**Определение ОФС**

**гликанового профиля Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод определения гликанового профиля.

Анализ гликанов включает комплекс методов исследования олигосахаридной составной части (гликан) гликопротеинов.

Определение гликанового профиля является обязательным исследованием для содержащей гликопротеины фармацевтической субстанции, произведенной для реализации с целью введения в государственный реестр лекарственных средств.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Изменение профиля гликозилирования оказывает сильное влияние на иммуногенность и общую биологическую активность лекарственных препаратов, содержащих в качестве субстанции: моноклональные антитела, рекомбинатный эритропоэтин, фолликулостимулирующий гормон, колониестимулирующий фактор, низкомолекулярные гепарины, интерфероны, соматропин и др.

Определение гликанового профиля лекарственных препаратов позволяет определить структуру и содержание различных групп сахаров, а также нормировать содержание отдельных углеводных структур.

1. ОСНОВЫ МЕТОДА

Анализ гликанов состоит в исследовании олигосахаридной составной части (гликан) гликопротеинов и может включать в себя:

- анализ цельного гликопротеина;

- разделение и детектирование гликоформ протеина;

- анализ гликопептидов, полученных после ферментной обработки гликопротеина;

- анализ отщепленных гликанов, полученных после химической или ферментной обработки гликопротеина.

1.1 ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ ПРОТЕИНОВ

Существуют 3 основных типа ферментного гликозилирования протеинов:

- *N*-гликозилирование: присоединение олигосахаридов через атом азота терминальной амидной группы аспарагина;

- *О*-гликозилирование: присоединение олигосахаридов через гидроксильные группы серина, треонина и/или гидроксипролина;

- *С*-гликозилирование: присоединение α-маннопиранозы к С2-углероду индольного цикла триптофана.

Присоединение без участия ферментов, также известное как гликирование, может происходить при выдерживании протеинов с восстанавливающими сахарами.

1.2 НЕОДНОРОДНОСТЬ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ ПРОТЕИНА

В процессе получения гликопротеинов может наблюдаться неоднородность гликанов на различных уровнях.

Неоднородность может появиться в результате изменчивости:

- по степени занятости (полная, частичная, незанятая);

- по типу (*N*- или *О*-опосредованное);

- по структуре олигосахарида (протяженность, разветвленность, тип соединения). Неоднородность гликозилирования приводит к наличию набора гликоформ у каждого отдельного гликопротеина. Эти разновидности возникают из-за того, что процесс гликозилирования, в отличие от транскрипционных или трансляционных процессов биосинтеза, не имеет матричного управления и представляет собой процесс пост-трансляционного изменения молекулы.

Структура гликозилирования в выбранной части зависит от многих факторов, включая присутствие ферментов гликозилтрансфераз и эксогликозидаз (зависящее от специализации клетки и/или от степени развития), обнаруживаемых в аппарате Гольджи и в эндоплазматической ретикулярной сети клетки.

Процесс гликозилирования протеина зависит также от структуры протеина, процесса получения, экспрессии системы «хозяин-векторная ДНК» и от режима культивирования клеток.

2 МЕТОДЫ АНАЛИЗА ГЛИКАНОВ

Неоднородность гликозилирования может быть установлена применением 4 следующих методов (как в отдельности, так и в качестве дополнения одного другими):

- анализ цельного гликопротеина;

- анализ гликопептидов;

- анализ отщепленных гликанов;

- анализ моносахаридов.



Рис. 1 Методы анализа гликанов

Определение гликанового профиля обычно представляет собой многоступенчатый процесс. Известно множество методологических подходов к анализу гликанов. Большое количество подходов является следствием разнообразия и большой сложности структуры гликанов, подходящих технологий и систем детектирования, кроме того, область выбора зависит от того, какой объем информации должен быть получен в ходе исследования.

На рисунке 1 представлены методы для определения гликанового профиля, которые могут применяться в отношении выбранного подхода или подходов. Большое количество модификаций одних и тех же методов и условий определяется специфичностью структур гликанов и источников их происхождения.

