

Análisis de proteínas PEGiladas con columnas Agilent AdvanceBio SEC

Nota de aplicación

Industria biofarmacéutica

Autor

M.Sundaram Palaniswamy
Agilent Technologies, Ltd
India

Resumen

La PEGilación de proteínas terapéuticas ha mejorado significativamente su valor con la modificación de propiedades fisicoquímicas y biológicas tales como el aumento de la solubilidad, la disminución de la inmunogenicidad, el aumento de la vida media y la protección frente a proteasas. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es el método de elección para determinar las impurezas de mayor peso molecular que las proteínas PEGiladas. La SEC de proteínas PEGiladas supone un desafío importante debido a la interacción con fases estacionarias de sílice mediada por el PEG, que produce una menor recuperación, una forma de pico deficiente y la aparición de colas de pico excesivas. Esta nota de aplicación describe un método SEC sencillo y sensible para la determinación de la pureza del Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos del PEG (*PEG Granulocyte Colony Stimulating Factor*, PEG GCSF). Se logró la separación y cuantificación del PEG GCSF utilizando una columna Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm y empleando fase móvil acuosa. Se observó un coeficiente de correlación excelente en la curva de linealidad dentro del intervalo de 12,5 a 2.000 µg/ml, lo que indica que el método es cuantitativo. La precisión del tiempo de retención y del área de pico de este método son excelentes, lo que demuestra la idoneidad del método. Es más, AdvanceBio SEC ha sido capaz de separar y cuantificar agregados obtenidos mediante estudios en condiciones extremas.



Agilent Technologies

Introducción

La PEGilación es el proceso de unión covalente de cadenas de polímeros de polietilenglicol (PEG) con otra molécula, generalmente un fármaco o una proteína terapéutica. La PEGilación se consigue habitualmente por incubación de un derivado reactivo del PEG con la macromolécula diana. La fracción de PEG ofrece numerosas ventajas al aumentar la estabilidad de una proteína y su vida media de circulación en el cuerpo. El PEG ha sido aprobado por la Dirección Federal de Fármacos y Alimentos (*Food and Drug Administration, FDA*) y es generalmente reconocido como seguro [1]. Existen productos PEGilados actualmente aprobados por la FDA. El Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos del PEG (PEG GCSF) es una forma de GCSF recombinante de acción prolongada. Está compuesto por GCSF con una molécula de PEG de 20 kDa ligada de forma covalente al residuo de metionina del extremo N. GCSF es una proteína compuesta por 175 aminoácidos con un peso molecular de 18.800 daltons. PEG GCSF tiene un peso molecular total de 39 kDa. El borrador del método de monografía recomienda la HPLC de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para determinar la pureza y los agregados de mayor tamaño [2]. La mayoría de los métodos publicados de PEG GCSF usan fases móviles acuosas que contienen NaCl 100 mM, ácido fosfórico al 85 % y hasta un 10 % de etanol para impedir interacciones no específicas y mejorar la forma de pico y la resolución [3]. La adsorción no ideal de proteínas terapéuticas es un tema de preocupación durante la SEC, puesto que a veces los agregados muestran una tendencia mayor a ligarse a la fase estacionaria que la forma nativa. Debido a estas uniones preferentes, el análisis SEC de agregados es impreciso y existe el peligro de que los agregados no sean detectados. Se han usado fases móviles que contienen disolventes orgánicos o valores de pH extremos para superar este problema, y se ha demostrado una mejora en la resolución y en la recuperación. Sin embargo, además de disociar agregados reversibles, podrían también disociar agregados irreversibles en la disolución tampón [4].

Aquí podemos ver los beneficios de la columna Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm, una tecnología revolucionaria para el análisis SEC. Estas columnas contienen unas innovadoras partículas de sílice y una exclusiva fase estacionaria de enlace hidrófilo, que ofrecen resolución y separación por tamaño para una amplia variedad de tipos de muestras sin necesidad de añadir modificadores orgánicos a la fase móvil.

