Note d'application

Biopharma/pharma

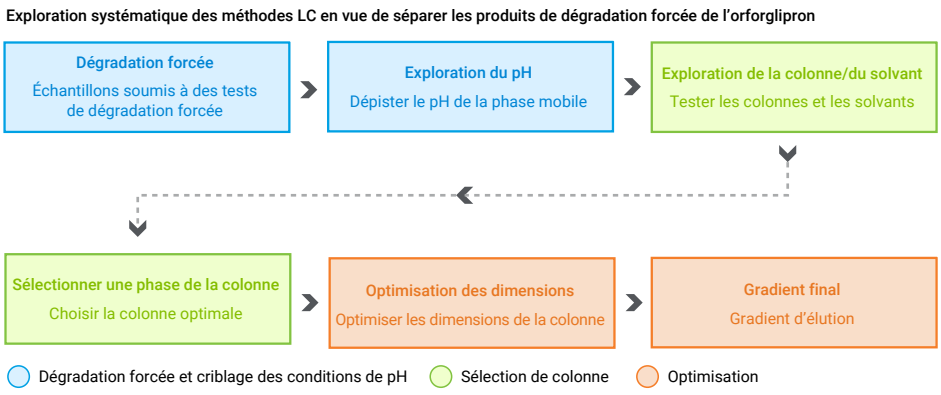
Exploration des phases stationnaires pour l'étude de la dégradation forcée d'un thérapeutique GLP-1 à petite molécule

Auteur

Emily Parry
Agilent Technologies, Inc.

Résumé

L'orforglipron est un agoniste oral non peptidique du récepteur du peptide-1 de type glucagon (GLP-1), récemment approuvé, qui représente une avancée majeure par rapport aux thérapies classiques à base de peptides GLP-1 administrées par voie injectable. Afin de caractériser le profil des impuretés et de développer une méthode analytique adaptée, des études de dégradation forcée ont été menées pour générer des produits de dégradation représentatifs et mettre à l'épreuve les conditions de séparation chromatographique. Un criblage systématique des conditions de méthodes de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS) a été mené sur six phases stationnaires de chimies différentes, notamment des phases C18, à base de phényle, pentafluorophényle (PFP) et à modes mixtes, en utilisant deux phases mobiles : l'acétonitrile et le méthanol. Les performances des colonnes ont été évaluées selon la rétention du principe actif pharmaceutique (API), de la séparation des impuretés et du nombre total de pics d'impuretés détectés. La colonne Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 a offert la meilleure sélectivité globale et la meilleure résolution des impuretés. Une optimisation supplémentaire, reposant sur l'utilisation d'une colonne de 100 mm présentant une granulométrie de 1,9 µm, et d'un gradient prolongé de 26 minutes, a permis d'améliorer considérablement la séparation des produits de dégradation et des impuretés apparentées. La méthode finale a permis de caractériser efficacement l'orforglipron et ses impuretés par détection UV et spectrométrie de masse (MS).



Introduction

Les agonistes du récepteur du GLP-1 constituent une classe importante de thérapeutiques utilisés pour traiter le diabète de type 2 et l'obésité. Depuis longtemps, la plupart des thérapies ciblant le récepteur du GLP-1 reposaient sur des médicaments à base de peptides, dont la biodisponibilité par voie orale est faible en raison de leur dégradation enzymatique et de leur absorption limitée par le système gastro-intestinal. Ils nécessitent donc une administration par injection sous-cutanée. Bien que le sémaglutide oral ait démontré qu'il était possible d'administrer des thérapies à base de peptides GLP-1 par voie orale, des formulations spécifiques restent nécessaires pour surmonter ces difficultés. L'approbation de l'orforglipron (figure 1) a marqué une avancée majeure dans ce domaine. En effet, il s'agit d'un agoniste non peptidique du récepteur du GLP-1 de type petite molécule, administrable par voie orale. Il pourrait ainsi offrir une plus grande facilité d'utilisation et un meilleur accès au traitement que les thérapies injectables.

Avec l'arrivée de ce nouveau thérapeutique, la caractérisation et le suivi des impuretés potentielles sont essentiels pour garantir la qualité et la sécurité du produit. Les études de dégradation forcée permettent de mieux comprendre le profil de stabilité du principe actif pharmaceutique (API) en générant des produits de dégradation susceptibles de se former au cours de la fabrication, du stockage ou de l'utilisation du thérapeutique. Les mélanges issus de ces études de dégradation permettent de mettre à l'épreuve les méthodes chromatographiques et de vérifier qu'elles assurent une séparation adéquate du principe actif, des impuretés apparentées et des produits de dégradation. Dans cette étude, une approche systématique d'exploration des méthodes de LC/MS a été mise en œuvre afin de développer une méthode de profilage des impuretés de l'orforglipron. Six phases stationnaires de chimie différentes présentant des mécanismes de sélectivité distincts ont été évaluées, notamment des colonnes en phase inverse, à sélectivité aromatique et à modes mixtes, avant de procéder à la sélection et à l'optimisation de la méthode chromatographique finale.

