바이오 시밀러 및 Innovator 인슐린의 크기 배제 크로마토그래피(SEC)

Agilent AdvanceBio SEC 컬럼 사용

응용 자료

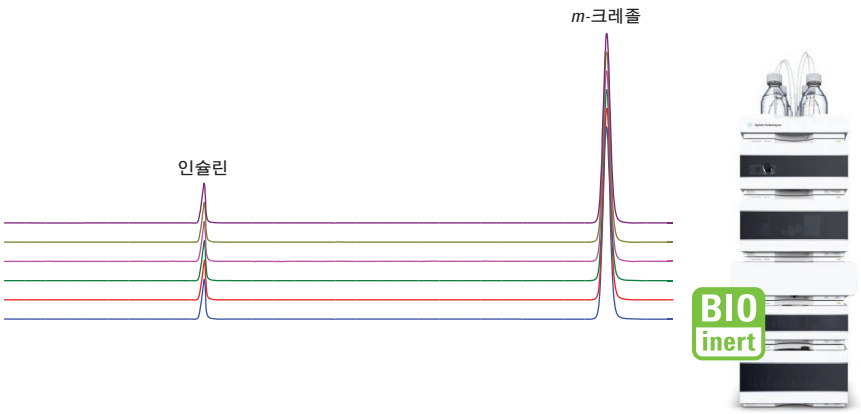
바이오 의약품

저자

M. Sundaram Palaniswamy 및
Andrew Coffey
애질런트사

개요

인슐린은 혈당 항상성을 조절하는 호르몬으로, 소규모 폴리펩타이드로 구성되어 있습니다. 유전 공학 기술로 바이오 의약품(Biopharma) 기업들은 다양하고 오랜 효과를 가진 인슐린 유사체를 개발할 수 있게 되었습니다. 인슐린 유사체의 분석에 이용 가능한 약전 분석법은 아직 없습니다. Innovator와 바이오시밀러 인슐린 유사체를 식별하는 SEC 분석법은 EP 분석법 초안에 따라 Agilent AdvanceBio SEC 130Å, 7.8 × 300mm, 2.7µm 컬럼을 사용하여 개발되었습니다. 일상 분석을 위해 이 분석법의 효과는 시스템 적합성 테스트와 Innovator 인슐린을 참조 물질로 사용한 머무름 시간(RT) 및 면적 정밀도 시험을 통해 확인되었습니다. 또한 이 응용 자료는 정량 분석 시 인슐린의 분자량보다 더 큰 분자량을 가진 불순물을 검출하기 위해 이 컬럼을 응용하는 방법을 제시합니다.



Agilent Technologies

서론

새로운 인슐린 유사체는 인간 인슐린 산물의 대체품입니다. 임상 시험에서 이러한 유사체를 인간 인슐린과 비교할 때 동일하거나 더 우수한 효능 결과를 보여주었습니다. 인슐린 유사체는 현재 시장에서 오랜 효과를 가진 기저 인간 인슐린(Basal human insulin)입니다. 인슐린 유사체는 2000년 4월 미국 FDA(USFDA)에 의해 사용이 승인되었습니다. 소분자와 달리 바이오 의약품은 생물학적 공정을 통해 만들어집니다. 각 제조사는 자체 개발 공정을 사용하여 약물 물질과 약물 제품을 생산합니다. 이러한 생산 방식에서 응집체 및 분해 산물과 같은 약물 물질로부터 유도된 불순물이 생성될 수가 있습니다. 항당뇨 약물 수요가 증가함에 따라, 불순물 없는 약물 생산과 부작용 없는 안전한 약물의 제공은 중요하면서도 어려운 과제입니다. 바이오 의약품 산업에서 UV 검출을 이용한 LC는 다양한 방출 및 특성 규명 시험에 사용되는 다용도 도구입니다[1]. 크기 배제 크로마토그래피(SEC)는 순도 분석과 의약품 응집체 검출을 위한 엄선된 분석법입니다. 이 응용 자료는 시스템 적합성과 방법 정밀도 분석에 이어 인슐린 바이오시밀러와 그 Innovator 참조물질 사이에 분자 유사성을 결정하는 SEC-UV 접근법을 설명합니다[2]. 이러한 테스트는 분석법이 허용 가능한 정확도와 정밀도 있는 결과를 획득할 수 있음을 보장합니다. 선택 기준은 중요한 크로마토그래피 파라미터와 분석법 평가 실험 동안에 정의된 허용 한계 내의 변화에 기초합니다. 10.6 ~ 3,400µg/mL 범위에서 인슐린의 선형 곡선에 대해 우수한 상관 계수가 관찰되었으며, 분석법의 정량성을 나타냅니다. Forced-stress 시험에 의해 결정된 대로 의약품보다 더 큰 분자량을 가진 불순물을 모니터링하고 분리하기 위해 Agilent AdvanceBio SEC 컬럼을 사용하는 방법도 나와 있습니다.

