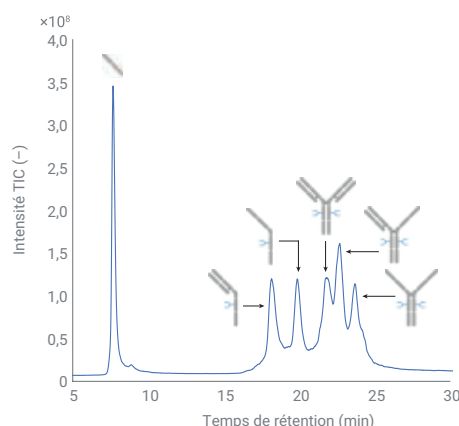


Contrôle des fragments de mAb liés au produit

L'analyse des protéines intactes avec le système LC Bio Agilent 1290 Infinity II permet la détection UV et MS des espèces de faible masse moléculaire



Auteur

André Feith
Agilent Technologies, Inc.

Résumé

Les impuretés liées au produit, telles que les espèces à faible masse moléculaire (LMW) ou à haute masse moléculaire (HMW), sont considérées comme des attributs qualité critiques (CQA) dans les produits à base d'anticorps monoclonaux thérapeutiques (mAb) devant être contrôlés pendant l'ensemble du procédé de production de médicaments. Cette note d'application rend compte du développement d'une méthode LC en phase inverse (RPLC) basée sur les excellentes performances du système LC Bio Agilent 1290 Infinity II associé avec une colonne PLRP-S Agilent doublée de PEEK. De très faibles écarts des temps de rétention et des surfaces de pics ont été observés dans l'analyse des chaînes lourde et légère réduites du NISTmAb, même avec des pentes de gradient extrêmement faibles. Après le développement de la méthode, tous les fragments LMW appropriés, tels que ceux constitués de deux chaînes lourdes (H2) ou de deux chaînes lourdes et une chaîne légère (H2L), ont pu être séparés et détectés. Grâce au couplage séquentiel du détecteur UV et du MSD, cette méthode peut être utilisée dans plusieurs domaines de la chaîne de production biopharmaceutique. Cette méthode constitue aussi une solution de remplacement des techniques SDS-PAGE/CE-SDS avec la possibilité de contrôler deux CQA – les espèces LMW et les modifications post-traductionnelles (MPT) – dans une même analyse.

Introduction

Les mAb représentent une classe majeure de produits biopharmaceutiques et se sont avérés efficaces dans la lutte contre diverses maladies¹. Ces biomolécules possèdent une structure hétérotétramérique conservée, constituée de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères liées par des liaisons disulfures. Pendant la fabrication, ou suite à un stockage inapproprié, des impuretés liées au produit telles que les espèces LMW (voir figure 1) ou HMW (p. ex. dimères d'anticorps) peuvent se former. Ces impuretés peuvent subsister aux étapes de purification approfondies, rendant leur contrôle essentiel en tant que CQA de produit pharmaceutique. Les espèces HMW, telles que les dimères, trimères ou agrégats d'anticorps plus importants, peuvent être analysés et séparés en routine par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) avec détection UV². Le couplage de la SEC avec la détection MS peut être effectué pour approfondir la caractérisation des impuretés relatives à la masse moléculaire et aux MPT³. L'analyse des espèces LMW, comme les chaînes lourdes (H), les chaînes légères (L) ou les fragments H2L, peut être effectuée par électrophorèse capillaire en présence de dodécylsulfate de sodium (CE-SDS)⁴. Malheureusement, la CE-SDS ne peut être couplée avec la détection MS en raison de la forte suppression des ions due au SDS. L'identification des espèces LMW est donc souvent fondée sur des connaissances empiriques. Cette note d'application présente une solution de remplacement pour l'analyse d'espèces LMW des mAb basée sur les excellentes performances du LC Bio Agilent 1290 Infinity II équipé d'une colonne PLRP-S doublée de PEEK. Grâce au mode de chromatographie liquide en phase inverse (RPLC), tous les fragments LMW appropriés induits par réduction peuvent être détectés par UV et MS dans une analyse de routine ou, si nécessaire, dans une analyse approfondie.

