응용 자료

바이오 의약품

Agilent

Trusted Answers

# Agilent InfinityLab LC/MSD iQ를 사용한 GLP-1 유사체(리라글루타이드)의 신속한 확인


**저자**

Chae-Young Ryu
Agilent Technologies, Inc.


## 개요


본 응용 자료에서는 Agilent InfinityLab LC/MSD iQ를 사용하여 리라글루타이드를 분석했습니다. GLP-1 유사체의 분자량을 신속하게 확인해야 하는 경우, InfinityLab LC/MSD iQ는 최대 1,450*m/z*의 넓은 질량 범위를 높은 감도로 스캔할 수 있습니다. 리라글루타이드와 같은 바이오의약품의 원형(Intact) MS 스펙트럼을 확인하기 위해 Agilent OpenLab CDS 2.8의 디콘볼루션 기능을 사용했습니다. 신속한 분석법 개발을 위해 Agilent InfinityLab Quick 밸브는 다양한 크로마토그래피 컬럼을 손쉽게 평가할 수 있는 유연한 스크리닝 환경을 제공합니다.

## 소개

GLP-1 유사 펩타이드에 대한 관심이 급증하면서 많은 제약회사가 GLP-1 유사체 개발에 뛰어들고 있습니다. 원래 제2형 당뇨병 치료제로 개발된 GLP-1 유사체는 추가적인 작용 기전이 밝혀지면서 다양한 분야로 활용 범위가 확대되었습니다. 그러나 천연 GLP-1은 혈장 내 반감기가 매우 짧기 때문에 반감기를 연장하기 위한 다양한 연구가 이루어졌습니다. 리라글루타이드는 팔미토일 글루탐산을 곁사슬로 도입함으로써 천연 GLP-1보다 반감기를 크게 연장했습니다.

GLP-1 유사체를 포함한 펩타이드 의약품은 일반적으로 약 40개 이하의 아미노산으로 구성된 의약품을 의미합니다. 이러한 합성 펩타이드 치료제는 의약품 허가를 받기 위해 규제 요구사항을 충족해야 합니다. 따라서 제조 공정의 적절성을 확인하고 분해 과정에서 생성되는 불순물을 프로파일링하는 것은 의약품 허가를 위해 필수적으로 요구됩니다.

곁사슬이 도입된 합성 펩타이드는 표적 물질과 유사한 특성을 지닌 다양한 불순물을 포함할 수 있습니다. 따라서 개발 초기 단계에서 정확한 HPLC 평가법을 확립하는 것은 고도화된 제조 공정을 확보하는 데 매우 중요합니다. Agilent Infinity II Flexible 펌프는 다양한 첨가제를 손쉽게 스크리닝할 수 있도록 지원하며, InfinityLab Quick Change 밸브는 여러 컬럼을 온라인에서 간편하게 전환할 수 있어 펩타이드 분석을 위한 다양한 분석법을 효율적으로 평가할 수 있습니다.

InfinityLab LC/MSD iQ는 최대 1,450*m/z*까지 스캔할 수 있어 다중 전하를 띠는 펩타이드 분석에 적합합니다. 또한 OpenLab CDS 2.8의 디콘볼루션 기능은 MS 스펙트럼에서 다중 전하를 띠는 피크를 단일 중성 질량으로 변환합니다. OpenLab CDS의 디콘볼루션 기능은 데이터 무결성 및 규정 준수 요구사항을 충족하므로, 바이오의약품 개발 후기 단계의 확인 시험뿐만 아니라 품질 관리에도 활용할 수 있습니다.

본 응용 자료에서는 Agilent 1260 Infinity II Prime LC와 InfinityLab Quick Change 밸브를 사용하여 산성 첨가제와 컬럼 조건에 따른 시험 결과를 비교했습니다. 또한 InfinityLab LC/MSD iQ와 OpenLab CDS 2.8의 디콘볼루션 기능을 이용해 리라글루타이드의 원형(Intact) MS 스펙트럼을 평가했습니다.

## 실험

### 기기 구성

Agilent 1260 Infinity II Bio Prime LC 시스템은 다음과 같은 모듈로 구성하였습니다.

- Agilent 1260 Infinity II Flexible 펌프 (G7131C)
- Agilent 1290 Infinity II Bio Multisampler(G7137A), 시료 온도 조절 장치 장착
- Agilent 1290 Infinity II 멀티 컬럼 온도 조절 장치(G7116B), Bio-Compatible Standard Flow 열 교환기 및 6컬럼 선택용 Bio-compatible 밸브(1,300bar, 부품 번호 5320-0025) 장착
- Agilent 1290 Infinity II DAD 검출기 (G7117B), Bio-inert Max-Light 카트리지 셀(60mm, 부품 번호 G5615-60017) 장착
- Agilent InfinityLab LC/MSD iQ(G6160A)

### 시약

포름산(FA)과 Difluoroacetic acid(DFA)는 Sigma-Aldrich에서, Trifluoroacetic acid(TFA)는 Merck에서, 아세토니트릴은 B&J에서 구입했습니다.

