



Agilent Fallstudie

Interview: Evaluierung einer innovativen analytischen Strategie für die Identitätsprüfung von Oligonukleotiden

Erzählen Sie uns von Ihrem Unternehmen.

Vetter ist ein familiengeführtes Unternehmen für Auftragsentwicklung und -herstellung (CDMO) mit Hauptsitz in Ravensburg, Deutschland, und Produktionseinrichtungen in Deutschland, Österreich und den Vereinigten Staaten. Das Unternehmen, das derzeit weltweit mehr als 5700 Mitarbeiter beschäftigt, ist auf sterile injizierbare Arzneimittel in einer großen Bandbreite von Formaten spezialisiert, darunter Spritzen, Karpulen, Vials und Zweikammersysteme. Zu den Kernleistungen gehören die klinische und die kommerzielle Herstellung, die Sekundärverpackung und die Montage von Medizinprodukten für parenterale Anwendungen.

Vetter verfügt über weitreichende Erfahrung bei der Unterstützung der Produktionsprozesse seiner Kunden aus der Biotechnologie- und Pharmabranche durch die Bereitstellung analytischer Dienstleistungen, so z. B. Qualitätskontrollen (QK) beim Wareneingang, bei der Herstellung und Abfüllung von Arzneimitteln, Stabilitätsstudien und analytische Anwendungen bei der Entwicklung.

Erfahren Sie mehr über Vetter unter vetter-pharma.com.

Womit beschäftigen Sie sich in Ihrem Labor?

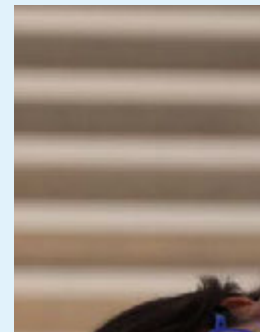
Das Analytical Science Laboratory (ASL) innerhalb von Vetter's Development Service (VDS) ist auf die Analytik für die Entwicklung und Prozesscharakterisierung nach cGMP-Anforderungen spezialisiert. VDS unterstützt die Entwicklung von Produkten der Kunden, insbesondere von Produktions- oder Verpackungsprozessen.

Das ASL bietet analytische Unterstützung bei der Entwicklung und Implementierung von Produktions- und Abfüllprozessen. Beispiele hierfür sind die Messung der Restfeuchte im Rahmen von Entwicklungsstudien zur Lyophilisierung, die Bestimmung der Proteinkonzentration und -stabilität im Rahmen der Entwicklung von Misch- und Pumpenanwendungen oder die Unterstützung der Prozessentwicklung zur Desinfektion von Reinräumen mit Hilfe des ASL-Kompetenzzentrums für H₂O₂-Bestimmungen.



Dr. Alexandra Heussner

Laborleiterin
Analytical Science Laboratory (ASL),
Development Service,
Vetter Pharma-Fertigung GmbH & Co. KG,
Ravensburg, Deutschland



Dr. Melanie Zerulla-Wernitz

Leiterin des Analytical Science Laboratory
(ASL), Development Service,
Vetter Pharma-Fertigung GmbH & Co. KG,
Ravensburg, Deutschland

Vetter ist einer der führenden Experten auf dem Gebiet der Abfüllung parenteraler Arzneimittel, einschließlich ophthalmischer Produkte. Daher umfasst ein beträchtlicher Teil unserer Laborkompetenzen die Analyse nicht-sichtbarer Partikel, wofür das ASL-Kompetenzzentrum für Partikel zuständig ist.

Darüber hinaus unterstützen wir den Transfer von analytischen Methoden unserer Kunden, sowohl zu Vetter als auch innerhalb von Vetter, durch Machbarkeitsstudien, Laborqualifizierung und die Validierung von Methoden.

Schließlich unterstützen wir die unternehmensweite Implementierung neuer analytischer Verfahren und Technologien, um unsere Analysesysteme fortlaufend zu modernisieren und zu verbessern und neueste Technologien für neue Produkte bereitzustellen.

Beschreiben Sie einige der Herausforderungen, denen Sie sich gegenübersehen.