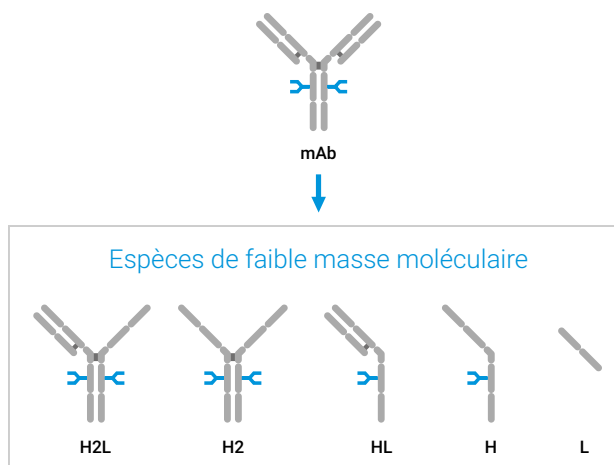


Figure 1. Représentation schématique des espèces LMW provenant des anticorps monoclonaux (mAb). Abréviations : H2L (deux chaînes lourdes et une chaîne légère), H2 (deux chaînes lourdes), HL (une chaîne lourde et une chaîne légère), H (chaîne lourde) et L (chaîne légère).

Données expérimentales

Équipement

Le système LC Bio Agilent 1290 Infinity II couplé au LC/Q-TOF Agilent AdvanceBio 6545XT 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)
- Échangeur de chaleur Bio à raccord rapide et débit standard (G7116-60071) et deux dispositifs de stabilisation thermique Agilent (G7116-60013)
- Détecteur de longueur d'ondes variables Agilent 1290 Infinity II (VWD) (G7114B), équipé d'une microcuve à circulation Bio de 3 mm, 2 μ L, avec identification par radiofréquence.
- LC/Q-TOF Agilent AdvanceBio 6545XT (G6545XT)

Logiciel

- Agilent MassHunter Workstation pour l'acquisition des données (B.09.00 ou version ultérieure)
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis (10.0 ou version ultérieure)
- Agilent MassHunter BioConfirm (10.0 ou version ultérieure)

Colonnes

PLRP-S Agilent 5 μ m 1 000 Å, 2,1 $\times$ 100 mm doublée de PEEK (référence PL1912-2502PK)

Produits chimiques

De l'acétonitrile Agilent InfinityLab Ultrapure LC/MS (référence 5191-4496) et l'Agilent-NISTmAb (référence 5191-5744) ont été utilisés. 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 DL-dithiothréitol (DTT) a été acheté auprès de Merck (Darmstadt, Allemagne).

Préparation d'échantillons

Afin de réduire partiellement le NISTmAb, 40 µg ont été incubés avec du DTT 1 mM dans un flacon de verre ambré placé à 4 °C directement dans le multiéchantillonneur Bio 1290 Infinity II. La réduction complète en chaînes lourdes et (H) chaînes légères (L) a été effectuée par incubation de 40 µg de NISTmAb avec du DTT 10 mM à 60 °C pendant 30 minutes. La concentration injectée était de 1 mg/mL de NISTmAb ou de NISTmAb réduit.

Tableau 1. Méthode LC pour l'analyse du NISTmAb intact et des espèces LMW correspondantes sur le LC Bio Agilent 1290 Infinity II.

