

Größenausschlusschromatographie von Biosimilar- und Innovator-Insulin

Unter Verwendung einer Säule des Typs Agilent AdvanceBio SEC

Application Note

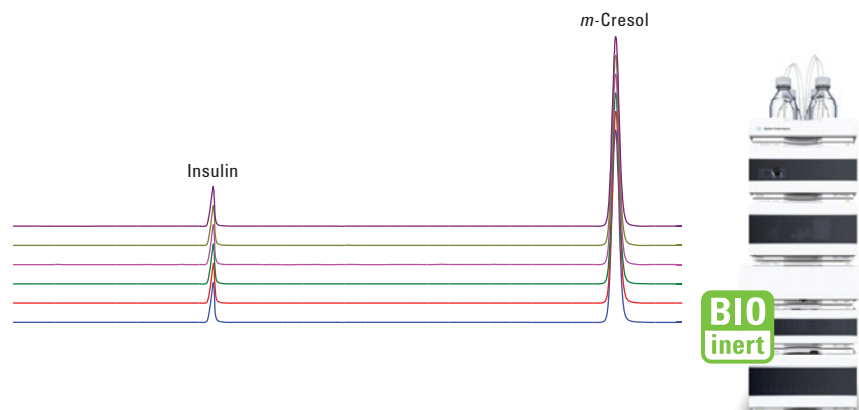
Biopharmazie

Autoren

M. Sundaram Palaniswamy und
Andrew Coffey
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

Insulin ist ein kleines Polypeptidhormon, das den Blutzuckerspiegel reguliert. Mit gentechnologischen Verfahren können biopharmazeutische Unternehmen mittlerweile verschiedene langwirksame Insulin-Analoga entwickeln. Für die Analyse von Insulin-Analoga gibt es jedoch keine Pharmakopöe-Methode. Eine SEC-Methode, die Innovator- und Biosimilar-Insulin-Analoga nach dem Entwurf einer EP-Methode identifiziert, wurde unter Verwendung einer Säule des Typs Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm entwickelt. Die Leistungsfähigkeit dieser Methode für Routineanalysen wurde mithilfe eines Systemeignungstests und von Untersuchungen der Retentionszeit- (RT) und Flächengenauigkeit unter Verwendung von Innovator-Insulin als Referenzmaterial bestätigt. Diese Application Note zeigt auch die Anwendung dieser Säule zur Detektion von Verunreinigungen mit Molekülmassen, die größer sind, als die von Insulin, in Quantifizierungsuntersuchungen.



Agilent Technologies

Einführung

Neuartige Insulin-Analoga stellen Alternativen zu Humaninsulinprodukten dar. Klinische Studien haben eine gleiche oder bessere Wirksamkeit für diese Analoga im Vergleich mit Humaninsulin gezeigt. Insulin-Analoga sind derzeit die langwirksamen basalen Humaninsuline auf dem Markt. Das erste langwirksame Insulin-Analogon wurde im April 2000 von der US Food and Drug Administration (USFDA) zum Gebrauch zugelassen. Im Gegensatz zu niedermolekularen Verbindungen werden Biotherapeutika mithilfe biologischer Prozesse hergestellt. Jeder Hersteller verwendet einen intern entwickelten Prozess für die Produktion der Arzneisubstanz und des Arzneiprodukts. Bei diesen Produktionsmethoden können aus der Arzneisubstanz stammende Verunreinigungen, wie z. B. Aggregate und Abbauprodukte, auftreten. Aufgrund der gestiegenen Nachfrage nach Antidiabetika ist die Produktion von Arzneimitteln, die von Verunreinigungen frei sind und sichere Arzneimittel ohne Nebenwirkungen darstellen, eine äußerst wichtige, aber gleichzeitig anspruchsvolle Aufgabe. Für die biopharmazeutische Industrie stellt die Flüssigkeitschromatographie mit UV-Detektion eine vielseitige Methode für die Chargenfreigabe und für Charakterisierungsuntersuchungen dar¹. Die Größenausschlusschromatographie (SEC) ist die Methode der Wahl für die Reinheitsanalyse und die Detektion von Aggregaten des Arzneiprodukts. Diese Application Note beschreibt den Ansatz, mithilfe von SEC und UV-Detektion die Molekülähnlichkeit von Insulin-Biosimilar und seiner Innovator-Referenz nach der Analyse der Systemeignung und der Präzision der Methode zu bestimmen². Diese Tests stellen sicher, dass die Methode Ergebnisse mit akzeptabler Genauigkeit und Präzision liefert. Das ausgewählte Kriterium basiert auf kritischen chromatographischen Parametern und ihrer Variation innerhalb akzeptabler Grenzen, die durch Experimente zur Methodenevaluation definiert werden. Für die Linearitätskurve von Insulin im Bereich von 10,6 bis 3400 µg/ml wurde ein hervorragender Korrelationskoeffizient beobachtet. Daher kann die Methode zur quantitativen Analyse eingesetzt werden. Die Verwendung einer Säule des Typs Agilent AdvanceBio SEC

