ανίχνευση νέας αιχμής (NPD) είναι ένα ουσιαστικό στοιχείο της MAM. Η ανίχνευση νέας αιχμής εντοπίζει αυτόματα νέες κορυφές σε δείγματα που δοκιμάστηκαν σε σύγκριση με μια αναφορά, με ορισμένα προκαθορισμένα κριτήρια επιλογής κορυφών που εφαρμόζονται με σκοπό την ελαχιστοποίηση της ψευδώς θετικής ανίχνευσης κορυφών. Η NPD λειτουργεί ως μέθοδος ακαθαρσίας/καθαρότητας για την πιθανή ανίχνευση τυχόν νέων ακαθαρσιών στα δείγματα που υπάρχουν πάνω από το προκαθορισμένο όριο ανίχνευσης.

Σύμφωνα με το ICH Q6B, οι ακαθαρσίες που σχετίζονται με το προϊόν είναι μοριακές παραλλαγές του επιθυμητού προϊόντος, όπως πρόδρομες ουσίες και προϊόντα αποδόμησης που προκύπτουν κατά τη διάρκεια της κατασκευής ή/και αποθήκευσης. Αυτές οι παραλλαγές δεν διαθέτουν ιδιότητες συγκρίσιμες με αυτές του επιθυμητού προϊόντος όσον αφορά τη δραστηριότητα, την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια. Οι κρίσιμες ποιοτικές παράμετροι (CQA) σε αυτή την κατηγορία ακαθαρσιών μπορεί να περιλαμβάνουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (PTMs), χημικές τροποποιήσεις διαφόρων υπολειμμάτων αμινοξέων του φαρμακευτικού προϊόντος, λανθασμένες ενσωματώσεις αμινοξέων (παραλλαγές αλληλουχίας) ή διάσπαση της κύριας αλληλουχίας του λόγω υδρόλυσης κατά τη διάρκεια της παραγωγής και της αποθήκευσης.

Τα πρωτόκολλα προετοιμασίας δειγμάτων έχουν βελτιστοποιηθεί και βελτιωθεί, γεγονός που καθιστά δυνατή τη δημιουργία συνεπών, γρήγορων και χαμηλών πέψων πεπτιδίων για ανάλυση MAM. Η εφεύρεση και η εξέλιξη των φασματομέτρων μάζας υψηλής ανάλυσης/υψηλής ακρίβειας μάζας έχει βελτιώσει δραστικά την ευαισθησία και την ειδικότητα, γεγονός που αυξάνει την εμπιστοσύνη της αναγνώρισης και της ποσοτικοποίησης των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Η στιβαρότητα και το αποτύπωμα στην κορυφή του πάγκου των σύγχρονων φασματομέτρων μάζας το καθιστά πρακτικό για χρήση στο εργαστήριο cGMP. Οι πωλητές οργάνων προσφέρουν τώρα

λογισμικό, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απόκτηση δεδομένων MAM και την αυτοματοποιημένη ανάλυση δεδομένων σε εργαστήριο ποιότητας. [93]



Σχήμα 5.4: Ροή εργασιών Multi-Attribute Method. [93]

Πιο πρόσφατα, αναπτύχθηκε μια άθικτη μέθοδος πολλαπλών χαρακτηριστικών που βασίζεται στην ανάλυση μάζας (iMAM). Οι συγγραφείς αξιολόγησαν την αναπαραγωγικότητα των ποσοτικών μετρήσεων της σχετικής αφθονίας των τροποποιήσεων πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας τις τιμές m/z των 6 κορυφαίων καταστάσεων φόρτισης. Βρήκαν ότι η ποσοτική μεταβλητότητα ήταν εντός 20% σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD) για τις περισσότερες τροποποιήσεις πρωτεϊνών στη μέθοδο iMAM που βασίζεται στην ανάλυση άθικτης μάζας[94]

ΚΥΡΙΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ MULTI-ATTRIBUTE METHOD

1. Φασματομετρία Μάζας (MS):

Η MAM χρησιμοποιεί φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης για τον προσδιορισμό της μάζας και της δομής των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων.

2. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC):

Συχνά συνδυάζεται με υγρή χρωματογραφία για τον διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος πριν την εισαγωγή τους στο μαζικό φασματόμετρο.

3. Εκχύλιση Δεδομένων:

Ειδικά λογισμικά και αλγόριθμοι χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των δεδομένων, επιτρέποντας την ταυτόχρονη παρακολούθηση πολλών ιδιοτήτων του δείγματος.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ

- **Ταυτόχρονη Ανάλυση Πολλών Ιδιοτήτων:**

Η MAM επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση πολλών χαρακτηριστικών όπως η καθαρότητα, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (PTMs), η γλυκοζυλίωση, η αλληλουχία και οι παραλλαγές της πρωτεΐνης.

- **Ακριβής και Ευαίσθητη Ανίχνευση:**

Η φασματομετρία μάζας παρέχει υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία, επιτρέποντας τον εντοπισμό μικρών παραλλαγών και τροποποιήσεων στις πρωτεΐνες.

- **Μείωση των Σταδίων Ανάλυσης:**

Η MAM μπορεί να αντικαταστήσει πολλές παραδοσιακές αναλυτικές μεθόδους, μειώνοντας τον αριθμό των απαιτούμενων αναλύσεων και το κόστος.

- **Βελτιωμένος Έλεγχος Ποιότητας:**

Παρέχει πιο ολοκληρωμένη και αξιόπιστη πληροφόρηση για την ποιότητα των βιοφαρμάκων, συμβάλλοντας στη βελτίωση του ελέγχου ποιότητας.

Η συνδυασμένη χρήση φασματοσκοπίας μάζας (MS) και υγρής χρωματογραφίας (HPLC) αποτελεί ισχυρό εργαλείο για τον ποιοτικό έλεγχο βιοφαρμάκων. Αυτή η στρατηγική επιτρέπει την ανάλυση δειγμάτων από διάφορες πηγές χωρίς τη χρήση συστημάτων τεχνητής νοημοσύνης. Συγκεκριμένα, μπορούν να εξεταστούν φαρμακευτικά προϊόντα και μέλι για την παρουσία αντιβιοτικών, ενώ δείγματα νεφρών από ζώα παραγωγής τροφίμων μπορούν να αναλυθούν για την ανίχνευση υπολειμμάτων αντιβιοτικών. Αυτές οι αναλύσεις είναι κρίσιμες για την εξασφάλιση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας των βιοφαρμάκων, προστατεύοντας τη δημόσια υγεία και διασφαλίζοντας τη συμμόρφωση με τους κανονισμούς ποιότητας και ασφάλειας.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΩΝ

Ο ποιοτικός έλεγχος των βιοφαρμάκων είναι κρίσιμος για να διασφαλιστεί η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στον άνθρωπο. Ένα σημαντικό μέρος αυτού του ελέγχου είναι η ανίχνευση και η μέτρηση υπολειμμάτων αμινογλυκοσιδών, που συχνά χρησιμοποιούνται ως αντιβιοτικά τόσο στη βιομηχανία

τροφίμων όσο και στην παραγωγή βιοφαρμάκων. Η ανάλυση δειγμάτων από νεφρούς και μυς ζώων παραγωγής τροφίμων, όπως βοοειδή και χοίροι, καθώς και από μέλι, προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για την παρουσία αυτών των αντιβιοτικών στην τροφική αλυσίδα. Τα δεδομένα από τέτοιες αναλύσεις είναι κρίσιμα όχι μόνο για τη διασφάλιση της ποιότητας των βιοφαρμάκων, αλλά και για την προστασία της δημόσιας υγείας από την υπερβολική έκθεση σε υπολείμματα αντιβιοτικών.

Κάποια από τα αμινογλυκοσιδικά (AG) αντιβιοτικά ανήκουν στην κατηγορία των βιοφαρμάκων, καθώς πολλές από αυτές παράγονται μέσω βιολογικών διεργασιών. Όπως είναι η Στρεπτομυκίνη (*Streptomycin*), η οποία παράγεται από το βακτήριο *Streptomyces griseus* μέσω ζύμωσης. Η Διυδροστρεπτομυκίνη (*Dihydrostreptomycin*) παράγεται μέσω χημικής τροποποίησης της στρεπτομυκίνης, η οποία παράγεται από το *Streptomyces griseus*, η οποία αποτελεί βιοφάρμακο, λόγω της βιολογικής προέλευσης της στρεπτομυκίνης. Η Γενταμικίνη (*Gentamicin*), η οποία παράγεται από βακτήρια του γένους *Micromonospora* μέσω ζύμωσης. Η Νεομυκίνη (*Neomycin*) από το βακτήριο *Streptomyces fradiae* μέσω ζύμωσης. Η Καναμυκίνη (*Kanamycin*) από το βακτήριο *Streptomyces kanamyceticus* μέσω ζύμωσης. Σπεκτινομυκίνη (*Spectinomycin*), που παράγεται από το βακτήριο *Streptomyces spectabilis*. Καθώς υπάρχουν και πολλές ακόμη.

Η HILIC έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανάλυση αμινογλυκοσιδών σε διαφορετικές μήτρες, συμπεριλαμβανομένων των μυών και των νεφρών, του πλάσματος, του ορού, του γάλακτος, του μελιού και κυρίως των υπολειμμάτων αμινογλυκοσιδών. Τα πολλαπλά υπολείμματα αμινογλυκοσιδών και άλλων παρόμοιων μορίων επηρεάζουν και χρησιμεύουν σε διάφορους κρίσιμους τομείς. Μπορούν να επηρεάσουν τη βιολογική δραστηριότητα του φαρμάκου. Για παράδειγμα, η προσθήκη συγκεκριμένων χημικών ομάδων μπορεί να αυξήσει ή να μειώσει την ικανότητα του φαρμάκου να αναστέλλει την ανάπτυξη βακτηρίων. Ακόμη μπορούν να επηρεάσουν τη σταθερότητα του φαρμάκου κατά την αποθήκευση και την μεταφορά του. Όπως ακόμη μπορούν να επηρεάσουν την απορρόφηση, στον μεταβολισμό και την απέκκριση του φαρμάκου από τον οργανισμό.