재료 및 방법

실험 기기

최대 압력이 600bar이고 완전한 생체적합성을 지닌 Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC 시스템을 사용했습니다. 이 시스템의 구성은 다음과 같습니다:

- Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC 펌프(G5611A)
- Agilent 1260 Infinity Bio-inert 고성능 자동 시료 주입기 (Autosampler)(G5667A)
- Agilent 1200 Infinity 시리즈 항온 장치(G1330B)
- Agilent 1260 Infinity 항온 컬럼 장치(TCC: Thermostatted Column Compartment), 생체 비활성 Click-in 가열 소자 포함(G1316C, 옵션 19)
- Agilent 1260 Infinity DAD VL(10mm 생체 비활성 표준 플로우 셀이 포함된 G1315D)
- Agilent AdvanceBio SEC, 130Å, 7.8 × 300mm, 2.7µm (p/n PL1180-5350)

소프트웨어

Agilent ChemStation B.04.03(또는 상위 버전)

크기 배제 크로마토그래피(SEC) 파라미터

표 1은 Agilent 1260 Bio-inert LC 시스템을 이용한 크기 배제 크로마토그래피(SEC)의 파라미터를 보여줍니다.

시약, 시료 및 재료

상용 Innovator 및 바이오시밀러 인슐린은 현지 약국에서 구매했으며 제조업체의 지침에 따라 보관했습니다. 아세트산과 암모니아는 Sigma Aldrich사에서 구매했습니다. 모든 화학품과 용매는 HPLC 등급이며, Milli-Q 정수 시스템 (Millipore Elix 10 모델, 미국)으로 얻은 초순수를 사용하였습니다.

절차

이동상(10µL)을 Blank로 주입한 후, 각 직선성(Linearity)을 확인 하기 위해, 표준 시료를 3회 반복 주입합니다. 각 수준의 면적 및 머무름 시간(RT)을 이용하여 표준 편차(SD) 및 상대 표준 편차(RSD%) 값을 계산했습니다. 검출 한계(LOD) 및 정량 한계(LOQ)는 낮은 직선성(Linearity)에서 표준 시료를 주입하여 설정되었습니다. 각 직선성(Linearity) 수준의 평균 면적으로 인슐린의 농도에 대한 플롯을 그려 단량체 검량선을 결정합니다.

표 1. SEC HPLC에 사용된 크로마토그래피 파라미터

파라미터	분석 조건
이동상	200mL의 무수 아세트산, 300mL의 아세토니트릴 및 400mL의 물, 농축 암모니아를 이용해 pH 3.0으로 조절하고 물을 이용해 1,000.0mL로 희석
TCC 온도	실온
등용매 분석	이동상 A
주입량	10µL
유속	0.5mL/분
UV 검출	276nm

직선성 및 범위

검량선은 농도 범위 10.6 ~ 3,400µg/mL에서 Innovator 인슐린의 9개 표준 농도로 구성되었습니다.

LOQ 및 LOD

신호 대 잡음비(S/N) > 3일 때의 인슐린 농도를 LOD로 간주하고 S/N > 10일 때의 인슐린 농도를 LOQ로 간주했습니다.

인슐린 응집체의 준비

인슐린 응집체는 온도 Stress 후 준비되었습니다. 간략히 말해서, 약 3.4mg/mL의 약물을 폴리프로필렌 튜브 안에서 60°C 온도로 6시간 동안 배양했습니다. 그런 다음 시료를 실온까지 냉각하고 즉시 분석했습니다.