zur Überwachung und Abtrennung von Verunreinigungen mit Molekülmassen, die größer sind als die des Arzneiprodukts, wie in Forced-Stress-Experimenten bestimmt, wird ebenfalls gezeigt.

Materialien und Methoden

Geräte

Es wurde ein vollständig biokompatibles Agilent 1260 Infinity bioinertes quaternäres LC-System mit einem Maximaldruck von 600 bar verwendet, bestehend aus:

- Agilent 1260 Infinity bioinerte quaternäre LC-Pumpe (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity bioinert Hochleistungsprobengeber (G5667A)
- Agilent 1200 Infinity Serie Thermostat (G1330B)
- Agilent 1260 Infinity thermostatisierter Säulenofen mit bioinerten einklickbaren Heizelementen (G1316C, Option 19)
- Agilent 1260 Infinity DAD VL (G1315D mit bioinert Standardflusszelle, 10 mm)
- Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm (Best.-Nr. PL1180-5350)

Software

Agilent ChemStation B.04.03 (oder höher)

Parameter der Größenausschlusschromatographie

Tabelle 1 fasst die chromatographischen Parameter der Größenausschlusschromatographie mit dem Agilent 1260 Infinity bioinerten LC-System zusammen.

Reagenzien, Proben und Materialien

Kommerziell erhältliches Innovator-Insulin und Biosimilar-Insulin wurden in einer Apotheke vor Ort gekauft und entsprechend den Herstelleranweisungen gelagert. Essigsäure und Ammoniak wurden von Sigma-Aldrich gekauft. Sämtliche verwendeten Chemikalien und Lösemittel hatten HPLC-Qualität und es wurde hochreines Wasser aus einem Milli-Q-Wasseraufreinigungssystem (Modell Millipore Elix 10, USA) verwendet.

Verfahren

10 µl der mobilen Phase wurden als Blindprobe injiziert. Danach wurden die einzelnen Proben der Linearitätsuntersuchung jeweils dreifach bestimmt. Aus den Peakflächen und Retentionszeiten (RT) der einzelnen Konzentrationen wurden die Standardabweichung (SD) und die relative Standardabweichung (% RSD) berechnet. Die Nachweisgrenzen (LOD) und die Quantifizierungsgrenzen (LOQ) wurden mithilfe der Injektionen mit geringen Konzentrationen im linearen Bereich bestimmt. Zur Erstellung der Kalibrierungskurve für die Monomere wurde die durchschnittliche Peakfläche für die einzelnen Konzentrationsstufen gegen die Insulinkonzentration aufgetragen.

Tabelle 1: Für SEC-HPLC verwendete chromatographische Parameter.

