

Рекламная статья / Sponsored article



Применение детектора заряженных аэрозолей (CAD, Thermo Fisher Scientific) для анализа биофармацевтических препаратов

Статья предоставлена компанией ООО «АВРОПА»

Настоящая работа посвящена проблемам определения критических компонентов и вспомогательных веществ биофармацевтических препаратов, таких как O-связанные гликаны, высвобождаемые из гликопротеинов путем восстановительного β -элиминирования; сиаловых кислот, а также адъювантов вакцин. Основной проблемой ВЭЖХ анализа таких соединений является отсутствие детектирующей системы, не зависящей от наличия или отсутствия хромофорных и флуорофорных группировок в молекуле и дающей практически универсальный отклик вне зависимости от химической структуры определяемых веществ. В статье дается характеристика детектора заряженного аэрозоля (CAD), применение которого дает возможность решить большинство проблем, связанных с детектированием бесхромофорных веществ. Статья демонстрирует несколько примеров, где CAD может применяться для обнаружения и количественного определения веществ, разделенных с помощью обращенно-фазовой хроматографии и хроматографии гидрофильных взаимодействий.

Application of a Charged Aerosol Detector (CAD, Thermo Fisher Scientific) for the Analysis of Biopharmaceuticals

The article is presented by the company LLC "AVRORA"

The present work is devoted to the problems of identifying critical components and excipients of biopharmaceuticals, such as O-linked glycans released from glycoproteins by reductive β -elimination; sialic acids; and vaccine adjuvants. The main problem of HPLC analysis of such compounds is the absence of a detection system that is independent of the presence or absence of chromophore and fluorophore groups in the molecule and gives an almost universal response regardless of the chemical structure of the analyte. The article describes the characteristics of a charged aerosol detector (CAD), the use of which makes it possible to solve most of the problems associated with the detection of chromophore-free substances. The article demonstrates several examples where CAD can be used to detect and quantify substances separated by reverse phase chromatography and hydrophilic interaction chromatography.

ВВЕДЕНИЕ

Долгое время детектирование в УФ/видимой области спектра было «рабочей лошадкой» при анализе биофармацевтических препаратов, так как многие белки и другие активные биофармацевтические ингредиенты обычно обладают хорошим хромофором. Однако есть много случаев, когда, хотя сам биотерапевтический агент может быть УФ-активным, он имеет важные нехромофорные химические модификации, которые необходимо обнаруживать и измерять. В отличие от детекторов УФ/видимого диапазона, детектор заряженных аэрозолей (CAD) – это серийный детектор, который обеспечивает чувствительный, почти универсальный отклик для любого нелетучего аналита независимо от химического состава. Таким образом, он может обнаруживать вещества, не поглощающие в УФ/видимой области, обеспечивая ценные статистически достоверные данные (рисунок 1). CAD хорошо подходит для определения аналитов без хромофоров и без хромофорных меток, и их количественного определения. Благодаря своему универсальному отклику, детектор заряженных аэрозолей может использоваться во многих аналитических приложениях биофармацевти-

ческой практики, начиная от анализа высвобожденных гликанов и заканчивая количественным определением наполнителей рецептуры для контроля качества.

Эта статья демонстрирует несколько примеров, где CAD может применяться для обнаружения и количественного определения веществ, разделенных с помощью обращенно-фазовой хроматографии и хроматографии гидрофильных взаимодействий. Примеры включают: гликаны, сиаловые кислоты, поверхностно-активные вещества, адъюванты, белки и аминокислоты. Во многих случаях пределы обнаружения находятся в диапазоне низких нанограмм с хорошей точностью площади пика.

ПРОБЛЕМА ОБНАРУЖЕНИЯ АНАЛИТОВ

Ни один детектор жидкостной хроматографии (ЖХ) не дает идеальных результатов. Часто один аналит реагирует сильнее, чем другой, или может вообще не реагировать. Что наиболее желательно, так это способность обнаруживать широкий спектр аналитов (универсальное обнаружение) с откликом, который обеспечивает точное количественное определение.

