



Количественный анализ агрегации моноклональных антител и конъюгатов антитела и лекарственного средства методом эксклюзионной хроматографии с водной подвижной фазой

Система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-Inert с четырехканальным насосом и колонка AdvanceBio SEC 300Å, 2,7 мкм

Рекомендации по применению

Биопрепараты и биоаналоги

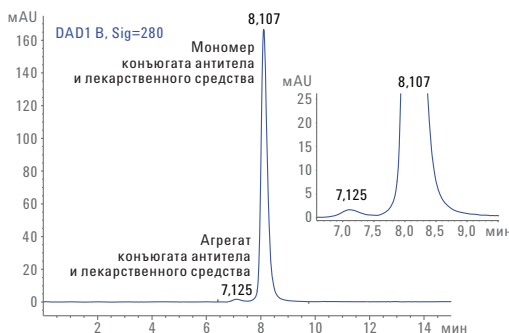
Автор

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

Аннотация

Эксклюзионная хроматография (SEC) представляет собой важный инструмент мониторинга мономеров, димеров, агрегатов и потенциальных продуктов деградации в биотерапевтических пробах белков, включая моноклональные антитела и их производные. Поскольку агрегация считается чрезвычайно важным качественным показателем, требуется количественный анализ.

В настоящих рекомендациях по применению описывается простая и чувствительная методика количественного анализа агрегатов в биотерапевтических моноклональных антителах и конъюгатах антитела и лекарственного средства (ADC) с применением колонки для эксклюзионной хроматографии Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7,8 x 300 мм, 2,7 мкм и системы ВЭЖХ 1260 Infinity Bio-inert Quaternary. В методике используется та же подвижная водная фаза без добавления органического модификатора для анализа моноклонального антитела и более гидрофобных конъюгатов антитела и лекарственного средства. Оптимизированная методика также позволила выполнять мониторинг агрегатов и продуктов деградации, возникших благодаря воздействию pH-среды или температуры. Эта простая и воспроизводимая методика в сочетании с устойчивым к коррозии оборудованием подходит для рутинного качественного анализа моноклональных антител и конъюгатов антитела и лекарственного средства в биофармацевтической отрасли.



Agilent Technologies

Введение

Терапевтические белки подвергаются агрегации и деградации на всех стадиях разработки: при биосинтезе, рефолдинге, производстве и выделении целевого продукта, приготовлении лекарственных форм, стерилизации и хранении. Кроме того, добавление гидрофобной нагрузки для образования конъюгатов антитела и лекарственного средства также усилит агрегацию, вызванную гидрофобностью. Несмотря на то что агрегаты и продукты деградации присутствуют в низких концентрациях, они могут оказать сильное влияние на качество биопрепаратов, что повлечет за собой потерю активности, снижение растворимости и повышение иммуногенности. Эксклюзионная хроматография является стандартной методикой, используемой для описания агрегации белков. В этой работе представлены преимущества использования колонки AdvanceBio SEC 300Å, 7,8 × 300 мм, 2,7 мкм для разделения, количественного анализа и мониторинга целостности терапевтических моноклональных антител и конъюгатов антитела и лекарственного средства. Колонки AdvanceBio SEC являются настоящим прорывом в методе эксклюзионной хроматографии. Они проектируются и изготавливаются компанией Agilent с применением инновационных частиц силикагеля и уникальной привитой фазы, что обеспечивает разрешение и разделение в широком диапазоне типов проб, при этом отсутствует необходимость добавления органического модификатора в подвижную фазу. При анализе моноклональных антител и более гидрофобных конъюгатов антитела и лекарственного средства используется та же водная подвижная фаза.

Вещества и методики

Оборудование

Использовали полностью биоинертную систему ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-inert с четырехканальным насосом с максимальным давлением 600 бар, состоящую из следующих модулей:

- биоинертный четырехканальный насос для ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary Pump (G5611A);
- высокоэффективный биоинертный автосамплер Agilent 1260 Infinity High Performance Bio-inert Autosampler (G5667A);
- термостат автосамплера серии Agilent 1200 Infinity (G1330B);
- термостат колоночного отделения Agilent 1260 Infinity (TCC), с теплообменниками в биоинертном исполнении (G1316C, опц. 19);
- диодно-матричный детектор Agilent 1260 Infinity DAD VL (G1315D со стандартной биоинертной проточной кюветой 10 мм).

Программное обеспечение

Agilent ChemStation, версия B.04.03 (или выше).