Materiales y métodos

Instrumentos

Se utilizó un sistema LC cuaternario bioinerte Agilent 1260 Infinity, completamente biocompatible, con una presión máxima de 600 bar y compuesto por los módulos siguientes:

- Bomba LC cuaternaria bioinerte Agilent 1260 Infinity (ref. G5611A)
- Inyector automático de alto rendimiento bioinerte Agilent 1260 Infinity (ref. G5667A)
- Termostato Agilent Serie 1200 Infinity (ref. G1330B)
- Compartimento termostatzado de columna Agilent 1260 Infinity con elementos calefactores bioinertes de conexión rápida (ref. G1316C, opción n.º 19)
- Detector de diodo array (DAD) VL Agilent 1260 Infinity (ref. G1315D, con celda de flujo estándar bioinerte de 10 mm)
- Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm empaquetada con partículas de 2,7 µm (ref. PL1180-5350)

Software

Agilent ChemStation B.04.03 (u otra versión posterior).

Parámetros para SEC

La Tabla 1 muestra los parámetros cromatográficos para SEC usando un sistema LC bioinerte Agilent 1260.

Tabla 1. Parámetros cromatográficos usados en SEC HPLC.

Parámetro	Condición
Fase móvil:	Tampón fosfato sódico 150 mM, pH 6,8
Temperatura TCC (compartimento de columna termostatzado):	Ambiente
Análisis isocrático:	Fase móvil A
Volumen de inyección:	10 µl
Velocidad de flujo:	0,8 ml/min
Detección UV:	214 y 280 nm

Reactivos, muestras y materiales

Se compró PEG GCSF en una farmacia local y se conservó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se compraron hidrogenofosfato sódico monobásico y dibásico y ácido clorhídrico a Sigma-Aldrich. Todos los productos químicos y disolventes utilizados fueron de calidad HPLC. Se utilizó agua de alta pureza obtenida con un sistema de purificación de agua Milli-Q (modelo Millipore Elix 10, EE.UU.).

Procedimiento

Se inyectó un volumen de 10 µl de fase móvil como blanco, y a continuación niveles individuales de linealidad por triplicado. Se utilizaron el área de pico y el tiempo de retención (TR) de cada nivel de linealidad para calcular la desviación estándar (DE) y la desviación estándar relativa (% DER). Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) se determinaron a partir de las inyecciones del nivel de linealidad inferior. Se representó el área media de cada nivel de linealidad frente a la concentración del analito para crear la curva de calibración para los monómeros.

Linealidad y rango

La curva de calibración se creó con nueve patrones de PEG GCSF en el intervalo de 7,8 a 2.000 µg/ml.

LOQ y LOD

Se consideró como LOD la concentración de PEG GCSF que dio lugar a una relación señal-ruido (S/N) > 3, y como LOQ la concentración que dio lugar a una relación S/N > 10.

Preparación de agregados de PEG GCSF

Se prepararon los agregados de PEG GCSF siguiendo el borrador de monografía. De forma resumida, se incubaron unos 2 mg/ml del fármaco a 55 °C durante 60, 120 y 180 minutos en un tubo de polipropileno. A continuación se enfriaron las muestras a temperatura ambiente, y se analizaron inmediatamente.

Idoneidad del sistema

Según el borrador de monografía, el porcentaje de agregado no debería superar el 5 %. Además, el % de DER del área porcentual del agregado entre las inyecciones por triplicado no debería ser mayor del 10 %. La variación del TR del pico debido al monómero de PEG GCSF en la inyección por triplicado no será superior a 0,2 minutos.

Resultados y comentarios

Separación y detección

La Figura 1 demuestra la excelente separación de PEG GCSF intacto en forma de pico simétrico individual a los 5,989 minutos en las condiciones cromatográficas. Observando la figura, es evidente que el conjugado contiene dímeros y agregados de mayor tamaño, como se indica en la vista ampliada. Sin embargo, la muestra no contiene GCSF libre, como indica la ausencia de un pico de elución tardía.