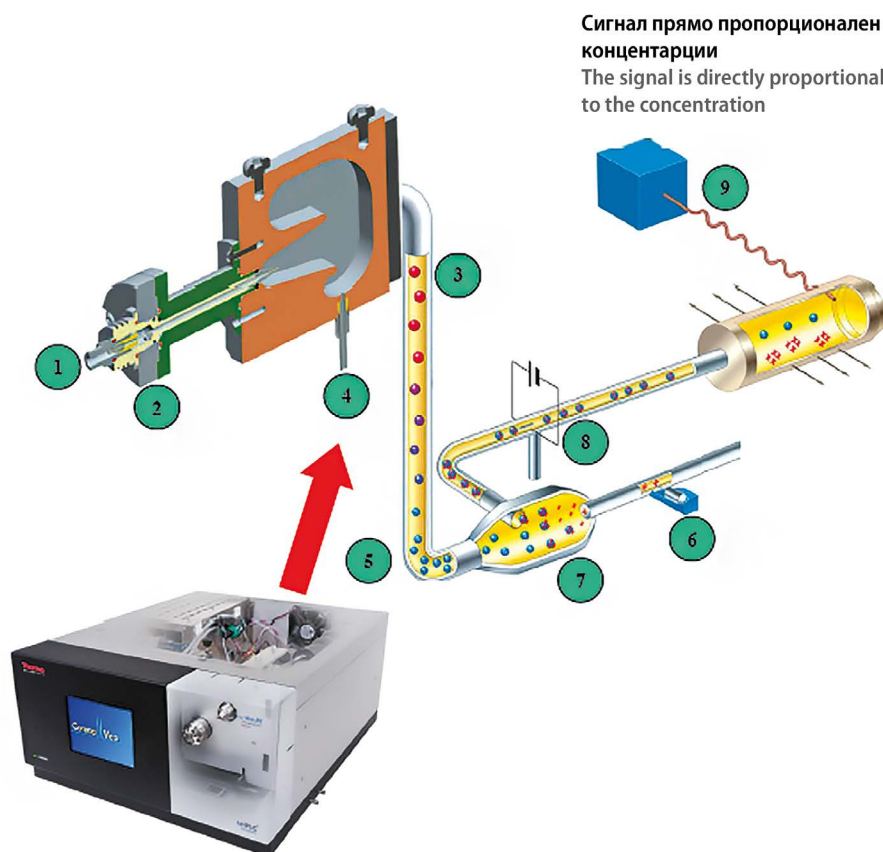


Рисунок 1. Принцип работы детектора заряженных аэрозолей.

Вверху слева (1) подвижная фаза из колонки LC, входящая в детектор распыляется путем объединения с концентрическим потоком азота или воздуха (2). Мелкие капли, переносимые объемным газовым потоком в нагретый сектор испарения (3), десольватируются с образованием сухих частиц (5) любых нелетучих или полунлетучих частиц. Любые оставшиеся крупные капли стекают в отходы (4). Сухие частицы аналита соединяются с другим газовым потоком, который заряжается высоковольтным зарядным устройством Согона (6). Заряженный газ передает положительный заряд поверхности частицы анализируемого вещества (7). Заряженные частицы анализируемого вещества проходят через ионную ловушку (8), которая удаляет любые высокоподвижные частицы, и попадают в коллектор, где они измеряются чувствительным электрометром. Производимый сигнал (9) прямо пропорционален количеству аналита

Детектор заряженных аэрозолей (CAD) может обнаруживать все нелетучие и многие полунлетучие аналиты с коэффициентом детектирования близким или равным единице.

Обнаружение заряженных аэрозолей – это метод, позволяющий измерять любые нелетучие и многие полунлетучие частицы. Эта технология обеспечивает более универсальное обнаружение, чем УФ, для которого требуется хромофор или масс-спектрометрия, требующая образования ионов газовой фазы. При обнаружении заряженного аэрозоля поток элюента распыляется, а капли сушатся для получения частиц анализируемого вещества, которые впоследствии заряжаются. Эта технология обеспечивает отличную однородность отклика, поскольку заряд частиц практически не зависит от физико-химических свойств соединения. Благодаря своей исключительной однородности отклика, CAD может использоваться для количественного определения нескольких аналитов с использованием одного калибранта. Количественное определение единичного калибранта

чрезвычайно полезно, когда недоступны определенные стандарты аналитов. Например, кривая отклика активного фармацевтического ингредиента (API) может использоваться для определения уровней неизвестных примесей.