Ο Kumar και η ομάδα του [95] ανέφερε μια μέθοδο HILIC για την ανάλυση και τη διερεύνηση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς αρκετών αμινογλυκοσιδών (στρεπτομυκίνη, διυδροστρεπτομυκίνη, σπεκτινομυκίνη, απραμυκίνη, νεομυκίνη, παραμομυκίνη, καναμυκίνη Α και γενταμυκίνη). Στατικές φάσεις με τρεις διαφορετικές καταστάσεις φορτίου, όπως πυρίτιο (αρνητικό), μινοπροπύλιο (θετικό), αμίδιο (ουδέτερο) και ZIC HILIC (αμφιτεριονικό). Το αμφιτεριονικό HILIC παρείχε τον πιο ικανοποιητικό διαχωρισμό και ευαισθησία. Η μέθοδος ήταν άμεσα εφαρμόσιμη για την ανάλυση των υπολειμμάτων AG στο μέλι. Με βάση αυτά τα ερευνητικά αποτελέσματα, οι Kumar et al. συνέχισαν να μελετάν υπολείμματα AG σε δείγματα νεφρών από ζώα παραγωγής τροφίμων και σε δείγματα μελιού με διπολικό HILIC σε συνδυασμό με αναλυτή μάζας τριπλού τετραπολικού. Το LOQ κυμαινόταν από 2 έως 125 μg/kg στο μέλι και 25 έως 264 μg/kg σε δείγματα νεφρών, το οποίο είναι πολύ κάτω από τα μέγιστα όρια υπολειμμάτων (MRLs) που έχουν καθοριστεί. Επίσης, σε άλλες μελέτες, οι στατικές φάσεις του αμφιτεριονικού HILIC βρέθηκαν να έχουν καλή απόδοση. Έξι AG (αμικασίνη, γενταμυκίνη, καναμυκίνη, νεομυκίνη, παρομομυκίνη και τομπραμυκίνη) ποσοτικοποιήθηκαν ταυτόχρονα με ZIC HILIC σε συνδυασμό με ανίχνευση ESI-MS/MS στον ανθρώπινο ορό. Παρομοίως, η νεομυκίνη μετρήθηκε ποσοτικά με LC-MS/MS χρησιμοποιώντας HILIC σε ανθρώπινο ορό. Η ανάλυση της νεομυκίνης, της απραμυκίνης και της καναμυκίνης ήταν δυνατή με διπολικό HILIC με ανίχνευση MS και η ίδια στήλη χρησιμοποιήθηκε επίσης με επιτυχία σε μια μελέτη μηχανισμού κατακράτησης.

Τα αντιβιοτικά αμινογλυκοσιδών πολλαπλών υπολειμμάτων σε μύες και νεφρούς βοοειδών και χοίρων ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας LC-MS/MS. Για τον

χρωματογραφικό διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε στήλη ZIC-HILIC. Η μέθοδος βρέθηκε να είναι ευαίσθητη, ισχυρή και εξαιρετικά ειδική για την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση των AG με LOQ 25 ng/g για τη γενταμυκίνη, 50 ng/g για τη σπεκτινομυκίνη, τη διυδροστρεπτομυκίνη, την καναμυκίνη και την απραμυκίνη, και 100 ng/g για τη στρεπτομυκίνη και τη νεομυκίνη, τα οποία είναι όλα πολύ κάτω από τα μέγιστα όρια υπολειμμάτων που έχει ορίσει η Επιτροπή Codex Alimentarius[88,95,96]

Μια αυτοματοποιημένη μέθοδος LC-MS/MS που χρησιμοποιεί στήλη CAPCELL PAK ST HILIC για την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση 15 υπολειμμάτων AGs στους μύες, το συκώτι (χοίροι, κοτόπουλο και βοοειδή), τα νεφρά (χοίροι και βοοειδή), το αγελαδινό γάλα και τα αυγά κότας αναφέρθηκε αλλού [65]. Τα 15 AG αποτελούνται από στρεπτομυκίνη (STREP), αμικασίνη (AMIK), υγρομυκίνη B (HYGRO), διυδροστρεπτομυκίνη (DIHY), νετιλμυκίνη (NETIL), κασουγαμυκίνη (KASUG), καναμυκίνη B (KANA), σισομυκίνη (SISO), σπεκτινομυκίνη (SPECT), γενταμυκίνη C1 (GENT), απραμυκίνη (APRA), παρομομυκίνη (PAROM), τομπραμυκίνη (TOBRA), ριβοσταμυκίνη (RIBOS) και νεομυκίνη B (NEOM). Οι δυνατότητες ανίχνευσης σε αυτή τη μέθοδο κυμαίνονταν από 10 έως 50 µg/kg. Η έκθεση κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος LC-MS/MS θα μπορούσε να εφαρμοστεί στην ανάλυση ιχνών πολυσυστατικών προσμείξεων AG σε σύνθετες μήτρες δειγμάτων. Η μέθοδος HILIC έδωσε ικανοποιητική συγκράτηση και διαχωρισμό των υπολειμμάτων AG.

Στη μελέτη των Gremilogianni και των συνεργατών του, συγκρίθηκαν οι μέθοδοι HILIC και ιόντων ζεύγους (IPC) ως προς την ανίχνευση υπολειμμάτων στρεπτομυκίνης (STR) και διυδροστρεπτομυκίνης (DHSTR) στο γάλα. Η σύγκριση των παραμέτρων επικύρωσης, όπως ευαισθησία, ακρίβεια και ανάκτηση, έδειξε ότι η μέθοδος HILIC επιδείκνυε υψηλότερη ευαισθησία σε σχέση με τη μέθοδο IPC για και τα δύο αντιβιοτικά. Η χρήση στήλης HILIC Fortis βασισμένης σε πυρίτιο προέβαλε την αποτελεσματικότητά της στο διαχωρισμό των ενώσεων.[97]

Πίνακας 5.3: Σύγκριση HILIC και IPC για Στρεπτομυκίνη και Διυδροστρεπτομυκίνη. [97]

	HILIC		IPC	
	Στρεπτομυκίνη	Διυδροστρεπτομυκίνη	Στρεπτομυκίνη	Διυδροστρεπτομυκίνη
LOQ(µg·Kg ⁻¹)	13.9	14	109	31
RECOVERY (%)	85.5	72.3	69.3	56.5
INTER-DAY PRECISION(%)	6.7-8.1	9.8-11.2	8.9-12.1	9.7-13.4

ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Η τραστουζουμάμπη (Herceptin®) είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα (mAb) ανοσοσφαιρίνης γάμμα 1 (IgG1), το οποίο στοχεύει τον υποδοχέα-2 του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (HER2/neu), ο οποίος υπερεκφράζεται σε περίπου 25% των ασθενών με καρκίνο του μαστού.

Οι Damen et al [98] ανέπτυξαν μια μέθοδο υγρής χρωματογραφίας για την ποσοτικοποίηση της τραστουζουμάμπης σε βιολογικά δείγματα, αναπτύχθηκε μια μέθοδος HPLC σε συνδυασμό με ανίχνευση φθορισμού. Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει τη χρήση στήλης Zorbax-300SB C8 σε υψηλές θερμοκρασίες (>70 °C) και κινητή φάση με οργανικούς διαλύτες υψηλής ευοτροφικής ισχύος, όπως ισοπροπανόλη και ακετονιτρίλιο. Το κατώτερο όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LLOQ) ορίστηκε ως λόγος σήματος προς θόρυβο (S/N) τουλάχιστον 5, με όγκο έγχυσης 20 µL στη στήλη HPLC.

Η μέθοδος LC-UV έχει LLOQ 12 g/mL (240 ng στη στήλη) και η μέθοδος LC-φθορισμού έχει LLOQ 2 g/mL (40 ng στη στήλη). Κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης σε 0,1 M γλυκίνης, pH 2,5, με γραμμικότητα μέχρι τα 30 g/mL χρησιμοποιώντας τον ανιχνευτή φθορισμού. Συγκεντρώσεις 35 g/mL και άνω ήταν εκτός του εύρους του ανιχνευτή φθορισμού.

Για την απομόνωση της τραστουζουμάμπης από τον ανθρώπινο ορό, χρησιμοποιήθηκε καθαρισμός ανοσοσυγγένειας με χρήση σφαρόζης και αντισωμάτων ιδιοτύπου κατά της τραστουζουμάμπης. Η τραστουζουμάμπη απομονώθηκε από τον ανθρώπινο ορό και τα δείγματα εγχύθηκαν στη στήλη Zorbax 300SB C8 στους 75 °C, χρησιμοποιώντας τους οργανικούς διαλύτες ισοπροπανόλη και ακετονιτρίλιο με υψηλές ευοτροφικές αντοχές.

Τα δείγματα QC υποβλήθηκαν σε επεξεργασία και αναλύθηκαν εις τριπλούν, με εξαίρεση το μεσαίο επίπεδο QC (15 g/mL), το οποίο υποβλήθηκε σε επεξεργασία και αναλύθηκε εις πενταπλούν. Το δείγμα QC των 85 g/mL αραιώθηκε πέντε φορές με ανθρώπινο ορό ελέγχου πριν από την επεξεργασία. Οι αποκλίσεις από τις ονομαστικές συγκεντρώσεις κυμαίνονταν μεταξύ 80-120%, ενώ για το κατώτερο (LLOQ, 5 g/mL) και το ανώτερο (ULOQ, 40 g/mL) όριο ποσοτικού προσδιορισμού επιτρέπεται απόκλιση έως 25%.

Η μέθοδος αυτή έχει το πλεονέκτημα έναντι της ELISA, καθώς εισάγει ένα βήμα διαχωρισμού HPLC που βελτιώνει την επιλεκτικότητα. Η ανάλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση δειγμάτων ορού ασθενών που έχουν λάβει θεραπεία με τραστουζουμάμπη. Συγκεντρώσεις πάνω από το ανώτατο όριο ποσοτικοποίησης (>ULOQ, >40 g/mL) μπορούν να αραιωθούν 5 φορές με ανθρώπινο ορό ελέγχου πριν από την προεπεξεργασία.

Η νέα αυτή μέθοδος προσφέρει αξιόπιστη ποσοτικοποίηση της τραστουζουμάμπης στον ανθρώπινο ορό, με ακρίβεια <20%, και μπορεί να αποτελέσει μια πιθανή εναλλακτική της ELISA για τη φαρμακοκινητική αξιολόγηση. Οι τεχνικές ανοσοπροσδιορισμού παραμένουν οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες βιοαναλυτικές μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό των mAbs, αλλά η εισαγωγή του διαχωρισμού HPLC παρέχει σημαντικά πλεονεκτήματα σε επιλεκτικότητα και ευαισθησία.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΔΟΧΩΝ

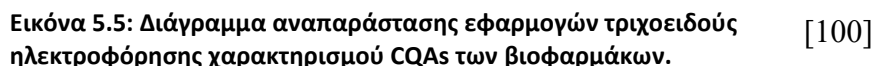
Τα έκδοχα είναι κρίσιμα συστατικά ενός βιοθεραπευτικού προϊόντος καθώς έχουν άμεσο αντίκτυπο στη σταθερότητα του προϊόντος και ως εκ τούτου στην ασφάλεια και την

αποτελεσματικότητά του. Ένα τυπικό βιοθεραπευτικό φαρμακευτικό προϊόν έχει μια ποικιλία εκδόχων και αυτά πρέπει να διατηρούνται εντός πολύ αυστηρών προδιαγραφών προκειμένου να διασφαλιστεί η συνέπεια στην ποιότητα του προϊόντος. Ως εκ τούτου, υπάρχει πάντα ανάγκη για εκτίμηση της συγκέντρωσης εκδόχου στο φαρμακευτικό προϊόν.

