

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Borza Beáta

**Innovátor és bioszimiláris bioterapeutikumok glikomikai
analízise**

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Innovátor és bioszimiláris bioterapeutikumok glikomikai
analízise**

Borza Beáta

Témavezető: Dr. Guttman András



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

Tartalomjegyzék

1.	Rövidítések jegyzéke.....	4
2.	Bevezetés.....	7
3.	Irodalmi áttekintés.....	9
3.1	A bioszimilitás és jellemzői	9
3.1.1	Hatósági követelmények	10
3.2	A bioszimilitási index statisztikai megfontolásai.....	15
3.3	A bioszimilitás vizsgálatának analitikai módszerei	17
3.3.1	Elsődleges szerkezet.....	17
3.3.2	Másodlagos szerkezet.....	18
3.3.3	Harmadlagos szerkezet.....	18
3.3.4	Negyedleges szerkezet	18
3.4	N-glikánok és glikoproteinek bioszintézise	19
3.5	Szerkezeti variabilitás.....	22
3.6	N-glikánok funkció-struktúra viszonya.....	23
3.7	Bioszimilárisok glikozilációjának szabályozása a gyártás során	24
3.8	Az N-glikozilációs mintázat nyomonkövetése analitikai módszerekkel.....	27
3.8.1	Folyadékkromatográfia (LC).....	29
3.8.1.1	Fordított fázisú folyadékkromatográfia (RPLC).....	29
3.8.1.2	Hidrofil interakciós kromatográfia (HILIC).....	30
3.8.2	Kapilláris elektroforézis (CE)	32
3.9	A glikoszimilitás értelmezése és a gCQA-k meghatározása	33
3.10	Adalimumab – monoklonális antitest.....	35
3.11	Etanercept - fúziós fehérje.....	36
3.12	Célkitűzések	37
4.	Anyagok és módszerek.....	38
4.1	Felhasznált anyagok	38

4.2	Módszerek	38
4.2.1	Az adalimumab minták előkészítése	38
4.2.2	Adalimumab minták CGE-LIF analízise.....	39
4.2.3	Etanercept minták előkészítése	39
4.2.4	Etanercept minták CE-LIF analízise	40
4.2.5	Etanercept minta exoglikozidázos emésztést követő szekvenálása	41
4.2.6	Etanercept és adalimumab minták előkészítése multikapilláris elektroforézis készülékhez.....	41
4.2.7	Multikapilláris gélelektroforézissel való mérés körülményei	42
5.	Eredmények.....	43
5.1	Az adalimumab mennyiségi értékelése	43
5.2	Az etanercept exoglikozidázos szekvenálása	48
5.3	Elválasztási hőmérséklet optimalizálása etanercept vizsgálatához	49
5.4	Innovátor és bioszimiláris etanercept összehasonlítása N-glikán profiljaik alapján 51	
5.5	Glikoszimilaritás mennyiségi értékelése	52
5.5.1	A GI kiértékeléséhez tartozó elméleti megfontolások	52
5.5.1.1	A GI számítása	52
5.5.1.2	Referencia sarzsok jellemzése, a cél profil fellállítása.....	54
5.5.1.3	gCQA-k osztályozása és tolerancia határuk definiálása.....	54
5.5.1.4	Profil és kompozíciós hasonlósági ráták megállapítása, GI számítása	57
5.5.2	Glikoszimilaritási kiértékelés	57
5.6	N-glikán adatbázis felállítása nagy mintaszám analíziséhez.....	60
6.	Megbeszélés	66
6.1	Adalimumab kritikus minőségi attribútumának mennyiségi meghatározása.....	66
6.2	Elválasztási hőmérséklet beállítása	66
6.3	Az etanercept innovátor és bioszimiláris verziójának glikoszimilaritása	66
6.4	Új glükózegység adatbázis létrehozása multikapilláris elektroforézissel	67

7.	Összefoglalás.....	68
8.	Summary	70
9.	Új tudományos eredmények.....	72
10.	Irodalomjegyzék.....	73
11.	Tárgyszavak	81
12.	Köszönetnyilvánítás	82
13.	Függelék.....	83

1. Rövidítések jegyzéke

2-AA – 2-amino-benzoésav

2-AB - 2-amino-benzamid

ABE – átlagos bioekvivalencia index (average bioequivalence)

ADCC - antitest-függő sejt közvetített citotoxicitásra (antibody-dependent cellular cytotoxicity)

APTS - 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonsav

Asn – aszparagin

Asp – aszparaginsav

BFS – nem bevont falú szilika (bare fused silica) kapilláris

BHK – újszülött hörcsög vese sejt (baby hamster kidney)

C1 – fehérjekomplex, a komplement útvonal első eleme

C1q – C1 komplex q doménje

CD- cirkuláris dikroizmus (circular dichroism)

CDC - komplement függő citotoxicitás (complement-dependent cytotoxicity)

CE – kapilláris elektroforézis (capillary electrophoresis)

CGE-LIF – kapilláris gélelektroforézis lézer indukált fluorescens detektálással

CHO – kínai hörcsög petefészkéből származó sejtek (chinese hamster ovary)

CQA – kritikus minőségi paraméter (critical quality attribute)

DER – durva felületű endoplazmatikus retikulum

DNS – dezoxiribonukleinsav

DoE – kísérlettervezés (design of experiment)

Dol-P – dolikol-foszfát

DSC - differenciális pásztázó kalorimetria (differential scanning calorimetry)

EMA – Európai Gyógyszerügynökség (European Medicines Agency)

endoT - endo-N-acetil- β -D-glükózaminidáz

ER – endoplazmatikus retikulum

F(ab')₂ – két Fab diszulfid hidakkal összekötve

Fab – antigénkötő fragmens

Fc – kristályosítható fragmens (fragment crystallizable), nehézláncok C-terminális része

Fc/2 – Fc monomer

Fc γ IIIa – antitest-kötő receptor

Fd – nehézlánc N-terminális fele

FDA - amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal (Food and Drug Administration)

FLR – fluoreszcencia spektroszkópia (fluorescence spectroscopy)

FTIR – Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (Fourier transform infrared spectroscopy)

Fuc – fukóz

Gal – galaktóz

gCQA - glikozilációval kapcsolatos kritikus minőségi paraméter

GI – glikoszimilaritási index

GlcNAc - N-acetil-glükózamin

Glu – glutaminsav

GnT I - N-acetil-glükózamin-transferáz I

GU – glükózegység (glucose unit)

HPLC – nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (high-performance liquid chromatography)

HILIC- hidrofil interakciós kromatográfia (hydrophilic-interaction chromatography)

ICH – Nemzetközi Harmonizációs Konferencia (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use)

ID – belső átmérő (internal diameter)

IdeS - *Streptococcus pyogenes*-ből származó endopeptidáz, amely az IgG-t Fc és F(ab')₂ fragmentumokra képes hasítani

IgG – immunglobulin G

LC – folyadékkromatográfia (liquid chromatography)

Lc – könnyűlánc(light chain)

LC-MS – folyadékkromatográfia tömegspektrométerrel kapcsolva (liquid chromatography hyphenated with mass spectrometer)

Man – mannóz

Man5 – mannóz-5

MoA – a termék hatásmechanizmusa (mechanism of action)

MS – tömegspektrométer (mass spectrometer)

Neu5Gc - N-glikolil-neuraminsav

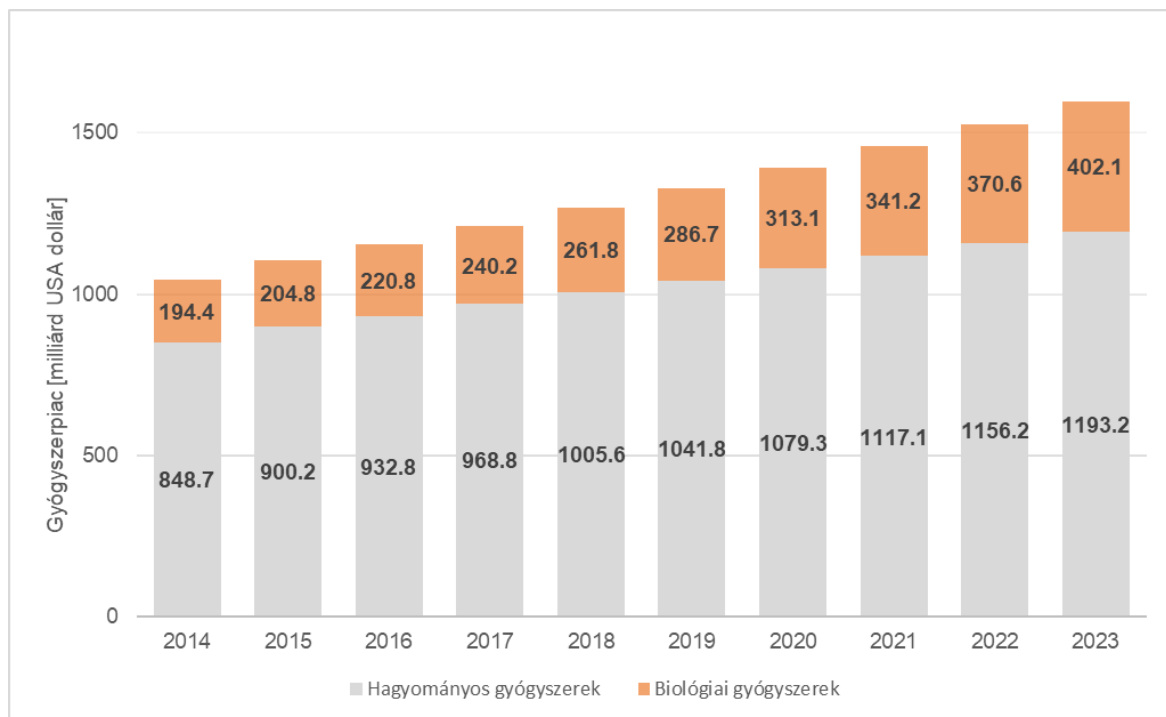
NMR - mágneses magrezonancia spektroszkópia (nuclear magnetic resonance)

NS0 - egér myeloma

OST - oligoszacharidtranszferáz
PCR – polimeráz-lánreakció (polymerase chain reaction)
PD – farmakodinamika (pharmacodynamics)
PEG – polietilén-glikol
PK – farmakokinetika (pharmacokinetics)
PNGáz F – peptid-N-glikozidáz F
RA - rheumatoid arthritis
rd – relatív különbség (relative difference)
RFU – relatív fluorescens egység (relative fluorescence unit)
rhEPO – rekombináns humán erythropoietin
RNS – ribonukleinsav
RPLC- fordított fázisú folyadékkromatográfia (reversed-phase liquid chromatography)
RSD – relatív szórás (relative standard deviation)
SD – szórás (standard deviation)
Ser – szerin
SP2/0 - egér hybridoma
STT3A – OST katalitikus alegysége
STT3B – OST katalitikus alegysége, amely a kitekeredett fehérje C-terminális végét is képes glikozilálni
Thr – treonin
TNF- α – tumor nekrozis faktor- α
UPLC – ultranagy teljesítményű folyadékkromatográfia (Ultra High Performance Liquid Chromatography)
UV – ultraibolya (ultraviolet)
VT-CD – változó hőmérsékletű cirkuláris dikroizmus (variable-temperature circular dichroism)
WHO – Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)
XRC – röntgen krisztallográfia (X-ray crystallography)

2. 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 [1]. Ezt jól szemlélteti, hogy az elmúlt 10 évben a biológiai gyógyszerek piaca megkétszereződött (1. ábra).



1. ábra: A hagyományos és biológiai gyógyszerek globális piaca 2014 és 2023 között amerikai dollárban kifejezve. Figyelembe véve az elmúlt évek trendjeit, egyes becslések szerint a biológiai gyógyszerek globális piaca 2014-hez képest az idei év végére mintegy megkétszereződik 194.4 milliárd dollárról több, mint 400 milliárd dollárra. Ehhez képest a hagyományos gyógyszerek éves forgalmának növekedése 848.1 milliárd dollárról 1200 milliárd dollár körülire becsülhető az idei évben [2].

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 [3]. Ezt pár év elteltével különböző betegségekre kifejlesztett bioterápiás készítmények tucatjai követték [4, 5]. 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 biohasonlónak, vagy más néven bioszimilárisnak hívunk [6]. 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 sejtvonalakat, 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 [1].

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 (glikozilációs mintázat vizsgálata a gyártás minden egyes fázisában).

3. Irodalmi áttekintés

3.1 A bioszimilitás és jellemzői

A bioszimilárisok, az EMA (European Medicines Agency), az FDA (Food and Drug Administration) és a WHO (World Health Organization) irányelveivel összhangban lévő, pontos meghatározása a következő: „A bioszimilárisok olyan másolatai a már jóváhagyott biológiai gyógyszereknek, amelyek átfogó, összehasonlító vizsgálatok alapján hasonlóságot mutatnak az eredetivel fizikai-kémiai tulajdonságaikban, hatékonyságukban és biztonságosságukban” [7]. Azaz, a biohasonló gyógyszereknek nagyfokú hasonlóságot kell mutatniuk a referenciatermékkel fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságaik alapján is. A biztonságosságra és hatékonyságra vonatkozó tulajdonságokat klinikai összehasonlító vizsgálatoknak is alá kell támasztaniuk, mind az eredeti, mind pedig a bioszimiláris termék esetén [8]. Biohasonló gyógyszerek kapcsán a legnagyobb aggodalmat általában az immunogenitás kérdése váltja ki, ezért a jóváhagyás előtt elengedhetetlenek az erre irányuló klinikai vizsgálatok [9]. Minden egyes eltérést ki kell vizsgálni és megfelelően igazolni, hiszen az hatással lehet a termék klinikai hatékonyságára [8]. Míg a bioszimilárisok az innovátor gyógyszerek másolatai, addig fontos megemlíteni az ún. „biobetter” termékeket is. Utóbbiak szerkezeti változásaik révén és az eredetihez képest célzottabb funkcionális targetálással vagy jobb kissereléssel bírnak, melyeknél fogva biztonságosabbak, illetve hatékonyabbak az innovátorhoz képest [10]. A hagyományos kismolekulás gyógyszerekkel párhuzamba állítva leginkább a generikus készítményekhez hasonlóak, azonban fontos megemlíteni, hogy van néhány lényeges különbség. Ugyanis a generikus készítmények jóváhagyásakor alkalmazható egy lerövidített, ún. ANDA (Abbreviated New Drug Application) eljárás, amelynek során nem szükséges preklinikai és klinikai adatokkal bebizonyítani a generikus készítmény hatékonyságát és biztonságos használatát, hiszen az kémiailag megegyezik az eredetivel. Ebben az esetben a gyártónak elegendő igazolnia a bioekvivalenciát és két termék azonosságát. Bioszimiláris produktumok esetében ez elképzelhetetlen, hiszen az aktív hatóanyag az adott fehérje számos izoformáját tartalmazhatja, ezért biohasonló termékeknél a biztonságos alkalmazás és hatékonyság igazolására elengedhetetlenek mind a preklinikai, mind pedig a klinikai vizsgálatok [1].

Bioszimiláris fejlesztés során a folyamatot lépésről lépésre kell megközelíteni, kezdve egy átfogó fizikai-kémiai és biológiai jellemzéssel megfelelő, lehetőség szerint ortogonális módszerekkel [11]. Ahogy arra fentebb már utaltam, a biohasonlóság alátámasztásához

nélkülözhetetlenek a klinikai adatok, amelyek nagyban függenek a preklinikai vizsgálatok tapasztalataitól és eredményeitől [12]. Ezek során a molekuláris szerkezetben bekövetkezett változásokat (poszttranszlációs módosulások, magasabb rendű struktúrák változásai) szigorú analitikai vizsgálatoknak vetik alá. A molekuláris szerkezeti paraméterek CQA (critical quality attributes) relevanciával bírnak az innovátor és a bioszimiláris termék között folytatott klinikai vizsgálatok során. Az ilyen vizsgálatokat „analitikai hasonlóságértékelésnek” hívják [13].

Az FDA által javasolt lépésről lépésre történő megközelítés bevett eljárás a bioszimilitás és felcserélhetőség vizsgálatára vonatkozólag. Célja, hogy a lehető legtöbb bizonyítékot felsorakoztassa az innovátor és a bioszimiláris termék hasonlóságának alátámasztására. A következő analitikai vizsgálatokat foglalja magába:

- 1) a kritikus minőségi jellemzők szerkezeti és funkcionális jellemzése analitikai módszerekkel
- 2) állatkísérletek a farmakokinetikára, farmakodinámiára és toxicitásra vonatkozólag, illetve
- 3) klinikai tanulmányok a biztonságosság, hatékonyság és immunogenitási problémák kiértékeléshez és validáláshoz [13, 14].

3.1.1 Hatósági követelmények

Az FDA irányelvei szerint terápiás fehérjék szerkezeti jellemzéséhez olyan analitikai módszereket kell használni, amelyek megfelelően érzékenyek és specifikusak az adott hatóanyagra. A bioszimiláris és a referencia terméket az alábbi szempontok szerint kell összehasonlítani: (i) elsődleges szerkezet, azaz aminosav szekvencia, (ii) másodlagos, harmadlagos és negyedleges szerkezet, (iii) poszttranszlációs módosulások, úgy, mint glikoziláció, foszforiláció, stb. (iv) lebomlási profil pl. fehérje deamidáció és oxidáció, és (v) kémiai módosítások, mint pl. PEGiláció. Bioszimilárisok fejlesztése során törekedni kell a minél pontosabb összehasonlító szerkezeti jellemzésre, ezért annak érdekében, hogy az új bioszimiláris variabilitását a gyártási paraméterek függvényében lehessen vizsgálni, annak minden gyártási sarzsát analizálni szükséges. Az egyes sarzsokból vett mintáknak reprezentatívnak kell lenniük annak érdekében, hogy megfelelő képet mutassanak az újonnan fejlesztett és a referencia termék egymáshoz viszonyított bioszimilitásáról. A kellő számú sarzs mellett, elengedhetetlen a megfelelő mintaszám is [12]. A fent említett követelmények a szabályozószervek alapvető elvárásai közé tartoznak az egyes bioszimiláris készítmények jellemzésekor. Számos összehasonlító tanulmány készült már, melyek az innovátor terméket és annak bioszimilárisát fizikai-kémiai tulajdonságaik alapján veti össze [15-17].

Mivel a termék jóváhagyását követően, gyártás során is történhetnek a termék minőségét célzó fejlesztések, ezért előfordulhat, hogy az így kapott termék a klinikai tanulmányok során jobb eredményeket mutathat hatékonyság és/vagy biztonsági szempontból [18]. A Nemzetközi Harmonizációs Konferencia (ICH) Q5E direktívája a következőképpen határozza meg az összehasonlítás kritériumait: „A változtatás előtti és utáni termék kritikus minőségi jellemzőinek (CQAs) összevetése, melyek nagy mértékben hasonlóak, de nem azonosak, illetve nincsenek negatív hatással a termék biztonságosságára és hatékonyságára” [18, 19]. Ezek a kritikus minőségi jellemzőket összehasonlító vizsgálatok képezik az alapját a bioszimilitásra vonatkozó összehasonlító vizsgálatoknak is.

A bioszimiláris termékek fejlesztése először átfogó és kiterjedt irodalmazással kezdődik, hogy pontosan kiderüljön az innovátor termék hatásmechanizmusa (mechanism of action – MoA), valamint az irodalmi adatok alapján feltérképezhetőbbé válnak a szerkezeti és funkcionális változásokkal kapcsolatos eltérések és immunogenitási problémák. Az összegyűjtött információt felhasználva az adott gyógyszer kritikus minőségi jellemzői (CQAs) meghatározhatók és kockázatértékeléssel becsülhető az adott paraméter által kiváltott probléma súlyossága. Mivel biológiai hatóanyagok esetén a szerkezeti jellemzők molekulafüggőek, bizonyos mértékben a CQA-k eltérhetnek az egyes típusok között. Például, az eukarióta sejtekkel előállított terápiás fehérjék esetén – tipikusan ilyenek az emlős sejtekkel termeltetett monoklonális antitestek (mAbs) – a glikoziláció kiemelt minőségi attribútum. Ezzel szemben a prokariótákat (pl. *E. coli*) felhasználó rendszerekben, ennek nincs jelentősége [20]. A kritikus minőségi jellemzők meghatározása után a biológiai hasonlóságot (bioszimilitás) átfogó analitikai módszerekkel vizsgálják, melyek közül a legelterjedtebb technikákat a 3.8 fejezetben fogom részletesebben kifejteni. A 2. ábrán összefoglalva láthatók az egyes szerkezeti elemekhez tartozó analitikai módszerek.

Az ezt követő lépésben a referenciatermék több gyártási sarzsából származó mintát vizsgálnak, majd ezek alapján felállítják a végtermék minőségi követelményeit (*quality target product profile - QTPP*), mely magába foglalja többek között a termék aggregációs szintjét, biológiai aktivitását és poszttranszlációs módosulásait.

Ezután történik az expressziós rendszer tervezése, szelekciója és fejlesztése, beleértve a teljes expressziós konstrukciót, a gazdasejt vonalat és a gyártási folyamat egyéb lépéseit is, így megágyazva és egyben szilárd alapot biztosítva a bioszimiláris termék előállításának. A kritikus minőségi paramétereket a gyártási folyamat alatt folyamatosan nyomon követik, ezáltal állandó visszajelzést lehet kapni arról, hogy a gyártási paraméterek megváltozása hogyan befolyásolja a terméket [4].

Kritikus minőségi attribútum (CQA)



2. ábra: A kritikus minőségi jellemzőkhöz tartozó ortogonális analitikai módszerek összefoglaló térképe. LC-UV/ESI-TOF-MS: folyadékkromatográfia ultraibolya-, vagy repülési idő analizátorral szerelt, elektrospray ionizációs tömegspektrometriás detektálással kapcsolva (Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection or Electrospray Ionization - Time-of-Flight Mass Spectrometry); CE-ESI-TOF-MS: kapilláris elektroforézissel kapcsolt, repülési idő analizátorral szerelt, elektrospray ionizációs tömegspektrometriával kapcsolva (Capillary Electrophoresis with Electrospray Ionization - Time-of-Flight Mass Spectrometry); MALDI-TOF-MS: tömegspektrometria mátrix segített lézerdeszorpciós ionforrással és repülési idő analizátorral (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-of-Flight Mass Spectrometry); LC-ESI-MS: folyadékkromatográfia elektrospray ionizációs tömegspektrometriával kapcsolva (Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry) ; RP-UV/ESI-QTOF-MS: fordított fázisú folyadékkromatográfia ultraibolya-, vagy kvadrupóllal és repülési idő analizátorral szerelt (hibrid), elektrospray ionizációs tömegspektrometriás detektálással kapcsolva (Reverse Phase Liquid Chromatography with Ultraviolet detection or Electrospray ionization quadrupole time-of-flight Mass Spectrometry); LC-IonTrap MS: folyadékkromatográfia ioncsapda analizátorral szerelt tömegspektrometriával kapcsolva; LC-Orbitrap MS: folyadékkromatográfia orbitrap analizátorral szerelt

tömegspektrometriával kapcsolva; 2D-LC-MS: kétdimenziós folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (Two-Dimensional Liquid Chromatography with Mass Spectrometry), Távoli UV-CD: távoli ultraibolya tartományban felvett cirkuláris dikroizmus (Far Ultraviolet Circular Dichroism); FTIR: Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (Fourier Transform Infrared Spectroscopy); Közeli UV-CD: közeli ultraibolya tartományban felvett cirkuláris dikroizmus (Near Ultraviolet Circular Dichroism); XRC: röntgen krisztallográfia (X-Ray Crystallography); 1D/2D NMR: 1 vagy 2 dimenziós mágneses magrezonancia spektroszkópia (Nuclear Magnetic Resonance); IT-FLR: közvetett időfüggő fluoreszcencia (Indirect Time-Resolved Fluorescence); IM-MS: ionmobilitás-tömegspektrometria (Ion Mobility-Mass Spectrometry); HDX-MS: hidrogén- deutérium csere tömegspektrometria (Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry); DSC: differenciális pásztázó kalorimetria (Differential Scanning Calorimetry); VT-CD: vibrációs cirkuláris dikroizmus (Vibrational Circular Dichroism); TCSPC: időkorrelált egyfoton számlálás (Time-Correlated Single Photon Counting); NanoDSF: nano differenciális pásztázó fluorimetria (Nano Differential Scanning Fluorimetry); HILIC-FLD/QTOF-MS: hidrofil interakciós folyadékkromatográfia fluorescens detektálással vagy kvadрупóllal és repülési idő analizátorral szerelt (hibrid) tömegspektrometriás detektálással (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Fluorescence Detection/Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry); CZE-LIF: kapilláris zóna elektroforézis lézer indukált fluorescens detektálással (Capillary Zone Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence detection); RP-FLD: fordított fázisú folyadékkromatográfia fluorescens detektálással (Reversed-Phase Fluorescence Detection); HPAEC-PAD: nagy hatékonyságú anioncserés kromatográfia pulzáló amperometriás detektálással (High-Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection); NP-WAX-FLD: gyenge anioncserés normál-fázisú folyadékkromatográfia fluoreszcens detektálással (Normal-Phase Weak Anion Exchange Chromatography with Fluorescence Detection); cIEF-UV: kapilláris izoelektromos fókuszálás ultraibolya detektálással (Capillary Isoelectric Focusing with Ultraviolet Detection); icIEF-UV: képalkotó kapilláris izoelektromos fókuszálás ultraibolya detektálással (Imaged Capillary Isoelectric Focusing with Ultraviolet Detection); CEX-UV: kationcserélő folyadékkromatográfia ultraibolya detektálással (Cation Exchange Chromatography with Ultraviolet Detection); CZE-UV: kapilláris zóna elektroforézis ultraibolya detektálással (Capillary Zone Electrophoresis with Ultraviolet Detection); CZE-ESI-MS: kapilláris zóna elektroforézis elektropray ionizációs tömegspektrometriával csatolva (Capillary Zone Electrophoresis with Electrospray Ionization Mass Spectrometry); 2D-LC-ESI-QTOF-MS: kétdimenziós folyadékkromatográfia

kvadrupóllal és repülési idő analizátorral szerelt (hibrid) tömegspektrometriás detektálással (Two-Dimensional Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry); WCX-LC-Natív-ESI-QTOF-MS: gyenge kationcserén alapuló folyadékkromatográfia kvadrupóllal és repülési idő analizátorral szerelt (hibrid), natív elektropray ionizációs tömegspektrometriás detektálással (Weak Cation Exchange Liquid Chromatography with Native Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry); SCX-LC-Natív-Orbitrap-MS: erős kationcserén alapuló folyadékkromatográfia orbitrap analizátorral szerelt tömegspektrometriával kapcsolva (Strong Cation Exchange Liquid Chromatography with Native Orbitrap Mass Spectrometry); SEC-UV: méretkizárásos kromatográfia ultraibolya detektálással (Size-Exclusion Chromatography with Ultraviolet Detection); SEC-RI/MALS: méretkizárásos kromatográfia törésmutató alapján történő vagy többszögű fényszórásos detektálással (Size-Exclusion Chromatography with Refractive Index/Multi-Angle Light Scattering); SDS-PAGE: nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gél elektroforézis (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis); CE-SDS-UV/LIF: nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid géllal kombinált kapilláris elektroforézis ultraibolya vagy lézer indukált fluorescens detektálással (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis with Ultraviolet and Laser-Induced Fluorescence detection); DLS/AF4: dinamikus fényszórás szimmetrikus áramlási tér áramlásának frakcionálásával (Dynamic Light Scattering/ Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation); MFI/LO: mikrofluidikai képalkotás fényelsötétítési teszttel (Micro Flow Imaging System/ Light Obscuration) ; AUC-SV/SE: szedimentációs sebességi vagy szedimentációs egyensúlyi módszer a koncentráció-idő görbe alatti területeket alkalmazva (Area Under Curve with Sedimentation Velocity or Sedimentation Equilibrium); DOSY-NMR: kétdimenziós NMR-diffúziometria (Diffusion Ordered Spectroscopy with Nuclear Magnetic Resonance) EM: elektronmikroszkópia (Electron Microscopy); RP/HC/ Boronát affinitáskromatográfia-FLD: fordított fázisú kromatográfia vagy hidrofób interakció kromatográfia vagy boronát affinitáskromatográfia fluorescens detektálással kiegészítve (Reversed-Phase/ Hydrophobic Interaction Chromatography/ Boronate Affinity Chromatography with Fluorescence Detection) HIC-UV: hidrofób interakció kromatográfia ultraibolya detektálással (Hydrophobic Interaction Chromatography with Ultraviolet Detection), RP-UV/QTOF-MS: fordított fázisú folyadékkromatográfia ultraibolya, vagy kvadrupóllal és repülési idő analizátorral szerelt tömegspektrometriás detektálással (Reversed-Phase Chromatography with Ultraviolet or Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry); qPCR: kvantitatív valósidejű polimeráz láncreakció (Quantitative Polymerase Chain Reaction); 2D PAGE/DIGE: kétdimenziós

gélelektroforézis vagy kétdimenziós differenciál gélelektroforézis (Two-dimensional Gel Electrophoresis or Two-Dimensional Differential Gel Electrophoresis); ELISA: enzimhez kötött immunszorbens vizsgálat (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay); CZE-MS: kapilláris zónaelektroforézis tömegspektrometriás detektálással (Capillary Zone Electrophoresis with Mass Spectrometry)

Összefoglalva, a bioszimiláris termékfejlesztés három fő pillére a fordított tervezés, fokozatos folyamat optimalizálás és az analitikai jellemzés. Mivel azonban bizonyos információk az eredeti termék gyártásával kapcsolatban nem hozzáférhetőek vagy hiányosak, ezért a gyártás egyes aspektusai eltérhetnek az innovátor gyártási technológiájához képest. Ez jelentheti eltérő sejtvonalt alkalmazását, egyedileg kifejlesztett sejt médiumot, tisztítási lépéseket, egyes esetekben pedig előfordulhat, hogy az újonnan fejlesztett bioszimiláris korszerűbb formulációval bír, mint amelyet az eredeti gyártó használt a piacra bocsátáskor [21]. Az előre meghatározott biohasonlósági kritériumok olyan kérdésekkel hivatottak foglalkozni, mint a kis eltérésekkel szembeni érzékenység, valamint a hasonlóság mértékének megállapítása. Ehhez az FDA megköveteli a megfelelő statisztikai módszerek használatát, az ún. „bioszimilitási index” használatát és a klinikai vizsgálatok terveit is. Ezek mind szükséges részei a nagyfokú biohasonlóság kimutatásának [14].

