胰岛素生物仿制药与创新药物的体积排阻色谱分析

使用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱

应用简报

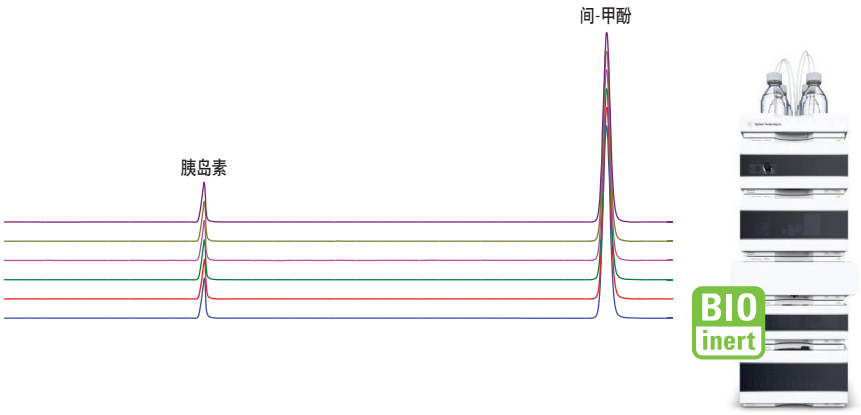
生物制药

作者

M. Sundaram Palaniswamy 与
Andrew Coffey
安捷伦科技有限公司

摘要

胰岛素是一种用于控制血糖稳态的小分子多肽激素。基因工程技术使生物制药公司开发出了各种长效胰岛素类似物。目前仍未出现用于胰岛素类似物分析的药典方法。本文根据 EP 方法草案，采用 Agilent AdvanceBio SEC 130Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm 色谱柱开发出了一种用于鉴定胰岛素类似物创新药物和生物仿制药的 SEC 方法。采用系统适用性测试以及由胰岛素创新药物作为标准物质的保留时间 (RT) 和峰面积精度研究证实了该方法在常规分析中的有效性。本应用简报还介绍了这款色谱柱在定量研究中检测分子量大于胰岛素的杂质方面的应用。



Agilent Technologies

前言

新型胰岛素类似物是人胰岛素产品的一种替代物。临床试验已经证明，与人胰岛素相比，这些类似物具有相同或更好的疗效。胰岛素类似物目前是市面上的长效型人胰岛素。美国食品药品监督管理局 (USFDA) 在 2000 年 4 月批准了胰岛素类似物的使用。与小分子不同，生物治疗药物来自于生物过程。每个制造商各自都有一套用于生产原料药和药品的内部开发过程。这些生产方法会使原料药中产生聚集体和降解产物等杂质。由于对降糖药需求的不断增加，因此生产不含杂质的药物以及提供无副作用的安全药物是一项十分重要却充满挑战的任务。在生物制药行业中，配备紫外检测器的液相色谱仪是批签发和表征研究的一种通用工具[1]。体积排阻色谱 (SEC) 则是纯度分析的首选方法，可用于检测药品中的聚集体。本应用简报描述了一种用于测定胰岛素生物仿制药及其创新药物参比之间的分子相似性，并进行了系统适用性与方法精密度分析的 SEC-UV 方法[2]。这些测试可确保方法所得到的结果具有合格的准确度和精密度。所选标准基于关键色谱参数及其在可接受限值内的变化，方法评价实验中对该限值进行了定义。胰岛素的线性曲线在 10.6 - 3400 µg/mL 的范围内具有出色的相关系数，表明此方法适用于定量分析。文中还描述了采用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱监测并分离强制应激研究中测得的分子量大于药品的杂质。

材料与方法

仪器

采用完全生物兼容、最高耐压达 600 bar 的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统，由以下模块组成：

- Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱泵 (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 生物惰性高性能自动进样器 (G5667A)
- Agilent 1200 Infinity 系列柱温箱 (G1330B)
- 包含生物惰性溶剂加热元件的 Agilent 1260 Infinity 柱温箱（G1316C，选项 19）
- Agilent 1260 Infinity DAD VL（G1315D，配备生物惰性标准 10 mm 流通池）
- Agilent AdvanceBio SEC, 130Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm（部件号 PL1180-5350）

