

# Analyse des protéines pégylées grâce aux colonnes Agilent AdvanceBio SEC

## Note d'application

Biopharmaceutique

### Auteur

M.Sundaram Palaniswamy  
Agilent Technologies, Ltd  
Inde

### Résumé

La pegylation des protéines thérapeutiques a considérablement augmenté leur intérêt en modifiant leurs propriétés physicochimiques et biologiques, en leur procurant notamment une solubilité accrue, une immunogénicité réduite, une demi-vie plus longue et une protection contre les protéases. La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) représente la méthode de choix pour identifier les impuretés de masse moléculaire supérieure à celle des protéines pégylées. La SEC des protéines pégylées constitue un réel défi en raison de l'interaction des groupements PEG avec les phases stationnaires de silice qui réduit le rendement, détériore la forme des pics et provoque des traînées de pic. Cette note d'application décrit une méthode SEC simple et sensible pour déterminer la pureté du facteur stimulant les colonies de granulocytes modifié par PEG (PEG-GCSF). La séparation et la quantification du PEG-GCSF ont été réalisées à l'aide d'une colonne Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm avec une phase mobile aqueuse. Un excellent coefficient de corrélation de linéarité a été obtenu dans la plage allant de 12,5 à 2 000 µg/mL, indiquant que la méthode était quantitative. Le temps de rétention et la précision des surfaces obtenus se sont avérés excellents et ont montré l'adéquation de la méthode utilisée. De plus, la colonne AdvanceBio SEC a réussi à séparer et quantifier des agrégats obtenus à partir d'études de stress forcé.



Agilent Technologies

## Introduction

La pegylation est le processus consistant à fixer de façon covalente des chaînes de polyéthylène glycol (PEG) sur une autre molécule, généralement un médicament ou une protéine thérapeutique. La pegylation est habituellement réalisée par incubation d'un dérivé réactif du PEG avec la macromolécule cible. La fraction PEG offre de nombreux avantages, notamment en améliorant la stabilité de la protéine et en rallongeant sa demi-vie de circulation dans l'organisme. Le PEG a été reconnu de manière générale comme sans danger par la Food and Drug Administration (FDA) [1]. Des produits péglés ont déjà été homologués par la FDA. Le facteur stimulant les colonies de granulocytes modifié par PEG (PEG-GCSF) est une forme à action prolongée de GCSF recombinant. Il est constitué d'un GCSF contenant une molécule de PEG de 20 KDa liée de façon covalente au résidu méthionine N-terminal. Le GCSF est une protéine comportant 175 acides aminés et présentant une masse moléculaire de 18 800 daltons. Le PEG-GCSF possède une masse moléculaire totale de 39 KDa. Selon la version préliminaire modifiée de la monographie, la méthode recommande d'utiliser une HPLC de chromatographie d'exclusion stérique (SEC) pour déterminer la pureté et les agrégats [2]. La plupart des méthodes publiées dans la littérature sur le PEG-GCSF utilisent des phases mobiles aqueuses contenant 100 mM de NaCl, 85 % d'acide orthophosphorique et jusqu'à 10 % d'éthanol, pour prévenir les interactions non spécifiques et améliorer la forme et la résolution des pics [3]. L'adsorption non idéale des protéines thérapeutiques constitue un réel problème lors d'une SEC, car les agrégats ont parfois davantage tendance à se lier à la phase stationnaire que la forme native. En raison de ce type de liaison préférentiel, l'analyse SEC des agrégats manque de précision et comporte un risque de ne pas détecter les agrégats. Les phases mobiles contenant des solvants organiques ou des pH extrêmes ont été utilisées pour résoudre ce problème et ont montré une amélioration de la résolution et du rendement. Cependant, outre l'éventuelle dissociation des agrégats réversibles, elles peuvent également dissocier les agrégats de façon irréversible qui sont présents dans la formulation tamponnée [4].

Nous présentons ici les avantages de la colonne Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm, une véritable percée technologique dans l'analyse par chromatographie d'exclusion stérique. Ces colonnes contiennent des particules de silice innovantes et une chimie de greffage hydrophile unique qui offrent une résolution et des séparations stériques sur une large gamme de types d'échantillons, sans avoir besoin d'ajouter d'agent modificateur organique à la phase mobile.

