Application Note

Biopharmazeutika/
Pharmazeutika

Agilent
Trusted Answers

Säulentypsuche für forciertem Abbau (Stresstest) eines niedermolekularen GLP-1-Arzneimittels

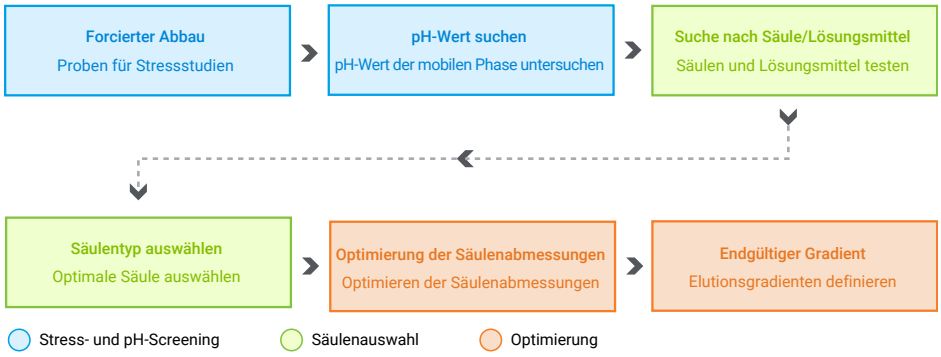
Verfasser

Emily Parry
Agilent Technologies, Inc.

Zusammenfassung

Orforglipron ist ein kürzlich zugelassener oraler, nicht-peptidischer Glucagon-ähnlicher Peptid-1 (GLP-1)-Rezeptoragonist, der einen bedeutenden Fortschritt gegenüber herkömmlichen injizierbaren, peptidbasierten GLP-1-Therapien darstellt. Zur Unterstützung der Verunreinigungsprofilerstellung und Methodenentwicklung wurden Studien zum forciertem Abbau durchgeführt, um repräsentative Abbauprodukte zu erzeugen und die chromatographischen Trennbedingungen auf die Probe zu stellen. Eine systematische Studie zur Methodensuche für die Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie (LC/MS) wurde durchgeführt, bei der sechs chemisch verschiedene stationäre Phasen untersucht wurden, darunter C18, phenylbasierte, Pentafluorphenyl (PFP)- und Mixed-Mode-Phasen, die sowohl mit Acetonitril als auch mit Methanol als mobile Phase bewertet wurden. Die Leistung der Säule wurde anhand der Retention des pharmazeutischen Wirkstoffs (API), der Trennung der Verunreinigungen und der Gesamtzahl der nachgewiesenen Verunreinigungspeaks bewertet. Die Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18-Säule bot die beste Gesamtselektivität und Verunreinigungsauflösung. Eine weitere Optimierung unter Verwendung einer 100-mm-Säule mit 1,9-µm-Partikeln und einem verlängerten 26-minütigen Gradienten verbesserte die Trennung von Abbauprodukten und damit im Zusammenhang stehenden Verunreinigungen beträchtlich. Das abschließende Verfahren ermöglichte eine effektive UV- und MS-Charakterisierung von Orforglipron und dessen Verunreinigungen.

Systematische LC-Verfahrenssuche zur Trennung von erzwungenen Abbauprodukten von Orforglipron



Einführung

GLP-1-Rezeptoragonisten sind eine wichtige Klasse von Therapeutika, die zur Behandlung von Typ-2-Diabetes und Adipositas eingesetzt werden. Historisch gesehen handelte es sich bei den meisten GLP-1-Therapien um peptidbasierte Arzneimittel, die aufgrund enzymatischen Abbaus und begrenzter Absorption im Magen-Darm-Trakt eine schlechte orale biologische Verfügbarkeit aufwiesen und daher eine subkutane Verabreichung erforderten. Obwohl orales Semaglutid gezeigt hat, dass peptidbasierte GLP-1-Therapien oral verabreicht werden können, sind spezielle Formulierungen erforderlich, um diese Herausforderungen zu bewältigen. Die Zulassung von Orforglipron (Abbildung 1) stellte einen bedeutenden Fortschritt auf diesem Gebiet dar, da es sich um einen nicht-peptidischen, niedermolekularen GLP-1-Rezeptoragonisten handelt, der oral verabreicht werden kann und somit potenziell mehr Komfort und einen besseren Patientenzugang im Vergleich zu Injektionstherapien bietet.

Mit der Einführung dieses neuen Therapeutikums sind die Charakterisierung und Überwachung potenzieller Verunreinigungen von entscheidender Bedeutung, um die Produktqualität und -sicherheit zu gewährleisten. Studien zum forciertem Abbau liefern wertvolle Erkenntnisse über das Stabilitätsprofil des pharmazeutischen Wirkstoffs (API), da sie Abbauprodukte erzeugen, die während der Herstellung, Lagerung oder Anwendung entstehen können. Die resultierenden Abbauproduktmischungen können dazu genutzt werden, chromatographische Verfahren auf die Probe zu stellen und eine hinreichende Trennung des Wirkstoffs (API) von entsprechenden Verunreinigungen und Abbauprodukten sicherzustellen. In dieser Studie wurde ein systematischer Ansatz zur Methodensuche für die LC/MS-Analyse verwendet, um ein Verfahren zur Profilerstellung von Verunreinigungen für Orforglipron zu entwickeln. Vor der Auswahl und Optimierung des endgültigen chromatographischen Verfahrens wurden sechs stationäre Säulenphasen mit unterschiedlichen Selektivitätsmechanismen untersucht,

