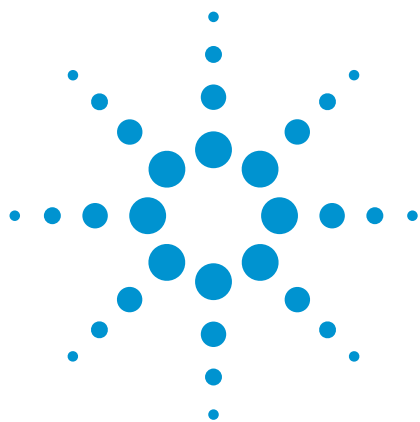




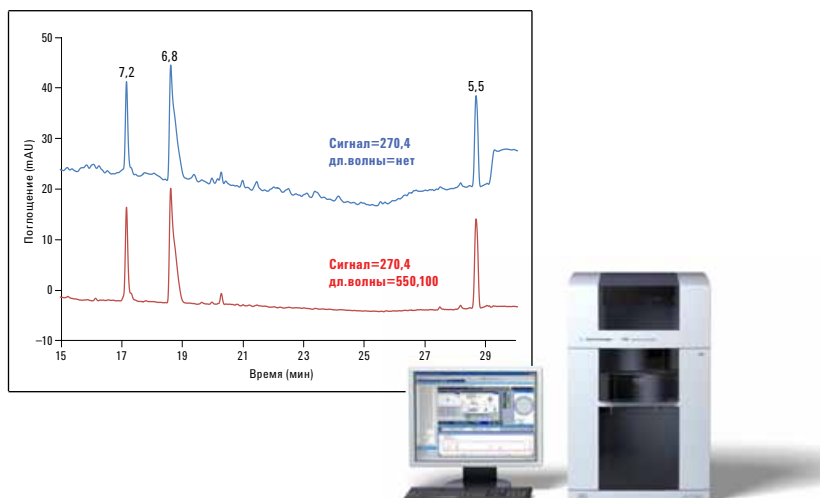
# Анализ гетерогенности моноклональных антител по заряду методом капиллярного изоэлектрического фокусирования с помощью системы капиллярного электрофореза Agilent 7100

## Методическая информация

Биофармацевтические препараты

### Автор

Кристиан Венц (Christian Wenz),  
Agilent Technologies, Inc.  
Вальдброн, Германия



### Краткое содержание

Ввиду большой значимости моноклональных антител (mAb) для лекарственной терапии постоянно растет спрос на аналитические методы с высоким разрешением, позволяющие определять характеристики этих сложных молекул. Одним из важных свойств моноклонального антитела является его зарядовое состояние, которое может изменяться в процессе производства и хранения. Для измерения гетерогенности заряда mAb очень удобно использовать методику капиллярного изоэлектрического фокусирования (КИЭФ). В данном документе описано использование системы КЭ Agilent 7100 для разделения с высоким разрешением и анализа изоформ mAb с разными зарядами с применением КИЭФ.



**Agilent Technologies**

## Введение

Методы капиллярного электрофореза (КЭ) стали неотъемлемой частью разработки и контроля качества биофармацевтических препаратов<sup>1</sup>. Для определения идентичности и чистоты терапевтических белков, особенно моноклональных антител (mAb), используется несколько методик на основе КЭ: (а) капиллярный гель-электрофорез (КГЭ, англ. CGE) — разделение производится по гидродинамическому размеру; (б) капиллярный зональный электрофорез (КЗЭ, англ. CZE) или капиллярное изоэлектрическое фокусирование (КИЭФ, англ. cIEF) — определение гетерогенности по заряду.

По сравнению с методиками, использующими гель, капиллярное ИЭФ (изоэлектрическое фокусирование) обладает некоторыми преимуществами, такими как большая автоматизация, воспроизводимость и возможность проводить количественный анализ. Поэтому многие биотехнические лаборатории предпочитают использовать именно КИЭФ. На зарядовое состояние моноклонального антитела могут повлиять следующие модификации: амидирование/дезамидирование, отщепление С-концевого остатка лизина, образование N-концевого остатка пироглутамата или сиапирование гликанов. Поскольку эти модификации могут оказывать сильное влияние на иммуногенность и общую биологическую активность терапевтического препарата, регулирующие органы требуют контролировать наличие форм белка с различными зарядами.

В данном обзоре описано использование популярного метода КИЭФ с высоким разрешением для анализа<sup>2,3</sup> изоформ mAb с разными зарядами, на системе капиллярного электрофореза Agilent 7100. Также представлены результаты исследований промежуточной прецизионности, которые проводились с помощью четырех различных приборов КЭ.

