

Separación y cuantificación de agregados y fragmentos de rituximab mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de alta resolución

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

Nota de aplicación

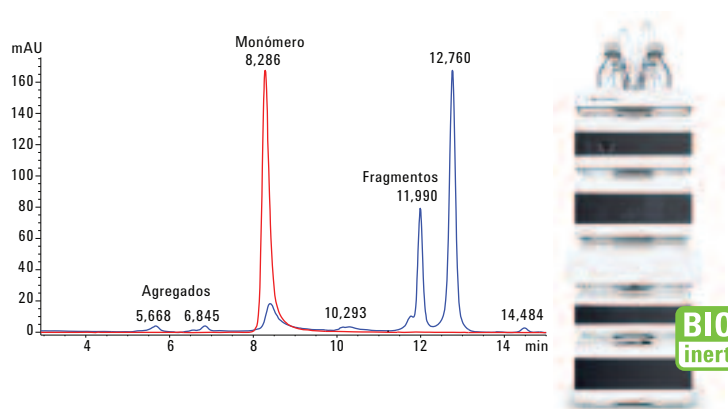
Productos biológicos y biosimilares

Autor

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

Resumen

La agregación de anticuerpos monoclonales puede producirse por varios mecanismos, incluidos factores asociados a los productos y medioambientales. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es un método normalizado de determinación y cuantificación de la agregación y las concentraciones de fragmentos en fármacos de anticuerpos monoclonales. El objeto de esta nota de aplicación es poner de manifiesto la separación de alta resolución y la cuantificación de rituximab original y biosimilar inalterado, así como de sus agregados y fragmentos, obtenidos en estudios en condiciones extremas. La separación y la cuantificación se realizaron con un sistema LC cuaternario bioinerte Agilent 1260 Infinity y una columna Agilent AdvanceBio SEC. Para la calibración de la columna se utilizaron marcadores de peso molecular. La columna AdvanceBio SEC consiguió una separación sensible y de alta resolución a la hora de monitorizar agregados y productos de degradación, y resulta idónea para aquellas aplicaciones en las que la alta resolución y la sensibilidad son fundamentales.



Agilent Technologies

Introducción

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es un método ampliamente utilizado para la separación de monómeros, formas de bajo peso molecular (BPM) y formas de alto peso molecular (APM) de fármacos de anticuerpos monoclonales. La SEC en condiciones naturales permite separar los monómeros y sus distintas formas en función del tamaño mediante difusión diferencial en los poros del material de relleno. Para conseguir desarrollar con éxito un fármaco de anticuerpos monoclonales es necesario evaluar la agregación y la fragmentación en estudios en condiciones extremas, en los que se examinan las rutas de degradación físicas y químicas. El tamaño es un parámetro importante para el desarrollo de productos bioterapéuticos, dado que los agregados juegan un papel importante en lo que respecta a la mejora de la inmunogenicidad y afectan a la seguridad y la eficacia. Un desafío importante es identificar un método de SEC que permita separar y monitorizar dichas formas. En esta nota de aplicación mostraremos las ventajas de un método de este tipo, consistente en el uso de una columna Agilent AdvanceBio SEC, una tecnología verdaderamente innovadora para el análisis mediante SEC. Esta columna, gracias a sus exclusivas partículas de sílice de 2,7 μm y a su fase de enlace, consigue una separación de alta resolución de los anticuerpos monoclonales y de sus formas de distintas masas. La precisión del tiempo de retención y del área de pico de este método son excelentes, lo que demuestra la idoneidad de la columna y el sistema LC bioinerte utilizados.

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 termostatizado 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 rituximab original y biosimilar, cetuximab, trastuzumab y un conjugado anticuerpo-fármaco 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 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.).

Calibración de la columna AdvanceBio SEC

La columna AdvanceBio SEC se calibró mediante la medida de los volúmenes de elución de varios patrones: agregados de proteínas, tiroglobulina (670 kDa), γ -globulina (158 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), mioglobina (17 kDa) y vitamina B12 (1,35 kDa). Los valores logarítmicos del peso molecular de los patrones se representaron frente al volumen de elución para determinar el peso molecular equivalente de la muestra.

Procedimiento

Se inyectó fase móvil (10 μl) como blanco; a continuación, se inyectaron seis réplicas de anticuerpos monoclonales inalterados y en condiciones extremas para calcular la desviación del área de pico y el tiempo de retención (TR).

