Agilent AdvanceBio SEC カラムによるインスリンのバイオシミラーおよび先発薬のサイズ排除クロマトグラフィー

アプリケーションノート

バイオ医薬品

著者

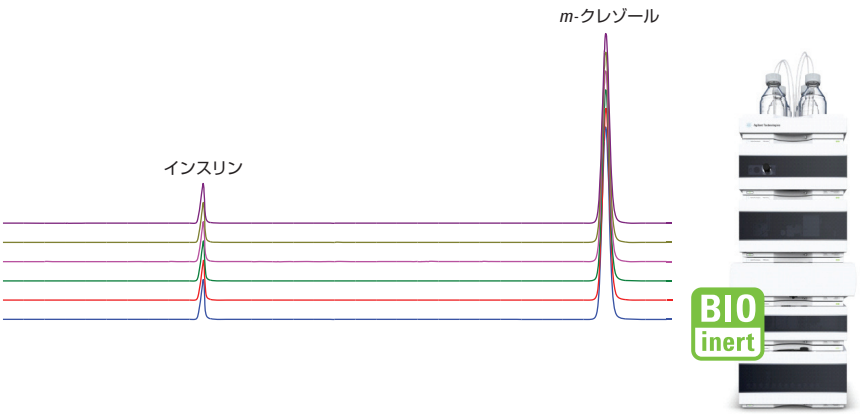
M. Sundaram Palaniswamy and

Andrew Coffey

Agilent Technologies, Inc.

概要

インスリンは血糖の恒常性を調節する小さいポリペプチドホルモンです。製薬会社は、遺伝子工学的手法を用いて、作用が長時間持続する多様なインスリン類似体を開発してきました。ところが、薬局方では、このようなインスリン類似体の分析に利用できるメソッドが定められていません。そこで、欧州薬局方 (EP) のドラフトメソッドに従い、インスリン類似体の先発薬とバイオシミラーを同定するためのサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) メソッドを、Agilent AdvanceBio SEC 130 Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムを用いて開発しました。ルーチン分析におけるこのメソッドの有効性を、参照物質としてインスリン先発薬を使用したシステム適合性試験とリテンションタイム (RT) およびピーク面積の精度の評価により確認しました。このアプリケーションノートでは、メソッドの定量性能を評価するために、このカラムを用いてインスリンより分子量の大きい不純物を検出した結果も示します。



Agilent Technologies

はじめに

最新のインスリン類似体はヒトインスリン製剤の代替薬であり、ヒトインスリンと同等、またはそれ以上の有効性転帰を持つことが臨床試験によって確認されています。インスリン類似体は、2000 年 4 月にアメリカ食品医薬品局 (USFDA) に承認され、作用が長時間持続する基礎ヒトインスリンとして市販されています。低分子製剤とは異なり、生物製剤は、生物学的プロセスにより製造されます。各製薬会社は、社内で開発されたプロセスに従って原薬および医薬品を製造していますが、その過程で、凝集体や分解生成物など、原薬由来の不純物が生じることがあります。抗糖尿病薬の需要の高まりを背景に、現代の製薬会社は、不純物のない医薬品を製造し、副作用のない安全な治療薬を提供するという、困難でありながらきわめて重要な役割を担っています。生物製剤業界では、原薬出荷試験や特性解析のための汎用ツールとして、LC と UV 検出が使用されています[1]。SEC は、医薬品の純度および凝集体の分析に最適な分析法です。このアプリケーションノートでは、SEC と UV を組み合わせたメソッドを用いて、インスリンバイオシミラーと先発薬 (参照物質) の分子類似性を測定し、システム適合性およびメソッドの精度を評価した結果を紹介します[2]。これらの調査から、このメソッドにより、許容可能な真度と精度の結果が得られることを確認できました。評価では、重要なクロマトグラフィーパラメータを基準として用い、メソッドの評価実験から得られた各パラメータの変動が許容限度内にあるかどうかにもとづいて判断しました。濃度範囲 10.6 ～ 3,400 µg/mL のインスリンの検量線では、良好な相関係数が得られました。これは、このメソッドによる定量が可能なことを示します。また、強制的なストレス負荷試験において、Agilent AdvanceBio SEC カラムにより、製剤より分子質量の大きい不純物をモニタリングおよび分離した結果も示します。

