

Cromatografia ad esclusione dimensionale dell'insulina biosimilare e innovativa

con la nuova colonna Agilent AdvanceBio SEC

Nota applicativa

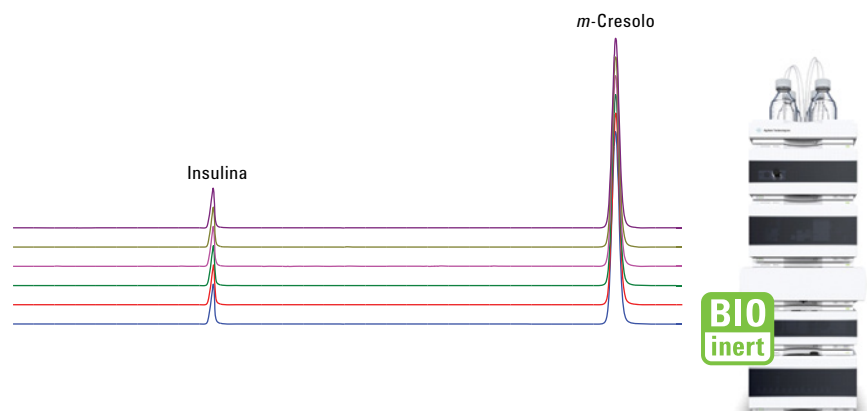
Biofarmaceutica

Autori

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

Abstract

L'insulina è un piccolo ormone polipeptidico che controlla l'omeostasi del glucosio nel sangue. Le tecniche di ingegneria genetica hanno permesso alle aziende biofarmaceutiche di sviluppare diversi analoghi dell'insulina a lunga durata d'azione. Non è disponibile alcun metodo della farmacopea per l'analisi degli analoghi dell'insulina. È stato sviluppato un metodo SEC per identificare gli analoghi dell'insulina innovativa e biosimilare seguendo un metodo orientativo EPA che utilizza una colonna Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm. L'efficacia di questo metodo per l'analisi di routine è stata confermata usando un test di idoneità del sistema e studi sulla precisione del tempo di ritenzione (RT) e dell'area che hanno impiegato l'insulina innovativa come prodotto di riferimento. La presente nota applicativa mostra anche l'utilizzo di questa colonna per la rivelazione di impurezze con masse molecolari superiori a quelle dell'insulina per studi di quantificazione.



Agilent Technologies

Introduzione

I nuovi analoghi dell'insulina rappresentano un'alternativa ai prodotti a base di insulina umana. Studi clinici hanno dimostrato un'efficacia uguale o superiore di questi analoghi rispetto all'insulina umana. Le insuline umane basali a lunga durata d'azione attualmente presenti sul mercato sono analoghi dell'insulina. L'uso degli analoghi dell'insulina è stato approvato dalla Food and Drug Administration statunitense (FDA) nell'aprile del 2000. A differenza delle piccole molecole, i farmaci bioterapeutici sono creati usando processi biologici. Ogni produttore utilizza un processo sviluppato internamente per la produzione del principio attivo e del prodotto farmaceutico. Questi metodi di produzione possono comportare impurezze derivate dal principio attivo, come aggregati e prodotti di degradazione. A causa della crescente richiesta di farmaci antidiabetici, è fondamentale ma anche difficile produrre farmaci privi di impurezze e fornire medicinali sicuri privi di effetti collaterali. Nell'industria biofarmaceutica, la cromatografia liquida con rivelazione UV è uno strumento versatile per il rilascio dei lotti e gli studi di caratterizzazione¹. La cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) è il metodo di prima scelta per l'analisi della purezza e per l'identificazione di aggregati del farmaco. Questa nota applicativa descrive un approccio SEC-UV per determinare le somiglianze molecolari tra l'insulina biosimilare e il suo riferimento innovativo, in seguito ad analisi dell'idoneità del sistema e della precisione del metodo². Questi test garantiscono che il metodo possa generare risultati con accuratezza e precisione accettabili. I criteri selezionati si basano su parametri cromatografici fondamentali e sulla loro variabilità entro limiti accettabili, definiti durante gli esperimenti di valutazione del metodo. È stato osservato un eccellente coefficiente di correlazione per la curva di linearità dell'insulina nell'intervallo 10,6 - 3.400 µg/mL, il che indica che il metodo è quantitativo. È anche mostrato l'uso della colonna Agilent AdvanceBio SEC per monitorare e separare le impurezze con masse molecolari superiori a quella del farmaco, determinate mediante studi di stress forzato.

