

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Innovátor és bioszimiláris bioterapeutikumok
glikomikai analízise**

Borza Beáta

Témavezető: Dr. Guttman András



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2023

INNOVÁTOR ÉS BIOSZIMILÁRIS BIOTERAPEUTIKUMOK GLIKOMIKAI ANALÍZISE

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az **elméleti orvostudományok** tudományágban

Írta: **Borza Beáta** okleveles vegyészmérnök

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Guttman András

Az értekezés bírálói:

Dr. Mizsey Péter, MTA doktora
Dr. Kerékgyártó János, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Csernoch László, MTA doktora
tagok: Dr. Mizsey Péter, MTA doktora
Dr. Kerékgyártó János, PhD
Dr. Ollár Tamás, PhD
Dr. Kalló Gergő, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”
épületének tanterme 2024. május 17., 13:00.

1. Bevezetés

A biológiai gyógyszerek, vagy más néven bioterápiás készítmények napjainkban egyre nagyobb teret hódítanak a gyógyszerpiacon. Ezek a készítmények a rekombináns fehérjék széles skáláját ölelik fel, mint a különböző hormonok, vérkészítmények, növekedési faktorok, antitest alapú termékek, fúziós proteinek vagy rekombináns oltóanyagok. Ezt jól szemlélteti, hogy az elmúlt 10 évben a biológiai gyógyszerek piaca megkétszereződött.

Az első rekombináns fehérjealapú gyógyszer az Eli Lilly nevű vállalat inzulinja volt, amit a Genentech fejlesztett ki, és a '80-as években vezetett be a piacra. Ezt pár év elteltével különböző betegségekre kifejlesztett bioterápiás készítmények tucatjai követték. Azonban számos olyan rekombináns fehérjealapú gyógyszer van jelenleg a piacon, melyek szabadalmi napjainkban lejárnak, megnyitva ezzel a lehetőséget a konkurens cégek számára, hogy azok is kifejlesszék a saját változataikat, amelyeket biohasznosnak, vagy más néven bioszimilárisnak hívunk. Az általánosan elfogadott nevezéktan szerint bioszimilárisnak nevezzük azokat az utólag kifejlesztett bioterápiás készítményeket, amelyek nagymértékben hasonlóak az innovátor termékhez, de nem teljesen azonosak vele. Ezek a különbségek abból adódnak, hogy gyártásuk során az eredetitől különböző sejtvonalatokat, illetve eltérő gyártási és tisztítási technológiákat használnak. Fejlesztésük során a következő megfontolásokat kell szem előtt tartani: (1) hasonlóság hitelesítése; (2) az eredeti – innovátor – termékkel való felcserélhetőség; (3) egyedi nevezéktan a megkülönböztethetőség jegyében; (4) hatósági szabályozások; (5) hatósági irányelvek, amelyek segítik a gyártót a termékfejlesztésben; (6) szellemi tulajdonjogok; végül, de nem utolsó sorban pedig (7) a biztonság.

A következő oldalakon szeretném összefoglalni a biológiai hasonlóság sajátosságait a hatósági irányelvek tekintetében. Ezt követően az egyik kiemelten fontos minőségi jellemzőt, az N-glikozilációt fogom tárgyalni, különös tekintettel annak szabályozására és vizsgálatára vonatkozóan.

2. Célkitűzések

Mivel a kritikus minőségi attribútumok részletes, ortogonális módszerekkel történő vizsgálata sarokpontja a biológiai gyógyszerek gyártásának, ezért doktori munkám során az alábbi célokat tűztem ki:

- (1) Egy hagyományos bioterapeutikum (adalimumab) glikomikai analízise, illetve módszerfejlesztés a pontos kiértékelhetőséghez,
- (2) Egy fúziós fehérje (etanercept) innovátor és bioszimiláris verziójának kvantitatív összehasonlítása glikosimilaritási szempontból,
- (3) Az analízisekhez egy ortogonális módszer alkalmazása a gyógyszeriparban leginkább elterjedt UPLC helyett
- (4) A CGE-LIF mérésekkel elért eredmények nagy mintaszámra történő adaptálása multikapilláris elektroforézis készülékkel, valamint ehhez egy új glikán adatbázis felállítása

