



RICHTER GEDEON

Biotechnológiai gyógyszerek és bioszimilitás- egy analitikus szemszögéből

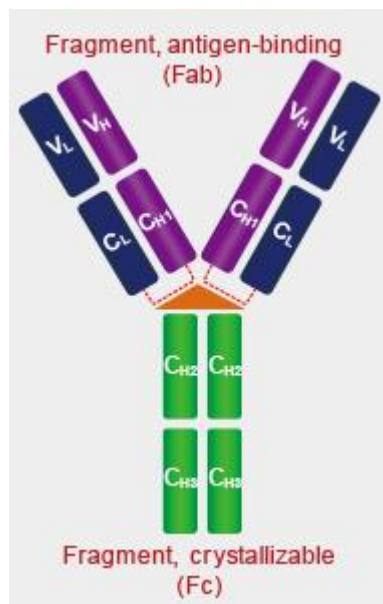
Lenkey Krisztián

Biotechnológiai Rutin Analitikai Osztály, Osztályvezető
Gedeon Richter Plc.

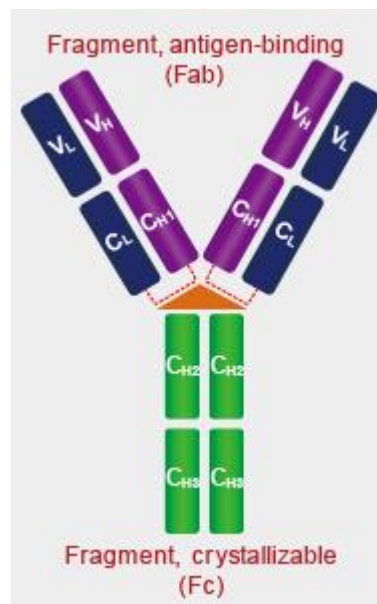


Az előadás témái

Biotechnológiai gyógyszerek



Bioszimilárisok



Módszerek

Szerkezeti vizsgálatok

Tisztaság vizsgálatok

Hatóanyag tartalom meghatározás

Hatóság: comparability

Példák



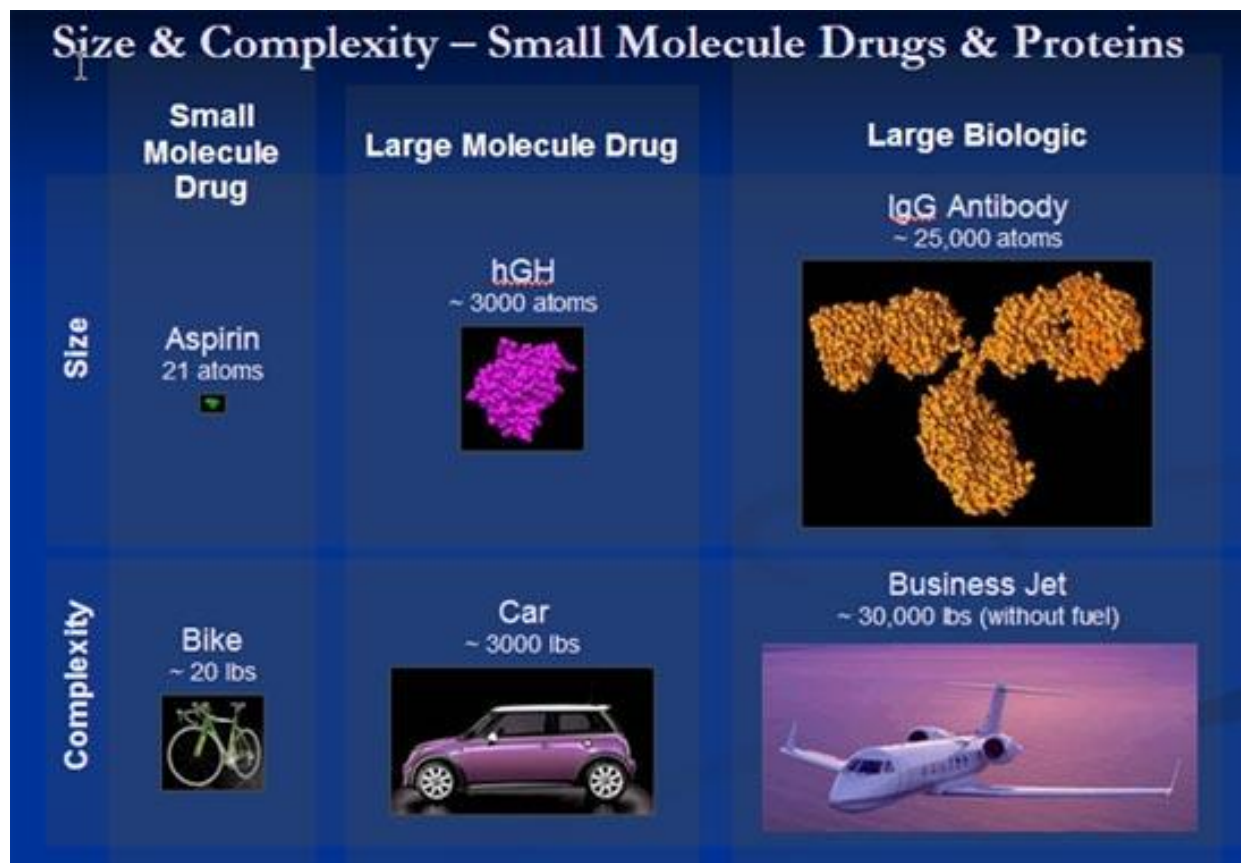
Biotechnológiai gyógyszerek

- Biotechnológia: Biokémiai, mikrobiológiai és vegyészmérnöki ismeretek integrált alkalmazása; mikroorganizmusok, növényi vagy állati szövetek, vagy részeinek technológiai felhasználása hasznos termékek előállítására céljából.
- Ereky Károly a „biotechnológia atyja”
- 1980-as években jelentek meg az első biotechnológiai készítmények
- Ma már több mint 150 termék van piacon világszerte
- Több mint 300 további termék fejlesztés alatt

A biotechnológiai termékek képezik a leggyorsabban fejlődő és legfontosabb csoportját a súlyos betegségek kezelésére szolgáló gyógyszerkészítményeknek.



Kismolekulák-Nagymolekulák



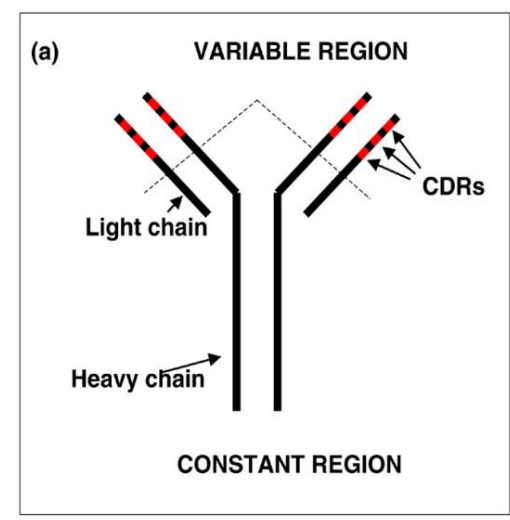
Példa: Monoklonális antitest (mAb)



Az antitestek az immunválasz részei, speciális fehérjék, amelyeket B-limfociták és a belőlük átalakult plazmasejtek termelnek és a vérrel, nyirokkal keringenek.



Az antitestek felismerik az idegen fehérjét, mikroorganizmusokat, toxinokat (mérgeanyagokat), hozzájuk kötődnek és ezzel semlegesítve őket.



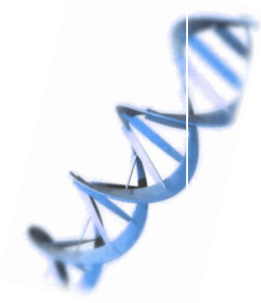
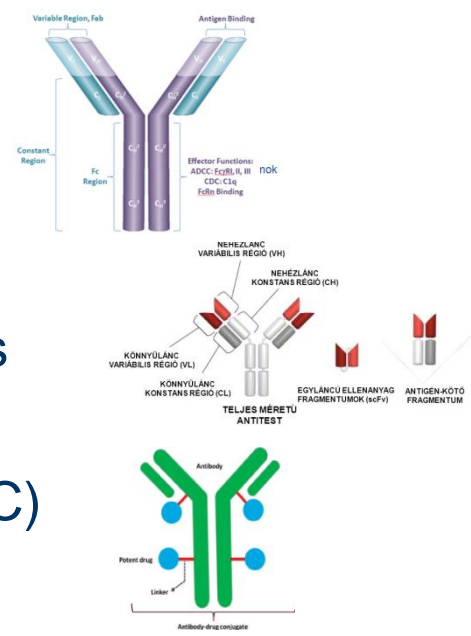
Sematikus ábra



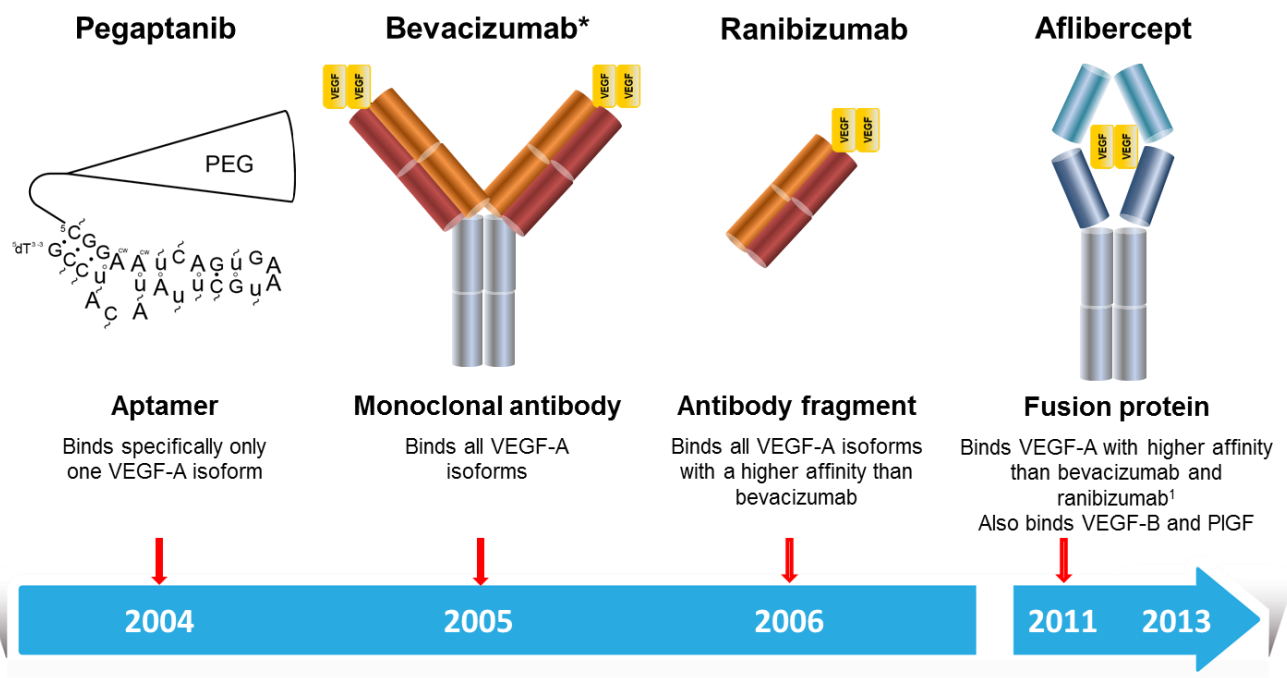
Biotechnológiai gyógyszer termékek

Gyakori képviselőik:

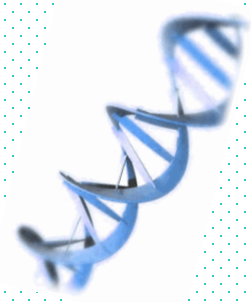
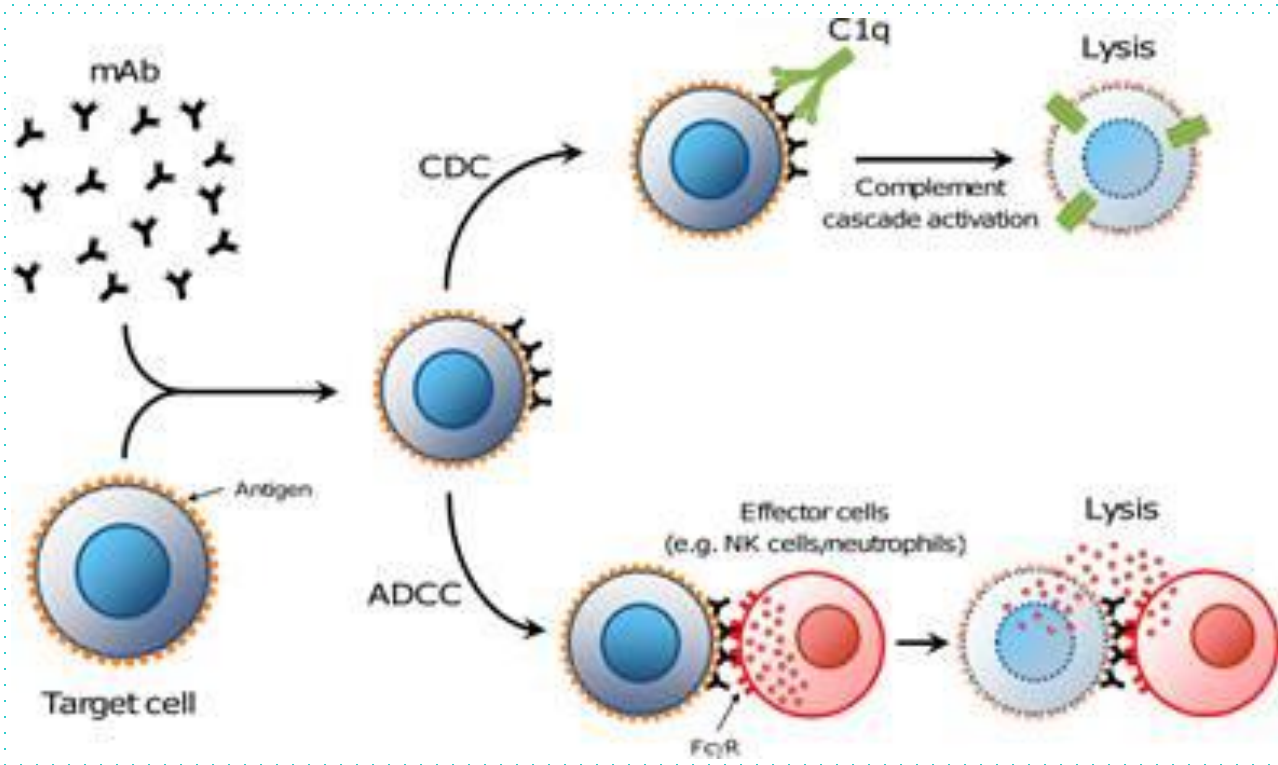
- Citokinek
- Monoklonális antitestek (mAb)
- Monoklonális antitest fragmens
- Antibody-drug conjugates (ADC)
- Rekombináns fuziók fehérjék



