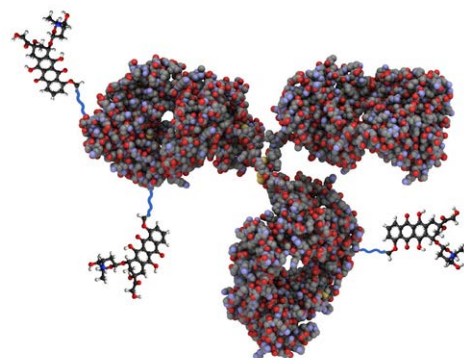


Amélioration de la qualité des conjugués anticorps-médicaments à l'aide de méthodes analytiques orthogonales



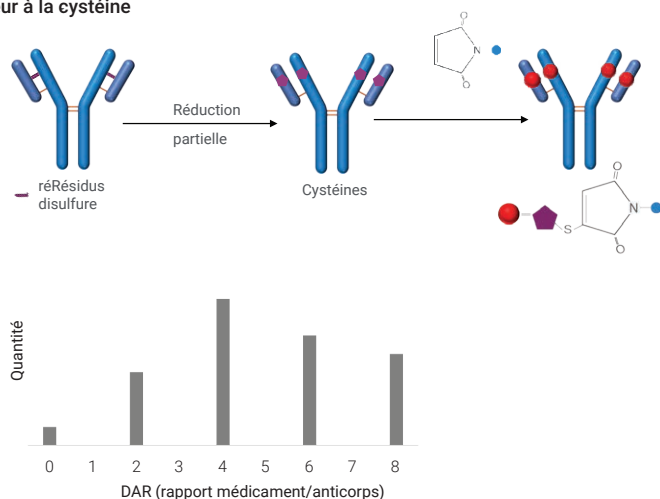
Conjugués anticorps-médicaments

Les conjugués anticorps-médicaments (ADC) sont une nouvelle génération de produits biothérapeutiques ciblés représentant une part en pleine croissance du pipeline de découverte de médicaments. Ils sont créés en fixant, à l'aide d'un lien, de puissants médicaments cytotoxiques sur des anticorps monoclonaux (mAb) qui ciblent des cellules spécifiques. Les ADC approuvés par la FDA en 2019/2020 sont basés sur la conjugaison à la cystéine et à la lysine, les liens à la cystéine représentant la majorité.

Tableau 1. ADC approuvés de 2019 à 2020.

Nom	Isotype IgG	Cible	Site du lien	Charge utile
Gemtuzumab ozogamicine	IgG4	CD33	Lysine	Calichéamicine
Brentuximab védotine	IgG1	CD30	Cystéine	Auristatine (MMAE)
Trastuzumab emtansine	IgG1	HER2	Lysine	Maytansine (DM1)
Inotuzumab ozogamicine	IgG4	CD22	Lysine	Calichéamicine
Polatuzumab védotine	IgG1	CD79b	Cystéine	Auristatine (MMAE)
Enfortumab védotine	IgG1	Nectine 4	Cystéine	Auristatine (MMAE)
Trastuzumab déruxtécan	IgG1	HER2	Cystéine	Inhibiteur de la topoisomérase I
Sacituzumab govitecan	IgG1	TROP-2	Cystéine	Métabolite actif de l'irinotécan (SN-38)
Belantamab mafodotine	IgG1 afucosylée	BCMA	Cystéine	Auristatine (MMAF)

Lieur à la cystéine



Lieur à la lysine

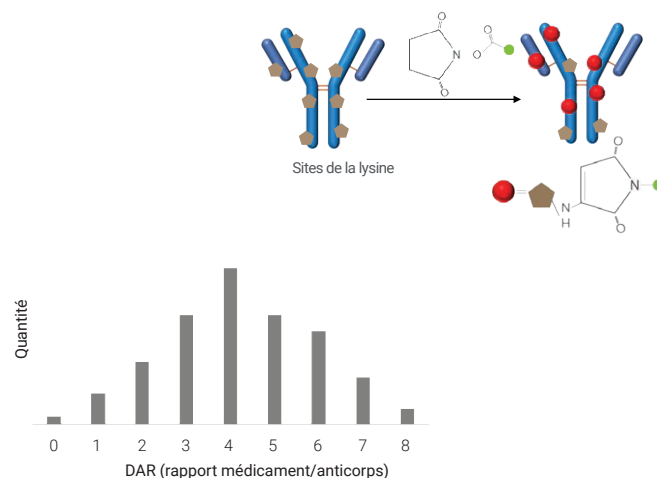


Figure 1. Types de conjugaison d'ADC.

