

Caracterización y monitoreo de la desamidación inducida por pH

Usando el sistema X500B y el software BioPharmaView™

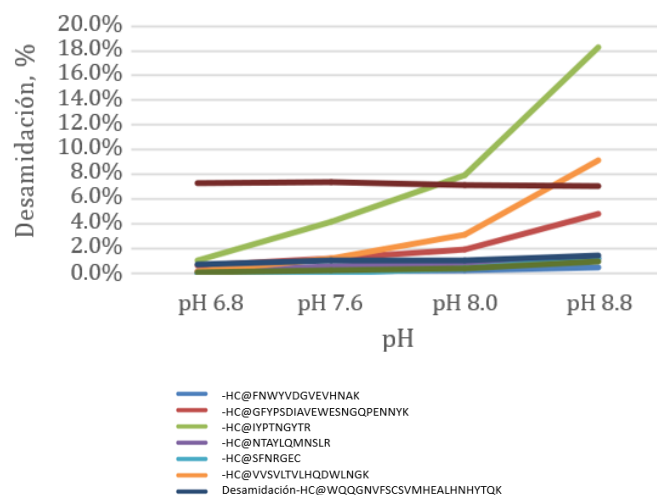
Luo Ji¹; Sibylle Heidelberger²; Annu Uppal³
¹SCIEX, China; ²SCIEX, Canada; ³SCIEX, India

El desarrollo de proteínas terapéuticas es un desafío debido al alto grado de heterogeneidad y potencial para una amplia gama de modificaciones postraduccionales. Comúnmente, los estudios para investigar sitios de posible modificación se ejecutan durante todo el proceso de descubrimiento y desarrollo, a menudo denominado análisis de puntos críticos o evaluación de responsabilidad. La desamidación es una de las modificaciones más comunes que pueden causar cambios estructurales en los productos bioterapéuticos que resultan en una disminución de su seguridad o eficacia¹⁻³. Es crítico evaluar y monitorear estos atributos de calidad del producto (PQA) biológicamente relevantes durante las diversas etapas del ciclo de vida del producto para garantizar la seguridad y eficacia del producto.

Este trabajo se enfoca en un flujo de trabajo optimizado para un monitoreo rápido y eficiente de la desamidación inducida en anticuerpos con pH estresado usando un flujo de trabajo de metodología de atributos múltiples (MAM) basado en péptidos con el Sistema SCIEX X500B QTOF operado por el software de



adquisición SCIEX OS y el procesamiento de datos en el software BioPharmaView™ 3.0. En conjunto, esta solución permite la facilidad de uso para la recopilación y el procesamiento de datos que es accesible para una amplia gama de usuarios. Esto permite la cuantificación automática y precisa de todos los sitios de asparagina susceptibles de desamidación debido al estrés del pH (Fig. 1), lo que resulta en una evaluación de alto rendimiento de la estabilidad del producto y la determinación de la estrategia de control adecuada para los anticuerpos monoclonales terapéuticos.



Principales Ventajas del sistema X500B con SCIEX OS y Software BioPharmaView 3.0

- Espectrómetro de masas y software fáciles de usar
- Definición personalizable y flexible de atributos moleculares específicos
- Cuantificación exacta y reproducible de modificaciones específicas utilizando capacidades MAM

Figura 1. Monitoreo de desamidación con respecto a los cambios de pH para varios sitios susceptibles a Asp. Algunos de los péptidos mostraron un mayor grado de cambios porcentuales relativos a un pH más alto, mientras que algunos de estos sitios mostraron una susceptibilidad relativamente menor a los cambios de pH.

Métodos

Preparación de la muestra: Trastuzumab se obtuvo de Myoderm (Norristown, PA, EE. UU.). Las muestras se digirieron en 25 mM Tris-HCl, amortiguador con diferentes valores de pH (6.8, 7.6, 8.0 y 8.8) para determinar su impacto en los niveles de desamidación. Las muestras se desnaturalizaron, redujeron y alquilaron usando DL-ditiotreitol y 2-yodoacetamida (Sigma Aldrich). Se añadió tripsina (Promega) en una proporción de 1:30 (w:w; Trypsin:mAb) seguido de una incubación a 37 °C durante 4 h. La digestión se detuvo agregando ácido fórmico y el sobrenadante se midió posteriormente usando LC-MS.

Cromatografía: Los péptidos tripsinizados de trastuzumab se separaron usando el Sistema ExionLC™. El solvente A consistió en agua que contenía 0.1 % de ácido fórmico y el solvente B consistió en acetonitrilo que contenía 0.1 % de ácido fórmico. Se usó un gradiente de 2 a 55 % de B durante 35 min a una velocidad de flujo de 300 µL / min. El volumen de inyección se ajustó a 4 µL .

Espectrometría de masas: Todas las mediciones se llevaron a cabo en réplicas en el X500B QTOF acoplado a una fuente TurboV™ utilizando una estrategia de adquisición dependiente de datos (DDA). Se adquirieron datos MS/MS de alta resolución de ocho iones candidatos por ciclo con un tiempo de ciclo total de 1s.

