

Разделение и количественное определение агрегатов и фрагментов ритуксимаба методом эксклюзионной хроматографии высокого разрешения

Система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-Inert с четырехканальным насосом и колонка AdvanceBio SEC 300Å, 2,7 мкм

Рекомендации по применению

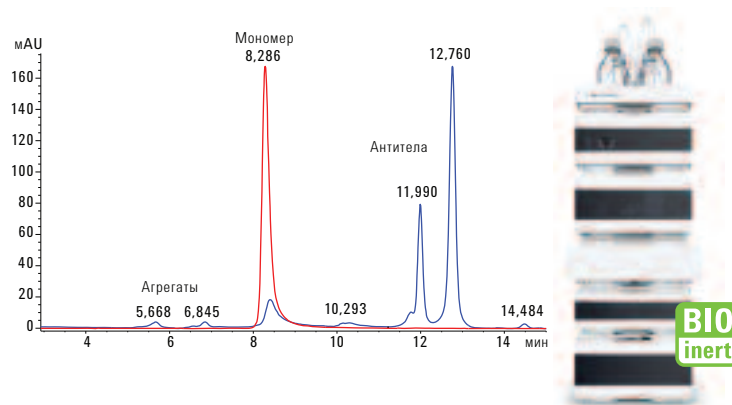
Биопрепараты и биоаналоги

Автор

М. Сундарам Паланисвами
(M.Sundaram Palaniswamy)
Agilent Technologies Pvt Ltd
Бангалор, Индия

Аннотация

Агрегация моноклональных антител может быть обусловлена воздействием различных механизмов, включая влияние окружающей среды и свойства самого продукта. Эксклюзионная хроматография (SEC) — стандартный метод качественного и количественного определения агрегатов и отдельных фрагментов в лекарственных препаратах на основе моноклональных антител. Задача данных рекомендаций по применению состоит в демонстрации разделения с высоким разрешением и количественного анализа оригинального ритуксимаба и его биоаналога (интактного, агрегатов и фрагментов), полученных при стресс-испытаниях. Разделение и количественный анализ проводили с использованием системы ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-inert с четырехканальным насосом и колонки AdvanceBio SEC. Калибровка колонки была выполнена с помощью маркеров молекулярных масс. Применение колонки AdvanceBio SEC обеспечило высокие показатели разрешения и чувствительности разделения для контроля агрегатов и продуктов распада. Данная колонка является оптимальным выбором при выполнении задач, требовательных к разрешению и чувствительности.



Agilent Technologies

Введение

Эксклюзионная хроматография (SEC) — широко используемый метод разделения различных терапевтических моноклональных антител в виде мономеров с низкой молекулярной массой (LMW) и с высокой молекулярной массой (HMW). В ходе эксклюзионной хроматографии при нормальных условиях различные мономеры разделяются в зависимости от их размера за счет различной способности проникать в поры неподвижной фазы. Эффективная разработка лекарственных препаратов на основе моноклональных антител также требует проведения оценки агрегации и фрагментации в результате деградации при стресс-испытаниях, которые включают физические и химические сценарии распада. С тех пор как стало известно, что агрегаты усиливают иммуногенность и влияют на безопасность и эффективность, их размер стал иметь значение при разработке биотерапевтических средств. Идентификация по методу эксклюзионной хроматографии, при которой возможно разделение и контроль таких агрегатов, является сложной задачей. В данной работе описаны преимущества одного из таких методов с использованием колонки Agilent AdvanceBio SEC, которая является воплощением передовой технологии в эксклюзионной хроматографии. Для разделения с высоким разрешением различных по массе моноклональных антител в колонке используются специальные частицы силикагеля размером 2,7 мкм и привитая фаза. Превосходные показатели времени удерживания и площади пиков, полученные по данному методу, позволяют судить о высокой эффективности колонки и используемой биоинертной системы ВЭЖХ.

Вещества и методики

Приборы

Использовали биоинертную систему ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-inert с четырехканальным насосом с максимальным давлением 600 бар, состоящую из следующих модулей:

- биоинертный четырехканальный насос для ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary Pump (G5611A);
- высокоэффективный биоинертный автосамплер Agilent 1260 Infinity High Performance Bio-inert Autosampler (G5667A);
- термостат автосамплера серии Agilent 1200 Infinity (G1330B);
- термостат колоночного отделения Agilent 1260 Infinity (TCC), с теплообменниками в биоинертном исполнении (G1316C, опц. 19);
- диодно-матричный детектор Agilent 1260 Infinity DAD VL (G1315D со стандартной биоинертной проточной кюветой 10 мм).

