

Evaluación de la glicosimilaridad de bioterapéuticos

Andras Guttman,¹ Beata Borza,² Marton Szigeti,² Akos Szekrenyes,² Laszlo Hajba²
¹SCIEX, USA; ²Universidad de Debrecen, Hungría

La expiración de la patente en numerosas proteínas terapéuticas ha creado oportunidades para el desarrollo de biosimilares. Sin embargo, muchas proteínas terapéuticas recombinantes, y en consecuencia sus contrapartes biosimilares, están fuertemente glucosiladas. La glucosilación puede afectar significativamente la actividad biológica, la función efectora, la vida media en suero y la inmunogenicidad de los productos. Incluso pequeños cambios en los enlaces, la posición y la ocupación del sitio en las estructuras de carbohidratos de las proteínas terapéuticas pueden tener efectos significativos en la seguridad y la eficacia. Como tal, la información sobre la glucosilación de bioterapéuticos es crítica para demostrar similitud. Las agencias reguladoras requieren un análisis exhaustivo de los atributos de calidad crítica (CQA) relacionados con la glucosilación durante el desarrollo, la fabricación y la liberación de biosimilares.¹

Muchas tecnologías comúnmente utilizadas para el análisis de carbohidratos complejos (por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear) son lentas, difíciles, costosas y ofrecen una resolución menos que ideal. Electroforesis capilar con detector de fluorescencia inducida por láser (CE-LIF) proporciona una manera rápida y fácil de identificar y comparar cuantitativamente los perfiles de N-gucano de productos innovadores y sus biosimilares. En este trabajo, se utilizó el sistema de análisis



farmacéutico SCIEX PA 800 Plus basado en CE para identificar y comparar cuantitativamente los perfiles de N-gucano de dos bioterapéuticos: el producto innovador, Enbrel, y su contraparte biosimilar, Benepali. El sistema PA 800 Plus, junto con el kit de análisis y marcadores de Glicano SCIEX, identificó rápida y fácilmente las diferencias cuantitativas en fucosilación, galactosilación y manosilación entre los dos productos (Figura 1). Dado el mecanismo de acción de estos productos, solo la manosilación se consideró como atributo crítico de calidad para la evaluación de la biosimilaridad.

Características Claves:

- Análisis, flujo de trabajo y preparación de muestras simplificado
- Separación rápida, menos de 5 minutos para estos análisis
- Separación de alta resolución
- Identificación de Glican automatizado basado en valores GU y secuenciación de carbohidratos
- Comparación cuantitativa de perfiles de N-glican basado en áreas de pico relativo

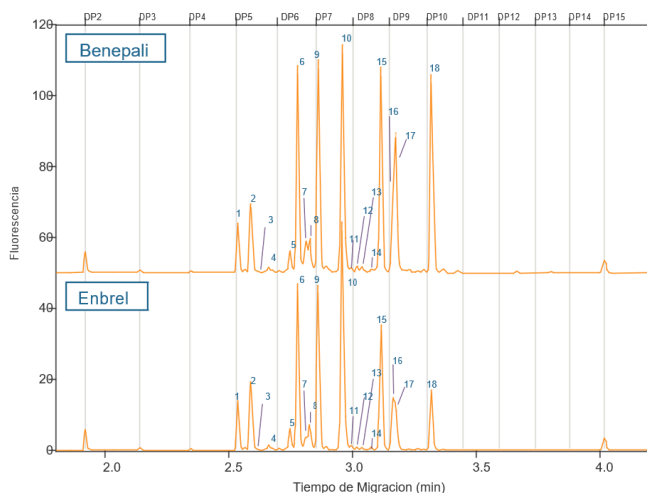


Figura 1. Análisis CE-LIF de PNGase F-liberado y marcadores de aminopireno trisulfónico (APTS) oligosacáridos unidos a asparagina de Enbrel® (innovador, traza inferior) y Benepali® (biosimilar, traza superior).

