Nota applicativa

Biofarmaceutica/
Farmaceutica

Esplorazione della chimica di colonna per la degradazione forzata di un farmaco GLP-1 a piccole molecole

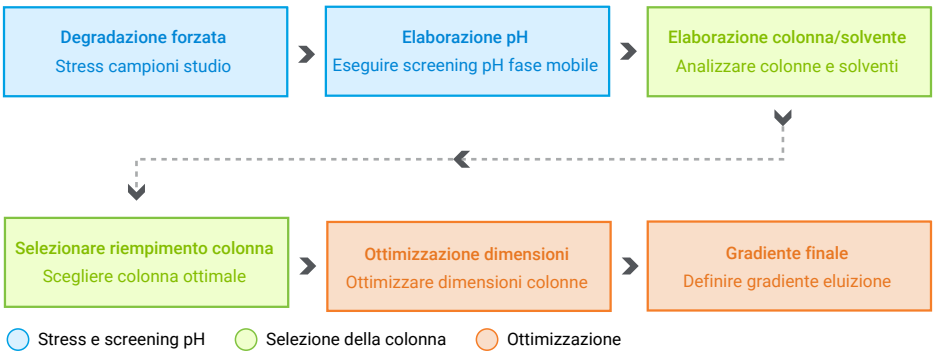
Autore

Emily Parry
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

L'orforglipron è un agonista orale e non peptidico del recettore del peptide-1 simile al glucagone (GLP-1) recentemente approvato, che rappresenta un avanzamento significativo rispetto alle tradizionali terapie con GLP-1 a base di peptidi iniettabili. Per supportare la profilazione delle impurezze e lo sviluppo di metodi, sono stati eseguiti studi sulla degradazione forzata per generare prodotti di degradazione tipici e contrastare condizioni di separazione cromatografica. È stato condotto uno studio sistematico di elaborazione del metodo di cromatografia liquida/spettrometria di massa (LC/MS) utilizzando sei tipologie di fasi stazionarie, tra cui C18, fasi a base fenilica, pentafluorofenil (PFP) e fasi in modalità mista, valutate con fasi mobili a base di acetonitrile e metanolo. Le prestazioni delle colonne sono state valutate in base alla ritenzione del principio attivo farmaceutico (API), alla separazione delle impurezze e al numero totale di picchi di impurezza rilevati. La colonna Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 ha fornito la migliore selettività complessiva e risoluzione delle impurezze. Un'ulteriore ottimizzazione mediante una colonna di 100 mm con particelle da 1,9 µm e un gradiente esteso di 26 minuti hanno migliorato in modo significativo la separazione dei prodotti di degradazione e delle impurezze correlate. Il metodo finale ha permesso una caratterizzazione mediante UV e MS dell'orforglipron e delle relative impurezze.

Elaborazione dei metodi LC sistematici per la separazione di prodotti di degradazione forzata dell'orforglipron



Introduzione

Gli agonisti del recettore GLP-1 sono un'importante classe di farmaci terapeutici utilizzati per il trattamento del diabete di tipo 2 e dell'obesità. Storicamente, la maggior parte delle terapie basate su GLP-1 sono state costituite da farmaci a base di peptidi che mostravano scarsa biodisponibilità orale a causa della degradazione enzimatica e dell'assorbimento limitato nel tratto gastrointestinale, rendendo necessaria la loro somministrazione mediante iniezione sottocutanea. Sebbene la semaglutide per via orale abbia dimostrato che le terapie con GLP-1 a base di peptidi possano essere somministrate per via orale, per superare queste problematiche sono necessarie formulazioni specifiche. L'approvazione dell'orforglipron (Figura 1) ha rappresentato un avanzamento significativo nel campo, in quanto si tratta di un agonista del recettore GLP-1 a piccola molecola non peptidico, che può essere somministrato per via orale, offrendo potenzialmente una maggiore praticità e un migliore accesso alle cure per i pazienti rispetto alle terapie iniettabili.

Con l'introduzione di questa nuova terapia, la caratterizzazione e il monitoraggio di potenziali impurezze sono fondamentali per garantire la qualità e la sicurezza del prodotto. Studi sulla degradazione forzata forniscono preziose informazioni sul profilo di stabilità del principio attivo farmaceutico (API) tramite generazione di prodotti di degradazione che potrebbero formarsi durante la produzione, lo stoccaggio o l'utilizzo. Le miscele di degradazione risultanti possono essere utilizzate per mettere alla prova i metodi cromatografici e assicurare una separazione adeguata dell'API dalle impurezze e dai prodotti di degradazione correlati. In questo studio è stato utilizzato un approccio di elaborazione del metodo LC/MS sistematico per sviluppare un metodo di profilazione delle impurezze per l'orforglipron. Sono state valutate sei tipologie di fase stazionaria con meccanismi di selettività distinti, includendo colonne a fase inversa, con selettività aromatica e in modalità mista, prima della selezione e dell'ottimizzazione del metodo cromatografico finale.

