



Separe e quantifique agregados e fragmentos de rituximabe com SEC de alta resolução

Sistema LC quaternário Agilent 1260 Infinity Bio-inert e coluna SEC AdvanceBio de 300Å, 2,7 µm

Nota de aplicação

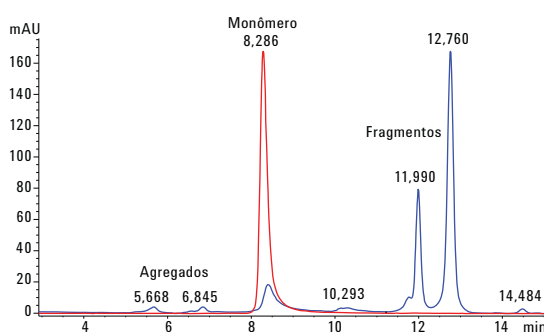
Biológicos e Biossimilares

Autor

M.Sundaram Palaniswamy
Agilent Technologies Pvt Ltd
Bangalore, Índia

Resumo

A agregação de anticorpos monoclonais pode surgir em decorrência de diversos mecanismos, como fatores ambientais e de produto. A cromatografia por exclusão de tamanhos (SEC) é um método padrão para determinar e quantificar os níveis de agregação e fragmentação de monoclonais terapêuticos. O enfoque desta nota de aplicação é demonstrar a separação e a quantificação de alta resolução do inovador rituximabe e de biossimilares intactos, assim como de seus agregados e fragmentos obtidos de estudos de degradação forçada. A separação e a quantificação foram obtidas com um LC quaternário Agilent 1260 Infinity Bio-inert e uma coluna SEC Agilent AdvanceBio. A calibração da coluna foi feita com marcadores de peso molecular. A coluna SEC AdvanceBio proporciona separação sensível e de alta resolução para monitorar agregados/degradantes e é ideal para aplicações em que a alta resolução e a sensibilidade são fundamentais.



Introdução

A cromatografia por exclusão de tamanhos (SEC) é um método amplamente aceitável para separar monômeros e variantes de baixo peso molecular (LMW) e alto peso molecular (HMW) em mAbs terapêuticos. Em condições nativas, a SEC separa monômeros e suas variantes de acordo com o tamanho por difusão diferenciada nos poros do material de empacotamento. O desenvolvimento bem sucedido de um medicamento à base de mAb também exige a avaliação da agregação e da fragmentação resultantes de estudos de degradação forçada, que englobam testes de degradação física e química. O tamanho é importante no desenvolvimento de bioterapêuticos, visto que os agregados implicam o aumento da imunogenicidade e afetam a segurança e a eficácia. O grande desafio é identificar um método de SEC capaz de separar e monitorar essas variantes. A seguir mostraremos os benefícios de um método utilizando uma coluna SEC Agilent AdvanceBio, que é uma tecnologia inovadora para análise de SEC. A coluna usa partículas únicas de sílica de 2,7 µm e química de ligação para proporcionar separações de alta-resolução de mAbs e suas variantes de massa. O tempo de retenção e a precisão da área do método são excelentes, demonstrando a adequação da coluna e do sistema LC bioinerte utilizados.

Materiais e métodos

Instrumento

Usamos um sistema quaternário Agilent 1260 Infinity Bio-inert completamente biocompatível -com uma pressão máxima de 600 bar, que inclui os seguintes módulos:

- Bomba de LC quaternário Agilent 1260 Infinity Bio-Inert (G5611A)
- Amostrador automático de alto desempenho Agilent 1260 Infinity Bio-Inert (G5667A)
- Termostatizador de amostras Série Agilent 1200 Infinity (G1330B)
- Compartimento de coluna termostatizado (TCC) Agilent 1260 Infinity com elementos de aquecimento com encaixe bioinerte (G1316C, opção 19)
- DAD VL Agilent 1260 Infinity (G1315D com cela de fluxo padrão bioinerte, 10 mm)

Software

Agilent ChemStation Rev. B.04.03 (ou mais recente).

