



# Характеризация препаратов инсулина методом аналитического ультрацентрифугирования

Chad Schwartz, Ph.D., Dean Clodfelter, M.S. | Beckman Coulter, Inc., Indianapolis, IN 46268

## Аннотация

Инсулин - это хорошо изученный лекарственный препарат, используемый для лечения диабета. Было исследовано большое количество различных форм инсулина с целью разработки препаратов с оптимальным времени доставки, соответствующему требованиям лечения заболевания. Кроме того, был разработан ряд аналогов инсулина, таких как инсулин Glarine и инсулин LysPro (Humalog), для немедленного использования (короткого действия) или наоборот длительного действия. После выхода ряда нормативных документов по биоаналогам многие фармацевтические компании стали активно разрабатывать различные версии инсулинов для удовлетворения нужд пациентов по всему миру. Биодоступность данных препаратов зависит не только от первичной структуры биомолекулы, но и от их организации. Для анализа структуры инсулина более высоких уровней при стандартных условиях применение находит метод аналитического ультрацентрифугирования (AUC). В данной работе метод AUC был использован для изучения влияния концентрации инсулина, катионов цинка и хелата цинка ЭДТА на образование мономеров, димеров и гексамеров эталонного стандарта человеческого инсулина Фармакопеи США (USP). Показано влияние концентрации ЭДТА на образование мономеров, димеров и гексамеров в присутствии катионов цинка. В работе представлены сведения об использовании аналитической ультрацентрифуги ProteomeLab XL-I Beckman Coulter для характеристики и разработки биофармацевтических препаратов.

## Введение

По данным Американской диабетической ассоциации в 2012 году 29,2 миллиона американцев или 9,4% населения страдали диабетом 1 или 2 типов. Заболевание занимало седьмое место среди причин смерти в США с 69,071 погибшими<sup>1</sup> в 2010 году. Поскольку организм заболевших не способен самостоятельно вырабатывать достаточное количество инсулина, стандартным методом лечения диабета 1 типа является ежедневная терапия препаратами инсулина. Обычно пациентам с диабетом 1 типа требуется делать несколько инъекций инсулина каждый день во время еды. Однако даже при должном контроле и правильном введении инъекции препаратов инсулина не воспроизводят естественный временной профиль действия нативного инсулина, поэтому интенсивно разрабатываются аналоги препарата с улучшенной эффективностью. Большая часть исследований в настоящее время направлена на изучение зависимости профиля действия инсулина от его стехиометрии в условиях готовой лекарственной формы и после попадания в человеческий организм путем инъекции.

Биофармацевтические компании используют различные методы в качестве рутинных для измерения размеров частиц и характеристики гетерогенности в растворе. Метод AUC позволяет характеризовать размеры частиц, гетерогенность, коэффициенты трения путем численного решения фундаментального уравнения Ламма, которое описывает седиментацию частиц в растворе. В ранних работах были представлены данные об использовании метода AUC для оценки влияния состава препарата на коэффициенты седиментации инсулина<sup>2,3</sup> но упоминаний об оценке влияния цинка и хелатирующего агента на олигомеризацию молекул инсулина в литературе ранее не было.

## Материалы

Двухосновный фосфат натрия, хлорид цинка, ЭДТА и глицерин производства Fisher Scientific. Гидроксид натрия производства Fluka, соляная кислота BDH Chemicals. Эталонный стандарт человеческого инсулина (USP) был приобретен у Fisher Scientific.

Аналитическая ультрацентрифуга ProteomeLab XL-I, двухсекторные ячейки для проведения экспериментов по скоростной седиментации, кварцевые окошки, ротор An 60 Ti, ротор An 50 Ti производства Beckman Coulter, Inc.

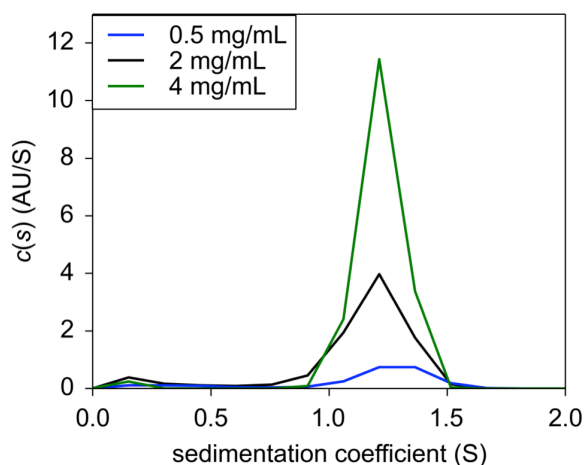
## Методы

*Характеризация образцов инсулина различной концентрации без примесей:* Инсулин ресуспендировали до 50 мг/мл