Paramètre	Valeur
Colonne	PLRP-S Agilent 5 µm 1 000 Å, 2,1 × 100 mm doublée de PEEK
Solvant	A) Eau + 0,1 % d'acide formique B) Acétonitrile + 0,1 % d'acide formique
Gradient	0,00 min – 25 % de B 9,00 min – 30 % de B 34,00 min – 38 % de B 34,01 min – 100 % de B 36,00 min – 100 % de B 36,01 min – 25 % de B 40,00 min – 25 % de B
Débit	0,400 mL/min
Température	60 °C avec les dispositifs de stabilisation thermique installés
Détection UV	VWD : 280 nm, 10 Hz ; MS : voir tableau 2
Injection	Volume d'injection : 0,3 µL Température d'échantillon : 4 °C Rinçage : 3 s avec de l'eau (orifice de rinçage)

Tableau 2. Paramètres de la source et paramètres MS pour l'analyse du NISTmAb intact et les espèces LMW correspondantes.

Paramètre	Valeur
Instrument	LC/Q-TOF Agilent AdvanceBio 6545XT
Température du gaz	350 °C
Débit du gaz de séchage	12 L/min
Nébuliseur	35 psig
Température du gaz de gainage	350 °C
Débit du gaz de gainage	11 L/min
VCap	4 000 V
Tension de la buse	2 000 V
Fragmenteur	180 V
Cône écreteur	65 V
Vpp Oct 1 RF	750 V
Mode d'acquisition	Positif, gamme de masse étendue (m/z 10 000)
Gamme de masse	m/z 100 à 10 000
Fréquence d'acquisition	1 spectre/s
Masse de référence	m/z 922,0098

Résultats et discussion

L'analyse des produits biopharmaceutiques pendant l'ensemble des procédés de production, de la fabrication au contrôle-qualité, exige la meilleure performance possible de la part des systèmes LC. Afin d'évaluer les performances du LC Bio 1290 Infinity II dans l'analyse des fragments de mAb, le NISTmAb a été entièrement réduit avec du DTT, entraînant la génération de fragments H et L. Les écarts-types (RSD) des temps de rétention et des surfaces de pics sont indiqués dans la figure 2 pour sept injections consécutives. Ces résultats démontrent que la précision des temps de rétention et des surfaces de pics du LC Bio 1290 Infinity II couplé au LC/Q-TOF AdvanceBio 6545XT est excellente et parfaitement adaptée à l'analyse des fragments de mAb avec des gradients à pente faible. Même si la méthode LC comprend deux étapes de gradient linéaire avec des pentes de 0,32 et 0,55 % de B/min, les valeurs de RSD restent faibles, à savoir 0,190 % (L) et 0,056 % (H) pour les temps de rétention et 0,530 % (L) et 0,744 % (H) pour les surfaces.

L'une des plus grandes difficultés dans l'analyse des espèces LMW par RPLC réside dans l'insuffisance du pouvoir de résolution pour séparer des fragments d'anticorps tels que H2 et H2L, en raison de leur hydrophobicité semblable par rapport au mAb non fragmenté. Ces fragments peuvent être générés durant la fermentation ou par réduction partielle du produit final. Cela étant, ces fragments peuvent également être générés artificiellement par réduction partielle au cours du temps avec une faible quantité de DTT et une diminution de la température. Suivant cette technique, une méthode RPLC a été développée avec une colonne PLRP-S doublée de PEEK et le LC Bio 1290 Infinity II.