### 시료

리라글루타이드는 한국 Kairos Tech를 통해 구매했습니다. 리라글루타이드를 물에 용해시켜 1mg/mL 농도의 용액을 제조한 후, 이를 물로 추가 희석하여 100µg/mL와 10µg/mL 농도의 용액을 만들어 실험에 사용했습니다.

### 이동상

- 이동상 A
  - 0.1% 포름산 수용액
  - 0.1% Trifluoroacetic acid(TFA) 수용액
  - 0.1% Difluoroacetic acid(DFA) 수용액
- 이동상 B
  - 0.1% 포름산 첨가 아세토니트릴 용액
  - 0.1% Trifluoroacetic acid(TFA) 첨가 아세토니트릴 용액
  - 0.1% Difluoroacetic acid(DFA) 첨가 아세토니트릴 용액

### 컬럼

- Agilent AdvanceBio Peptide Mapping 120Å, 2.1 × 150mm, 2.7µm(부품 번호 653750-902)
- Agilent AdvanceBio Peptide Plus 2.1 × 150mm, 2.7µm(부품 번호 695775-949)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18, 2.1 × 150mm, 2.7µm(부품 번호 693775-742)

### 소프트웨어

Agilent OpenLab CDS 2.8

## 분석법

**표 1.** Agilent 1260 Infinity II Bio Prime LC 분석법 파라미터.

| 파라미터 | 값 |
|---|---|
| 컬럼 | Agilent AdvanceBio Peptide Mapping 120Å, 2.1 × 150mm, 2.7µm |
| 유량 | 0.4mL/분 |
| 컬럼 온도 | 40°C |
| 주입 부피 | 5µL |
| 이동상 | A) 0.1% 산성 첨가제 수용액<br>B) 0.1% 산성 첨가제 함유 아세토니트릴 |
| 그레디언트 - 컬럼 스크리닝 | 시간(분) %A %B<br>0 70 30<br>1 70 30<br>15 10 90<br>15.1 70 30<br>20 70 30 |
| 그레디언트 - 최적화 | 시간(분) %A %B<br>0 80 20<br>1 80 20<br>20 40 60<br>25 10 90<br>25.1 80 20<br>30 80 20 |
| 검출기 | UV 280nm(DAD HS, Bio-inert Max-Light 카트리지 셀 포함, 60mm) |

**표 2.** Agilent InfinityLab LC/MSD iQ 데이터 수집 파라미터.

| 파라미터 | 값 |
|---|---|
| 이온화원 | ESI (+) |
| **소스 파라미터** | |
| 가스 온도 | 325°C |
| 가스 유량 | 11L/분 |
| Nebulizer | 45psi |
| 캐필러리 전압 | 4,500V |
| **수집** | |
| 스캔 범위 | 300-1,450 *m/z* |
| Fragmentor | 150V |
| 스캔 시간 | 997ms(1Hz) |
| 보관 | – 분석법 최적화: Centroid<br>– 디콘볼루션: 프로파일 |

# 결과 및 토의

### TFA를 산성 첨가제로 사용한 리라글루타이드의 기본 분석

펩타이드를 HPLC로 분석할 때는 일반적으로 TFA를 사용합니다. 리라글루타이드를 물에 용해시켜 100µg/mL 농도의 용액을 제조한 후, 0.1% TFA 수용액과 0.1% TFA 함유 아세토니트릴 조건에서 분석하여 리라글루타이드의 피크와 UV 스펙트럼을 관찰했습니다. 이 분석 조건은 API과 불순물 확인을 위한 컬럼 및 산성 첨가제 조건을 스크리닝하는 기준으로 사용했습니다.

### 컬럼 및 산성 첨가제 스크리닝

애질런트 컬럼 포트폴리오는 펩타이드 분석을 위한 다양한 화학적 특성의 컬럼을 제공합니다. 여기에 제시된 결과는 고유한 특성을 지닌 AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼, Peptide Plus 컬럼, 그리고 Poroshell 120 Aq-C18 컬럼을 사용하여 분석한 결과입니다. 이러한 컬럼은 분석 물질에 따라 서로 다른 선택성을 나타낼 수 있습니다. 따라서 적절한 컬럼을 선택할 때는 분석 대상 화합물과 분석 목적을 고려해야 합니다.

