

Quantifizierung von mAb und ADC mit SEC und einer wässrigen mobilen Phase

Das Agilent 1260 Infinity bioinerte Quaternäre LC-System und die AdvanceBio SEC-Säule mit 300 Å, 2,7 µm

Application Note

Biologika und Biosimilars

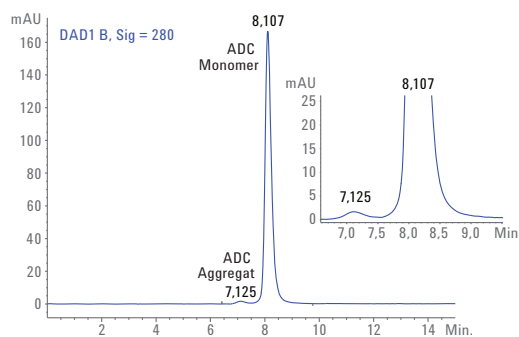
Autor

M. Sundaram Palaniswamy
Agilent Technologies Pvt Ltd
Bangalore, Indien

Zusammenfassung

Die Größenausschlusschromatographie (SEC) ist ein wichtiges Werkzeug zum Nachweis von Monomeren, Dimeren, Aggregaten und möglichen Abbauprodukten in Proben biotherapeutischer Proteine, wie zum Beispiel monoklonaler Antikörper und ihrer Derivate. Da die Bildung von Aggregaten als entscheidendes Qualitätskriterium gilt, ist deren Quantifizierung erforderlich.

In dieser Application Note wird eine einfache und empfindliche Methode beschrieben, mit der sich Aggregate von biotherapeutischen mAb und Antikörper-Arzneimittel-Konjugaten (ADC) mithilfe einer AdvanceBio SEC-Säule mit 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm, und einer Agilent 1260 Infinity bioinerten Quaternären LC quantifizieren lassen. Bei dieser Methode wird dieselbe wässrige mobile Phase ohne Zusatz von organischem Modifier für die Analyse des mAb und des stärker hydrophoben ADC verwendet. Mit der optimierten Methode konnten darüber hinaus auch durch pH- und Temperaturstress induzierte Aggregate und Abbauprodukte nachgewiesen werden. Diese einfache und reproduzierbare Methode ist gepaart mit der Korrosionsbeständigkeit des Geräts für routinemäßige Qualitätssicherungs- und Qualitätskontrollanalysen von mAb und ADC in der biopharmazeutischen Industrie geeignet.



Agilent Technologies

Einführung

Therapeutische Proteine unterliegen der Aggregation und Degradation während sämtlicher Phasen der Entwicklung, wie beispielsweise Expression, Neufaltung, nachgelagerte Prozessierung, Formulierung, Sterilisation und Lagerung. Darüber hinaus verstärkt die Kopplung (des Antikörpers) mit einer hydrophoben „Nutzlast“ (dem Wirkstoff) zur Bildung des ADC die Hydrophobie-getriebene Aggregation. Zwar liegen Aggregate und Abbauprodukte nur in niedrigen Konzentrationen vor, sie können jedoch die Qualität von Biologika stark beeinflussen und unter anderem zu Aktivitätsverlust, verringerter Löslichkeit und erhöhter Immunogenität führen. Die Größenausschlusschromatographie ist die Standardmethode zur Untersuchung der Proteinaggregation. Hier beschreiben wir die Vorteile der Agilent AdvanceBio SEC-Säule mit 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm bei der Trennung, Quantifizierung und Kontrolle der Integrität eines therapeutischen mAb und eines ADC. AdvanceBio SEC-Säulen repräsentieren eine bahnbrechende Technologie bei der SEC-Analyse. Die Säulen, die von Agilent mit innovativen Kieselgelpartikeln und mithilfe einer einzigartigen Bindungschemie hergestellt werden, sind für die Auflösung und größenabhängige Trennung einer Vielzahl unterschiedlicher Probenarten ohne Zusatz von organischem Modifier konzipiert. Auf diese Weise kann bei der Analyse monoklonaler Antikörper und stärker hydrophober ADC dieselbe wässrige mobile Phase verwendet werden.