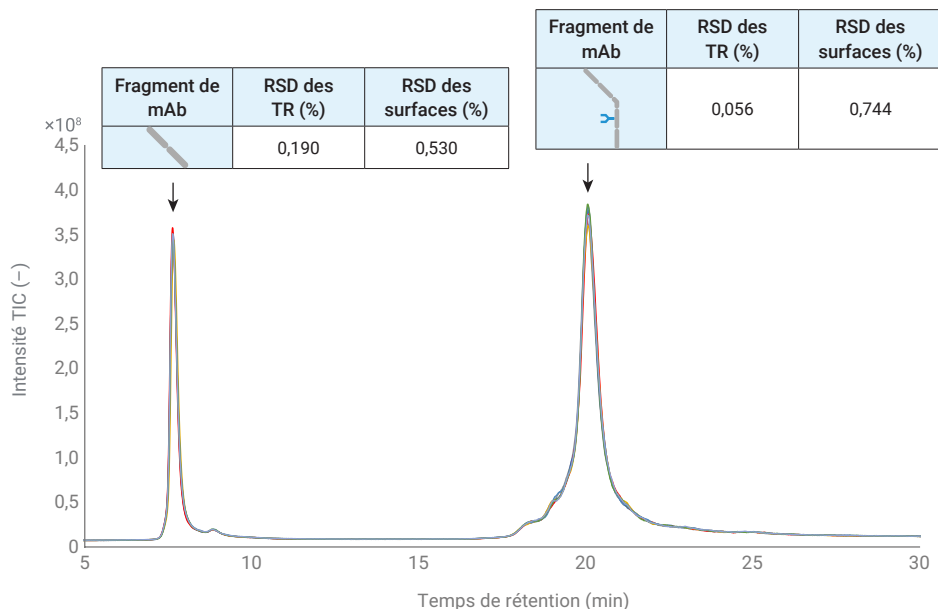


Figure 2. Précision des valeurs de temps de rétention et des surfaces de pics (RSD, n = 7) pour le LC Bio Agilent 1290 Infinity II dans l'analyse des fragments constitués d'une chaîne lourde ou d'une chaîne légère générés par réduction du NISTmAb.

La réduction dynamique du NISTmAb dans le multiéchantillonneur Bio 1290 Infinity II est illustrée dans les chromatogrammes de la figure 3. Tous les fragments de mAb appropriés représentés dans la figure 1 peuvent être séparés avec une bonne résolution et modifiés au cours du temps par l'addition de DTT. En particulier, la séparation des fragments H2 et H2L et du NISTmAb est d'une qualité exceptionnelle pour la RPLC, faisant de la combinaison entre la colonne PLRP-S doublée de PEEK et le LC Bio 1290 Infinity II la méthode de choix pour l'analyse des LMW. Grâce au mode RPLC, le système LC Bio 1290 Infinity II peut facilement être couplé au LC/Q-TOF AdvanceBio 6545XT, et les données MS peuvent être analysées à l'aide d'Agilent MassHunter BioConfirm. Après déconvolution, les spectres de la figure 3 illustrent les principales glycoformes des fragments

correspondants. La glycosylation caractéristique du NISTmAb montre qu'il est possible d'analyser facilement les MPT des différents fragments avec cette méthode. De plus, la figure 4B montre les chromatogrammes d'ions extraits (EIC) des ions représentatifs pour les fragments regroupés autour du pic du mAb. Ces EIC présentent également une bonne forme de pic grâce au pouvoir de résolution de la colonne PLRP-S doublée de PEEK.

Puisque l'instrument comprend séquentiellement le détecteur de longueur d'ondes variables 1290 Infinity II et le LC/Q-TOF AdvanceBio 6545XT, les détectations UV et MS sont possibles dans une même analyse avec un élargissement faible, voire nul, des pics. Cela simplifie le transfert de méthode entre le développement de procédés et le contrôle-qualité (figure 4A).

