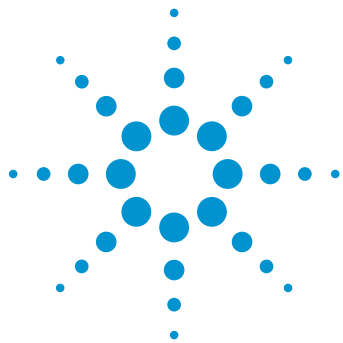




Анализ гидролизатов моноклональных антител с помощью приборного комплекса Agilent 1290 Infinity 2D-LC

Методическая информация

Биотерапевтические средства и биоаналоги

Авторы

Герд Ванхоенакер (Gerd Vanhoenacker), Козн Сандра (Koen Sandra), Изабель Ванденхид (Isabel Vandenneede), Фрэнк Дэвид (Frank David) и Пэт Сандра (Pat Sandra)

Исследовательский институт
Хроматографии
Kennedypark 26
B-8500 Кортрейк, Бельгия

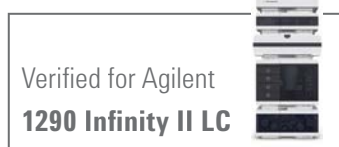
Metablys
Kennedypark 26
B-8500 Кортрейк, Бельгия

Удо Хубер (Udo Huber),
Эдгар Негеле (Edgar Naegele)
Agilent Technologies, Inc.
Вальдброн, Германия

Аннотация

Фармацевтические биопрепараты, такие как моноклональные антитела и рекомбинантные белки, в настоящее время широко используются для лечения различных опасных для жизни заболеваний, включая рак и аутоиммунные заболевания. По сложности состава белковые препараты значительно превосходят препараты с малой молекулярной массой, поэтому определение их состава представляет собой сложную аналитическую задачу.

В данной методической информации демонстрируется возможность использования комплексной двумерной жидкостной хроматографии (ЖХ-ЖХ) для анализа триптических гидролизатов моноклональных антител при использовании приборного комплекса Agilent 1290 Infinity 2D-LC с диодно-матричным детектором.



Agilent Technologies

Введение

Терапевтические макромолекулы, созданные посредством технологии рекомбинантных ДНК, приобретают все большее значение в лечении различных заболеваний. Согласно оценкам, в настоящее время мировой рынок белковых препаратов (моноклональных антител (mAb) и других рекомбинантных белков) составляет примерно 20% общего рынка фармацевтических продуктов. В текущем десятилетии более 50% новых утвержденных лекарственных средств составят биопрепараты¹.

Детальное определение характеристик этих молекул необходимо как в процессе их разработки, так и на протяжении всего срока годности.

В данной методической информации описывается метод картирования пептидов для идентификации и оценки чистоты моноклонального антитела трастузумаб. Трастузумаб, выпускаемый под коммерческим названием Герцептин, представляет собой большую молекулу массой 150 кДа, используемую для лечения HER-2-положительного рака молочной железы. Вслед за трипсинолизом ожидается получение более 100 пептидов с различными физико-химическими свойствами в широком динамическом диапазоне концентраций (рис. 1). Это сложная аналитическая задача, требующая высочайшей способности разделения. Комплексная ЖХ-ЖХ существенно повышает хроматографическое разрешение, если оба измерения ортогональны

и разделение, полученное в первом измерении, сохраняется после переноса на второе измерение^{2,3}. В настоящей методической информации описывается сочетание сильного катионного обменника (SCX) и обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (RPLC), представлены два варианта, демонстрирующие хорошую ортогональность при анализе пептидов³. Фракции переносили с первого на второе измерение с помощью интерфейса с двойной петлей, сохраняя разрешение (полученное в первом измерении). Использовали систему Agilent 1290 Infinity 2D-LC. В данной работе приведены некоторые ключевые результаты и продемонстрирована производительность системы.

