



Article scientifique

Article

2016

Published version

Open Access

This is the published version of the publication, made available in accordance with the publisher's policy.

Korszerű méretkizárás kromatográfia: fehérje aggregátumok elválasztása

Fekete, Szabolcs; Fekete, Jenő; Guillaume, Davy

How to cite

FEKETE, Szabolcs, FEKETE, Jenő, GUILLARME, Davy. Korszerű méretkizárás kromatográfia: fehérje aggregátumok elválasztása. In: Kromatográfus, 2016, vol. majus, p. 8–10.

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:86000>

KROMATOGRÁFUS

kromatográfiai folyóirat



Korszerű méretkizárásos kromatográfia: fehérje aggregátumok elválasztása

Fekete Szabolcs¹, Fekete Jenő², Guillaume Davy¹

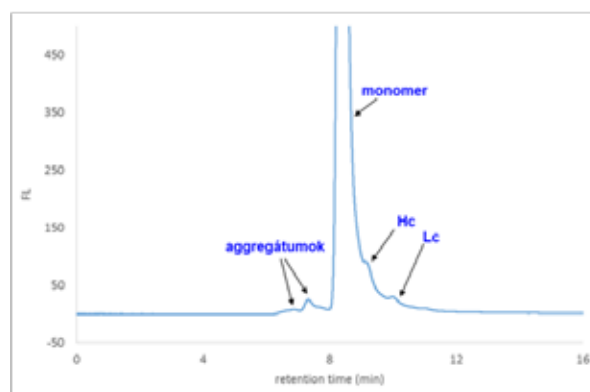
¹ Genfi Egyetem, Gyógyszerészeti Tudományok Tanszék, 1211 Geneva, Boulevard d'Yvoy 20.

³BME Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, 1111 Budapest, Szent Gellért tér 4.

A méretkizárásos kromatográfia (SEC, az angol „size exclusion chromatography” megnevezés alapján) széles körben alkalmazott a terápiás fehérjék aggregátumainak meghatározására. Régebben használták a gélszűrés (gel filtration) elnevezést, amelynél a gravitáció volt a folyadékáramlást biztosító erő. Nagy előnye ennek a kromatográfias módnak, hogy enyhe körülményeket használ (vizes mozgófázis, környezeti hőmérséklet, viszonylag kis nyomás, fiziológiás körüli mozgófázis pH) ezért a fehérjéket a természetes konformációs szerkezetüket megtartva tudjuk elválasztani. Az utóbbi években - a többi kromatográfias módhoz hasonlóan - a méretkizárásban is megjelentek a kis szemcse-méretű töltetek és a korábbihoz képest rövidebb és kisebb átmérőjű kolonnák. Ma már a méretkizárásos kromatográfiánál is megkülönböztethetjük a hagyományos (konvencionális, HP-SEC) és az ultranagy-nyomású (UHP-SEC) módokat [1].

Méretkizárásos kromatográfiában, a makromolekulákat az un. hidrodinamikai átmérőjük alapján választjuk el. Az állófázis jól kontrolált pórus-méretű és eloszlású szemcsés töltetből áll, sokszor olyan felületi módosítást alkalmazva, hogy a felülettel lehetőleg ne (vagy csak kis mértékben) alakuljon ki kölcsönhatás. Ez alapvető ahhoz, hogy a makromolekulák elválasztását az oldatban felvett méretük szabja meg. Ha a termodinamika technikus terminusait használjuk, akkor azt mondjuk, hogy az elválasztást az entrópia szabja meg. A folyadékkromatográfiában kis molekulatömegű anyagok elválasztásánál a visszatartás és az elválasztás alapja a komponensek eltérő kölcsönhatása az állófázissal, ugyanez vonatkozik a biopolimerekre is, ha fordított fázisú, ioncserés vagy hidrofób kölcsönhatású kromatográfias módszert használunk. A méretkizárásnál nem beszélhetünk erről - az eltérő kölcsönhatásokon alapuló megoszlásról -, hanem inkább szűrésről, ahol a szűrőágy a szemcsés töltetből áll, és a szemcsék eltérő átmérőjű pórusokat tartalmaznak. A gyakorlatban, sajnos az állófázissal való kölcsönhatást nem minden esetben tudjuk kizárni. Felléphet hidrofób, ioncserés, vagy ionkizárásos kölcsönhatás, amelyek befolyásolják a komponensünk elúciós idejét is és a csúcsalakját