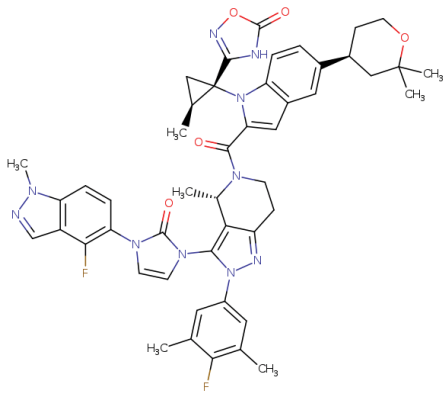


Figura 1. Struttura dell'orforglipron.

Condizioni sperimentali

Prodotti chimici

L'orforglipron è stato ottenuto da Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan). L'idrossido di ammonio di grado LC/MS e l'acido formico sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). L'acqua di grado LC/MS InfinityLab, l'acetonitrile e il metanolo sono stati utilizzati come solventi dei campioni e componenti di fasi mobili.

Strumentazione

Una pompa binaria Agilent 1290 Infinity II (G7120B) è stata abbinata a un driver valvola esterno e a una valvola di commutazione di solvente a 13 porte (G4235A) per facilitare l'elaborazione della fase mobile. I campioni sono stati introdotti mediante un multicampionatore Agilent (G7167B) in un comparto multicolonna termostatato (G7116B) dotato di una valvola di commutazione a 8 colonne (G4239C). La rilevazione delle impurezze è stata eseguita utilizzando un rivelatore a serie di diodi configurato in base alle impostazioni descritte nella Tabella 1. L'eluente è stato indirizzato successivamente al sistema Agilent InfinityLab LC/MSD Pro iQ per la rilevazione mediante spettrometria di massa. I parametri operativi della MS sono riepilogati nella Tabella 2. L'acquisizione e l'analisi dei dati sono state eseguite con Agilent OpenLab CDS versione 2.8.

Tabella 1. Impostazioni DAD.

DAD	
Parametro	**Impostazione**
Segnale	254 nm
Larghezza di banda	4
Velocità di campionamento	40 Hz
Spettro	Tra 190 e 400 nm
Passaggio	2 nm

Tabella 2. Impostazioni MS.

IQ Pro	
Parametro	**Impostazione**
Temperatura del gas	325 °C
Flusso del gas	11 L/min
Nebulizzatore	30 psi
Tensione capillare	3.500 V
Modalità di acquisizione	
Scan (+)	Da 70 a 1.000 *m/z*
SIM (+)	883,4 *m/z*

Preparazione del campione e degradazione forzata

Sono stati disciolti dieci milligrammi di orforglipron in 4 mL di acetonitrile:acqua 60:40 (v/v) e sonicati fino a completa dissoluzione. Aliquote di 900 µL di questa soluzione sono state trasferite in tre vial separate per studi di degradazione forzata. La degradazione è stata indotta mediante l'aggiunta di 100 µL di acido cloridrico 1 M (degradazione acida), 100 µL di idrossido di sodio 1 M (degradazione basica) o 100 µL di perossido di idrogeno al 30% (degradazione ossidativa).

I campioni di degradazione acida e basica sono stati riscaldati a 70 °C per 2 ore, mentre il campione di degradazione ossidativa è stato riscaldato a 70 °C per 1 ora. In seguito all'incubazione, i tre campioni degradati sono stati combinati per arrestare ulteriori reazioni di degradazione. La miscela risultante è stata trasferita in una vial per HPLC per analisi.

Inoltre, sono stati preparati e analizzati per confronto un vuoto di solvente e un campione di riferimento di orforglipron non degradato.

Elaborazione del metodo

In OpenLab, modifiche automatiche ai parametri del metodo possono essere ottenute tramite modifiche nel pannello delle sequenze. È possibile aggiungere alla sequenza una selezione di colonne di sovrascrittura del metodo, in modo da ignorare impostazioni del metodo specifiche (Figura 2). Ad esempio, quando viene installata una valvola di selezione a 8 colonne, è possibile valutare differenti riempimenti di colonna utilizzando lo stesso metodo mediante avanzamento della posizione della valvola nella lista di lavoro e mediante esecuzione di un metodo di equilibrazione breve prima dell'analisi dei campioni. Altri parametri disponibili per la sovrascrittura del metodo includono la temperatura della colonna, la composizione del gradiente iniziale e il flusso.

Sei colonne, tutte configurate come particelle 2,7 um, 2,1 × 50 mm, sono state selezionate per l'analisi e sono mostrate nella Tabella 3.

Tabella 3. Colonne per HPLC Agilent valutate.

