

Высокопроизводительная и высокочувствительная экслюзионная хроматография биопрепаратов с использованием колонок **Agilent AdvanceBio SEC** Колонки Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2,7 мкм

Методические рекомендации

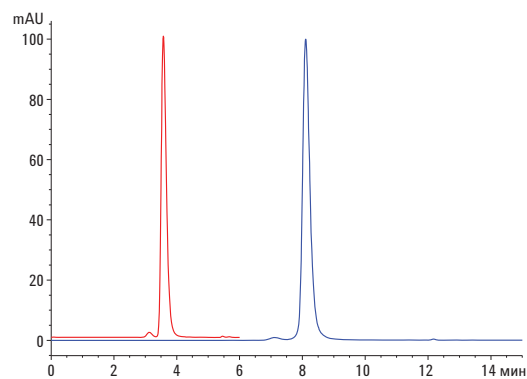
Биофармацевтические препараты

Автор

М. Сундарам Паланисвами
(M. Sundaram Palaniswamy)
Agilent Technologies Inc.

Аннотация

Агрегация моноклональных антител (mAb) может быть обусловлена различными механизмами, реализующимися во время выращивания и сбора клеток, а также очистки и хранения препарата и наполнения им лекарственных форм. Экслюзионная хроматография — это стандартный метод разделения моноклональных антител по их размеру, который считается эталонной и эффективной методикой как для качественного, так и для количественного анализа агрегации. Анализ большого количества проб в процессе производства методом экслюзионной хроматографии занимает несколько часов и может сильно повлиять на уровень агрегации, поскольку пробы содержатся в неблагоприятной среде. В данном исследовании продемонстрировано использование более коротких и узких колонок для экслюзионной хроматографии Agilent AdvanceBio SEC для быстрого, чувствительного, воспроизводимого разделения с высоким разрешением и количественного анализа моноклональных антител и конъюгатов антител с лекарственными веществами (ADC). Разделение и количественный анализ заняли менее четырех минут и, что еще важнее, данный метод позволил отслеживать и обнаруживать агрегаты, образованные в стрессовых условиях.



Agilent Technologies

Введение

Белки часто образуют агрегаты при стрессовых воздействиях, например при изменении значений pH, температуры, концентрации. Агрегация может происходить на многих стадиях производственного процесса: на стадиях операций с клетками, на стадиях операций с препаратом, начиная с его выделения из клеток, или даже в период его хранения. Эксклюзионная хроматография представляет собой метод отслеживания и характеристики агрегатов моноклональных антител (mAb) и конъюгатов антител с лекарственными веществами (ADC). Однако разделение методом эксклюзионной хроматографии обычно выполняют на больших колонках при относительно низкой скорости потока, и анализ часто является продолжительным. Для преодоления этих трудностей в последнее время стали применять методику сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ) с использованием колонок с размером частиц наполнителя менее 2 мкм, в результате чего время анализа значительно сократилось. Однако при использовании очень мелких частиц и высокой скорости потока термическое и разрушающее механическое воздействие могут стать критическими для белков, чувствительных к изменению температуры или к давлению [1]. Более того, анализ конъюгатов антител с лекарственными веществами методом эксклюзионной хроматографии с использованием водной подвижной фазы приводит к получению пиков неудовлетворительной формы и неприемлемому разрешению агрегатов и мономеров. Это можно объяснить неспецифическими взаимодействиями между гидрофобными цитотоксическими лекарственными веществами и неподвижной фазой. Чтобы решить эту проблему и улучшить форму пика, в подвижную фазу для эксклюзионной хроматографии добавляют различные органические модификаторы. Однако они потенциально могут привести к повреждению белка и сокращению срока службы колонки.

Достижения компании Agilent в области эксклюзионной хроматографии позволили улучшить качество получаемой информации. К этим достижениям относится разработка более коротких (длиной 150 мм) и узких (диаметром 4,6 мм) колонок, имеющих оптимальный объем и размер пор наполнителя, в сочетании с уникальным гидрофильным полимерным покрытием. Благодаря этим разработкам можно получить хорошее разрешение и узкую форму пиков, не добавляя никаких органических модификаторов в водную подвижную фазу. В данных методических рекомендациях продемонстрировано использование более коротких и узких колонок Agilent AdvanceBio SEC для быстрого высокопроизводительного анализа моноклональных антител и конъюгатов антител с лекарственными веществами методом эксклюзионной хроматографии. В данном исследовании также показано использование этих колонок для количественного анализа указанных молекул.