Οι Hebbi et al [99] επισήμαναν την ανάπτυξη μεθόδου που βασίζεται στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) για την άμεση και ταυτόχρονη εκτίμηση των εκδόχων σε βιοφαρμακευτικά προϊόντα. Τροποποιήθηκε η μέθοδος έτσι ώστε η πρωτεΐνη να διατηρείται στη στήλη φύλαξης με αποτέλεσμα τον σαφή διαχωρισμό των εκδόχων. Η χρωματογραφία αποκλεισμού ιόντων (IEC) βελτιστοποιήθηκε με επιτυχία για την ανάλυση 17 κοινώς χρησιμοποιούμενων εκδόχων. Οι συνθήκες λειτουργίας όπως η θερμοκρασία, ο τύπος του παράγοντα σύζευξης ιόντων και η ισχύς κινητής φάσης βελτιστοποιήθηκαν, επίσης. Η προτεινόμενη μέθοδος έχει επικυρωθεί με επιτυχία σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες σχετικά με τη γραμμικότητα, την ακρίβεια, την παρεμβολή πίνακα, την ακρίβεια, το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ). Χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για την ανάλυση εκδόχων σε μια ποικιλία βιοθεραπευτικών, συμπεριλαμβανομένης της ινσουλίνης, του rituximab και του ranibizumab. Επιπλέον, η χρησιμότητα της μεθόδου για την ανάπτυξη διεργασιών έχει αποδειχθεί για το σχεδιασμό μιας διαδικασίας υπερδιήθησης/διαδιήθησης για ένα από τα προϊόντα mAb. Η γραμμικότητα της μεθόδου προσδιορίστηκε στο 80–120% της επιθυμητής συγκέντρωσης εκδόχου, σύμφωνα με τη σύνθεση του εμπορικού δείγματος. Όσον αφορά την ακρίβεια, η συγκέντρωση κάθε εκδόχου κυμαινόταν στο εύρος 25–125% της επιθυμητής συγκέντρωσης στα τυφλά δείγματα και αναλύθηκε εις τριπλούν. Το τυποποιημένο φαρμακευτικό προϊόν θεωρήθηκε ως τυφλό στο οποίο η αντίστοιχη αναλυόμενη ουσία προστέθηκε για να μετρηθεί η ακρίβεια με τη μέθοδο ανάκτησης. Και τα δύο προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας αναλογία σήματος προς θόρυβο με 3:1 για το LOD και 10:1 για το LOQ. Η σχετική τυπική απόκλιση, %RSD, για τη μέθοδο ήταν στην περιοχή από 0.11 έως 0.96.

5.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Διάφοροι τύποι μεθόδων ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία για την ανάλυση βιομορίων: τριχοειδής ηλεκτροφόρηση-δωδεκυλοθειικό νάτριο (CE-SDS), τριχοειδής ισοηλεκτρική εστίαση (cIEF) και ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς ζώνης (CZE) για ανάλυση ολιγοσακχαριτών και πρωτεϊνών. Η μέθοδος CE-SDS διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση το υδροδυναμικό τους μέγεθος κάτω από μετουσιωμένες συνθήκες και χρησιμοποιείται συχνά για τον προσδιορισμό της καθαρότητας. Οι μέθοδοι cIEF και CZE διαχωρίζουν τις πρωτεΐνες με βάση το φορτίο τους και χρησιμοποιούνται ως μέθοδοι ταυτότητας και καθαρότητας. Η ανάλυση ολιγοσακχαριτών με CZE προσδιορίζει τη σύνθεση της δομής ολιγοσακχαρίτη κατά την ενζυματική απελευθέρωση γλυκανών από γλυκοπρωτεΐνη και χρησιμοποιείται συχνά ως ποιοτικός προσδιορισμός για την παρακολούθηση της συνέπειας της διαδικασίας παρασκευής.



Το SDS PAGE gel είναι μια κλασική βιοχημική τεχνική που χρησιμοποιείται συνήθως στην ανάπτυξη βιοφαρμάκων με βάση πρωτεΐνες για απελευθέρωση παρτίδας, δοκιμές σταθερότητας, διαλογή σκευασμάτων-ρυθμιστικού διαλύματος, ανάπτυξη διεργασιών και χαρακτηρισμό προϊόντων. Λόγω ορισμένων εγγενών περιορισμών της ανάλυσης SDS

PAGE, πολλά βιοφάρμακα εργαστήρια έχουν μετατοπίσει τις προσπάθειες στην ανάπτυξη αναλύσεων πηκτώματος CE SDS. Οι αναλύσεις CE SDS έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία σε πολλές θεραπευτικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAb) και εμβολίων με βάση τις πρωτεΐνες, και πλέον χρησιμοποιείται συνήθως στο περιβάλλον ποιοτικού ελέγχου για την αξιολόγηση της καθαρότητας και της ακεραιότητας, συμπεριλαμβανομένων των απαιτήσεων επικύρωσης της ανάλυσης που επιτυγχάνονται εύκολα.

Το πλεονέκτημα του πηκτώματος CE SDS έναντι του SDS PAGE είναι προφανές όσον αφορά την αναπαραγωγιμότητα, την ανάλυση και την ταχύτητα. Αυτά τα πιθανά πλεονεκτήματα είναι σημαντικά για κάθε εργαστήριο που υποστηρίζει την ανάπτυξη πρωτεϊνοθεραπευτικών. Αυτή η μέθοδος είναι επίσης ένα χρήσιμο εργαλείο για την αξιολόγηση των προφίλ μη γλυκοζυλιωμένων mAbs. Το μόριο περιέχει φυσικά 2–3% υδατάνθρακες (γλυκάνες) κατά μάζα. Οι γλυκάνες σε ένα mAb παίζουν σημαντικό ρόλο στις φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως η σταθερότητα των πρωτεϊνών, και σε βιολογικές λειτουργίες όπως η ρύθμιση των λειτουργιών τελεστών. Επομένως, είναι σημαντικό να χαρακτηριστεί και να ποσοτικοποιηθεί η μη γλυκοζυλιωμένη μορφή ενός mAb και να θεωρηθεί ως μέρος του συνολικού προφίλ προσμίξεων του φαρμακευτικού προϊόντος.

Εκτός από την ετερογένεια της γλυκάνης, η σχετιζόμενη με το προϊόν ακαθαρσία ενός mAb θα μπορούσε επίσης να προέλθει από ατελές σχηματισμό ανοσοσφαιρίνης G (IgG) σε κυτταρική καλλιέργεια. Το μη αναγωγικό πήκτωμα CE SDS είναι χρήσιμο για τον προσδιορισμό αυτών των ακαθαρσιών που σχετίζονται με το προϊόν καθώς και εκείνων με παραμορφωμένους ή απόντες δισουλφιδικούς δεσμούς.

Μεταξύ των διαφόρων μεθόδων διαχωρισμού με βάση το μέγεθος, η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους υψηλής απόδοσης (HPSEC) παρέχει ακριβείς και αξιόπιστους διαχωρισμούς πρωτεϊνών στη συσσωματωμένη ή μονομερή τους μορφή, αλλά γενικά είναι περιορισμένη στην ικανότητά της να διαχωρίζει πιο στενά συγγενείς παραλλαγές μεγέθους, όπως π.χ. θραύσματα ελαφριάς/βαριάς αλυσίδας που παρατηρήθηκαν σε ανασυνδυασμένα μονοκλωνικά αντισώματα. Η ηλεκτροφόρηση πηκτώματος δωδεκυλοθειικού νατρίου-πολυακρυ-λαμιδίου (SDS-PAGE), από την άλλη πλευρά, παρέχει τυπικά ανώτερους διαχωρισμούς μιας μετουσιωμένης πρωτεΐνης.

ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Η ανάλυση καθαρότητας αντισώματος είναι κρίσιμη για την επιτυχή ανάπτυξη βιοφαρμάκων μονοκλωνικών αντισωμάτων (MAb). Η παρασκευή τους περιλαμβάνει διαδικασίες καθαρισμού πρωτεϊνών, σύνθεση και αξιολόγηση σταθερότητας. Όλες αυτές οι διαδικασίες χρειάζονται εξαιρετικά ακριβή και αναπαραγώγιμα αναλυτικά αποτελέσματα για την υποστήριξη των αποφάσεων που λαμβάνονται από τους προγραμματιστές και τους κατασκευαστές προϊόντων. Μια κοινή τεχνολογία για την ανάλυση καθαρότητας αντισωμάτων είναι η ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου θειικού νατρίου-δωδεκυλεστέρα (SDS-PAGE). Σε αυτή την τεχνική, μια πολυπεπτιδική αλυσίδα δεσμεύει το SDS αναλογικά με τη σχετική μοριακή του μάζα. Η απορρυπαντική φύση του SDS μετουσιώνει τις πρωτεΐνες διαταράσσοντας τους μη ομοιοπολικούς δεσμούς τους, απλοποιώντας έτσι τη μοριακή δομή. Το αρνητικά φορτισμένο SDS δρα επίσης για την επικάλυψη πρωτεϊνών με συνέπεια, επιτρέποντας τον ηλεκτρικά οδηγούμενο διαχωρισμό προς μια άνοδο (ένα θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο).