Materiali e metodi

Strumenti

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

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

Software

ChemStation Agilent B.04.03 (o superiore)

Parametri della cromatografia a esclusione dimensionale

La Tabella 1 mostra i parametri relativi alla cromatografia ad esclusione dimensionale usando un sistema LC Agilent 1260 Infinity Bio-Inert.

Reagenti, campioni e materiali

L'insulina innovativa e biosimilare commerciale è stata acquistata in una farmacia di zona e conservata secondo le istruzioni del produttore. L'acido acetico e l'ammoniaca sono stati acquistati da Sigma-Aldrich. Tutte le sostanze chimiche e i solventi 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

Un volume di 10 µL di fase mobile è stato iniettato come bianco, seguito dai diversi livelli 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%). I limiti di rivelazione (LOD) e i limiti di quantificazione (LOQ) sono stati stabiliti con iniezioni al livello più basso dell'intervallo di linearità. È stato creato un grafico del valore medio dell'area di ciascun livello in funzione della concentrazione di insulina allo scopo di determinare la curva di calibrazione per i monomeri.

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

Parametri	Condizioni
Fase mobile	200 mL di acido acetico anidro, 300 mL di acetonitrile e 400 mL di acqua, aggiustati a pH 3,0 con ammoniaca concentrata e diluiti a 1.000 mL con acqua.
Temperatura TCC	Ambiente
Analisi isocratica	Fase mobile A
Volume di iniezione	10 µL
Flusso	0,5 mL/min
Rivelazione UV	276 nm

Linearità e intervallo

La curva di calibrazione è stata costruita con nove concentrazioni standard di insulina innovativa comprese tra 10,6 e 3.400 µg/mL.

LOQ e LOD

Il valore di concentrazione di insulina 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.

Preparazione degli aggregati di insulina

Gli aggregati sono stati ottenuti sottoponendo l'insulina a stress termico. In breve, circa 3,4 mg/mL del farmaco sono stati incubati a 60 °C per 6 ore in una provetta in polipropilene. I campioni sono stati raffreddati a temperatura ambiente e immediatamente analizzati.

Idoneità del sistema

In base alla bibliografia preliminare, questi sono i requisiti per l'idoneità del sistema:

- **Fattore di simmetria:** massimo 2.0 per il picco dovuto all'analogo dell'insulina
- **Rapporto picco-valle:** minimo 2
- **Totale di tutte le impurezze con un tempo di ritenzione inferiore a quello dell'analogo dell'insulina:** non più dello 0,3% dell'area totale dei picchi, trascurando tutti i picchi con un RT superiore a quello del picco dell'insulina

Risultati e discussione

Separazione e rivelazione

L'insulina biosimilare è stata confrontata usando quella innovativa come standard di riferimento. La separazione HPLC SEC ottimizzata dell'insulina biosimilare e innovativa intatta sulla colonna

AdvanceBio SEC 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm è stata eccellente. Sono stati dimostrati profili omogenei senza aggregazioni, con un tempo di analisi totale di 55 minuti. È stato anche osservato un picco dovuto al conservante *m*-cresolo, che eluisce a circa 49 minuti (Figura 1).