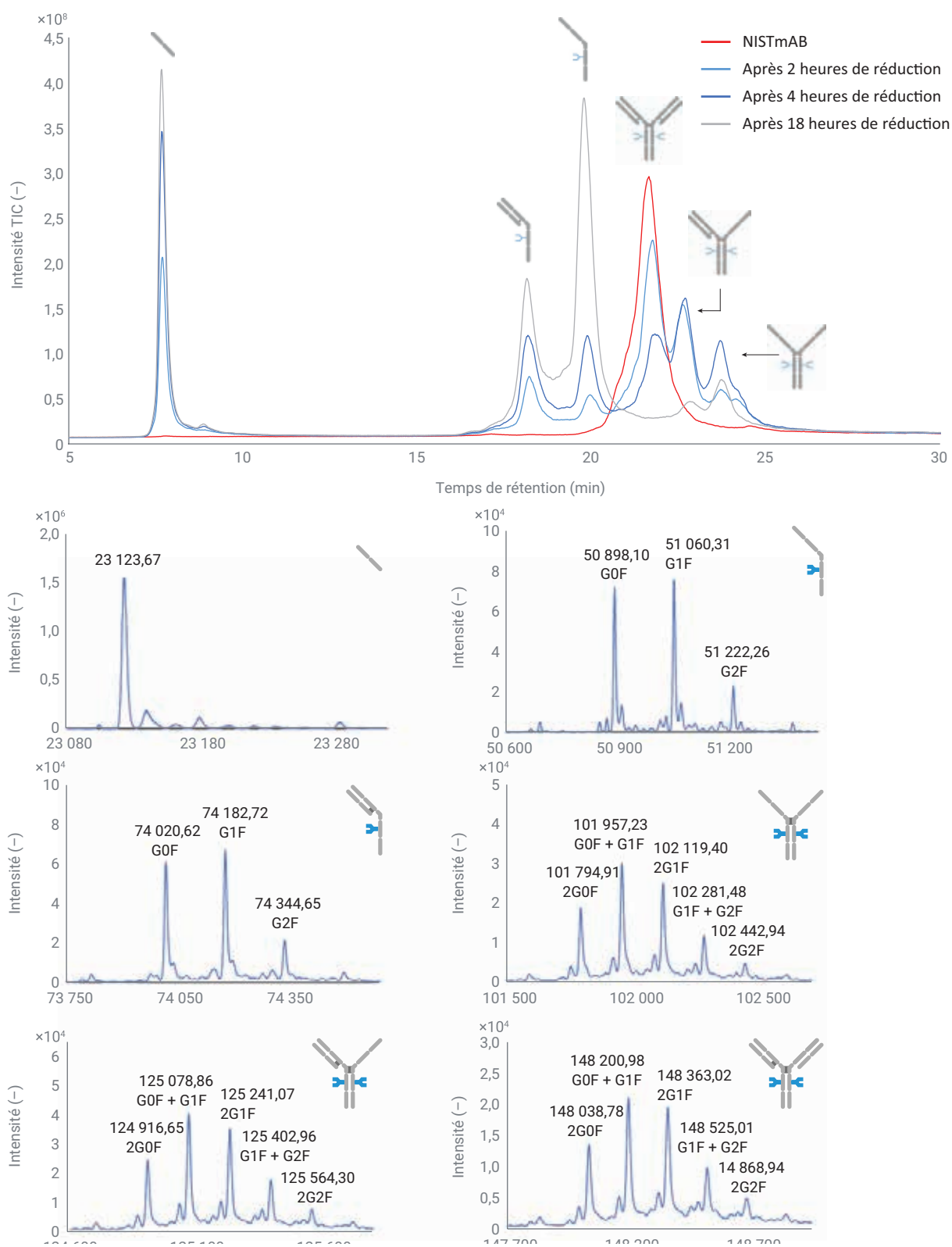


Figure 3. Chromatogrammes de la réduction partielle dynamique du NISTmAb avec séparation sur le LC Bio Agilent 1290 Infinity II et détection sur le LC/Q-TOF Agilent AdvanceBio 6545XT. Les spectres extraits des fragments correspondants présentent la glycosylation caractéristique du NISTmAb.