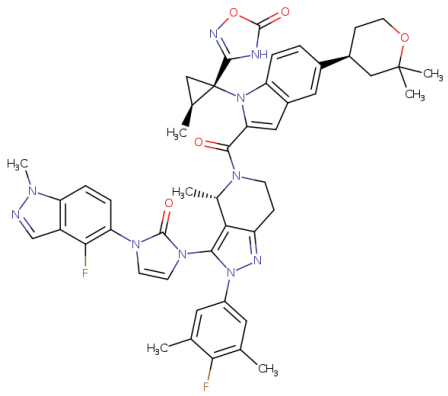


Abbildung 1. Struktur von Orforglipron

darunter Umkehrphasen-, aromatisch-selektive und Mixed-Mode-Säulen.

Experimentelles

Chemikalien

Orforglipron wurde von Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan) bezogen. Ammoniumhydroxid und Ameisensäure in LC/MS-Qualität wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri) bezogen. Als Probenlösungsmittel und Komponenten der mobilen Phase wurden Wasser, Acetonitril und Methanol in LC/MS-Qualität von InfinityLab verwendet.

Geräte

Eine binäre Pumpe des Typs Agilent 1290 Infinity II (G7120B) wurde mit einem externen Ventilantrieb sowie einem 13-Port-Lösungsmittel-Schaltventil (G4235A) kombiniert, um die Suche mobiler Phasen zu erleichtern. Proben wurden mittels eines Mehrfachprobengebers von Agilent (G7167B) in eine thermostatisierte Mehrsäulenkammer (G7116B) geleitet, die mit einem 8-Säulenschaltventil (G4239C) ausgestattet war. Die Verunreinigungserkennung erfolgte mithilfe eines Diodenarray-Detektors, der entsprechend den in Tabelle 1 beschriebenen Einstellungen konfiguriert war. Das Eluat wurde anschließend zur massenspektrometrischen Erkennung an das Agilent InfinityLab LC/MSD Pro iQ weitergeleitet. Die MS-Betriebsparameter sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Datenerfassung und -analyse wurde mit Agilent OpenLab CDS, Version 2.8 durchgeführt.

Tabelle 1. DAD-Einstellungen.

DAD	
Parameter	**Einstellung**
Signal	254 nm
Bandbreite	4
Datenrate	40 Hz
Spektrum	190 bis 400 nm
Schritt	2 nm

Tabelle 2. MS-Einstellungen.

IQ Pro	
Parameter	**Einstellung**
Gastemperatur	325 °C
Gasfluss	11 l/min
Zerstäuber	30 psi
Kapillarspannung	3500 V
Datenerfassungsmodus	
Scan (+)	70 bis 1000 *m/z*
SIM (+)	883,4 *m/z*

Probenvorbereitung und erzwungener Abbau

Zehn Milligramm Orforglipron wurden in 4 ml Acetonitril:Wasser (60:40, v/v) gelöst und bis zur vollständigen Auflösung mit Ultraschall behandelt. Für Untersuchungen zum forciertem Abbau wurden Aliquots dieser Lösung à 900 µl in drei separate Fläschchen überführt. Der Abbau wurde durch Zugabe von 100 µl 1-molarer Salzsäure (saurer Abbau), 100 µl 1-molarer Natriumhydroxidlösung (basischer Abbau) oder 100 µl einer 30-prozentigen Wasserstoffperoxidlösung (oxidativer Abbau) induziert.

Die Proben für den sauren und basischen Abbau wurden zwei Stunden lang bei 70 °C erhitzt, während die Probe für den oxidativen Abbau eine Stunde lang bei 70 °C erhitzt wurde. Nach der Inkubation wurden die drei abgebauten Proben zusammengeführt, um weitere Abbaureaktionen zu stoppen. Die resultierende Mischung wurde zur Analyse in ein HPLC-Fläschchen überführt.

Zum Vergleich wurden außerdem eine Lösungsmittelblindprobe und eine nicht abgebaute Orforglipron-Referenzprobe hergestellt und analysiert.

Methodensuche

In OpenLab lassen sich automatisierte Änderungen an den Methodenparametern durch Anpassungen im Sequenzfenster vornehmen. Der Sequenz können Spalten hinzugefügt werden, mit denen sich einzelne Methodenparameter überschreiben lassen (Abbildung 2). Wenn beispielsweise ein 8-Säulenauswahlventil installiert ist, lassen sich verschiedene Säulentypen mit demselben Verfahren bewerten, wobei die Ventilposition innerhalb der Arbeitsliste verschoben und vor der Probenanalyse eine kurze Methode zur Gleichgewichtseinstellung durchgeführt wird. Zu den weiteren überschreibbaren Methodenparametern gehören die Säulentemperatur, die anfängliche Gradientenzusammensetzung und die Flussrate.

Für die Tests wurden sechs Säulen mit den Abmessungen 2,1 × 50 mm und einer Partikelgröße von 2,7 µm ausgewählt (Tabelle 3).

Tabelle 3. Bewertete Agilent HPLC-Säulen.