Condições

Coluna:	SEC Agilent AdvanceBio 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm (p/n PL1180-5301)
Fase móvel:	Tampão de fosfato de sódio (PBS), 50 mM de fosfato de sódio com 150 mM de cloreto de sódio, pH 7,4.
Temp de TCC:	Ambiente
Vol. da inj.:	10 µL
Taxa de fluxo:	0,8 mL/min.
Deteção:	UV, 220 e 280 nm

Reagentes, amostras e materiais

O rituximabe inovador e o biossimilar, o cetuximabe, o trastuzumabe e o ADC foram comprados em uma farmácia local e armazenados de acordo com as instruções do fabricante. O PBS, ácido clorídrico e hidróxido de sódio foram comprados da Sigma-Aldrich, Corp. Todos os produtos químicos e solventes tinham grau de HPLC e foi utilizada água altamente purificada de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore Elix 10, USA).

Calibração da coluna SEC AdvanceBio

A coluna SEC AdvanceBio foi calibrada ao medir os volumes de eluição de diversos padrões (agregados de proteína, tireoglobulina (670 kDa), g-globulina (158 kDa), ovoalbumina (44 kDa), mioglobina (17 kDa) e vitamina B12 (1,35 kDa)). O registro dos valores do peso molecular dos padrões foram representados graficamente em relação ao volume da eluição para determinar o peso molecular equivalente da amostra.

Procedimento

A fase móvel (10 µL) foi injetada como branco, seguida de seis replicatas de mAbs intactos e degradados para calcular o desvio da área e do tempo de retenção (RT).

Preparo de agregados de rituximabe

Agregados de mAbs foram preparados ao diluir anticorpos monoclonais na fase móvel a uma concentração final de 2 mg/mL. O teste de degradação forçada utilizando pH foi realizado como descrito anteriormente com uma pequena modificação [1]. 1 M de HCl foi adicionado lentamente gota a gota às soluções da amostra para alterar o pH de 6,0 para 1,0. Em seguida, 1 M de NaOH foi adicionado para ajustar o pH a 10,0. Por fim, 1 M de HCl foi adicionado novamente para ajustar o pH de volta a 6,0. Houve aproximadamente um minuto de espera entre as trocas de pH, enquanto em agitação constante a 500 rpm. A solução resultante foi incubada a 60 °C por 60 minutos.

Resultados e discussão

Separação e detecção

A coluna SEC AdvanceBio 300Å foi calibrada usando uma série de proteínas padrão com pesos moleculares conhecidos (Figura 1). Os agregados de proteína padrão (primeiro pico) no marcador de proteína foram usados para calcular o volume morto, que eluiu a 5,748 minutos na coluna, correspondendo a $V_0 = 4,59$ (mL). A curva de calibração para proteínas separadas na coluna mostra uma relação linear e define o limite de exclusão (670 k Da) para o intervalo de proteína (1,3 a 670 kDa) analisado (Figura 2). O peso molecular de uma proteína desconhecida pode ser então determinado pelo seu volume de eluição usando essa representação gráfica.

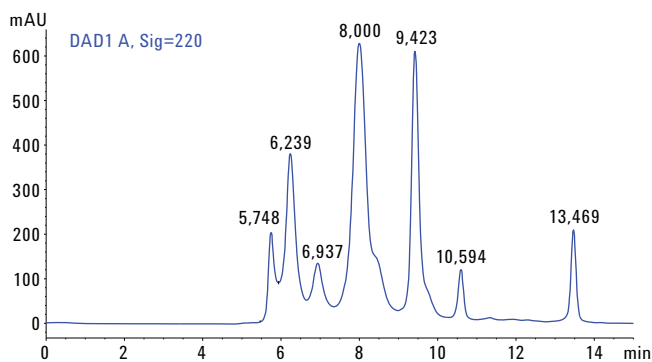


Figura 1. Separação de padrões de proteína na coluna SEC Agilent AdvanceBio de 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm

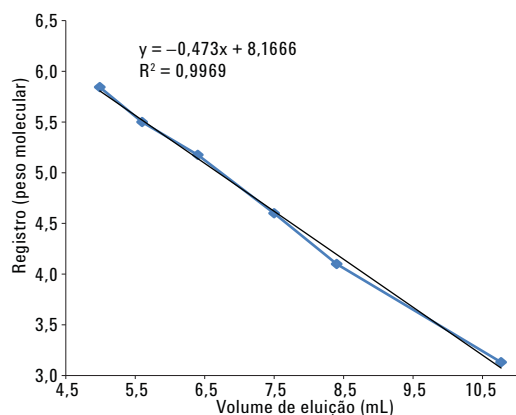


Figura 2. Curva de calibração de padrões na coluna SEC Agilent AdvanceBio de 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

A Figura 3 demonstra a excelente separação de mAbs intactos em oito minutos usando a SEC AdvanceBio 300Å. A ausência de picos de eluição precoces ou tardios sugere que as preparações de mAb comercializadas eram homogêneas, sem indicação de agregação ou degradação.

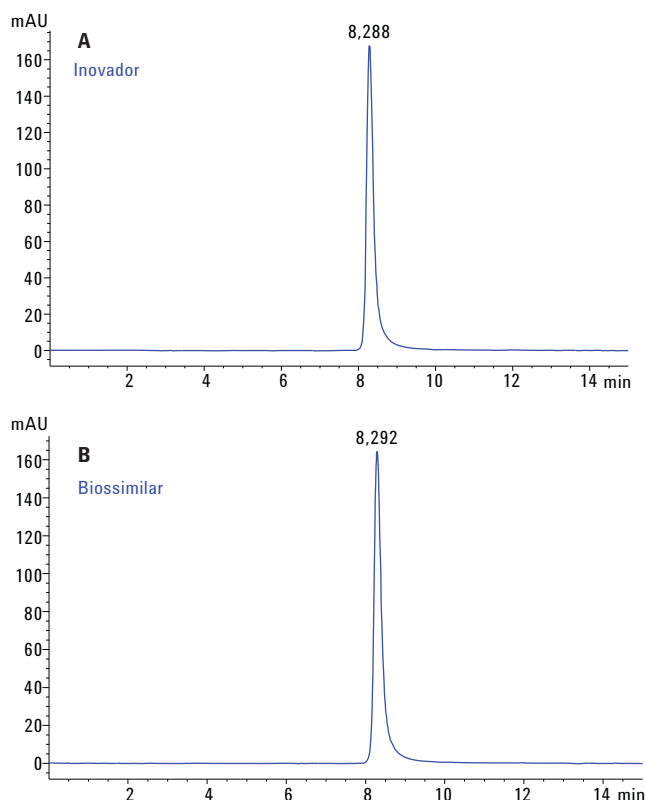


Figura 3. Perfil de SEC de mAbs intactos na coluna SEC Agilent AdvanceBio de 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm: A: rituximabe inovador; B: rituximabe biossimilar.

A Figura 4 demonstra as sobreposições de rituximabe inovador e biossimilar, exibindo um pico agudo e simétrico sem interações não específicas. A Tabela 1 mostra a média dos tempos de retenção e as RSDs de área de seis replicatas de mAbs intactos. O tempo de retenção e as RSDs de área do pico foram menores que 0,04 e 1%, respectivamente, o que demonstra reprodutibilidade excelente do método e, conseqüentemente, a precisão do sistema. Os RTs do biossimilar e do inovador foram semelhantes. Além disso, a pureza por porcentagem de área foi >99% para o inovador e o biossimilar, indicando que eles eram muito semelhantes.

