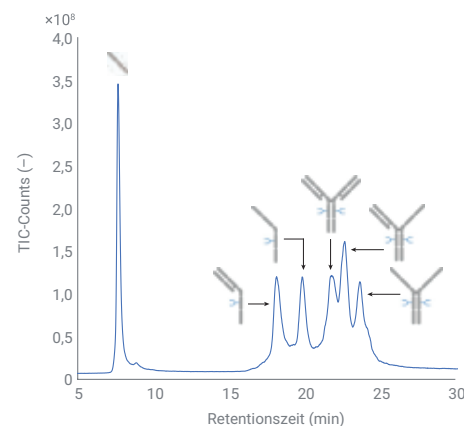


Überwachung produktabhängiger mAb-Fragmente

Die Analyse intakter Proteine mit dem Agilent 1290 Infinity II Bio LC-System ermöglicht den Nachweis von Spezies mit niedrigem Molekulargewicht mittels UV und MS



Autor

André Feith
Agilent Technologies, Inc.

Zusammenfassung

Produktbedingte Verunreinigungen, zum Beispiel Spezies mit niedrigem Molekulargewicht (LMW) oder hohem Molekulargewicht (HMW), gelten bei therapeutischen monoklonalen Antikörpern (mAb) als kritische Qualitätsmerkmale (CQAs) und müssen während des gesamten Arzneimittelherstellungsprozesses überwacht werden. Diese Application Note befasst sich mit einer RPLC-Methode, die auf der Grundlage der hervorragenden Leistung des Agilent 1290 Infinity II Bio LC-Systems in Kombination mit der Agilent PLRP-S-Säule mit PEEK-Beschichtung entwickelt wurde. Durch Analyse der reduzierten schweren und leichten Ketten des NISTmAb wurden selbst bei extrem flachen Gradienten eine hervorragende relative Retentionszeit und minimale Flächenabweichungen beobachtet. Nach der Methodenentwicklung konnten alle relevanten LMW-Fragmente wie beispielsweise zwei schwere Ketten (H2) oder zwei schwere Ketten und eine leichte Kette (H2L) getrennt und nachgewiesen werden. Durch die sequentielle Kopplung des UV- und des MS-Detektors lässt sich diese Methode in mehreren Bereichen der biopharmazeutischen Produktionskette einsetzen. Darüber hinaus stellt sie eine Alternative zu SDS-PAGE/CE-SDS dar und bietet die Möglichkeit, zwei CQAs – LMW-Spezies und posttranslationale Modifikationen (PTMs) – in einem Lauf zu analysieren.

Einführung

mAbs sind eine wichtige Klasse von Biopharmazeutika und bei der Bekämpfung verschiedener Krankheiten erfolgreich im Einsatz.¹ Diese Biomoleküle besitzen eine konservierte heterotetramere Struktur aus zwei schweren Ketten und zwei leichten Ketten, die durch Disulfidbindungen miteinander verbunden sind. Während der Herstellung oder bei unsachgemäßer Lagerung kann es zur Bildung produktbedingter Verunreinigungen wie etwa von LMW-Spezies (siehe Abb. 1) oder HMW-Spezies (z. B. Antikörperdimeren) kommen. Solche Verunreinigungen können selbst nach umfangreichen Reinigungsschritten noch vorhanden sein, sodass es wichtig ist, sie bei einem Arzneimittel als CQA zu überwachen. Für die Analyse und Trennung von HMW-Spezies wie beispielsweise von Dimeren, Trimeren oder höheren Aggregaten von Antikörpern wird in der Regel eine Größenausschlusschromatographie (SEC) mit UV-Detektion durchgeführt.² Durch die Kopplung der SEC mit MS-Detektion lassen sich Verunreinigungen hinsichtlich Molekulargewicht und PTM genauer charakterisieren.³ LMW-Spezies wie zum Beispiel schwere Ketten (H), leichte Ketten (L) oder H2L-Fragmente können durch Natriumdodecylsulfat-Kapillarelektrophorese (CE-SDS) analysiert werden.⁴ Leider kann die CE-SDS aufgrund der hohen SDS-bedingten Ionensuppression nicht mit einer MS-Detektion kombiniert werden, daher beruht die Angabe der Identität von LMW-Spezies häufig auf empirischen Erkenntnissen. In dieser Application Note wird eine alternative Analyse von LMW-Spezies von mAbs auf der Grundlage der hervorragenden Leistung des 1290 Infinity II Bio LC-Systems und der PLRP-S-Säule mit PEEK-Beschichtung vorgestellt. Mithilfe des Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie(RPLC)-Modus können alle relevanten reduktionsinduzierten LMW-Fragmente des NISTmAb je nach Bedarf im Rahmen einer routinemäßigen oder detaillierteren Analyse mit UV und MS nachgewiesen werden.

