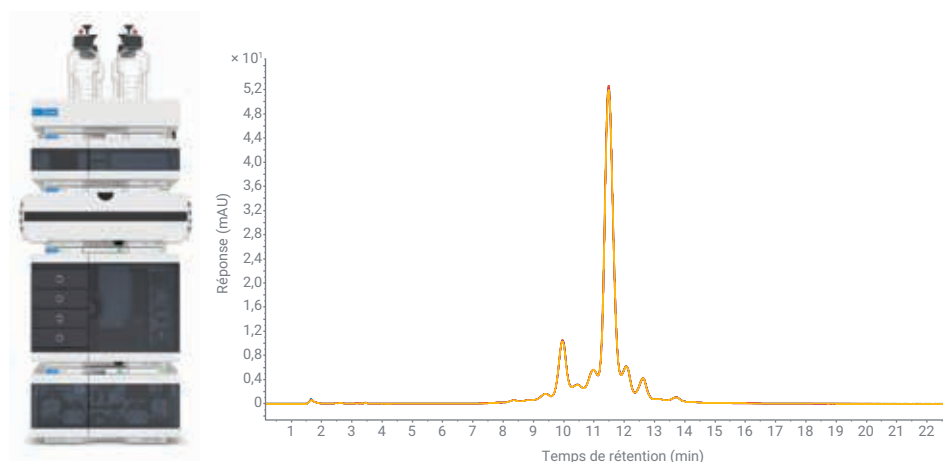


À quel point pouvez-vous réduire la pente du gradient ?

Affinement de l'analyse des isoformes de charge des mAb sur le système LC Bio Agilent 1290 Infinity II



Auteur

Sonja Schneider
Agilent Technologies, Inc.

Résumé

L'analyse des isoformes de charge est une application exigeante pour les systèmes de chromatographie en phase liquide, en raison de l'utilisation de sels de tampons hautement corrosifs et de très faibles gradients pour l'optimisation de la séparation. L'évaluation de différents gradients salins a été réalisée sur un système LC Bio Agilent 1290 Infinity II et analysée en termes de résolution et de reproductibilité.

Comprenant une pompe à haut débit et un circuit complètement exempt de fer, le LC Bio 1290 Infinity II est parfaitement adapté aux conditions utilisées en biochromatographie, évitant ainsi l'endommagement dû à la corrosion. La reproductibilité s'est avérée excellente, même avec les très faibles gradients, confirmant que le LC Bio 1290 Infinity II représente la prochaine génération de systèmes haut de gamme de chromatographie en phase liquide d'Agilent permettant d'assurer une haute fiabilité des données.

Introduction

Les anticorps monoclonaux (mAb) sont des macromolécules très hétérogènes d'environ 150 kDa, généralement obtenues suivant des méthodes de production recombinante. Ils sont produits par l'intermédiaire d'un processus biosynthétique complexe dans lequel de nombreuses modifications peuvent survenir et entraîner la génération de centaines d'isoformes différentes. La désamidation, l'oxydation, les ponts disulfures, la N-glycosylation et les traitements en N- et C-terminal sont parmi les modifications post-traductionnelles (MPT) les plus fréquentes. Toutes ces modifications peuvent survenir au cours de leur génération, mais la fabrication et le stockage contribuent aussi à la complexité de ces macromolécules. Les MPT entraînent l'obtention d'un profil d'isoformes complexe qui doit être analysé et contrôlé, car les modifications dans le produit pharmaceutique final risquent d'être associées avec une perte d'activité biologique, un changement de la demi-vie ou l'immunogénicité¹. Certaines des MPT provoquent la génération d'isoformes de charge de la molécule, qui sont généralement analysées par chromatographie à échange d'ions (IEX)². Les isoformes de charge étant considérées comme l'un des attributs qualité critiques (CQA) les plus importants, il convient d'instaurer des critères stricts d'acceptation et des contrôles qualité. Il est de la plus haute importance de s'assurer que le produit est fabriqué correctement et d'identifier et de quantifier toute impureté.

L'élution avec un gradient de pente faible est très courante dans l'IEX des protéines. Un gradient salin typique en mode force ionique pour l'élution des protéines serait d'environ 1 à 3 mM/min avec une valeur de pH définie par rapport à une tolérance de $\pm 0,02$ unités de pH³.