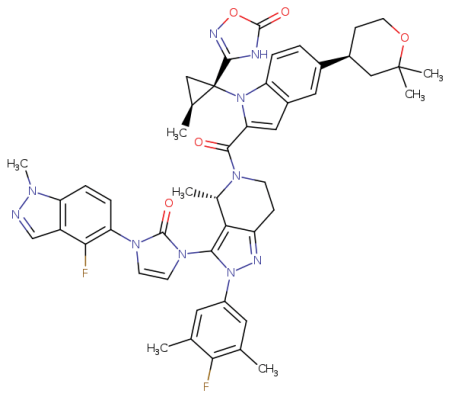


Figure 1. Structure de l'orforglipron.

Méthode expérimentale

Produits chimiques

L'orforglipron a été fourni par Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan). L'hydroxyde d'ammonium et l'acide formique de qualité LC/MS ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). L'eau, l'acétonitrile et le méthanol de qualité LC/MS InfinityLab ont été utilisés comme solvants des échantillons et comme composants des phases mobiles.

Instruments

Une pompe binaire Agilent 1290 Infinity II (G7120B) a été couplée à une commande de vanne externe et à une vanne de sélection de solvant à 13 positions (G4235A) afin de faciliter l'exploration des phases mobiles. Les échantillons ont été introduits à l'aide d'un multi-échantillonneur Agilent (G7167B) dans un compartiment thermostaté multicolonnes (G7116B) équipé d'une vanne de commutation à 8 colonnes (G4239C). La détection des impuretés a été réalisée à l'aide d'un détecteur à barrette de diodes, configuré selon les paramètres indiqués dans le tableau 1. L'éluant a ensuite été acheminé vers le système LC/MSD Pro iQ Agilent InfinityLab pour la détection par spectrométrie de masse. Les paramètres opérationnels de MS sont récapitulés dans le tableau 2. L'acquisition et l'analyse des données ont été réalisées à l'aide du logiciel Agilent OpenLab CDS, version 2.8.

Tableau 1. Paramètres de DAD

DAD	
Paramètre	**Valeur**
Signal	254 nm
Bande passante	4
Fréquence d'acquisition	40 Hz
Spectre	190 à 400 nm
Étape	2 nm

Tableau 2. Paramètres de MS.

IQ Pro	
Paramètre	**Valeur**
Température du gaz	325 °C
Débit du gaz	11 L/min
Nébuliseur	30 psi
Tension capillaire	3500 V
Mode d'acquisition	
Balayage (+)	*m/z* 70 à 1000
SIM (+)	*m/z* 883,4

Préparation d'échantillons et dégradation forcée

Dix milligrammes d'orforglipron ont été dissous dans 4 mL d'un mélange acétonitrile/eau (60:40, v/v), puis soumis aux ultrasons jusqu'à dissolution complète. Des aliquotes de 900 µL de cette solution ont ensuite été réparties dans trois flacons distincts en vue des études de dégradation forcée. La dégradation a été enduite par l'ajout de 100 µL d'acide chlorhydrique à 1 M (dégradation en milieu acide), de 100 µL d'hydroxyde de sodium à 1 M (dégradation en milieu basique) ou de 100 µL de peroxyde d'hydrogène à 30 % (dégradation oxydative).

Les échantillons soumis à une dégradation en milieu acide et basique ont été chauffés à 70 °C pendant 2 heures, tandis que l'échantillon soumis à une dégradation oxydative a été chauffé à 70 °C pendant 1 heure. À l'issue de l'incubation, les trois échantillons dégradés ont été mélangés afin de stopper la poursuite des réactions de dégradation. Le mélange obtenu a ensuite été transféré dans un flacon pour HPLC en vue de son analyse.

Un blanc de solvant et un échantillon de référence d'orforglipron non dégradé ont également été préparés et analysés à des fins de comparaison.

Exploration de méthodes

Dans OpenLab, il est possible d'automatiser les modifications des paramètres de méthode en intervenant directement dans le panneau de séquence. Des colonnes permettant de modifier certains paramètres de la méthode peuvent être ajoutées à la séquence (figure 2). Par exemple, lorsqu'une vanne de sélection à 8 colonnes est installée, différentes chimies de phases stationnaires peuvent être évaluées avec une même méthode en faisant varier la position de la vanne dans la liste de travail et d'exécuter une courte méthode de stabilisation avant l'analyse de l'échantillon. D'autres paramètres peuvent également être modifiés de cette manière, notamment la température de la colonne, la composition initiale du gradient et le débit.

Six colonnes de 2,1 × 50 mm, présentant une granulométrie de 2,7 µm, ont été retenues pour les tests (tableau 3).

Tableau 3. Colonnes HPLC Agilent évaluées.