Desarrollo

Para abordar adecuadamente la glucosimilaridad entre un producto innovador y su biosimilar, deben determinarse los atributos relacionados con la N-glucosilación, como la fucosilación total, la galactosilación y la manosilación, así como su criticidad (esta nota técnica se centra en los azúcares Asn ligados). El mecanismo de acción de un bioterapéutico particular determina qué forma (s) de glicosilación califica como atributos críticos de calidad. Por ejemplo, cuando el mecanismo de acción de un anticuerpo monoclonal terapéutico es la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la información sobre la presencia o ausencia de fucosilación central es de gran importancia. Si la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) es el mecanismo de acción, la galactosilación antenaria representa una CQA.² La manosilación del sitio de glucosilación conservado en la región Fc de los anticuerpos terapéuticos IgG aumenta la tasa de depuración sérica en humanos, ³ por lo que su presencia y extensión debe ser monitoreado de cerca.

Etanercept (nombre comercial Enbrel, biosimilar Benepali) fue desarrollado para tratar enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide y la psoriasis. Es una proteína de fusión Fc altamente glucosilada que se une al factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), una citocina involucrada en inflamación sistémica.

Las 2 partes principales de etanercept son la TNF α receptora (parte superior) y la porción Fc (parte inferior) de un anticuerpo IgG1, conectado con un enlazador O-glucosilada pesado (13 sitios) (Figura 2). Enbrel tiene tres sitios de glicosilación (Asn149, Asn171, y Asn317) que han sido caracterizados recientemente.⁴ El mecanismo de acción de etanercept se manifiesta por las partes receptoras TNF α , no por la porción Fc de la molécula. Esto sugiere que algunos glucanos regulares relacionados con la función Fc, como la fucosilación del núcleo para la función ADCC o la galactosilación terminal para la función CDC, que podrían ser atributos críticos de calidad en otros productos bioterapéuticos, probablemente no sean importantes desde el punto de vista de la glucosimilaridad de este producto en particular.

Metodos experimentales

Químicos: Enbrel and Benepali fueron proporcionados por la Facultad de Medicina de la Universidad de Debrecen (Hungría). Todos los demás productos químicos no incluidos en el kit de preparación y análisis rápido de muestras de glucano de SCIEX fueron de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EE. UU).

Preparación de Muestras: Se usó el kit de preparación y análisis rápido de muestras Glicano (SCIEX, Brea, CA) para la preparación y análisis de muestras.

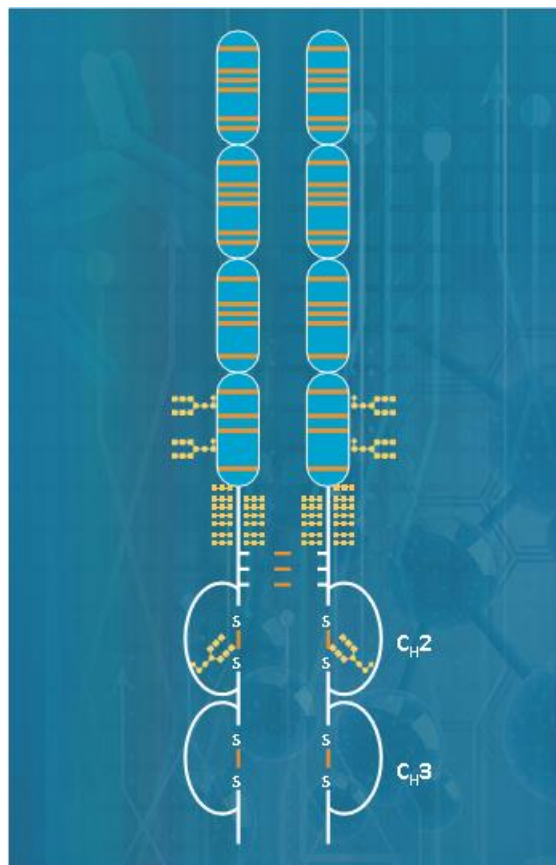


Figura 2. La proteína de fusión Fc etanercept y sus sitios de glicosilación. Las estructuras amarillas representan uno y dos sitios de N-glucosilación en la parte Fc y TNF α , respectivamente, así como los 13 sitios de O-glucosilación en la región bisagra.

