

Cromatografía de exclusión por tamaño para insulina biosimilar y original mediante la columna Agilent AdvanceBio SEC

Nota de aplicación

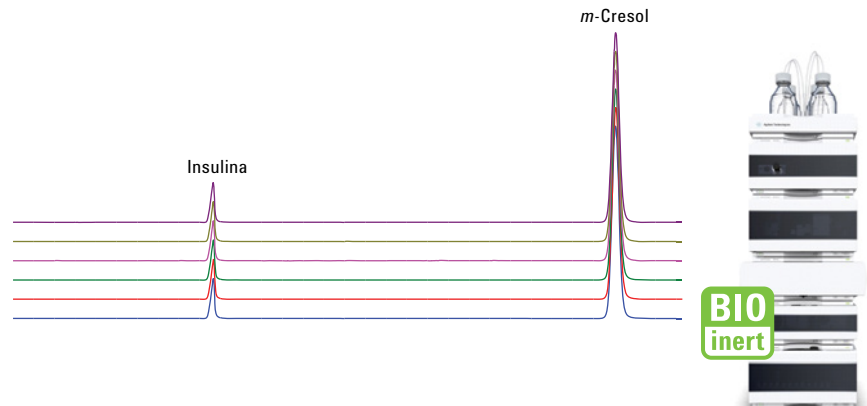
Industria biofarmacéutica

Autores

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

Resumen

La insulina es una hormona polipeptídica pequeña que controla la homeostasis de la glucosa en sangre. Las técnicas de ingeniería genética permiten a las empresas biofarmacéuticas desarrollar diversos análogos de la insulina de larga duración. No existe ningún método disponible en la farmacopea para el análisis de análogos de la insulina. Se ha desarrollado un método SEC para identificar la insulina original y un análogo biosimilar, siguiendo un borrador de método EP, que utiliza una columna Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm. La eficacia de este método, para el análisis de rutina, se ha confirmado con el uso de una prueba de idoneidad del sistema y mediante estudios de tiempo de retención (TR) y precisión del área, utilizando insulina original como material de referencia. Esta nota de aplicación también presenta la aplicación de esta columna para la detección de impurezas con masas moleculares mayores que la de la insulina para realizar estudios de cuantificación.



Agilent Technologies

Introducción

Los novedosos análogos de la insulina son alternativas a los productos de insulina humana. Los ensayos clínicos han demostrado unos resultados de eficacia iguales o superiores cuando estos análogos se comparan con la insulina humana. Los análogos de la insulina son, en la actualidad, la insulina humana basal de larga duración de venta en el mercado. El análogo de insulina fue aprobado para su uso por la Dirección Federal de Fármacos y Alimentos (Food and Drug Administration) de Estados Unidos en abril de 2000. A diferencia de las moléculas pequeñas, los productos bioterapéuticos se crean mediante procesos biológicos. Cada fabricante utiliza un proceso desarrollado internamente para la fabricación de principios activos y productos farmacéuticos. Estos métodos de producción pueden generar impurezas derivadas del principio activo, como agregados y productos de degradación. Debido al aumento en la demanda de fármacos antidiabéticos, resulta esencial aunque difícil producir fármacos exentos de impurezas, y proporcionar medicamentos seguros y sin efectos secundarios. En la industria biofarmacéutica, la LC con detección UV es una herramienta versátil para estudios de liberación y caracterización de lotes¹. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es el método de elección para el análisis de pureza y la detección de agregados del producto farmacéutico. Esta nota de aplicación describe un planteamiento SEC-UV para determinar la similitud molecular entre la insulina biosimilar y su referencia original, siguiendo un análisis de idoneidad del sistema y precisión del método². Estas pruebas garantizan que el método pueda generar resultados de exactitud y precisión aceptables. Los criterios seleccionados se basan en parámetros cromatográficos críticos y en su variación dentro de unos límites aceptables, que se definen durante los experimentos de evaluación del método. Se ha observado un coeficiente de correlación excelente para la curva de linealidad de la insulina en el rango de 10,6 a 3.400 µg/ml, lo que indica que el método es cuantitativo. También se muestra el uso de la columna Agilent AdvanceBio SEC

para vigilar y separar impurezas con masas moleculares mayores que las del producto farmacéutico, determinado por estudios en condiciones extremas.

