

Cromatografía de exclusión por tamaño rápida y de alta resolución de agregados en aplicaciones bioterapéuticas

Nota de aplicación

Productos biológicos y biosimilares

Autor

Andrew Coffey
Agilent Technologies, Inc.

Introducción

La agregación de proteínas es un atributo de calidad crítico para proteínas bioterapéuticas debido a que los agregados pueden afectar significativamente a la seguridad y pueden generar una respuesta antigénica [1]. Los agregados también podrían reducir la eficacia de los productos biofarmacéuticos, además de aumentar el precio del proceso. Las proteínas se agregan con frecuencia cuando se exponen a condiciones rigurosas, como cambios en pH, temperatura o concentración; en consecuencia, la agregación puede tener lugar en muchas etapas diferentes de la producción. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) tiene la consideración de método de referencia para la cuantificación de agregados.

La monitorización de la formación de agregados durante el desarrollo de productos bioterapéuticos, por ejemplo, durante la selección de clones, o al optimizar las condiciones de fermentación siguiendo el método de “diseño riguroso de experimentos”, podría originar un elevadísimo número de muestras que precisen el análisis de exclusión por tamaño.

Las condiciones que suelen emplearse para la SEC suelen requerir tiempos de análisis de 20 minutos o más, lo que restringe enormemente la posibilidad de analizar números elevados de muestras. Las columnas Agilent AdvanceBio SEC están diseñadas con un tamaño de partícula y un tamaño de poro muy optimizados que pueden permitir separaciones más rápidas con el fin de reducir significativamente este cuello de botella analítico. La presente nota de aplicación describe técnicas que permiten incrementar el número de muestras analizadas sin poner en peligro la exactitud de los análisis.



Agilent Technologies

Materiales y métodos

Reactivos, muestras y materiales

La inmunoglobulina G (IgG) se adquirió de Sigma-Aldrich, Corp. La mezcla de proteínas estándar se obtuvo de Bio-Rad Laboratories, Inc. Los componentes de la mezcla de proteínas estándar fueron tiroglobulina (670 kDa), γ -globulina (158 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), mioglobina (17 kDa) y vitamina B12 (1,35 kDa). Todos los compuestos químicos y los disolventes eran de calidad para HPLC; asimismo, se utilizó agua de alta pureza obtenida con un sistema de purificación de agua Milli-Q.

Instrumentos

Se utilizó un sistema LC cuaternario bioinerte Agilent 1260 Infinity, completamente biocompatible, compuesto por los módulos siguientes:

- Bomba LC cuaternaria bioinerte Agilent 1260 Infinity (G5611A)
- Inyector automático de alto rendimiento bioinerte Agilent 1260 Infinity (G5667A)
- Termostato Agilent Serie 1200 Infinity (G1330B)
- Compartimento termostatzado de columna Agilent 1260 Infinity (G1316C)
- Detector de diodo array Agilent 1260 Infinity (G1315D) con celda de flujo bioinerte.

El software utilizado fue Agilent ChemStation B.04.03.

Condiciones

Columnas: Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 × 150 mm, 2,7 μ m (ref. 1180-3301),
Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 μ m (ref 1180-5301),
Columna diol de otro fabricante, 7,8 × 300 mm, 5 μ m

Fase móvil: fosfato sódico 150 mM, pH 7,0

Temp. del TCC: 30 °C

Vol. iny.: 5 μ l

Vel. flujo: 0,5 – 1,4 ml/min (véanse las leyendas de las figuras)

Detección: UV a 220 nm

Resultados y comentarios

Las columnas AdvanceBio SEC tienen partículas de 2,7 μ m diseñadas para proporcionar la máxima eficiencia sin el riesgo de degradar las muestras por corte ni de producir obstrucción entre partículas. El exclusivo método de fabricación controla el tamaño, la estructura y el volumen del poro. La aplicación de un revestimiento polimérico hidrófilo garantiza unos picos estrechos y bien resueltos para las proteínas. En la Figura 1 se muestran cromatogramas SEC comparativos de la separación de patrones de proteínas mediante el uso de una columna AdvanceBio SEC y una columna de las mismas dimensiones (7,8 × 300 mm). La columna AdvanceBio SEC mostró una separación de elevada eficiencia del patrón de proteínas en comparación con la otra columna. La columna AdvanceBio SEC exhibió asimismo una forma ideal para el pico cromatográfico del monómero IgG (pico 4). El dímero de ovoalbúmina (pico 5) se resolvió bien en comparación con la columna del otro fabricante. Estos resultados demuestran el rendimiento superior de la columna AdvanceBio SEC.