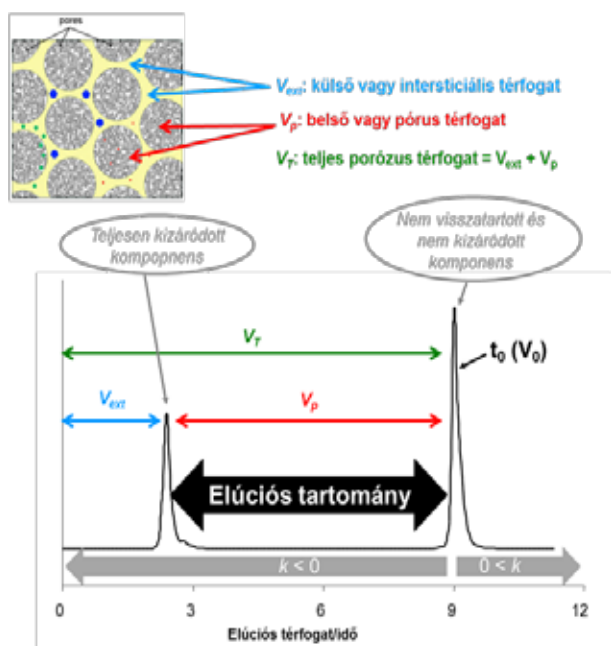
vagy szélességét. A gyakorlati elválasztások során arra törekszünk, hogy ezeket a kölcsönhatásokat csökkentjük (pl. a mozgófázis pH helyes megválasztásával, só vagy kis mennyiségű szerves oldószert hozzáadásával). Ha sikerül ezeket a kölcsönhatásokat kiküszöbölni, akkor a kisebb molekulák több időt fognak eltölteni a pórusokban, míg a nagyobbak kevesebbet, hiszen csak a pórusok egy részébe tudnak bediffundálni, kizáródnak onnan és így gyorsabban haladnak a mozgófázissal. Tehát a nagyobb molekulák hamarabb, a kisebbek később eluálódnak. Az 1. ábrán példát mutatunk be egy terápiás fúziós-fehérje aggregátumainak illetve nehéz- (Hc) és könnyű-lánc (Lc) fragmensének elválasztására. Az elválasztást egy 300 x 4,6 mm-es (3 µm szemcseátmérőjű és 290 Å pórusátmérőjű) kolonnán végeztük.



1. ábra: Terápiás fúziós-fehérje aggregátumainak és fragmensének elválasztása hagyományos 300 x 46 mm kolonnán

A másik lényeges különbség az eltérő kölcsönhatáson alapuló folyadékkromatográfias és a méretkizárásos kromatográfia között, hogy az utóbbi módszernél a maximális elúciós térfogat megegyezik a pórustérfogat és a szemcsék közötti térfogat összegével. Ez, az eltérő kölcsönhatáson alapuló kromatográfias módszereknél megadja a holtterefogatot. Érdemes átgondolni, hogy ebben a kromatográfias módban a komponenseink elúciós ideje kisebb lesz a hagyományos értelemben vett holtidőnél ($t_e < t_0$). A 2. ábrán szemléltetjük az un. belső-, külső- és teljes pórustérfogat (porozitás) szerepét a méretkizárásos elválasztásra. Teljes kizáródásnál a makromolekula minden pórusból kizáródik és a mozgófázissal együtt a szemcsék közötti térfogatban áramlik. Ez lesz a hasznos elúciós tartomány kezdetét meghatározó elúciós idő vagy térfogat (méretkizárásos kromatográfiában gyakran adjuk meg az elúciót térfogatban). A belső porozitás pedig meghatározza azt a molekulaméretet ami még teljes mértékben bejut a belső pórusokba, ez lesz a hasznos elúciós tartomány végpontja. Tehát a hasznos elúciós tartományt a belső- (pórustérfogat) és külső- (szemcsék közötti térfogat) porozitás viszonya határozza meg. Hasonlóan a visszatartásos (szorptív) kromatográfias módokhoz, a méretkizárásban is gyakran használják a „retenciós” tényezőt, persze itt mást értünk rajta. Gyakran k^* -gal jelölik és a következő

