



Quantification d'agrégats d'anticorps monoclonaux et de conjugués anticorps-médicaments par chromatographie d'exclusion stérique avec une phase mobile aqueuse

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

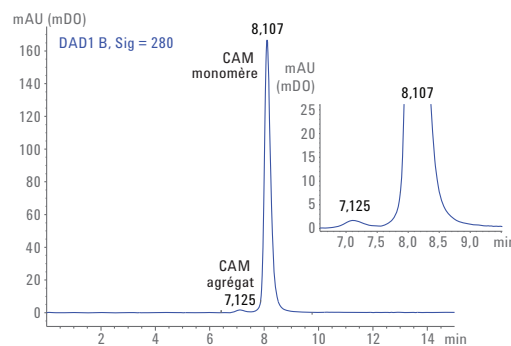
Auteur

M.Sundaram Palaniswamy
Agilent Technologies Pvt Ltd
Bangalore, Inde

Extrait

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est un outil puissant pour la surveillance des monomères, dimères, agrégats et autres possibles produits de dégradation dans des échantillons de protéines biothérapeutiques, notamment des anticorps monoclonaux (AcM) et leurs dérivés. Comme l'agrégation est un critère de qualité crucial, ladite quantification est nécessaire.

Cette note d'application décrit une méthode simple et sensible pour la quantification d'agrégats d'AcM biothérapeutiques et de conjugués d'anticorps-médicaments (CAM) à l'aide d'une colonne de chromatographie d'exclusion stérique Agilent AdvanceBio 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm et d'un LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity. La méthode fait appel à la même phase mobile aqueuse, sans ajout d'agent modificateur organique, pour l'analyse des AcM et des CAM plus hydrophobes. La méthode optimisée permet également de surveiller les agrégats et les produits de dégradation créés par un stress thermique lié au pH. Cette méthode simple et reproductible, ajoutée à la résistance à la corrosion de l'instrument, est appropriée pour une analyse AQ/CQ de routine des AcM et des CAM destinés à l'industrie biopharmaceutique.



Agilent Technologies

Introduction

Les protéines thérapeutiques sont soumises aux phénomènes d'agrégation et de dégradation pendant l'ensemble des stades de développement, tels que l'expression, le repliement, le traitement en aval, la formulation, la stérilisation et le stockage. De plus, la fixation de la charge utile hydrophobe permettant de former le CAM devrait également favoriser l'agrégation due à l'hydrophobicité. Bien que les agrégats et produits de dégradation ne sont présents qu'à de faibles concentrations, ils peuvent avoir de grandes conséquences sur la qualité des produits biologiques, menant à une perte d'activité, à une diminution de la solubilité et à une augmentation de l'immunogénicité. La chromatographie d'exclusion stérique représente la méthode standard utilisée pour caractériser l'agrégation protéique. Nous présentons ici les avantages de la colonne de chromatographie d'exclusion stérique Agilent AdvanceBio 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm pour la séparation, la quantification et la surveillance de l'intégrité d'un AcM thérapeutique et d'un CAM. Les colonnes de chromatographie d'exclusion stérique AdvanceBio représentent une percée technologique pour l'analyse par chromatographie d'exclusion stérique. Ces colonnes sont conçues et fabriquées par Agilent et grâce à l'utilisation de particules de silice innovantes et à une chimie de greffage unique on obtient une résolution et des séparations granulométriques sur une large gamme de types d'échantillons, sans avoir besoin d'ajouter d'agent modificateur organique à la phase mobile. L'analyse des anticorps AcM et des CAM plus hydrophobes fait appel à la même phase mobile aqueuse.

Équipement et méthodes

Instrument

Nous utilisons un système de LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity complètement biocompatible avec une pression maximale de 600 bars, composé des 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 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

Le trastuzumab et le conjugué anticorps-médicament (T-DM1) ont été achetés auprès d'une pharmacie de quartier et stockés conformément aux instructions du fabricant. La solution PBS, l'acide chlorhydrique et l'hydroxyde de sodium ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich, Corp. L'ensemble des produits chimiques et des solvants sont de qualité HPLC, et de l'eau hautement purifiée provient d'un système de purification d'eau Milli-Q (Millipore Elix 10, États-Unis).

