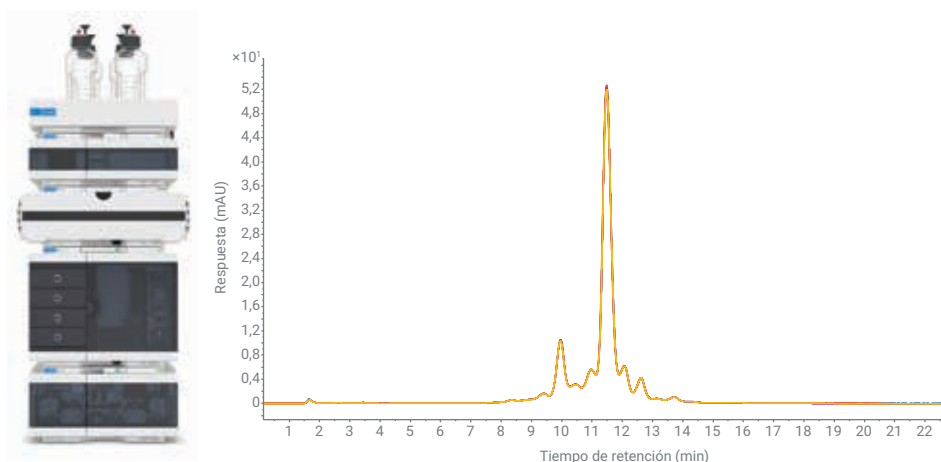


¿Qué nivel de superficialidad se puede alcanzar?

Perfeccionamiento del análisis de variantes con carga de anticuerpos monoclonales (mAb) con el sistema LC bioinerte Agilent 1290 Infinity II



Autor

Sonja Schneider
Agilent Technologies, Inc.

Resumen

El análisis de variantes con carga es una aplicación exigente de los sistemas de cromatografía de líquidos aplicada debido al uso de sales de tampón extremadamente corrosivas junto con gradientes muy superficiales para conseguir una separación óptima. La evaluación de los diferentes gradientes salinos se llevó a cabo mediante el sistema LC bioinerte Agilent 1290 Infinity II y en él se analizaron tanto la resolución como la reproducibilidad.

El sistema LC bioinerte 1290 Infinity II con la bomba de alta velocidad y la ruta de flujo sin ningún tipo de hierro es óptima para su uso con la biocromatografía, dado que evita los posibles daños que puede sufrir el sistema por la corrosión. Se ha demostrado su excelente reproducibilidad, incluso en gradientes superficiales de elevada exigencia, lo que confirma que el sistema LC bioinerte 1290 Infinity II es ya la generación Agilent más avanzada de sistemas de cromatografía de líquidos de alta gama que genera datos de absoluta confianza.

Introducción

Los anticuerpos monoclonales (mAb) son macromoléculas grandes y muy heterogéneas con un tamaño de unos 150 kDa y que se generan habitualmente mediante métodos recombinantes de producción. Se generan a través de un proceso biosintético complejo en el que se producen una gran cantidad de modificaciones y que da lugar a cientos de variantes distintas. Entre las modificaciones postranslacionales (PTM) más habituales se encuentran la deamidación, la oxidación, los puentes disulfuro, la N-glicosilación y el procesamiento N-terminal y C-terminal. Todas estas modificaciones pueden tener lugar durante la generación, pero los procesos de producción y almacenamiento también contribuyen a la complejidad de estas macromoléculas. Las PTM forman un perfil de isoformas complejo que se debe monitorizar y analizar en profundidad, dado que las modificaciones en el producto farmacéutico final pueden estar asociadas con una pérdida de actividad biológica, una vida media con afectación o la inmunogenicidad.¹ Algunas de las PTM dan como resultado variantes con carga de la molécula, que generalmente se analizan mediante cromatografía de intercambio iónico (IEX).² Las variantes con carga se consideran uno de los atributos de calidad críticos (CQA) más importantes y, por lo tanto, es necesario tener en cuenta criterios de aceptación y controles de calidad muy estrictos. La confirmación de que el producto se ha fabricado correctamente, así como la identificación y la cuantificación de cualquier tipo de impurezas, son de suma importancia.

