

Полный рабочий процесс для оптимизации и выполнения исследований белковых агрегатов

Сочетание эксклюзионной хроматографии
с разработкой методов и светорассеянием

Рекомендации по применению

Биотерапевтические средства и биоаналоги

Авторы

Энди Коффи (Andy Coffey)
и Мэттью Рэйн (Matthew Rain)
Agilent Technologies, Inc

Аннотация

В настоящих рекомендациях по применению демонстрируется полный процесс анализа агрегации в целях:

- оптимизации параметров подвижной фазы в высокопроизводительной эксклюзионной хроматографии моноклональных антител;
- характеристики профилей агрегации, включающих мономеры, димеры и агрегаты высоких порядков.

Для автоматизации сложных экспериментов по оптимизации эксклюзионной хроматографии, использующих полную емкость биоинертного четырехканального насоса системы ВЭЖХ 1260 Infinity Bio-inert для смешивания широкого диапазона буферных смесей, автоматически, в режиме реального времени во время серии анализов скоростной ВЭЖХ, применялось ПО Agilent Buffer Advisor. Применение мультidetекторной системы Agilent 1260 Infinity Bio-MDS, оборудованной возможностью определения светорассеяния, позволяет выявить белковые агрегаты высоких порядков, определить абсолютные молекулярные массы и дополнить количественные измерения, выполненные системой УФ-детектирования.



Agilent Technologies

Введение

Некоторые моноклональные антитела склонны к спонтанной агрегации в растворе. Многие биофармацевтические методики требуют характеристики и точного количественного определения таких агрегатов в различных условиях. Эксклюзионная хроматография является мощной методикой характеристики и количественного определения агрегации белков, но для точности измерений требуется высококачественное выполнение хроматографии в условиях, способствующих сохранению естественной конформации белка. Для улучшения формы хроматографического пика определенного белка и, как следствие, улучшения разрешения часто возникает необходимость в оценке большого количества различных параметров подвижной фазы.

Методики эксклюзионной хроматографии не используют оптимизацию параметров буферных растворов. Традиционно выполнялась оптимизация параметров буферных растворов в целях преодоления нежелательных неспецифических взаимодействий с неподвижной фазой, но компенсация недостатков колонки может повлечь риск разрушения агрегатов, на определение которых и направлена методика. Однако инертное поверхностное покрытие колонок Agilent AdvanceBio SEC позволяет уменьшить вторичные взаимодействия в широком диапазоне параметров буферных растворов и обеспечивает универсальность, позволяющую оптимизировать состав буферных растворов для конформации белка и хроматографического разрешения. Такая сложность экспериментов по определению параметров стала дополнительным препятствием на пути к стандартной оптимизации параметров буферных растворов эксклюзионной хроматографии для анализа агрегации. Для выполнения экспериментов по оптимизации требуется разработка сложных таблиц возможностей подвижных фаз и трудоемкое приготовление вручную разных многочисленных растворов для экспериментальной оценки матрицы солей, буферных растворов и изменений pH. Однако современные средства значительно усовершенствовали процессы оптимизации параметров эксклюзионной хроматографии, характеристики и количественного определения агрегатов и внедрения оптимизированных методик в ежедневную практику.

Настоящие рекомендации по применению демонстрируют использование полного решения по обеспечению рабочего процесса в исследованиях агрегатов для следующего:

- автоматического приготовления заданного списка буферных растворов для ВЭЖХ путем смешивания базовых растворов и регулирования pH и концентраций летучего буферного вещества с помощью ПО Agilent Buffer Advisor и биоинертного четырехканального насоса для ВЭЖХ, обеспечивающего высокое разрешение;
- измерения белковых агрегатов высоких порядков посредством динамического детектора по светорассеянию, дополняющего УФ-детектирование, в целях распространения высокой чувствительности на широкий диапазон масс;
- характеристики абсолютной молекулярной массы и гидродинамического радиуса агрегированных и мономерных белков посредством детектора по светорассеянию.

Для данного анализа использовалась колонка Agilent AdvanceBio SEC 15 см, что позволило обеспечить высокую скорость разделения для быстрого скрининга. Следует отметить, что колонки AdvanceBio SEC поставляются в различных исполнениях: более длинные и более короткие, поэтому применявшиеся методики легко адаптировать под 30-сантиметровый формат, кроме того, выпускаются мультиплексные колонки, где может потребоваться дополнительное разрешение. Пробы моноклональных антител в настоящем исследовании включали промышленно доступный ритуксимаб и биоаналог ритуксимаба.

