

---

**АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ  
В ХИМИИ И ХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ**  
**ANALYTICAL METHODS IN CHEMISTRY  
AND CHEMICAL TECHNOLOGY**

---

ISSN 2410-6593 (Print), ISSN 2686-7575 (Online)

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2021-16-1-76-87>



УДК 543.51:543.544.53

**НАУЧНАЯ СТАТЬЯ**

**Сравнение оригинального и биоаналогичного препаратов  
моноклонального антитела экулизумаб методами  
масс-спектрометрии интактного белка и «с середины вверх»**

**М.Б. Дегтерев<sup>@</sup>, Р.Р. Шукуров**

Международный биотехнологический центр «Генериум», Владимирская область, Петушинский район, пос. Вольгинский, 601125 Россия

<sup>@</sup>Автор для переписки, e-mail: [degterev@ibcgenerium.ru](mailto:degterev@ibcgenerium.ru)

**Аннотация**

**Цели.** В целях исследования биоаналогичности, а также внедрения масс-спектрометрии в процессы биофармацевтической разработки было необходимо провести сравнительное масс-спектрометрическое исследование моноклонального антитела экулизумаб из оригинального лекарственного препарата «Солирис»<sup>®</sup> и кандидатного «Элизария»<sup>®</sup> производства АО «ГЕНЕРИУМ» методами измерения молекулярных масс интактных молекул (*intact mass measurement*) и их субъединиц (*middle-up*).

**Методы.** Измерение масс интактных белков и оценку долей их модификаций проводили при помощи инфузионной масс-спектрометрии высокого разрешения с электрораспылительной ионизацией. Измерение молекулярных масс субъединиц и оценку долей их модификаций проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, совмещенной с масс-спектрометрией высокого разрешения с электрораспылительной ионизацией после предварительного расщепления антител ферментом IdeS и разрыва дисульфидных связей.

**Результаты.** Нами был зарегистрирован ряд небольших отличий в содержании некоторых минорных гликанов: олигосахарид Man5 был обнаружен только в белке оригинального препарата, а G0 – только в кандидатном белке; в субъединицах LC и Fd оригинального белка были зарегистрированы сайты гликирования с содержанием данной модификации не выше 4.4%. Также доли неотщепленного C-концевого лизина и гликана G0F в оригинальном белке были несколько ниже, чем в кандидатном. Однако зарегистрированные отличия не являлись критическими параметрами качества экулизумаба и не влияли на активность молекул и их безопасность в доклинических испытаниях, и, в целом, сравниваемые молекулы продемонстрировали высокое сходство.

**Выводы.** Сравнительный хромато-масс-спектрометрический анализ экулизумаба из оригинального и кандидатного препаратов позволил установить высокую степень сопоставимости сравниваемых молекул по молекулярным массам и по профилям мажорных модификаций.

**Ключевые слова:** экулизумаб, масс-спектрометрия, посттрансляционные модификации, биоаналогичность, гликозилирование, ВЭЖХ-МС, intact mass measurement, middle-up

**Для цитирования:** Дегтерев М.Б., Шукуров Р.Р. Сравнение оригинального и биоаналогичного препаратов моноклонального антитела экулизумаб методами масс-спектрометрии интактного белка и «с середины вверх». *Тонкие химические технологии*. 2021;16(1):76–87. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2021-16-1-76-87>

## RESEARCH ARTICLE

# Comparing the original and biosimilar biotherapeutics of the monoclonal antibody eculizumab by intact mass measurement and middle-up mass spectrometry analysis

Maksim B. Degterev<sup>@</sup>, Rakhim R. Shukurov

International Biotechnology Center Generium, Volginskiy, Vladimir oblast, 601125 Russia  
<sup>@</sup>Corresponding author, e-mail: [degterev@ibcgenerium.ru](mailto:degterev@ibcgenerium.ru)

### Abstract

**Objectives.** In this biosimilar research, we compare the monoclonal antibody eculizumab obtained from different drugs [original Soliris<sup>®</sup> (Alexion Pharmaceuticals) and candidate Elizaria<sup>®</sup> (Generium)] by intact mass measurement and middle-up mass spectrometry analysis to enhance the role of mass spectrometry methods in biopharmaceutical development processes.

**Methods.** The intact mass measurement is performed using a high-resolution ESI-MS. The middle-up analysis is performed by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ESI-MS detection, subsequent IdeS treatment of antibodies, and disulfide bond reduction.

**Results.** We have shown some small differences between the original and candidate drugs in the minor glycans level. Man5 glycan is only found in the original Soliris, and G0 is only found in the Elizaria. Glycation sites are also found in the light chain and Fd subunits of the original Soliris. The glycation level does not exceed 4.4%. The non-clipped C-end lysine level and G0F glycan levels are slightly lower in the original Soliris. All registered differences are not crucial for eculizumab's quality and do not affect its effectiveness and preclinical safety. Generally, the results show a high level of similarity between the original and candidate drugs.

**Conclusions.** The comparative mass spectrometry analysis of eculizumab in the original Soliris and Elizaria allows us to estimate their high degree of similarity by molecular masses and major modification profiles.

**Keywords:** Eculizumab, mass spectrometry, posttranslational modifications, biosimilar drugs, glycosylation, high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, intact mass measurement, middle-up analysis, monoclonal antibody

**For citation:** Degterev M.B., Shukurov R.R. Comparing the original and biosimilar biotherapeutics of the monoclonal antibody eculizumab by intact mass measurement and middle-up mass spectrometry analysis. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2021;16(1):76–87 (Russ., Eng.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2021-16-1-76-87>

## ВВЕДЕНИЕ

Биофармацевтика – одно из наиболее перспективных направлений фармацевтической отрасли. В сравнении с химически синтезированными низкомолекулярными лекарственными препаратами (ЛП), терапевтические белки, которыми является

большинство биофармацевтических препаратов, проявляют гораздо более высокую специфичность действия и активность. С их разработкой появилась возможность лечить ранее недоступные для терапии заболевания, повысилась эффективность терапии многих критических болезней, качество и продолжительность жизни пациентов. Только за последние

пять лет Food and Drug Administration<sup>1</sup> (FDA, США) одобрило выпуск 213 таких препаратов, из них 44 моноклональных антитела<sup>2</sup>.

Одним из основных локомотивов развития биофармацевтики является разработка биоаналогов оригинальных препаратов, и это обусловлено несколькими причинами. С одной стороны, стоимость биоаналога должна быть ниже стоимости оригинального препарата, и выпуск такого продукта является привлекательным для фармацевтических компаний. С другой стороны, жесткие требования по всесторонней характеристике молекулы перспективного биоаналога, разработанные ведущими регулирующими организациями, такими как FDA и European Medicines Evaluation Agency<sup>3</sup> (EMA), минимизируют риск допуска на рынок неэффективного или опасного продукта, и одновременно стимулируют научный поиск, развивая новые методы анализа и углубляя понимание структур и функций терапевтических белков, их мишеней и патогенеза различных заболеваний.