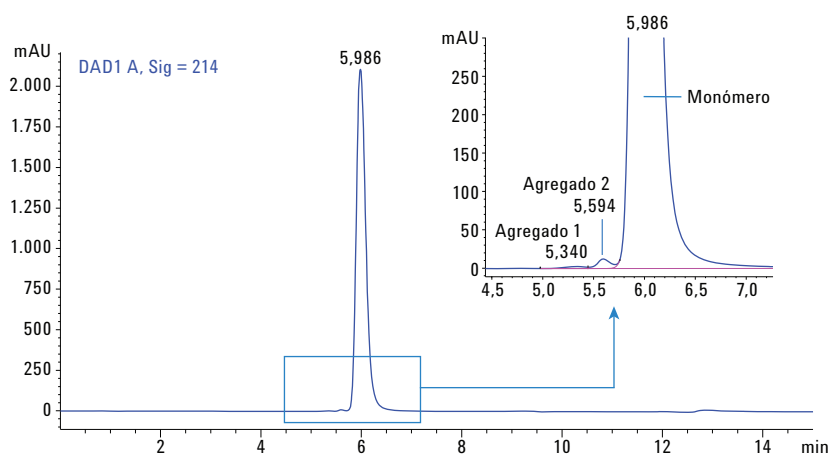


Figura 1. Perfil SEC de un PEG GCSF terapéutico inalterado obtenido con una columna Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

Precisión del tiempo de retención y del área

La precisión del procedimiento se expresa como el grado de concordancia entre una serie de medidas. Estas medidas se pueden obtener a partir de múltiples análisis de una muestra homogénea bajo las condiciones establecidas, y con frecuencia se expresan como la desviación estándar relativa (DER). La Figura 2 pone de manifiesto la superposición de seis réplicas, mostrando una excelente reproducibilidad de la separación. La Tabla 2 muestra los TR medios y las DER del área de pico en el monómero y los agregados de seis réplicas de PEG GCSF. Las DER del tiempo de retención y del área de pico correspondientes al pico principal fueron 0,023 y 0,081% respectivamente, lo que demuestra la excelente reproducibilidad del método analítico y la precisión del sistema.

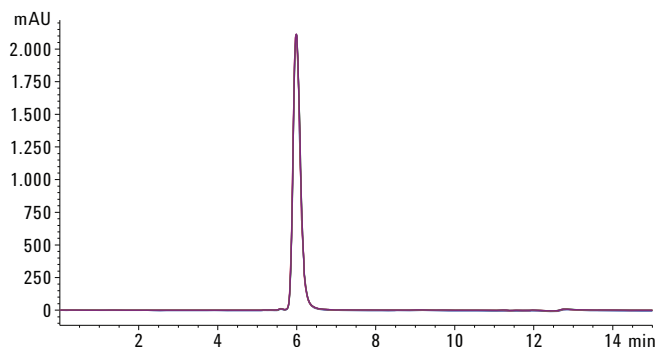


Figura 2. Superposición de seis réplicas de PEG GCSF independientes en una columna AdvanceBio SEC de Agilent, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

Tabla 2. Precisión del tiempo de retención y del área de pico (n = 6).

Muestras	Tiempo de retención		Área de pico	
	Media (min)	DER	Media (mAU/min)	DER
PEG GCSF	5,987	0,023	99,39	0,081
Agregado 1 PEG GCSF	5,594	0,01	0,413	4,91
Agregado 2 PEG GCSF	5,340	0	0,155	5,1

Este valor de la precisión cumple también con los requisitos de idoneidad del sistema:

- El porcentaje de agregado no es superior al 5 %.
- El % de DER del área porcentual del agregado entre las inyecciones por triplicado no debería ser mayor del 10 %.
- El tiempo de retención del pico debido al monómero de PEG GCSF en la inyección por triplicado no será superior a 0,2 minutos.

De este modo, el contenido en agregados de alto peso molecular en el conjugado de PEG no superará el 0,6 %. Además, la pureza del PEG GCSF, de acuerdo con la SEC HPLC, será superior al 99 %.