Таким образом, весь процесс можно разделить на три простых шага:

1. Распыление. Обнаружение заряженного аэрозоля начинается с распыления элюента на капли, которые затем высушиваются на частицы. Размер частиц увеличивается с увеличением количества аналита.
2. Получение заряда. Поток заряженного газообразного азота сталкивается с частицами анализируемого вещества. При этом заряд передается частицам – чем крупнее частица, тем больше заряд.
3. Обнаружение. Заряженные частицы переносятся в коллектор, где совокупный заряд измеряется высокочувствительным электрометром, который генерирует сигнал, прямо пропорциональный количеству присутствующего аналита.

Исходя из того факта, что готовится общая фармакопейная статья «Определение гликанового профиля», целью данного исследования была разработка количественного анализ профиля для О-связанных гликанов, высвобождаемых из гликопротеинов путем восстановительного β -элиминирования.

Гликопротеины, представляющие биологический, диагностический или терапевтический интерес, ключевыми аспектами своей нормальной функции обязаны олигосахаридам, прикрепленным к белковой цепи. Изменения количества, типа, состава или характера связывания этих гликанов могут служить биомаркером заболевания или влиять на эффективность биотерапевтического продукта. По этой причине способность правильно идентифицировать и измерять эти гликаны представляет научный интерес, а возможность делать это надежно, быстро и недорого – имеет практическую пользу.

Гликаны – это полярные молекулы, которые слабо удерживаются на колонках для жидкостной хроматографии с обращенной фазой, но более сильно удерживаются на пористом графитовом углероде, HILIC, анионообменных или смешанных колонках. Поскольку N-связанные гликаны плохо обнаруживаются детекторами поглощения УФ/видимого света, отделенные гликаны обнаруживаются непосредственно с помощью импульсной амперометрии, масс-спектрометрии или флуоресценции после мечения 2-AA (2-аминобензойная кислота) или 2-AB (2-аминобензамид). Для обнаружения методом детектирования заряженных аэрозолей не требуется флуорофор или хромофор для чувствительной и точной количественной оценки, поэтому УВЭЖХ-CAD обеспечивает простой и прямой подход к разделению и количественной оценке нативных гликанов. В этом методе используется летучая подвижная фаза, полностью совместимая с масс-спектрометрией, если требуется дальнейшее определение характеристик.

Метод количественного анализ профиля для О-связанных гликанов, высвобождаемых из гликопротеинов путем восстановительного β -элиминирования

О-связанные гликаны высвобождаются из белков путем восстановительного β -элиминирования. Высвободившиеся гликаны разделяются с помощью жидкостной хроматографии сверхвысокого качества (УВЭЖХ) на новой платформе УВЭЖХ, которая интегрирует детектор заряженных аэрозолей в систему для повышения производительности и простоты использования. В аналитической колонке смешанного режима используются механизмы как слабого анионного обмена, так и HILIC-разделения для разделения гликанов на основе заряда, размера и полярности. Восстановленные гликаны обнаруживаются напрямую, без маркировки, с помощью обнаружения заряженного аэрозоля.

Приборное оснащение, режим

Система УВЭЖХ Thermo Scientific™ Vanquish™ с детектор заряженных аэрозолей:

- Температура испарения: 50 °C.
- Функция мощности: 1,00.
- Скорость сбора данных: 10 Гц.
- Фильтр сигнала: 5 сек.

Реагенты: чистоты для реагентов или для ЖХМС

Анализ данных:

Система хроматографических данных Thermo Scientific™ Dionex™ Chromeleon™ (CDS) 7.2.

Разделение

Колонка: Thermo Scientific™ GlycanPac™ AXH-1 1,9 мкм, 2,1 × 100 мм.

Температура колонки: 30 °C, режим естественной конвекции.

Скорость потока: 0,5 мл/мин.

Объем впрыска: 0,2–2 мкл.

Подвижная фаза А: 95: 5 ацетонитрил: деионизированная вода.