## Équipements et méthodes

### Instruments

Un système de LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity entièrement biocompatible avec une pression maximale de 600 bars, comprenant les modules suivants, a été utilisé :

- Pompe de LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity (p/n G5611A)
- Échantillonner automatique bio-inerte à haute performance Agilent 1260 Infinity (p/n G5667A)
- Thermostat pour série Agilent 1200 Infinity (p/n G1330B)
- Compartiment à colonne thermostaté Agilent 1260 Infinity contenant des éléments de chauffage bio-inertes à clipser (p/n G1316C, option 19)
- DéTECTEUR à barrette de diodes DAD VL Agilent 1260 Infinity (p/n G1315D avec cellule standard bio-inerte, 10 mm)
- Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, garnie de particules de 2,7 µm, (p/n PL1180-5350)

### Logiciel

Agilent ChemStation B.04.03 (ou plus récent)

### Paramètres de la SEC

Le Tableau 1 présente les paramètres chromatographiques de la SEC utilisés sur un système de LC bio-inerte 1260 d'Agilent.

Tableau 1. Paramètres chromatographiques utilisés pour la HPLC SEC.

| Paramètre             | Conditions                                |
|-----------------------|---|
| Phase mobile :        | tampon phosphate de sodium 150 mM, pH 6,8 |
| Température CCT :     | ambiante                                  |
| Analyse isocratique : | phase mobile A                            |
| Volume d'injection :  | 10 µL                                     |
| Débit :               | 0,8 mL/min                                |
| Détection UV :        | 214 et 280 nm                             |

## Réactifs, échantillons et matériel

Le PEG-GCSF, disponible dans le commerce, a été acheté auprès d'une pharmacie de quartier et stocké conformément aux instructions du fabricant. L'hydrogénophosphate de sodium et l'acide hydrochlorique monobasique et dibasique ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich. Tous les produits chimiques et les solvants utilisés étaient de grade HPLC. L'eau hautement purifiée utilisée provenait d'un système de purification d'eau Milli-Q (modèle Millipore Elix 10, États-Unis).

## Procédure

Un volume de 10 µL de phase mobile a été injecté pour servir de blanc, suivi de niveaux individuels de linéarité en triplicat. La surface et le temps de rétention (RT) de chaque niveau ont été utilisés pour calculer les valeurs de déviation standard (SD) et de déviation standard relative (RSD) en %. Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) ont été établies à partir des niveaux d'injections linéaires les plus faibles. La surface moyenne pour chaque niveau de linéarité a été tracée en fonction de la concentration en analyte afin de déterminer la courbe d'étalonnage des monomères.

## Linéarité et plage de détection

La courbe d'étalonnage a été établie à l'aide de neuf concentrations standards de PEG-GCSF allant de 7,8 à 2 000 µg/mL.

## Limite de quantification et limite de détection

La concentration en PEG-GCSF permettant d'obtenir un rapport signal sur bruit (S/B) > 3 a été choisie comme limite de détection et celle permettant d'obtenir un S/B > 10 a été choisie comme limite de quantification.

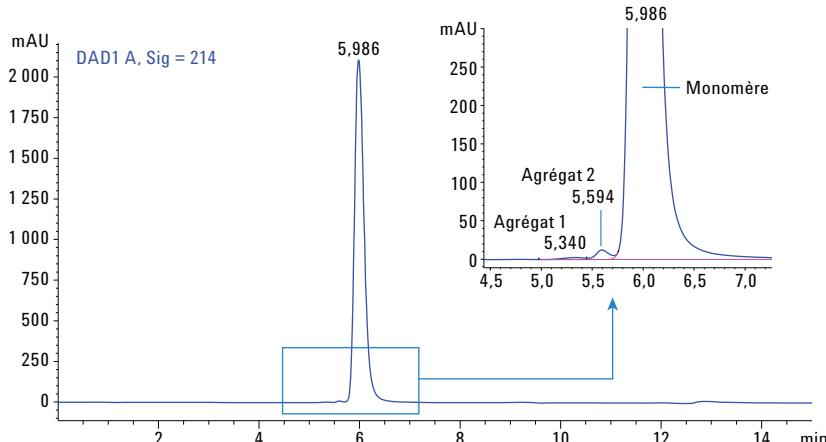


Figure1. Profil SEC de PEG-GCSF thérapeutique intact sur colonne Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

## Préparation des agrégats de PEG-GCSF

Des agrégats de PEG GCSF ont été préparés suivant la version préliminaire de la monographie. Pour faire court, environ 2 mg/mL du médicament ont été incubés à 55 °C pendant 60, 120 et 180 minutes dans un tube en polypropylène. Les échantillons ont ensuite été refroidis à température ambiante puis immédiatement analysés.

