

Анализ пегилированных белков с помощью колонок Agilent AdvanceBio SEC для эксклюзионной хроматографии

Рекомендации по применению

Биофармацевтические препараты

Автор

М. Сундарам Паланисвами
(M.Sundaram Palaniswamy)
Agilent Technologies, Ltd
Индия

Аннотация

Пегилирование терапевтических белков существенно повысило их ценность, поскольку позволило модифицировать их физико-химические и биологические свойства, например, повышать растворимость, снижать иммуногенность, повышать время полужизни и степень защищенности от протеаз. Метод эксклюзионной хроматографии является предпочтительным методом определения примесей с молекулярной массой выше, чем у пегилированных белков. Эксклюзионная хроматография пегилированных белков связана с существенными трудностями: обусловленное полиэтиленгликолем взаимодействие с неподвижной фазой, состоящей из частиц силикагеля, приводит к снижению точности определяемых содержаний, плохой форме пика и нежелательному размытию хвостов пиков. В настоящей методической информации описывается простая и чувствительная методика эксклюзионной хроматографии для определения чистоты пегилированного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (ПЭГ-Г-КСФ). Выделение и количественный анализ ПЭГ-Г-КСФ выполнялись с помощью колонки Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å размера 7,8 × 300 мм с размером частиц наполнителя 2,7 мкм с применением водной подвижной фазы. Для кривой линейности в диапазоне от 12,5 до 2 000 мкг/мл наблюдался отличный коэффициент корреляции, что свидетельствует о пригодности методики для количественного анализа. Превосходные показатели воспроизводимости времени удерживания и площади пиков, полученные по данной методике, позволяют говорить о ее хорошей применимости. Более того, применение колонки AdvanceBio SEC предоставило возможность выполнять разделение и проводить количественное определение агрегатов, полученных при стресс-испытаниях.



Agilent Technologies

Введение

Пегилирование представляет собой процесс ковалентного присоединения полимерных цепей полиэтиленгликоля (ПЭГ) к другой молекуле — обычно к лекарственному веществу или терапевтическому белку. Пегилирование традиционно выполняется посредством инкубации реакционноспособного производного ПЭГ с макромолекулой целевого вещества. Остаток ПЭГ обеспечивает многочисленные преимущества, повышая устойчивость белка и период полувыведения из крови в организме. Полиэтиленгликоль был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) и является общепринято безопасным веществом [1]. В настоящее время существуют пегилированные продукты, одобренные FDA. Пегилированный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ПЭГ-Г-КСФ) является формой пролонгированного действия рекомбинантного Г-КСФ. Он состоит из Г-КСФ с молекулой ПЭГ массой 20 кДа, ковалентно связанной с N-концевым метиониновым остатком. Г-КСФ представляет собой белок из 175 аминокислот с молекулярной массой 18 800 Да. ПЭГ-Г-КСФ имеет общую молекулярную массу 39 кДа. Методика из проекта фармакопейной статьи рекомендует применение эксклюзионной ВЭЖХ для определения чистоты и агрегатов более высокого порядка [2]. В большинстве опубликованных методик для определения ПЭГ-Г-КСФ используется водная подвижная фаза, содержащая 100 мМ NaCl, 85 % ортофосфорной кислоты и до 10 % этанола для предотвращения неспецифических взаимодействий и улучшения формы пиков и разрешения [3]. Особое внимание следует уделить неидеальной адсорбции терапевтических белков в процессе эксклюзионной хроматографии, так как агрегаты иногда проявляют большую склонность к связыванию с неподвижной фазой, чем исходная форма. Из-за этого избирательного связывания эксклюзионная хроматография агрегатов дает неточные результаты, и существует вероятность необнаружения агрегатов. Для решения этой проблемы использовались подвижные фазы, содержащие органические растворители или имеющие слишком низкие или высокие значения pH, что позволило повысить разрешение и точность определения содержаний. Однако помимо возможности диссоциации обратимо образующихся агрегатов, существует также вероятность диссоциации ими агрегатов, необратимых в буферном растворе лекарственной формы [4].

В настоящей работе показаны преимущества колонок Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å размера 7,8 × 300 мм с размером частиц наполнителя 2,7 мкм — технологической инновации в области эксклюзионной хроматографии. В них применяются инновационные частицы силикагеля и уникальная гидрофильная привитая фаза, что обеспечивает разрешение и разделение по размерам в широком диапазоне типов проб, причем отсутствует необходимость добавления органических модификаторов в подвижную фазу.

