

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA KLJUN

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA KLJUN

**PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI DEGLIKOZILACIJE DVEH METOD PRI
ANALIZI N-GLIKANOV TERAPEVTSKIH PROTEINOV**

**COMPARING DEGLYCOSYLATION EFFICIENCY OF TWO METHODS FOR
N-GLYCAN ANALYSIS OF THERAPEUTIC PROTEINS**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017

Magistrsko naložko sem opravljala v podjetju Lek d.d. Mengeš (Tehnični razvoj in proizvodnja bioloških zdravil, oddelek Razvojna analitika) pod mentorstvom doc. dr. Bojana Doljaka in somentorstvom dr. Mojce Beseničar.

Zahvala

Iskrena hvala doc. dr. Bojanu Doljaku za vse nasvete, predloge in kritičen pregled magistrske naloge ter dr. Mojci Beseničar za strokovno pomoč, usmerjanje in čas, ki mi ga je posvetila.

Hvala vsem sodelavcem Razvojne analitike - še posebej hvala Žani Marin, ki so mi kakorkoli pomagali pri delu.

Hvala prijateljem za vse zabavne in nepozabne trenutke, ki so nastali tekom študija.

Hvala staršem, ki so mi skozi celotno šolanje stali ob strani, me spodbujali in verjeli vame. In hvala tebi Jaka, za vso potrpežljivost in vzpodbudne besede med pisanjem magistrske naloge.

Hvala!

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Bojana Doljaka, mag. farm. in somentorstvom dr. Mojce Beseničar, univ. dipl. mikrobiol.

Kazalo vsebine

1. UVOD	1
1.1 BIOLOŠKA ZDRAVILA	1
1.2 PROTEINI	2
1.2.1 Protitelesa	2
1.2.1.1 Protitelesa IgG razreda.....	3
1.2.2 Fuzijski proteini.....	4
1.3 GLIKOZILACIJA	5
1.3.1 N-glikozilacija	6
1.3.1.1 Sinteza N-glikanov.....	7
1.3.1.2 Klinični vidik različnih N-glikanov	9
1.4 ANALITIKA BIOLOŠKIH ZDRAVIL	11
1.4.1 Kromatografija.....	11
1.4.1.1 HILIC kromatografija	12
1.4.2 Kapilarna elektroforeza	13
2. NAMEN DELA.....	15
3. MATERIALI IN METODE	16
3.1 MATERIALI	16
3.1.1 Kemikalije in reagenti	16
3.1.2 Raztopine in pufri	17
3.1.3 Vzorci	18
3.1.4 Oprema in potrošni material	18
3.2 METODE.....	19
3.2.1 HILIC kromatografija.....	19
3.2.2 Kapilarna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata	20
3.3 PRIPRAVA VZORCEV.....	21
3.3.1 Priprava vzorcev za analizo N-glikanskega profila	21
3.3.1.1 HT metoda	22
3.3.1.2 Klasična metoda.....	24
3.3.1.3 Klasična metoda z dodatnim denaturacijskim korakom	26
3.3.1.4 Priprava slepega vzorca	27
3.3.2 Priprava vzorcev za analizo CE-SDS pri reducirajočih pogojih	27
3.3.2.1 Priprava slepega vzorca	28

4. EKSPERIMENTALNO DELO	29
4.1 ELUCIJA PROTEINA Z RX MINI KOLONE	29
4.2 TEST USPEŠNOSTI DEGLIKOZILACIJE	30
4.3 ZMANJŠEVANJE NANOSA PROTEINA PRI KLASIČNI METODI	30
4.4 ANALIZA NEPOPOLNO DEGLIKOZILIRANEGA PROTEINA	30
4.5 OPTIMIZACIJA HT METODE	31
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	33
5.1 ELUCIJA PROTEINA Z RX MINI KOLONE	33
5.2 TEST USPEŠNOSTI DEGLIKOZILACIJE	34
5.2.1 Monoklonsko protitelo IgG ₁	35
5.2.2 Monoklonsko protitelo IgG ₂	36
5.2.3 Fuzijski protein	37
5.3 ZMANJŠEVANJE NANOSA PROTEINA PRI KLASIČNI METODI	40
5.4 ANALIZA NEPOPOLNO DEGLIKOZILIRANEGA PROTEINA	43
5.4.1 Monoklonsko protitelo IgG ₁	44
5.4.2 Monoklonsko protitelo IgG ₂	46
5.4.3 Fuzijski protein	47
5.5 OPTIMIZACIJA HT METODE	49
5.5.1 Monoklonsko protitelo IgG ₁	49
5.5.2 Monoklonsko protitelo IgG ₂	51
5.5.3 Fuzijski protein	53
6. SKLEP	56
7. LITERATURA	57

Kazalo slik

Slika 1: Zgradba monoklonskega protitelesa IgG in fuzijskega proteina.....	4
Slika 2: Oligomanozni, kompleksni in hibridni tip <i>N</i> -glikanov.	6
Slika 3: Sinteza <i>N</i> -glikanskega predhodnika v endoplazemskem retikulumu.....	7
Slika 4: Predelava <i>N</i> -glikanov v endoplazemskem retikulumu in golgijevem aparatu.....	8
Slika 5: Kromatografska oprema.....	12
Slika 6: Sistem za kapilarno elektroforezo.....	14
Slika 7: GlykoPrep® Kit (reagenti, RX in CU mini kolone)	18
Slika 8: Encimska sprostitev <i>N</i> -glikana s proteina.	21
Slika 9: Barvanje glikanov z 2-AB barvilom.	22
Slika 10: Izgled RX in CU mini kolon.	22
Slika 11: Lastnosti RX in CU mini kolon.	22
Slika 12: Nanos raztopine na mini kolono, centrifugiranje in odstranitev eluata.	23
Slika 13: Elucija vzorca v mikrotitrsko ploščico.....	24
Slika 14: Razsoljevanje vzorca.....	25
Slika 15: Odstranjevanje odvečnega 2-AB reagenta.	26
Slika 16: NAP-5 kolone.....	26
Slika 17: Redukcija disulfidnih vezi z 2-merkaptotetanolom.....	28
Slika 18: Diagram poteka eksperimentalnega dela.....	29
Slika 19: Elektroferogrami eluiranega mAb IgG ₁ , mAb IgG ₂ in fuzijskega proteina z RX mini kolone.....	33
Slika 20: Elektroferogrami deglikoziliranega mAb IgG ₁ s klasično in HT metodo. Nativni vzorec predstavlja ne-deglykoziliran protein.	35
Slika 21: Elektroferogrami deglikoziliranega mAb IgG ₂ s klasično in HT metodo. Nativni vzorec predstavlja ne-deglykoziliran protein.	36
Slika 22: Elektroferogrami deglikoziliranega fuzijskega proteina s klasično in HT metodo. Nativni vzorec predstavlja ne-deglykoziliran protein.	37
Slika 23: Elektroferogram deglikoziliranega fuzijskega proteina s klasično metodo z dodatnim denaturacijskim korakom. Nativni vzorec predstavlja ne-deglykoziliran protein.	39
Slika 24: Celotni <i>N</i> -glikanski profili mAb IgG ₁ , mAb IgG ₂ in fuzijskega proteina. Za lepši prikaz nižjih vrhov sta dodani tudi povečavi mAb IgG ₁ in IgG ₂	41
Slika 25: Grafični prikaz rezultatov odstotkov površine bolj zastopanih <i>N</i> -glikanskih struktur s koračno zmanjšanim nanosom proteina pri klasični metodi – dve ponovitvi: 1 in 2.	42
Slika 26: Grafični prikaz rezultatov odstotkov površine manj zastopanih <i>N</i> -glikanskih struktur s koračno zmanjšanim nanosom proteina pri klasični metodi – dve ponovitvi 1 in 2.	42
Slika 27: Kromatogrami <i>N</i> -glikanskih struktur mAb IgG ₁ po HT metodi, ter koncentriran vzorec deglykoziliran s HT + klasično metodo.	45
Slika 28: Kromatogrami <i>N</i> -glikanskih struktur mAb IgG ₂ po klasični in HT metodi, ter vzorec deglykoziliran s HT + klasično metodo.	46

Slika 29: Kromatogrami <i>N</i> -glikanskih struktur mAb IgG ₂ po HT metodi, ter koncentriran vzorec deglikoziliran s HT + klasično metodo.....	47
Slika 30: Elektroferogrami deglikoziliranega mAb IgG ₁ s HT metodo in HT metodo z optimiziranim denaturacijskim korakom. Nativni vzorec predstavlja ne-deglykoziliran protein.....	50
Slika 31: Kromatograma <i>N</i> -glikanskih struktur mAb IgG ₁ pripravljenega s HT metodo in HT metodo z optimiziranim denaturacijskim korakom.....	51
Slika 32: Elektroferogrami deglikoziliranega mAb IgG ₂ s HT metodo in HT metodo z optimiziranim denaturacijskim korakom. Nativni vzorec predstavlja ne-deglykoziliran protein.....	52
Slika 33: Kromatograma <i>N</i> -glikanskih struktur mAb IgG ₂ pripravljenega s HT metodo in HT metodo z optimiziranim denaturacijskim korakom.....	52
Slika 34: Elektroferogrami deglikoziliranega fuzijskega proteina s HT metodo in HT metodo z optimiziranim denaturacijskim korakom. Nativni vzorec predstavlja ne-deglykoziliran protein.....	53
Slika 35: Kromatograma <i>N</i> -glikanskih struktur fuzijskega proteina pripravljenega s HT metodo in HT metodo z optimiziranim denaturacijskim korakom.....	54

Kazalo preglednic

Preglednica I: Uporabljene kemikalije in proizvajalci	16
Preglednica II: Uporabljene raztopine in pufri	17
Preglednica III: Oprema in proizvajalci	18
Preglednica IV: Potrošni material in proizvajalci.....	19
Preglednica V: Različni gradienti HILIC kromatografije	20
Preglednica VI: Odstotek površine vrhov pri nativnem in deglikoziliranem mAb IgG ₁ s klasično in HT metodo.	35
Preglednica VII: Odstotek površine vrhov pri nativnem in deglikoziliranem mAb IgG ₂ s klasično in HT metodo.	37
Preglednica VIII: Odstotek površine vrhov pri nativnem in deglikoziliranem fuzijskem proteinu s klasično in HT metodo.	38
Preglednica IX: Odstotek površine vrhov pri deglikoziliranem fuzijskem proteinu s klasično metodo z dodatnim denaturacijskim korakom.	39
Preglednica X: Odstotek površine izbranih vrhov <i>N</i> -glikanskih struktur pri deglikoziliranem mAb IgG ₁ s HT in klasično metodo, ter vzorcu deglikoziliranem s HT + klasično metodo.	44
Preglednica XI: Odstotek površine izbranih vrhov <i>N</i> -glikanskih struktur pri deglikoziliranem fuzijskem proteinu s HT in klasično metodo ddk ter vzorcu, deglikoziliranem s HT + klasično metodo ddk.....	48
Preglednica XII: Odstotek površine izbranih vrhov <i>N</i> -glikanskih struktur pri deglikoziliranem mAb IgG ₁ s HT metodo in HT metodo z optimiziranim denaturacijskim korakom.	51

Preglednica XIII: Odstotek površine izbranih vrhov <i>N</i> -glikanskih struktur pri deglikoziliranem mAb IgG ₂ s HT metodo in HT metodo z optimiziranim denaturacijskim korakom.....	53
Preglednica XIV: Odstotek površine izbranih vrhov <i>N</i> -glikanskih struktur pri deglikoziliranem fuzijskem proteinu s HT metodo in HT metodo z optimiziranim denaturacijskim korakom.....	54
Preglednica XV: Oznaka, struktura in celotno ime vseh obravnavanih <i>N</i> -glikanov.....	61

Kazalo enačb

Enačba 1: Enačba za standardni odklon	34
Enačba 2: Enačba za relativni standardni odklon.....	35

POVZETEK

Biološka zdravila so po svoji sestavi običajno glikoproteini. Ustrezna glikozilacija tako predstavlja eno izmed najpomembnejših post-translacijskih modifikacij, saj vpliva na topnost, stabilnost, farmakokinetiko in farmakodinamiko terapevtskega proteina, kot tudi na njegovo biološko učinkovitost. Neustrezna glikozilacija pa lahko sproži imunski odziv po vnosu proteina v krvni obtok. Glikozilacijski vzorec zato predstavlja ključno lastnost kakovosti in zahteva skrben nadzor bioprocesa tako med razvojem kot tudi med proizvodnjo.

Priprava vzorcev za analizo *N*-glikanskega profila vsebuje več stopenj, vključuje neobvezno denaturacijo proteina, encimsko sprostitev glikanov, ločevanje in označevanje sproščenih glikanov. Najpomembnejši korak predstavlja encimska sprostitev *N*-glikanov s proteina, saj moramo za zanesljive rezultate doseči čim večjo učinkovitost deglikozilacije. V okviru magistrske naloge smo preverili in med seboj primerjali učinkovitost deglikozilacije pri klasični metodi in pri analitski metodi visoke zmogljivosti (HT metoda), ki je zaradi svoje hitrosti čedalje bolj zaželjena, predvsem v zgodnjih fazah razvoja. Največja razlika med metodama je v stopnji denaturacije in encimske deglikozilacije proteina. Sprostitev *N*-glikanov pri klasični metodi poteče v raztopini, medtem ko pri HT metodi ta korak poteče z adsorbiranim proteinom na trdni površini. Kot modelni protein smo uporabili monoklonsko protitelo IgG (podrazreda IgG₁ in IgG₂), ter fuzijski protein.

Učinkovitost deglikozilacije obeh metod priprave vzorca smo preverili s kapilarno elektroforezo. Opazili smo, da popolno deglikozilacijo vzorca monoklonskega protitelesa dobimo s klasično metodo, vzorca fuzijskega proteina pa s klasično metodo z dodatnim denaturacijskim korakom. S HT metodo pa dobimo delno deglikoziliran vzorec tako monoklonskega protitelesa kot tudi fuzijskega proteina. S kromatografsko metodo smo nato preverili, katere *N*-glikanske strukture ostanejo vezane na protein po analizi vzorca s HT metodo. Opazili smo, da je delež preostalih vezanih *N*-glikanov na monoklonskem protitelesu zelo majhen, različne strukture pa ostanejo vezane na protein v enakem deležu. Medtem ko je delež preostalih vezanih *N*-glikanov na fuzijskem proteinu večji. Pri slednjem encim s proteina slabše cepi večje in sialilirane *N*-glikanske strukture, ki zato ostajajo vezane na protein v večji meri.

HT metoda je, kljub nepopolni deglikozilaciji, primerna za analitiko monoklonskega protitelesa, saj je primerljiva s klasično metodo, pri kateri dobimo popolno deglikozilacijo.

V primeru fuzijskega proteina pa je zaradi popolne deglikozilacije proteina ustreznejša klasična metoda z dodatnim denaturacijskim korakom.

Ključne besede: biološka zdravila, *N*-glikozilacija, klasična metoda, analitska metoda visoke zmogljivosti, encimska deglikozilacija

ABSTRACT

Biopharmaceutical drugs are usually glycoproteins and appropriate glycosylation is one of the most important post-translational modifications. It has great impact on solubility, stability, pharmacokinetics and pharmacodynamics, bioactivity and safety (e.g. immunogenicity) of therapeutic proteins. Due to its various functional implications, glycosylation represents a critical quality attribute and therefore requires close monitoring during bioprocess development and routine manufacturing.

Analysis of *N*-glycans contains many steps, including optional denaturation of protein, enzymatic release of glycans, separation and labeling of released glycans. Enzymatic deglycosylation represents the most crucial step in this process, since its efficiency is important for reliable results. In master's thesis we compared the deglycosylation efficiency of classical and high throughput (HT) method for *N*-glycan sample preparation. The major difference between these two methods is the denaturation step and in the deglycosylation step (in-solution at classic and on a solid surface at HT). Because the classical method is more time consuming HT sample preparation is becoming more and more important and desirable for the support of bioprocess development. As model protein we used monoclonal antibody IgG (subclasses IgG₁ and IgG₂) and fusion protein.

The deglycosylation efficiency of both sample preparation methods was verified with capillary electrophoresis. We observed that complete deglycosylation of monoclonal antibody is obtained by classical method, and the fusion protein sample by classical method with additional denaturation step. Whereas using the HT method a part of *N*-glycans still remains attached on protein (both in the monoclonal antibody and in the fusion protein). With chromatographic method we further identified the presence of the remaining *N*-glycans that stay attached to the protein after HT sample preparation. We observed that the proportion of bound *N*-glycans on the monoclonal antibody is very small and the various structures remain attached to the protein in the same amounts. While the proportion of bound *N*-glycans on the fusion protein is greater. Larger and sialylated *N*-glycan structures are poorly cleaved by enzyme, so they remain attached to the protein to a greater extent.

HT method, despite incomplete deglycosylation, is suitable for the analysis of the monoclonal antibody, as it is comparable to the classical method in which complete

deglycosylation is obtained. In the case of fusion protein, the classical method with additional denaturation step is more appropriate due to complete protein deglycosylation.

Key words: biopharmaceuticals, *N*-glycosylation, classical method, high throughput method, enzyme deglycosylation

SEZNAM OKRAJŠAV

2-AB	2-aminobenzamid
2-ME	2-merkaptoetanol
ACN	acetonitril
ADCC	od protitelesa posredovana celična citotoksičnost (ang. <i>antibody dependent cell mediated cytotoxicity</i>)
Asn297	<i>N</i> -glikozilacijsko mesto na asparaginu težke verige, na mestu 297
CDC	s komplementom posredovana citotoksičnost (ang. <i>complement dependent cytotoxicity</i>)
CE	kapilarna elektroforeza
CE-SDS	kapilarna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata
CHO	ovarijske celice kitajskega hrčka (ang. <i>chinese hamster ovary cell</i>)
CQA	kritična lastnost kakovosti (ang. <i>critical quality attributes</i>)
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EOF	elektroosmogni tok
ER	endoplazemski retikulum
FcRn	neonatalni Fc receptor
Fc γ R	Fc receptor za protitelesa IgG
FDA	ameriška agencija za hrano in zdravila (ang. <i>food and drug administration</i>)
FLR detektor	fluorescenčni detektor
Fuc	fukoza
GA	golgijev aparat
Gal	galaktoza
GalNAc	N-acetylgalaktozamin
Glc	glukoza

GlcNac	N-acetilglukozamin
HC	glikozilirana težka veriga protitelesa
HC-NG	neglikozična težka veriga protitelesa
HILIC	tekočinska kromatografija hidrofilnih interakcij (ang. <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i>)
HP	protein večje molekulske mase (ang. <i>heavy protein</i>)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (ločljivosti) (ang. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HT metoda	analitska metoda visoke zmogljivosti (ang. <i>high throughput method</i>)
IAA	jodacetamid
Ig	imunoglobulin
LC	lahka veriga protitelesa
LP	protein manjše molekulske mase (ang. <i>light protein</i>)
mAb	monoklonsko protitelo
Man	manoza
NP-LC	normalno fazna tekočinska kromatografija
PNGaza-F	N-glikozidaza F
RP-LC	reverzno fazna tekočinska kromatografija
RRT	relativni retencijski čas (ang. <i>relative retention time</i>)
RSD	relativni standardni odklon (ang. <i>relative standard deviation</i>)
SDS	natrijev lavrilsulfat (ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
ST	sobna temperatura
TCEP	tris (2-karboksietil) fosfin
TFA	trifluoroocetna kislina
UPLC	tekočinska komatografija ultra visoke zmogljivosti (ločljivosti) (ang. <i>ultra performance liquid chromatography</i>)
UV detektor	ultravijolični detektor

1. UVOD

1.1 BIOLOŠKA ZDRAVILA

Prva naključno odkrita zdravila, ki jih je človek uporabljal, so bili posušeni deli rastlin in živali, ki jih uvrščamo med najpreprostejša naravna biološka zdravila. Z nadaljnjiimi medicinskimi raziskavami se je širilo razumevanje mehanizmov povezanih z bolezenskimi procesi. Prišlo je do odkritja beljakovin, ki so naravno prisotne v telesu in imajo dobre terapevtske lastnosti. S tem se pojavi tradicionalna biološka zdravila, ki so pridobljena z izolacijo iz rastlin, živali in človeške krvi. S prva je bila njihova izolacija in uporaba v medicini nepraktična, zaradi visoke cene pridobivanja, nahajanja majhnih količin v naravi in možnosti okužbe bolnika zaradi prisotnih nečistot. Druga generacija bioloških zdravil se pojavi z razvojem rekombinantne tehnologije DNA (genski inženiring) in pojavom monoklonskih protiteles (hibridomska tehnologija). S tem je farmacevtska biotehnologija razvila nove poti za pridobivanje spojin proteinskega izvora oz. sodobnih bioloških zdravil. Prvo biotehnološko zdravilo na svetu, rekombinantni človeški insulin - Humulin[®], je bilo s strani FDA odobreno leta 1982. Razvoj pa se ni ustavil, ampak gre naprej v izboljšavo obstoječih bioloških zdravil. Izboljšana biološka zdravila (*ang. biobetters*), izkazujejo bolj ugodne farmakokinetične in farmakodinamične lastnosti, večjo stabilnost zdravila, podaljšan razpolovni čas in manjšo imunogenost. Danes imamo že širok nabor bioloških zdravil za zdravljenje rakavih, infektivnih, avtoimunskih in kardiovaskularnih obolenj, ter genskih in nevroloških motenj. (1, 2)

Inovativno (referenčno) zdravilo je tisto, ki je prvo prodrlo na trg. Je plod dolgoletnih raziskav, z namenom izboljšati način zdravljenja ali pa odkriti zdravila za bolezni, pri katerih jih še ne poznamo. Po preteklu patentnih zaščit, pa lahko na trg vstopijo generična zdravila. To so zdravila, pri katerih je struktura učinkovine enaka referenčni. Ker je od procesa odvisno kakšno bo biološko zdravilo, pa dva biofarmacevtika ne moreta biti identična. Že ena sama sprememba v procesu proizvodnje da nekoliko drugačno obliko zdravila, zato izraz generik, na področju bioloških zdravil ni ustrezен. Bolj primeren izraz za ta zdravila je biološko podobna zdravila (*ang. biosimilars*), ki se po kakovosti, varnosti in učinkovitosti ne smejo razlikovati od inovativnega zdravila. Za pridobitev dovoljenja za prodajo je potreben dokaz, da je zdravilo dovolj podobno zdravilu, ki dovoljenje že ima. Njihova največja prednost pa je, da močno znižujejo stroške zdravljenja. (1)

Biološka zdravila se močno razlikujejo od klasičnih zdravil. Gre za proteinske molekule, ki imajo zapleteno tridimenzionalno zgradbo in veliko večjo molekulsko maso kot organske molekule. Za razliko od klasičnih zdravil, ima le ena struktura (nativna) optimalno delovanje. Pogosto gre za heterogene molekule, z različno glikozilacijo, ki so lahko tudi imunogene. Proces proizvodnje je bistveno bolj zahteven, saj zahteva uporabo živih organizmov. Biti mora skrbno nadzorovan saj je ključen za zgradbo in delovanje končnega zdravila. Za njihovo popolno karakterizacijo pa poleg fizikalno-kemijskih analiznih metod potrebujemo še dodatne tehnike, kot so kapilarna elektroforeza, določevanje peptidne zgradbe, masna spektrometrija in analiza glikozilacije. (1)

1.2 PROTEINI

Proteini so biološki polimeri. Vsaka vrsta proteinov ima v DNA zapisu določeno točno zaporedje med seboj povezanih aminokislin. To jim daje značilno velikost, obliko in biološko aktivnost. Zaporedje aminokislin v polipeptidni verigi določa primarno strukturo, ki je osnova za nadaljnje zvijanje proteina. Sekundarna struktura zajema urejene, ponavljajoče se strukturne elemente (α -vijačnica, β -struktura), ki se lahko povezujejo med seboj in tvorijo terciarno strukturo. Le ta predstavlja popolno tridimenzionalno ureditev v prostoru, ki je potrebna za določeno biokemijsko vlogo. Stabilizirajo jo nekovalentne interakcije kot so vodikove vezi, ionske vezi in hidrofobne interakcije. Kvartarna struktura pa povezuje več polipeptidnih verig v funkcionalen protein z več podenotami. Med proteine prištevamo tudi protitelesa, encime ter nekatere hormone. (3)

1.2.1 Protitelesa

V zadnjih letih so monoklonska protitelesa (mAb) doživela množično uporabo v diagnostiki, poleg tega pa predstavljajo najhitreje rastočo skupino bioloških zdravil. Največja prednost uporabe mAb v terapevtske namene je, da omogočajo ciljano zdravljenje, saj imajo visoko specifičnost vezave na tarčno molekulo. Večina terapevtskih mAb je IgG razreda, ali natančneje IgG₁, IgG₂ in IgG₄ podrazreda. (1, 4)

Protitelesa ali imunoglobulini (Ig) so molekule, ki posredujejo večji del humoralne imunosti. Nastajajo v limfocitih B po aktivaciji z antigenom. So glikozilirani globularni proteini, prisotni v krvi, tkivnih tekočinah in telesnih izločkih. Sestavljajo jih dve identični težki (50 kDa) in dve identični lahki (25 kDa) polipeptidni verigi. Verige med seboj povezujejo disulfidne vezi, tako da tvorijo strukturo v obliki črke Y. Glede na vrsto težke