Linéarité et plage de détection

La courbe d'étalonnage est établie à l'aide de huit concentrations standards de trastuzumab et de CAM allant de 15,625 à 2 000 µg/mL.

Limite de quantification (LQ) et limite de détection (LD)

Le trastuzumab et le CAM (T-DM1) sont utilisés pour les mesures de limite de détection et de limite de quantification. La concentration en biomolécules qui permet d'obtenir un rapport signal sur bruit (S/N) > 3 est considérée comme limite de détection et celle qui permet d'obtenir un S/N > 10 est considérée comme limite de quantification.

Procédure

La phase mobile (10 µL) est injectée pour servir de blanc, suivie de niveaux individuels de linéarité en triplicat. L'aire et le temps de rétention (RT) de chaque niveau sont utilisés pour calculer les valeurs de SD et de RSD en %. Les limites de détection et de quantification sont établies à partir des injections de niveau de linéarité le plus faible. L'aire moyenne pour chaque niveau de linéarité est tracée en fonction de la concentration en analyte afin de déterminer la courbe d'étalonnage pour les monomères.

Préparation d'agrégats de trastuzumab et de CAM

Les agrégats de trastuzumab et de CAM sont préparés en diluant un AcM dans une phase mobile jusqu'à obtenir une concentration finale de 2 mg/mL. Le mélange obtenu est soumis à un stress lié au pH tel que décrit dans la littérature avec une légère modification [1]. Brièvement, 1 M d'HCl est ajouté lentement goutte à goutte dans les solutions d'échantillons pour modifier 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, tout en agitant constamment à 500 tpm. La solution ainsi obtenue est incubée à 60 °C pendant 60 min.

Résultats et discussion

Séparation et détection

Pour la quantification par chromatographie d'exclusion stérique de l'agrégation de monomères, dimères et autres agrégats supérieurs, il est indispensable que la phase mobile n'affecte pas la composition de l'échantillon. Comme les conditions environnementales peuvent modifier le niveau d'agrégation, il est important que la séparation SEC puisse être accomplie dans des phases mobiles aqueuses à pH neutre et avec de faibles niveaux de sel. La figure 1 illustre l'excellente séparation de l'AcM thérapeutique trastuzumab intact en 15 minutes à l'aide de la colonne SEC AdvanceBio dans les conditions chromatographiques fréquemment utilisées pour les protéines, à savoir une solution saline et tampons de phosphate à pH 7,4. L'éluion de l'AcM permet d'obtenir un pic symétrique observé à un temps de rétention en accord avec la masse moléculaire de l'AcM, indiquant que la séparation est basée sur la taille, et qu'aucune interaction secondaire n'a eu lieu. La figure 1 présente également un grossissement, révélant la présence d'une petite quantité d'agrégat. L'absence d'un pic d'éluion précoce ou tardif indique que la préparation de l'AcM commercialisés est homogène sans aucune indication d'agrégation ni de dégradation.

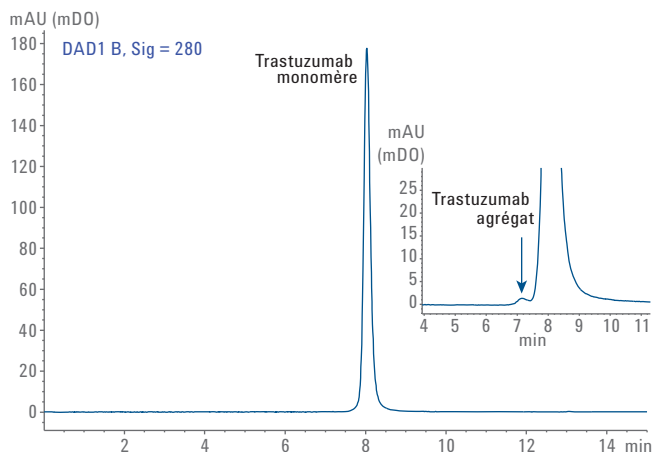


Figure 1. Profil chromatographique d'exclusion stérique de (A) le trastuzumab intact, (B) région de grossissement présentant les agrégats de trastuzumab sur une colonne SEC Agilent AdvanceBio 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

