

Agilent 1260 Infinity II Bio Prime LC 시스템 및 Blend Assist를 사용한 세마글루타이드 분석의 효율적인 분석법 최적화

저자

Chae-Young Ryu
Agilent Technologies, Inc.

개요

이 응용 자료는 제2형 당뇨병 및 비만 치료제인 세마글루타이드의 순도 테스트를 위한 HPLC 분석법 개발을 제시합니다. 산성 개질제(modifier)로 사용되는 TFA 농도가 불순물 피크 분리에 미치는 영향에 초점을 맞추고 Agilent 1260 Infinity II Bio Prime LC 시스템의 Blend Assist 기능을 사용하여 간편한 분석법 최적화를 보여줍니다.

고도로 정제된 합성 펩타이드는 제한된 불순물 프로파일을 나타내므로 동등성을 보장하기 위해 높은 피크 대 피크 분리능이 필요합니다. 또한 산성 개질제(modifier)에 대해 매우 견고하고 최소한의 상호작용을 보이는 시스템이 유리합니다. Agilent AdvanceBio Peptide Plus 컬럼과 Infinity II Bio LC 시스템의 조합은 변형된 펩타이드 분석을 위한 최적의 조합임이 입증되었습니다.

소개

최근 합성 분석법의 발전으로 인해 이제 rDNA를 사용한 생물학적 공급원뿐만 아니라 화학적 합성을 통해서도 40개 미만의 아미노산으로 구성된 펩타이드를 얻을 수 있습니다. 합성 펩타이드는 저분자에 비해 안전성, 유효성, 특이성이 우수하고, 생물학적 의약품에 비해 제조비용과 면역원성이 낮습니다.¹ FDA 가이드라인의 완화된 승인 기준으로 인해 많은 제약 회사가 합성 펩타이드 개발에 적극적으로 참여하게 되었습니다.

그러나 FDA 가이드라인에 따르면 합성 펩타이드 물질은 대조약품(RLD)으로 잘 식별된 불순물 수준과 같거나 그보다 낮은 불순물 수준을 나타내야 합니다. 불순물 프로파일 확인을 통해 원료의약품의 0.5%를 초과하는 불순물의 안전성을 입증해야 합니다.² 결과적으로, 원료의약품의 순도 테스트는 품질 보장에 있어서 주요 품질 속성(CQA)이 되며, 정제 또는 합성 계획 개선에 대한 판단을 위한 벤치마크 역할을 합니다.³

DPP-4에 의한 세마글루타이드의 분해를 방지하기 위해 변형된 아미노산이 포함되었습니다(예를 들어 위치 8의 Ala가 알파-아미노부티르산으로 대체되고 위치 28의 Lys가 아르기닌으로 대체됨). 또한 긴 지방산 사슬이 위치 20의 Lys에 부착되어 반감기가 7일 더 길어졌습니다.⁴ 그러나 이러한 변형은 소수성을 증가시켜 분석 조건 하에서 LC 시스템과 상호 작용을 일으키며 피크 테일링 또는 피크 갈라짐으로 관찰할 수 있습니다.

산성 개질제(modifier)의 다양한 농도는 분석물질의 소수성 및 이온쌍 특성을 변화시켜 특이성을 변화시킬 수 있습니다.⁵ 그러나 고농도 산성 개질제(modifier)를 사용하면 컬럼과 LC 시스템에 축적된 조건이 적용되어 잠재적으로 분석 시스템의 견고성이 손상될 수 있습니다. AdvanceBio Peptide Plus 컬럼은 넓은 pH 범위에서 안정성을 입증하고 고농도의 트리플루오로아세트산(TFA)에서도 안정적인 결과를 유지합니다. AdvanceBio Peptide Plus 컬럼은 표면이 하전된 변형 입자로 구성되어 있어 펩타이드 분석을 위한 대체 선택성을 제공합니다. 이 응용 자료에서는 생체 적합성 유로(MP35N)로 구성된 1260 Infinity II Bio Prime LC를 사용하여 시스템 표면 상호작용을 낮췄습니다. 또한 AdvanceBio Peptide Plus 컬럼은 세마글루타이드와 관련된 다양한 불순물 분석에서 최적의 결과를 입증했습니다.

실험

기기

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 내장
- Agilent 1290 Infinity II 멀티 컬럼 온도 조절 장치(G7116B), Quick-Connect Heat-Exchanger 1290 Bio Standard Flow(G7116-60071) 포함
- Agilent 1290 Infinity II 다이오드 어레이 검출기(G7117B), Bio-inert Max-Light 카트리지 셀(60 mm, G5615-60017) 장착

시약

TFA는 Merck에서 구입했고, acetonitrile은 B&J에서 구입했습니다.