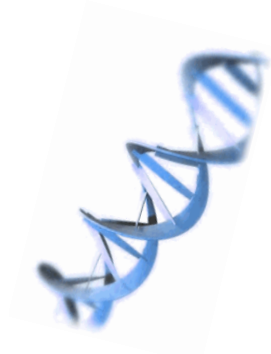
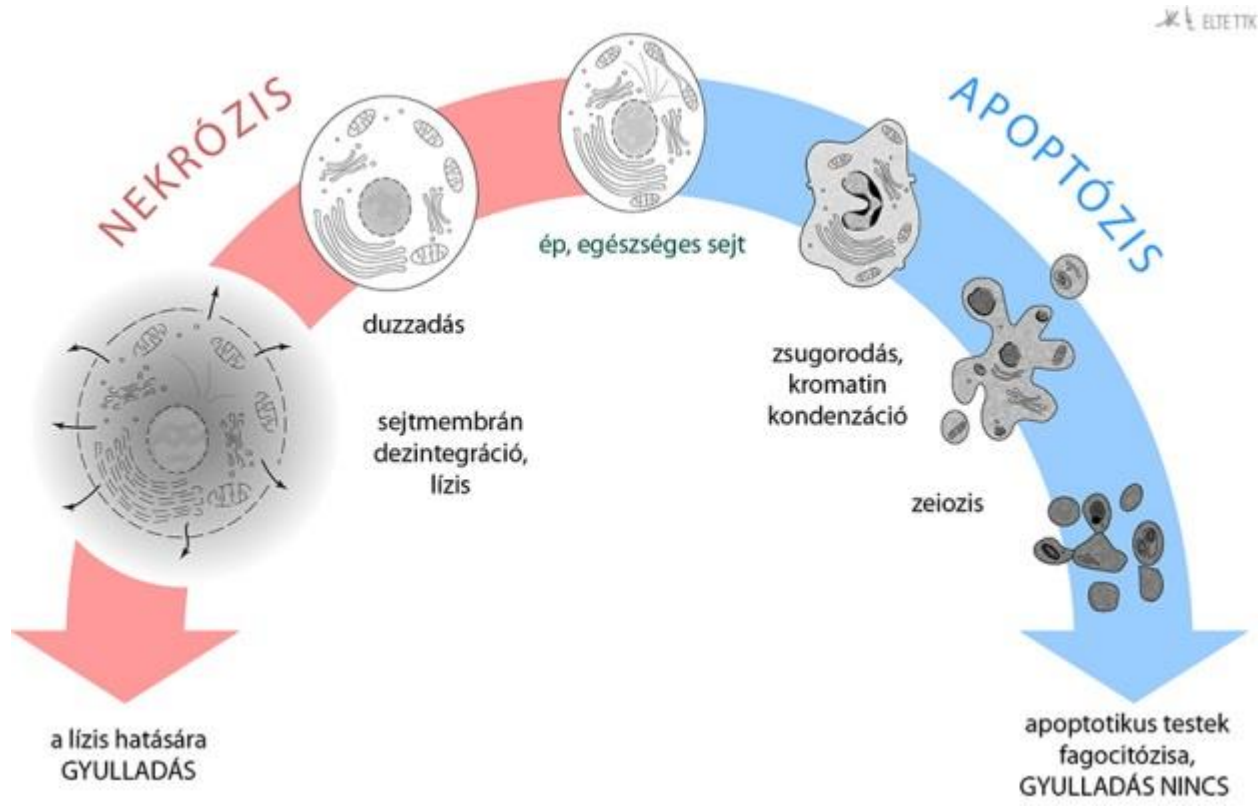
Biotechnológiai gyógyszerkészítmények fejlődése



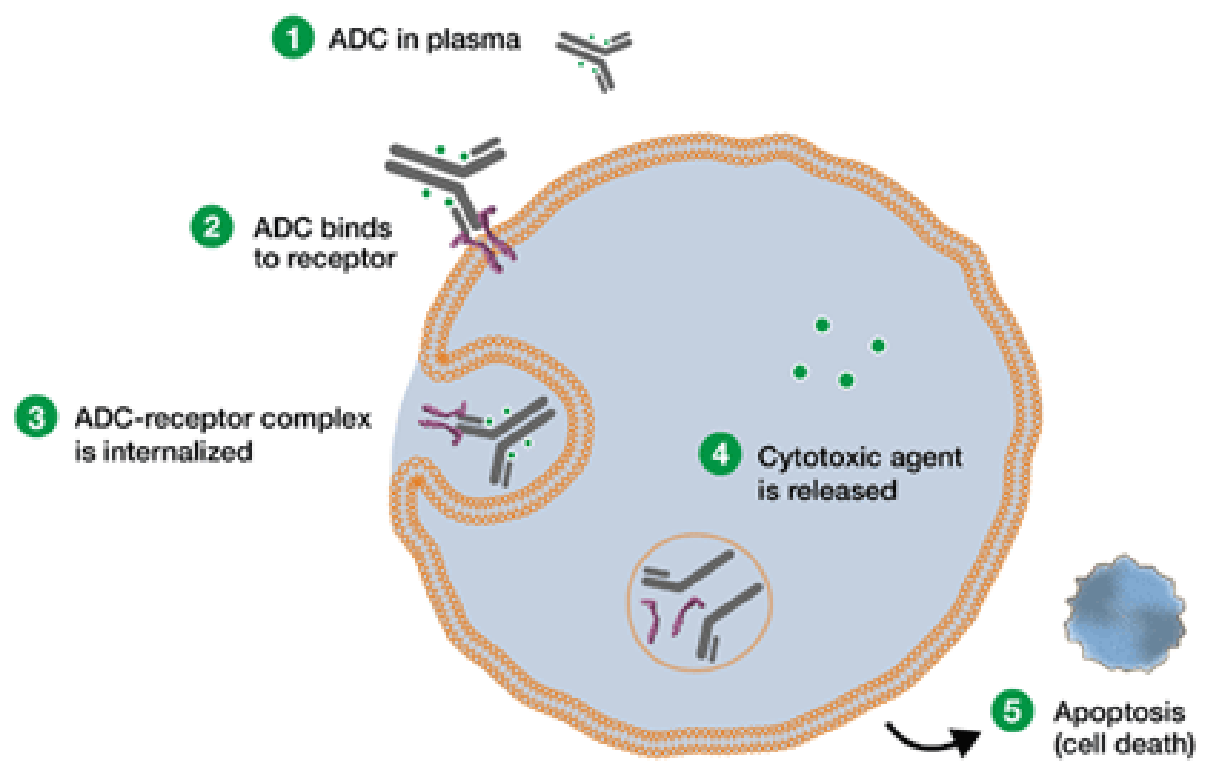
Biotechnológiai gyógyszerek néhány jellemző hatás mechanizmusa- ADCC, CDC



Hatás mechanizmus- apoptózis



Hatás mechanizmus- cytotoxic anti-microtubule agent



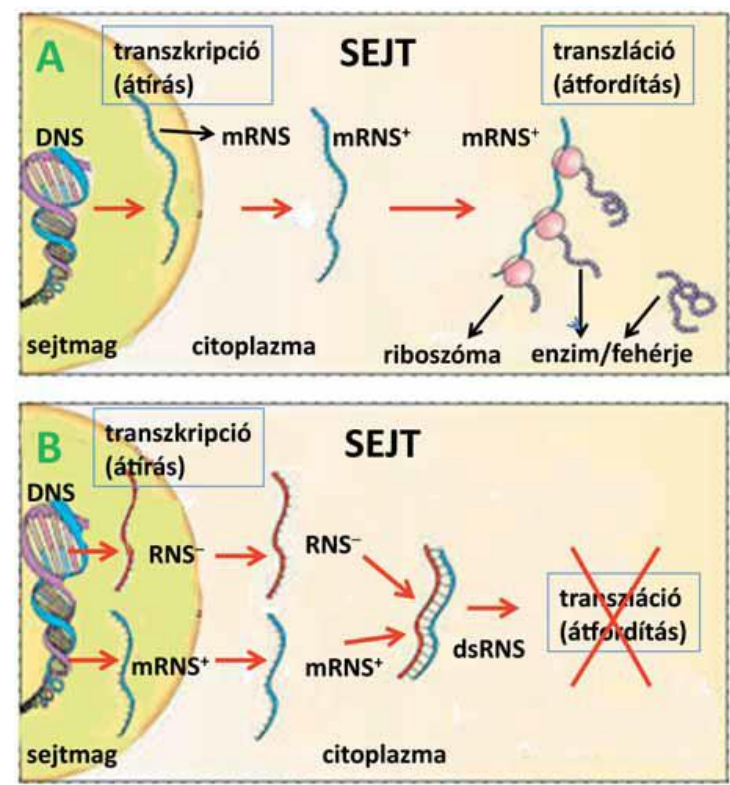
Hatás mechanizmus- VEGF inhibíció



Jövő biotechnológiai gyógyszerformái

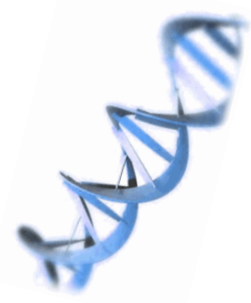
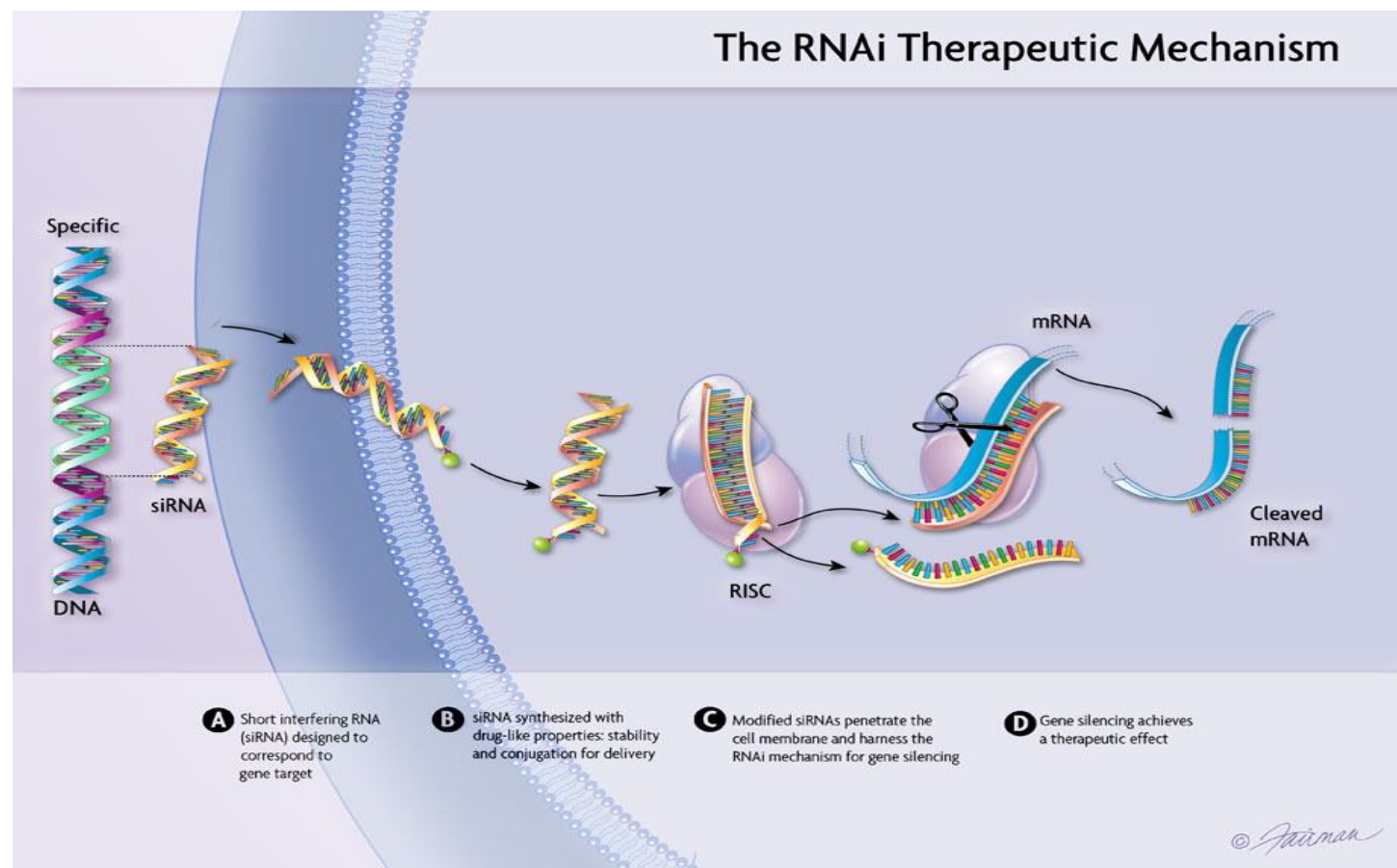
Antiszensz RNS terápia:

- Szensz RNS komplementer szárának szintetizálása
- Transzláció gátlása a citoszolban
- Kritikus fehérje expressziók kikapcsolása (tumor sejtek osztódásának leállítása, mikroorganizmusok létfontosságú fehérjéinek gátlása)



Jövő biotechnológiai gyógyszerformái

RNS interferencia



Biotechnológiai gyógyszerkészítmények előnyei

- Nagy
- Keve
- Óriás
- Enyh
- Kise
- Sok
- Egy



"The doctor will be with you in a few minutes. He's trying to figure out what disease goes with your insurance."



Bioszimilaritás

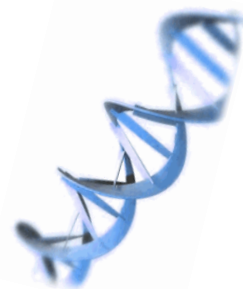
Azonos (Generikus)

A termék és az
originátor teljesen
azonosak a
tulajdonságaikban

(Komplex anyagok esetében
nehezen ellenőrizhető)

Hasonló (Bioszimiláris)

A termék tulajdonságai
hasonlóak az
originátorhoz,
ugyanolyan hatás és
biztonság mellett.



A bioszimiláris termékek nem generikusok

Hasonlóság???



COLONEL SANDERS



VÁGÓ ISTVÁN

www.klonok.com

Lehetne-e “biogenerikus”?

Elméletben – IGEN

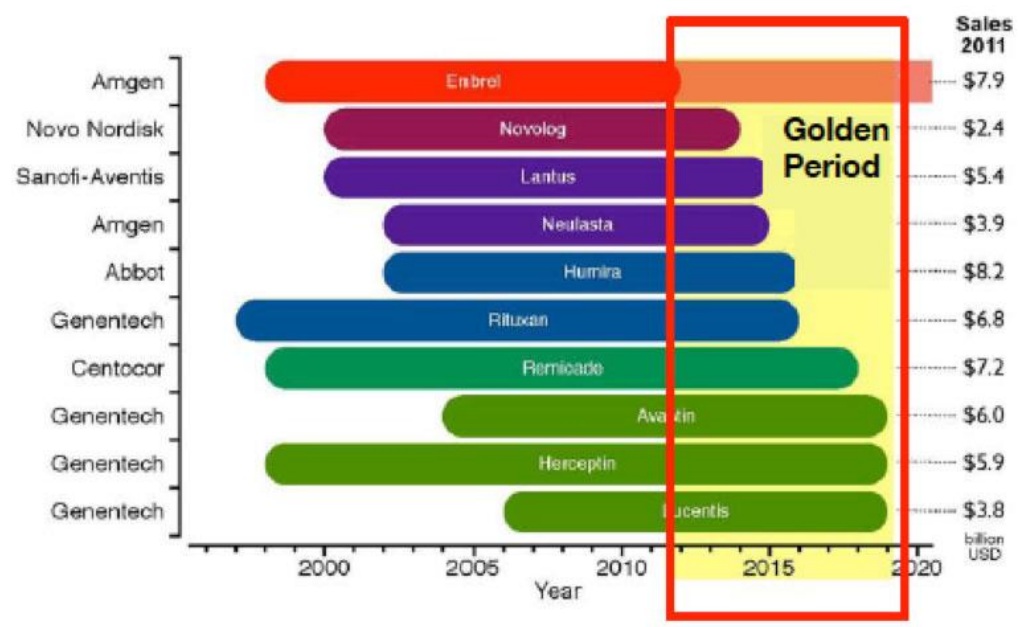
Gyakorlatban – Talán egyszer, ha a molekula teljesen jellemezhető, karakterizálható (függ a mérettől, komplexitástól)

Jelenleg – Similar Biological Medicinal Product,
röviden: “biosimilar”

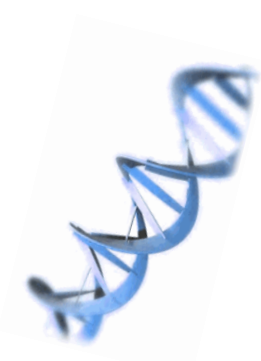


Biotechnológiai termékek szabadalmának lejárata

Top 10 Selling Biologic's Patent Cliff



Calo-Fernández B et al (2012) Pharmaceuticals 2012, 5, 1393-1408



Biosimilar Teriparatide: Terrosa



- Teriparatide: biologically active N-terminal 34-amino acid fragment of PTH(1-84)
- Only bone anabolic agent approved – Forsteo/Forteo (Eli Lilly)
 - Treatment of postmenopausal women and men at an increased risk of fracture
 - Treatment of glucocorticoid induced osteoporosis in men and women at an increased risk of fracture



Miért jó a világnak a bioszimiláris

- Mindazért amiért a biotechnológiai gyógyszerek általában

+

- Csökkenő árak
- Gyártó kapacitás növekedés

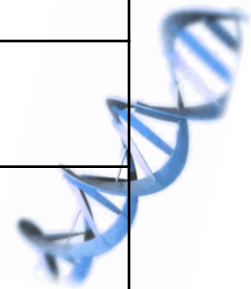
=

- Olyan betegekhez is eljuthatnak ezek a hatékony és unikális gyógyszerek akikhez korábban nem



Egy kismolekula karakterizálása

| Karakterizációs teszt példa | Cél |
|---|------------------------|
| Infravörös spektroszkópia | Azonosság |
| Moláris tömeg | Azonosság |
| Hatóanyag | Azonosság |
| Szennyezők (szennyezés profil meghatározás) | Tisztaság |
| Mikrobiológiai tisztaság | Tisztaság |
| Maradék oldószer (GC) | Tisztaság |
| Drug substance content | Hatóanyag meghatározás |



Bioszimiláris fehérjék karakterizálása 1.



