

Agilent InfinityLab LC/MSD 및 OpenLab CDS 디콘볼루션을 사용한 펩타이드 의약품 안정성 분석

저자

유재영
Agilent Technologies, Inc.

개요

미국 식품의약국(FDA) 제네릭 의약품 허가 신청(ANDA) 가이드라인에서는 면역원성의 가능성으로 인해 펩타이드 관련 불순물의 정성적 및 정량적 관리를 권고합니다. 이 응용 자료는 GLP-1 작용제 펩타이드를 사용한 안정성 분석에서 발생하는 불순물의 분석 및 식별을 집중적으로 소개합니다. 테스트는 산성, 염기성 및 산화 조건에서 리라글루타이드와 세마글루타이드에 대해 수행되었습니다. 분석은 Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC, InfinityLab LC/MSD 시스템 및 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 1.9µm 컬럼을 사용하여 수행되었습니다. 또한 Agilent OpenLab CDS 소프트웨어 버전 2.8의 디콘볼루션 기능을 사용하여 생성물의 질량을 생성하는 것이 입증되었습니다. 이러한 테스트를 통해 리라글루타이드와 세마글루타이드의 주요 강제 분해 불순물의 분자량을 확인할 수 있었습니다.

소개

전통적인 펩타이드 의약품은 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조되었습니다. 최근에는 여러 치료용 펩타이드 생산업체가 대규모 합성 기술을 적용하여 벌크 원료 의약품(API)용 고순도 합성 펩타이드 제조의 기반을 마련했습니다. 새로운 제조법의 개발에 맞춰 FDA는 합성 펩타이드 완제의약품에 대한 ANDA 가이드라인을 발표하여 API 제조업체가 테스트 및 분석 절차를 개발하는 데 도움을 주고 있습니다.¹

그러나 합성 펩타이드로의 전환은 제조법의 변화로 인한 임상효과 및 안전성 프로파일의 변화에 대한 우려를 불러일으키고 있습니다. 중복된 아미노산이나 측쇄 변형으로 인해 API에서 분리하기 어려운 불순물이 생성될 수 있으며 면역원성을 나타낼 수 있습니다.² 따라서 FDA 가이드라인에서는 일반 펩타이드 완제의약품 중 펩타이드 관련 불순물이 대조의약품(RLD)의 불순물을 초과하지 않거나, 면역원성을 고려하여 신규 펩타이드 관련 불순물이 주성분의 0.5%를 초과하지 않도록 권고하고 있습니다.¹ 이러한 목표를 달성하려면 불순물을 적절하게 분리하고 검출할 수 있는 분석법이 필요합니다.

합성 펩타이드 완제의약품의 합성 과정에서 발생하는 불순물을 관리하는 것은 매우 중요합니다. 또한, 부형제에서 발생하는 불순물, 완제의약품 제조 프로세스, 보관 조건 등에 대한 분석도 필요합니다. 일반적으로 장기 가속 안정성 연구가 수행되지만 제제의 적합성, API 특성 및 잠재적 불순물 프로파일을 조기에 식별하려면 가속 안정성 지시 테스트가 필요합니다. 의약품 개발 초기 단계에서 각 불순물에 대한 시퀀스 정보를 식별하려면 고분해능 MS가 필요합니다. 반면, SQ MS를 사용하면 의약품 제제의 불순물 모니터링, 안정성 연구 및 품질 관리를 달성할 수 있습니다. 또한 OpenLab CDS 2.8의 디콘볼루션 기능은 펩타이드 불순물의 다중 전하 및 부가물 해석을 용이하게 합니다.³

이 응용 자료에서는 InfinityLab LC/MSD와 함께 리라글루타이드 및 세마글루타이드를 사용하여 안정성 지시 테스트의 예시를 제시했으며, 주요 불순물의 raw MS 스펙트럼에서 디콘볼루션을 통해 얻은 원형(intact) 분자량을 확인했습니다. 테스트는 가용성에 따라 두 개의 SQ MS 기기(InfinityLab LC/MSD iQ 및 XT)를 사용하여 수행되었습니다. 이를 통해 펩타이드 관련 불순물의 분자량 확인에 있어 InfinityLab LC/MSD iQ와 InfinityLab LC/MSD XT 모두 충분한 성능을 입증했습니다.

실험

기기

- Agilent 1260 Infinity II Bio flexible 펌프(G7131C)
- Agilent 1290 Infinity II Bio multisampler(G7137A), 시료 온도 조절 장치 포함
- Agilent 1290 Infinity II 멀티 컬럼 온도 조절 장치 (G7116B), Quick Connect bio heat exchanger standard flow(G7116-60071) 포함
- Agilent 1290 Infinity II 다이오드 어레이 검출기(DAD) HS (G7117B), Bio-Inert Max-Light 카트리지 셀, 60mm(G5615-60017) 장착
- Agilent InfinityLab LC/MSD iQ (G6160A)
- Agilent InfinityLab LC/MSD XT (G6135C)

시약

Difluoroacetic acid (DFA)과 hydrochloric acid (HCl)은 Sigma-Aldrich에서, sodium hydroxide (NaOH)과 hydrogen peroxide (H_2O_2)는 Merck에서, acetonitrile (ACN)은 B&J에서 구입했습니다.

시료

리라글루타이드는 한국 Kairos Tech을 통해 구매했습니다. 리라글루타이드를 물에 1mg/mL의 농도로 용해시켰습니다. 리라글루타이드 1mg/mL (1mL) 용액을 100μL의 1M HCl, 1M NaOH 또는 2% H_2O_2 를 첨가한 후 60°C에서 가열했습니다. 시료는 즉시 채취되었으며, 1일과 2일 후에 채취되었습니다. 샘플링 후, 100μL의 1M NaOH 및 1M HCl을 첨가하여 각각 0.1M HCl 및 0.1M NaOH 조건에서 시료를 중화했습니다.

세마글루타이드는 현지 고객으로부터 제공받았습니다. 세마글루타이드를 1mg/mL의 농도로 30% ACN에 용해시켰습니다. 그런 다음 용액 1mL를 취하고 1M HCl 100μL를 첨가했습니다. 혼합물을 80°C 에서 하루 동안 가열한 후, 100μL의 1M NaOH로 중화시켰습니다.

