

Separazione e quantificazione degli aggregati e dei frammenti di rituximab tramite SEC ad alta risoluzione

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

Nota applicativa

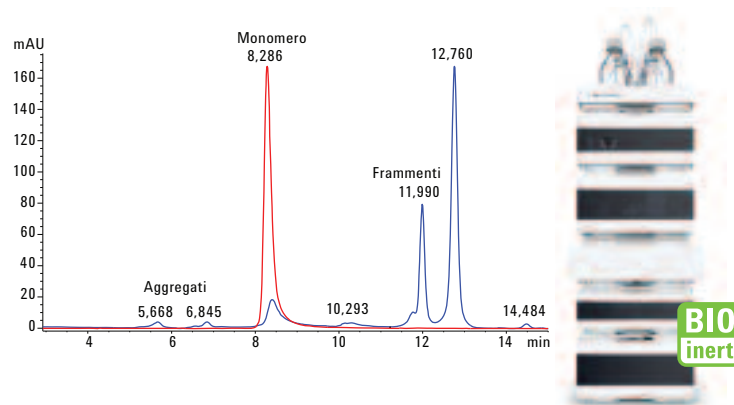
Biologici e biosimilari

Autore

M.Sundaram Palaniswamy
Agilent Technologies Pvt Ltd
Bangalore, India

Abstract

L'aggregazione degli anticorpi monoclonali può derivare da diversi meccanismi, che includono fattori relativi alla produzione e fattori ambientali. La cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) è un metodo standard per la determinazione e la quantificazione dei livelli di aggregazione e di frammentazione degli agenti terapeutici basati su anticorpi monoclonali. Lo scopo di questa nota applicativa è illustrare la separazione ad alta risoluzione e la quantificazione di rituximab innovatore e biosimilare intatti e dei loro aggregati e frammenti ottenuti da studi di stress forzato. La separazione e la quantificazione sono state ottenute impiegando un sistema LC quaternario Bio-Inert Agilent serie 1260 Infinity e una colonna Agilent AdvanceBio SEC. La calibrazione della colonna è stata effettuata utilizzando dei riferimenti a peso molecolare noto. La colonna AdvanceBio SEC ha garantito una separazione sensibile e ad alta risoluzione per il monitoraggio degli aggregati e dei prodotti di degradazione, ed è risultata ideale per le applicazioni nelle quali alta risoluzione e sensibilità sono essenziali.



Agilent Technologies

Introduzione

La cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) è un metodo ampiamente accettato per la separazione dei monomeri e delle varianti a basso peso molecolare (LMW) e ad alto peso molecolare (HMW) degli anticorpi monoclonali ad uso terapeutico. La cromatografia ad esclusione dimensionale in condizioni native separa i monomeri e le loro varianti sulla base delle loro dimensioni tramite diffusione differenziale nei pori del materiale di impaccamento. Per sviluppare con successo un prodotto farmaceutico basato su anticorpi monoclonali è necessario, tra le altre cose, valutare l'aggregazione e la frammentazione risultanti da studi di degradazione forzata, che includono percorsi di degradazione fisici e chimici. Nello sviluppo di prodotti bioterapeutici le dimensioni contano, visto che gli aggregati sono stati implicati nell'incremento dell'immunogenicità e influenzano la sicurezza e l'efficacia del prodotto. Una sfida significativa è l'identificazione di un metodo di cromatografia ad esclusione dimensionale che sia capace di separare e monitorare queste varianti. Qui mostriamo i vantaggi di uno di questi metodi usando una colonna Agilent AdvanceBio SEC, che rappresenta una tecnologia innovativa per l'analisi tramite cromatografia ad esclusione dimensionale. La colonna utilizza speciali particelle in silice da 2,7 µm e una affinità unica per garantire una separazione ad alta risoluzione degli anticorpi monoclonali e delle loro varianti di massa. La precisione del tempo di ritenzione e dell'area sono eccellenti e dimostrano l'adeguatezza della colonna e del sistema LC Bio-Inert impiegati in questo metodo.