Условия

Колонка: Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7,8 × 300 мм, 2,7 мкм (кат. № PL1180-5301)
Подвижная фаза: фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), 50 мМ натрий-фосфатного раствора содержат 150 мМ хлорида натрия, pH 7,4

Температура термостата колоночного отделения: комнатная
Вводимый объем: 10 мкл
Скорость потока: 0,8 мл/мин
Детектирование: УФ, 220 и 280 нм

Реагенты, пробы и материалы

Трастузумаб и конъюгат антитела и лекарственного средства (T-DM1) были приобретены в местной аптеке и хранились в соответствии с инструкцией производителя. Фосфатно-солевой буферный раствор, соляная кислота и раствор гидроксида натрия были приобретены у компании Sigma-Aldrich, Corp. Все химические вещества и растворители имели класс чистоты для ВЭЖХ, а очищенная вода была получена с помощью системы очистки воды MilliQ (модель Millipore Elix 10, США).

Линейность и диапазон

Калибровочную кривую строили по восьми стандартным концентрациям трастузумаба и конъюгата антитела и лекарственного средства от 15,625 до 2 000 мкг/мл.

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

Трастузумаб и конъюгат антитела и лекарственного средства (T-DM1) использовали для измерения предела обнаружения и предела количественного определения. Концентрацию биомолекул, 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

Подвижную фазу (10 мкл) вводили в виде холостой пробы с последующим трехкратным измерением уровня линейности. Площадь и время удерживания (ВУ) каждого уровня также использовали для расчета значений стандартного отклонения (СО) и относительного стандартного отклонения (СОС, %). Предел обнаружения и предел количественного определения устанавливали на основании результатов вводов с низкими уровнями линейности. Зависимость средней площади каждого уровня линейности от концентрации аналита определяла вид калибровочной кривой для мономеров.

Подготовка агрегатов трастузумаба и конъюгатов антитела и лекарственного средства

Агрегаты трастузумаба и конъюгаты антитела и лекарственного средства готовили разведением моноклонального антитела в подвижной фазе до конечной концентрации 2 мг/мл. Воздействие pH осуществлялось способом, описанным в других источниках, с незначительными изменениями [1]. 1 М HCl медленно по каплям добавляли в раствор проб для изменения pH от 6,0 до 1,0. Затем добавили 1 М NaOH для доведения pH до 10,0. После этого вновь добавляли 1 М HCl до возвращения pH к 6,0. Между изменениями pH выдерживалось время примерно в 1 минуту при постоянном перемешивании при 500 об/мин. Полученный раствор выдержали 60 минут при 60 °С.

Результаты и обсуждение

Разделение и обнаружение

При количественном анализе агрегатов, мономеров, димеров и более крупных агрегатов методом эксклюзионной хроматографии чрезвычайно важно исключить влияние подвижной фазы на состав пробы. Так как условия окружающей среды влияют на уровень агрегации, важно, чтобы гель-фильтрация выполнялась в водной подвижной фазе с нейтральным уровнем pH и низким содержанием солей. На рис. 1 представлено отличное разделение целого терапевтического моноклонального антитела трастузумаба в течение 15 минут с применением колонки AdvanceBio SEC в условиях хроматографирования, часто используемых для белков, а именно с применением фосфатно-солевого буферного раствора при pH 7,4. Пик был симметричен и элюировался в течение времени удерживания, соответствующего молекулярной массе моноклонального антитела, что свидетельствовало о том, что разделение происходило в зависимости от размера и отсутствовали вторичные взаимодействия. На рис. 1 также представлено увеличенное изображение, демонстрирующее присутствие небольшого количества агрегата. Отсутствие раннего или позднего пика элюирования предполагало, что коммерческий препарат моноклонального антитела был однородным, без каких-либо признаков агрегации или деградации.

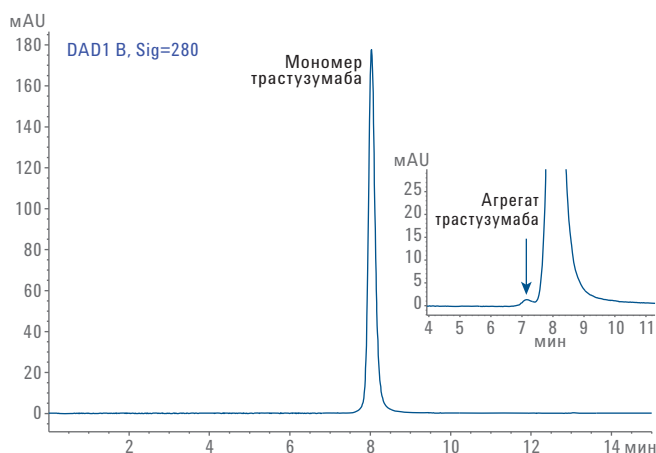


Рис. 1. Профиль эксклюзионной хроматографии (А) интактного трастузумаба и (В) увеличенной области, демонстрирующей агрегаты трастузумаба на колонке Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7,8 × 300 мм, 2,7 мкм