## Экспериментальная часть

### Материалы

IgG1-каппа из клона мышинной миеломы MOPC 21 (mIgG1-κ), маркеры ИЭФ, мочевины, L-аргинин, иминодиуксусная кислота и трис(гидроксиметил)аминометан (Sigma Aldrich) фармалит 5-8 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) (Уппсала, Швеция); соляная кислота и безводная уксусная кислота (Merck) (Дармштадт, Германия); ортофосфорная кислота (JT Baker) (Остин, штат Техас, США). Капилляр 0,05×670 мм с нейтральным покрытием (Beckman Coulter, кат. № 477441) и гель для КИЭФ (Beckman Coulter, кат. № 477497) (Beckman Coulter). Все остальные материалы и оборудование Agilent Technologies (Вальдброн, Германия).

### Пробоподготовка

Прежде чем проводить анализ КЭ, образцы mAb обессолили, используя ультрафильтрационное устройство Microcon YM-30 (Millipore, Бедфорд, штат Массачусетс, США) и буфер, содержащий 20 мМ трис/HCl, pH 8. Белковые концентраты измерили с помощью наборов для количественного анализа Qubit (Life Technologies, Пейсли, Великобритания) и после обессоливания концентрация была 2–3 мг/мл. Растворы образцов для анализа методом КИЭФ готовили путем добавления в 0,5 мл микроцентрифужные флаконы следующих реактивов:

- 100 мкл геля для КИЭФ, содержащего 3 М мочевины;
- 3,0 мкл фармалита 5-8;
- 4,5 мкл 500 мМ L-аргинина (катодный стабилизатор);
- 5,0 мкл 200 мМ иминодиуксусной кислоты (анодный стабилизатор);
- ~ 3 мкл смеси маркеров ИЭФ;
- 10 мкл обессоленного mAb.

Конечные концентрации компонентов в растворе образца: 80% геля

для КИЭФ, 2,4 М мочевины, 2,4% фармалита 5-8, 18 мМ L-аргинина, 8 мМ иминодиуксусной кислоты и 0,16–0,24 мг/мл mAb. Для маркеров ИЭФ 5,5/6,2/6,6/6,8/7,2 использовали объемы 0,5/1,0/0,2/2,0/0,2 мкл в соответствии с конечными концентрациями 12/8/1,6/16/1,6 нг/мл. Смеси перемешали на вортексе в течение 10 с, затем быстро центрифугировали и перенесли во флаконы для КЭ емкостью 100 мкл. Растворы образцов держали в автосамплере КЭ-прибора при 10 °С и анализировали в течение 24 часов.

### Условия КЭ

Система КЭ Agilent 7100 оборудована внешней водяной баней (установленная температура 6 °С) и блоком детекторного фильтра излучения (кат. № G7100-62700); все циклы анализа проводили при давлении 4 бара. Капилляр с нейтральным покрытием, обрезали с двух сторон на расстоянии 8,5 и 24,5 см от окна детектора соответственно, оснащенным зеленым интерфейсом (кат. № G7100-60210) и помещали в кассету для капилляра Agilent. Один раз в день проводили кондиционирование капилляров следующим образом: промывка под давлением 3,5 бар 350 мМ раствором уксусной кислоты в течение 5 минут, затем водой в течение 2 минут и гелем для КИЭФ в течение 5 минут. Перед каждым анализом проводили кондиционирование капилляров следующим образом: промывка под давлением 3,5 бар 4,3 М раствором мочевины в течение 3 минут, затем водой в течение 2 минут. Образцы вводили при давлении 2 бар в течение 100 секунд с последующим погружением входного и выходного электродов в воду. Фокусировка проводилась в течение 5 минут при напряжении 25 кВ 200 мМ раствором ортофосфорной кислоты (анолит) и 300 мМ раствором NaOH (католит). Для химической мобилизации выходной флакон заменили на флакон с 350 мМ раствором уксусной кислоты и подавали напряжение 30 кВ в течение 30 минут. После каждого анализа проводили

промывку под давлением 3,5 бар водой в течение 2 минут. Все циклы промывки проводили в прямом направлении, т. е. давление подавалось на входной флакон. Соблюдали температуру капилляра 20 °С. Детекцию проводили на длине волны 270 нм с шириной спектральной полосы 4 нм (без опорных длин волн), если не указано иное. Время отклика детектора составляло 2 секунды. Для всех реактивов использовали стеклянные флаконы емкостью 2 мл. Объем заполнения — 1,6 мл, кроме флаконов для отходов, которые были пустыми. Все флаконы для реактивов заменяли после трех анализов.

