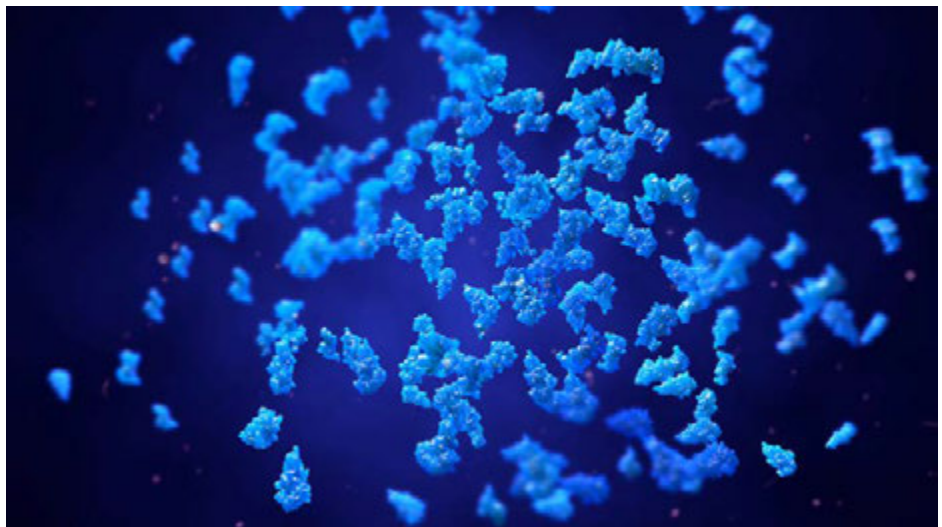


# Aggregationsanalyse von therapeutischen Innovator- und Biosimilar-Proteinen mittels FTIR

Messung der Aggregation von Rituximab in  
konzentrierten Proben mit dem Agilent Cary 630  
FTIR-Spektrometer

## Autoren

Aveline Neo und  
Ravindra Gudihal  
Agilent Technologies, Inc.



## Zusammenfassung

Bei der Herstellung oder Lagerung von Biopharmazeutika, wie z. B. monoklonalen Antikörpern (mAb), kann es zur Proteinaggregation kommen, was ihre Wirksamkeit, Potenz und Sicherheit potenziell beeinträchtigen kann. Daher muss die Herstellung von monoklonalen Antikörpern über den gesamten Prozess hinweg auf Proteinaggregation überwacht werden. Bei der Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR) handelt es sich um eine zerstörungsfreie Methode, die eine schnelle Überwachung auf mAb-Aggregation ermöglicht. Dies gilt selbst für hoch konzentrierte Proben, die für andere Methoden eine Herausforderung darstellen. Diese Application Note beschreibt die Anwendung des Agilent Cary 630 FTIR-Spektrometers zur Messung der thermisch induzierten Proteinaggregation. Die Untersuchung liefert neue Erkenntnisse über die Stabilität von hoch konzentrierten mAb-Proben in einem Formulierungspuffer. Darüber hinaus zeigt sie, wie das Cary 630 FTIR für die Qualitätskontrolle und die Optimierung des Herstellungsprozesses von Innovatorprodukten und Biosimilars eingesetzt werden kann.

## Einleitung

Aggregation stellt bei der Entwicklung und Herstellung monoklonaler Antikörper ein großes Problem dar, können Aggregate doch zu lebensbedrohlichen Immunreaktionen führen. Monoklonale Antikörper können aggregieren, wenn sie Belastungsfaktoren ausgesetzt sind, so z. B. einem niedrigen pH-Wert, einer hohen Temperatur und einer hohen Konzentration. Da therapeutische monoklonale Antikörper normalerweise in hohen Konzentrationen verabreicht werden, ist es wichtig, das Auftreten von mAb-Aggregaten im Rahmen der Qualitätskontrolle als kritisches Merkmal zu überwachen.<sup>1</sup>