Materiales y métodos

Instrumentos

Un sistema LC cuaternario bioinerte Agilent 1260 Infinity, completamente biocompatible, con una presión máxima de 600 bar, compuesto por:

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

Software

Agilent ChemStation B.04.03 (u otra versión posterior)

Parámetros de la cromatografía de exclusión por tamaño

En la tabla 1 se muestran los parámetros cromatográficos para la cromatografía de exclusión por tamaño utilizando un sistema LC bioinerte Agilent 1260 Infinity.

Reactivos, muestras y materiales

Se compraron insulina original y biosimilar comerciales en una farmacia local, y se conservaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ácido acético y el amoníaco se adquirieron de Sigma-Aldrich. Todos los compuestos químicos y los disolventes usados fueron de calidad para HPLC; asimismo, se utilizó agua de alta pureza obtenida con un sistema de purificación de agua Milli-Q (modelo Millipore Elix 10, EE.UU.).

Procedimiento

Se inyectaron 10 µl de fase móvil como blanco, y a continuación niveles de linealidad individuales 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 de insulina para crear la curva de calibración para los monómeros.

Tabla 1. Parámetros cromatográficos utilizados para HPLC SEC.

| Parámetros | Condiciones |
|---|--|
| Fase móvil | 200 ml de ácido acético anhidro, 300 ml de acetonitrilo y 400 ml de agua, ajustados a pH 3,0 con amoníaco concentrado y diluido a 1.000,0 ml con agua. |
| Temperatura TCC (compartimento termostatazado de columna) | Ambiente |
| Análisis isocrático | Fase móvil A |
| Volumen de inyección | 10 µl |
| Caudal | 0,5 ml/min |
| Detección UV | 276 nm |

Linealidad y rango

La curva de calibración se creó con nueve patrones de insulina original con concentraciones en un rango entre 10,6 y 3.400 µg/ml.

LOQ y LOD

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

Preparación de agregados de insulina

Se prepararon agregados de insulina en condiciones extremas de temperatura. De forma resumida, se incubaron aproximadamente 3,4 mg/ml del producto farmacéutico a 60 °C durante 6 horas en un tubo de polipropileno. Las muestras se enfriaron hasta temperatura ambiente y se analizaron de inmediato.

Idoneidad del sistema

Según el borrador de la monografía, los siguientes son los requisitos de idoneidad del sistema:

- **Factor de simetría:** 2,0 como máximo para el pico debido al análogo de insulina
- **Relación pico/valle:** 2 como mínimo
- **Total de todas las impurezas con tiempo de retención menor al del análogo de insulina:** No más del 0,3 % del área total de los picos, desechando todos los picos con TR mayor que el del pico de insulina

Resultados y comentarios

Separación y detección

Se comparó la insulina biosimilar utilizando la original como estándar de referencia. La separación por HPLC SEC optimizada de la insulina biosimilar intacta y original en la columna

AdvanceBio SEC 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm resultó excelente. Se demostraron perfiles homogéneos sin ninguna indicación de agregación para un tiempo de análisis total de 55 minutos. También se observó un pico debido al conservante *m*-cresol, que se eluyó aproximadamente a 49 minutos (Figura 1).

