научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

РегЛек

Практические аспекты оценки качества лекарственных средств по показателю «Гликановый профиль» при экспертизе качества ЛС получаемых методом рекомбинантных ДНКа

Бендрышев Александр Александрович,
главный эксперт лаборатории биотехнологических препаратов

27.02.2022

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

ЧТО ТАКОЕ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ ?

РегЛек – ЕАЭС

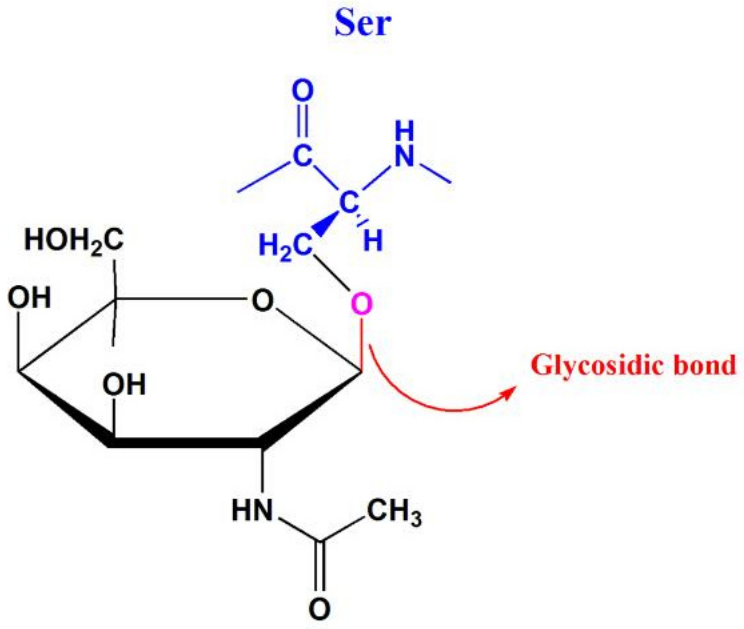
Гликозилирование является одной из форм котрансляционной и посттрансляционной модификации белков, в ходе которой происходит присоединение остатков сахаров к органическим молекулам белков и образуются молекулы гликопротеинов

научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

ВАРИАНТЫ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ

РегЛек – ЕАЭС

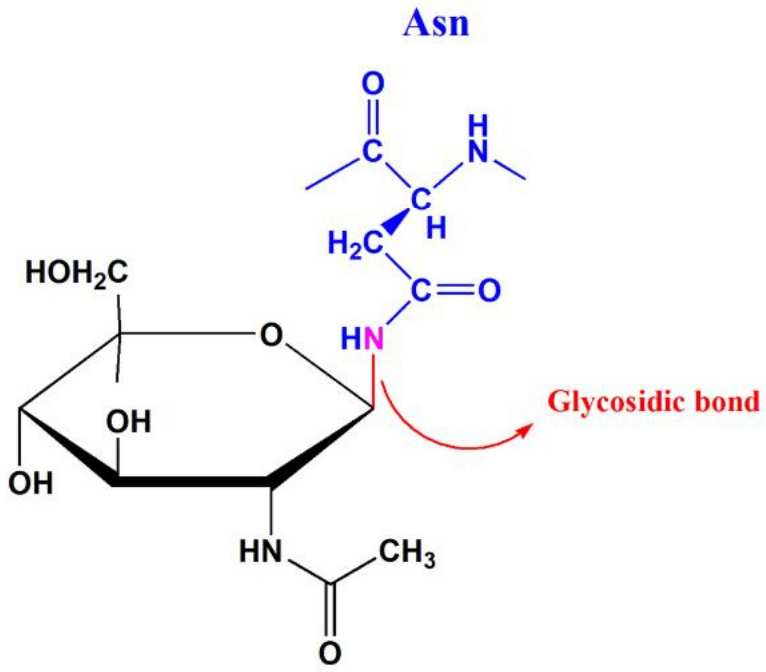
O-связанные гликаны - сахар присоединен к гидроксилам боковых цепей остатков серина, треонина, тирозина или гидроксилизина;



O-linked GalNAC

ВАРИАНТЫ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ

N-связанные гликаны - сахар присоединен к атому азота боковой цепи остатка аспарагина или аргинина;



N-linked GlcAC

научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

ВАРИАНТЫ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ

РегЛек – ЕАЭС

- **С-связанные гликаны - сахар соединяется с атомом углерода боковой цепи триптофана;**
- **Фосфогликаны содержат остаток сахара, соединенный через фосфат с фосфосерином**
- **Содержащие гликозилфосфатидилинозитольные «анкеры» между протеином и липидом (glypiation)**

научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

Зачем контролировать?

РегЛек – ЕАЭС

Влияет на :

- **На четвертичную структуру белка;**
- **На стабильность ;**
- **На активность:**
- **На иммуногенность**

- **Необходимо контролировать в биотехнологических препаратах для контроля их безопасности и эффективности**

научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

Зачем контролировать?

РегЛек – ЕАЭС

Дарбэпоэтин – видоизмененный эритропоэтин

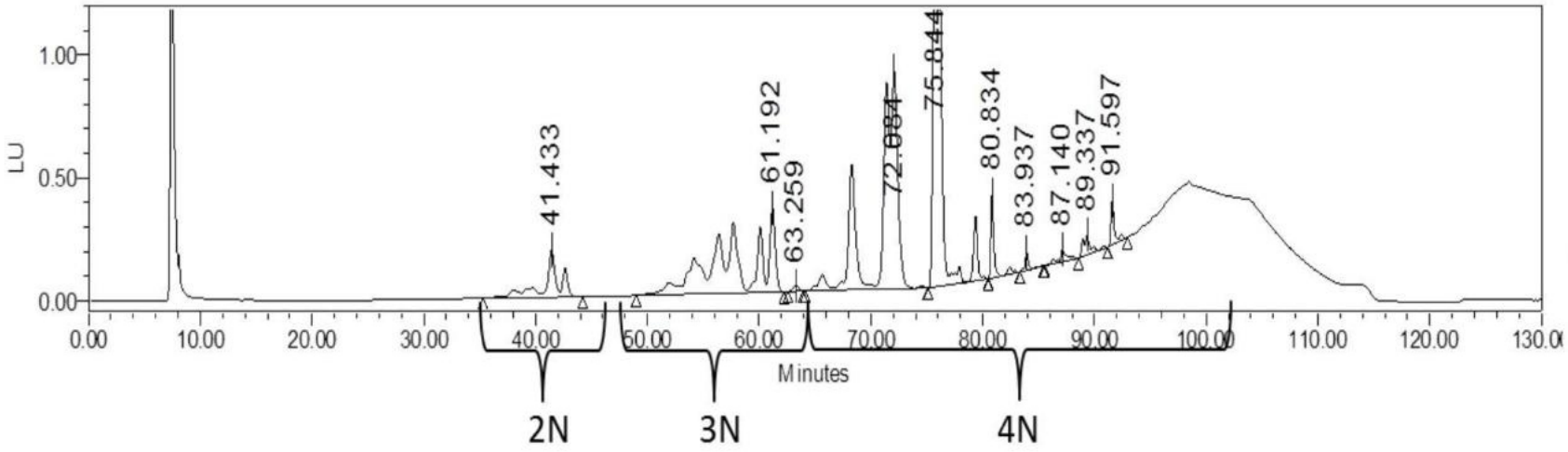
- Произведена замена пяти аминокислот (N30, T32, V87, N88, T90)
- Образуются два новых сайта N-гликозилирования
- В результате время полураспада соединения в крови увеличивается в три раза по сравнению с эритропоэтином
- Возможное снижение дозы препарата или увеличение интервалов между введениями.
- Снижение иммуногенности

научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

Зарубежные фармакопеи?