Biosimilars sind Kopien von (originalen) therapeutischen Innovatorprodukten, die in Bezug auf Qualität, Sicherheit und Wirksamkeit nahezu identische Eigenschaften aufweisen. Für die Zulassung von Biosimilars durch die Aufsichtsbehörden müssen die physikalisch-chemischen Ähnlichkeiten zwischen dem Innovatorprodukt und dem Biosimilar nachgewiesen werden.<sup>2</sup>

Die Größenausschlusschromatographie (SEC) stellt bei der Untersuchung von Proteinaggregaten den Goldstandard dar. SEC kann jedoch für die Analyse hochkonzentrierter mAb-Proben ungeeignet sein, da sich die Zusammensetzung der Aggregate in der Probe durch die während der Analyse stattfindende Verdünnung verändern kann. FTIR ist hingegen eine anerkannte und in pharmazeutischen Labors und Fertigungsprozessen weithin verwendete Methode, die ihre Eignung für die Aggregationsanalyse an hochkonzentrierten Proteinproben unter Beweis gestellt hat.

Diese Untersuchung beschreibt die Verwendung des Agilent Cary 630 FTIR-Spektrometers zur Überwachung der Proteinaggregation von Rituximab, einem therapeutischen monoklonalen Antikörper. In einem Modellsystem wurde das Innovatorprodukt und das Biosimilar von Rituximab thermischer Belastung ausgesetzt, woraufhin die Aggregation mittels FTIR anhand der Verschiebung der Amidbande bestimmt wurde.



**Abbildung 1.** Das Agilent Cary 630 FTIR-Benchtop-Spektrometer ist vielseitig, innovativ und intuitiv und liefert qualitative und quantitative Informationen bei der Analyse von Feststoffen, Flüssigkeiten und Gasen.

In vielen pharmazeutischen Labors ist das Cary 630 FTIR aufgrund seiner Robustheit, Flexibilität, Leistungsfähigkeit, Benutzerfreundlichkeit und seines ultrakompakten Designs (siehe Abbildung 1) die Methode der Wahl für die FTIR-Analyse. Zu den typischen Anwendungen gehört die Identifizierung von Arzneimitteln sowie die Kontrolle von eingehenden Waren und Verpackungsmaterialien. Aber auch quantitative Messungen, wie z. B. die Konzentration pharmazeutischer Inhaltsstoffe, gehören zum Anwendungsspektrum. Je nach Anwendung lässt sich das Cary 630 FTIR schnell mit optimierten Probenmodulen umkonfigurieren, die keine Justierung durch den Benutzer erfordern.

Zur weiteren Vereinfachung der Bedienung bietet die Agilent MicroLab Software schrittweise Anleitungen mit anschaulichen Bildern, die den Benutzer auf intuitive Weise durch den gesamten analytischen Arbeitsablauf führen (Abbildung 2). Darüber hinaus stellt Agilent mit MicroLab Expert eine leistungsfähige Software für die FTIR-Spektroskopie zur Verfügung, die in Bezug auf die analytische Flexibilität und die Visualisierung von Spektren mehr Möglichkeiten bietet als die Standardsoftware. Agilent MicroLab Expert ermöglicht die Anzeige von Spektralinformationen während der Datenerfassung, was für Aggregationsstudien von großem Nutzen ist.



**Abbildung 2.** Die intuitive Agilent MicroLab Software des Agilent Cary 630 FTIR führt den Benutzer sicher durch den analytischen Arbeitsablauf, reduziert den Schulungsbedarf und minimiert das Risiko von Bedienungsfehlern.

## Experimentelles

### Geräte

Das Cary 630 FTIR-Spektrometer war mit einem Diamant-Einfachreflexionsmodul für abgeschwächte Totalreflexion (ATR) ausgestattet. Die Datenerfassung wurde mit der Agilent MicroLab Expert Software unter Verwendung der in Tabelle 1 aufgeführten Parameter durchgeführt.