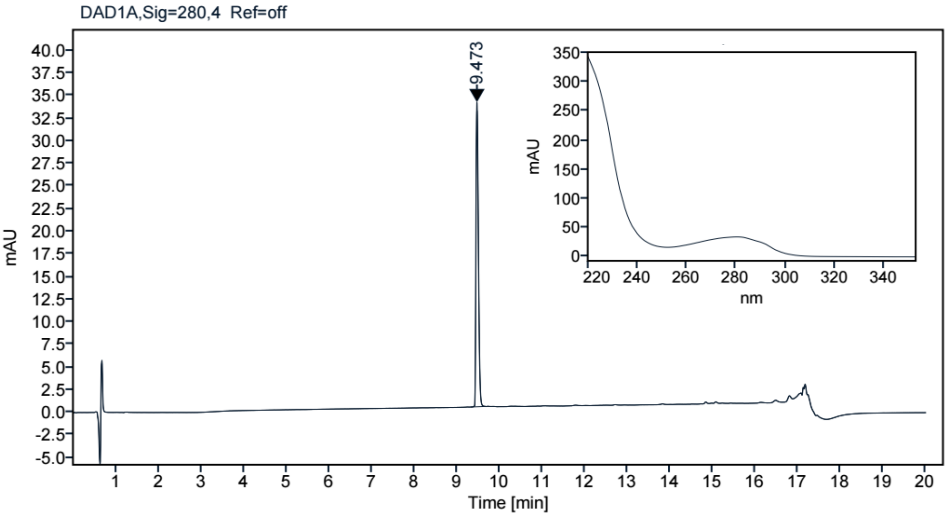



**그림 1.** TFA 조건에서 분석한 100µg/mL 리라글루타이드의 크로마토그램 및 UV 스펙트럼.

HPLC 및 LC/MS 분석에서 일반적으로 사용되는 산성 첨가제는 FA와 TFA입니다. 낮은 pH의 이동상은 컬럼의 엔드캡핑 영향을 줄일 뿐만 아니라 이동상의 pH를 일정하게 유지하여 분석 물질이 안정된 상태를 유지하도록 돕습니다. 따라서 산성 첨가제의 종류와 농도는 피크 모양에 영향을 미칩니다. 특히 TFA는 FA보다 pKa가 낮아 이온쌍을 형성함으로써 컬럼과의 2차 상호작용을 감소시키며, 그 결과 피크 테일링이 적고 높은 분리능을 제공합니다. 그러나 TFA는 MS에서 이온 형성을 억제하며, 분석 과정에서 쉽게 제거되지 않습니다. DFA는 TFA보다 이온쌍 형성

특성이 약하기 때문에 TFA의 이러한 문제를 최소화하면서도 높은 MS 감도와 분리능을 확보할 수 있어 펩타이드의 MS 분석에 사용할 수 있습니다.

세 종류의 컬럼과 세 종류의 산성 첨가제를 사용한 결과, 피크 용량과 대칭 계수가 서로 다르게 나타났습니다(그림 2). AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼과 TFA 조건을 조합했을 때 가장 우수한 결과를 얻었습니다.

반면 FA를 이동상 첨가제로 사용한 경우에는 대칭 계수가 크게 낮아져 높은 분리능을 기대하기 어려웠으며, 피크 폭이 넓어져 피크 높이도 감소했습니다.