3.2 A bioszimilitási index statisztikai megfontolásai

Az analitikai hasonlóság megállapítására az FDA háromszintű megközelítést irányoz elő, mely statisztikai módszertani útmutatást nyújt a bizonyítékok összegzéséhez a bioszimilitás kimutatására. A releváns klinikai eredményekkel rendelkező kritikus minőségi paramétereket (pl. hatékonyság, biztonságosság) besorolják a három kockázati szint valamelyikébe: alacsony, közepes, vagy magas kockázat. Az egyes kockázati szintekhez különböző statisztikai megközelítéseket ajánlott alkalmazni, például magas kockázati szint (Tier 1) esetén az FDA szerint ekvivalencia tesztet, míg az EMA (European Medicines Agency – Európai Gyógyszerügynökség) minőségi tartományok alkalmazását (+/- 1,5 szórás) ajánlja 95%-os konfidencia intervallum mellett. Közepes kockázati szintnél (Tier 2) mintkét gyógyszerügynökség minőségi tartomány megközelítést javasol +/- 3 szórás és szintén 95%-os konfidencia intervallum mellett a referencia termékre vonatkozóan. Alacsony kockázat (Tier 3) esetén pedig célszerű a nyers adatok és azok grafikus ábrázolásának használata [8, 12]. Ezeket a statisztikai módszereket Chow és munkatársai foglalták össze [22].

A bioszimilitási index, vagy más néven átlagos bioekvivalencia (average bioequivalence – ABE) index egy valószínűségeen alapuló, skálázott és súlyozott feltétele a bioszimilitás bizonyításának, amely az (1) egyenlettel írható le, ahol T a teszt termék, azaz a bioszimiláris, R pedig a referencia termék, tehát az innovátor vizsgálni kívánt tulajdonsága.

$$ABE = \left(1 - \delta < \frac{T}{R} < 1 + \delta\right), \quad (1)$$

ahol $0 < \delta < 1$ a biohasonlósági határ.

Annak érdekében, hogy alkalmazhassuk a bioszimilitási indexet egy adott paraméterre, a következők szerint kell eljárni [23-25]. Először meg kell állapítani az átlagos biohasonlóságot az adott paraméterre vonatkozóan a bioszimiláris és a referencia termék között a biohasonlóságra vonatkozó követelmények alapján. Ennek az átlagokon, arányokon és a teszt termék variabilitásán kell alapulnia. Egy összehasonlító tanulmány végén az átlagok arányának *in vivo* tesztek esetén 80-125%, míg *in vitro* vizsgálatok esetén 90-111% közé kell esnie [26, 27]. Ezután következik a vizsgált tulajdonságra vonatkozó bioszimilitási mutató kiszámítása az (1) egyenletnek megfelelően, majd az így kapott eredmények kiértékelése. A teszt termék nagyon hasonlónak minősíthető, ha a bioszimilitási index 95%-os konfidencia alsó határa nagyobb, mint p_0 (ahol p_0 a reprodukálhatóság valószínűségének becsült értéke magához a referencia termékhez képest).

A biohasonlósági mutató több szempontból is előnyös: (i) robusztus a vizsgálandó paraméterre vonatkozóan, (ii) az index megenged némi variabilitást, és érzékeny a teszt termék változásaira, illetve (iii) lehetővé teszi a hasonlóság mértékének megállapítását, ezáltal segít megválaszolni a kérdést, hogy „mennyire hasonló a hasonló” [28, 29].

A biohasonlósági (vagy ABE) index szintén leírható a momentumok módszerével a (2) egyenlet alapján [30]:

$$rd = \frac{d(T,R)}{d(R,R)}, \quad (2)$$

ahol rd a relatív eltérés, $d(T,R)$ a teszt (T) és a referencia (R) termék közötti különbség, $d(R,R)$ pedig az eltérés a referencia termék több sarzsa között. Elterjedten használják az egyoldalú 95%-os konfidencia intervallumot a relatív különbség (rd)-alapú biohasonlóság/ bioekvivalencia meghatározására. Ha az egyoldalú felső konfidencia határ kisebb, mint a bioszimilitási határ, akkor a teszt terméket biológiailag hasonlónak tekintjük a referencia termékhez képest. Ebben az esetben a hagyományos értelemben vett bioekvivalencia kritériumainak megfelelően, a bioszimilitás a (3) egyenlet szerint határozható meg.

$$rd = \frac{M_T}{M_R}, \quad (3)$$

skalázott átlagos bioekvivalencia kritériumok esetében a (4) egyenletet használhatjuk:

$$rd = \frac{M_T - M_R}{\sigma_R}, \quad (4)$$

ahol M_T a teszt termék vizsgált paraméterének átlagos értéke (ez lehet farmakodinamikai vagy farmakokinetikai adat, vagy analitikai adat, pl. csúcsterület), míg M_R ugyanez a referencia termékre értelmezve, σ_R pedig a referencia termék szórása [23].

3.3 A bioszimilitás vizsgálatának analitikai módszerei

Annak érdekében, hogy a biohasonlóság egyértelműen megállapítható legyen, be kell vezetnünk az ortogonalitás fogalmát. Az ortogonális vizsgáló módszerek alapelveikben eltérnek egymástól, ennél fogva alkalmazásuk nélkülözhetetlen a biohasonlósági vizsgálatok során. Különösen igaz ez olyan esetekben, amikor a vizsgált CQA (pl. méret) dinamikusan változhat, vagy az elsődleges technika csupán minőségi meghatározásra alkalmas. Az FDA szerint az eltérő fizikai-kémiai vagy biológiai elven működő módszerek szerepe kiemelt jelentőséggel bír ugyanazon minőségi attribútum értékelésére, mivel egymástól független adatokkal támasztják alá az adott jellemző minőségét [31]. Klasszikus példa ortogonális módszerek alkalmazására a mérettartományok lefedése, de nélkülözhetetlenek a magasabbrendű szerkezetek, a glikoziláció, és a töltésvariánsok jellemzésekor is [20].

3.3.1 Elsődleges szerkezet

Az elsődleges szerkezetek összehasonlító vizsgálata magába foglalja az innovátor és bioszimiláris termék szekvenciaazonosságának illetve tömegazonosságának vizsgálatát. Az aminosav-szekvenciák Edman-lebontással és tömegspektrometriával (MS) egyaránt összevethetők. Az Edman-lebontás, egy hagyományos eszköz, amely az N-terminális aminosavak egymást követő kémiai módszerekkel történő eltávolításán alapul [32, 33]. Mindazonáltal az MS egyre népszerűbb technika mind a szekvencia-, mind a tömegazonosság tekintetében, köszönhetően érzékenységének, sokoldalúságának, gyors átfutásának és megnövelt felbontásának. Ezenkívül a glikozilációval és más PTM-ekkel (poszttranszlációs módosulás) kapcsolatos további információk is beszerezhetők tömegspektrométeren keresztül egyetlen mérés alatt [34]. Az évek során számos MS-platform bukkant fel analitikai hasonlóság-értékelő vizsgálatokban, amelyeket elsődleges szerkezetanalízisre használtak. Ilyen többek között a fordított fázisú, nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával kapcsolt elektropray ionizációs tömegspektrometria (RP-HPLC-ESI-MS), illetve a mátrix segített lézerdeszorpción alapuló ionizációval kapcsolt tömegspektrometria (MALDI-MS). Ezen

platformok hatalmas előnye, hogy a felhasználók számára a kívánt hasonlóságértékelési problémák megoldásához különböző felbontást és érzékenységet lehetővé tevő analizátor típusokkal szerelve érhetőek el, a vizsgálandó minta típusára specializálva. Legelterjedtebb fajtái az ioncsapda (IonTrap), Orbitrap, repülési idő (TOF), és ezek kvadrupóllal (Q) hibridizált változatai (Q-Trap, Q-Exactive, Q-TOF) [20].

3.3.2 Másodlagos szerkezet

Biohasonlósági vizsgálatoknál szekunder szerkezeti elemek azonosítására a legelterjedtebb módszerek a távoli ultraviola (180-260 nm) cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia [35, 36] és a Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR) [16, 37].

3.3.3 Harmadlagos szerkezet

A háromdimenziós szerkezetek tanulmányozására jól bevált és elterjedt módszerek a közeli UV-CD (250-300 nm) és a fluoreszcencia (FLR) spektroszkópia. A biohasonlósági vizsgálatok során ezt a két technikát külön-külön vagy egymással kombinálva alkalmazzák [38, 39]. Fontos megemlíteni, hogy a fehérjeszerkezeti vizsgálatok hagyományos módszere a röntgen krisztallográfia (XRC), ennek hátránya azonban, hogy kizárólag kristályosítható fehérjékre alkalmazható, költséges berendezéseket igényel, valamint sokáig tart az analízis [40]. Biohasonlósági vizsgálatok során magasabbrendű szerkezetek összevetésére további ígéretes technika a mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR) [41, 42].

3.3.4 Negyedleges szerkezet

Negyedleges szerkezet tanulmányozásakor a konformációs stabilitást az entalpia változásának nyomon követésével mérik, amely a molekula fizikai-kémiai tulajdonságainak megváltozása miatt következik be, a hőmérséklet és/vagy az idő függvényében. Hagyományosan a változó hőmérsékletű cirkuláris dikroizmussal (VT-CD) végzett termikus denaturációt használják a konformációs stabilitás, valamint a fehérje feltekeredési mechanizmusok tanulmányozására [43, 44]. Egyre népszerűbb technika továbbá a differenciális pásztázó kalorimetria (DSC), mint gyors és érzékeny eszköz a termodinamikai stabilitás és a termikus kibontakozási mintázat mérésére, ahol a konformációs változások egy vagy több fehérjedomén jellegzetes olvadási hőmérsékletének változásaiként tükröződnek [17, 45].

3.4 N-glikánok és glikoproteinek bioszintézise

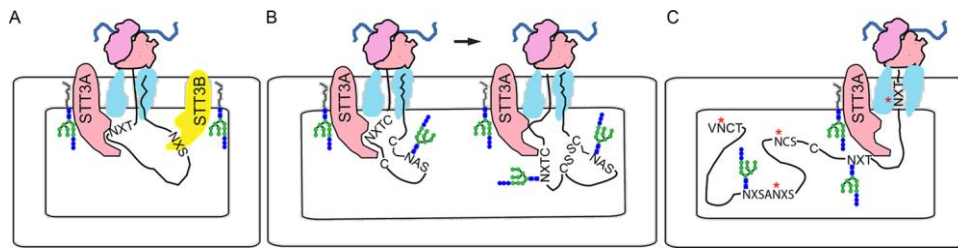
Az N-glikánok bioszintézise két lépésben valósul meg az eukarióta sejt két különböző kompartmentjében: az endoplazmatikus retikulumban (ER) és a Golgi-készülékben. Az első egy erősen konzervált folyamat, mely az ER membrán dolikol-foszfát (Dol-P) lipidjének segítségével megy végbe. A glikán a Dol-P-ról kerül a fehérjére a translációs lépésben, amelyet a glikotranszferázok katalizálnak. A második fázis az N-glikánok glikozidázokkal és glikotranszferázokkal való feldolgozása az ER lumenjében, majd a Golgi-apparátusban folytatódik faj-, sejtípus-, fehérje- vagy akár helyspecifikus módon [46].

Az N-glikánok kovalensen kötődhetnek azon szekretált illetve membránba ágyazott glikoproteinekhez, melyek tartalmazzák a konzervált Asn-X-Ser/Thr szekvenciát, ahol „X” tetszőleges aminosavat jelöl (ez alól kivételt képez a prolin). A fehérjék mintegy 70%-a tartalmazza ezt a kitüntetett szekvenciát és ezeknek kb. 70%-ához kapcsolódnak ténylegesen N-glikánok. Az N-kötött cukrok aszparaginhoz való kapcsolása az endoplazmatikus retikulum lumenáris oldalán történik meg a fehérje reorientációja alatt vagy után [46]. A polipeptidek N-glikozilációját hetero-oligomer oligoszacharidtranszferáz (OST) katalizálja, melynek különböző izoformái eltérő katalitikus alegységekkel (STT3A és STT3B) és enzimazikus tulajdonságokkal bírnak (3. ábra). Ezek az izoformák egymást kiegészítve működnek az N-glikoziláció során. Amikor a naszcens polipeptid lánc belép az ER lumenjébe az STT3A felelős annak kotranszlációs glikozilációjáért. Ehhez az STT3B szintén nélkülözhetetlen. Lényeges különbség az STT3A-hoz képest, hogy hatékonyan közvetíti a kitekeredett fehérje C-terminális végének poszttranszlációs glikozilációját is, amire az STT3A nem képes [47].

Tehát, az OST feladata, hogy a DER (durva felületű endoplazmatikus retikulum) lumenjében lipidhez kötött Dol-P-hez kapcsolódó oligoszacharidokat a megfelelő N-glikozilációs szekvencia aszparaginjához szállítsa. Régóta ismert tény, hogy az oligomannóz struktúra kotranszlációs mechanizmusokkal kerül a naszcensz polipeptidre amint a konszenzus szekvencia belép a DER lumenjébe, áthaladva a fehérje transzlokációs csatornán [47, 48]. A fehérjén lévő glikozilációs akceptor helyek akkor

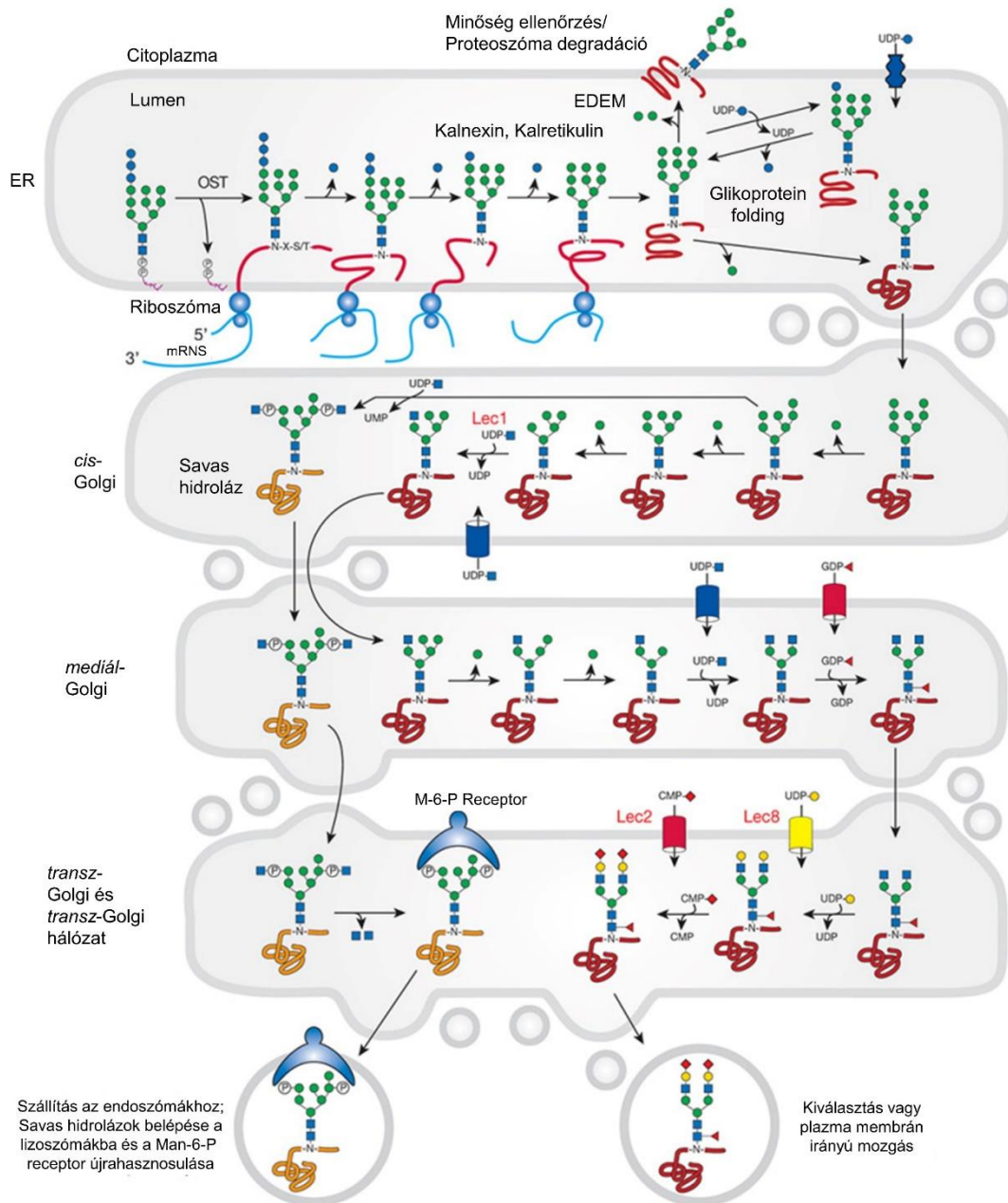
válnak hozzáférhetővé az OST aktív helye számára, amikor 65-75 aminosav hosszúságnak megfelelő fehérjerész van a szekvencia és a nagy riboszóma alegység peptidil transzferáz kötőhelye között. Emellett a C-terminális vég felé haladva csökken az Asn-X-Ser/Thr szekvenciáknál az oligoszacharidok hozzáadása. Ez azzal magyarázható, hogy gyorsabban halad el az OST aktív helye mellett a lánc irányultságát követve, következésképpen ezek a

helyek poszttranszlációs módon módosulnak, miután már a teljes fehérje átjutott az ER lumenjébe [49-51].



3. ábra: Fehérjék kotranszlációs glikozilációja: A) Az STT3A komplex közvetlen összeköttetésben van a fehérje transzlokációs csatornával, így folyamatosan pásztázva a növekvő polipeptid láncot glikozilációs helyeket keresve. Az STT3B ugyan egy távolabb eső pozícióban helyezkedik el, azonban képes ko- és poszttranszlációs mechanizmusokkal módosítani a kihagyott glikozilációs helyeket. B) A naszcens polipeptid kotranszlációs pásztázása hatékonyabb glikozilációt tesz lehetővé a cisztein-gazdag régiókban még mielőtt az oldalláncok között kialakuló diszulfid hidak kialakítanák a negyedleges szerkezetet. C) Piros csillag jelzi az STT3A által kihagyott glikozilációs helyeket. [52]

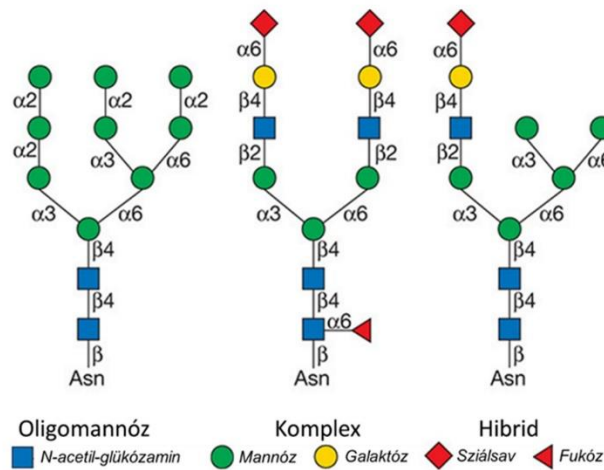
Jelenlegi tudásunk szerint a citoplazma és a sejtmag fehérjéi nem glikoziláltak, de még a transzmembrán fehérjék citoplazmatikus oldalai sem, kizárólag az ER lumenhez hozzáférő Asn-X-Ser/Thr szekvenciához kötődhetnek N-cukrok. Emellett, az aszparagin és szerin között elhelyezkedő aminosav is befolyásoló tényező, például a savas karakterű aminosavak, mint az aszparaginsav és a glutaminsav csökkentik annak hatékonyságát.



4. ábra: Glikoproteinek N-glikozilációjának útvonala: Az ER-ban $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ struktúrák kotranszlációosan kapcsolódnak a fehérjéhez, majd három Glc és egy Man eltávolítása mellett feltekeredik a fehérje. A cisz-Golgi ciszternába jutva néhány mannóz eltávolításával az $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ szerkezet alakul ki. A mediális Golgi ciszternában jön létre az N-glikánok első elágazása, majd a transz-Golgi ciszternában a biantennáris N-glikánok kiegészülhetnek fukózzal, galaktózzal, illetve szíálsavval, így komplex szerkezeteket hozva létre [46].

Az N-kötött glikánok kovalensen kötődnek a fehérje aszparaginjához (Asn) N-glikozidos kötéssel keresztül. Habár prokariótákban az Asn-hoz különböző cukrok kötődnek, eukarióta

szervezetekben az N-glikánok mindig egy ún. "core" (Man α 1-3(Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn-X-Ser/Thr) struktúrával kezdődnek és három csoportba sorolhatók: (1) oligomannóz szerkezetek, ebben az esetben kizárólag Man monomerek kapcsolódnak a core-hoz, (2) komplex stuktúrák, amikor a GlcNAc monomerek által kezdeményezett „antennák” további cukor monomerek - úgymint N-acetil-glükózamin, galaktóz, fukóz és szíálsav - hozzáadásával hosszabítják meg a core szerkezetet, illetve a core struktúra fukozilált is lehet, valamint (3) hibrid szerkezetek, amikor a Man α (1-6) karhoz további mannózek szintetizálódnak, míg a Man α (1-3) karhoz a 2-es pont alatt felsorolt cukrok



5. ábra: Az N-glikánok típusai: oligomannóz, komplex és hibrid cukorszerkezetek. Mindegyik típus ugyanazzal a Man₃GlcNAc₂Asn core struktúrával rendelkezik: A cukromonomerek egymáshoz α - és β -glikozidos kötéssel kapcsolódhatnak a monomer anomer szénatomjain keresztül [46].

3.5 Szerkezeti variabilitás

A fehérjék gyakran különböző N-glikánok egész skáláját tartalmazzák egy adott Asn-X-Ser/Thr szekvencián, amely általában a glikánok heterogenitásához vezet. Amennyiben egy molekulán több ilyen szekvencia is található, előfordulhat, hogy egy specifikus részén eltérő N-glikánok fejeződnek ki, ezt a sajátosságot hívjuk a glikoprotein mikroheterogenitásának. Azokat a glikoproteineket, amelyek csak N-glikozilációjukban térnek el egymástól, glikoformáknak nevezzük. A fehérjéhez kapcsolódó cukrok variabilitása függ: (1) a fehérje aktuális konformációs állapotától, hiszen az befolyásolja a Golgi enzimeinek hozzáférését a glikozilációs helyhez, (2) a nukleotid cukor metabolizmustól, (3) ez ER és Golgi membránjain

való átjutás fluxusától, illetve (4) az Asn-X-Ser/Thr szekvencia transzmembrán doméntól való közelségétől [46].

3.6 N-glikánok funkció-struktúra viszonya

A glikánok biológiai funkciói rendkívül széles skálát ölelnek fel az egészen egyszerűektől (pl tápanyagok raktározása) a létfontosságúakig az őket szintetizáló szervezet fejlődése, növekedése, fenntartása vagy túlélése szempontjából. Számos glikán esetében a specifikus funkciók jelenlegi ismereteink szerint még nem nyilvánvalóak. Ugyanazon glikánnak különböző funkciói is lehetnek attól függően, hogy melyik aglikonhoz (fehérjéhez vagy lipidhez) kapcsolódik. Az évek során számos elmélet született a glikánok biológiai szerepéről. Ez nem meglepő, figyelembe véve a természetben található glikánok bőségét és óriási diverzitását [53]. Biológiai szerepük szerint három fő funkciójuk van: (1) szerkezeti és modulátori szerep, (2) külső molekulafelismerés (amikor egy másik szervezet glikánjait ismeri fel), illetve (3) belső molekulafelismerés (amikor ugyanabból az organizmusból származókat) [53, 54].

Az N-glikánok szerkezeti és modulátori szerepei közé tartozik fehérjék feltekeredésére és működésére, valamint a makromolekulák vízdoldhatóságára gyakorolt hatásuk. Ezenfelül képesek védelmet biztosítani a proteázoktól, befolyásolják a membrán receptorok jelátvitelét, megakadályozhatják az immunrendszer által történő felismerést [53, 54]. Az N-kötött cukrok elágazásainak gyakorisága kihat az egész glikoprotein funkciójára. Az N-glikánok mérete, száma, elágazása és szialilációjának mértéke egyetlen polipeptid számos glikoformáját hozhatja létre, ugyanakkor az elágazások mértéke, a glikoziláció természete és a szialiláció modulálja egyes citokinek receptorokkal való kölcsönhatását megváltoztatva a keringésből való kiürülés sebességét [55]. Ezenfelül az effektor funkciókra gyakorolt hatásukat a 3.7. fejezetben fejtem ki.

