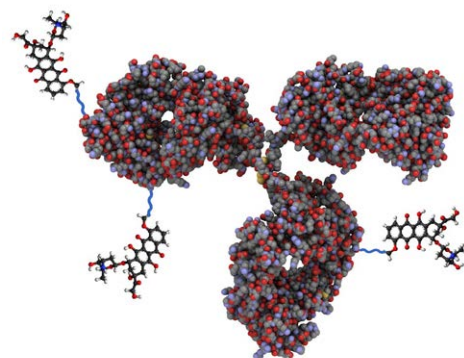


Mejora de la calidad de los conjugados anticuerpo-fármaco mediante métodos analíticos ortogonales



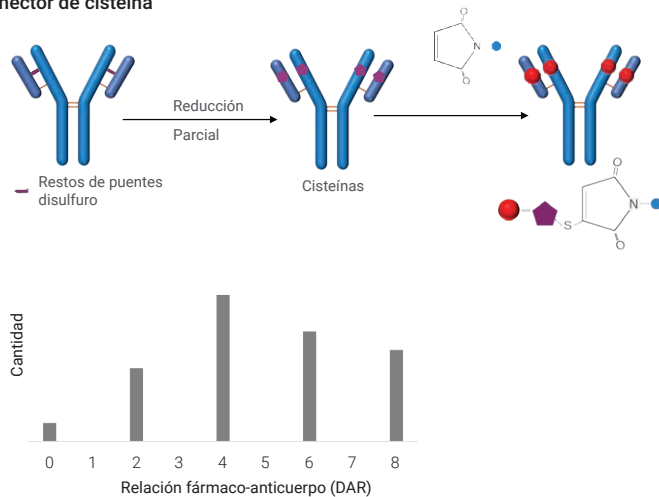
Conjugados anticuerpo-fármaco

Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) constituyen una nueva generación de productos bioterapéuticos selectivos y conforman un segmento en rápido crecimiento en el campo del descubrimiento de fármacos. Se crean uniendo potentes fármacos citotóxicos a través de un conector a anticuerpos monoclonales (mAb) que actúan sobre células específicas. Los ADC aprobados por la FDA estadounidense en el período de 2019/2020 están basados en la conjugación a través de cisteína y lisina, siendo mayoritario el conector de cisteína.

Tabla 1. ADC aprobados en 2019 y 2020.

Nombre	Isotipo de IgG	Diana	Punto de unión del conector	Carga terapéutica
Gemtuzumab ozogamicina	IgG4	CD33	Lisina	Caliqueamicina
Brentuximab vedotina	IgG1	CD30	Cisteína	Auristatina (MMAE)
Trastuzumab emtansina	IgG1	HER2	Lisina	Maitansina (DM1)
Inotuzumab ozogamicina	IgG4	CD22	Lisina	Caliqueamicina
Polatuzumab vedotina	IgG1	CD79b	Cisteína	Auristatina (MMAE)
Enfortumab vedotina	IgG1	Nectina-4	Cisteína	Auristatina (MMAE)
Trastuzumab deruxtecán	IgG1	HER2	Cisteína	Inhibidor de la topoisomerasa I
Sacituzumab govitecán	IgG1	TROP-2	Cisteína	Metabolito activo del irinotecán (SN-38)
Belantamab mafodotina	IgG1 afucosilada	BCMA	Cisteína	Auristatina (MMAF)

Conector de cisteína



Conector de lisina

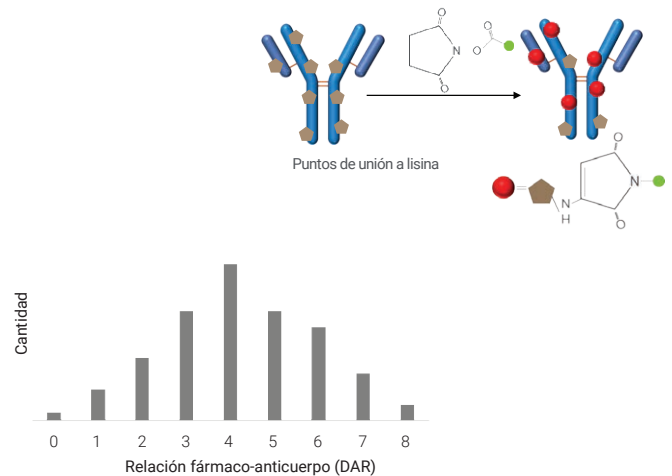


Figura 1. Tipos de conjugación de los ADC.