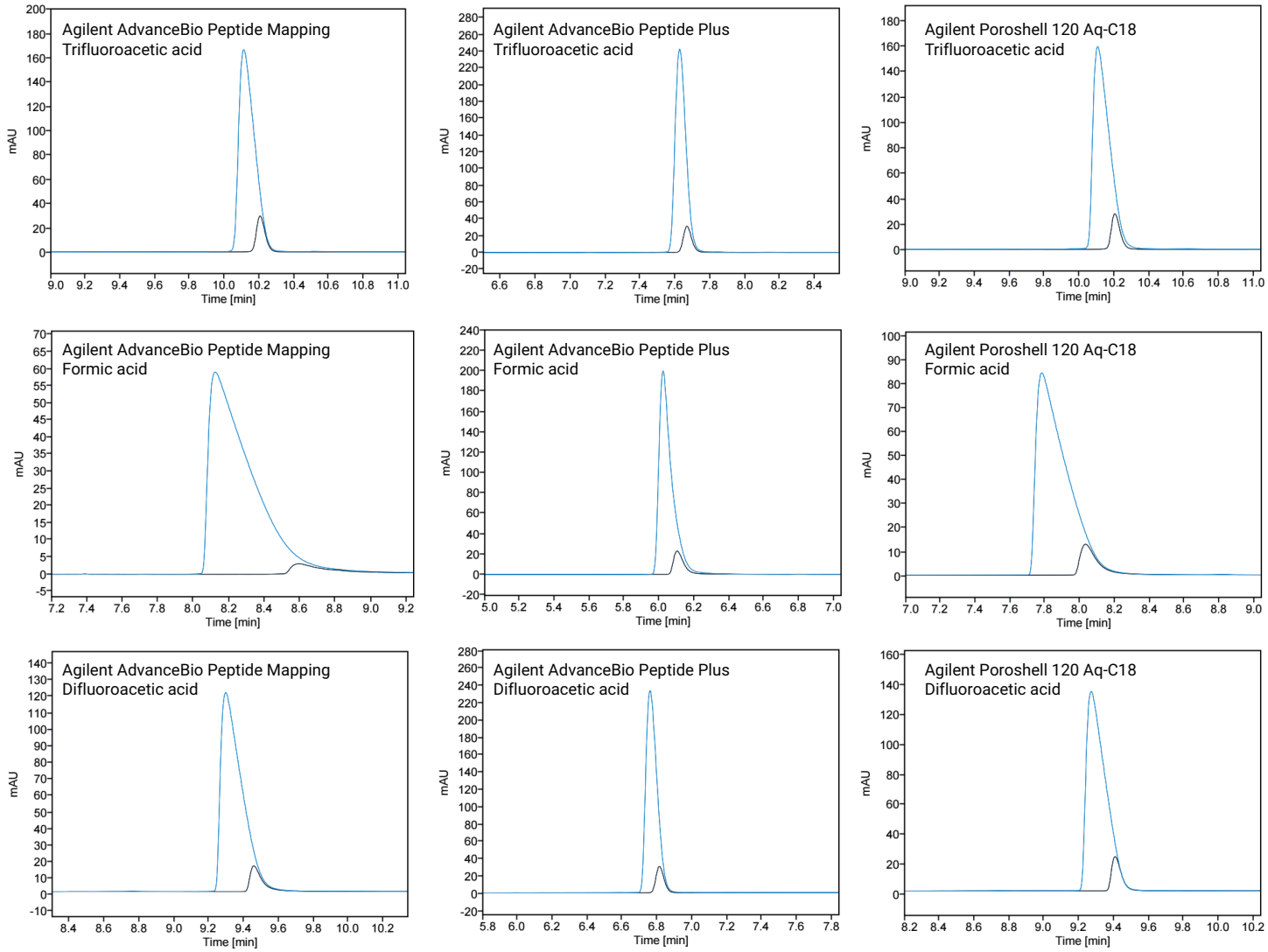



**그림 2.** Agilent AdvanceBio Peptide Mapping, Peptide Plus 및 Poroshell 120 Aq-C18 컬럼을 사용하여 포름산, Trifluoroacetic acid 및 Difluoroacetic acid 조건에서 분석한 리라글루타이드(1mg/mL 및 100µg/mL)의 크로마토그램(파란색: 1mg/mL, 검정색: 100µg/mL).