시료

세마글루타이드와 오젠폭(제조된 세마글루타이드) 1mg은 현지 고객으로부터 기증되었습니다. 세마글루타이드를 30% 아세토니트릴에 1mg/mL 농도로 용해한 후 분석 전 80°C에서 하루 동안 가열하고 냉각했습니다.

컬럼

- Agilent AdvanceBio Peptide Plus 2.1 × 150mm, 2.7µm (부품 번호 695775-949)
- Agilent AdvanceBio Peptide Plus 2.1 × 250 mm, 2.7µm (부품 번호 693775-949)

소프트웨어

Agilent OpenLab CDS 2.7

분석법

표 1. 분석법 파라미터

파라미터	값																																				
컬럼	TFA 농도 스크리닝: AdvanceBio Peptide Plus 2.1 × 150mm, 2.7µm 더 얇은 그레디언트 조건: AdvanceBio Peptide Plus 2.1 × 250 mm, 2.7µm																																				
유속	0.4mL/분																																				
컬럼 온도	40°C																																				
주입량	5µL(TFA 스크리닝), 10µL(더 얇은 그레디언트)																																				
이동상	A) 물 B) 아세토니트릴 C) 1% TFA가 함유된 물 D) 1% TFA가 함유된 아세토니트릴																																				
그레디언트-TFA 농도 스크리닝	<table><tr><th>시간(분)</th><th>%(A + C)</th><th>%(B + D)</th><th>유속(mL/분)</th></tr><tr><td>0</td><td>80</td><td>20</td><td>0.6</td></tr><tr><td>0.5</td><td>80</td><td>20</td><td>-</td></tr><tr><td>15</td><td>40</td><td>60</td><td>-</td></tr><tr><td>20</td><td>10</td><td>90</td><td>-</td></tr><tr><td>22</td><td>10</td><td>90</td><td>-</td></tr><tr><td>22.1</td><td>80</td><td>20</td><td>-</td></tr><tr><td>27</td><td>80</td><td>20</td><td>0.6</td></tr></table>	시간(분)	%(A + C)	%(B + D)	유속(mL/분)	0	80	20	0.6	0.5	80	20	-	15	40	60	-	20	10	90	-	22	10	90	-	22.1	80	20	-	27	80	20	0.6				
시간(분)	%(A + C)	%(B + D)	유속(mL/분)																																		
0	80	20	0.6																																		
0.5	80	20	-																																		
15	40	60	-																																		
20	10	90	-																																		
22	10	90	-																																		
22.1	80	20	-																																		
27	80	20	0.6																																		
그레디언트-더 얇음	<table><tr><th>시간(분)</th><th>%(A + C)</th><th>%(B + D)</th><th>유속(mL/분)</th></tr><tr><td>0</td><td>65</td><td>35</td><td>0.4</td></tr><tr><td>0.5</td><td>65</td><td>35</td><td>-</td></tr><tr><td>60</td><td>55</td><td>45</td><td>-</td></tr><tr><td>65</td><td>40</td><td>60</td><td>-</td></tr><tr><td>70</td><td>10</td><td>90</td><td>-</td></tr><tr><td>75</td><td>10</td><td>90</td><td>-</td></tr><tr><td>75.1</td><td>65</td><td>35</td><td>-</td></tr><tr><td>80</td><td>65</td><td>35</td><td>0.4</td></tr></table>	시간(분)	%(A + C)	%(B + D)	유속(mL/분)	0	65	35	0.4	0.5	65	35	-	60	55	45	-	65	40	60	-	70	10	90	-	75	10	90	-	75.1	65	35	-	80	65	35	0.4
시간(분)	%(A + C)	%(B + D)	유속(mL/분)																																		
0	65	35	0.4																																		
0.5	65	35	-																																		
60	55	45	-																																		
65	40	60	-																																		
70	10	90	-																																		
75	10	90	-																																		
75.1	65	35	-																																		
80	65	35	0.4																																		
검출기	UV 280nm(DAD HS, Bio-inert Max-Light 카트리지 셀 포함, 60mm)																																				

결과 및 토의

TFA 농도 스크리닝을 위한 Blend Assist 분석법 설정

Blend Assist를 사용하여 최적의 TFA 농도를 스크리닝하기 위해 이동상을 구성하고 그레디언트 시간표를 적용했습니다(그림 1). 그 후, 최종 농도를 0.05%에서 0.5% 범위로 조정하여 저장했습니다.

