MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK HASSASİYETLE BİR BİYOMOLEKÜLÜN ORTOGONAL METOTLARININ TASARIMI ve TAYİN SINIRLARININ SAYISAL ANALİZİ

ELİF ŞAHİNKAYA

DOKTORA TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU

EŞ-DANIŞMAN
Prof. Dr. Memet Vezir KAHRAMAN

İSTANBUL, 2025

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK HASSASİYETLE BİR BİYOMOLEKÜLÜN ORTOGONAL METOTLARININ TASARIMI ve TAYİN SINIRLARININ SAYISAL ANALİZİ

ELİF ŞAHİNKAYA
(720417004)

DOKTORA TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU

EŞ-DANIŞMAN
Prof. Dr. Memet Vezir KAHRAMAN

İSTANBUL, 2025

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca daima yanımda olan, tez çalışması dışında da desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım sayın hocam, Prof. Dr. Ece Kök Yetimoğlu'na,
Tez çalışmamın laboratuvar aşamasında destekleri için sayın Hatice Öncel başta olmak üzere sayın Dilan Bıçak, Aylin Özkan ve İlko Argem biyoteknoloji merkezi çalışanlarına,
Beni koşulsuz destekleyen değerli eşim ve aileme, İlkokul, ortaokul, lise, üniversite, yüksek lisans ve doktora mezuniyetlerimi kendisine adadığım ilk öğretmenim babam Hulusi Şahin'e,
Doktora sürecimi yakından takip eden meraklı kedim Jojo'ya,
En önemlisi tüm eğitim hayatım boyunca yoluma çıkan her türlü zorluğu aşmama yardımcı olan içimdeki pes etmeme dürtüme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.
İyi ki varsınız…

OCAK, 2025 **Elif ŞAHİNKAYA**

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **i**
İÇİNDEKİLER ..... **ii**
ÖZET ..... **v**
ABSTRACT……**vi**
YENİLİK BEYANI……...**vii**
SEMBOLLER……..**viii**
KISALTMALAR……...**ix**
ŞEKİL LİSTESİ…….**x**
TABLO LİSTESİ……..**xii**
1. GİRİŞ 1
1.1. Amaç 9
1.2. Özgün Değer 11
1.3. Literatür 12
2. MATERYAL VE YÖNTEM……..**14**
2.1. Boyut Dışlama Kromatografisi (SEC HPLC) Metot Geliştirme çalışması…….14
2.2. Boyut Dışlama Kromatografisi (SEC HPLC) Kromatografik Koşulları…….18
2.3. Protein A Kromatografisi Analitik Metot Geliştirme çalışması 23
2.3.1. Analiz süresi 24
2.3.2. Hareketli Faz Faz Tuz Konsantrasyonu……25
2.3.3. Enjektör Yıkama Süresi 26
2.3.4. Enjeksiyon Hacmi…….28
2.3.5. Çözücü Etkisi……29
2.4. Protein A Kromatografisi için Kromatografik Şartları 30
2.5. Materyaller 37
2.5.1. Metot Geliştirme ve Validasyon Analizlerinde Kullanılan kimyasallar.. 37
2.5.2. Metot Geliştirme ve Validasyon Analizlerinde Kullanılan ekipmanlar.. 38
2.5.2.1. Laboratuvar araçları ve cam materyaller 38
2.5.3. Referans Ürün numunesi 39
2.5.4. Enstrümental Cihazlar 39
2.5.5. HPLC kolonları 39

2.5.6. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları……40
2.5.6.1 SEC HPLC Hareketli Faz Hazırlığı…….....40
2.5.6.2 Protein A Kromatografisi Hareketli Faz Hazırlığı……...41

3. ANALİTİK METOT VALİDASYON ÇALIŞMASI……...42

3.1. SEÇİCİLİK/SPESİFİKLİK……...42
3.1.1. TAŞINMA ETKİSİ 42
3.1.2. PİK TANIMLAMASI VE ÇÖZÜCÜ ETKİSİ..... 44
3.1.3. SEÇİCİLİK SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ 45
3.2. DOĞRUSALLIK..... 47
3.3. UYGULAMA ARALIĞI 62
3.4. EN DÜŞÜK MİKTARLANDIRMA LİMİTİ (LLOQ) 67
3.5. DOĞRULUK & KESİNLİK 71
3.6. ARA KESİNLİK & DOĞRULUK..... 102
3.7. SAĞLAMLIK / DAYANIKLILIK 125
3.7.1. Akış Hızı Değişikliği 125
3.7.2. Kolon Sıcaklık Değişimi 125
3.7.3. Dalga Boyu Değişikliği 125
3.7.4. Akış Hızı Değişimi..... 125
3.7.5. Kolon Sıcaklığı Değişimi 136
3.7.6. Dalga Boyu Değişimi 146
3.8. SOLÜSYON STABİLİTESİ..... 156

4. BULGULAR VE TARTIŞMA..... 159

4.1. Analitik Metot Validasyonu Doğrusallık, Aralık ve Doğruluk & Kesinlik parametrelerinin Üç Gün Analizi Ortalama Sonuçları 159

5. SONUÇLAR..... 175

5.1. Genel Sonuç..... 175

KAYNAKLAR..... 178

ÖZGEÇMİŞ..... 184

ÖZET

BİR BİYOMOLEKÜLÜN ORTOGONAL METOTLARININ TASARIMI VE TAYİN SINIRLARININ SAYISAL ANALİZİ

Orijinal referans ürünü olarak da bilinen referans ürün, analitik metot geliştirme ve validasyon çalışması için çalışmada kullanılmıştır. Referans ürün spesifikasyonlarını inceledikten sonra spesifikasyonların SEC HPLC sonucunu içerdiğini ancak analitik bir test olarak Protein A kromatografisinin belirtilmediği anlaşılmıştır. Referans ürün spesifikasyonlarına ilişkin bir kayıt olmamasına rağmen, özellikle alt akım üretimi (USP) ve üst akım üretimi (DSP) ürünlerin rutin analizi için alternatif yöntemler gereklidir. Bu çalışmada, Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı (ICH M10) tarafından belirlenen kılavuzlara uygun olarak, monoklonal antikorların (mAb) konsantrasyon tayini (titer) validasyonunda ortogonal iki kromatografik yönteminin etkinliği incelenmiştir.

SEC HPLC analitik metot validasyon çalışması (0,01 mg/ml–2,0 mg/ml) % 1,0 (LLOQ seviyesi) ile % 200,0 aralığında gerçekleştirilmiştir. Protein A kromatografisi analitik yöntemi için (0,0078 mg/ml–4,0 mg/ml) % 0,78 (LLOQ seviyesi) ile % 400,0 doğrusallık seviyeleri arasında validasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Monoklonal antikor (mAb) için analitik metot validasyonu, Waters® HPLC ekipmanı, Empower® 3 isimli bir yazılıma sahip PDA dedektörü kullanılarak metotları geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Elde edilen kromatogramlar/datalar proses edilerek istatistiksel analizler (ANOVA) ile doğrulanmıştır.

Protein A kromatografisi ve SEC HPLC analitik metotları, ICH M10 kılavuzuna uygun olarak mAb referans ürünü için validasyon parametreleri oluşturularak gerçekleştirilmiştir.

ABSTRACT

DESIGN OF ORTHOGONAL METHODS FOR A BIOMOLECULE AND NUMERICAL ANALYSIS OF THE LIMITS OF DETERMINATION

The reference product, also known as the original reference product, was used in the study for bioanalytical method development and method validation study. After reviewing the reference product specifications, it became clear that the specifications included the SEC HPLC result but did not specify Protein A chromatography as an analytical test. Although there is no record of reference product specifications, alternative methods are required, especially for routine analysis of upstream production (USP) and downstream production (DSP) products. In this study, the effectiveness of two orthogonal chromatographic methods in the concentration determination (titer) validation of monoclonal antibodies (mAb) was examined, in accordance with the guideline set by the International Conference on Harmonization (ICH M10).

SEC HPLC analytical method validation study (0.01 mg/ml–2.0 mg/ml) was performed between 1.0 % (LLOQ level) and 200.0 %. A method validation study was conducted for the Protein A chromatography bioanalytical method (0.0078 mg/ml–4.0 mg/ml) between 0.78 % (LLOQ level) and 400.0 % linearity levels. Bioanalytical method validation for monoclonal antibody (mAb) was developed and validated using Waters® HPLC equipment and a PDA detector with software called Empower® 3. The obtained chromatograms/data were processed and confirmed by statistical analysis (ANOVA).

Protein A chromatography and SEC HPLC bioanalytical methods were performed by establishing validation parameters for the mAb reference product in accordance with the ICH M10 guideline.

YENİLİK BEYANI

BİR BİYOMOLEKÜLÜN ORTOGONAL METOTLARININ TASARIMI VE TAYİN SINIRLARININ SAYISAL ANALİZİ

Bu tez çalışmasında monoklonal antikor olan biyoteknolojik ilaca ait miktar/ konsantrasyon tayini (titer) analizlerinde ortogonal iki metodun hem analitik metot geliştirme hem de analitik metot validasyon analizleri tasarlanıp gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda orijinal referans ürün kullanılmıştır. Referans ürün spesifikasyonları incelendikten sonra analitik sonuçları içeren spesifikasyon testlerinde miktar tayini olarak SEC HPLC sonucunu yer aldığı ancak analitik bir test olarak Protein A kromatografisine ait analiz sonucunun belirtilmediği anlaşılmıştır. Rutin miktar tayini analizlerinde protein A kromatografisinin analiz süresinin kısa olması ve SEC HPLC sonucunu ayrı bir analitik metot ile karşılaştırabilmesi açısından ortogonal bir metot ihtiyacı elzemdir.

Zira biyobenzer ilaç üretimi sonrasında tüm analitik dataların regülasyon başvuruları esnasında ilgili otoritelere sunulması gerekmektedir. Bu sebep ile de kendi laboratuvarımızda gerçekleştirilen rutin miktar tayini analizlerinde iki ayrı kromatografik analiz kullanıldığı için iki metodun da hem metot geliştirme hem de validasyon analizlerinin tasarlanıp gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Laboratuvar içi spesifikasyonlarında protein A kromatografisi de yer aldığı için tıpkı SEC HPLC analizi gibi protein A kromatografisi metodunun da metot geliştirme ve validasyon çalışması ICH M10 kılavuzuna uygun bir şekilde tasarlanıp gerçekleştirilmiştir.

İki metot ortogonal olduğu için referans ürün ve biyobenzer ürünlerin ve bu ürünlerin farklı seri/ lot numaralarının miktar tayini analiz sonuçlarını karşılaştırmak için de rutin olarak gerçekleştirilmektedir.

Bu tez çalışmasının sunduğu en önemli yenilikler ise literatürde Protein A kromatografisinin validasyonuna ilişkin herhangi bir çalışma/yayın bulunmamasıdır. Ayrıca SEC HPLC analizleri için de ICH M10 kılavuzu esas alınarak yayınlanmış herhangi bir çalışma literatürde yer almamaktadır. Çalışmamızdaki araştırma bulguları SCI kapsamında Türk Biyokimya Dergisinde tez çalışması kapsamında elde edilen veriler yayın olarak yayınlanmıştır.

SEMBOLLER

Å **:** Ångström

°C **:** Sıcaklık (Celsius Ölçeği)

mM **:** Milimolar

R^2 **:** Korelasyon Katsayısı

PH **:** Asitlik, bazlık derecesi

PI **:** İzoelektrik Noktası

% : Yüzde Değer

KISALTMALAR

Kısaltmalar		Açıklamalar
CV	**:**	Değişim Katsayısı
Dk	**:**	Dakika
HPLC	**:**	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
ICH	**:**	International Council of Harmonization
IgG	**:**	İmmünoglobülin G
kDa	**:**	Kilodalton
LLOQ	**:**	Lower Limit of Quantitation
Low QC	**:**	Düşük seviyede hazırlanan numune
MID QC	**:**	Orta seviyede hazırlanan numune
PDA	**:**	Photodiode Array Detector
QC	**:**	Kalite Kontrol
RSD	**:**	Rölatif Standart Sapma
SD	**:**	Standart Sapma
SEC	**:**	Size Exclusion (Boyut Dışlama)
ULOQ	**:**	Upper Limit of Quantitation
UV	**:**	Ultraviyole (mor ötesi)
UV-VIS	**:**	Ultraviyole-Görünür Bölge

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA

Şekil 2.1. 2998 PDA Dedektörü için Waters® Empower yazılımındaki yöntem sekmesinin ekran görüntüsü……...18
Şekil 2.2. 2998 PDA Dedektörü için Waters® Empower yazılımındaki yöntem sekmesinin ekran görüntüsü-rezolüsyon……...19
Şekil 2.3. 2998 PDA Dedektörü için Waters® Empower yazılımındaki yöntem sekmesinin ekran görüntüsü-FTN-R…….20
Şekil 2.4. Quaternary Solvent Manager-R için Waters® Empower yazılımındaki yöntem sekmesinin ekran görüntüsü…….21
Şekil 2.5. Quaternary Solvent Manager-R-Sistem Basıncı için Waters® Empower yazılımındaki yöntem sekmesinin ekran görüntüsü……..22
Şekil 2.6. 10 dakikalık metoda ait gradient bilgileri…….20
Şekil 2.7. 30 saniyelik enjektör yıkama süresi metoduna ait görsel…….27
Şekil 2.8. 2998 PDA Dedektörü için Waters® Empower yazılımındaki yöntem sekmesinin ekran görüntüsü……..31
Şekil 2.9. 2998 PDA Dedektörü için Waters® Empower yazılımındaki yöntem sekmesinin ekran görüntüsü-rezolüsyon……...32
Şekil 2.10. 2998 PDA Dedektörü için Waters® Empower yazılımındaki yöntem sekmesinin ekran görüntüsü-FTN-R…….....33
Şekil 2.11. Quaternary Solvent Manager-R için Waters® Empower yazılımındaki yöntem sekmesinin ekran görüntüsü…….....34
Şekil 2.12. Quaternary Solvent Manager-R-Sistem Basıncı için Waters® Empower yazılımındaki yöntem sekmesinin ekran görüntüsü……..35
Şekil 3.1. SEC HPLC Doğrusallık Gün-1 Grafiği……51
Şekil 3.2. SEC HPLC Doğrusallık Gün-2 Grafiği……52
Şekil 3.3. SEC HPLC Doğrusallık Gün-3 Grafiği……54
Şekil 3.4. Protein A Kromatografisi Doğrusallık Gün-1 Grafiği……..58
Şekil 3.5. Protein A Kromatografisi Doğrusallık Gün-2 Grafiği…….....59
Şekil 3.6. Protein A Kromatografisi Doğrusallık Gün-3 Grafiği……..61
Şekil 3.7. SEC HPLC Standart Eğrisi Grafiği……...73
Şekil 3.8. Protein A Kromatografisi Standart Eğrisi Grafiği……89
Şekil 3.9. SEC HPLC Ara Kesinlik Standart Eğrisi Grafiği……...104

Şekil 3.10. Protein A Kromatografisi Ara Kesinlik Standart Eğrisi Grafiği……..…..115
Şekil 4.1. SEC HPLC Doğrusallık Gün-1-2-3 Grafiği……..…..160
Şekil 4.2. Protein A Kromatografisi Doğrusallık Gün-1-2-3 Grafiği…….…....162
Şekil 4.3. SEC HPLC Kromatografisi ortalama sonuçları GraphPad Grafiği……163
Şekil 4.4. Protein A Kromatografisi ortalama sonuçları GraphPad Grafiği……...164
Şekil 4.5. Miktar tayini/ titer analizi için elde edilen iki yöntemin kromatografik profili……...…165

TABLO LİSTESİ

SAYFA

Tablo 2.1 Gradient Tablosu…….……30
Tablo 3.1. Taşınma Etkisi Testi Sonuç Tablosu…….....43
Tablo-3.2. SEC HPLC Spesifiklik Testi Sonuç Tablosu……45
Tablo 3.3. Protein A Kromatografisi Spesifiklik Testi Sonuç Tablosu……46
Tablo 3.4. SEC HPLC Doğrusallık Gün-1 Sonuçları……....50
Tablo 3.5. SEC HPLC Doğrusallık Gün-1 Regresyon Analizi Sonuçları……50
Tablo 3.6. SEC HPLC Doğrusallık Gün-2 Sonuçları……....51
Tablo 3.7. SEC HPLC Doğrusallık Gün-2 Regresyon Analizi Sonuçları……52
Tablo 3.8. SEC HPLC Doğrusallık Gün-3 Sonuçları……....53
Tablo 3.9. SEC HPLC Doğrusallık Gün-3 Regresyon Analizi Sonuçları……54
Tablo 3.10. Protein A Kromatografisi Doğrusallık Gün-1 Sonuçları…….....57
Tablo 3.11. Protein A Kromatografisi Doğrusallık Gün-1 Regresyon Analizi Sonuçları…….…..57
Tablo 3.12. Protein A Kromatografisi Doğrusallık Gün-2 Sonuçları…….……58
Tablo 3.13. Protein A Kromatografisi Doğrusallık Gün-2 Regresyon Analizi Sonuçları……..…….59
Tablo 3.14. Protein A Kromatografisi Doğrusallık Gün-3 Sonuçları……..……...60
Tablo 3.15. Protein A Kromatografisi Doğrusallık Gün-3 Regresyon Analizi Sonuçları……...…60
Tablo 3.16. SEC HPLC İçin Uygulama Aralığı Gün-1 Tablosu……62
Tablo 3.17. SEC HPLC İçin Uygulama Aralığı Gün-2 Tablosu……63
Tablo 3.18. SEC HPLC İçin Uygulama Aralığı Gün-3 Tablosu……63
Tablo 3.19. Protein A Kromatografisi Uygulama Aralığı Gün-1 Tablosu……..……....64
Tablo 3.20. Protein A Kromatografisi Uygulama Aralığı Gün-2 Tablosu…….....65
Tablo.3.21. Protein A Kromatografisi Uygulama Aralığı Gün-3 Tablosu…….....66
Tablo 3.22. SEC HPLC İçin En Düşük Miktarlandırma Limiti (LLOQ) Gün-1-2-3 Tablosu……...…….68

Tablo 3.23. Protein A Kromatografisi İçin En Düşük Miktarlandırma Limiti (LLOQ) Gün-1-2-3 Tablosu……69

Tablo 3.24. SEC HPLC ve Protein A Kromatografisi İçin En Düşük Miktarlandırma Limiti (LLOQ) Gün-1-2-3 Sinyal/ Gürültü Karşılaştırma Tablosu……70

Tablo 3.25. SEC HPLC Standart Eğrisi Sonuçları…….72

Tablo 3.26. SEC HPLC Standart Eğrisi Regresyon Analizi Sonuçları……..73

Tablo 3.27. Kalibrasyon Eğrisi % 100 Seviyesi Sistem Uygunluk

Sonuçları Tablosu……..74

Tablo 3.28. (LLOQ seviyesi) Testi 1. Gün Sonuç Tablosu….....75

Tablo 3.29. (Low QC) Testi 1. Gün Sonuç Tablosu……..76

Tablo 3.30. (MID QC) Testi 1. Gün Sonuç Tablosu……..77

Tablo 3.31. (ULOQ) Testi 1. Gün Sonuç Tablosu…….....78

Tablo 3.32. (LLOQ) Testi 2. Gün Sonuç Tablosu…….79

Tablo 3.33. (Low QC) Testi 2. Gün Sonuç Tablosu……..….80

Tablo 3.34. (MID QC) Testi 2. Gün Sonuç Tablosu……..….81

Tablo 3.35. (ULOQ) Testi 2. Gün Sonuç Tablosu…….....82

Tablo 3.36. (LLOQ) Testi 3. Gün Sonuç Tablosu…….....83

Tablo 3.37. (Low QC) Testi 3. Gün Sonuç Tablosu……..84

Tablo 3.38. MID QC) Testi 3. Gün Sonuç Tablosu……..…….85

Tablo 3.39. (ULOQ) Testi 3. Gün Sonuç Tablosu……..86

Tablo 3.40. Protein A Kromatografisi Standart Eğrisi Sonuçları. ……88

Tablo 3.41. Protein A Kromatografisi Standart Eğrisi Regresyon Analizi Sonuçları…88

Tablo 3.42. Kalibrasyon Eğrisi % 100 Seviyesi Tablosu.....89

Tablo 3.43. (LLOQ seviyesi) Testi 1. Gün Sonuç Tablosu……..…….90

Tablo 3.44. (Low QC) Testi 1. Gün Sonuç Tablosu……..91

Tablo 3.45. (MID QC) Testi 1. Gün Sonuç Tablosu……..92

Tablo 3.46. (ULOQ) Testi 1. Gün Sonuç Tablosu……..93

Tablo 3.47. (LLOQ) Testi 2. Gün Sonuç Tablosu……..94

Tablo 3.48. (Low QC) Testi 2. Gün Sonuç Tablosu……..95

Tablo 3.49. (MID QC) Testi 2. Gün Sonuç Tablosu……..……96
Tablo 3.50. (ULOQ) Testi 2. Gün Sonuç Tablosu……..97
Tablo 3.51. (LLOQ) Testi 3. Gün Sonuç Tablosu……..98
Tablo 3.52. (Low QC) Testi 3. Gün Sonuç Tablosu……...99
Tablo 3.53. (MID QC) Testi 3. Gün Sonuç Tablosu……100
Tablo 3.54. (ULOQ) Testi 3. Gün Sonuç Tablosu……101
Tablo 3.55. SEC HPLC Standart Eğrisi Sonuçları……...103
Tablo 3.56. SEC HPLC Standart Eğrisi Regresyon Analizi Sonuçları……..…104
Tablo 3.57. Ara Kesinlik- Kalibrasyon Eğrisi % 100 Seviyesi Tablosu……..105
Tablo 3.58. Ara Kesinlik & Doğruluk (LLOQ Seviyesi) Sonuç Tablosu……106
Tablo 3.59. Ara Kesinlik & Doğruluk (Low QC Seviyesi) Sonuç Tablosu……107
Tablo 3.60. Ara Kesinlik & Doğruluk (MID QC Seviyesi) Sonuç Tablosu……108
Tablo 3.61. Ara Kesinlik & Doğruluk (ULOQ Seviyesi) Sonuç Tablosu……109
Tablo 3.62. LLOQ Seviyesi Karşılaştırma Sonuç Tablosu……110
Tablo 3.63. Low QC Seviyesi Karşılaştırma Sonuç Tablosu……...111
Tablo-3.64. MID QC Seviyesi Karşılaştırma Sonuç Tablosu……..112
Tablo 3.65. ULOQ Seviyesi Karşılaştırma Sonuç Tablosu……113
Tablo 3.66. Ara Kesinlik & Doğruluk Testi Protein A Kromatografisi Standart Eğrisi Sonuçları……..114
Tablo 3.67. Protein A Kromatografisi Standart Eğrisi Regresyon Analizi Sonuçları……115
Tablo 3.68. Kalibrasyon Eğrisi % 100 Seviyesi Tablosu……116
Tablo 3.69. Ara Kesinlik & Doğruluk (LLOQ Seviyesi) Sonuç Tablosu……117
Tablo 3.70. Ara Kesinlik & Doğruluk (Low QC Seviyesi) Sonuç Tablosu……118
Tablo 3.71. Ara Kesinlik & Doğruluk (MID QC Seviyesi) Sonuç Tablosu……119
Tablo 3.72. Ara Kesinlik & Doğruluk (ULOQ Seviyesi) Sonuç Tablosu……120
Tablo 3.73. LLOQ Seviyesi Karşılaştırma Sonuç Tablosu……..121
Tablo 3.74. Low QC Seviyesi Karşılaştırma Sonuç Tablosu……..122
Tablo 3.75. MID QC Seviyesi Karşılaştırma Sonuç Tablosu……..123
Tablo 3.76. ULOQ Seviyesi Karşılaştırma Sonuç Tablosu……124

Tablo 3.77. SEC HPLC Metot Stabilitesi-1……...……..126
Tablo 3.78. SEC HPLC Metot Stabilitesi-2…….127
Tablo 3.79. SEC HPLC Metot Stabilitesi-3…….128
Tablo 3.80. SEC HPLC Metot Stabilitesi-4…….129
Tablo 3.81. SEC HPLC Metot Stabilitesi-5…….130
Tablo 3.82. Protein A Kromatografisi Metot Stabilitesi-6……...131
Tablo3.83. Protein A Kromatografisi Metot Stabilitesi-7……....132
Tablo 3.84. Protein A Kromatografisi Metot Stabilitesi-8……..133
Tablo 3.85. Protein A Kromatografisi Metot Stabilitesi-9……..…134
Tablo 3.86. Protein A Kromatografisi Metot Stabilitesi-10…….135
Tablo 3.87. SEC HPLC Metot Stabilitesi -Kolon Sıcaklığı Değişimi Sonuçları……..136
Tablo 3.88. SEC HPLC Metot Stabilitesi -Kolon Sıcaklığı Değişimi Sonuçları……..137
Tablo 3.89. SEC HPLC Metot Stabilitesi -Kolon Sıcaklığı Değişimi Sonuçları……..138
Tablo 3.90. SEC HPLC Metot Stabilitesi -Kolon Sıcaklığı Değişimi Sonuçları…….139
Tablo 3.91. SEC HPLC Metot Stabilitesi -Kolon Sıcaklığı Değişimi Sonuçları…….140
Tablo 3.92. Protein A Kromatografisi -Kolon Sıcaklığı Değişimi Sonuçları……...141
Tablo 3.93. Protein A Kromatografisi Metot Stabilitesi-
Kolon Sıcaklığı Değişimi Sonuçları…….……142
Tablo 3.94. Protein A Kromatografisi Metot Stabilitesi-
Kolon Sıcaklığı Değişimi Sonuçları……143
Tablo 3.95. Protein A Kromatografisi Metot Stabilitesi-
Kolon Sıcaklığı Değişimi Sonuçları…….…144
Tablo 3.96. Protein A Kromatografisi Metot Stabilitesi-
Kolon Sıcaklığı Değişimi Sonuçları…….145
Tablo 3.97. SEC HPLC Metot Stabilitesi -Dalga Boyu Değişimi Sonuçları……146
Tablo 3.98. SEC HPLC Metot Stabilitesi -Dalga Boyu Değişimi Sonuçları……147
Tablo 3.99. SEC HPLC Metot Stabilitesi -Dalga Boyu Değişimi Sonuçları……148
Tablo 3.100. SEC HPLC Metot Stabilitesi-Dalga Boyu Değişimi Sonuçları……..149
Tablo 3.101. SEC HPLC Metot Stabilitesi -Dalga Boyu Değişimi Sonuçları…….150

Tablo 3.102. Protein A Kromatografisi Metot Stabilitesi-
Dalga Boyu Değişimi Sonuçları……..……151
Tablo 3.103. Protein A Kromatografisi Metot Stabilitesi -Dalga Boyu Değişimi Sonuçları……..152
Tablo 3.104. Protein A Kromatografisi -Dalga Boyu Değişimi Sonuçları……..….153
Tablo 3.105. Protein A Kromatografisi-Dalga Boyu Değişimi Sonuçları……154
Tablo 3.106. Protein A Kromatografisi -Dalga Boyu Değişimi Sonuçları…….……..155
Tablo 3.107. SEC HPLC Metodu Numune Çözeltisi Sonuçları (5°C)…….157
Tablo 3.108. Protein A Kromatografisi Numune Çözeltisi Sonuçları (5°C)…….158
Tablo 4.1. SEC HPLC Doğrusallık ortalama Sonuçları……...159
Tablo 4.2. SEC HPLC Doğrusallık ortalama Regresyon Analizi Sonuçları……160
Tablo 4.3. Protein A Kromatografisi Doğrusallık ortalama Sonuçları……161
Tablo 4.4. Protein A Kromatografisi Doğrusallık ortalama
Regresyon Analizi Sonuçları……...162
Tablo 4.5. SEC HPLC İçin Uygulama Aralığı ortalama Tablosu……165
Tablo 4.6. Protein A Kromatografisi Uygulama Aralığı ortalama Tablosu……..…..166
Tablo 4.7. LLOQ Seviyesi Doğruluk & Kesinlik Testi ortalama Sonuç Tablosu……167
Tablo 4.8. Düşük QC Seviyesi Doğruluk & Kesinlik Testi
ortalama Sonuç Tablosu……...168
Tablo 4.9. MID QC Seviyesi Doğruluk & Kesinlik Testi
ortalama Sonuç Tablosu……...169
Tablo 4.10 ULOQ Seviyesi Doğruluk & Kesinlik Testi
ortalama Sonuç Tablosu…….…..170
Tablo 4.11. LLOQ Seviyesi Doğruluk & Kesinlik Testi
ortalama Sonuç Tablosu……...……171
Tablo 4.12. Düşük QC Seviyesi Doğruluk & Kesinlik Testi
ortalama Sonuç Tablosu……...172
Tablo 4.13. MID QC Seviyesi Doğruluk & Kesinlik Testi
ortalama Sonuç Tablosu……...173
Tablo 4.14. ULOQ Seviyesi Doğruluk & Kesinlik Testi
ortalama Sonuç Tablosu……...174

1. GİRİŞ

İnsanlardaki beş antikor sınıfından monoklonal antikorlar (mAb), farmasötik ve biyomedikal amaçlar için en yaygın kullanılan alt sınıf olan; Immunoglobulin G'dir (IgG) [1].

Bu biyofarmasötik sınıfının artan önemi nedeniyle, analitik yöntemlerin geliştirilmesi ve ayrıntılı karakterizasyonları için dinamik bir araştırma alanı ortaya çıkmıştır. IgG1 içeren mAb'lar büyük ölçüde koproteinlerdir (E150kDa), dört peptit zincirinden, iki özdeş ağır zincirden oluşur; (E50 kDa) ve iki özdeş hafif zincir (E25 kDa), bunlar ilgili bölgelerinde disülfit bağları ile bağlanır, spesifik bir Y şekli oluştururlar [2].

İmmünoglobulin G (IgG), bağışıklık sisteminde rol oynayan en yaygın antikor türüdür. IgG'nin yaklaşık 146 kDa moleküler ağırlığı vardır; 50 kDa H zincirleri ve iki aynı L zinciri içerir [3]. IgG sınıfı, her birinin kendine özgü biyolojik özellikleri olan dört alt sınıfa ayrılır: IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4; bu alt sınıflar farklı fonksiyonlara sahiptir. Bu alt sınıflar, disülfid bağlarının sayısına ve menteşe bölgesinin uzunluğuna bağlı olarak farklılık gösterir [4].

IgG'nin Fc kısmı, plasenta yüzeyindeki reseptörlere bağlanır ve yeni doğanları enfeksiyon hastalıklarından korur, bu nedenle plasentayı geçebilen tek immünoglobulindir [3].

Terapötik monoklonal antikorlar tek bir B hücre klonu tarafından üretilir. Poliklonal antikorlardan farklı olarak, mAb'ler monospektrik ve homojendir, bu nedenle terapilerin ve tanıların geliştirilmesinde etkili olurlar [5,6].

Rekombinant Antikorlar, bir hayvanı immünize etmeden veya bir hibridoma yetiştirmeden in vitro olarak sentetik bir gen ile üretilebilen monoklonal antikorların (mAb) bir türüdür. Rekombinant antikor teknolojisi uygulandığında, antikor genleri hücrelerden izole edilir, çoğaltılır ve vektöre klonlanır. Vektör, yeterli miktarda fonksiyonel antikor ifadesi elde etmek için konak hücresine (bakteriyel, maya veya memeli hücresi) aktarılır [7].

Rekombinant teknolojinin avantajı olarak, rekombinant antikor dizisinin bilinirliği monoklonal antikorlara göre daha güvenilir ve tekrarlanabilir olmasını sağlar. Rekombinant teknoloji kullanılarak antikor üretimi, hibridoma teknolojisine göre daha az zaman ve çaba gerektirir [8].

Son yıllarda monoklonal antikorlar endüstriyel ve biyofarmasötik alanlarda tercih edilmiştir. Çin hamster yumurtalık (CHO) hücreleri, protein katlanması, salgılanması ve sonrası modifikasyonlardaki iyi performansları nedeniyle monoklonal antikor üretiminde yaygın olarak kullanılan konak hücreleridir [9].

Dünyanın önde gelen monoklonal antikor üreticileri Roche, Johnson & Johnson, Merck, Novartis, AbbVie ve Amgen'dir. 2018 verilerine göre, en büyük sekiz mAb'ın piyasa değeri, global pazarın yaklaşık % 55'ini kapsamaktadır [10].

Monoklonal antikor ilaçlarına olan talep, artan kanser vakalarıyla doğru orantılı olarak artmaktadır. Bu nedenle, global mAb pazarının 2024 yılında 161,7 milyar ABD Doları'na ulaşması beklenmektedir [11].

mAb'lar ilaçlarda tedavi edici madde olarak kullanıldığından hastaya garanti sunabilmek için emniyet ve kalite gereksinimlerine uymalıdır. Ayrıca ilaç etkinliği de dikkatle kontrol edilmelidir. [12]. Bu şekilde kontrol olmadan, mAb'lar hastalar tarafından üretilen anti-ilaç antikorlarıyla ilgili immünojenik yanıtları tetikleyebilir ve bu da potansiyel olarak yaşamı tehdit eden durumlara yol açabilir [13].

Biyoteknolojik ürünlerin kalitesinin sağlanmasına yönelik tavsiyeler, Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı (ICH) tarafından yayınlanan ICH Q5E kılavuzlarında İnsan Kullanımına Yönelik Farmasötiklere İlişkin Teknik Gereksinimler Yönetmeliği belirtilmiştir [14].

Test prosedürlerine ilişkin özel spesifikasyonlar ve Biyoteknolojik/biyolojik ürünler için kabul kriterleri ICH Q6B yönergelerinde belirlenmiştir [15]. Kullanılan tüm analitik yöntemler mAb'ları karakterize etmek, mümkün olduğunca uluslararası ilaç düzenleme kuruluşlarının gerekliliklerine uymalıdır. Özellikle ICH Q2 (R2) güncel kılavuzunda belirtilenler analitik metot validasyonu analizlerini kapsayan ilkelerini içerir. [16].

Boyut Dışlama Kromatografisi (SEC), biyofarmasötiklerin agregatlarının veya parçalarının (boyut değişkenlerinin) sıvı kromatografisi (HPLC) ile analizine yönelik son teknolojidir [17]. SEC ayrımları, protein konformasyonunu koruyan eluentler kullanılarak geliştirilebilir. Bu nedenle boyut çeşitleri analitik koşullarda karakterize edilebilir. Ayırma entropik olarak gerçekleştirilir; sabit fazda analitlerin tutunmadığı ve elüsyonun yalnızca farklı boyuttaki analitler için farklı erişilebilir kolon hacimlerine dayandığı anlamına gelir [18].

Sabit faz genellikle kontrollü gözenek boyutuna sahip küresel silika boncuklarından yapılır. Yüksek moleküler ağırlıklı analitler, sabit fazın gözeneklerinin çoğuna erişemedikleri için ilk önce elüsyona uğrayacaktır. Aksine, düşük moleküler ağırlıklı analitler, sabit faza daha fazla etki ettiklerinden daha geç elüsyona uğrar.

SEC analizlerinde biyofarmasötiklerin ayrılması için kullanıldığında, protein konformerlerinin, şekillerinin (yani çubuk benzeri, küresel veya esnek zincir yapıları) önemli boyut farklılıkları belirlemesi durumunda farklı zamanlarda elue olabileceği incelenmelidir [17].

Rekombinant olarak üretilen monoklonal antikor (mAb) ürünleri genellikle üretim ve depolama sırasında üretilen boyut değişkenlerini (varyant) (örn. agregatlar, fragmentler) içerir. [19-21]. Agregatlar ve fragmentler potansiyel olarak immünojeniteyi ve potensi etkileyebileceğinden bunların seviyeleri genellikle serbest bırakma analizleri, stabilite ve karakterizasyon analizleri esnasında izlenir. Boyut dışlama kromatografisi (SEC), boyut değişkenlerini öncelikle moleküllerin hidrodinamik hacmine göre ayırır. [22-24].

Antikor boyutu varyantları tipik olarak doğal koşullar altında SEC ile izlenir. [19, 20]. Tipik bir SEC profili, agregatlar, antikor monomeri ve fragmentler arasındaki net ayrımları gösterir. Bu nedenle SEC, antikor terapötiklerinin kalite kontrolü ve karakterizasyonu için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. [25].

Spesifik olmayan etkileşimler SEC HPLC ayırmalarını olumsuz etkileyebileceği bu sebeplerle gözlemlenebilir. Boyut Dışlama Kromatografisinde yaygın iki istenmeyen etkileşim elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerdir. Elektrostatik etkileşimlerle ilgili olarak, analitler ve sabit fazda aynı işaretli net yüklere sahip olduğunda, itme kuvvetleri elüsyon süresini azaltır (iyon dışlama etkileşimleri). Aksine, analitler ve sabit faz zıt işarette net yüklere sahip olduğunda (iyon değişimi etkileşimleri) elüsyon gecikmektedir [26].

Alternatif olarak elüsyon süresindeki artış, analitler ve donanım arasındaki hidrofobik etkileşimler tarafından da tetiklenebilir. Bu etki ise paslanmaz çelik donanımın titanyum veya PEEK (polieter eter keton) gibi diğer malzemelerle değiştirilmesiyle en aza indirilebilir [27].

SEC eluentleri çoğunlukla sulu çözelti olduğundan iyonik güç ve pH performans açısından önemli bir rol oynar. İyonik gücün arttırılması yüklü analitlerin etkileşimlerini azaltabilir [28,29].

Biyofarmasötikler için mobil fazın optimal pH'ı protein izoelektrik noktasındadır (pI), çünkü analitlerin net yükü nötrdür ve iyonik etkileşim olasılığı bu nedenle en aza indirilir. Bununla birlikte, toplanma veya çökme ile protein denatürasyonunu önlemek amacıyla, birçok biyofarmasötiğin analizi için neredeyse nötr bir pH gereklidir. Silika, SEC için en yaygın malzeme olduğundan, sabit faz, neredeyse nötr pH'ta negatif yüklü asidik grupları (yani silanolleri) açığa çıkarır. Bu nedenle, iyon değişimi, analitin izoelektrik noktasının altındaki pH'ta elüentler tarafından tetiklenirken, iyon dışlama, analitin izoelektrik noktasının üzerindeki pH'ta elüentler tarafından indüklenir. Bu nedenle, temel iyonik katkı maddelerinin kullanımı, ikincil iyonik etkileşimleri azaltarak ayırmayı iyileştirebilir [29].

Diğer bir kritik parametre ise sıcaklıktır; çözücü viskozitesini azaltmak ve analitin difüzyonunu ve kütle transferini arttırmak için artırılabilir. Bu, elüsyon süresini azaltabilir ve rezolüsyonu arttırabilir. Ancak yüksek sıcaklık aynı zamanda protein denatürasyonunu da tetikleyebilir. Bir yandan, denatüre proteinler daha hızlı elue edilebiliyorsa, açılma genellikle artan görünen boyutla ilişkilidir, aşırı denatürasyon, protein toplanmasına ve çökelmesine yol açabilir [29].

Biyofarmasötikler için en popüler dedektör seçeneği UV dedektördür. 280 nm'de tespit için mAb'ların aromatik amino asitlerinin absorbansı kullanılır. Aromatik amino asitler (özellikle triptofan), 280-295 nm'de tipik uyarılma dalga boyu ve 300-370 nm'de emisyon ile floresans tespitine de izin verir [30]. UV dedektör ile karşılaştırıldığında floresans dedektör (FLR) daha yüksek bir duyarlılığa sahiptir ve daha az miktarda maddenin tanımlanmasına olanak tanımaktadır. Ancak boyut değişkenlerini analiz etmek için SEC kullanıldığında, protein agregatlarının tipik olarak daha yüksek bir içsel floresansa sahip olduğu da akılda tutulmalıdır. [31].

Daha önce de belirtildiği gibi, SEC temel olarak mAb'ların ve boyut değişkenlerinin (agregatlar) karakterizasyonu için kullanılır, çünkü bu türler sağlam antikor monomerleriyle karşılaştırıldığında farklı bir boyuta sahiptir [32].

