

Möglichkeiten / Grenzen der Stabilitätskontrolle von Proteinen mittels Gelpermeations-Chromatographie im Vergleich zur Massenspektrometrie

N. Thiessen, M. Müller, E. Reh

Einführung

Zur chromatographischen Charakterisierung von Proteinformulierungen wird häufig die Gelpermeationschromatographie (GPC) eingesetzt. Die GPC ist einfach in der Anwendung und detektiert höher molekulare Verunreinigungen (z.B. Aggregate) und nieder molekulare Abbau-Produkte.

Hier wird die GPC für die Stabilitätsuntersuchung von Hämoglobin-Präparationen verwendet. Bislang wurde ein auf der TSKgel SuperSW2000 GPC-Säule von Tosoh basierendes, validiertes Verfahren für diese Messungen verwendet. Mit den vorgelegten Messungen soll überprüft werden ob das Verfahren auf die BioSEC-3 GPC-Säule von Agilent übertragbar ist und die Messungen gegebenenfalls mit dieser Säule fortgeführt werden können. Diese Phase zeichnet sich nach Hersteller-Angaben durch ein gecoatetes Silica-Gel aus, das z.B. andere Stabilitäts-Kennzahlen erwarten lässt.

Die Untersuchungen präsentieren einen detaillierten Vergleich hinsichtlich Linearität, Nachweisgrenze, Reproduzierbarkeit, Selektivität der beiden GPC-Säulen.

Darüber hinaus werden die Resultate mit MS-Untersuchungen verglichen, die eine deutlich höhere Trennleistung / Selektivität aufweist. Damit soll der Stellenwert (Richtigkeit) der GPC für die Stabilitätsuntersuchungen von Proteinen bewertet werden.

Resultate

Stabilität der Elution

Die statistische Auswertung der Retention ergab eine gute Reproduzierbarkeit beider Säulen ($s_{rel} < 0,1 \%$, vgl. Tab. 1).

Es wurde jedoch festgestellt, dass die Retention der Hauptkomponente signifikant steigt, wenn die Konzentration niedriger wird (von 15,56 min bei 1000 μ g/ml auf 16,15 min bei 5 μ g/ml). Dies kann z. Zt. nicht erklärt werden. Zur Untersuchung sollten daher Proben mit einer konstanten, niedrigen Konzentration eingesetzt werden.

Für einen detaillierten Vergleich wurden die Retentionszeiten bzw. Peakhöhen der einzelnen Messungen in Abb. 1 einander grafisch gegenübergestellt. Die Untersuchung der Peakflächen der Hauptkomponente ergab bei beiden Säulen keinen signifikanten Trend und wurden deshalb nicht in die grafische Auswertung mit einbezogen.

