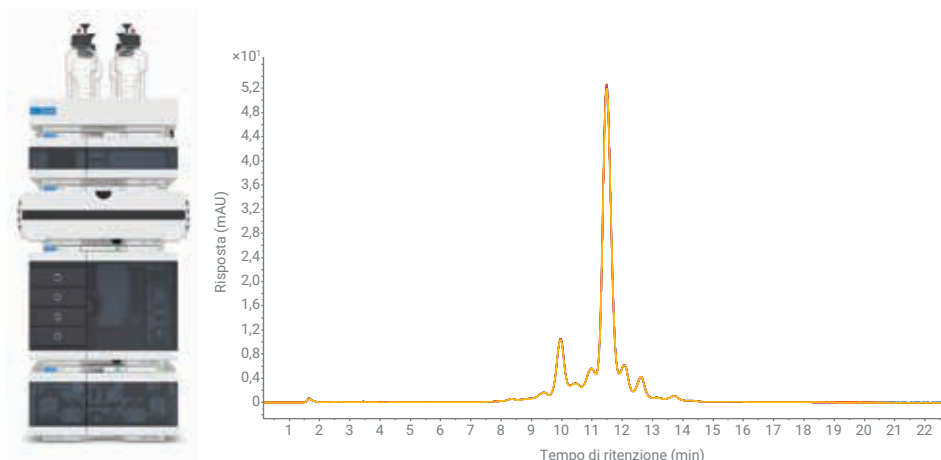


Di quanto puoi ridurre il tuo gradiente?

Perfezionamento dell'analisi delle isoforme cariche degli anticorpi monoclonali (mAb) con il sistema LC Bio Agilent 1290 Infinity II



Autore

Sonja Schneider
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

L'analisi delle isoforme cariche è un'applicazione problematica per i sistemi applicati di cromatografia liquida poiché utilizza tamponi altamente corrosivi combinati a gradienti con pendenze molto basse per separazioni ottimali. Una valutazione tra diversi gradienti salini è stata condotta sul sistema LC Bio Agilent 1290 Infinity II e analizzata in termini di risoluzione e riproducibilità.

Il sistema LC Bio Agilent 1290 Infinity II abbinato a una pompa High Speed, con il percorso del flusso completamente privo di ferro, è perfettamente adatto per le condizioni utilizzate in biocromatografia, in quanto consente di evitare possibili danni al sistema dovuti a corrosione. È stata determinata un'eccellente riproducibilità persino per gradienti con basse pendenze ed estremamente problematici. Questo conferma come LC Bio 1290 Infinity II sia la nuova generazione di sistemi di cromatografia liquida di fascia alta Agilent che garantiscono un'affidabilità elevata dei dati generati.

Introduzione

Gli anticorpi monoclonali (mAb) sono macromolecole molto eterogenee, con dimensioni attorno ai 150 kDa, tipicamente generati con metodi di produzione ricombinante. Sono generati in un processo biosintetico complesso durante il quale si possono verificare moltissime modificazioni che portano alla formazione di centinaia di varianti differenti. Deaminazione, ossidazione, ponti disolfuro, N-glicosilazione e processamento delle regioni N- e C-terminali sono alcune delle modificazioni post-traduzionali (PTM) più comuni.

Tutte queste modificazioni possono verificarsi durante la generazione; anche produzione e conservazione, tuttavia, possono contribuire alla complessità di queste macromolecole. Le PTM formano un profilo delle isoforme complesso che deve essere ampiamente analizzato e monitorato, in quanto modificazioni nel prodotto farmaceutico finale potrebbero essere associate a una perdita dell'attività biologica o dell'immunogenicità o a un'emivita alterata.¹ Alcune delle PTM generano isoforme cariche della molecola, che tipicamente sono analizzate mediante cromatografia a scambio ionico (IEX).² Le isoforme cariche sono considerate uno dei più importanti attributi critici per la qualità (CQA); è quindi necessario considerare criteri di accettazione e controlli qualità rigorosi. È estremamente importante confermare che la produzione avvenga correttamente, così come identificare e quantificare eventuali impurezze.

