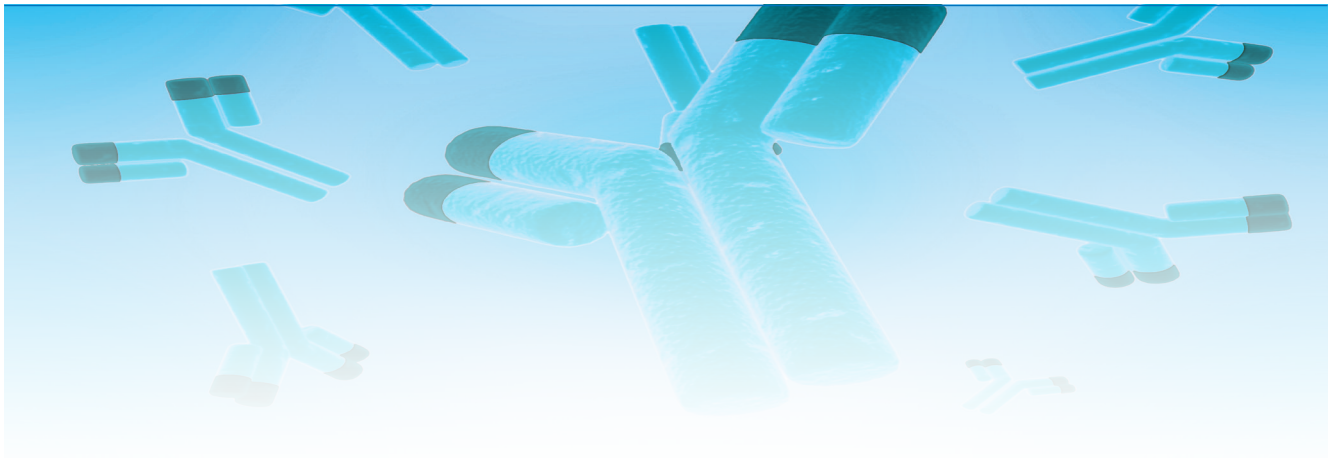

Charakterisierung von heterogen geladenen therapeutischen monoklonalen Antikörpern mittels IEX-MS unter Verwendung von BioPro IEX SF

Charakterisierung verschiedener mAbs im SCX-MSModus

1. Einführung

IEX ist eine nicht denaturierende Technik, die für die Trennung und Isolation von Ladungsspezies von Proteinen verwendet wird, bevor diese mittels MS analysiert werden können.
Dies ist ein zweistufiger Prozess, bei dem zunächst der Peak der gewünschten Spezies isoliert werden muss, da im IEX Modus meist nicht flüchtige Puffer verwendet werden, welche nicht mit MS kompatibel sind. Nach der Isolation kann die Spezies mittels MS analysiert werden. Durch die Kopplung von MS an IEX kann Zeit gespart werden und mögliche Artefakte aus dem Isolationsprozess können ausgeschlossen werden. Außerdem ist es bei diesem zweistufigen Prozess möglich Spezies zu übersehen, die nur geringfügig vorhanden sind und kein UV-Signal erzeugen.

In der Arbeit von Yan et al. wurde hochauflösende SCX direkt an ein hochempfindliches, natives online MS gekoppelt. Es wurde ein kombinierter pH- und Salzgradient basierend auf MS-kompatiblen Puffern verwendet.
BioPro IEX SF, eine unporöse, starke Kationaustauschsäule von YMC, wurde für die Analyse von fünf monoklonalen Antikörpern mit verschiedenen isoelektrischen Punkten (pI) verwendet. Die Evaluation der Methode wurde mit NISTmAb durchgeführt. Diese Studie wurde im Oktober 2018 in der Zeitschrift Analytical Chemistry unter dem Titel ***Ultrasensitive characterization of charge heterogeneity of therapeutic monoclonal antibodies using strong cation exchange chromatography coupled to native mass spectrometry*** veröffentlicht. [1]

2. Ergebnisse

Yan et al. wählten BioPro IEX SF aus den getesteten Säulen aus, da die unporöse, polymerbasierte Phase einige Vorteile wie schnelle Elution, Peakschärfe, hohe Auflösung und hohe Wiederfindung bietet. Durch diese Eigenschaften ist BioPro IEX SF besonders für Analysen im Mikromaßstab geeignet.