Biyolojik bazlı terapötiklerin erken dönemde piyasaya sürülmesinden bu yana, protein agregatlarının varlığı güvenlik ve etkililiği tehlikeye atabilir. Bu faktörler göz önüne alındığında, protein agregatları tipik olarak bir biyoterapötiğin üretimi boyunca izlenir. Agregat tayini için Boyut Dışlama Kromatografisi (SEC) en iyi sonuçları sunmaktadır. [33]

Bununla birlikte, herhangi bir SEC yönteminde olduğu gibi, rezolüsyonu ve metodun sağlamlığını artırmak için çeşitli parametreler ayarlanabilir. Uygulamada, hareketli faz bileşimi, akış hızı ve kolon uzunluğu dahil olmak üzere bu parametrelerden bazılarının SEC (Boyut dışlama kromatografisi) ayrımı üzerindeki etkisi önemlidir. Ayırmanın değerlendirilmesi kolon kalibrasyonu, rezolüsyonu ve agregat miktarının belirlenmesi gibi çeşitli kriterlere dayanır.

SEC HPLC metodunun geliştirilmesinde bir dizi faktörün değerlendirilmesi gerekir. İdeal olarak SEC ayrımları bir çözeltideki proteinlerin boyutuna dayanır. Bu nedenle biyomoleküllerin boyut dışlamalı kromatografisi sulu, doğal koşullar altında gerçekleştirilir [34].

Daha spesifik olarak, paketleme malzemesi üzerindeki yüklü alanlar proteinlerle etkileşime girerek iyon değişimi etkisine neden olabilir. Bu etkilerin etkisini belirlemek için ayırmanın hareketli faz koşullarının değerlendirilmesi gerekir. Ancak kromatografik

ayırma koşulları proteinin yapısını ve durumunu değiştirebilir. Tuzun ve pH'ın konsantrasyonu ve kimliği, 3 boyutlu yapıyı ve protein-protein etkileşimlerini etkileyebilir. Bu nedenlerden dolayı, bir SEC yönteminin değerlendirilmesi, biyomolekülün biyolojik aktivitesine ilişkin bilgileri içermelidir [35].

USP monografı dokümanında SEC HPLC yöntemi ve örnek bir analitik metot bulunmaktadır. İlgili kılavuz ya da monograflar ile paylaşılmış olan analitik metotlar metot geliştirme aşamasında rehber niteliğindedir. Kılavuza göre;

SEC-HPLC, monomer ve yüksek molekül ağırlıklı türlerin (HMWS, agregatlar) konsantrasyon ölçümü için sağlam olmasına rağmen, düşük molekül ağırlıklı türlerin (LMWS, fragmanlar) konsantrasyonunun belirlenmesi, çalışılan mAb'a bağlı olarak oldukça değişken olabilir [36].

USP <129> monografında belirtilen analitik metot aşağıdaki gibidir;

Hareketli faz: 10,5 g dibazik potasyum fosfat, 19,1 g monobazik potasyum fosfat ve 19,1 g monobazik potasyum fosfatın karıştırılmasıyla hazırlanır. PH 6,2 ± 0,1 olarak ayarlanır. 0,45 veya 0,22 µm membran filtreden geçirilerek filtrelenir.

Çözücü: Hareketli faz

Numune çözeltisi: Seyreltme gerekiyorsa numuneyi hareketli faz ile 10 mg/mL'ye seyreltilir. Benzer şekilde bir çözücü hazırlanmalıdır. Hareketli faz ile formülasyon tamponunun eşdeğer bir seyreltmesi kullanılarak çözücü seçilmelidir.

Mod: Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Dedektör: UV, 280 nm

Kolon: 7.8-mm × 30-cm; 5-µm L59

Kolon: 25 °C

Oto Örnekleyici: 2-8 °C

Akış Hızı: 0.5 mL/dk

Enjeksiyon Hacmi: 20 µL

Analiz süresi: 30 dk

Geliştirilen SEC HPLC metodu ile USP kılavuzu ve uygulama notunun paylaşmış olduğu analitik metot yüksek ölçüde benzerlik gösterdiği için metodu gerekçelendirme (justification) için büyük öneme sahiptir. Ayrıca geliştirdiğimiz analitik metodun validasyonu ICH M10 kılavuzuna uygun bir şekilde tasarlanmıştır.

Afinite kromatografisinin en yaygın kullanılan türü olan analitik Protein A kromatografisi, monoklonal antikorların hareketsizleştirilmiş bir liganda spesifik ve geri dönüşümlü olarak bağlanması prensibine dayanmaktadır. Protein A ise; staphylococcus aureus bakterisinin hücre duvarına özgü 56 kDa'luk bir yüzey proteinidir. Protein A kromatografisi kullanılarak monoklonal antikorların derişim/konsantrasyon (titer) analizleri, en yüksek antikor konsantrasyonunu ifade eden stabil klonları seçmek için rutin olarak gerçekleştirilir. [37].

Protein A kromatografisi antikorların Staphylococcus aureus protein A'ya spesifik bağlanmasına dayanan mAb konsantrasyonlarını (titer) ölçmek için yaygın olarak kullanılan bir analitik metottur [38,39].

Protein A konsantrasyon (titer) analitik prosedüründe mAb'lar, reçine veya monolit gibi bir kromatografik destek üzerine kovalent olarak immobilize edilmiş protein A ligandlarına seçici olarak bağlanırken, safsızlıklar ve diğer hücre kültürü bileşenleri uzaklaştırılır. Bağlı mAb daha sonra iyonik gücü, pH'ı veya mobil fazdaki denatürantın varlığını değiştirerek protein A ligandından elüe edilebilir [40].

Konsantrasyon (titer) hesaplanması, numune elüsyon pikin alanının, bilinen konsantrasyonlara sahip standartlardan oluşan bir kalibrasyon eğrisiyle (standart eğrisi ile) karşılaştırılması yoluyla gerçekleştirilir [41].

Protein A kromatografisi, özellikle üretilen monoklonal antikorların derişim (konsantrasyon/titre) belirlenmesi için yapılan rutin analizlerinde SEC HPLC yöntemine göre kısa analiz süresi ile avantaj sağlamaktadır.

Biyoanalitik metot validasyonu, biyofarmasötik ilaçların güvenliğini ve geçerliliğini kontrol etmek için çok önemlidir. İlaç ve biyofarmasötik endüstrisindeki düzenleyici otoriteler biyoanalitik yöntemlerin güvenilirliğini etkileyebilecek alt ve üst nicelik limiti (sırasıyla LLOQ ve ULOQ) veya seçicilik gibi analitik metot validasyon parametrelerinin önemini vurgulamaktadır. Metot geliştirmesi tamamlanan SEC HPLC ve Protein A Kromatografisi yöntemleri biyoanalitik metot validasyon çalışmaları, Kasım 2022 tarihli en son yayınlanan ICH M10 kılavuzuna uygun olarak tasarlanmıştır [42]

1.1. AMAÇ

Bu çalışmanın amacı; SEC HPLC ve protein A kromatografisi analitik metotlarını geliştirip analitik metot validasyon analizlerini ICH M10 kılavuzuna uygun bir şekilde gerçekleştirmektir. Bu doğrultuda da valide ortogonal metotlar ile hem referans ürün hem de biyobenzer ürüne ait tüm ürünlerin analizlerini gerçekleştirmektir.

Ek olarak, Protein A kromatografisinin metot geliştirme ve biyoanalitik metot validasyonuna ilişkin literatürde ayrıntılı bir çalışma bulunmadığından, bulgular biyoteknolojik ürünlerin rutin miktar tayini (konsantrasyon/titer) analizine ışık tutmaktadır.

Biyoanalitik metot geliştirme ve validasyonu çalışması, monoklonal antikor (mAb) numune çözeltisi olarak referans ürün (orijinatör referans ürünü) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

SEC HPLC yöntemiyle hem derişim (konsantrasyon/titer) hem de agregat sonuçları tespit edilir. Monomer/ana pik formunun saflık yüzdesini ve konsantrasyonunu belirlemek için bir SEC HPLC yöntemi geliştirilmiştir. SEC HPLC kromatografi yönteminden daha hızlı sonuç alabilmek ve iki farklı kromatografik metot ile sonuçları değerlendirmek üzere de Protein A kromatografisi metodu geliştirip validasyon analizleri ICH M10 kılavuna uygun olarak tasarlanmıştır.

Orijinal ürün için referans ürün spesifikasyonları da kontrol edildiğinde SEC HPLC sonucu spesifikasyonların içinde yer alan bir testtir. Ancak protein A kromatografisi analizinin spesifikasyonlarda yer alan bir test olmadığı sonucuna varılmıştır. Rutin analizlerde protein A kromatografisi derişim (konsantrasyon/titre) sonucunun tespitinde kullanılan bir analitik metottur. SEC HPLC analitik metodu gibi ICH M10 kılavuzuna uygun olarak analitik metot validasyon çalışmasının tamamlanarak analitik yöntemin en etkin şekilde çalışılması amaçlanmaktadır.

Aynı derişim (konsantrasyon/titer) sonucunu bulmak için iki farklı analitik yöntem kullanıldığından, iki yöntemin karşılaştırmalı olarak validasyon analizi sonuçları da bu sayede elde edilip raporlanmıştır.

Literatürde iki metodun ICH M10 kılavuzuna göre validasyon çalışması bulunmamaktadır. Bu çalışmanın sonuçları ile monoklonal antikor ürünlerinin protein A kromatografisi ve SEC HPLC metotlarının analitik validasyonları hakkında değerli bilgiler elde edilmiştir.

Bu kapsamda tez çalışmasını aşağıdaki konulara dair değerli katkılar sağlaması amaçlanmıştır. Sırasıyla;

- Akademik, biyoteknolojik ilaç çalışan tüm araştırma geliştirme laboratuvarlar için örnek bir analitik metot geliştirme ve analitik metot validasyonu çalışması gerçekleştirilmesi.
- Protein A kromatografisi rutin mAb analizlerinde sıklıkla tercih edilen bir metot olmasına karşın literatürde fazla çalışma bulunmaması ve literatürde yer alan bir validasyon çalışması bulunmadığından dolayı yeni bir analitik çalışmanın literatüre kazandırılması. Aynı şekilde literatürde ICH M10 kılavuzuna uygun bir şekilde gerçekleştirilmiş bir analitik metot validasyonu çalışması olmamasından ötürü literatüre değerli bilgiler kazandırılması.
- Ülkemizde de üretimi gerçekleştirilmekte olan biyobenzer bir monoklonal antikor ilacının yerli üretimine ve milli dataya katkı sağlamasıdır.

Bu bağlamda da orijinatör firmanın üretmiş olduğu referans ürünün miktar tayini yöntemlerinin (SEC HPLC ve Protein A kromatografisinin) kendi laboratuvarımızda metotlarının geliştirmesi ve ICH M10 kılavuzuna uygun bir şekilde analitik metot validasyon analizlerinin gerçekleştirilmesi de tüm analitik hedeflerin bütünüdür.

1.2. Özgün Değer

Biyoteknoloji araştırma ve geliştirme laboratuvarları kromatografik teknikler ile biyoteknolojik ilaç üretimi süreçlerini sürdürmektedir. Biyoteknolojik ilaç olarak kullanılan monoklonal antikorlar protein yapılıdır ve özellikle kanser ilacı olarak tedavi yöntemi sunmaktadır.

Tez araştırmasında çalışılan monoklonal antikora ait miktar tayini analizleri konsantrasyon/ titer belirlemek için SEC-HPLC (Boyut dışlama kromatografisi) ve protein A kromatografisi yöntemine ait ortogonal bir analitik metot geliştirme çalışması ve analitik metot validasyonu çalışması ile gerçekleştirilmiştir. Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu (ICH M10 ve ICH Q2 R2) tarafından belirlenen kılavuzlara uygun olarak, monoklonal antikorların derişim (konsantrasyon/titer) analitik metot validasyonunda Protein A kromatografisi ve Boyut Dışlama (SEC HPLC) kromatografisi yöntemleri birlikte incelenmiştir.

Literatürde ICH M10 kılavuzuna uygun bir şekilde gerçekleştirilmiş monoklonal antikorlara ait bir analitik metot validasyonu çalışması olmamasından ötürü literatüre değerli bilgiler kazandırılmıştır.

Çalışılan monoklonal antikorun Türkiye ve yurtdışı piyasasında biyobenzer ilacı bulunmadığı için geliştirdiğimiz ortogonal metotların literatürde yayınlanmış çalışması ve yayını bulunmamaktadır.

Türkiye'de biyoteknolojik ilaç Ar-Ge çalışmaları ile yerli ve milli data üretiyor olmak da seçilen monoklonal antikor ile birlikte özgün bir analitik metot ve analitik metot validasyonu çalışmasının gerçekleştirilmesini sağlayacaktır. Bu doğrultuda Türkiye ve yurtdışında piyasada biyobenzer ilacı bulunmayan monoklonal antikora ait analitik metot geliştirme ve analitik metot validasyonu çalışmalarını başarı ile gerçekleştirmek ve impact faktörü yüksek bir dergide çalışmamızı yayınlamaktır.

1.3. Literatür

Monoklonal antikorların SEC HPLC ve protein A kromatografisi ile ilgili analitik metot geliştirme ve analitik metot validasyon çalışması için literatür araştırması gerçekleştirilmiştir. SEC HPLC analizi için hali hazırda USP <129> monografının yayınlanmış olan metodu ve aplikasyon notunda yer alan analitik metodu esas alınmıştır. SEC HPLC metodu izokratik bir metot olarak geliştirilmiştir. Metodun justifiye edilebilmesi için eğer bir monograf yayınlanmış ise monograf üzerinden bir metot geliştirme çalışması yapılmalıdır. Laboratuvarımızda gerçekleştirilen rutin testler ve spesifikasyon belirlenmesinde bu nokta gözetilerek metot geliştirme çalışması finalize edilmiştir. Metot geliştirme başlığı altında tüm metot geliştirme süreci ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Protein A kromatografisi için ise literatürde analitik olarak çalışılmış bir metot geliştirme çalışmasına ya da protein A kromatografisi metoduna rastlanmamıştır. Monoklonal antikorun alt sınıfına göre de metotlar bulunabileceği için IgG 1-2-3-4 gibi monoklonal antikorlara göre literatür taraması gerçekleştirilmiştir. Protein A kromatografisi referans ürün spesifikasyonları incelendiğinde spesifikasyonlar yer almadığı için paylaşılan bir literatür çalışması bulunmamaktadır. Bu sebep ile kullanılan analitik kolon üreticisinin paylaşmış olduğu örnek analitik metot üzerinden tüm metot geliştirme çalışmaları tasarlanmış olup analitik metot validasyonu çalışması gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın amacında da detaylı olarak bahsedilmiş olduğu üzere bu sebeplerden ötürü çalışmanın tasarımı ve gerçekleştirilmesi tez çalışmasının özgün değerini belirleyen husustur. Ayrıca monoklonal antikorun miktar tayini (titer) analizlerinde SEC HPLC ve protein A kromatografisi ortogonal metotlar olduğu için konu ile alakalı literatürde bu başlık altında değerlendirilmiş bir çalışma bulunmamaktadır.

İki metodun analitik metot geliştirme süreci sonrasında analitik metot validasyonu için literatür araştırması yapılmıştır. ICH Q2 R2 ve ICH M10 kılavuzları incelenmiştir. Biyoteknolojik ürünler için 2022 tarihinde yayınlanan ICH M10 kılavuzunda detaylı bir şekilde validasyon tasarımı anlatılmaktadır.

Referans ürün üzerinden geliştirilen metotlara validasyon çalışması yapılması için ICH M10 kılavuzuna uygun olarak gerçekleştirilen çalışmalar araştırılmıştır. Ancak ICH M10 kılavuzuna uygun gerçekleştirilmiş bir analitik metot validasyonu bulunmamaktadır.

Monoklonal antikor üretimi orijinatör firmalar tarafından gerçekleştirilirken patent başvurusu esnasında analitik parametreleri paylaşılmamaktadır. Literatürde de bu sebep ile analitik data çok daha az paylaşılmıştır.

Biyobenzer ilaç üreticileri de aynı şekilde orijinatör firmadan tedarik ettikleri ilaç spesifikasyonlarını kendi spesifikasyonlarını oluştururken örnek almaktadır. Bu sebep ile de kendi laboratuvarlarında geliştirilmiş analitik metotlarının spesifikasyonlarını analiz sonuçlarına göre oluşturmaktadır.

Geliştirilmiş olan analitik metotlar ve analitik metot validasyon çalışmaları özgün değer barındırmaktadır. Biyobenzer üretim yapan laboratuvarlar ve akademik çalışmalar için tez çalışmamız örnek bir çalışma görevini teşkil etmektedir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Boyut Dışlama Kromatografisi (SEC HPLC) Metot Geliştirme çalışması

Literatür araştırması yapılmış ve laboratuvarımızda mevcut olan kolonlar üzerinden boyut dışlama kromatografisi (SEC HPLC) analizi için kolon seçimi yapılmıştır. TOSOH marka kolon kartı dokümanı da baz alınarak literatürdeki boyut dışlama kromatografisi (SEC HPLC) yöntemleri araştırılmıştır. Analitik metot geliştirme denemeleri için Waters® aplikasyon notu dokümanı öncelikli referans doküman olarak kullanılmıştır [43,44].

Boyut Dışlama Kromatografisi analizlerinde kolon seçimi analitik metot geliştirmesi için kritik öneme sahiptir. Hatta Koruyucu (Guard) kolon kullanılması tedarikçiler tarafından da önerilmektedir. Kolon seçiminde uzun kolon kullanılması daha iyi rezolüsyon elde etmemizi sağlayacağı için uzun bir kolon tercih edilmiştir.

Monoklonal antikor (mAb) SEC HPLC analizi için dalga boyu olarak 214 ve 280 nm seçilmiştir. Ayrıca PDA (Photo Diode Array) dedektör seçimi ile iki dalga boyunda da çalışmalar yapılmıştır. Analitik metot izokratik ters faz HPLC yöntemidir.

Kolon kartında yer alan bilgilere göre; Hareketli fazın iyonik gücü, paketleme malzemesi ve proteinler arasındaki herhangi bir ikincil etkileşimi en aza indirecek şekilde ayarlanmalıdır. Mobil faz konsantrasyonunun standart kalibrasyon eğrisi üzerindeki etkisini belirlemek için 50-250 mM sodyum klorür çözeltisi ile kolon kartında analiz sonuçları karşılaştırılmıştır. SEC HPLC analizlerinde en çok tercih edilen tuz çeşidi olduğu için sodyum klorür tuzu seçilmiştir. Sodyum fosfat tamponu konsantrasyonu 25 mM ve pH 6,8'de sabit tutulmuştur. Analitik yöntem hem kolon kartına hem de Waters® aplikasyon notu dokümanında yer alan analitik metoda göre sodyum tamponu ve pH 6,8 olarak seçilmiştir [43,44].

Özellikle kolon kartı dokümanı ve aplikasyon notunda yer alan kolonun 0,1 M fosfat tamponu, pH 6,7 içinde %0,05 NaN_3 ve 0,1 M Na_2SO_4 ile saklanması pH 6,8 sodyum fosfat tamponu kullanımının analitik metot için daha ideal olduğu tespit edilmiştir [43].

Hareketli faz seçiminden sonra akış hızının belirlenmesi amacıyla analitik metot geliştirme çalışması üç farklı akış hızı ile gerçekleştirilmiştir. Tüm sonuçlar USP<129> monografı ve USP<129> uygulama notu esas alınarak karşılaştırılmış ve 0,5 mL/dk akış hızıyla devam edilmesine karar verilmiştir. Ayrıca kolon sayfasındaki bilgiler ışığında optimum akış hızının 0,5-1,0 ml/dk olduğu açıklanmış ve bu doğrultuda akış hızı belirlenmiştir [43, 45, 46].

Kolon sayfası dokümanında, yüksek viskoziteli bir tampon kullanıldığında, maksimum basınç düşüşünü aşmayacak şekilde maksimum akış hızının (1,2 ml/dak) azaltılmasının gerekli olabileceğini belirtmektedir. Tampon çözeltiyi değiştirirken maksimum akış hızının %25'ine eşit bir akış hızının kullanılması tavsiyesiyle akış hızı seçiminde bu parametreler de kritik öneme sahiptir [43].

SEC HPLC metot geliştirme çalışmasında iki örnek konsantrasyonu ile başlanmasına karar verilmiştir. Numune kromatogramlarında ana pikler karşılaştırılmış ve pik yükseklikleri ve sistem uygunluk parametrelerine göre 1,0 mg/ml numune konsantrasyonu ile devam edilmesine karar verilmiştir. Numune kromatogramında konsantrasyon farklılıkları, ana pikler ve agregat pikleri incelenerek sonuçlar karşılaştırılmıştır. Numune hazırlığında ise çözücü olarak deiyonize su ve formülasyon tamponu kullanılarak denemeler gerçekleştirilmiştir.

Çözücü denemelerinde; referans ürün kendi formülasyon tamponu içerisinde saklandığı için ideal çözücü olarak formülasyon tamponu seçilmiştir. Aynı şekilde çözelti hazırlama işlemi gerektirmediği için deiyonize su da metot geliştirme çalışması için kullanılmıştır. Özellikle düşük konsantrasyonlardaki çözücü etkisini anlayabilmek adına iki çözücü kullanılarak gerçekleştirilen analiz sonuçları karşılaştırılmıştır. Sonuçlar iki çözücü için özellikle düşük konsantrasyonlarda (LLOQ) karşılaştırıldığında, formülasyon tamponunda daha iyi yanıt verdiği sonucuna varılmıştır.

Enjeksiyon hacmi denemeleri 5-10-20 µl olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. 1,0 mg/ml konsantrasyonda deiyonize su ve formülasyon tamponu ile hazırlanan çözeltiler üç farklı enjeksiyon hacminde analizlenmiştir. Hareketli faz ve formülasyon tamponu da SEC HPLC sistemine üç farklı enjeksiyon hacminde verilmiş ve tüm sonuçlar karşılaştırılmıştır. Kolon sayfası dokümanları ve USP <129> monografı incelendiğinde, 20 µl enjeksiyon hacminin kromatografik olarak daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır [43,45].

Boyut dışlama kromatografisi biyomoleküllerin boyutuna göre ayrılması için kullanılan bir analitik metot olup, yaygın olarak kullanılmaktadır. Zira referans ürünlere ait spesifikasyonlar incelendiğinde SEC HPLC analizinin spesifikasyonlarda yer alan bir analiz olduğu ve limitlendirilmesi gerekmektedir. Boyut dışlama kromatografisi ve diğer kromatografik analizlerde dikkat edilmesi gereken bazı önemli noktalar da yukarıdaki bilgiler baz alınarak aşağıdaki gibi özetlenebilir:

Moleküler Boyutlar: Kullanılan analitik kolonda, hedef moleküllerin boyutlarına uygun bir seçim yapılmalıdır. Moleküllerin boyut aralığını belirlemek için uygun bir kolonu seçmek, kromatografik analizin etkinliği açısından kritik öneme sahiptir.

Numune Hazırlığı: Numunelerin uygun bir şekilde hazırlanması, partiküllerin kolona zarar vermemesi açısından önemlidir. Bu yüzden de numunelerin uygun özellikte bir filtre seçilerek filtrelenmesi büyük önem teşkil etmektedir.

Çözücü Seçimi: Analizde kullanılan çözücünün pH'ı, tuz konsantrasyonu ve diğer özellikleri, biyomoleküllerin stabilitesi ve rezolüsyon parametresi üzerinde etkili bir rol oynamaktadır.

Akış Hızı: Rezolüsyon parametresi kalitesini etkileyebilir. Yüksek akış hızları, çözünme süresini kısaltabilirken, düşük akış hızları daha iyi bir rezolüsyon sağlayabilir. İdeal akış hızı, kolona ve hedef biyomoleküllere bağlı olarak metot geliştirme aşamasında çalışılmalıdır.

Kolonun dengelenmesi: Doğru tampon çözeltisi ve koşulların kullanılması gerekir. Gerekirse kolon kartlarındaki kolon saklama çözeltileri ve yıkama çözeltileri de dikkate alınarak uygun kromatografik şartlar sağlanmalıdır.

Sıcaklık Kontrolü: Kromatografi işlemi sırasında sıcaklık, özellikle biyomoleküller için önemli olabilir. Sıcaklık değişiklikleri, moleküllerin stabilitesini etkileyebilir.

Kolon Bakımı: Kolonun her analiz sonrası düzenli yıkama prosedürleri ve uygun saklama koşulları sağlanmalıdır. Kolon kartı dokümanları incelenmeli ve belirtilen şartlar kolon açılırken, analiz öncesi ve sonrasında sağlanmalıdır. Kolon performansının sürekliliği için kolon bakımı çok önemlidir.

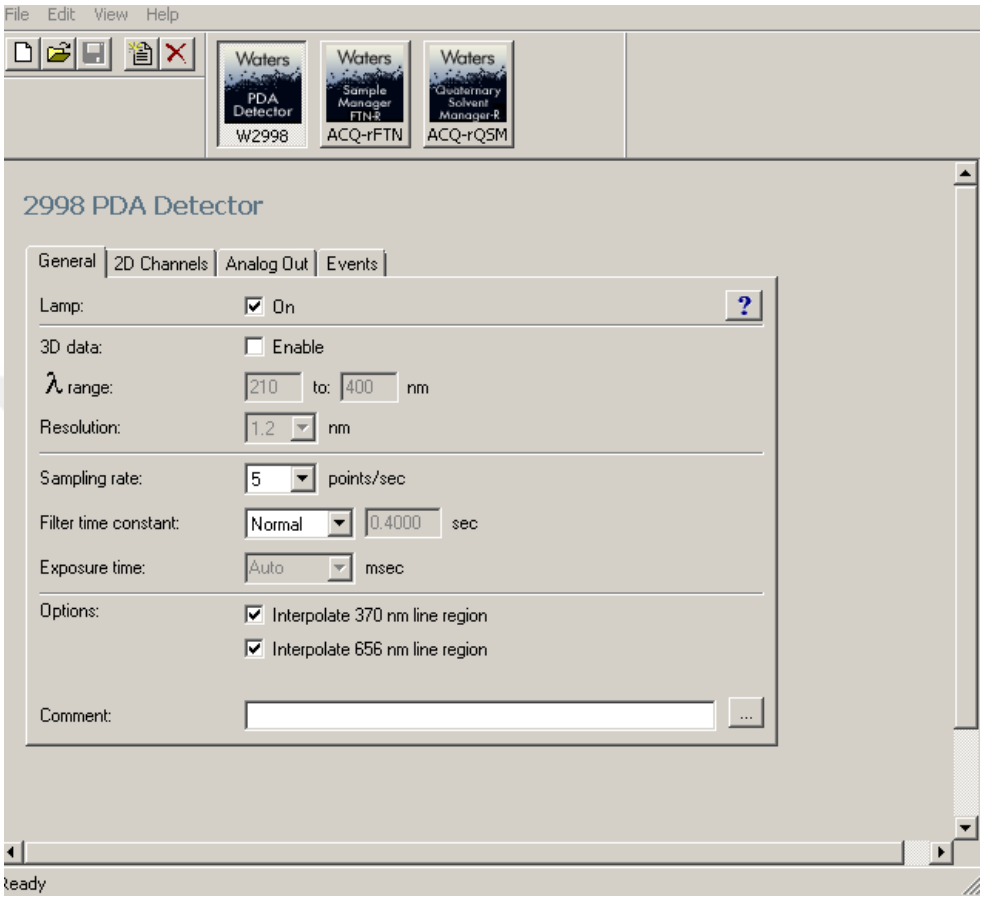
Geliştirilen nihai SEC HPLC kromatografik yöntemi, USP <129> monografına ve USP uygulama notuna göre akış hızı, enjeksiyon hacmi, kolon sıcaklığı ve otomatik numune alma sıcaklığı (autosampler) aynı olacak şekilde geliştirilmiştir. Karar verilen metot için sonuçlar simetri faktörü, sinyal/gürültü oranı, pik alanı, çözücü pik alanı ve pik şekli açısından değerlendirilmiştir [45,46].

SEC HPLC kolonu ve otomatik örnekleyici sıcaklıkları 25 °C ve 5 °C'ye ayarlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 20 µL olarak seçilmiştir. Kromatografik ayırma, ana pik için 16,1 dakikalık alıkonma süresiyle elde edilmiştir. Spesifiklik/seçicilik (20 dakika) ve sağlamlık (akış hızı değişimi) parametreleri dışındaki tüm biyoanalitik metot validasyon parametreleri için çalışma süresi 35 dakika olarak belirlenmiştir.

Biyoanalitik metot geliştirme çalışması, Waters®'ın HPLC ekipmanı, Empower® 3 adlı özel bir yazılıma sahip bir PDA dedektörü ve elde edilen sinyallerin ve elde edilen kromatogramların proses edildiği bir HPLC ekipmanı kullanılarak geliştirilmiştir ve analitik validasyonuna başlanmıştır.

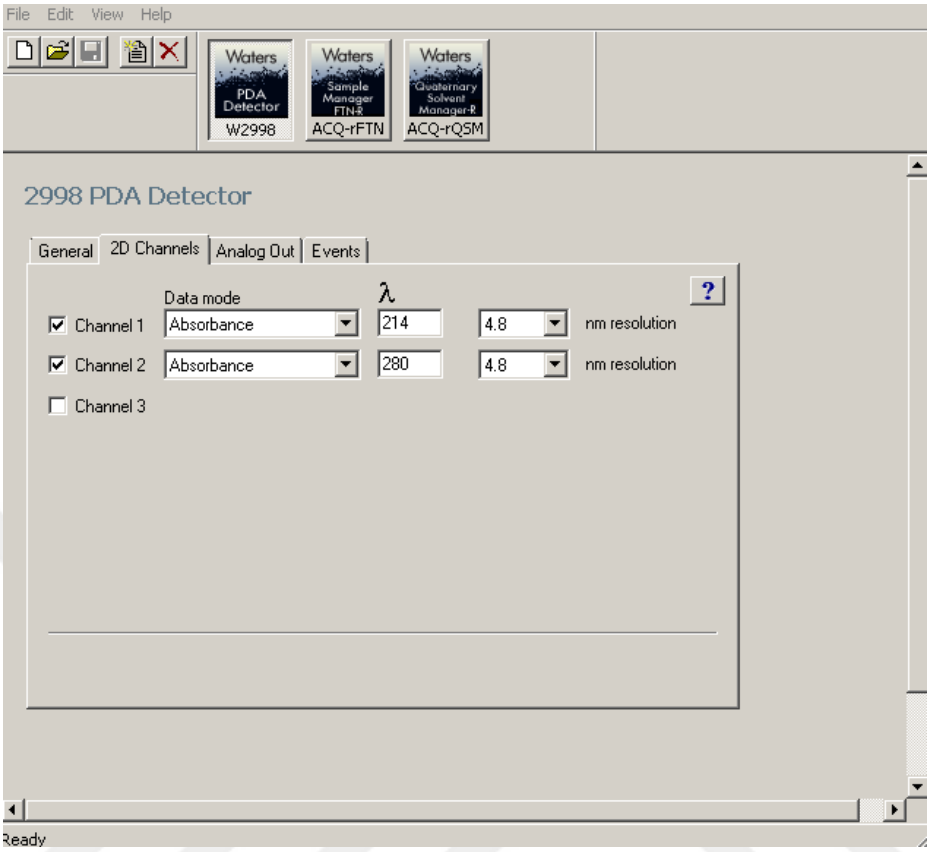
2.2 Boyut dışlama kromatografisi (SEC HPLC) Kromatografik Koşulları

Empower Yazılımına ait Metot Parametreleri- Dedektör:



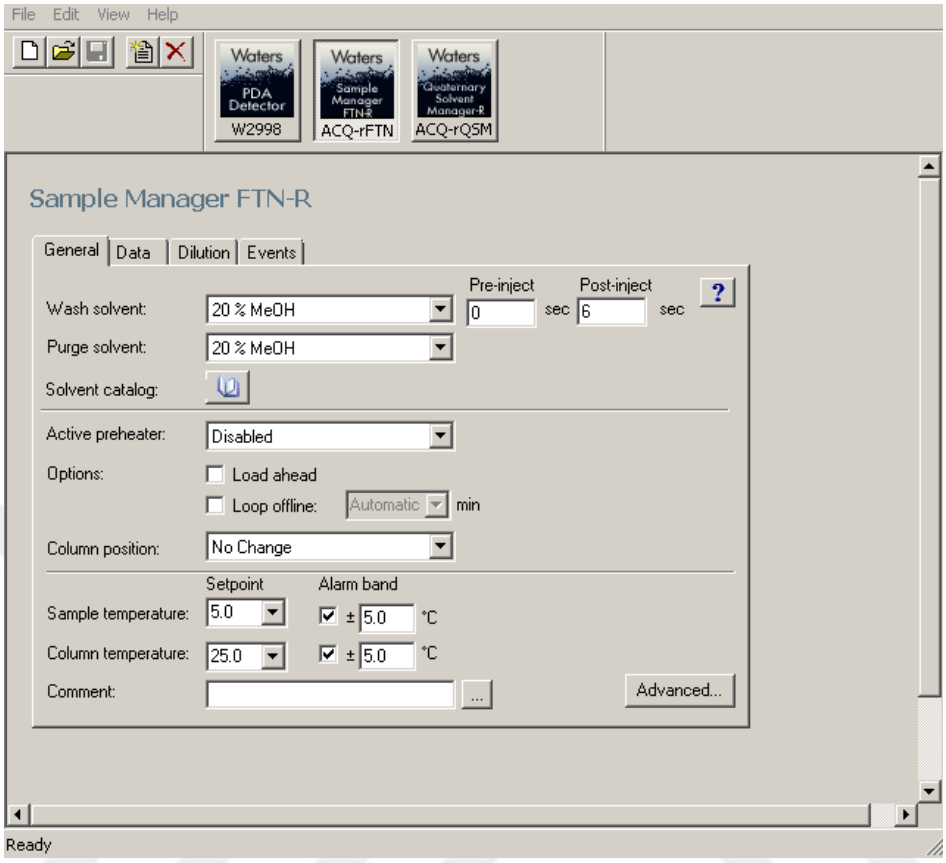
Şekil 2.1. 2998 PDA Dedektörü için Waters® Empower yazılımındaki yöntem sekmesinin ekran görüntüsü

Empower Yazılımına ait Metot Parametreleri- Dedektör Rezolüsyonu:



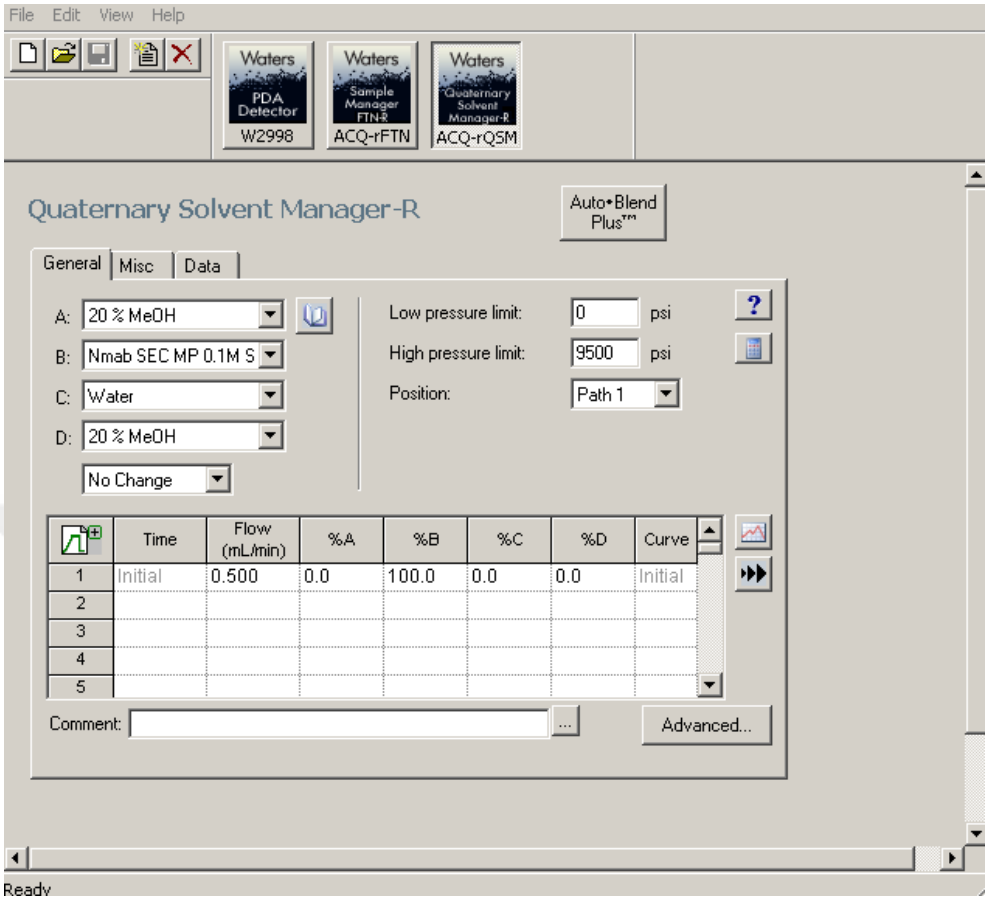
Şekil 2.2. 2998 PDA Dedektörü için Waters® Empower yazılımındaki yöntem sekmesinin ekran görüntüsü-rezolüsyon

Empower Yazılımına ait Metot Parametreleri- FTN-R:



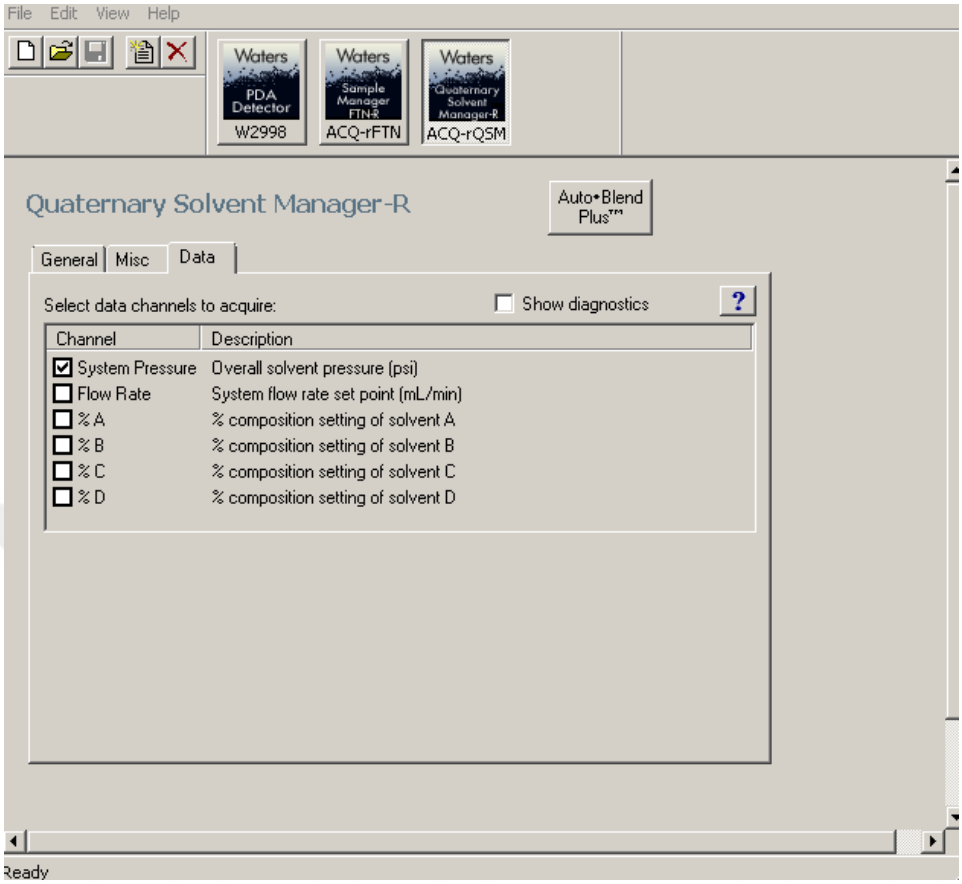
Şekil 2.3. 2998 PDA Dedektörü için Waters® Empower yazılımındaki yöntem sekmesinin ekran görüntüsü-FTN-R

Empower Yazılımına ait Metot Parametreleri- QSM-R:



Şekil 2.4. Quaternary Solvent Manager-R için Waters® Empower yazılımındaki yöntem sekmesinin ekran görüntüsü

Empower Yazılımına ait Metot Parametreleri- QSM- Sistem Basıncı:



Şekil 2.5. Quaternary Solvent Manager-R-Sistem Basıncı için Waters® Empower yazılımındaki yöntem sekmesinin ekran görüntüsü

Değerlendirme;

SEC HPLC analitik metot geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Metot geliştirme parametreleri iki farklı tampon (mobil faz), üç farklı akış hızı, iki farklı numune konsantrasyonu başlıkları altında incelenmiştir. Karar verilen metot çalışmalarında sonuçlar simetri faktörü, sinyal/gürültü oranı, pik alanı, çözücü pik alanı ve pik şekli açısından değerlendirilmiştir.