Le LC Bio 1290 Infinity II est équipé d'une pompe à haut débit et à hautes performances. Le principal avantage des pompes binaires est que le mélange des solvants est beaucoup plus exact et précis lors du mélange de faibles proportions de l'un des composants par rapport aux pompes de mélange à basse pression (p. ex. les pompes quaternaires). Ce type de mélange donne des compositions de solvant très précises au début et à la fin d'un gradient de solvant⁴. Cela constitue une base pour la génération de faibles gradients exacts et reproductibles (moins de 1 %/min pour chaque voie).

Le LC Bio Agilent 1290 Infinity II représente la prochaine génération de systèmes haut de gamme de chromatographie en phase liquide d'Agilent, spécialement conçus pour les conditions utilisées en biochromatographie : concentrations élevées en sels, telles que 2 M de NaCl, jusqu'à 8 M d'urée et des solvants à pH élevé et faible avec typiquement 0,5 M de NaOH ou 0,5 M de HCl. Le circuit entier est complètement exempt d'inox et de fer. Tous les capillaires et raccords du multiéchantillonneur, du thermostat multicolonne et des détecteurs sont constitués de MP35N, un alliage de nickel-cobalt. Ce matériau présente l'avantage de réduire la corrosion éventuelle due aux tampons à concentrations élevées en sels et de prévenir les modifications des protéines provoquées par la présence d'ions fer (p. ex. oxydation, formation de complexes protéiques).

Cette note d'application rend compte de l'analyse d'isoformes de charge pour le trastuzumab et l'étalon de référence NISTmAb. Différentes pentes de gradient salin ont été testées afin d'obtenir la meilleure résolution possible. Les meilleures pentes de gradient ont été évaluées en termes de reproductibilité.

Données expérimentales

Équipement

Le système LC Bio Agilent 1290 Infinity II était constitué des modules suivants :

- Pompe à haut débit Bio Agilent 1290 Infinity II (G7132A)
- Multiéchantillonneur Bio Agilent 1290 Infinity II (G7137A) avec thermostat d'échantillon (option n° 101)
- Thermostat multicolonne Agilent 1290 Infinity II (G7116B) avec échangeur de chaleur biocompatible à débit standard
- Détecteur de longueur d'ondes variables Agilent 1290 Infinity II (G7114B), équipé d'une microcuve à circulation biocompatible de 3 mm, 2 μ L

Logiciel

OpenLab CDS Agilent version 2.5

Colonnes

Bio MAb, NP5, 2,1 $\times$ 250 mm, PEEK (référence 5190-2411)

Produits chimiques

Tous les solvants étaient de qualité LC. L'eau ultrapure a été fraîchement préparée à l'aide d'un système Milli-Q Integral équipé d'une cartouche Millipak (Merck-Millipore, Billerica, MA, États-Unis) avec une membrane de 0,22 μ m. Le phosphate de sodium monobasique monohydraté, le phosphate de sodium dibasique heptahydraté et le chlorure de sodium ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne).

Échantillons

- Agilent-NISTmAb (réf. 5191-5744).
- L'anticorps monoclonal humanisé trastuzumab, commercialisé sous le nom d'Herceptin, a été obtenu auprès de Roche (Bâle, Suisse).
- Le trastuzumab a été dissous dans un tampon de phosphate 30 mM à pH 6,8.

Préparation des tampons

Pour 2 L de tampon de phosphate 30 mM à pH 6,8, 4,45 g de phosphate de sodium monobasique monohydraté et 7,44 g de phosphate de sodium dibasique heptahydraté ont été pesés et versés dans un flacon ambré de 2 L, dont le volume a été complété à 2 L à l'aide d'eau ultrapure (→tampon A). Une masse de 29,22 g de chlorure de sodium, pour une concentration totale de 500 mM, a été versée dans un flacon ambré de 1 L, dont le volume a été complété à 1 L à l'aide du tampon de phosphate A préparé (→tampon B). Les valeurs de pH des deux tampons préparés ont été vérifiées et ajustées, si nécessaire, à pH 6,8 (l'addition de grandes quantités de sels peut modifier le pH). Les deux tampons préparés ont été filtrés à l'aide d'une membrane de 0,2 µm.

Méthode

Voir le tableau 1.

