



Trennung und Quantifizierung von Rituximab-Aggregaten und -Fragmenten mit hochauflösender SEC

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

Application Note

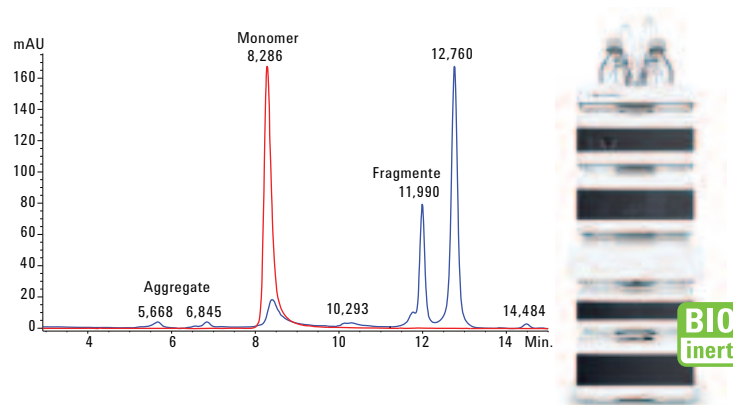
Biologika und Biosimilars

Autor

M. Sundaram Palaniswamy
Agilent Technologies Pvt Ltd
Bangalore, Indien

Zusammenfassung

Bei der Aggregation monoklonaler Antikörper spielen unterschiedliche Faktoren, wie z. B. Produkteigenschaften oder Umgebungseinflüsse, eine Rolle. Die Größenausschlusschromatographie (SEC) ist eine Standardmethode, mit der Aggregate und Fragmente in Therapeutika auf der Basis monoklonaler Antikörper nachgewiesen und quantifiziert werden können. Der Schwerpunkt dieser Application Note ist die hochauflösende Trennung und Quantifizierung intakter, aggregierter und fragmentierter Moleküle von Biosimilar- und Innovator-Rituximab im Rahmen von Forced-Stress-Experimenten. Die Trennung und Quantifizierung wurde mithilfe eines Agilent 1260 Infinity bioinerten quaternären LC-Systems und einer AdvanceBio SEC-Säule durchgeführt. Die Kalibrierung der Säule erfolgte mithilfe von Molekulargewichtsmarkern. Die AdvanceBio SEC-Säule ergab eine empfindliche und hochauflösende Trennung von Aggregaten und Abbauprodukten und ist daher ideal geeignet für Applikationen, bei denen hohe Auflösung und Empfindlichkeit wesentlich sind.



Agilent Technologies

Einführung

Die Größenausschlusschromatographie (SEC) ist eine weithin akzeptierte Methode zur Trennung von Monomeren therapeutischer mAb und ihrer Varianten mit niedrigerem (LMW) und höherem (HMW) Molekulargewicht. Mit der SEC können Monomere und ihre Varianten unter nativen Bedingungen durch differenzielle Diffusion in die Poren des Packungsmaterials auf der Grundlage ihrer Größe getrennt werden. Die erfolgreiche Entwicklung von mAb-basierten Pharmazeutika erfordert auch die Beurteilung der Aggregation und Fragmentierung in Experimenten mit forciertem Abbau, bei denen physikalische und chemische Abbauewege berücksichtigt werden. Die Größe spielt nämlich bei der Entwicklung von Biotherapeutika eine wichtige Rolle, da Aggregate möglicherweise die Immunogenität verstärken und die Sicherheit und Wirksamkeit beeinflussen. Es ist eine erhebliche Herausforderung, eine SEC-Methode zu finden, mit denen sich solche Varianten trennen und überwachen lassen. Hier demonstrieren wir die Vorteile einer solchen Methode, bei der eine Agilent AdvanceBio SEC-Säule zum Einsatz kommt, die im Rahmen der SEC-Analyse eine bahnbrechende Technologie repräsentiert. Durch ihre einzigartigen 2,7- μm -Silicapartikel und eine spezielle Bindungschemie ermöglicht diese Säule eine hochauflösende Trennung von mAb und ihren Massenvarianten. Die Retentionszeit und die Flächengenauigkeit der Methode sind ausgezeichnet und unterstreichen die Eignung der Säule und des bioinerten LC-Systems, die bei dieser Untersuchung verwendet wurden.

