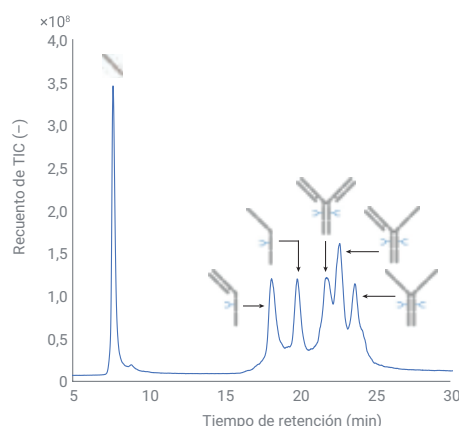


Monitorización de los fragmentos de mAb asociados al producto

El análisis de proteínas intactas mediante el sistema LC bioinerte Agilent 1290 Infinity II permite la detección mediante UV y MS de especies de bajo peso molecular



Autor

André Feith
Agilent Technologies, Inc.

Resumen

Las impurezas asociadas al producto, como las especies de bajo peso molecular (BPM) o las de alto peso molecular (APM), se consideran atributos de calidad críticos (CQA) en los productos con anticuerpos monoclonales (mAb) terapéuticos y se deben monitorizar durante todo el proceso de producción del fármaco. En esta nota de aplicación se ha desarrollado un método de RPLC basado en el excelente rendimiento del sistema LC bioinerte Agilent 1290 Infinity II junto con la columna Agilent PLRP-S con recubrimiento de PEEK. Al analizar las cadenas pesadas y ligeras reducidas de NISTmAb se observaron un tiempo de retención relativo y unas desviaciones de área excelentes, incluso con pendientes de gradiente extremadamente superficiales. Tras el desarrollo de método, fue posible separar y detectar todos los fragmentos de BPM relevantes, como dos cadenas pesadas (H2) o dos cadenas pesadas y una ligera (H2L). Gracias al acoplamiento secuencial del detector selectivo de masas y de UV, el método se puede utilizar en diferentes áreas de la cadena de producción biofarmacéutica. El método también se erige como alternativa a SDS-PAGE/CE-SDS gracias a la posibilidad de analizar dos CQA en una sola sesión: las especies de bajo peso molecular y las modificaciones postranslacionales (PTM).

Introducción

Los anticuerpos monoclonales son una gama imprescindible de productos biofarmacéuticos y se han empleado con éxito para combatir ciertas enfermedades.¹ Estas biomoléculas cuentan con una estructura heterotetramétrica conservada que está formada por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras que están conectadas mediante enlaces disulfuro. Durante la producción o un almacenamiento inadecuado, se pueden formar impurezas asociadas con el producto, como las especies de bajo peso molecular (consulte la Figura 1) o las especies de alto peso molecular (como los dímeros de anticuerpo). Estas impurezas pueden permanecer presentes incluso tras llevar a cabo pasos de purificación exhaustivos, por lo que es crucial monitorizarlas como un CQA en el caso de los fármacos. Es posible analizar y separar de forma rutinaria las especies de APM, como los dímeros o trímeros de anticuerpo o compuestos más elevados, mediante la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) con la detección UV.² La combinación de SEC con la detección MS se puede llevar a cabo para conseguir una caracterización más detallada de las impurezas en cuanto a peso molecular y PTM.³ El análisis de especies de bajo peso molecular, como la cadena pesada (H), la cadena ligera (L) o los fragmentos H2L se puede llevar a cabo mediante electroforesis capilar con dodecil sulfato sódico (CE-SDS),⁴ Lamentablemente, no es posible combinar CE-SDS con la detección MS por la elevada supresión iónica que provoca el SDS y, por tanto, las identidades de bajo peso molecular que se proponen suelen estar basadas en conocimientos empíricos. En esta nota de aplicación se muestra un análisis alternativo de especies de bajo peso molecular de anticuerpos monoclonales basado en el excelente rendimiento del sistema LC bioinerte Agilent 1290 Infinity II junto con la columna Agilent PLRP-S con recubrimiento de PEEK. Gracias al modo de cromatografía de líquidos de fase reversa (RPLC), es posible detectar todos los fragmentos de bajo peso molecular relevantes inducidos