LOD y LOQ

Los valores LOD y LOQ fueron de 3,125 µg/ml y 12,5 µg/ml respectivamente, lo que demuestra que el método es sensible. Los valores observados de LOD y LOQ del PEG GCSF aparecen recogidos en la Tabla 3. La Figura 3 muestra los cromatogramas de los valores de LOD y LOQ del conjugado superpuestos con los del blanco.

Tabla 3. Resultados de LOD, LOQ y S/N (n = 3).

Concentración (µg/ml)	Relación señal/ruido	
	relación	Área media
3,125 (LOD)	4,6	13,69
12,5 (LOQ)	17,7	27,16

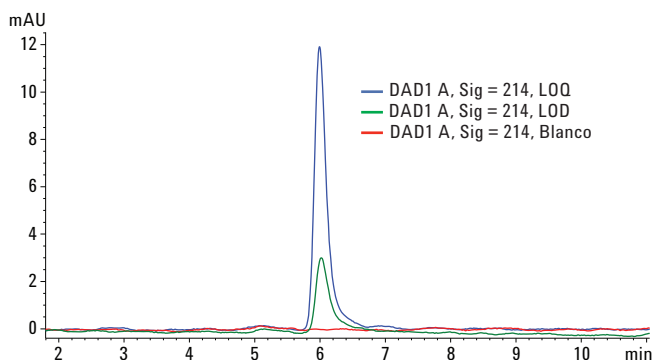


Figura 3. Cromatogramas de los valores de LOD y LOQ del PEG GCSF independientes en una columna Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm superpuestos con el blanco.

Linealidad

Las curvas de linealidad del PEG GCSF se construyeron desde el nivel límite de cuantificación hasta el nivel de concentración más alto en la prueba utilizando respuesta de área y concentración del PEG GCSF. La Figura 4 muestra la curva de linealidad del PEG GCSF en el rango de concentración desde 12,5 hasta 2.000 µg.

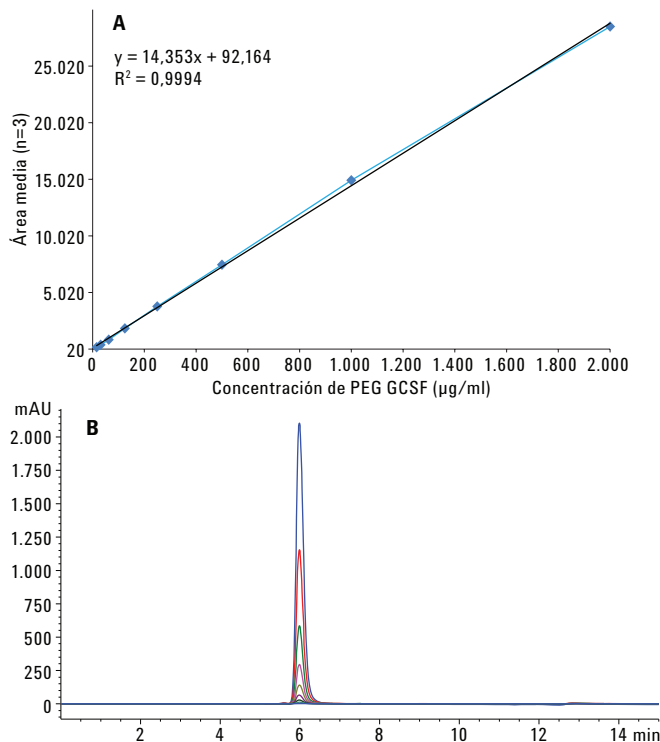


Figura 4. Curvas de linealidad (A) obtenidas con ocho patrones de PEG GCSF, con concentraciones entre 12,5 y 2.000 µg/ml, en las que se observan los excelentes valores del coeficiente. También se muestra la superposición de cromatograma (B) en el intervalo de linealidad.

