

# Séparez et quantifiez les agrégats et les fragments de Rituximab par chromatographie d'exclusion stérique haute résolution

Système de LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity et colonne de chromatographie d'exclusion stérique AdvanceBio 300 Å, 2,7 µm

## Note d'application

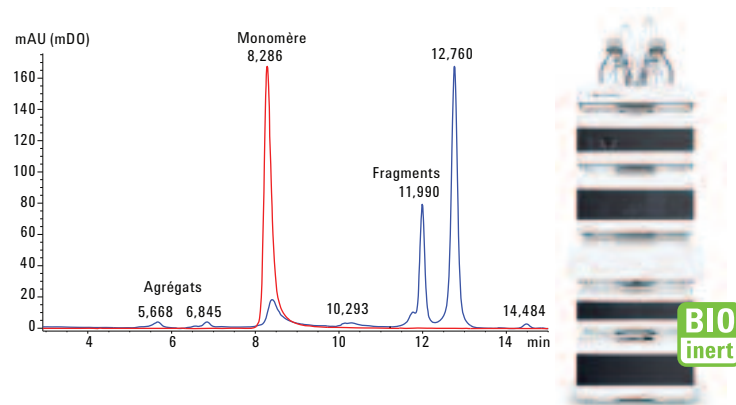
Produits biologiques et biosimilaires

### Auteur

M.Sundaram Palaniswamy  
Agilent Technologies Pvt Ltd  
Bangalore, Inde

### Extrait

L'agrégation d'anticorps monoclonaux peut être due à plusieurs mécanismes, dont des facteurs liés au produit ou à l'environnement. La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est une méthode standard permettant de déterminer et de quantifier le degré d'agrégation et la quantité de fragments d'anticorps monoclonaux thérapeutiques. Le but de cette note d'application est de présenter la séparation haute résolution et la quantification de rituximab princeps et biosimilaire intacts, agrégés ou fragmentés obtenus à partir d'études de stress. La séparation et la quantification ont été effectuées avec le système LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity et une colonne SEC Agilent AdvanceBio. L'étalonnage de la colonne a été effectué à l'aide de marqueurs de masse moléculaire. La colonne SEC AdvanceBio a permis une séparation sensible haute résolution pour la détection d'agrégats/de produits de dégradation, et se révèle idéale pour les applications exigeant sensibilité et haute résolution.



Agilent Technologies

## Introduction

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est une méthode largement reconnue pour séparer les monomères et les variants de faible masse moléculaire (LMW) et de haute masse moléculaire (HMW) d'anticorps monoclonaux thérapeutiques. Dans des conditions natives, la chromatographie d'exclusion stérique sépare les monomères et leurs variants en fonction de la taille par diffusion différentielle dans les pores du matériau de remplissage. La réussite du développement d'agents pharmaceutiques à base d'anticorps monoclonaux nécessite également l'évaluation de l'agrégation et de la fragmentation résultant d'études de dégradation forcée, comprenant des mécanismes de dégradation physiques et chimiques. La taille est importante dans le développement d'agents biothérapeutiques dans la mesure où les agrégats ont été impliqués dans l'augmentation de l'immunogénicité, ce qui affecte la sécurité et l'efficacité. L'identification d'une méthode SEC capable de séparer et détecter ces variants représente un défi majeur. Ici, nous montrons les avantages d'une telle méthode faisant appel à une colonne SEC Agilent AdvanceBio, qui représente une technologie de rupture pour l'analyse SEC. La phase utilisée pour cette colonne est composée de particules de silice uniques de 2,7 µm avec une chimie de greffage permettant d'obtenir une séparation haute résolution des anticorps monoclonaux et de leurs variants. Le temps de rétention et la précision des surfaces obtenus sont excellents et montrent l'adéquation de la colonne et du système de LC bio-inerte utilisés.

## Équipement et méthodes

### Instrument

Nous utilisons un système de LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity entièrement biocompatible avec une pression maximale de 600 bars, comprenant les modules suivants :

- Pompe pour système de LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity (G5611A)
- Échantillonneur automatique bio-inerte à haute performance Agilent 1260 Infinity (G5667A)
- Thermostat pour la série Agilent 1200 Infinity (G1330B)
- Compartiment à colonne thermostaté Agilent 1260 Infinity (TCC) contenant des éléments de chauffage bio-inertes à clipser (G1316C, option 19)
- Agilent 1260 Infinity DAD VL (G1315D avec cellule standard bio-inerte, 10 mm)

### Logiciel

Agilent ChemStation Version B.04.03 (ou plus récente).