Dans la conjugaison à la cystéine, la réduction des liaisons disulfure interchaînes dans la région charnière permet de fixer jusqu'à huit médicaments par multiples de deux. Les lieux à la lysine donnent souvent lieu à un degré d'hétérogénéité élevé. Par exemple, le trastuzumab emtansine compte 90 résidus Lys dans la molécule de trastuzumab, chaque molécule pouvant contenir jusqu'à huit conjugués DM1.

Étant donné que l'industrie poursuit une stratégie « fail fast, fail cheap » (échouer rapidement, échouer à moindre coût) afin d'accroître la probabilité d'approbation du produit final, il est essentiel de pouvoir rapidement bien comprendre la relation structure-fonction des ADC. Cela n'est possible qu'en utilisant une gamme de techniques analytiques orthogonales pour caractériser chaque aspect de la structure et de la fonction de la molécule.

Les petites molécules conjuguées à des anticorps pour produire des ADC sont généralement hydrophobes. Pour les ADC liés à la cystéine, l'hydrophobicité globale augmente avec la valeur du DAR (rapport médicament/anticorps), faisant de la chromatographie par interaction hydrophobe (HIC) l'outil idéal pour le suivi du DAR. En revanche, les ADC liés à la lysine présentent de nombreux résidus Lys et sont constitués d'un mélange d'isomères de position. La HIC n'est pas la méthode suggérée pour résoudre les ADC liés à la lysine^{7,8}. La RP-MS, c'est-à-dire la chromatographie en phase inverse (RP) couplée à la détection par spectrométrie de masse (MS), est la méthode de choix. La RP assure la sélectivité pour le mAb intact et ses fragments, tandis que la MS offre la sensibilité et les données de masse qui sont essentielles à l'identification des pics. Cela est très important pour l'étude des ADC liés à la lysine, car les fragments contiennent des chaînes légères et lourdes non conjuguées ou conjuguées de façon variable, ainsi que des chaînes liées au seul lieu⁷.

La fixation de la charge utile hydrophobe pour former l'ADC favorise également l'agrégation due à l'hydrophobicité⁹. Bien que les agrégats et produits de dégradation ne soient présents qu'en faibles concentrations, ils ont un effet majeur sur la qualité des produits biologiques, entraînant une perte d'activité, une diminution de la solubilité et une augmentation de l'immunogénicité. La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est la méthode typiquement utilisée pour caractériser l'agrégation protéique.

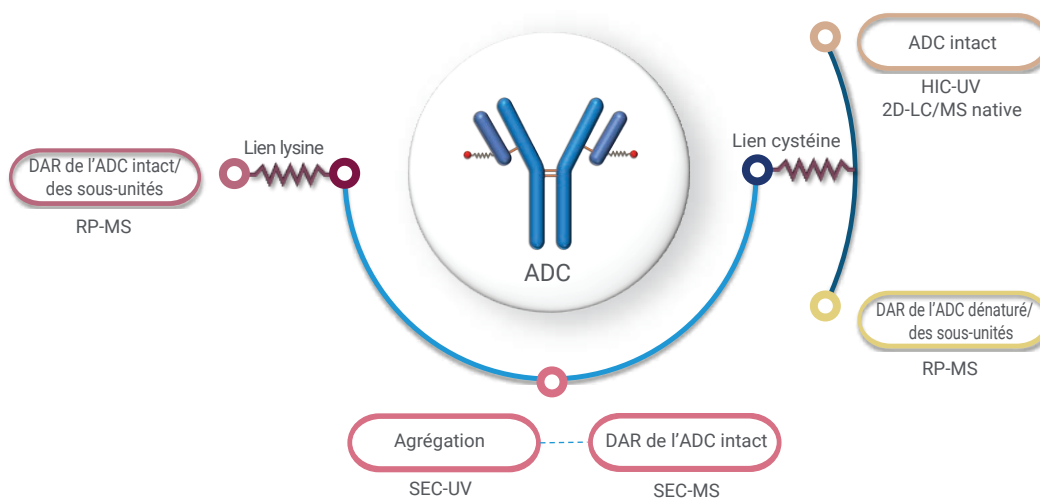


Figure 2. Méthodes orthogonales pour la caractérisation des ADC.