Oligonukleotide sind eine neu auftretende Klasse von Biopharmazeutika, für die es in Bezug auf die analytischen Methoden keine zeitgemäße Strategie für die Produktzulassung gibt. Als Auftragshersteller und -entwickler benötigt Vetter intelligente analytische Lösungen, um den Anforderungen unterschiedlichster Kunden mit vielen verschiedenen Produkten gerecht zu werden. Wir müssen die wahrscheinlichsten System- oder Verfahrenskandidaten für den zukünftigen Bedarf unserer Kunden im Bereich der Entwicklung und der kommerziellen Produktion weit im Voraus erkennen. Denn nur so können wir die wesentlichen analytischen Daten zur Gewährleistung der Patientensicherheit und zur Erfüllung der gesetzlichen Bestimmungen mit vertretbarem Zeit- und Arbeitsaufwand bereitstellen.

Eine weitere Herausforderung besteht darin, dass Verbesserungen analytischer bzw. technischer Systeme oder Verfahrensinnovationen in cGMP-Umgebungen regulatorisch anspruchsvoll und technisch oft komplex sind. Hierfür bedarf es eines integrativen Ansatzes, an dem Spezialisten für Analysetechnologie, Qualitätssicherung und IT beteiligt sind. Dabei kann es durchaus eine besondere Herausforderung darstellen, eine Lösung zu finden, die den Anforderungen an die Datenintegrität gerecht wird und die gleichzeitig eine bequeme Nutzung des Analysesystems ermöglicht, ohne auf notwendige Funktionen verzichten zu müssen. Wir bei Vetter sind stets bestrebt, die zukünftigen Bedürfnisse unserer Kunden und unseren eigenen Bedarf möglichst frühzeitig zu erkennen. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf die Einhaltung der regulatorischen Vorgaben.

Inwiefern hat Ihnen das Agilent Cary 3500 UV-Vis-Spektralphotometer dabei geholfen, diesen Herausforderungen gerecht zu werden?

Mit einem unserer aktuellen Projekte beabsichtigen wir, die Analytik von Arzneimitteln auf Oligonukleotidbasis zu optimieren. So gelingt es beispielsweise mit standardmäßigen Methoden zur Bestätigung der Identität (ID), wie etwa auf Basis von HPLC oder UPLC, normalerweise nicht, die ID dieser Produkte zu bestätigen.

Der Trend geht dahin, die Schmelztemperatur (T_m) in Verbindung mit der intakten Masse zu bestimmen, um eine eindeutige Identifizierung durch die Kombination von Sequenz und Masse zu erreichen. Es wurden zwar verschiedene analytische Methoden eingehend geprüft, diese T_m -basierte Strategie wurde jedoch auf Fachkonferenzen diskutiert und hat die Unterstützung vieler Pharmaunternehmen erhalten, die sich mit der Entwicklung und Herstellung von Oligonukleotiden beschäftigen.

Die moderne Technologie des Cary 3500 UV-Vis ist hierfür bestens geeignet. Die Temperatur kann mit dem integrierten Peltier-Element genau eingestellt und über die Sonden in den Küvetten überwacht werden. Das Design des Multizonen-Geräts mit vier Küvettenpaaren ermöglicht die parallele Messung von Proben und Referenzen in bis zu vier verschiedenen Temperaturzonen.

Warum verwenden Sie UV-Vis zur Identitätsprüfung von Oligonukleotiden?

Ein wesentliches Ziel jedes pharmazeutischen Herstellungsprozesses besteht darin, sicherzustellen, dass jede Einheit eines Arzneimittels das vorgesehene pharmazeutische Produkt in der richtigen Menge und Qualität enthält. Dies wird durch hochwertige Herstellungsprozesse und Tests zur Qualitätskontrolle erreicht.

Zu den aktuellen QK-Methoden bei der Identitätsprüfung gehören hochentwickelte Technologien wie die De-novo-Sequenzierungsbestätigung mittels MS/MS oder die Analyse von Fehlersequenzen. Insbesondere bei einzelsträngigen Oligonukleotiden kann die Bestimmung der intakten Masse mit einer zweiten, sequenzsensitiven Methode wie dem MS-Fragmentierungsmuster, der Schmelztemperatur oder der NMR-Analyse gekoppelt und mit einem umfassend charakterisierten Referenzstandard verglichen werden. Bei doppelsträngigen Oligonukleotiden kann die ID-Prüfung sogar auf eine Bestimmung der intakten Masse in Verbindung mit einer Bestätigung des gebildeten Doppelstrangs reduziert werden, vorausgesetzt, die intakten Massen der einzelnen Einzelstränge werden auch vor dem Annealing bestimmt.¹

Es gibt zwar noch andere Möglichkeiten, aber wir sind davon überzeugt, dass die kombinierte Messung von Schmelztemperatur und Masse in Zukunft die analytische Standardstrategie für ID-Prüfungen im Rahmen der QK darstellen wird. Dies ist nicht nur aus wissenschaftlicher, sondern auch aus behördlicher und geschäftlicher Sicht sinnvoll. Denn die Implementierung der Messung der Schmelztemperatur auf UV-Basis ist sowohl in Bezug auf die Methode als auch auf die Systeme der QK-Labore relativ einfach und mit geringen Betriebskosten verbunden.