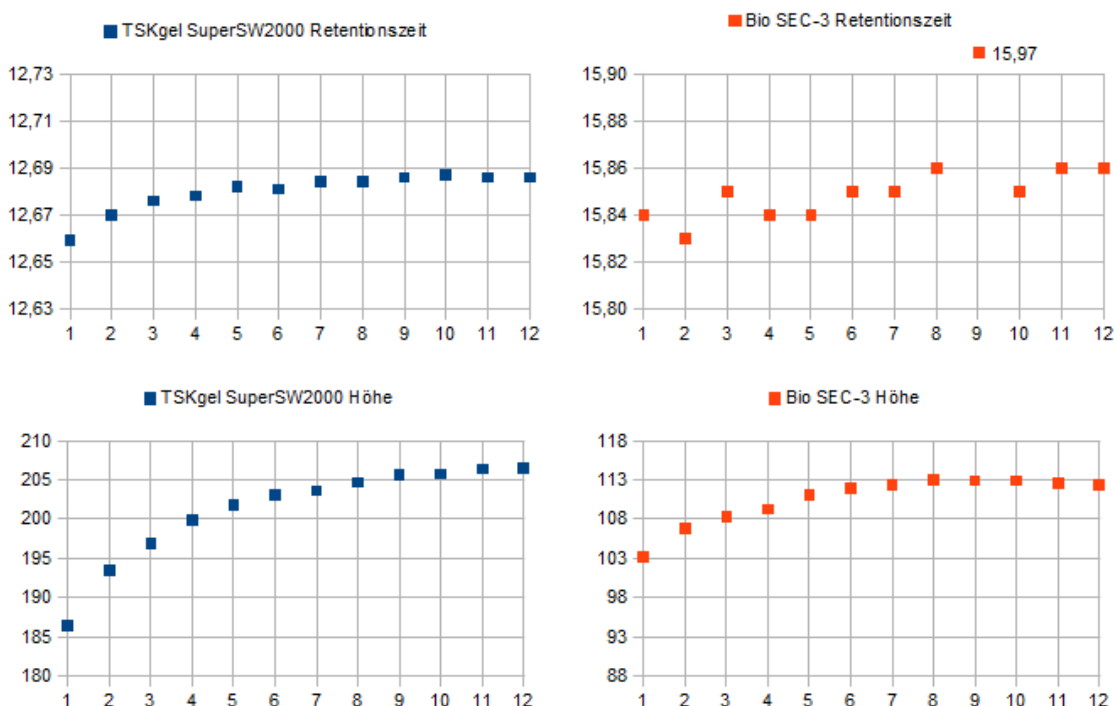


Abb. 1: Vergleich Verlauf Retentionszeit, Peakhöhe (TSKgel/Bio SEC)

Die Bio SEC-3-Säule benötigt ebenfalls einige Messungen, um eine konstante Retention bzw. Peakhöhe zu erreichen. Der Trend ist jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei der TSKgel SuperSW2000-Säule. Ein Ausreißer während der 9. Messung (15,97 min) mit der Bio SEC-3-Säule wurde im Vergleich nicht berücksichtigt.

Selektivität

Die GPC soll die Bildung von höhermolekularen Oligomeren bzw. von niedermolekularen Abbauprodukten aufzeigen.

Dieselben Proben wurden mit beiden Säulen analysiert und verglichen. Die Bio SEC-3-Säule zeigt eine andere Differenzierung des hochmolekularen Anteils, auch die niedermolekulare Verunreinigung kann in der erwarteten Form nicht detektiert werden. In Abb. 2 wird die Registrierung der gleichen Hämoglobin-Charge bei verschiedenen Lagerungs-Bedingungen aufgezeigt, gemessen mit der Bio SEC-3- und der TSKgel SuperSW2000-Säule.