実験方法

機器

分析には、完全なイナート仕様の、最大圧力 600 bar の Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システムを使用しました。このシステムは、次のコンポーネントで構成されています。

- Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC ポンプ (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity バイオイナート高性能オートサンプラ (G5667A)
- Agilent 1200 Infinity シリーズサーモスタット (G1330B)
- Agilent 1260 Infinity カラムコンパートメント、バイオイナートクリックイン加熱エレメントを搭載 (G1316C、オプション 19)
- Agilent 1260 Infinity ダイオードアレイ検出器 VL (G1315D、バイオイナート標準フローセル (光路長 10 mm) を搭載)
- Agilent AdvanceBio SEC、130 Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm (p/n PL1180-5350)

ソフトウェア

Agilent ChemStation B.04.03 (またはそれ以上)

SEC パラメータ

表 1 に、Agilent 1260 Infinity バイオイナート LC システムで用いた SEC のクロマトグラフィーパラメータを示します。

試薬とサンプル

市販のインスリンの先発薬とバイオシミラーを地域の薬局で購入し、製造元の指示に従って保管しました。酢酸およびアンモニアは、Sigma-Aldrich 社から購入しました。すべての試薬および溶媒は、HPLC グレードのものを使用しました。また、Milli Q 純水装置 (Millipore Elix 10 モデル、米国) で製造した超純水を使用しました。

手順

移動相 10 µL をブランクとして注入後、各濃度の標準溶液を 3 回ずつ注入しました。各濃度のピーク面積とリテンションタイム (RT) をもとに、標準偏差 (SD) と相対標準偏差 (RSD %) の値を計算しました。低濃度の標準溶液の測定結果から、検出下限 (LOD) と定量下限 (LOQ) を確立しました。各濃度の標準溶液で得られた平均ピーク面積をインスリンの濃度に対してプロットし、単量体の検量線を作成しました。

表1. SEC HPLC で使用したクロマトグラフィーパラメータ

パラメータ	条件
移動相	無水酢酸 200 mL、アセトニトリル 300 mL、および水 400 mL の混合液を濃アンモニアで pH 3.0 に調整し、水で 1,000.0 mL に希釈
カラム温度	室温
注入量	10 µL
流量	0.5 mL/min
UV 検出	276 nm

直線性と範囲

検量線の作成には、濃度範囲 10.6 ～ 3,400 µg/mL の 9 種類のインスリン先発薬標準溶液を使用しました。

LOQ と LOD

S/N 比が 3 を超えたインスリン濃度を LOD とし、S/N 比が 10 を超えた濃度を LOQ としました。

インスリン凝集体の調製

インスリンの凝集体は、約 3.4 mg/mL の製剤をポリプロピレン製試料管に入れ、60 ° C で 6 時間インキュベーションして調製しました。その後、サンプルを室温まで冷却し、すぐに分析しました。

システム適合性

ドラフトモノグラフで規定されているシステム適合性要件は次のとおりです。

- **シンメトリ係数**: インスリン類似体のピークについて 2.0 以下
- **p/v**: 2 以上
- **インスリン類似体より RT の短い全不純物の総量**: インスリンのピークより RT の長いピークを除いたピーク総面積の 0.3 % 以下

結果と考察

分離と検出

インスリンバイオシミラーを、参照標準として先発薬を用いて比較しました。最適化された SEC HPLC メソッドにより、インタクトインスリンのバイオシミラーおよび先発薬を AdvanceBio SEC 130 Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムできわめて明確に分離することができました。凝集体の兆候のない均一なプロファイルが、合計分析時間 55 分以内に得られました。約 49 分で溶出した保存剤の *m*-クレゾールのピークも観察されました (図 1)。