Karar verilen analitik metoda göre seçicilik, doğrusallık ve geri kazanım çalışmaları için analitik validasyon çalışmaları yapılarak metodun güvenilirliği kanıtlanmıştır. Karar verilen analitik metot SEC HPLC analizleri için uygundur.

2.3. Protein A Kromatografisi Analitik Metot Geliştirme çalışması

Literatür araştırması yapılmış ve laboratuvarımızda mevcut olan kolonlar üzerinden Protein A kromatografisi analitik metotları araştırılmıştır. Analitik metot geliştirme denemeleri için TOSOH® kolon kartı dokümanı uygulama notu referans doküman olarak kullanılmıştır [47].

Monoklonal antikor (mAb) gelişiminin birçok aşamasında hücre kültürü örneklerinin immünoglobülin G (IgG) konsantrasyonu (titer) açısından taranması gerekmektedir. TSKgel® Protein A-5PW, yüksek performanslı afinite kromatografisine yönelik 20 µm, 4,6 mm ID × 3,5 cm L'lik bir kolondur. PEEK (Polieter eter keton) donanımından yapılmış bu kolon, çeşitli antikorların hızlı ayrılması ve sağlam bir şekilde ölçülmesi için tasarlanmıştır. Monoklonal antikorlar, enjeksiyon başına 2 dakikadan daha kısa bir sürede yakalanabilir ve doğru bir şekilde ölçülebilmektedir [47].

Protein A Kromatografisi, antikorların hareketsizleştirilmiş bir Protein A ligandına spesifik ve geri dönüşümlü bağlanmasına dayanır. Protein A reçineleri biyoüretimde en sık kullanılan afinite reçineleridir. Hızlı ve kolay yöntem geliştirmenin yanı sıra yüksek sağlamlık ve seçicilik nedeniyle günümüzde rekombinant monoklonal antikorların yakalanmasında standart bir metottur. Kolona monoklonal antikorların bağlanması fizyolojik koşullar altında gerçekleşir. Doğru bir pH aralığında ve geniş bir iletkenlik aralığında kolona bağlanma gerçekleşmektedir. Bu nedenle hücre kültürü sıvısı doğrudan kolona uygulanabilir ve kolona yalnızca monoklonal antikor bağlanır [47].

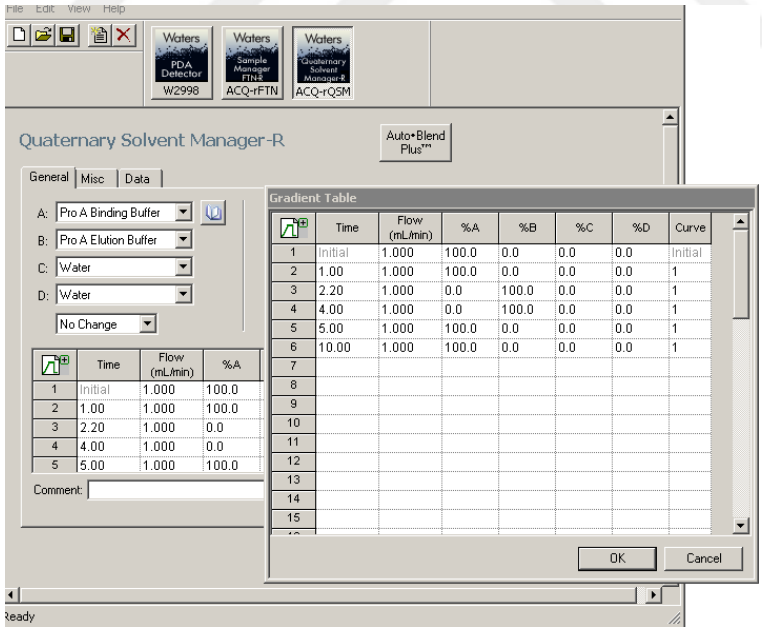
Protein A Kromatografisi analizleri için monoklonal antikor konsantrasyonu tayininde en uygun yöntemi bulmak amacıyla beş adet parametre denenmiştir. Bunlar sırasıyla; analiz süresi, mobil faz tuz konsantrasyonu, enjektör yıkama süresi, enjeksiyon hacmi ve çözücü etkisidir.

2.3.1 Analiz süresi

Metot geliştirme çalışmalarına başlanmadan önce ilk uygulanan metotta analiz süresi 6 dakika olarak belirlenmiştir. Metot geliştirme çalışmalarına başlanması ile çözücü Hareketli Faz A 'da analizin yaklaşık 5,9'uncu dakikasında gelen pik fark edilmiştir. Bunun üzerine analiz süresi için metot geliştirme çalışmalarına başlanmıştır.

En uygun analiz süresini belirlemek için kromatogramları incelendiğinde; 10, 11, 13 ve 16 dakikalık metotların gradient zaman bilgileri ile ana pikin yeniden dengeleme kısmının başladığı andan 1 dakika sonra geldiği anlaşılmıştır. 6 dakikalık metotta yeniden dengeleme kısmı 5. dakikada başlamaktadır ve ana pik 6. dakikada gelmektedir.

Yeniden dengeleme zamanında tespit edilen pikten sonra metot iyileştirmesi yapılarak Protein A kromatografisi analizinde farklı bir pik tespit edilmemiştir. Analiz süresinin kısa olması özellikle rutin konsantrasyon (titer) analizlerinde avantaj yarattığından dolayı 10 dakikalık metot süresinin Protein A kromatografisi için yeterli ve uygun olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 2.6. 10 dakikalık metoda ait gradient bilgileri

2.3.2. Hareketli Faz Tuz Konsantrasyonu

Kolon kartında da örnek olarak paylaşılan metot incelendiğinde farklı tuz konsantrasyonlarında denemeler yapıldığı görülmüştür. Metodun ilk mobil faz konsantrasyonu; 20 mM bağlanma tamponu & 20 mM elüsyon tamponu olarak çalışılmıştır. Ancak LLOQ seviyesini belirlemek üzere yapılan denemelerde pikin simetri faktörünün 2,0'dan büyük tespit edilmesinden dolayı daha yüksek tuz konsantrasyonları denenmesine karar verilmiştir. Zira; E.P. 2.2.46 monografına göre simetri faktörünün 0,8-1,5 arasında olması kromatografik analizler için ideal durumdur [48].

Ancak kolon kartları ve üreticilerin paylaştığı dokümanlar da göz önünde tutulduğunda en fazla 2,0 olarak simetri faktörü kabul kriteri olarak belirtilmektedir.

Bu durumdan dolayı da 40 mM-40 mM, 40-60 mM ve 60-60 mM olarak bağlanma ve elüsyon tamponları hazırlanarak kromatogramlardan elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Düşük konsantrasyon seviyelerine inildiğinde yaşanılan durum analitik metodun tuz konsantrasyonu arttırıldığında ana pike ait simetri faktörü değerinde iyileşme sağlamıştır. Bu yüzden de kademeli olarak hareketli faz tuz konsantrasyonu arttırılarak denemeler gerçekleştirilmiştir. İlk olarak 40-40 mM hareketli faz konsantrasyonu denemesi gerçekleştirilmiştir.

Hareketli faz tuz konsantrasyonu arttırılarak 40 mM-60 mM olarak denemeler de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatogramlara göre 40-40 mM tuz konsantrasyonuna göre sonuçlar analitik açıdan daha uygun bulunmuştur. Hareketli faz tuz konsantrasyonu arttırılarak son olarak 60 mM-60 mM olacak şekilde denemeler gerçekleştirilmiştir. LLOQ seviyesindeki kromatogramlar incelendiğinde simetri faktörü 2,0'dan daha düşük tespit edilmiştir. Elde edilen kromatogramlara göre diğer tuz konsantrasyonlarına göre sonuçlar analitik açıdan en uygun sonuçlar bu çalışmada bulunmuştur.

Son olarak; elüsyon tamponu olarak hazırlanan hareketli faz B hazırlığında pH değeri 2,5'e ayarlanırken çözeltiye orto-fosforik asit direkt konularak pH ayarlaması yapılmamalıdır. Zira asitler direkt olarak tampon çözeltilere eklendiğinde HPLC kromatogramında ya baseline etkilenir ya da gradient dönümünde response yüksekliğine sebep olabilir.

2.3.3. Enjektör Yıkama Süresi

Çözücü enjeksiyonunda dedekte edilen pik sebebi ile taşınma etkisi (carry-over) açısından analitik metot incelenmiştir. Taşınma etkisi özellikle metot validasyonu aşamasında sorun yaratabileceği için analitik anlamda bir çözüm olarak enjektör yıkama süresinin arttırılmasına yönelik denemeler yapılmıştır.

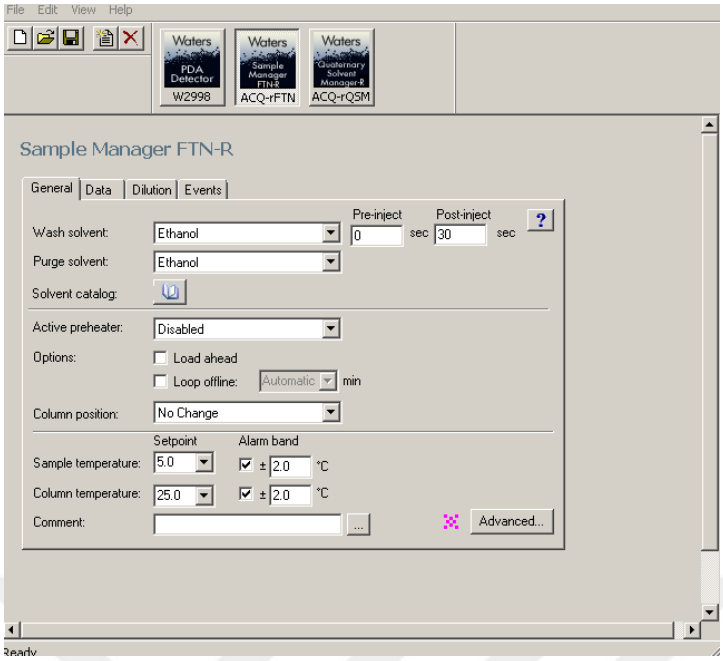
Metot geliştirme çalışmalarına başlanmadan önce kullanılan metotta enjektör yıkama süresi 6 saniyedir. Bunun üzerine 6 saniye olan enjektör yıkama süresinin yeterli olmadığı düşünülmüş enjektör yıkama süresi 12 saniye ve 30 saniye olarak denenmiştir. Çalışmalara ait sonuçlardan çözücü pik alanları karşılaştırılmıştır.

ICH M10 kılavuzuna göre; çözücü enjeksiyonunda tespit edilen pikin alanı LLOQ seviyesinin alanının % 20'sinden büyük olmamalıdır [42]. Ayrıca kalibrasyon standardının en üst konsantrasyon seviyesi ve çalışma konsantrasyonu için validasyonda taşınma etkisi sonuçları araştırılmalıdır. Bu çalışma ile birlikte LLOQ seviyesi alanları ile çözücü kromatogramlarından elde edilen pik alanları karşılaştırılmıştır.

12 saniyelik enjektör yıkaması denemesinde en üst kalibrasyon standardı olan 4,0 mg/ml konsantrasyonundaki referans ürün sonrası gelen çözücü pikinin alanı 2193 olarak tespit edilmiştir. Aynı denemede LLOQ seviyesinin alanı ise 8280 olarak tespit edilmiştir. 12 saniyelik enjektör yıkama denemesi sonucu elde edilen pik alanı, LLOQ seviyesinin % 20‘sinden yüksek olarak tespit edildiği için analitik açıdan uygun değildir.

30 saniye enjektör yıkama denemesinde ise en üst kalibrasyon standardı olan 4,0 mg/ml konsantrasyonundaki referans ürün sonrası gelen çözücü pikinin alanı 1329 olarak tespit edilmiştir. Aynı denemede LLOQ seviyelerinin alanlarının ortalaması ise 7057 olarak tespit edilmiştir. 30 saniyelik enjektör yıkama denemesi sonucu elde edilen çözücü pik alanı, LLOQ seviyesinin % 20‘sinden düşük olarak tespit edilmiştir.

Analitik metot için enjektör yıkama süresinin 30 saniye olmasına karar verilmiştir. Protein A kromatografisi analitik metot validasyonu çalışmasında detaylı olarak taşınma etkisi çalışması gerçekleştirilmiştir. Tüm sonuçlar tablo haline getirilerek sunulmuştur.



Şekil 2.7. 30 saniyelik enjektör yıkama süresi metoduna ait görsel

2.3.4. Enjeksiyon Hacmi

Analitik netot geliştirme çalışmalarına başlanmadan önce kullanılan ilk analitik metot denemelerinde enjeksiyon hacmi numune enjeksiyonu için 20 µl, çözücü enjeksiyonu için ise 10 µl olarak gerçekleştirilmiştir.

Analitik açıdan taşınma etkisini kontrol edebilmek amacı ile enjeksiyon hacimlerinin aynı olması gerekmektedir. Hem numune hem çözücü enjeksiyon hacimlerinin aynı olmasının uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sebep ile enjeksiyon hacmi hem 10 µl hem de 20 µl olacak şekilde doğrusallık çalışması tasarlanmıştır.

0,01 mg/ml ile 4,0 mg/ml arasında 10 µl enjeksiyon hacmi çalışmasında daha düşük çözücü pik alanı ve daha keskin pikler elde edilmesi üzerine 10 µl'lik enjeksiyon hacmi çalışmalarına devam edilmiştir. 0.0156 mg/ml ile 4,0 mg/ml arasında 10 µl numune enjeksiyonu hacmi – 10 µl çözücü enjeksiyonu hacmi denemesi yapılmıştır. Bu denemede LLOQ seviyesi 0,01 mg/ml'den 0.0156 mg/ml'ye çıkarılmıştır. 10 µl enjeksiyon hacmi denemelerinin doğrusallık tablosu oluşturulmuş ve ANOVA testine göre bu çalışma doğrusal olarak uygun bulunmamıştır.

Sonrasında, 20 µl numune enjeksiyonu hacmi – 20 µl çözücü enjeksiyonu hacmi denemeleri yapılmıştır. 0,01 mg/ml, 0,0156 mg/ml, 0,03 mg/ml, 0,06 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 2,0 mg/ml, 4,0 mg/ml konsantrasyon seviyeleri çalışılmıştır. Bu çalışmalarda 0,01 mg/ml konsantrasyon seviyesinde sinyal/gürültü (s/n) değerleri yüksek tespit edilmiştir.

Bu durum, analizde sayısal olarak dedekte edilebilen en düşük konsantrasyonun 0,01 mg/ml olmadığını göstermiştir. Bu nedenle LLOQ seviyesi 0,01 mg/ml'den 0,078 mg/ml'ye düşürülüp 20 µl numune enjeksiyon hacmi – 20 µl çözücü enjeksiyon hacmi olacak şekilde doğrusallık çalışması tasarlanmıştır. Regresyon (ANOVA) analizine göre bu çalışmanın doğrusal olduğu kanıtlanmıştır. Hem numune hem çözücü enjeksiyonu hacminin 20 µl olmasına karar verilmiştir.

2.3.5. Çözücü Etkisi

Protein A kromatografisi metodunun ilk halinde hareketli faz A çözücü olarak kullanılmıştır. Hareketli Faz A ile seyreltildiğinde çözücü pikinin alanı özellikle yüksek konsantrasyon seviyesinde referans ürün enjeksiyonundan sonra LLOQ seviyesinin %20'sinden daha yüksek tespit edilmiştir. Validasyon parametresi olan taşınma etkisini araştırabilmek için hem hareketli faz A hem de formülasyon tamponu kullanılmıştır. Referans ürünün kendi çözücüsü formülasyon tamponu olduğu için hareketli faz A ile çözücü piklerine ait alan, simetri faktörü ve sinyal/ gürültü oranı gibi analitik parametreler karşılaştırılmıştır.

LLOQ seviyesinde elde edilen pik alanların formülasyon tamponu ile hazırlandığında piklerin simetri faktörü 2,0'ın altında bulunmuştur. Hem de s/n sonuçları açısından değerlendirildiğinde enjeksiyonlar arasında % RSD sonucu da uygun bulunmuştur.

En yüksek kalibrasyon standardı olan 4,0 mg/ml doğrusallık seviyesinden sonra sistemde dedekte edilen formülasyon tamponu pik alanı LLOQ seviyesinin % 20'sinden daha düşük bulunmuştur. Sonuçlar ile metodun valide olmasına hazırlık yapılmış olup sonuçlar uygundur. Hareketli Faz A ile yapılan çalışmaların sonuçları incelendiğinde, LLOQ seviyesi pik alanlarının düşük olduğu ve çözücü enjeksiyonundan elde edilen pik alanlarının yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Hareketli faz A ile hazırlanan LLOQ (0.0078 mg/ml) kromatogram sonucunda pik alanı 6639, simetri faktörü 1,85 ve s/n 23,52 olarak bulunmuştur. Çözücü hareketli faz A'da tespit edilen pikin alanı 2518 olarak tespit edilmiştir. 6639'un % 20 'si olan 1328'den büyük olarak tespit edildiği için hareketli faz A'nın çözücü olarak kullanılması analizler için uygun değildir.

Formülasyon tamponu ile hazırlanan LLOQ (0.0078 mg/ml) kromatogramı sonucunda LLOQ seviyesi alanı 13283, simetri faktörü 1,61 ve s/n 33,89 olarak tespit edilmiştir. Formülasyon tamponundan tespit edilen pikin alanı 2527 olarak bulunmuştur. 13283 olarak tespit edilen LLOQ alanının %20 'si olan 2657'den küçük olarak tespit edildiği için formülasyon tamponunun çözücü olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

Nihai Protein A Kromatografi metodu, 280 nm'de PDA dedektör kullanılarak TSKgel Protein A-5PW kolonu ile gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz, 60 mM Sodyum Fosfat Tamponu (Bağlama Tamponu), Ph 7,4 (Hareketli Faz A), 60 mM Sodyum Fosfat Tamponu, (Elüsyon Tamponu) Ph 2,5 (Hareketli Faz B) içermektedir. Analiz 1,0 ml/dakikalık akış hızında gradient olarak gerçekleştirilmiştir.

Protein A Kromatografisi kolonu ve otomatik örnekleyici sıcaklıkları 25 °C ve 5 °C'ye ayarlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 20 µL olarak seçilmiştir. Kromatografik ayırma, ana pik için 3,1 dakikalık alıkonma süresiyle elde edilmiştir. Spesifiklik/seçicilik (20 dakika) ve sağlamlık (akış hızı değişimi) parametreleri dışındaki tüm biyoanalitik metot validasyon parametreleri için çalışma süresi 10 dakika olarak belirlenmiştir.

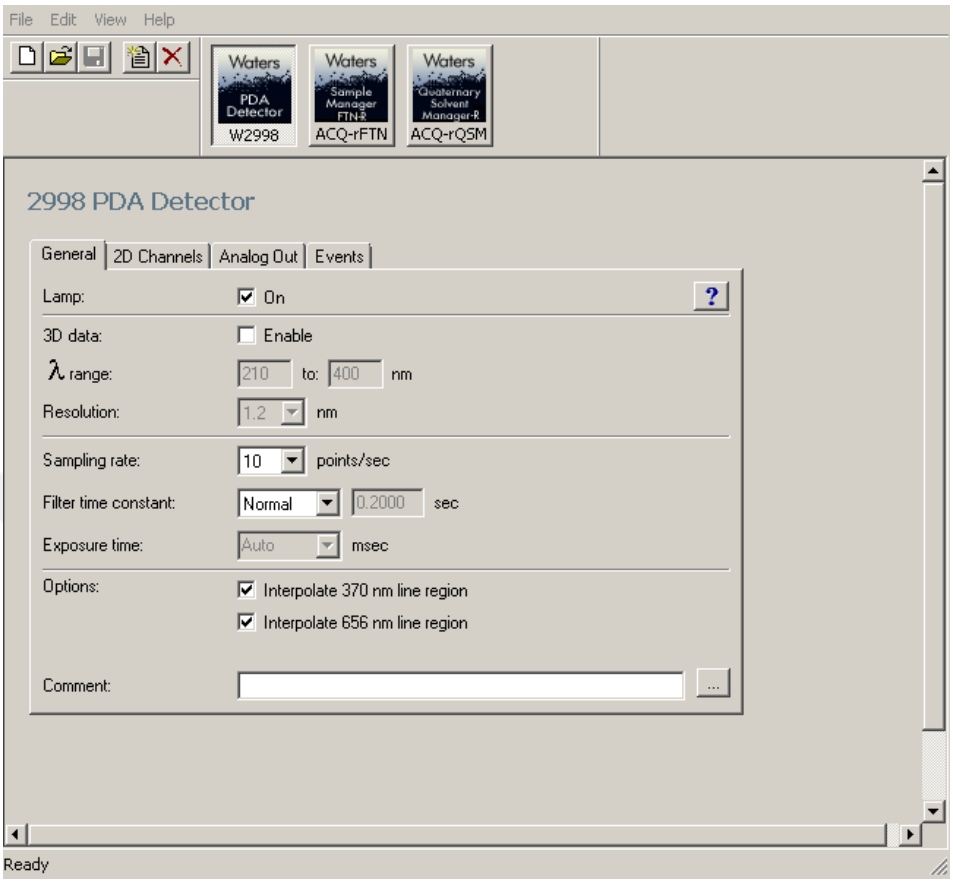
Biyoanalitik metot geliştirme çalışması, Waters®'ın HPLC ekipmanı, Empower® 3 adlı özel bir yazılıma sahip bir PDA dedektörü ve elde edilen sinyallerin ve elde edilen kromatogramların proses edildiği bir HPLC ekipmanı kullanılarak geliştirilmiştir ve protein A kromatografisi analitik validasyonuna başlanmıştır.

2.4. Protein A Kromatografisi için Kromatografik Şartları

Tablo 2.1. Gradient Tablosu.

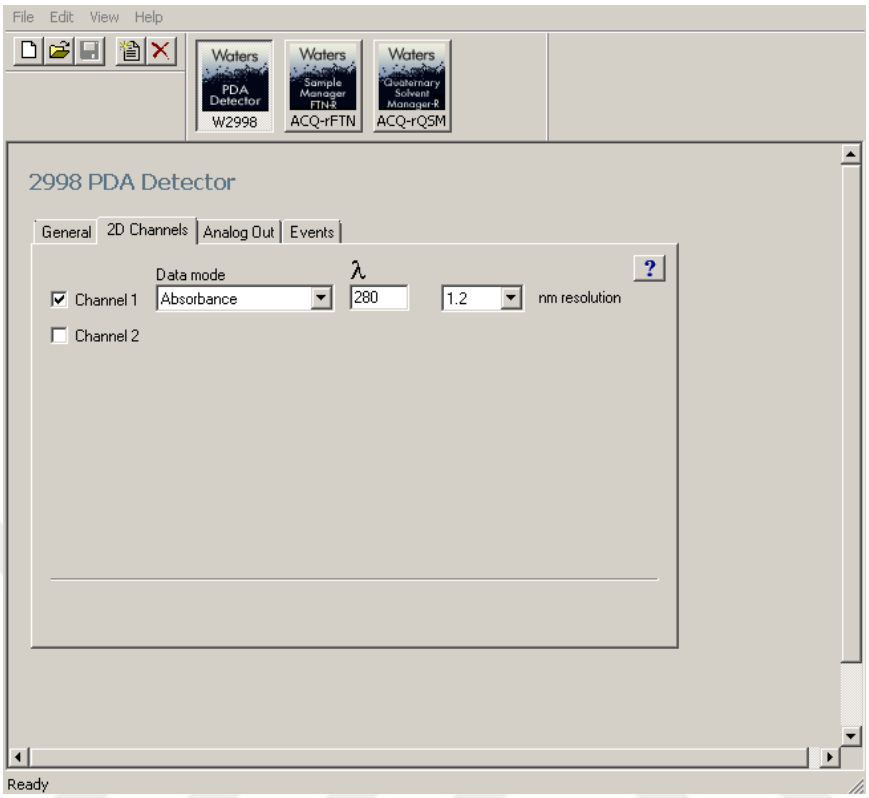
Zaman (dk)	Akış Hızı (ml/dk)	% Hareketli Faz A	% Hareketli Faz B
Başlangıç	1,0	100,0	0,0
1,00	1,0	100,0	0,0
2,20	1,0	0,0	100,0
4,00	1,0	0,0	100,0
5,00	1,0	100,0	0,0
10,00	1,0	100,0	0,0

Empower Yazılımı Metot Parametreleri- Dedektör:



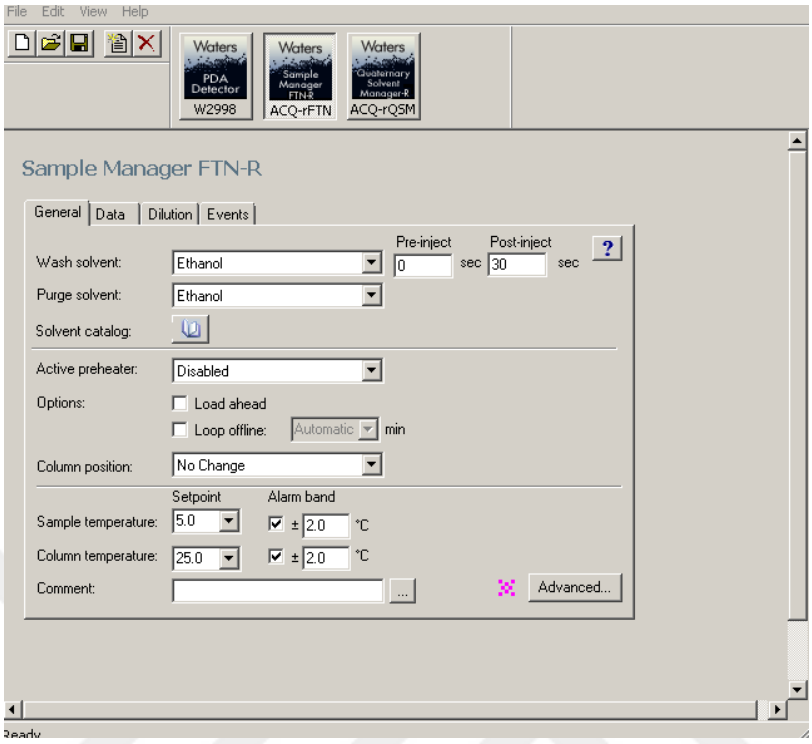
Şekil 2.8. 2998 PDA Dedektörü için Waters® Empower yazılımındaki yöntem sekmesinin ekran görüntüsü

Empower Yazılımı Metot Parametreleri- Dedektör-Rezolüsyon:



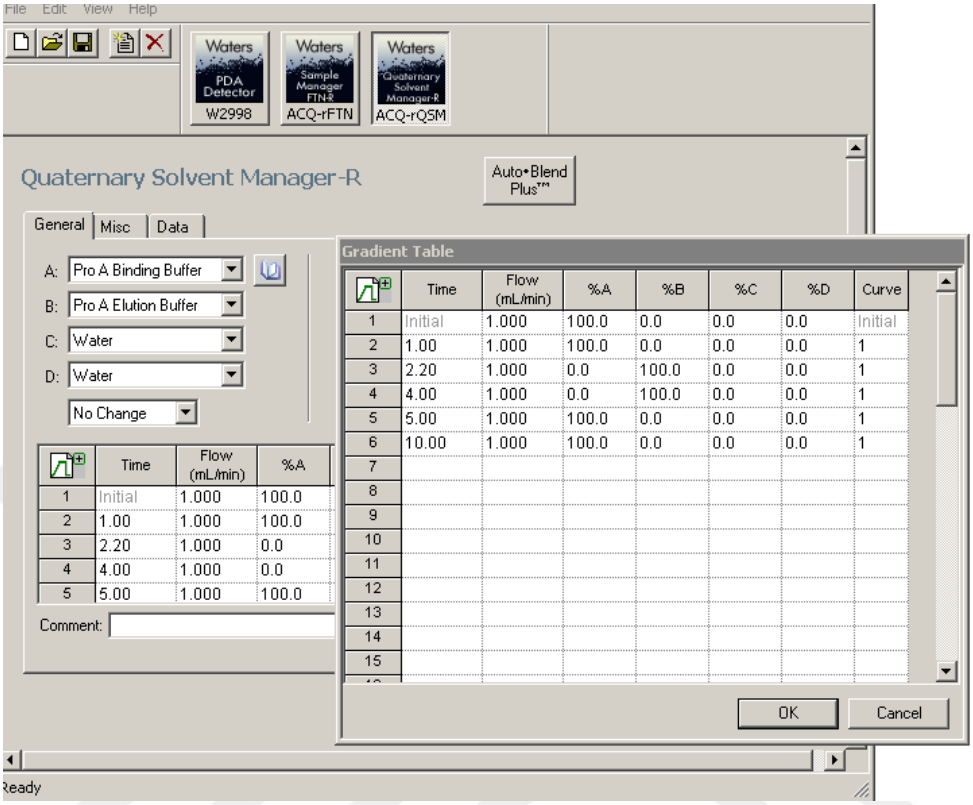
Şekil 2.9. 2998 PDA Dedektörü için Waters® Empower yazılımındaki yöntem sekmesinin ekran görüntüsü-rezolüsyon

Empower Yazılımı Metot Parametreleri- FTN-R:



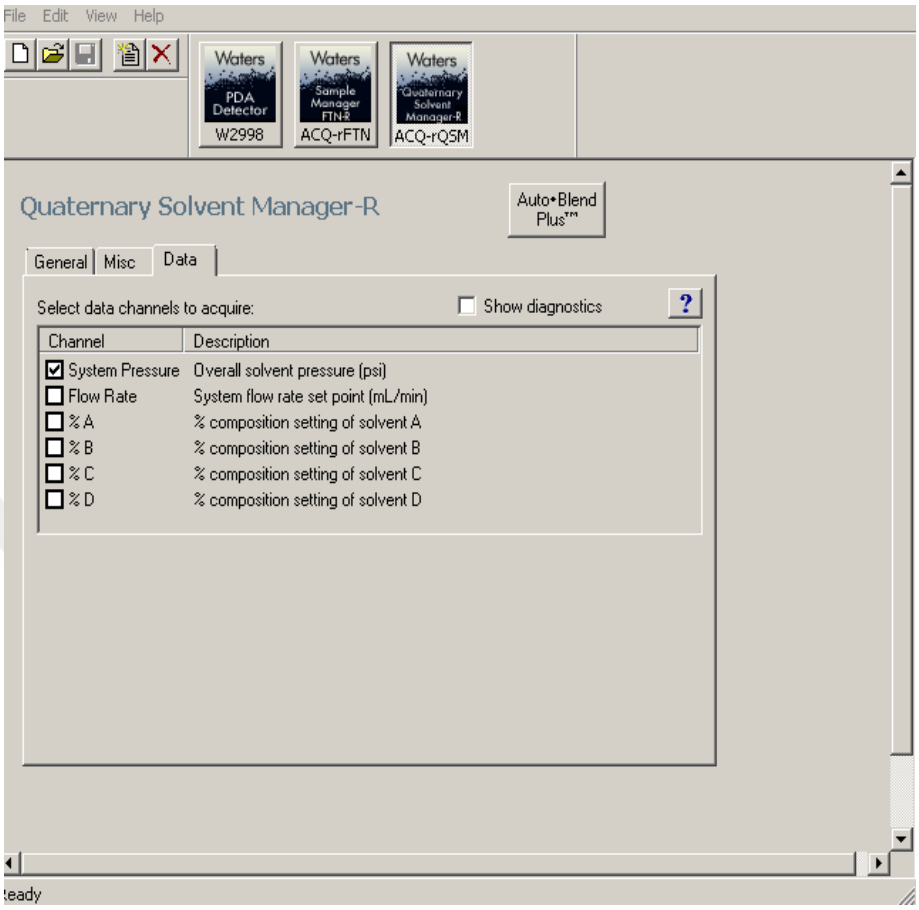
Şekil 2.10. 2998 PDA Dedektörü için Waters® Empower yazılımındaki yöntem sekmesinin ekran görüntüsü-FTN-R

Empower Yazılımı Metot Parametreleri- QSM:



Şekil 2.11. Quaternary Solvent Manager-R için Waters® Empower yazılımındaki yöntem sekmesinin ekran görüntüsü

Empower Yazılımı Metot Parametreleri- Sistem Basıncı:



Şekil 2.12. Quaternary Solvent Manager-R-Sistem Basıncı için Waters® Empower yazılımındaki yöntem sekmesinin ekran görüntüsü

Sistem Uygunluk Parametreleri:

Hem SEC HPLC hem de protein A kromatografisi için ortak sistem uygunluk parametreleri aşağıdaki gibidir;

- % 100 Standart çözelti'nin ardışık 6 enjeksiyonu ile sistem uygunluk kontrol edilir. Ana pik alanlarının % RSD'si % 2,0'ı geçmemelidir.
- % 100 Standart çözeltisinden elde edilen ana pik için teorik plaka sayısı minimum 2000 olmalıdır.
- % 100 Standart çözeltisinden elde edilen ana pik için kuyruklanma faktörü maksimum 2,0 olmalıdır.

Değerlendirme

Protein A kromatografisi HPLC metot geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Metot geliştirme parametreleri analiz süresi, mobil faz tuz konsantrasyonu, enjektör yıkama süresi, enjeksiyon hacmi ve çözücü etkisi başlıkları altında incelenmiştir. Karar verilen metot çalışmalarında sonuçlar simetri faktörü, sinyal/gürültü oranı, pik alanı, çözücü pik alanı ve pik şekli açısından değerlendirilmiştir.

SEC HPLC ve protein A kromatografisi için numunenin çalışma konsantrasyonu ortaktır. Ayrıca çözücü etkisi incelenmiş olup her iki analitik metot için formülasyon tamponu çözücü olarak seçilmiştir. Protein A kromatografisi için analitik metot geliştirilirken çözücü enjeksiyonunda ana pik alıkonma zamanında pik tespit edildiği için daha fazla deneme yapılarak analizler için ideal analitik metot geliştirilmiştir.

2.5. Materyaller

2.5.1. Metot Geliştirme ve Validasyon Analizlerinde Kullanılan kimyasallar

- D- Mannitol (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Dietilen Triamin Penta Asetik Asit (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Disodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat (Na_2HPO_4 x $2H_2O$), (Merck, Almanya)
- Disodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4), (Merck, Almanya)
- Etanol (Kromatografik Saflıkta), (Merck, Almanya)
- Metanol (Kromatografik Saflıkta), (Merck, Almanya)
- Orto-fosforik asit (H_3PO_4), (Merck, Almanya)
- Polisorbat 80 (Merck, Almanya)
- Sodyum Dihidrojen Fosfat Monohidrat, (NaH_2PO_4 x H_2O), (Merck, Almanya)
- Sodyum Hidroksit (NaOH), (Merch, Almanya)
- Sodyum Klorür (NaCl), (Merck, Almanya)
- Tri-Sodyum Sitrat Dihidrat (Merck, Almanya)

2.5.2. Metot Geliştirme ve Validasyon Analizlerinde Kullanılan ekipmanlar

2.5.2.1. Laboratuvar araçları ve cam materyaller

- Buzdolabı, (Arçelik, İstanbul, Türkiye)
- Hassas ölçüm otomatik pipet, (10–100 µL, 100-1000 µL), (Brand®, Almanya)
- Pipet uçları (1-200 µL) (WWR, MA, A.B.D)
- pH metre, (Mettler Toledo, İsviçre)
- Hassas terazi, (Shimadzu, Japonya)
- Ultrasonik ısıtmalı banyo (Su banyosu), (Lab Companion, UCP-10, Amerika)
- Ultra saf su sistemi, (Sartorius, Almanya)
- Buzdolabı, (Arçelik, Türkiye)
- Borosilikat cam malzeme Hareketli faz şişesi 2-5 litre, (ISOLAB, Almanya)
- Insert vial 2 mL, cam (Waters®, Milford, A.B.D.)
- Vial kapağı, (Waters®, Milford, A.B.D.)
- Manyetik balık ve olta (ISOLAB, Almanya)
- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı, (ISOLAB, Almanya)
- 0,22 µm hareketli faz süzme filtresi (Sartorius, Almanya)
- Hareketli faz süzme aparatı (ISOLAB, Almanya)
- Vorteks cihazı (Thermo Scientific, MA, A.B.D.)
- Spin Cihazı (Thermo Scientific, MA, A.B.D)

2.5.3. Referans Ürün numunesi

Çalışmada referans ürün stok çözeltisinin konsantrasyonu 10 mg/ml'dir. Bu çözelti formülasyon tamponu ile 1,0 mg/ml'ye seyreltilir.

2.5.4. Enstrümental Cihazlar

- Waters markalı, Alliance model PDA dedektörlü HPLC cihazı, (Waters®, Milford, A.B.D.).
- Waters ARC model PDA dedektörlü HPLC cihazı, (Waters®, Milford, A.B.D.).

2.5.5. HPLC kolonları

- TSKgel G3000SWXL; 5.0 µm, 7.8 x 300 mm ve Ön kolon olarak TSKgel SWXL Guard; 7.0 µm, 6.0 x 40 mm (TOSOH BIOSCIENCE® Massachusetts, A.B.D.).

  SEC HPLC analitik metodu için kullanılmıştır.

- TSKgel Protein A-5PW, 20 µm; 4.6 mm ID x 3.5 cm L, (TOSOH BIOSCIENCE®, Massachusetts, A.B.D.).

  Protein A kromatografisi analitik metodu için kullanılmıştır.

2.5.6. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

2.5.6.1. SEC HPLC Hareketli Faz Hazırlığı

4500 ml deiyonize su içeren 5000 ml'lik balon içerisine 35,21 g sodyum dihidrojen fosfat monohidrat, 43,6 g disodyum hidrojen fosfat dihidrat, 58,44 g sodyum klorür hassas bir şekilde tartılır ve karıştırılır, deiyonize su ile hacmine tamamlanır. Bu çözeltinin pH'ı sodyum hidroksit ya da hidroklorik asit ile 6,80'e ayarlanır. Süzme işlemi 0,22 µm sartorius markalı hareketli faz filtresi ile gerçekleştirilir.

HPLC analizlerinde hareketli faz hazırlanırken terazinin minimum ve maksimum değerleri dikkate alınarak tartım işlemi gerçekleştirilir. HPLC için hazırlanan tüm tampon çözeltiler de süzme aparatı ile süzülmelidir. Süzme işlemi 0,22 µm sartorius markalı hareketli faz filtresi ile gerçekleştirilir.

Filtreleme işlemi sonrası çözeltilerde bulunabilecek hava kabarcıkları ultrasonik banyoda degaze işlemi ile bertaraf edilmelidir. Degaze işlemi yapılmadığında HPLC cihazında oluşabilecek hava kabarcıkları cihazda sistemsel sorun yaratabilmektedir. Bu yüzden de cihaza takılacak her çözelti için süzme işlemi uygulanmalıdır.