Materiali e metodi

Strumento

Abbiamo usato un sistema LC quaternario Bio-Inert Agilent serie 1260 Infinity completamente biocompatibile, con una pressione massima di lavoro 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 colonne 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

Rituximab innovatore e biosimilare, cetuximab, trastuzumab e ADC sono stati acquistati da una farmacia locale e conservati secondo le istruzioni del produttore. PBS, acido cloridrico e idrossido di sodio sono stati acquistati da Sigma-Aldrich, Corp. Tutte le sostanze chimiche e i solventi erano di grado HPLC; è stata usata acqua altamente purificata ottenuta con il sistema di purificazione dell'acqua Milli-Q (Millipore Elix 10, Stati Uniti)

Calibrazione della colonna AdvanceBio SEC

La colonna AdvanceBio SEC è stata calibrata misurando i volumi d'eluizione di vari standard (aggregati proteici, tireoglobulina (670 kDa), γ-globulina (158 kDa), ovalbumina (44 kDa), mioglobina (17 kDa) e vitamina B12 (1,35 kDa)). I valori di peso molecolare degli standard, espressi in logaritmi, sono stati rappresentati in un grafico in funzione del volume d'eluizione, per determinare il peso molecolare equivalente del campione.

Procedura

La fase mobile (10 µL) è stata iniettata come bianco, seguita da sei replicati di anticorpi monoclonali intatti e sottoposti a stress, per calcolare la deviazione dell'area e del tempo di ritenzione (RT).

Preparazione degli aggregati di rituximab

Gli aggregati degli anticorpi monoclonali sono stati preparati diluendo gli anticorpi monoclonali nella fase mobile a una concentrazione finale di 2 mg/mL. I test da stress con pH sono stati eseguiti come descritto in precedenza, con lievi modifiche [1]. In breve, HCl 1 M è stato aggiunto al campione lentamente, goccia a goccia, per modificare il pH da 6,0 a 1,0. Quindi, è stato aggiunto NaOH 1 M per portare il pH a 10,0. Infine, è stato aggiunto nuovamente HCl 1 M per riportare il pH a 6,0. È stato utilizzato un tempo di attesa di circa un minuto tra le variazioni di pH, con agitazione costante a 500 rpm. La soluzione ottenuta è stata incubata a 60 °C per 60 minuti.

Risultati e discussione

Separazione e rivelazione

La colonna AdvanceBio SEC 300Å è stata calibrata usando una serie di proteine standard di peso molecolare noto (Figura 1). Gli aggregati di proteine standard (picco vuoto) nel marcatore proteico sono stati usati per calcolare il volume morto, che è stato eluito a 5,748 minuti sulla colonna, corrispondenti a $V_0 = 4,59$ (mL). La curva di calibrazione per le proteine separate sulla colonna mostra una relazione lineare e definisce il limite di esclusione (670 kDa) per l'intervallo di proteine (da 1,3 a 670 kDa) analizzato (Figura 2). Il peso molecolare di una proteina incognita può quindi essere determinato dal suo volume d'eluizione usando questo grafico.

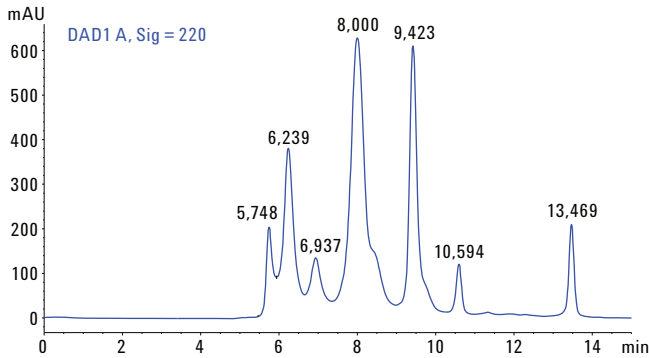


Figura 1. Separazione delle proteine standard sulla colonna Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm

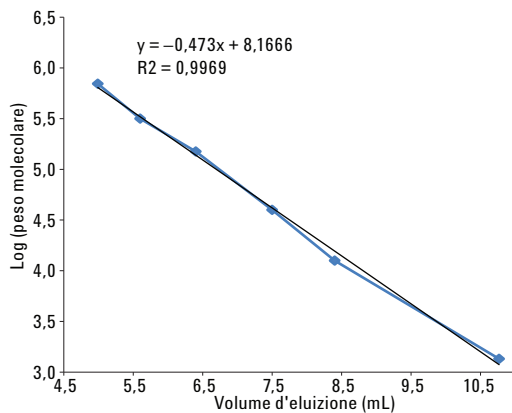


Figura 2. Curva di calibrazione degli standard sulla colonna Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

La Figura 3 mostra l'eccellente separazione degli anticorpi monoclonali intatti in otto minuti usando la colonna AdvanceBio SEC 300Å. L'assenza di picchi di eluizione precoci o tardivi suggerisce che le preparazioni commerciali di anticorpo monoclonale fossero omogenee, senza alcun indizio di aggregazione o degradazione.

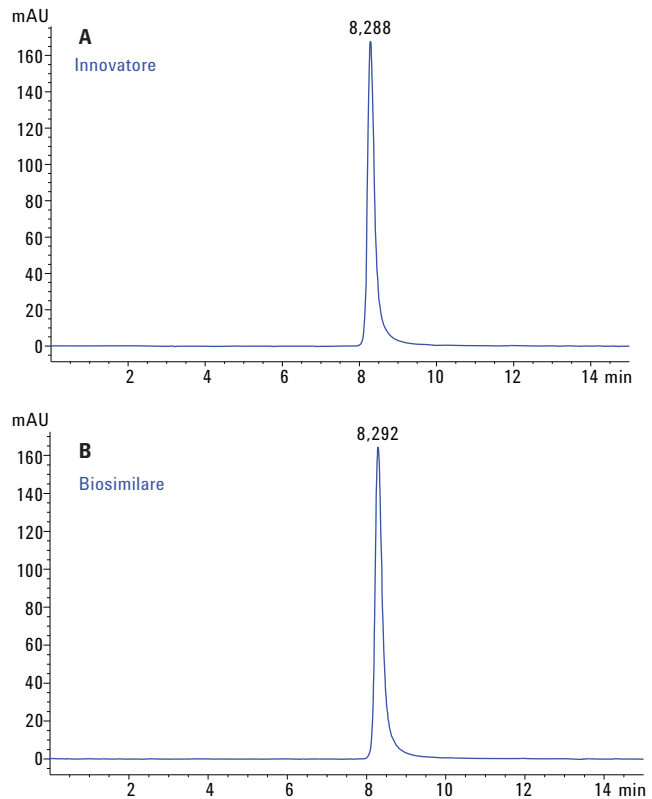


Figura 3. Profili SEC di anticorpi monoclonali terapeutici intatti sulla colonna Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm: A: rituximab innovatore; B: rituximab biosimilare.

La Figura 4 mostra la sovrapposizione di rituximab innovatore e biosimilare, evidenziando un picco ben definito e simmetrico privo di interazioni non specifiche. La Tabella 1 mostra le RSD medie per il tempo di ritenzione e l'area ricavate da sei replicati di anticorpi monoclonali intatti. Le RSD del tempo di ritenzione e dell'area del picco erano rispettivamente inferiori allo 0,04% e all'1%, il che dimostra l'eccellente riproducibilità del metodo e quindi la precisione del sistema. I RT del biosimilare e dell'innovatore erano paragonabili. Inoltre, la percentuale di purezza calcolata in base all'area era >99% per l'innovatore e per il biosimilare, il che indica una elevata similarità.

