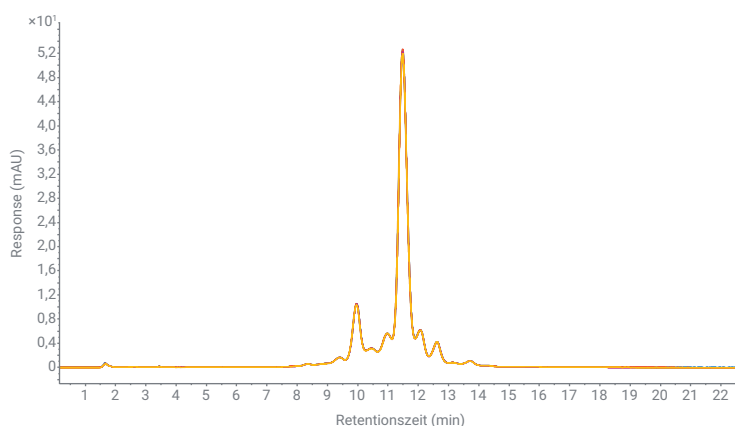


Benötigen Sie ein wirklich flaches Gradientenprofil?

Optimierung der Ladungsvariantenanalyse
monoklonaler Antikörper mit dem Agilent 1290
Infinity II Bio LC-System



Autor

Sonja Schneider
Agilent Technologies, Inc.

Zusammenfassung

Die Ladungsvariantenanalyse ist eine anspruchsvolle Anwendung für Systeme für die angewandte Flüssigkeitschromatographie, da für eine optimale Trennung hochkorrosive salzhaltige Pufferlösungen in Kombination mit sehr flachen Gradienten verwendet werden. Mit dem Agilent 1290 Infinity II Bio LC-System wurde eine Untersuchung verschiedener Salzgradienten durchgeführt und hinsichtlich Auflösung sowie Reproduzierbarkeit ausgewertet.

Das 1290 Infinity II Bio LC-System mit Hochgeschwindigkeitspumpe und vollständig eisenfreiem Flussweg ist für die in der Biochromatographie verwendeten Bedingungen optimal geeignet, weil potenzielle Korrosionsschäden am System vermieden werden. Es wurde eine hervorragende Reproduzierbarkeit auch bei sehr schwierigen flachen Gradienten festgestellt, was das 1290 Infinity II Bio LC-System als Agilent High-End-Flüssigkeitschromatographiesystem der nächsten Generation für den Erhalt von Daten mit hoher Zuverlässigkeit bestätigt.

Einführung

Monoklonale Antikörper (mAbs) sind große und sehr heterogene Makromoleküle mit einer Größe von etwa 150 kDa. Sie werden typischerweise durch Rekombinationsverfahren im Rahmen eines komplexen Biosyntheseprozesses erzeugt, in dem viele Modifikationen auftreten können, die zu Hunderten verschiedener Varianten führen. Zu den häufigsten posttranslationalen Modifikationen (PTMs) zählen Desamidierung, Oxidation, Disulfidbrücken, N-Glykosylierung sowie die N- und die C-terminale Prozessierung. Alle diese Modifikationen können bereits während der Erzeugung auftreten, aber auch Produktion und Lagerung tragen zur Komplexität dieser Makromoleküle bei. PTMs bilden ein komplexes Profil von Isoformen, das eingehend analysiert und überwacht werden muss, da Modifikationen im Arzneimittel-Endprodukt mit einem Verlust der biologischen Aktivität, einer geringeren Halbwertszeit oder mit Immunogenität verbunden sein können.¹ Manche PTMs führen zu Ladungsvarianten des Moleküls, die üblicherweise mittels Ionenaustauschchromatographie (IEX) analysiert werden.² Da Ladungsvarianten als eines der wichtigsten kritischen Qualitätsmerkmale (CQAs) gelten, sind strenge Akzeptanzkriterien und Qualitätskontrollen zu berücksichtigen. Dabei kommt der Bestätigung der korrekten Herstellung des Produkts und der Identifizierung und Quantifizierung etwaiger Verunreinigungen größte Bedeutung zu.