Säulentyp (2,1 × 50 mm, 2,7 µm)	Best.-Nr.
InfinityLab Poroshell HPH-C18	699775-702
InfinityLab Poroshell 120 CS-C18	699775-942
InfinityLab Poroshell 120 EC-C18	699775-902
InfinityLab Poroshell 120 PFP	699775-408
InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl	699775-912
Altura Poroshell 120 PFAS	227205-007
Zusätzliche Abmessungen	
InfinityLab Poroshell EC-C18, 2,1 × 100, 2,7 µm	695775-902
InfinityLab Poroshell EC-C18, 2,1 × 100, 1,9 µm	695675-902

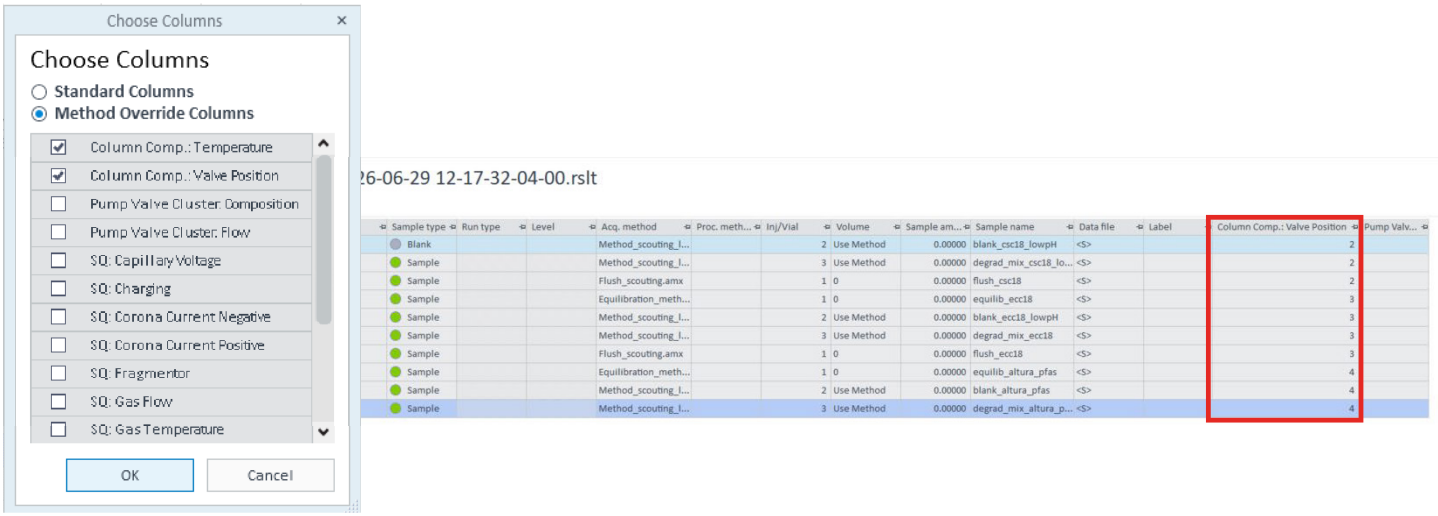


Abbildung 2. Im Sequenzfenster sind Spalten für die Überschreibung der OpenLab-Verfahren verfügbar.

Ergebnisse und Diskussion

Methodensuchergebnisse

Die anfängliche pH-Suche wurde unter Verwendung der Poroshell HPH-C18-Säule durchgeführt, da diese mit einem breiten pH-Bereich kompatibel ist. Die wässrige mobile Phase bestand entweder aus Wasser mit 0,1 % Ameisensäure oder aus 10 mM Ammoniumhydroxid und wurde mit dem entsprechenden Modifikator in der organischen Acetonitrilphase gepaart. Nachdem sich herausgestellt hatte, dass Bedingungen mit niedrigem pH-Wert eine bessere Retention bieten (Abbildung 3), wurde eine methanolbasierte organische mobile Phase mit 0,1 % Ameisensäure hergestellt und durch Umschalten des 12-Port-Ventils zur Lösemittelauswahl in den automatisierten Testablauf integriert.

Im Anfangssuchgradient eluierten der Wirkstoff (API) sowie sämtliche Verunreinigungen innerhalb eines Zeitfensters von einer Minute bei einem hohen Anteil an organischem Lösungsmittel. Eine ansteigende Basislinie unterhalb der Peaks zeigte eine deutliche Koelution an. Um eine effektivere Bewertung der verschiedenen Säulentypen zu ermöglichen, wurde ein flacher Gradient entwickelt, der bei einem hohen Anteil an organischem Lösungsmittel beginnt (Abbildung 4) und zum Testen der zusätzlichen Säulen verwendet wurde.

Poroshell EC-C18 wurde einbezogen, da sich die Eigenschaften seiner Oberfläche und seiner gebundenen Phase von denen von Poroshell HPH-C18 unterscheiden und es somit eine komplementäre Retention und Selektivität für Orforglipron und dessen Abbauprodukte bieten könnte. Die Poroshell CS-C18-Säule wurde einbezogen, da ihre alternative C18-Selektivität potenziell die Trennung von Verunreinigungen verbessern könnte, während die Poroshell PFP-Phase aufgrund ihrer einzigartigen Selektivität gegenüber aromatischen Verbindungen wie Orforglipron bewertet wurde. Die Poroshell Altura PFAS-Säule wurde ebenfalls in das Screening einbezogen, da ihr Mixed-Mode-Retentionsmechanismus eine Selektivität bietet, die über die traditionellen Umkehrphasen-Wechselwirkungen hinausgeht, und Vorteile bei der Trennung von Verunreinigungen bieten könnte, die auf herkömmlichen C18-Phasen nicht ausreichend getrennt werden.

