

# Analisi delle proteine PEGilate con le colonne Agilent AdvanceBio SEC

## Nota applicativa

Biofarmaceutica

### Autore

M. Sundaram Palaniswamy  
Agilent Technologies, Ltd  
India

### Abstract

La PEGilazione delle proteine bioterapeutiche ha significativamente migliorato il loro valore modificandone le proprietà fisico-chimiche e biologiche: maggiore solubilità, minore immunogenicità, maggiore emivita e protezione contro le proteasi. La cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) è il metodo ideale per la determinazione delle impurezze con peso molecolare superiore a quello delle proteine PEGilate. La SEC delle proteine PEGilate presenta un problema significativo a causa dell'interazione PEG-mediata con le fasi stazionarie in silice, che determina un minor recupero, una forma dei picchi scadente e uno scodamento eccessivo. Questa nota applicativa descrive un metodo SEC semplice e sensibile per determinare la purezza del fattore stimolante le colonie granulocitarie PEGilato (PEG GCSF). La separazione e la quantificazione del PEG GCSF sono state ottenute usando una colonna Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm in fase mobile acquosa. È stato osservato un eccellente coefficiente di correlazione per la curva di linearità nell'intervallo 12,5 - 2.000 µg/mL, il che indica che il metodo è quantitativo. La precisione del tempo di ritenzione e dell'area dei picchi era eccellente e questo dimostra l'idoneità del metodo. Inoltre, la colonna AdvanceBio SEC è stata in grado di separare e quantificare gli aggregati ottenuti mediante studi di stress forzato.



**Agilent Technologies**

## Introduzione

La PEGilazione è il processo attraverso il quale vengono legate in modo covalente catene polimeriche di polietilene glicole (PEG) a un'altra molecola, solitamente un farmaco o una proteina bioterapeutica. La PEGilazione viene abitualmente ottenuta mediante incubazione di un derivato reattivo del PEG con la macromolecola target. Il PEG offre numerosi vantaggi, migliorando la stabilità di una proteina e la sua emivita di circolazione nel corpo. Il PEG è stato approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) in quanto generalmente ritenuto sicuro [1]. Attualmente alcuni prodotti PEGilati sono approvati dalla FDA. Il fattore stimolante le colonie granulocitarie PEGilato (PEG GCSF) è una forma a lunga durata d'azione del GCSF ricombinante. È composto dal GCSF e da una molecola di PEG da 20 kDa legata in modo covalente al residuo di metionina N-terminale. Il GCSF è una proteina costituita da 175 aminoacidi, con un peso molecolare di 18.800 dalton. Il PEG GCSF ha un peso molecolare totale di 39 kDa. Il metodo monografico orientativo raccomanda l'uso dell'HPLC con cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) per determinare la purezza e gli aggregati superiori [2]. La maggior parte dei metodi pubblicati per il PEG GCSF utilizza fasi mobili acquose contenenti NaCl 100 mM, acido ortofosforico all'85% e fino al 10% di etanolo per impedire interazioni aspecifiche e migliorare la forma dei picchi e la risoluzione [3]. L'assorbimento non ideale delle proteine bioterapeutiche rappresenta un problema durante la SEC, in quanto gli aggregati talvolta mostrano una maggiore tendenza a legarsi alla fase stazionaria rispetto alla forma nativa. A causa di questo legame preferenziale, l'analisi SEC degli aggregati non è precisa e vi è il pericolo che essi non vengano identificati. Per superare questo problema sono state usate fasi mobili contenenti solventi organici o pH estremi, che hanno dimostrato di migliorare la risoluzione e il recupero. Oltre a poter dissociare aggregati reversibili, possono anche dissociare aggregati irreversibili nella soluzione tampone [4].

Qui mostriamo i vantaggi della colonna Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm, una tecnologia all'avanguardia per l'analisi SEC. Questa colonna contiene un'innovativa particella in silice e un'esclusiva chimica di legame idrofila che permettono la risoluzione e la separazione dimensionale di una vasta gamma di tipi di campione, senza aggiungere modificatori organici alla fase mobile.

