

Анализ малых терапевтических белков методом эксклюзионной хроматографии высокого разрешения

Авторы

Сандип Кондавити
(Sandeep Kondaveeti),
Те-Бей Чу (Te-Wei Chu),
Эндрю Коффи
(Andrew Coffey)
Agilent Technologies, Inc.

Аннотация

Среди факторов, мешающих разработке устойчивых белковых лекарственных препаратов, можно отметить процесс денатурации белков за счет агрегации. Одним из простейших методов для определения чистоты и поиска агрегатов этих белков является эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография (ЭХ). Регулярная калибровка методик ЭХ позволяет повысить воспроизводимость, что увеличивает точность и позволяет раньше обнаруживать потенциальные проблемы с пробами и сериями лекарственных препаратов. В данной работе колонки Agilent AdvanceBio SEC с неподвижной фазой размером 1,9 мкм с размером пор 120 Å сравниваются с колонками других производителей с частицами размером менее 2 мкм. Методики анализа рекомбинантного гормона роста человека (hGH), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (hG-CSF) и интерферона α -2b (INF α -2b) позволили продемонстрировать непревзойденную эффективность колонок AdvanceBio в методиках анализа малых терапевтических белков.

Введение

В последние годы фармацевтическая промышленность разрабатывает все больше лекарственных препаратов биологического происхождения для лечения большого числа различных заболеваний. Некоторые из биологических препаратов содержат малые терапевтические белки, такие как факторы роста или цитокины, которые играют ключевую роль в регуляции выработки, созревания и активности клеток крови, мышц и костей. Например, гормон роста человека (hGH) применяется для стимуляции роста у детей и взрослых с карликовостью из-за дефицита гормонов.¹ Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (hG-CSF) применяется для лечения онкологических пациентов в ходе химиотерапии для повышения уровня лейкоцитов, упавшего из-за применения цитотоксичных препаратов.² Интерфероны — это класс гликопротеинов с широким спектром терапевтического использования, которые известны своей склонностью образовывать частично развернутые и агрегированные формы под воздействием неблагоприятных значений pH и температуры.³

Среди основных факторов, мешающих разработке устойчивых белковых лекарственных препаратов, можно отметить процесс денатурации белков за счет агрегации. Фармакопея США рекомендует для определения чистоты и примесей агрегатов этих белков использовать эксклюзионную хроматографию (ЭХ). ЭХ — это довольно прямолинейный метод анализа. Он основан на простой диффузии молекул в пористую структуру неподвижной фазы. Крупные молекулы не в состоянии проникнуть в поры частиц неподвижной фазы и элюируются из колонки первыми, в то время как молекулы меньшего размера легко диффундируют в поры и элюируются из колонки позже. Колонки Agilent AdvanceBio SEC 120 Å с частицами размером 1,9 мкм созданы для эксклюзионной хроматографии (ЭХ) биомолекул в водной фазе. Их неподвижная фаза производится по патентованной технологии, которая позволяет добиться размера и объема пор, оптимально подходящих для разделения таких молекул, как малые белки и пептиды.

Экспериментальная часть

Оборудование и материалы

Для работы использовались реагенты и растворители классификации «для ВЭЖХ» и выше, приобретенные в компаниях Sigma-Aldrich (теперь Merck) и VWR Scientific. Вода очищалась с помощью системы Milli-Q A10 компании Millipore.

Оборудование

Биоинертный ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II Bio-inert, состоявший из следующих модулей:

- Насос Agilent 1260 Infinity II Bio-inert (G5654A)
- Мультисамплер Agilent 1260 Infinity II Bio-inert (G5668A) с холодильником для проб (вариант № 100)
- Многоколоночный термостат Agilent 1260 Infinity II (G7116A) с биоинертным теплообменником (вариант № 019)
- Детектор на диодной матрице Agilent 1260 Infinity II WR (G7115A) с биоинертной проточной ячейкой (вариант № 028)