Материалы и методики

Приборы, колонки и стандарты

Использовалась биоинертная система ЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-inert, оборудованная четырехканальным насосом с максимальным давлением 600 бар, состоящая из следующих модулей:

- биоинертный четырехканальный насос для ЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary Pump (G5611A);
- высокопроизводительный биоинертный автосамплер Agilent 1260 Infinity High Performance Bio-inert Autosampler (G5667A);
- термостат серии Agilent 1200 Infinity (G1330B);
- термостатируемое колоночное отделение Agilent 1260 Infinity, содержащее легкоустанавливаемые биоинертные нагревательные элементы (G1316C, поз. 19);
- детектор на основе диодной матрицы Agilent 1260 Infinity с высокочувствительной проточной кюветой Max-Light с длиной оптического пути 60 мм (G4212B, поз. 33);
- колонка Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 × 150 мм, наполненная частицами размером 2,7 мкм (кат. № PL1180-3301);
- колонка Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 4,6 × 150 мм, наполненная частицами размером 2,7 мкм (кат. № PL1580-3301);
- белковый стандарт для колонок AdvanceBio SEC 300 Å, лиофилизированный, 1,5 мл (кат. № 5190-9417).

Программное обеспечение

Agilent ChemStation версии B.04.03 (или более поздней версии).

Параметры анализов методом эксклюзионной хроматографии

В табл. 1 представлены хроматографические параметры для анализов методом эксклюзионной хроматографии с использованием системы ЖХ Agilent 1260 Bio-inert.

Таблица 1. Хроматографические параметры, использованные для анализа методом эксклюзионной ВЭЖХ

Параметр	Условия
Подвижная фаза	150-мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,0 (подвижная фаза А)
Температура термостата колоночного отделения	Комнатная
Изократический анализ	Подвижная фаза А
Вводимый объем	5 мкл для колонки размером 7,8 × 150 мм и 2 мкл для колонки размером 4,6 × 150 мм
Скорость потока	1 мл/мин для колонки размером 7,8 × 150 мм 0,35 мл/мин для колонки размером 4,6 × 150 мм
УФ-детектирование, длина волны	220 и 280 нм

Реактивы, пробы и вещества

Оригинальный ритуксимаб и его биоаналог, герцептин и конъюгат антитела с лекарственным веществом (ADC) были приобретены в местной аптеке и хранились в соответствии с инструкцией производителя. Однозамещенный и двузамещенный гидрофосфат натрия, соляная кислота (HCl) и гидроксид натрия (NaOH) были приобретены у компании Sigma-Aldrich. Все использовавшиеся 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 колонок Agilent AdvanceBio SEC

Калибровка колонок Agilent AdvanceBio SEC была проведена путем измерения элюирующихся объемов для белковых стандартов Agilent для колонок с размером пор наполнителя 300 Å [тиреоглобулин (670 кДа), γ -глобулин (158 кДа), овалбумин (44 кДа), миоглобин (17 кДа) и ангиотензин II (1 000 Да)]. Для определения эксклюзионного предела строили график зависимости значений логарифма молекулярной массы (LogMW) для белковых стандартов для колонок Agilent AdvanceBio SEC от величин элюирующего объема.

Предел количественного определения (LOQ) и предел обнаружения (LOD)

В качестве примера, для измерения предела обнаружения и предела количественного определения использовали герцептин и конъюгат антител с лекарственным веществом. Концентрацию белка, при которой соотношение «сигнал — шум» превышало 3, принимали за предел обнаружения. Концентрацию, при которой соотношение «сигнал — шум» превышало 10, принимали за предел количественного определения.

Процедура

Для расчета отклонений площадей пиков и времени удерживания выполнили ввод 5 и 2 мкл подвижной фазы в качестве холостой пробы, а затем шесть повторных вводов исходных и подвергнутых стрессовому воздействию моноклональных антител.

Подготовка агрегатов ритуксимаба

Для анализа агрегации использовали оригинальный ритуксимаб и конъюгат антитела с лекарственным веществом в качестве типичного примера моноклональных антител и конъюгатов. Агрегацию индуцировали описанным ранее способом [2] с небольшими модификациями.

1. В раствор пробы (2 мг/мл) медленно по каплям добавляли 1 М HCl для изменения pH от 6,0 до 1,0.
2. Затем добавляли 1 М NaOH для доведения pH до 10,0.
3. После этого вновь добавляли 1 М HCl для возвращения pH к 6,0.

Между изменениями pH выдерживалось время примерно в 1 минуту при постоянном перемешивании со скоростью 500 об/мин. Полученный раствор выдерживали 60 минут при 60 °C.