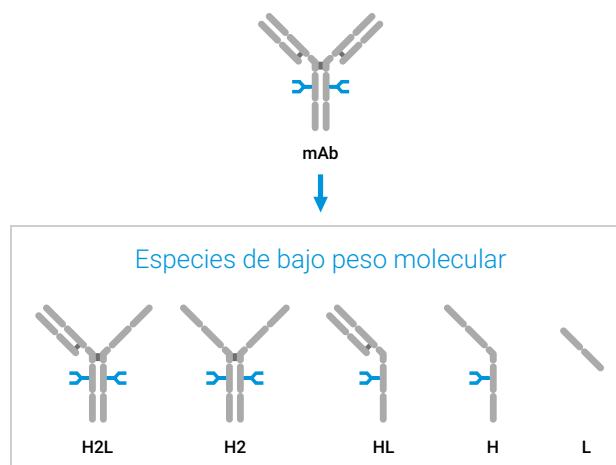


Figura 1. Resumen general esquemático de las especies de bajo peso molecular de anticuerpos monoclonales inducidas por reducción. Abreviaturas: H2L (dos cadenas pesadas y una ligera), H2 (dos cadenas pesadas), HL (una cadena pesada y una ligera), H (cadena pesada) y L (cadena ligera).

por la reducción de NISTmAb mediante MS y UV en análisis rutinarios o en profundidad, según el caso.

Experimento

Equipos

El sistema LC bioinerte Agilent 1290 Infinity II junto con el sistema LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio estaban formados 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) equipado con flujo estándar rápido
- intercambiador de calor Connect Bio (G7116-60071) y dos dispositivos de equilibrio térmico Agilent (G7116-60013)
- detector de longitud de onda variable Agilent 1290 Infinity II (VWD; G7114B) equipado con celda de microflujo biocompatible con VWD de 3 mm y 2 µl, con RFID.
- sistema LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio (G6545XT)

Software

- adquisición de datos estación de trabajo Agilent MassHunter (B.09.00 o posterior)
- análisis cuantitativo Agilent MassHunter (10.0 o posterior)
- software MassHunter BioConfirm (10.0 o posterior)

Columnas

Agilent PLRP-S de 5 µm y 1000 Å, 2,1 × 100 mm con recubrimiento de PEEK (ref. PL1912-2502PK)

Productos químicos

Se utilizaron acetronilo ultrapuro Agilent InfinityLab para LC/MS (ref. 5191-4496) y el patrón Agilent-NISTmAb (ref. 5191-5744). 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.). El DL-ditiotreitol (DTT) se compró a Merck (Darmstadt, Alemania).

Preparación de muestras

Para reducir de forma parcial el NISTmAb, se incubaron 40 µg con DTT 1 mM en un vial de vidrio ámbar directamente en el muestreador múltiple bioinerte 1290 Infinity II a 4 °C. Se logró la reducción completa a cadena pesada (H) y cadena ligera (L) a través de la incubación de 40 µg de NISTmAb con DTT 10 mM a 60 °C durante 30 minutos. La concentración de la inyección era de 1 mg/ml de NISTmAb o de NISTmAb reducido.

Tabla 1. Método de LC para el análisis de NISTmAb intacto y las especies de BPM correspondientes con el sistema LC bioinerte Agilent 1290 Infinity II.

Parámetro	Valor
Columna	Agilent PLRP-S de 5 µm y 1000 Å, 2,1 × 100 mm con recubrimiento de PEEK
Disolvente	A) Agua y ácido fórmico al 0,1 % B) Acetonitrilo y ácido fórmico al 0,1 %
Gradiente	0,00 min: 25 % B 9,00 min: 30 % B 34,00 min: 38 % B 34,01 min: 100 % B 36,00 min: 100 % B 36,01 min: 25 % B 40,00 min: 25 % B
Flujo	0,400 ml/min
Temperatura	60 °C con dispositivo de equilibrio térmico instalado
Detección UV	VWD: 280 nm, 10 Hz/MS: consulte la Tabla 2
Inyección	Volumen de inyección: 0,3 µl Temperatura de muestra: 4 °C Lavado: 3 seg con agua (puerto de irrigación)

Tabla 2. Fuente y parámetros de MS para el análisis de NISTmAb intacto y las especies de BPM correspondientes.

