

Validierung eines UPLC-QTOF Systems für die automatisierte Quantifizierung und Identifizierung von intakten Proteinen

Freiermuth Jacqueline

Bachelor-Thesis, Molecular Life Sciences, Chemie

Auftraggeber, Dr. Muckenschnabel Ingo, Novartis Pharma AG

Expert: Dr. Ehrat Markus, EK Biosciences GmbH

Begleitdozent: Prof. Dr. Schlotterbeck Götz, FHNW

ZUSAMMENFASSUNG

Bis im letzten Jahr wurde in der Open Access Analytik der Novartis in Basel, je eine Methode für die Quantifizierung und eine für die Identifizierung von intakten Proteinen eingesetzt. Um Analysenzeit einzusparen, wurden diese beiden Methoden kombiniert und eine neue erstellt, um die Quantifizierung und Identifizierung in einer Analyse durchzuführen. In dieser Arbeit wurde die Optimierung und Validierung der Methode durchgeführt und ihre Grenzen aufgezeigt.

Die optimierten Parameter wurden für alle Open Access Systeme der Proteinanalytik übernommen.

EINLEITUNG

Der unaufhaltsame Trend zu proteinbasierten, therapeutischen Wirkstoffen erfordert eine leistungsfähige Proteinanalytik in der pharmazeutischen Forschung und Entwicklung [1]. In der Open Access Analytik der Novartis in Basel werden den Anwendern moderne Analysengeräte zur Verfügung gestellt, welche aufgrund hoher Automation, ohne Expertenwissen verwendet werden können. Da viele Anwender sehr unterschiedliche Proben analysieren, ist es wichtig robuste Analysemethoden bereitzustellen.

Das Ziel dieser Thesis war, die UPLC-QTOF (Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit einem Quadrupol Time of Flight Massenspektrometer) Methode zur Quantifizierung und Identifizierung von intakten Proteinen zu optimieren, zu validieren und die Grenzen der Methode aufzuzeigen.

RESULTATE

Zur Validierung der Methode wurde eine kommerziell erhältliche Proteinreferenzmischung verwendet. Diese dient in der täglichen Analytik als Qualitätskontrollprobe (QC). Die Überprüfung der Stabilität dieser Proteinlösung zeigte, dass zwei der vier enthaltenen Proteine unter Lichteinfluss und bei Raumtemperatur weniger als eine Woche stabil sind. Daher müssen jeden Tag neue QC Proben verwendet werden.

Die aktuell verwendete Methode wies für der Injektionsreproduzierbarkeit relative Standardabweichungen der Flächen von bis zu 31.9 % auf. Die Optimierung der Injektionsparameter zeigte eine deutliche Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Injektion und eine relative Standardabweichungen von <1.1 % wurde erreicht. In Abbildung 1 sind die UV Flächen dieser Bestimmungen vor (hellblau) und nach (dunkelblau) der Optimierung der Injektionsparameter mit den entsprechenden Fehlern ersichtlich.