Phase (2,1 × 50 mm, 2,7 µm)	Référence
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
Dimensions supplémentaires	
InfinityLab Poroshell EC-C18, 2,1 × 100, 2,7 µm	695775-902
InfinityLab Poroshell EC-C18, 2,1 × 100, 1,9 µm	695675-902

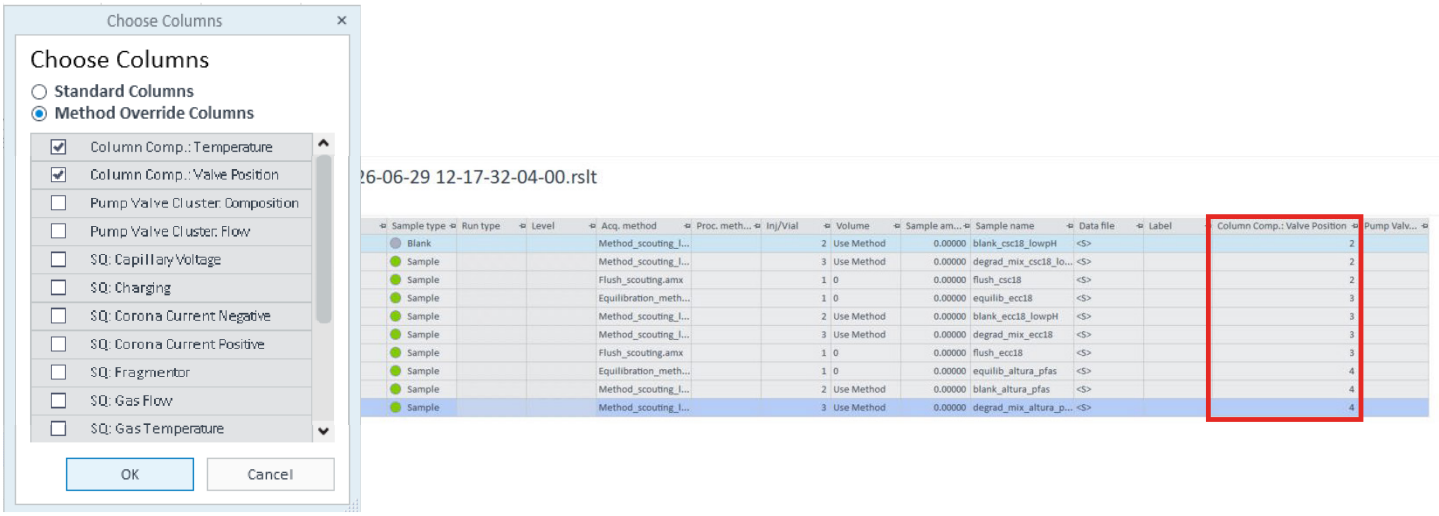


Figure 2. Colonnes de substitution des paramètres de méthode OpenLab disponibles dans le panneau de séquence.

Résultats et discussion

Résultats de l'exploration des méthodes

Une première évaluation du pH a été réalisée à l'aide de la colonne Poroshell HPH-C18 compatible avec une vaste gamme de pH. La phase mobile aqueuse était constituée soit d'eau contenant 0,1 % d'acide formique, soit d'une solution d'hydroxyde d'ammonium à 10 mM. Chacune de ces solutions était associée au modificateur correspondant dans la phase organique à base d'acétonitrile. Les conditions à pH acide ayant permis d'obtenir une meilleure rétention (figure 3), une phase mobile organique à base de méthanol contenant 0,1 % d'acide formique a été préparée. Elle a ensuite été intégrée au workflow de test automatisé par commutation de la vanne de sélection de solvant à 12 positions.

Lors de la première évaluation, le principe actif pharmaceutique et toutes les impuretés éluaient dans un intervalle d'une minute, à une forte proportion de solvant organique. L'élévation de la ligne de base sous les pics révélait une coélution importante. Afin de mieux évaluer les différentes chimies de phases stationnaires, un gradient de faible pente, débutant à une forte proportion de solvant organique, a été mis au point (figure 4), puis utilisé pour tester les autres colonnes.

La colonne Poroshell EC-C18 a également été retenue, car sa surface et sa phase greffée diffèrent de celles de la Poroshell HPH-C18, susceptibles d'apporter une rétention et une sélectivité complémentaires pour l'orforglipron et ses produits de dégradation. La colonne CS-C18 a été retenue pour sa sélectivité C18 différente, susceptible d'améliorer la séparation des impuretés. La phase de la Poroshell PFP a également été évaluée en raison de sa sélectivité particulière vis-à-vis des composés aromatiques tels que l'orforglipron. Enfin, cette étude comparative inclut la colonne Poroshell Altura PFAS, car son mécanisme de rétention mixte offre une sélectivité qui va au-delà des interactions classiques de phase inverse et pourrait ainsi faciliter la séparation d'impuretés mal résolues sur les phases C18 conventionnelles.