Remarque : Lors de l'utilisation de solutions salines concentrées comme éluants, pensez à définir les types de solvants correspondants dans la méthode de la pompe. Par exemple, pour le solvant B contenant 500 mM de chlorure de sodium, utilisez « Sodium Chloride 0.5 M » (Chlorure de sodium 0,5 M) au lieu de *Generic Aqueous* (Aqueux générique) ou *Water* (Eau) dans le champ de sélection du solvant de la méthode de la pompe. Puisque les grandes quantités de sels modifient la compressibilité du solvant, l'utilisation des tables de solvants préconfigurées permet de faire fonctionner la pompe avec des performances optimales.

Résultats et discussion

Développement de méthodes

Pour obtenir la résolution souhaitée et assurer une séparation optimale lors de l'analyse des isoformes de charge, il est nécessaire de recourir à un développement de méthodes approfondi. Il est essentiel de déterminer deux paramètres pour la réussite de l'analyse : le pH optimal et la pente de gradient optimale. Ces deux facteurs peuvent avoir un impact majeur sur la séparation. Il est recommandé d'explorer le pH afin de déterminer le pH optimal pour la séparation. Dans des expériences antérieures, le pH des tampons utilisés a été analysé entre 6,4 et 7,4, et il a été montré que le pH optimal était de 6,8 pour les deux échantillons utilisés : le trastuzumab et l'étalon de référence NISTmAb (données non présentées). La prochaine étape consiste à déterminer la pente de gradient idéale pour garantir l'efficacité de la séparation.

Tableau 1. Conditions chromatographiques des gradients salins.

Paramètre	Valeur
Solvant	A : tampon de phosphate 30 mM, pH 6,8 ; B : tampon de phosphate 30 mM, pH 6,8, 500 mM de chlorure de sodium
Gradient	0 ou 25 mM–150 mM de NaCl en 30 minutes – différentes pentes de gradient pour le développement de méthodes De 0 mM (trastuzumab) et 25 mM (NIST) à 100 mM de NaCl en 30 minutes pour les études de reproductibilité De 25 à 50 mM de NaCl en 30 minutes pour les études de reproductibilité (très faible pente de gradient) 31 minutes – rinçage avec 500 mM de NaCl Fin d'analyse : 35 minutes Durée postanalyse : 15 minutes
Débit	0,200 mL/min
Température	30 °C
Détection	280 nm 10 Hz
Injection	Volume d'injection : 3 µL pour le trastuzumab et 2 µL pour le NIST Température d'échantillon : 10 °C Rinçage de l'aiguille : 3 s dans l'eau

La figure 1 représente une superposition des analyses d'isoformes de charge du trastuzumab effectuées avec différentes pentes de gradient entre 1 % de B/min (5 mM/min) et 0,33 % de B/min (1,66 mM/min). Plus la pente du gradient est faible, plus les exigences de performances de la pompe sont élevées. Pour fournir des compositions de solvant très précises pendant le gradient, la pompe doit fonctionner avec exactitude et précision lors du mélange de petites proportions de composants du solvant. Néanmoins, il faut tenir compte du fait que pour les gradients salins, de très faibles pentes ne se traduisent pas toujours par une meilleure résolution, mais augmentent simplement la largeur de pic (p. ex. 0,33 % de B/min dans la figure 1). Par conséquent, la pente de gradient choisie pour les études de reproductibilité se situait au milieu de la gamme de gradients testés, soit 0,66 % de B/min (3,3 mM/min), ce qui peut encore être considéré comme une pente faible.

Une procédure semblable de développement de méthodes a été suivie pour la séparation des isoformes de charge de l'étalon de référence NISTmAb (voir figure 2). Les conditions de départ pour l'anticorps du NIST contenaient une quantité de sel légèrement supérieure en raison de son point isoélectrique plus élevé ($pI \sim 9,2$) par rapport au trastuzumab ($pI \sim 9$). Pour une plus grande efficacité de séparation des isoformes de charge de l'étalon de référence NISTmAb, la pente des gradients était légèrement plus faible par rapport au trastuzumab. Ainsi, le gradient le plus faible était de 0,17 % de B/min (0,83 mM/min), un gradient difficile à assurer pour la pompe. Pour les études de reproductibilité subséquentes, une pente de gradient de 0,5 % de B/min (2,5 mM/min) a été choisie.