## Materiali e metodi

### Strumenti

È stato usato un sistema LC quaternario Bio-Inert Agilent serie 1260 Infinity completamente biocompatibile, con una pressione massima di 600 bar, comprendente i seguenti moduli:

- Pompa LC quaternaria Bio-Inert Agilent 1260 Infinity (codice G5611A)
- Autocampionatore Bio-Inert ad alte prestazioni Agilent 1260 Infinity (codice G5667A)
- Termostato Agilent serie 1200 Infinity (codice G1330B)
- Comparto colonne termostato Agilent 1260 Infinity contenente elementi riscaldanti con alloggiamenti con sistema di blocco per le colonne Bio-Inert (codice G1316C, opzione 19)
- Rivelatore a serie di diodi Agilent 1260 Infinity VL (codice G1315D con cella di flusso standard Bio-Inert, 10 mm)
- Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm impaccata con particelle da 2,7 µm (codice PL1180-5350)

### Software

ChemStation Agilent B.04.03 (o superiore)

### Parametri SEC

La Tabella 1 mostra i parametri cromatografici della SEC usando un sistema LC Agilent 1260 Bio-Inert.

Tabella 1. Parametri cromatografici usati per l'HPLC SEC.

Parametro	Condizione
Fase mobile:	Tampone fosfato di sodio 150 mM, pH 6,8
Temperatura TCC:	Ambiente
Analisi isocratica:	Fase mobile A
Volume di iniezione:	10 µL
Flusso:	0,8 mL/min
Rivelazione UV:	214 e 280 nm

## Reagenti, campioni e materiali

Il PEG GCSF commerciale è stato acquistato in una farmacia di zona e conservato secondo le istruzioni del produttore. L'idrogenofosfato di sodio monobasico e dibasico e l'acido cloridrico sono stati acquistati da Sigma-Aldrich. Tutti i prodotti chimici e i solventi usati erano di grado HPLC. È stata usata acqua altamente purificata ottenuta con il sistema di purificazione dell'acqua Milli-Q (modello Millipore Elix 10, Stati Uniti).

## Procedura

È stato iniettato un volume di 10 µL di fase mobile come bianco, seguito da singoli livelli di concentrazione nel range di linearità in triplicato. Sono stati utilizzati l'area e il tempo di ritenzione (RT) di ogni livello per calcolare i valori di deviazione standard (SD) e deviazione standard relativa (RSD%). Il limite di rivelazione (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ) sono stati stabiliti con iniezioni dei livelli più bassi dell'intervallo di linearità. Si è creato un grafico del valore medio dell'area di ciascun livello in funzione della concentrazione dell'analita allo scopo di determinare la curva di calibrazione per i monomeri.

## Linearità e intervallo

La curva di calibrazione è stata costruita con nove concentrazioni di PEG GCSF standard nell'intervallo 7,8 - 2.000 µg/mL.

## LOQ e LOD

Il livello di concentrazione del PEG GCSF che ha fornito un rapporto segnale-rumore (S/N) > 3 è stato assunto come LOD, mentre quello che ha fornito un S/N > 10 è stato assunto come LOQ.

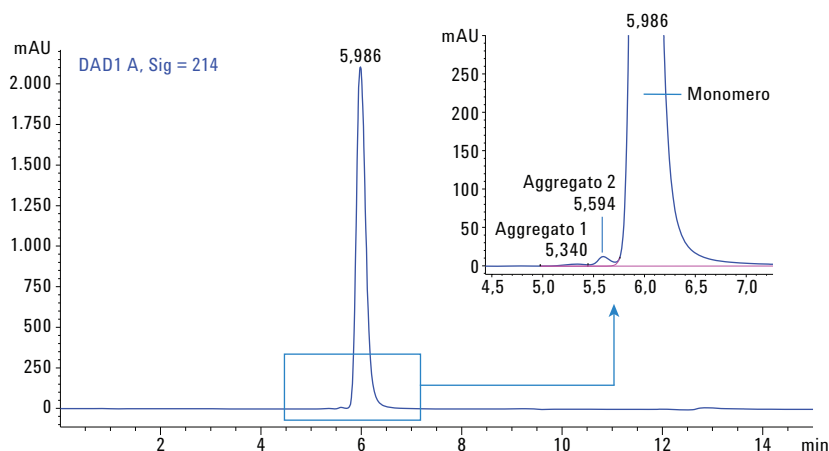


Figura 1. Profilo SEC del PEG GCSF terapeutico intatto sulla colonna Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