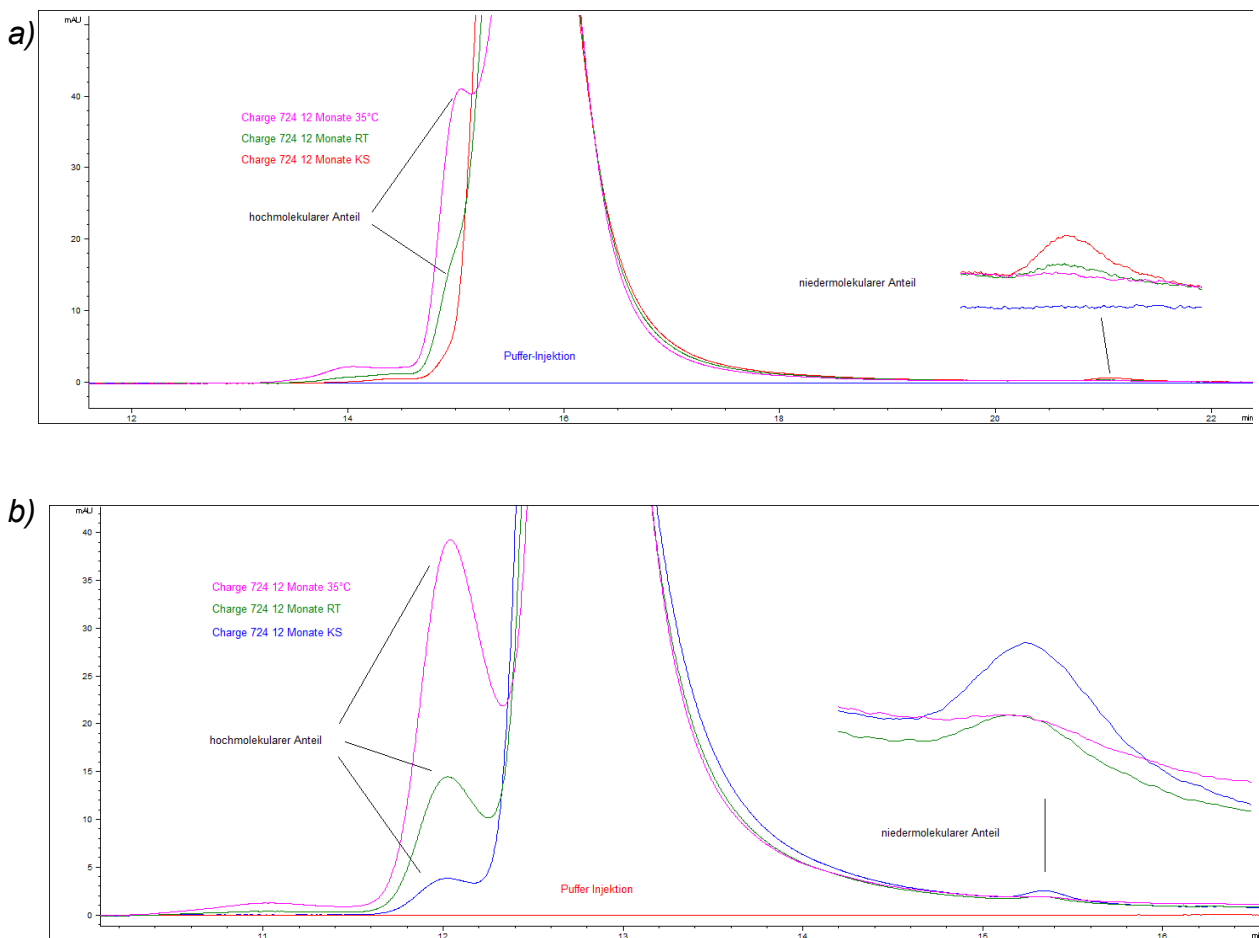


Abb. 2 Vergleich der Lagerungs-Stabilität bei 7°C, 25°C, 35°C mittels a) Bio-SEC- b) TSKgel-Säule

Der hochmolekulare Anteil ist bei der Bio SEC-3-Säule nur bei der Lagerung bei 35°C vom Hauptpeak zu unterscheiden. Bei den anderen beiden Proben kann der hochmolekulare Anteil nicht eindeutig vom Hauptpeak differenziert und deshalb nicht wie bislang mit der TSKgel-Säule als prozentualer Anteil der Hauptkomponente ausgewertet werden. Im Gegensatz dazu (Abb. 2b) kann der hochmolekulare Anteil mit der TSKgel SuperSW2000-Säule bei allen 3 Proben explizit ausgewertet werden.

Verfahrensvalidierung

Reproduzierbarkeit

Wesentlichen statistische Parameter wurden bei 12 Messungen in Serie ermittelt (Tabelle 1).

	Bio SEC-3	TSKgel SuperSW2000
Retention		
Ausreißer	1	1
Trend	nein	ja
Schiefe/Kurtosis	nicht signifikant	nicht signifikant
S _{rel} [%]	0,06	0,05
Fläche		
Ausreißer	keine	1
Trend	nein	nein
Schiefe/Kurtosis	nicht signifikant	nicht signifikant
S _{rel} [%]	0,31	0,37

Tab. 1: Reproduzierbarkeit Retention / Fläche (TSKgel-/BioSEC-Säule)

Die Resultate der Reproduzierbarkeit zeigen keine großen Unterschiede beider Säulen, auffällig ist nur der stärker ausgeprägte Trend der TSKgel SuperSW2000, der wie bereits oben beschrieben bei den ersten Messungen auftritt, bevor im weiteren Verlauf eine konstante Elution erreicht wird.

Linearität

Durch Verdünnung einer Standard-Hämoglobinpräparation (1000 µg/ml) wurden 4 weitere Kalibratoren erhalten (10, 50, 100, 500 µg/ml), zusätzlich wurde die Puffer-Leerinjektion als 0-Kalibrator eingesetzt.

Nach Regression wurde bei der BioSEC-Säule mittels Varianzanalyse die Gerade als Kalibrationsmodell verworfen, das Polynom 2. Grades für den gesamten Bereich der Kalibration akzeptiert. Im unteren Konzentrationsbereich von 0-10 µg/ml wurde eine Gerade akzeptiert.

Bei der SuperSW-Säule wurde sowohl Grade als auch Polynom 2. Grades verworfen, nur bei Kalibration im Bereich 10 – 1000 µg/ml (ohne 0-Kalibrator) konnte eine Kalibrationsgerade verwendet werden.