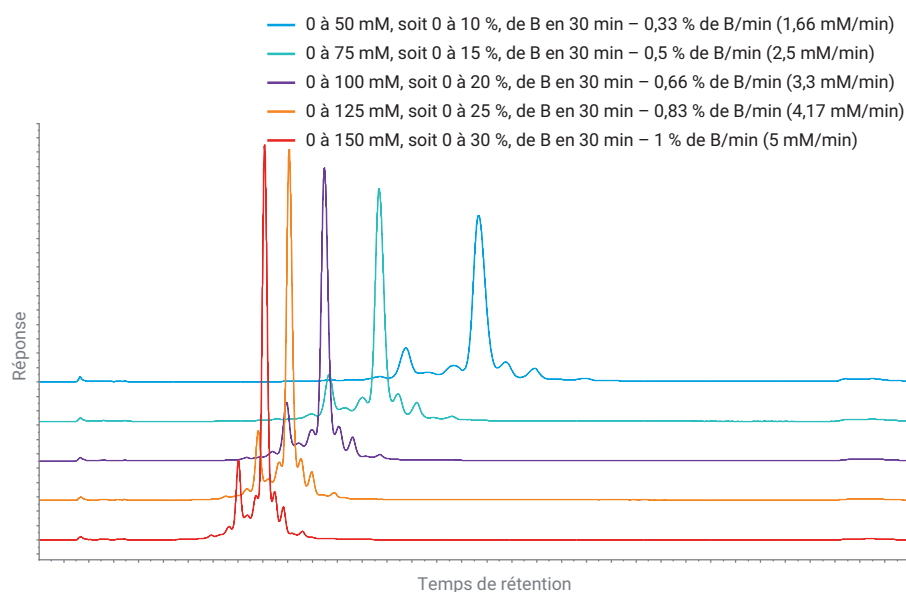


Figure 1. Développement de la méthode de séparation du trastuzumab avec différents pentes de gradient salin.

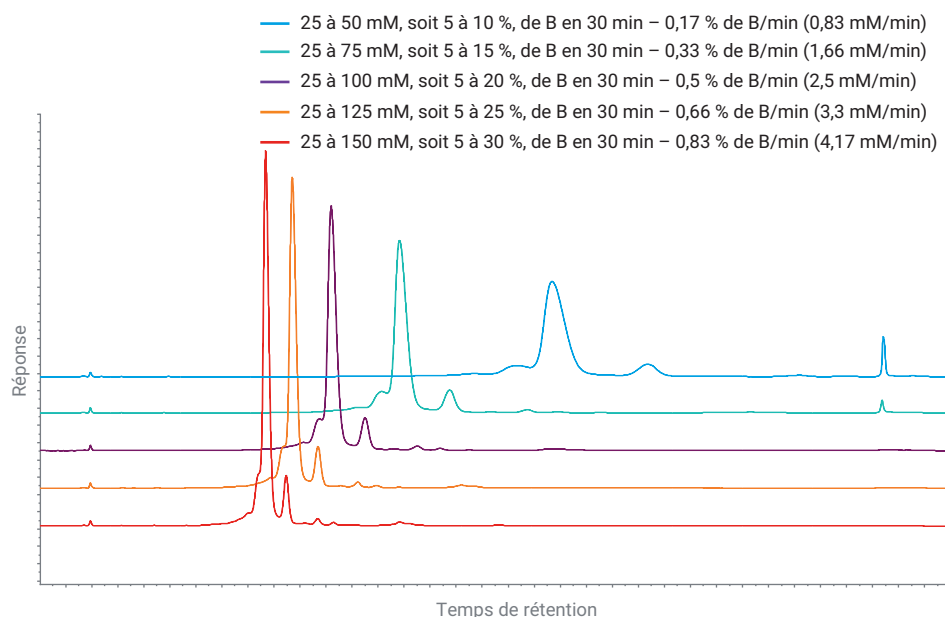


Figure 2. Développement de la méthode de séparation de l'étalon de référence NISTmAb avec différentes pentes de gradient salin.