3. Eredmények és megbeszélés

1.1 Az adalimumab mennyiségi értékelése

Az adalimumab APTS-szel jelölt N-kötött glikánjait CGE-LIF segítségével analizáltam. Ezek közül 72%-os arányban jelenlévő glikoforma egy mag-fukozilált biantennáris oligoszacharid (FA2), amely nem rendelkezik terminális galaktózzal. Szintén nagy arányban található meg benne, ugyanezen szénhidrátváz 6-os (12%), illetve 3-mas (4.5%) pozícióban monogalaktozilált formái. Továbbá, a Man5, mint oligomannóz struktúra 2.47%-ban van jelen. Mivel a rheumatoid arthritis (RA) kezelésének hatásmechanizmusában a CDC és ADCC effektor funkciók nem vesznek részt, ezért az ezekre ható struktúrák (galaktoziláció és fukoziláció) nem képezik részét az analízisnek. Ugyanakkor a Man5 szerkezet szignifikánsan befolyásolja a szérumból való kiürülést, így ezen struktúra mennyiségi analízise kiemelt fontosságú (CQA). Ezért az adalimumab mintákról PNGáz F segítségével lehasított cukrokhoz egyre növekvő mennyiségben adtam Man5 sztenderdet még az APTS-szel való jelölés előtt. Annak érdekében, hogy a sztenderddel megnövelt csúcsok egymással összevethetők legyenek, belső és bracketing sztenderdeket használtam (DP2, DP3 és DP15) a GU értékek számításához. Ezt a megközelítést használva a GU értékek %RSD értéke 0.05% alatt volt, tehát nagy pontosságot sikerült elérnem. A mannóz-5 és az A2 komplex glikánok közötti megfelelő felbontás érdekében 50 cm-es effektív hosszúságú (teljes hossz: 60 cm) kapillárist alkalmaztam. Az RFU értékeket az elektroferogram legnagyobb, vagyis FA2 csúcsára normalizáltam. Ezek a normalizációs lépések (mindkét tengelyen) lehetővé teszik a futtatások közötti egyszerű összehasonlítást, illetve a pontos csúcsterületszámítást az elektroferogramok alapján támogatva ezzel a kantitativ CQA kiértékelést.

A Man5-koncentrációk és a megfelelő csúcsterületek közötti pontos és reprodukálható összefüggés megállapítása érdekében vizsgáltam az elektrokinetikus injektálási paramétereket, valamint a mintakoncentráció és -térfogat hatását is. Először az injektálási feszültséget és időt változtattam 1.0 és 3.0 kV, illetve 1.0 és 3.0 s között 50 és 100 µliteres (0.5 ng/µl koncentráció) mintatérfogat között. Egy kombinált injektálási paramétert vezettem be, amelyet a befecskendezési feszültség és az idő szorzatával határoztam meg. Erre injektálási együtthatónak referálok a koncentrációszámítási vizsgálat során. A csúcs alatti területeket az injektálási paraméterek függvényében ábrázolva igen pontos, lineáris összefüggést találtam. Annak érdekében, hogy alacsony és magas koncentráció tartományban is megfelelően ki tudjam értékelni a Man5 csúcshoz tartozó területeket, a fenti, lineáris összefüggés alapján igyekeztem egy olyan injektálási paramétert választani, amelyhez közepes nagyságú csúcsterületek

tartoznak. Így a sztenderdek analizálásával vizsgált koncentrációfüggést a 4-es injektálási együtthatóhoz tartozó 2.0 kV 2.0 s-es injektálási paraméterekkel mellett végeztem.

Emellett a pontos és reprodukálható kvantitatív meghatározás érdekében vizsgáltam, hogy milyen hatással van a koncentráció a Man5 csúcs alatti területeire. A Man5 sztenderdből készült törzsoldat koncentrációja 0.5 ng/μL volt. Ebből HPLC tisztaságú vízzel sorozathígítást készítettem, amelynek végére 50-szeres hígítást értem el, majd 2.0 kV, 2.0 s injektálási paraméterekkel mértem a mintákat. Fontos megjegyezni, hogy ebben a koncentrációtarományban nagyon jó jelintenzitásokat kaptam alacsonyabb koncentrációknál, emellett magasabb koncentrációk mellett sem szaturáltak a csúcsok. A minta mennyiségeket és a csúcsterületeket összevetve exponenciális összefüggést kaptam.