软件

Agilent ChemStation B.04.03（或更高版本）

体积排阻色谱参数

表 1 展示了使用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相系统进行体积排阻分析时的色谱参数。

试剂、样品与材料

商品化胰岛素创新药物与生物仿制药购自当地药店并根据制造商的使用说明进行储存。乙酸和氨水购自 Sigma-Aldrich。所有化学品和溶剂均为 HPLC 级，高纯水采用 Milli Q 水纯化系统（Millipore Elix 10 型，美国）进行处理。

步骤

进样 10 µL 流动相 A 作为空白，随后对各线性浓度分别重复进样三次。用每个浓度的峰面积和保留时间 (RT) 计算标准偏差 (SD) 和相对标准偏差 (RSD%) 值。以较低线性浓度样品的进样分析确定检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。将各线性浓度下的平均峰面积对胰岛素浓度作图，得出单体校准曲线。

表 1. SEC HPLC 的色谱参数

参数	条件
流动相	200 mL 无水乙酸、300 mL 乙腈和 400 mL 水，用浓氨水将 pH 调节至 3.0，并用水稀释至 1000.0 mL。
TCC 温度	室温
等度运行	流动相 A
进样量	10 µL
流速	0.5 mL/min
紫外检测	276 nm

线性和范围

校准曲线由浓度范围为 10.6-3400 µg/mL 的 9 个胰岛素创新药物的标准浓度点构建。

LOQ 和 LOD

将信噪比 (S/N) > 3 时的最低胰岛素浓度定义为 LOD，而将 S/N > 10 时的浓度定义为 LOQ。

胰岛素聚集体制备

通过温度处理制备胰岛素聚集体。简言之，将约 3.4 mg/mL 的药品置于聚丙烯管中并在 60 °C 下温育 6 小时。将样品冷却至室温并立即进行分析。

系统适用性

根据各论草案得出以下系统适用性要求:

- **对称因子：**胰岛素类似物色谱峰的最大值为 2.0
- **峰谷比：**最小值为 2
- **保留时间小于胰岛素类似物保留时间的所有杂质总和：**不高于色谱峰总面积的 0.3%，不考虑 RT 大于胰岛素峰的所有峰

结果与讨论

分离和检测

采用胰岛素创新药物为参比标样，与胰岛素生物仿制药进行对比。通过优化 SEC HPLC 分离条件，完整胰岛素生物仿制药与创新药物 AdvanceBio SEC 130 Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm 色谱柱上实现了出色分离。55 分钟的总分析时间表明样品十分均匀，并未发生聚集。色谱柱中还可观察到防腐剂间-甲酚的峰，洗脱时间约为 49 分钟 （图 1）。