Para la conjugación con cisteína, la reducción de los puentes disulfuro entre cadenas en la región de bisagra permite la unión de hasta ocho fármacos en múltiplos de dos. El conector de lisina suele producir un elevado grado de heterogeneidad. Por ejemplo, la trastuzumab emtansina tiene 90 restos de lisina en la molécula de trastuzumab, y cada molécula puede contener hasta ocho conjugados de DM1.

Dado que en la industria se adopta la estrategia de “un fallo temprano es un fallo barato” para aumentar la probabilidad de aprobación del producto final, es esencial lograr comprender en profundidad la relación estructura-función de los ADC cuanto antes. Esto solo se puede conseguir empleando diversas técnicas analíticas ortogonales para caracterizar cada aspecto de la estructura y la función de la molécula.

Las moléculas de bajo peso molecular que se conjugan con los anticuerpos para producir ADC normalmente son hidrófobas. Para los ADC con uniones a cisteína, la hidrofobicidad total aumenta cuanto mayor es el valor de la relación fármaco-anticuerpo (DAR), lo que convierte a la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) en la técnica perfecta para la monitorización de la DAR. Por el contrario, los ADC con uniones a lisina tienen numerosos restos de lisina y son una mezcla de isómeros de posición. La HIC no es el método recomendado para separar ADC con uniones a lisina^{7,8}. El método de referencia es la cromatografía de fase reversa (RP) con detección por espectrometría de masas (MS), o RP-MS. La fase reversa ofrece selectividad tanto para anticuerpos monoclonales inalterados como para fragmentos, mientras que la MS proporciona sensibilidad y datos de masas; ambos resultan esenciales para la identificación de picos. Esto resulta fundamental para estudiar los ADC con uniones a lisina, ya que los fragmentos contienen cadenas ligeras y pesadas sin conjugar y con conjugación variable, así como cadenas que solo incluyen el conector⁷.

La unión de la carga terapéutica hidrofóbica para formar el ADC también mejora la agregación inducida por la hidrofobicidad⁹. Aunque los agregados y los productos de degradación están presentes en bajas concentraciones, tienen un gran impacto sobre la calidad de los productos biológicos y dan lugar a una pérdida de actividad o solubilidad, así como a un aumento de la inmunogenicidad. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es el método estándar utilizado para caracterizar la agregación de proteínas.

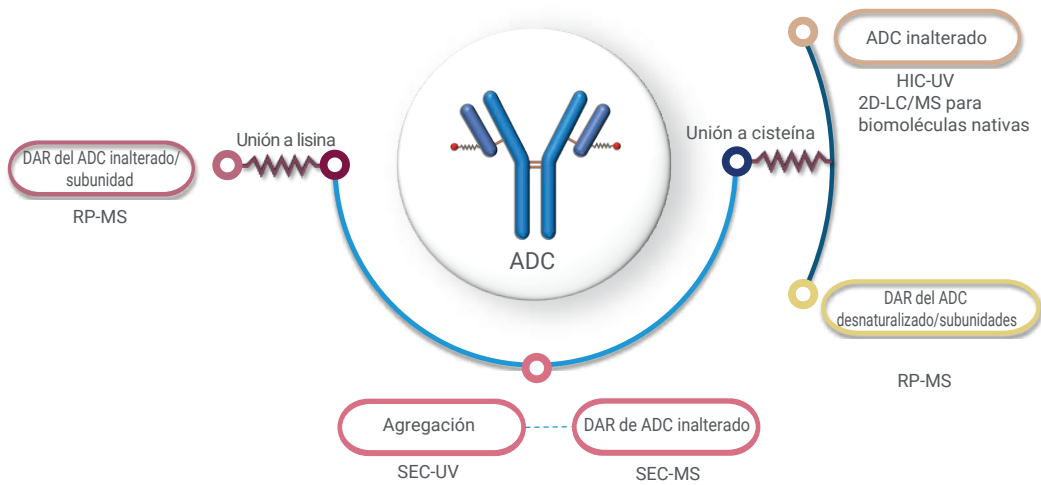


Figura 2. Métodos ortogonales para la caracterización de ADC.