컬럼

이 응용 자료에서 사용된 컬럼은 다음과 같습니다.

- Agilent AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼, 2.1 × 150mm, 2.7μm(제품 번호 653750-902)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 컬럼, 2.1 × 100mm, 1.9μm(제품 번호 695675-902)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 컬럼, 2.1 × 150 mm, 1.9μm(제품 번호 693675-902)

분석법

표 1. 분석법 확인을 위한 Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC 및 Agilent InfinityLab LC/MSD iQ 의 분석법 파라미터.

파라미터	값
Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC	
컬럼	Agilent AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼, 120 Å, 2.1 × 150mm, 2.7µm
유속	0.4mL/분
컬럼 온도	40°C
주입량	5µL
이동상	A: 0.1% DFA가 함유된 물 B: 0.1% DFA가 함유된 ACN
그레디언트-컬럼 스크리닝	시간 %A %B
	0 80 20
	1 80 20
	20 30 60
	25 10 90
	25.1 80 20
	30 80 20
검출기	UV 280nm(DAD HS, Bio-Inert Max-Light 카트리지 셀 포함, 60mm)
Agilent InfinityLab LC/MSD iQ 파라미터	
이온화원	ESI (+)
소스 파라미터	가스 온도: 325°C 가스 유속: 11L/분 네불라이저: 45psi 캐필러리 전압: 4,500V
수집	스캔 범위: 300-1,450m/z Fragmentor: 150V 스캔 시간: 997ms(1Hz) 게인: 5 보관: Centroid

표 2. 안정성 지시 테스트를 위한 Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC 및 Agilent InfinityLab LC/MSD iQ의 분석법 파라미터.

파라미터	값
Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC	
컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell EC-C18 컬럼, 120Å, 2.1×250mm, 1.9µm (100mm와 150mm를 직렬로 연결)
유속	0.4mL/분
컬럼 온도	40°C
주입량	5µL
이동상	A: 0.1% DFA가 함유된 물 B: 0.1% DFA가 함유된 ACN
그레디언트-컬럼 스크리닝	시간 %A %B
	0 80 20
	1 80 20
	120 30 60
	125 10 90
	130 10 90
	130.1 80 20
	140 80 20
검출기	UV 280nm(DAD HS, Bio-Inert Max-Light 카트리지 셀 포함, 60mm)

Agilent InfinityLab LC/MSD iQ 파라미터	
파라미터	값
이온화원	ESI (+)
소스 파라미터	가스 온도: 325°C 가스 유속: 11L/분 네불라이저: 45psi 캐필러리 전압: 4,500V
수집	스캔 범위: 300-1,450m/z Fragmentor: 150V 스캔 시간: 997ms(1Hz) 게인: 5 보관: Profile

표 3. Agilent InfinityLab LC/MSD XT 데이터 수집 파라미터.

파라미터	값
이온화원	ESI (+)
소스 파라미터	가스 온도: 325°C 가스 유속: 11L/분 네불라이저: 45psi 캐필러리 전압: 4,500V
수집	스캔 범위: 300-1,450m/z Fragmentor: 150V 스캔 시간: 997ms(1Hz) 게인: 1 보관: Profile

표 4. MS 스펙트럼 디콘볼루션 설정.

파라미터	값
기본 설정	
m/z 범위 사용	선택되지 않음
저/고분자량	2,500-8,000
최대 전하	10
세트의 최소 피크	3
고급 설정	
MW Agreement(0.01%)	10
상대 존재비 임계값(%)	50
MW 알고리즘	곡선 피팅
MW 알고리즘 임계값	40%
엔벨로프 임계값(%)	50%

소프트웨어

Agilent OpenLab CDS 소프트웨어 버전 2.8을 스펙트럼 디콘볼루션에 사용하였습니다.

결과 및 토의

불순물 분리능 향상을 위한 얇은 그레디언트 조건 설정

리라글루타이드 불순물을 분석하기 위해 산성 개질제로 0.1% DFA와 AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼을 사용하여 LC/MS 분석을 수행했습니다. 1mg/mL의 리라글루타이드 분석에서 UV 및 MS 크로마토그램 모두에서 불순물 피크를 확인할 수 있었습니다. 원형(intact) 리라글루타이드의 MS 스펙트럼은 총 이온 크로마토그램(TIC)의 주 피크에서 파생되었습니다(그림 1). 그러나 이 분석에서 불순물과 주요 화합물 간의 크로마토그래피 분리능이 부족하면 불순물의 정성적, 정량적 평가에 어려움이 따릅니다.

분리능을 향상시키기 위해 컬럼 길이를 늘리고 고정상의 입자 크기를 줄였습니다. 또한 그레디언트 기울기를 줄였습니다. 그림 1에서 16분에서 20분 사이에 관찰된 피크를 분리하기 위해 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 컬럼, 1.9 μ m, 2.1 $\times$ 100mm, 150mm를 직렬로 연결하여 컬럼 길이를 늘렸습니다. 그레디언트의 기울기는 약 0.34% B/분으로 변경했습니다. 그림 2에서 볼 수 있듯이 이전 실험에 비해 불순물 분리능이 향상되었습니다.

