



Быстрая эксклюзионная хроматография высокого разрешения применительно к агрегатам в биотерапевтических средствах

Методические рекомендации

Биопрепараты и биоаналоги

Автор

Эндрю Коффи (Andrew Coffey),
Agilent Technologies, Inc.

Введение

Агрегация белков является важным показателем качества для биотерапевтических белков, поскольку агрегаты могут оказывать существенное влияние на безопасность и вызывать антигенный ответ [1]. Агрегаты могут также снижать эффективность биопрепаратов и значительно ухудшать экономические показатели процесса. Белки часто агрегируют под воздействием стрессовых условий, таких как изменения pH, температуры или концентрации. Следовательно, агрегация может происходить на многих этапах производства. Эксклюзионная хроматография (SEC) признана предпочтительным методом для количественного анализа агрегатов.

Контроль образования агрегатов в процессе разработки биотерапевтического средства, например во время выбора клеточного клона или оптимизации условий ферментации с использованием строгого подхода к планированию экспериментов, может привести к необходимости анализа огромного количества проб методом эксклюзионной хроматографии.

При тех условиях, которые обычно используются для эксклюзионной хроматографии, время анализа составляет не менее 20 минут, что сильно ограничивает возможность выполнения анализа большого количества проб. Компания Agilent разработала колонки AdvanceBio SEC с хорошо оптимизированными размерами частиц и пор, которые обеспечивают более быстрое разделение и существенно ослабляют это аналитическое ограничение. В настоящих методических рекомендациях описываются способы увеличения пробопотока без снижения точности анализа.



Agilent Technologies

Вещества и методики

Реагенты, пробы и материалы

Иммуноглобулин G (IgG) был приобретен у компании Sigma-Aldrich, Corp. Стандартная смесь белков была получена у компании Bio-Rad Laboratories, Inc. и состояла из следующих компонентов: тироглобулин (670 кДа), γ -глобулин (158 кДа), овальбумин (44 кДа), миоглобин (17 кДа) и витамин B12 (1,35 кДа). Все химические вещества и растворители имели класс чистоты «для ВЭЖХ», а очищенная вода была получена с помощью системы очистки воды Milli-Q.

Приборы

Использовалась полностью биоинертная система ЖХ Agilent 1260 Infinity Quaternary Bio-inert LC, состоящая из следующих модулей:

- биоинертный четырехканальный насос для ЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary Pump (G5611A);
- высокоэффективный биоинертный автосамплер Agilent 1260 Infinity High Performance Bio-inert Autosampler (G5667A);
- термостат Agilent 1200 Infinity (G1330B);
- термостат колоночного отделения Agilent 1260 Infinity (G1316C);
- диодно-матричный детектор Agilent 1260 Infinity (G1315D) с биоинертной проточной кюветой.

Программное обеспечение: Agilent ChemStation B.04.03.

Условия

Колонки:	Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7,8 × 150 мм, 2,7 мкм (кат. № 1180-3301), Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7,8 × 300 мм, 2,7 мкм (кат. № 1180-5301), Колонка для диолов другого производителя, 7,8 × 300 мм, 5 мкм
Подвижная фаза:	150-мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,0
Температура термостата колоночного отделения:	30 °C
Вводимый объем:	5 мкл
Скорость потока:	0,5–1,4 мл/мин (см. подписи на рисунках)
Детектирование:	УФ-детектирование при длине волны 220 нм

Результаты и обсуждение

Колонки AdvanceBio SEC с частицами размером 2,7 мкм разработаны для получения максимальной эффективности без риска разрушения компонентов проб под действием механических напряжений или их забивания между частицами сорбента. Уникальный способ изготовления позволяет контролировать размер, структуру и объем пор. Нанесение гидрофильного полимерного покрытия обеспечивает малую ширину и хорошее разрешение пиков белков. На рис. 1 показаны сравнительные эксклюзионные хроматограммы для разделения стандартной пробы белков с использованием колонки AdvanceBio SEC и колонки таких же размеров (7,8 × 300 мм) от другого производителя. Колонка AdvanceBio SEC показала более высокую эффективность разделения стандартной пробы белков по сравнению с другой колонкой. Колонка AdvanceBio SEC продемонстрировала идеальную форму хроматографического пика мономера IgG (пик 4). Димер овальбумина (пик 5) был хорошо разрешен по сравнению с колонкой другого производителя. Эти результаты демонстрируют превосходную эффективность колонки AdvanceBio SEC.