Consejos para optimizar la separación

Preparación de muestras

- Las muestras de ADC suelen ser hidrófobas, por lo que resulta esencial garantizar la solubilidad en el eluyente. La situación ideal es que las muestras estén disueltas en la fase móvil inicial.
- Para proteger la columna frente a posibles daños causados por agregados e impurezas, recomendamos filtrar las muestras con filtros de jeringa Captiva Premium PES (consulte la sección Selección sencilla e información sobre pedidos) antes del análisis por HPLC.
- A la hora de trabajar con muestras complejas o “sucias”, utilice precolumnas (consulte la sección Selección sencilla e información sobre pedidos) para alargar la vida útil de la columna.

Columnas HIC Agilent AdvanceBio:

Monitorización de la DAR en la forma nativa de los ADC

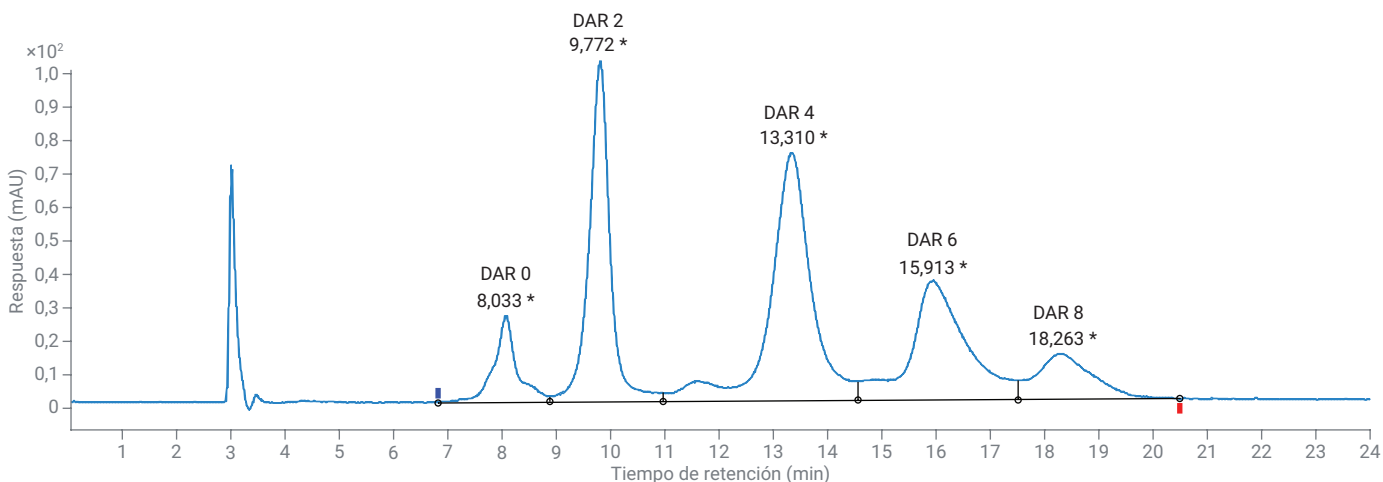


Figura 3. Separación de brentuximab vedotina con la columna HIC Agilent AdvanceBio (5994-0149EN).

Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)

En la HIC se utilizan fases móviles con elevado contenido salino, lo que reduce la solubilidad de las biomoléculas. Esto favorece la adsorción en la fase estacionaria de HIC. La elución mediante gradiente salino permite a las moléculas eluir por orden creciente de hidrofobicidad. Debido a las elevadas concentraciones salinas empleadas en la HIC, se recomienda usar un sistema de LC bioinerte. Aun así, es importante que el sistema de LC o la columna no permanezcan en solución salina concentrada durante ningún período de tiempo. Por este motivo, el uso de un sistema de LC cuaternario permite utilizar otros canales para modificadores orgánicos y agua u otros disolventes de lavado. Es necesario usar propan-2-ol para garantizar la determinación exacta de la DAR de mayor orden y prolongar la vida útil de la columna¹.

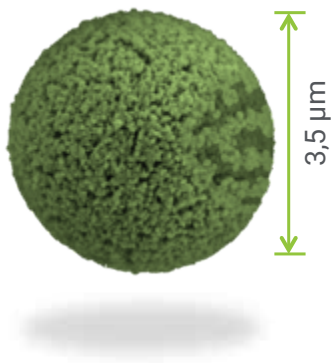


Figura 4. AdvanceBio HIC (tamaño de poro: 450 Å).