Вещества и методики

Приборы

Использовалась полностью биосовместимая система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity Bioinert с четырехканальным насосом с максимальным давлением 600 бар, состоящая из следующих модулей:

- биоинертный четырехканальный насос для ЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary Pump (кат. № G5611A);
- высокоэффективный биоинертный автосамплер Agilent 1260 Infinity High Performance Bio-inert Autosampler (кат. № G5667A);
- термостат Agilent 1200 Infinity (кат. № G1330B);
- термостат колоночного отделения Agilent 1260 Infinity, содержащий легко вставляемые биоинертные нагревательные элементы (кат. № G1316C, поз. 19);
- диодно-матричный детектор Agilent 1260 Infinity DAD VL (кат. № G1315D со стандартной биоинертной проточной кюветой с длиной оптического пути 10 мм);
- колонка Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 7,8 × 300 мм, наполненная частицами размером 2,7 мкм (кат. № PL1180-5350).

Программное обеспечение

Agilent ChemStation B.04.03 (или более поздние версии)

Параметры эксперимента для эксклюзионной хроматографии

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

Таблица 1. Хроматографические параметры, используемые для эксклюзионной ВЭЖХ

Параметр	Условия
Подвижная фаза:	150-мМ натрий-фосфатный буфер, pH 6,8
Температура термостата колоночного отделения:	Комнатная
Изократический анализ:	Подвижная фаза А
Вводимый объем:	10 мкл
Скорость потока:	0,8 мл/мин
УФ-детектирование, длина волны:	214 и 280 нм

Реагенты, пробы и вещества

Коммерчески доступный ПЭГ-Г-КСФ был приобретен в местной аптеке и хранился в соответствии с инструкциями производителя. Одноосновный и двухосновный гидрофосфат натрия и соляная кислота были приобретены у компании Sigma-Aldrich. Все используемые реактивы и растворители имели класс чистоты «для ВЭЖХ». Использовалась вода высокой очистки, полученная на системе очистки воды Milli-Q (модель Millipore Elix 10, США).

Процедура

Подвижную фазу объемом 10 мкл вводили в качестве холостой пробы, после чего вводили пробы с различными уровнями концентрации, по три для каждого уровня, для определения линейного диапазона методики. Площадь пиков и время удерживания для каждого уровня концентрации использовали для расчета значений стандартного отклонения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD, %). Предел обнаружения и предел количественного определения устанавливали на основании анализа проб с концентрациями из нижней части диапазона линейности. Для определения калибровочной кривой для мономеров строили концентрационную зависимость средней площади пиков для проб каждого уровня концентрации в диапазоне линейности.

Линейность и диапазон концентраций

Калибровочная кривая была построена на основе девяти стандартных концентраций ПЭГ-Г-КСФ в диапазоне от 7,8 до 2 000 мкг/мл.

Предел количественного определения и предел обнаружения

Концентрацию ПЭГ-Г-КСФ, при которой соотношение «сигнал/шум» превышало 3, принимали за предел обнаружения. Концентрацию, при которой соотношение «сигнал/шум» превышало 10, принимали за предел количественного определения.

Приготовление агрегатов ПЭГ-Г-КСФ

Агрегаты ПЭГ-Г-КСФ готовили согласно указаниям проекта фармакопейной статьи. Вкратце, около 2 мг/мл лекарственного вещества инкубировали при температуре 55 °С в течение 60, 120 и 180 минут в полипропиленовой пробирке. Затем пробы охлаждали до комнатной температуры и сразу же выполняли анализ.

Пригодность системы

Согласно проекту фармакопейной статьи количество агрегата не должно превышать 5 %. Кроме того, относительное стандартное отклонение выраженной в процентах площади пика агрегата по трем вводам пробы не должно превышать 10 %. Отклонение времени удерживания пика мономера ПЭГ-Г-КСФ по трем вводам пробы не должно превышать 0,2 минуты.

Результаты и обсуждение

Разделение и обнаружение

На рис. 1 представлено превосходное выделение интактного ПЭГ-Г-КСФ в виде одного симметричного пика со временем удерживания 5,989 минуты при описанных выше условиях хроматографирования. Из рисунка видно, что конъюгат содержит димеры и более крупные агрегаты, как показано на увеличенном изображении. Однако проба не содержит свободного Г-КСФ, на что указывает отсутствие поздно элюирующих пиков.