РегЛек – ЕАЭС

USP, Epoetin, N-Glycan Profiling



bi-sialylated (2 N), tri-sialylated (3 N), and tetra-sialylated (4 N) glycans

Требования:

2N: 4,5%-6,0%;
3N: 18%-25%;
4N: 69%-77%

научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

ЗА СЧЕТ ЧЕГО ВОЗНИКАЕТ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ?

РегЛек – ЕАЭС

Различия в

- **Положении гликановых связей (сайты гликозилирования)**
- **Составе гликанов (типы сахаров связанных с белком)**
- **Структуре гликанов (разветвленная или линейная цепочка сахаров)**
- **Длине гликановых цепей (коротко и длинно цепочечные олигосахариды)**

⇓

- **Большое разнообразие вариантов. Сложно контролировать возможные аспекты изменений**

научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ГЛИКАНОВОГО ПРОФИЛЯ

РегЛек – ЕАЭС

Анализ интактных гликопротеинов с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения (OrbiTrap, QTOF) с использованием ESI ионизации (С использованием ВЭЖХ или без)

Преимущества: позволяет определить наличие различных форм гликопротеинов, проводить прямое сравнение различных образцов без их расщепления, оценить степень гликозилирования

Недостатки: сложное и дорогое оборудование, необходимость использования специального программного обеспечения, неполнота информации.

РЕКОМЕНДУЕТСЯ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ПРИ РАЗРАБОТКЕ И ОХАРАКТЕРИЗАЦИИ ПРЕПАРАТА
НЕ ЯВЛЯЕТСЯ МЕТОДОМ РУТИННОГО КОНТРОЛЯ

научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ГЛИКАНОВОГО ПРОФИЛЯ

РегЛек – ЕАЭС

Анализ гликопептидов, полученных после расщепления гликопротеинов.
ВЭЖХ-МС с использованием ESI ионизации

Преимущества: позволяет определить положение «сайтов» гликозилирования и состав присоединенных гликанов. Возможность использования MS-MS.

Недостатки: сложное и дорогое оборудование, необходимость использования специального программного обеспечения, сложность интерпретации данных. Затрудненный трансфер методик.

НЕОБХОДИМО ИСПОЛЬЗОВАТЬ ПРИ РАЗРАБОТКЕ И ОХАРАКТЕРИЗАЦИИ ПРОТЕИНА
НЕ ЯВЛЯЕТСЯ МЕТОДОМ РУТИННОГО КОНТРОЛЯ

научный центр экспертизы средств медицинского применения

ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ГЛИКАНОВОГО ПРОФИЛЯ

РегЛек – ЕАЭС

Анализ моносахаридов, полученных после отщепления от белка и гидролиза (как правило кислотный гидролиз).

Преимущества: позволяет определить общее число моносахаридов и их содержание.
Применимы разные варианты детектирования и разделения.
Большое количество доступных коммерческих наборов.
Возможность простого трансфера методик
Относительно недорогое оборудование.

Недостатки: относительно низкая информативность методики.

МОЖЕТ БЫТЬ ИСПОЛЬЗОВАН ПРИ РАЗРАБОТКЕ И ОХАРАКТЕРИЗАЦИИ ПРОТЕИНА
МОЖЕТ БЫТЬ ИСПОЛЬЗОВАН В КАЧЕСТВЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО МЕТОДА ПРИ РУТИННОМ КОНТРОЛЕ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ

научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ГЛИКАНОВОГО ПРОФИЛЯ

РегЛек – ЕАЭС

Анализ гликанов, полученных после их отщепления от белка после энзиматического гидролиза (например, PNGase A или PNGase F (peptide-N-glycosidase F, peptide-N4-(N-acetyl-β-glucosaminyl)asparagine amidase)) или после химического гидролиза (например, гидразином)

Преимущества: позволяет получить общий профиль гликозилирования, оценить наличие в составе тех или иных гликанов.

Дает возможность легко сравнивать разные образцы белка.

Применимы разные варианты детектирования и разделения.

Большое количество доступных коммерческих наборов.

Селективное расщепление тех или иных типов гликановых связей

Возможность параллельной обработки большого числа проб

Возможность простого трансфера методик

Относительно недорогое оборудование.

Недостатки: многостадийная пробоподготовка, высокая стоимость коммерческих наборов, высокие требования к культуре работы персонала, отсутствие информации о положении сайтов гликозилирования и числе форм.

НАИБОЛЕЕ ПОДХОДЯЩИЙ ПОДХОД ПРИ РУТИННОМ КОНТРОЛЕ ПРОФИЛЯ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ

научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

Нормы и требования

РегЛек – ЕАЭС

НЕ ЯВЛЯЕТСЯ МЕТОДОМ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ ПОДЛИННОСТИ!!!!

Нормы: «Соответствует стандартному образцу» или «Отличается от стандартного образца не более чем на….» НЕ ПОДХОДЯТ!!

Устанавливаются требования на содержания определенных гликанов или групп. Для гликанов, оказывающих положительное влияние на на свойства устанавливают требования в формате «Не менее чем…», для гликанов, оказывающих отрицательное влияние – «Не более чем….». Допустимо требование диапазона содержания того или иного гликана в формате: «Содержание от …. до ….%»

НОРМЫ УСТАНАВЛИВАЮТСЯ В ХОДЕ ВАЛИДАЦИИ

научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

РЕАКТИВЫ И НАБОРЫ

РегЛек – ЕАЭС

Готовые наборы:

Преимущества: удобство, простота, хорошая воспроизводимость, готовые методики с подробным описанием

Недостатки: высокая стоимость, в настоящий момент, низкая доступность, часто, небольшие сроки годности.

Коммерческие реактивы:

Преимущества: более низкая стоимость, возможная взаимозаменяемость (не всегда), большие сроки годности реактивов, лучшая доступность.

Недостатки: необходимость разработки и валидации собственной методики, более высокая сложность трудозатратность, требования к квалификации персонала.