Material und Methoden

Gerät

Wir verwendeten ein vollständig biokompatibles Agilent 1260 Infinity bioinertes quaternäres LC-System mit einem Maximaldruck von 600 bar, das aus den folgenden Modulen bestand:

- Agilent 1260 Infinity bioinerte Quaternäre LC-Pumpe (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity bioinertes Hochleistungsprobengeber (G5667A)
- Agilent 1200 Infinity Serie Thermostat (G1330B)
- Agilent 1260 Infinity thermostatisierter Säulenofen (TCC) mit bioinerten einklickbaren Heizelementen (G1316C, Option 19)
- Agilent 1260 Infinity DAD VL (G1315D mit bioinertem Standarddurchflussszelle, 10 mm)

Software

Agilent ChemStation Version B.04.03 (oder höher)

Bedingungen

Säule: Agilent AdvanceBio SEC, 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm (Best.-Nr. PL1180-5301)
Mobile Phase: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), 50 mM Natriumphosphat mit 150 mM Natriumchlorid, pH 7,4
TCC-Temp.: Umgebungstemperatur
Inj. Vol.: 10 µl
Flussrate: 0,8 ml/min
Detektion: UV, 220 und 280 nm

Reagenzien, Proben und Materialien

Trastuzumab und Antikörper-Arzneimittel-Konjugat (T-DM1) wurden in einer örtlichen Apotheke gekauft und entsprechend den Herstelleranweisungen gelagert. PBS, Salzsäure und Natriumhydroxid wurden von Sigma-Aldrich, Corp. bezogen. Sämtliche Chemikalien und Lösemittel hatten HPLC-Qualität und es wurde hochreines Wasser aus einem Milli-Q-Wasseraufreinigungssystem (Millipore Elix 10, USA) verwendet.

Linearität und Bereich

Die Kalibrierungskurve wurde mit acht Standardkonzentrationen von Trastuzumab und ADC im Bereich von 15,625 bis 2000 µg/ml erstellt.

Quantifizierungsgrenze (LOQ) und Nachweisgrenze (LOD)

Trastuzumab und ADC (T-DM1) wurden für die Bestimmung von LOD und LOQ verwendet. Die Biomolekülkonzentration, die ein Signal/Rauschen-Verhältnis (S/N) von > 3 und von > 10 ergab, wurden als LOD bzw. als LOQ festgelegt.

Verfahren

Die mobile Phase (10 µl) wurde als Blindwert injiziert, gefolgt von den Proteinen, die in Triplikaten in den verschiedenen, im linearen Bereich gelegenen Konzentrationen aufgegeben wurden. Aus den Peakflächen und Retentionszeiten (RT) der einzelnen Konzentrationen wurden die Standardabweichung (SD) und die relative Standardabweichung (RSD %) berechnet. LOD und LOQ wurden anhand der Injektionen im niedrigen Linearbereich bestimmt. Zur Erstellung der Kalibrierungskurve für die Monomere wurde die durchschnittliche Peakfläche für die einzelnen Linearitätsbereiche gegen die Analytkonzentration aufgetragen.

Präparation von Trastuzumab- und ADC-Aggregaten

Trastuzumab- und ADC-Aggregate wurden durch Verdünnung der monoklonalen Antikörper in mobiler Phase auf eine Endkonzentration von 2 mg/ml hergestellt. Experimente mit pH-Stress wurden wie in [1] beschrieben durchgeführt, mit kleinen Änderungen. In Kürze: 1 M HCl wurde tropfenweise zu den gelösten Proben gegeben, um den pH-Wert von 6,0 auf 1,0 zu senken. Dann wurde 1 M NaOH zugegeben, um den pH-Wert auf 10,0 anzuheben. Zum Schluss wurde wieder 1 M HCl zugegeben, um den pH-Wert auf 6,0 einzustellen. Zwischen den pH-Verschiebungen lag jeweils eine Wartezeit von etwa einer Minute, in der die Proben konstant bei 500 Upm gerührt wurden. Die erhaltene Lösung wurde 60 Minuten lang bei 60 °C inkubiert.

