

Dizajn eksperimenata (DoE) u optimizaciji *in vivo* pokusa

B. Halassy

Sveučilište u Zagrebu, Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji,
Rockefellerova 10, Zagreb; bhalassy@unizg.hr

Dizajn eksperimenata (DoE, *engl.* Design of Experiments) je grana primijenjene statistike koja se bavi planiranjem, provođenjem, analiziranjem i interpretiranjem kontroliranih eksperimenata da bi se izmjerili čimbenici koji utječu na vrijednost parametra ili grupe parametara od interesa. Strateški planirani i provedeni eksperimenti mogu ponuditi ogromnu količinu informacija o učinku jednog ili više eksperimentalnih čimbenika (factors) na vrijednost mjerne veličine (response) od interesa. Drugim riječima, DoE omogućuje simultano ispitivanje svih faktora koji mogu utjecati na proces. DoE se uspješno i široko primjenjuje u optimizaciji i testiranju otpornosti različitih farmaceutskih analitičkih postupaka i procesa. Međutim, njegova uporaba je skromna, iako preporučena, u optimizaciji i validaciji bioloških testova, a gotovo se uopće ne koristi kad je riječ o testovima koji uključuju životinje.

Testovi imunogeničnosti u životinja su nužno pretkliničko testiranje za demonstraciju učinkovitosti cjepiva, a njegov rezultat je vrlo često baza odluke da li nastaviti ili odbaciti razvoj nekog novog cjepnog kandidata. No, usprkos njihovog važnosti, ovi testovi, kao i biološki *in vivo* testovi uopće, su rijetko, ako uopće, optimizirani i validirani.

U ovom radu ćemo pokazati važnost optimizacije *in vivo* testa na primjeru testa imunogeničnosti virusa mumpsa u zamorčića za dobivanje vjerodostojnih rezultata. Također, pokazat ćemo primjenjivost i korisnost reduciranog faktorskog dizajna eksperimenata (fractional factorial design of experiments) za takvu namjenu.

Upotrebom dizajna rezolucije IV ($2_{IV}^{(4-1)}$) utvrdili smo da su parametri koji značajno povećavaju osjetljivost testa razmak među imunizacijama životinja, te tjelesna masa pokusnih životinja. Količina (0 nasuprot 2%) stabilizatora (serum fetusa goveda, FBS) nije utjecala na rezultat u DoE planu. No, odvojeni eksperiment, u kojem smo ispitivali samo taj parametar, a u kojem su ostali parametri bili na optimalnim razinama, pokazao je da ipak postoji utjecaj FBS-a na rezultate testa imunogeničnosti. Takav nalaz je uputio da (a) faktori s jakim utjecajem na mjereni ishod mogu prikriti učinke manje utjecajnih faktora; i (b) matriks uzoraka virusa mumpsa koji se međusobno uspoređuju mora biti isti da bi se dobili vjerodostojni podaci o njihovoj imunogeničnosti.

Ključne riječi: Dizajn eksperimenata (DoE), optimizacija *in vivo* pokusa, virusa mumpsa, nekliničko testiranje imunogeničnosti cjepiva

***In vivo* assay optimization by Design of Experiments (DoE)**

B. Halassy

University of Zagreb, Centre for Research and Knowledge Transfer in Biotechnology,
Rockefellerova 10, Zagreb; bhalassy@unizg.hr

Design of Experiments (DoE) is a branch of applied statistics deals with planning, conducting, analyzing and interpreting controlled tests to evaluate the factors that control the value of a parameter or group of parameters. A strategically planned and executed experiment may provide a great deal of information about the effect on a response variable due to one or more factors. In another words, DoE enables simultaneous investigation of all factors that might influence the experiment outcome. DoE has been successfully used in the optimisation and robustness testing of pharmaceutical analytical procedures. However, it has not been widely used, although recommended, in optimisation and validation studies of biological assays yet, particularly in assays involving animals.

Immunogenicity testing in animals is a necessary preclinical assay for demonstration of vaccine efficacy the results of which are often the basis for the decision whether to proceed or withdraw the further development of the novel vaccine candidate. However, *in vivo* assays are rarely, if at all, optimized and validated.

Here we clearly demonstrate the importance of *in vivo* assay (mumps virus immunogenicity testing in guinea pigs) optimization for gaining reliable results and the suitability of Fractional factorial design of experiments (DoE) for such a purpose. By the use of DoE with resolution IV ($2_{IV}^{(4-1)}$) we clearly revealed that the parameters significantly increasing assay sensitivity were interval between animal immunisations followed by the body weight of experimental animals. The quantity (0 versus 2%) of the stabilizer (foetal bovine serum, FBS) in the sample was shown as non-influencing parameter in DoE setup. However, the separate experiment investigating only the FBS influence, and performed under other parameters optimally set, showed that FBS also influences the results of immunogenicity assay. Such finding indicated that (a) factors with strong influence on the measured outcome can hide the effects of parameters with modest/low influence and (b) the matrix of mumps virus samples to be compared for immunogenicity must be identical for reliable virus immunogenicity comparison.

Keywords: Design of Experiments (DoE), *in vivo* bioassay optimization, mumps virus, non-clinical vaccine immunogenicity assessment