Вещества и методики

Реагенты, пробы и вещества

Одноосновный и двухосновный гидрофосфат натрия и хлорид натрия были приобретены у компании VWR. Все используемые реактивы и растворители имели чистоту $\geq 99,7\%$. Вода >18 МОм была получена с помощью системы очистки воды Milli-Q A10 (Millipore, США). Ежедневно готовились свежие растворы и перед использованием фильтровались через мембранный фильтр 0,22 мкм.

Оборудование

Система ВЭЖХ 1260 Infinity II Bio-inert Agilent для анализа агрегации, включающая:

- биоинертный четырехканальный насос Agilent 1260 Infinity II Bio-inert Quaternary Pump (G5654A);
- многопозиционное устройство ввода Agilent 1260 Infinity II Bio-inert с охладителем для проб и многопозиционным устройством промывки (G5668A);
- многоколоночный термостат Agilent 1260 Infinity II с биоинертными теплообменниками (G7116A);
- диодно-матричный детектор WR Agilent 1260 Infinity II со стандартной биоинертной проточной кюветой (G7115A);
- многодетекторную систему для Agilent 1260 Infinity Bio-SEC (G7805AA);
- колонку Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7,8 × 150 мм, 2,7 мкм (кат. № PL1180-3301) или
- колонку Agilent AdvanceBio SEC, 2,7 мкм 300Å 7,8 × 300 мм (кат. № PL1180-5301).

Параметры оборудования

Параметр	Значение
Подвижная фаза	См. табл. 1.
Скорость потока	0,8 мл/мин
Температура	25 °C
Ввод	1–25 мкл (вне зависимости от концентрации пробы)
Детектирование	220 нм, 280 нм, светорассеяние 90° и детектор по светорассеянию
Пробы	Оригинальный ритуксимаб, биоаналог ритуксимаба и БСА

Результаты и обсуждение

Для определения оптимальных составов подвижной фазы для каждой смеси анализов были проанализированы три различные подвижные фазы при четырех различных уровнях pH, что дало матрицу из 12 параметров эксперимента. Буферные смеси:

- 150-мМ натрий-фосфатный буфер;
- 10-мМ натрий-фосфатный буфер + 140 мМ NaCl (обеспечение фосфатно-солевого буферного раствора при различных значениях pH);
- 100-мМ натрий-фосфатный буфер + 150 мМ NaCl.

Каждая подвижная фаза испытывалась при значениях pH 6,2, 6,6, 7,0 и 7,4.

Для выполнения каждого из экспериментов в программе Agilent Buffer Advisor в каждом из случаев задавали буферную смесь и значение pH. Программное обеспечение автоматически рассчитывало соответствующие смеси базовых растворов A–D для достижения требуемых параметров подвижной фазы в режиме реального времени на этапе определения параметров ВЭЖХ. 12 условий эксперимента приведены в табл. 1.

Эти условия использовались для анализа промышленной пробы ритуксимаба, пробы биоаналога ритуксимаба и промышленной смеси стандартов белков БСА (раствор 10 мг/мл для калибровки прибора).

Применение колонки Agilent AdvanceBio SEC 300Å 150 × 7,8 мм позволило выполнить эксперименты по скринингу, анализируя каждую пробу менее чем за 10 минут.

Таблица 1. Параметры эксперимента и соответствующие составы подвижной фазы

Эксперимент	Параметры, задаваемые пользователем				Параметры, рассчитываемые ПО			
	pH	Буфер (мМ)	NaCl (мМ)	Общая конц. (мМ)	% A	% B	% C	% D
1	6,2	150	0	150	25,0	0,0	57,0	18,0
2	6,6	150	0	150	25,0	0,0	42,3	32,7
3	7,0	150	0	150	25,0	0,0	26,3	48,7
4	7,4	150	0	150	25,0	0,0	13,8	61,2
5	7,4	10	140	150	67,0	28,0	0,9	4,1
6	7,0	10	140	150	67,0	28,0	1,8	3,2
7	6,6	10	140	150	67,0	28,0	2,9	2,1
8	6,2	10	140	150	67,0	28,0	3,9	1,1
9	6,2	100	150	250	20,0	30,0	36,3	13,7
10	6,6	100	150	250	20,0	30,0	26,1	23,9
11	7,0	100	150	250	20,0	30,0	15,6	34,4
12	7,4	100	150	250	20,0	30,0	7,8	42,2