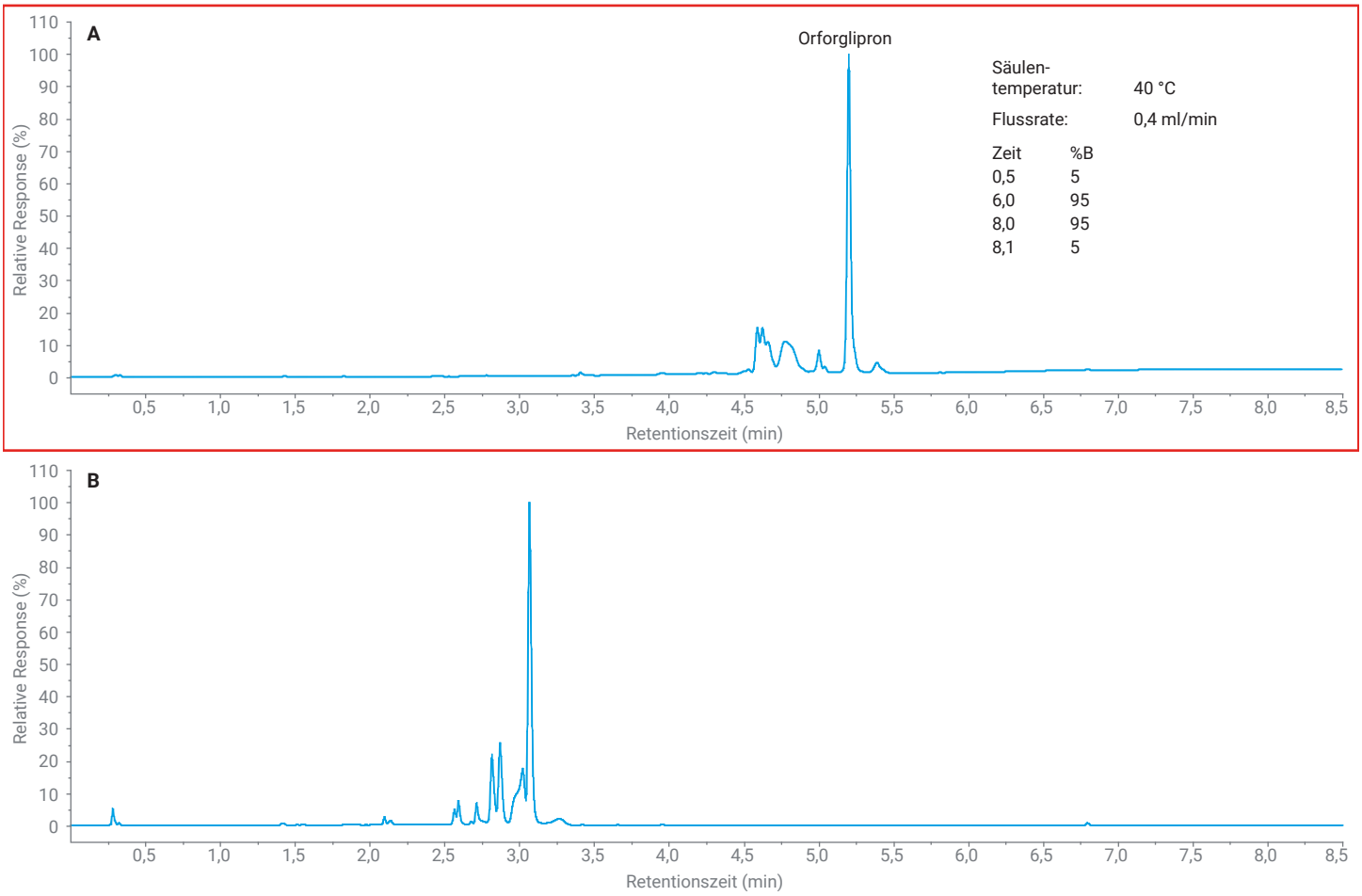


Abbildung 3. Chromatogramme von Abbauproduktmischungen bei einer Agilent Poroshell HPH-C18-Säule: (A) Ameisensäure-Gradient, (B) Ammoniumhydroxid-Gradient.