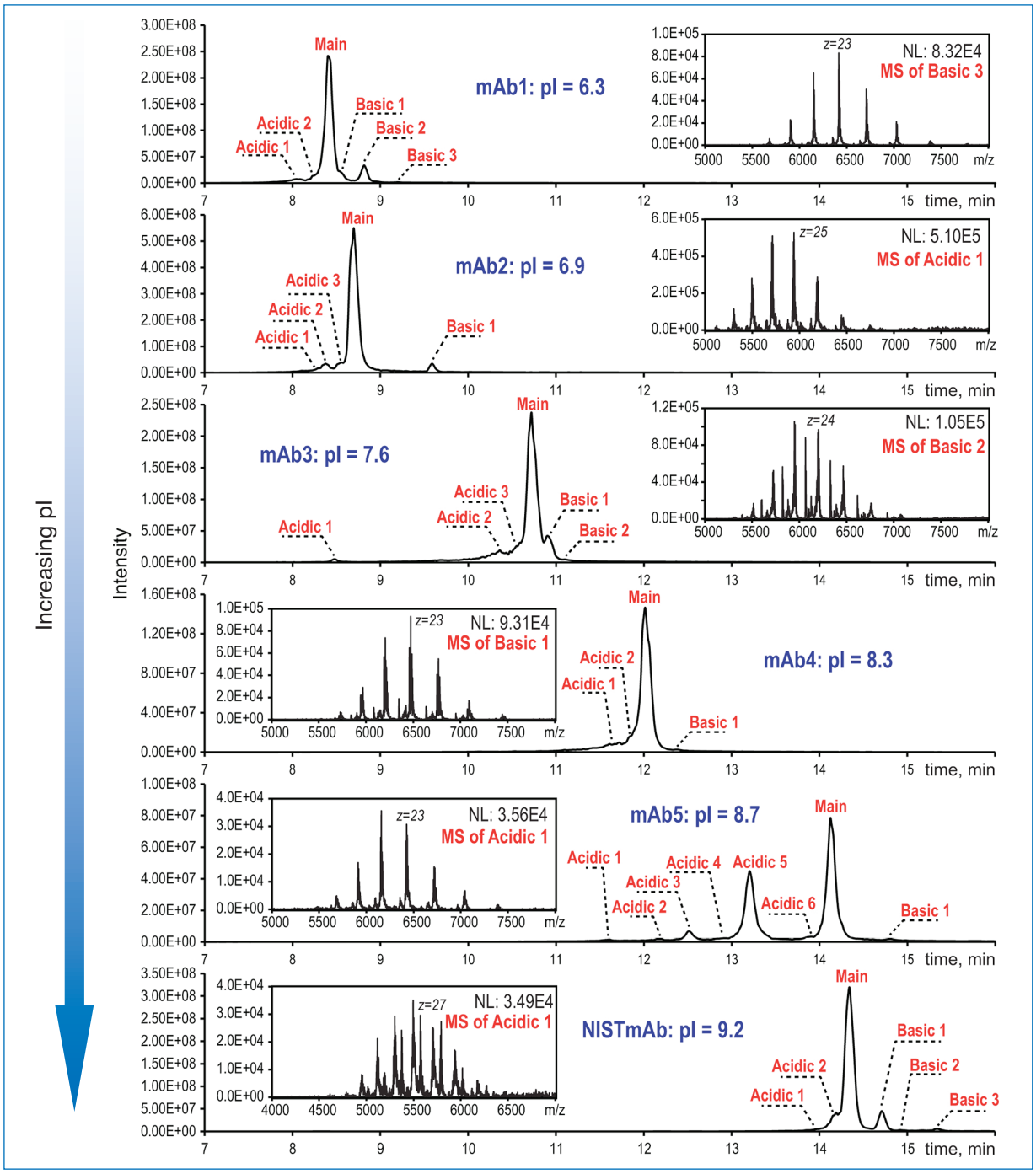

Abbildung 1: TICs der SCX-MS Analyse 6 verschiedener mAbs mit pI-Werten zwischen 6,3 und 9,2 [1]

