



# Quantificação de mAb e agregação de ADC usando SEC e uma fase móvel aquosa

Sistema LC quaternário Agilent 1260 Infinity Bio-inert e coluna SEC AdvanceBio de 300Å, 2,7 µm

## Nota de aplicação

Biológicos e biossimilares

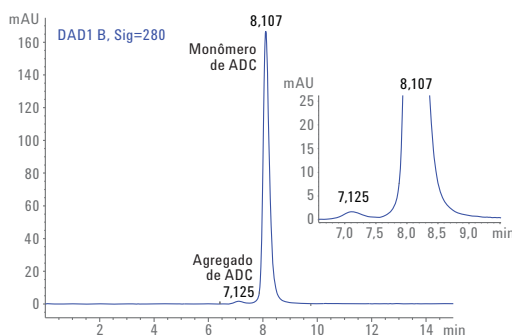
### Autor

M.Sundaram Palaniswamy  
Agilent Technologies Pvt Ltd  
Bangalore, Índia

### Resumo

A cromatografia por exclusão de tamanhos (SEC) é uma ferramenta importante para monitorar monômeros, dímeros, agregados e possíveis degradantes em amostras de proteína bioterapêutica, incluindo anticorpos monoclonais e seus derivados. A agregação de uma proteína é considerada um atributo essencial de qualidade, sua quantificação é fundamental.

Esta nota de aplicação descreve um método simples e sensível para a quantificação de agregados em um mAb bioterapêutico e em um conjugado anticorpo-droga (ADC) usando uma coluna SEC Agilent AdvanceBio de 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm e um LC quaternário Agilent 1260 Infinity Bio-inert. O método utiliza a mesma fase móvel, sem a adição de modificador orgânico, para a análise do mAb e do ADC mais hidrofóbico. O método otimizado também foi capaz de monitorar agregados e degradantes criados pela degradação forçada por pH/temperatura. Esse método simples e reprodutível, junto com a resistência à corrosão do instrumento, é adequado para análise de QA/QC de rotina de mAbs e ADC na indústria biofarmacêutica.



## Introdução

As proteínas estão sujeitas à agregação e degradação durante todos os estágios de desenvolvimento, como expressão, recomformação, processamento downstream, formulação, esterilização e armazenamento. Além disso, a ligação da carga hidrofóbica que forma o ADC aumentaria a agregação determinada pela hidrofobicidade. Embora presentes em concentrações baixas, os agregados/degradantes podem causar um grande impacto na qualidade de produtos biológicos, causando perda de atividade, redução de solubilidade e aumento da imunogenicidade. A cromatografia por exclusão de tamanhos é o método padrão usado para caracterizar a agregação de proteínas. Esta nota de aplicação demonstrará os benefícios da coluna SEC Agilent AdvanceBio de 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm para separar, quantificar e monitorar a integridade de um mAb e um ADC terapêuticos. As colunas SEC AdvanceBio são uma tecnologia inovadora para a análise de SEC. As colunas foram desenvolvidas e fabricadas pela Agilent com uma partícula de sílica inovadora e química de ligação exclusiva para oferecer resolução e separações por tamanho a diversos tipos de amostra, sem a necessidade de adicionar modificador orgânico à fase móvel. A análise do anticorpo monoclonal e do ADC mais hidrofóbico usa a mesma fase móvel aquosa.

## Materiais e métodos

### Instrumento

Usamos um sistema quaternário Agilent 1260 Infinity Bio-inert completamente biocompatível -com uma pressão máxima de 600 bar, que inclui os seguintes módulos:

- Bomba de LC quaternário Agilent 1260 Infinity Bio-Inert (G5611A)
- Amostrador automático de alto desempenho Agilent 1260 Infinity Bio-Inert (G5667A)
- Termostatizador de amostras Série Agilent 1200 Infinity (G1330B)
- Compartimento de coluna termostatizado (TCC) Agilent 1260 Infinity com elementos de aquecimento com encaixe bioinerte (G1316C, opção 19)
- DAD VL Agilent 1260 Infinity (G1315D com cela de fluxo padrão bioinerte, 10 mm)

### Software

Agilent ChemStation Rev. B.04.03 (ou mais recente).