Parámetro	Valor
Instrumento	Sistema LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio
Temperatura del gas	350 °C
Flujo de gas de secado	12 l/min
Nebulizador	35 psig
Temperatura del gas de focalización	350 °C
Flujo de gas de focalización	11 l/min
Vcap	4.000 V
Tensión de la boquilla	2.000 V
Fragmentador	180 V
Skimmer	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
Modo de adquisición	Positivo, rango de masas ampliado (m/z 10.000)
Rango de masas	m/z de 100 a 10.000
Velocidad de adquisición	1 espectro/s
Masa de referencia	m/z 922,0098

Resultados y comentarios

El análisis de los productos biofarmacéuticos durante todo el proceso de producción, desde la etapa de fabricación al control de calidad, exige el mayor rendimiento posible de los sistemas de LC. Para evaluar el rendimiento del sistema LC bioinerte 1290 Infinity II en cuanto al análisis de fragmentos de mAb, se redujo completamente el NISTmAb con DTT, dando como resultado fragmentos H y L. En la Figura 2 se muestra el tiempo de retención relativo y las desviaciones estándar (DER) del área en siete inyecciones consecutivas. La figura demuestra que el tiempo de retención y la precisión del área que se obtienen mediante el sistema LC bioinerte 1290 Infinity II junto con el sistema LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio son excelentes y perfectamente adecuados para analizar fragmentos de mAb con gradientes superficiales. A pesar de que el método de LC está formado por dos pasos lineales de gradiente con pendientes de 0,32 y 0,55 % B/min, los valores de DER siguen siendo bajos en cuanto al tiempo de retención, con 0,190 % (L) y 0,056 % (H), y a la precisión del área, con 0,530 % (L) y 0,744 % (H).

Uno de los problemas más importantes que hay que abordar a la hora de analizar especies de bajo peso molecular con RPLC es su insuficiente poder de resolución para separar los fragmentos de anticuerpo como H2 o H2L dada su semejanza en hidrofobicidad en comparación con el anticuerpo monoclonal real. Estos fragmentos pueden producirse por un proceso de fermentación o por reducción parcial en el producto final. Sin embargo, también se pueden generar de forma artificial mediante una reducción parcial con el tiempo con una pequeña cantidad de DTT junto con un incremento de la temperatura. Mediante esta técnica se desarrolló un método RPLC basado en las columnas PLRP-S con recubrimiento de PEEK y el sistema LC bioinerte 1290 Infinity II.