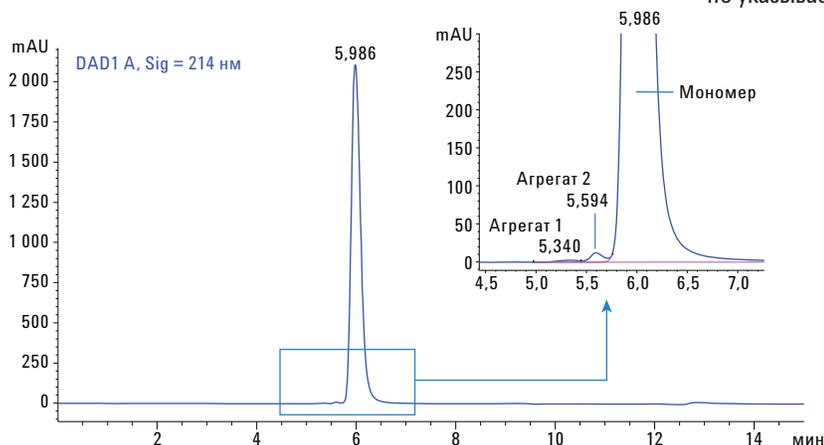


Рис. 1. Хроматограмма, полученная методом эксклюзионной хроматографии для интактного терапевтического ПЭГ-Г-КСФ с использованием колонки Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 мм, 2,7 мкм

Воспроизводимость времени удерживания и площади

Воспроизводимость процедуры выражается степенью согласования результатов серии измерений. Эти измерения можно получить в результате нескольких анализов гомогенной пробы в рекомендованных условиях, и воспроизводимость часто выражают относительным стандартным отклонением (RSD). На рис. 2 показано наложение хроматограмм от шести параллельных вводов, демонстрирующих превосходную воспроизводимость разделения. В табл. 2 представлены средние значения и относительные стандартные отклонения для времени удерживания и площадей пиков для мономера и агрегатов из шести параллельных вводов ПЭГ-Г-КСФ. Относительные стандартные отклонения для времени удерживания и площадей пиков для основного пика составляли 0,023 % и 0,081 %, соответственно, что демонстрирует превосходную воспроизводимость аналитической методики и воспроизводимость работы системы.

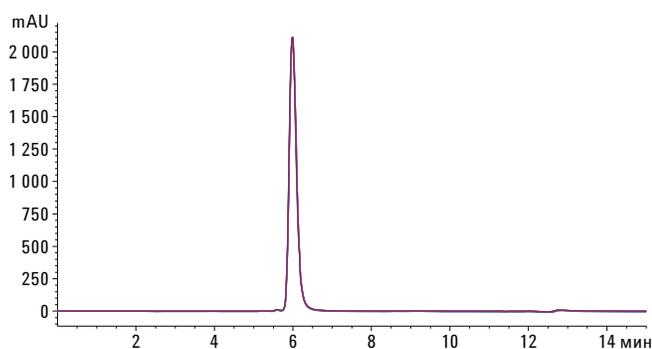


Рис. 2. Наложение шести параллельных вводов ПЭГ-Г-КСФ, разделяемого на колонке Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 мм, 2,7 мкм

Таблица 2. Воспроизводимость времени удерживания и площади пиков (n = 6)

Пробы	Время удерживания		Площадь пика	
	Среднее (мин)	RSD	Среднее (mAU/мин)	RSD
ПЭГ-Г-КСФ	5,987	0,023	99,39	0,081
Агрегат 1 ПЭГ-Г-КСФ	5,594	0,01	0,413	4,91
Агрегат 2 ПЭГ-Г-КСФ	5,340	0	0,155	5,1

Эта точность также соответствует требованиям пригодности системы:

- Процентное количество агрегата не превышает 5 %.
- Относительное стандартное отклонение выраженной в процентах площади пика агрегата по трем вводам пробы не превышает 10 %.
- Отклонения времени удерживания пика мономера ПЭГ-Г-КСФ по трем вводам пробы не превышают 0,2 минуты.

Таким образом, содержание агрегатов высокой молекулярной массы в конъюгате ПЭГ не превышает 0,6 %. Кроме того, чистота ПЭГ-Г-КСФ согласно эксклюзионной ВЭЖХ превышает 99 %.

Предел обнаружения и предел количественного определения

Предел обнаружения и предел количественного определения составили 3,125 и 12,5 мкг/мл соответственно, что демонстрирует чувствительность методики. Полученные значения предела обнаружения и предела количественного определения сведены в табл. 3. На рис. 3 представлено наложение хроматограмм, соответствующих пределу обнаружения и пределу количественного определения конъюгата, и хроматограммы холостой пробы.

