

Cromatografia por exclusão de tamanho de alta resolução rápida para agregados bioterapêuticos

Nota de aplicação

Biológicos e Biossimilares

Autor

Andrew Coffey
Agilent Technologies, Inc.

Introdução

A agregação de proteínas é um atributo essencial de qualidade para proteínas bioterapêuticas porque os agregados podem ter um impacto significativo na segurança e pode resultar em uma resposta antigênica [1]. Os agregados também podem reduzir a eficácia da biofarmacêutica e comprometer significativamente a economia do processo. As proteínas frequentemente agregam quando expostas a condições de tensão como alterações no pH, temperatura ou concentração, portanto a agregação pode ocorrer em muitos estágios diferentes da produção. A cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) foi identificada como o método escolhido para a quantificação de agregados.

O monitoramento da formação de agregados durante o desenvolvimento de bioterapêuticos, por exemplo durante a seleção de clones ou enquanto otimiza as condições de fermentação por meio de uma rigorosa abordagem de "projetos de experimentos" pode resultar em um grande número de amostras que demandarão análise de exclusão por tamanho.

As condições normalmente usadas pela SEC frequentemente resultam em tempos de execução de 20 minutos ou mais, restringindo muito a capacidade de analisar números maiores de amostras. As colunas SEC Agilent AdvanceBio foram projetadas com tamanho de partícula e tamanho de poro altamente otimizados que podem permitir separações mais rápidas para reduzir significativamente essa limitação analítica. Essa nota de aplicação descreve técnicas para aumentar a produtividade de amostras sem comprometer a precisão da análise.



Agilent Technologies

Materiais e métodos

Reagentes, amostras e materiais

A imunoglobulina G (IgG) foi comprada da Sigma-Aldrich, Corp. A mistura padrão de proteína foi adquirida da Bio-Rad Laboratories, Inc. Os componentes da mistura padrão de proteína foram tireoglobulina (670 kDa), g-globulina (158 kDa), ovoalbumina (44 kDa), mioglobina (17 kDa) e vitamina B12 (1,35 kDa). Todos os produtos químicos e solventes tinham grau de pureza HPLC e foi utilizada água purificada de um sistema de purificação MilliQ.

Instrumentos

Um sistema quaternário Agilent 1260 Infinity Bio-inert LC completamente biocompatível foi usado, consistindo nos seguintes módulos:

- Bomba de LC quaternário Agilent 1260 Infinity Bio-Inert (G5611A)
- Amostrador automático de alto desempenho Agilent 1260 Infinity Bio-Inert (G5667A)
- Termostatizador de amostras Série Agilent 1200 Infinity (G1330B)
- Compartimento de coluna termostatizado (TCC) Agilent 1260 Infinity (G1316C)
- Detector de arranjo de diodos Agilent 1260 Infinity (G1315D) com cela de fluxo Bio-inert

O software era o Agilent ChemStation B.04.03.

Condições

Colunas: SEC Agilent AdvanceBio 300Å, 7,8 × 150 mm, 2,7 µm (p/n 1180-3301),
SEC Agilent AdvanceBio 300Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm (p/n 1180-5301),
Coluna diól de outro fornecedor, 7,8 × 300 mm, 5 µm

Fase móvel: 150 mM de fosfato de sódio, pH 7,0

Temp de TCC: 30 °C

Vol. da inj.: 5 µL

Taxa de fluxo: 0,5 – 1,4 mL/min (veja as legendas da figura)

Detecção: UV a 220 nm

Resultados e discussão

As colunas SEC AdvanceBio têm partículas de 2,7 µm projetadas para dar eficiência máxima sem risco de degradação do corte da amostras ou entupimento entre as partículas. O método único de fabricação controla a estrutura e o tamanho dos poros, além do volume dos poros. Aplicar um revestimento polimérico hidrofílico garante que os picos de proteína sejam fortes e resolvidos. A Figura 1 mostra os cromatogramas comparativos de SEC da separação de padrões de proteína usando uma coluna SEC AdvanceBio e a coluna de outro fornecedor com as mesmas dimensões (7,8 × 300 mm). A coluna SEC AdvanceBio mostrou uma separação de padrão de proteínas de alta eficiência em comparação com a outra coluna. A coluna SEC AdvanceBio mostrou um formato ideal de pico de cromatografia para o monômero IgG (pico 4). O dímero ovoalbumina (pico 5) foi bem resolvido em comparação com a coluna de outro fornecedor. Esses resultados demonstram o desempenho superior da coluna SEC AdvanceBio.