HPLC Yıkama Çözeltisi Hazırlığı:

% 20 Metanol Çözeltisi: 800 ml ultra saf su içerisine 200 ml metanol eklenir bir şişede karıştırılır. Degaze edilir.

Formülasyon Tamponu, pH: 6.0

1950 ml deiyonize su içeren 2000 ml'lik balon içerisine 60 g D-mannitol, 16 mg dietilen triamin penta asetik asit, 11,76 g sodyum sitrat ve 5,84 g sodyum klorür hassas bir şekilde tartılır ve karıştırılır. Çözelti içerisine 374 µl polisorbat 80 eklenir ve iyice karıştırılır, hacmine deiyonize su ile tamamlanır. Bu çözeltinin pH'ı sodyum hidroksit ya da hidroklorik asit ile 6,0'a ayarlanır.

2.5.6.2. Protein A Kromatografisi Hareketli Faz Hazırlığı

Hareketli Faz A Hazırlığı; Sodyum Fosfat Tamponu, pH: 7,4;

3500 ml deiyonize su içeren 5000 ml'lik balon içerisine 25,6 g disodyum hidrojen fosfat, 8,26 g sodyum dihidrojen fosfat monohidrat hassas bir şekilde tartılır ve karıştırılır, deiyonize su ile 4000 ml'ye tamamlanır. Bu çözeltinin pH'ı sodyum hidroksit ya da hidroklorik asit ile 7,4'e ayarlanır. Süzme işlemi 0,22 µm sartorius markalı hareketli faz filtresi ile gerçekleştirilir.

Hareketli Faz B Hazırlığı; pH: 2,5;

1500 ml deiyonize su içeren 2000 ml'lik balon içerisine 16,56 g sodyum dihidrojen fosfat monohidrat hassas bir şekilde tartılır ve karıştırılır. Bu çözeltinin pH'ı 0,1 M orto-fosforik asit çözeltisi ile pH ayarlanır ve hacmine tamamlanır. Süzme işlemi 0,22 µm sartorius markalı hareketli faz filtresi ile gerçekleştirilir.

0,1 M Orto-Fosforik Asit Çözeltisi;

2,8 ml Orto-fosforik asit 400 ml'ye deiyonize su ile seyreltilir.

Filtreleme işlemi sonrası çözeltilerde bulunabilecek hava kabarcıkları ultrasonik banyoda degaze işlemi ile bertaraf edilmelidir. Degaze işlemi yapılmadığında HPLC cihazında oluşabilecek hava kabarcıkları cihazda sistemsel sorun yaratabilmektedir. Bu yüzden de cihaza takılacak her çözelti için süzme işlemi uygulanmalıdır.

Çözücü (Blank): Formülasyon Tamponu, pH: 6,0

SEC HPLC metodu ile ortaktır.

Çalışma konsantrasyonu referans ürün numune çözeltisi hazırlığı;

Referans ürün stok çözeltisinin konsantrasyonu 10 mg/ml'dir. Bu çözelti formülasyon tamponu ile 1,0 mg/ml'ye seyreltilir. Böylece hem SEC HPLC hem de Protein A kromatografisi analizi için ortak numune hazırlanabilir.

ortak numune hazırlanabilir.

3. ANALİTİK METOT VALİDASYON ÇALIŞMASI

Validasyon analizi iki farklı analitik metot için birlikte değerlendirilmiştir. ICH M10 ve ICH Q2 R2 kılavuzları esas alınarak geliştirilmiş olan iki biyoanalitik metodun validasyon parametreleri tasarlanmıştır. İki biyoanalitik metot için numune hazırlığı, çalışma konsantrasyonu (1,0 mg/ml) ve kromatografik analizde kullanılan çözücü (formülasyon tamponu) ortaktır. Rutin analizler sonrası sonuçlar karşılaştırılırken konsantrasyon (titer) sonuçları iki metot için birbiri ile uyumlu olmalıdır. Validasyon analizi iki farklı analitik metot için birlikte değerlendirilmiştir ve sonuçlar validasyon parametreleri için aşağıdaki tablolar, şekiller ve örnek kromatogramlar ile değerlendirilmiştir. Tüm sonuçlar için uygunluk ICH M10 ve ICH Q2 R2 kılavuzları esas alınarak değerlendirilmiştir [42,16].

3.1. SEÇİCİLİK/SPESİFİKLİK

3.1.1. TAŞINMA ETKİSİ

Bir analitik çalışmada bir örnekten bir sonraki örneğe analit veya matris bileşenlerinin taşınmasını ifade eder. Taşınma etkisi, analitik sonuçların doğruluğunu ve güvenilirliğini etkileyebilir, bu yüzden dikkatle değerlendirilmesi ve minimize edilmesi gerekmektedir. Her iki metot için de taşınma etkisi parametresi incelenmiştir.

Beş adet referans numune çözeltisi hazırlanmıştır. Her numune çözeltisi enjeksiyonundan sonra bir formülasyon tamponu çözeltisi (çözücü) sisteme enjekte edilmiştir. Çözücüde tespit edilen monoklonal antikora ait ana pik alanları incelenmiştir.

Referans ürün numune stok çözeltisinin konsantrasyonu 10 mg/ml'dir. Bu çözelti formülasyon tamponu ile SEC HPLC kromatografisi için 1,0 ve 2,0 mg/ml'ye ve protein A kromatografisi için 1,0 ve 4,0 mg/ml'ye seyreltilmiştir. SEC HPLC analizinde sisteme verilen çözücülerden herhangi bir pik dedekte edilmediği için herhangi bir taşınma olmamıştır.

Tablo 3.1. Taşınma Etkisi Testi Sonuç Tablosu**.**

Pik Adı	**Alan**	**Pik Adı**	**Alan**
Formülasyon Tamponu	**1363**	Formülasyon Tamponu	**1166**
1 mg/ml Standart Çözeltisi-1	2052427	4 mg/ml Standart Çözeltisi-1	7627365
Formülasyon Tamponu	1888	Formülasyon Tamponu	2867
1 mg/ml Standart Çözeltisi-2	2056493	4 mg/ml Standart Çözeltisi-2	7626967
Formülasyon Tamponu	1567	Formülasyon Tamponu	2401
1 mg/ml Standart Çözeltisi-3	2054030	4 mg/ml Standart Çözeltisi-3	7623487
Formülasyon Tamponu	1683	Formülasyon Tamponu	2299
1 mg/ml Standart Çözeltisi-4	2054519	4 mg/ml Standart Çözeltisi-4	7635175
Formülasyon Tamponu	2211	Formülasyon Tamponu	1955
1 mg/ml Standart Çözeltisi-5	2049919	4 mg/ml Standart Çözeltisi-5	7618362
Formülasyon Tamponu	1918	Formülasyon Tamponu	2089
1 mg/ml Standart Çözeltisi-6	2061478	4 mg/ml Standart Çözeltisi-6	7632004
Formülasyon Tamponu	**1766**	Formülasyon Tamponu	**2188**

Protein A kromatografisi için limit içerisinde tespit edilen taşınma gerçekleşmiştir. Tüm çalışma ICH M10 kılavuzu doğrultusunda gerçekleştirilmiş olup ayrıntılı sonuçlar aşağıdaki tabloda belirtilmiştir [42]. Çalışma konsantrasyonundaki pik alanlarının ortalama sistem uygunluk sonuçları; Teorik plaka sayısı 23350 ve simetri faktörü 1,5 olarak tespit edilmiştir.

3.1.2. PİK TANIMLAMASI VE ÇÖZÜCÜ ETKİSİ

Deiyonize su, hareketli faz, formülasyon tamponu, referans numune çözeltisi analiz edilerek tespit edilen pikler proses edilmiştir. Tüm pikler birbirinden ayrılmıştır. Analizler PDA dedektör ile tarama yapılarak (190 nm - 400 nm arasında) gerçekleştirilmiştir. Pik saflığı eşik değeri ve pik saflığı açısı açısından tüm datalar değerlendirilmiştir. Empower yazılımı ile proses edilen dataların pik saflığı eşik değeri > pik saflığı açısı (*Peak purity threshold > Peak purity angle)* olacak şekilde uygunluğu incelenmiştir.

SEC HPLC analizinde sisteme enjeksiyonu yapılan deiyonize su, formülasyon tamponu, hareketli faz çözeltilerinden herhangi bir pik dedekte edilmemiştir. Bu yüzden de referans ürün çözeltisinin çalışma konsantrasyonundan elde edilen pike ait pik saflığı açısı (purity angle) değeri 0,151 olarak tespit edilmiştir. Pik saflığı eşik değeri (purity threshold) değeri ise 0,210 olarak tespit edilmiştir.

Bu sonuçlara göre; pik saflığı açısı değeri, eşik değerinden daha düşük olduğu için kabul kriterine uygunluk sağlamaktadır. Ayrıca teorik plaka sayısı değeri 6767, simetri faktörü ise 1,2 olarak tespit edilmiştir. SEC HPLC metodu seçiciliği olan bir metot olarak ispatlanmıştır.

Tablo 3.2. SEC HPLC Spesifiklik Testi Sonuç Tablosu

Pik Adı		**RT**	**RRT**	**Pik Saflığı Açısı**	**Pik Saflığı Eşik değeri**
Deiyonize Su		Herhangi bir pik tespit edilememiştir.			
Formülasyon Tamponu		24,23	1,45	Uygulanması yoktur.	
Hareketli Faz		Herhangi bir pik tespit edilememiştir.			
Referans Numune Çözeltisi (1,0 mg/ml)	Ana Pik	16,68	1,00	0,151	0,210

3.1.3. SEÇİCİLİK SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu sonuçlara göre; Ana pikin alıkonma zamanında deiyonize su, hareketli faz ve formülasyon tampon çözeltisinden gelen herhangi bir pik tespit edilmemiştir.

Protein A kromatografisi analizinde; sisteme enjeksiyonu yapılan deiyonize su, formülasyon tamponu, hareketli faz çözeltilerinden pik dedekte edilmiştir. Bu yüzden çalışma konsantrasyonunda hazırlanan referans ürün çözeltisinden elde edilen kromatogramlar ile çalıştırılmıştır.

Tablo 3.3. Protein A Kromatografisi Spesifiklik Testi Sonuç Tablosu.

Pik Adı	RT	Pik Saflığı Açısı	Pik Saflığı Eşik değeri
Formülasyon Tamponu	3,055	5,7	90,0
Hareketli Faz A	3,058	3,8	7,2
Hareketli Faz B	3,051	3,2	27,8
Referans Numune Çözeltisi (1,0 mg/ml)	3,033	3,5	6,2

Elde edilen piklere ait kromatogramlarda pik saflığı açısı (purity angle) ve pik saflığı eşik değeri (purity threshold) değerleri tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre pik saflığı açısı değeri, Pik saflığı eşik değerinden daha düşük olduğu için kabul kriterine uygunluk sağlamaktadır. Ayrıca teorik plaka sayısı değeri ve simetri faktörü her kromatogramda uygun tespit edilmiştir. Protein A kromatografisi metodu seçiciliği olan bir metottur.

3.2. DOĞRUSALLIK

Analitik metodun doğrusallık parametresi; belirlenen uygulama aralığındaki referans numune çözeltisinin derişimi/ konsantrasyonu ile seri seyreltme yapılarak tespit edilir.

SEC HPLC ve Protein A kromatografisi için iki ayrı konsantrasyon seviyesi belirlenmiştir. ICH M10 kılavuzu ICH Q2 R2 kılavuzuna göre daha fazla seviye ve üç güne ait doğrusallık çalışması talep edilmektedir. Kılavuza göre de iki analitik metot için doğrusallık parametresine ait çalışma tasarımı yapılmıştır. En önemlisi de metot geliştirme aşamasında da belirtildiği üzere düşük ve yüksek konsantrasyonlarda çeşitli doğrusallık denemeleri yapılarak metotlar analitik metot validasyonuna hazır hale getirilmiştir.

Doğrusallık (Lineerlik) çalışması stok standart çözeltisinden seri seyreltme işlemi ile çalışılmıştır. Maksimum izin verilebilir limitlerin içinde minimum altı (6) çalışma konsantrasyonu hazırlanmıştır. ICH M10 kılavuzuna göre LLOQ ve ULOQ seviyelerini içerecek şekilde seviyeler belirlenmiştir.

SEC HPLC kromatografisi için; % 200, % 100, % 50, % 25, % 5, % 2,5, % 2,0 ve % 1,0 seviyelerinde seri seyreltme yöntemi ile numuneler ependorf tüplerine hazırlanmıştır. Hazırlanan her seviye için ayrı vial hazırlanıp HPLC sisteminde altı ardışık enjeksiyon yapılmıştır. Sonuçlar arasındaki rölatif standart sapma (RSD) ve standart sapma (SD) hesaplanarak kaydedilmiştir. Çalışma üç ayrı çalışma olarak ICH M10 kılavuzuna uygun olarak tasarlanmıştır. Ayrıntılı olarak SEC HPLC analizinin doğrusallık çözeltilerinin hazırlanışı aşağıdaki gibidir;

% 200 Doğrusallık Stok Standart Çözeltisi

10,0 mg/ml konsantrasyona sahip stok standart çözeltisinden 72 µl, formülasyon tampon çözeltisinden 288 µl ependorf tüpüne alınır. Önce spin yapılır, sonrasında vortekslenir. Insert vialin içerisine 180 µl alınarak, viallenir. (C_{mAb} = 2,0 mg/ml)

% 100 Doğrusallık Stok Standart Çözeltisi

2,0 mg/ml konsantrasyona sahip % 200 Doğrusallık Stok Standart çözeltisinden 180 µl, formülasyon tampon çözeltisinden 180 µl ependorf tüpüne alınır. Önce spin yapılır, sonrasında vortekslenir. Insert vialin içerisine 180 µl alınarak, viallenir. (C_{mAb} = 1,0 mg/ml)

% 50 Doğrusallık Stok Standart Çözeltisi

1,0 mg/ml konsantrasyona sahip % 100 Doğrusallık Stok Standart çözeltisinden 180 µl, formülasyon tampon çözeltisinden 180 µl ependorf tüpüne alınır. Önce spin yapılır, sonrasında vortekslenir. Insert vialin içerisine 180 µl alınarak, viallenir. (C_{Aab} = 0,5 mg/ml)

% 25 Doğrusallık Stok Standart Çözeltisi

0,5 mg/ml konsantrasyona sahip % 50 Doğrusallık Stok Standart çözeltisinden 180 µl, formülasyon tampon çözeltisinden 180 µl ependorf tüpüne alınır. Önce spin yapılır, sonrasında vortekslenir. Insert vialin içerisine 180 µl alınarak, viallenir. (C_{mAb} = 0,25 mg/ml)

% 5 Doğrusallık Stok Standart Çözeltisi

1,0 mg/ml konsantrasyona sahip % 100 Doğrusallık Stok Standart çözeltisinden 18 µl, formülasyon tampon çözeltisinden 342 µl ependorf tüpüne alınır. Önce spin yapılır, sonrasında vortekslenir. Insert vialin içerisine 180 µl alınarak, viallenir. (C_{mAb} = 0,05 mg/ml)

% 2,5 Doğrusallık Stok Standart Çözeltisi

0,05 mg/ml konsantrasyona sahip % 5 Doğrusallık Stok Standart çözeltisinden 180 µl, formülasyon tampon çözeltisinden 180 µl ependorf tüpüne alınır. Önce spin yapılır, sonrasında vortekslenir. Insert vialin içerisine 180 µl alınarak, viallenir. (C_{mAb} = 0,025 mg/ml)

% 2,0 Doğrusallık Stok Standart Çözeltisi

1,0 mg/ml konsantrasyona sahip % 100 Doğrusallık Stok Standart çözeltisinden 7,2 µl, formülasyon tampon çözeltisinden 352,8 µl ependorf tüpüne alınır. Önce spin yapılır, sonrasında vortekslenir. Insert vialin içerisine 180 µl alınarak, viallenir. (C_{mAb} = 0,02 mg/ml)

% 1,0 Doğrusallık Stok Standart Çözeltisi

0,02 mg/ml konsantrasyona sahip % 2,0 Doğrusallık Stok Standart çözeltisinden 180 µl, formülasyon tampon çözeltisinden 180 µl ependorf tüpüne alınır. Önce spin yapılır, sonrasında vortekslenir. Insert vialin içerisine 180 µl alınarak, viallenir. (C_{mAb} = 0,01 mg/ml)

Doğrusallık Parametresi Kabul Kriterleri;

- Korelasyon katsayısı (R^2) 0,99'dan az olmamalıdır.
- Eğim: Raporlandırılır.
- Karelerin farkları toplamı (RSS) raporlandırılır.
- LLOQ seviyesi için % RSD, % 20,0'den fazla olmamalıdır.
- Diğer seviyeler için % RSD % 15,0'ten fazla olmamalıdır.
- Ana pike ait simetri faktörü 2.0'den büyük olmamalıdır.
- Ana pike ait teorik plaka sayısı değeri 2000'den büyük olmalıdır.

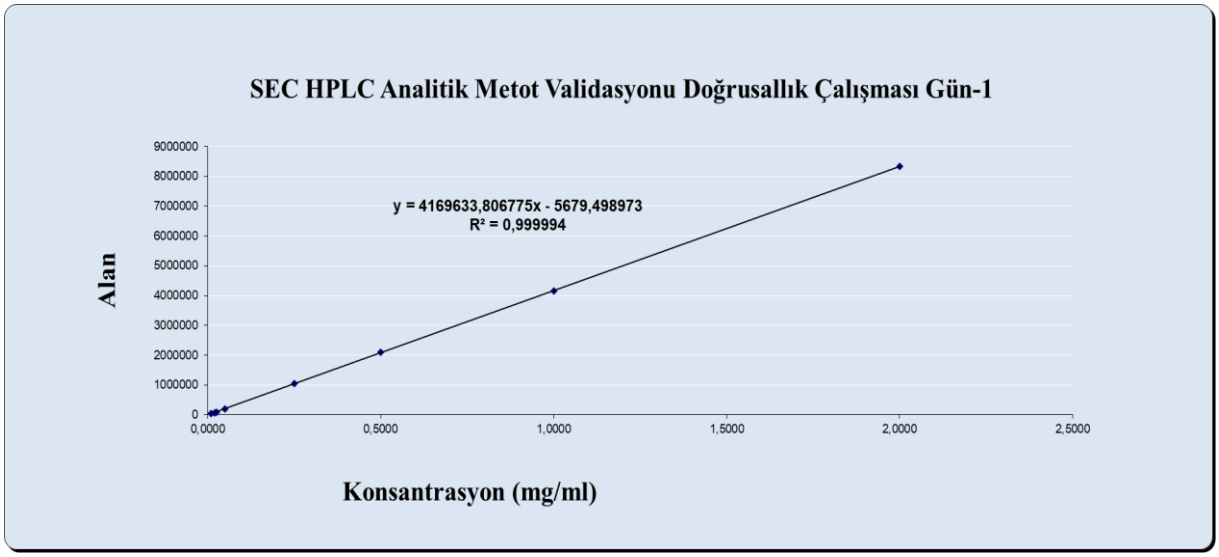
SEC HPLC için çalışma derişiminin % 1,0 ve % 200 seviyesi uygulama aralığında olacak şekilde sekiz ayrı derişimde referans numune çözeltisi hazırlanmış ve dedektör yanıtına göre derişim/alan grafikleri çizilmiştir ve aşağıda üç güne ait sonuçları yer almaktadır. Doğrusallık analizine ait tüm tablolar ve ANOVA regresyon analizine ait şekiller aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir;

Tablo 3.4. SEC HPLC Doğrusallık Gün-1 Sonuçları.

Referans numune Derişim Seviyesi (%)	**Derişim (mg/ml) (x)**	**Ortalama Alan (y)**	**Hesaplanan Alan (y_{cal})**	**Fark ($y-y_{cal}$)**	**Farkların Karesi $(y-y_{cal})^2$**
200	2,0	8332099	8333588	1489	2216965,87867
100	1,0	4159340	4163954	4615	21296451,04811
50	0,5	2092171	2079137	-13034	169874613,88739
25	0,25	1043536	1036729	-6807	46340430,80443
5,0	0,05	192152	202802	10650	113423026,09217
2,5	0,025	95471	98561	3091	9551269,75697
2,0	0,020	76092	77713	1621	2627134,71873
1,0	0,010	37641	36017	-1624	2637898,64595
				RSS	367967791

Tablo 3.5. SEC HPLC Doğrusallık Gün-1 Regresyon Analizi Sonuçları.

ÖZET ÇIKIŞI						
Regresyon İstatistikleri						
Çoklu R	0,99999694					
R Kare	**0,99999388**					
Ayarlı R Kare	0,99999286					
Standart Hata	**7831,217347**					
Gözlem	**8**					
ANOVA						
	df	*SS*	*MS*	*F*	*Anlamlılık F*	
Regresyon	1	6,01289E+13	6,01289E+13	980448,2215	7,16181E-17	
Fark	6	367967790,8	61327965,14			
Toplam	7	6,01293E+13				
	Katsayılar	***Standart Hata***	***t Stat***	***P-değeri***	***Düşük %95***	***Yüksek %95***
Kesişim	**-5679,498973**	3432,718434	-1,654519321	0,149104699	**-14079,05839**	**2720,060446**
X Değişkeni 1	**4169633,807**	4211,003319	990,1758538	7,16181E-17	4159329,853	4179937,761
FARK ÇIKIŞI						
Gözlem	***Öngörülen Y***	***Farklar***	***Standart Farklar***			
1	8333588,115	-1488,94791	-0,205363672			
2	4163954,308	-4614,807802	-0,636499014			
3	2079137,404	13033,59559	1,797663326			
4	1036728,953	6807,380613	0,938910402			
5	202802,1914	-10650,0247	-1,468908461			
6	98561,3462	-3090,512863	-0,426260091			
7	77713,17716	-1620,843829	-0,223555464			
8	36016,83909	1624,160905	0,224012973			



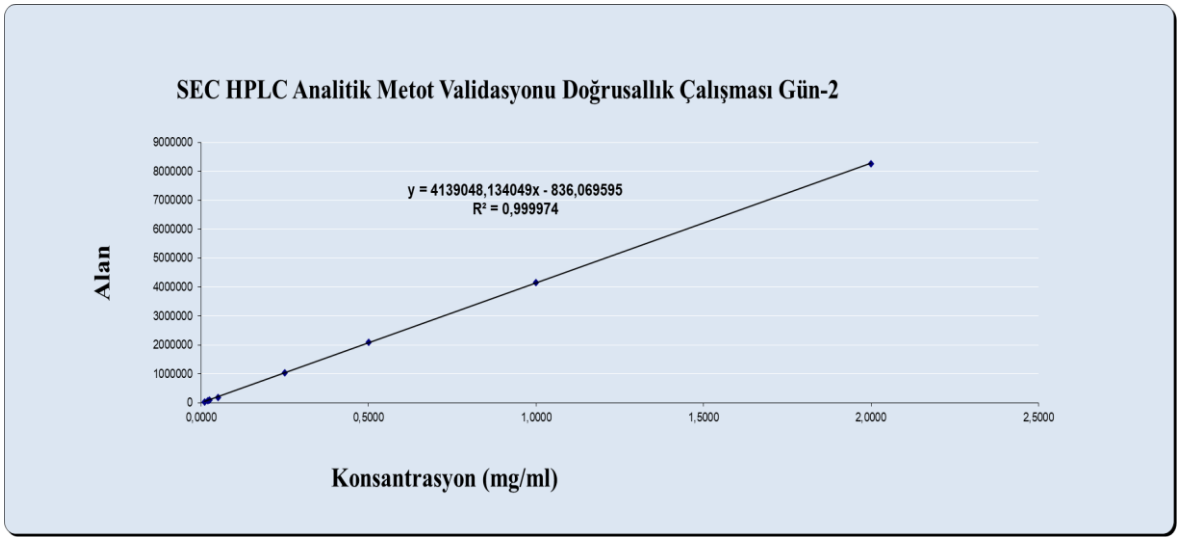
Şekil 3.1. SEC HPLC Doğrusallık Gün-1 Grafiği

Tablo 3.6. SEC HPLC Doğrusallık Gün-2 Sonuçları.

Referans numune Derişim Seviyesi (%)	**Derişim (mg/ml) (x)**	**Ortalama Alan (y)**	**Hesaplanan Alan (y_{cal})**	**Fark ($y-y_{cal}$)**	**Farkların Karesi $(y-y_{cal})^2$**
200	2,0	8264642	8277260	12618	159218933,46773
100	1,0	4148969	4138212	-10757	115715248,00987
50	0,5	2100303	2068688	-31615	999508387,52388
25	0,25	1032476	1033926	1450	2102395,36167
5,0	0,05	194401	206116	11716	137253028,68376
2,5	0,025	92060	102640	10580	111932176,99036
2,0	0,020	76409	81945	5536	30646112,26051
1,0	0,010	40082	40554	473	223487,90965
				RSS	1556599770

Tablo 3.7. SEC HPLC Doğrusallık Gün-2 Regresyon Analizi Sonuçları.

ÖZET ÇIKIŞI						
Regresyon İstatistikleri						
Çoklu R	**0,999986864**					
R Kare	**0,999973729**					
Ayarlı R Kare	0,99996935					
Standart Hata	16106,93314					
Gözlem	8					
ANOVA						
	df	*SS*	*MS*	*F*	*Anlamlılık F*	
Regresyon	1	5,925E+13	5,925E+13	228382,3986	5,66612E-15	
Fark	6	1556599770	259433295			
Toplam	7	5,92516E+13				
	Katsayılar	*Standart Hata*	*t Stat*	*P-değeri*	*Düşük %95*	*Yüksek %95*
Kesişim	**-836,0695949**	7060,277329	-0,118418804	0,909600871	**-18111,94586**	**16439,80667**
X Değişkeni 1	**4139048,134**	8661,022404	477,8937106	5,66612E-15	4117855,376	4160240,892
FARK ÇIKIŞI						
Gözlem	*Öngörülen Y*	*Farklar*				
1	8277260,199	-12618,1985				
2	4138212,064	10757,10221				
3	2068687,997	31615,00257				
4	1033925,964	-1449,963917				
5	206116,3371	-11715,50377				
6	102640,1338	-10579,80042				
7	81944,89309	-5535,893086				
8	40554,41175	-472,7450789				



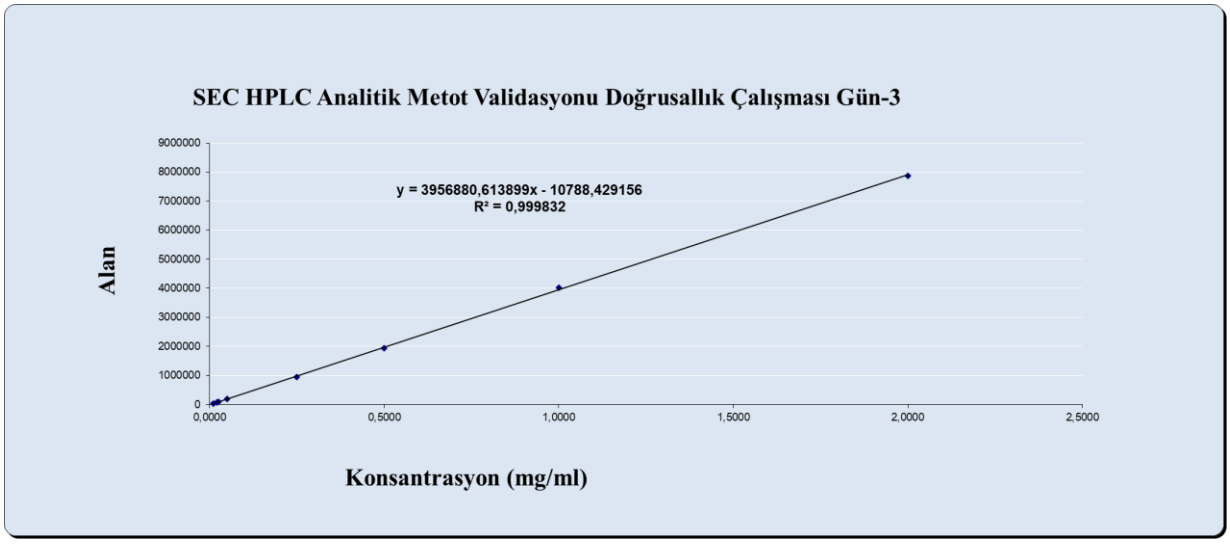
Şekil 3.2. SEC HPLC Doğrusallık Gün-2 Grafiği

Tablo 3.8. SEC HPLC Doğrusallık Gün-3 Sonuçları.

Referans numune Derişim Seviyesi (%)	**Derişim (mg/ml) (x)**	**Ortalama Alan (y)**	**Hesaplanan Alan (y_{cal})**	**Fark ($y-y_{cal}$)**	**Farkların Karesi ($y-y_{cal})^2$**
200	2,0	7878094	7902973	24879	618971207,82607
100	1,0	4022347	3946092	-76255	5814771431,64743
50	0,5	1930482	1967652	37170	1381624595,21933
25	0,25	944458	978432	33974	1154202619,55034
5,0	0,05	194986	187056	-7930	62891219,74746
2,5	0,025	90817	88134	-2683	7199815,22304
2,0	0,020	71046	68349	-2696	7270124,70543
1,0	0,010	35239	28780	-6458	41709505,63522
				RSS	9088640520

Tablo 3.9. SEC HPLC Doğrusallık Gün-3 Regresyon Analizi Sonuçları.

ÖZET ÇIKIŞI						
Regresyon İstatistikleri						
Çoklu R	0,999916089					
R Kare	**0,999832184**					
Ayarlı R Kare	0,999804215					
Standart Hata	38920,09018					
Gözlem	**8**					
ANOVA						
	df	*SS*	*MS*	*F*	*Anlamlılık F*	
Regresyon	1	5,41494E+13	5,41494E+13	35747,49432	1,47698E-12	
Fark	6	9088640520	1514773420			
Toplam	7	5,41584E+13				
	Katsayılar	*Standart Hata*	*t Stat*	*P-değeri*	*Düşük %95*	*Yüksek %95*
Kesişim	**-10788,42916**	17060,14597	-0,632376134	0,550463528	**-52533,10251**	**30956,24419**
X Değişkeni 1	**3956880,614**	20928,1165	189,0700778	1,47698E-12	3905671,358	4008089,87
FARK ÇIKIŞI						
Gözlem	***Öngörülen Y***	***Farklar***	***Standart Farklar***			
1	7902972,799	-24879,13197	-0,690454049			
2	3946092,185	76254,64859	2,116244688			
3	1967651,878	-37170,21113	-1,031560217			
4	978431,7243	-33973,55765	-0,942845613			
5	187055,6015	7930,398461	0,220087089			
6	88133,58619	2683,247142	0,074466378			
7	68349,18312	2696,316878	0,074829094			
8	28780,37698	6458,289683	0,17923263			



Şekil 3.3. SEC HPLC Doğrusallık Gün-3 Grafiği

Protein A kromatografisi için; % 400, % 200, % 100, % 50, % 25, % 12,5, % 6,25, % 3,125, % 1,56 ve % 0,78 seviyelerinde seri seyreltme yöntemi ile numuneler ependorf tüplerine hazırlanmıştır. Hazırlanan her seviye için ayrı vial hazırlanıp HPLC sisteminde altı ardışık enjeksiyon yapılmıştır. Sonuçlar arasındaki rölatif standart sapma (RSD) ve standart sapma (SD) hesaplanarak kaydedilmiştir. Çalışma üç ayrı çalışma olarak ICH M10 kılavuzuna uygun olarak tasarlanmıştır. Ayrıntılı olarak doğrusallık çözeltilerinin hazırlanışı aşağıdaki gibidir;

% 400 Doğrusallık Stok Standart Çözeltisi

10,0 mg/ml konsantrasyona sahip referans ürün stok standart çözeltisinden 144 µl, formülasyon tampon çözeltisinden 216 µl ependorf tüpüne alınır. Önce spin yapılır, sonrasında vortekslenir. Insert vialin içerisine 180 µl alınarak, viallenir. (C_{mAb} = 4,0 mg/ml)

% 200 Doğrusallık Stok Standart Çözeltisi

4,0 mg/ml konsantrasyona sahip % 400 Doğrusallık Stok Standart çözeltisinden 180 µl, formülasyon tampon çözeltisinden 180 µl ependorf tüpüne alınır. Önce spin yapılır, sonrasında vortekslenir. Insert vialin içerisine 180 µl alınarak, viallenir. (C_{mAb} = 2,0 mg/ml)

% 100 Doğrusallık Stok Standart Çözeltisi

2,0 mg/ml konsantrasyona sahip % 200 Doğrusallık Stok Standart çözeltisinden 180 µl, formülasyon tampon çözeltisinden 180 µl ependorf tüpüne alınır. Önce spin yapılır, sonrasında vortekslenir. Insert vialin içerisine 180 µl alınarak, viallenir. (C_{mAb} = 1,0 mg/ml)

% 50 Doğrusallık Stok Standart Çözeltisi

1 mg/ml konsantrasyona sahip % 100 Doğrusallık Stok Standart çözeltisinden 180 µl, formülasyon tampon çözeltisinden 180 µl ependorf tüpüne alınır. Önce spin yapılır, sonrasında vortekslenir. Insert vialin içerisine 180 µl alınarak, viallenir. (C_{mAb} = 0,5 mg/ml)

% 25 Doğrusallık Stok Standart Çözeltisi

0,5 mg/ml konsantrasyona sahip % 50 Doğrusallık Stok Standart çözeltisinden 180 µl, formülasyon tampon çözeltisinden 180 µl ependorf tüpüne alınır. Önce spin yapılır, sonrasında vortekslenir. Insert vialin içerisine 180 µl alınarak, viallenir. (C_{mAb} = 0,25 mg/ml)

% 12,5 Doğrusallık Stok Standart Çözeltisi

0,25 mg/ml konsantrasyona sahip % 25 Doğrusallık Stok Standart çözeltisinden 180 µl, formülasyon tampon çözeltisinden 180 µl ependorf tüpüne alınır. Önce spin yapılır, sonrasında vortekslenir. Insert vialin içerisine 180 µl alınarak, viallenir. (C_{mAb} = 0,125 mg/ml)

% 6,25 Doğrusallık Stok Standart Çözeltisi

0,125 mg/ml konsantrasyona sahip % 12,5 Doğrusallık Stok Standart çözeltisinden 180 µl, formülasyon tampon çözeltisinden 180 µl ependorf tüpüne alınır. Önce spin yapılır, sonrasında vortekslenir. Insert vialin içerisine 180 µl alınarak, viallenir. (C_{mAb} = 0,0625 mg/ml)

% 3,125 Doğrusallık Stok Standart Çözeltisi

0,0625 mg/ml konsantrasyona sahip % 6,25 Doğrusallık Stok Standart çözeltisinden 180 µl, formülasyon tampon çözeltisinden 180 µl ependorf tüpüne alınır. Önce spin yapılır, sonrasında vortekslenir. Insert vialin içerisine 180 µl alınarak, viallenir. (C_{mAb} = 0,03125 mg/ml)

% 1,56 Doğrusallık Stok Standart Çözeltisi

0,03125 mg/ml konsantrasyona sahip % 3,125 Doğrusallık Stok Standart çözeltisinden 180 µl, formülasyon tampon çözeltisinden 180 µl ependorf tüpüne alınır. Önce spin yapılır, sonrasında vortekslenir. Insert vialin içerisine 180 µl alınarak, viallenir. (C_{mAb} = 0,0156 mg/ml)

% 0,78 Doğrusallık Standart Çözeltisi

0,0156 mg/ml konsantrasyona sahip % 1,56 Doğrusallık Stok Standart çözeltisinden 180 µl, formülasyon tampon çözeltisinden 180 µl ependorf tüpüne alınır. Önce spin yapılır, sonrasında vortekslenir. Insert vialin içerisine 180 µl alınarak, viallenir. (C_{mAb} = 0,0078 mg/ml)

Doğrusallık Parametresi Kabul Kriterleri;

- Korelasyon katsayısı (R^2) 0,99'dan az olmamalıdır.
- Eğim: Raporlandırılır.
- Karelerin farkları toplamı (RSS) raporlandırılır.
- LLOQ seviyesi için % RSD, % 20,0'den fazla olmamalıdır.
- Diğer seviyeler için % RSD % 15,0'ten fazla olmamalıdır.
- Ana pike ait simetri faktörü 2.0'den büyük olmamalıdır.
- Ana pike ait teorik plaka sayısı değeri 2000'den büyük olmalıdır.

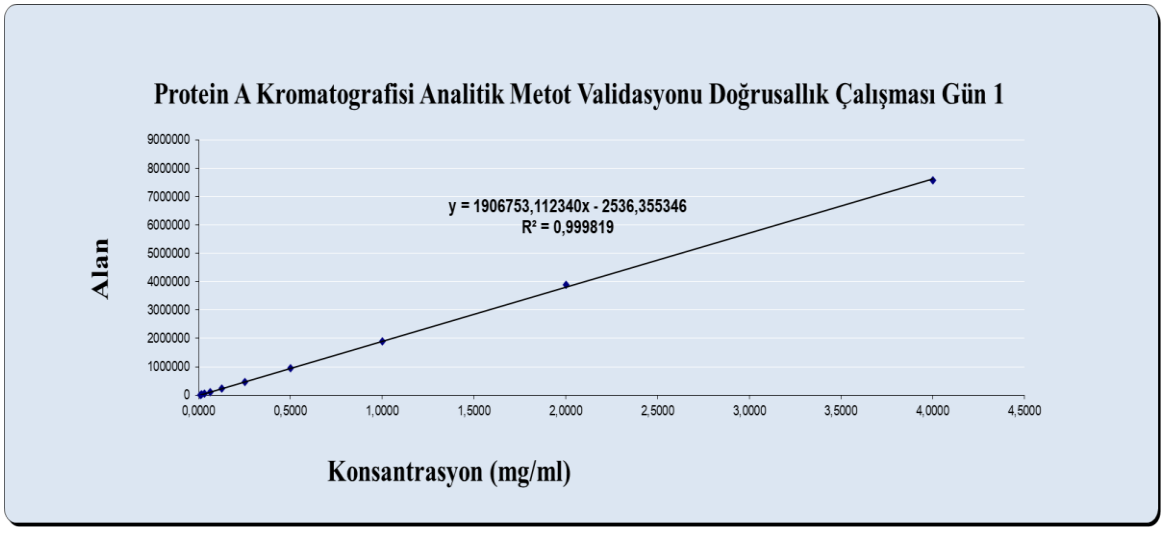
Protein A kromatografisi için çalışma derişiminin % 0,78 ve % 400 seviyesi uygulama aralığında olacak şekilde on ayrı derişimde referans numune çözeltisi hazırlanmış ve dedektör yanıtına göre derişim/alan grafikleri çizilmiştir ve aşağıda üç güne ait sonuçları yer almaktadır. Doğrusallık analizine ait tüm tablolar ve ANOVA regresyon analizine ait şekiller aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 3.10. Protein A Kromatografisi Doğrusallık Gün-1 Sonuçları.

Referans numune Derişim Seviyesi (%)	**Derişim (mg/ml) (x)**	**Ortalama Alan (y)**	**Hesaplanan Alan (y_{cal})**	**Fark ($y-y_{cal}$)**	**Farkların Karesi $(y-y_{cal})^2$**
400	4,0	7583166	7624476	41310	1706496327,59064
200	2,0	3898689	3810970	-87719	7694675124,40275
100	1,0	1904491	1904217	-274	75209,22603
50	0,5	940146	950840	10694	114365931,27387
25	0,25	460977	474152	13175	173587372,58233
12,5	0,125	225967	235808	9841	96844304,05786
6,25	0,0625	109703	116636	6933	48060214,96391
3,125	0,03125	52521	57050	4528	20505918,23525
1,56	0,0156	25136	27209	2073	4297300,83571
0,78	0,0078	12897	12336	-561	314176,39566
				RSS	9859221880

Tablo 3.11. Protein A Kromatografisi Doğrusallık Gün-1 Regresyon Analizi Sonuçları.