La elución en gradiente superficial es muy habitual en la IEX de las proteínas. Un gradiente salino típico en el modo de fuerza iónica para la elución de proteínas se encontraría entre 1 y 3 mM/min aproximadamente con un valor de pH establecido con una tolerancia de $\pm 0,02$ unidades de pH.³

El sistema LC bioinerte 1290 Infinity II está equipado con una bomba de alta velocidad de alto rendimiento. La ventaja más importante de las bombas binarias es que la mezcla del disolvente es mucho más exacta y precisa cuando se combinan proporciones reducidas de uno de los componentes del disolvente en comparación con las bombas de mezcla a baja presión (como las bombas cuaternarias). Con este tipo de mezcla se obtienen composiciones de disolventes de elevada precisión desde el principio hasta el final del gradiente de disolvente.⁴ Todo ello conforma la base de la generación de gradientes superficiales precisos y reproducibles (por debajo del 1 %/min en cada canal).

El sistema LC bioinerte 1290 Infinity II representa la nueva generación de sistemas de cromatografía de líquidos de alta gama de Agilent y se ha diseñado especialmente para las condiciones que habitualmente se utilizan en biocromatografía: concentraciones de contenido salino elevado, como NaCl 2 M, hasta 8 M de urea y disolventes con pH elevado y reducido, como NaOH 0,5 M o HCl 0,5 M. No hay restos de acero inoxidable o de hierro en toda la ruta de flujo; todos los capilares y los conectores del muestreador múltiple, del termostato multicolumna y de los detectores se han fabricado en MP35N, una aleación de níquel y cobalto. Gracias a este material se reduce la posible corrosión que ocasionan los tampones con elevado contenido salino y es posible eliminar las modificaciones en la proteína provocadas por la presencia de iones de hierro (como la oxidación o la formación de complejos de proteínas).

En esta nota de aplicación se incorpora el análisis de variantes con carga de trastuzumab y del patrón de referencia NISTmAb. Se llevaron a cabo pruebas en las pendientes de diferentes gradientes salinos para buscar la mejor resolución. Las pendientes del gradiente con mayor rendimiento se evaluaron posteriormente para comprobar su reproducibilidad.

Experimento

Equipos

El sistema LC bioinerte Agilent 1290 Infinity II estaba formado por los siguientes módulos:

- Bomba de alta velocidad bioinerte Agilent 1290 Infinity II (G7132A).
- Muestreador múltiple bioinerte Agilent 1290 Infinity II (G7137A) con termostato de muestras (opción n.º 101).
- Termostato multicolumna Agilent 1290 Infinity II (G7116B) con intercambiador de calor biocompatible de flujo estándar.
- Detector de longitud de onda variable Agilent 1290 Infinity II (G7114B) equipado con celda de microflujo biocompatible de 3 mm y 2 µl.

Software

Agilent OpenLab CDS versión 2.5

Columnas

Bio MAb, NP5, 2,1 × 250 mm, PEEK (referencia 5190-2411)

Productos químicos

Todos los disolventes eran de calidad LC. 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 (Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). Se obtuvieron fosfato sódico monobásico monohidrato, fosfato sódico dibásico heptahidrato y cloruro sódico a partir de un sistema Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

Muestras

- Patrón Agilent-NISTmAb (ref. 5191-5744).
- Se obtuvo el anticuerpo monoclonal humanizado trastuzumab, comercializado con el nombre Herceptin, de Roche (Basel, Suiza).
- El trastuzumab se disolvió en tampón fosfato 30 mM, pH 6,8.