A = Вода

B = 500 мМ NaCl

C = 200 мМ NaH₂PO₄

D = 200 мМ Na₂HPO₄

Исходный анализ хроматографических данных показал, что параметры подвижной фазы влияли на формы пиков оригинального ритуксимаба и биоаналога ритуксимаба во время эксперимента, что продемонстрировано на рис. 1 и 2. Две версии молекулы со схожими профилями демонстрируют одинаково необычные свойства при составе подвижной фазы 10-мМ натрий-фосфатный буфер со 140 мМ NaCl. Этот состав подвижной фазы вызвал существенное увеличение асимметрии пика при снижении высоты пика. Подобные свойства наблюдаются и у других белков, что свидетельствует о необходимости тщательной оценки влияния состава подвижной фазы при разработке методов и на надежность метода.

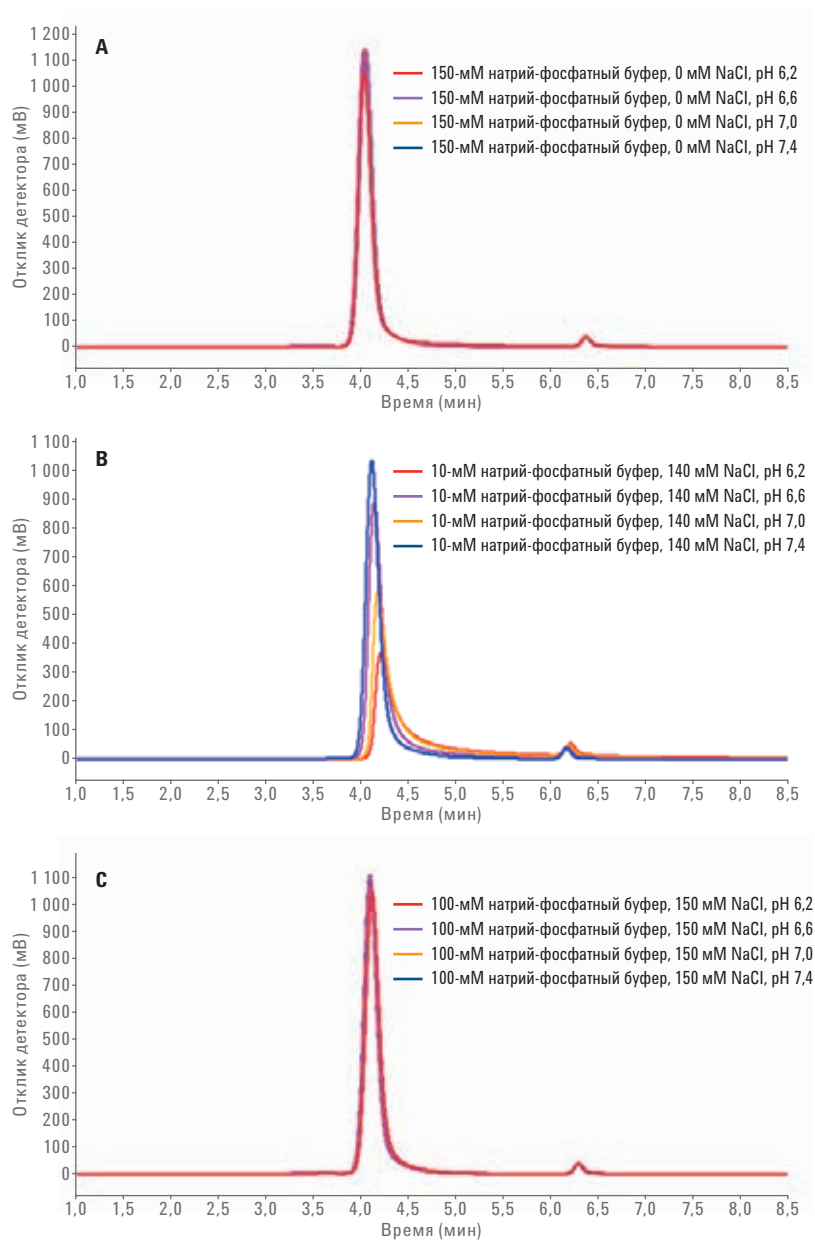


Рис. 1. Оригинальный ритуксимаб (ввод 1 мкл) анализируется поочередно при 12 различных параметрах подвижной фазы (эксперименты 1–12: см. табл. 1)