Conseils pour optimiser votre séparation

Préparation d'échantillons

- Les échantillons d'ADC ayant tendance à être hydrophobes, il est essentiel d'assurer leur solubilité dans l'éluant. Dans l'idéal, les échantillons doivent être dissous dans la phase mobile initiale.
- Afin de protéger la colonne d'éventuels dommages dus aux agrégats et impuretés, il est recommandé de filtrer les échantillons à l'aide de filtres-seringues Captiva Premium en PES (voir section « Sélection facile et informations pour commander ») avant l'analyse par HPLC.
- Lorsque vous travaillez avec des échantillons complexes ou « sales », utilisez des colonnes de garde (voir section « Sélection facile et informations pour commander ») afin de prolonger la durée de vie de la colonne.

Colonnes Agilent AdvanceBio HIC :

Le DAR est suivi dans la forme native des ADC

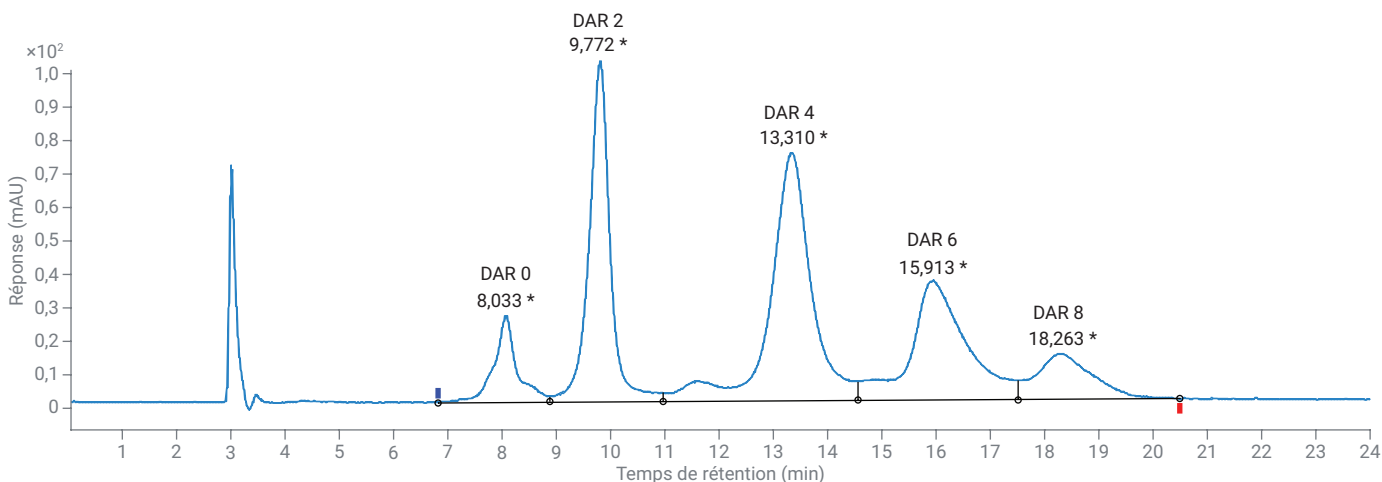


Figure 3. Séparation du brentuximab vécotine à l'aide d'une colonne Agilent AdvanceBio HIC. ([5994-Q149EN](#))

Chromatographie par interaction hydrophobe (HIC)

La HIC utilise des phases mobiles à forte teneur en sels qui réduisent la solubilité des biomolécules. Cela favorise l'adsorption sur la phase stationnaire HIC. L'élué avec un gradient salin permet d'éluer les molécules par ordre d'hydrophobicité croissante. En raison des hautes concentrations en sel utilisées dans la HIC, un LC bio-inerte est recommandé. Il est tout de même important d'éviter de laisser une solution saline concentrée dans le système LC ou la colonne pendant une durée prolongée. Un système LC quaternaire permet d'utiliser d'autres canaux pour des agents modificateurs et l'eau, ou pour d'autres solvants de rinçage. Le propan-2-ol est nécessaire pour assurer la détermination exacte des DAR plus élevés et étendre la durée de vie de la colonne¹.