Riempimento (2,1 × 50 mm, 2,7 µm)	Codice
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
Dimensioni aggiuntive	
Infinity Lab Poroshell EC-C18, 2,1 × 100, 2,7 µm	695775-902
Infinity Lab Poroshell EC-C18, 2,1 × 100, 1,9 µm	695675-902

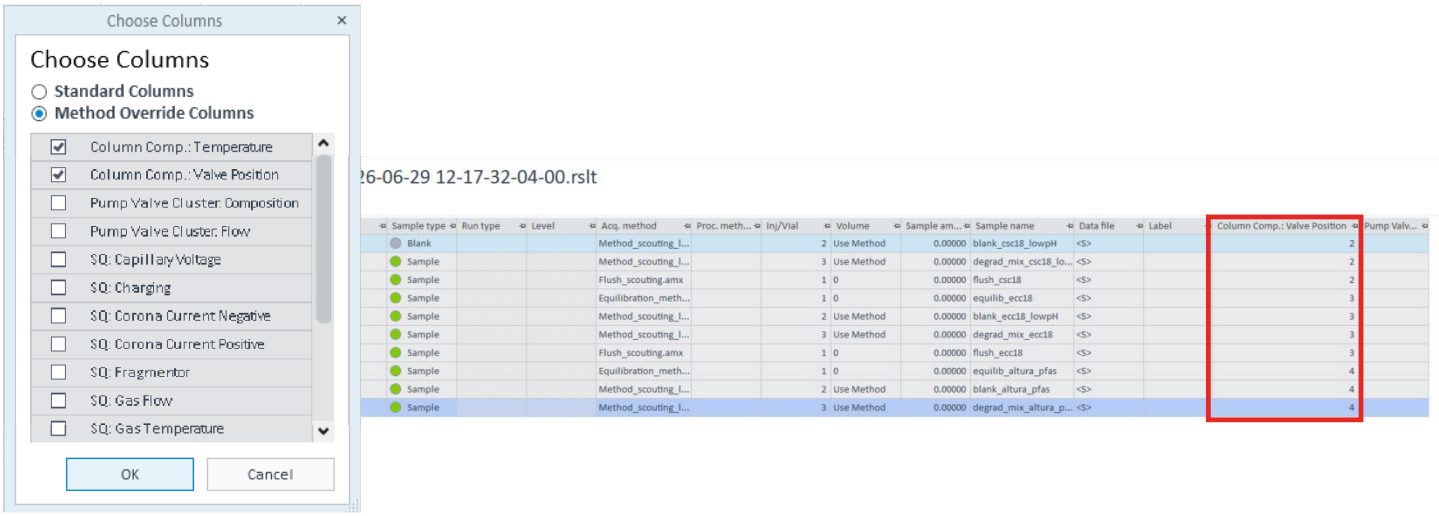


Figura 2. Colonne per la sovrascrittura del metodo OpenLab disponibili nel pannello delle sequenze.

Risultati e discussione

Risultati dell'elaborazione del metodo

L'ottimizzazione del pH iniziale è stata eseguita utilizzando la colonna Poroshell HPH-C18, in quanto compatibile con un'ampia gamma di pH. La fase mobile acquosa consisteva di acqua con acido formico allo 0,1% o idrossido di ammonio 10 mM ed è stata abbinata al modificatore corrispondente nella fase organica con acetonitrile. Dopo aver rilevato che le condizioni a basso pH hanno fornito una ritenzione migliore (Figura 3), è stata preparata una fase mobile organica a base di metanolo contenente acido formico allo 0,1% per essere integrata nel flusso di lavoro di analisi automatico mediante commutazione della valvola di selezione del solvente a 12 porte.

Nel gradiente di esplorazione iniziale, l'API e tutte le impurezze sono eluite entro una finestra di tempo di un minuto a una composizione di solvente ad alto contenuto organico. Un innalzamento delle linee di base al di sotto dei picchi ha indicato una significativa coeluizione. Per consentire una valutazione più efficace delle diverse composizioni chimiche della colonna, è stato sviluppato e utilizzato un gradiente poco ripido iniziando con un'elevata percentuale di solvente organico (Figura 4) per l'analisi di colonne aggiuntive.

Poroshell EC-C18 è stata inclusa perché la sua superficie e le sue caratteristiche a fase legata differiscono da quelle di Poroshell HPH-C18 e, pertanto, potevano fornire una ritenzione e una selettività complementari per l'orforglipron e i relativi prodotti di degradazione. La colonna Poroshell CS-C18 è stata inclusa perché la sua selettività C18 alternativa poteva migliorare potenzialmente la separazione delle impurezze, mentre la fase Poroshell PFP è stata valutata in ragione della sua esclusiva selettività rispetto a composti aromatici quali l'orforglipron. Anche la colonna Altura Poroshell PFAS è stata inclusa nello screening, in quanto il suo meccanismo di ritenzione a modalità mista fornisce una selettività che va oltre le interazioni a fase inversa tradizionali e poteva offrire vantaggi per risolvere impurezze che non vengono separate in modo adeguato sulle fasi C18 convenzionali.