Ergebnisse und Diskussion

Trennung und Nachweis

Bei der Quantifizierung von Monomeren, Dimeren und höheren Aggregaten mittels SEC ist entscheidend, dass die mobile Phase die Probenzusammensetzung nicht beeinflusst. Da die Umgebungsbedingungen das Ausmaß der Aggregation verändern können, ist es wichtig, die SEC-Trennung in einer wässrigen mobilen Phase bei neutralem pH-Wert und niedriger Salzkonzentration durchzuführen. Abbildung 1 zeigt die hervorragende Trennung von intaktem therapeutischem Trastuzumab-mAb mit der AdvanceBio SEC-Säule innerhalb von 15 Minuten unter Chromatographiebedingungen, die häufig für Proteine angewendet werden: phosphatgepufferte Kochsalzlösung bei pH 7,4. Der Peak war symmetrisch und eluierte bei einer Retentionszeit, die mit dem Molekulargewicht eines mAb vereinbar ist, was darauf hinweist, dass die Trennung nach der Größe erfolgte und keine sekundären Wechselwirkungen auftraten. Abbildung 1 zeigt auch eine Ausschnittvergrößerung, bei der das Vorliegen einer geringen Menge von Aggregaten erkennbar ist. Das Fehlen eines früher oder später eluierender Peaks weist darauf hin, dass die käufliche mAb-Präparation homogen war und keinerlei Aggregation oder Verschleiß vorlag.

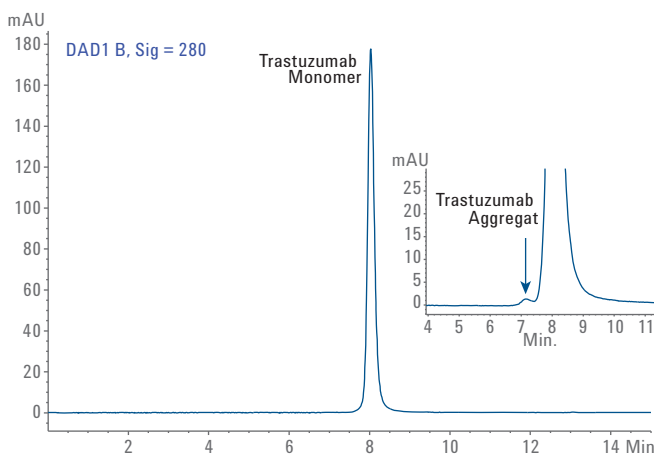


Abbildung 1. SEC-Profil von intaktem Trastuzumab (A) und vergrößerter Ausschnitt (B), der Aggregate zeigt; Analyse auf der Agilent AdvanceBio SEC-Säule mit 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

Größenausschlusschromatographie von ADC

Die meisten publizierten Methoden für die SEC-Analyse von ADC mit wässrigen Phasen auf handelsüblichen SEC-Säulen führten zu einer mangelhaften Peakform und unvollständigen Trennung der Aggregate vom monomeren Konjugat. Dieser Effekt war die Folge nicht-spezifischer Wechselwirkungen des konjugierten hydrophoben Wirkstoffs mit der stationären Phase. Wie gezeigt wurde, konnte dieser Effekt durch Zugabe von 15 % 2-Propanol vermieden werden [2]. Bei der Analyse des ADC T-DM1 auf der AdvanceBio SEC-Säule mit PBS als wässriger mobiler Phase wurden symmetrische Peaks und eine bessere Auflösung von Monomer und Aggregat erreicht, was darauf hinweist, dass zwischen dem hydrophoben Arzneimittel und der stationären Phase keine nicht-spezifischen Wechselwirkungen auftraten (Abbildung 2).