Результаты и обсуждение

Разделение и обнаружение

В качестве стандартов для калибровки колонок Agilent AdvanceBio SEC использовали ряд белковых стандартов Agilent для колонок с размером пор наполнителя 300 Å с известными молекулярными массами. Для расчета свободного объема колонки использовали агрегаты тиреоглобулина (неудерживаемый пик) в белковом стандарте. Эти агрегаты элюируют при времени 2,56 минуты на колонке Agilent AdvanceBio SEC с размерами 7,8 × 150 мм, что соответствует свободному объему (V_0) = 2,56 мл, и при времени 2,35 минуты на колонке с размерами 4,6 × 150 мм, что соответствует $V_0 = 0,805$ мл. Калибровочная кривая для белков, разделенных на колонке Agilent AdvanceBio SEC, имеет вид линейной зависимости и позволяет определить эксклюзионный предел (670 кДа) и предел полной проницаемости (1 000 Да) для диапазона анализируемых белков. Зная элюирующий объем для неизвестного белка, по данному графику можно определить его молекулярную массу (рис. 1).

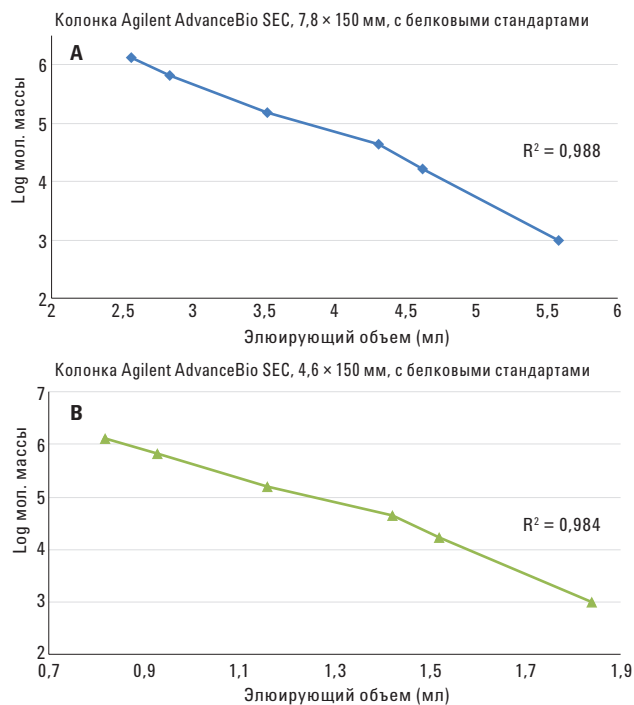


Рис. 1. Калибровочные кривые для белковых стандартов на колонках Agilent AdvanceBio SEC 300 Å с размерами 7,8 × 300 мм (А) и 4,6 × 150 мм (В)

Целью эксперимента было увеличение производительности анализа посредством сокращения времени анализа. В эксклюзионной хроматографии скорость потока определяет время анализа для заданных размеров колонки, однако при более высоких скоростях потока может ухудшиться разрешение. Для ускорения анализа необходимо снизить отношение свободного объема колонки к скорости потока. Прямой путь к ускорению выполнения анализа методом эксклюзионной хроматографии заключается в уменьшении длины колонки и повышении скорости потока [2,3]. На рис. 2 показаны хроматограммы оригинального ритуксимаба и его биоаналога, герцептина и конъюгата антитела с лекарственным веществом (ADC), полученные методом эксклюзионной хроматографии на колонке Agilent AdvanceBio SEC, 7,8 × 150 мм. Эти хроматограммы демонстрируют превосходное разделение мономера в указанных хроматографических условиях менее чем за четыре минуты.

Чтобы повысить чувствительность, разделение выполняли на колонке Agilent AdvanceBio SEC, 4,6 × 150 мм. Рис. 3 демонстрирует, что это привело к улучшению характеристик разделения. В обоих случаях отсутствие рано- или поздноэлюирующих пиков указывает на то, что коммерческий препарат моноклонального антитела является однородным, без каких-либо признаков агрегации или деградации. В результате анализа гидрофобных конъюгатов антител с лекарственным веществом с водной подвижной фазой с использованием обеих упомянутых колонок был получен симметричный пик, что указывает на отсутствие вторичных взаимодействий гидрофобного анализита нагрузки с неподвижной фазой. Более короткие колонки Agilent AdvanceBio SEC позволили разделить и разрешить агрегаты конъюгатов антител с лекарственным веществом. Это разделение свидетельствует об их пригодности для характеристики конъюгатов антител с лекарственным веществом с получением информации, необходимой для разработки, аттестационных испытаний партий препаратов и испытаний стабильности.

