

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Vesna BIZJAK ČERNAC

**UPORABA PRETOČNE CITOMETRIJE ZA DOLOČANJE  
N-GLIKOLILNEURAMINSKE KISLINE  
PRI OVARIJSKIH CELICAH KITAJSKEGA HRČKA**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Vesna BIZJAK ČERNAC

**UPORABA PRETOČNE CITOMETRIJE ZA DOLOČANJE  
N-GLIKOLILNEURAMINSKE KISLINE PRI OVARIJSKIH  
CELICAH KITAJSKEGA HRČKA**

MAGISTRSKO DELO

**APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY FOR  
N-GLYCOLYLNEURAMINIC ACID DETERMINATION AT  
CHINESE HAMSTER OVARY CELLS**

M. Sc. THESIS

Ljubljana, 2014

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu senata Biotehniške fakultete z dne 29.03.2010 je bilo potrjeno, da kandidatka izpoljuje pogoje za magistrski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje magisterija znanosti s področja biotehnologije.

Z mentorico je bila imenovana prof. dr. Mojca Narat.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Borut BOHANEC  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Mojca NARAT  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Miomir KNEŽEVIĆ  
Educell d.o.o, Podjetje za celično biologijo, Trzin

Datum zagovora: 19.05.2014

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v digitalni obliki identično tiskani verziji.

Vesna Bizjak Černac

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Md
DK	UDK 577:60(043.2)=163.6
KG	biokemija/biotehnologija/pretočna citometrija/Neu5Gc/celice/CHO/bioprocеси
KK	AGRIS /
AV	BIZJAK ČERNAC, Vesna, univ. dipl. mikr.
SA	NARAT, Mojca (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje biotehnologije
LI	2014
IN	UPORABA PRETOČNE CITOMETRIJE ZA DOLOČANJE N-ACETILGLIKOLILNEURAMINSKE KISLINE PRI OVARIJSKIH CELICAH KITAJSKEGA HRČKA
TD	Magistrsko delo
OP	XVI, 93 str., 15 pregl., 25 sl., 5 pril., 66 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Pretočna citometrija je tehnika, ki lahko z uporabo ustreznih protiteles in indirektnim barvanjem omogoča določevanje Neu5Gc sialične kisline na celični površini in v celicah. V prvem delu naloge smo razvili, optimirali in ovrednotili metodi za znotrajcelično in zunajcelično določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom. V krajši primerjavi z že uveljavljeno analitsko metodo RP-HPLC za določanje sialičnih kislin na rekombinantnih proteinih, smo izbirali med znotrajceličnim in zunajceličnim določanjem Neu5Gc in se odločili za slednjo. Z izbrano metodo pretočne citometrije in klasično RP-HPLC smo v nadaljevanju naredili obsežno primerjavo in izračunali pozitivno korelacijo med vsebnostjo Neu5Gc na celicah CHO in deležem Neu5Gc na rekombinantnem proteinu. V nadaljevanju smo s pretočno citometrijo spremljali dva bioprocesa in ugotovili, da obstaja pozitivna povezava med vsebnostjo Neu5Gc in fazo celične rasti ter količino rekombinantnega proteina. Za konec smo z izbrano metodo testirali še potencialne razlike v vsebnosti Neu5Gc pri različnih podtipih celic CHO. Zunajcelično določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom se je izkazalo za primerno metodo semikvantitativnega določanja Neu5Gc pri celicah CHO, za uporabno metodo pri spremjanju sinteze Neu5Gc med bioprocесом ter za edino metodo, s katero lahko po tendenci sinteze Neu5Gc ločimo med različnimi parentalnimi celičnimi linijami.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Md  
DC UDK 577:60(043.2)=163.6  
CX biochemistry/biotechnology/flow cytometry/Neu5Gc/CHO cells/bioprocesses  
CC AGRIS /  
AU BIZJAK ČERNAC, Vesna  
AA NARAT, Mojca (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate study of biological and biotechnical sciences, field: Biotechnology  
PY 2014  
TI APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY FOR N-GLYCOLYLNEURAMINIC ACID DETERMINATION AT CHINESE HAMSTER OVARY CELLS  
DT M. Sc. Thesis  
NO XVI, 93 p., 15 tab., 25 fig., 5 ann., 66 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Flow cytometry is a technique which could be applicable for extracellular/intracellular Neu5Gc sialic acid determination. The corresponding antibodies and indirect staining allows the determination of sialic acid Neu5Gc on the cell surface and within the cells themselves. In the first part of the thesis we have developed, optimized and evaluated a method for intracellular and extracellular Neu5Gc determination by flow cytometry. The short comparison of intracellular and extracellular flow cytometric methods for Neu5Gc determination and well known RP-HPLC method for the determination of sialic acid in the recombinant protein was done. According to this comparison, extracellular flow cytometric method for Neu5Gc determination was selected. Furthermore, an extensive comparison of extracellular flow cytometric and RP-HPLC methods were performed and positive correlation among Neu5Gc in CHO cells content and the percentage of Neu5Gc in our recombinant protein was calculated. In the second part of the thesis, the flow cytometric method for Neu5Gc sialic acid determination was used in two bioprocess monitoring. We found that there is a positive correlation between the content of Neu5Gc, and the phase of cell growth and the amount of recombinant protein. At the end of the thesis, flow cytometric method was used for Neu5Gc determination at different CHO cells subtypes. Flow cytometric method for extracellular Neu5Gc sialic acid measurement has proven to be an appropriate method of semi-quantitative Neu5Gc determination in CHO cells, a useful method for monitoring the synthesis of Neu5Gc among different bioprocesses and the only method for Neu5Gc at parental cell lines determination.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Kazalo prilog	XI
Okrajšave in simboli	XII
Slovarček	XIV
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJ RAZISKOVANJA	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	3
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>4</b>
2.1 REKOMBINANTNA BIOLOŠKA ZDRAVILA IN BIOLOŠKO PRIMERLJIVA ZDRAVILA	4
<b>2.1.1 Inovativna biološka zdravila</b>	4
<b>2.1.2 Biološko primerljiva zdravila</b>	6
2.2 CELICE CHO	7
2.3 POSTTRANSLACIJSKE MODIFIKACIJE	8
<b>2.3.1 Glikozilacija</b>	9
2.3.1.1 N–vezani glikani	9
2.3.1.2 O–vezani glikani	10
<b>2.3.2 Sialilacija</b>	11
2.3.2.1 Struktura sialičnih kislin	11
2.3.2.2 Pojavljanje sialičnih kislin	13
2.3.2.3 Funkcije sialičnih kislin	13
2.3.2.4 Metabolizem sialičnih kislin	15
2.3.2.5 N-acetylglkolilneuraminska kislina (Neu5Gc)	17
2.3.2.6 Biosinteza Neu5Gc	19

2.3.2.7	Metode za določanje sialičnih kislin	21
2.4	PRETOČNA CITOMETRIJA	22
<b>2.4.1</b>	<b>Kontrole v pretočni citometriji za ovrednotenje pozitivnega signala</b>	23
2.5	BIOPROCESI	25
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE</b>	28
3.1	SHEMA POTEKA DELA	28
3.2	MATERIAL	29
<b>3.2.1</b>	<b>Celične linije</b>	29
<b>3.2.2</b>	<b>Gojišče za rast in gojenje celic</b>	29
<b>3.2.3</b>	<b>Raztopine, pufri in reagenti</b>	30
<b>3.2.4</b>	<b>Oprema</b>	31
3.3	METODE	33
<b>3.3.1</b>	<b>Gojenje celic CHO v gojitvenih stekleničkah</b>	33
<b>3.3.2</b>	<b>Spremljanje bioprosesov</b>	34
<b>3.3.3</b>	<b>Štetje in določanje viabilnosti celic z aparatom Vi-Cell</b>	35
<b>3.3.4</b>	<b>Analiza Neu5Gc s pretočnim citometrom</b>	35
3.3.4.1	Postopek za določanje Neu5Gc na celicah - zunajcelično	35
3.3.4.2	Postopek za določanje Neu5Gc v celicah – znotrajcelično	36
3.3.4.3	Postopki fiksacije in uporaba različnih fiksativov za znotrajcelično določanje Neu5Gc	36
3.3.4.4	Izbira kontrol za preverjanje specifičnosti protiteles za določanje Neu5Gc	37
3.3.4.5	Titracija primarnih in sekundarnih protiteles	38
3.3.4.6	Testiranje ponovljivosti	39
3.3.4.7	Testiranje ponovljivosti – vpliv aparature	39
3.3.4.8	Testiranje linearnosti	39
3.3.4.9	Primerjava metod za zunajcelično in znotrajcelično določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom s klasično analitiko sialičnih kislin (RP-HPLC) na manjšem številu vzorcev	40
3.3.4.10	Ocena korelacije med vsebnostjo Neu5Gc na celicah CHO (pretočni citometer) in vsebnostjo Neu5Gc na rekombinantnem proteinu (RP-HPLC)	41
<b>3.3.5</b>	<b>Določanje koncentracije glikoproteina</b>	41
<b>3.3.6</b>	<b>Izolacija glikoproteina</b>	41
<b>3.3.7</b>	<b>RP - HPLC</b>	42
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	43
4.1	RAZVOJ IN OVREDNOTENJE METOD PRETOČNE CITOMETRIJE ZA DOLOČANJE Neu5Gc	44
<b>4.1.1</b>	<b>Testiranje protiteles za zunajcelično določanje Neu5Gc</b>	44
<b>4.1.2</b>	<b>Titracija primarnih in sekundarnih protiteles za zunajcelično določanje Neu5Gc</b>	45

<b>4.1.3</b>	<b>Primer postavitve vrat in histogram, ki ga dobimo z analizo podatkov, izmerjenih s pretočnim citometrom</b>	48
<b>4.1.4</b>	<b>Določanje načina fiksacije za znotrajcelično določanje Neu5Gc</b>	49
<b>4.1.5</b>	<b>Testiranje protiteles za znotrajcelično določanje Neu5Gc</b>	50
<b>4.1.6</b>	<b>Titracija primarnih in sekundarnih protiteles za znotrajcelično določanje Neu5Gc</b>	51
<b>4.1.7</b>	<b>Ponovljivost</b>	53
<b>4.1.8</b>	<b>Vpliv instrumenta na ponovljivost</b>	54
<b>4.1.9</b>	<b>Linearnost</b>	55
<b>4.1.10</b>	<b>Povzetek rezultatov preverjanja ustreznosti metode</b>	59
<b>4.1.11</b>	<b>Primerjava zunajceličnega in znotrajceličnega določanja Neu5Gc z RP-HPLC</b>	59
<b>4.1.12</b>	<b>Ocena korelacije med vsebnostjo Neu5Gc na celicah CHO in vsebnostjo Neu5Gc na rekombinantnem proteinu</b>	60
<b>4.1.13</b>	<b>Spremljanje bioprocесов in določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom.</b>	62
<b>4.1.14</b>	<b>Določanje Neu5Gc na različnih podtipih celic CHO</b>	65
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	67
<b>5.1</b>	<b>RAZPRAVA</b>	67
<b>5.1.1</b>	<b>Razvoj metode za zunajcelično določanje Neu5Gc</b>	67
<b>5.1.2</b>	<b>Razvoj metode za znotrajcelično določanje Neu5Gc</b>	69
<b>5.1.3</b>	<b>Izbor metode pretočne citometrije za določanje Neu5Gc</b>	72
<b>5.1.4</b>	<b>Ocena korelacije med vsebnostjo Neu5Gc na celicah CHO in vsebnostjo Neu5Gc na rekombinantnem proteinu</b>	74
<b>5.1.5</b>	<b>Spremljanje bioprocесов</b>	77
<b>5.1.6</b>	<b>Spremljanje Neu5Gc na različnih podtipih celic CHO</b>	78
<b>5.2</b>	<b>SKLEPI</b>	80
<b>6</b>	<b>POVZETEK (SUMMARY)</b>	81
<b>6.1</b>	<b>POVZETEK</b>	81
<b>6.2</b>	<b>SUMMARY</b>	83
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	85
<b>ZAHVALA</b>		
<b>PRILOGE</b>		

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl. 1: Priprava redčitvene vrste za kontrolna in primarna protitelesa.....	38
Pregl. 2: Priprava redčitvene vrste za sekundarna protitelesa .....	39
Pregl. 3: Priprava vzorcev za testiranje linearnosti .....	40
Pregl. 4: Kontrole za določanje specifičnosti protiteles proti Neu5Gc za zunajcelično določanje Neu5Gc .....	44
Pregl. 5: Kontrole za določanje specifičnosti protiteles proti Neu5Gc za znotrajcelično barvanje .....	50
Pregl. 6: Testiranje ponovljivosti za zunajcelično določanje Neu5Gc .....	54
Pregl. 7: Testiranje ponovljivosti za znotrajcelično določanje Neu5Gc .....	54
Pregl. 8: Testiranje ponovljivosti (vpliva instrumenta) za zunajcelično določanje Neu5Gc .....	54
Pregl. 9: Testiranje ponovljivosti (vpliva instrumenta) za znotrajcelično določanje Neu5Gc .....	55
Pregl. 10: Test linearnosti za zunajcelično določanje Neu5Gc .....	55
Pregl. 11: Test linearnosti za znotrajcelično določanje Neu5Gc .....	57
Pregl. 12: Povzetek rezultatov preverjanja ustreznosti metod za zunajcelično in znotrajcelično določanje Neu5Gc.....	59
Pregl. 13: Primerjava zunajceličnega (EP) in znotrajceličnega (IP) določanja Neu5Gc s pretočnim citometrom.....	60
Pregl. 14: Pearsonovi korelacijski koeficienti izračunani ločeno po poskusih in skupen koeficient .....	61
Pregl. 15: Pearsonovi korelacijski koeficienti izračunani za oba bioprocesa.....	64

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Pregled bioloških zdravil (EGA Handbook ..., 2008) .....	7
Slika 2: O-glikozilacija in N-glikozilacija proteinov v evkariontskih celicah (Werner, 2007).....	11
Slika 3: Kemijska struktura molekule sialične kisline in lista nekaterih radikalov z označenimi pozicijami,kjer se ti radikali lahko nahajajo (Traving in Schauer, 1998) .....	12
Slika 4: Prikaz metabolizma sialičnih kislin (Traving in Schauer, 1998) .....	17
Slika 5: Prikaz biosinteze Neu5Gc (Martensen in sod., 2001; Traving in Schauer, 1998)	18
Slika 6: Predlagana shema biosinteze Neu5Gc (Muchmore in sod., 1989) .....	20
Slika 7: Shematski prikaz pretočnega citometra (Italian ... , 2014).....	23
Slika 8: Specifična in nespecifična vezava primarnih protiteles .....	25
Slika 9: Shematski prikaz poteka eksperimentalnega dela naloge .....	28
Slika 10: Histogram kontrol za zunajcelično določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom.	45
Slika 11: Histogram titracije kontrolnih (cAb) in primarnih protiteles (pAb) za zunajcelično določanje Neu5Gc. ....	46
Slika 12: Histogram titracije sekundarnih protiteles (sAb) za zunajcelično določanje Neu5Gc.....	47
Slika 13: Primer rezultata, dobljenega s pretočnim citometrom, s pripadajočo statistiko...	48
Slika 14: Vpliv različnih fiksacijskih in permealizacijskih sredstev na obliko histograma	49
Slika 15: Histogram kontrol za zunajcelično določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom.	51
Slika 16: Histogram titracije primarnih protiteles za znotrajcelično določanje Neu5Gc ...	52
Slika 17: Histogram titracije sekundarnih protiteles za znotrajcelično določanje Neu5Gc	53
Slika 18: Test linearnosti za zunajcelično določanje Neu5Gc .....	56
Slika 19: Test linearnosti za zunajcelično določanje Neu5Gc – odstranitev nizkih vrednosti .....	56
Slika 20: Test linearnosti za znotrajcelično določanje Neu5Gc .....	57

Slika 21: Test linearnosti za znotrajcelično določanje Neu5Gc –odstranitev nizkih vrednosti .....	58
Slika 22: Ocena korelacije med vsebnostjo Neu5Gc na celicah CHO in vsebnostjo Neu5Gc na rekombinantnem proteinu .....	61
Slika 23: Bioprocес 1.....	63
Slika 24: Bioprocес 2.....	64
Slika 25: Neu5Gc pri različnih nastavivkah stresanja in deležih CO <sub>2</sub> pri vseh petih celičnih linijah.....	65

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Numerični rezultati obširne primerjave zunajceličnega določanja Neu5Gc pri celicah CHO s pretočnim citometrom (vsebnost Neu5Gc na celicah) z deležem Neu5Gc na proteinu izmerjenem z RP-HPLC

Priloga B: Numerični rezultati dobljeni iz Bioprocesa 1

Priloga C: Numerični rezultati dobljeni iz Bioprocesa 2

Priloga D: Numerični rezultati dobljeni pri določanju Neu5Gc pri različnih podtipih celic CHO s PC

Priloga E: Statistične formule, ki smo jih uporabili v izračunih z uporabo programa Excell

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

% via	odstotek živih celic
$\mu\text{L}$	mikroliter
Ca	kalcij
cAb	kontrolna protitelesa
CHO	chinese hamster ovary cells; celice iz ovarija kitajskega hrčka.
CMP	citidin-5'-monofosfat
$\text{CO}_2$	ogljikov dioksid
CV	koeficient variacije
$C_{\text{via}}$	koncentracija živih celic
DNK	dezoksiribonukleinska kislina
ELISA	encimski imunski test
EMA	European medical agency; evropski regulatorni organ
EP	zunajcelično določanje
FDA	ameriški regulatorni organ
FITC	flurescin izotiocianat
FL1	fluorescenčni detektor, ki meri zeleno fluorescenco
FL2	fluorescenčni detektor, ki meri rumeno fluorescenco
FL3	fluorescenčni detektor, ki meri rdečo fluorescenco
FSC	forward scatter; sipanje svetlobe v smeri vpadlega laserskega žarka
g	gravitacijski pospešek
GM3	monosialoganglioziid (glikosfingolipid)
H (pAb)	delež vzorca z visoko vsebnostjo primarnih protiteles
HD	Hanganutziu-Deicherjeva protitelesa
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija
L (cAb)	delež vzorca z nizko vsebnostjo kontrolnih protiteles
IP	Znotrajcelično določanje
Neu5Ac = NANA	N-Acetylneuraminska kislina
Neu5Gc = NGNA	N – Glikolilneuraminska kislina
NMR	jedrna magnetna resonanca
pAb	primarna protitelesa
PBS	fosfatni pufer s soljo
PC	pretočni citometer
Pregl.	preglednica
r	Personov koeficient korelacije
$R^2$	koeficient determinacije
rcf	relativna centrifugalna sila
RP-HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija na reverzni fazni
rpm	obrati na minuto
sAb	sekundarna protitelesa
SD	standardna deviacija
SSC	side scatter; sipanje svetlobe pravokotno na smer vpadlega laserskega žarka
t	čas

T	temperatura
$V_H$	Volumen vzorca z visoko vsebnostjo
$V_L$	Volumen vzorca z nizko vsebnostjo

## SLOVARČEK

**ANABOLIZEM SIALIČNIH KISLIN:** Nastanek oz. sinteza sialičnih kislin iz različnih prekurzorjev, pri čemer se energija porablja.

**BIOPROCES:** Proces pri katerem z uporabo mikroorganizmov ali evkariontskih celic ali njihovih delov pridobimo željen produkt.

**BIOREAKTOR:** Prostor oziroma posoda, kjer poteka bioprocес.

**DELOVNI ORGANIZEM:** Organizem, ki se uporablja v bioprocесu z namenom pridobivanja željениh produktov ali biomase.

**ZUNAJCELIČNO DOLOČANJE:** Z zunajceličnim določanjem določamo in merimo markerje na celični površini.

**GANGLIOZID:** Struktura sestavljena iz glikosfingolipida (ceramida ali oligosaharida) in ene ali več sialičnih kislin, ki je vezana na sladkorno verigo.

**GLIKOZILACIJA:** Vrsta posttranslacijske modifikacije za katero je značilno, da se glikozilna skupina (glikan) veže na nekatere aminokislinske ostanke in nastane glikoprotein.

**ZNOTRAJCELIČNO DOLOČANJE:** Z znotrajceličnim določanjem, kjer celice predhodno fiksiramo in permebaliziramo, določamo in merimo markerje na celični površini in v celici.

**KATABOLIZEM SIALIČNIH KISLIN:** Razpad sialičnih kislin na manjše gradnike, pri čemer energija nastaja. Katabolizem je navadno sklopljen z anabolizmom.

**LINEARNOST:** Linearno območje oz. linearnost je lastnost metode, da v določenem območju daje linearno proporcionalne rezultate, odvisne od koncentracije vzorca oz. sposobnosti metode, da z rezultati preskušanja dobimo proporcionalne vrednosti koncentracije analita. Za določitev linearnega območja je potrebno izmeriti standardne raztopine vzorca različnih koncentracij po celiem delovnem območju, potem pa izračunamo regresijsko premico z metodo najmanjših kvadratov.

**MONOKLONSKA PROTITELESA:** So monospecifična in monoafinitetna protitelesa, usmerjena proti enemu antigenu in enemu epitopu.

**N – GLIKOLILNEURAMINSKA KISLINA:** Najpogostejši oblici sialičnih kislin, ki jih najdemo na visoko glikoziliranih proteinih, sta Neu5Ac in Neu5Gc. Človeški in piščančji proteini vsebujejo le Neu5Ac, medtem ko proteini ostalih vretenčarjev vsebujejo tudi obliko sialične kisline Neu5Gc. Za človeka je Neu5Gc potencialno imunogena.

**NATANČNOST METODE:** Merilo za velikost slučajne napake in se ne nanaša na pravo ali specificirano vrednost. Pove nam, koliko rezultati meritev med seboj nihajo. Merilo natančnosti lahko prikažemo s standardno variacijo ali z relativno obliko standardne deviacije t.i. koeficientom variancije.

**POLIKLONSKA PROTITELESA:** Dobljena so z imunizacijo živali. Protitelesa nastala proti enemu antigenu, s katerim smo imunizirali žival, so produkti različnih limfocitov B in posledično reagirajo z različnimi epitopi tega antiga. Protitelesa se razlikujejo po specifičnosti, titru in afiniteti vezave na epitop. Pri uporabi poliklonskih protiteles lahko nastanejo številne težave (na primer nastanek navzkrižnih reakcij), zato se v raziskavah pogosteje uporablja monoklonska protitelesa.

**PONOVLJIVOST METODE:** Natančnost, dobljena iz rezultatov meritev pri ponovljivih pogojih. Za testiranje ponovljivosti uporabimo isto metodo, vzorec, isti reagent, analizo pa izvaja isti analitik na isti aparaturi isti dan.

**POSTTRANSLACIJSKE MODIFIKACIJE:** Modifikacije na proteinih, ki potečejo, ko je sesalski protein sintetiziran s pomočjo različnih encimov. Vrste posttranslacijskih modifikacij so: glikozilacija, sialilacija, acetilacija, alkilacija, fosforilacija, sulfacija, deaminacija, tvorba disulfidnih mostičkov

**PRETOČNA CITOMETRIJA:** Pretočna citometrija je tehnika s katero merimo in analiziramo lastnosti posameznih celic, ki v suspenziji ena za drugo potujejo skozi ozek snop laserske svetlobe.

**PREVERJANJE USTREZNOSTI METODE:** Postopek s katerim preverimo, če metodi lahko zaupamo. Tujka za preverjanje ustreznosti metode je izraz kvalifikacija metode. Pri preverjanju ustreznosti metode imamo omejen nabor različnih testov, ki so navadno predstojnja validacije. Validacija metode je obsežnejša in zahteva več testov.

**REKOMBINANTNI PROTEIN:** Protein, ki ga pridobimo s pomočjo vnesene rekombinantne DNK v gostiteljsko celico.

**SIALIČNA KISLINA:** Organska kislina, ki ima na poziciji 5 aminoskupino in karboksilno skupino na poziciji 1, kar povzroči, da je molekula pod fiziološkimi pogojimi negativno nabita in to jo uvršča med močne organske kisline.

**SIALILACIJA:** Sialilacija je zadnji korak v procesu glikozilacije in poteka v trans predelu golgijevega aparata. Tu pride do prenosa sialične kislina iz nukleotidnega prekurzorja CMP (CMP-sialična kislina) na galaktozo glikanske strukture, ki je že pripeta na sintetiziran protein.

**TITRACIJA PROTITELES:** Postopek s katerim določimo optimalno koncentracijo protiteles, ki jo uporabljamo za barvanje markerjev z določeno metodo.

# 1 UVOD

## 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Trajna celična linija CHO (*angl. Chinese hamster ovary cells*), ki izvira iz ovarija kitajskega hrčka, so sesalske celice, ki se pogosto uporabljajo za proizvodnjo visoko glikoziliranih rekombinantnih terapevtskih proteinov. Pripenjanje sialičnih kislin na glikozilirane celične proteine je zadnja stopnja v procesu glikozilacije. Poznanih je vsaj 40 vrst različnih sialičnih kislin, med njimi je napogostejsa N-Acetylneuraminska kislina (Neu5Ac). Pri vseh živalskih celicah, razen pri piščančjih in človeških celicah, se Neu5Ac pogosto pretvori v *N* – Glikolilneuraminsko kislino (Neu5Gc), ki se smatra kot potencialno imunogena struktura za človeka in piščanca. Za pretvorbo Neu5Ac v Neu5Gc je odgovorn encim CMP Neu5Ac-hidroksilaza, ki pri ljudeh zaradi genske okvare ni funkcionalen. Zato se vsak terapevtski protein z deležem Neu5Gc nad 1% smatra kot potencialno imunogen, saj lahko sproži nastanek anti Neu5Gc protiteles (Varki, 2001, 2009). Pri proizvodnji visoko glikoziliranih rekombinantnih proteinov, t.i. bioloških zdravil, ki se večinoma dogaja v nehumanih celicah, je nadzor nad deležem imunogenih struktur kot je Neu5Gc, ključnega pomena. Za detekcijo in kvantifikacijo Neu5Gc na rekombinantnih proteinih se rutinsko uporablajo metode visokotlačne tekočinske kromatografije (HPLC), pri katerih je nujna predhodna izolacija tarčnih proteinov iz biopresesnih žetev. Pri optimizaciji biopresesnih parametrov in produkcijskih gojišč, se tako pogosto srečujemo z zamudnim čakanjem na rezultate analiz. Le ti so osnova za nadaljnje korake uravnavanja gojitvenih pogojev in za eksperimente, namenjene raziskovanju pogojev zniževanja Neu5Gc na tarčnih glikoproteinih. Na trgu obstajajo poliklonska protitelesa proti Neu5Gc, ki omogočajo občutljivo in specifično detekcijo Neu5Gc molekul v/na celicah in v gojitvenem mediju (supernatantu) (Diaz in sod., 2009). Omenjena protitelesa bi lahko uporabili za indirektno barvanje celic in jih detektirali s pretočno citometrijo. Obe metodi sta relativno enostavni in hitri. Izmerili bi prisotnost Neu5Gc znotraj celice in na celični površini in v kolikor bi meritve korelirale s količino izmerjene Neu5Gc na tarčnem glikoproteinu, proizvodnem produktu, bi metoda pretočne citometrije lahko po potrebi zamenjala klasično detekcijo Neu5Gc s HPLC. S takim načinom določevanja Neu5Gc,

bi lahko hitro pridobili podatke o prisotnosti in količini potencialnega imunogena na rekombinantnem proteinu in skrajšali čas, ki je trenutno potreben od zaključka biopresnega poskusa do željenih analitskih rezultatov.

## 1.2 CILJ RAZISKOVANJA

Pričakujemo, da bomo uspeli vpeljati, ustrezen optimirati in ovrednotiti metodo za merjenje zunajcelične in/ali znotrajcelične vsebnosti Neu5Gc pri celicah CHO s pretočnim citometrom. Rezultate, izmerjene s pretočnim citometrom, bomo primerjali z rezultati dobljenimi z rutinsko metodo HPLC. Pričakujemo, da obstaja določena korelacija med vsebnostjo Neu5Gc slične kisline, izmerjene v/na celicah, z vsebnostjo le-te na rekombinantnem proteinu, ki ga celica proizvaja. Metoda za določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom bi bila lahko pomemben doprinos pri hitrejši analitiki Neu5Gc sličnih kislin, saj v primerjavi z ostalimi, že uveljavljenimi metodami, tu izolacija rekombinantnega proteina ni potrebna. V kolikor obstaja korelacija med vsebnostjo Neu5Gc, izmerjeno na celičnem nivoju in Neu5Gc na proteinu, ki ga celica proizvaja, bi z metodo pretočne citometrije lahko v zelo kratkem času identificirali celične klone, ki imajo večjo tendenco transformacije Neu5Ac v Neu5Gc. Metoda bi nam hitro podala tudi rezultate o vplivih različnih komponent gojič oz. biopresnih parametrov na delovanje encima CMP Neu5Gc hidroksilaze, ki je odgovoren za povečevanje količine Neu5Gc. Metoda bi lahko bila uporabna tudi pri izboru celične linije pred transfekcijo celic z genom želenega proteina, v kolikor se različne sesalske celice razlikujejo po vsebnosti Neu5Gc, saj je to edina metoda, ki omogoča zaznavanje Neu5Gc v celici in/ali na celični površini.

### 1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Oblikovali smo naslednje hipoteze:

- Pretočna citometrija je primerna metoda za kvantitativno določanje Neu5Gc.
- Znotrajcelično določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom je primernejša metoda od zunajceličnega določanja.
- Vsebnost Neu5Gc, ki jo s pretočnim citometrom izmerimo znotraj celice, korelira z vsebnostjo Neu5Gc, izmerjeno zunaj celice.
- Vsebnost Neu5Gc na rekombinantnem proteinu, določena z RP-HPLC, korelira z vsebnostjo celokupne Neu5Gc pri celicah CHO, določene s pretočnim citometrom.
- Vsebnost Neu5Gc pri celicah CHO je odvisna od faze celične rasti.
- Vsebnost Neu5Gc pri celicah CHO določena s pretočnim citometrom kolerira s količino rekombinantnega proteina.
- Različni podtipi parentalnih celic CHO se razlikujejo po vsebnosti NeuGc.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 REKOMBINANTNA BIOLOŠKA ZDRAVILA IN BIOLOŠKO PRIMERLJIVA ZDRAVILA

#### 2.1.1 Inovativna biološka zdravila

Biotehnologija je veda, ki povezuje naravoslovne in inženirske znanosti. Namen biotehnologije je doseči uporabo organizmov, celic, njihovih delov ali molekularnih analogov v proizvodnji in storitvah. Bioprocес je proces pri katerem z uporabo mikroorganizmov ali evkariontskih celic ali njihovih delov pridobimo željen produkt. Izraz rekombinantna biotehnologija se nanaša na biotehnologijo, kjer izkoriščamo gensko spremenjene organizme. Veda, ki se ukvarja z gensko spremenjenimi organizmi je genski inženiring. Nameni genskih inženirjev so (1) izolacija željenega gena, (2) manipulacija tega gena, (3) uspešen vnos gena v gostiteljsko celico in (4) dobro izražanje vnesenega gena v gostiteljski celici. Metode genskega inženiringu se uporabljajo tako v bazičnih raziskavah kot v industriji (Madigan in sod., 2000).

Velik delež rekombinantne tehnologije trenutno predstavlja področje razvoja in proizvodnje rekombinantnih bioloških zdravil (*angl. Biopharmaceuticals*). Sem spadajo učinkovine kot npr.: rekombinantni eritropoetin, rekombinantni rastni hormon, rekombinantni inzulin, rekombinantni filgrastim (G-CSF), rekombinantna monoklonska protitelesa in rekombinantna cepiva. Biološka zdravila se zelo razlikujejo od klasičnih zdravil, saj gre v večini primerov za kompleksne makromolekule, ki:

- imajo veliko molekulsko maso,
- imajo kompleksno tridimenzionalno zgradbo,
- so proizvedene s pomočjo živih organizmov,
- so pogosto heterogene ter različno glikozilirane,
- jih zelo težko ovrednotimo v celoti s fizikalno-kemijskimi analiznimi metodami
- so zaradi raznih sekundarnih struktur lahko potencialno imunogene (Štrukelj, 2007).

Pri bioloških zdravilih se nemalokrat srečujemo tudi s problemi ponovljivosti njihovega procesa, saj je le ta odvisna od obvladljivosti vseh stopenj procesa proizvodnje.