Общий ход анализа

Денатурация протеинов, разрыв дисульфидных связей

- **«Разворачивает» молекулу протеина.**
- **Разрывает дисульфидные связи (при использовании меркаптоэтанола и других восстановителей).**
- **Делает гликозилированные участки более доступными для фермента**
- **Сокращает время реакции дегликозилирования**

- **Не является строго обязательной стадией, однако, улучшает воспроизводимость и сокращает время анализа.**

Реагенты:
Различные ПАВ и другие хаотропные агенты
Гуанидина гидрохлорид

Дитиотреитол
Меркаптоэтанол

научный центр экспертизы средств медицинского применения

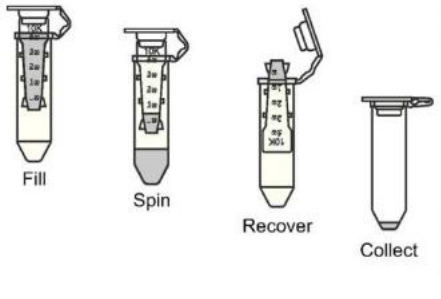
Общий ход анализа

РегЛек – ЕАЭС

Выделение и очистка гликозилированных протеинов, замена буфера (при необходимости), концентрирование

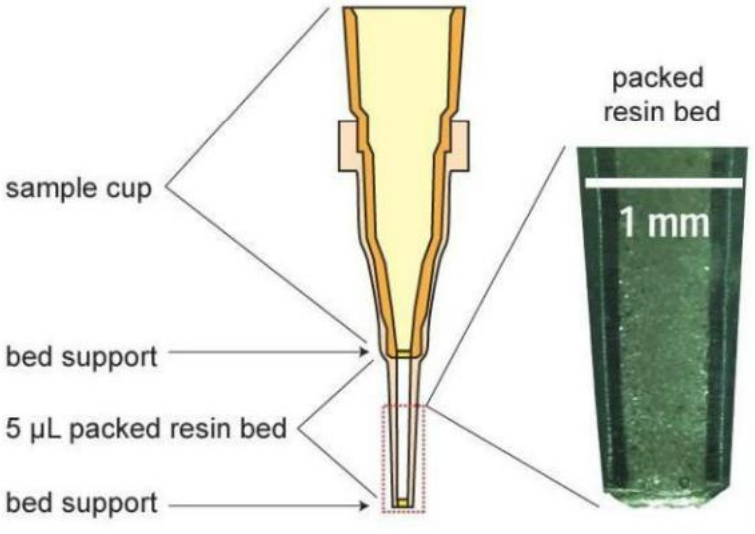
- **В зависимости от матрицы и последующих стадий возможно использование:**
- **Твердофазной экстракции (Обращеннофазовая)**
- **Твердофазной экстракции (Эксклюзионная)**
- **Центрифужных фильтров (например, с MWCO 10кДа)**
- **Диализа**

- **Не является строго обязательной стадией, однако, позволяет избавится от влияния матрицы и увеличить концентрацию целевых компонентров, улучшает воспроизводимость последующего ферментативногорасщепления, но усложняет и удорожает методику и увеличивает время анализа. Решение о необходимости данной стадии принимается в ходе валидации.**



Общий ход анализа

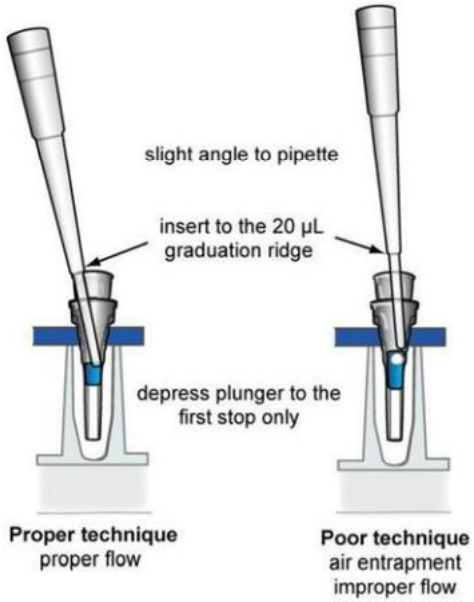
Замена буфера, гидролиз, выделение гликанов на картридже
Картридж для проведения отщепления гликанов (RX Digestion Cartridge)

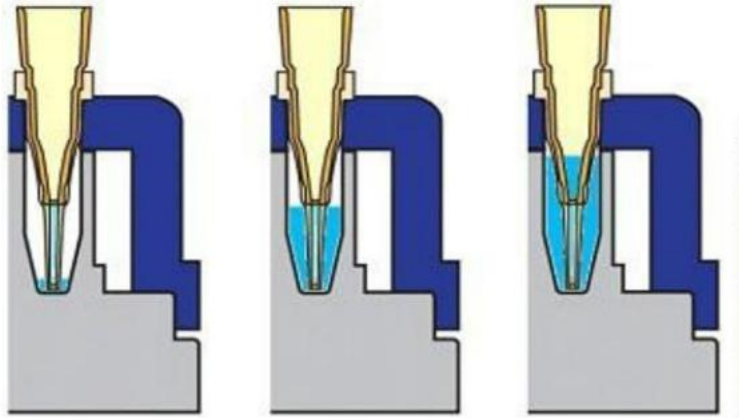


-

Общий ход анализа

Замена буфера, гидролиз, выделение гликанов на картридже
Одновременное проведение гидролиза и очистки от белковой части.
(RX Digestion Cartridge)





Гидролиз на картридже
(например 37 С, 15 мин-1 час с N – гликозидазой F) (не более 1 часа)

Общий ход анализа

Замена буфера, гидролиз, выделение гликанов на картридже

*

Преимущества

- **Параллельное выполнение замены буфера, гидролиза и очистки**
- **Малый объем пробы**
- **Коммерческие наборы**
- **Готовые отработанные методики**
- **Возможность большого числа параллельных**

- **Недостатки: высокая стоимость наборов, требовательность к культуре работы с малыми объемами жидкостей, ограниченное время гидролиза из-за возможного пересыхания картриджа, доступность наборов, малые объемы конечной пробы, невозможность масштабирования.**

научный центр экспертизы средств медицинского применения

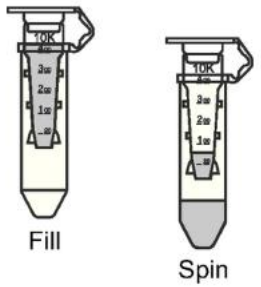
Общий ход анализа

РегЛек – ЕАЭС

Более привычный и доступный вариант: гидролиз в растворе

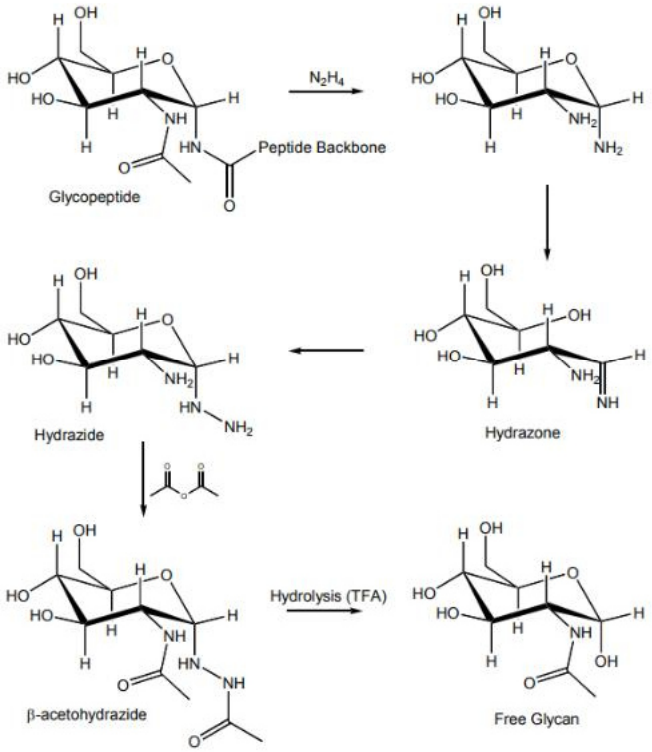
- **Выполняется после замены буфера**
- **Преимущества: возможность продолжительного гидролиза,**
- **Возможность больших объемов пробы**
- **Доступность реагентов и материалов, возможная взаимозаменяемость.**

