Ультрачистая вода для анализа методом эксклюзионной ВЭЖХ

Катрин Тёппнер, Sartorius Stedim Biotech GmbH, 37079 Гёттинген, Германия; доктор Дирк Хансен, Phenomenex Ltd., 63741 Ашаффенбург, Германия; доктор Эльмар Хербиг, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co KG, 37075 Гёттинген, Германия

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) представляет собой аналитическую процедуру для разделения, определения подлинности и количественного определения веществ. В отличие от других вариантов биополимерной ВЭЖХ (ионообменной хроматографии, хроматографии с гидрофобным взаимодействием и обращённо-фазовой хроматографии), обычно проводящихся в градиентном режиме, эксклюзионная хроматография (ЭХ) представляет собой, как правило, изократический метод [1].

Эксклюзионная хроматография

Эксклюзионная хроматография (ЭХ), включающая гель-проникающую хроматографию и гель-фильтрационную хроматографию (особый метод ЭХ в водных условиях), работает с пористой матрицей сферических частиц в качестве неподвижной фазы. Мелкие молекулы способны проникать в поры и, следовательно, удерживаются. Напротив, очень крупные молекулы исключаются и проходят через колонку с линейной скоростью потока. Следовательно, молекулы разделяются на основании своего размера, при этом крупные молекулы выходят из колонки в первую очередь, а мелкие молекулы – позднее [2].

Для данного метода ЭХ используется постоянный состав элюента. Для сведения к минимуму энтальпийных эффектов в ходе ЭХ применяют сильный элюент с соответствующей высокой силой элюирования. При ЭХ это, как правило, буфер с отрегулированным показателем pH и добавкой соли. Для успешного проведения данной аналитической методики необходимо выбрать колонку для ЭХ, подходящую для решения конкретной задачи. Успешный подход заключается в выборе подходящего растворителя, оптимальной скорости потока, соответствующего объёма и концентрации вводимой пробы, а также в обработке колонки как в ходе операции, так и в выключенном состоянии (при регенерации и хранении) [1].

ЭХ представляет метод разделения, часто используемый в отношении биополимеров. В настоящее время области её применения включают следующее:

- определение молекулярной массы, например, антител (иммуноглобулина G *(см. рисунок 1)*, пептидов и белков);
- ЭХ как инструмент изучения конформационных изменений;
- ЭХ в последовательной переработке (последующая обработка и очистка продукта);
- особое применение колонок с ограниченным доступом для ЭХ для автоматизированной подготовки проб смесей пептидов и белков [1].

За последние десятилетия биофармацевтические препараты заняли важное место на рынке лекарственных средств. Среди таких биофармацевтических препаратов терапевтические ферменты, коагулирующие факторы, многочисленные гормоны, такие как инсулин, эпоэтин или гормоны роста – моноклональные антитела (МАТ) и биотехнологические рекомбинантные вакцины [3].

ЭХ представляет стандартный метод последовательной переработки для определения чистоты и состояния агрегации целевой молекулы в ходе биопроизводства при рекомбинантном получении терапевтических белков и антител.

Определение различий в значениях молекулярной массы для выявления примесей и скоплений основано на использовании высокочистых элюентов, никак не взаимодействующих с неподвижной фазой.

Воду особого качества, необходимую для проведения ЭХ, можно приобрести у различных производителей или при необходимости приготовить непосредственно на месте с помощью лабораторной системы очистки воды, такой как arium® pro VF.

Рисунок 1. Иммуноглобулин G (антитело IgG; часть фотографии любезно предоставлена Sartorius)

Экспериментальная оценка воды

Данная работа описывает использование ЭХ для качественной оценки рекомбинантных моноклональных антител. (Применялся раствор собственного производства).

Содержание загрязнений, переходящих с этапа получения биомассы (ДНК клетки-хозяина, белки клетки-хозяина, компоненты среды, такие как альбумин, инсулин и трансферрин), а также микроорганизмов и эндотоксинов должно снижаться в процессе очистки. Помимо этого в самом продукте образуются загрязнения, обусловленные природой моноклональных антител (добавление протеаз, утечка белка А). Продукт на основе МАТ сам по себе образует загрязняющие вещества, такие как расщеплённые, слипшиеся антитела, дезаминированные или окисленные формы МАТ или неверно структурированные молекулы [4], которые необходимо выявить.