Za pridobivanje bioloških zdravil se uporabljajo različni ekspresijski sistemi. Uporabljajo se bakterije, kvasovke, nitaste glive, rastline, transgene rastline, celice insektov, sesalske celice, transgene živali in brezcelični sistemi (Jevnikar, 2007). Za produkcijo bioloških zdravil s kompleksnejšo strukturo proteinov (npr. visoko glikozilirani proteini), pa so zaradi potreb po sekundarnih modifikacijah proteinov, najprimernejše sesalske celice. Slabosti bioprocесov s sesalskimi celicami so težja prenosljivost bioprocесov na industrijski nivo zaradi občutljivosti celic in nižja količina produkta v primerjavi z drugimi delovnimi organizmi, ker se sesalske celice počasneje delijo (Madigan in sod., 2000).

Pridobivanje rekombinantnih bioloških zdravil je zahteven proces. Zelo poenostavljen prikaz pridobivanja rekombinantnih bioloških zdravil je opisan v nadaljevanju. Prvi korak je transfekcija celic, kjer gen za rekombinantni protein z ustreznim vektorjem najprej vnesemo v celico. Največkrat za vektor uporabimo plazmid, virusni vektor, liposom ali pa vnos gena dosežemo z balističnim obstreljevanjem celic s tujo DNK (genom za rekombinantni protein), ki je adsorbirana na težke kovinske delce. Gen lahko pred vnosom v celico tudi delno modificiramo, da se lažje izraža v gostiteljskem organizmu (Nelson in Cox, 2000). Transficiirane celice nato gojimo v ustreznih pogojih, da dobimo populacijo rekombinantnih celic, izmed katerih s celičnim kloniranjem in selekcijo, izberemo najbolj produktiven klon, ki se nato uporablja kot delovni organizem za produkcijo želenega produkta. Z izbiro ustreznega gojišča in njegovih dodatkov, izbiro najustreznejše bioreaktorske tehnologije in optimizacijo fizikalnih ter kemijskih pogojev v bioreaktorju, poskušamo doseči čim višjo celično koncentracijo, čim boljšo celično produktivnost in visoko kakovost želenega produkta. Če smo pri vsem uspešni, dobimo učinkovit, visoko produktiven in varen bioprocес (Leelavatcharamas in sod., 1996).

### 2.1.2 Biološko primerljiva zdravila

Inovativno zdravilo je tisto, ki pride na trg prvo po pridobljenem dovoljenju za promet. Nastane kot rezultat dolgoletnih raziskav in po dokazani kakovosti, varnosti in učinkovitosti, z obsežnimi pred-kliničnimi in kliničnimi študijami, je zdravilo dostopno bolnikom. Inovativno zdravilo je pod patentno zasčito, ko pa le-ta poteče, lahko na trg vstopi generično zdravilo, ki vsebuje že znano učinkovino v enaki farmacevtski obliki in jakosti, po kakovosti, varnosti in učinkovitosti pa se ne razlikuje od inovativnega zdravila in ima zato tudi podoben povzetek temeljnih značilnosti zdravila in podobno navodilo za uporabo. Predlagatelj za pridobitev dovoljenja za promet za generično zdravilo mora predložiti dokaz, da je zdravilo bistveno podobno zdravilu, za katerega je že izdano dovoljenje za promet. Dokazati mora t.i. bioekvivalenco in izvesti klinične študije v manjšem obsegu kot proizvajalec originatorskega zdravila. Na področju bioloških zdravil ne poznamo klasičnih generičnih zdravil, saj je v primeru izdelave kompleksne biološke učinkovine skoraj nemogoče izdelati biološko učinkovino z identično zgradbo, kot jo ima inovativno zdravilo (slika 1). Minimalne spremembe v procesu pridobivanja zdravila lahko vodijo do sprememb v strukturi učinkovine (Štrukelj, 2007).

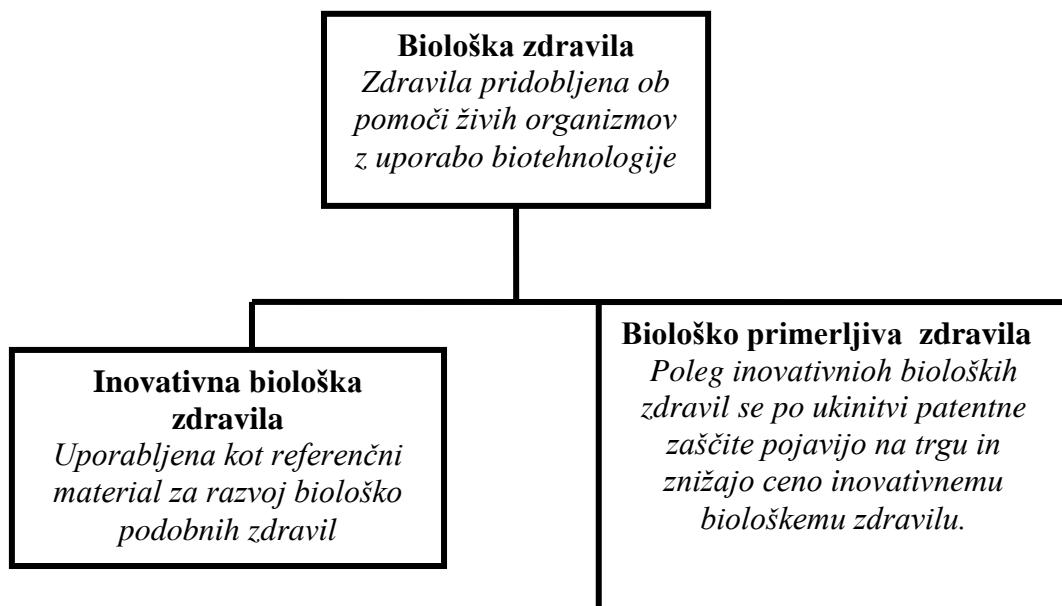
Ali je biološko primerljivo zdravilo dovolj primerljivo z originalnim biološkim zdravilom je potrebno potrditi s testi, ki potrdijo kakovost, varnost in učinkovitost biološko primerljivega zdravila. Testiranje kakovosti, varnosti in učinkovitosti zdravil je regulirano z zakonodajo in smernicami (Štrukelj, 2007). Smernice določa mednarodna konferenca o usklajevanju, ICH (*angl. International Conference of Harmonization*). Zakonodajo v Evropi regulira Evropska agencija za zdravila EMA (*angl. European Medical Agency*), v Ameriki pa Ameriška agencija za zdravila in hrano FDA (*angl. Food and Drug Administration*).

Regulatorni organi so zaradi procesnih specifik pri izdelavi bioloških zdravil, zaradi možnih sprememb v zgradbi med istimi biološkimi zdravili različnih proizvajalcev in zaradi strogih zahtev glede varnosti in z njo povezane potencialne imunogenosti

bioloških zdravil uvedli novo skupino zdravil, ki jo prepoznamo pod imenom: Biološko primerljiva zdravila (*angl. Biosimilars*) (Štrukelj, 2007).

Biološko primerljiva zdravila morajo z originatorskimi zdravili izkazovati primerljivo kakovost, varnost in učinkovitost. Slednje morajo dokazati tudi z lastnimi kliničnimi raziskavami, ki po številu bolnikov niso tako obsežne, kot pri razvoju inovativnega biološkega zdravila (Štrukelj, 2007).

Regulativa za biološko primerljiva zdravila, v primerjavi s klasičnimi generičnimi zdravili, še ni tako natančno definirana in vsak primer biološko primerljivega zdravila se obravnava ločeno.



Slika 1: Pregled bioloških zdravil (EGA Handbook ..., 2008)

Figure 1: Overview of biopharmaceuticals (EGA Handbook ..., 2008)

## 2.2 CELICE CHO

Celice CHO so sesalske celice pridobljene iz ovarija kitajskega hrčka (Puck in sod., 1958) in so najpogosteje uporabljena celična kultura za proizvodnjo sesalskih proteinov (Wurm, 1999). V tem sistemu lahko teoretično sintetiziramo katerikoli sesalski protein v aktivni obliki. Danes v farmacevtski industriji kompleksnejše sesalske proteine

večinoma proizvajajo s pomočjo celic CHO, saj ta delovni organizem omogoča pridobivanje proteinov z višjo biološko aktivnostjo in kompleksnejšo biokemično strukturo, kot proizvodnja v bakterijah in kvasovkah. Biološka aktivnost proteina in njegove farmakokinetične karakteristike so rezultat kompleksnih proteinskih sprememb, t.i. modifikacij, ki so posledica delovanja postranslacijskih mehanizmov v celici. Med najpogostejšimi modifikacijami so disulfidni mostički, oligomerizacija, proteolitični procesi, fosforilacija in glikozilacija. Poleg pomembnih postranslacijskih mehanizmov imajo celice CHO tudi druge pomembne karakteristike. Vnos gena za željen protein v celico CHO je dokaj enostaven in učinkovit, celice v primernem gojišču dobro rastejo v bioreaktorjih, možen pa je tudi prenos bioprocesa v večje merilo za industrijsko proizvodnjo rekombinantnih proteinov. Pomembna prednost sesalskih celic v primerjavi z mikroorganizmi je večja genetska stabilnost delovnih organizmov, saj sesalske celice ne mutirajo tako hitro kot bakterijske. Slabosti celic CHO in drugih sesalskih celic v primerjavi z ostalimi gostiteljskimi organizmi, kot sta pogosto uporabljeni bakterija *E.coli* in kvasovka *S. cerevisiae* so: (1) počasnejše razmnoževanje sesalskih celic, (2) nižja produkcija proteinov in (3) težji prenos na industrijski nivo. Za gojenje sesalskih celic potrebujemo kompleksna gojišča in visoko sofisticirano bioreaktorsko tehnologijo, kar poveča stroške bioprocесов (Wurm, 1999).

### 2.3 POSTTRANSLACIJSKE MODIFIKACIJE

Ko je sesalski protein sintetiziran, znotraj celice potečejo različne modifikacije proteinov. Modifikacije razširijo nabor funkcijskih značilnosti proteinov. Zelo znana posttranslacijska modifikacija proteinov je t.i. glikozilacija, pri kateri se glikozilna skupina (glikan) veže na nekatere aminokislinske ostanke in nastane glikoprotein. V tej nalogi se bomo dotaknili le glikozilacije oz. sialilacije. Obstajajo pa tudi druge posttranslacijske modifikacije proteinov, kot npr.: acetilacija, alkilacija, fosforilacija, sulfacija, deaminacija, tvorba disulfidnih mostičkov, itd.. S posttranslacijskimi modifikacijami je tako nadzorovana aktivnost proteina, njegova struktturna oblika (konformacija) in vloga v biokemijskem procesu (Slanc, 2007).

### 2.3.1 Glikozilacija

V nasprotju z aminokislinsko sekvenco proteina, glikozilacija ni določena in odvisna od sekvence vnesenega gena, temveč je pogojena s kompleksnimi post-translacijskimi mehanizmi gostiteljske evkariotske celice. Vzorec glikozilacije na tarčnem proteinu je odvisen od številnih dejavnikov. Razlikuje se lahko glede na vrsto gostiteljske celice, pogosto tudi med različnimi kloni pridobljenimi iz iste gostiteljske celice. Znaten vpliv na vzorec glikozilacije ima tudi gojišče z različnimi dodatki, specifična produktivnost, vrsta bioprosesa in fiziološko stanje gostiteljske celice (Werner in sod., 2007).

Poznamo dve osnovni vrsti glikozilacije proteinov, O-glikozilacijo in N-glikozilacijo (slika 2). Obe glikozilaciji potekata v endoplazmatskem retikulumu in golgijskem aparatu.

#### 2.3.1.1 N–vezani glikani

N-glikozilacija oz. N-glikani so najbolj preučevani in imajo tudi največji vpliv na končno funkcijo in strukturo proteina (Kornfeld in Kornfeld, 1985; Spellman, 1990). V nasprotju z O-glikozilacijo, N-glikozilacija poteče na aminokislinskem zaporedju asparagin-X-serin/treonin (Asn-X-Ser/Thr), kjer je X lahko katerakoli aminokislina, razen proлина (Bause, 1983). V kolikor se na proteinu nahaja omenjeno Asn-X-Ser/Thr zaporedje, se na asparaginski ostanek aminokislinskega zaporedja preko N-glikozidne veže gikan, sestavljen iz pentasaharidnega jedra sestavljenega iz treh manoz (Man) in dveh N-acetylglukozaminov (GlcNAc) ( $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ) (Butler, 2006).

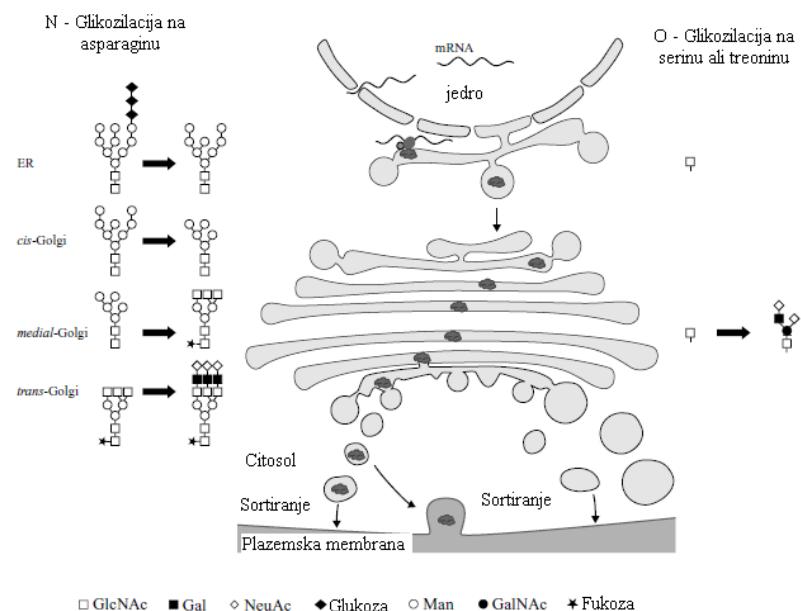
Prekurzor za N-glikozilacijo je oligosaharid sestavljen iz treh glukoz (Glc), devetih manoz (Man) in dveh N-acetylglukozaminov (GlcNAc) ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ), ki nastane postopoma z dodatkom monosaharidov, katerih prekurzorji so nukleotidni sladkorji UDP-GlcNAc in GDP-Man ali lipidnih fosfatnih intermediatov (dolihol-P-Man in dolihol-P-Glc). Oligosaharid se preko dolihola veže na dva fosfata in 14 delni oligosaharid se ob pomoči encima oligosaharid transferaze (OST) veže na asparaginski ostanek že omenjenega konsenznega zaporedja (Butler, 2006).

V naslednji stopnji N-glikozilacije encim  $\alpha$ -1,2 glukozidaza I odstrani terminalno glukozo, nato pa encim  $\alpha$ -1,2 glukozidaza II odstrani še dve terminalni glukozi. Sledi odstranitev vsaj ene manoze z encimom manozidaza I, nato pa se glikoprotein prenese v cis del golgijevega aparata. V golgijevem aparatu encimi transferaze posamično dodajajo monosaharide GlcNAc, galaktozo (Gal), fukozo (Fuc) in sialične kisline. Končna struktura N-glikanov je heterogena in je odvisna od prisotnosti in aktivnosti posameznih transferaz. Centralne manoze imajo lahko po dve ali po 4 antene, ki se še naprej modificirajo. Poteče lahko terminalna sialilacija anten, fukozilacija GlcNAc in dodajanje GlcNAc na centralno jedro manoznih ostankov. Končne strukture N-glikanov se lahko zelo razlikujejo, odvisni pa so od gostiteljskega (produkcijskega) organizma, faze celične rasti, »kondicije« kulture in okoljskih parametrov (pH, temperature, vsebnosti kisika in amonija, gojišča s svojimi dodatki, itd.) (Butler, 2006).

### 2.3.1.2 O-vezani glikani

Tudi O-vezani glikani, ki so strukturno manjši od N-vezanih glikanov, so zelo pomembna značilnost glikoproteinov. O-glikani se vedno dodajajo post-translacijsko na dokončno zvit protein. Natančna napoved mesta, kjer bo potekla O-glikozilacija ni mogoča, ker ne obstaja nobeno konsenzno aminokislinsko zaporedje, kjer bi bila ta glikozilacija zagotovljena. Vemo le, da O-glikozilacija pogosto poteče na delu proteina, ki je bogat s serinom, treoninom in prolinom (Van den Steen in sod., 1998).

Najpogostejsa oblika O-glikanov je t.i. mucinski tip, pri katerem se N-acetylgalaktozamin (GalNAc), ob pomoči encima GalNAc transferaze, doda na treoninski ali serinski aminokislinski ostanek proteina. Tako pripetemu sladkorju nato različne glikoliltransferaze dodajajo druge sladkorje in jederna struktura O-glikana ima lahko kar osem različic. Slednje se navadno še nadlje modificirajo s procesi sialilacije, fukozilacije, sulfilacije, metilacije in acetilacije (Van den Steen in sod., 1998).



Slika 2: O-glikozilacije in N-glikozilacija proteinov v evkariontskih celicah (Werner, 2007)

Figure 2: Protein glycosylation along the secretory pathway of eucaryotic cells (Werner, 2007)

### 2.3.2 Sialilacija

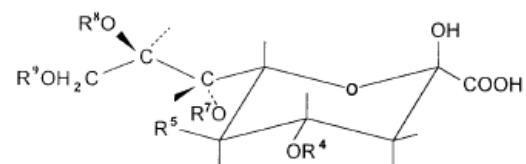
Sialilacija je zadnji korak v procesu glikozilacije in poteka v trans predelu golgijevega aparata. Tu pride do prenosa sialične kisline iz nukleotidnega prekurzorja CMP (CMP–sialična kislina) na galaktozo glikanske strukture, ki je že pripeta na sintetiziran protein. Prav razpoložljivost CMP-sialične kisline je ključna za stopnjo sialilacije (Werner, 2007).

#### 2.3.2.1 Struktura sialičnih kislin

Med sialične kisline sodi okoli 40 derivatov sladkih sialičnih kislin z devetimi ogljikovimi atomi. Na poziciji 5 imajo sialične kisline aminoskupino in na poziciji 1 karboksilno skupino, kar povzroči, da je molekula pod fiziološkimi pogojmi negativno nabita in se uvršča med močne organske kisline. To je osnovna oblika sialične kisline, ki je kot take v naravi ne najdemo. Z acetilacijo amino skupine dobimo t.i. N-acetylneuraminsko kislino (Neu5c), ki je daleč najbolj razširjena oblika sialičnih kislin. Z zamenjavo vodika s hidroksilno skupino v metilnem delu acetilne skupine nastane N–

glikolilneuraminska kislina (Neu5Gc), ki je prisotna pri večini živalskega kraljestva, ne najdemo pa je pri človeku in piščancu (Schauer in Kelm., 1995). Hidroksilna skupina na pozicijah 7, 8 in 9 je lahko esterificirana z ocetno kislino in to imenujemo O-acetilacija, ki jo včasih najdemo tudi na poziciji 4 (Schauer, 1991). Znane so še številne modifikacije sialičnih kislin: dodajanje laktoilne skupine na pozicijo 9, dodajanje sulfatne ali metilne skupine na pozicijo 8 (Schauer in Kelm., 1995). Struktura sialične kislina in njene modifikacije so prikazane na sliki 3.

Pestrost in zanimivost sialičnih kislin, poleg številnih modifikacij, poveča tudi raznolikost vezavnih mest za sialične kisline na celicah in molekulah. Navadno predstavljajo terminalni del glikanske verige in so preko C2 vezane na pozicijo 3 ali 6 sladkorja ali na pozicijo 8 naslednje sialične kisline. V bakterijskih kapsulah in gangliozidih višjih živali, se sialične kisline lahko nahajajo znotraj glikanske verige. Sialilirani glikani so lahko del glikolipidov ali glikoproteinov in so lahko predstavniki oligosaharidov ali polisaharidov (Schauer, 1982).



$R^5$	$R^{4,7,8,9}$	
$-\text{NH}-\overset{\parallel}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{CH}_3$	$-\text{H}$	(4,7,8,9)
$-\text{NH}-\overset{\parallel}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\overset{\parallel}{\underset{\text{OH}}{\text{O}}}$	$-\overset{\parallel}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{CH}_3$	(4,7,8,9)
$-\text{NH}-\overset{\parallel}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\overset{\parallel}{\underset{\text{O}=\text{O}}{\text{O}}} \text{CH}_3$	$-\overset{\parallel}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{CH}-\text{CH}_3$	(9)
$-\text{OH}$	$-\text{CH}_3$	(8)
	$-\text{SO}_3\text{H}$	(8)
	$-\text{PO}_3\text{H}_2$	(9)

Slika 3: Kemijska struktura molekule sialične kislina in lista nekaterih radikalov z označenimi pozicijami, kjer se ti radikali lahko nahajajo (Traving in Schauer, 1998)

Figure 3: Chemical structure of the sialic acid molecule and a list and positions of natural substituents (Traving in Schauer, 1998)

### 2.3.2.2 Pojavljanje sialičnih kislin

Sialične kisline so našli pri večini pripadnikov živalskega kraljestva, od iglokožcev do človeka. Sialokonjugati so prisotni na celičnih površinah, v celicah in tudi v membranah celičnih organelov (npr. golgijskega aparata) (Traving in Schauer, 1998). Pri nižjih živalih še niso našli sialičnih kislin. Edina znana izjema je žuželka iz rodu *Drosophila*, kjer so pri ličinki odkrili polisialično kislino (Roth in sod., 1992).

Sialične kisline so odkrili pri praživalih, virusih in bakterijah. Bakterija *Escherichia coli* na svojem zunanjem delu celične stene vsebuje dolge saharide, ki so sestavljeni iz preko 200 sialičnih kislin (Schauer in Kamerling, 1997).

Pri višjih živalih so sialične kisline tudi pomembnejša komponenta seruma in služi (Traving in Schauer, 1998).

### 2.3.2.3 Funkcije sialičnih kislin

Sialične kisline se močno razlikujejo po strukturi in po svojih bioloških funkcijah. V prvem delu bodo omenjene »splošne« funkcije sialičnih kislin, v drugem delu pa se bom osredotočila na vlogo sialičnih kislin pri visoko glikoziliranih bioloških zdravilih.

Sialične kisline so negativno nabite in so vključene v vezavo in transport pozitivno nabitih molekul, ki so za celico ključnega pomena (npr.  $\text{Ca}^{2+}$ ). Močno so vključene v razne interakcije v celičnih in v medmolekulske stike (Schauer, 1982). Sialične kisline imajo tudi zaščitno vlogo, saj se nahajajo na terminalnem delu glikoproteina in lahko zaščitijo protein pred razgradnjijo s proteazami (Schauer, 2000). Ob bakterijskih okužbah lahko sialične kisline na površju celice gostitelja celico zaščitijo pred kolonizacijo bakterij (Schauer, 2000). Med dvema sialičnima kislinama je negativen naboј in to lahko stabilizira strukturo encima ali celo celične membrane (Müller, 1974). Sialične kisline imajo velik pomen tudi v telesnih sluznicah, saj so pomembna komponenta služi in posledično nudijo močno zaščitno vlogo (Schauer, 1992).

Veliko vlogo imajo tudi pri razpoznavnih procesih med celicami in molekulami, saj je vzorec sialičnih kislin pomemben pri imunskega odzivu, ki glede na vzorec oz. vrsto sialičnih kislin lahko prepozna vsiljivca in sproži fagocitozo (Schauer, 2000). Sladkorji predstavljajo antigensko determinanto (npr. krvne skupine), so pa tudi nujen sestavni del receptorjev za hormone in citokine. Tudi mnogo patogenih mikroorganizmov in/ali njihovih toksinov (npr. kolera toksin, *E.Coli*, *H.Pylori*, *Trypanosoma cruzi*) se veže na gostiteljsko celico preko receptorja, ki vsebuje sialične kisline (Schauer in Kamerling, 1997). Pomembna skupina molekul, ki prepozna različne oz. točno določene sialične kisline so t.i. lektini. Navadno so to oligomerni glikoprotini iz rastlin in živali, ki se vežejo na specifični slatkorni ostanek in so tudi del imunskega sistema. Gre za zelo specifične interakcije (Crocker in sod., 1998).

Sialične kisline imajo vlogo tudi pri »maskiranju« eritrocitov, tumorskih celic in mikroorganizmov. Eritrociti so normalno pokriti s tankim slojem sialičnih kislin, življenjska doba eritrocitov pa je približno 120 dni. Eritrociti postopno izgubljajo sialične kisline in ko je eritrocit nemaskiran se veže na makrofag, ki izvede fagocitozo. Signal za degradacijo so subterminalni galaktozni ostanki (Bratosin in sod., 1995). Nekatere tumorske celice se zamaskirajo s sialičnimi kislinami in imunski sistem jih zaradi tega ne prepozna. Visoka stopnja sialilacije ima t.i. imunosupresivni efekt in prav povečana aktivnost encima sialil transferaze je pogosto karakteristika tumorskega tkiva. Omenjajo tudi, da je prav maskiranje s sialičnimi kislinami razlog za izgubo kontaktne inhibicije rakavih celic (Wieser in sod., 1995). Poleg tega maskiranje lahko izkoristijo tudi nekateri patogeni mikroorganizmi (npr. *E.Coli* in *N. Gonorrhoeae*), ki tako prekrijejo svoje antigene in ne izzovejo imunskega odziva (Jarvis, 1995).

Sialične kisline imajo tudi velik vpliv na biološke in fizikalne lastnosti kompleksnejših bioloških zdravil. Stopnja sialilacije lahko vpliva na farmakokinetične lastnosti rekombinantnih proteinov. Dokazali so, da povečana sialilacija poveča razpolovno dobo terapevtskih proteinov asparaginaze in eritropoetina. Poleg tega nekatere sialične kisline zamaskirajo galaktozne ostanke in zmanjšajo riziko za imunogenost biološkega zdravila. Hipersialilacijo lahko izzovejo tudi umetno, saj je to večinoma zaželena lastnost za originatorska biološka zdravila. Podobna biološka zdravila pa se morajo

čim bolj približati originatorskem zdravilu in če se pojavljajo prevelike razlike v sialilaciji med originatorjem in generičnim zdravilom, lahko pride do težav pri registraciji podobnih bioloških zdravil (Byrne in sod., 2007).

Vse sialične kisline pa niso zaželene in jih moramo tekom razvoja biološkega zdravila čim bolj zmanjšati. Taka je N-acetilglikolilneuraminska kislina (Neu5Gc), ki je človeku potencialno imunogena in je lahko produkt gostiteljskega organizma (Byrne in sod., 2007).

#### 2.3.2.4 Metabolizem sialičnih kislin

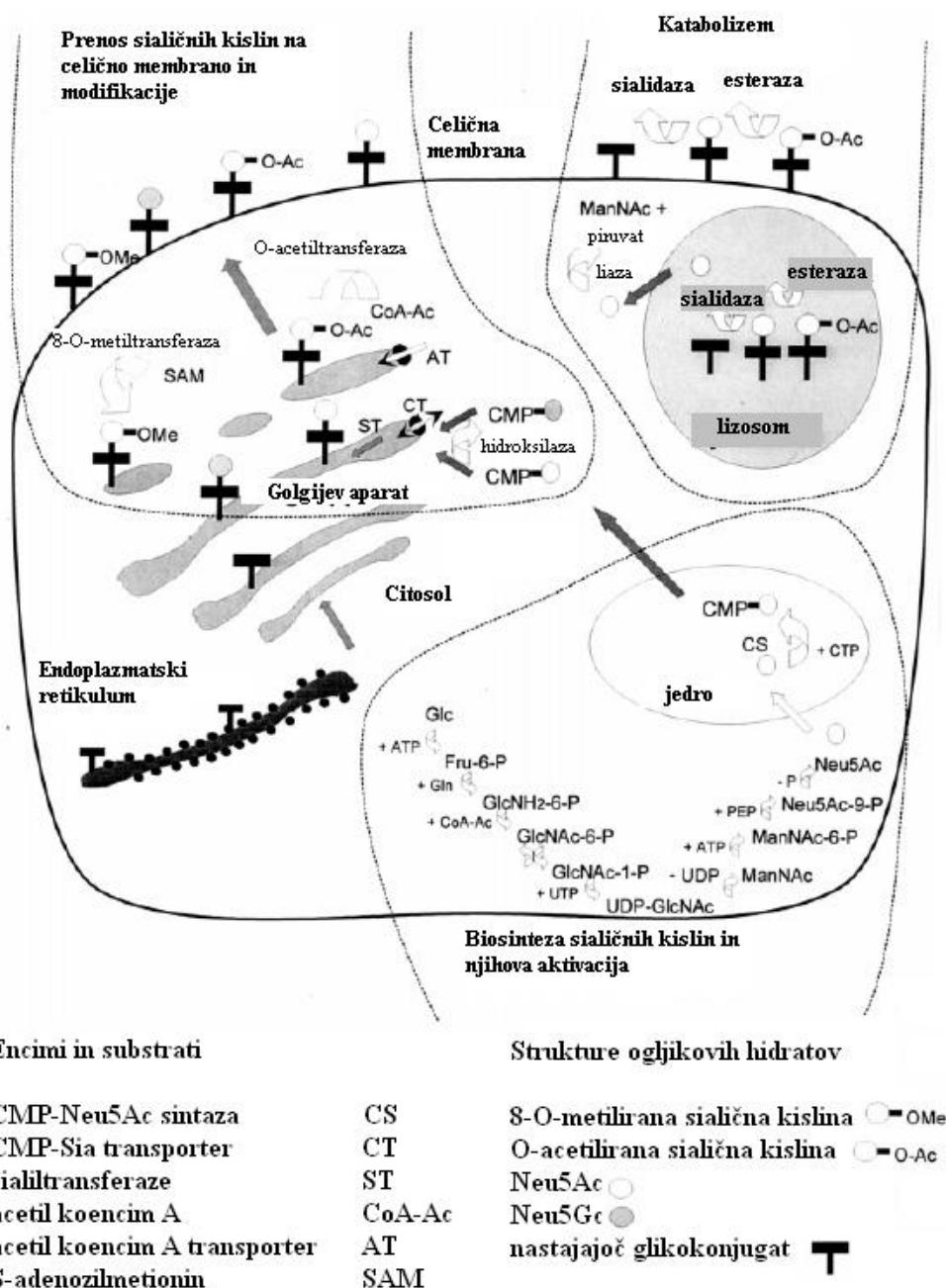
##### ➤ ***Anabolizem sialičnih kislin***

Sinteza sialičnih kislin poteka v različnih celičnih organelih. Sladkor se sintetizira v citosolu iz N-acetylmanozamina-6-fosfata (ManNac-6-P) in fosfoenolpiruvata (PEP). Sintezi N-acetylneuraminske kisline-9-fosfat (Neu5Ac-9-P) in defosforilizaciji Neu5Ac-9-P sledi prenos molekule Neu5Ac v jedro celice, kjer se ob pomoči CMP-Neu5Ac sintaze na molekulo Neu5Ac prenese citidin monofosfat (CMP) in tako nastane aktivna molekula CMP-Neu5Ac, ki zapusti jedro celice in se prenese v endoplazmatski retikulum ali golgijsev aparat. V omenjenih celičnih organelih se aktivirana sialična kislina s pomočjo encimov sialiltransferaze pripne na oligosaharidno verigo nastajajočega glikokonjugata. Vezane sialične kisline se lahko še naprej modificirajo z O-acetilacijo ali O-metilacijo, nato pa se glikokonjugat prenese na površino celice (slika 4). Edina modifikacija sialičnih kislin, ki poteče v citosolu je hidroksilacija N-acetilne skupine CMP-Neu5Ac, nastane pa CMP-Neu5Gc (Schauer in sod., 1995). Ta modifikacija je podrobnejše opisana v nadaljevanju naloge.

##### ➤ ***Katabolizem sialičnih kislin***

Ključni encimi, ki so vključeni v razgradnjo sialičnih kislin so sialidaze. Ti encimi so vezani na membrano in lahko odstranjujejo sialične kisline iz glikokonjugatov na celični

površini in iz glikokonjugatov v serumu. Pri višjih živalih razgradnja glikokonjugatov poteka z receptorsko pogojeno endocitozo. Ko se endosom zlije z lizosomom, se terminalne sialične kisline odstranijo s sialidazami, ki se nahajajo v lizosomih. Začetek razgranje poteče z odstranitvijo O-acetilne skupine z esterazo. Proste sialične kisline (Neu5Ac in/ali Neu5Gc) se prenesejo iz membrane lizosoma v citosol, kjer se lahko tudi reciklirajo s ponovno aktivacijo in prenosom na nov glikoprotein. V kolikor pa ne pride do reciklaže, se sialične kisline z encimom acetilneuraminat liazo razgradijo v molekuli acetilmanozamina in piruvat (slika 4). Sialidaze imajo tudi mikroorganizmi, večinoma pa jih izločajo v okolje kjer pridejo v stik s substratom (Schauer in sod., 1995).