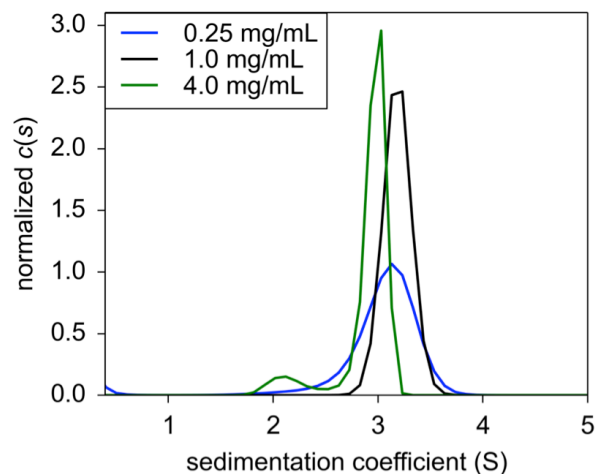
в 0.04 N HCl и разбавили до соответствующих концентраций. Также был создан эталонный буферный раствор, без инсулина. Далее по 420 мкл эталона и образца помещали в двухсекторную ячейку ротора An 60 Ti и уравнивали при 20°C в течение более 1 часа. Образцы сканировали в течение 4 часов при 60,000 об/мин, 20°C на длине волны поглощения 280 нм в непрерывном режиме.

*Характеризация образцов инсулина в виде лекарственной формы:* Инсулин ресуспендировали до 50 мг/мл в 0.04 N HCl, разбавили до соответствующих концентраций и приготовили препараты с добавлением 150 мкМ ZnCl<sub>2</sub>, 16 мг/мл глицерина, 1.9 мг/мл двухосновного фосфата натрия и 2,2 мМ NaOH. Также был создан эталонный буферный раствор, без инсулина. Далее по 420 мкл эталона и образца помещали в двухсекторную ячейку ротора An 60 Ti и уравнивали при 20°C в течение более 1 часа. Образцы сканировали в течение 4 часов при 60,000 об/мин, 20°C на длине волны поглощения 280 нм в непрерывном режиме.

*Характеризация образцов инсулина в зависимости от концентрации цинка:* Инсулин ресуспендировали до 50 мг/мл в 0.04 N HCl, приготовили серии препаратов с различными концентрациями ZnCl<sub>2</sub>, 16 мг/мл глицерина, 1.9 мг/мл двухосновного фосфата натрия и 2,2 мМ NaOH. Также был создан эталонный буферный раствор, без инсулина. Далее по 420 мкл эталона и образца помещали в двухсекторную ячейку ротора An 60 Ti и уравнивали при 20°C в течение более 1 часа. Образцы сканировали в течение 4 часов при 60,000 об/мин, 20°C на длине волны поглощения 280 нм в непрерывном режиме. После окончания центрифугирования ротор с образцами оставляли в центрифуге под вакуумом и температуре 20°C на 15 дней. Далее ячейки с образцами интенсивно встряхивали и осуществляли повторный прогон при аналогичных условиях.



**Рисунок 1.** Дифференциальное распределение по коэффициентам седиментации  $c(s)$  инсулинов различной концентрации в буфере 0.04N HCl.



**Рисунок 2.** Нормированное дифференциальное распределение по коэффициентам седиментации  $c(s)$  препаратов инсулина различной концентрации: 0.25 мг/мл (черная линия), 1.0 мг/мл (синяя линия), 4.0 мг/мл (зеленая линия).

*Характеризация образцов инсулина в зависимости от концентрации ЭДТА:* Инсулин ресуспендировали до 50 мг/мл в 0.04 N HCl, разбавили до концентрации 2 мг/мл с добавлением 150 мкМ ZnCl<sub>2</sub>, 16 мг/мл глицерина, 1.9 мг/мл двухосновного фосфата натрия и 2,2 мМ NaOH. Затем готовили серию препаратов с добавлением ЭДТА различных концентраций, инкубируя в течение 20 минут при комнатной температуре. Также был создан эталонный буферный раствор, без инсулина. Далее по 420 мкл эталона и образца помещали в двухсекторную ячейку ротора An 50 Ti и уравнивали при 20°C в течение более 1 часа. Образцы сканировали в течение 5 часов при 50,000 об/мин, 20°C на длине волны поглощения 280 нм в непрерывном режиме.