Эксклюзионная хроматография конъюгатов антитела и лекарственного средства

Применение большинства опубликованных методик анализа посредством эксклюзионной хроматографии, выполняемого на коммерческих колонках для эксклюзионной хроматографии с использованием водной фазы, приводило к получению плохой формы пика и неполного отделения агрегата от мономерного конъюгата. Такой результат был обусловлен неспецифическим взаимодействием гидрофобной нагрузки с неподвижной фазой. Показано добавление 15% 2-пропанола для решения этой проблемы [2]. При анализе T-DM1 (конъюгата антитела и лекарственного средства) с использованием колонки для эксклюзионной хроматографии AdvanceBio SEC с подвижной водной фазой применение фосфатно-буферного солевого раствора привело к получению симметричных пиков и лучшему разделению мономера и агрегата, что свидетельствует об отсутствии неспецифического взаимодействия гидрофобного лекарственного средства и неподвижной фазы (рис. 2).

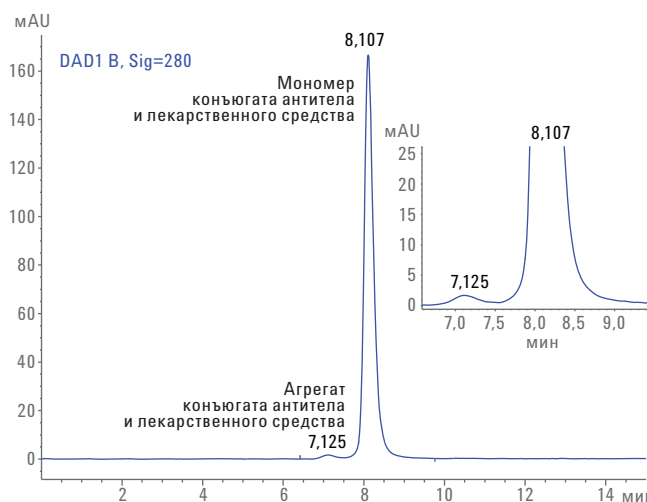


Рис. 2. Профиль эксклюзионной хроматографии интактного T-DM1 (конъюгат антитела и лекарственного средства) на колонке Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7,8 × 300 мм, 2,7 мкм с использованием фосфатно-буферного солевого раствора, pH 7,4, в качестве подвижной фазы

Воспроизводимость времен удерживания и площадей пиков

В табл. 1 приведены средние значения ОСО времени удерживания и площади пиков для шести параллельных вводов моноклонального антитела трастузумаба и конъюгата антитела и лекарственного средства. ОСО времени удерживания и площади пика не превышали 0,04% и 1% соответственно, что демонстрирует отличную воспроизводимость методики и, как следствие, воспроизводимость системы.

Таблица 1. Точность времени удерживания и площади пиков (n = 6)

Проба	Время удерживания		Площадь пика	
	Среднее значение (мин)	ОСО	Среднее значение (мАУ/мин)	ОСО
Оригинальный трастузумаб	8,034	0	100	0
Конъюгат антитела и лекарственного средства	8,106	0,005	98,91	0,33

Предел обнаружения и предел количественного определения

Предел обнаружения и предел количественного определения составляли 15 мкг/мл для трастузумаба и 31 мкг/мл для конъюгата антитела и лекарственного средства, что свидетельствует о чувствительности методики. Наблюдаемые значения предела обнаружения и предела количественного определения трастузумаба и конъюгата антитела и лекарственного средства представлены в табл. 2. Наложение хроматограмм предела обнаружения и предела количественного определения и холостой пробы изображено на рис. 3.

Таблица 2. Результаты по пределу обнаружения, пределу количественного определения и соотношению «сигнал — шум» (n = 3).