Slika 4: Prikaz metabolizma sialičnih kislin (Traving in Schauer, 1998)

Figure 4: Metabolism of sialic acids (Traving in Schauer, 1998)

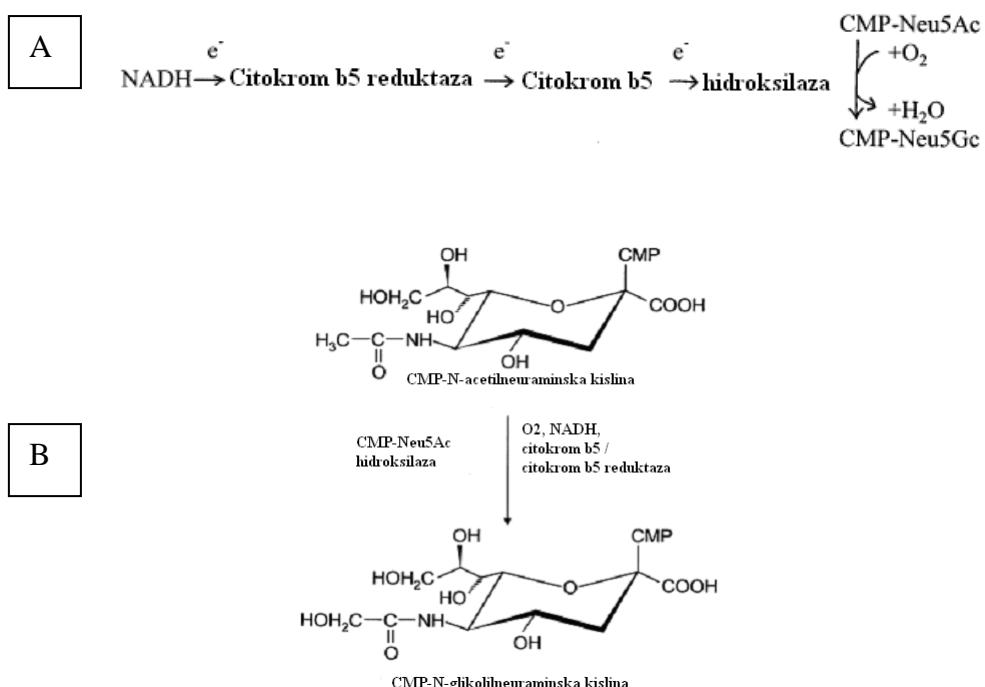
### 2.3.2.5 N-acetilglikolilneuraminska kislina (Neu5Gc)

Najpogostejši obliki sialičnih kislin, ki jih najdemo na visoko glikoziliranih bioloških zdravilih, sta Neu5Ac in Neu5Gc. Človeški in piščančji proteini vsebujejo le Neu5Ac,

medtem ko proteini ostalih vretenčarjev vsebujejo tudi drugo obliko sialične kisline in sicer Neu5Gc (Kiligore in sod., 2008).

Za nastanek Neu5Gc je odgovoren encim CMP-Neu5Ac hidroksilaza (slika 5A), ki je v aktivni obliki prisoten pri vseh vretenčarjih, razen pri človeku in piščancu. Pri človeku so dokazali, da genu za omenjeni encim manjka ekson 6, ki kodira N-terminalno domeno proteina. Tekom evolucije je prišlo do delecije eksona 6. Rezultat te delecije je neaktivnen protein, ki ni sposoben pretvorbe Neu5Ac v Neu5Gc (Irie in sod., 1998).

Izolacija in karakterizacija CMP-NeuAc hidroksilaze je pokazala, da je encim topna oksigenaza, ki se nahaja v citosolu. Aktivacija CMP-Neu5Ac hidroksilaze je odvisna od citokrom b5 reduktaze in citokroma b5, ki omogočita prenos elektronov iz kofaktorja NADH na hidroksilazo (slika 5B). Encim se skupaj z citokrom B5 reduktazo nahaja v membrani endoplazmatskega retikuluma (Martensen in sod., 2001).



Slika 5: Prikaz biosinteze Neu5Gc (Martensen in sod., 2001; Traving in Schauer, 1998)

Figure 5: The biosynthesis of Neu5Gc (Martensen in sod., 2001; Traving in Schauer, 1998)

Ker Neu5Gc različica sialične kisline pri človeku ni prisotna, je lahko potencialno imunogena. Posledice vnosa Neu5Gc v človeka še niso popolnoma znane. Pri človeku in piščancih so v majhni količini našli prisotnost Neu5Gc v nekaterih rakavih tkivih in limfomih. Ti rakavi bolniki so producirali t.i. Hanganutziu-Deicherjeva (HD) protitelesa proti Neu5Gc. Ta protitelesa so rezultat imunskega sistema, ki se lahko odzove že pri zelo majni količini Neu5Gc (Mukuria in sod., 1986; Higashihara in sod., 1991).

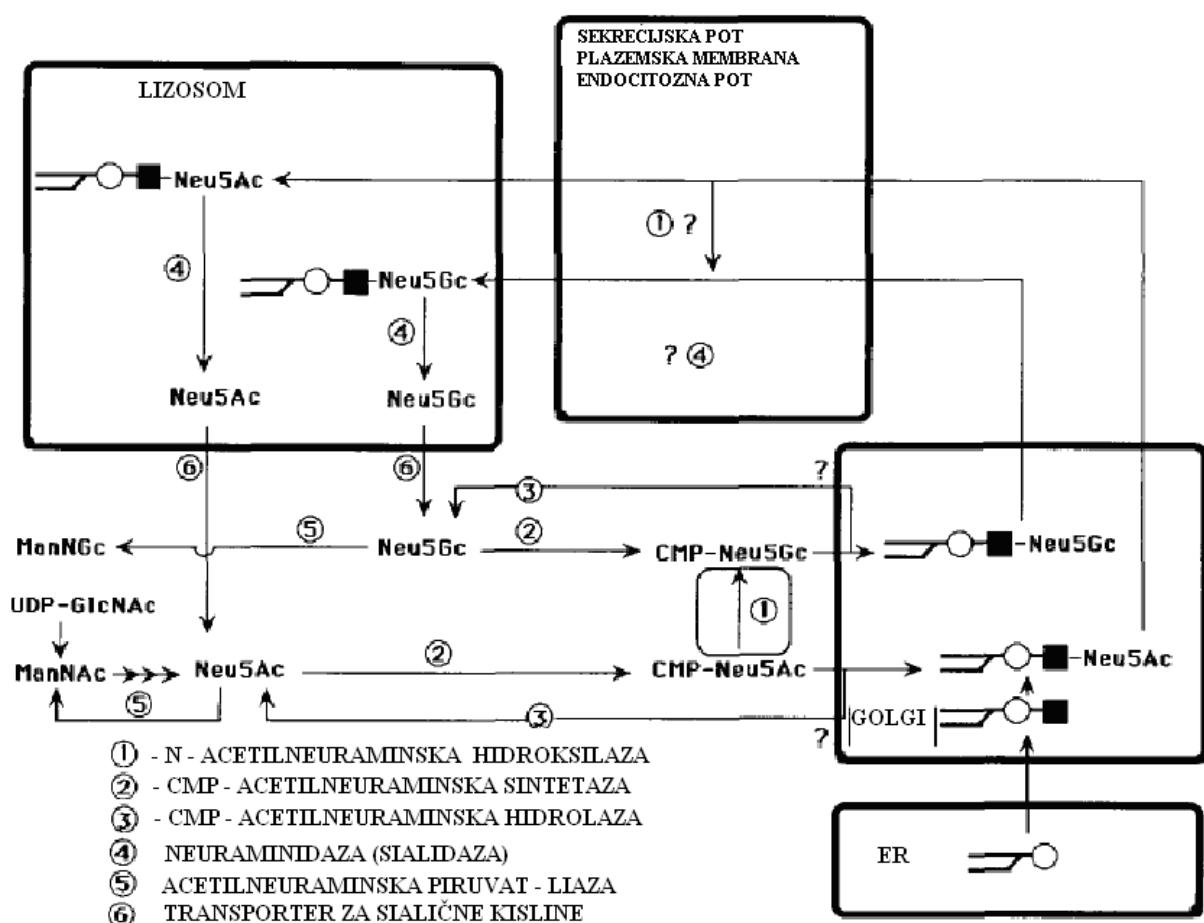
Potencialno imunogenost so najprej testirali na piščancih, saj so poleg ljudi to edini vretenčarji, ki nimajo Neu5Gc sialične kisline. Ko so piščance imunizirali z rekombinantnim eritropoetinom pridobljenim s celicami CHO, niso zaznali signifikantnega titra protiteles proti Neu5Gc. Morda je to posledica tega, da rekombinantni eritropoetin vsebuje zanemarljivo količino Neu5Gc saj od vseh sialičnih kislin, Neu5Gc predstavlja le 1 %. Tudi iz tega vidika so celice CHO zelo primeren ekspresijski sistem za produkcijo rekombinantnih bioloških zdravil, saj druge živalske celične linije (predvsem mišje) intenzivnejše sintetizirajo Neu5Gc. Ko pa so piščance imunizirali s fetuinom (7% vsebnost Neu5Gc) in GM3 (100% vsebnost Neu5Gc), je prišlo do imunskega odziva in signifikantnega povečanja titra protiteles proti Neu5Gc (Noguchi in sod., 1994).

Za produkcijo in varnost rekombinantnih bioloških zdravil ima spremeljanje vsebnosti Neu5Gc na proteinih izredno velik pomen (Kiligore in sod., 2008). Splošnega pravila o deležu Neu5Gc na proteinu, ki bi bil problematičen za regulatorne organe ni, če pa je delež Neu5Gc pod 1 %, je verjetnost za neodobritev produkta zaradi potencialne imunogenosti Neu5Gc močno zmanjšana (Kiligore in sod., 2008).

### 2.3.2.6 Biosinteza Neu5Gc

Po modelu, ki so ga leta 1989 predstavili Muchmore in sod., naj bi pretvorba CMP-Neu5Ac v CMP-Neu5Gc z encimom CMP-NeuAc hidroksilazo potekla v citoplazmi. Ta proces je ireverzibilen. Za razliko od drugih encimov, ki imajo podobno funkcijo in se nahajajo v celični membrani ali membranah celičnih organelov, je ta encim topen in se nahaja v citosolu. Nekateri raziskovalci dopuščajo možnost, da je encim v prvi fazi

vezan na membrano in se nato s proteolizo sprosti v citosol. Po nastanku CMP-Neu5Gc poteče transport omenjene molekule v lumen golgijskega aparata, kjer služi kot donor za encime sialiltransferaz. Neu5Gc se lahko veže na glikoprotein ali pa se potencialno kot prosta molekula (Neu5Gc) izloči iz golgijskega aparata. Slednje predstavlja alternativni vir za proste molekule Neu5Gc v citosolu. Direkten razpad CMP-Neu5Gc so zaenkrat dokazali le *in vitro*. Večino proste molekule Neu5Gc pripisujejo eksportu te molekule iz lisozomov. Glikoproteini se namreč v lisozomih s sialidazami razkrajajo, proste molekule Neu5Gc pa se izločajo v citoplazmo. Razkroj Neu5Gc poteče zelo pozno, ko je okoli 90 % Neu5Ac pretvorjenih v Neu5Gc. Predvidevajo, da se Neu5Gc razkroji v N-glikolilmanozamin z encimom acetilneuraminatno-piruvat-liazo (slika 6). Potrebno je poudariti, da opisani model ne upošteva, da je encim CMP-Neu5Ac sintaza verjetno locirana in aktivna v celičnem jedru, kot je navedeno in citirano v poglavju metabolizem sialičnih kislin (Muchmore in sod., 1989).



Slika 6: Predlagana shema biosinteze Neu5Gc (Muchmore in sod., 1989)

Figure 6: The proposed scheme of Neu5Gc biosynthesis (Muchmore in sod., 1989)

### 2.3.2.7 Metode za določanje sialičnih kislin

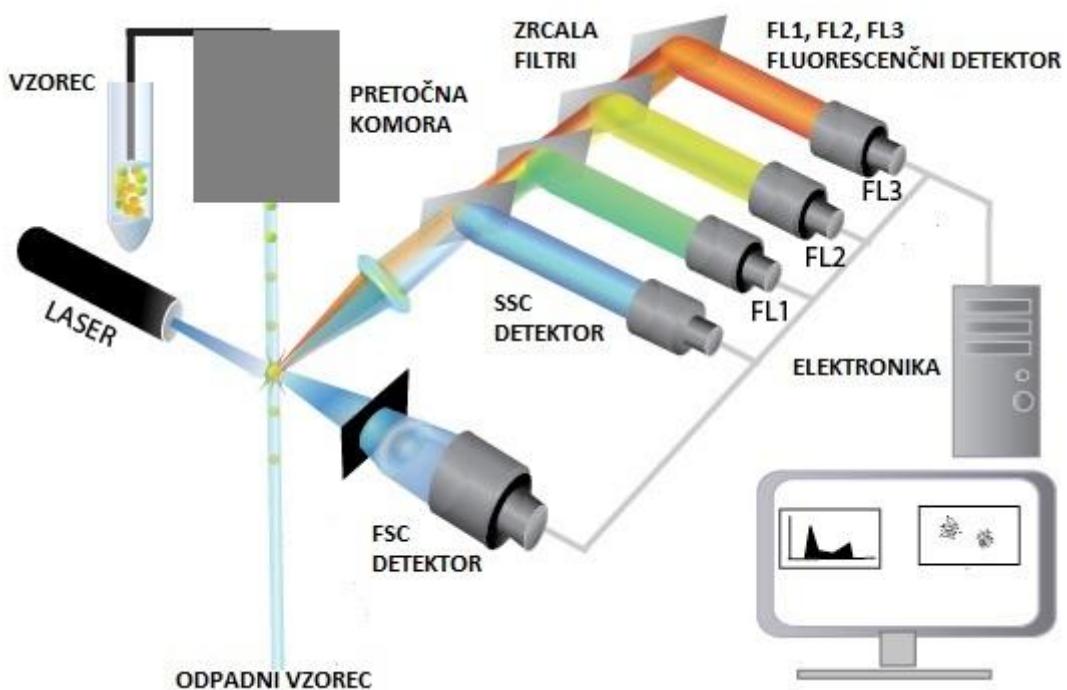
Metod za analizo sialičnih kislin je več. Navadno je pred analizo sialičnih kislin in drugih glikanskih struktur potrebno protein izolirati, za kar je potrebna izbira primernega tipa preoperativne kromatografske tehnike (odvisno od narave proteina). Pri prvotnih analizah sialičnih kislin so uporabljali kombinacijo plinske kromatografije z masno spektroskopijo in tudi NMR-spektroskopijo. Glavna pomanjkljivost teh tehnik je, da zahtevajo zelo sofisticirano opremo in analitike z zelo dobim poznavanjem omenjenih analitskih metod in zato so te tehnike za rutinsko uporabo dokaj neprimerne (Schauer, 2000). Revolucijo v analitiki sialičnih kislin je sprožila fluorometrična visokotlačna tekočinska kromatografija, ki je uporabniku prijaznejša in poda zanesljive, kvantitativne rezultate. Tudi ta metoda zahteva predhodno izolacijo proteina, odcepljanje sialičnih kislin z encimom sialidaza in nadalje derivatizacijo sialičnih kislin z 1,2-diamino-4,5-metilen- dioksibenzenom (DMB). Dodatno oviro pri analizi s to metodo lahko predstavljajo nečistoče (Reuter in Schauer, 1994). Zaradi omenjenih pomanjkljivosti vseh teh metod se je več pozornosti namenilo razvoju metod, ki bi omogočile detekcijo tarčnih sialičnih kislin v celicah. V preteklosti so že razvili monoklonska (Miyake in sod., 1988; Tai in sod., 1988) in poliklonska protitelesa (Makuira in sod., 1994) proti Neu5Gc sialični kislini, vendar so tudi pri uporabi protiteles opazili določene omejitve. Monoklonska protitelesa proti Neu5Gc so visoko specifična za Neu5Gc le na nekaterih glikanih, na drugih pa ne (Miyake in sod., 1988; Tai in sod., 1988). Za splošno detekcijo Neu5Gc so primernejša poliklonska protitelesa pridobljena v piščančjih celicah, ki so jim z dodatnimi modifikacijami izboljšali specifičnost in občutljivost. Ta protitelesa so uspešno uporabili za potrditev prisotnosti Neu5Gc z uporabo metod ELISA, western prenosa, imunohistokemijskih in imunocitokemijskih metod (Diaz in sod., 2009).

## 2.4 PRETOČNA CITOMETRIJA

Pretočna citometrija je tehnika s katero merimo in analiziramo lastnosti posameznih celic, ki v suspenziji ena za drugo potujejo skozi ozek snop laserske svetlobe. V eni sekundi lahko analiziramo več sto celic, kar nam da zanesljivo podobo o fizikalnih in biokemičnih lastnostih celic. Svetlobni žarek zadane ob celico, se odvije, lomi, ali pa se absorbira v fluorokromih, če smo jih predhodno vezali na celice in celica s fluorokromom nato oddaja svetlobo daljše valovne dolžine (Kotnik in sod., 2001).

Fotodetektor FSC (Forward Scatter) detektira svetlobo, ki jo celica sipa v smeri laserskega žarka in količina sprejete svetlobe je povezana z velikostjo celice. Fotodetektor SSC (Side Scatter) detektira razpršeno svetlobo pravokotno od smeri laserskega žarka, količina prejete svetlobe je povezana z granuliranostjo celice (Shapiro, 2003). Granuliranost celice je posledica količine in lastnosti membranskih struktur celice (lizosomov, endoplazmatskega retikuluma, fagosomov, citoplazemske in jederne membrane). Poleg fotodetektorjev FSC in SSC ima pretočni citometer tudi fluorescenčne detektorje (FL1, FL2 ...), ki merijo svetlobo večjih valovnih dolžin od vzbujevalne (laserske) svetlobe. Preko sistema filtrov in zrcal posamezen fluorescenčni fotodetektor prejme svetlobo določene valovne dolžine in izmeri signal, ki ga oddaja fluorokrom (slika 7). Fotodetektorji pretvorijo svetlobne signale v električne, ki jih izmerimo, obdelamo z ustreznimi računalniškimi programi in prikažemo v obliki točkovnih diagramov in/ali histogramov. O celicah dobimo podatke o njihovi velikosti in granuliranosti in o vrstah in moči fluorescenčnih signalov. Celice lahko razvrstimo glede na posamezne lastnosti (Ihan, 1999).

Glavni sestavni deli pretočnega citometra so: vir svetlobe, pretočni sistem z regulacijo toka nosilne tekočine, ki nosi delce skozi laserski žerek, optični sistem za fokusiranje in usmerjanje svetlobe, elektronika, ki omogoča merjenje intenzitete svetlobnega signala in spremicanje svetlobnega signala v električnega ter računalniški sistem z ustreznimi programi za analizo dobljenih podatkov (Givan, 2001).



Slika 7: Shematski prikaz pretočnega citometra (Italian ... , 2014)

Figure 7: Flow cytometry scheme (Italian ... , 2014)

Pretočna citometrija ima veliko možnosti uporabe v bioloških in medicinskih znanostih in se uporablja tako v raziskovalne, kot v diagnostične namene. Vse več se uporablja tudi za identifikacijo, karakterizacijo, spremljanje in kontrolo delovnih organizmov v bioprocесih. S pomočjo pretočne citometrije lahko pridobimo več informacij o delovnem organizmu v biopresusu, kar omogoča lažjo optimizacijo in vodenje biopresesa (Leelavatcharamas in sod., 1996). Pretočna citometrija s svojimi tehnikami med drugim omogoča merjenje in določevanje deleža apoptotičnih celic, merjenje in določevanje mrtvih celic in analizo celičnega cikla. S številnimi tehnikami pretočne citometrije lahko tako dobimo več podatkov o stanju celic v preiskovanem vzorcu, z uporabo primernih protiteles, pa lahko spremljamo še prisotnost ali odsotnost raznih molekul na ali v produkcijskih celicah.

#### 2.4.1 Kontrole v pretočni citometriji za ovrednotenje pozitivnega signala

Pomemben iziv pri analizah pretočne citometrije je ovrednotenje celic kot pozitivne oziroma negativne na testiran marker. V ta namen potrebujemo ustrezne in ponovljive

nastavite pretočnega citometra in ustrezne kontrole za uspešno analizo in interpretacijo izmerjenih rezultatov, ki jih izberemo glede na naravo testa (Maecker in Trotter, 2006). Spodaj so naštete kontrole, ki se najpogosteje uporabljajo pri analizah s pretočnim citometrom.

#### Kontrola celične autofluorescence

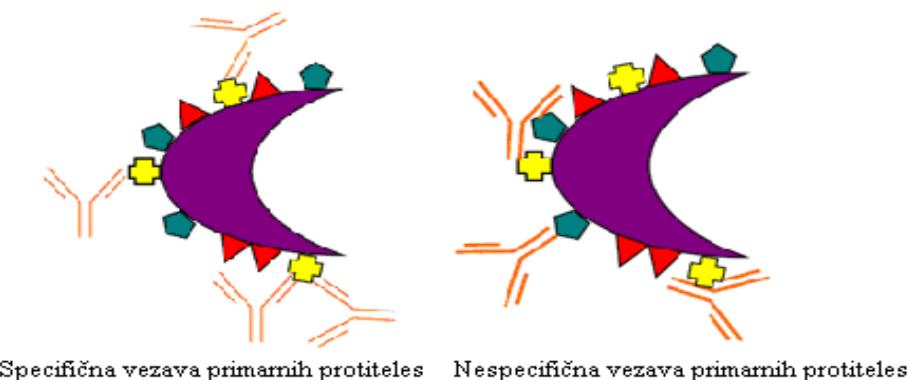
Uporabimo celice testiranega vzorca brez dodanih protiteles (Recommended ..., 1998). Ob pomoči te kontrole nastavimo ustrezne nastavite instrumenta, ki ustrezajo velikosti testiranih celic. Instrument nastavimo tako, da so dogodki lepo vidni na diagramih in histogramih, kot negativna populacija. Ta kontrola nam omogoča tudi ustrezno postavitev vrat za zajetje dogodkov, ki jih želimo analizirati.

#### Negativna biološka kontrola

Ko so izbrane nastavite pretočnega instrumenta in ovrednotena autofluorescencija, začnemo z meritvami obarvanih vzorcev. Za negativno kontrolo uporabimo celice, ki so teoretično negativne na testiran marker. Ob pomoči negativne kontrole na histogramu lahko ločimo neobarvane (celice so negativne na testiran marker) od obarvanih celic (celice so pozitivne na testiran marker) in kakšen delež celic je pozitiven. Negativna kontrola se uporabi, kadar ni jasne razlike med pozitivno in negativno populacijo. Ko uporaba negativne kontrole ni možna, kadar ne obstaja ali pa ni primerna, jo delno lahko nadomestijo druge kontrole (npr. izotipska kontrola) (Maecker in Trotter, 2006).

#### Izotipska kontrola

Testiranemu vzorcu dodamo izotipska protitelesa (kontrolna protitelesa), ki morajo biti istih izotipov, kot primarna protitelesa. Izotipska kontrola nam potrdi, da je vezava primarnih protiteles specifična in ovrže možnost ne-specifične vezave primarnih protiteles (navadno z Fc regijo) na markerje in druge površinske tarče testirane celice. Koncentracija izotipskih protiteles mora biti enaka koncentraciji primarnih protiteles (Maecker in Trotter, 2006).



Slika 8: Specifična in nespecifična vezava primarnih protiteles

Figure 8: Specific and nonspecific binding of primary antibodies

#### Kontrola nespecifične vezave sekundarnih protiteles

V kolikor uporabljamo indirektno barvanje celic, moramo preveriti specifičnost sekundarnih protiteles za Fc regijo primarnih protiteles. Testiranemu vzorcu dodamo le sekundarna protiteesa, da preverimo, če se le ta nespecifično vežejo na celice (Recommended ..., 1998). V primeru nespecifične vezave bi bili rezultati na testiran marker lažno pozitivni. V idealnem primeru je rezultat meritve enak kot pri meritvi neobarvanih celic.

#### Pozitivna biološka kontrola

Za pozitivno biološko kontrolo uporabimo celice, ki so močno pozitivne na testiran marker. Pozitivna kontrola nam omogoča zaznavo razlik med testiranim vzorcem in pozitivno kontrolo. Pozitivna kontrola pogosto ni na razpolago (Maecker in Trotter, 2006).

## 2.5 BIOPROCESI

Biopresna tehnologija predstavlja postopek aerobne ali anaerobne gojitve prokarionskih ali evkarionskih celic v bioreaktorjih z eksperimentalnim ali komercialnim namenom. Uporabi mikroorganizmov, evkarionskih celic ali celičnih delcev za pridobivanje želenega produkta pravimo biopreses, posoda, kjer vse skupaj poteka pa se imenuje bioreaktor. Za uspešen biopreses pa ni dovolj le bioreaktor,

temveč potrebujemo kompleksnejši sistem, ki nam omogoča ustrezeno vodenje in spremljanje bioprosesa. Bioreaktor je le del bioreaktorskega sistema, kamor sodijo še: mešalo, sterilizator zraka in prezračevalnik, podnožje bioreaktorja z motorjem, ki poganja mešalo, merilec pritiska, merilec temperature, črpalke za dovajanje svežega gojišča v bioreaktor in črpalke za odvajanje brozge, številni senzorji in elektrode, ki omogočajo kontrolo fizikalnih in kemijskih pogojev v bioreaktorju. Vsak bioreaktorski sistem je sestavljen nekoliko drugače in njegovi sestavni deli so odvisni od vrste in zahtevnosti bioprosesa (Pavko, 1996).

#### Bioreaktor z enkratnim polnjenjem

V bioreaktorju z enkratnim polnjenjem poteka zaprt (angl. batch) bioprocес. V gojišče na začetku bioprosesa dodamo vcepek in počakamo, da je bioprocес končan. Bioreaktorji z enkratnim polnjenjem se uporabljo tudi za kultivacijo sesalskih celic, vendar imajo številne slabosti: nizka koncentracija celic, izraba gojišča, ki ji sledi celična smrt in posledično nizka produktivnost. Zato so inženirji razvili še druge bioreaktorske tehnologije (Pavko, 1996).

#### Bioreaktor z dohranjevanjem

V tem bioreaktorju poteka polzaprt bioprocес. Pri kultivaciji celic v bioreaktorju z dohranjevanjem lahko povečamo število celic in podaljšamo bioprocес, ker pred izrabo gojišča dodajamo novega. Vendar to ne gre v nedogled, ker se s tem veča volumen v bioreaktorju, črpalke, ki bi odvajala gojišče iz bioreaktorja pri tem sistemu nimamo (Pavko, 1996).

#### Bioreaktor z neprekinjenim polnjenjem

Tu poteka kontinuirani bioprocес. Pri tem bioreaktorskem sistemu imamo dve črpalki. Prva dovaja sveže gojišče v bioreaktor in s tem omogoči, da imajo celice dovolj hrane. Druga črpalka pa odvaja gojišče iz bioreaktorja in volumen brozge v bioreaktorju je ves čas konstanten. Celice na ta način vzdržujemo v uravnoveženem fiziološkem stanju in pri stalni hitrosti rasti. Težavi, ki se pojavljata pri gojenju evkariontskih celic v tem bioreaktorju sta, da se z odstranjevanjem gojišča iz sistema odstranjuje tudi delovni organizem in večje tveganje kontaminacije (Pavko, 1996).

### Perfuzijski bioreaktor s spin-filtrom

Perfuzijski bioreaktor je izboljšana različica bioreaktorja z neprekinjenim polnjenjem in je zelo uporaben za kultivacijo sesalskih celic. Perfuzijski bioprocес заčnemo enako kot zaprt bioprocес. V izbrano gojišče dodamo vcepek in počakamo, da se celice namnožijo. Pri tem vestno spremljamo celično število in izrabo gojišča. Ko se celice dovolj namnožijo in je gojišče že izrabljeno, začnemo s perfuzijo. Črpalka, ki je del perfuzijskega bioreaktorskega sistema, začne dovajati sveže gojišče, kar pomeni novo hrano za celice. Na začetku perfuzije je dovanjanje svežega gojišča manjše, ko pa se število celic v bioreaktorju poveča in kakovost gojišča pade, povečamo pretok perfuzije in s tem v bioreaktor dovedemo več svežega gojišča. Del perfuzijskega bioreaktorskega sistema je tudi črpalka, ki odvaja bioreaktorsko brozgo (žetev), da je volumen v bioreaktorju ves čas enak. V žetvi je želen produkt, ki ga je potrebno izolirati in očistiti v zaključnih procesih. Pomemben del perfuzijskega bioreaktorskega sistema je spin-filter, ki je nameščen pred črpalko, ki oddvaja žetev iz bioreaktorja. Celice se ujamejo v spin-filter, ki deluje tako, da žive celice zadrži in vrne v bioreaktor, mrtve celice in celični debri, ki imajo drugačne membranske karakteristike in manjšo maso od živih celic, pa izloči iz bioreaktorskega sistema. Tako izpopolnjen perfuzijski sistem omogoča zadosten vnos svežega gojišča, odstranjevanje izrabljenega gojišča, zadrževanje živih celic v bioreaktorju in odstranjevanje mrtvih celic iz bioreaktorja. V perfuzijskem bioreaktorju lahko dosežemo najvišje število celic, najvišjo produktivnost in najdaljšo življensko dobo bioprosesa (Leelavatcharamas in sod., 1999).

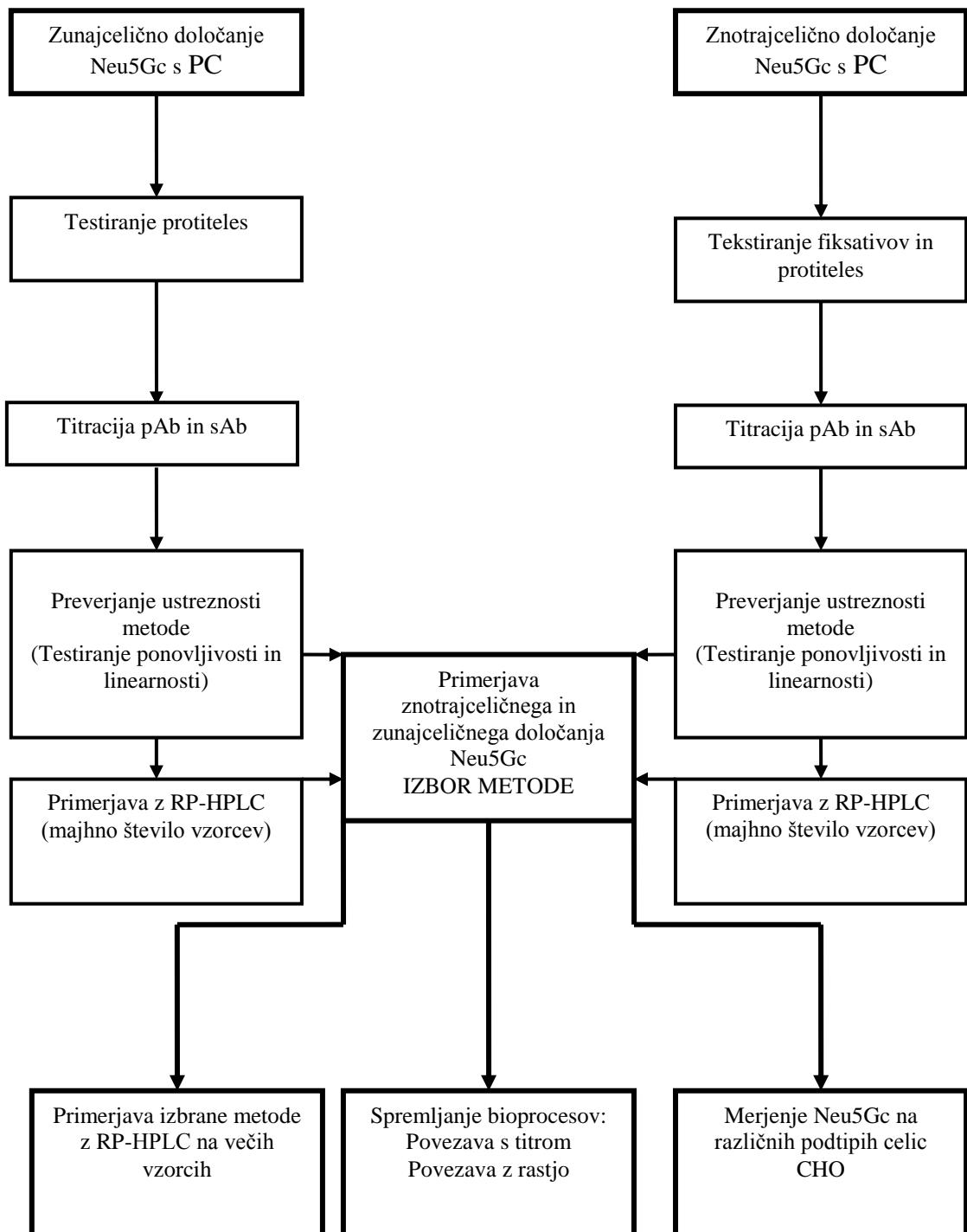
### Bioreaktor, z odstranjevanjem starega gojišča in vračanjem biomase in novega gojišča v bioreaktor (»repeated batch«)

V tem bioreaktorju poteka polzaprt bioprocес. Ko celice v bioreaktorju dosežo kritično koncentracijo in je gojišče že oslabljeno, odstranimo del kulture iz bioreaktorja, ki jo centrifugiramo. Celice in sveže gojišče vrnemo v bioreaktor in na ta način podaljšamo bioprocес (Russ in sod., 1999).

