



Аффинная хроматография иммуноглобулина G (IgG) на основе связывания с белком А с последующим анализом агрегации с использованием колонки для эксклюзионной хроматографии Agilent AdvanceBio SEC

Использование системы двумерной жидкостной
хроматографии Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution

Методические рекомендации

Биотерапевтические средства и биопрепараты

Авторы

Патрик Кронан (Patrick Cronan),
Тимоти Райс (Timothy Rice)
и Майкл Крюгер (Michael Kruger)
Agilent Technologies, Inc.

Аннотация

В настоящих методических рекомендациях описывается количественный анализ агрегатов в пробах биотерапевтических средств с использованием системы двумерной жидкостной хроматографии Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution. В качестве первой ступени разделения применялась аффинная хроматография на основе связывания с белком А, а в качестве второй — эксклюзионная хроматография. Для переноса проб с первой ступени на вторую была использована технология переноса множественных участков хроматограммы. Эта методика позволяет полностью охарактеризовать пробу за один анализ, исключая потребность в сборе фракций и множественных вводах проб.



Agilent Technologies

Введение

По сложности состава белковые препараты значительно превосходят препараты лекарственных веществ с малой молекулярной массой, поэтому определение их состава представляет собой сложную аналитическую задачу. Детальная характеристика таких препаратов необходима как в процессе их разработки, так и на протяжении всего срока годности¹.

Белок А является рецептором кристаллизующегося Fc-фрагмента иммуноглобулина (IgG), присутствующим в клеточных стенках золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus*. Этот белок отличается сильным сродством с поликлональными и моноклональными IgG, такими как человеческие IgG 1, IgG 2, IgG 4 и IgG других биологических видов, например кролика или мыши. Иммуобилизованный белок А широко используется для очистки IgG в препаративных и промышленных масштабах. В аналитических масштабах для быстрой количественной характеристики различных IgG и их очистки в малых количествах исходя из сложных смесей или чистых проб может быть использована колонка для ВЭЖХ с белком А Agilent Bio-Monolith Protein A^{2,3}.

Эксклюзионная хроматография является предпочтительным методом для количественного анализа агрегации в пробах биотерапевтических средств. Связывание IgG белком А с последующей эксклюзионной хроматографией для анализа агрегации обеспечивает более точную характеристику, так как анализируется более чистая проба. Система двумерной жидкостной хроматографии Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution позволяет выполнять этот анализ за один ввод пробы. Связывание IgG белком А происходит на первой ступени. Затем элюированный IgG переносится в петли системы переноса множественных участков хроматограммы, и его элюируют во вторую ступень, использующую колонку для эксклюзионной хроматографии Agilent AdvanceBio SEC, что обеспечивает точный анализ агрегации.

Экспериментальная часть

Оборудование

Система двумерной жидкостной хроматографии, использованная в этом исследовании, включала в себя систему ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-Inert в качестве системы первой ступени. Система 1260 Infinity Bio-Inert LC была сопряжена со второй ступенью через клапан быстрого переключения потоков для двумерной хроматографии Agilent 2D-LC Quick Change Valve, клапан системы переноса множественных участков хроматограммы (с 12 установленными на предприятии-изготовителе петлями для проб объемом 40 мкл) и высокоскоростной насос Agilent 1290 для второй хроматографической ступени. На второй ступени использовался детектор на основе диодной матрицы. На рис. 1 представлены использовавшиеся модули оборудования.

Программное обеспечение

ПО Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition и ПО Agilent 1290 Infinity 2D-LC использовались для конфигурирования системы, настройки методик двумерной жидкостной хроматографии и управления сбором данных двумерной жидкостной хроматографии (рис. 2).

Проба

В качестве пробы использовался стандарт IgG, приобретенный у компании Sigma (кат. № I9640).