Aus der Kalibration folgt, dass im Bereich 0 bis 100 % der Peakfläche kein linearer Zusammenhang mit der Konzentration der Komponenten zugrunde gelegt werden kann, jedoch im Bereich von 0-1%, weshalb die Nachweisgrenze mittels der Geradengleichung bestimmt werden kann.

Nachweisgrenze

Aus der Registrierung des 1. Kalibrators kann die Nachweisgrenze der BioSEC-Säule zu 0,5 µg/ml abgeschätzt werden (Signal/Rauschen = 3:1, Linearität im Bereich < 10 µg/ml konstatiert), bei der SuperSW-Säule ist diese 1µg/ml.

Wiederfindung

Die Wiederfindung wurde mittels 2-dimensionaler HPLC bestimmt. Bei der GPC-Messung 2 verschiedener Proteine wurde die Probe während der Elution des Hauptsignals auf eine Reversed-Phase-Kartusche (heart-cut) geleitet und anschließend über eine Reversed-Phase-Chromatography (RPC)-Säule mittels UV-Detektion quantifiziert.

Als 100%-Vergleich diente die direkte RPC-Messung der Protein-Probe.

	Bio SEC-3 Wiederfindung [%]	SuperSW2000 Wiederfindung [%]
Ribonulcease A	121	110
Hämoglobin	93	75

Tab. 2: Wiederfindung Hämoglobin / Ribonuclease A (TSKgel- / BioSEC-Säule)

Die beiden Säulen unterscheiden sich bei der Wiederfindung nicht gravierend, die BioSEC-Säule scheint auf Grund des Coatings eine geringfügig besser Wiederfindung zu haben.

Trennleistung

Die Trennleistung wurde anhand der Chromatogramme zweier Proteine (Ribonuclease A und Hämoglobin) mit jeweils neuen Säulen ermittelt und in Tabelle 3 dargestellt.

	Bio SEC-3	TSKgel SuperSW2000
Ribonuclease A		
Asymmetrie ¹	1,501	0,962
Trennstufenhöhe [μm] ²	43	33
Hämoglobin		
Asymmetrie ¹	1,519	0,876
Trennstufenhöhe [μm] ²	80	97

Tab. 3: Asymmetrie /Peakkapazität Hämoglobin / Ribonuclease A (TSKgel- / BioSEC-Säule)
(¹ USP-Tailing, ² Trennstufenhöhe nach Tangenten-Methode)

Die Trennstufenhöhen beider Säule sind vergleichbar trotz unterschiedlicher Partikelgröße (Bio Sec-3: 3 μm , SuperSW2000: 4 μm).

