

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KLAVDIJA ZUPANC

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKE
BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KLAVDIJA ZUPANC

**OPTIMIZACIJA IN VALIDACIJA METODE ZA DOLOČANJE
GLIKANSKIH STRUKTUR Z ANIONSKO IZMENJEVALNO
KROMATOGRAFIJO VISOKE ZMOGLJIVOSTI IN PULZNO
AMPEROMETRIČNO DETEKCIJO**

**METHOD OPTIMIZATION AND VALIDATION FOR THE GLYCAN
PROFILING BY HIGH PERFORMANCE ANION-EXCHANGE
CHROMATOGRAPHY WITH PULSED AMPEROMETRIC
DETECTION**

**MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKE
BIOMEDICINE**

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala v podjetju Lek d.d. Mengeš, organizacija Tehničnega razvoja in proizvodnje bioloških zdravil, oddelek Analitska znanost in tehnologija, pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom dr. Darje Kotnik.

Zahvala

Zahvaljujem se vsem, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku magistrske naloge. Posebna zahvala gre Darji Kotnik za vso strokovno pomoč in nasvete pri izvajanju eksperimentalnega dela in pisanju magistrske naloge ter mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc za pomoč pri izdelavi naloge. Hvala tudi družini in prijateljem za vso pomoč in podporo v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag.farm. in somentorstvom dr. Darje Kotnik.

Klavdija Zupanc

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	BIOLOŠKA ZDRAVILA.....	1
1.1.1	Rekombinantna biološka zdravila	1
1.2	RAZVOJ IN PROIZVODNJA PODOBNIH BIOLOŠKIH ZDRAVIL.....	2
1.3	STRUKTURA PROTEINOV.....	4
1.4	POSTTRANSLACIJSKE MODIFIKACIJE	5
1.4.1	Glikozilacija	5
1.4.1.1	N-glikozilacija.....	6
1.4.1.2	O-glikozilacija.....	7
1.4.1.3	Sialilacija.....	7
1.5	IMUNOTOKSIČNOST GLIKANSKIH STRUKTUR IN SIALIČNIH KISLIN PRI TERAPEVTSKIH PROTEINIH	8
1.6	TEHNIKE DOLOČANJA GLIKANSKIH STRUKTUR	10
1.7	IONSKA KROMATOGRAFIJA OGLJIKOVIH HIDRATOV.....	11
1.7.1	Splošno o ionsko izmenjevalni kromatografiji.....	11
1.7.1.1	Anionsko izmenjevalna kromatografija visoke zmogljivosti s pulzno amperometrično detekcijo (HPAEC-PAD)	12
2	NAMEN DELA	16
3	MATERIALI IN METODE	18
3.1	MATERIALI	18
3.1.1	Kemikalije	18
3.1.2	Mobilne faze, pufri in raztopine	18
3.1.3	Vzorci	19
3.1.4	Oprema	20
3.1.4.1	Naprave in pribor	20
3.1.4.2	Program za obdelavo podatkov	21

3.2	METODE.....	22
3.2.1	Priprava vzorcev	22
3.2.1.1	Redčitev.....	22
3.2.1.2	Deglikozilacija	22
3.2.1.3	Čiščenje vzorcev	23
3.2.1.4	Desialilacija.....	24
3.2.2	Anionsko izmenjevalna kromatografija visoke zmogljivosti s pulzno amperometrično detekcijo (HPAEC-PAD).....	25
3.2.2.1	Optimizacija HPAEC-PAD metode.....	26
3.2.2.1.1	Robustnost	26
3.2.2.1.2	Primerjava 4PAD detekcije z 2PAD detekcijo	30
3.2.2.2	Validacija HPAEC-PAD metode	32
3.2.2.2.1	Specifičnost in selektivnost	32
3.2.2.2.2	Meja določljivosti (LOQ)	34
3.2.2.2.3	Linearnost	35
3.2.2.2.4	Natančnost	37
3.2.2.2.5	Točnost.....	38
3.2.2.2.6	Območje.....	38
3.2.2.2.7	Stabilnost vzorčnih raztopin	39
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	40
4.1	OPTIMIZACIJA HPAEC-PAD METODE.....	40
4.1.1	Robustnost	40
4.1.2	Primerjava 4PAD detekcije z 2PAD detekcijo.....	48
4.2	VALIDACIJA HPAEC-PAD METODE.....	50
4.2.1	Specifičnost in selektivnost	50
4.2.2	Meja določljivosti (LOQ)	54
4.2.3	Linearnost	55
4.2.4	Natančnost	56
4.2.5	Točnost	58

4.2.6	Območje	58
4.2.7	Stabilnost vzorčnih raztopin	59
5	SKLEP	60
6	LITERATURA	62

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Uporabljene kemikalije	18
Preglednica II: Uporabljene mobilne faze, pufri in raztopine	19
Preglednica III: Uporabljeni standardi in vzorci	20
Preglednica IV: Uporabljene naprave.....	20
Preglednica V: Uporabljen pribor	21
Preglednica VI: DoE eksperiment – matrika testiranja faktorjev, ki vplivajo na pripravo vzorcev	27
Preglednica VII: DoE eksperiment – matrika testiranja različnih kromatografskih pogojev.	29
Preglednica VIII: Testiranje stabilnosti pufrov in raztopin za pripravo vzorcev ter mobilnih faz	30
Preglednica IX: Prikaz zaporedja napetostnih pulzov 4PAD in 2PAD detekcije	31
Preglednica X: Identiteta glikanskih struktur, preliminarno določena med karakterizacijo HPAEC-PAD mapiranih glikanov z MALDI-TOF masno spektrometrijo.....	33
Preglednica XI: Prikaz nanosa vzorca s koncentracijo 0,5 mg/mL na kolono za določanje LOQ.....	34
Preglednica XII: Deleži nominalnega nanosa (0,5 mg/mL), uporabljeni pri določevanju linearnosti metode, v odvisnosti od volumna injiciranja.....	36
Preglednica XIII: DoE eksperiment – rezultati testiranja faktorjev, ki vplivajo na pripravo vzorcev	41
Preglednica XIV: Faktorji, ki vplivajo na pripravo vzorcev: vpliv prevladujočih faktorjev oziroma prevladujočih interakcij dveh faktorjev na odziv glikanskih struktur 2A, 3A, 4A, HM6P in S	42
Preglednica XV: Interne specifikacije za glikanske strukture prisotne v aktivni učinkovini, izražene z relativnim deležem površine posamezne glikanske strukture	43

Preglednica XVI: DoE eksperiment – rezultati testiranja različnih kromatografskih pogojev	43
Preglednica XVII: Različni kromatografski pogoji: vpliv prevladujočih faktorjev oziroma prevladujočih interakcij dveh faktorjev na delež površin glikanskih struktur 2A, 3A, 4A, HM6P in S	45
Preglednica XVIII: Različni kromatografski pogoji: vpliv prevladujočih faktorjev, oziroma prevladujočih interakcij dveh faktorjev na delež površin glikanskih struktur 2A, 3A, 4A, HM6P in S pri uporabi kolone B	46
Preglednica XIX: Vpliv sestave mobilne faze B (nominalna sestava, 5 % koncentrirana (+5 %) in 10 % koncentrirana (+10 %)) na delež površin glikanskih struktur 2A, 3A, 4A, HM6P in S	47
Preglednica XX: Testiranje stabilnosti 70 % (v/v) acetonitrila/0,1 % (v/v) TFA in 40 % (v/v) acetonitrila/0,1 % (v/v) TFA	69
Preglednica XXI: Testiranje stabilnosti končnega pufru za redčenje vzorcev (25 mM natrijev acetat, pH = 6,0)	69
Preglednica XXII: Testiranje stabilnosti začetnega pufru za redčenje vzorcev (50 mM natrijev fosfat, 150 mM natrijev klorid, pH = 7,0)	70
Preglednica XXIII: Testiranje stabilnosti mobilnih faz (MFA, MFB in MFC) pod helijevo atmosfero	70
Preglednica XXIV: Testiranje mobilnih faz (MFA, MFB in MFC) brez helijeve atmosfere	71
Preglednica XXV: Rok uporabnosti pufov in raztopin za pripravo vzorcev ter mobilnih faz	71
Preglednica XXVI: Natančnost sistema 4PAD detekcije za glikanske strukture z deležem površin (<i>ang. % area</i>) < 5 %	72
Preglednica XXVII: Natančnost sistema 2PAD detekcije za glikanske strukture z deležem površin (<i>ang. % area</i>) < 5 %	72
Preglednica XXVIII: Natančnost sistema 4PAD detekcije za glikanske strukture z deležem površin (<i>ang. % area</i>) ≥ 5 %	73
Preglednica XXIX: Natančnost sistema 2PAD detekcije za glikanske strukture z deležem površin (<i>ang. % area</i>) ≥ 5 %	73
Preglednica XXX: Rezultati določanja LOQ	74

Preglednica XXXI: Retencijski časi glikanskih struktur v referenčni substanci in DS vzorcu	75
Preglednica XXXII: Retencijski čas HM6P vrha v HM6P standardu in DS vzorcu.....	75
Preglednica XXXIII: Retencijski čas HM6P vrha v HM6P standardu in DS vzorcu, združenem s HM6P standardom.....	76
Preglednica XXXIV: Razmerje vrha proti dolini (p/v razmerje) med vrhovoma HM6P in S pri DS vzorcu.....	76
Preglednica XXXV: Rezultati določanja LOQ	77
Preglednica XXXVI: Rezultati potrjevanja LOQ.....	77
Preglednica XXXVII: Deleži (60 %–140 %) nominalne koncentracije referenčne substance in površine vrhov 2A, 3A(1-4), 3A(1-6), 4A in 3A1R za izračun linearnosti posameznih glikanskih struktur	78
Preglednica XXXVIII: Deleži (60 %–140 %) nominalne koncentracije referenčne substance in površine vrhov 4A1R, 3A2R, 4A2R, HM6P in S za izračun linearnosti posameznih glikanskih struktur	79
Preglednica XXXIX: Enačba linearne funkcije $y = ax + b$, za posamezno glikansko strukturo	80
Preglednica XL: Zbrani rezultati linearne regresije za posamezno glikansko strukturo.....	80
Preglednica XLI: Rezultati natančnosti sistema za glikanske strukture z deležem površin (<i>ang. % area</i>) < 5 %	81
Preglednica XLII: Rezultati natančnosti sistema za glikanske strukture z deležem površin (<i>ang. % area</i>) ≥ 5 %	81
Preglednica XLIII: Rezultati natančnosti metode za DS vzorec s koncentracijo 0,35 mg/mL z glikanskimi strukturami z deležem površin (<i>ang. % area</i>) < 5 %	82
Preglednica XLIV: Rezultati natančnosti metode za DS vzorec s koncentracijo 0,50 mg/mL z glikanskimi strukturami z deležem površin (<i>ang. % area</i>) < 5 %	82
Preglednica XLV: Rezultati natančnosti metode za DS vzorec s koncentracijo 0,65 mg/mL z glikanskimi strukturami z deležem površin (<i>ang. % area</i>) < 5 %	83
Preglednica XLVI: Rezultati natančnosti metode za DS vzorec s koncentracijo 0,35 mg/mL z glikanskimi strukturami z deležem površin (<i>ang. % area</i>) ≥ 5 %	83
Preglednica XLVII: Rezultati natančnosti metode za DS vzorec s koncentracijo 0,50 mg/mL z glikanskimi strukturami z deležem površin (<i>ang. % area</i>) ≥ 5 %	84

Preglednica XLVIII: Rezultati natančnosti metode za DS vzorec s koncentracijo 0,65 mg/mL z glikanskimi strukturami z deležem površin (<i>ang. % area</i>) $\geq 5\%$	84
Preglednica XLIX: Rezultati S/N razmerja za HM6P vrh na LOQ nivoju DS vzorca s koncentracijo 0,35 mg/mL.....	85
Preglednica L: Rezultati vmesne natančnosti za DS vzorec s koncentracijo 0,50 mg/mL z glikanskimi strukturami z deležem površin (<i>ang. % area</i>) $< 5\%$ (Operater 2)	85
Preglednica LI: Rezultati vmesne natančnosti za DS vzorec s koncentracijo 0,50 mg/mL z glikanskimi strukturami z deležem površin (<i>ang. % area</i>) $\geq 5\%$ (Operater 2)	86
Preglednica LII: Absolutne razlike povprečnih deležev površin posameznih glikanskih skupin med dvema operaterjema (Operater 1 in Operater 2)	86
Preglednica LIII: Parametri za potrjevanje točnosti HPAEC-PAD metode.....	87
Preglednica LIV: Parametri za določanje območja HPAEC-PAD metode.....	87
Preglednica LV: Testiranje stabilnosti referenčne substance	88
Preglednica LVI: Testiranje stabilnosti DS vzorca	88

KAZALO SLIK

Slika 1: Primerjava kompleksnosti zgradbe molekule eritropoetina (biološko zdravilo) in aspirina (zdravilo kemijskega izvora majhne molekulske mase) (16, 17)	3
Slika 2: Štiri ravni strukture proteina (povzeto po 22)	4
Slika 3: a. Nevraminska kislina, ki je jedrna struktura vseh sialičnih kislin, b. N-acetilnevraminska kislina, c. N-glikolilnevraminska kislina, d. N-acetil-9-O-acetilnevraminska kislina (36).....	8
Slika 4: Ionski kromatografski sistem za izvajanje HPAEC-PAD (povzeto po 53)	12
Slika 5: Tri-pulzna in štiri-pulzna napetostna sekvenca (povzeto po 54)	15
Slika 6: Prikaz sprostitve N-vezanih oligosaharidov ob prisotnosti N-glikozidaze F (povzeto po 60).....	22
Slika 7: Prikaz čiščenja vzorcev z uporabo HyperSep Hypercarb SPE membran (povzeto po 62).....	23
Slika 8: Mesto, kjer sialidaza katalizira cepitev $\alpha(2-3)$ in $\alpha(2-6)$ vezane N-acetilnevraminske kisline (povzeto po 64)	24
Slika 9: Elektrokemijska detekcijska celica (53).....	25

Slika 10: Prikaz kromatogramov z ustrezno in neustrezno ločbo 2A vrha v odvisnosti od serije kromatografske kolone.....	47
Slika 11: Prikaz kromatograma končnega pufra za redčenje vzorcev.....	51
Slika 12: Prikaz kromatograma mobilne faze A.....	51
Slika 13: Prikaz kromatogramov DS vzorca in referenčne substance.....	52
Slika 14: Prikaz kromatograma HM6P standarda	53
Slika 15: Prikaz kromatogramov DS vzorca in DS vzorca, združenega s HM6P standardom	53

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Izračun absolutne razlike med dvema časovnima točkama.....	30
Enačba 2: Izračun razmerja med signalom in šumom (S/N).....	34
Enačba 3: Izračun relativne standardne deviacije.....	35
Enačba 4: Izračun LOQ vrednosti	35
Enačba 5: Izračun površine vrha posamezne glikanske strukture pri nominalnem nanosu na kolono (0,5 mg/mL; $x = 100\%$).....	36
Enačba 6: Izračun absolutnega odseka na y-osi	36
Enačba 7: Izračun intervala zaupanja, $P = 95\%$	38
Enačba 8: Izračun absolutne razlike med dvema operaterjema.....	38

POVZETEK

Sodobna biološka zdravila predstavljajo enega najpomembnejših in najhitreje rastočih segmentov farmacevtskega trga. Biotehnoška proizvodnja biološkega zdravila je edinstven proces, ki vključuje številne dejavnike, ki vplivajo tako na zgradbo in količino končnega produkta, kot tudi na njegovo kakovost. Ključno je, da se tekom proizvodnega procesa izvajajo testi kakovosti, s katerimi zagotavljamo nastanek varnega in učinkovitega končnega produkta. Biološka zdravila namreč lahko povzročajo resne neželene učinke, kot je imunogenost.

Namen magistrske naloge je bila optimizacija in validacija metode, imenovane anionsko izmenjevalna kromatografija visoke zmogljivosti s pulzno amperometrično detekcijo (HPAEC-PAD), s katero določamo prisotnost glikanskih struktur v aktivni učinkovini. Glikani vplivajo tako na fizikalno-kemijske kot tudi biološke lastnosti proteinov, prav tako lahko glikozilacija neposredno ali posredno vpliva na imunogenost terapevtskih proteinov. Optimizacijo analitske metode za določanje glikanskih struktur s HPAEC-PAD smo izvedli po pristopu Načrtovanje poskusa (DoE) (*ang. Design of Experiment, DoE*). V okviru optimizacije metode smo testirali robustnost, tekom katere sta bila kreirana dva seta DoE eksperimentov. V okviru prvega seta smo testirali faktorje, ki vplivajo na pripravo vzorcev (temperatura inkubacije, čas inkubacije in količina dodanega encima), pri drugem setu pa smo se osredotočili na kromatografske pogoje (uporaba različnih kolon, kontrolirana/nekontrolirana temperatura detektorja, različen pretok skozi kolono in različna sestava mobilne faze B). Poleg testiranja kromatografskih pogojev in faktorjev, ki vplivajo na pripravo vzorcev, smo testirali tudi stabilnost pripravljenih vzorčnih raztopin, mobilnih faz, pufrov in ostalih raztopin za pripravo vzorcev. Z izvedbo številnih eksperimentov smo dokazali, da je HPAEC-PAD metoda robustna za določanje glikanskih struktur, prav tako smo potrdili stabilnost pufrov in raztopin za pripravo vzorcev ter mobilnih faz za določeno časovno obdobje. Potrdili smo enomesečno stabilnost za mobilne faze pod helijevo atmosfero, pufre in raztopine za pripravo vzorcev ter enotedensko stabilnost za mobilne faze brez helijeve atmosfere. V okviru optimizacije metode smo prav tako primerjali detekcijo glikanskih struktur s štiri-pulzno napetostno sekvenco (4PAD) in dvo-pulzno napetostno sekvenco (2PAD), pri čemer smo testirali parametre natančnosti in občutljivosti metode. Dobljeni rezultati kažejo na primerljivost 2PAD in 4PAD detekcije, za dokončno

nadomestitev 4PAD detekcije z 2PAD detekcijo pa bi bila potrebna validacija in potrditev celotnega spektra validacijskih parametrov.

Po končani optimizaciji smo izvedli validacijo HPAEC-PAD metode. Vsi testirani validacijski parametri so ustrezali kriterijem sprejemljivosti, s čimer smo dokazali, da je HPAEC-PAD metoda točna, natančna, specifična, selektivna in linearna v delovnem območju od 0,3 mg/mL do 0,7 mg/mL. Prav tako smo določili mejo določljivosti, s katero lahko HPAEC-PAD metoda kvantitativno ovrednoti glikanske strukture z ustrezno natančnostjo in točnostjo (0,3 % površine za HM6P vrh in 0,2 % površine za S vrh) in potrdili vsaj 10 dnevno stabilnost vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku ionskega kromatografskega sistema pri 2–8 °C.

Ključne besede: biološka zdravila, rekombinatni terapevski protein, glikozilacija, anionsko izmenjevalna kromatografija visoke zmogljivosti s pulzno amperometrično detekcijo, validacija

ABSTRACT

Modern biopharmaceuticals represent one of the most important and fastest growing segments of the pharmaceutical market. The biotechnological production of biopharmaceuticals is a unique process which includes numerous factors that influence the structure, quantity and quality of the final product. Biopharmaceuticals can cause serious adverse effects, such as immunogenicity, and therefore it is crucial that quality assurance tests are carried out during the production process, in order to guarantee the safety and efficacy of the final product.

The purpose of the master's thesis was method optimization and validation for the glycan profiling in drug substance by applying a high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). Glycans affect both the physicochemical and biological properties of proteins, and in addition to that the glycosylation can directly or indirectly affect the immunogenicity of therapeutic proteins.

Method optimization to determine the glycan structures with the HPAEC-PAD was carried out by applying the Design of Experiment approach (DoE). In the context of method optimization, we tested the robustness of the method, during which two sets of DoE experiments were created. Within the first set we tested the factors that influence the sample preparation (incubation temperature, incubation time and amount of added enzyme), while in the second set we focused on chromatographic conditions (use of different columns, controlled / uncontrolled detector temperature, different flow rate and different composition of the mobile phase B). In addition to testing chromatographic conditions and factors that influence the sample preparation, the stability of mobile phases, buffers and other solutions for sample preparation was also tested. By carrying out numerous experiments, we have demonstrated that the HPAEC-PAD method is robust for determining glycan structures and we have also confirmed the stability of buffers, mobile phases and other sample preparation solutions for a certain period of time. We have confirmed one-month stability for buffers, sample preparation solutions and mobile phases under helium atmosphere and one-week stability for mobile phases without helium atmosphere. As part of method optimization we also compared four-step potential waveform for pulsed amperometric detection (4PAD) of carbohydrates and two-step potential waveform (2PAD) by evaluating parameters of accuracy and sensitivity. Results obtained show the comparability of 2PAD and 4PAD

detection. In case of complete replacement of 4PAD detection with 2PAD detection, full method validation should be carried out.

After the optimization was completed, we carried out the HPAEC-PAD method validation. All tested validation parameters met the acceptance criteria, thus we have shown that the method for the glycan structures in drug substance by HPAEC-PAD is accurate, precise, specific, selective and linear in the working range from 0,3 mg/mL to 0,7 mg/mL. We have also confirmed the lowest amount of glycans than can be quantified by HPAEC-PAD. During the validation the limit of quantification of 0,3 % area for HM6P peak and 0,2 % area for S peak was determined and confirmed and at least 10 days stability was confirmed for sample solutions stored in ion chromatography (IC) autosampler at 2–8 °C.

Key words: biopharmaceuticals, recombinant therapeutic protein, glycosylation, anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection, validation

SEZNAM OKRAJŠAV

2A	dvoantelarne glikanske strukture
2-AA	2-aminobenzojska kislina
2-AB	2-aminobenzamid
2PAD	dvo-pulzna napetostna sekvenca
3A	triantelarne glikanske strukture
3A(1-4)	triantelarne (1→4) glikanske strukture
3A(1-6)	triantelarne (1→6) glikanske strukture
3A1R	triantelarne glikanske strukture + 1 LacNAc ponovitev
3A2R	triantelarne glikanske strukture + 2 LacNAc ponovitvi
3PAD	tri-pulzna napetostna sekvenca
4A	tetraantelarne glikanske strukture
4A1R	tetraantelarne glikanske strukture + 1 LacNAc ponovitev
4A2R	tetraantelarne glikanske strukture + 2 LacNAc ponovitvi
4PAD	štiri-pulzna napetostna sekvenca
Asn	aspargin
BHK	ledvične celice mladičev hrčka (<i>ang. baby hamster kidney cells</i>)
CHO	ovarijske celice kitajskega hrčka (<i>ang. Chinese hamster ovary cells</i>)
CMP	citidin-5'-monofosfat
DC	enosmerni tok (<i>ang. direct current</i>)
DMB	1,2-diamino-4,5-metilendioksibenzen dihidroklorid
DNA	deoksiribonukleinska kislina (<i>ang. deoxyribonucleic acid</i>)
DoE	načrtovanje poskusa (<i>ang. Design of Experiment</i>)
DP	farmacevtski izdelek (<i>ang. drug product</i>)
DS	aktivna učinkovina (<i>ang. drug substance</i>)
EMA	Evropska agencija za zdravila (<i>ang. European Medicine Agency</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E_{ads}	adsorpcijski potencial
E_{det}	detekcijski potencial
E_{oksid}	oksidacijski potencial
E_{red}	redukcijski potencial
Fab	fragment za vezavo antigena

FDA	Ameriška agencija za zdravila (<i>ang. Food and Drug Administration</i>)
FIA	pretočni injekcijski sistemi (<i>ang. flow injection analysis</i>)
GDP	gvanozin difosfat
HM6P	manoza 6 fosfat glikanske strukture
HPAEC-PAD	anionsko izmenjevalna kromatografija visoke zmogljivosti s pulzno amperometrično detekcijo (<i>ang. high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection</i>)
HPLC-FLD	tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti, sklopljena z detektorjem fluorescence (<i>ang. high performance liquid chromatography with fluorescence detection</i>)
ICH	The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
Ig	imunoglobulin
IPAD	integrirana pulzna amperometrija
LacNAc	N-acetil-D-laktozamin
LOQ	meja določljivosti (<i>ang. limit of quantitation</i>)
mAb	monoklonsko protitelo
MALDI-TOF	identifikacija proteinov z masno spektrometrijo z ionizacijo v matriksu z lasersko desorpcijo in masnim analizatorjem na čas preleta ionov (<i>ang. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of flight Mass Spectrometry</i>)
MF	mobilna faza
MS	masna spektrometrija
Neu5Ac = NANA	N-acetilnevraminska kislina
Neu5Glc = NGNA	N-glikolilnevraminska kislina
QbD	kakovost z načrtovanjem (<i>ang. Quality by design</i>)
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
pI	izoelektrična točka
pKa	negativni desetiški logaritem disociacijske konstante kisline
p/v	razmerje vrha proti dolini
R	korelacijski koeficient
rDNA	rekombinantna deoksiribonukleinska kislina (<i>ang. recombinant deoxyribonucleic acid</i>)

RNAi	interferenca ribonukleinske kisline (<i>ang. ribonucleic acid interference</i>)
RS	referenčna substanca
RT	retencijski čas
S	sulfatirane glikanske strukture
Ser	serin
S/N	razmerje med signalom in šumom
SOP	standardni operacijski postopek
Temp.	temperatura
t_{det}	časovno obdobje detekcije
Thr	treonin
t_{int}	časovno obdobje integracije
t_{zak}	časovno obdobje zakasnitve
v/v	volumsko volumski
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (<i>ang. World Health Organization</i>)

1 UVOD

1.1 BIOLOŠKA ZDRAVILA

V zadnjih treh desetletjih je opazen porast v razvoju bioloških zdravil (1). Biološka zdravila v večini sestavljajo proteinske molekule ali nukleinske kisline, za katere je značilna velika molekulska masa in kompleksna tridimenzionalna zgradba. Proizvedena so s pomočjo živih organizmov in so lahko potencialno imunogena (2). Pogosto gre za heterogene molekule, katerim težko v celoti določimo biološko delovanje le s fizikalno-kemijskimi analitskimi metodami (2). Generično poimenovanje pri bioloških zdravilih ni primerno, saj so biološka zdravila zaradi kompleksnosti biotehnološkega proizvoda večja in bolj zapletena kot kemična zdravila (1). Namesto izraza generiki je Evropska agencija za zdravila (EMA) uvedla izraz »biološko podobna zdravila«, ki jim pravimo tudi »podobna biološka zdravila« oziroma biosimilarji (3).

Biološka zdravila so klasificirana v petih skupinah, ki obsegajo biološka zdravila pridobljena z izolacijo (naravni človeški in živalski hormoni, učinkovine iz rastlin, učinkovine iz človeške krvi ter klasična cepiva), biološka zdravila pridobljena s sintezo (sintezni peptidi), genska zdravila (terapevtski geni, učinkovine RNAi, ribocimi in protismiselne molekule DNA), monoklonska protitelesa (mišja protitelesa, proizvedena s hibridomsko tehnologijo) in rekombinantna biološka zdravila oz. biotehnološka zdravila, ki predstavljajo največjo skupino sodobnih bioloških zdravil (2).

1.1.1 Rekombinantna biološka zdravila

Osnovna tehnologija proizvodnje rekombinantnih bioloških učinkovin predstavlja vnos gena, ki kodira želeno učinkovino, v primerno gostiteljsko celico (3). Ena izmed metod izolacije in pomnoževanja gena za sintezo želene učinkovine je kloniranje gena z vstavitvijo slednjega v drugo DNA molekulo, ki služi kot nosilec oziroma vektor in se lahko ekspresira v živih celicah. Rezultat kombinacije dveh DNA različnega izvora je molekula rekombinantne DNA (4). V humani medicini se uporabljajo predvsem naslednji produkti, pridobljeni s tehnologijo rDNA: hormoni in encimi za terapevtske namene, hematopoetski rastni faktorji, produkti za strjevanje krvi, trombolitiki, antikoagulantni, interferoni in interleukini (5).

Terapevtski rekombinantni proteini so eden izmed najpomembnejših in najhitreje rastočih segmentov biofarmacevtskega trga (6). Za produkcijo terapevtskih rekombinantnih proteinov je zelo pomembna izbira ustreznega ekspresijskega sistema (gostitelj heterologne DNA). Slednji mora hitro in ponovljivo proizvesti čim večje količine pravilno zvitega in aktivnega tarčnega proteina (7). Obstaja široka paleta ekspresijskih sistemov za produkcijo terapevtskih rekombinantnih proteinov: celične kulture bakterij, kvasovk, plesni, sesalcev, rastlin in žuželk ter transgene živali in rastline (6, 8). Najpomembnejši dejavniki, ki vplivajo na izbor ekspresijskega sistema, so kakovost in funkcionalnost proteina ter hitrost proizvodnje. Medtem ko so neglikozilirani proteini običajno proizvedeni v bakterijah *Escherichia coli* (*E. coli*) ali kvasovkah, kar predstavlja 40 % terapevtskih rekombinantnih proteinov, so N-glikozilirani proteini običajno proizvedeni v celicah sesalcev, ki posnemajo človeško glikozilacijo. Ovarijske celice kitajskega hrčka (CHO) so najpogosteje uporabljene in proizvedejo kar 50 % terapevtskih proteinov na trgu (8).

Terapevtski proteini predstavljajo pomemben in sestavni del zdravljenja kompleksnih bolezni, kot so rak, avtoimunske, infektivne, kardiovaskularne, genetske in nevrološke bolezni (2, 9, 10, 11). Po odobritvi prvega terapevtskega proteina (humani inzulin) pred tremi desetletji je področje terapevtskih proteinov izjemno napredovalo, kar se odraža z več kot 130 terapevtskimi proteini in peptidi, odobrenimi s strani Ameriške agencije za zdravila (FDA) za klinično uporabo do leta 2015. Med slednjimi je več kot 30 % terapevtskih monoklonskih protiteles (mAb) (9).

