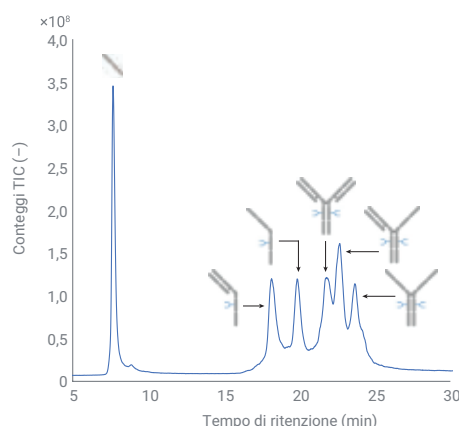


Monitoraggio di frammenti mAb legati al prodotto

L'analisi di proteine intatte con il sistema LC Bio Agilent 1290 Infinity II consente la rilevazione UV e MS di specie a basso peso molecolare



Autore

André Feith
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

Le impurezze legate al prodotto, come le specie a basso peso molecolare (LMW) o ad alto peso molecolare (HMW), sono considerate attributi critici per la qualità (CQA) nei prodotti terapeutici basati su anticorpi monoclonali (mAb) e devono essere monitorate lungo l'intero processo di produzione del farmaco. La presente nota applicativa descrive lo sviluppo di un metodo RPLC basato sulle eccellenti prestazioni del sistema LC Bio Agilent 1290 Infinity II in combinazione con la colonna PLRP-S Agilent con rivestimento in PEEK. Durante l'analisi delle catene pesanti e leggere ridotte di NISTmAb, sono state osservate eccellenti deviazioni relative del tempo di ritenzione e dell'area, persino con pendenze del gradiente estremamente basse. Dopo lo sviluppo del metodo, è stato possibile separare e rilevare tutti i frammenti LMW rilevanti, come due catene pesanti (H2) o due catene pesanti e una catena leggera (H2L). Grazie all'accoppiamento sequenziale del rivelatore UV e MS, questo metodo può essere impiegato in diverse aree della catena di produzione dei prodotti biofarmaceutici. Il metodo costituisce inoltre un'alternativa a SDS-PAGE/CE-SDS con la possibilità di analizzare due CQA, specie a basso peso molecolare e modificazioni post-traduzionali (PTM), in un'unica analisi.

Introduzione

Gli mAb costituiscono una classe di prodotti biofarmaceutici molto importante e sono utilizzati con successo nel trattamento di diverse malattie.¹ Queste biomolecole presentano una struttura eterotetramericata conservata, che consiste in due catene pesanti e due catene leggere collegate tra loro da legami disolfuro. Durante la produzione o in condizioni di conservazione improprie, si possono formare impurezze legate al prodotto, come le specie LMW (vedere Figura 1) o le specie HMW (per esempio i dimeri di anticorpi). Tali impurezze possono essere presenti anche dopo estese fasi di purificazione ed è per questo che per un farmaco è essenziale monitorarle come un CQA. Le specie HMW, come dimeri, trimeri o aggregati superiori di anticorpi, possono essere analizzate e separate mediante cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) con rivelazione UV.² L'accoppiamento di SEC con la rivelazione MS può essere adottato per caratterizzare ulteriormente le impurezze in termini di peso molecolare e PTM.³ L'analisi delle specie LMW, come frammenti di catene pesanti (H), catene leggere (L) o H2L, può essere condotta mediante elettroforesi capillare in presenza di sodio dodecil solfato (CE-SDS).⁴ Purtroppo, la CE-SDS non può essere accoppiata alla rivelazione MS a causa dell'elevata soppressione ionica causata da SDS. Ne deriva quindi che spesso ci si deve affidare alla conoscenza empirica nel proporre le identità delle specie LMW. La presente nota applicativa descrive un'analisi alternativa delle specie LMW degli mAb basata sulle eccellenti prestazioni del sistema LC Bio Agilent 1290 Infinity II e della colonna PLRP-S con rivestimento in PEEK. Grazie alla cromatografia liquida in fase inversa (RPLC), tutti i frammenti LMW rilevanti indotti dalla riduzione di NISTmAb possono essere rilevati mediante UV e MS per analisi di routine o approfondite secondo necessità.