Большую долю среди разрабатываемых биоаналогов занимают моноклональные антитела. Они с успехом применяются в лечении ряда серьезных заболеваний, в том числе и наследственных. Потенциал некоторых моноклональных антител к расширению показаний для терапевтического применения также является стимулом для разработки их биоаналогов. Ярким примером такого белка является экулизумаб – рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело (IgG2/4k). Его препараты изначально использовались для терапии пароксизмальной ночной гемоглобинурии и атипичного гемолитико-уремического синдрома, однако затем были также рекомендованы для лечения миастении гравис и оптиконевромиелита<sup>4</sup>. Разработка биоаналога экулизумаба в первую очередь требовала всестороннего, глубокого исследования его физико-химических свойств. В на-

стоящее время важным методом исследования белков стал метод масс-спектрометрии, позволяющий определять молекулярную массу интактного белка (intact mass measurement), а также его субъединиц (middle-up).

Масс-спектрометрическое измерение молекулярной массы интактного белка в исследованиях сопоставимости биопрепаратов позволяет установить его подлинность по соответствию измеренного значения ожидаемому, измерить содержание некоторых модифицированных форм, оценить чистоту препарата по количеству найденных протеоформ с обрывом полипептидной цепи [1–3]. Если измерение выполняется в режиме нативной масс-спектрометрии, то перечень определяемых характеристик также возможно дополнить информацией о пространственной организации молекулы, о содержании в образце белков с различными конформациями и их агрегатами [4, 5]. Методология измерения молекулярной массы интактной молекулы предполагает предварительную очистку и/или фракционирование белка перед его подачей в источник ионов масс-спектрометра при помощи офлайн (ультрафильтрация, диализ, эксклюзионная очистка) или онлайн (высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), капиллярный электрофорез) методов с последующим сбором масс-спектров для образца или для каждой из фракций, их математической обработкой (деконволюцией) и интерпретацией полученных данных [6, 7]. Основными преимуществами этого подхода являются высокая скорость исследования и получение картины о структуре и формах целых белковых молекул [3, 4].

С другой стороны, высокие сложность и гетерогенность терапевтических белков ограничивают применимость изучения интактной молекулы для глубокого исследования сопоставимости. Этот метод пока не позволяет идентифицировать минорные модификации и установить их положения в молекуле, интерпретировать и аннотировать спектры белков, обладающих сверхвысокой гетерогенностью [8]. Подход «с середины вверх» (middle-up) позволяет решить значительную часть этих задач, лишь незначительно снижая производительность анализа и минимизировав риск потери данных об исследуемой молекуле. Его суть заключается в ограниченном химическом или ферментативном расщеплении молекулы исследуемого белка с получением крупных фрагментов, после чего эти фрагменты разделяются при помощи ВЭЖХ или капиллярного электрофореза и подаются в масс-спектрометр. Полученные масс-спектры интерпретируются с учетом теоретических данных о строении молекулы, что позволяет глубже охарактеризовать профиль модификаций, деградантные формы, интерпретировать результаты анализа белков, отличающихся высокой гетерогенностью форм [9].

<sup>1</sup> Guidance, Compliance & Regulatory Information (Biologics). <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/guidance-compliance-regulatory-information-biologics> (дата обращения / accessed 21.10.2020).

<sup>2</sup> Global Therapeutic Proteins Market Report 2020: Market was Valued at \$93.14 Billion in 2018 and is Expected to Grow to \$172.87 Billion through 2022. <https://www.businesswire.com/news/home/20191223005228/en/Global-Therapeutic-Proteins-Market-Report-2020-Market-was-Valued-at-93.14-Billion-in-2018-and-is-Expected-to-Grow-to-172.87-Billion-through-2022---ResearchAndMarkets.com> (дата обращения / accessed 21.10.2020).

<sup>3</sup> Biological guidelines. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/scientific-guidelines/biological-guidelines> (дата обращения / accessed 21.10.2020).

<sup>4</sup> ASSESSMENT REPORT FOR Soliris. International Nonproprietary Name: ECULIZUMAB. Procedure No. EMEA/H/C/000791/L/0050. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). March 21, 2013. EMA/CHMP/126714/2013

Оценку сопоставимости экулизумаба из разных источников мы производили путем инфузионной масс-спектрометрии после очистки белка от низкомолекулярных примесей и полимеров методом эксклюзионной фильтрации. Для выполнения испытаний по способу middle-up антитело перед анализом было расщеплено в шарнирной области протеазой IdeS, после чего дисульфидные мостики фрагментов были разрушены при помощи TCEP-HCl. Полученные субъединицы антитела (LC, Fc/2 и Fd: легкая цепь и фрагменты моноклонального антитела, локализованные в области от шарнирного участка до C-конца тяжелой цепи и от N-конца тяжелой цепи до шарнирного участка, соответственно) перед вводом в масс-спектрометр разделялись и очищались от примесей при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Результаты масс-спектрометрического сравнения экулизумаба из оригинального и кандидатного препаратов показали их сходство по основным параметрам качества: молекулярные массы основных протеоформ белка совпали друг с другом и с ожидаемыми значениями, профили гликозилирования сравниваемых образцов оказались близки друг к другу, как и содержание некоторых модифицированных вариантов: окисленных форм субъединицы Fc/2, форм с неотщепленным C-концевым лизином. Достоверные отличия были зафиксированы в содержании высокоманнозных и афукозилированных форм гликанов и гликированных вариантов субъединиц LC и Fd: гликан Man5, так же, как и гликированные варианты, были зарегистрированы только в образцах экулизумаба из оригинального препарата, а гликан G0 (афукозилированный) – только в ЛП «Элизария»®. Содержание достоверно отличавшихся между референтными и экспериментальными образцами протеоформ не превышало 4.4%. Все зафиксированные отличия были ожидаемыми, объяснялись использованием различных клеточных линий продуцентов и были незначимы с точки зрения эффективности и безопасности экулизумаба. Полученные данные стали основой для дальнейшего, более глубокого сопоставления молекул другими методами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Кандидатный ЛП «Элизария» был произведен АО «Генериум» (Москва, Россия), оригинальный белок был приобретен в составе лекарственного препарата «Солирис»® (*Alexion Pharmaceuticals*, Цюрих, Швейцария). Деионизованная вода была получена на установке MilliQ IQ 7000 (*Merck*, Дармштадт, Германия). Ацетонитрил (LC-MS grade) также был приобретен у компании *Merck*. Использовали протеазу IdeS производства *Promega* (Мэдисон, Висконсин, США). Хроматографическая колонка BioResolve RP mAb Polyphenyl и дифторуксусная кислота (DFA,

LC-MS grade) были приобретены у компании *Waters* (Финглас, Дублин, Ирландия). Колонки для эксклюзионной очистки Zeba™ Spin Desalting Columns (7K MWCO, 0.5 mL) и трис-(2-карбокситетил)фосфин гидрохлорид (TCEP-HCl) были приобретены у компании *Thermo Scientific* (Драйайх, Германия). Остальные реактивы и материалы (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl, гуанидин-гидрохлорид, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), трисаминометан гидрохлорид (Трис-HCl)) были куплены у компании *Sigma-Aldrich* (Сент-Луис, Миссури, США). Все работы проводились с использованием системы ВЭЖХ Nexera X2 (*Shimadzu*, Токио, Япония), подключенной к масс-спектрометру 6550 QTOF (*Agilent Technologies*, Санта-Клара, Калифорния, США).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Подготовка проб для измерения молекулярной массы интактных антител

Для работы использовали по три серии референтного и кандидатного препаратов. Концентрацию антитела в растворе доводили до значения 1.0 мг/мл с одновременной заменой буфера на 0.15% раствор дифторуксусной кислоты путем эксклюзионной фильтрации через колонки Zeba Spin согласно инструкции.