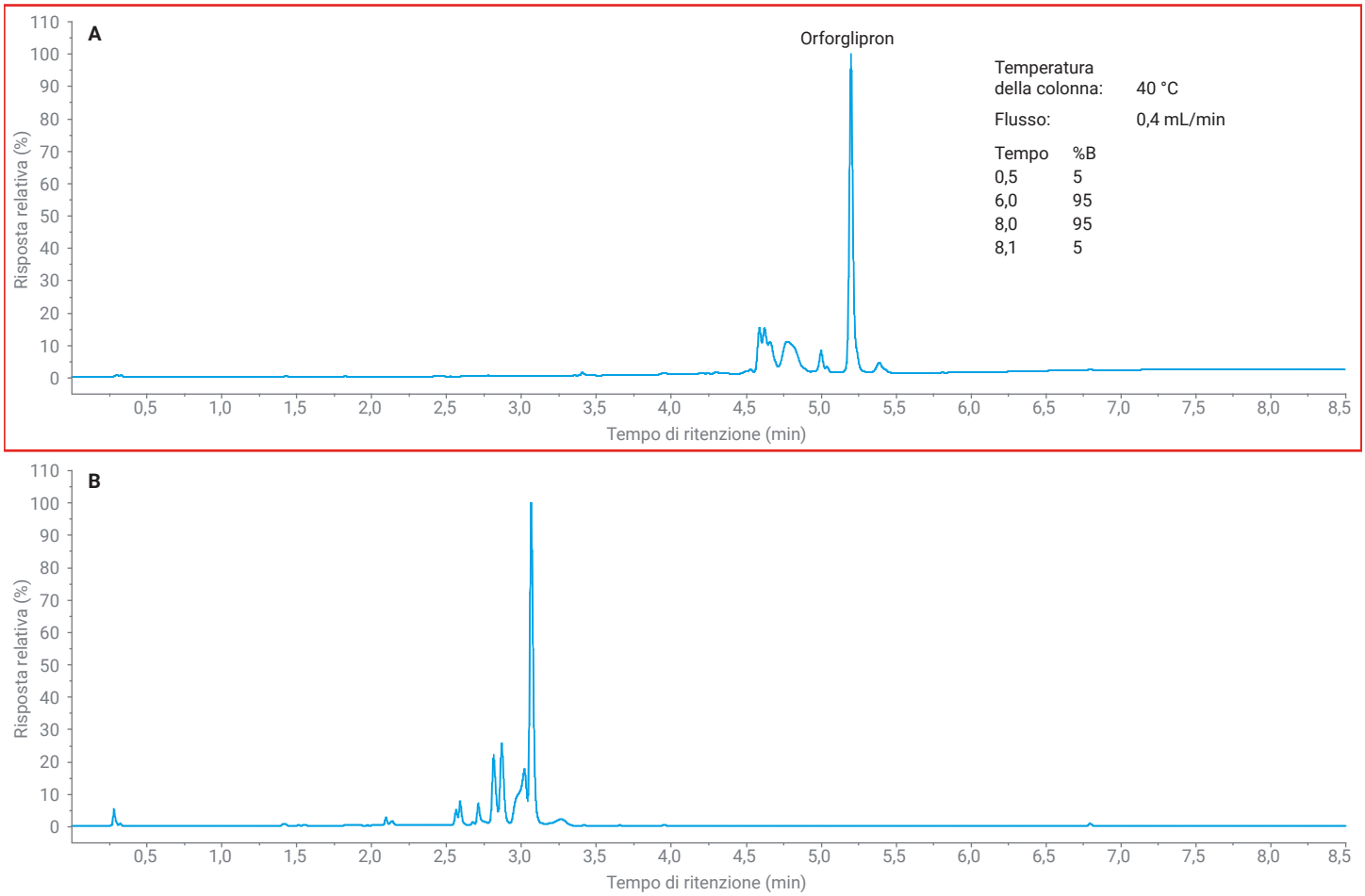


Figura 3. Cromatogrammi delle miscele di degradazione con una colonna Agilent Poroshell HPH-C18 con (A) gradiente acido formico e (B) gradiente idrossido di ammonio.

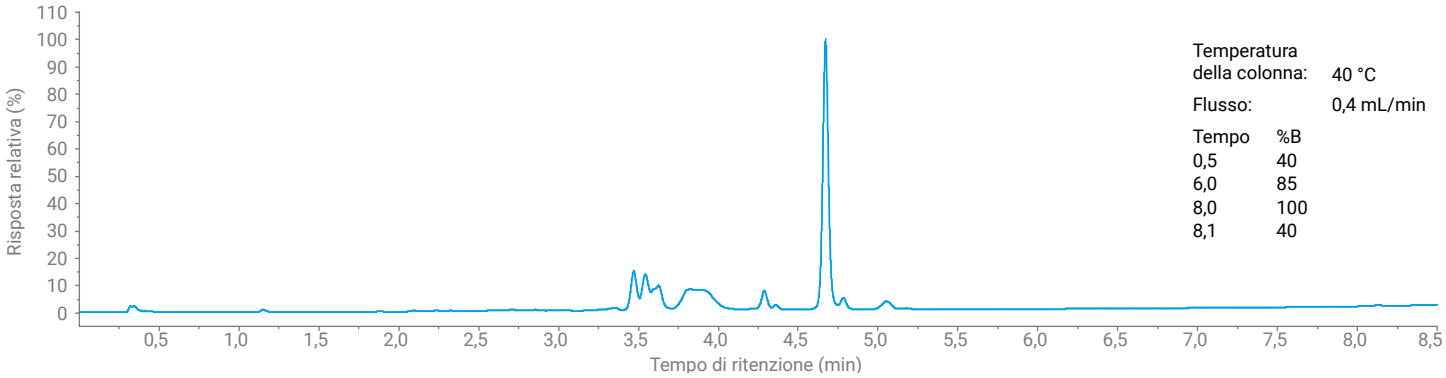


Figura 4. Cromatogramma delle miscele di degradazione con una colonna Agilent Poroshell HPH-C18 e un gradiente di esplorazione incentrato su pH basso.