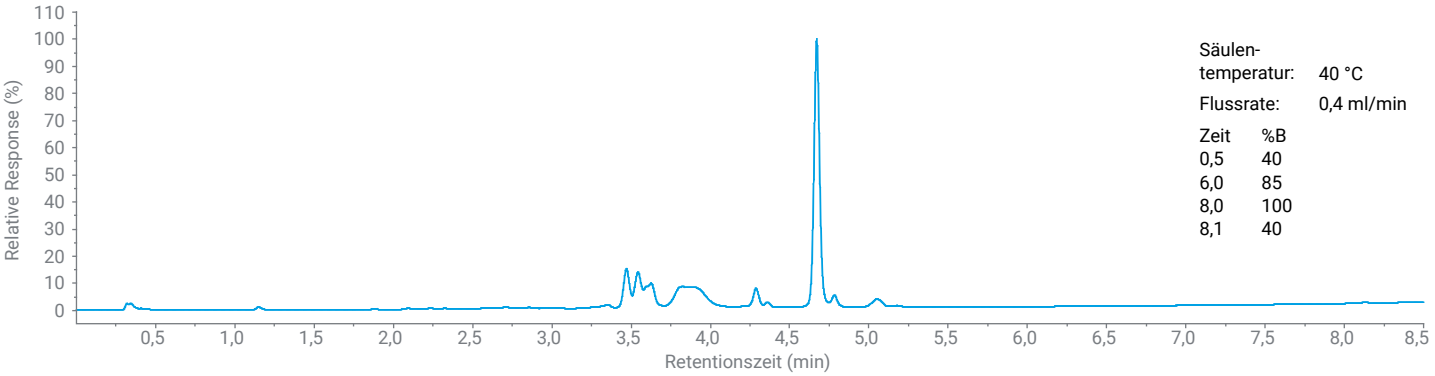


Abbildung 4. Chromatogramm einer Abbauproduktmischung bei einer Agilent Poroshell HPH-C18-Säule und eines auf niedrigen pH-Wert ausgelegten Suchgradienten.

Abbildung 5 zeigt Chromatogramme ausgewählter stationärer Phasen. Die Säulenleistung wurde anhand von drei primären Kennzahlen bewertet: Trennung der Verunreinigungen vom Wirkstoff, Wirkstoffretention und die Gesamtzahl der detektierten Verunreinigungspeaks. Gemessen an diesen Kriterien bot die Poroshell EC-C18-Säule die beste Gesamtleistung.

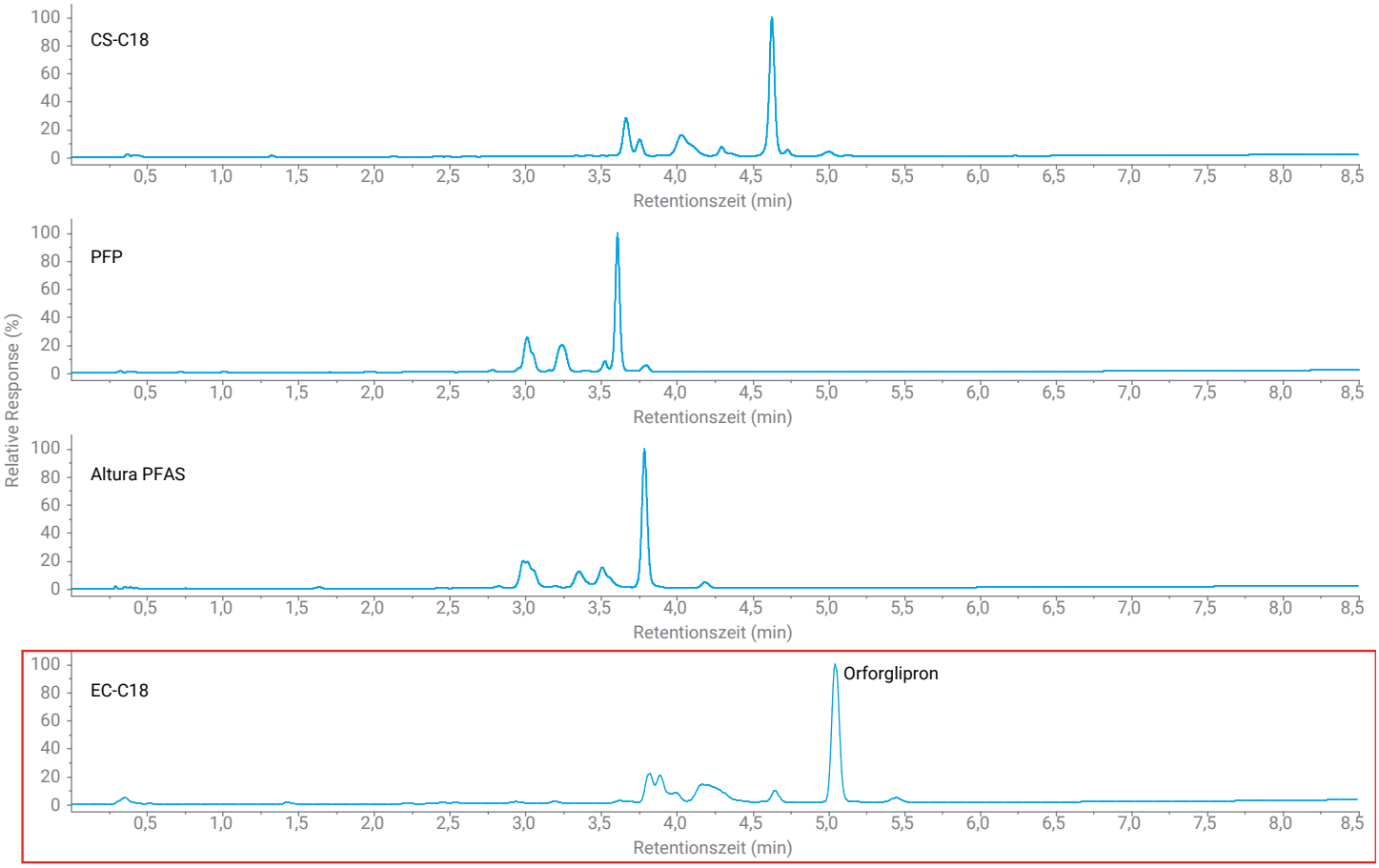


Abbildung 5. Chromatogramme von Abbauproduktmischungen.