Таблица 3. Результаты по пределу обнаружения, пределу количественного определения и соотношению «сигнал/шум» (n = 3)

Концентрация (мкг/мл)	Отношение сигнал/шум	Средняя площадь
3,125 (предел обнаружения)	4,6	13,69
12,5 (предел количественного определения)	17,7	27,16

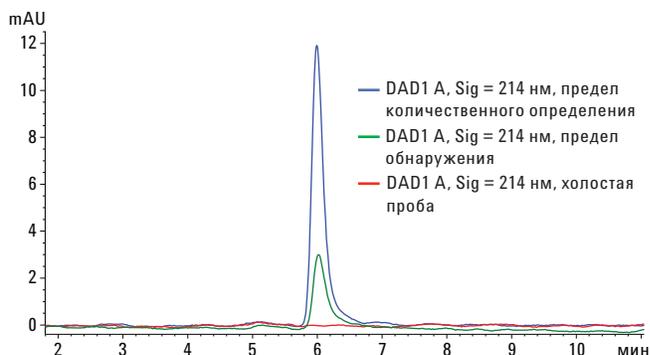


Рис. 3. Хроматограммы, соответствующие пределу обнаружения и пределу количественного определения ПЭГ-Г-КСФ, разделяемого на колонке Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 мм, 2,7 мкм, с наложением хроматограммы холостой пробы

Линейность

Кривые линейности для анализа ПЭГ-Г-КСФ строили от предела количественного определения до самого высокого применяемого в рамках исследования уровня концентрации с использованием площади пиков и концентрации ПЭГ-Г-КСФ. На рис. 4 представлена кривая линейности ПЭГ-Г-КСФ в диапазоне концентраций от 12,5 до 2 000 мкг.

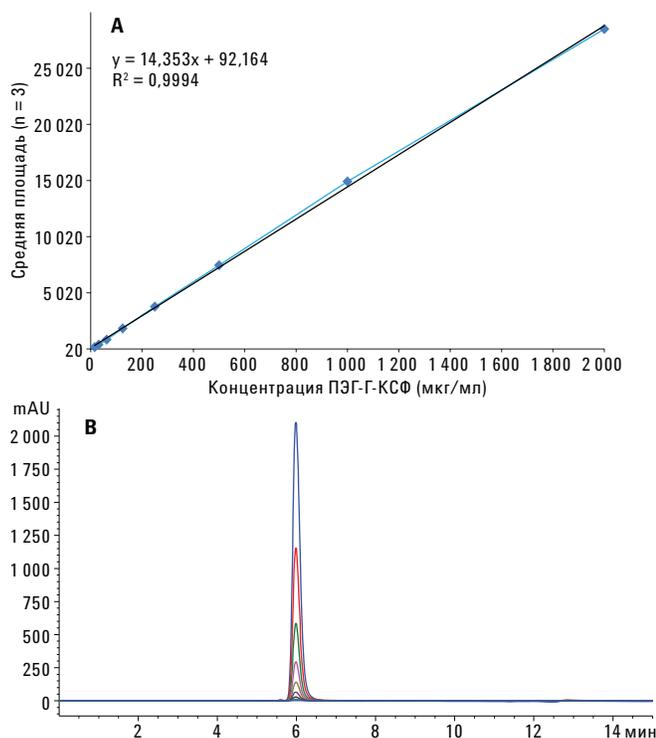


Рис. 4. Кривая линейности (А) с восемью стандартными концентрациями ПЭГ-Г-КСФ в диапазоне от 12,5 до 2 000 мкг/мл, демонстрирующая превосходные значения коэффициента корреляции. Также представлено наложение хроматограмм (В) для диапазона линейности

Анализ агрегации и деградации, количественное определение

Хроматограммы ПЭГ-Г-КСФ, подвергнутого тепловому воздействию, полученные по методу эксклюзионной хроматографии, свидетельствуют о возможности разделения и обнаружения агрегатов на колонке AdvanceBio SEC (см. рис. 5). Интактный ПЭГ-Г-КСФ и его более крупные агрегаты были хорошо отделены друг от друга, как показано на хроматограмме. В табл. 4 обобщены результаты анализа относительных количеств мономера и агрегатов ПЭГ-Г-КСФ, основанные на площади пиков в процентах.

