

Chromatographie d'exclusion stérique d'insuline biosimilaire et d'insuline princeps

Sur une colonne Agilent AdvanceBio SEC.

Note d'application

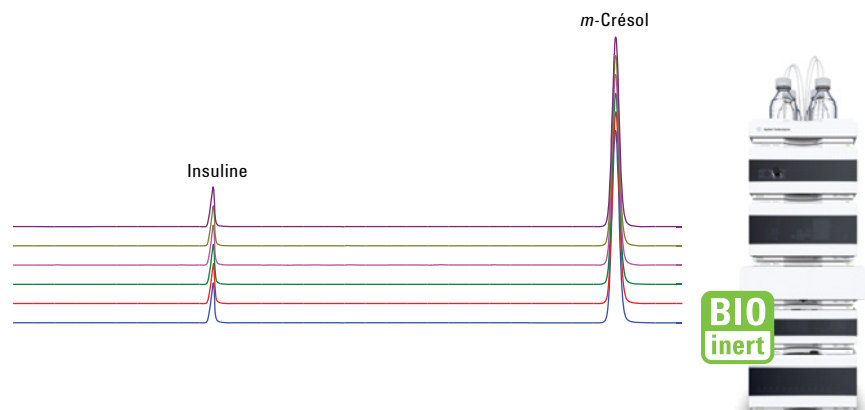
Bio-Pharmaceutique

Auteurs

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

Résumé

L'insuline est une petite hormone polypeptidique qui régule l'homéostasie de la glycémie. Les techniques de génie génétique ont permis aux laboratoires biopharmaceutiques de développer différents analogues de l'insuline à action prolongée. Il n'existe pas de méthode dans la pharmacopée pour l'analyse des analogues de l'insuline. Une méthode SEC permettant d'identifier les analogues de l'insuline princeps et biosimilaire, basée sur un projet de méthode de la pharmacopée européenne, a été développée avec une colonne Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm. L'efficacité de cette méthode pour les analyses de routine a été confirmée par un test de conformité des systèmes, et par des études de la précision du temps de rétention (TR) et des surfaces de pic avec l'insuline princeps pour référence. Cette Note d'application présente également l'application de cette colonne à la détection des impuretés de masse moléculaire supérieure à celle de l'insuline pour les études quantitatives.



Agilent Technologies

Introduction

Les nouveaux analogues de l'insuline sont des alternatives aux produits d'insuline humaine. Des essais cliniques ont montré une efficacité égale voire supérieure lorsque ces analogues étaient comparés à l'insuline humaine. Les analogues de l'insuline actuellement commercialisés sont de l'insuline basale humaine à action prolongée. L'utilisation d'analogues de l'insuline a été approuvée par la Food and Drug Administration des États-Unis (USFDA) en avril 2000. Contrairement aux petites molécules, les agents biothérapeutiques sont conçus par des procédés biologiques. Chaque fabricant utilise un procédé de développement interne pour la production de la substance active et du médicament. Ces méthodes de production peuvent engendrer la formation d'impuretés dérivées de la substance active, telles que des agrégats et des produits de dégradation. En raison de la demande accrue pour des médicaments antidiabétiques, il est crucial bien que difficile de produire des médicaments sans impuretés et d'offrir des médicaments sûrs ne produisant pas d'effets secondaires. Dans l'industrie biopharmaceutique, la LC avec détection UV est un outil polyvalent pour la libération des lots et les études de caractérisation¹. La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est la méthode privilégiée pour l'analyse de pureté et la détection des agrégats de médicament. Cette Note d'application décrit une approche SEC-UV permettant d'établir la similarité moléculaire entre l'insuline biosimilaire et sa référence princeps, de vérifier la conformité du système et d'analyser la précision de la méthode². Ces tests permettent d'assurer que la méthode va générer des résultats d'une exactitude et d'une précision acceptables. Les critères sélectionnés sont basés sur des paramètres chromatographiques primordiaux et leur variation dans des limites acceptables, définies lors des expériences d'évaluation de la méthode. Un excellent coefficient de corrélation a été observé pour la courbe de linéarité de l'insuline sur une plage de 10,6 à 3 400 µg/mL, indiquant que la méthode est quantitative. L'utilisation de la colonne Agilent AdvanceBio SEC pour contrôler et séparer les impuretés de masse moléculaire supérieure à celle du médicament, établie par des études de dégradation forcée, est également présentée.