Flow

0.600 mL/min

Solvents

☒ Enable Blend Assist

Solvent	Used	%	Channels
Water/1% TFA in water (0.4%)	☒	80.00	A, C
Acetonitrile/1% TFA in acetonitrile (0.4%)	☒	20.00	B, D

Pressure Limits

Min: 0.00 bar Max: 800.00 bar

Stoptime **Posttime**

☐ As Injector/No Limit ☒ Off

☒ 27.00 min ☐ 1.00 min

Quat. Pump (G7131C)

Advanced

Timetable (empty)

ISET

Blend Assist

Channel	Solvent Group	Calibration	Name	Stock conc.	Final conc.	Conc. unit
A	Solvent 1	100.0 % Water V.03	Water			
B	Solvent 2	100.0 % Acetonitrile V.03	Acetonitrile			
C	Solvent 1 Additive	100.0 % Water V.03	1% TFA in water	1.00	0.40	%
D	Solvent 2 Additive	100.0 % Acetonitrile V.03	1% TFA in acetonitrile	1.00	0.40	%

그림 1. 1% TFA를 사용하여 0.4% TFA 조건을 구성하기 위한 Blend Assist 설정의 예시.

TFA 농도에 따른 세마글루타이드 불순물 프로파일 검증

Flexible 펌프의 Blend Assist 기능을 사용하여 TFA 농도를 수동으로 변경하여 다양한 데이터를 얻었습니다. 많은 컬럼에서 높은 TFA 농도로 인해 성능이 저하되는 현상이 나타났습니다. 그러나 AdvanceBio Peptide Plus 컬럼은 0.5% TFA 농도에서도 안정적인 성능을 보여주었습니다. 불순물 분리 중 분리능을 평가하기 위해 하루 동안 80°C로 가열된 세마글루타이드 용액 시료를 분석에 사용했습니다. TFA 농도가 0.05%에서 0.50%로 증가함에 따라 불순물 피크의 분리가 시각적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었습니다. 그림 2에서는 0.40% 및 0.50% TFA 조건에서 가장 높은 분리능이 관찰되었습니다. 이러한 조건을 바탕으로 분리능을 더욱 높이기 위해 추가 테스트를 수행했습니다.

최대 피크 분리능 얻기

RLD와 불순물 프로파일을 비교하는 것은 중요한 CQA입니다. 세마글루타이드 용액은 30% 아세토니트릴을 사용하여 1mg/mL로 희석하고 80°C에서 하루 동안 가열하여 제조했으며, 이 용액을 사전 승인된 약물인 오젠폍과 비교했습니다. 최대 분리능을 보장하기 위해 유속을 0.4mL/분으로 설정하고 AdvanceBio Peptide Plus 컬럼(2.1 × 250mm, 2.7µm)을 사용했습니다. 1260 Infinity II Bio Flexible 펌프는 약 0.17%/분의 더 얇은 그레디언트 조건에서도 안정적인 머무름 시간을 보여주었습니다. 0.4% TFA 농도의 강산성 조건에도 불구하고 일관되게 안정적인 피크 모양을 나타냈습니다. 그림 3의 결과에서 볼 수 있듯이, 기존에 단순 TFA 농도 스크리닝을 통해 관찰했던 불순물 프로파일이 더 높은 분리능으로 검출되었습니다.

