

Cuantificación de la agregación de un anticuerpo monoclonal y un conjugado anticuerpo-fármaco mediante el uso de la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y una fase móvil acuosa

Sistema LC cuaternario bioinerte Agilent 1260 Infinity y columna AdvanceBio SEC 300 Å de 2,7 µm

Nota de aplicación

Productos biológicos y biosimilares

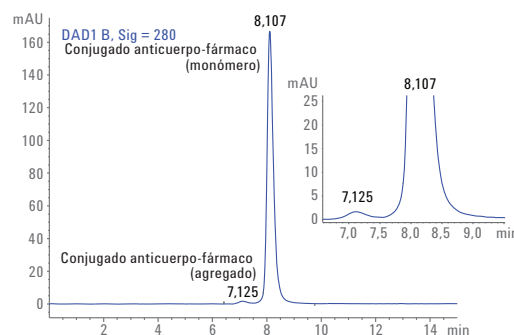
Autor

M. Sundaram Palaniswamy
Agilent Technologies Pvt Ltd
Bangalore (India)

Resumen

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es una herramienta importante para la monitorización de monómeros, dímeros, agregados y posibles productos de degradación de muestras de proteínas bioterapéuticas, incluidos los anticuerpos monoclonales y sus derivados. La agregación se considera un atributo de calidad crítico, por lo que es necesario cuantificarla.

En esta nota de aplicación se describe un método sencillo y sensible de cuantificación de agregados en un anticuerpo monoclonal bioterapéutico y un conjugado anticuerpo-fármaco, utilizando para ello una columna Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm, y un sistema LC cuaternario bioinerte Agilent 1260 Infinity. El método permite utilizar la misma fase móvil acuosa, sin añadir ningún modificador orgánico, para el análisis de anticuerpos monoclonales y de conjugados anticuerpo-fármaco, de carácter más hidrofóbico. Este método optimizado también hizo posible monitorizar los agregados y los productos de degradación generados en condiciones extremas de pH y temperatura. Este método sencillo y reproducible, combinado con la resistencia a la corrosión del instrumento, es idóneo para análisis rutinarios de control y garantía de calidad (QA/QC) de anticuerpos monoclonales y conjugados anticuerpo-fármaco dentro de la industria biofarmacéutica.



Agilent Technologies

Introducción

Las proteínas terapéuticas están sometidas a fenómenos de agregación y degradación durante todas las etapas de su desarrollo, como la expresión, el plegamiento, los pasos de procesamiento posteriores, la formulación, la esterilización y la conservación. Además, la unión de una carga hidrofóbica para formar el conjugado anticuerpo-fármaco también impulsa la agregación asociada a la hidrofobicidad. Aunque los agregados y los productos de degradación estén presentes en bajas concentraciones, pueden tener un gran impacto sobre la calidad de los productos biológicos y dar lugar a una pérdida de actividad o solubilidad, así como a un aumento de la inmunogenicidad. La cromatografía de exclusión por tamaño es el método estándar utilizado para caracterizar la agregación de proteínas. En esta nota de aplicación, mostraremos las ventajas de usar la columna Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm para la separación, la cuantificación y la monitorización de la integridad de un anticuerpo monoclonal terapéutico o un conjugado anticuerpo-fármaco. Las columnas AdvanceBio SEC son una tecnología revolucionaria para el análisis SEC. Agilent ha diseñado y fabricado estas columnas con unas innovadoras partículas de sílice y una exclusiva química de enlace, que ofrecen resolución y separación por tamaño para una amplia variedad de tipos de muestras sin necesidad de añadir modificadores orgánicos a la fase móvil. Se utiliza la misma fase móvil acuosa tanto para el análisis de anticuerpos monoclonales como para el de conjugados anticuerpo-fármaco, más hidrofóbicos.

Materiales y métodos

Instrumento

Utilizamos un sistema LC cuaternario bioinerte Agilent 1260 Infinity, completamente biocompatible, con una presión máxima de 600 bar y compuesto por los módulos siguientes:

- Bomba LC cuaternaria bioinerte Agilent 1260 Infinity (G5611A).
- Inyector automático de alto rendimiento bioinerte Agilent 1260 Infinity (G5667A).
- Termostato Agilent Serie 1200 Infinity (G1330B).
- Compartimento termostatzado de columna (TCC) Agilent 1260 Infinity con elementos calefactores bioinertes de conexión rápida (G1316C, opción n.º 19).
- Detector de diodo array (DAD) VL Agilent 1260 Infinity (G1315D, con celda de flujo estándar bioinerte de 10 mm).