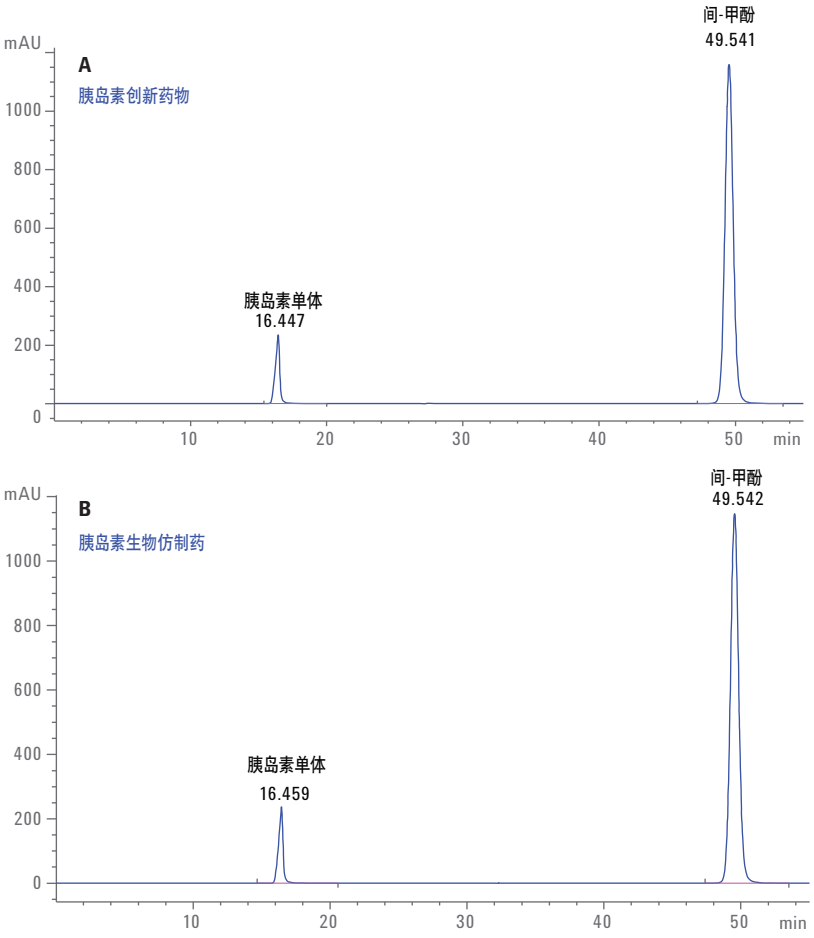


图 1. 胰岛素创新药物和生物仿制药在 Agilent AdvanceBio SEC, 130Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm 色谱柱上得到的 SEC HPLC 色谱图

保留时间和峰面积的精密度

图 2 展示了胰岛素创新药物与生物仿制药六次重复进样的叠加色谱图，表明结果具有绝佳的分离重现性。表 2 列出了六次重复进样中胰岛素单体的平均 RT 与峰面积 RSD。胰岛素单体的 RT 和峰面积 RSD 分别为可接受限值的 ±3% 和 ±5%，表明该方法具有优异的重现性和精密度。

系统适用性

表 3 列出了胰岛素类似物此次系统适用性研究的可接受标准，表 4 则展示了系统适用性的汇总结果。

胰岛素创新药物与生物仿制药的系统适用性测试结果表明，使用安捷伦生物惰性液相色谱仪以及 AdvanceBio SEC 色谱柱的方法符合胰岛素 QA/QC 分析的严格性能要求。

LOD 和 LOQ

胰岛素创新药物的 LOD 和 LOQ 分别为 11.3 µg/mL 和 28 µg/mL，表明该方法的灵敏度极高。表 5 展示了胰岛素创新药物的 LOD 和 LOQ 测定值。

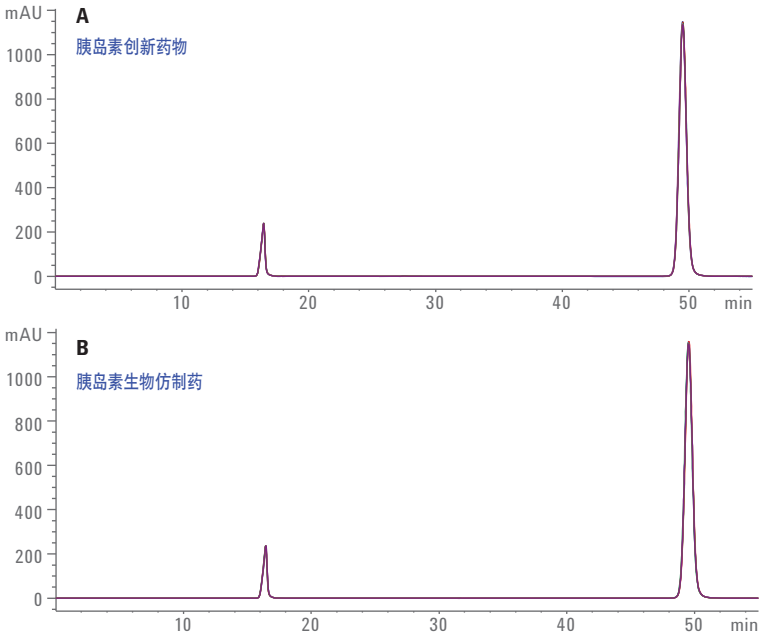


图 2. 在 Agilent AdvanceBio SEC, 130Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm 色谱柱上分离得到的胰岛素创新药物和生物仿制药的 6 次重复叠加色谱图