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 bioinert 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 Standarddurchflusszelle, 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

Innovator- und Biosimilar-Rituximab, Cetuximab, Trastuzumab und ADC 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.

Kalibrierung der AdvanceBio SEC-Säule

Die AdvanceBio SEC-Säule wurde durch Bestimmung der Elutionsvolumina verschiedener Standards kalibriert (Proteinaggregate, Thyreoglobulin (670 kDa), γ -Globulin (158 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Myoglobin (17 kDa) und Vitamin B12 (1,35 kDa). Der Logarithmus des Molekulargewichts der Standards wurde gegen das Elutionsvolumen aufgetragen und anhand der erhaltenen Kurve wurde das Molekulargewicht der Probe bestimmt.

Verfahren

Die mobile Phase (10 μl) wurde als Blindwert injiziert, gefolgt von sechs Replikaten intakter und Stressbedingungen ausgesetzter mAb, um Abweichungen hinsichtlich Fläche und Retentionszeit (RT) zu bestimmen.

Herstellung von Rituximab-Aggregaten

Aggregate von mAb wurden hergestellt durch Verdünnung von monoklonalen Antikörpern in mobiler Phase auf eine Endkonzentration von 2 mg/ml. Experimente mit pH-Stress wurden durchgeführt wie in [1] beschrieben, 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-Änderungen 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

Die AdvanceBio SEC 300-Å-Säule wurde mithilfe einer Reihe von Standardproteinen mit bekanntem Molekulargewicht kalibriert (Abbildung 1). Zur Ermittlung des Totvolumens wurden Standardproteinaggregate (Void-Peak) im Proteinmarker verwendet, die bei 5,748 Minuten von der Säule eluierten, was einem V_0 von 4,59 ml entspricht. Die Kalibrierungskurve der auf der Säule getrennten Proteine zeigt einen linearen Zusammenhang und definiert die Ausschlussgrenze (670 kDa) für den Größenbereich (1,3 bis 670 kDa) der analysierten Proteine (Abbildung 2). Das Molekulargewicht eines unbekannt Proteins kann dann mithilfe dieses Plots anhand seines Elutionsvolumens bestimmt werden.

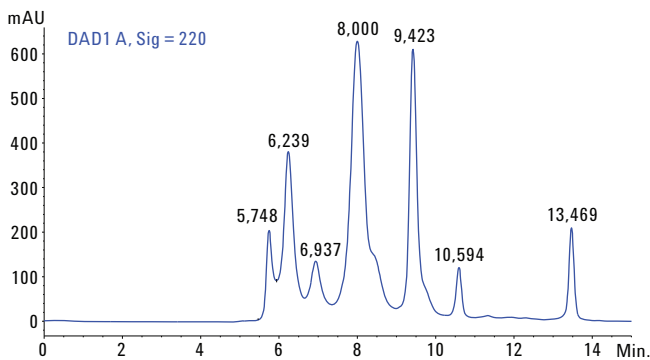


Abbildung 1. Trennung von Protein-Standards auf der Agilent AdvanceBio SEC-Säule mit 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

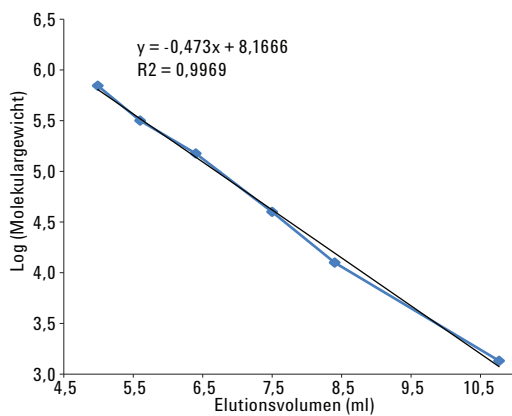


Abbildung 2. Kalibrierungskurve für Standards auf der Agilent AdvanceBio SEC-3-Säule mit 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

Abbildung 3 zeigt die hervorragende Trennung intakter mAb mit der AdvanceBio SEC 300 Å in 8 Minuten. Das Fehlen früher oder später eluierender Peaks weist darauf hin, dass die käuflichen mAb-Präparationen homogen waren und keinerlei Aggregation oder Abbau vorlag.