Программное обеспечение

OpenLab 2.2 CDS

Параметры методики

Условия ВЭЖХ	
Колонка	AdvanceBio SEC 1,9 мкм 120 Å, 4,6 × 300 мм (кат. № PL1580-5250)
Подвижная фаза	Натрий-фосфатный буфер 150 ммоль/л, pH 7,0
Скорость потока	от 0,30 до 0,35 мл/мин (как указано в тексте)
Температура колонки	25 °C.
Объем ввода	2 мкл, 1 мг/мл
Пробы	Смесь стандартов низкомолекулярных белков Рекомбинантный гормон роста человека (rhGH) Рекомбинантный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека (rG-CSH)
Полная продолжительность анализа	15–20 мин (в зависимости от скорости потока)

Результаты и их обсуждение

Белки представляют собой сложные молекулы с большим количеством боковых функциональных групп: кислотных, основных, нейтральных и гидрофобных. Поэтому поиск оптимальных условий разделения, позволяющих избежать вторичных взаимодействий, может быть непростой задачей. Однако у колонок линейки AdvanceBio SEC частица силикагеля покрыта слоем полимера, который позволяет побороть многие из этих проблем. Механизм разделения основывается на различии в размерах молекул в растворе (гидродинамический радиус). В природе белки зачастую имеют компактную глобулярную структуру, однако в экстремальных условиях, таких как неблагоприятные температуры, значения pH или состав солей, они часто образуют димеры и более крупные структурные элементы. Это большая проблема для терапевтических белков, для которых наличие агрегатов может вызывать негативные последствия при их использовании. ЭХ идеально подходит для количественного определения и контроля агрегации белков. На рис. 1 показано ЭХ-разделение стандарта низкомолекулярных белков и пептидов. Калибровочная кривая времени удерживания для этих стандартов приведена на рис. 2. Из этой кривой можно оценить оптимальный диапазон молекулярных масс для этой колонки — 1–80 кДа.

Пик	Белок/пептид	Молекулярная масса (Да)
1	Овальбумин	44 000
2	Миоглобин	17 000
3	Апротинин	6 700
4	Нейротензин	1 700
5	Уридин	244

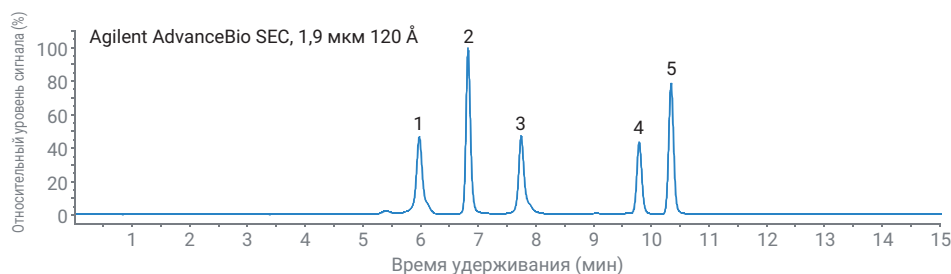


Рисунок 1. Эксклюзионная хроматограмма смеси низкомолекулярных белков и пептидов при скорости потока 0,35 мл/мин

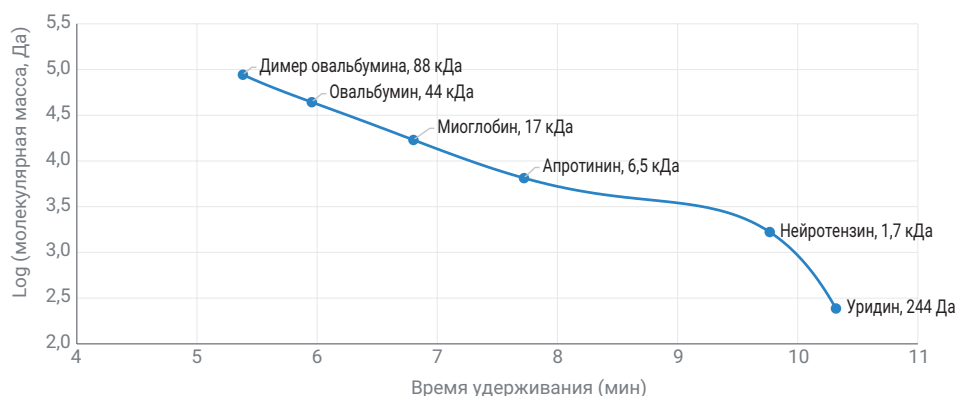


Рисунок 2. Калибровочная кривая колонки AdvanceBio SEC 1,9 мкм 120 Å для стандартов низкомолекулярных белков и пептидов