La Figura 5 presenta i cromatogrammi relativi alle fasi stazionarie selezionate. Le prestazioni delle colonne sono state valutate utilizzando tre metriche principali: separazione di impurezze dall'API, ritenzione dell'API e il numero totale di picchi di impurezze rilevati. In base a questi criteri, la colonna Poroshell EC-C18 ha fornito le migliori prestazioni complessive.

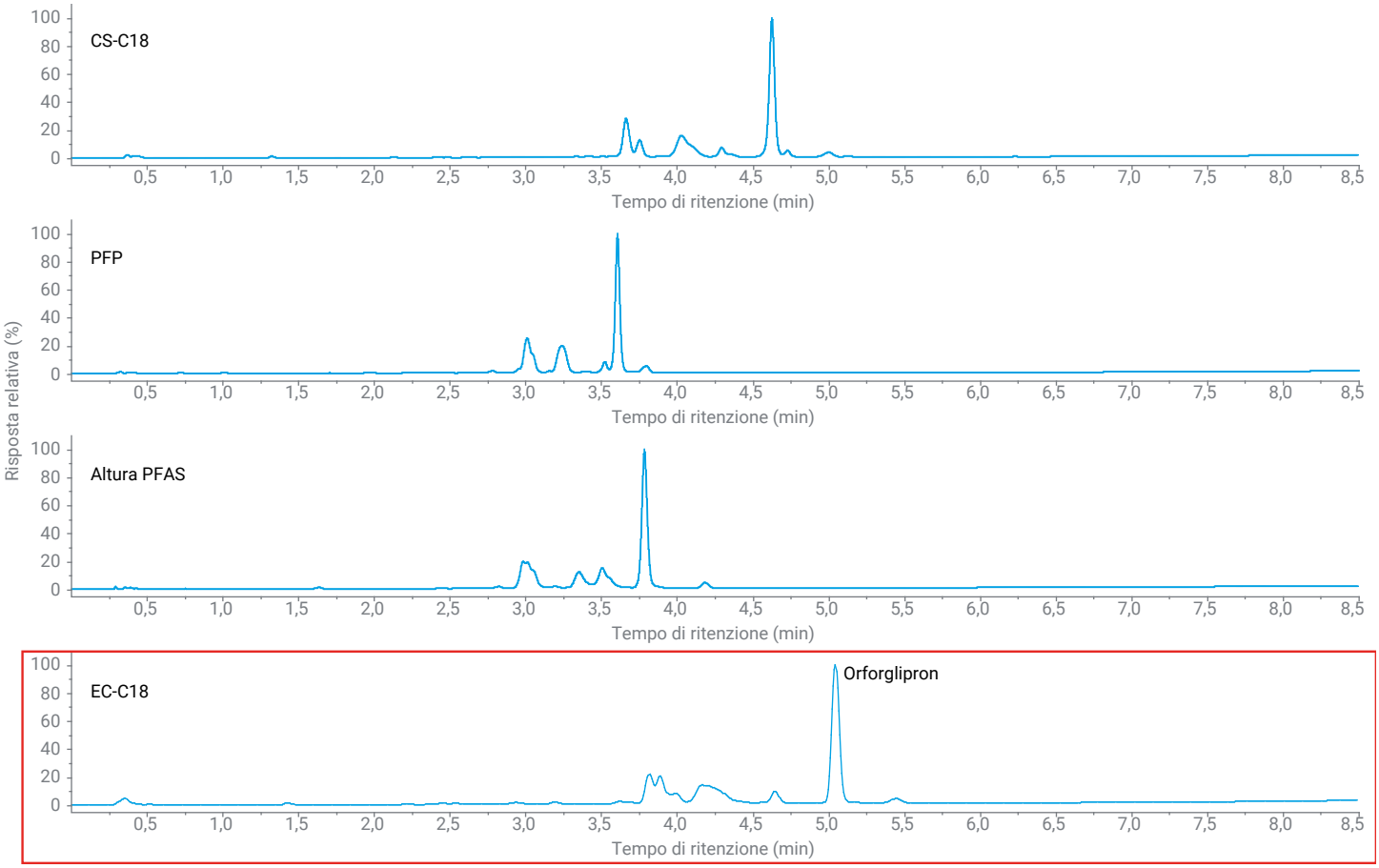


Figura 5. Cromatogrammi delle miscele di degradazione.