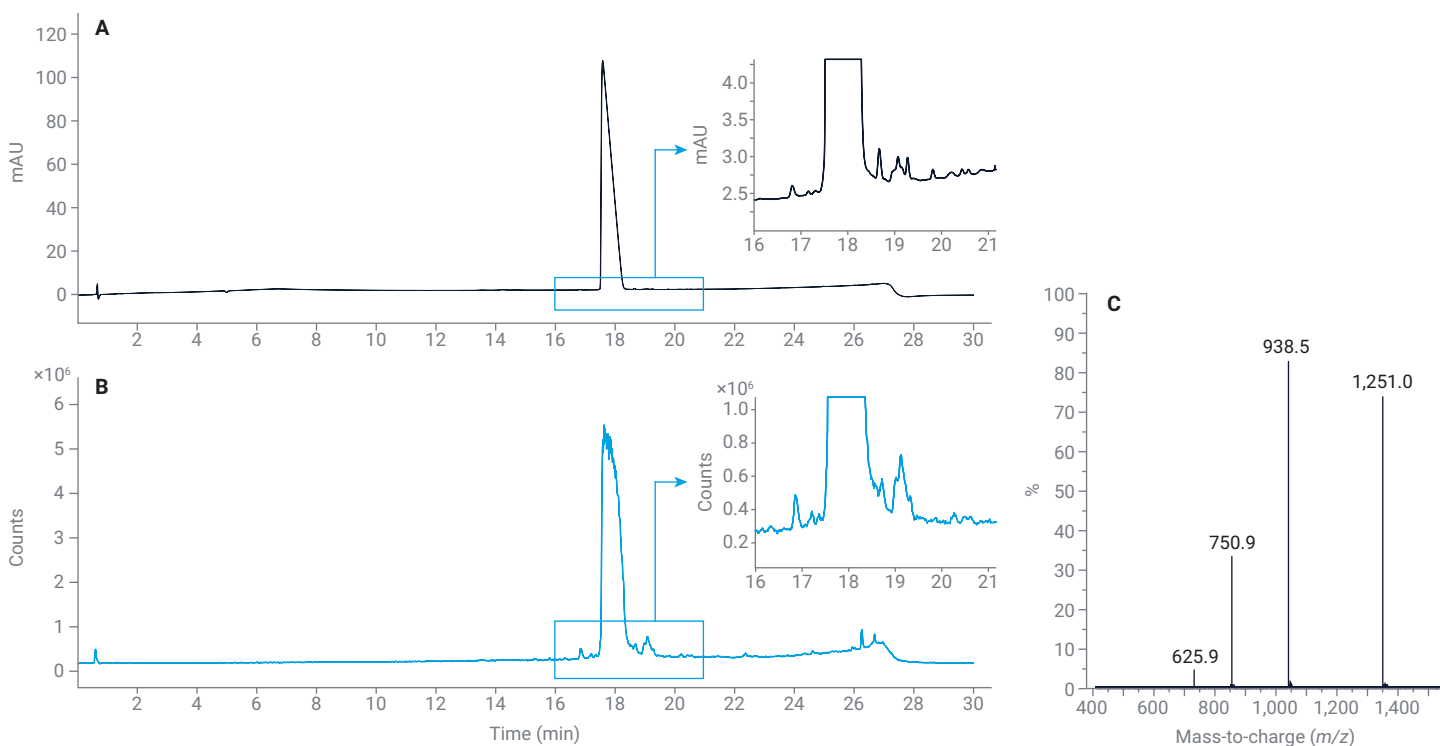


그림 1. UV 크로마토그램(A). 리라글루타이드 1mg/mL의 MS TIC(B). 리라글루타이드의 MS 스펙트럼(C).

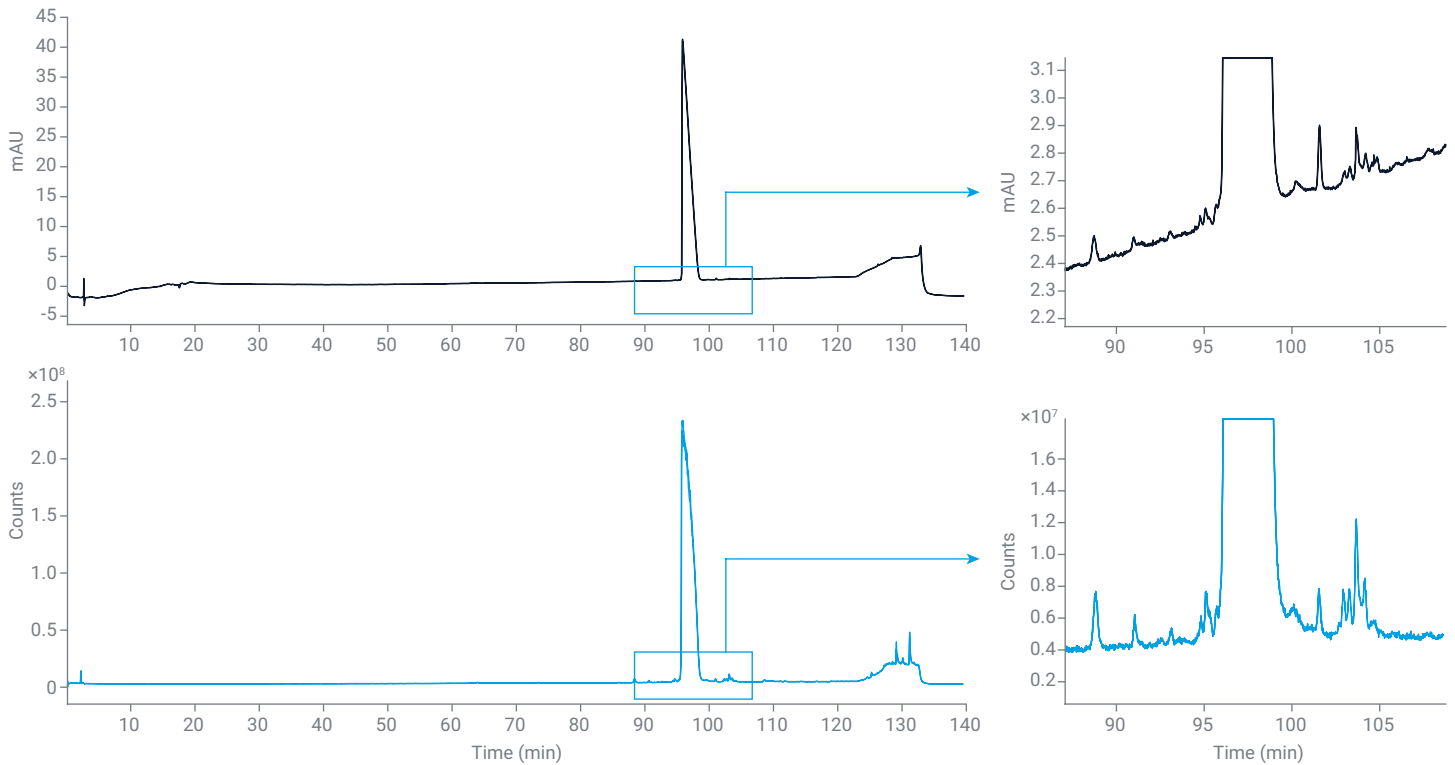


그림 2. Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 컬럼, 1.9 μ m, 2.1 $\times$ 250mm(100 + 150mm)를 사용한 리라글루타이드의 크로마토그램. (검정색: UV; 파란색: TIC.)