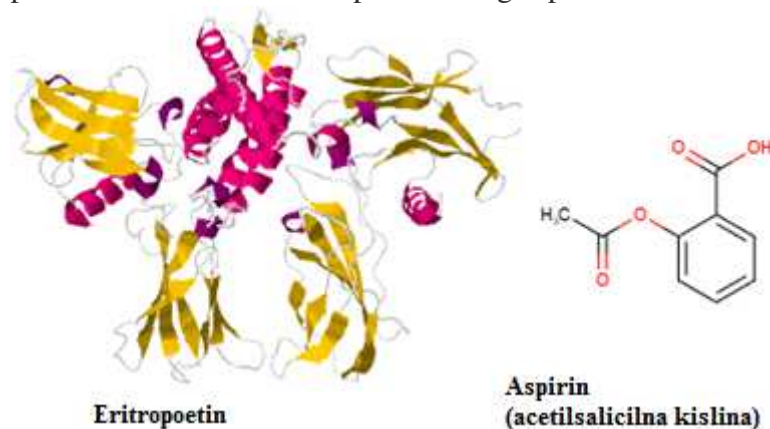
1.2 RAZVOJ IN PROIZVODNJA PODOBNIH BIOLOŠKIH ZDRAVIL

Razvoj podobnih bioloških zdravil je tehnološko izjemno zapleten, zahteven in dolgotrajen proces, ki vključuje skrbno zasnovane elemente ter se drži načela »kakovost zdravila z načrtovanjem« (Quality by Design). Pomembno je, da so vse stopnje razvoja nadzorovane s predpisanimi standardnimi operacijskimi postopki (SOP) in da so vsi parametri, ki vplivajo na razvoj zdravila, natančno validirani (tehnike, sistemi, aparature, produkcijsko okolje) (2). Začetna faza razvoja podobnih bioloških zdravil vključuje fizikalno-kemijske, biološke in predklinične študije z namenom potrditi biološko podobnost referenčnemu zdravilu (12). Naslednja faza vključuje farmakokinetične in farmakodinamične študije pri določeni populaciji ljudi, z namenom določiti bioekvivalenco (ugotoviti, ali podobno biološko in referenčno zdravilo delujeta v telesu na podoben način) (12, 13). Ko je potrjena

farmakokinetična, farmakodinamična in imunogena podobnost referenčnemu zdravilu, je potrebno izvesti vsaj eno klinično raziskavo stopnje 3. Slednje se izvajajo pri občutljivi populaciji bolnikov in njihov namen je potrditi, da sta učinkovitost in varnost podobnega biološkega zdravila visoko podobni referenčnemu zdravilu (12, 13). Po izvedbi vseh faz, ki so potrebne za razvoj podobnega biološkega zdravila, je potrebna še odobritev s strani regulative (EMA, FDA, Svetovna zdravstvena organizacija (WHO)) (14).

Proizvodnja bioloških zdravil je v primerjavi s kemijskimi zdravili (male molekule) veliko bolj zapletena (slika 1). Vzroki za to so v naravi vhodnega materiala in zahtevah po izredno visoki stopnji natančnosti v proizvodnem procesu. Proizvodnja biološkega zdravila se začne z zasnovano edinstvene celične linije, ki služi kot osnova. Izhodišče celične linije so celice (mikrobne, živalske ali človeške), ki se pod specifičnimi pogoji lahko razmnožujejo. Za proizvodnjo zelenega proteina je v celice potrebno vstaviti DNA s tehnikami molekularne biologije, kar ustvarja posamezne celične linije edinstvene (15).

Biotehnološka proizvodnja biološkega zdravila vključuje številne dejavnike (razmnoževanje celic, proizvodnjo zelenega proteina, fermentacija, čiščenje proteina, izdelava formulacije), ki ne vplivajo samo na zgradbo in količino končnega produkta, ampak tudi na njegovo kakovost. Vsak biofarmaceutski proizvodnji proces je edinstven, saj lahko sprememba le enega izmed mnogih korakov proizvodnega procesa vpliva na končni rezultat (15). Že najmanjše spremembe, kot so npr. temperatura ali sestavine gojišča, lahko vodijo do bistveno spremenjenih fizikalnih in kliničnih lastnosti biološkega zdravila, kar vpliva na količino motečih oziroma neželenih snovi v produktu ter povzroči velike spremembe v učinkovitosti zdravila in imunogenost (14, 15). Zato je bistvenega pomena, da so proizvodni procesi in okolje v obratu proizvodnje konstantni, saj s tem zagotovimo varen in učinkovit končni produkt. Na zahtevnost proizvodnega procesa biološkega zdravila kaže tudi število



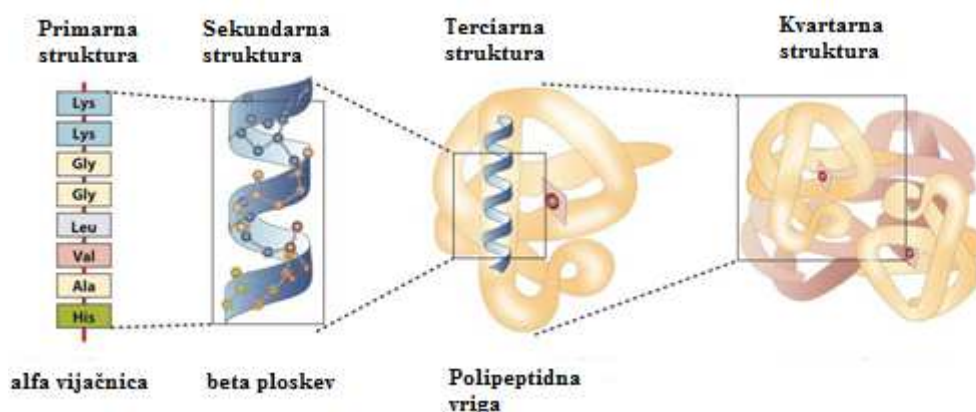
izvedenih testov kakovosti. Pri biološkem zdravilu se jih običajno izvede približno 250, medtem ko se jih pri zdravilih kemijskega izvora izvede približno 50 (15).

Slika 1: Primerjava kompleksnosti zgradbe molekule eritropoetina (biološko zdravilo) in aspirina (zdravilo kemijskega izvora majhne molekulske mase) (16, 17)

1.3 STRUKTURA PROTEINOV

Terapevtski proteini predstavljajo velik delež bioloških zdravil, zato je pomembno, da poznamo naravo njihove strukture. Strukturne lastnosti proteinov so namreč močno povezane z imunogenostjo terapevtskih proteinov (18).

Proteini so makromolekule in imajo štiri ravni strukture: primarno, sekundarno, terciarno in kvartarno (slika 2). **Primarna struktura** proteina predstavlja linearno zaporedje aminokislin v polipeptidni verigi. Proteini so zgrajeni iz 20 različnih aminokislin, ki vsebujejo bazično amino skupino in kislno karboksilno skupino, kar omogoča, da se posamezne aminokislone s tvorbo kovalentnih peptidnih vezi (amidna vez med amino skupino ene aminokislone in karboksilno skupino druge aminokislone) povežejo v dolge verige (19). Vodikove vezi, ki nastanejo med atomi vodika amino skupine in atomi kisika karboksilne skupine med sosednjimi peptidnimi vezmi znotraj proteinske verige, povzročijo nastanek alfa vijačnice in beta ploskev, ki tvorijo **sekundarno strukturo** proteina (19, 20). Ko se molekula proteina upogne in zvije na način, da doseže najvišjo stabilnost oziroma najnižje energetsko stanje, je ta konformacija njena **terciarna struktura** (19). Terciarna struktura je v celoti tridimenzionalna struktura polipeptidne verige in je odvisna od spontanih in termodinamičnih stabilnih interakcij med stranskimi verigami aminokislin. Na terciarno strukturo prav tako vplivajo tvorba disulfidne vezi, ionske in hidrofobne interakcije (21). **Kvartarna struktura** nastane s povezovanjem dveh ali več polipeptidnih verig v proteinski kompleks. Polipeptidne verige oziroma tako imenovane proteinske podenote, ki se združijo v funkcionalen protein, so lahko enake (homotipična struktura) ali različne (heterotipična struktura). Končna oblika proteinskega kompleksa je stabilizirana z vodikovimi vezmi, disulfidnimi in solnimi mostovi (19, 21).



Slika 2: Štiri ravni strukture proteina (povzeto po 22)

Za razumevanje delovanja proteinov je poleg poznavanja njihovih štirih ravni strukture potrebno vedeti, da je večina proteinov podvržena različnim kovalentnim modifikacijam (kotranslacijske modifikacije in posttranslacijske modifikacije) med ali po sestavljanju polipeptidne verige. Poznavanje teh nativnih konformacij je zelo pomembno, saj slednje lahko spremenijo fizikalne in kemijske lastnosti proteina ter vplivajo na zlaganje, stabilnost, aktivnost in funkcijo proteina (21).

1.4 POSTTRANSLACIJSKE MODIFIKACIJE

Kot smo omenili v prejšnjem podpoglavju, so sesalske celice trenutno za proizvodnjo rekombinantnih terapevtskih proteinov prevladujoč ekspresijski sistem, saj omogočajo kompleksne posttranslacijske modifikacije, ki so pogosto potrebne za učinkovito sekrecijo, učinkovitost in stabilnost zdravilne učinkovine (23).

Posttranslacijske modifikacije so kemijske modifikacije proteina, ki se zgodijo po njegovi translaciji na ribosomu (24). Povzročijo kovalentno vezavo funkcionalnih skupin in proteinov, proteolitično cepitev regulatornih podenot proteina ali degradacijo celotnega proteina. Tovrstne spremembe imajo ključno vlogo v številnih celičnih procesih, kot so celična diferenciacija, razgradnja proteina, signalizacijski in regulatorni procesi, uravnavanje izražanja genov in interakcija med proteini (25, 26). Pogoste posttranslacijske modifikacije so glikozilacija, fosforilacija, oksidacija, sulfatacija, deamidacija, tvorba disulfidne vezi, ubikvitinacija, nitrozilacija, metilacija, acetilacija, lipidacija, proteoliza itd. (25, 27). V tej nalogi se bomo osredotočili predvsem na glikozilacijo oz. sialilacijo. V večini primerov pride do tovrstnih kemijskih sprememb *in vivo*, lahko pa se pojavijo tudi *in vitro* pri različnih fazah tehnološkega procesa v proizvodnji zdravila/proteina (npr. čiščenje in shranjevanje) (27). Poleg tega, da predstavljajo izziv natančnemu in doslednemu bioprocesu rekombinantnih bioloških zdravil, so lahko tudi nevarne za pacienta, saj nepravilne modifikacije in agregacije terapevtskega rekombinantnega proteina lahko povzročijo imunogenost (23). Zato je poznavanje tovrstnih modifikacij izredno pomembno.

1.4.1 Glikozilacija

Glikozilacija je ena najpogostejših posttranslacijskih modifikacij proteinov. Igra pomembno vlogo pri zvijanju, interakciji, stabilnosti in mobilnosti proteinov, izražanju genov, celični komunikaciji, imunosti ter rasti in razvoju celice (28, 29). Od ustrezne glikozilacije je

pogosto odvisna tudi aktivnost nativnega ali terapevtskega proteina, kar posledično vpliva na normalno delovanje celic in razvoj bolezni. Neustrezna glikozilacija je povezana z metaboličnimi, nevrodegenerativnimi in neoplastičnimi boleznimi (28). Poznamo dve glavni vrsti glikozilacije: **O-glikozilacija**, kjer se oligosaharid kovalentno veže na protein preko hidroksilne skupine serina oziroma treonina in **N-glikozilacija**, kjer se oligosaharid kovalentno veže na protein preko aminske skupine aspargina (28, 29).

Glikoproteini predstavljajo velik delež terapevtskih proteinov, pri čemer imajo ogljikovi hidrati, ki so kovalentno vezani na terapevtski protein, pogosto ključno vlogo pri določanju njegovih farmakoloških lastnosti, kot so stabilnost, topnost/biorazpoložljivost, *in vivo* aktivnost, farmakokinetika in imunogenost (7, 30).

1.4.1.1 N-glikozilacija

Prekursor N-glikozilacije je oligosaharid (Glc3Man9GlcNAc2), sestavljen iz 14 sladkornih prekursorskih molekul: treh glukoze (Glc), devetih manoz (Man) in dveh N-acetilglukozaminov (GlcNAc) (28, 31). Nastane s postopnim dodajanjem aktiviranih nukleotidnih sladkorjev (UDP-N-acetilglukozamin, GDP-manoza), ki se vežejo na dolihol preko pirofosfatne povezave (-PP-) (31, 32). Nastali produkt je na dolihol vezan oligosaharid (Glc3Man9GlcNAc2-P-P-dolihol), ki se s pomočjo encima oligosaharil transferaze (OST) preko N-glikozidne vezi veže na aspargini (Asn) ostanek aminokislinskega zaporedja Asn-X-Ser/Thr, pri čemer je X lahko katerakoli aminokislina, razen prolina. V naslednji fazi sledi odstranitev glukoznih in manoznih ostankov, pri čemer najprej alfa-1,2-glukozidaza I odstrani terminalno glukozo, alfa-1,3-glukozidaza II nato zaporedno odstrani preostala dva glukozna ostanka, manozidaza I pa mora odstraniti vsaj en manozni ostanek, kar omogoči, da se glikoprotein prenese v Golgijev aparat (32). V Golgijevem aparatu sledi zaporedno dodajanje monosaharidov, kot so N-acetilglukozamin, galaktoza, fukoza in sialične kisline z nizom transferaz. Transferazne reakcije v Golgijevem aparatu ne potečejo vedno v celoti, kar se odraža v heterogenosti končne strukture, kot so variabilna antenarnost (dvoantenarnost, tetraantenarnost). Heterogenost glikanov prav tako povzročajo terminalna sialilacija, fukozilacija GlcNAc in dodajanje GlcNAc na osrednje jedro manoznih ostankov (28, 32).

1.4.1.2 O-glikozilacija

O-glikozilacija je posttranslacijska modifikacija, ki se odvija v Golgijevelem aparatu, pri čemer za prenos proteina ni potreben oligosaharidni prekurzor (33). Kljub temu da za O-glikozilacijo ni znanega konsenznega aminokislinskega zaporedja, slednja pogosto nastopi v predelu proteina, ki vsebuje visok delež serina, treonina in prolina (32). Najpogostejša oblika O-glikanov je mucinski tip, ki vključuje kovalentno vezavo GalNAc na hidroksilno skupino serina ali treonina preko α -vezi (28, 32, 34).

Prvi korak pri nastajanju mucinskega tipa O-glikana je dodajanje GalNAc na serinski oziroma treoninski ostanek proteina ob prisotnosti N-acetilgalaktozamin transferaze. Nadaljnjo elongacijo O-vezanih glikanov izvedejo glikozil transferaze, ki omogočajo nastanek kar osmih različnih jedrnih struktur O-glikana, katere se lahko potem še nadaljnje modificirajo s sialilacijo, fukozilacijo, sulfatacijo, metilacijo ali acetilacijo (32). Mucini so visoko glikozilirani mukozni proteini, ki se izločajo predvsem iz epitelija gastrointestinalnega in respiratornega trakta ter žlez slinavk (28).

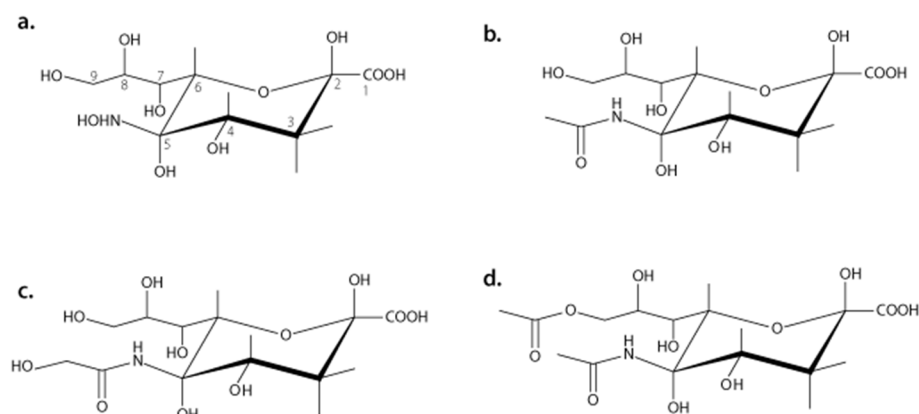
Poleg najpogostejšega mucinskega tipa O-glikanov obstaja tudi več vrst nemucinskih O-glikanov, kot so α -vezana O-fukoza, β -vezana O-ksiloza, α -vezana O-manoza, β -vezan O-GlcNAc, α - ali β -vezana O-galaktoza in α - ali β -vezana O-glukoza (34).

1.4.1.3 Sialilacija

Sialilacija je zadnja stopnja v procesu glikozilacije, ki poteka v trans predelu Golgijevega aparata in igra pomembno vlogo pri ohranjanju stabilnosti, razpolovni dobi in imunogenosti proteina (32, 35). Vključuje encimatski prenos sialične kisline ob prisotnosti sialil transferaze iz prekurzorja nukleotidnega sladkorja CMP-sialična kislina do proste galaktoze na glikanski strukturi, ki je pritrjena na novo sintetiziranem proteinu. Na proces sialilacije vpliva razpoložljivost nukleotidnega prekurzorja CMP-sialična kislina in aktivnost encima sialil transferaza (32). Vse sialične kisline temeljijo na ciklični strukturi devetih ogljikov s karboksilno kislino skupino na C1 atomu. Zaradi karboksilne kisle skupine imajo sialične kisline inherentno negativni naboj. Najpogostejše sialične kisline so N-acetilnevraminska kislina (Neu5Ac, NeuNAc ali NANA), N-glikolilnevraminska kislina (Neu5Glc ali NGNA) in N-acetil-9-O-acetilnevraminska kislina (Neu5,9Ac2) (slika 3). Substitucije lahko potekajo na ogljikovih atomih C4, C7, C8 in C9 ter na amino skupini, ki se nahaja na atomu C5. Hidroksilne skupine, ki se nahajajo na C4, C7, C8 in C9 atomu pa so lahko podvržene

acetilaciji, fosforilaciji, sulfataciji ali metilaciji. Zaradi številnih strukturnih modifikacij in različnih variant jedrne strukture je poznanih več kot 50 oblik sialičnih kislin (36).

Medtem ko je pri ljudeh naravno prisotna predvsem N-acetilnevraminska kislina, je pri veliko ostalih vrstah prisotna tudi N-glikolilnevraminska kislina. Slednjo so zaznali pri ljudeh le v primeru določene vrste raka. V človeškem telesu je najvišja koncentracija sialičnih kislin (N-acetilnevraminska kislina) v možganih, kjer deluje kot integralni del gangliozidne strukture v sinaptogenezi in sodeluje pri transmisiji vzdolž aksonov nevronske celice (37).



Slika 3: a. Nevraminska kislina, ki je jedrna struktura vseh sialičnih kislin, b. N-acetilnevraminska kislina, c. N-glikolilnevraminska kislina, d. N-acetil-9-O-acetilnevraminska kislina (36)

1.5 IMUNOTOKSIČNOST GLIKANSKIH STRUKTUR IN SIALIČNIH KISLIN PRI TERAPEVTSKIH PROTEINIH

Glikozilacija je najpogostejša, kompleksna in heterogena posttranslacijska modifikacija proteinov (38, 39). Heterogenost v glikozilaciji terapevtskih proteinov lahko izhaja iz razlik v sami vrsti in strukturi glikanov ali v načinu vezave glikanov. Te razlike so lahko posledica proizvodnega procesa in procesa čiščenja terapevtskega proteina. Ker glikani vplivajo tako na fizikalno-kemijske (topnost, električni naboj, masa, velikost, stabilnost) kot tudi biološke (aktivnost, razpolovna doba, funkcija receptorjev na površini celic) lastnosti proteinov, lahko vsaka sprememba povezana s procesom proizvodnje in čiščenja, povzroči spremembo glikozilacije in posledično vpliva na fiziološke funkcije terapevtskega proteina (38). Prav tako lahko glikozilacija neposredno ali posredno vpliva na imunogenost terapevtskih proteinov. Imunski odziv lahko izzove glikan sam (npr. glikan nečloveškega izvora) ali panjegova prisotnost vpliva na konformacijo proteina na način, da slednji postane imunogen (38, 40).

Glikozilacija močno variira glede na ekspresijski sistem rekombinantnega glikoproteina.

Medtem ko bakterije nimajo izraženega procesa glikozilacije, kvasovke, rastline in žuželke pa ustvarjajo imunogene vrste glikanov, ki pri ljudeh niso prisotne, je danes prevladujoči ekspresijski sistem, ki se rutinsko uporablja za proizvodnjo terapevtskih proteinov, sistem sesalcev, ki vsebuje človeku podobno kompleksno glikozilacijo. Večina bioloških zdravil, odobrenih s strani FDA, je trenutno bodisi očiščena neposredno iz plazme ali mleka sesalcev ali pa je pridobljena iz celičnih linij sesalcev, kot so ovarijske celice kitajskega hrčka (*ang. chinese hamster ovary cells, CHO*), ledvične celice mladičev hrčka (*ang. baby hamster kidney cells, BHK-21*), mišje mielomske in hibridomske celice (NS0 in Sp2/0) (41).

V zadnjem desetletju so bile odkrite vsaj štiri strukture ogljikovega hidrata, ki niso človeškega izvora in lahko pri ljudeh sprožijo imunski odziv. Slednje so galaktoza- α 1,3-galaktoza (α -Gal), N-glikolilnevraminska kislina (Neu5Gc), β 1,2-ksiloza in α 1,3-fukoza. Prisotnost α -Gal in Neu5Gc je bila dokazana v številnih terapevtskih monoklonskih protitelesih (mAbs), vključno s cetuksimabom, ki je himerno (humano/mišje) monoklonsko protitelo IgG1, odobreno za zdravljenje kolorektalnega raka in ploščatoceličnega karcinoma glave in vratu. Dokazano je bilo, da se α -Gal epitopi nahajajo v Fab fragmentih protitelesa cetuksimab, življenjsko nevarna preobčutljivostna reakcija pa je bila povezana z že obstoječimi protitelesi anti- α -Gal, razreda E. Intravenozno injiciranje in prisotnost α -Gal na obeh Fab fragmentih cetuksimaba omogoča učinkovito navzkrižno povezavo IgE na mastocitih, kar lahko pojasni takojšen imunski odziv na cetuksimab pri določeni skupini bolnikov (38).

Ljudje sintetiziramo Neu5Ac, nismo pa sposobni sintetizirati Neu5Gc. Uživanje z Neu5Gc bogate hrane (npr. rdeče meso in mlečni izdelki) omogoča kopičenje Neu5Gc na površini epiteljskih in endoteljskih celic. Posledično človeški imunski odziv Neu5Gc prepozna kot tujo, kar se odraža v zvišani koncentraciji specifičnih IgA, IgM in IgG protiteles proti Neu5Gc (0,1 % do 0,2 % imunoglobulinov, ki krožijo v krvi). Injiciranje izdelkov, ki vsebujejo Neu5Gc, lahko pri posameznikih z že prisotnimi protitelesi povzroči nastanek imunskih kompleksov, ki lahko aktivirajo komplement ali vplivajo na razpolovno dobo zdravila (38). Medtem ko mišje mielomske celice (SP2/0 in NS0) izražajo visoko raven α -Gal in Neu5Gc, je za CHO celice znano, da so negativne za tovrstne glikanske strukture, oziroma jih izražajo v sledovih (38, 42). Kljub temu so CHO celice sposobne tovrstne glikanske strukture prevzeti iz medija celične kulture in jih metabolično vključiti v izražen protein. Zato je poleg uporabe CHO celičnih linij pomembno tudi, da medij in druge komponente ne vsebujejo snovi, kot so Neu5Gc (38).

Glikozilacija lahko tudi posredno vpliva na imunogenost bioterapevtikov preko njenega vpliva na zlaganje, topnost in stabilnost proteinov (38, 39). Na primer: v *E. coli* proizveden rekombinantni humani IFN β ni glikoziliran in je nagnjen k agregaciji, kar vodi do povečane imunogenosti, medtem ko pri rekombinantnem IFN β iz CHO celic glikozilacija zmanjšuje imunogenost (38). Nadzor glikozilacije je v času razvoja bioloških zdravil izrednega pomena, saj imajo glikanske verige izrazit vpliv na stabilnost, aktivnost, imunogenost in farmakodinamiko proteina. V večini primerov mora biti glikozilacija optimizirana z namenom zagotavljanja daljše razpolovne dobe učinkovine v krvnem obtoku (43).

1.6 TEHNIKE DOLOČANJA GLIKANSKIH STRUKTUR

Na področju raziskovanja glikanov in glikoproteomike so uveljavljeni številni analitski pristopi:

- Anionsko izmenjevalna kromatografija visoke zmogljivosti s pulzno amperometrično detekcijo (HPAEC-PAD): Metoda HPAEC-PAD ogljikove hidrate loči na podlagi specifičnih interakcij med hidroksilnimi in karboksilnimi skupinami glikanov, ki so nabite pri visokem pH ter stacionarno fazo. Ločba glikanov poteka na osnovi naboja, velikosti, sestave, izomerov in povezav ter omogoča profil celotne glikozilacije in posameznih glikanov. Metoda omogoča neposredno detekcijo nabitih in nevtralnih predhodno sproščenih glikanov ter detekcijo nevtralnih in nabitih monosaharidov (npr. sialične kisline). HPAEC-PAD z detekcijo nevtralnih monosaharidov omogoča kvantifikacijo specifičnih monosaharidov, spremljanje fukozilacije, ki lahko vpliva na funkcijo in signalizacijo proteina, določanje vsebnosti galaktozamina in posredno prisotnost O-vezanih glikanov ter določanje vsebnosti manoze (29).
- Tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti, sklopljena z detektorjem fluorescence (HPLC-FLD): HPLC metode za analiziranje glikanov temeljijo na fluorescentnem označevanju oligosaharidov in se uporabljajo za ločevanje sialiliranih in nevtralnih glikanov. Označevanje glikanov se izvede z reduktivnim aminiranjem, z uporabo označevalca 2-aminobenzamid (2-AB) ali 2-aminobenzojska kislina (2-AA). Prav tako lahko s HPLC-FLD metodo določamo sialične kisline z derivatizacijo, kjer se običajno uporablja 1,2-diamino-4,5-metilendioksibenzen dihidroklorid (DMB), ki po sprostitvi sialične kisline iz glikoproteina z njo reagira in omogoči nastanek fluorescentnega

produkta. V primeru prisotnosti popolnoma neznanih glikanov lahko slednje po končani ločbi s tekočinsko kromatografijo identificiramo z masno spektrometrijo (29).

- Masna spektrometrija (MS): Pri MS se molekule ogljikovih hidratov pod vplivom različnih virov ionizacije najprej ionizirajo, nato pa se ioni ločijo glede na razmerje med maso in nabojem (m/z). Najpogosteje uporabljena ionizacijska vira sta ionizacija v matriksu z lasersko desorpcijo (MALDI) in elektrosprej ionizacija (ESI). Prednost MALDI in ESI je v tem, da lahko MS aparat enostavno združimo s tekočinskim kromatografskim sistemom (LC-MS), kar močno izboljša analitski potencial masne spektrometrije (44, 45). Zaradi svoje občutljivosti, majhne količine vzorca in sposobnosti analiziranja kompleksnih glikanskih zmesi je MS eden izmed najmočnejših orodij za določanje strukture glikanov. Masna spektrometrija omogoča karakterizacijo, identifikacijo in kvantifikacijo glikanov. Prav tako omogoča določanje glikozilacijskega mesta in določanje intaktnega glikoproteina (29).

S temi analitskimi pristopi lahko določamo identiteto in količino prisotnih ogljikovih hidratov, mesto posttranslacijske modifikacije in prisotnost različnih glikoform proteina. Izbira ustrezne tehnike je odvisna od eksperimentalnih zahtev in instrumentalnih zmožnosti (29). V magistrski nalogi se bomo osredotočili na analiziranje glikanskih struktur s HPAEC-PAD metodo.

1.7 IONSKA KROMATOGRAFIJA OGLJIKOVIH HIDRATOV

1.7.1 Splošno o ionsko izmenjevalni kromatografiji

Ločevanje temelji na osnovi različnih elektrostatskih interakcij med molekulami v mobilni fazi in nabitimi skupinami na stacionarni fazi (2). Pri kationsko izmenjevalni kromatografiji negativno nabit trdni nosilec (kationski izmenjevalec) privlači pozitivno nabite molekule. Pri anionsko izmenjevalni kromatografiji pa pozitivno nabit trdni nosilec (anionski izmenjevalec) privlači negativno nabite molekule. Za optimizacijo vezave vseh nabitih molekul je mobilna faza običajno raztopina z nizko do srednjo prevodnostjo (to je raztopina z nizko do srednjo koncentracijo soli). Adsorpcija molekul na trdni nosilec (matriks) je odvisna od ionske interakcije med funkcionalnimi ligandi na nosilcu in nasprotno nabitimi ionskimi skupinami v molekuli vzorca (46). Najpogostejši način eluiranja molekul iz kolone je z gradientom soli, pri čemer naraščajoča koncentracija raztopljenih ionov sčasoma izpodrine molekule analita, vezane na trdni nosilec. Iz kolone se najprej eluirajo molekule z

najšibkejšimi ionskimi interakcijami, molekule z večjo ionsko interakcijo pa zahtevajo višjo koncentracijo soli in se eluirajo kasneje (v gradientu) (46, 47). Praviloma mora biti pH mobilne faze med pI oziroma pKa nabite molekule vzorca in pKa nabite skupine na trdnem nosilcu (46).