- **После проведения гидролиза рекомендуется стадия отделения гликанов от остатков белка**
- **твердофазная экстракция**
- **центрифужные фильтры (например, с MWCO 10кДа)**



Общий ход анализа

Гидролиз гидразином



Одновременное расщепление N- и O-гликанов. Дешевизна и доступность реагента

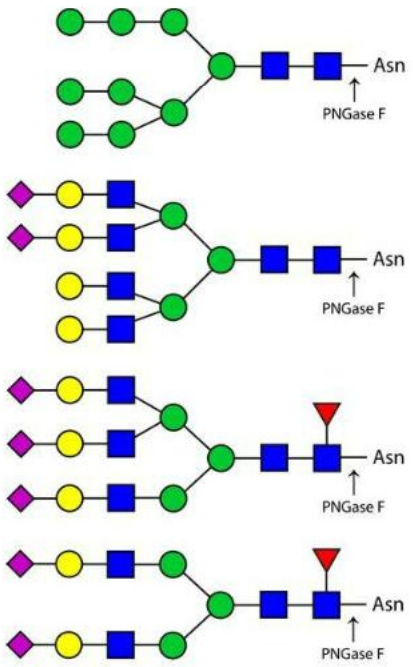
Необходимы дополнительные стадии для получения свободных гликанов

Токсичность гидразина

Энзиматический гидролиз

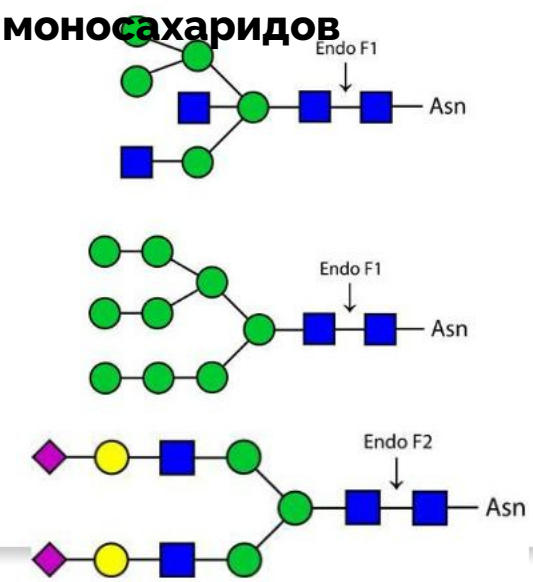
Ферменты

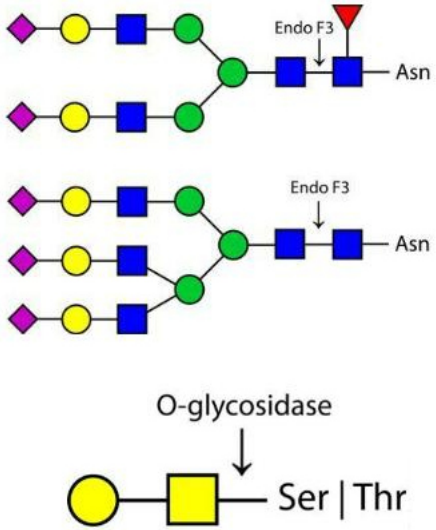
- **PNGase F (пептид N-гликозидаза F)**
- **Подходит для гидролиза всех типов N-связанных гликанов гликопротеинов и гликопептидов.**
- **Отщепляет N-связанные (аспарагин-связанные) олигосахариды от гликопротеинов. Фермент деаминирует аспарагин в аспарагиновую кислоту, оставляя олигосахариды без изменений.**
- **Денатурация увеличивает скорость отщепления, хотя большинство природных протеинов могут быть полностью N-дегликозилированы, при условии увеличения времени инкубирования.**
- **Энзим остается полностью активным при 37С в условиях проведения реакции не менее 96 часов PNGase F.**
- **Не высвобождает олигосахариды содержащие *core* a(1-3) фукозилирование (обычно содержащиеся в растениях). Для этих целей используют PNGase A (пептид N гликозидаза A)**

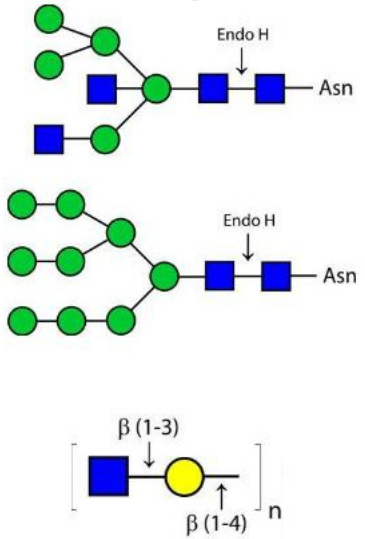


Энзиматический гидролиз
Другие ферменты

- **PNGase A (пептид N-гликозидаза A) может отщеплять олигосахариды с *core* α(1-3) фукозилированием.**
- **Эндогликозидазы F1, F2, F3 – Селективное отщепление определенных типов олигосахаридов**
- **Эндогликозидаза H – не отщепляет сложные олигосахариды**
- **О-гликозидаза – отщепляет олигосахариды, связанные с серином и треонином**
- **Эндо-в-галактозидаза – отщепляет неразветвленные олигосахариды**
- **Различные экзогликозидазы –отщепление определенных типов терминальных моносахаридов**







научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

Общий ход анализа

РегЛек – ЕАЭС

Энзиматический гидролиз

Наиболее часто используемый при анализе гликанового профиля фермент PNGase F

Преимущества: хорошая воспроизводимость, большое число существующих методик, изученность протекающих процессов, коммерческие наборы «под ключ» для разработки методики