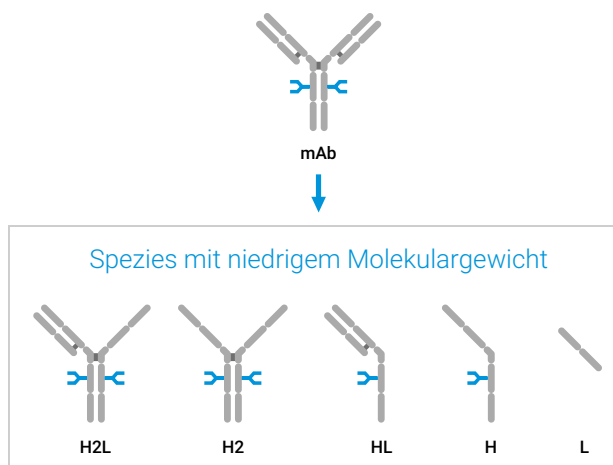


Abbildung 1: Schematischer Überblick über reduktionsinduzierte LMW-Spezies monoklonaler Antikörper (mAb). Abkürzungen: H2L (zwei schwere Ketten und eine leichte Kette), H2 (zwei schwere Ketten), HL (eine schwere Kette und eine leichte Kette), H (schwere Kette) und L (leichte Kette).

Experimentelles

Geräte

Das mit dem Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF gekoppelte Agilent 1290 Infinity II Bio LC-System umfasst die folgenden Module:

- 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 einem Standard Flow Quick
- Connect Bio Wärmeaustauscher (G7116-60071) und zwei Agilent Thermoäquilibrierungsvorrichtungen (G7116-60013)
- Agilent 1290 Infinity II variabler Wellenlängendetektor (VWD) (G7114B) mit einer biokompatiblen VWD-Mikrodurchflussszelle, 3 mm, 2 µl, RFID.
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6545XT)

Software

- Agilent MassHunter Workstation zur Datenerfassung (ab B.09.00)
- Agilent MassHunter zur qualitativen Analyse (ab 10.0)
- Agilent MassHunter BioConfirm (ab 10.0)

Säulen

Agilent PLRP-S 5 µm 1000 Å, 2,1 × 100 mm PEEK-Beschichtung (Bestell-Nr. PL1912-2502PK)

Chemikalien

Es wurden Agilent InfinityLab Ultrapure LC/MS Acetonitril (Bestell-Nr. 5191-4496) und der Agilent NIST-mAb (Bestell-Nr. 5191-5744) verwendet. Frisches Reinstwasser wurde einem Milli-Q Integral System entnommen, das mit einer Entnahmekartusche mit 0,22-µm-Membran (Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA) ausgestattet war. DL-Dithiothreitol (DTT) stammte von Merck (Darmstadt, Deutschland).

Probenvorbereitung

Zur partiellen Reduktion des NISTmAb wurden 40 µg in einem Braunglasgefäß mit 1 mM DTT direkt im 1290 Infinity II Bio Mehrfachprobengeber bei 4 °C inkubiert. Durch Inkubation von 40 µg des NISTmAb mit 10 mM DTT bei 60 °C für 30 Minuten fand eine vollständige Reduktion statt, sodass die schwere Kette (H) und die leichte Kette (L) erhalten wurden. Für die Injektion wurde der NISTmAb oder der reduzierte NISTmAb in einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet.

Tabelle 1. LC-Methode zur Analyse des intakten NISTmAb und der entsprechenden LMW-Spezies mit dem Agilent 1290 Infinity II Bio LC-System.

