

# Determinazione del livello di aggregazione in mAb e ADC mediante cromatografia ad esclusione dimensionale e fase mobile acquosa

Il sistema LC quaternario Bio-Inert Agilent serie 1260 Infinity e la colonna AdvanceBio SEC 300Å, 2,7 µm

## Nota applicativa

Biologici e biosimilari

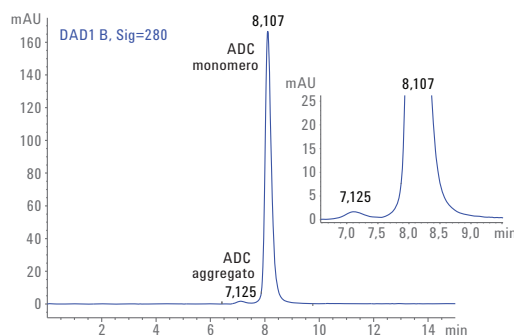
### Autore

M. Sundaram Palaniswamy  
Agilent Technologies Pvt Ltd  
Bangalore, India

### Abstract

La cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) è un importante strumento per il monitoraggio di monomeri, dimeri, aggregati e potenziali prodotti di degradazione nei campioni di proteine bioterapeutiche, inclusi gli anticorpi monoclonali e i loro derivati. Poiché l'aggregazione è ritenuta un attributo qualitativo critico, è necessario effettuarne la determinazione.

La presente nota applicativa descrive un metodo semplice e sensibile per la quantificazione degli aggregati in un anticorpo monoclonale ad attività terapeutica (mAb) e in un anticorpo-farmaco coniugato (ADC), mediante l'utilizzo di una colonna Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm e di un sistema LC quaternario Bio-Inert Agilent serie 1260 Infinity. Il metodo utilizza la medesima fase mobile acquosa, senza l'aggiunta di modificatore organico, per l'analisi di mAb e ADC, maggiormente idrofobico. Questo metodo ottimizzato ha consentito inoltre di monitorare gli aggregati e i prodotti di degradazione creati da stress termico o da pH. Questo metodo semplice e riproducibile, associato alla resistenza alla corrosione dello strumento, è indicato per l'analisi QA/QC routinaria di mAb e ADC per l'industria biofarmaceutica.



Agilent Technologies

## Introduzione

Le proteine ad attività terapeutica sono soggette ad aggregazione e degradazione durante tutte le fasi della produzione, come l'espressione, il folding, la lavorazione, la formulazione, la sterilizzazione e la conservazione. Inoltre, anche la formazione dell'ADC mediante il fissaggio del carico idrofobico favorisce l'aggregazione dovuta all'idrofobicità. Anche se sono presenti in piccole concentrazioni, gli aggregati/prodotti di degradazione possono avere un grande impatto sulla qualità dei farmaci biologici, provocando perdita di attività, minore solubilità e maggiore immunogenicità. La cromatografia ad esclusione dimensionale è il metodo standard utilizzato per caratterizzare l'aggregazione delle proteine. Nel presente documento, mostriamo i benefici derivanti dall'utilizzo della colonna Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm per la separazione, la quantificazione e il monitoraggio dell'integrità per un mAb ad attività terapeutica e un ADC. Le colonne AdvanceBio SEC sono all'avanguardia della tecnologia per le analisi SEC. Le colonne sono state progettate e fabbricate da Agilent con un'innovativa particella in silice e un'esclusiva chimica di legame per offrire risoluzione e separazioni dimensionali per una vasta gamma di tipi di campione, senza aggiungere un modificatore organico alla fase mobile. L'analisi dell'anticorpo monoclonale e dell'ADC, maggiormente idrofobico, utilizza la medesima fase mobile acquosa.

## Materiali e metodi

### Strumento

Abbiamo usato un sistema LC quaternario Bio-Inert Agilent serie 1260 Infinity completamente biocompatibile, con una pressione massima di 600 bar, comprendente i seguenti moduli:

- Pompa LC quaternaria Bio-inert Agilent 1260 Infinity (G5611A)
- Autocampionatore Bio-Inert ad alte prestazioni Agilent 1260 Infinity (G5667A)
- Termostato Agilent serie 1200 Infinity (G1330B)
- Comparto colonna termostato (TCC) Agilent 1260 Infinity contenente elementi riscaldanti con alloggiamenti con sistema di blocco per le colonne Bio-Inert (G1316C, opzione 19)
- Rivelatore a serie di diodi Agilent 1260 Infinity VL (G1315D con cella di flusso standard Bio-Inert, 10 mm)

### Software

ChemStation Agilent rev. B.04.03 (o superiore).