Manj pogosta metoda za elucijo je prekinitev interakcije med kolono in vezanim analitom s spreminjanjem naboja na analitu, kar lahko dosežemo s spreminjanjem pH mobilne faze (47). Pri kationsko izmenjevalni kromatografiji dvig pH mobilne faze povzroči, da so molekule manj protonirane in posledično manj pozitivno nabite. Ker molekula ne more več tvoriti ionskih interakcij z negativno nabitim trdnim nosilcem, se eluira iz kolone. Pri anionsko izmenjevalni kromatografiji pa znižanje pH mobilne faze povzroči, da molekula postane bolj protonirana in zato bolj pozitivno nabita. Posledica tega je, da molekula ne tvori več ionskih interakcij s pozitivno nabitim trdnim nosilcem, kar prav tako povzroči elucijo molekule iz kolone (46).

1.7.1.1 Anionsko izmenjevalna kromatografija visoke zmogljivosti s pulzno amperometrično detekcijo (HPAEC-PAD)

Anionsko izmenjevalna kromatografija visoke zmogljivosti (HPAEC) je razširjena tehnika za določanje obsežnega sklopa ogljikovih hidratov, kot so monosaharidi, disaharidi, oligosaharidi, manjši polisaharidi, sialične kisline in druge sladkorne kisline, sladkorni alkoholi ter aminosladkorji (48, 49, 50). Ogljikovi hidrati so namreč šibke kisline s pK_a vrednostjo v območju 12–14 in so v alkalnem območju delno ali v celoti ionizirani ter jih posledično lahko ločimo z anionsko-izmenjevalno kromatografijo (29, 51). HPAEC se



uporablja za ločevanje anionskih analitov, ki so bodisi anioni v njihovi običajni obliki (na primer aminokisline) ali analitov, ki se lahko ionizirajo pri visokih vrednostih pH (49). Po končani ločbi ogljikove hidrate detektiramo s pulzno amperometrično detekcijo (PAD) (52). Instrument, ki se uporablja za izvajanje HPAEC-PAD, je prikazan na sliki 4.

Slika 4: Ionski kromatografski sistem za izvajanje HPAEC-PAD (povzeto po 53)

HPAEC-PAD je izredno selektivna in specifična metoda za ogljikove hidrate, saj pulzna amperometrija zazna le tiste spojine, ki vsebujejo funkcionalne skupine, ki se lahko oksidirajo pri napetosti detekcije (50).

Kromatografija z alkalnimi eluenti ne bi bila možna z uporabo klasičnih silikatnih kolon, saj slednje v alkalnih raztopinah ($\text{pH} > 8,5$) razpadejo. Zato je uvedba na polimerih osnovanih stacionarnih faz, ki so stabilne v širokem pH območju, prispevala k razvoju vsestranskih in učinkovitih separacijskih tehnik za določanje ogljikovih hidratov in sorodnih spojin (54). Za ločevanje ogljikovih hidratov se uporabljata dve vrsti mobilnih faz: natrijev ali kalijev hidroksid in natrijev acetat. Mobilne faze, ki vsebujejo zgolj hidroksid, se uporabljajo predvsem za ločevanje mono-, di-, tri- in tetrasaharidov ter alkoholnih sladkorjev teh saharidov. Mobilne faze, ki vsebujejo acetat in hidroksid, pa se uporabljajo za ločevanje večjih ogljikovih hidratov in ogljikovih hidratov, ki imajo negativen naboj pri nevtralnem pH (sialične kisline, fosforilirani (M-6-P) in sulfatirani sladkorji) (52).

Amperometrična detekcija običajno poteka na trdni anodi iz npr. zlata (Au), platine (Pt) ali steklastega ogljika (*ang. glassy carbon*) pod vplivom konstantno delujočega potenciala (DC amperometrija). Pri konstantnem potencialu lahko z amperometrično detekcijo preko anodnih reakcij detektiramo številne aromatske spojine (fenoli, aminofenoli, kateholamini in drugi z metabolizmom nastali amini). Prisotnost π -resonance v aromatskih spojinah stabilizira vmesne oksidacijske produkte, ki nastanejo pri anodni oksidaciji, zaradi česar je aktivacijska bariera za elektrokemično reakcijo znatno znižana. Pri DC amperometriji mora biti elektroda inertna in sposobna sprejeti ali oddajati elektrone analiziranemu analitu. To zlasti velja za elektrode iz steklastega ogljika, ki so izjemno odporne na kontaminacijo. Steklasti ogljik je najpogosteje uporabljen material za delovno elektrodo pri kromatografski amperometrični detekciji, ki uporablja konstanten potencial, vendar slednji ni primeren za detekcijo ogljikovih hidratov, saj amperometrične elektrode iz steklastega ogljika zaradi odsotnosti π -resonance ne dajejo odziva za alifatske spojine (51).

Aldehidi in terminalni alkoholi v ogljikovih hidratih se lahko oksidirajo na zlati elektrodi v alkalnem mediju ali platinasti elektrodi pri vseh pH vrednostih (51). Najboljša izbira za detekcijo ogljikovih hidratov je na zlati elektrodi v alkalnem mediju katalizirana oksidacija polarnih alifatskih spojin (54). Z uporabo pozitivnega potenciala so ogljikovi hidrati pri visokem pH elektrokatalitično oksidirani na površini zlate elektrode. Nastali tok je sorazmeren koncentraciji ogljikovih hidratov, kar omogoča neposredno detekcijo in kvantifikacijo ogljikovih hidratov. Če je na elektrodi prisoten samo en potencial, produkti

oksidacije postopoma zasitijo površino elektrode, kar vodi do izgube analitskega signala. Za preprečevanje izgube signala se površina elektrode po detekcijskem potencialu očisti s serijo različnih potencialov (*ang. waveform*), ki si sledijo v določenih časovnih intervalih. Ponavljajoče se sekvence potencialov so osnova pulzne amperometrije (55).

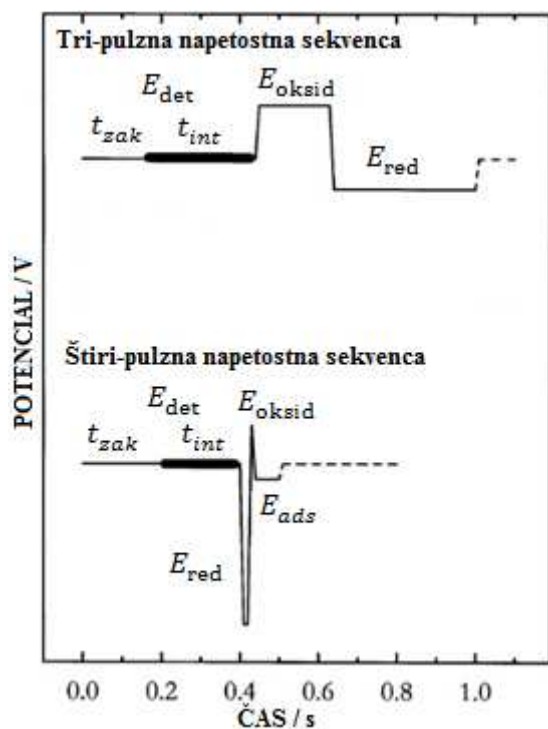
Leta 1981 je bila prvič predlagana uporaba ponavljajoče se tri-pulzne napetostne sekvence (3PAD) za določanje preprostih alkoholov na Pt elektrodah v pretočnih injekcijskih sistemih (*ang. flow injection analysis – FIA*). V takšnih aplikacijah se je anodna detekcija izmenjevala z oksidativnim in reduktivnim čiščenjem adsorbiranih produktov. 3PAD sekvenca se je z namenom ohranjanja konstantne elektrodne aktivnosti uporabljala za potrebe reaktivacije elektrod iz plemenitih kovin. Z uporabo preproste 3PAD sekvence lahko dosežemo ponovljivo detekcijo polarnih alifatskih spojin (51).

3PAD sekvenca uporablja detekcijo pri konstantnem potencialu E_{det} , ki poteka v časovnem intervalu t_1 . Časovno obdobje t_1 je dodatno razdeljeno na časovno obdobje zakasnitve t_{zak} in časovno obdobje integracije t_{int} ($t_1 = t_{zak} + t_{det}$). Potencial elektrode se nato v časovnem intervalu t_2 poveča iz E_{det} na E_{oksid} , kar povzroči popolno oksidacijo vseh absorbiranih nečistot in/ali določenih spojin na površini elektrode in nastanek tanke plasti inertnega oksida na površini elektrode. V časovnem intervalu t_3 se potencial E_{red} na elektrodi zmanjša ($E_{red} \ll E_{det}$), pri čemer se nastala inertna oksidna plast zlata reducira nazaj do atomarnega zlata in tako obnovi elektrokatalitsko površino elektrode (51).

V študiji avtorjev LaCourse in Johnson je bilo ugotovljeno, da lahko signal ozadja (šum), ki izvira predvsem iz kapacitivnega toka naboja dvojne plasti ob površini elektrode, hitro pade na zanemarljivo vrednost s pomočjo zamika integracije toka (časovni interval t_{zak}), ki je nastal tekom oksidacije analita (54). Obdobje zakasnitve, ki povzroči razpad kapacitivnega toka, omogoča, da se v obdobju detekcije t_{det} z integracijo meri le faraday-ski tok, ki je posledica oksidacije analita na elektrodni površini. Nastali izmerjeni naboj (izražen v mikrocoulombih – μC), pridobljen z integracijo faradayskega toka, je sorazmeren stopnji oksidacijske reakcije (51).

Pred kratkim je Rocklin s sodelavci dokazal, da neprekinjena uporaba standardne tri-pulzne napetostne sekvence zmanjša površino vrhov za 22 % do 32 %, kar je posledica recesije delovne elektrode (odtapljanje Au pri zelo visokem pozitivnem potencialu) (54). Izboljšanje dolgoročneje obnovljivosti pulzne amperometrične detekcije ogljikovih hidratov so dosegli z uvedbo štiri-pulzne napetostne sekvence (4PAD) na zlati delovni elektrodi, vgrajeni v pretočno celico elektrokemijskega detektorja (51). 4PAD sekvenca vsebuje visoko negativen

potencial E_{red} , ki traja kratek čas (10 ms), takoj za detekcijskim potencialom E_{det} (54, 56). Ta korak zmanjša odtapljanje Au in omogoči reduktivno čiščenje površine elektrode. Negativnemu potencialu sledi kratek pozitiven potencial E_{oksid} , ki reaktivira površino



elektrode, temu pa sledi negativni potencial, ki omogoči redukcijo nastalega oksida na površini elektrode (E_{ads}) (56). Pri tovrstni napetostni sekvenci negativni potenciali za čiščenje in pozitivni potenciali za re-aktivacijo omogočajo ohraniti čisto in aktivno površino zlate elektrode z zmanjšano korozijo elektrode (51). Ta visoko razvita štiri-pulzna napetostna sekvenci je postala prevladujoča PAD sekvenci za detektiranje ogljikovih hidratov (56). Primerjava tri-pulzne in štiri-pulzne napetostne sekvenci je prikazana na sliki 5.

Slika 5: Tri-pulzna in štiri-pulzna napetostna sekvenci (povzeto po 54)

Kljub temu da je 4PAD sekvenci postala standardna sekvenci za HPAEC-PAD analizo ogljikovih hidratov, so pred kratkim poročali o novo razviti dvo-pulzni napetostni sekvenci (2PAD) (52). V nasprotju s standardno tri-pulzno in štiri-pulzno napetostno sekvenco se pri dvo-pulzni uporablja izključno katodno čiščenje, kondicioniranje in reaktivacija elektrode. Napetostna sekvenci vsebuje potencial katodne reaktivacije v območju razvijanja vodika (od $-1,4$ V do $-2,0$ V v primerjavi z Ag/AgCl) in detekcijski potencial pri $+0,1/0,2$ V. Avtorji so pokazali, da kratek, a visoko negativen reaktivacijski potencial ohranja čisto in aktivno površino elektrode ter v celoti nadomesti oksidativno čiščenje in aktivacijo pri napetostih, višjih od $+0,3$ V, ki se običajno uporabljajo pri PAD in ki vodijo v odtapljanje elektrodne površine. Primerjali so učinkovitost standardne 4PAD in novo razvite 2PAD sekvenci, glede na občutljivost in ponovljivost detektorskih signalov, pri čemer so ugotovili, da se delovna elektroda v obeh primerih zelo podobno obnaša. Poleg tega so z zmanjšanjem napetostnih korakov iz štiri na dva z uporabo komercialne instrumentacije povečali frekvenco vzorčenja podatkov za 20 %. Višja frekvenci pa je bistvenega pomena za prihajajoče kapilarne sisteme (57, 58).

2 NAMEN DELA

Proizvodnja biološkega zdravila je edinstven proces, ki vključuje številne dejavnike, ki vplivajo na kakovost, učinkovitost in varnost končnega produkta, zato je izredno pomembno, da se med proizvodnim procesom izvajajo testi kakovosti, s katerimi zagotavljamo nastanek varnega in učinkovitega končnega produkta.

Glikozilacija je najpogostejša posttranslacijska modifikacija, ki vpliva na fizikalno-kemijske in biološke lastnosti ter imunogenost terapevtskih proteinov. Po pristopu kakovost z načrtovanjem (*ang. Quality by design, QbD*), v okviru katerega so bile prepoznane kritične značilnosti terapevtskega proteina, so med prepoznanimi kritičnimi lastnostmi tudi nekatere glikanske strukture. Ker morajo biti za zagotavljanje ustrezne kakovosti izdelka kritične lastnosti kontrolirane in znotraj ustreznih območij, je primarni cilj magistrskega dela optimizacija in validacija metode, imenovane anionsko izmenjevalna kromatografija visoke zmogljivosti s pulzno amperometrično detekcijo, s katero določamo relativne deleže posameznih glikanskih struktur, preliminarno identificiranih z masno spektrometrijo in spremljamo čistost oziroma prisotnost nečistot v izolatu terapevtskega proteina.

Pred validacijo bomo HPAEC-PAD metodo optimizirali. Optimizacija metode bo temeljila na testiranju robustnosti, ki je predpogoj za nadaljnjo izvedbo validacije. V okviru robustnosti bomo testirali faktorje, ki vplivajo na pripravo vzorca (temperatura inkubacije, čas inkubacije in količina dodanega encima), različne kromatografske pogoje (uporaba različnih kolon, kontrolirana/nekontrolirana temperatura detektorja, različen pretok skozi kolono in različna sestava mobilne faze B), stabilnost mobilnih faz, pufrov in ostalih raztopin za pripravo vzorcev.

V okviru optimizacije HPAEC-PAD metode bomo prav tako izvedli primerjavo detekcije glikanskih struktur s štiri-pulzno (4PAD) in dvo-pulzno (2PAD) napetostno sekvenco, pri čemer bomo testirali parametre analitske natančnosti in občutljivosti metode. Namen primerjave 2PAD in 4PAD detekcije je preveriti možnost implementacije 2PAD detekcije, da bi povečali dolgoročnejšo stabilnost in s tem ponovljivost detektorskih odzivov na zlati delovni elektrodi. Nadalje pa 2PAD detekcija predstavlja osnovo za uvedbo kapilarnih sistemov.

Po končani optimizaciji bomo izvedli popolno validacijo (*ang. full validation*) HPAEC-PAD metode, pri čemer bomo določali in potrjevali naslednje validacijske parametre:

specifičnost in selektivnost, mejo določljivosti, linearnost, natančnost, točnost in merilno območje metode ter stabilnost vzorcev. Na osnovi rezultatov validacije bomo lahko potrdili, ali je metoda ustrezna za zanesljivo in točno določanje glikanskih struktur.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

V preglednici I so navedene kemikalije, ki smo jih uporabili za eksperimentalno delo. Vse uporabljene kemikalije so imele čistost $\geq 98,0\%$, encimi pa so ustrezali klasifikaciji čistote, ki je deklarirana s kataložno številko.

Preglednica I: Uporabljene kemikalije

Kemikalija, čistost	Proizvajalec, kataložna številka
Acetonitril (ACN), $\geq 99,9\%$	Merck (Nemčija), 1.00030
Ocetna kislina (CH_3COOH), $\geq 99,8\%$	Merck (Nemčija), 1.00063
Trifluoroocetna kislina (TFA), $\geq 99,8\%$	Merck (Nemčija), 1.08262
Dinatrijev hidrogen fosfat dihidrat, $\geq 99,5\%$ ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck (Nemčija), 1.06580
Natrijev dihidrogen fosfat dihidrat, $\geq 98,0\%$ ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck (Nemčija), 1.06345
Natrijev klorid (NaCl), $\geq 99,5\%$	Merck (Nemčija), 1.06404
Natrijev acetat (CH_3COONa), $\geq 99,0\%$	Merck (Nemčija), 1.06268
50 % Natrijev hidroksid (NaOH)	J.T. Baker (ZDA), 7067
N-glikozidaza F (PNGaza F)	Roche (Nemčija), 11 365 193 001
Sialidaza C	ProZyme / Glyko (ZDA), GK 80030
Tekoči dušik	Messer (Slovenija)
Helij	Messer (Slovenija), Helij 4.6

3.1.2 Mobilne faze, pufri in raztopine

V preglednici II so navedene mobilne faze, pufri in raztopine, ki smo jih uporabili med eksperimentalnim delom. Mobilne faze, pufre in raztopine smo pripravili s prečiščeno vodo, pridobljeno s sistemom za pripravo ultra čiste vode Milli-Q Advantage, proizvajalca Millipore, ZDA.

Preglednica II: Uporabljene mobilne faze, pufri in raztopine

Mobilna faza*	Sestava mobilne faze
Mobilna faza A (MFA)	0,16 M natrijev hidroksid
Mobilna faza B (MFB)	0,16 M natrijev hidroksid, 0,10 M natrijev acetat
Modificirana MFB: 5 % koncentrirana MFB (MF vsebuje 5 % več natrijevega hidroksida in natrijevega acetata kot MFB)	0,168 M natrijev hidroksid, 0,105 M natrijev acetat
Modificirana MFB: 5 % razredčena MFB (MF vsebuje 5 % manj natrijevega hidroksida in natrijevega acetata kot MFB)	0,152 M natrijev hidroksid, 0,095 M natrijev acetat
Modificirana MFB: 10 % koncentrirana MFB (MF vsebuje 10 % več natrijevega hidroksida in natrijevega acetata kot MFB)	0,176 M natrijev hidroksid, 0,110 M natrijev acetat
Mobilna faza C (MFC)	0,16 M natrijev hidroksid, 0,75 M natrijev acetat
Pufer	Sestava puфра
Začetni pufer za redčenje vzorcev	50 mM natrijev fosfat, 150 mM natrijev klorid, pH = 7,0
Končni pufer za redčenje vzorcev	25 mM natrijev acetat, pH = 6,0
Raztopina	
2 M očetna kislina	
70 % (v/v) ACN/0,1 % (v/v) TFA	
40 % (v/v) ACN/0,1 % (v/v) TFA	

* Pomembno je, da so mobilne faze pod inertno helijevo atmosfero, ki preprečuje dostop zraka (CO₂) in tvorbo karbonata. Prav tako je pomembno, da mobilne faze pripravljamo v plastičnih posodah, saj hidroksid korodira steklo.

3.1.3 Vzorci

Za testiranje robustnosti in izvedbo validacijskih eksperimentov smo uporabili vzorce, navedene v preglednici III.

Preglednica III: Uporabljeni standardi in vzorci

Vrsta vzorca	Opis
Referenčna substanca (RS)	»In-house« standard, pripravljen iz aktivne učinkovine v laboratoriju kontrole kakovosti, $c \approx 1$ mg/mL.
Vzorec aktivne učinkovine (DS vzorec)	Vzorec, pripravljen iz aktivne učinkovine, $c \approx 2,5$ mg/mL.
HM6P standard	Man6GlcNAc2, kataloška številka: GTP Man6-6P, Proizvajalec: TheraProteins (Portugalska). Čistost standarda: > 90 %.

3.1.4 Oprema

3.1.4.1 Naprave in pribor

V preglednicah IV in V so navedene vse naprave in pribor, ki smo jih potrebovali za izvedbo eksperimentalnega dela.

Preglednica IV: Uporabljene naprave

Naprava	Model, proizvajalec
Ionski kromatograf za HPAEC-PAD	ICS-3000, Thermo Fisher Scientific (ZDA)
Programska oprema za ionski kromatograf	Chromeleon 7.2, Thermo Fisher Scientific (ZDA)
Sistem za prečiščevanje vode	Milli-Q Advantage, Millipore (ZDA)
pH meter	Methrom 780, Methrom (Švica)
Liofilizator	Alpha 1-2, Christ (Nemčija)
Inkubator	Binder (Nemčija)
Termomikser	Thermomixer comfort 5355, Eppendorf (Nemčija)
Ultrazvočna kopel	Sonis 10, Iskra PIO (Slovenija)
Hladilnik 2–8 °C	Angelantoni (Italija)
Zamrzovalnik ≤ -60 °C	Panasonic (Japonska)

Analitska tehtnica	AX205 Delta Range, Mettler Toledo (Švica)
Mikrocentrifuga	MiniSpin plus, Eppendorf (Nemčija)
Centrifuga	5415 R , Eppendorf (Nemčija)
Rotacijsko mešalo	Bio Vortex, Biosan (Latvija)
Polavtomatske pipete	Biohit (Finska)

Preglednica V: Uporabljen pribor

Pribor	Proizvajalec, kataloška številka
Kolona CarboPac PA-1, 2x250 mm	Thermo Fisher Scientific (ZDA), 057178
Predkolona CarboPac PA-1, 2x50 mm	Thermo Fisher Scientific (ZDA), 057179
Mikrocentrifugirke 1,5 mL	Eppendorf (Hamburg, Nemčija), 0030120.086
HPLC vial	Agilent (ZDA), 9301-0978
Pokrovčki za HPLC vial	Agilent (ZDA), 5182-0541
0,22 µm najlonski filter	Nalgene (Nemčija), AC44.1
HyperSep Hypercarb SPE membrana	Thermo Fisher Scientific (ZDA), 60106-304
Adapterji za kartušo za Hypercarb membrane	Sigma (ZDA), Supelco 21018-U
Plastične brizge	Braun (Nemčija), 4606027V

3.1.4.2 Program za obdelavo podatkov

Kromatografske podatke smo ovrednotili z avtomatsko integracijo v kromatografskem podatkovnem sistemu Chromeleon 7.2, proizvajalca Thermo Fisher Scientific, ZDA.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava vzorcev

Eksperimentalno delo vključuje pripravo vzorcev, s katerimi smo testirali robustnost in validacijske parametre HPAEC-PAD metode. Za potrebe robustnosti metode smo vzorce pripravili na različne načine, pri čemer smo testirali vpliv količine dodanega encima (glikozidaza in sialidaza) in vpliv pogojev inkubacije (čas in temperatura), kot je opisano v poglavju 3.2.2.1.1, medtem ko smo za testiranje validacijskih parametrov vzorce pripravili skladno z veljavnim analitskim postopkom, kot je opisano v poglavjih od 3.2.1.1. do 3.2.1.4.

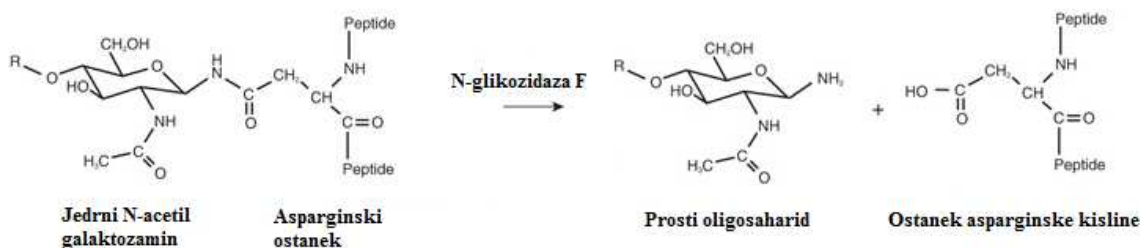
3.2.1.1 Redčitev

Vzorec smo najprej s pufrom za redčenje vzorcev redčili na tarčno koncentracijo 0,5 mg/mL.

3.2.1.2 Deglikozilacija

Redčenemu vzorcu smo nato dodali raztopino N-glikozidaze F in ga inkubirali. Po končani inkubaciji smo deglikozilirani vzorec centrifugirali.

Encim N-glikozidaza F katalizira cepitev N-vezanih oligosaharidov od glikoproteinov. Cepi amidno vez med asparaginom in sladkorjem, pri čemer omogoča sprostitev intaktnega oligosaharida, asparagin pa deamidira do asparginske kisline (slika 6) (59, 60).



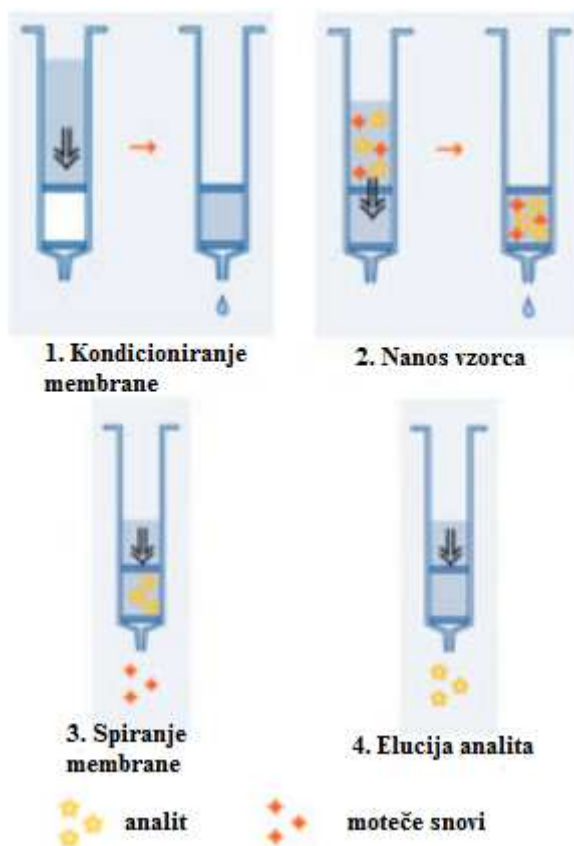
Slika 6: Prikaz sprostitve N-vezanih oligosaharidov ob prisotnosti N-glikozidaze F (povzeto po 60).

N-glikozidaza F je visoko aktivna ob vezavi α 1,6-fukoze na prvi N-acetilglukozamin in neaktivna ob vezavi α 1,3-fukoze, ki je običajno prisotna v rastlinskih glikoproteinih (59).

3.2.1.3 Čiščenje vzorcev

Po končani deglikozilaciji smo vzorce očistili z uporabo HyperSep Hypercarb SPE (*»solid phase«* ekstrakcija, oziroma ekstrakcija na trdni fazi (kartušah)) membran, pri čemer smo odstranili soli in deglikozilirani protein ter obdržali samo sproščene N-vezane oligosaharide. SPE membrana temelji na 100 % poroznem karbonskem grafitu (*PGC, ang. porous graphitic carbon*) in lahko s pomočjo dipol-dipol interakcije zadrži zelo polarne spojine. SPE membrana je pH stabilna (pH od 0 do 14), selektivna za strukturno podobne spojine in omogoča ločevanje spojin z enostavnimi topili (61, 62). Vzorce smo očistili po spodaj opisanem postopku (slika 7):

- HyperSep Hypercarb membrano smo najprej ekvilibrirali s 70 % ACN/0.1 % TFA.
- Nato smo membrano dvakrat zaporedoma sprali z Milli-Q vodo.
- Po spiranju membrane smo nanjo s pipeto nanесли supernatant deglikoziliranega vzorca.
- Po nanosu vzorca smo membrano ponovno dvakrat zaporedoma sprali z Milli-Q vodo, pri čemer smo iz membrane odstranili vse, razen glikanov.
- Na membrano smo nato nanесли 40 % ACN/0,1 % TFA in pri tem eluirali glikane direktno v polipropilensko epico oziroma vialo.



Slika 7: Prikaz čiščenja vzorcev z uporabo HyperSep Hypercarb SPE membran (povzeto po 62)

Opomba: Pri vseh korakih čiščenja vzorcev, razen pri eluciji glikanov, moramo paziti, da je membrana ves čas omočena.

Eluat z glikani smo nato zamrznili v tekočem dušiku in vzorec liofilizirali v liofilizatorju. Pri liofilizaciji mora imeti polipropilenska epica oziroma steklena viala na vrhu odprtino za prehajanje tekočine.

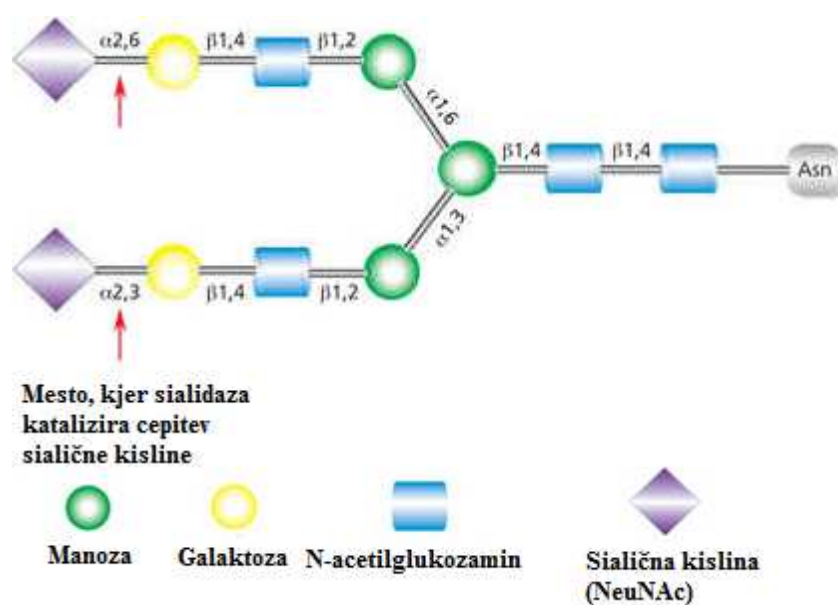
3.2.1.4 Desialilacija

Po končani liofilizaciji smo liofilizat vzorca rekonstituirali v končnem pufri za redčenje vzorcev (25 mM natrijev acetat, pH = 6,0), mu dodali sialidazo in ga inkubirali.