Tutte le colonne sono state valutate utilizzando acetonitrile e metanolo come modificatori organici. Nella maggior parte dei casi, l'acetonitrile ha fornito prestazioni superiori: una migliore separazione tra l'API e i picchi di impurezze. L'unica eccezione era la colonna PhenylHexyl. La Figura 6 confronta separazioni ottenute sulla colonna PhenylHexyl utilizzando (A) acetonitrile e (B) metanolo. Questa fase stazionaria è stata inclusa perché può fornire una selettività unica attraverso interazioni π-π con composti altamente aromatici quali l'orforglipron. Il metanolo è noto per alterare la selettività delle fasi di PhenylHexyl relative all'acetonitrile e, in questo caso, è stata osservata una maggiore separazione delle impurezze con il metanolo. Tuttavia, nessuna delle condizioni con PhenylHexyl ha superato la colonna Poroshell EC-C18, ne in termini di separazione delle impurezze dall'API né per quanto riguarda il numero totale di picchi di impurità rilevati.

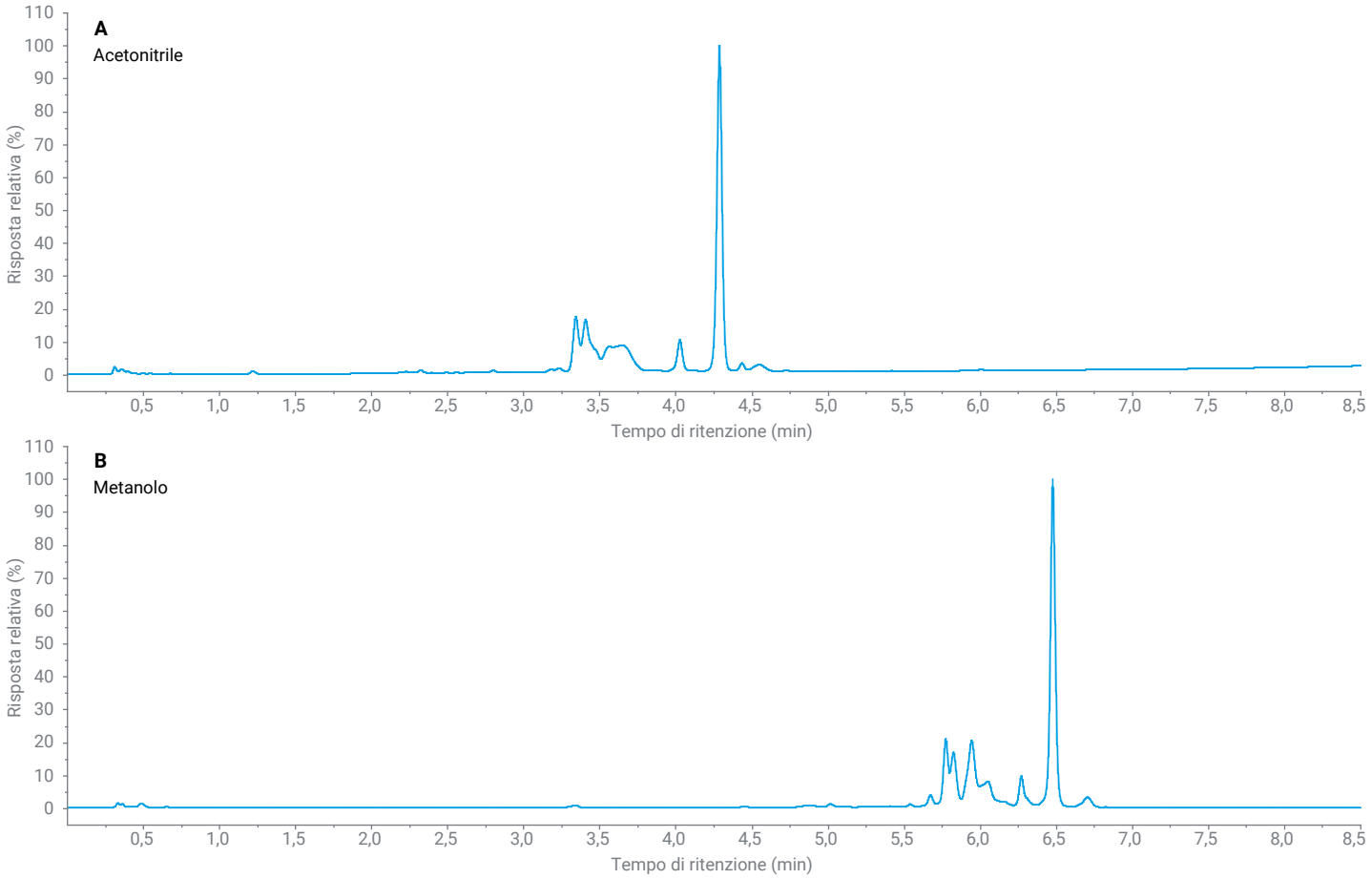


Figura 6. Cromatogrammi delle miscele di degradazione con una colonna Agilent Poroshell PhenylHexyl con (A) acetonitrile e (B) metanolo come fase mobile organica.