Procesamiento de datos: El procesamiento completo de los datos se realizó con el software BioPharmaView™ 3.0. Los datos de péptidos experimentales se combinaron con la lista generada in-silico de masas de péptidos con desamidación como modificación variable. Los sitios de asparagina se monitorearon para determinar la susceptibilidad a la desamidación utilizando el flujo de trabajo MAM y se establecieron rangos de referencia para los criterios de aprobación / falla.

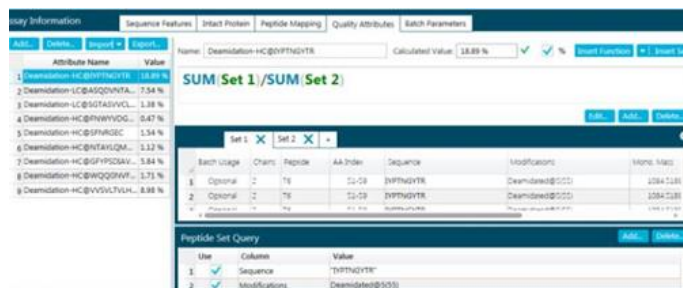


Figura 2. Software BioPharmaView 3.0 para definir atributos de calidad para monitorear la desamidación.

Resultados y discusión

La investigación de los sitios susceptibles de desamidación en función del pH utilizado para la digestión, fue logrado. Todos los demás parámetros del protocolo de digestión se mantuvieron constantes. El seguimiento de los sitios de desamidación se realizó utilizando el software BioPharmaView™ 3.0 mediante la definición de cálculos personalizados utilizando los atributos de calidad en el ensayo. Cada péptido se rastreó de forma independiente utilizando cálculos personalizados como se muestra en la Figura 2. La lista de atributos de calidad se creó para todos los péptidos que contienen residuos de asparagina basados en la secuencia de trastuzumab. Los cálculos de modificación se crearon como porcentaje relativo basado en la forma no modificada. En el caso, donde son posibles múltiples especies desamidadas para el péptido debido a la presencia de más de un sitio de modificación, se consideró la suma de todas las áreas XIC para el cálculo del porcentaje relativo. Los criterios de aprobación / reprobación se establecieron en función de los resultados obtenidos a partir de los valores determinados para la digestión con el pH más bajo. En cada caso, la localización de la desamidación se verificó utilizando datos de MS / MS y la localización de la modificación se realizó manualmente con la posición específica guardada como parte del ensayo.

Quality Attributes	pH 6.8 01	pH 6.8 02	pH 6.8 03	pH 7.6 01	pH 7.6 02	pH 7.6 03	pH 8.0 01	pH 8.0 02	pH 8.0 03	pH 8.8 01	pH 8.8 02	pH 8.8 03
1 Deamidation-HC@FNWYVDGVEVHNAK	0.00 %	0.00 %	0.02 %	0.09 %	0.14 %	0.17 %	0.24 %	0.18 %	0.18 %	0.39 %	0.41 %	0.52 %
2 Deamidation-LC@SGTASVCLLNIFYPR	0.00 %	0.04 %	0.03 %	0.22 %	0.23 %	0.23 %	0.39 %	0.39 %	0.38 %	0.89 %	1.04 %	0.85 %
3 Deamidation-HC@NTAYLQMNSLR	0.04 %	0.14 %	0.15 %	0.51 %	0.50 %	0.47 %	0.71 %	0.77 %	0.75 %	1.10 %	1.27 %	1.18 %
4 Deamidation-HC@WQQGNVFCSTMHEALHNYTQK	0.76 %	0.66 %	0.71 %	0.94 %	1.02 %	1.03 %	0.63 %	1.19 %	1.16 %	1.36 %	1.43 %	1.52 %
5 Deamidation-HC@SFNRGEC	0.00 %	0.00 %	0.00 %	0.00 %	0.00 %	0.00 %	0.00 %	0.00 %	0.00 %	1.50 %	1.01 %	1.99 %
6 Deamidation-HC@IYPTNGYTR	0.87 %	1.07 %	0.97 %	4.05 %	4.23 %	4.25 %	8.27 %	8.07 %	7.38 %	19.43 %	17.89 %	17.50 %
7 Deamidation-HC@GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	0.60 %	0.61 %	0.59 %	1.32 %	0.87 %	1.33 %	1.70 %	1.56 %	2.33 %	2.35 %	5.85 %	6.07 %
8 Deamidation-LC@ASQDVNTAVAWYQQKPGK	7.28 %	7.29 %	7.36 %	6.89 %	7.29 %	8.02 %	6.65 %	7.17 %	7.52 %	7.62 %	6.30 %	7.21 %
9 Deamidation-HC@VVSVLTVLHQDWLNGK	0.14 %	0.13 %	0.14 %	1.21 %	1.14 %	1.20 %	3.07 %	2.95 %	3.18 %	8.97 %	9.39 %	9.05 %

Figura 3. Resultados del atributo de calidad para muestras de digeridas de trastuzumab en cada pH de digestión. Se ejecutaron análisis y procesamientos replicados para cada muestra. Como se muestra, los análisis repetidos fueron consistentes.