Encimatska hidroliza odstrani sialične kisline od sproščenih oligosaharidnih verig, kar povzroči izgubo močnega anionskega značaja sproščenih oligosaharidov. Nevtralni oligosaharidi imajo pri visokem pH (pH > 12) šibak negativni naboj, na podlagi česar jih lahko ločimo z anionsko-izmenjevalno kromatografijo.

Encim sialidaza oziroma neuraminidaza katalizira cepitev terminalne N-acetilnevraminske kisline (sialična kislina) od različnih glikoproteinov. Sialidaza, ki smo jo uporabili med pripravo vzorcev, je sialidaza C iz *Clostridium perfringens*, izražena v *E.coli*. Slednja katalizira cepitev $\alpha(2-3)$ in $\alpha(2-6)$ vezane N-acetilnevraminske kisline (63).

Shematski prikaz mesta, kjer sialidaza cepi $\alpha(2-3)$ in $\alpha(2-6)$ vezano N-acetilnevraminsko kislino, je prikazan na sliki 8.



Slika 8: Mesto, kjer sialidaza katalizira cepitev $\alpha(2-3)$ in $\alpha(2-6)$ vezane N-acetilnevraminske kisline (povzeto po 64)

3.2.2 Anionsko izmenjevalna kromatografija visoke zmogljivosti s pulzno amperometrično detekcijo (HPAEC-PAD)

Po končani deglikozilaciji in desialilaciji smo sproščene desialilirane N-glikane kromatografsko ločili z anionsko izmenjevalno kromatografijo. Uporabili smo kolono CarboPac PA-1, ki jo proizvajalec priporoča za analizo ogljikovih hidratov v širokem območju pH (0 do 14) pri vseh koncentracijah soli (65). Stacionarna faza CarboPac PA1 je sestavljena iz neporoznih polistiren divinilbenzenskih kroglic. Slednje so prekrte z manjšimi polistiren divinilbenzenskimi kroglicami lateksa, ki imajo na svoji površini kvarterne amino skupine in predstavljajo močan anionski izmenjevalec (52). N-glikane smo ločevali z gradientno elucijo MFA, MFB in MFC, pri pretoku 0,25 mL/min ter temperaturi kolonskega modula 30 ± 2 °C. Na kolono smo nanegli 10 μ L vzorca s tarčno koncentracijo 0,5 mg/mL.

N-glikane smo detektirali s pulzno amperometrično detekcijo, pri čemer smo uporabili štiri-pulzno napetostno sekvenco (4PAD). Za detekcijo smo uporabili elektrokemijsko detekcijsko celico s konvencionalno zlato delovno elektrodo in Ag/AgCl referenčno elektrodo, kombinirano s pH elektrodo (slika 9).



Slika 9: Elektrokemijska detekcijska celica (53)

Znotraj optimizacije HPAEC-PAD metode smo glede na občutljivost in ponovljivost detektorskih signalov primerjali tudi učinkovitost standardne štiri-pulzne in novo razvite dvo-pulzne napetostne sekvence.

3.2.2.1 Optimizacija HPAEC-PAD metode

Kot predpogoj za izvedbo popolne validacije (*ang. full validation*) HPAEC-PAD metode za določanje glikanskih struktur v aktivni učinkovini smo v okviru optimizacije HPAEC-PAD metode testirali robustnost po pristopu, imenovanem načrtovanje poskusa (DoE) (*ang. Design of Experiment*). DoE je strukturirano orodje za določanje razmerja med faktorji, ki vplivajo na sam proces določanja glikanskih struktur in končno določitev kvalitete produkta. Rezultate DoE eksperimentov smo statistično ovrednotili z ANOVA modelom, s pomočjo programske opreme Design-Expert®, verzija 8.0.7.1, proizvajalca Stat-Ease (ZDA).

Poleg testiranja robustnosti HPAEC-PAD metode smo v okviru optimizacije izvedli tudi primerjavo detekcije glikanskih struktur s štiri-pulzno (4PAD) in novo razvito dvo-pulzno (2PAD) napetostno sekvenco.

3.2.2.1.1 Robustnost

ICH definira robustnost kot merilo sposobnosti analitske metode, da na rezultat ne vplivajo manjše, a namerne spremembe parametrov analitske metode. Robustnost zagotavlja zanesljivost analitskega postopka (66).

V okviru testiranja robustnosti smo ovrednotili parametre, ki bi lahko potencialno vplivali na rezultate. Za ovrednotenje parametrov je bil izbran sistematičen pristop z DoE orodjem. Zaradi obsežne priprave vzorcev sta bila kreirana dva seta DoE eksperimentov. Znotraj prvega smo testirali faktorje, ki vplivajo na pripravo vzorca, pri drugem pa smo se osredotočili na same kromatografske pogoje. Testni matriki (matrika testiranja faktorjev, ki vplivajo na pripravo vzorcev in matrika testiranja različnih kromatografskih pogojev) sta bili definirani s pomočjo programa Design-Expert®, verzija 8.0.7.1. in temeljita na dvonivojskem načrtu (*ang. two-level factorial design*) z različnim številom eksperimentov (*ang. run*). Eksperimenti vključujejo štiri centralne točke (*ang. four center points*). Centralna točka je nastavitev, kjer so vrednosti za vse faktorje na osrednjem nivoju, kar v našem primeru predstavlja pripravo vzorcev pri nominalnih pogojih, skladno z veljavnim analitskim postopkom. Poleg štirih centralnih točk matrika vključuje po dva vzporedna eksperimenta z enakimi pogoji, pri čemer so se pri izračunih nato uporabile srednje vrednosti vzporednih meritev. Tovrstna zasnova programske opreme Design-Expert® omogoča vrednotenje prevladujočega faktorja oziroma prevladujočo interakcijo med dvema faktorjema. V našem primeru je bil zasnovan model z interakcijo med dvema faktorjema, pri

čemer so bili v model dodani vsi faktorji z $\alpha < 0,05$. Kombinacija pogojev znotraj posameznega eksperimenta in samo zaporedje eksperimentov je bilo avtomatsko generirano z validiranim programom Design-Expert®, verzija 8.0.7.1. Sama funkcionalnost programa Design-Expert® pa presega okvire te magistrske naloge.

- **Testiranje faktorjev, ki vplivajo na pripravo vzorcev**

V prvem delu smo robustnost metode testirali preko variacij priprave vzorcev glede na nominalne pogoje. Testirali smo vpliv temperature inkubacije (temperatura deglikozilacije in desialilacije: 35 °C, 37 °C in 39 °C), časa inkubacije (čas deglikozilacije: 20 ur, 22 ur in 24 ur, čas desialilacije: 16 ur, 18 ur in 20 ur) in količine dodanega encima (volumen glikozidaze: 3 µL, 4 µL in 5 µL, volumen sialidaze: 8 µL, 10 µL in 12 µL)). Kombinacije testiranih faktorjev, ki vplivajo na pripravo vzorcev, so prikazane v preglednici VI.

Matrika testiranja faktorjev, ki vplivajo na pripravo vzorcev, temelji na dvonivojskem načrtu s 36 eksperimenti in štirimi centralnimi točkami.

Preglednica VI: DoE eksperiment – matrika testiranja faktorjev, ki vplivajo na pripravo vzorcev

Ime vzorca	Čas deglikozilacije (ure)	Temp. deglikozilacije (°C)	Čas desialilacije (ure)	Temp. desialilacije (°C)	Volumen glikozidaze (µL)	Volumen sialidaze (µL)
vzorec_1	20	39	16	35	5	12
vzorec_2	20	35	20	39	5	8
vzorec_3	24	35	16	39	5	12
vzorec_4	24	35	20	39	3	8
vzorec_5	20	39	20	39	3	12
vzorec_6	24	39	20	39	5	12
vzorec_7	24	35	20	35	3	12
vzorec_8	20	35	16	39	3	12
vzorec_9	22	37	18	37	4	10
vzorec_10	20	39	20	35	3	8
vzorec_11	20	39	16	39	5	8
vzorec_12	20	39	20	39	3	12
vzorec_13	20	35	20	35	5	12
vzorec_14	20	35	16	35	3	8
vzorec_15	24	39	16	35	3	12
vzorec_16	24	39	20	39	5	12
vzorec_17	24	35	16	35	5	8
vzorec_18	24	35	16	39	5	12
vzorec_19	20	35	20	35	5	12
vzorec_20	20	39	20	35	3	8
vzorec_21	20	35	16	39	3	12
vzorec_22	22	37	18	37	4	10

Ime vzorca	Čas deglikozilacije (ure)	Temp. deglikozilacije (°C)	Čas desialilacije (ure)	Temp. desialilacije (°C)	Volumen glikozidaze (μL)	Volumen sialidaze (μL)
vzorec _23	20	35	16	35	3	8
vzorec _24	20	35	20	39	5	8
vzorec _25	20	39	16	35	5	12
vzorec _26	24	35	20	39	3	8
vzorec _27	24	35	16	35	5	8
vzorec _28	24	39	16	39	3	8
vzorec _29	20	39	16	39	5	8
vzorec _30	24	39	20	35	5	8
vzorec _31	24	39	16	39	3	8
vzorec _32	22	37	18	37	4	10
vzorec _33	22	37	18	37	4	10
vzorec _34	24	39	20	35	5	8
vzorec _35	24	35	20	35	3	12
vzorec _36	24	39	16	35	3	12

- **Testiranje vpliva različnih kromatografskih pogojev**

V drugem delu DoE smo robustnost metode testirali preko variacij naslednjih kromatografskih pogojev, glede na nominalne pogoje:

- Uporaba različnih serij kolon (kolona A (serijska številka: 014-11-119, kolona B (serijska številka: 014-11-181)).
- Različna temperatura detektorja (kontrolirana pri 25 °C/nekontrolirana).
- Različen pretok skozi kolono (0,25 mL/min ± 5 %), pri čemer 100 % predstavlja nominalen pretok mobilne faze skozi kolono.
- Različna sestava mobilne faze B (5 % koncentrirana (+5): 0,168 M NaOH, 0,105 M Na-acetat/5 % razredčena (-5): 0,152 M NaOH, 0,095 M Na-acetat), pri čemer 0 predstavlja nominalno sestavo mobilne faze B: 0,16 M NaOH, 0,10 M Na-acetat.

Različni kromatografski pogoji, testirani v okviru kromatografskega dela DoE eksperimenta, so prikazani v preglednici VII. Matrika testiranja različnih kromatografskih pogojev temelji na dvonivojskem načrtu z 32 eksperimenti in štirimi centralnimi točkami.

Preglednica VII: DoE eksperiment – matrika testiranja različnih kromatografskih pogojev.

Ime vzorca	Temp. detektorja	Pretok ($\pm 5\%$)	Sestava MFB ($\pm 5\%$)	Serijska št. kolone
vzorec_1	kontrolirana	95	-5	A
vzorec_2	nekontrolirana	100	0	B
vzorec_3	kontrolirana	100	0	B
vzorec_4	kontrolirana	100	0	B
vzorec_5	nekontrolirana	95	+5	A
vzorec_6	nekontrolirana	105	+5	B
vzorec_7	nekontrolirana	100	0	A
vzorec_8	kontrolirana	100	0	B
vzorec_9	nekontrolirana	100	0	B
vzorec_10	kontrolirana	100	0	A
vzorec_11	kontrolirana	105	-5	B
vzorec_12	nekontrolirana	100	0	A
vzorec_13	kontrolirana	95	+5	B
vzorec_14	nekontrolirana	100	0	A
vzorec_15	nekontrolirana	105	+5	B
vzorec_16	nekontrolirana	105	-5	A
vzorec_17	nekontrolirana	95	-5	B
vzorec_18	nekontrolirana	100	0	B
vzorec_19	kontrolirana	105	+5	A
vzorec_20	nekontrolirana	105	-5	A
vzorec_21	nekontrolirana	100	0	A
vzorec_22	kontrolirana	100	0	B
vzorec_23	nekontrolirana	95	+5	A
vzorec_24	kontrolirana	105	-5	B
vzorec_25	kontrolirana	100	0	A
vzorec_26	kontrolirana	100	0	A
vzorec_27	kontrolirana	100	0	A
vzorec_28	kontrolirana	105	+5	A
vzorec_29	nekontrolirana	100	0	B
vzorec_30	kontrolirana	95	-5	A
vzorec_31	kontrolirana	95	+5	B
vzorec_32	nekontrolirana	95	-5	B

- **Testiranje stabilnosti mobilnih faz, pufrov in raztopin za pripravo vzorcev**

Med testiranjem robustnosti metode smo prav tako testirali stabilnost mobilnih faz, pufrov in raztopin za pripravo vzorcev. V preglednici VIII so prikazane časovne točke, pri katerih je bila stabilnost testirana.

Preglednica VIII: Testiranje stabilnosti pufrov in raztopin za pripravo vzorcev ter mobilnih faz

Ime raztopine/Sestava (koncentracija)	Čas testiranja
70 % (v/v) acetonitril/0,1 % (v/v) TFA	t ₀ = sveže t ₁ = 1 mesec
40 % (v/v) acetonitril/0,1 % (v/v) TFA	t ₀ = sveže t ₁ = 1 mesec
Začetni pufer za redčenje vzorcev, 50 mM natrijev fosfat, 150 mM natrijev klorid, pH = 7,0	t ₀ = sveže t ₁ = 1 mesec t ₂ = 1,5 meseca
Končni pufer za redčenje vzorcev, 25 mM natrijev acetat, pH = 6,0	t ₀ = sveže t ₁ = 1 mesec t ₂ = 4 mesece
MFA, MFB, MFC pod helijevo atmosfero	t ₀ = sveže t ₁ = 1 mesec
MFA, MFB, MFC brez helijeve atmosfere	t ₀ = sveže t ₁ = 1 teden

Da bi potrdili stabilnost pufrov in raztopin za pripravo vzorcev ter mobilnih faz pri vseh določenih časovnih točkah, smo morali ovrednotiti povprečje ($n = 2$) deleža površin vseh posameznih glikanskih struktur. Za vsak vzorec smo nato izračunali absolutne razlike povprečnih vrednosti deležev površin posameznih glikanskih struktur pri časovnih točkah t_1 in t_2 v primerjavi s časovno točko t_0 .

$$\text{absolutna razlika } (t_0 - t_1) = |t_0 - t_1| \quad (\text{Enačba 1})$$

3.2.2.1.2 Primerjava 4PAD detekcije z 2PAD detekcijo

V okviru optimizacije HPAEC-PAD metode smo izvedli tudi primerjavo 4PAD detekcije z 2PAD detekcijo, pri čemer smo primerjali zaporedje 4PAD in 2PAD napetostnih pulzov. Napetostna sekvenca, ki smo jo uporabljali za detekcijo glikanskih struktur, vsebuje zaporedje štirih napetostnih pulzov, pri čemer visoko negativni redukcijski potencial (E_{red}), ki sledi detekcijskemu potencialu (E_{det}), omogoča reduktivno čiščenje elektrode, pozitivni

oksidacijski potencial (E_{oksid}) in negativni adsorpcijski potencial (E_{ads}) pa elektrodo reaktivirata. Kljub temu da 4PAD detekcija z visoko negativnim redukcijskim potencialom zmanjšuje odtapljanje Au iz elektrode, pri oksidacijskem potencialu nastaja neaktiven oksid, ki se mora med negativnim adsorpcijskim potencialom reducirati. Ta proces je ireverzibilen in povzroča korozijo elektrode. Novo razvita 2PAD detekcija za razliko od 4PAD detekcije ne vsebuje oksidacijskega in adsorpcijskega potenciala, saj je bilo pred kratkim dokazano, da visoko negativen reaktivacijski potencial ohranja čisto in aktivno površino elektrode ter preprečuje oksidativno odtapljanje Au elektrode. Nadalje 2PAD detekcija v primerjavi s 4PAD detekcijo z zmanjšanim številom napetostnih pulzov poveča frekvenco vzorčenja podatkov in s tem natančneje definira ožje vrhove. Slednje pa je poglavitnega pomena za vpeljavo kapilarnih sistemov.

Primerljivost 2PAD in 4PAD zaporedja napetostnih pulzov smo testirali s parametri natančnosti in občutljivosti metode.

Primerjava zaporedja napetostnih pulzov 4PAD in 2PAD detekcije je prikazana v preglednici IX.

Preglednica IX: Prikaz zaporedja napetostnih pulzov 4PAD in 2PAD detekcije

Potencial	Čas (s)	Napetost (V)	Integracija	4PAD zaporedje napetostnih pulzov	2PAD zaporedje napetostnih pulzov	
E_{det}	0,00	0,10	-			
	0,20	0,10	začetek			
	0,40	0,10	konec			
E_{red}	0,41	-2,0	-			
	0,42	-2,0	-			
E_{oksid}	0,43	0,6	-			-
E_{ads}	0,44	-0,1	-			-
	0,50	-0,1	-			-

3.2.2.2 Validacija HPAEC-PAD metode

Validacija analitske metode je postopek, ki zagotavlja visoko stopnjo zanesljivosti, da bomo z določeno analitsko metodo in instrumenti, ki se uporabljajo za izvajanje metode, pridobili konsistentne, zanesljive in točne rezultate, ki natančno odražajo kakovostne značilnosti testiranega produkta (66, 67).

V okviru magistrske naloge smo izvedli popolno validacijo (*ang. full validation*) HPAEC-PAD metode za določanje glikanskih struktur v aktivni učinkovini, pri čemer smo se ravnali po ICH (Q2) R1 in FDA smernicah ter smernicah ameriške in evropske farmakopeje, ki definirajo validacijske parametre, potrebne za validacijo metod, ki se uporabljajo za določanje vsebnosti in čistosti aktivne učinkovine ter kriterije sprejemljivosti. Testirali smo naslednje validacijske parametre:

- specifičnost in selektivnost (*ang. Specificity and selectivity*),
- meja določljivosti (*ang. Limit of quantitation*),
- linearnost (*ang. Linearity*),
- natančnost (*ang. Precision*): natančnost sistema (*ang. System precision*), natančnost metode (*ang. Method precision*), vmesna natančnost (*ang. Intermediate precision*),
- točnost (*ang. Accuracy / Recovery*),
- območje (*ang. Range*),
- stabilnost vzorčnih raztopin.

3.2.2.2.1 Specifičnost in selektivnost

Specifičnost in selektivnost pomeni sposobnost analitske metode nedvoumno izmeriti in razlikovati analit od ostalih komponent (metaboliti, nečistote, razkrojni produkti, komponente matriksa), ki so lahko prisotne v vzorcu (68).

V našem primeru je bila identiteta vseh glikanskih struktur določena med karakterizacijo HPAEC-PAD mapiranih glikanov z MALDI-TOF masno spektrometrijo, zato med validacijo nismo izvajali dodatnih eksperimentov za določanje identitete glikanov. Identiteta glikanskih struktur, preliminarno določena med karakterizacijo HPAEC-PAD mapiranih glikanov z MALDI-TOF masno spektrometrijo, je prikazana v preglednici X.

Preglednica X: Identiteta glikanskih struktur, preliminarno določena med karakterizacijo HPAEC-PAD mapiranih glikanov z MALDI-TOF masno spektrometrijo

Vrh	Oznaka	Struktura
1	2A	Dvoantenne glikanske strukture
2	3A(1-4)	Triantenne (1→4) glikanske strukture
3	3A(1-6)	Triantenne (1→6) glikanske strukture
4	4A	Tetraantenne glikanske strukture
5	3A1R	Triantenne glikanske strukture + 1 LacNAc* ponovitev
6	4A1R	Tetraantenne glikanske strukture + 1 LacNAc* ponovitev
7	3A2R	Triantenne glikanske strukture + 2 LacNAc* ponovitvi
8	4A2R	Tetraantenne glikanske strukture + 2 LacNAc* ponovitvi
9	HM6P	Manoza 6 fosfat glikanske strukture
10	S	Sulfatirane glikanske strukture

* LacNAc: N-acetil-D-laktozamin

Z določanjem specifičnosti in selektivnosti smo želeli dokazati, da je metoda sposobna ustrezno in specifično ločiti glikanske strukture ter da v matriksu (končni pufer za redčenje in mobilna faza A) ni prisotnih komponent, katerih retencijski časi so sicer karakteristični za posamezne glikanske strukture. Za namen potrjevanja identitete glikanskih struktur smo naredili primerjavo kromatografskega profila vzorca aktivne učinkovine s kromatografskim profilom referenčne substance, pri čemer je pomembno zaporedje elucije in profil 10 identificiranih glikanskih struktur (po MALDI-TOF), največje dovoljeno odstopanje v retencijskem času vsake posamezne glikanske strukture pa je lahko $\pm 0,5$ minute. Kriterij $\pm 0,5$ minute smo določili interno na podlagi generalnih smernic za validacijo analitskih postopkov, ki narekujejo, da je največje dovoljeno odstopanje v retencijskih časih $\pm 2,0$ %. Za večino glikanskih struktur smo interno določili ožje območje od $\pm 2,0$ %.

Dodatno smo med seboj primerjali kromatografske profile aktivne učinkovine, aktivne učinkovine z dodanim standardom HM6P in HM6P standarda v matriksu vzorca, da bi potrdili retencijski čas HM6P glikanske strukture, ki se je med QbD izkazala kot kritičen parameter aktivne učinkovine.

3.2.2.2.2 Meja določljivosti (LOQ)

Meja določljivosti (*ang. Limit of Quantitation*) je najmanjša oziroma največja množina analita, ki jo z ustrezno natančnostjo in točnostjo še lahko kvantitativno določimo (69).

- Določanje LOQ

Za določanje LOQ smo pripravili vzorec s koncentracijo 0,5 mg/mL. Nato smo s postopnim zmanjševanjem volumna injiciranja zmanjševali nanos vzorca na kolono in tako določili najnižjo množino analita, ki jo še lahko kvantitativno določimo.

Preglednica XI: Prikaz nanosa vzorca s koncentracijo 0,5 mg/mL na kolono za določanje LOQ

Nanos na kolono (μL)	Število injiciranj
10	1
4	1
3	1
2	1
1	1

Po končanem injiciranju smo evaluirali kromatograme in izračunali razmerje signal/šum (S/N) (enačba 2) za glikanski strukturi HM6P in S ter določili LOQ pri nanosu na kolono, ki je imel $S/N \geq 10$.

$$S/N = \frac{h_s}{h_n}$$

h_s ... višina signala

(Enačba 2)

h_n ... višina šuma

- Potrjevanje LOQ

Za potrjevanje LOQ smo pripravili raztopino s koncentracijo, za katero smo določili LOQ, in jo šestkrat injicirali.

Za potrditev LOQ je morala biti relativna standardna deviacija (RSD) (enačba 3) šestih določitev površine HM6P in S vrhov ≤ 30 % ter S/N (enačba 2) za posamezno injiciranje (6 injiciranj) $\geq 10:1$.

$$RSD (\%) = \frac{100}{\bar{x}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

X_i ... posamezna meritev

(Enačba 3)

\bar{X} ... povprečna vrednost meritev

N ... število meritev

Iz minimalne integrirane površine HM6P in S vrhov smo nato s spodnjo enačbo (enačba 4) preračunali LOQ za nominalen nanos vzorca na kolono (10 μ L).

$$LOQ = \frac{\text{minimalna integrirana površina (HM6P/S)}}{\text{površina vseh glik. struktur (100\% delavno območje)}} \times 100$$

(Enačba 4)

3.2.2.2.3 Linearnost

Linearnost analitske metode je sposobnost metode, da v določenem območju daje odzive, ki so neposredno sorazmerni koncentraciji oziroma vsebnosti analita v vzorcu (69).

V našem primeru smo linearnost določali v območju od 60 % do 140 % nominalnega nanosa ($c = 0,5$ mg/mL) referenčne substance. Linearnost smo vrednotili na podlagi sedmih različnih deležev nominalne koncentracije 0,5 mg/mL (60 %, 70 %, 80 %, 100 %, 120 %, 130 % in 140 %). Da bi dosegli teoretično območje od 60 % do 140 % nominalne koncentracije, smo postopoma prilagodili volumen injiciranja (6 μ L, 7 μ L, 8 μ L, 10 μ L, 12 μ L, 13 μ L in 14 μ L) referenčne substance, pri čemer so bili vsi različni nanosi na kolono (različni volumni injiciranja) izvedeni v treh ponovitvah.

Rezultate smo ovrednotili s tako imenovanim linearnim regresijskim modelom, kjer smo umeritveno premico narisali z uporabo matematične transformacije. Enačba linearne funkcije je $y = ax + b$, pri čemer y predstavlja površino posameznega vrha, x delež nominalne koncentracije (od 60 % do 140 %), a naklon premice in b presečišče z ordinato. Za vsako glikansko strukturo smo določili naklon krivulje, odsek na y -osi (*ang. intercept*) in ostanke (*ang. residuals*) ter izračunali korelacijski koeficient (R) linearne krivulje.

Prav tako smo izračunali absolutni odsek na y-osi (enačba 6), pri čemer je bilo najprej potrebno določiti izračunano površino vrha posamezne glikanske strukture pri nominalnem nanosu na kolono (0,5 mg/mL; x = 100 %) (enačba 5).

Izračunana površina vrha pri nominalni koncentraciji

$$= a * \text{nominalni nanos na kolono} + b$$

a ... naklon premice

(Enačba 5)

b ... odsek na y-osi

$$K = \frac{b}{\text{Izračunana površina vrha pri nominalnem nanosu na kolono}} \times 100 (\%)$$

K ... absolutni odsek na y-osi

(Enačba 6)

b ... odsek na y-osi

V preglednici XII je navedenih sedem različnih deležev nominalne koncentracije 0,5 mg/mL, na podlagi katerih smo ovrednotili linearnost HPAEC-PAD metode.

Preglednica XII: Deleži nominalnega nanosa (0,5 mg/mL), uporabljeni pri določevanju linearnosti metode, v odvisnosti od volumna injiciranja

Delež nominalnega nanosa (c=0,5 mg/mL) (%)	Volumen injiciranja (μL)	Končna koncentracija (mg/mL)	Število injiciranj
60 %	6	0,3	3
70 %	7	0,35	3
80 %	8	0,4	3
100 %	10	0,5	3
120 %	12	0,6	3
130 %	13	0,65	3
140 %	14	0,7	3

3.2.2.2.4 Natančnost

Z natančnostjo analitske metode ocenimo stopnjo razpršenosti rezultatov pri seriji meritev istega homogenega vzorca. Natančnost običajno podajamo kot standardno deviacijo (SD) ali relativno standardno deviacijo (RSD) serij meritev. Določamo lahko tri vrste natančnosti (70):

- **Ponovljivost** (*ang. Repeatability*): Ponovljivost je natančnost, ki jo izvede en operater pod istimi pogoji (npr. reagenti, oprema, laboratorij) v kratkem časovnem obdobju, običajno v istem dnevu. Da lahko ocenimo ponovljivost, moramo določiti najmanj devet meritev z vsaj tremi koncentracijami, ki pokrivajo delovno območje (na primer tri koncentracije s tremi ponovitvami) ali pa vsaj šest meritev pri 100 % testirane koncentracije (69, 70).
- **Vmesna natančnost** (*ang. Intermediate precision*): Predstavlja variacije znotraj istega laboratorija, kot so na primer različni dnevi izvedbe analize, različen operater, različna laboratorijska oprema itd. (70).
- **Obnovljivost** (*ang. Reproducibility*): Predstavlja variacije med laboratoriji. Določa se jo na primer pri implementaciji nove tehnike v laboratorij in pri medlaboratorijskih študijah (standardizacija metode) (69, 70).

Med validacijo metode za določanje glikanov s HPAEC-PAD smo natančnost analitske metode določali z natančnostjo sistema (*ang. System precision*), natančnostjo metode (*ang. Method Precision*) oziroma ponovljivostjo (*ang. Repeatability*) in vmesno natančnostjo (*ang. Intermediate precision*).

- **Natančnost sistema**

Za določanje natančnosti sistema smo računali RSD za delež površin (*ang. % area*) vseh posameznih glikanskih struktur pri šestih injiciranih referenčne substance.

- **Natančnost metode (ponovljivost)**

Za določanje natančnosti metode smo računali RSD za delež površin (*ang. % area*) in 95 % interval zaupanja (P) (enačba 7) za vsako posamezno glikansko strukturo pri šestih ponovitvah priprave posameznega vzorca aktivne učinkovine (DS vzorec) ($c_1 = 0,35$ mg/mL, $c_2 = 0,50$ mg/mL, $c_3 = 0,65$ mg/mL).

$$\text{Interval zaupanja povprečja deleža površin} = \bar{x} \pm t * \frac{s}{\sqrt{n}}$$

\bar{x} ... povprečje deleža površin (% area) posamezne glikanske strukture (Enačba 7)

t ... tabelarična t-vrednost ($t_{\text{tab}}(0,05, n-1) = 2,571$; 95 % interval zaupanja), $n = 6$

s ... standardna deviacija

Za potrjevanje najnižjega območja metode smo določili S/N razmerje za HM6P vrh na LOQ nivoju DS vzorca s koncentracijo 0,35 mg/mL za vsako posamezno injiciranje.