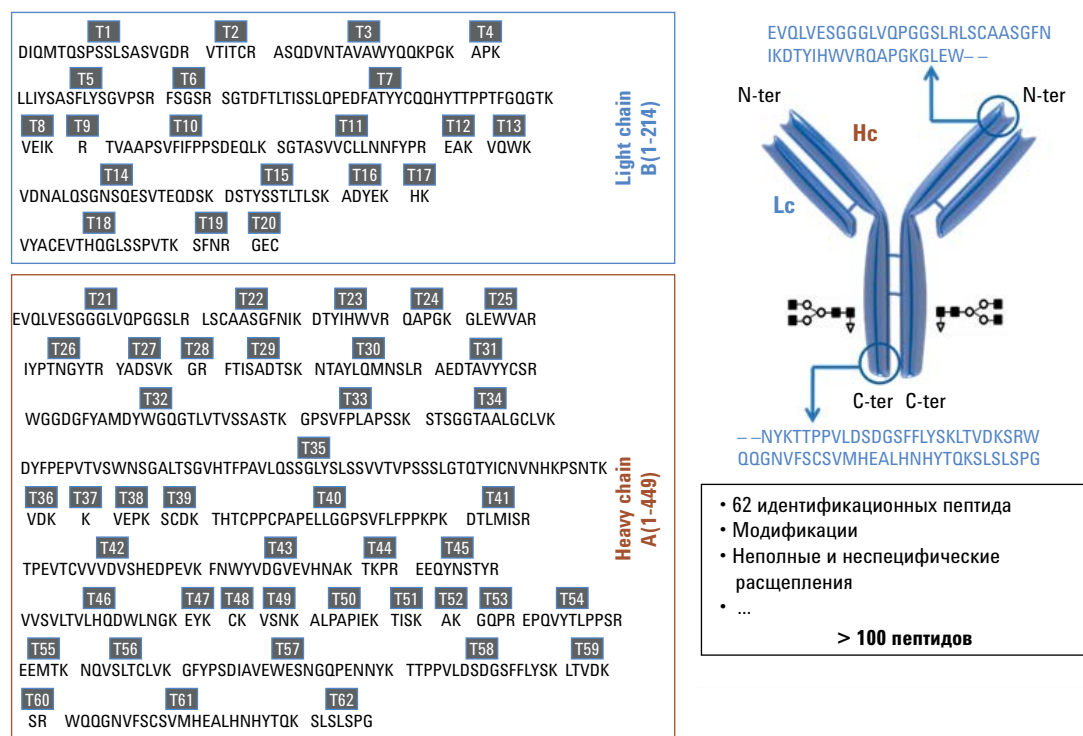


Рис. 1. Структура и аминокислотная последовательность белка. Идентификационные пептиды маркированы T1-T62.

Экспериментальная часть

Растворы и образцы

Все растворители имели класс чистоты «для ВЭЖХ» и были приобретены у компании Biosolve B.V. (Валькенсваард, Нидерланды). Фосфорная кислота и хлорид натрия были приобретены у компании Sigma-Aldrich (Борнем, Бельгия).

Пробоподготовка

Была использована следующая процедура пробоподготовки.

Проба	Объем, соответствующий 100 мкг белка
Добавление ПАВ	0,1% рапигеста в 100 мМ триса pH 7,5
Разбавление	1 мМ CaCl ₂
Восстановление	5 мМ дитиотреитола (DTT)
Алкилирование	10 мМ йодацетамида (IAA)
Расщепление	Трипсин (масс. соотношение — 1:25), 37 °С в течение 16 часов
Подготовка к анализу	Снижение pH (TFA), ожидание, центрифугирование

Пробу также подвергали форсированной деградации при следующих условиях.

Окисление	терт-бутилгидропероксид (TBHP), 30 °С в течение 23 часов
Воздействие pH	Трис pH 9, 37 °С в течение 3 дней

Оборудование

Использовали системный комплекс Agilent 1290 Infinity 2D-LC. Конфигурация приведена ниже.

G4220A	Бинарный насос Agilent 1290 Infinity с функцией промывки уплотнения (1-е измерение)
G4220A	Бинарный насос Agilent 1290 Infinity (2-е измерение)
G4226A	Автосамплер Agilent 1290 Infinity
G1330A	Автосамплер с термостатом Agilent 1290 Infinity
G1316C	Термостат отсека для колонок Agilent 1290 Infinity
G4212A	Диодно матричный детектор Agilent 1290 Infinity со стандартной проточной кюветой
G1170A	Привод крана Agilent 1290 Infinity
G4236A	2-позиционный/4-портовый двойной кран для 2D-ЖХ

Программное обеспечение

- Agilent OpenLAB CDS Chemstation в редакции C.01.04 с дополнительным ПО 2D-ЖХ
- ПО GC Image LCxLC Edition для анализа данных 2D-ЖХ (GC Image, LLC., Линкольн, Небраска, США)