리라글루타이드의 안정성 시험

리라글루타이드 분해로 인한 잠재적 불순물을 분석하기 위해 시료를 0.1M HCl을 사용하는 산성 조건, 0.1M NaOH를 사용하는 염기성 조건, 0.2% H₂O₂를 사용하는 산화 조건에 노출시켰습니다. 시료는 즉시, 그리고 노출 후 1-2일 후에 수집되었습니다. 각 샘플링 지점 직후에 시료를 동등한 양의 NaOH 및 HCl로 중화한 다음 강제 분해 프로파일링을 위해 표 2에 설명된 분석법에 따라 분석했습니다(그림 3). 염기성 조건에서 리라글루타이드의 분해가

가장 두드러졌습니다. 산성 및 산화성 조건에서는 주 피크 옆에 다양한 불순물 피크가 관찰되었습니다. 산성 및 산화성 조건에서 머무름 시간이 다른 피크는 불순물이 다를 수 있습니다. 이는 TIC에서 관찰된 차이로 확인되었으며, 다양한 조건에 대한 다양한 유형의 불순물 프로파일을 나타냅니다.

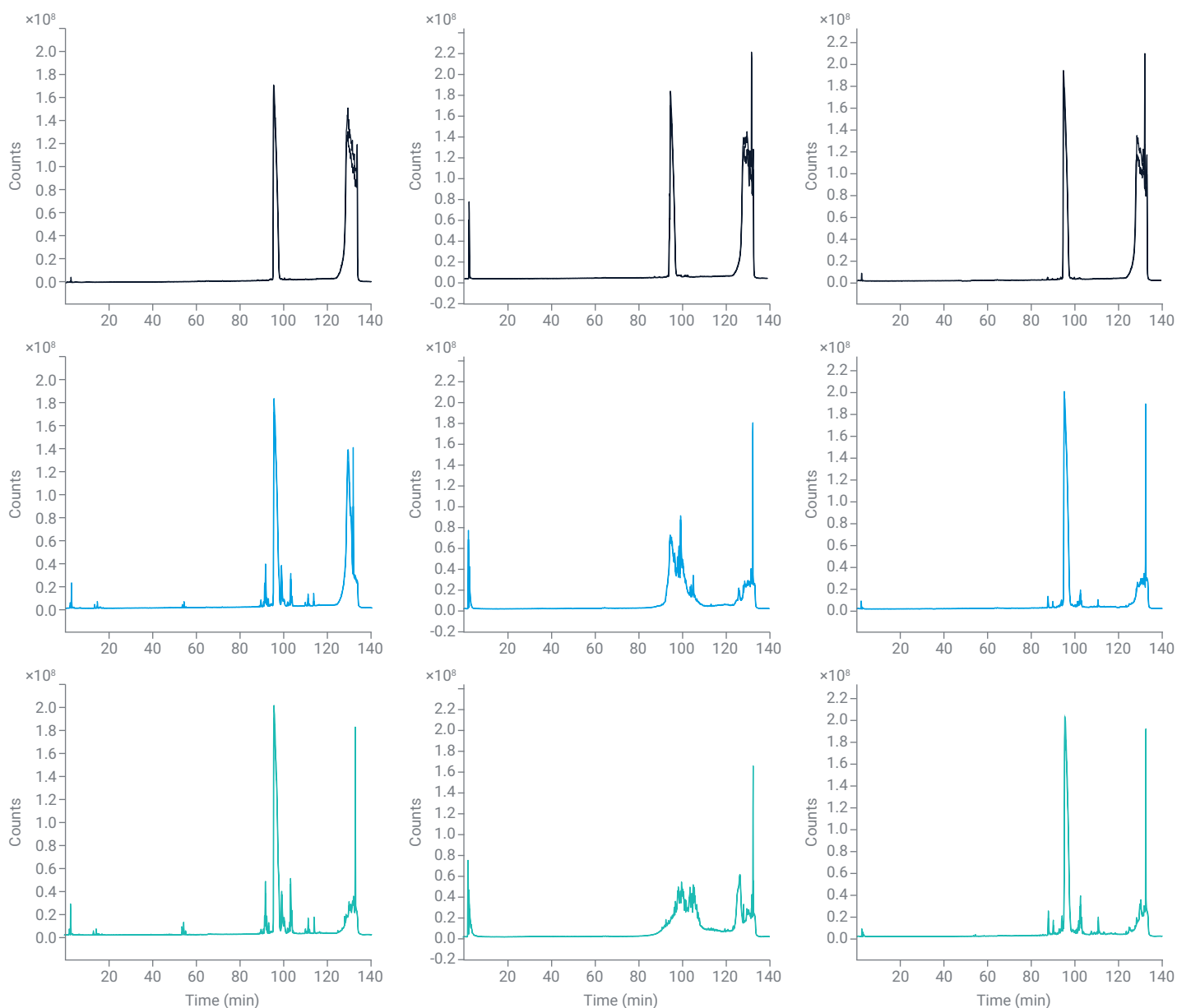