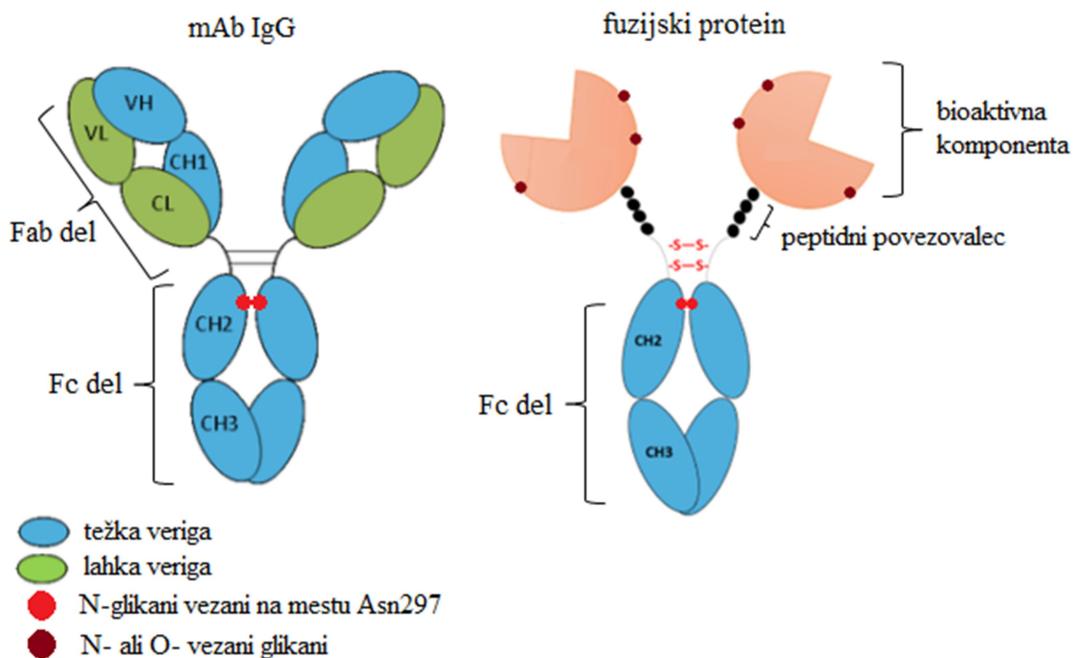
verige (γ , α , δ , ϵ , μ) protitelesa delimo v 5 razredov: IgG, IgA, IgD, IgE in IgM. Ker imamo dve vrsti luhkih verig (κ , λ), se protitelesne molekule nahajajo v tipu z luhkimi verigami κ ali v tipu z luhkimi verigami λ . Pri človeku sta oba tipa v približno enakem razmerju, pri živalskih vrstah pa je razmerje obeh tipov različno. Molekule protiteles se med seboj razlikujejo po zgradbi, lastnostih, zaščitni vlogi, po količini v serumu in po razpolovnem času. (1, 5)

1.2.1.1 Protitelesa IgG razreda

Imunoglobulin G predstavlja 75 % vseh protiteles v obtoku in ima najdaljšo življenjsko dobo. Nastaja pri naravni infekciji ali imunizaciji z virusi, bakterijami ali njihovimi produkti. Glede na različno število disulfidnih vezi v gibljivem delu molekule, se dodatno deli v 4 podrazrede: IgG₁, IgG₂, IgG₃ in IgG₄. Kljub temu, da so si na ravni aminokislinskega zaporedja več kot 90 % identični, pa ima vsak podrazred svoje lastnosti. IgG je edini razred protiteles, ki lahko prehaja skozi placento v plod in daje otroku zaščito pred okužbo, v prvih tednih življenja. (5, 6, 7)

Je monomerno protitelo, sestavljeno iz dveh luhkih (LC) in dveh težkih γ verig (HC). Vsaka težka veriga ima na N-terminalnem delu variabilno področje (VH), kateremu sledijo tri konstantna področja (CH1, CH2 in CH3) z gibljivim delom med CH1 in CH2. Lahka veriga ima prav tako variabilno področje (VL), vendar le eno konstantno področje (CL). Del, ki veže antigen, se imenuje Fab in je sestavljen iz lahke verige in iz VH in CH1 področij težke verige. Komplementarnost določajoča področja (CDR), ki se nahajajo na VL in VH omogočajo visoko specifičnost vezave protitelesa na antigen. Drugi del protitelesa se imenuje Fc in je sestavljen iz ostalih konstantnih področij obeh težkih verig. Pomemben je pri interakciji protitelesa z ostalimi elementi imunskega sistema. Lahko se poveže z različnimi Fc receptorji za protitelesa IgG (Fc γ R) in s tem sproži različne poti obrambe. Z vezavo na Fc γ R prisotne na površini mononuklearnih fagocitov in nevtrofilcev pride do opsonizacije in s tem do pospešene fagocitoze antigenov. Lahko se veže na Fc γ RIII, ki se nahajajo na naravnih celicah ubijalkah in posreduje od protitelesa posredovano celično citotoksičnost (ADCC). Ko se kompleks antigen-protitelo z delom Fc veže na beljakovino C1q pride do aktivacije klasične poti komplementnega sistema oz. s komplementom posredovane citotoksičnosti (CDC). IgG pa se lahko poveže tudi na neonatalni Fc receptor (FcRn), ki mu omogoča prehod skozi placento. (1, 5, 6)

Na efektorske funkcije in vezavo na Fc γ R pa ima poleg podrazreda težke verige močan vpliv tudi zgradba glikanov v delu Fc protitelesa. Pri IgG molekulah najdemo visoko ohranjeno glikozilacijsko mesto na asparaginu oben težkih verig, na mestu 297 (Asn297). Kljub temu da velja to mesto za edino glikozilacijsko mesto, pri 10-15 % vseh serumskih IgG najdemo glikozilacijo tudi v variabilni regiji. (1, 5, 6)



Slika 1: Zgradba monoklonskega protitelesa IgG in fuzijskega proteina.

1.2.2 Fuzijski proteini

Leta 1998 je bil s strani FDA odobren prvi fuzijski protein in od takrat ta skupina predstavlja najhitreje razvijajoči razred derivatov mAb. Sestavljeni so iz dela Fc imunoglobulina, na katerega je neposredno ali posredno - prek peptidnega povezovalca, pripeta bioaktivna komponenta, ki nadomešča del Fab. Generiranje fuzijskih proteinov poteka na genetskem nivoju, največkrat pa se zaradi ugodnih lastnosti uporablja del Fc molekule IgG₁. Fuzijski partnerji imajo velik terapevtski potencial, medtem ko del Fc prispeva koristne biološke in farmakološke lastnosti. (8, 9)

Glavni razlog za razvoj fuzijskih proteinov je podaljšanje razpolovne dobe. Številni biološko aktivni proteini (zunajcelične domene receptorjev, citokini, encimi, bioaktivni peptidi) imajo zelo kratko serumsko razpolovno dobo. Posledično imajo omejeno izpostavljenost v tarčnem tkivu in s tem kraši farmakološki učinek. Vezava na Fc del zaščiti bioaktivno komponento pred prehitro proteolitično razgradnjo, z izkorisčanjem

mehanizma recikliranja preko FcRn, zaradi večje velikosti molekule, pa se zmanjša tudi ledvični očistek. Drugi pomembni vidik Fc regije je, da ima ohranjene Fc efektorske funkcije. (8, 9)

Vendar pa farmakokinetika fuzijskih proteinov ni odvisna samo od dela Fc, temveč tudi od fuzijskega partnerja in z njim povezano glikozilacijo. Fuzijski proteini so pogosto bolj obširno glikozilirani kot mAb. Vsebujejo eno *N*-glikozilacijsko mesto na delu Fc vsake težke verige (Asn297), ter več glikozilacijskih mest, ki so lahko *N*- ali *O*-glikozilirana, na bioaktivni komponenti. Večja kot je vsebnost sialične kisline na vezanih glikanih, manjši bo očistek. (4, 8)

1.3 GLIKOZILACIJA

Glikozilacija je encimsko dodajanje ogljikovih hidratov na proteine in velja za najkompleksnejšo post-translacijsko modifikacijo. Zagotavlja največjo raznolikost, saj omogoča spremenjanje mesta vezave in vrste sladkorjev, ki so povezani s proteinom, lahko gre za dolge ali kratke verige, razvezanih ali nerazvezanih oligosaharidov. Odvija se v endoplazemskem retikulumu (ER) in golgijskem aparatu (GA). Vključuje vrsto encimsko kataliziranih reakcij, pri katerih sodelujejo glikoziltransferaze in glikozidaze. (4,10) Proteine, ki imajo kovalentno vezan ogljikov hidrat, imenujemo glikoproteini. Najpogosteje jih sestavlja monosaharidi manoza (Man), galaktoza (Gal), fukoza (Fuc), N-acetilgalaktozamin (GalNAc), N-acetylglukozamin (GlcNAc), sialična kislina (N-acetylnevraminska kislina) in glukoza (Glc). (3)

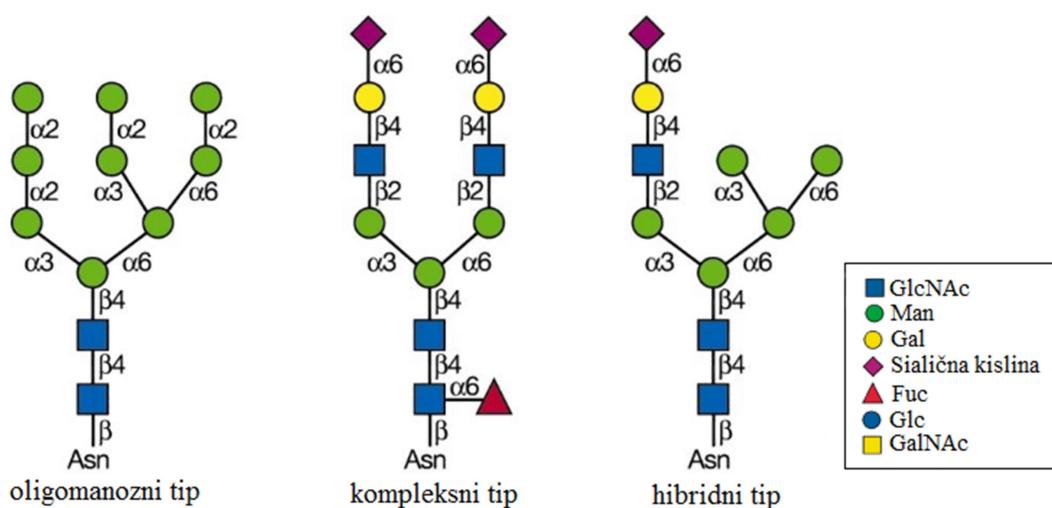
Glikozilacija deluje brez določene podlage ali načrta. To je vzrok, da vsi koraki ne nastanejo med vsako sintezo in tako dobimo nabor različnih glikoproteinov. Tu med seboj sodeluje več encimov, ki so visoko organizirani, saj je posamezna encimska aktivnost odvisna od zaključka prejšnje encimske reakcije. Encimska aktivnost je odvisna tudi od fiziološkega stanja in vrste celice. Nabor različnih glikanskih struktur, ki jih nosijo terapevtska mAb in fuzijski proteini, je tako odvisen tudi od vrste gostiteljskih celic. Poznamo več vrst glikozilacije. Najpogostejsa je *N*-glikozilacija, pri kateri je oligosaharid vezan na dušik asparagina, vezava pri *O*-glikozilaciji gre preko hidroksilne skupine serina ali treonina, pri vezavi manoze na triptofan pa gre za *C*-glikozilacijo. (4, 10)

Glikani imajo številne funkcije. Sodelujejo pri imunskem odzivu, pri vezavi med proteini in medsebojnem prepoznavanju celic, delujejo kot ligandi za receptorje na celični površini, ker so hidrofilni lahko spremenijo topnost proteina, v ER pa sodelujejo pri nadzoru kakovosti zvijanja proteina. (3, 10)

1.3.1 N-glikozilacija

Čeprav glikozilacijo označujemo kot post-translacijsko modifikacijo, to ne velja pri sintezi N-glikanov. Ta se začne odvijati že med samo sintezo proteina, zato jo označujemo kot ko-in post-translacijsko modifikacijo. (10) Poznavanje N-glikanov je pomembno, ker vplivajo na številne lastnosti glikoproteinov. Kot že omenjeno so pomembni pri vezavi IgG na Fc γ R. Pri načrtovanju terapevtskih proteinov je ta vidik še posebej pomemben, saj si želimo dobiti protein, ki se bo vezal na pravilne receptorje in bo sprožil želene učinke v telesu.

Znanih je več N-glikanskih povezav, najpogostejsa med njimi pa je vezava N-acetylglukozamina preko glikozidne vezi na asparagin. Da pa asparagin lahko veže N-glikane, mora biti izpolnjena zahteva o minimalnem zaporedju aminokislin. Tako so kandidati za vezavo le zaporedja, ki se začnejo z asparaginom, kateremu sledi katerakoli aminokislina razen prolina in se končajo s serinom ali treoninom (Asn-X-Ser/Thr). Kljub prisotnosti ustreznega zaporedja pa do prenosa N-glikanov, zaradi konformacijskih ali drugih ovir med zvijanjem, ne pride vedno. Prav tako se učinkovitost glikozilacije zmanjša ko je na mestu X kisla aminokislina. (11)

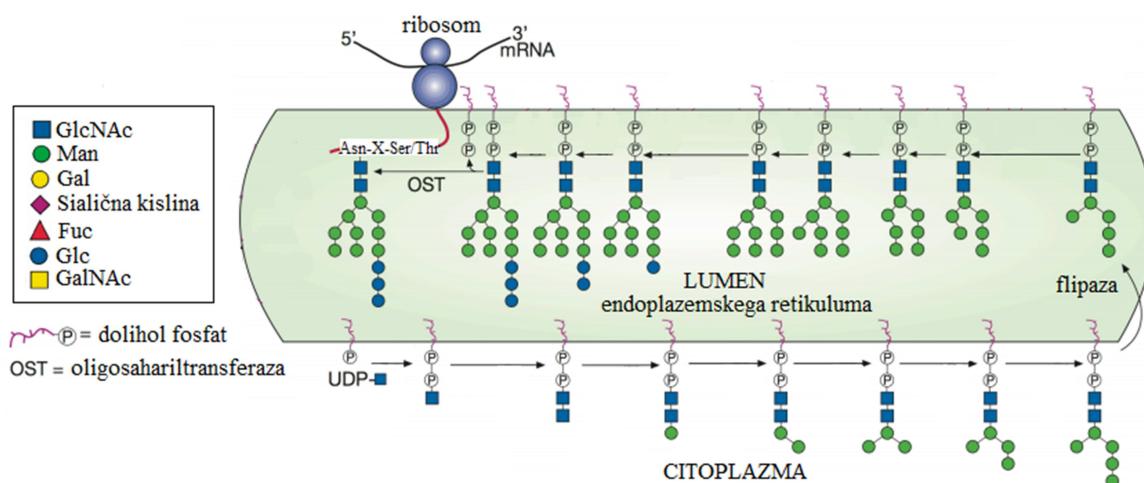


Slika 2: Oligomanozni, kompleksni in hibridni tip N-glikanov.
Povzeto po (11)

N-glikane delimo v tri tipe, ki si delijo enako jedro, sestavljeno iz treh manoz in dveh N-acetylglukozaminov ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$). Prvi je oligomanozni tip, v katerem so na jedro pritrjeni le manozni ostanki, drugi je kompleksni tip, v katerem se pritrjevanje na jedro različnih monosaharidov začne z N-acetylglukozaminom in zadnji je hibridni tip, ki je združitev obeh. Tu so na jedrno manozo α 1-6 vezani le manozni ostanki na jedrno manozo α 1-3 pa kompleksna veriga. (11)

1.3.1.1 Sinteza *N*-glikanov

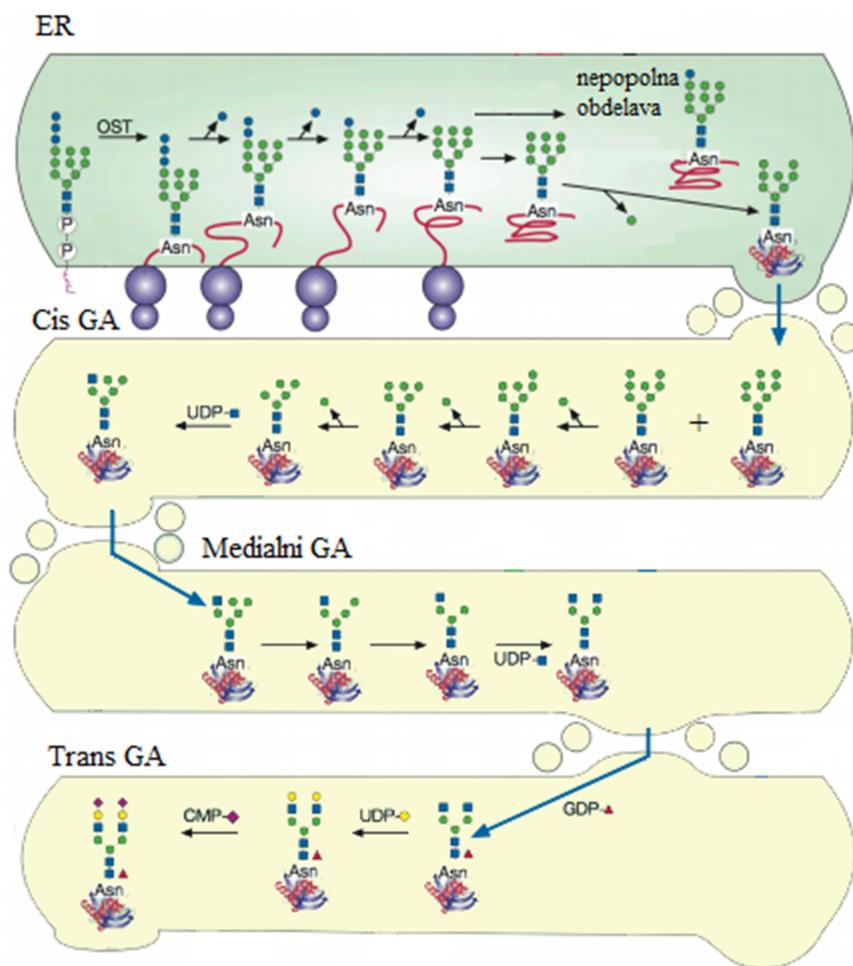
Sinteza *N*-glikanov je precej zapleten proces. Začne se na citoplazemskem delu membrane ER s prenosom GlcNAc-P iz uridin-difosfata N-acetylglukozamina (UDP-GlcNAc) na molekulo, vezano na membrani, ki jo imenujemo dolihol fosfat (Dol-P). Ta korak katalizira encim GlcNAc-1-fosfotransferaza, pri tem pa nastane dolihol pirofosfat N-acetylglukozamin (Dol-P-P-GlcNAc). Dolihol je lipid, sestavljen iz izoprenskih enot. Vsaka enota ima med seboj povezanih pet ogljikov, število izoprenskih enot pa se razlikuje med celicami, med vrstami celic in med organizmi. Na Dol-P-P-GlcNAc se nato zaporedno doda 6 monosaharidnih enot, en N-acetylglukozamin, ter pet manoz. Na citoplazemski strani ER tvorijo kompleks $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$, ki se nato s pomočjo flipaze prenese na notranjo stran ER. Ko je kompleks izpostavljen lumnu ER se podaljša še za štiri manoze in tri glukoze. S tem je zaključena sinteza *N*-glikanskega predhodnika $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$. Oligosahariltransferaza nato cepi vez GlcNAc-P in prenese kompleks štirinajstih monosaharidov iz Dol-P-P na Asn-X-Ser/Thr regijo na proteinu. (11)



Slika 3: Sinteza *N*-glikanskega predhodnika v endoplazemskem retikulumu.
Povzeto po (11)

Sledi predelava *N*-glikanov v ER in GA. Predvsem prvi koraki so ključni pri zvijanju proteina. Proses predelave $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ se začne z odstranitvijo treh glukoz, ki jo katalizirata encima α -glukozidaza I in α -glukozidaza II. Pred izstopom iz ER glikoprotein spremeni še α -manozidaza I, ki odstrani terminalno manozo iz centralne veje. Tako iz $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ dobimo $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$, ki se iz ER prenese v GA. (11)

Nekateri glikani imajo v cis predelku GA, zaradi nepopolne obdelave v ER, še vedno vezane ostanke glukoze. Tu encim endo- α -manozidaza cepi vez med dvema manoznima ostankoma, tako da odstrani terminalno glukozo in manozo, na katero je glukosa vezana. S tem dobimo nekoliko drugačen $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ izomer, kot tisti, ki je proizведен v ER. V cis predelku GA se nadaljuje odstranjevanje manoznih ostankov z manozidazo, tako da na koncu dobimo kompleks $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$, ki je pomemben vmesni produkt v sintezi hibridnih in kompleksih *N*-glikanov. Če se kompleks izogne nadaljnjam spremembam, pa dobimo oligomanozni tip *N*-glikanov ($\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$). (11)



**Slika 4: Predelava *N*-glikanov v endoplazemskem retikulumu in golgijevem aparatu.
Povzeto po (11)**

Sinteza hibridnih in kompleksnih *N*-glikanov se nadaljuje z delovanjem N-acetilglukozaminiltransferaze (GlcNAcT-I), ki na jedrno manozo doda N-acetilglukozamin. Šele po tem koraku lahko α -manozidaza II, v medialnem predelku GA, odcepi preostali terminalni manozi na drugi veji. Odkrije se druga jedrna manoza, na katero encim GlcNAcT-II doda drug N-acetilglukozamin in s tem dobimo GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂Asn, ki je predhodnik za *N*-glikane kompleksnega tipa. Hibridni *N*-glikani nastanejo, če na kompleks Man₅GlcNAc₂Asn deluje encim GlcNAcT-I, ne pa tudi α -manozidaza II. S tem terminalni manozi ostaneta nedotaknjeni in nespremenjeni v zreli obliki glikoproteina. Nadaljnje dodajanje sladkorjev poteka v trans predelku GA, kjer lahko pride do vezave fukoze na jedro, do podaljševanja verige z vezavo galaktoze na končni N-acetilglukozamin ali do dodajanja sialične kisline. (11)

1.3.1.2 Klinični vidik različnih *N*-glikanov

Sestava Asn297 glikanov vpliva na stabilizacijo protitelesa, na kvartarno strukturo saj omogoča bolj odprto zgradbo dela Fc, neposredno sodeluje pri vezavi z Fc γ R, ter s specifičnimi spremembami na tem mestu tudi uravnava interakcije. Sprememba glikanske strukture povzroči konformacijsko spremembo v delu Fc in s tem se spremeni afiniteta vezave za določen Fc γ R. Fc γ R lahko razdelimo na aktivacijske (Fc γ RIa, Fc γ RIIa in Fc γ RIIIa), ki vodijo v pro-vnetne aktivnosti in na zaviralne (Fc γ RIIb), ki imajo protivnetno delovanje. Vezavo terapevtskih protiteles na aktivacijske receptorje izkoriščamo pri imunoterapijah, medtem ko si želimo vezave na zaviralne receptorje pri zdravljenju avtoimunskih bolezni. (6, 7)

Ni še čisto pojasnjeno, kako različne *N*-glikanske strukture vplivajo na delovanje efektorskih funkcij, vendar so nekateri vidiki vse bolj jasni. Zelo dobro je znano, da se protitelesa, ki nimajo vezane jedrne fukoze, zaradi manjšega steričnega oviranja, lažje vežejo na Fc γ RIIIa in s tem pride do povečanega ADCC odziva. Nasprotno pa visoko fukozilirana protitelesa znižujejo ADCC odziv. Za pridobivanje terapevtskih mAb brez jedrne fukoze, so zelo primerne ovarijske celice kitajskega hrčka (CHO), ki jim primanjkuje encima fukoziltransferaze. Protitelesa brez jedrne fukoze kažejo zelo visoko, do 50-krat višjo afiniteto do Fc γ RIIIa, medtem ko ob vezavi N-acetilglukozamina na sredinsko manozo zasledimo, do 20-krat višjo afiniteto do Fc γ RIIIa. Dodatek N-acetilglukozamina na sredinsko manozo zavre jedrno fukozilacijo zaradi česar pride do enakega učinka, višjega ADCC odziva. (4, 6, 7, 12)

Znano je tudi, da dodatek galaktoze omogoča vezavo na Fc γ RIIb in s tem povzroči protivnetno delovanje. Protitelesa z zmanjšano galaktozilacijo tako najdemo pri številnih avtoimunskih boleznih. Visoka galaktozilacija pri terapevtskih protitelesih pa se lahko odraža v povečani vezavi na beljakovino C1q, kar privede do CDC odziva. Tudi sialična kislina, ki ima največji vpliv na strukturo dela Fc, sodeluje pri protivnetnem delovanju, kar vodi do zmanjšanega ADCC odziva. Zvečana sialilacija zapre vezavno mesto in onemogoči vezavo na aktivacijske Fc γ R. Povečani sialilaciji običajno sledi tudi povečana galaktozilacija, saj so galaktozni ostanki podlaga za sialiltransferaze. Na splošno pa je količina sialiliranih terapevtskih mAb nizka. (4, 6, 7, 12)

Ker oligomanozni tip (Man₅₋₉) ne preide vseh stopenj glikozilacije, ima močno pomanjkanje jedrne fukoze. Taki glikoproteini imajo zato višjo afiniteto vezave na Fc γ RIIIa in zato ojačajo ADCC odziv. Prav tako ker nimajo vezane galaktoze, posredujejo nižji CDC odziv. Zaradi vezave na manozne receptorje (ManR), ki se nahajajo v hepatocitih pa imajo ti glikoproteini hitrejši očistek in s tem krajšo življensko dobo. (4, 6, 7, 12)

Struktura glikanov pa poleg farmakodinamičnih in farmakokinetičnih lastnosti, vpliva tudi na varnost terapevtskih protiteles. Rekombinantni proteini, proizvedeni v CHO celicah, imajo podobne glikozilacijske vzorce kot protitelesa, prisotna v človeškem serumu. Mišje celice (NS0 ali SP2/0) pa lahko dodajo monosaharid, ki naravno ni prisoten v telesu. Gre za dodajanje galaktoznega epitopa (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R) ali N-glikolineuraminske kisline. Ko se jih uporabi kot zdravila so lahko imunogena in povzročajo preobčutljivostne reakcije. (4, 6, 7, 12)