Методика

1-е измерение	
Колонка	MIC-15-Polysulfoethyl-Asp, 150 × 1,0 мм, 5 мкм (PolyLC Inc.)
Растворитель А	5 мМ фосфат рН 3 в 5 % ацетонитриле
Растворитель В	5 мМ фосфат рН 3 в 5 % ацетонитриле + 400 мМ NaCl
Скорость потока	60 мкл/мин
Градиент	от 0 до 30 минут: от 3 до 25% В от 30 до 50 минут: от 25 до 45% В от 50 до 55 минут: от 45 до 100% В от 55 до 58 минут: 100% В Восстановление колонки после анализа: 13 минут при 3% В
Температура	25 °С
2-е измерение	
Колонка	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4,6 × 50 мм, 3,5 мкм (каталожный номер 959943-902)
Растворитель А	0,1% водный раствор фосфорной кислоты
Растворитель В	Ацетонитрил
Скорость потока	3,5 мл/мин
Скорость потока во время ожидания	0,5 мл/мин
Начальный градиент	от 0 до 0,43 минуты: от 2 до 35% В 0,43 минуты: 2% В
Модуляция градиента	35% В при 0,43 минуты до 65% В при 50 минутах до 100% В при 51 минуте (рис. 2)
Температура	55 °С
Модуляция	
Модуляция включена	от 1 до 53 минут
Петли	Две петли 40 мкл, конфигурация совместных потоков
Время модуляции	0,50 минуты
Ввод	
Объем	20 мкл
Температура	4 °С
Промывка иглы	6 секунд, промывочный порт (5 мМ фосфат рН 3 в 5% ацетонитриле)
Обнаружение	
Длина волны	Сигнал 214/4 нм, опорная 360/100 нм
Скорость передачи данных	80 Гц

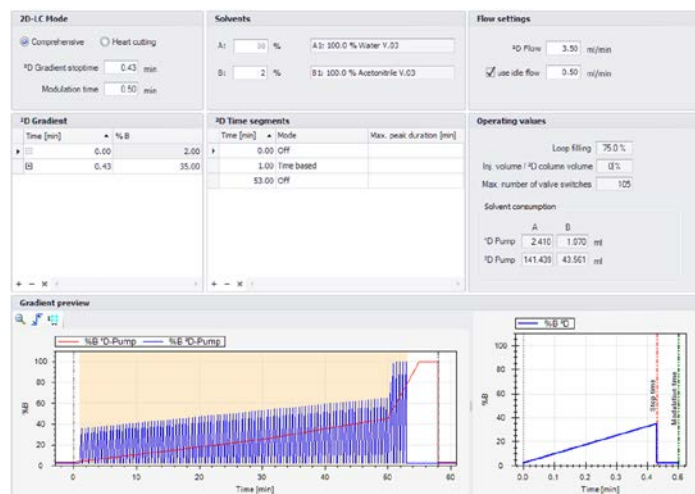


Рис. 2. Скриншот метода 2D-ЖХ (OpenLAB CDS Chemstation)

Результаты и обсуждение

На рис. 3 показан контурный график для гидролизата, полученный с помощью описанного метода и ПО для работы с изображениями ГХ. Был получен хороший охват последовательности трастузумабов. Идентификация пятен основывалась на методе, адаптированном для сочетания с масс-спектрометрией (использовали квадрупольно-времяпролетную систему G6530B). Пятна расположены на поверхности в случайном порядке, что свидетельствует о хорошей ортогональности между двумя измерениями.