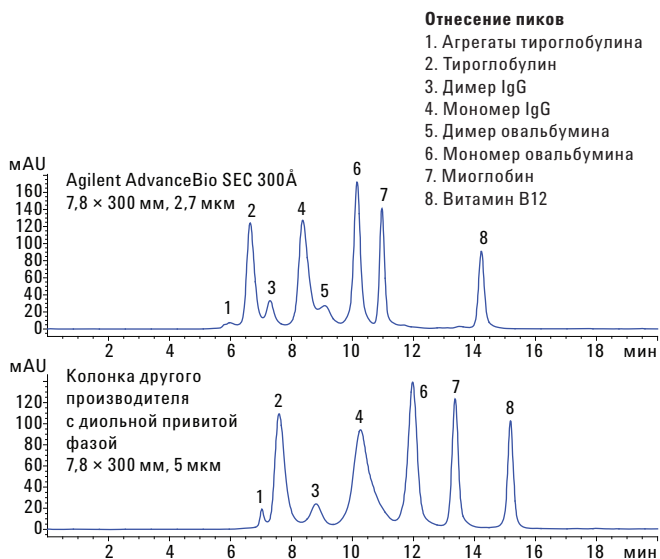


Рис. 1. Анализ методом эксклюзионной хроматографии для стандартной пробы белков в условиях высокого разрешения (при скорости потока 0,8 мл/мин) с временем анализа 20 минут, показывающий превосходную эффективность колонки Agilent AdvanceBio SEC

При «стандартных» условиях высокого разрешения с колонками длиной 300 мм и скоростью потока 0,8 мл/мин время анализа составляет 20 минут. Это дает максимальный пробопоток, равный трем пробам в час, что позволяет анализировать 96 проб в течение 1,3 суток. Для повышения производительности использовали более короткие колонки длиной 150 мм, что дает соответственно меньшее время анализа. На рис. 2 показано разделение иммуноглобулина G на колонках AdvanceBio SEC длиной 300 и 150 мм при скорости потока 0,8 мл/мин. При использовании колонки длиной 150 мм время удерживания уменьшается в два раза, и при значении фактора разрешения для пиков мономера и димера 1,73 точность количественного анализа не страдает. Более короткая колонка AdvanceBio SEC позволяет выполнять анализ моноклональных антител с высоким разрешением за меньшее время.

Агрегация биотерапевтических белков усиливает иммуногенность и влияет на эффективность и токсичность. Точный количественный анализ агрегатов методом эксклюзионной хроматографии главным образом зависит от разрешения пиков мономера и агрегатов. Таким образом, разрешение и точность количественного определения являются двумя ключевыми характеристиками эксклюзионной хроматографии, причем линейная скорость влияет на разрешение. Для оценки этих двух характеристик были испытаны различные скорости потока с колонкой длиной 150 мм. Превосходная стабильность частиц колонок AdvanceBio SEC позволяет работать при значительно более высоких скоростях потока без чрезмерного снижения эффективности. При более высоких скоростях потока фактор разрешения уменьшается. Однако результаты количественного анализа по площади пика мономера остаются в значительной степени неизменными (рис. 3), что позволяет выполнить скрининг значительно большего количества проб для определения содержания агрегатов.

Максимальное увеличение пробопотока дает конкурентные преимущества и более высокую уверенность в результатах, приводя к экономическим выгодам. Уменьшение длины колонки и увеличение скорости потока — это очевидная стратегия ускорения анализа методом эксклюзионной хроматографии. В табл. 1 приведены теоретические расчеты количества анализов проб в сутки в зависимости от скорости потока. При скорости потока 1,5 мл/мин и времени анализа 4,8 минуты можно выполнять анализ 300 проб в сутки. Пробопоток может быть увеличен до 4,2 раза.

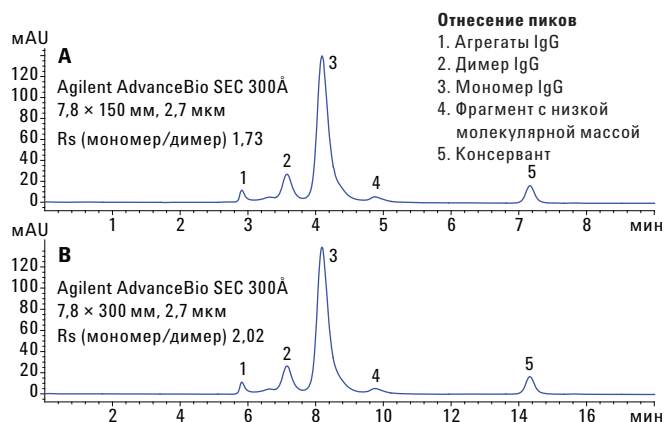


Рис. 2. Эксклюзионный анализ иммуноглобулина G в условиях высокого-разрешения (при скорости потока 0,8 мл/мин). Колонка длиной 150 мм (время анализа 9 минут, А) в сравнении с колонкой длиной 300 мм (время анализа 18,5 минуты, В)