시스템 적합성(System suitability)

모노그래프 초안에 따라 다음은 시스템 적합성의 요구사항입니다:

- **대칭 인자:** 인슐린 유사체로 인한 최대 피크 값: 2.0
- **피크 대 밸리(Valley)비율:** 최소 2
- **인슐린 유사체보다 작은 머무름 시간(RT)을 가진 모든 불순물의 총합:** 인슐린 피크보다 큰 RT를 가진 피크를 무시하고 피크 총 면적의 0.3%이하

결과 및 토의

분리 및 검출

바이오시밀러 인슐린은 Innovator를 참조 표준으로 사용하여 비교했습니다. AdvanceBio SEC 130Å, 7.8 × 300mm, 2.7µm 컬럼에서 Intact 바이오시밀러와 Innovator 인슐린의 최적화된 SEC HPLC 분리는 우수한 분리 결과를 얻었습니다. 총 55분의 실행 시간에 응집을 보이지 않는 균일 프로필이 증명되었습니다. 방부제 m-크레졸로 인한 피크도 관찰되었으며, 약 49분에 용출됩니다(그림 1).

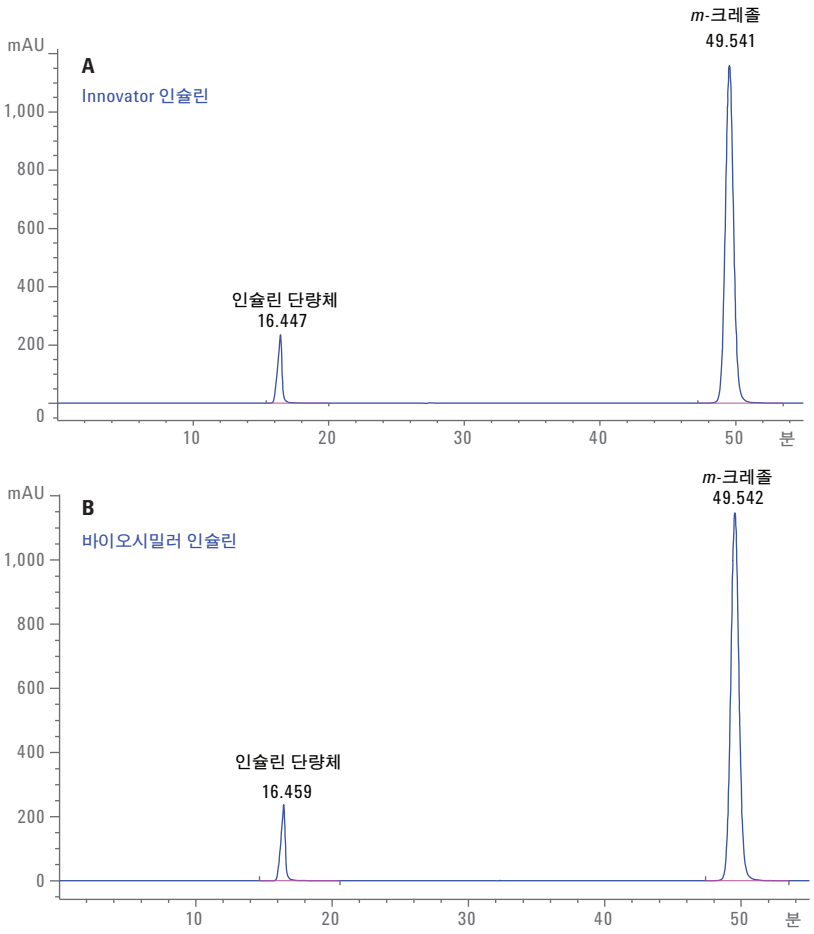


그림 1. Agilent AdvanceBio SEC, 130Å, 7.8 × 300mm, 2.7µm 컬럼에서 Innovator 및 바이오시밀러 인슐린의 SEC HPLC프로필

머무름 시간(RT)과 면적 정밀도

그림 2는 우수한 분리 재현성을 보이는 Innovator와 바이오시밀러 인슐린의 6회 반복 주입에 대한 오버레이를 보여줍니다. 표 2는 6회 반복 주입에서 인슐린 단량체에 대한 평균 RT 및 피크 면적 RSD를 보여줍니다. 인슐린 단량체에 대한 RT 및 피크 면적 RSD는 각각 허용 한계 ±3% 및 ±5% 내에 있었으며, 이 분석법의 우수한 재현성과 정밀도를 입증하는 것입니다.

