

Etablierung einer validierten Methodik zur Proteinanalytik unter Zuhilfenahme der Größenausschlusschromatographie

Koller AK¹, Kemmer I¹, Busse M¹, Borst T¹, Heimke-Brinck R¹, Spielvogel H¹, Hannappel E², Atreya R³, Neurath MF³, Dörje F¹

¹Apotheke des Universitätsklinikums Erlangen, ² Institut für Biochemie, FAU Erlangen-Nürnberg ³Medizinische Klinik 1 des Universitätsklinikums Erlangen

Hintergrund

Im Rahmen einer klinischen Studie ist ein Reaktivfarbstoff (Fluoresceinisothiocyanat, FITC) kovalent an einen monoklonalen Antikörper (INN Adalimumab) zu binden. Zur Qualitätssicherung der Kopplungsreaktion wurde eine neue Methodik auf Grundlage der Größenausschlusschromatographie entwickelt, mit deren Hilfe das Konjugat auf Identität und Reinheit geprüft werden kann. Für eine Krankenhausapotheke stellt diese hochinnovative Form der analytischen Kontrolle eine besondere Herausforderung dar.

Methodik

Zur Gewährleistung der Validität der Ergebnisse wurde auf Linearität, Spezifität und Robustheit geprüft. Bei der Prüfung auf Reinheit wurde der Anteil des ungebundenen FITC durch Bestimmung mittels Fluoreszenzdetektor ($\lambda_{ex} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 518 \text{ nm}$) quantifiziert. Der Identitätsnachweis erfolgte unter Verwendung eines Proteinmischstandards und Zuordnung der Retentionszeiten zu den molekularen Massen im Diodenarray-Detektor (bei Wellenlänge 280 nm).

Die HPLC-Anlage (Merck Hitachi) bestand aus folgenden Komponenten: Programmable Autosampler L-7250, Interface D-7000I/F, HPLC-Pumpe L-7100, Diodenarray-Detektor 1 L-7455, Fluoreszenzdetektor L-7480, Säulen-Ofen L-7360. Säule: Phenomenex, Yarra, 3 μm , 300 x 7.8 mm, Puffer: TRIS-Puffer (pH 7), Fließgeschwindigkeit: 0,5 mL/min, Säulentemperatur: 22,0°C.

Ergebnisse

Für die Ermittlung der **Linearität** der zu validierenden Methode im Messbereich des Fluoreszenzdetektors wurde ein Konzentrationsbereich von 0,04 mg/mL bis 0,06 mg/mL von FITC-Adalimumab untersucht.