Parameter	Bedingungen
Mobile Phase	200 ml Essigsäure (wasserfrei), 300 ml Acetonitril und 400 ml Wasser, eingestellt auf pH 3,0 mit konzentriertem Ammoniak, und mit Wasser verdünnt auf 1000,0 ml.
TCC-Temperatur	Umgebungstemperatur
Isokratische Analyse	Mobile Phase A
Injektionsvolumen	10 µl
Flussrate	0,5 ml/min
UV-Detektion	276 nm

Linearität und Bereich

Die Kalibrierungskurve wurde mit neun Standardkonzentrationen von Innovator-Insulin im Bereich von 10,6 bis 3400 µg/ml erstellt.

Quantifizierungsgrenze und Nachweisgrenze

Die Insulinkonzentration, die ein Signal/Rauschen-Verhältnis (S/N) von > 3 und von > 10 ergab, wurde als Nachweisgrenze bzw. als Quantifizierungsgrenze bestimmt.

Herstellung von Insulin-Aggregaten

Aggregate des Insulins wurden durch thermische Belastung hergestellt. Dazu wurde ungefähr 3,4 mg/ml Arzneiprodukt 6 Stunden lang in einem Polypropylenröhrchen bei 60 °C inkubiert. Danach wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und sofort im Anschluss daran analysiert.

Systemeignung

Gemäß dem Entwurf der Monographie bestehen folgende Anforderungen an die Systemeignung:

- **Symmetriefaktor:** Maximal 2,0 für den Peak des Insulin-Analogons
- **Peak-Tal-Verhältnis:** Mindestens 2
- **Gesamtfläche aller Verunreinigungen mit einer Retentionszeit, die geringer ist als die des Insulin-Analogons:** Nicht mehr als 0,3 % der Gesamtfläche der Peaks, wobei Peaks mit einer größeren Retentionszeit als der des Insulin-Peaks außer Acht gelassen werden

Ergebnisse und Diskussion

Trennung und Nachweis

Das Biosimilar-Insulin wurde mit dem Innovator-Insulin als Referenzstandard verglichen. Die optimierte SEC-HPLC-Trennung des intakten Biosimilar- und des Innovator-Insulins auf der Säule

des Typs AdvanceBio SEC 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm lieferte eine hervorragende Trennung. Homogene Profile ohne Anzeichen von Aggregation wurden für eine Gesamt-Analysendauer von 55 Minuten gezeigt. Ein Peak des Konservierungsmittels *m*-Cresol wurde ebenfalls beobachtet. Er eluierte ungefähr nach 49 Minuten (Abbildung 1).