Külső molekulafelismerés esetén a szerkezeti specifitás kiemelten fontos. A vírusok, fágok, baktériumok, paraziták, és toxinok a glikánokat specifikusan felismerik, majd hozzájuk kötődnek. Tekintettel a kórokozók gyors evolúciójára és a folytonos szelekcióra, az érintett glikánok szekvenciája jellemzően kiváló felismerési specifitást mutat. Például a vírusok és toxinok jelentős része specifikusan felismeri a gazdaszervezet szialsav típusát, annak módosulásait és glikozidos kötését a mögöttes cukorláncához. A glikánok ezen funkciói tekintetében aligha kétséges a szerkezeti specifitás fontossága [53]. Belső molekulafelismerésnél antigén epitópként immunválaszt válthatnak ki, illetve hatással vannak az intracelluláris glikoproteinek feltekeredésre és degradációra is [54]. Fontos megjegyezni

azonban, hogy a glikánok (beleértve az O-glikánokat) még számos további funkcióval bírnak, jelen fejezetben azonban az N-glikánok legfontosabb, a téma szempontjából releváns szerepeire próbáltam fókuszálni.

3.7 Bioszimilárisok glikozilációjának szabályozása a gyártás során

A legtöbb rekombináns fehérje készítmény (pl. monoklonális antitestek, fúziós fehérjék, stb.) beleértve a biohasonló gyógyszereket is, általában glikolizált. Ezért a glikoziláció kritikus minőségi attribútum, amely alighanem az egyik legnagyobb kihívást jelentő bioszimilitást befolyásoló jellemző. A bioszimilárisok glikozilációja erősen befolyásolhatja a készítmény biológiai aktivitását, a stabilitását, a farmakokinetikai profilját, felezési idejét, effektor funkcióit és immunogenitását [21, 56]. A glikozilációnak kiemelt jelentősége van a monoklonális antitestek két fő effektor funkciójára, az antitest-függő sejt közvetített citotoxicitásra (ADCC) és a komplement függő citotoxicitásra (CDC). Például a terminális galaktóz (Gal), az N-acetil-glükózamin (GlcNAc) és a mannóz (Man) végek a CDC aktivitást befolyásolják a C1 fehérjekomplex C1q doménjéhez való kötődésen, vagy annak hiányán keresztül. A terminális szialsav, mannóz, a core-fukóz (Fuc) és kettéágazásnál lévő GlcNAc az FcγIIIa receptorhoz való kötődést befolyásolva az ADCC funkcióra hatnak. Emellett a terminális mannóz jelentősen csökkentheti a készítmény szervezetből való kiürülési idejét, míg a terminális szialiláció serkenti a gyulladáscsökkentő funkciókat [57-59].

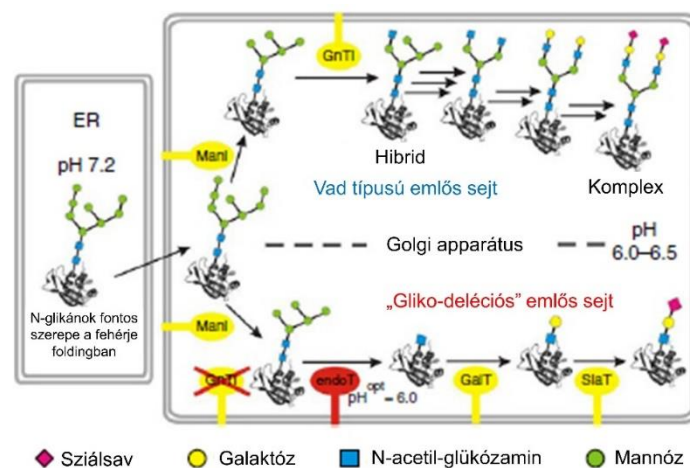
Számos terápiás monoklonális antitest hatásmechanizmusának alapja az ADCC funkció, nevezetesen: anti-Her2 trastuzumab (Herceptin®), infliximab (Remicade®), anti-CD20 rituximab (Rituxan®), és anti-RhD (HyperRHO®). Sokak szerint az ADCC aktivitás növelése az egyik legígéretesebb mód a már jóváhagyott terápiás fehérjék hatékonyságának növelésére. Az ADCC aktivitás az Fc fragmenszen található aminosavak módosítása mellett, a core-fukóz eltávolításával is növelhető. Ez utóbbi azért is előnyös, mert nem okoz olyan konformációs változást, amely megváltoztatná más biológiai funkcióit, ezáltal nincs hatással a CDC-re, illetve az antigén kötődését sem befolyásolja. Az IgG1 típusú monoklonális antitestek Fc régióján található, biantennáris, nem core-fukozilált oligoszacharidok a többi glikoformához képest kiemelt ADCC serkentő aktivitással rendelkeznek. Az ilyen jellegű, állandó minőségű cukormintázat létrehozása azonban komoly kihívás elé állítja a gyártókat. Nem core-fukozilált antitestek előállítására kiváló alternatíva lehet olyan sejtvonalak alkalmazása, amelyekben a FUT8 (α-1,6-fukoziltranszferáz) gént eltávolítják, mint például a CHO (chinese hamster ovary) sejtek fukoziltranszferáz-deficiens Lec13 variánsa [57, 60].

A konzervált Fc régió levő N-kötött cukorszerkezetek végéhez szialsavat kapcsolva az IgG antitest gyulladáscsökkentő mediátorokba jut, így csillapíthatók az autoantitestek okozta gyulladások [60]. Továbbá fontos megemlíteni az oligomannóz sturktúrákat, amelyek szintén jelentős hatást gyakorolhatnak a terápiás antitestek farmakokinetikai tulajdonságaira, különös tekintettel a felezési időre. Goetze és mtsai szerint a nagy mannozilált oligoszaccharid tartalommal rendelkező monoklonális antitestek hamarabb ürülnek a szervezetből, mint más glikoformák, éppen ezért az ilyen szerkezetek mennyiségre kiemelt kritikus minőségi jellemzőként kell tekinteni [58, 61]. Az $\alpha(1,3)$ -galaktózra, $\beta(1,2)$ -xilózra, $\alpha(1,3)$ -fukózra, és az N-glikolil-neuraminsavra (Neu5Gc) végződő N-glikánok igen kedvezőtlenül befolyásolják a monoklonális antitestek immunogenitását és biztonságosságát, így ezeket szigorúan ellenőrizni kell a gyártás minden egyes lépése során, ezért is tekintünk a glikozilációra, mint CQA-ra [62-65]. Például, ha az adott glikoprotein hatásmechanizmusa az ADCC aktivitáson alapul, akkor kiemelt minőségi jellemzőként a core-fukozilációt választják, míg CDC esetében a galaktozidációt vagy szialilációt monitorozzák CQA-ként. A gyártás során különböző sejtvonalak használata növeli a terápiás fehérjéhez kapcsolódó glikánszerkezetek mikroheterogenitását, ennek azonban kritikus következményei lehetnek az effektor funkciókra nézve. Az Fc régió glikozilációja és a kapcsolódó effektor funkciók közötti összefüggés, illetve a gyógyszer klinikai aktivitásának kérdése a glikozilációval kapcsolatos kritikus minőségi paraméterek (gCQA) gondos analizését és jellemzését a monitorozás kiemelt sarokpontjává teszik. A vizsgálatok során kapott információk segítenek a terápiás antitestek glikozilációs profiljának finomhangolásában [62].

A jelenleg jóváhagyott terápiás antitesteket emlős sejtek segítségével állítják elő, amihez CHO (chinese hamster ovary), HEK (human embryonic kidney), NS0 (egér myeloma) vagy SP2/0 (egér hybridoma) sejtvonalakat használnak. A kiválasztott sejtvonal szignifikánsan befolyásolja az expresszált fehérje glikozilációs mintázatát, ugyanakkor aminosav szekvenciája és a glikoziláció helye változatlan marad [66, 67].

Ezzel szemben a nem-emplős sejt expressziós rendszerek számos előnnyel bírnak, többek között nagyobb hozamot tudnak produkálni, fenntarthatóságuk egyszerű és olcsó az emlős sejtekhez képest. Alkalmazásuk azonban korlátokba ütközik, hiszen a glikozilációs gépezetük korlátozott, ami immunogén struktúrák expressziójához vezethet. Nem-emplős sejtek humanizálására ígéretes megoldást nyújthatnak a glikomérnökség eszközei, úgy mint a génkiütés, egyes enzimek túlexpresszálása illetve, a genom módosítása RNS-közvetített CRISPR-Cas9 nukleáz rendszerrel. Utóbbi esetben a Cas-9 enzim a célszekvenciánál hasítja a DNS-t, így beindítja a sejt javítómechanizmusát, amely így a javításhoz egy mesterséges

templátot fog használni, amelynek eleje komplementere a javítandó szekvenciának. A templát az egyes komplementer szakaszok között a bejuttatni kívánt szekvenciákat is tartalmazza, így azok szintén beépülnek a DNS-be [68, 69]. Megemlíteném továbbá a GlycoFi technológiát, amely humanizált *Pichia pastoris* élesztősejteket használ, így lehetővé téve humán glikoproteinek előállítását megfelelő komplex N-kötött oligoszacharidokkal is, az élesztőknél megszokott oligomannóz struktúrák mellett [70]. Ráadásul a GlycoFi segítségével előállított terápiás glikoproteinek cukormintázata hasonló egyes emlős CHO és NS0 sejtek által termelt fehérjék cukormintázatához. Ezért a GlycoFi alkalmazása vonzó megoldás lehet humanizált glikoproteinek ipari mennyiségben való előállítására, az emlős sejtekhez képest alacsonyabb költségek mellett. Egy másik alternatíva a GlycoDelete technológia, amely a kapcsolódó cukrok heterogenitását és komplexitását hivatott csökkenteni, mivel az gondot jelenthet egyrészt a tisztítási lépéseknél, másrészt pedig a reprodukálhatóságban. Ez a fajta összetettség a Golgi-készülékben lejátszódó többlépéses glikánszintézisre vezethető vissza. Azonban, ha kiütjük a GnT I enzimet (N-acetil-glukózamin-transzferáz I) kódoló gént, akkor megakadályozható, hogy a core-struktúrához további GlcNAc monomerek kapcsolódjanak. Ezzel párhuzamosan, ha túlexpresszáljuk az endoT enzimet (endo-N-acetil- β -D-glukózaminidáz), akkor az a core-szerkezeten belül a két GlcNAc monomer között hasít, melynek eredményeképp egyetlen GlcNAc fog kapcsolódni, melyhez galaktozil-transzferázok és szialil-transzferázok segítségével további monoszacharidok kapcsolhatók, melyek az eredeti emlős sejtek cukorstruktúráihoz képest jelentősen egyszerűbbek [71, 72].



6. ábra: A GlycoDelete technika sematikus ábrája. A GnT I enzim kiiktatásával és ezzel párhuzamosan az endoT enzim túltermelésével az emlős sejtekhez képest jelentősen egyszerűbb cukorszerkezetekhez jutunk [71].

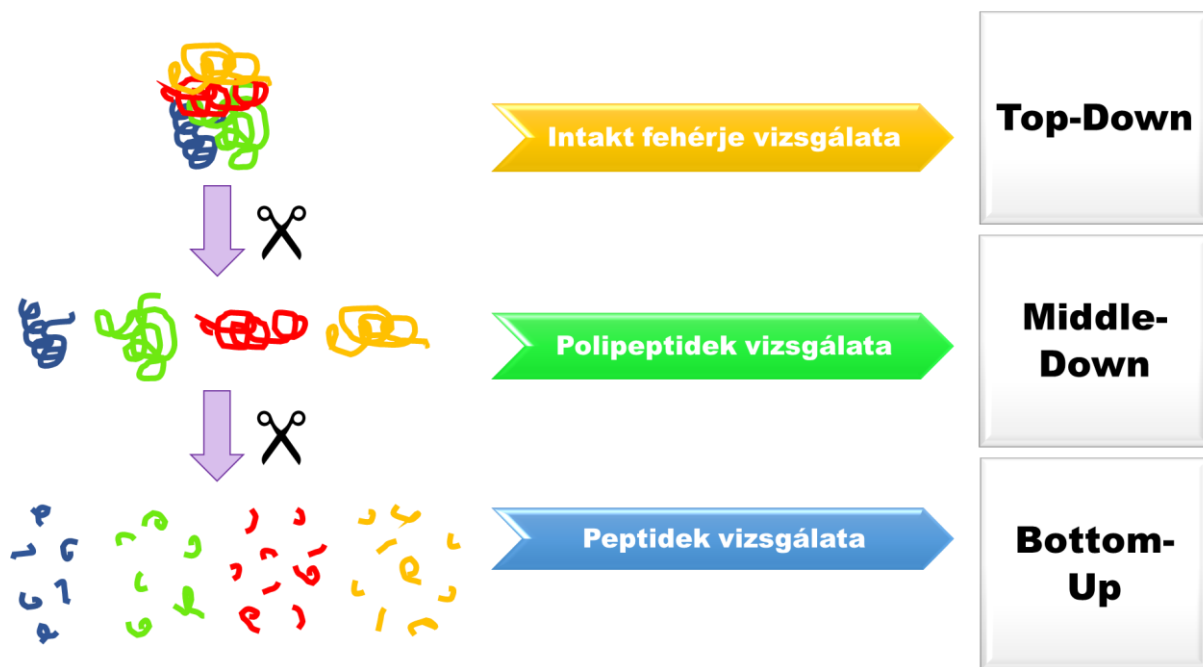
A matematikai alapokon nyugvó prediktív glikomanipuláció szintén hasznos lehet a bioszimiláris gyógyszerek fejlesztése során. Például a glikoziláció Markov-modelljét alkalmazó számítási módszer megjósolja azokat az enzim, tápanyag és inhibitor mennyiségeket, amelyek a reakcióba való beavatkozáshoz szükségesek, hogy a speciális glikánprofil megkaphassuk [73]. Egy lehetséges opció lehet a Brühlmann és mtsai által kifejlesztett, párhuzamosokon alapuló kísérleti terv megközelítés. Ezt a módszert használva 17 glikozilációt moduláló tápközeg komponensét öt csoportra osztottak biológiai hatásuk szerint. Az öt párhuzamos kísérletet 96-os plate-ekben CHO sejtek rátáplálásos tenyésztésével valósították meg különböző tápanyagösszetételek mellett, majd ezekből kiválasztották a legjobb glikozilációs modulátorokat többváltozós analízis, főkomponens analízis és döntésfák felállításának segítségével. Ezzel a módszerrel a legnagyobb mértékben a fukozilációt és a galaktozidációt tudták befolyásolni [74].

A biológiai készítmények előállítására számos, egymásra épülő lépésből tevődik össze. Először a kívánt gént klónozó vektoron keresztül a megfelelő gazdasejtbe juttatják (pl. *E. coli*, CHO, NS0, élesztő), majd bioreaktorban termeltetik vele a célfehérjét, amelyet tisztítanak, majd csomagolnak [74]. Ezen lépések során számos olyan meghatározó paraméter van, amelyek hatással lehetnek a biológiai gyógyszer glikozilációs mintázatára: az alkalmazott sejtvonal, a sejtek növekedési fázisa, tápanyaghozáférhetőség, oldott oxigénszint, tápanyagok összetétele, pH, hőmérséklet és a tenyésztési mód [75]. Emellett az elhalt sejtekből felszabaduló szialidázok és más glikozidázok lebonthatják a már létrejött cukorstruktúrákat [76]. Ezen felül a downstream műveletek során, a tisztítási lépéseknél is szelektíven módosulhatnak, ezért az egyes sarzsok variabilitásának vizsgálata kiváló indikátora az alkalmazott folyamatok megbízhatóságának ellenőrzésére.

3.8 Az N-glikozilációs mintázat nyomonkövetése analitikai módszerekkel

Az N-kötött szénhidrátokat rendszerint a fehérjéről való eltávolítás után folyadékkromatográfiával (LC) vagy kapilláris elektroforézissel (CE) választják el. A detektálás javításának érdekében, az elválasztott cukrokat UV aktív vagy fluorofór ágenssel jelölik meg. Folyadékkromatográfia esetében az elválasztás alapja az analitikum megoszlása a mozgó és az álló fázis között, leggyakoribb formája a hidrofil interakciós kromatográfia. Ezzel szemben CE-nél az elválasztás mozgatórugója a molekulák eltérő elektroforetikus mobilitása, amely összefügg azok töltésével, méretével és formájával [77-79], amihez viszont töltéssel rendelkező derivatizációs ágenszt kell használni. Terápiás fehérjék N-glikozilációs analízise

négy szinten lehetséges: 1) intakt fehérje, 2) fehérjealegység, 3) glikopeptid és 4) felszabadított glikánok szintjén [76, 77, 80].



7. ábra: A fehérjék poszttranszlációs modosulásainak tanulmányozását célzó analitikai szintek vizuális összefoglalása: A *top-down* megközelítés esetén közvetlenül az intakt fehérjét vizsgálják, míg az ún. *middle-down* technikáknál proteolitikus hasítást követően történik meg az analízis. Az így kapott polipeptidek további hasításával kisebb peptidek vizsgálatát *bottom-up* mérés technikának nevezzük [81-83].

Az intakt fehérje vizsgálható tömegspektrométerrel (MS) közvetlenül vagy kapcsolt módszerekkel pl. folyadékkromatográfiával (LC-MS) vagy kapilláris elektroforézissel (CE-MS). Intakt fehérje analízisével fontos információk nyerhetők a moláris tömegről a fehérje glikozilált és deglikozilált formáját összehasonlítva, így a tömegkülönbségekhez specifikusan hozzárendelhetők az egyes glikorformák vagy proteoformák [80, 84, 85].

A glikoprotein alegységek szintjén először endopeptidázzal (pl. IdeS) lehasítják a nehézláncok csuklós régió alatti részét, így létrehozva az $F(ab')_2$ és az $Fc/2$ alegységeket. Majd a diszulfid hidak redukálását követően a $F(ab')_2$ két további részre hasad, míg végül három antitest alegységet kapunk: L_c , F_d és $Fc/2$ [86]. Ezen glikoprotein alegységek LC-MS-sel (folyadékkromatográfia tömegspektrométerrel) vagy CE-MS-sel történő analízise lehetővé

teszi a glikánok feltérképezését, a töltéseloszlás és a különböző glikoformák eloszlásának tanulmányozását [86-88].

Proteolitikus emésztéssel a glikopeptid fragmentumok még pontosabb glikomikai analízise érhető el, azok makro- és mikroheterogenitásról is lényeges adatok nyerhetők, amelyek a készítmény biztonságosságáról és hatékonyságáról árulkodnak. A glikopeptid szintű megközelítés gyakori választás, ha az adott glikoprotein több helyen is glikozilált. Ehhez általában LC, CE vagy MS, valamint tandem MS (LC-MS/MS vagy CE-MS/MS) technikákat alkalmaznak. Utóbbiak kiválóan alkalmasak arra, hogy mélyebb strukturális információt nyerjünk a különböző glikoformákról. [78, 84, 89-93].

A harmadik megközelítés esetén a glikánokat kémiai vagy enzimatis úton hasítják le a peptidről, majd fluorescens festést követően LC-vel vagy CE-vel mérik, mely opcionálisan kiegészülhet tömegspektrométeres dektektálással. Exoglikozidázos szekvenálással a glikánok olyan finom részletei válnak megismerhetővé, mint a kötések irányultsága vagy a helyzeti izomerek elkülönülése [77, 79, 84, 94]. Mivel a lehasított cukrok nem rendelkeznek sem kromofór, sem pedig fluorofór csoporttal, ezért a szénhidrátokat fluorofór ágenssel jelölik. Ez kapilláris elektroforézis esetében nem csak a detektálás szempontjából előnyös, hanem azért is, mert az extra töltések az elektromigrációt is biztosítják [78, 95-99]. Az elválasztott cukrok gyors azonosítását és szerkezeti felderítését általában GU (Glucose Unit) alapú számítással végzik, melynek során az egyes cukrokhoz tartozó migrációs időket egy oligoszacharid létrához normálják. Az így kapott GU értékekhez tartozó szerkezetek nyilvánosan is hozzáférhető adatbázisokban (pl. www.GlycoStore.com) kikereshetők. A kalkuláció egyszerűsítése és pontosítása érdekében különböző cukor standardokat – pl. *bracketing standard*-et - használó megközelítések használhatók [100]. Napjainkban azonban létezik olyan megközelítés is, amely a GU kalkulációhoz nélkülözi a maltooligoszacharid létrát, mivel virtuális létrával számol három hozzáadott belső standard (maltóz, maltotrióz, maltopentadekaóz) migrációs idejéből [101].

3.8.1 Folyadékkromatográfia (LC)

3.8.1.1 Fordított fázisú folyadékkromatográfia (RPLC)

Robosztusságának, reprodukálhatóságának köszönhetően, illetve amiatt, hogy analitikumok rendkívül széles köre meghatározható vele a fordított fázisú folyadékkromatográfia (RPLC) az egyik legnépszerűbb LC szeparációs technika [102, 103]. A hidrofíli interakciós kromatográfiához (HILIC) képest viszonylag alacsony a szerves oldószerek és gyenge pufferek

aránya, ami megnyitja az utat érzékeny tömegspektrometriás detektálás felé [92]. Az antitestek abszorpciója és az alacsony visszanyerése ellenére még mindig az egyik legnépszerűbb módszer intakt fehérje, valamint middle-up megközelítésű vizsgálatok esetén [104, 105]. Chan és Flynn RPLC kísérleteik során kimutatták, hogy a savas N-kötött cukrok hamarabb eluálódnak, mint a semlegesek, amelyek általában gyakoriak az antitesteken. Azonban az egyes sztiálsavtartalmú cukrok mennyiségi meghatározása már egy jóval komplexebb probléma. Hibrid típusú szénhidrátok részletesebb analizéséhez az RPLC-t javasolt összekötni MS/MS detektálással [106]. Fontos azonban megemlíteni, hogy az iparban gyakran alkalmazzák még az UPLC-t (ultranagy teljesítményű folyadékkromatográfia) biomolekulák karakterizálására. Vitathatatlan előnye, hogy jelentősen csökkenti az adatgyűjtéshez szükséges időt és jó felbontás érhető el vele, mivel nagyobb nyomást képes elviselni a kisebb részecskeméretnek köszönhetően (gyakran kevesebb mint 2 μm) a HPLC-hez képest. Emellett hatékonyan képes elválasztani a kar-specifikus izomereket, illetve viszonylag könnyen kapcsolható tömegspektrométerrel [84, 107].

3.8.1.2 Hidrofil interakciós kromatográfia (HILIC)

A HILIC az egyik legalkalmasabb módszer poláris komponensek, pl. a cukrok meghatározására. Állófázisként semleges, poláris, vagy ionos felületű tölteteket használnak, mozgófázisként többnyire magas koncentrációjú apoláros, szerves oldószereket, mint pl. az acetonitril [92]. Glikán analizésre a HILIC vált az egyik leggyakrabban alkalmazott módszerré jobb felbontása és magasabb kromatográfiás visszatartása miatt. Ezenkívül cukrok esetében jobb csúcsalakok is érhetők el, mint az RPLC esetében [77]. A HILIC erősen szelektív az antitesteken expresszálandó szénhidrátsoportokra, így több szinten is alkalmas glikánok tanulmányozására. Kiváló technika kisméretű intakt fehérjék vizsgálatára (pl. interferon-béta-1a, rhEPO, ribonukleáz B), csakúgy mint glikopeptidek és lehasított cukrok esetében [108-112]. A közelmúltban versenyképes technikaként jelent meg a HILIC-MS az intakt fehérjék glikoformáinak meghatározására. Kiváltképp alkalmas glikoproteinek analizésére, ha amid-alapú álló fázist kombinálunk ionpár képző ágens (pl. trifluoroecetsav) tartalmazó acetonitril-víz gradiens mozgó fázissal [109, 113]. HILIC-nél az eluálódás sorrendjét hidrofilitás és a polaritás határozza meg [114]. Az intakt fehérjék denaturálásával nem csupán az emésztés hatékonysága növelhető, de csökkenti a lehetőségét annak, hogy a triptikus emésztés során bizonyos cukorstruktúrákkal (pl. oligómannóz, hibrid, α 2,3-szialilált és ún. bisecting glikánok) rendelkező peptidek nagyobb eséllyel hasítódjanak le [115]. A HILIC oszlopok képesek a glikozilált és nem glikozilált peptidek elválasztására, hiszen az utóbbiak előbb eluálódnak

[116]. A lehasított N-kötött glikánok vizsgálatokor HILIC-nél többnyire fluoreszcens detektálást alkalmaznak (HILIC-FLR). A módszer hátránya, hogy a hasonló polaritással rendelkező oligoszacharidokat nehéz elválasztani [117]. Mennyiségi meghatározás esetén a közvetlen MS kapcsolás nem ajánlott figyelembe véve az addukt ionok, illetve a többszörösen töltött ionok hatását a nagyobb polimerizáltsági fokkal rendelkező glikánokra, ami csökkentheti a jelintenzitást [118].

Carillo és munkatársai bevacizumab, infliximab, rituximab és trastuzumab bioterápiás készítményeket vizsgáltak tíz különböző LC-MS módszerrel. A referencia módszer N-glikánok vizsgálatára jelölést követően HILIC volt. A négy bioterapeutikumot a következő módzatok szerint analizálták: intakt tömeg analízis (denaturált és natív állapotban), redukált mAb (könnyű és nehéz lánc analízis), intakt Fc régió, egy láncú Fc analízis (IdeS emésztés alegységekre), triptikus emésztés alapú peptid térkép készítése, illetve fehérjéről lehasított cukrok analízise MS valamint fluoreszcens detektálás segítségével 2-amino-benzoészav (2-AA) vagy 2-amino-benzamid (2-AB) jelölést követően. A módszereket egymással összehasonlítva a 8. ábrán látható mérés-technikai szempontrendszer alapján vizsgálták, és hőtérképen ábrázolták, hogy prioritás szerint az adott feladatra melyik módszer a legalkalmasabb [89].

	Idő	Strukturális azonosítás	Adatminőség	Érzékenység	Minta mennyisége	Szaktudás szüksége
Intakt tömeg RP	Green	Orange	Yellow	Orange	Yellow	Green
Intakt tömeg SEC	Green	Orange	Orange	Orange	Yellow	Orange
Fc régió	Yellow	Orange	Green	Yellow	Green	Yellow
Redukált HC	Green	Orange	Green	Yellow	Green	Red
IdeS alegységek	Yellow	Orange	Green	Yellow	Green	Yellow
Peptid térképezés	Orange	Green	Green	Green	Yellow	Red
N-glikán 2AB FLR	Red	Yellow	Green	Green	Orange	Orange
N-glikán 2AA FLR	Red	Yellow	Green	Green	Orange	Orange
N-glikán 2AB MS	Red	Green	Green	Green	Red	Red
N-glikán 2AA MS	Red	Green	Green	Green	Red	Red

8. ábra: Az egyes analitikai módszerek különböző faktorok szerinti hőtérképes kiértékelése, amely alapján kiválasztható a kinyerni kívánt adatok mélységének megfelelő analitikai módszer Carillo és mtsai munkája nyomán [89]. Az ábrán alkalmazott jelölések magyarázatai: Intakt tömeg RP: intakt tömeg analízis denaturált állapotban fordított fázisú oszloppal; Intakt tömeg SEC: intakt tömeg analízis natív állapotban méretkizárásos kromatográfiás oszloppal (SEC); Fc régió: Fc régió analízise fordított fázisú oszloppal; redukált (HC): nehéz lánc analízise fordított fázisú oszloppal, IdeS alegységek: IdeS emésztést követően mAb alegységek analízise

fordított fázisú oszloppal; Peptide mapping: peptid fragmentumokra törtnő emésztést követő analízis. Végül az utolsó négy esetben a lehasított N-glikánok analízise valósult meg 2-AB, 2-AA jelölést követően fluorescens és MS detektálással.