Alle Säulen wurden unter Verwendung von sowohl Acetonitril als auch Methanol als organische Modifikatoren bewertet. In den meisten Fällen lieferte Acetonitril eine überlegene Leistung, was zu einer besseren Trennung zwischen den Peaks des Wirkstoffs (API) und der Verunreinigungen führte. Die einzige Ausnahme war die Phenyl-Hexyl-Säule. Abbildung 6 vergleicht Trennungen, die auf der Phenyl-Hexyl-Säule unter Verwendung von (A) Acetonitril und (B) Methanol erzielt wurden. Diese stationäre Phase wurde einbezogen, da sie durch π-π-Wechselwirkungen mit hoch aromatischen Verbindungen wie Orforglipron eine einzigartige Selektivität bieten kann. Von Methanol ist bekannt, dass es die Selektivität von Phenyl-Hexyl-Phasen gegenüber Acetonitril verändert, und in diesem Fall wurde mit Methanol eine bessere Trennung der Verunreinigungen beobachtet. Allerdings schnitt keine der beiden Phenyl-Hexyl-Bedingungen hinsichtlich der Trennung von Verunreinigungen vom Wirkstoff oder der Gesamtzahl der nachgewiesenen Verunreinigungspeaks besser ab als die Poroshell EC-C18-Säule.

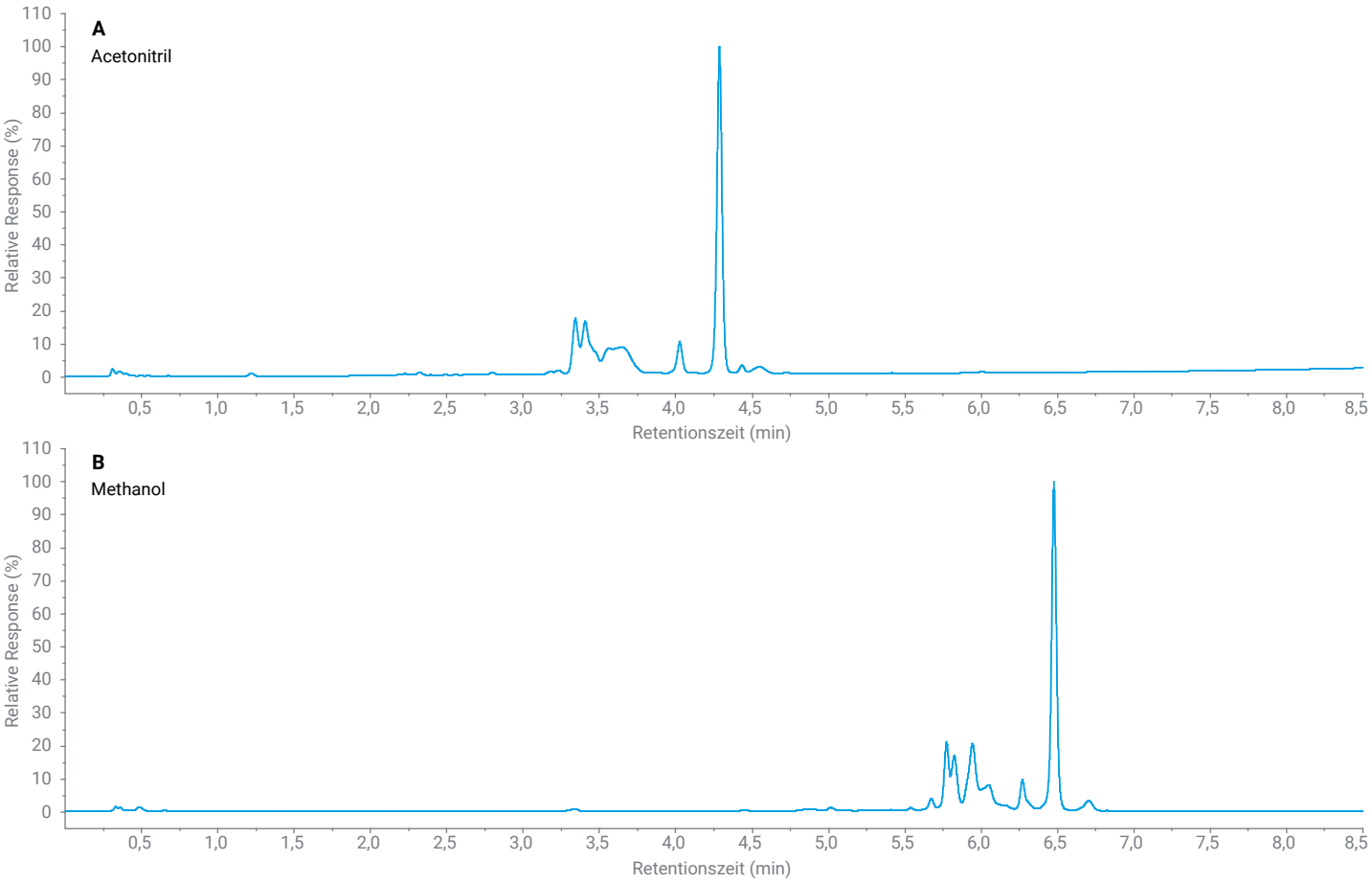


Abbildung 6. Chromatogramme der Abbauproduktmischungen mit einer Agilent Poroshell Phenyl-Hexyl-Säule, wobei (A) Acetonitril und (B) Methanol als organische mobile Phase verwendet wurden.