## Condizioni

Colonna:	Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm (codice PL1180-5301)
Fase mobile:	tampone fosfato salino (PBS), fosfato di sodio 50 mM contenente cloruro di sodio 150 mM, pH 7,4
Temperatura TCC:	ambiente
Volume di iniezione:	10 µL
Flusso:	0,8 mL/min
Rivelazione:	UV, 220 e 280 nm

## Reagenti, campioni e materiali

Il trastuzumab e l'anticorpo-farmaco coniugato (T-DM1) sono stati acquistati in una farmacia di zona e conservati secondo le istruzioni del produttore. Il PBS, l'acido cloridrico e l'idrossido di sodio sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich, Corp. Tutte le sostanze chimiche e i solventi sono di grado HPLC, mentre è stata utilizzata acqua altamente purificata proveniente da un sistema per la purificazione dell'acqua Milli-Q (Millipore Elix 10, USA).

## Linearità e intervallo

La curva di calibrazione è stata costruita con otto concentrazioni standard di trastuzumab e dell'ADC comprese tra 15,625 e 2000 µg/mL.

## Limite di quantificazione (LOQ) e limite di rivelazione (LOD)

Per le misure di LOD e LOQ sono stati utilizzati trastuzumab e l'ADC (T-DM1). Il valore di concentrazione della biomolecola che ha fornito un rapporto segnale-rumore (S/N) > 3 è stato assunto come LOD, mentre quello che ha fornito un S/N > 10 è stato assunto come LOQ.

## Procedura

È stata iniettata la fase mobile (10 µL) come bianco, seguita da individuali livelli di linearità in triplicato. Sono stati utilizzati l'area e il tempo di ritenzione (RT) di ogni livello per calcolare i valori di deviazione standard (SD) e deviazione standard relativa (RSD%). Sono stati determinati i valori di LOD e LOQ dalle iniezioni di livello di linearità più basso. È stato creato un grafico del valore medio dell'area di ciascun livello di linearità in funzione della concentrazione dell'analita allo scopo di determinare la curva di calibrazione per i monomeri.

## Preparazione degli aggregati di trastuzumab e di ADC

Gli aggregati di trastuzumab e di ADC sono stati preparati mediante diluizione dell'anticorpo monoclonale nella fase mobile sino a ottenere la concentrazione finale di 2 mg/mL. Lo stress da pH è stato prodotto con piccole variazioni rispetto a quanto altrove descritto [1]. In breve, è stato aggiunto lentamente, goccia a goccia, HCl 1 M alle soluzioni campione, in modo da portare il pH da 6,0 a 1,0. Quindi, è stato aggiunto NaOH 1 M per portare il pH al valore 10,0. Infine, è stato aggiunto nuovamente HCl 1 M per ripristinare il pH al valore 6,0, è stato osservato un tempo di attesa di circa 1 minuto tra una variazione di pH successiva, mantenendo un'agitazione costante a 500 giri/minuto. La soluzione risultante è stata tenuta in incubazione a 60 °C per 60 minuti.

## Risultati e discussione

### Separazione e rivelazione

Per la quantificazione mediante SEC di aggregazioni, monomeri, dimeri e aggregati superiori, è essenziale che la fase mobile non modifichi la composizione del campione. Poiché le condizioni ambientali possono modificare il livello di aggregazione, è importante che la separazione SEC possa essere effettuata in fasi mobili acquose in condizioni di pH neutro e con bassi livelli di sale. La figura 1 mostra l'eccellente separazione dell'anticorpo monoclonale terapeutico intatto trastuzumab ottenuta in 15 minuti mediante la colonna AdvanceBio SEC nelle condizioni cromatografiche utilizzate per le proteine, cioè in tampone fosfato salino con pH 7,4. Il picco è simmetrico ed è stato eluito con un tempo di ritenzione coerente con il peso molecolare di un anticorpo monoclonale, il che indica che la separazione è basata sulle dimensioni e non ci sono state interazioni secondarie. La figura 1 mostra anche un ingrandimento, che rivela la presenza di una piccola quantità di aggregato. L'assenza di picchi eluiti prima o dopo suggerisce che la preparazione di anticorpo monoclonale commercializzata era omogenea, senza alcun indizio di aggregazione o degradazione.