Preparación de agregados de rituximab

Los agregados de anticuerpos monoclonales se prepararon mediante la dilución de anticuerpos monoclonales 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 calibrar la columna AdvanceBio SEC 300 Å se utilizó una serie de patrones de proteínas de peso molecular conocido (consulte la figura 1). Se utilizaron agregados de proteínas estándar (pico no retenido) del patrón de proteínas para calcular el volumen muerto; la elución se produjo a los 5,748 minutos en la columna, lo que equivale a un valor de $V_0 = 4,59$ (ml). La curva de calibración de las proteínas separadas en la columna muestra una relación lineal y define el límite de exclusión (670 kDa) para el rango de proteínas analizado (entre 1,3 y 670 kDa; véase la figura 2). En consecuencia, el peso molecular de una proteína desconocida puede determinarse a partir del volumen de elución con dicha curva.

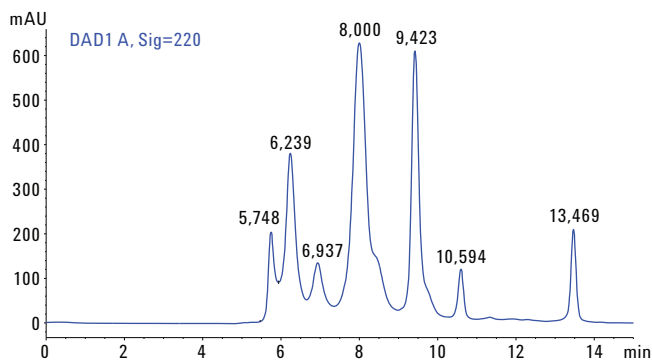


Figura 1. Separación de patrones de proteínas con la columna Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 μm.

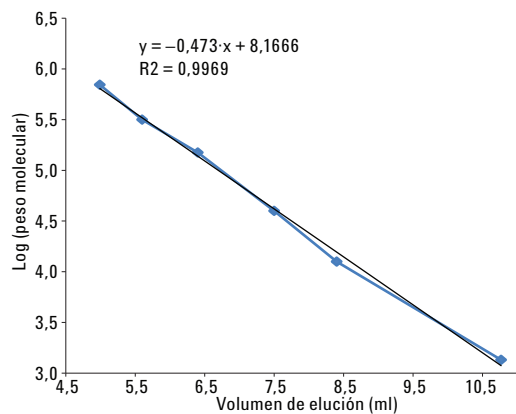


Figura 2. Curva de calibración obtenida con patrones para la columna Agilent AdvanceBio SEC-3 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 μm.

En la figura 3 se puede observar la excelente separación de anticuerpos monoclonales inalterados en ocho minutos con la columna AdvanceBio SEC 300 Å. La ausencia de picos de elución anteriores o posteriores sugiere que las preparaciones comerciales de anticuerpos monoclonales eran homogéneas, sin que existan signos de agregación o degradación.

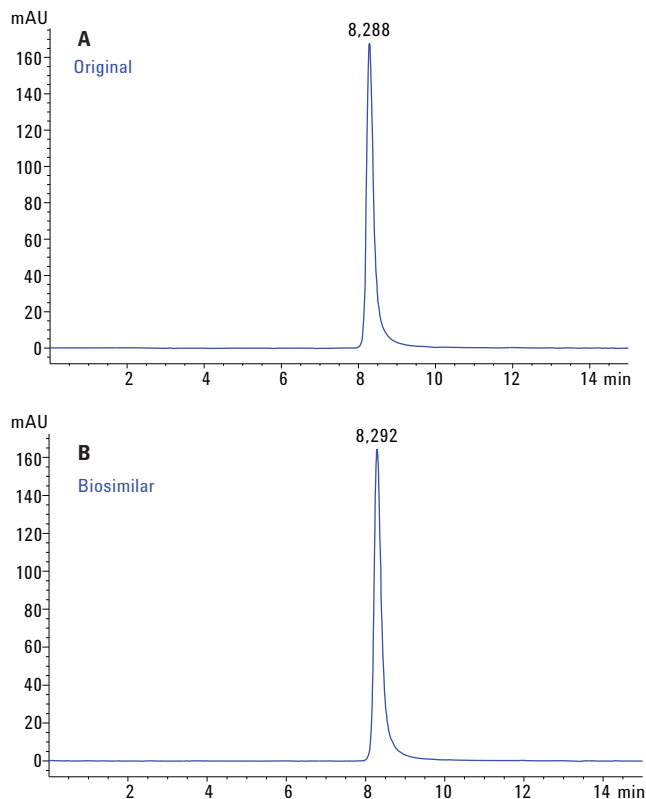


Figura 3. Perfil SEC de un fármaco de anticuerpos monoclonales inalterados obtenido con una columna Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 μm: A = rituximab original; B = rituximab biosimilar.