- **Vmesna natančnost**

Za določanje vmesne natančnosti smo računali RSD za delež površin (*ang. % area*) za vsako posamezno glikansko strukturo pri šestih ponovitvah DS vzorca in absolutne razlike med meritvami DS vzorca pri vmesni natančnosti in natančnosti metode (natančnost metode je izvedel drug operater, na drugi dan kot je bila izvedena vmesna natančnost).

$$\text{absolutna razlika (Operator 1, Operator 2)} = | \text{Operator 1} - \text{Operator 2} |$$

(Enačba 8)

3.2.2.2.5 Točnost

Točnost analitske metode je odstopanje srednje vrednosti (koncentracije), pridobljene z analitsko metodo, od dejanske vrednosti analita (68).

V našem primeru smo točnost analitske metode potrdili posredno preko kriterijev sprejemljivosti za specifičnost, natančnost metode (*ang. Method precision*) in linearnost.

3.2.2.2.6 Območje

Območje analitske metode je interval med vključno zgornjo in spodnjo koncentracijo (količino) analita v vzorcu, za katerega je bilo dokazano, da ima analitska metoda ustrezno natančnost, točnost in linearnost (71).

Območje analitske metode smo določili kot interval, znotraj katerega so bili doseženi kriteriji sprejemljivosti za linearnost in natančnost metode (*ang. Method Precision*).

3.2.2.2.7 Stabilnost vzorčnih raztopin

Stabilnost vzorcev, shranjenih pri 2–8 °C v avtomatskem vzorčevalniku ionskega kromatografskega sistema, smo testirali v različnih časovnih točkah: t_0 = dan 0, t_1 = dan 5, t_2 = dan 7, t_3 = dan 10.

Vsak vzorec smo pripravili v dveh paralelkah, ki smo ju po končani pripravi združili v eno HPLC vialo in homogenizirali. Vse združene vzorce smo injicirali dvakrat.

Paralelke posameznih vzorcev smo združili z namenom, da bi zagotovili zadostne količine pripravljenih vzorcev tekom testiranja stabilnosti v vseh časovnih točkah in posledično izključili vpliv priprave vzorcev. Vsak posamezen vzorec smo injicirali dvakrat, skladno s kriterijem za določanje vmesne natančnosti (*ang. Intermediate precision*). Stabilnost vzorčnih raztopin smo namreč potrjevali na podlagi doseganja določenih kriterijev sprejemljivosti za vmesno natančnost, ki so navedeni v poglavju 4.2.7. Da bi potrdili stabilnost vzorcev v vseh določenih časovnih točkah, smo morali ovrednotiti povprečje ($n = 2$) deleža površin vseh posameznih glikanskih struktur. Za vsak vzorec smo nato izračunali absolutno razliko povprečij površin vseh posameznih glikanskih struktur pri časovnih točkah t_1 , t_2 in t_3 , v primerjavi s časovno točko t_0 (enačba 1).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V nadaljevanju so podani rezultati, ki smo jih pridobili tekom optimizacije in validacije HPAEC-PAD metode za določanje glikanskih struktur. V okviru optimizacije metode so prikazani rezultati testiranja robustnosti in primerjava 4PAD detekcije z 2PAD detekcijo. V okviru validacije HPAEC-PAD metode pa so rezultati razdeljeni po različnih validacijskih parametrih.

4.1 OPTIMIZACIJA HPAEC-PAD METODE

4.1.1 Robustnost

Robustnost metode smo potrjevali z uporabo dveh različnih IC sistemov enake konfiguracije, različnih serij kolon, s spremenjeno sestavo mobilne faze B ($\pm 5\%$) in z različnim pretokom mobilne faze skozi kolono ($\pm 5\%$) glede na nominalne pogoje, z različno temperaturo detektorja (kontrolirana pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ /nekontrolirana) in z različno pripravo vzorcev (različen čas deglikozilacije in desialilacije, različna temperatura deglikozilacije in desialilacije, različna količina dodane glikozidaze in sialidaze) glede na nominalne pogoje. Vse testirane parametre smo ovrednotili z DoE orodjem, pri čemer sta bila zaradi obsežne priprave vzorcev kreirana dva seta DoE eksperimentov. V okviru prvega smo testirali faktorje, ki vplivajo na pripravo vzorcev, pri drugem pa smo testirali vpliv različnih kromatografskih pogojev. Vse dobljene rezultate obeh DoE eksperimentov smo statistično ovrednotili s programsko opremo Design-Expert®, verzija 8.0.7.1, proizvajalca Stat-Ease (ZDA). Tovrstna zasnova programske opreme Design-Expert® omogoča vrednotenje prevladujočega faktorja oziroma prevladujočo interakcijo med dvema faktorjema.

- Faktorji, ki vplivajo na pripravo vzorcev

Testirali smo šest različnih faktorjev, ki vplivajo na pripravo vzorcev:

- Faktor 1: Čas deglikozilacije (20 ur, 22 ur in 24 ur).
- Faktor 2: Temperatura deglikozilacije ($35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $39\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- Faktor 3: Čas desialilacije (16 ur, 18 ur in 20 ur).
- Faktor 4: Temperatura desialilacije ($35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $39\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- Faktor 5: Količina encima glikozidaze ($3\text{ }\mu\text{L}$, $4\text{ }\mu\text{L}$ in $5\text{ }\mu\text{L}$).
- Faktor 6: Količina encima sialidaze ($8\text{ }\mu\text{L}$, $10\text{ }\mu\text{L}$ in $12\text{ }\mu\text{L}$).

V preglednici XIII so prikazani rezultati prvega seta DoE eksperimenta, pri katerem smo testirali faktorje, ki vplivajo na pripravo vzorcev. Preglednica prikazuje deleže površin dvoantenarnih (2A), triantenarnih (3A), štiriantenarnih (4A), manosa 6 fosfat (HM6P) in sulfatiranih (S) glikanskih struktur v odvisnosti od kombinacije testiranih faktorjev. 3A glikanska skupina predstavlja 3A(1-4), 3A(1-6), 3A1R in 3A2R glikanske strukture, 4A glikanska skupina pa 4A1R ter 4A2R glikanske strukture. Identiteta posameznih glikanskih struktur je prikazana v preglednici X, v poglavju 3.2.2.2.1.

Preglednica XIII: DoE eksperiment – rezultati testiranja faktorjev, ki vplivajo na pripravo vzorcev

Testirani faktorji						Rezultati: delež površin glikanskih struktur ter resolucija					
Čas deglik. (ure)	Temp. deglik. (°C)	Čas desial. (ure)	Temp. desial. (°C)	V Gliko. (µL)	V Siali. (µL)	2A (%)	3A (%)	4A (%)	HM6P (%)	S (%)	R*
20	39	16	35	5	12	5,561	14,845	76,079	2,508	1,008	1,09
20	35	20	39	5	8	5,915	15,273	75,208	2,661	0,941	1,13
24	35	16	39	5	12	6,107	14,922	75,366	2,642	0,964	1,06
24	35	20	39	3	8	6,046	15,258	74,981	2,815	0,900	1,08
20	39	20	39	3	12	5,730	14,911	75,856	2,536	0,968	1,09
24	39	20	39	5	12	5,304	14,678	76,620	2,451	0,947	1,08
24	35	20	35	3	12	5,604	15,087	75,441	2,864	1,004	1,09
20	35	16	39	3	12	5,998	15,127	74,911	2,931	1,033	1,10
22	37	18	37	4	10	5,647	15,023	75,867	2,512	0,952	1,17
20	39	20	35	3	8	5,504	15,170	75,779	2,583	0,964	1,07
20	39	16	39	5	8	5,688	15,221	75,362	2,632	1,097	1,07
20	39	20	39	3	12	5,458	14,844	76,138	2,561	0,999	1,05
20	35	20	35	5	12	5,513	14,836	76,176	2,575	0,898	1,00
20	35	16	35	3	8	5,726	15,208	75,324	2,869	0,874	1,08
24	39	16	35	3	12	5,487	14,620	76,047	2,494	0,992	1,10
24	39	20	39	5	12	5,526	14,594	76,584	2,392	0,913	1,07
24	35	16	35	5	8	5,678	15,087	75,612	2,638	0,986	0,98
24	35	16	39	5	12	5,840	14,950	75,696	2,602	0,911	1,08
20	35	20	35	5	12	5,661	14,834	75,944	2,608	0,952	1,06
20	39	20	35	3	8	6,168	15,188	75,070	2,589	0,986	1,12
20	35	16	39	3	12	6,073	14,955	75,248	2,845	0,881	1,16
22	37	18	37	4	10	5,989	15,177	75,155	2,637	1,042	1,12
20	35	16	35	3	8	6,343	15,206	74,670	2,857	0,924	1,06
20	35	20	39	5	8	5,793	15,192	75,468	2,649	0,897	1,11
20	39	16	35	5	12	6,012	14,803	75,582	2,546	1,056	1,04
24	35	20	39	3	8	6,162	15,415	74,689	2,749	0,940	1,04
24	35	16	35	5	8	5,990	14,907	75,596	2,624	0,883	1,07
24	39	16	39	3	8	5,772	14,986	75,660	2,532	1,049	1,09
20	39	16	39	5	8	5,996	15,093	75,277	2,612	1,023	1,08
24	39	20	35	5	8	5,807	14,763	75,945	2,483	1,002	1,05
24	39	16	39	3	8	6,036	14,936	75,388	2,545	1,095	1,05
22	37	18	37	4	10	6,110	14,958	75,325	2,584	1,022	1,08
22	37	18	37	4	10	6,082	15,025	75,257	2,592	1,044	1,07
24	39	20	35	5	8	5,875	14,628	75,999	2,456	1,041	1,07
24	35	20	35	3	12	6,154	14,699	75,434	2,711	1,003	1,05
24	39	16	35	3	12	5,794	14,495	76,359	2,441	0,911	1,11

* R: resolucija med vrhovoma HM6P in S.

S statistično obdelavo podatkov, ki so prikazani v preglednici XIII, je bilo s pomočjo programske opreme Design-Expert® ugotovljeno, da nekateri faktorji statistično pomembno vplivajo (faktorji z $\alpha < 0,05$) na dobljene rezultate. Prevladujoči faktorji oziroma prevladujoče interakcije med posameznimi faktorji ter najmanjša in največja pričakovana vrednost za posamezno glikansko strukturo so prikazani v preglednici XIV.

Preglednica XIV: Faktorji, ki vplivajo na pripravo vzorcev: vpliv prevladujočih faktorjev oziroma prevladujočih interakcij dveh faktorjev na odziv glikanskih struktur 2A, 3A, 4A, HM6P in S

Prevladujoči faktor oziroma prevladujoča interakcija dveh faktorjev	Glikanska struktura	Najmanjša in največja pričakovana vrednost deleža površin posamezne glikanske strukture
Faktor 2 (Temperatura deglikozilacije)	2A	5,7 %–6,0 %
Faktor 1 + 2 (Čas deglikozilacije + Temperatura deglikozilacije)	3A	14,5 %–15,3 %
Faktor 1 + 2 (Čas deglikozilacije + Temperatura deglikozilacije)	4A	75,0 %–76,5 %
Faktor 1 + 3 (Čas deglikozilacije + Čas desialilacije)	HM6P	2,4 %–2,9 %
Faktor 2 + 6 (Temperatura deglikozilacije + Količina encima sialidaze)	S	0,9 %–1,0 %

Glede na rezultate, podane v preglednici XIV, vidimo, da ima največji vpliv na 2A glikanske strukture temperatura deglikozilacije, na 3A in 4A glikanske strukture čas in temperatura deglikozilacije, na HM6P glikanske strukture najbolj vpliva čas deglikozilacije in desialilacije ter na S glikanske strukture temperatura deglikozilacije in količina dodane sialidaze.

Glede na interne specifikacije za glikanske strukture, ki so navedene v preglednici XV, je razvidno, da imajo faktorji, ki so se sicer izkazali kot statistično pomembni, zanemarljiv vpliv na določeno kvaliteto vzorca. Nekoliko povišane vrednosti pri 2A glikanski strukturi so posledica uporabe določene serije kromatografske kolone, pri kateri je prišlo do koelucije 2A vrha.

Preglednica XV: Interne specifikacije za glikanske strukture prisotne v aktivni učinkovini, izražene z relativnim deležem površine posamezne glikanske strukture

Glikanska struktura	Specifikacije
2A	2 %–6 %
3A	8 %–20 %
4A	71 %–82 %
HM6P	≤ 5 %
S	≤ 5 %

- Različni kromatografski pogoji

V okviru preizkušanja različnih kromatografskih pogojev, smo testirali štiri različne faktorje:

- Faktor 1: Temperatura detektorja (kontrolirana pri 25 °C/nekontrolirana).
- Faktor 2: Pretok mobilne faze skozi kolono (0,25 mL/min ± 5 %).
- Faktor 3: Sestava mobilne faze B (0,16 M NaOH, 0,10 M Na-acetat ± 5 %).
- Faktor 4: Serijska številka kromatografske kolone (A: 014-11-119, B: 014-11-181).

V preglednici XVI so prikazani rezultati drugega DoE eksperimenta, pri katerem smo testirali vpliv različnih kromatografskih pogojev. Preglednica prikazuje deleže površin dvoantenarnih (2A), triantenarnih (3A), štiriantenarnih (4A), manosa 6 fosfat (HM6P) in sulfatiranih (S) glikanskih struktur v odvisnosti od kombinacije testiranih faktorjev.

Preglednica XVI: DoE eksperiment – rezultati testiranja različnih kromatografskih pogojev

Testirani faktorji				Rezultati: delež površin glikanskih struktur ter resolucija					
Temp. detektorja	Pretok (±5 %)	Sestava MFB (±5 %)	Serijska št. kolone	2A (%)	3A (%)	4A (%)	HM6P (%)	S (%)	R*
kontrolirana	95	-5	A	5,27	15,15	76,54	2,76	0,26	1,23
nekontrolirana	100	0	B	3,38	14,94	78,16	2,48	1,04	0,95
kontrolirana	100	0	B	3,42	14,72	78,32	2,46	1,09	1,20
kontrolirana	100	0	B	3,43	14,78	78,24	2,39	1,15	1,23
nekontrolirana	95	+5	A	3,08**	15,07	77,86	2,73	1,27	0,92
nekontrolirana	105	+5	B	3,45	14,38	78,14	2,77	1,27	1,14
nekontrolirana	100	0	A	5,58	15,32	75,26	2,56	1,28	1,19
kontrolirana	100	0	B	3,33	14,69	78,44	2,47	1,07	1,14
nekontrolirana	100	0	B	3,44	14,92	78,21	2,34	1,09	1,15

Testirani faktorji				Rezultati: delež površin glikanskih struktur ter resolucija					
Temp. detektorja	Pretok (±5 %)	Sestava MFB (±5 %)	Serijska št. kolone	2A (%)	3A (%)	4A (%)	HM6P (%)	S (%)	R*
kontrolirana	100	0	A	5,38	15,16	75,67	2,54	1,24	1,27
kontrolirana	105	-5	B	3,04	15,50	78,51	2,78	0,17	1,14
nekontrolirana	100	0	A	5,28	15,41	75,48	2,58	1,25	1,19
kontrolirana	95	+5	B	3,17	14,16	78,78	2,70	1,18	0,73
nekontrolirana	100	0	A	5,18	15,41	75,56	2,61	1,25	1,26
nekontrolirana	105	+5	B	3,39	14,40	78,19	2,79	1,24	1,08
nekontrolirana	105	-5	A	5,21	15,22	76,48	2,85	0,23	1,19
nekontrolirana	95	-5	B	3,31	14,49	79,03	2,98	0,18	1,21
nekontrolirana	100	0	B	3,44	14,91	78,19	2,38	1,09	1,14
kontrolirana	105	+5	A	4,89	15,22	75,84	2,70	1,32	1,19
nekontrolirana	105	-5	A	5,05	15,25	76,67	2,79	0,26	1,17
nekontrolirana	100	0	A	5,17	15,41	75,58	2,57	1,26	1,23
kontrolirana	100	0	B	3,36	14,73	78,36	2,43	1,14	1,13
nekontrolirana	95	+5	A	3,32**	15,24	77,49	2,65	1,31	1,05
kontrolirana	105	-5	B	3,01	15,53	78,48	2,81	0,18	1,15
kontrolirana	100	0	A	5,35	15,22	75,65	2,53	1,26	1,24
kontrolirana	100	0	A	5,30	15,27	75,70	2,52	1,20	1,29
kontrolirana	100	0	A	5,35	15,16	75,76	2,51	1,22	1,23
kontrolirana	105	+5	A	4,95	15,18	75,88	2,65	1,35	1,18
nekontrolirana	100	0	B	3,45	14,87	78,19	2,39	1,10	1,18
kontrolirana	95	-5	A	5,05	15,33	76,55	2,81	0,24	1,18
kontrolirana	95	+5	B	3,18	14,14	78,71	2,76	1,21	0,99
nekontrolirana	95	-5	B	3,34	14,53	79,02	2,95	0,15	1,11

* R: resolucija med vrhovoma HM6P in S.

Pri pregledu kromatogramov smo ugotovili, da je pri vzorcih, ki so bili analizirani s kolono A (serijska številka: 014-11-119), opažena rama pri vrhu 2A oziroma koelucija z vrhom 2A. Pri uporabi kolone A je rama vidna le pri dveh vzorcih (vzorca označena z **) z naslednjima modificiranima kromatografskima pogojema: 95 % pretok mobilne faze in 5 % koncentrirana mobilna faza B (0,168 M NaOH, 0,105 M Na-acetat), medtem ko je pri uporabi kolone B (serijska številka: 014-11-181) rama vidna pri vseh vzorcih. Omenjena rama vpliva na integracijo 2A vrha, kar se odraža v različnih deležih 2A glikanske strukture (kolona A zaradi koelucije posledično daje višje deleže 2A glikanske strukture).

Preko statistične obdelave podatkov, ki so prikazani v preglednici XVI, je bilo s pomočjo programske opreme Design-Expert® ugotovljeno, da nekateri faktorji statistično pomembno vplivajo (faktorji z $\alpha < 0,05$) na dobljene rezultate. Prevladujoči faktorji oziroma prevladujoče interakcije med posameznimi faktorji ter najmanjša in največja pričakovana vrednost deleža površin za posamezno glikansko strukturo so prikazani v preglednici XVII.

Preglednica XVII: Različni kromatografski pogoji: vpliv prevladujočih faktorjev oziroma prevladujočih interakcij dveh faktorjev na delež površin glikanskih struktur 2A, 3A, 4A, HM6P in S

Prevladujoči faktor, oziroma prevladujoča interakcija dveh faktorjev	Glikanska struktura	Najmanjša in največja pričakovana vrednost deleža površin posamezne glikanske strukture
Faktor 4 (Serijska številka kolone)	2A	Kolona A: rezultati na ravni 5,0 % Kolona B: rezultati na ravni 3,3 %
Faktor 4 (Serijska številka kolone)	3A	Kolona A: 15,2 %–15,7 % Kolona B: 14,3 %–14,7 %
Faktor 4 (Serijska številka kolone)	4A	Kolona A: rezultati na ravni 75,9 % Kolona B: rezultati na ravni 78,4 %
Ni signifikantnega prevladujočega faktorja	HM6P	ni določena
Faktor 3 (Sestava mobilne faze B)	S	0,4 %–1,5 %

Glede na rezultate, podane v preglednici XVII, vidimo, da serijska številka kolone (kolona A in B) statistično pomembno vpliva na rezultate glikanskih struktur 2A, 3A in 4A, medtem ko sestava mobilne faze statistično pomembno vpliva na glikansko strukturo S. Za glikansko strukturo HM6P ni bilo ugotovljenih statistično pomembnih faktorjev, prav tako pretok in kontrola temperature detektorja nista pomembno vplivala na dobljene rezultate.

Glede na interne specifikacije za glikanske strukture, ki so navedene v preglednici XV, je razvidno, da serijska številka kromatografske kolone in sestava mobilne faze B, ki sta se sicer izkazali kot statistično pomembni, zanemarljivo vplivata na poročane rezultate glikanskih struktur 3A, 4A, HM6P in S. Nekoliko povišane vrednosti smo opazili le pri 2A glikanski strukturi, ob uporabi kromatografske kolone A (serijska številka: 014-11-181), pri kateri je prišlo do koelucije 2A vrha.

Dobljeni rezultati kažejo na to, da je elucija 2A glikanske strukture močno odvisna od serije kromatografske kolone, zato je potrebno z navedenimi modificiranimi kromatografskimi pogoji (95 % pretok mobilne faze in 5 % koncentrirana mobilna faza B (0,168 M NaOH, 0,105 M Na-acetat)) zagotoviti ustrezno ločbo 2A vrha.

Zaradi pojava koelucije pri koloni A, smo z namenom, da bi preverili, ali še kakšen drug faktor pomembno vpliva na odziv glikanskih struktur, v preglednici XVIII nadalje statistično ovrednotili le rezultate, dobljene pri uporabi kolone B.

Preglednica XVIII: Različni kromatografski pogoji: vpliv prevladujočih faktorjev, oziroma prevladujočih interakcij dveh faktorjev na delež površin glikanskih struktur 2A, 3A, 4A, HM6P in S pri uporabi kolone B

Prevladujoči faktor, oziroma prevladujoča interakcija dveh faktorjev	Glikanska struktura	Najmanjša in največja pričakovana vrednost deleža površin posamezne glikanske strukture
Faktor 1 (Temperatura detektorja)	2A	3,2 %–3,5 %
Faktor 1 (Temperatura detektorja)	3A	14,0 %–15,4 %
Faktor 2 + 3 (Pretok + Sestava mobilne faze B)	4A	78,0 %–78,9 %
Faktor 3 (Sestava mobilne faze B)	HM6P	2,6 %–2,7 %
Faktor 3 (Sestava mobilne faze B)	S	0,4 %–1,4 %

Glede na rezultate, podane v preglednici XVIII, vidimo, da na 2A in 3A glikanske strukture vpliva predvsem temperatura detektorja, na 4A glikanske strukture pretok in sestava mobilne faze B ter na HM6P in S glikanske strukture sestava mobilne faze B.

Glede na interne specifikacije za glikanske strukture, ki so navedene v preglednici XV, je razvidno, da statistično pomembni faktorji, navedeni v preglednici XVIII, ne predstavljajo tveganja za ustrezno določitev glikanskih struktur 2A, 3A, 4A, HM6P in S.

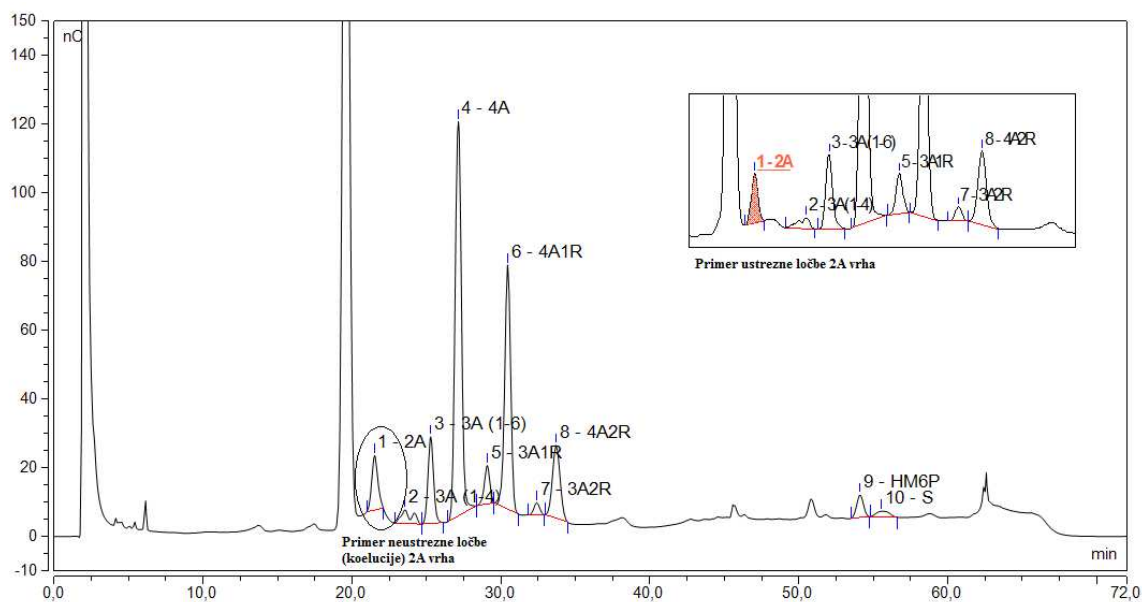
Kot smo omenili že zgoraj, lahko določeni modificirani kromatografski pogoji rezultirajo v ustrežnejši ločbi 2A vrha. Z namenom, da bi lahko kontrolirali elucijo 2A glikanske strukture, smo izvedli eksperiment z modificiranimi kromatografskimi pogoji, ki so navedeni v preglednici XIX.

Preglednica XIX: Vpliv sestave mobilne faze B (nominalna sestava, 5 % koncentrirana (+5 %) in 10 % koncentrirana (+10 %)) na delež površin glikanskih struktur 2A, 3A, 4A, HM6P in S

Sestava MFB	Število ponovitev (n)	Povprečne vrednosti deleža površin posameznih glikanskih struktur				
		2A (%)	3A (%)	4A (%)	HM6P (%)	S (%)
Nominalna	2	4,351	15,347	76,475	2,295	1,531
5 % koncentrirana	3	4,748	15,246	76,160	2,381	1,464
10 % koncentrirana	3	3,914	15,063	77,263	2,388	1,371
Razlika povprečij (nominalna MFB – 5 % koncentrirana MFB)		0,4 %	0,1 %	0,3 %	0,1 %	0,1%
Razlika povprečij (nominalna MFB – 10 % koncentrirana MFB)		0,4 %	0,3 %	0,8 %	0,1 %	0,2 %
Kriterij sprejemljivosti		$\Delta \leq 0,6 \%$ (absolutno)	$\Delta \leq 2,0 \%$ (absolutno)	$\Delta \leq 4,0 \%$ (absolutno)	$\Delta \leq 0,5 \%$ (absolutno)	$\Delta \leq 0,5 \%$ (absolutno)
Ustreznost		DA	DA	DA	DA	DA

Glede na rezultate, navedene v preglednici XIX, vidimo, da pri uporabi nominalnega pretoka skozi kolono (0,25 mL/min) in bolj koncentrirane mobilne faze B (10 %), dosežemo boljše ločbo 2A vrha in koeluirane rame. Na podlagi zgornjih rezultatov v primeru koelucije 2A vrha kolono spiramo z bolj koncentrirano mobilno fazo B (od 5 % do 10 %) pri pretoku 0,25 mL/min.

Na sliki 10 sta prikazana kromatograma z ustrezno in neustrezno ločbo 2A vrha v odvisnosti od serije kromatografske kolone.



Slika 10: Prikaz kromatogramov z ustrezno in neustrezno ločbo 2A vrha v odvisnosti od serije kromatografske kolone

Z izvedbo številnih eksperimentov smo dokazali, da je HPAEC-PAD metoda robustna za določanje glikanskih struktur in primerna za nadaljnjo izvedbo popolne validacije (*ang. full validation*).

- Testiranje stabilnosti mobilnih faz, pufrov in raztopin za pripravo vzorcev

Za potrjevanje stabilnosti mobilnih faz, pufrov in raztopin za pripravo vzorcev smo uporabili naslednje kriterije sprejemljivosti za vmesno natančnost (*ang. Intermediate precision*):

- Absolutna razlika povprečij med dvema časovnima točkama mora biti:

- Biantenarni glikani: $\Delta \leq 0,6$ % (absolutno).
- Triantenarni glikani: $\Delta \leq 2,0$ % (absolutno).
- Tetraantenarni glikani: $\Delta \leq 4,0$ % (absolutno).
- HM6P: $\Delta \leq 0,5$ % (absolutno).
- S: $\Delta \leq 0,5$ % (absolutno).

Rezultati testiranja stabilnosti 70 % (v/v) acetonitrila/0,1 % (v/v) TFA, 40 % (v/v) acetonitrila/0,1 % (v/v) TFA, končnega pufra za redčenje vzorcev, začetnega pufra za redčenje vzorcev, mobilnih faz pod helijevo atmosfero ter mobilnih faz brez helijeve atmosfere so prikazani v preglednicah od XX do XXIV priloge A.

Na podlagi vseh doseženih kriterijev sprejemljivosti smo potrdili stabilnost pufrov in raztopin za pripravo vzorcev ter mobilnih faz za določeno časovno obdobje ter določili roke uporabnosti za posamezno raztopino. Za 70 % (v/v) acetonitril/0,1 % (v/v) TFA, 40 % (v/v) acetonitril/0,1 % (v/v) TFA, začetni in končni pufer za redčenje vzorcev ter mobilne faze pod helijevo atmosfero smo določili rok uporabnosti 1 mesec, medtem ko smo za mobilne faze brez helijeve atmosfere določili rok uporabnosti 1 teden. Roki uporabnosti posameznih raztopin so navedeni v razpredelnici XXV, ki se nahaja v prilogi A.

4.1.2 Primerjava 4PAD detekcije z 2PAD detekcijo

Da bi dokazali primerljivost detekcije z 2PAD in 4PAD zaporedjem napetostnih pulzov, smo testirali parametre natančnosti sistema in občutljivosti metode.

Da bi dokazali primerljivo natančnost sistema 2PAD detekcije v primerjavi s 4PAD, smo analizirali vzorce referenčne substance (RS) z nominalno koncentracijo (0,50 mg/mL) v šestih paralelkah, pri čemer so morali biti izpolnjeni naslednji kriteriji sprejemljivosti za natančnost sistema:

- Za glikanske strukture z deležem površin $< 5 \%$ mora biti RSD ($n = 6$) $\leq 5 \%$.
- Za glikanske strukture z deležem površin $\geq 5 \%$ mora biti RSD ($n = 6$) $\leq 3 \%$.

