

Analisi FTIR dell'aggregazione di proteine bioterapeutiche (innovatori e biosimilari)

Misura dell'aggregazione di rituximab in campioni concentrati con lo spettrometro FTIR Agilent Cary 630

Autori

Aveline Neo e
Ravindra Gudihal
Agilent Technologies, Inc.



Abstract

L'aggregazione delle proteine può verificarsi durante la produzione o la conservazione di agenti bioterapeutici, per esempio gli anticorpi monoclonali (mAb), con potenziali ripercussioni sulla loro efficacia, potenza e sicurezza. È pertanto importante monitorare l'aggregazione delle proteine per l'intera durata del processo di produzione dei mAb. La spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR) è una tecnica non distruttiva che consente il monitoraggio rapido dell'aggregazione dei mAb, anche in campioni ad alta concentrazione che si rivelano problematici per altre tecniche. Questa nota applicativa descrive l'uso dello spettrometro FTIR Agilent Cary 630 per la misura dell'aggregazione delle proteine indotta termicamente. Il presente studio fornisce informazioni cruciali sulla stabilità dei campioni di mAb ad alta concentrazione in una soluzione tampone. Spiega inoltre come impiegare lo strumento FTIR Cary 630 per l'ottimizzazione dei processi di controllo della qualità e produzione di innovatori o biosimilari.

Introduzione

L'aggregazione è ritenuta un serio problema nello sviluppo e nella produzione dei mAb in quanto gli aggregati possono contribuire all'insorgere di risposte immunitarie potenzialmente letali. I mAb possono aggregarsi se esposti a condizioni di stress quali basso pH, alta temperatura e alta concentrazione. Poiché i mAb terapeutici sono spesso somministrati ad alte concentrazioni, la formazione di aggregati costituisce un attributo critico per la qualità che è importante monitorare.¹

I biosimilari sono copie di prodotti terapeutici originali (innovatori) caratterizzati da metriche di qualità, sicurezza ed efficacia pressoché identiche a quelle del prodotto di riferimento. Affinché i biosimilari ottengano l'approvazione da parte degli enti regolatori è necessario determinare le similarità fisicochimiche tra l'innovatore e il biosimilare.²

La cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) è il gold standard per lo studio degli aggregati di proteine. La SEC, tuttavia, potrebbe non essere indicata per il monitoraggio di campioni di mAb ad alte concentrazioni in quanto la diluizione, che ha luogo nel corso dell'analisi, potrebbe far variare la composizione degli aggregati nel campione. Al contrario, la tecnica FTIR, ben consolidata e ampiamente diffusa nei laboratori farmaceutici oltre che nelle attività di produzione, si presta agli studi di aggregazione su campioni di proteine ad alta concentrazione.

In questo studio è stato usato lo spettrometro FTIR Agilent Cary 630 per monitorare l'aggregazione delle proteine con il rituximab (un farmaco mAb). Come sistema modello, rituximab innovatore e biosimilare sono stati sottoposti a stress termico e l'aggregazione è stata monitorata tramite FTIR in base agli scostamenti delle bande ammidiche.



Figura 1. Lo spettrometro FTIR da banco Agilent Cary 630, versatile, innovativo e dall'uso intuitivo, fornisce informazioni quantitative e qualitative per le analisi di solidi, liquidi e gas.

Molti laboratori farmaceutici usano lo strumento FTIR Cary 630 per le analisi FTIR perché ne apprezzano la robustezza, la flessibilità, le alte prestazioni, la facilità d'uso e il formato estremamente compatto (Figura 1). Le applicazioni tipiche includono l'identificazione di prodotti farmaceutici, merci in arrivo e materiali di imballaggio, così come misure quantitative quali la concentrazione di principi farmaceutici. Lo spettrometro FTIR Cary 630 può essere rapidamente riconfigurato a seconda dell'applicazione tramite moduli di campionamento ottimizzati che non richiedono l'allineamento da parte dell'utilizzatore.