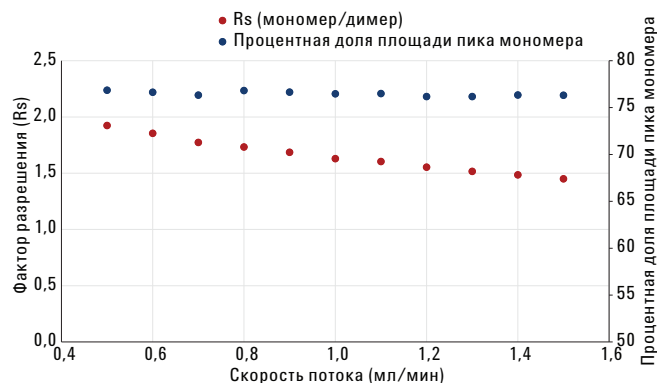


Рис. 3. Влияние скорости потока на фактор разрешения и определение процентной доли площади пика мономера.

Таблица 1. Повышение производительности за счет увеличения скорости потока для достижения более высокого пробопотока

Длина колонки (мм)	Скорость потока (мл/мин)	Время анализа (мин)	Проб в час	Проб в сутки
300	0,8	20	3	72
150	0,5	15	4	96
150	0,6	12	4–5	120
150	0,7	10	5–6	144
150	0,8	9	6–7	160
150	0,9	8	6–7	180
150	1,0	7	7–8	205
150	1,1	6,5	8–9	220
150	1,2	6	8–9	240
150	1,3	5,5	11	260
150	1,4	5	12	288
150	1,5	4,8	12–13	300

На рис. 4 показано наложение эксклюзионных хроматограмм с использованием колонок длиной 300 и 150 мм при различных скоростях потока. Очевидно, что при сохранении точности количественного определения содержания мономера время анализа в условиях быстрой эксклюзионной хроматографии можно сократить в четыре раза.

Выводы

Настоящее исследование демонстрирует преимущества использования более коротких колонок Agilent AdvanceBio SEC и более высоких скоростей потока для существенного увеличения пробопотока при анализе агрегатов в биотерапевтических белках. За счет уменьшения длины колонки с 300 до 150 мм и увеличения скорости потока с 0,8 до 1,5 мл/мин можно достигнуть увеличения пробопотока и производительности в 5 раз, в результате чего время, необходимое для анализа 96 проб, можно сократить с 1,3 суток до менее чем восьми часов.

Литература

1. K. D. Ratanji, J. P. Derrick, R. J. Dearman, I. Kimber. Immunogenicity of therapeutic proteins: Influence of aggregation. (Иммуногенность терапевтических белков: влияние агрегации) *J. Immunotoxicol.* **2014**, *11(2)*, 99–109.

Дополнительная информация

Представленные данные отражают типичные результаты. Для получения дополнительной информации о наших продуктах и услугах посетите наш веб-сайт по адресу: www.agilent.com/chem.

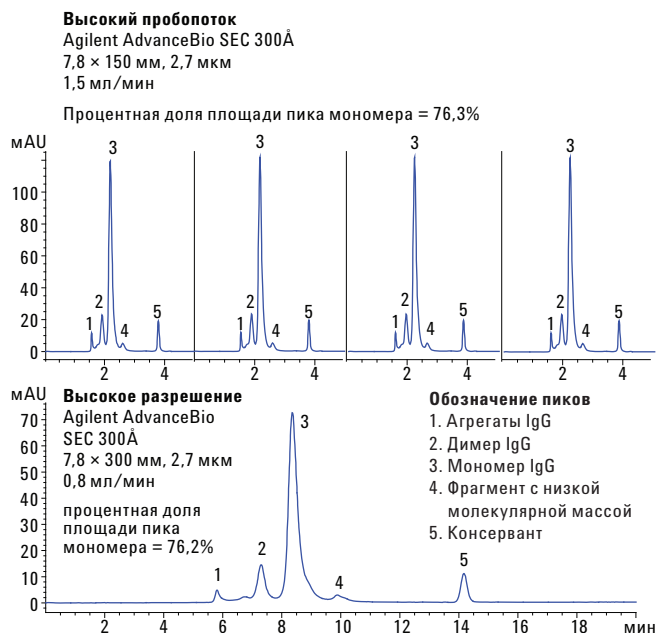


Рис. 4. Сравнительные хроматограммы иммуноглобулина G в условиях высокого пробопотока и в условиях высокого разрешения

www.agilent.com/chem

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., 2015
Напечатано в США
24 ноября 2015 г.
5991-6458RU



Agilent Technologies