## Condições

Coluna:	SEC Agilent AdvanceBio 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm (p/n PL1180-5301)
Fase móvel:	Tampão de fosfato de sódio (PBS), 50 mM de fosfato de sódio com 150 mM de cloreto de sódio, pH 7,4.
Temp de TCC:	Ambiente
Vol. da inj.:	10 µL
Taxa de fluxo:	0,8 mL/min.
Deteção:	UV, 220 e 280 nm

## Reagentes, amostras e materiais

O trastuzumabe e o conjugado droga-anticorpo (T-DM1) foram comprados em uma farmácia local e armazenados de acordo com as instruções do fabricante. O PBS, ácido clorídrico e hidróxido de sódio foram comprados da SigmaAldrich, Corp. Todos os produtos químicos e solventes tinham grau de HPLC e foi utilizada água altamente purificada de um sistema de purificação MilliQ (Millipore Elix 10, USA).

## Linearidade e intervalo

A curva de calibração foi construída com oito concentrações padrão de trastuzumabe e ADC de 15,625 a 2,000 µg/mL.

## Limite de quantificação (LOQ) e limite de detecção (LOD)

Trastuzumabe e ADC (T-DM1) foram usados para fazer medições de LOD e LOQ. A concentração da biomolécula que forneceu uma razão sinal-ruído (S/N) > 3 foi considerada a LOD e S/N > 10 foi considerada a LOQ.

## Procedimento

A fase móvel (10 µL) foi injetada como branco, seguida de níveis de linearidade em triplicada. A área e o tempo de retenção (RT) de cada nível foram usados para calcular os valores do desvio padrão (SD) e do desvio padrão relativo (RSD %). O LOD e o LOQ foram estabelecidos nas injeções com nível de linearidade mais baixo. A área média de cada nível de linearidade foi representada graficamente em relação à concentração do analito para determinar a curva de calibração dos monômeros.

## Preparo de agregados de trastuzumabe e ADC

Agregados de trastuzumabe e ADC foram preparados ao diluir anticorpos monoclonais na fase móvel a uma concentração final de 2 mg/mL. O teste de degradação de pH foi realizado como descrito anteriormente com uma pequena modificação [1]. 1 M de HCl foi adicionado lentamente gota a gota às soluções da amostra para alterar o pH de 6,0 para 1,0. Em seguida, 1 M de NaOH foi adicionado para ajustar o pH a 10,0. Por fim, 1 M de HCl foi adicionado novamente para ajustar o pH de volta a 6,0. Houve aproximadamente 1 minuto de espera entre as trocas de pH, enquanto em agitação constante a 500 rpm. A solução resultante foi incubada a 60 °C por 60 minutos.

Resultados e discussão

Separação e detecção

Para a quantificação da agregação em SEC, monômeros, dímeros e agregados de alto peso molecular, é essencial que a fase móvel não afete a composição da amostra. Como as condições ambientais podem alterar o nível de agregação, é importante que o preparo de SEC possa ser realizado em fases móveis aquosas com pH neutro e níveis baixos de sal. A Figura 1 demonstra a separação excelente de mAb de trastuzumabe terapêutico intacto em 15 minutos utilizando a coluna SEC AdvanceBio em condições cromatográficas usadas com frequência para proteínas, ou seja, tampão de fosfato de sódio com pH 7,4. O pico foi simétrico e eluído em um tempo de retenção consistente com o peso molecular de um mAb, indicando que a separação foi feita de acordo com o tamanho e que não houve interações secundárias. A Figura 1 também mostra uma ampliação, revelando a presença de uma pequena quantidade de agregado. A ausência de um pico de eluição precoce ou tardio sugere que as preparações de mAb comercializadas eram homogêneas, sem indicação de agregação ou degradação.