Bioszimiláris fehérjék karakterizálása 2.

| Karakterizációs teszt példa | Szerkezteti szint | Cél |
|------------------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| Szerkezet vizsgálatok | | |
| Aminosav szekvencia | elsődleges | Teljes aminosav sorrend meghatározás |
| N-terminális szekvenálás | elsődleges | N-terminális integritásának igazolása |
| C-terminális szekvenálás | elsődleges | C-terminális integritásának igazolása |
| „Peptide mapping” | elsődleges | Elsődleges szerkezet igazolása |
| Tömegspekrometria | elsődleges | Moláris tömeg |
| HDX-MS | Magasabb rendű szerkezet | Szerkezet azonosság vizsgálat |
| FT-IR | Másodlagos szerkezet | Szerkezet azonosság vizsgálat |
| | | |



Bioszimiláris fehérjék karakterizálása 3.



| Karakterizációs teszt | Szerkezeti szint | Cél |
|--------------------------------|--------------------------|---------------------|
| Circular Dikroismus | másodlagos | Fehérje konformáció |
| Fluoreszcens spektrofotometria | harmadlagos | Fehérje konformáció |
| RP-HPLC | másodlagos | Azonosság |
| NMR | Magasabb rendű szerkezet | Azonosság vizsgálat |
| DSC | Magasabb rendű szerkezet | Azonosság vizsgálat |



Bioszimiláris fehérjék karakterizálása 4.

| Karakterizációs teszt | Vizsgálati szint | Cél |
|--------------------------------|-------------------|--|
| Biological activity | | |
| Biológiai aktivitás (in-vitro) | Szerkezet-Funkció | Biológiai aktivitás és azonosság meghatározása |
| Biológiai aktivitás (in-vivo) | Szerkezet-Funkció | Biológiai aktivitás és azonosság meghatározása |
| Szennyezések | | |
| I) Gyártásból | | |
| Gazdasejt fehérje | Tisztaság | Gyártás eredetű szennyezések meghatározása |
| Gazdasejt DNS | Tisztaság | |
| Endotoxin | Tisztaság | |
| II) Termékből | | |
| SDS PAGE és SEC-HPLC | Tisztaság | Aggregáció meghatározása |
| Peptid mapping | Tisztaság | Redukált és oxidált formák meghatározása |
| RP- HPLC | Tisztaság | Redukált és oxidált formák meghatározása |
| RP- HPLC és IEF | Tisztaság | Deamidált formák meghatározása |
| IEX-HPLC | Tisztaság | Töltésvariánsok |

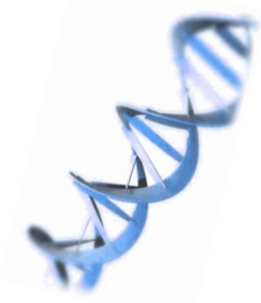


Bioszimiláris fehérjék karakterizálása

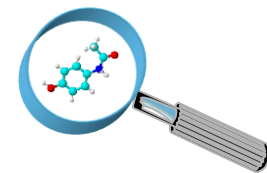
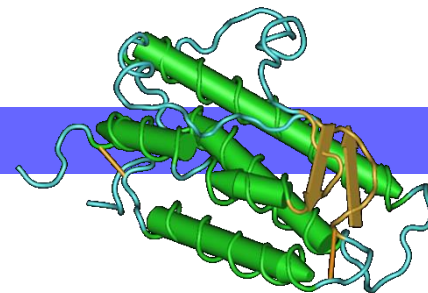
5.



| Karakterizációs teszt | Vizsgálati szint | Cél |
|-----------------------|------------------|----------------------|
| Western blot | Funkció | Azonosság igazolása |
| Slot blot | | |
| IEF | tisztaság | Azonosság igazolása |
| AF4 és HF5 | tisztaság | Aggregáció vizsgálat |
| AUC | tisztaság | Aggregáció vizsgálat |



Miért olyan bonyolult a biotechnológiai termékek vizsgálata?

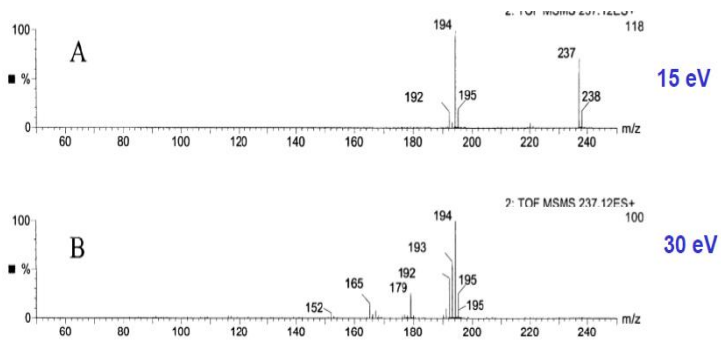


- Nagy molekulatömeg
- Összetett háromdimenziós szerkezet
- Összetett gyártási eljárás
- Élő szervezetek termelik; gyakran heterogének
- Bonyolult a karakterizálásuk fizikokémiai analitikai módszerekkel vagy bio assay-el
- Függ a biológiai aktivitás a gyártási folyamat reprodukálhatóságától
- Immunogenitásban rejlő veszélyek

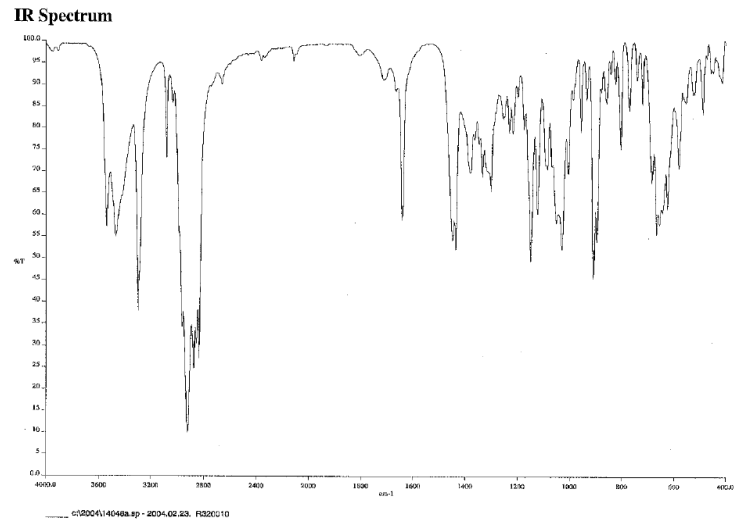


Kismolekula szerkezete

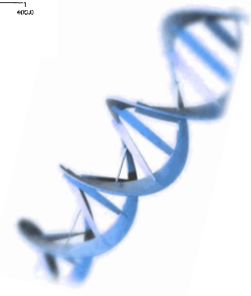
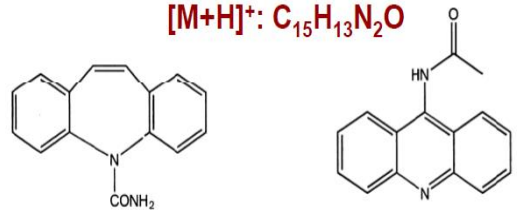
MS spektrum



IR spektrum

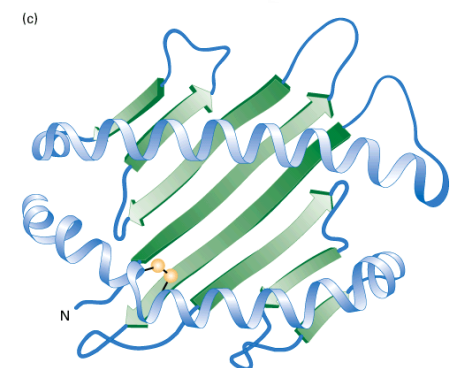
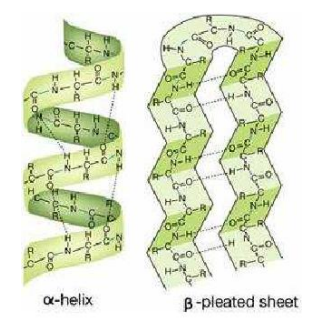
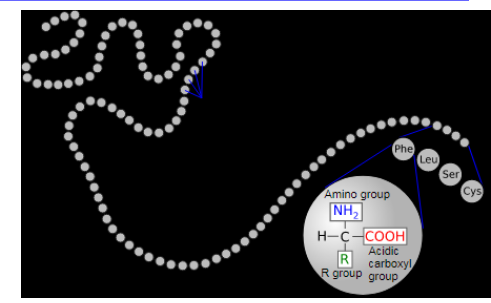


$[M+H]^+$: $C_{15}H_{13}N_2O$



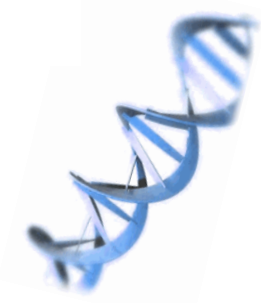
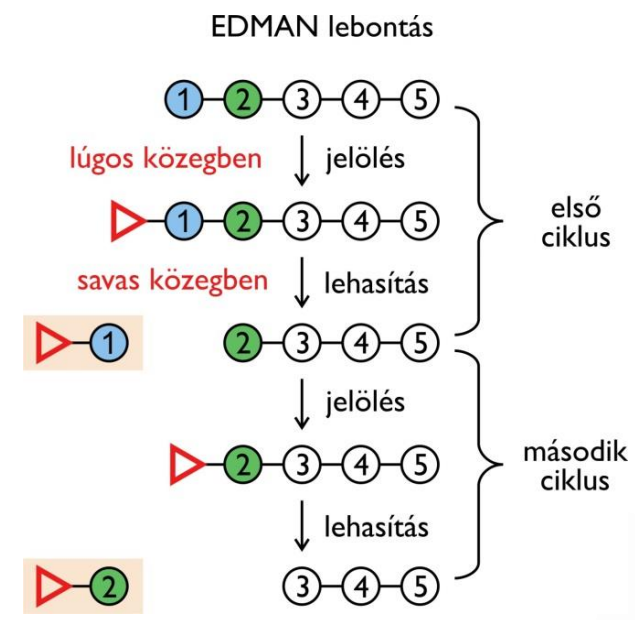
Fehérje szerkezet

- Összetett, többszintű szerkezet, dinamikus struktúrák egymásba alakulása
 - Elsődleges szerkezet: Aminosav szekvencia
 - Másodlagos szerkezet : α -helix, β -redő, rendezetlen, kanyarok
 - Harmadlagos szerkezet: A fehérje teljes háromdimenziós szerkezete



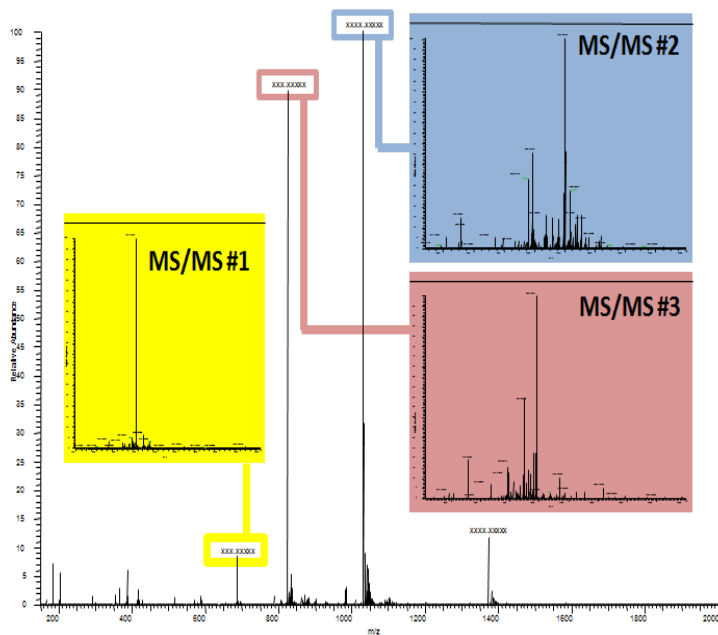
Fehérjék szerkezete: Elsődleges szerkezet- szekvenálás

- Sanger féle módszer
- Edman szekvenálás
- MS szekvenálás

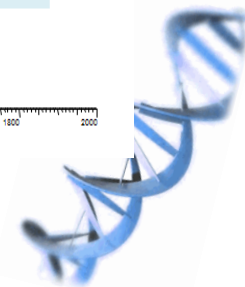
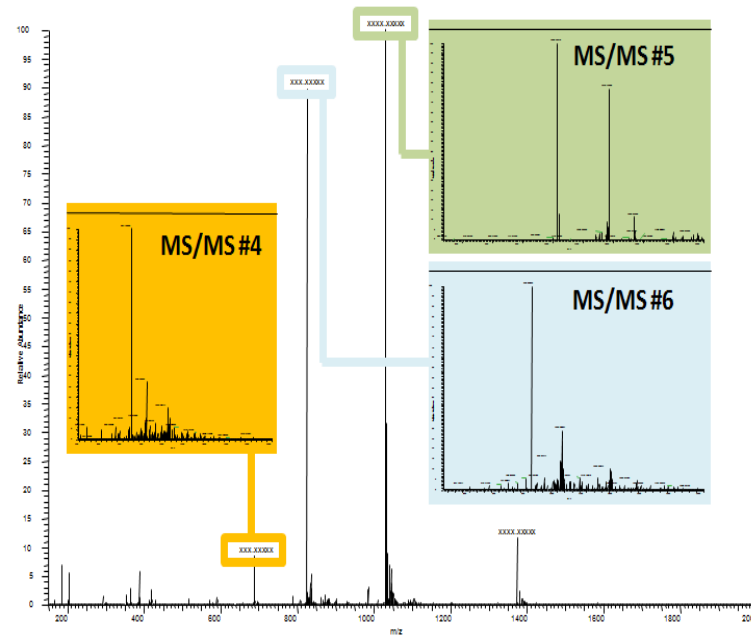


MS-szekvenálás

CID fragmentációs technika alkalmazása:

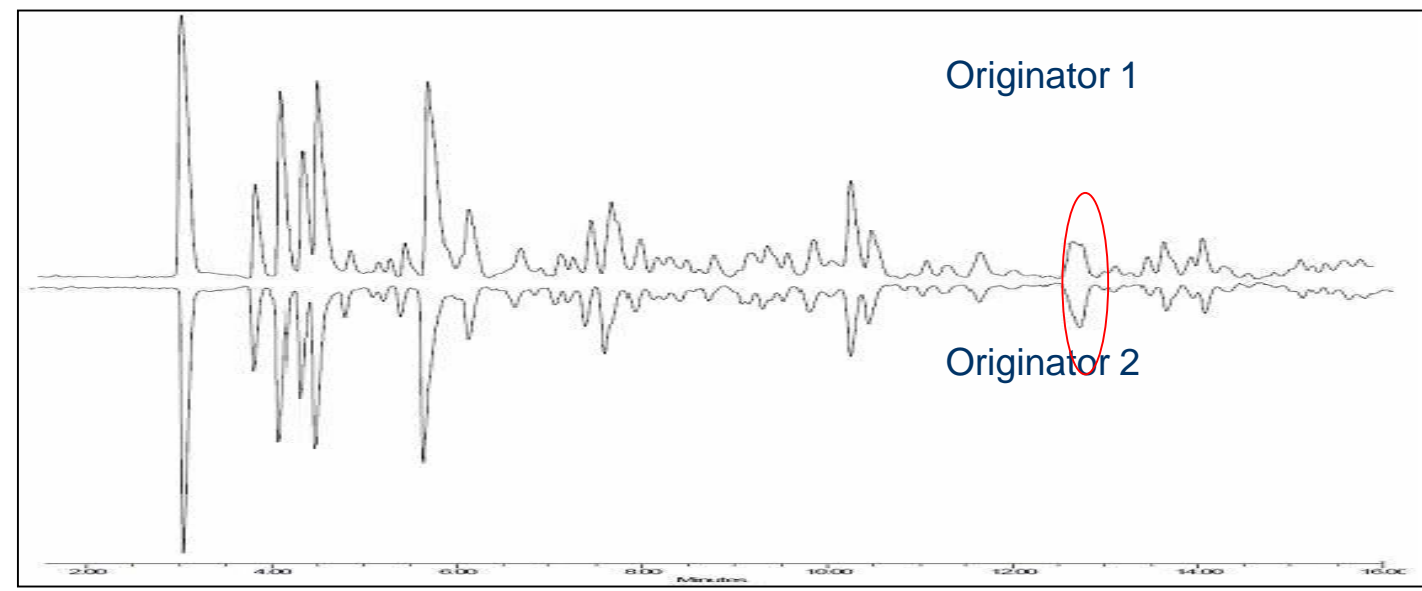


ECD fragmentációs technika alkalmazása:

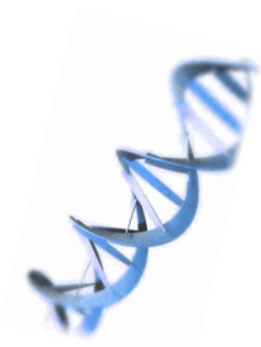


Fehérjék szerkezete: Elsődleges szerkezet- peptid map

Tripszin emésztett polipeptid minták kromatogramjai



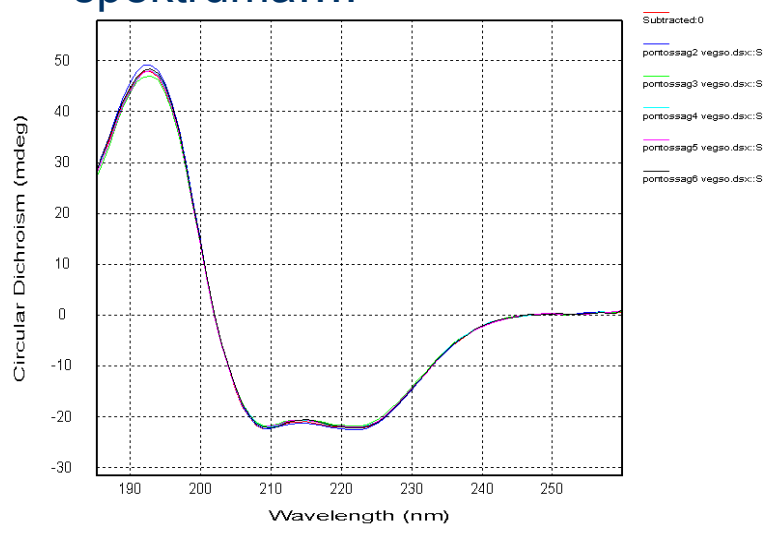
Mi számít releváns különbségnek????



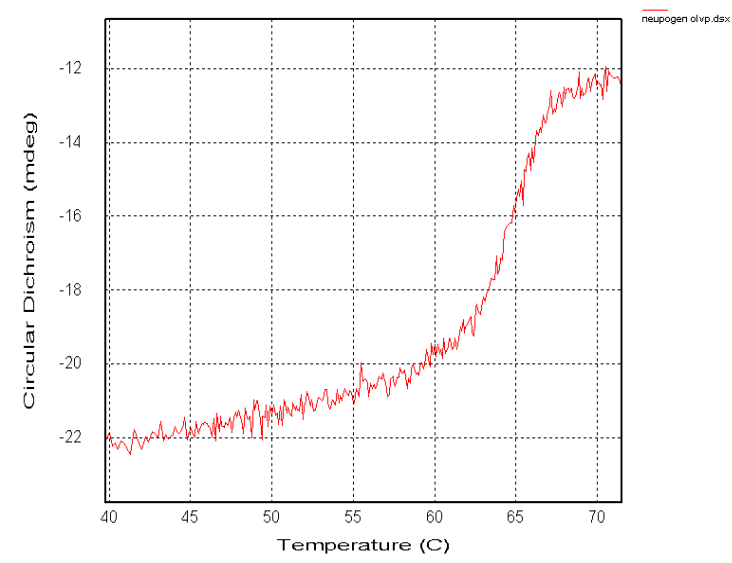
Másodlagos szerkezet

- CD spektrofotometria:

Egy citokin CD spektruma....



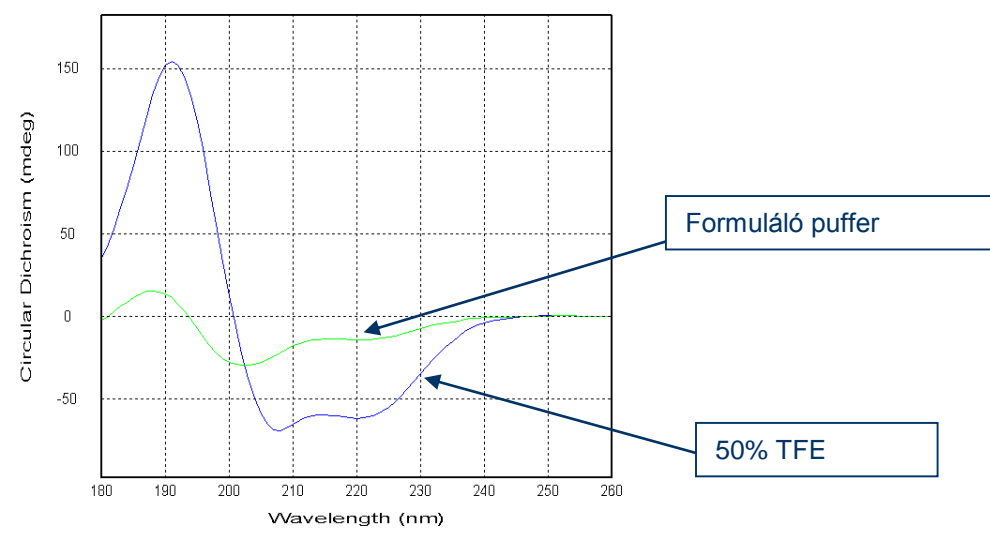
....és olvadáspont görbéje



A CD spektrum segítségével jól jellemezhető a fehérje másodlagos szerkezete, az olvadáspont méréssel viszont apró szerkezeti eltérések is kimutathatóak amik esetleg a spektrumban nem látszanak.



Aktív szerkezet



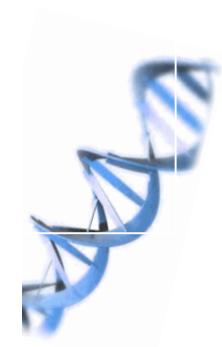
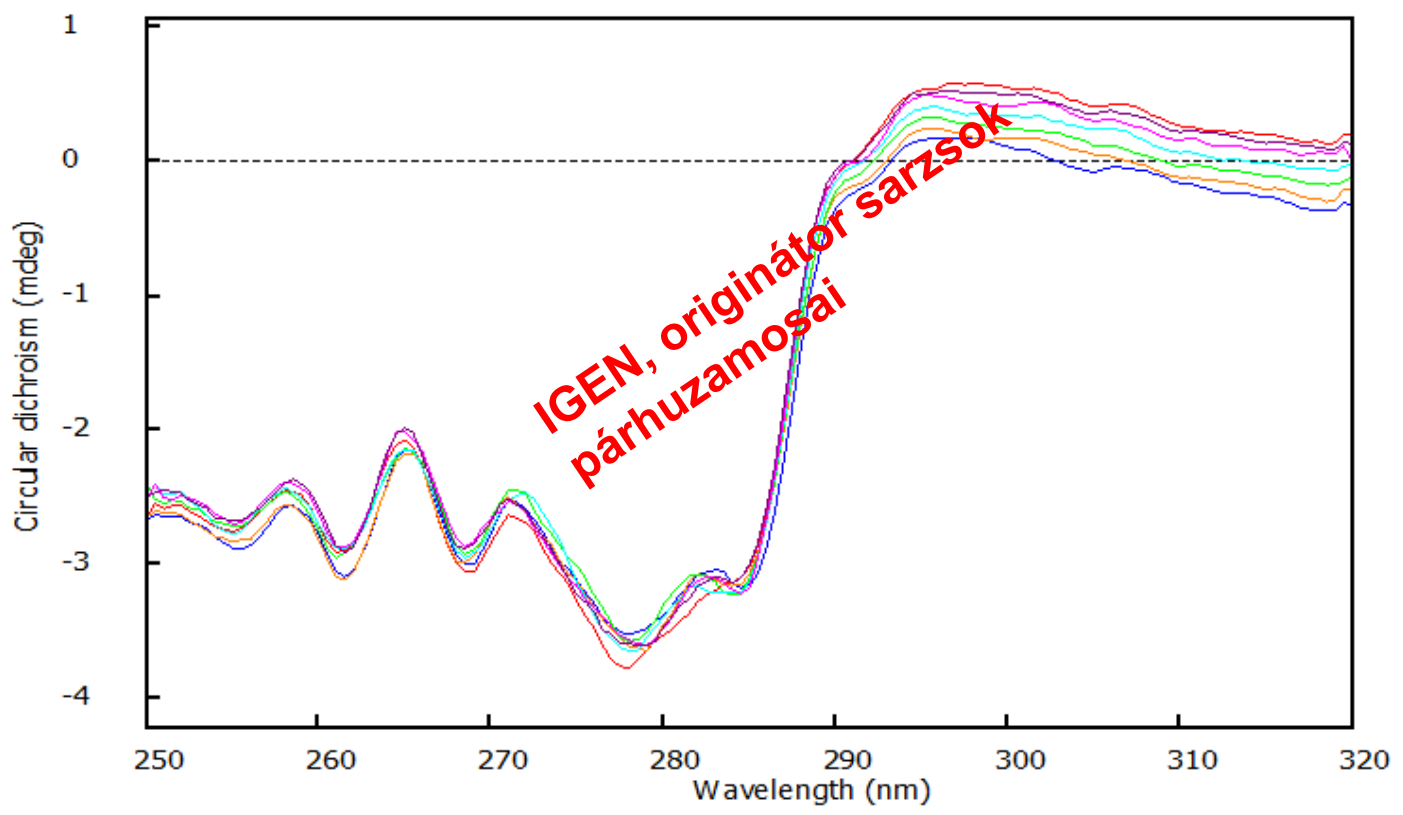
| α -helix arány formuláló pufferben | α -helix arány 50 % TFE-ben |
|---|------------------------------------|
| 26.8 % | 82.6 % |

Feltételezés: Kis random aminosav oligomerek aktív szerkezete modellezhető TFE-s közegben



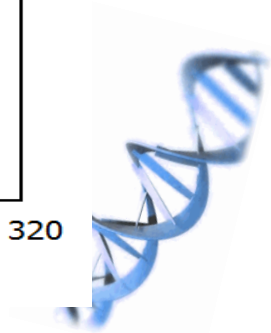
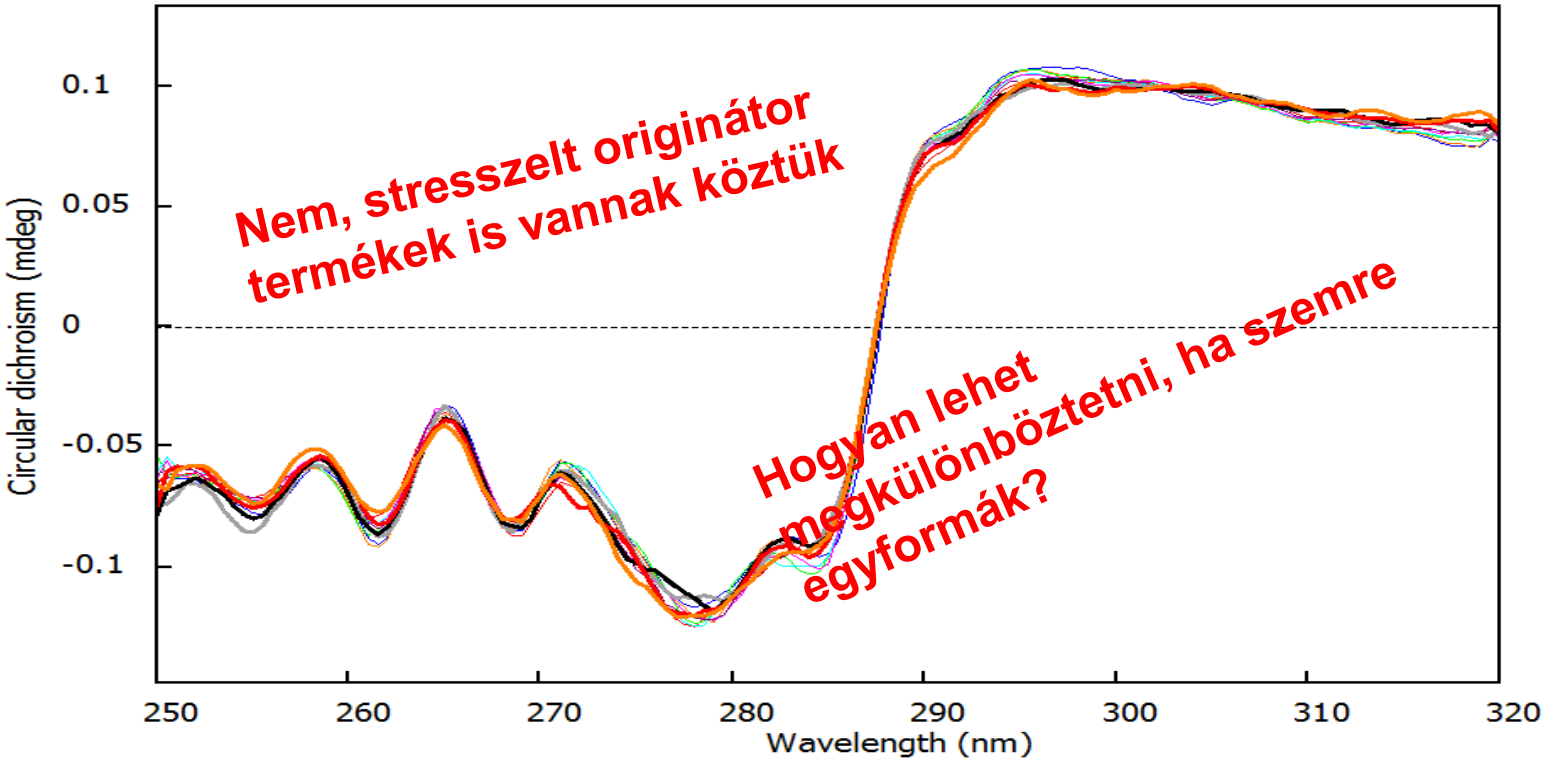
Másodlagos/harmadlagos szerkezet-CD near UV

Hasonlóak?