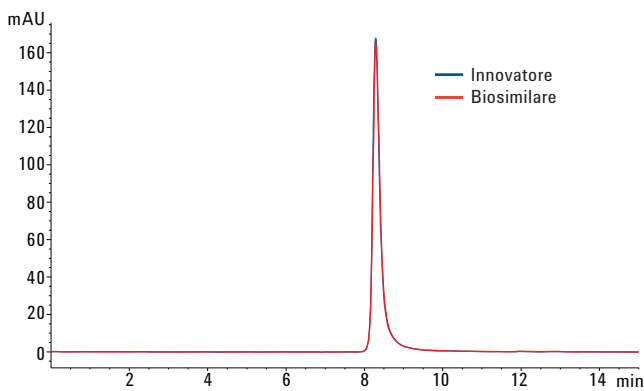


Figura 4. Sovrapposizione di rituximab innovatore e biosimilare separati sulla colonna Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

Tabella 1. Precisione del tempo di ritenzione e dell'area del picco di rituximab (n = 6).

Campione	Tempo di ritenzione		Area del picco	
	Media (min)	RSD	Media (mAU/min)	RSD
Rituximab innovatore	8,28	0,04	99,33	1,21
Rituximab biosimilare	8,29	0	100	0

Analisi e quantificazione dell'aggregazione/degradazione

Abbiamo confrontato gli anticorpi monoclonali biosimilare e innovatore intatti o sottoposti a stress usando la cromatografia ad esclusione dimensionale per il monitoraggio degli aggregati e dei prodotti di degradazione. Tutti i picchi dell'analisi cromatografica eluiti prima della forma monomerica sono stati considerati aggregati e tutti quelli eluiti dopo prodotti di degradazione [2].

La Figura 5 mostra i profili SEC del rituximab innovatore e del biosimilare sottoposti a test da stress con pH/calore. I profili indicano che la colonna AdvanceBio SEC, utilizzando lo stesso metodo di analisi impiegato per la forme intatte, ha separato e rivelato gli aggregati e i prodotti di degradazione degli anticorpi monoclonali. Le quantità relative degli aggregati e dei frammenti dell'innovatore e del biosimilare, calcolate sulla percentuale dell'area, sono riportate nella Tabella 2.

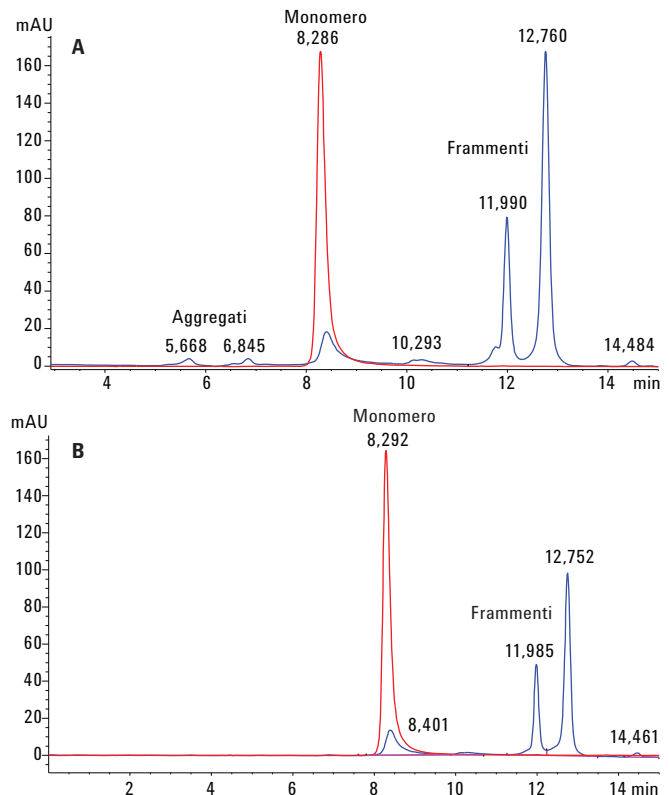


Figura 5. Cromatogrammi ottenuti con la colonna Agilent AdvanceBio SEC: (A) rituximab innovatore intatto (traccia rossa) sovrapposto al campione sottoposto a stress con calore/pH (traccia blu); (B) rituximab biosimilare intatto (traccia rossa) sovrapposto al campione sottoposto a stress (traccia blu).

Tabella 2. Percentuale relativa dell'area per il rituximab innovatore e il biosimilare intatti e sottoposti a stress.