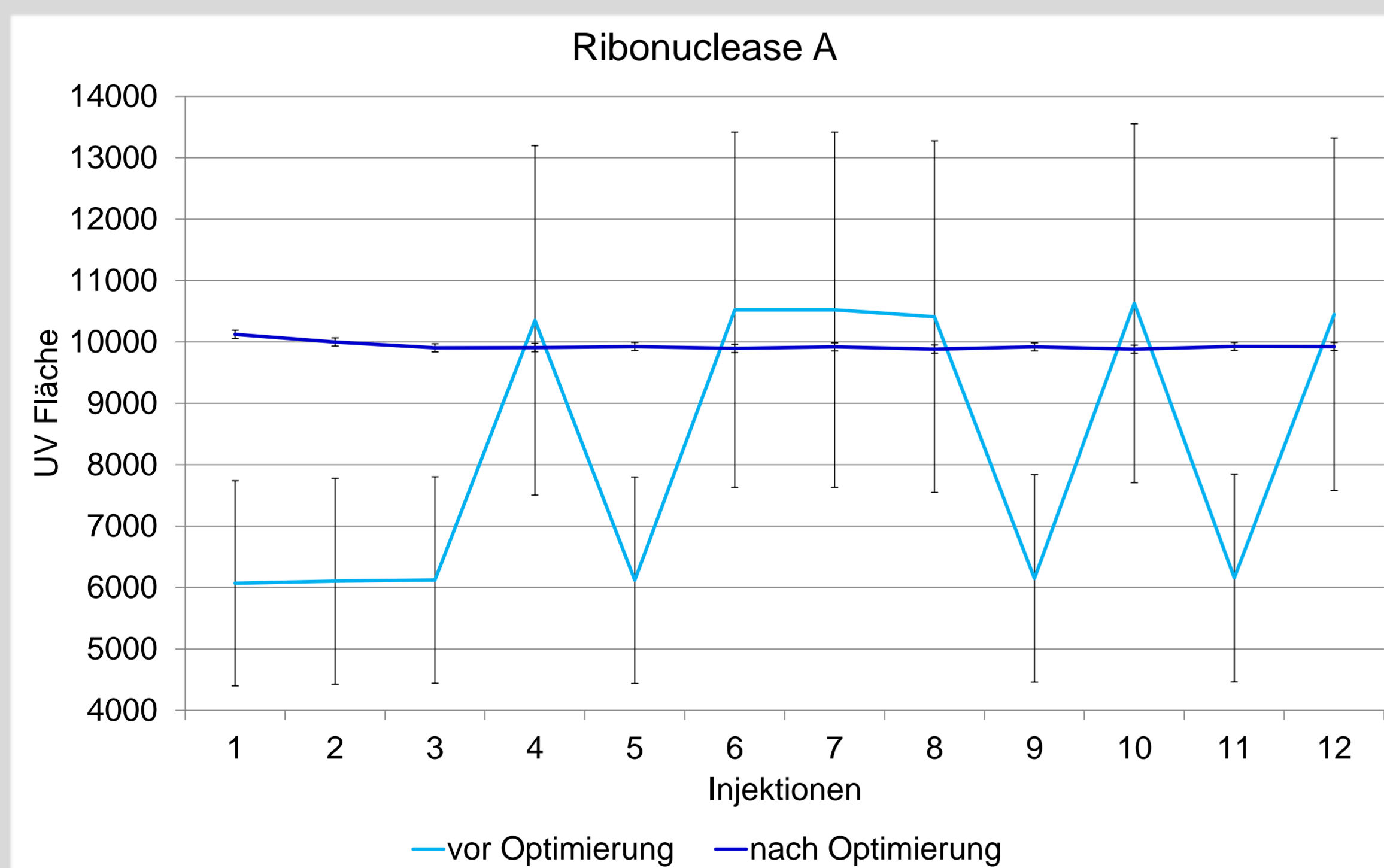


Abbildung 1 UV Flächen der Ribonuclease A von 12 Injektionen der gleichen Lösung

Die grösste Verbesserung der Methode wurde durch die Anpassung der Position der Injektionsnadel im Vial erreicht. Durch die zu tief eingestellte Nadelposition wurde die Öffnung teilweise abgedichtet, weshalb nicht das gesamte Injektionsvolumen aspiriert und injiziert wurde, woraus die unterschiedlichen Flächen resultierten.

Eine Erhöhung der Datensammelrate von 10 auf 40 Hz zeigte, wie in Abbildung 2 ersichtlich, eine Verbesserung der Peakform.