Ottimizzazione della separazione con Poroshell EC-C18

Un altro approccio per il miglioramento della risoluzione delle impurezze prevedeva l'incremento della lunghezza della colonna. Il riempimento della colonna Poroshell EC-C18 identificato durante lo screening iniziale è stato valutato in un formato di 100 mm con particelle di dimensioni pari a 2,7 e 1,9 µm utilizzando un gradiente da 8,5 minuti. La colonna da 100 mm × 1,9 µm ha fornito la migliore separazione complessiva ed è stata selezionata per un ulteriore sviluppo del metodo. Inoltre, lo spettro di massa dell'API ha mostrato uno ione molecolare protonato pulito a *m/z* 883,4 insieme a uno ione frammento nella sorgente a *m/z* 797,3, derivante da una perdita neutra (Figura 7).

Sebbene il gradiente da 8,5 minuti abbia fornito una separazione alla linea di base delle impurezze principali dall'API, un numero di picchi di impurezze restava risolto solo in parte. Per migliorare ulteriormente la risoluzione, è stato sviluppato un gradiente più lungo e completamente ottimizzato.

Il metodo finale prevedeva un gradiente da 26 minuti, che ha migliorato in modo significativo la separazione delle impurezze e ha permesso una caratterizzazione più completa del profilo delle impurezze (Tabella 4). Il gradiente iniziale poco ripido era necessario per separare completamente le impurezze. Cromatogrammi UV e MS rappresentativi ottenuti con il metodo ottimizzato sono mostrati nella Figura 8. La risoluzione migliorata ottenuta con il gradiente più lungo ha permesso di ottenere una migliore rilevazione e caratterizzazione di picchi di impurezze singoli, mantenendo al contempo una ritenzione e una forma dei picchi dell'API accettabili.

Tabella 4. Metodo LC ottimizzato finale per profilazione delle impurezze dell'orforglipron.

Parametro	Condizione finale
Colonna	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18
Dimensioni	2,1 × 100 mm, 1,9 µm
Fase mobile A	Acqua con acido formico allo 0,1%
Fase mobile B	Acetonitrile con acido formico allo 0,1%
Flusso	0,5 mL/min
Temperatura della colonna	40 °C
Volume di iniezione	1 µL
Programma gradiente	Tempo (min) %B 0,5 40 16 52 18,4 70 24 100