Die Methoden sind weniger komplex als andere Ansätze wie die MS/MS-Sequenzierung oder NMR. Außerdem ist oft qualifiziertes Personal vorhanden, das schnell in die neuen Geräte und Methoden eingewiesen werden kann, anstatt hochqualifizierte Experten neu einzustellen.

Mit diesen Geräten können auch standardmäßige UV-Vis-Methoden durchgeführt werden, sodass sie sich in den bestehenden Gerätepark integrieren lassen und von Anfang an eine hohe Auslastung bieten. Wir haben dies bei Vetter sowohl im ASL als auch im QK-Labor erfolgreich umgesetzt.

Wie haben Sie UV-Vis mit dem Cary 3500 im Rahmen der Identitätsprüfung von Oligonukleotiden implementiert?

Um uns mit dem Gerät und der Tm-Anwendung besser vertraut zu machen, haben wir mehrere Studien durchgeführt. Eine Untersuchung der Geräteleistung mit verschiedenen Parametereinstellungen ergab eine sehr robuste Performance. Diese Arbeit wurde im Expertenkreis diskutiert und ist in einem kürzlich erschienenen Whitepaper detailliert beschrieben.²⁻⁴

In einer weiteren Studie, in der die Empfindlichkeit von Tm-Messungen für die ID-Prüfung bestimmt werden sollte, haben wir uns die Spezifität des Verfahrens für verschiedene Oligonukleotidsequenzen genauer angeschaut. Dabei wurden Modellsequenzen und Varianten von Oligonukleotiden entworfen, synthetisiert und analysiert. Wir fanden heraus, dass selbst der Austausch einer einzelnen Base oder die Deletion oder Insertion eines einzelnen Nukleotids zu signifikanten Veränderungen der gemessenen Schmelztemperatur der Oligonukleotidduplexe führte. Die allgemein hohe Spezifität der Methode gegenüber subtilen Veränderungen in den Oligonukleotidsequenzen bestätigte die Eignung der Methode für die ID-Prüfung von Oligonukleotiden in Rahmen der pharmazeutischen QK-Umgebung. Dieses Verfahren ist robust und empfindlich genug, um sowohl unsere eigenen Anforderungen bei Vetter als auch die unserer Kunden und der Regulierungsbehörden zu erfüllen.⁵

Diese und andere laufende Studien haben Veters Know-how auf dem Gebiet der Oligonukleotide und der Spezialanalytik vertieft.

Wie lange dauert eine Messung? Ist sie schwierig?

Die Analyse einer Probe in einer GMP-Umgebung kann je nach den gewählten Parametern weniger als eine Stunde dauern. Die Temperaturanstiegsrate ist für die benötigte Zeit von entscheidender Bedeutung. Unsere bevorzugte Einstellung ist eine Temperaturanstiegsrate von 10 °C/min, was zu einer Messung von 10 Minuten führt.

Das Cary 3500 UV-Vis System selbst ist einfach zu bedienen. Jeder erfahrene Labortechniker oder Forscher kann das System und das Verfahren nach kurzer Schulung problemlos nutzen.

Beschreiben Sie Ihre Erfahrungen bei der Zusammenarbeit mit Agilent.

Bei der Auswahl eines Geräts für die Tm-Analyse im ASL und bei der QK haben wir uns für Agilent entschieden und waren unter den ersten Benutzern des Cary 3500 UV-Vis. Unseres Wissens gehörten wir auch zu den allerersten Benutzern der Software für ein reguliertes Umfeld, das den Compliance-Vorgaben von FDA 21 CFR Part 11 unterliegt.

Langfristig gesehen haben wir bei der Zusammenarbeit mit Agilent gute Erfahrungen gemacht. In der Qualitätskontrolle kommen bei uns verschiedene Agilent Geräte zum Einsatz, darunter Agilent HPLC-Systeme. Gleiches gilt für das ASL, in dem wir mit dem Agilent 7800 ICP-MS arbeiten. Agilent hat sich bei Fragen und Service als zuverlässiger und professioneller Partner erwiesen. Selbst bei komplizierten Problemen waren die Techniker von Agilent innerhalb kürzester Zeit zur Stelle und leisteten umfassenden Support.