En la figura 4 se pueden ver las curvas superpuestas del rituximab biosimilar y original, en las que se observa un pico agudo y simétrico sin interacciones no específicas. En la tabla 1 se incluyen los tiempos de retención medios, el área de pico y las DER correspondientes de seis réplicas de anticuerpos monoclonales inalterados. Las DER del tiempo de retención y del área de pico fueron inferiores a 0,04 y 1 %, respectivamente, lo que demuestra la excelente reproducibilidad del método y, por tanto, la precisión del sistema. Los tiempos de retención del rituximab biosimilar y original fueron similares. Asimismo, la pureza expresada en forma de área porcentual fue > 99 % tanto para el rituximab original como para el biosimilar, lo que indica que ambos eran muy parecidos.

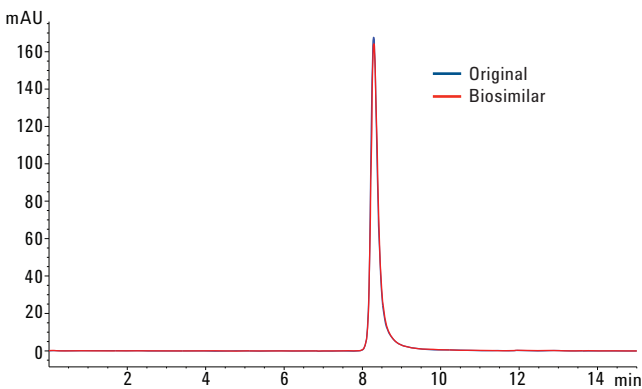


Figura 4. Superposición de las curvas de rituximab original y biosimilar correspondientes a las separaciones realizadas en la columna Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

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

Muestra	Tiempo de retención		Área de pico	
	Media (min)	DER	Media (mAU/min)	DER
Rituximab original	8,28	0,04	99,33	1,21
Rituximab biosimilar	8,29	0	100	0

Análisis de la agregación o degradación y cuantificación

Comparamos mediante SEC los anticuerpos monoclonales biosimilares y originales inalterados y en condiciones 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 agregados, y los que eluyeron después, productos de degradación [2].

En la figura 5 se muestran los perfiles SEC del rituximab original y biosimilar en condiciones extremas de pH y calor. Dichos perfiles indican que la columna AdvanceBio SEC, con exactamente el mismo método de análisis, separó y detectó los anticuerpos monoclonales agregados y degradados. La cuantificación relativa de los agregados y los fragmentos del producto original y el producto biosimilar, expresada en forma de área porcentual, se resume en la tabla 2.

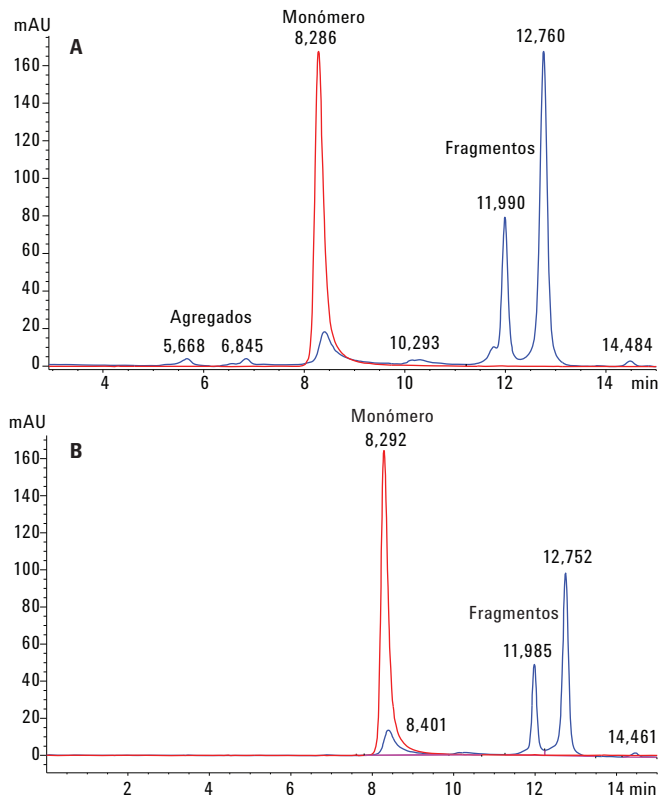


Figura 5. Cromatograma obtenido con la columna Agilent AdvanceBio SEC para: (A) el rituximab original inalterado (curva roja), superpuesto con el correspondiente a la muestra en condiciones extremas de pH o calor (curva azul); y (B) el rituximab biosimilar inalterado (curva roja), superpuesto con el correspondiente a la muestra en condiciones extremas (curva azul).