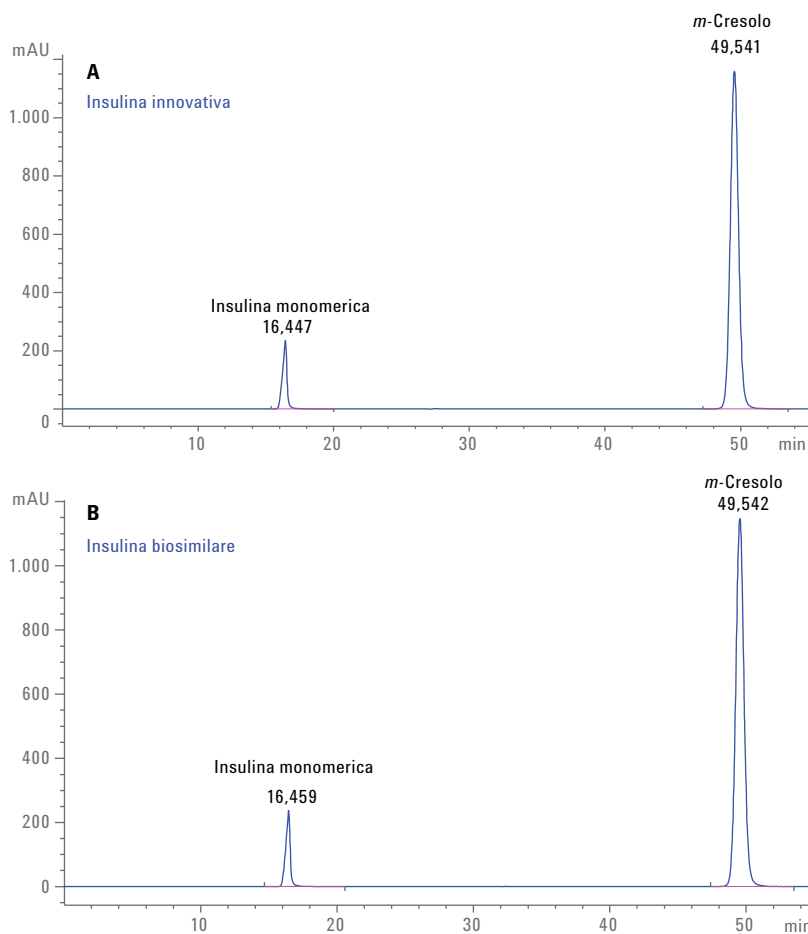


Figura 1. Profilo HPLC SEC dell'insulina innovativa e biosimilare su una colonna Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

Precisione dei valori di tempo di ritenzione e area

La Figura 2 mostra la sovrapposizione di sei replicati di insulina innovativa e biosimilare, che dimostra l'eccellente riproducibilità della separazione. La Tabella 2 elenca i valori medi dei RT e delle RSD delle aree dei picchi per il monomero insulinico, ottenuti da sei replicati. I valori di RT e di RSD delle aree dei picchi per il monomero insulinico erano compresi nel limite accettabile rispettivamente di $\pm 3\%$ e $\pm 5\%$, dimostrando l'eccellente riproducibilità e precisione del metodo.

Idoneità del sistema

La Tabella 3 elenca i criteri di accettazione per questo studio di idoneità del sistema per l'analogo dell'insulina e la Tabella 4 presenta il riassunto dei risultati di idoneità del sistema.

I risultati del test di idoneità del sistema per l'insulina innovativa e biosimilare dimostrano che il metodo condotto usando una colonna per LC Agilent Bio-Inert e una colonna AdvanceBio SEC soddisfano i rigidi requisiti in termini di prestazioni delle analisi QA/QC dell'insulina.

LOD e LOQ

I valori di LOD e LOQ sono stati testati per l'insulina innovativa e sono risultati pari rispettivamente a 11,3 $\mu\text{g/mL}$ e 28 $\mu\text{g/mL}$, indicando che il metodo è sensibile. La Tabella 5 mostra i valori di LOD e LOQ osservati per l'insulina innovativa.

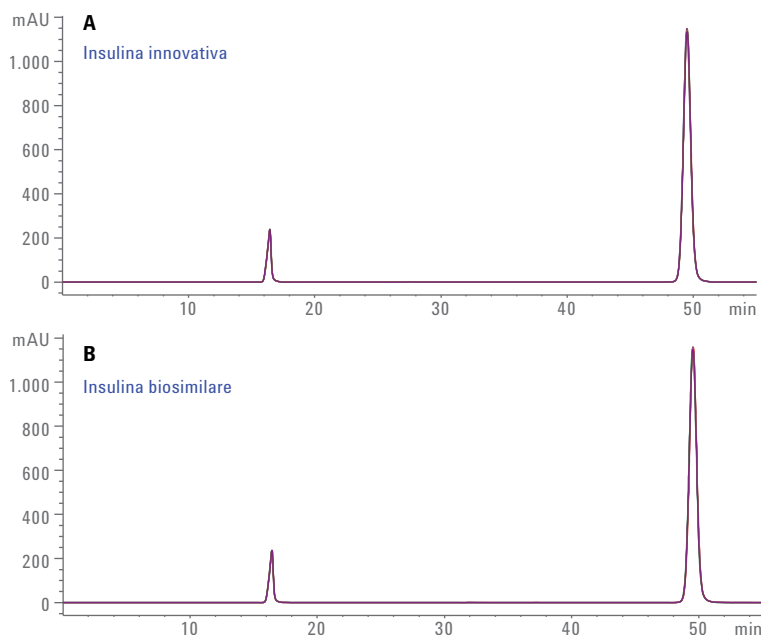


Figura 2. Sovrapposizione di sei replicati dell'insulina innovativa e biosimilare separati su una colonna Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 μm .