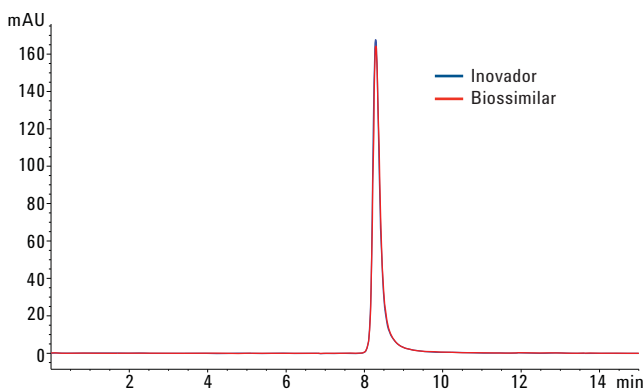


Figura 4. Sobreposição de rituximabe inovador e biossimilar separada na coluna SEC Agilent AdvanceBio de 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

Tabela 1. Tempo de retenção e precisão da área do pico do rituximabe (n = 6).

Amostra	Tempo de retenção		Área do pico	
	Média (min)	RSD	Média (mAU/min)	RSD
rituximabe inovador	8,28	0,04	99,33	1,21
rituximabe biossimilar	8,29	0	100	0

Análise e quantificação de agregação/degradação

Comparamos os mAbs do biossimilar e do inovador intactos e degradados usando a SEC para monitorar os agregados e os degradantes. Os picos da corrida cromatográfica que eluíram antes da forma monomérica foram considerados como agregados e os que eluíram posteriormente como degradantes [2].

A Figura 5 mostra os perfis de SEC do rituximabe inovador e biossimilar degradados com pH/calor. O perfil indica que a coluna SEC AdvanceBio, usando o mesmo método de análise intacto, separou e detectou mAbs agregados e degradados. De acordo com a porcentagem de área, a quantificação relativa de agregados e fragmentos no inovador e no biossimilar é resumida na Tabela 2.

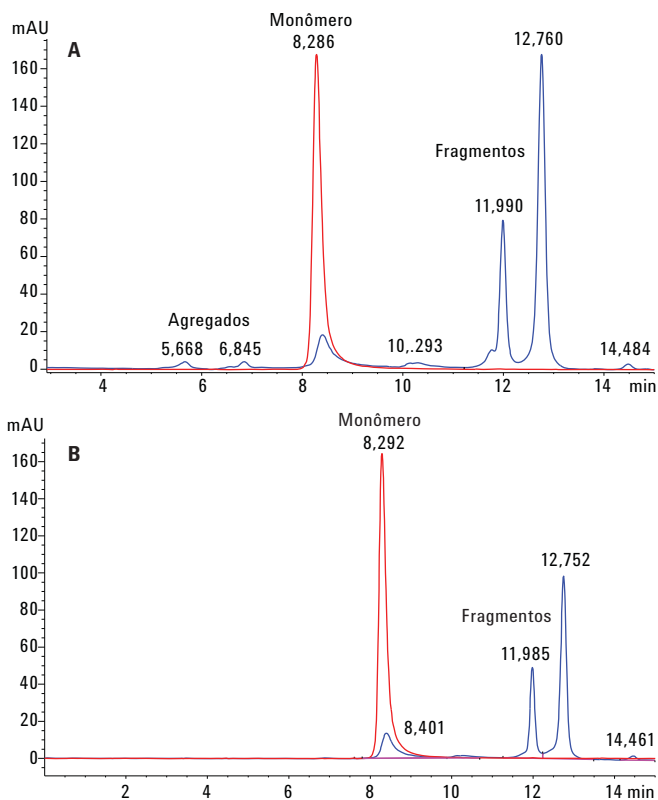


Figura 5. O cromatograma com a SEC Agilent AdvanceBio de (A) rituximabe inovador intacto (traço vermelho) sobreposto com a amostra com degradação de pH/calor (traço azul) e (B) rituximabe biossimilar intacto (traço vermelho) sobreposto com a amostra degradada (traço azul).

Tabela 2. Porcentagem da área relativa de rituximabe inovador e biossimilar intacto e degradado.