Chromatographie d'exclusion stérique du CAM

La plupart des méthodes publiées d'analyse par chromatographie d'exclusion stérique de CAM réalisées sur des colonnes SEC du marché et utilisant une phase aqueuse mènent à une détérioration de la forme des pics et à une résolution incomplète des agrégats du monomère conjugué. Cet effet est dû à une interaction non spécifique de la charge utile hydrophobe avec la phase stationnaire. Il est démontré que l'addition de 2-propanol à 15 % permet de remédier à cet effet [2]. Lors de l'analyse du CAM T-DM1 sur une colonne SEC AdvanceBio avec une phase mobile aqueuse, la PBS permet d'obtenir des pics symétriques et une meilleure résolution du monomère et de l'agrégat, indiquant qu'aucune interaction non spécifique du médicament hydrophobe avec la phase stationnaire est observée (Figure 2).

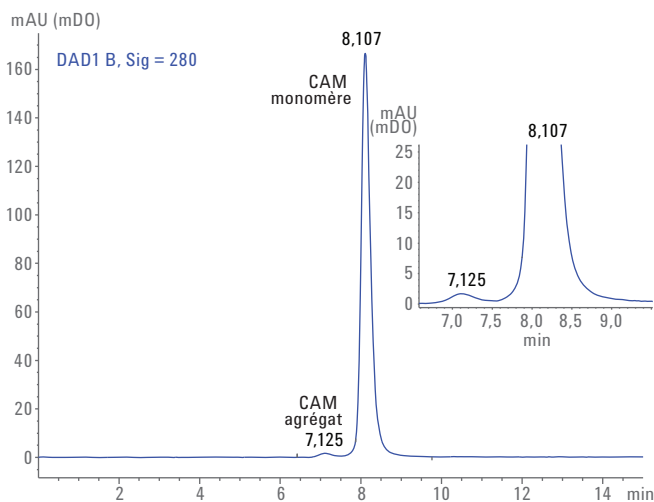


Figure 2. Profil de chromatographie d'exclusion stérique du T-DM1 intact (CAM) sur une colonne SEC Agilent AdvanceBio 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm en faisant appel à la solution PBS, à pH 7,4, comme phase mobile.

Précision du temps de rétention et de l'aire

Le tableau 1 illustre les temps de rétention moyens ainsi que les RSDs de six répliques d'une analyse d'AcM trastuzumab et de CAM. 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.

Tableau 1. Précision du temps de rétention et de la surface des pics (n = 6).