Рисунок 2. Действующая система arium® pro VF для ультрачистой воды (фотография любезно предоставлена Sartorius)

ЭХ является одним из методов качественного контроля чистоты целевого белка, используемых для выявления слипшихся антител на основании разделения по их молекулярной массе.

Чтобы определить возможность использования ультрачистой воды, применявшейся в данных определениях, в работе ЭХ проводились предварительные испытания. Ультрачистую воду получали, как описано в работе [5], и использовали как для данных предварительных испытаний, так и для дальнейших испытаний в процессе определения состояний агрегации моноклональных антител.

Предварительные испытания должны были выяснить, можно ли использовать применявшуюся систему arium® pro VF *(модель-прототип для производства ультрачистой воды с теми же техническими характеристиками, что и у действующей системы, представленной на рисунке 2)* в процессе ЭХ для выявления скоплений и мономеров моноклонального антитела. Кроме того, испытывалось воздействие различных буферов.

В серии испытаний использовались следующие материалы *(см. таблицу 1)*:

Таблица 1. Материалы

ВЭЖХ	Dionex (насос/пробоотборник/термостат колонок/детектор УФ-излучения)
Колонка	Phenomenex Yarra SEC 3000 (OOH-4513-KO 300 x 7,8 мм)
Предколонка	Phenomenex SecurityGuard GFC 3000 (4 x 3 мм, арт. № AJO-4488)
Подвижная фаза	0,1 М фосфат натрия/0,1 М сульфат натрия, pH 6,6, проводимость 23 мСм/см в ультрачистой воде arium® pro VF

Использовалась колонка Phenomenex Yarra SEC 3000 (3 мкм), представляющая колонку для ЭХ, наполненная модифицированным силикагелем. Модификация ультрачистого силикагеля нового поколения обеспечивает минимальную адсорбцию белка, что очень важно для эффективного извлечения и надёжного количественного определения. Наполнитель, в применявшейся колонке Yarra, имеет размер пор 290 Å. Это обеспечивает линейный диапазон нативных белков от 5 до 700 кДа [6].

Таблица 2. Метод эксклюзионной ВЭЖХ

Параметры/ настройки		
Скорость потока	(мл/мин)	1
Время	(мин)	20
Максимальное давление	(бар)	180
Температура термостата колонок	(°C)	25
Объём вводимой пробы	(мкл)	5
Детектор УФ-излучения	(нм)	220, 260, 280

«ILM», статья Sartorius hr.indd 2 15.11.2016 г. 09:08

Для определения чистоты воды ультрачистую воду исследовали как с добавлением буферных солей, так и без них. Буферные соли добавлялись в ультрачистую воду следующим образом:
- буфер ТЕ – 1% 1 М трис-(гидроксиметил)-аминометан (Трис), 0,2% 0,5 М тетранатрия этилендиаминтетраацетата дигидрат (ЭДТА), 0,01% додецилсульфат натрия (ДСН), pH 8, проводимость 1,4 мСм/см;
- цитрат – 20 мМ моногидрат лимонной кислоты, pH 3,6, проводимость 1,7 мСм/см;
- фосфат натрия/ сульфат натрия – 0,1 М фосфат натрия/ сульфат натрия, pH 6,6, проводимость 23 мСм/см; и
- ультрачистая вода arium® без каких-либо буферных добавок для использования в качестве контроля.