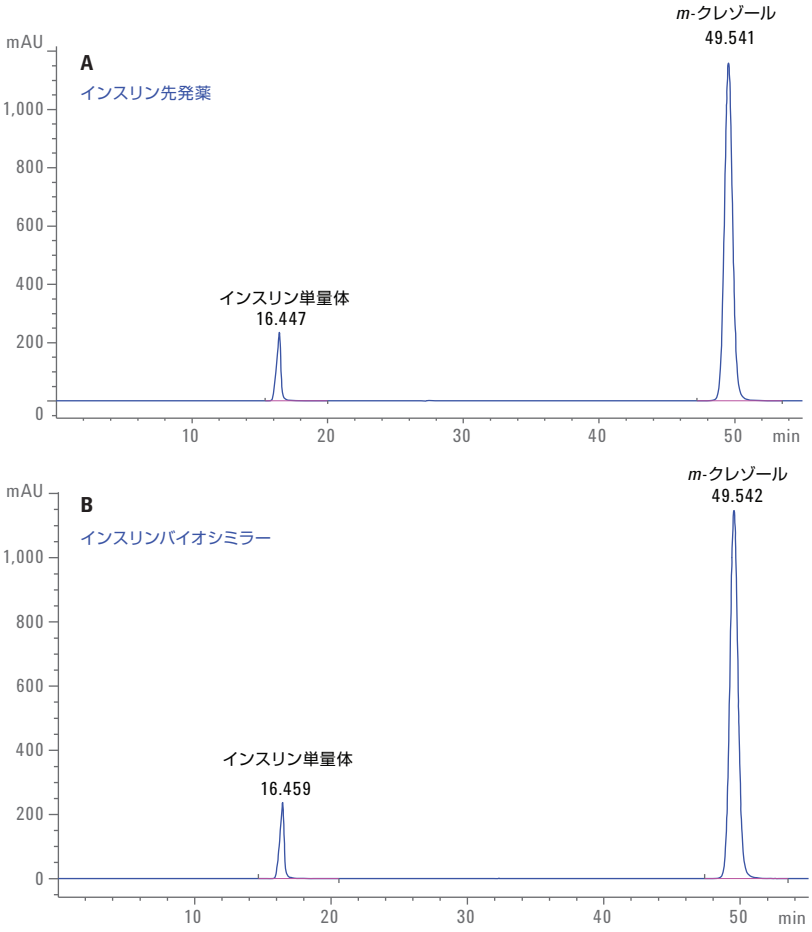


図 1. Agilent AdvanceBio SEC、130 Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムによるインスリンの先発薬およびバイオシミラーの SEC HPLC プロファイル

リテンションタイムとピーク面積の精度

図 2 は、インスリンの先発薬とバイオシミラーを 6 回繰り返し分析した結果を重ね合わせたものです。この図から、優れた分離再現性が得られていることがわかります。表 2 に、6 回の繰り返し分析により得られたインスリン単量体の RT およびピーク面積の平均値と RSD を示します。インスリン単量体の RT とピーク面積の RSD は、それぞれの許容限度 ±3 % および ±5 % に収まっていました。これは、この分析メソッドの再現性と精度がきわめて優れていることを示します。

システム適合性

表 3 に、インスリン類似体のシステム適合性試験の許容基準を示します。また、表 4 に、インスリンの先発薬およびバイオシミラーのシステム適合性試験の結果をまとめます。

これらの結果から、Agilent バイオイナート LC および AdvanceBio SEC カラムを用いたメソッドが、インスリンの QA/QC 分析に求められる厳しい性能要件を満たしていることがわかります。

LOD と LOQ

インスリン先発薬の LOD および LOQ の調査から、それぞれの値が 11.3 µg/mL と 28 µg/mL であることがわかりました。これは、このメソッドが高感度であることを示しています。測定により求めたインスリン先発薬の LOD と LOQ の値を表 5 に示します。