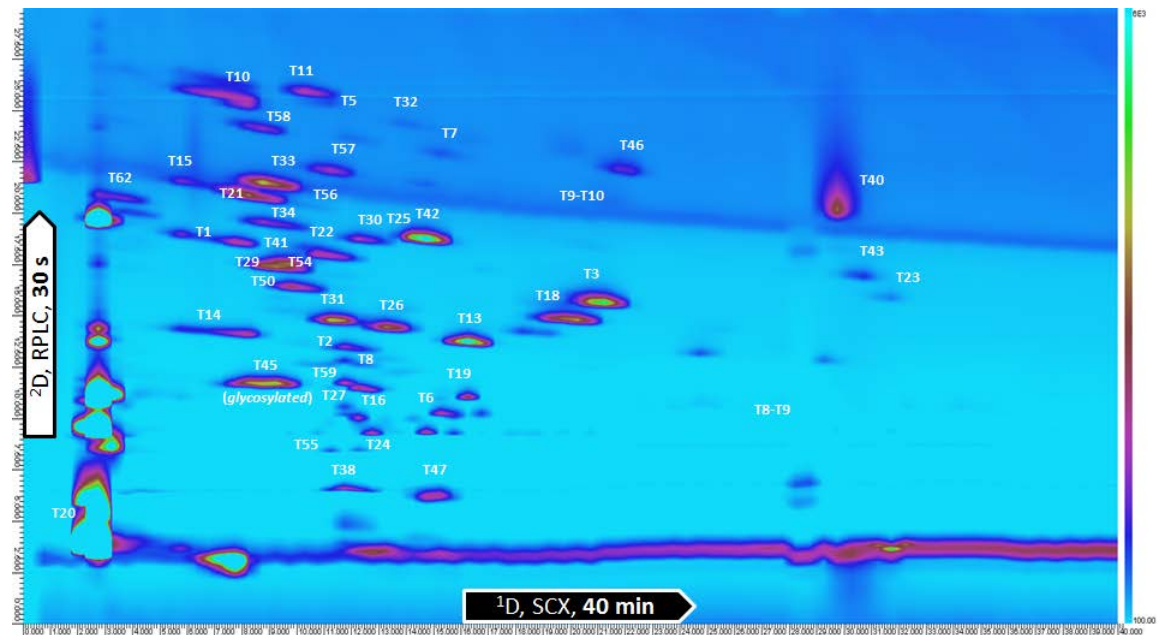


Рис. 3. Контурный график ЖХ-ЖХ для анализа триптического гидролизата трастузумаба

Для вычисления воспроизводимости метода анализ повторили пять раз. В табл. 1 представлены результаты для выборки из четырех пептидов. Точность объема и времени удерживания является очень высокой, что свидетельствует о целесообразности применения данного метода для сравнения различных производственных партий, а также оригинальных продуктов и биоаналогов.

Табл. 1. Воспроизводимые данные, рассчитанные по выборке пятен, n = 5

% ОСО	T3	T11	T43	T50
Объем	2,04	1,94	4,56	2,59
Высота	0,85	1,78	2,15	0,54
БУ 2D	0,09	0,05	0,25	0,15

Он также может использоваться для обнаружения примесей и модификаций. Для подтверждения полученных результатов было проведено исследование по форсированному разложению пробы трастузумаба. Продукт подвергли окислению и воздействию среды с повышенным уровнем pH, что привело к окислению и дезамидированию соответственно. На рис. 4 представлено

детальное изображение пробы оригинального продукта и пробы, подвергнутой окислению. На увеличенном фрагменте хорошо видно, что проба, подвергнутая воздействию, содержит дополнительные пятна. Для определения посредством ЖХ-МС было выбрано отмеченное пятно. Пятно можно отследить до пептида T41. Это результат окисления метионина, присутствующего в этом фрагменте.

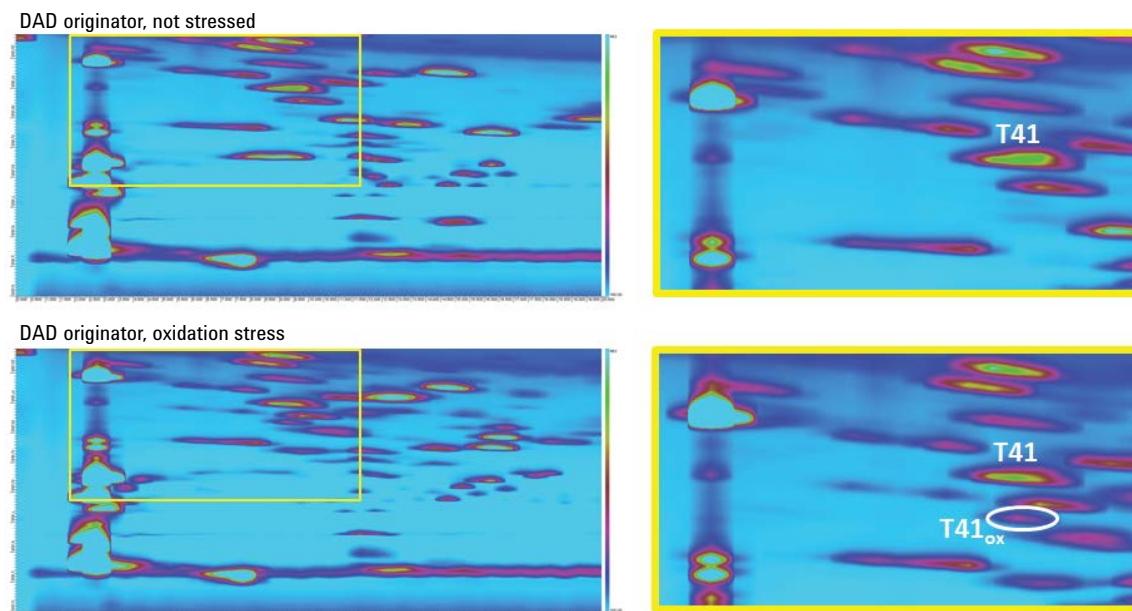
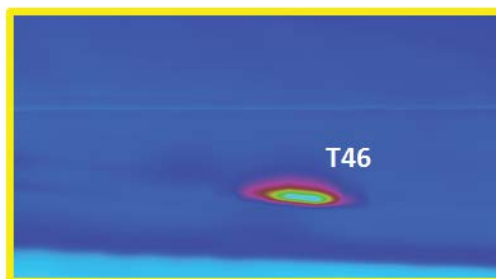
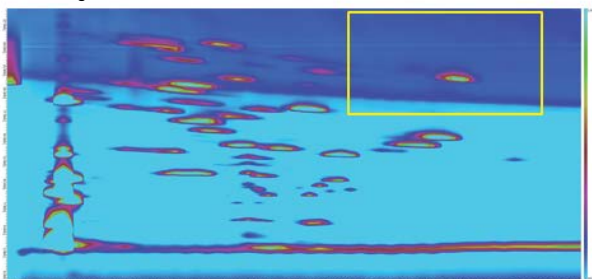