- El sulfato amónico es la sal más utilizada para la HIC debido a su capacidad de inducir la interacción con proteínas hidrofobas en la columna, pero también aumenta la probabilidad de que se produzca precipitación. El mejor modo de evitar la precipitación es diluir la muestra con sulfato amónico concentrado para que la matriz de la muestra se parezca lo máximo posible a la fase móvil inicial². Esto ofrece las siguientes ventajas:
 - Formas de pico y sensibilidad excelentes.
 - Determinación previa de si la muestra precipita o no antes de la inyección para evitar la precipitación de la muestra al inicio en la cabeza de la columna.
- Al final del gradiente, utilice un gradiente inverso relativamente lento durante varios minutos. Reequilibre con 2-3 volúmenes de columna (consulte la [Guía de usuario](#)).
 - Un cambio drástico de la viscosidad debido a la variación de la concentración salina requiere un retorno gradual a la fase móvil inicial para evitar que la columna sufra daños.
- El uso de temperaturas elevadas es un planteamiento habitual a la hora de utilizar fases móviles de alta viscosidad; sin embargo, no se recomienda para la HIC debido a la degradación de la forma del pico de la proteína.
- Una concentración de 2 M de sulfato de amonio es una cantidad considerable. Si se emplea una sal menos pura, podría producirse deriva en la línea de base del cromatograma.
 - La función de [sustracción del blanco de OpenLab CDS](#) se puede aplicar para eliminar la deriva de la línea de base³.

Columnas Agilent PLRP-S:

Monitorización de la DAR de los ADC inalterados y las subunidades

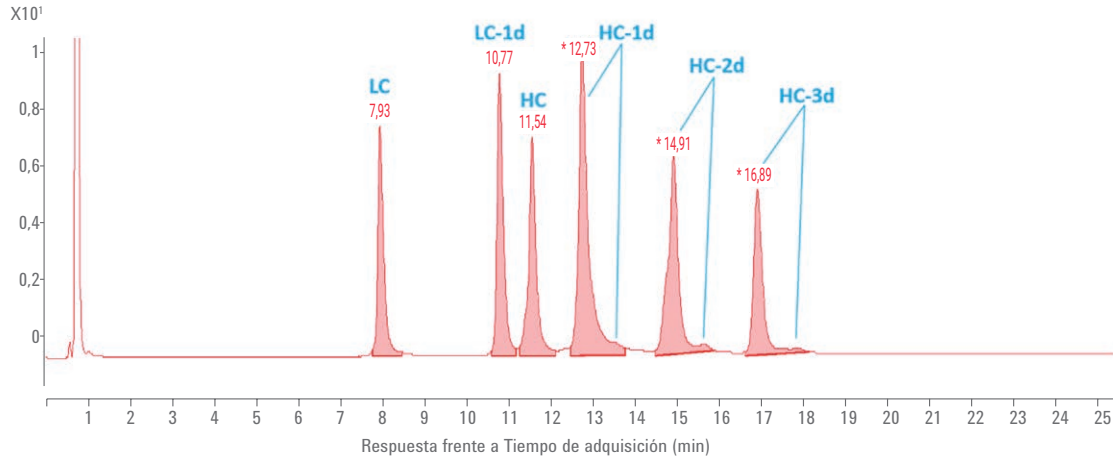


Figura 5. Espectro de absorción UV a una longitud de onda de 280 nm para la forma reducida de brentuximab vedotina, separada mediante cromatografía de fase reversa; los picos se identificaron mediante espectrometría de masas ([5991-6559EN](#)).

PLRP-S

- El retroflujo, por lo general, no resulta dañino para la columna, pero se debe evitar, salvo para tratar de eliminar obstrucciones en la frita (consulte [“Cuidado de la columna”](#)).
- Utilice un flujo bajo al principio y aumentelo poco a poco hasta alcanzar el flujo operativo deseado con el fin de evitar la sobrepresión.
- Utilice siempre reactivos de gran pureza y disolventes de calidad cromatográfica para preparar las fases móviles. Desgasifique y filtre todas las fases móviles antes de usarlas.
- Utilice un filtro en línea para proteger la columna y alargar su vida útil.
- Evite el uso de eluyentes 100 % acuosos con columnas PLRP-S, ya que reducirán significativamente la vida útil de la columna y pueden provocar un deterioro rápido de la anchura y simetría de los picos.

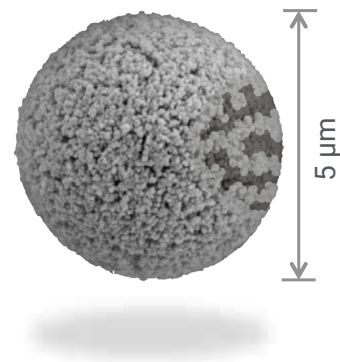


Figura 6. PLRP-S (tamaño de poro: 1.000 Å).