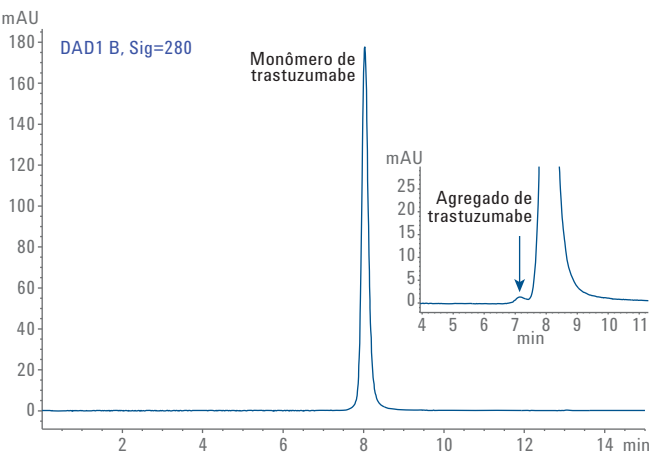


Figura 1. Perfil de SEC de (A) trastuzumabe intacto (B) região ampliada mostrando agregados de trastuzumabe em uma coluna SEC Agilent AdvanceBio de 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

SEC de ADC

Os métodos mais publicados para análise de SEC de ADC realizados em colunas SEC comercializadas usando fase aquosa geraram um formato de pico inadequado e resolução incompleta do agregado do conjugado monomérico. Esse efeito foi causado devido à interação não específica da carga hidrofóbica com a fase estacionária. Foi demonstrado que a adição de 15% 2-propanol superou esse efeito [2]. Quando o ADC T-DM1 foi analisado usando a coluna SEC AdvanceBio com uma fase móvel aquosa, o PBS gerou picos simétricos e melhor resolução do monômero e do agregado, indicando nenhuma interação não específica da droga hidrofóbica com a fase estacionária (Figura 2).

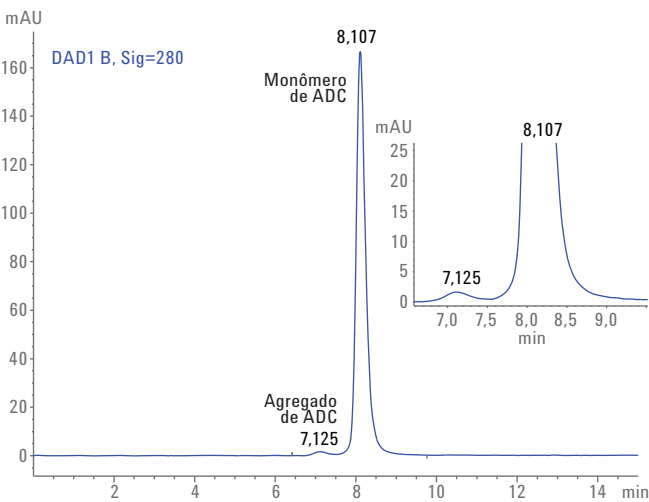


Figura 2. Perfil de SEC de T-DM1 (ADC) intacto em uma coluna SEC Agilent AdvanceBio de 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm usando PBS, pH 7,4, como fase móvel.

Precisão do tempo de retenção e da área

A Tabela 1 mostra a média dos tempos de retenção e as RSDs de área de seis replicações de mAb trastuzumabe e análise de ADC. O tempo de retenção e as RSDs de área do pico foram menores que 0,04 e 1%, respectivamente, o que demonstra reprodutibilidade excelente do método e, consequentemente, a precisão do sistema.

Tabela 1. Tempo de retenção e precisão da área do pico (n = 6).

Amostra	Tempo de retenção		Área do pico	
	Média (min)	RSD	Média (mAU/min)	RSD
Trastuzumabe inovador	8,034	0	100	0
ADC	8,106	0,005	98,91	0,33

Limite de detecção e limite de quantificação

O LOD e o LOQ foram de 15 µg/mL e 31 µg/mL, respectivamente, para o trastuzumab e o ADC, indicando a sensibilidade do método. Os valores de LOD e LOQ observados de trastuzumab e ADC estão organizados na Tabela 2 e a sobreposição dos cromatogramas de LOD e LOQ com a amostra em branco é mostrada na Figura 3.

Tabela 2. Resultados de LOD, LOQ e S/N (n = 3).