Preparación de tampones

Para la obtención de 2 l de tampón fosfato 30 mM, pH 6,8, se pesaron 4,45 g de fosfato sódico monobásico monohidrato y 7,44 g de fosfato sódico dibásico heptahidrato y se vertieron en una botella de 2 l de color ámbar que se rellenó con agua ultrapura hasta alcanzar los 2 l (→tampón A). Se vertieron 29,22 g de cloruro sódico, de una concentración total de 500 mM, en una botella vacía de 1 l de color ámbar, que se rellenó hasta alcanzar el litro con el tampón fosfato A preparado anteriormente (→tampón B). Se comprobaron los valores de pH de ambos tampones y se ajustaron a un pH de 6,8 en los casos en los que correspondía (la incorporación de una gran cantidad de sal puede modificar el pH). Los tampones preparados se filtraron con un filtro de membrana de 0,2 µm.

Método

Consulte la Tabla 1.

Nota: Si se utilizan soluciones salinas concentradas como eluyentes, hay que aplicar los tipos de disolvente correspondientes en el método de la bomba. Por ejemplo, en el caso del disolvente B, que incorpora cloruro sódico 500 mM, introduzca la opción «Cloruro sódico 0,5 M» en lugar de *Acuoso genérico* o *Agua* en el campo de selección de disolventes del método de la bomba. Las grandes cantidades de sal modifican la compresibilidad del disolvente, por lo que las tablas de disolventes predefinidas permiten que el rendimiento de la bomba sea óptimo.

Resultados y comentarios

Desarrollo de métodos

Para alcanzar la resolución que se desea y permitir una separación óptima, es necesario llevar a cabo un desarrollo de método exhaustivo para el análisis de variantes con carga. Para lograr los objetivos hay dos parámetros que son cruciales: encontrar el pH y la pendiente de gradiente óptimos. Ambos factores afectan en gran medida a la separación. En primer lugar, se recomienda llevar a cabo un control de pH para conocer el pH óptimo para que se produzca la separación. En experimentos anteriores, se analizó el pH de 6,4 a 7,4 de los tampones que se habían usado y se descubrió que el pH 6,8 era óptimo para ambas muestras: trastuzumab y el patrón de referencia NISTmAb (no se muestran los datos). A continuación se determina la pendiente de gradiente óptima para permitir que la separación sea eficaz.

Tabla 1. Condiciones cromatográficas del gradiente salino.

Parámetro	Valor
Disolvente	A) 30 mM de tampón de fosfato, pH 6,8, B: 30 mM de tampón de fosfato, pH 6,8, cloruro sódico 500 mM
Gradiente	0 o 25 mM (NaCl 150 mM en 30 minutos) con gradientes de distinta superficialidad para el desarrollo de método 0 mM (trastuzumab) y 25 mM (NIST) a NaCl 100 mM en 30 minutos para la evaluación de reproducibilidad NaCl de 25 a 50 mM en 30 minutos para evaluar la reproducibilidad (gradiente muy superficial) Lavado de NaCl 500 mM, 31 minutos Tiempo de parada: 35 minutos Tiempo posterior: 15 minutos
Flujo	0,200 ml/min
Temperatura	30 °C
Detección	280 nm 10 Hz
Inyección	Volumen de inyección: 3 µl para trastuzumab y 2 µl para NIST Temperatura de la muestra: 10 °C Lavado de aguja: 3 segundos en agua

En la Figura 1 se muestra una superposición del análisis de variantes con carga de trastuzumab con diferentes pendientes de gradiente que oscilan entre 1 % B/min (5 mM/min) y 0,33 % B/min (1,66 mM/min). Cuanto más superficial es el gradiente, más exigente es el rendimiento de la bomba. Para obtener composiciones de disolvente de alta precisión durante el gradiente, la bomba debe funcionar de forma exacta y precisa al mezclar proporciones reducidas de los componentes del disolvente. Es necesario tener en cuenta, no obstante, que, en el caso de los gradientes salinos, los gradientes muy superficiales no siempre dan lugar a una resolución elevada, sino que únicamente incrementan la anchura de pico (por ejemplo, 0,33 % B/min en la Figura 1). Por este motivo, la pendiente de gradiente que se eligió para los estudios de reproducibilidad se encontraba en medio de los gradientes que se habían probado con 0,66 % B/min y 3,3 B/min, un valor que se sigue considerando superficial.