Per una facilità d'uso ancora maggiore, il software MicroLab di Agilent fornisce indicazioni passo a passo con immagini illustrative che accompagnano in modo intuitivo gli utilizzatori lungo l'intero flusso di lavoro delle analisi (Figura 2). Agilent propone anche MicroLab Expert, un avanzato software per spettroscopia FTIR che rispetto al software standard offre una maggiore flessibilità analitica e una migliore visualizzazione degli spettri. Con MicroLab Expert gli analisti possono visualizzare informazioni spettrali nel corso della raccolta dati, cosa che si rivela utile per gli studi di aggregazione.



Figura 2. L'intuitivo software MicroLab di Agilent per lo spettrometro FTIR Agilent Cary 630 accompagna l'utilizzatore lungo l'intero flusso di lavoro delle analisi, riducendo le esigenze di formazione e il rischio di errori dell'operatore.

Condizioni sperimentali

Strumentazione

Sullo spettrometro FTIR Cary 630 è stato montato un modulo per riflettanza totale attenuata (ATR) a singola riflessione con cristallo di diamante. L'acquisizione dei dati è stata effettuata con il software MicroLab Expert e i parametri mostrati in Tabella 1.

Tabella 1. Parametri sperimentali dello spettrometro FTIR Agilent Cary 630.

Parametro	Valore
Intervallo spettrale	4.000-650 cm^{-1}
Scansioni del fondo	140
Scansioni del campione	140
Risoluzione	4 cm^{-1}
Fattore di riempimento zero	Nessuno
Apodizzazione	Triangolare
Correzione di fase	Mertz
Tecnologia di campionamento	ATR

Materiali

- Rituximab innovatore e biosimilare sono stati acquistati presso un distributore locale a Singapore. Entrambi i campioni di mAb sono stati concentrati utilizzando concentratori centrifughi Vivaspin 500 (cut-off del peso molecolare 10 kDa; Sartorius).

- L'acqua ultra pura fresca è stata ottenuta con un sistema Milli-Q Integral dotato di cartuccia con membrana da 0,22 μm al punto d'uso (Merck Millipore).
- La soluzione tampone era costituita da 5,35 mg/mL di sodio citrato monobasico anidro a pH 6,5 (CAS 18996-35-5), 9 mg/mL di cloruro di sodio (CAS 7647-14-5) e 0,7 mg/mL di polisorbato 80 (CAS 9005-65-6). Tutti i reagenti sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich, St. Louis.

Flusso di lavoro

Il flusso di lavoro dello studio di aggregazione di rituximab innovatore e biosimilare con lo spettrometro FTIR Cary 630 è mostrato in Figura 3.

Utilizzando lo spettrofotometro UV-Vis Cary 60 è stata innanzitutto misurata tramite assorbanza UV la concentrazione di due campioni di rituximab concentrati su concentratore centrifugo. Per calcolare la concentrazione delle proteine in ciascun campione è stato utilizzato un coefficiente di estinzione di 1,7 $\text{mL}/\text{mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La concentrazione di rituximab innovatore e del biosimilare è stata stimata al valore di 50 mg/mL.



Figura 3. Flusso di lavoro dell'analisi dell'aggregazione di rituximab innovatore e biosimilare con lo spettrometro FTIR Agilent Cary 630.

Per lo studio di aggregazione, 10 μL di rituximab concentrato sono stati diluiti con un identico volume di acqua e incubati ad alta temperatura per 15 minuti prima di acquisire le misure con lo strumento FTIR Cary 630. Sono state impiegate le seguenti temperature di incubazione: 20, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 e 90 $^{\circ}\text{C}$.

Per gli esperimenti di cinetica di aggregazione, 75 μL di rituximab concentrato sono stati diluiti con un identico volume di acqua o soluzione tampone. Ciascuna soluzione è stata quindi incubata a 60 $^{\circ}\text{C}$ e sono stati raccolti 10 μL di ciascun campione dopo 0,5, 1, 2, 3 e 4 ore per le misure FTIR.

I campioni ottenuti in ciascuna delle condizioni sperimentali sono stati misurati tre volte con lo strumento FTIR Cary 630.