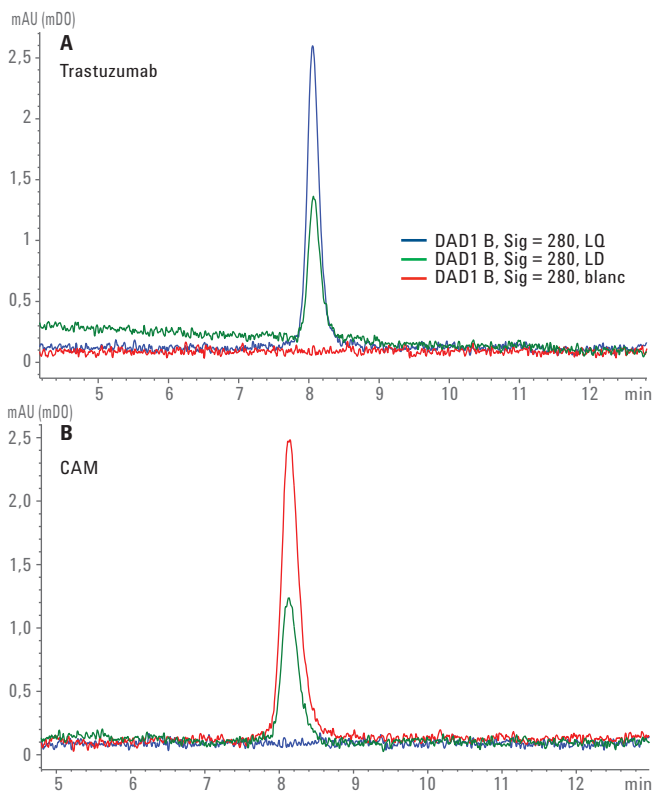
Échantillon	Temps de rétention		Surface de pic	
	Moyenne (min)	RSD	Moyenne (mAU/min)	RSD
Trastuzumab - Médicament original	8,034	0	100	0
CAM	8,106	0,005	98,91	0,33

Limite de détection et limite de quantification

La limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) étaient respectivement de 15 µg/mL et de 31 µg/mL, pour le trastuzumab et le CAM, indiquant que la méthode était sensible. Les valeurs de la LD et de la LQ observées du trastuzumab et du CAM ont été présentées sous la forme du tableau 2 et la superposition des chromatogrammes de la LD et de la LQ avec le blanc est présentée sur la figure 3.

Tableau 2. Résultats de LD, LQ et S/B (n = 3).

Concentration (µg/mL)	S/B	Surface moyenne
Trastuzumab		
15,625 (LD)	7,8	12,62
31,25 (LQ)	21,4	29,16
62,5	32,7	60,74
CAM		
15,625 (LD)	10,5	15,20
31,25 (LQ)	15,5	37,89
62,5	37,9	80,24



Linéarité

Les courbes de linéarité du trastuzumab et du CAM ont été construites du niveau de la LQ au niveau de concentration le plus élevé de l'étude, en utilisant la mesure des aires des pics et la concentration en trastuzumab/CAM. Les résultats d'exactitude sont présentés dans le tableau 3. La courbe de linéarité pour le trastuzumab/CAM dans la plage de concentrations allant de 12,5 à 2 000 µg est présentée sur la figure 4.

Tableau 3. Résumé de la plage de linéarité (n = 3) pour le trastuzumab et le CAM.

Trastuzumab		CAM	
Concentration (µg/mL)	Surface moyenne	Concentration (µg/mL)	Surface moyenne
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

Analyse de l'agrégation/dégradation

Nous avons comparé le trastuzumab et le CAM natifs avec ces composés soumis à un stress forcé par chromatographie d'exclusion stérique afin de surveiller les agrégats et les produits de dégradation. Tout pic de l'analyse chromatographique élué avant la forme monomère était considéré comme agrégat et tout pic élué plus tard était considéré comme produit de dégradation, respectivement [3].