Программное обеспечение

Agilent ChemStation, версия В.04.03 (или выше).

Условия

Колонка:	Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7,8 × 300 мм, 2,7 мкм (кат. № PL1180-5301)
Подвижная фаза:	фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), 50 мМ натрий-фосфатного раствора содержат 150 мМ хлорида натрия, pH 7,4
Температура термостата колоночного отделения:	комнатная
Вводимый объем:	10 мкл
Скорость потока:	0,8 мл/мин
Детектирование:	УФ, 220 и 280 нм

Реагенты, пробы и материалы

Оригинальный ритуксимаб и его биоаналог, цетуксимаб, трастузумаб и конъюгат антитела и лекарственного средства (ADC) были приобретены в местной аптеке и хранились в соответствии с инструкцией производителя. Фосфатно-солевой буферный раствор, соляная кислота и раствор гидроксида натрия были приобретены у компании Sigma-Aldrich, Corp. Все химические вещества и растворители имели класс чистоты для ВЭЖХ, а очищенная вода была получена с помощью системы очистки воды Milli-Q (модель Millipore Elix 10, США).

Калибровка колонки AdvanceBio SEC

Калибровка колонки AdvanceBio SEC была проведена путем измерения объемов элюции нескольких стандартов [агрегаты белков, тиреоглобулин (670 кДа), γ -глобулин (158 кДа), овальбумин (44 кДа), миоглобин (17 кДа) и витамин B12 (1,35 кДа)]. Для определения эквивалентной молекулярной массы пробы была построена зависимость полученных значений молекулярного веса стандартов от объемов элюции (калибровочная кривая).

Процедура

Подвижная фаза (10 мкл) была введена в качестве холостой пробы, далее проведено шесть повторных вводов интактных и обработанных моноклональных антител для подсчета отклонений площадей пиков и времен удерживания.

Подготовка агрегатов ритуксимаба

Агрегаты моноклональных антител были приготовлены путем их растворения в подвижной фазе до конечной концентрации 2 мг/мл. Стресс-испытания при различных значениях pH были проведены по ранее описанной методике с незначительными изменениями [1]. 1 М HCl медленно по каплям добавляли в раствор проб для изменения pH от 6,0 to 1,0. Затем добавили 1 М NaOH для доведения pH до 10,0. После этого вновь добавляли 1 М HCl до возвращения pH к 6,0. Между изменениями pH выдерживалось время примерно в 1 минуту при постоянном перемешивании при 500 об/мин. Полученный раствор выдержали 60 минут при 60 °C.

Результаты и обсуждение

Разделение и обнаружение

В качестве стандартов для калибровки колонки AdvanceBio SEC 300Å были использованы белки с известными значениями молекулярной массы (рис. 1). Агрегаты белка-стандарта (пустой пик) в маркере белка были использованы для расчета объема пустого пространства, который элюируется на 5,748 мин в колонке и соотносится с $V_0 = 4,59$ (мл). Калибровочная кривая разделенных в колонке белков имеет вид линейной зависимости и позволяет определить эксклюзионный предел (670 кДа) в диапазоне измерений (от 1,3 до 670 кДа) анализируемого белка (рис. 2). Зная объем элюции неизвестного белка, по данному графику можно определить его молекулярную массу.

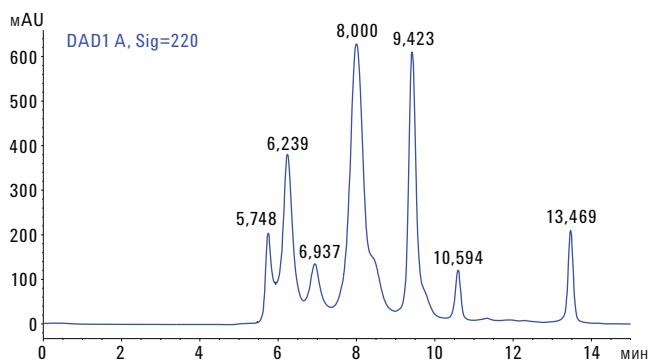


Рис. 1. Разделение стандартов белков с использованием колонки Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7,8 × 300 мм, 2,7 мкм