Équipements et méthodes

Instruments

Nous avons utilisé un système de LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity entièrement biocompatible avec une pression limite de 600 bars, comprenant les modules suivants :

- Pompe LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity (G5611A)
- Échantillonneur automatique Haute Performance Bio-Inerte Agilent 1260 Infinity (G5667A)
- Thermostat Agilent 1200 Infinity (G1330B)
- Compartiment à colonne thermostaté Agilent 1260 Infinity contenant des éléments de chauffage bio-inertes à clipser (G1316C, option 19)
- Agilent 1260 Infinity DAD VL (G1315D avec cellule standard bio-inerte, 10 mm)
- Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm (Réf. PL1180-5350)

Logiciel

Agilent ChemStation B.04.03 (ou plus récente).

Paramètres de chromatographie d'exclusion stérique

Le tableau 1 présente les paramètres chromatographiques de chromatographie d'exclusion stérique pour un système de LC Agilent 1260 Infinity Bio-inert.

Réactifs, échantillons et matériel

L'insuline princeps et l'insuline biosimilaire commercialisées ont été achetées auprès d'une pharmacie de quartier et stockées conformément aux instructions du fabricant. L'acide acétique et l'ammoniac ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich. Tous les produits chimiques et les solvants utilisés étaient de grade HPLC et l'eau hautement purifiée utilisée provenait d'un système de purification d'eau Milli-Q (modèle Millipore Elix 10, USA).

Procédure

Un volume de 10 µL de phase mobile a été injecté comme blanc, suivi de concentrations individuelles en triple pour établir la linéarité. L'aire et le temps de rétention (RT) de chaque concentration sont utilisés pour calculer les valeurs de déviation standard (SD) et de déviation standard relative (RSD) en %. Les limites de détection (LD) et les limites de quantification (LQ) ont été établies à partir des injections correspondant à la concentration de linéarité la plus basse. L'aire moyenne de chaque concentration de linéarité est tracée par rapport à la concentration en insuline afin d'établir la courbe d'étalonnage pour les monomères.

Tableau 1. Paramètres chromatographiques utilisés pour la SEC.

Paramètres	Conditions opératoires
Phase mobile	200 mL d'acide acétique anhydre, 300 mL d'acétonitrile et 400 mL d'eau, ajusté à pH 3,0 avec de l'ammoniaque concentrée puis diluée jusqu'à 1 000,0 mL avec de l'eau.
Température TCC	Ambiante
Analyse isocratique	Phase mobile A
Volume d'injection	10 µL
Débit	0,5 mL/min
Détection UV :	276 nm

Linéarité et plage de détection

La courbe d'étalonnage est établie à l'aide de neuf concentrations étalons d'insuline princeps allant de 10,6 à 3 400 µg/mL.

LQ et LD

La concentration en insuline permettant d'obtenir un rapport signal sur bruit (S/B) > 3 est considérée comme la LD et celle qui permet d'obtenir un S/B > 10 est considérée comme la LQ.

Préparation des agrégats d'insuline

Les agrégats d'insuline ont été préparés par exposition à température élevée. Brièvement, environ 3,4 mg/mL de médicament ont été incubés à 60 °C pendant 6 heures dans un tube en polypropylène. Les échantillons ont été refroidis à température ambiante et immédiatement analysés.