Columnas Agilent AdvanceBio SEC:

Monitorización de monómeros, dímeros, agregados y productos de degradación

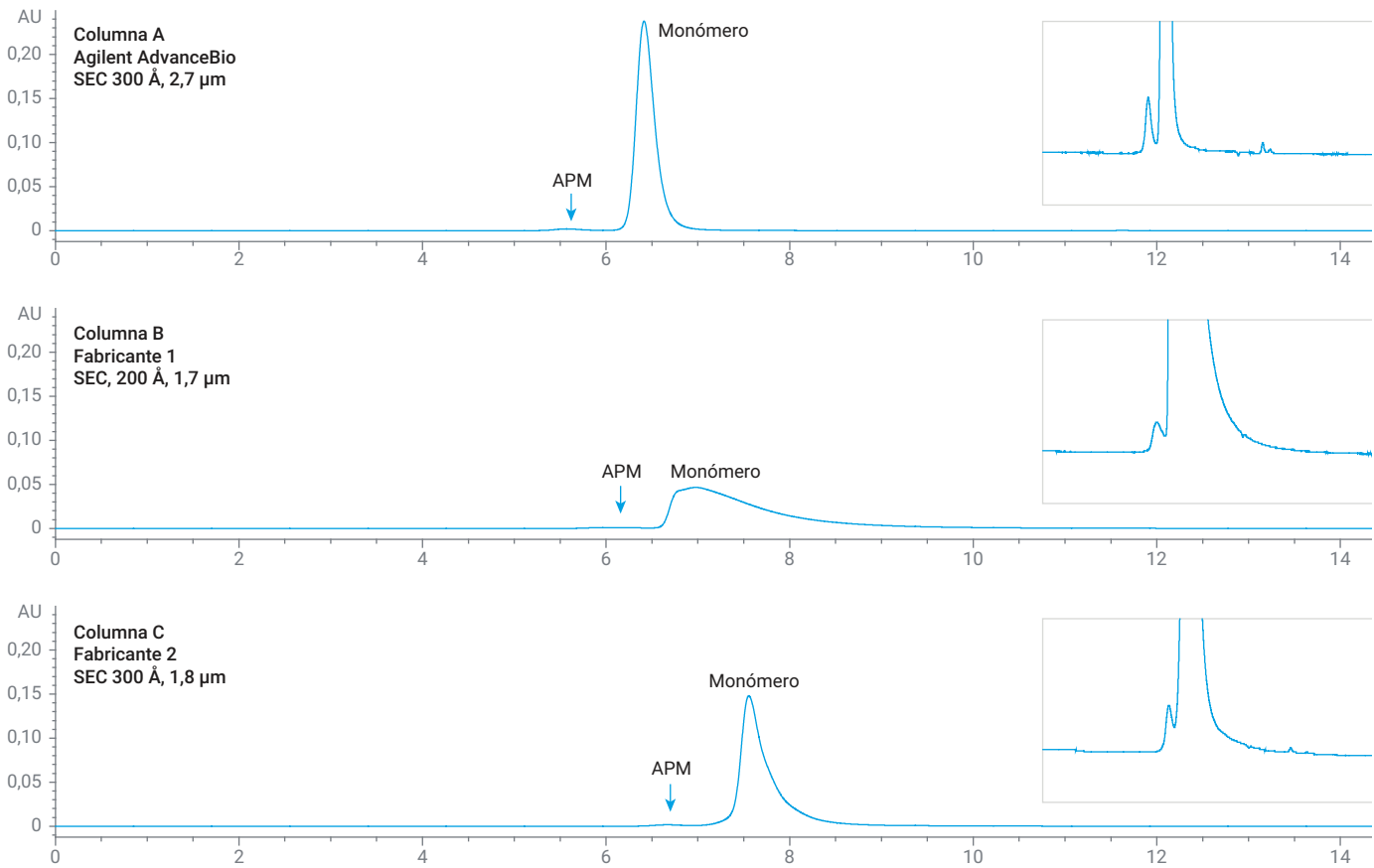


Figura 7. Uso de una columna AdvanceBio SEC 300 Å de 2,7 µm para analizar trastuzumab emtansina con uniones a lisina. La columna B presenta más interacciones secundarias, lo que provoca una pérdida de resolución de los picos. La columna C proporciona unos picos con una forma ligeramente más estrecha; sin embargo, la resolución también es inferior a la de la columna AdvanceBio ([5994-3276EN](#)).