L'eluizione in gradiente con bassa pendenza è molto comune nella cromatografia a scambio ionico delle proteine. Un tipico gradiente salino in modalità forza ionica per l'eluizione di proteine è compreso approssimativamente tra 1 e 3 mM/min con un valore di pH impostato a una tolleranza di $\pm 0,02$ unità di pH.³

Il sistema LC Bio 1290 Infinity II è dotato di una pompa High Speed ad alte prestazioni. Il vantaggio principale delle pompe binarie risiede nel fatto che la miscelazione del solvente è molto più accurata e precisa quando si miscelano piccole proporzioni di uno dei componenti rispetto alle pompe di miscelazione a bassa pressione (per esempio le pompe quaternarie). Questo tipo di miscelazione permette di ottenere composizioni del solvente molto precise all'inizio e alla fine di un gradiente di solvente.⁴ Questo è il punto di partenza per la generazione di gradienti con bassa pendenza riproducibili e accurati (inferiore a 1%/min per ciascun canale).

Il sistema LC Bio Agilent 1290 Infinity II è la nuova generazione di sistemi di cromatografia liquida di fascia alta Agilent, progettato appositamente per le condizioni utilizzate in biocromatografia: concentrazioni saline elevate, come NaCl 2 M, urea fino a 8 M e solventi a pH alti e bassi, come NaOH 0,5 M o HCl 0,5 M. L'intero percorso del flusso è completamente privo di acciaio inossidabile (SST) o ferro; tutti i capillari e i raccordi nel multicampionatore, termostato multicolonna e rivelatori sono prodotti con MP35N, una lega di nickel e cobalto. Grazie a questo materiale, la possibile corrosione dovuta a tamponi ad alto contenuto di sali viene ridotta e si possono evitare le modificazioni delle proteine causate dalla presenza di ioni ferro (per esempio ossidazione, formazione di complessi proteici).

In questa nota applicativa è presentata l'analisi di isoforme cariche per trastuzumab e lo standard di riferimento NISTmAb. Sono state testate differenti pendenze del gradiente salino per trovare la miglior risoluzione possibile. Successivamente, le pendenze del gradiente che presentavano le migliori prestazioni sono state valutate in termini di riproducibilità.

Condizioni sperimentali

Apparecchiature

Il sistema LC Bio Agilent 1290 Infinity II era composto dai seguenti moduli:

- Pompa High Speed Bio Agilent 1290 Infinity II (G7132A).
- Multicampionatore Bio Agilent 1290 Infinity II (G7137A) con termostato del campione (opzione n. 101).
- Termostato multicolonna Agilent 1290 Infinity II (G7116B) con scambiatore di calore a flusso standard biocompatibile.
- Rivelatore a lunghezza d'onda variabile Agilent 1290 Infinity II (G7114B) dotato di una cella di flusso micro biocompatibile, 3 mm, 2 μ L.

Software

Agilent OpenLab CDS Versione 2.5

Colonne

Colonna per HPLC Bio-MAb NP5, 2,1 $\times$ 250 mm, con rivestimento in PEEK (codice 5190-2411)

Prodotti chimici

Tutti i solventi sono di grado LC. L'acqua ultrapura fresca è stata ottenuta con un sistema Milli-Q Integral dotato di cartuccia con membrana da 0,22 μ m al punto d'uso (Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA). Sodio fosfato monobasico monoidrato, sodio fosfato bibasico eptaidrato e cloruro di sodio sono stati ottenuti da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germania).

Campioni

- Agilent-NISTmAb (codice 5191-5744).
- L'anticorpo monoclonale umanizzato trastuzumab, commercializzato come Herceptin, è stato ottenuto da Roche (Basilea, Svizzera).
- Trastuzumab è stato disciolto in un tampone fosfato 30 mM, pH 6,8.

Preparazione del tampone

Per 2 L di tampone fosfato 30 mM e pH 6,8, 4,45 g di sodio fosfato monobasico monoidrato e 7,44 g di sodio fosfato bibasico eptaidrato sono stati pesati e aggiunti a un flacone ambrato da 2 L e portati al volume di 2 L usando acqua ultra pura (tampone A). 29,22 g di cloruro di sodio, per una concentrazione finale di 500 mM, sono stati aggiunti a un flacone ambrato vuoto da 1 L e portati al volume di 1 L usando il tampone fosfato A preparato in precedenza (tampone B). I pH di entrambi i tamponi sono stati controllati e, se necessario, regolati a pH 6,8 (l'aggiunta di elevate quantità di sale può modificare il pH). Entrambi i tamponi preparati sono stati filtrati con un filtro a membrana da 0,2 µm.

Metodo

Vedere la Tabella 1.