## Limites acceptables liées au système

Selon la version préliminaire de la monographie, il convient que le pourcentage d'agrégat ne dépasse pas 5 %. De plus, il convient que le % RSD de la surface d'agrégat comprise entre les injections en triplicat ne dépasse pas 10 %. La variation du temps de rétention du pic due au monomère de PEG-GCSF dans les injections en triplicat ne dépasse pas 0,2 minutes.

## Résultats et discussion

### Séparation et détection

La Figure 1 illustre l'excellente séparation du PEG-GCSF intact sous forme d'un pic symétrique unique à 5,989 minutes dans les conditions chromatographiques. Il est évident, d'après la figure, que le conjugué contient des dimères et des agrégats plus grands, comme l'indique la vue agrandie. Toutefois l'échantillon ne contient pas de GCSF libre, comme en témoigne l'absence de pic en fin d'élution.

## Précision du temps de rétention et de la surface

La précision de la procédure est exprimée par la variation des résultats d'une série de mesures. Ces mesures peuvent être obtenues à partir de plusieurs analyses de l'échantillon homogène dans les conditions prescrites, et le résultat est souvent exprimé sous forme d'un RSD. La Figure 2 illustre la superposition de six réplicats montrant une excellente reproductibilité de séparation. Le Tableau 2 montre les temps de rétention moyens et les RSD des surfaces des pics du monomère et des agrégats à partir de six réplicats de PEG-GCSF. Le temps de rétention et les RSD des surfaces des pics étaient respectivement de 0,023 et 0,081 % pour le pic principal, ce qui montre l'excellente reproductibilité de la méthode analytique et la précision du système.

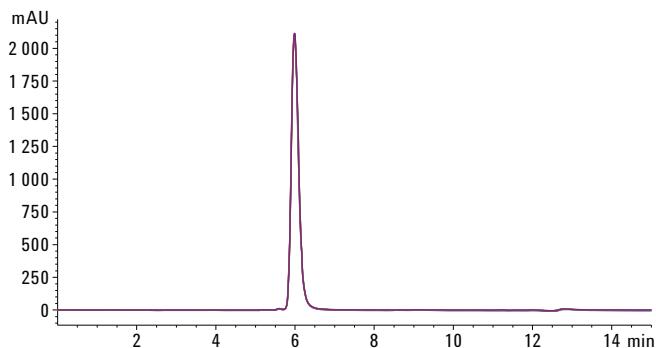


Figure 2. Superposition de six réplicats de PEG-GCSF séparées sur une colonne Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

Tableau 2. Précision du temps de rétention et de la surface des pics (n = 6).

| Échantillons          | Temps de rétention |       | Surface de pic       |       |
|-----------------------|--------------------|-------|----------------------|-------|
|                       | Moyenne<br>(min)   | RSD   | Moyenne<br>(mAU/min) | RSD   |
| PEG-GCSF              | 5,987              | 0,023 | 99,39                | 0,081 |
| Agrégat 1 de PEG-GCSF | 5,594              | 0,01  | 0,413                | 4,91  |
| Agrégat 2 de PEG-GCSF | 5,340              | 0     | 0,155                | 5,1   |

Cette précision satisfait également aux exigences des limites acceptables du système :

- Le pourcentage d'agrégat ne dépasse pas 5 %.
- Le RSD du pourcentage de surface de l'agrégat comprise entre les injections en triplicat ne dépasse pas 10 %.
- Le temps de rétention du pic du monomère de PEG-GCSF dans les injections en triplicat ne dépasse pas 0,2 minutes.

Ainsi, le contenu des agrégats de haut poids moléculaire dans le conjugué de PEG ne dépasse pas 0,6 %. De plus, la pureté du PEG-GCSF selon la HPLC SEC est supérieure à 99 %.

## Limite de détection et limite de quantification

Les limites de détection et de quantification se sont respectivement avérées être égales à 3,125 µg/mL et 12,5 µg/mL, démontrant ainsi la sensibilité de la méthode. Les valeurs des limites de détection et de quantification observées pour le PEG-GCSF sont présentées dans le Tableau 3. La Figure 3 illustre une superposition des chromatogrammes des limites de détection et de quantification entre le conjugué et le blanc.

