

Leitfaden zur Entwicklung von Size Exclusion Chromatography - Methoden für die Bestimmung von Aggregaten in peptidischen Wirkstoffen

Mindach Michèle

Bachelor-Thesis, Molecular Life Sciences, Vertiefungsrichtung Chemie

Bachem AG, Hauptstrasse 144, 4416 Bubendorf, Betreuung: S. Rihm und Dr. S. Ferrari
Experte: Dr. Markus Ehrat, EK Biosciences GmbH, Im Brüel 6, 4312 Magden
Begleitdozent: Prof. Dr. Götz Schlotterbeck, Dozent für Analytische Chemie, Fachhochschule Nordwestschweiz, Hochschule für Life Sciences

ZUSAMMENFASSUNG

Das Erstellen eines allgemeinen Leitfadens zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Aggregaten in synthetisch hergestellten Peptiden war das Ziel dieser Bachelor-Thesis. Dazu sind eine ausführliche Literaturrecherche und insgesamt 14 verschiedene Experimente durchgeführt worden. Die Entwicklung des Leitfadens und die Durchführung der Experimente wurden anhand von Modellpeptiden durchgeführt.

Als Resultat entstand ein Fließdiagramm, welches ein mögliches Vorgehen für die Entwicklung von Size Exclusion Chromatography (SEC) - Methoden aufzeigt. Im erstellten Leitfaden wurden alle Punkte dieses Fließdiagramms kurz und prägnant diskutiert. Zukünftige Methoden können so zielorientiert, effizient und strukturiert entwickelt werden.

EINLEITUNG

Peptide können durch Temperaturerhöhung, mechanischen Stress oder durch organische Lösemittel denaturiert werden und Aggregate bilden. Aggregate sind Zusammenlagerungen von Einzelbausteinen, sogenannten Monomeren. Eine in der Aggregationsanalytik wichtige Methode ist die SEC. Diese Methode kann Auskunft bezüglich der Aggregatmenge wie auch der Aggregatsgrösse geben. Durch Verwendung wässriger Eluenten können Peptide und Proteine in ihrer nativen Struktur untersucht werden [1-3].

In der Firma Bachem AG werden peptidische Wirkstoffe sowohl durch Festphasensynthese (SPPS) wie auch durch Lösungssynthese hergestellt. Bei der Aufreinigung und Isolierung der synthetisierten Peptide können unerwünschte Aggregate auftreten, welche durch SEC nachzuweisen sind.

Für das Standardisieren des Vorgehens bei Methodenentwicklungen im Bereich der SEC sind allgemeine Betrachtungen nötig. Das Ziel der Entwicklung ist eine Methode, welche die Aggregate von der Hauptkomponente abtrennt und die Aggregate qualitativ sowie quantitativ bestimmen kann. Diese allgemeinen Untersuchungen werden im Rahmen dieser Bachelor-Arbeit durchgeführt. Dazu werden zwei für Aggregation bekannte Modellpeptide verwendet, bei denen Aggregate isoliert bzw. synthetisiert werden konnten. Peptid 1 liegt in Lösung als Oligomer vor und bildet unter Stressbedingungen weitere, grössere Aggregate. Bei Peptid 2 können im ungestressten Zustand Dimere (D) und in gestressten Proben Tetramere (T) nachgewiesen werden.

RESULTATE

Bei der Durchführung der Experimente konnten verschiedene Parameter untersucht und ihr Einfluss quantifiziert werden. Als besonders wichtig stellten sich die Pufferkonzentration, die Wahl der Additive in der mobilen Phase und die stationäre Phase für die Methodenentwicklung heraus.