Se empleó un procedimiento de desarrollo de método similar para la separación de las variantes con carga del patrón de referencia NISTmAb (consulte la Figura 2). Las condiciones de inicio de NIST contenían una cantidad de sal ligeramente mayor debido al punto isoeléctrico más elevado (pI) del anticuerpo NIST (aproximadamente 9,2 pI) en comparación con el de trastuzumab, de aproximadamente 9 pI. Para lograr que la separación de las variantes con carga del patrón de referencia NISTmAb fuera más eficaz, los gradientes eran ligeramente más superficiales en comparación con trastuzumab, por lo que el gradiente más superficial era de 0,17 % B/min (0,83 mM/min), un valor que representa una labor exigente de la bomba. En los demás estudios de reproducibilidad se eligió la pendiente de gradiente de 0,5 % B/min (2,5 mM/min).

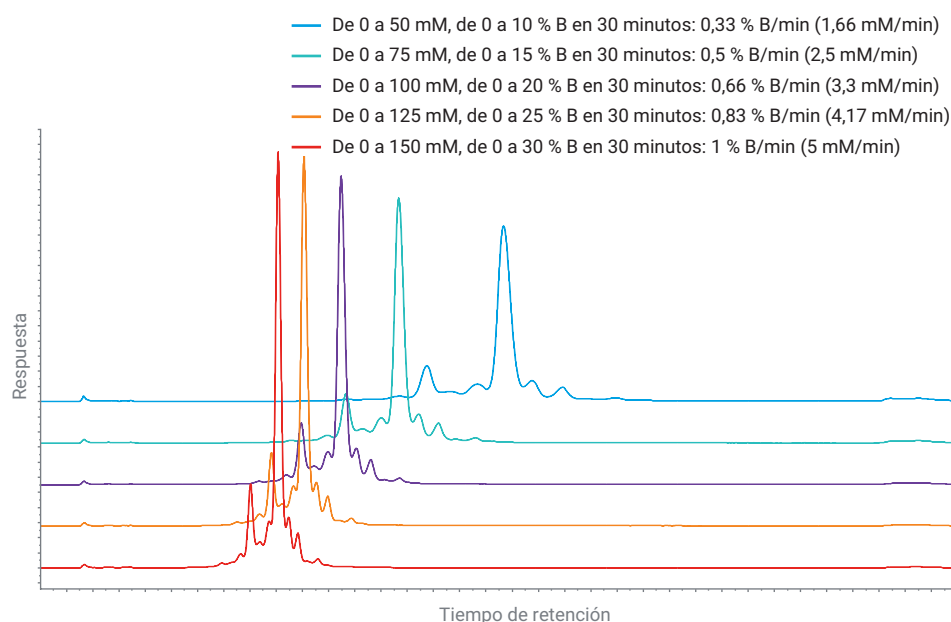


Figura 1. Desarrollo de método para la separación de trastuzumab con distintas pendientes de gradiente salino.