ÖZET ÇIKIŞI						
Regresyon İstatistikleri						
Çoklu R	0,999909292					
R Kare	**0,999818593**					
Ayarlı R Kare	0,999795917					
Standart Hata	35105,59407					
Gözlem	**10**					
ANOVA						
	df	***SS***	***MS***	***F***	***Anlamlılık F***	
Regresyon	1	5,43388E+13	5,43388E+13	44091,75183	2,96145E-16	
Fark	8	9859221880	1232402735			
Toplam	9	5,43487E+13				
	Katsayılar	***Standart Hata***	***t Stat***	***P-değeri***	***Düşük %95***	***Yüksek %95***
Kesişim	**-2536,355346**	13263,0965	-0,191234026	0,853106527	**-33121,11071**	**28048,40002**
X Değişkeni 1	**1906753,112**	9080,625955	209,9803606	2,96145E-16	1885813,151	1927693,073
FARK ÇIKIŞI						
Gözlem	***Öngörülen Y***	***Farklar***	***Standart Farklar***			
1	7624476,094	-41309,76068	-1,248109284			
2	3810969,869	87719,29733	2,650300257			
3	1904216,757	274,2430054	0,00828582			
4	950840,2008	-10694,20082	-0,323108416			
5	474151,9227	-13175,25607	-0,398069588			
6	235807,7837	-9840,950364	-0,297328798			
7	116635,7142	-6932,547509	-0,209455992			
8	57049,67941	-4528,346082	-0,136816837			
9	27208,99321	-2072,993207	-0,062632221			
10	12336,31893	560,5144027	0,016935059			



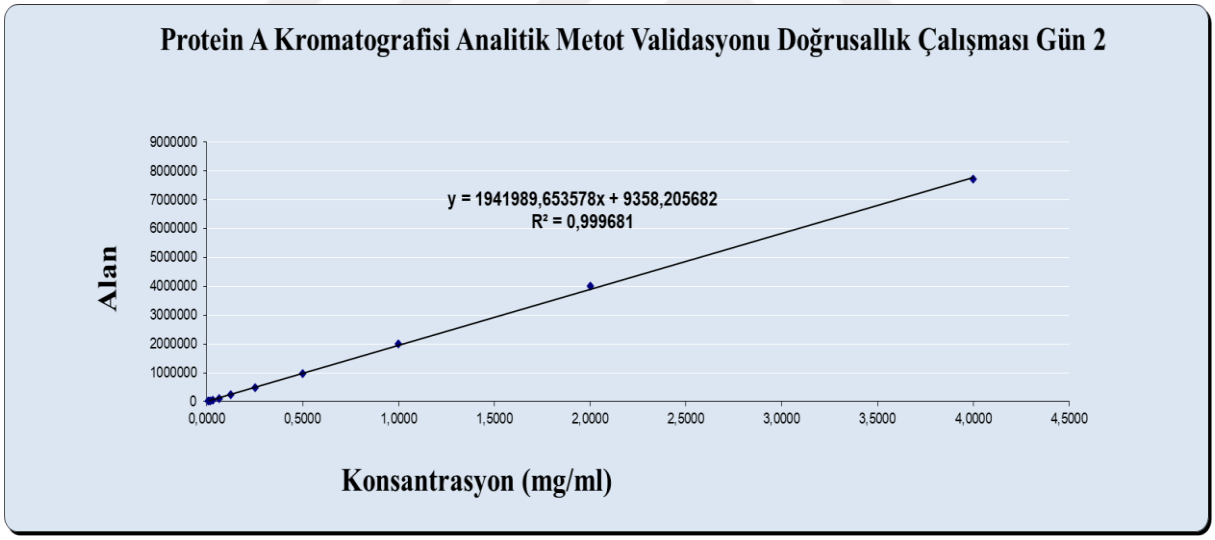
Şekil 3.4. Protein A Kromatografisi Doğrusallık Gün-1 Grafiği

Tablo 3.12. Protein A Kromatografisi Doğrusallık Gün-2 Sonuçları.

Referans numune Derişim Seviyesi (%)	**Derişim (mg/ml) (x)**	**Ortalama Alan (y)**	**Hesaplanan Alan (y_{cal})**	**Fark ($y-y_{cal}$)**	**Farkların Karesi $(y-y_{cal})^2$**
400	4,0	7715834	7777317	61483	3780157648,88087
200	2,0	3999702	3893338	-106365	11313475038,85400
100	1,0	1991753	1951348	-40405	1632575398,18776
50	0,5	981376	980353	-1023	1046121,60352
25	0,25	480211	494856	14644	214455104,93193
12,5	0,125	233520	252107	18587	345467116,18836
6,25	0,0625	114651	130733	16081	258605819,93016
3,125	0,03125	55612	70045	14433	208317715,14618
1,56	0,0156	27127	39653	12526	156906795,70945
0,78	0,0078	14468	24506	10038	100762614,70152
				RSS	18011769374

Tablo 3.13. Protein A Kromatografisi Doğrusallık Gün-2 Regresyon Analizi Sonuçları.

ÖZET ÇIKIŞI						
Regresyon İstatistikleri						
Çoklu R	0,999840262					
R Kare	0,99968055					
Ayarlı R Kare	0,999640619					
Standart Hata	47449,66988					
Gözlem	**10**					
ANOVA						
	df	***SS***	***MS***	***F***	***Anlamlılık F***	
Regresyon	1	5,63657E+13	5,63657E+13	25035,05287	2,8479E-15	
Fark	8	18011769374	2251471172			
Toplam	9	5,63837E+13				
	Katsayılar	***Standart Hata***	***t Stat***	***P-değeri***	***Düşük %95***	***Yüksek %95***
Kesişim	**9358,205682**	17926,75974	0,522024382	0,615795069	**-31980,97641**	**50697,38777**
X Değişkeni 1	**1941989,654**	12273,6195	158,2246911	2,8479E-15	1913686,636	1970292,671
FARK ÇIKIŞI						
Gözlem	***Öngörülen Y***	***Farklar***	***Standart Farklar***			
1	7777316,82	-61482,98666	-1,374352137			
2	3893337,513	106364,8205	2,377612512			
3	1951347,859	40405,14074	0,903191184			
4	980353,0325	1022,800862	0,022863049			
5	494855,6191	-14644,28574	-0,327349182			
6	252106,9124	-18586,74571	-0,415476461			
7	130732,559	-16081,2257	-0,359469637			
8	70045,38236	-14433,21569	-0,322631055			
9	39653,24428	-12526,24428	-0,280003811			
10	24505,72498	-10038,05831	-0,224384462			



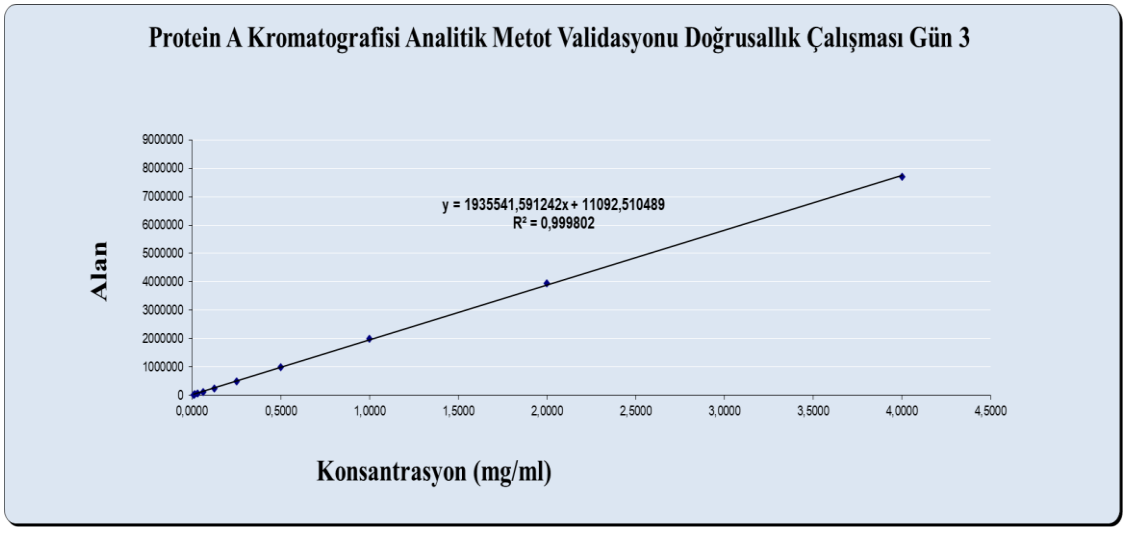
Şekil 3.5. Protein A Kromatografisi Doğrusallık Gün-2 Grafiği

Tablo 3.14. Protein A Kromatografisi Doğrusallık Gün-3 Sonuçları.

Referans numune Derişim Seviyesi (%)	**Derişim (mg/ml) (x)**	**Ortalama Alan (y)**	**Hesaplanan Alan (y_{cal})**	**Fark ($y-y_{cal}$)**	**Farkların Karesi $(y-y_{cal})^2$**
400	4,0	7704965	7753259	48294	2332346700,80570
200	2,0	3958108	3882176	-75932	5765740561,23865
100	1,0	1991374	1946634	-44740	2001643583,85932
50	0,5	982795	978863	-3932	15460838,08644
25	0,25	485909	494978	9069	82239051,91320
12,5	0,125	240974	253035	12061	145468751,67119
6,25	0,0625	118384	132064	13680	187129448,22062
3,125	0,03125	57434	71578	14144	200053260,69778
1,56	0,0156	27433	41287	13854	191941424,70635
0,78	0,0078	12687	26190	13502	182314848,07965
				RSS	11104338469

Tablo 3.15. Protein A Kromatografisi Doğrusallık Gün-3 Regresyon Analizi Sonuçları

ÖZET ÇIKIŞI						
Regresyon İstatistikleri						
Çoklu R	0,999900855					
R Kare	0,999801719					
Ayarlı R Kare	0,999776934					
Standart Hata	37256,43983					
Gözlem	**10**					
ANOVA						
	df	***SS***	***MS***	***F***	***Anlamlılık F***	
Regresyon	1	5,5992E+13	5,5992E+13	40338,83874	4,22683E-16	
Fark	8	11104338469	1388042309			
Toplam	9	5,60031E+13				
	Katsayılar	***Standart Hata***	***t Stat***	***P-değeri***	***Düşük %95***	***Yüksek %95***
Kesişim	**11092,51049**	14075,69847	0,788061105	0,453376499	**-21366,10838**	**43551,12936**
X Değişkeni 1	**1935541,591**	9636,976769	200,8453105	4,22683E-16	1913318,683	1957764,5
FARK ÇIKIŞI						
Gözlem	***Öngörülen Y***	***Farklar***	***Standart Farklar***			
1	7753258,875	-48294,37546	-1,374901113			
2	3882175,693	75932,47369	2,161735017			
3	1946634,102	44739,7316	1,273703328			
4	978863,3061	3932,027224	0,111941578			
5	494977,9083	-9068,574966	-0,258174864			
6	253035,2094	-12061,04273	-0,343367958			
7	132063,8599	-13679,52661	-0,389444861			
8	71578,18522	-14144,01855	-0,402668564			
9	41286,95931	-13854,29265	-0,394420307			
10	26189,7349	-13502,40157	-0,384402257			



Şekil 3.6. Protein A Kromatografisi Doğrusallık Gün-3 Grafiği

3.3 UYGULAMA ARALIĞI

Analitik metodun aralığı numunedeki analitin (bu konsantrasyonları içerecek) üst ve alt konsantrasyonu (miktar) arasındaki aralığın kesinlik, doğruluk ve doğrusallık için uygun ve çalışılabilir bir düzeyde olduğunu göstermektir.

SEC HPLC ve Protein A kromatografisi için gerçekleştirilmiş olan doğrusallık parametresi sonuçlarına göre LLOQ seviyesi ve piklerin overload olmadığı ve sistem uygunluk parametrelerini sağladığı metodun çıkılabilecek en üst sınır çözeltilerinin üç gün tasarlanarak gerçekleştirilen sonuçları tespit edilmiştir. Bu seviyeler de aşağıdaki tablolarda ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.

Kabul Kriterleri:

- LLOQ seviyesi için % RSD % 20,0'den fazla olmamalıdır.
- Diğer seviyeler için % RSD % 15,0'ten fazla olmamalıdır.

Tablo 3.16. SEC HPLC İçin Uygulama Aralığı Gün-1 Tablosu.

Enjeksiyon Sayısı	**% 1,0**	**% 200**
1	37293	8287769
2	38399	8265461
3	37943	8425800
4	37077	8319263
5	38513	8332157
6	36621	8362145
Ortalama	**37641**	**8332099**
SD	**762,3**	**57014,3**
% RSD	**2,03**	**0,68**

- SEC HPLC için uygulama aralığı gün-1 alan sonuçlarına göre LLOQ seviyesi % RSD sonucu % 2,03 ve % 200 seviyesi için % 0,68 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.17. SEC HPLC İçin Uygulama Aralığı Gün-2 Tablosu.

Enjeksiyon Sayısı	**% 1,0**	**% 200**
1	41943	8282073
2	39059	8348968
3	39294	8309434
4	38015	8227697
5	44102	8235007
6	38077	8184673
Ortalama	**40082**	**8264642**
SD	**2432,44**	**60098,7**
% RSD	**6,07**	**0,73**

- SEC HPLC için uygulama aralığı gün-2 alan sonuçlarına göre LLOQ seviyesi % RSD sonucu % 6,07 ve % 200 seviyesi için % RSD sonucu % 0,73 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.18. SEC HPLC İçin Uygulama Aralığı Gün-3 Tablosu.

Enjeksiyon Sayısı	**% 1,0**	**% 200**
1	36719	7898549
2	36265	7891487
3	35386	7904225
4	36486	7877632
5	33773	7829324
6	32803	7867345
Ortalama	**35239**	**7878094**
SD	**1606,4**	**27476,8**
% RSD	**4,56**	**0,35**

- SEC HPLC için uygulama aralığı gün-3 alan sonuçlarına göre LLOQ seviyesi % RSD sonucu % 4,56 ve % 200 seviyesi için % RSD sonucu % 0,35 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Doğrusallık çalışmasının üç güne ait ortalama sonuçları (18 enjeksiyona ait) bulgular ve tartışma bölümünde sonuçlar ayrıntılı olarak gösterilmiştir. % RSD sonuçları kabul kriterine göre uygun bulunmuştur.

Uygulama aralığı doğrusallık sonuçlarına göre SEC HPLC metodu için gerçekleştirilen validasyon çalışmasında çalışma aralığı 0,01 mg/ml – 2,0 mg/ml olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.19. Protein A Kromatografisi İçin Uygulama Aralığı Gün-1 Tablosu.

Enjeksiyon Sayısı	**% 0,78**	**% 400**
1	11114	7577903
2	12657	7582397
3	11917	7589586
4	16186	7588216
5	12220	7580777
6	13287	7580119
Ortalama	**12897**	**7583166**
SD	**1767,77**	**4690,44**
% RSD	**13,71**	**0,06**

- Protein A kromatografisi için uygulama aralığı gün-1 alan sonuçlarına göre LLOQ seviyesi % RSD sonucu % 13,71 ve % 400 seviyesi için % RSD sonucu % 0,06 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.20. Protein A Kromatografisi İçin Uygulama Aralığı Gün-2 Tablosu.

Enjeksiyon Sayısı	**% 0,78**	**% 400**
1	15993	7724147
2	16154	7727490
3	13518	7726081
4	13261	7712726
5	13703	7703751
6	14177	7700808
Ortalama	**14468**	**7715834**
SD	**1280,43**	**11759,32**
% RSD	**8,85**	**0,15**

- Protein A kromatografisi için uygulama aralığı gün-2 alan sonuçlarına göre LLOQ seviyesi % RSD sonucu % 8,85 ve % 400 seviyesi için % RSD sonucu % 0,15 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.21. Protein A Kromatografisi İçin Uygulama Aralığı Gün-3 Tablosu.

Enjeksiyon Sayısı	% 0,78	% 400
1	12142	7707706
2	13075	7710173
3	12287	7704031
4	12473	7698388
5	12291	7705549
6	13856	7703940
Ortalama	**12687**	**7704965**
SD	**659,81**	**4003,93**
% RSD	**5,20**	**0,05**

- Protein A kromatografisi için uygulama aralığı gün-3 alan sonuçlarına göre LLOQ seviyesi % RSD sonucu % 5,20 ve % 400 seviyesi için % RSD sonucu % 0,05 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Protein A kromatografisinin doğrusallık çalışmasının üç güne ait ortalama sonuçları (18 enjeksiyona ait) bulgular ve tartışma bölümünde sonuçlar ayrıntılı olarak gösterilmiştir. % RSD sonuçları kabul kriterine göre uygun bulunmuştur.

Uygulama aralığı doğrusallık sonuçlarına göre; Protein A Kromatografisi metodu için gerçekleştirilen validasyon çalışmasında çalışma aralığı 0,0078 mg/ml – 4,0 mg/ml olarak belirlenmiştir.

3.4. EN DÜŞÜK MİKTARLANDIRMA LİMİTİ (LLOQ)

Teşhis limiti, hesaplanmış LLOQ limitinde hazırlanmış referan ürün numune çözeltisi ile deneysel olarak doğrulanmıştır. LLOQ limitinde hazırlanan çözeltiden 6 ardışık enjeksiyon yapılmıştır. Çalışma en az üç gün boyunca gerçekleştirilmiştir.

LLOQ Çözeltisi:

LLOQ çözeltisi s/n oranı yaklaşık 10,0-20,0 arasında bir değer olacak şekilde konsantrasyon hesabı yapılmıştır. Doğrusallık çalışması yapılırken LLOQ seviyesini belirlemek için seri seyreltme yöntemi ile konsantrasyonu belirlenmiştir.

Üç farklı günde gerçekleştirilen doğrusallık çalışmalarından elde edilen kromatogramlar doğrultusunda elde edilen tüm sonuçlar aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Kabul Kriteri

- LLOQ seviyesi için % RSD % 20,0’ dan fazla olmamalıdır.

Tablo 3.22. SEC HPLC İçin En Düşük Miktarlandırma Limiti (LLOQ) Gün-1-2-3 Tablosu.

Enjeksiyon Sayısı	LLOQ Seviyesi Alanı	Sinyal/Gürültü
1	37293	19,61
2	38399	17,32
3	37943	13,26
4	37077	22,37
5	38513	19,37
6	36621	13,05
7	41943	11,69
8	39059	12,69
9	39294	14,59
10	38015	19,04
11	44102	19,19
12	38077	18,80
13	36719	21,93
14	36265	26,48
15	35386	16,63
16	36486	26,01
17	33773	16,06
18	32803	24,63
Ortalama	**37654**	**18,5**
SD	**2609,46**	**-**
% RSD	**6,93**	**-**

- LLOQ seviyesine ait SEC HPLC için gün-1-2-3 sonuçlarına göre sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama sinyal/gürültü sonucu ise; 18,5 olarak bulunmuştur. Alanlara ait % RSD sonucu da % 6,93 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.23. Protein A Kromatografisi İçin En Düşük Miktarlandırma Limiti (LLOQ) Gün-1-2-3 Tablosu.

Enjeksiyon Sayısı	LLOQ Seviyesi Alanı	Sinyal/Gürültü
1	11114	30,25
2	12657	38,75
3	11917	37,32
4	16186	35,25
5	12220	30,05
6	13287	38,81
7	15993	39,55
8	16154	44,45
9	13518	34,04
10	13261	45,76
11	13703	43,59
12	14177	42,34
13	12142	39,48
14	13075	39,09
15	12287	34,34
16	12473	40,79
17	12291	36,67
18	13856	34,82
Ortalama	**13351**	**38,1**
SD	**1482,47**	-
% RSD	**11,10**	-

- LLOQ seviyesine ait Protein A kromatografisi için gün-1-2-3 sonuçlarına göre sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama sinyal/gürültü sonucu ise; 38,1 olarak bulunmuştur. Alanlara ait % RSD sonucu da % 11,1 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.
- En düşük miktarlandırma limiti iki analitik metot için doğrusallık çalışması sonuçlarına göre aşağıdaki tabloda karşılaştırılmıştır.

Tablo 3.24. SEC HPLC ve Protein A Kromatografisi İçin En Düşük Miktarlandırma Limiti (LLOQ) Gün-1-2-3 Sinyal/Gürültü Karşılaştırma Tablosu.

Enjeksiyon Numarası	Sinyal/ Gürültü Protein A Kromatografisi	Sinyal/ Gürültü SEC HPLC
1	30,25	19,61
2	38,75	17,32
3	37,32	13,26
4	35,25	22,37
5	30,05	19,37
6	38,81	13,05
7	39,55	11,69
8	44,45	12,69
9	34,04	14,59
10	45,76	19,04
11	43,59	19,19
12	42,34	18,80
13	39,48	21,93
14	39,09	26,48
15	34,34	16,63
16	40,79	26,01
17	36,67	16,06
18	34,82	24,63
Ortalama	**38,1**	**18,5**

- LLOQ seviyesine ait gün-1-2-3 karşılaştırma sonuçlarına göre; Protein A kromatografisi için ortalama sinyal/gürültü sonucu 38,1 ve SEC HPLC için ortalama sinyal/gürültü sonucu 18,5 olarak bulunmuştur.

3.5. DOĞRULUK & KESİNLİK

Aynı şekilde doğrusallık parametresinde olduğu gibi üç ayrı gün olarak tasarlanmıştır. İki analitik metot için de laboratuvar içi kesinlik (ara kesinlik) yapılmıştır.

SEC HPLC Kromatografisi için; % 200, % 100, % 50, % 25, % 12,5, % 6,25, % 3,125, % 1,56 ve % 0,78 seviyelerinde seri seyreltme metodu ile numuneler hazırlanmıştır. Hazırlanan her seviye için ayrı vial hazırlanmış HPLC sisteminde altı ardışık enjeksiyon yapılmıştır. Standart eğrisi oluşturulmuştur. Konsantrasyonlar standart eğrisine göre Empower yazılımı ile hesaplanmıştır. Standart eğrisi sonucu uygun bulunduğunda doğruluk & kesinlik seviyeleri hazırlanmıştır. Hemen arkasından; LLOQ (% 1,0- 0,01 mg/ml), LLOQ seviyesinin yaklaşık üç katı (Low QC) (% 2,5- 0,025 mg/ml), % 50 seviyesinde (MID QC) (0,5 mg/ml) ve En yüksek hesaplanabilir konsantrasyonda % 75 seviyesinde (ULOQ-0,75 mg/ml) her seviyeden beş adet ependorf tüplerine ayrı ayrı referans ürün numune çözeltileri hazırlanmıştır.

Çalışma üç ayrı çalışma olarak ICH M10 kılavuzuna uygun olarak tasarlanmıştır. Çalışmalar arası doğruluk ve kesinlik, en az iki gün boyunca en az üç analitik çalışmada her bir konsantrasyon seviyesinin analiz edilmesiyle değerlendirilmiştir. Ayrıntılı olarak SEC HPLC analizinin doğruluk & kesinlik çözeltilerinin hazırlanışı aşağıdaki gibidir;

Kabul Kriterleri

- Standart Eğrisi için R^2 sonucu 0,99'dan yüksek olmalıdır. Her konsantrasyon seviyesindeki % RSD sonucu % 5,0'dan büyük olmamalıdır.
- Çalışılan her seviyedeki numunelerin her birinin sonucu spesifikasyon limitleri içinde olmalıdır.
- Doğruluk analizi sonucu LLOQ seviyesi için % 80,0 - % 120,0 arasında, diğer seviyeler için ise % 85,0 - % 115,0 değerleri arasında olmalıdır.
- LLOQ seviyesindeki % RSD sonucu %20,0 ve diğer seviyelerde ise %15,0 olmalıdır.
- Ana pike ait ait simetri faktörü ve kuyruklanma faktörü en fazla 2,0 olmalıdır.
- Ana pike ait teorik plaka sayısı değeri 2000'den büyük olmalıdır.

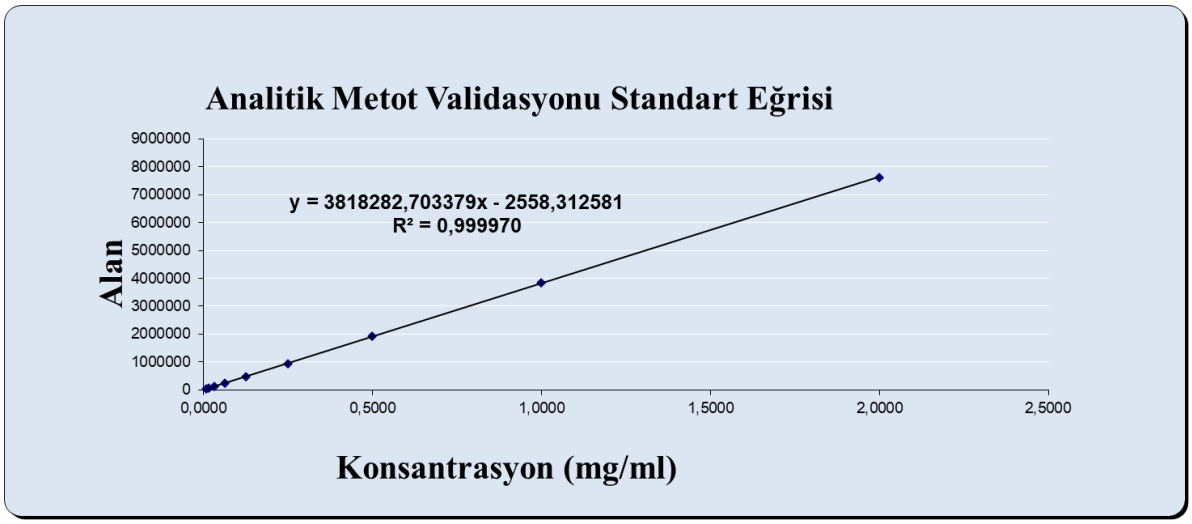
Aşağıdaki tablolarda ayrıntılı olarak tüm sonuçlar gösterilmiştir.

Tablo 3.25. SEC HPLC Standart Eğrisi Sonuçları.

Referans numune Derişim Seviyesi (%)	**Derişim (mg/ml) (x)**	**Ortalama Alan (y)**	**Hesaplanan Alan (y_{cal})**	**Fark ($y-y_{cal}$)**	**Farkların Karesi $(y-y_{cal})^2$**
200	2,0	7617908	7634007	16099	259170100,70585
100	1,0	3848645	3815724	-32921	1083777483,79273
50	0,5	1911970	1906583	-5387	29019347,64671
25	0,25	944186	952012	7826	61249353,17559
12,5	0,125	466100	474727	8627	74419815,00072
6,25	0,0625	230902	236084	5182	26856817,65067
3,0	0,03125	114670	116763	2093	4379345,43510
2,0	0,015625	56536	57102	566	320380,14138
0,8	0,0078125	29357	27272	-2085	4347137,26746
				RSS	1543539781

Tablo 3.26. SEC HPLC Standart Eğrisi Regresyon Analizi Sonuçları.

ÖZET ÇIKIŞI						
Regresyon İstatistikleri						
Çoklu R	0,999985141					
R Kare	**0,999970282**					
Ayarlı R Kare	0,999966037					
Standart Hata	**14849,43376**					
Gözlem	**9**					
ANOVA						
	df	*SS*	*MS*	*F*	*Anlamlılık F*	
Regresyon	1	5,19383E+13	5,19383E+13	235541,7729	4,16387E-17	
Fark	7	1543539781	220505683			
Toplam	8	5,19398E+13				
	Katsayılar	*Standart Hata*	*t Stat*	*P-değeri*	*Düşük %95*	*Yüksek %95*
Kesişim	**-2558,312581**	6056,355939	-0,422417805	0,685392432	**-16879,31871**	**11762,69355**
X Değişkeni 1	**3818282,703**	7867,452153	485,3264601	4,16387E-17	3799679,135	3836886,272
FARK ÇIKIŞI						
Gözlem	***Öngörülen Y***	***Farklar***	***Standart Farklar***			
1	7634007,094	-16098,76084	-1,158986904			
2	3815724,391	32920,77587	2,370042545			
3	1906583,039	5386,960892	0,387819733			
4	952012,3633	-7826,196597	-0,563425934			
5	474727,0253	-8626,692008	-0,621055444			
6	236084,3564	-5182,35638	-0,373089782			
7	116763,0219	-2092,688566	-0,150657474			
8	57102,35466	-566,0213259	-0,04074918			
9	27272,02104	2084,978961	0,150102442			



Şekil 3.7. SEC HPLC Standart Eğrisi Grafiği

Çalışma konsantrasyonuna ait sistem uygunluk sonuçları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3.27. Kalibrasyon Eğrisi % 100 Seviyesi Tablosu.

Numune sayısı	Ortalama Alan	Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı
% 100 Numune-1	3872461	1,31	5909
% 100 Numune-2	3856414	1,30	5911
% 100 Numune-3	3849667	1,29	5926
% 100 Numune-4	3848676	1,29	5931
% 100 Numune-5	3837631	1,28	5955
% 100 Numune-6	3827022	1,30	5932
Ortalama	**3848645**	**1,30**	**5927**
SD	**15604,27**	**0,01**	**16,77**
% RSD	**0,41**	**0,81**	**0,28**

Tablo 3.28. (LLOQ seviyesi) Testi 1. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% LLOQ Numune-1	33779	100,0
	33035	100,0
	33854	100,0
% LLOQ Numune-2	34773	100,0
	33661	100,0
	34054	100,0
% LLOQ Numune-3	34185	100,0
	33536	100,0
	32950	100,0
% LLOQ Numune-4	36208	100,0
	33746	100,0
	33640	100,0
% LLOQ Numune-5	35582	100,0
	33421	100,0
	34847	100,0
Ortalama	**34085**	**100,0**
SD	**909,70**	**0,00**
% RSD	**2,67**	**0,01**

- LLOQ seviyesi birinci güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 100,0 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 0,01 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.29. (Low QC) Testi 1. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% Low QC Numune-1	85272	92,0
	84647	92,0
	82536	92,0
% Low QC Numune-2	87573	96,0
	88033	96,0
	81504	88,0
% Low QC Numune-3	81822	88,0
	81611	88,0
	80241	88,0
% Low QC Numune-4	83031	92,0
	81190	88,0
	81951	88,0
% Low QC Numune-5	83233	92,0
	*	*
	81943	88,0
Ortalama	**83185**	**90,6**
SD	**2362,71**	**2,98**
% RSD	**2,84**	**3,29**

***Enjeksiyon Hatası**

- Low QC seviyesi birinci güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 90,6 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 3,29 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.30. (MID QC) Testi 1. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% MID QC Numune-1	1809036	95,2
	1809007	95,2
	1786171	94,0
% MID QC Numune-2	1771171	93,2
	1766133	92,8
	1754323	92,2
% MID QC Numune-3	1887360	99,2
	1881183	99,0
	1882911	99,0
% MID QC Numune-4	1888705	99,4
	1894708	99,6
	1904350	100,2
% MID QC Numune-5	1805156	95,0
	1814012	95,4
	1815218	95,4
Ortalama	**1831296**	**96,3**
SD	**52783,21**	**2,78**
% RSD	**2,88**	**2,89**

- MID QC seviyesi birinci güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 96,3 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 2,89 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.31. (ULOQ) Testi 1. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% ULOQ Numune-1	3019250	105,7
	3010149	105,5
	2994532	104,9
% ULOQ Numune-2	2840467	99,5
	2850451	99,9
	2860430	100,3
% ULOQ Numune-3	3252672	114,0
	3272189	114,7
	3256197	114,0
% ULOQ Numune-4	2820912	98,8
	2816818	98,7
	2817502	98,7
% ULOQ Numune-5	2961277	103,7
	2976976	104,3
	2965213	103,9
Ortalama	**2981002**	**104,4**
SD	**162156,35**	**5,69**
% RSD	**5,44**	**5,45**

- ULOQ seviyesi birinci güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 104,4 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 5,45 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.32. (LLOQ) Testi 2. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% LLOQ Numune-1	36753	110,0
	37096	110,0
	36272	100,0
% LLOQ Numune-2	35814	100,0
	35605	100,0
	35550	100,0
% LLOQ Numune-3	37255	110,0
	36272	100,0
	37535	110,0
% LLOQ Numune-4	36722	110,0
	38123	110,0
	38727	110,0
% LLOQ Numune-5	36040	100,0
	35586	100,0
	33750	100,0
Ortalama	**36473**	**104,7**
SD	**1212,45**	**5,16**
% RSD	**3,32**	**4,93**

- LLOQ seviyesi ikinci güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 104,7 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 4,93 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.33. (Low QC) Testi 2. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% Low QC Numune-1	92728	100,0
	92291	100,0
	90414	100,0
% Low QC Numune-2	91199	100,0
	91310	100,0
	88950	96,0
% Low QC Numune-3	86653	96,0
	90027	100,0
	88029	96,0
% Low QC Numune-4	97779	108,0
	90651	100,0
	89369	96,0
% Low QC Numune-5	93141	100,0
	92163	100,0
	92242	100,0
Ortalama	**91130**	**99,5**
SD	**2590,75**	**2,97**
% RSD	**2,84**	**2,99**

- Low QC seviyesi ikinci güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 99,5 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 2,99 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.34. (MID QC) Testi 2. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% MID QC Numune-1	1891263	99,4
	1896486	99,8
	1897610	99,8
% MID QC Numune-2	1945773	102,4
	1938570	102,0
	1945981	102,4
% MID QC Numune-3	1874761	98,6
	1874485	98,6
	1854703	97,6
% MID QC Numune-4	1817498	95,6
	1815984	95,6
	1812730	95,4
% MID QC Numune-5	1821854	95,8
	1815529	95,4
	1803313	94,8
Ortalama	**1867103**	**98,2**
SD	**51387,62**	**2,72**
% RSD	**2,75**	**2,77**

- MID QC seviyesi ikinci güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 98,2 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 2,77 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.35. (ULOQ) Testi 2. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% ULOQ Numune-1	2958414	103,6
	2966110	103,9
	2963670	103,9
% ULOQ Numune-2	2833905	99,3
	2835188	99,3
	2832354	99,2
% ULOQ Numune-3	2875863	100,8
	2883067	101,1
	2873118	100,7
% ULOQ Numune-4	2839330	99,5
	2827377	99,1
	2831855	99,2
% ULOQ Numune-5	3012089	105,5
	3015941	105,6
	3008009	105,3
Ortalama	**2903753**	**101,7**
SD	**74466,36**	**2,58**
% RSD	**2,56**	**2,54**

- ULOQ seviyesi ikinci güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 101,7 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 2,54 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.36. (LLOQ) Testi 3. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% LLOQ Numune-1	36932	110,0
	36551	110,0
	35893	100,0
% LLOQ Numune-2	36984	110,0
	35956	100,0
	35917	100,0
% LLOQ Numune-3	36019	100,0
	35238	100,0
	34670	100,0
% LLOQ Numune-4	36449	100,0
	33934	100,0
	35917	100,0
% LLOQ Numune-5	40701	120,0
	37910	110,0
	38998	110,0
Ortalama	**36538**	**104,7**
SD	**1677,21**	**6,40**
% RSD	**4,59**	**6,11**

- LLOQ seviyesi üçüncü güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 104,7 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 6,11 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.37. (Low QC) Testi 3. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% Low QC Numune-1	86176	96,0
	90271	100,0
	85327	92,0
% Low QC Numune-2	91833	100,0
	90450	100,0
	87693	96,0
% Low QC Numune-3	87749	96,0
	89011	96,0
	89603	96,0
% Low QC Numune-4	87726	96,0
	88572	96,0
	86445	96,0
% Low QC Numune-5	89450	96,0
	91141	100,0
	87212	96,0
Ortalama	**88577**	**96,8**
SD	**1898,94**	**2,24**
% RSD	**2,14**	**2,32**

- Low QC seviyesi üçüncü güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 96,8 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 2,32 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.38. (MID QC) Testi 3. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% MID QC Numune-1	1885061	99,2
	1900069	100,0
	1881508	99,0
% MID QC Numune-2	1863656	98,0
	1862036	98,0
	1872978	98,4
% MID QC Numune-3	1847529	97,2
	1857702	97,6
	1843967	97,0
% MID QC Numune-4	1923006	101,2
	1927718	101,4
	1926402	101,2
% MID QC Numune-5	1925114	101,2
	1920489	101,0
	1915363	100,8
Ortalama	**1890173**	**99,4**
SD	**31135,84**	**1,64**
% RSD	**1,65**	**1,65**

- MID QC seviyesi üçüncü güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 99,4 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 1,65 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.39. (ULOQ) Testi 3. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% ULOQ Numune-1	2916258	102,1
	2911414	102,0
	2912045	102,0
% ULOQ Numune-2	3042040	106,5
	3036385	106,4
	3050505	106,8
% ULOQ Numune-3	3019122	105,7
	3027571	106,0
	3024957	106,0
% ULOQ Numune-4	2975171	104,3
	2971628	104,1
	2967408	104,0
% ULOQ Numune-5	2908703	101,9
	2907196	101,9
	2897312	101,5
Ortalama	**2971181**	**104,1**
SD	**58251,39**	**2,04**
% RSD	**1,96**	**1,96**

- ULOQ seviyesi üçüncü güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 104,1 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 1,96 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Protein A kromatografisi için; % 400, % 200, % 100, % 50, % 25, % 12,5, % 6,25, % 3,125, % 1,56 ve % 0,78 seviyelerinde seri seyreltme metodu ile numuneler hazırlanır. Hazırlanan her seviye için ayrı vial hazırlanmış HPLC sisteminde altı ardışık enjeksiyon yapılmıştır. Standart eğrisi oluşturulmuştur. Konsantrasyonlar standart eğrisine göre Empower yazılımı ile hesaplanmıştır.

Standart eğrisi sonucu uygun bulunduğunda doğruluk & kesinlik seviyeleri hazırlanmıştır. Hemen arkasından; LLOQ (% 0,78- 0,0078 mg/ml), LLOQ seviyesinin yaklaşık üç katı (Low QC) (% 3,125- 0,03125 mg/ml), % 50 seviyesinde (MID QC) (0,5 mg/ml) ve En yüksek hesaplanabilir konsantrasyonda % 100 seviyesinde (ULOQ-1,0 mg/ml) her seviyeden beş adet ependorf tüplerine ayrı ayrı referans ürün numune çözeltileri hazırlanmıştır.

Çalışma üç ayrı çalışma olarak ICH M10 kılavuzuna uygun olarak tasarlanmıştır. Çalışmalar arası doğruluk ve kesinlik, en az iki gün boyunca en az üç analitik çalışmada her bir konsantrasyon seviyesinin analiz edilmesiyle değerlendirilmiştir.