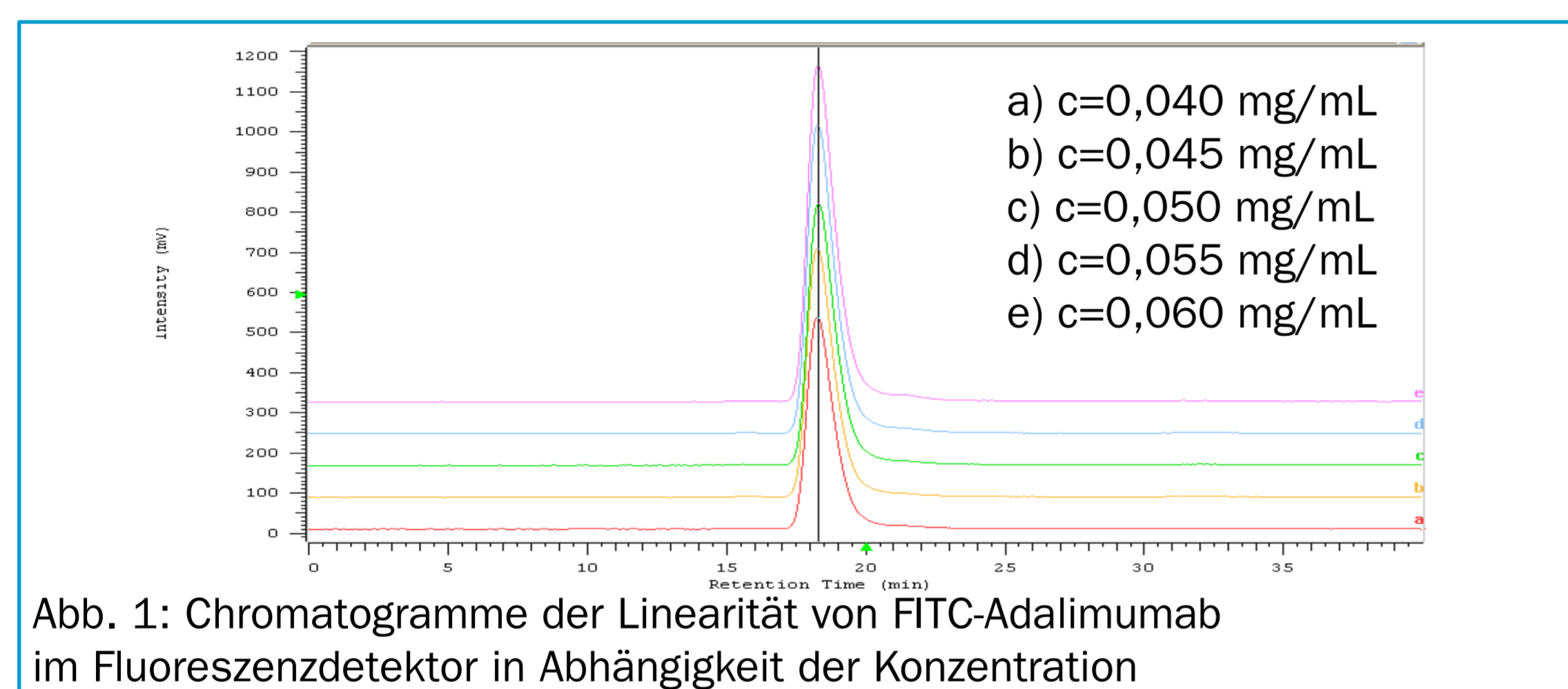


Abb. 1: Chromatogramme der Linearität von FITC-Adalimumab im Fluoreszenzdetektor in Abhängigkeit der Konzentration