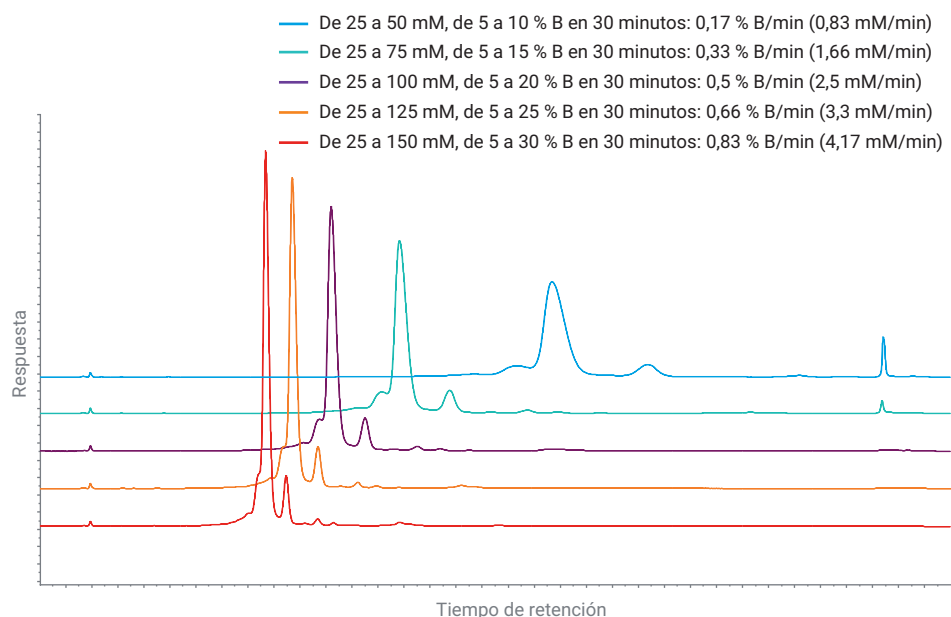


Figura 2. Desarrollo de método para la separación del patrón de referencia estándar NISTmAb con distintas pendientes de gradiente salino.

Reproducibilidad de la separación de variantes con carga de trastuzumab

En la Figura 3 se muestran los estudios de reproducibilidad de la separación de variantes con carga de trastuzumab (A) con una pendiente de gradiente de 0,66 % B/min (3,3 mM/min). En la Figura 3B se muestra una vista aumentada de las variantes separadas para obtener una mejor visualización. Las variantes marcadas con A representan las variantes ácidas en elución antes del pico principal, mientras que las variantes básicas B eluyen tras el pico principal. Se establecieron cinco variantes ácidas antes del pico principal y cuatro variantes básicas eluyeron tras el pico principal. Se evaluaron todas las variantes y el pico principal para determinar la precisión del tiempo de retención (TR) y el área. La precisión tanto de TR como del área son excelentes, con valores por debajo de 0,052 % de DER en TR y por debajo de 0,82 % de DER en el área, salvo en el caso de los dos picos pequeños de variante de A1 y B3.