Rezultati natančnosti sistema so prikazani v preglednicah od XXVI do XXIX, ki se nahajajo v prilogi B. Iz rezultatov v preglednicah od XXVI do XXIX je razvidno, da je tako pri 2PAD kot tudi 4PAD detekciji RSD pri vseh glikanskih strukturah z deležem površin $< 5 \%$ (3A(1-4), 3A1R, 3A2R, HM6P in S) $\leq 5 \%$ ter pri vseh glikanskih strukturah z deležem površin $\geq 5 \%$ (2A, 3A(1-6), 4A, 4A1R in 4A2R) $\leq 3 \%$, kar pomeni, da so izpolnjeni vsi kriteriji sprejemljivosti za natančnost sistema in da sta 2PAD in 4PAD detekcija primerljivi po validacijskem kriteriju natančnost sistema.

Za določitev občutljivosti 2PAD in 4PAD detekcije smo z zmanjševanjem nanosa vzorca na kolono preko postopnega zmanjševanja volumna injiciranja referenčne substance s koncentracijo 0,5 mg/mL (RS 0,5 mg/mL) primerjalno določili LOQ za vrh HM6P. Rezultati določanja LOQ so prikazani v preglednici XXX priloge B. LOQ smo določili na podlagi kriterija $S/N \geq 10$ za glikansko strukturo HM6P, kar je ustrezalo 1 μ L nanosa na kolono (RS 0,5 mg/mL_4) tako pri 4PAD kot tudi 2PAD detekciji, kar kaže na primerljivo občutljivost 2PAD in 4PAD detekcije.

Dobljeni rezultati kažejo na primerljivo natančnost in občutljivost 4PAD in 2PAD detekcije. Nadomestitev štiri-pulzne napetostne sekvence z dvo-pulzno napetostno sekvenco bi dolgoročno pomenila zmanjšano odtapljanje Au elektrode z eliminacijo tvorbe oksida in naknadne redukcije le-tega. Nadalje uporaba 2PAD sekvence rezultira v povečani frekvenci vzorčenja podatkov in s tem predstavlja dobro osnovo za vpeljavo kapilarnih sistemov. Za dokončno nadomestitev 4PAD detekcije z 2PAD detekcijo bi bila potrebna validacija in potrditev celotnega spektra validacijskih parametrov.

4.2 VALIDACIJA HPAEC-PAD METODE

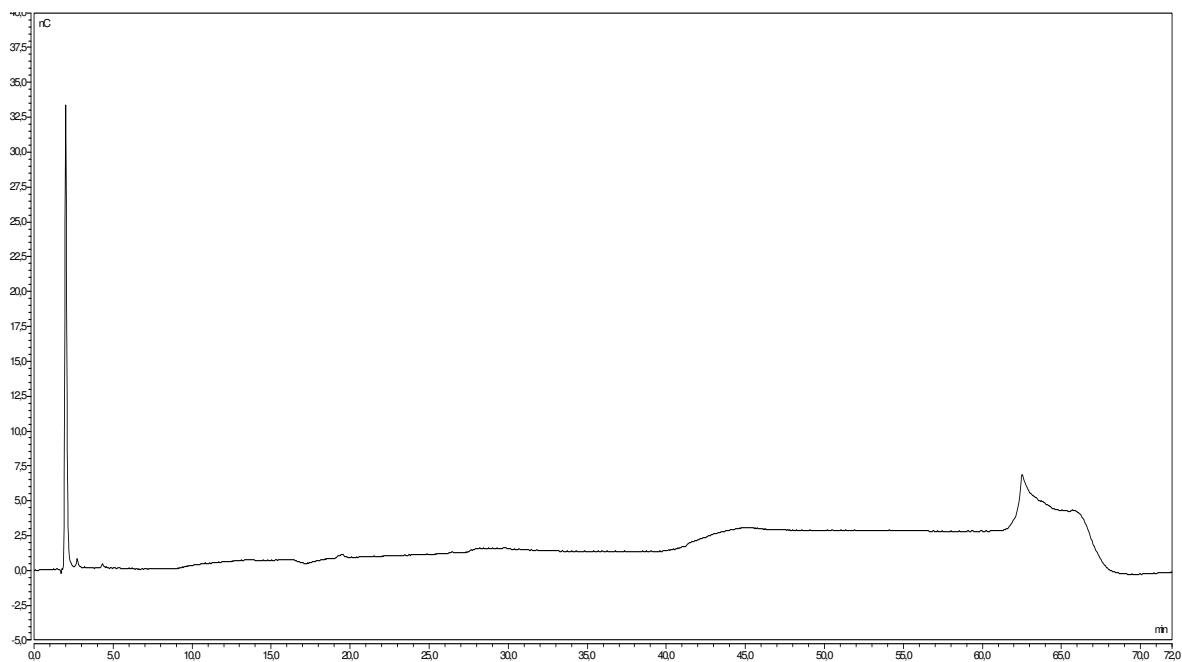
Namen validacije HPAEC-PAD metode je dokazati, da je analitska metoda dovolj občutljiva, specifična in natančna, da omogoča zanesljivo in točno določanje glikanskih struktur.

4.2.1 Specifičnost in selektivnost

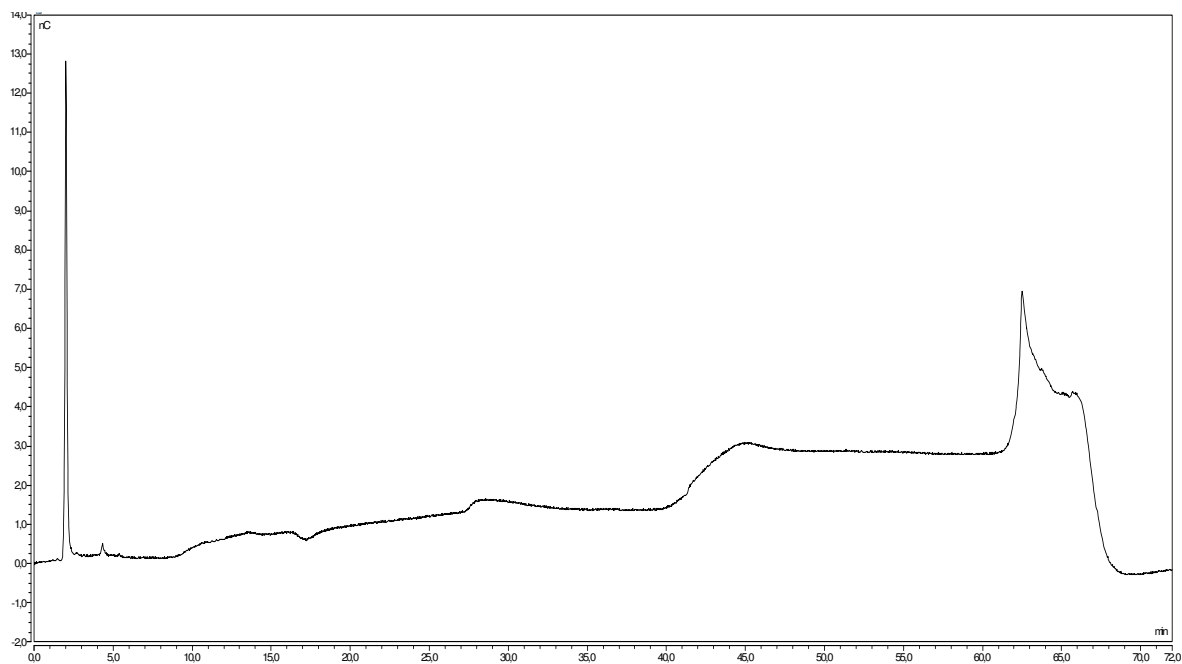
Da bi dokazali specifičnost analitske metode, smo morali doseči naslednje kriterije sprejemljivosti:

- V kromatogramu matriksa (končni pufer za redčenje vzorcev in mobilna faza A) ni prisotnih vrhov, ki se eluirajo v območju glikanskih struktur (slika 11 in 12).
- Kromatografski profil vzorca aktivne učinkovine (DS vzorec) je primerljiv s kromatografskim profilom referenčne substance (RS) (slika 13).
- Razlika v retencijskem času (RT) posamezne glikanske strukture (2A, 3A(1-4), 3A(1-6), 4A, 3A1R, 4A1R, 3A2R, 4A2R, HM6P in S) v referenčni substanci in DS vzorcu ni večja od $\pm 0,5$ minute (preglednica XXXI priloge C).
- Retencijski čas HM6P glikanske strukture v DS vzorcu in HM6P standardu se ne razlikuje za več kot $\pm 0,5$ minute (preglednica XXXII priloge C).
- Vzorec aktivne učinkovine, združen s HM6P standardom, potrjuje retencijski čas HM6P glikanske strukture v DS vzorcu (preglednica XXXIII priloge C, sliki 14 in 15).
- Razmerje vrha proti dolini (*ang. peak-to-valley*) med vrhovoma HM6P in S v DS vzorcu je $\geq 2,2$ (preglednica XXXIV priloge C).

Sliki 11 in 12 prikazujeta kromatogram končnega pufru za redčenje vzorcev in kromatogram mobilne faze A. Pri nobenem od kromatogramov ni bilo prisotnih vrhov, ki se eluirajo v območju glikanskih struktur, kar ustreza kriteriju sprejemljivosti za specifičnost analitske metode.

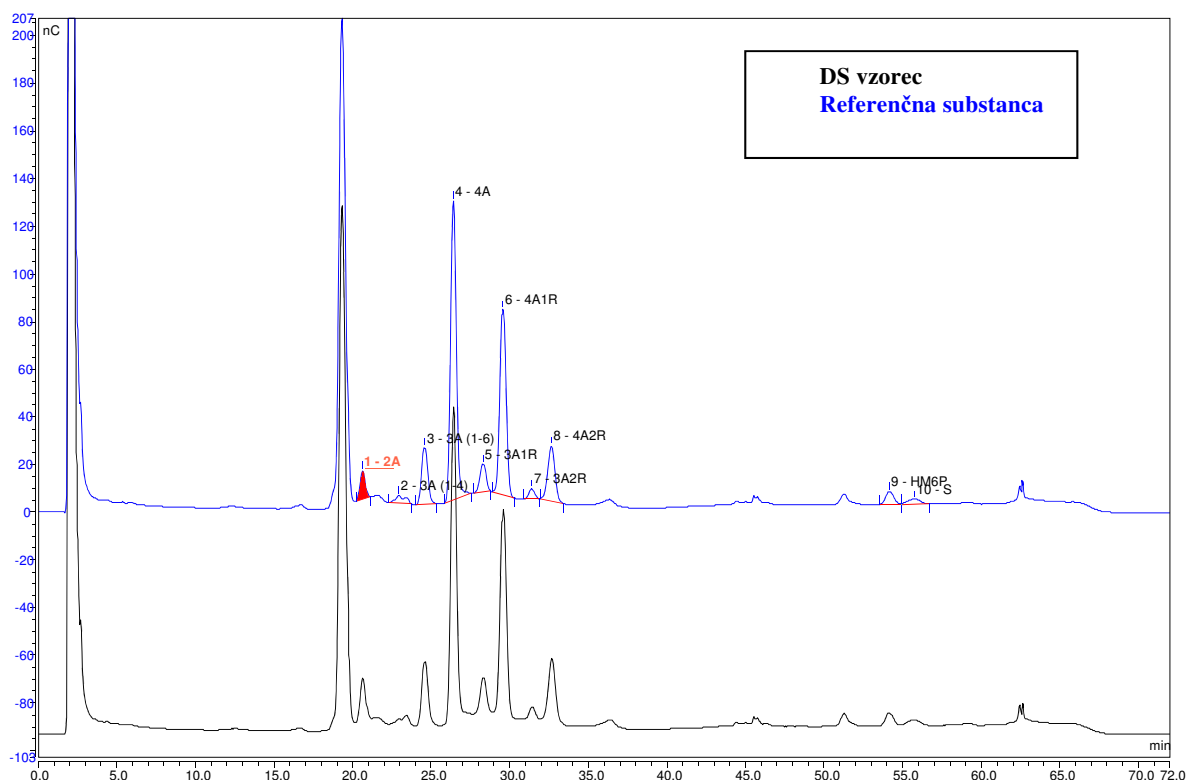


Slika 11: Prikaz kromatograma končnega pufra za redčenje vzorcev



Slika 12: Prikaz kromatograma mobilne faze A

Slika 13 prikazuje kromatografski profil DS vzorca in referenčne substance, pri čemer vidimo, da je kromatografski profil obeh vzorcev popolnoma primerljiv. Vsaka posamezna glikanska struktura (2A, 3A(1-4), 3A(1-6), 4A, 3A1R, 4A1R, 3A2R, 4A2R, HM6P in S) se v DS vzorcu in referenčni substanci eluira pri zelo primerljivih retencijskih časih, kar ustreza kriteriju sprejemljivosti za specifičnost analitske metode.



Slika 13: Prikaz kromatogramov DS vzorca in referenčne substance

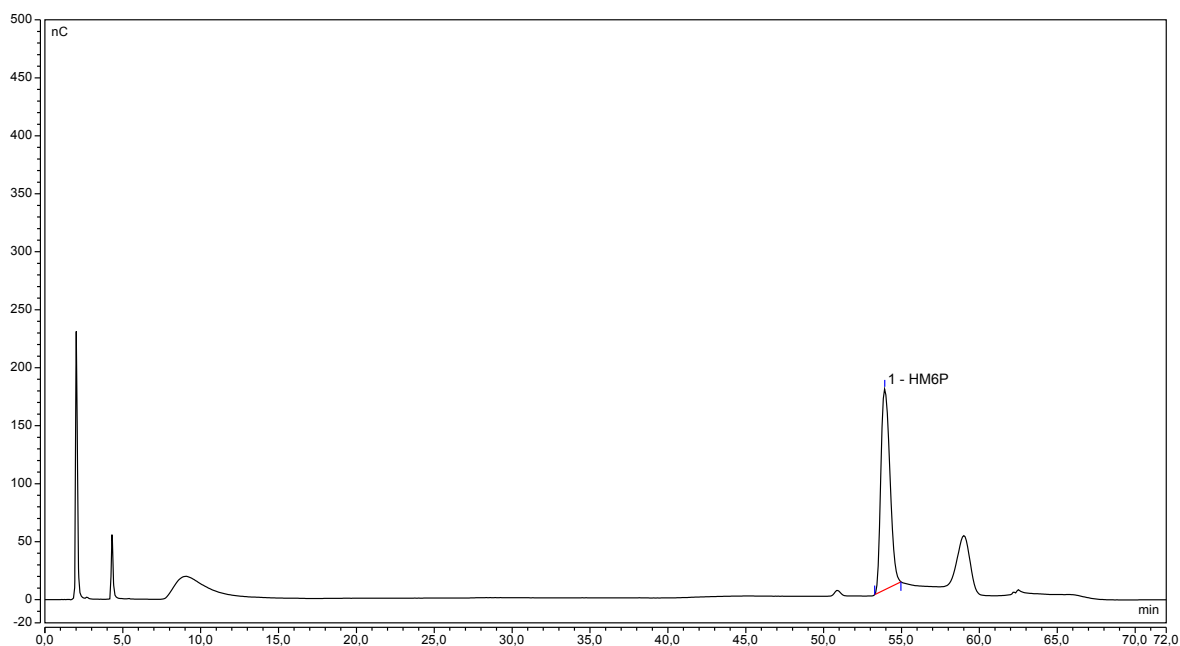
Razlike v retencijskem času (RT) posamezne glikanske strukture v referenčni substanci in DS vzorcu so prikazane v preglednici XXXI priloge C. Iz rezultatov v preglednici vidimo, da je bila največja razlika v RT pri 3A(1-4) vrhu (0,4 minute), medtem ko so bile razlike v RT vseh ostalih glikanskih struktur 0,0 minute. Vsi rezultati v preglednici XXXI ustrezajo kriteriju sprejemljivosti ($\Delta RT = \pm 0,5$ minute) za specifičnost metode.

Retencijska časa HM6P glikanske strukture v DS vzorcu in HM6P standardu sta prikazana v preglednici XXXII priloge C, pri čemer je razlika v retencijskih časih 0,2 minute, kar ustreza kriteriju sprejemljivosti, da razlika ne sme biti večja od $\pm 0,5$ minute.

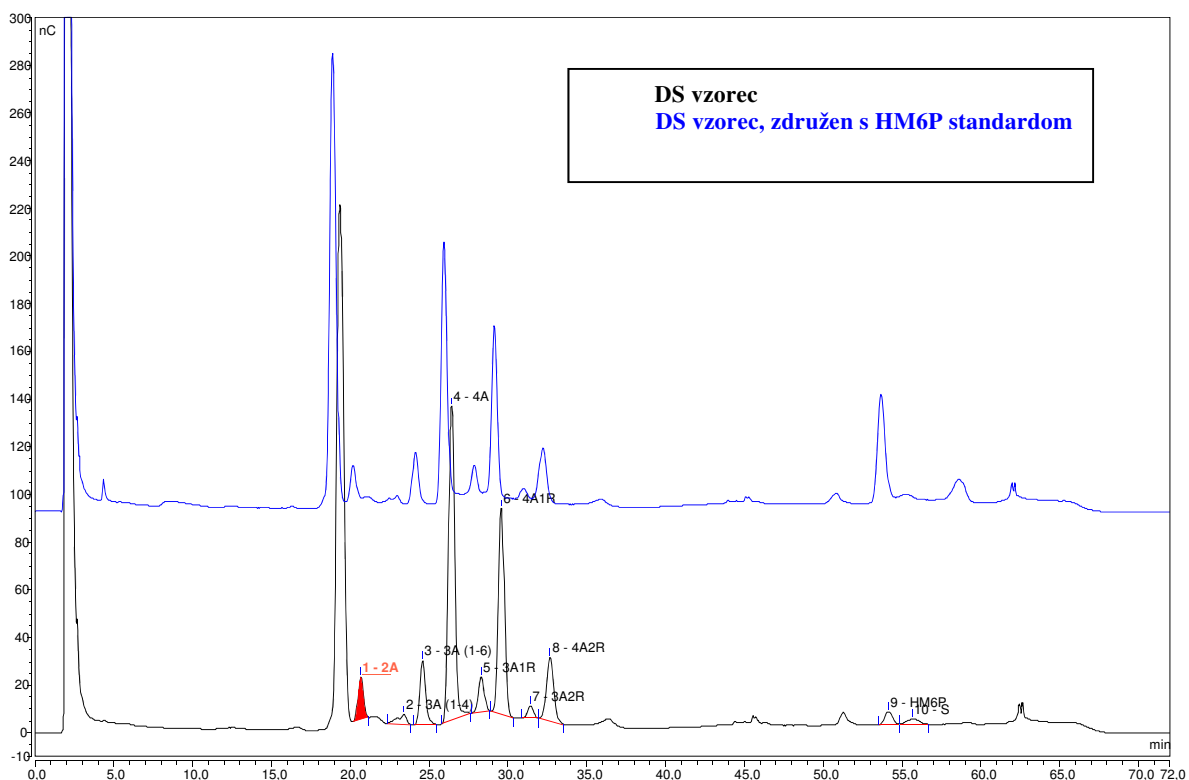
Retencijska časa HM6P glikanske strukture v HM6P standardu in DS vzorcu, združenem s HM6P standardom sta prikazana v preglednici XXXIII priloge C. Razlika v retencijskih časih je 0,3 minute, kar prav tako ustreza kriteriju sprejemljivosti, da razlika ne sme biti večja od $\pm 0,5$ minute.

Sliki 14 in 15 prikazujeta kromatograme HM6P standarda, DS vzorca in DS vzorca, združenega s HM6P standardom, pri čemer vidimo, da se HM6P glikanska struktura pri vseh treh vzorci eluirajo pri zelo primerljivih retencijskih časih.

Iz rezultatov v preglednici XXXIII, ki se nahaja v prilogi C in kromatogramov na sliki 14 ter 15 vidimo, da DS vzorec, združen s HM6P standardom potrjuje retencijski čas HM6P glikanske strukture v DS vzorcu.



Slika 14: Prikaz kromatograma HM6P standarda



Slika 15: Prikaz kromatogramov DS vzorca in DS vzorca, združenega s HM6P standardom

Razmerje vrha proti dolini (*ang. peak-to-valley, p/v*) med HM6P in S glikansko strukturo v DS vzorcu prikazuje preglednica XXXIV, ki se nahaja v prilogi C. P/v razmerje med HM6P in S vrhom je 6,9, kar ustreza kriteriju sprejemljivosti, da mora biti razmerje $p/v \geq 2,2$.

Iz kromatogramov (slike 12 – 15) in preglednic od XXV do XXVIII, ki se nahajajo v prilogi C, je razvidno, da so bili doseženi vsi kriteriji sprejemljivosti za specifičnost, kar pomeni, da je HPAEC-PAD metoda specifična za določanje glikanskih struktur.

4.2.2 Meja določljivosti (LOQ)

LOQ smo določali z zmanjševanjem nanosa vzorca na kolono preko postopnega zmanjševanja volumna injiciranja referenčne substance s koncentracijo 0,5 mg/mL (RS 0,5 mg/mL). Rezultati določanja LOQ so prikazani v preglednici XXXV priloge D.

LOQ smo določili na podlagi kriterija $S/N \geq 10$ za glikanski strukturi HM6P in S, kar je ustrezalo 1 μ L nanosa na kolono (RS 0,5 mg/mL₅).

Določeno vrednost LOQ smo nato še potrdili. Za potrjevanje LOQ smo pripravili raztopino referenčne substance s koncentracijo, ki je ustrezala 1 μ L nanosa na kolono ($c = 0,05$ mg/mL) in jo injicirali šestkrat.

Za potrditev LOQ sta morala biti izpolnjena naslednja kriterija sprejemljivosti:

- RSD šestih določitev površine HM6P in S vrhov mora biti ≤ 30 %.
- S/N za posamezno injiciranje (šest injiciranj) HM6P in S vrhov mora biti $\geq 10:1$.

Rezultati S/N razmerja in površin za HM6P ter S glikanski strukturi vsakega posameznega injiciranja so prikazani v preglednici XXXVI priloge D. Iz rezultatov v preglednici XXXVI je razvidno, da je RSD šestih določitev površine HM6P in S vrhov ≤ 30 % in da je S/N razmerje za posamezno injiciranje HM6P in S vrhov $\geq 10:1$, kar pomeni, da so bili doseženi vsi kriteriji sprejemljivosti za LOQ.

LOQ smo nato preračunali iz minimalne integrirane površine HM6P in S vrhov glede na enačbo 4, pri čemer smo upoštevali povprečje površin šestih injiciranj HM6P in S glikanske strukture. Površina vseh glikanskih struktur pri 100 % delavnem območju je bila 144,78 nC*min.

Izračunan LOQ za HM6P in S glikanski strukturi:

- 0,3 % površine za HM6P vrh
- 0,2 % površine za S vrh.

Za HPAEC-PAD metodo smo potrdili mejo določljivosti (0,3 % površine za HM6P in 0,2 % površine za S vrh), s katero lahko metoda z ustrezno natančnostjo in točnostjo kvantitativno ovrednoti glikanske strukture.

4.2.3 Linearnost

Linearnost HPAEC-PAD metode smo določali v območju od 60 % do 140 % nominalnega nanosa ($c = 0,5 \text{ mg/mL}$) referenčne substance za vsako posamezno glikansko strukturo (2A, 3A(1-4), 3A(1-6), 4A, 3A1R, 4A1R, 3A2R, 4A2R, HM6P in S).

V preglednicah XXXVII in XXXVIII, ki se nahajata v prilogi E, so prikazani deleži (od 60 % do 140 %) nominalne koncentracije referenčne substance ter površine vrhov posameznih glikanskih struktur, na podlagi katerih smo z linearnim regresijskim modelom in z uporabo podatkovnega sistema Chromeleon 7.2, Thermo Fisher Scientific (ZDA), določili enačbo linearne funkcije ($y = ax + b$) za vsako posamezno glikansko strukturo. Enačbe linearne funkcije za vsako posamezno glikansko strukturo so navedene v preglednici XXXIX priloge E.

Za vsako posamezno glikansko strukturo smo prav tako določili odsek na y-osi, naklon krivulje, vsoto kvadratov ostankov, korelacijski koeficient (R), izračunano površino vrha pri $x = 100 \%$ in absolutni odsek na y-osi pri $x = 100 \%$, pri čemer sta morala biti za potrditev linearnosti metode dosežena naslednja kriterija sprejemljivosti:

- Korelacijski koeficient (R) za vse glikanske strukture mora biti $\geq 0,99$.
- Absolutni odsek na y-osi za $x = 100 \%$ mora biti za vse glikanske strukture $\leq 12 \%$.

Na podlagi rezultatov linearne regresije za posamezno glikansko strukturo, zbranih v preglednici XL priloge E, je razvidno, da sta izpolnjena oba kriterija sprejemljivosti za linearnost metode (za vsako posamezno glikansko strukturo je $R \geq 0,99$ in absolutni odsek na y-osi $\leq 12 \%$), kar pomeni, da je metoda HPAEC-PAD linearna v delovnem območju od 60 % do 140 % nominalne koncentracije $0,5 \text{ mg/mL}$.

4.2.4 Natančnost

Natančnost metode smo ovrednotili s testiranjem natančnosti sistema, natančnosti metode (ponovljivost) in vmesne natančnosti.

- Natančnost sistema

Da bi dokazali natančnost sistema, smo pripravili dve referenčni substanci, ju združili in injicirali šestkrat, pri čemer sta morala biti izpolnjena dva kriterija sprejemljivosti:

- Za glikanske strukture z deležem površin $< 5\%$ mora biti RSD ($n = 6$) $\leq 5\%$.
- Za glikanske strukture z deležem površin $\geq 5\%$ mora biti RSD ($n = 6$) $\leq 3\%$.

Rezultati natančnosti sistema za glikanske strukture z deležem površin $< 5\%$ in $\geq 5\%$ so prikazani v preglednicah XLI in XLII priloge F. Iz rezultatov v preglednicah XLI in XLII je razvidno, da je RSD pri vseh glikanskih strukturah z deležem površin $< 5\%$ (2A, 3A(1-4), 3A1R, 3A2R, HM6P in S) $\leq 5\%$ ter pri vseh glikanskih strukturah z deležem površin $\geq 5\%$ (3A(1-6), 4A, 4A1R in 4A2R) $\leq 3\%$, kar pomeni, da je metoda HPAEC-PAD primerna za uporabo v smislu natančnosti sistema.

- Natančnost metode (ponovljivost)

Da bi dokazali natančnost metode, smo analizirali DS vzorce različnih koncentracij ($c_1 = 0,35$ mg/mL, $c_2 = 0,50$ mg/mL, $c_3 = 0,65$ mg/mL) v šestih paralelkah, pri čemer so morali biti izpolnjeni naslednji kriteriji sprejemljivosti:

- Za glikanske strukture z deležem površin $< 5\%$ mora biti RSD ($n = 6$) $\leq 10\%$.
- Za glikanske strukture z deležem površin $\geq 5\%$ mora biti RSD ($n = 6$) $\leq 5\%$.
- Za potrditev najnižjega območja metode mora biti za vsako posamezno injiciranje razmerje $S/N \geq 10:1$ za HM6P vrh na LOQ nivoju DS vzorca s koncentracijo 0,35 mg/mL.

V preglednicah od XLIII do XLVIII, ki se nahajajo v prilogi F, so prikazani rezultati za natančnost metode za DS vzorec s koncentracijo 0,35 mg/mL, 0,50 mg/ml in 0,65 mg/mL za glikanske strukture z deležem površin $< 5\%$ (3A(1-4), 3A1R, 3A2R, HM6P in S) ter glikanske strukture z deležem površin $\geq 5\%$ (2A, 3A(1-6), 4A, 4A1R in 4A2R). V preglednicah so prikazane RSD vrednosti in 95 % interval zaupanja povprečnih deležev površin posameznih glikanskih struktur. Iz rezultatov je razvidno, da je RSD $\leq 10\%$ za vse glikanske strukture z deležem površin $< 5\%$ ter $\leq 5\%$ za vse glikanske strukture z deležem

površin ≥ 5 %, kar ustreza kriterijem sprejemljivosti za natančnost metode oziroma ponovljivost.

Za potrjevanje najnižjega območja metode so rezultati prikazani v preglednici XLIX, ki se nahaja v prilogi F. Iz tabele je razvidno, da je S/N razmerje za HM6P vrh na LOQ nivoju DS vzorca s koncentracijo 0,35 mg/mL za vsako posamezno injiciranje $\geq 10:1$, kar prav tako ustreza kriteriju sprejemljivosti za ponovljivost.

Izpolnjeni so bili vsi kriteriji sprejemljivosti za natančnost metode, kar pomeni, da lahko potrdimo natančnost, oziroma ponovljivost HPAEC-PAD metode.

- **Vmesna natančnost**

V sklopu vmesne natančnosti smo drugi dan z drugo serijsko številko kromatografske kolone in drugim operaterjem ponovili analizo natančnosti metode. Analizirali smo DS vzorec s koncentracijo 0,5 mg/mL v šestih paralelkah, pri čemer je bilo potrebno doseči naslednje kriterije sprejemljivosti:

- Doseženi morajo biti kriteriji sprejemljivosti za natančnost metode:
 - Za glikanske strukture z deležem površin < 5 % mora biti RSD ($n = 6$) ≤ 10 %.
 - Za glikanske strukture z deležem površin ≥ 5 % mora biti RSD ($n = 6$) ≤ 5 %.
- Absolutna razlika povprečij med rezultati, dobljenimi z dvema operaterjema v dveh različnih dneh mora biti:
 - Biantenarni glikani: $\Delta \leq 0,6$ % (absolutno).
 - Triantenarni glikani: $\Delta \leq 2,0$ % (absolutno).
 - Tetraantenarni glikani: $\Delta \leq 4,0$ % (absolutno).
 - HM6P: $\Delta \leq 0,5$ % (absolutno).
 - S: $\Delta \leq 0,5$ % (absolutno).