表 2. RT 和峰面积精确度 (n = 6)

样品	RT		峰面积	
	平均值 (min)	RSD	平均值 (mAU/min)	RSD
胰岛素创新药物	16.450	0.057	5544.91	0.285
胰岛素生物仿制药	16.460	0.044	5459.55	0.662

表 3. 可接受标准

参数	限值
对称因子	胰岛素类似物色谱峰的最大值为 2.0
峰谷比	最小值为 2
保留时间小于胰岛素类似物保留时间的所有杂质总和	不高于色谱峰总面积的 0.3%

表 4. 系统适用性测试结果汇总

样品	Agilent AdvanceBio SEC, 130Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm 色谱柱分析结果			
	对称因子	峰谷比	保留时间小于胰岛素类似物保留时间的所有杂质总和	通过（是/否）
胰岛素创新药物	1.71	–	0.167	是
胰岛素生物仿制药	1.72	–	0	是

表 5. 胰岛素创新药物的 LOD、LOQ 和 S/N 结果 (n = 3)

浓度 (µg/mL)	S/N	平均峰面积
10.6 (LOD)	11.9	12.8
31.8 (LOQ)	34.7	37.4

线性

使用面积响应与胰岛素浓度从 LOD 到本研究声明的最高浓度水平 (3.4 mg/mL) 构建了胰岛素创新药物的线性曲线。图 3 显示了浓度范围为 10.6 - 3400 µg 的胰岛素线性曲线。R^2 测定值大于 0.99，表明峰面积与胰岛素浓度之间存在良好的剂量依赖相关性。

聚集/降解分析与定量

生物治疗药物中的杂质分布对药品安全的重要性日益凸显。尽管聚集体浓度极低，但仍会对产品质量产生极大影响。AdvanceBio SEC 色谱柱设计用于最大限度减少与生物分子的相互作用，从而实现胰岛素聚集体的完全基线分离。这些胰岛素聚集体在 AdvanceBio SEC 色谱柱上的洗脱时间分别为 11.181 和 13.884 分钟，如图 4 所示。

