

Welcher LC-Modus ist besser für verschiedene ADC-Typen geeignet? RP oder HIC?

Die chromatographische Analyse von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (ADCs) insbesondere die Bestimmung der Wirkstoff-zu-Antikörper-Verhältnisse (DAR) ist essentiell, um die Wirksamkeit zu garantieren und gleichzeitig die Toxizität gering zu halten. Es gibt verschiedene Möglichkeiten ADCs herzustellen, dementsprechend sind verschieden konjugierte ADCs mit unterschiedlichen Charakteristika möglich.

Bekanntermaßen ist die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) der Standardmodus in der ADC-Analyse. Inwiefern Reversed-Phase Chromatographie (RP) bald eine größere Rolle einnehmen kann, wird anhand eines Beispiels gezeigt.

Beide Modi nutzen hydrophobe Wechselwirkungen zur Trennung der Analyten. Im HIC-Modus werden Salzgradienten zur Trennung verwendet. Hohe Salzkonzentrationen stärken die Wechselwirkungen, während geringe Konzentrationen zur Elution führen. Je hydrophober das Biomolekül ist desto weniger Salz wird benötigt, um die Bindung zu begünstigen.

In der RP werden die Biomoleküle durch die Erhöhung des organischen Eluenten nach ihrer Hydrophobizität von der Säule eluiert. Da bei RP stärkere hydrophobe Wechselwirkungen auftreten, werden unpolare organische Eluenten wie Acetonitril benötigt, damit die Biomoleküle eluieren.

ADC Typen

Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADCs) sind durch ihren zielgerichteten Angriff therapeutische Mittel mit hohem Potential für die Krebtherapie. Ein ADC basiert auf einem rekombinanten monoklonalen Antikörper (MAb), an dem ein zytotoxischer Wirkstoff (auch Beladung genannt) kovalent gebunden ist.

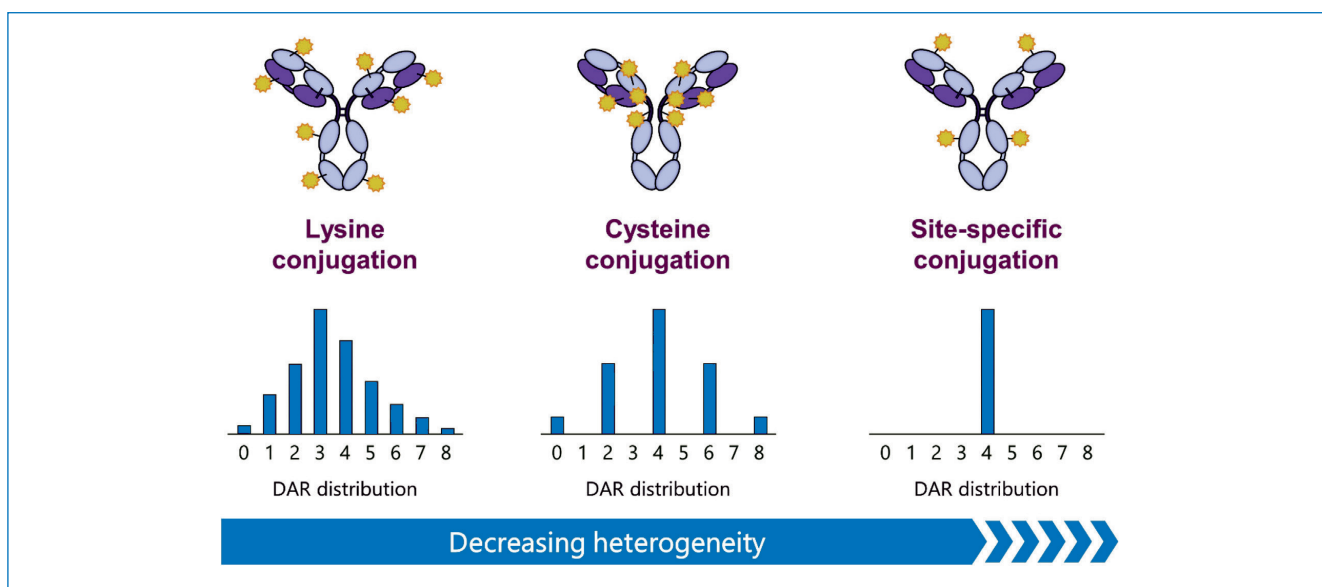
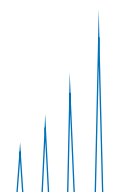


Abb.1: Schematische Beschreibung des ersten (Lysinkonjugation), zweiten (Cysteinkonjugation) und dritten (ortsspezifische Konjugation) ADC Typen. Die theoretische DAR Verteilung wird ebenfalls gezeigt.(1)