Glikozilacijski vzorec terapevtskih proteinov je odvisen tako od gostiteljskih celic kot tudi od uporabljenega bioprosesa. Je eden od ključnih lastnosti kakovosti (CQA), saj predstavlja glavni vir heterogenosti z možnim vplivom na varnost in učinkovitost zdravila. CQA je opredeljena kot fizikalna, kemijska, biološka ali mikrobiološka lastnost, ki mora biti v ustreznom območju, da zagotovi želeno kakovost, varnost in učinkovitost produkta. Pri načrtovanju terapevtskih proteinov je potrebno razumeti vpliv glikozilacije na farmakodinamiko in farmakokinetiko, zagotoviti ustrezne profile varnosti in učinkovitosti, ter skrbeti za kontrolo med razvojem bioprosesa in proizvodnjo tako pri inovativnih kot tudi pri biološko podobnih zdravilih. (4, 12)

1.4 ANALITIKA BIOLOŠKIH ZDRAVIL

Da lahko zagotavljamo ustrezeno kakovostno sestavo v vseh fazah proizvodnje, vključno z gotovim zdravilom, je tudi pri bioloških zdravilih potrebno spremljati istovetnost zdravilne snovi, njeno koncentracijo in prisotnost nečistot. Pri tem si pomagamo z različnimi analiznimi metodami, ki jih ločimo na separacijske, spektroskopske ter imunološke. (1)

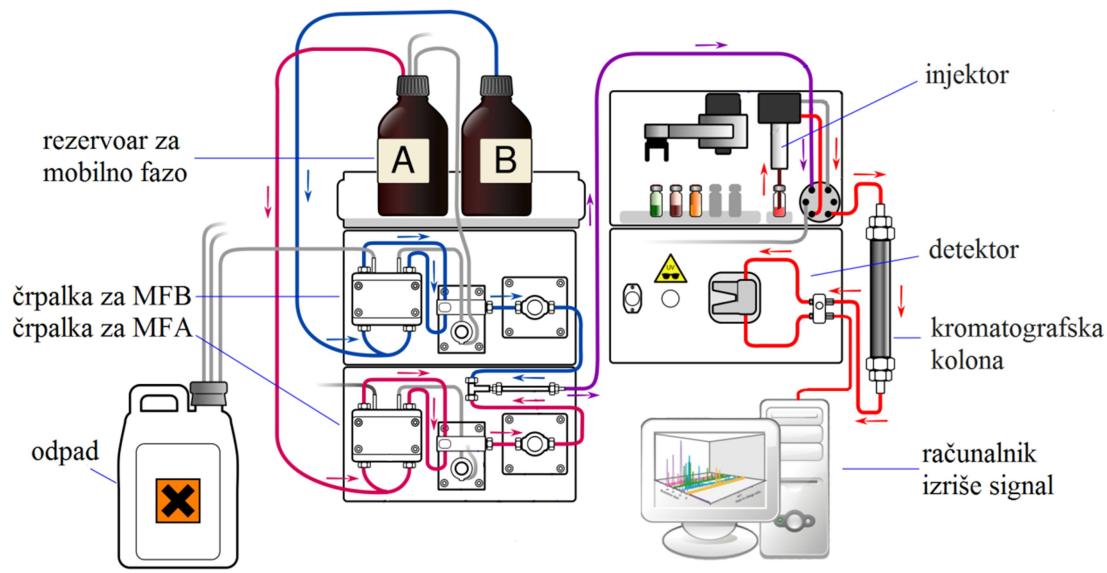
1.4.1 Kromatografija

Kromatografija je najpogosteje uporabljena separacijska metoda. Omogoča tako analizo, izolacijo kot tudi čiščenje vzorca. Osnova kromatografskih metod je porazdeljevanje molekul med stacionarno in mobilno fazo. Komponente vzorca potujejo s tokom mobilne faze skozi stacionarno fazo in se pri tem ločujejo zaradi različnih fizikalnih interakcij. Najprej se eluirajo komponente, ki imajo najmanjšo afiniteto do stacionarne faze, nato pa še komponente, ki imajo večjo afiniteto do stacionarne faze in se v njej zadržujejo dlje časa. Glede na položaj stacionarne faze in način potovanja mobilne faze ločimo kolonsko in planarno kromatografijo. (1)

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) predstavlja eno izmed najmočnejših orodij v analizni kemiji. Ima sposobnost za ločevanje, identifikacijo in kvantifikacijo spojin v vzorcih, raztopljenih v tekočini. Glede na mehanizem ločevanja, jo razdelimo na porazdelitveno, adsorpcijsko, ionsko izmenjevalno, izključitveno, afinitetno in kiralno kromatografijo. Porazdelitveno kromatografijo pa delimo naprej na normalno fazno (NP-LC) in reverzno fazno (RP-LC). NP-LC je uporabna za ločevanje polarnih analitov, saj uporablja polarne kolone in nepolarne mobilne faze, ki so sestavljene iz organskega topila. RP-LC pa uporablja nepolarne kolone, ter mešanico vode in organskega topila za mobilne faze, zato je primerna za ločevanje manj polarnih komponent. (1, 13, 14) V zadnjih 20. letih je prišlo do izboljšanj kolon in instrumentov, s čimer se je doseglo znatno izboljšanje v resoluciji, hitrosti in občutljivosti pri tekočinski kromatografiji. Novemu sistemu, ki omogoča tako izvedbo, pravimo tekočinska kromatografija ultra visoke zmogljivosti (UPLC). (13)

Kromatografska oprema je sestavljena iz več komponent. Rezervoar drži mobilno fazo, črpalka ustvari tlak, ki z določenim pretokom neprestano poganja mobilno fazo v kolono, injektor pa potisne vzorec v tekočo mobilno fazo. Po injiciranju vzorca, sledi ločitev komponent v kromatografski koloni, ki je napolnjena z majhnimi sferičnimi delci, katerih

pore so prekrite s stacionarno fazo. Detektor, je nameščen neposredno po koloni in pretvarja fizikalne ali kemijske lastnosti eluiranega analita v električne signale. V večini primerov se uporablja ultravijolični (UV) ali fluorescenčni (FLR) detektor, ki je povezan z računalnikom. Le ta nam izriše signal, glede na čas, kar zaznamo kot kromatografski vrh s pripadajočim retencijskim časom. Retencijski čas nam po primerjavi z referenčnim standardom pove identiteto vsakega vrha, medtem ko nam površina vrha pove, koliko spojine je prisotne v vzorcu. (1, 13, 15, 16)



Slika 5: Kromatografska oprema.
Povzeto po (17)

1.4.1.1 HILIC kromatografija

Po uvedbi RP-LC, je bila uporaba NP-LC vedno manj pogosta. V današnjem času pa priljubljenost NP-LC ponovno narašča v bioanalitskih aplikacijah, saj so zdravila in njihovi metaboliti pogosto polarne strukture. (13, 18)

Najnovejša različica NP-LC je tako imenovana tekočinska kromatografija hidrofilnih interakcij oz. HILIC. Uporabna je pri ločevanju zelo polarnih spojin, kot so oligosaharidi, peptidi in aminokisline, ki so močno zadržane v NP-LC in šibko zadržane v RP-LC. Tako kot NP-LC, tudi HILIC kromatografija uporablja polarne stacionarne faze, mobilne faze pa so podobne tistim, ki se jih uporablja v RP-LC. So mešanica vode in organskega topila, najpogosteje acetonitrila. Kolone so sestavljeni iz prostih silicijevih delcev ali iz silicijevih delcev, ki imajo vezane polarne funkcionalne skupine. Najpogosteje vezane polarne funkcionalne skupine so amini, amidi in dioli. (13, 18, 19)

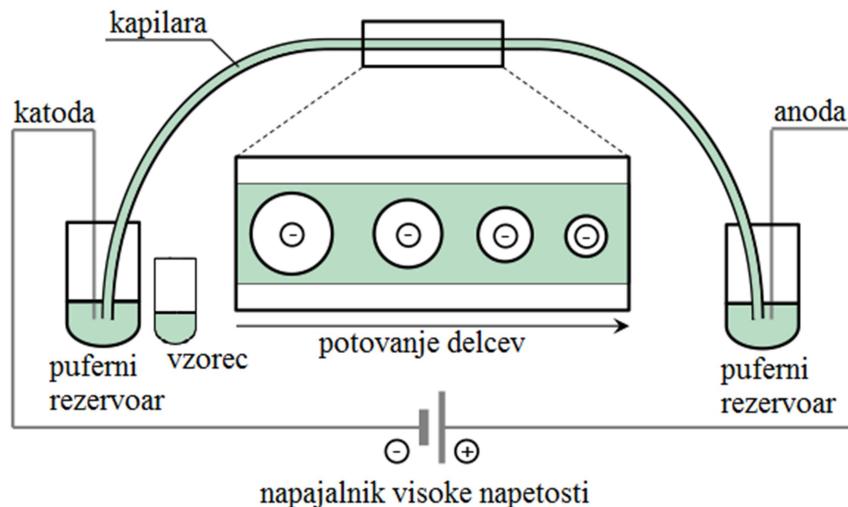
Mehanizem ločevanja molekul je zapleten in odvisen od številnih dejavnikov. Mobilna faza, z adsorpcijo vode na površino polarne stacionarne faze, oblikuje z vodo bogato plast, ki meji na plast mobilne faze s primanjkljajem vode. Ločevanje komponent vzorca je posledica porazdeljevanja molekul med obema plastema. Bolj kot je analit hidrofilen, bolj se bo zadrževal v imobiliziranem vodnem sloju na stacionarni fazi in posledično bo imel daljši retencijski čas. Zadrževanje pri HILIC kromatografiji je sorazmerno polarnosti analita in obratno sorazmerno polarnosti mobilne faze. Vendar pa je končni mehanizem elucije najverjetnejše prekrivanje porazdeljevanja med fazama in tvorbe vodikovih ali elektrostatičnih interakcij s stacionarno fazo. Kateri mehanizem bo prevladoval, je odvisno od tipa stacionarne faze, vrste organskega topila, koncentracije soli ter pH-ja. Za nadzor pH-ja mobilne faze in ionske moči, se običajno uporablja ionske dodatke kot so amonijev acetat in amonijev formiat, ki ohranjajo analite v nenabiti obliki. (13, 18, 19)

Ločitev je lahko izvedena v izokratičnem načinu, z nespremenjeno sestavo mobilne faze ali pa z gradientno elucijo, pri kateri se sestava mobilne faze spreminja skozi čas. Gradientna elucija se pri HILIC kromatografiji začne z visokim deležem organskega topila in konča z visokim deležem vodnega topila, s čimer se eluirajo polarni analiti. (13, 18)

1.4.2 Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza (CE) je sodobna separacijska analizna metoda, ki omogoča hitro ločevanje nabitih delcev pod vplivom električnega polja. Ločitev komponent poteka v prevodnem mediju v notranjosti ozke kapilare ob priključitvi visoke napetosti in temelji na razliki v elektroforezni mobilnosti ionov. Zaradi različnega celokupnega naboja, se nabite molekule gibljejo z različno hitrostjo, v smeri elektrode z nasprotnim naboljem. Na njihovo potovanje pa vpliva tudi jakost električnega polja, zavorni koeficient in dodatni tekočinski tok, imenovan elektroosmogni tok (EOF). Le ta nastane kot posledica vezave kationov iz puferne raztopine na površino kapilare, prekrite z negativno nabitim silanolnim skupinami. Ustvari se tako imenovana električna dvojna plast, ki ob priključitvi napetosti začne potovati proti negativno nabiti elektrodi in s seboj potegne celotno raztopino. Ker je EOF veliko močnejši kot elektroforezna mobilnost molekul, se vse molekule, ne glede na nabolj, gibljejo v isti smeri. (1, 20)

Sistem za CE je relativno enostaven. Sestavlja ga napajalnik visoke napetosti, dve elektrodi, ki sta potopljeni vsaka v svoj puferni rezervoar, kapilara z optičnim oknom ter UV detektor. Vzorec se injicira šele po napolnjenju kapilare s puferno raztopino, ko se eden od koncov kapilare potopi v raztopino vzorca. CE analize so zelo hitre in porabijo malo vzorca. (21)



Slika 6: Sistem za kapilarno elektroforezo.
Povzeto po (22)

Številne različne izvedbe metode, ki se med seboj razlikujejo po načinu ločitve in selektivnosti, omogočajo široko uporabnost CE. Med pogosteje uporabljenimi je kapilarna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata (CE-SDS), ki je zaradi večje enostavnosti, hitrosti in natančnosti analize, boljše ločljivosti, avtomatizacije in kvantitativne detekcije z UV detektorjem nadomestila tradicionalno poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata (SDS-PAGE). CE-SDS je metoda, ki ločuje molekule glede na njihovo velikost. Ločitveni medij v notranjosti kapilare vsebuje prepleteno polimerno mrežo, ki služi kot molekulsko sito, v katerem manjše molekule potujejo hitreje kot velike. Ker preprečuje nastanek elektroosmognega toka, je metoda podvržena omejitvi, da nevtralne molekule ne migrirajo skozi. (1, 20, 23, 24)

CE-SDS se uporablja za oceno čistosti terapevtskih proteinov pri razvoju, nadzoru kakovosti in testiranju stabilnosti. Poleg tega predstavlja močno orodje za karakterizacijo glikoproteinskih molekul, saj je metoda sposobna ločiti med glikozilirano in neglikozilirano (HC-NG) težko verigo. Ker imajo glikani velik vpliv na stabilnost in efektorsko funkcijo terapevtskih proteinov, je prisotnost HC-NG nezaželjena in je obravnavana kot nečistota produkta. (25)

2. NAMEN DELA

Glikozilacija je post-translacijska modifikacija, ki vpliva na stopnjo, stabilnost, farmakokinetiko in farmakodinamiko terapevtskega proteina, kot tudi na njegovo biološko učinkovitost. Neustrezna glikozilacija pa lahko sproži imunski odziv po vnosu proteina v krvni obtok. Da bi preprečili neželene učinke, je potreben skrben nadzor bioprocesa tako med razvojem kot tudi med proizvodnjo. Za to potrebujemo analizno metodo, ki je sposobna zaznati neustrezno proizveden produkt.

Priprava vzorcev za analizo *N*-glikanskega profila vsebuje več stopenj, med katerimi najpomembnejši korak predstavlja encimska sprostitev *N*-glikanov s proteina. Za zanesljive rezultate moramo doseči čim večjo učinkovitost deglikozilacije.

V okviru magistrske naloge bomo preverili in med seboj primerjali učinkovitost deglikozilacije dveh različnih metod za pripravo vzorcev za analizo *N*-glikanskega profila. Prva je klasična metoda, ki predstavlja referenčno metodo za analizo *N*-glikanskega profila, druga pa je analitska metoda visoke zmogljivosti (HT metoda), ki je zaradi svoje hitrosti čedalje bolj zaželjena, predvsem v zgodnjih fazah razvoja, kjer se srečujemo z velikim številom vzorcev. Največja razlika med metodama je ravno v stopnji encimske deglikozilacije proteina. Sprostitev *N*-glikanov pri klasični metodi poteče v raztopini, medtem ko pri HT metodi ta korak poteče z adsorbiranim proteinom na trdni površini. HT metoda pa se od klasične metode razlikuje tudi v stopnji priprave vzorcev, saj vsebuje še korak denaturacije proteina.

Kot modelni protein bomo uporabili monoklonsko protitelo IgG₁ in IgG₂, ter terapevtski fuzijski protein. Učinkovitost deglikozilacije proteina bomo preverili z elektroforezno metodo, razliko v prisotnih *N*-glikanskih strukturah med metodama pa s kromatografsko metodo. V primeru nezadostne deglikozilacije, bomo preverili kateri *N*-glikani ostanejo na proteinu in če le to pomembno vpliva na rezultat. Po potrebi bomo metodi poskušali tudi optimizirati z različnimi izboljšavami v sami pripravi vzorcev.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije in reagenti

Vse kemikalije, ki smo jih potrebovali tekom študije, so navedene v Preglednici I.

Preglednica I: Uporabljene kemikalije in proizvajalci

kemikalija	proizvajalec, kataloška številka
acetonitril (ACN)	J.T.Baker, 8143
amonijev formiat (amonijeva sol mravljične kisline)	Fluka, 17843
mravljična kislina (čistost $\geq 98\%$)	Merck, 100264
tris (hidroksimetil) aminometan (Tris)	Sigma, 93362
klorovodikova kislina (HCl) (čistost 32%)	Merck, 100319
N-glikozidaza F (PNGaza-F)	Roche, 11365193001
ocetna kislina (čistost $\geq 99,8\%$)	Merck, 100063
dimetil sulfoksid (DMSO)	Sigma-Aldrich, 472301
2-aminobenzamid (2-AB)	Sigma-Aldrich, A89804
natrijev cianoborohidrid (NaBH₃CN)	Aldrich, 156159
HEPES	Sigma, H7523
Rapigest SF Surfactant, 1 mg	Waters, 186001861
1 M natrijev hidroksid (NaOH)	Merck, 109137
GlykoPrep® Kit¹	PROzyme, GP96NG-AB
trifluoroacetna kislina (TFA)	Sigma-Aldrich, 302031
Triton X-100	Sigma, T8787
natrijev lavrilsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, L4509
2-merkaptoetanol (2-ME)	Sigma-Aldrich, M3148
SDS-MW Gel (polimerni pufer, pH 8,0 z 0,2% SDS)	Beckman Coulter, A30341
0,1 M klorovodikova kislina (HCl)	Merck, 109060
0,1 M natrijev hidroksid (NaOH)	Merck, 109141
Bond-Breaker TCEP Solution	Thermo Scientific, 77720
jodacetamid (IAA)	Sigma, I1149

¹ GlykoPrep® kit vsebuje komplet za odcepitev: - 96 RX mini kolon: vežejo izbrani protein na steno
- reagent A: denaturacijski reagent
- reagent B: blokira prosta vezavna mesta na RX mini koloni
- reagent C: 25x koncentriran encimski pufer
- reagent D: pospeši pretvorbo glikozilaminske skupine na N-glikanu v reducirajočo skupino
- encim PNGaza-F
komplet za označevanje: - 2-AB raztopina
- redukcijska raztopina
komplet za čiščenje: - 96 CU mini kolon: ločujejo presežek barvila od označenih N-glikanov

3.1.2 Raztopine in pufri

Pri pripravi raztopin in pufrov smo uporabili prečiščeno vodo Milli-Q, pridobljeno s sistemom za pripravo ultra čiste vode Milli-Q Advantage A10, proizvajalca Millipore. Raztopine in pufre, potrebne za analizo *N*-glikanskega profila, smo pripravili tik pred oz. največ eno uro pred uporabo.

Preglednica II: Uporabljeni raztopini in pufri

Pripravljeni raztopini in pufri	sestava/priprava
Pufer za deglikozilacijo	15 mM Tris/HCl, pH 7,0
2-AB raztopina za označevanje glikanov (klasična metoda)	<i>Raztopina 1:</i> Zmešaj 700 µL DMSO s 300 µL ocetne kisline. <i>Raztopina 2:</i> Natehtaj 50 mg 2-AB in dodaj 1000 µL raztopine 1. <i>2-AB raztopina:</i> Natehtaj 50 mg NaBH ₃ CN in dodaj 800 µL raztopine 2. Inkubiraj na inkubacijskem bloku Eppendorf pri 70°C 2 minuti.
HEPES pufer	50 mM HEPES/NaOH, pH 7,9
5% Rapigest	Pripravljen s HEPES pufrom.
Redčitev reagenta C	Za vsak vzorec je potrebno pripraviti 100 µL encimskega pufra.
Raztopina encima	Za vsak vzorec je potrebno pripraviti zmes 2,5 µL encima PNGaza-F in 7,5 µL razredčenega reagenta C.
2-AB raztopina za označevanje glikanov (HT metoda)	Za vsak vzorec pripravimo zmes 2,5 µL reduksijske raztopine in 2,5 µL 2-AB raztopine.
Elucijska raztopina 1	0,1% TFA (v/v)/50% ACN (v/v)
Elucijska raztopina 2	1% Triton (v/v)/20% ACN (v/v)
Raztopina 96% ACN (v/v)	
600 mM IAA (w/v)	
Pufer za CE-SDS	50 mM Tris/HCl z 1% SDS, pH 9,0

3.1.3 Vzorci

Analize smo izvajali na terapevtskih proteinih, proizvedenih v ovarijskih celicah kitajskega hrčka z rekombinantno DNA tehnologijo. Analizirali smo terapevtsko monoklonsko protitelo IgG₁, monoklonsko protitelo IgG₂ in rekombinantni terapevtski fuzijski protein vezan na Fc domeno protitelesa IgG₁.



Slika 7: GlykoPrep® Kit (reagenti, RX in CU mini kolone)

3.1.4 Oprema in potrošni material

V Preglednici III je opisana vsa oprema, ki smo jo uporabljali tekom študije, v Preglednici IV pa je naštet uporabljen potrošni material.

Preglednica III: Oprema in proizvajalci

oprema	proizvajalec, model
pipete	Sartorius BioHit, mLine
tehnicka	Mettler Toledo, XP205 in XP26
pH meter	Metrohm, 780
črpalka za filtriranje	Millipore, WP6122050
rotacijsko mešalo	Scientifica, Vortex mixer VELP
mikrocentrifuga	Eppendorf, MiniSpin plus
centrifuga	Eppendorf, Centrifuge 5810R in 5415R
inkubacijski blok	PROzyme, Assay MAP GS150
inkubacijski blok	Eppendorf, Thermomixer Comfort
vakuumski koncentrator	Eppendorf, Concentrator Plus 5301
UPLC sistem	Waters, Acquity UPLC System
FLR detektor	Waters, Acquity UPLC FLR Detector
sistem za kapilarno elektroforezo	Beckman Coulter, PA 800 plus
programska oprema	Empower 3

Preglednica IV: Potrošni material in proizvajalci

potrošni material	proizvajalec, kataloška številka
PES filter, 0,22 µm	TPP, 99505
1,5 mL mikrocentrifugirke	Eppendorf, 0030108116
0,5 mL mikrocentrifugirke	Eppendorf, 022431064
30 kDa centrifugalni filtri (0,5 mL)	Millipore, Amicon Ultra UFC5030BK
mikrotitrská ploščica	Eppendorf, 951020460
NAP-5 kolone (Sephadex G10 matrix)	GE Healthcare, 28940928
HPLC viale	Waters, 186002639
mikro viale	Beckman Coulter, 144709
univerzalne plastične viale	Beckman Coulter, A62251
univerzalni pokrovčki za viale	Beckman Coulter, A62250
HILIC kromatografska kolona	
Acquity UPLC Glycan BEH Amide	Waters, 186004741
1,7 µm, 2,1 mm x 100 mm	
HILIC kromatografska kolona	
Acquity UPLC Glycan BEH Amide	Waters, 186004740
1,7 µm, 2,1 mm x 50 mm	
Kapilara za kapilarno elektroforezo	
Uncoated capillary, 30 cm x 50 µm	Beckman Coulter, 338451

3.2 METODE

3.2.1 HILIC kromatografija

Uporabili smo sledeči mobilni fazi:

Mobilna faza A (MFA): 100% ACN

Mobilna faza B (MFB): 100 mM amonijev formiat, pH 4,4

V približno 950 mL Milli-Q vode raztopimo 6,3 g amonijevega formiata. Raztopini umerimo pH z mravljično kislino na 4,4 ter jo prenesemo v merilno bučko (V = 1 L). Z Milli-Q vodo dopolnimo do oznake in raztopino prefiltriramo skozi 0,22 µm PES filter.

Uporabili smo gradientno metodo s pretokom mobilne faze 0,6 mL/min in temperaturo kolone 60°C. Za lepšo ločbo glikanov, smo uporabili tri različne kromatografske ločbene razmere. Pri fuzijskem proteinu smo uporabili najdaljšo, 80-minutno, pri mAb IgG₂ krajšo, 54-minutno in pri mAb IgG₁ najkrajšo, 28-minutno metodo. Pri 80-minutni in 54-minutni metodi smo uporabili 100 mm kromatografsko kolono, medtem ko smo 28-minutno metodo dali na krajšo, 50 mm kromatografsko kolono.

Preglednica V: Različni gradienti HILIC kromatografije

Pretok (mL/min)	80 min		54 min		28 min	
	čas (min)	MFB (%)	čas (min)	MFB (%)	čas (min)	MFB (%)
0,600	0,0	23,0	0,0	23,0	0,0	23,0
0,600	60,0	42,0	35,0	34,0	19,0	33,8
0,400	61,0	100,0	38,0	100,0	20,0	100,0
0,400	65,0	100,0	42,0	100,0	21,5	100,0
0,600	66,0	23,0	43,0	23,0	22,5	23,0
0,600	80,0	23,0	54,0	23,0	28,0	23,0

Opomba: sestava MFB je opisana v besedilu nad preglednico (glej poglavje 3.2.1)

Vzorce smo pred analizo pripravili po ustreznom protokolu za analizo *N*-glikanskega profila (glej poglavje 3.3.1). Injicirali smo 1 µL vzorca. Detekcija je potekala s FLR detektorjem pri ekscitacijski valovni dolžini 250 nm in emisijski valovni dolžini 428 nm.