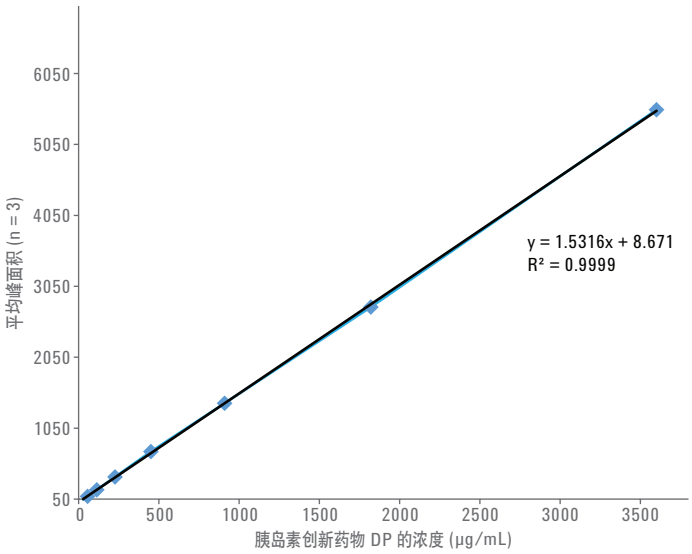


图 3. 10.6 - 3400 µg/mL 胰岛素标准浓度的线性曲线，显示出极佳的线性相关系数值

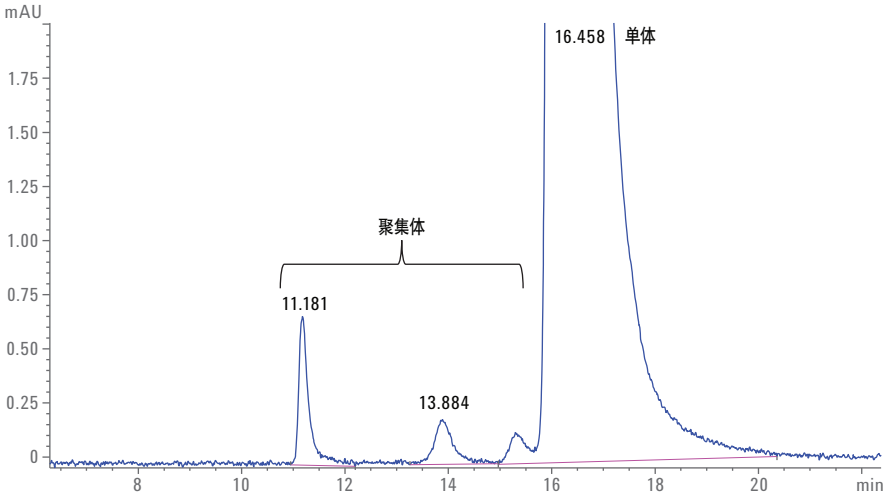


图 4. 经加热处理胰岛素的 Agilent AdvanceBio SEC 色谱图表明胰岛素聚集体实现了基线分离

经济价值和使用寿命研究

特别在对比 AdvanceBio SEC 色谱柱与其他色谱柱类型的成本时，成本是实验室主管或团队负责人可能会重点关注的一个方面。在 SEC 分离中，除操作人员和仪器成本外，最昂贵的开销就是色谱柱本身的成本。如果色谱柱寿命不够长或柱间重现性出现问题，那么就可能需要筛选多个色谱柱。通过控制整个生产过程来确保批间重现性是必不可少的。图 5 展示了 AdvanceBio 130Å 蛋白质标准品在 4 个不同批次 AdvanceBio SEC 130Å 介质中的分离，确保对整个生产过程实现了完全控制。

我们的一个目标是确保色谱柱在整个用户开发过程中具有更长的使用寿命。延长色谱柱使用寿命具有额外优势，例如可大大缩短停机时间。图 6 显示 3 mg/mL 胰岛素原料药共进样 250 次，每隔 50 次选择一张色谱柱得到的 6 张叠加色谱图。表 6 列出了所选进样的 RT、峰面积、拖尾因子与理论塔板数。