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

Campione	RT		Area del picco	
	Media (min)	RSD	Media (mAU/min)	RSD
Insulina innovativa	16,450	0,057	5.544,91	0,285
Insulina biosimilare	16,460	0,044	5.459,55	0,662

Tabella 3. Criteri di accettazione

Parametro	Limite
Fattore di simmetria	Massimo 2.0 per il picco dovuto all'analogo dell'insulina
Rapporto picco-valle	Minimo 2
Totale di tutte le impurezze con un RT inferiore a quello dell'analogo dell'insulina	Non più dello 0,3% dell'area totale dei picchi

Tabella 4. Riassunto dei risultati dei test di idoneità del sistema.

Campione	Risultati su una colonna Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 μm			
	Fattore di simmetria	Rapporto picco-valle	Totale di tutte le impurezze con un RT inferiore a quello dell'analogo dell'insulina	Superato (S/No)
Insulina innovativa	1,71	–	0,167	Si
Insulina biosimilare	1,72	–	0	Si

Tabella 5. Risultati di LOD, LOQ e S/N (n = 3) per l'insulina innovativa.

Concentrazione ($\mu\text{g/mL}$)	S/N	Area media
10,6 (LOD)	11,9	12,8
31,8 (LOQ)	34,7	37,4

Linearità

Le curve di linearità per l'insulina innovativa sono state costruite dal livello LOD al valore indicato (3,4 mg/mL) nello studio, utilizzando la risposta in termini di area e la concentrazione di insulina. La Figura 3 mostra la curva di linearità per l'insulina nell'intervallo di concentrazione 10,6 - 3.400 µg. Il valore R² osservato è stato superiore a 0,99 suggerendo un'eccellente correlazione dipendente dalla dose tra l'area del picco e la quantità iniettata di insulina.

Analisi e quantificazione dell'aggregazione/degradazione

Il profilo di impurezza dei farmaci bioterapeutici è di elevatissima importanza per la sicurezza farmacologica. Anche se gli aggregati sono presenti in concentrazioni estremamente basse, possono avere un forte impatto sulla qualità del prodotto. La colonna AdvanceBio SEC è progettata per avere un'interazione minima con le biomolecole, permettendo una separazione netta degli aggregati di insulina alla linea di base. Questi aggregati di insulina eluiscono dalla colonna AdvanceBio SEC rispettivamente a 11,181 e 13,884 minuti, come illustrato nella Figura 4.

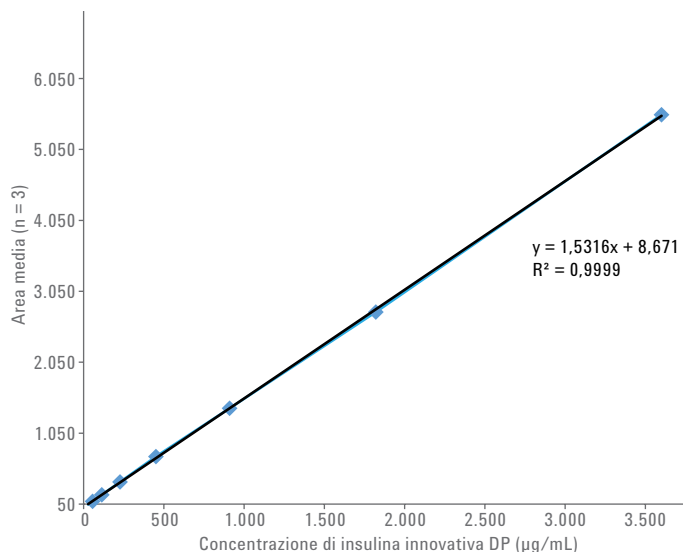


Figura 3. Curva di linearità con concentrazioni standard di insulina comprese tra 10,6 e 3.400 µg/mL, che mostra un valore eccellente del coefficiente di linearità.