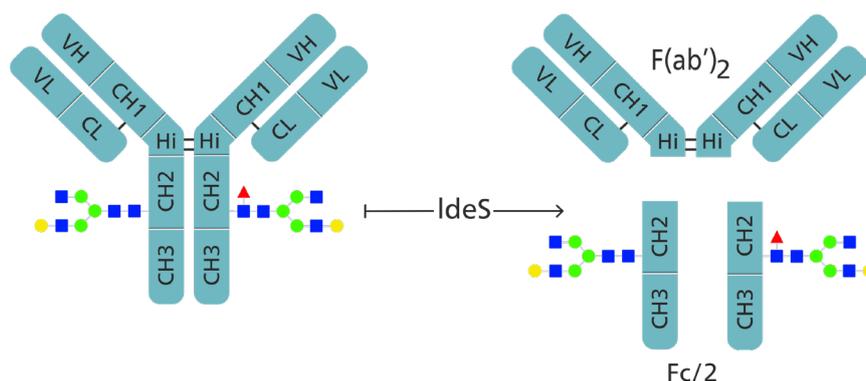
### Подготовка проб для анализа middle up

Концентрацию антитела в растворе доводили до значения 2.0 мг/мл путем разбавления 50 mM фосфатным буфером с добавкой 150 mM NaCl (pH 6.6). Затем к 25 мкл растворов образцов добавляли по 2 мкл раствора IdeS (1 Ед/мкл) и инкубировали при 37 °С в течение 1.5 ч. После этого образцы разбавляли в два раза денатурирующим буфером, содержащим 6 M гуанидин-HCl, 1 mM ЭДТА, 0.1 M Трис-HCl (pH 7.8), и добавляли по 2.5 мкл 1M раствора TCEP-HCl. Инкубировали в течение 18 ч при температуре 4 °С.

Механизм действия фермента IdeS заключался в разрезании молекулы антитела в шарнирной области, в результате чего образовывались две субъединицы: F(ab')<sub>2</sub> и Fc/2 (рис. 1). Последующий химический разрыв дисульфидных мостиков делил субъединицу F(ab')<sub>2</sub> на два фрагмента: LC (легкую цепь) и субъединицу Fd.

### Измерение молекулярной массы интактных антител

Испытание проводили в режиме инфузионного ввода пробы в источник ионизации. Скорость ввода раствора образца составляла 10 мкл/мин, перед ионизацией он смешивался с потоком 0.15% раствора DFA, подаваемым со скоростью 100 мкл/мин. Прибор работал в следующих условиях: режим положительной ионизации, диапазон высоких масс с границами 700–8000 Th с детектированием сигнала во фронтальном сканирующем режиме. Частота сбора



**Рис. 1.** Механизм действия протеазы IdeS.  
**Fig. 1.** Mechanism of action of the IdeS protease.

данных 1 Гц. Давление в испарителе составляло 22 psi. Анализ каждой пробы проводили в трех технических репликах. Обработку результатов экспериментов проводили в ПО MassHunter Qualitative Analysis B.09.00 (Agilent Technologies) и UniDec v.4.1.2 [10].

**Анализ middle-up**

Испытание проводили в режиме градиентной обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС, используя колонку BioResolve RP mAb Polyphenyl (1.0 × 150 мм, Waters). Подвижная фаза А – 0.15% DFA в воде; подвижная фаза Б – 0.15% DFA в ацетонитриле. Схема градиента: 0 мин – 26% Б, 22 мин – 41.5% Б, 22.1 мин – 98% Б, 24 мин – 98% Б, 24.1 мин – 26% Б, 30 мин – 26% Б при температуре 80 °С и скорости потока 0.1 мл/мин.

Обработку полученных масс-спектров проводили в ПО MassHunter Qualitative Analysis B.09.00 (Agilent Technologies) и UniDec [10].

**Статистическое сопоставление результатов**

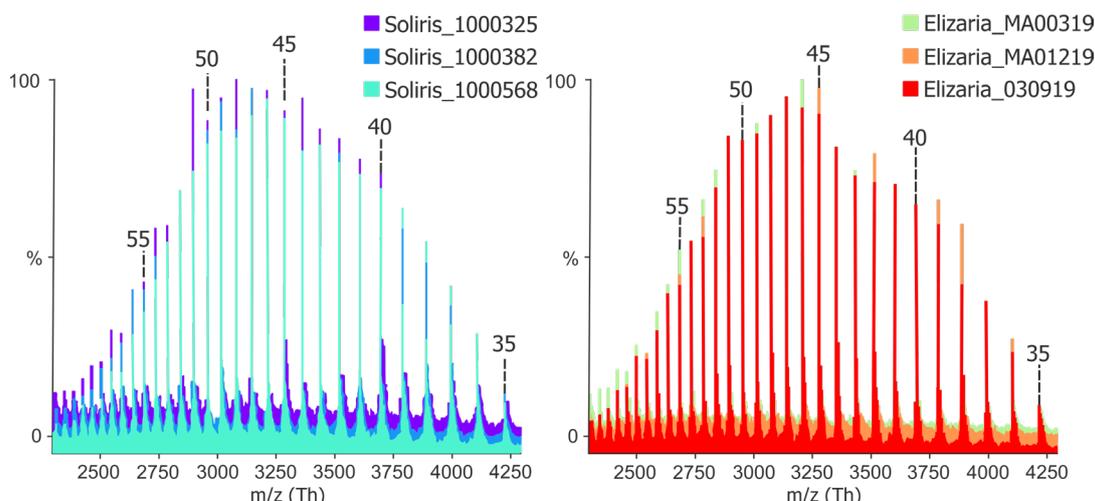
Использованные для сравнения методики анализа являлись качественными, поэтому для установления эквивалентности результатов, согласно принятым в

настоящее время нормам [11, 12], было введено понятие диапазона качества. Его границы определялись трехкратно увеличенным уровнем стандартного отклонения измеренных параметров референтных образцов от их средних значений.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

**Измерение молекулярной массы интактных антител**

Средняя молекулярная масса мажорной протеоформы экулизумаба с учетом его аминокислотной последовательности и основных модификаций: пары гликанов G0F, пары отщепленных С-концевых лизинов и пары пироглутаматов на N-концах тяжелых цепей, а также 17 дисульфидных связей составляла 147874 Да. Сравнительный анализ необработанных масс-спектров экулизумаба из образцов различного производства показал, что распределение зарядовых состояний белка во всех случаях находилось в диапазоне от 35+ до 65+, с наиболее интенсивными состояниями в диапазоне примерно от 40+ до 50+ (рис. 2).