Η τεχνολογία τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (CE) χρησιμοποιείται συνήθως και για ανάλυση καθαρότητας αντισωμάτων. Σε αυτή την τεχνική, ένα δείγμα αντισώματος

αναμιγνύεται με ένα αντικαταστάσιμο ρυθμιστικό διάλυμα SDS-gel και στη συνέχεια ηλεκτροφορείται μέσω ενός γεμισμένου τριχοειδούς πύργου SDS. Για να επιτευχθεί αυτό, τα δείγματα εγχέονται στις εισόδους των τριχοειδών με χρήση υψηλής τάσης. Η μετανάστευση πρωτεΐνης μέσω της μήτρας διαχωρισμού λαμβάνει χώρα σε ανοδική κατεύθυνση και η ποσοτική ανίχνευση λαμβάνει χώρα κοντά στο περιφερικό άκρο του τριχοειδούς με τη χρήση ενός συστήματος ανίχνευσης απορρόφησης UV. Είναι γνωστό ότι το CE παρέχει υψηλής ποσοτική ανάλυση σε σχέση με το SDS-PAGE. Ωστόσο, η άμεση σύγκριση των δύο τεχνολογιών είναι δύσκολη εκτός εάν χρησιμοποιηθούν τυποποιημένα δείγματα.[44,101–105]

Οι Lacher et al.[106] ανέπτυξαν μία μέθοδο μειωμένης και μη μειωμένης CGE (reduced and non-reduced CGE), η οποία επικυρώθηκε για την ανάλυση καθαρότητας ενός mAb IgG2 ανά ICH και τις ιαπωνικές οδηγίες. Για το οποίο παρασκευάστηκε απογλυκοζυλιωμένο mAb χρησιμοποιώντας επεξεργασία PNGase F του ίδιου mAb. Η προκύπτουσα απογλυκοσυλιωμένη βαριά αλυσίδα μπορούσε να διαχωριστεί από τη γλυκοσυλιωμένη βαριά αλυσίδα υπό αναγωγικές συνθήκες και χρησιμοποιήθηκε για την ακρίβεια (ανάκτηση αιχμής σε 2,6 και 6,5%) και μελέτες γραμμικότητας ακαθαρσιών. Επιπρόσθετα, η γραμμικότητα αποδείχθηκε χρησιμοποιώντας αραιωμένο άθικτο μόριο τόσο για αναγωγικές όσο και για μη αναγωγικές συνθήκες. Το LOQ, το LOD, η ειδικότητα και η σταθερότητα του δείγματος αξιολογήθηκαν επίσης από τους συγγραφείς. Όπως και οι μελέτες ακρίβειας και αναπαραγωγιμότητας έδειξαν αποδεκτές επιδόσεις. Όλα τα ανωτέρω αναπαριστώνται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.4: Αποτελέσματα επικύρωσης ICH της μεθόδου CGE για μονοκλωνικό αντίσωμα [106]

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ Επίτευξη ποιοτικού επιπέδου στο 120% του στόχου φόρτισης	Ο οπτικός έλεγχος όλων των διαγραμμάτων δείχνει ότι είναι γραμμικά. Η γραμμική παλινδρόμηση ελαχίστων τετραγώνων δείχνει ότι η τομή είναι μικρή σε σύγκριση με την κλίση για όλα $R^2 = 0.997, 0.997, 0.998, 0.993, 0.990, 0.995$
ΑΚΡΙΒΕΙΑ (Ανάκτηση σε τρία επίπεδα, 2.6, 6.5 και 32.3%)	Καθαρότητα: 100% (99.8–100.4% για μεμονωμένες αναλύσεις) Ακαθαρσία: 97% (94–108% για μεμονωμένες αναλύσεις) Ανάκτηση σε QL (μέσος όρος): 99% (95–102% για μεμονωμένες αναλύσεις)
ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ (Ακρίβεια συστήματος: 1 προετοιμασία 6 ενέσεις) (Ακρίβεια μεθόδου: 6 προετοιμασίες 1 ένεση) (Σε QL: Ακρίβεια %LC όταν υπήρχε LC σε ποσότητες QL)	Σύστημα: 0.08% RSD (μειωμένο) 0.22% RSD (μη μειωμένο) Μέθοδος: 0.06% RSD (μειωμένο) 0.23% RSD (μη μειωμένο) Σε QL: 3.5% RSD
INTERMEDIATE PRECISION Σε κάθε εργαστήριο-2 αναλυτές, 2 όργανα, 2 τριχοειδή, τριπλές προετοιμασίες, 3 ημέρες	0.13% RSD (μειωμένο) 0.33% RSD (μη μειωμένο)
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ (Ακρίβεια και στις 36 αναλύσεις και από τα δύο εργαστήρια» αποτελέσματα ενδιάμεσης ακρίβειας)	0.12% RSD (μειωμένο) 0.30% RSD (μη μειωμένο)
ΕΛΑΧΙΣΤΟ ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	0.16%
ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	48 ώρες (μειωμένο) 24 ώρες (μη μειωμένη)

5.4 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ

ELISA

Η μέθοδος ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη ανοσολογική τεχνική για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών, αντισωμάτων, αντιγόνων και ορμονών σε δείγματα. Χρησιμοποιείται σε διάφορες εφαρμογές, όπως η διάγνωση ασθενειών μέσω της ανίχνευσης αντισωμάτων ή αντιγόνων σχετιζόμενων με μολυσματικές ασθένειες, όπως ο HIV και η ηπατίτιδα, καθώς και στην παρακολούθηση της απόκρισης του ανοσοποιητικού συστήματος σε θεραπείες, όπως τα εμβόλια. Η ELISA είναι η πιο κοινή προσέγγιση ανοσοδοκιμασίας που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της βιολογικής δραστηριότητας των mAbs που διατίθενται στο εμπόριο. Αυτό συμβαίνει επειδή τα εγγενή χαρακτηριστικά του είναι ιδιαίτερα κατάλληλα για την ανάλυση αυτού του είδους βιοφαρμάκων. Η διάρκεια της ανοσολογικής αντίδρασης στην οποία βασίζονται οι φαρμακολογικές ιδιότητες των mAbs είναι ευκολότερο να μετρηθεί στο εργαστήριο από άλλες συνιστώμενες διαδικασίες όπως οι βιολογικοί προσδιορισμοί με βάση τα ζώα ή οι κυτταρικές καλλιέργειες. Επιπλέον, και σε σύγκριση με άλλες μεθόδους ανοσοδοκιμασίας, η ELISA έχει το πλεονέκτημα ότι είναι ακριβής, εξαιρετικά ευαίσθητη και έντονα ειδική. Αυτά τα χαρακτηριστικά έχουν ιδιαίτερη σημασία κατά την ανάλυση της ενεργής συγκέντρωσης των mAbs στον ορό ασθενών και σε φαρμακοκινητικές μελέτες.

Επιπλέον, η ELISA είναι κρίσιμη για τον ποιοτικό έλεγχο βιοφαρμάκων, βοηθώντας στην ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών και αντισωμάτων για να εξασφαλιστεί η σταθερότητα και η αποτελεσματικότητα των προϊόντων. Τα κύρια πλεονεκτήματα της ELISA περιλαμβάνουν την υψηλή ευαισθησία και ειδικότητά της, τη δυνατότητα ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων ταυτόχρονα, και την ευελιξία στις εφαρμογές της. Ωστόσο, η μέθοδος απαιτεί εξειδικευμένη προετοιμασία των δειγμάτων και μπορεί να εμφανίσει ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα λόγω αλληλεπιδράσεων.

Παρά αυτά τα μειονεκτήματα, η ELISA παραμένει ένα ισχυρό εργαλείο για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση βιομορίων σε πολλές εφαρμογές, εξασφαλίζοντας αξιόπιστα αποτελέσματα στον τομέα της ανάλυσης και του ποιοτικού ελέγχου των βιοφαρμάκων. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των θεραπευτικών μονοκλωνικών αντισωμάτων σε βιολογικά δείγματα, η ELISA είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική. [98]

Παρά τους περιορισμούς της, όπως οι παρεμβολές από άλλες πρωτεΐνες στο βιολογικό υγρό που μπορούν να δώσουν υψηλά σήματα, η ELISA παραμένει αναντικατάστατη. Πρόσφατα έχει περιγραφεί μια ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA) για τον ποσοτικό προσδιορισμό του rituximab στον ανθρώπινο ορό, χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές προσεγγίσεις. [107] Η πρώτη προσέγγιση χρησιμοποίησε το αντιγόνο ως σύλληψη στις πλάκες ELISA, ενώ η δεύτερη προσέγγιση χρησιμοποίησε αντισώματα ιδιοτύπου κατά του rituximab ως συλλέκτη στις πλάκες ELISA.

Παρόλο που και οι δύο δοκιμασίες επικυρώθηκαν και πληρούσαν τα απαιτούμενα κριτήρια, παρατηρήθηκε απόκλιση κατά την ανάλυση των κλινικών δειγμάτων χρησιμοποιώντας και τις δύο δοκιμασίες. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι οι δοκιμές δέσμευσης για μακρομόρια συνήθως εκτελούνται χωρίς διαχωρισμό του μορίου ενδιαφέροντος από τα προϊόντα ή τα ενδογενή μακρομόρια, τα οποία υπάρχουν επίσης στον

ορό ή στο πλάσμα. Η μέθοδος για το rituximab βασίστηκε στη σύνδεσή του με ένα 20-μερές πεπτιδίο (P20) από τον εξωκυτταρικό βρόχο του ανθρώπινου CD20. Τα παράγωγα του P20 αναλύθηκαν με συντονισμό επιφανειακού πλασμονίου (SPR) και ELISA, χρησιμοποιώντας το μονοκλωνικό αντι-ιδιοτυπικό αντίσωμα (MB2A4) ως αναφορά.

Οι μέθοδοι ELISA που βασίζονται στο P20 ή το MB2A4 ήταν ακριβείς και αναπαραγωγίμες για τη μέτρηση του rituximab, με τη μέθοδο MB2A4 να έχει χαμηλότερο όριο ποσοτικοποίησης. Ωστόσο, υπήρχαν ασυμβίβαστα αποτελέσματα στις φαρμακοκινητικές αναλύσεις, με τη μέθοδο MB2A4 να δίνει υψηλότερες συγκεντρώσεις rituximab από τη μέθοδο P20. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε παρεμβολή του κυκλοφορούντος CD20 και στη συσσώρευση του rituximab στην κυκλοφορία του αίματος.

Η μέθοδος ELISA που βασίζεται στο P20 είναι λιγότερο ευαίσθητη και η διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων υποδεικνύει ότι τα δεδομένα από διαφορετικές μελέτες θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή.

Πραγματοποίησαν πειράματα ανταγωνισμού με την προσθήκη P20 και δοκιμές ELISA βασισμένες σε πεπτιδίο και MB2A4. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στις συγκεντρώσεις των δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου μετά από προεπώαση με 1 mM P20. Ωστόσο, με μεγάλη περίσσεια P20, οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου μειώθηκαν κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) με τη μέθοδο που βασίζεται σε πεπτιδίο. Αυτό υποδηλώνει ότι το κυκλοφορούν CD20 (cCD20) μπορεί να προκαλέσει προκατάληψη μεταξύ των δύο μεθόδων.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μέθοδος MB2A4 μπορεί να προσδιορίσει το συνολικό rituximab (ελεύθερο, δεσμευμένο ή συσσωματωμένο), ενώ η μέθοδος πεπτιδίου προσδιορίζει μόνο το ελεύθερο rituximab. Αυτό είναι σημαντικό για τις φαρμακοκινητικές μελέτες, καθώς οι παράμετροι υπολογίζονται συνήθως από τη συνολική συγκέντρωση του φαρμάκου, αν και το ανοσολογικά ενεργό κλάσμα είναι το ελεύθερο αντίσωμα. Έτσι, τα φαρμακοκινητικά δεδομένα του rituximab πρέπει να ερμηνεύονται σύμφωνα με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε.