Концентрация (мкг/мл)	С/Ш	Средняя площадь
Трастузумаб		
15,625 (предел обнаружения)	7,8	12,62
31,25 (предел количественного определения)	21,4	29,16
62,5	32,7	60,74
Конъюгат антитела и лекарственного средства		
15,625 (предел обнаружения)	10,5	15,20
31,25 (предел количественного определения)	15,5	37,89
62,5	37,9	80,24

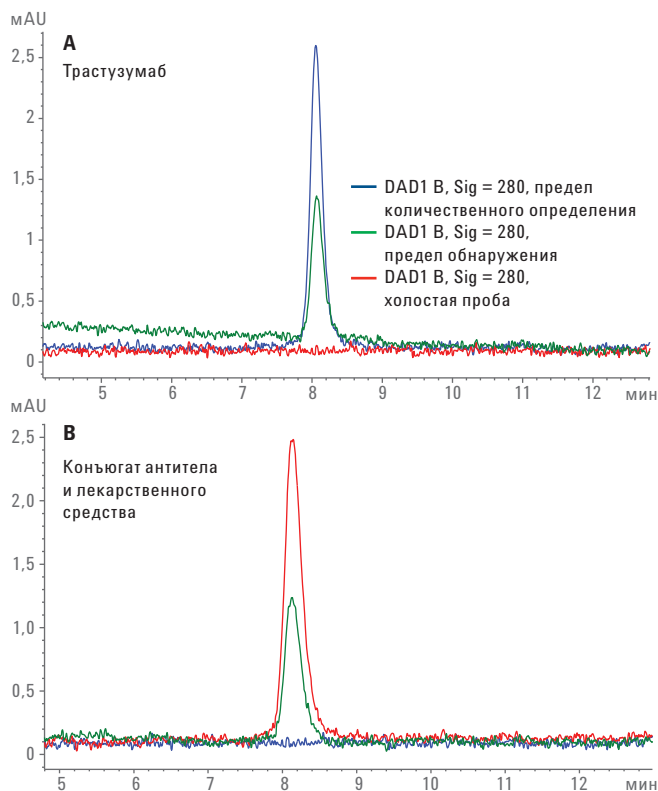


Рис. 3. Хроматограммы предела обнаружения и предела количественного определения трастузумаба и конъюгата антитела и лекарственного средства с наложением холостой пробы

Линейность

Кривые линейности трастузумаба и конъюгата антитела и лекарственного средства строили от предела количественного определения до самого высокого наблюдаемого в рамках исследования уровня концентрации с использованием площади пиков и концентрации трастузумаба и конъюгата антитела и лекарственного средства. Показатели точности приведены в табл. 3. Кривая линейности трастузумаба и конъюгата антитела и лекарственного средства в диапазоне концентраций от 12,5 до 2 000 мкг представлена на рис. 4.

Таблица 3. Сводный обзор диапазона линейности (n = 3) трастузумаба и конъюгата антитела и лекарственного средства

Трастузумаб		Конъюгат антитела и лекарственного средства	
Концентрация (мкг/мл)	Средняя площадь	Концентрация (мкг/мл)	Средняя площадь
15,625	16,4	15,625	22,6
31,25	30,6	31,25	37,9
62,5	64,4	62,5	91,2
125	140,7	125	178,8
250	277	250	348,4
500	538,2	500	704,7
1000	1095	1000	1400
2000	2179	2000	2821

Анализ агрегации и деградации

Было проведено сравнение естественного и подверженного воздействию трастузумаба и конъюгата антитела и лекарственного средства посредством эксклюзионной хроматографии на предмет агрегатов и продуктов деградации. Все пики элюции при хроматографическом анализе до мономерной формы считались агрегатами, а элюции после — соответственно, продуктами деградации [3].