Для количественного анализа состава агрегатов необходимо использовать УФ-детектор. Объединение пика мономера и пика агрегата (при его обнаружении) позволяет определить процентное отношение площади пика агрегата. Результаты представлены на рис. 3А для оригинального ритуксимаба и на рис. 3В — для биоаналога ритуксимаба. Наиболее единообразные результаты были получены при уровне pH 7,0 с использованием 150-мМ натрий-фосфатного буфера или 100-мМ натрий-фосфатного буфера со 150 мМ NaCl (эксперименты 3 и 11).

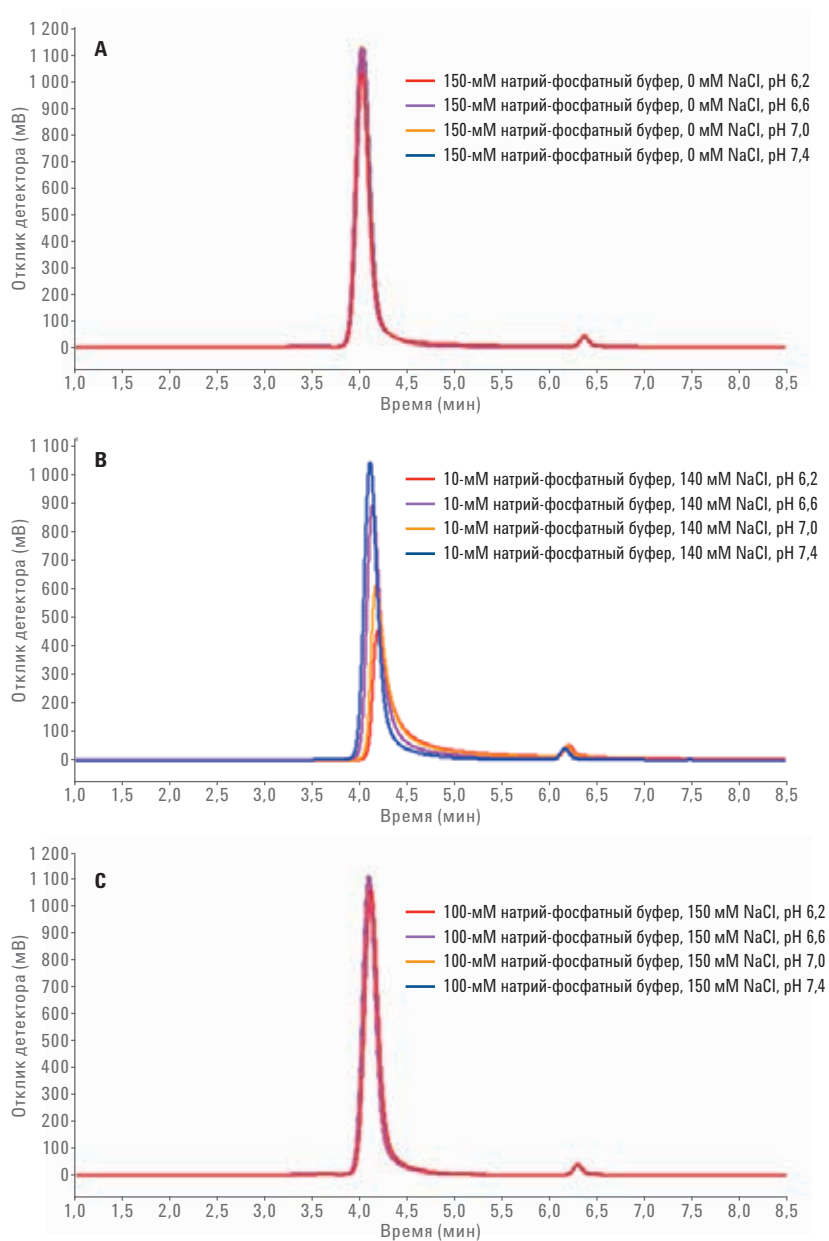


Рис. 2. Биоаналог ритуксимаба (ввод 1 мкл) анализируется поочередно при 12 различных параметрах подвижной фазы (эксперименты 1–12: см. табл. 1)

Рис. 4, демонстрирующий хроматограммы, полученные при значении pH 7,0 в трех различных буферных смесях, ясно показывает, что агрегаты (обозначенные стрелкой) не были обнаружены при использовании 10-мМ натрий-фосфатного буфера со 140 мМ NaCl в качестве подвижной фазы для анализа этой молекулы.