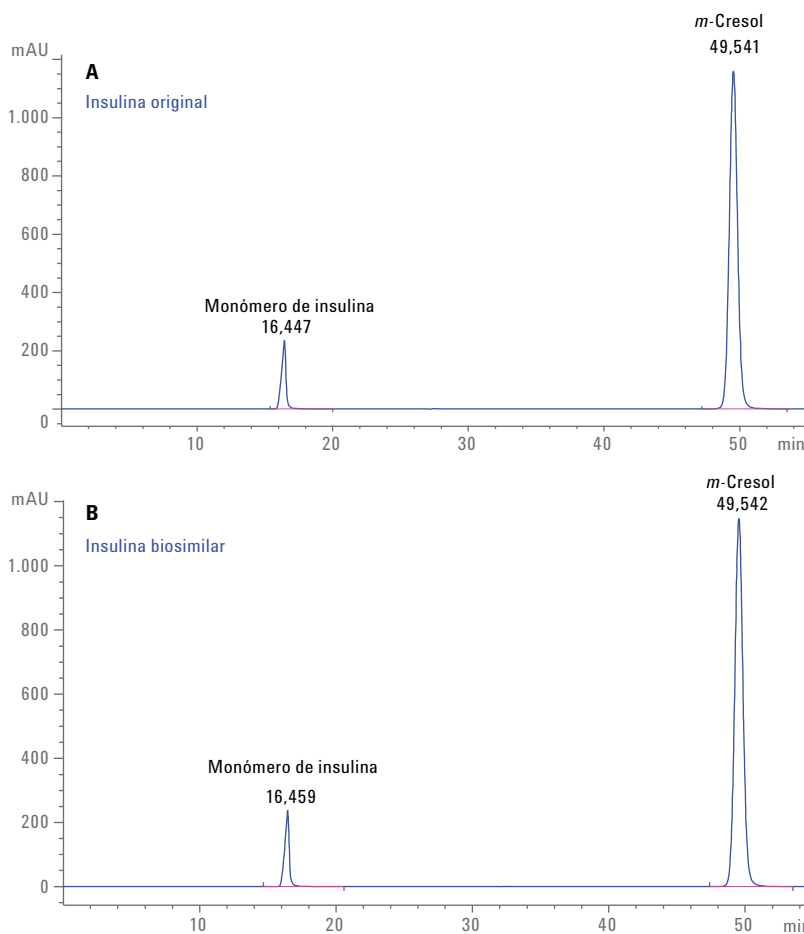


Figura 1. Perfil HPLC SEC de insulina original y biosimilar en una columna Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

Precisión del tiempo de retención y del área

En la figura 2 se muestra la superposición de seis réplicas de insulina original y biosimilar, que demuestra una excelente reproducibilidad de la separación. En la tabla 2 se muestran los TR promedio y las DER del área del pico para el monómero de insulina para las seis réplicas. El TR y la DER del área del pico para el monómero de insulina estuvieron dentro del límite aceptable de $\pm 3\%$ y $\pm 5\%$, respectivamente, lo cual demuestra la excelente reproducibilidad y precisión de este método.

Idoneidad del sistema

En la tabla 3 se muestran los criterios de aceptación para este estudio de idoneidad del sistema para el análogo de insulina; en la tabla 4 se presenta el resumen de los resultados de idoneidad del sistema.

Estos resultados de la prueba de idoneidad del sistema para la insulina original y biosimilar demuestran que el método realizado con un sistema LC bioinerte Agilent y una columna AdvanceBio SEC satisface los exigentes requisitos de rendimiento para el análisis de control y garantía de calidad (QA/QC) de insulina.

LOD y LOQ

Se analizaron los valores LOD y LOQ de la insulina original, y fueron de 11,3 $\mu\text{g/ml}$ y 28 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, lo que indica que el método es sensible. En la tabla 5 se muestran los valores LOD y LOQ observados de la insulina original.

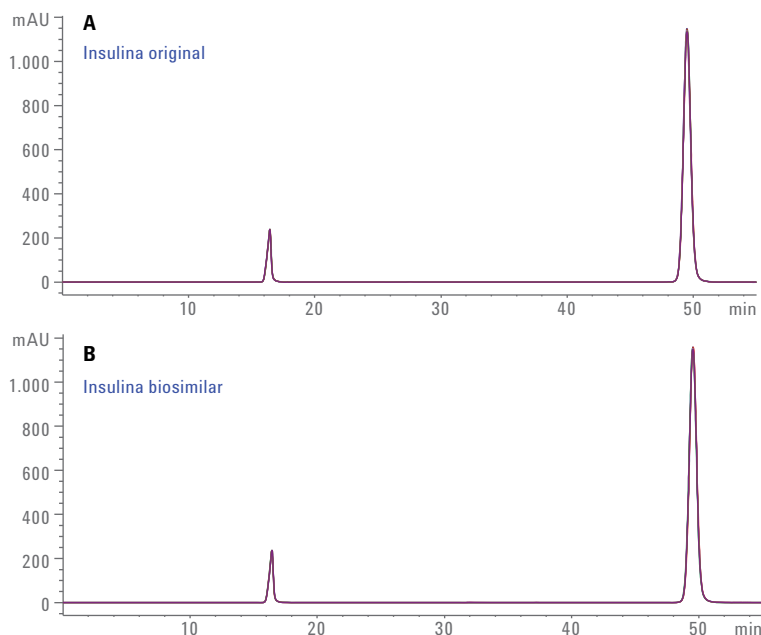


Figura 2. Superposición de seis réplicas de insulina original y biosimilar separadas en una columna Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 μm .