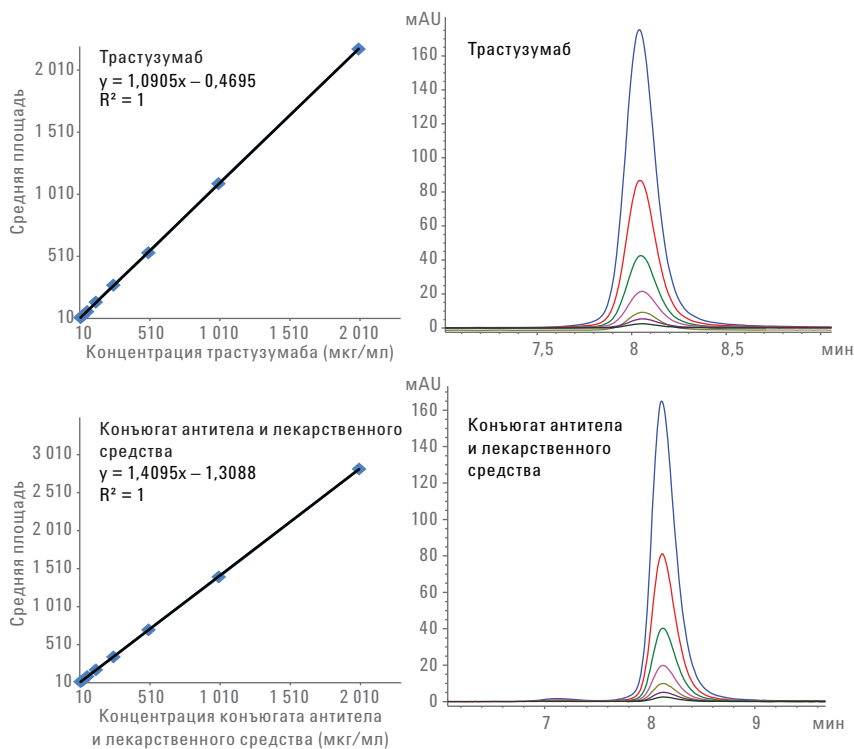


Рис. 4. Кривая линейности с восемью стандартными концентрациями trastuzумаба и конъюгата антитела и лекарственного средства в диапазоне от 15,62 до 2 000 мкг/мл, демонстрирующая превосходные значения коэффициентов; также представлены наложения хроматограмм для линейных диапазонов.

Хроматограммы агрегатов, образовавшихся при воздействии pH и температуры, представленные на рис. 5 и 6, свидетельствуют о том, что колонка AdvanceBio SEC справилась с задачей разделения и обнаружения агрегатов, а также разложившихся trastuzумаба и конъюгата антитела и лекарственного средства. Агрегаты и продукты деградации были отделены друг от друга с высокой точностью и без повреждений.

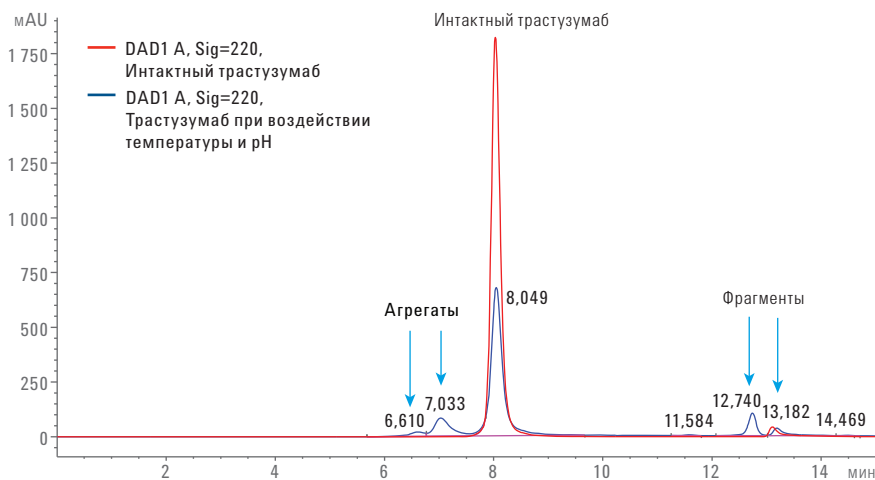


Рис. 5. Хроматограмма естественного (контроль; красна линия) trastuzумаба с наложением 2 мг/мл trastuzумаба, подвергнутого воздействию pH и температуры, с применением колонки Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7,8 × 300 мм, 2,7 мкм