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

El análisis de agregados es otro atributo de calidad crítico de la caracterización de ADC. El análisis resulta complicado debido a la presencia de fármacos citotóxicos unidos al anticuerpo, que pueden provocar agregación y generar perfiles de impurezas más complejos. La SEC, aunque es eficaz, sigue conllevando dificultades asociadas a la cuantificación de agregados y fragmentos. Los ADC suelen ser más hidrófobos que los mAb originales y, en consecuencia, más susceptibles a interacciones no específicas. Es importante seleccionar una fase estacionaria con una superficie inerte que favorezca las interacciones hidrófilas para minimizar las interacciones secundarias sin necesidad de usar modificadores orgánicos que puedan afectar al estado de agregación.

Los métodos de LC/MS para biomoléculas nativas también permiten la determinación de la DAR de ADC con uniones a cisteína y a lisina. Agilent ha desarrollado un método de 2D-LC/MS¹⁰ para la caracterización de la DAR de ADC inalterados con uniones a cisteína en condiciones de LC/MS para biomoléculas nativas. En este flujo de trabajo se utilizan la columna HIC Agilent AdvanceBio, la columna Agilent AdvanceBio SEC y un método de MS de alta sensibilidad para determinar con exactitud la masa intacta de todos los ADC con diversas DAR. Asimismo, Agilent ha desarrollado un método de LC/MS para biomoléculas nativas¹¹ usando una columna Agilent AdvanceBio SEC con un tamaño de poro de 200 Å y 1,9 µm y un sistema de LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio equipado con una fuente Agilent Jet Stream. Este método minimiza las interferencias asociadas a los disolventes orgánicos y los ácidos en la fase móvil, y es ideal para ADC con uniones a lisina.

- El uso de columnas más largas mejora la resolución, lo que resulta idóneo para separar agregados de mayor orden de los monómeros.
- Las [columnas AdvanceBio SEC 300 Å de 2,7 µm](#) están disponibles con distintas longitudes y diámetros de columna para conseguir una cuantificación rápida y exacta de ADC, agregados y monómeros ([Guía del usuario](#)).
- El uso de PBS a pH 7,4 como fase móvil acuosa ofrece mejor resolución para los ADC con uniones tanto a cisteína como a lisina⁶.
- Una concentración salina mayor no mejora la resolución de los picos de los ADC⁶.

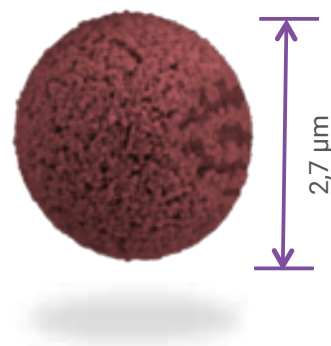


Figura 8. AdvanceBio SEC (tamaño de poro: 300 Å).

Selección sencilla e información sobre pedidos

Para pedir los artículos que aparecen en las siguientes tablas en la tienda en línea de Agilent, añada los artículos a su lista de productos favoritos haciendo clic en los enlaces a "Mi lista" del encabezado. A continuación, puede introducir las cantidades de los productos que necesita, añadir los productos a la cesta y proceder a la compra. Su lista permanecerá guardada en Productos favoritos para que pueda usarla para futuros pedidos.

Si es la primera vez que utiliza Productos favoritos, se le pedirá que introduzca su dirección de correo electrónico para verificar la cuenta. Si ya tiene cuenta de Agilent, podrá iniciar sesión. En cambio, si no tiene una cuenta registrada de Agilent, deberá registrarse para hacerse una. Esta función solo es válida en las regiones que tengan habilitado el comercio electrónico. Todos los artículos se pueden pedir también a través de sus canales habituales de venta y distribución.

Descripción	Referencia
Mi lista de consumibles para la preparación de muestras	
Jeringa desechable Captiva, 5 ml, 100/paq.	9301-6476
Filtro de jeringa Captiva Premium, PES, 15 mm, 0,2 µm, 100/paq.	5190-5096
Mi lista de patrones	
Agilent-NISTmAb, 25 µl	5191-5744
Agilent-NISTmAb, 4 x 25 µl	5191-5745
Patrón de calibración para AdvanceBio SEC 300 Å	5190-9417
Mi lista de columnas AdvanceBio HIC	
AdvanceBio HIC, 4,6 x 100 mm, 3,5 µm	685975-908
AdvanceBio HIC, 4,6 x 30 mm, 3,5 µm	681975-908
Mi lista de columnas AdvanceBio PLRP-S	
PLRP-S 1.000 Å, 1,0 x 50 mm, 5 µm	PL1312-1502
PLRP-S 1.000 Å, 2,1 x 50 mm, 5 µm	PL1912-1502
PLRP-S 1.000 Å, 4,6 x 50 mm, 5 µm	PL1512-1502
PLRP-S 1.000 Å, 5 µm, 2,1 x 50 mm, revestimiento de PEEK	PL1912-1502PK
PLRP-S 1.000 Å, 5 µm, 2,1 x 100 mm, revestimiento de PEEK	PL1912-2502PK