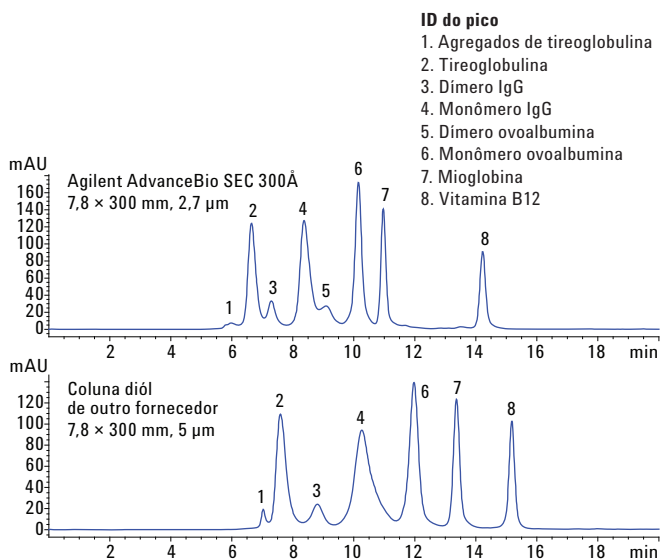


Figura 1. Exclusão por tamanho de padrões de proteína sob condições de alta resolução a 0,8 mL/min com um tempo de corrida cromatográfica de 20 minutos, mostrando o desempenho superior da coluna SEC Agilent AdvanceBio.

Sob condições “padrão” de alta resolução com colunas de 300 mm e taxa de fluxo de 0,8 mL/min, o tempo de corrida cromatográfica é de 20 minutos. Isso gera uma produtividade máxima de três amostras por hora, levando mais de 1,3 dias para executar 96 amostras. Para aumentar a produtividade, colunas menores de 150 mm resultam em tempos de corrida cromatográfica proporcionalmente menores. A Figura 2 mostra a separação de imunoglobulina G executada em colunas SEC AdvanceBio de 300 mm e 150 mm operadas a 0,8 mL/min. O tempo de retenção é reduzido pela metade com colunas de 150 mm e com um fator de resolução de 1,73 entre picos de monômero e dímero, a quantificação não seria comprometida. A coluna SEC AdvanceBio menor permite um tempo de execução mais rápido e a análise de alta resolução de mAbs.

A agregação de proteínas bioterapêuticas foi implicada em imunogenicidade aprimorada, afetando a eficácia e a toxicidade. A quantificação precisa de agregados por análise de SEC depende principalmente da resolução entre picos de monômeros e agregados. Assim, a resolução e a quantificação são dois parâmetros essenciais na SEC, onde a velocidade linear influencia a resolução. Para avaliar esses dois parâmetros, diferentes taxas de fluxo foram testadas com uma coluna de 150 mm. A excelente estabilidade de partícula das colunas SEC AdvanceBio permite a operação em taxas de fluxo significativamente maiores sem perda excessiva de desempenho. Em taxas de fluxo mais altas, o fator de resolução é diminuído. No entanto, a quantificação da área de pico de monômero permanece amplamente inalterada (Figura 3), permitindo que significativamente mais amostras sejam examinadas para determinar seu conteúdo de agregados.

Maximizar a produtividade das amostras fornece vantagens competitivas e resultados mais confiáveis, resultando em benefícios econômicos. Diminuir o comprimento da coluna com taxa de fluxo maiores é uma estratégia simples para atingir execuções rápidas de SEC. A Tabela 1 mostra o cálculo teórico de taxa de fluxo em relação ao número de análises de amostras por dia. Em uma taxa de fluxo de 1,5 mL/min com um tempo de execução de 4,8 minutos, 300 amostras podem ser analisadas por dia, demonstrando uma produtividade até 4,2 vezes maior.

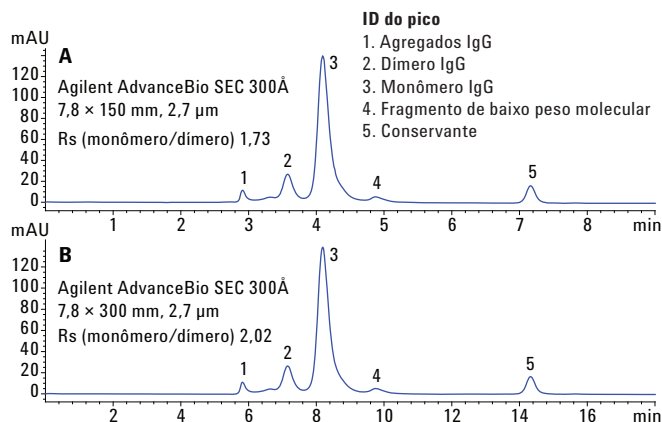


Figura 2. Exclusão por tamanho de imunoglobulina G sob condições de alta resolução a 0,8 mL/min. Uma coluna de 150 mm com um tempo de corrida cromatográfica de nove minutos (A) em relação a uma coluna de 300 mm com um tempo de corrida cromatográfica de 18,5 minutos (B).