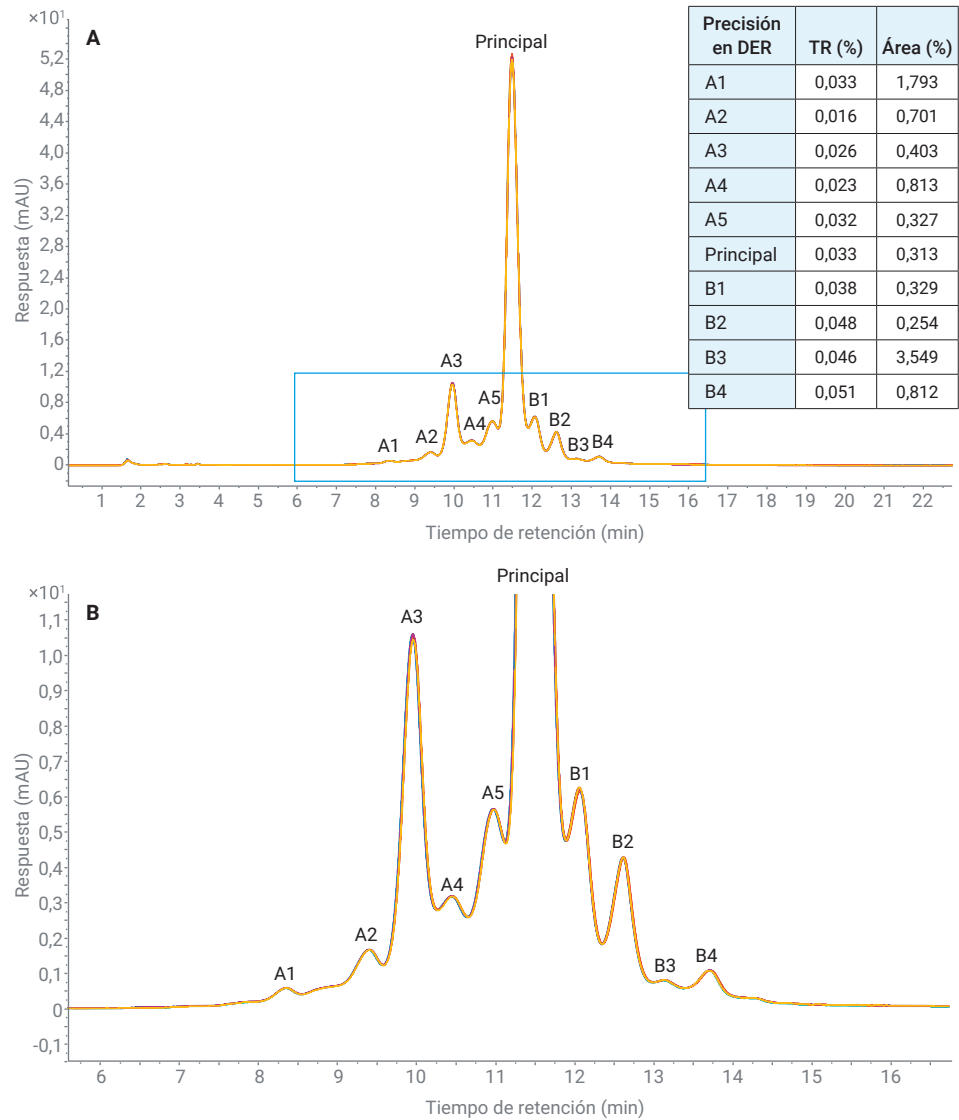


Figura 3. Estudios de reproducibilidad en siete análisis consecutivos de la separación de variantes con carga de trastuzumab (A) con una pendiente de gradiente de 0,66 % B/min (3,3 mM/min). (B) Vista aumentada.

Reproducibilidad de la separación de variantes con carga de NISTmAb

En la Figura 4 se muestran los estudios de reproducibilidad de la separación de variantes con carga del patrón de referencia NISTmAb (A) con una pendiente de gradiente de 0,5 % B/min (2,5 mM/min).

En la Figura 4B se refleja la vista aumentada con dos variantes ácidas y cuatro variantes básicas. De nuevo, se evaluaron todas las variantes y el pico principal para determinar la precisión del tiempo de retención (TR) y el área. La precisión tanto de TR como del área son excelentes, con valores por debajo de 0,06 % de DER en TR y por debajo de 0,55 % de DER en el área, salvo en el caso del pico pequeño de variante de B2.

Tal y como se muestra en la Figura 2, el gradiente más superficial, con 0,17 % B/min (0,83 % mM/min) no ofrece una resolución mayor en comparación con gradientes como 0,5 % B/min (2,5 mM/min), que sigue siendo superficial y es el que se ha usado en los estudios de reproducibilidad.