Descripción	Referencia
Mi lista de columnas AdvanceBio SEC	
AdvanceBio SEC 300 Å, 4,6 x 150 mm, 2,7 µm, columna para LC	PL1580-3301
AdvanceBio SEC 300 Å, 4,6 x 300 mm, 2,7 µm, columna para LC	PL1580-5301
AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 x 150 mm, 2,7 µm, columna para LC	PL1180-3301
AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 x 300 mm, 2,7 µm, columna para LC	PL1180-5301
AdvanceBio SEC 300 Å, 4,6 x 50 mm, 2,7 µm, precolumna para LC	PL1580-1301
AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 x 50 mm, 2,7 µm, precolumna para LC	PL1180-1301
AdvanceBio SEC 200 Å, 4,6 x 150 mm, 1,9 µm, columna para LC	PL1580-3201
AdvanceBio SEC 200 Å, 4,6 x 30 mm, 1,9 µm, precolumna para LC	PL1580-1201
AdvanceBio SEC 200 Å, 4,6 x 300 mm, 1,9 µm, columna para LC	PL1580-5201
AdvanceBio SEC 200 Å, 1,9 µm, 2,1 x 150 mm, revestimiento de PEEK	PL1980-3201PK
AdvanceBio SEC 200 Å, 1,9 µm, 2,1 x 50 mm, revestimiento de PEEK	PL1980-1201PK
Mi lista de consumibles para HPLC	
Kit de dispersión ultrabaja, bioinerte, para uso con el sistema de LC Bio 1290 Infinity II	5004-0007
Kit de dispersión ultrabaja para el sistema de LC Agilent serie 1290 Infinity	5067-5189
Mi lista de disolventes y reactivos	
Acetonitrilo ultrapuro InfinityLab para LC/MS, 1 l	5191-4496
Patrón ultrapuro InfinityLab para LC/MS, agua, 1 l	5191-4498
Ácido fórmico, 99,5 % de pureza	G2453-85060

Descripción	Referencia
Mi lista de conectores de columna y conectores	
Conector de conexión rápida Agilent InfinityLab (para la conexión en la entrada de la columna)	5067-5965
Capilar de conexión rápida Agilent InfinityLab MP35N 0,12 x 105 mm (para conector de conexión rápida)	5500-1578
Conector de giro rápido Agilent InfinityLab (para la conexión en la salida de la columna)	5067-5966
Capilar de giro rápido MP35N, 0,12 x 280 mm (para conector de giro rápido)	5500-1596
Herramienta de montaje para conectores de giro rápido	5043-0915
Capilar MP35N, 0,17 x 100 mm, SL/SL, ps/ps (para conectar la precolumna y la columna SEC)	5500-1278
Capilar MP35N, 0,12 x 90 mm, SL/SL, ns/ns (para conectar la precolumna y la columna PLRP-S)	5004-0018
Mi lista de consumibles para manipulación de disolventes	
Kit de inicio de tapas InfinityLab Stay Safe	5043-1222
Botella de disolvente InfinityLab, transparente, 1 l	9301-6524
Botella de disolvente InfinityLab, ámbar, 1 l	9301-6526
Botella de disolvente, transparente, 2 l	9301-6342
Botella de disolvente, ámbar, 2 l	9301-6341
Botella de purga InfinityLab Stay Safe, 1 l	5043-1339
Depósito de residuos InfinityLab, GL45, 6 l con tapa Stay Safe (filtro de carbón 5043-1193 no incluido)	5043-1221
Filtro de carbón InfinityLab con lector de tiempo, 58 g (para la ref. 5043-1221)	5043-1193
Mi lista de consumibles de filtración de disolventes	
Conjunto de filtración de disolventes InfinityLab	5191-6776
Matraz de filtración de disolventes InfinityLab, vidrio, 2 l	5191-6781
Membrana de filtro, 47 mm, de nylon, tamaño de poro de 0,2 µm, 100/paq.	5191-4341
Membrana de filtro, celulosa regenerada, 47 mm, tamaño de poro de 0,2 µm, 100/paq.	5191-4340
Filtro de vidrio para botella de disolvente, entrada de disolvente, 20 µm	5041-2168
Mi lista de recipientes para muestras	
Vial de rosca A-Line, 2 ml, ámbar, con zona de escritura, 100/paq.	5190-9590
Tapón de rosca, adherido, azul, séptum de PTFE/silicona, 100/paq.	5190-7021
Vial, tapón de rosca, transparente, alta recuperación, 5 ml, para LC, 30/paq.	5188-5369
Séptum, PTFE/silicona, prerranurado, 16 mm, 100/paq.	5188-2758
Tapón, de rosca, para viales de 6 ml, 100/paq.	9301-1379
Placa de 96 pocillos InfinityLab, 2,0 ml, pocillos redondos, con forma de U, polipropileno, 45 mm, 30/paq.	5043-9302
Placa de 96 pocillos InfinityLab, 2,2 ml, pocillos cuadrados, con forma de U, polipropileno, 41 mm, 30/paq.	5043-9300