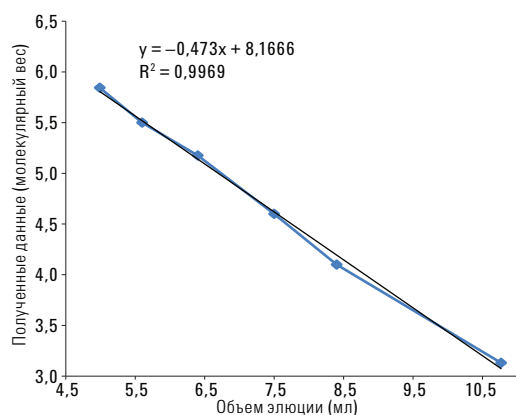


Рис. 2. Калибровочная кривая колонки Agilent AdvanceBio SEC-3, 300Å, 7,8 × 300 мм, 2,7 мкм по стандартам

На рис. 3 показано превосходное разделение интактных моноклональных антител на восьмой минуте с использованием колонки AdvanceBio SEC 300Å. Отсутствие более ранних или более поздних пиков предполагает однородность подготовленных купленных моноклональных антител и отсутствие их агрегации или деградации.

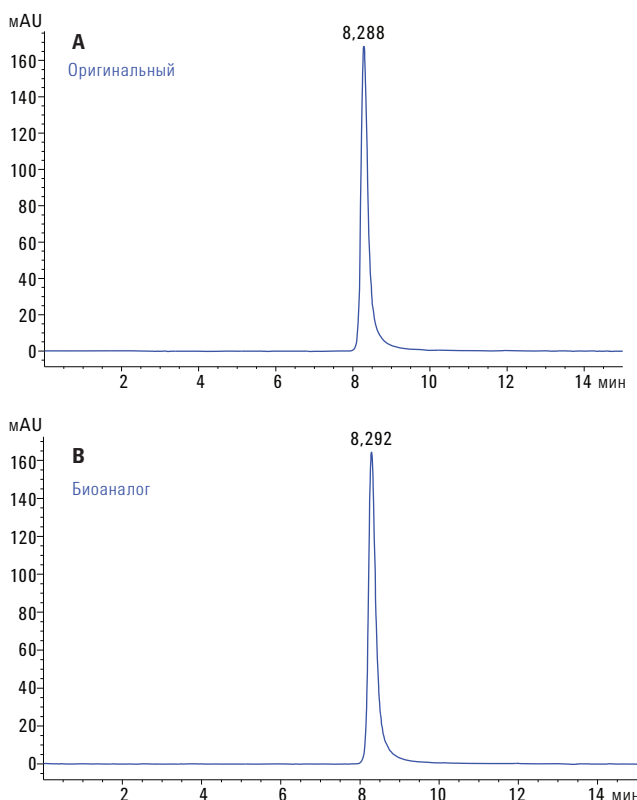


Рис. 3. Хроматограмма по методу эксклюзионной хроматографии интактных терапевтических моноклональных антител с использованием колонки Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7,8 × 300 мм, 2,7 мкм: А: оригинальный ритуксимаб, В: биоаналог ритуксимаба

На рис. 4 показано совмещение хроматограмм оригинального лекарственного препарата ритуксимаб и его биоаналога. Пик острый и симметричный, неспецифические взаимодействия отсутствуют. В табл. 1 приведены средние показатели времени удерживания и ОСО площадей пиков для шести повторных вводов интактных моноклональных антител. Время удерживания и ОСО площадей пиков были ниже 0,04% и 1% соответственно, что демонстрирует превосходную воспроизводимость метода и, следовательно, точность системы. Времена удерживания биоаналога и оригинального ритуксимаба были сопоставимы. Чистота по соотношению площадей пиков биоаналога и оригинального ритуксимаба превышала >99%, что указывает на их высокую схожесть.

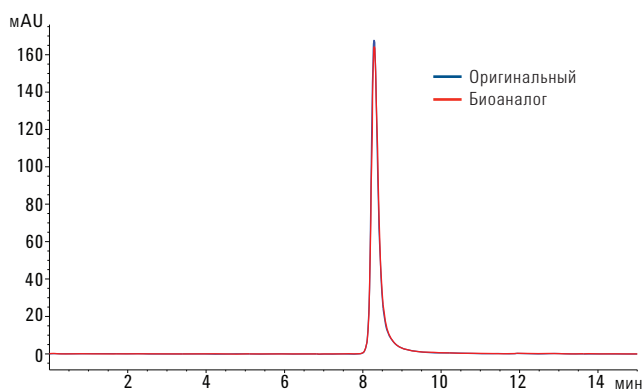


Рис. 4. Наложение хроматограмм оригинального ритуксимаба и его биоаналога с использованием колонки Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7,8 × 300 мм, 2,7 мкм.