Es sind derzeit drei Typen von ADCs auf dem Markt erhältlich

1. Lysinkonjugation (1. Generation):

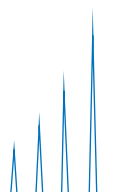
- Der zytotoxische Wirkstoff ist zufällig an Amingruppen von Lysinseitenketten gebunden
- Über 60 Lysingruppen sind an der Oberfläche verfügbar
- Stark heterogen
- DAR liegt zwischen 0 und 8
- Charakterisierung ist herausfordernd
 - ⇒ **Nur HIC** ist möglich
- Beispiele: Trastuzumab-Emtansine (Kadcyla®), Gemtuzumab-Ozogamicin (Mylotarg®)

2. Cysteinkonjugation (2. Generation):

- Reduzierbare Cysteine aus Disulfidbrücken zwischen den Ketten werden verwendet (zwischen zwei schweren Ketten oder schwerer und leichter Kette)
- Homogenere Population
- DAR zwischen 0 und 8
- Mittlere DAR kann kontrolliert werden – gleich ca. 4 (z.B. Brentuximab-Vedotin)
 - ⇒ **HIC** ist der Goldstandard für die Analyse der Wirkstoffverteilung, intakter Antikörper und mittlere DAR
- Beispiele: Brentuximab-Vedotin (Adcetris®), Enfortumab-Vedotin (Padcev®)

3. Ortsspezifische Konjugation (3. Generation):

- Beladung an definierte Positionen gebunden
- Verbesserter therapeutischer Index
 - Höhere Wirksamkeit
 - Geringere Toxizität
- Mehr als 40 Technologien für ortsspezifische Wirkstoffkonjugation entwickelt
- Zusätzliche Cysteingruppen eingearbeitet in verschiedene Stellen des MAb
- Nahezu uniforme Stöchiometrie der gebundenen, zytotoxischen Moleküle
- Disulfidbrücken werden nicht aufgespalten
- Mittlere DAR nahe 2 oder 4
- In der Praxis heterogener durch unterschiedliche Beladungszugänglichkeit und mögliche Artefakte während der Synthese
 - ⇒ **HIC** wird immer noch standardmäßig eingesetzt
 - ⇒ **RP** kann bessere Auflösung liefern
- Beispiel: Substanzen sind derzeit in F&E, klinische Phase



Vor- und Nachteile von HIC und RP in der ADC-Analyse

HIC:

HIC-Materialien sind meist hydrophile Polymerpartikel funktionalisiert mit hydrophoben Gruppen. Dadurch ist HIC dafür geeignet besonders hydrophobe Biomoleküle zu trennen.

- ✓ Native Bedingungen
⇒ MAb's können in nativer Struktur analysiert werden
- ✗ Hohe Salzgradienten verwendet
⇒ Direkte Verbindung zu MS nicht möglich (2D-LC nötig)
- ✗ Limitierte kinetische Effizienz
⇒ Trennung anderer als nativ verknüpfter Spezies ist eine Herausforderung
- ✗ Nicht genügend Auflösung zur Trennung von Regioisomeren

RP:

Basispartikel für RP-Analysen bestehen üblicherweise aus porösem, hydrophobem Silica oder Hybridsilica ebenfalls funktionalisiert mit hydrophoben Gruppen. Stark hydrophobe Biomoleküle wechselwirken zu stark mit der stationären Phase, sodass keine Trennung möglich ist. Deshalb ist RP im Allgemeinen für weniger hydrophobe Biomoleküle besser geeignet.

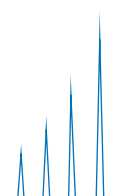
- ✓ Probenvorbereitung nicht nötig
- ✓ Direkte Kopplung zu MS möglich
- ✓ Hohe Auflösung
- ✗ Meist denaturierende Bedingungen

Für beide Modi bietet YMC die ideale Lösung: BioPro HIC HT für schnelle und reproduzierbare HIC Analysen und YMC-Triart Bio C4 für die Analyse mittels RP.

	BioPro HIC HT	YMC-Triart Bio C4
Basispartikel	Polymethacrylat	Vollporöses organisch/ anorganisches Hybridsilica
Modifikation	C4	C4
Partikelgröße [μm]	2,3	1,9; 3; 5
Porengröße [\AA]	unporös	300
Endcapping	–	ja
pH Bereich	2–12	1–10
Temperaturbereich [$^{\circ}\text{C}$]	10–60	pH < 7: 90, pH > 7: 50

Beispiel eines ortsspezifischen ADCs analysiert mit HIC und RP

Mit diesem Beispiel soll gezeigt werden, welche Vorteile RP gegenüber HIC bei der Analyse von heterogenen Populationen eines ortsspezifischen cysteinkonjugierten ADCs aufweist. Außerdem sollte der unkonjugierte MAb vom ADC, sowie DAR-Spezies getrennt und somit das mittlere DAR und die Verteilung bestimmt werden.