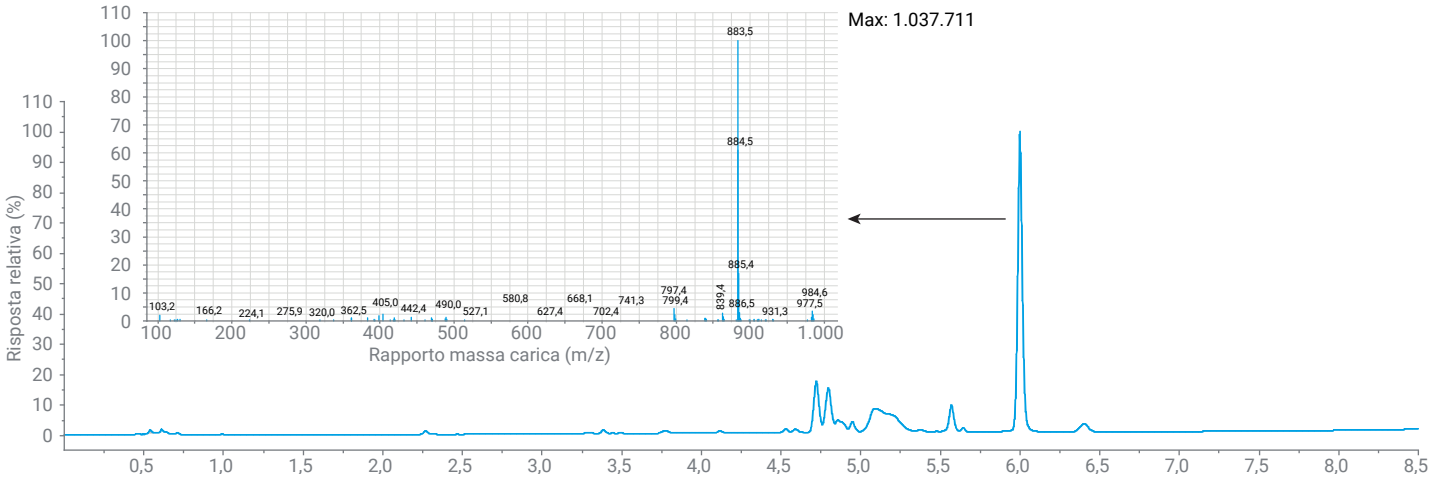
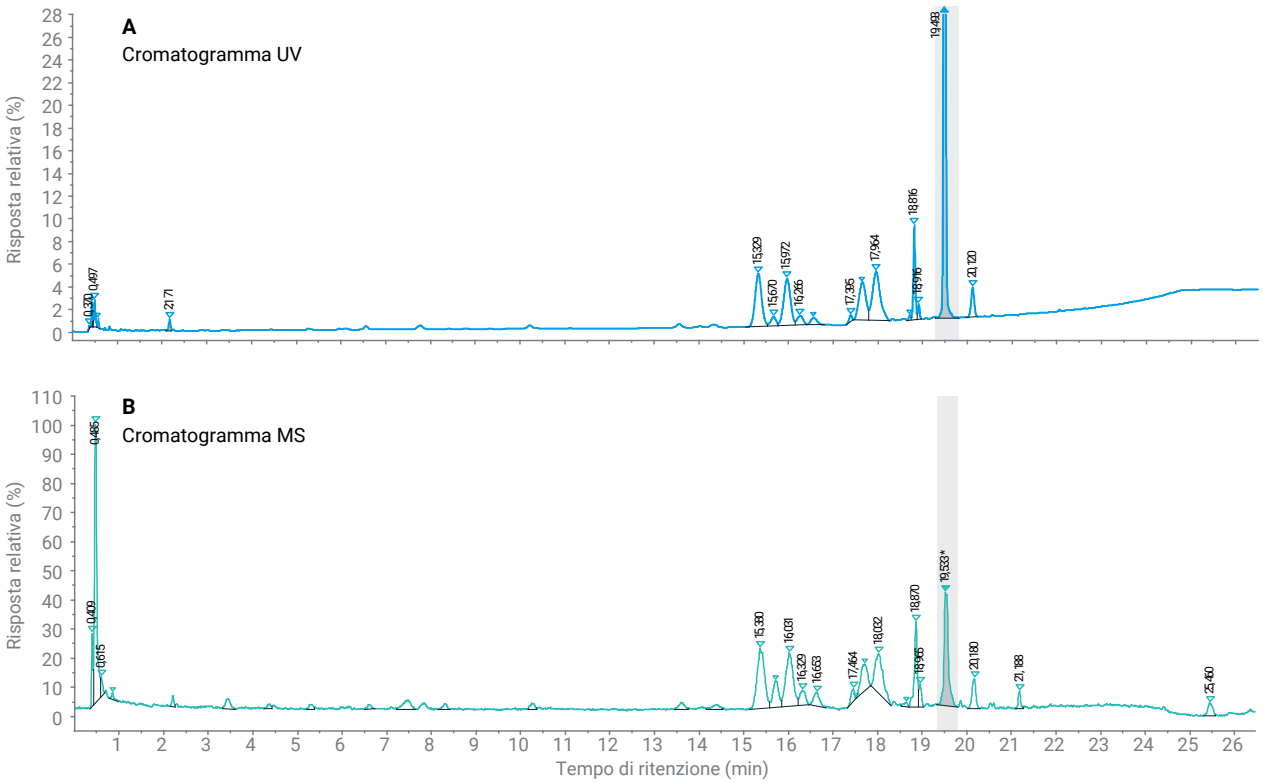


Figura 7. Cromatogramma UV della miscela di degradazione mediante una colonna Agilent EC-C18 2,1 × 100 mm, 1,9 µm, e un gradiente di 8,5 minuti e spettri MS del picco dell'API.



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

Figura 8. Cromatogramma UV (A) e cromatogramma MS (B) della miscela di degradazione utilizzando il gradiente finale per la colonna Agilent Poroshell EC-C18 e tabella MS di tutti i valori *m/z* dei picchi.

Conclusione

Lo screening delle colonne ha identificato la fase di Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 come la migliore opzione complessiva tra le fasi stazionarie valutate per la profilazione delle impurezze di orforglipron, fornendo una ritenzione dell'API, una separazione delle impurezze e un rilevamento dei picchi di impurezza di livello superiore. In generale, l'acetonitrile ha prodotto separazioni migliori rispetto al metanolo, sebbene quest'ultimo abbia migliorato la selettività sulla colonna Agilent InfinityLab Poroshell 120 PhenylHexyl.

Un'ulteriore ottimizzazione ha dimostrato che l'incremento della lunghezza della colonna e la riduzione delle dimensioni delle particelle migliorano la risoluzione; in particolare la colonna Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 da 100 mm impaccata con particelle di 1,9 µm ha fornito le migliori prestazioni. Sebbene un gradiente da 8,5 minuti abbia separato le principali impurezze dall'API, l'estensione del gradiente a 26 minuti ha migliorato ulteriormente la risoluzione del profilo delle impurezze. Il metodo finale ha permesso un'analisi UV e MS efficace dell'orforglipron e delle relative impurezze, inclusa la rilevazione dello ione molecolare protonato a *m/z* 883,4, ed è stato selezionato come approccio preferenziale per l'analisi delle impurezze.

www.agilent.com

DE-017712

Le informazioni fornite sono soggette a modifica senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2026
Stampato negli Stati Uniti, 8 ottobre 2026
5994-9501ITE

Agilent
Trusted Answers