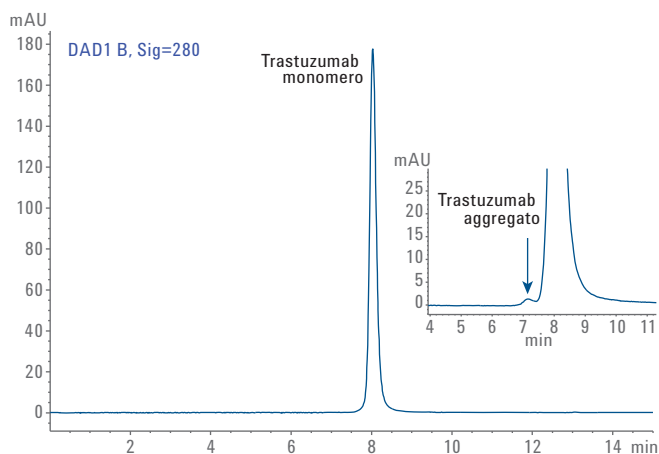


Figura 1. Profilo SEC di trastuzumab intatto (A) e ingrandimento di una regione del profilo che evidenzia aggregati di trastuzumab (B) ottenuti mediante una colonna Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

### SEC di ADC

I metodi più pubblicati per l'analisi SEC di ADC, eseguiti con colonne SEC commercializzate, utilizzando una fase acquosa, hanno dato per risultato picchi di forma scadente e una risoluzione incompleta dell'aggregato rispetto al coniugato monomero. Questo effetto è dovuto all'interazione non specifica tra il carico idrofobico e la fase stazionaria. Si è dimostrato che l'aggiunta di 2-propanolo al 15% controbilancia tale effetto [2]. Quando l'ADC T-DM1 è stato analizzato utilizzando la colonna AdvanceBio SEC con una fase mobile acquosa, il PBS ha prodotto picchi simmetrici e una migliore risoluzione del monomero rispetto all'aggregato, senza alcun indizio di interazione non specifica del farmaco idrofobico con la fase stazionaria (figura 2).

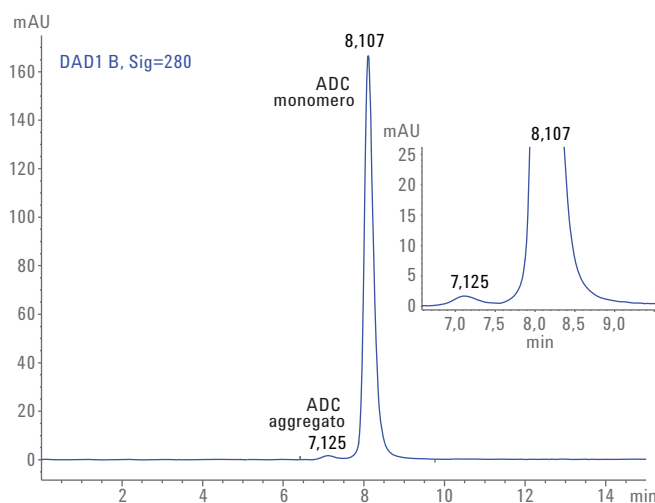


Figura 2. Profilo SEC di T-DM1 intatto (ADC) prodotto con una colonna Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm utilizzando PBS (pH 7,4) come fase mobile.

### Precisione dei valori di tempo di ritenzione e area

La tabella 1 riporta i valori di RSD medi per il tempo di ritenzione e l'area risultanti dall'analisi di 6 replicati di mAb trastuzumab e di ADC. I valori di RSD del tempo di ritenzione e dell'area del picco sono rispettivamente inferiori a 0,04% e 1%, il che dimostra l'elevatissima riproducibilità del metodo e quindi la precisione del sistema.

Tabella 1. Valori di precisione per il tempo di ritenzione e per l'area del picco (n=6).

Campione	Tempo di ritenzione		Area del picco	
	Media (min)	RSD	Media (mAU/min)	RSD
Trastuzumab innovatore	8,034	0	100	0
ADC	8,106	0,005	98,91	0,33

### Limite di rivelazione e limite di quantificazione

I valori di LOD e LOQ per il trastuzumab e l'ADC sono rispettivamente di 15 µg/mL e 31 µg/mL, il che dimostra che il metodo è sensibile. I valori di LOD e LOQ osservati per il trastuzumab e l'ADC sono riportati nella Tabella 2, mentre la sovrapposizione dei cromatogrammi LOD e LOQ con il bianco è illustrata nella figura 3.