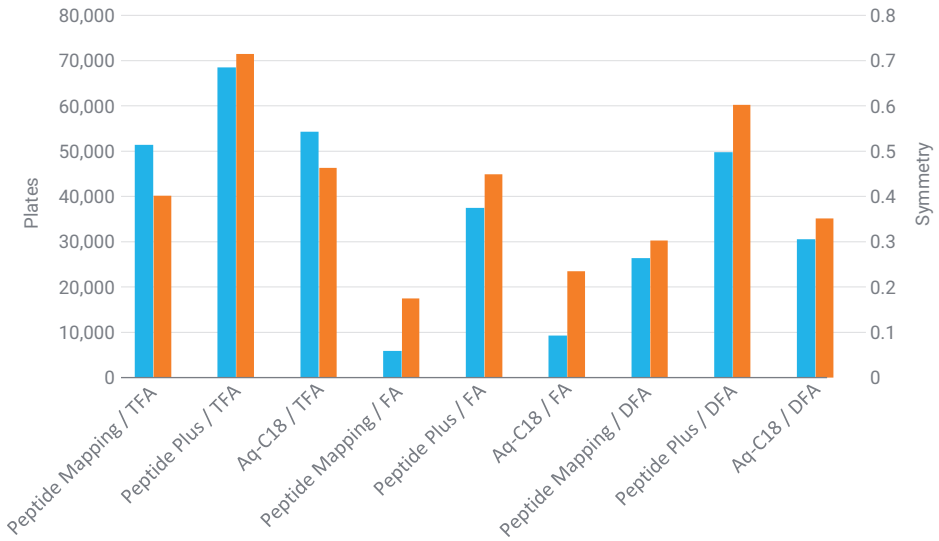



**그림 3.** 조건별 이론 단수와 대칭 계수 결과(왼쪽 축, 파란색: 이론 단수, 오른쪽 축, 주황색: 대칭 계수).

## 피크 분리능 최적화를 위한 조건 스크리닝

AdvanceBio Peptide Plus 컬럼과 TFA를 조합한 조건에서 가장 우수한 결과를 얻었지만, MS와의 호환성 및 불순물에 대한 특이성 측면에서는 우려가 있었습니다. 따라서 피크 분리능이 가장 낮았던 FA 조건을 제외하고, 피크 분리능을 향상시키기 위해 그레디언트 조건을 최적화했습니다. AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼과 TFA를 조합한 조건에서 가장 다양한 불순물을 확인할 수 있었습니다. 그러나 MS 분석을 고려하면 AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼과 DFA를 조합한 조건 역시 우수한 피크 분리능을 제공하는 적합한 선택이 될 수 있습니다(그림 4).