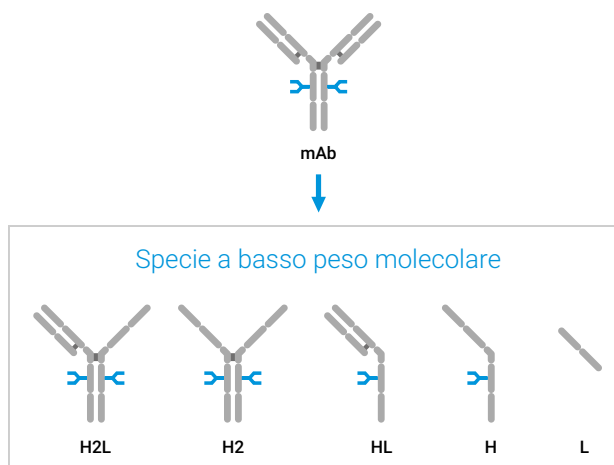


Figura 1. Panoramica schematica delle specie LMW indotte da riduzione di anticorpi monoclonali (mAb). Abbreviazioni: H2L (due catene pesanti e una catena leggera), H2 (due catene pesanti), HL (una catena pesante e una catena leggera), H (catena pesante) e L (catena leggera).

Condizioni sperimentali

Apparecchiature

Il sistema LC Bio Agilent 1290 Infinity II accoppiato al sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio Agilent 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) dotato di un flusso standard Quick
- scambiatore di calore Bio Connect (G7116-60071) e due dispositivi di equilibratura termica Agilent (G7116-60013)
- rivelatore a lunghezza d'onda variabile Agilent 1290 Infinity II (VWD) (G7114B) dotato di una cella di flusso micro Bio per VWD, 3 mm, 2 µL, RFID.
- sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio Agilent (G6545XT)

Software

- Workstation Agilent MassHunter per l'acquisizione dei dati (versione B.09.00 o successiva)
- analisi qualitativa MassHunter Agilent (versione 10.0 o successiva)
- software Agilent MassHunter BioConfirm (versione 10.0 o successiva)

Colonne

Agilent PLRP-S 5 µm 1.000 Å, 2,1 × 100 mm con rivestimento in PEEK (codice PL1912-2502PK)

Prodotti chimici

Sono stati utilizzati acetonitrile LC/MS ultrapuro Agilent InfinityLab (codice 5191-4496) e standard Agilent-NISTmAb (codice 5191-5744). L'acqua ultrapura fresca è stata ottenuta con un sistema Milli-Q Integral dotato di cartuccia con membrana da 0,22 µm al punto d'uso (Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA). DL-ditiotreitolo (DTT) è stato acquistato presso Merck (Darmstadt, Germania).

Preparazione del campione

Per ridurre parzialmente NISTmAb, 40 µg sono stati incubati con DTT 1 mM in un vial in vetro ambrato direttamente nel multicampionatore Bio 1290 Infinity II a 4 °C. Una riduzione completa in catena pesante (H) e catena leggera (L) è stata ottenuta incubando 40 µg di NISTmAb con DTT 10 mM a 60 °C per 30 minuti. La concentrazione di iniezione era 1 mg/mL di NISTmAb o di NISTmAb ridotto.

Tabella 1. Metodo LC per l'analisi di NISTmAb intatto e le corrispondenti specie LMW con il sistema LC Bio Agilent 1290 Infinity II.

Parametro	Valore
Colonna	Colonna Agilent PLRP-S, 5 µm 1.000 Å, 2,1× 100 mm, con rivestimento in PEEK
Solvente	A) Acqua + acido formico 0,1% B) Acetonitrile + acido formico 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
Flusso	0,400 mL/min
Temperatura	60 °C con dispositivi di equilibratura termica installati
Rivelazione UV	VWD: 280 nm, 10 Hz/MS: vedere la Tabella 2
Iniezione	Volume di iniezione: 0,3 µL Temperatura del campione: 4 °C Lavaggio: 3 s con acqua (porta di lavaggio)

Tabella 2. Sorgente e parametri MS per l'analisi di NISTmAb intatto e le corrispondenti specie LMW.