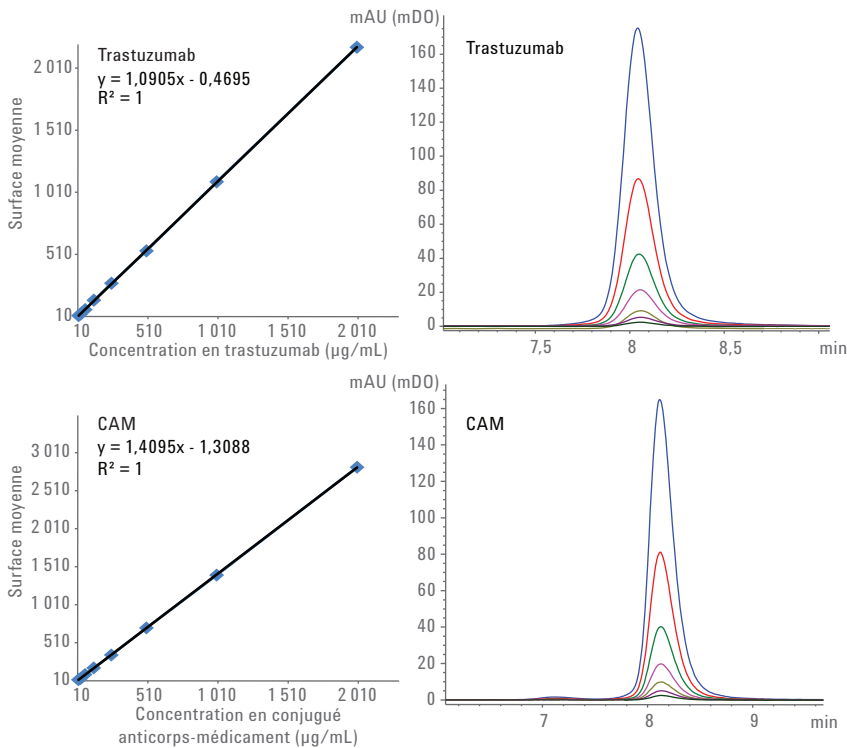


Figure 4. Courbe de linéarité obtenue avec huit concentrations standards de trastuzumab et du CAM, située dans la plage allant de 15,62 à 2 000 µg/mL, présentant d'excellentes valeurs de coefficient de linéarité. Sont également présentées les superpositions des chromatogrammes pour les plages de linéarité.

Les chromatogrammes des agrégats induits par le pH/chaueur présentés sur les figures 5 et 6 indiquent que la colonne SEC AdvanceBio était capable de séparer les agrégats ainsi que les produits de dégradation du trastuzumab et du CAM. Les produits intacts, agrégats et de dégradation ont été distinctement séparés les uns des autres.

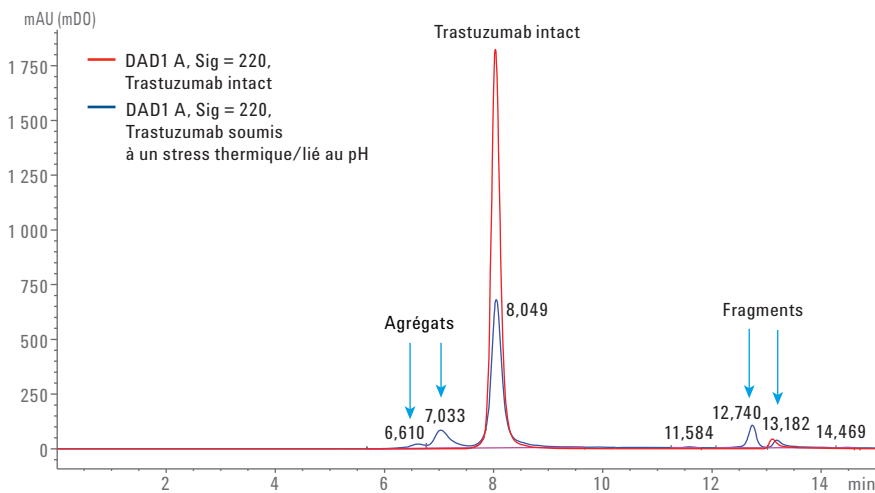


Figure 5. Chromatogramme du trastuzumab natif (contrôle ; tracé rouge) superposé à celui du trastuzumab à 2 mg/mL soumis à un stress de pH/thermique à l'aide d'une colonne SEC Agilent AdvanceBio 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