*Выделение и очистка****.*** Методики выделения и очистки могут применяться для анализа фармацевтических субстанций или готовых лекарственных форм, в состав которых входят вспомогательные вещества, мешающие определению, в случае необходимости применения выделения и очистки методики должны быть приведены в частной статье.

2.1 АНАЛИЗ ЦЕЛЬНЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ

Анализ цельных гликопротеинов является источником информации об общей структуре гликозилирования гликопротеина.

Данный метод обеспечивает получение ограниченной информации в том случае, если молекула большая и имеет многочисленные разнообразные участки гликозилирования. Для анализа могут также быть использованы и другие методы, например, капиллярный электрофорез и масс-спектрометрия. Методики, в основу которых положены свойства, связанные с размером молекулы, такие как эксклюзионная хроматография и электрофорез в полиакридном геле в присутствии натрия додецилсульфата, позволяют получать информацию о состоянии гликозилирования протеина.

Если гликановый профиль оказывает значительное влияние на биологическую активность гликопротеина, для контроля могут быть использованы ионообменная хроматография, изоэлектрическое фокусирование или капиллярный электрофорез.

Методику выбирают для обеспечения достоверной корреляции между измеренным гликановым профилем и биологической активностью вещества.

2.2 АНАЛИЗ ГЛИКОПЕПТИДОВ

Анализ гликопептидов обеспечивает получение информации о свойствах гликозилирования, характерных для данного участка молекулы, степени занятости и структуре олигосахаридов и включает в себя протеолитическое расщепление гликопротеина.

Подходы к расщеплению «опорной» молекулы протеина, характерному для данного участка молекулы, представлены в ОФС*«*Пептидное картирование».

После протеолитического расщепления гликопротеинов могут быть применимы следующие подходы:

*2.2.1 Прямой анализ методом масс-спектрометрии*. При проведении испытания необходимо принять во внимание, что регистрации сигнала гликопептида не мешает присутствие других пептидов, даже когда гликопептиды представляют небольшую долю в общей смеси пептидов и интенсивность их сигналов гораздо меньше, чем сигналов негликозилированных пептидов.

*2.2.2 Разделение, предшествующее анализу методом масс-спектрометрии.* Этот метод позволяет устранить недостатки предыдущего метода.

Методики обогащения и фракционирования могут сочетаться с прямым анализом как параллельно, так и последовательно. Могут быть применены следующие методики разделения: жидкостная хроматография и капиллярный электрофорез. Эти методики могут быть сопряжены с масс-спектрометрией, что позволяет применять непрерывную масс-спектрометрию в ходе исследования.

*2.2.3 Дегликозилирование гликопептидов****.*** Сравнение пептидных карт, полученных после протеолитического расщепления цельного гликопротеина и гликопротеина, дегликозилированного до или после протеолитического расщепления, дает возможность идентифицировать различные молекулы.

Масса пептида позволяет получить информацию об участках гликозилирования, а расчет разницы масс цельного и дегликозилированного гликопептида дает возможность получения информации о строении и неоднородности присоединенных гликанов. Стадия разделения может предшествовать или следовать за стадией дегликозилирования.

2.3АНАЛИЗ ОТЩЕПЛЕННЫХ ГЛИКАНОВ

Проведение анализа отщепленных гликанов позволяет получать информацию о многообразных семействах гликанов, сцепленных с протеином (профилирование по характеру ветвления: двойное, тройное и более высокого порядка). На этой стадии также может быть получена информация о степени сиалирования. В зависимости от выбранного метода для детектирования гликанов могут понадобиться предварительные дериватизация и/или маркирование молекулы. Анализ отщепленных гликанов обычно включает отщепление и выделение гликанов из реакционной смеси с последующим маркированием и/или дериватизацией гликанов (где это необходимо), после чего гликаны профилируются в соответствии со специфическими свойствами (фракционирование или разделение).

*2.3.1 Отщепление гликанов.* Выбор метода отщепления гликанов зависит от природы гликопротеина. Выбор реактива, применяемого для отщепления, зависит от выбора типа отщепления и от объема той информации, которая должна быть получена в результате исследования: может применяться ферментное или химическое отщепление.