3.8.2 Kapilláris elektroforézis (CE)

A kapilláris elektroforézis kiemelt ortogonális módszere a folyadékkromatográfiának. Ígéretes analitikai technika, melyet a gyógyszeriparban gyakran használnak minőségügyi ellenőrzésre mivel gyors, hatékony és már kis mennyiségű minta analízisére is alkalmas [119]. Különösen alkalmas glikozilációs hely specifikusság és mikroheterogenitások feltérképezésére, így kiemelt helye van a glikoanalitika eszköztárában [78]. Mitöbb, kapilláris elektroforézissel meghatározhatók N-kötött cukrok, beleértve az α -Gal epitópot is, melynek hosszabb migrációs ideje van, mint a legtöbb semleges vagy szialilált N-glikánnak [63]. Tömegspektrométerrel kapcsolva meghatározhatók vele oligoszacharidok, glikopeptidek és intakt fehérjék is [120-124]. Alapjában véve a CE kétféle módon képes N-glikozilációs analízisre: oldatban vagy géllal töltött kapillárisban [125, 126], közös pont azonban, hogy mindkét esetben az elválasztás alapját az eltérő hidrodinamikai térfogat-töltés arányok képezik. Fontos azonban megemlíteni, hogy géllal töltött kapilláris esetén az analitikum molekulái interakcióba léphetnek szűrő mátrixszal is [127].

CE-MS rendszerrel jól tanulmányozhatók intakt fehérjék poszttranszlációs módosulásai, úgy mint a glikoziláció [128-132]. A módszerben a legnagyobb kihívás, a fehérjék töltéssel bíró részei hozzátapadnak, a kapilláris ellentétesen töltött falához, ezzel csökkentve az elválasztás hatékonyságát [92]. Összefoglaló munkájában Stutz számos megoldást ajánl a jelenség kiküszöbölésére, beleértve a kapillárisok belső felületének borítását, illetve elektrolitokkal való atmoszféra [133].

Az ún. peptide mapping technika során a fehérje molekulákat enzimatikusan peptid fragmentumokra emésztik (általában tripszinnel, vagy ha szükséges más enzimekkel). Kiváló módszer terápiás proteinek elsődleges szerkezetének meghatározására, beleértve az aminosav sorrendet, a szekvencia variánsokat, a glikozilációs heterogenitást és más poszttranszlációs módosulásokat [134]. Glikopeptid analízis szintén megvalósítható CE-MS kapcsolással [135-138], Barroso és mtsai humán transferrin glikopeptidek glikoformáit vizsgálták CE-TOF-MS kapcsolással [135].

A fehérjéről lehasított cukrok CE vizsgálata esetén a glikánok a szükséges töltéseket származékképzés útján kapják meg. A detektálást illetően fontos megemlíteni, hogy a glikánok UV fény abszorpciójára kevésbé képesek. Erre a problémára több lehetséges alternatíva is

rendelkezésre áll. Egyrészt a CE-hez csatolt tömegspektrometriás detektálás, másrészt pedig lehetőség van származékképzés útján az oligoszacharidok fluorescens jelölésére [77]. Az említett detektálási opciókat Harvey összefoglaló munkájában találjuk meg részletesen kifejtve [139]. Tömegspektrometriás detektálással fontos szerkezeti információk nyerhetők, míg a fluorescens módszer szignifikánsan érzékenyebb glikánokra, ugyanakkor további mintaelőkészítési lépéseket igényel [77].

3.9 A glikoszimilaritás értelmezése és a gCQA-k meghatározása

Az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) hangsúlyozza az innovátor és a bioszimiláris gyógyszerek párhuzamos, lehetőleg ortogonális analitikai módszerekkel történő analizését, amennyiben az megvalósítható. Ezért a szimilaritás – jelen esetben a glikoszimilaritás – definiálása egy előre meghatározott, szigorú keretrendszer szerint történik [99]. Azonban két N-glikozilációs profil összevetésénél még mindig kihívást jelent a hasonlóság meghatározása, noha ez az egyik leglényegesebb kérdés glikozilált terapeutikumok esetén [91]. A probléma kiküszöbölésére szolgál a glikoszimilaritási index (GI) bevezetése, amely egy glikoanakitikai és statisztikai alapokon nyugvó módszer, és segítségével két fehérje N-glikozilációs profilja számszerűsíthető és egymással összemérhető. A bioszimilitási index analógiájára megalkotott glikoszimilaritási index kiegészítő minőségi attribútumként szolgálhat a biohasonlóság megállapításakor [91, 99].

A jelen fejezetben bemutatott megközelítés két különböző hasonlóságot értékelő módszer kombinációján és számításán alapul. Az egyik a profil hasonlóság (Profile Similarity Score), melynek értékét úgy kapjuk meg, ha a normalizált elektroferogram (vagy kromatogram) minden egyes adatpontját össze kell hasonlítani a teszt termék előre meghatározott minőségi tartományával, amely már magába foglalja a sarzsok variabilitását is. A másik a kompozíciós hasonlóság (Compositional Similarity Score) elve, melynek során a glikozilációval összefüggő CQA csoportok szintjeit az előre meghatározott hasonlósági tartománnyal hasonlítják össze. A két módszerrel kapott eredmény átlagát véve kapjuk meg a glikoszimilaritási indexet, mely alkalmazható folyamatfejlesztés során az összetett kísérlettervezésnél (DoE – Design of Experiment), például klónszelekciónál hasznos indikátor lehet a referencia és a céltermék N-glikozilációs profiljának összehasonlításakor. Emellett hasznos paraméter hasonlósági vizsgálatok esetén is [99]. A glikoszimilaritási index számolása az alábbi négy fő lépésből áll:

- 1) Referencia sarzsok jellemzése, a cél profil felállítása
- 2) gCQA-k meghatározása, valamint kockázati szintjük besorolása

- 3) gCQA-k osztályozása és tolerancia határuk definiálása
- 4) Profil és kompozíciós hasonlósági ráták megállapítása, GI számítása

A termék glikozilációját nagymértékben meghatározza az adott sejtvonal minősége és genetikai apparátusa. A 1. táblázatban a legfontosabb N-glikánokat gyűjtöttem össze aszerint, hogy az adott sejtvonal milyen mértékben képes annak expresszálnia.

1. táblázat: Specifikus N-glikán struktúrák jelenléte különböző expressziós sejtvonalak esetén [75]. CHO: kínai hörcsög petefészkéből származó sejtek (chinese hamster ovary), BHK: újszülött hörcsög vese sejt (baby hamster kidney), NS0: egér myeloma sejt, SP2/0: egér hybridoma sejt. Neu5Gc: N-glikolil-neuraminsav, bisect. GlcNAc: olyan N-acetil-glükózamin, amely core struktúra elágazásánál lévő mannózhhoz kapcsolódik, α 1,6-core Fuc: a mag struktúrához α (1-6) kötéssel kapcsolódó fukóz, α 1,3-core Fuc: a mag struktúrához α (1-3) kötéssel kapcsolódó fukóz, β 1,6-xilóz: β (1-6) kötéssel kapcsolódó xilóz

N-glikán	CHO	BHK	NS0, SP2/0	Humán	Élesztő
Szialisiláció	++	+	+++	++	-
α 2,6-sziálsav	-	-	+	+	-
Neu5Gc	+	+++	+++	+/- *	-
α 1,3-Gal	-	+	++	-	-
bisect. GlcNAc	-	-	-	+	-
α 1,6-core Fuc	+	+	++	+	-
α 1,3-core Fuc	-	-	-	-	-
β 1,6-xilóz	-	-	-	-	-
Oligomannóz	+	+	+	+	+++

2. táblázat: Oligoszacharid szerkezetek hatása a termék fizikai-kémiai és biológiai tulajdonságaira [99]. Ahol n.d. szerepel, azokban az esetekben nincs meghatározva, vagy nem jelentős az adott N-glikán hatása az adott tulajdonságra. GlcNAc: N-acetil-glükózamin, α 1,3-Gal: α (1-3) kötéssel kapcsolódó galaktóz, bisect. GlcNAc: olyan N-acetil-glükózamin, amely core struktúra elágazásánál lévő mannózhhoz kapcsolódik, Neu5Gc: N-glikolil-neuraminsav, α 1,3-core Fuc: a mag struktúrához α (1-3) kötéssel kapcsolódó fukóz, β 1,6-xilóz: β (1-6) kötéssel kapcsolódó xilóz. PK: farmakokinetika, PD: farmakodinamika.

N-glikán	Biztonság/Immunogenitás	Biológiai aktivitás	Kiürülés (PK/PD)
----------	-------------------------	---------------------	------------------

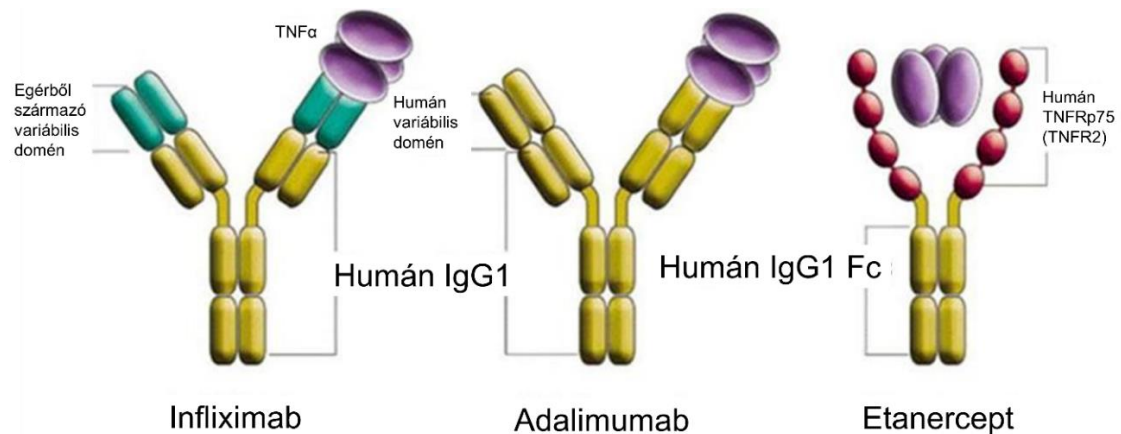
Term. galaktóz	n.d.	+	-
Term. GlcNAc	n.d.	-	-
α 1,3-Gal	--	n.d.	n.d.
Core-fukóz	n.d.	++	n.d.
bisect. GlcNAc	n.d.	+	n.d.
Oligomannóz	n.d.	+	--
Neu5Gc	--	(-)	+
Szialiláció	n.d.	(-)	+
α 1,3-core Fuc	--	n.d.	n.d.
β 1,6-xilóz	--	n.d.	n.d.

Az 1. táblázatban a (+++) a cukrok nagyarányú jelenlétét, a (++) a cukrok jelenlétét, a (+) a cukrok szórványos jelenlétét jelölik, míg (-) azok hiányát demonstrálja. A csillaggal jelölt esetben az adott struktúra jelenléte és hiánya is kimutatható volt az irodalom szerint. A terminális szialiláció a gyulladáscsökkentő folyamatok szempontjából fontos, a Neu5Gc szerkezet pedig immunogén, akár csak az α (1,3)-galaktóz, a β (1,6)-xilóz és az α (1,3)-core fukóz. Az oligomannóz struktúrák meggyorsítják az antitest szervezetből történő kiürülését [61]. A kritikus glikán epitópokat érintő struktúrák hatását a következő szempontok szerint ajánlott értékelni: biztonságosság/immunogenitás, biológiai aktivitás/hatékonyság, illetve felezési idő. A 2. táblázatban az imént említett szempontok szerint csoportosítottam a már korábban tárgyalt cukorstruktúrákat. Jól látható, hogy az α (1,3)-Gal, a Neu5Gc, az α (1,3)-core fukóz és a β (1,6)-xilóz erősen immunogének, ellenben például a core-fukoziláció hiánya kedvezően hat a biológiai aktivitásra az ADCC serkentésén keresztül. Azon cukorepitópoknál, melyeknél n.d. (not determined) jelölés került feltüntetésre, vagy nincs meghatározva, vagy nem jelentős annak hatása az adott tulajdonságra.

3.10 Adalimumab – monoklonális antitest

A Humira® néven forgalomba hozott adalimumab volt az első bejegyzett, teljesen humán TNF-alfa kötő IgG1 antitest, így elenyésző az immunogenitás esélye [140]. 1330 aminosavból áll, tömege mintegy 147 kDa. Kezdetben a rheumatoid arthritis (RA), ma már azonban tíz különböző autoimmun állapot [141], köztük a Crohn-betegség kezelésére is használják. Hatásmechanizmusa az etanerceptéhez hasonló, szintén a TNF-alfa megkötésével gátolja a

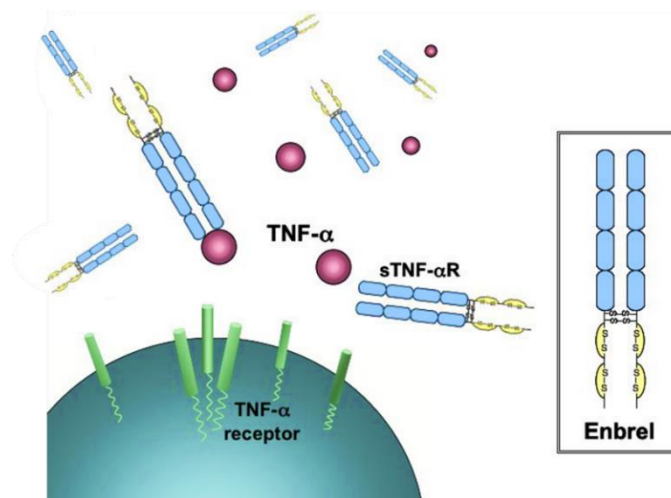
gyulladásos folyamatokat. Fontos különbség azonban, hogy az adalimumab képes lizálni a TNF-et expresszáló sejteket [140, 142].



9. ábra: Különböző TNF-alfa inhibitorok szerkezeti különbségei. Az adalimumab esetében beszélünk egyedül teljesen humán IgG molekuláról, melyet úgy alkottak meg, hogy variábilis doménje képes legyen kötődni a TNF-alfához. Míg az etanercept csupán az IgG-nek Fc régióját használja fel, melyhez TNF-alfa receptorok vannak fúzionáltatva [143].

3.11 Etanercept - fúziós fehérje

Az etanercept az anticitokinek családjába tartozó fúziós fehérje, egy TNF (tumor nekrosis faktor) inhibitor, olyan biológiai gyógyszer, mely egy konzerváltan glikozilált IgG Fc fragmensből és egy TNF-alfa kötő egységből áll amelyet a következő öt gyulladásos állapot kezelésére alkalmaznak: rheumatoid arthritis (RA), plakkos psoriasis (PsO); ízületi gyulladással járó psoriasis (PsA), poliartikuláris juvenilis idiopatiás arthritisz (JIA) és ankylotizáló spondylitis (Bechterew-kór). A TNF olyan citokin, amely a TNF1 és TNF2 receptorokhoz kötődik, melynek révén aktiválja a gyulladásos immunválaszt (10. ábra).



10. ábra: Az etanercept (Enbrel) működésének sematikus ábrája. A fúziós protein megköti a szabad állapotú TNF-alfát, így az már nem tud kötődni a sejtfelszínen lévő receptorokhoz [144] Mivel két p75 TNF receptor van fuzionáltatva a humán IgG molekula Fc régiójához, szerkezeténél fogva képes a szolubilis TNF-alfát megkötni, melynek révén képes megakadályozni a gyulladás kialakulását a bőrön és az ízületekben. Használható önmagában vagy egyéb immunszuppresszánsokkal kombinálva is [145, 146].

A TNF-alfa alegység két N-glikozilációs hellyel rendelkezik illetve egy konzervált N-glikozilációs hely található az Fc régió (Asn297). A két rész egymással egy erősen O-glikozilált linker régió keresztül kapcsolódik (13 hely) [147]. Mivel az etanercept hatásmechanizmusának alapja a TNF-alfa megkötése, ezért az Fc régióhoz kötött oligoszacharidok- mint pl. a szialinsav, core-fukóz, terminális galaktoziláció - glikoszimilaritás szempontjából nem kifejezetten fontos. Mindazonáltal a mannoziláció mértéke fontos információt nyújthat a termék szérumból való kiürülésére vonatkozóan [148].

Munkám során ezen hatóanyag két formáját vizsgáltam, melyek a kereskedelmi forgalomban Enbrel® (innovátor) és Benepali (bioszimiláris) néven elérhetőek.

3.12 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 glikoszimilaritási szempontból,
- (3) Az analízisekhez egy ortogonális módszer alkalmazása a gyógyszeriparban leginkább elterjedt UPLC (ultranagy teljesítményű folyadékkromatográfia) helyett
- (4) A CGE-LIF (kapilláris gélelektroforézis lézer indukált fluoreszcens detektálással) mérésekkel elért eredmények nagy mintaszámra történő adaptálása multikapilláris elektroforézis készülékkel, valamint ehhez egy új glikán adatbázis felállítása

4. Anyagok és módszerek

4.1 Felhasznált anyagok

A munkám során felhasznált bioterapeutikumok a Debreceni Egyetem Orvostudományi Karának nagylelkű felajánlásából származtak. Minden egyes APTS-szel (8-aminopirén-1,3,6-triszulfonsav) jelölt N-glikán könyvtárat (mannózban gazdag szerkezetek, afukozilált biantennáris, fukozilált biantennáris, bi-, tri- és tetraantennáris szialilált könyvtárak, utóbbiak $\alpha(2-3)$ és $\alpha(2-6)$ irányultságú szialsavakkal (Neu5Ac) egyaránt) a Prozyme (Hayward, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) cégtől vásároltunk, csak úgy, mint a szialidáz-A (*Arthrobacter ureafaciens*), β -galaktozidáz (kardbab), β -N-acetil-hexózaminidáz (kardbab) exoglikozidáz enzimeket. A Fast Glycan Sample Preparation and Analysis kit a kaliforniai Beckman (Brea, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) cég terméke, a PNGáz F (peptid-N-glikozidáz F) enzimet pedig a New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) cégtől szereztük be. A mannóz-5 (Man5) standard, a nátrium-cianoborohidrid (1 M tetrahidrofuránban oldva) és a minden más felhasznált vegyszer a Sigma-Aldrich-tól (St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok) származott.

4.2 Módszerek

4.2.1 Az adalimumab minták előkészítése

A minták előkészítéséhez és fluorofórral történő jelöléséhez a Fast Glycan Sample Preparation and Analysis (Beckman, Brea, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) kit-jét használtam. Ennek során 100 μ g-nyi adalimumab denaturálását követően, az aszparaginhoz kötött glikánokat PNGáz F segítségével enzimatis úton lehasítottam. Az így kapott glikánokat mágneses gyöngyök segítségével összegyűjtöttem, és APTS-szel jelöltem. Ezt újabb mágneses gyöngyöket alkalmazó tisztítási lépések követték az alábbi módon:

1. 9 μ L 0.5% NP-40 oldatot teszek a reakcióedénybe (200 μ L PCR cső), majd vortex segítségével összekevertem 10 másodpercig maximális sebesség mellett
2. Ehhez hozzáadtam 150 μ L acetonitrilt, majd vortex segítségével összekeverem 10 másodpercig maximális sebesség mellett
3. A minták 1 percig álltak szobahőmérsékleten

4. A mintákat tartalmazó reakcióedényeket mágneses állványra helyeztem, majd amikor a gyöngyök az edény falához tapadtak (kb. 30 másodperc múlva), a felülúszókat pipetta segítségével óvatosan eltávolítottam

5. Az első négy lépést még háromszor megismételtem 20 μL HPLC tisztaságú víz és 150 μL acetonitril segítségével

6. Az utolsó alkalommal, amikor a felülúszó eltávolításra került, a jelölt cukrokat lemostam a mágneses gyöngyökről úgy, hogy 50 μL HPLC tisztaságú vizet adtam a mintához, majd vortex segítségével összekevertem 10 másodpercig maximális sebesség mellett

7. A mintákat tartalmazó reakcióedényeket mágneses állványra helyeztem, majd amikor a gyöngyök az edény falához tapadtak (kb. 30 másodperc múlva), a jelölt cukrokat tartalmazó felülúszókat pipetta segítségével óvatosan eltávolítottam CE mintatartó edénybe helyeztem

Az így megjelölt cukrok már készen álltak a CGE-LIF analízisre. A fel nem használt, előkészített mintákat -20°C -on tároltam további feldolgozásig.

4.2.2 Adalimumab minták CGE-LIF analízise

Az elválasztást ugyanazzal a berendezéssel (PA 800 Plus Pharmaceutical Analysis System (Beckman, Brea, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) kapilláris elektroforézis szilárdtest lézer indukált fluoreszcens detektálással ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$)) és kondíciókkal végeztem, mint az etanercept esetében. A szeparáció 30°C -on ment végbe 30 kV-os elektromos potenciál mellett. A minták injektálása három lépésben valósult meg: 1) 3 psi, 5 másodperc: víz, 2) 2 kV, 2 másodperc: minta 3) 1 kV, 1 másodperc: bracketing standard (DP2 és DP15). A mérési adatok gyűjtését és feldolgozását a 32 Karat szoftver (Beckman, Brea, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) 10.1 verziójával végeztem.

4.2.3 Etanercept minták előkészítése

Az etanercept innovátor és bioszimiláris verziójának minta-előkészítési procedúrája megegyezett. Mindkét esetben a Beckman által forgalmazott Fast Glycan kitet használtam fel, beleértve az előkészítés folyamán a tisztítási lépésben alkalmazott mágneses gyöngyöket,

illetve az analízis során szintén a kit részét képező 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonsav (APTS) fluorescens ágenst.

Első lépésként az előzetesen bekevert denaturáló mix oldatból adtam 5 μ l-t 100 μ g glikoprotein mintához, majd 10 másodperces kevertetést követően a már korábban felütött 60°C-os fűtő blokkba helyeztem nyitott kupakkal 8 percre. Ennek a lépésnek a célja a fehérje denaturációja volt, annak érdekében hogy a glikozilációs helyek az emésztés során hozzáférhetővé váljanak. Lényeges különbség a Beckman protokolljához képest, hogy a másneses gyöngyöket ebben a lépésben még nem adtam a mintához, azokat csupán a tisztítási lépésben használtam fel.

Annak érdekében, hogy a glikoproteineken lévő cukrokat leválasszam a fehérjékről, a mintákat peptid-N glikozidáz F (PNGáz F) enzimmel történő emésztésnek vetettem alá. Az emésztőoldat mintánként 5 mU enzimet tartalmazott, ahol 1 U az az enzim mennyiség, amely ahhoz szükséges, hogy az N-kötött cukrok leválásait katalizálja 1 μ mol denaturált ribonukleáz B-ről 1 perc alatt, 37°C-on, 7.5 pH mellett. Jelen esetben ez 12 μ l volt. Az enzim hozzáadását követően a minták nyitott kupakkal 20 percre 60°C-os termoblokkba kerültek. A 20 perc letele után a kupakokat lezártam, majd 10 másodpercre maximális sebességen vortexszel megkevertettem. A reakciót végül 200 μ l acetonitril hozzáadásával állítottam le.

Eután következett a lehasított szénhidrátok fluorescens jelölése APTS-szel, majd a felesleges festéket egy újabb mágneses gyöngyös tisztítási lépéssel távolítottam el úgy, ahogy azt a 4.2.1 fejezetben, az adalimumab minták előkészítésénél részleteztem.

4.2.4 Etanercept minták CE-LIF analízise

Minden elválasztáshoz a PA 800 Plus Pharmaceutical Analysis System (Beckman, Brea, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) kapilláris elektroforézist használtam szilárdtest lézer indukált fluorescens detektálással (λ_{ex} = 488 nm / λ_{em} = 520 nm). Továbbá 20 és 50 cm effektív hosszúságú, 50 μ m belső átmérőjű bare fused silica kapillárist (EZ-CE cartridge-ba ágyazva) alkalmaztam, melyet HR-NCHO (nagy felbontással N-kötött szénhidrátok elválasztására szolgáló szeparációs közeg) géllal (Beckman, Brea, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) töltöttem meg. Fordított polaritású elválasztás módban 30 kV elektromos térerősséggel 30°C-on, illetve 15–55°C hőmérséklet gradiens alkalmazása mellett ment végbe a szeparáció. A minták injektálása három lépésben valósult meg: 1) 3 psi, 5 másodperc: víz, 2) 2 kV, 2 másodperc: minta 3) 1 kV, 1 másodperc: bracketing standard (DP2 és DP15). A mérési adatok gyűjtését és feldolgozását a 32 Karat szoftver (Beckman, Brea, Kalifornia, Amerikai Egyesült

Államok) 10.1 verziójával végeztem. A glikán struktúrák azonosítása GU értékük alapján történt a szoftver beépített adatbázisának segítségével. Az innovátor és bioszimiláris verziók mennyiségi összehasonlítására N-glikán profiljaik relatív csúcs alatti területeit használtam.

4.2.5 Etanercept minta exoglikozidázos emésztést követő szekvenálása

Az etanercept PNGáz F enzimmel lehasított N-glikánjaiból négy párhuzamos mintát készítettem elő a 4.2.3 fejezetnek megfelelően. Az első minta a bioterapeutikum N-glikán profiljának referenciájaként szolgált. A második mintánál az α (2-3,6,8)-kötésekkel kapcsolódó szialsavakat vágtam le szialidáz-A enzimmel. A harmadik minta esetében a szialidáz-A emésztés mellett, a β (1-4,6)-kötésekkel kapcsolódó galaktóz monomereket hasítottam le kardbab β -galaktozidázzal. Az utolsó mintánál az előbb említett két enzim mellett kardbab hexózaminidázt is adtam a mintához, amely a β (1-2,4,6)-kötésekkel kapcsolódót N-acetilglükózaminokat képes terminálisan hasítani. Az enzimatis reakciók 37 °C-on mentek végbe egész éjszakán át [54]. Mind a négy mintát CGE-LIF segítségével analizáltam, majd az egyes enzimatis hasítást követő csúcsterület változásokból következtettem a hozzájuk tartozó cukorszerkezetekre.

4.2.6 Etanercept és adalimumab minták előkészítése multikapilláris elektroforézis készülékhez

A fúziós fehérje és mAb esetében is PNGáz F-fel (Asparia Glycomics, San Sebastian, Gipuzkoa, Spanyolország) hasítottam le az N-glikánokat a gyártó protokolja szerint. A felszabadult szénhidrátok APTS jelölését a C100HT glikán készlettel (Beckman, Brea, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) végeztem, így munkám során a nagy léptékű minta-előkészítésre és analízisére optimalizált reagenskonfigurációt használtam.

