

Detección de Impurezas de Anticuerpos Intactos en SCIEX X500B

Detección de alta sensibilidad de impurezas proteicas de bajo nivel en SCIEX X500B QTOF

Chris Nortcliffe¹, Sibylle Heidelberger²

¹SCIEX, UK; ²SCIEX, Canada

Los bioterapéuticos basados en anticuerpos monoclonales (mAb) son una gran clase de biológicos proteicos. Los anticuerpos permiten una focalización altamente específica de los marcadores de enfermedades, lo que está generando un gran interés e inversión en el campo. Comprender la estructura primaria, la heterogeneidad, las modificaciones y los contaminantes potenciales de estos productos biológicos es clave para garantizar la seguridad y la calidad del producto.

El análisis LC-MS se ha convertido en una técnica muy útil para la identificación, caracterización y cuantificación de proteínas intactas, así como para la caracterización de recortes de proteínas e impurezas. El sistema X500B ha sido desarrollado para la caracterización biológica, lo que permite al usuario aumentar la capacidad analítica, simplificar los flujos de trabajo y acelerar el rendimiento. Utilizando el nuevo software SCIEX OS con una interfaz intuitiva basada en iconos, el sistema ofrece una potente caracterización biológica a manos de científicos de cualquier nivel sin la necesidad de expertos en espectrometría de masas.

Esta nota técnica describe el método LCMS utilizando el sistema SCIEX X500B QTOF en dos anticuerpos monoclonales comúnmente disponibles, el estándar de anticuerpos monoclonales NIST y Trastuzumab. El Trastuzumab se añadió al estándar NIST mAb1 a diferentes concentraciones relativas para representar una impureza intacta. Además, el estándar de mAb NIST tratado por la enzima FabRICATOR (IdeS) se añadió para representar impurezas proteicas de menor peso molecular, nuevamente a concentraciones variables. Estos datos fueron

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la muestra: El mAb NIST intacto, el anticuerpo monoclonal IgG1k humanizado (RM) y el trastuzumab se diluyeron en serie en FA al 0,1 % (ácido fórmico) y acetonitrilo al 15 % hasta 0,1 µg/µL. El mAb NIST (10 µg / µl) también se trató con FabRICATOR (IdeS, Genovis) durante 4 horas a 37 ° C para separar el Fc de las regiones Fab. Las muestras se trataron con PNGasa F (Sigma) para eliminar la glucosilación en la cadena pesada de los anticuerpos.



Las muestras se añadieron con Trastuzumab o mAb NIST digerido (con y sin glicanos para ambos) desde 0.1 µg / µl hasta 0.0001 µg / µl en una concentración final de mAb NIST de 0.1 µg / µl. Para IdeS digerir, la concentración es la concentración total de proteínas no especies individuales.

Cromatografía líquida: Se inyectaron muestras a 10 µl en una columna Agilent PLRP-S (300 Å, 3 µM, 50 x 2.1 mm) usando el gradiente de HPLC indicado en la Tabla 1 usando un sistema ExionLC™ AD. La temperatura de la columna se mantuvo a 80 ° C. La fase móvil A era 100 % de agua con 0.1 % de FA y la fase móvil B era 100 % de acetonitrilo con 0.1 % de FA.

Tabla 1. Gradiente de HPLC utilizado en el análisis de impurezas.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	B.Conc (%)	B.Curva
0.5	0.5	25	0
5.5	0.5	55	0
6.2	0.5	95	0
7.0	0.5	95	0
7.1	0.5	25	0
8.1	0.5	25	0

Espectrómetro de Masas: El análisis MS de realizado en un SCIEX X500B QTOF. El método MS utilizado es descrito en la Tabla 2. Un mínimo de 3 inyecciones replicadas fueron realizadas para cada dilución serial.

Tabla 2. Gradiente de HPLC utilizado en el análisis de impurezas.