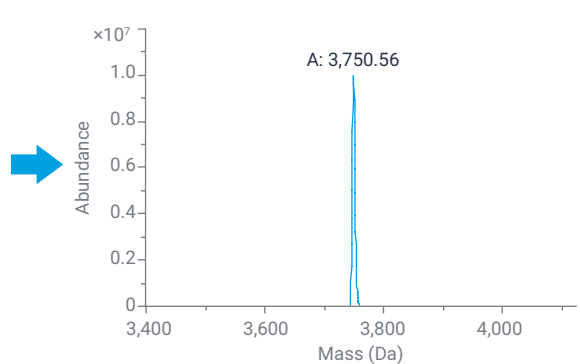
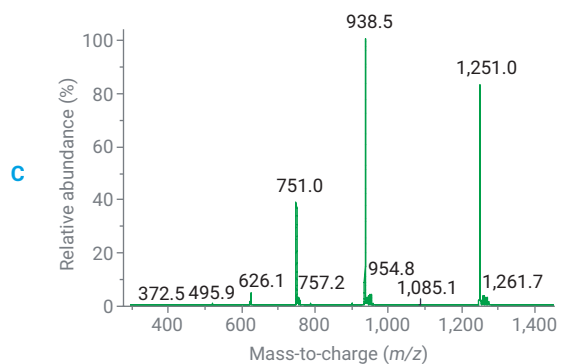
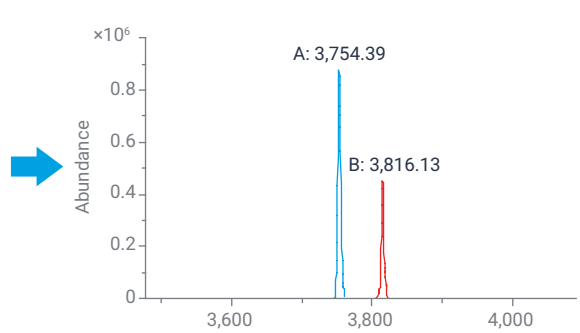
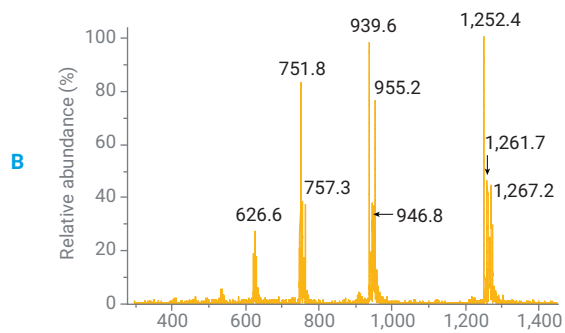
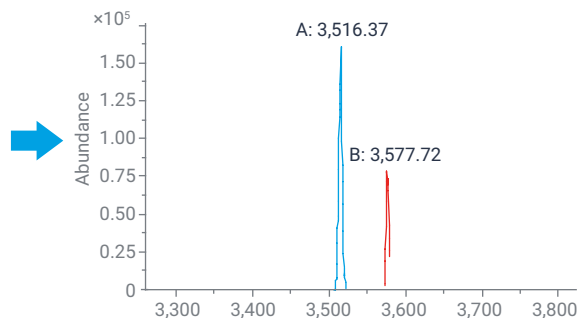
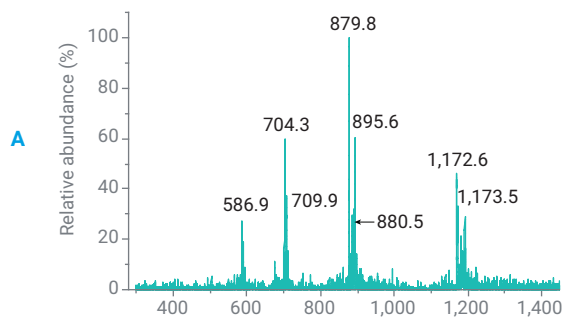
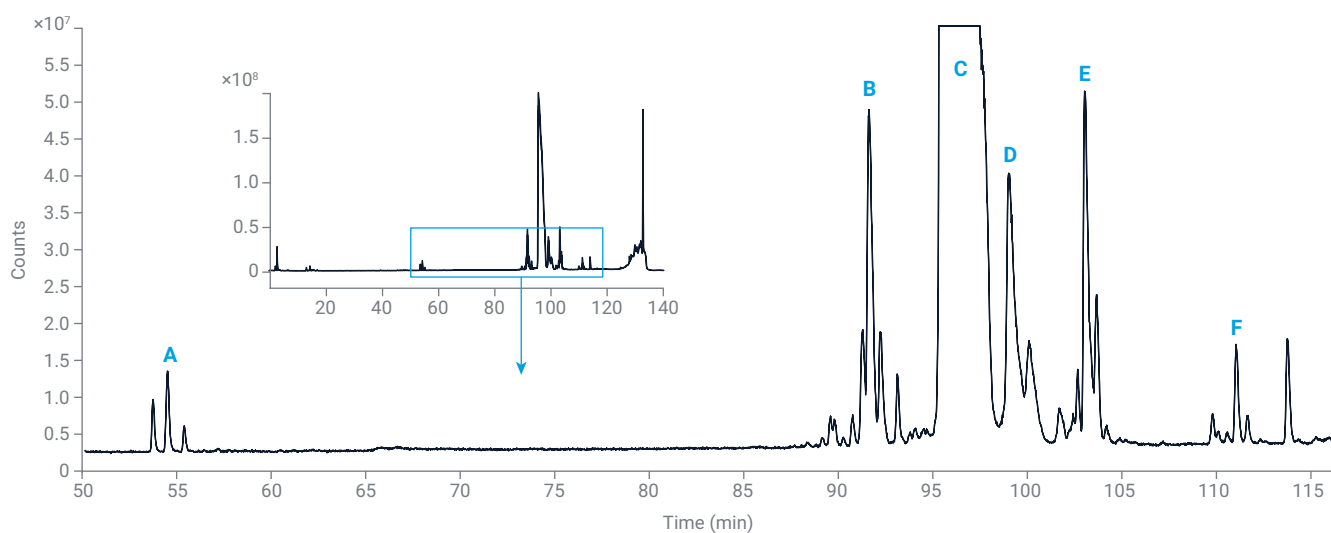


그림 3. Agilent InfinityLab LC/MSD iQ를 사용한 리라글루타이드의 강제 분해 TIC 프로파일. 상단, 중간, 하단 행은 각각 즉시, 1일 후, 2일 후 시료 수집을 나타냅니다. 왼쪽에서 오른쪽 열은 각각 산성(0.1M HCl), 염기성(0.1M NaOH) 및 산화성(0.2% H₂O₂)에 대한 노출을 나타냅니다.