Kabul Kriterleri

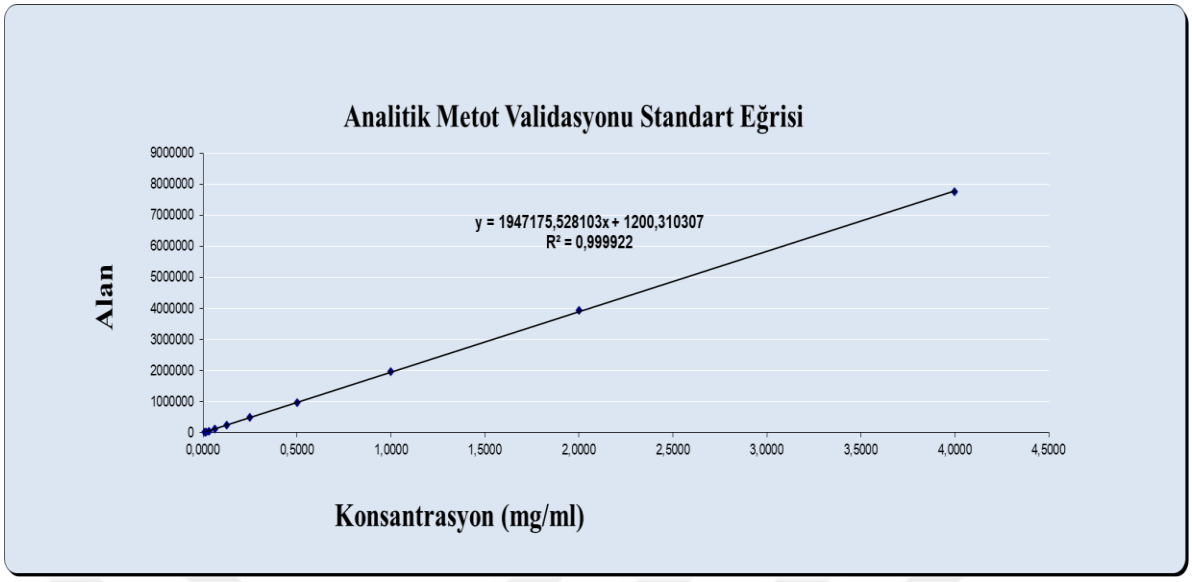
- Standart Eğrisi için R^2 sonucu 0,99'dan yüksek olmalıdır. Her konsantrasyon seviyesindeki % RSD sonucu % 5,0'dan büyük olmamalıdır.
- Çalışılan her seviyedeki numunelerin her birinin sonucu spesifikasyon limitleri içinde olmalıdır.
- Doğruluk analizi sonucu LLOQ seviyesi için % 80,0 - % 120,0 arasında, diğer seviyeler için ise % 85,0 - % 115,0 değerleri arasında olmalıdır.
- LLOQ seviyesindeki % RSD sonucu % 20,0 ve diğer seviyelerde ise %15,0 olmalıdır.
- Ana pike ait ait simetri faktörü ve kuyruklanma faktörü en fazla 2,0 olmalıdır.
- Ana pike ait teorik plaka sayısı değeri 2000'den büyük olmalıdır.

Tablo 3.40. Protein A Kromatografisi Standart Eğrisi Sonuçları.

Referans numune Derişim Seviyesi (%)	**Derişim (mg/ml) (x)**	**Ortalama Alan (y)**	**Hesaplanan Alan (y_{cal})**	**Fark ($y-y_{cal}$)**	**Farkların Karesi $(y-y_{cal})^2$**
400	4,0	7759676	7789902	30227	913666856,99936
200	2,0	3950748	3895551	-55197	3046686747,23455
100	1,0	1961904	1948376	-13528	182997628,09120
50	0,5	973902	974788	886	785718,59662
25	0,25	484462	487994	3532	12477560,10332
12,5	0,125	237702	244597	6895	47539894,04675
6,25	0,0625	116166	122899	6733	45330337,48759
3,125	0,03125	54076	62050	7974	63585402,60349
1,56	0,0156	24127	31576	7449	55491303,89791
0,078	0,0078	11361	16388	5028	25278565,96308
				RSS	4393840015

Tablo 3.41. Protein A Kromatografisi Standart Eğrisi Regresyon Analizi Sonuçları.

ÖZET ÇIKIŞI						
Regresyon İstatistikleri						
Çoklu R	0,999961233					
R Kare	0,999922468					
Ayarlı R Kare	0,999912777					
Standart Hata	23435,65663					
Gözlem	10					
ANOVA						
	df	***SS***	***MS***	***F***	***Anlamlılık F***	
Regresyon	1	5,66671E+13	5,66671E+13	103175,607	9,88072E-18	
Fark	8	4393840015	549230001,9			
Toplam	9	5,66715E+13				
	Katsayılar	***Standart Hata***	***t Stat***	***P-değeri***	***Düşük %95***	***Yüksek %95***
Kesişim	**1200,310307**	8854,126633	0,135565071	0,895514158	**-19217,34232**	**21617,96294**
X Değişkeni 1	**1947175,528**	6062,009134	321,2095998	9,88072E-18	1933196,51	1961154,546
FARK ÇIKIŞI						
Gözlem	***Öngörülen Y***	***Farklar***	***Standart Farklar***			
1	7789902,423	-30226,92272	-1,368021965			
2	3895551,367	55196,80015	2,498118506			
3	1948375,838	13527,66159	0,612240232			
4	974788,0744	-886,4076921	-0,040117388			
5	487994,1923	-3532,359	-0,159868894			
6	244597,2513	-6894,917987	-0,312052912			
7	122898,7808	-6732,780814	-0,304714844			
8	62049,54556	-7974,045561	-0,360892492			
9	31576,24855	-7449,248546	-0,337141023			
10	16388,27943	-5027,779427	-0,22754922			



Şekil 3.8. Protein A Kromatografisi Standart Eğrisi Grafiği

Çalışma konsantrasyonuna ait sistem uygunluk sonuçları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3.42. Kalibrasyon Eğrisi % 100 Seviyesi Tablosu.

Numune sayısı	Alan	Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı
% 100 Numune-1	1967697	1,55	25806
% 100 Numune-2	1956893	1,54	25737
% 100 Numune-3	1964185	1,55	25950
% 100 Numune-4	1962706	1,55	25854
% 100 Numune-5	1958684	1,55	25790
% 100 Numune-6	1961256	1,54	25582
Ortalama	**1961904**	**1,5**	**25787**
SD	**3880,81**	**0,01**	**123,25**
% RSD	**0,20**	**0,33**	**0,48**

Tablo 3.43. (LLOQ seviyesi) Testi 1. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% LLOQ Numune-1	14900	89,7
	14755	89,7
	14331	85,9
% LLOQ Numune-2	13954	83,3
	14377	87,2
	14048	84,6
% LLOQ Numune-3	14382	87,2
	13382	80,8
	13776	82,1
% LLOQ Numune-4	15528	94,9
	14114	84,6
	16745	102,6
% LLOQ Numune-5	15089	91,0
	14474	87,2
	14445	87,2
Ortalama	**14553**	**87,9**
SD	**806,80**	**5,44**
% RSD	**5,54**	**6,19**

- LLOQ seviyesi birinci güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 87,9 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 6,19 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.44. (Low QC) Testi 1. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% Low QC Numune-1	61786	99,6
	60836	98,0
	60878	98,1
% Low QC Numune-2	61050	98,4
	62749	101,2
	61150	98,5
% Low QC Numune-3	61753	99,5
	62620	100,9
	64057	103,3
% Low QC Numune-4	60970	98,2
	62074	100,0
	62169	100,2
% Low QC Numune-5	64346	103,8
	63538	102,4
	62898	101,4
Ortalama	**62192**	**100,2**
SD	**1157,03**	**1,90**
% RSD	**1,86**	**1,89**

- Low QC seviyesi birinci güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 100,2 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 1,89 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.45. (MID QC) Testi 1. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% MID QC Numune-1	981479	100,7
	978865	100,4
	988756	101,4
% MID QC Numune-2	949967	97,5
	941795	96,6
	953463	97,8
% MID QC Numune-3	887400	91,0
	886052	90,9
	887337	91,0
% MID QC Numune-4	962368	98,7
	955681	98,0
	959374	98,4
% MID QC Numune-5	946877	97,2
	948766	97,3
	953396	97,8
Ortalama	**945438**	**97,0**
SD	**33084,32**	**3,40**
% RSD	**3,50**	**3,50**

- MID QC seviyesi birinci güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 97,0 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 3,50 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.46. (ULOQ) Testi 1. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% ULOQ Numune-1	1991819	102,2
	1998957	102,6
	1997324	102,5
% ULOQ Numune-2	1929131	99,0
	1931858	99,2
	1936611	99,4
% ULOQ Numune-3	1973859	101,3
	1969950	101,1
	1967135	101,0
% ULOQ Numune-4	1923187	98,7
	1921721	98,6
	1921162	98,6
% ULOQ Numune-5	1922475	98,7
	1921941	98,6
	1921832	98,6
Ortalama	**1948597**	**100,0**
SD	**30763,02**	**1,58**
% RSD	**1,58**	**1,58**

- ULOQ seviyesi birinci güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 100,0 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 1,58 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.47. (LLOQ) Testi 2. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% LLOQ Numune-1	14138	89,7
	14838	89,7
	15025	91,0
% LLOQ Numune-2	16629	101,3
	14205	85,9
	16161	98,7
% LLOQ Numune-3	18714	115,4
	18364	112,8
	17530	107,7
% LLOQ Numune-4	16206	98,7
	18098	111,5
	16285	100,0
% LLOQ Numune-5	14897	89,7
	15548	94,9
	15653	94,9
Ortalama	**16153**	**98,8**
SD	**1474,14**	**9,35**
% RSD	**9,13**	**9,47**

- LLOQ seviyesi ikinci güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 98,8 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 9,35 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.48. (Low QC) Testi 2. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% Low QC Numune-1	57734	92,9
	56085	90,2
	57027	91,7
% Low QC Numune-2	58393	94,0
	61679	99,4
	57834	93,1
% Low QC Numune-3	57208	92,0
	58553	94,2
	58035	93,4
% Low QC Numune-4	59308	95,5
	57515	92,5
	57278	92,2
% Low QC Numune-5	57522	92,5
	56038	90,1
	57355	92,3
Ortalama	**57838**	**93,1**
SD	**1360,19**	**2,23**
% RSD	**2,35**	**2,40**

- Low QC seviyesi ikinci güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 93,1 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 2,40 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.49. (MID QC) Testi 2. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% MID QC Numune-1	1004618	103,1
	1004165	103,0
	1006758	103,3
% MID QC Numune-2	1012910	103,9
	1014248	104,1
	1010373	103,7
% MID QC Numune-3	987251	101,3
	986691	101,2
	988952	101,5
% MID QC Numune-4	988026	101,4
	990152	101,6
	985409	101,1
% MID QC Numune-5	987773	101,3
	985747	101,1
	986064	101,2
Ortalama	**995942**	**102,2**
SD	**11264,69**	**1,16**
% RSD	**1,13**	**1,13**

- MID QC seviyesi ikinci güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 102,2 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 1,13 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.50. (ULOQ) Testi 2. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% ULOQ Numune-1	1998947	102,6
	2006565	103,0
	2008058	103,1
% ULOQ Numune-2	1995875	102,4
	2000059	102,7
	1996556	102,5
% ULOQ Numune-3	1960417	100,6
	1960636	100,6
	1964267	100,8
% ULOQ Numune-4	1991634	102,2
	1986943	102,0
	1988710	102,1
% ULOQ Numune-5	1985897	101,9
	1983162	101,8
	1988654	102,1
Ortalama	**1987759**	**102,0**
SD	**15265,59**	**0,79**
% RSD	**0,77**	**0,77**

- ULOQ seviyesi ikinci güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 102,0 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 0,77 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.51. (LLOQ) Testi 3. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% LLOQ Numune-1	15773	95,9
	15343	93,1
	15092	91,0
% LLOQ Numune-2	16259	99,1
	17158	105,1
	16492	101,3
% LLOQ Numune-3	17547	107,7
	18271	112,8
	18987	116,7
% LLOQ Numune-4	16517	102,6
	16158	98,5
	18040	110,9
% LLOQ Numune-5	15252	92,6
	15707	95,5
	15644	95,1
Ortalama	**16549**	**101,2**
SD	**1199,11**	**7,93**
% RSD	**7,25**	**7,84**

- LLOQ seviyesi üçüncü güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 101,2 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 7,84 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.52. (Low QC) Testi 3. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% Low QC Numune-1	55669	89,5
	56387	90,7
	59337	95,6
% Low QC Numune-2	58381	94,0
	58008	93,3
	58212	93,7
% Low QC Numune-3	58882	94,8
	59638	96,0
	57391	92,4
% Low QC Numune-4	57505	92,5
	58762	94,6
	57230	92,1
% Low QC Numune-5	57919	93,2
	57258	92,1
	57449	92,4
Ortalama	**57869**	**93,1**
SD	**1064,52**	**1,75**
% RSD	**1,84**	**1,88**

- Low QC seviyesi üçüncü güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 93,1 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 1,88 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.53. (MID QC) Testi 3. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% MID QC Numune-1	1004634	103,1
	1001671	102,8
	1004687	103,1
% MID QC Numune-2	1008710	103,5
	1007996	103,4
	1007475	103,4
% MID QC Numune-3	984853	101,0
	985171	101,0
	986468	101,2
% MID QC Numune-4	991028	101,7
	992532	101,8
	990528	101,6
% MID QC Numune-5	983875	100,9
	984975	101,0
	985445	101,1
Ortalama	**994670**	**102,0**
SD	**9898,78**	**1,02**
% RSD	**1,00**	**1,00**

- MID QC seviyesi üçüncü güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 102,0 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 1,00 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.54. (ULOQ) Testi 3. Gün Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% ULOQ Numune-1	2008875	103,1
	2003042	102,8
	2005281	102,9
% ULOQ Numune-2	2005565	102,9
	2006344	103,0
	2008171	103,1
% ULOQ Numune-3	1963009	100,8
	1963226	100,8
	1962374	100,7
% ULOQ Numune-4	1981525	101,7
	1984310	101,8
	1980049	101,6
% ULOQ Numune-5	1982541	101,8
	1985284	101,9
	1988344	102,1
Ortalama	**1988529**	**102,1**
SD	**17028,14**	**0,87**
% RSD	**0,86**	**0,86**

- ULOQ seviyesi üçüncü güne ait doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 102,1 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 0,86 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

3.6. ARA KESİNLİK & DOĞRULUK

Ara kesinliğin genişliği, kullanılacak metodun amacına bağlı olarak kurulmalıdır. Çalışmalar olabilecek varyasyonları kapsayacak şekilde, gün, kişi, ekipman vb. parametreleri içerir. Farklı gün, farklı cihaz ve farklı kişi tarafından kesinlik & doğruluk analizi gerçekleştirilir. Ara kesinlik analizinde farklı cihazda çalışma yapılacağı için yeniden standart eğrisi oluşturulmalıdır. Kesinlik & doğruluk parametresinde belirtildiği gibi analiz gerçekleştirilmelidir. Üç ayrı gün olarak çalışılan kesinlik & doğruluk parametresinden elde edilen sonuçlar ile ara kesinlik sonuçları karşılaştırılır. Aşağıdaki kabul kriterleri sağlanmalıdır.

Kabul Kriteri

- Standart Eğrisi için R^2 sonucu 0,99'dan yüksek olmalıdır. Her konsantrasyon seviyesindeki % RSD sonucu % 5,0'dan büyük olmamalıdır.
- Çalışılan her seviyedeki numunelerin her birinin sonucu spesifikasyon limitleri içinde olmalıdır.
- Doğruluk analizi sonucu LLOQ seviyesi için % 80,0 - % 120,0 arasında, diğer seviyeler için ise % 85,0 - % 115,0 değerleri arasında olmalıdır.
- LLOQ seviyesindeki % RSD sonucu % 20,0 ve diğer seviyelerde ise %15,0 olmalıdır.
- Ana pike ait ait simetri faktörü ve kuyruklanma faktörü en fazla 2,0 olmalıdır.
- Ana pike ait teorik plaka sayısı değeri 2000'den büyük olmalıdır.

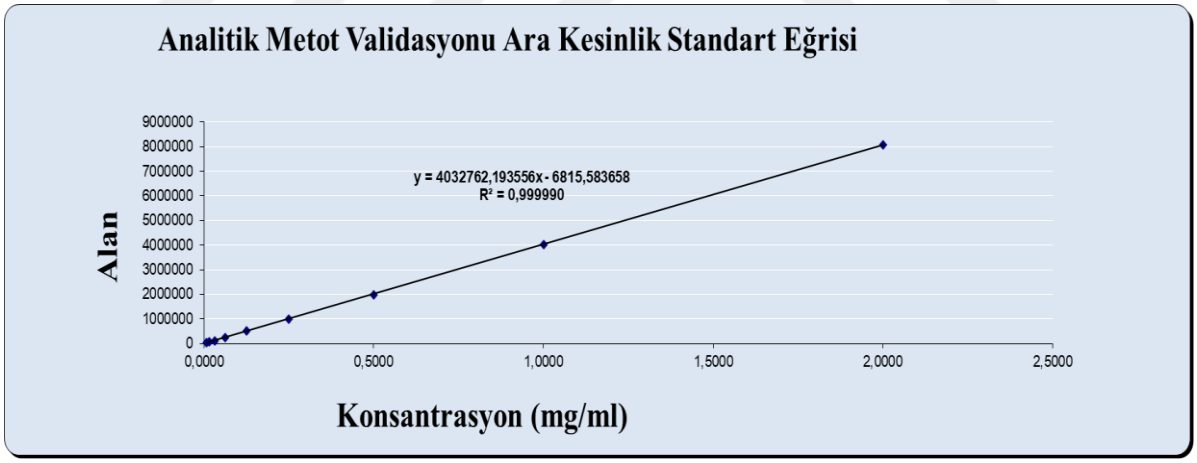
SEC HPLC için; % 200, % 100, % 50, % 25, % 12,5, % 6,25, % 3,125, % 1,56 ve % 0,78 seviyelerinde seri seyreltme yöntemi ile numuneler hazırlanmıştır. Hazırlanan her seviye için ayrı vial hazırlanıp HPLC sisteminde altı ardışık enjeksiyon yapılmış ve standart eğrisi oluşturulmuştur. Standart eğrisi sonucu uygun bulunup doğruluk & kesinlik analizindeki prosedür ile hazırlanmıştır. Farklı gün, farklı kişi, farklı kolon ve farklı bir SEC HPLC sisteminde analizi yapılmıştır.

Tablo 3.55. SEC HPLC Standart Eğrisi Sonuçları.

Referans numune Derişim Seviyesi (%)	**Derişim (mg/ml) (x)**	**Ortalama Alan (y)**	**Hesaplanan Alan (y_{cal})**	**Fark ($y-y_{cal}$)**	**Farkların Karesi $(y-y_{cal})^2$**
200	2,0	8061043	8058709	-2334	5448473,51785
100	1,0	4032184	4025947	-6237	38900877,13632
50	0,5	1989239	2009566	20327	413180686,74453
25	0,25	995194	1001375	6181	38204325,00950
12,5	0,125	501266	497280	-3987	15893852,34355
6,25	0,0625	247173	245232	-1941	3767920,56017
3,0	0,03125	121789	119208	-2580	6657768,03261
2,0	0,015625	59942	56196	-3746	14030076,58558
0,8	0,0078125	30373	24690	-5683	32294166,82135
				RSS	568378147

Tablo 3.56. SEC HPLC Standart Eğrisi Regresyon Analizi Sonuçları.

ÖZET ÇIKIŞI						
Regresyon İstatistikleri						
Çoklu R	0,999995095					
R Kare	0,99999019					
Ayarlı R Kare	0,999988788					
Standart Hata	9010,931034					
Gözlem	9					
ANOVA						
	df	*SS*	*MS*	*F*	*Anlamlılık F*	
Regresyon	1	5,79371E+13	5,79371E+13	713538,5812	8,60599E-19	
Fark	7	568378146,8	81196878,11			
Toplam	8	5,79377E+13				
	Katsayılar	*Standart Hata*	*t Stat*	*P-değeri*	*Düşük %95*	*Yüksek %95*
Kesişim	-6815,583658	3675,116949	-1,854521571	0,10606097	**-15505,85432**	**1874,687007**
X Değişkeni 1	4032762,194	4774,126065	844,7121292	8,60599E-19	4021473,179	4044051,208
FARK ÇIKIŞI						
Gözlem	*Öngörülen Y*	*Farklar*	*Standart Farklar*			
1	8058708,803	2334,196547	0,276925998			
2	4025946,61	6237,056769	0,739956185			
3	2009565,513	-20326,84645	-2,411550241			
4	1001374,965	-6180,964731	-0,7333015			
5	497279,6905	3986,709463	0,47297795			
6	245232,0534	1941,113227	0,230291112			
7	119208,2349	2580,265109	0,306119248			
8	56196,32562	3745,674383	0,444381866			
9	24690,37098	5682,795687	0,674199382			



Şekil 3.9. SEC HPLC Ara Kesinlik Standart Eğrisi Grafiği

Tablo 3.57. Ara Kesinlik- Kalibrasyon Eğrisi % 100 Seviyesi Tablosu.

Numune sayısı	Ortalama Alan	Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı
% 100 Numune-1	4021223	1,08	3858
% 100 Numune-2	4017895	1,08	3854
% 100 Numune-3	4014849	1,08	3856
% 100 Numune-4	4000223	1,08	3856
% 100 Numune-5	4008420	1,08	3852
% 100 Numune-6	4130492	1,11	3812
Ortalama	**4032184**	**1,1**	**3848**
SD	**48735**	**0,01**	**17,75**
% RSD	**1,21**	**1,13**	**0,46**

Tablo 3.58. Ara Kesinlik & Doğruluk (LLOQ Seviyesi) Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% LLOQ Numune-1	35428	100,0
	36552	110,0
	36728	110,0
% LLOQ Numune-2	35898	100,0
	42543	120,0
	38155	110,0
% LLOQ Numune-3	37230	110,0
	38653	110,0
	39721	110,0
% LLOQ Numune-4	41627	120,0
	38104	110,0
	36557	110,0
% LLOQ Numune-5	37942	110,0
	38233	110,0
	37109	110,0
Ortalama	**38032**	**110,0**
SD	**1990,63**	**5,35**
% RSD	**5,23**	**4,86**

- LLOQ seviyesine ait ara kesinlik & doğruluk sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 110,0 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 4,86 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.59. Ara Kesinlik & Doğruluk (Low QC Seviyesi) Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% Low QC Numune-1	95155	100,0
	93468	100,0
	92424	96,0
% Low QC Numune-2	92102	96,0
	94381	100,0
	97185	104,0
% Low QC Numune-3	95626	100,0
	91930	96,0
	98468	104,0
% Low QC Numune-4	105425	112,0
	96514	100,0
	92563	96,0
% Low QC Numune-5	89909	96,0
	94580	100,0
	95483	100,0
Ortalama	**95014**	**100,0**
SD	**3661,05**	**4,28**
% RSD	**3,85**	**4,28**

- Low QC seviyesine ait ara kesinlik & doğruluk sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 100,0 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 4,28 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.60. Ara Kesinlik & Doğruluk (MID QC Seviyesi) Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% MID QC Numune-1	2146477	106,8
	2147277	106,8
	2143310	106,6
% MID QC Numune-2	2015424	100,4
	2026231	100,8
	2015476	100,4
% MID QC Numune-3	2059172	102,6
	2064855	102,8
	2059918	102,6
% MID QC Numune-4	*	*
	1891829	94,2
	1890914	94,2
% MID QC Numune-5	2017976	100,4
	2031460	101,2
	2014617	100,4
Ortalama	**2037495**	**101,4**
SD	**79222,89**	**3,91**
% RSD	**3,89**	**3,85**

***Enjeksiyon Hatası**

- MID QC seviyesine ait ara kesinlik & doğruluk sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 101,4 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 3,85 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.61. Ara Kesinlik & Doğruluk (ULOQ Seviyesi) Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% ULOQ Numune-1	3011608	99,9
	3030715	100,5
	3011247	99,9
% ULOQ Numune-2	3034102	100,7
	3030261	100,5
	3020409	100,1
% ULOQ Numune-3	2910563	96,5
	2894942	96,0
	2905864	96,4
% ULOQ Numune-4	2940779	97,5
	3176751	105,3
	2931198	97,2
% ULOQ Numune-5	2958360	98,1
	2979667	98,8
	3015974	100,0
Ortalama	**2990163**	**99,2**
SD	**71728,78**	**2,38**
% RSD	**2,40**	**2,40**

- ULOQ seviyesine ait ara kesinlik & doğruluk sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 99,2 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 2,40 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.62. LLOQ Seviyesi Karşılaştırma Sonuç Tablosu.

Numune Sayısı	(%) Geri Kazanım	(%) Geri Kazanım
	Doğruluk & Kesinlik	Ara Kesinlik & Doğruluk
Gün-1 Numune-1	100,0	106,7
Gün-1 Numune-2	100,0	110,0
Gün-1 Numune-3	100,0	110,0
Gün-1 Numune-4	100,0	113,3
Gün-1 Numune-5	100,0	110,0
Gün-2 Numune-1	106,7	-
Gün-2 Numune-2	100,0	-
Gün-2 Numune-3	106,7	-
Gün-2 Numune-4	110,0	-
Gün-2 Numune-5	100,0	-
Gün-3 Numune-1	106,7	-
Gün-3 Numune-2	103,3	-
Gün-3 Numune-3	100,0	-
Gün-3 Numune-4	100,0	-
Gün-3 Numune-5	113,3	-
Ortalama	**104,8**	
SD	**5,01**	
% RSD	**4,78**	

- LLOQ seviyesine ait karşılaştırma sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 104,8 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 4,78 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.63. Low QC Seviyesi Karşılaştırma Sonuç Tablosu.

Numune Sayısı	(%) Geri Kazanım Doğruluk & Kesinlik	(%) Geri Kazanım Ara Kesinlik & Doğruluk
Gün-1 Numune-1	92,0	98,7
Gün-1 Numune-2	93,3	100,0
Gün-1 Numune-3	88,0	100,0
Gün-1 Numune-4	89,3	102,7
Gün-1 Numune-5	90,0	98,7
Gün-2 Numune-1	100,0	-
Gün-2 Numune-2	98,7	-
Gün-2 Numune-3	97,3	-
Gün-2 Numune-4	101,3	-
Gün-2 Numune-5	100,0	-
Gün-3 Numune-1	96,0	-
Gün-3 Numune-2	98,7	-
Gün-3 Numune-3	96,0	-
Gün-3 Numune-4	96,0	-
Gün-3 Numune-5	97,3	-
Ortalama	**96,7**	
SD	**4,15**	
% RSD	**4,29**	

- Low QC seviyesine ait karşılaştırma sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 96,7 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 4,29 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo-3.64. MID QC Seviyesi Karşılaştırma Sonuç Tablosu.

Numune Sayısı	**(%) Geri Kazanım**	**(%) Geri Kazanım**
	Doğruluk & Kesinlik	**Ara Kesinlik & Doğruluk**
Gün-1 Numune-1	94,8	106,7
Gün-1 Numune-2	92,7	100,5
Gün-1 Numune-3	99,1	102,7
Gün-1 Numune-4	99,7	94,2
Gün-1 Numune-5	95,3	100,7
Gün-2 Numune-1	99,7	-
Gün-2 Numune-2	102,3	-
Gün-2 Numune-3	98,3	-
Gün-2 Numune-4	95,5	-
Gün-2 Numune-5	95,3	-
Gün-3 Numune-1	99,4	-
Gün-3 Numune-2	98,1	-
Gün-3 Numune-3	97,3	-
Gün-3 Numune-4	101,3	-
Gün-3 Numune-5	101,0	-
Ortalama	**98,7**	
SD	**3,41**	
% RSD	**3,46**	

- MID QC seviyesine ait karşılaştırma sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 98,7 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 3,46 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.65. ULOQ Seviyesi Karşılaştırma Sonuç Tablosu.

Numune Sayısı	**(%) Geri Kazanım**	**(%) Geri Kazanım**
	Doğruluk & Kesinlik	**Ara Kesinlik & Doğruluk**
Gün-1 Numune-1	105,4	100,1
Gün-1 Numune-2	99,9	100,4
Gün-1 Numune-3	114,2	96,3
Gün-1 Numune-4	98,7	100,0
Gün-1 Numune-5	104,0	99,0
Gün-2 Numune-1	103,8	-
Gün-2 Numune-2	99,3	-
Gün-2 Numune-3	100,8	-
Gün-2 Numune-4	99,2	-
Gün-2 Numune-5	105,5	-
Gün-3 Numune-1	102,0	-
Gün-3 Numune-2	106,6	-
Gün-3 Numune-3	105,9	-
Gün-3 Numune-4	104,1	-
Gün-3 Numune-5	101,7	-
Ortalama	**102,3**	
SD	**3,98**	
% RSD	**3,89**	

- ULOQ seviyesine ait karşılaştırma sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 102,3 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 3,89 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

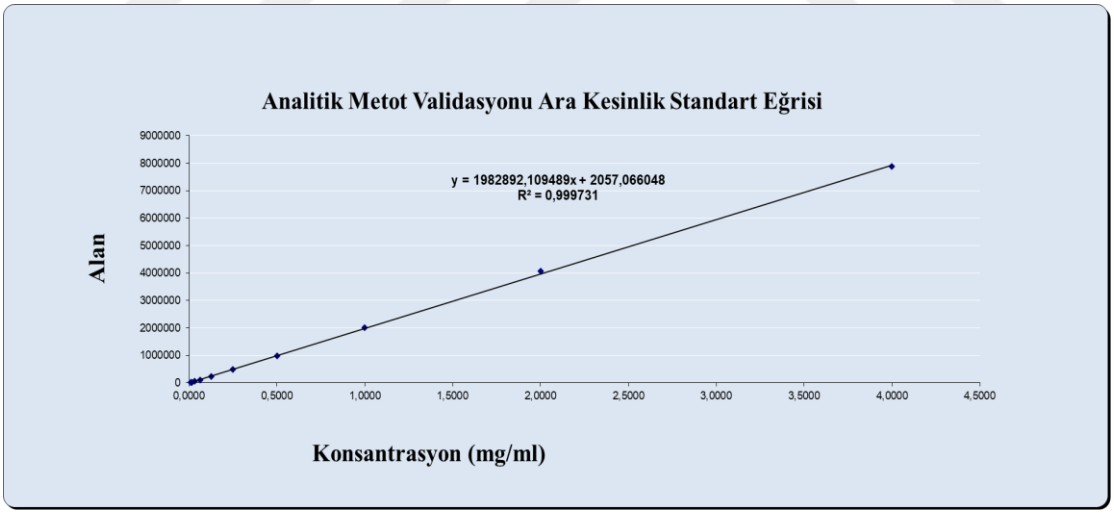
Protein A kromatografisi için; % 400, % 200, % 100, % 50, % 25, % 12,5, % 6,25, % 3,125, % 1,56 ve % 0,78 seviyelerinde seri seyreltme yöntemi ile numuneler hazırlanmıştır. Hazırlanan her seviye için ayrı vial hazırlanıp HPLC sisteminde altı ardışık enjeksiyon yapılmış ve standart eğrisi oluşturulmuştur. Standart eğrisi sonucu uygun bulunup doğruluk & kesinlik parametresindeki prosedür uygulanmıştır. Farklı gün, farklı kişi, farklı kolon ve farklı bir HPLC sisteminde analiz gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.66. Ara Kesinlik & Doğruluk Testi Protein A Kromatografisi Standart Eğrisi Sonuçları.

Referans numune Derişim Seviyesi (%)	**Derişim (mg/ml) (x)**	**Ortalama Alan (y)**	**Hesaplanan Alan (y_{cal})**	**Fark ($y-y_{cal}$)**	**Farkların Karesi $(y-y_{cal})^2$**
400	4,0	7876196	7933626	57429	3298109643,86473
200	2,0	4069794	3967841	-101953	10394356090,59650
100	1,0	2018012	1984949	-33063	1093139340,55438
50	0,5	992163	993503	1340	1795477,05970
25	0,25	485871	497780	11910	141838415,43994
12,5	0,125	233833	249919	16086	258761961,21911
6,25	0,0625	110571	125988	15417	237683567,02969
3,125	0,03125	51776	64022	12247	149983566,55808
1,56	0,0156	21911	32990	11079	122751988,06681
0,078	0,0078	8016	17524	9507	90391754,49514
				RSS	15788811805

Tablo 3.67. Protein A Kromatografisi Standart Eğrisi Regresyon Analizi Sonuçları.

ÖZET ÇIKIŞI						
Regresyon İstatistikleri						
Çoklu R	0,999865689					
R Kare	**0,999731395**					
Ayarlı R Kare	0,99969782					
Standart Hata	**44425,23467**					
Gözlem	**10**					
ANOVA						
	df	*SS*	*MS*	*F*	*Anlamlılık F*	
Regresyon	1	5,87651E+13	5,87651E+13	29775,54969	1,4235E-15	
Fark	8	15788811805	1973601476			
Toplam	9	5,87809E+13				
	Katsayılar	*Standart Hata*	*t Stat*	*P-değeri*	*Düşük %95*	*Yüksek %95*
Kesişim	**2057,066048**	16784,11062	0,122560325	0,905478225	**-36647,16246**	**40761,29455**
X Değişkeni 1	**1982892,109**	11491,30074	172,5559321	1,4235E-15	1956393,122	2009391,097
FARK ÇIKIŞI						
Gözlem	*Öngörülen Y*	*Farklar*	*Standart Farklar*			
1	7933625,504	-57429,17067	-1,371131396			
2	3967841,285	101952,715	2,434138727			
3	1984949,176	33062,6578	0,789376681			
4	993503,1208	-1339,954126	-0,031991637			
5	497780,0934	-11909,59342	-0,284343606			
6	249918,5797	-16086,07973	-0,38405794			
7	125987,8229	-15416,98956	-0,368083296			
8	64022,44447	-12246,7778	-0,292393941			
9	32990,18296	-11079,34962	-0,264521391			
10	17523,6245	-9507,457836	-0,226992202			



Şekil 3.10. Protein A Kromatografisi Ara Kesinlik Standart Eğrisi Grafiği

Tablo 3.68. Kalibrasyon Eğrisi % 100 Seviyesi Tablosu.

Numune sayısı	Alan	Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı
% 100 Numune-1	2018192	1,48	32979
% 100 Numune-2	2018268	1,47	32947
% 100 Numune-3	2017143	1,48	32910
% 100 Numune-4	2019639	1,48	32855
% 100 Numune-5	2015462	1,47	32825
% 100 Numune-6	2019367	1,48	32725
Ortalama	**2018012**	**1,5**	**32874**
SD	**1538,75**	**0,01**	**92,32**
% RSD	**0,08**	**0,35**	**0,28**

Tablo 3.69. Ara Kesinlik & Doğruluk (LLOQ Seviyesi) Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% LLOQ Numune-1	16382	92,3
	17461	100,0
	17564	100,0
% LLOQ Numune-2	17944	102,6
	18063	103,8
	17951	102,6
% LLOQ Numune-3	17862	102,6
	17244	98,7
	17466	100,0
% LLOQ Numune-4	17831	102,6
	18230	105,1
	18342	105,1
% LLOQ Numune-5	18241	105,1
	18192	103,8
	18500	106,4
Ortalama	**17818**	**102,1**
SD	**536,62**	**3,52**
% RSD	**3,01**	**3,45**

- LLOQ seviyesine ait ara kesinlik & doğruluk sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 102,1 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 3,45 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.70. Ara Kesinlik & Doğruluk (Low QC Seviyesi) Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% Low QC Numune-1	64858	101,4
	66599	105,6
	67166	105,6
% Low QC Numune-2	68479	105,6
	68628	108,8
	68355	105,6
% Low QC Numune-3	70376	110,2
	70312	110,1
	70888	111,1
% Low QC Numune-4	70172	109,9
	69116	108,2
	69879	109,4
% Low QC Numune-5	68748	107,6
	68616	107,4
	68268	106,8
Ortalama	**68697**	**107,6**
SD	**1599,60**	**2,54**
% RSD	**2,33**	**2,37**

- LLOQ seviyesine ait ara kesinlik & doğruluk sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 107,6 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 2,37 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.71. Ara Kesinlik & Doğruluk (MID QC Seviyesi) Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% MID QC Numune-1	994261	100,1
	995718	100,2
	993638	100,0
% MID QC Numune-2	1002212	100,9
	1005441	101,2
	1003191	101,0
% MID QC Numune-3	979178	98,6
	977760	98,4
	981175	98,8
% MID QC Numune-4	993955	100,0
	994995	100,2
	996936	100,3
% MID QC Numune-5	1008627	101,5
	1007330	101,4
	1009753	101,6
Ortalama	**996278**	**100,3**
SD	**10369,72**	**1,04**
% RSD	**1,04**	**1,04**

- MID QC seviyesine ait ara kesinlik & doğruluk sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 100,3 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 1,04 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.72. Ara Kesinlik & Doğruluk (ULOQ Seviyesi) Sonuç Tablosu.

(%) Seviye	Alan	(%) Geri Kazanım
% ULOQ Numune-1	1949452	98,2
	1953842	98,4
	1953876	98,4
% ULOQ Numune-2	1937700	97,6
	1934913	97,5
	1940925	97,8
% ULOQ Numune-3	1997696	100,6
	1995812	100,5
	1998802	100,7
% ULOQ Numune-4	1993186	100,4
	1992209	100,4
	1989062	100,2
% ULOQ Numune-5	2020218	101,8
	2017394	101,6
	2021807	101,9
Ortalama	**1979793**	**99,7**
SD	**31320,44**	**1,58**
% RSD	**1,58**	**1,58**

- ULOQ seviyesine ait ara kesinlik & doğruluk sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 99,7 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 1,58 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.73. LLOQ Seviyesi Karşılaştırma Sonuç Tablosu.

Numune Sayısı	**(%) Geri Kazanım**	**(%) Geri Kazanım**
	Doğruluk & Kesinlik	**Ara Kesinlik & Doğruluk**
Gün-1 Numune-1	88,5	97,4
Gün-1 Numune-2	85,0	103,0
Gün-1 Numune-3	83,3	100,4
Gün-1 Numune-4	94,0	104,3
Gün-1 Numune-5	88,5	105,1
Gün-2 Numune-1	90,2	-
Gün-2 Numune-2	95,3	-
Gün-2 Numune-3	112,0	-
Gün-2 Numune-4	103,4	-
Gün-2 Numune-5	93,2	-
Gün-3 Numune-1	93,3	-
Gün-3 Numune-2	101,8	-
Gün-3 Numune-3	112,4	-
Gün-3 Numune-4	104,0	-
Gün-3 Numune-5	94,4	-
Ortalama	**97,5**	
SD	**8,29**	
% RSD	**8,50**	

- LLOQ seviyesine ait karşılaştırma sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 97,5 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 8,50 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.74. Low QC Seviyesi Karşılaştırma Sonuç Tablosu.

Numune Sayısı	(%) Geri Kazanım	(%) Geri Kazanım
	Doğruluk & Kesinlik	Ara Kesinlik & Doğruluk
Gün-1 Numune-1	98,5	104,2
Gün-1 Numune-2	99,3	106,7
Gün-1 Numune-3	101,2	110,5
Gün-1 Numune-4	99,5	109,2
Gün-1 Numune-5	102,5	107,3
Gün-2 Numune-1	91,6	-
Gün-2 Numune-2	95,5	-
Gün-2 Numune-3	93,2	-
Gün-2 Numune-4	93,4	-
Gün-2 Numune-5	91,6	-
Gün-3 Numune-1	91,9	-
Gün-3 Numune-2	93,7	-
Gün-3 Numune-3	94,4	-
Gün-3 Numune-4	93,1	-
Gün-3 Numune-5	92,6	-
Ortalama	**98,5**	
SD	**6,35**	
% RSD	**6,44**	

- Low QC seviyesine ait karşılaştırma sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 98,5 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 6,44 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.75. MID QC Seviyesi Karşılaştırma Sonuç Tablosu.

Numune Sayısı	**(%) Geri Kazanım**	**(%) Geri Kazanım**
	Doğruluk & Kesinlik	**Ara Kesinlik & Doğruluk**
Gün-1 Numune-1	100,8	100,1
Gün-1 Numune-2	97,3	101,0
Gün-1 Numune-3	91,0	98,6
Gün-1 Numune-4	98,4	100,2
Gün-1 Numune-5	97,4	101,5
Gün-2 Numune-1	103,1	-
Gün-2 Numune-2	103,9	-
Gün-2 Numune-3	101,3	-
Gün-2 Numune-4	101,3	-
Gün-2 Numune-5	101,2	-
Gün-3 Numune-1	103,0	-
Gün-3 Numune-2	103,4	-
Gün-3 Numune-3	101,1	-
Gün-3 Numune-4	101,7	-
Gün-3 Numune-5	101,0	-
Ortalama	**100,4**	
SD	**2,87**	
% RSD	**2,86**	

- MID QC seviyesine ait karşılaştırma sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 100,4 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 2,86 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.76. ULOQ Seviyesi Karşılaştırma Sonuç Tablosu.