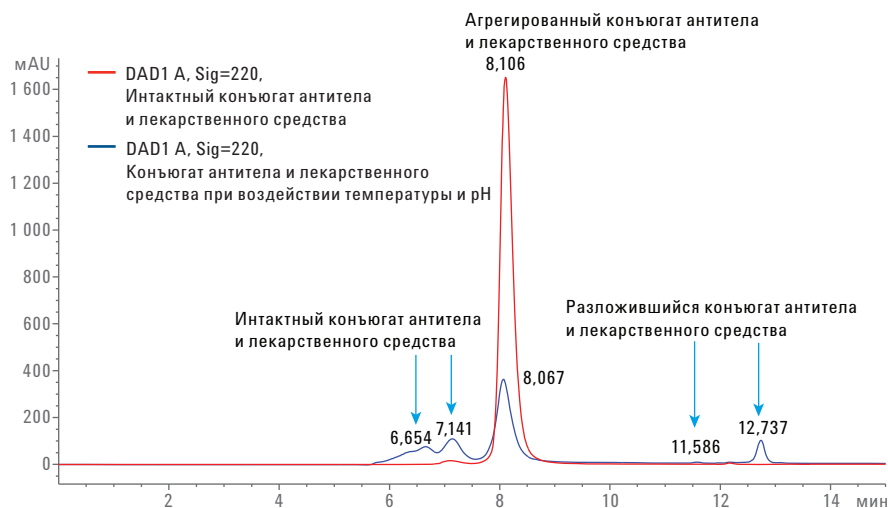


Рис. 6. Хроматограмма естественного (контроль; красная линия) конъюгата антитела и лекарственного средства с наложением 2 мг/мл конъюгата антитела и лекарственного средства, подвергнутого воздействию pH и температуры, с применением колонки Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7,8 × 300 мм, 2,7 мкм

Количественный анализ агрегации и деградации трастузумаба и конъюгата антитела и лекарственного средства

Относительный количественный анализ агрегатов и продуктов деградации в трастузумабе и конъюгате антитела и лекарственного средства на основании процента площади представлен в табл. 4.

Данные однозначно свидетельствуют о наличии выраженного повышения уровней агрегатов и продуктов деградации трастузумаба и конъюгата антитела и лекарственного средства с относительным снижением содержания мономерных форм до 71% и 54% соответственно. Несмотря на обнадеживающие результаты, необходимо подтверждение в виде данных о биологической активности для оценки потери силы действия в зависимости от процессов агрегации и деградации.

Таблица 4. Время удерживания и площадь пика мономеров, агрегатов и фрагментов трастузумаба и конъюгата антитела и лекарственного средства

Интактный трастузумаб		Подвергнутый воздействию трастузумаб	
Время удерживания (мин)	Площадь, %	Время удерживания (мин)	Площадь, %
7,14	0,140	6,61	2,8
8,034	96,8	7,033	13,26
13,10	3	8,03	71,83
		12,74	7,65
		13,18	4
Интактный конъюгат антитела и лекарственного средства		Подвергнутый воздействию конъюгат антитела и лекарственного средства	
7,115	2	6,654	19
8,106	97,8	7,141	17,8
		8,06	54,92
		11,58	0,2
		12,73	7,5
		14,46	0,2

Выводы

В данной работе продемонстрировано применение нескольких высокоэффективных инструментов разработки методов и мониторинга чистоты и долговременной стабильности терапевтического моноклонального антитела трастузумаба и конъюгата антитела и лекарственного средства T-DM1. Впервые была использована колонка Agilent AdvanceBio SEC для разработки простого способа разделения моноклональных антител с высоким разрешением. В частности, колонка AdvanceBio SEC позволила добиться превосходного разрешения гидрофобного конъюгата антитела и лекарственного средства без применения органических модификаторов в подвижной фазе. Отличные показатели площади пиков и точности времени удерживания подтвердили надежность методики. Кривые линейности с восемью стандартными концентрациями моноклонального антитела и конъюгата антитела и лекарственного средства в диапазоне от 15 до 2 000 мкг/мл отличались превосходными значениями коэффициента линейности, что свидетельствовало о точности методики количественного определения. Предел обнаружения и предел количественного определения для моноклонального антитела и конъюгата антитела и лекарственного средства составили 15 и 25 мкг/мл соответственно, что говорит о чувствительности методики. Кроме того, исследование воздействий на моноклональное антитело и конъюгат антитела и лекарственного средства продемонстрировало, что колонка AdvanceBio SEC справляется с задачей разделения, обнаружения и количественного анализа агрегатов и продуктов деградации на основании процента площади. Простая и воспроизводимая методика в сочетании с инертностью и устойчивостью к коррозии системой ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-inert позволяет использовать этот приборный комплекс для качественного анализа моноклональных антител и конъюгатов антитела и лекарственного средства в биофармацевтической отрасли.

Литература

1. Başak Kükrer, 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. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 2197–2204.
2. Wakankar, A.; Yan Chen; Gokarn, Y.; Jacobson, F. S. Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates. *MABs* **2011**, *3*:2, 161–172.
3. Rodriguez-Diaz, R.; Wehr, T. Use of Size Exclusion Chromatography in Biopharmaceutical Development. In *Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development*; Rodriguez-Diaz, R., Wehr, T., Tuck, S., Eds.; CRC Press: New York, 2005.

Дополнительная информация

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

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
16 октября 2015 г.
5991-6303RU



Agilent Technologies