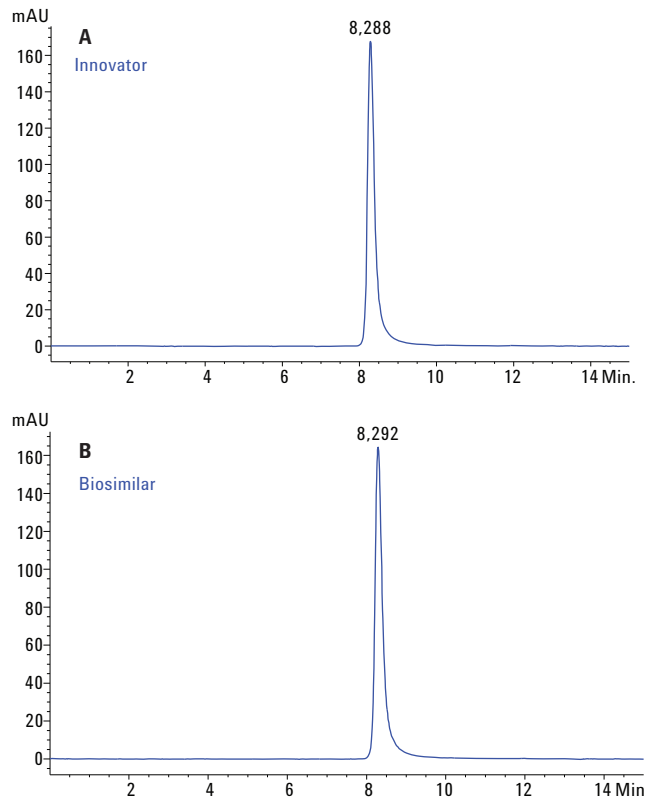


Abbildung 3. SEC-Profil intakter therapeutischer mAb auf der Agilent AdvanceBio SEC-Säule mit 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm: A: Rituximab-Innovator; B: Rituximab-Biosimilar.

In Abbildung 4 ist die Überlagerung von Biosimilar- und Innovator-Rituximab dargestellt, die einen scharfen und symmetrischen Peak ohne nicht-spezifische Wechselwirkungen zeigt. Tabelle 1 zeigt die durchschnittlichen Retentionszeiten und Peakflächen von sechs Replikaten der intakten mAb 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. Die Retentionszeiten des Biosimilars und des Innovator-Produkts waren vergleichbar. Darüber hinaus betrug die anhand der Peakflächen beurteilte Reinheit von Innovator-Produkt und Biosimilar > 99 %. Dies zeigt, dass die beiden mAb sehr ähnlich sind.

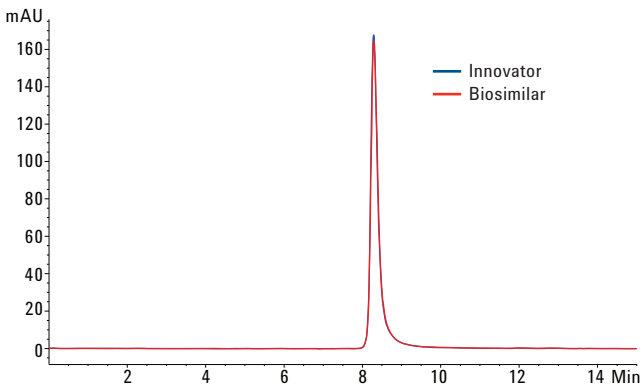


Abbildung 4. Überlagerung von Rituximab-Innovator und -Biosimilar, getrennt auf der Agilent AdvanceBio SEC-Säule mit 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

Tabelle 1. Retentionszeit und Peakflächengenauigkeit von Rituximab (n = 6).

Probe	Retentionszeit		Peakfläche	
	Mittel (min)	RSD	Mittel (mAU/min)	RSD
Innovator-Rituximab	8,28	0,04	99,33	1,21
Rituximab-Biosimilar	8,29	0	100	0

Analyse von Aggregation und Abbau und Quantifizierung

Wir verglichen die intakten und „gestressten“ Biosimilar- und Innovator-mAb mittels SEC zum Nachweis von Aggregaten und Abbauprodukten. Alle Peaks, die bei der chromatographischen Trennung vor der Monomerform eluierten, wurden als Aggregate angesehen, alle die später eluierten als Abbauprodukte [2].

Abbildung 5 zeigt die SEC-Profile des pH- oder Wärmegestressten Innovator- bzw. Biosimilar-Rituximab. Die Profile zeigen, dass die AdvanceBio SEC-Säule mit derselben Methode, die auch für die Analyse der intakten mAb verwendet wurde, aggregierte und abgebaute mAb getrennt hat. Die Quantifizierung der relativen prozentualen Anteile von Aggregaten und Fragmenten im Innovator-Produkt und im Biosimilar auf der Grundlage der Peakfläche ist in Tabelle 2 zusammengefasst.

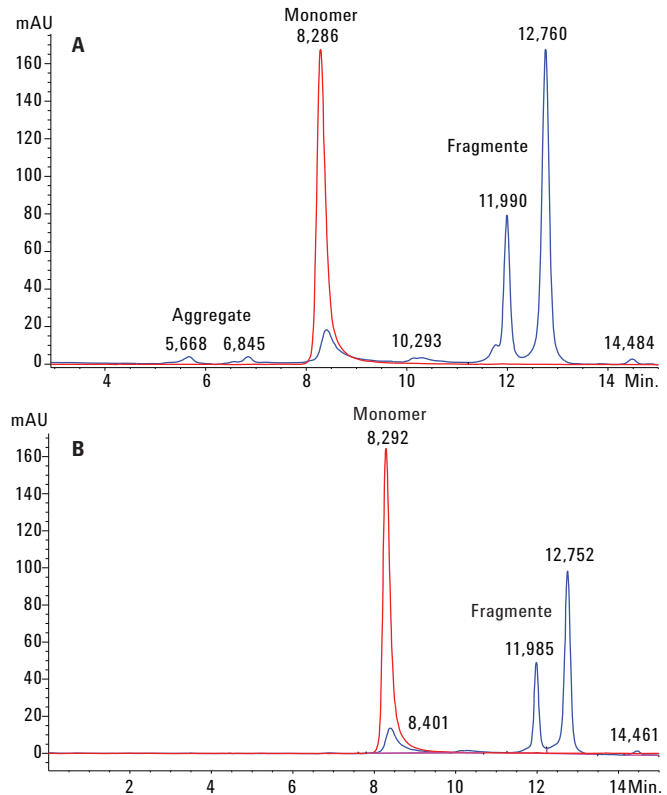


Abbildung 5. Agilent AdvanceBio SEC-Chromatogramm von (A) intaktem Rituximab-Innovator (rote Spur) überlagert mit pH-/Wärme-gestresster Probe (blaue Spur) und (B) intaktem Rituximab-Biosimilar (rote Spur) überlagert mit „gestresster“ Probe.

Tabelle 2. Relative Peakflächen von intaktem und gestresstem Innovator- und Biosimilar-Rituximab in Prozent.

Intaktes Innovator-Produkt		„Gestresstes“ Innovator-Produkt	
Zeit	Fläche %	Zeit	Fläche %
8,288 (Monomer)	100	1,289	4,24
		5,668	2,26
		6,845	2
		8,40 (Monomer)	13,6
		10,29	2,81
		11,99	23,22
		12,76	51,01
		14,48	1,11
Intaktes Biosimilar		„Gestresstes“ Biosimilar	
Zeit	Fläche %	Zeit	Fläche %
8,292 (Monomer)	100	8,40 (Monomer)	16,832
		11,985	24,24
		12,75	57,36
		14,46	1,5

Interessanterweise sind die relativen Peakflächen der durch Stress erzeugten Aggregatspezies im Fall des Innovator-mAb größer als beim Biosimilar. Das Fragmentierungsmuster und die Peakflächen der Fragmente sind bei den beiden mAb vergleichbar. Der Anteil der Monomerform betrug, nachdem Innovator-Produkt und Biosimilar Stress ausgesetzt worden waren, 13 % bzw. 16 %, während die vorherrschende Form (> 50 %) bei beiden mAb Fragmente waren, die nach etwa 12,75 Minuten eluierten.

Schließlich wurden noch Analysen einzelner Injektionen von Proben vorgenommen, um zu testen, wie gut die AdvanceBio SEC-Säule kommerzielle monoklonale Antikörper und ADC mit sehr ähnlichem Molekulargewicht trennt. Abbildung 6 zeigt die Überlagerungen. Die AdvanceBio SEC-Säule trennte, wie aus den deutlichen Unterschieden zwischen den Retentionszeiten ersichtlich, therapeutische mAb und ADC entsprechend ihrer Molekülmasse, was die Eignung dieser Säule für die Analyse solcher Moleküle belegt.

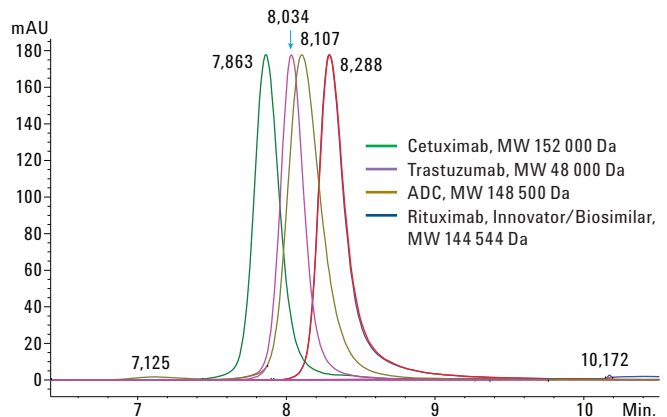


Abbildung 6. Überlagerung von Rituximab-Innovator/-Biosimilar, Trastuzumab, Cetuximab und ADC, getrennt auf einer Agilent AdvanceBio SEC-Säule mit 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

Schlussfolgerungen

Die Entwicklung mAb-basierter Produkte ist ein komplexer Prozess und schließt eine Vielzahl physikalisch-chemischer Analyseschritte zur Bestimmung von Reinheit, Aggregation und anderen produktbezogenen Eigenschaften ein. Die Größenausschlusschromatographie wird zum Nachweis und zur Quantifizierung von Monomer-, HMW- und LMW-Spezies unter nativen Bedingungen häufig eingesetzt. In dieser Arbeit wurde die Agilent AdvanceBio SEC-Säule 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm zur Entwicklung einer einfachen Methode für die Trennung intakter und „gestresster“ Rituximab-Proben unter nativen Bedingungen verwendet. Bei der optimierten Methode eluierte das Monomer als einzelner symmetrischer Peak mit einem Reinheitsgrad von 100 % und ohne Anzeichen für Aggregate oder Fragmente. Mit derselben Methode konnten bei Stress-Experimenten erhaltene Aggregate und Fragmente aufgelöst und quantifiziert werden. Dies bietet nur eine Säule wie die AdvanceBio SEC, die eine hochauflösende und empfindliche Trennung von mAb und ihren Massenvarianten erlaubt. Darüber hinaus sorgt das Agilent 1260 Infinity bioinerte quaternäre LC-System für die erforderliche Biolnertheit und Korrosionsresistenz.

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. Rodriguez-Diaz, R.; Wehr, T. Use of Size Exclusion Chromatography in Biopharmaceutical Development. In *Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development*; Rodriguez-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
5991-6304DEE



Agilent Technologies