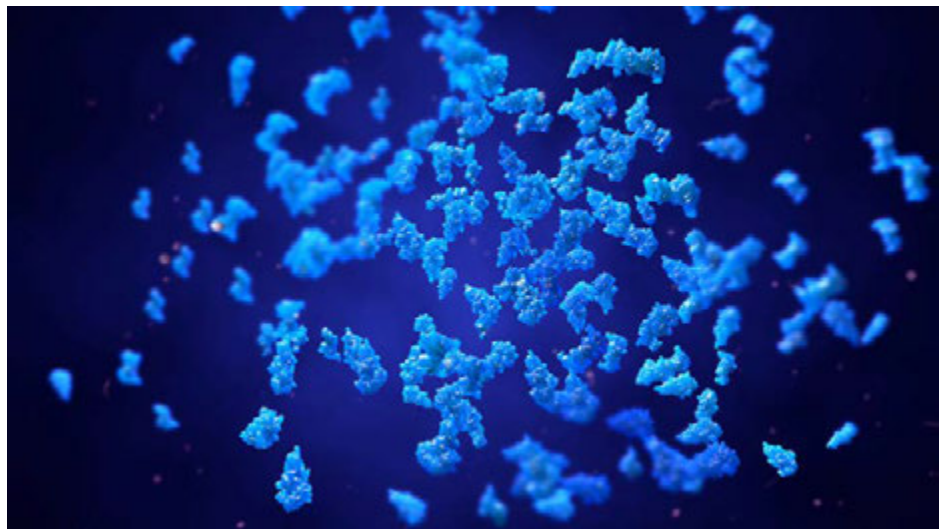


Análisis de agregación de proteínas terapéuticas originales y biosimilares mediante FTIR

Medición de la agregación de rituximab en muestras concentradas mediante el espectrómetro FTIR Agilent Cary 630

Autores

Aveline Neo y
Ravindra Gudihal
Agilent Technologies, Inc.



Resumen

La agregación de proteínas puede tener lugar durante la fabricación o el almacenamiento de sustancias terapéuticas biológicas como los anticuerpos monoclonales (mAbs) y puede influir en su eficacia, su intensidad y su seguridad. Por tanto, es importante monitorizar la agregación de proteínas a lo largo del proceso de fabricación de los anticuerpos monoclonales. La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica no destructiva que monitoriza de forma rápida la agregación de anticuerpos monoclonales incluso en muestras de elevada concentración, que resultan exigentes para otros métodos. En esta nota de aplicación, el espectrómetro FTIR Agilent Cary 630 se utilizó para medir la agregación de proteínas provocada por el calor. El estudio facilita información sobre la estabilidad de las muestras con concentraciones altas de anticuerpos monoclonales en un tampón de formulación. También demuestra cómo se puede utilizar FTIR Cary 630 para optimizar los procesos de control de calidad y fabricación de productos originales o biosimilares.

Introducción

La agregación supone un problema importante en el desarrollo y la fabricación de anticuerpos monoclonales, ya que los agregados pueden contribuir a la generación de respuestas inmunitarias que pueden poner la vida en peligro. Los anticuerpos monoclonales pueden sufrir agregaciones cuando se exponen a condiciones rigurosas como pH bajo, temperaturas elevadas y altas concentraciones. Dado que los anticuerpos monoclonales terapéuticos se suelen administrar en concentraciones elevadas, es importante monitorizar los agregados de anticuerpos monoclonales como si se tratase de un atributo de control de calidad crítico.¹

Los productos biosimilares son copias de productos terapéuticos originales que tienen casi los mismos parámetros de calidad, seguridad y eficacia que el producto de referencia. Para que los organismos de regulación aprueben los productos biosimilares, es necesario definir las similitudes fisicoquímicas entre el producto original y el biosimilar.²

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es el patrón más importante en cuanto a técnicas de estudio de los agregados de proteínas. Sin embargo, la SEC puede resultar poco idónea a la hora de monitorizar concentraciones elevadas de muestras de anticuerpos monoclonales dado que la dilución, que tiene lugar durante el análisis, puede modificar la composición de los agregados de la muestra. En cambio, FTIR, una técnica ampliamente conocida y utilizada en los laboratorios farmacéuticos o en las operaciones de fabricación, es idónea para llevar a cabo los estudios de agregación en muestras con concentraciones elevadas de proteínas.

En este estudio, el espectrómetro FTIR Agilent Cary 630 se empleó para monitorizar la agregación de proteínas con rituximab (un fármaco con anticuerpos monoclonales). Para elaborar el modelo del sistema, rituximab original y su biosimilar se sometieron a tensión térmica y se monitorizó la agregación mediante FTIR a través de los desplazamientos de las bandas de amida.



Figura 1. El espectrómetro FTIR de sobremesa Agilent Cary 630 es versátil, innovador e intuitivo; además, proporciona información cuantitativa y cualitativa para el análisis de sólidos, líquidos y gases.

Varios laboratorios farmacéuticos recurren a FTIR Cary 630 para llevar a cabo sus análisis de FTIR debido a la solidez, la flexibilidad, el alto rendimiento y la facilidad de uso de su diseño ultracompacto (Figura 1). Entre las aplicaciones típicas se encuentran la identificación de productos farmacológicos, mercancías entrantes y materiales de empaquetamiento, así como las mediciones cuantitativas, como la concentración de ingredientes farmacéuticos. En función de la aplicación, FTIR Cary 630 se puede volver a configurar con rapidez con módulos de muestra optimizados que no precisan la alineación del usuario.

Para facilitar aún más su uso, el software Agilent MicroLab ofrece orientación paso a paso con imágenes didácticas que guían al usuario a través de todo el flujo de trabajo analítico (Figura 2). Agilent también ofrece MicroLab Expert, un software avanzado de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier que proporciona una mayor flexibilidad analítica y mejor visualización espectral que el software estándar. MicroLab Expert permite que el analista pueda consultar la información espectral durante la recogida de datos, un factor muy útil cuando se trata de estudios de agregación.



Figura 2. El software Agilent MicroLab para el instrumento Agilent FTIR Cary 630 es intuitivo y guía al usuario a través del flujo de trabajo analítico, reduciendo de este modo la necesidad de impartir formación y reduciendo al máximo el riesgo de que el operador cometa errores.

Experimento

Instrumentos

El espectrómetro FTIR Cary 630 se equipó con un módulo de muestreo de reflectancia total atenuada (ATR) de diamante de reflexión única. La adquisición de datos se llevó a cabo mediante el software Agilent MicroLab Expert con los parámetros que se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros experimentales del sistema FTIR Agilent Cary 630.

Parámetro	Valor
Rango espectral	De 4.000 a 650 cm^{-1}
Barridos del fondo	140
Barridos de la muestra	140
Resolución	4 cm^{-1}
Factor de llenado cero	Ninguno
Apodización	Triangular
Corrección de fase	Mertz
Tecnología de muestreo	ATR

Materiales

- Se adquirieron tanto el rituximab original como su biosimilar en un distribuidor local de Singapur. Ambas muestras de anticuerpos monoclonales se concentraron mediante columnas centrífugas concentradoras Vivaspin 500 (10 kDa de MWCO; Sartorius).

- Se obtuvo agua ultrapura nueva a partir de un sistema integrado MilliQ equipado con un cartucho de membrana de 0,22 μm en el punto de consumo (Merck Millipore).
- El tampón de formulación contenía 5,35 mg/ml citrato sódico monobásico anhidro con pH 6,5 (CAS 18996-35-5), 9 mg/ml de cloruro sódico (CAS 7647-14-5) y 0,7 mg/ml de polisorbato 80 (CAS 9005-65-6). Todos los reactivos se adquirieron a Sigma- Aldrich, St. Louis.

Flujo de trabajo

El flujo de trabajo del estudio de agregación de rituximab original y biosimilar mediante FTIR Cary 630 se muestra en la Figura 3.

En primer lugar, se midió la concentración de dos muestras concentradas de rituximab de columna centrífuga mediante absorbancia UV con el espectrofotómetro UV-vis Cary 60. El coeficiente de extinción de 1,7 $\text{mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ sirvió para calcular la concentración de proteína en cada muestra. Se estimó que la concentración en rituximab original y su biosimilar era de 50 mg/ml.



Figura 3. Flujo de trabajo de agregación del análisis de rituximab original y biosimilar mediante Agilent FTIR Cary 630.

En el estudio de agregación, se diluyeron 10 µl de rituximab concentrado en un volumen equivalente de agua y se incubaron a una temperatura elevada durante 15 minutos antes de hacer las mediciones con FTIR Cary 630. Las temperaturas de incubación fueron 20, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 y 90 °C.

En los ensayos cinéticos de agregación se diluyeron 75 µl de rituximab concentrado con un volumen de agua o de tampón de formulación equivalente. Cada solución se incubó posteriormente a 60 °C. Se recogieron 10 µl de cada muestra una vez transcurridas 0,5; 1; 2; 3 y 4 horas para llevar a cabo las mediciones con FTIR.

Las muestras que se obtuvieron en cada una de las condiciones experimentales se midieron tres veces con FTIR Cary 630.

Análisis de datos

El análisis de datos se llevó a cabo mediante Agilent MicroLab Expert (versión 1.1.0.1). El espectro promedio (de las tres mediciones) se utilizó para llevar a cabo el procesamiento de los datos. Se sustrajo un espectro en blanco (como el del agua o del tampón de formulación) del espectro promedio mediante la función "Sustraer espectro" de la sección Aritmética de espectros que se encuentra en la pestaña "Cálculos matemáticos". El espectro en blanco sustraído se combinó mediante la función "Combinar vista" de la pestaña Vista en 2D. Se llevaron a cabo el procesamiento y análisis de datos posteriores mediante la función Normalización, que normaliza el espectro por área de pico, y el Suavizado a través de la ventana 9 de suavizado y el orden polinómico 3 de la pestaña Cálculos matemáticos. En el caso de los espectros derivados de segundo orden, se aplicó una derivada de segundo orden de Savitzky Golay con ventana de suavizado 9 en la pestaña Cálculos matemáticos.

En el estudio de agregación, el gráfico sigue una cinética de reacciones de primer orden, tal y como se ilustra en las siguientes ecuaciones:

$$\text{Índice} = -d[A]/dt = k[A]$$

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

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

Reorganizar para resolver para [A] y obtener una forma de la ley de velocidad:

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

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

donde

[A] es la concentración en el momento t

[A]₀ es la concentración en el momento 0

k es la constante del índice de primer orden

Por consiguiente, la pendiente de la línea de ln[A] frente al tiempo es igual al valor de -k.

La vida media de la cinética de primer orden se calcula de la siguiente forma:

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

Resultados y comentarios

Agregación provocada por la temperatura

Los cambios en la estructura secundaria que dependen de la temperatura tanto de los anticuerpos monoclonales originales como sus biosimilares se estudiaron mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier. Las bandas espectrales de amida que sirven habitualmente para la caracterización de las proteínas son Amida I y Amida II³, tal y como se muestra en la Figura 4. En la Figura 4A aparece el espectro FTIR del rituximab original a 25 y 75 °C. A 25 °C, la banda de Amida I se sitúa en 1.638 cm⁻¹, lo que se atribuye a la estructura secundaria de hoja beta intramolecular. Los anticuerpos monoclonales son proteínas ricas en hoja beta, como se evidencia en el análisis por rayos X.⁴

A 75 °C, la banda Amida I se desplaza a 1.616 cm⁻¹, lo que se atribuye a la formación de estructuras secundarias de hoja beta intermolecular durante la agregación.^{5,6} El espectro IR de segunda derivada del rituximab original a 25 y 75 °C (Figura 4B) muestra una distinción más clara del desplazamiento de las bandas de Amida I de 1.638 a 1.616 cm⁻¹ durante la agregación de rituximab.

En la Figura 5 se muestra el cambio en el índice de absorbancia a 1.616 y 1.638 cm⁻¹ tanto en el original como en el biosimilar con el aumento de temperatura. Si se tiene en cuenta el punto de cruce en el que la absorbancia a 1.616 cm⁻¹ se hace mayor que 1.638 cm⁻¹, se puede estimar la temperatura de fusión (T_m) del original y del biosimilar a 70,2 y 71,8 °C, respectivamente. Estas temperaturas coinciden con la T_m notificada de rituximab a 71,6 °C medida mediante calorimetría de barrido diferencial.⁷ Los resultados muestran la idoneidad de FTIR Cary 630 para la observación de la desnaturalización térmica de los anticuerpos monoclonales.

Efectos del tampón de formulación en la cinética de agregación

Se llevó a cabo un estudio detallado de la cinética, ya que los estudios de desnaturalización térmica no consiguieron identificar de forma clara los efectos del tampón en la estabilidad térmica. Para estudiar el efecto del tampón de formulación en la cinética de agregación, se mantuvo una temperatura de 60 °C (inferior a la T_m) durante el experimento. En la Figura 6 se muestra el logaritmo natural de absorbancia a 1.638 cm⁻¹ frente al tiempo a 60 °C de las soluciones de los anticuerpos monoclonales originales y biosimilares con tampones de formulación o sin ellos. Se supuso que la cinética de primer orden regía el proceso de agregación.⁸

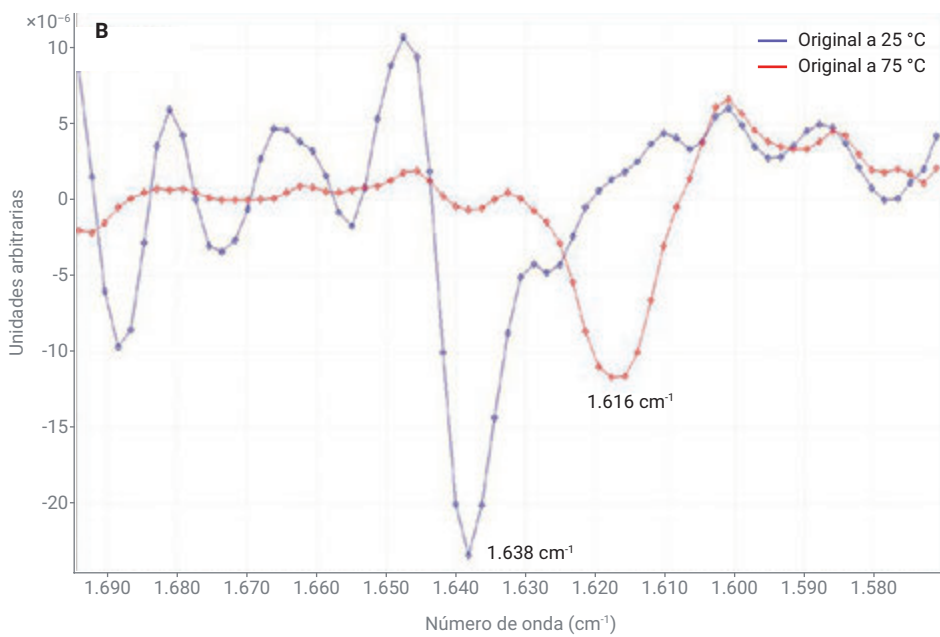
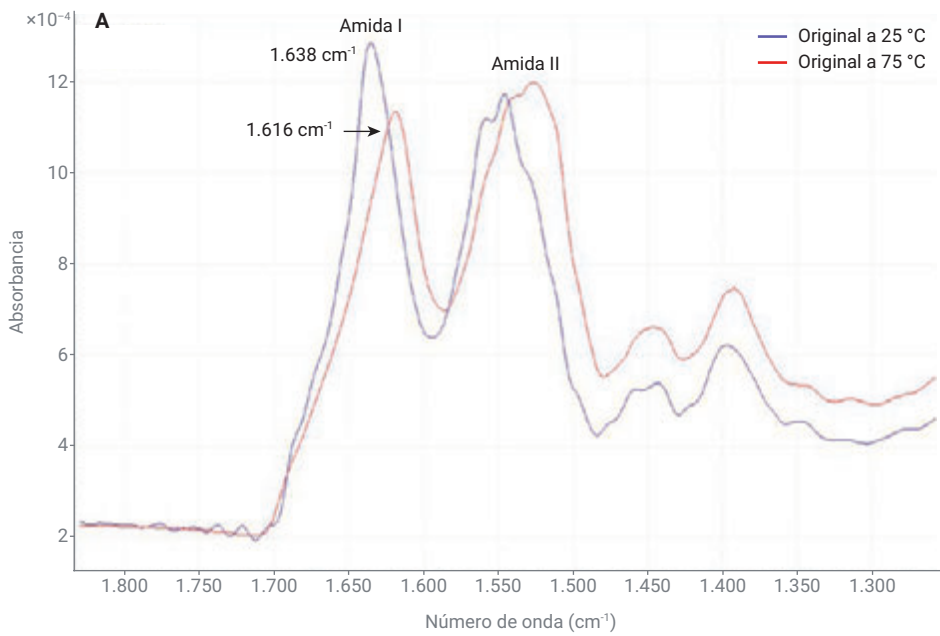


Figura 4. (A) Espectro FTIR de rituximab original a 25 y 75 °C. (B) Espectro IR de segunda derivada de rituximab original a 25 y 75 °C.

Se calcularon las constantes de primer orden, k_1 y $t_{1/2}$, a partir de la pendiente de la línea. En la Tabla 2 se muestran los parámetros de la cinética del producto original y el biosimilar. Ambas proteínas presentan un aumento de la estabilidad con el tampón de formulación, tal y como evidencia la constante de velocidad más lenta y la

$t_{1/2}$ más elevada en comparación con la ausencia de tampón de formulación. Este resultado sugiere que el tampón de formulación ofrece protección frente a la tensión térmica. El valor de k_1 de los anticuerpos monoclonales originales y biosimilares era parecido al de las condiciones sin formulación. Con el tampón de formulación, el producto

biosimilar era más estable (un valor k_1 inferior y un valor $t_{1/2}$ superior) que el original. La formulación y los excipientes pueden afectar en gran medida a la estabilidad de los anticuerpos. Los excipientes que conservan el pH (como los tampones con tris, acetato, histidina y citrato) pueden aumentar la estabilidad.⁹

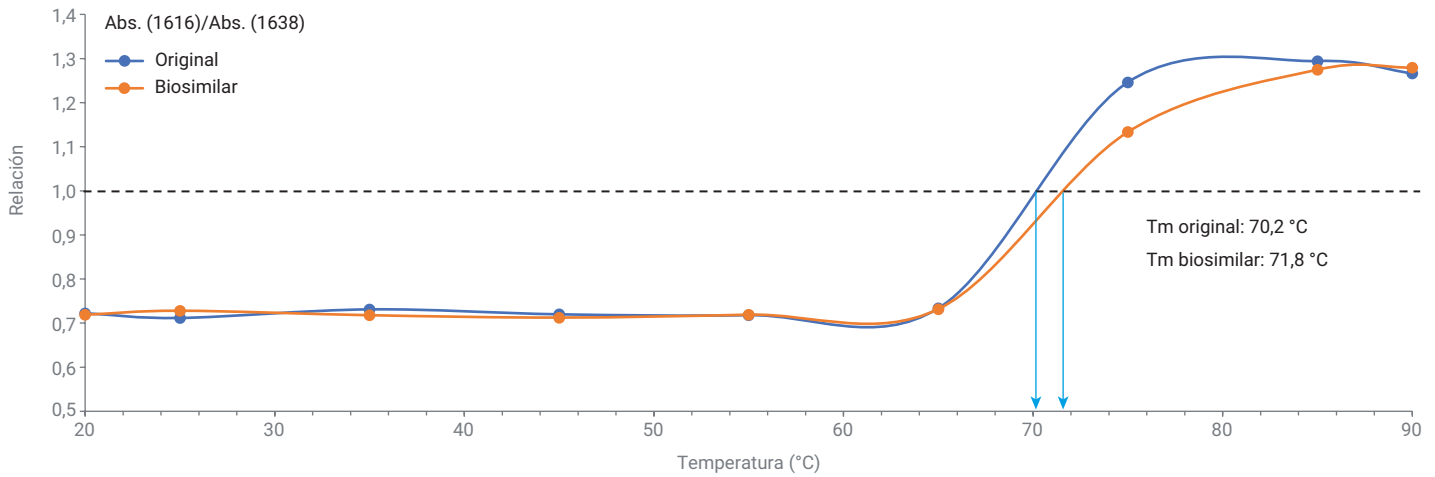


Figura 5. Cambio en el índice de absorbancia a 1.616 cm^{-1} y 1.638 cm^{-1} tanto para rituximab original como para el biosimilar con los incrementos de temperatura

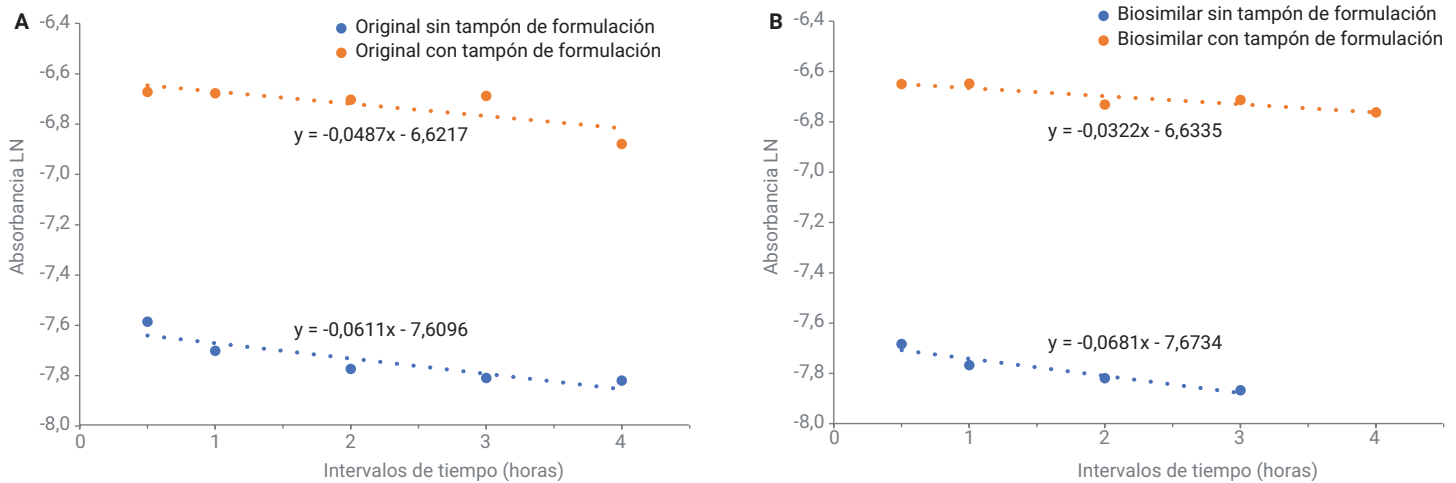


Figura 6. Logaritmo natural de absorbancia (1.638 cm^{-1}) frente al tiempo a 60 °C de las soluciones originales (A) y biosimilares (B) con tampones de formulación y sin ellos. Debido a la gran variación en las mediciones en el producto biosimilar sin tampón de formulación a las 4 horas, el punto de datos no se incluyó en el análisis.

Tabla 2. Cinética de la agregación del producto original y biosimilar con el tampón de formulación y sin él.

	Sin tampón de formulación		Con tampón de formulación	
	k_1 (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	k_1 (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
Original	0,0611	11,34	0,0487	14,34
Biosimilar	0,0681	10,17	0,0322	21,52

Conclusión

El espectrómetro FTIR Agilent Cary 630 es un instrumento sencillo y fácil de usar en el análisis de la agregación de proteínas de los productos terapéuticos biológicos sin la necesidad de llevar a cabo procedimientos de preparación de muestras exhaustivos. La medición de la agregación en las muestras con elevada concentración se llevó a cabo de forma rápida mediante el método, que se puede emplear durante el proceso de fabricación de los anticuerpos monoclonales. Hubo concordancia entre la temperatura a la que tiene lugar la desnaturalización térmica del rituximab que se determinó mediante FTIR y la temperatura que aparecía en la documentación al respecto, lo que confirma la eficacia del método.

El instrumento FTIR Cary 630 con el software Agilent MicroLab Expert también sirvió para estudiar el efecto estabilizador de los tampones de formulación en la cinética de la agregación de los anticuerpos monoclonales. A pesar de que resulta necesario profundizar en la materia para comprender el mecanismo de la agregación de proteínas, este estudio inicial ha demostrado que FTIR Cary 630 puede ofrecer información ortogonal sobre el modo en el que se pliegan las proteínas.

El instrumento FTIR Cary 630 es fácil de utilizar y no precisa preparación de muestras, además de poder emplearse de forma generalizada en la industria biofarmacéutica, incluso para el control de calidad de la agregación de productos terapéuticos a partir de proteínas originales y biosimilares.

Referencias

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. Disponible en: 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 β -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

DE95285922

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Impreso en EE. UU., 31 de mayo de 2022
5994-4944ES