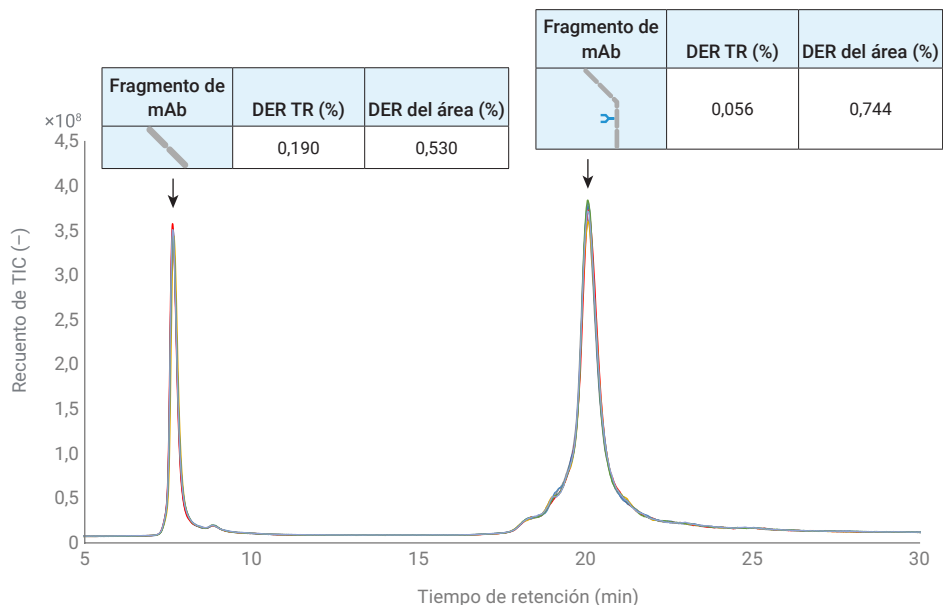


Figura 2. Valores relativos de tiempo de retención y precisión del área (DER, n = 7) del sistema LC bioinerte Agilent 1290 Infinity II al analizar fragmentos de cadena pesada y ligera derivados de la reducción de NISTmAb.

La reducción dinámica de NISTmAb en el muestreador múltiple bioinerte 1290 Infinity II se puede observar en el cromatograma de la Figura 3. Todos los fragmentos de mAb relevantes que se reflejan en la Figura 1 se pueden resolver sin problemas y cambian con el tiempo debido a la incorporación de DTT. En concreto, la separación de los fragmentos H2 y H2L de NISTmAb es excepcional en RPLC, por lo que la combinación de la columna PLRP-S con recubrimiento de PEEK y el sistema LC bioinerte 1290 Infinity II son el método perfecto para el análisis de BPM. Gracias al modo RPLC, el sistema LC bioinerte 1290 Infinity II se puede combinar fácilmente con el sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio y los datos MS se pueden analizar mediante el software Agilent MassHunter BioConfirm. Tras la deconvolución, el espectro que aparece en la Figura 3 refleja las glucoformas principales de

los fragmentos correspondientes. La glucosilación característica de NISTmAb demuestra que es posible analizar las PTM de los distintos fragmentos de manera sencilla con este método. Además, en la Figura 4B se muestran los cromatogramas de iones extraídos (EIC) de los iones representativos de los fragmentos que se agrupan en torno al pico de mAb. Estos EIC también ofrecen una adecuada forma de pico gracias al poder de resolución de la columna PLRP-S con recubrimiento de PEEK.

Dado que la configuración de los instrumentos está formada por el detector de longitud de onda variable 1290 Infinity II y el sistema LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio en secuencia, es posible llevar a cabo la detección mediante MS y UV en un solo análisis con un ensanchamiento de la banda ínfimo o nulo y una transferencia de métodos cómoda desde el desarrollo del proceso al control de calidad (Figura 4A).