3.2.2 Kapilarna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata

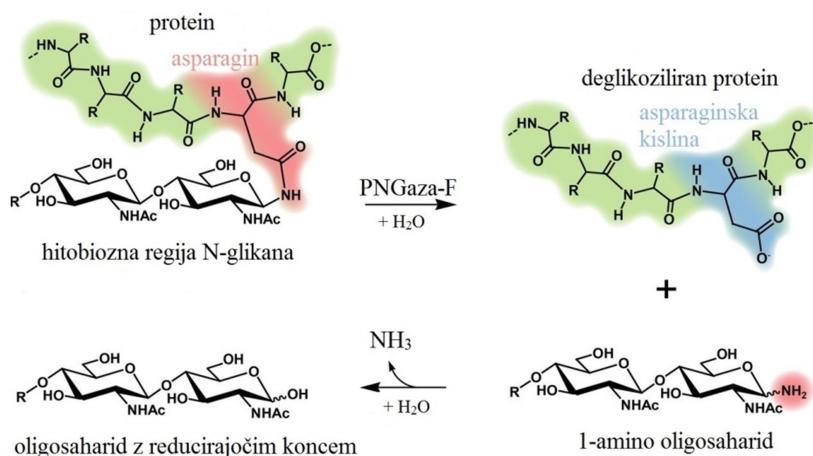
Ločba vzorcev je potekala v kapilari, napoljeni z elektroforeznim gelom. Vzorce smo pred analizo pripravili po protokolu za analizo CE-SDS pri reducirajočih pogojih (glej poglavje 3.3.2). Celotna dolžina kapilare je znašala 30 cm, dolžina učinkovitosti kapilare² pa 10 cm. Da smo preprečili nastanek EOF, smo pred vsakim injiciranjem vzorca kapilaro sprali z NaOH, HCl in Milli-Q vodo, nato smo jo napolnili z gelom, šele nato smo injicirali vzorec. Analite smo ločevali z napetostjo 10 kV, detekcija pa je potekala pri valovni dolžini 214 nm z UV detektorjem.

² Dolžina učinkovitosti kapilare - predstavlja pot vzorca od mesta injiciranja do detektorja

3.3 PRIPRAVA VZORCEV

3.3.1 Priprava vzorcev za analizo *N*-glikanskega profila

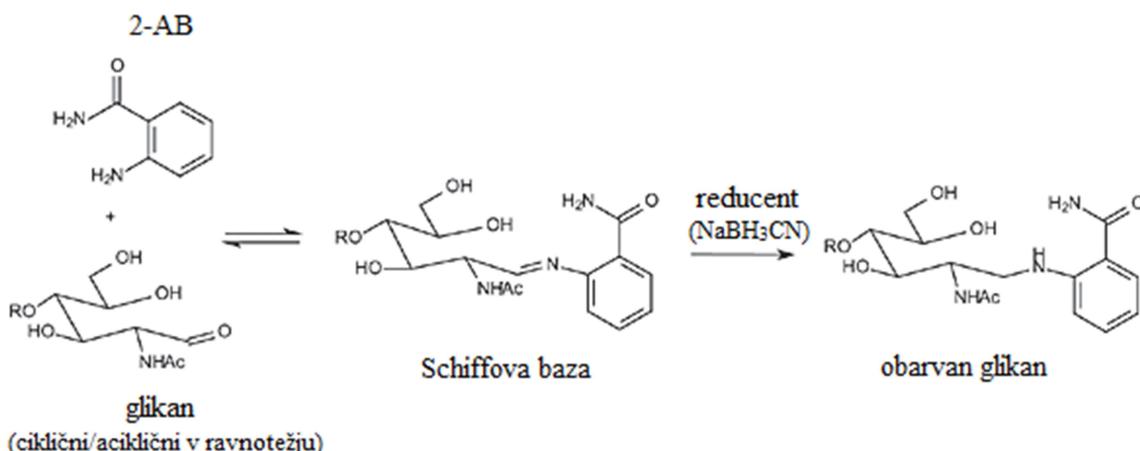
Priprava vzorcev za analizo *N*-glikanskega profila vsebuje več stopenj. Prva stopnja predstavlja encimsko sprostitev *N*-glikanov s terapevtskega proteina. Najučinkovitejšo deglikozilacijo omogoča encim PNGaza-F, ki lahko s proteina sprosti vse tri tipe *N*-glikanov. Minimalni substrat za encim predstavlja ustrezen tripeptid polipeptidne verige in di-N-acetyl hitobiozna³ regija oligosaharida. Pri reakciji pride do hidrolize *N*-glikozidne vezi, pri čemer se asparagin deaminira do asparaginske kisline. Sprosti se 1-amino oligosaharid, ki se kasneje ne-encimsko pretvori do oligosaharida z reducirajočim koncem, kot stranski produkt pa se sprosti amonijak. (26, 27)



**Slika 8: Encimska sprostitev *N*-glikana s proteina.
Povzeto po (28)**

V drugi stopnji sledi ločevanje *N*-glikanov od proteina in njihovo označevanje s fluorescenčnim barvilm. To je nujno potrebno za njihovo detekcijo med kromatografsko analizo, saj imajo sami po sebi nizko spektralno aktivnost. Obstaja več vrst derivatizacije *N*-glikanov, med katerimi je najpogosteje uporabljena reakcija reduktivne aminacije. Pri tej reakciji primarna aminska skupina barvila reagira z aldehidno skupino na *N*-glikanu. Nastane imin oz. Schiffova baza, ki se s pomočjo reducenta reducira v sekundarni amin. Natrijev cianoborohidrid je najpogosteje uporabljen reducent, kot barvilo pa se najpogosteje uporablja 2-aminobenzamid. Prednost tega označevanja je stehiometrična pritrdiritev ene molekule barvila na glikan, kar omogoča neposredno kvantifikacijo, ki temelji na fluorescenci. (29, 30)

³ Hitobioza - predstavlja dimer glukozaminskih enot, povezanih med seboj z β -1,4 vezjo



Slika 9: Barvanje glikanov z 2-AB barvilm.
Povzeto po (31)

V končni stopnji sledi ločitev označenih *N*-glikanov od presežka barvila. To lahko naredimo z ekstrakcijo na trdni fazi, gelsko filtracijo, papirno kromatografijo ali ekstrakcijo tekoče-tekoče (30). Vsak korak priprave vzorca je neselektiven, kar omogoča analizo reprezentativnega *N*-glikanskoga profila.

3.3.1.1 HT metoda

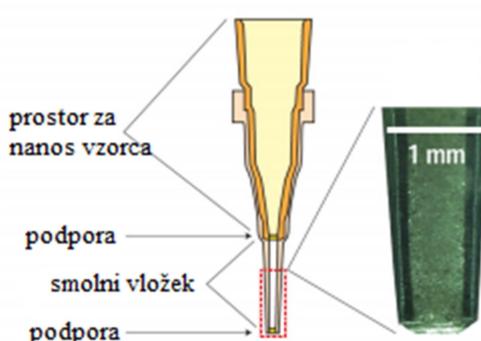
Vzorce smo pripravili s pomočjo GlykoPrep® kita. Pri izvedbi smo sledili navodilom proizvajalca PROzyme (32).

PRIPRAVA VZORCEV

V prvi stopnji smo vzorec glede na njegovo koncentracijo redčili z Milli-Q vodo tako, da smo v končnem volumnu 50 µL imeli raztopljenega 0,05 mg izbranega proteina. Ker je priporočeno razmerje denaturacijskega reagenta z vzorcem 1:1, smo razredčenemu proteinu dodali 50 µL reagenta A. Tako pripravljen vzorec smo dobro zmešali z rotacijskim mešalom in inkubirali na sobni temperaturi (ST) najmanj 5 min.



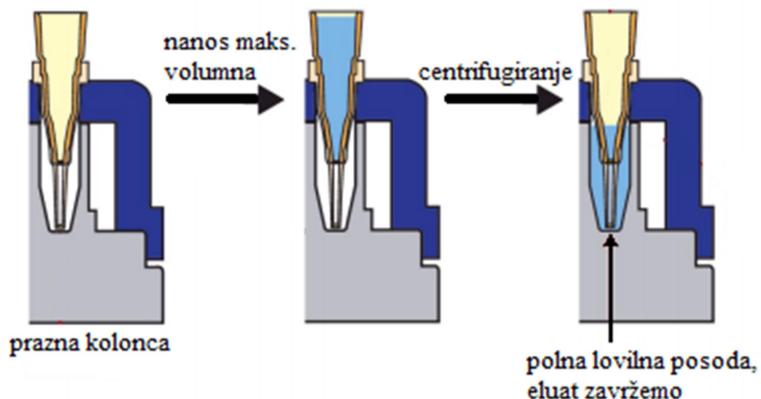
Slika 10: Izgled RX in CU mini kolon.



Slika 11: Lastnosti RX in CU mini kolon.
Povzeto po (33)

ENCIMSKA SPROSTITEV N-GLIKANOV

V RX mini kolono smo odpipetirali 50 µL 100% ACN in centrifugirali pri 300 x g, 3 min na ST. Nato smo odpipetirali 150 µL reagenta A in centrifugirali pri 1000 x g, 2 min na ST. Po tej stopnji smo zavrgli eluat in v RX mini kolono odpipetirali predhodno denaturiran vzorec. Centrifugirali smo pri 200 x g, 10 min na ST. Ko protein preide skozi RX mini kolono, se preko hidrofobnih interakcij adsorbira na steno. Zopet smo zavrgli eluat in odpipetirali najprej 50 µL reagenta B, nato pa še 50 µL razredčenega reagenta C. Po vsaki stopnji smo centrifugirali pri 300 x g, 3 min na ST. Ponovno smo zavrgli eluat in odpipetirali 10 µL raztopine encima PNGaza-F ter centrifugirali pri 300 x g, 3 min na ST. Sledila je inkubacija vzorcev na inkubacijskem bloku Assay MAP pri temperaturi 50°C, 45 min. Pri teh pogojih je realna temperatura v RX mini koloni 37°C.



Slika 12: Nanos raztopine na mini kolono, centrifugiranje in odstranitev eluata.
Povzeto po (33)

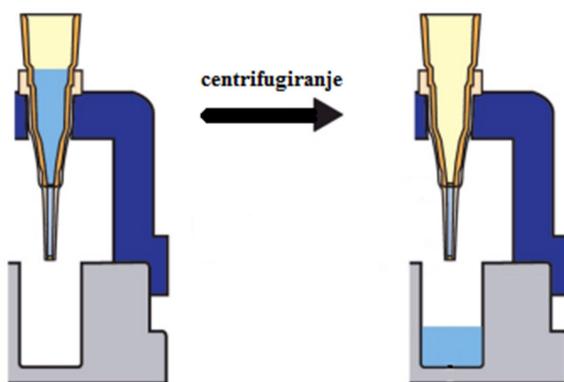
LOČEVANJE N-GLIKANOV OD PROTEINA

Po inkubaciji smo v RX mini kolono odpipetirali 15 µL reagenta D in sprošcene N-glikane, s centrifugiranjem pri 300 x g, 3 min na ST, eluirali v mikrotitrsko ploščico s 96. vdolbinicami⁴. Sledila je inkubacija N-glikanov v pokriti mikrotitrski ploščici na inkubacijskem bloku Eppendorf pri temperaturi 37°C, 10 min. Po inkubaciji smo reagent D odstranili s sušenjem v vakuumskem koncentratorju, pri temperaturi 45°C, 45 min. V tem koraku se N-glikani skoncentrirajo v oborino, ki je dovolj majhna, da se lahko raztopi v 5 µL 2-AB raztopine za označevanje glikanov, ki smo jo dodali v naslednjem koraku.

⁴ RX mini kolone smo po tej stopnji odstranili in zavrgli. V primeru, ko smo želeli analizirati protein, pa smo jih obdržali in protein eluirali s pomočjo elucijske raztopine. Eluiran protein smo analizirali z metodo CE-SDS (glej poglavje 3.3.2).

OZNAČEVANJE N-GLIKANOV

Na stran vsake vdolbinice, ki je vsebovala posušene *N*-glikane, smo dodali 5 µL 2-AB raztopine za označevanje glikanov. Mikrotitrsko ploščico smo nato prekrili z aluminijasto folijo, da smo jo zaščitili pred svetlobo in centrifugirali pri 1000 x g, 1 min na ST. Sledila je inkubacija na inkubacijskem bloku Eppendorf pri temperaturi 65°C, 60 min.



Slika 13: Elucija vzorca v mikrotitrsko ploščico.
Povzeto po (33)

ODSTRANJEVANJE ODVEČNEGA BARVILA

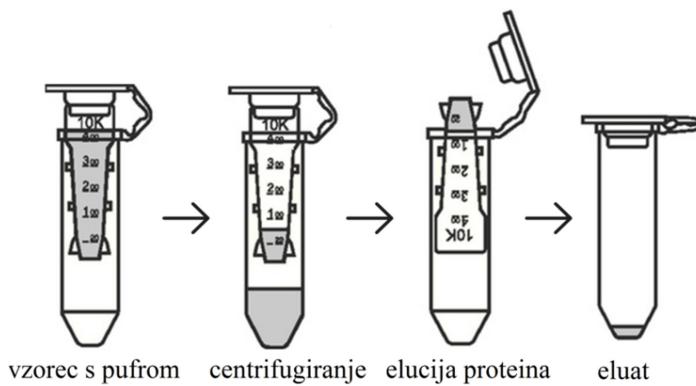
Po inkubaciji smo mikrotitrsko ploščico odstranili z inkubacijskega bloka in pustili na ST, dokler se ni ohladila. V označen vzorec smo dodali 20 µL Milli-Q vode in 180 µL 100 % ACN. Na hitro smo premešali s pipeto in raztopino vzorca prenesli v CU mini kolono. Sledilo je centrifugiranje vzorcev pri 50 x g, 10 min na ST. Zavrgli smo dobljeni eluat in v CU mini kolono odpipetirali 200 µL 96 % ACN. Odvečno barvilo od označenih *N*-glikanov ločujemo z ekstrakcijo na trdni fazi, po principu HILIC kromatografije. Ker je barvilo hidrofobno se njegov presežek odstrani z ACN, hidrofilne glikane pa smo iz CU mini kolon eluirali v zadnji stopnji, ko smo v CU mini kolono odpipetirali 25 µL Milli-Q vode. Označene *N*-glikane smo eluirali v mikrotitrsko ploščico s centrifugiranjem pri 300 x g, 3 min na ST. Dobljene vzorce smo prenesli v plastične HPLC viale in jih analizirali na UPLC sistemu s HILIC kromatografijo.

3.3.1.2 Klasična metoda

PRIPRAVA VZORCEV

S 30 kDa centrifugalnim filtrom, smo v prvem koraku izbran protein razsolili s pufrom za deglikozilacijo. S tem protein prenesemo v pufer, ki je primernejši za optimalno delovanje encima. V filter smo odpipetirali 500 µL pufra in centrifugirali pri 11000 x g 10 min na ST.

S tem smo s filtra sprali glicerol in ga pripravili za nanos vzorca. V filter smo odpipetirali volumen vzorca, ki ustreza 0,25 mg proteina in s pufrom dopolnili do končnega volumna 500 μ L. Vzorce smo centrifugirali pri 11000 x g, 10 min na ST oziroma toliko časa, dokler se ni volumen zmanjšal do 50 μ L. V filter smo ponovno dodali 450 μ L pufra in stopnjo centrifugiranja in redčenja ponovili vsaj 2x. Po razsoljevanju smo filter obrnili in vzorec s centrifugiranjem pri 1000 x g, 2 min na ST zbrali v epico. Dobljen vzorec smo s pufrom dopolnili do volumna 96 μ L.



**Slika 14: Razsoljevanje vzorca.
Povzeto po (34)**

ENCIMSKA SPROSTITEV N-GLIKANOV

Pred inkubacijo na inkubacijskem bloku Eppendorf, pri temperaturi 37°C, 17 ur smo v vzorec dodali 4 μ L encima PNGaza-F.

LOČEVANJE N-GLIKANOV OD PROTEINA

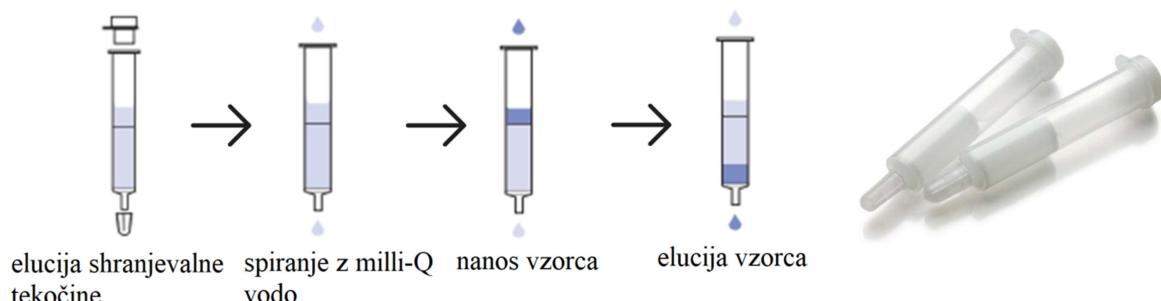
Po inkubaciji smo vzorce odstranili z inkubacijskega bloka in jih pustili na ST dokler se niso ohladili. Ločevanje *N*-glikanov od proteina smo zopet izvedli s 30 kDa centrifugalnim filtrom. Filter smo najprej sprali s 500 μ L Milli-Q vode. Vanj smo nato odpipetirali 100 μ L Milli-Q vode, nato pa še vzorec z encimom. Epico, v kateri je bil vzorec, smo sprali s 100 μ L Milli-Q vode, ki smo jo dodali k mešanici v filtru. Vse skupaj smo centrifugirali pri 11000 x g dokler ni skoraj vsa mešanica prešla skozi. Eluat smo shranili, v filter pa odpipetirali 100 μ L Milli-Q vode in ponovili centrifugiranje. Zadnji korak smo ponovili še 1x. Epico z vsemi eluati smo dali v vakuumski koncentrator, da smo odstranili Milli-Q vodo. Vzorce smo sušili 5-8 ur pri temperaturi 45°C. V tem koraku se *N*-glikani skoncentrirajo v oborino, ki smo jo nato raztopili z dodatkom 10 μ L Milli-Q vode.

OZNAČEVANJE N-GLIKANOV

V raztopljeni oborini smo dodali 15 µL 2-AB raztopine za označevanje glikanov. Vzorce smo dobro premešali z rotacijskim mešalom in inkubirali na inkubacijskem bloku Eppendorf pri temperaturi 37°C, 17 ur.

ODSTRANJEVANJE ODVEČNEGA BARVILA

Po inkubaciji smo vzorce vzeli z inkubacijskega bloka in jih pustili na ST, dokler se niso ohladili. Vzorec smo z Milli-Q vodo dopolnili do volumna 100 µL. Odstranjevanje odvečnega 2-AB reagenta poteče z gelsko filtracijo na kolonah NAP-5, ki vsebujejo matriks Sephadex G-10. Molekule se ločijo na osnovi razlike v velikosti. Ker so označeni N-glikani večji od por v matriksu kolone, vanje ne morejo prehajati in se zato eluirajo pred manjšimi molekulami barvila, ki lahko prehajajo in se zadržujejo v porah matriksa. Najprej smo skozi kolone NAP-5 spustili tekočino, v kateri je matriks shranjen, nato pa smo jih sprali še z 10 mL Milli-Q vode. Ko je vsa voda prešla skozi, smo na kolono nanesli 100 µL vzorca in počakali, da je popolnoma prešel v matriks. Kolono smo sprali v dveh korakih. Najprej smo nanesli 100 µL nato pa še 600 µL Milli-Q vode. Eluat smo zavrgli. Glikane smo eluirali s ponovnim nanosom 600 µL Milli-Q vode in eluat zbrali v epico. Dobljene vzorce smo prenesli v plastične HPLC viale in jih analizirali na UPLC sistemu s HILIC kromatografijo.



Slika 15: Odstranjevanje odvečnega 2-AB reagenta.
Povzeto po (25)

Slika 16: NAP-5 kolone

3.3.1.3 Klasična metoda z dodatnim denaturacijskim korakom

PRIPRAVA VZORCEV

Tako kot pri klasični metodi, smo v prvi stopnji 30 kDa centrifugalni filter sprali in ga s tem pripravili za nanos vzorca. Za razsolitev vzorca, smo namesto pufra za deglikozilacijo uporabili HEPES pufer. V filtre smo odpipetirali volumen vzorca, ki ustreza 0,25 mg proteina in s pufrom dopolnili do končnega volumna 450 µL. Vzorce smo centrifugirali pri

11000 x g, 10 min na ST oziroma toliko časa, dokler se ni volumen zmanjšal do 30 µL. V filtre smo ponovno dodali 450 µL pufra in stopnjo centrifugiranja in redčenja ponovili vsaj 2x. Po razsoljevanju smo filter obrnili in vzorec s centrifugiranjem pri 1000 x g, 2 min na ST zbrali v epico. Dobljen vzorec smo s pufrom dopolnili do volumna 170 µL.

DENATURACIJSKI KORAK

Sledil je korak denaturacije proteina, ki ga pri klasični metodi navadno ni. V vzorec smo dodali 20 µL 5% Rapigesta in inkubirali na inkubacijskem bloku Eppendorf pri temperaturi 90°C, 5 min. Rapigest je površinsko aktivna snov, ki denaturira proteine in tako olajša encimsko cepitev. Hkrati je toplotno stabilen in za razliko od drugih denaturantov, ne zavira encimske aktivnosti (36).

ENCIMSKA SPROSTITEV N-GLIKANOV

Namesto 4 µL smo k vzorcu dodali 10 µL encima PNGaza-F, ter inkubirali na inkubacijskem bloku Eppendorf pri temperaturi 37°C, 17 ur.

Nadaljnji koraki priprave vzorca so enaki kot pri klasični metodi (glej poglavje 3.3.1.2).

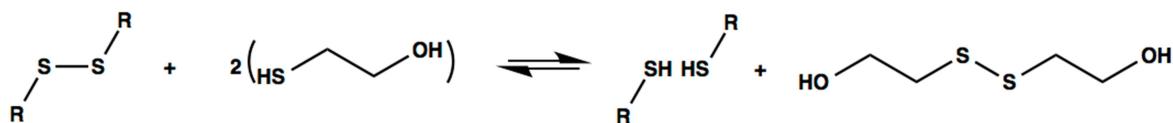
3.3.1.4 Priprava slepega vzorca

K pripravi vzorcev, tako pri HT metodi kot tudi pri klasični metodi, smo vedno vključili tudi pripravo slepega vzorca. Le ta se uporablja za potrditev odsotnosti vrhov v retencijskem oknu N-glikanskega profila vzorcev. To nam potrdi, da pri pripravi ni prišlo do kontaminacije med vzorci. Pripravo slepega vzorca smo izvedli po enakih navodilih kot pripravo vzorcev, le da smo volumen vzorca proteina zamenjali z volumnom Milli-Q vode.

3.3.2 Priprava vzorcev za analizo CE-SDS pri reducirajočih pogojih

Pred analizo izbrane proteine izpostavimo detergentu natrijev lavrilsulfat (SDS), ki je anionska površinsko aktivna molekula. Na proteine se veže v stelnem razmerju 1,4 g SDS na 1 g proteina, jih denaturira in doda negativen nabo. Zaradi negativnega naboja vsi kompleksi potujejo proti anodi, konstantno razmerje med nabojem in dolžino verige pa omogoča ločitev proteinov na osnovi razlike v molekulski masi. Priprava vzorcev za analizo pri reducirajočih pogojih vsebuje reducent, kot je 2-merkaptoetanol (2-ME), ki povzroči redukcijo vseh disulfidnih vezi in kot končni produkt pri mAb dobimo dve lahki in dve težki verigi. (1, 24, 25)

Z metodo CE-SDS smo analizirali deglikoziliran protein. Po eluciji *N*-glikanov z reagentom D smo RX mini kolone obdržali in nanje, po navodilih proizvajalca PROzyme, nanesli 25 µL elucijske raztopine. Protein smo eluirali v mikrotitrsko ploščico s centrifugiranjem pri 50 x g, 5 min na ST. Dobljenemu eluatu smo pomerili koncentracijo na nanodropu in preračunali, da je bila končna koncentracija proteina po dodatku CE-SDS pufru med 0,2 mg/mL in 2 mg/mL. Če je koncentracija proteina previsoka lahko pride do nezadostne vezave SDS, kar daje široke vrhove in slabo resolucijo. Po drugi strani pa, če je koncentracija proteina prenizka, se pojavi prenizek signal. (37) Vzorce za analizo CE-SDS pri reducirajočih pogojih smo pripravili tako, da smo k 25 µL CE-SDS pufru dodali 22,5 µL vzorca ter 2,5 µL reducenta 2-ME. Vzorce smo dobro premešali z rotacijskim mešalom in inkubirali na inkubacijskem bloku Eppendorf pri temperaturi 70°C, 10 min.