Conformité du système

Comme l'indique le projet de monographie, les exigences de conformité du système sont les suivantes :

- **Facteur de symétrie** : Maximum de 2,0 pour le pic d'analogue d'insuline
- **Rapport pic-vallée** : Minimum de 2
- **Total de toutes les impuretés avec un temps de rétention inférieur à celui de l'analogue d'insuline** : Pas plus de 0,3 % de l'ensemble des aires de pic, sans tenir compte des pics avec un TR supérieur à celui du pic d'insuline

Résultats et discussion

Séparation et détection

L'insuline biosimilaire a été comparée en utilisant l'insuline princeps comme étalon de référence. La séparation HPLC SEC optimisée de l'insuline biosimilaire et princeps intacte sur la colonne

AdvanceBio SEC 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm a permis d'obtenir une excellente séparation. Des profils homogènes sans évidence d'agrégation ont été obtenus en un temps d'analyse de 55 minutes. Un pic dû au conservateur *m*-crésol, éluant à environ 49 minutes, a également été observé (Figure 1).

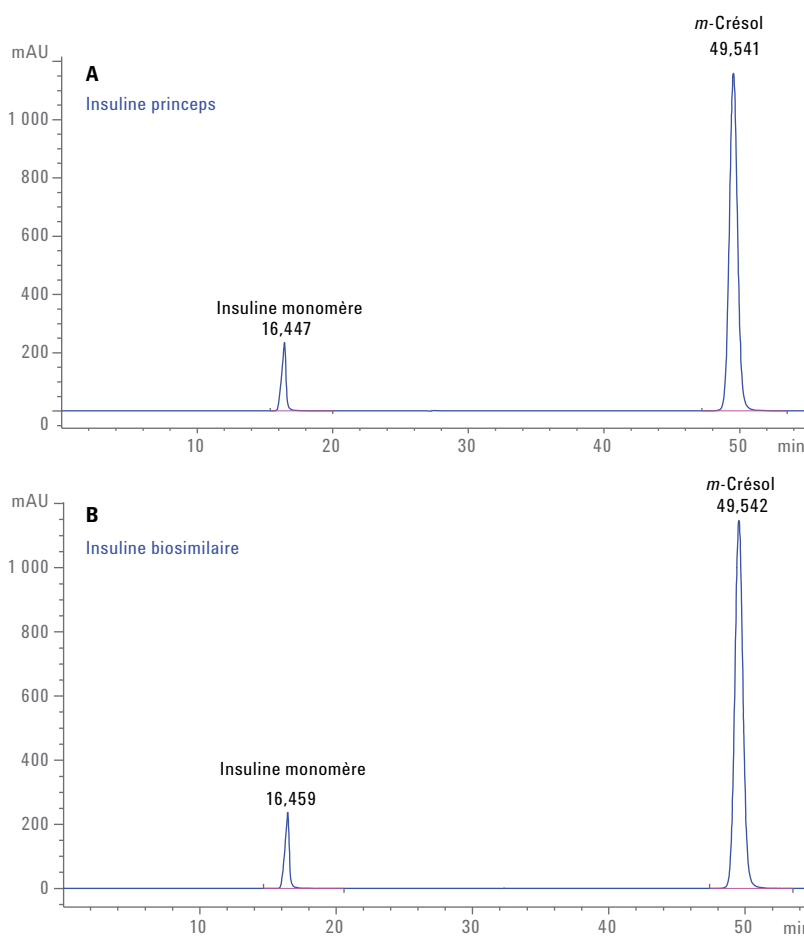


Figure1. Profil SEC d'insuline princeps et biosimilaire sur une colonne Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

Précision du temps de rétention et de l'aire

La figure 2 présente les superpositions de six répliques d'insuline princeps et biosimilaire et démontre l'excellente reproductibilité de la séparation. Le tableau 2 présente les TR moyens et les RSD des surfaces des pics d'insuline monomère de six répliques. Le TR et les RSD des surfaces de pics pour l'insuline monomère étaient dans les limites acceptables de $\pm 3\%$ et $\pm 5\%$, respectivement, ce qui montre que la reproductibilité et la précision de la méthode sont excellentes.