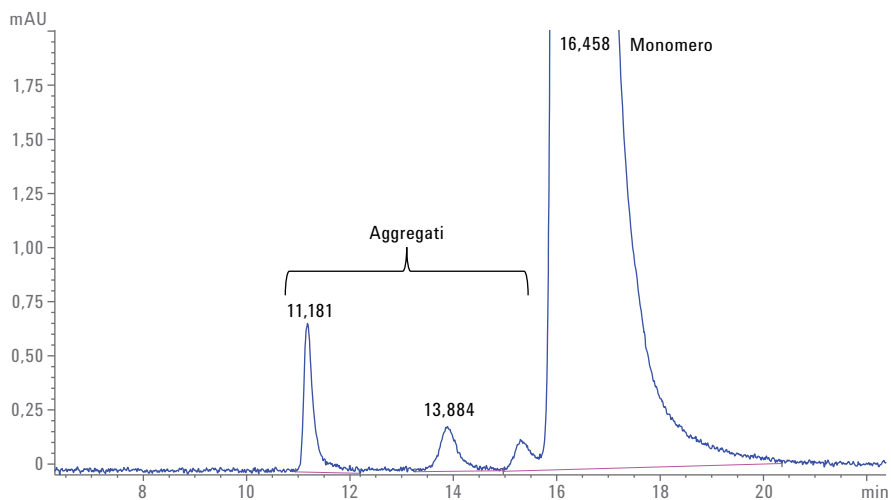


Figura 4. Profilo Agilent AdvanceBio SEC di insulina sottoposta a stress termico che mostra la separazione alla linea di base degli aggregati di insulina.

Studi sul valore economico e sulla durata

Un responsabile di laboratorio o un capogruppo può prendere principalmente in considerazione il costo, specialmente quando confronta quello della colonna AdvanceBio SEC con quello di altri tipi di colonne. Nella separazione SEC, oltre al costo dell'operatore e dello strumento, la componente più cara è la colonna stessa. Se le colonne non durano abbastanza a lungo o se vi sono problemi di riproducibilità tra colonne, potrebbe essere necessario valutarne diverse. È essenziale garantire un'elevata riproducibilità da lotto a lotto attraverso il controllo dell'intero processo di produzione. La Figura 5 mostra la separazione di marcatori proteici AdvanceBio 130 Å su quattro lotti distinti di supporto AdvanceBio 130 Å, che assicura un controllo completo dell'intero processo di produzione.

Uno dei nostri obiettivi è garantire una durata prolungata delle colonne per tutti i processi di sviluppo dei nostri clienti. Questa durata prolungata delle colonne fornisce benefici aggiuntivi, in quanto il fermo macchina è fortemente ridotto. La Figura 6 mostra sei cromatogrammi sovrapposti di 250 iniezioni di insulina 3 mg/mL effettuati a intervalli di 50 analisi. La Tabella 6 mostra l' RT, l'area, lo scodamento e i piatti teorici delle analisi selezionate.

I risultati dimostrano chiaramente che non vi è virtualmente alcuna variazione di RT, area e scodamento nel corso delle 250 iniezioni. Anche i piatti teorici, che rappresentano una misura dell'efficienza della colonna, non mostrano variazioni significative.