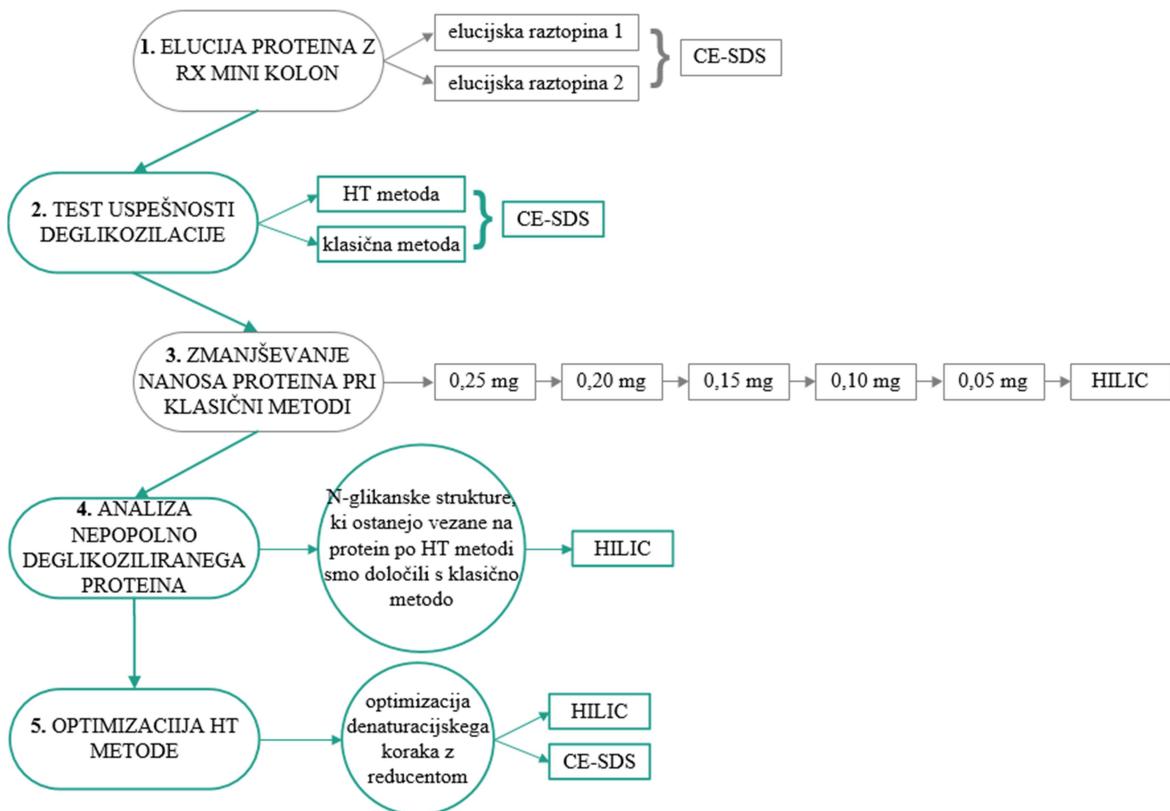
Slika 17: Redukcija disulfidnih vezi z 2-merkaptoetanolom.

3.3.2.1 Priprava slepega vzorca

K pripravi vzorcev smo vedno vključili tudi pripravo slepega vzorca. Izvedli smo jo po enakih navodilih kot pripravo vzorcev, le da smo volumen vzorca proteina zamenjali z volumnom CE-SDS pufra.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

Eksperimentalno delo smo načrtovali po korakih, ki so v kronološkem zaporedju predstavljeni v nadaljevanju. Za lažji pregled poteka, spodnji diagram prikazuje vse korake (slika 18).



Slika 18: Diagram poteka eksperimentalnega dela.

4.1 ELUCIJA PROTEINA Z RX MINI KOLONE

Da lahko preverimo uspešnost deglycosylation koraka posamezne metode, potrebujemo protein, ki je bil predhodno izpostavljen encimu PNGaza-F. Pri klasični metodi reakcija z encimom poteče v raztopini, medtem ko pri HT metodi reakcija z encimom poteče na površini RX mini kolone. Za pridobitev deglycosyliranega proteina s HT metodo, je potrebno vezan protein eluirati z RX mini kolone.

Po navodilih proizvajalca PROzyme smo pripravili dve elucijski raztopini, s katerima smo po ločevanju *N*-glikanov od proteina, eluirali adsorbiran protein z RX mini kolone. Ker smo želeli dobiti čim bolj reprezentativne rezultate, smo testirali, katera elucijska raztopina nam eluira večjo količino proteina z RX mini kolone. Dobljene eluate smo pripravili po protokolu za analizo CE-SDS pri reducirajočih pogojih in jih analizirali.

4.2 TEST USPEŠNOSTI DEGLIKOZILACIJE

Pred analizo *N*-glikanskega profila je potrebno *N*-glikane encimsko odcepiti s proteina, kar predstavlja ključen korak, saj moramo za zanesljive rezultate doseči čim večjo učinkovitost deglikozilacije. V tem poskusu smo preverili uspešnost deglikozilacije proteina tako s klasično kot tudi s HT metodo.

Vzorce smo po HT metodi pripravili vključno do ločevanja *N*-glikanov od proteina, pri čemer smo RX mini kolone obdržali in z izbrano elucijsko raztopino eluirali adsorbiran protein. Pripravili smo tudi vzorce po klasični metodi, vključno do encimske sprostitev *N*-glikanov. Tako pripravljene vzorce deglikoziliranega proteina smo skupaj z nativnim (ne-degliziliranim) proteinom pripravili po protokolu za analizo CE-SDS pri reducirajočih pogojih in jih analizirali. Ker smo želeli preveriti tudi ponovljivost deglikozilacije proteina, smo vzorce sočasno pripravili v štirih ponovitvah.

4.3 ZMANJŠEVANJE NANOSA PROTEINA PRI KLASIČNI METODI

Ker za klasično metodo potrebujemo 5 x večjo izhodno količino proteina kot pri HT metodi, smo najprej želeli določili najmanjšo količino proteina, s katero pri klasični metodi še lahko določimo vse *N*-glikanske strukture. Pripravili smo vzorce po klasični metodi in nanos proteina nižali v korakih po 0,05 mg od količine, ki je potrebna za klasično metodo (0,25 mg) do količine s katero delamo pri HT metodi (0,05 mg). Vse vzorce smo pripravili v paralelkah in jih analizirali s HILIC kromatografijo.

4.4 ANALIZA NEPOPOLNO DEGLIKOZILIRANEGA PROTEINA

Različne *N*-glikanske strukture vplivajo na različne efektorske funkcije proteina. Vprimeru nepopolne deglikozilacije je pomembno, da vemo kateri *N*-glikani ostanejo vezani na protein, saj le teh z nadaljnjo analizo ne moremo ovrednotiti.

Delno deglikoziliran protein po HT metodi, eluiran z RX mini kolon, smo popolno deglikozilirali s klasično metodo oz. klasično metodo z dodatnim denaturacijskim korakom. S tem smo dobili vzorec *N*-glikanov, ki po deglikozilaciji s HT metodo še ostanejo vezani na proteinu. Z zmanjševanjem nanosa proteina pri klasični metodi in oceno izkoristka pri eluciji proteina smo preračunali potrebno število reakcij na RX mini kolonah za elucijo zadostne količine proteina.

Naredili smo več priprav vzorca po HT metodi, ki smo jih na koncu združili in homogenizirali v en vzorec. V vmesni stopnji smo z RX mini kolon z izbrano elucijsko raztopino eluirali adsorbiran protein. Vse dobljene eluate smo združili v en vzorec, ki smo ga pripravili s klasično metodo oz. klasično metodo z dodatnim denaturacijskim korakom. Za primerjavo smo pripravili še vzorce po klasični metodi oz. klasični metodi z dodatnim denaturacijskim korakom. Vse vzorce smo analizirali na sistemu UPLC s HILIC kromatografijo. Za preverjanje zanesljivosti rezultatov smo pripravili vzorce v dveh ponovitvah.

4.5 OPTIMIZACIJA HT METODE

V zadnjem poskusu smo želeli optimizirati pripravo vzorcev in obenem preveriti, če lahko tudi s HT metodo dobimo popolno deglikozilacijo proteina. Da bi dosegli še boljšo denaturacijo, smo protein v začetnem koraku izpostavili bolj agresivnim pogojem in s tem omogočili encimu olajšan dostop do vseh cepitvenih mest. Spremenili smo pripravo vzorcev.

OPTIMIZIRANA PRIPRAVA VZORCEV

Pri pripravi smo sledili navodilom proizvajalca PROzyme. K 55 µL vzorca s koncentracijo 1 mg/mL smo namesto 50 µL reagenta A dodali 35 µL reagenta A in 10 µL reducenta 500 mM TCEP. Vzorec smo dobro premešali in namesto na ST, 5 min, inkubirali na inkubacijskem bloku Eppendorf pri temperaturi 100°C, 10 min. Po končani inkubaciji smo vzorec pustili na ST 10 min oz. dokler se ni ohladil in mu dodali 10 µL alkilanta 600 mM IAA. Tako pripravljen vzorec smo postavili za 30 min v temo na ST. Nadaljnji koraki (encimska sprostitev, ločevanje *N*-glikanov od proteina, označevanje in odstranjevanje odvečnega barvila) so bili enaki kot že prej opisano pri HT metodi (glej poglavje 3.3.1.1).

V pripravi vzorcev imamo tako vključen še reducent TCEP in alkilant IAA. Z reducentom povzročimo redukcijo vseh disulfidnih vezi, medtem ko se alkilant veže na nastale proste tiolne skupine in s tem prepreči da bi se povezale nazaj.

Pripravili smo vzorec po HT metodi z optimiziranim denaturacijskim korakom in za primerjavo še vzorec, pripravljen po standardnem protokolu za HT metodo. Vzorce smo analizirali na UPLC sistemu s HILIC kromatografijo. Da bi preverili, če se nam je stopnja deglikozilacije izboljšala, smo po ločevanju *N*-glikanov od proteina z izbrano elucijsko raztopino z RX mini kolon eluirali deglikoziliran protein. Eluate proteina smo nato skupaj

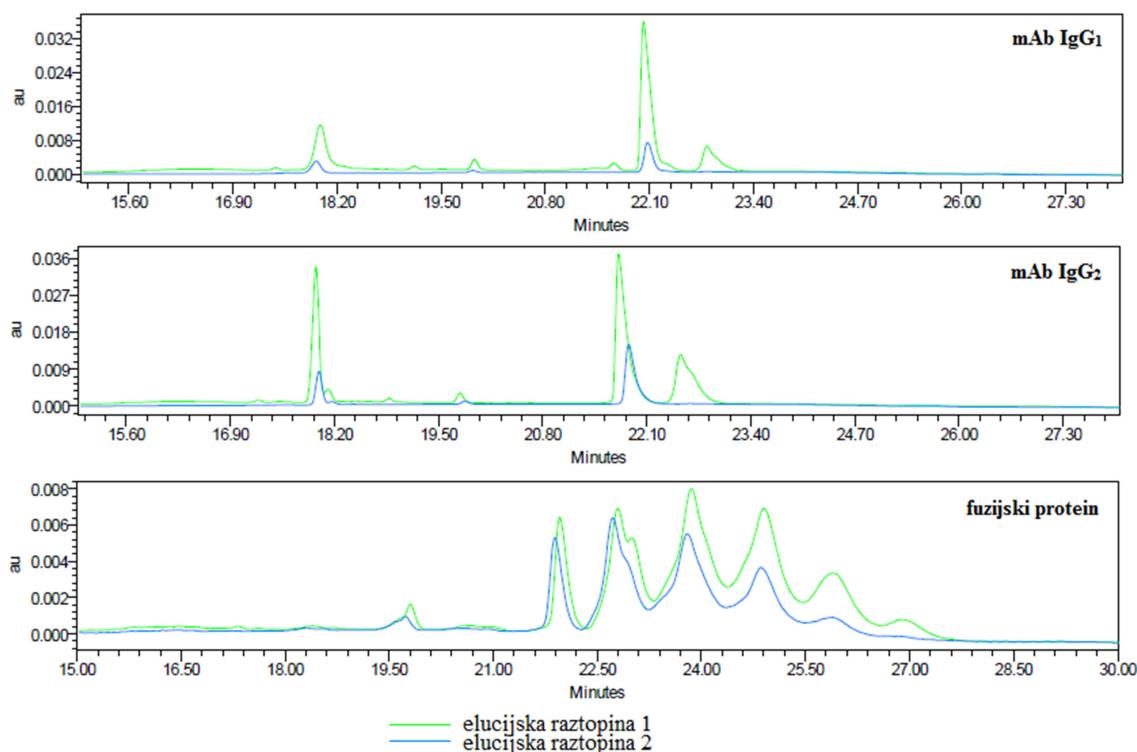
z nativnim (ne-deglikoziliranim) proteinom pripravili za analizo s CE-SDS pri reducirajočih pogojih (glej poglavje 3.3.2).

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 ELUCIJA PROTEINA Z RX MINI KOLONE

Protein se v navzočnosti vodnega medija veže na RX mini kolono s hidrofobnimi interakcijami. Elucijo proteina se lahko doseže z dodatkom ionskega modifikatorja, kot je TFA, v organsko topilo, ali pa z dodatkom Tritona, ki je blag, neionski detergent (38). Uporabili smo elucijsko raztopino 1, ki je vsebovala 0,1% TFA (v/v)/50% ACN (v/v) in elucijsko raztopino 2, ki je vsebovala 1% Triton (v/v)/20% ACN (v/v). Triton absorbira v ultravijoličnem delu spektra in s tem moti kvantifikacijo proteinov pri $A_{280\text{nm}}$ (39). Vzorec, eluiran z elucijsko raztopino 2, smo zato pred meritvijo koncentracije proteina na nanodropu razsolili s pufrom za deglikozilacijo.

Elucijo proteina z RX mini kolon z obema elucijskima raztopinama smo izvedli na vseh treh terapevtskih proteinih. V vseh primerih je bila izračunana ocena izkoristka elucije boljša v primeru uporabe elucijske raztopine 1 (slika 19).



Slika 19: Elektroferogrami eluiranega mAb IgG₁, mAb IgG₂ in fuzijskega proteina z RX mini kolone.

Manjši izkoristek elucije z elucijsko raztopino 2 je lahko posledica izgub v koraku razsoljevanja vzorca. Pri vseh nadalnjih poskusih smo zato za elucijo proteina z RX mini kolone uporabili elucijsko raztopino 1.

5.2 TEST USPEŠNOSTI DEGLIKOZILACJE

Z metodo CE-SDS pri reducirajočih pogojih dobimo pri testiranju vzorcev monoklonskega protitelesa tri osnovne vrhove, ki predstavljajo lahko verigo (LC), težko verigo brez vezanih glikanov (HC-NG) in težko verigo (HC) (sliki 20 in 21). Vrhovi so na elektroferogramu poimenovani z okrajšavami. Pri testiranju vzorcev fuzijskega proteina pa dobimo nekoliko drugačno sliko. Protein se razcepi na dve glavni komponenti, ki smo ju poimenovali HP1 in HP2⁵, ter na manjše vrhove z imeni LP1, LP2, LP3, LP4, LP5 in LP6⁶ (sliki 22 in 23). Integrirali smo tudi vse ostale, neznane vrhove, ki se niso pojavili v elektroferogramu slepega vzorca in jih označili z RRT⁷. Na elektroferogramu deglikoziliranega mAb se nam med LC in HC-NG pojavi dodaten vrh, z retencijskim časom okoli 19,8 minute. Vrh predstavlja elucijo encima in ker se pojavi tudi v slepem vzorcu, ga zato nismo integrirali. Elektroferogrami imajo na abscisni osi za enote minute, na ordinatni osi pa absorpcijske enote (oznaka au). Pri integriranih vrhovih trikotnik označuje začetek ali konec vrha, ki je ločen do bazne linije, medtem ko romb označuje začetek ali konec vrha, ki se ni ločil do bazne linije.

Pri vseh treh terapevtskih proteinih smo dobili skladne rezultate med različnimi ponovitvami priprave vzorca. Lahko zaključimo da je deglikozilacija proteina ponovljiva in ni naključna. Pri rezultatih smo zato podali povprečno vrednost vseh štirih ponovitev. Podan je tudi relativni standardni odklon (RSD), štirih ponovitev priprave vzorca po HT metodi.

Enačba 1: Enačba za standardni odklon

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

N – število meritev, x_i – posamezna meritev, \bar{x} – povprečna vrednost

⁵ HP – je interna oznaka za protein večje molekulske mase (ang. *heavy protein*). Protein vsebuje N-glikane na skoraj vseh vezavnih mestih.

⁶ LP – je interna oznaka za protein manjše molekulske mase (ang. *light protein*). Protein vsebuje N-glikane le še na nekaj ali pa nobenem vezavnem mestu več. Lahko predstavlja tudi odломek proteina.

⁷ RRT – je oznaka za relativni retencijski čas (ang. *relative retention time*). Določi se ga glede na glavni vrh. Pri elektroferogramih glavni vrh predstavlja vrh HC, pri kromatogramih pa vrh bG0.

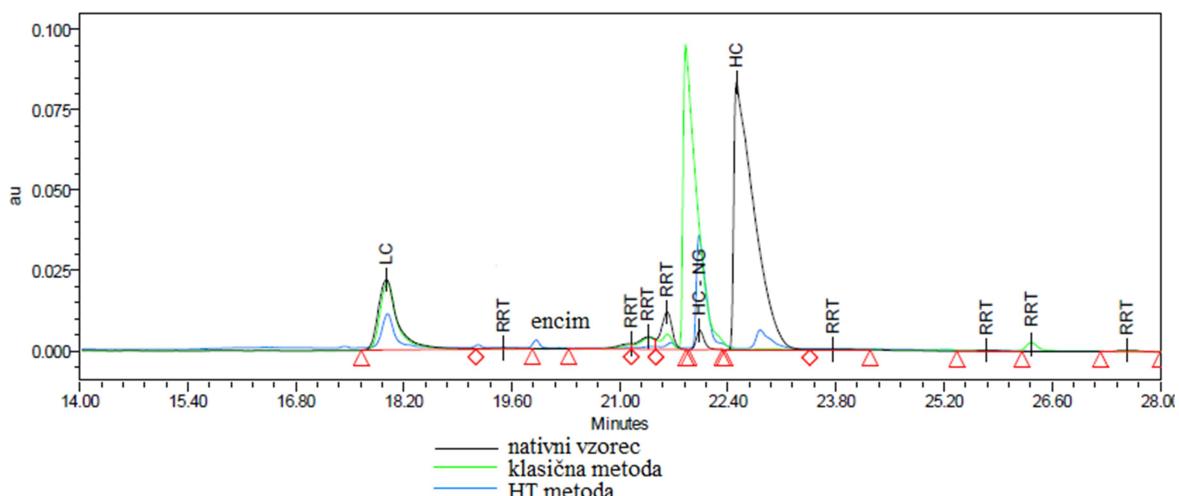
Enačba 2: Enačba za relativni standardni odklon

$$RSD (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

s – standardni odklon, \bar{x} – povprečna vrednost

5.2.1 Monoklonsko protitelo IgG₁

Na sliki 20 so prikazani elektroferogrami monoklonskega protitelesa IgG₁ kot nativnega vzorca, deglikoziliranega vzorca po HT metodi in deglikoziliranega vzorca po klasični metodi. Na elektroferogramu množina proteina v sicer enakem volumnu injiciranja, med vzorci ni primerljiva zaradi različnih začetnih količin proteina pri pripravi (izguba proteina pri eluciji z RX mini kolon). Ker absolutne vrednosti vrhov na ordinati niso primerljive, so preračunani deleži posameznih vrhov v odstotkih.



Slika 20: Elektroferogrami deglikoziliranega mAb IgG₁ s klasično in HT metodo. Nativni vzorec predstavlja ne-deglikoziliran protein.

Preglednica VI: Odstotek površine vrhov pri nativnem in deglikozilranem mAb IgG₁ s klasično in HT metodo.

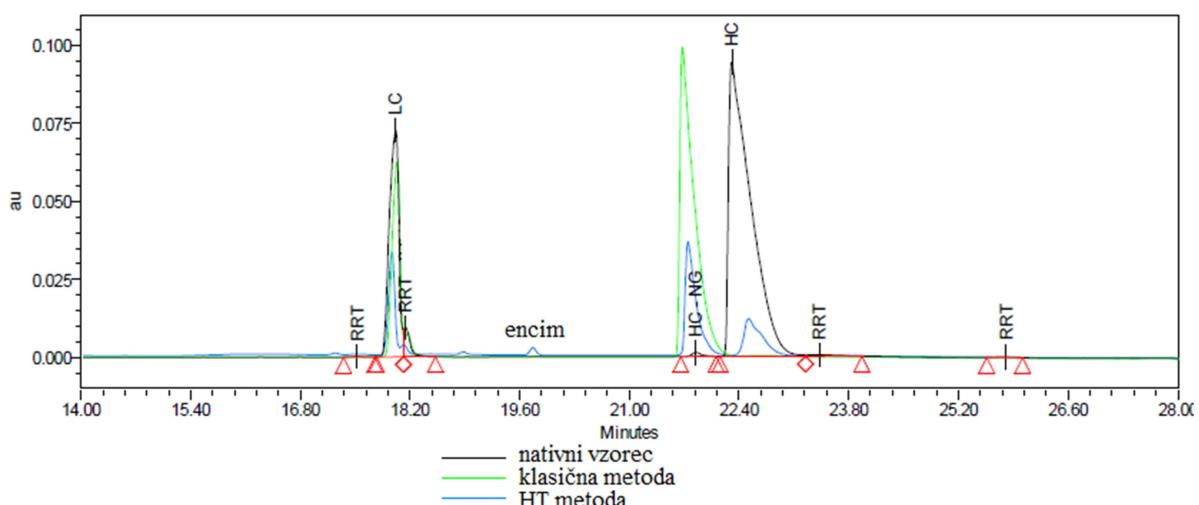
Ime vzorca	LC	HC-NG	HC	Vsota RRT vrhov	% deglikozilacije ⁸
nativni vzorec	23,4	1,9	66,3	8,4	2,8
klasična metoda	23,8	67,6	0,2	8,4	99,7
HT metoda	26,9	53,4	17,0	2,6	75,9
RSD HT metode	1,7	0,6	2,6	5,5	0,7

⁸ Izračun % deglikozilacije za mAb IgG₁ in IgG₂: % deglikozilacije = (HC-NG/(HC-NG + HC))*100

Iz elektroferograma in preglednice VI razberemo, da so deleži vrha LC približno enaki med vsemi vzorci. Po pričakovanjih ima največji delež vrha HC nativni vzorec (66,3 %), ki predhodno ni bil izpostavljen encimu PNGazi-F in ima N-glikane še vedno vezane na težki verigi. Pojavlja se tudi majhen delež vrha HC-NG (1,9 %), kar ni nič nenavadnega, saj se določen delež proteinov, med proizvodnjo v celični kulturi, izogne glikozilacijskem procesu (25). Pri vzorcu, deglikoziliranem po klasični metodi se vrh HC zmanjša (na 0,2 %) na račun povečanja vrha HC-NG (na 67,6 %), kar kaže na popolno sprostitev N-glikanov s proteina po izpostavitvi encimu PNGaza-F (40). Deglikozilacija je bila uspešna v 99,7 %. Pri vzorcu, deglikoziliranem po HT metodi, pa deglikozilacija proteina ni popolna - uspešnost deglikozilacije je 75,9 %. Še vedno imamo prisoten vrh HC (17,0 %), kar kaže na to, da je določen del N-glikanov, kljub izpostavitvi encimu PNGaza-F, ostal vezan na težko verigo.

5.2.2 Monoklonsko protitelo IgG₂

Na sliki 21 so prikazani elektroferogrami monoklonskega protitelesa IgG₂ kot nativnega vzorca, deglikoziliranega vzorca po HT metodi in deglikoziliranega vzorca po klasični metodi. Ker absolutne vrednosti vrhov na ordinati niso primerljive, so preračunani deleži posameznih vrhov v odstotkih.



Slika 21: Elektroferogrami deglikoziliranega mAb IgG₂ s klasično in HT metodo. Nativni vzorec predstavlja ne-deglikoziliran protein.

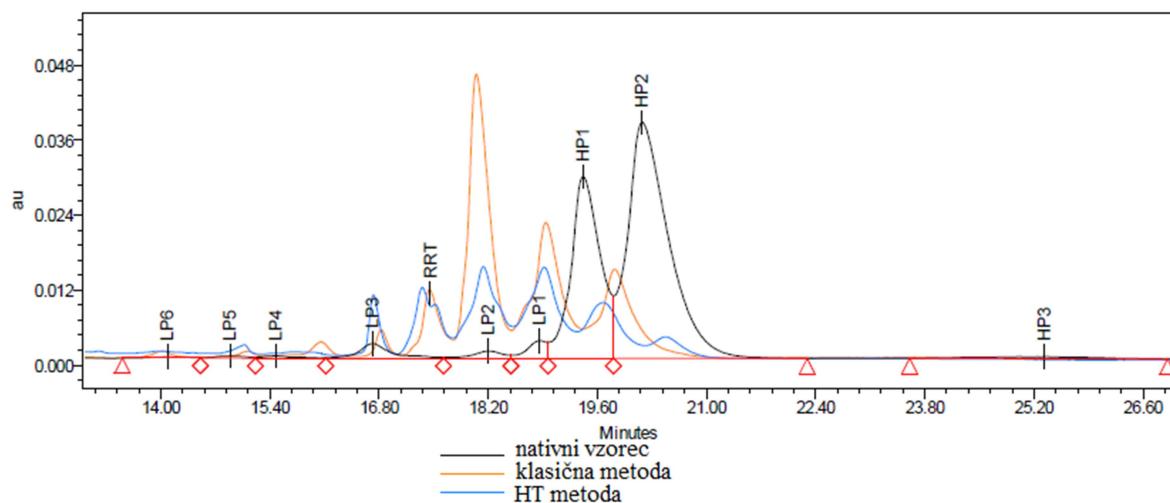
Preglednica VII: Odstotek površine vrhov pri nativnem in deglikoziliranem mAb IgG₂ s klasično in HT metodo.

Ime vzorca	LC	HC-NG	HC	Vsota RRT vrhov	% deglikozilacije
nativni vzorec	28,2	0,4	68,4	3,0	0,6
klasična metoda	27,9	68,2	0,6	3,3	99,1
HT metoda	28,5	41,0	28,5	2,0	59,0
RSD HT metode	1,1	2,6	3,7	4,0	2,5

Iz elektroferograma in preglednice VII razberemo, da so rezultati primerljivi z rezultati, ki smo jih dobili pri analizi mAb IgG₁. Največji delež vrha HC (68,4 %) ima zopet nativni vzorec, medtem ko se pri vzorcu, deglikoziliranem po klasični metodi, vrh HC močno zmanjša (na 0,6 %) na račun povečanja vrha HC-NG (na 68,2 %), kar potrjuje popolno sprostitev *N*-glikanov s proteina. Deglikozilacija je bila uspešna v 99,1 %. Pri vzorcu, deglikoziliranem po HT metodi, pa nam tudi tu ostane del proteina ne-deglikoziliranega. Še vedno imamo prisoten vrh HC (28,5 %), katerega delež je višji kot pri mAb IgG₁ (17,0 %). Predvidevamo, da je to lahko posledica, tega ker je mAb IgG₂ bolj obširno glikoziliran in ker ima vezanih več različnih struktur *N*-glikanov kot mAb IgG₁.