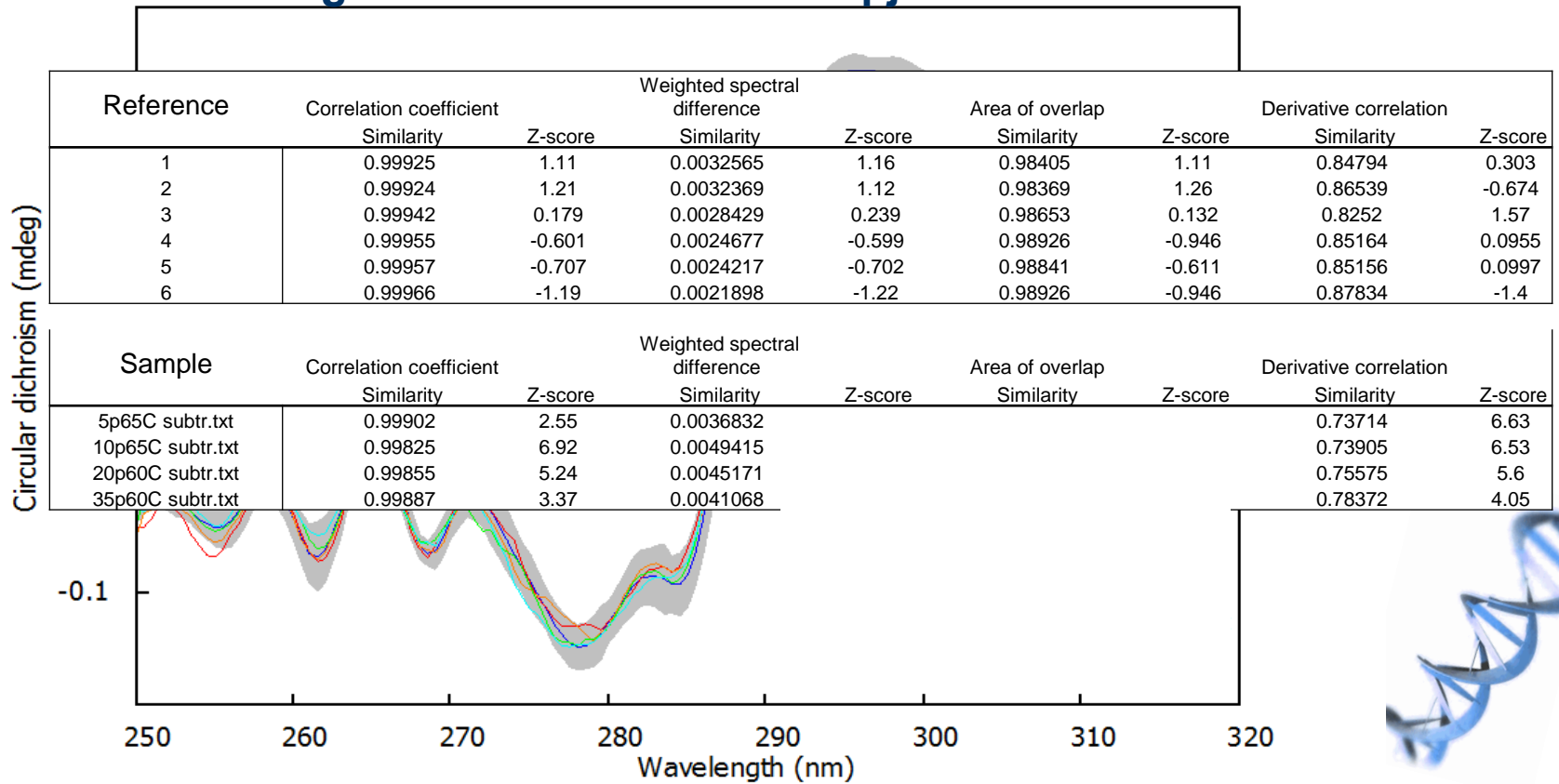
Másodlagos szerkezet

És ezek?



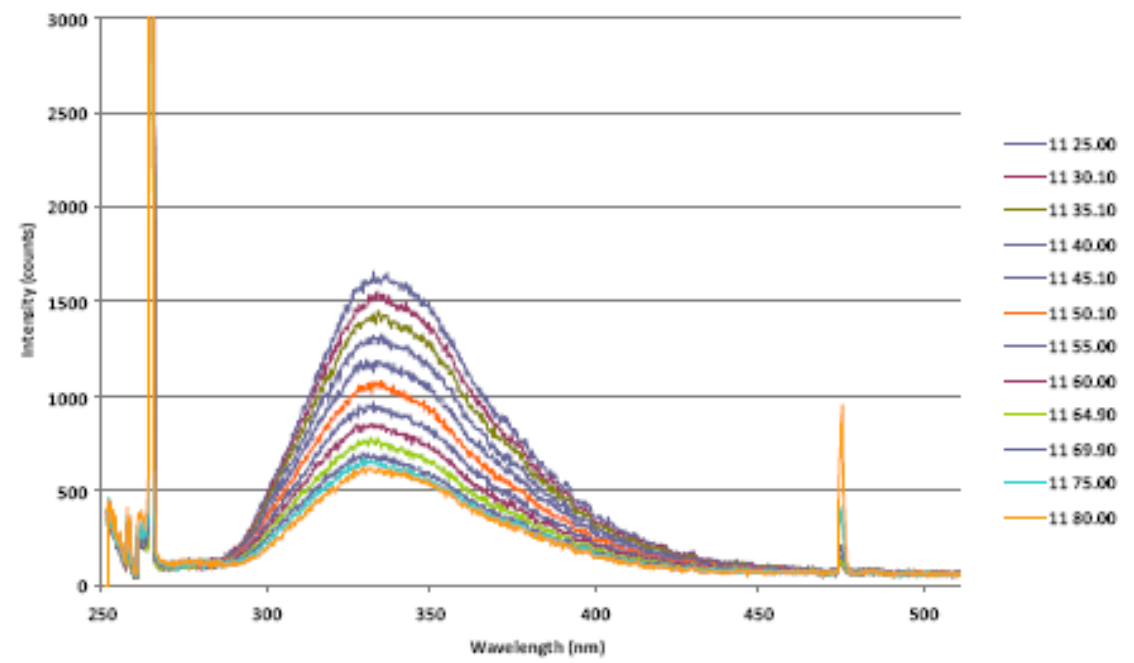
Másodlagos szerkezet

A különbség szoftveres értékelés alapján:



Harmadlagos szerkezet 1.

Fluoreszcens spektrofotometria Spectra

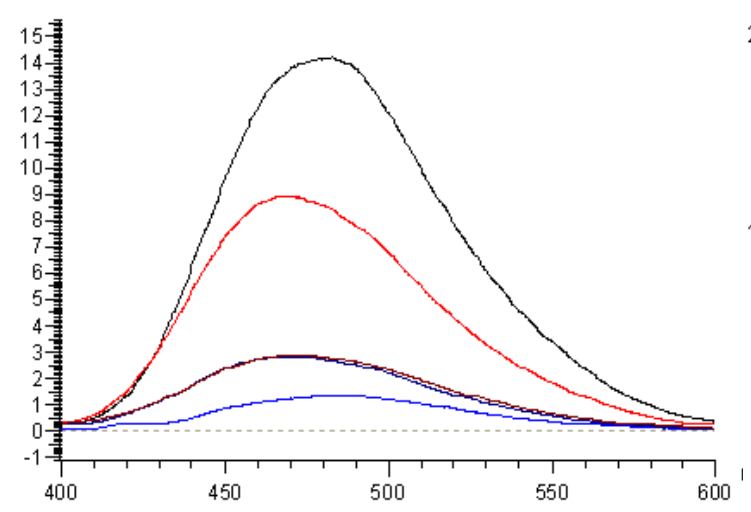


Hő hatására egyre hozzáférhetőbbek a fluoreszcens aminosavak → egyre nagyobb intenzitást tapasztalunk



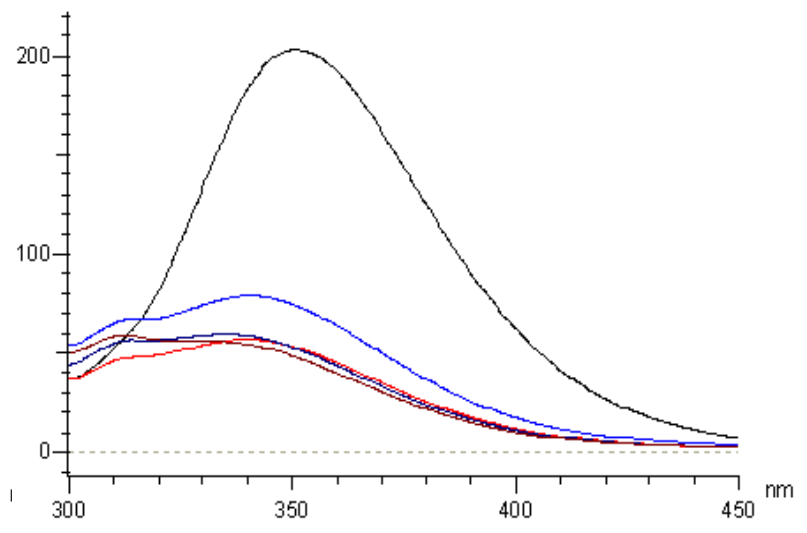
Harmadlagos szerkezet 2.

Fluoreszcens festés



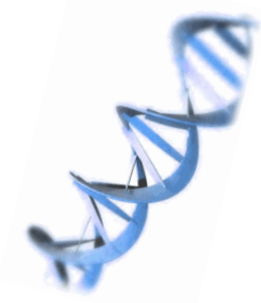
Black – 0 M GuHCl Brown- 2 M GuHCl
 Red -1 M GuHCl
 Blue -5 M GuHCl

Belső Fluoreszcencia



Black – 5 M GuHCl Brown- 1 M GuHCl
 Red -0 M GuHCl
 Blue -3M GuHCl

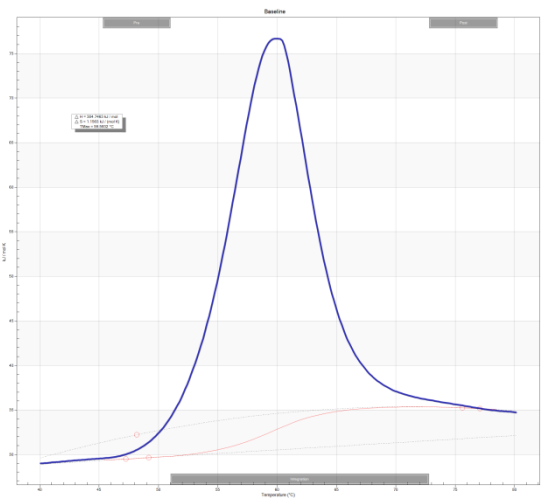
Fluoreszcens festékek használatával a fehérjék szerkezetéről részletesebb kép is nyerhető pl. a felszínen található hidrofób zsebek mennyisége, milyensége



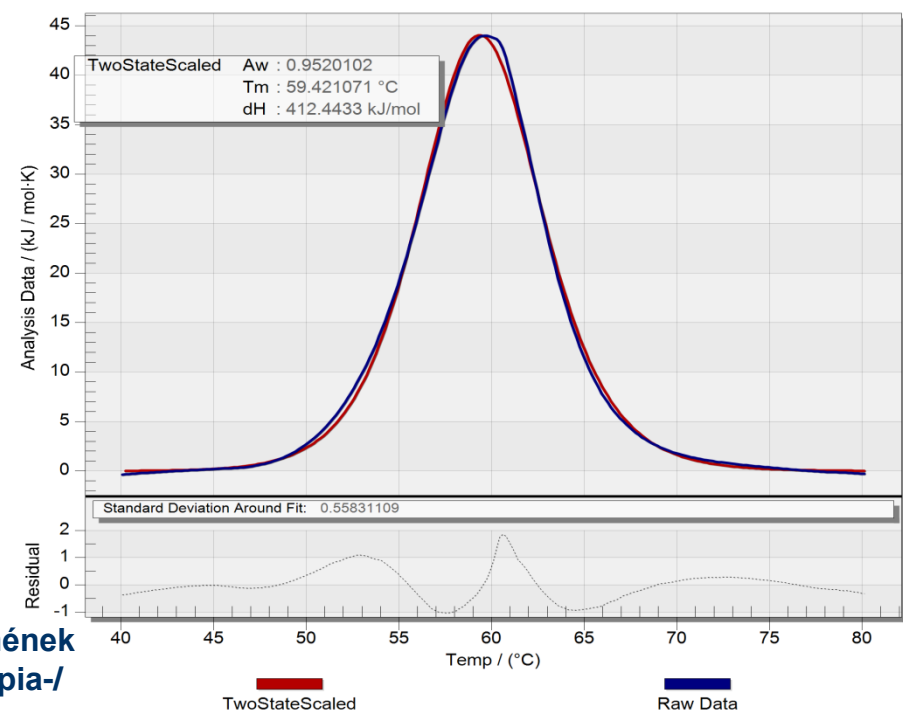
Nano DSC – „egyszerűbb” fehérje



Lizozim 1 mg/ml



Alapvonal illesztés

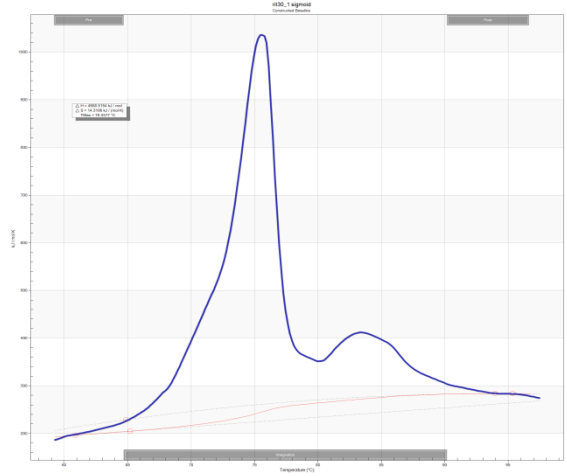


Szerkezeti stabilitás vizsgálata (domének szintjén), Tm mellett entalpia-/ entrópia-/ hőkapacitás-változás is számolható