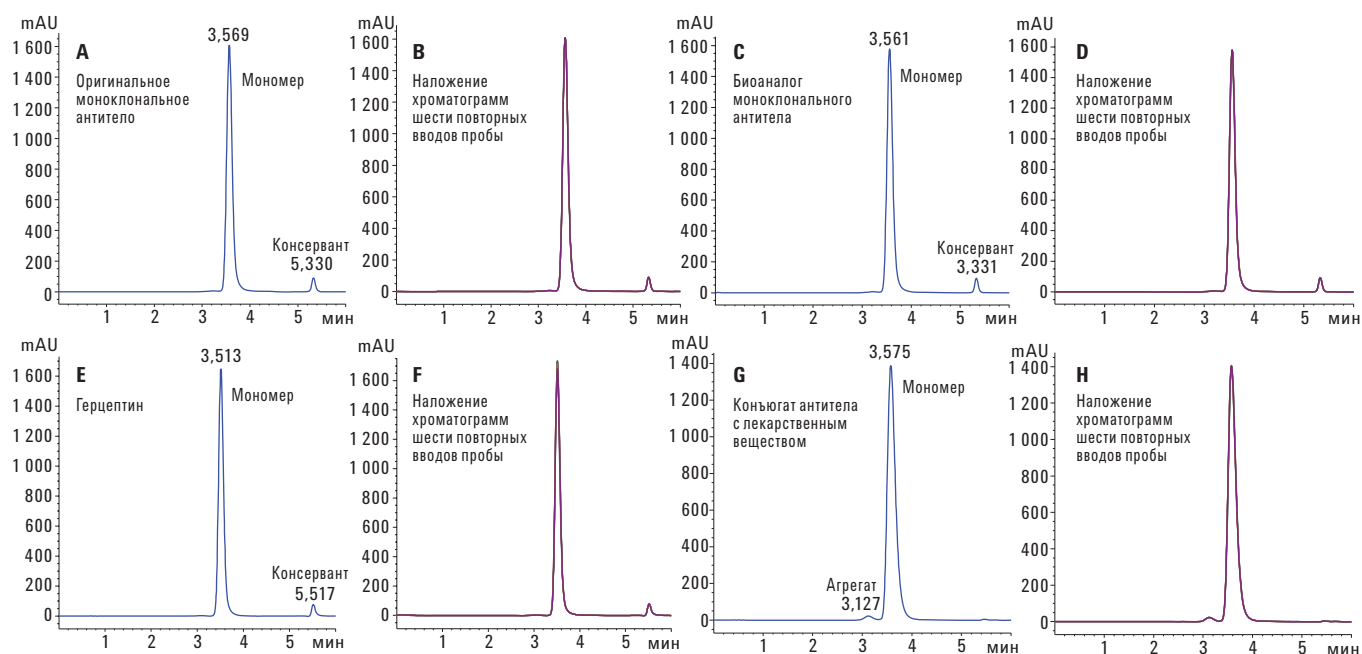


Рис. 2. Полученные методом эксклюзионной хроматографии хроматограммы нативного оригинального ритуксимаба и его биоаналога, герцептина и конъюгата антител с лекарственным веществом на колонке Agilent AdvanceBio SEC, 150 Å, 7,8 × 300 мм, 2,7 мкм