Conformité du système

Le tableau 3 présente les critères d'acceptation de cette étude de conformité du système pour l'analogue d'insuline et le tableau 4 présente le résumé des résultats de conformité du système.

Ces résultats du test de conformité du système pour l'insuline princeps et biosimilaire démontrent que la méthode utilisant un système LC Agilent Bio-inert et une colonne AdvanceBio SEC répond aux exigences rigoureuses de performance pour l'analyse AQ/CQ de l'insuline.

LD et LQ

La LD et la LQ ont été testées pour l'insuline princeps et biosimilaire et se sont avérées égales à 11,3 $\mu\text{g/mL}$ et 28 $\mu\text{g/mL}$ respectivement, indiquant que la méthode était sensible. Le tableau 5 présente les valeurs de LD et LQ observées pour l'insuline princeps.

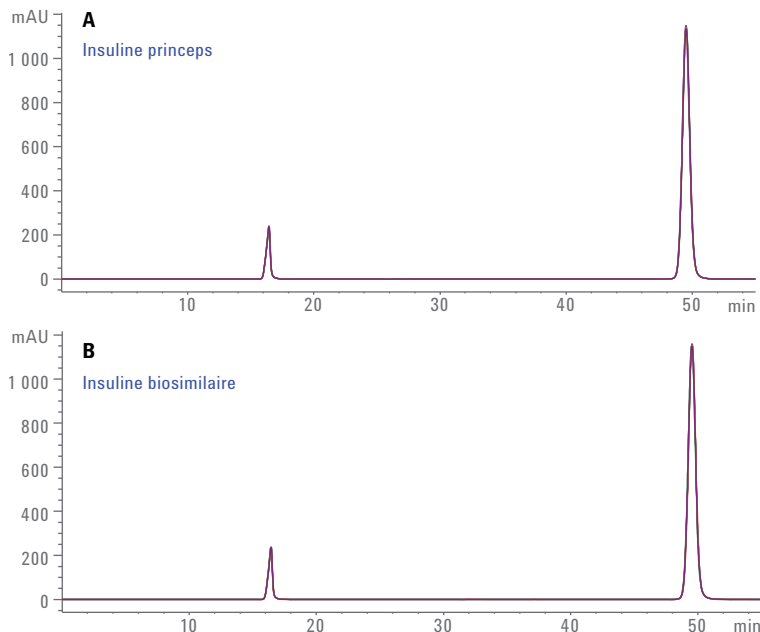


Figure 2. Superposition de six répliques d'insuline princeps et biosimilaire séparées sur une colonne Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 \times 300 mm, 2,7 μm .

Tableau 2. Précision du TR et de la surface des pics (n = 6).

Échantillon	ambiante		Surface de pic	
	Moyenne (min)	RSD	Moyenne (mAU/min)	RSD
Insuline princeps	16,450	0,057	5 544,91	0,285
Insuline biosimilaire	16,460	0,044	5 459,55	0,662

Tableau 3. Critères d'acceptation.

Paramètre	Limite
Facteur de symétrie	Maximum de 2,0 pour le pic d'analogue d'insuline
Rapport pic-vallée	Minimum de 2
Total de toutes les impuretés avec un TR inférieur à celui de l'analogue d'insuline	Pas plus de 0,3 % de la surface totale des pics

Tableau 4. Résumé des résultats du test de conformité des systèmes.

Échantillon	Résultats sur une colonne Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 \times 300 mm, 2,7 μm			Validée (Oui/Non)
	Facteur de symétrie	Rapport pic-vallée	Total de toutes les impuretés avec un TR inférieur à celui de l'analogue d'insuline	
Insuline princeps	1,71	–	0,167	Oui
Insuline biosimilaire	1,72	–	0	Oui

Tableau 5. Résultats de LD, LQ, et de S/B (n = 3) pour l'insuline princeps.

