

Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern und verwandten Produkten via HIC-MS

Zusammenfassung

Wie Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) und native Massenspektrometrie (MS) direkt gekoppelt werden können, zeigt die Arbeit von Yan et al. Die Kombination aus HIC, mit BioPro HIC BF von YMC, und nativer MS ermöglicht eine hochsensitive Methode sogar für geringkonzentrierte Proben. Speziell molekulare Spezies und auch Wirkstoff-zu-Antikörper-Raten (DAR) können so charakterisiert werden.

BioPro HIC BF:

- **Hohe Trennleistung**
- **Exzellente Lot-zu-Lot Reproduzierbarkeit**
- **Langzeitstabilität**
- **Nahezu keine Übertragungseffekte**

Literatur:

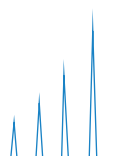
- [1] Y. Yan, T. Xing, S. Wang, T. J. Dali, N. Li, "Online coupling of analytical hydrophobic interaction chromatography with native mass spectrometry for the characterization of monoclonal antibodies and related products", J. Pharmaceut. Biomed., 2020, 186, 113313.

1. Herausforderungen bei HIC-Anwendungen in Kopplung mit MS

Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) ist eine der LC-Standardtechniken für die Analyse von monoklonalen Antikörpern (MAbs) und Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (ADCs). Die nativen Bedingungen bieten für die Proteinanalytik entscheidende Vorteile. Für gewöhnlich werden im HIC-Modus nicht flüchtige Salze wie Ammoniumsulfat in hohen Konzentrationen (1–2 M) verwendet. Daher ist eine Kopplung mit MS nahezu unmöglich. Werden flüchtige Salze wie Ammoniumacetat im HIC-Modus verwendet, muss die Salzkonzentration erhöht werden, um einen vergleichbaren Aussalzeffekt zu erzielen. Anstelle von 2 M Ammoniumsulfat, werden stattdessen 5–5,5 M Ammoniumacetat eingesetzt, sodass eine direkte Kopplung an ein Massenspektrometer erneut herausfordernd ist, doch durchaus realisierbar.

2. Innovative Lösung für HIC-MS

In den Studien von Yan et al. wird HIC mit nativer MS direkt gekoppelt. Dies ermöglicht die Kombination aus „Makeup“-Fluss und einem Splitter (s. Abb. 1). Dabei wird die Salzkonzentration verringert und gleichzeitig die Flussrate reduziert, sodass diese für die Nanospray Ionisation (NSI) geeignet ist.



Flow Path Design

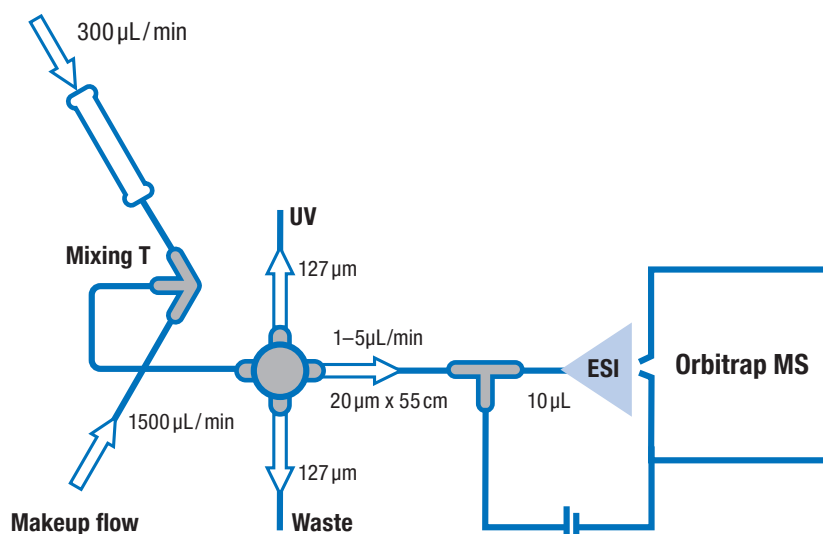


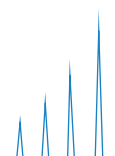
Abb. 1: Aufbau aus Makeup Fluss und Splitter [1].