Tabella 2. Risultati per LOD, LOQ e S/N (n=3).

Concentrazione (µg/mL)	S/N	Area media
<b>Trastuzumab</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

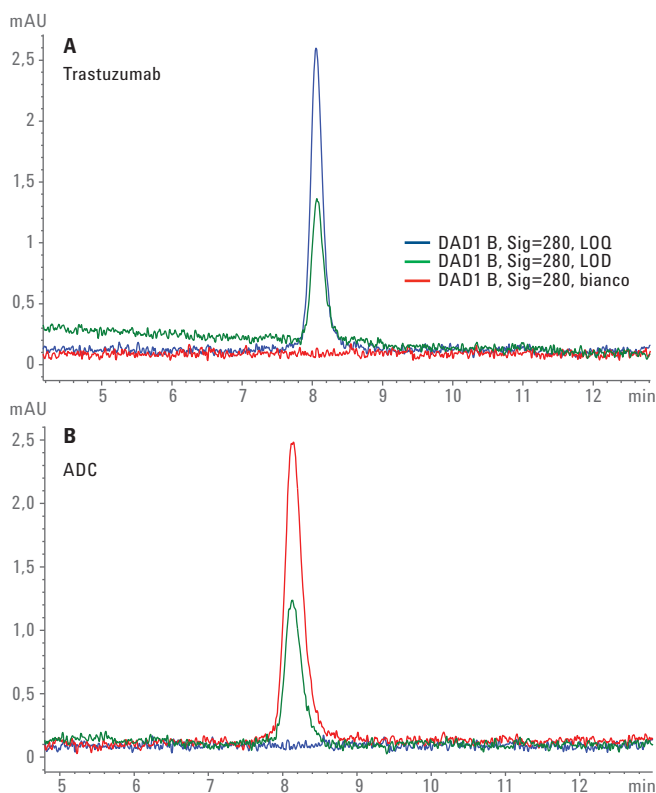


Figura 3. Cromatogrammi LOD e LOQ di trastuzumab e ADC sovrapposti al bianco.

### Linearità

Sono state costruite le curve di linearità per il trastuzumab e l'ADC nell'intervallo tra il livello LOQ e il più elevato livello di concentrazione dello studio, utilizzando la risposta in termini di area e la concentrazione del trastuzumab/ADC. I risultati di accuratezza sono riportati nella tabella 3. La curva di linearità per il trastuzumab/ADC nell'intervallo di concentrazione tra 12,5 e 2000 µg è riportata nella figura 4.

Tabella 3. Schema riassuntivo dell'intervallo di linearità (n=3) per trastuzumab e l'ADC.

Trastuzumab		ADC	
Concentrazione (µg/mL)	Area media	Concentrazione (µg/mL)	Area media
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

### Analisi dell'aggregazione/degradazione

Abbiamo confrontato mediante SEC il trastuzumab e l'ADC nelle condizioni originarie e in condizioni di stress, allo scopo di monitorare gli aggregati e i prodotti di degradazione. Qualsiasi picco dell'analisi cromatografica eluito prima della forma monomerica è stato considerato un aggregato, mentre qualsiasi picco eluito successivamente è stato considerato un prodotto di degradazione [3].