Slabosti t.i. kontinuiranih bioprosesov, kjer celice dosežo visoko koncentracijo so: slabši prenos kisika in toplote, večja verjetnost zakisanja gojišča zaradi nastajanja CO<sub>2</sub> in verjetnost slabše stabilnosti celičnega kariotipa (Shojaosodati in sod., 2008).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 SHEMA POTEKA DELA



Slika 9: Shematski prikaz poteka eksperimentalnega dela naloge

Figure 9: Scheme of the experimental part in this thesis

## 3.2 MATERIAL

### 3.2.1 Celične linije

Uporabili smo celične linije, katere izhajajo iz celic CHO. Večina poskusov za vpeljavo metode in iskanju korelacij z drugimi metodami, je bila narejenih na CHO K1 (ECAACC 85051005) celični liniji.

Za poskus primerjave različnih podtipov celic CHO smo uporabili različne celične linije in nekatere od teh celičnih linij so last farmacevtske družbe Lek d.d. in sodijo pod zaupne informacije družbe in lastnikov. Celične linije bomo imenovali CHO A, CHO B, CHO C in CHO D. Nobena od teh celičnih linij ni mutanta na encim CMP-Neu5Ac hidroksilazo. Poskus je možno izvesti na katerikoli CHO celičnih linijah iz komercialnih zbirk, zato ocenujemo da nerazkritje tipa uporabljenih celičnih linij nima nobenega vpliva na kakovost naloge.

### 3.2.2 Gojišče za rast in gojenje celic

Sestava gojišča sodi med zaupne informacije farmacevtske družbe Lek d.d. in njenih lastnikov. Gojišče je kemijsko definirano, brezserumsko gojišče za gojenje sesalskih celic in je sestavljeno iz osnovnih nevariabilnih komponent in dodatkov, ki tekom poskusov lahko varirajo. Pripravljeno je s posebno čisto vodo, ki jo dobimo z napravo za demineralizacijo. Ker je cilj magistrske naloge vpeljava nove metode in testiranje njene primerljivosti z drugimi analitskimi metodami, ocenujemo da nerazkritje sestave gojišča, nima vpliva na kakovost naloge.

### 3.2.3 Raztopine, pufri in reagenti

Vse vodne raztopine smo pripravili s posebno čisto vodo.

**Raztopine, pufri in reagenti za analizo s pretočnim citometrom in štetje celic:**

- 10 x komercialni puffer PBS (GIBCO)
- Nosilna tekočina BD FACS Flow™ (BD Biosciences)
- Set reagentov za aparat Vi-Cell (Beckman Coulter)
- 70 % Etanol
- Komercialni kit FIX & PERM (Invitrogen)
- Pufer Tris (0,1 M Tris HCl z 0,1 % TRITON X-100 in 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4)

### Reagneti za določanje Neu5Gc

Na trgu obstaja komercialni kit za določanje Neu5Gc (Protocol..., 2008). Nekateri reagenti so del kita, nekatere druge pa smo naročili oz. pripravili sami.

➤ Reagenti, ki so del kita za določanje Neu5Gc

#### Blokirni pufer (angl. Blocking Agent)

Za analizo smo morali pripraviti 0,5 % raztopino. Za pripravo 100 ml delovne raztopine smo odpipetirali 0,5 ml blokirne tekočine in 95,5 ml pufra PBS. Alikvote po 10 ml smo zamrznili na - 20° C.

#### Primarna protitelesa proti Neu5Gc

Protitelesa so piščančjega izvora. Primarna protitelesa so liofilizirana, zato smo jih previdno resuspendirali v 100 µL blokirne tekočine. Shranili smo jih na 4° C.

#### Kontrolna protitelesa (izotipska protitelesa)

Protitelesa so piščančjega izvora. Primarna protitelesa so liofilizirana, zato smo jih previdno resuspendirali v 100 µL blokirne tekočine. Shranili smo jih na 4° C.

➤ Regenti, ki niso del kita

Sekundarna protitelesa

Uporabili smo oslovska protitelesa proti piščančjim protitelesom, ki so označena z fluorokromom FITC (Jackson antibodies, kat. št. 703-095-155). Protitelesa so liofilizirana, zato smo jih previdno resuspendirali v 0,4 ml destilirane vode. Pripravili smo alikvote po 100 µL in jih do 6 tednov hranili na 4° C ali pa zamrznili pod -70° C.

Pufer Tris (0,1 M Tris HCl z 0,1 % TRITON X-100 in 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4)

Za pripravo 500 ml smo zatehtali 7,88 g Tris/HCl (Merck) in 0,203 g MgCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (Merck). Zatehto smo prenesli v 500 ml čašo in dodali 0,5 Tritona X-100 (Merck) in 400 ml posebno čiste vode. Dobro smo premešali in izmerili pH, ki smo ga z 1M NaOH uravnali na 7,4. Vsebino čaše smo prelili v 500 ml bučko in jo z vodo dopolnili do oznake 500 ml. Raztopino smo prefiltrirali s pomočjo nuče s filtrom velikosti por 0,2 µm in raztopino shranili pri 4° C.

70 % Etanol

Za pripravo 100 ml raztopine 70 % etanola smo v stekleno 100 ml bučko odpipetirali 73 ml raztopine 96 % etanola (Merck) in bučko dopolnili do oznake s posebno čisto vodo. Raztopino smo shranili na -20° C.

### 3.2.4 Oprema

- CO<sub>2</sub> stresalniki (Kuhner)
- Vodna kopel (Kambrič)
- Analitska tehnica (Mettler Toledo)
- pH meter (Metrohm)
- Centrifuga za analitske vzorce do 50 ml: 5810 (Eppendorf)
- Aparat za štetje in določanje celične viabilnosti Vi-Cell (Beckman Coulter)
- Vibro-mix mešalo (Tehnica)
- Vakumska črpalka (Millipore)

- Mikrobiološka komora (ISKRA PIO)
- Gojitvene stekleničke s totalnim volumnom 125, 250 in 500 ml (Corning)
- Gojitvene centrifugirke s totalnim volumnom 50 ml (TPP TubeSpin Bioreactors)
- Plastične pipette (Corning)
- Plastenke s filtrom, nuče, (velikost por 0,22 µm) za sterilno filtracijo gojišča in pufrov (Corning)
- 50 ml vakumske centrifugirke s filtrom s premerom por 0,22 µm (Millipore)
- Nastavki za avtomatske pipete (Burnik)
- Steklovina (čaše, meritni valji, bučke)
- Epruvete za pretočni citometer (BD Falcon)
- Epruvete za aparat Vi-Cell (Beckman Coulter)
- Pretočni citometer FACSCalibur (Becton Dickinson)
- Bioreaktorski sistem: Bioreaktor (BBI System Biostat B5) s totalnim volumnom 6,6 l, delovnim volumnom 5 l, razmerje višina proti širini je 2,2:1. Bioreaktor ima mešalo, ki ima po svoji osi nameščene trikrat po dve lopatici, ki so obrnjene za 90° in prstanast prezračevalnik (perforiran prstan). V bioreaktorju je nameščen termometer (Pt100), pH elektroda (Mettler-Toledo) in pO<sub>2</sub> elektroda (Mettler-Toledo).
- Računalniška programa:
  - \*CELL Quest: program za akvizicijo in analizo podatkov, dobljenih s pretočnim citometrom (FACS Calibur)
  - \*WinMDI 2.8: program za analizo podatkov, dobljenih s pretočnim citometrom in izris histogramov (Joseph Trotter, The Scripps Research Institute, La Jolla, ZDA)
- Aparat za HPLC
- Kromatografske kolone za izolacijo glikoproteina
- Centrifuga za vračanje celične biomase v bioreaktor (Centritech® Lab)
- Čitalec mikrotitrskih ploščic (Tecan)

### 3.3 METODE

#### 3.3.1 Gojenje celic CHO v gojitvenih stekleničkah

Celice smo odmrznili in prenesli v gojitveno stekleničko s celokupnim volumenom 250 ml. Celicam smo dodali 50 ml (delovni volumen) predhodno ogretega gojišča in jih inkubirali v stresalniku pri 37 °C, 90 rpm in 10 % CO<sub>2</sub>. Ko so se celice dovolj namnožile, smo jih prenesli v več stekleničk s svežim gojiščem. Začetna koncentracija živih celic je bila vedno  $2 \times 10^5$  živih celic/ml.

Ker je šlo hkrati z vpeljavo metode, za poskuse optimizacije gojišča, se je gojišče tekom poskusov spreminja.

V posameznih poskusih za določanje Neu5Gc na različnih potipih celic CHO smo varirali vrste gojitvenih posod, začetno koncentracijo živih celic ter pogoje stresanja. V ta namen smo celice prenesli v sveže gojišče v gojitvenih stekleničkah z različnimi delovnimi volumeni in različnimi začetnimi koncentracijami živih celic. Celice CHO smo gojili v stresalnikih, kjer smo nastavili različen % CO<sub>2</sub> in različne obrate stresanja. Testirani delovni volumeni so bili 200, 100 in 50 ml. Različne začetne koncentracije so bile 0,1, 0,2 in  $0.5 \times 10^6$  živih celic/ml. Različni obrati stresanja so bili 90, 200 in 150 rpm in različen odstotek CO<sub>2</sub> je bil 2,5 in 10 % (za več podatkov glej prilogo D). Celice smo prenesli tudi v 10 posebnih centrifugirk s filteri, z začetno koncentracijo  $0.2 \times 10^6$  živih celic/ml v 30 ali 50 ml gojišča. Inkubacija centrifugirk je potekala pri različnih obratih stresanja (150 in 180 rpm) (za več podatkov o gojitvenih pogojih glej prilogo D in doktorsko disertacijo Strnad, 2011).

Ob zaključku posameznega poskusa smo odvzeli približno 2 ml celične kulture, ki je bila namenjena analizi s pretočnim citometrom. Preostalo kulturo smo centrifugirali (5 minut, 1000 g) in prefiltrirali skozi filter s premerom por 0,22 µm (Millipore), da bi odstranili ostanke celic. Tako pripravljeno žetev smo zamrznili (-85°C) in kasneje rekombinantni protein izolirali preko sistema različnih kromatografij. Izoliran protein

smo analizirali na vsebnost Neu5Gc z visokotlačno tekočinsko kromatografijo oz. metodo, ki se imenuje RP-HPLC. Vsebnost Neu5Gc na izoliranem proteinu smo določili na podlagi pozicije in integracije kromatogramskega pika, v primerjavi s standardom.

### 3.3.2 Spremljanje biopressov

Pred prenosom celic CHO v gojišče bioreaktorjev smo celice sprva namnožili do željene koncentracije živih celic v gojitvenih posodicah v CO<sub>2</sub> stresalniku. Celice smo odmrznili in prenesli v gojitveno stekleničko s celokupnim volumenom 250 ml. Celicam smo dodali 50 ml (delovni volumen) predhodno ogretega gojišča in jih inkubirali v stresalniku pri 37 °C, 90 rpm in 10 % CO<sub>2</sub>. Ko so celice zrasle do željene koncentracije živih celic (minimalno do koncentracije 1 x 10<sup>6</sup> živih celic/ml), smo jih prenesli v gojitveno posodo z večjim volumenom z začetno koncentracijo 0,2 x 10<sup>6</sup> živih celic/ml. Končni delovni volumen v gojitveni posodi s celokupnim volumenom 3 litrov, je bil 1 liter. Ko je bil inokulum pripravljen smo nacepili dva 5 literska bioreaktorja z začetno koncentracijo 0,2 x 10<sup>6</sup> živih celic/ml.

V zaprtem »batch« biopresusu smo celice v bioreaktoru gojili 7 dni, pri tem pa smo dnevno spremljali celično koncentracijo, viabilnost, celične metabolite, fizikalne in kemijske pogoje v biopresesih. Pri t.i »repeated batch« biopresusu, smo celice z menjavo gojišča, ki se je pričela sedmi dan, najprej pomnožili do optimizirane koncentracije živih celic, potem pa biopreses s to koncentracijo celic vzdrževali z vsakodnevnim centrifugiranjem celic, resuspendiranjem celic v svežem gojišču ter vračanjem celic v bioreaktor s svežim gojiščem. S tem smo vsakodnevno odstranjevali toksične stranske produkte ter celicam nudili sveže komponente gojiča ter na ta način precej podaljšali življenje kulture.

Vzorec za analizo Neu5Gc s pretočnim citometrom smo odvzeli po 162, 186, 210, 233, 307, 331, 355, 379, 403, 475, 499, 522, 546 in 570 urah biopresusa. V določenih časovnih točkah biopresusa, smo odvzeli tudi vzorce za določitev koncentracije

rekombinantnega proteina in glikoanalitiko (med drugim tudi določanje Neu5Gc z RP-HPLC). Več podatkov o poteku vzorčenja je razvidno iz prilog B in C.

### **3.3.3 Štetje in določanje viabilnosti celic z aparatom Vi-Cell**

Štetje in določanje viabilnosti celic z aparatom Vi-Cell lahko nadomesti ročno štetje in določanje viabilnosti celic s hemocitometrom.

1 ml celične kulture smo dali v posebno epruvetko, ki se uporablja za analizo celičnih vzorcev na aparatu Vi-Cell. Avtomat posrka suspenzijo celic, jo premeša in doda enak volumen 0,4 % raztopine tripanskega modrila. Točno določen volumen celične raztopine potuje skozi posebno pretočno celico, kjer celice posname posebna kamera visoke resolucije. Obarvane, mrtve celice so temnejše in sistem Vi-Cella za vsak vzorec posname 50 slik, ki se shranijo za kasnejšo analizo. Na vsaki sliki sistem presteje celice in kot rezultat, med drugim, poda: celokupno koncentracijo celic, koncentracijo živih celic in odstotek živih celic.

### **3.3.4 Analiza Neu5Gc s pretočnim citometrom**

#### **3.3.4.1 Postopek za določanje Neu5Gc na celicah - zunajcelično**

Za izvedbo meritev smo potrebovali  $1 \times 10^6$  celic. Celice iz gojitvene stekleničke smo najprej prešteli z aparatom Vi-Cell. Nato smo odvzeli ustrezen volumen kulture, ki je vseboval  $1 \times 10^6$  celic in ga prenesli v epruvete, namenjene analizi vzorcev s pretočnim citometrom. Epruvete z vzorcem smo centrifugirali (pogoji centrifugiranja: rcf = 300 g, t = 5 min, T = 4° C) in odlili supernatant. Celični pelet smo resuspendirali v 1 ml 0,5 % blokirnega pufra, ki smo ga predhodno pripravili ali odmrznili. Tako pripravljen vzorec smo ponovno centrifugirali pri istih pogojih. V blokirnem pufru smo pripravili ustrezeno redčino primarnih protiteles in celični pelet resuspendirali v 100 µL pripravljene redčine protiteles. Sledila je 60 minutna inkubacija celic s primarnimi protitelesi na ledu. Celice smo sprali v 1 ml 0,5 % raztopini blokirnega pufra in znova centrifugirali. V 0,5% raztopini blokirnega pufra smo pripravili ustrezeno redčino sekundarnih protiteles in

celični pelet resuspendirali v 100  $\mu\text{L}$  pripravljene redčine protiteles. Sledila je 60 minutna inkubacija celic z vezanimi primarnimi protitelesi in sekundarnimi protitelesi na ledu. Celice smo sprali v 1 ml 0,5 % raztopine blokirnega pufra in znova centrifugirali. Celični pelet smo resuspendirali v 400  $\mu\text{L}$  0,5% raztopine blokirnega pufra. Sledila je analiza s pretočnim citometrom. Izvor svetlobe je bil argonski laser, ki daje svetlobo valovne dolžine 488 nm. Za merjenje smo uporabili in spremajali nastavitev naslednjih detektorjev: FSC, SSC in FL1. Meritve so potekale pri visokem pretoku, za vsako analizo smo izmerili 10 000 dogodkov.

### 3.3.4.2 Postopek za določanje Neu5Gc v celicah – znotrajcelično

Pri znotrajceličnem določanju Neu5Gc operiramo s predhodno fiksiranimi celicami. Postopek fiksacije je opisan v podpoglavlju 3.3.4.3. Predhodno fiksiran oz. permebealiziran vzorec smo dvakrat sprali z 1 ml 0,5% raztopini blokirnega pufra (pogoji centrifugiranja:  $\text{rcf} = 300 \text{ g}$ ,  $t = 5 \text{ min}$ ,  $T = 4^\circ \text{C}$ ). V 0,5% raztopini blokirnega pufra smo pripravili ustrezno redčino primarnih protiteles in celični pelet resuspendirali v 100  $\mu\text{L}$  pripravljene redčine protiteles. Sledila je 60 minutna inkubacija na ledu. Celice smo sprali v 1 ml 0,5% raztopini blokirnega pufra in znova centrifugirali. V 0,5% raztopini blokirnega pufra smo pripravili ustrezno redčino sekundarnih protiteles in celični pelet resuspendirali v 100  $\mu\text{L}$  pripravljene redčine protiteles. Sledila je 60 minutna inkubacija na ledu. Celice smo sprali v 1 ml 0,5% raztopine blokirnega pufra in znova centrifugirali. Celični pelet smo resuspendirali v 400  $\mu\text{L}$  0,5% raztopine blokirnega pufra. Sledila je analiza s pretočnim citometrom. Izvor svetlobe je bil argonski laser (488 nm). Za merjenje smo uporabili in spremajali nastavitev naslednjih detektorjev: FSC, SSC in FL1. Meritve so potekale pri srednjem pretoku, za vsako analizo smo izmerili 10 000 dogodkov.

### 3.3.4.3 Postopki fiksacije in uporaba različnih fiksativov za znotrajcelično določanje Neu5Gc

Pri postopkih fiksacije smo za izvedbo meritev potrebovali  $1 \times 10^6$  celic. Celice iz gojitvene stekleničke smo najprej prešteli z aparatom Vi-Cell. Nato smo odvzeli ustrezen volumen kulture, ki je vseboval  $1 \times 10^6$  celic in ga prenesli v epruvete,

namenjene analizi vzorcev s pretočnim citometrom. Epruvete z vzorcem smo centrifugirali (pogoji centrifugiranja: rcf = 300 g, t = 5 min, T = 4° C) in odlili supernatant.

➤ **Fiksacija s 70 % ledeno ohlajenim etanolom**

Celičnemu peletu smo po kapljicah dodajali 2 ml 70 % ledeno hladnega etanola. Tako pripravljene vzorce smo ali zamrznili pri – 20 °C ali pa jih procesirali naprej čez 30 minut.

➤ **Fiksacija z FIX&PERM komercialnim kitom**

Celičnemu peletu smo dodali 100 µL Reagenta A. Čez 20 minut smo celice dvakrat sprali v pufru PBS (pogoji centrifugiranja: rcf = 300 g, t = 5 min, T = 4° C). Nato smo celičnemu peletu dodali 100 µL Reagenta B in vzorec čez 20 minut ponovno 2 x sprali, tokrat v 1 ml 0,5% raztopine blokirnega pufra, pri istih pogojih centrifugiranja. Tudi v Reagentu A smo lahko vzorce hranili nekaj časa pri na + 4° C, vendar so ti vzorci manj stabilni, kot vzorci fiksirani v 70 % etanolu (Cell cycle ..., 1998).

➤ **Permebilizacija z tris pufrom, ki vsebuje detergent Triton X-100**

Celičnemu peletu smo dodali 1000 µL Tris pufra (0,1 M Tris HCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton X-100, pH 7,4) in inkubirali 30 minut. Nato smo celice dvakrat sprali v 0,5% raztopine blokirnega pufra (pogoji centrifugiranja: rcf = 300 g, t = 5 min, T = 4° C) in vzorec barvali, kot je opisano v podpoglavlju 3.3.4.2..

### 3.3.4.4 Izbira kontrol za preverjanje specifičnosti protiteles za določanje Neu5Gc

Da bi preverili, če je kit za določanje Neu5Gc uporaben za določevanje Neu5Gc na celicah, smo za določanje Neu5Gc uporabili močno pozitivno kontrolo (krvne celice miši). Kot kontrolo nespecifične vezave sekundarnih protiteles smo uporabili celice CHO z dodanimi sekundarnimi protitelesi brez primarnih protiteles. Kot kontrolo nespecifične vezave primarnih protiteles, izotipska kontrola, smo uporabili celice CHO z dodanimi izotipskimi (kontrolnimi) protitelesi in sekundarnimi protitelesi. Ob pomoči kontrole nespecifične vezave sekundarnih protiteles in izotipske kontrole smo na

histogramu s spremembo napetosti na FL1 detektorju nastavili »Neu5Gc« negativno populacijo in nato izmerili obe teoretično pozitivni populaciji. Teoretično pozitivne celice so bile celice CHO (obarvane s primarnimi in sekundarnimi protitelesi) in mišja kri. Za preverjanje testa smo uporabili 1:100 redčino primarnih, sekundarnih in kontrolnih protiteles.

### 3.3.4.5 Titracija primarnih in sekundarnih protiteles

Pri razvoju metod pretočne citometrije, po testiranju ustreznih kontrol, sledi določevanje optimalne redčine protiteles. Ta postopek se imenuje titracija. V primeru, ko gre za uporabo primarnih in sekundarnih protiteles, je potrebno določiti optimalno redčino obeh protiteles. Pripravili smo redčitveno vrsto primarnih in kontrolnih protiteles (pregl. 1). Sekundarna protitelesa so bila za ta test uporabljeni v redčini 1:100. Ko smo določili optimalno redčino primarnih in kontrolnih protiteles, smo optimirali še koncentracijo sekundarnih protiteles (pregl. 2).

Pregl. 1: Priprava redčitvene vrste za kontrolna in primarna protitelesa.

Table 1: Dilution preparation for the control and primary antibodies

Redčitev za zunajcelično določanje Neu5Gc	Blokirna raztopina ( $\mu\text{L}$ )	Primarna in kontrolna protitelesa ( $\mu\text{L}$ )	Prenos raztopine iz predhodne redčitve ( $\mu\text{l}$ ) in redčina
1:50	250	2,5	/
1:100	125	/	125 (1:50)
1:200	125	/	125 (1:100)
1:400	125	/	125 (1:100)
Redčitev za znotrajcelično določanje Neu5Gc	Blokirna raztopina ( $\mu\text{L}$ )	Primarna in kontrolna protitelesa ( $\mu\text{L}$ )	Prenos raztopine iz predhodne redčitve ( $\mu\text{l}$ ) in redčina
1:25	250	5	/
1:50	125	/	125 (1:25)
1:100	125	/	125 (1:50)
1:200	125	/	125 (1:100)
1:400	125	/	125 (1:100)

Pregl. 2: Priprava redčitvene vrste za sekundarna protitelesa

Table 2: Dilution preparation for the secondary antibodies

Redčitev za zunajcelično določanje Neu5Gc	Blokirna raztopina ( $\mu$ L)	Sekundarna protitelesa ( $\mu$ L)	Prenos raztopine iz predhodne redčitve ( $\mu$ L) in redčina
1:50	250	2,5	/
1:100	125	/	125 (1:50)
1:200	125	/	125 (1:100)
1:400	125	/	125 (1:200)
Redčitev za znotrajcelično določanje Neu5Gc	Blokirna raztopina ( $\mu$ L)	Sekundarna protitelesa ( $\mu$ L)	Prenos raztopine iz predhodne redčitve ( $\mu$ L) in redčina
1:25	250	5,0	/
1:50	125	/	125 (1:25)
1:100	125	/	125 (1:50)

### 3.3.4.6 Testiranje ponovljivosti

Za test ponovljivosti obeh metod smo uporabili neodvisno pripravljene tri paralelke treh vzorcev. V grobem za analitske metode velja, da je ponovljivost ustrezna, če je koeficient variacije (CV) manjši od 10 %, za bioanalitske metode pa je sprejemljivo, če je CV manjši od 20 % (Guidelance ..., 2009).

### 3.3.4.7 Testiranje ponovljivosti – vpliv aparature

Zanimalo nas je, kakšna je ponovljivost, če posamezen vzorec trikrat zapored pomerimo na pretočnem citometru. V grobem za analitske metode velja, da je ponovljivost ustrezna, če je koeficient variacije (CV) manjši od 10 %, za bioanalitske metode pa je sprejemljivo, če je CV manjši od 20 % (Guidelance ..., 2009).

### 3.3.4.8 Testiranje linearnosti

Linearnost nam pove v katerem območju je metoda linearna. Linearnost je lahko hkrati tudi testiranje občutljivosti metode. Linearnost smo preverjali tako, da smo pripravili mešanice vzorca celic CHO, kjer smo glede na predhodne rezultate pričakovali pozitiven rezultat glede na določanje Neu5Gc (H) in izotipsko kontrolo na celicah CHO, kjer smo glede na predhodne rezultate pričakovali negativen rezultat na določanje

Neu5Gc (L) v različnih razmerjih. Nato smo vsem vzorcem določili vsebnost Neu5Gc s pretočnim citometrom. Narisali smo graf, ki prikazuje izmerjene vrednosti Neu5Gc v odvisnosti od deleža vzorca H in izvedli test linearne regresije. Izračunali smo koeficient determinacije ( $R^2$ ). Za analitske metode velja, da naj bi bil koeficient determinacije višji od 0,98 (1 je najvišji možen koeficient determinacije). Ker metode pretočne citometrije ne sodijo med klasične analitske metode, bi bil tak kriterij previsok, zato smo kot sprejemljiv koeficient determinacije določili koeficient višji od 0,8. Priprava vzorcev za testiranje linearnosti je prikazana v preg. 3.

Pregl. 3: Priprava vzorcev za testiranje linearnosti

Table 3: Samples preparation for the linearity test

H (pAb + sAb)	L (cAb + sAb)	V <sub>H</sub> (µL)	V <sub>L</sub> (µL)
0	1	0	400
0,1	0,9	40	360
0,25	0,75	100	300
0,5	0,5	200	200
0,75	0,25	300	100
0,9	0,1	360	40
1	0	400	0

### 3.3.4.9 Primerjava metod za zunajcelično in znotrajcelično določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom s klasično analitiko sialičnih kislin (RP-HPLC) na manjšem številu vzorcev

Da bi ugotovili, če metoda kaže potencial, da bi lahko zamenjala dokaj zamudno analizo Neu5Gc z visokotlačno tekočinsko kromatografijo na reverzni fazi, smo naredili primerjavo metode pretočne citometrije s klasično analitiko sialičnih kislin (RP-HPLC) na manjšem številu vzorcev tekom enega poskusa. Cilja primerjave sta bila dva:

1. Ugotoviti, če vsebnost Neu5Gc na rekombinantnem proteinu določena z RP-HPLC korelira z vsebnostjo celokupne Neu5Gc pri celicah CHO, določene s pretočnim citometrom. V tem primeru bi bilo nadaljevanje poskusov smiselno.
2. Ugotoviti ali je za določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom za naš namen bolj uporabno znotrajcelično ali zunajcelično določanje Neu5Gc.

### 3.3.4.10 Ocena korelacije med vsebnostjo Neu5Gc na celicah CHO (pretočni citometer) in vsebnostjo Neu5Gc na rekombinantnem proteinu (RP-HPLC)

Ko smo razvili, preverili ustreznost metode in izbrali metodo za določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom, smo naredili primerjavo te metode s klasično metodo za določanje Neu5Gc, z metodo RP-HPLC na večjem številu vzorcev. V ta namen smo tekom osmih neodvisnih poskusov, pri katerih se je z metodo RP-HPLC določila količina Neu5Gc na izoliranem proteinu, odvezeli vzorek za pretočni citometer in z njim pomerili količino Neu5Gc na celicah. Skupaj je analiza zavzemala 149 vzorcev.

### 3.3.5 Določanje koncentracije glikoproteina

Za določanje koncentracije glikoproteina smo uporabili encimsko imunski test (ELISA) proizvajalca R&D Systems (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA). Test je potekal po navodilih proizvajalca. Uporabili smo mikrotitrsko ploščico z vezanimi mišjimi monoklonskimi protitelesi, ki so bila specifična za rekombinantni glikoprotein. V mikrotitrsko ploščico smo nanesli standard, slepi vzorec in testirane vzorčke. Odstranili smo odvečne raztopine in izvedli inkubacijo z anti-glikoproteinskimi poliklonskimi protitelesi, konjugiranimi z encimom hrenove peroksidaze, HRP (angl. horseradish peroxidase). Nastal je konjugat med protitelesi, encimom in imobiliziranim glikoproteinom. Preostanek konjugata smo sprali in v mikrotitrsko ploščico dodali kromogen. Encim HRP je oksidiral dodan kromogen, rezultat oksidacije pa je bil modro obarvan kompleks. Reakcijo smo ustavili z dodatkom kisline, ki je spremenila barvo kompleksa v rumeno. Fotometrično smo izmerili absorbanci obarvane raztopine pri valovni dolžini 450 nm in izmerjena absorbanca je bila sorazmerna z koncentracijo rekombinantnega glikoproteina v vzorcu.

### 3.3.6 Izolacija glikoproteina

Na koncu vsakega poskusa smo celice s centrifugiranjem in filtracijo ločili od gojišča, supernatant oz. filtrat pa smo očistili z afinitetno kromatografijo, ki za ločevanje izkorišča specifične biološke interakcije med imobiliziranim ligandom in rekombinantnim proteinom. Supernatant oz. filtrat (20-500 ml) smo nanesli na kromatografsko kolono. Za disociacijo kompleksa ligand-rekombinantnega protein smo

uporabili 0.1 M Na-fosfatni pufer s pH vrednostjo 2.5. Za uravnavanje pH izolata smo uporabili 0.1 M Na-fosfatni pufer s pH vrednostjo 7.0 in vzorce shranili pri temperaturi pod -60°C.

### 3.3.7 RP - HPLC

Po izolaciji glikoproteina, je bila izvedena analitika sialičnih kislin z uporabo anionske izmenjevalne kromatografije. Kromatografska seperacija različnih izoform je temeljila na razliki v naboju sialičnih kislin. Manj sialilirane izoforme so se iz kolone izločile prej kot bolj sialilirane.

Za določanje količine Neu5Gc na glikoproteinu smo uporabili visokotlačno tekočinsko kromatografijo na reverzni fazi (RP-HPLC). Izoliran protein smo najprej desialilirali z milo kislinsko hidrolizo ali encimsko hidrolizo z uporabo encima neuraminidaze ( $\alpha$ 2-3, 6, 8, 9 – Neuraminidaza (Sialidaza) pridobljena iz organizma *Arthrobacter ureafaciens*, (Roche, USA). Proste sialične kisline smo obarvali z 1,2-diamino-4,5-metilendioksibenzen (DMB). DMB barvilo ni selektivno zato pri barvanju nastane veliko obarvanih derivatov sialičnih kislin različne stehiometrije. Te derivate smo nato ločili na koloni RP-HPLC, kjer se je sočasno merila tudi fluorescanca pri eksitaciji 373 nm in emisiji 448 nm. Delež Neu5Gc smo določili na podlagi primerjave elucijskih vrhov s standardno raztopino Neu5Gc.

#### 4 REZULTATI

V prvem delu naloge smo testirali, razvili in preverili ustreznost metode in ob primerjavi s klasično analitiko sialičnih kislin (RP-HPLC) izbrali metodo za določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom.

V drugem delu naloge smo ocenili korelacijo med vsebnostjo Neu5Gc pri celicah CHO in vsebnostjo Neu5Gc na rekombinantnem proteinu. V osmih neodvisnih poskusih smo določali vsebnost Neu5Gc s izbrano in optimizirano metodo pretočne citometrije in rezultate primerjali z rezultati izmerjenimi z metodo RP-HPLC tako, da smo izračunali Pearsonov koreacijski koeficient.