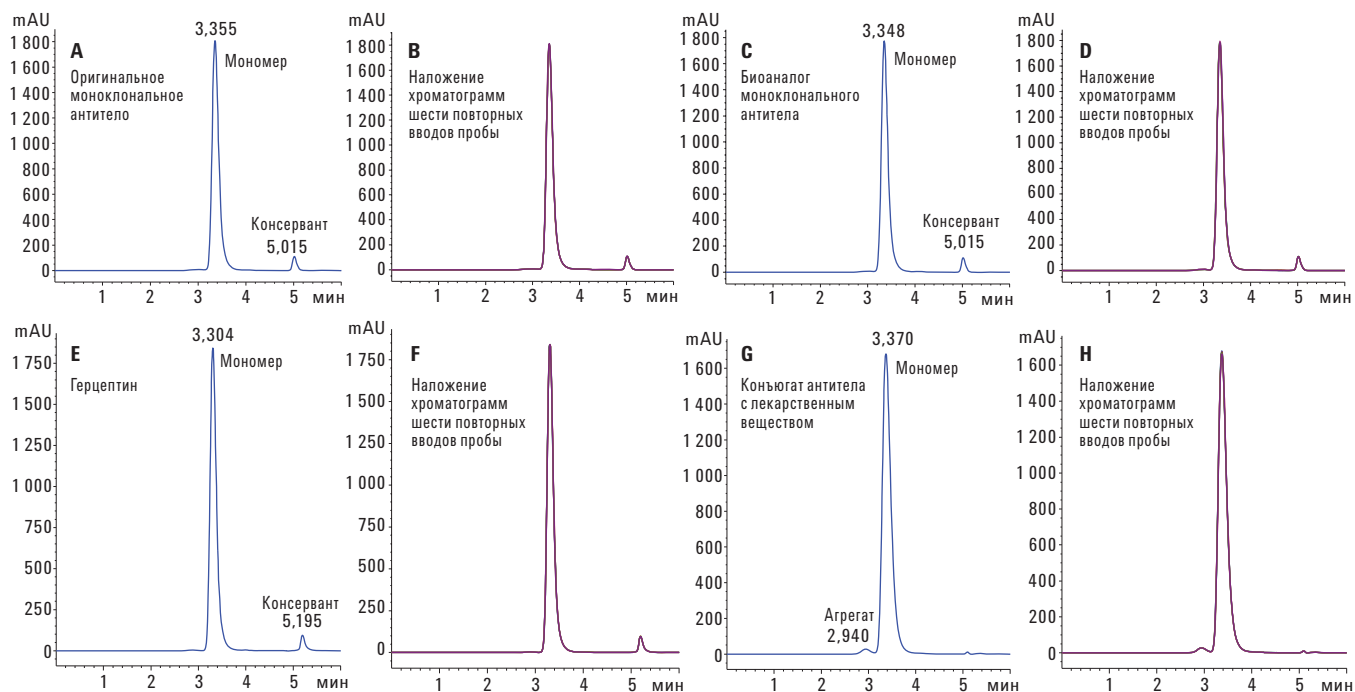


Рис. 3. Полученные методом эксклюзионной хроматографии хроматограммы нативного оригинального ритуксимаба и его биоаналога, герцептина и конъюгата антител с лекарственным веществом на колонке Agilent AdvanceBio SEC, 300 Å, 4,6 × 150 мм, 2,7 мкм

Воспроизводимость времен удерживания и площадей пиков

Для определения воспроизводимости методики рассчитывали значения относительного стандартного отклонения (RSD) для времени удерживания и площади пиков всех четырех биопрепаратов при концентрации 10 мкг на колонку для колонки с размерами 7,8 × 150 мм и 4 мкг — для колонки с размерами 4,6 × 150 мм. В табл. 2 приведены относительные стандартные отклонения средних времен удерживания и площадей пиков по шести повторным вводам проб. Наивысшее наблюдаемое значение относительного стандартного отклонения для площадей пиков составляло 0,21%, а для времен удерживания — 0,02%. Относительные стандартные отклонения площадей пиков и времен удерживания демонстрируют превосходную воспроизводимость методики, и, соответственно, воспроизводимую работу системы.

Таблица 2. Воспроизводимость времен удерживания и площадей пиков (n = 6) проб

Проба	Колонка Agilent AdvanceBio SEC, 300 Å, 7,8 × 150 мм, 2,7 мкм		Колонка Agilent AdvanceBio SEC, 300 Å, 4,6 × 150 мм, 2,7 мкм	
	RSD времен удерживания	RSD площади пиков	RSD времен удерживания	RSD площади пиков
Оригинальный ритуксимаб	0	0,15	0,02	0,02
Биоаналог ритуксимаба	0	0,04	0,01	0,01
Герцептин	0	0,21	0,01	0,02
Конъюгат антитела с лекарственным веществом	0	0,01	0	0,02

Количественный анализ герцептина и конъюгатов антител с лекарственным веществом с использованием более коротких и узких колонок Agilent AdvanceBio SEC

Предел обнаружения и предел количественного определения

Пределы обнаружения и пределы количественного определения с использованием колонок с размерами $7,8 \times 150$ мм и $4,6 \times 150$ мм для герцептина и конъюгатов антител с лекарственным веществом приведены в табл. 3. На рис. 4 представлено наложение хроматограмм, отвечающих пределам обнаружения и количественного определения, а также хроматограммы холостой пробы для проб герцептина и конъюгата антител с лекарственным веществом. Следует отметить, что узкая колонка $4,6 \times 150$ мм позволила провести высокочувствительный анализ биопрепаратов.

Таблица 3. Значения предела обнаружения и предела количественного определения для проб

Проба	Колонка Agilent AdvanceBio SEC, 300 Å, $7,8 \times 150$ мм, 2,7 мкм		Колонка Agilent AdvanceBio SEC, 300 Å, $4,6 \times 150$ мм, 2,7 мкм	
	Предел обнаружения	Предел количественного определения	Предел обнаружения	Предел количественного определения
Герцептин	78 нг	156 нг	31,2 нг	62,4 нг
Конъюгат антитела с лекарственным веществом	78 нг	156 нг	31,2 нг	62,4 нг