**Рис. 2.** Масс-спектры экулизумаба серий ЛП «Солирис» и ЛП «Элизария» до деконволюции. Аннотированы отдельные зарядовые состояния.

**Fig. 2.** Mass spectra of the original Soliris and Elizaria drugs before deconvolution. Individual charge states are annotated.

Деконволюция масс-спектров была выполнена с применением программного обеспечения UniDec со следующими настройками: диапазон  $m/z$  2250–4300 Th, автоматическое вычитание шума, диапазон зарядовых состояний 35–65, автоматическое сглаживание масс-спектров, ширина пика на половине его высоты 0.8 Th, нормализованный предел детектирования пиков 1%. Она показала наличие во всех исследованных образцах молекулярно-массового распределения гликоформ, характерного для моноклональных анти-

тел, в ожидаемой для экулизумаба области. Молекулярная масса мажорной гликоформы G0F/G0F во всех образцах соответствовала ожидаемому значению в 148874 Да, а отклонение ее массы от ожидаемой не превышало 1 Да (7 ppm). В экулизумабе серий ЛП «Солирис» было обнаружено восемь, а в экулизумабе серий ЛП «Элизария» – семь протеоформ, из которых шесть и пять, соответственно, отличались по профилю гликанов, а оставшиеся две – по содержанию неотщепленного С-концевого лизина (рис. 3, табл. 1).

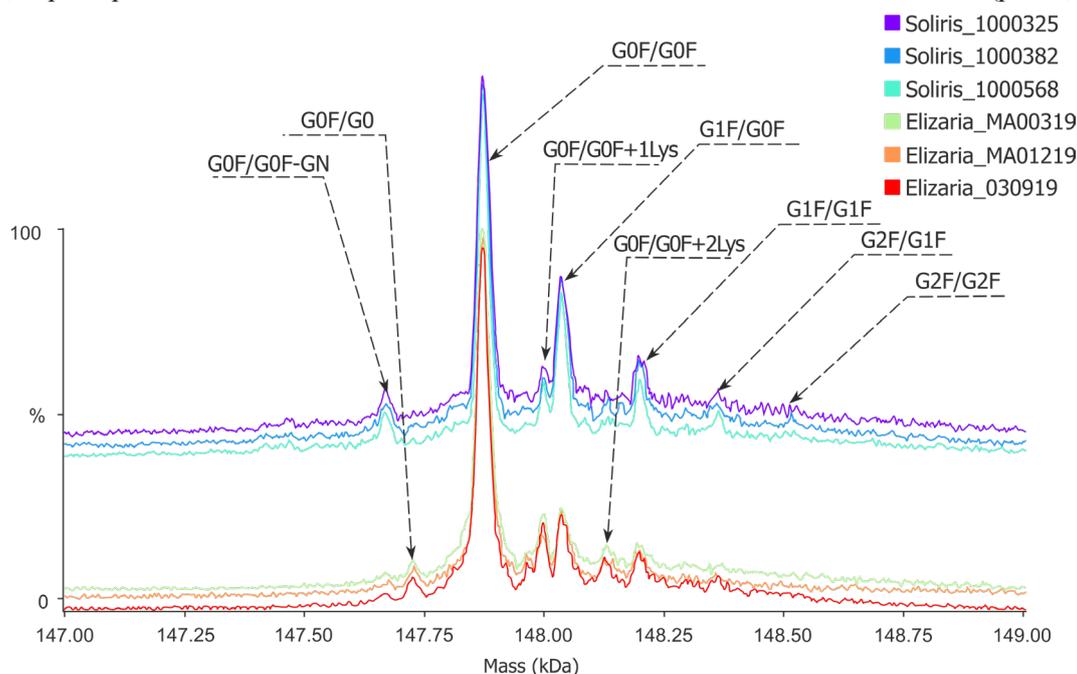


Рис. 3. Масс-спектры экулизумаба серий ЛП «Солирис» и ЛП «Элизария» после деконволюции. Аннотированы идентифицированные протеоформы.

Fig. 3. Mass spectra of the original Soliris and Elizaria drugs after deconvolution. The identified proteoforms are annotated.

Таблица 1. Результаты измерения молекулярных масс протеоформ экулизумаба из сравниваемых образцов  
Table 1. Results of measuring the molecular masses of ecuzumab proteoforms from the compared samples

Протеоформы экулизумаба Eculizumab proteoforms	Теор. масса, Да Theoretical mass, Da	Измеренная масса / Measured mass			
		ЛП «Солирис» Original Soliris		ЛП «Элизария» Elizaria	
		Среднее ± SD, Да Average ± SD, Da	Ошибка, ppm Error, ppm	Среднее ± SD, Да Average ± SD, Da	Ошибка, ppm Error, ppm
G0F/G0	147728	–	–	147727 ± 2	–5
G0F/G0F-GN	147671	147669 ± 1	–11	–	–
G0F/G0F	147874	147873 ± 1	–5	147874 ± 0	0
G0F/G0F+1Lys	148002	147999 ± 3	–23	148000 ± 1	–16
G1F/G0F	148036	148036 ± 3	0	148036 ± 2	2
G0F/G0F+2Lys	148130	148130 ± 3	2	148128 ± 2	–14
G1F/G1F	148198	148197 ± 2	–7	148198 ± 2	–2
G2F/G1F	148360	148360 ± 2	0	148363 ± 1	20
G2F/G2F	148522	148513 ± 13	–61	–	–

Примечание: SD – среднее квадратическое отклонение.  
Note: SD, standard deviation.

Содержание мажорных гликоформ экулизумаба в сравниваемых образцах было аналогичным: на первом, втором и третьем местах находились варианты G0F/G0F, G1F/G0F и G1F/G1F. Гликоформы с меньшими долями распределялись более вариативно. Так, в образцах ЛП «Солирис» на четвертом месте находился вариант G0F/G0F-GN, а у ЛП «Элизария» – G0F/G0. Пятое место во всех случаях были представлены гликоформой G2F/G1F, а шестое, зарегистрированное только у образцов ЛП «Солирис», G2F/G2F. Содержание галактозилированных гликанов, основной функциональной группы олигосахаридов, в образцах ЛП «Солирис» составляло 25.7–26.4%, а в сериях ЛП «Элизария» 11.9–14.7%. Доли форм антител с неотщепленными С-концевыми лизинами, как одним, так и двумя, были несколько выше в образцах ЛП «Элизария» (рис. 4, табл. 2). Все наблюдаемые отличия могли быть объяснены использованием разных продуцентов для производства оригинального и кандидатного экулизумаба: «Солирис» производится при помощи клеток миеломы грызунов NS0, в то время как для ЛП «Элизария» применяют линию клеток яичников китайского хомячка (СНО), продуцирующую больше агалактозилированных форм [13, 14]. Однако, доля галактозилированных гликанов важна только для антител, реализующих терапевтическую функцию через механизм комплемент-опосредованной цитотоксичности, а у экулизумаба этот механизм намеренно ингибирован [13–15]. Аналогично предыдущим, отличия в содержании неотщепленных С-концевых лизинах были обусловлены разными продуцентами и обычно не оказывают значимого влияния на терапевтическую эффективность и безопасность антитела.