Referencias

1. An AdvanceBio HIC Column for Drug-to-Antibody Ratio (DAR) Analysis of Antibody Drug Conjugates (ADCs) [5994-0149EN](#)
2. A Trio of Techniques on the Road to Complete CQA Characterization: Glycosylation, Aggregation, and DAR [5994-2097EN](#)
3. High Salt—High Reproducibility [5994-2691EN](#)
4. PLRP-S Polymeric Reversed-Phase Column for LC/MS Separation of mAbs and ADC [5991-7163EN](#)
5. Measuring Drug-to-Antibody Ratio (DAR) for Antibody-Drug Conjugates (ADCs) with UHPLC/Q-TOF [5991-6559EN](#)
6. Evaluation of SEC Columns for Analysis of ADC Aggregates and Fragments [5994-3276EN](#)
7. Analysis of Antibody-Drug Conjugates Using Size Exclusion Chromatography and Mass Spectrometry [5991-6439EN](#)
8. Analysis of Monoclonal Antibodies [5991-6376EN](#)
9. Jakob W. Buecheler, Matthias Winzer, Jason Tonillo, Christian Weber y Henning Gieseler. Molecular Pharmaceutics 2018 15 (7), 2656-2664 DOI: [10.1021/acs.molpharmaceut.8b00177](https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00177)
10. Characterization of Antibody-Drug Conjugates Using 2D-LC and Native MS [5994-4328EN](#)
11. Sensitive Native Mass Spectrometry of Macromolecules Using Standard Flow LC/MS [5994-1739EN](#)

Nota: Está disponible la actualización de la calculadora de la relación fármaco-anticuerpo (DAR) para ADC (referencia G4994AA) para el software MassHunter DAR Calculator, diseñado para investigar las relaciones DAR de datos procesados de muestras de ADC analizadas por LC/MS. Contacte con su representante local de Agilent para obtener la información necesaria para poder hacer un pedido.

Servicios Agilent CrossLab

CrossLab es una herramienta de Agilent que integra servicios y consumibles con el fin de contribuir al éxito del flujo de trabajo y a obtener resultados importantes, como la mejora de la productividad y la eficiencia operativa. Por medio de CrossLab, Agilent se esfuerza por aportar información en cada interacción para ayudarle a alcanzar sus objetivos. CrossLab ofrece servicios de optimización de métodos, planes de servicios flexibles y formación en todos los niveles de competencia. Tenemos muchos otros productos y servicios para ayudarle a gestionar sus instrumentos y su laboratorio con el fin de obtener el mejor rendimiento.

Para obtener más información acerca de Agilent CrossLab y conocer ejemplos de casos en los que se han conseguido excelentes resultados, visite www.agilent.com/crosslab.

Para obtener más información:

www.agilent.com/chem/advancebio

Compre on-line:

www.agilent.com/chem/store

Obtenga respuestas a sus preguntas técnicas y acceda a recursos en la Comunidad Agilent:

community.agilent.com

España

901 11 68 90

customercare_spain@agilent.com

Europa

info_agilent@agilent.com

Asia-Pacífico

inquiry_lsca@agilent.com

www.agilent.com/chem/ordering-guides

DE73791623

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Impreso en EE. UU., 17 de noviembre de 2022
5994-5089ES