Nota: quando si utilizzano come eluenti soluzioni saline concentrate, sarebbe utile impostare i tipi di solventi corrispondenti nel metodo della pompa. Per esempio, per il solvente B, che contiene cloruro di sodio 500 mM, utilizzare "Cloruro di sodio 0,5 M" piuttosto che *Acquoso generico* o *Acqua* nel campo per la scelta del solvente nel metodo della pompa. Elevate quantità di sali cambiano la comprimibilità del solvente: l'uso di tabelle di solventi preconfigurate consente di ottenere le migliori prestazioni della pompa.

Risultati e discussione

Sviluppo di metodi

Per ottenere la risoluzione desiderata e consentire una separazione ottimale, l'analisi delle isoforme cariche richiede uno sviluppo di metodi esteso. Per una buona riuscita, sono essenziali due parametri: il pH ottimale e la pendenza del gradiente ideale. Entrambi i fattori possono influenzare in modo importante la separazione. Come prima cosa, si raccomanda la creazione di gradienti di pH per trovare il pH ottimale per la separazione. In esperimenti precedenti, il pH dei tamponi utilizzati è stato analizzato da 6,4 a 7,4: il pH ottimale è risultato essere a 6,8 per entrambi i campioni usati, trastuzumab e lo standard di riferimento NISTmAb (dati non mostrati). Il passaggio successivo consiste nella determinazione della pendenza del gradiente ideale per consentire una separazione efficiente.

Tabella 1. Condizioni cromatografiche del gradiente salino.

Parametro	Valore
Solvente	A) Tampone fosfato 30 mM, pH 6,8, B: Tampone fosfato 30 mM, pH 6,8, cloruro di sodio 500 mM
Gradiente	0 o 25 mM—NaCl 150 mM in 30 minuti—diversi gradienti con bassa pendenza per lo sviluppo di metodi NaCl da 0 mM (trastuzumab) e 25 mM (NIST) a 100 mM in 30 minuti per la riproducibilità NaCl da 25 a 50 mM in 30 minuti per la riproducibilità (gradiente con pendenza molto bassa) 31 minuti—lavaggio con NaCl 500 mM Tempo finale: 35 minuti Tempo post analisi: 15 minuti
Flusso	0,200 mL/min
Temperatura	30 °C
Rivelazione	280 nm 10 Hz
Iniezione	Volume di iniezione: 3 µL per trastuzumab e 2 µL per NIST Temperatura del campione: 10 °C Lavaggio dell'ago: 3 s in acqua

La Figura 1 mostra la sovrapposizione dell'analisi delle isoforme cariche di trastuzumab a pendenze del gradiente differenti, comprese tra 1% B/min (5 mM/min) e 0,33% B/min (1,66 mM/min). Man mano che la pendenza del gradiente diminuisce, aumenta il fabbisogno di prestazioni della pompa. Per garantire composizioni del solvente altamente precise durante il gradiente, la pompa deve funzionare in modo accurato e preciso per la miscelazione di piccole proporzioni di componenti del solvente. Si deve tuttavia considerare che, per i gradienti salini, gradienti con pendenze molto basse non sempre si traducono in una risoluzione migliore, ma semplicemente aumentano la larghezza del picco (per esempio, 0,33% B/min in Figura 1). Di conseguenza, la pendenza del gradiente scelta per gli studi di riproducibilità è stata trovata a metà dell'intervallo dei gradienti testati, a 0,66% B/min e 3,3 mM/min, che può sempre essere considerata una pendenza bassa.

Una procedura di sviluppo di metodi simile è stata eseguita per la separazione delle isoforme cariche dello standard di riferimento NISTmAb (vedere la Figura 2). Le condizioni iniziali per NIST contenevano una quantità di sale leggermente superiore poiché il punto isoelettrico (pI) dell'anticorpo NIST è maggiore (pI ~9,2), rispetto a trastuzumab con pI ~9. Per una separazione più efficace delle isoforme cariche dello standard di riferimento NISTmAb, i gradienti presentavano una pendenza leggermente più bassa rispetto a trastuzumab, con il valore più basso a 0,17% B/min (0,83 mM/min), che può essere problematico per la pompa. Per successivi studi di riproducibilità, è stata scelta la pendenza del gradiente di 0,5% B/min (2,5 mM/min).