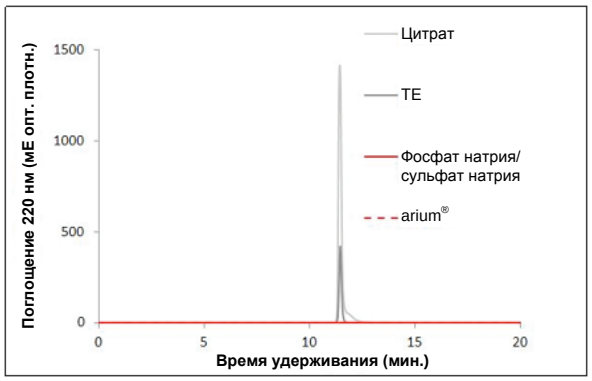

Рисунок 3. Анализ методом эксклюзионной ВЭЖХ различных буферов и ультрачистой воды arium® pro VF. Подвижная фаза: 0,1 М фосфата натрия/ сульфата натрия, pH 6,6, проводимость 23 мСм/см, в ультрачистой воде (условия, описанные в таблице 2).

Полученные хроматограммы представлены на *рисунке 3.* Они показывают, что применявшаяся ультрачистая вода никак не взаимодействовала с неподвижной фазой. Добавление 0,1 М фосфата натрия/ сульфата натрия к подвижной фазе аналогичным образом показало прямую исходную линию без пиков. Напротив, добавление цитрата и ТЕ указывало на присутствие примесей или веществ, взаимодействующих с матрицей колонки, что выражается пиками и в результате может исказить фактическую хроматограмму.
После того, как было доказано, что ультрачистую воду arium® VF можно использовать в качестве растворителя для буферных веществ, применяемых для приготовления элюента, был проведён фактический анализ проб.
Для получения воспроизводимых результатов ЭХ необходимо всегда использовать свежеприготовленные элюенты. pH и ионная сила должны быть оптимизированы для анализируемых проб [1]. Перед помещением колонки на хранение её следует промыть элюентом, затем ультрачистой водой с содержанием 0,05% азида натрия и хранить в таком состоянии [1].
Использованная для колонки подвижная фаза (0,1 М фосфата натрия/ 0,1 М сульфата натрия, pH 6,6, проводимость 23 мСм/см) была приготовлена с помощью ультрачистой воды с исходной проводимостью 0,055 мкСм/см или 18,2 МОм, приведённой для 25°C. Эксклюзионную ВЭЖХ проводили с использованием настроек/параметров, перечисленных в таблице 2. Для промывания и хранения колонки после использования применялся 0,05% раствор азида в ультрачистой воде, чтобы избежать роста бактерий. Для приготовления обоих растворов для проведения эксклюзионной ВЭЖХ каждый из них дегазировали фильтрацией через вакуумную фильтровальную установку Sartolab BT 500 Bottle Top 0,2 мкм. Пробы для введения подготавливали предварительной фильтрацией через Sartorius Minisart® RC4 (17821, 0,2 мкм) и разливали во флаконы (WICOM WIC 42000).

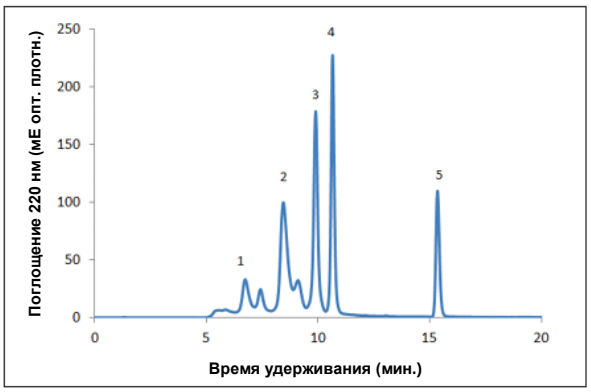

Рисунок 4. Анализ методом эксклюзионной ВЭЖХ смеси белков (стандартные белки) (условия описаны в таблице 2).

Описание эксперимента и результаты по определению состояния агрегации моноклональных антител

Колонку и предколонку промывают подвижной фазой 1 мл/мин, пока не будет достигнута стабильная исходная линия. Детектор УФ-излучения измеряет поглощение проб при длине волны 220, 260 и 280 нм в миллиединицах оптической плотности (мЕ опт. плотн.). Производительность колонки проверяют с помощью белков известного молекулярного размера *(см. рисунок 4 и таблицу 3)*.