Reproductibilité pour la séparation des isoformes de charge du trastuzumab

La figure 3 présente les études de reproductibilité pour la séparation des isoformes de charge du trastuzumab (A) avec une pente de gradient de 0,66 % de B/min (3,3 mM/min). La figure 3B présente un agrandissement pour une meilleure visualisation des isoformes séparées. Les isoformes marquées d'un A sont des isoformes acides éluées avant le pic principal, tandis que les isoformes B sont éluées après le pic principal. Les cinq isoformes acides ont été séparées avant le pic principal et les quatre isoformes basiques ont été éluées après le pic principal. La précision des temps de rétention (TR) et des surfaces de pics a été évaluée pour le pic principal et toutes les isoformes. La précision des temps de rétention et des surfaces était excellente, avec des valeurs d'écart-type relatif (RSD) inférieures à 0,052 % pour les TR et inférieures à 0,82 % pour les surfaces, à l'exception des deux pics de très faible intensité des isoformes A1 et B3.

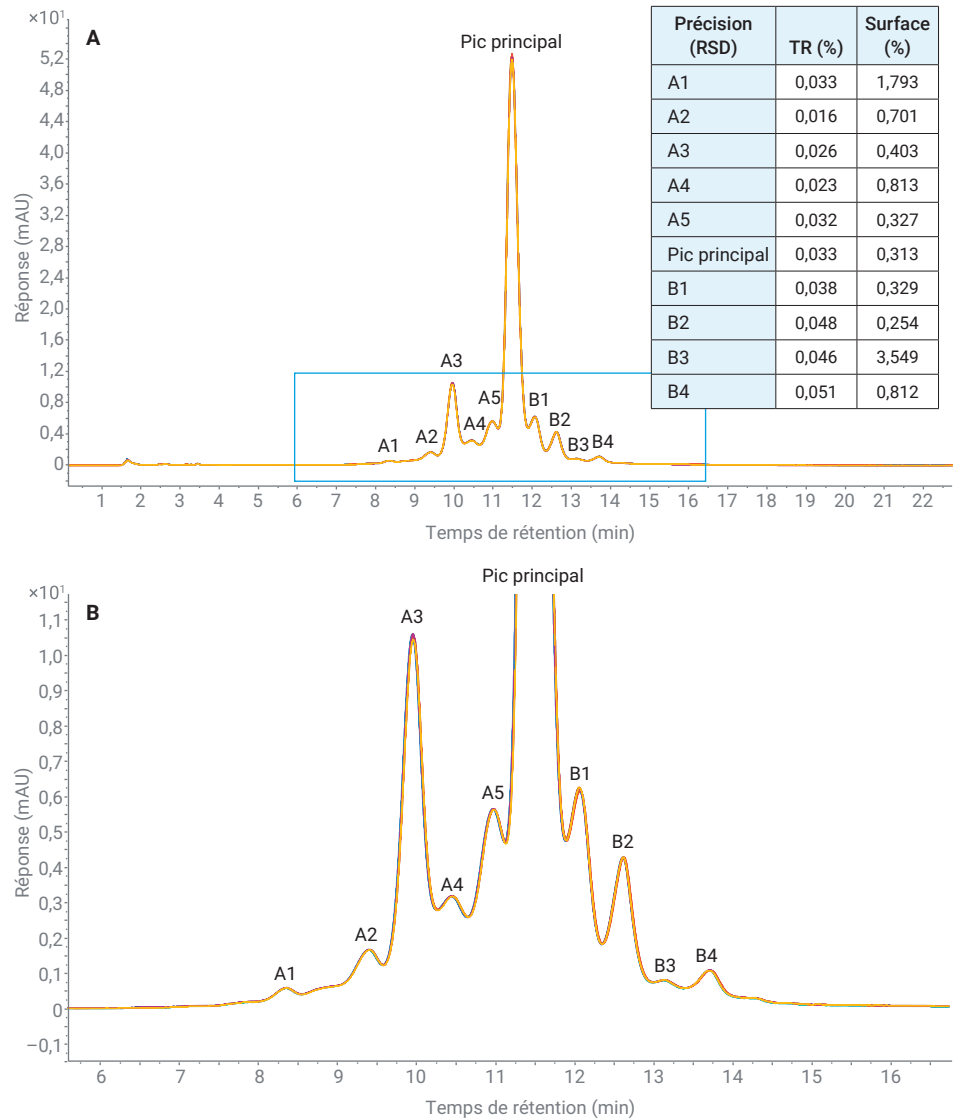


Figure 3. Études de reproductibilité avec sept analyses subséquentes pour la séparation des isoformes de charge du trastuzumab (A) avec une pente de gradient de 0,66 % de B/min (3,3 mM/min). (B) Agrandissement.