100 μ g glikoprotein mintát összekevertem glikánbefogó mágneses gyöngyökkel és a denaturáló oldattal, majd 60°C-on 8 percig inkubáltam. Ezután a PNGáz F emésztés 60°C -on 20 percen át történt. A felszabaduló szénhidrátokat a mágneses gyöngyök nagy szerves oldószer tartalom mellett (>85% acetonitril) megkötötték, majd APTS master mix hozzáadásával 60°C-on 20 percig jelöltem a gyöngyökön. A származékképzési lépés után a felesleges APTS-t mágnesgyöngy által közvetített tisztítással eltávolítottam, háromszor megismételve a nagyobb tisztaság elérése érdekében (bővebben: 4.2.1. fejezet). A jelölt glikánokat 50 μ L vízzel eluáltam a gyöngyökből, és multikapilláris gélelektroforézissel analizáltam. A maradék minták –20 °C-ra kerültek további feldolgozásig.

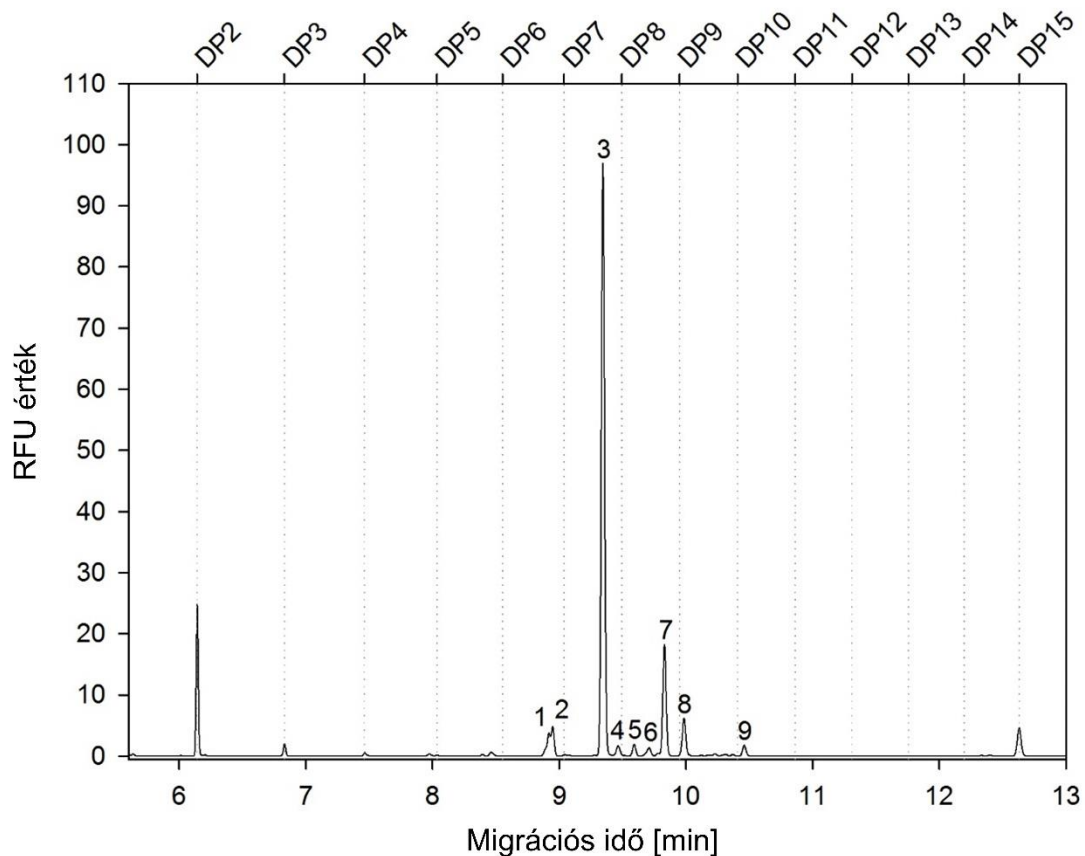
4.2.7 Multikapilláris gélelektroforézissel való mérés körülményei

Az új glukózegység (GU) adatbázis létrehozásához C100HT multikapilláris gélelektroforézis készüléket használtam (Beckman, Brea, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) LED-indukált fluorescens detektálással (gerjesztés: 450 nm, emisszió: 540 nm). Az elválasztáshoz a készülékhez kapható, a szeparációs géllal gyárilag töltött cartridge-ot használtam, melyhez 12 párhuzamos mérésre alkalmas bare fused szilika kapilláris tartozik. Ezek egyenként 17 cm teljes hosszal (effektív: 13 cm) és 50 µm belső átmérővel rendelkeznek.. Az elválasztás során 6 kV feszültséget használtam, az injektálás pedig a következő paraméterekkel történt: 2 kV, 2 s szobahőmérsékleten. Mérésre és adatgyűjtésre a C100HT Biologics Analyzer (1.0.1.11. verzió) szoftvercsomagot használtam.

5. Eredmények

5.1 Az adalimumab mennyiségi értékelése

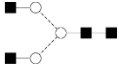
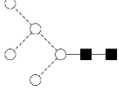

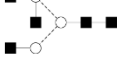
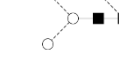
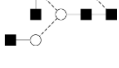
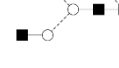
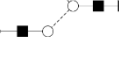

Az adalimumab APTS-szel jelölt N-kötött glikánjainak CGE-LIF elválasztását a 11. ábra szemlélteti. Az azonosított szénhidrát szerkezetek ugyanezekkel a sorszámokkal feltüntetve szerepelnek az 3. táblázatban a hozzájuk tartozó GU értékekkel és területi eloszlásukkal.



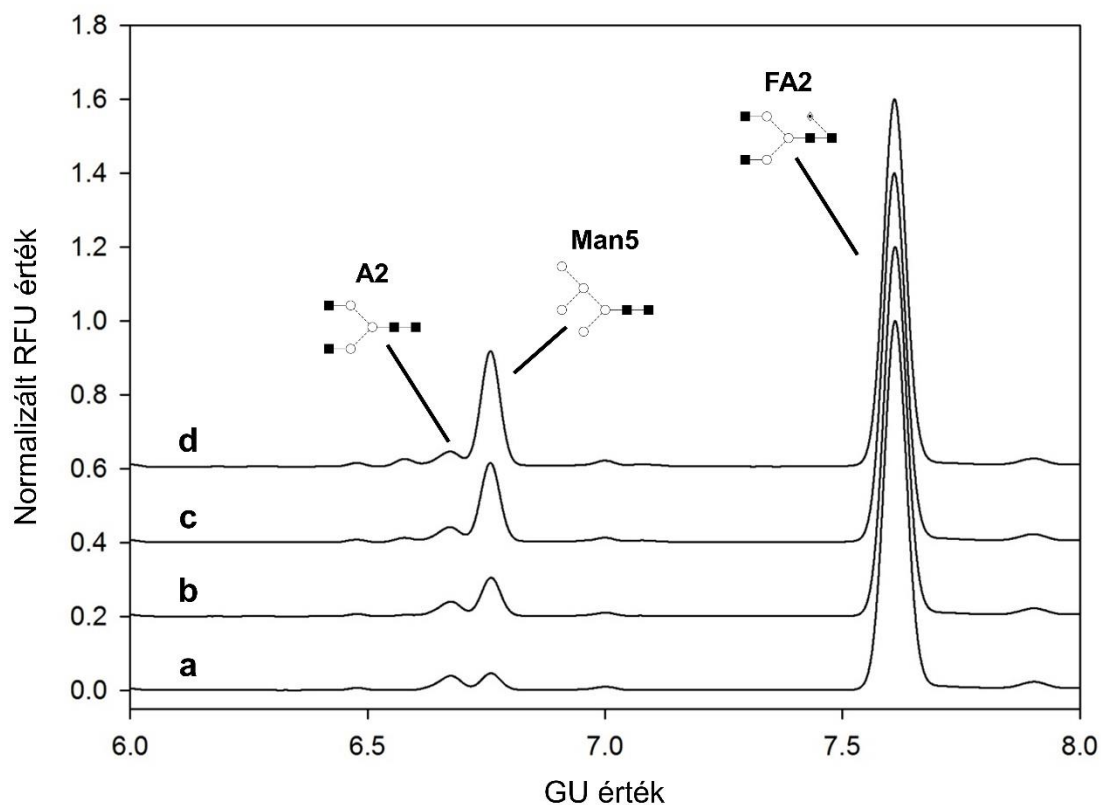
11. ábra: Az APTS-szel jelölt adalimumab (Humira®) N-glikánjainak CGE-LIF analízise. Az elválasztás körülményei: 50 cm effektív (60 cm teljes) hossz, 50 μ m ID bare fused silica kapilláris HR-NCHO géllal töltve; hőmérséklet: 30°C; Feszültség: 30 kV; Injektálás: víz: 3 s 5 psi, utána minta: 2 kV/2 s, végül 2.0 kV/2.0 s bracketing standard (DP2 és DP15).

Az adalimumabon lévő N-glikánok közül 72%-os arányban jelenlévő glikoforma egy magfukozilált biantennáris oligoszacharid (FA2, a 11. ábrán a 3. csúcs), amely nem rendelkezik terminális galaktózzal. Szintén nagy arányban található meg benne, ugyanezen szénhidrátváz 6-os (12%), illetve 3-mas (4.5%) pozícióban monogalaktozilált formái (7. és 8. csúcs).

3. táblázat: Az adalimumab (Humira®) N-glikán struktúrái a hozzájuk tartozó GU értékekkel és csúcs alatti területekkel

Cúcs	Szerkezet	N-glikán	GU érték	%Csúcs alatti terület
1		A2	6.76	3.61
2		Man5	6.82	2.47
3		FA2	7.67	72.24
4		A3	7.94	1.33
5		FA1(6)G1	8.21	1.25
6		FA3	8.47	0.99
7		FA2(6)G1	8.74	12.54
8		FA2(3)G1	9.08	4.45
9		FA2G2	10.11	1.12

Továbbá, a Man5 (2. csúcs), mint mannózból gazdag 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 standardot még az APTS-szel való jelölés előtt. Annak érdekében, hogy a standarddal megnövelt csúcsok egymással összevethetők legyenek, belső és bracketing standardokat használtam (DP2, DP3 és DP15), így a glikán profilok GU függvényében vannak ábrázolva az 12. ábrán. Ezt a megközelítést használva a GU értékek %RSD értéke az X tengelyen 0.05% alatt volt, tehát nagy pontosságot sikerült elérnem.



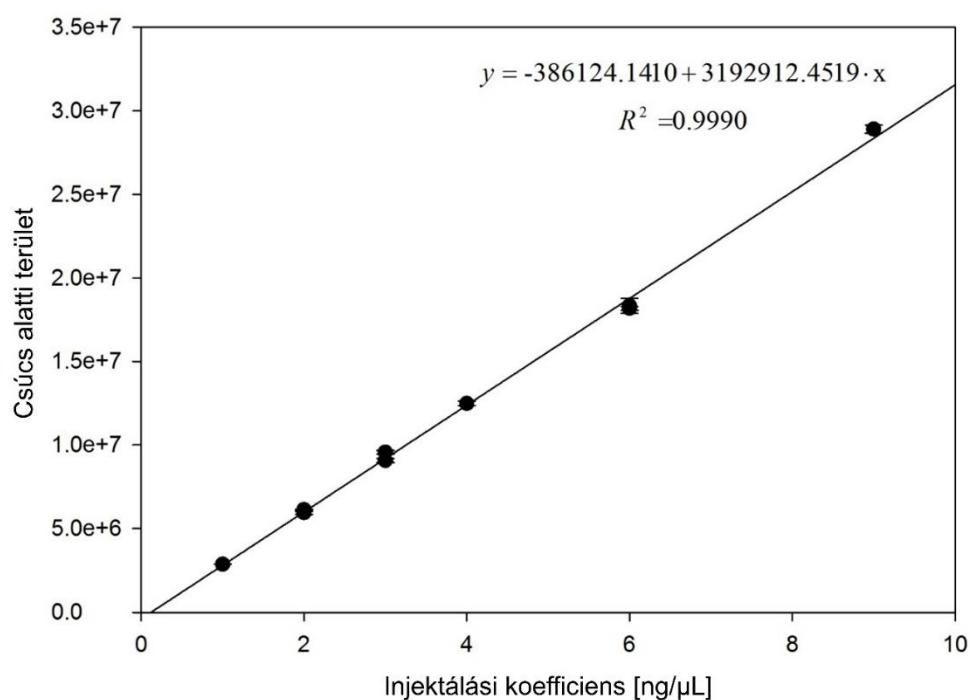
12. ábra: Az adalimumab APTS-szel jelölt N-glikánjainak CGE-LIF analízise során kapott profilok releváns részeinek összehasonlítása. Az N-glikánokhoz egyre nagyobb mennyiségű Man5 standardot adtam. Az a, b, c és d profilok jelzik a nulla, 5.0 ng, 10 ng és 15 ng Man5 standard hozzáadásával elválasztott profilokat. Az elválasztás körülményei megegyeznek az 11. ábrán lévő kondíciókkal.

A mannóz-5 (Man5, 2. csúcs) és az A2 komplex (1. csúcs a 11. ábrán) glikánok közötti megfelelő felbontás érdekében 50 cm-es effektív hosszúságú (teljes hossz: 60 cm) kapillárist alkalmaztam. Az RFU értékeket az elektroferogram legnagyobb, vagyis FA2 (3. csúcs) 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 4. táblázat: Különböző injektálási paraméterek hatása a Man-5 csúcsterületére eltérő minta térfogatok mellett. Ugyanazokat az elválasztási körülményeket alkalmaztam, mint az 11. ábra

esetében, kivéve a BFS (nem bevont falú szilika) kapilláris hosszát, ami 30 cm (effektív: 20 cm).

Injektálási feszültség [kV]	Injektálás hossza [s]	Injektálási együttható (kVs)	Jel (Man5 csúcsterület)		Különbség [%]
			50 µL minta térfogat	100 µL minta térfogat	
1.0	1.0	1.0	2869911	2862972	0.24
1.0	2.0	2.0	6128706	6152961	0.40
1.0	3.0	3.0	9517325	9624550	1.13
2.0	1.0	2.0	5996257	5899887	1.61
2.0	2.0	4.0	12414187	12554423	1.13
2.0	3.0	6.0	18115499	18226226	0.61
3.0	1.0	3.0	9011171	9128700	1.30
3.0	2.0	6.0	18107924	18548067	2.43
3.0	3.0	9.0	28771956	29008740	0.82



13. ábra: Lineráris összefüggés az injektálási együttható (injektási paraméterek kombinálása) és a mért Man5 csúcsterületek között. Elválasztási paraméterek ugyanazok, mint a 11. ábrán, kivéve a 20 cm-es effektív hosszt (30 cm teljes hossz).

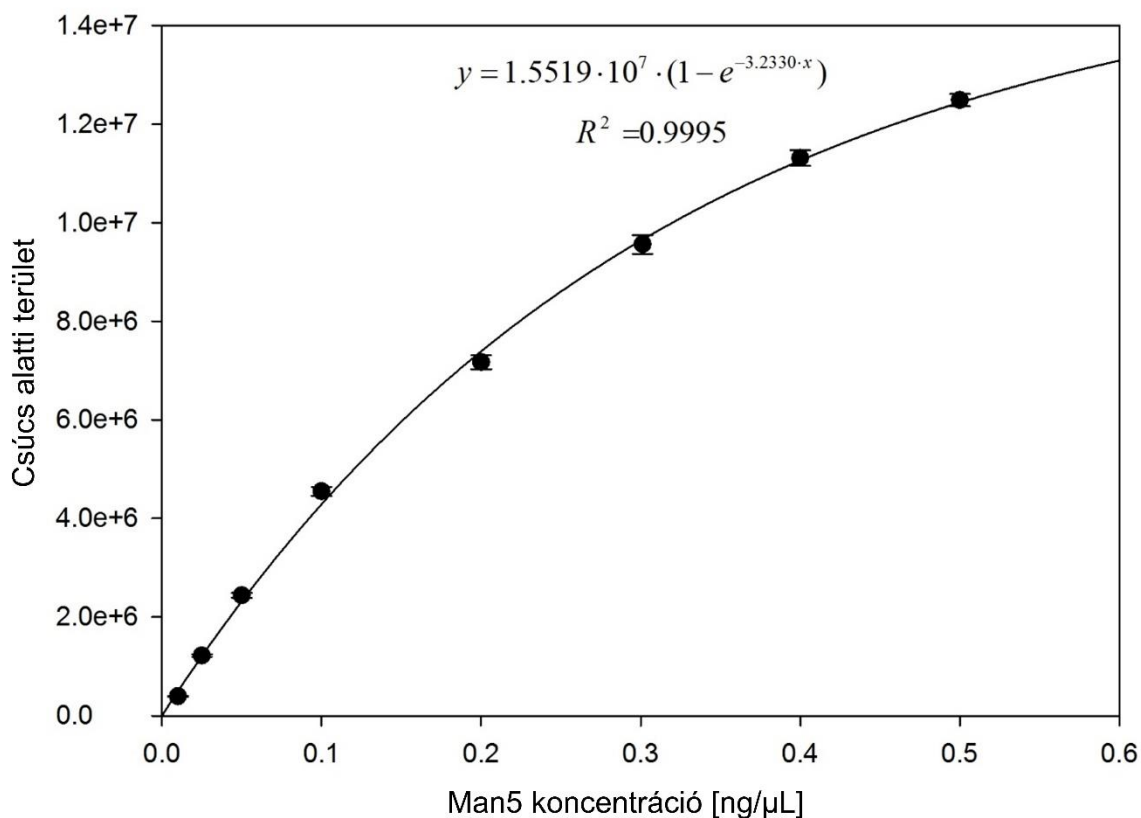
változtattam 1 és 3 kV, illetve 1 és 3 s között 50 és 100 mikroliteres (0.5 ng/μl koncentráció) mintatérfogatok között (4. táblázat). Egy kombinált injektálási paramétert vezettem be, amelyet a befecskendezési feszültség és az idő szorzatával határoztam meg. Erre injektálási együtthatónak referálok a koncentrációsámítási vizsgálat során. A különböző injektálási paraméterek és különböző mintatérfogatok felhasználásával kapott csúcsterületeket az 4. táblázat mutatja. Igen pontos lineáris összefüggést találtam az injektálási együttható és a kapott csúcsterületek között a 4. táblázatban bemutatott, különböző injektálási paraméterek mellett (13. ábra). Annak érdekében, hogy alacsony és magas koncentráció tartományban is megfelelően ki tudjam értékelni a Man5 csúchoz tartozó területeket, a 13. ábrán látható összefüggés alapján igyekeztem egy olyan injektálási paramétert választani, amelyhez közepes nagyságú csúcsterületek tartoznak. Így a standardok analizálásával vizsgált koncentrációfüggést a 4-es injektálási együtthatóhoz tartozó 2 kV 2 s-es injektálási paraméterek mellett végeztem.

5. táblázat: Jelintenzitások, amelyeket a Man5 standardból készített hígítási sor CGE-LIF analízisével kaptam. Az elválasztási és injektálási paraméterek ugyanazok, mint az 11. ábra esetében, kivéve a BFS kapilláris hosszát: 30 cm (20 cm effektív hossz).

Lépés	Hígítás	Man5 tömege [ng]	Man5 törzsoldat [μL]	Víz [μL]	Koncentráció [ng/μL]	RFU	Csúcsterület
1.	1x	25	50.0	0.0	0.50	155.77	12486232
2.	1.25x	20	40.0	10.0	0.40	141.84	11310092
3.	1.66x	15	30.1	19.9	0.30	119.97	9560043
4.	2.5x	10	20.0	30.0	0.20	90.58	7169258
5.	5x	5	10.0	40.0	0.10	56.85	4551500
6.	10x	2.5	5.0	45.0	0.05	32.35	2439668
7.	20x	1.25	2.5	47.5	0.03	16.17	1217856
8.	50x	0.5	1.0	49.0	0.01	5.39	392288

Emellett a pontos és reprodukálható kvantitatív meghatározás érdekében vizsgáltam, hogy milyen hatással van a koncentráció a Man5 csúcs alatti területeire. A Man5 standardból készült törzsoldat koncentrációja 0.5 ng/μL volt. Ebből HPLC tisztaságú vízzel sorozathígítást készítettem (5. táblázat), amelynek végére 50-szeres hígítást értem el, majd 2 kV, 2 s injektálási

paraméterekkel mértem a mintákat. Fontos megjegyezni, hogy ebben a koncentrációtartományban nagyon jó jelintenzitásokat kaptam alacsonyabb koncentrációknál,



14. ábra: Csúcssterületek exponenciális függése a hozzáadott Man5 standardtól

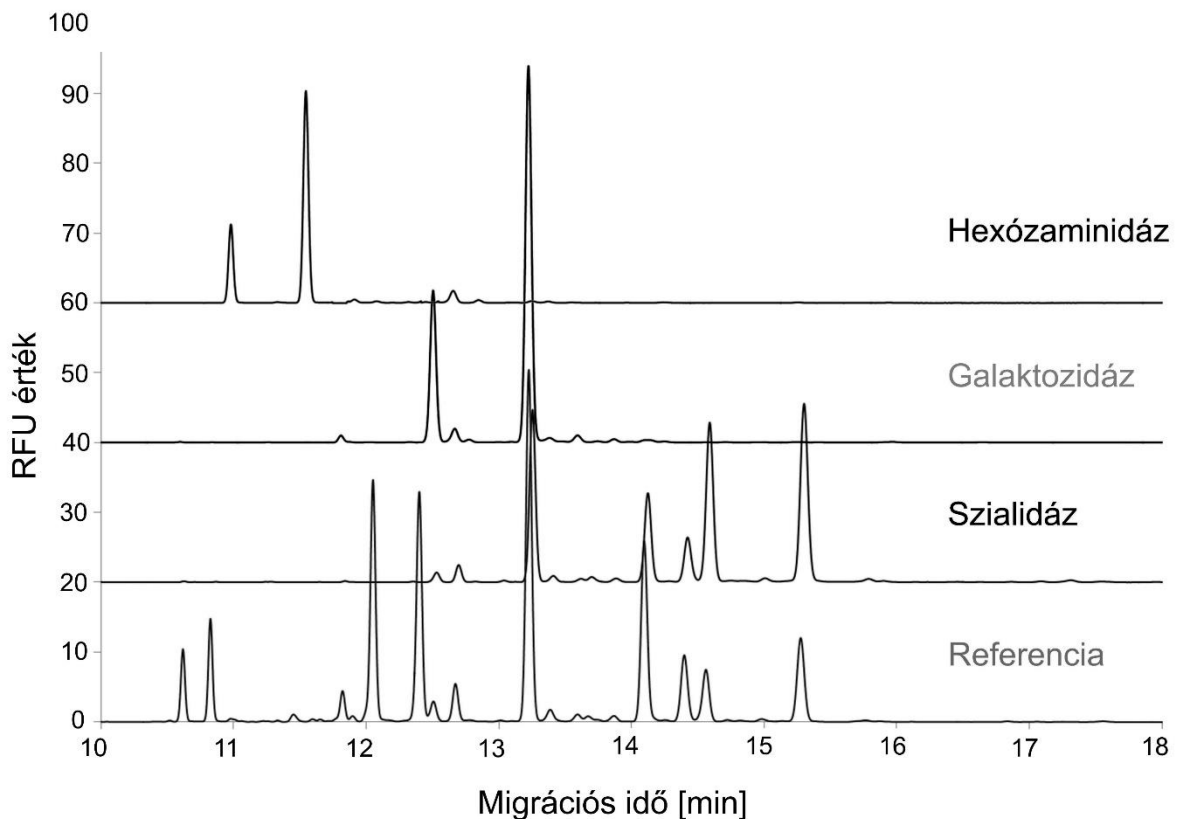
emellett magasabb koncentrációk mellett sem szaturáltak a csúcsok. A CGE-LIF analízist követően kapott RFU értékeket az 5. táblázat tartalmazza. A minta mennyisége és a csúcssterületek közötti exponenciális összefüggés van, ahogy ez a 14. ábrán megfigyelhető.

A különböző injektálási paraméterekkel, Man5 koncentrációkkal és változó mintatérfogatokkal kapott eredmények alapján az adalimumab mintában lévő Man5 koncentrációját pontosan kiszámítottam. Az eredeti adalimumab mannóz-5-tartalmát az mintában 2.94 ng-nak határoztam meg.

5.2 Az etanercept exoglikozidázos szekvenálása

Ahhoz, hogy a későbbiekben pontos képet kapjak a vizsgált bioterapeutikum innovátor és bioszimiláris verziójának N-glikán profiljairól, először azonosítanom kellett az egyedi cukorszerkezeteket. Ehhez top-down exoglikozidázos emésztést alkalmaztam, melynek során a fehérjéről lehasított N-cukrokat a terminális végük felől kezdtem kötésspecifikusan,

monomerenként emésztteni. Minden egyes core-struktúrához közeledő szerkezeti szintnél, az adott monomer kötésére jellemző új enzimet is az elegyhez adtam. Minden egyes emésztést CGE-LIF segítségével analizáltam, majd figyelembe véve a hozzáadott enzimek specificitását, a csúcsterületek változásából következtettem a hozzájuk tartozó oligoszacharidokra. Az egyes futtatásokat a 15. ábrán foglaltam össze. A szekvenálás eredményeként azonosított oligoszacharid szerkezeteket a 7. táblázat tartalmazza.

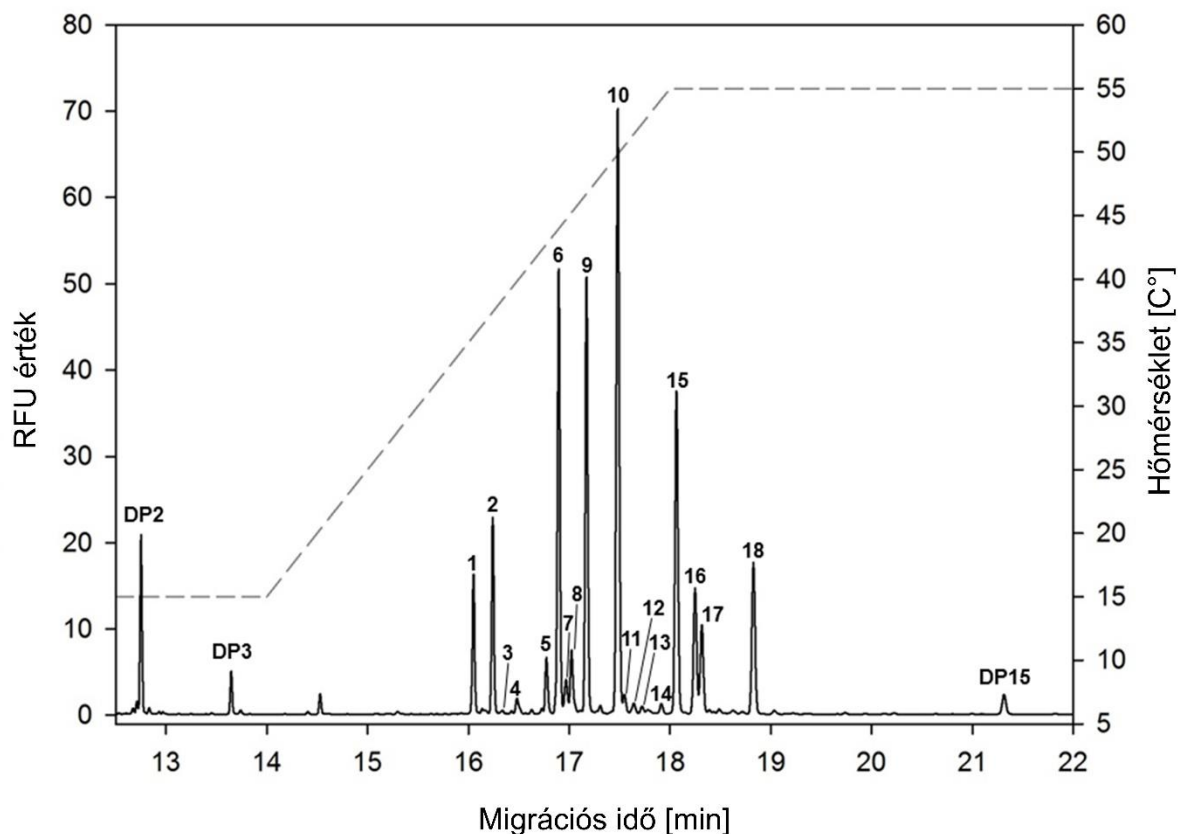


15. ábra: Az exoglikozidázos emésztések egymást követő lépései alulról felfelé haladva. Referencia: az Etanercept N-glikán profilja, Szialidáz: a szialidázos emésztést követően kapott N-glikán profil, Galaktozidáz: a szialidáz és galaktozidáz hozzáadásával történt emésztést követő N-glikán profil, Hexóaminidáz: a hexóaminidáz, a szialidáz és galaktozidáz enzimes emésztést követő N-glikán profil, Az elválasztás körülményei: 20 cm effektív (30 cm teljes, 50 μm ID) HR-NCHO géllal töltött fused silica kapilláris, hőmérséklet: 30°C, feszültség: 30 kV, injektálás: 3 psi/ 5 s víz; 3 kV/ 3 s a minta esetében, illetve 1 kV/ 1 s bracketing standard-nél.