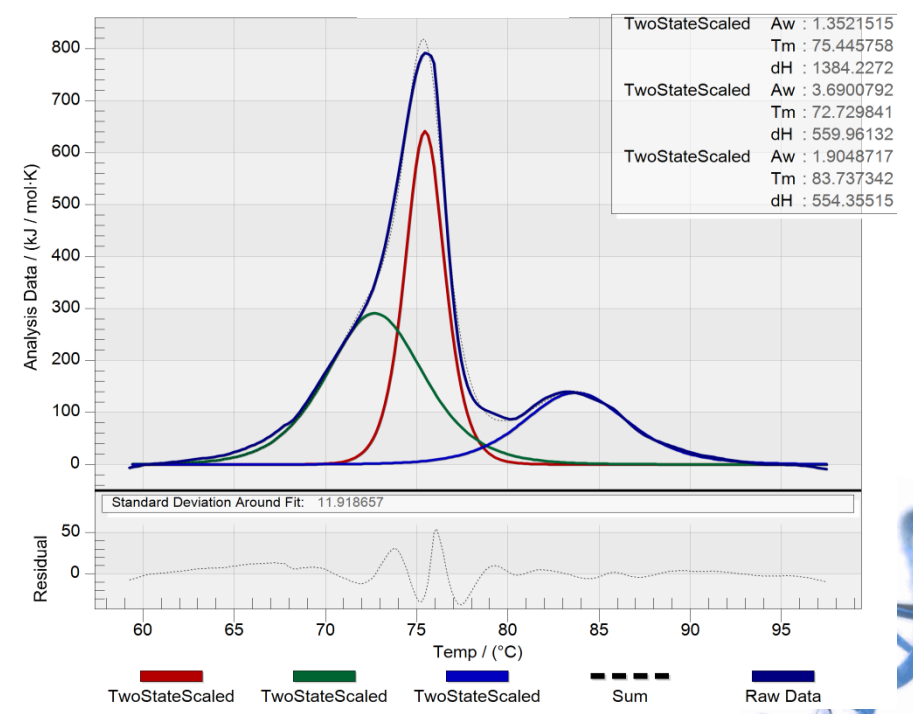


Nano DSC – „bonyolult” eset

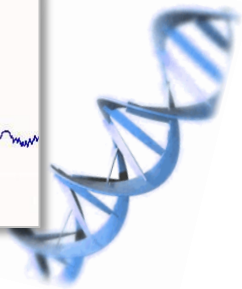
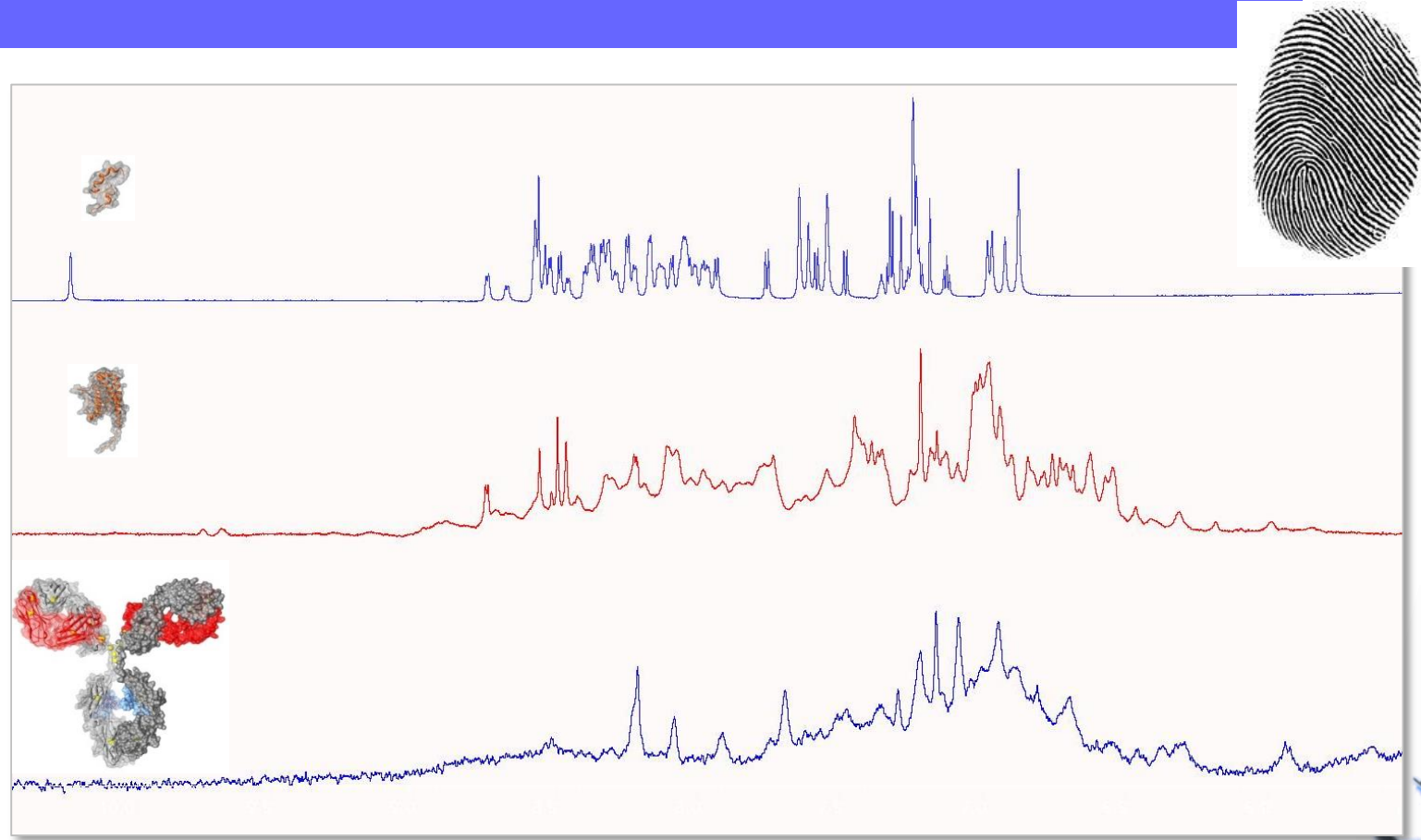
hulgG1 0,5 mg/ml



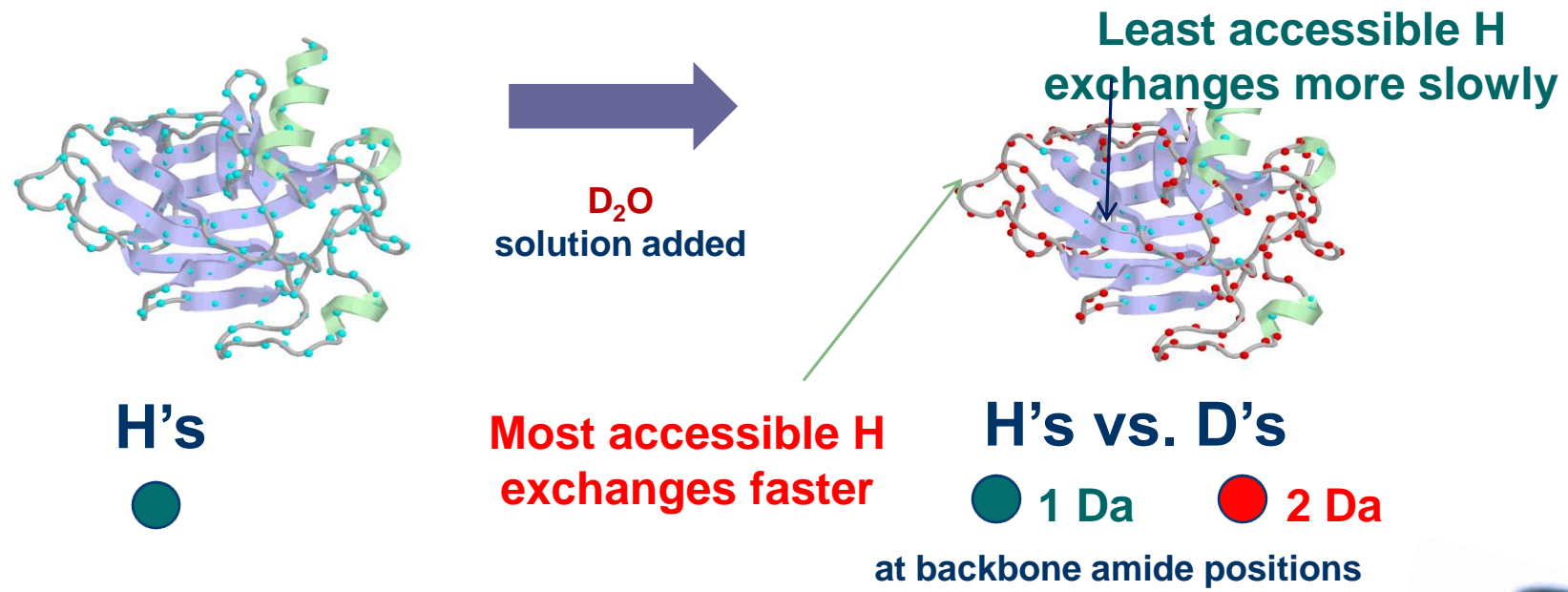
Alapvonal illesztés



Magasabb rendű szerkezet-NMR



HDX (Hydrogen Deuterium Exchange)-MS

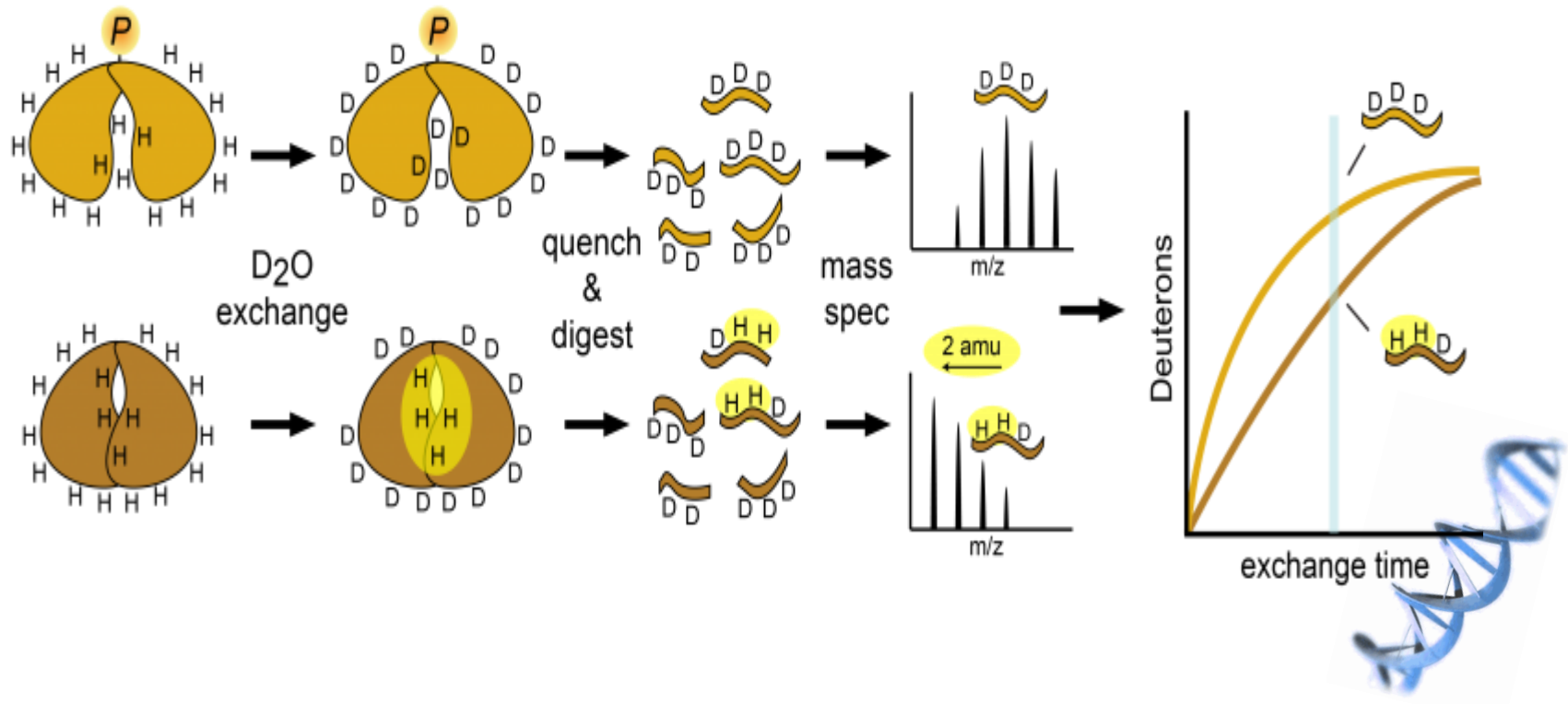


We measure H-D exchange as the mass increase of a protein or peptide.



HDX MS

HDX-MS: Conformational Changes



N-glikán struktúra meghatározása

N-glikán struktúrajelentősége:

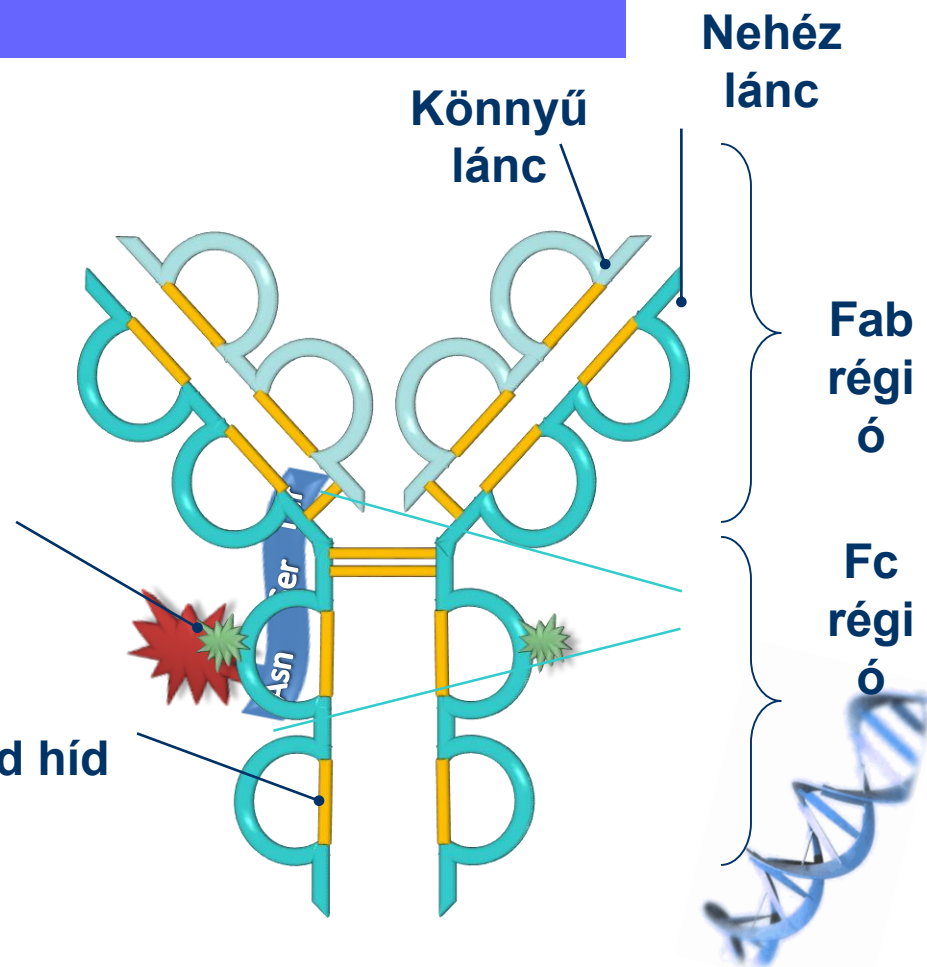
- Fajspecifikus
- Immunogenicitás veszélye
- Befolyásolja a hatékonyságot