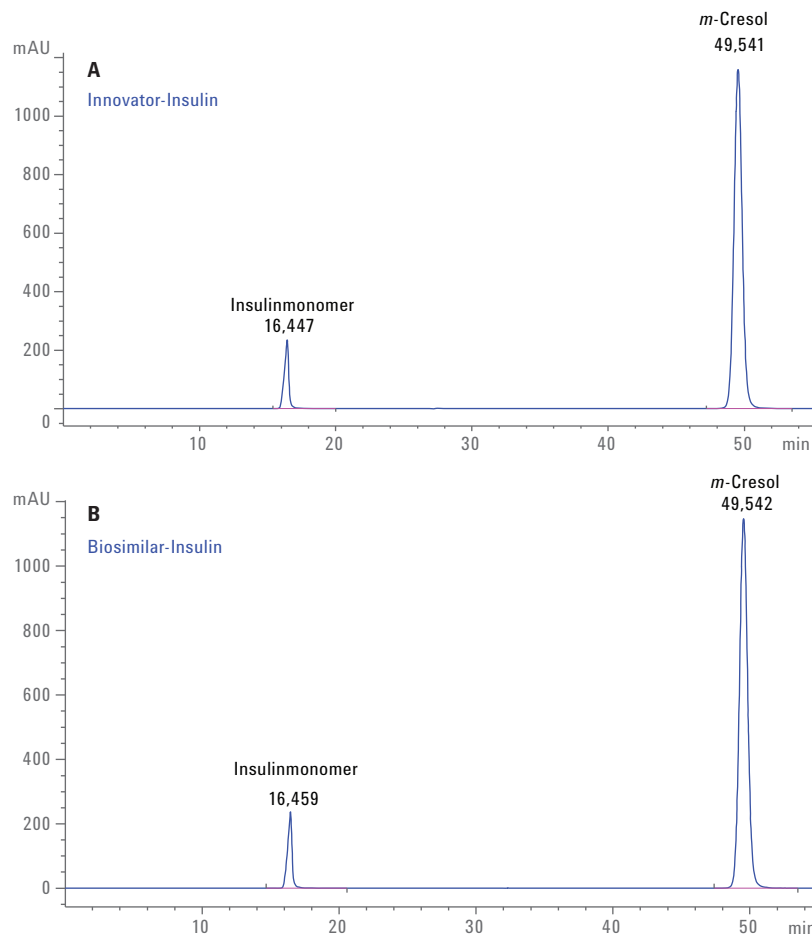


Abbildung 1: SEC-HPLC-Profil von Innovator- und Biosimilar-Insulin auf einer Säule des Typs Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

Präzision von Retentionszeit und Peakfläche

Abbildung 2 zeigt die überlagerten Chromatogramme von jeweils sechs Wiederholungsanalysen von Innovator- und Biosimilar-Insulin. Sie zeigen die hervorragende Reproduzierbarkeit der Trennung. Tabelle 2 fasst die durchschnittlichen Retentionszeiten (RT) und die relativen Standardabweichungen (RSD) der Peakflächen für das Insulinmonomer der sechs Wiederholungsanalysen zusammen. Die Retentionszeiten (RT) und die relativen Standardabweichungen (RSD) der Peakflächen für das Insulinmonomer lagen innerhalb der akzeptablen Grenze von $\pm 3\%$ bzw. $\pm 5\%$, was die hervorragende Reproduzierbarkeit und Präzision dieser Methode aufzeigt.

Systemeignung

Tabelle 3 führt die Akzeptanzkriterien für die Systemeignungsuntersuchung für Insulin-Analoga auf und Tabelle 4 fasst die Ergebnisse für die Systemeignung zusammen.

Diese Ergebnisse des Systemeignungstests für Innovator- und Biosimilar-Insulin zeigen, dass die mit dem bioinerten LC-System von Agilent und einer AdvanceBio SEC-Säule durchgeführte Methode den strengen Leistungsanforderungen für die Insulinanalytik in der Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle entspricht.

Nachweisgrenze und Quantifizierungsgrenze

Die Nachweisgrenze und die Quantifizierungsgrenze wurden für das Innovator-Insulin bestimmt und betrugen $11,3 \mu\text{g/ml}$ bzw. $28 \mu\text{g/ml}$, was auf die Empfindlichkeit der Methode hinweist. Tabelle 5 zeigt die beobachteten Werte für die Nachweisgrenze bzw. die Quantifizierungsgrenze für Innovator-Insulin.