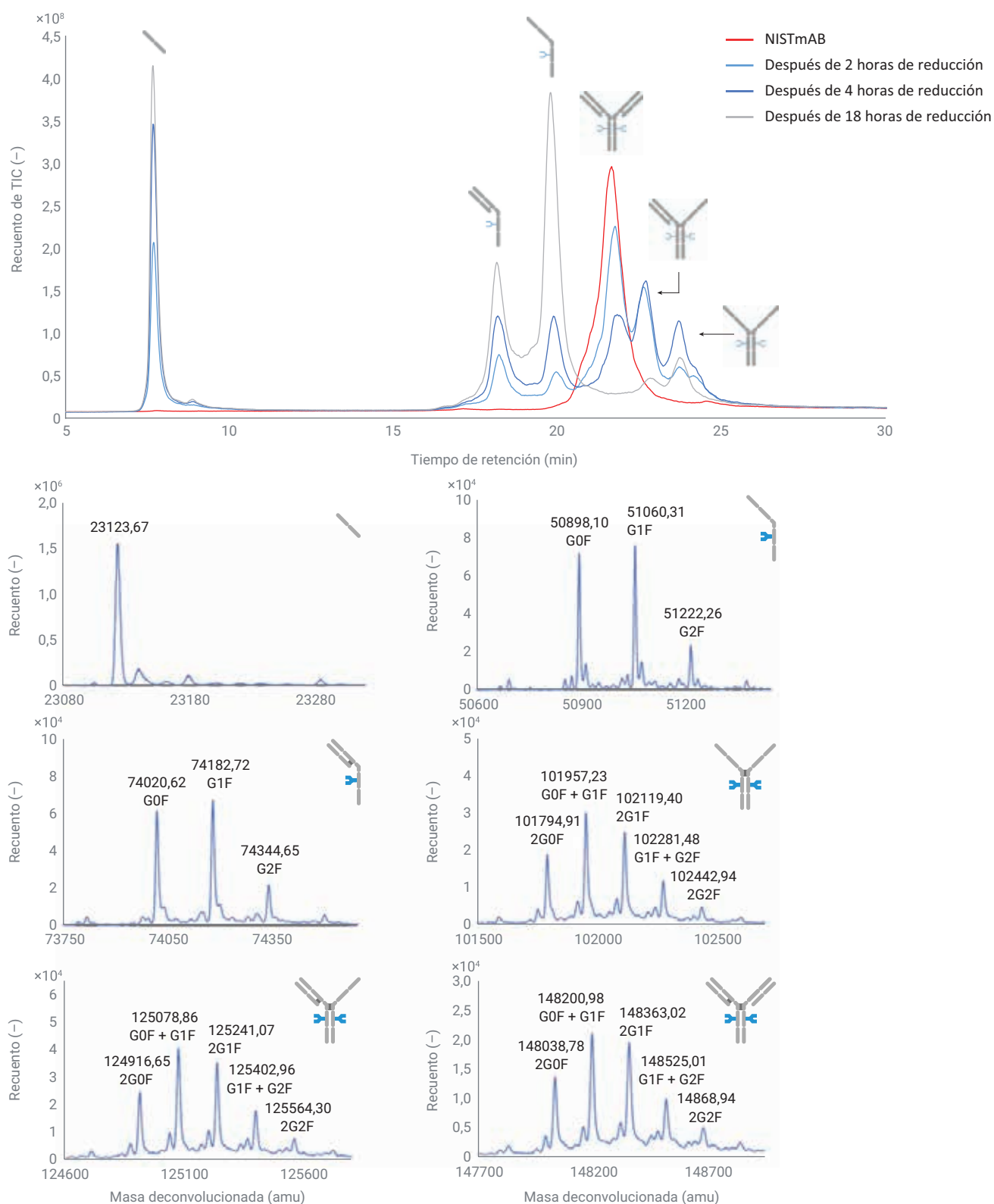


Figura 3. Cromatogramas de la reducción dinámica parcial de NISTmAb con separación mediante el sistema LC bioinerte Agilent 1290 Infinity II y detección a través del sistema LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio. Los espectros extraídos correspondientes de los respectivos fragmentos muestran la glucosilación característica de NISTmAb.