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

| Muestra | TR | | Área de pico | |
|---------------------|-------------|-------|-----------------|-------|
| | Media (min) | DER | Media (mAU/min) | DER |
| Insulina original | 16,450 | 0,057 | 5.544,91 | 0,285 |
| Insulina biosimilar | 16,460 | 0,044 | 5.459,55 | 0,662 |

Tabla 3. Criterios de aceptación.

| Parámetro | Límite |
|--|--|
| Factor de simetría | 2,0 como máximo para el pico debido al análogo de insulina |
| Relación pico/valle | 2 como mínimo |
| Total de todas las impurezas con TR menor al del análogo de insulina | No más del 0,3 % del área total de los picos |

Tabla 4. Resumen de resultados de la prueba de idoneidad del sistema.

| Muestra | Resultados en una columna Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 μm | | | Superado (Sí/No) |
|---------------------|--|---------------------|--|------------------|
| | Factor de simetría | Relación pico/valle | Total de todas las impurezas con TR menor al del análogo de insulina | |
| Insulina original | 1,71 | – | 0,167 | Sí |
| Insulina biosimilar | 1,72 | – | 0 | Sí |

Tabla 5. Valores LOD y LOQ, y relación señal-ruido (S/N) (n = 3) para la insulina original.

| Concentración ($\mu\text{g/ml}$) | S/N | Área media |
|------------------------------------|------|------------|
| 10,6 (LOD) | 11,9 | 12,8 |
| 31,8 (LOQ) | 34,7 | 37,4 |

Linealidad

Las curvas de linealidad para la insulina original se construyeron desde el nivel del límite de detección hasta el indicado en la etiqueta (3,4 mg/ml) en la prueba, utilizando la respuesta de área y la concentración de insulina. En la figura 3 se muestra la curva de linealidad para insulina en el rango de concentración de 10,6 a 3.400 µg. El valor de R² observado fue superior a 0,99, lo que sugiere una excelente correlación dependiente de la dosis entre el área de pico y la concentración de insulina.

Análisis de la agregación o degradación y cuantificación

El perfil de impurezas de los productos bioterapéuticos tiene cada vez mayor importancia en la seguridad de los fármacos. Aunque los agregados estén presentes en concentraciones extremadamente bajas, pueden afectar de manera importante la calidad del producto. La columna AdvanceBio SEC se ha diseñado para presentar una interacción mínima con las biomoléculas, permitiendo una separación en línea de base de los agregados de insulina. Los agregados de insulina se eluyen de la columna AdvanceBio SEC a 11,181 y 13,884 minutos, respectivamente, como se muestra en la Figura 4.

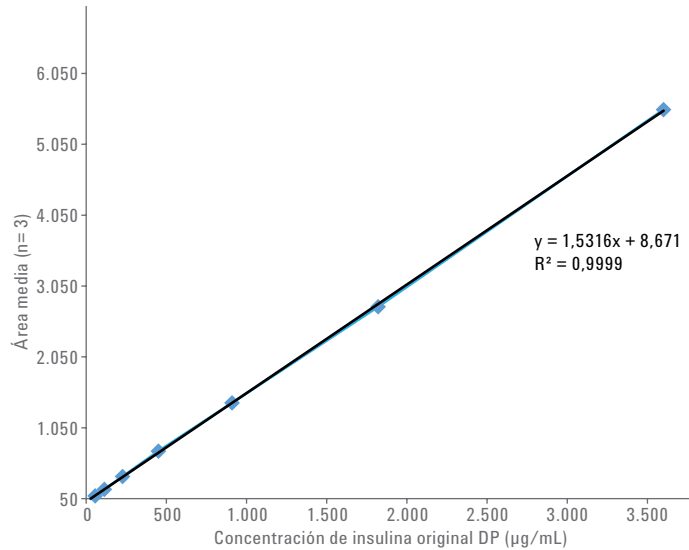


Figura 3. Curva de linealidad obtenida con ocho patrones de insulina, con concentraciones entre 10,6 y 3.400 µg/ml, en las que se observa un excelente valor del coeficiente de linealidad.