Подвижная фаза В: 50 мМ формиат аммония, pH 4,4.

Градиент: Время, % В: –8, 2; 0, 2; 60, 42 (наклон = 0,67 мМ/мин).

Подготовка образца

Thermo Scientific™ Dionex™ OligoStandard™ Силированные N-связанные альдиты фетуина были получены от Thermo Fisher Scientific (P/N 04360). В один флакон добавляли 500 мкл чистой воды для ВЭЖХ, перемешивали для растворения и переносили в полипропиленовый флакон для автоматического пробоотборника для ВЭЖХ. Gal β (1-3) GalNAc- α -Thr (TCI G0340) из VWR растворяли в деионизированной воде в концентрации 1 мг/мл. О-связанный гликан Core 1 высвобождался во время процедуры восстановительного β -элиминирования. Муцин, бычий подчелюстной тип 1-S (Sigma M3895), кроличьи поликлональные антитела против IgG H&L (VWR RL105-4102), фетуин из фетальной бычьей сыворотки (Sigma F3004) и коммерческое моноклональное антитело от частного донора получали растворением 10 мг $\pm$ 1 мг в 1 мл воды, пригодной для ВЭЖХ. Пулы О-гликанов высвобождались путем восстановительного β -элиминирования.

Высвобождение О-гликанов

О-связанные гликаны не могут быть высвобождены одним ферментом, таким как PNGase F, обычно используемым для высвобождения N-связанных гликанов. Вместо этого О-связанные гликаны высвобождаются химическими методами, такими как восстановительное β -элиминирование. Химическое восстановление образует гликаны с одним концевым фрагментом, восстановленным до альдита, который не может быть флуоресцентно помечен (рисунок 2). Но это не представляет проблемы для обнаружения, потому что детектор заряженного аэрозоля

легко обнаруживает нативный гликан. Из-за однородного отклика детектора заряженного аэрозоля относительная площадь пика точно отражает количество каждого нелетучего аналита.

Разработка метода

По сравнению с N-связанными гликанами, разделенными в тех же условиях, O-связанные гликаны, исследованные в этой работе, обычно элюируются раньше и с меньшим разрешением. После предварительного изучения метода для оценки альтернативных колонок, таких как колонки GlycanPac AXR-1 и Thermo Scientific™ Accucore™ 150 Amide HILIC, на колонке GlycanPac AXH-1 был разработан подходящий метод для малых, полярных, нейтральных и заряженных O-связанных гликанов. Этот несколько общий метод максимизирует удержание малых, нейтральных и однозарядных гликанов, давая достаточно времени для элюирования возможных крупных и/или более высокозарядных гликанов. Последний метод был использован для анализа пулов O-связанных (верхняя хро-

матограмма) и N-связанных (нижняя хроматограмма) гликанов, высвобожденных из бычьего фетуина, которые сравниваются на рисунке 3. Идентификация пиков O-связанных гликанов присвоена предварительно до тех пор, пока не будет подтверждения с использованием MS.

Были проанализированы пулы O-связанных гликанов, высвобождаемые из различных белков, в том числе из бычьего фетуина, бычьего подчелюстного муцина и IgG. Представлены количественные характеристики, включая точность, пределы обнаружения и динамический диапазон. Показатели качества включают чувствительность на уровне колонки с низким нанограммом, динамический диапазон более двух порядков величины и точность площади пика, составляющую в среднем три процента RSD.

В таблице 1 представлены сводные данные о времени удерживания и точности площади пика для двух пиков, элюируемых в пределах временного окна удерживания, соответствующего O-гликанам плюс трисиалилированным и тетрасиалилированным

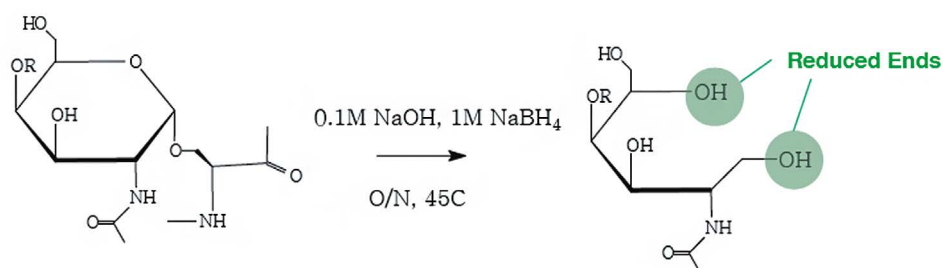


Рисунок 2. Альдиты, полученные восстановительным β-элиминированием, не могут быть помечены