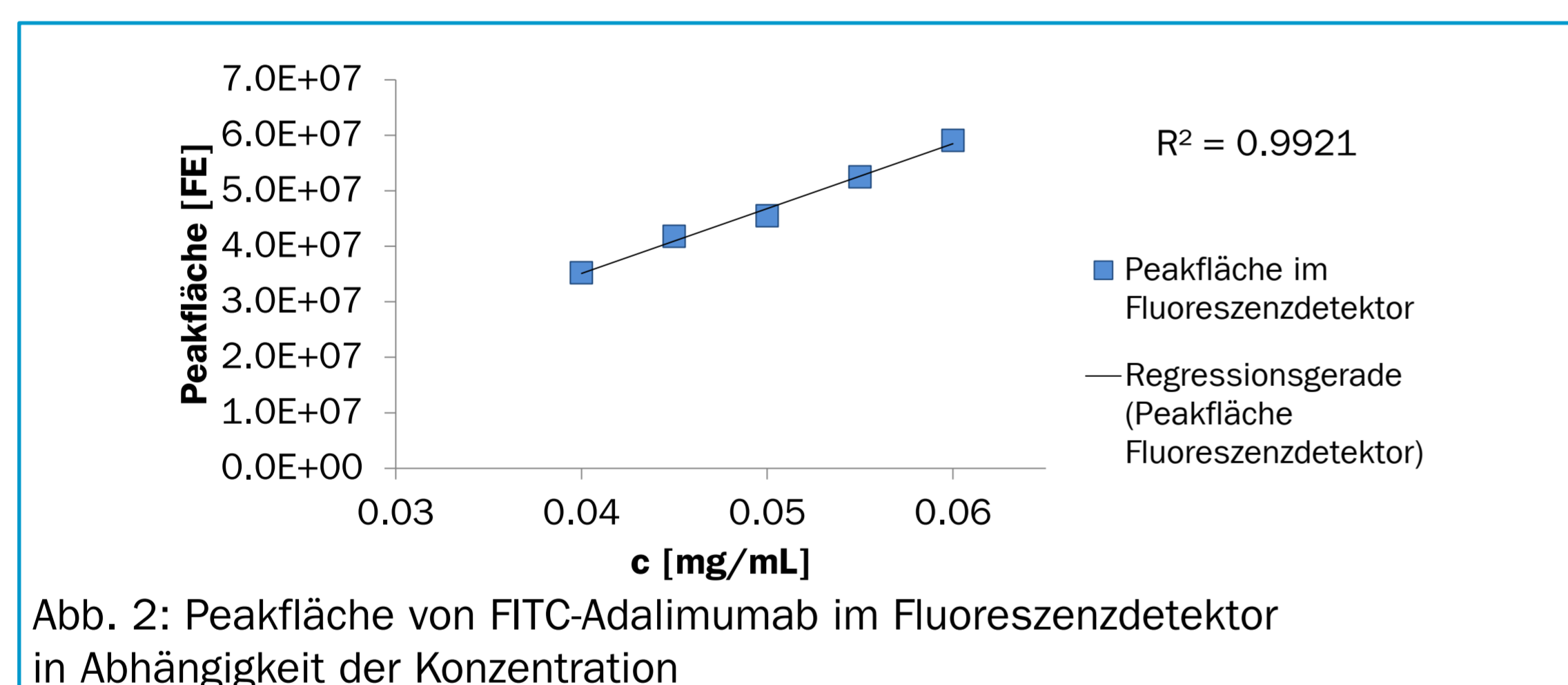


Abb. 2: Peakfläche von FITC-Adalimumab im Fluoreszenzdetektor in Abhängigkeit der Konzentration

Im Bereich von 80-120 % der Zielkonzentration $c=0,05 \text{ mg/mL}$ konnte mit einem Bestimmtheitsmaß $>99 \%$ lineares Verhalten nachgewiesen werden.

Zur Ermittlung der **Robustheit** der Methode wurde die Säulentemperatur von standardmäßig 22,0°C auf 20,0°C und 24,0°C variiert. Der Einfluss auf die Retentionszeit von FITC-Adalimumab wurde untersucht.

Die Retentionszeit von FITC-Adalimumab wird durch Erhöhung der Säulentemperatur auf 24,0°C um 0,08 % erhöht. Durch Verminderung der Säulentemperatur auf 20,0°C wird die Retentionszeit von FITC-Adalimumab um 0,11 % erniedrigt. Somit kann die Methode als robust bezeichnet werden.

Die **Spezifität** der Methode wurde mittels Behandlung von FITC-Adalimumab-Prüflösung, die zu Abbauprodukten führte, ermittelt. Als Vergleichslösung diente unbehandeltes FITC-Adalimumab.

Tab. 1: Retentionszeiten Abbauprodukte

Art der Behandlung	HCl	H ₂ O ₂	32°C, 4 h	Vergleich
Retentionszeit der Abbauprodukte [min]	31,83	21,54 31,57	–	–

Die Peakflächen der Abbauprodukte lassen sich im Fluoreszenzdetektor klar von FITC-Adalimumab (Retentionszeit 18,41 min) abgrenzen. Die Lagerung der Prüflösung bei 32°C über 4 h führt nicht zu detektierbaren Abbauprodukten.

Zur Bestimmung des Anteils an freiem FITC (**Reinheit**) wurde über die Fläche des FITC-Adalimumab-Peaks ($c=0,05 \text{ mg/mL}$) im Fluoreszenzdetektor und den Verdünnungsfaktor 50 die Fläche des theoretischen FITC-Adalimumab Peaks ($c=2,5 \text{ mg/mL}$) berechnet. Diese wurde mit der Fläche des Peaks von freiem FITC ($c=2,5 \text{ mg/mL}$) ins Verhältnis gesetzt.