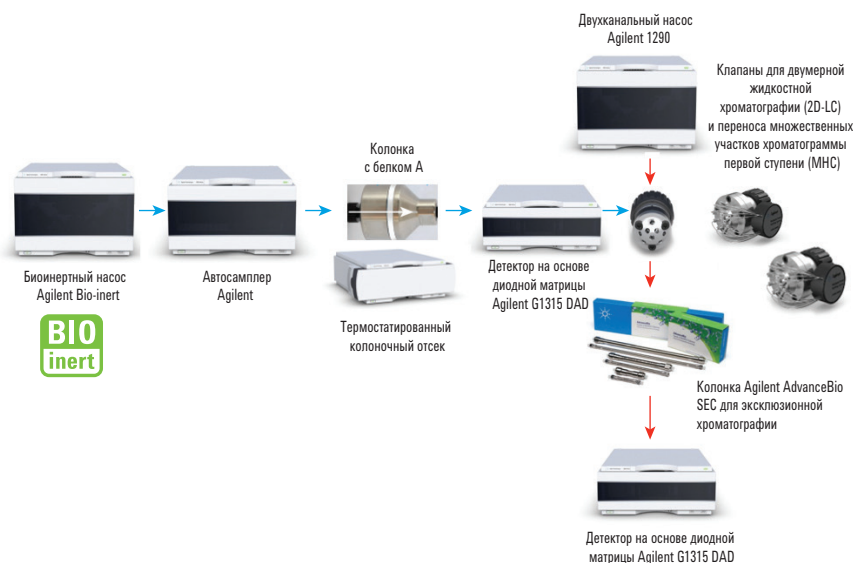
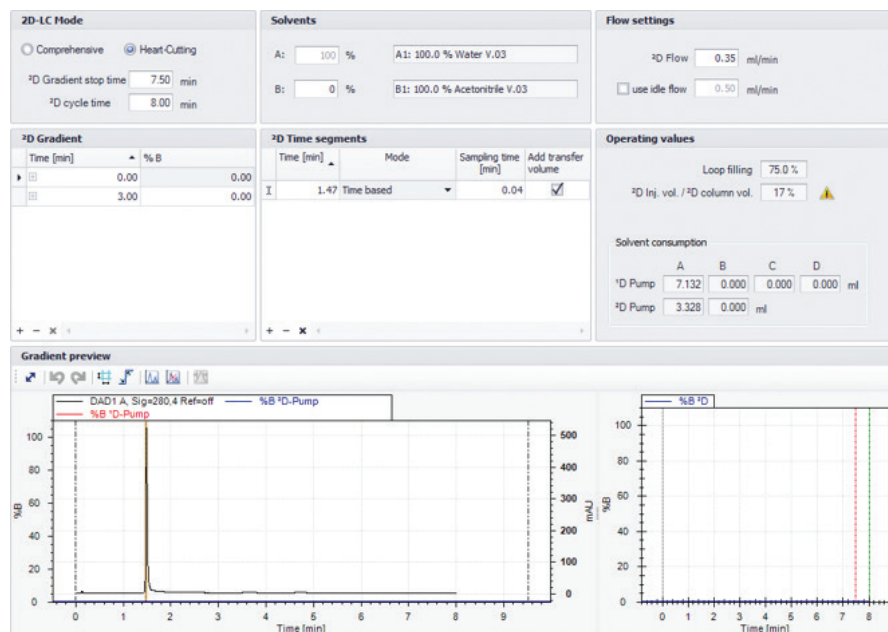


Рис. 1. Конфигурация системы двумерной жидкостной хроматографии с колонкой Agilent Bio-Monolith Protein A на первой ступени и колонкой Agilent AdvanceBio SEC на второй ступени

A



B

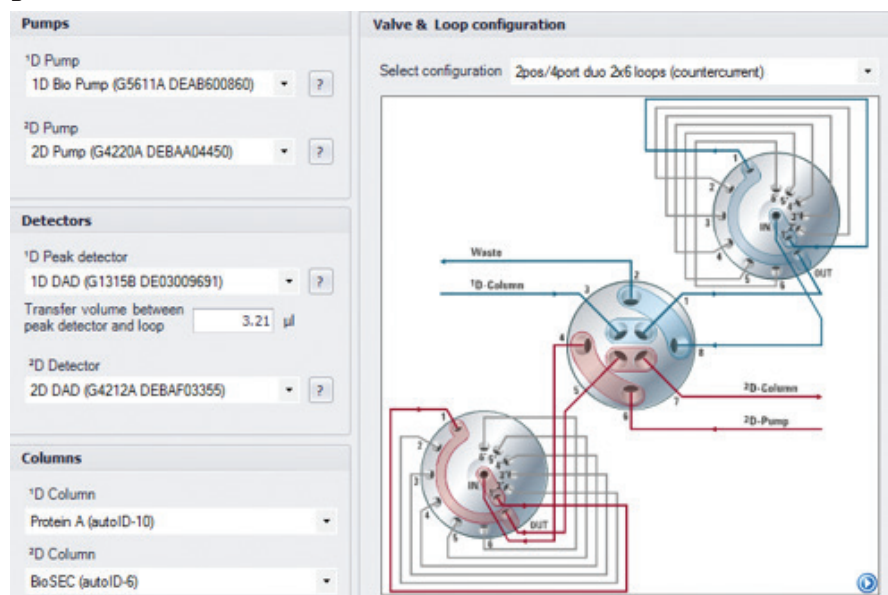


Рис. 2. Конфигурирование системы двумерной жидкостной хроматографии с помощью ПО Agilent OpenLAB CDS ChemStation 2D-LC и задание градиента для второй ступени и временных параметров переноса множественных участков хроматограммы первой ступени с использованием опорной хроматограммы первой ступени с наложенным графиком градиента на первой ступени; диалоговое окно настройки методики обеспечивает простоту задания нескольких событий с указанием времени

Результаты и обсуждение

Данное двумерное разделение служило для ускорения анализа агрегации моноклональных антител (mAb). Использование для характеристики агрегации двух хроматографических ступеней позволило выполнить весь анализ за один ввод пробы, дав возможность полностью отказаться от сбора фракций. На рис. 3 представлены типичные результаты разделения методом аффинной хроматографии на основе связывания с белком А. Подвергнутая связыванию проба находилась в забуференном фосфатом физиологическом растворе и была элюирована 500-мМ водным раствором уксусной кислоты.