Optimierung der Trennung mit Poroshell EC-C18

Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der Verunreinigungsauflösung bestand darin, die Säulenlänge zu erhöhen. Die bei der ersten Screening-Phase identifizierte Poroshell EC-C18-Säulenphase wurde daher im 100-mm-Format sowohl mit einer Partikelgröße von 2,7 als auch von 1,9 µm unter Verwendung eines 8,5-minütigen Gradienten untersucht. Die 100 mm × 1,9 µm-Säule lieferte die insgesamt beste Trennung und wurde für die weitere Methodenentwicklung ausgewählt. Darüber hinaus zeigte das API-Massenspektrum ein sauberes protoniertes Molekül-Ion bei *m/z* 883,4 sowie ein In-Source-Fragment-Ion bei *m/z* 797,3, das durch einen Neutralverlust entstand (Abbildung 7).

Obwohl der 8,5-minütige Gradient eine Basislinientrennung der wichtigsten Verunreinigungen vom Wirkstoff ermöglichte, blieben einige Verunreinigungspeaks nur teilweise aufgelöst. Um die Auflösung weiter zu verbessern, wurde ein längerer und vollständig optimierter Gradient entwickelt.

Beim letzten Verfahren wurde ein 26-minütiger Gradient verwendet, der die Trennung der Verunreinigungen deutlich verbesserte und eine umfassendere Charakterisierung des Verunreinigungsprofils ermöglichte (Tabelle 4). Der flache anfängliche Gradient war zur vollständigen Trennung der Verunreinigungen erforderlich. Repräsentative UV- und MS-Chromatogramme, die mit dem optimierten Verfahren erhalten wurden, sind in Abbildung 8 dargestellt. Die mit dem längeren Gradienten erzielte verbesserte Auflösung ermöglichte eine optimierte Detektion und Charakterisierung einzelner Verunreinigungspeaks, wobei gleichzeitig eine akzeptable Peakform sowie ein angemessenes Retentionsverhalten für den Wirkstoff (API) gewahrt blieben.

Tabelle 4. Endgültige optimierte LC-Methode zur Erstellung eines Verunreinigungsprofils von Orforglipron.

Parameter	Endgültige Bedingungen
Säule	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18
Maße	2,1 × 100 mm, 1,9 µm
Mobile Phase A	Wasser mit 0,1 % Ameisensäure
Mobile Phase B	Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure
Flussrate	0,5 ml/min
Säulentemperatur	40 °C
Injektionsvolumen	1 µl
Gradienten-Programm	Zeit (min) %B 0,5 40 16 52 18,4 70 24 100