Software

Agilent ChemStation B.04.03 (u otra versión posterior).

Condiciones

Columna:	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm (ref. PL1180-5301)
Fase móvil:	Solución salina tamponada con fosfato (PBS), compuesta por fosfato de sodio 50 mM con cloruro sódico 150 mM (pH = 7,4)
Temp. del TCC:	Ambiente
Vol. iny.:	10 µl
Velocidad de flujo:	0,8 ml/min
Detección:	UV (220 y 280 nm)

Reactivos, muestras y materiales

Se compraron trastuzumab y un conjugado anticuerpo-fármaco (T-DM1) en una farmacia local, y se conservaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. También se compraron solución PBS, ácido clorhídrico e hidróxido sódico de Sigma-Aldrich, Corp. Todos los compuestos químicos y los disolventes eran de calidad para HPLC; asimismo, se utilizó agua de alta pureza obtenida con un sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore Elix 10, EE. UU.).

Linealidad y rango

La curva de calibración se creó con ocho patrones de trastuzumab y conjugado anticuerpo-fármaco con concentraciones entre 15,625 y 2.000 µg/ml.

Límite de cuantificación (LOQ) y límite de detección (LOD)

Se utilizaron el trastuzumab y el conjugado anticuerpo-fármaco (T-DM1) para realizar medidas de los valores LOD y LOQ. Se consideró como LOD la concentración de biomolécula que dio lugar a una relación señal-ruido (S/N) > 3, y como LOQ la concentración que dio lugar a una relación S/N > 10.

Procedimiento

Se inyectó fase móvil (10 µl) como blanco, seguida de niveles individuales de linealidad por triplicado. Se utilizaron el área de pico y el tiempo de retención (TR) de cada nivel de linealidad para calcular la desviación estándar (DE) y la desviación estándar relativa (DER, %). Los límites LOD y LOQ se determinaron a partir de las inyecciones del nivel de linealidad inferior. Se representó el área media de cada nivel de linealidad frente a la concentración del analito para crear la curva de calibración para los monómeros.

Preparación de agregados de trastuzumab y conjugado anticuerpo-fármaco

Se prepararon los agregados de trastuzumab y conjugado anticuerpo-fármaco mediante la dilución del anticuerpo monoclonal en fase móvil hasta obtener una concentración final de 2 mg/ml. Las pruebas en condiciones extremas de pH se realizaron tal como se especificó con anterioridad, con pequeñas modificaciones [1]. De forma resumida, se añadió HCl 1 M gota a gota a las soluciones de muestra para cambiar el pH de 6,0 a 1,0. Seguidamente, se añadió NaOH 1 M para ajustar el pH a un valor igual a 10,0. Por último, se añadió de nuevo HCl 1 M para volver a ajustar el pH a un valor igual a 6,0. Se dejó aproximadamente un minuto de espera entre cambios sucesivos de pH; asimismo, las muestras se sometieron a una agitación constante a 500 rpm. Las soluciones resultantes se incubaron a 60 °C durante 60 minutos.

Resultados y comentarios

Separación y detección

Para la cuantificación mediante SEC de la agregación, los monómeros, los dímeros y los agregados de mayor tamaño, es fundamental que la fase móvil no afecte a la composición de la muestra. Dado que las condiciones ambientales pueden modificar el nivel de agregación, es importante que la separación SEC pueda realizarse en una fase móvil acuosa a un pH neutro y con bajas concentraciones salinas. En la figura 1 queda patente la excelente separación del anticuerpo monoclonal inalterado del trastuzumab en 15 minutos con la columna AdvanceBio SEC y en las condiciones cromatográficas utilizadas frecuentemente para las proteínas (es decir, con solución salina tamponada con fosfato y a un pH de 7,4). El pico fue simétrico y eluyó a un tiempo de retención coherente con el peso molecular de un anticuerpo monoclonal, lo que indica que la separación se realizó en función del tamaño y que no se produjeron interacciones secundarias. La figura 1 también incluye un detalle en el que se observa la presencia de una pequeña cantidad de agregado. La ausencia de picos de elución anteriores o posteriores sugiere que la preparación comercial de anticuerpo monoclonal era homogénea, sin que existan signos de agregación o degradación.