## Результаты и обсуждение

### Адаптация метода для прибора Agilent 7100

В качестве модельного белка использовали имеющиеся в продаже мышинные моноклональные антитела, чтобы продемонстрировать пригодность системы КЭ Agilent 7100 для проведения анализа с высоким разрешением методом КИЭФ<sup>2,3</sup> с применением амфолитов-носителей в диапазоне pH 5–8. С целью подавления электроосмотического потока разделение проводили в капилляре с нейтральным покрытием, который был заполнен гелем, содержащим смесь этиленгликоля и полиэтиленгликоля в воде с добавкой мочевины для повышения растворимости белков. В раствор образца добавили анодный (иминодиуксусная кислота) и катодный (L-аргинин) стабилизаторы, чтобы избежать потерь амфолитов-носителей и компонентов образца во время фокусировки (см. экспериментальную часть).

На рис. 1 представлены результаты измерений, проводимых с помощью одного прибора. В отношении высоты пиков, времени анализа и разрешения эти результаты имели большое сходство с опубликованными данными для аналогичного образца<sup>2</sup>. Чтобы адаптировать методику КИЭФ

с высоким разрешением под систему КЭ 7100, в нее внесли некоторые изменения. Во-первых, использовали более длинный капилляр (общая длина 33 см, эффективная длина 24,5 см). Это

вызвано необходимостью помещения капилляра в кассету системы КЭ 7100. Чтобы компенсировать увеличение времени анализа из-за использования

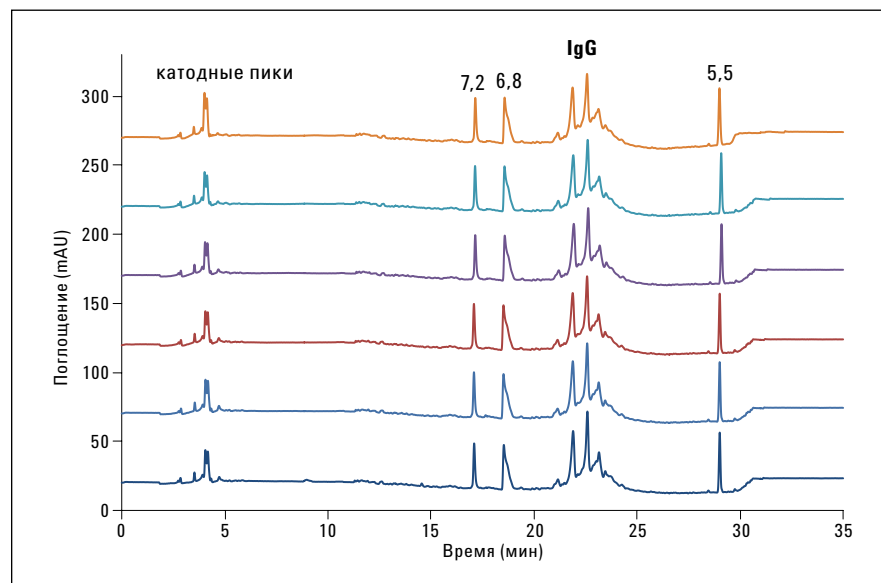


Рис. 1  
Анализ изоформ моноклональных антител с помощью системы КЭ Agilent 7100. Анализ образца, содержащего mIgG1-κ и маркеры ИЭФ 5,5; 6,8 и 7,2, был проведен методом КИЭФ с высоким разрешением. Показаны электрофореграммы шести последовательных вводов образца.