V tretjem delu naloge smo spremljali dva bioprocesa in skušali ugotoviti, če ima vsebnost Neu5Gc pri celicah CHO kakršnokoli povezavo s fazo celične rasti oz. koncentracijo živih celic in količino rekombinantnega proteina.

V zadnjem delu naloge smo odvzeli vzorce različnih podtipov parentalnih celic CHO in skušali ugotoviti, če se parentalne celice razlikujejo po vsebnosti Neu5Gc.

#### 4.1 RAZVOJ IN OVREDNOTENJE METOD PRETOČNE CITOMETRIJE ZA DOLOČANJE Neu5Gc

##### 4.1.1 Testiranje protiteles za zunajcelično določanje Neu5Gc

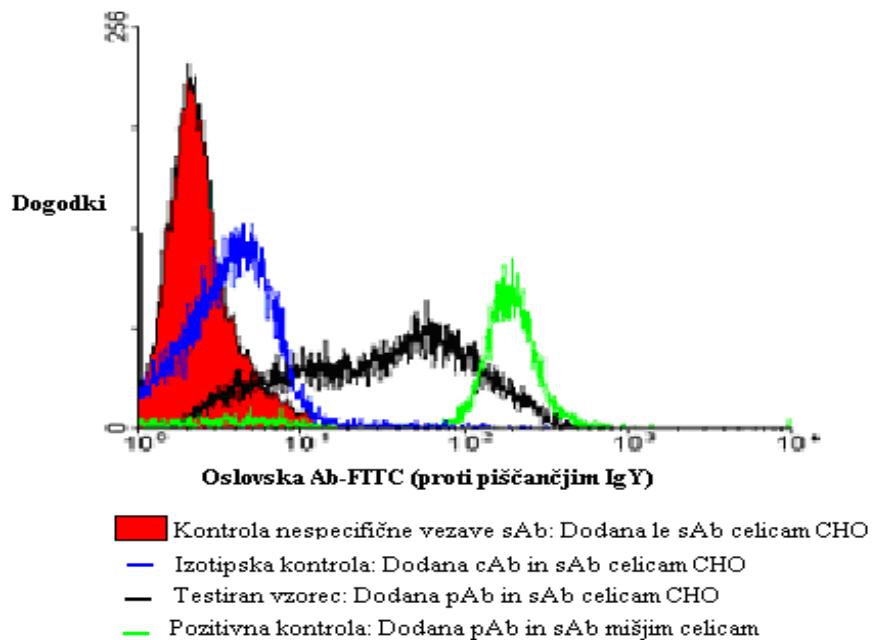
Da bi ugotovili, če so protitelesa, ki so sestavni del kita za določanje Neu5Gc (Gc-Free kit), dovolj specifična za detekcijo Neu5Gc na celicah CHO, smo v začetku testiranja uporabili različne kontrole, ki so prikazane v preglednici 4.

Pregl. 4: Kontrole za določanje specifičnosti protiteles proti Neu5Gc za zunajcelično določanje Neu5Gc

Table 4: Controls for Neu5Gc antibodies specificity determination for extracellular Neu5Gc determination

Kontrola	Vzorec	Kontrolna protitelesa (cAb)	Primarna protitelesa (pAb)	Sekundarna protitelesa (sAb)
<b>Kontrola celične avtofluorescence (ni prikazana na sliki 10)</b>	Celice CHO	NE	NE	NE
<b>Izotipska kontrola</b>	Celice CHO	DA	NE	DA
<b>Kontrola nespecifične vezave sekundarnih protiteles</b>	Celice CHO	NE	NE	DA
<b>Vzorec</b>	Celice CHO	NE	DA	DA
<b>Močna pozitivna kontrola</b>	Krvne celice miši	NE	DA	DA

V testu pozitivne kontrole smo uporabili krvne celice miši, ki naj bi na površini imele odstotek Neu5Gc tudi do 50 % (Butler, 2006). V ostalih testih specifičnosti vezave protiteles proti Neu5Gc smo uporabili celice CHO, ki naj bi imele odstotek Neu5Gc do 15 % (Baker in sod., 2001). Rezultat testiranja je prikazan na spodnjem histogramu (slika 9).



Slika 10: Histogram kontrol za zunajcelično določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom

Figure 10: Histogram of controls for the determination of extracellular Neu5Gc by flow cytometry

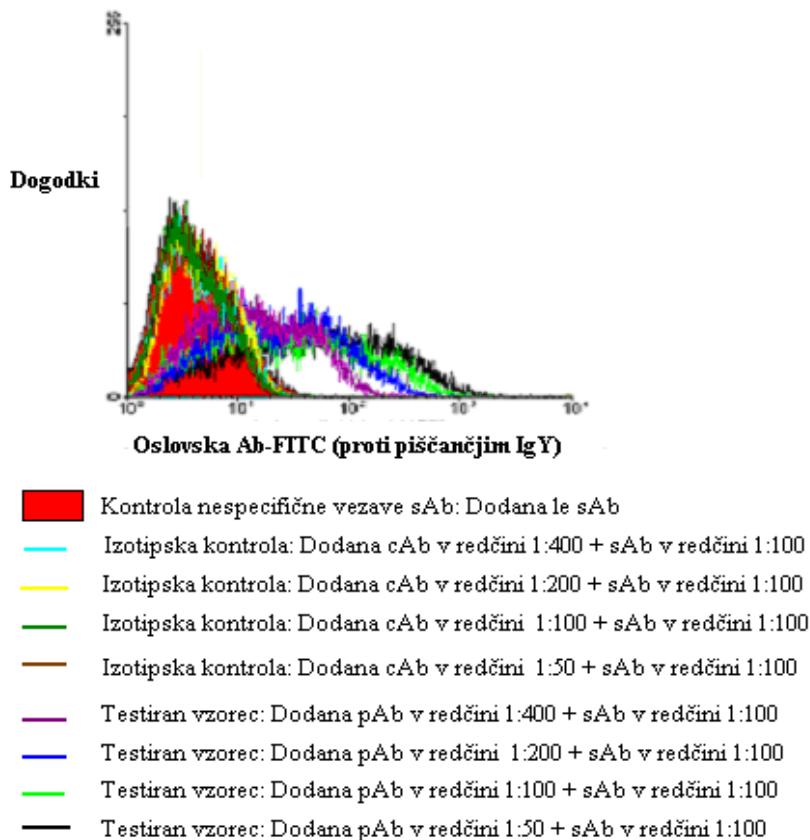
Na sliki 10 je prikazan t.i. prekrivajoči histogram, na katerem so prikazane štiri različne meritve štirih vzorcev. Na histogramu je prikazana jakost zelene fluorescence različnih vzorcev. Rezultati testa kontrol kažejo, da ni nespecifične vezave sekundarnih protiteles (sAb) in šibko nespecifično vezavo kontrolnih (cAb) oz. primarnih protiteles (pAb). Iz histograma je tudi razvidno, da testirana protitelesa proti Neu5Gc omogočajo razlikovanje med teoretično močno pozitivno populacijo pozitivne kontrole (krvne celice miši) in teoretično manj, vendar vseeno pozitivnimi celicami CHO.

#### 4.1.2 Titracija primarnih in sekundarnih protiteles za zunajcelično določanje Neu5Gc

##### ➤ Primarna protitelesa

Za določanje optimalne koncentracije primarnih protiteles smo uporabili redčine 1:50, 1:100, 1:200 in 1:400. Uporabili smo sistem redčitvene vrste (glej preglednico 1). S t.i. titracijo smo določili redčino z najbolj pozitivnim signalom (največjo fluorescenco). To ni vedno redčina z najvišjo koncentracijo protiteles, saj pri uporabi visokih koncentracij

protiteles lahko pride do steničnega oviranja med protitelesi in posledično je fluorescensa manjša.



Slika 11: Histogram titracije kontrolnih (cAb) in primarnih protiteles (pAb) za zunajcelično določanje Neu5Gc.

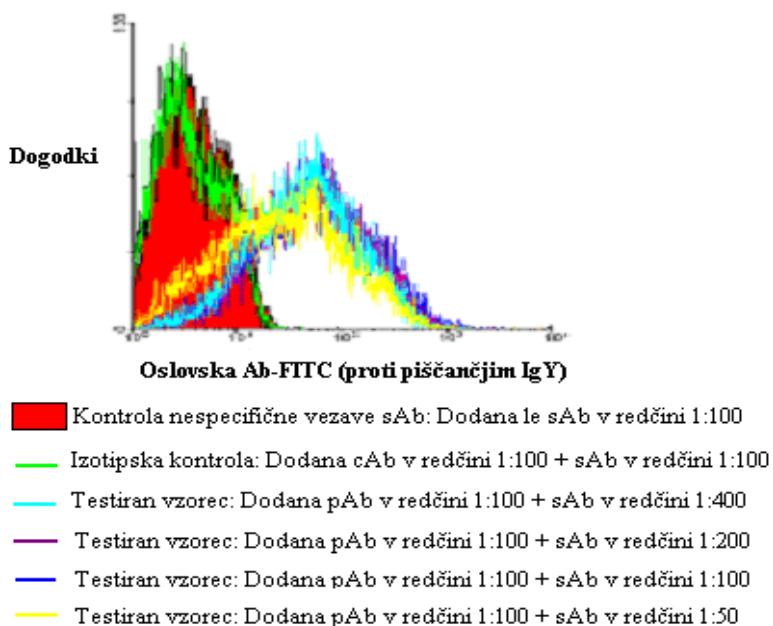
Figure 11: Histogram of control (cAb) and primary antibodies (pAb) titration for extracellular Neu5Gc determination

Na sliki 11 so prikazane meritve posameznih redčitev primarnih in kontrolnih protiteles. Levo sta, podobno kot na sliki 10, prikazani obe kontroli (kontrola nespecifične vezave sekundarnih protiteles in izotipska kontrola), desno pa so prikazani prekrivajoči se histogrami, ki smo jih izmerili pri različnih redčinah primarnih protiteles s katerimi smo tretirali vzorce celic CHO. Kot je razvidno iz slike 11, bi bila optimalna koncentracija redčitev primarnih protiteles 1:50. Razvidno je, da v primeru titracije primarnih protiteles nismo dobili nasičenja (to je pri različnih metodah pretočne citometrije pogosto problem). Ker je struktura histogramov pri redčinah 1:50 in 1:100 podobna,

proizvajalec kot najnižjo redčino priporoča redčino 1:200 in ker ločitev med kontrolami in testiranim vzorcem pri omenjenih redčinah ni izrazitejša, smo kot optimalno redčino primarnih protiteles določili redčino 1:100.

➤ Sekundarna protitelesa

Za določanje optimalne koncentracije sekundarnih protiteles smo uporabili redčine 1:50, 1:100, 1:200 in 1:400. Uporabili smo sistem redčitvene vrste (glej pregл. 2). S t.i. titracijo smo določili redčino z najbolj pozitivnim signalom (največjo fluorescenco).



Slika 12: Histogram titracije sekundarnih protiteles (sAb) za zunajcelično določanje Neu5Gc.

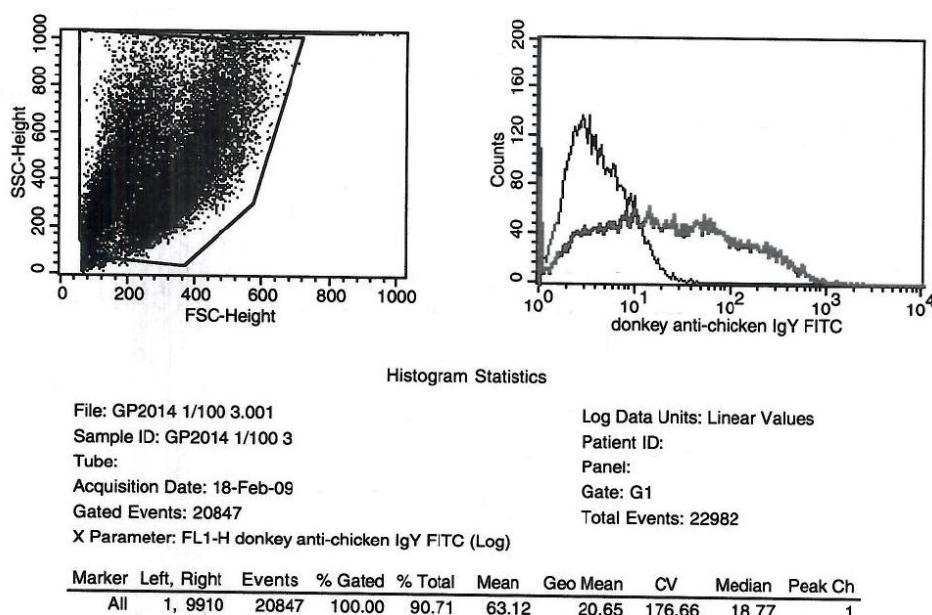
Figure 12: Histogram of secondary antibodies (sAb) titration for extracellular Neu5Gc determination

Na sliki 12 so prikazane meritve posameznih redčitev sekundarnih protiteles. Levo sta, podobno kot na sliki 10, prikazani obe kontroli (kontrola nespecifične vezave sekundarnih protiteles in izotipska kontrola), desno pa so prikazani prekrivajoči se histogrami, ki smo jih izmerili pri različnih redčinah sekundarnih protiteles s katerimi smo tretirali vzorec celic CHO. Iz histograma je razvidno, da najmočnejši signal ne dobimo pri najvišji koncentraciji protiteles. Rumen histogram prikazuje redčino 1:50, ki

pa ima v primerjavi z ostalimi redčinami najnižjo fluorescenco. Kot optimalna redčina sekundarnih protiteles smo določili redčino 1:100.

#### 4.1.3 Primer postavitve vrat in histogram, ki ga dobimo z analizo podatkov, izmerjenih s pretočnim citometrom

Na sliki 13 je prikazan primer rezultata analize Neu5Gc s pretočnim citometrom in pripadajoča statistika. Na točkovnem diagramu FSC/SSC smo z vrti zajeli dogodke, ki predstavljajo celice. Na podlagi zajetih celic smo izrisali desni histogram. Tak primer rezultata smo dobili pri vseh analizah Neu5Gc s pretočnim citometrom. Pri obdelavi podatkov smo vedno zajeli vse dogodke, kot statistični parameter za jakost fluorescence pa smo vzeli mediano.

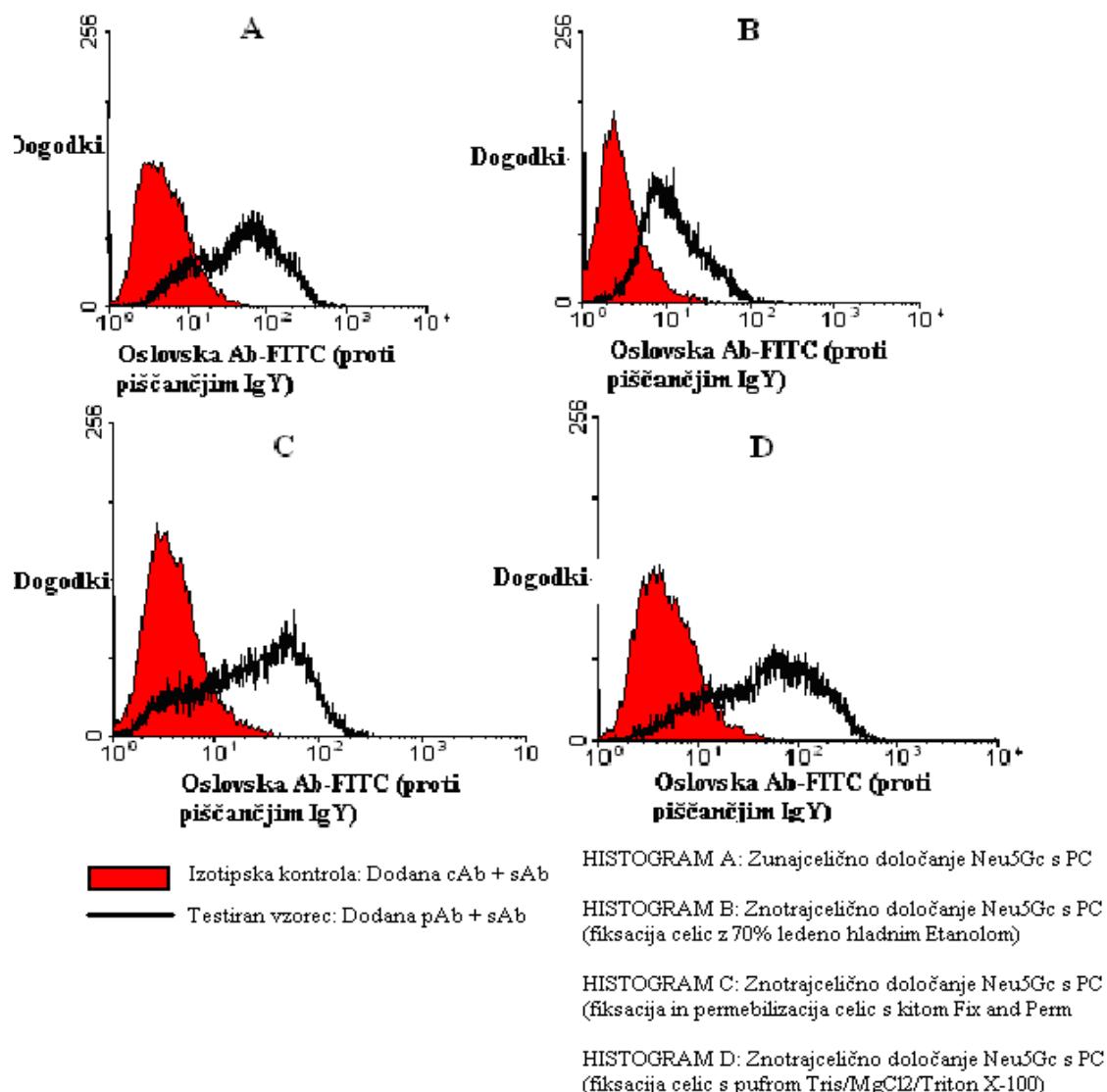


Slika 13: Primer rezultata, dobljenega s pretočnim citometrom, s pripadajočo statistiko

Figure 13: An example of the result obtained by flow cytometry, with corresponding statistics

#### 4.1.4 Določanje načina fiksacije za znotrajcelično določanje Neu5Gc

Pri vpeljavi metode za znotrajcelično določanje Neu5Gc, smo celice istega vzorca najprej fiksirali z različnimi fiksativi. Na sliki 14 so prikazani rezultati testiranj treh fiksacijskih sredstev, izmed katerih smo izbrati ustrezni fiksativ ali permeabilizacijsko sredstvo.



Slika 14: Vpliv različnih fiksacijskih in permeabilizacijskih sredstev na obliko histograma

Figure 14: Influence of different fixation and permeabilization reagents on the form of a histogram

Kot najustreznejši fiksativ je bil izbran 70 % Etanol.

#### 4.1.5 Testiranje protiteles za znotrajcelično določanje Neu5Gc

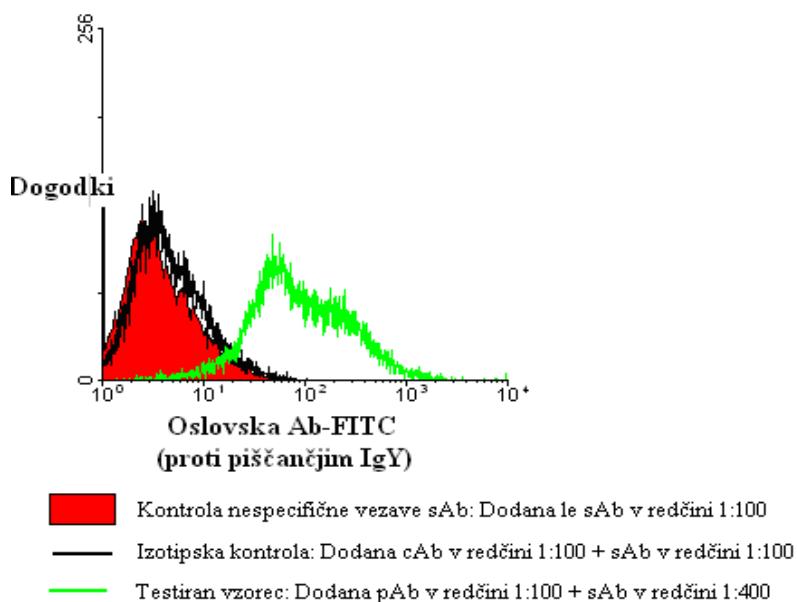
Celice CHO smo najprej fiksirali v 70 % etanolu. Da bi ugotovili, če so protitelesa, ki so sestavni del kita za določanje Neu5Gc (Gc-Free kit), dovolj specifična za detekcijo Neu5Gc v celicah CHO, smo v začetku testiranja uporabili različne kontrole, ki so prikazane v preglednici 5. Verjetnost nespecifične vezave je pri znotrajceličnem barvanju celic teoretično večja.

Pregl. 5: Kontrole za določanje specifičnosti protiteles proti Neu5Gc za znotrajcelično barvanje

Table 5: Controls for Neu5Gc antibodies specificity determination for intracellular Neu5Gc determination

Kontrola	Vzorec	Kontrolna protitelesa (cAb)	Primarna protitelesa (pAb)	Sekundarna protitelesa (sAb)
<b>Kontrola celične autofluorescence (ni prikazana na sliki 15)</b>	Celice CHO	NE	NE	NE
<b>Izotipska kontrola</b>	Celice CHO	DA	NE	DA
<b>Kontrola nespecifične vezave sekundarnih protiteles</b>	Celice CHO	NE	NE	DA
<b>Vzorec</b>	Celice CHO	NE	DA	DA

Rezultat testiranja je prikazan na histogramu (slika 15).



Slika 15: Histogram kontrol za zunajcelično določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom

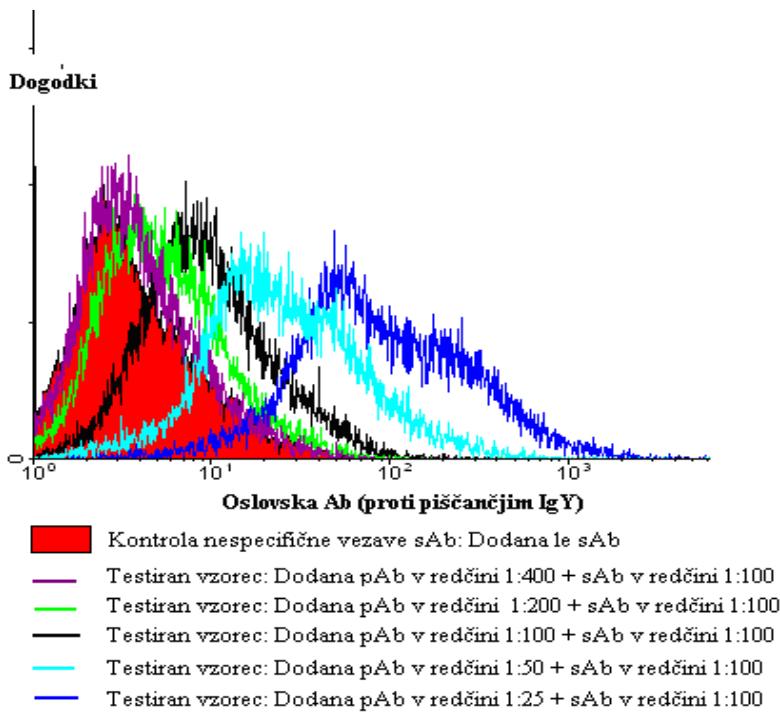
Figure 15: Histogram of control intracellular Neu5Gc determination by flow cytometry

Na sliki 15 je prikazan t.i. prekrivajoči histogram, na katerem so prikazane tri različne meritve treh vzorcev. Na histogramu je prikazana jakost zelene fluorescence različnih vzorcev. Rezultati testa kontrol kažejo, da ni nespecifične vezave sAb in šibko nespecifično vezavo cAb oz. pAb.

#### 4.1.6 Titracija primarnih in sekundarnih protiteles za znotrajcelično določanje Neu5Gc

##### ➤ Primarna protitelesa

Za določanje optimalne koncentracije primarnih protiteles pri znotrajceličnem določanju Neu5Gc, smo uporabili redčine 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 in 1:400. Uporabili smo sistem redčitvene vrste (glej pregл. 1). Kot optimalno redčino smo izbrali redčino z najbolj pozitivnim signalom (največjo fluorescenco).



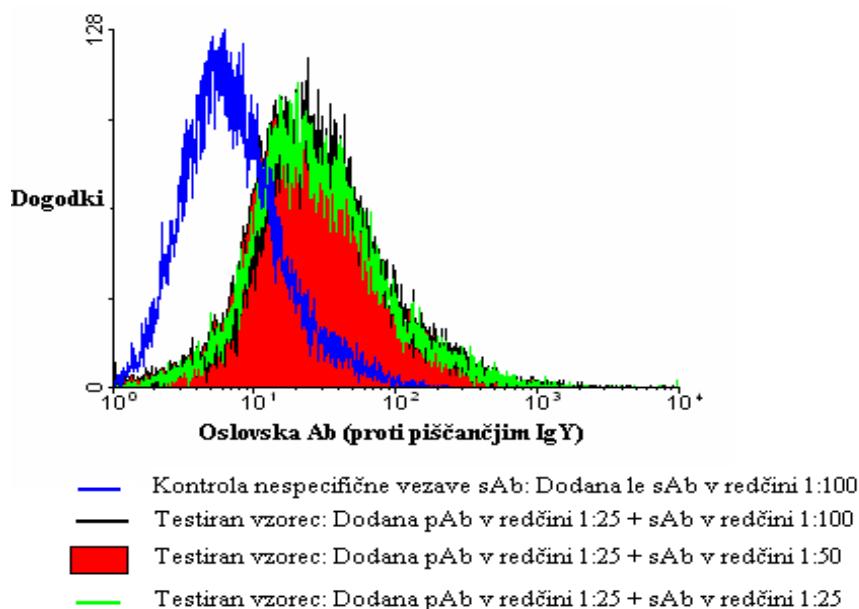
Slika 16: Histogram titracije primarnih protiteles za znotrajcelično določanje Neu5Gc

Figure 16: Histogram of primary antibodies (pAb) titration for intracellular Neu5Gc determination

Histogram na sliki 16 prikazuje rezultate titracije primarnih protiteles pri znotrajceličnem določanju Neu5Gc. Kontrola nespecifične vezave sekundarnih protiteles je prikazana levo (rdeč histogram), desno pa so prikazani prekrivajoči se histogrami, ki smo jih izmerili pri različnih redčinah primarnih protiteles s katerimi smo tretirali fiksirani vzorec celic CHO. Na podlagi meritev prikazanih na sliki 16, smo za optimalna redčitev primarnih protiteles pri znotrajceličnem določevanju Neu5Gc, izbrali redčino 1:25.

#### ➤ Sekundarna protitelesa

Za določitev optimalne koncentracije sekundarnih protiteles pri znotrajceličnem določanju Neu5Gc, smo uporabili redčine 1:25, 1:50 in 1:100. Uporabili smo sistem redčitvene vrste (glej pregл. 2). Kot optimalno redčino smo izbrali redčino z najbolj pozitivnim signalom (največjo fluorescenco).



Slika 17: Histogram titracije sekundarnih protiteles za znotrajcelično določanje Neu5Gc

Figure 17: Histogram of secondary antibodies (sAb) titration for intracellular Neu5Gc determination

Histogram na sliki 17 prikazuje rezultate titracije sekundarnih protiteles. Pri znotrajceličnem določanju Neu5Gc. Moder histogram je kontrola nespecifične vezave sekundarnih protiteles, desno pa so prikazani prekrivajoči se histogrami, ki smo jih izmerili pri različnih redčinah sekundarnih protiteles s katerimi smo tretirali fiksirani vzorec celic CHO. Glede na najvišjo fluorescenco smo kot optimalno redčino sekundarnih protiteles pri znotrajceličnem določanju Neu5Gc določili redčino 1:100.

#### 4.1.7 Ponovljivost

Za test ponovljivosti smo izvedli tri neodvisne ponovitve testov treh vzorcev, ki smo jih izmerili pri enakih pogojih. Rezultati ponovljivosti znotrajceličnega in zunajceličnega merjenja Neu5Gc so prikazani v pregл. 6 in pregл. 7.

Pregl. 6: Testiranje ponovljivosti za zunajcelično določanje Neu5Gc

Table 6: Repeatability test for extracellular Neu5Gc determination

vzorec/ponovitev	1	2	3	povprečje	SD	CV
1	31,34	29,43	35,55	32,11	3,13	9,75
2	61,53	62,64	58,82	61,00	1,97	3,22
3	25,48	24,36	26,42	25,42	1,03	4,06

Pregl. 7: Testiranje ponovljivosti za znotrajcelično določanje Neu5Gc

Table 7: Repeatability test for intracellular Neu5Gc determination

vzorec/ponovitev	1	2	3	povprečje	SD	CV
1	32,20	35,55	32,78	33,51	1,79	5,34
2	69,16	65,52	74,32	69,67	4,42	6,35
3	33,08	33,98	39,95	35,67	3,73	10,47

Ponovljivost pri zunajceličnem določanje Neu5Gc je ustrezala kriterijem, saj je  $CV \leq 10\%$  za bioanalitske metode odličen rezultat. Pri znotrajceličnem določanju Neu5Gc, je bila ponovljivost nekoliko slabša, vendar še vedno sprejemljiva.

#### 4.1.8 Vpliv instrumenta na ponovljivost

Na variacije med različimi ponovitvami vzorcev lahko vpliva tudi instrument. Vpliv instrumenta pri merjenju Neu5Gc smo testirali na treh enako tretiranih vzorcih, ki smo jih trikrat zapored izmerili na pretočnem citometru. Rezultati testiranja ponovljivosti za zunajcelično določanje Neu5Gc so prikazani v pregл. 8, rezultati testiranja ponovljivosti za znotrajcelično določanje Neu5Gc pa v pregл. 9.

Pregl. 8: Testiranje ponovljivosti (vpliva instrumenta) za zunajcelično določanje Neu5Gc

Table 8: Repeatability test (instrument influences) for extracellular Neu5Gc determination

vzorec/ponovitev	1	2	3	povprečje	SD	CV
1	20,91	19,63	19,46	20,00	0,79	3,96
2	29,96	27,63	25,71	27,77	2,13	7,66
3	8,06	8,82	9,56	8,81	0,75	8,51

Pregl. 9: Testiranje ponovljivosti (vpliva instrumenta) za znotrajcelično določanje Neu5Gc

Table 9: Repeatability test (instrument influences) for intracellular Neu5Gc determination

vzorec/ponovitev	1	2	3	povprečje	SD	CV
1	65,52	60,43	54,74	60,23	5,39	8,95
2	29,96	29,64	28,13	29,24	0,98	3,34
3	33,68	33,38	33,38	33,48	0,17	0,52

Iz pregl. 8 in pregl. 9 je razvidno, da je bil koeficienti variacije pri obeh načinih določanja Neu5Gc manjši od 10%, kar je za bioanalitske metode odličen rezultat.

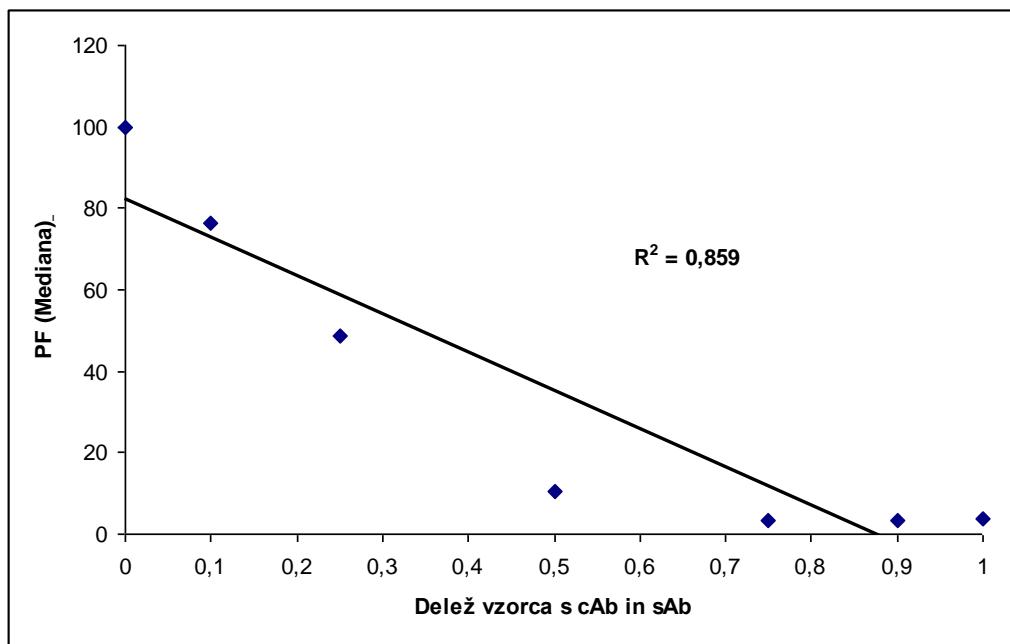
#### 4.1.9 Linearnost

Za testiranje linearnosti smo v različnih razmerjih zmešali vzorec izotipske kontrole (celice, obarvane s kontrolnimi protitelesi) in vzorec pozitivne kontrole (celice CHO, obarvane s primarnimi in sekundarnimi protitelesi) (pregl. 3). Skozi točke na grafu (glej slike 18-21) smo potegnili regresijsko premico in izračunali koeficient determinacije. Pri testiranju linearnosti za zunajcelično merjenje smo uporabili netretirane celice, pri testiranju linearnosti za znotrajcelično določanje Neu5Gc pa celice, fiksirane z 70% etanolom. Rezultati testiranj so prikazani v pregl. 10 in 11.