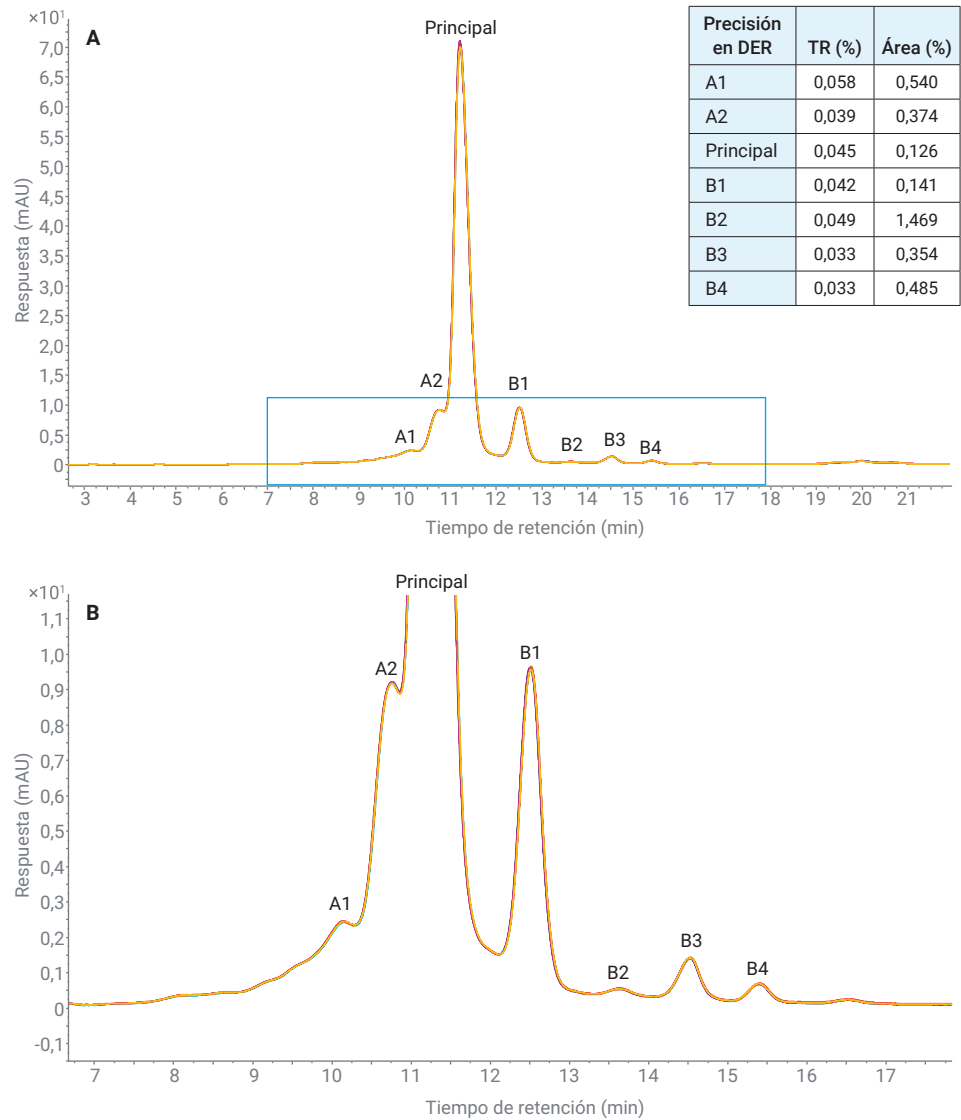


Figura 4. Estudios de reproducibilidad en siete análisis consecutivos de la separación de variantes con carga del patrón de referencia NISTmAb (A) con una pendiente de gradiente de 0,5 % B/min (2,5 mM/min). (B) Vista aumentada.

Sin embargo, la bomba de alta velocidad bioinerte Agilent 1290 Infinity II consiguió resolver la compleja pendiente del gradiente, que se muestra en la Figura 5. La precisión de TR en los siete análisis consecutivos fue excelente, por debajo del 0,25 % de DER, aunque los picos pasaron a ser bastante amplios con el gradiente que se aplicó. A medida que se incrementa la anchura de pico, la altura se reduce, algo que afecta de forma negativa a la precisión del área.

Conclusión

Se evaluaron las pendientes de distintos gradientes salinos para obtener su resolución y la reproducibilidad de la separación de variantes con carga de trastuzumab y NISTmAb en el sistema LC bioinerte 1290 Infinity II. A primera vista, los gradientes más superficiales parecían aumentar la resolución. No obstante, en ambos anticuerpos monoclonales (mAb) los gradientes más superficiales que se evaluaron no dieron lugar a la mayor resolución, dado que, a medida que decrecía la pendiente, los picos comenzaban a ensancharse y como resultado no se presentaba un aumento en la resolución. Se evaluó con mayor profundidad la reproducibilidad de los métodos en los que se había conseguido la mejor combinación de una resolución elevada y formas de pico más estrechas. En los casos de una pendiente de gradiente de 3,3 mM/min (trastuzumab) y de 2,5 mM/min (NISTmAb), se documentó una excelente reproducibilidad tanto en cuanto a TR como al área. La precisión de TR era inferior al 0,06 % de DER en todos los picos que se evaluaron. También se evaluó la reproducibilidad del gradiente más superficial que se había probado para NISTmAb e incluso la de un gradiente extremadamente superficial con pendiente de 0,83 mM/min, con un resultado para ambas de una precisión de TR óptima (< 0,25 % de DER). Estos datos demuestran que el sistema LC bioinerte 1290 Infinity II, gracias a su ruta de flujo sin hierro, es óptimo para su uso en condiciones de biocromatografía y ofrece resultados con una elevada reproducibilidad.