Суммируя вышеизложенное, образцы оригинального и кандидатного экулизумаба можно считать

сопоставимыми по молекулярным массам и спектру представленных протеоформ, несмотря на некоторые отличия в их содержании.

#### Анализ middle-up

Обработка образцов протеазой IdeS с последующим разрушением дисульфидных связей при помощи ТСЕР позволила получить из молекулы экулизумаба три хорошо хроматографически разделяемые субъединицы, Fc/2, LC и Fd. Также был зарегистрирован хроматографический пик коэлюирующихся окисленной формы и формы с неотщепленным С-концевым лизином субъединицы Fc/2 и пик субъединицы Fd с одной неразорванной внутренней дисульфидной связью (рис. 5).

Молекулярные массы всех субъединиц совпали с расчетными, максимальное расхождение от ожидаемого значения не превышало 0.6 Да (40 ppm, табл. 3).

Доли гликозилированных форм в сравниваемых образцах несколько изменились в сравнении с результатами анализа интактных молекул (рис. 6, табл. 4). Так, уменьшилась разница между содержанием мажорного гликана G0F: его средний уровень в сериях «Солирис» составил 58.2%, а в сериях «Элизария» – 60.8%. Содержание G1F и G2F составляло около 14.0 и 2.5%, соответственно, во всех образцах; достоверной разницы по этому параметру установить не удалось. Благодаря middle-up анализу нашли свое подтверждение данные об уникальности олигосахаридов G0F-GN в составе «Солирис» и G0 в составе «Элизария», а также был обнаружен еще один уникальный для ЛП «Солирис» гликан – Man5. Исследование субъединиц LC и Fd позволило понять причину разницы содержания гликанов G1F и G2F в интактных молекулах и middle-up анализе: в этих субъединицах в составе ЛП «Солирис» были обнаружены минорные протеоформы, идентифицированные по

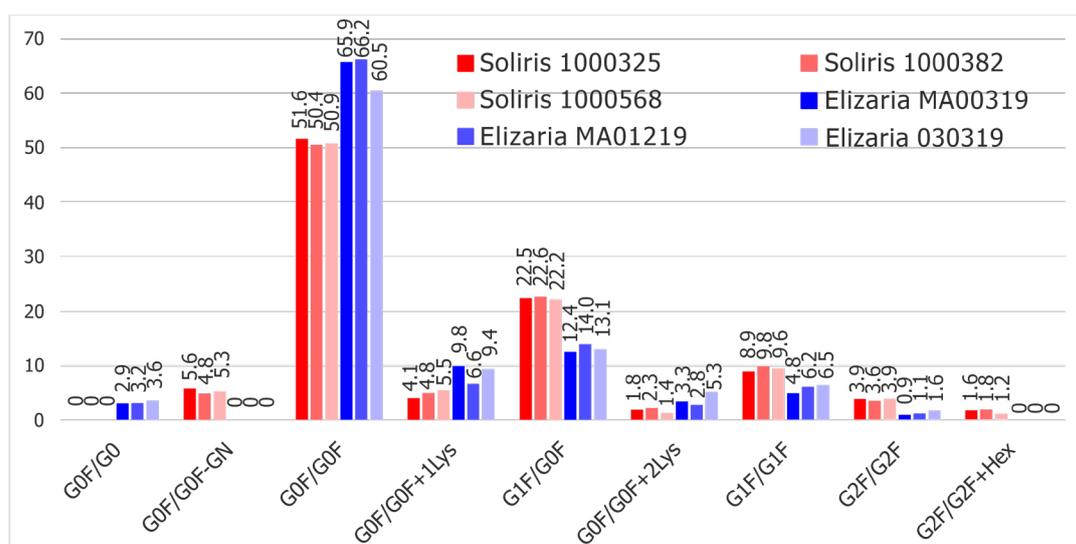


Рис. 4. Содержание протеоформ в отдельных сериях экулизумаба ЛП «Солирис» и ЛП «Элизария».

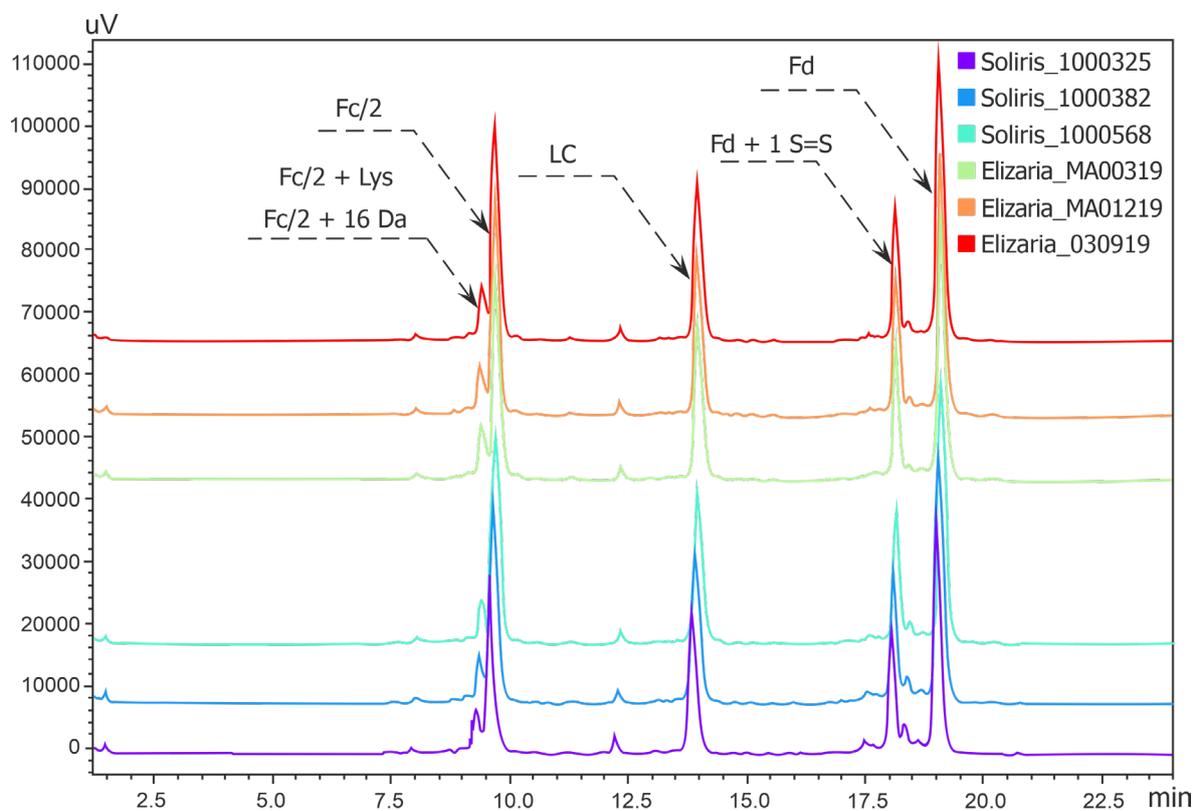
Fig. 4. The content of proteoforms in individual series of the original Soliris and Elizaria drugs.