Даже при использовании колонки AdvanceBio SEC для количественного определения мономеров и димеров рекомендуется регулярно калибровать ее с помощью стандартов с соответствующей молекулярной массой. Регулярная калибровка позволяет повысить воспроизводимость, что увеличивает точность и позволяет раньше обнаруживать потенциальные проблемы, снижая продолжительность простоев и расход времени и средств на поиск и устранение неисправностей. При разделении белков стандарты представляют собой набор хорошо охарактеризованных белков с молекулярными массами, покрывающими весь рабочий диапазон колонки. Правильный подбор стандартов связан с двумя основными аспектами успешного использования ЭХ. Вторичное взаимодействие определяемых веществ с неподвижной фазой должно быть минимальным. Размер пор неподвижной фазы должен соответствовать размеру определяемых молекул.

Данные методические рекомендации демонстрируют высокое разрешение колонки AdvanceBio SEC 120 Å с размером частиц 1,9 мкм для эксклюзионно-хроматографического анализа (ЭХ) рекомбинантных терапевтических белков (hGH и hG-CSF) в сравнении с имеющимися на рынке конкурирующими колонками с размером частиц менее 2 мкм. Дополнительная оптимизация подвижной фазы позволила сравнить также ЭХ-разделение нативного и денатурированного под действием температуры интерферона α-2b (INF α-2b).

Наличие вторичных взаимодействий можно определить сравнением времени удерживания определяемых веществ с калибровочной кривой. Слишком рано или слишком поздно выходящие пики, а также плохая форма пиков говорят о недостаточно оптимизированной подвижной фазе. На рис. 3 показана ЭХ-хроматограмма hG-CSF на колонке AdvanceBio SEC 120 Å, 1,9 мкм, на которой время удерживания хорошо соответствует белкам с молекулярной массой порядка 20 кДа.

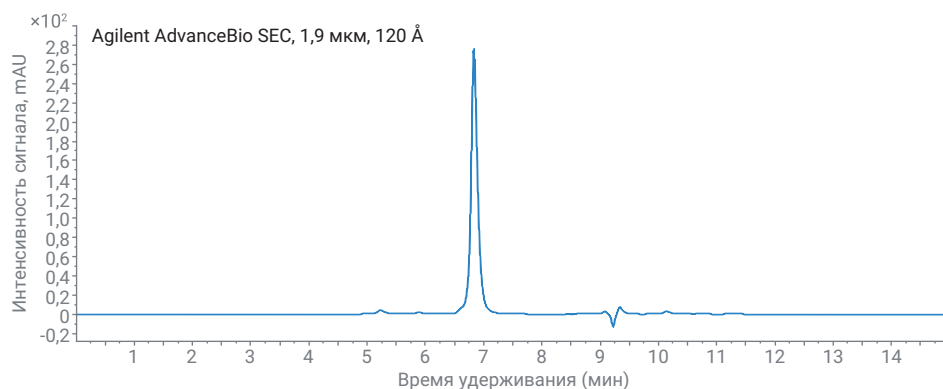


Рисунок 3. Эксклюзионная хроматограмма hG-CSF на колонке Agilent AdvanceBio SEC 1,9 мкм, 120 Å 4,6 × 300 мм, при скорости потока 0,35 мл/мин

На рис. 4 крупным планом сравниваются базовые линии хроматограмм hG-CSF на колонке AdvanceBio SEC 120 Å, 1,9 мкм и на колонках других производителей с размером частиц менее 2 мкм.