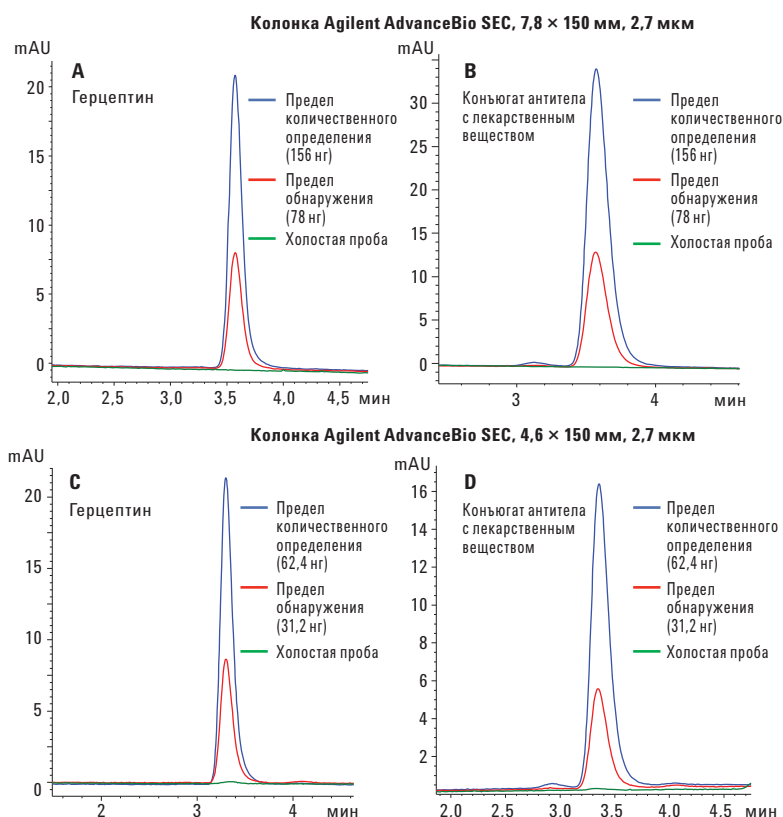


Рис. 4. Полученные методом эксклюзионной хроматографии хроматограммы, соответствующие пределу обнаружения и пределу количественного определения, для герцептина и конъюгата антитела с лекарственным веществом с наложением хроматограмм холостой пробы для колонок Agilent AdvanceBio SEC 300 Å с размерами $7,8 \times 150$ мм и $4,6 \times 150$ мм

Линейность методики

Представленные кривые линейности методики для герцептина и конъюгата антитела с лекарственным веществом были построены от предела количественного определения до самого высокого уровня концентрации в данном исследовании в виде зависимости площади пиков от концентрации герцептина и конъюгата антитела с лекарственным веществом. На рис. 5 представлена кривая линейности для герцептина и конъюгата антитела с лекарственным веществом в диапазоне концентраций от 15,6 до 2 000 мкг/мл на обеих колонках. Наблюдаемый коэффициент регрессии (R^2) для моноклональных антител и конъюгата антител с лекарственным веществом свидетельствует о пригодности методики для количественного анализа в анализируемом диапазоне.