Bei der IEX von Proteinen findet häufig eine Elution mit flachen Gradienten statt. Ein typischer Salzgradient im Ionenstärke-Modus für die Elution von Proteinen wäre ungefähr 1 bis 3 mM/min mit einem pH-Wert, der eine Toleranz von $\pm 0,02$ pH-Einheiten aufweist.³

Das 1290 Infinity II Bio LC-System ist mit einer hochleistungsfähigen Hochgeschwindigkeitspumpe ausgestattet. Binäre Pumpen haben vor allem den Vorteil, dass das Mischen von Lösemitteln viel genauer und präziser ist, wenn eine der Lösemittelkomponenten in geringer Menge zugemischt wird, als bei Niederdruck-Mischpumpen (z. B. quaternären Pumpen). Durch diese Art des Mischens werden zu Beginn und am Ende eines Lösemittelgradienten hochpräzise Lösemittelzusammensetzungen erhalten.⁴ Dies ist eine der Voraussetzungen für die Erzeugung reproduzierbarer und genauer flacher Gradienten (unter 1 %/min aus jedem Kanal).

Das 1290 Infinity II Bio LC-System stellt die nächste Generation von Agilent High-End-Flüssigkeitschromatographiesystemen dar, die speziell für die Bedingungen in der Biochromatographie entwickelt wurden: hohe Salzkonzentrationen wie beispielsweise 2 M NaCl, bis zu 8 M Harnstoff sowie Lösemittel mit hohem und niedrigem pH-Wert, zum Beispiel 0,5 M NaOH oder 0,5 M HCl. Der gesamte Flussweg ist gänzlich frei von Edelstahl (SST) oder Eisen. Alle Kapillaren und Fittings des Mehrfachprobengebers, des Thermostats für mehrere Säulen und der Detektoren bestehen aus MP35N, einer Nickel-Kobalt-Legierung. Mit diesem Material wird die potenzielle Korrosion durch Puffer mit hoher Salzfracht verringert und Proteinmodifikationen infolge des Vorhandenseins von Eisenionen (z. B. Oxidation, Proteinkomplexbildung) lassen sich vermeiden.

In dieser Application Note wird die Analyse von Ladungsvarianten von Trastuzumab und des NISTmAb-Referenzstandards vorgestellt. Es wurden unterschiedlich steile Salzgradienten getestet, um die bestmögliche Auflösung zu finden. Anschließend wurden die am besten geeigneten Gradientensteilheiten hinsichtlich der Reproduzierbarkeit untersucht.

Experimentelles

Geräte

Das Agilent 1290 Infinity II Bio LC-System bestand aus den folgenden Modulen:

- Agilent 1290 Infinity II Bio Hochgeschwindigkeitspumpe (G7132A).
- Agilent 1290 Infinity II Bio Mehrfachprobengeber (G7137A) mit Probenthermostat (Option 101).
- Agilent 1290 Infinity II Thermostat für mehrere Säulen (G7116B) mit dem Standardfluss-biokompatiblen Wärmetauscher.
- Agilent 1290 Infinity II variabler Wellenlängendetektor (G7114B) mit einer biokompatiblen Mikrodurchflussszelle, 3 mm, 2 μ l.

Software

Agilent OpenLab CDS Version 2.5

Säulen

Bio MAb, NP5, 2,1 $\times$ 250 mm, PEEK (Bestellnummer 5190-2411)

Chemikalien

Alle Lösemittel waren LC-Qualität. Frisches Reinstwasser wurde einem Milli-Q Integral System entnommen, das mit einer Entnahmekartusche mit 0,22- μ m-Membran (Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA) ausgestattet war. Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, dibasisches Natriumphosphat-Heptahydrat und Natriumchlorid stammten von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland).

Proben

- Agilent NIST-mAb (Bestellnummer 5191-5744).
- Der unter der Bezeichnung Herceptin im Handel erhältliche humanisierte monoklonale Antikörper. Trastuzumab stammte von Roche (Basel, Schweiz).
- Trastuzumab wurde in 30 mM Phosphatpuffer, pH 6,8 gelöst.