На самой нижней хроматограмме хорошо заметны типичные проблемы, связанные со вторичными взаимодействиями (запаздывание и размытый пик).

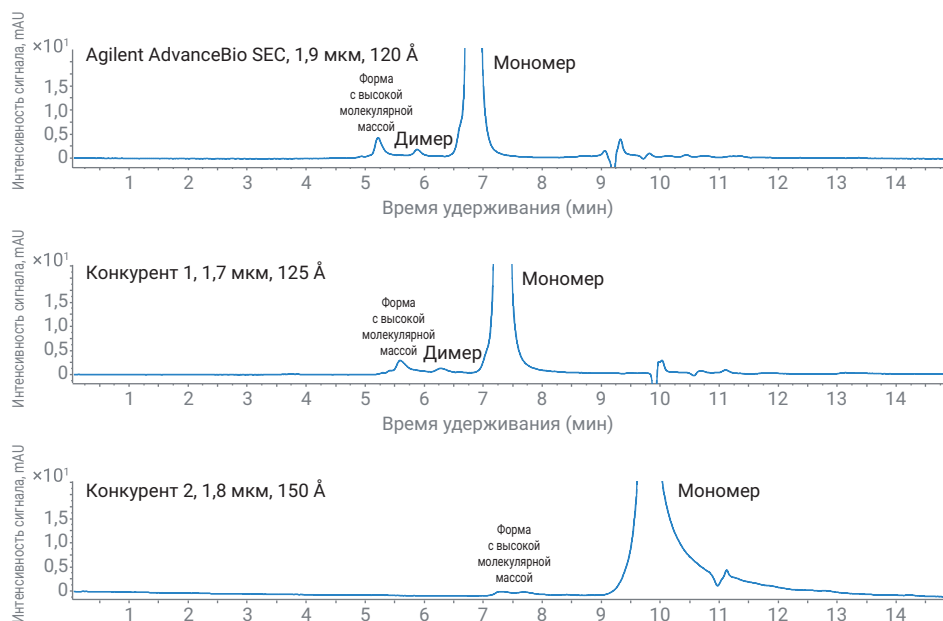


Рисунок 4. Увеличенный участок эксклюзионной хроматограммы hG-CSF при скорости потока 0,35 мл/мин

Молекулярные массы многих других терапевтических белков близки к hG-CSF, поэтому колонка AdvanceBio SEC 120 Å, 1,9 мкм подходит для их анализа. Рекомбинантная форма hGH, соматотропин, может содержать некоторые примеси из-за посттрансляционной модификации

или последующей обработки. На рис. 5 показана ЭХ-хроматограмма соматотропина, полученная в уже описанных выше условиях. На врезке показан увеличенный участок базовой линии, на котором очевидны пики димера и других высокомолекулярных агрегатов.

Оптимизация формы пиков и разрешения для других белков может потребовать дополнительной работы с методикой. Серия экспериментов с различным составом подвижной фазы позволила добиться оптимальной формы пика и степени извлечения IFN α-2b, как показано в табл. 2.

Таблица 1. Данные по площадям пиков высокомолекулярных примесей (HMW), димера и мономера hG-CSF

	AdvanceBio SEC 1,9 мкм, 120 Å				Конкурент 1, 1,7 мкм, 125 Å				Конкурент 2, 1,8 мкм, 150 Å			
	RT (мин)	Отн. площадь	Rs по Фарм. США	Несимметричные пики	RT (мин)	Отн. площадь	Rs по Фарм. США	Несимметричные пики	RT (мин)	Отн. площадь	Rs по Фарм. США	Несимметричные пики
Форма с высокой молекулярной массой	5,22	2,61		1,16	5,59	2,49		1,28	7,40	2,01		1,37
Димер	5,88	1,02	2,41	1,11	6,27	0,83	1,68	1,26	Не определено			
Мономер	6,82	96,37	3,77	1,13	7,31	96,68	3,04	1,11	9,74	97,99		2,13