A különböző injektálási paraméterekkel, Man5 koncentrációkkal és változó mintatérfogatokkal kapott eredmények alapján az adalimumab mintában lévő Man5 koncentrációját pontosan kiszámítottam (2.94 ng).

1.2 Innovátor és bioszimiláris etanercept összehasonlítása N-glikán profiljaik alapján

A glikoszimilaritás kiértékelésénél az általánosan elfogadott $\pm 20\%$ toleranciaküszöböt alkalmaztam. Munkám során kizárólag az 1%-nál nagyobb csúcsterülettel rendelkező csúcsokat értékeltem ki glikoszimilaritási szempontból, minden szerkezet esetében 6 mérés átlagát vettem alapul.

Az 1%-nál nagyobb relatív csúcsterület-kritériumot teljesítő összes di- és monosziálsavas szerkezet csúcsterülete kisebb volt az innovátor termék bioszimilárisában. A disziálsavas glikánok kiesnek a 20%-os toleranciaablakból (-30, illetve -35%), ezzel szemben a jelentős monosziálsavas termékek a határon belül (-16 –14%) esnek. Mivel az említett termékek gyulladáscsökkentő tulajdonságainak nem volt MOA jelentősége, így az átlagos $\sim 33\%$ -os eltérésük sem jelentett CQA problémát. Hasonlóképpen, az afukozilált semleges glikánok nagyobb mennyiségben voltak jelen a bioszimilárisban, ezek ugyan jóval a tűréshatáron kívül esnek (+63 és +130%), azonban mivel az ADCC effektor funkcióra van hatásuk, adalimumab esetén ennek nincs relevanciája, mert nem része a hatásmechanizmusnak. Mindkét elektroferogramon a legnagyobb csúcs egy mag-fukozilált biantennáris glikán (FA2), mely az innovátor termékben, több mint 36%-kal nagyobb mértékben van jelen a bioszimilárishoz képest. Az említett szerkezet CDC modulátori szereppel bír, amely a fentiekhez hasonlóan nem képezi részét a hatásmódnak, azaz nem tekinthető glikoszimilaritási kritériumnak. A

bioszimiláris esetében megfigyelhető az erősen galaktozilált cukorszerkezetek erőteljesebb jelenléte (+130 és +124%), azonban glikoszimilaritás szempontjából ezeknek sincs jelentősége. Érdekes módon ezzel szemben a monogalaktozillált glikánok nagyon hasonló arányban vannak jelen az innovátorral összehasonlítva (+7 és +10%). Ugyanez érvényes a mannozban gazdag szerkezetekre, ahol a különbség szintén tolerancia határon belül esik (−13 and +19%). Tekintve, hogy emberben az Fc-régió mannozillációja befolyással bír a szérum kiürülési sebességre, a magas mannóz tartalmú glikánok jelenléte (ha van ilyen) és annak mértéke fontos kritikus minőségi attribútumnak tekinthető a glikoszimilaritás aspektusában. Mindezek alapján kijelenthető, hogy mint ortogonális technikával, CGE-LIF módszerrel mért N-glikozilációs profilok összehasonlításánál szintén alátámasztható az etanercept két változatának biohasonlósága.

1.3 N-glikán adatbázis felállítása nagy mintaszám analíziséhez

Nagy mintaszám analízisére alkalmas multikapilláris gélelektroforézis készülékkel különböző N-glikán könyvtárakat analizáltam, hogy felállítsak egy új glükózegység adatbázist, amelynek megfelelőségét az N-glikán könyvtárakkal egyszerre analizált bioterapeutikumokkal (etanercept és adalimumab) igazoltam.