Pregl. 10: Test linearnosti za zunajcelično določanje Neu5Gc

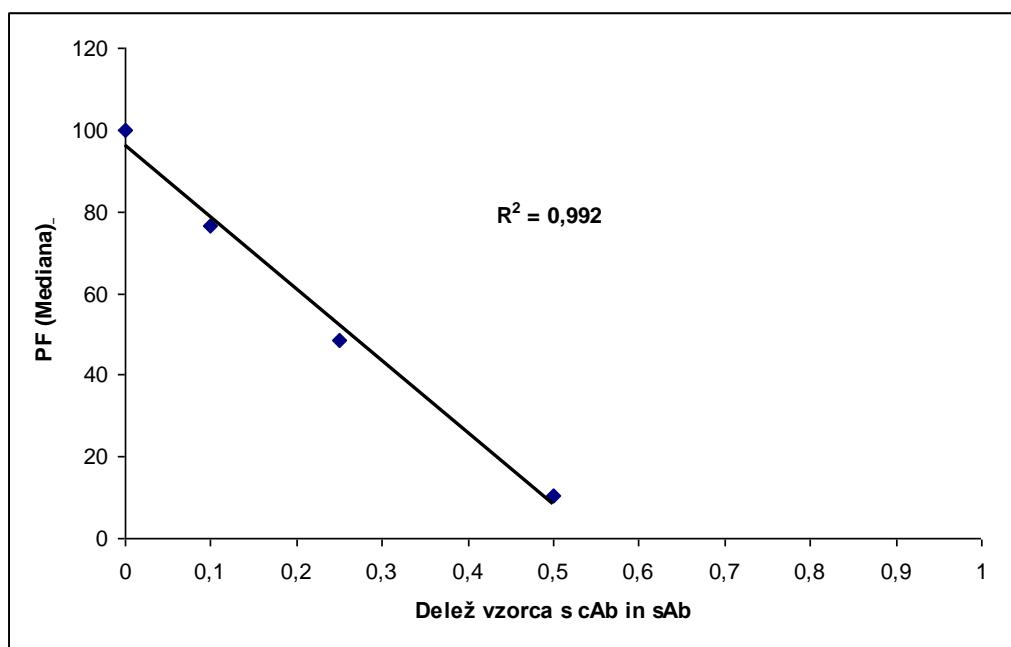
Table 10: Linearity test for extracellular Neu5Gc determination

Linearost za zunajcelično določanje Neu5Gc	H	L	Mediana	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ožjega merilnega območja
	0	1	3,68	0,859	0,992
	0,1	0,9	3,25		
	0,25	0,75	3,49		
	0,5	0,5	10,65		
	0,75	0,25	48,70		
	0,9	0,1	76,35		
	1	0	100		



Slika 18: Test linearnosti za zunajcelično določanje Neu5Gc

Figure 18: Linearity test for extracellular Neu5Gc determination



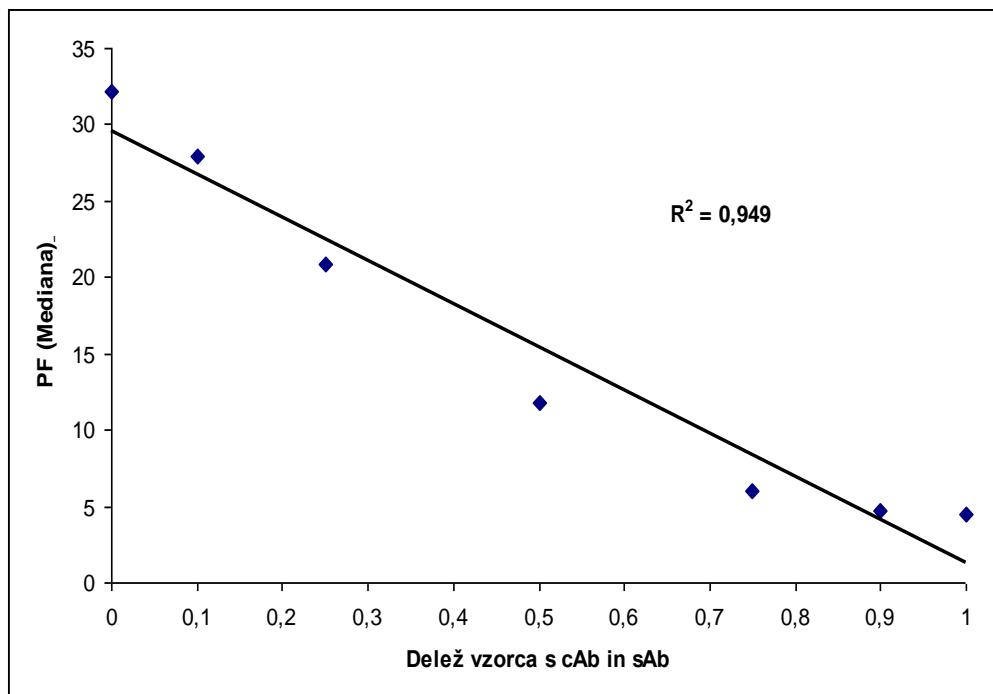
Slika 19: Test linearnosti za zunajcelično določanje Neu5Gc – odstranitev nizkih vrednosti

Figure 19: Linearity test for extracellular Neu5Gc determination – low value elimination

Pregl. 11: Test linearnosti za znotrajcelično določanje Neu5Gc

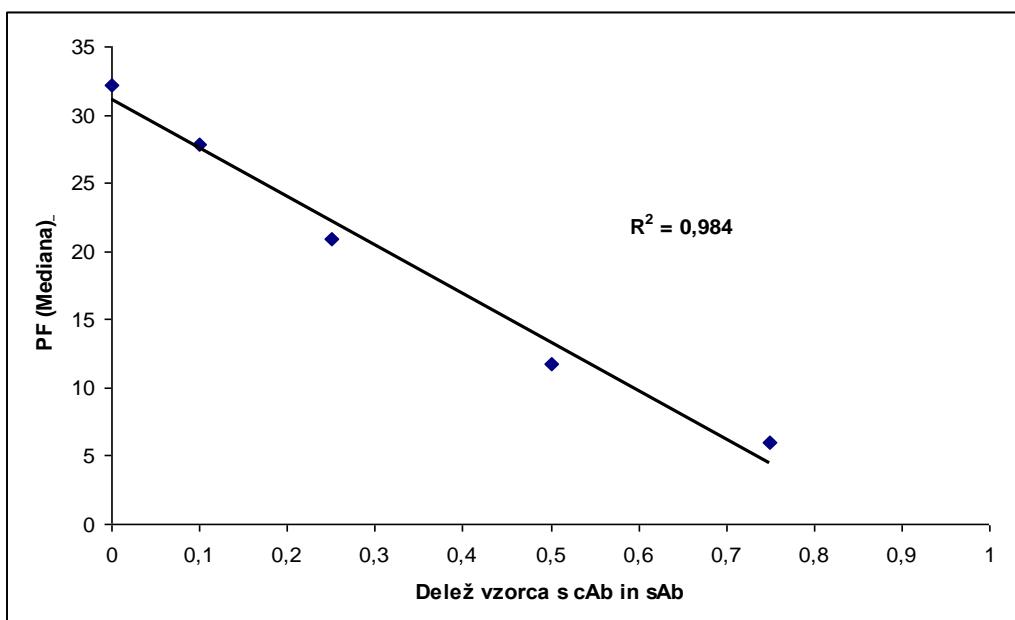
Table 11: Linearity test for intracellular Neu5Gc determination

Linearost za znotrajcelično določanje Neu5Gc	H	L	Mediana	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ožjega merilnega območja
	0	1	4,53	0,949	0,984
	0,1	0,9	4,74		
	0,25	0,75	5,99		
	0,5	0,5	11,76		
	0,75	0,25	20,91		
	0,9	0,1	27,88		
	1	0	32,20		



Slika 20: Test linearnosti za znotrajcelično določanje Neu5Gc

Figure 20: Linearity test for intracellular Neu5Gc determination



Slika 21: Test linearnosti za znotrajcelično določanje Neu5Gc –odstranitev nizkih vrednosti

Figure 21: Linearity test for intracellular Neu5Gc determination - low value elimination

Iz grafov linearnosti zunajceličnega določanja Neu5Gc (slika 18) smo določili nižji koeficient determinacije, kar je bila posledica nizkih vrednosti Neu5Gc na celici. V primerih ko je bila mediana manjša od 10 oz. 5 nismo bili uspešni pri določevanju razlik v vsebnosti Neu5Gc. Zaradi omenjene nizke občutljivosti, smo pri testu linearnosti za zunajcelično določanje Neu5Gc, odstranili vzorce z zelo nizko vsebnostjo Neu5Gc (odstranitev nizkih vrednosti) in ponovili izračun linearnosti (slika 19). Koeficient determinacije ( $R^2$  zmanjšan) je bil v tem primeru precej višji zato smo zaključili, da metoda za zunajcelično določanje Neu5Gc ni primerna za določanje zelo nizkih vrednosti Neu5Gc na celicah CHO.

Test linearnosti je pokazal, da je znotrajcelično določanje Neu5Gc ustreznnejše, saj je bil koeficient determinacije pri analizi vzorcev dokaj visok tudi pri zajetju vzorcev z nizkimi vrednostmi Neu5Gc (slika 20). Ob odstranitvi nizkih vrednosti, pri katerih je tudi znotrajcelično določanje Neu5Gc manj občutljivo, se koeficient determinacije še izboljša (slika 21).

#### 4.1.10 Povzetek rezultatov preverjanja ustreznosti metode

V pregл. 12 je prikazan povzetek rezultatov preverjanja ustreznosti metode.

Pregл. 12: Povzetek rezultatov preverjanja ustreznosti metod za zunajcelično in znotrajcelično določanje Neu5Gc

Table 12: Qualification results summary of the methods for intracellular and extracellular Neu5Gc determination

	Test	Izračunan CV/R <sup>2</sup>	Opomba
Ponovljivost	Zunajcelično določanje Neu5Gc	$3,22 \leq CV \leq 9,75$	Ponovljivost ustrezena
	Znotrajcelično določanje Neu5Gc	$5,34 \leq CV \leq 10,47$	Ponovljivost ustrezena
Vpliv instrumenta	Zunajcelično določanje Neu5Gc	$3,96 \leq CV \leq 8,51$	Ni signifikantnega vpliva instrumenta
	Znotrajcelično določanje Neu5Gc	$0,52 \leq CV \leq 8,95$	Ni signifikantnega vpliva instrumenta
Linearnost	Zunajcelično določanje Neu5Gc	$R^2 = 0,859$	Linearnost ustrezena
	Znotrajcelično določanje Neu5Gc	$R^2 = 0,949$	Linearnost ustrezena

#### 4.1.11 Primerjava zunajceličnega in znotrajceličnega določanja Neu5Gc z RP-HPLC

Tako znotrajcelično kot zunajcelično določanje Neu5Gc ima svoje prednosti in slabosti, ki so podrobnejše povzete v razpravi. V namen izbora optimalne metode za določanje Neu5Gc, smo izvedli primerjavo znotrajceličnega in zunajceličnega določanja Neu5Gc z vsebnostjo Neu5Gc na rekombinantnem proteinu, določeno z metodo RP-HPLC. Primerjali smo 11 vzorcev enega poskusa in izračunali koeficiente korelacijske. Za nadaljnje poskuse smo želeli izbranati metodo pretočne citometrije, ki bi bila najbolj primerljiva z metodo RP-HPLC. Rezultati so prikazani v spodnjih tabelah.

Pregl. 13: Primerjava zunajceličnega (EP) in znotrajceličnega (IP) določanja Neu5Gc s pretočnim citometrom

Table 13: The comparison of extracellular (EP) and intracellular (IP) Neu5Gc determination by flow cytometry

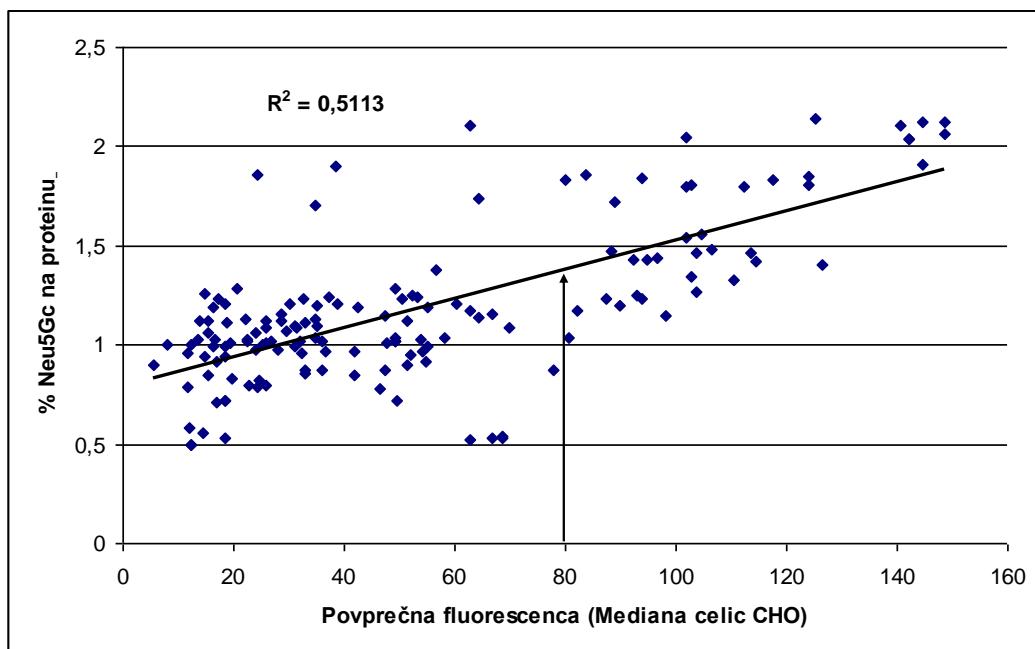
Oznaka vzorca	IP (Median)	EP (Median)	RP-HPLC (%)
1	26,66	31,91	1,02
2	24,80	37,18	1,24
3	25,03	26,66	1,02
4	25,03	34,91	1,04
5	24,58	31,06	1,10
6	29,43	31,06	0,99
7	10,65	14,46	0,56
8	9,56	17,00	0,71
9	8,58	11,86	0,58
10	8,13	18,43	0,72
11	9,82	12,41	0,50
Pearsonov koreacijski koeficient (r) – IP:RP-HPLC		0,892	
Pearsonov koreacijski koeficient (r) – EP:RP-HPLC		<b>0,971</b>	
Pearsonov koreacijski koeficient (r) – IP:EP		0,921	

Iz pregl. 13 je razvidno, da zunajcelično določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom bolje korelira z rezultati meritev Neu5Gc na rekombinantnem proteinu z metodo RP-HPLC. Korelacija med znotrajceličnem in zunajceličnem določanjem Neu5Gc je odlična, vendar smo tu izmerili le 11 vzorcev. Glede na naše potrebe in na nekatere prednosti zunajceličnega določanja Neu5Gc, smo se odločili v nadaljnjih poskusih uporabljati slednje.

#### **4.1.12 Ocena korelacije med vsebnostjo Neu5Gc na celicah CHO in vsebnostjo Neu5Gc na rekombinantnem proteinu**

Po preverjanju ustreznosti metode (testiranje ponovljivosti, linearnosti, vpliva instrumenta) in izboru metode (zunajcelično določanje Neu5Gc) smo ocenili korelacijo med vsebnostjo Neu5Gc na celicah CHO in vsebnostjo Neu5Gc na rekombinantnem proteinu. Primerjali smo rezultate dobljene s pretočnim citometrom na celicah CHO z rezultati deležev Neu5Gc izmerjenimi na proteinu z metodo RP-HPLC (primerjava 149 vzorcev iz osmih neodvisnih poskusov). Pri analizi točkovnega diagrama smo z vrati

zajeli celice, kot kriterij za povprečno jakost fluorescence, pa smo uporabili mediano. Rezultati so prikazani grafično (slika 22), koeficienti korelacije pa so prikazani v pregл. 14. Tabelarični prikaz vseh rezultatov je v prilogi A.



Slika 22: Ocena korelacji med vsebnostjo Neu5Gc na celicah CHO in vsebnostjo Neu5Gc na rekombinantnem proteinu

Figure 22: Assessment of correlation between Neu5Gccontent at CHO cells and Neu5Gc content at the recombinant protein

Pregл. 14: Pearsonovi korelacijski koeficienti izračunani ločeno po poskusih in skupen koeficient

Table 14: Pearson correlation coefficients for individual experiments and common coefficient

Poskus	Pearsonovi korelacijski koeficienti (r)
1	0,431
2	0,650
3	0,821
4	0,194
5	0,699
6	0,955
7	0,016
8	0,288
Združeni (1-8)	<b>0,715</b>

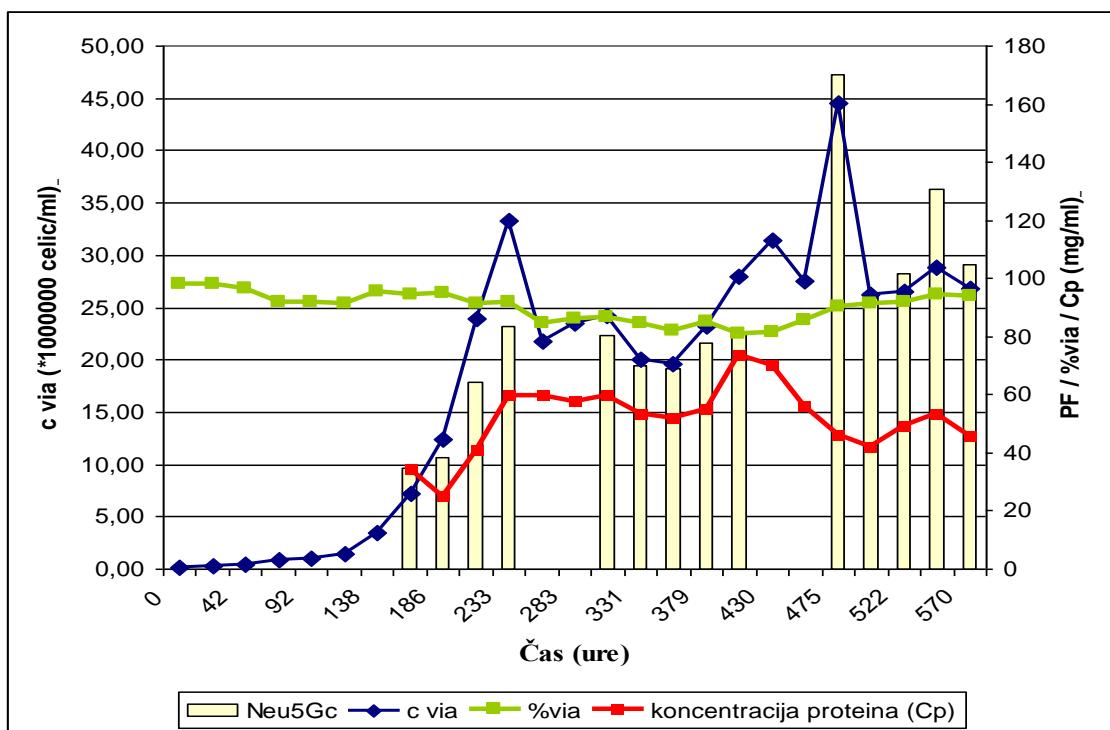
Na sliki 22 je prikazana primerjava med rezultati meritev Neu5Gc na celicah CHO s pretočnim citometrom in rezultati meritev vsebnosti Neu5Gc na proteinu z RP-HPLC.

Iz slike 22 je razvidno, da je koeficient determinacije prenizek, da bi vsebnost Neu5Gc lahko določali le z metodo pretočne citometrije. Iz diagrama na sliki 22 je razvidno tudi, da je bil delež Neu5Gc na proteinu pri vzorcih z mediano nad 80, vedno višji od 1%. Kljub temu, da se metoda ni izkazala kot ustrezna pomožna analitska metoda, smo z njo lahko grobo izključili neželene vzorce z vsebnostjo Neu5Gc na proteinu nad 1%. Pearsonov korelacijski koeficient, ki je skupen vsem osmim poskusom, je 0,715.

#### **4.1.13 Spremljanje bioprosesov in določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom.**

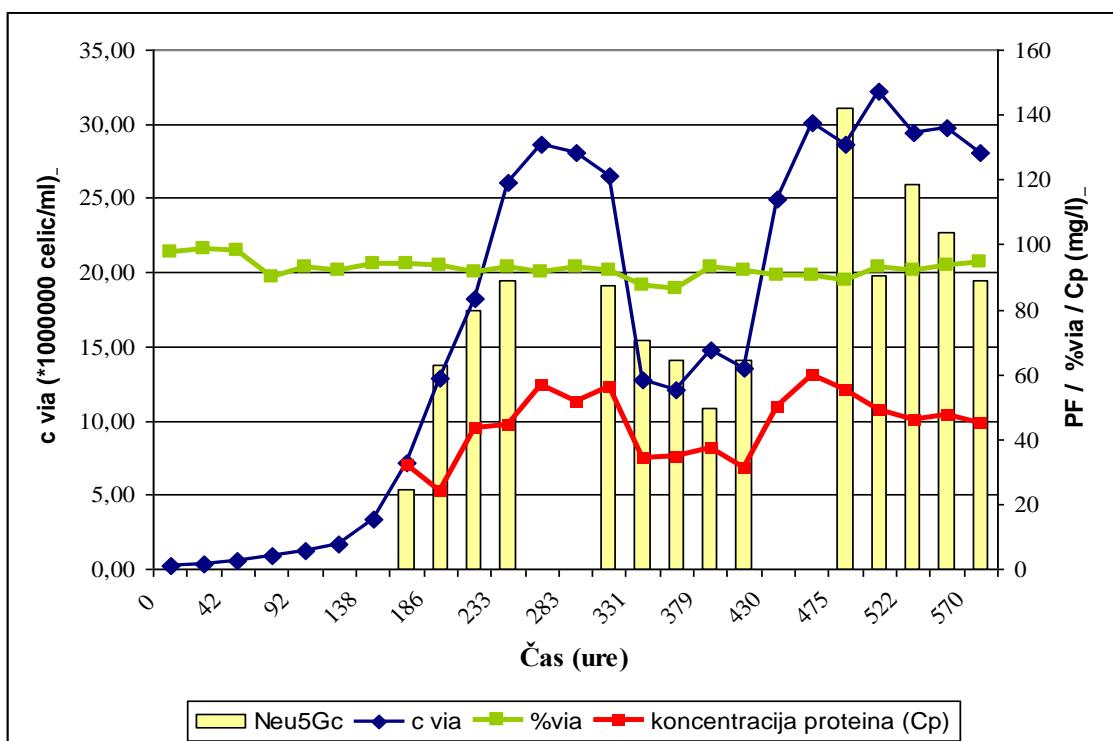
Glede na to, da je pretočna citometrija edina metoda, ki omogoča določanje Neu5Gc neposredno v ali na celicah, smo z njo lahko določili količino Neu5Gc na celični površini glede na rast celic (lag, eksponentna, stacionarna, log faza). V začetnih fazah rasti je namreč klasična metoda določanja vsebnosti Neu5Gc na proteinu nemogoča, zaradi prenizke vsebnosti proteinov. Pri spremljanju dveh bioprosesov smo se tako osredotočili na dinamiko izražanja Neu5Gc na celični površini med bioprosesom ter na kakšnokoli povezavo med količino rekombinantnega proteina ter količino Neu5Gc na celični površini.

Slika 23 in slika 24 prikazujeta potek obeh bioprosesov, s podatki o količini viabilnih celic (c via), o celični viabilnosti (% via) ter o koncentraciji rekombinantnega glikoproteina. Ker je bil tip bioprosesa t.i. »repeated batch« bioproses, smo prve žetve začeli pobirati šele, ko se je koncentracija celic povečala nad  $5 \times 10^6$  živih celic/ml, zato so bile prve meritve količine Neu5Gc na celicah izvedene 7 dan gojenja.



Slika 23: Bioprocес 1

Figure 23: Bioprocess 1



Slika 24: Bioprocес 2

Figure 24: Bioprocess 2

Pregl. 15: Pearsonovi korelacijski koeficienti izračunani za oba bioprosesa

Table 15: Pearson correlation coefficients for bioprocess 1 and bioprocess 2

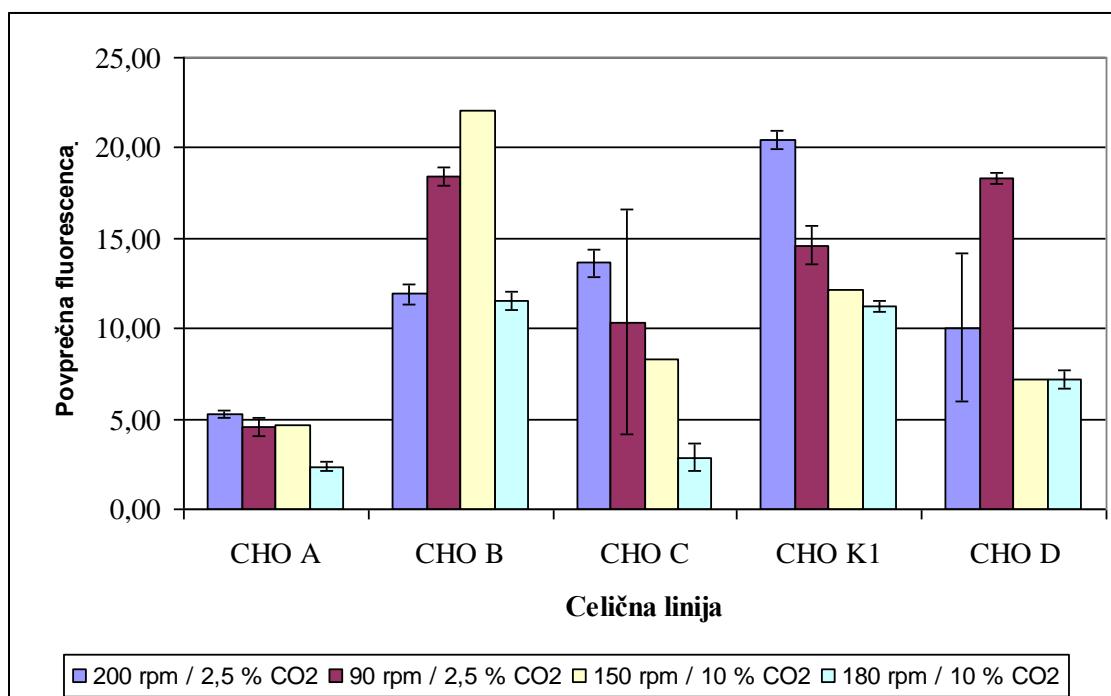
	Bioprocес 1	Bioprocес 2	Skupno
<b>Pearsonov korelacijski koeficient (r) (Neu5Gc/Cvia)</b>	0,892	0,838	<b>0,859</b>
<b>Pearsonov korelacijski koeficient (r) (Neu5Gc/Cprotein)</b>	0,287	0,758	<b>0,653</b>

Pri obeh bioprosesih se je pokazala močna pozitivna korelacija med celično koncentracijo in vsebnostjo Neu5Gc, izmerjeno s pretočnim citometrom (pregl. 15). Korelacija med vsebnostjo Neu5Gc ter koncentracijo rekombinantnega proteina pa je bila nižja.

Iz tega lahko sklepamo, da je nastajanje Neu5Gc povezano s fazo celične rasti in da je količina Neu5Gc vsaj delno povezana s količino rekombinantnega proteina oz. obratno. Obsežnejše tabele z vsemi rezultati so priložene v prilogah (glej prilogo B in C).

#### 4.1.14 Določanje Neu5Gc na različnih podtipih celic CHO

Poleg celične linije CHO K1, ki smo jo najpogosteje uporabili, smo vsebnost Neu5Gc določali še na 4 drugih celičnih linijah CHO. Zanimalo nas je, če obstaja kakšna razlika v vsebnosti Neu5Gc med celičnimi linijami in pretočni citometer je v tem primeru omogočal merjenje potencialnih razlik. V teh poskusih smo uporabili parentalne celične linije, ki niso bile transficirane z genom rekombinantnega proteina. Parentalne celice smo gojili v različnih pogojih (% CO<sub>2</sub>, obrati stresanja (rpm), začetna koncentracija živih celic), vse meritve pa so bile izvedene pri istih nastavitevah pretočnega citometra. Ker je pri nekaterih celičnih linijah prišlo do premika izotipskih kontrol, smo vrednost mediane negativne kontrole odšteli od mediane pozitivne kontrole. Na sliki 25 je prikazanih več histogramov, ki se med seboj ločijo glede na eksperimentalne pogoje.



Slika 25: Neu5Gc pri različnih nastavitevah stresanja in deležih CO<sub>2</sub> pri vseh petih celičnih linijah  
Figure 25: Neu5Gc at different CO<sub>2</sub> shaker incubator settings for five different CHO cell lines

Iz slike 25 je razvidno, da ima izmed vseh testiranih celičnih linij celična linija CHO A pri vseh pogojih najnižji delež Neu5Gc, celični liniji CHO B in CHO K1 pa najvišji delež Neu5Gc. Pri celičnih linijah CHO D in CHO C je vsebnost Neu5Gc precej varirala glede na pogoje, poleg tega smo pri teh dveh celičnih linijah pri poskusih dvakrat izračunali zelo visoko standardno deviacijo. Za nas so najbolj zanimivi prav kontrolni pogoji (150 rpm, 10% CO<sub>2</sub>), ki se največkrat uporabljajo za gojenje celic CHO.

V predhodnih študijah so že dokazali, da sta koncentracija CO<sub>2</sub> in količina Neu5Gc na rekombinantnem glikoproteinu obratno sorazmerni (Blumen, 1995). V večini primerov smo res izmerili manj Neu5Gc pri višjih vrednostih CO<sub>2</sub>.

Podrobnejši komentarji so navedeni v razpravi.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Razvoj metode za zunajcelično določanje Neu5Gc

Pri začetnem testiranju protiteles za zunajcelično določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom, smo dobili pričakovane rezultate (slika 10):

- pri izotipski kontroli smo zaznali zelo šibko nespecifično vezavo izotipskih (kontrolni) protiteles. Iz tega lahko sklepamo na šibko nespecifično vezavo primarnih protiteles, saj so ta protitelesa istega tipa, kot izotipska (kontrolna) protitelesa,
- pri kontroli nespecifične vezave sekundarnih protiteles smo izločili možnost nespecifične vezave sekundarnih protiteles,
- pri uporabi mišje krvi kot pozitivne kontrole, smo izmerili največjo vsebnost Neu5Gc, kar se popolnoma sklada s predhodnimi objavami, da imajo mišje celice večjo vsebnost Neu5Gc od hrčkovih (Butler, 2006; Hokke in sod., 1995; Baker in sod.; 2001),
- pri določevanju Neu5Gc s pretočnim citometrom na celicah CHO smo izmerili višjo fluorescenco kot pri kontroli nespecifične vezave sekundarnih protiteles in izotipski kontroli, vendar je bila fluorescanca nižja kot izmerjena fluorescanca na mišjih celicah.

Podobne rezultate so v znanstvenem prispevku dobili tudi Diaz in sodelavci leta 2009, kar le še potrjuje uporabnost metode za detekcijo Neu5Gc na celicah CHO s pretočnim citometrom.