시스템 적합성(System suitability)

표 3은 인슐린 유사체에 대한 이 시스템의 적합성 시험에 허용 기준을 보여주며, 표 4는 시스템 적합성 결과의 요약 내용을 제시합니다.

인슐린 Innovator 및 바이오시밀러에 대한 시스템 적합성 테스트의 결과에 따라 Agilent Bio-inert LC 및 AdvanceBio SEC 컬럼을 사용하여 수행한 분석법이 인슐린 QA/QC 분석에 대한 엄격한 성능 요구사항을 준수함을 나타냅니다.

LOD 및 LOQ

인슐린 Innovator에 대해 LOD와 LOQ는 각각 11.3µg/mL 및 28µg/mL이며, 이는 분석법의 높은 감도를 나타냅니다. 표 5는 인슐린 Innovator의 관찰된 LOD 및 LOQ 값을 보여줍니다.

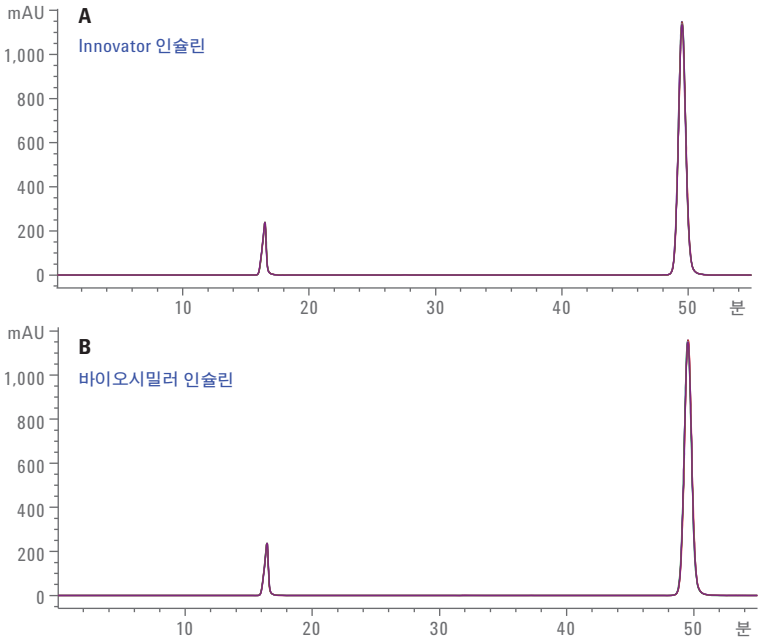


그림 2. Agilent AdvanceBio SEC, 130Å, 7.8 × 300mm, 2.7µm 컬럼에서 분리된 Innovator 및 바이오시밀러 인슐린의 6회 반복 주입에 대한 오버레이

표 2. RT 및 피크 면적 정밀도(n = 6)

	RT		피크 면적	
시료	평균(분)	상대표준편차	평균(mAU/분)	상대표준편차(RSD)
Innovator 인슐린	16.450	0.057	5,544.91	0.285
바이오시밀러 인슐린	16.460	0.044	5,459.55	0.662

표 3. 허용 기준

파라미터	한계
대칭 인자	인슐린 유사체로 인한 최대 피크 값: 2.0
피크 대 밸리(Valley) 비율	최소 2
인슐린 유사체보다 작은 RT를 가진 모든 불순물의 총합	총 피크 면적의 0.3%이하

표 4. 시스템 적합성 테스트 결과 요약

	Agilent AdvanceBio SEC, 130Å, 7.8 × 300mm, 2.7µm 컬럼의 결과			
시료	대칭 인자	피크 대 밸리(Valley) 비율	인슐린 유사체보다 작은 RT를 가진 모든 불순물의 총합	통과 (예/아니오)
Innovator 인슐린	1.71	–	0.167	예
바이오시밀러 인슐린	1.72	–	0	예