Таблица 2. Сравнение долей протеоформ экулизумаба в анализируемых образцах интактного белка  
 Table 2. Comparison of the proportions of eculizumab proteoforms in the analyzed intact molecules

Протеоформы экулизумаба Eculizumab proteoforms	ЛП «Солирис» Original Soliris		ЛП «Элизария» Elizaria		Диапазон качества, % (Среднее ± 3SD) Quality range, % (Average ± 3SD)	Соответствие ЛП «Элизария» диапазону качества, % Compliance of Elizaria with the quality range, %
	Среднее Average	SD, %	Среднее Average	SD, %		
G0F/G0	–	–	3.2	0.3	–	Нет / None
G0F/G0F-GN	5.2	0.4	–	–	4.0–6.4	Нет / None
G0F/G0F	51.0	0.6	64.2	3.2	49.2–52.8	Нет / None
G0F/G0F+1Lys	4.8	0.7	8.6	1.7	2.7–6.9	33
G1F/G0F	22.4	0.2	13.2	0.8	21.8–23.0	Нет / None
G0F/G0F+2Lys	1.8	0.4	3.8	1.3	0.6–3.0	33
G1F/G1F	9.4	0.5	5.8	0.9	7.9–10.9	Нет / None
G2F/G1F	3.8	0.2	1.2	0.4	3.2–4.4	Нет / None
G2F/G2F	1.5	0.3	–	–	0.6–2.4	Нет / None
Галактозилированные гликаны, сумма (0.5 × G0F/G1F + G1F/G1F + G2F/G1F + G2F/G2F) Galactosylated glycans, sum (0.5 × G0F/G1F + G1F/G1F + G2F/G1F + G2F/G2F)	26.0	0.4	13.6	1.5	24.8–27.2	Нет / None

Примечание: SD – среднее квадратическое отклонение.

Note: SD is standard deviation.



a

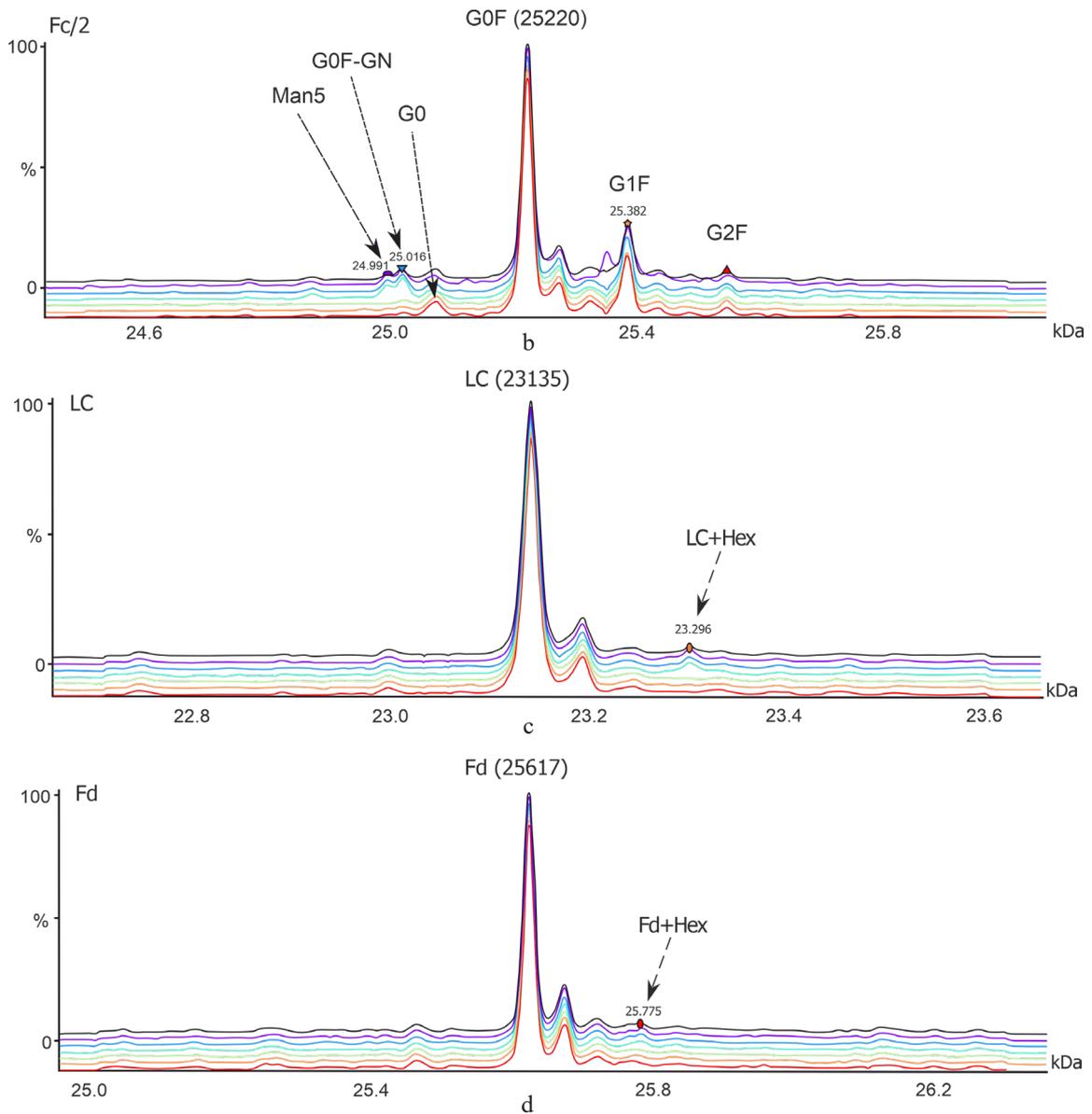


Рис. 5. Аннотированные хроматограммы (а) и масс-спектры (б–д) субъединиц экулизумаба серий ЛП «Солирис» и ЛП «Элизария».

Fig. 5. Annotated chromatograms (a) and mass spectra (b–d) of eculizumab subunits of the original Soliris and Elizaria drugs.