Po testiranju ustreznosti protiteles smo s postopkom titracije določili optimalno redčino (koncentracijo) primarnih (slika 11) in sekundarnih protiteles (slika 12). Pri vseh metodah pretočne citometrije, kjer uporabljam protitelesa, lahko pride pri neki koncentraciji protiteles do t.i. nasičenja pri vezavi na antigen. Ta koncentracija protiteles je optimalna, saj pri njej dobimo najboljše razmerje signal/šum in dobljena fluorescanca ni odvisna od števila celic, koncentracije dodanih protiteles in časa inkubacije (Kantor in Roderer, 1997). Ko je ta koncentracija presežena se zaradi sferičnega oviranja protiteles jakost fluorescence zniža, kljub temu, da uporabimo zelo visoko koncentracijo protiteles. Včasih se lahko zgodi, da nasičenja kljub zelo visokim

koncentracijam protiteles ne zaznamo. V kolikor ocenimo, da razlika med dvema koncentracijama ni prevelika (je najmanjša od vseh testiranih koncentracij), lahko koncentracijo določimo na podlagi lastnih kriterijev. Pri tem pa velja omeniti, da morajo biti vzoreci v primeru nenasičenja, obravnavani in merjeni pri popolnoma identičnih pogojih. Pri protitelesih, ko ne pride do nasičenja niti pri zelo visokih koncentracijah, lahko metodo uporabimo za kvantitativno merjenje le, če imamo zelo natančno izdelan protokol, kjer so dobro definirani volumen reagentov, število celic in časi inkubacije vzorcev s protitelesi (Kantor in Roderer, 1997).

Pri titraciji primarnih protiteles (slika 11) nismo dosegli nasičenja. Proizvajalec priporoča, da moramo za izvedbo metode sami določiti optimalno redčino protiteles, ki je odvisna od vrste uporabljenih celic. Test titracije (slika 11) je pokazal, da se po fluorescenci najmanj razlikujeta meritvi, narejeni pri redčinah 1:100 in 1:50, zato smo kot optimalno redčino primarnih protiteles določili redčino 1:100. Z redčino 1:50 bi porabili preveč protiteles, razlika v fluorescenci, izmerjeni pri obeh redčinah, pa je bila relativno majhna. Tako smo se odločili tudi zaradi ekonomičnosti in dejstva, da pri določanju Neu5Gc na celicah CHO s pretočnim citometrom vedno uporabljamo iste volumne reagentov, isto število celic in identične čase inkubacije.

Pri titraciji sekundarnih protiteles (slika 12) smo dosegli nasičenje. Najmočnejši signal smo dobili pri redčini 1:100, pri redčini 1:50 pa se je jakost fluorescence malo zmanjšala. Tak primer titracije sekundarnih protiteles je lep primer uspešne titracije.

Za ovrednotenje rezultatov je potrebno dobljene histograme, ki prikazujejo fluorescenco celotne populacije, predstaviti z neko numerično vrednostjo fluorescence. Povprečno vrednost populacije lahko predstavimo z Mean, Geo Mean in Mediano (aritmetično sredina, geometrijsko sredina in mediano). Kot najprimernejši parameter za numerično podajanje povprečne fluorescence je bila izbrana mediana (Watson, 1992). Slednje velja tako za histograme pridobljene z zunajceličnim določanjem Neu5Gc, kot za histograme pridobljene z znotrajceličnem določanjem Neu5Gc.

Po določitvi vseh pogojev testa za zunajcelično določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom, smo ovrednotili ponovljivost, linearost in vpliv instrumenta na ponovljivost vpeljane metode. Le to nam omogoča, da pridobimo zaupanje v rezultate, ki jih izmerimo z uporabo te metode. Preverjanja ustreznosti metode so lahko še obsežnejša in se nadaljujejo v validacije metode. Ker je bil namen testirane metode uporaba le v razvojnih fazah projekta bi bilo obsežnejše preverjanje ustreznosti metode oz. validacija metode v tej fazi nesmiselna.

Pri testiranju ponovljivosti in vpliva aparata na ponovljivost (pregl. 6, 7, 8 in 9) smo izračunali ustrezne koeficiente variacije (CV). Za strogo analitske metode, ki navadno niso bioanalitske metode, v splošnem velja, da mora biti koeficient variacije manjši od 10 % (Cubliffe in sod., 2009). Tudi mi smo pri testiranju obeh ponovljivosti izračunali koeficient variacije, ki je bil nižji od 10 %, kar je za metodo, ki se uvršča med bioanalitske metode, odličen rezultat.

Pri testiranju linearnosti smo izračunali koeficient determinacije ( $R^2$ ) 0,859. Za analitske metode v splošnem velja, da naj bi bil  $R^2 \geq 0,980$ . Če graf linearnosti (pregl. 10, slika 18) podrobneje analiziramo, lahko razberemo, da je linearost do mediane 10,65 veliko boljša, kot če zraven vključimo nižje vrednosti mediane. Izračunani koeficient determinacije, vključno z vrednostjo mediane 10,65 je 0,992 (pregl. 10, slika 19). Iz dobljenih rezultatov testa linearnosti lahko zaključimo, da metoda za zunajcelično določanje Neu5Gc, omogoča zadovoljivo detekcijo različnih vsebnosti Neu5Gc na celicah, pri nižjih vrednostih (mediana nižja od 10,65) pa metoda ni dovolj občutljiva, saj glede na teoretično vsebnost Neu5Gc ne omogoči detekcijo ustreznih razlik v vsebnosti Neu5Gc. Meja detekcije je, ko je izmerjena mediana enaka ali večja od 10,65.

### **5.1.2 Razvoj metode za znotrajcelično določanje Neu5Gc**

V nasprotju z zunajceličnim določanjem Neu5Gc, kjer vzorce obarvamo in izmerimo takoj, znotrajcelično določanje omogoča fiksacijo vzorcev v ustreznem fiksativu in bolj ali manj dolgoročno shranjevanje fiksiranih vzorcev, ki se lahko analizirajo tudi do pol leta po fiksaciji. Doba shranjevanja je odvisna od uporabljenega fiksativa. Za uspešen

razvoj metode je potrebno najprej določiti ustrezeno fiksacijsko in permeabilizacijsko sredstvo (Larsen, 2005). S fiksativi in permeabilizatorji uničimo celično membrano, da lahko protitelesa prodrejo v celico. Tako lahko merimo tarče znotraj celice. Za ta namen smo testirali dva fiksativa in en permeabilizacijski reagent. Sklepali smo, da se vsebnost Neu5Gc znotraj celice razlikuje od vsebnosti Neu5Gc zunaj celice, saj ima celica v svoji notranjosti več različnih proteinov, ki so izpostavljeni procesom sialilacije. Pričakovali smo, da naj bi se histogram pridobljen z znotrajceličnim določanjem Neu5Gc razlikoval od histograma, ki ga dobimo z zunajceličnim določanjem Neu5Gc.

Kriteriji za izbor fiksativa so bili:

- histogram, pridobljen z znotrajceličnim določanjem Neu5Gc, naj bi se čim bolj razlikoval od histograma, ki ga dobimo z zunajceličnim določanjem Neu5Gc,
- enostavnost postopka fiksacije,
- cena reagentov za fiksacijo,
- možnost shranjevanja fiksiranih vzorcev.

Možnost shranjevanja vzorcev s fiksacijo, je bila za naš namen postranskega pomena, saj smo se za razvoj teh metod odločili izključno zaradi možnosti takojšnjega pridobivanja podkov o vsebnosti Neu5Gc na rekombinantnem proteinu. Slednji podatek bi bil lahko koristen za druge poskuse, saj ima pri analizah, kjer hitrost pridobivanja rezultatov ni tako pomembna, metoda s fiksacijo načeloma prednost. Vse vzorce lahko izmerimo na isti dan in zmanjšamo potencialne variacije med poskusi. Znotrajcelično barvanje pa ima v primerjavi z zunajceličnim barvanjem celic tudi svoje pomanjkljivosti, saj so nespecifične vezave protiteles, zaradi večje možnosti vezav, navadno višje.

Pri testiranju fiksativov in permeabilizacijskega reagenta, smo izbranim kriterijem najustreznejše rezultate, torej največjo razliko v primerjavi z zunajceličnim določanjem, dobili pri uporabi fiksacije s 70 %, ledeno hladnim etanolom (slika 14). Komercialni kit FIX&PERM in permeabilizator Tris/MgCl<sub>2</sub>/Triton X-100, sta dala zelo podobne histograme, kot zunajcelično določanje Neu5Gc.

Ostale prednosti 70% etanola kot fiksacijskega sredstva v primerjavi s komercialnim kitom FIX&PERM so: enostavnejša in hitrejša fiksacija (imamo samo 1 reagent), nižja cena in dolgoročnejše shranjevanje vzorcev. Prednosti 70% etanola kot fiksacijskega

sredstva v primerjavi s Tris pufom pa so: enostavnejša priprava raztopine in dolgoročno shranjevanje vzorcev.

Kot najbolj optimalni fiksacijski/permobilizacijski reagent je bil izbran 70 % ledeno hladni etanol.

Pri testiranju protiteles za znotrajcelično določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom, smo dobili rezultat, ki se sklada s predhodnimi podatki iz literature (slika 15) (Diaz in sod., 2009). Z uporabo izotipske kontrole smo izločili nespecifično vezavo izotipskih (kontrolnih) protiteles iz česar sklepamo na specifično vezavo primarnih protiteles. S testiranjem kontrole nespecifične vezave sekundarnih protiteles smo izločili možnost nespecifične vezave sekundarnih protiteles. Pri celicah CHO, smo izmerili visoko vsebnost Neu5Gc, kar se tudi popolnoma sklada s predhodnimi objavami (Diaz in sod., 2009).

Po testiranju ustreznosti protiteles, smo podobno kot pri metodi za zunajcelično določanje Neu5Gc, s postopkom titracije žeeli določiti optimalno redčino (koncentracijo) primarnih (slika 16) in sekundarnih protiteles (slika 17). Pri titraciji primarnih protiteles ponovno nismo dosegli nasičenja. Zaradi potencialnih večjih možnosti vezav protiteles smo uporabili višjo redčino protiteles (1:25), kot pri zunajceličnem določanju. Titracija je pokazala, da je optimalna testirana redčina najmanj 1:25 in slednji histogram se je močno razlikoval od histogramov dobljenih pri ostalih redčinah. V testih za znotrajcelično merjenje Neu5Gc vedno uporabljamo iste eksperimentalne pogoje (iste volumne reagentov, isto število celic in identične čase inkubacije). Višjih redčin primarnih protiteles od 1:25 tudi nismo testirali, saj bi že s titracijo porabili preveč protiteles. V rednih analizah Neu5Gc s pretočnim citometrom pa bi analizirali še večje število celičnih vzorcev, kjer bi bila poraba protiteles večjih koncentracijah prevelika.

Podobno kot pri zunajceličnem določanju Neu5Gc smo pri titraciji sekundarnih protiteles dosegli nasičenje (slika 17). Najmočnejši signal smo dobili pri redčini 1:100, pri redčini 1:50 in 1:25 pa se je jakost fluorescence malo zmanjšala.

Po določitvi vseh pogojev testa za znotrajcelično določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom, je sledilo ovrednotenje ponovljivosti, linearnosti ter vpliva instrumenta na ponovljivost omenjene metode.

Pri testiranju ponovljivosti smo dobili koeficiente variacije nižje od 10%, razen pri enem testiranju neodvisnih ponovitev, kjer je vrednost CV malenkost presegla 10 %. Zaključili smo, da je bila ponovljivost metode za določanje Neu5Gc znotraj celice zadovoljiva. Tudi vpliv aparature na ponovljivost je bil minimalen (pregl. 7 in 9).

Pri testiranju linearnosti smo izračunali koeficient determinacije ( $R^2$ ) 0,949. Če graf linearnosti (pregl. 11, slika 20) podrobnejše analiziramo, lahko razberemo, da je linearnost boljša pri vrednostih, ko je mediana večja od 5,99 (slika 21). Iz dobljenih rezultatov testa linearnosti lahko zaključimo, da metoda za znotrajcelično določanje Neu5Gc, omogoča dokaj občutljivo detekcijo različnih vsebnosti Neu5Gc, pri nižjih vrednostih (mediana nižja od 5,99) pa metoda ni najbolj občutljiva (slika 21), saj glede na teoretično vsebnost Neu5Gc ne omogoči detekcijo ustreznih razlik v vsebnosti Neu5Gc. Meja detekcije za znotrajcelično določanje Neu5Gc merjenje je pri medianah višjih od 5,99.

### 5.1.3 Izbor metode pretočne citometrije za določanje Neu5Gc

Po razvoju in preverjanju ustreznosti metod za znotrajcelično in zunajcelično določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom, smo vpeljani metodi primerjali z referenčno metodo RP-HPLC. V ta namen smo na 11 vzorcih enega poskusa izvedli znotrajcelično ter zunajcelično določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom, iz istih vzorcev pa smo izolirali tarčni glikoprotein ter izvedli meritve vsebnosti Neu5Gc na glikoprotinu z metodo RP-HPLC. Rezultate zunajceličnega (EP) oz. znotrajceličnega določanja (IP) smo nato primerjali z rezultati RP-HPLC ter na ta način izbrali metodo, ki bi potencialno lahko nadomestila metodo RP-HPLC. Želeli smo določiti, katera od obeh metod, zunajcelično ali znotrajcelično določanje Neu5Gc, je za nas primernejša.

Kriteriji izbora metode so bili:

- metoda, kjer bi izračunali višji korelacijski koeficient med rezultati določanja Neu5Gc na/v celicah CHO s pretočnim citometrom in rezultati metode RP-HPLC, bi bila za nadomestilo RP-HPLC primernejša,
- enostavnost in hitrost priprave celičnih vzorcev za merjenje na pretočnem citometru, saj smo želeli skrajšati čas pridobitve rezultatov o vsebnosti Neu5Gc na rekombinantnem proteinu,
- poraba protiteles (ekonomičnost).

Iz preglednice 13 je razvidno, da je metoda zunajceličnega določanja Neu5Gc malenkost bolje korelirala z metodo RP-HPLC.

Tudi korelacija med znotrajceličnim določanjem Neu5Gc s pretočnim citometrom in RP-HPLC ni slaba, vendar se je, poleg višjega korelacijskega koeficiente, štirikrat manjše porabe protiteles (izbrana optimalna redčina primarnih protiteles za zunajcelično določanje Neu5Gc je 1:100, medtem ko je izbrana optimalna redčina primarnih protiteles za znotrajcelično določanje Neu5Gc 1:25) in enostavnejše ter hitrejše priprave vzorca, kot uporabnejša izkazala metoda za zunajcelično določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom.

Za nadaljnje poskuse smo izbrali metodo zunajceličnega določanja Neu5Gc s pretočnim citometrom.

Ker obe metodi kažeta potencial za določanje Neu5Gc pri celicah in bi se lahko uporabljali tudi v drugih poskusih, je smiselno omeniti tudi prednosti in pomanjkljivosti obeh metod.

Prednosti testiranega znotrajceličnega določanja Neu5Gc v primerjavi z zunajceličnim določanjem Neu5Gc s pretočnim citometrom so:

+ vzorce lahko dolgoročno hranimo in zbiramo na - 20° C, nato pa jih izmerimo vse naenkrat in se s tem izognemo variacijam med dnevi merjenja, med posmeznimi meritvami

- + v primeru časovne stiske vzorce lahko fiksiramo, shranimo in analiziramo kdaj drugič,
- + višji koeficient determinacije ( $R^2$ ) pri testiranju linearnosti,
- + nižja meja detekcije (metoda je bolj občutljiva za detekcijo nižjih vrednosti Neu5Gc).

Slabosti testiranega znotrajceličnega določanja Neu5Gc v primerjavi z zunajceličnim določanjem Neu5Gc s pretočnim citometrom so:

- določena optimalna redčina primarnih protiteles je zelo visoka, kar pomeni hitro porabo protiteles in posledično višje stroške,
- pri titraciji primarnih protiteles smo bili bolj oddaljeni od nasičenja, kljub uporabi visoke koncentracije protiteles,
- malenkost slabši rezultati ponovljivosti metode,

Za zunajcelično določanje Neu5Gc pa velja ravno nasprotno.

#### **5.1.4 Ocena korelacije med vsebnostjo Neu5Gc na celicah CHO in vsebnostjo Neu5Gc na rekombinantnem proteinu**

Da bi preverili uporabnost izbrane metode določanja Neu5Gc s pretočnim citometrom, smo ocenili korelacijo med vsebnostjo Neu5Gc na celicah CHO in vsebnostjo Neu5Gc na rekombinantnem proteinu. Primerjali smo deleže Neu5Gc na celicah CHO izmerjene s pretočnim citometrom ter deleže Neu5Gc na izoliranem rekombinantnem proteinu izmerjene z RP-HPLC.

Primerjali smo 149 različnih vzorcev, ki smo jih odvzeli v 8 različnih poskusih ter za vsak posamezen poskus izračunali Pearsonove korelačijske koeficiente. Le ti so se med posameznimi poskusi precej razlikovali, kar je verjetno posledica variacij med dnevi, ki pa niso najbolj zaželene ( $0,016 \leq r \leq 0,955$ ). Temu bi se verjetno lahko izognili, če bi uporabili metodo za znotrajcelično določanje Neu5Gc z uporabo fiksacije, vendar za naše potrebe čakanje na zaključek vseh poskusov ni bilo smiselno, saj smo rezultate o

deležu Neu5Gc na rekombinantnem proteinu potrebovali takoj, da smo lahko nadaljevali s poskusi.

Pomen izračunanih vrednosti koreacijskih koeficientov v biostatistiki sta leta 1994 opisala Saunders in Trapp (Saunders in Trapp, 1994). Navajata, kaj izračunane vrednosti koreacijskih koeficientov v biostatistiki pomenijo. Korelacija med 0 do 0,25 (ali – 0,25) nakazuje, da sta dva testirana parametra v zelo šibki oziroma nični povezavi. Korelacija med 0,25 in 0,50 (ali – 0,50) nakazuje na šibko povezavo dveh testiranih parametrov. Korelacija med 0,50 in 0,75 (ali – 0,75) kaže na očitno povezavo dveh testiranih parametrov, medtem ko korelacija nad 0,75 ( ali pod - 0,75) kaže na nedvoumno povezavo dveh parametrov.

Pri izračunanih koreacijskih koeficientih smo pri dveh poskusih dobili nično oz. zelo šibko povezavo med vsebnostjo Neu5Gc na celicah in na izoliranem rekombinantnem proteinu, pri dveh smo dobili šibko povezavo, pri dveh smo dobili očitno povezavo in pri dveh nedvoumno povezavo. Ko smo izračunali skupen koreacijski koeficient rezultatov vseh 149 vzorcev, smo dobili dobro povezavo, saj je bil  $r =$  koreacijski koeficient 0,715 (glej pregl. 14).

Glede na to, da smo primerjali količino Neu5Gc na celici in količino na izoliranem rekombinantnem proteinu, je bil skupen koreacijski koeficient presenetljivo dober. Poudariti je potrebno, da izoliran rekombinantni protein ni edini protein v celici, ki vsebuje Neu5Gc in če bi določali delež Neu5Gc na vseh sialiliranih proteinih, bi bil verjetno koreacijski koeficient višji. Glede na dobljene rezultate, se metoda pretočne citometrije ni izkazala za kvantitativno pri nizkih vrednosti Neu5Gc na izoliranem rekombinantnem proteinu. Vrednosti prikazane na sliki 22 so zelo razpršene in izračunani koeficient determinacije ( $R^2$ ) je nizek. V kolikor bi analizirali vzorce z višjo vrednostjo Neu5Gc na rekombinantnem proteinu, bi verjetno dobili boljšo povezavo med metodo pretočne citometrije in RP-HPLC, saj smo s testom linearnosti dokazali, da je metoda občutljivejša za določanje višjih vsebnosti Neu5Gc.

Metoda za določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom ni kvantitativna, lahko pa jo uvrstimo med semikvantitativne metode. S pomočjo te metode lahko zmanjšamo število vzorcev, iz katerih je potrebno izolirati rekombinantni protein in opraviti podrobnejšo analizo vsebnosti Neu5Gc z metodo RP-HPLC. Kot je razvidno iz slike 22, bi 30 vzorcev lahko izločili iz postopka izolacije in analitike, kar je dobra petina vseh vzorcev. V predhodnih poskusih, kjer še ni bilo ciljanih poskusov za nižanje Neu5Gc (tekom poskusov je že potekalo namerno zniževanje Neu5Gc z različnimi dodatki v gojišče), bi tako lahko izločili še večje število vzorcev.

Pomembna prednost določanja Neu5Gc s pretočnim citometrom je, da ne potrebujemo izolacije rekombinantnega proteina in rezultat analize 20-tih vzorcev pridobimo v samo štirih urah.

Na podlagi meritev omenjenih 149 vzorcev (slika 22), smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- V kolikor pri zunajceličnem določanju Neu5Gc s pretočnim citometrom izmerimo mediano večjo od 80, obstaja velika verjetnost, da bo vsebnost Neu5Gc na rekombinantnem proteinu višja od 1 %. V tem primeru se lahko izognemo podrobnejši in zamudnejši analitiki Neu5Gc z RP-HPLC in na podlagi dobljenih rezultatov sklepamo, da testirani okoljski pogoji gojenja celic niso optimalni. Delež Neu5Gc, ki je na terapevtskem proteinu večji od 1 % za regulatorne organe ni sprejemljiv.
- Če pri zunajceličnem določanju Neu5Gc s pretočnim citometrom izmerimo mediano manjšo od 80, obstaja možnost, da je vsebnost Neu5Gc na rekombinantnem proteinu nižja od 1 %. Za natančnejšo meritev in potrditev rezultatov je potrebno na vzorcih z mediano pod 80, vsebnost Neu5Gc na rekombinantnem proteinu podrobneje analizirati z metodo RP-HPLC.

Glede na dobljene rezultate lahko zaključimo, da je metoda za zunajcelično določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom uporabna za izločanje vzorcev z višjimi vrednostmi Neu5Gc.

### 5.1.5 Spremljanje bioprosesov

Da bi ugotovili, kakšna je povezava med vsebnostjo Neu5Gc na celicah z ostalimi parametri oziroma celičnimi karakteristikami v biopresusu, smo z metodo za zunajcelično določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom količino Neu5Gc na celicah spremljati v dveh biopresesih.

Kot je razvidno iz slik 23 in 24, ter pregl. 15 smo izračunali zelo dober koeficient korelacije med koncentracijo živih celic in zunajcelično vsebnostjo Neu5Gc ( $r = 0,859$ ). Ko so se celice še prilagajale na novo okolje v bioreaktorju, se niso pospešeno delile in tudi sinteza Neu5Gc je bila očitno nizka. Ko se je koncentracija živih celic povečevala, se je večala tudi izmerjena vrednost Neu5Gc na celicah. Poudariti je potrebno, da s pretočnim citometrom vedno analiziramo isto število celic. Izračunan Pearsonov koeficient korelacije dokazuje, da je sinteza Neu5Gc v celici povezana s fazo celične rasti. Glede na rezultate lahko zaključimo, da se večina Neu5Gc sintetizira v eksponentni fazi celične rasti, torej v fazi ko celice aktivno rastejo in se delijo.

Med spremjanjem omenjenih biopresesov smo opazili tudi povezavo med količino Neu5Gc pri celicah in količino rekombinantnega proteina. Skupen korelacijski koeficient je bil soliden ( $r = 0,653$ ), zato lahko sklepamo, da sta sinteza proteina in sialilacija (postranslacijska modifikacija) v pozitivni povezavi. Dejstvo, da sta tako sinteza proteina, kot sinteza Neu5Gc tesno povezana, je za biopresese neugodna, vendar pričakovana informacija, saj po tej teoriji s količino proteina narašča tudi vsebnost Neu5Gc. V kolikor bi bila sinteza rekombinantnega proteina vezana na eno fazo celične rasti in sinteza Neu5Gc na drugo fazo celične rasti, bi lahko slednjo zmanjšali s sinhronizacijo večine celic v fazo, kjer je produkcija rekombinantnega proteina močnejša, sinteza Neu5Gc pa počasnejša. Ker poteka oboje naenkrat, manipulacija celic na omenjen način ni možna.

Glede na to, da je pretočni citometer edina neposredna metoda za določevanje Neu5Gc na celicah, smo z njeno uporabo dobili podrobnejši vpogled, kaj se dogaja s sintezo Neu5Gc pri celicah tekom biopresusa in kako je sinteza Neu5Gc povezana z drugimi

bioprocесними спременljivkami (celično viabilnostjo in količino rekombinantnega proteina).

### 5.1.6 Spremljanje Neu5Gc na različnih podtipih celic CHO

Ker je pretočna citometrija edina metoda, ki omogoča določanje Neu5Gc neposredno pri celicah, lahko le z njo ugotavljamo razlike v vsebnosti Neu5Gc pri izvornih (še ne transficiranih) parentalnih celičnih linijah. Na podlagi ugotovljenih razlik v vsebnosti oziroma tendenci do sinteze Neu5Gc različnih parentalnih celičnih linij, smo skušali določiti parentalno celično linijo, ki bi imela najnižjo tendenco do produkcije Neu5Gc. Na podlagi predpostavke, da obstaja pozitivna povezava med vsebnostjo Neu5Gc pri celicah in vsebnostjo Neu5Gc na rekombinantnem proteinu, bi delež Neu5Gc na rekombinantnem proteinu lahko zmanjšali s primerno izbiro parentalne celične linije za transfekcijo celic z genom visokoglikoziliranega proteina. Za transfekcijo bi izbrali celično linijo, ki ima najnižjo mediano pri določanju Neu5Gc s pretočnim citometrom oz. kjer je izračunana razlika med mediano negativne kontrole in mediano testirane parentalne celične linije najmanjša.

Najnižjo vsebnost Neu5Gc smo izmerili pri celični liniji CHO A pri vseh eksperimentalnih pogojih, celični liniji CHO B in CHO K1 pa sta imeli v primerjavi s celično linijo CHO A pri vseh pogojih precej večjo vsebnost Neu5Gc (slika 25). Celični liniji CHO C in CHO D sta imeli glede na eksperimentalne pogoje precej različne vrednosti Neu5Gc (od relativno nizkih vrednosti do zelo visokih), vendar smo pri dveh eksperimentalnih pogojih med paralelkama izračunali visoke standardne deviacije, tako da gotovi zaključki tu niso možni. Omenjeni celični liniji sta imeli kljub visoki variaciji, višje izmerjene vrednosti Neu5Gc glede na celično linijo CHO A in primerljive oz. malo nižje vrednosti Neu5Gc v primerjavi s celičnima linijama CHO B in CHO K1.

Pri celičnih linijah CHO C in CHO D je izmerjena količina Neu5Gc precej niha glede na nastavljeno mešanje in delež CO<sub>2</sub>, tako da verjetno, pri nekaterih celičnih linijah lahko bolj vplivamo na sintezo Neu5Gc z eksperimentalnimi pogoji, kot pri drugih.

Iz slike 25 je razvidno, da smo pri poskusih z nižjimi deleži CO<sub>2</sub> pri večini primerov izmerili večjo vsebnost Neu5Gc pri celicah. Rezultati se skladajo s patentom (US 5,459,031), kjer so dokazali, da z večanjem deleža CO<sub>2</sub>, lahko regulirajo oziroma zmanjšajo delež Neu5Gc na rekombinantnem proteinu. Pri večjih obratih stresanja in enakem deležu CO<sub>2</sub> (10 %) smo pri vseh celičnih linijah izmerili nižjo ali vsaj primerljivo vsebnost Neu5Gc pri celicah, kar je povezano z boljšim prenosom ogljikovega dioksida v gojišče in posledično pride do slabše sinteze Neu5Gc zaradi večjega zakisanja gojišča.

Glede na dosedanje rezultate zaključujemo, da je za transfekcijo celic z genom hiperglikoziliranih proteinov najprimernejša celična linija CHO A. Na sintezo Neu5Gc lahko v veliki meri vplivamo s pogoji gojenja celičnih linij (hitrost stresanja, delež ogljikovega dioksida). Poleg tega bi lahko bile nekatere celične linije bolj dovzetne na regulacijo sinteze Neu5Gc z različnimi pogoji gojenja.

## 5.2 SKLEPI

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo:

- Pretočna citometrija ni primerna metoda za kvantitativno določanje Neu5Gc na rekombinantnih proteinih, saj primerjava s splošno uveljavljenou analitsko metodo (RP-HPLC) ni dala dovolj visokega koeficiente determinacije. Kljub temu pa lahko trdimo, da je pretočna citometrija primerna za semikvantitativno določanje Neu5Gc, ker pri določeni izmerjeni vrednosti fluorescence lahko sklepamo, da je vsebnost Neu5Gc na rekombinantnem proteinu večja od 1 %. Vzorci, kjer izmerimo nižjo vrednost fluorescence od določene, pa nujno potrebujejo podrobnejšo, natančnejšo in bolj specifično analizo z RP-HPLC.
- Zunajcelično določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom je za naše potrebe primernejše od znotrajceličnega določanja Neu5Gc.
- Vsebnost Neu5Gc, ki jo s pretočnim citometrom izmerimo v celici (znotrajcelično), korelira z vsebnostjo Neu5Gc izmerjeno na celični površini (zunajcelično).
- Vsebnost Neu5Gc na izoliranem rekombinantnem proteinu pozitivno korelira ( $r = 0,715$ ) z vsebnostjo Neu5Gc izmerjeno pri celicah CHO z zunajceličnim določanjem Neu5Gc s pretočnim citometrom.
- Vsebnost Neu5Gc pri celicah CHO je odvisna od faze celične rasti, saj smo pri rastoči koncentraciji živih celic zaznavali naraščanje Neu5Gc na celicah. Nastajanje Neu5Gc je najintenzivnejše v eksponentni fazì celične rasti.
- Vsebnost Neu5Gc korelira s količino rekombinantnega proteina. Sinteza obeh je odvisna od faze celične rasti.
- Različni podtipi parentalnih celic CHO se razlikujejo po vsebnosti Neu5Gc. Merjenje Neu5Gc s pretočnim citometrom bi bila lahko zelo uporabna metoda za začeten izbor podtipa celic CHO pred transfekcijo z genom visoko glikoziliranega proteina.

## 6 POVZETEK (SUMMARY)

### 6.1 POVZETEK

Trajna celična linija CHO, ki izvirajo iz ovarijskega kitajskega hrčka, so sesalske celice, ki se pogosto uporabljajo za proizvodnjo visoko glikoziliranih rekombinantnih terapevtskih proteinov. Pripenjanje sialičnih kislin na glikozilirane celične proteine je zadnja stopnja glikozilacije. Poznanih je vsaj 40 vrst različnih sialičnih kislin, med njimi je napogostejša N-acetyl neuraminska kislina (Neu5Ac). Pri vseh živalskih celicah, razen pri piščančjih in človeških celicah, se Neu5Ac pogosto pretvori v N-acetyl glikolilno kislino (Neu5Gc), ki pa se smatra kot potencialno imunogena struktura. Za pretvorbo Neu5Ac v Neu5Gc je odgovoren encim CMP Neu5Ac-hidroksilaza, ki pri ljudeh zaradi genske okvare ni funkcionalen. Zato se vsak terapevtski protein z deležem Neu5Gc nad 1% smatra kot potencialno imunogen, saj lahko sproži nastanek anti Neu5Gc protiteles (Varki, 2001, 2008). Pri proizvodnji visoko glikoziliranih rekombinantnih proteinov, t.i. bioloških zdravil, ki se večinoma dogaja v nehumanih celicah, je nadzor nad deležem imunogenih struktur, kot je Neu5Gc ključnega pomena. Za detekcijo in kvantifikacijo Neu5Gc na rekombinantnih proteinih se rutinsko uporablja zamudne in zahtevne HPLC metode, pri katerih je nujna predhodna izolacija tarčnih proteinov iz bioprocесnih žetev. Pri optimizaciji bioprocесnih parametrov in produkcijskih gojišč, se tako pogosto srečujemo z zamudnim čakanjem na rezultate analiz. Le ti so osnova za nadaljnje korake uravnavanja gojitevnih pogojev in za eksperimente, namenjene raziskovanju pogojev zniževanja Neu5Gc na tarčnih glikoproteinih. Na trgu obstajajo anti Neu5Gc poliklonska protitelesa, ki z uporabo različnih tehnik omogočajo občutljivo in specifično detekcijo Neu5Gc molekul v/na celicah in v samem gojitevnom mediju (supernatantu) (Diaz in sod., 2009). V nalogi smo Neu5Gc molekule v/na celicah CHO skušali detektirati z metodo pretočne citometrije. Pretočna citometrija je tehnika, ki lahko z uporabo ustreznih protiteles in indirektnim barvanjem omogoča določevanje Neu5Gc sialične kisline na celični površini in v celicah. V prvem delu naloge smo razvili, optimirali in ovrednotili metodi za znotrajcelično in zunajcelično določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom. V kraji primerjavi z že uveljavljeno analitsko metodo RP-HPLC za določanje sialičnih kislin na

rekombinantnih proteinih, smo izbirali med znotrajceličnim in zunajceličnim določanjem Neu5Gc in se odločili za slednjo. Z izbrano metodo pretočne citometrije in klasično RP-HPLC smo v nadaljevanju naredili obsežno primerjavo in izračunali pozitivno korelacijo med vsebnostjo Neu5Gc na celicah CHO in deležem Neu5Gc na rekombinantnem proteinu. Ugotovili smo, da pretočna citometrija ni primerna metoda za kvantitativno določanje Neu5Gc na rekombinantnih proteinih, saj primerjava s splošno uveljavljeno analitsko metodo (RP-HPLC) ni dala dovolj visokega koeficiente determinacije. Kljub temu pa lahko trdimo, da je pretočna citometrija primerna za semikvantitativno določanje Neu5Gc, ker pri določeni izmerjeni vrednosti fluorescence lahko sklepamo, da je vsebnost Neu5Gc na rekombinantnem proteinu večja od 1 %. Vzorci, kjer izmerimo nižjo vrednost fluorescence od določene, pa potrebujejo podrobnejšo, natančnejšo in bolj specifično analizo z RP-HPLC. V nadaljevanju smo s pretočno citometrijo spremljali dva bioprosesa in ugotovili, da obstaja pozitivna povezava med vsebnostjo Neu5Gc in fazo celične rasti ter količino rekombinantnega proteina. Za konec smo z izbrano metodo testirali še potencialne razlike v vsebnosti Neu5Gc pri različnih podtipih celic CHO. Zunajcelično določanje Neu5Gc s pretočnim citometrom se je izkazalo za primočno metodo semikvantitativnega določanja Neu5Gc pri celicah CHO, za uporabno metodo pri spremeljanju sinteze Neu5Gc med biopresosom ter za edino metodo, s katero lahko po tendenci sinteze Neu5Gc ločimo med različnimi parentalnimi celičnimi linijami.