5.3 Elválasztási hőmérséklet optimalizálása etanercept vizsgálatához

A CGE-LIF gyors és hatékony módszer bioterapeutikumok N-glikán profiljának meghatározására és mennyiségi kiértékelésére. Ehhez először optimalizáltam az elválasztás hőmérsékletét annak érdekében, hogy a lehető legjobb felbontásban vizsgálhassam az

etanercept innovátor és bioszimiláris verzióinak N-glikozilációs profiljait, mivel közismert, hogy a szénhidrátok elektromigrációs tulajdonságai nagyban függenek az aktivációs energiától [149]. Ennek az egyik leggyorsabb módja a hőmérsékletgradiens alkalmazása [150].



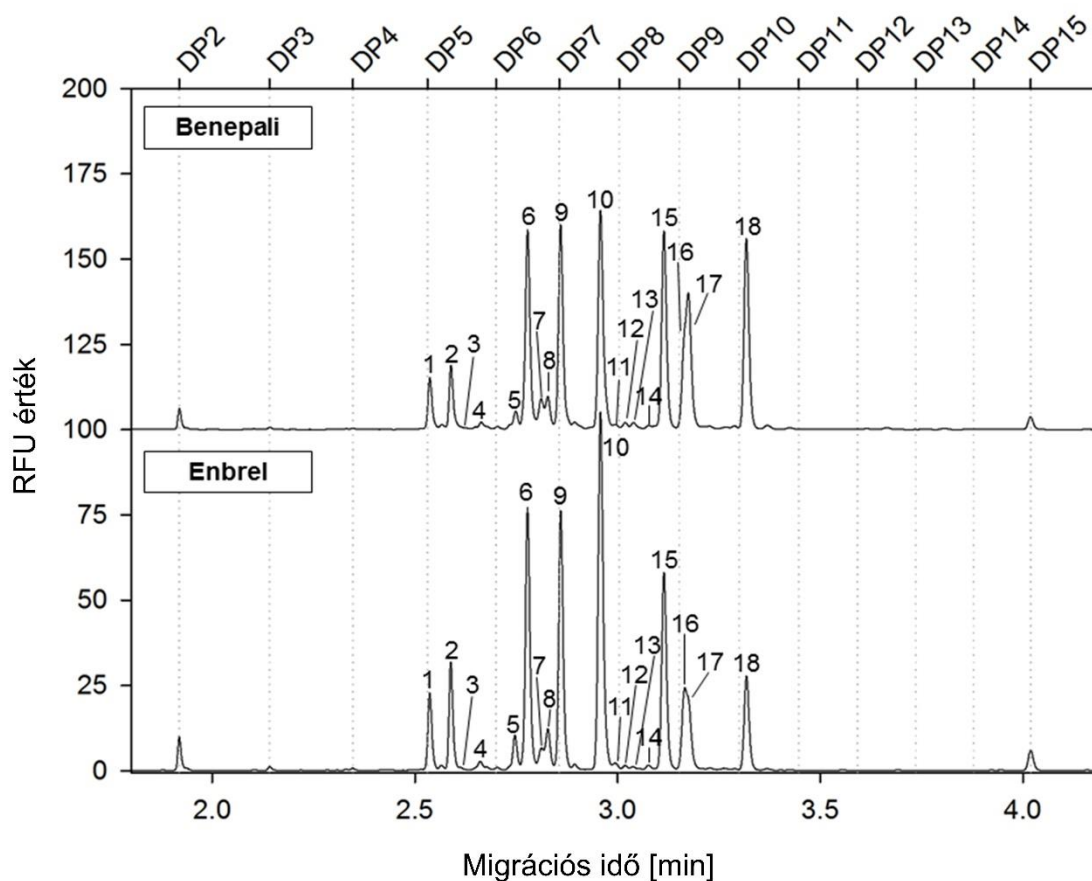
16. ábra: Az etanercept APTS-szel jelölt, szabad állapotú N-glikozilációs profilja. A DP2 (maltóz), DP3 (maltotrióz) és DP15 (maltopentadekaóz) bracketing és belső standardek. Az elválasztás körülményei: 50 cm effektív (60 cm teljes, 50 μ m ID) HR-NCHO géllal töltött fused silica kapilláris. Az alkalmazott elektromos térerősség: 500 V/cm. Az elválasztás hőmérséklete (szaggatott vonallal jelölve): 0–14 min: 15°C izoterm, 14–18 min: lineáris növelés 15-ről 55°C-ra, 18–22 min: 55°C, izoterm. Injektálás: 3 psi/ 5 s víz; 2 kV/ 2 s a minta esetében, illetve 1 kV/ 1 s bracketing standard-nél.

Ahogy az a 16. ábrán látható, az etanerceptről lehasított, APTS-szel jelölt N-glikánok szeparációjakor 15 és 55°C közötti hőmérsékletgradienst alkalmaztam. Ez azért előnyös, mert számos átlapoló csúcs felbotása számottevően növekszik a hőmérséklet emelésével, azonban a számomra érdekes A2 és Man5 glikánpáré csökken. Hőmérsékletgradiens alkalmazása során az elválasztás alatt valamennyi cukorszerkezet eléri szeparációs hőmérsékleti optimumát, így egy nagyfelbontású, pontos analízist megvalósítva [147]. Mindezek alapján a 30°C-os

elválasztási hőmérséklet tűnt megfelelőnek arra, hogy biztosítsa a megfelelő felbontást mind a 18 szénhidrát esetében, különös tekintettel az A2 és Man5 struktúrákra (7-es és 8-as csúcsok), amelyek fontos CQA-k. 25°C-os, 30°C-os és 35°C-os izoterm mérések szintén alátámasztották a gradienssel mért eredményeket, így a későbbiekben 30°C-os elválasztási hőmérsékletet alkalmaztam.

5.4 Innovátor és bioszimiláris etanercept összehasonlítása N-glikán profiljaik alapján

Az innovátor etanercept bioterapeutikum, az Enbrel® és a bioszimiláris termék, a Benepali összehasonlító analizését CGE-LIF rendszerrel, 30°C-on és 20 cm effektív kapilláris hossz mellett végeztem. Az így kapott elektroferogram a 17. ábrán látható.



17. ábra: Az Enbrel® (innovátor, alul) és Benepali (bioszimiláris, felül) bioterápiás készítmények N-glikán profiljai. Elválasztási körülmények: 20 cm effektív (30 cm teljes hossz, 50 µm ID) fused silica kapilláris HR-NCHO géllal töltve. Elektromos térerősség: 1000 V/cm. Elválasztás hőmérséklete: 30°C (izoterm). A szerkezeti azonosítás megkönnyítésének érdekében a felső x-tengely a polimerizáltsági fokot jelöli (DP) a maltooligoszacharid létrán. Az alsó és felső csúcsok a két termék APTS jelölt N-glikozilációs profiljait jelenítik meg.

Ahogy az jól látható, mindkét esetben ugyanazokat a csúcsoakat detektáltuk, de eltérő csúcsterületeloszlással, így a megfigyelt mikroheterogenitás miatt a különböző relatív mennyiségeket kvantifikáltuk. A kvantitatív értékelést a relatív csúcsterületekből származtattam, és a következő pontban részletesen tárgyalom.

5.5 Glikoszimilaritás mennyiségi értékelése

5.5.1 A GI kiértékeléséhez tartozó elméleti megfontolások

5.5.1.1 A GI számítása

Az innovátor és bioszimiláris termékek N-glikomikai összehasonlítására Szekrényes és munkatársai munkájára alapuló módszert dolgoztam ki [99]. A profilhasonlóság és kompozíciós hasonlóság számítása Altman és Karlsson munkáira alapul [151, 152]. A százalékos értékek egyszerű matematikai számítások eredményei, amelyeknél minden mérési pontot figyelembe vettem egy kiválasztott csúcsra vonatkozóan függetlenül attól, hogy belesznek-e a tolerancia limitbe. Lényeges különbség jelen munkában, hogy a tolerancia limitek megállapításánál az egyes sarzsok szórása helyett egy általánosan elfogadott 20%-os küszöböt alkalmaztam. Ennek oka, hogy nem volt lehetőségem több sarzs beszerzésére. Ezért az 5.5.1 fejezetben végigvezetem a kidolgozott módszer használatát, majd az 5.5.2 részben ismertetem az egyszerűsített számítás eredményeit. Ha a teszt termék mérési pontjai ezeken a tolerancia határokon belül esnek - függetlenül az átlagtól való távolságuktól - akkor a hasonlóság 100%-os (18. ábra, egyenlet (5)). Fontos azonban megemlíteni, hogy mivel a tolerancia határon kívül eső pontok értéke az átlagtól való eltérés négyzeteinek összegével módosul, így ezek a pontok csökkentik a hasonlóság mértékét.

$$A_i = Y_i + X_i \cdot \sum_{j=1}^n \frac{((x_{uj} - x_{lj}) - \bar{x}_j)^2}{(x_{sj} - \bar{x}_j)^2} \quad (5)$$

ahol A_i az adott paraméterre vonatkozó i ($i=1, \dots, n$), százalékos értékben megállapított hasonlóság, Y_i és X_i pedig az adott paraméter tolerancia limiteken belül és kívül eső adatpontjainak százalékos értékei. Adott j pont tolerancia limit feletti értékeit x_{uj} , míg tolerancia limit alatti értékeit x_{lj} jelöli. A j -edik referencia minta pontjainak átlagát \bar{x}_j jelöli, míg x_{sj} a j -edik minta tolerancia limiten kívül eső pontja [91].

Az N-glikozilációs profillal a termék több biológiai tulajdonsága is összefüggésbe hozható (gCQA-k), úgy mint a biztonságosság, a felezési idő és a hatékonyság. Ezek a

jellemzők rendszerint megfeleltethetők bizonyos N-glikán alcsoportoknak mint pl. teljes afukoziláció, szialiláció, mannozilált struktúrák stb. Ezekhez pedig értékek rendelhetők, ha összegezzük az adott struktúrára vonatkozó relatív százalékokat. Eszerint jártam el én is az etanercept innovátor és bioszimiláris verzióinak összehasonlításakor.

Mivel a gCQA struktúrák csúcsterület aránya kiemelten fontos a többi glikán típushoz képest, a kompozíciós hasonlóságot az egyik fő attribútumának tekintjük. Például, az Fc régióhoz kötődő N-glikánok esetén a teljes afukoziláció kritikus paraméter az ADCC szempontjából. Ha a teszt termékünk teljes afukoziláltsága 10%, ami csak a oligomannóz struktúrákat foglalja magába, akkor ennek jelentősen alacsonyabb lesz az ADCC aktivitása, mint egy olyan glikoproteinnek, amelynél a 10%-os afukoziláltság a fő komplex típusú glikánokból adódik, mint a G0, G1, G1' és a G2. Ezek alapján egy összetettebb, részletesebb képet kaphatunk a glikozilációs hasonlóságról a GI révén, amely a profil- és a kompozíciós ráták átlagából adódik. Fontos megjegyezni, hogy a profil hasonlóság minden esetben „nagyon kritikus”, azaz Tier 1-es tulajdonság. A GI a következő képlettel számítható:

$$GI = \frac{e^{t_{ip} \cdot A_{ip} + \sum_{i=1}^n e^{t_{ic} \cdot A_{ic}}}{e^{t_{ip} + \sum_{i=1}^n e^{t_{ic}}}, \quad (6)$$

ahol n a paraméterek száma, A_{ip} a profil hasonlóság százalékos értéke, A_{ic} pedig i tulajdonságra vonatkozó hasonlósági ráta. Mindegyik hasonlósági ráta az (5) egyenlet szerint számolandó. t_i az ún. „tier rank faktor”, melynek értéke magas kockázat esetén 3 (Tier 1), közepes kockázat esetén 2 (Tier 2), alacsony kockázat esetén pedig 1 (Tier 3). A profil hasonlóság minden esetben kiemelt fontosságú tulajdonság ($t_{ip} = 3$), tehát ez esetben $e^3 = 20.09$. Ugyanennek a faktornak az értéke kompozíciós hasonlóság esetén (t_{ic}) lehet 1, 2 és 3 is ($e^1 = 2.71$, $e^2 = 7.39$ és $e^3 = 20.09$).

Előforulnak azonban olyan esetek is komplex molekulák esetén, ahol nem csak az Fc régión fordul elő N-glikoziláció. Az etanercept fúziós fehérje esetében a TNF α részen további 2 glikozilációs hely található. Az ilyen és ehhez hasonló esetekben minden eltérő kritikusságú N-glikozilációs helyhez külön alindex rendelhető. Sőt, az alindexek használata elkerülhetetlen, ha egyszerre vannak jelen olyan N-glikánok, amelyek lokalizációjukból kifolyólag nincsenek hatással az elsődleges hatásmechanizmusra, és olyanok, amelyek az Fc fragmenszen való elhelyezkedésük miatt befolyásolják a termék stabilitását, és felezési idejét. A glikoprotein más-más részein lévő glikozilációs helyek általában különböznek oligoszacharid összetételükben, valamint az N-kötött struktúrák hatásának kritikusságában. Példának okáért

vegyünk egy Fc fúziós fehérjét, amelynek az ADCC-re is jelentős hatása van, ebben az esetben az Fc fragmens afukoziláltsága magas kockázati tényező ($t_i = 3$). Azonban ha az N-glikozilációs helyek az Fc fragmensen kívül helyezkednek el, ez a kockázat jelentősen lecsökken ($t_i = 1$). Ennélfogva ezeket a helyeket először csoportosítani kell az alapján, hogy az N-glikoziláció elsődlegesen mire van hatással, majd az egyes csoportokat külön-külön kell kezelni és vizsgálni. A glikoszimilaritási index számolásánál minden egyes csoportra eltérő alindexeket kell alkalmazni. Mivel én a teljes fehérjén lévő N-glikánokat vizsgáltam, nem alkalmaztam alindexeket a kiértékelés során, illetve a kiértékelésnél a kockázati besorolásnál valamivel tágabb határokat szabtam meg, hiszen az én szempontomból az Fc fragment glikozilációja jelentős, mivel ezen a régióban található oligomannóz struktúrák befolyásolják a sérumból való kiürülési időt. Általánosságban elmondható, hogy az alacsonyabb glikoszimilaritási index arra enged következtetni, hogy a vizsgált glikozilációs különbségnek szignifikáns hatása van, következésképpen a vizsgált teszt termék biohasonlósága alacsonyabb lesz [99].

5.5.1.2 Referencia sarzsok jellemzése, a cél profil fellállítása

A különböző sarzsokból származó bioterapikumokról lehasított, fluorofórral jelölt N-glikánokból három-három párhuzamos mérést követően, a kapott elektroferogramokból megállapítható a termék sarzsok varianciája. Az egyes struktúrák GU (glucose unit) értékeik alapján azonosíthatók, melyek az elektroferogram alapján a [ww.GUcal.com](http://www.GUcal.com) oldalról ingyenesen letölthető GUcal szoftver segítségével számolhatók. Doktori munkám során egy sarzsból származó mintát volt lehetőségem vizsgálni, így egyszerűbb kvantitatív összehasonlítást alkalmaztam a csúcsterületek figyelembe vételével.

Látható, hogy az általam vizsgált oligomannóz szerkezetek erős jelenléte negatívan befolyásolja a kiürülést.

5.5.1.3 gCQA-k osztályozása és tolerancia határuk definiálása

A harmadik lépés folyamán a kritikus minőségi paraméterek három szintes kockázat értékelése valósul meg. A gCQA-k osztályozásakor sorra kell venni az adott cukorszerkezet mennyiségét, az előre meghatározott biológiai funkciókra való hatását, azt, hogy hogyan befolyásolja a biztonságosságot és a szervezetből való kiürülés időt. Tier 1-es, azaz magas kockázatú besorolást kapnak azok a gCQA-k, amelyek közvetlenül befolyásolják a termék hatását, pl. az ADCC-t a core-fukóz jelenléte vagy az oligomannóz struktúrák a kiürülést. Ebben az esetben az adott glikán adatpontjainak bele kell esnie az átlag +/- 1,5 szórás tartományba, amely a referencia termék több gyártási sarzsából vett mintákkal definiálható. A Tier 2-es besorolású

(közepes kockázatú) gCQA-k mérsékelten befolyásolják a termékminőséget így ezeknél a tolerancia limitet az átlag ± 3 szórás segítségével kapjuk meg. Végül azoknál a cukorstruktúráknál, amelyek alig vagy egyáltalán nincsenek hatással a termékre (Tier 3), nincs számszerűsített tolerancia limit, elegendő numerikus vagy grafikus összehasonlítás.

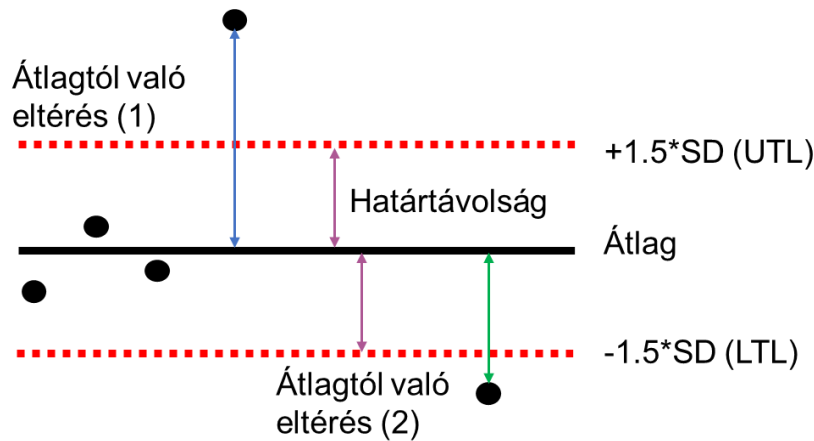
6. táblázat: A glikozilációval összefüggő kritikus minőségi paraméterek és azok toleranciaküszöbei [99]

gCQA	N-glikán attribútum kockázata	Profilhasonlóság	Kompozíciós
		tolerancia küszöbe	hasonlóság tolerancia küszöbe
Terminális galaktoziláció %	Közepes (Tier 2)	+/- 3	+/- 3
Összes afukoziláció %	Magas (Tier 1)	+/- 1,5	+/- 1,5
Oligomannóz %	Magas (Tier 1)	+/- 1,5	+/- 1,5
Szialiláció %	Alacsony (Tier 3)	+/- 3	< 3 %
Terminális GlcNAc %	Alacsony (Tier 3)	+/- 3	+/- 3

Az egyes glikán struktúrákra vonatkozó tolerancia limiteket az 6. táblázatban tüntettem fel. Tekintsük az afukoziláció példáját. Jól látszik, hogy a teljes afukoziláció magas kockázati besorolású glikozilációs tulajdonság, ezért ez esetben a tolerancia limitek megállapításához +/- 1,5-es szórást veszünk alapul mind a kompozíciós, mind pedig a profil hasonlósági ráta esetében. Fontos azonban megjegyezni, hogy a teljes afukoziláció magába foglal más afukozilált struktúrákat is, mint például az oligomannóz szerkezeteket. Noha erre a részalmazra mindenképpen ezt a tolerancia limitet kell használni profil hasonlóság esetén a szérumból való kiürülésre gyakorolt hatása miatt. Ahogy arra már fentebb is utaltam a korábbi lépéseket minta hiányában nem tudtam megvalósítani, így 20%-os tolerancia határt alkalmaztam. A tolerancia küszöbök megállapítása után a kapott elektroferogramok kiértékelése következik. Mindenekelőtt, hogy az analitikai eltérések hatását minimalizáljam a csúcsok relatív fluorescens intenzitásait (RFU) normalizáltam legnagyobb csúcsra az elektroferogramon. Majd a csúcsokat kezdőpontjuktól a végpontjukig integráltam, hogy megkapjam a megfelelő GU tartományokat, melyek a hasonlósági számítások során használhatók. Előfordulhat, hogy egy struktúra, több szempontból is be van sorolva eltérő kockázati szintekbe, ebben az esetben, mindig a szigorúbbat kell figyelembe venni. A fenti példánál maradva, ha az összes afukozilált struktúra alatt a core-fukóz nélküli cukrokat értjük, beleértve az oligomannóz szerkezeteket is, akkor a profil hasonlóságnál +/- 1,5 szórás tolerancia limitet kell megállapítani utóbbinál is, hiszen az afukozilált struktúrák részalmazát képezi.

5.5.1.4 Profil és kompozíciós hasonlósági ráták megállapítása, GI számítása

A mért és számított adatok alapján a kompozíciós és profil hasonlóság az (5) egyenlet alapján és a 18. ábra alapján számolható.



18. ábra: A glikoszimilaritás koncepciója, Szekrényes és mtsai munkájából adaptálva [99].

UTL: felső tolerancia limit, LTL: alsó tolerancia limit

A glikoszimilaritási index az (6) egyenlettel adható meg, felhasználva a már korábban kiszámolt profil és kompozíciós hasonlósági értékeket.

A GI magában hordozza a lehetőséget arra, hogy olyan gyógyszeripari indikátorrá váljon, amely egyszerűsíti és megkönnyíti a döntéshozatalt a bioterápiás készítmények fejlesztése és gyártása során, mindezt egyszerű matematikai számításokkal. Emellett információvesztés nélkül képes egyszerűsíteni komplex DoE modelleket.

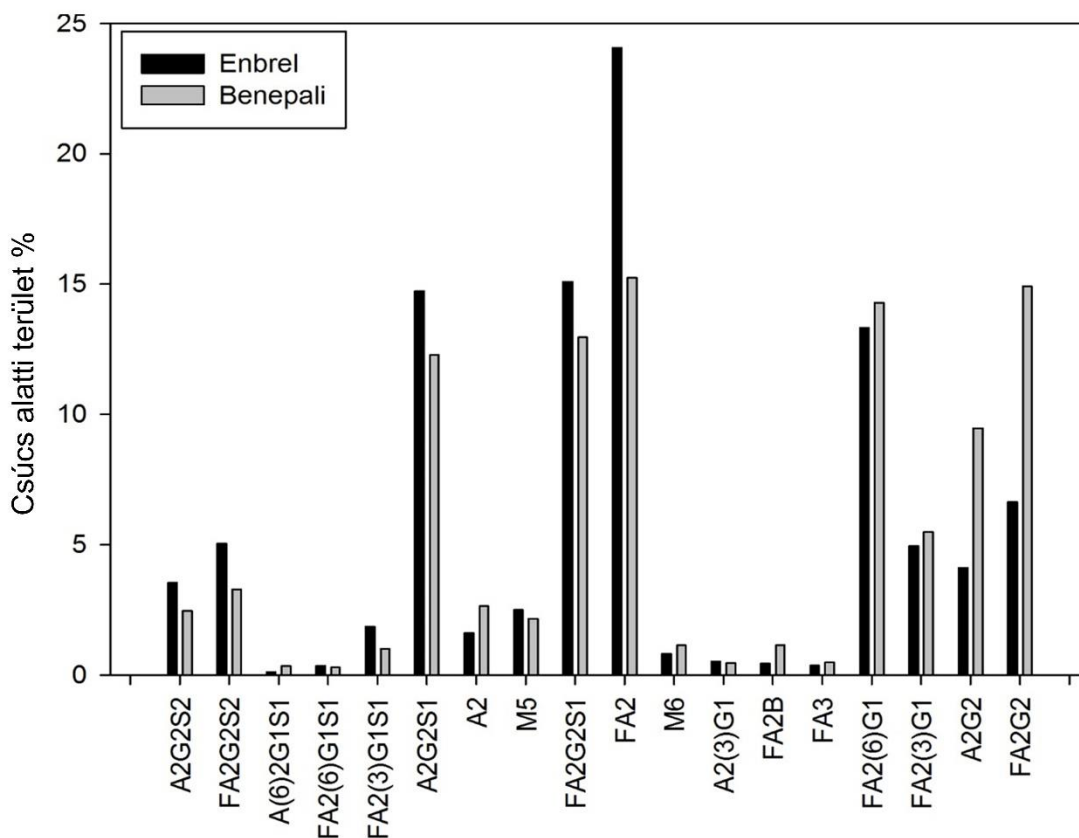
5.5.2 Glikoszimilaritási kiértékelés

A 7. táblázat foglalja össze az azonosított struktúrákat (a sorszámok megfelelnek a 17. ábrán feltüntetett számozásnak), a csúcsterületeket százalékosan, a hasonlósági arányokat, illetve a hasonlósági százalékot (tolerancia%). A glikoszimilaritás kiértékelésénél az általánosan elfogadott $\pm 20\%$ toleranciaküszöböt alkalmaztam [89]. Munkám során kizárólag az 1%-nál nagyobb csúcsterülettel rendelkező csúcsokat (1, 2, 5–11, 13,15–18) értékeltem ki glikoszimilaritási szempontból.

7. Táblázat: Az innovátor (Enbrel®) és bioszimiláris (Benepali®) N-glikozilációs profiljainak kvantitatív analízise. Az 1%-nál kisebb csúcsterülettel bíró csúcsokat nem értékeltem ki.