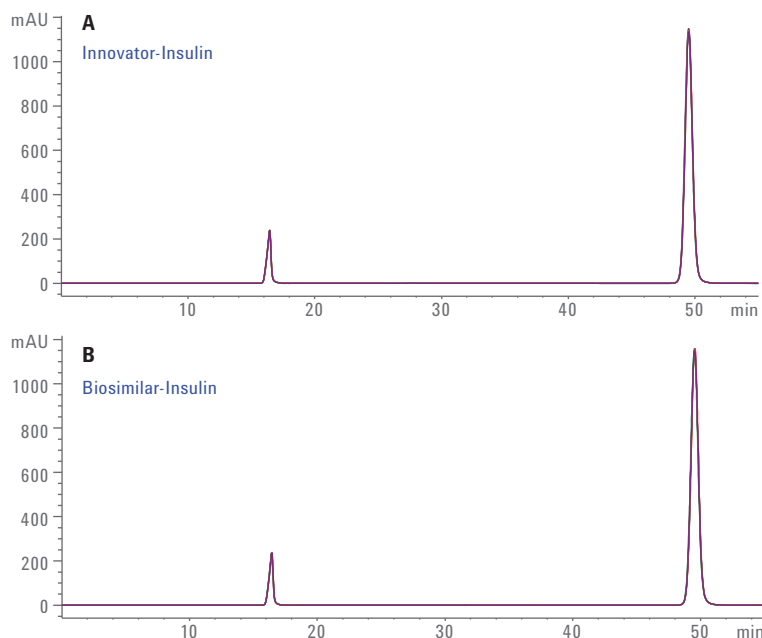


Abbildung 2: Überlagerte Chromatogramme von sechs Wiederholungsanalysen von Innovator- und Biosimilar-Insulin, die auf einer Säule des Typs Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, $7,8 \times 300 \text{ mm}$, $2,7 \mu\text{m}$ durchgeführt wurden.

Tabelle 2: Retentionszeit- und Peakflächengenauigkeit ($n = 6$).

Probe	RT		Peakfläche	
	Mittel (Min.)	RSD	Mittel (mAU/Min.)	RSD
Innovator-Insulin	16,450	0,057	5544,91	0,285
Biosimilar-Insulin	16,460	0,044	5459,55	0,662

Tabelle 3: Akzeptanzkriterien.

Parameter	Grenzwert
Symmetriefaktor	Maximal 2,0 für den Peak des Insulin-Analogons
Peak-Tal-Verhältnis	Mindestens 2
Gesamtfläche aller Verunreinigungen mit einer Retentionszeit, die geringer ist als die des Insulin-Analogons	Nicht mehr als 0,3 % der Gesamtfläche der Peaks

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse des Systemeignungstests.

Probe	Ergebnisse an einer Säule des Typs Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, $7,8 \times 300 \text{ mm}$, $2,7 \mu\text{m}$			Geeignet (Ja/Nein)
	Symmetrie-faktor	Peak-Tal-Verhältnis	Gesamtfläche aller Verunreinigungen mit einer Retentionszeit, die geringer ist als die des Insulin-Analogons	
Innovator-Insulin	1,71	–	0,167	Ja
Biosimilar-Insulin	1,72	–	0	Ja

Tabelle 5: Ergebnisse für LOD, LOQ und S/N ($n = 3$) für Innovator-Insulin.

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	S/N	Fläche (0)
10,6 (LOD)	11,9	12,8
31,8 (LOQ)	34,7	37,4

Linearität

Die Linearitätskurven von Innovator-Insulin wurden für den Bereich ab der Nachweisgrenze (LOD) bis zur auf dem Etikett angegebenen Konzentration (3,4 mg/ml) in der Studie erstellt, wobei die Flächen-Response und die Insulin-Konzentration herangezogen wurden. Abbildung 3 zeigt die Linearitätskurve für Insulin im Konzentrationsbereich von 10,6 bis 3400 µg. Der beobachtete Wert für R^2 war größer als 0,99, was eine hervorragende dosisabhängige Korrelation zwischen Peakfläche und Insulinkonzentration nahelegt.

Analyse und Quantifizierung von Aggregation und Abbau

Das Verunreinigungsprofil von Biotherapeutika ist für die Arzneimittelsicherheit von immer größerer Bedeutung. Obwohl Aggregate in äußerst geringen Konzentrationen vorhanden sind, können sie einen erheblichen Einfluss auf die Produktqualität haben. Die AdvanceBio SEC-Säule wurde so entwickelt, dass sie so wenig wie möglich Wechselwirkungen mit Biomolekülen eingeht und damit eine eindeutige Basislinientrennung der Insulinaggregate ermöglicht. Diese Insulinaggregate eluieren, wie in Abbildung 4 gezeigt, nach 11,181 bzw. 13,884 Minuten von der AdvanceBio SEC-Säule.