Введение детектора по светорассеянию в процесс анализа агрегации не является обязательным, но позволяет получить более ценную информацию о белковых агрегатах. После простой калибровки прибора с однократным вводом известной молекулы, в данном случае БСА, можно быстро определить междетекторную задержку и постоянные прибора. Можно использовать ПО Agilent Bio-SEC для получения информации о молекулярной массе для отдельных пиков любой другой хроматограммы, полученной при тех же параметрах колонки и скорости потока.

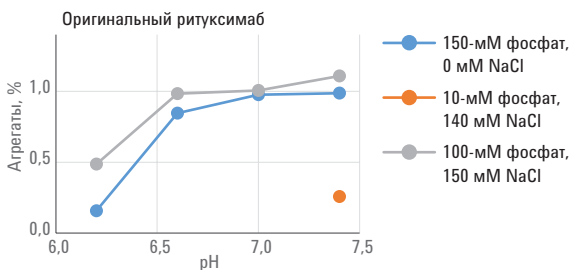


Рис. 3А. Процентное соотношение площади пиков агрегатов в оригинальном ритуксимабе (эксперименты 1–12: см. табл. 1); точками обозначены эксперименты, в ходе которых были обнаружены агрегаты

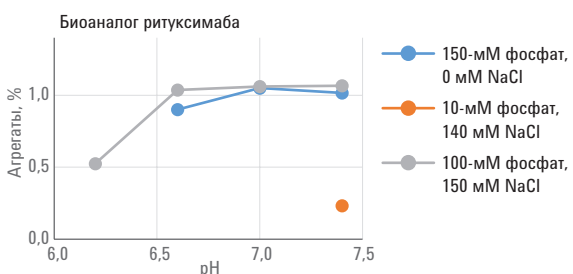


Рис. 3В. Процентное соотношение площади пиков агрегатов в биоаналоге ритуксимаба (эксперименты 1–12: см. табл. 1); точками обозначены эксперименты, в ходе которых были обнаружены агрегаты

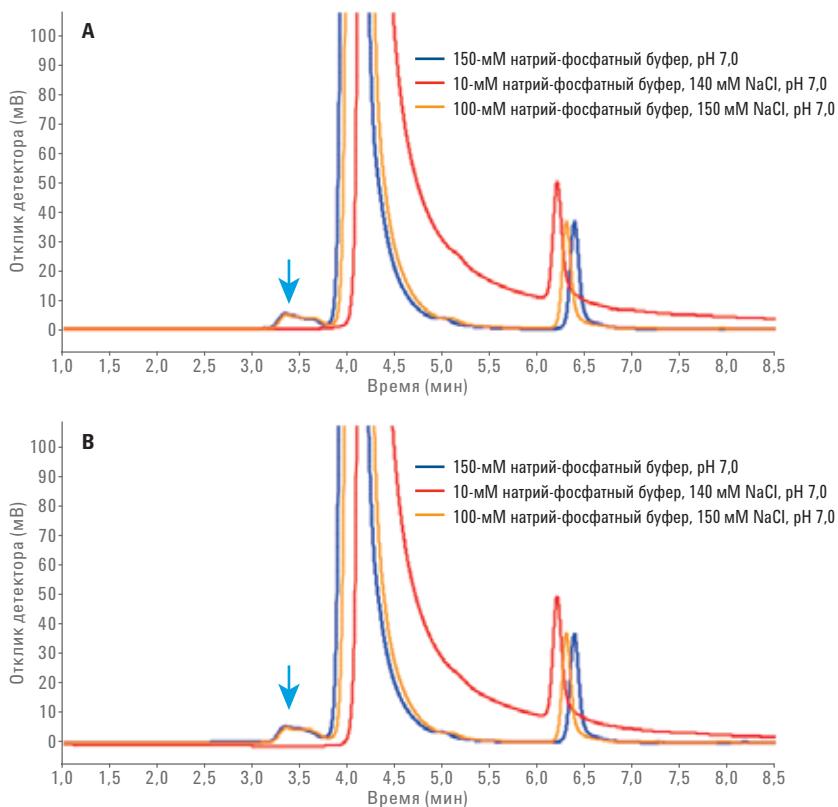


Рис. 4. Увеличение базовой линии сигналов УФ 220 нм оригинального ритуксимаба (А) и биоаналога ритуксимаба (В), проанализированных при разных концентрациях буферной соли при оптимальном значении pH 7,0 (эксперименты 3, 6 и 11 в табл. 1)