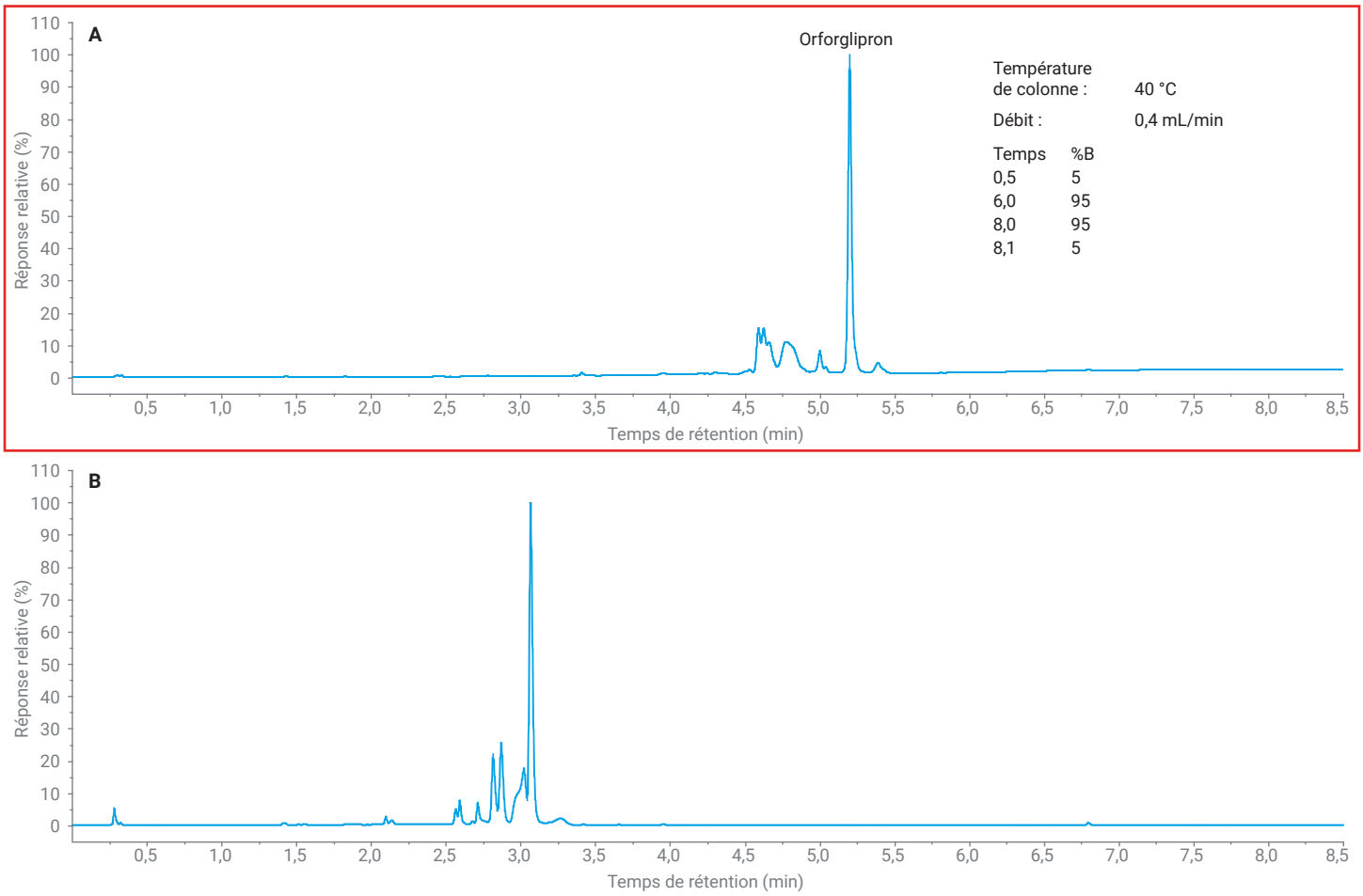


Figure 3. Chromatogrammes des mélanges de produits de dégradation obtenus sur une colonne Agilent Poroshell HPH-C18 avec (A) un gradient à l'acide formique et (B) un gradient à l'hydroxyde d'ammonium.

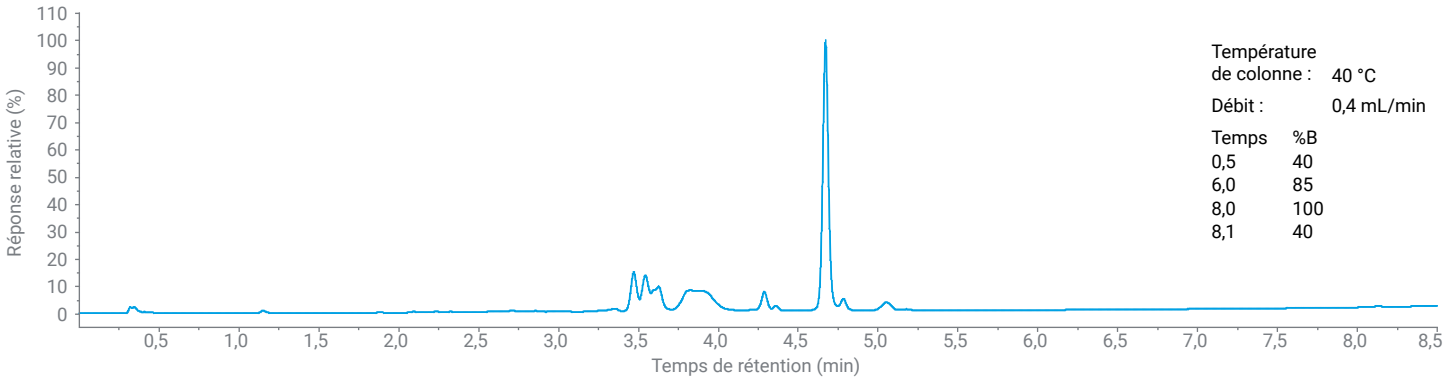


Figure 4. Chromatogramme du mélange de produits de dégradation obtenu sur une colonne Agilent Poroshell HPH-C18 avec un gradient exploratoire ciblé à faible pH.