5.2.3 Fuzijski protein

Na sliki 22 so prikazani elektroferogrami fuzijskega proteina kot nativnega vzorca, deglikoziliranega vzorca po HT metodi in deglikoziliranega vzorca po klasični metodi.



Slika 22: Elektroferogrami deglikoziliranega fuzijskega proteina s klasično in HT metodo.
Nativni vzorec predstavlja ne-deglikoziliran protein.

Preglednica VIII: Odstotek površine vrhov pri nativnem in deglikoziliranem fuzijskem proteinu s klasično in HT metodo.

Ime vzorca	LP6	LP5	LP4	LP3	LP2	LP1	HP1	HP2	HP3	Vsota RRT vrhov	% deglikozilacije ⁹
nativni vzorec	0,3	0,5	0,5	3,3	1,4	2,2	33,1	57,8	1,1	0	3,3
klasična metoda	1,0	0,7	2,2	2,4	40,6	26,3	18,1	0	0	8,7	2,5
HT metoda	1,0	2,0	1,3	7,5	24,4	25,4	16,3	5,2	0	16,9	7,8
RSD HT metode	6,3	10,8	9,5	5,5	1,2	1,5	3,8	6,4	0	3,2	5,6

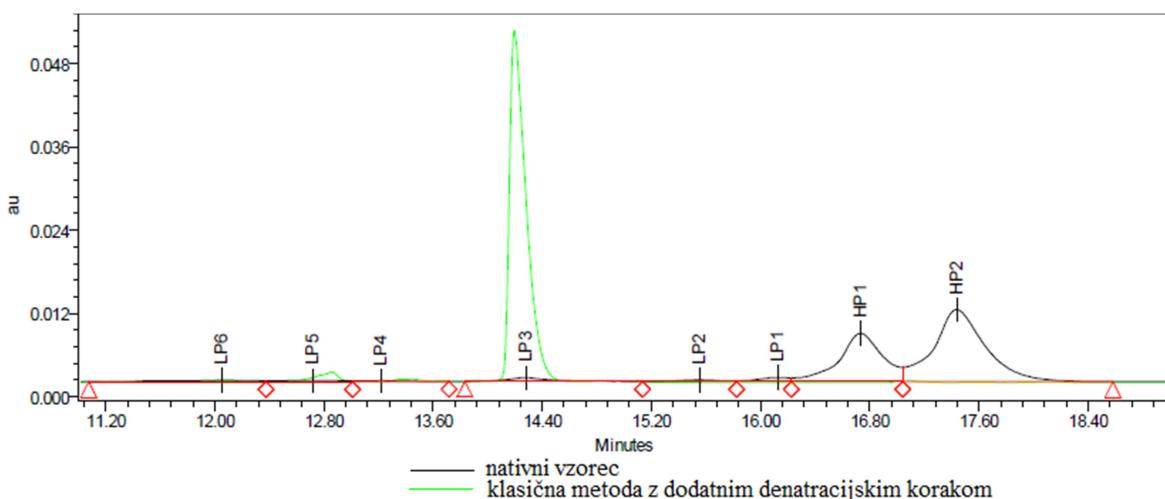
Ker absolutne vrednosti vrhov na ordinati niso primerljive, so preračunani deleži posameznih vrhov v odstotkih. Iz elektroferograma in razpredelnice VIII razberemo, da je največji delež komponent HP1 (33,1 %) in HP2 (57,8 %), ki predstavlja glikoziliran protein, zastopan pri nativnem proteinu. Komponenti LP1 in LP2 predstavlja delno glikoziliran protein, medtem ko LP3 predstavlja popolnoma deglikoziliran protein. Manjše komponente LP4, LP5 in LP6 predstavljajo odlomke proteina (*ang. clipping*). Pri vzorcu, deglikoziliranem po klasični metodi se delež komponent HP1 in HP2 zmanjša (na 18,1 % oz. 0 %) na račun povečanja komponent LP1 in LP2 (na 26,3 % oz. 40,6 %). Pojavlji se tudi nov vrh (8,7 %), med LP2 in LP3, za katerega predvidevamo, da predstavlja delno glikoziliran protein, z vezanim manjšim številom *N*-glikanov kot protein, ki se eluira v vrhu LP1 in LP2. Vse to nakazuje, da smo protein uspeli deglikozilirati le delno. Podobne rezultate dobimo pri vzorcu, deglikoziliranem po HT metodi. Zmanjša se delež komponent HP1 in HP2 (na 16,3 % oz. 5,2 %) na račun povečanja LP1 in LP2 (na 25,4 % oz. 24,4 %). Prav tako pa se tu nekoliko poveča tudi delež komponente LP3 (na 7,5 %). Posledica tega je, da tu dobimo višje odstotke (7,8 %) popolnega deglikoziliranega fuzijskega proteina, kot pri klasični metodi (2,5 %).

Pri deglikozilaciji fuzijskega proteina, dobimo nekoliko boljše rezultate s HT metodo. Fuzijski protein je bolj obširno glikoziliran kot mAb in kljub dolgi, 17-urni inkubaciji pri klasični metodi, le-ta ni dovolj, da bi encim lahko dosegel in odcepil vse vezane *N*-glikane s proteina. HT metoda se od klasične metode razlikuje v tem, da že vsebuje stopnjo

⁹ Izračun % deglikozilacije za fuzijski protein: % deglikozilacije = $(LP3/(HP3 + HP2 + HP1 + LP1 + LP2 + \text{neznani vrh med LP2 in LP3})) * 100$

denaturacije proteina. Ker smo želeli izboljšati izkoristek deglikozilacije po klasični metodi, smo pri pripravi vzorca fuzijskega proteina pred encimskim delovanjem dodali denaturacijski korak, kot je opisano v poglavju 3.3.1.3. Dobljen vzorec deglikoziliranega proteina smo pripravili za analizo s CE-SDS pri reducirajočih pogojih.

Na sliki 23 so prikazani elektroferogrami fuzijskega proteina kot nativnega vzorca in deglikoziliranega vzorca po klasični metodi z dodatnim denaturacijskim korakom (*okrajšano ddk*). Pri slednjem sta se komponenti HP1 in HP2 zmanjšali (na 0,5 % oz. 0,3 %) na račun povečanja komponente LP3 (na 93,4 %). To kaže na popolno sprostitev *N*-glikanov s fuzijskega proteina. V tem primeru je bila denaturacija proteina učinkovitejša in zaradi tega je encim imel olajšan dostop do vseh cepitvenih mest.



Slika 23: Elektroferogram deglikoziliranega fuzijskega proteina s klasično metodo z dodatnim denaturacijskim korakom. Nativni vzorec predstavlja ne-deglikoziliran protein.

Preglednica IX: Odstotek površine vrhov pri deglikoziliranem fuzijskem proteinu s klasično metodo z dodatnim denaturacijskim korakom.

Ime vzorca	LP6	LP5	LP4	LP3	LP2	LP1	HP1	HP2	HP3	Vsota RRT vrhov	% deglikozilacije
klasična metoda ddk	0	3,6	1,0	93,4	0	0	0,5	0,3	0	1,0	99,1

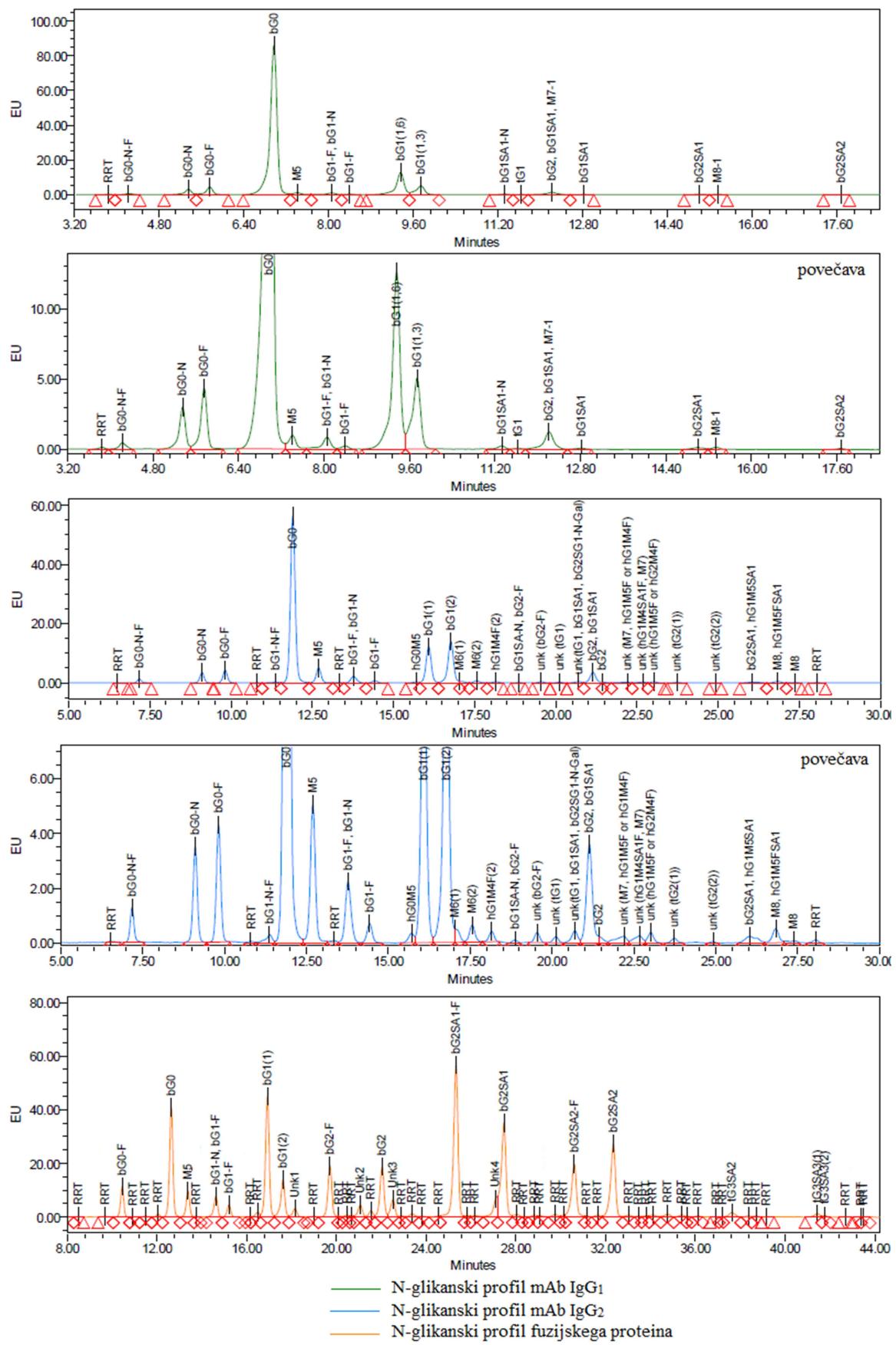
Popolno deglikozilacijo vzorca mAb tako dobimo s klasično metodo, popolno deglikozilacijo vzorca fuzijskega proteina pa s klasično metodo z dodatnim denaturacijskim korakom. S HT metodo pa dobimo delno deglikoziliran vzorec tako mAb kot tudi fuzijskega proteina.

5.3 ZMANJŠEVANJE NANOSA PROTEINA PRI KLASIČNI METODI

HILIC kromatografija ločuje analite glede na polarnost. Ker je polarnost glikanov sorazmerna z njihovo velikostjo, gre pri HILIC kromatografiji pravzaprav za ločitev po velikosti. Zmožna je ločevati celo strukturne izomere, saj dobro loči fukoziliran monogalaktoziliran *N*-glikan z vezano galaktozo preko α 1-6 (bG1(1)) ali α 1-3 (bG1(2)) vezi. Vseeno pa včasih težko loči analite s podobnimi hidrofilnimi lastnostmi, ki se zato eluirajo skupaj, v istem vrhu. (30, 40) Kromatogrami *N*-glikanskih profilov vseh treh terapevtskih proteinov so prikazani na sliki 24.

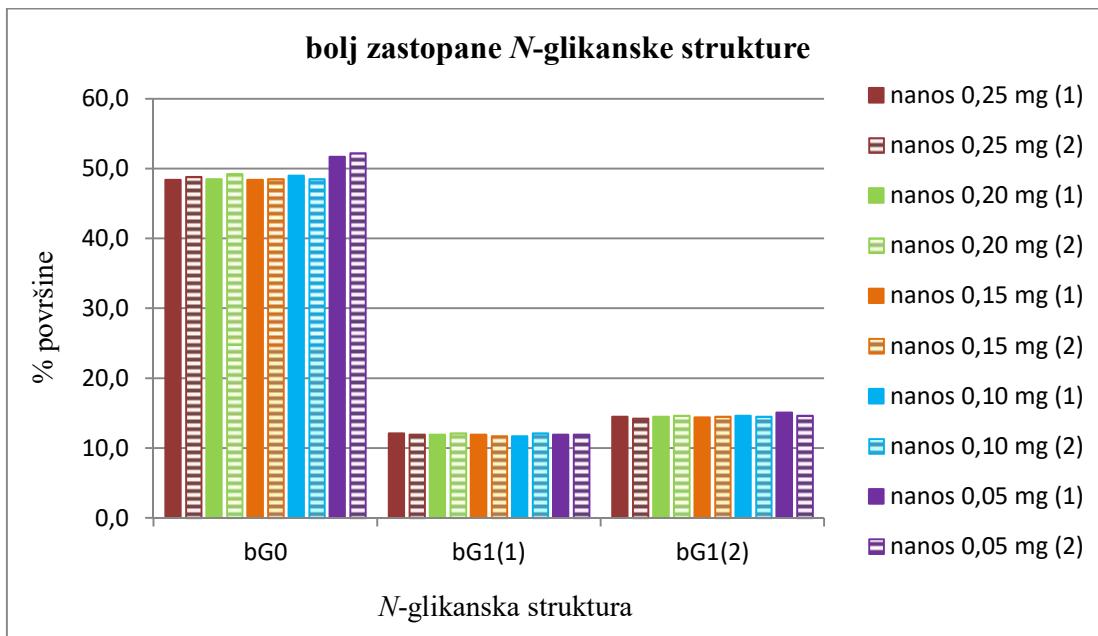
Vrhovi so poimenovani z oznakami *N*-glikanskih struktur (v prilogi A magistrske naloge so zbrane vse oznake, strukture in celotna imena obravnavanih *N*-glikanov). Pri fuzijskem proteinu so z Unk1, Unk2, Unk3 in Unk4 označeni vrhovi z neznano *N*-glikansko strukturo. Za podrobnejšo analizo, bi morali vzorec analizirati z masno spektroskopijo. Integrirali smo tudi vse ostale vrhove, ki se niso pojavili v kromatogramu slepega vzorca in jim dali oznako RRT.

Kromatogrami imajo na abscisni osi za enote minute, na ordinatni osi pa emisijske enote (oznaka EU). Pri integriranih vrhovih trikotnik označuje začetek ali konec vrha, ki je ločen do bazne linije, medtem ko romb označuje začetek ali konec vrha, ki se ni ločil do bazne linije.

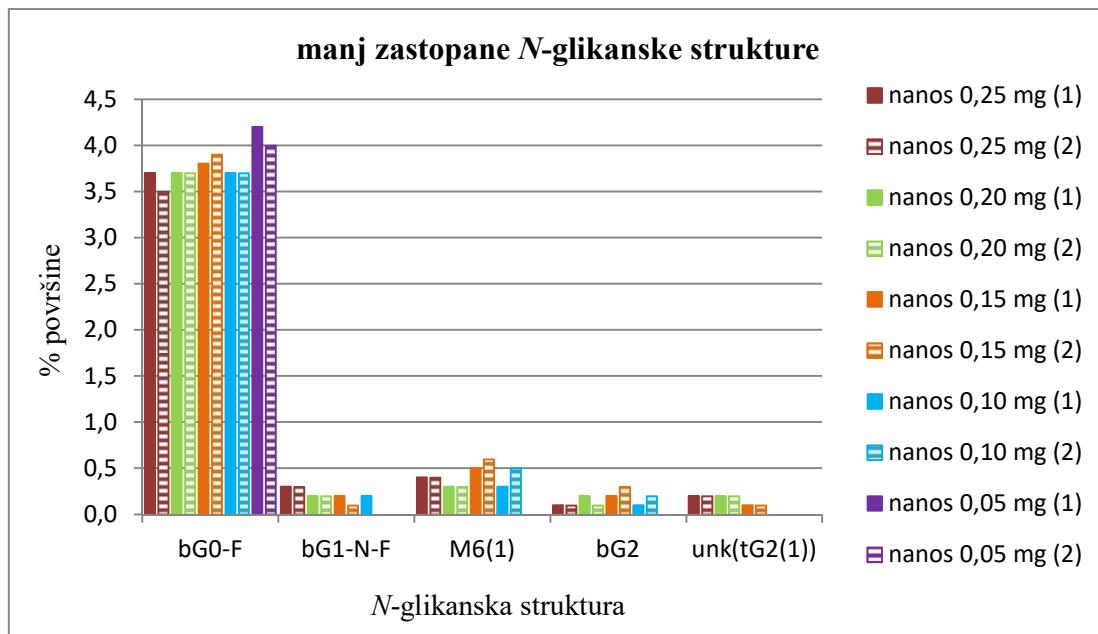


Slika 24: Celotni N-glikanski profili mAb IgG₁, mAb IgG₂ in fuzijskega proteina. Za lepši prikaz nižjih vrhov sta dodani tudi povečavi mAb IgG₁ in IgG₂.

Zmanjševanje nanosa količine proteina pri klasični metodi smo izvedli na mAb IgG₂. Rezultati so prikazani v obliki grafa (sliki 25 in 26).



Slika 25: Grafični prikaz rezultatov odstotkov površine bolj zastopanih N-glikanskih struktur s koračno zmanjšanim nanosom proteina pri klasični metodi – dve ponovitvi: 1 in 2.



Slika 26: Grafični prikaz rezultatov odstotkov površine manj zastopanih N-glikanskih struktur s koračno zmanjšanim nanosom proteina pri klasični metodi – dve ponovitvi 1 in 2.

Ker vzorec vsebuje veliko število *N*-glikanskih struktur, smo se, zaradi boljše preglednosti, odločili za poročanje rezultatov le osmih *N*-glikanskih struktur. Predstavljene so spremembe na treh strukturah, ki so bolj zastopane ($\geq 5\%$); (bG0; bG1(1); bG1(2)) in petih, ki so manj zastopane ($< 5\%$); (bG0-F; bG1-N-F; M6(1); bG2; unk(tG2(1))). Ostale *N*-glikanske strukture smo iz rezultatov izpustili.

Pri nanosu proteina v količini 0,15 mg ali več se da detektirati vse *N*-glikanske strukture, prav tako je odstotek površine vrhov primerljiv z nanosom 0,25 mg, ki se uporablja pri klasični metodi. Največje odstopanje od normalno uporabljenega nanosa imajo manj zastopane strukture bG0-F, M6(1) in bG2, pri katerih se delež površine vrha razlikuje za 0,2 %. Pri nanosu nižje količine proteina pa se nam določene *N*-glikanske strukture že začnejo izgubljati. Pri nanosu 0,10 mg proteina izgubimo vrh unk (tG2(1)) in v eni izmed priprav ne moremo določiti vrha bG1-N-F. To je posledica tega, ker se manj zastopane strukture eluirajo v obliki nizkih vrhov, ki jih težko ovrednotimo. Pri bolj zastopanih strukturah tega problema ni. Odstotek površine vrhov treh najbolj zastopanih struktur *N*-glikanov je tudi pri nanosu 0,10 mg proteina primerljiv z nanosom 0,25 mg proteina. S klasično metodo in nanosom 0,05 mg proteina, ki je enakovreden nanosu, uporabljenem pri HT metodi, pa izgubimo kar štiri manj zastopane *N*-glikanske strukture, bG1-N-F; M6(1); bG2 in unk (tG2(1)). Opazimo pa lahko tudi, da se vrh bG0 v povprečju zviša za 3,4 % in vrh bG0-F za 0,5 %.

Kot najnižji nanos pri klasični metodi, s katerim ne izgubimo nobene od *N*-glikanskih struktur, smo izbrali 0,15 mg proteina. S tako količino proteina še vedno dobimo reprezentativen *N*-glikanski profil vzorca. Pri nanosu nižje količine proteina pa se nam začnejo izgubljati manj zastopane *N*-glikanske strukture, kar ima za posledico povišanje odstotka površine pri drugih glikoizoformah in tako rezultati vzorca niso več reprezentativni.

5.4 ANALIZA NEPOPOLNO DEGLIKOZILIRANEGA PROTEINA

Analizo nepopolno deglikoziliranega proteina smo izvedli na vseh treh terapevtskih proteinih. Ker smo dobili primerljive vrednosti med posameznimi ponovitvami smo podali njihovo povprečno vrednost.

5.4.1 Monoklonsko protitelo IgG₁

V preglednici X so zbrani rezultati *N*-glikanskega profila mAb IgG₁, ki smo jih dobili s HT metodo in klasično metodo ter rezultat profila *N*-glikanov, ki po deglikozilaciji s HT metodo še ostanejo vezani na protein. Pri slednjem smo po deglikozilaciji s HT metodo, preostanek *N*-glikanov, ki so ostali vezani na protein, odcepili s klasično metodo, saj le ta popolno deglikozilira mAb IgG₁. Oznaka tega vzorca je HT + klasična metoda, saj smo protein obdelali z obema korakoma deglikozilacije.

Zaradi prevelikega števila različnih struktur, smo se odločili za poročanje rezultatov le štirih *N*-glikanskih vrhov, ki so bolj zastopani ($\geq 5\%$); (bG0; bG1(1); bG1(2); bG2,bG1SA1,M7¹⁰) in šestih, ki so manj zastopani ($< 5\%$); (bG0-N; bG0-F; M5; bG1-F,bG1-N¹¹; tG1; bG2SA1). Ostale *N*-glikanske strukture smo iz rezultatov izpustili.

Preglednica X: Odstotek površine izbranih vrhov *N*-glikanskih struktur pri deglikoziliranem mAb IgG₁ s HT in klasično metodo, ter vzorcu deglikoziliranem s HT + klasično metodo.

Ime vzorca	bG0-N	bG0-F	bG0	M5	bG1-F, bG1-N	bG1(1)	bG1(2)	tG1	bG2, bG1SA1,M7	bG2SA1
HT metoda	0,4	1,6	59,8	0,8	0,3	22,2	8,4	0,4	5,0	0,4
klasična metoda	0,4	1,9	60,0	0,9	0,4	22,2	8,2	0,4	4,9	0,3
HT + klasična metoda	0	0	67,1	0	0	24,3	8,7	0	0	0

Opomba: *N*-glikanski strukturi bG1(1) in bG1(2) sta na kromatogramu, na sliki 27, poimenovani z oznako bG1(1,6) in bG1(1,3). Imeni sta si med seboj skladni (glej prilogo A).

Opomba: HT + klasična metoda = *N*-glikani, ki ostanejo vezani na protein po HT metodi

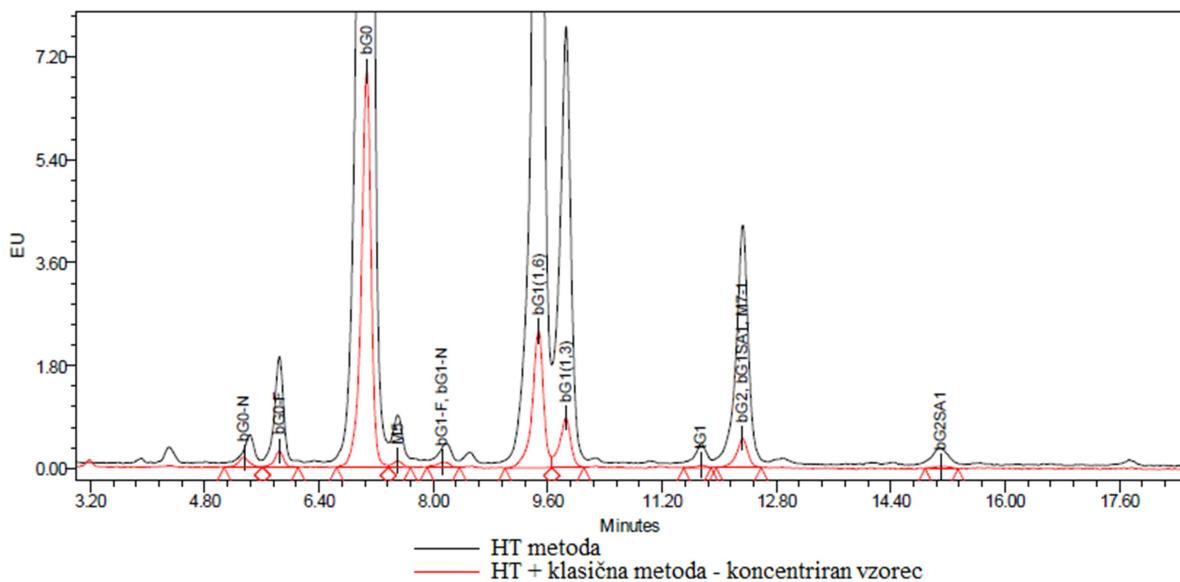
Primerjava deležev površin posameznih vrhov *N*-glikanskih struktur potrjuje, da sta si HT in klasična metoda med seboj primerljivi. Največje odstopanje se pojavi v vrhu bG0-F (1,6 % s HT oz. 1,9 % s klasično metodo) kar pri tako majhni površini vrha že predstavlja večje odstopanje. Pri vzorcu HT + klasična metoda pa je možno zaznati le tri najbolj zastopane *N*-glikanske strukture, bG0; bG1(1) ter bG1(2). Izkoristek elucije z RX mini

¹⁰ *N*-glikanske strukture bG2, bG1SA1 in M7 so integrirane skupaj, saj jih 28-minutna metoda, zaradi preveč podobnih hidrofilnih lastnosti ne loči. Strukture se zato eluirajo v istem vrhu.