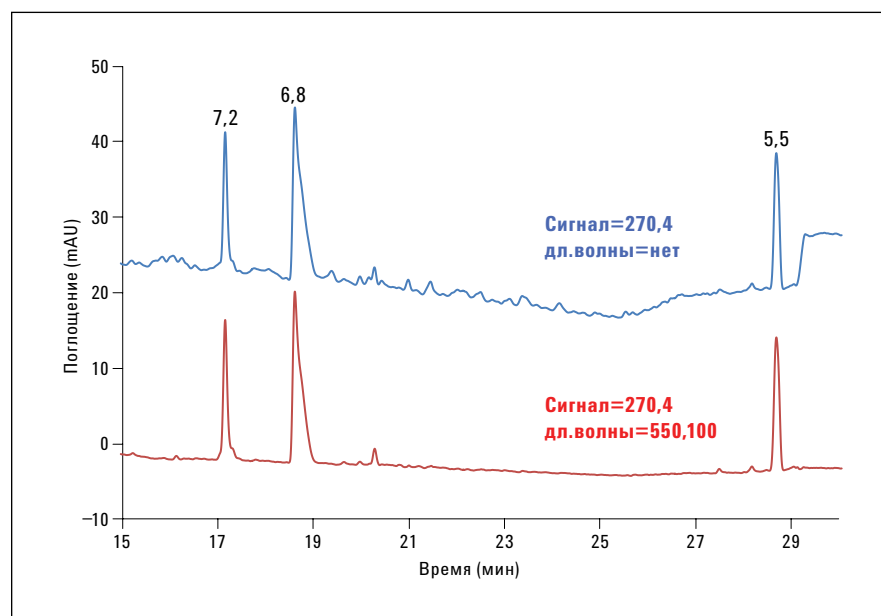


Рис. 2  
Сбор данных с использованием референсной длины волны и без нее. Анализ образца, содержащего только маркеры ИЭФ, был проведен методом КИЭФ. Показаны электрофореграммы, полученные в ходе одного и того же анализа с использованием референсной длины волны (красная) и без нее (синяя). Шум по стандарту ASTM в промежутке между 21 и 25 минутами составлял 0,12 mAU (ед. изм. поглощения) без референсной длины волны и 0,039 mAU с использованием референсной длины волны. Высота маркера ИЭФ в обоих случаях была одинаковой.

более длинного капилляра, увеличили концентрацию анодного стабилизатора, иминодиуксусной кислоты, в растворе образца с 4 до 8 мМ. Во-вторых, регистрировали поглощение излучения при длине волны 270 нм. Была выбрана именно эта длина волны, поскольку возможная интенсивность излучения при 280 нм была ограничена из-за установленного фильтра детектора <sup>4</sup>. Этот фильтр пропускает излучение только с длинами волн приблизительно 260 нм и выше 450 нм. Он использовался для защиты соединений образца от денатурации под воздействием интенсивного УФ-излучения. Регистрации более коротковолнового излучения препятствовало повышение фона, вызванное большей абсорбцией амфолитов. Однако этот фон можно было снизить приблизительно в три раза, если бы использовалась референсная длина волны в видимом диапазоне (рис. 2). Еще одним преимуществом применения референсной длины волны является увеличение стабильности базовой линии.

## Промежуточная прецизионность

Количественный анализ изоэлектрических точек (измеряемых в единицах рI) изоформ mAb и относительной интенсивности проводили по адаптированному методу КИЭФ с помощью четырех различных приборов. Интегрирование пиков было проведено автоматически в ПО ChemStation, и пики mAb были присвоены группам изоформ,

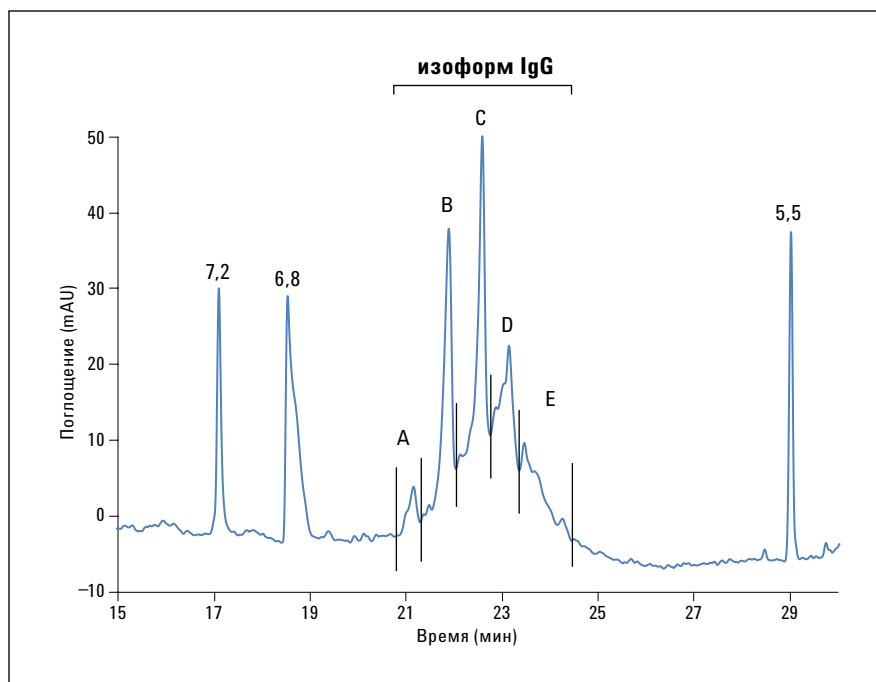


Рис. 3  
Количественное определение изоформ моноклональных антител. Увеличенная часть электрофореграммы, представленной на рис. 1, на которой обозначено, какие пики mIgG1 присвоены каждой из 5 групп изоформ (А–Е).