Concentração (µg/mL)	S/N	Área média
<b>Trastuzumabe</b>		
15,625 (LOD)	7,8	12,62
31,25 (LOQ)	21,4	29,16
62,5	32,7	60,74
<b>ADC</b>		
15,625 (LOD)	10,5	15,20
31,25 (LOQ)	15,5	37,89
62,5	37,9	80,24

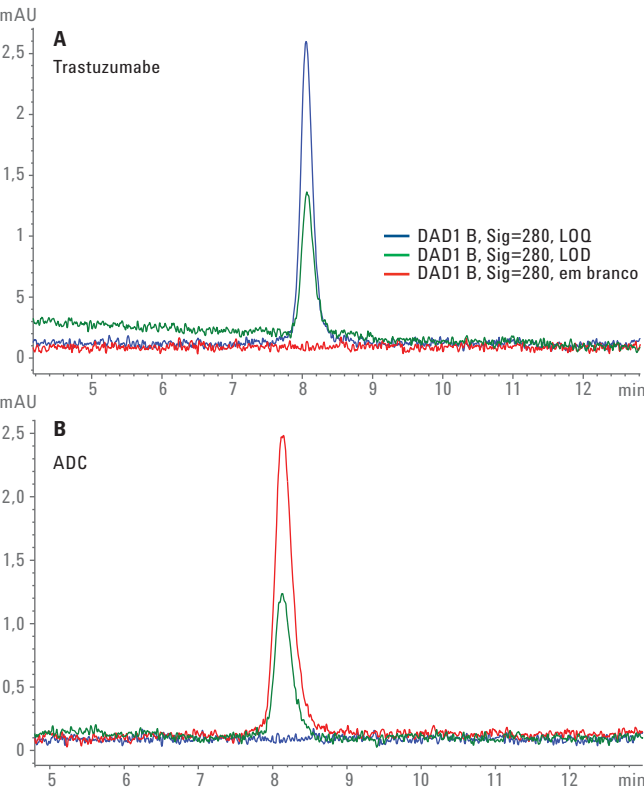


Figura 3. Cromatogramas de LOD e LOQ de trastuzumabe e ADC sobrepostos com a amostra em branco.

Linearidade

As curvas de linearidade do trastuzumabe e do ADC foram construídas do nível de LOQ ao nível de concentração mais alto do estudo usando a resposta de área e a concentração de trastuzumabe/ADC. Os resultados de precisão são mostrados na Tabela 3. A curva de linearidade do trastuzumabe/ADC no intervalo de concentração de 12,5 a 2,000 µg é mostrada na Figura 4.

Tabela 3. Resumo da faixa de linearidade (n = 3) do trastuzumabe e ADC.

Trastuzumabe		ADC	
Concentração (µg/mL)	Área média	Concentração (µg/mL)	Área média
15,625	16,4	15,625	22,6
31,25	30,6	31,25	37,9
62,5	64,4	62,5	91,2
125	140,7	125	178,8
250	277	250	348,4
500	538,2	500	704,7
1000	1095	1000	1400
2000	2179	2000	2821

Análise de agregação/degradação

Comparamos o trastuzumabe e o ADC nativos e degradados com a SEC para monitorar agregados e degradantes. Os picos da corrida cromatográfica que eluíram antes da forma monomérica foram considerados como agregados e os que eluíram posteriormente como degradantes [3].