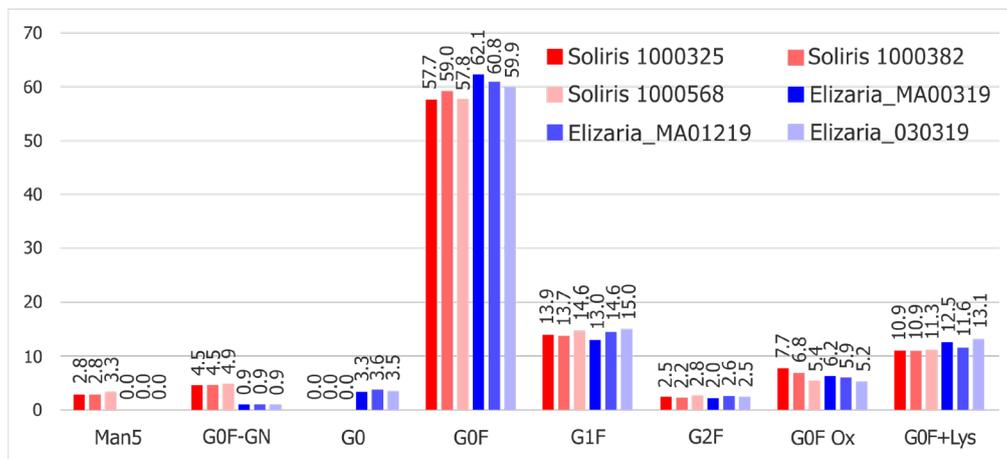


Рис. 6. Содержание протеоформ в субъединице Fc/2 отдельных серий экулизумаба ЛП «Солирис» и ЛП «Элизария».

Fig. 6. The content of proteoforms in the Fc/2 subunit of separate series of the original Soliris and Elizaria drugs.

**Таблица 3.** Результаты измерения молекулярных масс субъединиц экулизумаба из сравниваемых образцов  
**Table 3.** Results of measuring the molecular masses of eculizumab subunits from the compared samples

Субъединицы экулизумаба Eculizumab proteoforms	Теор. масса, Да Theoretical mass, Da	Измеренная масса / Measured mass			
		ЛП «Солирис» Original Soliris		ЛП «Элизария» Elizaria	
		Среднее ± SD, Да Average ± SD, Da	Ошибка, ppm Error, ppm	Среднее ± SD, Да Average ± SD, Da	Ошибка, ppm Error, ppm
Fc/2+Man5	24992	24992 ± 0.3	7	–	–
Fc/2+G0F-GN	25017	25017 ± 0.6	–13	25016	–40
Fc/2+G0	25074	–	–	25073	–40
Fc/2+G0F	25220	25220	0	25220	0
Fc/2+G1F	25382	25382 ± 0.3	–7	25382	0
Fc/2+G2F	25544	25544 ± 0.6	13	25544 ± 0.6	13
Fc/2+16 Да (окисление) Fc/2 + 16 Da (oxidation)	148198	148197 ± 2	–7	148198 ± 2	–2
Fc/2+Lys	25348	25349	39	25349	39
LC	23135	23135	0	23135	0
Fd	25617	25617 ± 0.6	–13	25617 ± 0.6	–13

Примечание: SD – среднее квадратическое отклонение.  
 Note: SD, standard deviation.

**Таблица 4.** Сравнение долей протеоформ экулизумаба в субъединицах анализируемых образцов  
**Table 4.** Comparison of the proportions of eculizumab proteoforms in the subunits of the analyzed samples

Протеоформы экулизумаба Eculizumab proteoforms	ЛП «Солирис» Original Soliris		ЛП «Элизария» Elizaria		Диапазон качества, % (Среднее ± 3SD) Quality range, % (Average ± 3SD)	Соответствие ЛП «Элизария» диапазону качества, % Compliance of Elizaria with the quality range, %
	Среднее Average	SD, %	Среднее Average	SD, %		
Man5	3.0	0.3	–	–	2.1–3.9	Нет / None
G0F-GN	4.6	0.2	0.9	0	4.0–5.2	Нет / None
G0	–	–	3.5	0.2	–	Нет / None
G0F	58.2	0.8	60.9	1.1	55.8–60.6	33
G1F	14.1	0.5	14.2	1.0	12.6–15.6	100
G2F	2.5	0.3	2.4	0.3	1.6–3.4	100
G0F Ox	6.6	1.2	5.8	0.5	2.0–10.2	100
G0F+Lys	11.1	0.2	12.4	0.8	10.5–11.7	67
LC+Hex	4.4	0.2	–	–	3.8–5.0	Нет / None
Fd+Hex	2.9	0.1	–	–	2.6–3.2	Нет / None
Галактозилированные гликаны, сумма (G1F+G2F) Galactosylated glycans, sum (G1F + G2F)	16.6	0.7	16.5	1.3	14.5–18.7	100

характерному сдвигу масс на 162 Да как гликированные варианты. Их содержание колебалось от 2.8 до 4.6%. Скорее всего, вклад этих форм превышал уровни содержания G1F/G1F, G2F/G1F и G2F/G2F при анализе интактного экулизумаба из ЛП «Солирис». Содержание галактозилированных гликанов

в образцах кандидатного препарата полностью соответствовало диапазону качества оригинального ЛП «Солирис». В содержании С-концевого лизина сравниваемых образцов также наблюдали достаточно близкое сходство: соответствие диапазону качества продемонстрировали две серии ЛП «Элизария»

из трех. Новой модификацией, установленной с применением методологии middle-up, стало окисление Fc/2-субъединицы. Ее содержание во всех сериях кандидатного препарата также соответствовало диапазону качества оригинального экулизумаба.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка и регистрация биоаналогичных терапевтических белков требует их всесторонней характеристики, в физико-химической части которой хромато-масс-спектрометрия занимает одну из лидирующих позиций. Варианты этого анализа достаточно разнообразны, что обусловлено целями, стоящими перед исследователями. Однако, в первую очередь как в биофармацевтических исследованиях сопоставимости, так и при разработке молекулы должна быть описана молекула белка целиком. Результаты этого анализа становятся базой для более глубокой характеристики объектов сравнения или разработки.

Изучение моноклонального антитела экулизумаба в составе оригинального препарата «Солирис» и кандидатного «Элизария» методом масс-спектрометрического измерения массы интактного белка показало идентичность молекулярных масс большинства обнаруженных в образцах протеоформ, но продемонстрировало отличия в их содержании, заключавшиеся в меньшем содержании мажорной гликоформы G0F/G0F и большем – гликоформ G1F/G0F, G1F/G1F, G2F/G1F и G2F/G2F в составе оригинального препарата «Солирис». Однако подробное изучение субъединиц антитела хромато-масс-спектрометрическим подходом middle-up позволило объяснить повышенное содержание более «тяжелых» гликоформ наличием в субъединицах LC и Fd экулизумаба из оригинального ЛП «Солирис» сайтов гликирования. Ожидаемо, сопоставление олигосахаридов, присоединенных к каноническому сайту гликозилирования на субъединице Fc/2, установило высокий уровень сходства сравниваемых образцов. Достоверные отличия наблюдались в содержании мажорной гликоформы G0F, однако разница в содержании этого гликана составила в среднем 2.7%, в то время как при анализе интактного белка аналогичный

параметр для варианта G0F/G0F между оригинальным и кандидатным антителом находился на уровне 13.2%. Также отличалось и содержание минорных олигосахаридов Man5, G0F-GN и G0, доля которых не превышала 4.6%.