На рис. 5 представлены результаты анализов светорассеянием оригинального ритуксимаба и биоаналога ритуксимаба, выполненных в высокосолевых условиях эксперимента 11. При рассмотрении данных анализа пика мономера видно, что анализ по светорассеянию дал молекулярные массы, близкие к значениям точных масс, представленным в предыдущих рекомендациях по применению.¹ Молекула биоаналога должна иметь чуть большую массу в связи с присутствием вариантов С-концевого лизина, отсутствующих в оригинальной молекуле.

Образование крупных агрегатов и невидимых невооруженным глазом частиц существенно затрудняет применение биофармацевтических методик. Чувствительность детектора по светорассеянию к пробам с высокой степенью агрегации дополняет данные по концентрации, полученные при УФ-детектировании.

Несмотря на значительное сходство результатов мономеров и димеров, анализирувавшихся УФ-детектированием, детектор по светорассеянию продемонстрировал большую чувствительность по отношению к агрегатам большего порядка и выявил некоторые различия в более существенной агрегации оригинального ритуксимаба и биоаналога при определенных параметрах подвижной фазы, что показано на рис. 6.

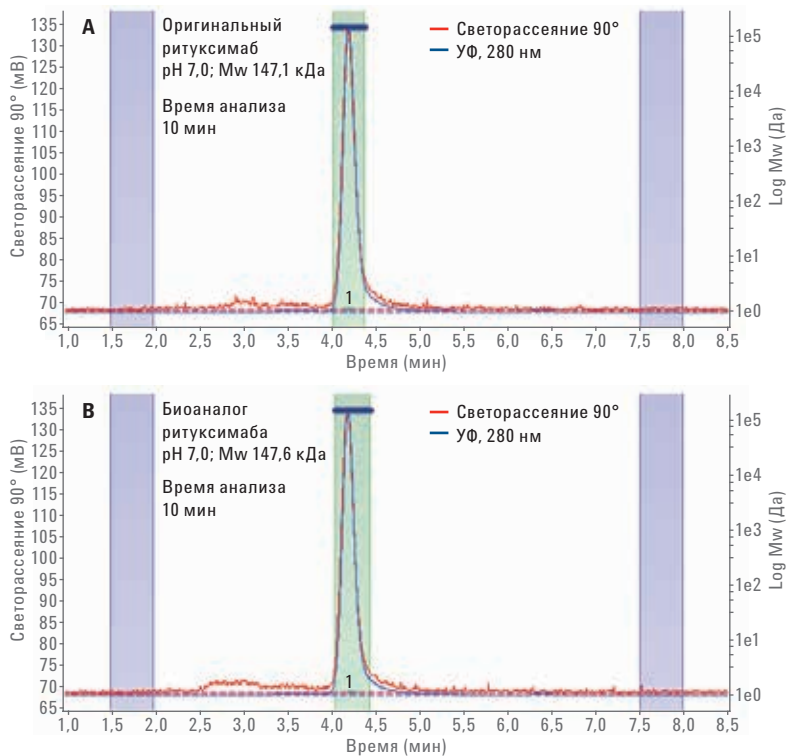


Рис. 5. Сравнительная характеристика анализов оригинального ритуксимаба (А) и биоаналога ритуксимаба (В), выполненных с использованием 100-мМ натрий-фосфатного буфера со 150 мМ NaCl, pH 7,0 (эксперимент 11 в табл. 1)