V preglednicah L in LI, ki se nahajata v prilogi F, so prikazani rezultati vmesne natančnosti za DS vzorec s koncentracijo 0,50 mg/mL, pridobljeni s strani drugega operaterja. Rezultati prikazujejo RSD vrednosti za posamezne glikanske strukture z deležem površin < 5 % (3A(1-4), 3A1R, 3A2R, HM6P in S) ter glikanske strukture z deležem površin ≥ 5 % (2A, 3A(1-6), 4A, 4A1R in 4A2R). Iz rezultatov je razvidno, da je RSD ≤ 10 % za vse glikanske strukture z deležem površin < 5 % ter ≤ 5 % za vse glikanske strukture z deležem površin ≥ 5 %, kar ustreza kriterijem sprejemljivosti za natančnost metode.

Prav tako smo določili povprečne vrednosti deleža površin (*ang. % area*) posameznih glikanskih skupin (2A, 3A, 4A, HM6P in S) za vsakega operaterja posebej ter izračunali (skladno z enačbo 8) absolutne razlike med njima, kar je prikazano v preglednici LII, ki se nahaja v prilogi F. Iz rezultatov je razvidno, da so vse razlike znotraj kriterijev sprejemljivosti za vmesno natančnost.

Doseženi so bili vsi kriteriji sprejemljivosti za vmesno natančnost, kar pomeni, da je HPAEC-PAD metoda natančna in neodvisna od osebe ter dneva priprave.

Doseženi so bili vsi kriteriji sprejemljivosti za vse nivoje natančnosti (natančnost sistema, natančnost metode in vmesna natančnost), kar pomeni, da je HPAEC-PAD metoda z vidika natančnosti ustrezna za določanje relativnega deleža posameznih glikanskih struktur in spremljanje čistosti oziroma prisotnosti nečistot v terapevtskem proteinu.

4.2.5 Točnost

Točnost analitske metode smo ovrednotili na podlagi rezultatov za specifičnost, linearnost, LOQ in natančnost metode (*ang. Method precision*). Točnost analitske metode smo potrdili z doseganjem vseh kriterijev sprejemljivosti prej naštetih validacijskih parametrov.

Rezultati validacijskih parametrov, na podlagi katerih smo ovrednotili točnost HPAEC-PAD metode so prikazani v preglednici LIII, ki se nahaja v prilogi G. Na podlagi doseženih kriterijev sprejemljivosti za specifičnost, linearnost, LOQ in natančnost metode, smo potrdili, da HPAEC-PAD metoda daje točne rezultate v delovnem območju od 70 % do 130 % nominalne koncentracije 0,5 mg/mL.

4.2.6 Območje

Območje analitske metode smo ovrednotili na podlagi rezultatov za linearnost in natančnost metode (*ang. Method Precision*). Območje analitske metode smo določili kot interval, znotraj katerega so bili doseženi kriteriji sprejemljivosti za prej omenjena validacijska parametra.

Rezultati validacijskih parametrov, na podlagi katerih smo ovrednotili območje HPAEC-PAD metode, so prikazani v preglednici LIV, ki se nahaja v prilogi G. Na podlagi doseženih kriterijev sprejemljivosti za linearnost in natančnost metode je bilo za HPAEC-PAD metodo določeno območje od 70 % do 130 % nominalne koncentracije 0,5 mg/mL.

4.2.7 Stabilnost vzorčnih raztopin

Stabilnost vzorčnih raztopin pri 2–8 °C smo potrjevali v treh časovnih točkah, pri čemer smo iste vzorce analizirali ob t_0 , po 5 dneh (t_1), 7 dneh (t_2) in 10 dneh (t_3).

Za potrjevanje stabilnosti vzorčnih raztopin smo uporabili naslednje kriterije sprejemljivosti za vmesno natančnost (*ang. Intermediate precision*):

- Absolutna razlika povprečij med dvema časovnima točkama mora biti:
 - Biantenarni glikani: $\Delta \leq 0,6$ % (absolutno).
 - Triantenarni glikani: $\Delta \leq 2,0$ % (absolutno).
 - Tetraantenarni glikani: $\Delta \leq 4,0$ % (absolutno).
 - HM6P: $\Delta \leq 0,5$ % (absolutno).
 - S: $\Delta \leq 0,5$ % (absolutno).

V preglednicah LV in LVI, ki se nahajajo v prilogi H, so prikazani rezultati testiranja stabilnosti referenčne substance in DS vzorca. Iz rezultatov je razvidno, da so bili doseženi vsi kriteriji sprejemljivosti za stabilnost in vmesno natančnost. Potrjena je bila vsaj 10 dnevna stabilnost vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku ionskega kromatografskega sistema pri 2–8 °C.

5 SKLEP

V okviru optimizacije in validacije HPAEC-PAD metode smo med raziskovalnim delom prišli do naslednjih zaključkov:

1. Optimizacija HPAEC-PAD metode

- Robustnost metode:

- Testiranje faktorjev, ki vplivajo na pripravo vzorcev:

Pri testiranju šestih različnih faktorjev, ki vplivajo na pripravo vzorcev (čas in temperatura deglikozilacije, čas in temperatura desialilacije, količina dodane glikozidaze in količina dodane sialidaze), smo ugotovili, da imajo faktorji, ki so se sicer izkazali kot statistično pomembni, zanemarljiv vpliv na poročan delež posameznih glikanskih struktur znotraj preddefiniranih specifikacij aktivne učinkovine, kar pomeni, da je HPAEC-PAD metoda za določanje glikanskih struktur v aktivni učinkovini robustna v smislu priprave vzorcev.

- Testiranje različnih kromatografskih pogojev:

V okviru testiranja različnih kromatografskih pogojev (kontrolirana/nekontrolirana temperatura detektorja, različen pretok mobilne faze skozi kolono, različna sestava mobilne faze B in različna serijska številka kromatografske kolone), smo ugotovili, da sicer statistično pomembni faktorji ne predstavljajo tveganja za določanje glikanskih struktur, z izjemo serijske številke kromatografske kolone. Ugotovili smo, da je elucija 2A glikanske strukture močno odvisna od serije kromatografske kolone, zato je potrebno pri prvi uporabi kolone preveriti ustrezno ločbo 2A vrha in le-to zagotoviti z modificirano sestavo mobilne faze B (uporaba nominalnega pretoka skozi kolono (0.25 ml/min) in bolj koncentrirana mobilna faza B).

- Testiranje stabilnosti mobilnih faz, pufrov in raztopin za pripravo vzorcev:

Dokazali smo enomesečno stabilnost za 70 % (v/v) acetonitril/0,1 % (v/v) TFA, 40 % (v/v) acetonitril/0,1 % (v/v) TFA, začetni in končni pufer za redčenje vzorcev in za mobilne faze pod helijevo atmosfero ter enotedensko stabilnost za mobilne faze brez helijeve atmosfere.

V okviru testiranja robustnosti smo potrdili, da je HPAEC-PAD metoda robustna za določanje glikanskih struktur in tako primerna za izvedbo popolne validacije (*ang. full validation*).

- **Primerjava 4PAD detekcije z 2PAD detekcijo:**

Med optimizacijo metode smo nadalje primerjali 4PAD in 2PAD detekcijo, pri čemer smo ugotovili, da dobljeni rezultati kažejo na primerljivo natančnost in občutljivost 4PAD in 2PAD detekcije. Z uvedbo 2PAD detekcije bi zmanjšali število napetostnih pulzov, s čimer bi eliminirali oksidacijski potencial, ki povzroča nastajanje neaktivnega oksida in naknadno redukcijo le-tega in posledično korozijo elektrode. Z zmanjšanjem števila napetostnih pulzov bi z 2PAD detekcijo povečali frekvenco vzorčenja podatkov, kar je bistvenega pomena za mikroanalitske metode in kapilarne sisteme, ki bodo v bodoče ključni za določanje ogljikovih hidratov. Z mikroanalitskimi metodami bomo namreč skrajšali čas analiziranja vzorcev, zmanjšali količino potrebnega vzorca in reagentov ter količino odpadnih snovi. Za popolno nadomestitev 4PAD detekcije z 2PAD detekcijo pa bi bila potrebna validacija in potrditev celotnega spektra validacijskih parametrov.

2. Validacija HPAEC-PAD metode

- Na podlagi rezultatov validacije smo prišli do zaključka, da je HPAEC-PAD metoda točna, natančna, specifična, selektivna in linearna v delovnem območju od 0,3 mg/mL do 0,7 mg/mL.
- Meja določljivosti, s katero lahko HPAEC-PAD metoda kvantitativno ovrednoti glikanske strukture z ustrežno natančnostjo in točnostjo, je 0,3 % površine za HM6P vrh in 0,2 % površine za S vrh.
- Pri testiranju stabilnosti vzorčnih raztopin smo dokazali vsaj 10 dnevno stabilnost vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku ionskega kromatografskega sistema pri 2–8 °C.

6 LITERATURA

1. Kumar R, Singh J: Biosimilar drugs: Current status. *International Journal of Applied and Basic Medical Research* 2014; 4: 63–66.
2. Štrukelj B, Kos J: *Biološka zdravila: od gena do učinkovine (prva izdaja)*. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 4–24.
3. Štrukelj B, Kos J, Jeras M, Kocbek P, Bratkovič T, Marušič AP, Laptoš T: *Biološka zdravila, Spletni učbenik za študente farmacije*. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2015: 9–13.
4. Stryjewska A, Kiepusa K, Librowski T, Lochyński S: Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. *Pharmacological Reports* 2013; 65: 1075–1085.
5. Bhopale GM, Nanda RK: Recombinant DNA expression products for human therapeutic use. *Current Science* 2005; 89: 614–622.
6. Dabhale MP: Recent Innovations in Therapeutic Recombinant Protein. *Pharma Bio World* 2014; 12: 10–18.
7. Novak-Štagoj M, Podobnik M: Kvasovke – tovarne rekombinantnih proteinov. *Farmaceutski vestnik* 2006; 4: 235–240.
8. Demain AL, Vaishnav P: Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*. 2009; 27: 297–306.
9. Shah DK: Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations for the next generation protein therapeutics. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics* 2015; 42: 553–571.
10. Russel CS, Clarke LA: Recombinant proteins for genetic disease. *Clinical Genetics* 1999; 55: 389–94.
11. Malerba F, Paoletti F, Capsoni S, Cattaneo A: Intranasal delivery of therapeutic proteins for neurological diseases. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2011; 8: 1277–96.
12. Alten R, Cronstein BN: Clinical trial development for biosimilars. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2015; 44: 2–8.
13. Sandoz, A Novartis Division. Development of Biosimilars.
<https://www.sandoz.com/our-work/biopharmaceuticals/development-biosimilars>
(dostopano 24. 12. 2016)
14. Undela K: Biogenerics or Biosimilars: An overview of the current situation in India. *International Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences* 2011; 1: 1–10.

15. Nefarma. Biopharmaceuticals and biosimilars.
www.nefarma.nl/stream/com-biologicals-and-biosimilars (dostopano 27. 12. 2016)
16. RCSB Protein Data Bank. Crystal structure of human erythropoietin complexed to its receptor at 1.9 angstroms.
<https://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1EER&bionumber=1&jmolMode=HTML5> (dostopano 23. 07. 2017)
17. DrugBank. Acetylsalicylic acid.
<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00945> (dostopano 23. 07. 2017)
18. Hermeling S, Crommelin DJ, Schellekens H, Jiskoot W: Structure-Immunogenicity Relationships of Therapeutic Proteins. *Pharmaceutical Research* 2004; 21: 897–903.
19. Particle Sciences. Protein Structure.
<http://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2009/protein-structure.html>
(dostopano 30. 12. 2016)
20. Scitable by nature education. Essentials of Cell Biology. Unit 2: How Do Cells Decode Genetic Information into Functional Proteins? The Functions of Proteins Are Determined by Their Three-Dimensional Structures.
<http://www.nature.com/scitable/ebooks/essentials-of-cell-biology-14749010/122996920> (dostopano 30. 12. 2016)
21. Thermo Fisher Scientific. Overview of Crosslinking and Protein Modification.
<https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-crosslinking-protein-modification.html> (dostopano 30. 12. 2016)
22. Introduction to Chemistry: General, Organic and Biological. Chapter 18: Amino Acids, Proteins, and Enzymes.
<http://2012books.lardbucket.org/pdfs/introduction-to-chemistry-general-organic-and-biological/s21-amino-acids-proteins-and-enzym.pdf> (dostopano 30. 12. 2016)
23. Jenkins N, Murphy L, Tyther R: Post-translational Modifications of Recombinant Proteins: Significance for Biopharmaceuticals. *Molecular Biotechnology* 2008; 39: 113–118.
24. Khoury GA, Baliban RC, Floudas CA: Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Scientific Reports* 2011; 1: 1–5.
25. Thermo Fisher Scientific. Overview of Post-Translational Modifications (PTMs).

- <https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-post-translational-modification.html> (dostopano 02. 01. 2017)
26. Yale School of Medicine. Proteomics: Technologies: Post Translational Modifications (PTMs).
<http://keck.med.yale.edu/proteomics/technologies/posttransmodifications/> (dostopano 02. 01. 2017)
 27. Berkowitz SA, Engen JR, Mazzeo JR, Jones GB: Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars. *Nature reviews Drug discovery* 2012; 11: 527–540.
 28. Roth Z, Yehezkel G, Khalaila I: Review Article Identification and Quantification of Protein Glycosylation. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* 2012; 2012: 1–10.
 29. Thermo Fisher Scientific. Guide to Glycan Analysis.
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/BR63722_Glycans_0713S_medium.pdf (dostopano 17. 02. 2017)
 30. Li H, d'Anjou M: Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology* 2009; 20: 678–684.
 31. Thermo Fisher Scientific. Protein Glycosylation.
<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> (dostopano 17. 02. 2017)
 32. Butler M: Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. *Cytotechnology* 2006; 50: 57–76.
 33. Sigma-Aldrich. O-Glycans.
<http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/biology/Glycobiology/glycobiology-pdf/o-glycans.pdf> (dostopano 18. 02. 2017)
 34. Brockhausen I, Schachter H, Stanley P: Chapter 9: O-GalNAc Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors: *Essentials of Glycobiology*, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2009.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1896/> (dostopano 18. 02. 2017)

35. Genetic Engineering & Biotechnology News. Cultivating the Glycome to Improve Therapeutics.
<http://www.genengnews.com/print/34186?page=1> (dostopano 19. 02. 2017)
36. Sigma-Aldrich. Sialic Acid.
<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/learning-center/biofiles/biofiles-5-1/sialic-acid-synthesis.html> (dostopano 19. 02. 2017)
37. Wang B, Brand-Miller J: The role and potential of sialic acid in human nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition* 2003; 57: 1351–1369.
38. Kuriakose A, Chirmule N, Nair P: Immunogenicity of Biotherapeutics: Causes and Association with Posttranslational Modifications. *Journal of Immunology Research* 2016; 2016: 1–18.
39. Singh SK: Impact of product-related factors on immunogenicity of biotherapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011; 100: 354–387.
40. European Medicines Agency. Guideline on Immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/10/WC500194507.pdf (dostopano 27. 02. 2017)
41. Ghaderi D, Zhang M, Hurtado-Ziola N, Varki A: Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 2012; 28: 147–176.
42. Yu C, Gao K, Zhu L, Wang W, Wang L, Zhang F, Liu C, Li M, Wormald MR, Rudd PM, Wang J: At least two Fc Neu5Gc residues of monoclonal antibodies are required for binding to anti-Neu5Gc antibody. *Scientific Reports* 2016; 7: 1–10.
43. Bertozzi CR, Freeze HH, Varki A, Esko JD: Chapter 51: Glycans in Biotechnology and the Pharmaceutical Industry. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors: *Essentials of Glycobiology*, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2009.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1895/> (dostopano 27. 02. 2017)
44. Sasaki GL, de Souza LM: Chapter 4: Mass Spectrometry Strategies for Structural Analysis of Carbohydrates and Glycoconjugates. In: Coelho AV, de Matos Ferraz Franco C: *Tandem Mass Spectrometry - Molecular Characterization*.

- <https://www.intechopen.com/books/tandem-mass-spectrometry-molecular-characterization/mass-spectrometry-strategies-for-structural-analysis-of-carbohydrates-and-glycoconjugates> (dostopano 09. 08. 2017)
45. Kailemia MJ, Ruhaak LR, Lebrilla CB, Amster IJ: Oligosaccharide Analysis By Mass Spectrometry: A Review Of Recent Developments. *Analytical chemistry* 2014; 86: 196–212.
 46. Tosoh Bioscience LLC. Principles of Ion Exchange Chromatography. <https://www.separations.us.tosohbioscience.com/service--support/technical-support/resource-center/principles-of-chromagrapy/ion-exchange> (dostopano 27. 02. 2017)
 47. Gagnon P: Chapter 5: Practical Strategies for Protein Contaminant Detection by High-Performance Ion-Exchange Chromatography. In: Rodriguez-Diaz R, Wehr T, Tuck S: *Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development*. Informa Healthcare, 2005. <http://docshare04.docshare.tips/files/14270/142704812.pdf> (dostopano 27. 02. 2017)
 48. Rohrer J: Eluent preparation for high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA. Technical note 71. <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TN-71-Eluent-Preparation-for-High-Performance-Anion-Exchange-Chromatograpy-with%20APD-TN-70669.pdf> (dostopano 23. 01. 2016)
 49. Thermo Fisher Scientific. High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection. <http://www.dionex.com/en-us/products/ion-chromatography/ic-rfic-solutions/hpae-pad/lp-111613.html> (dostopano 23. 01. 2016)
 50. Rohrer J: Analysis of Carbohydrates by High Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD). Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA. Technical note 20. <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TN-20-Analysis-Carbohydrates-HPAE-PAD-TN70671-EN.pdf> (dostopano 23. 01. 2016)
 51. Corradini C, Cavazza A, Bignardi C: High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Electrochemical Detection as a Powerful Tool to Evaluate Carbohydrates of Food Interest: Principles and Applications. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* 2012; 2012: 1–13.

52. Rohrer JS, Basumallick L, Hurum D: High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection for Carbohydrate Analysis of Glycoproteins. *Biochemistry (Moscow)* 2013; 78: 697–709.
53. Thermo Fisher Scientific Inc. ICS-3000 Ion Chromatography System Operator's Manual. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/48428-Man-IC-ICS-3000-System-Operators-2008-01-065031-04.pdf> (dostopano 18. 03. 2017)
54. Cataldi TRI, Campa C, De Benedetto GE: Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: The potential is still growing. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 2000; 368: 739–758.
55. Rohrer J: Optimal Settings for Pulsed Amperometric Detection of Carbohydrates Using the Dionex ED40 Electrochemical Detector. Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA. Technical note 21. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TN-21-Optimal-Settings-Pulsed-Amperometric-Detection-Carbohydrates-ED40-TN70670-EN.pdf> (dostopano 18. 03. 2017)
56. LaCourse WR: Pulsed Electrochemical Detection: Waveform Evolution. *LCGC North America* 2011; 29: 584–593.
57. Kotnik D: Optimizacija pulzne amperometrične detekcije in določanje izbranih ogljikovih hidratov z ionsko kromatografijo: doktorska disertacija. Ljubljana, 2011.
58. Kotnik D, Novič M, LaCourse WR, Pihlar B: Cathodic re-activation of the gold electrode in pulsed electrochemical detection of carbohydrates. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2011; 663: 30–35.
59. Norris GE, Stillman TJ, Anderson BF, Baker EN: The three-dimensional structure of PNGase F, a glycosylasparaginase from *Flavobacterium meningosepticum*. *Structure* 1994; 2: 1049–1059.
60. Sigma-Aldrich. N-Linked Glycan Strategies. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/glycobiology/n-linked-glycan-strategies.html> (dostopano 29. 07. 2017)
61. Thermo Fisher Scientific. Thermo Scientific Chromatography Columns and Consumables 2016-2017. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/BR-21443-Chromatography-Catalog-BR21443-EN.pdf> (dostopano 25. 07. 2017)
62. Hichrom Limited. Solid Phase Extraction and QuEChERs products.

- http://www.hichrom.com/assets/ProductPDFs/Sample_Prep/SP_SPE_and_QuEChERS.pdf (dostopano 25. 07. 2017)
63. Prozyme Advancing Glycosciences. Glyko® Sialidase C™ [GK80030].
<https://prozyme.com/products/gk80030> (dostopano 29. 07. 2017)
64. Sigma-Aldrich. Endoglycosidases.
<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/glycobiology/endoglycosidases.html> (dostopano 29. 07. 2017)
65. Thermo Fisher Scientific. Dionex™ CarboPac™ PA1 IC Columns.
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/057178> (dostopano 19. 03. 2017)
66. Huber L: Validation of Analytical Methods. Agilent Technologies.
<https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990-5140EN.pdf> (dostopano 02. 04. 2017)
67. Shabir GA: Step-by-Step Analytical Methods Validation and Protocol in the Quality System Compliance Industry. Institute of Validation Technology.
<http://www.ivtnetwork.com/sites/default/files/Step-by-Step%20Analytical%20Methods%20Validation%20and%20Protocol%20in%20the%20Quality%20System%20Compliance%20Industry.pdf> (dostopano 11. 09. 2017)
68. U.S. Department of Health and Human Services. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation.
<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf> (dostopano 08. 04. 2017)
69. Ederveen JC: A Practical Approach to Biological Assay Validation. Progress, Project Management & Engineering, 2010.
<https://www.scribd.com/doc/33265309/A-Practical-Approach-to-Biological-Assay-Validation> (dostopano 08. 04. 2017)
70. USP 37. (1225) Validation of compendial procedures.
<https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c1225.pdf> (dostopano 09. 04. 2017)
71. ICH. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1).
https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf (dostopano 09. 04. 2017)

Priloga A: Zbrani rezultati testiranja stabilnosti mobilnih faz, pufrov in raztopin za pripravo vzorcev

Preglednica XX: Testiranje stabilnosti 70 % (v/v) acetonitrila/0,1 % (v/v) TFA in 40 % (v/v) acetonitrila/0,1 % (v/v) TFA

Časovna točka	Število ponovitev (n)	Povprečne vrednosti deleža površin posameznih glikanskih struktur				
		2A (%)	3A (%)	4A (%)	HM6P (%)	S (%)
t_0 (sveže)	2	3,800	15,477	77,229	2,141	1,354
t_1 (1 mesec)	2	4,243	15,222	76,890	2,205	1,439
Absolutna razlika povprečij ($t_0 - t_1$)		0,4 %	0,3 %	0,3 %	0,1 %	0,1 %
Kriterij sprejemljivosti		$\Delta \leq 0,6$ % (absolutno)	$\Delta \leq 2,0$ % (absolutno)	$\Delta \leq 4,0$ % (absolutno)	$\Delta \leq 0,5$ % (absolutno)	$\Delta \leq 0,5$ % (absolutno)
Ustreznost		DA	DA	DA	DA	DA

Preglednica XXI: Testiranje stabilnosti končnega pufra za redčenje vzorcev (25 mM natrijev acetat, pH = 6,0)

Časovna točka	Število ponovitev (n)	Povprečne vrednosti deleža površin posameznih glikanskih struktur				
		2A (%)	3A (%)	4A (%)	HM6P (%)	S (%)
t_0 (sveže)	2	3,470	15,711	77,319	2,122	1,377
t_1 (1 mesec)	8	3,577	15,210	77,199	2,399	1,615
t_2 (4 meseci)	4	3,927	15,603	76,564	2,372	1,533
Absolutna razlika povprečij ($t_0 - t_1$)		0,1 %	0,5 %	0,1 %	0,3 %	0,2 %
Absolutna razlika povprečij ($t_0 - t_2$)		0,5 %	0,1 %	0,8 %	0,3 %	0,2 %
Kriterij sprejemljivosti		$\Delta \leq 0,6$ % (absolutno)	$\Delta \leq 2,0$ % (absolutno)	$\Delta \leq 4,0$ % (absolutno)	$\Delta \leq 0,5$ % (absolutno)	$\Delta \leq 0,5$ % (absolutno)
Ustreznost		DA	DA	DA	DA	DA

Preglednica XXII: Testiranje stabilnosti začetnega pufra za redčenje vzorcev (50 mM natrijev fosfat, 150 mM natrijev klorid, pH = 7,0)

Časovna točka	Število ponovitev (n)	Povprečne vrednosti deleža površin posameznih glikanskih struktur				
		2A (%)	3A (%)	4A (%)	HM6P (%)	S (%)
t_0 (sveže)	2	4,351	15,347	76,475	2,295	1,531
t_1 (1 mesec)	2	4,523	15,266	76,486	2,251	1,474
t_2 (1,5 meseca)	2	4,497	15,234	76,400	2,287	1,583
Absolutna razlika povprečij ($t_0 - t_1$)		0,2 %	0,1 %	0,0 %	0,0 %	0,1 %
Absolutna razlika povprečij ($t_0 - t_2$)		0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,0 %	0,1 %
Kriterij sprejemljivosti		$\Delta \leq 0,6$ % (absolutno)	$\Delta \leq 2,0$ % (absolutno)	$\Delta \leq 4,0$ % (absolutno)	$\Delta \leq 0,5$ % (absolutno)	$\Delta \leq 0,5$ % (absolutno)
Ustreznost		DA	DA	DA	DA	DA

Preglednica XXIII: Testiranje stabilnosti mobilnih faz (MFA, MFB in MFC) pod helijevo atmosfero

Časovna točka	Število ponovitev (n)	Povprečne vrednosti deleža površin posameznih glikanskih struktur				
		2A (%)	3A (%)	4A (%)	HM6P (%)	S (%)
t_0 (sveže)	4	3,734	15,829	76,585	2,334	1,518
t_1 (1 mesec)	4	3,788	15,803	76,439	2,414	1,557
Absolutna razlika povprečij ($t_0 - t_1$)		0,1 %	0,0 %	0,1 %	0,1 %	0,0 %
Kriterij sprejemljivosti		$\Delta \leq 0,6$ % (absolutno)	$\Delta \leq 2,0$ % (absolutno)	$\Delta \leq 4,0$ % (absolutno)	$\Delta \leq 0,5$ % (absolutno)	$\Delta \leq 0,5$ % (absolutno)
Ustreznost		DA	DA	DA	DA	DA

Preglednica XXIV: Testiranje mobilnih faz (MFA, MFB in MFC) brez helijeve atmosfere

Časovna točka	Število ponovitev (n)	Povprečne vrednosti deleža površin posameznih glikanskih struktur				
		2A (%)	3A (%)	4A (%)	HM6P (%)	S (%)
t_0 (sveže)	2	4,289	16,192	75,636	2,403	1,481
t_1 (1 teden)	2	4,113	16,256	75,784	2,428	1,420
Absolutna razlika povprečij ($t_0 - t_1$)		0,176 %	0,064 %	0,148 %	0,025 %	0,061 %
Kriterij sprejemljivosti		$\Delta \leq 0,6$ % (absolutno)	$\Delta \leq 2,0$ % (absolutno)	$\Delta \leq 4,0$ % (absolutno)	$\Delta \leq 0,5$ % (absolutno)	$\Delta \leq 0,5$ % (absolutno)
Ustreznost		DA	DA	DA	DA	DA

Preglednica XXV: Rok uporabnosti pufrov in raztopin za pripravo vzorcev ter mobilnih faz

Ime raztopine / Sestava (koncentracija)	Rok uporabnosti
70 % (v/v) acetonitril/0,1 % (v/v) TFA	1 mesec
40 % (v/v) acetonitril/0,1 % (v/v) TFA	1 mesec
Začetni pufer za redčenje vzorcev (50 mM natrijev fosfat, 150 mM natrijev klorid, pH = 7,0)	1 mesec
Končni pufer za redčenje vzorcev (25 mM natrijev acetat, pH = 6,0)	1 mesec
MFA, MFB, MFC pod helijevo atmosfero	1 mesec
MFA, MFB, MFC brez helijeve atmosfere	1 teden

Priloga B: Zbrani rezultati primerjave 4PAD detekcije z 2PAD detekcijo

Preglednica XXVI: Natančnost sistema 4PAD detekcije za glikanske strukture z deležem površin (*ang. % area*) < 5 %

Ime vzorca	3A(1-4) (%)	3A1R (%)	3A2R (%)	HM6P (%)	S (%)
Vzorec RS_1	2,170	3,613	1,274	2,013	0,495
Vzorec RS_2	2,171	3,622	1,273	2,010	0,494
Vzorec RS_3	2,164	3,603	1,272	2,010	0,464
Vzorec RS_4	2,162	3,609	1,266	1,999	0,495
Vzorec RS_5	2,170	3,613	1,272	2,018	0,438
Vzorec RS_6	2,172	3,629	1,270	1,989	0,475
Povprečje	2,168	3,615	1,271	2,007	0,477
RSD	0 % (0,19 %)	0 % (0,26 %)	0 % (0,22 %)	1 %	5 %
Kriterij sprejemljivosti	RSD ≤ 5 %				
Ustreznost	DA	DA	DA	DA	DA

Preglednica XXVII: Natančnost sistema 2PAD detekcije za glikanske strukture z deležem površin (*ang. % area*) < 5 %