Parametro	Valore
Strumento	Sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio Agilent
Temperatura del gas	350 °C
Flusso del Drying Gas	12 L/min
Nebulizzatore	35 psig
Temperatura dello sheath gas	350 °C
Flusso dello sheath gas	11 L/min
VCap	4.000 V
Nozzle Voltage	2.000 V
Fragmentor	180 V
Skimmer	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
Modalità di acquisizione	Intervallo di massa positivo, esteso (m/z 10.000)
Intervallo di massa	m/z tra 100 e 10.000
Velocità di acquisizione	1 spettro/s
Massa di riferimento	m/z 922,0098

Risultati e discussione

L'analisi dei prodotti biofarmaceutici durante l'intero processo di produzione fino al controllo qualità richiede prestazioni ottimali dei sistemi LC. Per valutare le prestazioni del sistema LC Bio 1290 Infinity II per quanto riguarda l'analisi di frammenti mAb, NISTmAb è stato interamente ridotto con DTT, generando frammenti H e L. La Figura 2 mostra le deviazioni standard relative (RSD) del tempo di ritenzione e dell'area basate su sette iniezioni consecutive. Dimostra che la precisione del tempo di ritenzione e quella dell'area del sistema LC Bio 1290 Infinity II accoppiato al sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio sono eccellenti e perfettamente adatte per l'analisi di frammenti mAb con gradienti con bassa pendenza. Anche se il metodo LC consiste di due fasi a gradiente lineare con pendenze di 0,32% e 0,55%B/min, i valori di RSD si mantengono bassi con 0,190% (L) e 0,056% (H) per il tempo di ritenzione e con 0,530% (L) e 0,744% (H) per la precisione dell'area.

Uno degli aspetti più problematici nell'analisi delle specie LMW con RPLC è il potere risolutivo necessario per separare i frammenti dell'anticorpo come H2 o H2L normalmente insufficiente, in quanto la loro idrofobicità è molto simile a quella dell'mAb stesso. Questi frammenti possono formarsi nel processo di fermentazione o in seguito a riduzione parziale del prodotto finale. Questi frammenti, tuttavia, possono anche essere generati artificialmente mediante riduzione parziale nel tempo con una piccola quantità di DTT e temperatura ridotta. Utilizzando tale tecnica, è stato sviluppato un metodo RPLC basato su colonna PLRP-S con rivestimento in PEEK e il sistema LC Bio 1290 Infinity II.