BioPro HIC BF, eine unporöse Säule mit Butylliganden von YMC, wurde für die Trennung von sieben hauseigenen MABs, zwei MAB Proben mit durch posttranslationalen Modifikationen (PTMs) induzierten Spezies und einer Cystein-konjugierten ADC-Mimik verwendet.

Die Studie wurde im April 2020 im **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** unter dem Titel **Online coupling of analytical hydrophobic interaction chromatography with native mass spectrometry for the characterization of monoclonal antibodies and related products veröffentlicht** [1].

3. Chromatographische Bedingungen

Säule:	BioPro HIC BF (4 µm) 100 x 4,6 mm ID
Art.Nr.:	BHB00S04-1046WT
Eluent:	A) 3 M Ammoniumacetat in Wasser B) 100 % Wasser für die Analyse der MABs/Wasser/Isopropanol (70/30) für ADC-Mimik
Gradient:	MAB Proben: 0–90 % B in 16 min ADC-Mimik: 10–67 % B in 16 min Gefolgt von einem 4 min isokratischen Halt
Flussrate:	0,3 mL/min
Probe:	Mischung von 7 hauseigenen MABs bei jeweils 1–2 mg/mL 2 hauseigenen MABs mit molekularen Spezies SigmaMAB ADC-Mimik (Sigma-Aldrich)
Injektion:	MAB-Mischung: 3 µL (3–6 µg) MAB 8, MAB 9 und SigmaMAB ADC-Mimik jeweils 10 µg
Detektion:	NSI-MS
Apparatur:	Post-Säulen Makeup Fluss: 100 % Wasser bei 1,5 mL/min (Reduzierung der Salzkonz. 6-fach) Splitter um die Flussrate auf 1 – 5 µL/min zu reduzieren



4. Ergebnisse

HIC-MS einer MAb-Mischung

Sieben verschiedene MABs wurden unter Verwendung eines 16 min Gradienten (von 3 M bis 300 mM Ammoniumacetat) analysiert. Es wurden sechs sehr gut getrennte Peaks erhalten. Die Injektion von 3 – 6 µg pro MAB war ausreichend, um Spezies geringer Häufigkeit eines MABs wie nicht glykolysierte und teilweise glykolysierte Spezies zu detektieren.

Lediglich zwei MABs (MAB 5 und MAB 6, s. Abb. 2) konnten nicht getrennt werden. Das Dekonvolutionsspektrum zeigt außerdem, dass MAB 5 und dessen oxidierte Form getrennt wurden (Peak 4 und 5).