Η τραστουζουμάμπη (Herceptin) είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που χρησιμοποιείται ευρέως για τη θεραπεία καρκίνου του μαστού που υπερεκφράζει την ογκοπρωτεΐνη Her2. Ωστόσο, η ανταπόκριση στην τραστουζουμάμπη διαφέρει μεταξύ των ασθενών Her2+ και οι φαρμακολογικές έρευνες έχουν δυσκολευτεί από την έλλειψη αξιόπιστης μεθόδου για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της τραστουζουμάμπης στο πλάσμα.

Οι Jamieson et al [108] ανανέπτυξαν και επικύρωσαν μια μέθοδο ELISA βασισμένη σε κύτταρα για τη μέτρηση της τραστουζουμάμπης στο ανθρώπινο πλάσμα. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ανίχνευση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της τραστουζουμάμπης και της Her2 και έχει εύρος μέτρησης από 10 έως 120 $\mu\text{g/ml}$ και η μέση μεταβλητότητα της ELISA εντός και μεταξύ των αναλύσεων ήταν 9%.

Έχοντας επιβεβαιώσει την αξιοπιστία της μεθόδου οι συγγραφείς, μετρήθηκαν οι ελάχιστες συγκεντρώσεις της τραστουζουμάμπης στο πλάσμα 30 ασθενών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία για μεταστατική ή πρώιμη νόσο. Η ενδιάμεση ελάχιστη συγκέντρωση ήταν 62 $\mu\text{g/ml}$, με ένα εύρος από 21 $\mu\text{g/ml}$ έως 441 $\mu\text{g/ml}$.

Αυτή η μέθοδος ELISA βασισμένη σε κύτταρα είναι κατάλληλη για την ποσοτικοποίηση της τραστουζουμάμπης στο πλάσμα ασθενών που χρησιμοποιούν Herceptin, βοηθώντας έτσι στην καλύτερη κατανόηση της φαρμακοδυναμικής της ουσίας και της ανταπόκρισης των ασθενών.

Οι συγγραφείς έχοντας καθορίσει την ειδικότητα της αλληλεπίδρασης μεταξύ της τραστουζουμάμπης και Her2 στα κύτταρα SKBR3, προχώρησαν στην ανάπτυξη μιας κυτταρικής ELISA για τον ποσοτικό προσδιορισμό της τραστουζουμάμπης στο πλάσμα από ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Τα αρχικά πειράματα εντόπισαν ένα δυναμικό εύρος

για τον προσδιορισμό μεταξύ 8 και 125 $\mu\text{g/ml}$ όταν τα δείγματα είχαν αραιωθεί 1/4000 σε ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης. Επτά συγκεντρώσεις τραστουζουμάμπης μεταξύ αυτών των τιμών χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία προτύπων και αυτές οι συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα επόμενα πειράματα επικύρωσης και ανάλυση δειγμάτων ασθενών. Η γραφική παράσταση του σήματος έναντι της συγκέντρωσης προσαρμόστηκε καλύτερα από μια καμπύλη ισχύος με τιμή $R^2=0.996$.

Η μεταβλητότητα εντός της δοκιμασίας προσδιορίστηκε με εκτέλεση 15 επαναλήψεων του χαμηλού και υψηλού QC, και αυτό επαναλήφθηκε δύο φορές, για συνολικά 3 ανεξάρτητα πειράματα, και οι μέσες τιμές χρησιμοποιήθηκαν για να συνεισφέρουν στην απόκτηση δεδομένων για τον προσδιορισμό της μεταβλητότητας μεταξύ των προσδιορισμών. Η μέση μεταβλητότητα εντός της ανάλυσης ήταν 9% και μόνο σε μία περίπτωση ήταν πάνω από 15%. Η μεταβλητότητα μεταξύ των προσδιορισμών αξιολογήθηκε σε 11 ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν ως μέρος του επικύρωσης. Η μέση μεταβλητότητα μεταξύ της ανάλυσης ήταν 12% για το χαμηλό QC και 11% για το υψηλό QC. Χαμηλό QC, είναι δείγμα ποιοτικού ελέγχου που περιέχει γνωστή χαμηλή συγκέντρωση του αναλύομενου συστατικού. Χρησιμοποιείται για να ελέγξει την ακρίβεια της μεθόδου ανάλυσης στην ανίχνευση χαμηλών συγκεντρώσεων. Αντίστοιχα και το υψηλό QC. Η μεταβλητότητα των εκ των υστέρων υπολογισμένων συγκεντρώσεων της τραστουζουμάμπης από την τυπική καμπύλη ήταν μεταξύ 5 και 12% και όλες οι υπολογισμένες τιμές των προτύπων ήταν εντός $\pm 8\%$ της προβλεπόμενης τιμής. Το μέσο ποσοστό ανάκτησης για τα δείγματα χαμηλού και υψηλού QC ήταν 98% και 95% αντίστοιχα. Όσο για την σταθερότητα της τραστουζουμάμπης υπό πολλές συνθήκες αποθήκευσης. Τόσο το υψηλό όσο και το χαμηλό QC ήταν σταθερά για 72 ώρες στους 4 °C ($CV=4$ και 5% αντίστοιχα) και για 10 εβδομάδες στους -20 °C ($CV=4$ και 9% αντίστοιχα) χωρίς πτωτική τάση. Τα δείγματα QC ήταν επίσης σταθερά για τουλάχιστον 6 μήνες στους -80 °C. Το "CV" στη σταθερότητα βιοφαρμάκου αναφέρεται στο "Coefficient of Variation," που μεταφράζεται ως Συντελεστής Μεταβλητότητας. Αυτή η παράμετρος χρησιμοποιείται για να μετρήσει το βαθμό διακύμανσης ή απόκλισης των μετρήσεων στον χρόνο κατά την αξιολόγηση της σταθερότητας ενός φαρμάκου.

Το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης προσδιορίστηκε με ανάλυση του πλάσματος οκτώ ατόμων που δεν είχαν λάβει τραστουζουμάμπη. Η φαινομενική συγκέντρωση στο πλάσμα ήταν $5,6 \pm 1,1$ $\mu\text{g/ml}$ (Μέση και SD). Επομένως, μια συγκέντρωση 9 $\mu\text{g/ml}$ τραστουζουμάμπης (Μέση ± 3 SD) καθορίστηκε ως το κατώτερο όριο ανίχνευσης και σε αυτή την τιμή προβλέπεται ότι λιγότερες από 1 στις 200 θετικές τιμές θα είναι ψευδείς.

Οι Suárez et al [109] ανέπτυξαν εσωτερικές ειδικές συνδεδεμένες με ένζυμα ανοσοπροσροφητικές δοκιμασίες (ELISA) για την αξιολόγηση της μακροπρόθεσμης σταθερότητας αυτών των τριών mAbs, των Μβεβακιζουμάμπη (Bevacizumab - BVZ), Κετουξιμάμπη (cetuximab - CTX), Τραστουζουμάμπη (trastuzumab - TTZ) στη φαρμακευτική τους μορφή. Αυτές οι δοκιμασίες αξιολογούν τη βιολογική λειτουργικότητα των mAbs ποσοτικοποιώντας τη βιολογική τους δράση. Για το σκοπό αυτό, ανέπτυξαν μια έμμεση διαδικασία ELISA σύμφωνα με την οποία τα ειδικά αντιγόνα κατά των οποίων κατευθύνονται τα mAbs χρησιμοποιούνται ως ειδικά αντισώματα «σύλληψης» στις πλάκες ELISA. Οι τρεις μέθοδοι ELISA επικυρώθηκαν ως προς τα μοντέλα βαθμονόμησης, το εύρος της ανάλυσης, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, την ακρίβεια και την πιστότητα και την ειδικότητα με διασταυρούμενες αντιδράσεις. Πραγματοποιήθηκαν επίσης μελέτες αναγκαστικής αποδόμησης για τα φάρμακα, παρέχοντας χρήσιμες πληροφορίες.

Έχουν περιγραφεί αρκετές μέθοδοι ELISA για την ανάλυση των BVZ, CTX και TTZ. Αυτά προορίζονται κυρίως για χρήση με βιολογικά ανθρώπινα δείγματα (υπερκείμενο

ορού, πλάσματος και κυτταροκαλλιέργειας) από ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία με το αντίστοιχο φάρμακο mAbs σύμφωνα με τη χρήση για την οποία προορίζονται. Τα χαρακτηριστικά κάθε ELISA (είδος πλακών, ανοσογονικές αντιδράσεις, ανάπτυξη μορφής και άλλα) ποικίλλουν, δίνοντας σε καθεμία τα δικά της ιδιαίτερα χαρακτηριστικά.

- **Μπεβακίζουμάμπη – Bevacizumab**

Η μέθοδο ELISA που χρησιμοποιεί το VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ως αντιγόνο για την ανίχνευση του αντισώματος μπεβακίζουμάμπη. Συγκεκριμένα, η μέθοδος αυτή αναπτύσσεται για να επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίησή της σε δείγματα βιολογικού υγρού ή ιστού. Το VEGF λειτουργεί ως αντιγόνο στην ELISA, η μπεβακίζουμάμπη που είναι παρόν στο δείγμα συγκρούεται με το VEGF που είναι στην πλάκα. Μετά από στάδια πλύσης και ανίχνευσης, η ποσότητα του BVZ στο δείγμα μπορεί να μετρηθεί με βάση την αλληλεπίδραση που προκύπτει με το VEGF.

- **Κετουξιμάμπη - Cetuximab**

Η μέθοδος ELISA που χρησιμοποιεί το hEGFR (hEGFR - human Epidermal Growth Factor Receptor) ως αντιγόνο για την ανίχνευση του αντισώματος κετουξιμάμπης. Η κετουξιμάμπη είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει και αναστέλλει τον ανθρώπινο επικεφαλής ενδοθηλιακό ανάγοντα (hEGFR), ο οποίος εκφράζεται υπερβολικά σε κάποιους τύπους καρκίνων. Η ELISA που χρησιμοποιεί το hEGFR ως αντιγόνο στοχεύει να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει το cetuximab σε δείγματα βιολογικού υγρού ή ιστού.

- **Τραστουζουμάμπη - Trastuzumab**

Η ELISA για τον προσδιορισμό του τραστουζουμάμπης χρησιμοποιεί τον ανθρώπινο HER2 (hHER2) ως αντιγόνο, συνήθως χρησιμοποιείται για να μετρήσει τη συγκέντρωση του trastuzumab σε δείγματα βιολογικού υλικού, όπως αίμα ή ορός. Αυτή η τεχνική έχει σχεδιαστεί από τους συγγραφείς, για να είναι ειδική και ευαίσθητη στον προσδιορισμό της, έχοντας ως στόχο την αναγνώριση μόνο του συγκεκριμένου αντισώματος στα δείγματα.