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	S/B	Surface moyenne
10,6 (LD)	11,9	12,8
31,8 (LQ)	34,7	37,4

Linéarité

Dans cette étude, les courbes de linéarité de l'insuline princeps ont été construites à partir de la concentration LD jusqu'à la concentration déclarée sur l'étiquette (3,4 mg/mL) en utilisant la mesure des aires des pics et la concentration d'insuline. La figure 3 présente la courbe de linéarité pour l'insuline dans la plage de concentration de 10,6 à 3 400 µg. La valeur R² observée était supérieure à 0,99, ce qui indique une excellente corrélation dose-dépendante entre la surface de pic et la concentration d'insuline.

Analyse et quantification de l'agrégation/la dégradation

Le profil d'impureté des agents biothérapeutiques est de plus en plus important pour la sécurité des médicaments. Bien que les agrégats soient présents à très faible concentration, ils peuvent avoir un fort impact sur la qualité du produit. La colonne AdvanceBio SEC est conçue pour avoir un minimum d'interaction avec les biomolécules, ce qui permet une séparation complète des agrégats d'insuline. Comme le montre la figure 4, ces agrégats d'insuline éluent de la colonne AdvanceBio SEC à 11,181 et 13,884 minutes, respectivement.

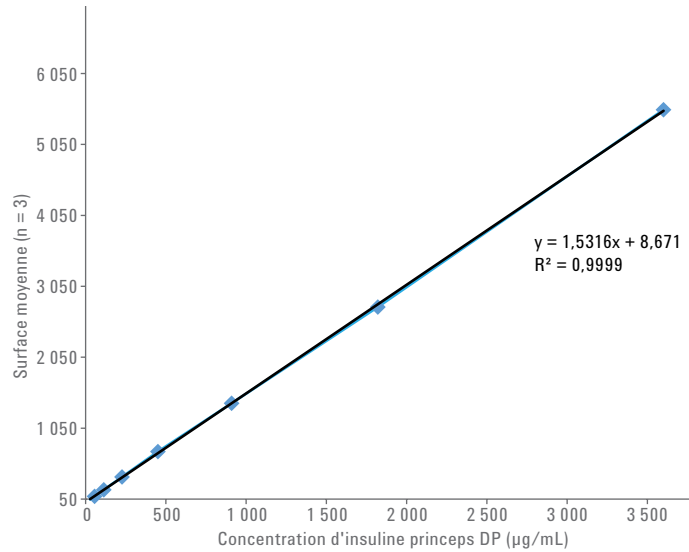


Figure 3. Courbe de linéarité obtenue avec des concentrations étalons d'insuline, situées dans la plage allant de 10,6 à 3 400 µg/mL, présentant d'excellentes valeurs de coefficient de linéarité.

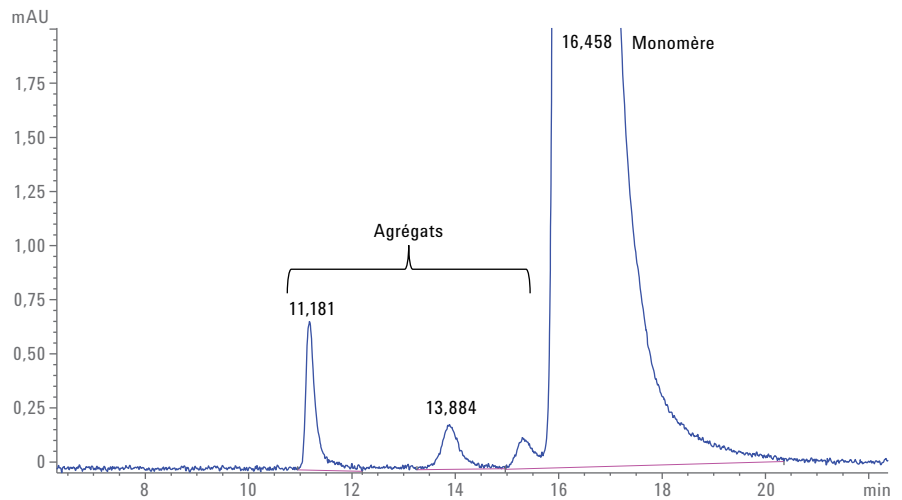


Figure 4. Profil AdvanceBio SEC Agilent d'insuline stressée par la chaleur présentant une séparation complète d'agrégats d'insuline.