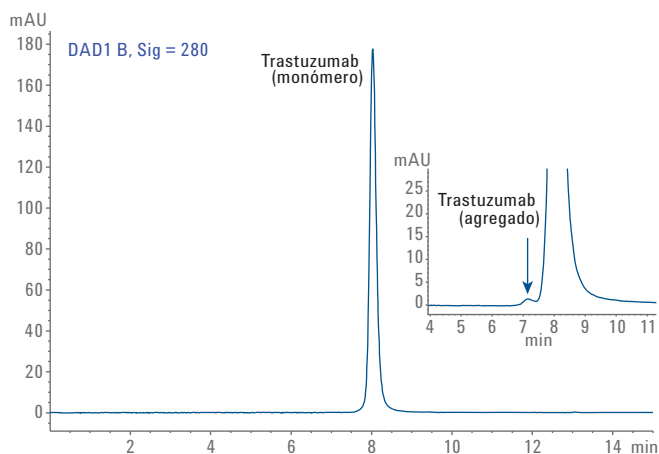


Figura 1. Perfil SEC del: (A) trastuzumab inalterado; (B) detalle en el que se muestran los agregados de trastuzumab. El perfil se obtuvo con una columna Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

Análisis SEC del conjugado anticuerpo-fármaco

La mayoría de los métodos publicados de análisis SEC de conjugados anticuerpo-fármaco realizados en columnas SEC comerciales con una fase acuosa dieron lugar a una forma de pico deficiente y a una resolución incompleta del agregado respecto al conjugado monomérico. Este efecto se debió a una interacción no específica entre la carga hidrofóbica y la fase estacionaria. Se ha comprobado que la adición de 2-propanol al 15 % anula este efecto [2]. Al analizar el conjugado anticuerpo-fármaco T-DM1 con la columna AdvanceBio SEC y una fase móvil acuosa, la solución PBS dio lugar a picos simétricos y mejoró la resolución del monómero y el agregado, lo que indica que no existen interacciones no específicas entre el fármaco hidrofóbico y la fase estacionaria (consulte la figura 2).

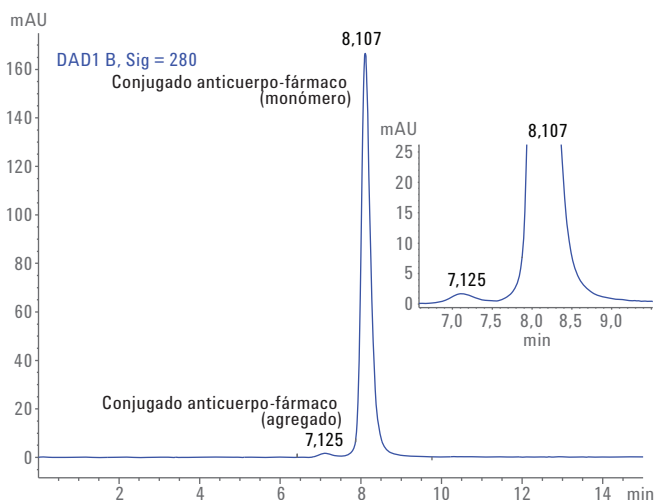


Figura 2. Perfil SEC del T-DM1 (conjugado anticuerpo-fármaco), obtenido con una columna Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm, con solución PBS de pH igual a 7,4 como fase móvil.

Precisión del tiempo de retención y del área

En la tabla 1 se incluyen los tiempos de retención medios, el área de pico y las DER correspondientes a las seis réplicas realizadas con anticuerpo monoclonal del trastuzumab y al análisis de conjugado anticuerpo-fármaco. Las DER del tiempo de retención y del área de pico resultaron inferiores a 0,04 y 1 %, respectivamente, lo que demuestra la excelente reproducibilidad del método y, por tanto, la precisión del sistema.

Tabla 1. Precisión del tiempo de retención y del área de pico (n = 6).

Muestra	Tiempo de retención		Área de pico	
	Media (min)	DER	Media (mAU/min)	DER
Trastuzumab original	8,034	0	100	0
Conjugado anticuerpo-fármaco	8,106	0,005	98,91	0,33

Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

Los valores LOD y LOQ fueron de 15 µg/ml y 31 µg/ml, respectivamente, para el trastuzumab y el conjugado anticuerpo-fármaco, lo que indica que el método es sensible. Los valores LOD y LOQ observados para el trastuzumab y el conjugado anticuerpo-fármaco aparecen recogidos en la tabla 2, mientras que en la figura 3 se muestran los cromatogramas de los valores LOD y LOQ superpuestos con el del blanco.

Tabla 2. Valores LOD y LOQ, y relación señal-ruido (S/N) (n = 3).