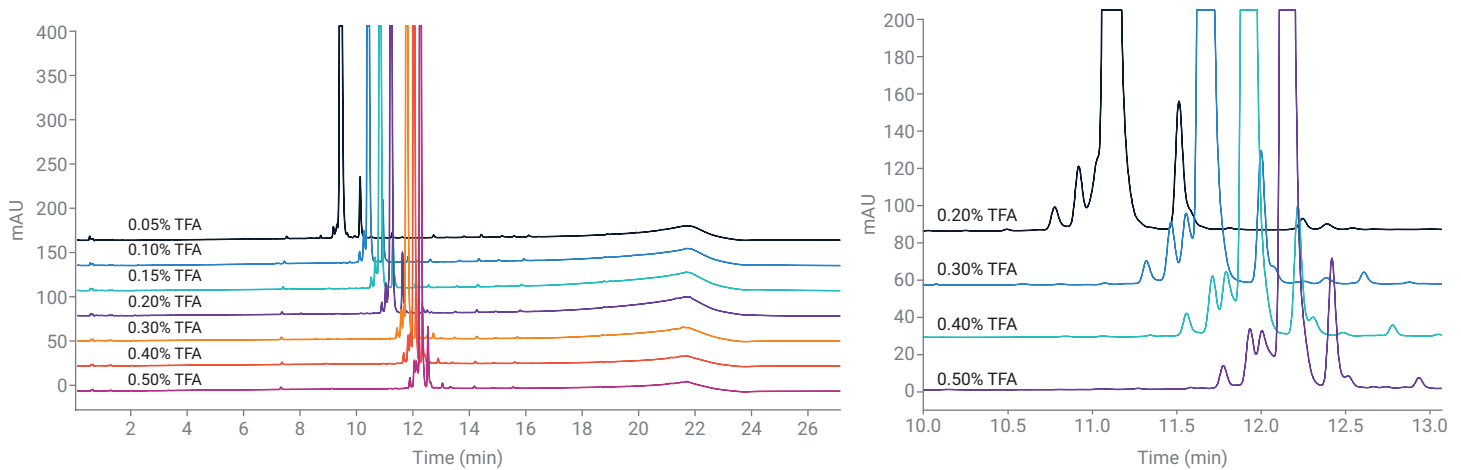


그림 2. Blend Assist를 사용하여 TFA 농도를 0.05%~0.50% 범위로 설정하여 얻은 크로마토그램.

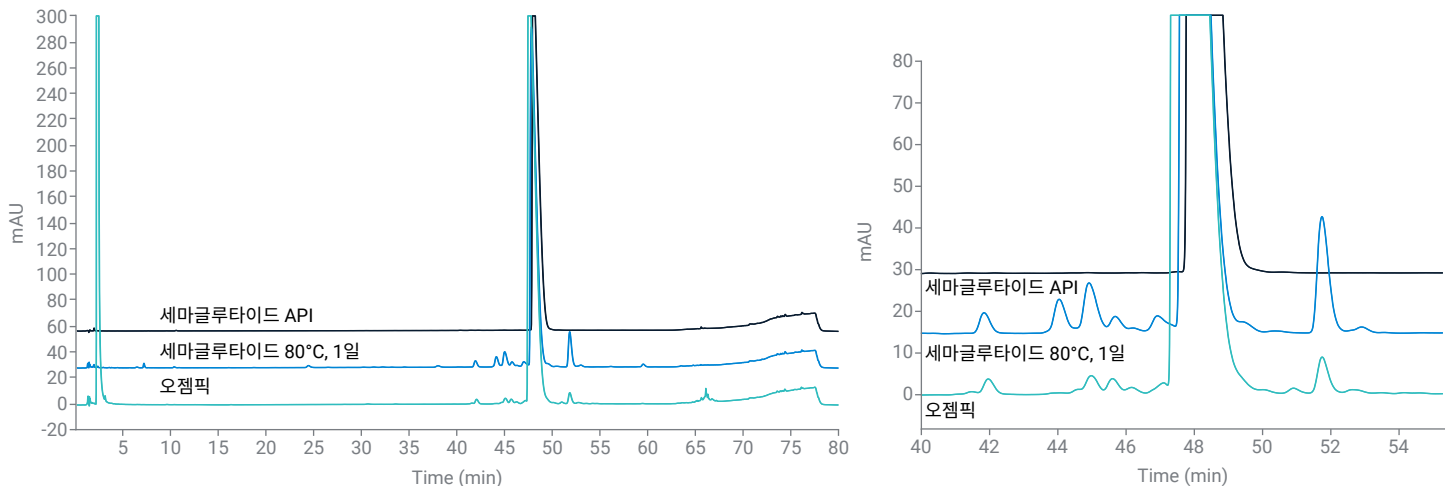


그림 3. Agilent AdvanceBio Peptide Plus 2.1 × 250mm, 2.7µm 컬럼을 사용하여 0.4% TFA 조건에서 분석한 세마글루타이드 API, 80°C에서 가열된 시료 및 오젠폍(모두 1mg/mL의 최종 농도로 제조)의 크로마토그램.

그림 4에서는 Max-Light 카트리지 셀(60mm)을 사용하여 매우 낮은 농도(0.01% 미만)까지 검출했습니다. 분석법 스크리닝을 통해 피크 분리능을 높이면 더욱 합리적인 불순물 프로파일 관리가 가능해집니다.