## Preparazione degli aggregati del PEG GCSF

Gli aggregati del PEG GCSF sono stati preparati secondo la bibliografia. In breve, 2 mg/mL circa del prodotto sono stato incubati a 55 °C per 60, 120 e 180 minuti in una provetta di polipropilene. I campioni sono quindi stati raffreddati a temperatura ambiente e immediatamente analizzati.

## Idoneità del sistema

In base alla bibliografia, la percentuale di aggregati non deve essere superiore al 5%. Inoltre, la RSD% dell'area percentuale di aggregato tra le iniezioni in triplicato non deve essere superiore al 10%. La variazione del tempo di ritenzione del picco dovuto al monomero del PEG GCSF nelle iniezioni in triplicato non è superiore a 0,2 minuti.

## Risultati e discussione

### Separazione e rivelazione

La Figura 1 mostra l'eccellente separazione del PEG GCSF intatto come singolo picco simmetrico a 5,989. Dalla figura è evidente che il coniugato contiene dimeri e aggregati superiori come indicato nell'immagine ingrandita. Il campione, però, non contiene GCSF libero, come indicato dall'assenza di un picco a eluizione tardiva.

## Precisione dei valori di tempo di ritenzione e area

La precisione della procedura è espressa come concordanza tra una serie di misure. Queste misure possono essere ottenute da diverse analisi del campione omogeneo nelle condizioni prescritte e sono spesso espresse come deviazione standard relativa (RSD). La Figura 2 mostra la sovrapposizione di sei replicati, che presentano un'eccellente riproducibilità della separazione. La Tabella 2 mostra i RT medi e le RSD dell'area dei picchi per il monomero e gli aggregati di sei replicati del PEG GCSF. Il tempo di ritenzione (RT) e la RSD dell'area del picco per il picco principale sono state rispettivamente 0,023 e 0,081% e questo dimostra un'eccellente riproducibilità del metodo analitico e della precisione del sistema.

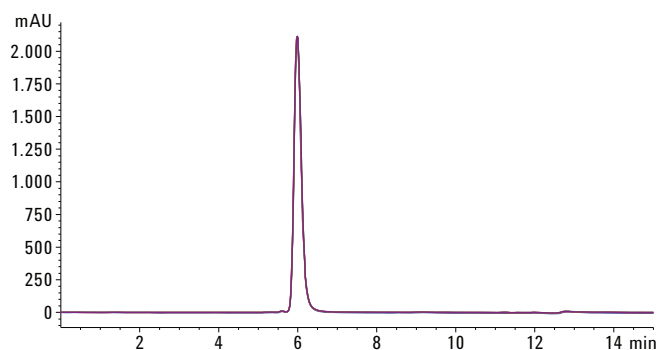


Figura 2. Sovrapposizione di sei replicati del PEG GCSF separati sulla colonna Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

Tabella 2. Valori di precisione per il tempo di ritenzione e per l'area del picco (n=6).

Campioni	Tempo di ritenzione		Area del picco	
	Media (min)	RSD	Media (mAU/min)	RSD
PEG GCSF	5,987	0,023	99,39	0,081
Aggregato 1 di PEG GCSF	5,594	0,01	0,413	4,91
Aggregato 2 di PEG GCSF	5,340	0	0,155	5,1

Questa precisione si conforma anche ai requisiti di idoneità del sistema:

- La percentuale di aggregato non è superiore al 5%.
- La RSD dell'area percentuale di aggregato tra le iniezioni in triplicato non è superiore al 10%.
- Il tempo di ritenzione del picco dovuto al monomero del PEG GCSF nelle iniezioni in triplicato non è superiore a 0,2 minuti.