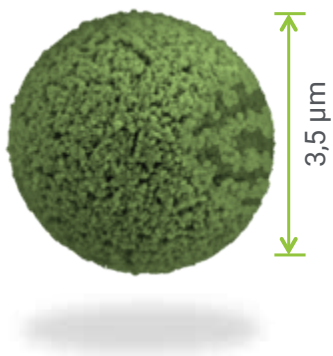


Figure 4. AdvanceBio HIC (diamètre de pore de 450 Å).

- Le sulfate d'ammonium est le sel habituellement utilisé pour la HIC en raison de sa capacité à induire l'interaction des protéines hydrophobes sur la colonne, mais il augmente également le risque de précipitation. Le meilleur moyen d'éviter la précipitation est de diluer l'échantillon avec du sulfate d'ammonium concentré pour que la matrice de l'échantillon soit aussi proche que possible de la phase mobile initiale². Cela présente les avantages suivants :
 - Amélioration de la sensibilité et de la forme des pics.
 - Détermination au préalable du risque de précipitation de l'échantillon avant l'injection et prévention de la précipitation en tête de colonne.
- À la fin du gradient, utilisez un gradient inverse relativement lent pendant plusieurs minutes. Rééquilibrez avec 2-3 volumes de colonne. ([Guide d'utilisation](#))
 - Un changement radical de la viscosité dû à un changement de la concentration en sel nécessite un retour progressif à la phase mobile initiale pour éviter d'endommager la colonne.
- L'utilisation d'une température élevée est une approche répandue pour les phases mobiles à forte viscosité, mais elle n'est pas recommandée dans le cas de la HIC en raison de la dégradation de la forme des pics de protéines.
- Le sulfate d'ammonium 2 M représente une quantité importante. Si un sel de moindre pureté est utilisé, la ligne de base du chromatogramme peut dériver.
 - La fonction de [soustraction du blanc d'OpenLab CDS](#) peut être appliquée pour corriger la dérive de la ligne de base.³

Colonnes PLRP-S Agilent :

Suivi du DAR des ADC intacts et de leurs sous-unités

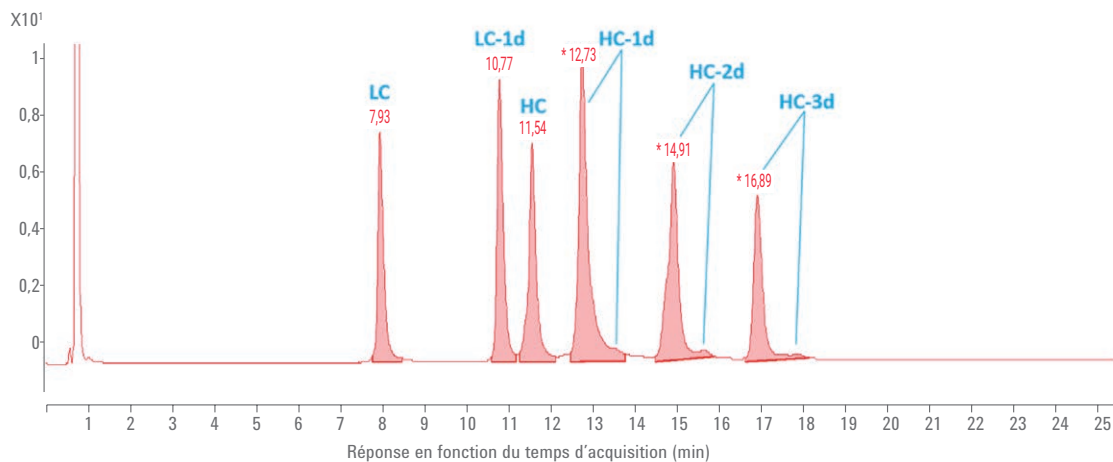


Figure 5. Spectre d'absorption UV à une longueur d'onde de 280 nm pour le brentuximab vécétine réduit séparé par chromatographie en phase inverse. Les pics ont été identifiés par spectrométrie de masse. (5991-6559EN)

PLRP-S

- Même si l'inversion du flux ne détériore généralement pas la colonne, il est préférable de l'éviter, sauf pour essayer de déboucher un fritté obstrué (voir « [Entretien des colonnes](#) »).
- Commencez avec un débit réduit, puis augmentez-le doucement jusqu'à la valeur désirée pour éviter les surpressions.
- Utilisez toujours des réactifs de haute pureté et des solvants de qualité chromatographique pour préparer votre phase mobile. Dégazez et filtrez la phase mobile avant utilisation.
- Utilisez un filtre en ligne pour protéger votre colonne et prolonger sa durée de vie.
- Évitez d'utiliser des éluants 100 % aqueux avec les colonnes PLRP-S, car ils diminuent considérablement leur durée de vie et peuvent entraîner la détérioration rapide de la largeur et de la symétrie des pics.