formában írható fel: $k^* = (V_e - V_{ext}) / V_{ext}$. Könnyen belátható, hogy k^* -nak van egy maximum értéke, $k^*_{max} = V_p / V_{ext}$. Korszerű kolonnákkal ez a maximum érték általában $k^* \sim 2$ adódik. Annak, hogy nem visszatartott komponenseket választunk el, egy másik következménye is van, nevezetesen a kromatográfiás csúcs szélesedése. A csúcsvarianciát meghatározza a visszatartás. Mivel itt a klasszikus visszatartás (k) zéró, ezért rendkívül keskeny csúcsok várhatók amelyeket nagyban befolyásolhat a készülék oszlopon kívüli térfogataiban lejátszódó zónaszélesedés.



2. ábra: Elúciós tartomány értelmezése a méretkizárásos kromatográfiában: külső és belső porozitás szerepe

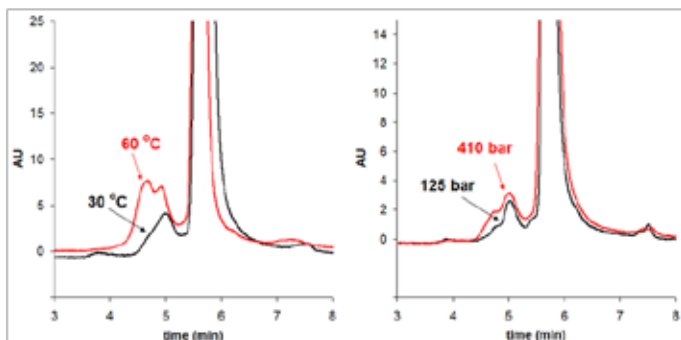
Azt is fontos megemlíteni, hogy a töltet átlagos pórusmérete és pórusméret eloszlása pedig meghatározza azt a molekulaméretet (tömeget), amelyeket megfelelően el lehet választani. Például kisebb fehérjék (15-80 kDa) elválasztására jól beváltak a 150 - 200 Å pórusméretű töltetek, nagyobb antitestek és aggregátumainak (145 - 450 kDa) elválasztására pedig a 250 - 300 Å pórusúak.

A hagyományos SEC elválasztásokat nagy térfogatú kolonnákkal végezzük, melyek leggyakrabban 300 mm hosszúságúak és 6 - 8 mm átmérőjűek. A nagy kolonna-térfogatra a már említett okok miatt van szükség, nevezetesen, hogy megfelelő pórustérfogat álljon rendelkezésre az elválasztáshoz. Ennek megfelelően a hagyományos SEC mérések analízis ideje a 25-50 perces tartományba esik. Az elválasztás gyorsításának legegyszerűbb módja a kolonna méret csökkentése és/vagy a mozgófázis térfogat-áramának növelése. Ezt többször kihasználták már méretkizárásban, elsősorban szintetikus polimerek elválasztásakor [2,3]. Meg kell jegyeznünk, hogy a kolonnahossz csökkentéssel arányosan csökken az elérhető tányérszám is. Ezért viszont egyszerre hatékony és gyors elválasztást nem tudunk végezni - ha csak a kolonna méretét csökkentjük.

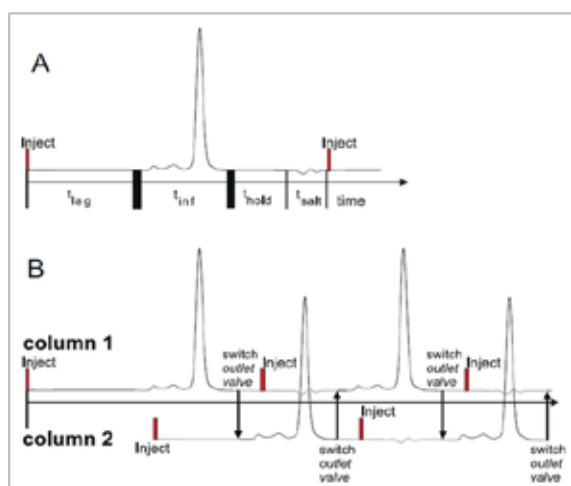
A kinetikai hatékonyság növelésére is szükség van, amit például a hőmérséklet növelésével lehet elérni.