### Conditions opératoires

Colonne :	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm (Réf. PL1180-5301)
Phase mobile :	Solution saline et tampons de phosphate (PBS), phosphate de sodium à 50 mM contenant du chlorure de sodium à 150 mM, pH 7,4
Température du TCC :	ambiante
Volume d'injection :	10 µL
Débit :	0,8 mL/min
Détection :	UV, 220 et 280 nm

### Réactifs, échantillons et matériel

Les produits princeps et biosimilaires de rituximab, cétuximab, trastuzumab, et CAM sont achetés dans une pharmacie locale et conservés conformément aux instructions du fabricant. Le PBS, l'acide chlorhydrique, et l'hydroxyde de sodium sont achetés chez Sigma-Aldrich, Corp. Tous les produits chimiques et les solvants sont de grade HPLC et l'eau hautement purifiée utilisée provient d'un système de purification de l'eau Milli-Q (Millipore Elix 10, USA).

### Étalonnage de la colonne SEC AdvanceBio

La colonne SEC AdvanceBio est étalonnée en mesurant les volumes d'élution de plusieurs étalons (agrégats de protéines, tryglobuline (670 kDa), γ-globuline (158 kDa), ovalbumine (44 kDa), myoglobine (17 kDa) et vitamine B12 (1,35 kDa)). Le log des valeurs de masse moléculaire des étalons est tracé par rapport au volume d'élution afin de déterminer la masse moléculaire équivalente de l'échantillon.

### Procédure

Pour calculer la surface et l'écart de temps de rétention (TR) un blanc de 10 µL de phase mobile est injecté, suivi de six répliques d'AcM intacts et stressés.

### Préparation des agrégats de rituximab

Les agrégats d'AcM sont préparés en diluant l'anticorps monoclonal dans la phase mobile pour obtenir une concentration finale de 2 mg/mL. Le test de stress par le pH est effectué comme décrit précédemment avec une légère modification [1]. Brièvement, 1 M d'HCl est ajouté lentement, goutte à goutte, aux solutions d'échantillon pour faire passer le pH de 6,0 à 1,0. Ensuite, 1 M de NaOH est ajouté pour ajuster le pH à 10,0. Enfin, 1 M d'HCl est ajouté de nouveau pour rétablir le pH à 6,0. Le délai entre les changements de pH est d'environ une minute en remuant constamment à 500 t/min. La solution obtenue est incubée à 60 °C pendant 60 minutes.

## Résultats et discussion

### Séparation et détection

La colonne SEC AdvanceBio 300 Å a été étalonnée avec une série de protéines standards de masse moléculaire connue (Figure 1). Des agrégats de protéines standards (pic non retenu) dans le marqueur de protéines ont été utilisés pour calculer le volume mort, élution à 5,748 minutes, ce qui correspond à  $V_0 = 4,59$  (mL). La courbe d'étalonnage pour les protéines séparées sur la colonne montre une relation linéaire et définit la limite d'exclusion (670 k Da) pour l'éventail de protéines (1,3 à 670 kDa) analysées (Figure 2). En utilisant cette courbe, la masse moléculaire d'une protéine inconnue peut être déduite de son volume d'élution.

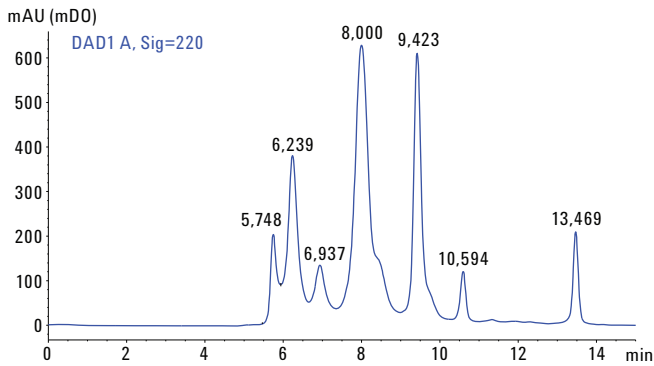


Figure 1. Séparation d'étalons de protéines sur colonne SEC Agilent AdvanceBio, 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