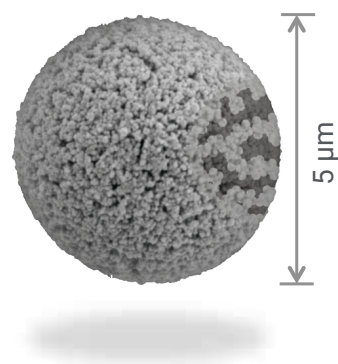


Figure 6. PLRP-S (diamètre de pore de 1 000 Å).

Colonnes Agilent AdvanceBio SEC :

Suivi des monomères, dimères, agrégats et produits de dégradation

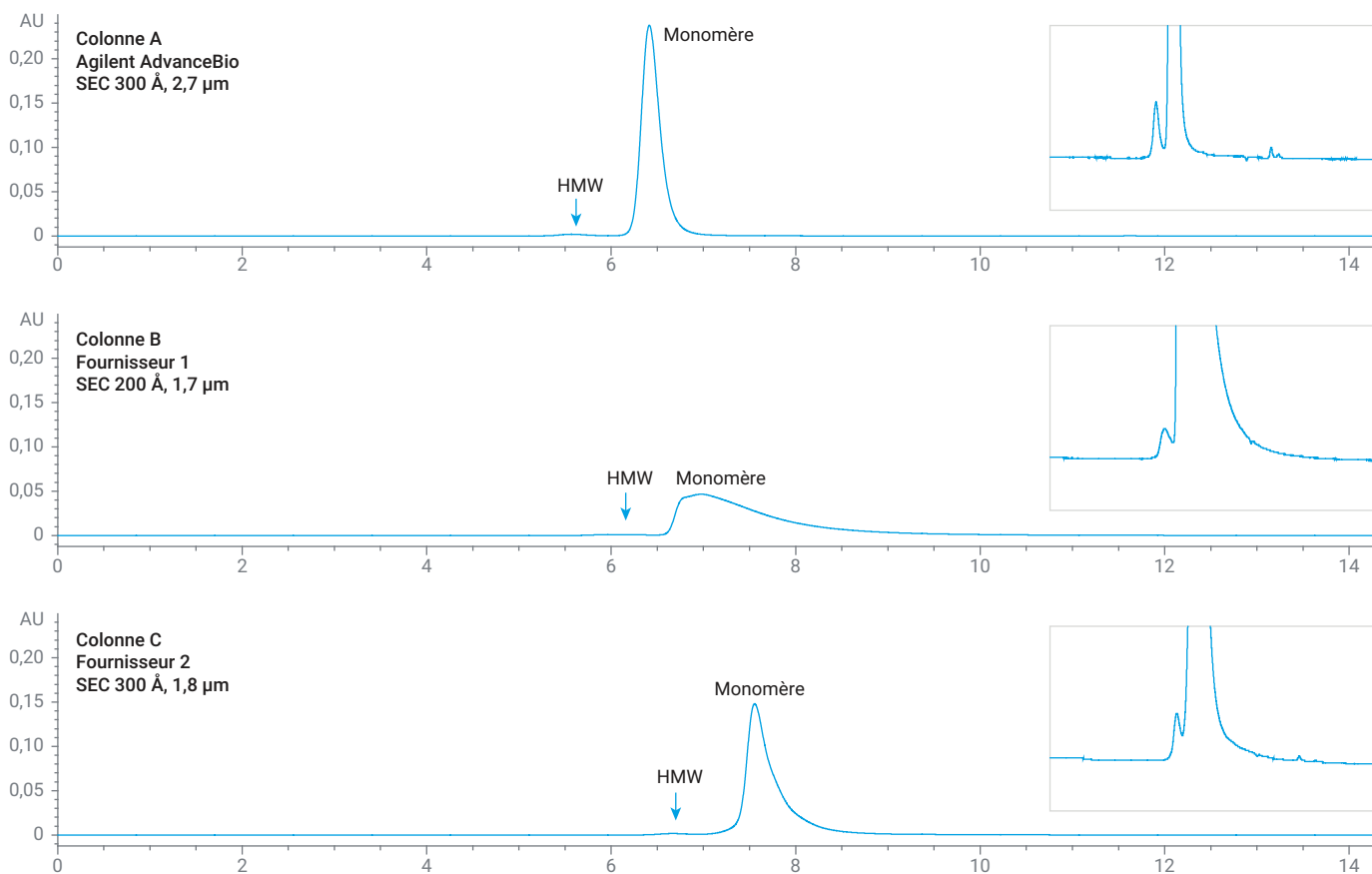


Figure 7. AdvanceBio SEC 300 Å, 2,7 µm pour l'analyse du trastuzumab emtansine lié à la lysine. La colonne B présente une augmentation des interactions secondaires, comme l'indique la perte de résolution des pics. La colonne C offre une forme de pic légèrement plus étroite, mais la résolution est également inférieure à la colonne AdvanceBio. ([5994-3276EN](#))

Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

L'analyse des agrégats est un autre attribut qualité critique de la caractérisation des ADC. Cette analyse est complexe en raison de la présence de médicaments cytotoxiques liés à l'anticorps, qui peuvent induire l'agrégation et créer des profils d'impureté plus complexes. La SEC est efficace pour quantifier les agrégats et fragments, mais elle comporte tout de même des difficultés. Les ADC sont souvent plus hydrophobes que les mAb seuls et sont donc plus sensibles aux interactions non spécifiques. Il est important de sélectionner une phase stationnaire hydrophile inerte greffée pour réduire les interactions secondaires sans nécessiter d'agents modificateurs qui pourraient influencer l'état d'agrégation.

Les méthodes de LC/MS native permettent également de déterminer le DAR des ADC liés à la cystéine ou à la lysine. Agilent a développé une méthode de 2D-LC/MS¹⁰ pour caractériser des DAR de conjugués liés à la cystéine intacts dans des conditions de LC/MS native. Cette méthode utilise la colonne Agilent AdvanceBio HIC, la colonne Agilent