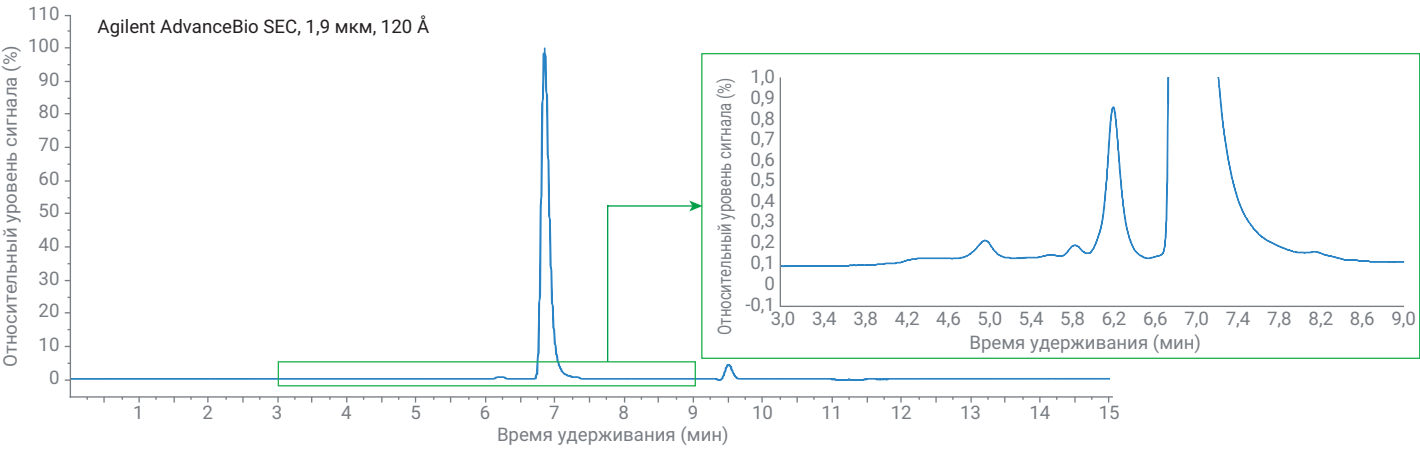


Рисунок 5. Эксклюзионная хроматограмма соматотропина (rhGH)

Таблица 2. Данные о форме пиков в ходе оптимизации методики анализа IFN α-2b

NaCl (ммоль/л)	Ширина пика (мин)	Размытие	Разрешение НМВ-мономер	Разрешение мономер-LMW
100	0,20	2,88	1,94	1,98
150	0,18	2,65	2,25	2,31
200	0,16	2,52	2,26	2,66
250	0,15	2,39	2,84	2,86
400	0,14	2,08	3,32	3,59

На рис. 6 приведены ЭХ-хроматограммы, а также времена удерживания и данные по размыванию пиков стандарта интерферона α -2b (INF α -2b) на трех разных колонках для ЭХ с частицами размером менее 2 мкм. Различие в эффективности колонок может привести к разнице в разрешении при разделении примесей INF α -2b методом ЭХ, поэтому эксперимент повторялся с использованием разложившейся пробы.

Для интерферона α -2b за образование агрегатов отвечает, предположительно, частичное развертывание молекул, однако иногда такие частично развернутые формы сохраняют некоторую устойчивость.³ Кроме того, температурную устойчивость этих молекул может снижать также присутствие О-гликозилированных форм.⁴ Выбор клеточной линии для производства рекомбинантного белка особенно важен, так как линии *E. coli* не приводят к появлению гликозилированных форм.