Valeur économique et études de la durée de vie

Un directeur de laboratoire ou un directeur de groupe peut considérer en premier lieu les coûts, particulièrement quand il compare le coût d'une colonne AdvanceBio SEC à celui d'autres types de colonnes : Dans le cas des séparations SEC, en dehors du coût de l'opérateur et de l'instrument, la composante la plus chère est le coût de la colonne elle-même. Si les colonnes ne durent pas assez longtemps ou s'il y a des problèmes de reproductibilité entre colonnes, les utilisateurs peuvent être amenés à tester plusieurs types de colonnes. Il est essentiel de contrôler la reproductibilité d'un lot à l'autre en contrôlant l'ensemble du processus de production. La figure 5 montre la séparation de marqueurs protéiques sur une colonne AdvanceBio 130 Å sur quatre lots de phase différents, assurant ainsi un contrôle rigoureux de l'ensemble du processus de production.

L'un des objectifs est de prolonger la durée de vie de la colonne d'un bout à l'autre des processus de développement de nos clients. Cette longue durée de vie de la colonne offre des bénéfices supplémentaires puisque l'indisponibilité est réduite de beaucoup. La figure 6 présente six chromatogrammes superposés de 250 injections de 3 mg/mL de produit d'insuline obtenus à intervalles de 50 analyses. Le tableau 6 présente le TR, la surface, les facteurs de symétrie et les plateaux théoriques des analyses sélectionnées.

Les résultats montrent clairement qu'il n'y a pratiquement aucun changement en TR, surface, facteur de symétrie sur 250 injections. Les plateaux théoriques, une mesure de l'efficacité de la colonne, ne varient pas non plus de manière significative.

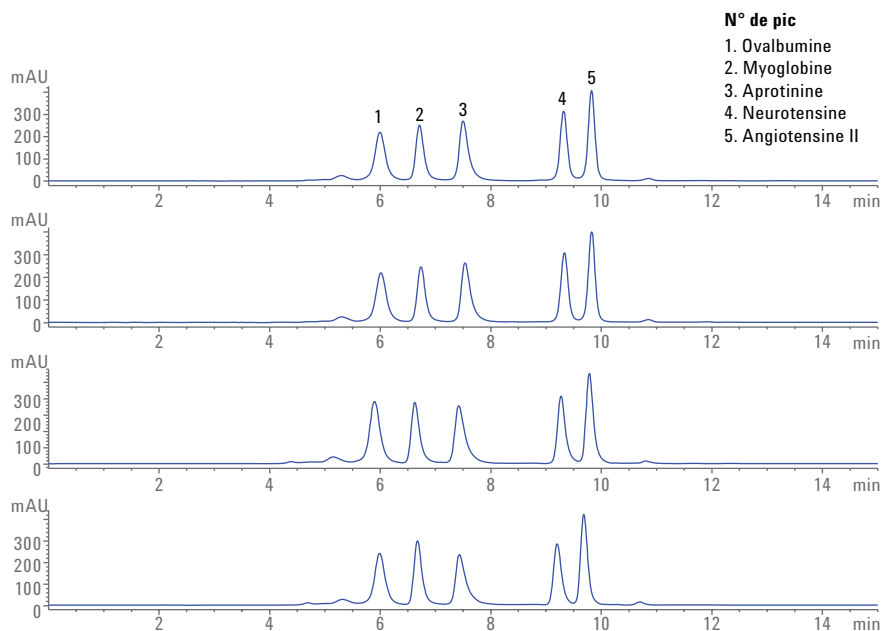


Figure 5. Séparation d'étalons de protéines sur quatre lots différents de phase Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 7,8 x 300 mm, 2,7 µm.