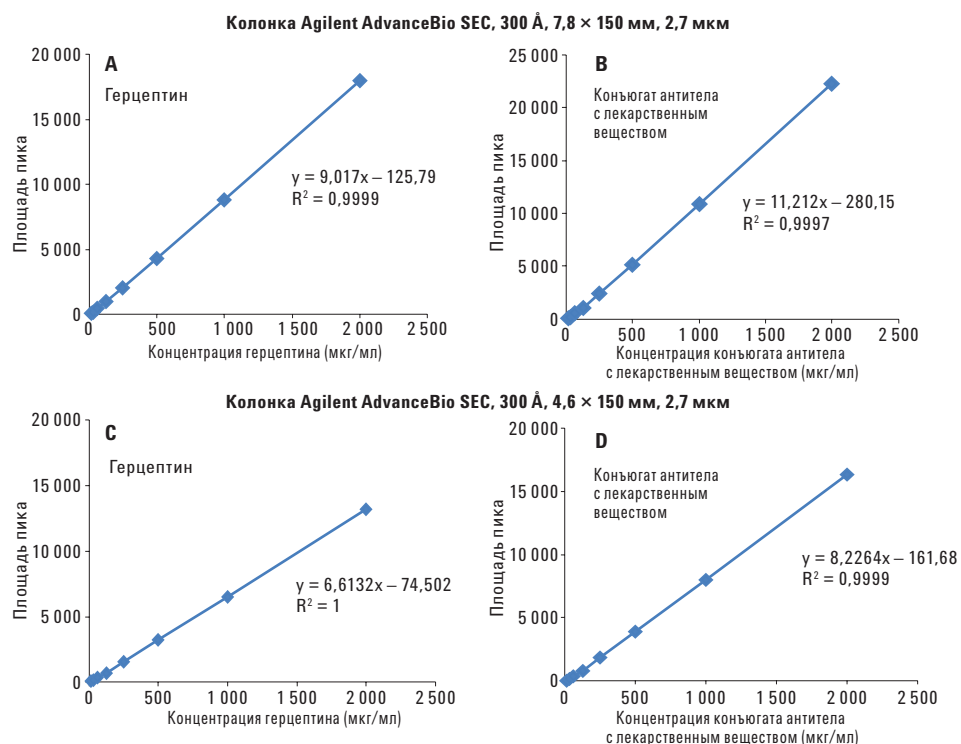


Рис. 5. Кривые линейности с восемью стандартными концентрациями герцептина и конъюгата антитела с лекарственным веществом, полученные на колонках Agilent AdvanceBio SEC в диапазоне от 15,6 до 2 000 мкг/мл, демонстрирующие превосходные значения коэффициентов корреляции

Анализ агрегации и деградации

Контроль агрегации белков всегда является проблемой при очистке, приготовлении лекарственных форм и производстве белковых препаратов. Был проведен анализ естественного и подверженного стресс-испытаниям герцептина и конъюгата антитела с лекарственным веществом для сравнения колонок Agilent AdvanceBio SEC на предмет отслеживания агрегатов и продуктов деградации. Любой пик хроматограммы, элюированный до пика мономерной формы, считался пиком агрегатов, а элюированный после — пиком фрагментов/продуктов деградации.

Хроматограммы агрегатов, образовавшихся при воздействии pH и температуры, показывают, что обе испытываемые колонки Agilent AdvanceBio SEC позволили разделить и обнаружить агрегаты и фрагменты. Мономер, агрегаты и продукты деградации были четко и хорошо разделены друг от друга, как показано на рис. 6 и 7. Также наблюдалось значительное снижение высоты пика мономера в результате воздействия стресс-факторов (данные не показаны).

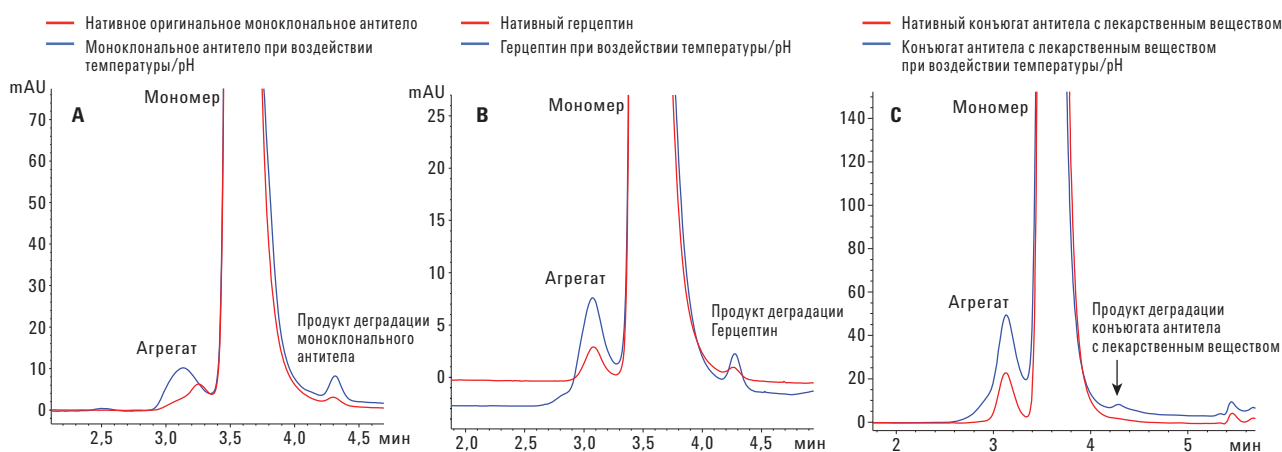


Рис. 6. Хроматограммы нативных (контроль, красная линия) оригинального моноклонального антитела, герцептина и конъюгата антитела с лекарственным веществом с наложенными хроматограммами тех же препаратов после воздействия температуры/pH (голубая линия), полученные с использованием колонок Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 × 150 мм, 2,7 мкм