Trennung von verschieden geladenen mAbs mittels SCX-MS

Tabelle 1: Chromatographische Bedingungen

Säule	BioPro IEX SF (100 x 4,6 mm ID, 5 µm Partikelgröße)
P/N	SF00S05-1046WP
Mobile Phase	A: 20 mM Ammoniumacetat pH 5,6 eingestellt mit 20 mM Essigsäure B: 140 mM Ammoniumacetat, 10 mM Ammoniumcarbonat, pH 7,6
Flussrate	0.4 mL/min
Gradient	0 % B (0 – 2 min), 0 – 100 % B (2 – 16 min), 100 % B (16 – 20 min), 100 % A (20 – 27 min)
Temperatur	45 °C
Apparatur	analytischer Splitter nach der Säule (~ 400:1) um die analytische Flussrate auf ca. 1 µL/min zu reduzieren
Detektor	PDA (UV) PicoTip Emitter (NSI-MS)

Die Zusammensetzung der mobilen Phase und des Gradienten wurde optimiert, sodass eine effiziente Trennung der Ladungsspezies durch die Änderung des pH-Wertes (5,6 - 7,4) und der Salzkonzentration (20 - 150 mM) in dem Bereich, in dem mAbs nativ vorliegen, erreicht wurde. Ein Splitter nach der Säule wurde verwendet, um Nanospray-Ionisation einsetzen zu können, während die Trennung im analytischen Maßstab mit einer idealen Flussrate von 0,4 mL/min durchgeführt wurde. Es wurden fünf hauseigene mAbs und NISTmAb mit einem isoelektrischen Punkt (pI) zwischen 6,3 und 9,2 verwendet, um die Methode zu testen. Im Allgemeinen korreliert die Retentionszeit mit dem pI der mAbs. Einige mAbs mit einem pI von 8 oder höher sind bei einem pH unter 7,4 eluiert, trotzdem konnten alle mAbs getrennt werden. In Abbildung 1 sind die Chromatogramme aller sechs mAbs dargestellt. Alle zeigen eine gute Trennung der Ladungsspezies. Es ist ersichtlich, dass 2 – 6 azide und 1 – 3 basische Spezies vom Hauptpeak getrennt oder teilweise getrennt wurden.

In Abbildung 1 wird außerdem das Massenspektrum von einer niedrig konzentrierten Spezies jedes mAbs dargestellt. Das Massenspektrum gibt Auskunft über die Modifikation der Ladungsspezies, dies wird in Tabelle 2 gezeigt. Mit dieser SCX-MS Methode ist es möglich geringe Mengen unter 1 % von allen 6 mAbs zu detektieren. Dies demonstriert die hohe Auflösung der BioPro IEX SF-Säule und die hohe Empfindlichkeit des Detektors.

Tabelle 2: Geringfügige Ladungsspezies von 6 verschiedenen mAbs mit SCX-MS ermittelt

mAb Probe	peak #	ΔMasse, Da	Spezies	relative Abundanz[1]
mAb1	basic 3	+ 39.4	2× N-term Gln	0.2 %
mAb2	acidic 1	+ 176.7	1× glucuronyl	0.5 %
mAb3	basic 2	+ 254.4	2× C-term Lys	0.5 %
mAb4	basic 1	+ 129.0	1× C-term Lys	0.2 %
mAb5	acidic 1	+ 352.4	2× glucuronyl	0.4 %
NISTmAb	acidic 1	+ 2238.1	unbekannt	0.05 %

[1] *Die relative Abundanz wurde mittels einer repräsentativen Glycoform kalkuliert.*

3. Zusammenfassung

Mit einer BioPro IEX SF-Säule wurde eine SCX-MS Methode entwickelt, die sowohl eine gute chromatographische Auflösung als auch hochqualitative MS-Daten erzielt. Es ist möglich die Ladungsheterogenität von mAbs in einem breiten pI Bereich zu analysieren.

Vorteile:

- Es können einfache Änderungen des pH-Werts und der Salzkonzentration der mobilen Phase vorgenommen werden, ohne signifikanten Einfluss auf die MS-Qualität
- pI im Bereich von 6,3 bis 9,2

Die unporöse BioPro IEX SF-Säule bietet:

- hohe Effizienz
- sehr gute Auflösung
- hohe Wiederfindung
- geringe Rückdrücke
- exzellente Batch-zu-Batch-Reproduzierbarkeit

4. Literatur

[1] Y. Yan, A. P. Liu, S. Wang, T. J. Daly und N. Li, “Ultrasensitive Characterization of Charge Heterogeneity of Therapeutic Monoclonal Antibodies,” Anal. Chem., 2018, 90, 13013 - 13020.

YMC Europe GmbH · Schöttmannshof 19 · 46539 Dinslaken · Tel +49 (0)2064 427-0 · Fax +49 (0) 2064 427-222 · E-Mail: info@ymc.de · www.ymc.de