Таблица 3. Использованные стандартные белки

Пик	Белок	Производитель	Заказ номер	мВт (кДа)	Удерж. (мин.)
1	Тиреоглобулин (пик мономера)	Sigma	T 1126	670	6,73
2	Гамма-глобулин (пик мономера)	Sigma	G 5009	150	8,44
3	Яичный альбумин (пик мономера)	Sigma	A 5503	45	9,89
4	Рибонуклеаза	Sigma	R 5000	14	10,65
5	Аденин	Sigma	A 8626	0,14	15,35

Стандартную кривую можно построить на основании логарифмических молекулярных размеров стандартных белков и экспериментально определённых значений времени удерживания. Данную кривую можно затем использовать для вычисления неизвестных проб на основании значений их времени удерживания.
Эффективность колонки регулярно проверяют с помощью стандартной смеси белков. На неё влияют чистота добавок к элюенту, взаимодействие элюента с матрицей колонки и состав анализируемой пробы. Используемые буферы могут не взаимодействовать с неподвижной фазой.
ЭХ используется для контроля качества, а также для оптимизации и разработки процессов очистки.
Ниже представлены ЭХ хроматограммы, записанные на этапах последовательной очистки. Сначала проводится сбор клеток, наряду с этапами очищения и концентрации, затем – этап захвата (аффинная хроматография на основе белка А). После этого проводится промежуточный этап для удаления примесей (напр., катионообменники) и этап завершающей очистки (анионообменники). Далее проводятся этапы фильтрации вирусов и заключительной ультрафильтрации (см. также работу [7]).
Для определения чистоты антитела пробы исследуют ЭХ на каждом этапе последовательной очистки. Ниже представлены хроматограммы, проведённые на первоначальной стадии очистки после сбора клеток *(рисунок 5)* и после аффинной хроматографии на основе белка А *(рисунок 6)*.

Рисунок 5. Анализ методом эксклюзионной ВЭЖХ моноклонального антитела после сбора клеток и первичной очистки (условия описаны в таблице 2).

Аналитическая серия ВЭЖХ после первоначального сбора и очистки клеток *(рисунок 5)* показывает количество примесей, например ДНК клетки-хозяина, белков клетки-хозяина, эндотоксинов, компонентов среды и примесей, вызванных самим продуктом антитела, а также скоплений, которые необходимо удалить с помощью последующих этапов очистки.
На следующем этапе применяется хроматография на основе белка А, основанная на специфическом аффинном взаимодействии белка А с иммуноглобулином G (IgG). На данном этапе в качестве адсорбента применяется белок А Sartorius Sartobind® (93PRAP06HB-12--A). После первоначальной очистки *(анализ см. на рисунке 5)* пробу фильтруют через фильтровальную установку с белком А. IgG связывается с адсорбентом белка А, в то время как примеси проходят через адсорбент. Вымывание (элюирование) белка А изучают с помощью анализа методом эксклюзионной ВЭЖХ *(см. рисунок 6)*.

Проанализированный посредством аффинной хроматографии на основе белка А выделенный образец указывает на значительную очистку моноклонального антитела. Процент скоплений и примесей значительно снижен. Фракционирование методом эксклюзионной ВЭЖХ демонстрирует два пика *(рисунок 6)*. На основании соответствующих значений времени удерживания данные пики можно вычислить как молекулярные размеры с помощью стандартного образца. Полученные площади пиков дают информацию о процентах скоплений и мономеров в растворах МАТ *(таблица 4)*.

Рисунок 6. Анализ методом эксклюзионной ВЭЖХ моноклонального антитела после аффинной хроматографии на основе белка А в ходе последовательной очистки (условия описаны в таблице 2).

Таблица 4. Проценты скоплений МАТ при очистке

	Скопления МАТ (%)	Мономеры МАТ (%)
После сбора и первоначальной очистки	10	90
После аффинной хроматографии на основе белка А	3	97

ЭХ процентов скоплений МАТ и мономеров после сбора и первоначальной очистки *(рисунок 5)* показывает, что 10% скоплений, загрязняющих моноклональное антитело, всё ещё присутствует в веществе *(таблица 4)*. Аналитическая серия ЭХ после этапа дополнительной очистки с помощью аффинной хроматографии на основе белка А указывает на снижение процента скоплений до 3% *(рисунок 6)*. ЭХ не выявила каких-либо ещё примесей. Полученные результаты явно указывают на пригодность используемого метода.