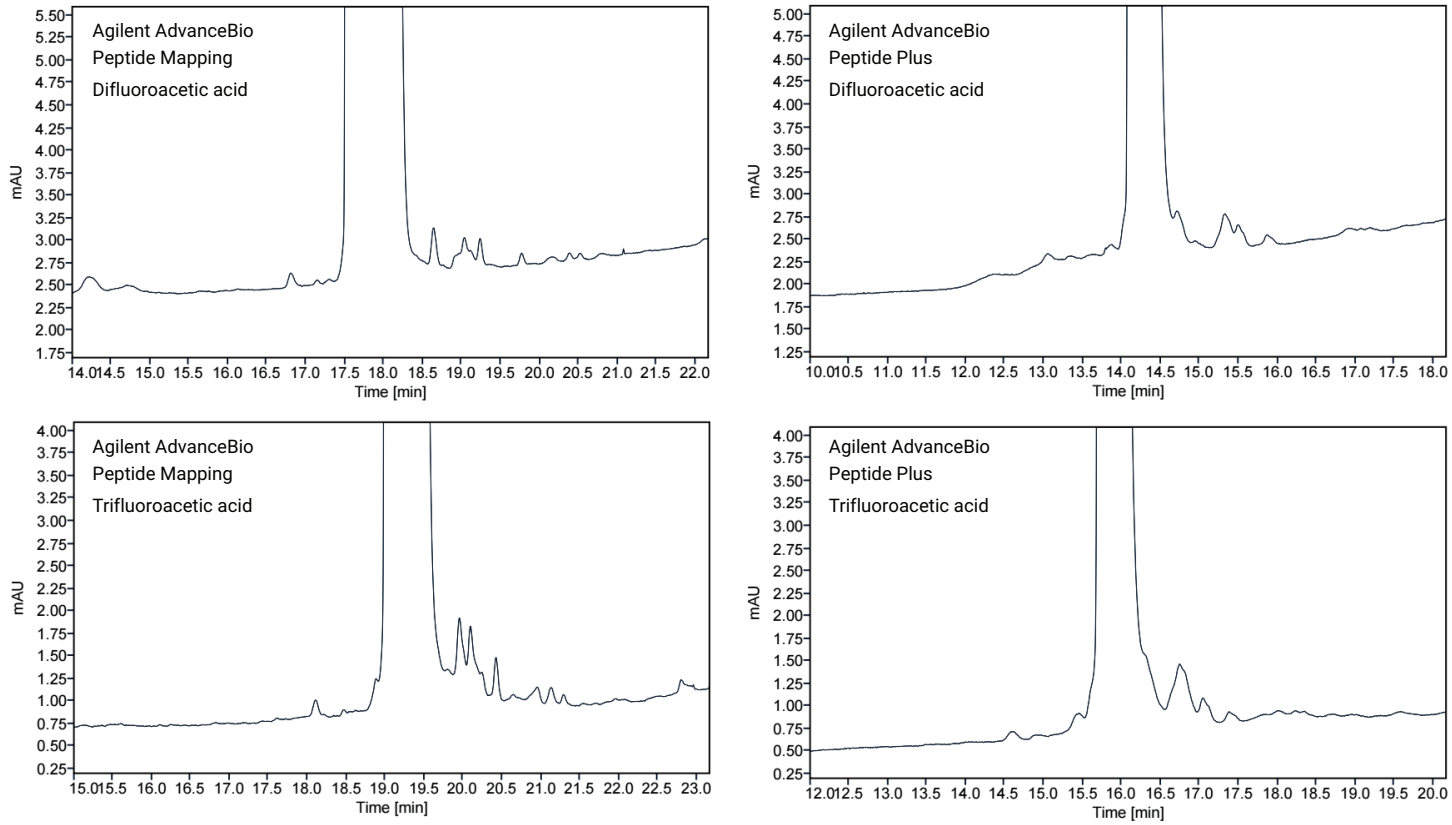



**그림 4.** Agilent AdvanceBio Peptide Mapping 및 Peptide Plus 컬럼을 사용하여 DFA와 TFA 조건에서 분석한 리라글루타이드(1mg/mL)의 크로마토그램.

## 산성 첨가제 조건별 MS 결과

AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼을 사용하여 산성 첨가제에 따른 MS 결과를 비교했습니다(그림 5). FA 조건에서 가장 높은 감도를 나타냈으며, DFA 조건에서도 충분한 감도를 확보하는 동시에 명확한 MS 스펙트럼과 우수한 불순물 분리능을 보여주었습니다. 반면 TFA 조건에서는 가장 낮은 MS 감도가 관찰되었습니다. 이러한 결과를 통해 산성 첨가제의 종류는 피크의 머무름 시간과 특이성뿐만 아니라 MS 감도에도 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었습니다.

10µg/mL 농도에서는 MS를 수행했을 때 TIC에서 뚜렷한 차이가 관찰되었습니다 (그림 6). DFA 조건에서는 피크 높이가 $1 \times 10^6$ 카운트에 도달한 반면, TFA 조건에서는 MS 피크가 검출되지 않았습니다. 이는 DFA가 크로마토그래피 피크 분리능을 유지하면서도 저농도 불순물의 MS 스펙트럼을 확인하는 데 더 적합함을 시사합니다.

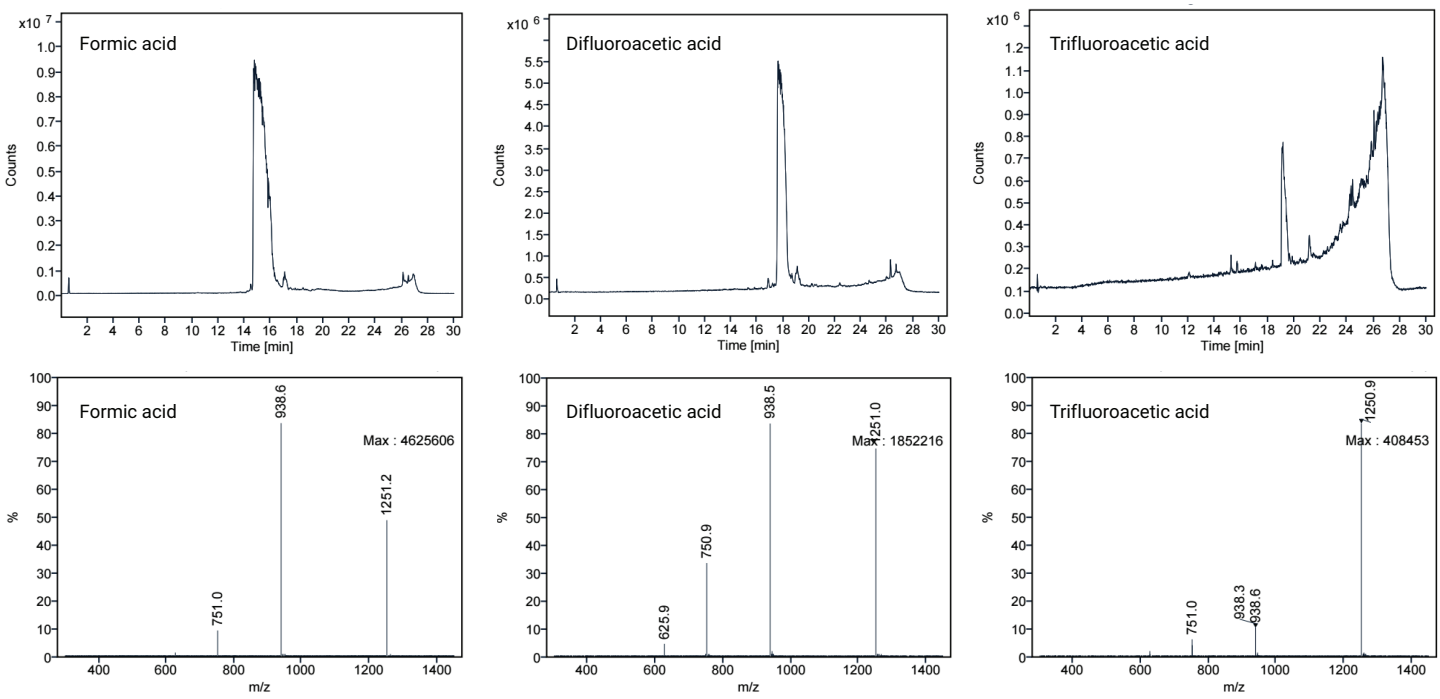



**그림 5.** Agilent AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼과 Agilent InfinityLab LC/MSD iQ를 사용하여 다양한 산성 첨가제 조건에서 분석한 리라글루타이드(1mg/mL)의 총 이온 크로마토그램(TIC) 및 MS 스펙트럼.