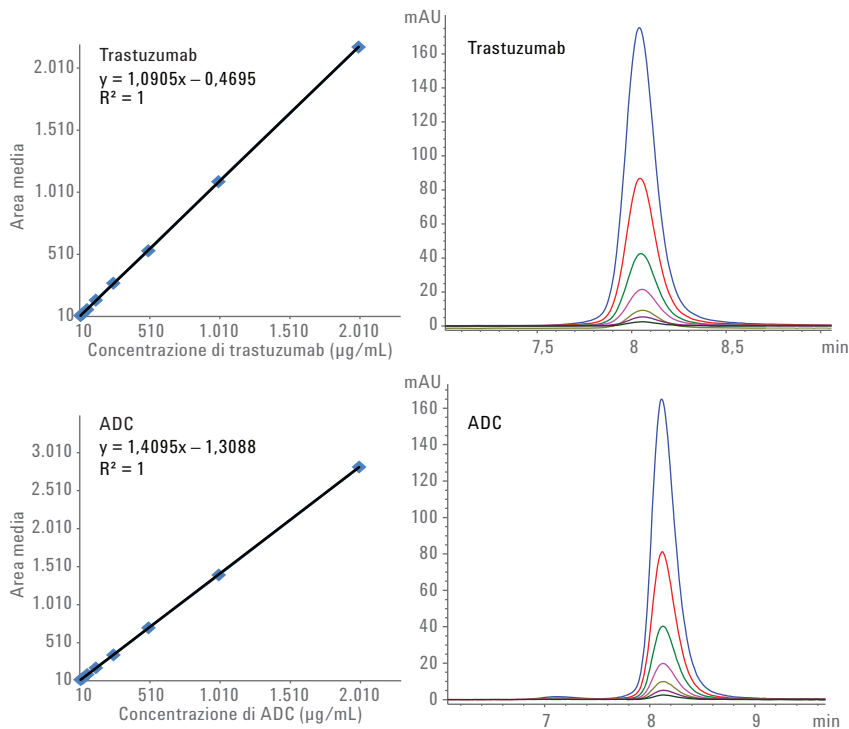


Figura 4. Curve di linearità con standard su otto concentrazioni, comprese tra 15,62 e 2000 µg/mL, di trastuzumab e dell'ADC: i valori dei coefficienti di linearità sono eccellenti. La figura mostra anche la sovrapposizione dei cromatogrammi per gli intervalli di linearità.

I cromatogrammi degli aggregati indotti dal calore/dal pH riportati nelle figure 5 e 6 mostrano che la colonna AdvanceBio SEC ha consentito di separare e rivelare sia gli aggregati che il trastuzumab e l'ADC degradati. Il campione intatto, gli aggregati e i prodotti di degradazione risultano chiaramente distinti gli uni dagli altri.

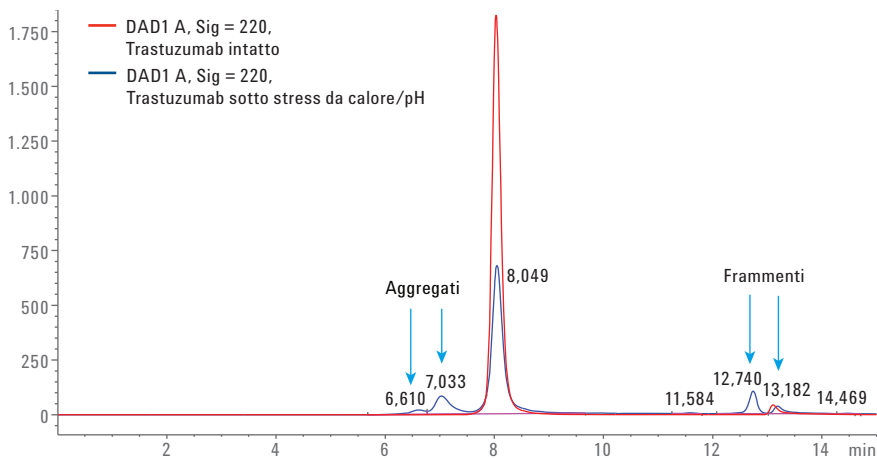


Figura 5. Cromatogramma di trastuzumab in condizioni originarie (controllo, traccia rossa) e cromatogramma di 2 mg/mL di trastuzumab sottoposto a stress da pH/da calore, realizzati utilizzando una colonna Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

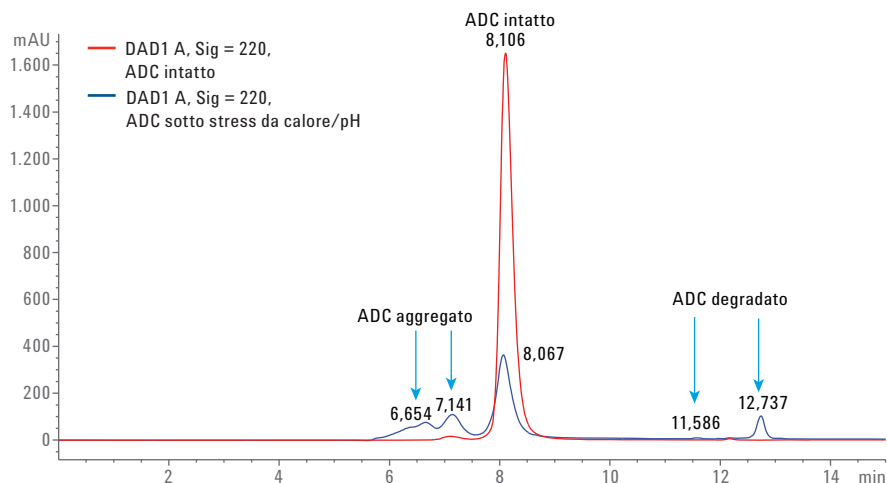


Figura 6. Cromatogramma di ADC in condizioni originarie (controllo, traccia rossa) e cromatogramma di 2 mg/mL di ADC sottoposto a stress da pH/da calore, realizzati utilizzando una colonna Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