La figure 5 présente les chromatogrammes obtenus avec les différentes phases stationnaires sélectionnées. Les performances des colonnes ont été évaluées selon trois critères principaux : la séparation des impuretés par rapport au principe actif pharmaceutique, sa capacité de rétention et le nombre total de pics d'impuretés détectés. Au regard de ces critères, la colonne Poroshell EC-C18 a présenté les meilleures performances globales.

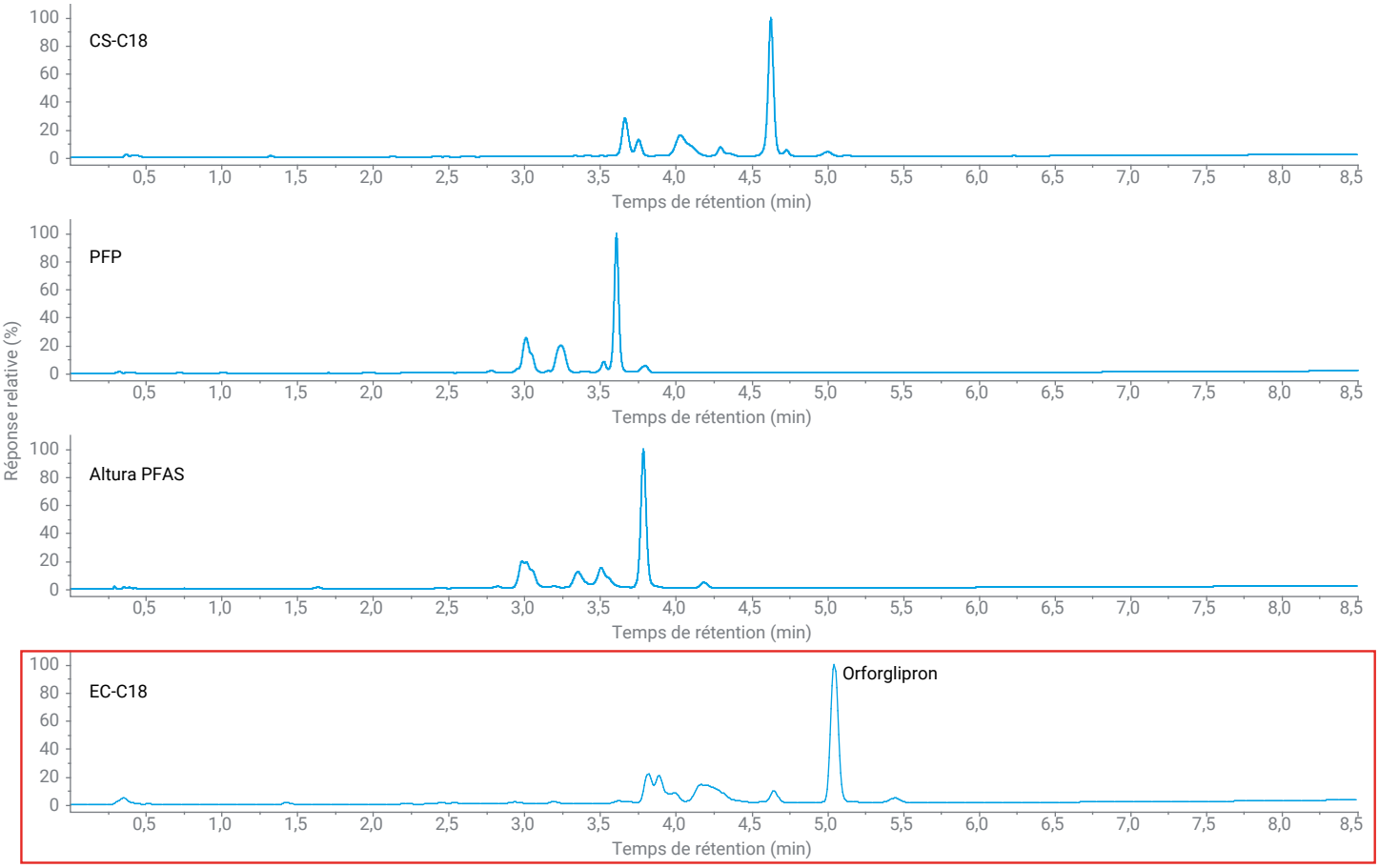


Figure 5. Chromatogrammes des mélanges de produits de dégradation.