Проведенная работа стала частью отчета о всесторонней сравнительной характеристике экулизумаба оригинального и кандидатного препаратов и позволила получить российское регистрационное удостоверение на первое в мире биоаналогичное лекарственное средство на основе экулизумаба. Масс-спектрометрическое исследование интактных молекул и субъединиц экулизумаба из различных источников показало принципиальную сопоставимость образцов, стало базой для дальнейшей, более глубокой, хромато-масс-спектрометрической характеристики, и выступило в качестве ортогонального метода анализа для «классических» хроматографических и электрофоретических исследований сопоставимости экулизумаба.

### Благодарности

Авторы статьи благодарят С. Тарана, ведущего эксперта Отдела аналитических методов, и М. Смолова, начальника Лаборатории физико-химических методов «МБЦ «Генериум», за помощь в подготовке текста статьи.

### Acknowledgments

The authors thank S. Taran, Lead Expert of the Department of Analytical Methods, and M. Smolov, Head of the Laboratory of Physicochemical Methods of IBC Generium, for their help with preparing the manuscript.

### Вклад авторов

Все авторы в равной степени внесли свой вклад в исследовательскую работу.

### Authors' contribution

All authors equally contributed to the research work.

### Заявление о потенциальном конфликте интересов

Авторы статьи являются сотрудниками ООО «Международный биотехнологический центр «Генериум», организации, разрабатывавшей биоаналог экулизумаба.

### Potential Conflict of Interest Statement

The authors are employees of the Generium International Biotechnological Center, an organization that develops a biosimilar drug to eculizumab.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Dillon T.M., Bondarenko P.V., Rehder D.S., Pipes G.D., Kleemann G.R., Ricci M.S. 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):112–120. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.016>
2. Ren D., Pipes G., Xiao G., Kleemann G.R., Bondarenko P.V., Treuheit M.J., Gadgil H.S. Reversed-phase liquid chromatography–mass spectrometry of site-specific chemical modifications in intact immunoglobulin molecules and their fragments. *J. Chromatogr. A*. 2008;1179(2):198–204. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.11.088>

3. Sawyer W.S., Srikumar N., Carver J., Chu P.Y., Shen A., Xu A., Williams A.J., Spiess C., Wu C., Liu Y., Tran J.C. High-throughput antibody screening from complex matrices using intact protein electrospray mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020;117(18):9851–9856. <https://doi.org/10.1073/pnas.1917383117>
4. Habberger M., Leiss M., Heidenreich A-K., Pester O., Hafenmair G., Hook M., Bonnington L., Wegele H., Haindl M., Reusch D., Bulau P. Rapid characterization of biotherapeutic proteins by size-exclusion chromatography coupled to native mass spectrometry. *MAbs*. 2015;8(2):331–33. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1122150>

5. Loney A.C., Heck A.J. Native Mass Spectrometry: What is in the Name? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2017;28(1):5–13. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1545-3>
6. Wehofsky M., Hoffmann R. Automated deconvolution and deisotoping of electrospray mass spectra. *J. Mass Spectrom.* 2002;37(2):223–229. <https://doi.org/10.1002/jms.278>
7. Lu J., Trnka M.J., Roh S.H., *et al.* Improved Peak Detection and Deconvolution of Native Electrospray Mass Spectra from Large Protein Complexes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2015;26(12):2141–2151. <https://doi.org/10.1007/s13361-015-1235-6>
8. Wohlschlager T., Scheffler K., Forstenlehner I.C. *et al.* Native mass spectrometry combined with enzymatic dissection unravels glycoform heterogeneity of biopharmaceuticals. *Nat. Commun.* 2018;9:1713. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04061-7>
9. Lermyte F., Tsybin Y.O., O'Connor P.B., Loo J.A. Top or Middle? Up or Down? Toward a Standard Lexicon for Protein Top-Down and Allied Mass Spectrometry Approaches. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2019;30(7):1149–1157. <https://doi.org/10.1007/s13361-019-02201-x>
10. Marty M.T., Baldwin A.J., Marklund E.G., Hochberg G.R.A., Benesch J.L.P., Robinson C.V. Bayesian deconvolution of mass and ion mobility spectra: from binary interactions to polydisperse ensembles. *Anal. Chem.* 2015;87(8):4370–4376. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00140>
11. Tsong Y., Dong X., Shen M. Development of statistical methods for analytical similarity assessment. *J. Biopharm. Stat.* 2017;27(2):197–205. <https://doi.org/10.1080/10543406.2016.1272606>
12. Chow S.-C. Challenging issues in assessing analytical similarity in biosimilar studies. *Biosimilars.* 2015;5:33–39. <https://doi.org/10.2147/BS.S84141>
13. Raju T.S., Jordan R.E. Galactosylation variations in marketed therapeutic antibodies. *MAbs.* 2012;4(3):385–391. <https://doi.org/10.4161/mabs.19868>
14. Bruce A., Hunter J., Malanson H.F. Recombinant glycosylated eculizumab and eculizumab variants: US Patent US20170073399A1. Priority 11.09.2015.
15. Reusch D., Tejada M.L. Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes. *Glycobiology.* 2015;25(12):1325–1334. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv065>

#### Об авторах:

**Дегтерев Максим Борисович**, научный сотрудник лаборатории физико-химических методов ООО «МБЦ «Генериум» (601125, Россия, Владимирская обл., Петушинский район, пос. Вольгинский, ул. Владимирская, д. 14). E-mail: degterev@ibcgenerium.ru. <https://orcid.org/0000-0002-5541-5575>

**Шукуров Рахим Рахманкулович**, начальник отдела аналитических методов ООО «МБЦ «Генериум» (601125, Россия, Владимирская обл., Петушинский район, пос. Вольгинский, ул. Владимирская, д. 14). E-mail: shukurov@ibcgenerium.ru. <https://orcid.org/0000-0002-6532-7835>

#### About the authors:

**Maksim B. Degterev**, Research Scientist, Physico-Chemical Methods Laboratory, International Biotechnology Center Generium (14, Vladimirskaya ul., Volginskiy, Vladimir oblast, 601125, Russia). E-mail: degterev@ibcgenerium.ru. <https://orcid.org/0000-0002-5541-5575>

**Rakhim R. Shukurov**, Head of the Analytical Methods Department, International Biotechnology Center Generium (14, Vladimirskaya ul., Volginskiy, Vladimir oblast, 601125, Russia). E-mail: shukurov@ibcgenerium.ru. <https://orcid.org/0000-0002-6532-7835>

Поступила: 19.11.2020; получена после доработки: 08.12.2020; принята к опубликованию: 06.02.2021.  
The article was submitted: November 19, 2020; approved after reviewing: December 08, 2020; accepted for publication: February 06, 2021.