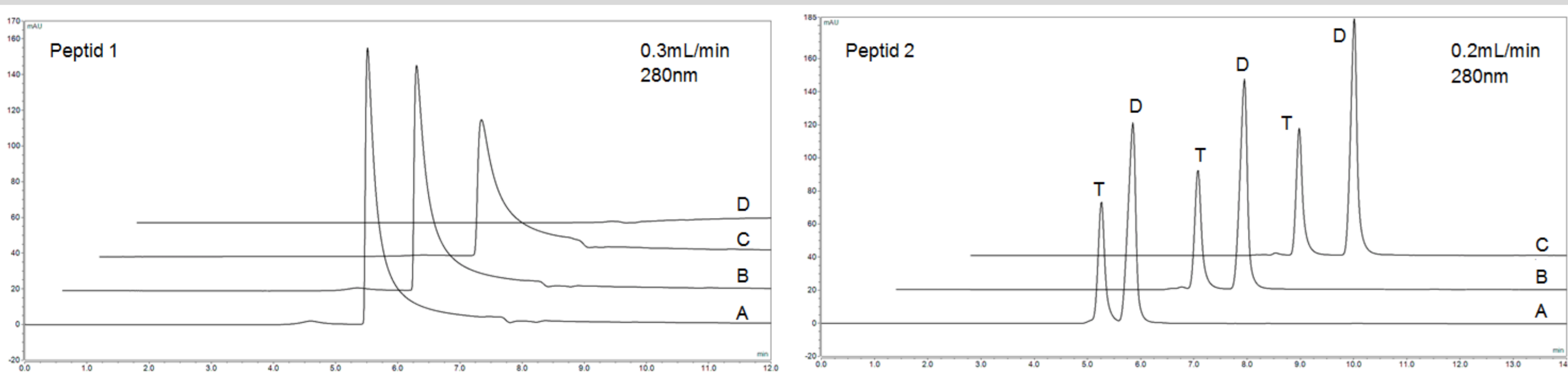


Abb. 1: Einfluss der Pufferkonzentration; Peptid 1, Puffer: Na_2HPO_4 + 0.2M Lys pH 9, A = 0.05M Puffer, B = 0.1M Puffer, C = 0.2M Puffer, D = 0.3M Puffer; Peptid 2, Eluent: Gly-HCl pH 3, A = 0.05M Eluent, B = 0.1M Eluent, C = 0.4M Eluent

In Abb. 1 können die Einflüsse der Pufferkonzentration beobachtet werden. Je nach Eigenschaft des Peptids werden andere Pufferkonzentrationen gewählt. Falls das Peptid keine grossen hydrophoben Reste trägt, können hohe Pufferkonzentrationen zu einer Verbesserung der Auflösung führen (Abb. 1, Peptid 2), während bei Peptiden mit lipophilen Eigenschaften eine Erhöhung der Pufferkonzentration verstärkt zu hydrophoben Wechselwirkungen führt und das Peptid nicht mehr von der stationären Phase eluiert (Abb. 1, Peptid 1).

Bei der Wahl der Additive zeigte sich, dass Aminosäuren wie z.B. Arginin und

Lysin die besten Eigenschaften besitzen, um im hohen pH-Bereich unerwünschte Wechselwirkungen zwischen der stationären Phase und dem Peptid zu unterdrücken. In Abb. 2 kann der Einfluss der Additive beobachtet werden.

Für die Auswahl der stationären Phase ist die Porengrösse entscheidend. Dieser Parameter beeinflusst den dynamischen Bereich und somit die Trennung. Es ist wichtig zu wissen, in welchem Massebereich das Peptid und seine Aggregate erwartet werden, um die richtige Porengrösse abzuschätzen. So zeigt Säule A in Abb. 3 einen grösseren dynamischen Bereich zwischen Peak 4 und 5 als Säule B.

Alle Ergebnisse wurden zusammengetragen und ein mögliches Vorgehen in einem Fließdiagramm dargestellt.

Im erstellten Leitfaden wurden alle Punkte des Fließdiagramms diskutiert und mit den Resultaten unterstrichen. So kann eine Entwicklung zielgerichtet und strukturiert durchgeführt werden.