표 5. Innovator 인슐린에 대한 LOD, LOQ 및 S/N 결과(n = 3)

농도(µg/mL)	S/N	평균 면적
10.6(LOD)	11.9	12.8
31.8(LOQ)	34.7	37.4

직선성

인슐린 Innovator에 대한 선형 곡선은 인슐린의 면적 감응도와 농도를 이용한 시험에서 LOD 수준부터 표시 기준(3.4mg/mL)까지 구성되었습니다. 그림 3은 10.6 ~ 3,400µg의 농도 범위에서 인슐린의 선형 곡선을 보여줍니다. 관찰된 R2 값은 0.99보다 컸으며, 이는 피크 면적과 인슐린 농도 사이에 우수한 용량 의존적 상관관계를 알 수 있습니다

응집(Aggregation)/ 분해(Degradation) 분석 및 정량화

약물 안전성 분야에서 바이오 의약품의 불순도 프로필의 중요성이 점점 높아지고 있습니다. 응집체가 매우 낮은 농도로 존재하더라도 제품의 품질에 큰 영향을 줄 수 있습니다. AdvanceBio SEC 컬럼은 바이오 분자와 최소한의 상호 작용을 갖도록 고안되어, 인슐린 응집체의 뚜렷한 베이스라인 분리가 가능합니다. 이러한 인슐린 응집체는 각각 11.181분과 13.884분에 AdvanceBio SEC 컬럼에서 용출되어 그림 4에 나와 있습니다.