Análisis de la agregación o degradación y cuantificación

Los perfiles SEC de PEG GCSF en condiciones extremas de temperatura que se muestran en la Figura 5 indican que la columna AdvanceBio SEC fue capaz de separar y detectar los agregados. Se separaron de forma diferenciada agregados de PEG GCSF inalterados y de mayor tamaño, como se puede ver en el cromatograma. La Tabla 4 resume la cuantificación relativa de monómeros y segregados de PEG GCSF expresados en forma de área porcentual.

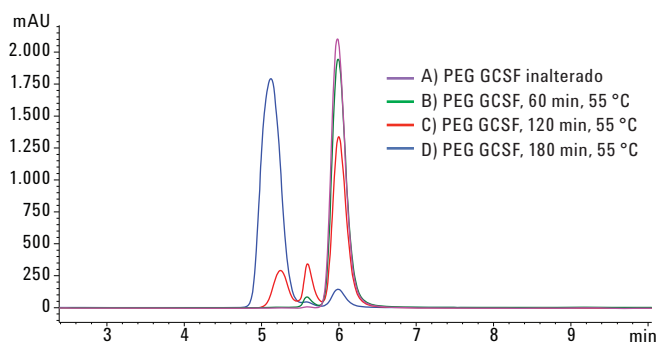


Figura 5. Tendencia de la agregación de PEG GCSF obtenida mediante SEC HPLC en una columna Agilent AdvanceBio SEC. (A) Control del PEG GCSF inalterado, (B) 60 minutos a 55 °C (C), 120 minutos a 55 °C, y (D) 180 minutos a 55 °C.

Tal como demuestran los datos, existe un incremento en los niveles de agregado al someterlo a 55 °C, con una disminución relativa de la cantidad de forma monomérica desde un 96 % a un 70 % y un 6,44 % respectivamente.

Tabla 4. Cuantificación relativa de monómeros y agregados a partir del área de pico.

PEG GCSF sometido a condiciones extremas (60 min.)		PEG GCSF sometido a condiciones extremas (120 min.)		PEG GCSF sometido a condiciones extremas (180 min.)	
Tiempo	Área (%)	Tiempo	Área (%)	Tiempo	Área (%)
5,59	2,85	5,24	16,01	5,12	91,89
5,99 (monómero)	96	5,59	12,74	5,57	1,14
		5,99 (monómero)	70,29	5,98 (monómero)	6,44

Conclusión

Esta nota de aplicación muestra varias soluciones excelentes para el análisis de proteínas PEGiladas empleando PEG GCSF como proteína modelo. Se desarrolló un método sencillo para PEG HPLC utilizando una columna Agilent AdvanceBio SEC con el fin de monitorizar la pureza del PEG GCSF sin emplear modificadores orgánicos en la fase móvil. Las DER del TR y del área obtenidas fueron excelentes, y cumplieron con los requisitos de idoneidad de PEG GCSF. Los valores LOD y LOQ de PEG GCSF fueron de 3,125 µg/ml y 12,5 µg/ml respectivamente, lo que indica la sensibilidad del método analítico. Una curva de linealidad creada con ocho patrones del conjugado con concentraciones entre 12,5 y 2.000 µg/ml presentó un coeficiente de linealidad excelente, lo que ilustra que el método es cuantitativo y preciso. Además, los estudios en condiciones extremas de la proteína PEG terapéutica demostraron que la columna AdvanceBio SEC era capaz de separar, detectar y cuantificar los agregados expresados en forma de área porcentual. Un método así de sencillo y reproducible, combinado con el carácter bioinerte y la resistencia a la corrosión del instrumento, hace que esta solución sea fiable e idónea para el control de calidad de las proteínas PEGiladas en la investigación biofarmacéutica.

Referencias

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
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.

Más información

Estos datos representan resultados típicos. Si desea obtener más información sobre nuestros productos y servicios, visite nuestra página web www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Solo para uso en investigación. Prohibido su uso en procedimientos diagnósticos.

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc., 2016

Impreso en EE.UU.

23 de marzo de 2016

5991-6791ES



Agilent Technologies