Az analízis során APTS-szel jelölt három neutrális (fukozilált biantennáris, afukozilált biantennáris és oligomannóz) N-glikán könyvtárat és hat szializáltat (a bi-, tri- és tertaantennáris $\alpha(2-3)$, illetve $\alpha(2-6)$ irányultságú szialsavakkal) vizsgáltam. A maradék három helyen maltooligoszacharid létra volt az új GU adatbázis felállítása érdekében, illetve egy fúziós fehérje (etanercept, Enbrel®) és egy monoklonális antitest (adalimumab, Humira®).

Kiemelném, hogy a 12 minta a multikapilláris gélelektroforézis készülékkel egyszerre volt mérhető kevesebb, mint 10 perc alatt (beleértve a két bioterapeutikumot).

A fukozilált, az afukozilált és a mannózgazdag könyvtárak esetén 15-15 és 9 szerkezetet sikerült azonosítanom, míg a bi-, tri- és tertaantennáris $\alpha(2-3)$ pozícióban kapcsolódó szialsavas könyvtárak esetén, 17-6-6 N-glikánszerkezetet határoztam meg. A bi-, tri- és tetraantennáris szerkezetekhez $\alpha(2-6)$ orientációban kapcsolódó szialsavas szerkezeteknél pedig 18-6-6 struktúrát azonosítottam.

Minden glikán neve követi az Offord nomenklatúrát, amelyek www.GlycoStore.org oldalon megtalálhatók, a hozzájuk tartozó, számított GU értékek 25°C-on pedig az új GU adatbázist képezik a multikapilláris gélelektroforézissel történő elválasztásokhoz. A kalkulációhoz a www.GUcal.hu weboldalról ingyenesen letölthető szoftvert használtam.

A GU adatbázis létrehozását követően az etanerceptről és az adalimumabról PNGáz F-fel lehasított, APTS-szel jelölt az N-glikánok analízisének kiértékelését végeztem el. Kilenc cukorstruktúrát sikerült azonosítani az adalimumab, míg 17-et az etanercept mintából. Utóbbi a CGE-LIF mérésekhez képest 1-gyel kevesebb csúcsot azonosított, ami tekintve a kapillárisok hosszúságát és a módszer gyorsaságát, megfelelő kezdeti eredménynek mondható.

4. Összefoglalás

Munkám során először egy olyan ortogonális analitikai módszeren (CGE-LIF) alapuló mennyiségi kiértékelést fejlesztettem ki, amellyel bioterapeutikumok N-glikán profiljában található CQA relevanciával bíró cukorszerkezetek pontos mennyiségei könnyen meghatározhatók. Ehhez adalimumabot használtam, fel melyhez különböző mennyiségben adtam Man5 cukorszteridet. Az elektrokinetikus injektálás paramétereinek kombinációjával definiált injektálási együttható és a csúcsterületek között nagy pontosságú ($R^2=0.9990$) lineáris összefüggés mutatkozott. Ezenkívül vizsgáltam a koncentráció hatását a csúcs alatti területekre, itt szintén nagyon akkurátus ($R^2=0.9995$) exponenciális összefüggést kaptam. Mindezek alapján megállapítottam az adalimumab mintában lévő eredeti Man5 mennyiségét (2.94 ng).

A következő lépésben az etanercept nevű fúziós fehérje innovátor és bioszimiláris verziójának mennyiségi összehasonlítását végeztem el, melyhez a relatív csúcsterületeket használtam. Kezdetben exoglikozidázos emésztéssel azonosítottam az etanercepthez kapcsolódó N-glikánokat, majd meghatároztam az elválasztás hőmérsékleti optimumát. Ezután megállapítottam, hogy a két N-glikozilációs mintázat között ugyan nincs minőségbeli eltérés, azonban az egyes struktúrák eltérő mennyiségben vannak jelen. Ezután a glikoszimilaritási index elméleti megfontolási alapján összehasonlítottam a relatív csúcsterületeket a mennyiségi kiértékeléshez. A glikoszimilaritás kiértékelésénél az általánosan elfogadott $\pm 20\%$ toleranciaküszöböt alkalmaztam. A mindkét verzióban legnagyobb mértékben kifejeződő FA2 CDC modulátori szereppel bír, amely nem képezi részét a hatásmódnak, azaz nem tekinthető glikoszimilaritási kritériumnak. A bioszimiláris profilján megfigyelhető az erősen galaktozilált cukorszerkezetek markáns jelenléte (+130 és +124%), viszont glikoszimilaritás szempontjából ezeknek sincs relevanciája. A monogalaktozilált és oligomannóz glikánok nagyon hasonló arányban vannak jelen az innovátorral összehasonlítva (+7 és +10%) (-13 and +19%).