В таблице 1 представлен примерный перечень реагентов для ферментного отщепления и их субстратная специфичность.

Эффективность отщепления главным образом зависит от досягаемости гликанов на молекуле протеина, поэтому протеин может быть денатурирован, чтобы увеличивать досягаемость участка гликозилирования. В других случаях, когда необходимо профилировать гликаны по их положению в структуре молекулы (на поверхности или погружены в структуру молекулы протеина), денатурирование протеина нежелательно. Для отщепления гликанов могут применяться и химические реагенты, например, для отщепления по типу β-элиминирования используют гидразин или борогидриды щелочных металлов.

*2.3.2 Анализ гликанов.* Анализ отщепленных гликанов или их профилирование могут быть осуществлены с помощью методов хроматографии, электрофореза, масс-спектрометрии или комбинирования этих методов.

Выбранные методы могут быть сгруппированы в соответствии с природой гликанов и объемом той информации, которая должна быть получена в результате исследования. Анализ гликанов обеспечивает информацию о различных семействах гликанов (с высоким содержанием маннозы, гибридных, комплексных), связанных с протеином. Информация об относительном содержании разветвленных структур может быть получена в результате анализа десиалирования гликанов.

Если необходимо разделение в качестве обязательной стадии, то в качестве промежуточных методик используют методы жидкостной хроматографии и капиллярного электрофореза. Жидкостная хроматография может применяться как подготовительная методика для накопления отдельных фракций (как правило, требуется и маркирование) или может непосредственно сочетаться с масс-спектрометрией.

Таблица 1 *–* Перечень реагентов для ферментного отщепления

|  |  |
| --- | --- |
| Реагент | Специфичность |
| Отщепление N-сцепленных гликанов |
| Пептид-N4-(*N*-ацетил-β-глюкозаминил)-аспарагин-амидаза  | Гидролизует участки *N*4-(ацетил-β-D-глюкозаминил) аспарагина, в которых остаток глюкозамина в дальнейшем может быть гликозилирован, до получения в результате *N*-ацетил-β-D-глюкозаминиламина (замещенного) и пептида, содержащего остаток аспарагиновой кислоты |
| -Пептид*- N*-гликозидаза F(PNGase F) | Отщепляет цепь у *N*-сцепленного гликана, но не отщепляет цепь *N*-сцепленного гликана, в которой присутствует ядро фукозы, сцепленное по положению(α1-3) |
| -Пептид- N-гликозидаза А(PNGase А) | Отщепляет цепь у *N-*сцепленного гликана, , в которой присутствует ядро фукозы, сцепленное по положению(α1-3) |
| Маннозилгликопротеин-эндо-β-*N*-ацетилглюкозаминидаза  | Эндогидролизует блок N, N"-диацетилхитобиозил в гликопептидах и/или гликопротеинах с высоким содержанием глюкозы, содержащих [Man(GlcNAc)2]Asn |
| -Эндо-β-*N*- ацетилглюкозаминидаза F (endo F) | Отщепляет гибридные и комплексные олигасахариды с высоким содержанием маннозы |
| -Эндо-β-*N*- ацетилглюкозаминидаза Н (endo Н) | Отщепляет гибридные олигосахариды с высоким содержанием маннозы |
| Отщепление О-сцепленных гликанов |
| Гликопептид –α-*N*-ацетилгалактозаминидаза  | Гидролизует терминальные участки D-галактозил-*N*-ацетил-α- D-галактозамина |

\*Этот фермент имеет ограниченное применение, так как обладает высокой субстратной специфичностью

*2.3.2.1 Анализ немаркированных гликанов.* Анализ немаркированных гликанов **(**в естественном состоянии) осуществляется методами высокоэффективной ионообменной хроматографии на сильнощелочной анионообменной смоле с импульсным амперометричеким детектированием, высокоэффективной хроматографии на пористом графитизированном углероде и масс-спектрометрии.