结果清晰表明，RT、峰面积和拖尾因子在 250 进样中几乎未发生改变。理论塔板数和柱效指标也未产生明显差异。

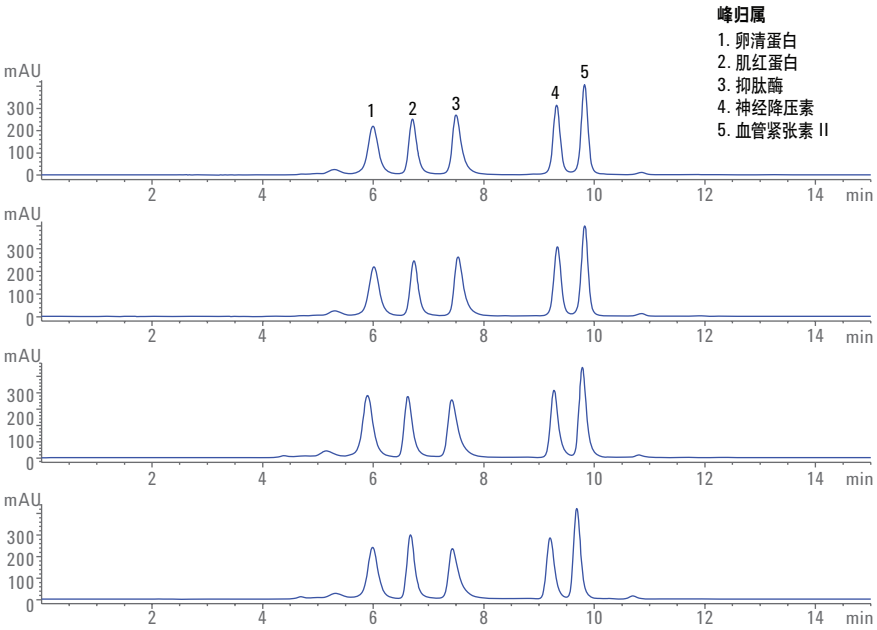


图 5. AdvanceBio 130Å 蛋白质标准品在 4 个不同批次 AdvanceBio SEC 130Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm 介质中的分离

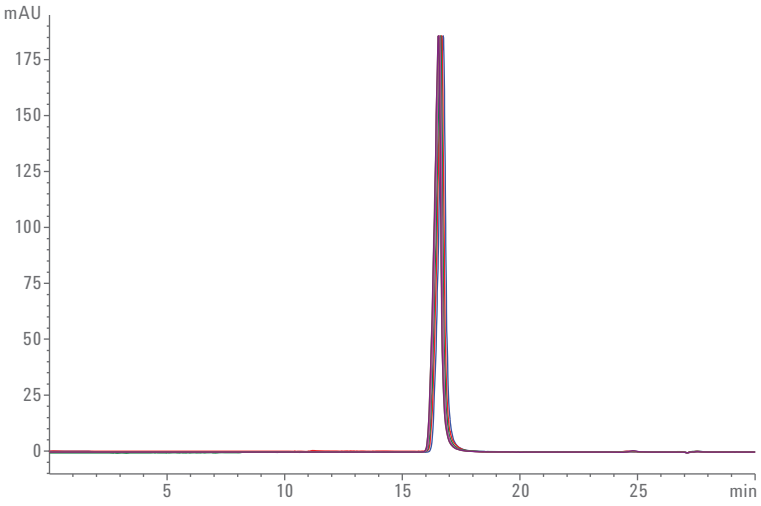


图 6. 250 次进样中每隔 50 次选择一张色谱图得到的 6 次重复进样叠加色谱图

结论

体积排阻色谱法是检测与监控生物药物聚集体和单体的常用方法。本应用简报证明了 Agilent AdvanceBio SEC 130Å 色谱柱是进行胰岛素类似物研究的最佳选择。我们采用药典方法草案开发了一个用于定义胰岛素生物仿制药品和创新药品之间生物相似性的紫外型简单方法，方法采用了 AdvanceBio SEC 130Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm 色谱柱。该方法具有优异的 RT 和峰面积精度，并能满足系统适用性要求。峰面积与胰岛素药品的 8 个标准浓度之间呈线性关系，并具有出色的线性相关系数。LOD 和 LOQ 测定值分别为 10.6 µg/mL 和 31.8 µg/mL，表明方法的灵敏度极高。AdvanceBio SEC 色谱柱可用于分离和监测强制应激研究中分析的聚集体。我们还展示了使用 AdvanceBio SEC 色谱柱所具备的更大经济效益，其中包括减少批间生产差异，以及利用重现而稳定的结果延长色谱柱使用寿命。将这一简单的重现方法与生物惰性和耐腐蚀仪器相结合，可作为整个开发过程中胰岛素常规质量检查的可靠适用方法。

表 6. 胰岛素原料药 250 进样的 RT、峰面积、拖尾因子和理论塔板数

进样次数	RT (min)	峰面积	拖尾因子	理论塔板数
1	16.657	3944	0.899	16001
50	16.671	3966	0.890	15849
100	16.681	3968	0.898	15982
150	16.622	3942	0.893	15942
200	16.634	3953	0.895	15919
250	16.634	3963	0.890	15944

参考文献

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**

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2016

2016 年 5 月 1 日，中国出版

5991-6872CHCN

Agilent Technologies