AdvanceBio SEC et une méthode MS à haute sensibilité afin de déterminer exactement la masse intacte de tous les ADC avec différents DAR. De plus, Agilent a développé une méthode de LC/MS native¹¹ utilisant une colonne Agilent AdvanceBio SEC 200 Å, 1,9 µm, et un système LC/Q-TOF AdvanceBio 6545XT équipé d'une source Agilent Jet Stream. Cette méthode diminue les interférences dues au solvant organique et à l'acide de la phase mobile et est idéale pour les ADC liés à la lysine.

- Les colonnes plus longues permettent d'obtenir une meilleure résolution, ce qui est idéal pour la séparation des agrégats de plus grande taille des monomères.
- [Les colonnes AdvanceBio SEC 300 Å, 2,7 µm](#) sont disponibles dans plusieurs longueurs et diamètres de colonne afin de permettre la quantification rapide et exacte des agrégats et monomères d'ADC ([guide d'utilisation](#)).
- Une phase mobile aqueuse constituée de PBS à pH 7,4 offre la meilleure résolution pour les ADC liés à la cystéine et les ADC liés à la lysine.⁶
- Une concentration plus élevée en sel n'améliore pas la résolution des pics d'ADC.⁶

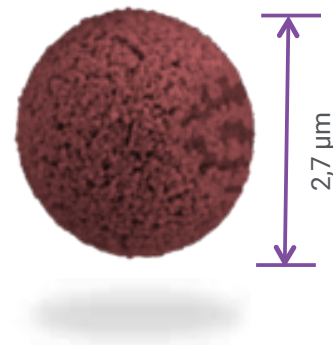


Figure 8. AdvanceBio SEC (diamètre de pore de 300 Å).

Sélection facile et informations pour commander

Pour commander les produits figurant dans les tableaux ci-dessous depuis la boutique en ligne d'Agilent, ajoutez les produits à votre liste de produits favoris en cliquant sur les liens de références MaListe. Vous pouvez ensuite saisir les quantités des produits dont vous avez besoin, ajouter les produits à votre panier et procéder au paiement. Votre liste d'articles sera disponible dans la rubrique Produits favoris pour faciliter vos futures commandes.