A megnövelt hőmérséklet azért is előnyös a méretkizárásos kromatográfiában, mert a mozgófázis viszkozitása csökken, ennek megfelelően csökken a nyomásesés is, s a térfogatáramlási sebesség növelhető. Park és kollégái mutattak be először 110 °C-os mozgófázissal végzett gyors SEC méréseket [4]. A szemcseméret csökkentése is jó lehetőséget ad arra, hogy egy rövid kolonnával is megfelelő tányérszámot tudjunk elérni. A hagyományos SEC kolonnák szemcsemérete az 5 - 10 µm-es tartományba esik. Néhány évvel ezelőtt méretkizárásban is megjelentek az apró szemcsés töltetek, először 2,5 majd 1,7 µm-es szemcseátmérővel (Waters BEH), nemsokkal később pedig 3 µm-es töltetek követték őket (Phenomenex Yarra). 2016-ban már több gyártó is kereskedelmi forgalomba bocsátotta az UHP-SEC kolonnáit (Agilent AdvanceBio 3 µm, Tosoh UP-SW3000 2 µm és Phenomenex Yarra 1,8 µm). Ezek az UHP-SEC kolonnák a korábbi 300 mm x 6 mm helyett már 150 x 4,6 mm-es dimenzióval kerülnek kereskedelmi forgalomba. Ezekkel a kolonnákkal az analízis idő 5 perc alá is csökkenthető [5,6]. Azt azonban nem szabad elfelejtenünk, hogy kis szemcsés töltetekkel dolgozva, az ár amit fizetnünk kell az mindig a megnövekedett nyomás. Ezekkel az UHP-SEC kolonnákkal gyakran dolgozunk 200 bar felett, de akár 500-600 bar nyomáson is. Sajnos ilyen körülmények között a nyomás- és hőérzékeny fehérjék, a fellépő nyíróerők és súrlódásból eredő hőmérséklet-gradiensek miatt bizony aggregálódhatnak az elválasztás során [5]. Ennek az lesz a következménye, hogy nem a valós - mintában jelenlevő - aggregátum mennyiséget fogjuk mérni, hanem az általunk „mesterségesen” előállítottat. Ez nem minden fehérjére igaz, de bizonyos monoklonális antitest családok hajlamosak nyomás indukált aggregációra. A nagy nyomáson létrejövő fehérje asszociáció és aggregáció jól ismert jelenség [7,8,9]. Tehát UHP-SEC kolonnákkal dolgozva - ha azokat fehérje aggregáció meghatározásra alkalmazzuk - mindig érdemes olyan körülményeket választani, hogy az oszlopon létrejövő nyomás ne legyen túl nagy (pl. $\Delta p < 200$ bar). A 3. ábrán példát mutatunk be monoklonális antitest kolonnán létrejövő hőmérséklet- (A) és nyomás-indukált (B) aggregációjára. Az ábrán a 4-5 perc közötti elúciós tartományban figyelhetjük meg az aggregátumokat. Gyakran fordul elő az is, hogy ha ugyanazt a fehérje mintát megmérjük hagyományos (HP-SEC) és UHP-SEC körülmények között, bizony más-más aggregátum mennyiséget mérünk.

További lehetőség az elválasztás gyorsítására, hogy nem egy, hanem kettő kolonnán dolgozunk amiket párhuzamosan üzemeltetünk. Még jobban járunk, ha a két kolonnán az injektálásokat idejét „összefonjuk” (parallel interlaced SEC), nem várjuk meg amíg a számunkra érdektelen elúciós tartomány (pl. a monomer csúcsot követő tartomány) végig fut, hanem már előtte injektáljuk a következő mintát a másik oszlopra [10]. A 4. ábrán ilyen „párhuzamosan-összefonott” SEC elválasztással kapott kromatogramokat mutatunk be. Ma már az ilyen elválasztás technikai háttere (szelepek, oszlop váltók vezérlése), rutinban is rendelkezésre áll.