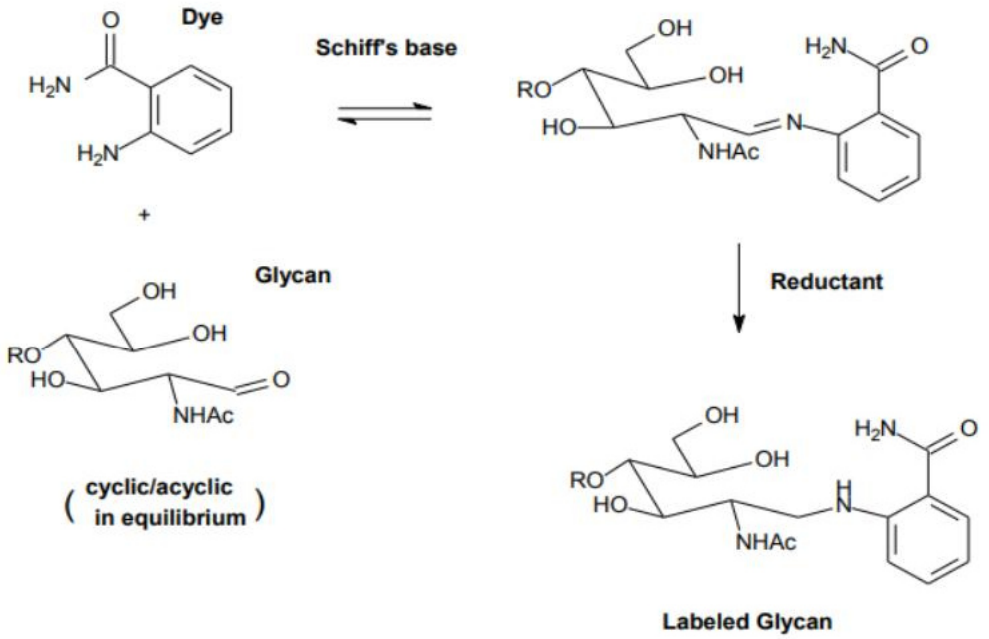
Недостатки: не всегда коммерчески доступен. При замене необходима частичная ревалидация методики. Не все типы гликанов отщепляются.

научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

Общий ход анализа

РегЛек – ЕАЭС

Присоединение флуоресцентной метки



Реакция с 2-аминобензамидом в присутствии восстановителя (например натрия цианоборогидрида)

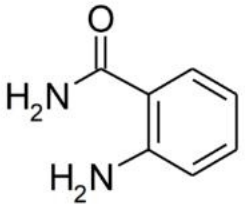
В случае использования электрохимического или масс спектрометрического детектирования данная стадия может быть опущена

Необходима при использовании флуориметрического детектирования. Повышает чувствительность масс спектрометрического детектирования

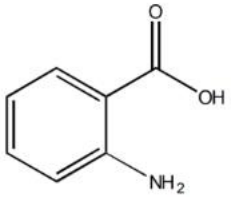
В ряде случаев стадии предшествует сушка пробы и/или замена растворителя

Присоединение флуоресцентной метки

Используемые реагенты:

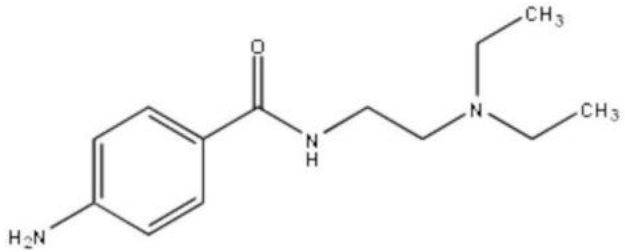


•**2-аминобензамид – не является прекурсором, используется как в коммерческих наборах, так и отдельным реактивов. НЕ является прекурсором. Доступен. Большое число методик и коммерческих наборов.**



•**2-аминобензойная кислота – по свойствам близка к 2-аминобензамиду, используется в коммерческих наборах или отдельным реактивом, большое число методик . НО ЯВЛЯЕТСЯ ПРЕКУРСОРОМ В РФ. ОБОРОТ ЗАТРУДНЕН. НЕ РЕКОМЕНДУЕТСЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ**

•**Прокаинамид – производные с ним лучше ионизируются в масс-спектрометрическом детекторе**



Общий ход анализа

Присоединение флуоресцентной метки

- К образцу добавляют реагент для мечения
- Инкубируют при комнатной или повышенной температуре в течение промежутка времени от нескольких минут до нескольких часов. (температура и продолжительность подбираются в зависимости от исследуемого белка и используемого реагента)
- После завершения процедуры немедленно переходят к процедуре удаления излишков маркирующего агента и реактивов. Задержка в проведении процедуры очистки может приводить к значительному снижению интенсивности сигналов образца при использовании флуориметрического детектирования.

Общий ход анализа

Удаление излишков флуоресцентной метки. Очистка образца. Замена растворителя

- **Твердофазная экстракция**
- **Ludger Clean S cartridge**

Prozyme CU Cartridge

По окончании, при необходимости – разведение образца подходящим растворителем.

ВАЖНО! При выборе условий твердофазной экстракции необходимо добится не только наиболее полного извлечения гликанов, но и удаления остатков реагентов и продуктов реакции. Неудаленнные продукты реакции могут приводить к нестабильности и снижению аналитического сигнала, особенно при использовании флуоресцентного детектирования. ОСОБОЕ внимание обратить на стадию промывки картриджа после нанесения образца. (не только 100% ацетонитрил, но и 95%)

научный центр экспертизы средств медицинского применения

Хроматографическое разделение

РегЛек – ЕАЭС

- **ВЭЖХ и УВЭЖХ системы**
- **Разделение в режимах HILIC (как правило на амидо фазах) или обращенно-фазовой (на С18 фазах) хроматографии**
- **Подвижные фазы: вода-ацетонитрил с добавлением кислоты (муравьиная или трифторуксусная) или буферного раствора**
- **Специализированные колонки, предназначенные для разделения гликанов или обычные колонки**
- **В зависимости от типа и количества гликанов возможно проведения разделения как в изократическом, так и в градиентном режимах. При использовании изократического режима необходимо убедиться, что элюируются все интересующие гликаны.**
- **Детектирование флуориметрическое, масс-спектрометрическое (необходим подбор условий детектирования)**
- **Необходима оценка пригодности хроматографической системы**