OpenLab CDS 2.8의 디콘볼루션 기능을 이용한 리라글루타이드 불순물 MS 스펙트럼 확인

설명을 위해 OpenLab CDS 2.8의 디콘볼루션 기능을 사용하여 산성 조건에서 60°C에서 이들 동안 가열된 시료의 MS TIC로부터 MS 스펙트럼과 주 피크의 분자량을 추출했습니다. 6개의 대표 피크에 대한 디콘볼루션 결과는 그림 4와 표 5에 나와 있습니다.



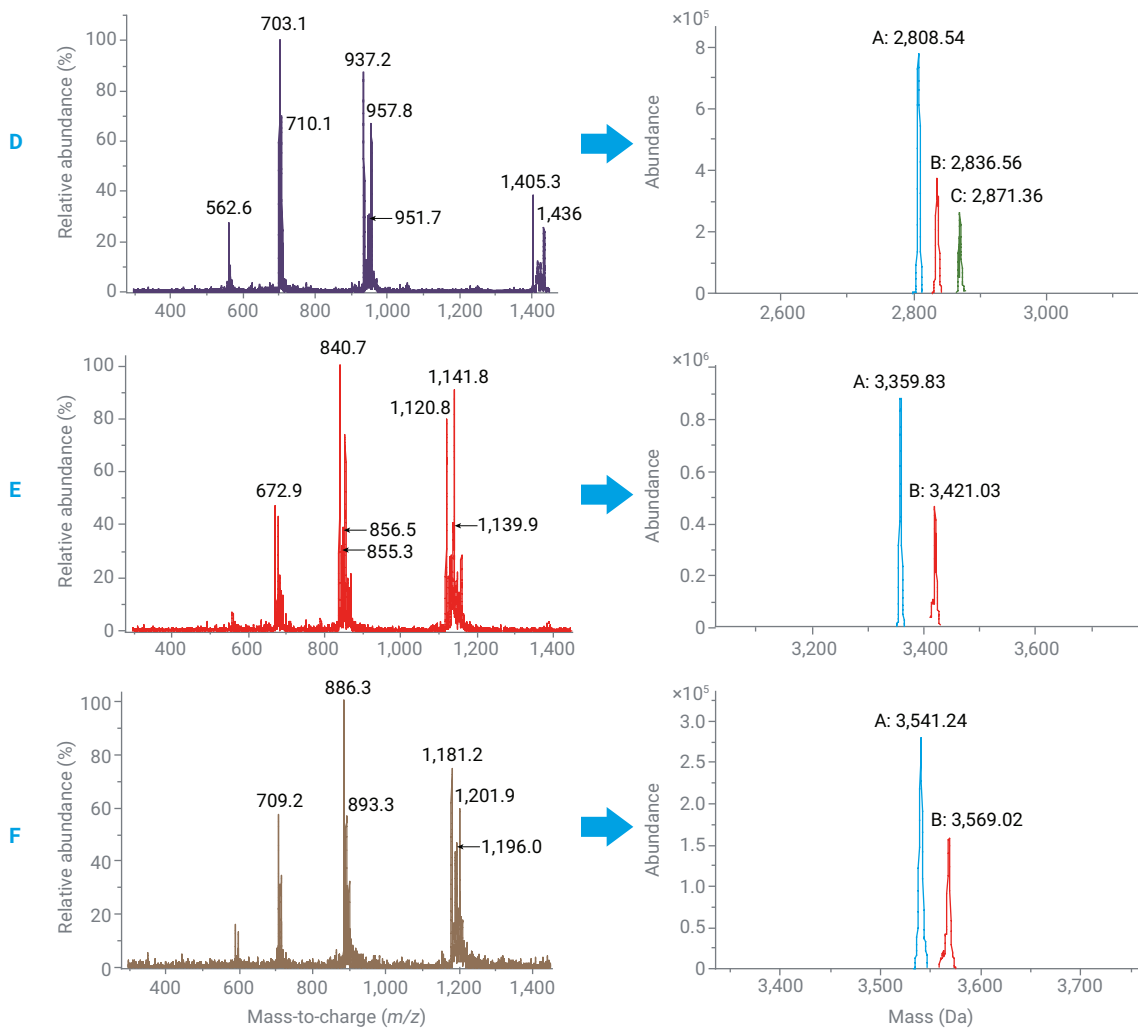


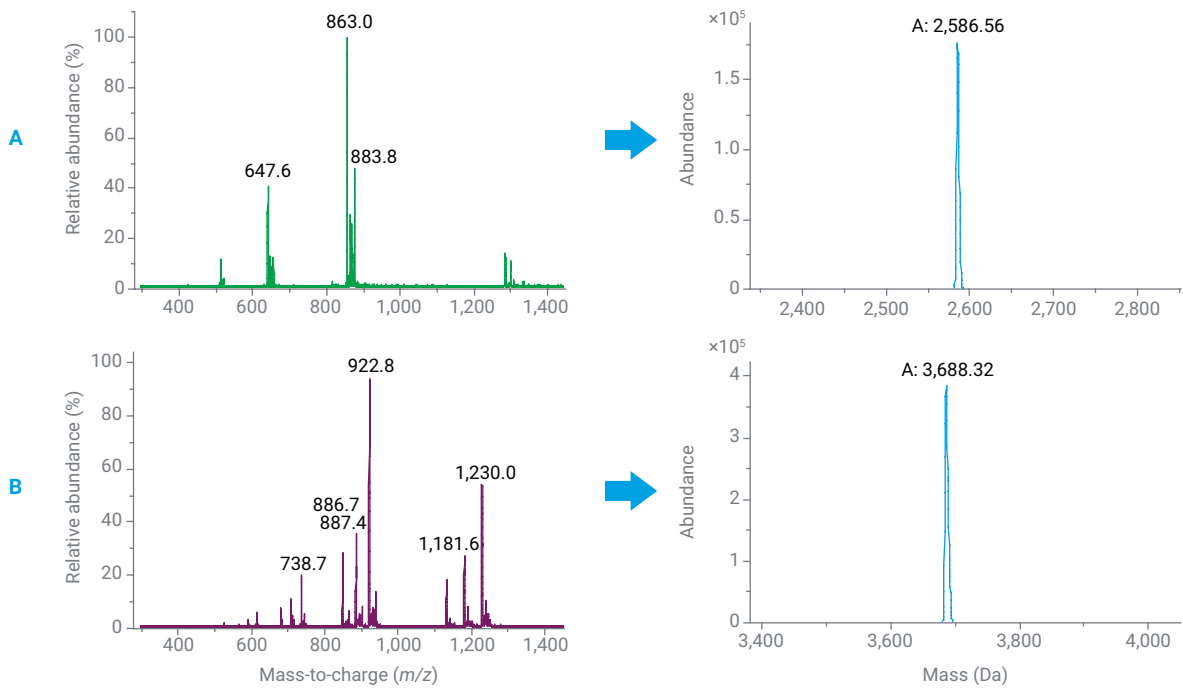
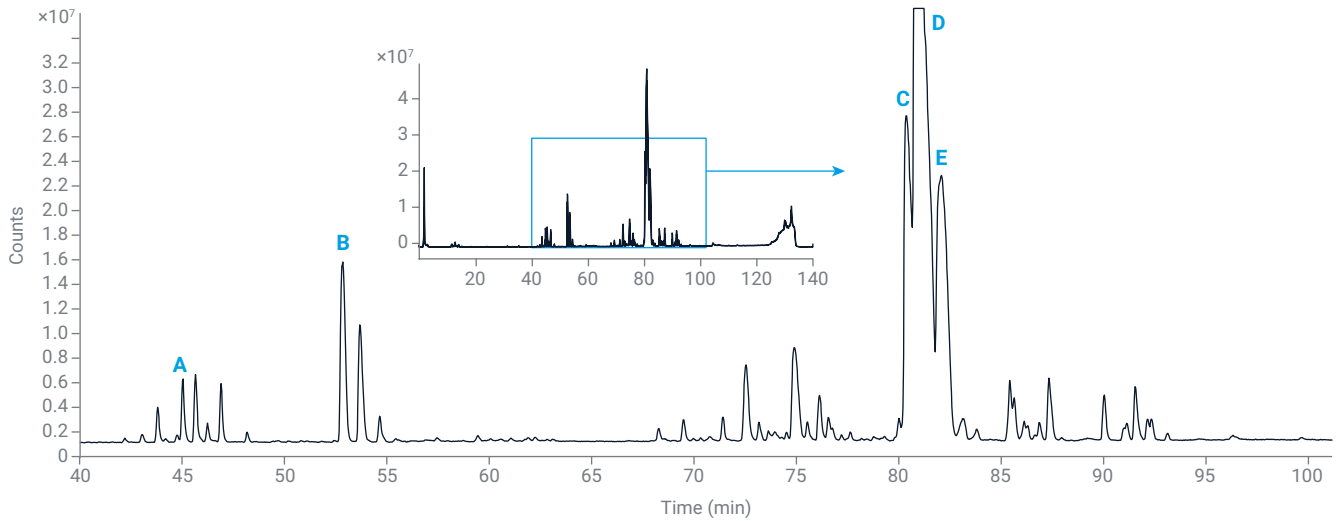
그림 4. Agilent InfinityLab LC/MSD iQ를 사용하여 산성 조건에서 이틀 동안 가열한 리라글루타이드 시료의 TIC(상단)와 6개의 피크 각각에 대한 MS 원시 스펙트럼(A-F, 왼쪽) 및 디콘볼루션 스펙트럼(A-F, 오른쪽).

표 5. Agilent InfinityLab LC/MSD iQ 및 OpenLab CDS 2.8 디콘볼루션을 사용하여 산성 조건에서 이틀 동안 가열된 리라글루타이드 시료의 질량 스펙트럼과 리라글루타이드와 비교한 질량 차이에 따른 디콘볼루션 결과.

피크	스펙트럼 RT(분)	구성 요소	질량(Da)	절대 존재비	질량 차이(Da)
A	54.372	A	3,516.37	159,683	-234
	54.372	B	3,577.72	78,012	-173
B	91.635	A	3,754.39	875,778	4
	91.635	B	3,816.13	453,879	66
C	95.557	A	3,750.56	9,934,175	(리라글루타이드)
D	99.057	A	2,808.54	777,637	-942
	99.057	B	2,836.56	370,460	-914
	99.057	C	2,871.36	259,511	-879
E	103.088	A	3,359.83	876,644	-391
	103.088	B	3,421.03	462,119	-330
F	111.134	A	3,541.24	279,455	-209
	111.134	B	3,569.02	156,874	-182

세마글루타이드 불순물 MS 스펙트럼 확인

유사하게, 세마글루타이드를 0.1 M HCl에서 하루 동안 80°C에서 가열한 후 표 3에 설명된 조건 하에서 분석했습니다. 디콘볼루션을 적용하면 81.0분의 분자량은 피크 D에 해당하는 세마글루타이드를 나타냈고, 40-95분 사이의 다양한 불순물 피크는 TIC로 확인된 MS 스펙트럼과 분자량을 보여주었습니다(그림 5 및 표 6).