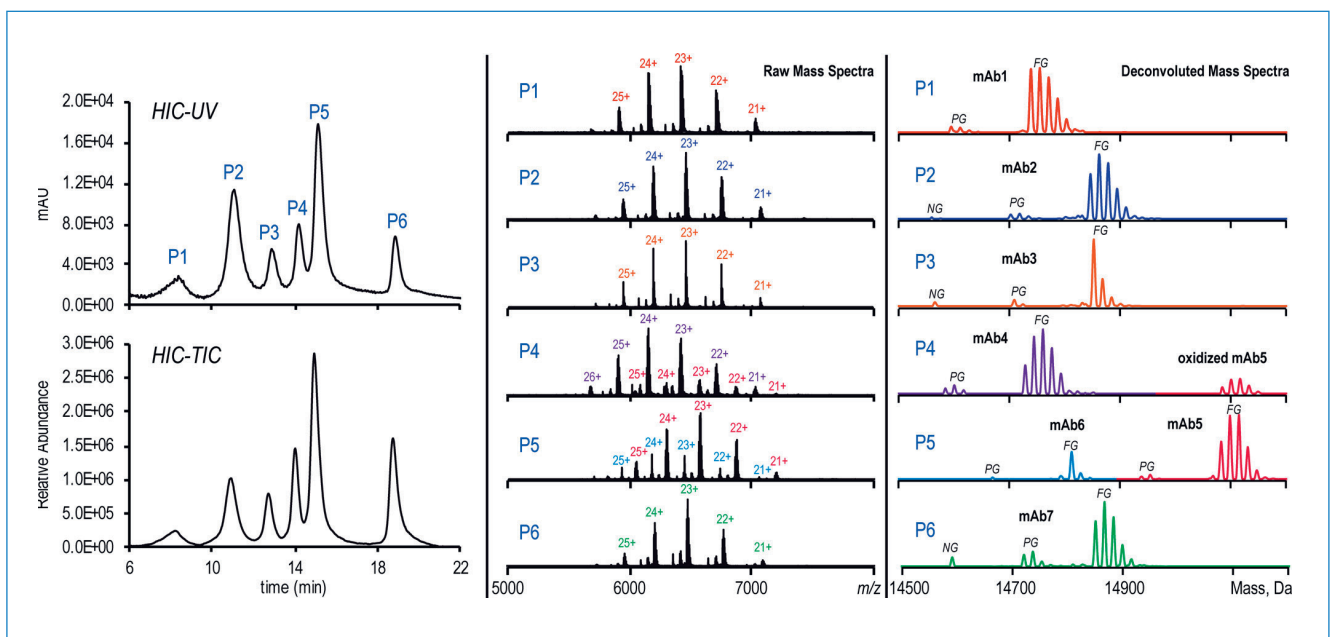


Abb. 2: Chromatogramm und Massenspektren einer MAB-Mischung [1].

MAB molekulare Spezies

Zwei MABs mit posttranslationalen Modifikationen (PTMs) an oder in der Nähe der komplementärbestimmenden Region (CDR) wurden charakterisiert. Die Spezies konnten mindestens partiell getrennt werden, Injektionen von jeweils 10 µg MAB 8 und MAB 9 zeigten je einen Nebenpeak, der leicht früher eluierte, sodass molekulare Spezies mit reduzierter Hydrophobizität angenommen werden können. Die Massenbestimmung zeigte zwei Hauptformen für MAB 8 und ein oxidiertes Produkt von MAB 9 (s. Abb. 3).

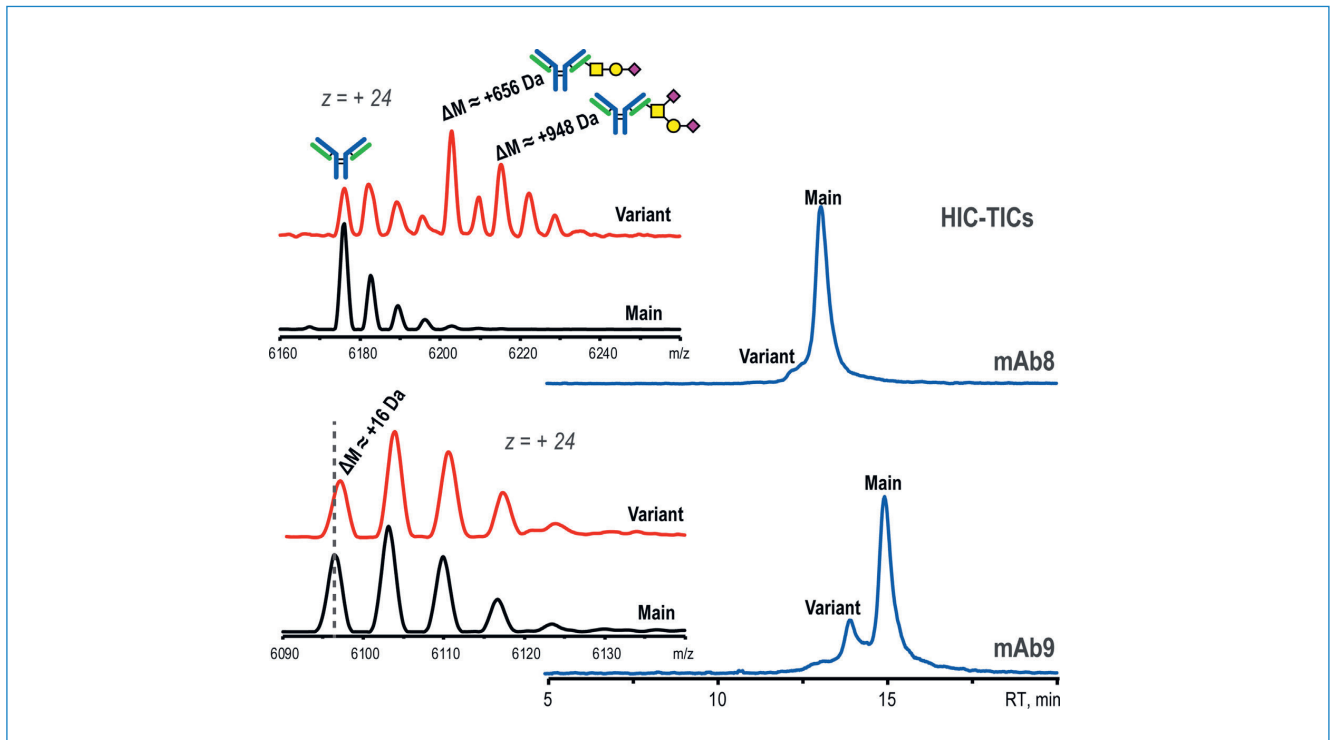


Abb. 3: Chromatogramme und Massenspektren der MAb Spezies induziert durch PTM [1].