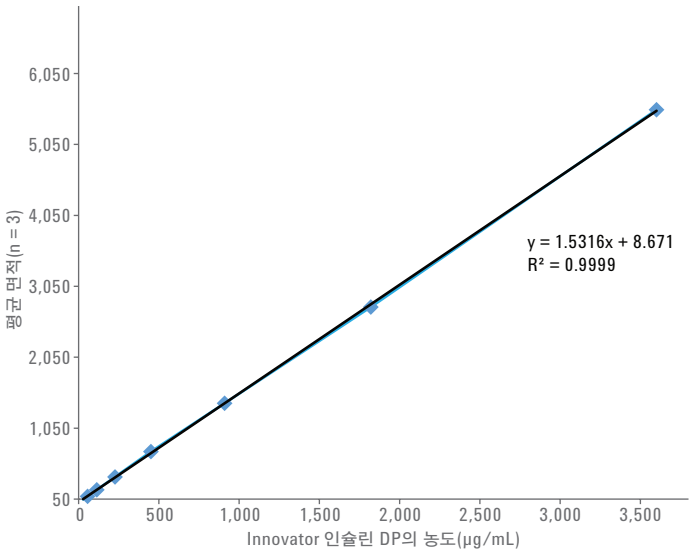


그림 3. 우수한 계수 값을 보여주는 농도 범위가 10.6 ~ 3,400µg/mL인 인슐린의 표준 농도로 구성된 선형 곡선

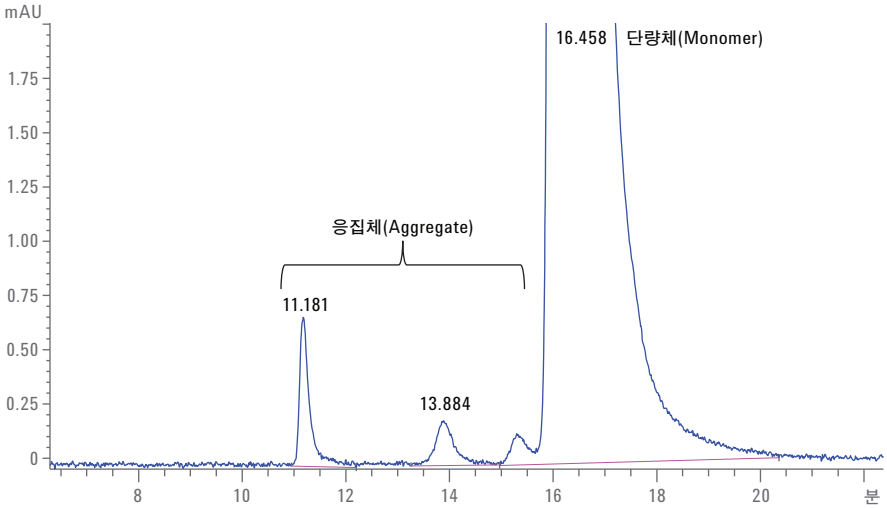


그림 4. 인슐린 응집체의 베이스라인 분리를 보여주는 Heat stressed 인슐린의 Agilent AdvanceBio SEC 프로필

경제적 가치 및 수명 시험

실험실 책임자나 그룹 리더는 주로 비용을 고려할 수 있으며, AdvanceBio SEC 컬럼과 다른 컬럼 유형을 비교할 때 더욱 그렇습니다. SEC 분리에서, 작업자와 기기 비용 이외에, 가장 비싼 구성 요소는 컬럼 자체의 비용입니다. 컬럼이 충분히 오래 사용되지 못할 경우 또는 컬럼 간 재현성에 문제가 있을 경우, 여러 컬럼을 스크리닝해야 할 수가 있습니다. 전체 생산 공정의 제어를 통해 각 배치 간의 재현성을 보장하는 일이 필수적입니다. 그림 5는 AdvanceBio SEC 130Å 미디어의 4회 분리 배치에서 AdvanceBio 130Å 단백질 마커의 분리를 보여주며, 전체 생산 공정의 철저한 제어를 보장합니다.

고객의 개발 과정 전반에 컬럼의 수명을 확장할 수 있도록 하는 것이 애질런트 여러 목표 중의 하나입니다. 이 확장된 컬럼 수명은 가동 중단 시간을 크게 줄이기 때문에 추가적인 이점을 제공합니다. 그림 6은 50회 실행 간격으로 얻어진 3mg/mL 인슐린 약물의 250회 주입에 대해 6개의 오버레이된 크로마토그램을 보여줍니다. 표 6은 선택된 실행으로부터 RT, 면적, 테일링 인자 및 이론 단수를 보여줍니다.

이러한 결과에 250회의 주입 과정 동안에 RT와 면적뿐 아니라 테일링 인자까지 실제적인 변화가 없음을 명확히 보여줍니다. 컬럼의 효율성을 측정한 이론 단수도 크게 달라지지 않습니다.

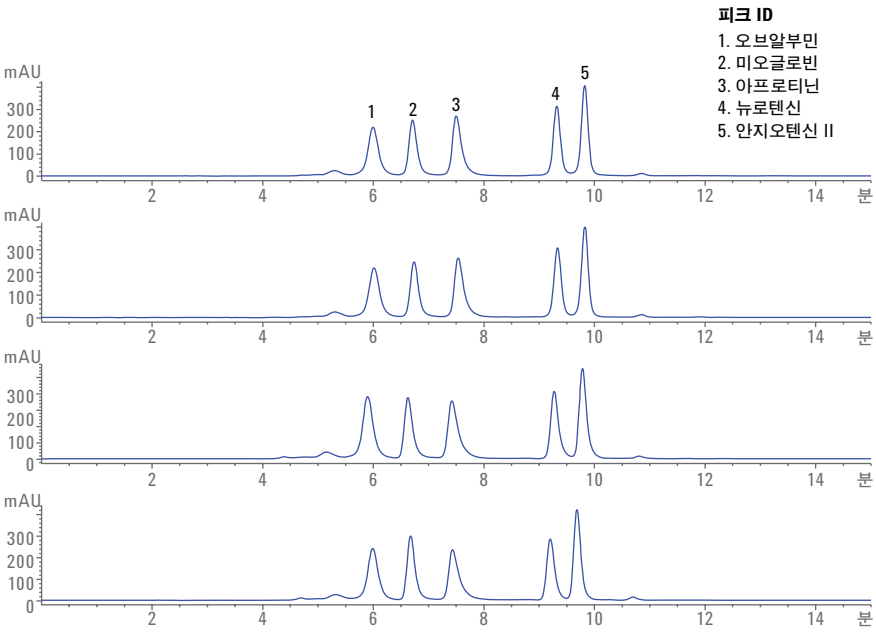


그림 5. Agilent AdvanceBio SEC 130Å, 7.8 × 300mm, 2.7µm 미디어의 4회 개별 배치에서 Agilent AdvanceBio 130Å 단백질 표준물질의 분리