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
Curtain gas:	45	Contenedores de tiempo	120
Fuente de iones Gas 1 (psi)	50	para sumar	900
Fuente de iones 2 (psi)	50	Inicio de masas TOF (Da)	5000
Temperatura (°C)	500	Fin de masas (Da)	1
Tipo de Escaneo:	TOF MS	Tiempo de acumulación	250
Polaridad	Positive	Potencial de reducción (V)	15
Voltaje de Ionspray (V)	5000	Energía de colisión (V)	7

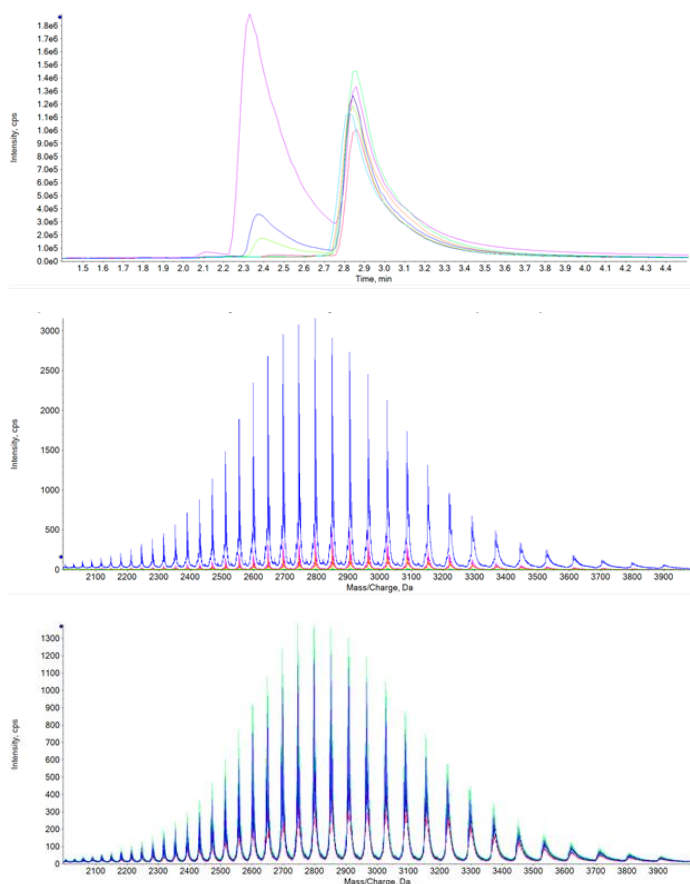


Figura 1. A) Cromatogramas de iones sin procesar en las 27 inyecciones (3 x 9 repeticiones), B) Datos sin procesar no normalizados para la impureza de Trastuzumab en todas las inyecciones C) Datos sin procesar para el mAb NIST en las 27 inyecciones (3 x 9 repeticiones) inyecciones.

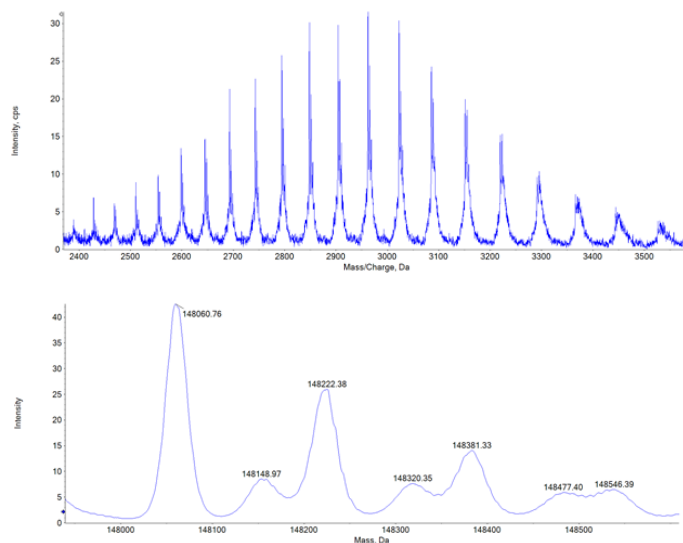


Figura 2. A) Datos brutos de impureza de Trastuzumab a una concentración del 0.1 % hasta el pico principal. B) Reconstrucción de datos en la figura 2 A.