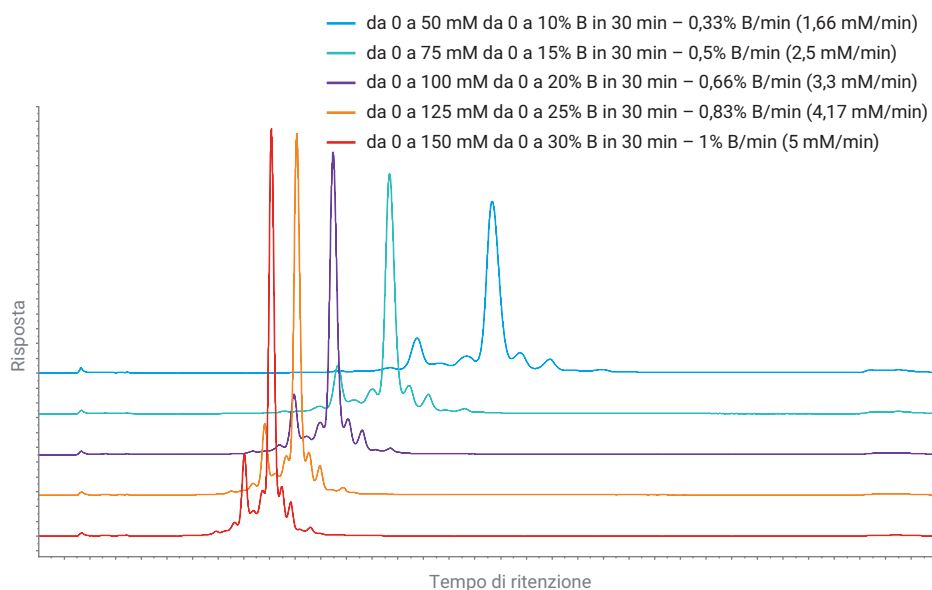


Figura 1. Sviluppo di metodi per la separazione di trastuzumab con diverse pendenze del gradiente salino.

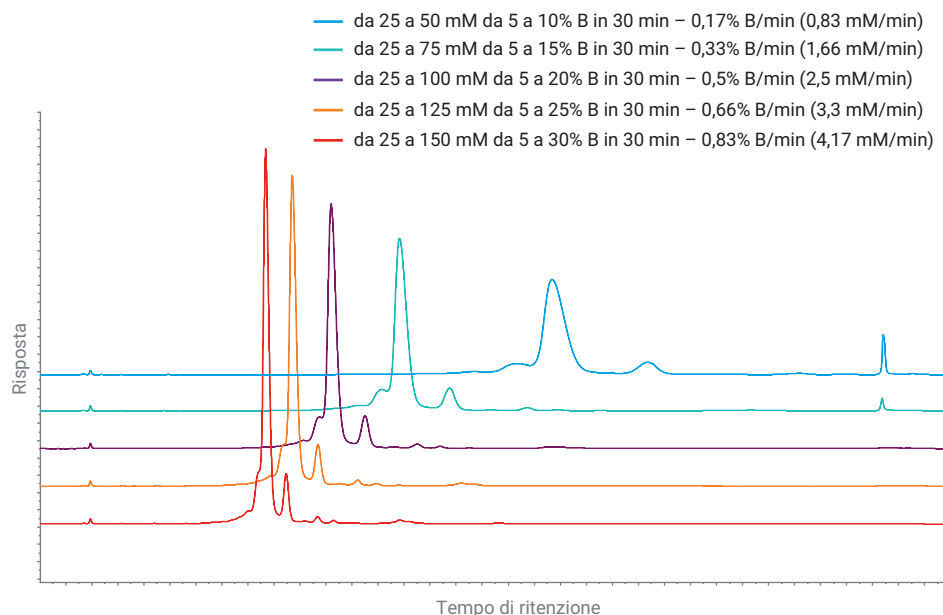


Figura 2. Sviluppo di metodi per la separazione dello standard di riferimento NISTmAb con diverse pendenze del gradiente salino.