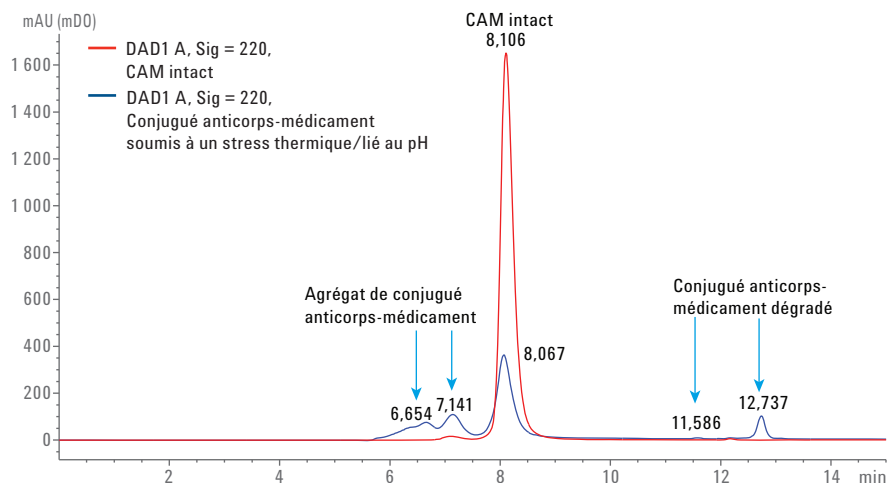


Figure 6. Chromatogramme du CAM natif (contrôle ; tracé rouge) superposé à celui du CAM à 2mg/mL soumis à un stress de pH/thermique à l'aide d'une colonne SEC Agilent AdvanceBio 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

Quantification de l'agrégation et de la dégradation du trastuzumab et du CAM

Sur la base du pourcentage d'aire, la quantification relative des agrégats et des produits de dégradation du trastuzumab et du CAM a été récapitulée dans le tableau 4.

À partir de ces données, on observe de manière évidente une augmentation prononcée des niveaux d'agrégation et de dégradation du trastuzumab et du CAM conjointement avec une diminution relative des formes monomères, qui ont baissé respectivement jusqu'à 71 % et 54 %. Bien que ces résultats soient encourageants, ils doivent être étayés par des données d'activité biologique permettant d'accéder à la perte d'activité en fonction de l'agrégation/dégradation.

Tableau 4. Temps de rétention et surface de pic des monomères, agrégats, et fragments du trastuzumab et du CAM.

Trastuzumab intact		Trastuzumab soumis à un stress	
Temps de rétention (min)	% surface	Temps de rétention (min)	% surface
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
CAM intact		CAM soumis à un stress	
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

Conclusions

Nous avons présenté ici plusieurs excellents outils de développement de méthodes et de surveillance de la pureté et de la stabilité de l'AcM trastuzumab/CAM T-DM1 thérapeutiques. Nous avons d'abord utilisé la colonne SEC AdvanceBio d'Agilent pour développer une séparation simple, haute résolution d'AcM. Plus particulièrement, la colonne SEC AdvanceBio a permis d'obtenir une résolution supérieure du CAM hydrophobe sans utiliser d'agents modificateurs dans la phase mobile. La précision des temps de rétention et des aires de la méthode était excellente, et a démontré sa fiabilité. Les courbes de linéarité obtenues avec huit concentrations standards d'AcM et du CAM, situées dans la plage allant de 15 à 2 000 µg/mL, présentaient d'excellentes valeurs de coefficient de linéarité, indiquant que la méthode était quantitative et précise. La limite de détection et la limite de quantification pour l'AcM et le CAM se sont respectivement avérées être égales à 15 µg/mL et à 25 µg/mL, indiquant que la méthode était sensible. De plus, les études de stress de l'AcM et du CAM ont démontré que la colonne SEC AdvanceBio était capable de séparer, de détecter et de quantifier les agrégats et les produits de dégradation sur la base du pourcentage d'aire. Une telle méthode simple et reproductible, couplée à la bioinertie et à la résistance à la corrosion du LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity, rend cette solution appropriée pour une analyse AQ/CQ de l'AcM/CAM destinés à l'industrie biopharmaceutique.

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. 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. Rodriquez-Diaz, R.; Wehr, T. Use of Size Exclusion Chromatography in Biopharmaceutical Development. In *Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development*; Rodriquez-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.

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
5991-6303FR



Agilent Technologies