Η τυπική βαθμονόμηση καμπύλης για κάθε mAb, ελήφθησαν χρησιμοποιώντας τυπικά δείγματα του κάθε mAb. Αυτά τα πρότυπα δείγματα παρασκευάστηκαν εις τριπλούν και ο μέσος όρος των δεδομένων απορρόφησης χρησιμοποιήθηκε για να διερευνηθεί το μοντέλο που ταίριαζε καλύτερα στα αποτελέσματα.

Το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) τα υπολόγισαν με την εφαρμογή των εξισώσεων (1) και (2) αντίστοιχα,

$$LOD = sc \cdot K = sc \cdot 3 \quad (1)$$

$$LOQ = sc \cdot K = sc \cdot 10 \quad (2)$$

όπου sc είναι η τυπική απόκλιση τουλάχιστον δέκα τυφλών δειγμάτων και K είναι μία σταθερά. η τιμή της οποίας εξαρτάται από το επιθυμητό επίπεδο εμπιστοσύνης. οπότε το LOD και το LOQ υπολογίστηκαν ως $3 \cdot sc$ και $10 \cdot sc$ αντίστοιχα, τιμές που παρέχουν επίπεδο εμπιστοσύνης 99,86%.

Η αποδοχή του μοντέλου βασίστηκε στην αξιολόγηση του σχετικού σφάλματος (RE, %) μεταξύ των προβλεπόμενων και των πραγματικών συγκεντρώσεων των τυπικών δειγμάτων βαθμονόμησης. Για να γίνει αποδεκτό το μοντέλο, η τιμή του RE θα πρέπει να είναι μικρότερη από 10%. Επιπλέον, ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί η καλύτερη προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στα μαθηματικά μοντέλα. Ο πίνακας περιλαμβάνει τις επιλεγμένες τυπικές καμπύλες βαθμονόμησης και τα στατιστικά τους χαρακτηριστικά, όπως οι τιμές RE και R^2 για τα τρία μονοκλωνικά αντισώματα (mAb) που εξετάστηκαν. Όλες οι μετρήσεις R^2 υπερέβησαν το όριο του 0,85, υποδεικνύοντας υψηλή συσχέτιση των προβλεπόμενων με τις πραγματικές τιμές συγκέντρωσης των mAb.

Η πιστότητα αξιολογήθηκε σε σχέση τόσο με την επαναληψιμότητα όσο και με την ενδιάμεση ακρίβεια στο εύρος συγκέντρωσης της μεθόδου. Η επαναληψιμότητα υπολογίστηκε αναλύοντας τουλάχιστον δέκα πρότυπα διαλύματα εργασίας που παρασκευάστηκαν στην ίδια συγκέντρωση την ίδια ημέρα και κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Η ενδιάμεση ακρίβεια υπολογίστηκε αναλύοντας τουλάχιστον εννέα αντίγραφα της ίδιας συγκέντρωσης του προτύπου διαλύματος εργασίας σε τρεις διαφορετικές ημέρες και υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Η επαναληψιμότητα και η ενδιάμεση (ή μεσοημερήσια) ακρίβεια προσδιορίστηκαν ως η σχετική τυπική απόκλιση εκφρασμένη ως ποσοστό (RSD, %) των συγκεντρώσεων που υπολογίστηκαν από την απορρόφηση χρησιμοποιώντας την τυπική βαθμονόμηση καμπύλη. Η πιστότητα και η ακρίβεια ελήφθησαν από τα τυπικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα επικύρωσης. Η επαναληψιμότητα (ενδιάμεση) και η αναπαραγωγιμότητα (εντός ημέρας) εκφρασμένα ως RSD (%). Η πιστότητα στο δυναμικό εύρος βρέθηκε να είναι αποδεκτή για τις τρεις μεθόδους ELISA με $RSD < 10 \%$ τόσο για επαναληψιμότητα όσο και για αναπαραγωγιμότητα. Η ακρίβεια βρέθηκε επίσης αποδεκτή, με τιμές ανάκτησης μεταξύ 90 και 110 % για όλες τις μεθόδους ELISA. Λαμβάνοντας υπόψη τη μεγάλη μεταβλητότητα που είναι εγγενής στις μεθόδους που βασίζονται σε ανοσοδοκιμασίες, αυτές οι τιμές υποδεικνύουν διάφορα χαρακτηριστικά υψηλής ποιότητας των συγκεκριμένων μεθόδων ELISA που προτείνουμε, τα οποία τις καθιστούν κατάλληλες για τον επιδιωκόμενο σκοπό τους, τον αυστηρό έλεγχο της βιολογικής δραστηριότητας των τριών mAbs που μελετώνται εδώ. Τόσο, η ακρίβεια όσο και η ακρίβεια πληρούσαν τα κριτήρια που υποδεικνύονται για την επικύρωση της βιοαναλυτικής μεθόδου, συνιστώνται $RSD \leq 20 \%$.

Πίνακας 5.5: Αποτελέσματα ELISA για Bevacizumab, cetuximab, trastuzumab [109]

	Μπεβακιζουμάμπη (Becacizumab-BVZ)			Κετουξιμάμπη (cetuximab - CTX)			Τραστουζουμάμπη (trastuzumab - TTZ)		
ΑΝΑΚΤΗΣΗ (%)	98.7	98.2	99.8	77.9	97.3	103.7	100.8	109.6	94.8
RSD (%) Intra-day	1.2	1.3	5.6	1.8	2.6	4.9	3.7	2.8	2.9
RSD(%) Inter-day	6.5	8.0	7.3	3.0	2.9	6.4	8.9	10.7	5.0
RE (%)	4.5			2.9			1.2		
R ²	98.9			93.5			99.6		
LOD (μg · ml ⁻¹)	0.008			0.008			-		
LOQ (μg · ml ⁻¹)	0.01			0.1			2.5		

Αυτή η μέθοδος προσφέρει έναν απλό τρόπο για την αξιολόγηση της βιολογικής λειτουργικότητας οποιουδήποτε συγκεκριμένου μονοκλωνικού αντισώματος (mAb). Οι ανοσοδοκιμασίες έχουν επιβεβαιωθεί και αποδειχθεί ότι είναι ευαίσθητες, ακριβείς και επιλεκτικές. Έτσι, αποδεικνύονται αποτελεσματικές για την αξιολόγηση αυτού του σημαντικού ποιοτικού χαρακτηριστικού σε φάρμακα που βασίζονται σε αυτά τα αντισώματα. Επίσης, διαθέτουν μεγάλες δυνατότητες για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας αυτών των βιοφαρμακευτικών φαρμάκων στα κατάλληλα διαλύματα που παρασκευάζονται συχνά στα νοσοκομεία.

Βιβλιογραφία

Ακολουθούν οι βιβλιογραφικές αναφορές (πηγές) της Εργασίας.

- [1] A.C. Szkodny, K.H. Lee, Biopharmaceutical Manufacturing: Historical Perspectives and Future Directions, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 13 (2022) 141–165. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-092220-125832>.
- [2] La Merie Publishing, (n.d.). <https://lamerie.com/>.
- [3] A. Kumar, S.K. Saxena, Quality Management System (QMS) Quality Planning, Quality Control And Quality Improvement INTRODUCTION, *Indian J. Med. Allied Res.* 13 (2023) 2278–0890. www.ijmar.in.
- [4] Guidance for Industry Q8 Pharmaceutical Development. U.S. Food and Drug Administration – International Conference of Harmonisation, May 2006, (n.d.).
- [5] S. Malhotra, Quality Gurus: A Framework for Comparison and Implications, *J. Adv. Sch. Res. Allied Educ.* 14 (2018) 07. <https://doi.org/10.29070/jasrae.v14.i2.2018.7-9>.
- [6] J.C. Anderson, M. Rungtusanatham, R.G. Schroeder, A Theory of Quality Management Underlying the Deming Management Method, *Acad. Manag. Rev.* 19 (1994) 472. <https://doi.org/10.2307/258936>.
- [7] A. Ghobadian, S. Speller, Gurus of quality: A framework for comparison, *Total Qual. Manag.* 5 (1994) 53–70. <https://doi.org/10.1080/095441294000000025>.
- [8] S. Bisgaard, Quality management and Juran’s legacy, *Qual. Eng.* 20 (2008) 390–401. <https://doi.org/10.1080/08982110802317398>.
- [9] H.R. Neave, Deming’s 14 Points for Management: Framework for Success, *Stat.* 36 (1987) 561. <https://doi.org/10.2307/2348667>.
- [10] bidin A, Quality control, Robust design and the Taguchi method, 1st ed., Springer New York, NY, 2017. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4684-1472-1](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-1472-1).
- [11] L. Liliana, A new model of Ishikawa diagram for quality assessment, *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 161 (2016). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/161/1/012099>.

- [12] A. V. Feigenbaum, New quality for the twenty-first century, TQM Mag. 11 (1999) 376–383. <https://doi.org/10.1108/09544789910287656>.
- [13] J. Geigert, Quality Attributes of a Biopharmaceutical, Chall. C. Regul. Compliance Biopharm. (2019) 311–327. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-13754-0>.
- [14] Behera, B. (2020). Biopharmaceuticals: Challenges and Opportunities (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351013154>, n.d.
- [15] D.J.A. Crommelin, G. Storm, R. Verrijck, L. De Leede, W. Jiskoot, W.E. Hennink, Shifting paradigms: Biopharmaceuticals versus low molecular weight drugs, Int. J. Pharm. 266 (2003) 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00376-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00376-4).
- [16] J. Geigert, Quality assurance and quality control for biopharmaceutical products., Pharm. Biotechnol. 14 (2002) 361–404. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0549-5_7.
- [17] M. Kesik-Brodacka, Progress in biopharmaceutical development, Biotechnol. Appl. Biochem. 65 (2018) 306–322. <https://doi.org/10.1002/bab.1617>.
- [18] D.S. Dimitrov, Therapeutic proteins, in: Methods Mol. Biol., 2012: pp. 1–26. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-921-1>.
- [19] F. Lalor, J. Fitzpatrick, C. Sage, E. Byrne, Sustainability in the biopharmaceutical industry: Seeking a holistic perspective, Biotechnol. Adv. 37 (2019) 698–707. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.015>.
- [20] R.R. Vanete Thomaz-Soccol, Ashok Pandey, ed., Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, 2017.
- [21] Y.-C. Chen, M.-K. Yeh, Introductory Chapter: Biopharmaceuticals, Biopharmaceuticals. (2018) 3–12. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79194>.
- [22] G. Walsh, E. Walsh, Biopharmaceutical benchmarks, Nat. Biotechnol. 18 (2002) 1722–1760. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01582-x>.
- [23] B.S. Sekhon, Biopharmaceuticals: An overview, Thai J. Pharm. Sci. 34 (2010) 1–19. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0926-2_1.
- [24] T. Lipiäinen, M. Peltoniemi, S. Sarkhel, T. Yrjönen, H. Vuorela, A. Urtti, A. Juppo, Formulation and stability of cytokine therapeutics, J. Pharm. Sci. 104 (2015) 307–