Was glauben Sie, was die Zukunft für diese Technologie bereithält?

Wir werden die Leistung dieser Identitätsprüfung weiter untersuchen, da sich neue Möglichkeiten ergeben haben. Unser Ziel dabei ist es, ein Plattformverfahren für die Analyse zu entwickeln und zu validieren, das auf dem aktuellen Wissensstand basiert und eine schnelle Implementierung einer ID-Bestimmung ermöglicht. Dies gilt insbesondere für neue Produkte oder Kunden, die kein geeignetes analytisches Verfahren zum Methodentransfer haben.

Dies schließt auch ein System-Upgrade unserer Geräte ein, das die Präzision der Datenanalyse weiter verbessern würde. Wir haben das System direkt nach der Markteinführung Ende 2019 implementiert und qualifiziert. Außerdem betreiben wir immer noch die erste Version der Software, die über die für 21 CFR Part 11 erforderlichen Funktionen in einem regulierten Umfeld verfügt.

Die aktualisierte Software bietet jetzt neue integrierte Berechnungen für die Datenanalyse, darunter eine Glättungsfunktion und Verbesserungen der Ableitungsfunktion. Diese können innerhalb einer Methode gespeichert und am Ende der Datenerfassung automatisch angewendet werden. Wir arbeiten derzeit gemeinsam mit Agilent an der Evaluierung, wie diese Funktionen besser auf Systemebene anstelle von in produktspezifischen Verfahrensvalidierungen qualifiziert werden können.

Über die Autoren

Dr. Alexandra Heussner ist eine erfahrene interdisziplinäre Wissenschaftlerin und Laborleiterin im Development Service von Vetter in Ravensburg, Deutschland. Dr. Heussner hat einen wichtigen Beitrag zu unserem Verständnis der Toxikologie natürlicher Toxine und pharmazeutischer Arzneimittel geleistet und die Entwicklung und Implementierung von Methoden durch die Integration von Biowissenschaften, Informationstechnologie und Statistik vorangetrieben. Sie erhielt ihren Dokortitel in Angewandten Wissenschaften von der britischen Universität Sunderland. Nach langjähriger Tätigkeit in der wissenschaftlichen Forschung kam sie 2016 zu Vetter. Derzeit arbeitet sie mit ihrem Team im Analytical Science Laboratory an der Implementierung, Entwicklung und Validierung analytischer Verfahren. Sie ist Mitglied der Parenteral Drug Association (PDA).

Dr. Melanie Zerulla-Wernitz ist die Leiterin des Analytical Science Laboratory, wo sie ein vielseitiges Team von Wissenschaftlern leitet, das sowohl im Bereich der Naturwissenschaften als auch der angewandten Wissenschaften tätig ist. Sie hält einen Dokortitel in Naturwissenschaften von der Universität Konstanz, Deutschland. Nach langjähriger Tätigkeit in der präklinischen Entwicklung kam Dr. Zerulla-Wernitz 2004 zu Vetter. Ihre Karriere begann sie in der Abteilung für Qualitätskontrolle, anschließend wechselte sie in den Development Service. Nach einem einjährigen Auslandsaufenthalt beim Vetter Development Service in Chicago setzte sie ihre Arbeit als Leiterin des Analytical Science Laboratory fort. Zu ihren Aufgaben gehört der Ausbau des Service- und Analyseportfolios.

Literaturverweise

1. Capaldi, D. *et al.* Strategies for Identity Testing of Therapeutic Oligonucleotide Drug Substances and Drug Products. *Nucleic Acid Therapeutics* **2020**, 30(5), 249–264. doi: 10.1089/nat.2020.0878.
2. Schuler, S. *et al.* Challenging Oligonucleotide ID Testing. *8th Annual Oligo Networking Event*, 23–25. März **2021**.
3. Schuler, S. *et al.* Emerging Therapeutic Oligonucleotides – ID Testing. *PDA UPS Conference*, 05–06. Okt. **2021**.
4. Heussner A. H. Emerging Therapeutic Oligonucleotides – Analytical Challenges Accepted. *PDA UPS Conference* 05–06. Okt. **2021**.
5. Heussner, A. H. *et al.* Investigating Tm Method Specificity Using Oligonucleotide Sequence Variants. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology* **2022**, (eingereicht).

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

RA44813.3348032407

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Veröffentlicht in den USA, 30. September 2022
5994-5144DEE