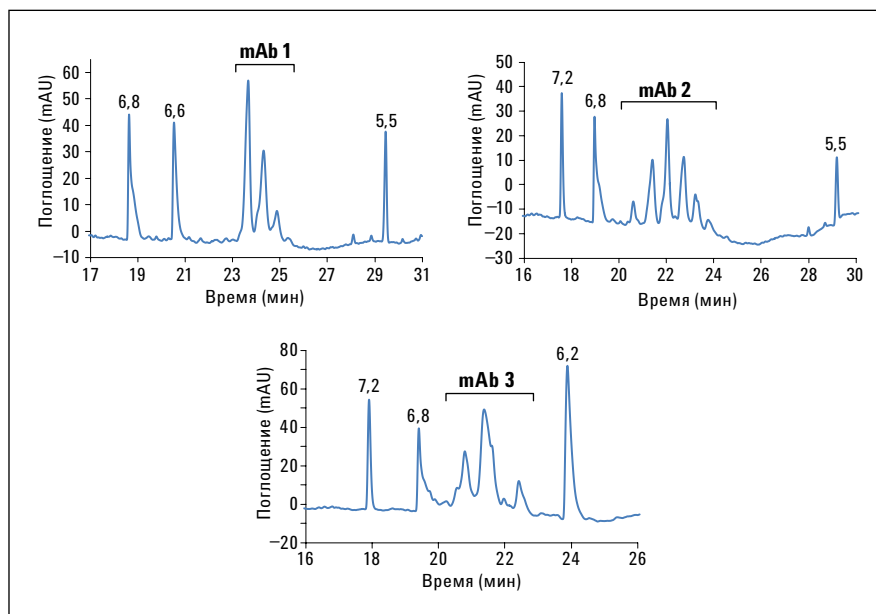
| Группа изоформ | Кажущаяся изоэл. точка (pI) |       |         | Площадь пика (%) |      |         |
|----------------|-----------------------------|-------|---------|------------------|------|---------|
|                | Среднее значение            | СО    | ОСО (%) | Среднее значение | СО   | ОСО (%) |
| A              | 6,546                       | 0,007 | 0,105   | 4,29             | 0,47 | 10,93   |
| B              | 6,457                       | 0,004 | 0,056   | 23,22            | 0,58 | 2,50    |
| C              | 6,365                       | 0,003 | 0,042   | 32,94            | 0,69 | 2,08    |
| D              | 6,290                       | 0,002 | 0,036   | 25,66            | 1,48 | 5,77    |
| E              | 6,232                       | 0,002 | 0,029   | 13,89            | 1,76 | 12,67   |

Таблица 1.  
Промежуточная прецизионность метода КИЭФ с высоким разрешением (анализ проводили с помощью системы КЭ Agilent 7100). Были получены данные для четырех приборов КЭ: шесть аналитических циклов на каждом приборе проводили в четыре разных дня (n=24). Присвоение пиков группам изоформ А–Е показано на рис. 3.

как показано на рис. 3. Кажущиеся изоэлектрические точки рассчитывали методом линейной регрессии зависимости изоэлектрической точки маркера от времени миграции. Как показано в таблице 1, ОСО (%), характеризующее промежуточную прецизионность кажущихся изоэлектрических точек, для всех изоформ было равно 0,105 или меньше. Эти данные согласуются с опубликованными значениями внутрилабораторной прецизионности (ОСО (%)) приблизительно равно 0,1)<sup>3</sup>. Хорошую промежуточную прецизионность относительной площади пиков получили для основных изоформ В, С и D, на каждую из которых приходится более 20% относительной площади пиков. Однако для второстепенных изоформ А и Е были получены значения ОСО (%) > 10 (таблица 1). Такие относительно высокие значения могут объясняться менее определенными границами этих изоформ (рис. 3) и повышением фона из-за абсорбции амфолитов. Сочетание этих двух эффектов затрудняет интегрирование. Однако все данные, представленные на рис. 1, 3–4 и в таблице 1, были получены без использования опорной длины волны. Вероятнее всего, использование опорной длины волны улучшило бы результаты (рис. 2).