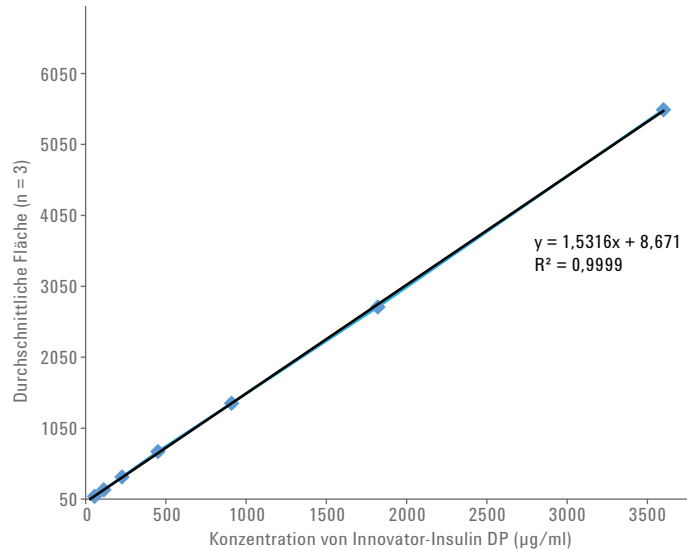


Abbildung 3: Linearitätskurve von Insulin mit Standardkonzentrationen von 10,6 bis 3400 µg/ml mit hervorragendem Linearitätskoeffizienten.

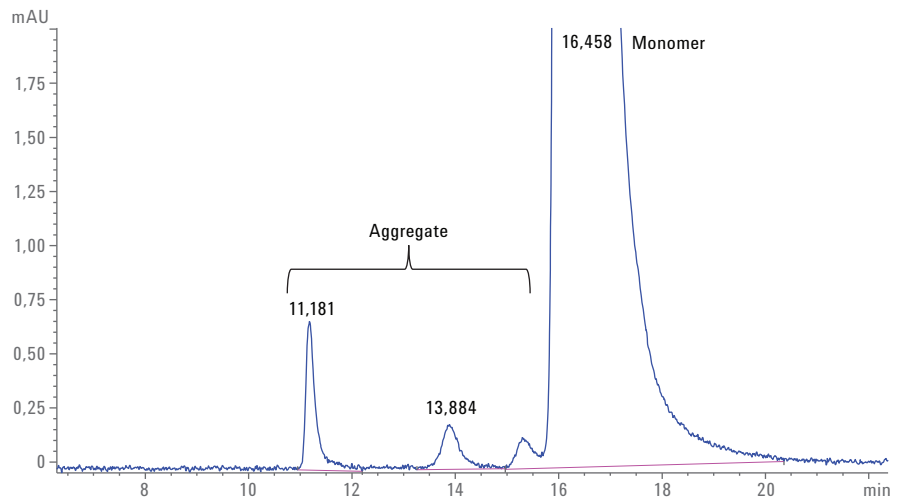


Abbildung 4: Profil des Insulins, das thermischer Belastung unterzogen wurde. Die Trennung an einer Agilent AdvanceBio SEC-Säule zeigt die Basislinientrennung der Insulinaggregate.

Untersuchungen zum wirtschaftlichen Wert und der Lebensdauer

Ein Labor- oder Gruppenleiter muss in erster Linie die Kosten im Blick haben, insbesondere wenn man die Kosten der AdvanceBio SEC-Säule mit denen anderer Säulentypen vergleicht. Bei SEC-Trennungen ist, abgesehen von den Kosten für Mitarbeiter und Gerät, die Säule selbst die teuerste Komponente. Ist die Lebensdauer der Säulen nicht lang genug, oder gibt es Probleme bei der Reproduzierbarkeit von Säule zu Säule, müssen unter Umständen mehrere Säulen getestet werden. Die Sicherstellung der Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge durch die Kontrolle des gesamten Herstellungsprozesses ist daher äußerst wichtig. Abbildung 5 zeigt die Trennung von AdvanceBio 130 Å-Proteinmarkern auf vier verschiedenen Chargen des AdvanceBio SEC 130 Å-Mediums und damit die sorgfältige Kontrolle des gesamten Herstellungsprozesses.