Detección de impurezas intactas

El trastuzumab se añadió al mAb NIST a concentraciones variables para determinar el límite de detección de impurezas intactas.

Los espectros de MS se analizaron utilizando la micro aplicación BioToolKit en la función del software Explorer™ del sistema operativo SCIEX. El mAb NIST eluye a los 2.8 minutos en esta columna mientras que la impureza (Trastuzumab) eluye a los 2.3 minutos. La Figura 1A muestra los cromatogramas de iones totales de las inyecciones con todos los niveles de impureza, la Figura 1B muestra los datos sin procesar sobre el pico de impureza (Trastuzumab) para todas las inyecciones y la Figura 1C muestra lo mismo para el mAb NIST. La impureza fue detectable hasta 0.001 µg / µl como se muestra en la Figura 2. La Figura 2A muestra los datos en bruto y 2B muestra la reconstrucción intacta de Trastuzumab.

Detección de impurezas intactas en muestras desglicosiladas

Los anticuerpos se glicosilan de forma nativa en la región Fc de la cadena pesada; Esto puede complicar los espectros de masas al tener varias glicofomas potenciales diferentes. La eliminación de estos glicanos con enzimas como la PNGasa F no solo simplifican los espectros de masas, sino que también aumenta la intensidad de la proteína ya que los iones ya no se dividen entre varios picos m/z. A través de la desglicosilación de

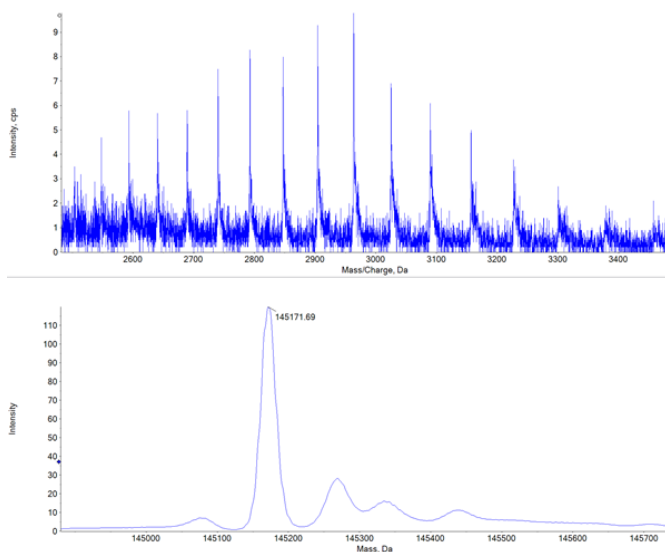


Figura 3. A) Datos crudos de impureza de Trastuzumab desglicosilada a una concentración del 0,01 % hasta el pico principal. B) Reconstrucción de las proteínas.

las muestras, el límite de detección precisa de la impureza se redujo en un factor de diez a 0,0001 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Detección de impurezas intactas de bajo peso molecular

No todas las impurezas tienen un peso molecular similar al biológico objetivo; algunos pueden ser construcciones a medias (como cadenas pesadas o ligeras) o proteínas co-purificadas. Las condiciones de espectrometría de masas que son óptimas para el objetivo pueden no ser ideales para estas moléculas que conducen a la fragmentación o a una pobre ionización.

Al observar las formas IdeS de NIST de baja abundancia como una impureza en la muestra de NIST intacta, tanto la región Fc como las formas desglicosiladas se pueden identificar con facilidad, identificando la región Fc desglicosilada hasta el 0.01 % de la concentración relativa del estándar NIST intacto.

Conclusión

Este trabajo ha demostrado como el X500B puede detectar impurezas intactas y semi-intactas en muestras de hasta 0.1 % (0.01 % con desglicosilación) en relación con la proteína de interés. El flujo de trabajo se desarrolló para analizar el estándar NIST mAb y detectar impurezas de masa similar sin optimización adicional.