Innovatore intatto		Innovatore sottoposto a stress	
Tempo	Area %	Tempo	Area %
8,288 (monomero)	100	1,289	4,24
		5,668	2,26
		6,845	2
		8,40 (monomero)	13,6
		10,29	2,81
		11,99	23,22
		12,76	51,01
		14,48	1,11
Biosimilare intatto		Biosimilare sottoposto a stress	
Tempo	Area %	Tempo	Area %
8,292 (monomero)	100	8,40 (monomero)	16,832
		11,985	24,24
		12,75	57,36
		14,46	1,5

È interessante notare che le aree relative dei picchi delle specie aggregate dell'anticorpo monoclonale innovatore sono aumentate a causa dello stress in confronto al biosimilare. Tuttavia, il pattern di frammentazione e le aree dei picchi dei frammenti di entrambi gli anticorpi monoclonali sono risultati altamente paragonabili. Dopo il test da stress, la forma monomerica rappresentava il 13% e il 16% nell'innovatore e nel biosimilare, mentre le forme predominanti in entrambi gli anticorpi monoclonali erano i frammenti eluiti a 12,75 minuti circa, che costituivano più del 50%.

Infine, per determinare la capacità della colonna AdvanceBio SEC di risolvere anticorpi monoclonali commerciali e ADC che differiscono lievemente nel peso molecolare, è stata effettuata un'analisi a iniezione singola dei campioni. La Figura 6 mostra la sovrapposizione dei profili. La colonna AdvanceBio SEC ha risolto gli anticorpi monoclonali terapeutici e l'ADC secondo il loro peso molecolare, visto che si notano evidenti differenze nei tempi di ritenzione; ciò dimostra l'adeguatezza di questa colonna per l'analisi di queste molecole.

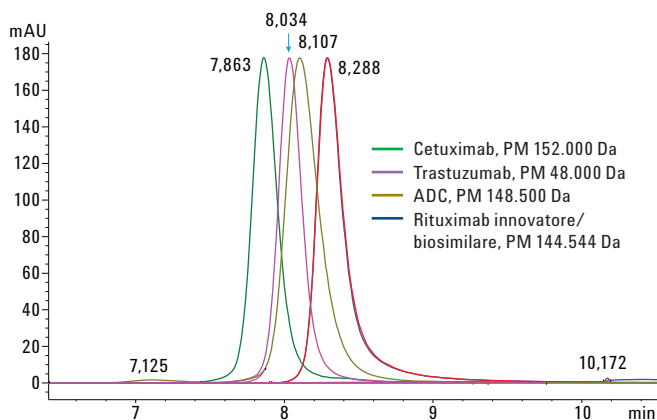


Figura 6. Sovrapposizione di rituximab innovatore/biosimilare, trastuzumab, cetuximab e ADC separati su una colonna Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

Conclusioni

Il processo di sviluppo dei prodotti basati su anticorpi monoclonali è complesso e richiede molteplici caratterizzazioni fisico-chimiche per la determinazione della purezza, dell'aggregazione e di altre varianti legate al prodotto. La cromatografia ad esclusione dimensionale è stata usata ampiamente per il monitoraggio e la quantificazione di specie monomeriche, HMW e LMW in condizioni native. In questo lavoro, la colonna Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm è stata usata per sviluppare un semplice metodo per la separazione in condizioni native dei campioni di rituximab intatti e sottoposti a stress. Il metodo ottimizzato ha risolto il monomero come singolo picco simmetrico con un livello di purezza del 100% e senza alcun segno di aggregati o frammenti. Lo stesso metodo ha risolto e quantificato gli aggregati e i frammenti ottenuti da studi di stress. Questo è possibile solo con una colonna come la AdvanceBio SEC, capace di fornire una separazione sensibile e ad alta risoluzione degli anticorpi monoclonali e delle loro varianti di massa. Inoltre, il sistema LC quaternario Bio-Inert Agilent serie 1260 Infinity offre delle certezze riguardo all'inerzia biologica e alla resistenza alla corrosione.

Bibliografia

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**.

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.

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
5991-6304ITE



Agilent Technologies