Numune Sayısı	**(%) Geri Kazanım**	**(%) Geri Kazanım**
	Doğruluk & Kesinlik	**Ara Kesinlik & Doğruluk**
Gün-1 Numune-1	102,4	98,4
Gün-1 Numune-2	99,2	97,6
Gün-1 Numune-3	101,1	100,6
Gün-1 Numune-4	98,6	100,3
Gün-1 Numune-5	98,6	101,8
Gün-2 Numune-1	102,9	-
Gün-2 Numune-2	102,5	-
Gün-2 Numune-3	100,7	-
Gün-2 Numune-4	102,1	-
Gün-2 Numune-5	101,9	-
Gün-3 Numune-1	102,9	-
Gün-3 Numune-2	103,0	-
Gün-3 Numune-3	100,7	-
Gün-3 Numune-4	101,7	-
Gün-3 Numune-5	101,9	-
Ortalama	**101,0**	
SD	**1,67**	
% RSD	**1,66**	

- ULOQ seviyesine ait karşılaştırma sonuçlarına göre tekli sonuçları limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 101,2 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 1,66 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

3.7. SAĞLAMLIK / DAYANIKLILIK

3.7.1. Akış Hızı Değişikliği

SEC HPLC ve Protein A kromatografisi için akış hızı 0,2 birim farklılık olacak şekilde enjeksiyon verilmiştir.

3.7.2. Kolon Sıcaklık Değişimi

Kolon sıcaklığı her iki metot için aynı olduğu için 23°C, 25°C ve 27°C olacak şekilde enjeksiyon verilmiştir.

3.7.3. Dalga Boyu Değişikliği

Dalga boyu her iki metot için aynı olduğu için 278 nm, 280 nm ve 282 nm olacak şekilde enjeksiyon verilmiştir.

Kabul Kriteri

- Sonuçlar sistem uygunluk kriterlerini sağlamalıdır.
- Sonuçlar limitleri karşılamalıdır.
- % RSD en fazla % 5,0 olmalıdır.
- Ortalamalar arasındaki % bağıl fark ise en fazla % 5,0 olmalıdır.

3.7.4. Akış Hızı Değişimi

SEC HPLC metodu için akış hızı 0,5 ml/dk, 0,3 ml/dk ve 0,7 ml/dk olacak şekilde enjeksiyonlar verilmiştir. Tüm sonuçlar ayrıntılı olarak aşağıdaki tablolarda bulunmaktadır.

Tablo 3.77. SEC HPLC Metot Stabilitesi-1.

Akış Hızı Değişikliği				
0,5 ml/dk				
Numune	**Alan Sonucu**	**Simetri Faktörü**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Başlangıç Sonucu (mg/ml)**
% 100-1	3927241	1,17	6807	1,025
% 100-2	3937421	1,18	6796	1,028
% 100-3	3926282	1,18	6785	1,025
% 100-4	3930358	1,17	6785	1,026
% 100-5	3927299	1,17	6787	1,025
% 100-6	3926263	1,18	6807	1,025
Ortalama	**3929144**	**1,2**	**6795**	**1,0**
SD	**4324,33**	**0,01**	**10,50**	**0,00**
% RSD	**0,11**	**0,47**	**0,15**	**0,12**

- Akış hızı 0,5 ml/dk için aslında metodun normal akış hızıdır. Aynı analizde diğer akış hızları da çalışılmış olduğu için sonuçları kıyas etmek adına metodun ilk koşulu uygulanmıştır. Başlangıç miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,12 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.78. SEC HPLC Metot Stabilitesi-2.

Akış Hızı Değişikliği								
0,3 ml/dk					**0,7 ml/dk**			
Numune	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**
% 100-1	6659392	9645	1,18	1,004	2802280	5355	1,16	0,998
% 100-2	6588854	9655	1,18	0,993	2807629	5382	1,15	0,999
% 100-3	6630444	9653	1,18	1,000	2820282	5352	1,15	1,004
% 100-4	6645007	9674	1,18	1,002	2807922	5365	1,15	1,000
% 100-5	6624857	9681	1,18	0,999	2807990	5358	1,15	1,000
% 100-6	6643255	9698	1,18	1,002	2809182	5356	1,15	1,000
Ortalama	**6631968**	**9668**	**1,2**	**1,0**	**2809214**	**5361**	**1,2**	**1,0**
SD	**24335,96**	**20,14**	**0,00**	**0,00**	**5937,37**	**11,02**	**0,00**	**0,00**
% RSD	**0,37**	**0,21**	**0,00**	**0,37**	**0,21**	**0,21**	**0,35**	**0,21**

- Akış hızları 0,3 ve 0,7 ml/dk için çalışılmıştır. 0,3 ml/dk akış hızında miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,37 olarak tespit edilmiştir. 0,7 ml/dk akış hızında ise miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,21 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.79. SEC HPLC Metot Stabilitesi-3.

Akış Hızı Değişikliği				
0,5 ml/dk				
Numune	**Başlangıç Alan**	**Simetri Faktörü**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Başlangıç Sonucu (mg/ml)**
Numune-1	3929785	1,17	6808	1,026
Numune-2	3938402	1,17	6812	1,028
Numune-3	3936096	1,17	6809	1,028
Ortalama	**3934761**	**1,2**	**6810**	**1,0**
SD	**4460,92**	**0,00**	**2,08**	**0,00**
% RSD	**0,11**	**0,00**	**0,03**	**0,11**

- Akış hızı 0,5 ml/dk için aslında metodun normal akış hızıdır. Aynı analizde diğer akış hızları da çalışılmış olduğu için sonuçları kıyas etmek adına metodun ilk koşulu uygulanmıştır. Başlangıç miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,11 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.80. SEC HPLC Metot Stabilitesi-4.

Akış Hızı Değişikliği					
0,3 ml/dk					
Numune	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**	**% Değişim**
Numune-1	6668318	9698	1,18	1,01	1,58
Numune-2	6655598	9696	1,18	1,00	2,80
Numune-3	6677072	9682	1,18	1,01	1,78
Ortalama	**6666996**	**9692**	**1,2**	**1,0**	**2,1**
SD	**10797,87**	**8,72**	**0,00**	**0,01**	**-**
% RSD	**0,16**	**0,09**	**0,00**	**0,57**	**-**

- Akış hızı 0,3 için çalışılmıştır. 0,3 ml/dk akış hızında miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,57 olarak tespit edilmiştir. Kabul kriterine göre % RSD en fazla % 5,0 olmalıdır. % Değişimi ise ilk sonuca göre hesap edilmiş olup sonucu % 2,1 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.81. SEC HPLC Metot Stabilitesi-5.

Akış Hızı Değişikliği					
0,7 ml/dk					
Numune	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**	**% Değişim**
Numune-1	2831583	5356	1,15	1,01	1,58
Numune-2	2813262	5349	1,15	1,00	2,80
Numune-3	2817361	5343	1,15	1,00	2,80
Ortalama	**2820735**	**5349**	**1,15**	**1,0**	**2,4**
SD	**9615,32**	**6,51**	**0,00**	**0,01**	**-**
% RSD	**0,34**	**0,12**	**0,00**	**0,58**	**-**

- Akış hızı 0,7 için çalışılmıştır. 0,7 ml/dk akış hızında miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,58 olarak tespit edilmiştir. Kabul kriterine göre % RSD en fazla % 5,0 olmalıdır. % Değişimi ise ilk sonuca göre hesap edilmiş olup sonucu % 2,4 olarak tespit edilmiştir.

Protein A kromatografisi metodu için akış hızı 0,8 ml/dk, 1,0 ml/dk ve 1,2 ml/dk olacak şekilde enjeksiyonlar verilmiştir. Tüm sonuçlar ayrıntılı olarak aşağıdaki tablolarda bulunmaktadır.

Tablo 3.82. Protein A Kromatografisi Metot Stabilitesi-1.

Akış Hızı Değişikliği				
1,0 ml/dk				
Numune	**Başlangıç Alan**	**Simetri Faktörü**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Başlangıç Sonucu (mg/ml)**
% 100-1	2014115	1,5	22278	1,034
% 100-2	2018023	1,5	22488	1,036
% 100-3	2017550	1,5	22370	1,036
% 100-4	2010905	1,5	22491	1,032
% 100-5	2017439	1,5	22315	1,035
% 100-6	2021936	1,5	22171	1,038
Ortalama	**2016661**	**1,50**	**22352**	**1,04**
SD	**3760,05**	**0,00**	**124,70**	**0,00**
% RSD	**0,19**	**0,00**	**0,56**	**0,20**

- Akış hızı 1,0 ml/dk için aslında metodun normal akış hızıdır. Aynı analizde diğer akış hızları da çalışılmış olduğu için sonuçları kıyas etmek adına metodun ilk koşulu uygulanmıştır. Başlangıç miktar tayini sonuç ortalaması 1,04 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,20 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.83. Protein A Kromatografisi Metot Stabilitesi-2.

Akış Hızı Değişikliği								
0,8 ml/dk					**1,2 ml/dk**			
Numune	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**
% 100-1	2536583	20066	1,53	1,000	1684201	1,74	22708	0,992
% 100-2	2539181	19891	1,53	1,001	1693691	1,74	22996	0,997
% 100-3	2526854	19987	1,53	0,996	1705289	1,74	22750	1,004
% 100-4	2541933	19758	1,53	1,002	1706367	1,74	22562	1,005
% 100-5	2533696	19847	1,53	0,999	1696091	1,74	22884	0,999
% 100-6	2543549	20005	1,53	1,003	1702586	1,73	22833	1,003
Ortalama	**2536966**	**19926**	**1,53**	**1,00**	**1698038**	**1,74**	**22789**	**1,00**
SD	**6099,27**	**114,24**	**0,00**	**0,00**	**8447,29**	**0,00**	**150,61**	**0,00**
% RSD	**0,24**	**0,57**	**0,00**	**0,24**	**0,50**	**0,23**	**0,66**	**0,50**

- Akış hızları 0,8 ve 1,2 ml/dk için çalışılmıştır. 0,8 ml/dk akış hızında miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,24 olarak tespit edilmiştir. 1,2 ml/dk akış hızında ise miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,50 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.84. Protein A Kromatografisi Metot Stabilitesi-3.

Akış Hızı Değişikliği				
1,0 ml/dk				
Numune	**Başlangıç Alan**	**Simetri Faktörü**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Başlangıç Sonucu (mg/ml)**
Numune-1	1999214	1,5	22392	1,026
Numune-2	2005771	1,5	22321	1,029
Numune-3	2006159	1,5	22441	1,030
Ortalama	**2003715**	**1,5**	**22385**	**1,03**
SD	**3902,52**	**0,00**	**60,34**	**0,00**
% RSD	**0,19**	**0,00**	**0,27**	**0,20**

- Akış hızı 1,0 ml/dk için aslında metodun normal akış hızıdır. Aynı analizde diğer akış hızları da çalışılmış olduğu için sonuçları kıyas etmek adına metodun ilk koşulu uygulanmıştır. Başlangıç miktar tayini sonuç ortalaması 1,03 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,20 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.85. Protein A Kromatografisi Metot Stabilitesi-4.

Akış Hızı Değişikliği					
0,8 ml/dk					
Numune	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**	**% Değişim**
Numune-1	2510830	19735	1,52	0,99	-3,67
Numune-2	2525501	19750	1,53	1,00	-3,37
Numune-3	2526235	19669	1,52	1,00	-3,44
Ortalama	**2520855**	**19718**	**1,52**	**0,99**	**-3,49**
SD	**8689,95**	**43,09**	**0,01**	**0,00**	**-**
% RSD	**0,34**	**0,22**	**0,38**	**0,34**	**-**

- Akış hızı 0,8 ml/dk için çalışılmıştır. 0,8 ml/dk akış hızında miktar tayini sonuç ortalaması 0,99 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,34 olarak tespit edilmiştir.
- Kabul kriterine göre % RSD en fazla % 5,0 olmalıdır. % Değişimi ise ilk sonuca göre hesap edilmiş olup sonucu % 3,49 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.86. Protein A Kromatografisi Metot Stabilitesi-5.

Akış Hızı Değişikliği					
1,2 ml/dk					
Numune	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**	**% Değişim**
Numune-1	1701180	1,74	22680	1,00	-2,41
Numune-2	1696186	1,73	22704	1,00	-3,01
Numune-3	1698741	1,73	22592	1,00	-2,96
Ortalama	**1698702**	**1,73**	**22659**	**1,00**	**-2,79**
SD	**2497,22**	**0,01**	**58,97**	**0,00**	**-**
% RSD	**0,15**	**0,33**	**0,26**	**0,15**	**-**

- Akış hızı 1,2 için çalışılmıştır. 0,8 ml/dk akış hızında miktar tayini sonuç ortalaması 0,99 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,34 olarak tespit edilmiştir.
- Kabul kriterine göre % RSD en fazla % 5,0 olmalıdır. % Değişimi ise ilk sonuca göre hesap edilmiş olup sonucu % 3,49 olarak tespit edilmiştir.

3.7.5. Kolon Sıcaklığı Değişimi

SEC HPLC metodu için; kolon sıcaklığı 23°C, 25°C ve 27°C olacak şekilde enjeksiyon verilmiştir. Tüm sonuçlar ayrıntılı olarak aşağıdaki tablolarda bulunmaktadır.

Tablo 3.87. SEC HPLC Metot Stabilitesi -Kolon Sıcaklığı Değişimi Sonuçları.

Kolon Sıcaklığı Değişimi				
25°C				
Numune	**Başlangıç Alan**	**Simetri Faktörü**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Başlangıç Sonucu (mg/ml)**
% 100-1	3927241	1,17	6807	1,025
% 100-2	3937421	1,18	6796	1,028
% 100-3	3926282	1,18	6785	1,025
% 100-4	3930358	1,17	6785	1,026
% 100-5	3927299	1,17	6787	1,025
% 100-6	3926263	1,18	6807	1,025
Ortalama	**3929144**	**1,2**	**6795**	**1,0**
SD	**4324,33**	**0,01**	**10,50**	**0,00**
% RSD	**0,11**	**0,47**	**0,15**	**0,12**

- Kolon sıcaklığı 25°C için aslında metodun normal kolon sıcaklığıdır. Aynı analizde diğer kolon sıcaklıkları da çalışılmış olduğu için sonuçları kıyas etmek adına metodun ilk koşulu uygulanmıştır. Başlangıç miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,12 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.88. SEC HPLC Metot Stabilitesi -Kolon Sıcaklığı Değişimi Sonuçları.

Kolon Sıcaklığı Değişimi								
23°C					**27°C**			
Numune	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**
% 100-1	3930498	6523	1,17	0,999	3944627	7045	1,17	1,001
% 100-2	3927181	6524	1,17	0,998	3944906	7049	1,18	1,001
% 100-3	3931070	6529	1,17	0,999	3936436	7045	1,18	0,999
% 100-4	3941061	6521	1,17	1,001	3934737	7029	1,18	0,999
% 100-5	3946966	6528	1,17	1,003	3944488	7035	1,17	1,001
% 100-6	3937230	6523	1,17	1,000	3935846	7050	1,17	0,999
Ortalama	**3935668**	**6525**	**1,2**	**1,0**	**3940173**	**7042**	**1,2**	**1,0**
SD	**7470,86**	**3,14**	**0,00**	**0,00**	**4961,79**	**8,35**	**0,01**	**0,00**
% RSD	**0,19**	**0,05**	**0,00**	**0,19**	**0,13**	**0,12**	**0,47**	**0,13**

- Kolon sıcaklığı 23 ve 27°C için çalışılmıştır. 23°C kolon sıcaklığı uygulandığında miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,19 olarak tespit edilmiştir. 27°C kolon sıcaklığı uygulandığında ise miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,13 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.89. SEC HPLC Metot Stabilitesi -Kolon Sıcaklığı Değişimi Sonuçları.

Kolon Sıcaklığı Değişimi				
25°C				
Numune	**Başlangıç Alan**	**Simetri Faktörü**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Başlangıç Sonucu (mg/ml)**
Numune-1	3929785	1,17	6808	1,026
Numune-2	3938402	1,17	6812	1,028
Numune-3	3936096	1,17	6809	1,028
Ortalama	**3934761**	**1,2**	**6810**	**1,0**
SD	**4460,92**	**0,00**	**2,08**	**0,00**
% RSD	**0,11**	**0,00**	**0,03**	**0,11**

- Kolon sıcaklığı 25°C için aslında metodun normal sıcaklığıdır. Aynı analizde diğer kolon sıcaklıkları da çalışılmış olduğu için sonuçları kıyas etmek adına metodun ilk koşulu uygulanmıştır. Başlangıç miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,11 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.90. SEC HPLC Metot Stabilitesi -Kolon Sıcaklığı Değişimi Sonuçları.

Kolon Sıcaklığı Değişimi					
23°C					
Numune	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**	**% Değişim**
Numune-1	3988364	6536	1,17	1,01	1,58
Numune-2	4023126	6514	1,18	1,02	0,78
Numune-3	3981698	6528	1,18	1,01	1,78
Ortalama	**3997729**	**6526**	**1,2**	**1,0**	**1,4**
SD	**22245,27**	**11,14**	**0,01**	**0,01**	**-**
% RSD	**0,56**	**0,17**	**0,49**	**0,57**	**-**

- Kolon sıcaklığı 23°C için çalışılmıştır. 23°C kolon sıcaklığı uygulandığında miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,57 olarak tespit edilmiştir.
- Kabul kriterine göre % RSD en fazla % 5,0 olmalıdır. % Değişimi ise ilk sonuca göre hesap edilmiş olup sonucu % 1,4 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.91. SEC HPLC Metot Stabilitesi -Kolon Sıcaklığı Değişimi Sonuçları.

Kolon Sıcaklığı Değişimi					
27°C					
Numune	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**	**% Değişim**
Numune-1	3906121	7048	1,17	0,99	3,64
Numune-2	3898762	7046	1,17	0,99	3,84
Numune-3	3895656	7043	1,18	0,99	3,84
Ortalama	**3900180**	**7046**	**1,8**	**1,0**	**3,8**
SD	**5374,61**	**2,52**	**0,01**	**0,00**	**-**
% RSD	**0,14**	**0,04**	**0,49**	**0,00**	**-**

- Kolon sıcaklığı 27°C için çalışılmıştır. 27°C kolon sıcaklığı uygulandığında miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuştur.
- Kabul kriterine göre % RSD en fazla % 5,0 olmalıdır. % Değişimi ise ilk sonuca göre hesap edilmiş olup sonucu % 3,8 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.92. Protein A Kromatografisi -Kolon Sıcaklığı Değişimi Sonuçları.

Kolon Sıcaklığı Değişimi				
25°C				
Numune	**Başlangıç Alan**	**Simetri Faktörü**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Başlangıç Sonucu (mg/ml)**
% 100-1	2014115	1,5	22278	1,034
% 100-2	2018023	1,5	22488	1,036
% 100-3	2017550	1,5	22370	1,036
% 100-4	2010905	1,5	22491	1,032
% 100-5	2017439	1,5	22315	1,035
% 100-6	2021936	1,5	22171	1,038
Ortalama	**2016661**	**1,50**	**22352**	**1,04**
SD	**3760,05**	**0,00**	**124,70**	**0,00**
% RSD	**0,19**	**0,00**	**0,56**	**0,20**

- Kolon sıcaklığı 25°C için aslında metodun normal kolon sıcaklığıdır. Aynı analizde diğer kolon sıcaklıkları da çalışılmış olduğu için sonuçları kıyas etmek adına metodun ilk koşulu uygulanmıştır. Başlangıç miktar tayini sonuç ortalaması 1,04 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,20 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.93. Protein A Kromatografisi Metot Stabilitesi -Kolon Sıcaklığı Değişimi Sonuçları.

Kolon Sıcaklığı Değişimi								
	23°C				**27°C**			
Numune	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**
% 100-1	1996978	23278	1,63	0,994	1997892	1,56	23437	0,996
% 100-2	2004206	23321	1,64	0,997	2014705	1,56	23504	1,004
% 100-3	2014455	23020	1,63	1,002	2003619	1,56	23469	0,999
% 100-4	2012170	23166	1,64	1,001	2004033	1,57	23276	0,999
% 100-5	2012964	22978	1,64	1,002	2007511	1,57	23279	1,001
% 100-6	2017869	23057	1,63	1,004	2007431	1,56	23118	1,001
Ortalama	**2009774**	**23137**	**1,64**	**1,0**	**2005865**	**1,56**	**23347**	**1,0**
SD	**7721,37**	**141,38**	**0,01**	**0,00**	**5572,73**	**0,01**	**148,15**	**0,00**
% RSD	**0,38**	**0,61**	**0,33**	**0,38**	**0,28**	**0,33**	**0,63**	**0,28**

- Kolon sıcaklığı 23 ve 27°C için çalışılmıştır. 23°C kolon sıcaklığı uygulandığında miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,38 olarak tespit edilmiştir. 27°C kolon sıcaklığı uygulandığında ise miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,28 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.94. Protein A Kromatografisi Metot Stabilitesi -Kolon Sıcaklığı Değişimi Sonuçları.

Kolon Sıcaklığı Değişimi				
25°C				
Numune	**Başlangıç Alan**	**Simetri Faktörü**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Başlangıç Sonucu (mg/ml)**
Numune-1	1999214	1,5	22392	1,026
Numune-2	2005771	1,5	22321	1,029
Numune-3	2006159	1,5	22441	1,030
Ortalama	**2003715**	**1,5**	**22385**	**1,03**
SD	**3902,52**	**0,00**	**60,34**	**0,00**
% RSD	**0,19**	**0,00**	**0,27**	**0,20**

- Kolon sıcaklığı 25°C için aslında metodun normal sıcaklığıdır. Aynı analizde diğer kolon sıcaklıkları da çalışılmış olduğu için sonuçları kıyas etmek adına metodun ilk koşulu uygulanmıştır. Başlangıç miktar tayini sonuç ortalaması 1,03 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,20 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.95. Protein A Kromatografisi Metot Stabilitesi -Kolon Sıcaklığı Değişimi Sonuçları.

Kolon Sıcaklığı Değişimi					
23°C					
Numune	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**	**% Değişim**
Numune-1	2007506	23202	1,63	1,00	-2,60
Numune-2	2002643	23124	1,63	1,00	-2,90
Numune-3	2007408	23132	1,63	1,00	-3,00
Ortalama	**2005852**	**23153**	**1,6**	**1,0**	**-2,83**
SD	**2779,80**	**42,91**	**0,00**	**0,00**	**-**
% RSD	**0,14**	**0,19**	**0,00**	**0,14**	**-**

- Kolon sıcaklığı 23°C için çalışılmıştır. 23°C kolon sıcaklığı uygulandığında miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,14 olarak tespit edilmiştir.
- Kabul kriterine göre % RSD en fazla % 5,0 olmalıdır. % Değişimi ise ilk sonuca göre hesap edilmiş olup sonucu % 2,83 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.96. Protein A Kromatografisi Metot Stabilitesi -Kolon Sıcaklığı Değişimi Sonuçları.

Kolon Sıcaklığı Değişimi					
27°C					
Numune	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**	**% Değişim**
Numune-1	2000231	1,56	23233	1,00	-2,60
Numune-2	1992239	1,55	23344	0,99	-3,94
Numune-3	1990906	1,55	23236	0,99	-4,04
Ortalama	**1994459**	**1,55**	**23271**	**1,0**	**-3,5**
SD	**5043,22**	**0,01**	**63,24**	**0,00**	**-**
% RSD	**0,25**	**0,37**	**0,27**	**0,25**	**-**

- Kolon sıcaklığı 27°C için çalışılmıştır. 27°C kolon sıcaklığı uygulandığında miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,25 olarak tespit edilmiştir.
- Kabul kriterine göre % RSD en fazla % 5,0 olmalıdır. % Değişimi ise ilk sonuca göre hesap edilmiş olup sonucu % 3,5 olarak tespit edilmiştir.

3.7.6. Dalga Boyu Değişimi

Dalga boyu 278 nm, 280 nm ve 282 nm olacak şekilde enjeksiyon verilmiştir. Tüm sonuçlar ayrıntılı olarak aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Tablo 3.97. SEC HPLC Metot Stabilitesi -Dalga Boyu Değişimi Sonuçları.

Dalga Boyu Değişimi				
280 nm				
Numune	**Başlangıç Alan**	**Simetri Faktörü**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Başlangıç Sonucu (mg/ml)**
% 100-1	3927241	1,17	6807	1,025
% 100-2	3937421	1,18	6796	1,028
% 100-3	3926282	1,18	6785	1,025
% 100-4	3930358	1,17	6785	1,026
% 100-5	3927299	1,17	6787	1,025
% 100-6	3926263	1,18	6807	1,025
Ortalama	**3929144**	**1,2**	**6795**	**1,0**
SD	**4324,33**	**0,01**	**10,50**	**0,00**
% RSD	**0,11**	**0,47**	**0,15**	**0,12**

- Dalga Boyu 280 nm için aslında metodun normal dalga boyudur. Aynı analizde diğer dalga boyları da çalışılmış olduğu için sonuçları kıyas etmek adına metodun ilk koşulu uygulanmıştır. Başlangıç miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,12 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.98. SEC HPLC Metot Stabilitesi -Dalga Boyu Değişimi Sonuçları.

Dalga Boyu Değişimi								
	278 nm				**282 nm**			
Numune	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**
% 100-1	3938325	6775	1,18	1,002	3874037	6775	1,18	1,002
% 100-2	3933975	6770	1,18	1,001	3872581	6767	1,18	1,002
% 100-3	3925002	6777	1,18	0,999	3861314	6776	1,17	0,999
% 100-4	3930010	6782	1,17	1,000	3866485	6780	1,18	1,000
% 100-5	3921988	6781	1,17	0,998	3857516	6781	1,17	0,998
% 100-6	3932793	6768	1,18	1,001	3867049	6769	1,18	1,000
Ortalama	**3930349**	**6776**	**1,2**	**1,0**	**3866497**	**6775**	**1,2**	**1,0**
SD	**6022,45**	**5,68**	**0,01**	**0,00**	**6351,27**	**5,68**	**0,01**	**0,00**
% RSD	**0,15**	**0,08**	**0,44**	**0,15**	**0,16**	**0,08**	**0,44**	**0,16**

- Dalga boyu 278 ve 282 nm için çalışılmıştır. 278 nm dalga boyu uygulandığında miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,15 olarak tespit edilmiştir. 282 nm dalga boyu uygulandığında ise miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,16 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.99. SEC HPLC Metot Stabilitesi -Dalga Boyu Değişimi Sonuçları.

Dalga Boyu Değişimi				
280 nm				
Numune	**Başlangıç Alan**	**Simetri Faktörü**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Başlangıç Sonucu (mg/ml)**
Numune-1	3929785	1,17	6808	1,026
Numune-2	3938402	1,17	6812	1,028
Numune-3	3936096	1,17	6809	1,028
Ortalama	**3934761**	**1,2**	**6810**	**1,0**
SD	**4460,92**	**0,00**	**2,08**	**0,00**
% RSD	**0,11**	**0,00**	**0,03**	**0,11**

- Dalga Boyu 280 nm için aslında metodun normal dalga boyudur. Aynı analizde diğer dalga boyları da çalışılmış olduğu için sonuçları kıyas etmek adına metodun ilk koşulu uygulanmıştır. Başlangıç miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,11 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.100. SEC HPLC Metot Stabilitesi-Dalga Boyu Değişimi Sonuçları.

Dalga Boyu Değişimi					
278 nm					
Numune	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**	**% Değişim**
Numune-1	3906090	6783	1,17	0,99	3,64
Numune-2	3899117	6781	1,18	0,99	3,84
Numune-3	3891183	6786	1,18	0,99	3,84
Ortalama	**3898797**	**6783**	**1,2**	**1,0**	**3,8**
SD	**7458,66**	**2,52**	**0,01**	**0,00**	**-**
% RSD	**0,19**	**0,04**	**0,49**	**0,00**	**-**

- Dalga boyu 278 nm için çalışılmıştır. 278 nm dalga boyu uygulandığında miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuştur.
- Kabul kriterine göre % RSD en fazla % 5,0 olmalıdır. % Değişimi ise ilk sonuca göre hesap edilmiş olup sonucu % 3,8 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.101. SEC HPLC Metot Stabilitesi -Dalga Boyu Değişimi Sonuçları.

Dalga Boyu Değişimi					
282 nm					
Numune	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**	**% Değişim**
Numune-1	3842658	6781	1,17	0,99	3,64
Numune-2	3835435	6779	1,18	0,99	3,84
Numune-3	3830329	6784	1,18	0,99	3,84
Ortalama	**3836141**	**6781**	**1,2**	**1,0**	**3,8**
SD	**6194,72**	**2,52**	**0,01**	**0,00**	**-**
% RSD	**0,16**	**0,04**	**0,49**	**0,00**	**-**

- Dalga boyu 282 nm için çalışılmıştır. 282 nm dalga boyu uygulandığında miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuştur.
- Kabul kriterine göre % RSD en fazla % 5,0 olmalıdır. % Değişimi ise ilk sonuca göre hesap edilmiş olup sonucu % 3,8 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.102. Protein A Kromatografisi Metot Stabilitesi- Dalga Boyu Değişimi Sonuçları.

Dalga Boyu Değişimi				
280 nm				
Numune	**Başlangıç Alan**	**Simetri Faktörü**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Başlangıç Sonucu (mg/ml)**
% 100-1	2014115	1,5	22278	1,034
% 100-2	2018023	1,5	22488	1,036
% 100-3	2017550	1,5	22370	1,036
% 100-4	2010905	1,5	22491	1,032
% 100-5	2017439	1,5	22315	1,035
% 100-6	2021936	1,5	22171	1,038
Ortalama	**2016661**	**1,50**	**22352**	**1,04**
SD	**3760,05**	**0,00**	**124,70**	**0,00**
% RSD	**0,19**	**0,00**	**0,56**	**0,20**

- Dalga Boyu 280 nm için aslında metodun normal dalga boyudur. Aynı analizde diğer dalga boyları da çalışılmış olduğu için sonuçları kıyas etmek adına metodun ilk koşulu uygulanmıştır. Başlangıç miktar tayini sonuç ortalaması 1,04 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,20 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.103. Protein A Kromatografisi Metot Stabilitesi -Dalga Boyu Değişimi Sonuçları

Dalga Boyu Değişimi								
	278 nm				**282 nm**			
Numune	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**
% 100-1	1984896	22330	1,50	0,996	2017276	1,50	22293	0,998
% 100-2	1993314	22475	1,50	1,000	2023555	1,50	22440	1,001
% 100-3	1990296	22380	1,50	0,999	2019415	1,50	22343	0,999
% 100-4	2000854	22277	1,50	1,004	2024676	1,50	22250	1,002
% 100-5	1993583	22488	1,50	1,000	2019608	1,50	22450	1,000
% 100-6	1995647	22400	1,18	1,001	2018987	1,50	22372	0,999
Ortalama	**1993098**	**22392**	**1,45**	**1,0**	**2020586**	**1,50**	**22358**	**1,0**
SD	**5330,27**	**81,71**	**0,13**	**0,00**	**2876,93**	**0,00**	**79,37**	**0,00**
% RSD	**0,27**	**0,36**	**9,03**	**0,27**	**0,14**	**0,00**	**0,35**	**0,14**

- Dalga boyu 278 ve 282 nm için çalışılmıştır. 278 nm dalga boyu uygulandığında miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,27 olarak tespit edilmiştir. 282 nm dalga boyu uygulandığında ise miktar tayini sonuç ortalaması 1,0 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,14 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.104. Protein A Kromatografisi -Dalga Boyu Değişimi Sonuçları.

Dalga Boyu Değişimi				
280 nm				
Numune	**Başlangıç Alan**	**Simetri Faktörü**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Başlangıç Sonucu (mg/ml)**
Numune-1	1999214	1,5	22392	1,026
Numune-2	2005771	1,5	22321	1,029
Numune-3	2006159	1,5	22441	1,030
Ortalama	**2003715**	**1,5**	**22385**	**1,03**
SD	**3902,52**	**0,00**	**60,34**	**0,00**
% RSD	**0,19**	**0,00**	**0,27**	**0,20**

- Dalga Boyu 280 nm için aslında metodun normal dalga boyudur. Aynı analizde diğer dalga boyları da çalışılmış olduğu için sonuçları kıyas etmek adına metodun ilk koşulu uygulanmıştır. Başlangıç miktar tayini sonuç ortalaması 1,03 mg/ml olarak bulunmuş ve % RSD sonucu da % 0,20 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.105. Protein A Kromatografisi Metot Stabilitesi -Dalga Boyu Değişimi Sonuçları.

Dalga Boyu Değişimi					
278 nm					
Numune	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**	**% Değişim**
Numune-1	1977248	22252	1,50	0,99	-3,64
Numune-2	1974695	22532	1,50	0,99	-3,94
Numune-3	1979587	22487	1,50	0,99	-4,04
Ortalama	**1977177**	**22424**	**1,50**	**0,99**	**-3,87**
SD	**2446,78**	**150,36**	**0,00**	**0,00**	**-**
% RSD	**0,12**	**0,67**	**0,00**	**0,00**	**-**

- Dalga boyu 278 nm için çalışılmıştır. 278 nm dalga boyu uygulandığında miktar tayini sonuç ortalaması 0,99 mg/ml olarak bulunmuştur.
- Kabul kriterine göre % RSD en fazla % 5,0 olmalıdır. % Değişimi ise ilk sonuca göre hesap edilmiş olup sonucu % 3,87 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.106. Protein A Kromatografisi -Dalga Boyu Değişimi Sonuçları.

Dalga Boyu Değişimi					
282 nm					
Numune	**Alan**	**Teorik Plaka Sayısı**	**Simetri Faktörü**	**Sonuç (mg/ml)**	**% Değişim**
Numune-1	2000761	1,50	22220	0,99	-3,64
Numune-2	2004591	1,50	22495	0,99	-3,94
Numune-3	2006586	1,50	22456	0,99	-4,04
Ortalama	**2003979**	**1,50**	**22390**	**0,99**	**-3,87**
SD	**2960,28**	**0,00**	**148,80**	**0,00**	**-**
% RSD	**0,15**	**0,00**	**0,66**	**0,00**	**-**

- Dalga boyu 282 nm için çalışılmıştır. 282 nm dalga boyu uygulandığında miktar tayini sonuç ortalaması 0,99 mg/ml olarak bulunmuştur.
- Kabul kriterine göre % RSD en fazla % 5,0 olmalıdır. % Değişimi ise ilk sonuca göre hesap edilmiş olup sonucu % 3,87 olarak tespit edilmiştir.

3.8. SOLÜSYON STABİLİTESİ

SEC HPLC metodu için 96 saat boyunca 5°C sıcaklıkta bekletilip 0-6-12-18-24-36-48-72-96 saat sürelerinde referans numune çözeltisi çalışma konsantrasyonundan üç enjeksiyon verilerek analiz edilmiştir. Protein A kromatografisi metodu için 72 saat boyunca 5°C sıcaklıkta bekletilip 0-6-12-18-24-36-48-72 saat sürelerinde referans numune çözeltisi çalışma konsantrasyonundan üç enjeksiyon verilerek analiz edilmiştir.

Hem SEC HPLC hem de Protein A kromatografisi metotları için numune hazırlığı ortaktır. Ayrıca numune (autosampler) sıcaklığı 5°C sıcaklık olduğu için çözelti stabilitesi 5°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Analizde ana pik alan sonuçları üzerinden % değişim sonuçları hesaplanmıştır. Tüm sonuçlar aşağıdaki tablolarda detaylı bir şekilde verilmiştir.

Kabul Kriteri

- Numune çözeltisi için % değişim en fazla % 5,0 olmalıdır.

Tablo 3.107. SEC HPLC Metodu Numune Çözeltisi Stabilite Sonuçları (5°C).

5°C		**Sonuç**
		Numune
Başlangıç	**Alan**	3778521
6.Saat	Alan	3769991
	% Değişim	**0,23**
12.Saat	Alan	3753603
	% Değişim	**0,66**
24.Saat	Alan	3791172
	% Değişim	**0,33**
36.Saat	Alan	3795278
	% Değişim	**0,44**
48.Saat	Alan	3773691
	% Değişim	**0,13**
72.Saat	Alan	3812112
	% Değişim	**0,88**
98.Saat	Alan	3824590
	% Değişim	**1,20**

Tablo 3.108. Protein A Kromatografisi Numune Çözeltisi Stabilite Sonuçları (5°C).

5°C		**Sonuç**
Başlangıç	**Alan**	1989521
6.Saat	Alan	1991514
	% Değişim	**0,10**
12.Saat	Alan	1999990
	% Değişim	**0,52**
24.Saat	Alan	2007586
	% Değişim	**0,90**
48.Saat	Alan	2009075
	% Değişim	**0,97**
72.Saat	Alan	2018268
	% Değişim	**1,42**

Sonuçların Değerlendirilmesi

Elde edilen sonuçlara göre çözelti stabilitesinin 5°C sıcaklıkta, SEC HPLC metodu için 98 saat, protein A kromatografisi için ise 72 saat stabil olduğu kanıtlanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Analitik Metot Validasyonu Doğrusallık, Aralık ve Doğruluk & Kesinlik parametrelerinin Üç Gün Analizi Ortalama Sonuçları

ICH M10 kılavuzuna uygun bir şekilde analitik metot validasyonu analizleri gerçekleştirilmiş olup kılavuzda belirtilen kabul kriterlerine uygun olarak istatistiksel analizleri gerçekleştirilmiştir. Üç gün analizi gerçekleştirilen doğrusallık çalışmasının her seviyeye ait 18 enjeksiyon içeren datalarının prosesi gerçekleştirilmiş sonuç ve regresyon analizi tabloları aşağıdaki gibidir.

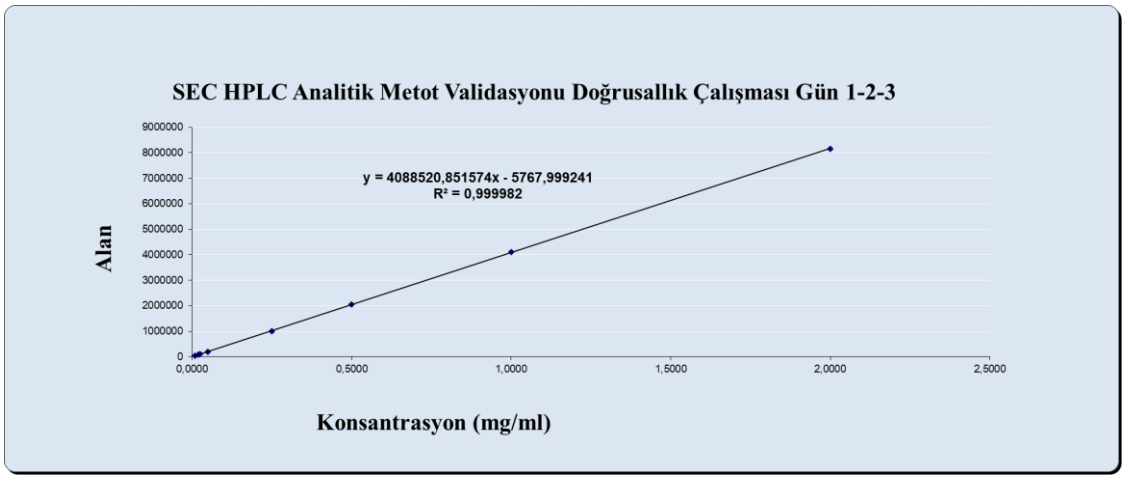
Tablo 4.1. SEC HPLC Doğrusallık Ortalama Sonuçları.

Referans numune Derişim Seviyesi (%)	**Derişim (mg/ml) (x)**	**Ortalama Alan (y)**	**Hesaplanan Alan (y_{cal})**	**Fark ($y-y_{cal}$)**	**Farkların Karesi $(y-y_{cal})^2$**
200	2.0	8158278	8171274	12995	168881100.28
100	1.0	4110219	4082753	-27466	754361801.77
50	0.5	2040985	2038492	-2493	6214030.28
25	0.25	1006824	1016362	9539	90987058.14
5	0.05	193846	198658	4812	23152553.16
2.5	0.025	92783	96445	3662	13412846.94
2.0	0.020	74516	76002	1487	2210594.10
1.0	0.010	37654	35117	-2537	6434179.77
				RSS	1065654164

***Hesaplanan Alan:** Konsantrasyon değerlerinin doğru formülünde ($y = mx \pm n$) "x" yerine konulması ile hesaplanan alan değerleridir.