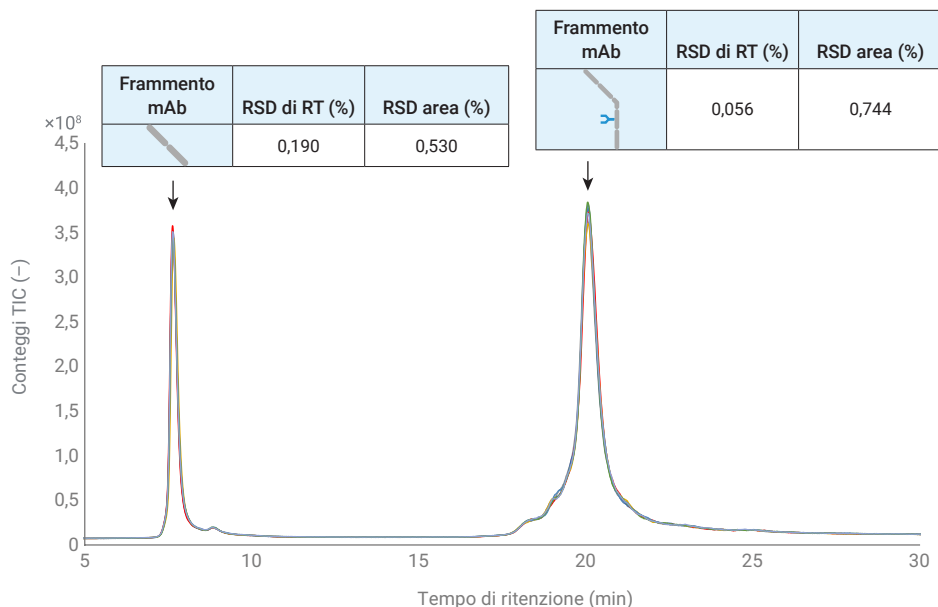


Figura 2. Valori di tempo di ritenzione e precisione dell'area relativi (RSD, n= 7) per il sistema LC Bio Agilent 1290 Infinity II nell'analisi di frammenti di catene pesanti e leggere derivate dalla riduzione di NISTmAb.

La riduzione dinamica di NISTmAb nel multicampionatore Bio 1290 Infinity II è rappresentata nel cromatogramma della Figura 3. Tutti i frammenti mAb rilevanti illustrati nella Figura 1 possono essere facilmente identificati e cambiano nel tempo in seguito all'aggiunta di DTT. In particolare, la separazione dei frammenti H2, H2L e NISTmAb è eccezionalmente buona per RPLC. La combinazione della colonna PLRP-S con rivestimento in PEEK e il sistema LC Bio 1290 Infinity II risulta così il metodo di elezione per l'analisi delle specie LMW. Grazie alla modalità RPLC, il sistema LC Bio 1290 Infinity II può essere facilmente accoppiato al sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio e i dati MS possono essere analizzati con il software Agilent MassHunter BioConfirm. Dopo deconvoluzione, gli spettri in Figura 3 illustrano le glicoforme principali dei

rispettivi frammenti. La caratteristica glicosilazione di NISTmAb dimostra che con questo metodo è facilmente possibile analizzare le PTM di frammenti differenti. In aggiunta, la Figura 4B mostra i cromatogrammi degli ioni estratti (EIC) di ioni rappresentativi per il clustering di frammenti attorno al picco mAb. Questi EIC garantiscono inoltre una buona forma dei picchi grazie al potere risolutivo della colonna PLRP-S con rivestimento in PEEK.

Poiché la configurazione della strumentazione include il rivelatore a lunghezza d'onda variabile 1290 Infinity II e in sequenza il sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio, è possibile eseguire la rilevazione UV e MS in un'unica analisi in assenza di o con un minimo allargamento di banda e con un comodo trasferimento del metodo dallo sviluppo dei processi al controllo qualità (Figura 4A).