Concentración (µg/ml)	S/N	Área media
Trastuzumab		
15,625 (LOD)	7,8	12,62
31,25 (LOQ)	21,4	29,16
62,5	32,7	60,74
Conjugado anticuerpo-fármaco		
15,625 (LOD)	10,5	15,20
31,25 (LOQ)	15,5	37,89
62,5	37,9	80,24

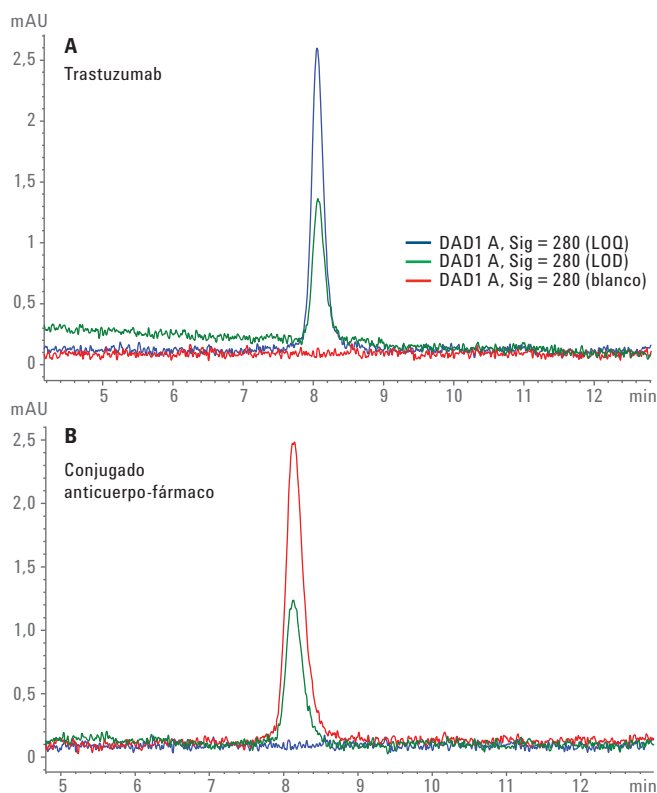


Figura 3. Cromatogramas de los valores LOD y LOQ del trastuzumab y del conjugado anticuerpo-fármaco, superpuestos con el del blanco.

Linealidad

Las curvas de linealidad del trastuzumab y el conjugado anticuerpo-fármaco se construyeron desde el valor LOQ hasta el valor de concentración más alto del estudio, utilizando para ello la respuesta de área de pico y la concentración del trastuzumab o el conjugado anticuerpo-fármaco. Los resultados de precisión se incluyen en la tabla 3. La curva de linealidad del trastuzumab y el conjugado anticuerpo-fármaco para el rango de concentración entre 12,5 y 2.000 µg se muestra en la figura 4.

Tabla 3. Resumen del rango de linealidad (n = 3) del trastuzumab y el conjugado anticuerpo-fármaco.

Trastuzumab		Conjugado anticuerpo-fármaco	
Concentración (µg/ml)	Área med.	Concentración (µg/ml)	Área med.
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

Análisis de agregación y degradación

Comparamos mediante SEC el trastuzumab y el conjugado anticuerpo-fármaco en condiciones naturales y extremas, con el fin de monitorizar los agregados y los productos de degradación. Los picos del análisis cromatográfico que eluyeron antes de la forma monomérica se consideraron como agregados y los que eluyeron después como productos de degradación, respectivamente [3].