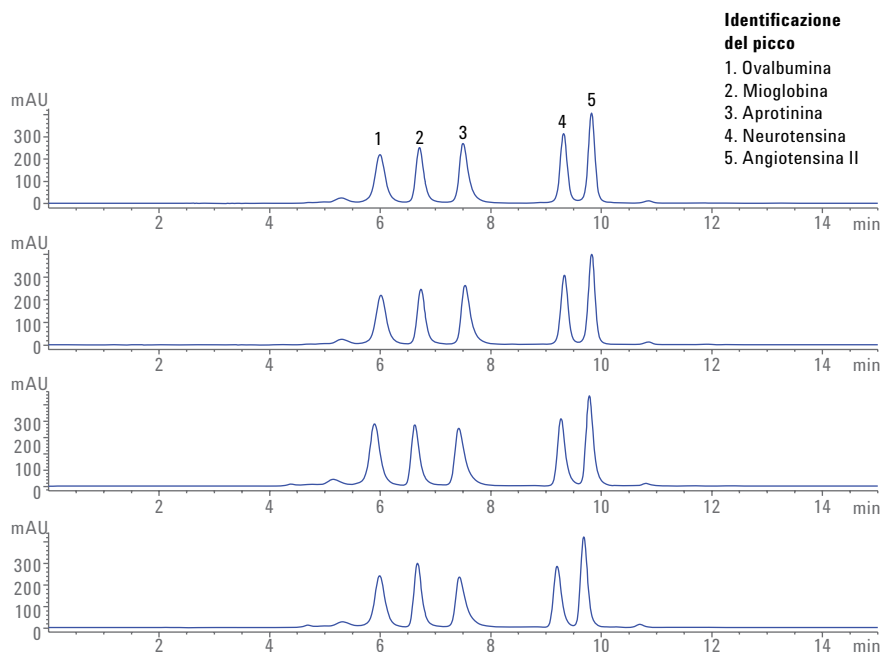


Figura 5. Separazione di standard proteici Agilent AdvanceBio 130 Å su quattro lotti separati con una colonna Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm.

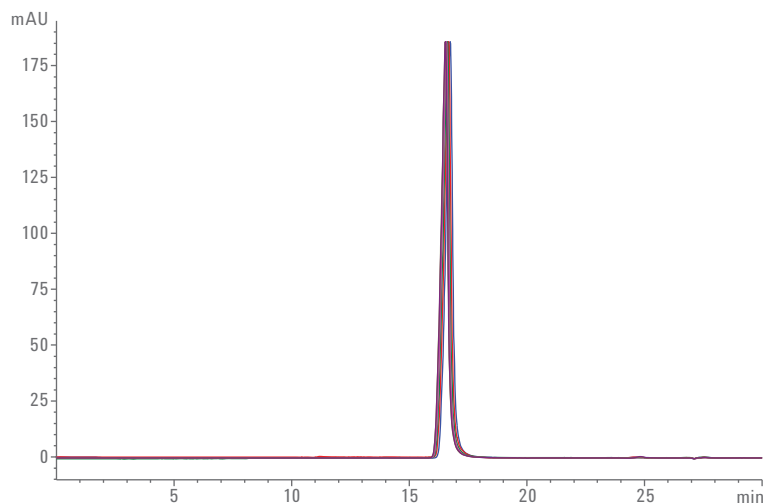


Figura 6. Sovrapposizione di sei cromatogrammi per le 250 iniezioni a intervalli di 50 analisi.

Conclusioni

La cromatografia ad esclusione dimensionale è il sistema più affidabile per la rivelazione e il monitoraggio di aggregati e monomeri di prodotti biofarmaceutici. Questa nota applicativa dimostra che la colonna AdvanceBio SEC 130 Å rappresenta una scelta eccellente per studiare gli analoghi dell'insulina. Abbiamo usato un metodo orientativo della farmacopea per sviluppare un semplice approccio basato su UV volto a definire le somiglianze molecolari tra l'insulina biosimilare e quella innovativa usando una colonna AdvanceBio SEC 130 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm. La precisione dell'area e dei RT del metodo era eccellente e soddisfaceva i requisiti di idoneità del sistema. È stata osservata una relazione lineare tra l'area del picco e otto concentrazioni standard di insulina, con un valore eccezionale del coefficiente di linearità. Il LOD e il LOQ osservati sono risultati pari rispettivamente a 10,6 e 31,8 µg/mL, indicando la sensibilità del metodo. La colonna AdvanceBio SEC è stata in grado di separare e monitorare gli aggregati analizzati in uno studio di stress forzato. Abbiamo anche dimostrato i maggiori benefici economici dell'uso di una colonna AdvanceBio SEC, tra i quali la riduzione delle variazioni da lotto a lotto e la prolungata durata delle colonne, con esiti solidi e riproducibili. Questo metodo semplice e riproducibile, abbinato a uno strumento bioinerte e resistente alla corrosione, è considerato affidabile e idoneo per i controlli qualità di routine durante tutto il processo di sviluppo.

Tabella 6. RT, area, scodamento e piatti teorici osservati per 250 iniezioni di insulina.

N. iniezione	RT (min)	Area	Scodamento	Piatti teorici
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

Bibliografia

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. 2, aprile **2011**.

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
Pubblicato negli Stati Uniti il 1 maggio 2016
5991-6872ITE



Agilent Technologies