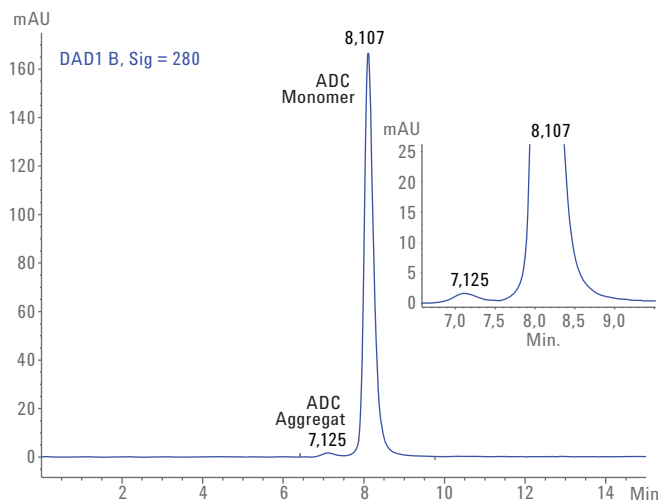


Abbildung 2. SEC-Profil von intaktem T-DM1 (ADC) auf einer Agilent AdvanceBio SEC-Säule mit 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm unter Verwendung von PBS, pH 7,4, als mobile Phase.

Präzision von Retentionszeit und Peakfläche

Tabelle 1 zeigt die durchschnittlichen Retentionszeiten und Peakflächen bei einer Analyse von jeweils sechs Replikaten des Trastuzumab-mAb und eines ADC sowie die zugehörigen Standardabweichungen. Die Standardabweichung der Retentionszeit und der Peakfläche betrug weniger als 0,04 % bzw. 1 %, was die hervorragende Reproduzierbarkeit der Methode und damit die Präzision des Systems belegt.

Tabelle 1. Retentionszeit- und Peakflächengenauigkeit (n = 6)

Probe	Retentionszeit		Peakfläche	
	Mittel (min)	RSD	Mittel (mAU/min)	RSD
Trastuzumab-Innovator	8,034	0	100	0
ADC	8,106	0,005	98,91	0,33

Nachweisgrenze und Quantifizierungsgrenze

Die LOD und die LOQ lagen bei 15 µg/ml bzw. 31 µg/ml für Trastuzumab und ADC, was auf die Empfindlichkeit der Methode hinweist. Die beobachteten LOD- und LOQ-Werte von Trastuzumab und ADC sind in Tabelle 2 aufgeführt, und die Überlagerung der LOD- und LOQ-Chromatogramme mit dem Blindwert sind in Abbildung 3 gezeigt.

Tabelle 2. Ergebnisse für LOD, LOQ und S/N (n = 3)

Konzentration (µg/ml)	S/N	Fläche (θ)
Trastuzumab		
15,625 (LOD)	7,8	12,62
31,25 (LOQ)	21,4	29,16
62,5	32,7	60,74
ADC		
15,625 (LOD)	10,5	15,20
31,25 (LOQ)	15,5	37,89
62,5	37,9	80,24

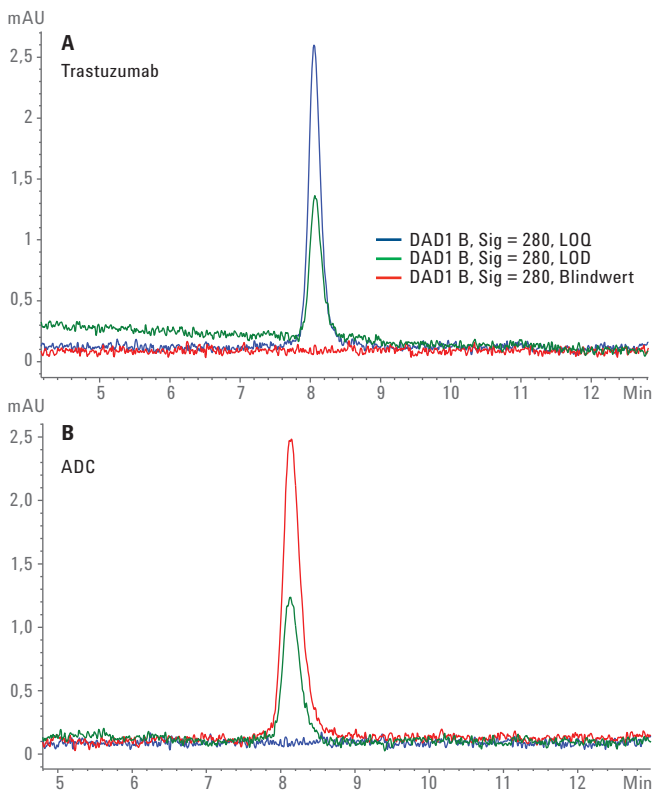


Abbildung 3. LOD- und LOQ-Chromatogramme von Trastuzumab und ADC; Überlagerung mit Blindwert.