Parameter	Wert
Säule	Agilent PLRP-S 5 µm 1.000 Å, 2,1 × 100 mm, PEEK-Beschichtung
Lösemittel	A) Wasser + 0,1 % Ameisensäure B) Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure
Gradient	0,00 min – 25 % B 9,00 min – 30 % B 34,00 min – 38 % B 34,01 min – 100 % B 36,00 min – 100 % B 36,01 min – 25 % B 40,00 min – 25 % B
Flussrate	0,400 ml/min
Temperatur	60 °C bei installierten Thermoäquilibrierungsvorrichtungen
UV-Detektion	VWD: 280 nm, 10 Hz/MS: siehe Tabelle 2
Injektion	Injektionsvolumen: 0,3 µl Probentemperatur: 4 °C Spülen: 3 s mit Wasser (Spülanschluss)

Tabelle 2. Quellen- und MS-Parameter für die Analyse des intakten NISTmAb und der entsprechenden LMW-Spezies.

Parameter	Wert
Gerät	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
Gastemperatur	350 °C
Trocknungsgasstrom	12 l/min
Zerstäuber	35 psig
Sheathgas-Temperatur	350 °C
Sheathgas-Fluss	11 l/min
VCap	4000 V
Nozzle Voltage	2000 V
Fragmentor	180 V
Skimmer	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
Datenerfassungsmodus	Positiv, erweiterter (m/z 10 000) Massenbereich
Massenbereich	m/z 100 bis 10000
Akquisitionsrate	1 Spektrum/s
Referenzmasse	m/z 922.0098

Ergebnisse und Diskussion

Die Analyse von Biopharmazeutika während des gesamten Produktionsprozesses von der Herstellung bis zur Qualitätskontrolle verlangt die bestmögliche Leistung von LC-Systemen. Zur Beurteilung der Leistung des 1290 Infinity II Bio LC-Systems bei der Analyse von mAb-Fragmenten wurde der NISTmAb mit DTT vollständig reduziert, um H- und L-Fragmente zu erhalten. Abb. 2 zeigt die relative Retentionszeit und die Flächen-Standardabweichungen (RSD) aus sieben aufeinanderfolgenden Injektionen. Es ist zu sehen, dass das 1290 Infinity II Bio LC-System in Verbindung mit dem 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF eine hervorragende Retentionszeit- und Flächenpräzision erzielt und damit perfekt für die Analyse von mAb-Fragmenten mit flachen Gradienten geeignet ist. Obwohl die LC-Methode aus zwei linearen Gradientenschritten mit einer Steilheit von 0,32 bzw. 0,55 % B/min besteht, sind die RSD-Werte für die Retentionszeit (0,190 % [L] und 0,056 % [H]) und die Flächenpräzision (0,530 % [L] und 0,744 % [H]) nach wie vor niedrig.

Eine der größten Schwierigkeiten bei der Analyse von LMW-Spezies mit RPLC ist die unzureichende Trennleistung bei Antikörperfragmenten wie H2 oder H2L, weil sie ähnlich hydrophob wie der eigentliche mAb sind. Diese Fragmente können während der Fermentation oder durch partielle Reduktion des Endprodukts auftreten, aber auch durch partielle Reduktion mit einer niedrigen Menge an DTT und einer verringerten Temperatur artifiziiell erzeugt werden. Mit dieser Technik wurde daher eine RPLC-Methode auf der Grundlage der PLRP-S mit PEEK-Beschichtung und des 1290 Infinity II Bio LC-Systems entwickelt.