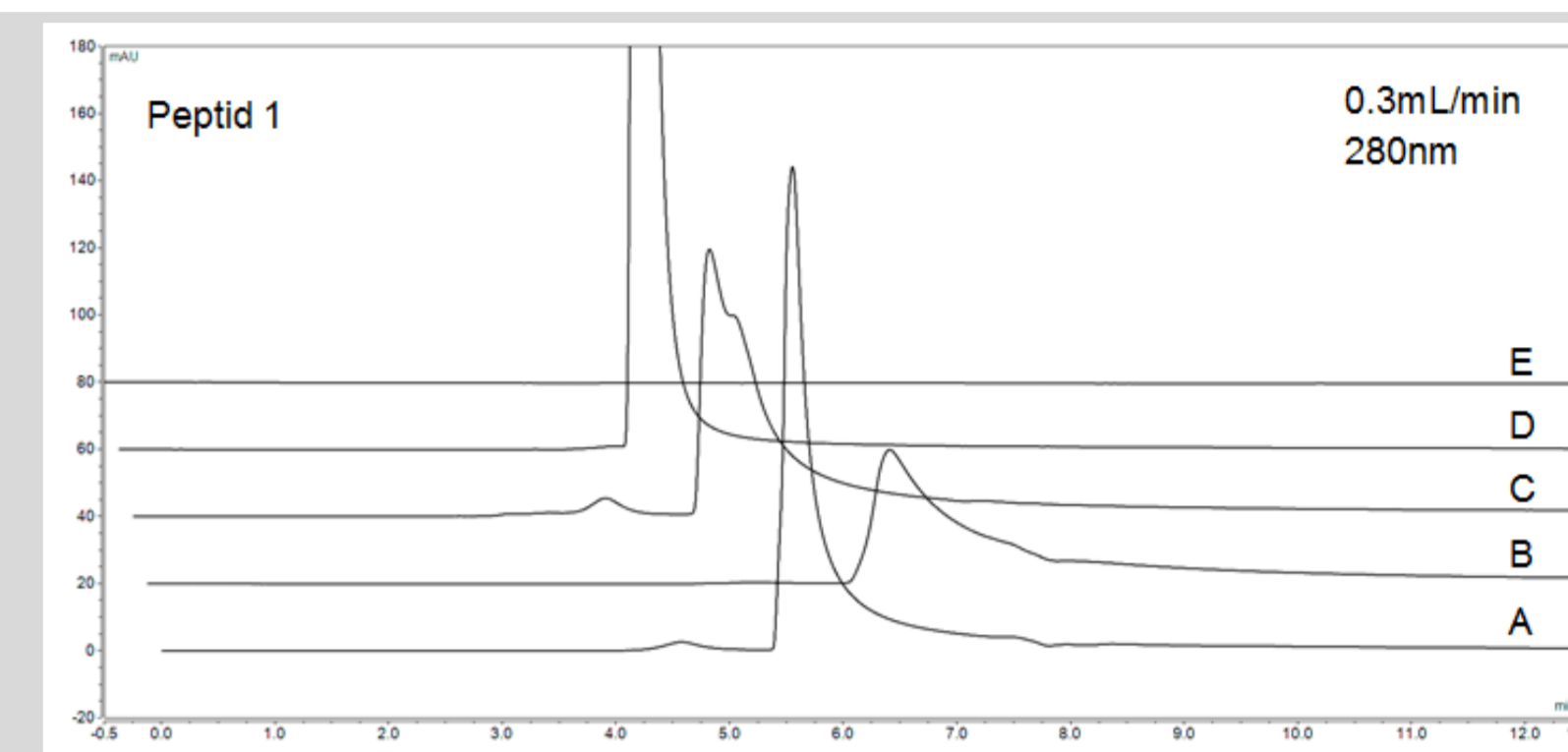


Abb. 2: Einfluss der Additive auf die Elution von Peptid 1; Eluent: 0.05M Na_2HPO_4 A = mit 0.2M Lys, B = 0.3M NaCl, C = 0.3M Sucrose, D = 0.1M Arg, E = ohne Additiv