Richtigkeit

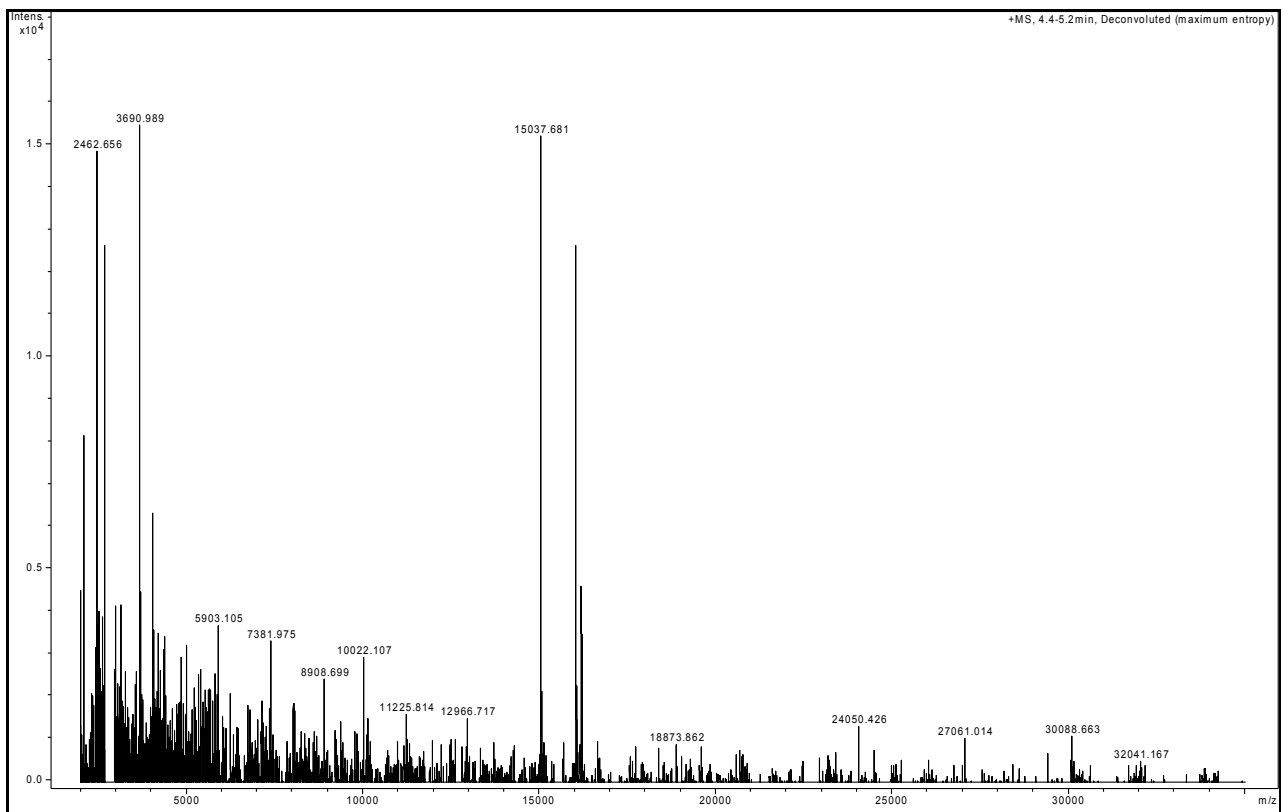


Abb. 3: Massenspektrum Hämoglobin 12 Monate

Im Massenspektrum sind neben der Hauptkomponente und deren beiden Untereinheiten ($m/z = 15037,68/16033,56$) einige weitere Massen zu finden, die mit der GPC nicht erfasst wurden. Besonders im unteren Massenbereich (2-4kDa) ist eine große Anzahl an Massenpeaks mit sehr deutlichen Intensitäten zu erkennen. Zusätzlich wurde bei $m/z = 16195,61$ ein weiterer Massenpeak mit signifikanter Intensität identifiziert.

Die zugehörige Massenliste basiert auf den Ergebnissen von 2 unterschiedlichen Dekonvolutions-Algorithmen. Als relevant werden nur die Massen betrachtet, die von beiden Algorithmen bestätigt wurden und deren Intensitäten mindestens 15% des Hauptpeaks entsprechen, um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen. Die Reultate der Massenliste sind in Tabelle 4 dargestellt.

Masse	Intensität [%]
2460,27	19
2503,29	22
2531,50	20
2675,43	35
3562,88	19
3690,99	18
15037,63	82
16033,56	85
16195,61	27

Tab. 4: Massenliste Hämoglobin 12 Monate

Die Massenliste bestätigt den Eindruck des Massenspektrums. Beide Untereinheiten des Hämoglobins werden mit deutlichen Intensitäten detektiert. Desweiteren konnten 5 weitere Komponenten mit Massen zwischen 2-4 kDa bestätigt werden, die mittels GPC-Messung nicht zu bestimmen sind. Bei der Masse 16195,61 handelt es sich um ein Addukt, das zu Beginn der Stabilitätsuntersuchungen im Massenspektrum nicht zu finden war und stetig mit der Lagerungszeit zunahm. Dieses sich aus niedermolekularem Anteil und Hämoglobin zusammensetzende Addukt ist in den reinen GPC-Messungen nicht zu finden. Die Richtigkeit einer reinen GPC-Analyse zur Proteinstabilität ist daher kritisch zu betrachten.

Schlussfolgerung

Die GPC-Analyse zeigt mit der Bio SEC-3-Säule keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich Nachweisgrenze und Reproduzierbarkeit. Auch hinsichtlich Linearität und Wiederfindung gibt es keine wesentlichen Unterschiede.

Anders ist dies bei der Selektivität der Elution.

Kurz vor bzw. nach dem Hauptpeak eluieren im Gegensatz zur TSKgel-Säule keine oder kaum auswertbare Komponenten (hoch-, niedermolekular) die als entsprechende Indikatoren für eine Protein-Degradation gut ausgewertet werden könnten.