Muestras de Enbrel y Benepali experimental:

1. Liberación enzimática de los N-glucanos de las glucoproteínas
2. Captura mediada por microesferas magnéticas de los glicanos liberados
3. Etiquetado de los glicanos liberados con un fluoróforo cargado
4. Captura mediada por perlas magnéticas de los glicanos marcados con fluoróforo y eliminación de colorantes, seguida de elución de los glicanos marcados

Separación y Análisis: Se utilizó para la separación y detección un Sistema SCIEX de Análisis Farmacéutico PA 800 Plus (Figure 3) equipado con un detector de fluorescencia basado en láser en estado sólido ($\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}/\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$). Las separaciones se lograron utilizando una columna capilar de sílica fundida de 20 cm (Cartucho EZ-CE, SCIEX) (50 μm I.D.)

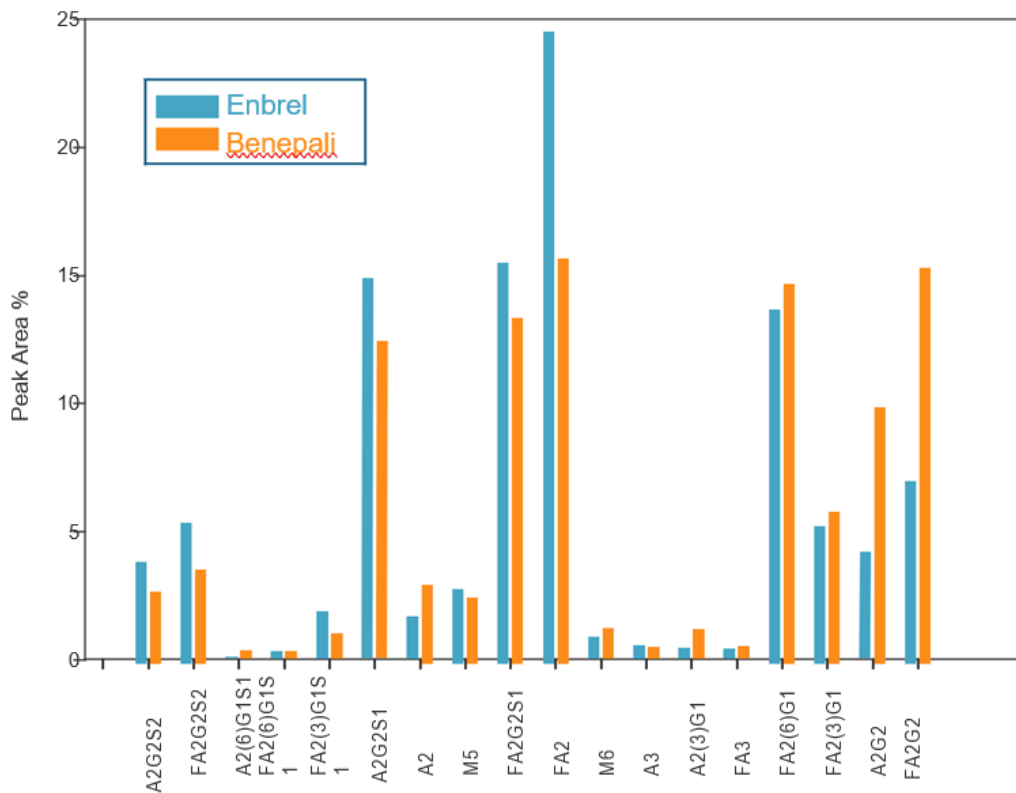


Figura 3. Análisis cuantitativo del perfil de N-glicosilación de Enbrel y Benepali a nivel de carbohidratos individuales para la evaluación de la glucosimilaridad. Cada barra indica el promedio de 6 corridas.