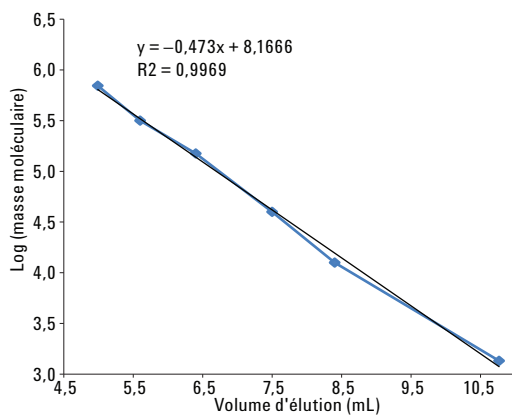


Figure 2. Courbe d'étalonnage pour étalons de protéines sur colonne SEC-3 Agilent AdvanceBio, 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

La figure 3 montre qu'une excellente séparation d'AcM intacts est obtenue en huit minutes sur une colonne SEC AdvanceBio 300 Å. L'absence de pics éluant de manière précoce ou tardive suggère que les préparations commerciales d'AcM étaient homogènes et ne présentaient pas d'agrégation ou de dégradation.

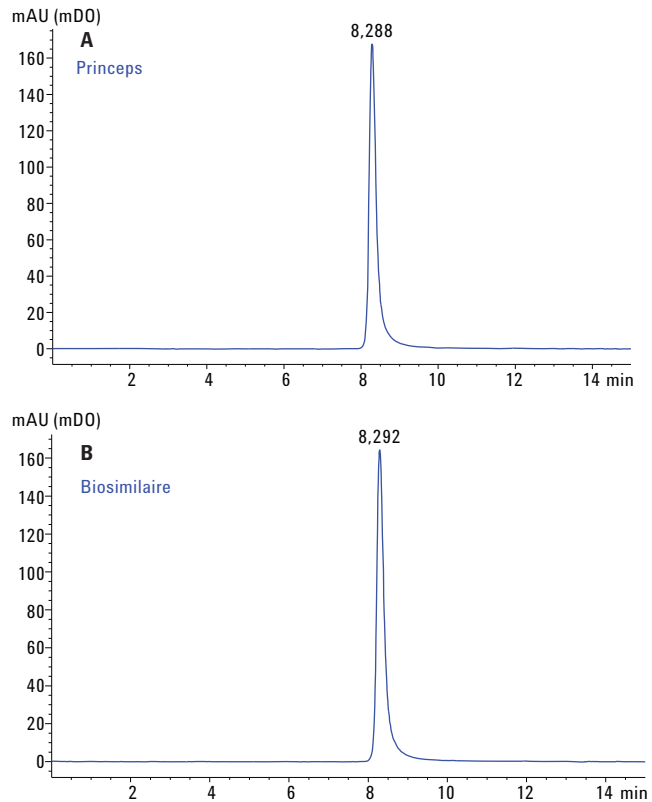


Figure 3. Profil SEC d'anticorps monoclonaux thérapeutiques intacts sur colonne SEC Agilent AdvanceBio, 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm. A : rituximab princeps ; B : rituximab biosimilaire.

La figure 4 montre les superpositions de rituximab biosimilaire et princeps, avec un pic symétrique et net, sans interactions non spécifiques. Le tableau 1 illustre les temps de rétention moyens ainsi que les RSDs de six répliques d'AcM intacts. Le temps de rétention et les RSDs des surfaces des pics étaient inférieurs à 0,04 et 1 %, respectivement, ce qui montre l'excellente reproductibilité de la méthode et par conséquent, la précision du système. Les TR du biosimilaire et du princeps étaient comparables. En outre, la pureté selon le pourcentage de surface était > 99 % pour le princeps et le biosimilaire, ce qui indique qu'ils sont extrêmement semblables.