Оптимизированные условия ВЭЖХ для анализа INF α -2b	
Колонка	Agilent AdvanceBio SEC 1,9 мкм 120 Å, 4,6 × 300 мм (кат. № PL1580-5250)
Подвижная фаза	Натрий-фосфатный буфер 200 ммоль/л + NaCl 250 ммоль/л, pH 6,5
Скорость потока	0,35 мл/мин
Температура колонки	25 °C.
Объем ввода	2 мкл, 1 мг/мл
Пробы	Интерферон альфа-2b (INF α -2b) Обработанный нагреванием интерферон альфа-2b (INF α -2b): 60 °C в течение 30 мин
Полная продолжительность анализа	15 мин

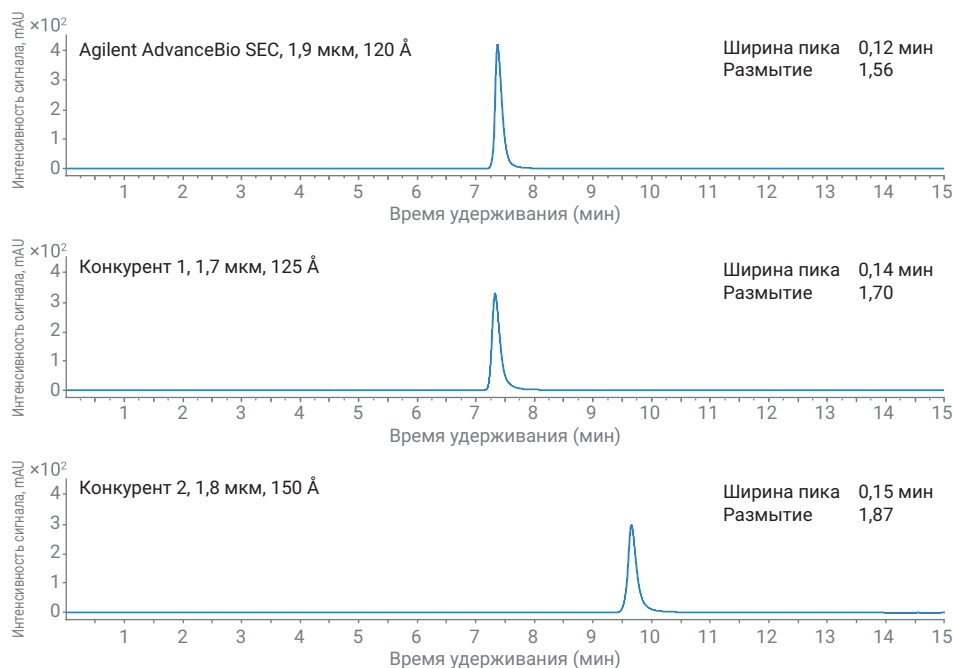


Рисунок 6. Эксклюзионная хроматограмма интерферона α -2b

Термическим разложением пробы интерферона α -2b (нагреванием при 60 °C в течение 30 мин) можно добиться появления в ней различных примесей. Эти примеси включают в себя как рано выходящие соединения с высокой молекулярной массой (НМВ), так и поздно выходящие соединения с низкой молекулярной массой

(LMW), как показано на рис. 7. Как и ожидалось, колонка AdvanceBio SEC 120 Å, 1,9 мкм продемонстрировала максимальное разрешение как между НМВ и мономером, так и между мономером и LMW. Эта же колонка продемонстрировала минимальные ширину и асимметрию пиков при разделении неразложенных проб.