научный центр экспертизы средств медицинского применения

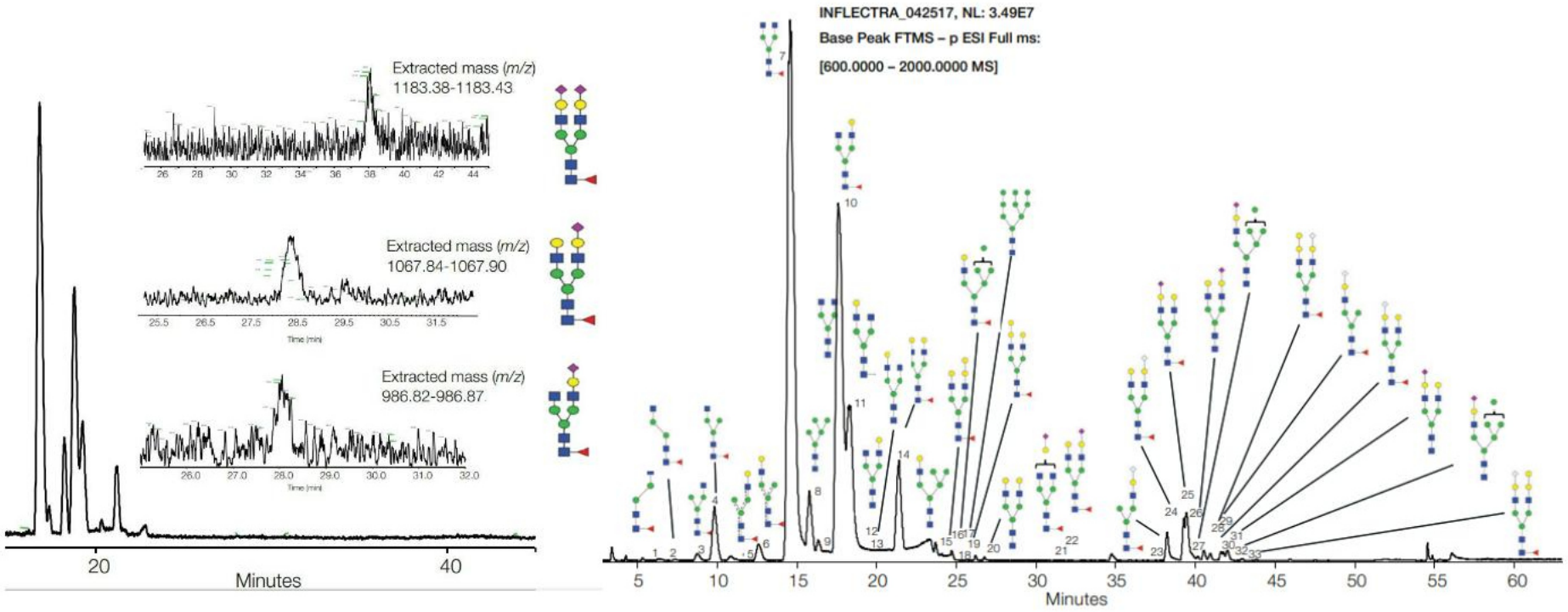
Хроматографическое разделение

РегЛек – ЕАЭС

- **Варианты детектирования**
- **Флуориметрическое: доступность , чувствительность, воспроизводимость, большое число методик, возможность переноса методик на масс-спектрометрический детектор. Относительно простая валидация. Необходимость сложной пробоподготовки и дополнительных реактивов. Малая информативность.**
- **Масс-спектрометрическое детектирование: высокая информативность или высокая чувствительность. Необходимость сложной пробоподготовки, дополнительных реактивов, квалифицированного персонала. Высокая стоимость.**
- **Электрохимическое детектирование. Простая пробоподготовка. Уменьшение числа стадий анализа. Высокая чувствительность. Малая информативность. Сложная валидация.**
- **Другие варианты (CAD, ELSD): Мало данных**

Хроматографическое разделение

- **Масс-спектрометрическое детектирование**



Хроматографическое разделение

Стандартные образцы

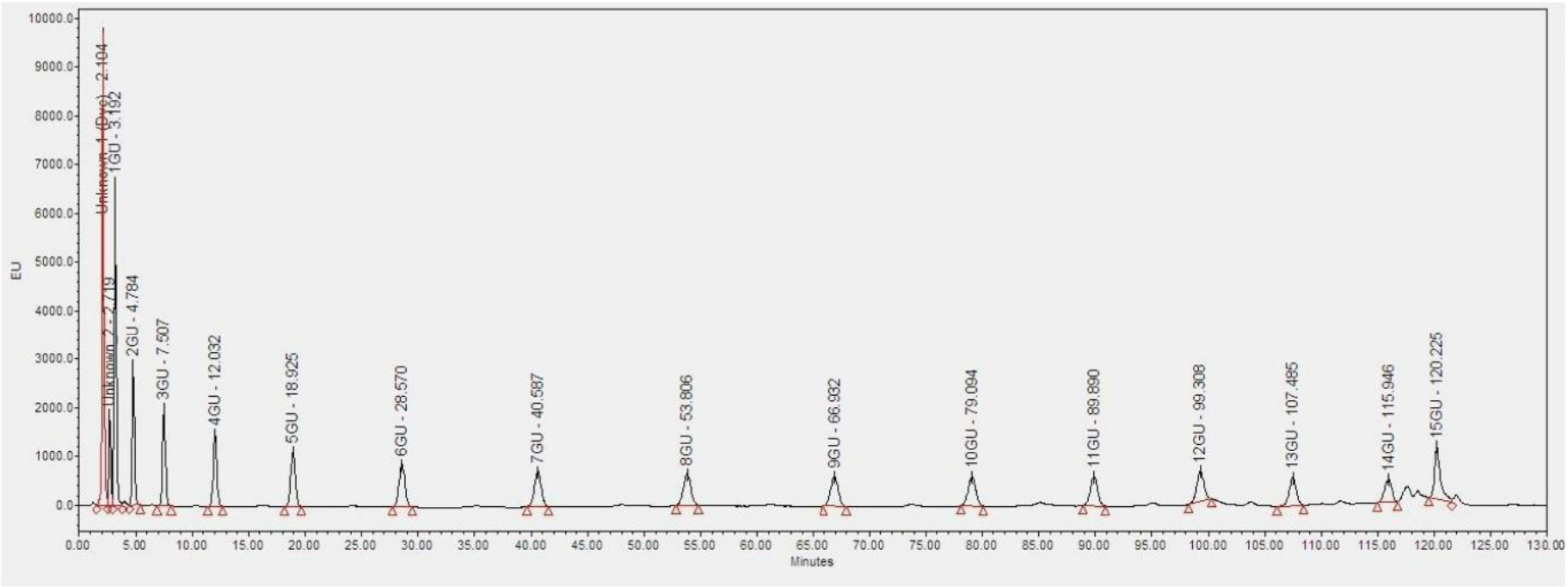
- **Готовые смеси 2-АВ производных гомополимеров глюкозы. (Ладдер)**
- **Готовые смеси производных интересующих гликанов**
- **Отдельные стандарты производных интересующих гликанов**
- **Недериватизированные гликаны и их смеси.**
- **Стандартные образцы исследуемого белка. Наиболее доступно, но наименее воспроизводимо. Для валидации не достаточно, но достаточно для рутинного контроля.**

научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

Пригодность хроматографической системы

РегЛек – ЕАЭС

Ладдер гомополимеров глюкозы (производные с 2-АВ (2-аминобензамидом))