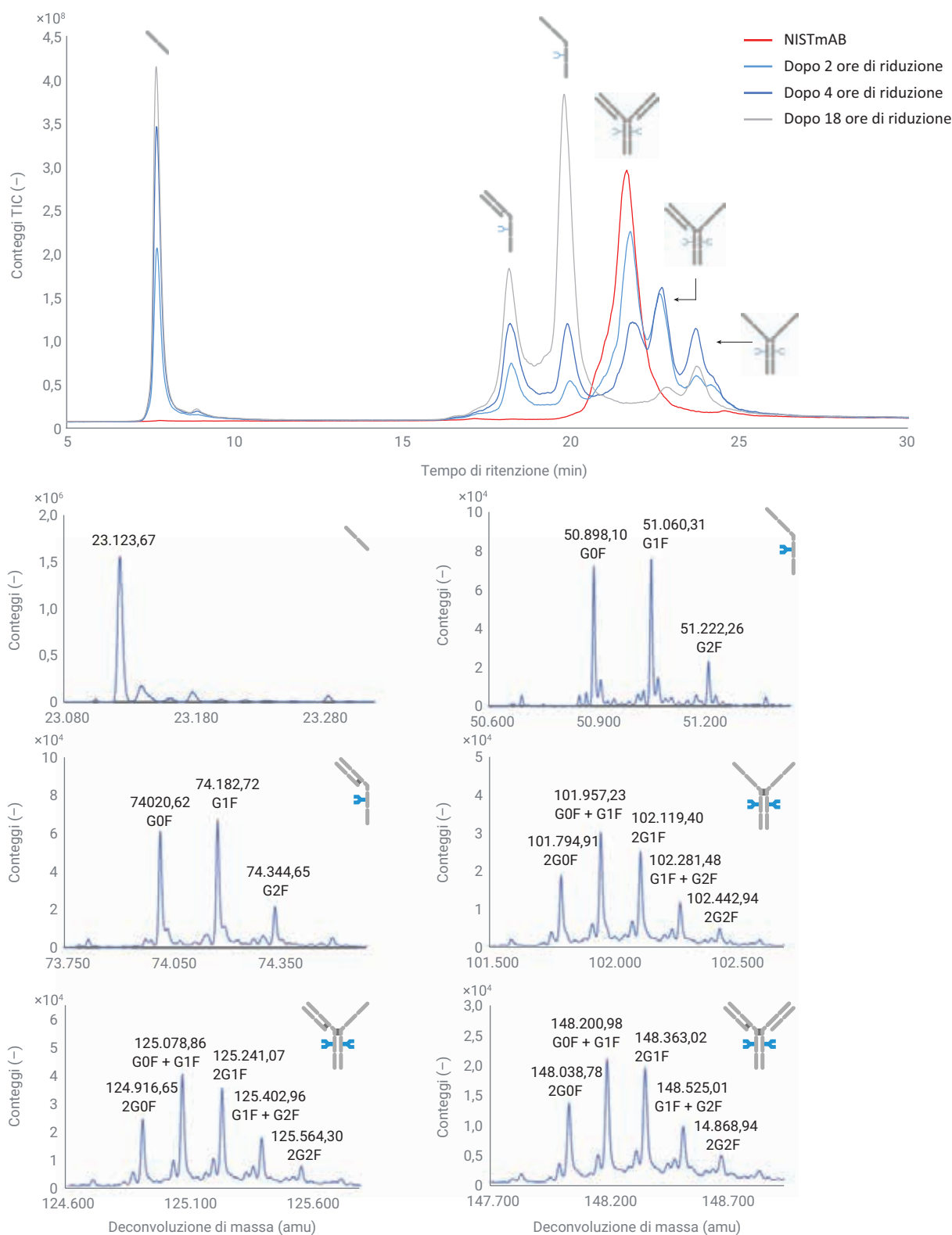


Figura 3. Cromatogrammi della riduzione parziale dinamica di NISTmAb separato con il sistema LC Bio Agilent 1290 Infinity II e rilevato con il sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio Agilent. Gli spettri corrispondenti estratti dei rispettivi frammenti mostrano la caratteristica glicosilazione di NISTmAb.