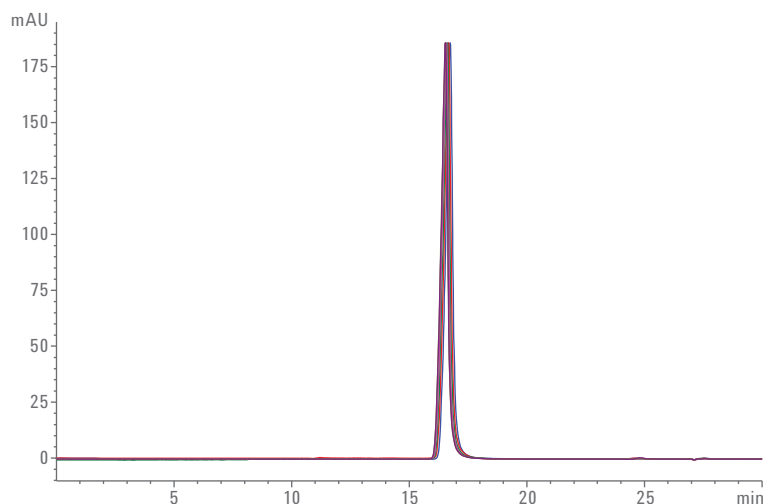


Figure 6. Superposition de six chromatogrammes pour les 250 injections à intervalles de 50 analyses.

Conclusion

La chromatographie d'exclusion stérique est un outil à toute épreuve qui permet la détection et le contrôle des agrégats et des monomères d'agents biopharmaceutiques. Cette Note d'application démontre la conformité de la colonne Agilent AdvanceBio SEC 130 Å qui constitue donc un excellent choix pour étudier les analogues de l'insuline. Nous avons utilisé la méthode du projet de la Pharmacopée pour développer une approche simple permettant d'établir la similarité moléculaire entre le produit d'insuline biosimilaire et le produit d'insuline princeps avec la colonne AdvanceBio SEC 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm. La précision de la méthode au niveau du TR et de la surface était excellente et a rempli les critères de conformité du système. Une relation linéaire a été retrouvée entre la surface des pics et huit concentrations étalons du produit d'insuline, avec une valeur exceptionnelle de coefficient de linéarité. Les LD et LQ observées étaient de 10,6 et de 31,8 µg/mL, respectivement, ce qui montre la sensibilité de la méthode. La colonne AdvanceBio SEC a permis de séparer et de contrôler les agrégats analysés par des études de stress forcé. Nous avons également démontré les grands avantages économiques d'utiliser la colonne AdvanceBio SEC, parmi lesquels la réduction des variations d'un lot de fabrication à l'autre et la prolongation de la durée de vie de la colonne, ce qui permet d'obtenir des résultats reproductibles et rigoureux. Cette méthode simple et reproductible, associée à un instrument bio-inerte résistant à la corrosion est considérée fiable et adaptée au contrôle qualité de routine de l'insuline pendant tout le processus de développement.

Tableau 6. TR, surface, facteur de symétrie et plateaux théoriques pour les 250 injections de produit d'insuline.

Injection n°	TR (min)	Surface	Facteur de symétrie	Plateaux théoriques
1	16,657	3 944	0,899	16 001
50	16,671	3 966	0,890	15 849
100	16,681	3 968	0,898	15 982
150	16,622	3 942	0,893	15 942
200	16,634	3 953	0,895	15 919
250	16,634	3 963	0,890	15 944

Références

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, avril **2011**.

www.agilent.com/chem

Utilisation en recherche uniquement. Ne pas utiliser dans les procédures de diagnostic.

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2016
Publié aux États-Unis, le 1 mai 2016
5991-6872FR



Agilent Technologies