Riproducibilità per la separazione delle isoforme cariche di trastuzumab

La Figura 3 mostra gli studi di riproducibilità per la separazione delle isoforme cariche di trastuzumab (A) con una pendenza del gradiente di 0,66% B/min (3,3 mM/min). In Figura 3B è riportata una regione ingrandita che permette di meglio distinguere le isoforme separate. Le isoforme contrassegnate con A rappresentano le isoforme acide che sono eluite prima del picco principale, mentre le isoforme contrassegnate con B eluiscono dopo il picco principale. Cinque isoforme acide sono state identificate prima del picco principale e quattro isoforme basiche sono eluite dopo il picco principale. È stata eseguita la valutazione della precisione del tempo di ritenzione (RT) e dell'area di tutte le isoforme e del picco principale. La precisione di RT e quella dell'area sono eccellenti, con valori della deviazione standard relativa (RSD) sotto allo 0,052% per RT e con RSD inferiore a 0,82% per l'area, ad eccezione dei due picchi delle isoforme più piccoli A1 e B3.

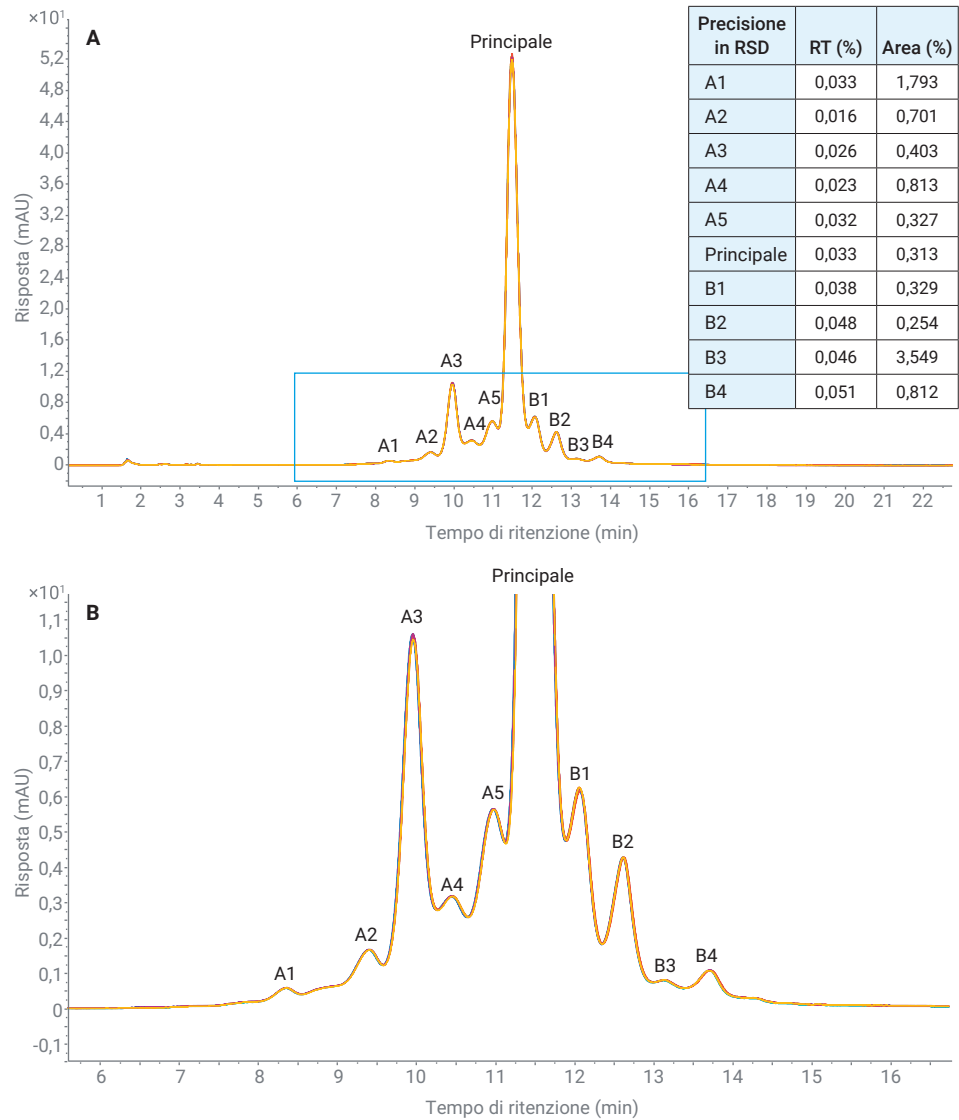


Figura 3. Studi di riproducibilità con sette analisi successive per la separazione delle isoforme cariche di trastuzumab (A) con una pendenza del gradiente di 0,66% B/min (3,3 mM/min). (B) Regione ingrandita.