Se utilizó el software 32 Karat, versión 10.1 (SCIEX) para la adquisición y el procesamiento de datos, junto con el software GU Value para la identificación de picos. Se utilizaron áreas de pico relativas para comparar cuantitativamente los perfiles de N-glicano del producto innovador y biosimilar.

Resultados y Discusión

El producto innovador, Enbrel, y el product Biosimilar, Benepali, fueron analizados utilizando el método descrito anteriormente.

Las estructuras de glucano se identificaron por sus valores de GU y por secuenciación de carbohidratos. Se compararon las áreas de pico de los datos cuantitativos del perfil de N-glicosilación. Los cambios cuantitativos de distribución de picos se visualizan en el diagrama de barras de la Figura 4, donde las barras representan estructuras individuales de glicanos. Cada barra indica el promedio de 6 corridas. La tabla 1 enumera las identidades de pico, los valores de área de pico, las proporciones de similitud y los porcentajes de similitud. Se usó un umbral arbitrario del 20% para determinar la glucosimilaridad. Los números rojos indican glicanos cuya abundancia en el biosimilar difiere más del 20% de la abundancia en el innovador.

Los números verdes indican glicanos que estaban dentro del umbral del 20%

La abundancia del núcleo de glucano FA2 fucosilado fue casi el doble en el innovador que en el biosimilar. Por el contrario, la abundancia de glicanos A2G2 y FA2G2 altamente galactosilados fue mucho mayor en el biosimilar que en el innovador. Sin embargo, como se señaló anteriormente, dado el mecanismo de acción de etanercept, estos no se consideraron atributos de calidad críticos.

Debido a que la manosilación en la región Fc de los anticuerpos terapéuticos y las proteínas de fusión Fc (como el etanercept) afecta la tasa de depuración sérica en humanos, la presencia (si la hubiera) y la extensión de las estructuras de manosa alta se consideraron CQA. Mientras que el área pico del glicano Man5 estaba dentro del umbral arbitrario del 20% entre el originador y el biosimilar, el glicano Man6 difería hasta en un 40%, aunque su concentración absoluta estaba por debajo 1%.

Conclusiones

La N-glicosilación desempeña un papel esencial en el mecanismo de acción de la mayoría de los bioterapéuticos y, por lo tanto, representa un atributo crítico de calidad para la biosimilaridad. Este trabajo demostró la capacidad de la electroforesis capilar con detección de fluorescencia inducida por láser (CE-LIF) para proporcionar separaciones rápidas de alta resolución y una caracterización integral de la N-glicosilación de estas estructuras de carbohidratos.

La identificación y la comparación cuantitativa de las áreas de pico relativas entre los perfiles de N-glucano de un producto innovador, Enbrel, y su contraparte biosimilar, Benepali, fueron los primeros pasos para definir la glicosimilaridad como un subconjunto importante de biosimilaridad.⁶ Se encontraron diferencias cuantitativas significativas, encontrado en las principales estructuras fucosiladas y galactosiladas (FA2, A2G2 y FA2G2) entre el innovador y el biosimilar.⁷ Sin embargo, debido a que las funciones ADCC y CDC no son críticas para el mecanismo de acción de este producto, estas diferencias no se consideraron significativas para la evaluación de la glicosimilaridad. La manosilación, por otro lado, juega un papel importante en el aclaramiento sérico del producto, por lo que las diferencias cuantitativas encontradas en las estructuras de manosa representaron una CQA de glicosimilaridad.

Reconocimiento

Los autores agradecen el apoyo de las subvenciones de la Oficina Nacional de Investigación, Desarrollo e Innovación (NKFIH) (K 116263) del gobierno húngaro.