Analisi dei dati

Per l'analisi dei dati è stato utilizzato MicroLab Expert Agilent (versione 1.1.0.1). Per l'elaborazione dei dati è stata utilizzata la media (di tre misure) degli spettri. Dalla media degli spettri è stato sottratto uno spettro del bianco (ossia acqua o soluzione tampone) tramite la funzione "Subtract Spectra" di Spectrum Arithmetic nella scheda Mathematics. Gli spettri con sottrazione del bianco sono stati combinati tra loro tramite la funzione "Merge View" della scheda 2D View. L'ulteriore elaborazione e analisi dei dati sono state eseguite tramite la funzione Normalization con normalizzazione dello spettro per area del picco e Smoothing utilizzando una finestra di smoothing 9 e un polinomio di ordine 3 nella scheda Mathematics. Per gli spettri derivati di secondo ordine è stata applicata una derivata seconda di Savitzky-Golay con finestra di smoothing 9 nella scheda Mathematics.

Per lo studio di aggregazione il grafico segue una cinetica di reazione di primo ordine descritta dalle seguenti equazioni:

$$\text{Velocità} = -d[A]/dt = k[A]$$

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

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

Riformulando per risolvere rispetto ad $[A]$ si ottiene una forma dell'equazione cinetica:

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

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

In cui

$[A]$ è la concentrazione al tempo t

$[A]_0$ è la concentrazione al tempo 0

k è la costante di velocità di primo ordine

Pertanto, la pendenza della retta $\ln[A]$ in funzione del tempo fornisce il valore $-k$.

L'emivita di una cinetica di primo ordine si calcola come segue:

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

Risultati e discussione

Aggregazione indotta dalla temperatura

Le modifiche dipendenti dalla temperatura della struttura secondaria di entrambi i mAb, innovatore e biosimilare, sono state esaminate tramite spettroscopia FTIR. Le bande spettrali ammidiche comunemente utilizzate per la caratterizzazione di proteine sono Ammide I e Ammide II³, come mostrato in Figura 4. In Figura 4A sono mostrati gli spettri FTIR di rituximab innovatore a 25 e 75 $^{\circ}\text{C}$. A 25 $^{\circ}\text{C}$ la banda Ammide I, attribuibile alla struttura secondaria intramolecolare a foglietti β , cade a 1.638 cm^{-1} .

L'analisi a raggi X dimostra che i mAb sono proteine ricche di foglietti β .⁴ A 75 $^{\circ}\text{C}$ la banda Ammide I si sposta a 1.616 cm^{-1} , fenomeno attribuibile alla formazione di strutture secondarie intermolecolari a foglietti β durante l'aggregazione.^{5,6} Gli spettri IR in derivata seconda di rituximab innovatore a 25 e 75 $^{\circ}\text{C}$ (Figura 4B) mostrano più chiaramente lo scostamento delle bande Ammide I da 1.638 a 1.616 cm^{-1} durante l'aggregazione del rituximab.

In Figura 5 è mostrata la variazione del rapporto tra l'assorbanza a 1.616 e 1.638 cm^{-1} per l'innovatore e il biosimilare all'aumentare della temperatura. Considerando il punto di crossover al quale l'assorbanza a 1.616 cm^{-1} supera l'assorbanza a 1.638 cm^{-1} , è stato possibile stimare una temperatura di fusione (T_m) di 70,2 e di 71,8 $^{\circ}\text{C}$ rispettivamente per l'innovatore e per il biosimilare. Tali temperature sono in accordo con il valore T_m di 71,6 $^{\circ}\text{C}$ segnalato in letteratura per il rituximab e ottenuto mediante misure di calorimetria differenziale a scansione.⁷ I risultati dimostrano l'adeguatezza dello strumento FTIR Cary 630 per l'osservazione della denaturazione termica dei mAb.

Effetti della soluzione tampone sulla cinetica di aggregazione

Poiché gli studi di denaturazione termica non hanno permesso una chiara identificazione dell'effetto del tampone sulla stabilità termica, è stato condotto un approfondito studio cinetico. Per esaminare l'effetto della soluzione tampone sulla cinetica di aggregazione è stata mantenuta una temperatura costante di 60 $^{\circ}\text{C}$ (inferiore a T_m) per l'intera durata dell'esperimento.