Csúcs	Rövidítés	Glikán kompozíciós betűkód	Csúcsterület [%]		Hasonlósági arány	Tolerancia [%]
			Enbrel	Benepali		
1	A2G2S2	H5N4A2	3.53	2.45	0.70	-30.44
2	FA2G2S2	H5N4A2F1	5.04	3.27	0.65	-35.02
3	A2G(6)1S1	H4N4A1	0.11	0.34	3.09	209.09
4	FA2(6)G1S1	H4N4A1F1	0.35	0.28	0.80	-20.00
5	FA2(3)G1S1	H4N4A1F1	1.86	1.01	0.54	-45.68
6	A2G2S1	H5N4A1	14.74	12.28	0.83	-16.65
7	A2	H3N4	1.61	2.64	1.64	63.81
8	M5	H5N2	2.49	2.16	0.87	-13.41
9	FA2G2S1	H5N4A1F1	15.09	12.96	0.86	-14.15
10	FA2	H3N4F1	24.06	15.24	0.63	36.69
11	M6	H6N2	0.88	1.05	1.19	19.32
12	A2(3)G1	H4N4	0.51	0.46	0.90	-9.80
13	FA2B	H3N3F1	0.44	1.13	2.59	159.18
14	FA3	H3N5F1	0.35	0.49	1.40	40.00
15	FA2(6)G1	H4N4F1	13.33	14.29	1.07	7.20
16	FA2(3)G1	H4N4F1	4.95	5.49	1.11	10.85
17	A2G2	H5N4	4.11	9.47	2.31	130.69
18	FA2G2	H5N4F1	6.63	14.91	2.25	124.94

A különbségek a mennyiségi csúcseloszlásban a 19. ábrán szerepelnek, ahol minden egyes oszlop egy egyedi N-glikán szerkezetet jelöl. Sötéttel az innovátor, szürke oszlopokkal pedig a bioszimiláris N-kötött cukraihoz tartozó csúcsterületek százalékban kifejezve (X tengely). Minden egyes oszlop 6 futtatás átlagából származó eredményeit tüntet fel.

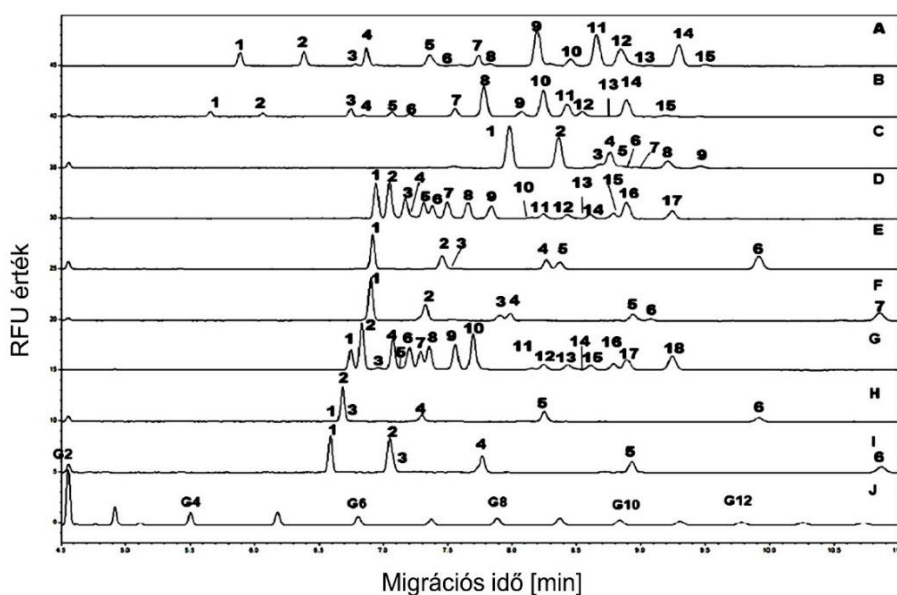


19. ábra: Az egyes cukorszerkezetek mennyiségi eloszlása a két N-glikán profilban.

Az 1%-nál nagyobb relatív csúcsterület-kritériumot teljesítő összes di- és monosziálsavas szerkezet (1., 2., 5., 6. és 9. csúcs) csúcsterülete kisebb volt az innovátor termék bioszimilárisában. A disziálsavas glikánok (1. és 2. csúcs) kiesnek a 20%-os toleranciaablakból (-30, illetve -35%), ezzel szemben a jelentős monosziálsavas termékek (6. és 9. csúcs) a határon belül (-16 –14%) esnek.. Mivel ezeknek a termékeknek a gyulladáscsökkentő tulajdonságainak nem volt MoA (mechanism of action) jelentősége, így az átlagosan ~33%-os eltérésük ellenére sem jelentett CQA problémát. Hasonlóképpen, az afukozilált semleges glikánok nagyobb mennyiségben voltak jelen (7. és 17. csúcs) a bioszimilárisban, ezek ugyan jóval a tűréshatáron kívül esnek (+63 és +130%), mivel az ADCC effektor funkcióra van hatásuk, adalimumab esetén ennek nincs relevanciája, mivel nem része a hatásmechanizmusnak. Mindkét elektroferogramon a legnagyobb csúcs egy mag-fukozilált biantennáris glikán (FA2, 10-es csúcs), 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 glikoszimilitási kritériumnak. A bioszimiláris esetében megfigyelhető az erősen galaktozilált cukorszerkezetek

(17 és 18 csúcs) erőteljesebb jelenléte (+130 és +124%), azonban glikoszimilaritás szempontjából ezeknek sincs jelentősége. Érdekes módon ezzel szemben a monogalaktozilált glikánok (15 és 16 csúcs) nagyon hasonló arányban vannak jelen az innovátorral összehasonlítva (+7 és +10%). Ugyanez érvényes a mannozban gazdag szerkezetekre (8 és 11 csúcs), ahol a különbség szintén tolerancia határon belül esik (–13 és +19%). Tekintve, hogy emberben a terápiás IgG antitestek, valamint Fc fragmentumot tartalmazó fúziós fehérjék – mint például az etanercept – esetében az Fc-régió mannozilációja befolyással bír a szérumban kiürülési sebességre, a magas mannoz 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, egyszerűsített számításokkal is.

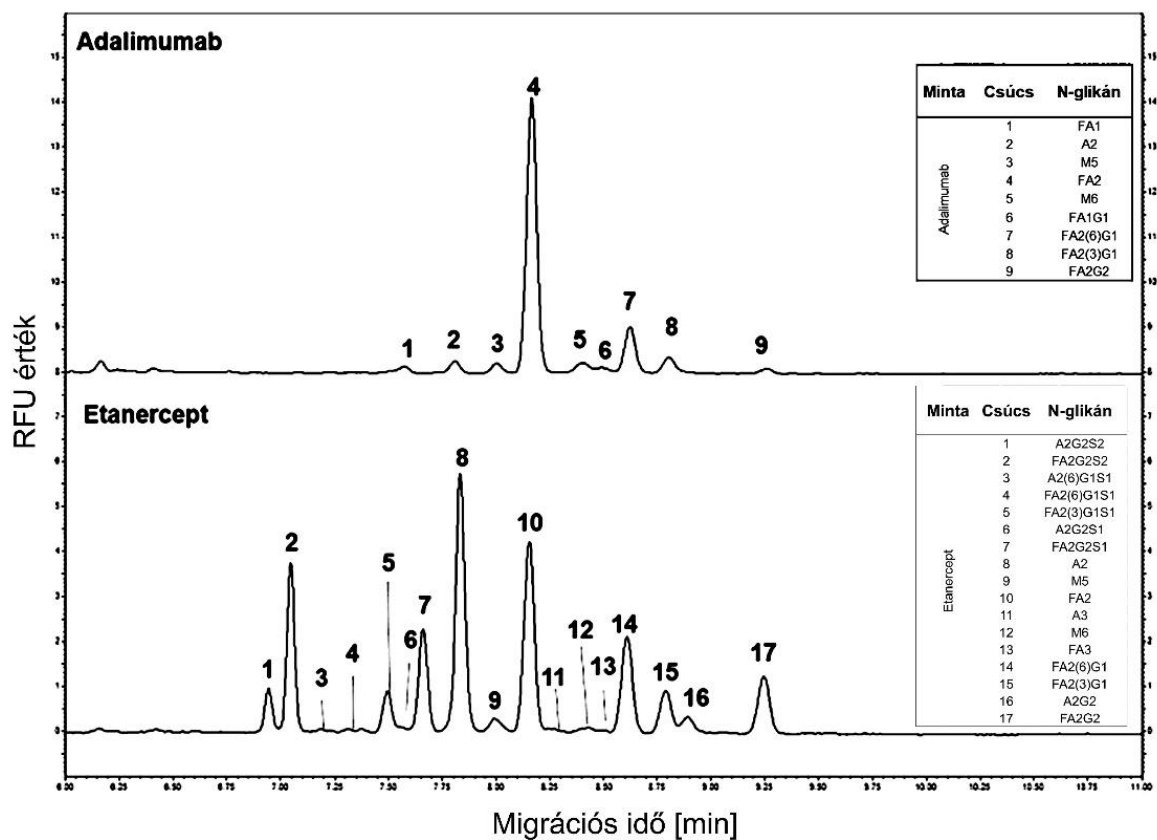
5.6 N-glikán adatbázis felállítása nagy mintaszám analíziséhez



20. ábra: Az N-glikán könyvtárak és a maltooligoszacharid létra elektroferogramjai. Az egyes csúcsokhoz tartozó cukorszerkezetekhez tartozó számított GU értékek a függelékben találhatóak.

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. A 20. ábra mutatja a 12 minta szimultán analízisét,

amelyből három APTS-szel jelölt neutrális és hat szialilált N-glikán könyvtár található. A felső három elektroferogramon (A, B és C) láthatók a partíciónált fukozilált biantennáris, afukozilált biantennáris és mannózban gazdag könyvtárak struktúrái. A hat középső elektroferogramon (D-I) pedig a bi-, tri- és tertaantennáris szialilált könyvtárak láthatók $\alpha(2-3)$ (D-F), illetve $\alpha(2-6)$ (G-I) irányultságú szialsavakkal. Az ábra legalsó elektroferogramján pedig a maltooligoszacharid létra (J) N-glikánjai láthatók. Kiemelném, hogy a multikapilláris gélelektroforézis készülékkel egyszerre 12 minta volt mérhető kevesebb, mint 10 perc alatt (beleértve a két bioterapeutikumot, amelyek profiljait a 21. ábrán láthatjuk).



21. ábra: A két bioterapeutikum APTS-szel jelölt N-glikán profilja multikapilláris elektroforézissel való elválasztást követően. A szerkezeti azonosításhoz az új GU adatbázis használtam

A fukozilált (A), afukozilált (B) és mannózgazdag könyvtárak (C) esetén 15-15 és 9 szerkezetet sikerült azonosítanom, míg a bi- (D), tri- (E) és tertaantennáris (F) $\alpha(2-3)$ pozícióban kapcsolódó szialsavas könyvtárak esetén, 17-6-6 N-glikánszerkezetet határoztam meg. A G-től I-ig ábrázolt glikán profilok az $\alpha(2-6)$ orientációban kapcsolódó bi-, tri- és tetraantennáris

szerkezeteket reprezentálják, ahol 18-6-6 szerkezetet identifikáltam J-vel jelöltem a maltooligoszacharid létrát, melyen jól látszik a rendszer megfelelő elválasztási képessége.

Minden glikán neve követi az Oxford nomenklatúrát, amelyek www.GlycoStore.org oldalon megtalálhatók, a hozzájuk tartozó, számított GU értékek 25°C-on pedig az új GU adatbázist képezik a multikapilláris gélelektorforézissel történő elválasztásokhoz. A feltüntetett adatokhoz a www.GUcal.hu weboldaltól 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.

8. táblázat: A multikapilláris gélelektroforézis használatához létrehozott GU adatbázis összefoglalása.

Minta	Csúcs	N-glikán	GU 25°C-on
APTS-(Fucosyl Biantennary Library)	1	FN2	2,535
	2	FM1	3,299
	3	A2G2S2	3,907
	4	FA2G2S2	4,052
	5	FM3	4,966
	6	FA2G1S1	5,017
	7	FA2G2S1	5,697
	8	A2	6,507
	9	FA2	6,663
	10	FA2B	7,197
	11	FA2[6]G1	7,660
	12	FA2[3]G1	8,054
	13	FA2B[6]G1	8,126
	14	FA2G2	9,052
	15	FA2BG2	9,477
APTS-(Afucosyl biantennary Library)	1	N2	2,241
	2	M1	2,852
	3	A2GS2	3,908
	4	A2BG2S2	4,084

Minta	Csúcs	N-glikán	GU 25°C-on
	5	M3	4,530
	6	A2G1S1	4,749
	7	A2G2S1	5,430
	8	A2	5,915
	9	A2B	6,507
	10	A2 [6]G1	6,887
	11	A2 [3]G1	7,289
	12	A2[6]BG1	7,529
	13	A2[3]BG1	7,670
	14	A2G2	8,307
	15	A2BG2	8,949
APTS High Mannose Library	1	M5	6,331
	2	M6	7,137
	3	M7	7,828
	4	M7	8,009
	5	M7	8,181
	6	M8	8,293
	7	M8	8,452
	8	M8	8,988
	9	M9	9,535
APTS α(2-3) Sialylated Biantennary Library	1	A2G2S(3)2	4,235
	2	FA2G2S(3)2	4,422
	3	A2[6]G1S(3)1	4,657
	4	A2[3]G1S(6)1	4,772
	5	A2[3]G1S(3)1	4,923
	6	FA2[6]G1S(3)1	5,033
	7	FA2[3]G1S(3)1	5,275
	8	A2G2S(3)1	5,592
	9	FA2G2S(3)1	5,959
	10	FA2	6,636
	11	A2[6]G1	6,839
	12	A2[3]G1	7,25
	13	FA1G1	7,34
	14	FA2[6]G1	7,631
	15	FA2[3]G1	8,028

Minta	Csúcs	N-glikán	GU 25°C-on
	16	A2G2	8,26
	17	FA2G2	9,025
APTS α(2-3) Sialylated Triantennary Library	1	A3G3S(3)3	4,185
	2	A3G3S(3)2	5,183
	3	FA2[3]G1S(3)1	5,234
	4	A3G3S(3)1	6,876
	5	A3G3S(3)1	7,094
	6	A3G3	10,49
APTS α(2-3) Sialylated Tetrantennary Library	1	A4G4S(3)4	4,184
	2	A4G4S(3)3	4,967
	3	A4G4S(3)2	6,18
	4	A4G4S(3)2	6,305
	5	A4G4S(3)1	8,398
	6	A4G4S(3)1	8,487
	7	A4G4	12,555
APTS α(2-6) Sialylated Biantennary Library	1	A2G2S(6)2	3,887
	2	FA2G2S(6)2	4,028
	3	A2G2S(3)2	4,269
	4	A2[6]G1S(6)1	4,482
	5	A2[6]G1S(3)1	4,616
	6	A2[3]G1S(6)1	4,72
	7	FA2[6]G1S(6)1	4,864
	8	FA2[3]G1S(6)1	4,989
	9	A2G2S(6)1	5,395
	10	FA2G2S(6)1	5,665
	11	FA2	6,636
	12	A2[6]G1	6,841
	13	A2[3]G1	7,237
	14	FA1G1	7,381
	15	FA2[6]G1	7,62
	16	FA2[3]G1	8,017
	17	A2G2	8,25
	18	FA2G2	9,009
APTS α(2-6) Sialylated Triantennary Library	1	A4G4S(6)4	3,658
	2	A3G3S(6)3	3,782

Minta	Csúcs	N-glikán	GU 25°C-on
	3	A2G2S(6)2	3,859
	4	A3G3S(6)2	4,887
	5	A3G3S(6)1	6,846
	6	A3G3	10,496
APTS α(2-6) Sialylated Tetraantennary Library	1	A4G4S(6)4	3,615
	2	A4G4S(6)3	4,419
	3	A4G4S(6)3	4,467
	4	A4G4S(6)2	5,813
	5	A4G4S(6)1	8,32
	6	A4G4	12,52

6. Megbeszélés

6.1 Adalimumab kritikus minőségi attribútumának mennyiségi meghatározása

Az adalimumab monoklonális antitest alapú bioterapeutikum Fc régióján található CQA jelentőségű N-glikánok CGE-LIF analízise megfelelő kvalitatív és kvantitatív szénhidrát azonosítást biztosított, különös tekintettel a jelenlévő mannóz-5 (Man5) oligoszacharid struktúrák mennyiségére. Ennek az N-glikozilációval szoros összefüggésben lévő kvantitatív CQA analízise a következőképpen történt.

Az adalimumab Fc-régiójáról lehasított glikánokoz Man5 oligoszacharidot adtam különböző koncentrációkban. Az injektálási paraméterek kombinálásával meghatározott injektálási együttható, valamint a csúcsterületek nagysága között nagyon pontos, lineáris összefüggést tártam fel. Pontos mennyiségi meghatározást értem el elektrokinetikus injektálás segítségével, melynek révén szoros korreláció mutatkozott a csúcsterületek és a mintában lévő, vizsgálni kívánt N-glikán koncentrációja között. Bebizonyítva, hogy a mannóz-5, mint CQA tényleges koncentrációja pontosan mérhető széles koncentráció-tartományban, jelen munkában ismertetett módszer megkönnyítheti a további kiemelt fontosságú szénhidrátok mennyiségi meghatározását. Ez idáig az adalimumab kapilláris elektroforézissel történő kvantitatív analízisére nem volt példa.

6.2 Elválasztási hőmérséklet beállítása

Mivel az eltérő N-kötött cukrok elválasztási optimuma eltérő hőmérsékleti értékekhez rendelhető, hőmérsékletgradienst alkalmaztam Szigeti Márton és Guttman András munkája nyomán, a minél nagyobb felbontású analízis érdekében, majd három eltérő hőmérsékleten is elvégeztem a szeparációt. Megállapítottam, hogy 30°C-ot használok a továbbiakban az elválasztások során, mellyel jóval rövidebb idő alatt mentek végbe az egyes elválasztások a hőmérsékletgradienshez képest, viszonylag jó felbontás mellett.

6.3 Az etanercept innovátor és bioszimiláris verziójának glikoszimilaritása

A kapilláris elektroforézis, mint potenciális ortogonális analitikai módszer, egy olyan elektromos tér által vezérelt elválasztási technika, amely nagy felbontóképességgel bír, emellett pedig kiválóan alkalmas oligoszacharidok detektálására [95]. Doktori munkám során ezt az analitikai technikát használtam fel fluorescens detektálással kombinálva, hogy kvantitatív

összehasonlítást végeztek egy innovátor bioterápiás fúziós fehérje (Enbrel®) és annak bioszimiláris verziója (Benepali) között glikomikai szempontból. Noha szignifikáns különbségeket találtam a szialilált, mag-fukozilált és galaktozilált N-glikán struktúrák mennyiségében, mivel az ADCC és CDC nem képezik részét a terapeutikum hatásmechanizmusának, az adatok ezen részét nem vettem figyelembe a glikoszimilaritás kiértékelésekor. Másrészt a mannoziláció fontos szerepet játszik a szérumból való kiürülésben, így a mennyiségi analízis során az erősen mannozilált struktúrákat vettem a biohasonlóság megállapításának alapjául, mint kritikus minőségi paramétert. Az összehasonlítás alapját a Szkrényes és mtsi által összefoglalt bioszimilaritási index számítások képezik, eltekintve attól, hogy eltérő sarzsok összehasonlítására nem volt lehetőség. Tudomásom szerint eddig még nem készült olyan munka, amely kapilláris elektroforézissel végzett volna N-glikomikai összehasonlítást etanercept esetében, így az eredményeim nem tudtam összehasonlítani irodalmi adatokkal.

6.4 Új glükózegység adatbázis létrehozása multikapilláris elektroforézissel

Az előzőekben bebizonyítottam, hogy a CGE-LIF erős potenciállal bír biohasonlósági vizsgálatokban, mint ortogonális technika. A klinikai gyakorlatban, bioszimilaritási klinikai és preklinikai vizsgálatoknál és a gyógyszeriparban azonban gyakran előfordul, hogy egyszerre nagy mintaszámot kell rövid időn belül analizálni. Erre kínál vonzó alternatívát a multikapilláris gélelektroforézis készülék, amely egyszerre képes 12 mintát analizálni, mindezt kb. 10 perc alatt. A klasszikus CE elrendezéstől való eltérések miatt azonban szükség van a gyors és pontos kiértékeléshez egy új GU adatbázisra.

Munkám során particionált fukozilált biantennáris, afukozilált biantennáris, oligomannóz, valamint bi-, tri- és tertaantennáris $\alpha(2-3)$, illetve $\alpha(2-6)$ irányultságú szialósavak glikánkönyvtárakat analizáltam maltooligoszaharid létrával 25°C-on. Emellett a dolgozatban vizsgált 2 terápiás fehérje N-glikozilációs profilját is vizsgáltam.

A maltooligoszaharid segítségével normalizáltam könyvtárakban lévő N-kötött cukrok migrációs idejeit, Gucal segítségével pedig új adatbázist állítottam fel a multikapilláris elektroforézissel való kiértékeléshez.

7. 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 cukorstandardot. 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 ugyan nincs minőségbeli eltérés a két N-glikozilációs mintázat között, 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 magfukozilált biantennáris glikán (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 és +19%).

Végezetül, annak érdekében, hogy a kapilláris elektroforézisre 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 terápiais antitestek (etanercept és adalimumab) N-glikánjait azonosítottam.

8. Summary

In the course of my work, I first developed a quantitative evaluation method based on an orthogonal analytical technique (CGE-LIF), which can be used to easily determine the exact amounts of CQA-relevant sugar structures in the N-glycan profile of biotherapeutics. To accomplish this part of the task, I used adalimumab, to which I added different amounts of Man5 sugar standard. I found a highly accurate ($R^2=0.9990$) linear relationship between peak areas and the injection coefficient defined by the combination of electrokinetic sample introduction parameters. I also examined the effect of concentration on peak areas, and the result was also a very accurate ($R^2=0.9995$) exponential relationship. The amount of original Man5 in the sample (2.94 ng) was calculated based on my results.

In the next step, instead of a monoclonal antibody a fusion protein (etanercept) was analyzed. I performed a quantitative comparison of the innovative and biosimilar version using CGE-LIF, for which I used the relative peak areas. Initially, I identified the N-glycans associated with etanercept by exoglycosidase matrix digestion mediated sequencing, then determined the temperature optimum of the separation. I found no profile difference between the two N-glycan pools, but the individual structures were present in different amounts. Based on the theoretical considerations of the glycosimilarity index, I compared the relative peak areas for quantitative evaluation. When evaluating glycosimilarity, I used the generally accepted tolerance limit of $\pm 20\%$. A core-fucosylated biantennary glycan (FA2) was expressed to the greatest extent in both versions, however, this structure has a CDC modulatory role, which is not part of the mode of action, i.e., it cannot be considered as glycosimilarity criterion. The biosimilar profile showed the abundance of highly galactosylated sugar structures (+130 and +124%), but these were not relevant from glycosimilarity point of view. Monogalactosylated and high-mannose glycans were present in very similar proportions compared to the innovator (+7 and +10%) (-13 and +19%).

Finally, in order to ensure that the analytical methods and evaluations I developed for capillary electrophoresis can be applied to high throughput screening, fucosylated biantennary, afucosylated biantennary, high-mannose, in addition bi-, tri- and tertaantennary $\alpha(2-3)$ and $\alpha(2-6)$ sialylated glycan libraries were analyzed with a multicapillary electrophoresis device. With the help of the maltooligosaccharide ladder and the GUCal software, I generated a new glucose unit database, creating the opportunity for a more accurate evaluation when using a multicapillary electrophoresis device. After setting up the database, I identified the N-glycan

pools of therapeutic antibodies (etanercept and adalimumab) analyzed parallel with glycan libraries and the maltooligosaccharide ladder by using a multicapillary electrophoresis system.

9. Új tudományos eredmények

Az elvégzett munka alapján a következő megállapításokat lehet tenni:

Az adalimumab monoklonális antitest mintaelőkészítése során az egyes mintákhoz egyre növekvő mennyiségben adtam Man5 cukor standardot. A CGE-LIF analízissel kapott eredmények segítségével lineáris összefüggést tártam fel a csúcsterületek nagysága és az elektrokinetikus injektálási együtthatók értéke között.

Munkám során exponenciális összefüggést állapítottam meg a vizsgálni kívánt N-glikán koncentrációja és a kapott csúcsterületek között elektrokinetikus injektálás mellett.

A kapott összefüggések és a hozzáadott Man5 koncentrációk ismeretében egy olyan kiértékelési módszert kaptam, melynek segítségével kiszámolható a minta eredeti Man5 koncentrációja. A módszer tetszőleges N-glikánra alkalmazható.

Szintén CGE-LIF segítségével összevettem az etanercept nevű fúziós fehérje N-glikomikai mintázatát, melyre tudomásom szerint eddig az irodalomban nem volt példa. Az egyes struktúrákat egymással összevettem és az adott glikán hatásmechanizmusban betöltött szerepe szerint kiértékeltem.

Multikapilláris elektroforézis eszközzel LED-indukált detektálás mellett N-glikán könyvtárakat és két terápiás fehérjét analizáltam. A glikánkönyvtárak segítségével új GU adatbázist hoztam létre, melynek révén nagy mintaszám mellett, gyors kiértékelés válik megvalósíthatóvá. Az új GU adatbázis segítségével azonosítottam az adalimumab és az innovátor etanercept N-glikán szerkezeit.

10. Irodalomjegyzék

1. Sekhon, B. and V. Saluja, *Biosimilars: an overview*. Biosimilars, 2011. **Volume 1**: p. 1-11.
2. Mikulic, M. *Size of the global chemical drugs and biologics pharmaceutical market from 2014 to 2023*. 2022; Available from: <https://www.statista.com/statistics/1085563/revenue-chemical-drugs-and-biologics-global-pharmaceuticals/>.
3. Kresse, G.B., *Biosimilars--science, status, and strategic perspective*. Eur J Pharm Biopharm, 2009. **72**(3): p. 479-86.
4. Nikolov, N.P. and M.A. Shapiro, *An FDA perspective on the assessment of proposed biosimilar therapeutic proteins in rheumatology*. Nat Rev Rheumatol, 2017. **13**(2): p. 123-128.
5. Calo-Fernandez, B. and J.L. Martinez-Hurtado, *Biosimilars: company strategies to capture value from the biologics market*. Pharmaceuticals (Basel), 2012. **5**(12): p. 1393-408.
6. Nowicki, M., *Basic facts about biosimilars*. Kidney Blood Press Res, 2007. **30**(5): p. 267-72.
7. Weise, M., et al., *Biosimilars-why terminology matters*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(8): p. 690-3.
8. EMA. *Guideline on similar biological medicinal products*. 2014; Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-rev1_en.pdf.
9. Stevenson, J.G., *Clinical data and regulatory issues of biosimilar products*. Am J Manag Care, 2015. **21**(16 Suppl): p. s320-30.
10. Anour, R. and DVM, *Biosimilars versus 'biobetters'—a regulator's perspective*. Generics and Biosimilars Initiative, 2014. **3**(4): p. 166-167.
11. Berkowitz, S.A., et al., *Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars*. Nat Rev Drug Discov, 2012. **11**(7): p. 527-40.
12. FDA. *Guidance for Industry: Quality Considerations in Demonstrating Biosimilarity of a Therapeutic Protein Product to a Reference Product*. 2015; Available from: <https://www.fda.gov/media/135612/download>.
13. Chow, S.C., *On Assessment of Analytical Similarity in Biosimilar Studies*. Drug Des, 2014. **3**(3): p. e124.
14. Karalis, V.D., *From Bioequivalence to Biosimilarity: The Rise of a Novel Regulatory Framework*. Drug Res (Stuttg), 2016. **66**(1): p. 1-6.
15. Fang, J., et al., *Advanced assessment of the physicochemical characteristics of Remicade(R) and Inflectra(R) by sensitive LC/MS techniques*. MAbs, 2016. **8**(6): p. 1021-34.
16. Jung, S.K., et al., *Physicochemical characterization of Remsima*. MAbs, 2014. **6**(5): p. 1163-77.
17. Visser, J., et al., *Physicochemical and functional comparability between the proposed biosimilar rituximab GP2013 and originator rituximab*. BioDrugs, 2013. **27**(5): p. 495-507.
18. EMA. *ICH Topic Q5E: Comparability of Biotechnological/Biological Products* 2005; Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-5-e-comparability-biotechnological/biological-products-step-5_en.pdf.