Riproducibilità per la separazione delle isoforme cariche di NISTmAb

La Figura 4 mostra gli studi di riproducibilità per la separazione delle isoforme cariche dello standard di riferimento NISTmAb (A) con una pendenza del gradiente di 0,5% B/min (2,5 mM/min).

In Figura 4B è riportata una regione ingrandita con due isoforme acide e quattro isoforme basiche. Similmente, è stata eseguita la valutazione della precisione del tempo di ritenzione (RT) e dell'area di tutte le isoforme e del picco principale. La precisione di RT e quella dell'area sono eccellenti, con valori di RSD inferiori a 0,06% per RT e inferiori a 0,55% per l'area, ad eccezione del picco più piccolo B2.

Come mostrato in Figura 2, il gradiente con la pendenza più bassa di 0,17% B/min (0,83 mM/min) non garantisce una risoluzione migliore rispetto a gradienti come 0,5% B/min (2,5 mM/min) (comunque basso, utilizzato negli studi di riproducibilità).

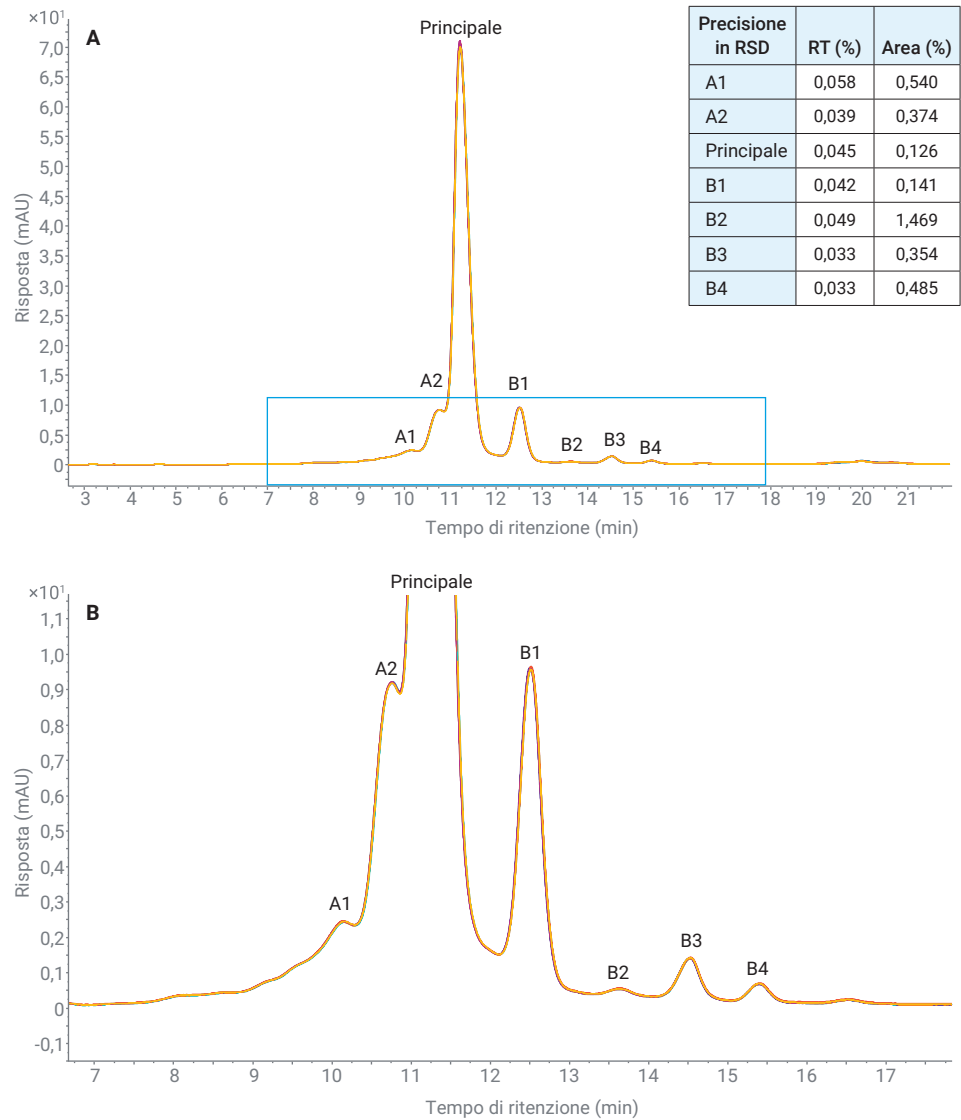


Figura 4. Studi di riproducibilità con sette analisi successive per la separazione delle isoforme cariche dello standard di riferimento NISTmAb (A) con una pendenza del gradiente di 0,5% B/min (2,5 mM/min). (B) Regione ingrandita.