Végezetül, annak érdekében a kapilláris elektrofozézisre kifejlesztett analitikai módszerek és kiértékelések nagy mintaszámra is alkalmazhatók legyenek a gyakorlatban, fukozilált biantennáris, afukozilált biantennáris, oligomannóz, valamint bi-, tri- és tertaantennáris $\alpha(2-3)$, illetve $\alpha(2-6)$ irányultságú sziálsavas glikánkönyvtárakat analizáltam multikapilláris elektroforézis készülékkel. Maltooligoszacharid létra és a GUcal szoftver segítségével új glükózegység adatbázist hoztam létre, melynek segítségével multikapilláris elektroforézis készülék alkalmazása esetén a pontosabb kiértékelhetőség valósítható meg. Az adatbázis felállítása után a glikánkönyvtárakkal és maltooligoszacharid létrával együtt analizált terápiás antitestek (etanercept és adalimumab) N-glikánjait azonosítottam.



Nyilvántartási szám: DEENK/165/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Borza Beáta
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Filep, C. B., **Borza, B.**, Járvas, G., Guttman, A.: N-glycosylation analysis of biopharmaceuticals by multicapillary gel electrophoresis: generation and application of a new glucose unit database. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 178, 1-5, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112892>
IF: 3.935
2. **Borza, B.**, Szigeti, M., Szekrényes, Á., Hajba, L., Guttman, A.: Glycosimilarity assessment of biotherapeutics 1: quantitative comparison of the N-glycosylation of the innovator and a biosimilar version of etanercept. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 153, 182-185, 2018.
IF: 2.983
3. Szigeti, M., Chapman, J., **Borza, B.**, Guttman, A.: Quantitative assessment of mAb Fc glycosylation of CQA importance by capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* 39 (18), 2340-2343, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201800076>
IF: 2.754

További közlemények

4. Sárközy, D., **Borza, B.**, Domokos, A., Várad, E., Szigeti, M., Mészáros-Matwiejuk, Á., Molnár-Gábor, D., Guttman, A.: Ultrafast high-resolution analysis of human milk oligosaccharides by multicapillary gel electrophoresis. *Food Chem.* 341 (2), 1-8, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128200>
IF: 9.231





5. **Borza, B.**, Hajba, L., Guttman, A.: N-glycan Analysis in Molecular Medicine: innovator and Biosimilar Protein Therapeutics.
Curr. Mol. Med. 20 (10), 828-839, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1566524020999201203212352>
IF: 2.222
6. Hajba, L., Szekrényes, Á., **Borza, B.**, Guttman, A.: On the glycosylation aspects of biosimilarity.
Drug Discov. Today. 23 (3), 616-625, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.009>
IF: 6.88
7. Bakonyi, P., **Borza, B.**, Orlovits, K., Simon, V., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K.: Fermentative hydrogen production by conventionally and unconventionally heat pretreated seed cultures: a comparative assessment.
Int. J. Hydrog. Energy. 39 (11), 5589-5596, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.01.110>
IF: 3.313
8. Bakonyi, P., Orlovits, K., Simon, V., **Borza, B.**, Kumar, G., Periyasamy, S., Lin, C. Y., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K.: The Effect of Different Pretreatment Methods and Operational Conditions on the Biohydrogen Production Potential of Aged Anaerobic Culture.
CBE. 1 (2), 84-91, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/2212711901999140501111443>
9. Simon, V., Orlovits, K., **Borza, B.**, Bakonyi, P., Nemestóthy, N.: Biohidrogén fermentációs kísérletek mérési módszereinek összehasonlítása.
Membrántechn. ipari biotech. 4, 18-29, 2013.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 31,318

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,672**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.05.18.