Linearität

Die Linearitätskurven für Trastuzumab und ADC wurden aus der Flächen-Response und der Trastuzumab- bzw. der ADC-Konzentration innerhalb des Bereichs von der LOQ bis zur höchsten in der Studie verwendeten Konzentration erstellt. Die Genauigkeitsergebnisse sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Linearitätskurve für Trastuzumab- bzw. das ADC im Konzentrationsbereich von 12,5 bis 2000 µg/ml ist in Abbildung 4 gezeigt.

Tabelle 3. Zusammenfassung: Linearitätsbereich (n = 3) für Trastuzumab und ADC.

Trastuzumab		ADC	
Konzentration (µg/ml)	Fläche (θ)	Konzentration (µg/ml)	Fläche (θ)
15,625	16,4	15,625	22,6
31,25	30,6	31,25	37,9
62,5	64,4	62,5	91,2
125	140,7	125	178,8
250	277	250	348,4
500	538,2	500	704,7
1000	1095	1000	1400
2000	2179	2000	2821

Analyse der Aggregation und Degradation

Wir verglichen Trastuzumab und ADC in nativem Zustand und nach Temperatur- und pH-Stress mittels SEC, um Aggregate und Abbauprodukte nachzuweisen. Alle Peaks, die bei der chromatographischen Trennung vor der Monomerform eluierten, wurden als Aggregate angesehen, alle, die später eluierten, als Abbauprodukte [3].

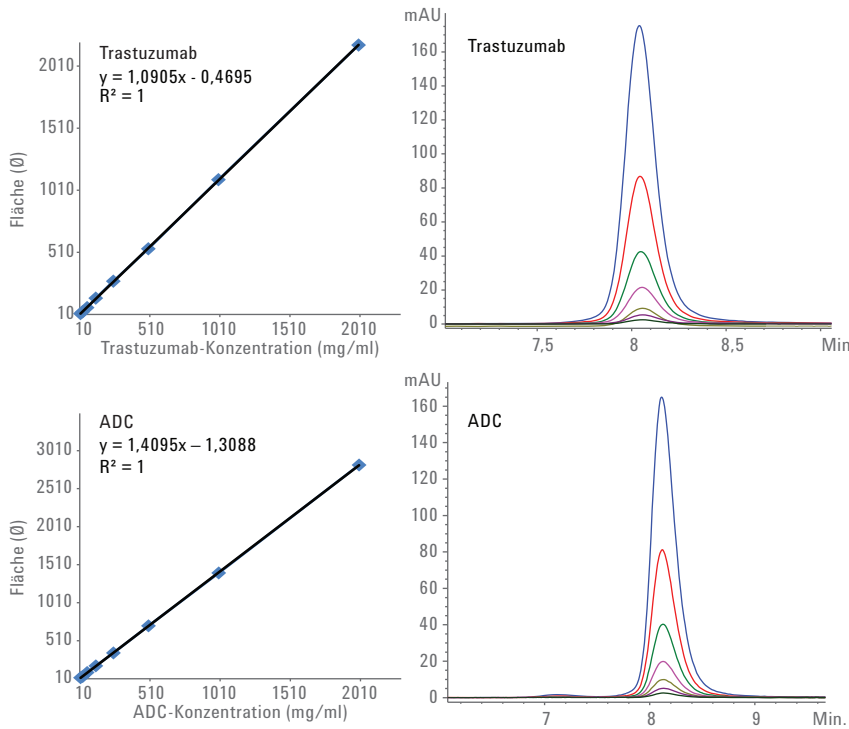


Abbildung 4. Linearitätskurven von Trastuzumab und ADC mit acht Standardkonzentrationen von 15,62 bis 2000 µg/ml mit hervorragenden Linearitätskoeffizienten. Ebenfalls gezeigt ist die Überlagerungen der Chromatogramme für die Linearitätsbereiche.