Figure 2. Aldites obtained by reductive β-elimination cannot be labeled

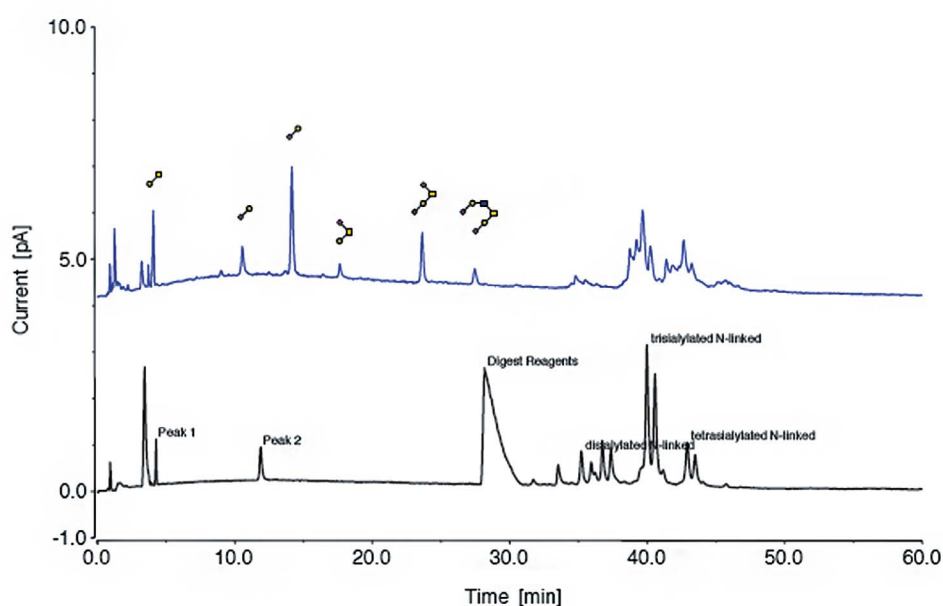


Рисунок 3. N- и O-связанные нативные гликаны, полученные из бычьего фетуина

Figure 3. N- and O-linked native glycan fragments derived from bovine fetuin

ным N-гликанам. Пределы обнаружения стандартов O-связанных гликанов не были определены для этой работы, но аналогичные методы для N-связанных гликанов дали пределы обнаружения в диапазоне низких нг/мкл и квадратичные калибровочные кривые в диапазоне от 1 до 200 нг/мкл.

Таблица 1. Сводные данные о времени удерживания и точности площади пика

Table 1. Summary of retention times and peak area accuracy

Компонент Component	Время удерживания (% RSD) Retention time (% RSD)	Площадь пика (% RSD) Peak area (% RSD)
Пик 1 Peak 1	0,06	3,3
Пик 2 Peak 2	0,04	3,7
Трисиалилированное производное Trisialylated derivative	0,01	3,5
Тетрасиалилированное производное Tetrasialylated	0,02	1,9
Среднее Average	0,03	3,1

Таким образом можно утверждать:

O-гликаны, высвобождаемые восстановительным β -элиминированием для сохранения структурной целостности, можно измерить количественно. Высвободившиеся гликаны разделяются с высоким разрешением по заряду, размеру и полярности на колонке смешанного режима, использующей как ионный обмен, так и разделение HILIC.

Метод УВЭЖХ, разработанный для измерения нативных O-связанных гликанов, является точным и чувствительным. Точность времени удерживания лучше, чем 0,1 % RSD, а точность площади пика в среднем составляет 3,1 %. Непосредственно реагируя на любые нелетучие соединения, обнаружение заряженных аэрозолей позволяет количественно определять немеченные O-связанные гликаны.