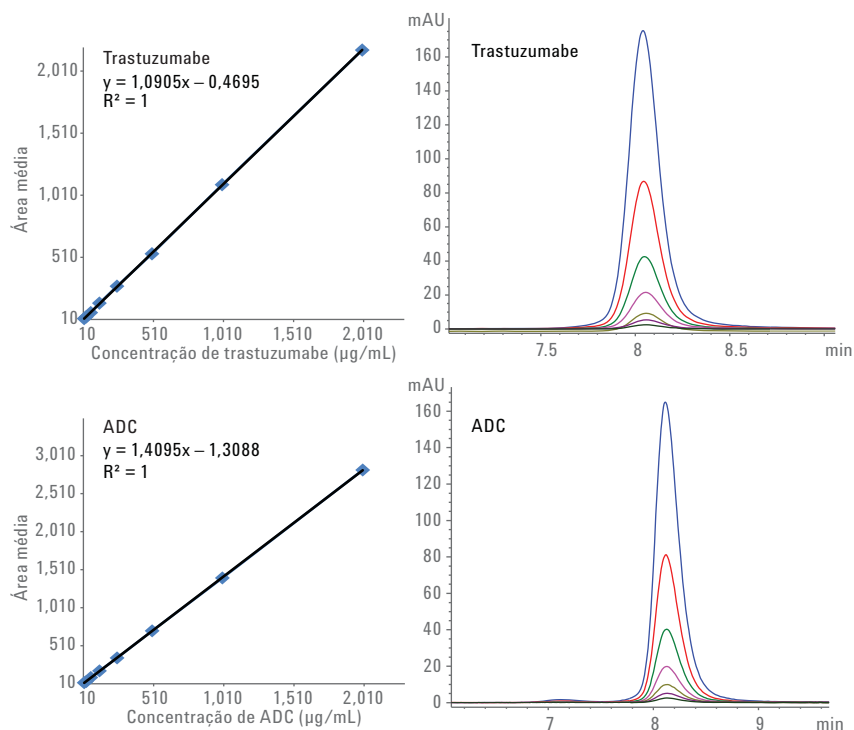


Figura 4. Curva de linearidade com oito concentrações padrão de trastuzumabe e ADC com intervalo de 15,62 a 2,000 µg/mL, mostrando valores de coeficiente excelentes. Sobreposições de cromatogramas também são mostradas para as faixas de linearidade.

Os cromatogramas de agregados com pH/calor induzido mostrados nas Figuras 5 e 6 indicam que a coluna SEC AdvanceBio foi capaz de separar e detectar agregados, assim como trastuzumabe e ADC degradados. Intactos, agregados e degradantes foram nitidamente separados uns dos outros.

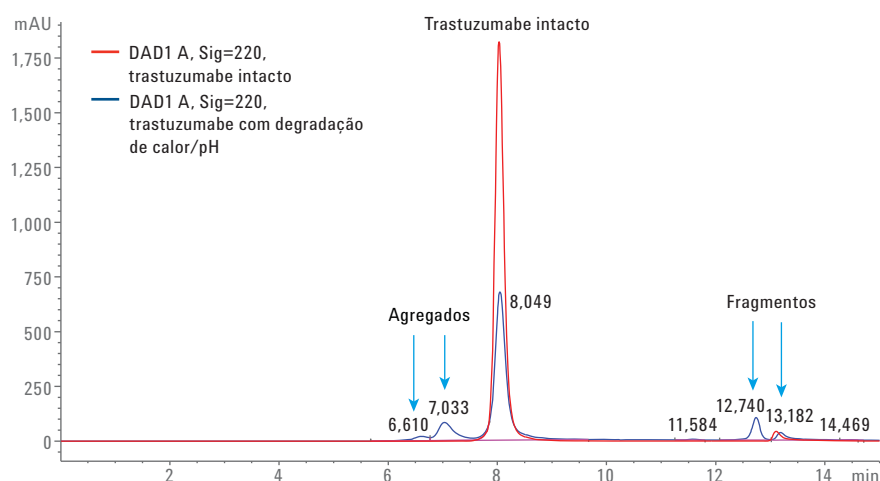


Figura 5. Cromatograma de trastuzumabe nativo (controle; traço vermelho) sobreposto com 2 mg/mL de trastuzumabe com degradação de pH/calor usando uma coluna SEC Agilent AdvanceBio de 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

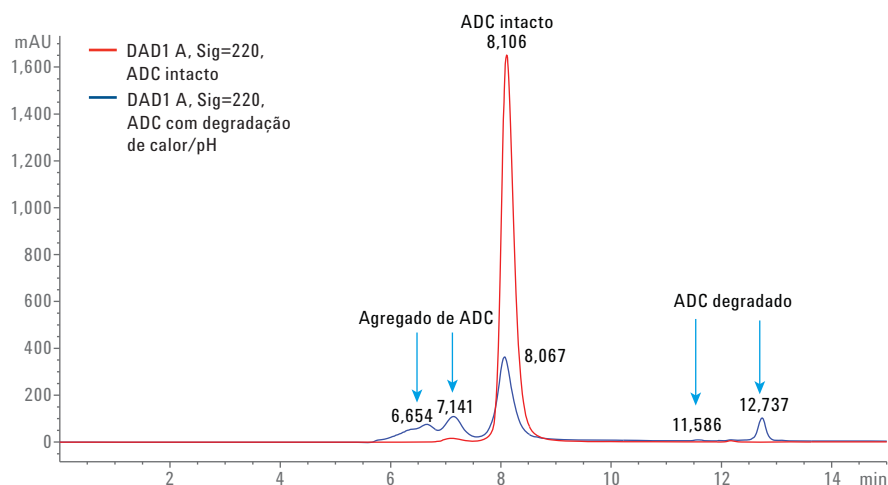


Figura 6. Cromatograma de ADC nativo (controle; traço vermelho) sobreposto com 2 mg/mL de ADC com degradação de pH/calor usando uma coluna SEC Agilent AdvanceBio de 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

### Quantificação de agregação e degradação de trastuzumabe e ADC

De acordo com a porcentagem de área, a quantificação relativa de agregados e degradantes no trastuzumabe e no ADC é resumida na Tabela 4.