Tableau 3. Résultats de LOD, LOQ et S/B (n = 3).

| Concentration (µg/mL) | Rapport signal/bruit | Surface moyenne |
|-----------------------|----------------------|-----------------|
| 3,125 (LD)            | 4,6                  | 13,69           |
| 12,5 (LOQ)            | 17,7                 | 27,16           |

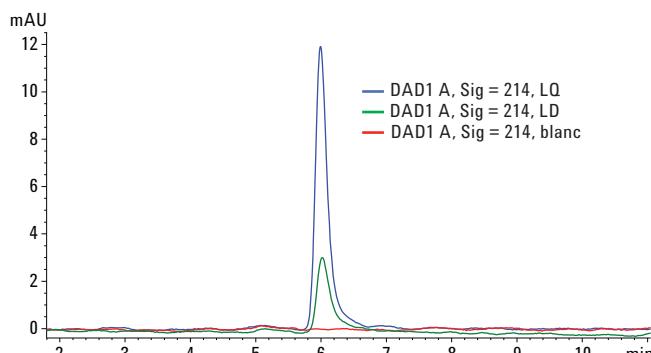


Figure 3. Chromatogrammes des limites de détection et de quantification du PEG-GCSF séparé sur une colonne Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm, après superposition avec un blanc.

## Linéarité

Les courbes de linéarité du PEG-GCSF ont été construites de la limite de quantification jusqu'aux concentrations les plus élevées de l'étude en comparant les aires et la concentration du PEG-GCSF. La Figure 4 illustre la courbe de linéarité du PEG-GCSF dans la plage de concentration allant de 12,5 à 2 000 µg.

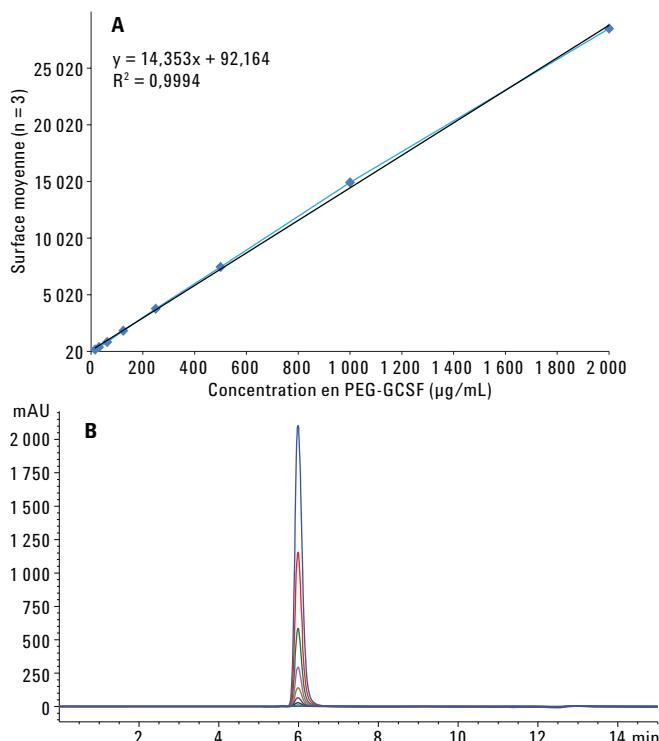


Figure 4. Courbe de linéarité (A) obtenue avec huit standards PEG-GCSF de concentrations allant de 12,5 à 2 000 µg/mL, présentant une excellente valeur de coefficient de linéarité. La figure illustre également la superposition des chromatogrammes (B) sur la plage de linéarité.

Tableau 4. Quantification relative du monomère et des agrégats sur la base de la surface de pic.

| PEG-GCSF soumis à un stress (60 min) |             | PEG-GCSF soumis à un stress (120 min) |             | PEG-GCSF soumis à un stress (180 min) |             |
|--------------------------------------|-------------|---------------------------------------|-------------|---------------------------------------|-------------|
| Temps                                | Surface (%) | Temps                                 | Surface (%) | Temps                                 | Surface (%) |
| 5,59                                 | 2,85        | 5,24                                  | 16,01       | 5,12                                  | 91,89       |
| 5,99 (monomère)                      | 96          | 5,59                                  | 12,74       | 5,57                                  | 1,14        |
|                                      |             | 5,99 (monomère)                       | 70,29       | 5,98 (monomère)                       | 6,44        |

## Analyse et quantification de l'agrégation/la dégradation

Les profils SEC du PEG-GCSF soumis à un stress thermique présentés à la Figure 5 indiquent que la colonne AdvanceBio SEC a été capable de séparer et de détecter les agrégats. Les agrégats intacts et plus grands de PEG-GCSF ont été clairement séparés les uns des autres, comme le montre le chromatogramme. Le Tableau 4 résume la quantification relative du monomère et des agrégats de PEG-GCSF sur la base du pourcentage des aires.