Toutes les colonnes ont été évaluées avec deux modificateurs organiques : l'acétonitrile et le méthanol. Dans la plupart des cas, l'acétonitrile a donné de meilleurs résultats, en permettant une meilleure séparation des pics du principe actif et des impuretés. Seule la colonne PhenylHexyl a fait exception à cette tendance. La figure 6 compare les séparations obtenues sur cette colonne avec (A) l'acétonitrile et (B) le méthanol. Cette phase stationnaire a été retenue pour sa sélectivité particulière, fondée sur des interactions π-π avec les composés fortement aromatiques tels que l'orforglipron. Le méthanol est connu pour modifier la sélectivité des phases PhenylHexyl par rapport à l'acétonitrile. Dans le cas présent, il a permis d'obtenir une meilleure séparation des impuretés. Toutefois, aucune des deux conditions testées avec la phase PhenylHexyl n'a donné de meilleurs résultats que la colonne Poroshell EC-C18, ni en termes de séparation des impuretés par rapport au principe actif pharmaceutique, ni en nombre total de pics d'impuretés détectés.

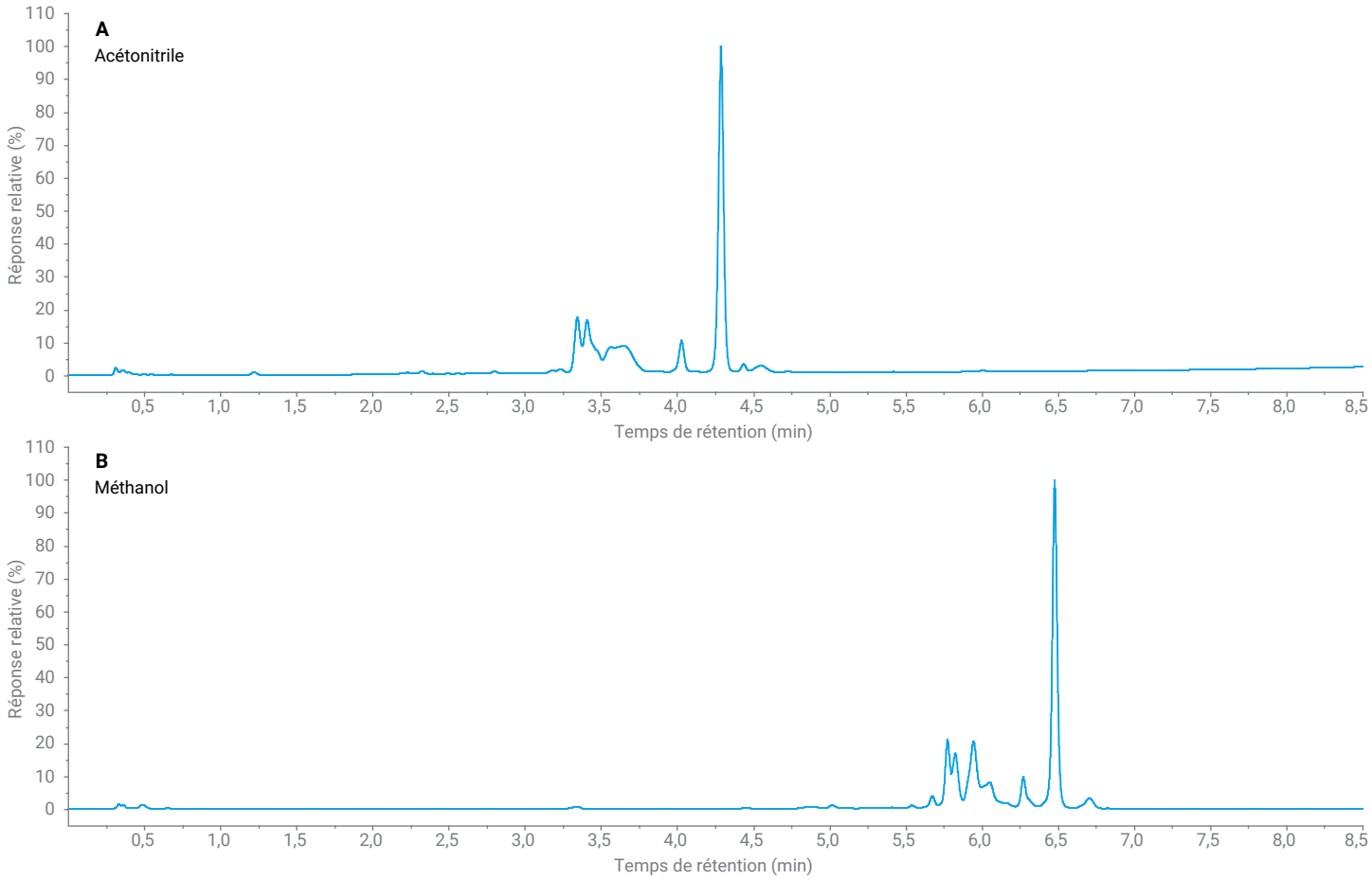


Figure 6. Chromatogrammes des mélanges de produits de dégradation obtenus sur une colonne Agilent Poroshell PhenylHexyl avec (A) l'acétonitrile et (B) le méthanol comme phase mobile organique.