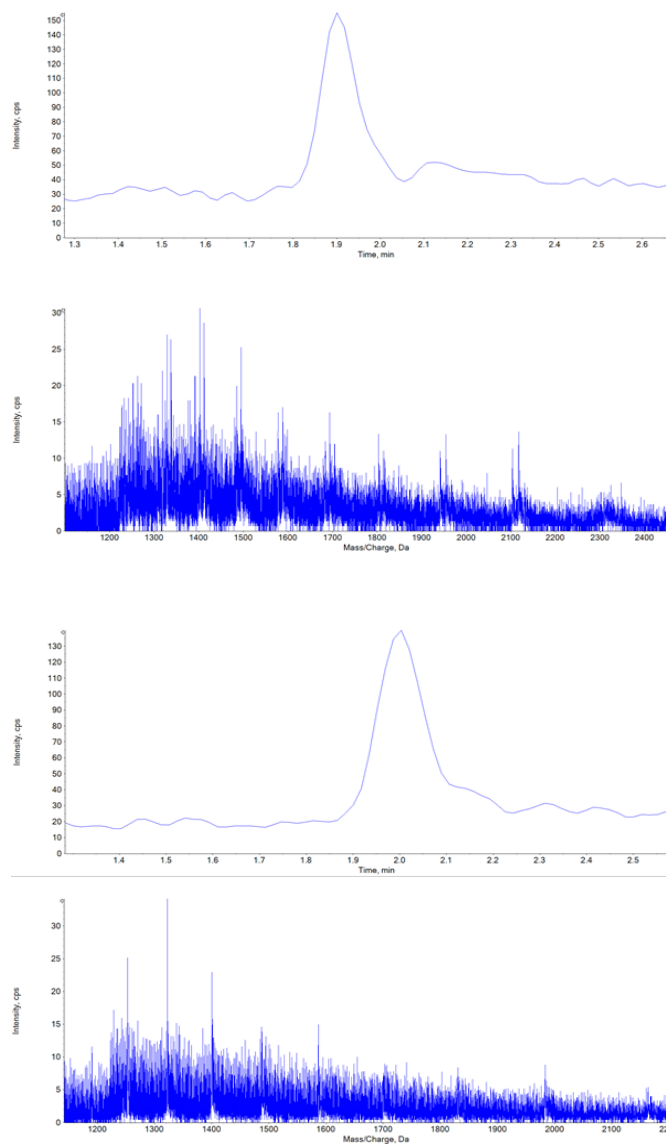


Figura 4. A) Extracción del cromatograma de iones para los diez estados de carga más intensos de la impureza de la región Fc a una concentración relativa del 0,05 % con respecto al pico principal. (0,005 μg en columna). B) Datos crudos de la impureza de la región Fc a una concentración del 0,05 % hasta el pico principal. C) Extracción del cromatograma de iones extraídos para los diez estados de carga más intensos de impurezas de la región Fc desglicosilada a una concentración relativa del 0,01 % con respecto al pico principal (0.001 μg en columna). D) Datos brutos de la impureza de la región Fc desglicosilada a una concentración del 0,01 % del pico principal.

Referencias

1. T. Formolo, M. Ly, M. Levy, L. Kilpatrick, S. Lute, K. Phinney, L. Marzilli, K. Brorson, M. Boyne, D. Davis, J. Schiel (2015) State-of-the-Art and Emerging Technologies for Therapeutic Monoclonal Antibody Characterization Volume 2. Biopharmaceutical Characterization: The NISTmAb Case Study. 1-62.
2. M. Wilm, (2011) Principles of Electrospray Ionization. *Mol. Cell Proteomics*, **10(7)**, M111-009407.

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-02-6335-A . AB SCIEX™ is being used under license.



Headquarters

500 Old Connecticut Path | Framingham, MA 01701 USA
Phone 508-383-7700
sciex.com

International Sales

For our office locations please call the division headquarters or refer to our website at sciex.com/offices