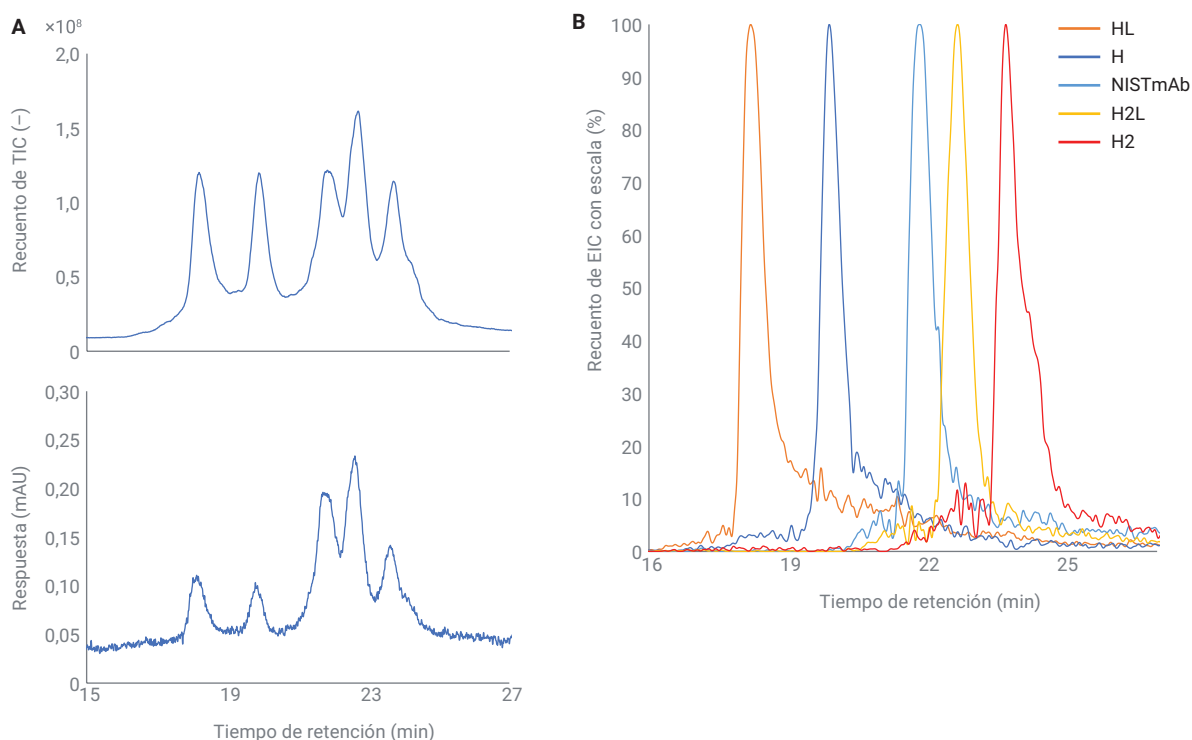


Figura 4. Cromatograma de MS y UV de los fragmentos agrupándose en torno al NISTmAb adquirido en un análisis (A). Los cromatogramas de iones extraídos de fragmentos de NISTmAb muestran una forma de pico extraordinaria (B).

Conclusión

El método SDS-PAGE convencional y su equivalente actual, CE-SDS, se utilizan habitualmente para analizar impurezas asociadas con el producto, como las especies de bajo y alto peso molecular. Sin embargo, la identificación estructural de las especies de bajo peso molecular con estos métodos ha sido siempre muy compleja y se ha basado, principalmente, en conocimientos empíricos. En esta nota de aplicación se presenta un método de RPLC que es capaz de separar todas las especies relevantes de BPM inducidas por la reducción del NISTmAb. El sistema LC bioinerte 1290 Infinity II ha demostrado conseguir valores excepcionales de tiempo de retención y precisión del área basados en el análisis de fragmentos

de cadena pesada y ligera. La reducción dinámica de NISTmAb en el muestreador múltiple bioinerte 1290 Infinity II y su posterior detección mediante el sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio demuestra el potencial del método para analizar las modificaciones postranslacionales. Esta capacidad, si se combina con el análisis de fragmentos, puede agilizar el desarrollo biofarmacéutico. Por este motivo, la columna PLRP-S con recubrimiento de PEEK y el sistema LC bioinerte 1290 Infinity II son una combinación perfecta y adaptada al futuro para el análisis de productos de biofarmacéutica durante el proceso de producción y hasta el control de calidad final.

Referencias

1. Walsh, G. Biopharmaceutical Benchmarks 2014. *Nat. Biotechnol.* **2014**, 32, 992-1000.
2. Nägele, E. Elevate Your mAb Aggregate Analysis: High-resolution SEC with the Agilent 1290 Infinity II Bio LC System. Nota de aplicación de Agilent Technologies, número de publicación 5994-2709EN, **2020**.
3. Vandenheede, I. *et al.* SEC Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry for Detailed Characterization of mAbs and ADCs. Nota de aplicación de Agilent Technologies, número de publicación 5994-0303EN, **2018**.
4. Rustandi, R. R.; Washabaugh, M. W.; Wang, Y. Applications of CE SDS Gel in Development of Biopharmaceutical Antibody-Based Products. *Electrophoresis* **2008**, 29, 3612-3620.

www.agilent.com/chem

DE44181.2356018519

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
Impreso en EE. UU., 29 de enero de 2021
5994-3021ES