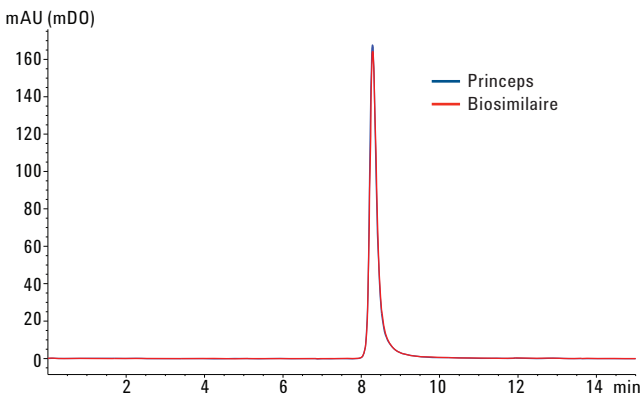


Figure 4. Superposition de rituximab princeps et rituximab biosimilaire séparés sur colonne SEC Agilent AdvanceBio, 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

Tableau 1. Temps de rétention et précision des surfaces des pics pour le rituximab (n=6).

Échantillon	Temps de rétention		Surface de pic	
	Moyenne (min)	RSD	Moyenne (mAU/min)	RSD
Rituximab - médicament original	8,28	0,04	99,33	1,21
Rituximab biosimilaire	8,29	0	100	0

## Analyse et quantification de l'agrégation/la dégradation

Nous avons comparé l'AcM biosimilaire et l'AcM princeps intacts et stressés par chromatographie d'exclusion stérique afin de détecter les agrégats et les produits de dégradation. Tout les pics élués avant la forme monomérique étaient considérés comme un agrégat et ceux élués après comme un produit de dégradation [2].

La figure 5 montre les profils SEC de rituximab princeps et biosimilaire stressés par le pH/la chaleur. Les profils indiquent que la colonne SEC AdvanceBio, avec la même méthode d'analyse que pour la forme intacte, séparait et détectait les agrégats et les AcM dégradés. Sur la base du pourcentage de surface, la quantification relative d'agrégats et de fragments de princeps et de biosimilaire est résumée dans le tableau 2.

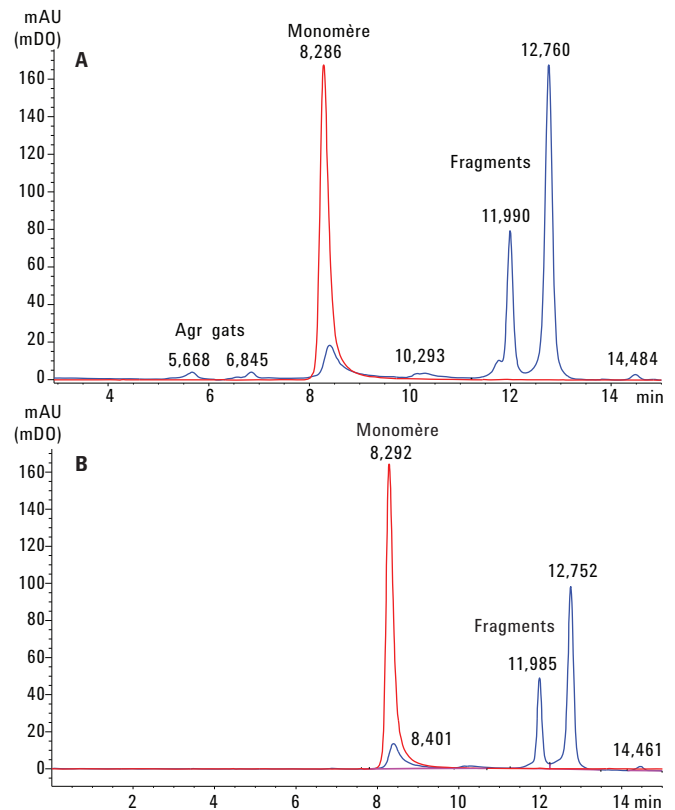


Figure 5. Chromatogramme SEC Agilent AdvanceBio de (A) rituximab princeps intact (tracé rouge) superposé à l'échantillon stressé par le pH/la chaleur (tracé bleu) et (B) rituximab biosimilaire intact (tracé rouge) superposé à l'échantillon stressé (tracé bleu).

Tableau 2. Pourcentage relatif de la surface pour le rituximab princeps et le rituximab biosimilaire intacts et stressés.