На рис. 4 показано, что при использовании аффинной хроматографии в качестве первой ступени двумерного хроматографического анализа стадия эксклюзионной хроматографии может идти непосредственно после высвобождения аналита из связанного с белком А состояния.

Методики

Разделение на первой ступени — аффинная хроматография на основе связывания с белком А с УФ-детектированием	
Колонка	Agilent Bio-Monolith Protein A (кат. № 5069–3639) при комнатной температуре
Скорость потока	0,75 мл/мин
Подвижная фаза А	Забуференный фосфатом физиологический раствор с концентрацией 100 мМ
Подвижная фаза В	Уксусная кислота, 500 мМ
Градиент	0 минут — 0% В 0,5 минуты — 0% В 0,51 минуты — 100% В 2,5 минуты — 100% В 2,6 минуты — 0% В
Разделение на второй ступени — эксклюзионная хроматография	
Колонка	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 4,6 × 150 мм, 2,7 мкм (кат. № PL1580-3301) при 25 °С
Скорость потока	0,35 мл/мин
Подвижная фаза	Забуференный фосфатом физиологический раствор с концентрацией 10 мМ при pH 7,4, изократический режим
Режим двумерной жидкостной хроматографии	Перенос множественных участков хроматограммы

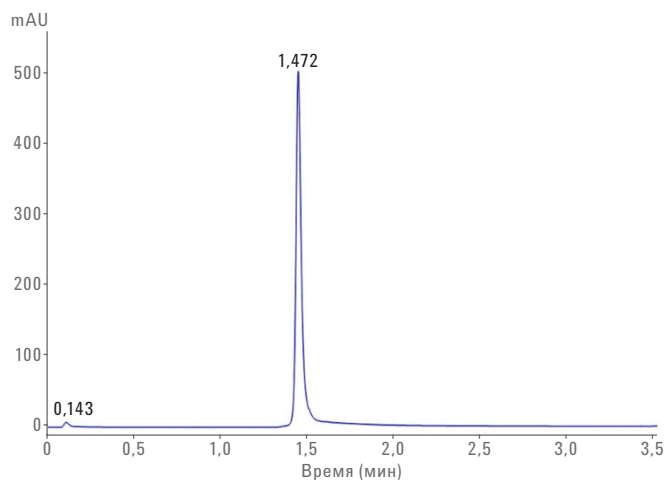


Рис. 3. Результаты разделения IgG с помощью аффинной хроматографии на основе связывания с белком А с использованием колонки Agilent Bio-Monolith Protein A

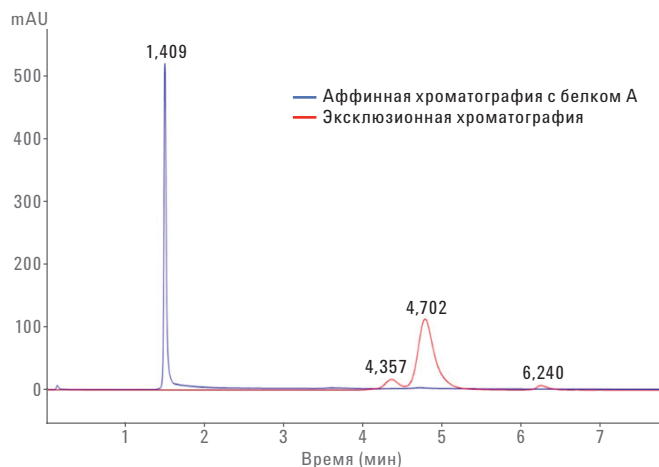


Рис. 4. Результаты аффинной хроматографии на основе связывания с белком А с использованием колонки Agilent Bio-Monolith Protein A и разделения методом эксклюзионной хроматографии IgG с помощью колонки Agilent AdvanceBio SEC

Этот процесс демонстрирует возможность сочетания методик аффинной хроматографии с белком А и эксклюзионной хроматографии в одном анализе с помощью системы двумерной жидкостной хроматографии Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution. После этой демонстрации тестировалось обнаружение посредством эксклюзионной хроматографии различных концентраций агрегатов с использованием двумерной методики. Стандарт IgG подвергался температурному воздействию на горячей водяной бане при температуре 65 °С в течение 24 часов. Нагревание привело к повышению концентрации агрегатов, как показано на рис. 5 и 6. На рис. 6 представлено четкое разрешение между агрегатами и мономерами и димерами.