Probe:

IgG1 MAb mit zwei identischen leichten Ketten und schweren Ketten verbunden durch Disulfidbrücken

- Schwere Ketten bestehen aus einer N-terminalen variablen Domäne (VH) und drei konstanten Domänen (CH1/CH2/CH3)
- Eingeführte Cysteine (E157C) in CH1 und (S380C) in CH3 erlauben die ortsspezifische Konjugation
- Linker und Beladung mittels Disulfidbrücken verbunden

Ergebnisse:

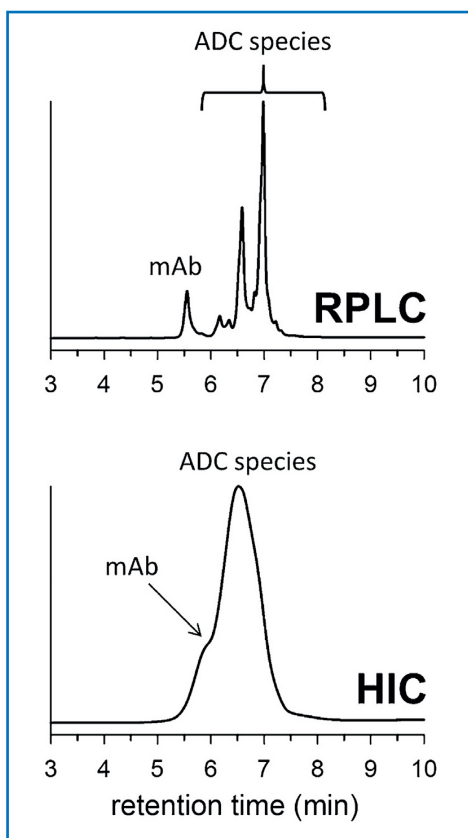


Abb. 2 zeigt die chromatographischen Ergebnisse der RP und HIC Trennung der ortsspezifischen cysteinkonjugierten ADC Probe, zu der 10 % unkonjugiertes MAb zugegeben wurde.

RP:

- Das unkonjugierte MAb ist basisliniengetrennt von früh eluierenden DAR Spezies
- DAR2, DAR3, DAR4 können unterschieden werden
 - Ihre Spezies sind teilweise aufgelöst
- Mittlere DAR und DAR-Verteilung können bestimmt werden
 - 7,4 % DAR2, 37 % DAR3, 55,6 % DAR4
- Die Messung der DAR-Verteilung ist allgemein für konventionelle cysteinkonjugierte ADCs nicht möglich, da diese zu hydrophob sind

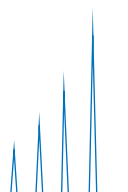
HIC:

- Alle ADC Spezies coeluieren
- Unkonjugiertes MAb kann nur teilweise aufgelöst werden

Abb. 2: RP und HIC Trennung des ortsspezifisch cysteinkonjugierten ADCs mit Zugabe von 10 % unkonjugiertem MAb. (1)

Schlussfolgerung aus diesen Ergebnissen:

- Derzeit HIC Standardtechnik für stark hydrophobe ADCs (Cysteinkonjugation)
- RP zeigt viel Potential für ortsspezifische MAb
 - Höhere Auflösung als mit HIC kann erreicht werden
 - Durch direkte MS-Kopplung können ADC Spezies analysiert werden
 - Unbeladenes MAb und ADC können getrennt werden
 - ⇒ DAR Verteilung kann ermittelt werden
 - Moderne Materialien können auch unter milden Bedingungen hohe Auflösung erreichen
 - ⇒ ADC kann nativ analysiert werden



Chromatographische Bedingungen:

100 mm Säulenlänge und 10 min Gradienten für beide Modi

RP:

Mobile Phase: (A) Wasser + TFA/FA (0,0 %/0,05 %)
(B) Acetonitril + TFA/FA (0,05 %/0,05 %)
Gradient: 30–46 % B in 10 min
Temperatur: 60 °C
Detektion: Fluoreszenz ex. 280 nm, em. 350 nm

HIC:

Mobile Phase: (A) 1,5 M Ammoniumsulfat und 0,1 M Phosphatpuffer
(B) 0,1 M Phosphatpuffer
Gradient: 25–75 % B in 10 min
Temperatur: Raumtemperatur
Detektion: Fluoreszenz ex. 280 nm, em. 350 nm

Literatur:

- (1) V. D'Atri, R. Pell, A. Clarke, D. Guillaume, S. Fekete, Is hydrophobic interaction chromatography the most suitable technique to characterize site-specific antibody-drug conjugates?, J. Chrom. A (2018)