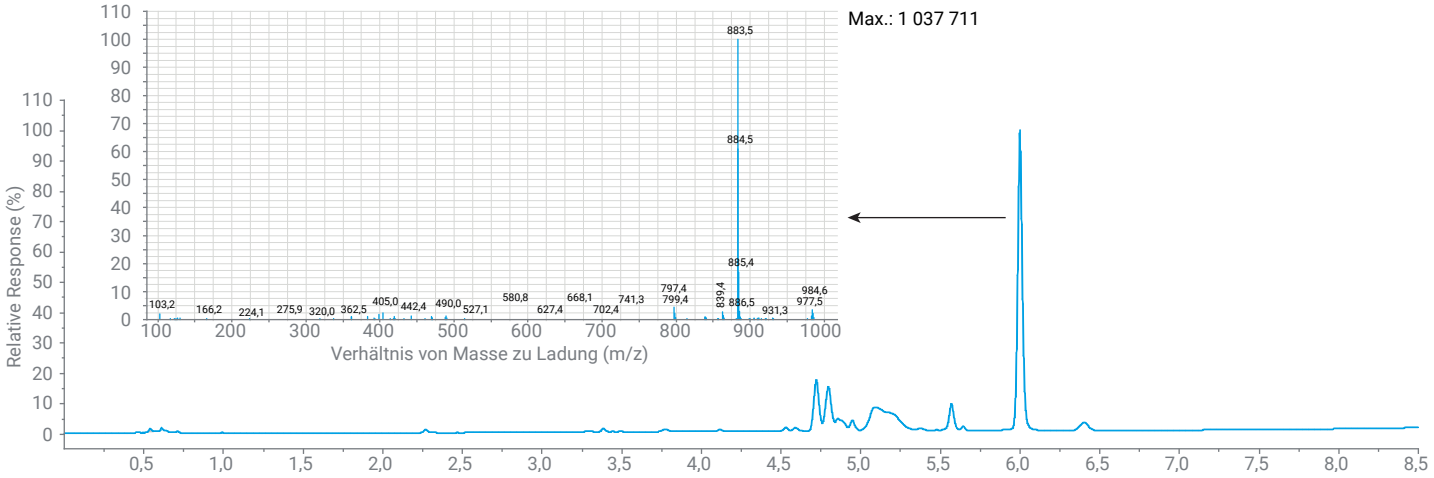
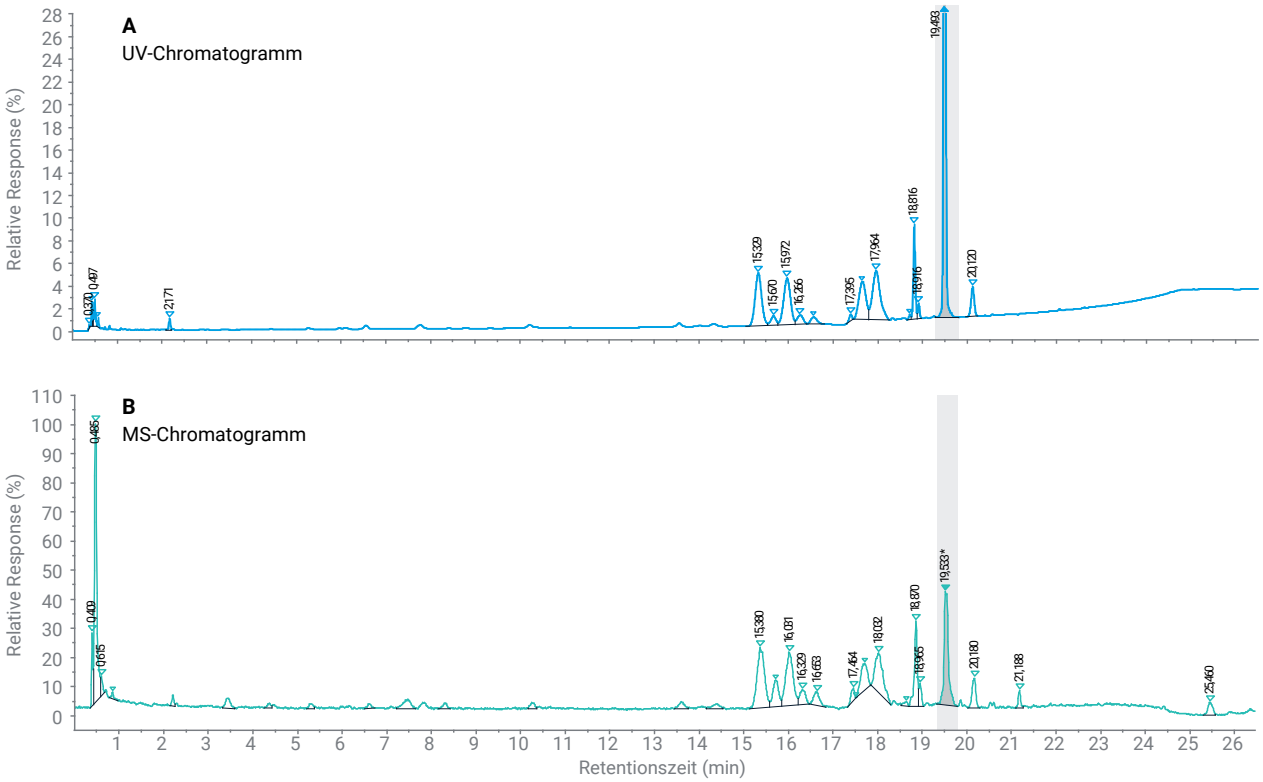


Abbildung 7. UV-Chromatogramm der Abbauproduktmischung unter Verwendung einer Agilent EC-C18 2,1 × 100 mm, 1,9 µm Säule und eines 8,5-minütigen Gradienten sowie MS-Spektren des API-Peaks.



RT	*m/z*
0,496	130,1
15,329	917,4
15,670	696,3
15,972	917,4
16,266	917,4
16,568	917,4
17,395	859,5
17,657	951,4
17,964	951,4
18,816	887,4
18,916	887,4
19,493	883,4
20,120	917,5

Abbildung 8. Abbauproduktmischung (A) UV-Chromatogramm (B) MS-Chromatogramm unter Verwendung des endgültigen Gradienten für die Agilent Poroshell EC-C18-Säule sowie MS-Tabelle aller Peak-*m/z*-Werte.

Fazit

Durch Säulenscreening wurde die Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18-Phase als die insgesamt beste Option unter den für die Profilerstellung von Verunreinigungen in Orforglipron evaluierten stationären Phasen identifiziert, da sie eine überlegene API-Retention, Verunreinigungstrennung und Verunreinigungspeak-Detektion bietet. Acetonitril lieferte im Allgemeinen bessere Trennungen als Methanol, obgleich Methanol die Selektivität auf der Agilent InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl-Säule verbesserte.

Weitere Optimierungen zeigten, dass eine Erhöhung der Säulenlänge und eine Verringerung der Partikelgröße die Auflösung verbesserten, wobei die 100 mm Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18-Säule, die mit 1,9 µm Partikeln gepackt war, die beste Leistung erbrachte. Während ein 8,5-minütiger Gradient die Hauptverunreinigungen vom Wirkstoff (API) trennte, verbesserte die Verlängerung des Gradienten auf 26 Minuten die Auflösung des Verunreinigungsprofils weiter. Die endgültige Methode ermöglichte eine effektive UV- und MS-Analyse von Orforglipron und dessen Verunreinigungen sowie den Nachweis des protonierten Molekülions bei *m/z* 883,4. Sie wurde als bevorzugte Methode zur Verunreinigungsanalyse ausgewählt.

www.agilent.com

DE-017712

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2026
Gedruckt in den USA, 8. Oktober 2026
5994-9501DEE

Agilent
Trusted Answers