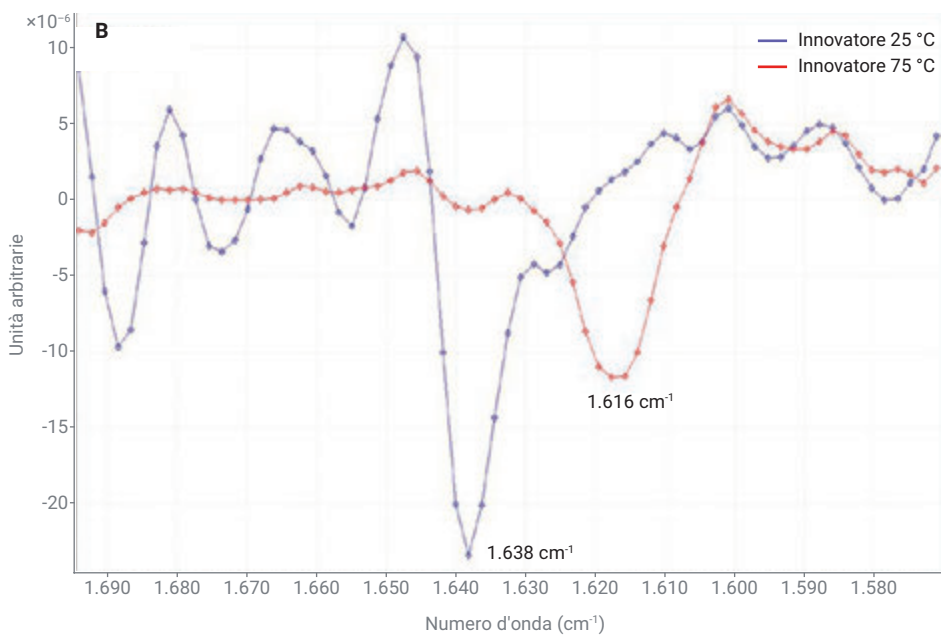
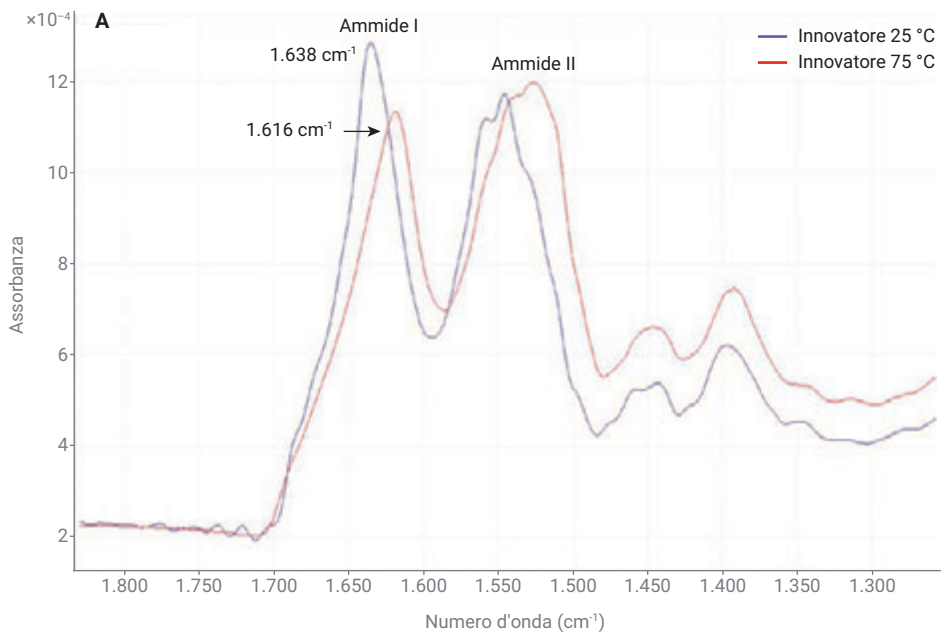


Figura 4. (A) Spettri FTIR di rituximab innovatore a 25 e 75 °C. (B) Spettri IR in derivata seconda di rituximab innovatore a 25 e 75 °C.