Tabla 1. Análisis del perfil cuantitativo de N-glicosilación de Enbrel y Benepali a nivel individual de carbohidratos usando un umbral arbitrario del 20% para glucosimilaridad.

Pico	Pico ID	Area Pico %		Similaridad Radio	Similaridad %
		Enbrel	Benepali		
1	A2G2S2	3.53	2.45	1.44	69.56
2	FA2G2S2	5.04	3.27	1.54	65.98
3	A2(6)G1S1	0.11	0.34	0.32	317.43
4	FA2(6)G1S1	0.35	0.28	1.24	80.55
5	FA2(3)G1S1	1.86	1.01	1.84	54.32
6	A2G2S1	14.74			
7	A2	1.61	12.26	1.20	83.35
8	M5	2.49			
9	FA2G2S1	15.09	2.64	0.61	85.85
10	FA2	24.06			
11	M6	0.81	2.16	1.15	163.81
12	A3	0.51			
13	A2(3)G1	0.44	12.96	1.16	86.59
14	FA3	0.35	15.24	1.58	63.31
15	FA2(6)G1	13.33	1.13	0.71	140.31
16	FA2(3)G1	4.95	0.46	1.12	89.56
17	A2G2	4.11	1.13	0.39	259.18
18	FA2G2	6.63	0.49	0.73	137.48

Rojo = diferencias de abundancia > 20%

Verde = diferencia de abundancia < 20%

Referencia

1. Schiestl, M. y col. El papel de la evaluación de la calidad en la determinación de la biosimilaridad general: un ejercicio de estudio de caso simulado. *Biologicals* (2014) **42**, 128-132.
2. Reusch, D. y Tejada, M. L. Fc glucanos de anticuerpos terapéuticos como atributos críticos de calidad. *Glycobiology* (2015) **25**, 1325--1334.
3. Goetze, A. M. y col. Los glucanos con alto contenido de manosa en la región Fc de los anticuerpos terapéuticos IgG aumentan el aclaramiento sérico en humanos. *Glicobiología* (2011) **21**, 949-959.
4. Houel, S. y col. Análisis de glicosilación de N y O de etanercept usando cromatografía líquida y espectrometría de masas de tiempo de vuelo cuadrupolo equipado con funcionalidad de disociación de transferencia de electrones. *Anal. Chem* (2014) **86**, 576-584.
5. Szigeti, M. y Guttman, A. Secuenciación automática de N-glucosilación de biofarmacéuticos por electroforesis capilar. *Nature Scientific Reports*, (2017), **7**, 11663.
6. Hajba, L. y col. Sobre los aspectos de glicosilación de la biosimilaridad, *Drug Discovery Today* (2018) **23**, 616-625.
7. Borza, B. y col. Evaluación cuantitativa de la glucosimilaridad de la bio-terapéutica, *J. Pharm. Biomed. Análisis*, (2018) **153**, 182-185.

Quién es SCIEX?

El liderazgo global de la compañía SCIEX y el servicio y soporte de clase mundial en la industria de la electroforesis capilar y la cromatografía líquida-espectrometría de masas lo han convertido en un socio confiable para miles de científicos y analistas de laboratorio en todo el mundo que se centran en investigación básica, descubrimiento y desarrollo de medicamentos, alimentos. y pruebas ambientales, forenses e investigación clínica.

Contáctanos en: sciex.com/contact-us

The SCIEX clinical diagnostic portfolio is For In Vitro Diagnostic Use. Rx Only. Product(s) not available in all countries. For information on availability, please contact your local sales representative or refer to <https://sciex.com/diagnostics>. All other products are For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

Trademarks and/or registered trademarks mentioned herein, including associated logos, are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners in the United States and/or certain other countries.

© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-6884-B. AB SCIEX™ is being used under license.



Headquarters

500 Old Connecticut Path | Framingham, MA 01701 USA
Phone 508-383-7700
sciex.com

International Sales

For our office locations please call the division headquarters or refer to our website at sciex.com/offices