Die in Abbildung 5 und 6 gezeigten Chromatogramme der pH- bzw. Wärme-induzierten Aggregate zeigen, dass mit der AdvanceBio SEC-Säule sowohl aggregiertes als auch abgebautes Trastuzumab und ADC getrennt und nachgewiesen werden konnte. Intakte Moleküle, Aggregate und Abbauprodukte wurden klar voneinander getrennt.

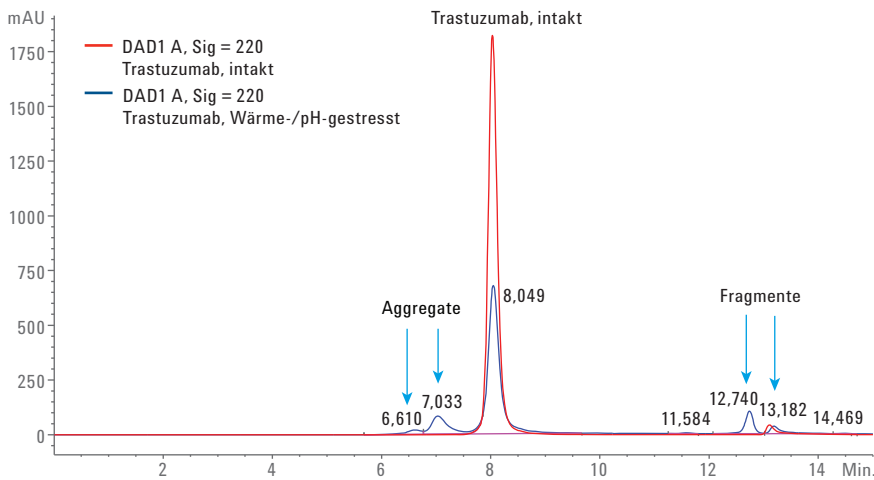


Abbildung 5. Chromatogramm von nativem Trastuzumab (Kontrolle; rote Spur) überlagert mit dem von 2 mg/ml wärme- und pH-gestresstem Trastuzumab, erstellt mit einer Agilent AdvanceBio SEC-Säule mit 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

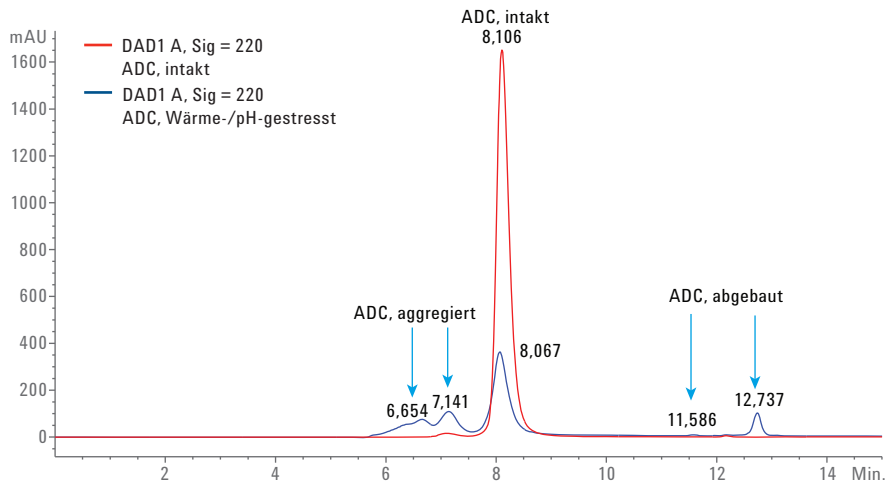


Abbildung 6. Chromatogramm von nativem ADC (Kontrolle; rote Spur) überlagert mit 2 mg/ml des wärme- und pH-gestresstem ADC, erstellt mit einer Agilent AdvanceBio SEC-Säule mit 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

Quantifizierung der Aggregations- und Abbauprodukte von Trastuzumab und ADC

Die Quantifizierung der relativen prozentualen Anteile der Aggregate und Abbauprodukte von Trastuzumab und ADC auf Grundlage der Peakfläche ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

Die Daten zeigen einen deutlichen Anstieg des Anteils an Aggregaten und Abbauprodukten von Trastuzumab und ADC parallel zu einer Abnahme der monomeren Formen auf 71 % bzw. 54 %. Diese Ergebnisse sind vielversprechend, müssen aber noch durch Daten zur biologischen Aktivität ergänzt werden, sodass auch der mit der Aggregation und Degradation einhergehende Wirksamkeitsverlust beurteilt werden kann.