3. ábra: Hőmérséklet (A) és nyomás (B) okozta oszlopon létrejövő aggregátumok UHP-SEC elválasztás során



4. ábra: „Párhuzamosan összefon” (parallel interlaced) SEC elválasztással kapott kromatogram

A kis mennyiségben rendelkezésre álló fehérje mintákból történő aggregáció-meghatározás érzékenységének növelésére a kapilláris kolonnák alkalmazása is jó lehetőség. Ekkor az oszlopon kívüli térfogatok szerepe jelentős, nagyban ronthatják az elválasztás hatékonyságát. Feltehetőleg ezért sem terjedt még el a kapilláris SEC kromatográfia. Néhány alkalmazást azonban már közöltek, amelyekből említésre méltó az antitestek fragmenseinek elválasztása amit 300 mm x 300 μ m kolonnán végeztek [11,12].

Végül meg kell említenünk, hogy a gyakorlatban a SEC kolonnák élettartama elmarad a más típusú (pl. RP, IEX, HIC) kolonnák élettartamától. Tovább bonyolítja a dolgot, hogy a SEC kolonnák messze a legdrágábbak az összes más típusú kolonnhoz képest. A kolonnák élettartamát valószínűleg a terápiás fehérje oldatokban lévő segédanyagok (poliszorbátok, sók, PEG) is csökkentik. Érdemes előtét kolonnát alkalmazni és rendszeresen mosni, regenerálni az oszlopot. Az irodalomban számos SEC kolonna tisztítási protokoll áll rendelkezésünkre (pl. 10-20% szerves oldószer adása a mozgófázisba ami segíthet a megkötődött hidrofób komponensek eltávolításában, vagy nátrium-azid hozzáadása ami a bakteriális szennyeződések eltávolítására alkalmas).

Felhasznált irodalom

- [1] Sz. Fekete, A. Beck, J.L. Veuthey, D. Guillaume, Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 101 (2014) 161-173.
- [2] H. Pasch, P. Kilz, Fast liquid chromatography for high-throughput screening of polymers, *Macromol. Rapid Commun.* 24 (2003) 104-108.
- [3] S.T. Popovici, P.J. Schoenmakers, Fast size-exclusion chromatography – theoretical and practical considerations, *J. Chromatogr. A* 1099 (2005) 92-102.
- [4] S. Park, H. Cho, Y. Kim, S. Ahn, T. Chang, Fast size exclusion chromatography at high temperature, *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 96-100.
- [5] Sz. Fekete, K. Ganzler, D. Guillaume, Critical evaluation of fast size exclusion chromatographic separations of protein aggregates, applying sub-2 μ m particles, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 78-79 (2013) 141-149.
- [6] S. M. Koza, P. Hong, K.J. Fountain, Advantages of ultra performance liquid chromatography using 125 Å pore size, sub-2 μ m particles for the analysis of peptides and small proteins, poster presented at Medimmune 2012, Rockville, MD.
- [7] T.W. Randolph, M. Seefeldt, J.F. Carpenter, High hydrostatic pressure as a tool to study protein aggregation and amyloidosis, *Biochim. Biophys. Acta* 1595 (2002) 224-234.
- [8] N. Rivalain, J. Roquain, G. Demazeau, Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies, *Biotech. Adv.* 28 (2010) 659-672.
- [9] V.L. Pellerin, C. Balny, High pressure as a tool to study some proteins properties: conformational modification, activity and oligomeric dissociation, *Inn. Food Sci. Emerg. Tech.* 3 (2002) 209-221.
- [10] D. Farnan, G. Moreno, J. Stults, A. Becker, G. Tremintin, M. van Gils, Interlaced size exclusion liquid chromatography of monoclonal antibodies, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8904-8909.
- [11] J.C. Rea, Y. Lou, J. Cuzzi, Y. Hu, I. Jong, Y.J. Wang, D. Farnan, Development of capillary size exclusion chromatography for the analysis of monoclonal antibody fragments extracted from human vitreous humor, *J. Chromatogr. A*, 1270 (2012) 111-117.
- [12] J.C. Rea, G.T. Moreno, L. Vampola, Y. Lou, B. Haan, G. Tremintin, L. Simmons, A. Nava, Y. J. Wang, D. Farnan, Capillary size exclusion chromatography with picogram sensitivity for analysis of monoclonal antibodies purified from harvested cell culture fluid, *J. Chromatogr. A*, 1219 (2012) 140-146.