**Tabelle 1.** Versuchsparameter für das Agilent Cary 630 FTIR.

Parameter	Wert
Spektralbereich	4000 bis 650 $\text{cm}^{-1}$
Hintergrundscans	140
Probenscans	140
Auflösung	4 $\text{cm}^{-1}$
Zerofill-Faktor	Keiner
Apodisation	Triangular
Phasenkorrektur	Mertz
Messtechnologie	ATR

### Materialien

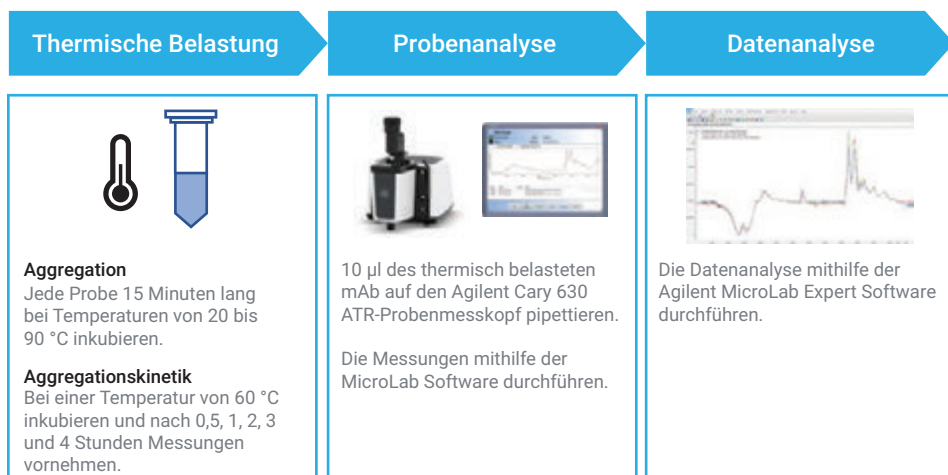
- Das Innovatorprodukt und das Biosimilar von Rituximab wurden von einem lokalen Händler in Singapur bezogen. Beide mAb-Proben wurden mit Vivaspin 500 Zentrifugalkonzentratoren (10 kDa MWCO, Sartorius) aufkonzentriert.

- Frisches Reinstwasser wurde einem Milli-Q Integral System entnommen, das mit einer Entnahmeeinheit mit 0,22- $\mu\text{m}$ -Membran (Merck Millipore) ausgestattet war.
- Der Formulierungspuffer bestand aus 5,35 mg/ml wasserfreiem Natriumdihydrogencitrat mit pH 6,5 (CAS 18996-35-5), 9 mg/ml Natriumchlorid (CAS 7647-14-5) und 0,7 mg/ml Polysorbat 80 (CAS 9005-65-6). Alle Reagenzien wurden bei Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, erworben.

### Arbeitsablauf

Der Arbeitsablauf für die Aggregationsanalyse des Innovatorprodukts und Biosimilars von Rituximab unter Verwendung des Cary 630 FTIR ist in Abbildung 3 dargestellt.

Zuerst wurden die Konzentrationen von zwei Rituximab-Proben, die in Zentrifugalkonzentratoren aufkonzentriert wurden, mittels UV-Extinktion auf dem Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometer gemessen. Zur Berechnung der Proteinkonzentration in jeder Probe wurde ein Extinktionskoeffizient von  $1,7 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$  zugrunde gelegt. Für das Innovatorprodukt und das Biosimilar von Rituximab wurde eine Konzentration von 50 mg/ml bestimmt.



**Abbildung 3.** Arbeitsablauf für die Aggregationsanalyse des Innovatorprodukts und Biosimilars von Rituximab unter Verwendung des Agilent Cary 630 FTIR ist dargestellt.

Für die Aggregationsstudie wurden 10 µl konzentriertes Rituximab mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und 15 Minuten lang bei erhöhter Temperatur inkubiert. Danach wurden Messungen mit dem Cary 630 FTIR durchgeführt. Die Inkubationstemperaturen betragen 20, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 und 90 °C.

Für die kinetischen Aggregationsexperimente wurden 75 µl konzentriertes Rituximab mit demselben Volumen Wasser oder Formulierungspuffer verdünnt. Alle Lösungen wurden bei 60 °C inkubiert. Dann wurden nach 0,5, 1, 2, 3 und 4 Stunden jeder Probe 10 µl für FTIR-Messungen entnommen.

Die unter den jeweiligen Testbedingungen gewonnenen Proben wurden mit dem Cary 630 FTIR in Dreifachbestimmungen gemessen.

### Datenanalyse

Für die Datenanalyse wurde Agilent MicroLab Expert (Version 1.1.0.1) verwendet. Für die Datenverarbeitung wurden die (über drei Messungen) gemittelten Spektren herangezogen. Mit der Spektrum-Arithmetikfunktion „Subtract Spectra“ auf der Registerkarte „Mathematics“ wurde das Spektrum einer Blindprobe (z. B. Wasser oder Formulierungspuffer) von den gemittelten Spektren subtrahiert. Die Spektren wurden nach der Subtraktion mit „Merge View“ auf der Registerkarte „2D View“ zusammengeführt. Die weitere Verarbeitung und Datenanalyse erfolgte auf der Registerkarte „Mathematics“ durch Normalisierung, Normalisierung des Spektrums nach Peakfläche und Glättung unter Verwendung von Glättungsfenster 9 und Polynomordnung 3. Für die Spektren der Ableitung zweiter Ordnung wurde auf der Registerkarte „Mathematics“ eine Savitzky-Golay-Ableitung zweiter Ordnung mit Glättungsfenster 9 angewendet.

Das Diagramm für die Aggregationsstudie folgt einer Reaktionskinetik erster Ordnung, die sich durch die folgenden Gleichungen beschreiben lässt:

$$\text{Reaktionsgeschwindigkeit} = -d[A]/dt = k[A]$$

$$d[A]/[A] = -kdt$$

$$\ln[A] - \ln[A]_0 = -kt$$

Durch Umformung und Auflösung nach  $[A]$  erhält man eine Form des Geschwindigkeitsgesetzes:

$$\ln[A] = \ln[A]_0 - kt$$

$$\ln[A] = -kt + \ln[A]_0$$

Dabei gilt:

$[A]$  ist die Konzentration zum Zeitpunkt  $t$

$[A]_0$  ist die Konzentration zum Zeitpunkt 0

$k$  ist die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung

Die Steigung der Linie von  $\ln[A]$  als Funktion der Zeit ergibt somit den Wert von  $-k$ .

Die Halbwertszeit einer Kinetik erster Ordnung lässt sich wie folgt berechnen:

$$t_{1/2} = 0,693/k$$

## Ergebnisse und Diskussion

### Temperaturinduzierte Aggregation

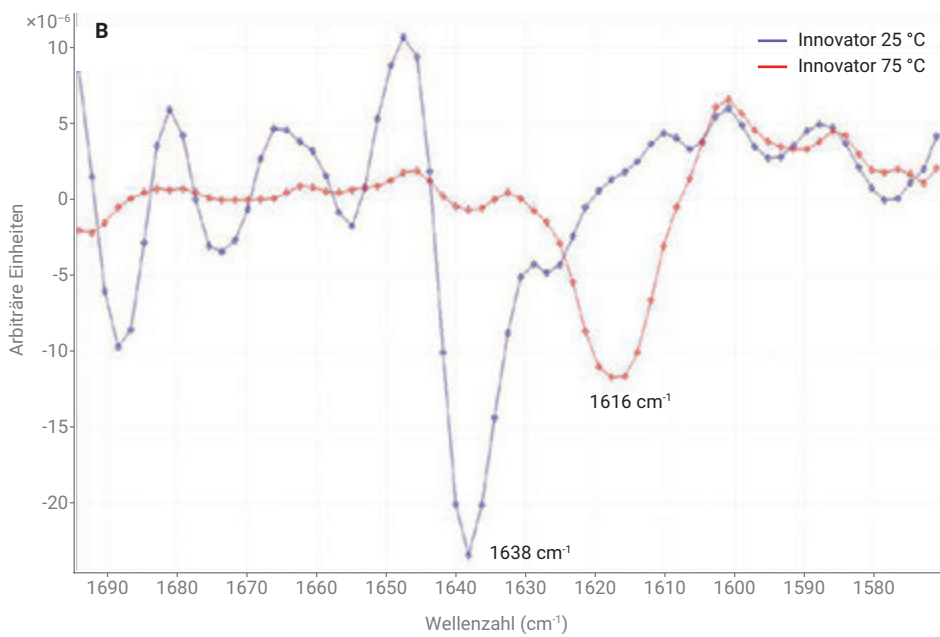
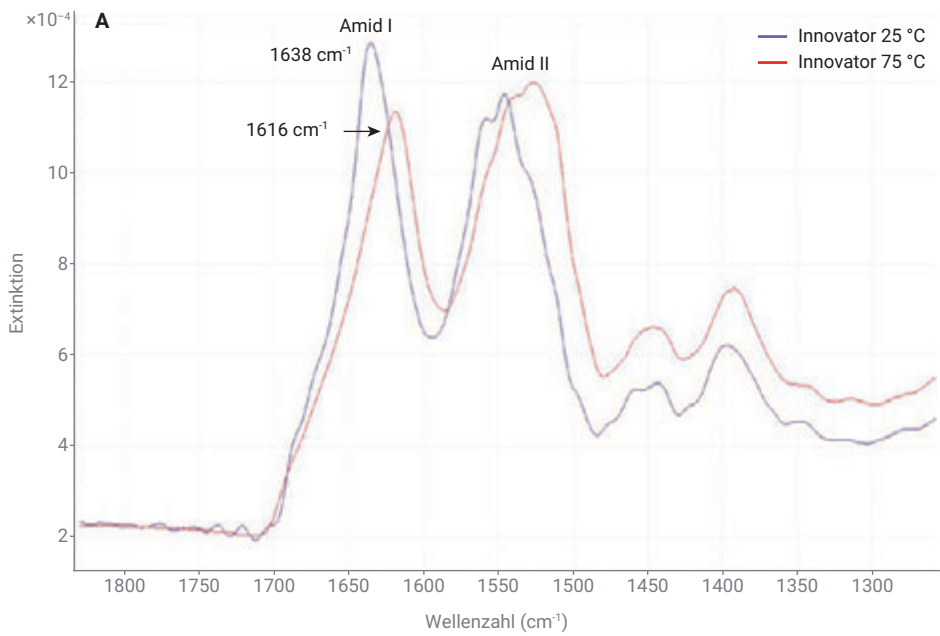
Die temperaturabhängigen Veränderungen der Sekundärstrukturen sowohl des mAb-Innovatorprodukts als auch des entsprechenden Biosimilars wurden mittels FTIR-Spektroskopie untersucht. Zur Proteincharakterisierung werden normalerweise die Amid-Spektralbanden Amid I und Amid II<sup>3</sup> herangezogen (siehe Abbildung 4). Abbildung 4A zeigt die FTIR-Spektren des Rituximab-Innovatorprodukts bei 25 und 75 °C. Bei 25 °C liegt die Amid-I-Bande bei 1638 cm<sup>-1</sup>, was mit der Sekundärstruktur der intramolekularen β-Faltblätter vereinbar ist.

Wie die Röntgenanalyse zeigt, handelt es sich bei den monoklonalen Antikörpern um Proteine, die reich an β-Faltblättern sind.<sup>4</sup> Bei 75 °C ist die Amid-I-Bande auf 1616 cm<sup>-1</sup> verschoben, was sich auf die Bildung intermolekularer β-Faltblatt-Sekundärstrukturen während der Aggregation zurückführen lässt.<sup>5,6</sup> Die IR-Spektren der zweiten Ableitung des Rituximab-Innovatorprodukts bei 25 und 75 °C (Abbildung 4B) zeigen eine deutlichere Unterscheidung der Amid-I-Verschiebung von 1638 auf 1616 cm<sup>-1</sup> während der Rituximab-Aggregation.

Abbildung 5 zeigt, wie sich das Verhältnis der Extinktionen bei 1616 und 1638 cm<sup>-1</sup> sowohl für das Innovatorprodukt als auch für das Biosimilar mit steigender Temperatur verändert. Auf der Grundlage des Wendepunkts, an dem die Extinktion bei 1616 cm<sup>-1</sup> größer wird als die bei 1638 cm<sup>-1</sup>, lässt sich die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) des Innovatorprodukts auf 70,2 °C und die des Biosimilars auf 71,8 °C bestimmen. Diese Temperaturen stimmen mit der für Rituximab berichteten  $T_m$  von 71,6 °C überein, die mithilfe der dynamischen Differenzkalorimetrie (DSC) gemessen wurde.<sup>7</sup> Die Ergebnisse machen deutlich, dass das Cary 630 FTIR für die Messung der thermischen Denaturierung monoklonaler Antikörper geeignet ist.

### Effekte des Formulierungspuffers auf die Aggregationskinetik

Es wurde eine ausführliche kinetische Untersuchung durchgeführt, da bei Studien zur thermischen Denaturierung der Einfluss des Puffers auf die thermische Stabilität nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Um den Einfluss des Formulierungspuffers auf die Aggregationskinetik zu untersuchen, wurde die Temperatur während des Versuchs konstant auf 60 °C (niedriger als  $T_m$ ) gehalten. Abbildung 6 zeigt den natürlichen Logarithmus der Extinktion bei 1638 cm<sup>-1</sup> in Abhängigkeit von der Zeit bei 60 °C für Lösungen des mAb-Innovatorprodukts und des entsprechenden Biosimilars mit oder ohne Formulierungspuffer.

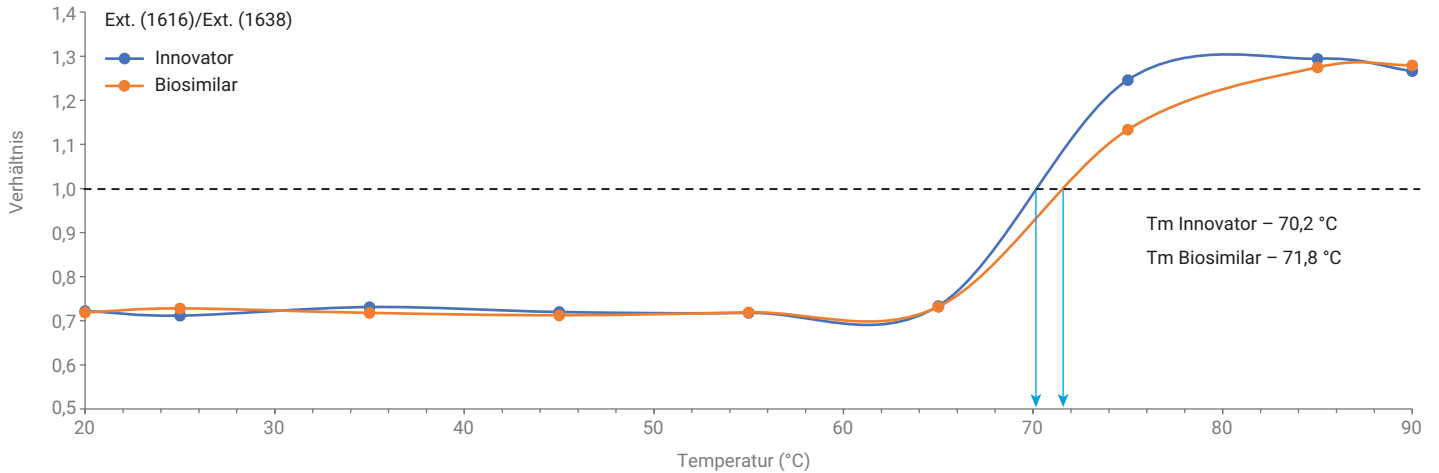


**Abbildung 4.** (A) FTIR-Spektren des Rituximab-Innovatorprodukts bei 25 und 75 °C. (B) IR-Spektren der zweiten Ableitung des Rituximab-Innovatorprodukts bei 25 und 75 °C.

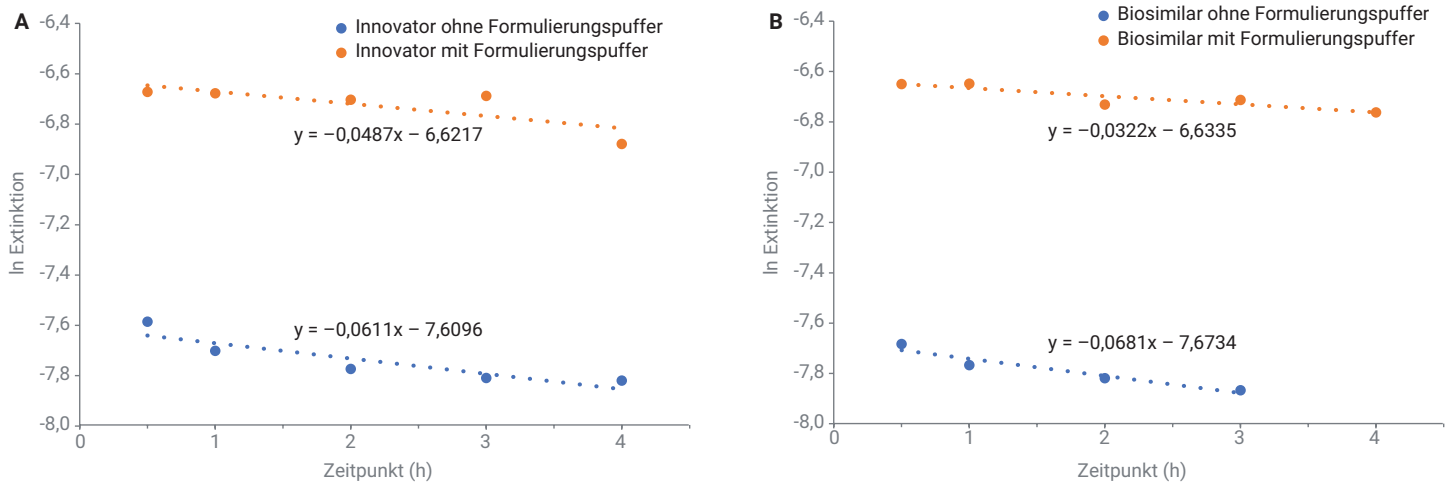
Es wurde angenommen, dass der Aggregationsprozess einer Kinetik erster Ordnung unterliegt.<sup>8</sup> Anhand der Steigung der Kurve wurden die Konstanten erster Ordnung  $k_1$  und  $t_{1/2}$  bestimmt. Die kinetischen Parameter für das Innovatorprodukt und das Biosimilar sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Beide Proteine weisen mit Formulierungspuffer eine höhere Stabilität auf, was sich

im Vergleich zum Versuch ohne Formulierungspuffer in einer niedrigeren Geschwindigkeitskonstante und einem höheren  $t_{1/2}$ -Wert zeigt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Formulierungspuffer Schutz vor thermischer Belastung bietet. Es zeigte sich, dass unter nicht formulierten Bedingungen ähnliche  $k_1$ -Werte für das mAb-Innovatorprodukt und das

entsprechende Biosimilar erhalten wurden. Mit Formulierungspuffer wies das Biosimilar eine höhere Stabilität als das Innovatorprodukt auf (niedriger  $k_1$ -Wert und höherer  $t_{1/2}$ -Wert). Formulierung und Hilfsstoffe können einen großen Einfluss auf die Stabilität von Antikörpern haben. Hilfsstoffe zur Aufrechterhaltung des pH-Werts (z. B. Tris-, Acetat-, Histidin- und Citratpuffer) können die Stabilität erhöhen.<sup>9</sup>



**Abbildung 5.** Änderung des Verhältnisses der Extinktion bei  $1616\text{ cm}^{-1}$  und  $1638\text{ cm}^{-1}$  für das Innovatorprodukt und das Biosimilar von Rituximab bei Erhöhung der Temperatur.



**Abbildung 6.** Natürlicher Logarithmus der Extinktion ( $1638\text{ cm}^{-1}$ ) als Funktion der Zeit bei  $60\text{ °C}$  für Lösungen des Innovatorprodukts (A) und des Biosimilars (B) mit oder ohne Formulierungspuffer. Aufgrund der großen Schwankungen in den Messwerten des Biosimilars ohne Formulierungspuffer nach 4 Stunden wurde dieser Datenpunkt nicht in die Analyse einbezogen.

**Tabelle 2.** Aggregationskinetik von Innovatorprodukt und Biosimilar mit und ohne Formulierungspuffer.

	Ohne Formulierungspuffer		Mit Formulierungspuffer	
	$k_1$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)	$k_1$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)
Innovator	0,0611	11,34	0,0487	14,34
Biosimilar	0,0681	10,17	0,0322	21,52

## Schlussfolgerung

Das Agilent Cary 630 FTIR-Spektrometer ist ein leicht zu bedienendes Gerät für die Analyse der Proteinaggregation von Biopharmazeutika, ohne dass eine aufwendige Probenvorbereitung erforderlich ist. Die Aggregation konnte mit dieser Methode, die über den gesamten mAb-Herstellungsprozess eingesetzt werden kann, in hochkonzentrierten Proben schnell gemessen werden. Die mittels FTIR ermittelte Temperatur, bei der Rituximab thermisch denaturiert, stimmte mit der in der Literatur angegebenen Temperatur überein, was die Effektivität der Methode unterstreicht.

Das Cary 630 FTIR mit Agilent MicroLab Expert Software wurde auch dazu eingesetzt, die stabilisierende Wirkung von Formulierungspuffern auf die Aggregationskinetik monoklonaler Antikörper zu untersuchen. Es sind zwar noch weitere Untersuchungen erforderlich, um den Mechanismus der Proteinaggregation vollständig aufzuklären, aber diese erste Studie hat gezeigt, dass das Cary 630 FTIR wichtige Informationen zur Faltung von Proteinen liefern kann.

Das Cary 630 FTIR ist einfach zu bedienen, erfordert keine Probenvorbereitung und kann in der biopharmazeutischen Industrie auf vielfältige Weise eingesetzt werden, so z. B. zur Qualitätskontrolle der Aggregation in Innovator- und Biosimilar-Therapeutika auf Proteinbasis.

## Literaturverweise

1. Carpenter, J. F. *et al.* Overlooking Subvisible Particles in Therapeutic Protein Products: Gaps That May Compromise Product Quality. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*(4), 201–5.
2. Biologics vs Biosimilars: Understanding the Differences. Erhältlich unter: [https://www.pfizer.com/news/articles/biologics\\_vs\\_biosimilars\\_understanding\\_the\\_differences](https://www.pfizer.com/news/articles/biologics_vs_biosimilars_understanding_the_differences).
3. Tiernan, H.; Byrne, B.; Kazarian, S. G. ART-FTIR Spectroscopy And Spectroscopic Imaging for the Analysis of Biopharmaceuticals. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2020**, *241*, 118636.
4. Costantino, H. R. *et al.* Fourier-Transform Infrared Spectroscopic Analysis of the Secondary Structure of Recombinant Humanized Immunoglobulin G. *Pharmacy and Pharmacology Comm.* **1997**, *3*(3), 121–128.
5. Sathya Devi, V.; Coleman, D. R.; Truntzer, J. Thermal Unfolding Curves of High Concentration Bovine IgG Measured by FTIR Spectroscopy. *Protein J.* **2011**, *30*(6), 395–403.
6. Baird, G. *et al.* FTIR Spectroscopy Detects Intermolecular  $\beta$ -Sheet Formation Above the High Temperature  $T_m$  for Two Monoclonal Antibodies. *Protein J.* **2020**, *39*(4), 318–327.
7. Flores-Ortiz, L. F. *et al.* Physicochemical Properties of Rituximab. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2014**, *37*(10), 1438–1452.
8. Byler, D. M. *et al.* Effect of Sucrose on the Thermal Denaturation of a Protein: an FTIR Spectroscopic Study of a Monoclonal Antibody. AIP Conference Proceedings, *American Institute of Physics* **1998**, *430*(1), 332–335.
9. Ma, H.; Ó'Fágáin, C.; O'Kennedy, R. Antibody Stability: a Key to Performance-Analysis, Influences and Improvement. *Biochimie* **2020**, *177*, 213–225.

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

DE95285922

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2022  
Gedruckt in den USA, 31. Mai 2022  
5994-4944DEE