Pufferherstellung

Für 2 l 30 mM Phosphatpuffer, pH 6,8, wurden 4,45 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat und 7,44 g dibasisches Natriumphosphat-Heptahydrat in eine 2-l-Flasche aus Braunglas eingewogen und mit Reinstwasser auf 2 l aufgefüllt (→Puffer A). In eine leere 1-l-Flasche aus Braunglas wurden 29,22 g Natriumchlorid eingewogen (Gesamtkonzentration 500 mM) und mit dem hergestellten Phosphatpuffer A auf 1 l aufgefüllt (→Puffer B). Die pH-Werte beider hergestellten Puffer wurden überprüft und gegebenenfalls auf pH 6,8 eingestellt (die Zugabe hoher Salzmengen kann den pH-Wert verändern). Beide hergestellten Puffer wurden durch einen 0,2-µm-Membranfilter filtriert.

Methode

Siehe Tabelle 1.

Hinweis: Bei Verwendung konzentrierter Salzlösungen als Elutionsmittel empfiehlt es sich, in der Pumpenmethode die entsprechenden Lösemitteltypen einzustellen. Für Lösemittel B mit 500 mM Natriumchlorid sollte in der Pumpenmethode im Feld zur Auswahl des Lösemittels zum Beispiel „Sodium Chloride 0.5 M“ anstelle von *Generic Aqueous* oder *Water* verwendet werden. Hohe Salzmengen verändern die Kompressibilität des Lösemittels. Für eine optimale Pumpenleistung empfiehlt sich daher die Verwendung der vorkonfigurierten Lösemitteltabellen.

Ergebnisse und Diskussion

Methodenentwicklung

Um die gewünschte Auflösung zu erreichen und eine optimale Trennung zu ermöglichen, ist für die Ladungsvariantenanalyse eine umfangreiche Methodenentwicklung erforderlich. Für den Erfolg sind zwei Parameter entscheidend: der optimale pH-Wert und die optimale Gradientensteilheit. Beide Faktoren können großen Einfluss auf die Trennung haben. Zunächst wird ein pH-Scouting empfohlen, um den optimalen pH-Wert für die Trennung zu ermitteln. In früheren Experimenten wurde der pH-Wert der verwendeten Puffer im Bereich von pH 6,4 bis 7,4 untersucht, wobei sich für beide verwendeten Proben, d. h. Trastuzumab und den NISTmAb-Referenzstandard, ein pH von 6,8 als optimal erwies (Daten nicht gezeigt). Der nächste Schritt ist die Bestimmung der idealen Gradientensteilheit, um eine effiziente Trennung zu ermöglichen.

Tabelle 1: Salzgradienten-Chromatographiebedingungen.

Parameter	Wert
Lösemittel	A) 30 mM Phosphatpuffer, pH 6,8, B: 30 mM Phosphatpuffer, pH 6,8, 500 mM Natriumchlorid
Gradient	0 oder 25 mM–150 mM NaCl in 30 Minuten – verschiedene flache Gradienten für die Methodenentwicklung 0 mM (Trastuzumab) und 25 mM (NIST) bis 100 mM NaCl in 30 Minuten zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit 25 bis 50 mM NaCl in 30 Minuten zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit (sehr flacher Gradient) 31 Minuten–Spülen mit 500 mM NaCl Stoppzeit: 35 Minuten Nachlaufzeit: 15 Minuten
Flussrate	0,200 ml/min
Temperatur	30 °C
Detektion	280 nm 10 Hz
Injektion	Injektionsvolumen: 3 µl für Trastuzumab und 2 µl für NIST Proben temperatur: 10 °C Nadelspülung: 3 s in Wasser

Abb. 1 zeigt übereinander dargestellte Ladungsvariantenanalysen von Trastuzumab bei verschiedenen Gradientensteilheiten im Bereich von 1 % B/min (5 mM/min) bis 0,33 % B/min (1,66 mM/min). Je flacher der Gradient ist, desto höher sind die Anforderungen an die Leistungsmerkmale der Pumpe. Um hochpräzise Lösemittelzusammensetzungen in dem Gradienten bereit zu stellen, muss die Pumpe beim Mischen kleiner Anteile der Lösemittelkomponenten sehr genau arbeiten. Allerdings ist zu bedenken, dass gerade bei Salzgradienten sehr flache Gradienten nicht immer zu einer höheren Auflösung führen, sondern lediglich die Peakbreite erhöhen (z. B. 0,33 % B/min in Abb. 1). Daher lag die für Reproduzierbarkeitsstudien gewählte Gradientensteilheit in der Mitte der getesteten Gradienten mit 0,66 % B/min und 3,3 mM/min, was immer noch relativ flach ist.