Quindi, il contenuto di aggregati ad alto peso molecolare nel coniugato PEG non supera lo 0,6%. Inoltre, la purezza del PEG GCSF secondo l'HPLC SEC è superiore al 99%.

## LOD e LOQ

I LOD e LOQ sono risultati pari rispettivamente a 3,125 µg/mL e 12,5 µg/mL, indicando la sensibilità del metodo. I valori di LOD e LOQ osservati per il PEG GCSF sono riportati nella Tabella 3. La Figura 3 mostra una sovrapposizione dei cromatogrammi LOD e LOQ del coniugato e del bianco.

Tabella 3. Risultati per LOD, LOQ e S/N (n = 3).

Concentrazione (µg/mL)	Rapporto segnale-rumore	
	rumore	Area media
3,125 (LOD)	4,6	13,69
12,5 (LOQ)	17,7	27,16

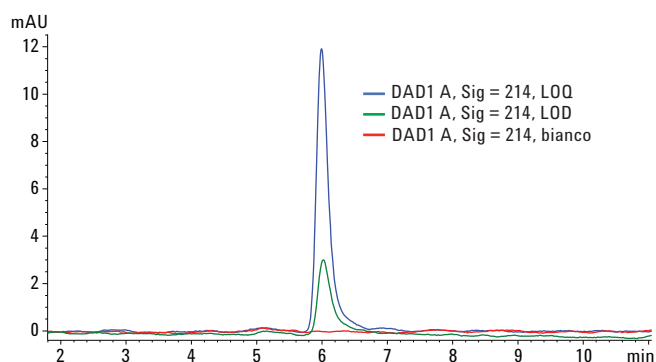


Figura 3. Cromatogrammi LOD e LOQ del PEG GCSF separato sulla colonna Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm, sovrapposti al bianco.

## Linearità

Sono state costruite le curve di linearità per il PEG GCSF nell'intervallo tra LOQ e il più elevato livello di concentrazione dello studio, utilizzando la risposta in termini di area e la concentrazione del PEG GCSF. La Figura 4 mostra la curva di linearità per il PEG GCSF nell'intervallo di concentrazione 12,5 - 2.000 µg.

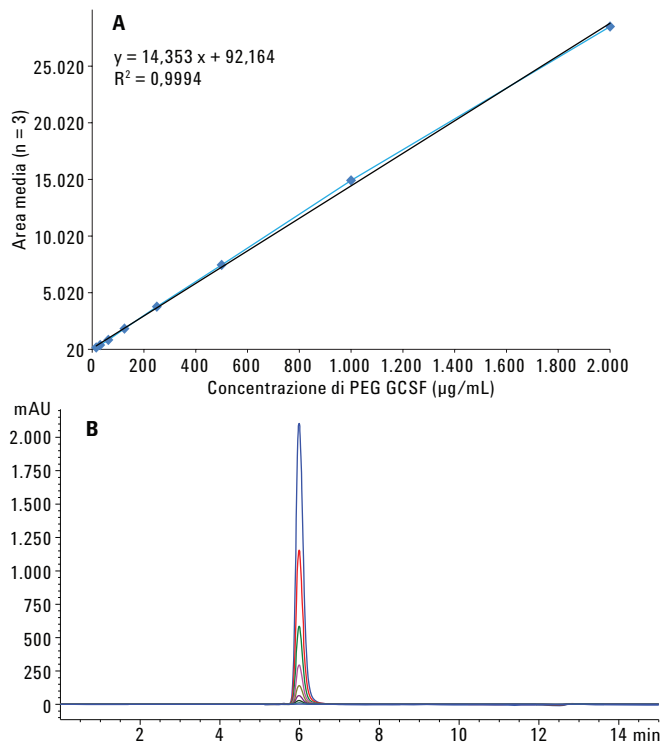


Figura 4. Curva di linearità (A) con otto concentrazioni standard di PEG GCSF, comprese tra 12,5 e 2.000 µg/mL, che mostra un eccellente valore di linearità. È illustrata anche la sovrapposizione dei cromatogrammi (B) nell'intervallo di linearità.