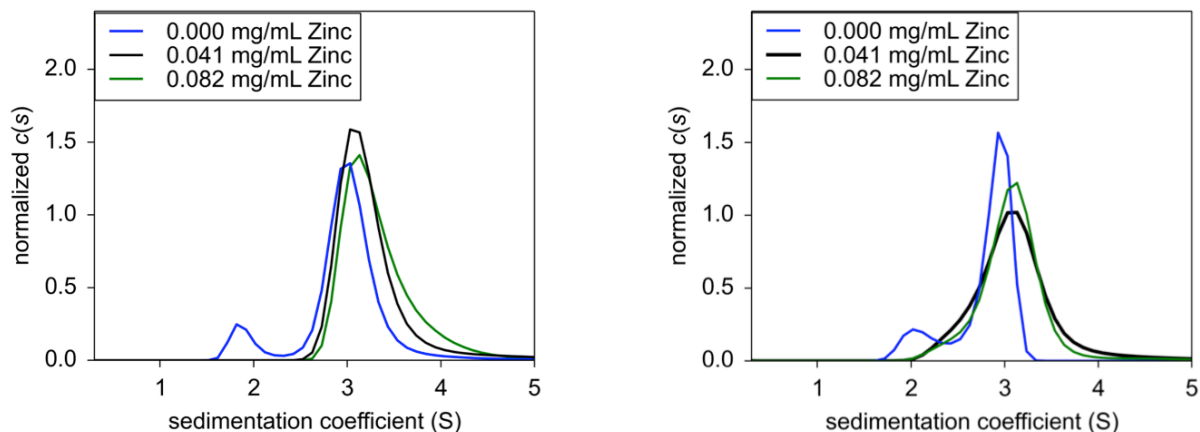
*Анализ седиментационных данных<sup>†</sup>:* Полученные экспериментальные данные обрабатывались в программе SEDFIT 14.7 g4 ([www.analyticalultracentrifugation.com](http://www.analyticalultracentrifugation.com)). Данные по абсорбции были проанализированы с точки зрения дифференциального распределения коэффициента седиментации  $c(s)$  с использованием максимального доверительного интервала энтропии 0.68. Во всех экспериментах значения среднеквадратичного отклонения составляли от 0.0016 до 0.0093 единиц поглощения. Парциальный удельный объем молекул инсулина рассчитывали по аминокислотной последовательности в программе SEDNTERP5 (<http://sednterp.unh.edu>); значения плотности  $\rho$  и вязкости  $\eta$  различных буферов также были рассчитаны в SEDNTERP. Использовалась модель  $c(s)$ , в которой коэффициент трения  $f/f_0$  не учитывался, а парциальный удельный объем подбирался. Данные были выгружены в GUSI (<http://biophysics.swmed.edu/MBR/software.html>) и построены в координатах  $c(s)$  с минимальным ограничением в 0.3S.

## Результаты и обсуждение

Проводили эксперименты по скоростной седиментации трех серий образцов различных концентраций на основе эталонного USP человеческого инсулина в буфере 0.04 N HCl с использованием двухсекторных ячеек. Результаты

обработки полученных данных в программе SEDFIT показали наличие пика в районе 1.2 S для всех трех образцов (Рис. 1). Значения  $c(s)$  приведены в ненормированном виде для демонстрации снижения сигнала при уменьшении концентрации. Полученный коэффициент седиментации 1.2 S с наибольшей вероятностью говорит о наличии мономерной формы инсулина, что согласуется с данными Pohl, et.al.<sup>1</sup> и поведением мономера<sup>2,3</sup>.

Далее анализировали стандартные готовые препараты инсулина<sup>1</sup>, также по методу скоростной седиментации. В данном случае значения коэффициента  $s_{20,w}$  инсулина составили 2.95 – 3.1 S, однако при концентрации 4.0 мг/мл наблюдался пик 2.12 S со значением  $c(s)$  8.3% (Рис. 2). Новый пик (2.95 - 3.1 S) по всей видимости соответствовал димерной форме инсулина. Примечательно, что белок диссоциировал при самых высоких значений его концентрации,

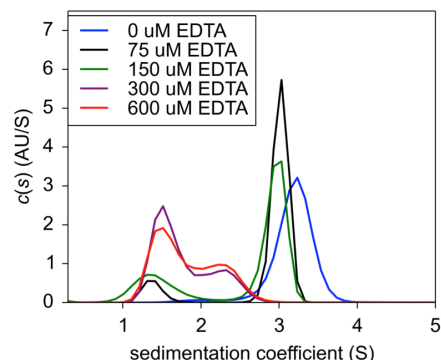


**Рисунок 3.** Нормированное распределение коэффициентов седиментации  $c(s)$  препаратов инсулина при различных концентрациях цинка: 0.25 мг/мл (черная линия), 1.0 мг/мл (синяя линия) и 4.0 мг/мл (зеленая линия).