Метод высокоэффективной ионообменной хроматографии на сильнощелочной анионообменной смоле с амперометрическим детектированием имеет высокую чувствительность, а также позволяет разделять изомеры, отличающиеся по месту связывания. Факторы отклика различных сигналов у олигосахаридов различной структуры неодинаковы. Абсолютное количественное определение гликана затруднительно, если только исследователь не имеет в своем распоряжении «библиотеку» стандартов олигосахаридов. Количественное определение возможно в сравнении с хорошо исследованным стандартным образцом испытуемого вещества или через отношение площади пиков всех гликанов.

Высокоэффективная хроматография на пористом графитизированном углероде также может использоваться для разделения гликанов в естественном состоянии, поскольку колонки с пористым графитизированным углеродом по своей высокой селективности сравнимы с обычно используемыми обращенно-фазными колонками.

Сочетанное применение методов хроматографии на пористом графитизированном углероде и масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением может использоваться для прямого анализа гликана.

*2.3.2.2 Маркирование гликанов.* Тип производимого химического изменения (дериватизация) зависит от способа, который планируется применять для детектирования гликанов с использованием ультрафиолетового или флуоресцентного излучения.

Дериватизация с целью флуоресцентного маркирования является более распространенной методикой маркирования гликанов, она происходит по восстанавливающему концу молекулы путем восстановительного аминирования. Одна метка может быть присоединена к каждому одинарному моно- и олигосахариду, что позволяет осуществлять количественное определение в молях.

В Таблице 2 представлен примерный перечень обычно применяемых флуоресцентных меток и подходящих аналитических методик.

Таблица 2 *–* Примеры флуоресцентных меток и подходящих методик

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Название | Аббревиатура | Аналитическая методика |
| 2-Аминобензойная кислота | 2-АА | Жидкостная хроматография, масс-спектрометрия  |
| 2-Аминобензамид | 2-АВ | Жидкостная хроматография, масс-спектрометрия  |
| 2-Аминопиридин | 2-АР | Жидкостная хроматография,масс-спектрометрия  |
| 2-Амино-9(10Н) -акридинон | АМАС | Гель-электрофорез  |
| Натриевая соль 8-аминопирен-1,3,6-трис-ульфоновой кислоты | АРТS | Капиллярный электрофорез  |

Предельное метилирование гликанов может быть использовано в том случае, если метод масс-спектрометрии применяется как единственный метод детектирования. Этот способ дериватизации основан на метилировании олигосахаридов.

*2.3.2.3 Анализ маркированных гликанов.* Маркированные гликаны могут быть проанализированы с помощью следующих методик: жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез и масс-спектрометрия.

В соответствии со свойствами, позволяющими провести разделение гликанов, может быть осуществлено профилирование и количественное определение гликанов, снабженных соответствующей меткой, с применением различных видов жидкостной хроматографии: обращенно-фазной (разделение по степени гидрофобности), нормально-фазной (разделение по размеру) и анионообменной (разделение по заряду).

2.4 АНАЛИЗ МОНОСАХАРИДОВ

Анализ моносахаридов позволяет получить информацию о моносахаридном составе гликопротеина. Анализ может быть осуществлен как с использованием колометрических методов, так и методов разделения.

*2.4.1 Колориметрические методы.* Колориметрические методы, основанные на придании окраски с помощью химических реагентов, обеспечивают получение информации о количественном содержании характерных классов сахаров, таких как сиаловые кислоты, нейтральные сахара и гексозамины.

*2.4.2 Методы разделения.* Методы разделения позволяют получать количественные данные об общем составе моносахаридов. Методы требуют кислотного гидролиза в качестве предварительной обработки олигосахаридных цепочек цельных гликопротеинов или отщепленных гликанов, прежде чем приступить к анализу. Для отщепления сиаловых кислот применяют мягкий кислотный гидролиз или ферментную обработку. Стадия гидролиза является существенным источником нестабильности, поэтому может потребоваться валидация процесса в отношении характерности образующихся продуктов. Методы, применяемые для разделения и количественного определения моносахаридов, включают:

- применение высокоэффективной ионообменной хроматографии на сильнощелочной анионообменной смоле с импульсным амперометрическим детектированием высокоэффективной хроматографии на пористом графитизированном углероде с масс-спектрометрическим детектированием, что позволяет определять мольные количества моносахаридов в естественном состоянии (сиаловые кислоты, нейтральные сахара и спирто-сахара);

- маркирование моносахаридов флюорофорами. С последующим применением методов разделения, таких как обращенно-фазная или ионообменная хроматография, или капиллярный электрофорез.

