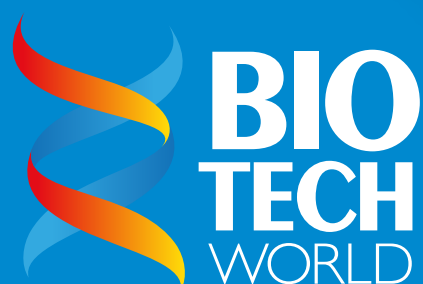


МАТЕРИАЛЫ КОНГРЕССА  
CONGRESS PROCEEDINGS



МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС  
**БИОТЕХНОЛОГИЯ:  
СОСТОЯНИЕ  
И ПЕРСПЕКТИВЫ  
РАЗВИТИЯ**

INTERNATIONAL CONGRESS  
**BIOTECHNOLOGY:  
STATE OF THE ART  
AND PERSPECTIVES**

**25 - 27 ФЕВРАЛЯ 2019**  
МОСКВА, ГОСТИНЫЙ ДВОР,  
ИЛЬИНКА, 4

**25 - 27 FEBRUARY 2019**  
ILYNKA 4, GOSTINY DVOR,  
MOSCOW



[WWW.BIOMOS.RU](http://WWW.BIOMOS.RU)

МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС

**БИОТЕХНОЛОГИЯ:  
СОСТОЯНИЕ  
И ПЕРСПЕКТИВЫ  
РАЗВИТИЯ**

ВЫПУСК 17

25 - 27 ФЕВРАЛЯ 2019  
МОСКВА, ГОСТИНЫЙ ДВОР,  
ИЛЬИНКА, 4

INTERNATIONAL CONGRESS

**BIOTECHNOLOGY:  
STATE OF THE ART  
AND PERSPECTIVES**

ISSUE 17

25 - 27 FEBRUARY, 2019  
ILYNKA 4, GOSTINY DVOR,  
MOSCOW

Application of multimodal resins (mixed-mode chromatography, MMC) allows attaining the high product quality and decrease in protein loss during the purification process. In addition, mixed-mode chromatography is usually performed at higher values of protein load per resin volume and, consequently, requires fewer amounts of both resin and corresponding buffer solutions than traditional chromatography approaches.

The outstanding selectivity of multimodal resins is due to the distinctive structure of their ligands, which can bind biomolecules through simultaneous implementation of several types of interaction (electrostatic, hydrophobic, hydrogen-bonding etc.). Since the number of different mixed-mode resins having unique features is steadily growing, it will likely result in wider implication of this chromatography technique for future laboratory and production purposes.

УДК 57.088.1

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ИМИГЛЮЦЕРАЗЫ БИОАНАЛОГИЧНОГО И РЕФЕРЕНТНОГО ПРЕПАРАТА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Дегтерев М.Б., Смолов М.А., Вишневский А.Ю., Шукуров Р.Р.

ООО «Международный биотехнологический центр «Генериум», Вольгинский, Россия  
601125, Владимирская область, Петушинский район, пос. Вольгинский, ул. Владимирская, д.14  
e-mail: [degterev@ibcgenerium.ru](mailto:degterev@ibcgenerium.ru)

**Ключевые слова:** имиглюцераза, биоаналог, масс-спектрометрия, гликозилирование

При помощи методов ВЭЖХ и масс-спектрометрии было проведено исчерпывающее сравнительное исследование молекул референтного («Церезим®», («Джензайм», Европа, Б.В. Нидерланды)) и биоаналогичного («Глуразим, АО «Генериум», Россия) препарата имиглюцеразы, по результатам которого было подтверждено их биоподобие.

Болезнь Гоше – это орфанное генетическое заболевание, вызываемое недостатком активности фермента глюкоцереброзидазы, приводящему к накоплению в клетках сфинголипида глюкоцереброзида. Симптомы заболевания включают в себя спленомегалию, тромбоцитопению, анемию, кровоизлияния, хроническую усталость и разнообразные неврологические проявления [1]. На сегодняшний день основным способом лечения болезни является ферментозаместительная терапия рекомбинантной человеческой бета-глюкоцереброзидазой (имиглюцеразой), представляющей собой гликопротеин с молекулярной массой порядка 58 кДа.

Для того, чтобы перевести этот белок в активную форму, необходимо проводить энзиматическое отщепление остатков маннозы в составе олигосахаридов на каждом из сайтов гликозилирования имиглюцеразы. Для подтверждения биоаналогичности кандидатной молекулы референтной, мы провели их исследование широким набором физико-химических методов, включая масс-спектрометрический анализ.

Интактные белки исследовали при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ-масс-спектрометрии.

Валидацию аминокислотной последовательности, идентификацию и полуколичественный анализ посттрансляционных модификаций включая анализ гликопептидов проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ-танDEMной масс-спектрометрии высокого разрешения по стратегиям «снизу вверх» и «multiple attribute method» [2].