In Figura 6 è mostrato il logaritmo naturale dell'assorbanza a 1.638 cm^{-1} in funzione del tempo a 60 °C per soluzioni di mAb innovatore e biosimilare con o senza soluzione tampone. Per il processo di aggregazione è stata ipotizzata una cinetica di primo ordine.⁸ Le costanti di primo ordine, k_1 e $t_{1/2}$, sono state stimate dalla pendenza della retta. In Tabella 2 sono mostrati

i parametri cinetici di innovatore e biosimilare. La stabilità di entrambe le proteine aumenta in presenza della soluzione tampone, come indicato dal valore più basso della costante cinetica e più alto dell'emivita $t_{1/2}$ rispetto all'assenza di soluzione tampone. Questo risultato suggerisce che la soluzione tampone protegge dallo stress termico. In assenza di tampone le costanti k_1

dei mAb innovatore e biosimilare sono risultate simili. In presenza di soluzione tampone il biosimilare è risultato più stabile (valore inferiore di k_1 e superiore di $t_{1/2}$) dell'innovatore. Formulazione ed eccipienti possono influenzare notevolmente la stabilità degli anticorpi. Gli eccipienti che stabilizzano il pH (come i tamponi tris, acetato, istidina e citrato) possono incrementare la stabilità.⁹

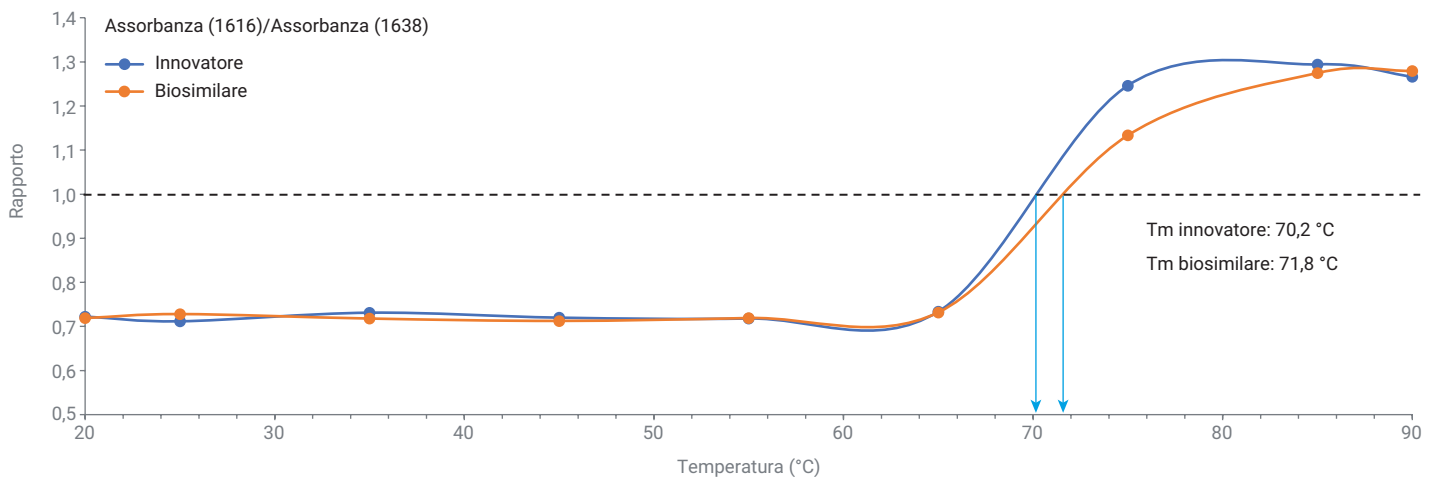


Figura 5. Variazione del rapporto di assorbanza a 1.616 cm^{-1} e 1.638 cm^{-1} per rituximab innovatore e biosimilare all'aumentare della temperatura.