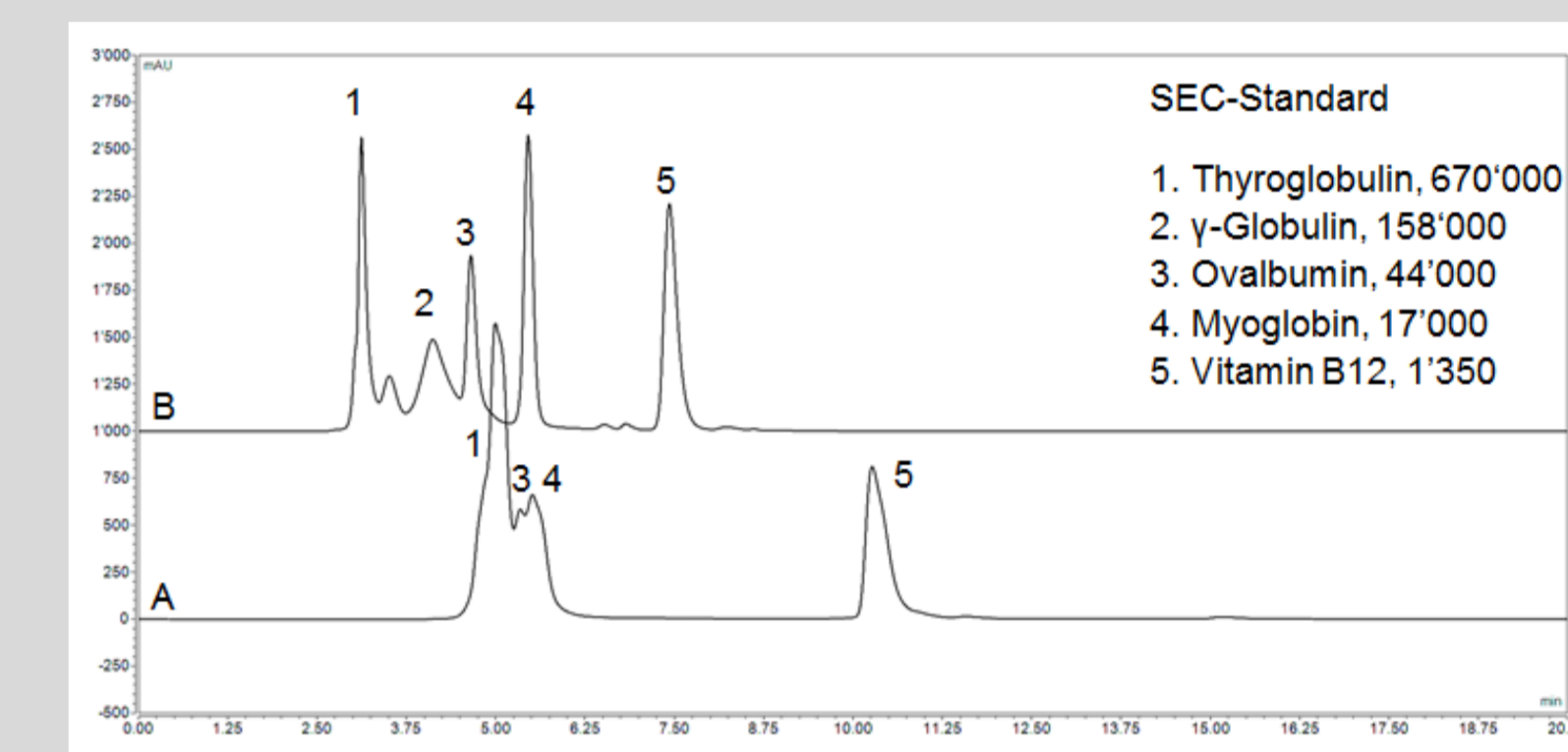


Abb. 3: Einfluss der Porengrösse auf den dynamischen Bereich; Waters Acquity Protein UPLC BEH SEC, A = 125Å, B = 250Å