Tablo 4.2. SEC HPLC Doğrusallık Ortalama Regresyon Analizi Sonuçları.

ÖZET ÇIKIŞI						
Regresyon İstatistikleri						
Çoklu R	**0,999990784**					
R Kare	**0,999981567**					
Ayarlı R Kare	0,999978495					
Standart Hata	**13327,00369**					
Gözlem	**8**					
ANOVA						
	df	*SS*	*MS*	*F*	*Anlamlılık F*	
Regresyon	1	5,78122E+13	5,78122E+13	325502,8426	1,95712E-15	
Fark	6	1065654164	177609027,4			
Toplam	7	5,78133E+13				
	Katsayılar	*Standart Hata*	*t Stat*	*P-değeri*	*Düşük %95*	*Yüksek %95*
Kesişim	**-5767,999241**	5841,729226	-0,98737874	0,361585945	**-20062,19571**	**8526,197232**
X Değişkeni 1	**4088520,852**	7166,198343	570,5285642	1,95712E-15	4070985,796	4106055,907
FARK ÇIKIŞI						
Gözlem	*Öngörülen Y*	*Farklar*				
1	8171273,704	-12995,42613				
2	4082752,852	27465,64767				
3	2038492,427	2492,795676				
4	1016362,214	-9538,713652				
5	198658,0433	-4811,710004				
6	96445,02205	-3662,355381				
7	76002,41779	-1486,806679				
8	35117,20927	2536,568503				



Şekil 4.1. SEC HPLC Doğrusallık Gün-1-2-3 Grafiği

Sonuçların Değerlendirilmesi; Elde edilen sonuçlar ICH M10 kılavuzunda belirlenen kabul kriterlerine uygundur, sonuç olarak bu derişim aralığında derişime bağlı alan değişiminin doğrusal olduğu kanıtlanmıştır.

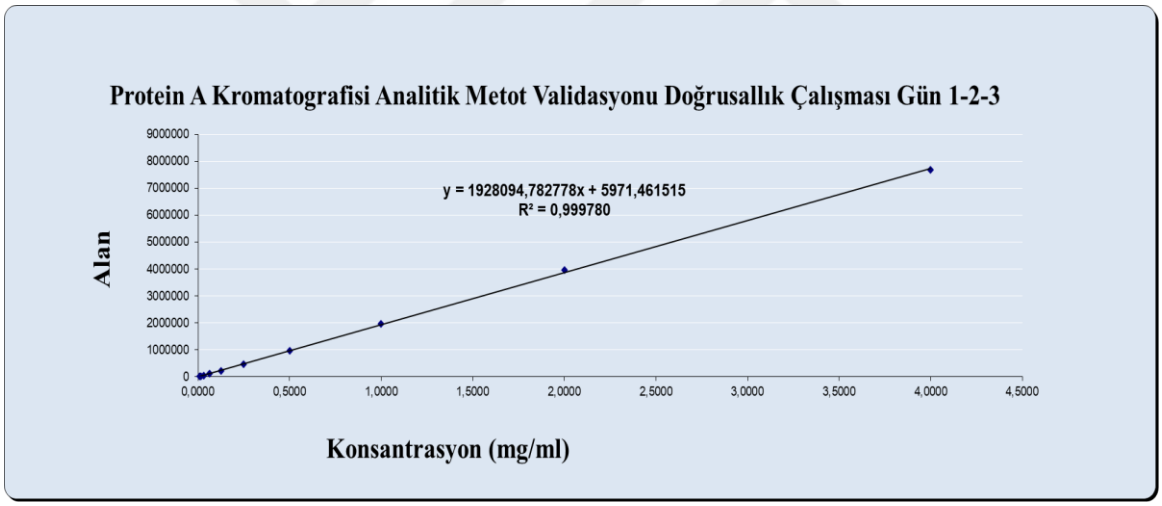
Tablo 4.3. Protein A Kromatografisi Doğrusallık Ortalama Sonuçları.

Referans numune Derişim Seviyesi (%)	**Derişim (mg/ml) (x)**	**Ortalama Alan (y)**	**Hesaplanan Alan (y_{cal})**	**Fark ($y-y_{cal}$)**	**Farkların Karesi $(y-y_{cal})^2$**
400	4,0	7667988	7718351	50362	2536368352,96864
200	2,0	3952167	3862161	-90006	8100995157,61664
100	1,0	1962539	1934066	-28473	810713635,79679
50	0,5	968106	970019	1913	3660069,00665
25	0,25	475699	487995	12296	151192749,65807
12,5	0,125	233487	246983	13496	182148866,81805
6,25	0,0625	114246	126477	12231	149599994,61360
3,125	0,03125	55189	66224	11035	121775666,73115
1,56	0,0156	26565	36050	9485	89956079,87492
0,78	0,0078	13351	21011	7660	58674591,24476
				RSS	12205085164

***Hesaplanan Alan:** Konsantrasyon değerlerinin doğru formülünde ($y = mx \pm n$) "x" yerine konulması ile hesaplanan alan değerleridir.

Tablo 4.4. Protein A Kromatografisi Doğrusallık Ortalama Regresyon Analizi Sonuçları.

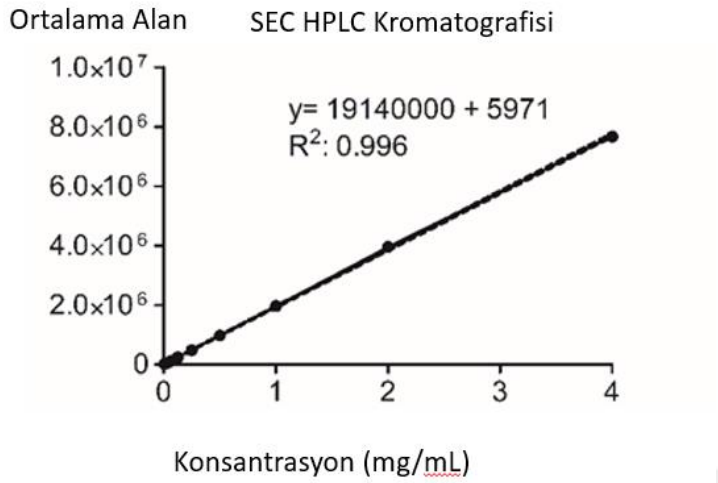
ÖZET ÇIKIŞI						
Regresyon İstatistikleri						
Çoklu R	0,999890185					
R Kare	0,999780382					
Ayarlı R Kare	0,99975293					
Standart Hata	39059,38614					
Gözlem	**10**					
ANOVA						
	df	***SS***	***MS***	***F***	***Anlamlılık F***	
Regresyon	1	5,5562E+13	5,5562E+13	36418,91572	6,3616E-16	
Fark	8	12205085164	1525635646			
Toplam	9	5,55742E+13				
	Katsayılar	***Standart Hata***	***t Stat***	***P-değeri***	***Düşük %95***	***Yüksek %95***
Kesişim	**5971,461515**	14756,86201	0,404656594	0,696333542	**-28057,92331**	**40000,84634**
X Değişkeni 1	**1928094,783**	10103,3378	190,8374065	6,3616E-16	1904796,444	1951393,122
FARK ÇIKIŞI						
Gözlem	***Öngörülen Y***	***Farklar***	***Standart Farklar***			
1	7718350,593	-50362,37041	-1,367593445			
2	3862161,027	90005,52848	2,444105982			
3	1934066,244	28473,03348	0,773187077			
4	970018,8529	-1913,130682	-0,051951188			
5	487995,1572	-12296,0461	-0,333899932			
6	246983,3094	-13496,25381	-0,36649165			
7	126477,3854	-12231,10766	-0,332136524			
8	66224,42348	-11035,20125	-0,299661608			
9	36049,74013	-9484,517904	-0,257552701			
10	21010,60082	-7659,934154	-0,20800601			



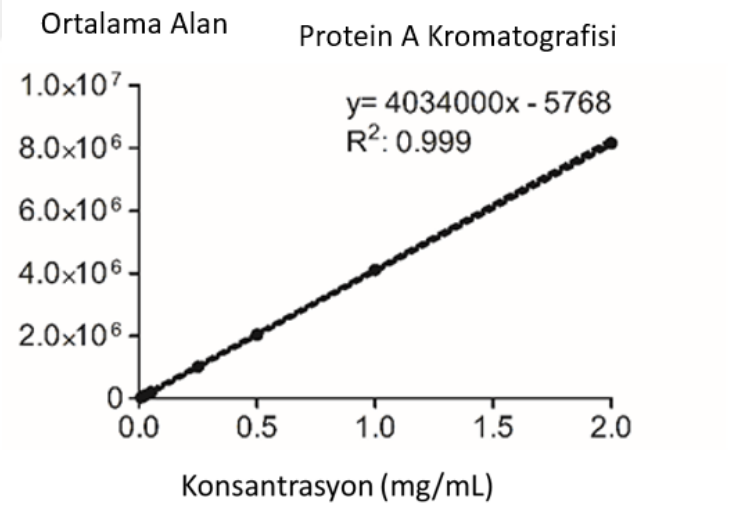
Şekil 4.2. Protein A Kromatografisi Doğrusallık Gün-1-2-3 Grafiği

Sonuçların Değerlendirilmesi

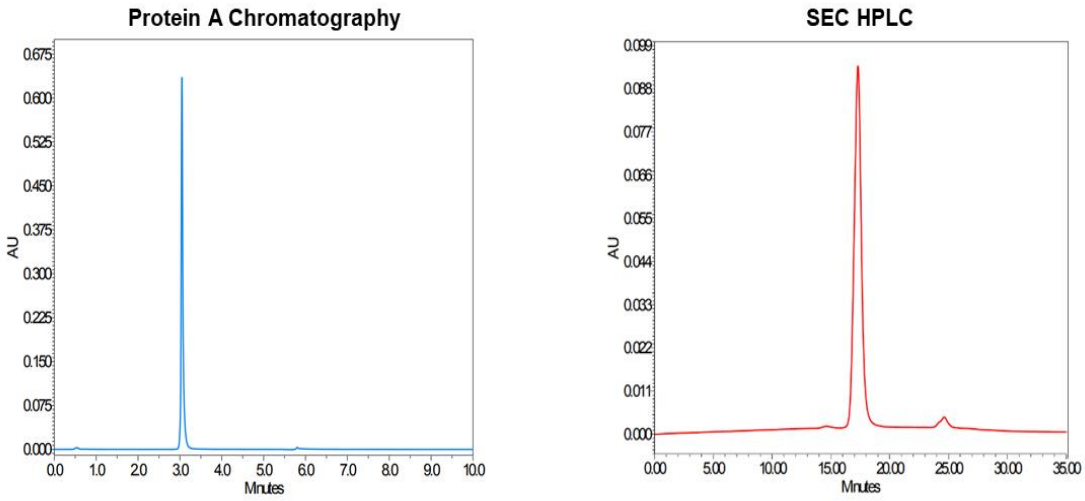
Elde edilen sonuçlar ICH M10 kılavuzunda belirlenen kabul kriterlerine uygundur, sonuç olarak bu derişim aralığında derişime bağlı alan değişiminin doğrusal olduğu kanıtlanmıştır. Her iki kromatografik metodun üç güne ait ortalama sonuçları GraphPad yazılımı ile de çizdirilmiş ve grafikler aşağıda verilmiştir



Şekil 4.3. SEC HPLC Kromatografisi ortalama sonuçları GraphPad Grafiği



Şekil 4.4 Protein A Kromatografisi ortalama sonuçları GraphPad Grafiği



Şekil 4.5. Miktar tayini/ titer analizi için elde edilen iki yöntemin kromatografik profili

Tablo 4.5. SEC HPLC İçin Uygulama Aralığı Ortalama Tablosu.

Enjeksiyon sayısı	**% 1,0**	**% 200**
1	37293	8287769
2	38399	8265461
3	37943	8425800
4	37077	8319263
5	38513	8332157
6	36621	8362145
7	41943	8282073
8	39059	8348968
9	39294	8309434
10	38015	8227697
11	44102	8235007
12	38077	8184673
13	36719	7898549
14	36265	7891487
15	35386	7904225
16	36486	7877632
17	33773	7829324
18	32803	7867345
Ortalama	**37654**	**8158278**
SD	**2609,46**	**211196,79**
% RSD	**6,93**	**2,59**

- SEC HPLC için uygulama aralığı gün 1-2-3 alan ortalaması sonuçlarına göre % RSD sonucu LLOQ seviyesi için % 6,93 ve % 200 seviyesi için de % 2,59 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.6. Protein A Kromatografisi İçin Uygulama Aralığı Ortalama Tablosu.

Enjeksiyon sayısı	**% 0,78**	**% 400**
1	11114	7577903
2	12657	7582397
3	11917	7589586
4	16186	7588216
5	12220	7580777
6	13287	7580119
7	15993	7724147
8	16154	7727490
9	13518	7726081
10	13261	7712726
11	13703	7703751
12	14177	7700808
13	12142	7707706
14	13075	7710173
15	12287	7704031
16	12473	7698388
17	12291	7705549
18	13856	7703940
Ortalama	**13351**	**7667988**
SD	**1482,47**	**62303,23**
% RSD	**11,10**	**0,81**

- Protein A kromatografisi için uygulama aralığı gün 1-2-3 alan ortalaması sonuçlarına göre % RSD sonucu LLOQ seviyesi için % 11,10 ve % 400 seviyesi için de % 0,81 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.7. LLOQ Seviyesi SEC HPLC Doğruluk & Kesinlik Testi Ortalama Sonuç Tablosu.

Numune Sayısı	Ortalama Alan	(%) Geri Kazanım
Gün-1 Numune-1	33556	100,0
Gün-1 Numune-2	34163	100,0
Gün-1 Numune-3	33557	100,0
Gün-1 Numune-4	34531	100,0
Gün-1 Numune-5	34617	100,0
Gün-2 Numune-1	36707	106,7
Gün-2 Numune-2	35656	100,0
Gün-2 Numune-3	37021	106,7
Gün-2 Numune-4	37857	110,0
Gün-2 Numune-5	35125	100,0
Gün-3 Numune-1	36459	106,7
Gün-3 Numune-2	36286	103,3
Gün-3 Numune-3	35309	100,0
Gün-3 Numune-4	35433	100,0
Gün-3 Numune-5	39203	113,3
Ortalama	**35699**	**103,1**
SD	**1586,78**	**4,45**
% RSD	**4,44**	**4,31**

- LLOQ seviyesi SEC HPLC için gün 1-2-3 doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre sonuçlar limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 103,1 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 4,31 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.8. Low QC Seviyesi SEC HPLC Doğruluk & Kesinlik Testi Ortalama Sonuç Tablosu.

Numune sayısı	Ortalama Alan	(%) Geri Kazanım
Gün-1 Numune-1	84152	92,0
Gün-1 Numune-2	85703	93,3
Gün-1 Numune-3	81225	88,0
Gün-1 Numune-4	82057	89,3
Gün-1 Numune-5	82588	90,0
Gün-2 Numune-1	91811	100,0
Gün-2 Numune-2	90486	98,7
Gün-2 Numune-3	88236	97,3
Gün-2 Numune-4	92600	101,3
Gün-2 Numune-5	92515	100,0
Gün-3 Numune-1	87258	96,0
Gün-3 Numune-2	89992	98,7
Gün-3 Numune-3	88788	96,0
Gün-3 Numune-4	87581	96,0
Gün-3 Numune-5	89268	97,3
Ortalama	**87617**	**95,6**
SD	**3757,15**	**4,17**
% RSD	**4,29**	**4,36**

- Low QC seviyesi SEC HPLC için gün 1-2-3 doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre sonuçlar limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 95,6 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 4,36 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.9. MID QC Seviyesi SEC HPLC Doğruluk & Kesinlik Testi Ortalama Sonuç Tablosu.

Numune sayısı	Ortalama Alan	(%) Geri Kazanım
Gün-1 Numune-1	1801405	94,8
Gün-1 Numune-2	1763876	92,7
Gün-1 Numune-3	1883818	99,1
Gün-1 Numune-4	1895921	99,7
Gün-1 Numune-5	1811462	95,3
Gün-2 Numune-1	1895120	99,7
Gün-2 Numune-2	1943441	102,3
Gün-2 Numune-3	1867983	98,3
Gün-2 Numune-4	1815404	95,5
Gün-2 Numune-5	1813565	95,3
Gün-3 Numune-1	1888879	99,4
Gün-3 Numune-2	1866223	98,1
Gün-3 Numune-3	1849733	97,3
Gün-3 Numune-4	1925709	101,3
Gün-3 Numune-5	1920322	101,0
Ortalama	**1862857**	**98,0**
SD	**52169,69**	**2,75**
% RSD	**2,80**	**2,81**

- MID QC seviyesi SEC HPLC için gün 1-2-3 doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre sonuçlar limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 98,0 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 2,81 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.10 ULOQ Seviyesi SEC HPLC Doğruluk & Kesinlik Testi Ortalama Gün Sonuç Tablosu.

Numune Sayısı	Ortalama Alan	(%) Geri Kazanım
Gün-1 Numune-1	3007977	105,4
Gün-1 Numune-2	2850449	99,9
Gün-1 Numune-3	3260353	114,2
Gün-1 Numune-4	2818411	98,7
Gün-1 Numune-5	2967822	104,0
Gün-2 Numune-1	2962731	103,8
Gün-2 Numune-2	2833816	99,3
Gün-2 Numune-3	2877349	100,8
Gün-2 Numune-4	2832854	99,2
Gün-2 Numune-5	3012013	105,5
Gün-3 Numune-1	2913239	102,0
Gün-3 Numune-2	3042977	106,6
Gün-3 Numune-3	3023883	105,9
Gün-3 Numune-4	2971402	104,1
Gün-3 Numune-5	2904404	101,7
Ortalama	**2951979**	**103,4**
SD	**113912,49**	**3,99**
% RSD	**3,86**	**3,85**

- ULOQ seviyesi SEC HPLC için gün 1-2-3 doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre sonuçlar limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 103,4 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 3,85 olarak tespit edilmiştir.
- Tüm sonuçların kabul kriterine uygun olduğu tespit edilmiştir, SEC HPLC metodu için doğruluk & kesinlik parametresi valide olmuştur

Tablo 4.11. LLOQ Seviyesi Protein A Kromatografisi Doğruluk & Kesinlik Testi Ortalama Sonuç Tablosu.

Numune Sayısı	Ortalama Alan	(%) Geri Kazanım
Gün-1 Numune-1	14662	88,5
Gün-1 Numune-2	14126	85,0
Gün-1 Numune-3	13847	83,3
Gün-1 Numune-4	15462	94,0
Gün-1 Numune-5	14669	88,5
Gün-2 Numune-1	14667	90,2
Gün-2 Numune-2	15665	95,3
Gün-2 Numune-3	18203	112,0
Gün-2 Numune-4	16863	103,4
Gün-2 Numune-5	15366	93,2
Gün-3 Numune-1	15403	93,3
Gün-3 Numune-2	16636	101,8
Gün-3 Numune-3	18268	112,4
Gün-3 Numune-4	16905	104,0
Gün-3 Numune-5	15534	94,4
Ortalama	**15742**	**96,0**
SD	**1360,25**	**8,97**
% RSD	**8,64**	**9,35**

- LLOQ seviyesi Protein A kromatografisi için gün 1-2-3 doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre sonuçlar limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 96,0 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 9,35 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.12. Low QC Seviyesi Protein A Kromatografisi Doğruluk & Kesinlik Testi Ortalama Sonuç Tablosu.

Numune sayısı	Ortalama Alan	(%) Geri Kazanım
Gün-1 Numune-1	61167	98,5
Gün-1 Numune-2	61650	99,3
Gün-1 Numune-3	62810	101,2
Gün-1 Numune-4	61738	99,5
Gün-1 Numune-5	63594	102,5
Gün-2 Numune-1	56949	91,6
Gün-2 Numune-2	59302	95,5
Gün-2 Numune-3	57932	93,2
Gün-2 Numune-4	58034	93,4
Gün-2 Numune-5	56972	91,6
Gün-3 Numune-1	57131	91,9
Gün-3 Numune-2	58200	93,7
Gün-3 Numune-3	58637	94,4
Gün-3 Numune-4	57832	93,1
Gün-3 Numune-5	57542	92,6
Ortalama	**59299**	**95,5**
SD	**2263,52**	**3,72**
% RSD	**3,82**	**3,90**

- Low QC seviyesi Protein A kromatografisi için gün 1-2-3 doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre sonuçlar limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 95,5 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 3,90 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.13. MID QC Seviyesi Protein A Kromatografisi Doğruluk & Kesinlik Testi Ortalama Sonuç Tablosu.

Numune sayısı	Ortalama Alan	(%) Geri Kazanım
Gün-1 Numune-1	983033	100,8
Gün-1 Numune-2	948408	97,3
Gün-1 Numune-3	886930	91,0
Gün-1 Numune-4	959141	98,4
Gün-1 Numune-5	949680	97,4
Gün-2 Numune-1	1005180	103,1
Gün-2 Numune-2	1012510	103,9
Gün-2 Numune-3	987631	101,3
Gün-2 Numune-4	987862	101,3
Gün-2 Numune-5	986528	101,2
Gün-3 Numune-1	1003664	103,0
Gün-3 Numune-2	1008060	103,4
Gün-3 Numune-3	985497	101,1
Gün-3 Numune-4	991363	101,7
Gün-3 Numune-5	984765	101,0
Ortalama	**978684**	**100,4**
SD	**32049,95**	**3,29**
% RSD	**3,27**	**3,28**

- MID QC seviyesi Protein A kromatografisi için gün 1-2-3 doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre sonuçlar limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 100,4 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 3,28 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.14. ULOQ Seviyesi Protein A Kromatografisi Doğruluk & Kesinlik Testi Ortalama Sonuç Tablosu.

Numune Sayısı	Ortalama Alan	(%) Geri Kazanım
Gün-1 Numune-1	1996033	102,4
Gün-1 Numune-2	1932533	99,2
Gün-1 Numune-3	1970315	101,1
Gün-1 Numune-4	1922023	98,6
Gün-1 Numune-5	1922083	98,6
Gün-2 Numune-1	2004523	102,9
Gün-2 Numune-2	1997497	102,5
Gün-2 Numune-3	1961773	100,7
Gün-2 Numune-4	1989096	102,1
Gün-2 Numune-5	1985904	101,9
Gün-3 Numune-1	2005733	102,9
Gün-3 Numune-2	2006693	103,0
Gün-3 Numune-3	1962870	100,7
Gün-3 Numune-4	1981961	101,7
Gün-3 Numune-5	1985390	101,9
Ortalama	**1974962**	**101,4**
SD	**29273,71**	**1,50**
% RSD	**1,48**	**1,48**

- ULOQ seviyesi Protein A kromatografisi için gün 1-2-3 doğruluk & kesinlik sonuçlarına göre sonuçlar limit içerisinde bulunmuştur. Ortalama % geri kazanım sonucu ise; % 101,4 olarak bulunmuştur. % RSD sonucu da % 1,48 olarak tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun olarak tespit edilmiştir.

5. SONUÇLAR

5.1 Genel Sonuç

Analitik metot geliştirme aşamasında metodun analitik metot validasyonuna hazır hale getirilmesi sonrasında güncel ICH M10 ve ICH Q2 R2 kılavuzu doğrultusunda analitik metot validasyonu için gereken tüm parametreler uygulanmıştır. Sonuçların kabul kriteri bu kılavuzlarda bahsedilen prosedür ve kriterlere uygun bir şekilde tasarlanmıştır.

Analitik metot validasyonunda ilk kontrol edilmesi gereken seçicilik/spesifiklik parametresi olduğu için PDA dedektör ile tarama yapılarak pik saflıkları tespit edilip pik saflığı açısı ve eşik değerleri tabloları yapılmıştır. ICH M10 ve ICH Q2 R2 kılavuzları kabul kriterine göre uygunluğu kanıtlanmıştır.

SEC HPLC analizinde sisteme verilen çözücülerden herhangi bir pik dedekte edilmediği için herhangi bir taşınma olmamıştır. Protein A kromatografisi için ise ayrıntılı bir şekilde incelenmiş olup kılavuzda yer alan kabul kriterine uygun olarak taşınma etkisi kanıtlanmıştır.

İkinci kontrol edilmesi gereken parametre olan doğrusallık parametresi özellikle ICH M10 kılavuzunda belirtildiği gibi LLOQ, Low QC, MID QC ve ULOQ seviyelerinin tespit edilebilmesi için tasarlanmıştır. Her iki metot için de tespit edilip çalışma üç ayrı gün olacak şekilde tasarlanmıştır. Aynı şekilde her güne ait sonuçlar için doğrusallık grafiği çizdirilip doğru denkleminden eğim, kesişim ve R^2 tespit edilmiştir. ANOVA analizi de Microsoft Excel kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm sonuçlar kabul kriterlerine uygun bir şekilde tespit edilmiştir.

ICH Q2 R2 sadece bir gün doğrusallık çalışması istediği halde ICH M10 kılavuzu 2022 tarihi itibari ile en az altı derişim seviyesi ve en az üç güne ait doğrusallık çalışmasını zorunlu kılmıştır. Her konsantrasyon seviyesinden 18 enjeksiyon ve konsantrasyon seviyeleri de eklenince ortaya çıkan veri çözümleme analizi başarılı bir şekilde yerine getirilmiştir. Analitik metotların doğrusal olduğu kanıtlanmıştır.

Doğrusallık çalışmasının içerisinden hem LLOQ tespiti gerçekleştirilmiş hem de uygulama aralığı parametresi tespit edilmiştir. LLOQ tespiti için Empower yazılımının sinyal/ gürültü hesaplaması ile hem pik şekli ve pik sistem uygunluk parametreleri açısından incelemeler yapılmıştır. Özellikle alanlar arasında % RSD limiti olduğu için RSD incelenmiştir.

LLOQ tespiti için en doğru/ ideal konsantrasyon seviyesinde karar kılınarak üç günlük doğrusallık dataları tablolanmıştır. Hem SEC HPLC hem de protein A kromatografisi için en düşük miktarlandırma limiti (LLOQ) kanıtlanmıştır.

Uygulama Aralığı (range) parametresi için; SEC HPLC analitik metot validasyon çalışması (0,01 mg/ml–2,0 mg/ml), % 1,0 (LLOQ seviyesi) ile % 200,0 aralığında gerçekleştirilmiştir. Protein A kromatografisi analitik yöntemi için (0,0078 mg/ml–4,0 mg/ml), % 0,78 (LLOQ seviyesi) ile % 400,0 doğrusallık seviyeleri arasında analitik validasyon çalışma aralığı kanıtlanmıştır.

Doğrusallık & Kesinlik parametresi için hem SEC HPLC hem de protein A kromatografisi metotlarının ICH M10 kılavuzunun gerektirdiği tüm prosedürler uygulanmıştır. Tıpkı doğrusallık parametresinde olduğu gibi bu parametre de en az üç gün boyunca üç kez tekrarlanmıştır. Doğrusallık çalışmasında çalışma aralığı belirlendiği için bu çalışma aralığındaki seviyelerde standart eğrisi oluşturularak % geri kazanım hesabı yapılmıştır. Üç güne ait sonuçlar tek standart eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.

Kesinlik parametresi de alanların ortalama sonuçları, SD ve RSD sonuçlarını kapsamaktadır. Tüm sonuçlar kendi günlerinde ayrı ayrı değerlendirilip tartışma kısmında üç günün ortalama sonuçları hesaplanarak ispat edilmiştir.

Analitik validasyon çalışması ara kesinlik & doğruluk çalışması ile laboratuvarımızda bulunan farklı cihaz, farklı kişi ve farklı bir günde gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar kendi içinde uygun olduğu gibi doğruluk & kesinlik parametresi için de uygun olmalıdır. Tüm sonuçlar karşılaştırma tablosu şeklinde verilmiştir.

Analitik validasyon çalışması Sağlamlık parametresinde ise metotlardaki akış hızı, kolon sıcaklığı ve dalga boyu değişiklikleri EP.2.2.46 monografında yer alan minör değişiklik limitleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Özellikle sistem uygunluk parametreleri de tablolarda gösterilmiştir. Derişim (titer) sonuçlarımızın metotlardaki minör değişikliklerden etkilenmemiş olduğu da ispat edilmiştir.

Solüsyon stabilitesi parametresi ile de analiz için kaç saat boyunca metodun referans numune üzerindeki stabilite parametresi incelenmiştir. Beklenen en az çözelti stabilitesi sonucu 24 saat olduğu halde çözelti stabilitesinin 5°C sıcaklıkta, SEC HPLC metodu için 98 saat, protein A kromatografisi için ise 72 saat stabil olduğu kanıtlanmıştır.

Tüm parametreler ayrı ayrı uygulandığı esnada sonuçlar her analiz sonrası proses edilerek kontrol edilmiş, veri çözümleme analizleri gerçekleştirilmiş ve son olarak raporlanarak analitik validasyon çalışması her iki metot için nihai hale getirilmiştir.

KAYNAKLAR

[1] D.S.Dimitrov, Therapeutic Proteins, in:V.Voynov,J.A.Caravella(Eds.),Springer, NewYork,NewJersey,2012,pp.1–26.

[2] D.R.Mould,K.R.D.Sweeney,Thepharmacokineticsandpharmacodynamicsofmonoclonalantibodies,Curr.Opin.Drug.Discov.Dev.10(2007)84–96..

[3] Justiz Vaillant, A. A., Jamal, Z., & Ramphul, K. (2021). StatPearls Immunoglobulin. StatPearls Publishing.

[4] Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 125(2). https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046.

[5] Breedveld, F. C. (2000). Therapeutic monoclonal antibodies. The Lancet, 355(9205), 735–740. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)01034-5.

[6] Lu, R.-M., Hwang, Y.-C., Liu, I.-J., Lee, C.-C., Tsai, H.-Z., Li, H.-J., & Wu, H.-C. (2020). Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. Journal of Biomedical Science, 27(1). https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z.

[7] Karu, A. E., Bell, C. W., & Chin, T. E. (1995). Recombinant antibody technology. ILAR Journal, 37(3), 132–141. https://doi.org/10.1093/ilar.37.3.132.

[8] Guide to understanding the benefits and uses of recombinant antibodies. Active Motif. (n.d.). https://www.activemotif.com/blog-recombinant-abs.

[9] You, M., Yang, Y., Zhong, C., Chen, F., Wang, X., Jia, T., Chen, Y., Zhou, B., Mi, Q., Zhao, Q., An, Z., Luo, W., & Xia, N. (2018). Efficient MAB production IN cho cells with optimized signal Peptide, codon, and Utr. Applied Microbiology and Biotechnology, 102(14), 5953–5964. https://doi.org/10.1007/s00253-018-8986-5.

[10] Global monoclonal Antibody Industry 2019-2025 with focus on the Chinese market -ResearchAndMarkets.com. Global Monoclonal Antibody Industry 2019-2025 with Focus on the Chinese Market - ResearchAndMarkets.com | Business Wire. (2019,

May 2). https://www.businesswire.com/news/home/20190502005572/en/Global Monoclonal-Antibody-Industry-2019-2025-with-Focus-on-the-Chinese-Market-ResearchAndMarkets.com.

[11] Markets, R. and. (2021, February 12). Global monoclonal Antibodies market Outlook to 2024 - global market forecast to reach US$161.7 billion in 2024. Global Monoclonal Antibodies Market Outlook to 2024 - Global Market Forecast to Reach US$161.7 Billion in 2024. https://www.prnewswire.com/news-releases/global monoclonal-antibodies-market-outlook-to-2024---global-market-forecast-to-reach us161-7-billion-in-2024--301227543.html.

[12] M.R. Nejadnik, T.W. Randolph, D.B. Volkin, C. Sch¨oneich, J.F. Carpenter, D.J.A. Crommelin, W. Jiskoot, Postproduction handling and administration of proteinpharmaceuticals and potential instability issues, J. Pharm. Sci. 107 (2018)2013–2019, https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.04.005.

[13] Y. Le Basle, P. Chennell, N. Tokhadze, A. Astier, V. Sautou, Physicochemical stability of monoclonal antibodies: A Review, J. Pharm. Sci. 109 (2020) 169–190,https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.08.009.

[14] ICH Secretariat (2005) International Conference on Harmonization (ICH) guideline ICH Q5E: Comparability of Biotechnological/Biological Products, 2005. http://www.emea.eu.int (accessed February 15, 2022).

[15] ICH Secretariat (1999) International Conference on Harmonization (ICH) guideline ICH Q6B: Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, 1999. http://www.emea.eu.int (accessed February 15, 2022).

[16] ICH Secretariat (2005) International Conference on Harmonization (ICH) guideline ICH Q2(R2): validation of analytical procedures: text and methodology., 24.03.2022.

[17] S. Fekete, A. Beck, J.L. Veuthey, D. Guillarme, Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates, J Pharm Biomed Anal 101 (2014) 161–173. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.011.

[18] D.S. Greg, G.B. Howard, The state of the art and future trends of size-exclusion chromatography packings and columns, LCGC N Am 30 (2012) 544–563. [54] A.D. Stephens, N. Nespovitaya.

[19] Cordoba-Rodriguez RV. Aggregates in MAbs and recombinant therapeutic proteins: a regulatory perspective. BioPharm International 2008; 21:44-53.

[20] Cordoba AJ, Shyong BJ, Breen D, Harris RJ. Nonenzymatic hinge region fragmentation of antibodies in solution. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed LifeSci2005;818:115-21;PMID:15734150;
http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.12.033.

[21] Xiang T, Lundell E, Sun Z, Liu H. Structural effect of a recombinant monoclonal antibody on hinge region peptide bond hydrolysis. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2007; 858:254-62; PMID:17901002; http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.08.043.

[22] Rosenberg AS. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. AAPS J 2006; 8:E501-7; PMID:17025268; http://dx.doi.org/10.1208/aapsj080359.

[23] Rosenberg AS, Worobec A. A risk-based approach to immunogenicity concerns of therapeutic protein products, part 2: considering host-specific and product specific factors impacting immunogenicity. BioPharm International, 2004; http://www.biopharminternational.com/biopharm/21+CFR+Part+11/A-Risk-Based-Approach-to-Immunogenicity-Concernso/ArticleStandard/Article/detail/140695.

[24] Schenerman MA, Sunday BR, Kozlowski S, Webber K, Gazzano-Santoro H, Mire-Sluis A. CMC strategy forum report: analytical and structural characterization of monoclonal antibodies. BioProcess International 2004; 2:42-5.

[25] International Union of Pure and Applied Chemistry. Size-exclusion chromatography (SEC). Compendium of Chemical Terminology 1997, 2nd edition.

[26] N.P. Golovchenko, I.A. Kataeva, V.K. Akimenko, Analysis of pH-dependent protein interactions with gel filtration medium, J Chromatogr 591 (1992) 121–128. https: //doi.org/10.1016/0021- 9673(92)80229- n.

[27] S. Rao, R. Brian , A.A. Jason , Bioinert versus biocompatible: the benefits of different column materials in liquid chromatography separations, LCGC Suppl 36 (2018) 24–29.

[28] P. Hong, S. Koza, E.S. Bouvier, Size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates, J Liq Chromatogr Relat Technol 35 (2012) 2923–2950. https://doi.org/10.1080/10826076.2012.743724.

[29] S. Park, H. Cho, Y. Kim, S. Ahn, T. Chang, Fast size-exclusion chromatography at high temperature, J Chromatogr A 1157 (2007) 96–100. https://doi.org/10.1016/ j.chroma.2007.04.049.

[30] J.R. Albani, Principles and applications of fluorescence spectroscopy, principles and applications of fluorescence spectroscopy, 2007, pp. 1–255, https://doi.org/ 10.1002/9780470692059.

[31] I.K. Ventouri, D.B.A. Malheiro, R.L.C. Voeten, S. Kok, M. Honing, G.W. Somsen, R. Haselberg, Probing protein denaturation during size-exclusion chromatography using native mass spectrometry, Anal Chem 92 (2020) 4292–4300. https://doi.org/ 10.1021/acs.analchem.9b04961.

[32] A. Goyon, V. D'Atri, O. Colas, S. Fekete, A. Beck, D. Guillarme, Characterization of 30 therapeutic antibodies and related products by size exclusion chromatography: feasibility assessment for future mass spectrometry hyphenation, J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci 1065-1066 (2017) 35–43. https://doi.org/10.1016/ j.jchromb.2017.09.027.

[33] A. Goyon, M. Kim, L. Dai, C. Cornell, F. Jacobson, D. Guillarme, C. Stella, Stream- lined characterization of an antibody-drug conjugate by two-dimensional and four- dimensional liquid chromatography/mass spectrometry, Anal Chem 91 (2019) 14896–14903. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02454.

[34] Z.D. Dunn, J. Desai, G.M. Leme, D.R. Stoll, D.D. Richardson, Rapid two-dimensional protein-A size exclusion chromatography of monoclonal antibodies for titer and aggregation measurements from harvested cell culture fluid samples, MAbs 12 (2020) 1702263. https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1702263.

[35] Philo, J.S., "Is Any Measurement Method Optimal for All Aggregate Sizes and Types?" AAPS Journal, 8(3), article 65 [2006].

[36] USP <129> ANALYTICAL PROCEDURES FOR RECOMBINANT THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES.

[37] C. Zhang, E. Rodriguez, C. Bi, X. Zheng, D. Suresh, K. Suh, Z. Li, F. Elsebaei, D. S. Hage, High performance affinity chromatography and related separation methods for the analysis of biological and pharmaceutical agents, The Analyst 143(2018) 374–391, https://doi.org/10.1039/C7AN01469D.

[38] A. Tscheliessnig, A. Jungbauer, High-performance monolith affinity chromatography for fast quantitation of immunoglobulin G, J. Chromatogr. A 1216(2009) 2676–2682, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.07.063.

[39] P. Leblebici, M.E. Leblebici, F. Ferreira-da-Silva, A.E. Rodrigues, L.S. Pais, Separation of human immunoglobulin G subclasses on a protein A monolith column, J. Chromatogr. B 962 (2014) 89–93, https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.05.029.

[40] C. Reed, S.M. Koza, W. Chen, Protein A for Monoclonal Antibody Titer Measurements with ACQUITY Arc Bio, Alliance, and ACQUITY UPLC H-Class Bio Chromatography Systems.

[41] T.-W. Chu, A. Coffey, A. Technologies, Robust, Reliable Recombinant Protein A Monolith Column for Antibody Titer Determination, (n.d.).

[42] Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis M10; 24 May 2022.

[43] https://www.separations.us.tosohbioscience.com/HPLC_Columns/id8327/TSKgel_G3000SWxl.

[44] https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2011/method development-for-size-exclusion-chromatographyofmonoclonalantibodies.

[45] https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/ourwork/biologics/guide-proc-for-recombinant-therapeutic.pdf.

[46] https://www.usp.org/sites/default/files/mAb/USP_AggregationAnalysis_ApplicationNote_FINAL.pdf.

[47] tskgel®protein a-5pw affinity HPLC column beginners guide for mAb titer analysis-column sheet document.

[48] EP 2.2.46 monograph.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Elif ŞAHİNKAYA

Lisans: Marmara Üniversitesi, Kimya Bölümü.

Yüksek Lisans: Marmara Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı.

Yayın Listesi:

1. Basak Yuce-Dursun, Özkan Danış, Lalehan Ozalp, Elif Sahin, Serap Demir, Safiye Sağ Erdem, Ayse Ogan‘‘In vitro and in silico investigation of inhibitory activities of 3-arylcoumarins and 3-phenylazo-4-hydroxycoumarin on MAO isoenzymes’’, Structural Chemistry, (2022), https://doi.org/10.1007/s11224-022-02092-x.

Tezden Türetilen Yayın:

2. Elif Sahinkaya, Aylin Ozkan, Nilay Ozdemir, Merve Elif Aslan, Dilan Bicak, Nilufer Cakir, Hatice Oncel, Ece Kok Yetimoglu “Validation of Protein A Chromatography: Orthogonal Method with Size exclusion chromatography validation for mAb titer analysis”, Turkish Journal of Biochemistry, (2025)