### Determinazione dell'aggregazione e degradazione di trastuzumab e dell'ADC

La tabella 4 riporta la quantificazione relativa, sulla base della percentuale di area, degli aggregati e dei prodotti di degradazione nel trastuzumab e nell'ADC.

I dati mostrano chiaramente che si ha un aumento pronunciato dei livelli degli aggregati e della degradazione del trastuzumab e dell'ADC e una corrispondente diminuzione delle forme monomeriche, che scendono rispettivamente al 71% e al 54%. Benché questi risultati siano incoraggianti, occorre supportarli con dati relativi all'attività biologica per poter trarre conclusioni sulla perdita di potenza in relazione all'aggregazione/degradazione.

Tabella 4. Tempo di ritenzione e area del picco per monomeri, aggregati e frammenti di trastuzumab e dell'ADC.

Trastuzumab intatto		Trastuzumab sotto stress	
Tempo di ritenzione (min)	Area %	Tempo di ritenzione (min)	Area %
7,14	0,140	6,61	2,8
<b>8,034</b>	<b>96,8</b>	7,033	13,26
13,10	3,0	<b>8,03</b>	<b>71,83</b>
		12,74	7,65
		13,18	4,0
ADC intatto		ADC sotto stress	
7,115	2	6,654	19
<b>8,106</b>	<b>97,8</b>	7,141	17,8
		<b>8,06</b>	<b>54,92</b>
		11,58	0,2
		12,73	7,5
		14,46	0,2

## Conclusioni

Abbiamo illustrato diversi eccellenti strumenti per lo sviluppo di metodi e per il monitoraggio della purezza e stabilità dell'anticorpo monoclonale ad attività terapeutica trastuzumab/ADC T-DM1. Per prima cosa, abbiamo utilizzato la colonna AdvanceBio SEC per sviluppare un semplice metodo di separazione ad alta risoluzione per gli anticorpi monoclonali. In particolare, la colonna AdvanceBio SEC ha consentito di ottenere ottime prestazioni in termini di risoluzione dell'ADC idrofobico senza l'utilizzo di modificatori organici nella fase mobile. I valori di precisione del tempo di ritenzione e dell'area offerti dal metodo sono eccellenti e dimostrano la sua affidabilità. Le curve di linearità con otto concentrazioni standard, comprese tra 15 e 2000 µg/mL, di mAb e ADC, presentano eccellenti valori dei coefficienti di linearità, il che indica che il metodo è quantitativo e accurato. I valori di LOD e LOQ per mAb e ADC misurati sono rispettivamente di 15 µg/mL e 25 µg/mL, ciò dimostra che il metodo è sensibile. Inoltre, gli studi di stress per mAb e ADC dimostrano che la colonna AdvanceBio SEC ha permesso di separare, rivelare e quantificare aggregati e prodotti di degradazione con misure basate sulla percentuale dell'area. Grazie alla sua semplicità e riproducibilità, associate alle caratteristiche di bio-inerzia e resistenza alla corrosione del sistema LC quaternario Bio-Inert Agilent serie 1260 Infinity, questo metodo è indicato per l'analisi QA/QC di anticorpi monoclonali/ADC per l'industria biofarmaceutica.

## Bibliografia

1. Başak Kükreç, 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.

## Ulteriori informazioni

Questi dati rappresentano i risultati tipici. Per ulteriori informazioni sui nostri prodotti e servizi, visitare il nostro sito web all'indirizzo [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).

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

Agilent non può essere ritenuta responsabile per errori contenuti nella presente pubblicazione o per danni accidentali o consequenziali derivanti dalla fornitura, dalle prestazioni o dall'utilizzo del presente materiale.

Le informazioni, descrizioni e specifiche fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2015  
Stampato negli Stati Uniti  
16 ottobre 2015  
5991-6303ITE



**Agilent Technologies**