3 ОЦЕНКА И АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ

Оценка и анализ данных, полученных с помощью аналитических методов в ходе определения гликанового профиля, могут применяться для достижения следующих трех различных целей:

– подтверждение подлинности отдельных структур или семейств структур;

– подтверждение соответствия испытуемого вещества предъявляемым качественным требованиям;

– подтверждение соответствия испытуемого вещества предъявляемым количественным требованиям.

*3.1 Подтверждение подлинности отдельных структур или семейств структур.* Объектом анализа при исследовании гликана может быть отдельный моносахарид (например, сиаловая кислота, фукоза), олигосахарид установленной структуры (например, тетра-сиалированный гликан, гликан с четверным ветвлением) или семейство структур, обладающих общими аналитическими атрибутами (например, тетра-сиалированные гликаны, гликаны с тройным ветвлением, изоформы гликопротеина с одинаковым зарядом). Подтверждение подлинности как аналитическая задача является важнейшей стадией анализа и оценки данных и может быть совершено в абсолютной форме путем подтверждения молекулярной структуры или в сравнительной форме путем сравнения с соответствующим стандартным образцом.

*3.1.1 Абсолютное подтверждение подлинности.* Абсолютное подтверждение подлинности структур гликанов, как правило, выполняется в ходе процесса получения и не требует обязательного решения этой задачи в ходе повседневного анализа. Аналитическая задача как подтверждение подлинности может быть решена в отношении известных отличительных свойств молекулы. Такое абсолютное потверждение подлинности отдельных структур может потребовать многоступенчатые подходы с использованием ферментных и химических реакций, методов разделения с текущим или автономным детектированием и чаще всего будет использоваться как отношение заряд/масса для молекулярного иона, определяемое с применением подходящих масс-спектрометрических методов, в качестве окончательного основания для интерпретации структуры.

*3.1.2. Сравнительное подтверждение подлинности.* При рутинном применении аналитического метода, для подтверждения подлинности, путём сравнения со стандартными образцами Стандартные образцы могут быть получены из хорошо изученных гликопротеинов, которые относятся к тому же общему классу, что и испытуемое вещество (например, фетуин для комплексных *N*-сцепленных гликопротеинов), или получены из хорошо изученной промышленной серии того продукта, который подвергается исследованию и который был признан стандартным образцом. Для интерпретации данных при сравнительном подтверждении подлинности структуры применяют следующие подходы:

*–* в том случае если методика анализа валидирована для демонстрации высокой степени воспроизводимости времени удерживания, для надлежащей интерпретации может применяться абсолютное значение времени удерживания;

­ альтернативно, гликановый маркер можно ввести в прибор в начале и в конце последовательности исследовательских введений, после чего проверяют время удерживания на наличие любых тенденций сдвига; основываясь на этих стандартных хроматограммах, могут быть интерпретированы гликаны испытуемых образцов;

*–* в том случае если не существует стандартного образца, чтобы интерпретировать пики всех гликанов испытуемого образца, можно использовать абсолютное или относительное время удерживания для контроля и маркирования пиков неидентифицированных гликанов.

3.2 ПОДТВЕРЖДЕНИЕ СООТВЕТСТВИЯ ИСПЫТУЕМОГО ВЕЩЕСТВА ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫМ КАЧЕСТВЕННЫМ ТРЕБОВАНИЯМ

Аналитические данные, полученные об испытуемом образце, оценивают для того, чтобы показать его соответствие требованиям спецификации качества. Обычно оценка проводится путем сравнения полученных данных с данными параллельного исследования стандартного образца.