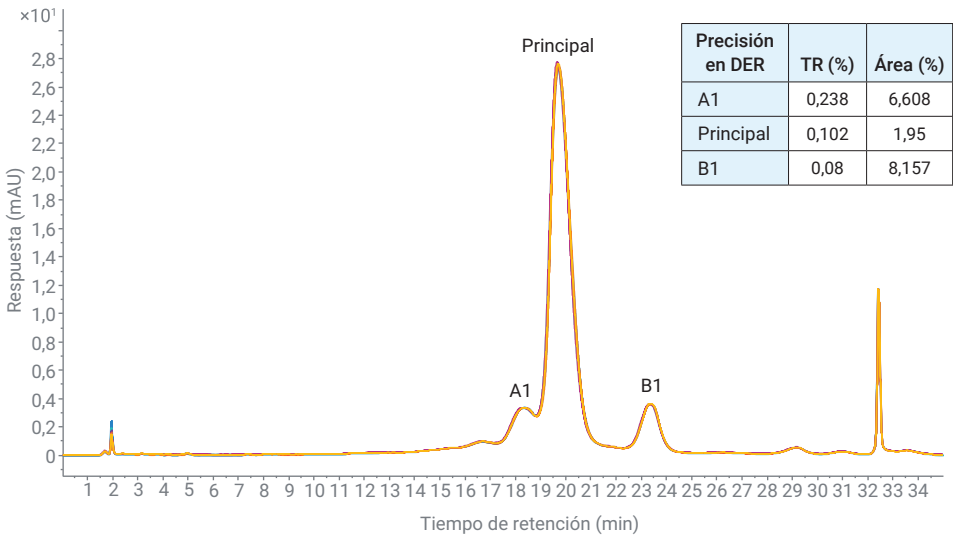


Figura 5. Estudios de reproducibilidad en siete análisis consecutivos de la separación de variantes con carga del patrón de referencia NISTmAb (A) con una pendiente de gradiente de 0,17 % B/min (0,83 mM/min).

Referencias

1. Dick Jr., L. W. *et al.* Identification and Measurement of Isoaspartic Acid Formation in the Complementarity Determining Region of a Fully Human Monoclonal Antibody. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, 877(30), 3841–3849.
2. Zhang, L. *et al.* Improving pH Gradient Cation-Exchange Chromatography of Monoclonal Antibodies by Controlling Ionic Strength. *J. Chromatogr. A* **2013**, 1272, 56–64.
3. Farnan, D.; Moreno, G. T. Multiproduct High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations by pH Gradient Ion-Exchange Chromatography. *Anal. Chem.* **2009**, 81(21), 8846–8857.
4. The LC Handbook Guide to LC Columns and Method Development. *Agilent Technologies*, número de publicación 5990-7595EN, **2016**.
5. Goyon, A. *et al.* Determination of Isoelectric Points and Relative Charge Variants of 23 Therapeutic Monoclonal Antibodies. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2017**, 1065-1066, 119-128.
6. Xie, L. *et al.* Demonstrating Analytical Similarity of Trastuzumab Biosimilar HLX02 to Herceptin with a Panel of Sensitive and Orthogonal Methods Including a Novel FcγRIIIa Affinity Chromatography Technology. *BioDrugs* **2020**, 34(3), 363-379.

www.agilent.com/chem

DE.964027778

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
Impreso en EE. UU., 5 de enero de 2021
5994-2692ES