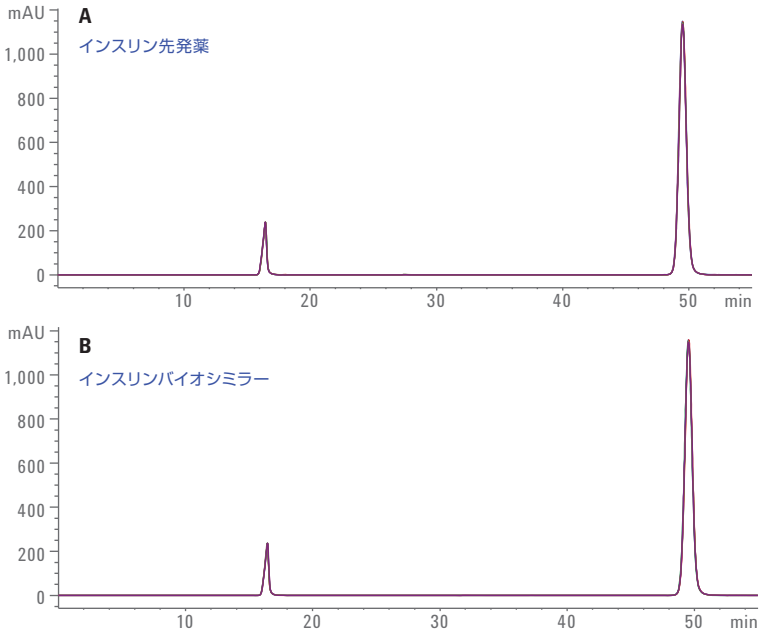


図 2. Agilent AdvanceBio SEC、130 Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムを用いたインスリンの先発薬およびバイオシミラーの 6 回の繰り返し分析により得られたクロマトグラムの重ね表示

表2. RT とピーク面積の精度 (n = 6)

	RT		ピーク面積	
サンプル	平均 (分)	RSD	平均 (mAU/分)	RSD
インスリン先発薬	16.450	0.057	5,544.91	0.285
インスリンバイオシミラー	16.460	0.044	5,459.55	0.662

表3. 許容基準

パラメータ	限度
シンメトリ係数	インスリン類似体のピークについて 2.0 以下
p/v	2 以上
インスリン類似体より RT の短い全不純物の総量	ピーク総面積の 0.3 % 以下

表4. システム適合性試験結果のまとめ

	Agilent AdvanceBio SEC、130 Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムによる結果			合否 (合格/不合格)
サンプル	シンメトリ係数	p/v	インスリン類似体より RT の短い全不純物の総量	
インスリン先発薬	1.71	–	0.167	合格
インスリンバイオシミラー	1.72	–	0	合格

表5. インスリン先発薬の LOD、LOQ、S/N 比の結果 (n = 3)

濃度 (mg/mL)	S/N 比	平均面積
10.6 (LOD)	11.9	12.8
31.8 (LOQ)	34.7	37.4

直線性

LOQ 濃度からラベル表示濃度 (3.4 mg/mL) までの標準溶液を用い、各インスリン濃度に対して面積レスポンスをプロットし、インスリン先発薬の検量線を作成しました。図 3 に、濃度範囲 10.6 ～ 3,400 µg/mL のインスリンの検量線を示します。この検量線の R^2 値は 0.99 を超えていました。これは、インスリンのピーク面積と濃度の間に、良好な投与量依存的相関性があることを示唆しています。

凝集体/分解物の分析と定量

生物製剤の不純物プロファイルは、製剤の安全性を確保するうえでますます重要になっています。凝集体は、ごく低濃度であっても、製剤の品質に大きな影響を与える可能性があるからです。AdvanceBio SEC カラムは、生体分子との相互作用を最小限に抑えるよう設計されているため、インスリン凝集体を明確にベースライン分離することが可能です。図 4 に示すように、これらのインスリン凝集体は、AdvanceBio SEC カラムからそれぞれ 11.181 分と 13.884 分で溶出しています。