## Analisi e quantificazione dell'aggregazione/degradazione

I profili SEC del PEG GCSF sottoposto a stress termico mostrati nella Figura 5 mostrano che la colonna AdvanceBio SEC è stata in grado di separare e rivelare gli aggregati. Il PEG GCSF intatto e gli aggregati superiori sono stati separati distintamente gli uni dagli altri, come si osserva nel cromatogramma. La Tabella 4 riassume la quantificazione relativa del monomero e degli aggregati del PEG GCSF in base all'area percentuale.

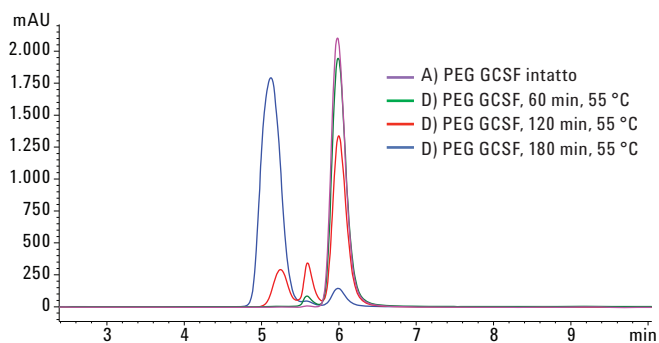


Figura 5. Andamento dell'aggregazione del PEG GCSF determinato mediante HPLC SEC su una colonna Agilent AdvanceBio SEC. (A) Controllo PEG GCSF intatto, (B) 60 minuti a 55 °C, (C) 120 minuti a 55 °C e (D) 180 minuti a 55 °C.

Dai dati risulta evidente che si è verificato un aumento dei livelli di aggregato in seguito a stress a 55 °C, con una riduzione relativa della quantità della forma monomerica rispettivamente dal 96 al 70% al 6,44%.

Tabella 4. Quantificazione relativa del monomero e degli aggregati in base all'area del picco.

PEG GCSF sottoposto a stress (60 min)		PEG GCSF sottoposto a stress (120 min)		PEG GCSF sottoposto a stress (180 min)	
Tempo	Area %	Tempo	Area %	Tempo	Area %
5,59	2,85	5,24	16,01	5,12	91,89
5,99 (monomero)	96	5,59	12,74	5,57	1,14
		5,99 (monomero)	70,29	5,98 (monomero)	6,44

## Conclusioni

Questa nota applicativa dimostra diverse eccellenti soluzioni per l'analisi delle proteine PEGilate usando il PEG GCSF come proteina modello. È stato sviluppato un metodo semplice per l'HPLC SEC usando una colonna Agilent AdvanceBio SEC per monitorare la purezza del PEG GCSF senza utilizzare modificatori organici nella fase mobile. Le RSD di RT e area dei replicati sono state eccellenti e hanno soddisfatto i requisiti di idoneità del sistema per il PEG GCSF. I valori di LOD e LOQ per il PEG GCSF sono risultati rispettivamente pari a 3,125 µg/mL e 12,5 µg/mL, indicando che il metodo analitico è sensibile. Una curva di linearità con otto concentrazioni standard del coniugato, comprese tra 12,5 e 2.000 µg/mL, ha mostrato un valore eccellente del coefficiente di linearità, il che indica che il metodo è quantitativo e accurato. Inoltre, gli studi di stress per la proteina bioterapeutica PEG hanno dimostrato che la colonna AdvanceBio SEC ha permesso di separare, rivelare e quantificare gli aggregati in base all'area percentuale. Tale metodo semplice e riproducibile, abbinato alla bio-inerzia e alla resistenza alla corrosione dello strumento, rende questa soluzione affidabile e adatta al QC delle proteine PEGilate nella ricerca biofarmaceutica.

## Bibliografia

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.

## Ulteriori informazioni

Questi dati rappresentano i risultati tipici. Per ulteriori informazioni sui nostri prodotti e servizi, visitare il nostro sito web all'indirizzo [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).

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

Solo per scopi di ricerca. Non utilizzabili per procedure diagnostiche.

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc., 2016

Stampato negli Stati Uniti

23 marzo 2016

5991-6791ITE



**Agilent Technologies**