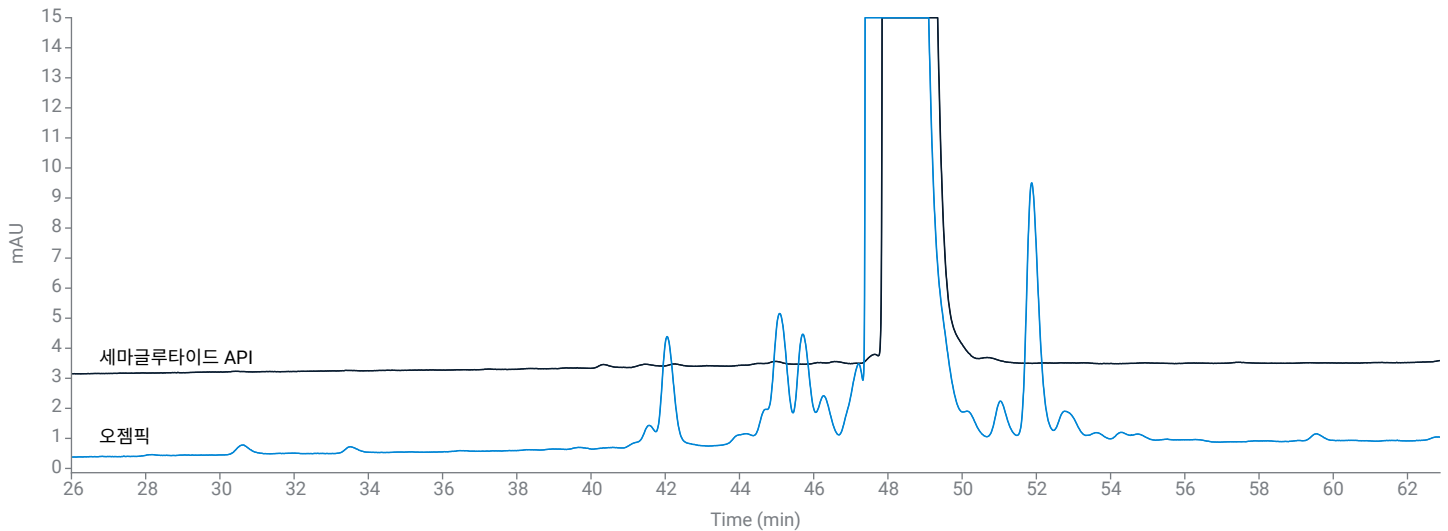


그림 4. 세마글루타이드 API와 오젠펙의 확대 크로마토그램.

결론

화학적 특성으로 인해 세마글루티드의 분리는 LC 시스템과 컬럼 재료의 조합에 의해 영향을 받습니다. 높은 분리능을 달성하려면 Agilent 1260 Infinity II Bio Prime LC와 견고한 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 컬럼, 그리고 신뢰할 수 있는 얇은 그레디언트 성능을 제공할 수 있는 시스템을 함께 사용해야 합니다. 또한 화학적 공정으로 합성된 치료용 펩타이드는 생물학적 공정으로 생산된 펩타이드에 비해 불순물과 양이 훨씬 적습니다. 그러나 합성 저분자 의약품과 달리 펩타이드 의약품과 관련된 불순물은 원료의약품과 매우 유사한 특성을 나타냅니다. 이는 원료의약품과 불순물 사이에 필요한 분리능을 달성하기 위한 분리에 있어 상당한 어려움을 야기합니다.

이 응용 자료에서는 Blend Assist 기능을 단순화하고 산성 개질제(modifier)의 농도를 자동으로 조정하여 불순물과 주요 피크 사이의 분리능을 개선하는 데 도움을 준 예시에 대해 설명합니다. 혹독한 조건에서도 견고성과 고분해능을 제공하는 1260 Infinity II Bio Prime LC의 탁월한 성능을 집중적으로 살펴봅니다. 또한 AdvanceBio Peptide Plus 컬럼은 고분리능 분리를 입증하고 높은 TFA 농도에서도 강력한 성능을 유지합니다.

참고문헌

1. Stefan, M. Regulatory Challenges of Nanomedicines and Their Follow-on Versions: A Generic or Similar Approach? *Advanced Drug Delivery Reviews* **2018**, 131, 122–131.
2. 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**.
3. Guideline on the Development and Manufacture of Synthetic Peptides. *European Medicines Agency* **2023**.
4. Minzhi, Y.; *et al.* Battle of GLP-1 Delivery Technologies. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2018**, 130, 113-130.
5. Melanie, M.; Clarissa, D. Agilent 1260 Infinity II Flexible Pump with Blend Assist. *Agilent Technologies 기술 개요*, 발행 번호 5991-9088EN, **2018**.

www.agilent.com

DE27116299

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
2024년 5월 6일 한국에서 발행
5994-7414KO

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