### Анализ ряда различных моноклональных антител

Для демонстрации пригодности адаптированного метода КИЭФ был проведен анализ трех различных mAb с изоэлектрическими точками в пределах 5,5–6,8 (рис. 4). Разделение изоформ с разными зарядами было возможно в каждом случае. Особенно информативная электрофореграмма была получена для mAb2, по которой удалось четко разделить шесть изоформ с разными зарядами.



**Рис. 4**  
Анализ набора различных моноклональных антител. Три mAb от биотехнологических компаний были проанализированы тем же методом, что и mIgG1-ис. Для mAb1 и mAb3 использовали различные наборы маркеров для ИЭФ.

## Заключение

В данной работе продемонстрировано, что с помощью системы КЭ Agilent 7100 можно с высокой надежностью и прецизионностью провести анализ гетерогенности заряда моноклональных антител. Для анализа с помощью данной системы использовался традиционный метод КИЭФ с высоким разрешением, в который были внесены незначительные изменения. В ходе анализа были получены результаты, сопоставимые с опубликованными данными. Изоэлектрические точки и относительная интенсивность были определены с хорошей промежуточной прецизионностью. Также была продемонстрирована применимость данного метода для анализа ряда различных моноклональных антител. Универсальная конструкция системы КЭ 7100 позволяет легко адаптировать существующий метод КИЭФ. Благодаря такой простоте использования можно проводить тонкую настройку методов в соответствии с имеющимися в продаже наборами для КИЭФ или КГЭ<sup>5</sup>, а также разрабатывать специализированные методы КЗЭ. Кассета с воздушным охлаждением позволяет быстро заменить любой стандартный капилляр из плавленого кварца, а диодно-матричный детектор системы КЭ 7100 позволяет оптимизировать чувствительность методов для решения самых разных аналитических задач.

## Литература

1. Guo, A., Camblin, G., Han, M., Meert, C. and Park S., "Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis; Vol. 9 of separation sciences and technology series", Ahuja, S. and Jimilar M. I. (Eds.), Academic Press, Chapter 14, **2008** [Гуо А., Камблин Г., Хан М., Меерт К. и Парк С., «Методы капиллярного электрофореза для фармацевтического анализа. Т. 9 сборника по теории и технологии разделения». Под ред.: Ахуджа С. и Джимилар М. И., Academic Press, гл. 14, **2008 г.**].
2. Mack, S., Cruzado-Park, I., Chapman, J., Ratnayake, C. and Vigh, G., "A systematic study in CIEF: Defining and optimizing experimental parameters critical to method reproducibility and robustness", Electrophoresis 30, 4049-4058, **2009** [Мак С., Крузадо-Парк И, Чапмен Дж., Ратнаяке С. и Виг Г., «Систематическое исследование в области КИЭФ: Определение и оптимизация параметров эксперимента, определяющих воспроизводимость и надежность метода», журн. «Electrophoresis», № 30, 4049–4058, **2009 г.**].
3. Salas-Solano, O. et al., "Intercompany Study to Evaluate the Robustness of Capillary Isoelectric Focusing Technology for the Analysis of Monoclonal Antibodies", Chromatographia 73, 1137-1144, **2011** [Салас-Солано О. и др., «Межфирменное исследование для оценки надежности технологии капиллярного изоэлектрического фокусирования применительно к анализу моноклональных антител», журн. «Chromatographia», №73, 1137–1144, **2011 г.**].
4. Agilent Technologies technical document, "7100 Capillary Electrophoresis System: Installing the detector filter assembly", p/n G7100-90111 [Техническая документация Agilent Technologies, «Система капиллярного электрофореза 7100: установка блока детекторного фильтра», кат. № G7100-90111].
5. Wenz, C., "Performance of commercially available gels for protein characterization by capillary gel electrophoresis with UV detection on the Agilent 7100 CE system", Agilent Technologies Application Note, publication number 5990-7976EN [Венц К., «Эффективность имеющихся в продаже гелей для характеристики белков методом капиллярного гель-электрофореза с УФ-детектированием с помощью системы КЭ Agilent 7100», методическая информация Agilent Technologies, номер публикации 5990-7976EN].

**[www.agilent.com/chem/ce](http://www.agilent.com/chem/ce)**

© Agilent Technologies, Inc., 2012.  
Напечатано 1 сентября 2012 г.  
Номер публикации 5991-1142RU



**Agilent Technologies**