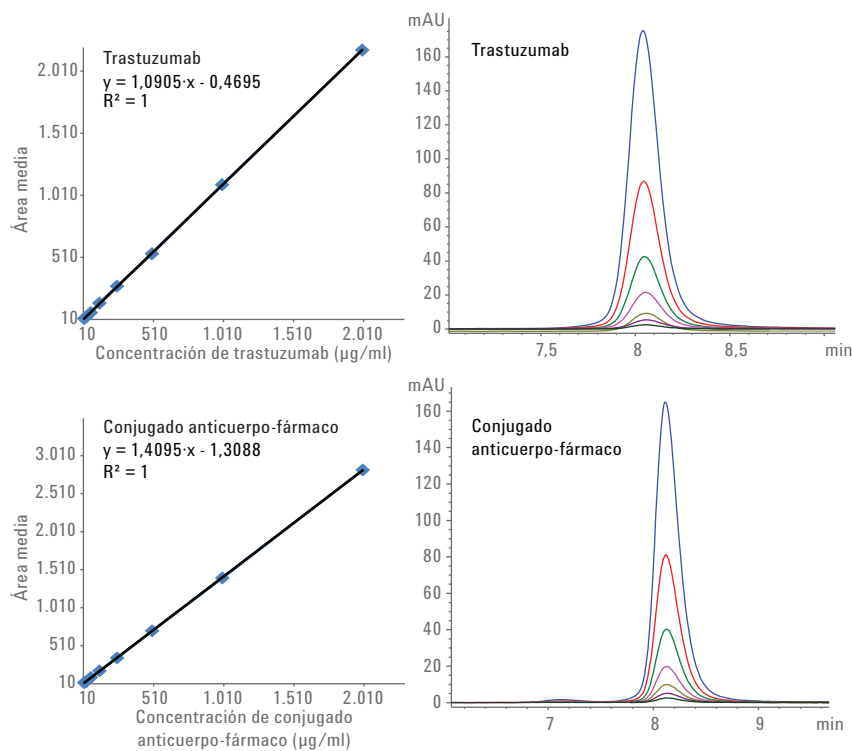


Figura 4. Curvas de linealidad obtenidas con ocho patrones de trastuzumab y conjugado anticuerpo-fármaco, con concentraciones entre 15,62 y 2.000 µg/ml, en las que se observan los excelentes valores de los coeficientes de linealidad. También se muestran los cromatogramas superpuestos de los rangos de linealidad.

Los cromatogramas de los agregados formados en condiciones extremas de pH y temperatura, que se muestran en las figuras 5 y 6, indican que la columna AdvanceBio SEC fue capaz de separar y detectar los agregados, así como los productos de degradación del trastuzumab y el conjugado anticuerpo-fármaco. Las formas inalteradas, los agregados y los productos de degradación se separaron entre sí de forma diferenciada.

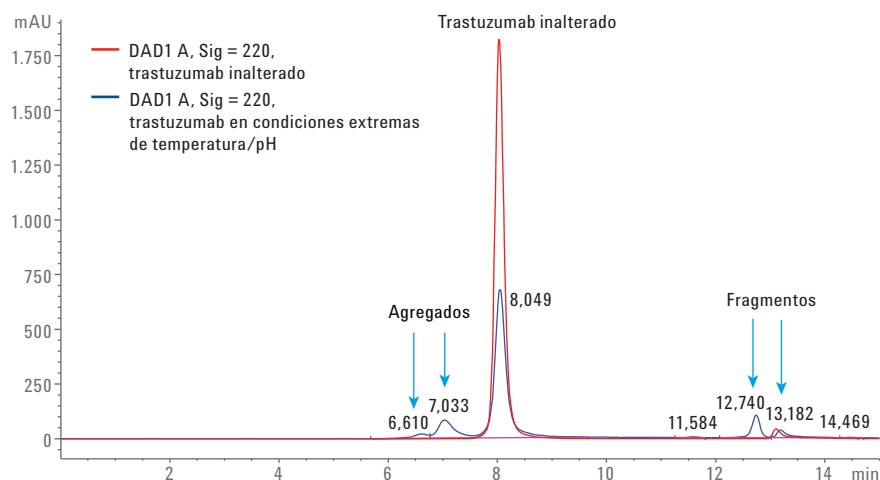


Figura 5. Cromatograma del trastuzumab en condiciones naturales (control; curva roja) superpuesto con el de una solución de 2 mg/ml de trastuzumab en condiciones extremas de pH y temperatura; ambos se obtuvieron con una columna Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