¹¹ *N*-glikanski strukturi bG1-F in bG1-N sta poročani skupaj, saj se zaradi preveč podobnih hidrofilnih lastnosti eluirata v istem vrhu.

kolon je bil visok, zato to ni posledica premajhne začetne količine proteina, ki smo ga po HT metodi pripravili še s klasično metodo. Porajalo se nam je vprašanje, ali na proteinu zaradi nepopolne deglikozilacije res ostanejo deloma vezane le tri najbolj zastopane *N*-glikanske strukture. Preden pa bi to lahko potrdili, smo izvedli še dodatni poskus.

Pri klasični metodi imamo sicer 5 x večjo začetno količino proteina, vendar so glikani v končnem volumnu 24 x bolj razredčeni kot pri HT metodi. Pri HILIC kromatografiji, pa smo vse vzorce injicirali z enakim volumnom 1 μ L. V primeru vzorca, deglikoziliranega z obema metodama smo posumili, da smo morda na HILIC kolono nanesli premalo glikanov in je razlog, da opazimo le tri najbolj zastopane *N*-glikanske strukture preveč redčen vzorec. S klasično metodo smo namreč popolno deglikozilirali protein, ki je že bil predhodno delno deglikoziliran s HT metodo. Da bi bila količina injiciranih glikanov primerljiva med vsemi tremi uporabljenimi načini deglikozilacije, smo vzorec, obdelan z obema metodama, skoncentrirali z vakuumskim koncentratorjem. Končni vzorec je bil 7 x bolj koncentriran od začetnega. Po koncentriranju smo ponovili analizo s HILIC kromatografijo na UPLC sistemu.



Slika 27: Kromatogrami *N*-glikanskih struktur mAb IgG₁ po HT metodi, ter koncentriran vzorec deglikoziliran s HT + klasično metodo.

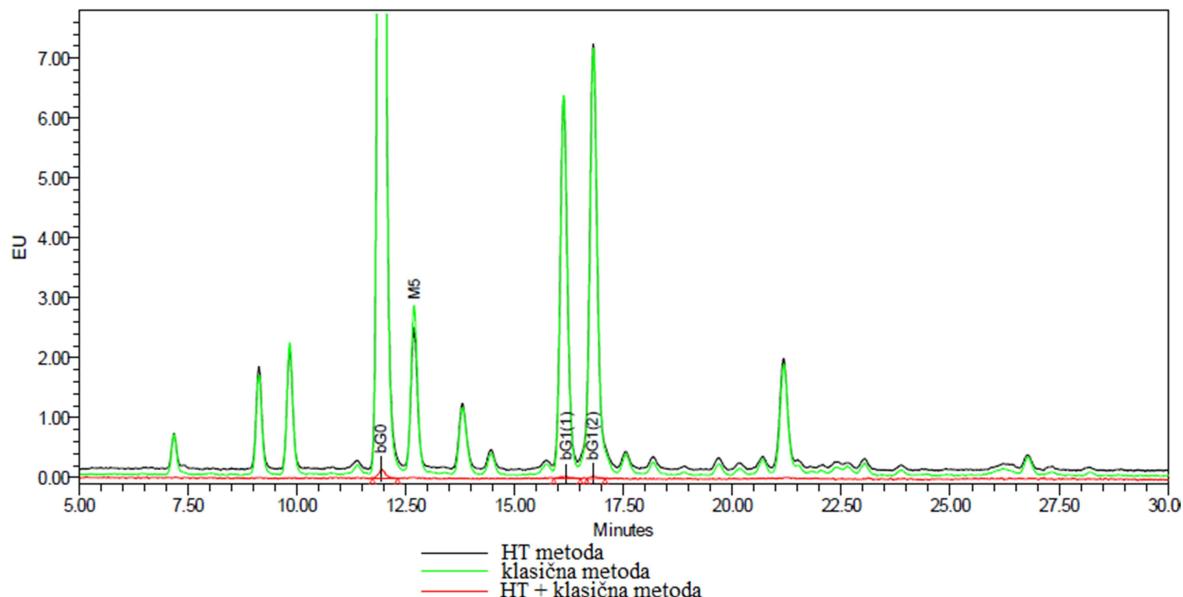
Odziv koncentriranega vzorca HT + klasična metoda se je močno izboljšal. Poleg vrhov bG0; bG1(1) in bG1(2), ki smo jih dobili že v prejšnjem poskusu, se nam na kromatogramu pojavi še sedem novih vrhov: bG0-N; bG0-F; M5; bG1-F,bG1-N; tG1;

bG2,bG1SA1,M7 ter bG2SA1. Sklepamo, da bi ostale *N*-glikanske strukture videli, če bi vzorec še dodatno koncentrirali.

Zaključimo lahko, da je delež *N*-glikanov, ki po HT metodi ostanejo vezani na protein, zelo majhen, različne strukture pa ostanejo vezane v enakem deležu. Nobena od glikanskih struktur ne ostaja vezana na protein bolj od druge. Sama deglikozilacija proteina s HT metodo ni popolna, vendar kljub temu da primerljive rezultate kot popolna deglikozilacija s klasično metodo.

5.4.2 Monoklonsko protitelo IgG₂

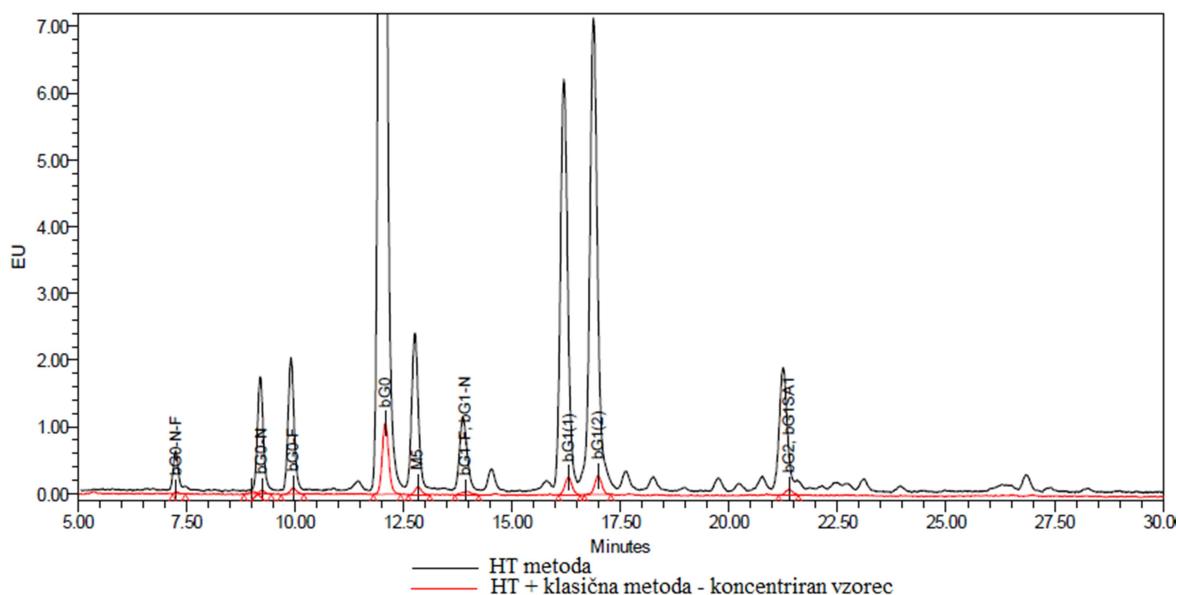
N-glikanska profila mAb IgG₂, ki smo ju dobili s HT metodo in klasično metodo, se kvalitativno ujemata (slika 28). Prisotna je le ena manjša kvantitativna razlika. Vidna je v vrhu M5 in sicer se površini razlikujeta za 0,8 %.



Slika 28: Kromatogrami *N*-glikanskih struktur mAb IgG₂ po klasični in HT metodi, ter vzorec deglikoziliran s HT + klasično metodo.

mAb IgG₂ smo deglikozilirali še z obema metodama, da bi ovrednotili količino in vrsto *N*-glikanov, ki jih HT metoda ne odcepi popolnoma. V vzorcu tako deglikoziliranega mAb IgG₂ smo pred koncentriranjem dobili tri glavne *N*-glikanske strukture: bG0; bG1(1) ter bG1(2), kar je primerljivo z rezultati deglikozilacije mAb IgG₁. Vzorec smo naknadno skoncentrirali z vakuumskim koncentratorjem, da bi bila količina injiciranih glikanov primerljiva med vsemi tremi uporabljenimi načini deglikozilacije in ponovno analizirali s HILIC kromatografijo (slika 29). Končni vzorec je bil 7 x bolj koncentriran od začetnega.

Po koncentriranju se je intenziteta vrhov močno povečala. Poleg vrhov bG0; bG1(1) ter bG1(2), se je na kromatogramu pojavilo še šest novih vrhov: bG0-N-F; bG0-N; bG0-F; M5; bG1-F,bG1-N ter bG2,bG1SA1¹². Sklepamo, da bi ostale N-glikanske strukture videli, če bi vzorec še dodatno koncentrirali.



Slika 29: Kromatogrami N-glikanskih struktur mAb IgG₂ po HT metodi, ter koncentriran vzorec deglikoziliran s HT + klasično metodo.

Zaključek poskusa je enak, kot v primeru mAb IgG₁. Delež N-glikanov, ki po HT metodi ostanejo vezani na protein, je zelo majhen, N-glikanske strukture pa ostanejo vezane v enakem deležu. Podobno, kot pri mAb IgG₁, tudi deglikozilacija mAb IgG₂ s HT metodo ni popolna, vendar kljub temu da primerljive kvalitativne in kvantitativne rezultate kot popolna deglikozilacija s klasično metodo.

5.4.3 Fuzijski protein

V preglednici XI so zbrani rezultati N-glikanskega profila fuzijskega proteina, ki smo jih dobili s HT metodo in klasično metodo z dodatnim denaturacijskim korakom (*okrajšano ddk*) ter rezultat profila N-glikanov, po deglikozilaciji z obema metodama (HT + klasična metoda ddk). Slednji nam poda vrsto N-glikanov, ki po deglikozilaciji s HT metodo še ostanejo vezani na protein.

¹² N-glikansi strukturi bG2 in bG1SA1 sta integrirani skupaj, saj jih 54-minutna metoda, zaradi preveč podobnih hidrofilnih lastnosti ne loči. Strukturi se zato eluirata v istem vrhu.

Zaradi prevelikega števila različnih *N*-glikanskih struktur, smo se odločili za poročanje rezultatov le štirih bolj zastopanih ($\geq 6\%$); (bG0; bG1(1); bG2SA1; bG2SA2) in štirih nekoliko manj zastopanih ($< 6\%$); (bG1(2); bG2-F; bG2; tG3SA3(1)) struktur. Ostale *N*-glikanske strukture smo iz rezultatov izpustili.

Preglednica XI: Odstotek površine izbranih vrhov *N*-glikanskih struktur pri deglikoziliranem fuzijskem proteinu s HT in klasično metodo ddk ter vzorcu, deglikoziliranem s HT + klasično metodo ddk.

Ime vzorca	bG0	bG1(1)	bG1(2)	bG2-F	bG2	bG2SA1	bG2SA2	tG3SA3(1)
HT metoda	9,4	11,2	3,8	4,9	5,2	12,1	9,2	0,4
klasična metoda ddk	6,8	8,1	2,6	3,4	3,9	14,1	15,8	1,4
HT + klasična metoda ddk	2,6	3,1	1,0	3,2	3,1	37,9	22,4	2,5

Opomba: HT + klasična metoda ddk = *N*-glikani, ki ostanejo vezani na protein po HT metodi

Ob primerjavi odstotkov površin posameznih *N*-glikanskih struktur opazimo, da HT in klasična metoda ddk med seboj nista primerljivi. Opazimo lahko večje odstopanje pri vseh osmih vrhovih. Ker nam klasična metoda ne da popolne deglikozilacije fuzijskega proteina, smo šele z vključitvijo denaturacijskega koraka v pripravo vzorcev lahko določili *N*-glikanske strukture, ki po HT metodi še ostanejo vezane na fuzijski protein (glej poglavje 5.2.3). Le ta nam omogoči popolno deglikozilacijo proteina in s tem pomembno vpliva na rezultat *N*-glikanskega profila fuzijskega proteina.

Pri popolni deglikozilaciji vzorca s klasično metodo ddk, opazimo višji odstotek površine večjih in sialiliranih *N*-glikanskih struktur, bG2SA1; bG2SA2 ter tG3SA3(1). Na račun tega se ostalim strukturam odstotek površine zmanjša. Sklepamo, da encim pri HT metodi s proteina slabše cepi večje in sialilirane *N*-glikane. Te strukture zato v večji meri ostanejo vezane na fuzijski protein. Na to kaže tudi rezultat vzorca HT + klasična metoda ddk, kjer prav tako dobimo visoke deleže večjih in sialiliranih *N*-glikanskih struktur.

Večje in sialilirane *N*-glikane smo s fuzijskega proteina, ki je bil že obdelan s HT metodo, odcepili šele s klasično metodo ddk, ki kot denaturacijsko sredstvo vsebuje Rapigest. Eden izmed razlogov bi lahko bila slabša denaturacija proteina pri HT metodi, kar oteži encimu dostop do vseh cepitvenih mest zlasti tistih z večjimi in sialiliranimi *N*-glikanskimi strukturami. Pri HT metodi se za denaturacijo proteina uporablja gvanidinijev hidroklorid,

ki deluje kaotropno, pri višjih koncentracijah pa za razliko od Rapigesta lahko zmanjša encimsko aktivnost (41). To dejstvo bi lahko predstavljalo dodaten razlog za slabšo deglikozilacijo, doseženo s HT metodo.

Vzorec obdelan z obema metodama (HT + klasična metoda ddk) smo skoncentrirali z vakuumskim koncentratorjem tako, da je bil končni vzorec 7 x bolj koncentriran od začetnega. Pri vseh *N*-glikanskih strukturah na kromatogramu koncentriranega vzorca je možno opaziti nekoliko večjo intenziteto odzivov, odstotki površin vrhov pa so ostali nespremenjeni. Tu nismo opazili večje razlike kot pri mAb IgG₁ in IgG₂, saj smo že v prvem poskusu na kromatogramu videli vse *N*-glikanske strukture. Iz tega lahko sklepamo, da je delež *N*-glikanov, ki po HT metodi ostanejo vezani na protein večji.

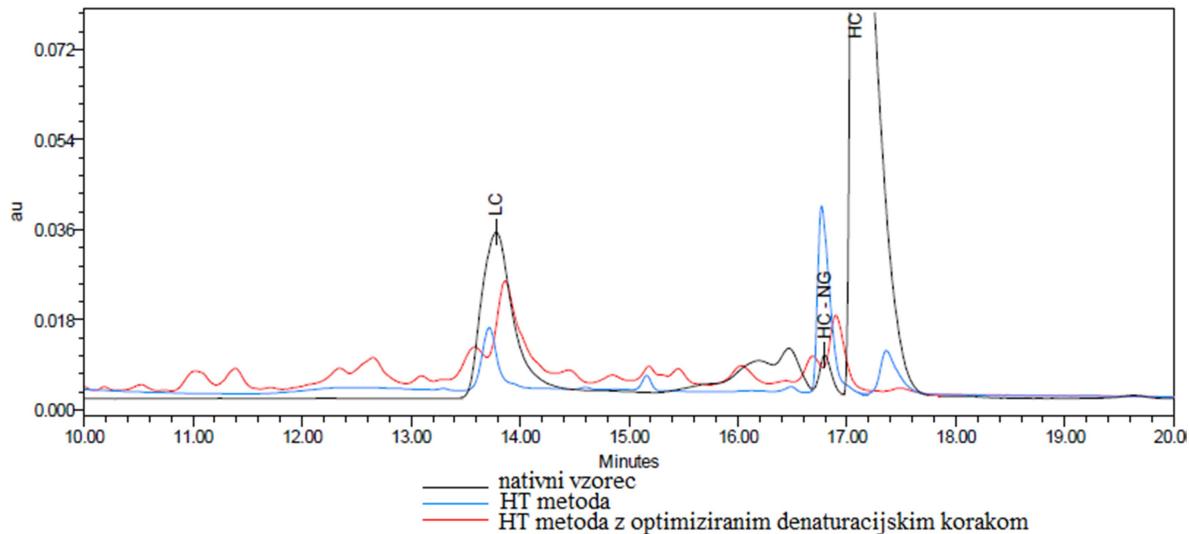
5.5 OPTIMIZACIJA HT METODE

Predvidevamo da nepopolna deglikozilacija mAb in fuzijskega proteina, pri HT metodi, izhaja iz nezadostne denaturacije terapevtskega proteina, ki encimu oteži dostop do cepitvenih mest. Denaturacijski korak smo zato optimizirali z dodatkom reducenta TCEP z namenom, da bi tudi s HT metodo dobili popolno deglikozilacijo mAb in fuzijskega proteina. Poskus smo izvedli na vseh treh terapevtskih proteinih in analizirali tako dobljene *N*-glikane kot deglikozilirane proteine.

5.5.1 Monoklonsko protitelo IgG₁

Na elektroferogramu vzorca mAb IgG₁, ki je bil pripravljen po HT metodi z optimiziranim denaturacijskim korakom se zmanjša delež vrha HC na račun povečanja vrha HC-NG (slika 30). Optimizirana HT metoda torej omogoči popolno sprostitev *N*-glikanov z mAb IgG₁, kar se z neoptimizirano HT metodo ne zgodi, saj pri slednji vrh HC ostaja tudi po deglikozilaciji. Poleg vrhov LC, HC-NG in HC se nam pri HT metodi z optimiziranim denaturacijskim korakom pojavi še veliko manjših vrhov.

TCEP je eden izmed pogosteje uporabljenih reducentov za redukcijo disulfidnih vezi. Njegove prednosti so, da je brez vonja, da ima močno redukcijsko moč, visoko stabilnost in zmožnost delovanja v širokem pH območju. V eni izmed študij o nespecifičnih učinkih TCEP so dokazali da TCEP že pri nizki koncentraciji cepi protein na mestih cisteinskih ostankov in s tem ustvarja heterogene peptide. Mehanizem te reakcije ta trenutek še ni pojasnjen, malo verjetno pa je, da bi TCEP peptidno vez cepil neposredno. (42)

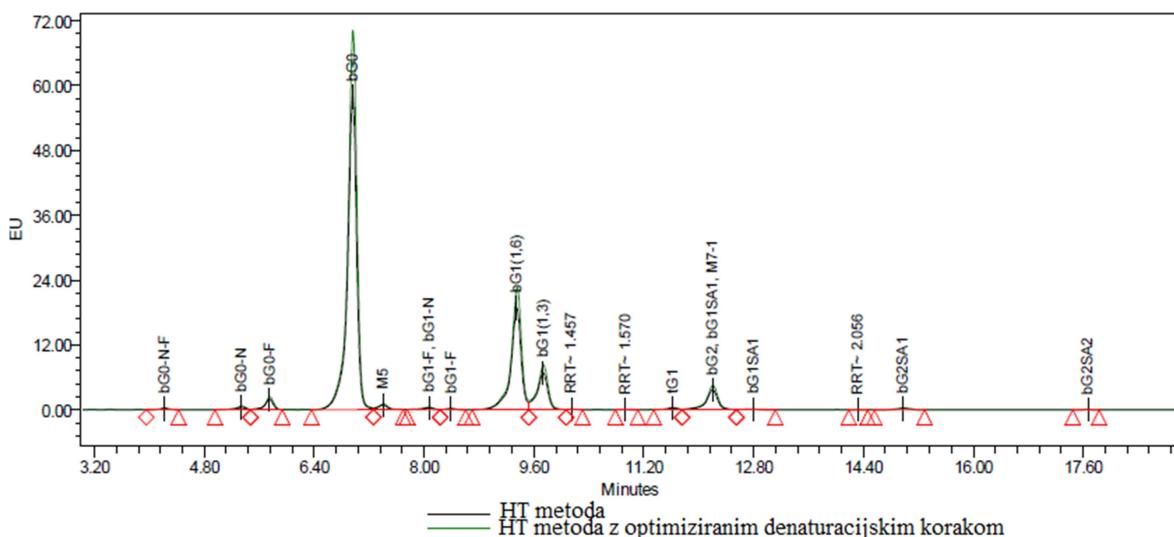


Slika 30: Elektroferogrami deglikoziliranega mAb IgG₁ s HT metodo in HT metodo z optimiziranim denaturacijskim korakom. Nativni vzorec predstavlja ne-deglikoziliran protein.

Glede na podatke, pridobljene iz literature in uporabljeno visoko koncentracijo TCEP-a sklepamo, da manjši vrhovi predstavljajo različno velike odlomke proteina, kljub temu pa teh vrhov ne moremo identificirati. Zaradi velikega števila neznanih vrhov, integracije nismo naredili. Rezultati so zato prikazani le v obliki elektroferogramov. To pa pojasni tudi relativno visok vrh LC v primerjavi z vrhoma HC in HC-NG. Možna razlaga bi bila, da eden izmed nastalih peptidov ustreza velikosti LC verige mAb IgG₁ in se zato pri analizi eluira skupaj z njem.

Na kromatogramu *N*-glikanov sproščenih z mAb IgG₁, obdelanim s HT metodo z optimiziranim denaturacijskim korakom (*okrajšano odk*) je intenziteta vrhov nekoliko večja kot s standardnim protokolom za HT metodo (slika 31). Večja intenziteta nakazuje, da smo z optimizacijo denaturacijskega koraka s proteina uspeli odcepiti več *N*-glikanov. Kljub temu pa imata obe pripravi vzorca med seboj primerljive odstotke površin posameznih vrhov, ki se razlikujejo le za 0,1 % (preglednica XII).

To še enkrat potrdi, da HT metoda, pri mAb IgG₁, kljub nepopolni deglikozilaciji, da primerljive rezultate kot metoda (klasična metoda oz. HT metoda z optimiziranim denaturacijskim korakom), ki protein deglikozilira v celoti.



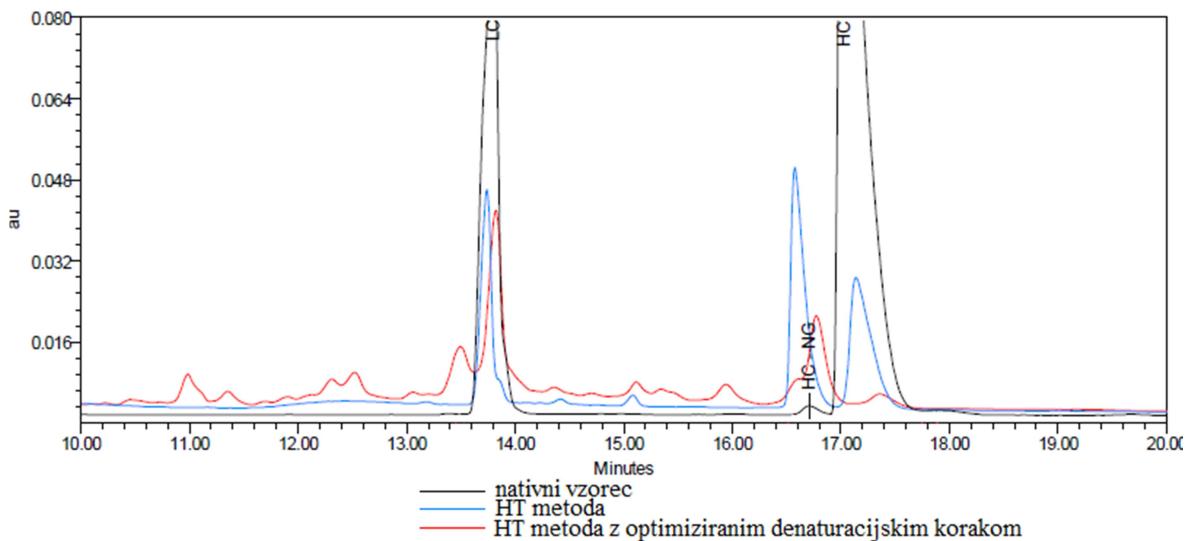
Slika 31: Kromatograma *N*-glikanskih struktur mAb IgG₁ pripravljenega s HT metodo in HT metodo z optimiziranim denaturacijskim korakom.

Preglednica XII: Odstotek površine izbranih vrhov *N*-glikanskih struktur pri deglikoziliranem mAb IgG₁ s HT metodo in HT metodo z optimiziranim denaturacijskim korakom.