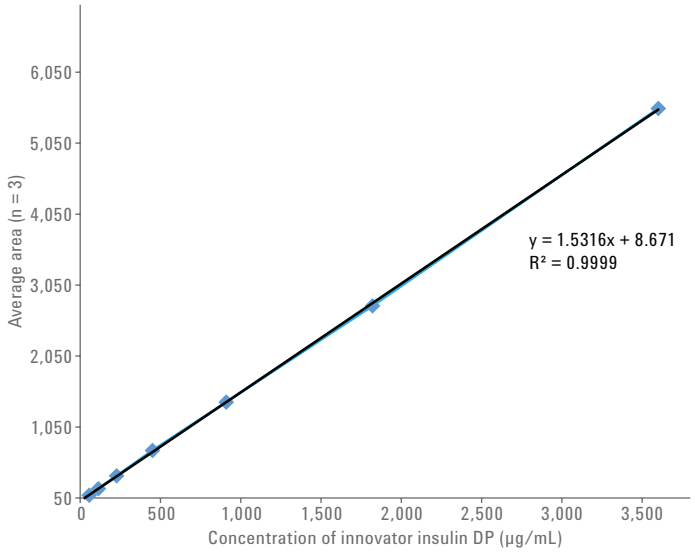


図 3. 濃度範囲 10.6 ～ 3,400 µg/mL のインスリン標準液を用いて作成した検量線。優れた相関性が得られています。

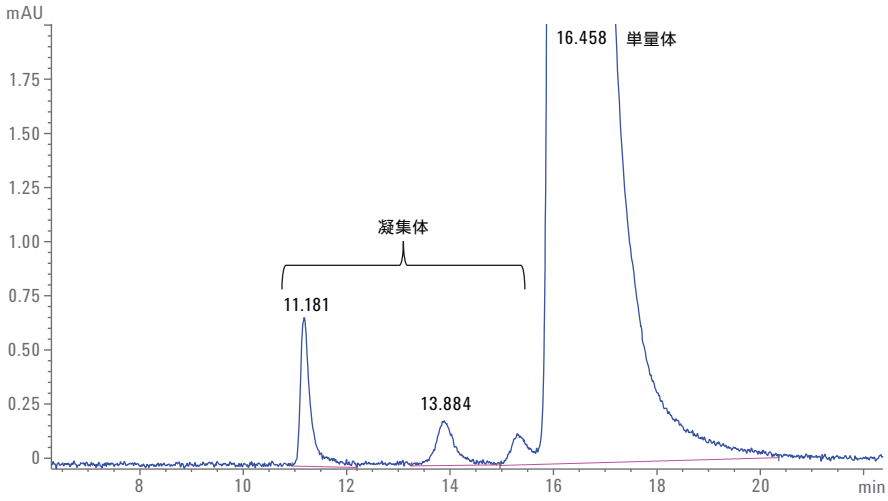


図 4. 熱ストレスを加えたインスリンの Agilent AdvanceBio SEC プロファイル。インスリン類似体がベースライン分離しています。

カラムの経済的価値と寿命の評価

特に AdvanceBio SEC カラムと他の種類のカラムを比較する際に、ラボ責任者やグループリーダーが主に重視するのはコストでしょう。SEC 分離では、人件費や機器の費用を除けば、カラム自体が最も高価なコンポーネントだからです。カラムの寿命が十分でなかったり、カラム間の再現性に問題がある場合、複数のカラムのスクリーニングが必要になる可能性があります。バッチ間の再現性を確保するためには、生産プロセス全体を厳密にコントロールすることが不可欠です。図 5 は、4 つのバッチの AdvanceBio SEC 130 Å カラムで AdvanceBio 130 Å タンパク質マーカーを分離した結果です。アジレントでは、このような試験により、生産プロセス全体が厳密にコントロールされています。

また、お客様が開発プロセスの最初から最後まで利用できる長いカラム寿命を確保することもアジレントの目標の 1 つです。カラム寿命が長くなれば、ダウンタイムが大幅に削減され、さらに多くの利点がもたらされます。図 6 は、3 mg/mL のインスリン原薬を 50 回ずつ、合計 250 回注入して得られた 6 個のクロマトグラムを重ね合わせたものです。また、表 6 に、特定の分析で得られた RT、ピーク面積、テーリングファクター、および理論段数を示します。

この結果から、250 回の注入に渡って RT、ピーク面積、およびテーリングファクターに実質的な変化がないことは明らかです。カラムの効率の指標となる理論段数についても、顕著な変化はありません。