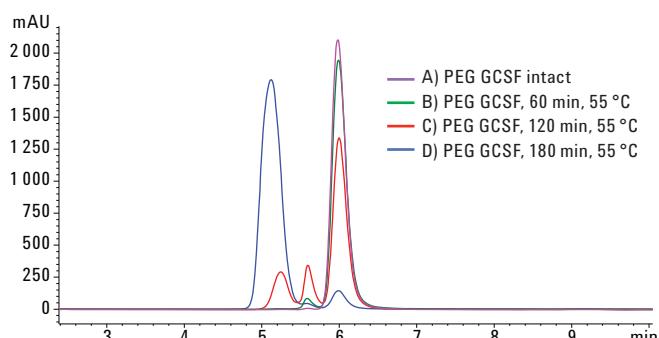


Figure 5. Tendance d'agrégation du PEG-GCSF déterminée par HPLC SEC sur une colonne Agilent AdvanceBio SEC. (A) Contrôle de PEG-GCSF intact, (B) 60 minutes à 55 °C (C) 120 minutes à 55 °C et (D) 180 minutes à 55 °C.

À partir de ces données, on observe une augmentation manifeste des niveaux d'agrégation lors d'un stress thermique à 55 °C, ainsi qu'une diminution relative de la quantité de la forme monomère de 96 % à 70 % et 6,44 %, respectivement.

## Conclusion

Cette note d'application illustre plusieurs excellentes solutions pour l'analyse des protéines pégylées à l'aide de PEG-GCSF comme protéine modèle. Une méthode simple de HPLC SEC avec une colonne Agilent AdvanceBio SEC a été développée pour contrôler la pureté du PEG-GCSF sans addition d'agents modificateurs organiques à la phase mobile. Le temps de rétention et le RSD de la surface des réplicats se sont avérés excellents et ont satisfait aux exigences acceptables du système pour le PEG-GCSF. La limite de détection et la limite de quantification du PEG-GCSF étaient respectivement égales à 3,125 µg/mL et à 12,5 µg/mL, indiquant la bonne sensibilité de la méthode analytique. La courbe de calibration obtenue avec huit standards de conjugué, situées dans la plage de concentrations allant de 12,5 à 2 000 µg/mL, a donné un excellent coefficient de linéarité, indiquant que la méthode était quantitative et précise. De plus, les études de stress réalisées sur la protéine pégylée thérapeutique ont montré que la colonne AdvanceBio SEC était capable de séparer, détecter et quantifier les agrégats sur la base du pourcentage des aires. Une telle méthode simple et reproductible, associée à la bio-inertie et la résistance à la corrosion de l'instrument, démontre la fiabilité de cette solution ainsi que son aptitude pour le contrôle qualité des protéines pégylées en recherche biopharmaceutique.

## Références

1. Gaberc-Porekar V., Zore I., Podobnik B., Menart V., Obstacles and pitfalls in the PEGylation of therapeutic proteins, *Current Opinion in Drug Discovery and Development* **2008**, *11*, 242–250.
2. [ipc.nic.in/writereaddata/monoprepimages/  
Pefilgrastim-2961377726.pdf](http://ipc.nic.in/writereaddata/monoprepimages/Pefilgrastim-2961377726.pdf)
3. Ratto J. J., O'Conner S. R., Distler A. R., Wu G. M., Hummel D., Treuheit M. J., Herman A. C., Davis J. M., Ethanol-sodium chloride-phosphate mobile phase for size-exclusion chromatography of poly (ethylene glycol) modified proteins, *J. of Chromatog. A* **1997**, *763*, 337–344.
4. Tsutomu Arakawa *et al.*, The Critical Role of Mobile Phase Composition in Size Exclusion Chromatography of Protein Pharmaceuticals, *J. of Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 1674–1692.

## Pour plus d'informations

Ces données représentent des résultats types. Pour plus d'informations sur nos produits et services, consultez notre site Internet sur [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

Utilisation en recherche uniquement. Ne pas utiliser dans les procédures de diagnostic.

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc., 2016  
Imprimé aux États-Unis,  
le 23 mars 2016  
5991-6791FR



**Agilent Technologies**