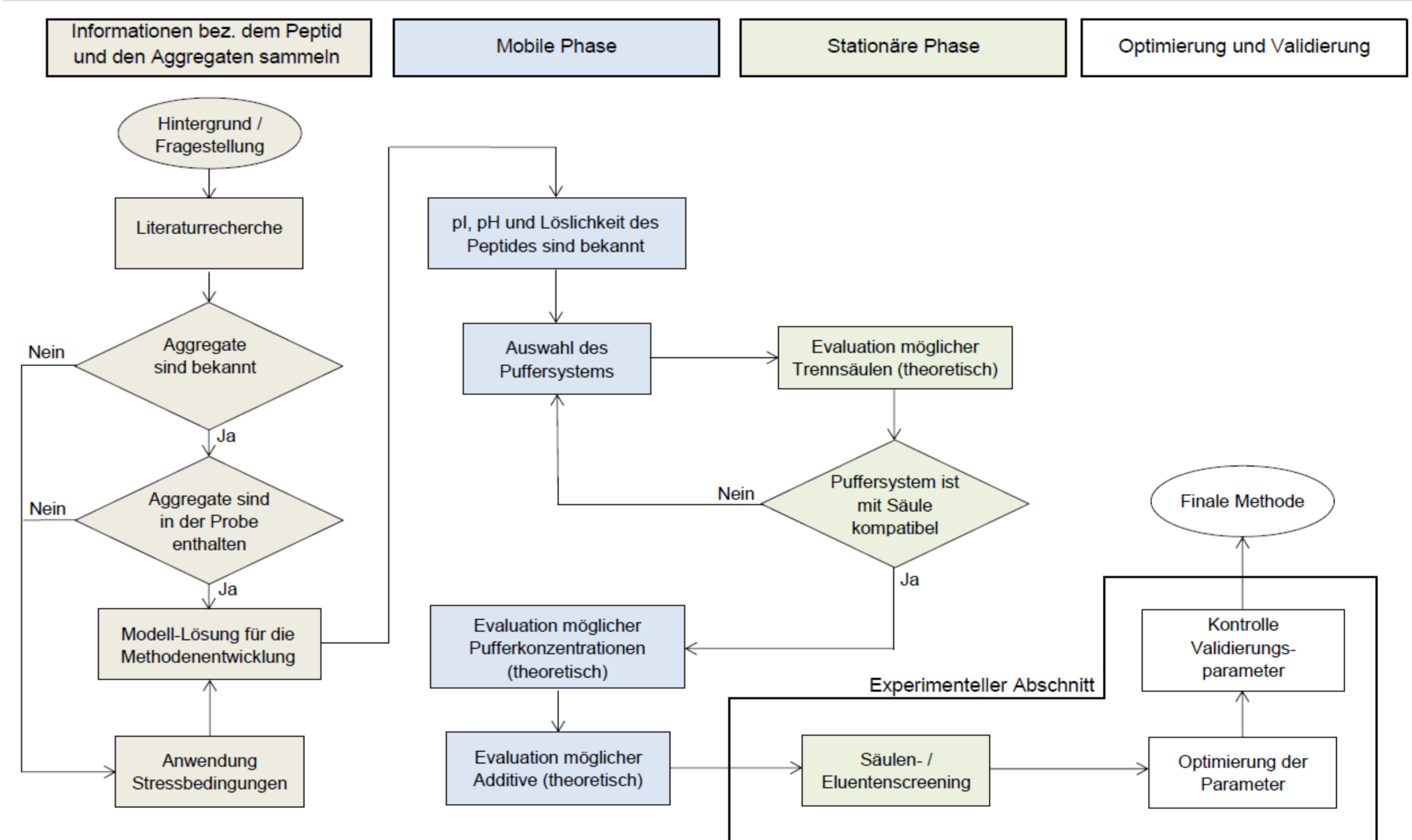


Abb. 4: Fließdiagramm für die Entwicklung von SEC-Methoden

SCHLUSSFOLGERUNG

Es konnte erfolgreich ein Leitfaden zur SEC-Methodenentwicklung erstellt werden. Dabei wurde ein Fließdiagramm erarbeitet, welches ein strukturiertes und zielorientiertes Vorgehen ermöglicht. Weiter wurden die einzelnen Punkte des Fließdiagramms mit Literatur diskutiert und durch Experimente unterlegt. Mit Hilfe des Konzepts können zukünftig SEC Methodenentwicklungen zielgerichtet und unter Beachtung der wichtigsten Parametern durchgeführt werden.

REFERENZEN

- [1] Manfred H. Gey (2013): Instrumentelle Bioanalytik. Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen, Vieweg + Teubner Verlag
- [2] Wang, W.; Roberts, C. J. (Hg.) (2010): Aggregation of Therapeutic Proteins. Hoboken, NJ, USA, John Wiley & Sons, Inc
- [3] Chi, E.; Krishnan, S.; Randolph, T.; Carpenter, J. (2003): Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation. *Pharmaceutical Research* 20(9), S. 1325-1336