Выводы

Система двумерной жидкостной хроматографии Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution предлагает универсальный эффективный способ определения титра моноклональных антител и их агрегации в единой методике, позволяя отказаться от сбора фракций и множественных вводов проб. Колонки Agilent Bio-Monolith Protein А с белком А, использовавшиеся на первой ступени рабочего процесса двумерной жидкостной хроматографии, удобны для очистки моноклональных антител в аналитических масштабах для определения титра, а также в качестве начального этапа очистки перед анализом агрегации. Колонка для эксклюзионной хроматографии Agilent AdvanceBio SEC 300 Å продемонстрировала отличное разрешение агрегатов от мономера, что позволило использовать ее для точного количественного определения в качестве второй ступени рабочего процесса двумерной жидкостной хроматографии.

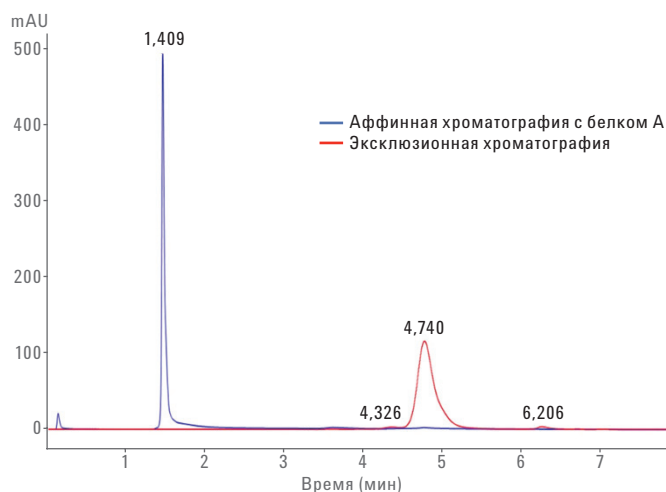


Рис. 5. Результаты аффинной хроматографии на основе связывания с белком А с использованием колонки Agilent Bio-Monolith Protein А и разделения методом эксклюзионной хроматографии подвергнутого температурному воздействию IgG с помощью колонки Agilent AdvanceBio SEC

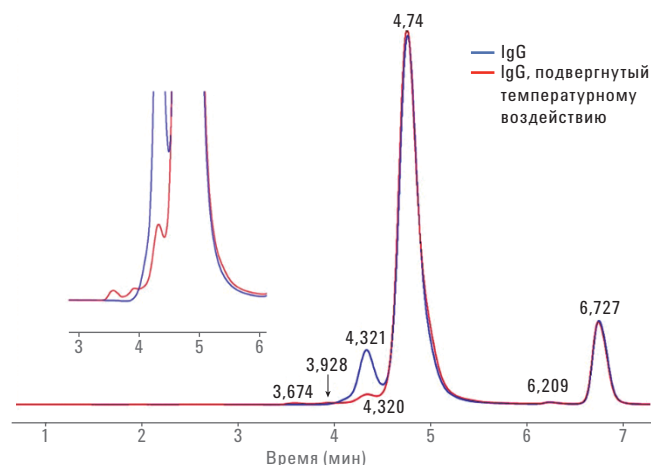


Рис. 6. Наложение результатов разделения исходного IgG и подвергнутого температурному воздействию IgG с помощью двумерной хроматографической методики, использующей эксклюзионную хроматографию с колонкой Agilent AdvanceBio SEC

Литература

1. Vanhoenacker, G. и др. Analysis of Monoclonal Antibody Digests with the Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution. (Анализ подвергнутых разложению проб моноклональных антител с помощью системы двумерной жидкостной хроматографии Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution) *Agilent Technologies*, номер публикации 5991-2880EN, **2013**.
2. Lidija, U. и др. Rapid Human Polyclonal IgG Quantification Using the Agilent Bio-Monolith Protein A HPLC Column. (Быстрое количественное определение человеческого поликлонального иммуноглобулина G с использованием колонки для ВЭЖХ Agilent Bio-Monolith Protein A с белком A) *Agilent Technologies*, номер публикации 5989-9733EN, **2008**.
3. Duong, P. T. Agilent Bio-Monolith Protein A Monitors Monoclonal Antibody Titer from Cell Cultures. (Отслеживание титра моноклональных антител в клеточных культурах с помощью колонки Agilent Bio-Monolith Protein A с белком A) *Agilent Technologies*, номер публикации 5991-2990EN, **2014**.

www.agilent.com/chem

Только для исследовательских целей.
Не для использования в диагностических процедурах.

Информация может быть изменена
без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
Напечатано в США 1 сентября 2016 г.
5991-7225RU



Agilent Technologies