Si c'est la première fois que vous utilisez les Produits favoris, il vous sera demandé d'entrer votre adresse e-mail pour la vérification de votre compte. Si vous possédez un compte Agilent, vous pourrez vous connecter. Toutefois, si vous n'avez pas de compte Agilent enregistré, vous devrez en créer un. Cette fonctionnalité n'est valide que dans les régions où le commerce en ligne est disponible. Tous les articles peuvent aussi être commandés auprès de vos circuits de vente et de distribution habituels.

Description	Référence
MaListe de consommables de préparation d'échantillons	
Seringue jetable Captiva, 5 mL, 100/pqt	9301-6476
Filtre-seringue Captiva Premium, PES, 15 mm, 0,2 µm, 100/pqt	5190-5096
MaListe d'étalons	
Agilent-NISTmAb, 25 µL	5191-5744
Agilent-NISTmAb, 4 × 25 µL	5191-5745
Mélange étalon pour AdvanceBio SEC 300 Å	5190-9417
MaListe de colonnes AdvanceBio HIC	
AdvanceBio HIC, 4,6 × 100 mm, 3,5 µm	685975-908
AdvanceBio HIC, 4,6 × 30 mm, 3,5 µm	681975-908
MaListe de colonnes AdvanceBio PLRP-S	
PLRP-S 1 000 Å, 1,0 × 50 mm, 5 µm	PL1312-1502
PLRP-S 1 000 Å, 2,1 × 50 mm, 5 µm	PL1912-1502
PLRP-S 1 000 Å, 4,6 × 50 mm, 5 µm	PL1512-1502
PLRP-S 1 000 Å, 5 µm, 2,1 × 50 mm, revêtement PEEK	PL1912-1502PK
PLRP-S 1 000 Å, 5 µm, 2,1 × 100 mm, Revêtement PEEK	PL1912-2502PK

Description	Référence
MaListe de colonnes AdvanceBio SEC	
AdvanceBio SEC 300 Å, 4,6 × 150 mm, 2,7 µm, colonne LC	PL1580-3301
AdvanceBio SEC 300 Å, 4,6 × 300 mm, 2,7 µm, colonne LC	PL1580-5301
AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 × 150 mm, 2,7 µm, colonne LC	PL1180-3301
AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm, colonne LC	PL1180-5301
AdvanceBio SEC 300 Å, 4,6 × 50 mm, 2,7 µm, colonne de garde LC	PL1580-1301
AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 × 50 mm, 2,7 µm, colonne de garde LC	PL1180-1301
AdvanceBio SEC 200 Å, 4,6 × 150 mm, 1,9 µm, colonne LC	PL1580-3201
AdvanceBio SEC 200 Å, 4,6 × 30 mm, 1,9 µm, colonne de garde LC	PL1580-1201
AdvanceBio SEC 200 Å, 4,6 × 300 mm, 1,9 µm, colonne LC	PL1580-5201
AdvanceBio SEC 200 Å, 2,1 × 150 mm, 1,9 µm, revêtement PEEK	PL1980-3201PK
AdvanceBio SEC 200 Å, 2,1 × 50 mm, 1,9 µm, revêtement PEEK	PL1980-1201PK
MaListe de consommables de HPLC	
Kit ultra-faible dispersion, bio., pour utilisation avec Bio 1290 Infinity II	5004-0007
Kit ultra-faible dispersion pour série Agilent LC 1290 Infinity	5067-5189
MaListe de solvants et réactifs	
Acétonitrile InfinityLab Ultrapure LC/MS, 1 L	5191-4496
Eau InfinityLab Ultrapure LC/MS, 1 L	5191-4498
Acide formique, pureté de 99,5 %	G2453-85060

