WYSOKOPRZEPUSTOWA METODA DO DETEKCJI EFEKTÓW DESTABILIZACI STRUKTURALNEJ PRZECIWCIAŁ MONOKLONALNYCH ZAADSORBOWANYCH NA FAZIE STACJONARNEJ W CHROMATOGRAFII PREPARATYWNEJ

Artur Stańczak[1,3], Krystian Baran[2]

[1]*Zakład Biofarmacji i Farmakokinetyki, Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny*
[2]*Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Wydział Chemiczny, Politechnika Rzeszowska*
[3] *Polpharma Biologics, Gdańsk*

W czasie prac rozwojowych w Polpharma Biologics zaobserwowaliśmy zwiększone straty produktu na etapie preparatywnej chromatografii jonowymiennej. Rozwinięta została szybka metoda pozwalająca ocenić stabilność przeciwciał monoklonalnych (mAb) zaadsorbowanych na złożach kationonowymiennych. Metoda ta wykorzystuje szeroko dostępne w laboratoriach urządzenie do RT-PCR i znacznik fluorescencyjny Orange Sypro. Zastosowanie wyżej wymienionego urządzenia i znacznika pozwoliło przy użyciu techniki spektroskopii fluorescencyjnej określić tak zwaną temperaturę topnienia. Zmiany w temperaturach topnienia zostały zbadane dla różnych warunków adsorpcyjnych i powiązane ze stabilnością białka podczas adsorpcji. Metoda została przetestowana dla dwóch mAbs i kilku złóż kationowymiennych w różnych warunkach pH i stężenia mAb. Badania wykazały, że przeciwciała monoklonalne ulegają destabilizacji w czasie adsorpcji z powodu silnych oddziaływań, co objawia się zwiększoną agregacją i obniżeniem odzysku. Zaobserwowany fenomen zależy od konkretnego złoża i warunków wiązania. Niezależnie od powyższych, obniżenie temperatury topnienia poniżej krytycznej wartości (około 30°C) może stanowić wskaźnik bardzo silnych zmian w strukturze mAb w czasie związania do fazy stacjonarnej. Z uwagi na wysoką przepustowość metodymoże ona być wykorzystywana do badań przesiewowych złóż chromatograficznych i warunków wiązania badanego mAb. Pozwoli to na odrzucenie złóż i warunków, które prowadzą do destabilizacji przeciwciał w czasie adsorpcji a co za tym idzie zwiększoną agregacją i stratami produktu.

PIŚMIENNICTWO:

[1] A.M.-B. Staby, „*Comparison of chromatographic ion-exchange resins - IV. Strong and weak cation-exchange resins and heparin resins*", J. Chromatogr. A 1069 (2005) 65–77 .
[2] M. Gospodarek, "*Unfolding of a model protein on ion exchange and mixed mode chromatography surfaces*", J. Chro- matogr. A. 1355 (2014) 238–252 .
[3] R. Gillespie, "*Cation exchange surface mediated denaturation of an aglycosylated immunoglobulin (IgG1)*", J. Chromatogr. A. 1251 (2012) 101–110 .
[4] H. Luo, "*Effects of salt-induced reversible self-association on the elution behavior of a mono- clonal antibody in cation exchange chromatography"*, J. Chromatogr. A 1362 (2014) 186–193 .
[5] H. Luo, "*Double-peak elution profile of a monoclonal antibody in cation exchange chromatography is caused by histidine-protonation-based charge variants*", J. Chromatogr. A 1424 (2015) 92–101 .
[6] J. Guo, "*Unfolding and aggregation of a glycosylated monoclonal antibody on a cation exchange column - part I. Chromatographic elution and batch adsorption behawior*", J. Chromatogr. A. 1356 (2014) 117–128 .
[7] J. Guo, G. Carta , "*Unfolding and aggregation of monoclonal antibodies on cation exchange columns: effects of resin type, load buffer, and protein stability*", J. Chromatogr. A. 1388 (2015) 184–194 .

kontakt: artur.stanczak@gumed.edu.pl; artur.stanczak@polpharmabiologics.com