Ein wichtiges Ziel ist es, eine möglichst lange Lebensdauer der Säule für die Entwicklungsprozesse der Kunden sicherzustellen. Die lange Lebensdauer einer Säule bietet zusätzliche Vorteile, da die Ausfallzeit stark reduziert ist. Abbildung 6 zeigt sechs überlagerte Chromatogramme von 250 Injektionen von 3 mg/ml Insulin, aufgenommen jeweils nach 50 Analysenläufen. Tabelle 6 gibt die Retentionszeit, die Peakfläche, den Tailing-Faktor und die Anzahl der theoretischen Trennstufen jeweils für die ausgewählten Analysenläufe an.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass es nahezu keine Veränderung der Retentionszeit, der Peakfläche sowie des Tailing-Faktors im Verlauf der 250 Injektionen gibt. Darüber hinaus verändert sich die Anzahl der theoretischen Trennstufen, ein Maß für die Effizienz der Säule, auch nicht wesentlich.

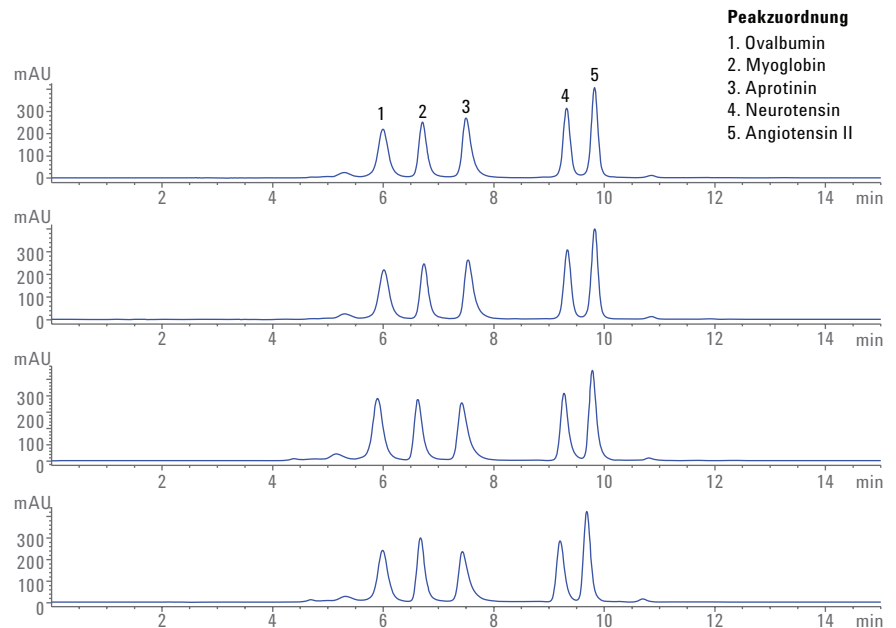


Abbildung 5: Trennung von Agilent AdvanceBio 130 Å-Proteinstandards auf vier verschiedenen Chargen des Mediums für Säulen des Typs Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