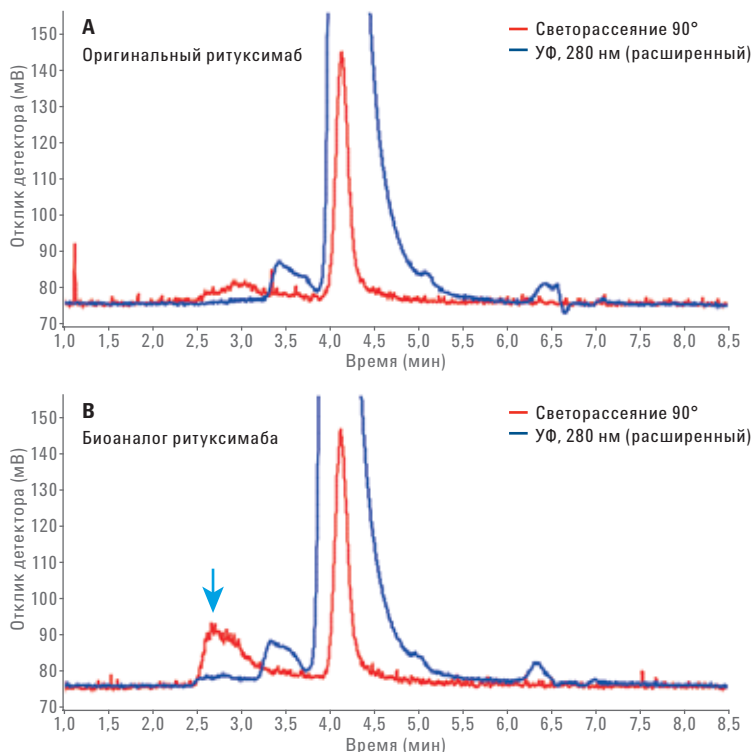


Рис. 6. Сравнительная характеристика анализов оригинального ритуксимаба (А) и биоаналога ритуксимаба (В), выполненных с использованием 150-мМ натрий-фосфатного буфера, pH 7,0 (эксперимент 3 в табл. 1)

Добавление возможностей детектора по светорассеянию дополнительно повышает уровень получаемой информации, обеспечивая выполнение измерений гидродинамического радиуса (рис. 7).

Выводы

Система ВЭЖХ 1260 Infinity II Bio-inert, включающая в себя полностью биоинертный тракт, с ПО Agilent Buffer Advisor обеспечивает простой способ выполнения оптимизации метода эксклюзионной хроматографии при количественном анализе белковых агрегатов. Разделения можно ускорить при использовании более короткой колонки Agilent AdvanceBio SEC 300Å 15 см, которая значительно увеличивает пропускную способность и снижает время, необходимое для скрининга в широком диапазоне параметров анализа. Для того чтобы добиться лучшего разрешения и большей точности, следует использовать более длинную колонку 30 см. Колонка AdvanceBio SEC обеспечивает дополнительные преимущества, например низкое неспецифическое связывание. Мультидетекторная система Bio-MDS с ПО Bio-SEC может использоваться для выявления низких уровней агрегатов с высокими молекулярными массами, которые сложно определить с помощью любых других средств. Кроме того, систему Bio-MDS можно использовать для определения молекулярной массы белка или получения информации о гидродинамическом радиусе совместно с применением детектора по светорассеянию. Этот комплект технологий представляет собой полное решение по обеспечению рабочего процесса для быстрой оптимизации параметров эксклюзионной хроматографии, точного количественного определения агрегатов по всему диапазону их молекулярных масс и характеристики динамики агрегации моноклональных антител в подходящих буферных смесях.

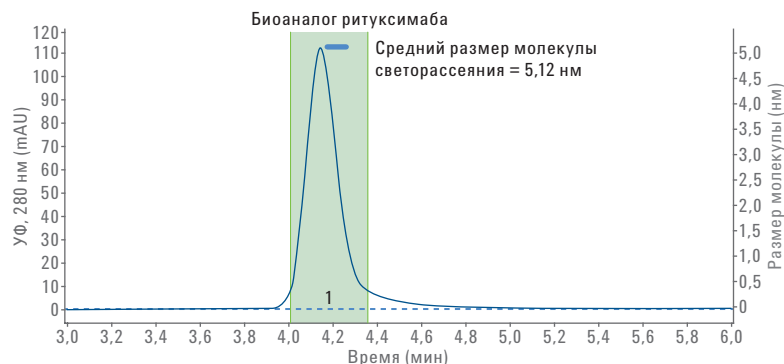


Рис. 7. Анализ детектированием по светорассеянию биоаналога ритуксимаба, демонстрирующий результаты по гидродинамическому радиусу детектора по светорассеянию

Литература

1. Schneider, S. 2D-LC/MS Characterization of Charge Variants Using Ion Exchange and Reversed-Phase Chromatography, *Agilent Technologies Application Note* publication number 5991-6673EN 2016.

www.agilent.com/chem

Информация может быть изменена без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
Напечатано в США 1 ноября 2016 г.
5991-7476RU



Agilent Technologies