Рис. 4. Контурный график ЖХ-ЖХ для анализа триптического гидролизата, не подвергнутого и подвергнутого окислению трастузумаба. Следует обратить внимание, что окисление уже присутствует на пограничных уровнях в не подвергавшихся воздействию пробах, что иллюстрирует силу данной методики.

На рис. 5 представлен схожий пример, где показан результат для пробы, подвергнутой воздействию pH. Известно, что пептид 46 чувствителен к дезамидированию, поскольку он содержит аспарагин. Во время воздействия pH аспарагин превращается в аспарат. На контурном графике с идентичным временем удерживания во втором измерении заметно дополнительное пятно. Это свидетельствует о том, что в случае применения воздействия будет сложно отделить идентификационный пептид от его дезамидированного продукта разложения с помощью одной только обращенно-фазовой жидкостной хроматографии. Идентичность модификации была подтверждена посредством ЖХ-МС-МС с помощью адаптированного метода.

DAD originator, not stressed



DAD originator, pH stressed

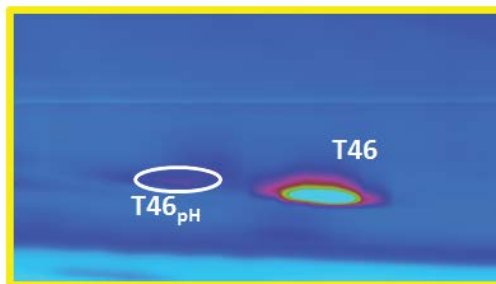
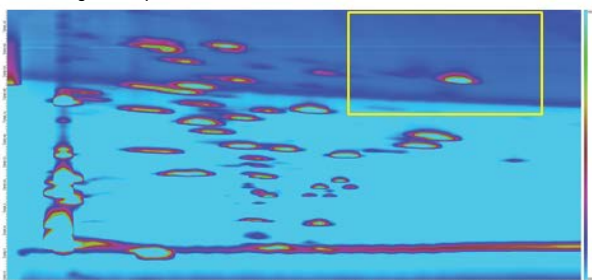


Рис. 5. Контурный график ЖХ-ЖХ для анализа триптического гидролизата, не подвергнутого и подвергнутого воздействию pH трастузумаба

Выводы

Приборный комплекс Agilent 1290 Infinity 2D-LC идеально подходит для анализа проб сложного состава, таких как белковые препараты. Этот метод демонстрирует огромный потенциал для оценки чистоты и идентичности. Точность настройки была превосходной, что позволяет использовать метод для контроля и обеспечения качества и сравнительного анализа производственных партий, а также оригинальных продуктов и биоаналогов.

Литература

1. K. Sandra, I. Vandenheede, P. Sandra, "The power of liquid chromatography-mass spectrometry in the characterization of protein biopharmaceuticals," *LCGC Europe Supplement*, May **2013**.
2. I. Francois, K. Sandra, P. Sandra, "Comprehensive liquid chromatography: fundamental aspects and practical considerations – a review," *Anal. Chim. Acta.* 64 14-31 (**2009**).
3. K. Sandra, M. Moshir, F. D'hondt, R. Tuytten, K.n Verleysen, K. Kas, I. Francois, P. Sandra, "Highly efficient peptide separations in proteomics. Part 2: bi- and multidimensional liquid-based separation techniques," *J. Chromatogr.*, B 877, 1019-1039 (**2009**).

www.agilent.com/chem

Информация может быть изменена без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2013-2014
Напечатано в США 15 сентября 2014 г.
5991-2880RU



Agilent Technologies