- N-acetilglükózamin
- ▲ Fukóz
- Mannóz
- Galaktóz
- ◆ Sziálsav

N-glikán

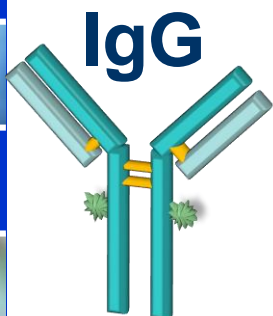
Diszulfid híd



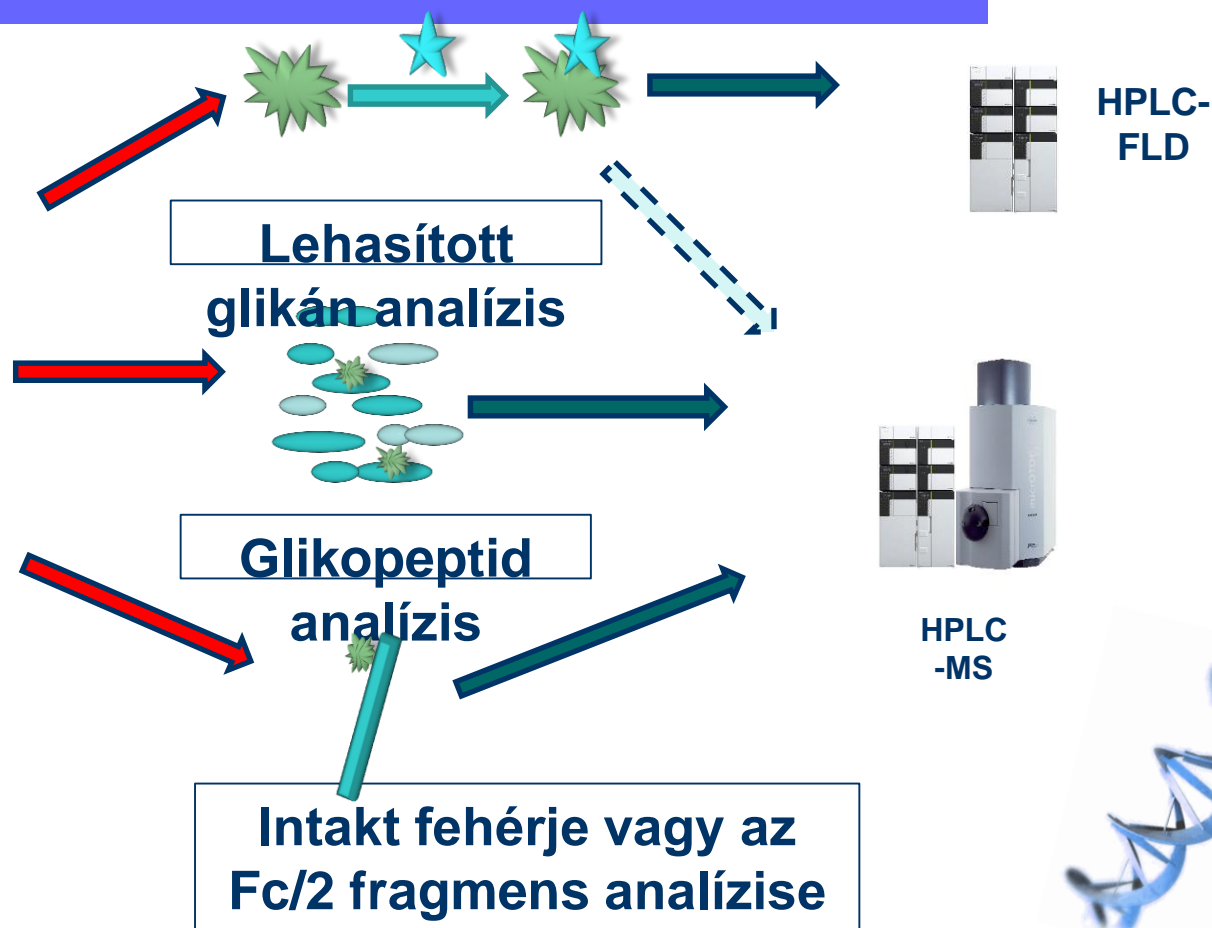
G01



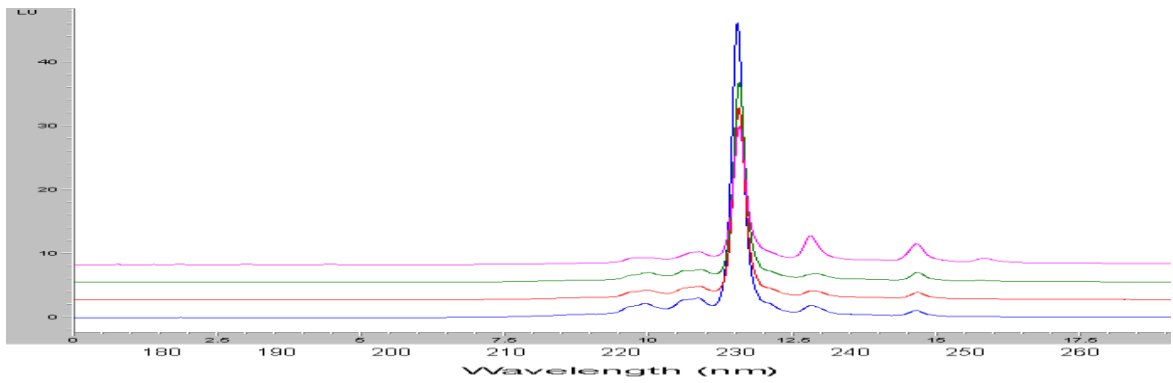
A glikoziláció vizsgálatának főbb lehetőségei



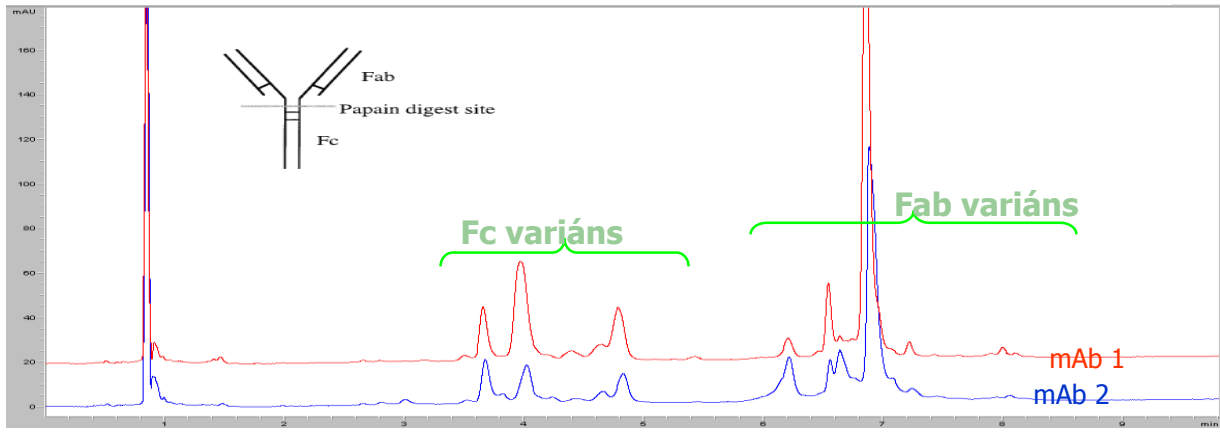
Enzimes emésztés



Tisztaság vizsgálat: Töltés variánsok- Ioncserés kromatográfia



Egy mAb IEX-HPLC kromatogramja

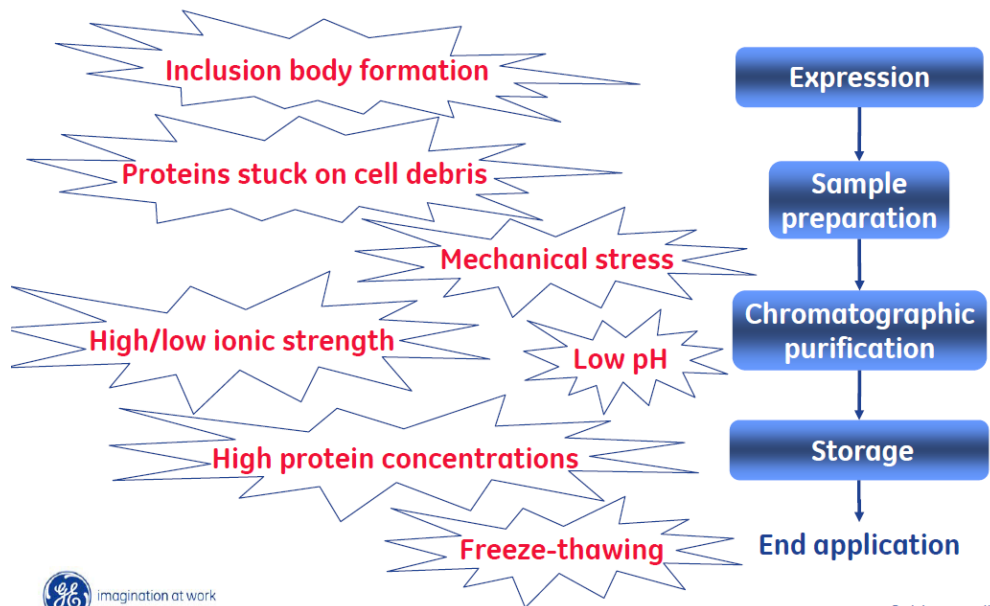


Egy papain emésztet mAb IEX-HPLC kromatogramja



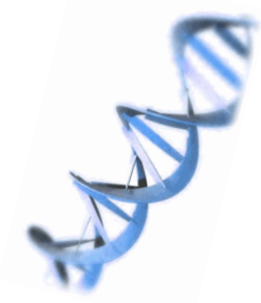
Aggregáció 1.

When does aggregation occur?



Aggregáció vizsgálatára alkalmas technikák:

- Dinamikus fényszórás
- SEC-HPLC
- MALS (Multi Angle Light Scattering)
- SDS- PAGE



Aggregáció 2.



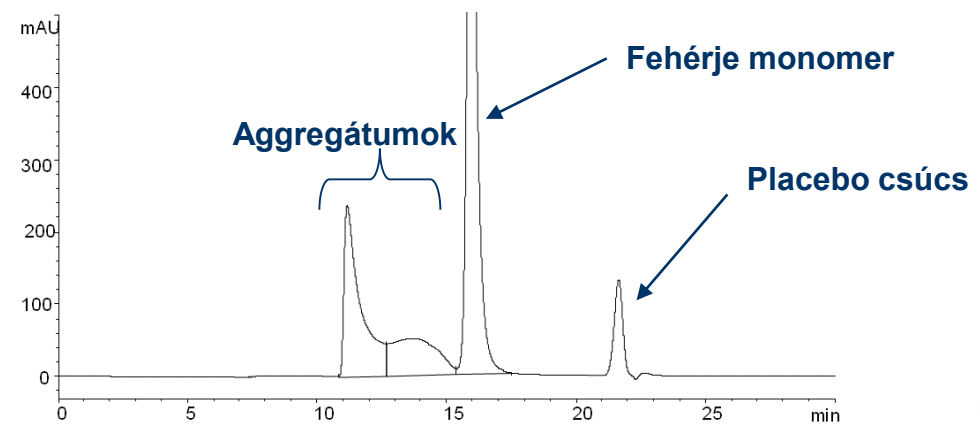
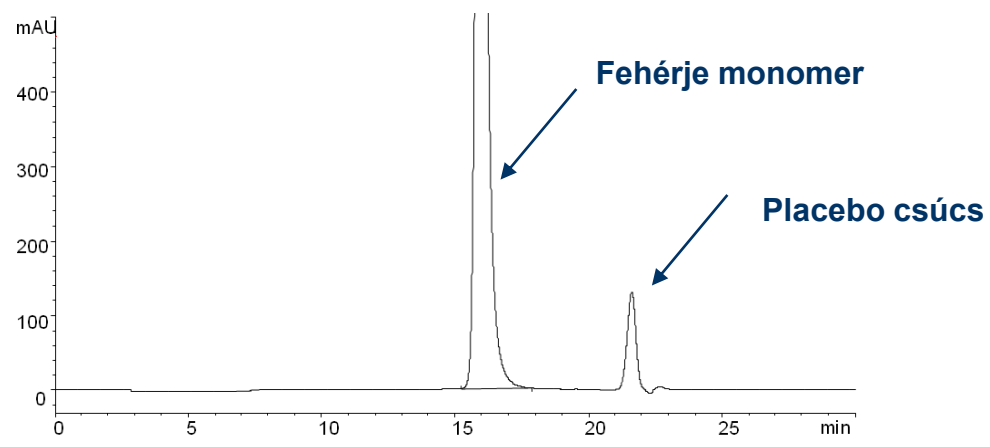
SEC-HPLC



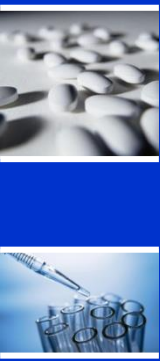
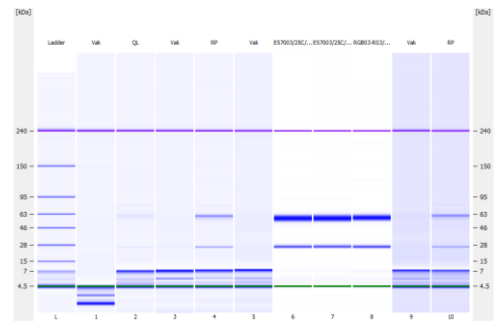
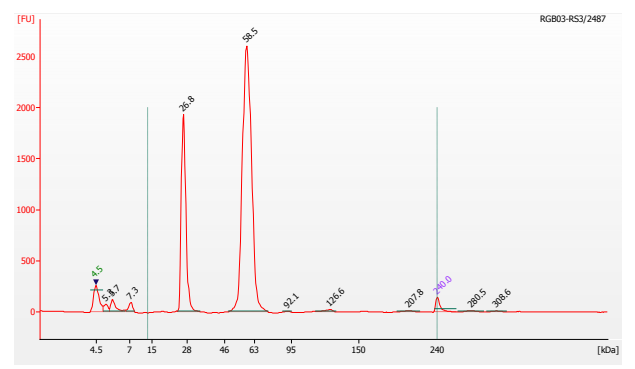
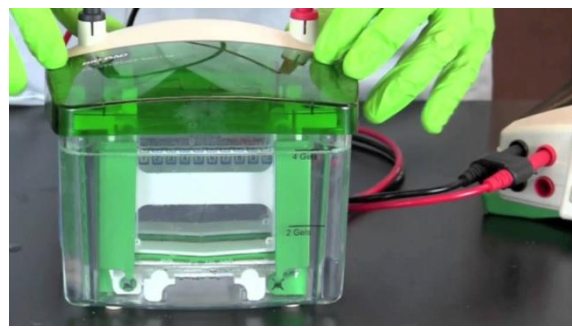
**Kezeletlen
fehérje**



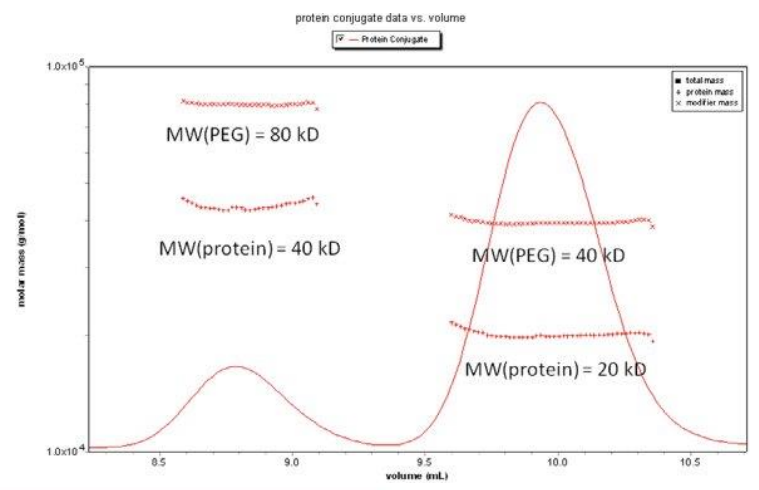
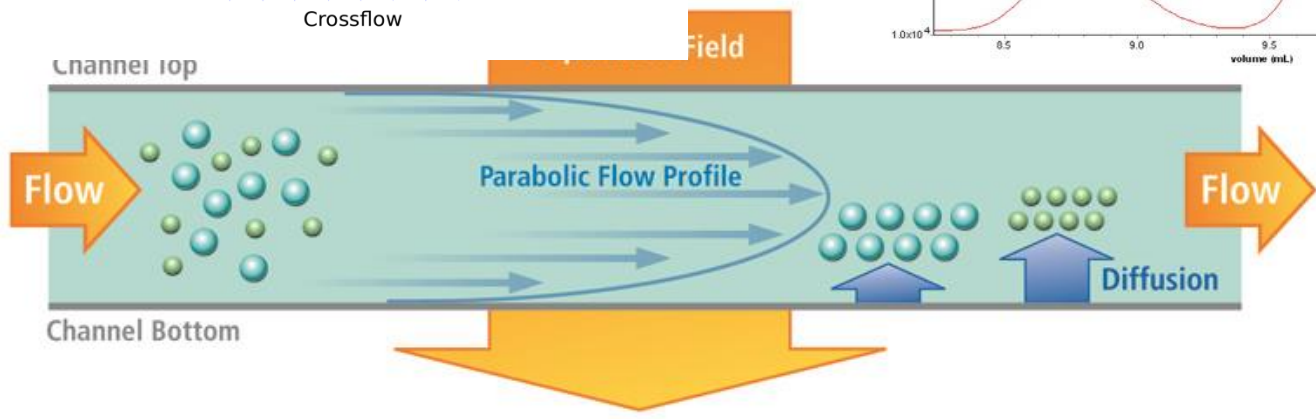
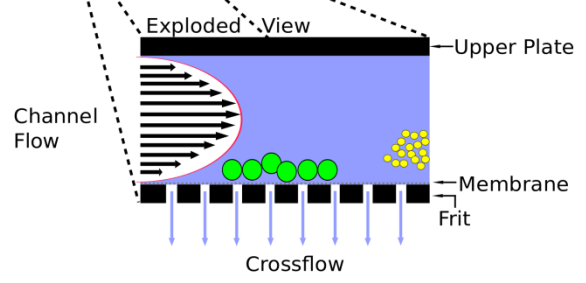
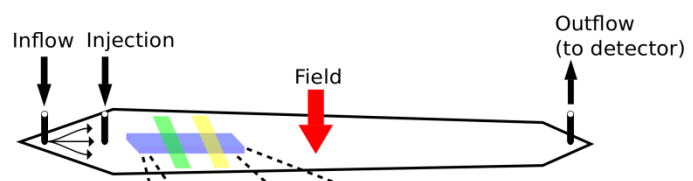
**Hőkezelt
fehérje (1
óra 60 °C)**