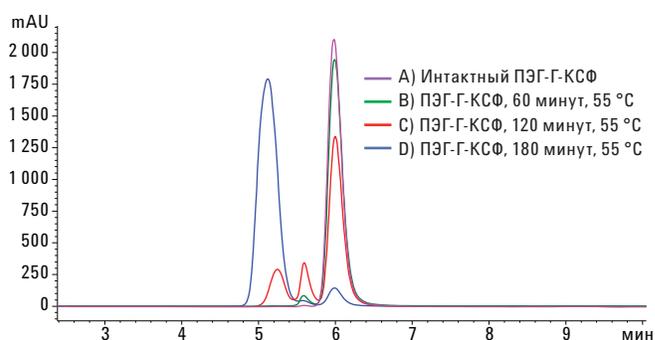


Рис. 5. Тенденция к агрегированию ПЭГ-Г-КСФ, выявленная с помощью эксклюзионной ВЭЖХ на колонке Agilent AdvanceBio SEC. (А) контрольная проба интактного ПЭГ-Г-КСФ, (В) 60 минут при 55 °С (С), 120 минут при 55 °С и (D) 180 минут при 55 °С.

Данные свидетельствуют о повышении концентраций агрегата при воздействии температуры 55 °С при относительном снижении количества мономерной формы с 96 % до 70 % и 6,44 % соответственно.

Таблица 4. Анализ относительных количеств мономера и агрегатов на основании площади пика

Подвергнутый стрессу ПЭГ-Г-КСФ (60 минут)		Подвергнутый стрессу ПЭГ-Г-КСФ (120 минут)		Подвергнутый стрессу ПЭГ-Г-КСФ (180 минут)	
Время	Площадь пика, %	Время	Площадь пика, %	Время	Площадь пика, %
5,59	2,85	5,24	16,01	5,12	91,89
5,99 (мономер)	96	5,59	12,74	5,57	1,14
		5,99 (мономер)	70,29	5,98 (мономер)	6,44

Выводы

В данной методической информации представлено несколько превосходных решений для анализа пегилированных белков с использованием ПЭГ-Г-КСФ в качестве модельного белка. Была разработана простая методика эксклюзионной ВЭЖХ с использованием колонки Agilent AdvanceBio SEC для мониторинга чистоты ПЭГ-Г-КСФ без применения органических модификаторов в подвижной фазе. Получены отличные значения относительного стандартного отклонения и времен удерживания по наборам параллельных анализов, удовлетворяющие требованиям пригодности системы к анализу ПЭГ-Г-КСФ. Предел обнаружения и предел количественного определения для ПЭГ-Г-КСФ составили 3,125 и 12,5 мкг/мл, соответственно, что говорит о чувствительности аналитической методики. Кривая линейности с восемью стандартными концентрациями конъюгата в диапазоне от 12,5 до 2 000 мкг/мл продемонстрировала превосходное значение коэффициента корреляции, что свидетельствовало о точности методики и ее пригодности для количественного определения. Кроме того, стресс-испытания пегилированного терапевтического белка продемонстрировало, что колонка AdvanceBio SEC справляется с задачей разделения, обнаружения и количественного анализа агрегатов на основе процентного соотношения площади пиков. Такая простая и воспроизводимая методика в сочетании с биоинертностью и устойчивостью к коррозии прибора является надежным решением, подходящим для контроля качества пегилированных белков в биофармацевтических исследованиях.

Литература

1. Gaberc-Porekar, V.; Zore, I.; Podobnik, B.; Menart, V. Obstacles and pitfalls in the PEGylation of therapeutic proteins. (Препятствия и подводные камни в пегилировании терапевтических белков) *Current Opinion in Drug Discovery and Development* **2008**, *11*, 242–250.
2. ipc.nic.in/writereaddata/monoprepimages/Pefilgrastim-2961377726.pdf
3. Ratto, J. J.; O'Conner, S. R.; Distler, A. R.; Wu, G. M.; Hummel, D.; Treuheit M. J.; Herman, A. C.; Davis, J. M. Ethanol-sodium chloride-phosphate mobile phase for size-exclusion chromatography of poly (ethylene glycol) modified proteins. (Подвижная фаза, содержащая этанол, хлорид натрия и фосфат для эксклюзионной хроматографии белков, модифицированных полиэтиленгликолем) *J. of Chromatog. A* **1997**, *763*, 337–344.
4. Tsutomu Arakawa; *et al.* The Critical Role of Mobile Phase Composition in Size Exclusion Chromatography of Protein Pharmaceuticals. (Ключевая роль состава подвижной фазы в эксклюзионной хроматографии белковых лекарственных веществ) *J. of Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 1674–1692.

Дополнительная информация

Представленные данные являются характерными значениями. Дополнительную информацию о продуктах и услугах нашей компании см. на веб-сайте www.agilent.com/chem.

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
23 марта 2016 г.
5991-6791RU



Agilent Technologies