что может говорить о том, что олигомеризация молекул инсулина не зависит от концентрации, а может зависеть от состава компонентов раствора.

Для того, чтобы изучить этот эффект, исследовали влияние концентрации цинка в препаратах на коэффициенты седиментации инсулина. При фиксированной концентрации инсулина увеличение концентрации цинка способствовало образованию гексамера с коэффициентом седиментации около 3.0 S (Рис. 3А). Таким образом, было показано, что наличие цинка является критическим для образования гексамеров. При высоких концентрациях инсулина, если концентрация цинка не находится на уровне насыщения, образуются другие олигомерные формы инсулина, такие как димеры. Для определения зависимости этого эффекта от времени аналогичные по составу образцы оставляли под вакуумом при 20 °C в течение 15 дней и делали прогон в аналогичных условиях второй раз. Полученные результаты оказались одинаковыми (Рис. 3В), что позволяет предположить, что гексамер стабилен в течение по меньшей мере 15 дней после приготовления препаратов.

Наконец, для подтверждения роли катионов цинка в образовании гексамерных форм инсулина в состав препаратов вводили раствор ЭДТА в качестве хелатирующего агента. При проведении данной серии экспериментов значения концентраций инсулина и цинка оставляли неизменными, а концентрацию ЭДТА варьировали. После добавления ЭДТА растворы инкубировали в течение 20 минут. Результаты показали, что при увеличении концентрации ЭДТА гексамер инсулина диссоциировал на мономеры и димеры (Рис. 4). При концентрации ЭДТА 75 мкМ около 11% комплексов гексамера диссоциировали в форму мономера (Таблица 1). А при концентрации 150 мкМ еще 15% комплексов диссоциировали в мономерную форму, что соответствует пику с сигналом 26.4%. При 300 мкМ ЭДТА гексамерная форма полностью диссоциировала на мономер (60%) и димер (40%), при 600 мкМ ЭДТА соотношение мономерной и димерной формы составляли 68% и 32% соответственно.



**Рисунок 4.** Распределение коэффициентов седиментации  $c(s)$  образцов инсулина с различной концентрацией ЭДТА.

Конц. ЭДТА	Гексамер	Димер	Мономер
0 ЭДТА	100% (3.201 S)	N/A	N/A
75 мкМ ЭДТА	88.88% (3.015 S)	N/A	11.11% (1.373 S)
150 мкМ ЭДТА	73.59% (2.949 S)	N/A	26.41% (1.400 S)
300 мкМ ЭДТА	N/A	40.63% (2.258 S)	59.37% (1.52 S)

**Таблица 1.** Олигомерный состав препаратов инсулина в зависимости от концентрации ЭДТА..

## Выводы

Инсулин - хорошо изученный лекарственный препарат, который производится многими фармацевтическими предприятиями по всему миру и используется для лечения диабета вот уже более 80 лет. В настоящее время биофармацевтические компании прилагают большие усилия для создания новых производных инсулина и его лекарственных форм для улучшения эффективности препаратов, их методов введения и характеристик по времени воздействия на организм. При разработке аналогов инсулина в будущем необходимо будет учитывать влияние вспомогательных веществ, таких как цинк, на состояние готового лекарственного средства. Влияние таких факторов могут быть исследованы различными аналитическими методами.