326. <https://doi.org/10.1002/jps.24243>.
- [25] T. Fukuda, A. Roberts, Acid Alpha-Glucosidase Deficiency (Pompe Disease), (2007).
- [26] Stárka L, Dušková M. What is a hormone? *Physiol Res*. 2020 Sep 30;69(Suppl 2):S183-S185. doi: 10.33549/physiolres.934509. PMID: 33094616; PMCID: PMC8603735., (n.d.).
- [27] H.A. Alhazmi, M. Albratty, Analytical Techniques for the Characterization and Quantification of Monoclonal Antibodies, *Pharmaceuticals*. 16 (2023). <https://doi.org/10.3390/ph16020291>.
- [28] G. Walsh, Second-generation biopharmaceuticals, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58 (2004) 185–196. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.03.012>.
- [29] K. Skeene, K. Khatri, Z. Soloviev, C. Laphorn, Current status and future prospects for ion-mobility mass spectrometry in the biopharmaceutical industry, *BBA - Proteins and Proteomics*, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2021.140697>.
- [30] Z.M. Ali Rastegari, Homa Faghihi, Current applications of biomolecules in biopharmaceuticals and drug discovery, in: D.K.V. Chandrabhan Verma (Ed.), Elsevier, 2023: pp. 439–466. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91684-4.00023-2>.
- [31] J.N. Arnold, M.R. Wormald, R.B. Sim, P.M. Rudd, R.A. Dwek, The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins, *Annu. Rev. Immunol.* 25 (2007) 21–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702>.
- [32] P. Zhang, T. Wang, M. Bardor, Z. Song, Deciphering O-glycomics for the development and production of biopharmaceuticals, *Pharm. Bioprocess.* 1 (2013) 89–104. <https://doi.org/10.4155/pbp.13.7>.
- [33] P. Hossler, S.F. Khattak, Z.J. Li, Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture, *Glycobiology*. 19 (2009) 936–949. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp079>.
- [34] V. Dotz, R. Haselberg, A. Shubhakar, R.P. Kozak, D. Falck, Y. Rombouts, D. Reusch, G.W. Somsen, D.L. Fernandes, M. Wührer, Mass spectrometry for

- glycosylation analysis of biopharmaceuticals, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 73 (2015) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.024>.
- [35] C.J. Robinson, C. Jones, Quality control and analytical techniques for biopharmaceuticals, *Bioanalysis*. 3 (2011) 81–95. <https://doi.org/10.4155/bio.10.161>.
- [36] H. V. Chavda, C.N. Patel, I.S. Anand, Biopharmaceutics classification system, *Syst. Rev. Pharm.* 1 (2010) 62–69. <https://doi.org/10.4103/0975-8453.59514>.
- [37] M. Yasir, M. Asif, A. Kumar, A. Aggarwal, Biopharmaceutical classification system: An account, *Int. J. PharmTech Res.* 2 (2010) 1681–1690.
- [38] H. Mahler, A. Allmendinger, Stability, Formulation, and Delivery of Biopharmaceuticals, (2017) 469–491. <https://doi.org/10.1002/9783527699124.ch14>.
- [39] J. Auclair, A.S. Rathore, Analytical Methods to Determine the Stability of Biopharmaceutical Products, *LCGC*. 41 (2023) 23–27. <https://doi.org/https://doi.org/10.56530/lcgc.na.qc1477t9>.
- [40] F.V. Meeting, Development of Bioassays, (2020).
- [41] L. Wang, C. Yu, J. Wang, Development of reporter gene assays to determine the bioactivity of biopharmaceuticals, *Biotechnol. Adv.* 39 (2020) 107466. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107466>.
- [42] K.K. Kumar, Importance of Critical Quality Attributes in Biopharmaceuticals Development, *Res. J. Top. Cosmet. Sci.* 10 (2019) 29. <https://doi.org/10.5958/2321-5844.2019.00007.4>.
- [43] O. Doblhoff-Dier, R. Bliem, Quality control and assurance from the development to the production of biopharmaceuticals, *Trends Biotechnol.* 17 (1999) 266–270. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(99\)01314-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01314-1).
- [44] A. Guo, G. Camblin, M. Han, C. Meert, S.A. Park, 14 Role of CE in biopharmaceutical development and quality control, *Sep. Sci. Technol.* 9 (2008). [https://doi.org/10.1016/S0149-6395\(07\)00014-1](https://doi.org/10.1016/S0149-6395(07)00014-1).
- [45] K.J. Bronsema, R. Bischoff, N.C. Van de Merbel, Internal standards in the quantitative determination of protein biopharmaceuticals using liquid

- chromatography coupled to mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 893–894 (2012) 1–14.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.02.021>.
- [46] N. Lingg, P. Zhang, Z. Song, M. Bardor, The sweet tooth of biopharmaceuticals: Importance of recombinant protein glycosylation analysis, *Biotechnol. J.* 7 (2012) 1462–1472. <https://doi.org/10.1002/biot.201200078>.
- [47] A. Beck, E. Wagner-Rousset, D. Ayoub, A. Van Dorsselaer, S. Sanglier-Cianférani, Characterization of therapeutic antibodies and related products, (2012).
<http://pubs.acs.org>.
- [48] I.A. Kaltashov, C.E. Bobst, R.R. Abzalimov, G. Wang, B. Baykal, S. Wang, Advances and challenges in analytical characterization of biotechnology products: Mass spectrometry-based approaches to study properties and behavior of protein therapeutics, 30 (2012) 210–222. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.006>.
- [49] K. Sandra, I. Vandenheede, P. Sandra, Modern chromatographic and mass spectrometric techniques for protein biopharmaceutical characterization, *J. Chromatogr. A.* 1335 (2014) 81–103. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.11.057>.
- [50] L.R. Ruhaak, G. Xu, Q. Li, E. Goonatilleke, C.B. Lebrilla, Mass Spectrometry Approaches to Glycomic and Glycoproteomic Analyses, *Chem. Rev.* 118 (2018) 7886–7930. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00732>.
- [51] M. Källsten, M. Pijnappel, R. Hartmann, F. Lehmann, L. Kovac, S.B. Lind, J. Bergquist, Application of triple quadrupole mass spectrometry for the characterization of antibody–drug conjugates, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 2569–2576. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01699-0>.
- [52] A.P. Kafka, T. Kleffmann, T. Rades, A. McDowell, The application of MALDI TOF MS in biopharmaceutical research, *Int. J. Pharm.* 417 (2011) 70–82.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.12.010>.
- [53] C. Jakes, F. Füssl, I. Zaborowska, J. Bones, Rapid Analysis of Biotherapeutics Using Protein A Chromatography Coupled to Orbitrap Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 93 (2021) 13505–13512. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c02365>.
- [54] G. Hopfgartner, A. Lesur, E. Varesio, Analysis of biopharmaceutical proteins in

- biological matrices by LC-MS/MS II. LC-MS/MS analysis, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 48 (2013) 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.03.008>.
- [55] E. Higgins, Carbohydrate analysis throughout the development of a protein therapeutic, *Glycoconj. J.* 27 (2010) 211–225. <https://doi.org/10.1007/s10719-009-9261-x>.
- [56] M.J. Oh, S. Hua, B.J. Kim, H.N. Jeong, S.H. Jeong, R. Grimm, J.S. Yoo, H.J. An, Analytical platform for glycomic characterization of recombinant erythropoietin biotherapeutics and biosimilars by MS, *Bioanalysis.* 5 (2013) 545–559. <https://doi.org/10.4155/bio.12.327>.
- [57] A. Lim, Catherine A. Srebalus, APPLICATIONS OF MASS SPECTROMETRY FOR THE STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT PROTEIN PHARMACEUTICALS, *Mass Spectrom. Rev.* 26 (2007) 370–388. <https://doi.org/10.1002/mas>.
- [58] S. Nicolardi, L. Switzar, A.M. Deelder, M. Palmblad, Y.E.M. Van Der Burgt, Top-Down MALDI-In-Source Decay-FTICR Mass Spectrometry of Isotopically Resolved Proteins, *Anal. Chem.* 87 (2015) 3429–3437. <https://doi.org/10.1021/ac504708y>.
- [59] M.K. Parr, O. Montacir, H. Montacir, Physicochemical characterization of biopharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 130 (2016) 366–389. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.028>.
- [60] S. Yamamoto, M. Kinoshita, S. Suzuki, Current landscape of protein glycosylation analysis and recent progress toward a novel paradigm of glycoscience research, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 130 (2016) 273–300. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.07.015>.
- [61] C.T. McDowell, X. Lu, A.S. Mehta, P.M. Angel, R.R. Drake, Applications and continued evolution of glycan imaging mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 42 (2023) 674–705. <https://doi.org/10.1002/mas.21725>.
- [62] A.S. Ira S. Krull, Jared Auclair, Rathore, Ion Mobility Spectrometry (IMS): How It Works and Its Use in Biotechnology, *LC-GC North Am.* 38 (2020) 619–624.
- [63] J. Hofmann, K. Pagel, Glycan Analysis by Ion Mobility–Mass Spectrometry,

- Angew. Chemie - Int. Ed. 56 (2017) 8342–8349.
<https://doi.org/10.1002/anie.201701309>.
- [64] A. Barroso, E. Giménez, A. Konijnenberg, J. Sancho, V. Sanz-Nebot, F. Sobott, Evaluation of ion mobility for the separation of glycoconjugate isomers due to different types of sialic acid linkage, at the intact glycoprotein, glycopeptide and glycan level, *J. Proteomics*. 173 (2018) 22–31.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.11.020>.
- [65] A. Illiano, G. Pinto, C. Melchiorre, A. Carpentieri, V. Faraco, A. Amoresano, Protein glycosylation investigated by mass spectrometry: An overview, *Cells*. 9 (2020) 1–23. <https://doi.org/10.3390/cells9091986>.
- [66] T. Gundinger, A. Pansy, O. Spadiut, A sensitive and robust HPLC method to quantify recombinant antibody fragments in *E. coli* crude cell lysate, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1083 (2018) 242–248.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.02.044>.
- [67] J.H. Knox, B. Kaur, G.R. Millward, Structure and performance of porous graphitic carbon in liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*. 352 (1986) 3–25.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)83368-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)83368-9).
- [68] T. Hanai, Separation of polar compounds using carbon columns, *J. Chromatogr. A*. 989 (2003) 183–196. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)02017-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)02017-4).
- [69] S. Hua, M.J. Oh, S. Ozcan, Y.S. Seo, R. Grimm, H.J. An, Technologies for glycomic characterization of biopharmaceutical erythropoietins, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 68 (2015) 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.004>.
- [70] G. Brusotti, E. Calleri, R. Colombo, G. Massolini, F. Rinaldi, C. Temporini, Advances on Size Exclusion Chromatography and Applications on the Analysis of Protein Biopharmaceuticals and Protein Aggregates: A Mini Review, *Chromatographia*. 81 (2018) 3–23. <https://doi.org/10.1007/s10337-017-3380-5>.
- [71] D.M.A.M. Luykx, S.S. Goerdal, P.J. Dingemans, W. Jiskoot, P.M.J.M. Jongen, HPLC and tandem detection to monitor conformational properties of biopharmaceuticals, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 821 (2005) 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.04.005>.