Für diese Aufgabenstellung ist die TSKgel-Säule daher zu bevorzugen.

Unabhängig davon darf nicht ausser Acht gelassen werden, dass die Trennleistung der GPC sehr gering ist (Peakkapazität ~10). Es kann daher nicht erwartet werden, dass damit alle Protein-Komponenten nach Lagerung erfasst werden.

Dies zeigen die MS-Messungen eindrucksvoll.

Ein Beurteilung der Proteinstabilität alleine durch GPC-Untersuchungen ist daher abzulehnen.

Experimenteller Teil

Reproduzierbarkeit, Linearität, Nachweisgrenze, Selektivität

Säule1: TSKgel SuperSW2000; Tosoh,
Vorsäule: TSKgel SuperSW2000, 5x 4,6 mm, homemade
Säule: Bio SEC-3, 3µm, 150Å, 4.6 x 300mm, 5190-2508, Agilent
Vorsäule: Bio SEC-3 guard, 3µm, 150Å, 7.8 x 50 mm, 5190-2510, Agilent
Temperatur: 25°C
Fluss: 0,25ml/min
Eluent (Säule1): 25mM NaH₂PO₄ + 250mM NaCl, pH 6,8; isokratisch
Eluent (Säule2): 150mM NaH₂PO₄, pH 7,0; isokratisch
Proben: S. Charge 690 12 Monate Kühlschrank
S. Charge 746 12 Monate Kühlschrank
S. Charge 724 12 Monate Kühlschrank, Raumtemperatur, 30°C
Injektions-V.: 5,0 µl
Detektion: UV (220nm)
Stop-Zeit: 30 min

Wiederfindung, Trennleistung

Säule1 (GPC): TSKgel SuperSW2000; Tosoh, keine Vorsäule
Säule2 (GPC): Bio SEC-3; Agilent, keine Vorsäule
Säule3 (RPC): Discovery BIO Wide Pore C5, 58796-01
Vorsäule (RPC): Jupiter C18, 5 µm
Temperatur: 25°C
Fluss: 0,25ml/min
Eluent GPC (Säule1): 25mM NaH₂PO₄ + 250mM NaCl, pH 6,8, isokratisch
Eluent GPC (Säule2): 150mM NaH₂PO₄, pH 7,0
EluentA RPC: H₂O + 0,1% TFA
EluentB RPC: CH₃CN + 0,1% TFA
Gradient:

Time	%B
0	0
25	0
45	80
50	80
50,5	0
52,5	0

Proben: Hämoglobin human, RNase A, je 10µg/ml
100 % Standard (Direktinjektion in RPC)
Injektions-V.: 20,0 µl
Detektion: UV (220nm)
Schalteinheit: 6-Port in Säulenofen, heart-cut, backflush
Fraktionen Tosoh: Hämoglobin 11,5-14; RNase A 12,5 -14,5
Fraktionen Agilent: Hämoglobin 9,6-12; RNase A 11 -13

Richtigkeit

Säule: Poroshell 120 SB-C18, 5 x 2mm Kartusche, homemade
Temperatur: 25°C
Eluent: A: H₂O + 0,1% FA
B: CH₃CN + 0,1 % FA

Time [min]	%B	Flow [ml/min]
0,00	10	0,50
1,45		0,50
1,50	10	0,25
2,50	80	
3,00	80	
3,10	10	
7,40		0,25
7,50		0,50

Stop-Zeit: 8,00 min
 Injektions-V.: 50,0 µl
 Proben: S. Charge 724 12 Monate Kühlschrank

MS-Parameter:

Source

End Plate Offset	-500 V
Capillary	-4500 V
Nebulizer	4.0 bar
Dry Gas	10.0 l/min
Dry Temp	200° C

Transfer

Capillary Exit	269 V	Skimmer 1	91.3 V
Hexapole 1	24.0 V	Skimmer 2	23.0 V
Hexapole 2	20.0 V	Hexapole RF	736.5 Vpp
Transfer Time	76 µs	Pre Puls Storage	25 µs
Lens 1 Storage	50.0 V	Lens 1 Extraction	20.3 V
Lens 2	8.3 V	Lens 3	-20.0 V
Lens 4	0.0 V	Lens 5	-25.7 V