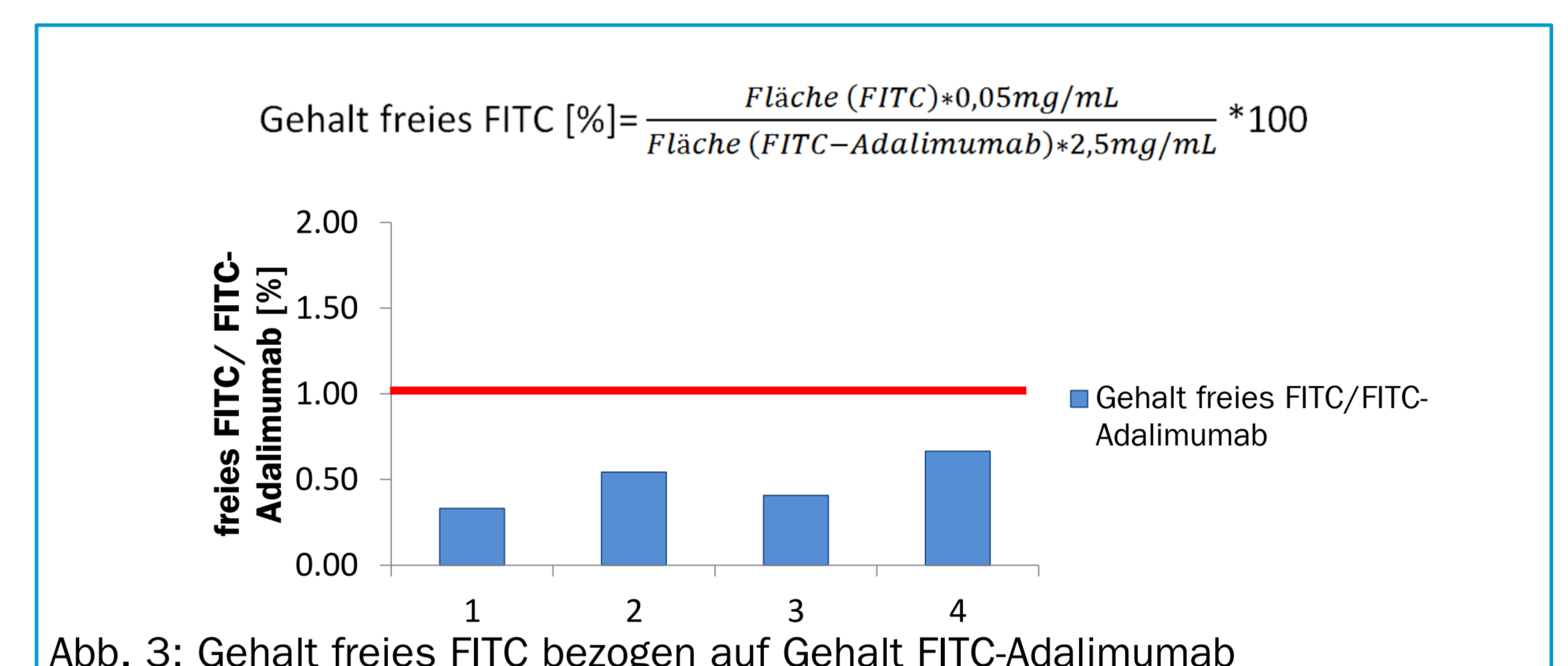


Abb. 3: Gehalt freies FITC bezogen auf Gehalt FITC-Adalimumab

Der Anteil an nicht gebundenem FITC übersteigt bei keiner der vier Messungen die Spezifikation (Gehalt $<1 \%$).

Der **Identitätsnachweis** erfolgte durch das Auftragen der Molekulargewichte von Referenzproteinen gegen ihre Retentionszeit. Über eine Kalibriergerade konnte das Molekulargewicht der Prübsubstanz bestimmt werden.