Reproductibilité pour la séparation des isoformes de charge du NISTmAb

La figure 4 présente les études de reproductibilité pour la séparation des isoformes de charge de l'étalon de référence NISTmAb (A) avec une pente de gradient de 0,5 % de B/min (2,5 mM/min).

La figure 4B est un agrandissement avec deux isoformes acides et quatre isoformes basiques. Une fois encore, la précision des temps de rétention (TR) et des surfaces de pics a été évaluée pour le pic principal et toutes les isoformes. La précision des temps de rétention et des surfaces était excellente, avec des valeurs de RSD inférieures à 0,06 % pour les TR et à 0,55 % pour les surfaces, à l'exception du pic de très faible intensité de l'isoforme B2.

Comme illustré dans la figure 2, le gradient avec la pente la plus faible, soit 0,17 % de B/min (0,83 mM/min), ne fournit pas la meilleure résolution par rapport à des gradients tels que 0,5 % de B/min (2,5 mM/min) (une pente encore faible, utilisée dans les études de reproductibilité).

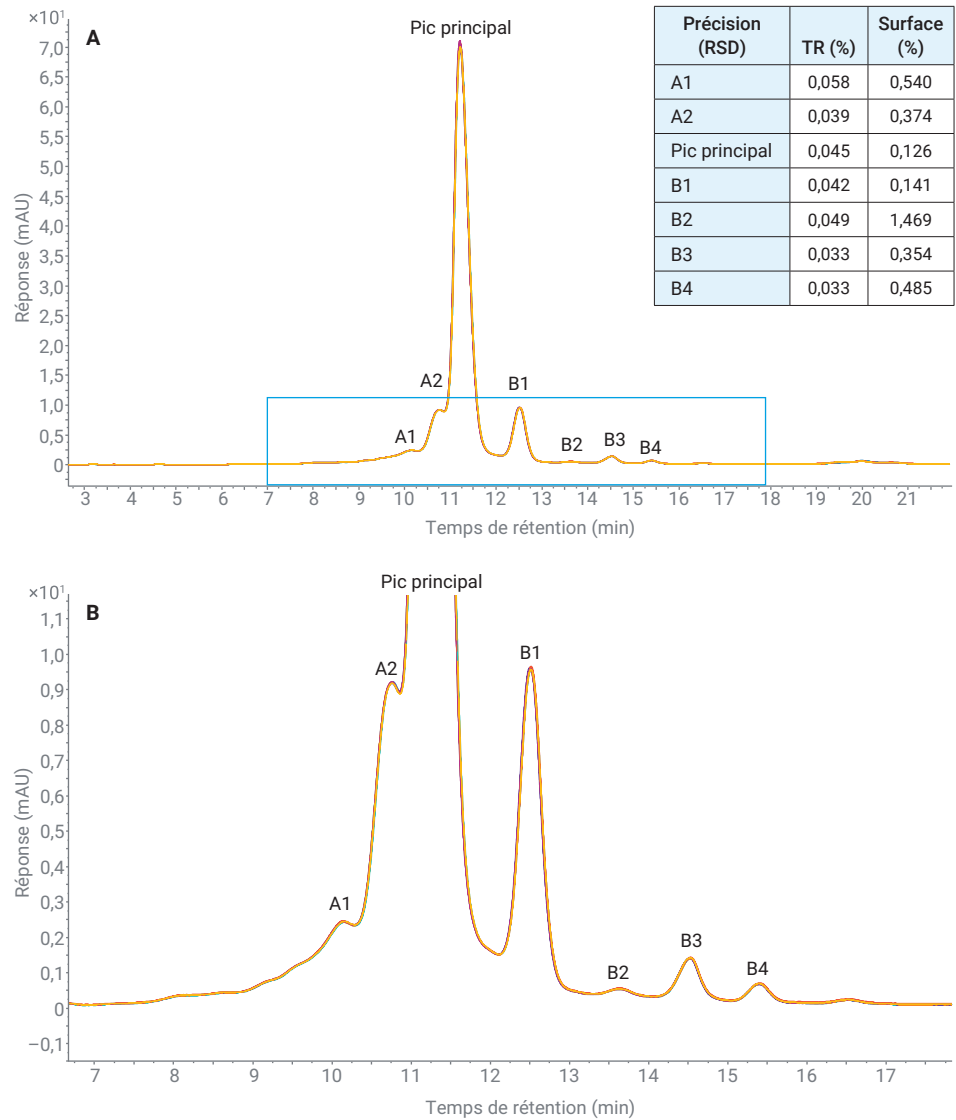


Figure 4. Études de reproductibilité avec sept analyses subséquentes pour la séparation des isoformes de charge de l'étalon de référence NISTmAb (A) avec une pente de gradient de 0,5 % de B/min (2,5 mM/min). (B) Agrandissement.