Ime vzorca	bG0-N	bG0-F	bG0	M5	bG1-F, bG1-N	bG1(1)	bG1(2)	tG1	bG2, bG1SA1,M7	bG2SA1
HT metoda	0,5	1,8	59,8	0,9	0,4	22,0	8,2	0,3	4,8	0,4
HT metoda odk	0,6	1,8	59,7	0,8	0,4	21,9	8,2	0,4	4,9	0,4

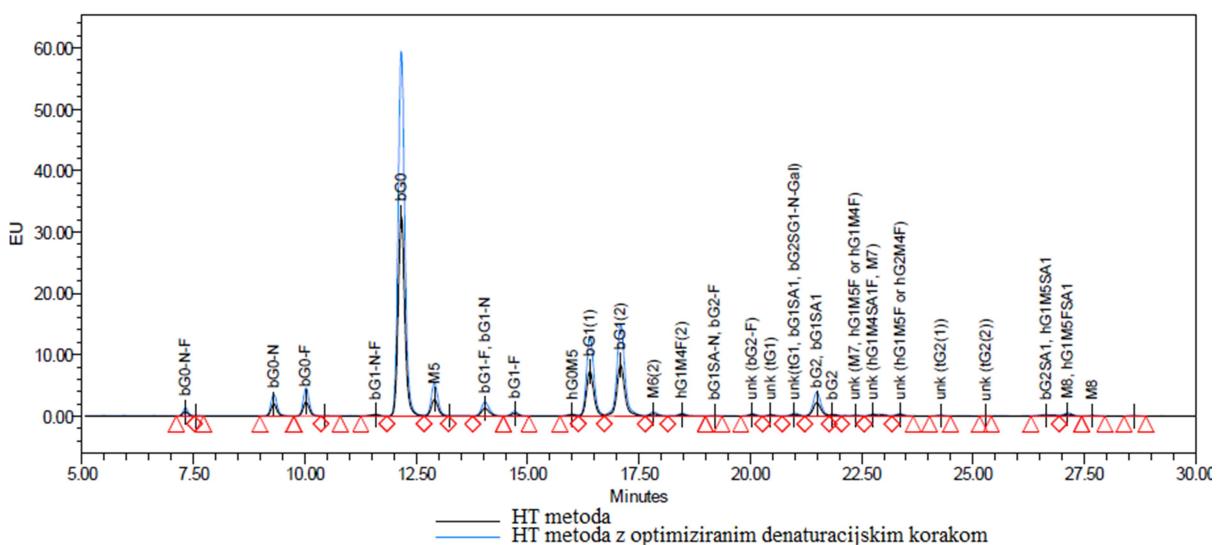
5.5.2 Monoklonsko protitelo IgG₂

Rezultati deglikozilacije mAb IgG₂ s HT metodo z optimiziranim denaturacijskim korakom so primerljivi z rezultati, dobljenimi pri analizi mAb IgG₁ (slika 32). Elektroferogram nakazuje popolno sprostitev *N*-glikanov s proteina, saj se delež vrha HC pri vzorcu, ki je bil pripravljen po HT metodi z optimiziranim denaturacijskim korakom, zmanjša na račun povečanja vrha HC-NG. Tudi tu se poleg vrhov LC, HC-NG in HC pojavijo manjši vrhovi, za katere sklepamo da predstavljajo različne odlomke proteina. Zaradi velikega števila neznanih vrhov, integracije nismo naredili. Rezultati so prikazani le v obliki elektroferogramov.



Slika 32: Elektroferogrami deglikoziliranega mAb IgG₂ s HT metodo in HT metodo z optimiziranim denaturacijskim korakom. Nativni vzorec predstavlja ne-deglikoziliran protein.

N-glikanski profil vzorca, pripravljenega s HT metodo z optimiziranim denaturacijskim korakom (*okrajšano odk*) je identičen kot s HT metodo, so pa intenzitete vrhov približno 2 x večje (slika 33). Optimiziran denaturacijski korak torej povzroči odcepitev večjega števila *N*-glikanov. Kljub večji intenziteti vrhov pri HT metodi odk, pa imata obe pripravi vzorca med seboj primerljive odstotke površin posameznih vrhov, ki se razlikujejo le za 0,2 % do 0,4 % (preglednica XIII).



Slika 33: Kromatograma *N*-glikanskih struktur mAb IgG₂ pripravljenega s HT metodo in HT metodo z optimiziranim denaturacijskim korakom.

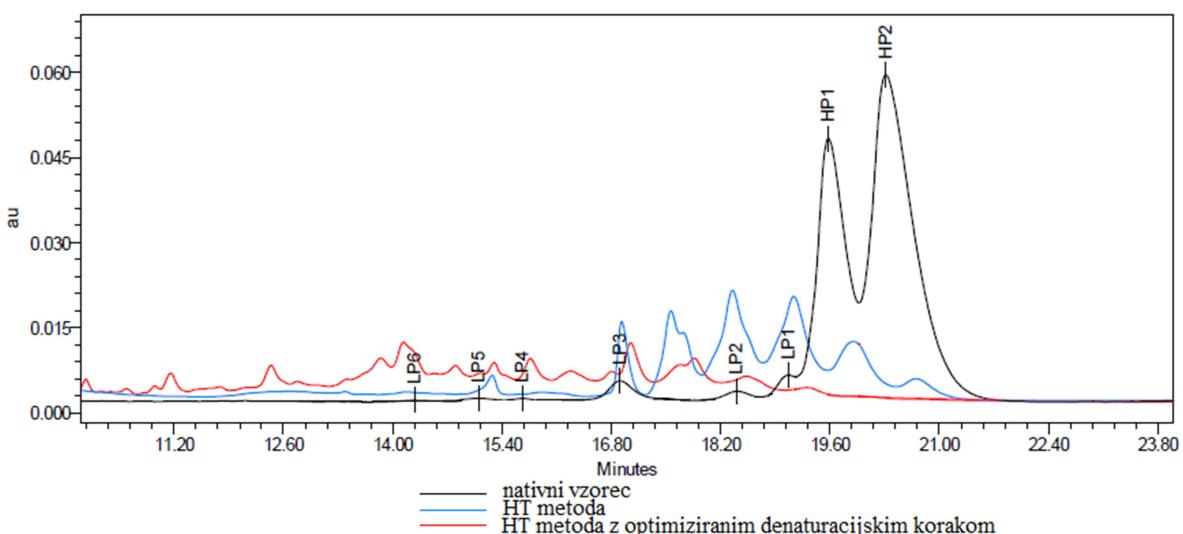
Preglednica XIII: Odstotek površine izbranih vrhov N-glikanskih struktur pri deglikoziliranem mAb IgG₂ s HT metodo in HT metodo z optimiziranim denaturacijskim korakom.

Ime vzorca	bG0-N-F	bG0-N	bG0-F	bG0	M5	bG1-F, bG1-N	bG1(1)	bG1(2)	bG2, bG1SA1
HT metoda	0,8	2,7	3,2	48,8	4,2	2,3	12,0	15,1	4,0
HT metoda odk	0,8	2,7	3,4	48,5	4,5	2,3	11,7	14,7	3,8

To še enkrat potrdi, da HT metoda, pri mAb IgG₂, kljub nepopolni deglikozilaciji, da primerljive rezultate kot metoda (klasična metoda oz. HT metoda z optimiziranim denaturacijskim korakom), ki protein deglikozilira v celoti.

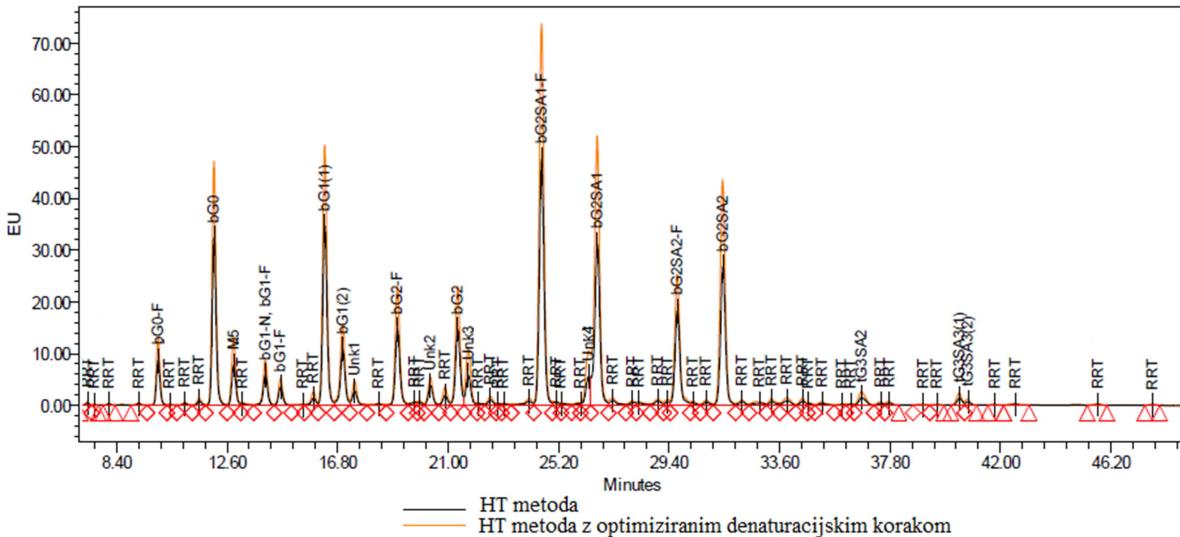
5.5.3 Fuzijski protein

Pri vzorcu fuzijskega proteina, ki je bil pripravljen s HT metodo z optimiziranim denaturacijskim korakom, se delež proteinskih komponent HP1 in HP2 zmanjša na račun povečanja komponente LP3 (slika 34). Poveča se delež deglikoziliranega proteina. Iz tega lahko sklepamo, da smo z optimiziranim denaturacijskim korakom dobili tudi boljšo deglikozilacijo fuzijskega proteina. Ne moremo pa trditi, da gre za popolno deglikozilacijo proteina, saj ostane vrh komponent LP1 in LP2, ter neznani vrh med LP2 in LP3. Tudi tu se nam, zaradi delovanja reducenta TCEP, pojavi večje število neznanih vrhov. Rezultati so zato prikazani le v obliki elektroferogramov.



Slika 34: Elektroferogrami deglikoziliranega fuzijskega proteina s HT metodo in HT metodo z optimiziranim denaturacijskim korakom. Nativni vzorec predstavlja ne-deglikoziliran protein.

Kromatogram *N*-glikanskega profila vzorca pripravljenega po HT metodi z optimiziranim denaturacijskim korakom (*okrajšano odk*) ima približno za 1,5 x višje intenzitete vrhov, kar zopet nakazuje na odcepitev večjega števila *N*-glikanov (slika 35).



Slika 35: Kromatograma *N*-glikanskih struktur fuzijskega proteina pripravljenega s HT metodo in HT metodo z optimiziranim denaturacijskim korakom.

Kljud večji intenziteti vrhov pri HT metodi odk, pa so odstotki površine posameznih vrhov med metodama primerljivi. Površine pod vrhovi se razlikujejo za največ 0,8 % (preglednica XIV). To potrdi, da tudi HT metoda odk ne da popolne deglikozilacije fuzijskega proteina, saj bi se odstotki površin posameznih vrhov v nasprotnem primeru bolj razlikovali (glej preglednico XI pri poglavju 5.4.3).

Preglednica XIV: Odstotek površine izbranih vrhov *N*-glikanskih struktur pri deglikoziliranem fuzijskem proteinu s HT metodo in HT metodo z optimiziranim denaturacijskim korakom.

Ime vzorca	bG0	bG1(1)	bG1(2)	bG2-F	bG2	bG2SA1	bG2SA2	tG3SA3 (1)
HT metoda	9,0	10,7	3,6	4,8	4,9	11,6	9,5	0,5
HT metoda odk	8,4	9,9	3,4	4,8	4,9	12,3	9,8	0,5

Optimiziran denaturacijski korak pri HT metodi, da zadovoljivo denaturacijo mAb IgG₁ in IgG₂, pri katerem encim lahko doseže popolno deglikozilacijo proteina. Pri fuzijskem proteinu pa pride le do izboljšanja. Odcepimo večje število *N*-glikanov, predvidevamo pa,

da del proteina še vedno ostaja nedenaturiran in posledično encim ne odcepi *N*-glikanov iz vseh vezavnih mest. To se kaže v nepopolni deglikozilaciji.

6. SKLEP

V okviru eksperimentalnega dela magistrske naloge smo prišli do pomembnih spoznanj lastnosti obeh metod za pripravo vzorcev za analizo *N*-glikanskega profila.

Dokazali smo, da s klasično metodo dobimo popolno deglikozilacijo mAb, medtem ko je deglikozilacija fuzijskega proteina delna. Ko klasično metodo optimiziramo z dodatkom denaturacijskega koraka z denaturantom Rapigest, pa dobimo popolno deglikozilacijo tudi pri fuzijskem proteinu.

S HT metodo dobimo delno deglikozilacijo tako pri mAb kot tudi pri fuzijskem proteinu. Z analizo nepopolno deglikoziliranega proteina smo določili kateri *N*-glikani ostanejo vezani na protein. Pri mAb IgG₁ in IgG₂ s HT metodo, kljub nepopolni deglikozilaciji, dobimo reprezentativen rezultat vzorca. Vse *N*-glikanske strukture ostanejo vezane na proteinu v enakem deležu. V primeru fuzijskega proteina pa encim PNGaza-F s proteina slabše cepi večje in sialilirane *N*-glikanske strukture, ki zato v večjem deležu ostanejo vezane na protein.

Zaradi pomembne vloge HT metode v zgodnjih fazah razvoja, smo optimizirali korak priprave vzorcev z namenom izboljšanja deglikozilacije. Tako CE-SDS kot HILIC analiza, potrjujeta da optimizirana HT metoda popolnoma deglikozilira mAb, vendar ne tudi fuzijskega proteina. Pri slednjem rezultati HILIC analize kažejo izboljšanje v deglikozilaciji, vendar pa CE-SDS analiza ne potrdi popolne deglikozilacije.

Zaključimo lahko, da je HT metoda, kljub nepopolni deglikozilaciji, primerna za analitiko mAb IgG, saj je primerljiva s klasično metodo, pri kateri dobimo popolno deglikozilacijo proteina. V primeru fuzijskega proteina pa je zaradi popolne deglikozilacije proteina ustreznejša klasična metoda z dodatnim denaturacijskim korakom. V farmacevtski industriji biološko podobnih zdravil, predvsem v zgodnjih fazah razvoja, je HT metoda bolj zaželjena, saj omogoča hitre rezultate in analizo velikega števila vzorcev. Ker se rezultate vzorcev biološko podobne učinkovine primerja z rezultatom vzorca inovativne učinkovine, se lahko za analitiko fuzijskih proteinov, kljub nepopolni deglikozilaciji, vseeno uporablja HT metoda.

7. LITERATURA

- (1) Štrukelj B, Kos J, et al.: Biološka zdravila: od gena do učinkovine, 1. izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 4-24, 136-150, 532-534
- (2) Walsh G: Biopharmaceuticals biochemistry and biotechnology, 2. izdaja, John Wiley & Sons, West Sussex, 2003: 5-8
- (3) Boyer R: Temelji biokemije, 2. izdaja, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 84-85, 198-199
- (4) Liu L: Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins, *J. Pharm Sci.*, 2015, 104(6): 1866-1884
- (5) Vozelj M: Temelji imunologije, 1. izdaja, DZS d.d., Ljubljana, 2000: 52-64
- (6) Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T: IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, *Frontiers in immunology*, 2014, 5(520)
- (7) Shade KTC, Anthony RM: Antibody Glycosylation and Inflammation, *Antibodies*, 2013, 2(3): 392-414
- (8) Linderholm LA, Chamow SM: Immunoglobulin Fc-Fusion Proteins; Part 1: Their Design and Manufacture, *BioProcess International*, 2014, 12(9): 30-35
- (9) Czajkowsky DM, Hu J, Shao Z, Pleass RJ: Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives, *EMBO Molecular Medicine*, 2012, 4(10): 1015-1028
- (10) <https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/protein-glycosylation.html> (10.05.2017)
- (11) Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al.: Essentials of Glycobiology, 2. izdaja, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2009 (Chapter 8)
- (12) Reusch D, Tejada M: Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes, *Glycobiology*, 2015, 25(12): 1325-1334
- (13) Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW: Introduction to modern liquid chromatography, 3. izdaja, A John Wiley & Sons, New Jersey, 2010: 20-24, 88-89, 395-401
- (14) http://www.waters.com/waters/en_SI/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography-Explained/nav.htm?cid=10048919&locale=en_SI (24.05.2017)

- (15) http://www.waters.com/waters/en_SI/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_SI (24.05.2017)
- (16) http://www.waters.com/waters/en_SI/Identifying-and-Quantitating-Compounds/nav.htm?cid=10049064&locale=en_SI (24.05.2017)
- (17) http://alumni-umj.kurikulum.org/IT/2411-2301/chromatographic-device_6766_alumni-umj-kurikulum.html (30.05.2017)
- (18) Buszewski B, Noga S: Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) - a powerful separation technique, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 402(1): 231–247
- (19) http://www.waters.com/waters/en_SI/HPLC-Separation-Modes/nav.htm?cid=10049076&locale=en_SI (24.05.2017)
- (20) Li SFY: *Capillary electrophoresis: principles, practice and applications*, Elsevier, 1992, 52: 1-5, 9-10
- (21) Coulter B: *Introduction to Capillary Electrophoresis*, Beckman Coulter, 1991: 1-2
- (22) http://www.biomers.net/en/Technical_Information/Quality_control.html (01.06.2017)
- (23) Xu Y: Tutorial: *Capillary Electrophoresis*, *The Chemical Educator*, 1996, 1(2): 1-14
- (24) Lacher NA, Roberts RK, He Y, Cargill H, Kearns KM, Holovics H, Ruesch MN: Development, validation, and implementation of capillary gel electrophoresis as a replacement for SDS-PAGE for purity analysis of IgG2 mAbs, *Journal of separation science*, 2010, 33(2): 218-227
- (25) Rustandi RR, Washabaugh M, Wang Y: Applications of CE SDS gel in development of biopharmaceutical antibody-based products, *Electrophoresis*, 2008, 29(17): 3612-3620
- (26) <http://www.sigmadralich.com/technical-documents/articles/biology/glycobiology/n-linked-glycan-strategies.html> (05.06.2017)
- (27) Tarentino AL, Trimble RB, Plummer TH: Enzymatic approaches for studying the structure, synthesis, and processing of glycoproteins. *Methods in cell biology*, 1989, 32: 111-139

- (28) Wang T, Cai ZP, Gu XQ, Ma HY, Du MY, Huang K, Voglmeir J, Liu L: Discovery and characterization of a novel extremely acidic bacterial N-glycanase with combined advantages of PNGase F and A, *Bioscience Reports*, 2014, 34(6): 673-684
- (29) Bigge JC, Patel TP, Bruce JA, Goulding PN, Charles SM, Parekh RB: Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid, *Analytical biochemistry*, 1995, 230(2): 229-238
- (30) Ruhaak LR, Zauner G, Huhn C, Bruggink C, Deelder AM, Wuhrer M: Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2010, 397(8): 3457-3481
- (31) <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/proteomics/post-translational-analysis/glycosylation/glycoprofile-labeling-kits-for-glycan-analysis.html> (13.06.2017)
- (32) PROzyme: GP96NG-AB Instruction Manual, Rapid N-GlycanPreparation with 2-AB, GlykoPrep, Hayward CA: 1-38
- (33) PROzyme: GlykoPrep Guidebook, Hayward CA: 1-50
- (34) http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Amicon-Ultra-0.5%C2%A0mL-Centrifugal-Filters-for-DNA-and-Protein-Purification-and-Concentration,MM_NF-C82301?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.si%2F&bd=1 (21.06.2017)
- (35) https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1479135496644/litdoc28922532_20161114155810.pdf (21.06.2017)
- (36) <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715000122en.pdf> (22.06.2017)
- (37) Coulter B: Application Guide PA 800 plus Pharmaceutical Analysis System, Beckman Coulter, 2014: 1-6
- (38) Aguilar MI: Reversed-phase high-performance liquid chromatography. HPLC of peptides and proteins: Methods and protocols, 2004: 9-22
- (39) <https://www.snowpure.com/docs/triton-x-100-sigma.pdf> (22.06.2017)
- (40) Melmer M, Stangler T, Schiefermeier M, Brunner W, Toll H, Rupprechter A, et al.: HILIC analysis of fluorescence-labeled N-glycans from recombinant biopharmaceuticals, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2010, 398(2): 905-914

- (41) <https://biospectra.us/bp/products/biological-buffers/all-biological-buffers/guanidine-hydrochloride-detail.html#> (22.06.2017)
- (42) Liu P, O'Mara BW, Warrack BM, Wu W, Huang Y, Zhang Y, et al.: A tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) related cleavage on cysteine-containing proteins, Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2010, 21(5): 837-844

Priloga A

Preglednica XV: Oznaka, struktura in celotno ime vseh obravnavanih *N*-glikanov.

Oznaka	Struktura	Celotno ime
bG0-N-F		asialo- agalakto- 1,6 ali 1,3 mono- $\beta(1,2)$ N-acetylglukozamin, dvovejni
bG0-N		asialo- agalakto- 1,6 ali 1,3 mono- $\beta(1,2)$ N-acetylglukozamin, dvovejni, $\alpha(1,6)$ jedrna fukoza
bG0-F		asialo- agalakto- dvovejni
bG1-N-F		asialo- 1,6 ali 1,3 mono- $\beta(1,4)$ galaktoza mono- $\beta(1,2)$ N-acetylglukozamin, dvovejni
bG0		asialo- agalakto- dvovejni, $\alpha(1,6)$ jedrna fukoza
M5		oligomanoza 5
bG1-F		asialo- 1,6 ali 1,3 mono- $\beta(1,4)$ galaktoza, dvovejni

Oznaka	Struktura	Celotno ime
bG1-N	A branched glycan chain. It starts with a yellow circle (Galactose) connected to a blue square (Glucosamine). This is followed by another blue square and a green circle (Galactose). A third green circle is attached to the second blue square. From this third green circle, two branches emerge: one to the right leading to a fourth blue square and then a red triangle (Fucose), and another branch going up-left leading to a fifth blue square and then a red triangle.	asialo- 1,6 ali 1,3 mono- β (1,4) galaktoza, mono- β (1,2) N-acetilglukozamin, dvovejni, α (1,6) jedrna fukoza
bG1(1) ali bG1(1,6)	A branched glycan chain. It starts with a yellow circle (Galactose) connected to a blue square (Glucosamine). This is followed by another blue square and a green circle (Galactose). A third green circle is attached to the second blue square. From this third green circle, two branches emerge: one to the right leading to a fourth blue square and then a red triangle (Fucose), and another branch going up-left leading to a fifth blue square.	asialo- 1,6 mono- β (1,4) galaktoza, dvovejni, α (1,6) jedrna fukoza
bG1(2) ali bG1(1,3)	A branched glycan chain. It starts with a yellow circle (Galactose) connected to a blue square (Glucosamine). This is followed by another blue square and a green circle (Galactose). A third green circle is attached to the second blue square. From this third green circle, two branches emerge: one to the right leading to a fourth blue square and then a red triangle (Fucose), and another branch going up-left leading to a fifth blue square.	asialo- 1,3 mono- β (1,4) galaktoza, dvovejni, α (1,6) jedrna fukoza
M6	A branched glycan chain. It starts with a yellow circle (Galactose) connected to a blue square (Glucosamine). This is followed by another blue square and a green circle (Galactose). A third green circle is attached to the second blue square. A fourth green circle is attached to the third green circle. From this fourth green circle, two branches emerge: one to the right leading to a fifth blue square and then a red triangle (Fucose), and another branch going up-left leading to a sixth blue square.	oligomanoza 6
bG2-F	A branched glycan chain. It starts with a yellow circle (Galactose) connected to a blue square (Glucosamine). This is followed by another blue square and a green circle (Galactose). A third green circle is attached to the second blue square. From this third green circle, two branches emerge: one to the right leading to a fourth blue square and then a red triangle (Fucose), and another branch going up-left leading to a fifth blue square.	asialo- di- β (1,4) galaktoza, dvovejni
tG1	A branched glycan chain. It starts with a yellow circle (Galactose) connected to a blue square (Glucosamine). This is followed by another blue square and a green circle (Galactose). A third green circle is attached to the second blue square. A fourth green circle is attached to the third green circle. From this fourth green circle, two branches emerge: one to the right leading to a fifth blue square and then a red triangle (Fucose), and another branch going up-left leading to a sixth blue square.	asialo- 1,6 mono- β (1,4) galaktoza, di- β (1,2) N-acetilglukozamin, mono- β (1,4) N-acetilglukozamin, trivejni, α (1,6) jedrna fukoza
bG1SA1	A branched glycan chain. It starts with a purple diamond (Sialic acid) connected to a yellow circle (Galactose). This is followed by another yellow circle (Galactose) connected to a blue square (Glucosamine). This is followed by another blue square and a green circle (Galactose). A third green circle is attached to the second blue square. From this third green circle, two branches emerge: one to the right leading to a fourth blue square and then a red triangle (Fucose), and another branch going up-left leading to a fifth blue square.	1,6 ali 1,3 mono-sialična kislina, mono- β (1,4)galaktoza, dvovejni, α (1,6) jedrna fukoza

Oznaka	Struktura	Celotno ime
bG2		asialo- di- $\beta(1,4)$ galaktoza, dvovejni, $\alpha(1,6)$ jedrna fukoza
M7		oligomanoza 7
tG2		asialo- 1,6 di- $\beta(1,4)$ galaktoza, di- $\beta(1,2)$ N-acetilglukozamin, mono- $\beta(1,4)$ N- acetilglukozamin, trivejni, $\alpha(1,6)$ jedrna fukoza
bG2SA1		1,6 ali 1,3 mono-salična kislina, di- $\beta(1,4)$ galaktoza dvovejni, $\alpha(1,6)$ jedrna fukoza
bG2SA2		di-salična kislina, di- $\beta(1,4)$ galaktoza dvovejni, $\alpha(1,6)$ jedrna fukoza
tG3SA3		tri-salična kislina, tri- $\beta(1,4)$ galaktoza, di- $\beta(1,2)$ N- acetilglukozamin, mono- $\beta(1,4)$ N-acetilglukozamin, trivejni, $\alpha(1,6)$ jedrna fukoza
Legenda:	■ GlcNAc ● Man ○ Gal ◆ Salična kislina ▲ Fuc	