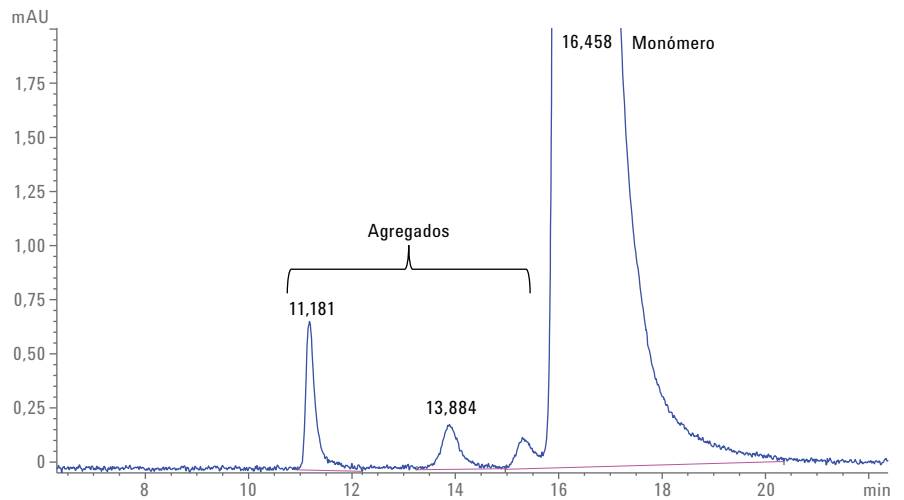


Figura 4. Perfil Agilent AdvanceBio SEC de insulina sometida a condiciones extremas de temperatura, que muestra la separación en línea de base de la insulina y los agregados.

Valor económico y estudios sobre vida útil

Un jefe de laboratorio o responsable de un grupo de trabajo podría considerar en primer lugar el coste, en particular al comparar el de la columna AdvanceBio SEC con el de otros tipos de columna. En la separación SEC, aparte del coste del usuario y del instrumento, el componente más caro es el coste de la columna en sí. Si la columna no dura lo suficiente, o si hay problemas con la reproducibilidad en distintas columnas, habría que examinar varias columnas. Resulta esencial garantizar una reproducibilidad entre lotes mediante el control de todo el proceso de producción. En la figura 5 se muestra la separación de patrones de proteínas AdvanceBio 130 Å en cuatro lotes diferentes de medios AdvanceBio SEC 130 Å, lo que asegura un control completo de todo el proceso de producción.

Uno de nuestros objetivos fue garantizar una prolongada vida útil de la columna durante todos los procesos de desarrollo de nuestros clientes. La prolongada vida útil de la columna ofrece ventajas adicionales, como la importante reducción del tiempo de inactividad. En la figura 6 se muestran seis cromatogramas superpuestos de las 250 inyecciones de insulina de 3 mg/ml, tomados en un intervalo de 50 análisis. La tabla 6 muestra el TR, área, factores de cola y platos teóricos de los análisis seleccionados.

Los resultados demuestran con claridad que no hay virtualmente ningún cambio en TR, área y factor de cola durante el transcurso de 250 inyecciones. Los platos teóricos, una medida de la eficiencia de la columna, tampoco varían significativamente.