Os dados evidenciam que há um grande aumento dos níveis de agregados e degradação de trastuzumabe e ADC com diminuição relativa das formas monoméricas, que caíram para 71 e 54%, respectivamente. Embora animadores, esses resultados devem ser fundamentados com dados da atividade biológica para avaliar a perda de potência em relação à agregação/degradação.

Tabela 4. Tempo de retenção e área do pico de monômeros, agregados e fragmentos de trastuzumabe e ADC.

Trastuzumabe intacto		Trastuzumabe degradado	
Tempo de retenção (min)	Área %	Tempo de retenção (min)	Área %
7,14	0,140	6,61	2,8
8,034	96,8	7,033	13,26
13,10	3,0	8,03	71,83
		12,74	7,65
		13,18	4,0
ADC intacto		ADC degradado	
7,115	2	6,654	19
8,106	97,8	7,141	17,8
		8,06	54,92
		11,58	0,2
		12,73	7,5
		14,46	0,2

## Conclusões

Demonstramos diversas ferramentas excelentes para o desenvolvimento de métodos e para monitorar a pureza e a estabilidade de mAb trastuzumabe/ADC T-DM1 terapêutico. Primeiro usamos a coluna SEC Agilent AdvanceBio para desenvolver uma separação- de alta resolução e simples de mAbs. A coluna SEC AdvanceBio foi capaz de proporcionar resolução superior de ADC hidrofóbico sem usar modificadores orgânicos na fase móvel. A precisão da área e do tempo de retenção do método foram excelentes e demonstraram a confiabilidade do método. As curvas de linearidade com oito concentrações padrão de mAb e ADC, variando de 15 a 2.000 µg/mL, tiveram valores de coeficiente de linearidade excelentes, indicando que o método é quantitativo e preciso. O LOD e o LOQ para o mAb e o ADC foram de 15 µg/mL e 25 µg/mL, respectivamente, indicando a sensibilidade do método. Além disso, os estudos de degradação forçada de mAb e ADC demonstraram que a coluna SEC AdvanceBio foi capaz de separar, detectar e quantificar agregados e degradantes de acordo com a porcentagem da área. Um método simples e reprodutível, junto com a biocompatibilidade e a resistência à corrosão do LC quaternário Agilent 1260 Infinity Bio-inert, torna essa solução adequada para a análise de QA/QC de anticorpo monoclonal/ADC na indústria farmacêutica.

## Referências

1. Basak Kükrer, B.; Filipe, V.; van Duijn, E.; Kasper, P. T.; Vreeken, R. J.; Heck, A. J. R.; Jiskoot, W. Mass Spectrometric Analysis of Intact Human Monoclonal Antibody Aggregates Fractionated by Size-Exclusion Chromatography. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 2197-2204.
2. Wakankar, A.; Yan Chen; Gokarn, Y.; Jacobson, F. S. Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates. *MAbs* **2011**, *3*:2, 161-172.
3. Rodriguez-Diaz, R.; Wehr, T. Use of Size Exclusion Chromatography in Biopharmaceutical Development. In *Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development*; Rodriguez-Diaz, R., Wehr, T., Tuck, S., Eds.; CRC Press: New York, 2005.

## Mais informações

Estes dados representam os resultados típicos. Para obter mais informações sobre nossos produtos e serviços, acesse o site [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

A Agilent Technologies não será responsável por erros contidos neste documento ou por danos incidentais ou consequenciais em relação ao fornecimento, desempenho ou uso deste material.

As informações, descrições e especificações nesta publicação estão sujeitas a mudanças sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc., 2015  
Impresso nos EUA  
16 de outubro de 2015  
5991-6303PTBR



**Agilent Technologies**