Optimisation de la séparation sur la Poroshell EC-C18

Une autre approche pour améliorer la résolution des impuretés consistait à augmenter la longueur de la colonne. La phase de la colonne Poroshell EC-C18, identifiée lors du criblage initial, a donc été évaluée dans un format de 100 mm, présentant une granulométrie de 2,7 et 1,9 µm, en utilisant un gradient de 8,5 minutes. La colonne de 100 mm × 1,9 µm a fourni la meilleure séparation globale et a été retenue pour la suite du développement de la méthode. Par ailleurs, le spectre de masse du principe actif pharmaceutique a révélé un ion moléculaire protoné bien défini à *m/z* 883,4 ainsi qu'un ion fragment issu de la source à *m/z* 797,3 résultant d'une perte de neutre (figure 7).

Bien que le gradient de 8,5 minutes ait permis d'obtenir une séparation à la ligne de base des principales impuretés par rapport au principe actif pharmaceutique, plusieurs pics d'impuretés restaient insuffisamment résolus. Afin d'améliorer davantage la résolution, un gradient plus long et entièrement optimisé a été mis au point.

La méthode finale repose sur un gradient de 26 minutes, qui a permis d'améliorer considérablement la séparation des impuretés et de dresser un profil plus complet de celles-ci (tableau 4). Le gradient initial plus faible était indispensable pour assurer une séparation complète des impuretés. Les chromatogrammes UV et MS représentatifs obtenus avec la méthode optimisée sont présentés à la figure 8. La meilleure résolution obtenue grâce au gradient plus long a facilité la détection et la caractérisation de chaque pic d'impureté, tout en conservant une forme de pic et une rétention satisfaisantes pour le principe actif.

Tableau 4. Méthode LC finale optimisée pour l'analyse du profil d'impuretés de l'orforglipron.

Paramètre	Condition finale
Colonne	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18
Dimensions	2,1 × 100 mm, 1,9 µm
Phase mobile A	Eau avec acide formique à 0,1 %
Phase mobile B	Acétonitrile avec acide formique à 0,1 %
Débit	0,5 mL/min
Température de colonne	40 °C
Volume d'injection	1 µL
Programme de gradient	Temps (min) % de B 0,5 40 16 52 18,4 70 24 100