В ходе оценки полученных данных необходимо:

*–* установить, что аналитические данные, полученные с использованием стандартного образца, в целом сопоставимы с ожидаемыми результатами; подтвердить пригодность аналитической системы, например, для метода картирования пригодность системы может быть подтверждена путём сравнения гликанового профиля, полученного с использованием стандартного образца, с известным, аттестованным соответствующим образом гликановым профилем стандартного образца, а также подтвердить соответствие всем установленным критериям пригодности аналитической системы;

*–* подтвердить сходство гликановых профилей, полученных с использованием стандартного и испытуемого вещества, применяя любые специфические критерии соответствия, приведенные в частной статье.

3.3 ПОДТВЕРЖДЕНИЕ СООТВЕТСТВИЯ ИСПЫТУЕМОГО ВЕЩЕСТВА ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫМ КОЛИЧЕСТВЕННЫМ ТРЕБОВАНИЯМ

*3.3.1 Количественное определение содержания анализируемого вещества и выражение результатов.* В некоторых случаях, например, при определении сиаловой кислоты или других моносахаридов, полученные данные представлены информацией о молярном соотношении сиаловой кислоты и гликопротеина. Данные рассчитывают с применением стандартного образца сиаловой кислоты и валидированного метода определения протеина. При этом могут использоваться как внутренний, так и внешний стандарты (ОФС «Хроматография»*)*.

*3.3.2 Способы количественного выражения профиля разделения.* Профили или схемы распределения могут быть выражены в численной форме многими способами, включая нормализацию, оценку процентного содержания каждого объекта анализа, например, гликановой части молекулы, которое рассчитывают через отношение отклика гликановой части к суммарному отклику всех частей молекулы (в процентах), не учитывая отклики растворителей или любых других прибавленных в ходе анализа реактивов, а также отклики, удовлетворяющие критерию неучитываемых откликов. Кроме этого, могут использоваться численные выражения, которые являются метод- и продукт-специфичными и указываются в частных статьях.

4 СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ

Стандартные образцы для анализа гликанов предназначены для: подтверждения пригодности аналитической системы и подтверждения того, что испытуемое вещество соответствует установленным требованиям.

Стандартные образцы, используемые для подтверждения пригодности аналитической системы, могут представлять собой:

- то же вещество, что и испытуемый образец, аттестованное соответствующим образом;

- гликаны, отщепленные от того же вещества, что и испытуемый образец, аттестованного соответствующим образом;

- гликаны, аттестованные соответствующим образом, предварительно отщепленные от гликопротеинов (например: от фетуина, иммуноглобулина G);

- производные гликанов («меченые» гликаны), для которых подтверждена подлинность и чистота (количественное содержание).

Стандартный образец, применяемый для подтверждения соответствия испытуемого гликопротеина представляет собой то же вещество, что и испытуемый образец, аттестованное соответствующим образом.

5 ЭТАПЫ РАЗРАБОТКИ МЕТОДИКИ И ЕЕ ВАЛИДАЦИИ

Объем работ при разработке методики и ее валидации определяется на основании их применимости к отдельному продукту. В зависимости от выбранного подхода в процессе анализа гликопротеина необходимо пройти отдельные стадии, например, такие как:

*-* выделение и очистка (или обессоливание гликопротеина);

*-* ферментная (или химическая) обработка гликопротеина с целью избирательного отщепления от «опорного» протеина *N*- или только *О*- связанных гликанов;

*-* выделение и очистка отщепленных остатков сиаловой кислоты и моносахаридов;

*-* хромофорное маркирование отщепленных гликанов;

*-* разделение гликанов, в естественном состоянии или после флуоресцентного маркирования;

*-* подтверждение подлинности и количественное определение гликана;

- определение степени гликозилирования, основанное на относительных количествах гликозилированных и негликозилированных пептидов.

*5.1 Выделение и очистка протеина.* Выделение гликопротеина из сопутствующих веществ и очистка необходимы для того, чтобы исключить влияние веществ, мешающих проведению анализа (например, вспомогательные вещества, соли), и, если эти стадии необходимы, они должны быть приведены в частной статье. Методы очистки должны быть валидированы на предмет воспроизводимости и чтобы гарантировать количественное выделение протеина.