Sodium Dodecil Sulfate-PoliAkrilamid Gel Electrophoresis



AF4-Malls



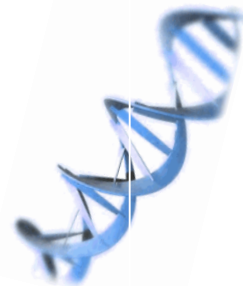
Hatóanyag tartalom meghatározás

- Kismolekulák: relatív módszer hatósági std.-ek alapján
 - UV spektrofotometriás módszer
- Fehérjék:
 - ha van ismert std.
 - Festéses eljárások (UV, Fluoreszencia):
 - Bradford
 - Bicinchoninic acid assay (BCA)
 - Lowry
 - Biuret



Hatóanyag tartalom meghatározás

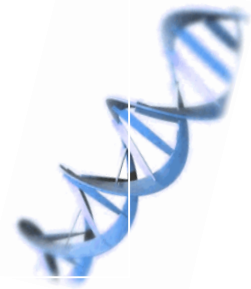
- De általában nincs megfelelő hatósági std.
 - Abszolút módszerek:
 - UV spektrofotometria
 - ϵ nem ismert (több tényezőtől függ- puffer közeg, fehérje szerk, stb)
 - Meghatározása: AAA, számolás szekvencia alapján, visszaszámolás egyéb abszolút módszer alapján
 - Degradációs módszerek
 - Dumas módszer: Nitrogén meghatározás
 - Kjeldhal módszer: Nitrogén meghatározás
 - ICP-MS: pl. S meghatározás
 - LC-MS



A bioszimiláris fejlesztés koronája: comparability vizsgálat

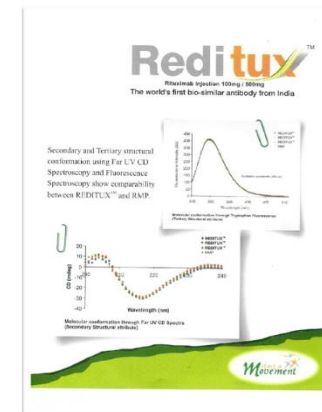
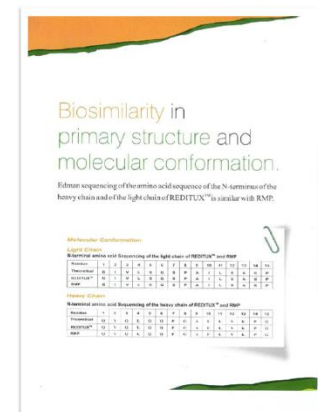
Analitikus számára a fejlesztés során az egyik legnagyobb kihívás és legizgalmasabb feladat a Comparability vizsgálat elvégzése

- Az eddig felsorolt analitikus vizsgálatok mellett összehasonlítani kell a referenciatermékkel a bioszimiláris terméket.
- A hasonlóságot nemcsak a normál körülmények közt vizsgálni, a finom különbségek kimutatására stressz körülmények (hő, mechanikai, ox., red, fény stb) is vizsgálni kell.
- Ellenőrző kérdés: Mi a legnehezebb kérdés ebben az összehasonlításban?



Példa: egy bioszimiláris fejlesztés

Reditux Promotion



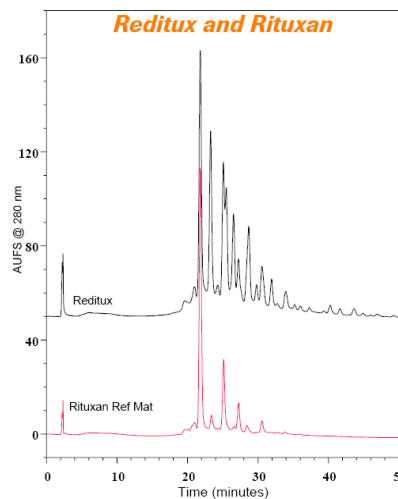
Reditux: an intended copy, not a proven biosimilar



- Same amino acid sequence
- Host cell protein content much higher
- Content of aggregates not comparable
- Glycosylation not comparable
- Effector function not comparable
- Charge distribution not comparable
- Clinical (PK/PD) published data - 17 patients

Different manufacturing means:

- Different drug
- Different safety/efficacy profile?



Releváns-e a különbség?

Lys heterogeneity... effect... it is possible that the presence or absence of terminal... meters, especially for subcutaneous in... migrate through the cationic non-val... atic system. For intravenous adminis... pharmacokinetic effect because distr... lys residues will be rapidly removed... (1988).

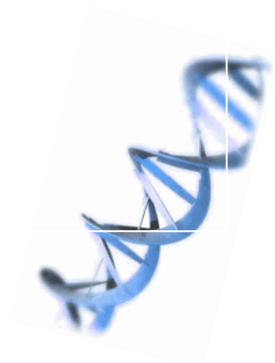


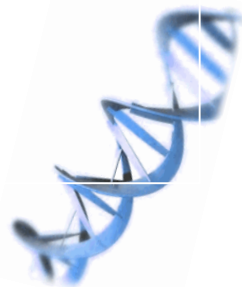
Depends on the formula!!!



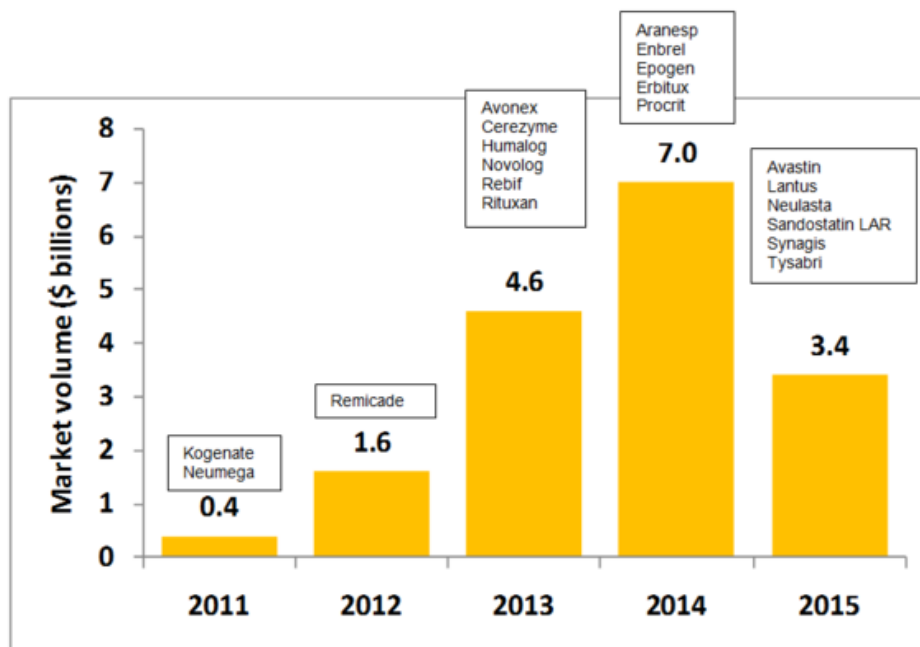
Köszönöm a figyelmet



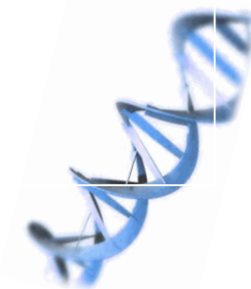


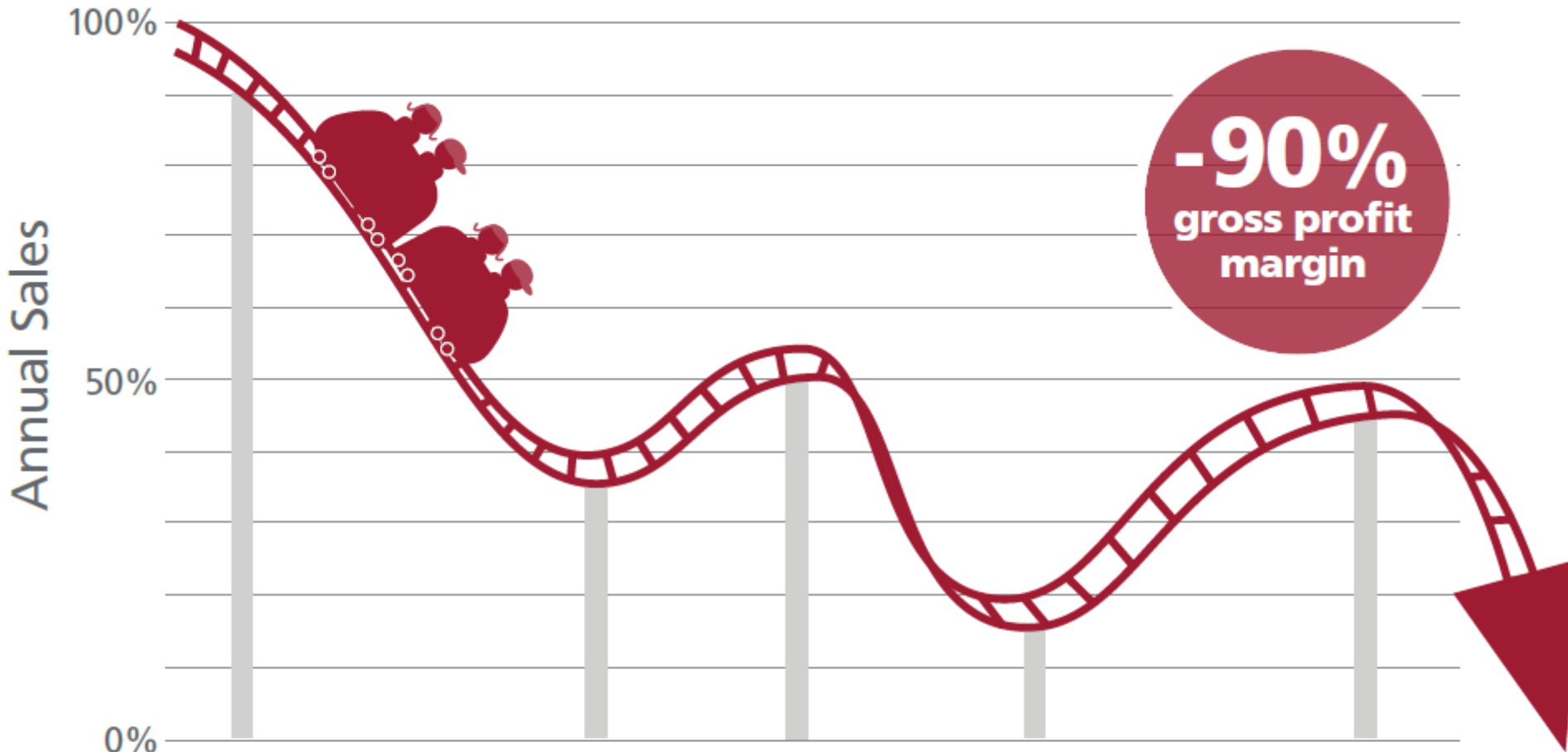


Pótdiák



Source: IMS Health





Once a drug loses its patents, its sales can decline by up to 90% very quickly

U.S. Pharmacist. Drug Patent Expirations and the "Patent Cliff". 2012;37(6)(Generic suppl):12-20. June 20, 2012.



| Drug Name (Maker) | 2008 Revenue | Molecule | Patent Expiration | Approval Date |
|------------------------|--------------|--|-------------------|---------------|
| Enbrel (Amgen) | \$5,982 M | Etanercept | 2012 | 11/1998 |
| Rituxan (Genentech)+ | \$5,082 M | Rituximab | 2015 | 11/1997 |
| Humira (Abbott)+ | \$4,521 M | Adalimumab | 2016 | 12/2002 |
| Avastin (Genentech)+ | \$4,479 M | Bevacizumab | 2019 | 2/2004 |
| Herceptin (Genentech)+ | \$4,394 M | Trastuzumab | 2019 | 9/1998 |
| Remicade (J&J)+ | \$3,748 M | Infliximab | 2013 | 11/1999 |
| Gleevec (Novartis)* | \$3,700 M | Imatinib mesylate | 2015 | 5/2001 |
| Neulasta (Amgen) | \$3,318 M | Pegfilgrastim | 2015 | 1/2002 |
| Lantus (Sanofi) | \$3,159 M | Insulin glargine | 2015 | 4/2000 |
| Aranesp (Amgen) | \$3,137 M | Darbepoetin alfa | 2024 | 9/2001 |
| Pevnar (Wyeth) | \$2,716 M | Vaccine | 2007 | 2/2000 |
| Taxotere (Sanofi)* | \$2,622 M | Docetaxel | 2010 | 5/1996 |
| Procrit/Eporex (Ortho) | \$2,460 M | Epoetin alfa | 2013 | 6/1989 |
| Epogen (Amgen) | \$2,456 M | Epoetin alfa | 2013 | 6/1989 |
| Copaxone (Teva)* | \$2,262 M | Glatiramer acetate | 2014 | 1/1997 |
| Avonex (Biogen Idec) | \$2,203 M | Interferon beta 1a | 2013 | 5/1996 |
| Truvada (Gilead)* | \$2,110 M | emtricitabine/ tenofovir disoproxil fumarate | 2021 | 8/2004 |
| Lucentis (Genentech)+ | \$1,761 M | Ranibizumab | 2019 | 7/2006 |
| Humalog (Eli Lilly) | \$1,736 M | Human insulin | 2013 | 6/1996 |
| Rebif (Merck Serono) | \$1,688 M | Interferon beta 1a | 2013 | 3/2002 |
| Atripla (Gilead)* | \$1,570 M | Efavirenz, Emtricitabine, and Tenofovir Disoproxil Fumarate | 2021 | 7/2006 |
| Erbix (ImClone)+ | \$1,457 M | Cetuximab | 2007/2019 | 10/2007 |
| Cialis (Eli Lilly)* | \$1,445 M | Tadalafil | 2016 | 1/2008 |
| Betaseron (Bayer) | \$1,439 M | Interferon beta 1b | Expired | 7/1993 |
| Tracleer (Actelion)* | \$1,410 M | Bosentan | 2015 | 11/2001 |

* Small molecule drugs

+ Antibody derivative



Reditux Promotion



Biosimilarity in primary structure and molecular conformation.

Edman sequencing of the amino acid sequence of the N-terminus of the heavy chain and of the light chain of REDITUX™ is similar with RMP.

Molecular Conformation

Light Chain

N-terminal amino acid Sequencing of the light chain of REDITUX™ and RMP

| Residue | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|
| Reditux™ | G | L | V | L | S | L | S | R | P | A | L | L | S | S | P |
| RMP | G | L | V | L | S | L | S | R | P | A | L | L | S | S | P |

Heavy Chain

N-terminal amino acid Sequencing of the heavy chain of REDITUX™ and RMP

| Residue | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|
| Reditux™ | S | L | D | E | L | D | S | P | A | L | L | S | S | P | S |
| RMP | S | L | D | E | L | D | S | P | A | L | L | S | S | P | S |

Reditux™
Rituximab Injection 100mg / 50mg
The world's first bio-similar antibody from India

Secondary and Tertiary structural conformation using Far UV CD Spectroscopy and Fluorescence Spectroscopy show comparability between REDITUX™ and RMP.

Molecular conformation through Far UV CD Spectroscopy (Primary Structure attributes)

Molecular conformation through Far UV CD Spectroscopy (Secondary Structure attributes)

Movement





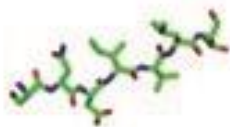


Small molecules



Salicylic acid
MW 138 Da

Peptides



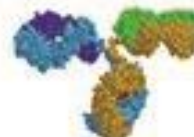
Tiptorelin
MW 1311 Da

Proteins



Human growth hormone
MW 22,125 Da

mAbs



Rituximab
MW-150,000 Da

ADC



Breuduximab-vedotin
MW-150,000 Da

Analytical complexity