19. Schiestl, M., et al., *Acceptable changes in quality attributes of glycosylated biopharmaceuticals*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(4): p. 310-2.
20. Nupur, N., et al., *Analytical Similarity Assessment of Biosimilars: Global Regulatory Landscape, Recent Studies and Major Advancements in Orthogonal Platforms*. Front Bioeng Biotechnol, 2022. **10**: p. 832059.
21. Azevedo, V., et al., *Differentiating biosimilarity and comparability in biotherapeutics*. Clin Rheumatol, 2016. **35**(12): p. 2877-2886.
22. Chow, S.C., *Challenging issues in assessing analytical similarity in biosimilar studies*. Biosimilars, 2015. **5**: p. 33-39.
23. Lu, Y., S.C. Chow, and Z.Z. Zhang, *Statistical Designs for Assessing Interchangeability of Biosimilar Products*. Drug Des, 2013. **3**(1): p. 1000109.
24. Chow, S.C., et al., *Statistical methods for assessing interchangeability of biosimilars*. Stat Med, 2013. **32**(3): p. 442-8.
25. Hsieh, T.C., et al., *The evaluation of biosimilarity index based on reproducibility probability for assessing follow-on biologics*. Stat Med, 2013. **32**(3): p. 406-14.
26. FDA. *Guidance for Industry: Statistical Approaches to Establishing Bioequivalence*. 2001; Available from: <https://www.fda.gov/media/70958/download>.
27. Lu, Y., S.C. Chow, and S. Zhu, *In vivo and In vitro Bioequivalence Testing*. J Bioequiv Availab, 2014. **6**: p. 067-074.
28. Chow, S.C., et al., *Scientific factors for assessing biosimilarity and drug interchangeability of follow-on biologics*. Biosimilars, 2011. **1**: p. 13-26.
29. Zhang, A., J.Y. Tzeng, and S.C. Chow, *Statistical considerations in biosimilar assessment using biosimilarity index*. J Bioequivalence Bioavailab, 2013. **5**(5): p. 209-214.
30. Chow, S.C., et al., *Scientific considerations for assessing biosimilar products*. Stat Med, 2013. **32**(3): p. 370-81.
31. Food, U. and D. Administration, *Development of Therapeutic Protein Biosimilars: Comparative Analytical Assessment and Other Quality-Related Considerations Guidance for Industry DRAFT GUIDANCE*. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), 2019.
32. Lee, J.-H., et al., *Biochemical characterization of a new recombinant TNF receptor-hyFc fusion protein expressed in CHO cells*. Protein Expression and Purification, 2013. **87**(1): p. 17-26.
33. Crobu, D., et al., *Preclinical and clinical phase I studies of a new recombinant Filgrastim (BK0023) in comparison with Neupogen(R)*. BMC Pharmacol Toxicol, 2014. **15**: p. 7.
34. Singleton, C.A., *MS in the analysis of biosimilars*. Bioanalysis, 2014. **6**(12): p. 1627-1637.
35. Deechongkit, S., et al., *Biophysical comparability of the same protein from different manufacturers: a case study using Epoetin alfa from Epogen and Eprex*. J Pharm Sci, 2006. **95**(9): p. 1931-43.
36. Skrlin, A., et al., *Comparison of the physicochemical properties of a biosimilar filgrastim with those of reference filgrastim*. Biologicals, 2010. **38**(5): p. 557-66.
37. Liu, J., et al., *Assessing Analytical Similarity of Proposed Amgen Biosimilar ABP 501 to Adalimumab*. BioDrugs, 2016. **30**(4): p. 321-38.
38. Zhang, E., et al., *Quality by Design-Based Assessment for Analytical Similarity of Adalimumab Biosimilar HLX03 to Humira(R)*. AAPS J, 2020. **22**(3): p. 69.
39. Moro Perez, L., et al., *Conformational characterization of a novel anti-HER2 candidate antibody*. PLoS One, 2019. **14**(5): p. e0215442.

40. Lerch, T.F., et al., *Crystal Structures of PF-06438179/GP1111, an Infliximab Biosimilar*. *BioDrugs*, 2020. **34**(1): p. 77-87.
41. Kovacs, P., et al., *Comparative Physicochemical and Biological Characterisation of the Similar Biological Medicinal Product Teriparatide and Its Reference Medicinal Product*. *BioDrugs*, 2020. **34**(1): p. 65-75.
42. Montacir, O., et al., *Comparability study of Rituximab originator and follow-on biopharmaceutical*. *J Pharm Biomed Anal*, 2017. **140**: p. 239-251.
43. Hermosilla, J., et al., *Comparative Stability Studies of Different Infliximab and Biosimilar CT-P13 Clinical Solutions by Combined Use of Physicochemical Analytical Techniques and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. *BioDrugs*, 2019. **33**(2): p. 193-205.
44. Halim, L.A., et al., *Quality Comparison of Biosimilar and Copy Filgrastim Products with the Innovator Product*. *Pharm Res*, 2018. **35**(11): p. 226.
45. Lee, N., et al., *Evaluation of similar quality attribute characteristics in SB5 and reference product of adalimumab*. *MAbs*, 2019. **11**(1): p. 129-144.
46. Stanley, P., N. Taniguchi, and M. Aebi, *N-Glycans*, in *Essentials of Glycobiology*, rd, et al., Editors. 2015: Cold Spring Harbor (NY). p. 99-111.
47. Rothman, J.E. and H.F. Lodish, *Synchronised transmembrane insertion and glycosylation of a nascent membrane protein*. *Nature*, 1977. **269**(5631): p. 775-80.
48. Chen, W., et al., *Cotranslational folding and calnexin binding during glycoprotein synthesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(14): p. 6229-33.
49. Ruiz-Canada, C., D.J. Kelleher, and R. Gilmore, *Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms*. *Cell*, 2009. **136**(2): p. 272-83.
50. Gavel, Y. and G. von Heijne, *Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering*. *Protein Eng*, 1990. **3**(5): p. 433-42.
51. Ben-Dor, S., et al., *Biases and complex patterns in the residues flanking protein N-glycosylation sites*. *Glycobiology*, 2004. **14**(2): p. 95-101.
52. Shrimal, S., N.A. Cherepanova, and R. Gilmore, *Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum*. *Semin Cell Dev Biol*, 2015. **41**: p. 71-8.
53. Gagneux, P., T. Hennet, and A. Varki, *Biological Functions of Glycans*, in *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, et al., Editors. 2022: Cold Spring Harbor (NY). p. 79-92.
54. Varki, A., *Biological roles of glycans*. *Glycobiology*, 2017. **27**(1): p. 3-49.
55. Partridge, E.A., et al., *Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis*. *Science*, 2004. **306**(5693): p. 120-4.
56. Azadi, P., *Challenges in Comparability Studies of Glycoprotein Biosimilars*. *Pharm. Outsourcing*, 2015. **16**(7).
57. Natsume, A., R. Niwa, and M. Satoh, *Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC*. *Drug Des Devel Ther*, 2009. **3**: p. 7-16.
58. Raju, T.S., *Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs*. *Curr Opin Immunol*, 2008. **20**(4): p. 471-8.
59. Iida, S., et al., *Two mechanisms of the enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) efficacy of non-fucosylated therapeutic antibodies in human blood*. *BMC Cancer*, 2009. **9**: p. 58.
60. Shade, K.-T.C. and R.M. Anthony, *Antibody Glycosylation and Inflammation*. *Antibodies*, 2013. **2**(3): p. 392-414.
61. Goetze, A.M., et al., *High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans*. *Glycobiology*, 2011. **21**(7): p. 949-59.

62. Reusch, D. and M.L. Tejada, *Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes*. *Glycobiology*, 2015. **25**(12): p. 1325-34.
63. Szabo, Z., et al., *Ultrasensitive capillary electrophoretic analysis of potentially immunogenic carbohydrate residues in biologics: galactose-alpha-1,3-galactose containing oligosaccharides*. *Mol Pharm*, 2012. **9**(6): p. 1612-9.
64. Szabo, Z., et al., *Sialic acid speciation using capillary electrophoresis: optimization of analyte derivatization and separation*. *Anal Chem*, 2012. **84**(18): p. 7638-42.
65. Schiestl, M., et al., *The role of the quality assessment in the determination of overall biosimilarity: a simulated case study exercise*. *Biologicals*, 2014. **42**(2): p. 128-32.
66. Jefferis, R., *Glycosylation of antibody therapeutics: optimisation for purpose*. *Methods Mol Biol*, 2009. **483**: p. 223-38.
67. Zeck, A., et al., *Cell type-specific and site directed N-glycosylation pattern of FcgammaRIIIa*. *J Proteome Res*, 2011. **10**(7): p. 3031-9.
68. Costa, A.R., et al., *Glycosylation: impact, control and improvement during therapeutic protein production*. *Crit Rev Biotechnol*, 2014. **34**(4): p. 281-99.
69. Steentoft, C., et al., *Precision genome editing: a small revolution for glycobiology*. *Glycobiology*, 2014. **24**(8): p. 663-80.
70. Beck, A., O. Cochet, and T. Wurch, *GlycoFi's technology to control the glycosylation of recombinant therapeutic proteins*. *Expert Opin Drug Discov*, 2010. **5**(1): p. 95-111.
71. Meuris, L., et al., *GlycoDelete engineering of mammalian cells simplifies N-glycosylation of recombinant proteins*. *Nat Biotechnol*, 2014. **32**(5): p. 485-9.
72. Piron, R., et al., *Using GlycoDelete to produce proteins lacking plant-specific N-glycan modification in seeds*. *Nat Biotechnol*, 2015. **33**(11): p. 1135-7.
73. Spahn, P.N., et al., *Predictive glycoengineering of biosimilars using a Markov chain glycosylation model*. *Biotechnol J*, 2017. **12**(2).
74. Bruhlmann, D., et al., *Parallel experimental design and multivariate analysis provides efficient screening of cell culture media supplements to improve biosimilar product quality*. *Biotechnol Bioeng*, 2017. **114**(7): p. 1448-1458.
75. Albrecht, S., M. Hilliard, and P.M. Rudd, *Therapeutic proteins: facing the challenges of glycobiology*. *JHPOR*, 2014.
76. Kuhlmann, M. and A. Covic, *The protein science of biosimilars*. *Nephrol Dial Transplant*, 2006. **21 Suppl 5**: p. v4-8.
77. Planinc, A., et al., *Glycan characterization of biopharmaceuticals: Updates and perspectives*. *Anal Chim Acta*, 2016. **921**: p. 13-27.
78. Guttman, A., *Capillary electrophoresis in the N-glycosylation analysis of biopharmaceuticals*. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2013. **48**: p. 132-143.
79. Mittermayr, S., et al., *Multiplexed analytical glycomics: rapid and confident IgG N-glycan structural elucidation*. *J Proteome Res*, 2011. **10**(8): p. 3820-9.
80. Thakur, D., et al., *Profiling the glycoforms of the intact alpha subunit of recombinant human chorionic gonadotropin by high-resolution capillary electrophoresis-mass spectrometry*. *Anal Chem*, 2009. **81**(21): p. 8900-7.
81. Zhang, C. and Y. Liu, *Retrieving Quantitative Information of Histone PTMs by Mass Spectrometry*. *Methods Enzymol*, 2017. **586**: p. 165-191.
82. El Kennani, S., et al., *Proteomic Analysis of Histone Variants and Their PTMs: Strategies and Pitfalls*. *Proteomes*, 2018. **6**(3).
83. Marx, V., *Making sure PTMs are not lost after translation*. *Nat Methods*, 2013. **10**(3): p. 201-4.
84. Zhang, P., et al., *Challenges of glycosylation analysis and control: an integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs*. *Drug Discov Today*, 2016. **21**(5): p. 740-65.

85. Bush, D.R., et al., *High Resolution CZE-MS Quantitative Characterization of Intact Biopharmaceutical Proteins: Proteoforms of Interferon-beta1*. *Anal Chem*, 2016. **88**(2): p. 1138-46.
86. An, Y., et al., *A new tool for monoclonal antibody analysis: application of IdeS proteolysis in IgG domain-specific characterization*. *MAbs*, 2014. **6**(4): p. 879-93.
87. Sjogren, J., F. Olsson, and A. Beck, *Rapid and improved characterization of therapeutic antibodies and antibody related products using IdeS digestion and subunit analysis*. *Analyst*, 2016. **141**(11): p. 3114-25.
88. Faid, V., et al., *Middle-up analysis of monoclonal antibodies after combined IgdE and IdeS hinge proteolysis: Investigation of free sulphhydryls*. *J Pharm Biomed Anal*, 2018. **149**: p. 541-546.
89. Carillo, S., et al., *Comparing different domains of analysis for the characterisation of N-glycans on monoclonal antibodies*. *J Pharm Anal*, 2020. **10**(1): p. 23-34.
90. Chen, F.T. and R.A. Evangelista, *Profiling glycoprotein n-linked oligosaccharide by capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*, 1998. **19**(15): p. 2639-44.
91. Hajba, L., et al., *On the glycosylation aspects of biosimilarity*. *Drug Discov Today*, 2018. **23**(3): p. 616-625.
92. Yang, X. and M.G. Bartlett, *Glycan analysis for protein therapeutics*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2019. **1120**: p. 29-40.
93. Duke, R. and C.H. Taron, *N-Glycan Composition Profiling for Quality Testing of Biotherapeutics*. *Biopharm International*, 2015. **28**(12): p. 59-64.
94. Szigeti, M. and A. Guttman, *Automated N-Glycosylation Sequencing Of Biopharmaceuticals By Capillary Electrophoresis*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 11663.
95. Guttman, A., *Analysis of monosaccharide composition by capillary electrophoresis*. *J Chromatogr A*, 1997. **763**(1-2): p. 271-7.
96. Kitagawa, H., A. Kinoshita, and K. Sugahara, *Microanalysis of glycosaminoglycan-derived disaccharides labeled with the fluorophore 2-aminoacridone by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography*. *Anal Biochem*, 1995. **232**(1): p. 114-21.
97. Morell, M.K., M.S. Samuel, and M.G. O'Shea, *Analysis of starch structure using fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis*. *Electrophoresis*, 1998. **19**(15): p. 2603-11.
98. O'Shea, M.G., et al., *Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) of oligosaccharides: efficiency of labelling and high-resolution separation*. *Carbohydrate Research*, 1998. **307**(1-2): p. 1-12.
99. Szekrenyes, A., et al., *Quantitative comparison of the N-glycosylation of therapeutic glycoproteins using the Glycosimilarity Index. A tutorial*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2020. **122**: p. 115728.
100. Jarvas, G., et al., *Triple-Internal Standard Based Glycan Structural Assignment Method for Capillary Electrophoresis Analysis of Carbohydrates*. *Anal Chem*, 2016. **88**(23): p. 11364-11367.
101. Jarvas, G., M. Szigeti, and A. Guttman, *Structural identification of N-linked carbohydrates using the GUcal application: A tutorial*. *J Proteomics*, 2018. **171**: p. 107-115.
102. Ahuja, S., *1 Overview of HPLC method development for pharmaceuticals*. *Sep Sci Technol*, 2007. **8**: p. 1-11.
103. Horvath, C.G. and S.R. Lipsky, *Use of liquid ion exchange chromatography for the separation of organic compounds*. *Nature*, 1966. **211**(5050): p. 748-9.

104. Dillon, T.M., et al., *Optimization of a reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry method for characterizing recombinant antibody heterogeneity and stability*. J Chromatogr A, 2006. **1120**(1-2): p. 112-20.
105. Fekete, S., et al., *Adsorption and recovery issues of recombinant monoclonal antibodies in reversed-phase liquid chromatography*. J Sep Sci, 2015. **38**(1): p. 1-8.
106. Chen, X. and G.C. Flynn, *Analysis of N-glycans from recombinant immunoglobulin G by on-line reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry*. Anal Biochem, 2007. **370**(2): p. 147-61.
107. Novakova, L., L. Matysova, and P. Solich, *Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis*. Talanta, 2006. **68**(3): p. 908-18.
108. Buszewski, B. and S. Noga, *Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)--a powerful separation technique*. Anal Bioanal Chem, 2012. **402**(1): p. 231-47.
109. Periat, A., et al., *Potential of hydrophilic interaction chromatography for the analytical characterization of protein biopharmaceuticals*. J Chromatogr A, 2016. **1448**: p. 81-92.
110. D'Atri, V., et al., *Hydrophilic Interaction Chromatography for the Characterization of Therapeutic Monoclonal Antibodies at Protein, Peptide, and Glycan Levels*. Lc Gc Europe, 2017. **30**(8): p. 424-434.
111. Dominguez-Vega, E., et al., *High-resolution glycoform profiling of intact therapeutic proteins by hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry*. Talanta, 2018. **184**: p. 375-381.
112. Zhang, Z., Z. Wu, and M.J. Wirth, *Polyacrylamide brush layer for hydrophilic interaction liquid chromatography of intact glycoproteins*. J Chromatogr A, 2013. **1301**: p. 156-61.
113. van Schaick, G., et al., *Computer-aided gradient optimization of hydrophilic interaction liquid chromatographic separations of intact proteins and protein glycoforms*. J Chromatogr A, 2019. **1598**: p. 67-76.
114. Wuhler, M., A.R. de Boer, and A.M. Deelder, *Structural glycomics using hydrophilic interaction chromatography (HILIC) with mass spectrometry*. Mass Spectrom Rev, 2009. **28**(2): p. 192-206.
115. Falck, D., et al., *Glycoforms of Immunoglobulin G Based Biopharmaceuticals Are Differentially Cleaved by Trypsin Due to the Glycoform Influence on Higher-Order Structure*. J Proteome Res, 2015. **14**(9): p. 4019-28.
116. Largy, E., et al., *Orthogonal liquid chromatography-mass spectrometry methods for the comprehensive characterization of therapeutic glycoproteins, from released glycans to intact protein level*. J Chromatogr A, 2017. **1498**: p. 128-146.
117. Deguchi, K., et al., *Two-dimensional hydrophilic interaction chromatography coupling anion-exchange and hydrophilic interaction columns for separation of 2-pyridylamino derivatives of neutral and sialylated N-glycans*. J Chromatogr A, 2008. **1189**(1-2): p. 169-74.
118. Melmer, M., et al., *HILIC analysis of fluorescence-labeled N-glycans from recombinant biopharmaceuticals*. Anal Bioanal Chem, 2010. **398**(2): p. 905-14.
119. Staub, A., et al., *Intact protein analysis in the biopharmaceutical field*. J Pharm Biomed Anal, 2011. **55**(4): p. 810-22.
120. Lew, C., et al., *Rapid level-3 characterization of therapeutic antibodies by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry*. J Chromatogr Sci, 2015. **53**(3): p. 443-9.
121. Balaguer, E., et al., *Glycoform characterization of erythropoietin combining glycan and intact protein analysis by capillary electrophoresis - electrospray - time-of-flight mass spectrometry*. Electrophoresis, 2006. **27**(13): p. 2638-50.

122. Gahoual, R., et al., *Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry*. *Mabs*, 2013. **5**(3): p. 479-490.
123. Gimenez, E., et al., *Analysis of recombinant human erythropoietin glycopeptides by capillary electrophoresis electrospray-time of flight-mass spectrometry*. *Anal Chim Acta*, 2012. **709**: p. 81-90.
124. Khatri, K., et al., *Microfluidic Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry for Analysis of Monosaccharides, Oligosaccharides, and Glycopeptides*. *Anal Chem*, 2017. **89**(12): p. 6645-6655.
125. Chiesa, C. and R.A. O'Neill, *Capillary zone electrophoresis of oligosaccharides derivatized with various aminonaphthalene sulfonic acids*. *Electrophoresis*, 1994. **15**(8-9): p. 1132-40.
126. Hong, M., et al., *High-Resolution Studies of Hyaluronic Acid Mixtures through Capillary Gel Electrophoresis*. *Anal Chem*, 1998. **70**(3): p. 568-73.
127. Guttman, A. and T. Pritchett, *Capillary gel electrophoresis separation of high-mannose type oligosaccharides derivatized by 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonic acid*. *Electrophoresis*, 1995. **16**(10): p. 1906-11.
128. Amon, S., A.D. Zamfir, and A. Rizzi, *Glycosylation analysis of glycoproteins and proteoglycans using capillary electrophoresis-mass spectrometry strategies*. *Electrophoresis*, 2008. **29**(12): p. 2485-507.
129. Francois, Y.N., et al., *Characterization of cetuximab Fc/2 dimers by off-line CZE-MS*. *Anal Chim Acta*, 2016. **908**: p. 168-76.
130. Han, M., et al., *Intact mass analysis of monoclonal antibodies by capillary electrophoresis-Mass spectrometry*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016. **1011**: p. 24-32.
131. Kuster, B. and M. Mann, *Identifying proteins and post-translational modifications by mass spectrometry*. *Curr Opin Struct Biol*, 1998. **8**(3): p. 393-400.
132. Parker, C., et al., *Mass Spectrometry for Post-Translational Modifications*, in *Neuroproteomics*, O. Alzate, Editor. 2010, CRC Press/Taylor & Francis.
133. Stutz, H., *Protein attachment onto silica surfaces--a survey of molecular fundamentals, resulting effects and novel preventive strategies in CE*. *Electrophoresis*, 2009. **30**(12): p. 2032-61.
134. Dada, O.O., et al., *High-Resolution Capillary Zone Electrophoresis with Mass Spectrometry Peptide Mapping of Therapeutic Proteins: Peptide Recovery and Post-translational Modification Analysis in Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug Conjugates*. *Anal Chem*, 2017. **89**(21): p. 11236-11242.
135. Barroso, A., et al., *Analysis of human transferrin glycopeptides by capillary electrophoresis and capillary liquid chromatography-mass spectrometry. Application to diagnosis of alcohol dependence*. *Anal Chim Acta*, 2013. **804**: p. 167-75.
136. Faserl, K., et al., *Exploiting charge differences for the analysis of challenging post-translational modifications by capillary electrophoresis-mass spectrometry*. *J Chromatogr A*, 2017. **1498**: p. 215-223.
137. Kammeijer, G.S.M., et al., *Sialic acid linkage differentiation of glycopeptides using capillary electrophoresis - electrospray ionization - mass spectrometry*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 3733.
138. Snovida, S.I., et al., *Isolation and identification of sialylated glycopeptides from bovine alpha1-acid glycoprotein by off-line capillary electrophoresis MALDI-TOF mass spectrometry*. *Anal Chem*, 2006. **78**(18): p. 6556-63.

139. Harvey, D.J., *Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011. **879**(17-18): p. 1196-225.
140. Bain, B. and M. Brazil, *Adalimumab*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(9): p. 693-94.
141. Inc., A. *Humira: Prescribing information*. 2002 02/2021; Available from: <https://www.rxabbvie.com/pdf/humira.pdf>.
142. Vena, G.A. and N. Cassano, *Drug focus: adalimumab in the treatment of moderate to severe psoriasis*. Biologics, 2007. **1**(2): p. 93-103.
143. Eng, G.P., *Optimizing biological treatment in rheumatoid arthritis with the aid of therapeutic drug monitoring*. Dan Med J, 2016. **63**(11).
144. Chang, M. and Y. Hsu. *Interleukin-20 antagonist is a potential drug for rheumatoid arthritis*. 2006 Sep. 2006]; Available from: <http://research.ncku.edu.tw/re/articles/e/20080620/4.html>.
145. Pan, A. and V. Gerriets, *Etanercept*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
146. Goffe, B. and J.C. Cather, *Etanercept: An overview*. J Am Acad Dermatol, 2003. **49**(2 Suppl): p. S105-11.
147. Houel, S., et al., *N- and O-glycosylation analysis of etanercept using liquid chromatography and quadrupole time-of-flight mass spectrometry equipped with electron-transfer dissociation functionality*. Anal Chem, 2014. **86**(1): p. 576-84.
148. Liu, H., et al., *Impact of IgG Fc-Oligosaccharides on Recombinant Monoclonal Antibody Structure, Stability, Safety, and Efficacy*. Biotechnol Prog, 2017. **33**(5): p. 1173-1181.
149. Guttman, A., M. Kerekgyarto, and G. Jarvas, *Effect of Separation Temperature on Structure Specific Glycan Migration in Capillary Electrophoresis*. Anal Chem, 2015. **87**(23): p. 11630-4.
150. Szigeti, M. and A. Guttman, *High-Resolution Glycan Analysis by Temperature Gradient Capillary Electrophoresis*. Anal Chem, 2017. **89**(4): p. 2201-2204.
151. Altman, D.G. and J.M. Bland, *Measurement in medicine: the analysis of method comparison studies*. Journal of the Royal Statistical Society: Series D (The Statistician), 1983. **32**(3): p. 307-317.
152. Karlsson, R., E. Pol, and A. Frostell, *Comparison of surface plasmon resonance binding curves for characterization of protein interactions and analysis of screening data*. Anal Biochem, 2016. **502**: p. 53-63.

11. Tárgyszavak

bioszimiláris

bioterapeutikum

kritikus minőségi attribútum (CQA)

glikoszimilaritás

etanercept

adalimumab

N-glikán

kapilláris gélelektroforézis lézer indukált fluorescens detektálással (CGE-LIF)

multikapilláris gélelektroforézis

biosimiar

biotherapeutic

critical quality attribute (CQA)

glycosimilarity

etanercept

adalimumab

N-glycan

capillary gelelectrophoresis with laser induced fluorescence (CGE-LIF)

multicapillary gelelectrophoresis

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Guttman Andrásnak, a Horváth Csaba Elválasztástudományi Laboratórium vezetőjének munkám során nyújtott iránymutatásáért és támogatásáért, továbbá, hogy lehetőséget és stabil szakmai háttérrel biztosított számomra doktori értekezésem elkészültéhez.

Köszönet illeti Szekrényes Ákost, aki ipari tapasztalataival, szakértelmével támogatta munkámat és segítséget nyújtott az elméleti kérdések megoldásában.

További köszönet illeti kollégáimat, a Horváth Csaba Elválasztástudományi Laboratórium, valamint a Horváth Csaba Memorial Laboratory of Bioseparation Sciences munkatársait, akik szakmai tanácsaikkal segítettek munkámat. Kiemeltem hálás vagyok Mészáros Brigittának, Szigeti Mártonnak, Reider Balázsnek és Szarka Máténak, akik értékes elméleti és tapasztalati tanácsokkal segítettek munkámat.

Hálával tartozom családomnak és barátaimnak, akik mindvégig türelmet és megértést tanúsítottak irányomban munkám során.

Az értekezésemet férjemnek és kollégámnak, Sárközy Dánielnek ajánlom, akinek a türelme, megértése és szakmai tanácsai nélkül jelen dolgozat nem készülhetett volna el.

13. Függelék



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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.**, Járvás, 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.





Registry number: DEENK/165/2023.PL
Subject: PhD Publication List

Candidate: Beáta Borza
Doctoral School: Doctoral School of Molecular Medicine

List of publications related to the dissertation

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

List of other publications

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., Nemesóthy, 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., Nemesóthy, 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., Nemesóthy, N.: Biohidrogén fermentációs kísérletek mérési módszereinek összehasonlítása.
Membrántechn. ipari biotech. 4, 18-29, 2013.

Total IF of journals (all publications): 31,318

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 9,672

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

18 May, 2023