*5.2 Отщепление и выделение олигосахаридов.* Подход, выбираемый для отщепления гликанов, зависит от анализируемого протеина и основывается на типе гликозилирования, например: *N*- или *О*-опосредованное гликозилирование. Применение не указанных в фармакопеях методов отщепления гликанов возможно только после оптимизации этих методов с целью подтверждения количественного профилирования всех гликановых частей молекулы. Оптимизированы должны быть все факторы, которые обладают существенным влиянием на эффективность расщепления, например: относительная концентрация фермент/протеин, температура, течение реакции во времени, денатурирование белка до начала отщепления.

Необходимо отметить, что ферментная или химическая реакция не должна нарушать строение гликана, например, не должна разрушать остатки сиаловой кислоты. В том случае если участков гликозилирования больше одного, при ферментной обработке должны пропорционально отсоединяться все олигосахаридные части молекулы, соединенные с протеином, вне зависимости от их структуры и положения на молекуле протеина. В этом случае должна быть подтверждена воспроизводимость отсоединения в реакционной смеси всех гликановых частей молекулы.

*5.3 Дериватизация отщепленных гликанов***.** Дериватизация обычно осуществляется по методикам, не описанным в фармакопеях. Вследствие этого должна быть подтверждена воспроизводимость дериватизации для всех гликанов молекулы, на которую влияют условия реакции, такие как, например, количество дериватизирующего реактива, температура и время реакции. Реакция дериватизации не должна нарушать строение гликана, например, не должна разрушать остатки сиаловой кислоты.

*5.4 Разделение, подтверждение подлинности и пригодность системы.* Методы, применяемые для анализа гликанов должны быть способны детектировать и разделять различные группы гликанов, обеспечивая надёжную идентификацию и количественный анализ гликанов.

Выбор критериев пригодности аналитической системы, которые помимо непосредственного анализа также должны оценивать степень отщепления гликанов, зависит от критических параметров испытаний, оказывающих влияние на получаемый результат.

Сравнение гликанового профиля испытуемого вещества с гликановым профилем стандартного вещества, полученного в аналогичных условиях, позволяет оценить эффективность выбранной аналитической методики. Чтобы в дальнейшем подтвердить полученные результаты, исследования могут быть повторены другим ортогональным методом.

Применение стандартных образцов (например, стандартного образца исследуемого вещества, гликановых маркеров) для оценки пригодности системы критично и необходимо при установлении параметров пригодности аналитической системы и при валидации аналитической методики.

Должна быть подтверждена воспроизводимость количественного выражения профилей гликанов.

*5.5 Определение степени гликозилирования, основанное на относительных количествах гликозилированных и негликозилированных пептидов.* В том случае, если степень гликозилирования оценивается путем сравнения содержания гликозилированных и негликозилированных пептидов после ферментного расщепления, должна быть доказана воспроизводимость отщепления для обеих форм пептида.

6 АЛГОРИТМ ПРИНЯТИЯ РЕШЕНИЯ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ГЛИКАНА

Представленный алгоритм принятия решения приведён для информационной цели и не является обязательным для выполнения.

Выбор методик, используемых для анализа гликанов, производится в соответствии с тем объемом данных, который необходим для гарантирования качества гликопротеина и происходит на стадии разработки продукта.

Рисунок 2 является руководством в выборе методов, которые могут **применяться при необходимости проведения анализа гликана.**

Подбор методов для анализа гликанов

Белок с небольшой массой, незначительное гликозилирование и/или простая структура

Анализ цельного гликопротеина (т.е. методом масс-спектрометрии

Да

Большая молекула, наличие разветвленных структур и/или многочисленные гликозилированные связи

Стоп

Да

Нужны данные о расположении гликозированных связей

Анализ расположения гликозилированныхсвязей

Нет

Нет

Да

Определение отрицательно заряженных комплексов Определение сиаловой кислоты и/или моносахаридов

О

О

Стоп

Выбор методов для анализа отщепленных гликанов (т.е. профиль, идентификацияиндивидуальной структуры)

Необходим детальный анализ гликанов

Стоп

Отщепление протеазами и разделение гликопептидов

Рисунок 2. Методы определения гликанового профиля