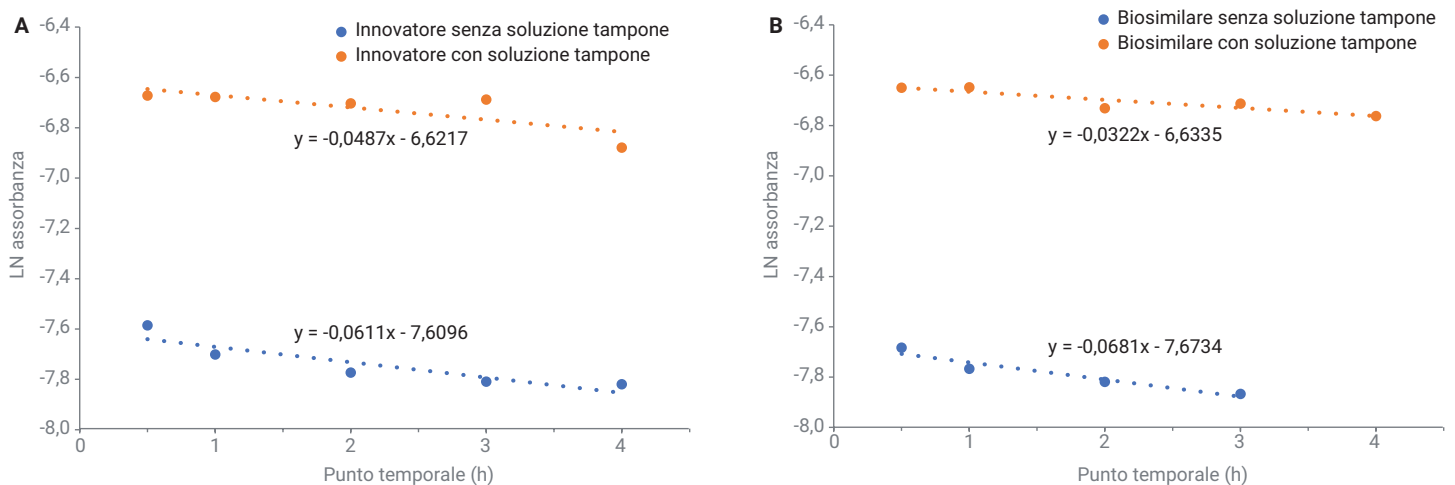


Figura 6. Logaritmo naturale dell'assorbanza (1.638 cm^{-1}) in funzione del tempo a 60 °C per soluzioni di innovatore (A) e biosimilare (B) con o senza soluzione tampone. A causa dell'ampia variabilità nelle misure sul biosimilare senza soluzione tampone al punto temporale di 4 ore, nell'analisi non è stato incluso quest'ultimo punto di dati.

Tabella 2. Cinetica di aggregazione di innovatore e biosimilare con e senza soluzione tampone.

	Senza soluzione tampone		Con soluzione tampone	
	k_1 (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	k_1 (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
Innovatore	0,0611	11,34	0,0487	14,34
Biosimilare	0,0681	10,17	0,0322	21,52

Conclusione

Lo spettrometro FTIR Agilent Cary 630 è uno strumento dall'uso semplice e intuitivo per l'analisi di aggregazione delle proteine di agenti bioterapeutici; inoltre, non richiede prolungate procedure di preparazione del campione. Il metodo impiegato ha permesso di eseguire rapidamente misure di aggregazione su campioni ad alta concentrazione e potrebbe essere adottato per l'intero processo di produzione di mAb.

La temperatura di denaturazione termica del rituximab determinata tramite FTIR è risultata in accordo con il valore segnalato in letteratura, a conferma dell'efficacia del metodo.

Lo strumento FTIR Cary 630 con il software MicroLab Expert Agilent è stato impiegato anche nello studio dell'effetto stabilizzante delle soluzioni tampone sulla cinetica di aggregazione dei mAb. Sebbene siano necessarie ulteriori ricerche per comprendere il meccanismo di aggregazione delle proteine, questo studio iniziale ha dimostrato che lo spettrometro FTIR Cary 630 è in grado di fornire informazioni ortogonali sul ripiegamento delle proteine.

Lo strumento FTIR Cary 630 è facile da usare, non richiede preparazione del campione e può essere utilizzato in diversi contesti nel settore biofarmaceutico, incluso il controllo della qualità dell'aggregazione di prodotti terapeutici basati su proteine, tanto per gli innovatori che per i biosimilari.

Bibliografia

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. Disponibile alla pagina: 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

Le informazioni fornite potrebbero variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Stampato negli Stati Uniti, 31 maggio 2022
5994-4944ITE