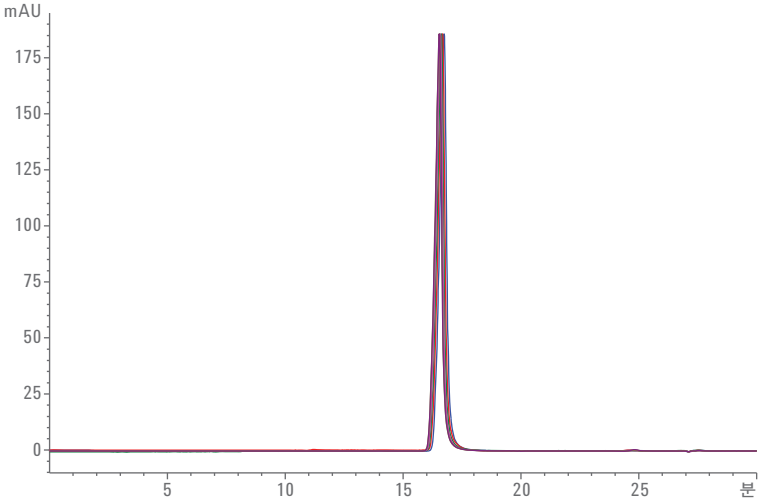


그림 6. 50회 실행 간격으로 250회 주입에 대한 6개의 크로마토그램 오버레이

결론

크기 배제 크로마토그래피(SEC)는 바이오의약품에 대한 응집체 및 단량체를 검출 및 모니터링하기 위한 중요한 기기입니다. 이 응용 자료는 인슐린 유사체를 시험하기 위한 우수한 선택 방법으로서 Agilent AdvanceBio SEC 130Å 컬럼의 적합성을 보여줍니다. 당사는 AdvanceBio SEC 130Å, 7.8 × 300mm, 2.7µm 컬럼을 사용하여 바이오시밀러와 Innovator 인슐린 약물 제품 사이에 분자 유사성을 정의하기 위해 약전 분석법 초안을 사용하여 간단한 UV 기반 접근 방법을 개발하였습니다. 분석법의 RT 및 면적 정밀도는 우수했으며 시스템 적합성 요구사항을 만족했습니다. 피크 면적과 인슐린 약물의 8개 표준 농도 사이의 선형 관계가 관찰되었으며, 직선성(Linearity) 값의 계수가 우수했습니다. 관찰된 LOD 및 LOQ는 각각 10.6 및 31.8µg/mL로 확인되었으며, 이는 분석법의 우수한 감도를 나타냅니다. AdvanceBio SEC 컬럼은 Forced stress 시험에 의해 분석된 응집체를 분리하고 모니터링할 수 있었습니다. 당사는 또한 AdvanceBio SEC 컬럼을 이용한 높은 경제적 이득을 입증했으며, 그 중 일부는 로트 간 제조 편차를 줄이면서 재현 가능하며 안정적인 결과와 함께 컬럼 수명을 연장하는 것으로 밝혀졌습니다. 생물 비활성 및 내부식성 기기를 조합한 이 간단하고 재현 가능한 분석법은 개발 과정 전체에서 인슐린의 일상적인 품질 점검에 신뢰할 수 있고 적합한 것으로 간주됩니다.

표 6. 인슐린 약물의 250회 주입에 대해 관찰된 RT, 면적, 테일링 인자 및 이론 단수

주입 횟수	RT(분)	면적	테일링 인자	이론 단수
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

참조 문헌

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 (Pichia pastoris의 작용 약물 성분에서 O-glycosylated glargine 글리코형의 식별을 위한 Tandem 질량 분석법). *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2009**, *23(7)*, 1035-42.

2. Pharmeuropa, Vol. 23, No. 2, April **2011**.

www.agilent.com/chem

연구 전용. 진단 용도로는 사용하실 수 없습니다.

이 정보는 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2016

2016년 5월 1일 한국에서 발행
5991-6872KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr

Agilent Technologies