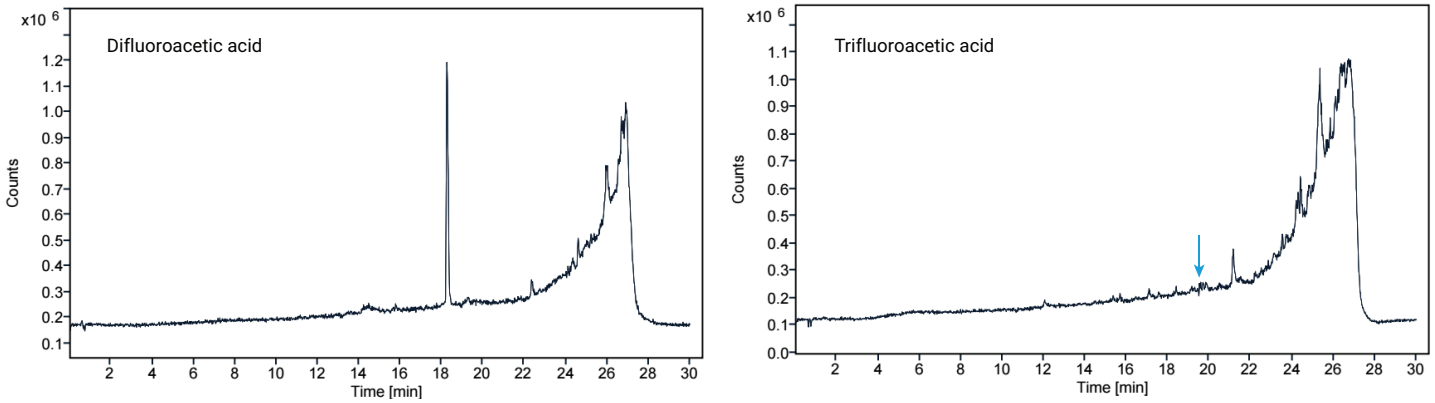



**그림 6.** 10µg/mL 리라글루타이드의 DFA 및 TFA 조건에서의 TIC 비교.

### 리라글루타이드의 MS 스펙트럼 확인 및 디콘볼루션

마지막으로, InfinityLab LC/MSD iQ를 사용하여 0.1% DFA와 AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼 조건에서 리라글루타이드의 MS 스펙트럼을 확인했습니다(그림 7). +3부터 +6까지의 다중 전하가 관찰되었으며, 리라글루타이드의 각 전하 상태에 대한 이론값과 매우 잘 일치하는 결과를 나타냈습니다(표 3).

**표 3.** 리라글루타이드의 다중 전하에 대한 이론값 및 실측값.

| | 이론값 | 실측값 |
|---|---|---|
| $[M+3H]^{3+}$ | 1,251.3 | 1,251.0 |
| $[M+4H]^{4+}$ | 938.7 | 938.5 |
| $[M+5H]^{5+}$ | 751.1 | 750.9 |
| $[M+6H]^{6+}$ | 626.1 | 625.9 |

InfinityLab LC/MSD iQ에서 획득한 MS 스펙트럼을 OpenLab CDS 2.8의 디콘볼루션 기능으로 처리한 결과, 분자량은 3,750.23으로 확인되었으며, 계산된 질량값인 3,749.95와 허용 오차 범위 내에서 일치했습니다.

## 결론

Agilent 1260 Infinity II Bio Prime LC와 Agilent InfinityLab LC/MSD iQ를 사용하면 리라글루타이드와 같은 합성 펩타이드의 분석법 개발뿐만 아니라 신속한 확인까지 효율적으로 수행할 수 있습니다. Agilent Flexible 펌프와 InfinityLab Quick Change 밸브를 활용하여 최적의 산성 첨가제와 역상 컬럼을 효율적으로 스크리닝했습니다. 그 결과, Trifluoroacetic acid를 사용한 Agilent AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼은 UV 기반 검출에서 우수한 성능을 보였으며, Difluoroacetic acid를 사용한 AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼은 MS 기반 검출에서 높은 선택성과 MS 감도를 나타냈습니다. Agilent InfinityLab LC/MSD iQ와 OpenLab CDS 2.8의 디콘볼루션 기능은 리라글루타이드의 중성 MS를 확인하기 위해 충분함이 입증되었습니다.