Princeps intact		Princeps stressé	
Temps	% surface	Temps	% surface
8,288 (monomère)	100	1,289	4,24
		5,668	2,26
		6,845	2
		8,40 (monomère)	13,6
		10,29	2,81
		11,99	23,22
		12,76	51,01
		14,48	1,11
Biosimilaire intact		Biosimilaire stressé	
Temps	% surface	Temps	% surface
8,292 (monomère)	100	8,40 (monomère)	16,832
		11,985	24,24
		12,75	57,36
		14,46	1,5

Il est intéressant de noter que les surfaces des pics relatives des espèces agrégées d'AcM princeps ont augmenté avec le stress par rapport au biosimilaire. Cependant, le profil de fragmentation et les surfaces des pics des fragments des deux AcM étaient hautement comparables. La forme monomérique du princeps et du biosimilaire suite au stress correspondait à 13 et 16 %, alors que la forme prédominante dans les deux AcM était des fragments éluant à environ 12,75 minutes, ce qui correspondait à plus de 50 %.

Enfin, pour déterminer la capacité de la colonne SEC AdvanceBio à séparer des anticorps monoclonaux et des CAM commerciaux de masse moléculaire proche, une analyse a été effectuée avec une seule injection d'échantillons. La figure 6 montre la superposition. La colonne SEC AdvanceBio a séparé les AcM thérapeutiques et les CAM selon leur masse moléculaire, car nous pouvons observer des différences notoires de temps de rétention, ce qui montre l'adéquation de cette colonne pour l'analyse de ces molécules.

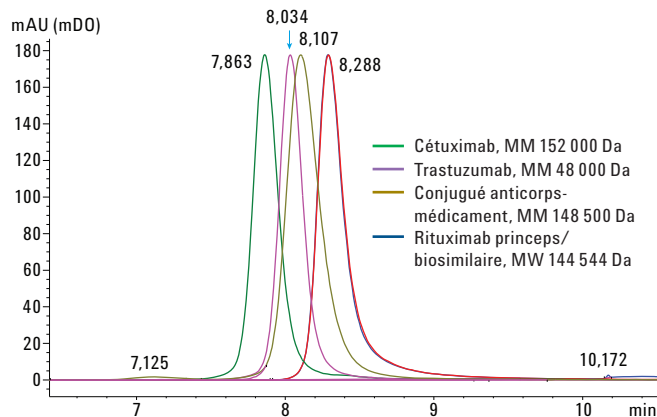


Figure 6. Superposition de rituximab princeps/biosimilaire, trastuzumab, cétuximab et CAM séparés sur colonne SEC Agilent AdvanceBio, 300Å, 7,8 × 300mm, 2,7 µm.

## Conclusions

Le processus de développement de produits à base d'AcM est complexe et comprend de très nombreuses caractérisations physicochimiques pour établir la pureté, le degré d'agrégation et la présence de variants liés au produit. La chromatographie d'exclusion stérique a été largement utilisée pour détecter et quantifier le monomère ainsi que les espèces de faible et haute masse moléculaire dans des conditions natives. Dans cette étude, la colonne SEC Agilent AdvanceBio 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm a été utilisée pour développer une méthode simple de séparation d'échantillons de rituximab intact et stressé, dans des conditions natives. La méthode optimisée a permis une séparation du monomère sous forme d'un seul pic symétrique d'un niveau de pureté de 100 %, sans signe de présence d'agrégats ou de fragments. La même méthode a permis de séparer et quantifier des agrégats et des fragments obtenus lors d'études de stress. Ceci n'est possible qu'avec une colonne telle que la colonne SEC AdvanceBio capable d'offrir une haute résolution et une séparation sensible des AcM et leurs variants de masse. En outre, le système de LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity offre une certitude en termes de bio-inertie et de résistance à la corrosion.

## Références

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. In *Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development*; Rodriguez-Diaz, R., Wehr, T., Tuck, S., Eds.; CRC Press: New York, **2005**.

## Pour plus d'informations

Ces données représentent des résultats types. Pour plus d'informations sur nos produits et services, consultez notre site Internet sur [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).

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

Agilent décline toute responsabilité en cas d'erreurs dans le présent document, ainsi qu'en cas de dommages fortuits ou consécutifs à la fourniture, aux performances ou à l'utilisation de ce matériel.

Les informations, descriptions et spécifications de cette publication peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc., 2015  
Imprimé aux États-Unis, le 16 octobre 2015  
5991-6304FR



**Agilent Technologies**