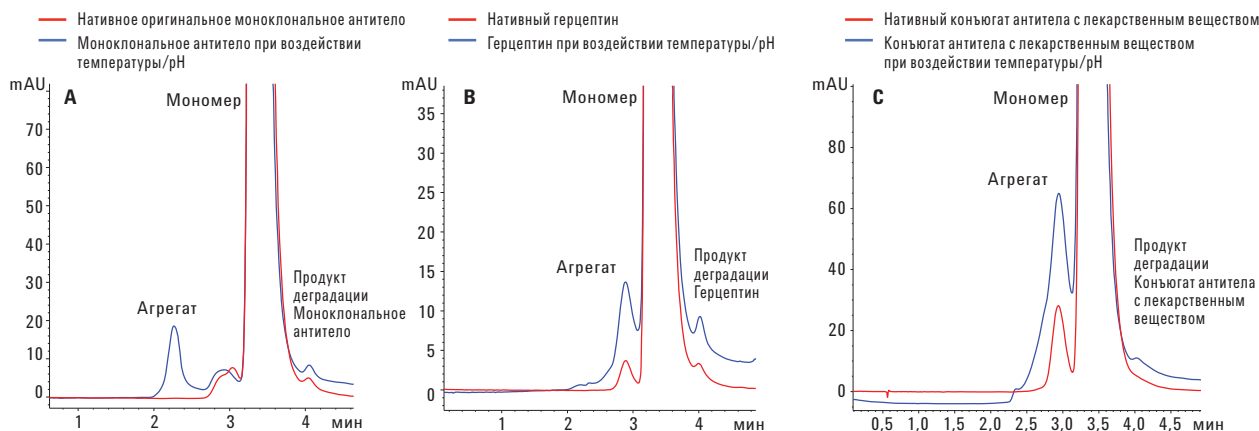


Рис. 7. Хроматограммы нативных (контроль, красная линия) оригинального моноклонального антитела, герцептина и конъюгата антитела с лекарственным веществом с наложенными хроматограммами тех же препаратов после воздействия температуры/pH (голубая линия), полученные с использованием колонок Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 4,6 × 150 мм, 2,7 мкм

Выводы

Эксклюзионная хроматография широко применяется для характеристики белковых агрегатов. Из-за потенциальной иммуногенности агрегатов необходимо строго контролировать их концентрацию во время производства рекомбинантных белков. В данном исследовании продемонстрировано использование более коротких и узких колонок Agilent AdvanceBio SEC с размером частиц наполнителя 2,7 мкм для высокопроизводительного разделения мономеров, агрегатов и фрагментов менее чем за четыре минуты. Колонки Agilent AdvanceBio SEC позволили добиться превосходной формы пиков гидрофобного конъюгата антитела с лекарственным веществом без использования органических модификаторов в подвижной фазе. Воспроизводимость значений площадей пиков и времен удерживания была превосходной, что демонстрирует надежность методики для рутинного применения. Была также показана точность методики и ее пригодность для количественного анализа, о чем свидетельствуют значения коэффициента линейности для рассмотренного диапазона концентрации. Наконец, более короткие и узкие колонки Agilent AdvanceBio SEC обеспечили надежное отслеживание агрегатов и фрагментов при исследовании подвергнутым стрессовым воздействиям препаратов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что данные колонки подходят для вариантов применения, требующих высокой производительности и чувствительности.

Литература

1. Fekete, S.; Beck, A.; Veuthey, J-L.; Guillaume, D. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates [С. Фекете, А. Бек, Дж.-Л. Войтей, Д. Гиларме. Теория и практика эксклюзионной хроматографии для анализа белковых агрегатов]. *J. Pharm. and Biomed. Anal.* **2014**, *101*, 161–173.
2. Başak Kükreer, B.; Filipe, V.; van Duijn, E.; Kasper, P. T.; Vreeken, R. J.; Heck, A. J. R.; Jiskoot, W. Mass Spectrometric Analysis of Intact Human Monoclonal Antibody Aggregates Fractionated by Size-Exclusion Chromatography [Б. Басак Кюкрер, В. Филип, Э. ван Дуин, П. Т. Каспер, Р. Д. Врикен, А. Д. Р. Хек, В. Джискут. Масс-спектральный анализ интактных агрегатов человеческих моноклональных антител, фракционированных методом эксклюзионной хроматографии]. *Pharmaceutical Research* **2010**, *27*, 2197–2204.
3. Coffey, A. *Fast, High-Resolution Size Exclusion Chromatography of Aggregates in Biotherapeutics*; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-6458EN, **2015** [Э. Коффи. Быстрая эксклюзионная хроматография высокого разрешения применительно к агрегатам в биотерапевтических средствах. Методические рекомендации, Agilent Technologies, Inc., номер публикации 5991-6458RU, 2015].

Дополнительная информация

Представленные данные отражают характерные результаты. Дополнительную информацию о продуктах и услугах нашей компании см. на веб-сайте www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem/advancebio

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., 2016
Напечатано в США
1 августа 2016 г.
5991-7165RU



Agilent Technologies