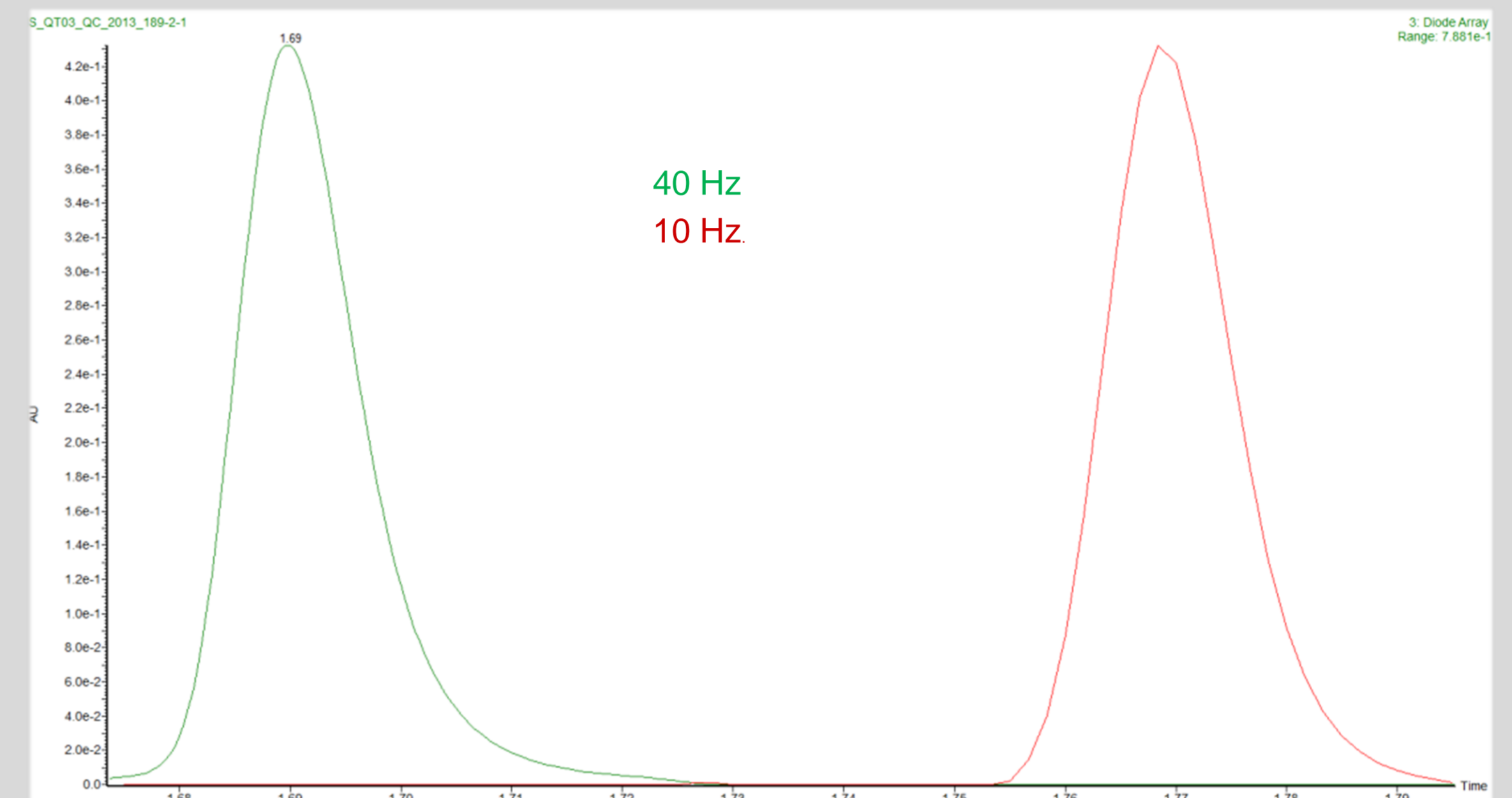


Abbildung 2 Vergleich der Datenraten von 10 und 40 Hz

Die *intra* und *inter day* Präzision der Quantifizierung wurde mit Lösungen von BSA (Rinderserumalbumin) und Human Apo Transferrin bestimmt. Injiziert wurden die Lösungen zu unterschiedlichen Zeiten während eines Tages und an mehreren Tagen einer Woche. Daraus ergaben sich Werte von 0.2 bis 17 % für die *intra day* und Werte von <12 % für die *inter day* Präzision.

Die Richtigkeit der Quantifizierung wurde mit den BSA- und Human Apo Transferrin- Lösungen, auf zwei identischen Geräten (QT02 und QT03) bestimmt. Die Resultate liegen im Bereich von 77 bis 100 %. In Abbildung 3 sind die Werte der Richtigkeit für die Quantifizierung angegeben. Der Vergleich der zwei Systeme zeigt, dass die gefundenen Konzentrationen teilweise leicht abweichen.