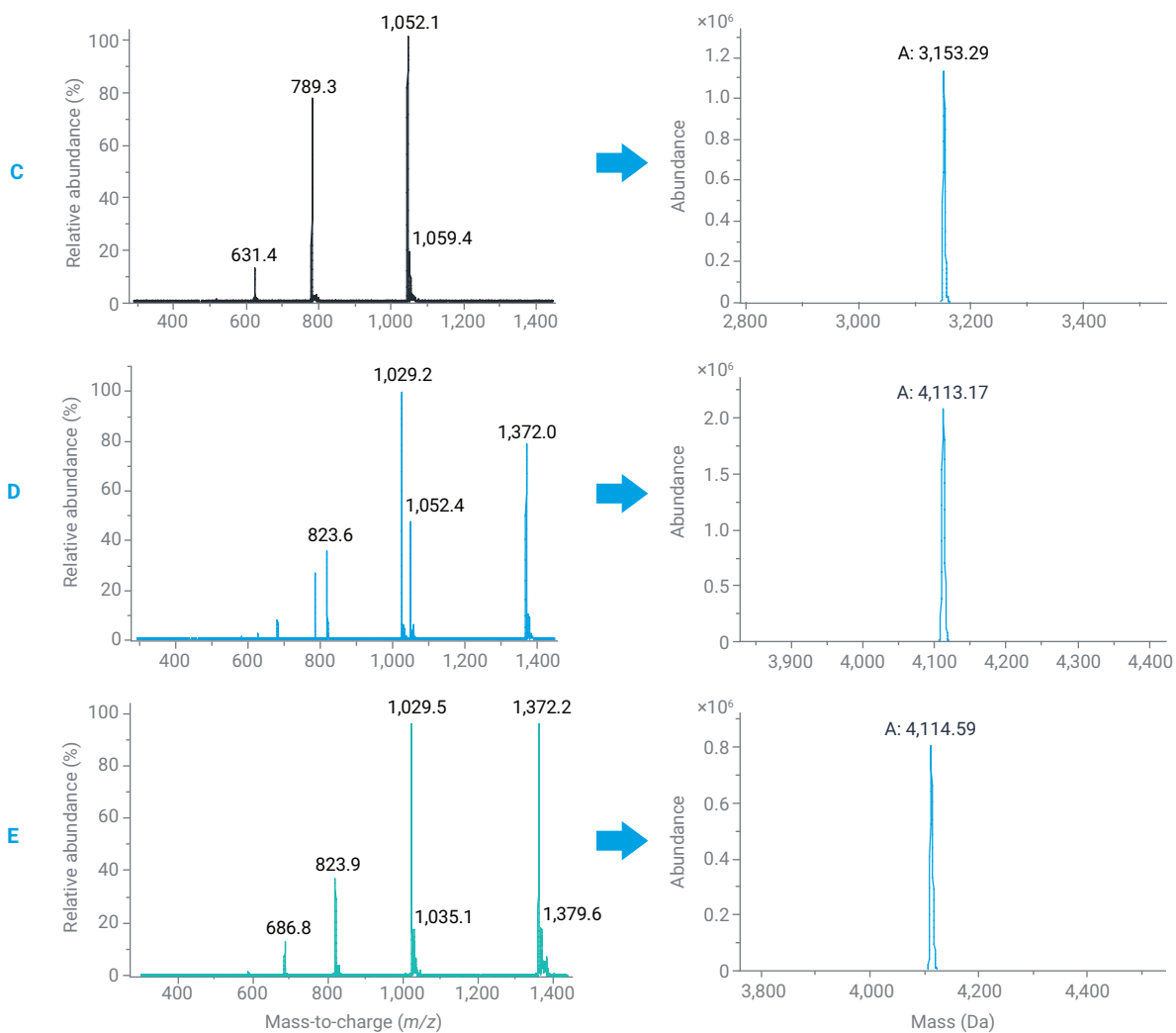


그림 5. Agilent AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼과 Agilent InfinityLab LC/MSD XT(A-E, 왼쪽: raw 스펙트럼, A-E, 오른쪽: 디콘볼루션 스펙트럼)를 사용하여 산성 조건에서 하루 동안 가열된 세마글루타이드 1mg/mL의 TIC(상단) 및 MS 스펙트럼.

표 6. Agilent InfinityLab LC/MSD XT 및 OpenLab CDS 2.8 디콘볼루션을 사용하여 산성 조건에서 하루 동안 가열된 세마글루타이드 시료의 MS 스펙트럼과 세마글루타이드와 비교한 질량 차이에 따른 디콘볼루션 결과.

피크 명칭	스펙트럼 RT (분)	구성 요소	질량 (Da)	절대 존재비	질량 차이 (Da)
A	45.044	A	2,586.56	177,605	-1,527
B	52.855	A	3,688.32	383,321	-425
C	80.392	A	3,153.29	1,125,716	-960
D	81.000	A	4,113.17	2,080,250	(세마글루타이드)
E	82.094	A	4,114.59	799,997	1

결론

Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC, InfinityLab LC/MSD iQ 및 InfinityLab LC/MSD XT를 사용하여 분석한 리라글루타이드 및 세마글루타이드의 강제 분해 연구에서 얻은 MS 스펙트럼은 Agilent OpenLab CDS 소프트웨어, 버전 2.8의 디콘볼루션 기능을 적용하여 쉽게 중성 질량으로 변환되었습니다. 분해 연구에서 생성된 펩타이드 제제의 불순물 평가에서는 후기 단계 개발 및 품질 관리를 위해 사용 편의성을 우선시해야 합니다. OpenLab CDS 2.8 및 디콘볼루션과 함께 사용되는 InfinityLab LC/MSD iQ 또는 XT는 유용한 고품질 분석과 함께 사용하기 쉬운 이상적인 도구입니다. 이 설정을 통해 GLP-1 작용제와 같은 치료 펩타이드의 분해로 인해 발생하는 불순물을 유연하게 모니터링할 수 있습니다.

또한 Agilent AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼과 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 1.9µm 컬럼은 리라글루타이드와 세마글루타이드의 다양한 강제 분해 조건에서 생성된 여러 불순물을 간단하게 분리하는 데 도움을 줍니다. 이를 통해 주요 화합물과 불순물의 간단한 질량 측정이 가능하고 RLD와의 비교가 단순화됩니다.

참고 문헌

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. Houel, S.; et al. Influence of Production Process and Scale on Quality of Polypeptide Drugs: a Case Study on GLP-1 Analogs. *Pharm. Res.*, **2020**. 37: 120

3. Brian, R.; Jarod, G. Unit Mass Spectral Deconvolution for Molecular Weight Confirmation of Large Molecules. *Agilent Technologies 기술 개요, 발행 번호 5994-6928EN*, **2024**.

www.agilent.com

DE40962987

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
2024년 5월 28일, 한국에서 발행
5994-7500KO

한국에질런트테크놀로지스(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