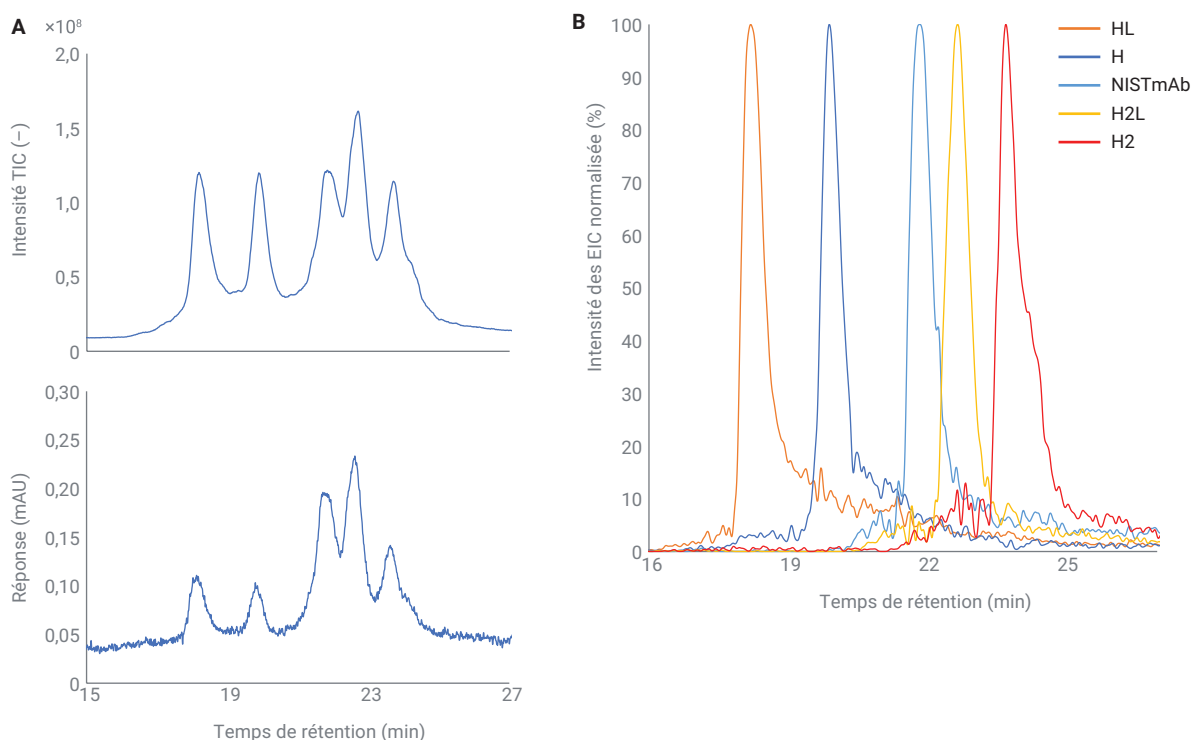


Figure 4. Chromatogrammes MS et UV des fragments regroupés autour du NISTmAb acquis dans une même analyse (A). Chromatogrammes d'ions extraits des fragments du NISTmAb présentant une excellente forme de pic (B).

Conclusion

La technique SDS-PAGE et la CE-SDS, son équivalent moderne, sont largement utilisées pour analyser les impuretés liées au produit telles que les espèces LMW et HMW. Cependant, l'identification structurale des espèces LMW avec ces méthodes est difficile et se fonde principalement sur des connaissances empiriques. Cette note d'application présente une méthode RPLC capable de séparer toutes les espèces LMW appropriées induites par la réduction du NISTmAb. D'après l'analyse des fragments constitués d'une chaîne lourde ou d'une chaîne légère, le LC Bio 1290 Infinity II a fait preuve d'une précision remarquable des

temps de rétention et surfaces de pics. La réduction dynamique du NISTmAb dans le multiéchantillonneur Bio 1290 Infinity II et la détection subséquente à l'aide du LC/Q-TOF AdvanceBio 6545XT a révélé le potentiel de cette méthode pour l'analyse des modifications post-traductionnelles. Combinée à l'analyse de fragments, cette capacité peut accélérer le développement des produits biopharmaceutiques. C'est pourquoi la colonne PLRP-S doublée de PEEK et le LC Bio 1290 Infinity II constituent une solution pérenne pour l'analyse des produits biopharmaceutiques du procédé de production au contrôle-qualité final.

Références

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. Note d'application Agilent Technologies, numéro de publication 5994-2709EN, **2020**.
3. Vandenheede, I. *et al.* SEC Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry for Detailed Characterization of mAbs and ADCs. Note d'application Agilent Technologies, numéro de publication 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

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
Imprimé aux États-Unis, le 29 janvier 2021
5994-3021FR