Tabelle 4. Retentionszeit und Peakfläche für Monomere, Aggregate und Fragment von Trastuzumab und ADC

Trastuzumab, intakt		Trastuzumab, „gestresst“	
Retentionszeit (min)	Fläche %	Retentionszeit (min)	Fläche %
7,14	0,140	6,61	2,8
8,034	96,8	7,033	13,26
13,10	3,0	8,03	71,83
		12,74	7,65
		13,18	4,0
ADC, intakt		ADC, „gestresst“	
Retentionszeit (min)	Fläche %	Retentionszeit (min)	Fläche %
7,115	2	6,654	19
8,106	97,8	7,141	17,8
		8,06	54,92
		11,58	0,2
		12,73	7,5
		14,46	0,2

Schlussfolgerungen

Wir haben verschiedene hervorragende Werkzeuge für die Methodenentwicklung und die Kontrolle von Reinheit und Stabilität des therapeutischen mAb Trastuzumab und des ADC T-DM1 vorgestellt. Als Erstes verwendeten wir die Agilent AdvanceBio SEC-Säule, um eine einfache, hochauflösende Methode zur Trennung von mAb zu entwickeln. Bemerkenswerterweise erlaubte die AdvanceBio SEC-Säule eine überlegene Trennung von hydrophoben ADC ohne Zusatz organischer Modifizier in der mobilen Phase. Die Retentionszeit- und Peakflächenpräzision der Methode waren ausgezeichnet, was für die Zuverlässigkeit der Methode spricht. Die Linearitätskurven mit acht mAb- und ADC-Standardkonzentrationen von 15 bis 2000 µg/ml wiesen erstklassige Linearitätskoeffizienten auf und belegen, dass die Methode eine zuverlässige und genaue Quantifizierung erlaubt. Die LOD und die LOQ für den mAb und das ADC betragen 15 µg/µl bzw. 25 µg/µl und weisen auf die Empfindlichkeit der Methode hin. Darüber hinaus ließ sich in Stressuntersuchungen mit dem mAb und dem ADC zeigen, dass mit der AdvanceBio SEC-Säule der Nachweis und die Trennung von Aggregaten und Abbauprodukten sowie deren Quantifizierung anhand des prozentualen Peakflächenanteils möglich ist. Diese einfache und reproduzierbare Methode bietet, in Kombination mit der Bioinertheit und Korrosionsbeständigkeit der Agilent 1260 Infinity bioinerten Quaternären LC, eine geeignete Lösung für die Qualitätssicherungs- und -kontrollanalyse von monoklonalen Antikörpern und ADC in der biopharmazeutischen Industrie.

Literatur

1. Başak Kükrer, B.; Filipe, V.; van Duijn, E.; Kasper, P. T.; Vreeken, R. J.; Heck, A. J. R.; Jiskoot, W. Mass Spectrometric Analysis of Intact Human Monoclonal Antibody Aggregates Fractionated by Size-Exclusion Chromatography. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 2197-2204.
2. Wakankar, A.; Yan Chen; Gokarn, Y.; Jacobson, F. S. Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates. *MABs* **2011**, *3:2*, 161-172.
3. Rodriquez-Diaz, R.; Wehr, T. Use of Size Exclusion Chromatography in Biopharmaceutical Development. In *Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development*; Rodriquez-Diaz, R., Wehr, T., Tuck, S., Eds.; CRC Press: New York, 2005.

Weitere Informationen

Diese Daten stellen typische Ergebnisse dar. Weitere Informationen zu unseren Produkten und Leistungen finden Sie auf unserer Website unter www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Agilent haftet weder für hierin enthaltene Fehler noch für Neben- oder Folgeschäden in Zusammenhang mit der Bereitstellung, Leistung oder Verwendung dieses Materials.

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
Gedruckt in den USA,
16. Oktober 2015
5991-6303DEE



Agilent Technologies