Близкий к единице коэффициент детектирования для обнаружения заряженных аэрозолей обеспечивает простую и относительно точную оценку концентрации, даже при отсутствии чистого первичного стандартного образца.

Метод. Определение сиаловых кислот с использованием детектора заряда аэрозоля

Сиаловые кислоты представляют собой компоненты клеточных рецепторов, которые специфичны для вирусов семейства Adenoviridae, ротавирусов (Reoviridae), вирусов гриппа (Orthomyxoviridae), а также для многих грамположительных бактерий. Накоплены факты, отражающие важнейшую роль сиаловых кислот в обеспечении устойчивости макроорганизма к патогенам различной природы, а также в разви-

тии соматической патологии и опухолеассоциированных процессов. Концентрация сиаловых кислот также возрастает при сиалидозе, инфаркте миокарда, онкологических заболеваниях, в том числе и при опухолях головного мозга. Особенно высокий рост этого показателя отмечается при активной форме туберкулеза и ревматизме, при паренхиматозной желтухе. После отщепления от белково-углеводных комплексов тканей свободных сиаловых кислот инактивируют многие бактериальные и вирусные агенты. Поэтому увеличение содержания в крови сиалогликопротеинов может быть проявлением компенсаторной, защитной реакции организма. Одной из многих причин формирования иммунологической несостоятельности при старении связывают с уменьшением концентрации сиаловых кислот в организме. Сиаловые кислоты способны выраженно изменять процесс распознавания опухолевых антигенов. Анализ частоты экспрессии разных антигенов на клетках различных опухолей во многих случаях может быть использован для оценки прогноза и степени злокачественности опухолевого процесса, а также для получения вакцин с целью иммунотерапии.

Будучи замещенными моносахаридами с 9 углеродными атомами, сиаловые кислоты не имеют в структуре хромофорных группировок, поэтому не обнаруживаются в рабочем диапазоне спектрофотометрических детекторов УФ/видимой области. Однако, прямое обнаружение высвобожденных сиаловых кислот из трансферрина человека и крупного рогатого скота возможно с использованием ВЭЖХ с детектором заряженного аэрозоля.

Приборное оснащение, режим

Система УВЭЖХ Thermo Scientific™ Vanquish™ с детектором заряженных аэрозолей.

Колонка: Thermo Scientific™ Acclaim™ Trinity P2, 3 мкм, 2,1 × 100 мм.

Температура колонки: 30 °C.

Скорость потока: 0,3 мл/мин.

Объем впрыска: 5 мкл.

Подвижная фаза: 65/25/10 (ACN/вода/100 мМ формиат аммония, pH 4).

Метод. Определение адъювантов вакцин

Адъювант (от лат. *adjuvans* – «помогающий, под-держивающий») – соединение или комплекс веществ, используемое для усиления иммунного ответа при введении одновременно с иммуногеном. В отличие от иммуномодуляторов, они применяются для усиления конкретного иммунного ответа (например, при вакцинации) чаще всего в здоровом организме, а не для нормализации нарушенных реакций иммунной системы при патологии.

Адъюванты на протяжении десятилетий применяются для улучшения иммунного ответа на вакцинные антигены. Включение адъювантов в состав

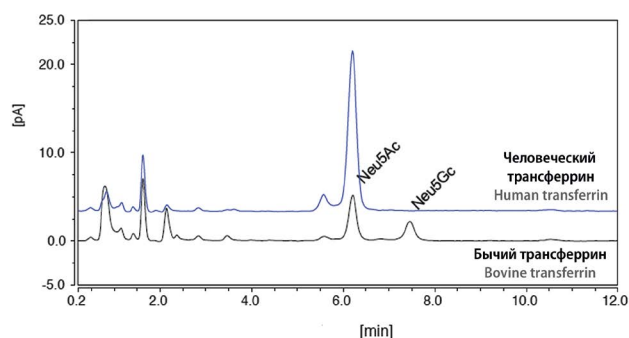


Рисунок 4. Прямое обнаружение высвобожденных сиаловых кислот из трансферрина человека и крупного рогатого скота с использованием ВЭЖХ с детектором заряженного аэрозоля

Figure 4. Direct detection of released sialic acids from human and bovine transferrin using HPLC with charged aerosol detector

вакцин направлено на усиление, ускорение и prolongation специфического иммунного ответа до желаемого уровня. Таким образом, адъюванты играют ключевую роль в получении эффективного и длительного иммунитета.