Tab. 2: Molekulargewicht Referenzproteine

Protein	Molekulargewicht [Da]
Apoferritin	443000
Gamma-Globulin	158000
Ovalbumin	44000
Myoglobin	17000

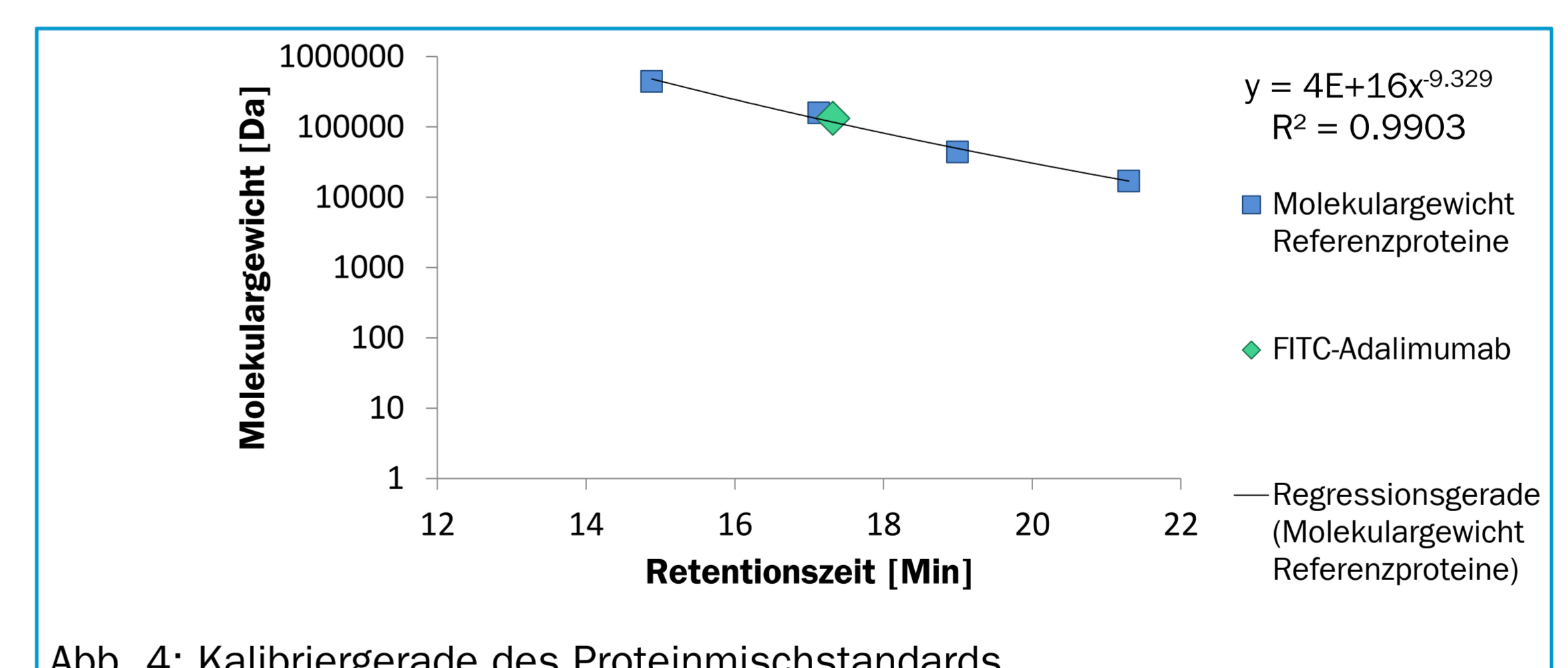


Abb. 4: Kalibriergerade des Proteinmischstandards

Die Identität von FITC-Adalimumab kann über das korrespondierende Molekulargewicht von 144 000 Da ($\pm 15 \%$) bestätigt werden.

Fazit

Ein Systemeignungstest sowie die Messungen von Linearität, Robustheit und Spezifität belegen, dass die Methode geeignet ist, reproduzierbar richtige Ergebnisse zu liefern. Für die Daten des Diodenarray-Detektors wird auf den Validierungsbericht verwiesen.

Eine innovative Methode zur Prüfung von FITC-Adalimumab auf Identität und Reinheit wurde entwickelt und einer Validierung unterzogen, um die GMP-konforme Herstellung der Studienmedikation zu gewährleisten.