Идентификация и полуколичественный анализ свободных гликанов были выполнены методом быстрой гидрофильной ВЭЖХ с флуориметрическим и масс-спектрометрическим детектированием сигнала.

Все работы были выполнены с использованием жидкостного хроматографа Nexera X2 (Shimadzu), оснащенного диодно-матричным, флуориметрическим детекторами и масс-спектрометром Q-TOF 6550 (Agilent Technologies).

Нами было показано сходство профилей молекулярно-массового распределения между белками референтного и биоаналогичного препаратов, была подтверждена идентичность их аминокислотных последовательностей.

Проведенный сравнительный полуколичественный анализ профилей посттрансляционных модификаций, включая дезамидирование, окисление и двойное окисление, образование пироглутамовой кислоты и гликозилирование как на уровне гликопептидов, так и гликанов подтвердил близкое сходство между оригинальной и кандидатной молекулами.

Мы установили несколько большее содержание маннозо-3-содержащих гликанов в кандидатной мо-

лекуле, которое демонстрирует несколько более эффективное протекание процесса отщепления маннозы при производстве кандидатной молекулы в сравнении с оригинальной.

Также нами было подтверждена биоаналогичность других критических параметров качества между сравниваемыми препаратами.

*Литература:*

1. Gaucher Disease. URL: <https://emedicine.medscape.com/article/944157-overview> (дата обращения: 18.01.2007).
2. Development of a quantitative mass spectrometry multi-attribute method for characterization, quality control testing and disposition of biologics// *MAbs*. 2015 Sep-Oct; Vol. 7(5). P881–890.

UDC 57.088.1

## PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF AN ORIGINAL AND BIOSIMILAR IMIGLUCERASE BY MASS SPECTROMETRY METHODS

**M.Degterev, M.Smolov, A.Vishnevskiy, R.Shukurov**

*International Biotechnology Center Generium, Volginsky, Russia  
601125, Vladimir region, Petushinsky district, Volginskiy village, Vladimirskaaya str., 14  
e-mail: [degterev@ibcgenerium.ru](mailto:degterev@ibcgenerium.ru)*

**Key words:** imiglucerase, biosimilarity, mass spectrometry, glycosylation

The deep characterization of the original (Cerezyme, Sanofi Genzyme) and candidate (Glurazyme, JSCGenerium) molecules of imiglucerase by hyphenated analytical techniques including UHPLC and HPLC-MS multiple attribute methods was done to compare them and to prove the biosimilarity.

The Gaucher disease is an orphan genetic disorder. It is caused by the lack of activity of the glucocerebrosidase and leads to the accumulation in cells a sphingolipid called glucocerebroside. Its symptoms include splenomegaly, thrombocytopenia, anemia, bruising, fatigue and various neurologic symptoms [1]. For the day, the principal treatment for this disease is the Enzyme replacement therapy by the recombinant human Beta-glucocerebrosidase (imiglucerase): a glycoprotein with molecular mass of about 58 kDa.

To transform the imiglucerase into the active form the mannose residues of the oligosaccharides at each glycosylation site are need to be exposed by several exoglycosidases. To prove the candidate protein biosimilarity we performed a physicochemical study including detailed mass spectrometry research.

Intact proteins were analyzed by the reversed phase HPLC-MS.

The amino acid sequence validation, PTMs identification and quantification including glycopeptide analysis were done with the high resolution RP-HPLC-MS/MS method under a bottom-up multiple attribute method concept [2].

The identification and semiquantitative analysis of glycans was made by the fast HILIC-MS with additional fluorimetric detection.

All work was performed with the Agilent 6550 QTOF mass spectrometer equipped with the Shimadzu Nexera X2 HPLC with diode-array and fluorometric detectors.

We showed the molecular mass profiles similarity between original and a new protein.

We proved the amino acid sequence identity between studied molecules.

We performed the comparative semiquantitative analysis of PTMs including deamidation, oxidation and dioxidation of methionine and tryptophan, pyroglutamic acid formation and glycosylation both on the glycopeptides and glycans level and demonstrated strong similarity between original and biosimilar molecules.

We showed a slightly bigger Man-3 glycans amount in the candidate molecule that does not affect the biosimilarity of the biologics but demonstrates the more effective mannose exposition process.

Moreover, we confirmed the similarity of critical quality attributes between them.

*References:*

1. Gaucher Disease. URL: <https://emedicine.medscape.com/article/944157-overview> (дата обращения: 18.01.2007).
2. Development of a quantitative mass spectrometry multi-attribute method for characterization, quality control testing and disposition of biologics// *MAbs*. 2015 Sep-Oct; Vol. 7(5). P881–890.