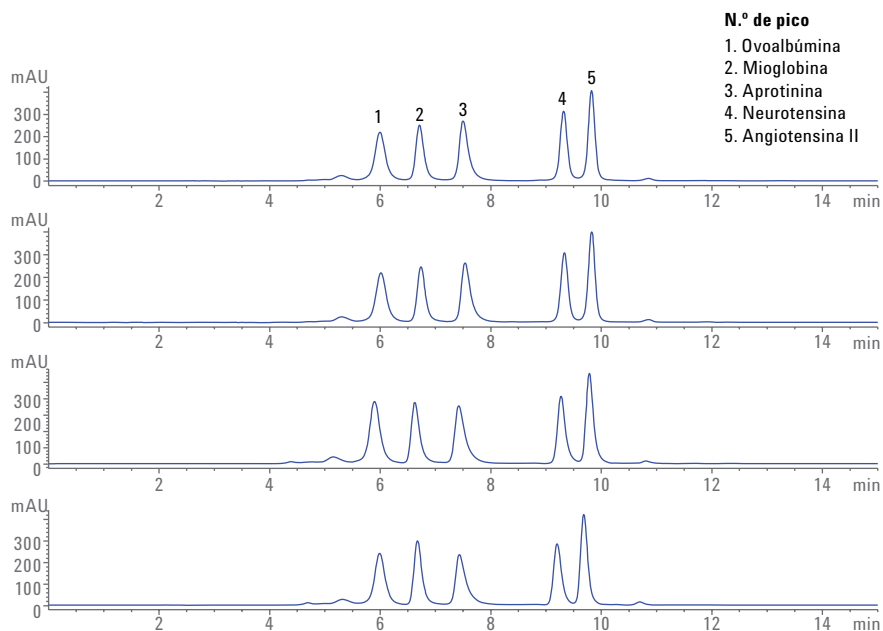


Figura 5. Separación de patrones de proteínas Agilent AdvanceBio 130 Å en cuatro lotes diferentes de un medio Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

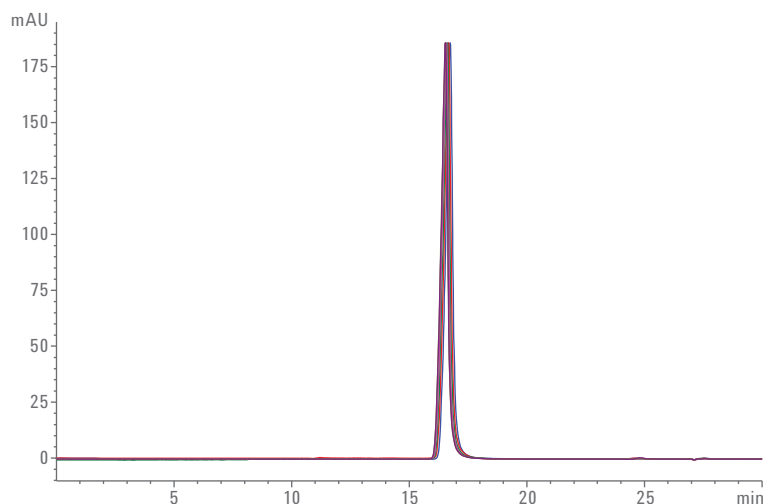


Figura 6. Superposición de seis cromatogramas para las 250 inyecciones, a intervalos de 50 análisis.

Conclusión

La cromatografía de exclusión por tamaño es el sistema ideal que permite detectar y vigilar agregados y monómeros para productos biofarmacéuticos. En esta nota de aplicación se demuestra la idoneidad de una columna Agilent AdvanceBio SEC 130 Å como excelente elección para estudiar los análogos de insulina. Hemos usado un método de la farmacopea aún en fase de borrador para desarrollar un planteamiento sencillo basado en UV para definir la similitud molecular entre insulina biosimilar y original, utilizando una columna AdvanceBio SEC 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm. El TR y la precisión del área del método resultaron excelentes y satisficieron los requisitos de idoneidad del sistema. Se observó una relación lineal entre el área de pico y ocho patrones de la insulina, con un excelente coeficiente del valor de linealidad. Los valores LOD y LOQ fueron de 10,6 y 31,8 µg/ml, respectivamente, lo que indica la sensibilidad del método. La columna AdvanceBio SEC también consiguió separar y vigilar agregados analizados mediante el estudio en condiciones extremas. Asimismo, hemos mostrado las mayores ventajas económicas del uso de una columna AdvanceBio SEC, algunas de las cuales son reducir las variaciones entre lotes derivadas de la fabricación y la mayor vida útil de la columna, con resultados reproducibles y robustos. Este método, sencillo y reproducible, acoplado a un instrumento bioinerte y resistente a la corrosión, se considera fiable y adecuado para las comprobaciones de calidad rutinarias de la insulina en todo el proceso de desarrollo.

Tabla 6. TR observado, área, factor de cola y platos teóricos para 250 inyecciones de insulina.

| Nº inyección | TR (min) | Área | Factor de cola | Platos teóricos |
|--------------|----------|------|----------------|-----------------|
| 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 |

Referencias

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, N.º 2, Abril **2011**.

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
Publicado en EE. UU., 1 de mayo de 2016
5991-6872ES



Agilent Technologies