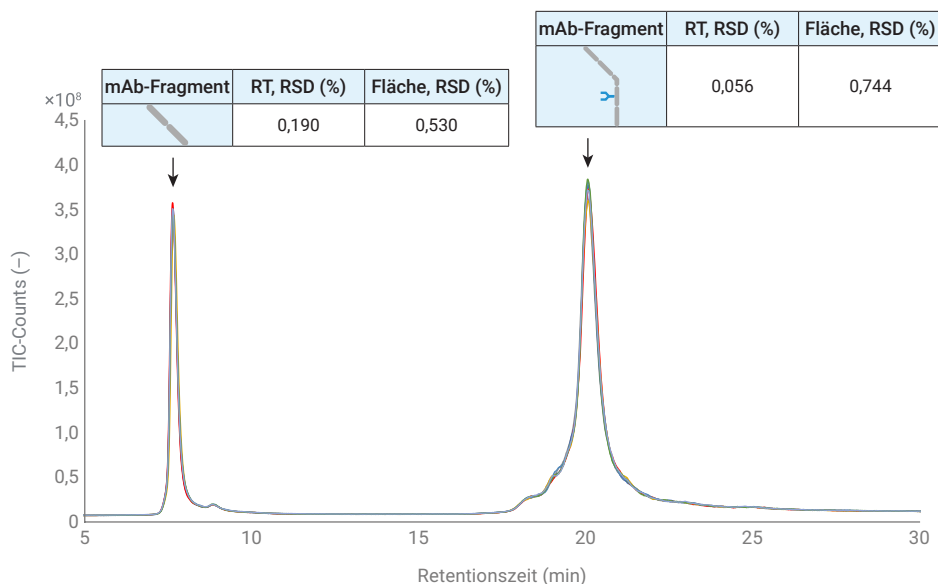


Abbildung 2: Relative Werte für Retentionszeit- und Flächenpräzision (RSD, n = 7) für das Agilent 1290 Infinity II Bio LC-System bei der Analyse von NISTmAb-Fragmenten nach Reduktion (schwere und leichte Ketten).

Die dynamische Reduktion des NISTmAb im 1290 Infinity II Bio Mehrfachprobengeber ist im Chromatogramm von Abb. 3 zu sehen. Alle in Abb. 1 dargestellten relevanten mAb-Fragmente können gut aufgelöst werden und verändern sich im Lauf der Zeit aufgrund der Zugabe von DTT. Insbesondere die Trennung der Fragmente H2 und H2L und des NISTmAb ist für eine RPLC außergewöhnlich gut, was die Kombination aus der PLRP-S-Säule mit PEEK-Beschichtung und dem 1290 Infinity II Bio LC-System zur Methode der Wahl für die Analyse von LMW macht. Durch den RPLC-Modus lässt sich das 1290 Infinity II Bio LC-System problemlos mit dem 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF koppeln, und MS-Daten können in Agilent MassHunter BioConfirm analysiert werden. Die Spektren in Abb. 3 zeigen die Hauptglykoformen der jeweiligen Fragmente nach der Dekonvolution. Die charakteristische Glykosylierung

des NISTmAb beweist, dass PTMs der verschiedenen Fragmente mit dieser Methode leicht analysiert werden können. Abb. 4B zeigt außerdem die extrahierten Ionenchromatogramme (EIC) repräsentativer Ionen für die Fragmente im Umfeld des mAb-Peaks. Auch diese EICs weisen aufgrund des hohen Auflösungsvermögens der PLRP-S-Säule mit PEEK-Beschichtung eine gute Peakform auf.

Da bei der vorliegenden Gerätekonfiguration der 1290 Infinity II variable Wellenlängendetektor und das 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF nacheinander verwendet werden, können in einem Durchgang sowohl eine UV- als auch eine MS-Detektion mit geringer bis keiner Bandverbreiterung durchgeführt werden. Darüber hinaus ist ein bequemer Methodentransfer von der Prozessentwicklung bis zur Qualitätskontrolle möglich (Abb. 4A).