Оценка работоспособности хроматографической системы в целом

Оценка разрешающей способности

Оценка чувствительности

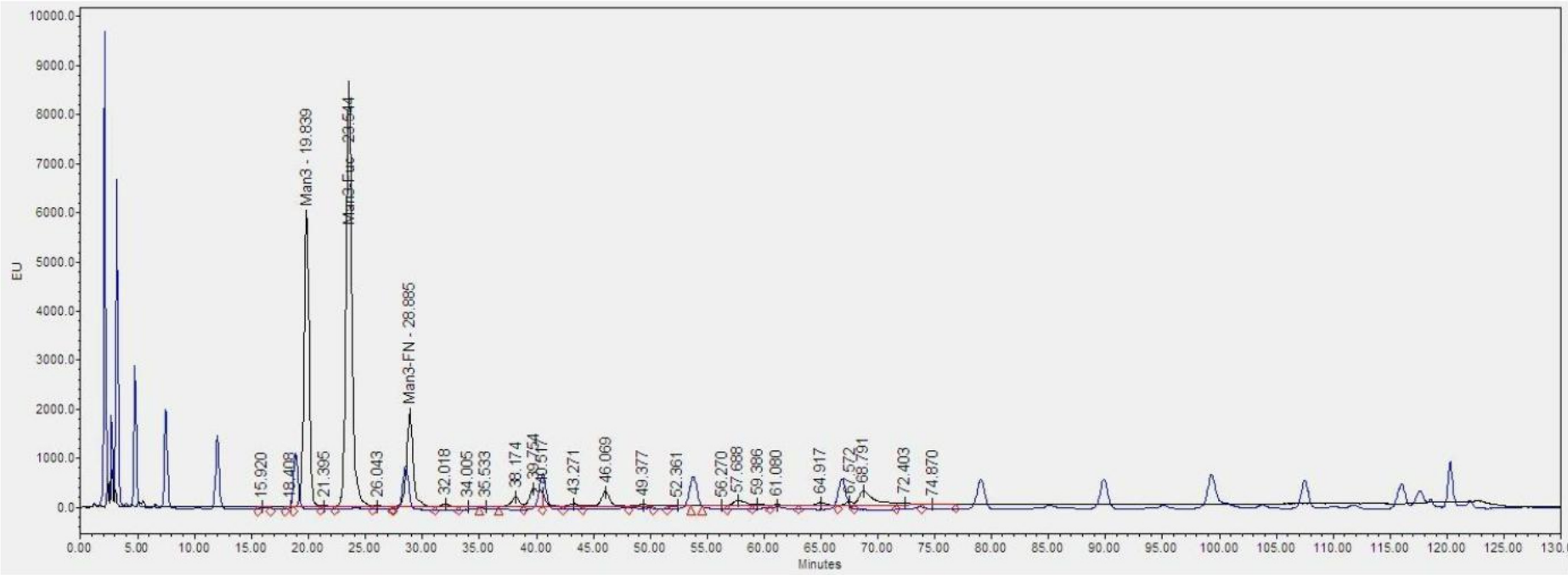
Идентификация пиков

научный центр экспертизы средств медицинского применения

Идентификация пиков с использованием ладдера

РегЛек – ЕАЭС

Ладдер гомополимеров глюкозы и стандартный образец



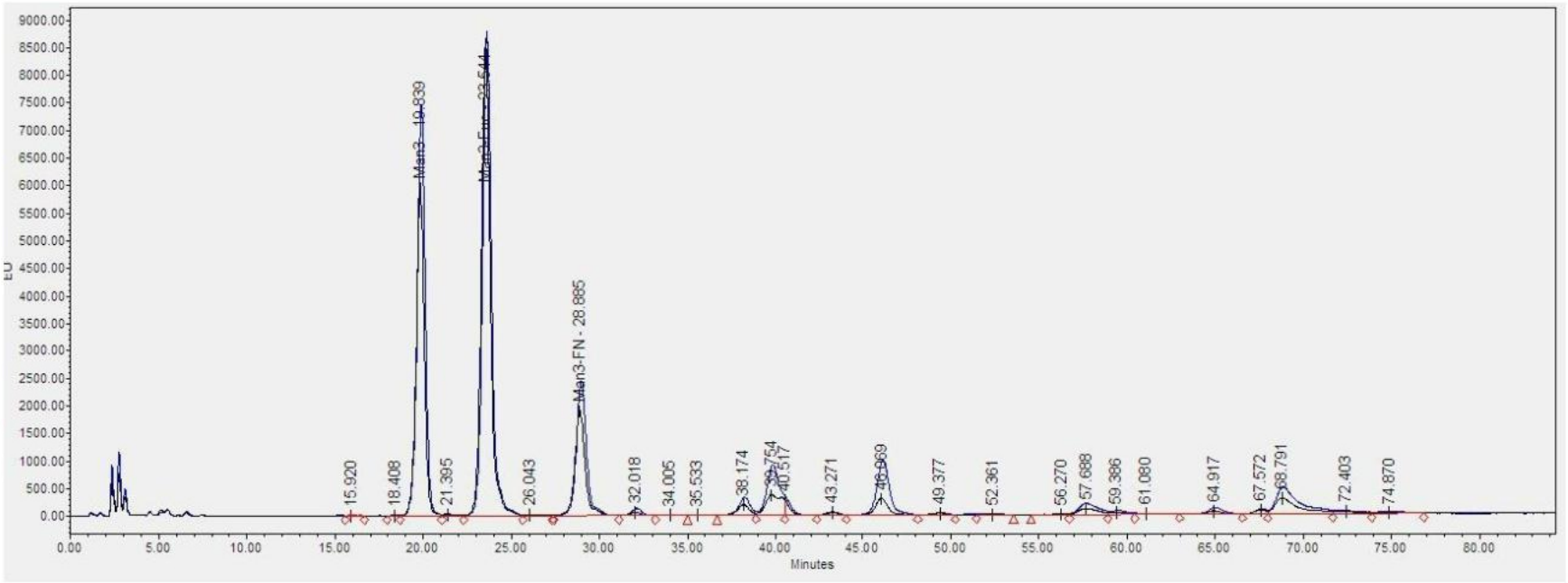
Идентификация пиков в соответствии с их положением по отношению к пикам ладдера

научный центр экспертизы средств медицинского применения

Оценка пригодности по стандартному образцу

РегЛек – ЕАЭС

Стандартный образец белка+ Испытуемый раствор.



Оценка соответствия профиля.