Inovador intacto		Inovador degradado	
Tempo	Área %	Tempo	Área %
8,288 (monômero)	100	1,289	4,24
		5,668	2,26
		6,845	2
		8,40 (monômero)	13,6
		10,29	2,81
		11,99	23,22
		12,76	51,01
		14,48	1,11
Biossimilar intacto		Biossimilar degradado	
Tempo	Área %	Tempo	Área %
8,292 (monômero)	100	8,40 (monômero)	16,832
		11,985	24,24
		12,75	57,36
		14,46	1,5

É interessante notar que as áreas do pico relativo de espécies agregadas do mAb inovador aumentaram devido à degradação em relação ao biossimilar. No entanto, o padrão de fragmentação e as áreas do pico de fragmentos para ambos os mAbs foram muito semelhantes. A forma monomérica no inovador e no biossimilar após a degradação foi de 13 e 16%, enquanto a forma predominante em ambos os mAbs foram fragmentos eluindo a cerca de 12,75 minutos, que foi maior que 50%.

Por fim, para determinar a capacidade da coluna SEC AdvanceBio de distinguir monoclonais comerciais e ADC que diferem muito no peso molecular, foi realizada uma análise de injeção simples das amostras. A Figura 6 mostra as sobreposições. A coluna SEC AdvanceBio diferenciou mAbs terapêuticos e ADC de acordo com a massa molecular, visto que é possível observar diferenças claras nos tempos de retenção, demonstrando a adequação dessa coluna para a análise dessas moléculas.

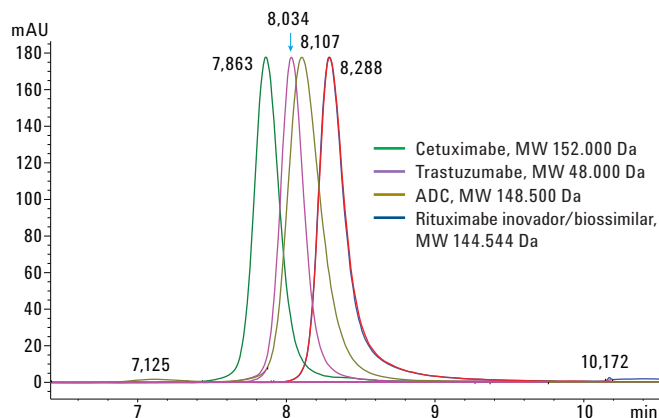


Figura 6. Sobreposição de rituximabe inovador/biossimilar, trastuzumabe, cetuximabe e ADC separada na coluna SEC Agilent AdvanceBio de 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

Conclusões

O processo para o desenvolvimento de produtos à base de mAb é complexo e envolve muitas caracterizações físico-químicas para determinar a pureza, a agregação e outras variantes do produto. A cromatografia por exclusão de tamanhos foi amplamente usada para monitorar e quantificar monômeros e espécies HMW e LMW em condições nativas. Nesse trabalho, a coluna SEC Agilent AdvanceBio de 7,8 × 300 mm, 2,7 µm foi usada para desenvolver um método simples para a separação de amostras de rituximabe intactas e degradadas em condições nativas. O método otimizado determinou o monômero como um pico único simétrico com um nível de pureza de 100% e nenhum sinal de agregados ou fragmentos. O mesmo método determinou e quantificou agregados e fragmentos obtidos de estudos de degradação forçada. Isso somente é possível com uma coluna como a SEC AdvanceBio, que é capaz de oferecer separação sensível e de alta resolução de mAbs e seus variantes de massa. Além disso, o LC quaternário Agilent 1260 Infinity Bio-inert garante a biocompatibilidade e resistência à corrosão.

Referências

1. Ba?ak K?krer, 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. 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**.

Mais informa?ões

Estes dados representam os resultados t?picos. Para obter mais informa?ões sobre nossos produtos e servi?os, acesse o site www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

A Agilent Technologies n?o ser? respons?vel por erros contidos neste documento ou por danos incidentais ou consequenciais em rela?ao ao fornecimento, desempenho ou uso deste material.

As informa?ões, descri?ões e especifica?ões nesta publica?ao est?o sujeitas a mudan?as sem aviso pr?vio.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
Impresso nos EUA
16 de outubro de 2015
5991-6304PTBR



Agilent Technologies