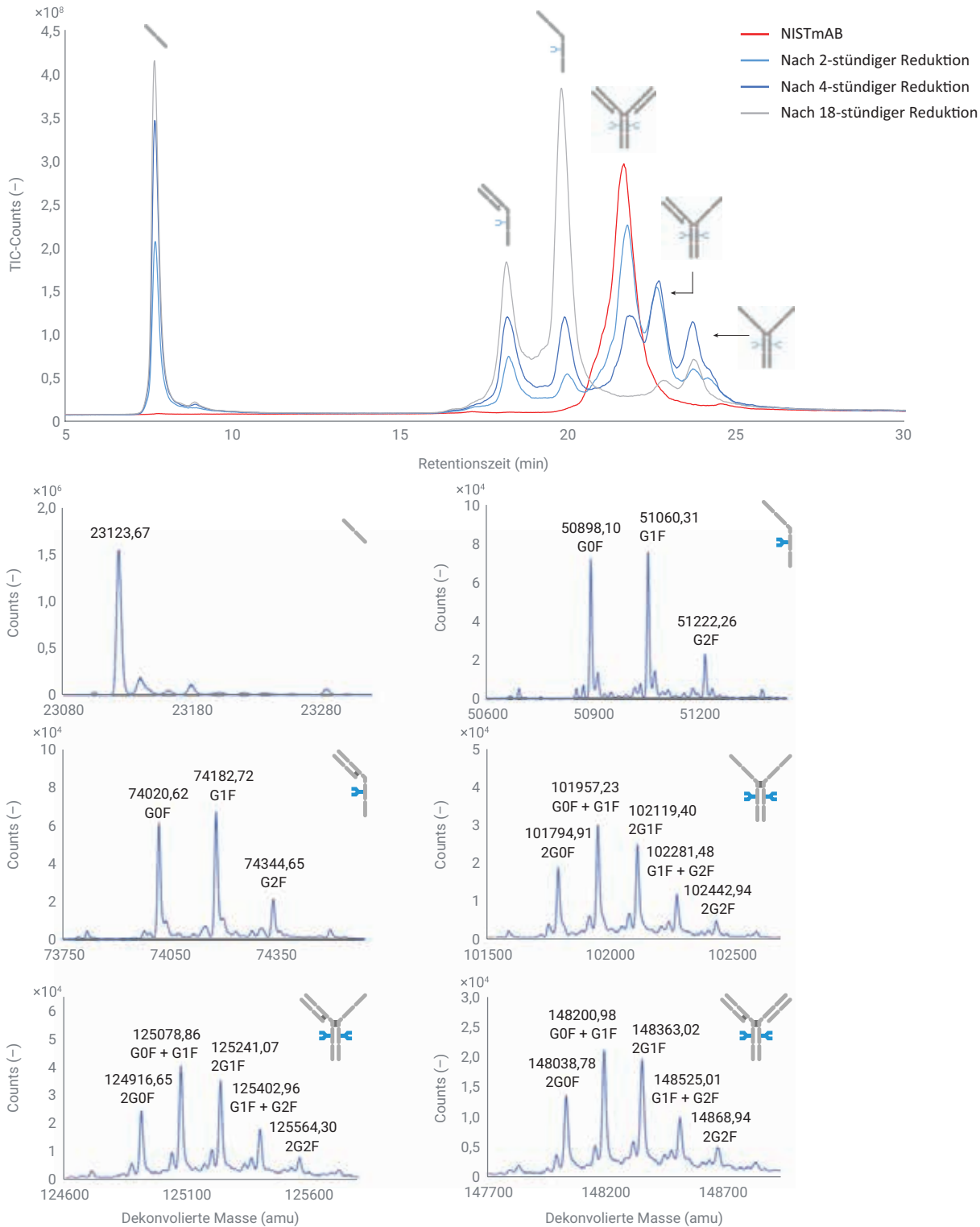


Abbildung 3: Chromatogramme der dynamischen partiellen Reduktion des NISTmAb nach Trennung mit dem Agilent 1290 Infinity II Bio LC-System und Detektion mit dem Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF. Entsprechende extrahierte Spektren der jeweiligen Fragmente zeigen die charakteristische Glykosylierung des NISTmAb.