Description	Référence
MaListe de raccords et connecteurs de colonne	
Raccord rapide Quick Connect Agilent InfinityLab (pour connexion d'entrée de colonne)	5067-5965
Capillaire à raccord rapide Quick Connect Agilent InfinityLab MP35N 0,12 × 105 mm (pour raccord rapide Quick Connect)	5500-1578
Raccord rapide Quick Turn Agilent InfinityLab (pour connexion de sortie de colonne)	5067-5966
Capillaire à raccord rapide Quick Turn MP35N 0,12 × 280 mm (pour raccord rapide Quick Turn)	5500-1596
Outil de montage pour raccords rapides Quick Turn	5043-0915
Capillaire MP35N, 0,17 × 100 mm, SL/SL, ps/ps (pour connexion de la colonne de garde et de la colonne SEC)	5500-1278
Capillaire MP35N, 0,12 × 90 mm, SL/SL, ns/ns (pour connexion de la colonne de garde et de la colonne PLRP-S)	5004-0018
MaListe de consommables pour la manipulation de solvants	
Bouchons Stay Safe InfinityLab, kit de démarrage	5043-1222
Flacon pour solvant InfinityLab, transparent, 1 L	9301-6524
Flacon pour solvant InfinityLab, ambré, 1 L	9301-6526
Flacon pour solvant, transparent, 2 L	9301-6342
Flacon pour solvant, ambré, 2 L	9301-6341
Flacon de purge Stay Safe InfinityLab, 1 L	5043-1339
Bidon de collecte de déchets InfinityLab, GL45, 6 L, avec bouchon Stay Safe (filtre à charbon 5043-1193 non inclus)	5043-1221
Filtre à charbon InfinityLab avec indicateur de date, 58 g (pour utilisation avec 5043-1221)	5043-1193
MaListe de consommables pour la filtration de solvants	
Ensemble filtration de solvants InfinityLab	5191-6776
Flacon de filtration de solvants InfinityLab, verre, 2 L	5191-6781
Membrane de filtre, nylon, 47 mm, diamètre de pore de 0,2 µm, 100/pqt	5191-4341
Membrane de filtre, cellulose régénérée, 47 mm, diamètre de pore de 0,2 µm, 100/pqt	5191-4340
Filtre en verre de flacon pour solvant, entrée de solvant, 20 µm	5041-2168
MaListe de contenants	
Flacon à visser A-Line, 2 mL, ambré, plage d'écriture, 100/pqt	5190-9590
Capsule à visser, bleue, septum solidaire en PTFE/silicone, 100/pqt	5190-7021
Flacon, à visser, transparent, capacité de récupération élevée, 5 mL, pour LC, 30/pqt	5188-5369
Septa, PTFE/silicone prépercé, 16 mm, 100/pqt	5188-2758
Capsule, à visser, pour flacons de 6 mL, 100/pqt	9301-1379
Plaque à 96 puits InfinityLab, 2,0 mL, puits ronds, en U, polypropylène, 45 mm, 30/pqt	5043-9302
Plaque à 96 puits InfinityLab, 2,2 mL, puits carrés, en U, polypropylène, 41 mm, 30/pqt	5043-9300

Remarque : La mise à niveau du calculateur de DAR des ADC (référence G4994AA) est disponible pour le logiciel MassHunter DAR Calculator conçu pour déterminer les DAR à partir de données d'échantillons de LC/MS déconvolués. Pour les informations pour commander, contactez un représentant Agilent local.

Références

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, and Henning Gieseler Molecular Pharmaceutics 2018 15 (7), 2656-2664 DOI: [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](#)

Services Agilent CrossLab

CrossLab est une ressource d'Agilent intégrant des services et des consommables afin de faciliter le bon déroulement des tâches et la qualité des résultats, notamment par une productivité et une efficacité opérationnelle accrues. Avec CrossLab, Agilent s'efforce d'apporter son expertise à chaque interaction afin de vous aider à atteindre vos objectifs. Agilent CrossLab propose des services d'optimisation de méthode, des contrats de service modulables et des formations s'adressant à tous les niveaux de compétences. Nous disposons de nombreux autres produits et services pour vous aider à gérer vos instruments et à optimiser les performances de votre laboratoire.

Pour en savoir plus sur Agilent CrossLab et voir des exemples d'excellents résultats obtenus grâce aux conseils d'experts, rendez-vous sur : www.agilent.com/crosslab.

Pour en savoir plus :

www.agilent.com/chem/advancebio

Pour acheter en ligne :

www.agilent.com/chem/store

Pour obtenir les réponses à vos questions techniques et accéder à des ressources dans la communauté Agilent :

community.agilent.com

France

0810 446 446

customercare_france@agilent.com

États-Unis et Canada

agilent_inquiries@agilent.com

Europe

info_agilent@agilent.com

Asie et Pacifique

inquiry_lsca@agilent.com

www.agilent.com/chem/ordering-guides

DE73791623

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Imprimé aux États-Unis, le 17 novembre 2022
5994-5089FR