Таблица 1. Точность времен удерживания и площадей пиков ритуксимаба (n = 6)

Проба	Время удерживания		Площадь пика	
	Среднее (мин)	ОСО	Среднее (mAU/мин)	ОСО
Оригинальный ритуксимаб	8,28	0,04	99,33	1,21
Биоаналог ритуксимаба	8,29	0	100	0

Анализ агрегации и деградации, количественное определение

Интактные и обработанные биоаналоги и оригинальные моноклональные антитела сравнили, используя эксклюзионную хроматографию для контроля агрегатов и продуктов деградации. Любой пик хроматограммы, элюированный до пика мономерной формы, считался агрегатом, а элюированный после — продуктом деградации [2].

На рис. 5 показаны хроматограммы, полученные по методу эксклюзионной хроматографии, при тепловой обработке при различных значениях pH оригинального ритуксимаба и его биоаналога. Из хроматограмм видно, что в случае такой же методики анализа интакта при использовании колонки AdvanceBio SEC агрегаты и продукты деградации моноклональных антител были разделены и обнаружены. На основании процента площади пика данные относительного количественного определения агрегатов и фрагментов оригинального ритуксимаба и его биоаналога обобщены в табл. 2.

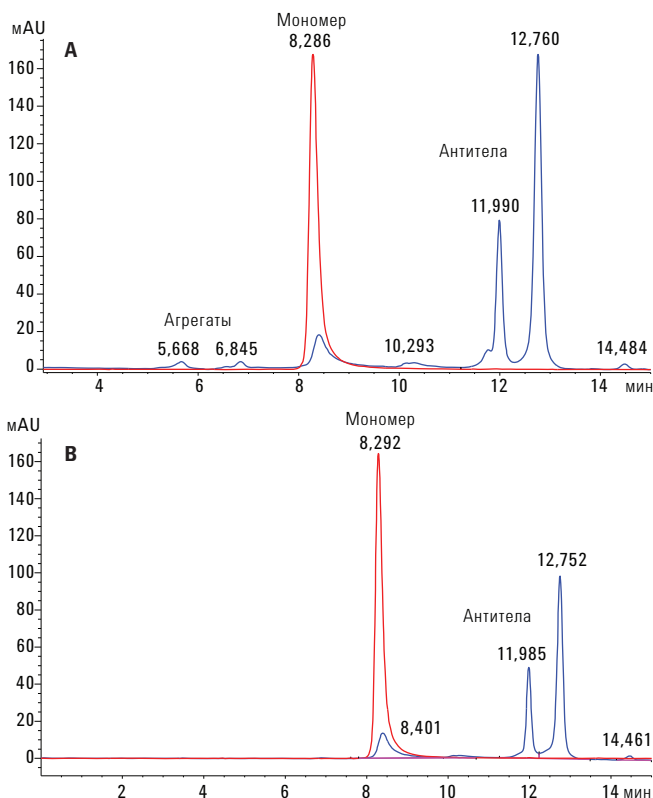


Рис. 5. Наложение хроматограмм, полученных при использовании колонки Agilent AdvanceBio SEC: А — интактный оригинальный ритуксимаб (красный цвет) и проба с тепловой обработкой при различных значениях pH (синий цвет), В — интактный биоаналог ритуксимаба (красный цвет) и проба с тепловой обработкой при различных значениях pH (синий цвет)

Таблица 2. Соотношение площадей пиков на хроматограммах оригинального ритуксимаба и его биоаналога до (интактного) и после воздействия

Интактный оригинальный материал		Оригинальный материал после воздействия	
Время	Площадь пика, %	Время	Площадь пика, %
8,288 (мономер)	100	1,289	4,24
		5,668	2,26
		6,845	2
		8,40 (мономер)	13,6
		10,29	2,81
		11,99	23,22
		12,76	51,01
		14,48	1,11
Интактный биоаналог материала		Биоаналог материала после воздействия	
Время	Площадь пика, %	Время	Площадь пика, %
8,292 (мономер)	100	8,40 (мономер)	16,832
		11,985	24,24
		12,75	57,36
		14,46	1,5

Стоит отметить, что относительная площадь пиков агрегированных видов оригинальных моноклональных антител под воздействием возросла по сравнению с биоаналогами. Однако характер фрагментации и площади пиков фрагментов для обоих моноклональных антител были сопоставимы. Мономерная форма у оригинального моноклонального антитела и его биоаналога после воздействия составила 13% и 16%, в то время как преобладающей формой у обоих антител (более 50%) были фрагменты, элюируемые примерно на 12,75 мин.