Wirkstoff-zu-Antikörper-Verhältnis (DAR) einer ADC-Mimik

Der MAb IgG1 wurde mit Dansylfluorophoren an Cysteingruppen der Disulfidbrücken konjugiert, was in einer Beladung von 0–4 Paaren resultiert. Die erhaltene Trennung ist ähnlich der vom Hersteller angegebenen HIC-UV-Methode, bei der Ammoniumsulfat und Isopropanol verwendet wurde. Das Wirkstoff-zu-Antikörper-Verhältnis sowie Abbauprodukte konnten bestimmt werden (s. Abb. 4).

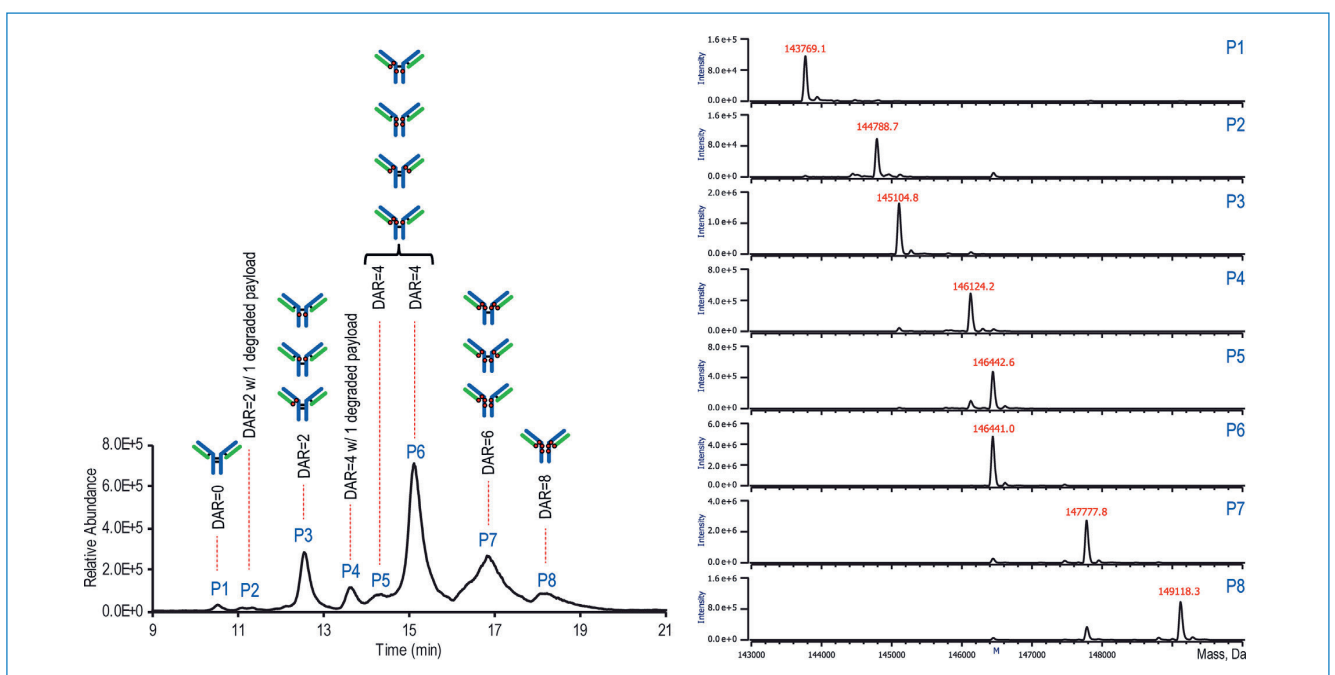


Abb. 4: DAR Bestimmung und Massenspektren des SigmaMAb ADC-Mimik [1].