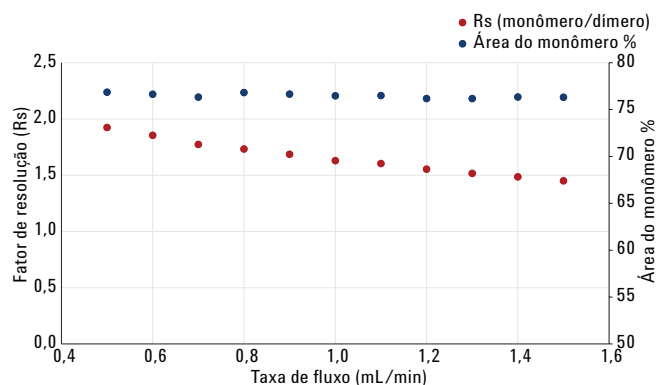


Figura 3. Efeito de taxa de fluxo no fator de resolução e determinação de porcentagem da área do monômero.

Tabela 1. Ganhos em produtividade através do aumento da taxa de fluxo para permitir maior produtividade de amostras.

Comprimento da coluna (mm)	Taxa de fluxo (mL/min)	Tempo de aquisição (min)	Amostras por hora	Amostras por dia
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

A Figura 4 mostra os cromatogramas de SEC de sobreposição com colunas de 300 mm e 150 mm em diferentes taxas de fluxo. Mantendo a quantificação precisa do conteúdo de monômeros, fica claro que as condições de SEC rápida podem ser atingidas em um quarto do tempo.

Conclusões

Esse estudo demonstra as vantagens do uso de colunas SEC Agilent AdvanceBio e de taxas de fluxo mais altas para aumentar significativamente a produtividade da análise de agregados em proteínas bioterapêuticas. Reduzindo o comprimento da coluna de 300 mm para 150 mm, e aumentando a taxa de fluxo de 0,8 mL/min para 1,5 mL/min, é possível atingir um aumento de 400% na produtividade das amostras, de tal modo que o tempo necessário para analisar 96 amostras pode ser reduzido de 1,3 dia para menos de 8 horas.

Referência

1. K. D. Ratanji, J. P. Derrick, R. J. Dearman, I. Kimber. Imunogenicidade de proteínas terapêuticas: influência de agregação. *J. Immunotoxicol.* **2014**, 11(2), 99–109.

Mais informações

Estes dados representam os resultados típicos. Para obter mais informações sobre nossos produtos e serviços, acesse o site www.agilent.com/chem.

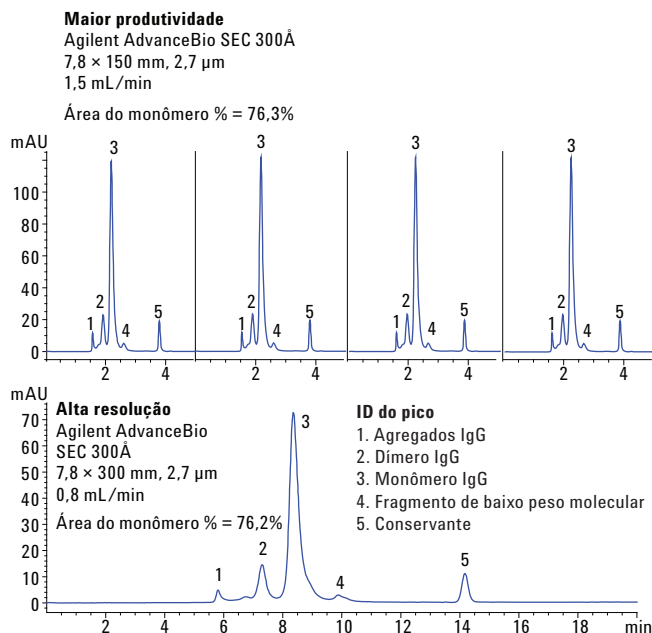


Figura 4. Cromatogramas comparativos de imunoglobulina G sob condições de alta produtividade e alta resolução.

www.agilent.com/chem

A Agilent Technologies não será responsável por erros contidos neste documento ou por danos incidentais ou consequenciais em relação ao fornecimento, desempenho ou uso deste material.

As informações, descrições e especificações nesta publicação estão sujeitas a mudanças sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
Impresso nos EUA
24 de novembro de 2015
5991-6458PTBR