Ime vzorca	3A(1-4) (%)	3A1R (%)	3A2R (%)	HM6P (%)	S (%)
Vzorec RS_1	2,120	3,608	1,266	1,961	0,433
Vzorec RS_2	2,121	3,615	1,272	1,965	0,485
Vzorec RS_3	2,125	3,627	1,270	1,964	0,498
Vzorec RS_4	2,120	3,624	1,275	1,958	0,476
Vzorec RS_5	2,129	3,628	1,270	1,956	0,498
Vzorec RS_6	2,136	3,636	1,278	1,963	0,472
Povprečje	2,125	3,623	1,272	1,961	0,477
RSD	0 % (0,31 %)	0 % (0,28 %)	0 % (0,35 %)	0 % (0,18 %)	5 %
Kriterij sprejemljivosti	RSD ≤ 5 %				
Ustreznost	DA	DA	DA	DA	DA

Preglednica XXVIII: Natančnost sistema 4PAD detekcije za glikanske strukture z deležem površin (*ang. % area*) $\geq 5\%$

Ime vzorca	2A (%)	3A(1-6) (%)	4A (%)	4A1R (%)	4A2R (%)
Vzorec RS_1	8,169	7,793	40,629	24,517	9,327
Vzorec RS_2	8,128	7,793	40,597	24,579	9,334
Vzorec RS_3	8,143	7,789	40,704	24,536	9,314
Vzorec RS_4	8,131	7,769	40,748	24,541	9,281
Vzorec RS_5	8,181	7,797	40,639	24,542	9,328
Vzorec RS_6	8,114	7,788	40,672	24,563	9,326
Povprečje	8,144	7,788	40,665	24,546	9,318
RSD	0 % (0,32 %)	0 % (0,13 %)	0 % (0,13 %)	0 % (0,09 %)	0 % (0,21 %)
Kriterij sprejemljivosti	RSD $\leq 3\%$				
Ustreznost	DA	DA	DA	DA	DA

Preglednica XXIX: Natančnost sistema 2PAD detekcije za glikanske strukture z deležem površin (*ang. % area*) $\geq 5\%$

Ime vzorca	2A (%)	3A(1-6) (%)	4A (%)	4A1R (%)	4A2R (%)
Vzorec RS_1	8,075	7,720	41,004	24,556	9,259
Vzorec RS_2	8,109	7,727	40,933	24,517	9,256
Vzorec RS_3	8,088	7,739	40,876	24,555	9,260
Vzorec RS_4	8,090	7,743	40,891	24,532	9,291
Vzorec RS_5	8,088	7,749	40,849	24,543	9,290
Vzorec RS_6	8,086	7,761	40,842	24,520	9,306
Povprečje	8,089	7,740	40,899	24,537	9,277
RSD	0 % (0,14 %)	0 % (0,19 %)	0 % (0,15 %)	0 % (0,07 %)	0 % (0,23 %)
Kriterij sprejemljivosti	RSD $\leq 3\%$				
Ustreznost	DA	DA	DA	DA	DA

Preglednica XXX: Rezultati določanja LOQ

Ime vzorca	Nanos na kolono (μL)	Površina vrha HM6P (nC*min) 4PAD	Površina vrha HM6P (nC*min) 2PAD	S/N (HM6P) 4PAD	S/N (HM6P) 2PAD
RS 0,5 mg/mL_1	10	3,149	2,352	437	323
RS 0,5 mg/mL_2	4	1,210	0,952	159	133
RS 0,5 mg/mL_3	2	0,541	0,329	74	44
RS 0,5 mg/mL_4	1	0,226	0,126	31	17

Priloga C: Zbrani rezultati določanja specifičnosti in selektivnosti HPAEC-PAD metode

Preglednica XXXI: Retencijski časi glikanskih struktur v referenčni substanci in DS vzorcu

Oznaka vrha	Zaporedna številka vrha	Retencijski čas (min)		
		Referenčna substanca	DS vzorec	Razlika v RT
2A	1	20,68	20,67	0,0 (0,01)
3A (1-4)	2	22,97	23,40	0,4
3A (1-6)	3	24,61	24,59	0,0 (0,02)
4A	4	26,45	26,43	0,0 (0,02)
3A1R	5	28,35	28,33	0,0 (0,02)
4A1R	6	29,60	29,58	0,0 (0,02)
3A2R	7	31,43	31,43	0,0 (0,00)
4A2R	8	32,69	32,68	0,0 (0,01)
HM6P	9	54,12	54,14	0,0 (0,02)
S	10	55,67	55,68	0,0 (0,01)
Kriterij sprejemljivosti		$\Delta RT = \pm 0,5$ minute		
Ustreznost		DA		

Preglednica XXXII: Retencijski čas HM6P vrha v HM6P standardu in DS vzorcu

Oznaka vrha	Zaporedna številka vrha	Retencijski čas (min)		
		HM6P standard	DS vzorec	Razlika v RT
HM6P	9	53,93	54,14	0,2
Kriterij sprejemljivosti		$\Delta RT = \pm 0,5$ minute		
Ustreznost		DA		

Preglednica XXXIII: Retencijski čas HM6P vrha v HM6P standardu in DS vzorcu, združenem s HM6P standardom

Oznaka vrha	Zaporedna številka vrha	Retencijski čas (min)		
		HM6P standard	DS vzorec, združen s HM6P standardom	Razlika v RT
HM6P	9	53,93	53,68	0,3
Kriterij sprejemljivosti		$\Delta RT = \pm 0,5$ minute		
Ustreznost		DA		

Preglednica XXXIV: Razmerje vrha proti dolini (p/v razmerje) med vrhovoma HM6P in S pri DS vzorcu

Oznaka vrha	Zaporedna številka vrha	p/v razmerje
HM6P	9	6,9
S	10	
Kriterij sprejemljivosti		$\geq 2,2$
Ustreznost		DA

Priloga D: Zbrani rezultati določanja meje določljivosti (LOQ) HPAEC-PAD metode

Preglednica XXXV: Rezultati določanja LOQ

Ime vzorca	Nanos na kolono (µL)	Površina vrha HM6P (nC*min)	Površina vrha S (nC*min)	S/N (HM6P)	S/N (S)
RS 0,5 mg/mL_1	10	3,484	2,303	338	122
RS 0,5 mg/mL_2	4	1,291	0,845	127	46
RS 0,5 mg/mL_3	3	0,968	0,641	94	32
RS 0,5 mg/mL_4	2	0,636	0,435	61	22
RS 0,5 mg/mL_5	1	0,370	0,280	36	13

Preglednica XXXVI: Rezultati potrjevanja LOQ

Ime vzorca	Koncentracija (mg/mL)	Volumen injiciranja (µL)	Površina vrha HM6P (nC*min)	Površina vrha S (nC*min)	S/N (HM6P)	S/N (S)
LOQ_1	0,05	10	0,363	0,258	34	14
LOQ_2	0,05	10	0,355	0,241	34	13
LOQ_3	0,05	10	0,381	0,256	36	16
LOQ_4	0,05	10	0,395	0,247	36	15
LOQ_5	0,05	10	0,384	0,262	37	14
LOQ_6	0,05	10	0,357	0,255	36	14
Povprečje			0,366	0,253	/	/
RSD (%)			3 %	3 %	/	/
Kriterij sprejemljivosti			RSD ≤ 30 %		S/N ≥ 10:1 (za vsako posamezno injiciranje)	
Ustreznost			DA	DA	DA	DA

Priloga E: Zbrani rezultati določanja linearnosti HPAEC-PAD metode

Preglednica XXXVII: Deleži (60 %-140 %) nominalne koncentracije referenčne substance in površine vrhov 2A, 3A(1-4), 3A(1-6), 4A in 3A1R za izračun linearnosti posameznih glikanskih struktur

Delež nominalne koncentracije 0.5 mg/mL (%)	Površina vrha 2A (nC*min)	Površina vrha 3A(1-4) (nC*min)	Površina vrha 3A(1-6) (nC*min)	Površina vrha 4A (nC*min)	Površina vrha 3A1R (nC*min)
60 %_1	2,949	1,656	6.437	35,064	3,102
60 %_2	2,896	1,638	6.283	34,280	3,043
60 %_3	2,948	1,669	6.466	35,144	3,143
70 %_1	3,423	1,932	7.529	40,587	3,610
70 %_2	3,389	1,899	7.430	40,054	3,594
70 %_3	3,384	1,906	7.419	39,995	3,575
80 %_1	3,764	2,145	8.261	44,309	3,981
80 %_2	4,001	2,232	8.777	46,989	4,234
80 %_3	3,901	2,162	8.598	46,069	4,143
100 %_1	4,948	2,769	10.859	57,487	5,230
100 %_2	5,109	2,894	11.107	58,767	5,346
100 %_3	5,035	2,854	10.973	58,104	5,292
120 %_1	5,923	3,357	12.985	67,686	6,291
120 %_2	6,013	3,429	13.163	68,615	6,387
120 %_3	6,016	3,449	13.197	68,656	6,390
130 %_1	6,415	3,633	14.039	72,638	6,821
130 %_2	6,316	3,587	13.816	71,589	6,712
130 %_3	6,287	3,577	13.743	71,311	6,669
140 %_1	6,700	3,740	14.735	76,000	7,154
140 %_2	6,650	3,676	14.577	75,146	7,096
140 %_3	6,571	3,597	14.455	74,554	7,008

Preglednica XXXVIII: Deleži (60 %–140 %) nominalne koncentracije referenčne substance in površine vrhov 4A1R, 3A2R, 4A2R, HM6P in S za izračun linearnosti posameznih glikanskih struktur

Delež nominalne koncentracije 0.5 mg/mL (%)	Površina vrha 4A1R (nC*min)	Površina vrha 3A2R (nC*min)	Površina vrha 4A2R (nC*min)	Površina vrha HM6P (nC*min)	Površina vrha S (nC*min)
60 %_1	20,817	1,151	7,999	1,971	1,236
60 %_2	20,302	1,116	7,835	1,909	1,203
60 %_3	20,906	1,152	8,071	1,972	1,238
70 %_1	24,201	1,343	9,310	2,269	1,456
70 %_2	23,902	1,321	9,205	2,249	1,436
70 %_3	23,900	1,332	9,183	2,231	1,420
80 %_1	26,555	1,471	10,189	2,497	1,647
80 %_2	28,212	1,566	10,846	2,652	1,726
80 %_3	27,628	1,518	10,608	2,616	1,712
100 %_1	34,715	1,920	13,384	3,324	2,170
100 %_2	35,525	1,965	13,709	3,392	2,224
100 %_3	35,144	1,942	13,559	3,329	2,175
120 %_1	41,331	2,294	15,939	3,966	2,606
120 %_2	41,939	2,328	16,161	4,015	2,621
120 %_3	41,997	2,311	16,142	4,028	2,642
130 %_1	44,602	2,486	17,155	4,287	2,812
130 %_2	43,879	2,456	16,909	4,231	2,760
130 %_3	43,630	2,436	16,814	4,203	2,752
140 %_1	46,774	2,623	18,054	4,518	2,893
140 %_2	46,220	2,583	17,854	4,480	2,915
140 %_3	45,527	2,578	17,562	4,476	2,937

Preglednica XXXIX: Enačba linearne funkcije $y = ax + b$, za posamezno glikansko strukturo

Glikanska struktura	Enačba linearne funkcije ($y = ax + b$)
2A	$y = 0,048x + 0,086$
3A(1-4)	$y = 0,027x + 0,064$
3A(1-6)	$y = 0,105x + 0,166$
4A	$y = 0,520x + 4,339$
3A1R	$y = 0,051x + 0,034$
4A1R	$y = 0,329x + 1,300$
3A2R	$y = 0,019x + 0,039$
4A2R	$y = 0,127x + 0,465$
HM6P	$y = 0,033x - 0,002$
S	$y = 0,022x - 0,054$

Preglednica XL: Zbrani rezultati linearne regresije za posamezno glikansko strukturo

Glikanska struktura	Odsek na y-osi	Naklon krivulje	Vsota kvadratov ostankov	Korelacijski koeficient (R)	Izračunana površina vrha, $x=100$ % (nC*min)*	Absolutni odsek na y-osi, $x=100$ % (%)**
2A	0,086	0,048	0,2838	1,00	4,886	1,76
3A(1-4)	0,064	0,027	0,1838	0,99	2,764	2,32
3A(1-6)	0,166	0,105	1,1938	1,00	10,666	1,56
4A	4,339	0,520	38,1684	1,00	56,339	7,70
3A1R	0,034	0,051	0,2553	1,00	5,134	0,66
4A1R	1,300	0,329	14,0283	1,00	34,200	3,80
3A2R	0,039	0,019	0,0284	1,00	1,939	2,01
4A2R	0,465	0,127	2,0340	1,00	13,165	3,53
HM6P	-0,002	0,033	0,0933	1,00	3,298	0,06
S	-0,054	0,022	0,0606	1,00	2,146	2,52
Kriterij sprejemljivosti	/	/	/	$\geq 0,99$	/	≤ 12 %
Ustreznost	/	/	/	DA	/	DA

* Izračunano skladno z enačbo 5 (glej poglavje 3.2.2.2.3)

** Izračunano skladno z enačbo 6 (glej poglavje 3.2.2.2.3)

Priloga F: Zbrani rezultati določanja natančnosti HPAEC-PAD metode

Preglednica XLI: Rezultati natančnosti sistema za glikanske strukture z deležem površin (*ang. % area*) < 5 %

Ime vzorca	2A (%)	3A(1-4) (%)	3A1R (%)	3A2R (%)	HM6P (%)	S (%)
Vzorec RS_1	3,397	1,963	3,807	1,375	2,400	1,530
Vzorec RS_2	3,489	1,971	3,795	1,387	2,409	1,531
Vzorec RS_3	3,519	1,925	3,789	1,376	2,383	1,519
Vzorec RS_4	3,488	1,969	3,815	1,367	2,356	1,482
Vzorec RS_5	3,525	1,973	3,779	1,366	2,380	1,510
Vzorec RS_6	3,512	1,977	3,808	1,381	2,418	1,536
Povprečje	3,488	1,963	3,799	1,375	2,391	1,518
RSD	1 %	1 %	0 % (0,35 %)	1 %	1 %	1 %
Kriterij sprejemljivosti	RSD ≤ 5 %					
Ustreznost	DA	DA	DA	DA	DA	DA

Preglednica XLII: Rezultati natančnosti sistema za glikanske strukture z deležem površin (*ang. % area*) ≥ 5 %

Ime vzorca	3A(1-6) (%)	4A (%)	4A1R (%)	4A2R (%)
Vzorec RS_1	7,827	42,516	25,485	9,699
Vzorec RS_2	7,816	42,445	25,496	9,662
Vzorec RS_3	7,813	42,519	25,493	9,664
Vzorec RS_4	7,858	42,491	25,558	9,617
Vzorec RS_5	7,862	42,390	25,524	9,692
Vzorec RS_6	7,817	42,371	25,463	9,719
Povprečje	7,832	42,455	25,503	9,675
RSD	0 % (0,28 %)	0 % (0,15 %)	0 % (0,13 %)	0 % (0,37 %)
Kriterij sprejemljivosti	RSD ≤ 3 %			
Ustreznost	DA	DA	DA	DA

Preglednica XLIII: Rezultati natančnosti metode za DS vzorec s koncentracijo 0,35 mg/mL z glikanskimi strukturami z deležem površin (ang. % area) < 5 %

Ime vzorca	3A(1-4) (%)	3A1R (%)	3A2R (%)	HM6P (%)	S (%)
vzorec_0,35 mg/mL_1	1,937	4,169	1,546	2,101	1,563
vzorec_0,35 mg/mL_2	1,907	4,165	1,548	2,143	1,630
vzorec_0,35 mg/mL_3	1,939	4,170	1,560	2,194	1,707
vzorec_0,35 mg/mL_4	1,930	4,162	1,547	2,318	1,691
vzorec_0,35 mg/mL_5	1,928	4,165	1,547	2,227	1,709
vzorec_0,35 mg/mL_6	1,940	4,162	1,569	2,154	1,735
Povprečje	1,930	4,165	1,553	2,189	1,672
Interval zaupanja povprečnih deležev površin (% area)	1,920 – 1,940 %	4,165 – 4,165 %	1,543 – 1,563 %	2,205 – 2,273 %	1,609 – 1,735 %
RSD	1 %	0 %	1 %	4 %	4 %
Kriterij sprejemljivosti	RSD ≤ 10 %				
Ustreznost	DA	DA	DA	DA	DA

Preglednica XLIV: Rezultati natančnosti metode za DS vzorec s koncentracijo 0,50 mg/mL z glikanskimi strukturami z deležem površin (ang. % area) < 5 %

Ime vzorca	3A(1-4) (%)	3A1R (%)	3A2R (%)	HM6P (%)	S (%)
vzorec_0,50 mg/mL_1	1,970	4,222	1,599	2,238	1,704
vzorec_0,50 mg/mL_2	1,977	4,222	1,608	2,155	1,616
vzorec_0,50 mg/mL_3	1,988	4,246	1,616	2,170	1,617
vzorec_0,50 mg/mL_4	1,981	4,236	1,614	2,157	1,641
vzorec_0,50 mg/mL_5	1,994	4,240	1,598	2,177	1,659
vzorec_0,50 mg/mL_6	1,993	4,203	1,602	2,153	1,632
Povprečje	1,984	4,228	1,606	2,175	1,645
Interval zaupanja povprečnih deležev površin (% area)	1,974 – 1,994 %	4,207 – 4,249 %	1,596 – 1,616 %	2,144 – 2,206 %	1,614 – 1,676 %
RSD	1 %	0 %	1 %	2 %	2 %
Kriterij sprejemljivosti	RSD ≤ 10 %				
Ustreznost	DA	DA	DA	DA	DA

Preglednica XLV: Rezultati natančnosti metode za DS vzorec s koncentracijo 0,65 mg/mL z glikanskimi strukturami z deležem površin (*ang. % area*) < 5 %

Ime vzorca	3A(1-4) (%)	3A1R (%)	3A2R (%)	HM6P (%)	S (%)
vzorec_0,65 mg/mL_1	2,029	4,293	1,662	2,231	1,680
vzorec_0,65 mg/mL_2	2,038	4,306	1,669	2,201	1,662
vzorec_0,65 mg/mL_3	2,012	4,269	1,644	2,173	1,628
vzorec_0,65 mg/mL_4	2,031	4,313	1,656	2,272	1,699
vzorec_0,65 mg/mL_5	2,016	4,317	1,653	2,268	1,696
vzorec_0,65 mg/mL_6	2,014	4,308	1,666	2,267	1,699
Povprečje	2,023	4,301	1,658	2,235	1,677
Interval zaupanja povprečnih deležev površin (% area)	2,013 – 2,033 %	4,208 – 4,322 %	1,648 – 1,668 %	2,193 – 2,277 %	1,646 – 1,708 %
RSD	1 %	0 %	1 %	2 %	2 %
Kriterij sprejemljivosti	RSD ≤ 10 %				
Ustreznost	DA	DA	DA	DA	DA

Preglednica XLVI: Rezultati natančnosti metode za DS vzorec s koncentracijo 0,35 mg/mL z glikanskimi strukturami z deležem površin (*ang. % area*) ≥ 5 %

Ime vzorca	2A (%)	3A(1-6) (%)	4A (%)	4A1R (%)	4A2R (%)
vzorec_0,35 mg/mL_1	4,728	7,998	40,144	25,753	10,062
vzorec_0,35 mg/mL_2	4,773	7,955	40,174	25,758	9,946
vzorec_0,35 mg/mL_3	4,740	7,977	39,984	25,739	9,990
vzorec_0,35 mg/mL_4	4,826	7,962	40,077	25,627	9,861
vzorec_0,35 mg/mL_5	4,817	7,994	39,900	25,686	10,027
vzorec_0,35 mg/mL_6	4,671	7,904	40,111	25,736	10,018
Povprečje	4,759	7,965	40,065	25,717	9,984
Interval zaupanja povprečnih deležev površin (% area)	4,696 – 4,822 %	7,934 – 7,996 %	39,960 – 40,170 %	25,665 – 25,769 %	9,911 – 10,057 %
RSD	1 %	0 %	0 %	0 %	1 %
Kriterij sprejemljivosti	RSD ≤ 5 %				
Ustreznost	DA	DA	DA	DA	DA

Preglednica XLVII: Rezultati natančnosti metode za DS vzorec s koncentracijo 0,50 mg/mL z glikanskimi strukturami z deležem površin (*ang. % area*) ≥ 5 %

Ime vzorca	2A (%)	3A(1-6) (%)	4A (%)	4A1R (%)	4A2R (%)
vzorec_0,50 mg/mL_1	4,885	8,135	39,461	25,614	10,171
vzorec_0,50 mg/mL_2	4,852	8,122	39,621	25,660	10,167
vzorec_0,50 mg/mL_3	4,908	8,146	39,602	25,584	10,124
vzorec_0,50 mg/mL_4	4,861	8,140	39,552	25,612	10,204
vzorec_0,50 mg/mL_5	4,876	8,146	39,505	25,657	10,149
vzorec_0,50 mg/mL_6	4,868	8,103	39,666	25,611	10,169
Povprečje	4,875	8,132	39,568	25,623	10,164
Interval zaupanja povprečnih deležev površin (% area)	4,854 - 4,896 %	8,111 – 8,153 %	39,484 – 39,652 %	25,592 – 25,654 %	10,133 – 10,195 %
RSD	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Kriterij sprejemljivosti	RSD ≤ 5 %				
Ustreznost	DA	DA	DA	DA	DA

Preglednica XLVIII: Rezultati natančnosti metode za DS vzorec s koncentracijo 0,65 mg/mL z glikanskimi strukturami z deležem površin (*ang. % area*) ≥ 5 %

Ime vzorca	2A (%)	3A(1-6) (%)	4A (%)	4A1R (%)	4A2R (%)
vzorec_0,65 mg/mL_1	4,988	8,301	39,002	25,523	10,292
vzorec_0,65 mg/mL_2	5,001	8,333	38,868	25,549	10,374
vzorec_0,65 mg/mL_3	4,974	8,275	39,221	25,500	10,303
vzorec_0,65 mg/mL_4	5,035	8,343	38,947	25,457	10,247
vzorec_0,65 mg/mL_5	5,062	8,360	39,019	25,413	10,197
vzorec_0,65 mg/mL_6	5,034	8,330	39,048	25,434	10,200
Povprečje	5,016	8,324	39,017	25,479	10,269
Interval zaupanja povprečnih deležev površin (% area)	4,985- 5,047 %	8,293 – 8,355 %	38,891 – 39,143 %	25,427 – 25,531 %	10,196 – 10,342 %
RSD	1 %	0 %	0 %	0 %	1 %
Kriterij sprejemljivosti	RSD ≤ 5 %				
Ustreznost	DA	DA	DA	DA	DA

Preglednica XLIX: Rezultati S/N razmerja za HM6P vrh na LOQ nivoju DS vzorca s koncentracijo 0,35 mg/mL

Ime vzorca	Površina vrha HM6P (nC*min)	S/N razmerje
vzorec_0,35 mg/mL_1	2,198	26
vzorec_0,35 mg/mL_2	1,832	20
vzorec_0,35 mg/mL_3	2,348	24
vzorec_0,35 mg/mL_4	2,033	20
vzorec_0,35 mg/mL_5	2,541	25
vzorec_0,35 mg/mL_6	1,970	24
Kriterij sprejemljivosti	S/N ≥ 10:1 (za vsako posamezno injiciranje)	
Ustreznost	DA	

Preglednica L: Rezultati vmesne natančnosti za DS vzorec s koncentracijo 0,50 mg/mL z glikanskimi strukturami z deležem površin (*ang. % area*) < 5 % (Operator 2)

Ime vzorca	3A(1-4) (%)	3A1R (%)	3A2R (%)	HM6P (%)	S (%)
vzorec_0,50 mg/mL_1	2,371	3,818	1,558	2,209	1,518
vzorec_0,50 mg/mL_2	2,408	3,877	1,561	2,217	1,582
vzorec_0,50 mg/mL_3	2,399	3,860	1,570	2,271	1,624
vzorec_0,50 mg/mL_4	2,408	3,905	1,582	2,309	1,580
vzorec_0,50 mg/mL_5	2,400	3,834	1,525	2,251	1,544
vzorec_0,50 mg/mL_6	2,415	3,884	1,493	2,270	1,549
Povprečje	2,400	3,863	1,548	2,255	1,566
RSD	1 %	1 %	2 %	2 %	2 %
Kriterij sprejemljivosti	RSD ≤ 10 %				
Ustreznost	DA	DA	DA	DA	DA

Preglednica LI: Rezultati vmesne natančnosti za DS vzorec s koncentracijo 0,50 mg/mL z glikanskimi strukturami z deležem površin (*ang. % area*) $\geq 5\%$ (Operater 2)

Ime vzorca	2A (%)	3A(1-6) (%)	4A (%)	4A1R (%)	4A2R (%)
vzorec_0,50 mg/mL_1	5,261	8,438	40,360	24,993	9,475
vzorec_0,50 mg/mL_2	5,370	8,637	40,216	24,629	9,502
vzorec_0,50 mg/mL_3	5,435	8,636	40,335	24,358	9,510
vzorec_0,50 mg/mL_4	5,519	8,682	40,153	24,405	9,457
vzorec_0,50 mg/mL_5	5,309	8,496	40,440	24,622	9,579
vzorec_0,50 mg/mL_6	5,440	8,615	40,235	24,582	9,518
Povprečje	5,389	8,584	40,290	24,598	9,507
RSD	2 %	1 %	0 %	1%	0 %
Kriterij sprejemljivosti	RSD $\leq 5\%$				
Ustreznost	DA	DA	DA	DA	DA

Preglednica LII: Absolutne razlike povprečnih deležev površin posameznih glikanskih skupin med dvema operaterjema (Operater 1 in Operater 2)

Operater	2A* (%)	3A* (%)	4A* (%)	HM6P* (%)	S* (%)
Operater_1	4,875	15,950	75,355	2,175	1,645
Operater_2	5,389	16,395	74,395	2,255	1,566
Absolutna razlika	0,5	0,4	1,0	0,1	0,1
Kriterij sprejemljivosti za absolutno razliko	$\Delta \leq 0,6\%$	$\Delta \leq 2,0\%$	$\Delta \leq 4,0\%$	$\Delta \leq 0,5\%$	$\Delta \leq 0,5\%$
Ustreznost	DA	DA	DA	DA	DA

*Povprečne vrednosti deležev površin posameznih glikanskih skupin.

Priloga G: Zbrani rezultati potrjevanja točnosti in določanja območja HPAEC-PAD metode

Preglednica LIII: Parametri za potrjevanje točnosti HPAEC-PAD metode

Validacijski parameter	Testirano območje (delež nominalne koncentracije 0,5 mg/mL (%))	Doseženi kriteriji sprejemljivosti
Specifičnost	100 %	DA
Linearnost	60 %-140 %	DA
LOQ	10 % (nanos na kolono 1 µL)	DA
Natančnost metode	70 %-130 %	DA

Preglednica LIV: Parametri za določanje območja HPAEC-PAD metode

Validacijski parameter	Testirano območje (delež nominalne koncentracije 0,5 mg/mL (%))	Doseženi kriteriji sprejemljivosti
Linearnost	60 %-140 %	DA
Natančnost metode	70 %-130 %	DA

Priloga H: Zbrani rezultati testiranja stabilnosti vzorčnih raztopin

Preglednica LV: Testiranje stabilnosti referenčne substance

Časovna točka	Število ponovitev (n)	Povprečne vrednosti deleža površin posameznih glikanskih struktur				
		2A (%)	3A (%)	4A (%)	HM6P (%)	S (%)
RS_ t_0 (dan 0)	2	3,637	15,270	77,181	2,400	1,513
RS_ t_1 (dan 5)	2	3,624	15,344	77,084	2,391	1,559
RS_ t_2 (dan 7)	2	3,637	15,346	77,017	2,427	1,576
RS_ t_3 (dan 10)	2	3,638	15,469	76,911	2,374	1,608
Absolutna razlika povprečij ($t_0 - t_1$)		0,0 %	0,1 %	0,1 %	0,0 %	0,0 %
Absolutna razlika povprečij ($t_0 - t_2$)		0,0 %	0,1 %	0,2 %	0,0 %	0,1 %
Absolutna razlika povprečij ($t_0 - t_3$)		0,0 %	0,2 %	0,3 %	0,0 %	0,1 %
Kriterij sprejemljivosti		$\Delta \leq 0,6$ % (absolutno)	$\Delta \leq 2,0$ % (absolutno)	$\Delta \leq 4,0$ % (absolutno)	$\Delta \leq 0,5$ % (absolutno)	$\Delta \leq 0,5$ % (absolutno)
Ustreznost		DA	DA	DA	DA	DA

Preglednica LVI: Testiranje stabilnosti DS vzorca

Časovna točka	Število ponovitev (n)	Povprečne vrednosti deleža površin posameznih glikanskih struktur				
		2A (%)	3A (%)	4A (%)	HM6P (%)	S (%)
DS_ t_0 (dan 0)	2	4,947	16,052	75,320	2,170	1,510
DS_ t_1 (dan 5)	2	4,960	16,103	75,137	2,194	1,607
DS_ t_2 (dan 7)	2	5,005	16,100	75,058	2,217	1,620
DS_ t_3 (dan 10)	2	4,987	16,241	74,935	2,193	1,642
Absolutna razlika povprečij ($t_0 - t_1$)		0,0 %	0,1 %	0,2 %	0,0 %	0,1 %
Absolutna razlika povprečij ($t_0 - t_2$)		0,1 %	0,0 %	0,3 %	0,0 %	0,1 %
Absolutna razlika povprečij ($t_0 - t_3$)		0,0 %	0,2 %	0,4 %	0,0 %	0,1 %
Kriterij sprejemljivosti		$\Delta \leq 0,6$ % (absolutno)	$\Delta \leq 2,0$ % (absolutno)	$\Delta \leq 4,0$ % (absolutno)	$\Delta \leq 0,5$ % (absolutno)	$\Delta \leq 0,5$ % (absolutno)
Ustreznost		DA	DA	DA	DA	DA