Резюме

Эксклюзионная ВЭЖХ представляет важный инструмент для определения чистоты терапевтических белков и используется во всём мире в процессе производства моноклональных антител в качестве стандартного метода измерения содержания скоплений и процента примесей.
Поскольку целостность белков (в данном случае моноклональных антител) подвергается риску в силу температурных изменений, воздействий механической нагрузки, колебаний pH и воздействия УФ-излучения в ходе производства и на протяжении всего их жизненного цикла (см. также работу [3]), чрезвычайно важно установить надёжный метод определения чистоты МАТ.
Метод, описанный в данной работе, обеспечил хорошее определение состояний агрегации моноклональных антител. Кроме того, он продемонстрировал хорошие результаты очистки. Важной предпосылкой применения данного метода является чистота использованных веществ и растворов и, в первую очередь, воды, использованной в качестве основного растворителя для приготовления растворов. Как показали предварительные испытания *(рисунок 3)*, ультрачистая вода из системы arium® pro VF подходит в качестве среды растворения буферных веществ и солей для приготовления подвижной фазы, используемой в ходе ЭХ.
При использовании ультрачистой воды arium® не выявляются ложные пики [8], вызванные взаимодействием между подвижной и неподвижной фазами, а также активные в УФ-излучении примеси или сдвиги пиков. Сильные органические примеси, выраженные в виде высоких значений общего органического углерода, могут проявляться посредством сдвигов пиков, поскольку матрица колонки становится более неполярной в ходе прогона. Соли тяжёлых металлов или хелатные компоненты могут маскировать заряд в колонке, что может спровоцировать сворачивание белка (усиленное образование скоплений антител). Данные предположения необходимо прояснить в ходе дальнейших исследований.

Библиография

1. Quaglia M., Machtejevas E., Hennessy T., Unger K.K.: Gelfiltration-Größenausschluss-Chromatographie von Biopolymeren-Optimierungsstrategien und Fehlersuche. Excerpted from "HPLC richtig optimiert. Ein Handbuch für Praktiker." Herausgeber Stavros Kromidas [Publisher]. WILEY-VCH, Weinheim (2006).

2. Schmid Thomas: Vorlesung ETH Zürich. Analytische Chemie (für BioI./Pharm. Wiss.) Teil "Chromatographische und elektrophoretische Trennverfahren," p. 58, (2011).

3. Frieß W., Ruberg E.-M.: Proteinarzneistoffe - Sensibel und stressanfällig PHARM. ZTG., 156 JG., 50. AUSG. [50th issue], (2011).

4. Richter A., Jostameling M., Müller K., Hermann A. and Pitschke M.: Quality control of antibodies for human use. Excerpted from: "Antibodies Volume 1, Production and Purification," edited by G. Subramanian, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (2004).

5. Nitzki F., Herbig E.: In situ Hybridisierung – Die Bedeutung von Reinstwasser für RNA Technologien. GIT Labor-Fachzeitschrift 57. Jahrgang, 3, (2013) [also available in English: In Situ Hybridization: The Importance of Ultrapure Water for RNA Technologies].

6. Phenomenex Chromatography Product Guide, p. 311 (2015/16).

7. Fish Brendan: Concepts in development of manufacturing strategies for monoclonal antibodies. Excerpted from: "Antibodies Volume 1, Production and Purification," edited by G. Subramanian, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York (2004).

8. Gottwald, W.: RP-HPLC für Anwender. Reihe: Die Praxis der instrumentellen Analytik, Herausgeber [editor] Gruber, U., Klein, W., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, pp. 7-8 (1993).

Прочесть статью, поделиться мнением и прокомментировать её можно на сайте ***www.labmate-online.com/articles.***

Первая публикация в журнале «International Labmate» (выпуск 41.7) доступна для скачивания на сайте **www.labmate-online.com**

«ILM», статья Sartorius hr.indd 4 15.11.2016 г. 09:08