Идентификация пиков и оценка эффективности

Оценка разрешения

Оценка чувствительности

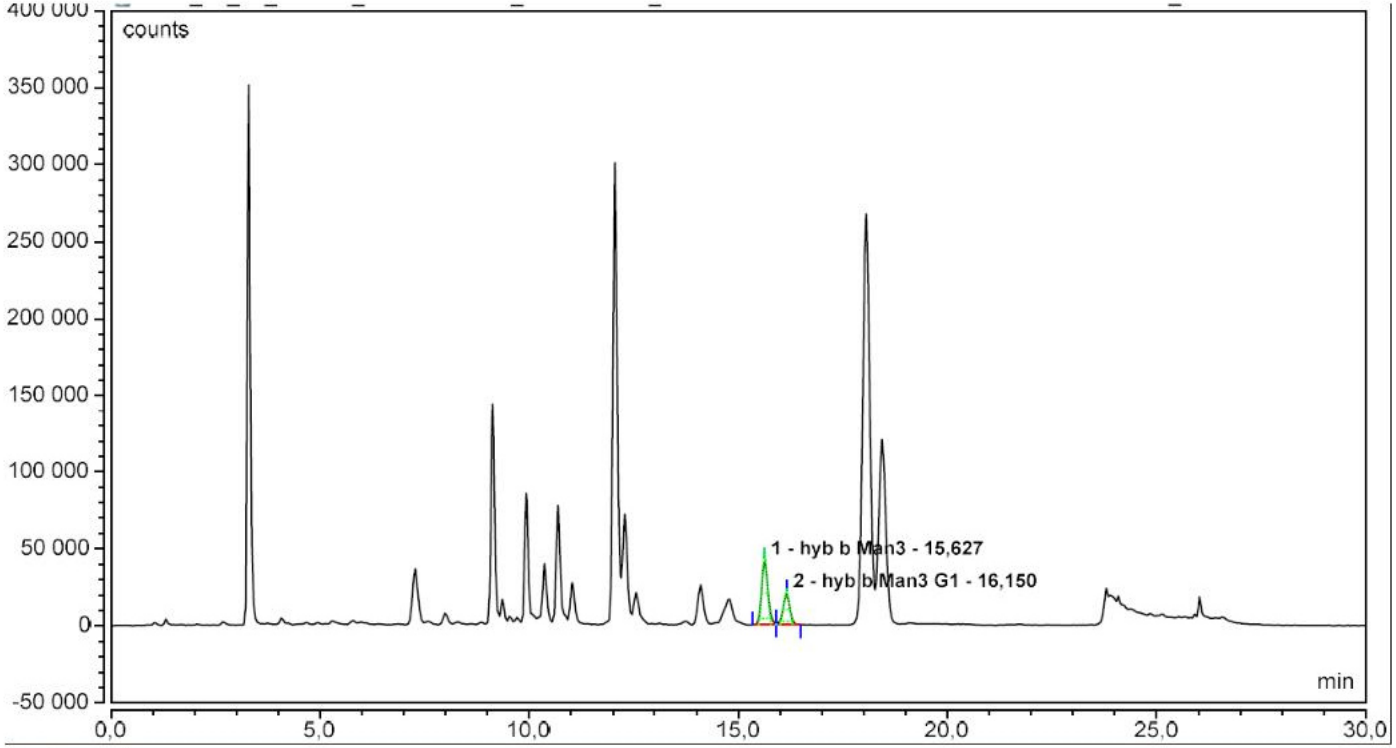
ВАЖНО!!! Стабильность состава стандартного образца и хроматографической системы

научный центр экспертизы средств медицинского применения

Оценка пригодности по стандартному образцу

РегЛек – ЕАЭС

Стандартный образец



Peak Results

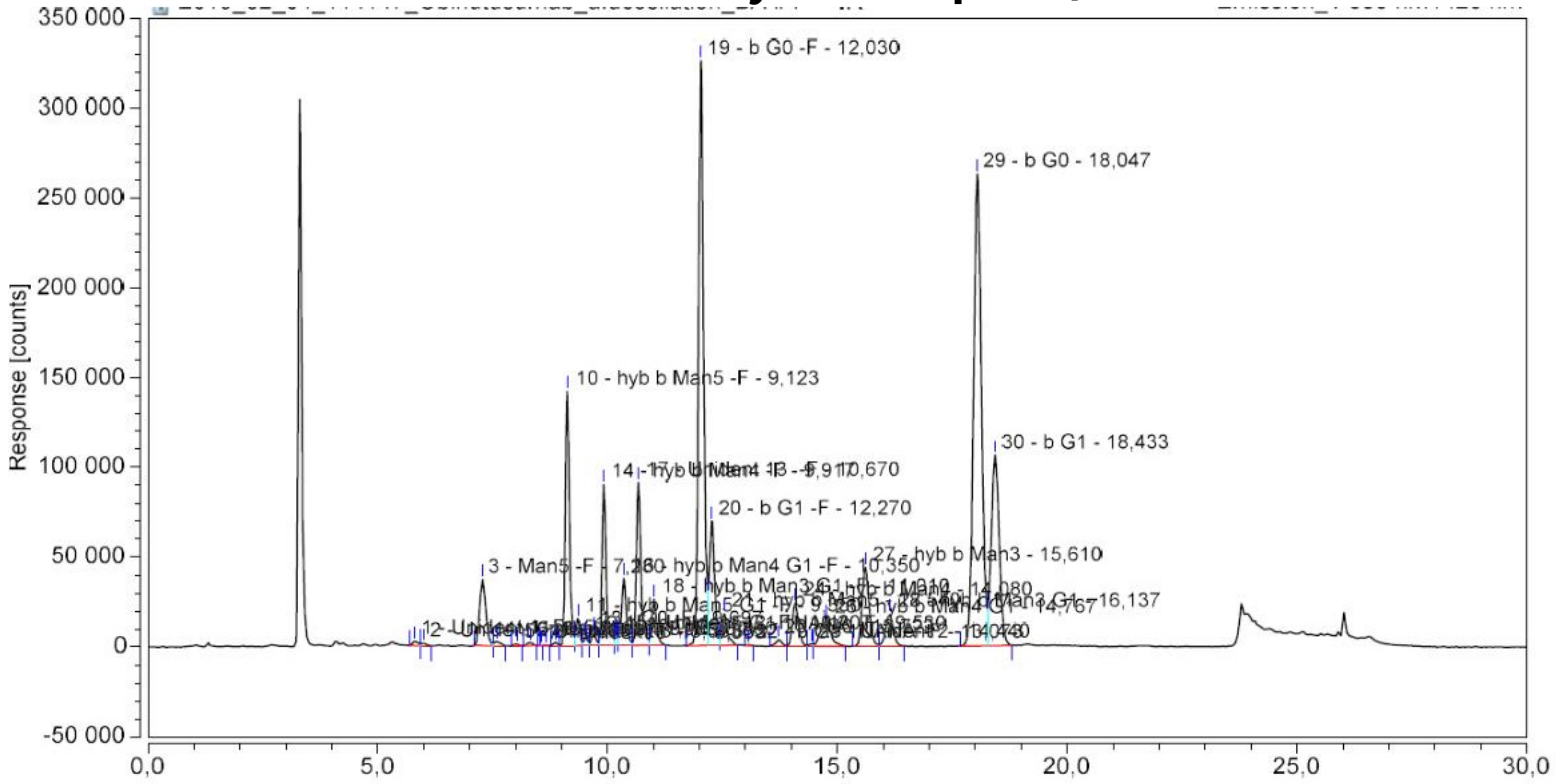
No.	Peak Name	Retention Time min	Width (50%) min	Type	Resolution (EP)	Asymmetry (EP)	Plates (EP)
1	hyb b Man3	15,627	0,165	BM	1,83	1,17	49499
2	hyb b Man3 G1	16,150	0,173	MB	n.a.	n.a.	48328

научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

Оценка результатов

РегЛек – ЕАЭС

Испытуемый образец



Соответствие общего профиля

Наличие/отсутствие тех или иных фракций

Минимальное/максимальное содержание фракций

Соотношение содержания фракций

Соответствие соотношения фракций в испытуемом образце соотношению в стандартном образце

Общее содержание гликанов

научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

Оценка результатов

РегЛек – ЕАЭС

Испытуемый образец

Указать диапазон интегрирования

Указать пики не подлежащие учету при расчетах

Привести пример разметки

Предусмотреть надежный способ идентификации интересующих пиков

Ввести обоснованные требования к испытуемому образцу

РегЛек – ЕАЭС

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

научный центр
экспертизы средств
медицинского применения