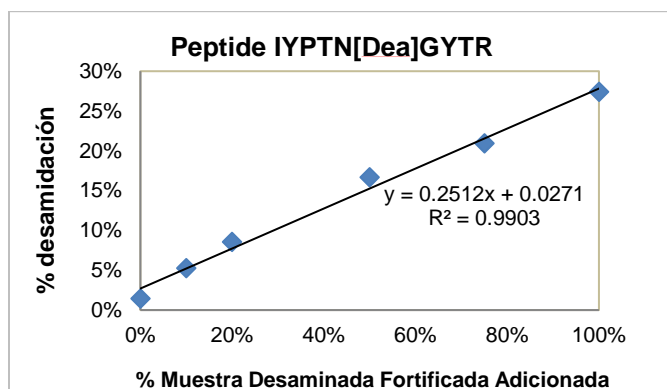


Figura 4. Linealidad de la desamidación del péptido IYPTNGYRN a partir de digeridos.

Los niveles más bajos de desamidación se observaron en la muestra digerida al pH más bajo (6,8). Como se esperaba, el grado de desamidación aumentó a medida que el pH aumentó con niveles crecientes de pH como se muestra en la tabla de resultados de atributos de calidad, Figura 3.

Como se esperaba, el grado de desamidación aumentó a medida que el pH utilizado en la digestión se volvió más básico. Como se muestra en la Figura 3, se encontró que dos péptidos dentro de la cadena pesada eran los más susceptibles a la desamidación inducida por el pH. En particular, nuestros resultados indicaron que Asn55 era el residuo más susceptible, es importante destacar que este residuo se encuentra en la región CDR2 de la cadena pesada. Esto es de interés ya que la desamidación en este sitio puede reducir en gran medida la capacidad de unión del anticuerpo.¹⁻³

La precisión del método se evaluó añadiendo las muestras desamidadas a la muestra de control a niveles crecientes. La muestra con los niveles de desamidación determinados más bajos (pH 6.8) se utilizó como línea base para los estudios de fortificación debido a la falta de muestras sin desamidación. Es decir, la muestra con el nivel de desamidación determinado más alto se añadió a la muestra con el nivel más bajo. Como se muestra en las Figuras 4 y 5, cuando la muestra desamidada fortificada se añadió a la muestra de control, la cantidad de desamidación medida en las muestras fortificadas aumentó correspondientemente con la cantidad adicionada como se esperaba, exhibiendo una excelente linealidad para cada péptido, lo que destaca la linealidad del ensayo.

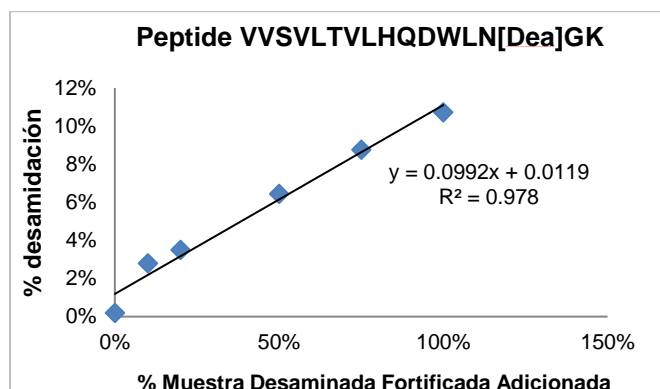


Figura 5. Linealidad de la desamidación del péptido VVSVLTVLHQDWLN[Dea]GK a partir de digeridos añadidos.

Conclusiones

- El sistema SCIEX X500B y el software BioPharmaView 3.0 con el flujo de trabajo MAM permiten una cuantificación precisa de las modificaciones postraduccionales.
- El sistema SCIEX X500B proporciona una respuesta lineal para una evaluación segura de los atributos de calidad.
- El flujo de trabajo permite el seguimiento de atributos en todo el proceso de desarrollo biofarmacéutico

Referencias

1. I. Schmid, L. Bonnington, M. Gerl, K. Bomans, A.L. Thaller, K. Wagner, T. Schlothauer, R. Falkenstein, B. Zimmerman, J. Kopitz, M. Hasmann, F. Bauss, M. Haberberger, D Reusch and P. Bulau.. *Comm Biol.* (2018) 1 (28), 1–10.
2. A.L Pace, R.L. Wong, Y.T. Zhang, Y-H. Kao, and Y.J. Wang. *J. Pharm Sci.* (2013) **102**, 1712-1723.
3. L.Huang, J. Lu, V.J Wroblewski, J.M Beals, and R.M. Rigglin. *Anal Chem* (2005) **77(5)**, 1432-1439.

The SCIEX clinical diagnostic portfolio is For In Vitro Diagnostic Use. Rx Only. Product(s) not available in all countries. For information on availability, please contact your local sales representative or refer to <https://sciex.com/diagnostics>. All other products are For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

Trademarks and/or registered trademarks mentioned herein, including associated logos, are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners in the United States and/or certain other countries. © 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-8167-A. AB SCIEX™ is being used under license.