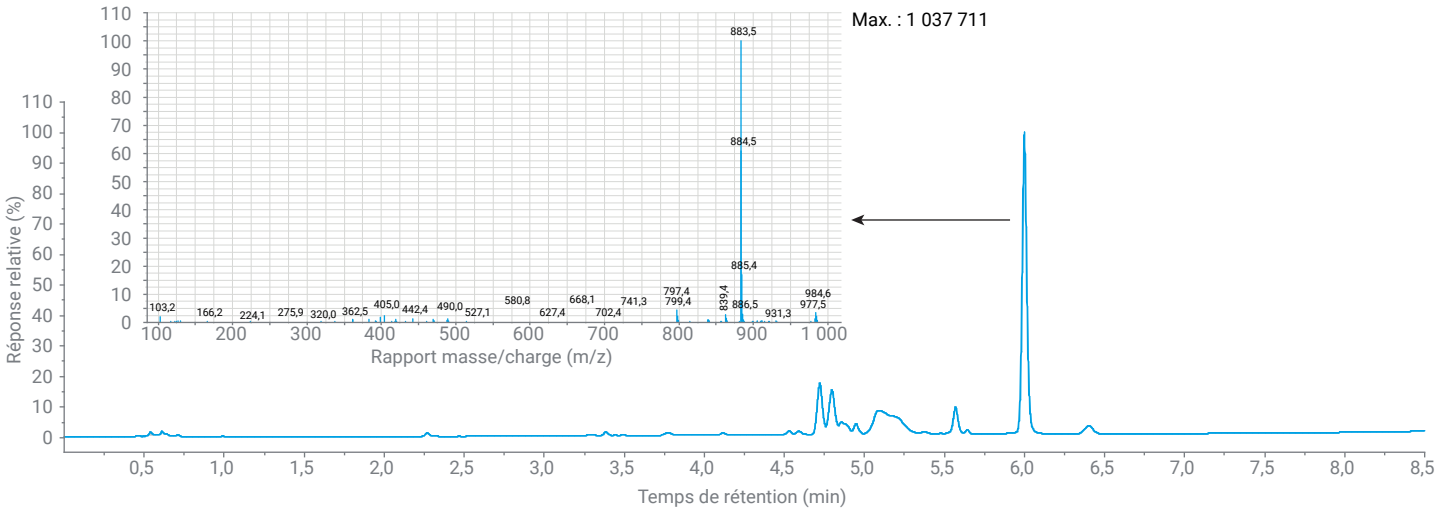
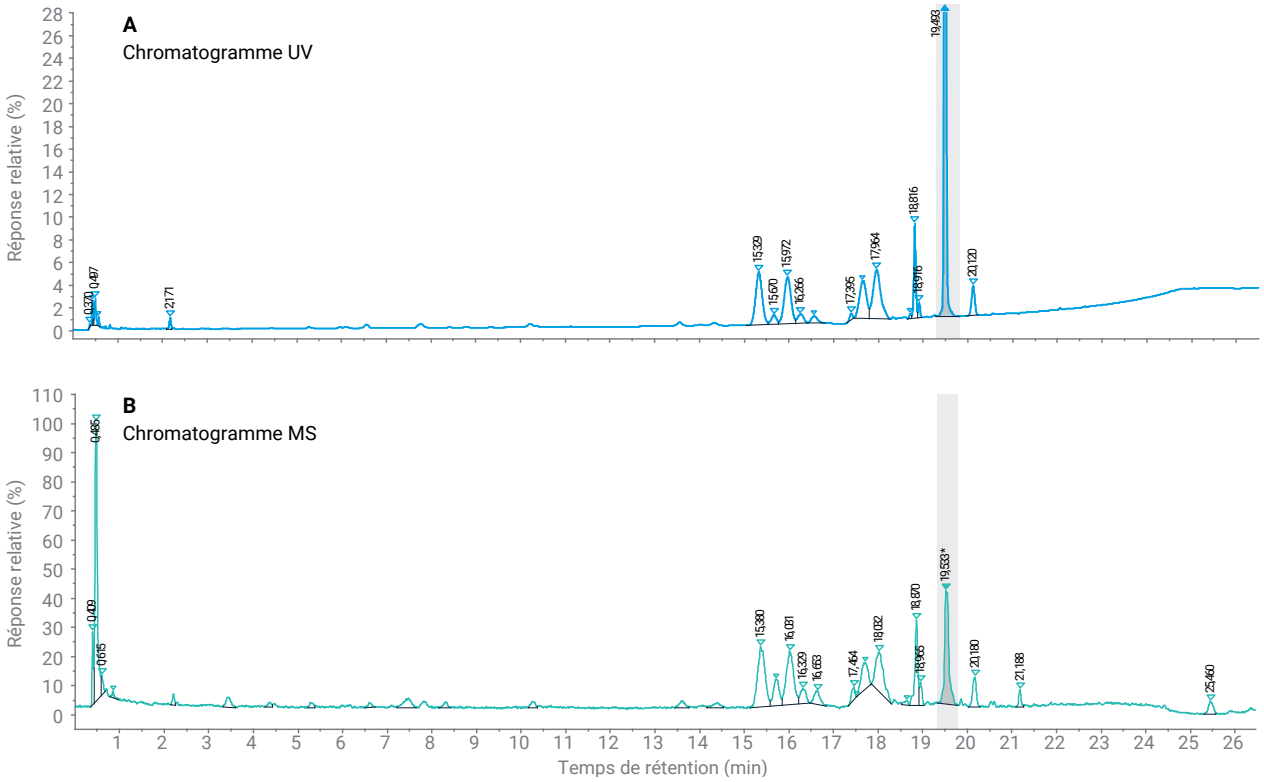


Figure 7. Chromatogramme UV du mélange de produits de dégradation obtenu sur une colonne Agilent EC-C18 2,1 × 100 mm, 1,9 µm, avec un gradient de 8,5 minutes, et spectres de masse du pic correspondant au principe actif.



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

Figure 8. Mélange de produits de dégradation : (A) chromatogramme UV et (B) chromatogramme MS obtenus avec le gradient final sur la colonne Agilent Poroshell EC-C18, et tableau MS des valeurs *m/z* de l'ensemble des pics.

Conclusion

Le criblage des colonnes a permis d'identifier la phase Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 comme la plus performante parmi les phases stationnaires évaluées pour l'analyse du profil d'impuretés de l'orforglipron. Elle a en effet offert les meilleurs résultats en termes de rétention du principe actif, de séparation des impuretés et de détection de leurs pics. Dans l'ensemble, l'acétonitrile a donné de meilleurs résultats que le méthanol, même si ce dernier a amélioré la sélectivité de la colonne Agilent InfinityLab Poroshell 120 PhenylHexyl.

L'optimisation complémentaire a montré qu'une augmentation de la longueur de la colonne et une réduction de la granulométrie amélioraient la résolution. La colonne Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 de 100 mm, présentant une granulométrie de 1,9 µm, a ainsi offert les meilleures performances. Si un gradient de 8,5 minutes suffisait à séparer les principales impuretés du principe actif, son allongement à 26 minutes a permis d'améliorer davantage la résolution du profil des impuretés. La méthode finale a permis d'analyser efficacement l'orforglipron et ses impuretés par détection UV et MS, notamment de détecter l'ion moléculaire protoné à *m/z* 883,4. Elle a donc été retenue comme méthode de référence pour l'analyse des impuretés.

www.agilent.com

DE-017712

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2026
Imprimé aux États-Unis, le 8 octobre 2026
5994-9501FR

Agilent
Trusted Answers