Tabla 2. Áreas relativas porcentuales del rituximab original y biosimilar, inalterados y en condiciones extremas.

Original inalterado		Original en condiciones extremas	
Tiempo	Área (%)	Tiempo	Área (%)
8,288 (monómero)	100	1,289	4,24
		5,668	2,26
		6,845	2
		8,40 (monómero)	13,6
		10,29	2,81
		11,99	23,22
		12,76	51,01
		14,48	1,11
Biosimilar inalterado		Biosimilar en condiciones extremas	
Tiempo	Área (%)	Tiempo	Área (%)
8,292 (monómero)	100	8,40 (monómero)	16,832
		11,985	24,24
		12,75	57,36
		14,46	1,5

Un aspecto interesante que cabe señalar es que las áreas de pico relativas de las especies agregadas de anticuerpo monoclonal original aumentaron en condiciones extremas, en comparación con el producto biosimilar. Sin embargo, el patrón de fragmentación y las áreas de pico de los fragmentos de ambos anticuerpos monoclonales fueron muy similares. La forma monomérica del producto original y del producto biosimilar, tras someter estos a condiciones extremas, tuvo un valor del 13 y el 16 %, respectivamente; por otra parte, la forma predominante de ambos anticuerpos monoclonales fueron los fragmentos que eluyeron alrededor de los 12,75 minutos, con una proporción superior al 50 %.

Por último, para determinar la capacidad de la columna AdvanceBio SEC de analizar anticuerpos monoclonales y conjugados anticuerpo-fármaco comerciales con pequeñas diferencias de peso molecular, se realizaron análisis de una sola inyección de las muestras. En la figura 6 se muestran las curvas superpuestas. La columna AdvanceBio SEC separó los fármacos de anticuerpos monoclonales y los conjugados anticuerpo-fármaco en función de su peso molecular, ya que pueden observarse diferencias claras en los tiempos de retención, lo que demuestra la idoneidad de esta columna para el análisis de estas moléculas.

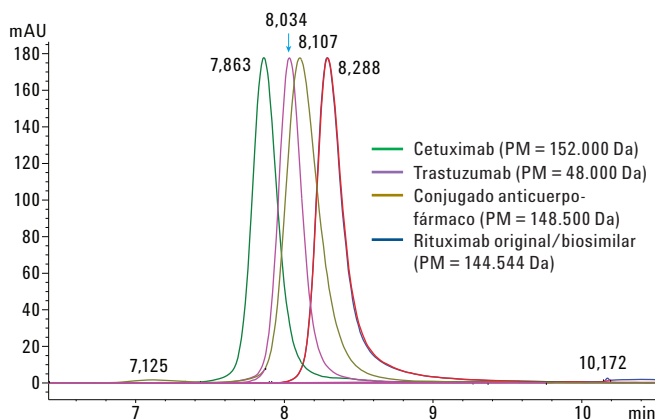


Figura 6. Superposición de las curvas de rituximab original y biosimilar, trastuzumab, cetuximab y conjugado anticuerpo-fármaco, correspondientes a las separaciones realizadas con una columna Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

Conclusiones

El proceso de desarrollo de fármacos de anticuerpos monoclonales es complejo y conlleva numerosas caracterizaciones fisicoquímicas para determinar su pureza, su agregación y otras variables asociadas al producto. La cromatografía de exclusión por tamaño es un método ampliamente utilizado para la monitorización y la cuantificación de monómeros, especies de BPM y especies de APM en condiciones naturales. En este estudio, se utilizó la columna Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm para desarrollar un método sencillo de separación en condiciones naturales de muestras de rituximab inalterado y en condiciones extremas. Este método optimizado permitió detectar el monómero como un pico simétrico sencillo con un nivel de pureza del 100 % y sin signos de agregados o fragmentos. Además, este mismo método sirvió para analizar y cuantificar agregados y fragmentos obtenidos en estudios en condiciones extremas. Esto solo resulta posible con una columna como la AdvanceBio SEC, capaz de ofrecer una separación de alta resolución y sensibilidad de anticuerpos monoclonales y sus diversas formas de distintos pesos moleculares. Además, el sistema LC cuaternario bioinerte Agilent 1260 Infinity ofrece seguridad en cuanto a las condiciones bioinertes y la resistencia a la corrosión.

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. 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
5991-6304ES



Agilent Technologies