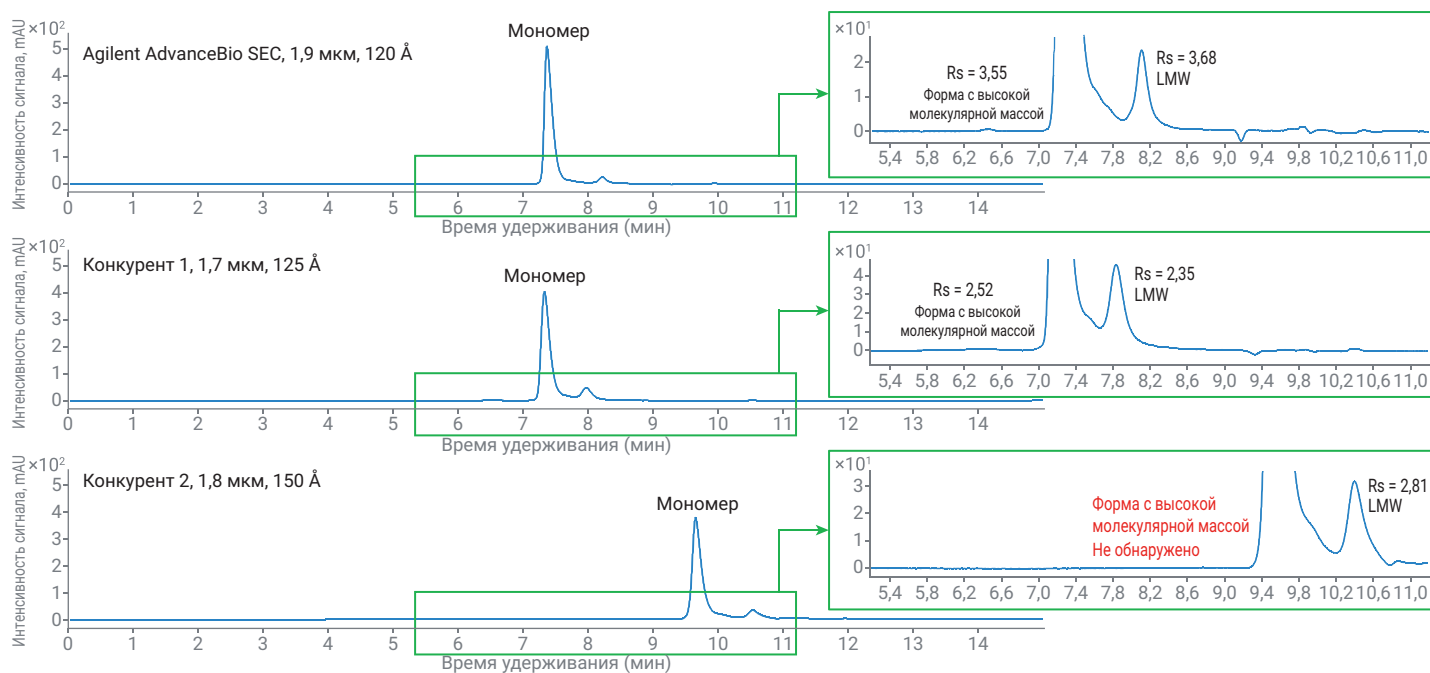


Рисунок 7. Эксклюзионная хроматограмма обработанного нагреванием интерферона α -2b

Выводы

В линейку Agilent AdvanceBio SEC входит множество колонок с различными размерами колонок и пор, которые подходят для разделения соединений с различной молекулярной массой. Представленная в данной работе колонка AdvanceBio SEC 120 Å, 1,9 мкм демонстрирует повышенную эффективность ЭХ-анализа высокого разрешения малых терапевтических белков по сравнению с колонками других производителей с близким размером пор и частиц.

Калибровка ЭХ-колонок AdvanceBio SEC с помощью соответствующих стандартов гарантирует, что вы всегда будете знать оптимальный рабочий диапазон своей колонки. Эти стандарты позволяют также построить калибровочную кривую для оценки молекулярной массы неизвестных соединений. Регулярная калибровка по набору стандартов крайне полезна и позволяет следить за изменением эффективности колонки со временем и обнаруживать потенциальные проблемы на ранней стадии. Это дает возможность заранее выполнить корректирующие действия, которые позволяют снизить продолжительность простоя системы и увеличить ее производительность.

Литература

1. Bayol, A. et al. *Pharmeuropa Bio.* **2004**, 2004(1), 35–45
2. Advani, S. H. et al. *Indian J. Med. Paediatr. Oncol.* **2010** (Jul–Sep), 31(3), 79–82
3. Sharma, V. K.; Kalonia, D. S. *Pharmaceutical Research* **2003**, 20, 1721–1729
4. Johnston, M. J. W. et al. *Pharmaceutical Research* **2011**, 28, 1661–1667

www.agilent.com/chem

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

DE.1110648148

Информация в этом документе может быть изменена без уведомления.

© Agilent Technologies, Inc., 2020
Напечатано в США 30 марта 2020 г.
5994-1829RU