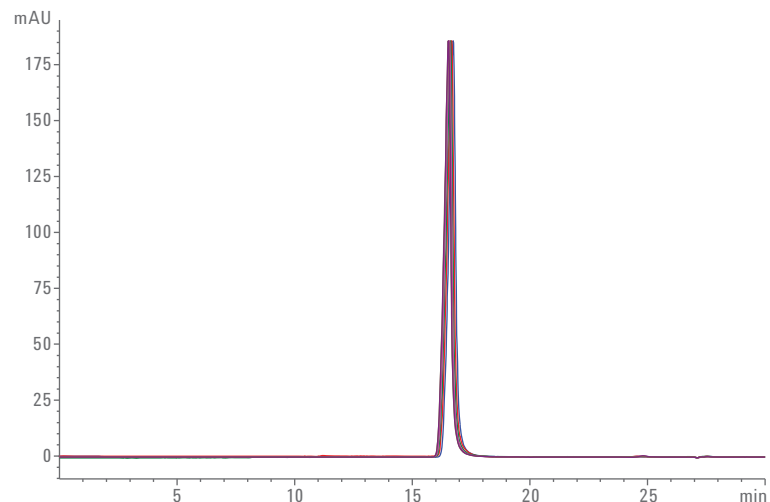


Abbildung 6: Überlagerung von sechs Chromatogrammen für 250 Injektionen, aufgenommen jeweils nach 50 Analysen.

Schlussfolgerung

Die Größenausschlusschromatographie ist eine bestens geeignete Methode für den Nachweis und die Überwachung von Aggregaten und Monomeren in Biopharmazeutika. Diese Application Note zeigt, dass sich eine Säule des Typs AdvanceBio SEC 130 Å von Agilent hervorragend für die Untersuchung von Insulin-Analoga eignet. Wir verwendeten den Entwurf der Pharmakopöe-Methode, um ein einfaches Verfahren mit UV-Detektion zur Bestimmung der molekularen Ähnlichkeit zwischen den Arzneimittelprodukten Biosimilar- und Innovator-Insulin mit einer Säule des Typs AdvanceBio SEC 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm zu entwickeln. Die Retentionszeit- und Peakflächengenauigkeit der Methode war hervorragend und entsprach den Anforderungen an die Systemeignung. Es wurde eine lineare Beziehung zwischen Peakfläche und acht Standardkonzentrationen des Arzneimittelprodukts Insulin mit ausgezeichnetem Wert für den Linearitätskoeffizienten beobachtet. Die Nachweisgrenze und die Quantifizierungsgrenze wurde bestimmt; sie betrug 10,6 bzw. 31,8 µg/ml, was die Empfindlichkeit der Methode verdeutlicht. Mit der AdvanceBio SEC-Säule konnten Aggregate, die in Forced-Stress-Experimenten hergestellt wurden, getrennt und überwacht werden. Darüber hinaus haben wir die wirtschaftlichen Vorteile der Verwendung einer AdvanceBio SEC-Säule, darunter die Reduzierung der Herstellungsschwankungen von Charge zu Charge und die verlängerte Lebensdauer der Säule mit reproduzierbaren und robusten Ergebnissen gezeigt. Diese einfache und reproduzierbare Methode ist in Verbindung mit einem bioinerten und korrosionsfesten Gerät als zuverlässig anzusehen und eignet sich für Routine-Qualitätsprüfungen von Insulin während des gesamten Entwicklungsprozesses.

Tabelle 6: Beobachtete Retentionszeit, Peakfläche, Tailing-Faktor und Anzahl der theoretischen Trennstufen für 250 Insulin-Injektionen.

Injektion Nr.	RT (Min)	Fläche	Tailing-Faktor	Theoretische Trennstufen
1	16,657	3944	0,899	16 001
50	16,671	3966	0,890	15 849
100	16,681	3968	0,898	15 982
150	16,622	3942	0,893	15 942
200	16,634	3953	0,895	15 919
250	16,634	3963	0,890	15 944

Literatur

1. Kannan V; Narayanaswamy P; Gadamsetty D; Hazra P; Khedkar A; Iyer, H. A tandem mass spectrometric approach to the identification of O-glycosylated glargine glycoforms in active pharmaceutical ingredient expressed in *Pichia pastoris*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2009**, 23(7), 1035-42.
2. Pharmeuropa, Vol. 23, No. 2, April **2011**.

www.agilent.com/chem

Ausschließlich zu Forschungszwecken. Nicht für Diagnoseverfahren geeignet.

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2016
Veröffentlicht in den USA, 1. Mai 2016
5991-6872DEE



Agilent Technologies