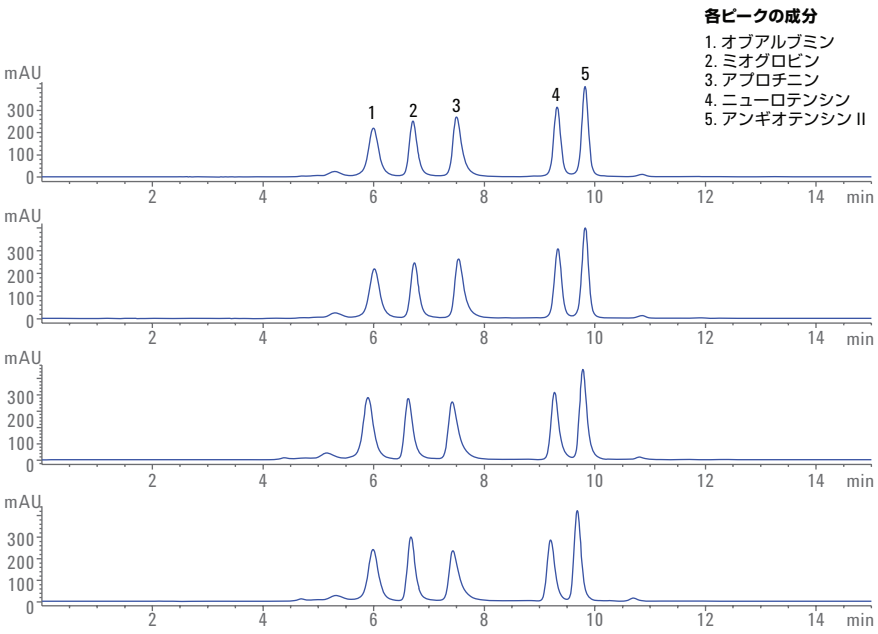


図 5. 4 つのバッチの Agilent AdvanceBio SEC 130 Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムによる Agilent AdvanceBio 130 Å タンパク質標準の分離

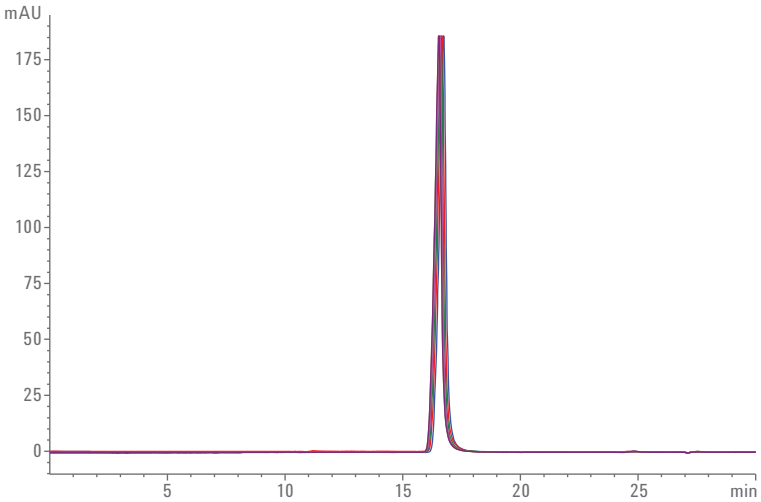


図 6. インスリン原薬を 50 回ずつ、合計 250 回注入して得られた 6 個のクロマトグラムの重ね表示

結論

サイズ排除クロマトグラフィーは、バイオ医薬品の凝集体および単量体の検出とモニタリングにおいて大きな役割を果たします。このアプリケーションノートでは、Agilent AdvanceBio SEC 130 Å カラムがインスリン類似体の試験に最適であることを実証しました。ここでは、薬局方のドラフトメソッドに従い、インスリン製剤のバイオシミラーと先発薬の分子類似性を明らかにするシンプルな UV ベースのメソッドを、AdvanceBio SEC 130 Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムを用いて開発しました。このメソッドにより、きわめて優れた RT およびピーク面積の精度が得られ、その結果はシステム適合性要件に適合していました。8 種類の濃度のインスリン製剤標準溶液をもとに各濃度に対してピーク面積をプロットした検量線は、直線の相関性を表すとともに、卓越した直線性も示しました。また、測定により得られた LOD および LOQ は、それぞれ 10.6 µg/mL と 31.8 µg/mL でした。これは、メソッドの感度の高さを表しています。さらに、強制的なストレス負荷試験では、AdvanceBio SEC カラムにより、凝集体を分離およびモニタリングすることができました。AdvanceBio SEC カラムは製造上のロット間のばらつきが低減し、カラム寿命も長く、このカラムを使用して分析することで、再現性と堅牢性に優れた結果が得られるなど、多くの経済的利点がもたらされることも示しました。今回の調査で用いたシンプルで再現性の高いメソッドと、バイオ不活性で耐腐食性の機器を組み合わせることで、バイオ医薬品の開発プロセスに渡るインスリンの日常的な品質検査に適した、信頼性の高いソリューションを実現できるものと考えられます。

表6. インスリン原薬の 250 回の注入により得られた RT、ピーク面積、テーリングファクター、および理論段数

注入回数	RT (分)	ピーク面積	テーリングファクター	理論段数
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

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**.

ホームページ
www.agilent.com/chem/jp

カストマコンタクトセンタ
0120-477-111
email_japan@agilent.com

本資料掲載の製品は、すべて研究用です。本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2016

Printed in Japan, May 1, 2016
5991-6872JAJP

Agilent Technologies