В заключение был проведен анализ для определения способности колонки AdvanceBio SEC разделять имеющие коммерческое значение моноклональные антитела и конъюгаты антитела и лекарственного средства (ADC), близкие по молекулярной массе. На рис. 6 показано наложение хроматограмм. Использование колонки AdvanceBio SEC позволило разделить терапевтические моноклональные антитела и конъюгат антитела и лекарственного средства (ADC) в зависимости от их молекулярной массы. Четкое различие времен удерживания свидетельствует о пригодности этой колонки для анализа таких молекул.

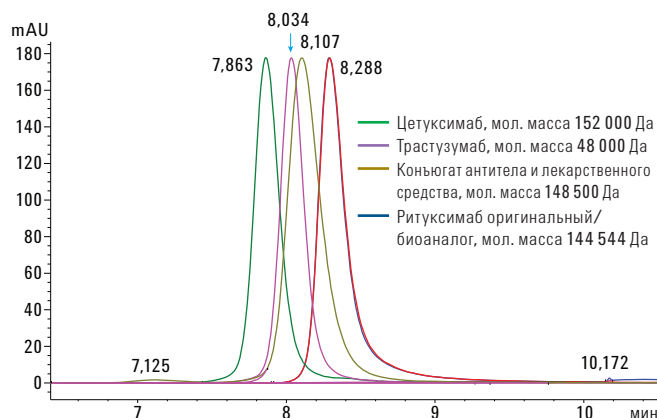


Рис. 6. Наложение хроматограмм оригинального ритуксимаба и его биоаналога, трастузумаба, цетуксимаба и конъюгата антитела и лекарственного средства с использованием колонки Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7,8 × 300 мм, 2,7 мкм

Выводы

Разработка новых продуктов на основе моноклональных антител — сложный процесс, включающий определение разнообразных физико-химических свойств, таких как чистота, агрегация и ряд других, связанных с данными продуктами. Эксклюзионная хроматография широко используется для контроля и количественного определения при нормальных условиях моноклональных антител в виде мономеров с низкой молекулярной массой (LMW) и высокой молекулярной массой (HMW). В данной работе для разработки простого метода разделения интактных и обработанных проб ритуксимаба при нормальных условиях была использована колонка Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7,8 × 300 мм, 2,7 мкм. Применение оптимизированного метода позволило получить соответствующий мономеру отдельный симметричный пик с уровнем чистоты 100%, без признаков присутствия агрегатов или фрагментов. Такой же метод разделения и количественного определения агрегатов и фрагментов получен при стресс-испытаниях. Это возможно только при использовании такой колонки, как AdvanceBio SEC, которая обеспечивает высокое разрешение и чувствительность разделения различных по массе моноклональных антител. Кроме этого, система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-inert обладает биоинертностью и коррозионной прочностью.

Литература

1. Б. Басак Кюкрер , В. Филип , Э. ван Дуин , П. Т. Каспер, Р. Д. Врикен, А. Д. Р. Хек, В. Джискут. Масс-спектрометрический анализ интактных агрегатов человеческих моноклональных антител, разделенных по методу эксклюзионной хроматографии. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 2197–2204.
2. Р. Родригез-Диаз, Т. Вер. Применение эксклюзионной хроматографии в процессе разработки биопрепаратов. В *аналитических методиках разработки биопрепаратов*, Р. Родригез-Диаз, Т. Вер, С. Так, Eds.; CRC Press: Нью-Йорк, **2005**.

Дополнительная информация

Представленные данные являются стандартными значениями. Для получения дополнительной информации о наших продуктах и услугах посетите наш веб-сайт по адресу:
www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Компания Agilent не несет ответственности за возможные ошибки в настоящем документе, а также за убытки, связанные или являющиеся следствием получения настоящего документа, ознакомления с ним и его использования.

Информация, описания и спецификации в настоящем документе могут быть изменены без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
Напечатано в США
16 октября 2015 г.
5991-6304RU



Agilent Technologies