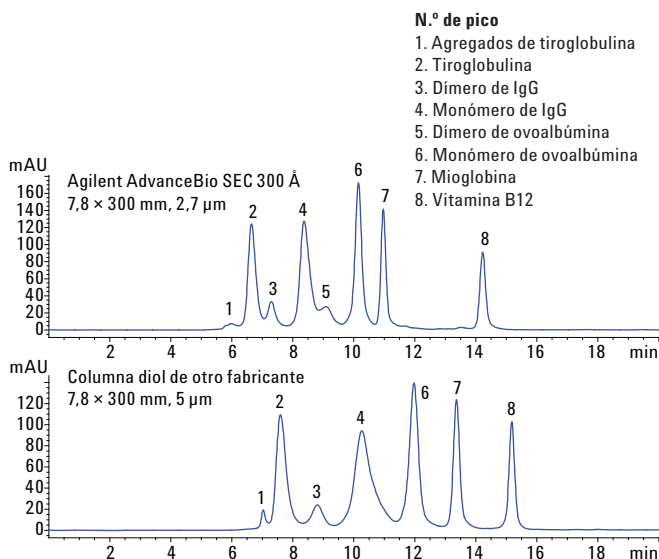


Figura 1. Exclusión por tamaño de patrones de proteínas en condiciones de alta resolución a 0,8 ml/min con un tiempo de análisis de 20 minutos, lo que demuestra el superior rendimiento de la columna Agilent AdvanceBio SEC.

En condiciones “estándar” de alta resolución con columnas de 300 mm y una velocidad de flujo de 0,8 ml/min, el tiempo de análisis es de 20 minutos. Esto proporciona una productividad máxima de tres muestras a la hora, precisándose 1,3 días para el análisis de 96 muestras. Para aumentar la productividad, se pueden usar columnas más cortas, de 150 mm, que proporcionarán unos tiempos de análisis más cortos. En la Figura 2 se muestra la separación de inmunoglobulina G en columnas AdvanceBio SEC de 300 mm y de 150 mm, a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min. El tiempo de retención se reduce a la mitad con la columna de 150 mm y, con un factor de resolución de 1,73 entre los picos del monómero y del dímero, la cuantificación no se ve afectada negativamente. La columna AdvanceBio SEC más corta permite tiempos de análisis más rápidos y un análisis de alta resolución para los anticuerpos monoclonales.

La agregación de las proteínas bioterapéuticas juega un papel importante en lo que respecta a la mejora de la inmunogenicidad, afectando a la eficacia y a la toxicidad. Una cuantificación exacta de los agregados mediante análisis SEC depende principalmente de la resolución entre los picos de los monómeros y de los agregados. En consecuencia, la resolución y la cuantificación son dos parámetros fundamentales en la SEC, dependiendo la primera de la velocidad lineal. Con el fin de evaluar estos dos parámetros, se probaron diferentes velocidades de flujo con una columna de 150 mm. La excelente estabilidad de partículas de las columnas AdvanceBio SEC permite el funcionamiento a velocidades de flujo significativamente más elevadas sin excesiva pérdida de rendimiento. Con velocidades de flujo más elevadas, el factor de resolución disminuye. No obstante, la cuantificación del área de pico del monómero varía muy poco (Figura 3), lo que permite la identificación de muchas más muestras para determinar su contenido en agregados.

La maximización del número de muestras analizadas proporciona ventajas competitivas y resultados de mayor confianza, lo que conlleva beneficios económicos. La disminución de la longitud de la columna y el aumento de la velocidad de flujo es una estrategia sencilla que permite realizar análisis SEC rápidos. En la tabla 1 se muestra el cálculo teórico de la velocidad de flujo frente al número de análisis de muestras al día. Con una velocidad de flujo de 1,5 ml/min y un tiempo de análisis de 4,8 minutos, se pueden analizar 300 muestras al día, es decir, se consigue una productividad 4,2 veces superior.

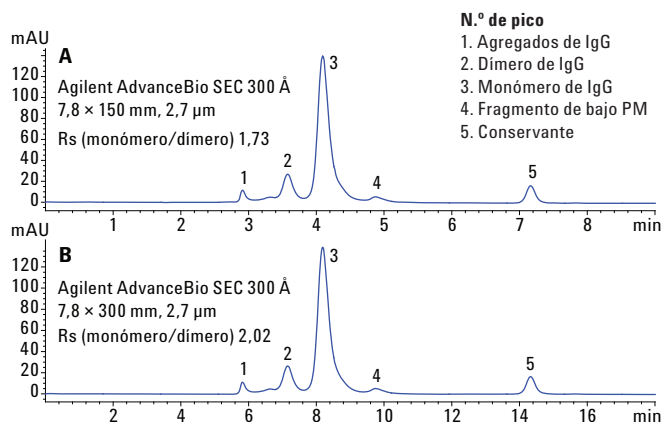


Figura 2. Exclusión por tamaño de la inmunoglobulina G en condiciones de alta resolución a 0,8 ml/min. Comparación entre una columna de 150 mm con un tiempo de análisis de nueve minutos (A) y otra de 300 mm con un tiempo de análisis de 18,5 minutos (B).