Toutefois, la pompe à haut débit Bio 1290 Infinity II a tout de même pu générer une telle pente de gradient, comme l'indique la figure 5. La précision des TR sur sept analyses subséquentes s'est avérée très bonne (RSD inférieur à 0,25 %), même si les pics sont devenus assez larges avec le gradient appliqué. Avec l'augmentation de la largeur de pic, la hauteur de pic diminue, ce qui nuit à la précision des surfaces.

Conclusion

Différentes pentes de gradient salin ont été évaluées en termes de résolution et de reproductibilité de la séparation des isoformes de charge du trastuzumab et du NISTmAb sur le LC Bio 1290 Infinity II. Les gradients plus faibles semblaient, à première vue, améliorer la résolution. Pour les deux mAb, cependant, les plus faibles gradients évalués n'ont pas donné la meilleure résolution, car les pics ont commencé à s'élargir avec la diminution de la pente, empêchant d'améliorer davantage la résolution. Les méthodes offrant la meilleure combinaison entre haute résolution et finesse des pics ont été soumises à des études de reproductibilité supplémentaires. Pour une pente de gradient de 3,3 mM/min (trastuzumab) et de 2,5 mM/min (NISTmAb), une excellente reproductibilité des TR et des surfaces de pics a été démontrée. La précision des TR présentait un RSD de 0,06 % pour tous les pics évalués. La pente de gradient la plus faible testée pour le NISTmAb a aussi été évaluée en termes de reproductibilité, et même avec une très faible pente de 0,83 mM/min, une très bonne précision des TR a été démontrée (RSD < 0,25 %). Ces données prouvent que grâce à son circuit complètement exempt de fer, le LC Bio 1290 Infinity II convient idéalement aux conditions utilisées en biochromatographie, permettant d'obtenir des résultats hautement reproductibles.

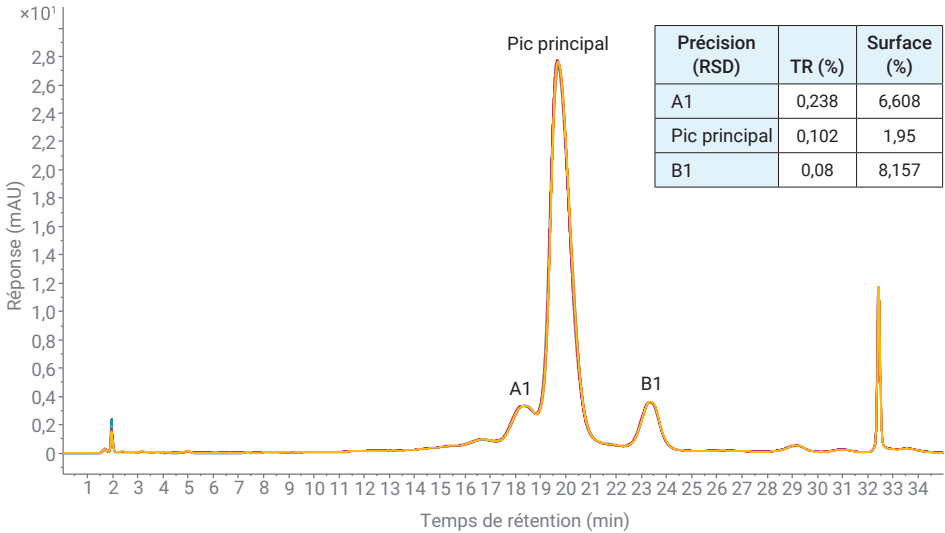


Figure 5. Études de reproductibilité avec sept analyses subséquentes pour la séparation des isoformes de charge de l'étalon de référence NISTmAb avec une pente de gradient de 0,17 % de B/min (0,83 mM/min).

Références

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*, numéro de publication 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.9640277778

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
Imprimé aux États-Unis, le 5 janvier 2021
5994-2692FR