Für die Trennung von Ladungsvarianten des NISTmAb-Referenzstandards wurde eine ähnliche Methode entwickelt (siehe Abb. 2). Die Ausgangsbedingungen für NIST erforderten aufgrund des höheren isoelektrischen Punktes (pI) des NIST-Antikörpers (pI ~9,2) im Vergleich zu Trastuzumab (pI ~9) eine etwas höhere Salzmenge. Für eine effektivere Trennung der Ladungsvarianten des NISTmAb-Referenzstandards waren die Gradienten im Vergleich zu Trastuzumab etwas flacher, sodass der flachste Gradient 0,17 % B/min (0,83 mM/min) betrug und damit für die Pumpe eine Herausforderung darstellte. Für weitere Reproduzierbarkeitsstudien wurde eine Gradientensteilheit von 0,5 % B/min (2,5 mM/min) gewählt.

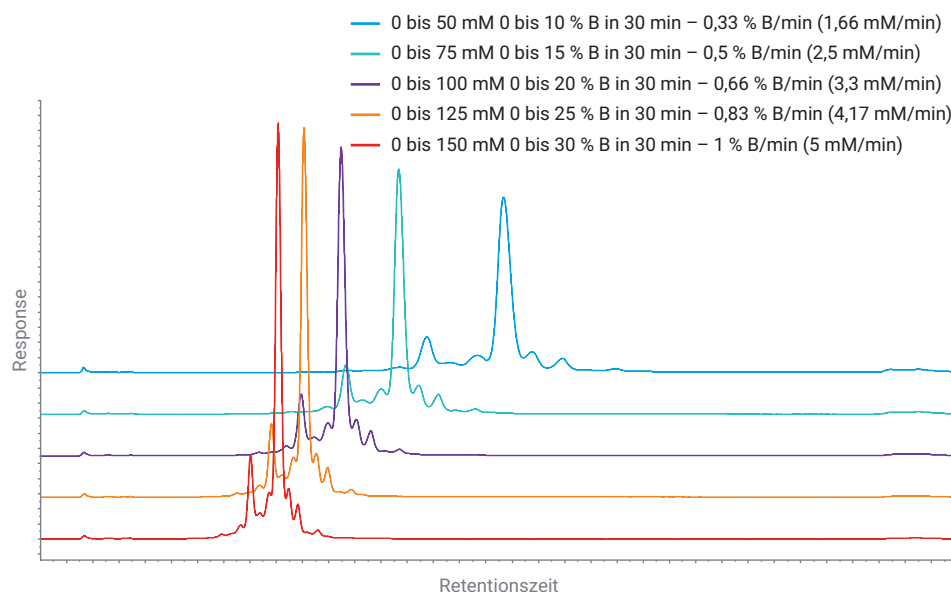


Abbildung 1: Methodenentwicklung für die Trennung von Trastuzumab mit verschiedenen Salzgradientensteilheiten.