- [72] S.A. Berkowitz, D.J. Houde, Size-exclusion chromatography (SEC) in biopharmaceutical process development, Second Edi, Elsevier, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64173-1.00007-X>.
- [73] L.R. Ruhaak, G. Zauner, C. Huhn, C. Bruggink, A.M. Deelder, M. Wuhler, Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 3457–3481. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3532-z>.
- [74] K. Račaityte, S. Kiessig, F. Kálmán, Application of capillary zone electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography in the biopharmaceutical industry for the quantitative analysis of the monosaccharides released from a highly glycosylated therapeutic protein, *J. Chromatogr. A.* 1079 (2005) 354–365. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.080>.
- [75] S. Hase, High-Performance Liquid Chromatography of Pyridylaminated Saccharides, 230 (1994) 225–237.
- [76] F.N. Lamari, R. Kuhn, N.K. Karamanos, Derivatization of carbohydrates for chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric structure analysis, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 793 (2003) 15–36. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00362-3](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00362-3).
- [77] I.H. Lee, S. Pollack, S.H. Hsu, J.R. Miksic, Influence of the mobile phase on salmon calcitonin analysis by reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 29 (1991) 136–140. <https://doi.org/10.1093/chromsci/29.3.136>.
- [78] P. Hemström, K. Irgum, Hydrophilic interaction chromatography, 2006. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600199>.
- [79] S.S. Rane, A. Ajameri, R. Mody, P. Padmaja, Development and validation of RP-HPLC and RP-UPLC methods for quantification of erythropoietin formulated with human serum albumin, *J. Pharm. Anal.* 2 (2012) 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2011.11.006>.
- [80] D. Åsberg, A. Langborg Weinmann, T. Leek, R.J. Lewis, M. Klarqvist, M. Leško, K. Kaczmariski, J. Samuelsson, T. Fornstedt, The importance of ion-pairing in peptide purification by reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1496 (2017) 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.03.041>.

- [81] Y. He, K.S. Cook, E. Littlepage, J. Cundy, R. Mangalathillam, M.T. Jones, Ion-pair reversed phase liquid chromatography with ultraviolet detection for analysis of ultraviolet transparent cations, *J. Chromatogr. A*. 1408 (2015) 261–266.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.026>.
- [82] A. Tartaglia, M. Locatelli, V. Samanidou, Trends in the Analysis of Biopharmaceuticals by HPLC, *Curr. Anal. Chem.* 16 (2018) 52–58.
<https://doi.org/10.2174/1573411015666181205114810>.
- [83] D. Farnan, G.T. Moreno, Multiproduct high-resolution monoclonal antibody charge variant separations by pH gradient ion-exchange chromatography, *Anal. Chem.* 81 (2009) 8846–8857. <https://doi.org/10.1021/ac901408j>.
- [84] S. Fekete, A. Beck, J. Fekete, D. Guilleme, Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, Part I: Salt gradient approach, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102 (2015) 33–44.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.035>.
- [85] M. Melmer, T. Stangler, M. Schiefermeier, W. Brunner, H. Toll, A. Rupprechter, W. Lindner, A. Premstaller, HILIC analysis of fluorescence-labeled N-glycans from recombinant biopharmaceuticals, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 905–914.
<https://doi.org/10.1007/s00216-010-3988-x>.
- [86] S.H. Walker, L.M. Lilley, M.F. Enamorado, D.L. Comins, D.C. Muddiman, Hydrophobic derivatization of N-linked glycans for increased ion abundance in electrospray ionization mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22 (2011) 1309–1317. <https://doi.org/10.1007/s13361-011-0140-x>.
- [87] X. Wang, S. Buckenmaier, D. Stoll, The growing role of two-dimensional LC in the biopharmaceutical industry, *J. Appl. Bioanal.* 3 (2017) 120–126.
<https://doi.org/10.17145/jab.17.015>.
- [88] G. Kahsay, H. Song, A. Van Schepdael, D. Cabooter, E. Adams, Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87 (2014) 142–154. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.04.015>.
- [89] W. Xu, R.B. Jimenez, R. Mowery, H. Luo, M. Cao, N. Agarwal, I. Ramos, X. Wang, J. Wang, A Quadrupole Dalton-based multi-attribute method for product

- characterization, process development, and quality control of therapeutic proteins, 2017. <https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1364326>.
- [90] R.S. Rogers, N.S. Nightlinger, B. Livingston, P. Campbell, R. Bailey, A. Balland, Development of a quantitative mass spectrometry multi-attribute method for characterization, quality control testing and disposition of biologics, *MAbs*. 7 (2015) 881–890. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1069454>.
- [91] F. Yang, J. Zhang, A. Buettner, E. Vosika, M. Sadek, Z. Hao, D. Reusch, M. Koenig, W. Chan, A. Bathke, H. Pallat, V. Lundin, J.F. Kepert, P. Bulau, G. Deperalta, C. Yu, R. Beardsley, T. Camilli, R. Harris, J. Stults, Mass spectrometry-based multi-attribute method in protein therapeutics product quality monitoring and quality control, *MAbs*. 15 (2023) 1–17. <https://doi.org/10.1080/19420862.2023.2197668>.
- [92] D. Rathore, A. Faustino, J. Schiel, E. Pang, M. Boyne, S. Rogstad, The role of mass spectrometry in the characterization of biologic protein products, *Expert Rev. Proteomics*. 15 (2018) 431–449. <https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1469982>.
- [93] R.S. Rogers, M. Abernathy, D.D. Richardson, J.C. Rouse, J.B. Sperry, P. Swann, J. Wypych, C. Yu, L. Zang, R. Deshpande, A View on the Importance of “Multi-Attribute Method” for Measuring Purity of Biopharmaceuticals and Improving Overall Control Strategy, *AAPS J.* 20 (2018). <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0168-3>.
- [94] X. Li, Recent applications of quantitative mass spectrometry in biopharmaceutical process development and manufacturing, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 234 (2023) 115581. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115581>.
- [95] P. Kumar, A. Rúbies, R. Company, F. Centrich, Determination of aminoglycoside residues in kidney and honey samples by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 2710–2717. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200344>.
- [96] R. Ishii, M. Horie, W. Chan, J. MacNeil, Multi-residue quantitation of aminoglycoside antibiotics in kidney and meat by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control*.

- Expo. Risk Assess. 25 (2008) 1509–1519.
<https://doi.org/10.1080/02652030802189740>.
- [97] A.M. Gremilogianni, N.C. Megoulas, M.A. Koupparis, Hydrophilic interaction vs ion pair liquid chromatography for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk based on mass spectrometric detection, J. Chromatogr. A. 1217 (2010) 6646–6651.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.059>.
- [98] C.W.N. Damen, E.J.B. Derissen, J.H.M. Schellens, H. Rosing, J.H. Beijnen, The bioanalysis of the monoclonal antibody trastuzumab by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after immuno-affinity purification from human serum, J. Pharm. Biomed. Anal. 50 (2009) 861–866.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.04.031>.
- [99] V. Hebhi, S. Chattopadhyay, A.S. Rathore, High performance liquid chromatography (HPLC) based direct and simultaneous estimation of excipients in biopharmaceutical products, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 1117 (2019) 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.04.022>.
- [100] A.S.R. Ramesh Kumar, Andras Guttman, Applications of capillary electrophoresis for biopharmaceutical product characterization, Electrophoresis. 43 (2022) 143–166. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elps.202100182>.
- [101] R.R. Rustandi, M.W. Washabaugh, Y. Wang, Applications of CE SDS gel in development of biopharmaceutical antibody-based products, Electrophoresis. 29 (2008) 3612–3620. <https://doi.org/10.1002/elps.200700958>.
- [102] S. Ma, W. Nashabeh, Analysis of protein therapeutics by capillary electrophoresis, Chromatographia. 53 (2001). https://doi.org/10.1007/978-3-322-83021-0_9.
- [103] K. Weber, M. Osborn, The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis., J. Biol. Chem. 244 (1969) 4406–4412. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)94333-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)94333-4).
- [104] D. Dong, J. Kang, Comparing SDS-PAGE and CE-SDS for antibody purity analysis, Bioprocess Int. 12 (2014) 28–30.
- [105] B. Singh Sekhon, An overview of capillary electrophoresis: Pharmaceutical,

- biopharmaceutical and biotechnology applications, *J Pharm Educ Res.* 2 (2011).
- [106] N.A. Lacher, R.K. Roberts, Y. He, H. Cargill, K.M. Kearns, H. Holovics, M.N. Ruesch, Development, validation, and implementation of capillary gel electrophoresis as a replacement for SDS-PAGE for purity analysis of IgG2 mAbs, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 218–227. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900597>.
- [107] H. Blasco, G. Lalmanach, E. Godat, M.C. Maurel, S. Canepa, M. Belghazi, G. Paintaud, D. Degenne, E. Chatelut, G. Cartron, C. Le Guellec, Evaluation of a peptide ELISA for the detection of rituximab in serum, *J. Immunol. Methods.* 325 (2007) 127–139. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2007.06.011>.
- [108] D. Jamieson, N. Cresti, M.W. Verrill, A. V. Boddy, Development and validation of cell-based ELISA for the quantification of trastuzumab in human plasma, *J. Immunol. Methods.* 345 (2009) 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.04.006>.
- [109] I. Suárez, A. Salmerón-García, J. Cabeza, L.F. Capitán-Vallvey, N. Navas, Development and use of specific ELISA methods for quantifying the biological activity of bevacizumab, cetuximab and trastuzumab in stability studies, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1032 (2016) 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.05.045>.

Υπέθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν. 1599/1986 και τα άρθρα 2,4,6 παρ. 3 του Ν. 1256/1982, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής εργασίας και δεν προσβάλλει κάθε μορφής πνευματικά δικαιώματα τρίτων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον.