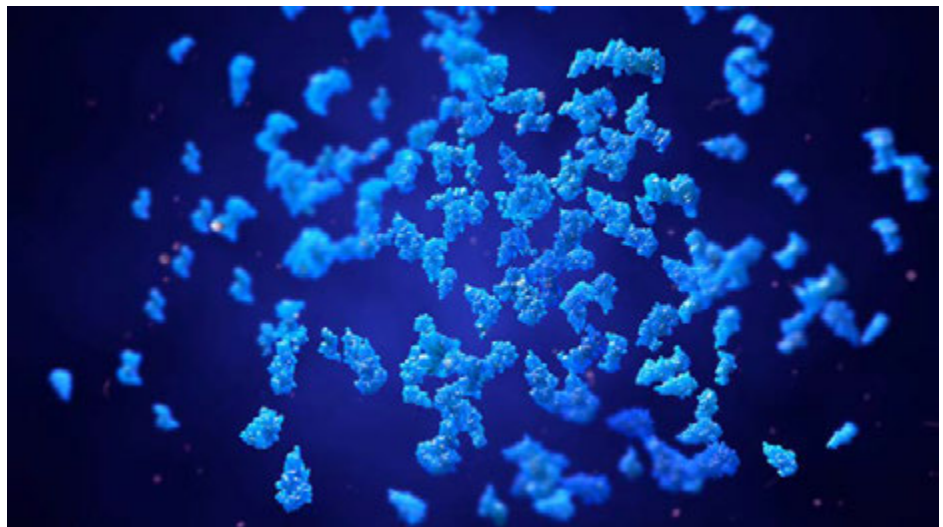


Analyse de l'agrégation de protéines thérapeutiques princeps et biosimilaires par FTIR

Mesure de l'agrégation du rituximab dans des échantillons concentrés à l'aide du spectromètre FTIR Agilent Cary 630

Auteurs

Aveline Neo et
Ravindra Gudihal
Agilent Technologies, Inc.



Résumé

Une agrégation protéique peut survenir durant la fabrication ou le stockage des produits biothérapeutiques d'origine biologique tels que les anticorps monoclonaux (mAb), ce qui altère potentiellement leur efficacité, leur puissance et leur sécurité. Il est donc important de surveiller l'agrégation protéique tout au long du processus de fabrication des mAb. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est une technique non destructive qui permet de surveiller rapidement l'agrégation des mAb, même dans les échantillons fortement concentrés difficiles à analyser avec d'autres techniques. Dans cette note d'application, le spectromètre FTIR Agilent Cary 630 a été utilisé pour mesurer l'agrégation protéique induite par voie thermique. Cette étude fournit des informations précieuses sur la stabilité des échantillons de mAb de concentration élevée dans un tampon de formulation. Elle montre également comment le FTIR Cary 630 peut servir à optimiser les procédures de contrôle-qualité et de fabrication des produits princeps ou biosimilaires.

Introduction

L'agrégation est considérée comme un problème majeur dans le développement et la fabrication des mAb, car les agrégats peuvent être impliqués dans des réponses immunitaires potentiellement mortelles. Les mAb peuvent s'agréger lorsqu'ils sont exposés à des conditions stressantes telles qu'un faible pH, une température élevée ou une forte concentration. Comme les mAb thérapeutiques sont typiquement administrés à haute concentration, il est important de considérer les agrégats de mAb comme un attribut de contrôle-qualité critique et de les surveiller.¹

Les biosimilaires sont des copies de produits thérapeutiques princeps (originaux) dont la qualité, la sécurité et l'efficacité sont quasiment identiques à celles du produit de référence.

Pour qu'un biosimilaire soit approuvé par les organismes de réglementation, il est nécessaire d'établir les similitudes physicochimiques entre le produit princeps et le biosimilaire.²

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est la technique par excellence qui permet d'étudier les agrégats protéiques. Cependant, la SEC peut ne pas être adaptée à la surveillance des échantillons de mAb de concentration élevée, car la dilution réalisée pendant l'analyse peut modifier la composition des agrégats de l'échantillon. En revanche, la FTIR, qui est une technique bien établie et couramment employée dans les laboratoires pharmaceutiques ou au cours des opérations de fabrication, est compatible avec l'étude de l'agrégation des échantillons de protéines à forte concentration.

Dans cette étude, le spectromètre FTIR Agilent Cary 630 a été utilisé pour suivre l'agrégation protéique avec du rituximab, un médicament du type mAb. En guise de système modèle, le rituximab princeps et un rituximab biosimilaire ont été soumis à une contrainte thermique, et l'agrégation a été suivie par FTIR en se concentrant sur le décalage des bandes correspondant aux amides.



Figure 1. Le spectromètre FTIR de paillasse Agilent Cary 630 est polyvalent, innovant et intuitif. Il produit des informations quantitatives et qualitatives pour l'analyse des solides, des liquides et des gaz.

Un grand nombre de laboratoires pharmaceutiques utilisent le FTIR Cary 630 pour leurs analyses FTIR en raison de sa robustesse, de sa flexibilité, de ses très bonnes performances, de sa facilité d'utilisation et de son design ultracompact (figure 1). Cet appareil est typiquement utilisé pour identifier les médicaments, les matières entrantes et les matériaux d'emballage, et pour réaliser des mesures quantitatives, par exemple pour déterminer la concentration d'ingrédients pharmaceutiques. En fonction de l'application, le FTIR Cary 630 peut être reconfiguré rapidement avec des modules d'échantillonnage optimisés ne nécessitant aucun alignement de la part de l'utilisateur.

Pour simplifier encore davantage l'utilisation de l'instrument, le logiciel Agilent MicroLab fournit des consignes pas à pas avec des instructions illustrées pour guider intuitivement l'utilisateur au travers de l'ensemble du processus d'analyse (figure 2). Agilent propose aussi MicroLab Expert Agilent, un logiciel de spectroscopie FTIR offrant plus de flexibilité analytique et une meilleure visualisation spectrale que le logiciel standard. MicroLab Expert Agilent permet aux analystes de voir les informations spectrales durant la collecte des données, ce qui est utile dans les études d'agrégation.



Figure 2. Le logiciel intuitif Agilent MicroLab du FTIR Agilent Cary 630 guide l'utilisateur au travers du processus d'analyse, réduisant ainsi le besoin en matière de formation et limitant au minimum le risque d'erreur due à l'opérateur.

Méthode expérimentale

Instrumentation

Le spectromètre FT-IR Cary 630 a été équipé d'un module à réflexion totale atténuée (ATR) avec cristal en diamant à réflexion simple. L'acquisition des données a été effectuée avec le logiciel MicroLab Expert Agilent en utilisant les paramètres figurant dans le tableau 1.

Tableau 1. Paramètres expérimentaux du FTIR Agilent Cary 630.

Paramètre	Valeur
Domaine spectral	De 4 000 à 650 cm^{-1}
Balayages pour mesurer le bruit de fond	140
Balayages pour mesurer les échantillons	140
Résolution	4 cm^{-1}
Facteur de remplissage nul	N/A
Apodisation	Triangulaire
Correction de phase	Mertz
Technologie d'échantillonnage	Réflexion totale atténuée

Matériel

- Du rituximab princeps et un rituximab biosimilaire ont été achetés auprès d'un distributeur local à Singapour. Les deux échantillons de mAb ont été concentrés à l'aide de colonnes à centrifuger sur un concentrateur centrifuge Vivaspin 500 (de Sartorius, avec seuil de coupure [MWCO] de 10 kDa).

- De l'eau ultrapure fraîchement préparée a été obtenue à partir d'un système Milli-Q Integral équipé d'une cartouche (de Merck Millipore) dotée d'une membrane de 0,22 μm .
- Le tampon de formulation était constitué de citrate de sodium monobasique anhydre à 5,35 mg/mL et pH 6,5 (n° CAS 18996-35-5), de chlorure de sodium à 9 mg/mL (n° CAS 7647-14-5) et de polysorbate 80 à 0,7 mg/mL (n° CAS 9005-65-6). Tous les réactifs ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, États-Unis.

Méthode

La méthode utilisée pour étudier l'agrégation du rituximab princeps et du rituximab biosimilaire avec le FTIR Cary 630 est présentée à la figure 3.

Pour commencer, la concentration de deux échantillons de rituximab concentrés sur une colonne à centrifuger a été mesurée par absorbance UV à l'aide du spectrophotomètre UV-Vis Cary 60. Un coefficient d'extinction de 1,7 $\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a été appliqué pour calculer la concentration en protéines de chaque échantillon. La concentration du rituximab princeps et du biosimilaire a été estimée à 50 mg/mL.

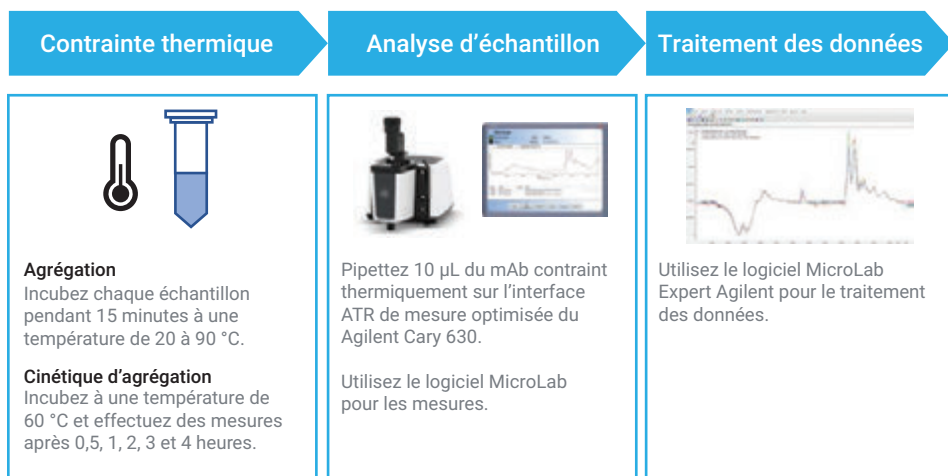


Figure 3. Processus d'agrégation utilisé pour l'analyse du rituximab princeps et du rituximab biosimilaire avec le FTIR Agilent Cary 630.

Pour l'étude d'agrégation, 10 µL de rituximab concentré ont été dilués avec un volume égal d'eau, puis incubés à haute température pendant 15 minutes avant de procéder aux mesures sur le FTIR Cary 630. Les températures d'incubation étaient de 20, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 et 90 °C.

Pour les expériences cinétiques d'agrégation, 75 µL de rituximab concentré ont été dilués avec un volume égal d'eau ou de tampon de formulation. Chaque solution a ensuite été incubée à 60 °C. 10 µL de chaque échantillon ont été recueillis après 0,5, 1, 2, 3 et 4 heures en vue des mesures par FTIR.

Les échantillons obtenus dans chacune des conditions expérimentales ont été mesurés à trois reprises avec le FTIR Cary 630.

Traitement des données

Le traitement des données a été réalisé avec le logiciel MicroLab Expert Agilent (version 1.1.0.1). Le traitement des données a été appliqué sur des spectres moyennés (à partir de trois mesures). Un spectre blanc (obtenu avec de l'eau ou du tampon de formulation par exemple) a été soustrait des spectres moyennés à l'aide de la fonction « Subtract Spectra » (Soustraire des spectres) de la section « Spectrum Arithmetic » (Spectre arithmétique) de l'onglet « Mathematics » (Mathématiques). Les spectres blancs soustraits ont été fusionnés à l'aide de « Merge View » (Fusionner l'affichage) de l'onglet « 2D View » (Affichage en 2D). Un traitement des données supplémentaire a été effectué à l'aide de « Normalization, normalize spectrum by peak area » (Normalisation, normaliser le spectre par rapport à l'aire de pic) et « Smoothing » (Lissage) avec une fenêtre de lissage de 9 et un ordre polynomial de 3 dans l'onglet « Mathematics » (Mathématiques). Pour les spectres de dérivée seconde, une dérivée seconde de Savitzky Golay avec une fenêtre de lissage de 9 dans l'onglet « Mathematics » (Mathématiques) a été appliquée.

Pour l'étude d'agrégation, le graphique suit une cinétique de réaction du premier ordre, comme illustré par les équations suivantes :

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

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

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

Après réarrangement pour trouver la valeur de $[A]$ et une forme de la loi de vitesse, on obtient :

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

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

où

$[A]$ est la concentration à l'instant t

$[A]_0$ est la concentration à l'instant 0

k est la constante de vitesse du premier ordre

La pente de la courbe de $\ln[A]$ en fonction du temps donne alors la valeur de $-k$.

La demi-vie d'une cinétique du premier ordre est calculée comme suit :

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

Résultats et discussion

Agrégation induite par la température

Les changements dépendants de la température touchant à la structure secondaire des mAb princeps et biosimilaire ont été examinés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. Les bandes spectrales des amides qui sont généralement utilisées pour caractériser les protéines sont les bandes Amide I et Amide II³, comme le montre la figure 4. La figure 4A présente les spectres FTIR du rituximab princeps à 25 et 75 °C. À 25 °C, la bande Amide I se situe à 1 638 cm⁻¹, ce qui correspond à la structure secondaire des feuillets β intramoléculaires. Les mAb sont des protéines riches en feuillets β, comme le prouve leur analyse par rayons X.⁴

À 75 °C, la bande Amide I est décalée vers 1 616 cm⁻¹, correspondant à la formation de structures secondaires en feuillets β intramoléculaires durant l'agrégation.^{5,6} Les spectres IR de dérivée seconde du rituximab princeps à 25 et 75 °C (figure 4B) montrent une distinction plus claire du décalage des bandes Amide I de 1 638 à 1 616 cm⁻¹ lors de l'agrégation du rituximab.

La figure 5 illustre la variation du rapport d'absorbance à 1 616 et 1 638 cm⁻¹ pour le rituximab princeps et le biosimilaire lorsque la température augmente. En se basant sur le point d'intersection au niveau duquel l'absorbance à 1 616 cm⁻¹ devient supérieure à celle à 1 638 cm⁻¹, il est possible d'estimer la température de fusion (T_m) du rituximab princeps et du biosimilaire comme respectivement égale à 70,2 et 71,8 °C. Ces températures concordent avec la T_m de 71,6 °C indiquée pour le rituximab et mesurée par analyse calorimétrique différentielle.⁷ Ces résultats montrent que le FTIR Cary 630 convient parfaitement à l'observation de la dénaturation thermique des mAb.

Effets du tampon de formulation sur la cinétique d'agrégation

Une étude cinétique détaillée a été réalisée, car les études de dénaturation thermique n'ont pas permis d'identifier clairement l'effet du tampon sur la stabilité thermique. Pour étudier l'effet du tampon de formulation sur la cinétique d'agrégation, une température constante de 60 °C (inférieure à T_m) a été maintenue durant l'expérience. La figure 6 montre le logarithme naturel de l'absorbance en fonction du temps à 1 638 cm⁻¹ et à 60 °C pour des solutions de mAb princeps et de mAb biosimilaires avec et sans tampons de formulation. L'hypothèse a été faite que le processus d'agrégation suivait une cinétique du premier ordre.⁸

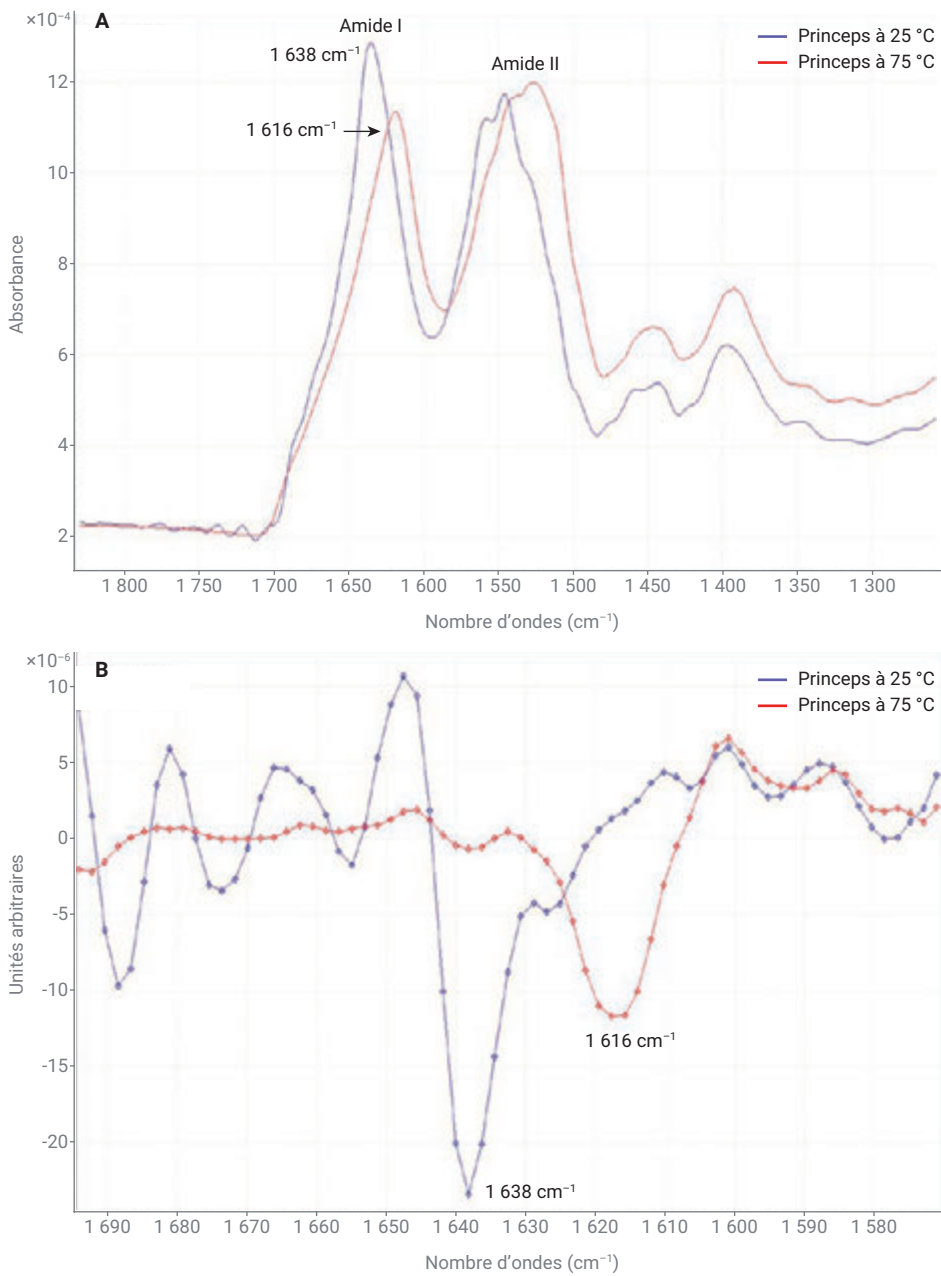


Figure 4. (A) Spectres FTIR du rituximab princeps à 25 et 75 °C. (B) Dérivée seconde des spectres IR du rituximab princeps à 25 et 75 °C.

La pente de la courbe a permis d'estimer les constantes du premier ordre, k_1 et $t_{1/2}$. Le tableau 2 donne les paramètres cinétiques du produit princeps et du biosimilaire. Les deux protéines montrent une stabilité accrue avec le tampon de formulation, comme le montrent la constante de vitesse plus faible et le $t_{1/2}$ plus élevé obtenus, par rapport à

l'absence de tampon de formulation. Ce résultat suggère que le tampon de formulation offre une protection contre la contrainte thermique. La constante k_1 des mAb princeps et biosimilaire s'est avérée similaire en conditions non formulées. Avec le tampon de formulation, le biosimilaire s'est montré plus stable (constante k_1 plus basse

et temps $t_{1/2}$ plus haut) que pour le produit princeps. Ainsi, la formulation et les excipients peuvent influencer grandement sur la stabilité des anticorps. Les excipients capables de maintenir le pH (par exemple les tampons du type tris, acétate, histidine et citrate) sont capables d'améliorer la stabilité.⁹

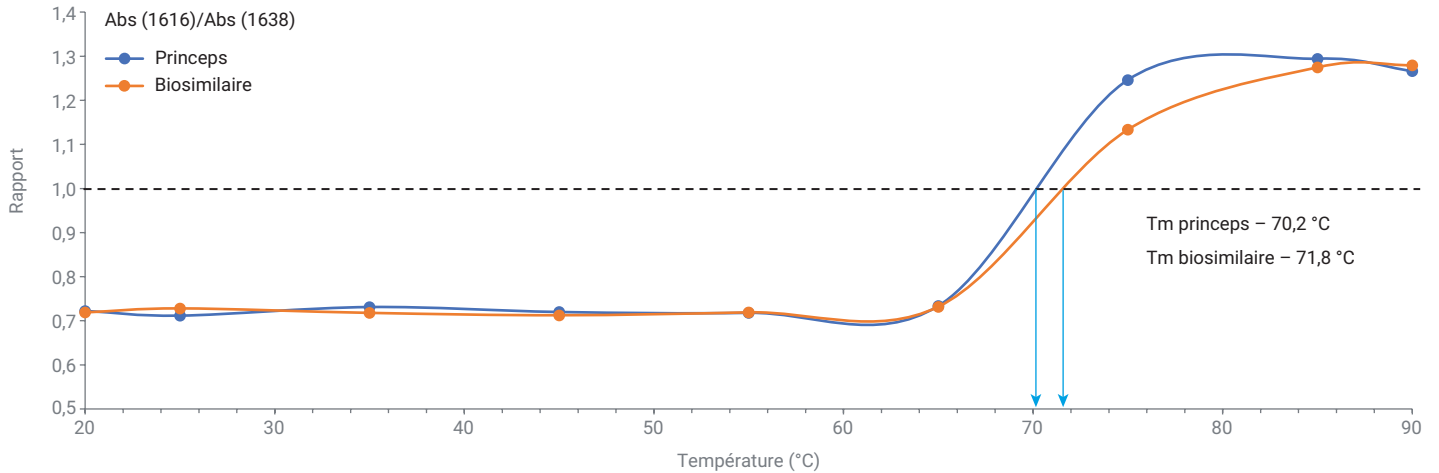


Figure 5. Variation du rapport d'absorbance à 1 616 cm^{-1} et 1 638 cm^{-1} pour le rituximab princeps et le rituximab biosimilaire avec l'augmentation de la température.

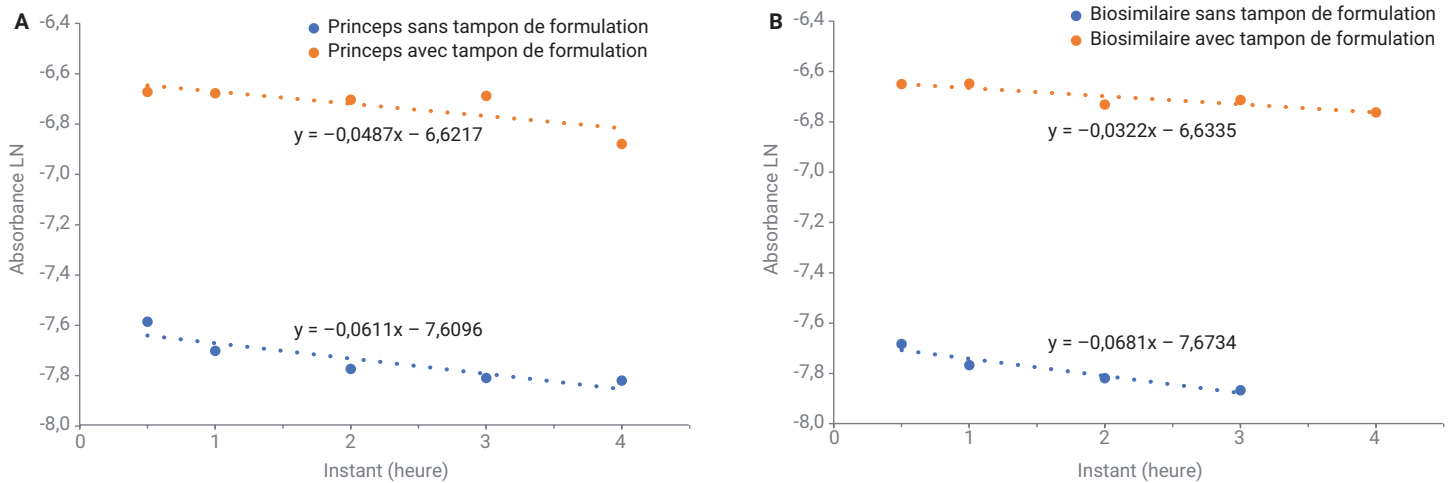


Figure 6. Logarithme naturel de l'absorbance (1 638 cm^{-1}) et à 60 °C pour des solutions de mAb princeps (A) et de mAb biosimilaires (B) avec et sans tampons de formulation. En raison de la forte variation des mesures sur le biosimilaire sans tampon de formulation après 4 heures, le point de données n'a pas été inclus dans l'analyse.

Tableau 2. Cinétique d'agrégation du produit princeps et du biosimilaire avec et sans tampon de formulation.

	Sans tampon de formulation		Avec tampon de formulation	
	k_1 (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	k_1 (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
Princeps	0,0611	11,34	0,0487	14,34
Biosimilaire	0,0681	10,17	0,0322	21,52

Conclusion

Le spectromètre FTIR Agilent Cary 630 est un instrument simple et facile à utiliser qui permet d'analyser l'agrégation protéique des produits biothérapeutiques sans nécessiter de lourds protocoles de préparation des échantillons. Cette méthode a permis de mesurer rapidement l'agrégation d'échantillons fortement concentrés, et pourrait donc être utilisée tout au long du processus de fabrication des mAb. La température de dénaturation thermique du rituximab déterminée par FTIR concordait avec la température publiée dans la littérature, ce qui confirme l'efficacité de cette méthode.

Le FTIR Cary 630 et le logiciel MicroLab Expert Agilent ont également servi à étudier l'effet stabilisant de tampons de formulation sur la cinétique d'agrégation des mAb. Même si un travail plus poussé est nécessaire pour comprendre le mécanisme de l'agrégation protéique, cette étude initiale a montré que le FTIR Cary 630 peut fournir des informations orthogonales sur la manière dont les protéines se replient.

Le FTIR Cary 630 est facile à utiliser, ne nécessite aucune préparation d'échantillons, et peut être largement utilisé dans l'industrie biopharmaceutique, notamment pour le contrôle-qualité de l'agrégation des produits biothérapeutiques à base de protéines princeps et biosimilaires.

Références

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 sur : 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

Ces informations sont susceptibles d'être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Imprimé aux États-Unis, le 31 mai 2022
5994-4944FR