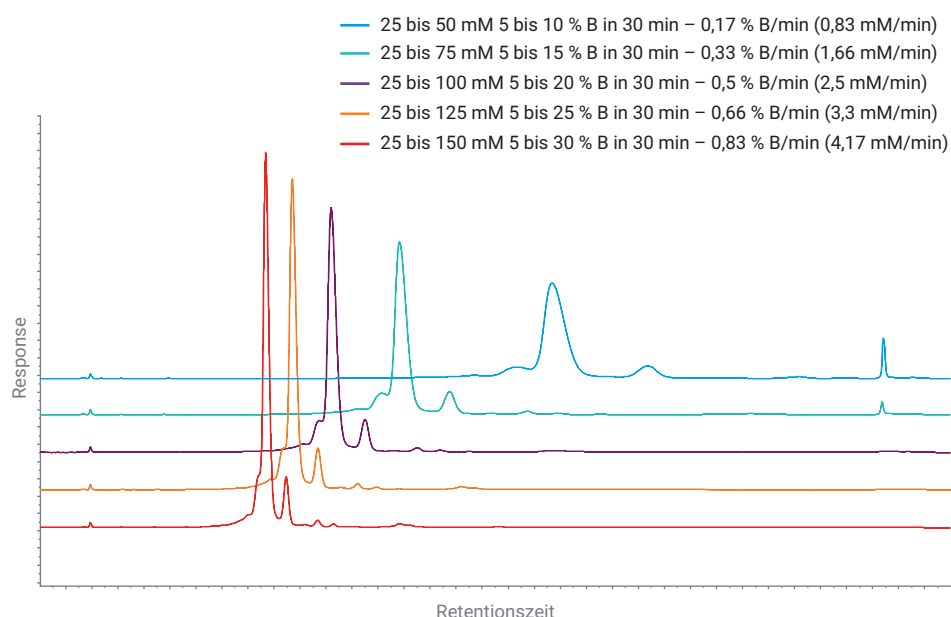


Abbildung 2: Methodenentwicklung für die Trennung des NISTmAb-Referenzstandards mit verschiedenen Salzgradientensteilheiten.

Reproduzierbarkeit der Trennung von Trastuzumab-Ladungsvarianten

Abb. 3 zeigt Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Trennung von Ladungsvarianten von Trastuzumab (A) mit einer Gradientensteilheit von 0,66 % B/min (3,3 mM / min). Abb. 3B zeigt eine vergrößerte Ansicht zur besseren Darstellung der getrennten Varianten. Mit A gekennzeichnete Varianten stellen die sauren Varianten dar, die vor den Hauptpeaks eluieren, wohingegen die basischen Varianten B nach dem Hauptpeak eluieren. Fünf saure Varianten eluierten vor dem Hauptpeak und vier basische Varianten nach dem Hauptpeak. Alle Varianten und der Hauptpeak wurden hinsichtlich der Präzision der Retentionszeit (RT) und der Fläche untersucht. Sowohl die RT- als auch die Flächenpräzision sind hervorragend, mit einer relativen Standardabweichung (RSD) für die RT von unter 0,052 % und für die Fläche von unter 0,82 % mit Ausnahme der beiden sehr kleinen Variantenpeaks A1 und B3.

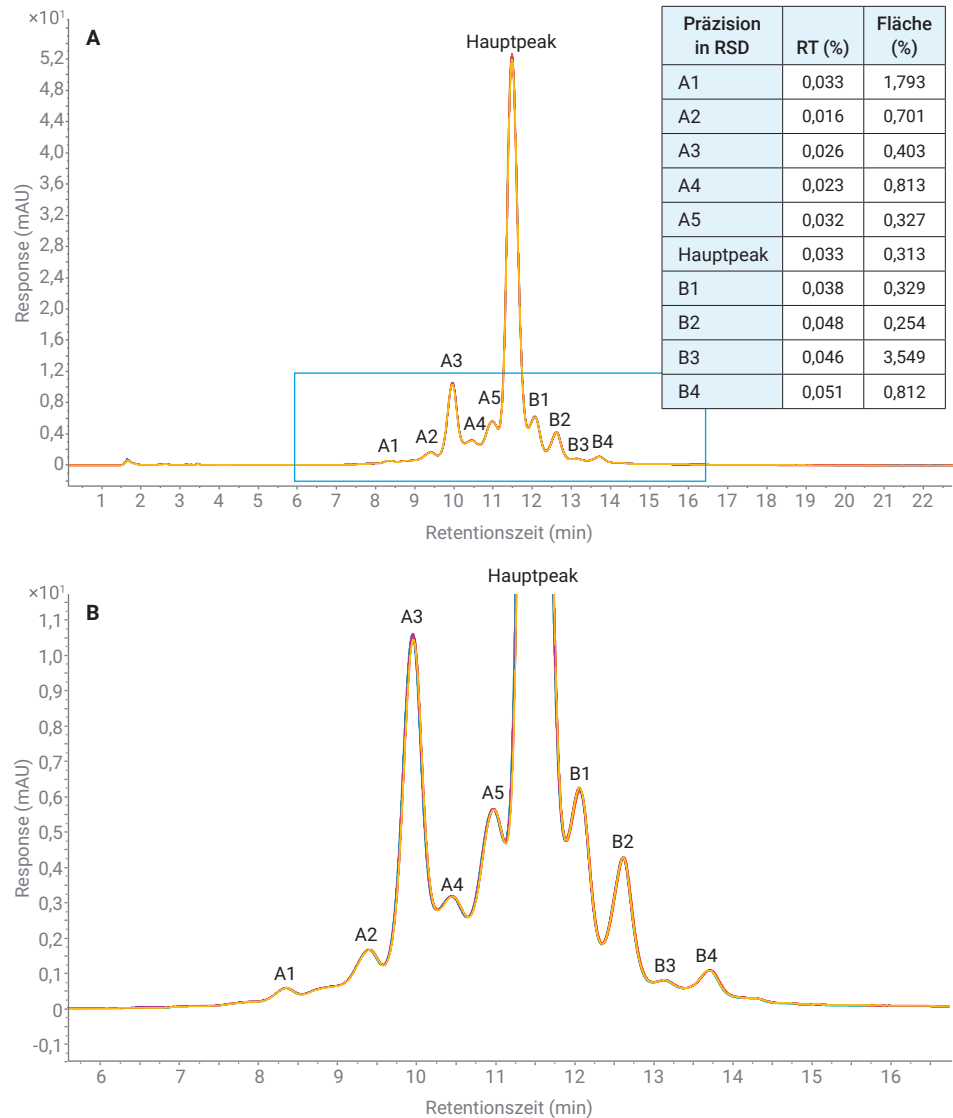


Abbildung 3: Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit mit sieben aufeinanderfolgenden Läufen zur Trennung von Ladungsvarianten von Trastuzumab (A) mit einer Gradientensteilheit von 0,66 % B/min (3,3 mM / min). (B) Vergrößerte Ansicht.

Reproduzierbarkeit der Trennung von NISTmAb-Ladungsvarianten

Abb. 4 zeigt Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Trennung von Ladungsvarianten des NISTmAb-Referenzstandards (A) mit einer Gradientensteilheit von 0,5% B/min (2,5 mM / min).

Abb. 4B zeigt die vergrößerte Ansicht mit zwei sauren Varianten und vier basischen Varianten. Alle Varianten und der Hauptpeak wurden erneut hinsichtlich der Präzision der Retentionszeit (RT) und der Fläche untersucht. Sowohl die RT- als auch die Flächenpräzision sind hervorragend, mit einer RSD für die RT von unter 0,06 % und für die Fläche von unter 0,55 % mit Ausnahme eines sehr kleinen Variantenpeaks, B2.

Wie in Abb. 2 gezeigt, liefert der flachste Gradient mit 0,17 % B/min (0,83 mM/min) keine bessere Auflösung als beispielsweise ein Gradient von 0,5 % B/min (2,5 mM/min) (auch dieser Gradient gilt noch als flach und wurde in den Reproduzierbarkeitsstudien verwendet).

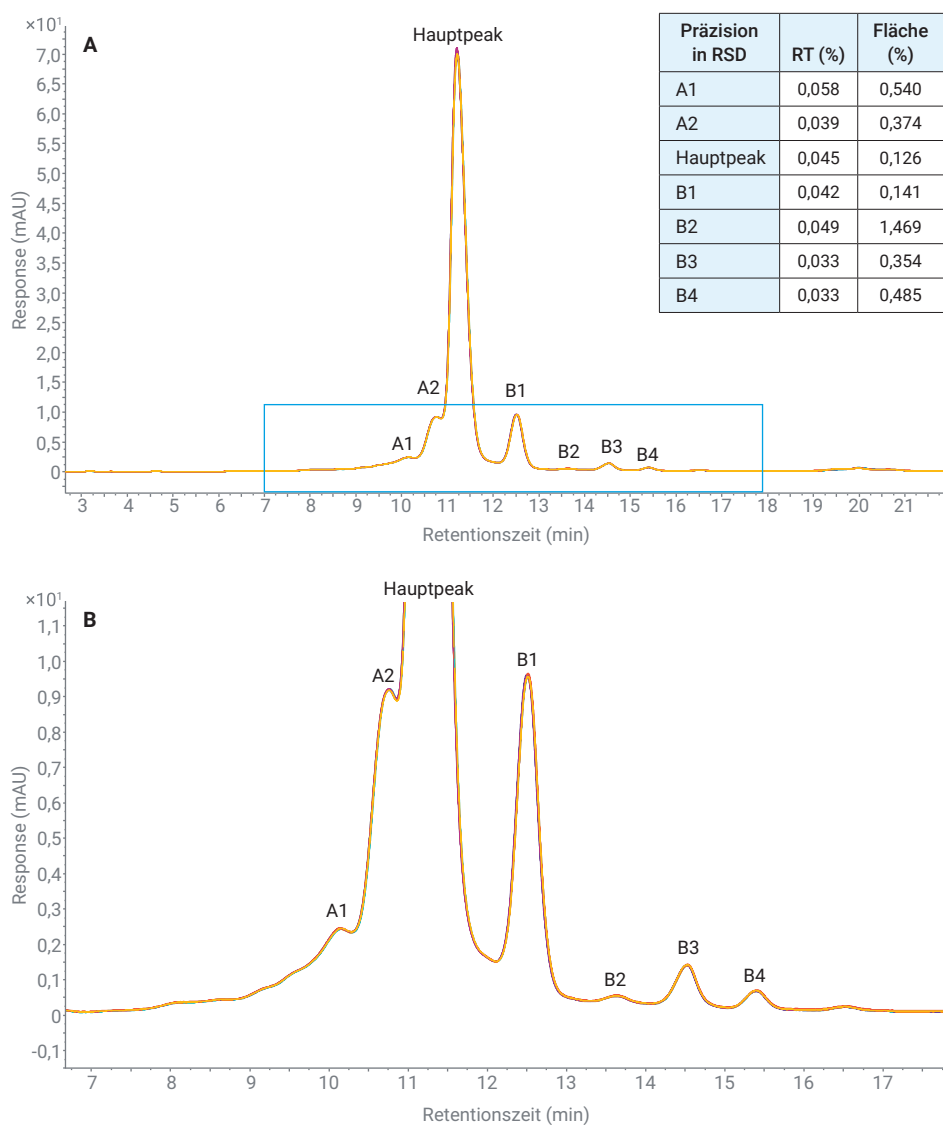


Abbildung 4: Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit mit sieben aufeinander folgenden Läufen zur Trennung von Ladungsvarianten des NISTmAb-Referenzstandards (A) mit einer Gradientensteilheit von 0,5 % B/min (2,5 mM/min). (B) Vergrößerte Ansicht.

Wie in Abb. 5 dargestellt war die 1290 Infinity II Bio Hochgeschwindigkeitspumpe dennoch in der Lage, die schwierige Gradientensteilheit herzustellen. Die RT-Präzision über sieben aufeinanderfolgende Läufe war sehr gut (RSD unter 0,25 %), obwohl die Peaks mit dem verwendeten Gradienten relativ breit wurden. Mit zunehmender Peakbreite nimmt die Peakhöhe ab, was sich negativ auf die Flächenpräzision auswirkt.

Abschließende Bemerkungen

Auf dem 1290 Infinity II Bio LC-System wurden unterschiedlich steile Salzgradienten hinsichtlich Auflösung und Reproduzierbarkeit der Trennung von Ladungsvarianten von Trastuzumab und NISTmAb untersucht. Auf den ersten Blick schienen flachere Gradienten die Auflösung zu verbessern. Die flachsten untersuchten Gradienten ergaben jedoch bei keinem der beiden mAbs eine optimale Auflösung, da sich die Peaks mit abnehmender Steilheit lediglich verbreiterten, die Auflösung sich aber nicht weiter verbesserte. Die Methoden mit der besten Kombination aus hoher Auflösung und scharfen Peakformen wurden weiter auf Reproduzierbarkeit untersucht. Eine hervorragende Reproduzierbarkeit der RT, aber auch der Fläche lag bei einer Gradientensteilheit von 3,3 mM/min (Trastuzumab) bzw. 2,5 mM/min (NISTmAb) vor. Die RT-Präzision für alle untersuchten Peaks hatte eine RSD von unter 0,06 %. Der flachste Gradient für den NISTmAb wurde auch hinsichtlich der Reproduzierbarkeit bewertet, und selbst bei einem superflachen Gradienten mit einer Gradientensteilheit von 0,83 mM/min war die RT-Präzision sehr gut (RSD < 0,25 %). Diese Daten zeigen, dass das 1290 Infinity II Bio LC-System mit seinem vollständig eisenfreien Flussweg für die in der Biochromatographie verwendeten Bedingungen optimal geeignet ist und hoch reproduzierbare Ergebnisse liefert.

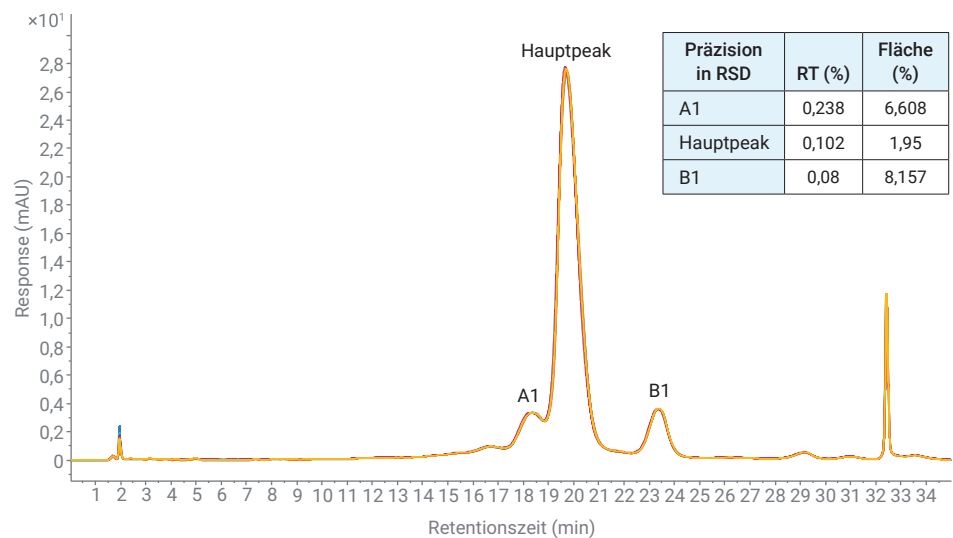


Abbildung 5: Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit mit sieben aufeinanderfolgenden Läufen zur Trennung von Ladungsvarianten des NISTmAb-Referenzstandards mit einer Gradientensteilheit von 0,17 % B/min (0,83 mM/min).

Literatur

1. Dick Jr., L. W. *et al.* Identification and Measurement of Isoaspartic Acid Formation in the Complementarity Determining Region of a Fully Human Monoclonal Antibody. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, 877(30), 3841–3849.
2. Zhang, L. *et al.* Improving pH Gradient Cation-Exchange Chromatography of Monoclonal Antibodies by Controlling Ionic Strength. *J. Chromatogr. A* **2013**, 1272, 56–64.
3. Farnan, D.; Moreno, G. T. Multiproduct High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations by pH Gradient Ion-Exchange Chromatography. *Anal. Chem.* **2009**, 81(21), 8846–8857.
4. The LC Handbook Guide to LC Columns and Method Development. *Agilent Technologies*, publication number 5990-7595EN, **2016**.
5. Goyon, A. *et al.* Determination of Isoelectric Points and Relative Charge Variants of 23 Therapeutic Monoclonal Antibodies. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2017**, 1065–1066, 119–128.
6. Xie, L. *et al.* Demonstrating Analytical Similarity of Trastuzumab Biosimilar HLX02 to Herceptin with a Panel of Sensitive and Orthogonal Methods Including a Novel FcγRIIIa Affinity Chromatography Technology. *BioDrugs* **2020**, 34(3), 363–379.