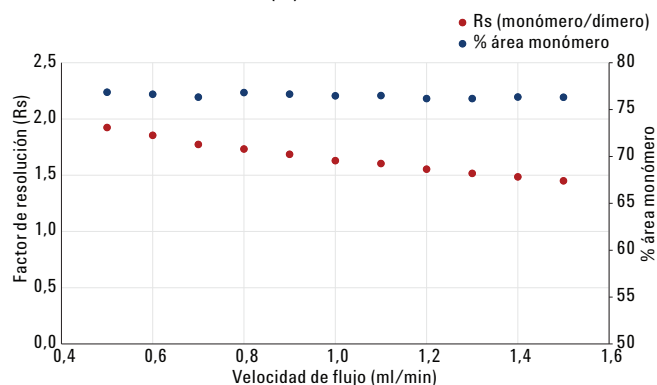


Figura 3. Efecto de la velocidad de flujo sobre el factor de resolución y determinación del porcentaje de área del monómero.

Tabla 1. Ganancias en productividad aumentando la velocidad de flujo para permitir un mayor número de muestras analizadas.

Longitud de la columna (mm)	Velocidad de flujo (ml/min)	Tiempo de análisis (min)	Muestras a la hora	Muestras al día
300	0,8	20	3	72
150	0,5	15	4	96
150	0,6	12	4–5	120
150	0,7	10	5–6	144
150	0,8	9	6–7	160
150	0,9	8	6–7	180
150	1,0	7	7–8	205
150	1,1	6,5	8–9	220
150	1,2	6	8–9	240
150	1,3	5,5	11	260
150	1,4	5	12	288
150	1,5	4,8	12–13	300

En la figura 4 se muestran los cromatogramas SEC superpuestos, con las columnas de 300 mm y 150 mm a velocidades de flujo diferentes. Conservando una cuantificación exacta del contenido en monómeros, queda claro que las condiciones de SEC rápida pueden conseguirse en la cuarta parte del tiempo.

Conclusiones

Este estudio demuestra las ventajas de utilizar columnas Agilent AdvanceBio SEC más cortas y velocidades de flujo superiores para aumentar significativamente la productividad para el análisis de agregados en proteínas bioterapéuticas. Mediante la reducción de la longitud de la columna de 300 mm a 150 mm y el aumento de la velocidad de flujo de 0,8 ml/min a 1,5 ml/min, se puede conseguir un aumento del 400 % en el rendimiento y la productividad de las muestras; por ejemplo, el tiempo necesario para analizar 96 muestras puede reducirse desde 1,3 días a menos de ocho horas.

Referencia

1. K. D. Ratanji, J. P. Derrick, R. J. Dearman, I. Kimber. Immunogenicity of therapeutic proteins: Influence of aggregation. *J. Immunotoxicol.* **2014**, 11(2), 99–109.

Más información

Estos datos representan resultados típicos. Si desea obtener más información sobre nuestros productos y servicios, visite nuestra página web www.agilent.com/chem.

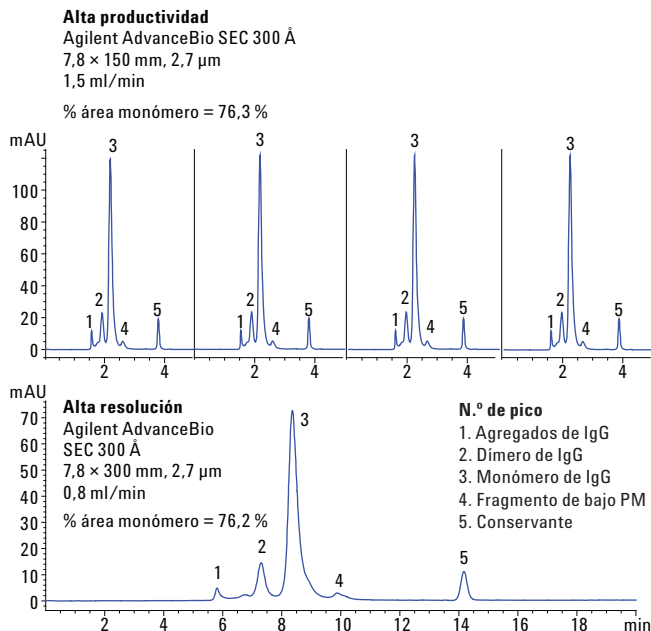


Figura 4. Comparación de cromatogramas de inmunoglobulina G en condiciones de alta productividad y alta resolución.

www.agilent.com/chem

Agilent no se hace responsable de ningún error incluido en este documento ni de ningún daño incidental o consecuencial relacionado con la distribución, la aplicación o el uso de este material.

La información, las descripciones y las especificaciones de esta publicación están sujetas a modificación sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2015
Impreso en EE. UU.
24 de noviembre de 2015
5991-6458ES



Agilent Technologies