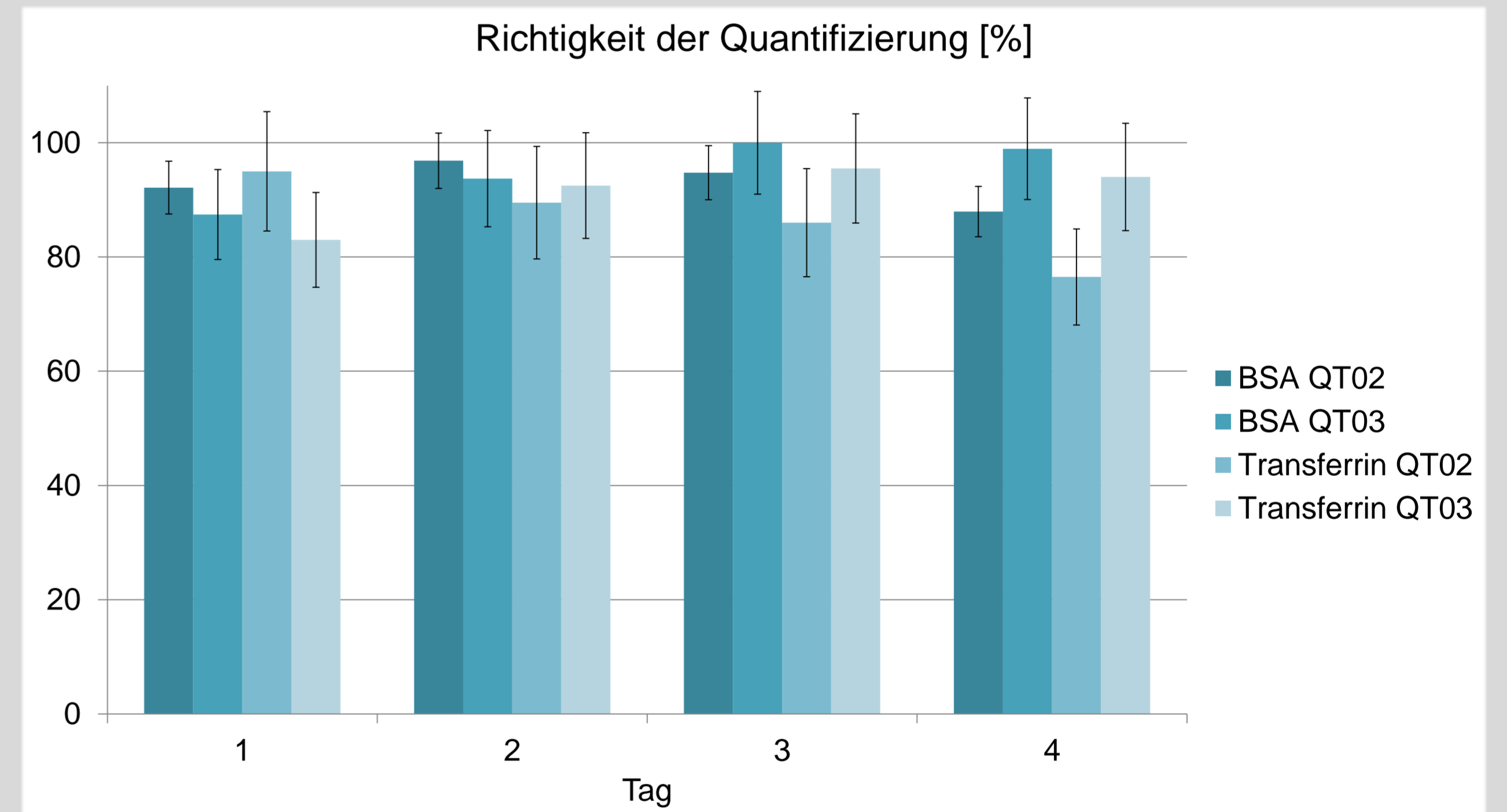


Abbildung 3 Richtigkeit der Quantifizierung mit BSA und Transferrin

Die durch die Quantifizierung erhaltenen Resultate der beiden Geräten sind mit einem Fehler von ± 12 % behaftet.

SCHLUSSFOLGERUNG

Nach der Optimierung und Validierung der Methode, kann der Fehlerbereich angegeben und die Quantifizierung von intakten Proteinen in der Open Access Umgebung, mit der nötigen Genauigkeit durchgeführt werden. Die Messresultate der Quantifizierung, sind mit einem Fehler von ± 12 % behaftet.

Die Anforderungen in der Open Access Analytik, die Unterscheidung einer Proteinkonzentration von 0.1, 1 oder 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, ist mit der optimierten Methode möglich. Da es von grossem Interesse ist, schnelle und reproduzierbare Resultate zu erhalten, wird eine Verringerung der Genauigkeit der Quantifizierung in Kauf genommen. Das Ziel der Arbeit wurde erreicht und die automatisierte Methode wird in der Open Access Analytik der Novartis in Basel zur Verfügung gestellt.

REFERENZEN

[1] D. Dimitrov, «Therapeutic proteins,» *Methods Mol Biol.*, 2012.