Традиционно степень агрегации препаратов человеческого инсулина анализируют с помощью стандартного фармакопейного метода гель-фильтрационной хроматографии (SEC). Данный метод позволяет количественно оценить ковалентные агрегаты, такие как димеры, которые образуются в результате реакции конденсации свободных аминов на N-концах и/или свободных лизинов. Дополнительная ковалентная агрегация может возникнуть в результате разрушения и преобразования дисульфидных связей. Однако этот метод не позволяет измерить отношение нековалентных агрегатов, таких как гексамеры, по отношению к мономерным формам молекул инсулина, так как нековалентные агрегаты разрушаются в ходе пробоподготовки или проведения анализа SEC. Как показано в данной работе, метод AUC может быть использован для оценки содержания нековалентных агрегатов. Нами был продемонстрирован прямой подход, требующий минимальной пробоподготовки, к характеристике биофармацевтических препаратов с различными олигомерными формами белковых молекул. Большинство распространенных сегодня методов, таких как гель-фильтрационная хроматография (SEC), требуют дополнительных манипуляций с образцом, например, дополнительных разведений или взаимодействий с матрицей, что может повлиять на характер агрегации. Кроме того, не смотря на то, что SEC является более распространенным методом для оценки агрегации, диапазон измерения молекулярных масс AUC, который составляет от нескольких сотен Да до  $10^9$  Да, что превышает известные возможности аналитической SEC<sup>3</sup>. Наконец, метод AUC позволяет получить разнообразную количественную информацию о свойствах белковых молекул, таких как молекулярная масса, форма, коэффициенты сольватации<sup>4</sup>, данные о посттрансляционных модификациях<sup>5</sup>, и конформационных флуктуациях<sup>6</sup> при концентрациях около 40-50 мг/мл<sup>7</sup>. Таким образом, метод AUC - это прямой, не требующий стандартов, метод, независимый по отношению к другим традиционным методам как SEC, который позволяет характеризовать биосимиляры, изучать агрегацию, а также может быть использован для оценки качества выпускаемой продукции и разработки готовых лекарственных форм<sup>3</sup>.

†Результаты, полученные с помощью программного обеспечения, не гарантированы. Подробная информация об ограничении ответственности приведена в описании каждого программного продукта.

## Список литературы

1. American Diabetes Association: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/statistics/>
2. Richards, J.P., Stickelmeyer, M.P., Flora, D.B., Chance, R.E., Frank, B.H., DeFelippis, M.R. Self association properties of monomeric insulin analogs under formulation conditions. *Pharmaceutical Research*. (1998) 15(9): 1434-1441.
3. Pohl, R., Hauser, R., Li, M., De Souza, E., Feldstein, R., Seibert, R., Ozhan, K., Kashyap, N., Steiner, S. Ultra rapid absorption of recombinant human insulin induced by zinc chelation and surface charge masking. *J Diabetes Science & Technology*. (2012) 6(4): 755-763.
4. Schuck P. Size distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. *Biophys. J.* (2000) 78:1606-19.
5. Cole J.L., Lary J W, Moody T P and Laue T M Analytical ultracentrifugation: sedimentation velocity and sedimentation equilibrium. *Methods Cell Biol.* (2008) 84:143-79. Fredericq E, Neurath H. The interaction of insulin with thiocyanate and other anions. the minimum molecular weight of insulin. *J Am Chem Soc.* (1950) 72:2684-91.
6. Jeffrey P.D., Coates J.H. An equilibrium ultracentrifuge study of the self association of bovine insulin. *Biochemistry*. (1966) 5(2):489-98.
7. Berkowitz, S.A., Philo, J.S. Characterizing Biopharmaceuticals using analytical ultracentrifugation. *Biophysical Characterization of Proteins in Developing Pharmaceuticals*. (2014) 9:211-260. DOI:10.1016/B978-0-444-59573-7.00009-9.
8. Schuck, P. A model for sedimentation in inhomogeneous media. I. Dynamic density gradients from sedimenting co-solutes. *Biophys Chem.* (2004) 108(1-3):187-200.
9. Moores, S.C., Jason, L., Ausio, J. The elusive structural role of ubiquitinated histones. *Biochem Cell Biol.* (2002) 80(3):311-9.
10. Hansen, J.C., Kreider, J.L., Demeler, B., Fletcher, T.M. Analytical ultracentrifugation and agarose gel electrophoresis as tools for studying chromatin folding in solution. *Methods*. (1997) 12(1):62-72.
11. Philo, J.S., Maluf, N.K. New approaches to investigating the self-association and colloidal stability of protein pharmaceuticals at high concentrations. <http://www.ap-lab.com/WCBP%202015%20poster.pdf>.



Не для применения в медицинских целях.

© 2021 Beckman Coulter, Inc. Все права защищены. Название Beckman Coulter, стилизованный логотип, а также знаки продукции и услуг Beckman Coulter, упомянутые в настоящем документе, являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками компании Beckman Coulter, Inc. в США и других странах. Все остальные торговые знаки являются собственностью соответствующих владельцев. Продукты, перечисленные в данном документе не предназначены и не валидированы для медицинского применения.

ООО "Бекмен Культер", представительство Beckman Coulter Life Sciences  
ул. Станиславского, д. 21, стр. 3, Москва, Россия, 109004.  
тел. +7 (495) 228 67 00, эл. почта: [ls-russia@beckman.com](mailto:ls-russia@beckman.com), [mybeckman.ru](http://mybeckman.ru)

21.03.1219.CENT