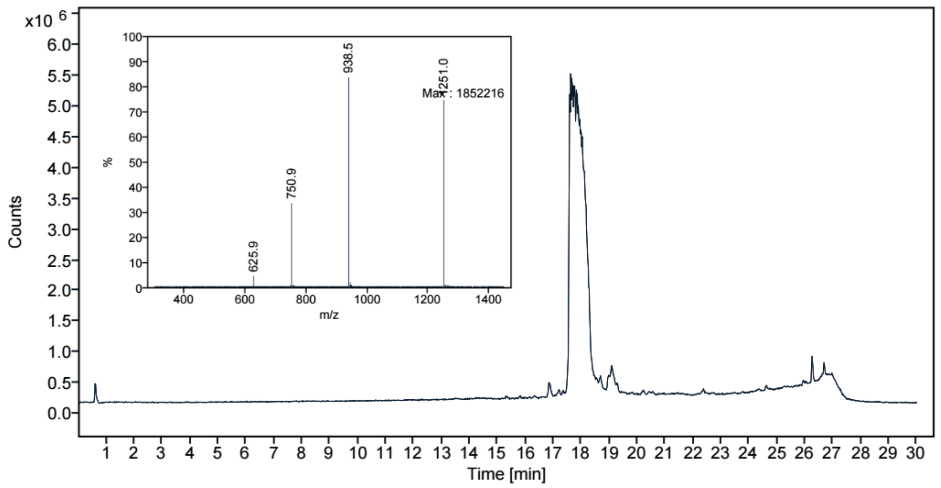



**그림 7.** 1mg/mL 리라글루타이드의 TIC 및 MS 스펙트럼.

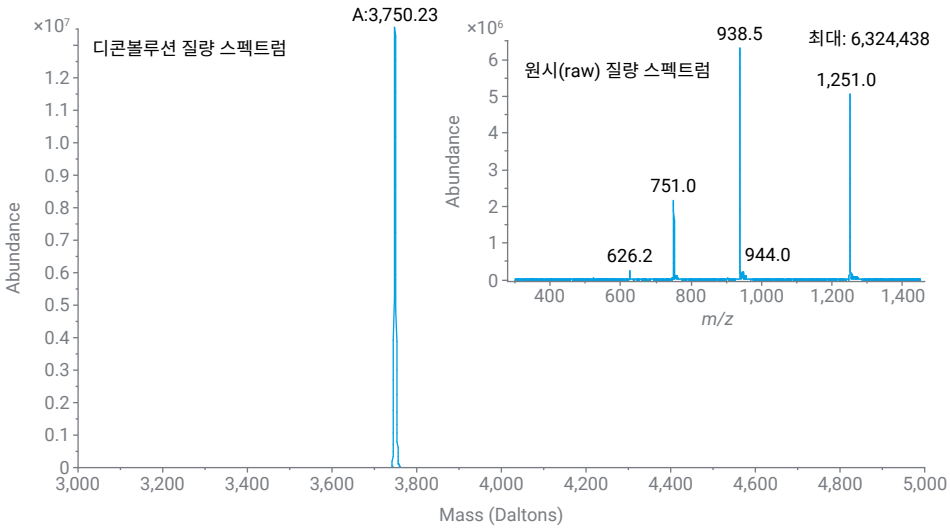



**그림 8.** 리라글루타이드의 디콘볼루션 결과.

## 참고 자료


1. ANDAs for Certain Highly Purified Synthetic Peptide Drug Products That Refer to Listed Drugs for rDNA Origin, Guidance for Industry. *U.S. Department of Health and Human Services, FDA, CDER*, **2021**.
2. Guideline on the Development and Manufacture of Synthetic Peptides. *European Medicines Agency*, **2023**.
3. Brian, R.; Jarod, G. Unit Mass Spectral Deconvolution for Molecular Weight Confirmation of Large molecules. *Agilent Technologies technical overview*, publication number 5994-6928EN, **2024**.
4. Benedikt, M.; Lucas, W. Simplify Your Method Development Using the Agilent 1260 Infinity II Prime LC System and InfinityLab LC/MSD iQ. *Agilent Technologies technical overview*, publication number 5994-2124EN, **2020**.


**www.agilent.com**


DE51523916



이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2024



2024년 5월 1일, 한국에서 인쇄
5994-7415KO



**한국애질런트테크놀로지스㈜**
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
DF타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090(고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com


Agilent
Trusted Answers