Достаточно изученными и часто применяющимися адъювантами являются сапонины и производные холестерина, входящие в состав липосом. И сапонины, и производные холестерина практически не имеют хромофорных группировок, но с применением детектора заряженного аэрозоля возможно прямое определение этих адъювантов.

Приборное оснащение, режим

Система УВЭЖХ Thermo Scientific™ Vanquish™ с детектором заряженных аэрозолей.

Колонка: Thermo Scientific™ Accucore™ PFP 2,6 мкм, 2,1 × 100 мм.

Температура колонки: 50 °С.

Скорость потока: 1,0 мл/мин.

Объем впрыска: 0,2 мкл.

Подвижная фаза А: 0,1 % муравьиной кислоты в деионизированной воде.

Подвижная фаза В: 0,1 % муравьиной кислоты в соотношении 30:70 ацетонитрил: 2-пропанол.

Градиент: 25–70–70 % В при 0–4–9 мин.

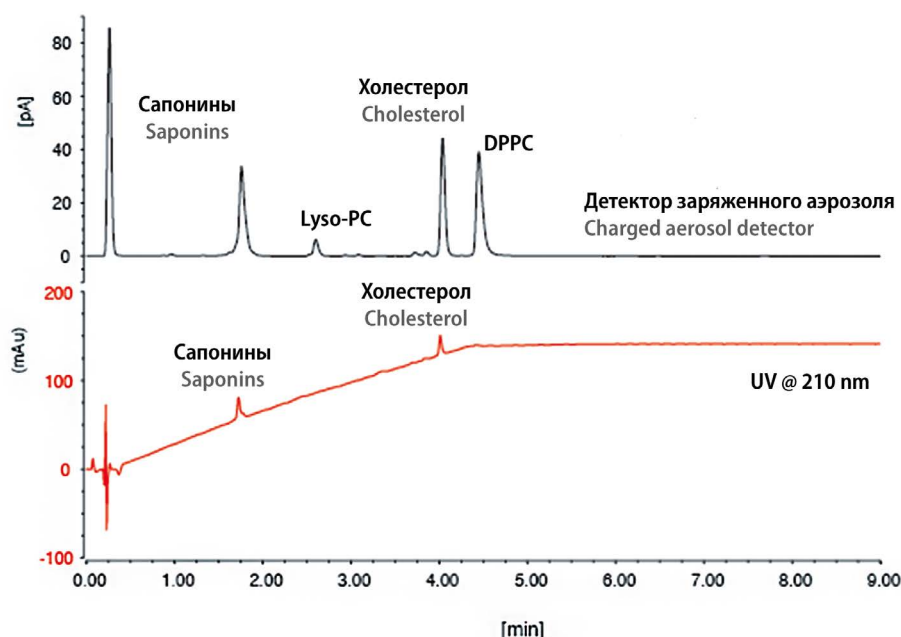
Детектор: VCAD 2 Гц, 5 с, PF 1

Сравнение детектирования УФ (210 нм) и детектора заряженного аэрозоля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Детекторы заряженных аэрозолей Thermo Scientific™ Vanquish™ и Thermo Scientific™ Corona™ Veo™ обеспечивают:

- Простое, интуитивно понятное управление.
- Широкий линейный и динамический диапазон.
- Чувствительность на уровне субнанограмм.
- Гибкость метода, охватывающая приложения ВЭЖХ с микропоток и УВЭЖХ с одним небулайзером.
- Отклик детектора не зависит от структуры анализируемого вещества для всех нелетучих соединений.
- Превосходная чувствительность в сочетании с широким динамическим диапазоном для повышенной производительности.
- Единый калибратор для количественного определения нескольких аналитов, когда отдельные стандарты недоступны.



Риснок 5. Сравнение детектирования УФ (210 нм) и детектора заряженного аэрозоля

Figure 5. Comparison of UV detection (210 nm) and charged aerosol detector for selected adjuvants