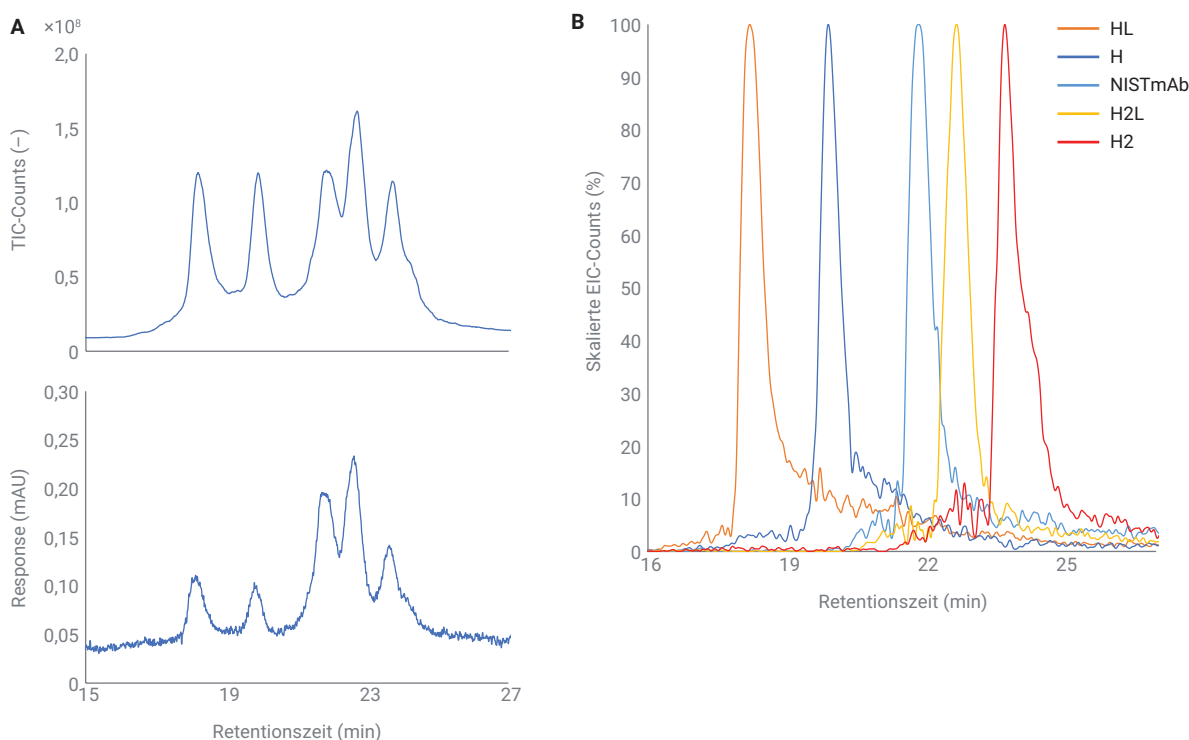


Abbildung 4: MS- und UV-Chromatogramm der in einem Lauf erfassten Fragmente rund um den NISTmAb (A). Extrahierte Ionenchromatogramme von NISTmAb-Fragmenten weisen eine ausgezeichnete Peakform auf (B).

Abschließende Bemerkungen

Bei der Analyse produktbedingter Verunreinigungen wie LMW- und HMW-Spezies werden häufig die traditionelle SDS-PAGE sowie die CE-SDS als modernes Gegenstück verwendet. Bislang war die strukturelle Identifizierung von LMW-Arten mit diesen Methoden jedoch schwierig und basierte hauptsächlich auf empirischen Erkenntnissen. In dieser Application Note wird eine RPLC-Methode vorgestellt, mit der alle relevanten reduktionsinduzierten LMW-Spezies des NISTmAb getrennt werden können. Das 1290 Infinity II Bio LC-System lieferte bei der Fragmentanalyse schwerer und

leichter Ketten hervorragende Werte für Retentionszeit- und Flächenpräzision. Die dynamische Reduktion des NISTmAb im 1290 Infinity II Bio Mehrfachprobengeber und die anschließende Detektion mit dem 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF veranschaulichten das Potenzial der Methode bei der Analyse posttranslati onaler Modifikationen. Kombiniert mit einer Fragmentanalyse könnte sie daher eine beschleunigte Entwicklung von Biopharmazeutika ermöglichen. Aus diesem Grund sind die PLRP-S-Säule mit PEEK-Beschichtung und das 1290 Infinity II Bio LC-System eine zukunftsfähige Kombination für die Analyse von Biopharmazeutika im gesamten Produktionsprozess bis hin zur abschließenden Qualitätskontrolle.

Literatur

- Walsh, G. Biopharmaceutical Benchmarks 2014. *Nat. Biotechnol.* **2014**, 32, 992–1000.
- Nägele, E. Elevate Your mAb Aggregate Analysis: High-resolution SEC with the Agilent 1290 Infinity II Bio LC System. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-2709EN, **2020**.
- Vandenheede, I. *et al.* SEC Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry for Detailed Characterization of mAbs and ADCs. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-0303EN, **2018**.
- Rustandi, R. R.; Washabaugh, M. W.; Wang, Y. Applications of CE SDS Gel in Development of Biopharmaceutical Antibody-Based Products. *Electrophoresis* **2008**, 29, 3612–3620.

www.agilent.com/chem

DEE44181.2356018519

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
Gedruckt in den USA, 29. Januar 2021
5994-3021DEE