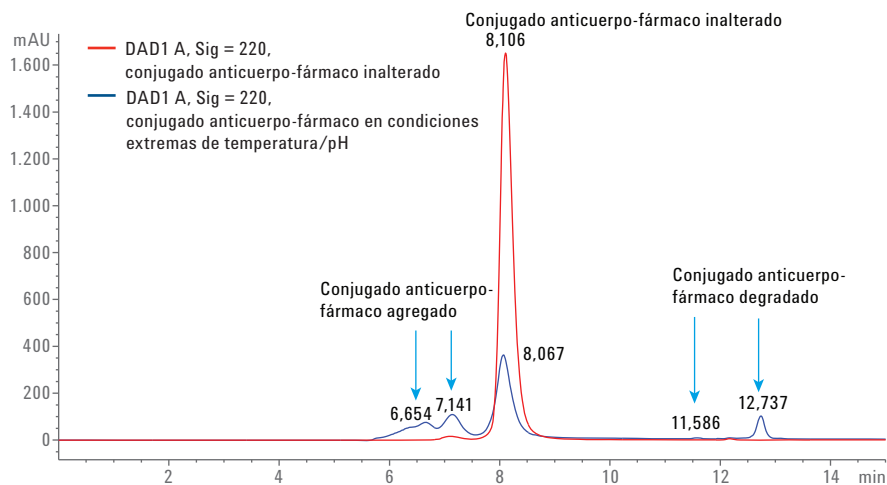


Figura 6. Cromatograma del conjugado anticuerpo-fármaco en condiciones naturales (control; curva roja) superpuesto con el de una solución de 2 mg/ml de conjugado anticuerpo-fármaco en condiciones extremas de pH y temperatura; ambos se obtuvieron con una columna Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

Cuantificación de la agregación y la degradación del trastuzumab y el conjugado anticuerpo-fármaco

La cuantificación relativa de los agregados y los productos de degradación del trastuzumab y el conjugado anticuerpo-fármaco, expresada en forma de área porcentual, se resume en la tabla 4.

Tal como demuestran los datos, existe un notable incremento en los niveles de agregados y productos de degradación del trastuzumab y el conjugado anticuerpo-fármaco, así como una disminución relativa de las formas monoméricas, que descendieron hasta el 71 % y el 54 %, respectivamente. Aunque estos resultados son prometedores, deben venir respaldados por datos de actividad biológica que permitan determinar la pérdida de eficacia en relación con la agregación o la degradación.

Tabla 4. Tiempos de retención y áreas de pico de los monómeros, los agregados y los fragmentos de trastuzumab y conjugado anticuerpo-fármaco.

Trastuzumab inalterado		Trastuzumab en condiciones extremas	
Tiempo de retención (min)	Área (%)	Tiempo de retención (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
Conjugado anticuerpo-fármaco inalterado		Conjugado anticuerpo-fármaco en condiciones extremas	
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

Conclusiones

Hemos presentado diferentes herramientas excelentes para el desarrollo de métodos y la monitorización de la pureza y la estabilidad del trastuzumab (un anticuerpo monoclonal terapéutico) y el conjugado anticuerpo-fármaco T-DM1. En primer lugar, utilizamos la columna Agilent AdvanceBio SEC para desarrollar un método sencillo y de alta resolución para la separación de anticuerpos monoclonales. Cabe destacar que la columna AdvanceBio SEC fue capaz de conseguir una resolución extraordinaria del conjugado anticuerpo-fármaco hidrofóbico sin utilizar modificadores orgánicos en la fase móvil. El método ofreció una precisión excelente en cuanto al área de pico y el tiempo de retención, lo que demuestra su fiabilidad. Las curvas de linealidad creadas con ocho patrones de anticuerpo monoclonal y conjugado anticuerpo-fármaco con concentraciones entre 15 y 2.000 µg/ml presentaron unos coeficientes de linealidad excelentes, lo que indica que el método es cuantitativo y preciso. Los valores LOD y LOQ del anticuerpo monoclonal y el conjugado anticuerpo-fármaco fueron de 15 µg/ml y 25 µg/ml, respectivamente, lo que indica que el método es sensible. Además, los estudios en condiciones extremas del anticuerpo monoclonal y el conjugado anticuerpo-fármaco demostraron que la columna AdvanceBio SEC es capaz de separar, detectar y cuantificar los agregados y los productos de degradación, expresados en forma de área porcentual. Un método tan sencillo y reproducible, combinado con las condiciones bioinertes y la resistencia a la corrosión del sistema LC cuaternario bioinerte Agilent 1260 Infinity, convierte a esta solución en la idónea para los análisis QA/QC de anticuerpos monoclonales y conjugados anticuerpo-fármaco propios de la industria biofarmacéutica.

Referencias

1. Başak 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. En *Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development*; Rodriguez-Diaz, R., Wehr, T., Tuck, S., Eds.; CRC Press: Nueva York, 2005.

Más información

Estos datos representan resultados típicos. Si desea obtener más información sobre nuestros productos y servicios, visite nuestra página web www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Agilent no se hace responsable de ningún error incluido en este documento ni de ningún daño incidental o consecuencial relacionado con la distribución, la aplicación o el uso de este material.

La información, las descripciones y las especificaciones de esta publicación están sujetas a modificación sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2015
Impreso en EE. UU.
16 de octubre de 2015
5991-6303ES



Agilent Technologies