## 6.2 SUMMARY

Mammalian Chinese hamster ovary cells, CHO cells, are widely used for the production of highly glycosylated recombinant therapeutic proteins. The sialic acid attachments on glycosylated cellular proteins are the last stage of glycosylation process. There are at least 40 different types of sialic acids. The most common form of sialic acid is N-acetyl neuraminic acid (Neu5Ac). In all animal cells, except in chicken and human cells, Neu5Ac is often converted to N-glycolyl neuraminic acid (Neu5Gc). Responsible for the conversion of Neu5Ac to Neu5Gc is enzyme CMP - Neu5Ac hydroxylase, which is not functional in humans due to genetic defects. Therefore, any therapeutic protein with the proportion of Neu5Gc above 1 % could cause the formation of anti Neu5Gc antibodies and is considered to be potentially immunogenic for humans (Varki, 2001, 2008). Highly glycosylated recombinant therapeutic proteins, so-called biologics, are widely produced in non-human cells; therefore, it is necessary to control immunogenic structures, such as Neu5Gc. For the detection and quantification of Neu5Gc in the recombinant proteins the well-known and complex HPLC methods are routinely used where protein isolation from the bioprocess harvest is necessary and also time-consuming. Based on the results of glycoanalytics we can plan further experiments for cell environmental conditions optimisation for reducing Neu5Gc on the target glycoproteins. On the market there are polyclonal anti Nez5Gc antibodies. By using a variety of techniques, these antibodies allow sensitive and specific intracellular or extracellular detection of Neu5Gc (Diaz et al., 2009). In this thesis, the flow cytometry method was evaluated for intracellular/extracellular Neu5Gc determination. Flow cytometry is a technique which could be applicable for extracellular/intracellular Neu5Gc sialic acid determination. The corresponding antibodies and indirect staining allows the determination of sialic acid Neu5Gc on the cell surface and within the cells themselves. In the first part of the thesis we have developed, optimized and evaluated a method for intracellular and extracellular Neu5Gc determination by flow cytometry. The short comparison of intracellular and extracellular flow cytometric methods for Neu5Gc determination and well known RP-HPLC method for the determination of sialic acid in the recombinant protein was done. According to this comparison,

extracellular flow cytometric method for Neu5Gc determination was selected. Furthermore, an extensive comparison of extracellular flow cytometric and RP-HPLC methods were performed and positive correlation among Neu5Gc in CHO cells content and the percentage of Neu5Gc in our recombinant protein was calculated. Flow cytometric method for extracellular Neu5Gc sialic acid measurement has proven to be an appropriate method for semi-quantitative Neu5Gc determination in CHO cells. It was concluded that all cell samples where fluorescence is above 80, the percentage of Neu5Gc on the glycoprotein is above 1%. On the other hand, if cell sample fluorescence is less than 80, a more specific analysis with RT-HPLC is needed to obtain more accurate information on Neu5Gc content on the glycoprotein. In the second part of the thesis, the flow cytometric method for Neu5Gc sialic acid determination was used in two bioprocess monitoring. We found that there is a positive correlation between the content of Neu5Gc , and the phase of cell growth and the amount of recombinant protein. At the end of the thesis, flow cytometric method was used for Neu5Gc determination at different CHO cells subtypes. Flow cytometric method for extracellular Neu5Gc sialic acid measurement has proven to be an appropriate method of semi-quantitative Neu5Gc determination in CHO cells, a useful method for monitoring the synthesis of Neu5Gc among different bioprocesses and the only method for Neu5Gc at parental cell lines determination.

## 7 VIRI

Baker K.N., Rendall M.H., Hills A.E., Hoare M., Freedman R.B., James D.C. 2001.

Metabolic control of recombinant protein N-glycan processing in NS0 and CHO cells.

Biotechnology and bioengineering, 73: 188-202

Bause E. 1983. Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides ac conformational probes. Biochemical journal, 209, 2: 331–336

Blumen T. K. 1995. Methods for controlling sialic acid derivates in recombinant glycoproteins. United states patent US 5459031.

Bratosin D., Mazurier J., Debray H., Lecocq M., Boilly B., Alonso C. 1995. Flow cytofluorimetric analysis of young and senescent human erythrocytes probed with lecithins. Evidence that sialic acids control their life span. Glycoconjugate journal, 12, 3: 258–267

Butler M. 2006. Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. Cytotechnology, 50, 1-3: 57-76

Byrne B., Donohoe G.G., O'Kennedy R. 2007. Sialic acids: carbohydrate moieties that influence the biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells. Drug discovery today, 12, 7-8: 319-326

Cell cycle. 1998. Abcam.

<http://www.med.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2012/10/pi.pdf> (maj 2013)

Crocker P.R., Clark E.A., Filbim M., Gordon S., Jones Y., Kehrl J.H. 1998. Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins. Glycobiology, 8, 2: 5-6

Cunliffe J., Derbyshire N., Keeler S., Coldwell R. 2009. An approach to the validation of flow cytometry methods. *Pharmaceutical research*, 26, 12: 2551–2557

Diaz S.L., Padler-Karavani V., Ghaderi D., Hurtado-Ziola N., Yu H., Chen X., Brinkman-Van der Linden E.C.M., Varki A., Varki N.M. 2009. Sensitive and specific detection of the non-human sialic acid *N*-glycolylneuraminic acid in human tissues and biotherapeutic products. *Plos one*, 4, 1: 1-10

EGA Handbook of bisimilar medicines. 2008. Brussels, European generic medicines association: 24 str.

Givan A. L. 2001. Flow cytometry: First principles. 2<sup>nd</sup> ed. New York, John Wiley and Sons: 273 str.

Guideline on bioanalytical method validation. 2009. London, European medicines agency: 22 str.  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf) (februar 2012)

Higashihara T., Takeshima T., Anzai M., Tomioka T., Matsumoto K., Nishida K., Kitamura Y., Okinaga K., Naiki M. 1991. Survey of Hanganutziu and Deicher antibodies in operated patients. *International archives of allergy and applied immunology*, 95, 2-3: 231-235

Hokke C.H., Bergwerff A.A., Dedem G.W.Van, Kamerling J.P., Vliegenthart J.F. 1995. Structural analysis of the sialylated N- and O-linked carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. Sialylation patterns and branch location of dimeric N-acetyllactosamine units. *European journal of biochemistry*, 228: 981-1008

Ihan A. 1999. Klinična uporaba analize limfocitnih populacij s pretočnim citometrom. Ljubljana, Kemomed: 7-18

Irie A., Koyama S., Kozutsumi Y., Kawasaki T., Suzuki A. 1998. The Molecular basis for the Absence of N-Glycoylneuraminic Acid. *The journal of biological chemistry*, 273, 25: 15866–15871

Italian national agency for new technologies. 2014

<http://utbiorad.casaccia.enea.it/facs-flow-cytometry.html> (maj 2014)

Jarvis G.A. 1995. Recognition and control of neisserial infection by antibody and complement. *Trends on microbiology*, 3, 5: 198–201

Jevnikar Z. 2007. Ekspresijski sisitemi. V: Biološka zdravila. Od gena do učinkovine. Štrukelj B., Kos J. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 68-111

Kantor A.B., Roederer M. 1997. FACS Analysis of Leukocytes. V: *Handbook of experimental immunology*. Herzenberg L. A., Weir D. M., Blackwell C. (eds.). Cambridge, UK, Blackwell Science: 1-13

Kilgore B.R., Lucka A.W., Patel R., Andrien J., Dhume S.T. 2008. Comparability and monitoring immunogenic N-linked oligosaccharides from recombinant monoclonal antibodies from two different cell lines using HPLC with fluorescence detection and mass spectrometry. *Methods in molecular biology*, 446: 333-346

Kornfeld R., Kornfeld S. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual review of biochemistry*, 54: 631-664

Kotnik V., Čurin-Šerbec V., Ihan A., Jeras M., Malovrh T., Simčič S., Škobrne M., Wraber B. 2001. Imunologija. Priročnik za vaje. Ljubljana, Medicinski razgledi: 13-17

Larsen J.K. 2005. Measurement of cytoplasmic and nuclear antigens. V: *Flow cytometry*. Third edition. Ormerod M.G. (ed.). Oxford, Oxford University Press: 133-158

Leelavatcharamas V., Emery A. N., Al-Rubeai M. 1996. Monitoring the proliferative capacity of cultured animal cells by cell cycle analysis. V: Flow cytometry applications in cell culture. Al-Rubeai M., Emery A. N. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc: 1-15

Leelavatcharamas V., Emery A. N., Al-Rubeai M. 1999. Use of cell cycle analysis to characterise growth and interferon- $\gamma$  production in perfusion culture of CHO cells. Cytotechnology, 30, 1-3: 59-69

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2000. Brock biology of microorganisms. 9<sup>th</sup> ed. New Jersey, Prentice-Hall, Inc.: 243-381

Maecker H.T., Trotter J. 2006. Flow cytometry controls, instrument setup, and the determination of positivity. Cytometry A, 69, 9: 1037-42

Makuria J.C., Fujii Y., Kato S., Naiki M. 1986. Specificities of human heterophile Hanganutziu and Deicher (HD) antibodies to glycosphingolipids and a glycoprotein. The journal of biochemistry, 100, 2: 469-475

Martensen I., Schauer R., Shaw L. 2001. Cloning and expression of a membrane-bond CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase from the starfish *Asteria rubens*. European journal of biochemistry, 268, 19: 5157-5166

Miyake M., Ito M., Hitomi S., Ikeda S., Taki T, et al. 1988. Generation of two murine monoclonal antibodies that can discriminate N-glycolyl and N-acetyl neuraminic acid residues of GM2 gangliosides. Cancer research, 48, 21: 6154-6160

Muchmore E.A., Milewski M., Varki A., Diaz S. 1989. Biosynthesis of N-Glycolyneuraminic Acid. The primary site of hydroxylation of N-acetylneuraminic acid is the cytosolic sugar nucleotide pool. The journal of biological chemistry, 264, 34: 20213-20223

Mukuiwa C.J., Noguchi A., Suzuki E., Naiki M. 1994. Potential use of specific human and chicken antibodies for detection of Hanganutziu-Deicher antigen(s) in sera of cancer patients. Japanese journal of medical science & biology, 47, 5-6: 253-264

Müller H.E. 1974. Die patogenetische Bedeutung mikrobieller Neuraminidasen. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 99, 39: 1933-1940

Nelson D. L., Cox M. M. 2000. Lehninger principles of biochemistry. 3<sup>rd</sup> ed. New York, Worth Publishers: 1119-1150

Noguchi A., Mukura C.J., Suzuki E., Naiki M. 1994. Immunogenicity of N-Glycolylneuraminic Acid-Containing Carbohydrate Chains of Recombinant Human Erythropoietin Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells. Journal of biochemistry, 117, 1: 59-62

Pavko A. 1996. Masne bilance in načini vodenja bioprosesov. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspored P. (ur.). Ljubljana, Bia: 425-428

Protocol to detect N-Glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) using flow cytometry analysis. Neu5Gc flow cytometry detection kit instructions. 2008. Gc-Free.Vista, California, Gc-Free: 5 str.  
<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/info/men/pdf/FC.pdf> (februar 2009)

Puck T. T., Cieciura S. J., Robinson A. 1958. Genetic of somatic mammalian cells. Journal of experimental medicine, 108, 2: 945-956

Recommended controls for Flow Cytometry/Facs. 1998. Abcam.  
[http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/flow\\_cytometry\\_controls.pdf](http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/flow_cytometry_controls.pdf) (marec 2014)

Reuter G., Schauer R. 1994. Determination of sialic acids. Methods in enzymology, 230: 168-199

Roth J., Kempf A., Reuter G., Schauer R., Gerhring W.J. 1992. Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*. Science, 256, 5057: 673-675

Russ K., Schlenke P., Huchler H., Hofer H., Kuchenbecker M., Fehrenbach R. 2007. Repeated batch fermentation using a viafuge centrifuge. Cell technology for cell products, 3: 523-526

Saunders B.D., Trapp R.G. 1994. Basic & Clinical Biostatistics. USA. Prentice-Hall International Inc.: 41–63

Schauer R. 1982. Chemistry, metabolism and biological functions of sialic acids. Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry, 40: 131-234

Schauer R. 1991. Biosynthesis and function of N- and O- substituted sialic acids. Glycobiology, 1: 449-452

Schauer R. 1992. Sialinsäurerreiche schleme – bioaktive Schmierstoffe. Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium, 40: 1227–1231

Schauer R. 2000. Achievements and challenges of sialic acid research. Glycoconjugate journal, 17, 7-9: 485-499

Schauer R., Kamerling J.P. 1997. Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids. V: Glycoproteins II. Montreuil J., Vliegenthart J.F.G., Schachter H. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 241–400

Schauer R., Kelm S., Reuter G., Roggentin P., Shaw L. 1995. Biochemistry and role of sialic acids. V: Biology of Sialic Acids, Chapter 2. Rosenberg A. (ed.). New York, Plenum Press: 7-67

Shapiro H.M. 2003. Practical flow cytometry. 4<sup>th</sup> ed. New York, John Wiley and Sons:  
681 str.

Shojaosadati S.A., Kolaei S.M.V., Babaeipour V., Farnoud A.M. 2008. Recent  
advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein.  
Iranian journal of biotechnology, 6, 2: 63-84

Slanc P. 2007. Genska informacija in kako do nje. V: Biološka zdravila. Od gena do  
učinkovine. Štrukelj B., Kos J. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 25–  
66

Spellman M.W. 1990. Carbohydrate characterisation of recombinant glycoproteins of  
pharmaceutical interest. Analytical chemistry, 62, 17: 1714-1722

Strnad J. 2011. Optimizacija gojitvenih pogojev pri izboru sesalskih celičnih linij za  
proizvodnjo kompleksnih bioloških zdravil. Doktorska disertacija. Maribor, Univerza  
v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 79 str.

Štrukelj B. 2007. Razvoj, delitev in vloga bioloških zdravil. V: Biološka zdravila. Od  
gena do učinkovine. Štrukelj B., Kos J. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko  
društvo: 3-24

Tai T., Kawashima I., Furukawa K., Lloyd K.O. 1988. Monoclonal antibody R24  
distinguishes between different N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acid derivates of  
ganglioside GD3. Archives of biochemistry and biophysics, 260, 1: 51-55

Traving C., Schauer R. 1998. Structure, function and metabolism of sialic acids. CMLS  
Cellular and molecular life sciences, 54, 12: 1330-1349

Van Den Steen P., Rudd P.M., Dwek R.A., Opdenakker G. 1998. Concepts and principles of O-linked glycosylation. Critical reviews in biochemistry and molecular  
biology, 33, 3: 151-208

Varki A. 2001. Loss of *N*-Glycolylneuraminic acid in Humans: Mechanisms, Consequences and Implications for Hominid Evolution. *American journal of physical anthropology*, 116, 33: 54-69

Varki A. 2009. Multiple changes in sialic acid biology during human evolution. *Glycoconjugate journal*, 26, 3: 231-245

Watson J.V. 1992. Flow cytometry data analysis. 1<sup>st</sup> ed. New York, Cambridge University Press: 288 str.

Weiser R.J., Baumann C.E., Oesch F. 1995. Cell-contact mediated modulation of the sialylation of contactinhibin. *Glycoconjugate journal*, 12, 5: 672 -679

Werner G.W., Kopp K., Schlueter M. 2007. Glycosylation of therapeutic proteins in different production systems. *Acta Paediatrica*, 96, 455: 17–22

Wurm F. M. 1999. Chinese hamster ovary cells, Recombinant protein production. V: Encyclopedia of bioprocess technology. Vol. 1. Fermentation, biocatalysis and bioseparation. Flickinger M. C., Drew S. W. (eds.). New York, John Wiley and Sons: 570-580

## ZAHVALA

Hvala podjetju Lek d.d., enoti Biofarmacevtika, ki mi je omogočila izvedbo magistrskega dela.

Hvala oddelkoma Razvoj izolacij pod vodstvom dr. Monike Svetina in Razvojni analitiki pod vodstvom dr. Tadeja Čepelnika za vse izolacije in analize proteina z RP-HPLC.

Hvala dr. Juretu Strnadu, Matjažu Brincu in dr. Ani Schweiger. Prvemu zahvala za vzorce parentalnih celičnih linij, Matjažu hvala za biopresne vzorce in Ani hvala za pregled magistrskega dela in strokovne kritike na področju pretočne citometrije.

Hvala Nini Gornik za pregled angleških prevodov v magistrskem delu.

Še posebej hvala moji delovni mentorici dr. Tanji Ficko Trček za idejno zasnovo te naloge ter vso strokovno pomoč tekom laboratorijskega dela in za nasvete pri pisanju magistrskega dela.

Hvala vsem mojim najbližnjim, še zlasti mojemu življenjskemu sopotniku Vasji Černac, za vse spodbude in neformalno pomoč pri nastajanju tega dela. Nalogo posvečam najini hčerki Vivi Černac, ker naju vsak dan sproti razveseljuje.

## PRILOGE

### Priloga A:

Numerični rezultati obširne primerjave zunajceličnega določanja Neu5Gc pri celicah CHO s pretočnim citometrom (vsebnost Neu5Gc na celicah) z deležem Neu5Gc na proteinu izmerjenem z RP-HPLC

Št. vzorca	Mediana	RP-HPLC	Št.vzorca	Mediana	RP-HPLC	Št. vzorca	Mediana	RP-HPLC
1	19,81	0,83	51	25,95	1,01	101	15,26	1,12
2	35,87	0,87	51	5,42	0,9	102	15,26	1,06
3	31,34	1,09	53	16,85	0,92	103	32,93	1,11
4	36,52	0,97	54	17,15	1,23	104	24,14	1,06
5	34,91	1,13	55	8,02	1	105	28,64	1,16
6	22,88	0,8	56	13,95	1,12	106	25,95	1,12
7	15,26	0,85	57	14,72	0,94	107	50,48	1,23
8	25,25	1	58	14,86	1,26	108	35,23	1,1
9	11,55	0,96	59	18,43	0,94	109	55,23	0,99
10	22,47	1,03	60	18,77	1,11	110	41,79	0,97
11	16,4	0,99	61	113,42	1,46	111	53,28	1,24
12	29,43	1,07	62	106,5	1,48	112	49,14	1,02
13	25,71	0,8	63	94,75	1,43	113	53,76	1,03
14	18,6	0,99	64	92,22	1,43	114	47,4	0,87
15	49,14	1,04	65	103,66	1,46	115	52,33	1,25
16	41,79	0,85	66	66,71	0,53	116	47,83	1,01
17	46,56	0,78	67	68,54	0,54	117	51,4	1,12
18	11,55	0,79	68	62,64	0,52	118	49,14	1,02
19	47,4	1,15	69	68,54	0,53	119	58,29	1,04
20	22,47	1,02	70	126,35	1,4	120	51,4	0,9
21	69,78	1,09	71	110,4	1,33	121	51,86	0,95
22	35,87	1,02	72	96,47	1,44	122	12,41	1
23	23,93	0,98	73	88,17	1,47	123	16,25	1,19
24	24,36	0,79	74	56,74	1,38	124	27,88	0,98
25	54,98	1,19	75	31,91	1,02	125	16,55	1,03
26	32,78	0,87	76	37,18	1,24	126	25,71	1,09
27	112,4	1,8	77	26,66	1,02	127	32,78	0,86
28	102,74	1,81	78	34,91	1,04	128	13,58	1,03
29	101,82	1,8	79	31,06	1,1	129	60,43	1,21
30	93,9	1,84	80	31,06	0,99	130	62,64	1,17
31	148,55	2,12	81	14,46	0,56	131	54,25	0,97
32	125,21	2,14	82	17	0,71	132	64,36	1,14
33	148,55	2,06	83	11,86	0,58	133	18,43	0,72
34	101,81	2,05	84	18,43	0,53	134	12,41	0,5
35	124,09	1,85	85	18,43	0,72	135	34,91	1,7
36	144,6	1,91	86	12,41	0,5	136	38,54	1,9
37	144,6	2,12	87	24,58	0,82	137	64,36	1,74
38	140,75	2,11	88	66,71	1,16	138	83,54	1,86
39	142,02	2,04	89	30,23	1,21	139	80,58	1,04
40	142,02	2,04	90	20,54	1,28	140	77,74	0,87
41	124,09	1,81	91	49,14	1,28	141	101,82	1,54
42	117,57	1,83	92	38,89	1,21	142	104,6	1,56
43	102,74	1,34	93	22,27	1,13	143	24,36	1,86
44	114,44	1,42	94	19,28	1,01	144	62,64	2,11
45	103,66	1,27	95	18,43	1,21	146	79,86	1,83
46	82,05	1,17	96	42,55	1,19	147	88,96	1,72
47	93,06	1,25	97	28,64	1,12	148	87,38	1,23
48	89,77	1,2	98	35,23	1,2	149	49,58	0,72
49	93,9	1,23	99	32,2	0,96	/	/	/
50	98,22	1,15	100	32,49	1,23	/	/	/

Priloga B:  
Numerični rezultati dobljeni iz Bioprosesa 1

Ure bioprosesa	Koncentracija živih celic	Celična viabilnost (%)	Koncentracija rekombinantnega proteina (mg/l)	Vsebnost Neu5Gc na celicah določena z PC (Mediana)	%Neu5Gc določena na izoliranem rekombinantnem proteinu z RP-HPLC
0	0,17	98,2	/	/	/
18	0,22	98,2	/	/	/
42	0,49	96,5	/	/	/
66	0,89	92	/	/	/
92	1,00	91,8	/	/	/
116	1,43	91,5	/	/	/
138	3,53	95,2	/	/	/
162	7,18	94,6	34,3	34,91	1,7
186	12,34	94,7	25,0	38,54	1,9
210	23,99	91,5	40,9	64,36	1,74
233	33,30	91,6	59,7	83,54	1,86
260	21,71	84,7	59,4	/	/
283	23,48	86,3	57,8	/	/
307	24,14	86,4	59,8	80,58	1,04
331	20,06	84,5	53,4	69,78	
355	19,58	81,8	51,9	69,16	
379	23,18	85,2	55,1	77,74	0,87
403	27,98	81	73,7	81,31	
430	31,47	81,6	69,9	/	/
451	27,59	85,5	56,2	/	/
475	44,59	90,5	46,4	170,01	/
499	26,29	91,4	41,8	94,75	/
522	26,54	91,9	49,1	101,82	1,54
546	28,8	94,4	53,3	130,97	/
570	26,76	94	45,9	104,6	1,56

Priloga C:  
Numerični rezultati dobljeni iz Bioprocesa 2

Ure bioprocesa	Koncentracija živih celic	Celična viabilnost (%)	Koncentracija rekombinantnega proteina (mg/l)	Vsebnost Neu5Gc na celicah določena z PC (Mediana)	%Neu5Gc določena na izoliranem rekombinantnem proteinu z RP-HPLC
0	0,23	97,8	/	/	/
18	0,30	98,6	/	/	/
42	0,60	98	/	/	/
66	0,87	89,9	/	/	/
92	1,22	93	/	/	/
116	1,71	91,8	/	/	/
138	3,37	93,9	/	/	/
162	7,13	94,3	32,4	24,36	1,86
186	12,82	93,8	24,0	62,64	2,11
210	18,22	91,4	43,5	79,86	1,83
233	26,10	92,8	44,4	88,96	1,72
260	28,61	91,4	56,8	/	/
283	28,11	93	51,8	/	/
307	26,53	91,9	56,4	87,38	1,23
331	12,7	87,6	34,3	70,41	/
355	12,04	86,5	34,6	64,36	/
379	14,74	92,8	37,2	49,58	0,72
403	13,57	92,1	31,3	64,36	/
430	24,95	90,5	50,1	/	/
451	30,1	90,6	59,8	/	/
475	28,67	88,8	55,2	142,02	/
499	32,19	93,2	49,2	90,58	/
522	29,43	91,9	45,8	118,64	/
546	29,72	93,4	47,5	103,66	/
570	28,06	94,5	45,0	88,96	/

Priloga D: Numerični rezultati dobljeni pri določanju Neu5Gc pri različnih podtipih celic CHO s PC

Št.	Kontrola (cAb)	Signal vzorca	Odštet signal	Pov (*)	STD	Celični podtip in pogoji gojenja
1	5,52	10,94	5,42	5,28	0,21	CHO A/200 rpm/2.5 % CO <sub>2</sub> /200 mL/0.5 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)/1
2	5,52	10,65	5,13			CHO A/200 rpm/2.5 % CO <sub>2</sub> /200 mL/0.5 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)/2
3	5,52	10,46	4,94	4,58	0,52	CHO A /90 rpm/2.5 % CO <sub>2</sub> /200 mL/0.5 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)/1
4	5,52	9,73	4,21			CHO A /90 rpm/2.5 % CO <sub>2</sub> /200 mL/0.5 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)/2
5	7,91	20,35	12,44	11,91	0,76	CHO B/200 rpm/2.5 % CO <sub>2</sub> /200 mL/0.5 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)/1
6	7,91	19,28	11,37			CHO B/200 rpm/2.5 % CO <sub>2</sub> /200 mL/0.5 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)/2
7	7,91	25,95	18,04	18,40	0,50	CHO B/90 rpm/2.5 % CO <sub>2</sub> /200 mL/0.5 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)/1
8	7,91	26,66	18,75			CHO B/90 rpm/2.5 % CO <sub>2</sub> /200 mL/0.5 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)/2
9	17,15	33,68	16,53	13,63	4,10	CHO C/200 rpm/2.5 % CO <sub>2</sub> /200 mL/0.5 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)/1
10	17,15	27,88	10,73			CHO C/200 rpm/2.5 % CO <sub>2</sub> /200 mL/0.5 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)/2
11	17,15	31,91	14,76	10,35	6,24	CHO C/ 90 rpm/2.5 % CO <sub>2</sub> /100 mL/0.1 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)/1
12	17,15	23,08	5,93			CHO C/90 rpm/2.5 % CO <sub>2</sub> /100 mL/0.1 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)/2
13	6,15	24,58	18,43	20,46	2,87	CHO K1/200 rpm/2.5 % CO <sub>2</sub> /100 mL/0.1 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)/1
14	6,15	28,64	22,49			CHO K1/200 rpm/2.5 % CO <sub>2</sub> /100 mL/0.1 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)/2
15	6,15	21,48	15,33	14,59	1,05	CHO K1/90 rpm/2.5 % CO <sub>2</sub> /200 mL/0.5 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)/1
16	6,15	19,99	13,84			CHO K1/ 90 rpm/2.5 % CO <sub>2</sub> /200 mL/0.5 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)/2
17	8,82	18,11	9,29	10,05	1,07	CHO D/200 rpm/2.5 % CO <sub>2</sub> /200 mL/0.5 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)/1
18	8,82	19,63	10,81			CHO D/200 rpm/2.5 % CO <sub>2</sub> /200 mL/0.5 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)/2
19	8,82	26,90	18,08	18,32	0,34	CHO D/ 90 rpm/2.5 % CO <sub>2</sub> /200 mL/0.5 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)/1
20	8,82	27,38	18,56			CHO D/ 90 rpm/2.5 % CO <sub>2</sub> /200 mL/0.5 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)/2
21	5,52	10,18	4,66	4,66	/	CHO A 150 rpm/10% CO <sub>2</sub> /50 mL/0.2 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)
22	7,91	29,96	22,05	22,05	/	CHO B 150 rpm/10% CO <sub>2</sub> /50 mL/0.2 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)
23	17,15	25,48	8,33	8,33	/	CHO C 150 rpm/10% CO <sub>2</sub> /50 mL/0.2 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)
24	6,15	18,27	12,12	12,12	/	CHO K1 150 rpm/10% CO <sub>2</sub> /50 mL/0.2 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)
25	8,82	15,96	7,14	7,14	/	CHO D 150 rpm/10% CO <sub>2</sub> /50 mL/0.2 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)
26	5,52	8,06	2,54	2,36	0,25	CHO A 180 rpm/10% CO <sub>2</sub> /30 mL/0.2 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)
27	5,52	7,70	2,18			CHO A 180 rpm/10% CO <sub>2</sub> /30 mL/0.2 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)
28	7,91	19,81	11,9	11,55	0,49	CHO B 180 rpm/10% CO <sub>2</sub> /30 mL/0.2 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)
29	7,91	19,11	11,2			CHO B 180 rpm/10% CO <sub>2</sub> /30 mL/0.2 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)
30	17,15	20,54	3,39	2,85	0,76	CHO C 180 rpm/10% CO <sub>2</sub> /30 mL/0.2 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)
31	17,15	19,46	2,31			CHO C 180 rpm/10% CO <sub>2</sub> /30 mL/0.2 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)
32	6,15	17,62	11,47	11,24	0,33	CHO K1 180 rpm/10% CO <sub>2</sub> /30 mL/0.2 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)
33	6,15	17,15	11			CHO K1 180 rpm/10% CO <sub>2</sub> /30 mL/0.2 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)
34	8,82	15,68	6,86	7,22	0,51	CHO D 180 rpm/10% CO <sub>2</sub> /30 mL/0.2 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)
35	8,82	16,4	7,58			CHO D 180 rpm/10% CO <sub>2</sub> /30 mL/0.2 * 10 <sup>6</sup> (celic/mL)

\*Izračunano za posamezen celični podtip pri posameznih nastavitevah

Priloga E:

Statistične formule, ki smo jih uporabili v izračunih z uporabo programa Excell

Aritmetična sredina – povprečna vrednost:

$$\bar{X}_n = (X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n)/n$$

$\bar{X}_n$  : povprečje

X: koncentracija ene meritve

n: število paralelk

Standardna deviacija:

$$SD = \sqrt{n \sum X^2 - (\sum X)^2 / n(n-1)}$$

X: koncentracija ene meritve

SD: standardna deviacija

n: število paralelk

Relativna standardna deviacija:

$$CV(\%) = (SD \times 100\%) / \bar{X}_n$$

$\bar{X}_n$  : povprečje meritev redčitve enega vzorca (enačba 1)

CV: koeficient variacije, relativna standardna deviacija

SD: standardna deviacija

Pearsonov korelacijski koeficient:

$$r = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[n \sum x^2 - (\sum x)^2] \times [n \sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

r: korelacijski koeficient

x: vrednosti na x osi ali vrednost določena z referenčno metodo

y: vrednosti na y osi ali vrednost določena z pretočnim citometrom

n: število meritev ali primerjav

Koeficient determinacije:

$$R^2 = r \times r$$

r: korelacijski koeficient

R<sup>2</sup>: determinacijski koeficient