La pompa High Speed Bio 1290 Infinity II, tuttavia, è stata in grado di gestire la difficile pendenza del gradiente, come mostrato in Figura 5. La precisione di RT su sette analisi successive era ottima (RSD inferiore a 0,25%), nonostante i picchi risultassero piuttosto allargati con il gradiente applicato. Con l'aumentare della larghezza del picco, diminuisce l'altezza del picco, con un effetto negativo sulla precisione dell'area.

Conclusione

Differenti pendenze del gradiente salino sono state valutate in termini di risoluzione e riproducibilità della separazione delle isoforme cariche per trastuzumab e NISTmAb sul sistema LC Bio 1290 Infinity II. A prima vista, i gradienti con pendenze più basse sembravano migliorare la risoluzione. Tuttavia, per entrambi gli mAb, i gradienti valutati con le pendenze più basse non si traducevano nella risoluzione migliore, in quanto con il diminuire della pendenza, si assisteva ad un allargamento dei picchi, senza un ulteriore miglioramento della risoluzione. I metodi con la migliore combinazione di alta risoluzione e forme dei picchi simmetriche sono stati ulteriormente valutati in termini di riproducibilità. Per una pendenza del gradiente di 3,3 mM/min (trastuzumab) e 2,5 mM/min (NISTmAb), è stata documentata un'eccellente riproducibilità per RT e anche per l'area. La precisione di RT era inferiore a 0,06% (RSD) per tutti i picchi valutati. Il gradiente con la pendenza più bassa per NISTmAb è anche stato valutato in termini di riproducibilità: persino nel caso di un gradiente con pendenza estremamente bassa pari a 0,83 mM/min, è stata trovata un'ottima precisione di RT (RSD <0,25%). Questi dati dimostrano che il sistema LC Bio Agilent 1290 Infinity II con il percorso del flusso completamente privo di ferro è perfettamente adatto per le condizioni utilizzate nella biocromatografia, garantendo risultati altamente riproducibili.

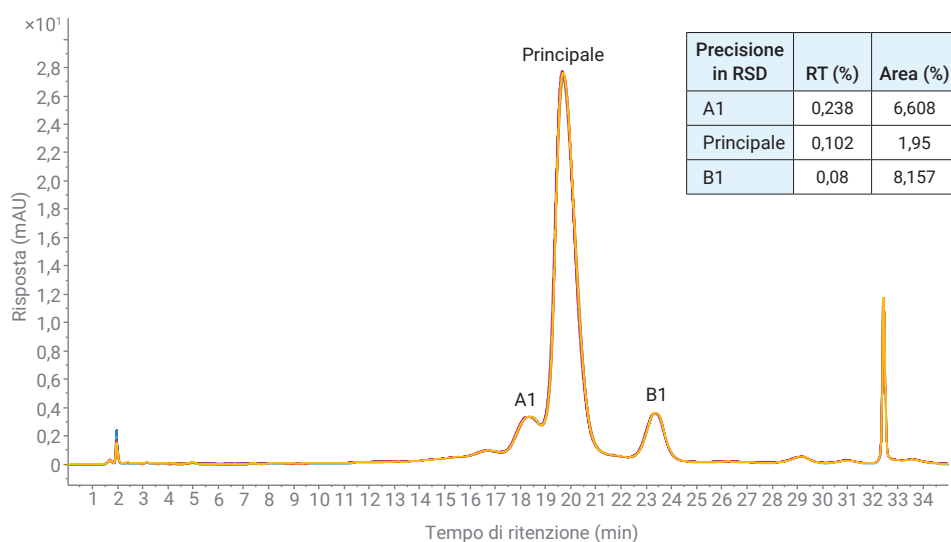


Figura 5. Studi di riproducibilità con sette analisi successive per la separazione delle isoforme cariche dello standard di riferimento NISTmAb con una pendenza del gradiente di 0,17% B/min (0,83 mM/min).

Bibliografia

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*, publication number 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

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
Stampato negli Stati Uniti Stati Uniti, 5 gennaio 2021
5994-2692ITE