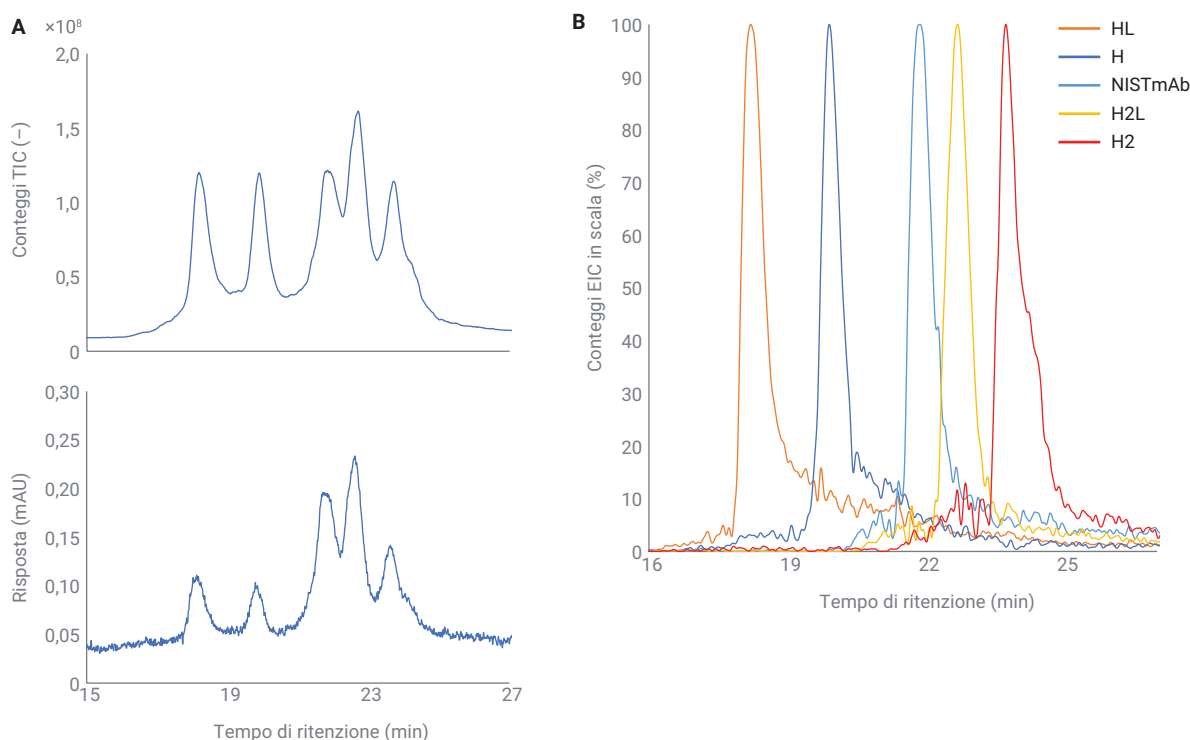


Figura 4. Cromatogramma MS e UV del clustering di frammenti attorno a NISTmAb acquisiti in un'unica analisi (A). Cromatogrammi degli ioni estratti dei frammenti di NISTmAb che mostrano un'eccellente forma dei picchi (B).

Conclusion

Il metodo tradizionale SDS-PAGE e l'equivalente moderno CE-SDS sono ampiamente utilizzati per analizzare impurezze legate al prodotto come le specie LMW e HMW. L'identificazione strutturale delle specie LMW, tuttavia, con questi metodi risulta problematica ed è principalmente basata sulla conoscenza empirica. La presente nota applicativa descrive un metodo RPLC che consente di separare tutte le specie LMW rilevanti di NISTmAb indotte da riduzione. Il sistema LC Bio 1290 Infinity II mostra valori del tempo di ritenzione e della precisione dell'area eccellenti, basati sull'analisi dei frammenti delle catene pesanti e delle catene leggere.

www.agilent.com/chem

DE44181.2356018519

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
Stampato negli Stati Uniti Stati Uniti, 29 gennaio 2021
5994-3021ITE

La riduzione dinamica di NISTmAb sul multicampionatore Bio 1290 Infinity II e la successiva rilevazione con il sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio hanno mostrato il potenziale del metodo nell'analisi delle modificazioni post-traduzionali. In combinazione con l'analisi dei frammenti, questa capacità può rendere più rapido lo sviluppo dei prodotti biofarmaceutici. È proprio per questo che la colonna PLRP-S con rivestimento in PEEK e il sistema LC Bio 1290 Infinity II sono una combinazione al passo con i tempi per l'analisi di prodotti biofarmaceutici a partire dal processo di produzione fino al controllo qualità finale.

Bibliografia

- Walsh, G. Biopharmaceutical Benchmarks 2014. *Nat. Biotechnol.* **2014**, 32, 992-1000.
- Nägele, E. Elevate Your mAb Aggregate Analysis: High-resolution SEC with the Agilent 1290 Infinity II Bio LC System. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-2709EN, **2020**.
- Vandenhede, I. *et al.* SEC Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry for Detailed Characterization of mAbs and ADCs. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-0303EN, **2018**.
- 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.