

HILIC-MSによるGLP-1受容体作動薬の不純物プロファイリング

Agilent 1290 Infinity III Bio LC システムおよび
Agilent InfinityLab LC/MSD iQ の使用

著者

Piotr Alvarez, Cindy Lecluyse,
Griet Debyser, Pat Sandra, and
Koen Sandra
RIC group
President Kennedypark 6,
8500 Kortrijk, Belgium
Sonja Schneider and
Udo Huber
Agilent Technologies, Inc.

概要

グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体作動薬が糖尿病および肥満症の治療薬として普及しつつあります。これらの（生）合成治療用ペプチドにはいくつかの関連不純物が付随し、そのモニタリングには一般的に逆相液体クロマトグラフィー (RPLC) が用いられています。このアプリケーションノートでは、HILIC を相補的手法として取り上げ、エキセナチド、セマグルチド、およびチルゼパチドの分析に適用しました。分析の際は、非特異的相互作用を防ぐため、LC 流路全体のステンレス製コンポーネントを排除または不活性化しました。また、生体適合性を備えた LC をコンパクト設計の積み重ね可能なシングル四重極マスアナライザに接続することにより、溶出ピークの分子量 (MW) 情報が容易に得られました。

はじめに

グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体作動薬は (生)、インスリンの放出促進、グルカゴンの抑制、胃排出の遅延、食欲の抑制により血糖値を調節する天然 GLP-1 ホルモンを模倣する合成ペプチドです。このような効果から、これらの治療薬は 2 型糖尿病 (T2DM) や肥満症の管理に広く適用されています¹。天然 GLP-1 は内因性酵素によって急速に分解されますが、GLP-1 受容体作動薬は治療薬としての有効性を高めるように設計されています (図 1)。例えば、セマグルチド (オゼンピック) と天然 GLP-1 には、アミノ酸が 2箇所置換され、短いスペーサーを介してステアリン二酸ガリジンに共役しているという違いがあります。一方、エキセナチド (バイエッタ、ビデュリオン) はアメリカドクトカゲの唾液で見られるエキセンジン-4の合成バージョンであり、ヒト GLP-1 と 53 % の配列類似性を共有しています。また、GLP-1 および胃抑制ポリペプチド (GIP) ホルモンの機能を同時に発揮する共作動ペプチドであるチルゼパチド (マンジャロ) の発売が成功を収めたことで、次世代の治療薬のための土台が築かれました。このように、同じ治療目的に向けて特性の異なる複数のペプチド医薬品の開発が進行しており、これらの医薬品の品質に評価に適した分析メソッドが求められています。

安全性、効能、および規制準拠の懸念材料となる (生) 合成ペプチド中の不純物のプロファイリングには、液体クロマトグラフィー (LC) と質量分析 (MS) の組み合わせが不可欠です。脂肪酸に関連する不純物に加え、

これらの不純物が生産または保管中に生じ、アミノ酸の付加、挿入、欠失、切断、酸化、脱アミド化、(立体) 異性化などを引き起こす可能性があります²。こういった種の分離には、一般に逆相液体クロマトグラフィー (RPLC) が用いられています。ただし、構造的に類似した実際の不純物や潜在的な不純物は膨大な数にのぼります。この分析上の課題に対処するには、それぞれ選択性が異なる複数の分離モードが必要になります。

このアプリケーションノートでは、GLP-1 受容体作動薬の不純物を評価する相補的な分離モードとして親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) を取り上げます。使用条件は、HILIC とダイオードアレイ検出器 (DAD)

および蒸発光散乱検出器 (ELSD) による GLP-1 受容体作動薬製品中の有効成分、製品関連の不純物、および製剤成分の同時測定に関する以前の論文にもとづきます³。今回は、溶出するペプチドの同定を確認するために、そのメソッドにシングル四重極 MS を組み合わせました。研究対象の成分と金属面および金属で汚染された流路との非特異的相互作用を防ぐために、ウルトライナートテクノロジー搭載の Agilent Altura Poroshell HILIC-Z カラムと Agilent 1290 Infinity III Bio LC システムを使用して、低吸着性と生体適合性を備えた LC ハードウェアを実装しました。また、LC システムには Agilent InfinityLab LC/MSD iQ を組み合わせました。

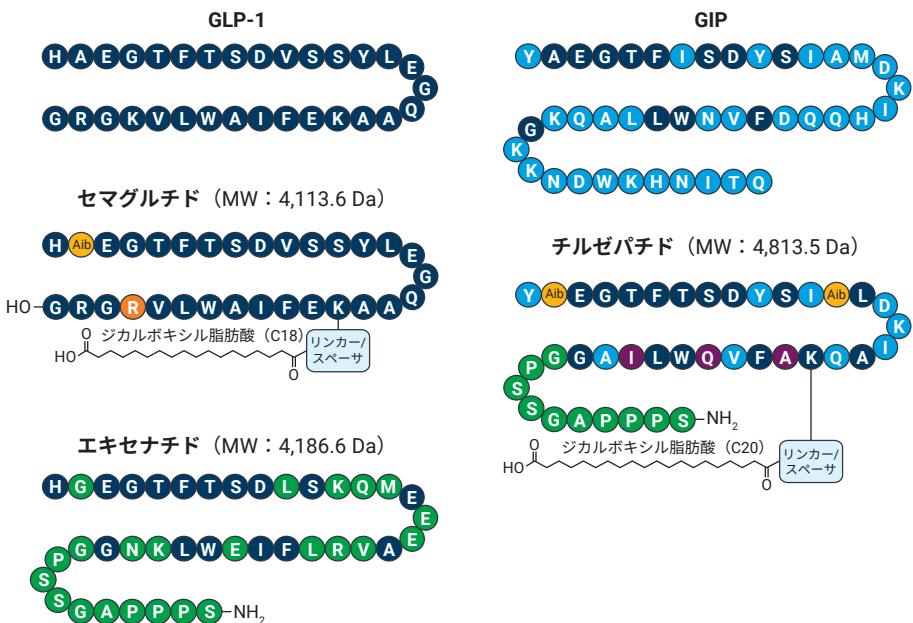


図 1. 天然 GLP-1 および GIP、GLP-1 受容体作動薬であるセマグルチドおよびエキセナチド、GLP-1 および GIP 受容体共作動薬であるチルゼパチドの分子構造。治療用ペプチドには分子量 (MW) を記載しています。

実験方法

材料

水 (ULC/MS グレード)、アセトニトリル (HPLC-S グレード)、およびギ酸 (99 %、ULC-MS グレード) は Biosolve 社から入手しました。ギ酸アンモニウム (LiChropur)、ジメチルスルホキシド (DMSO、Suprasolv)、過酸化水素 ($\geq 30\%$ 、微量分析用)、および L-メチオニンは Merck 社から入手しました。酢酸セマグルチド ($\geq 95\%$)、エキセンジン-4 (48 ~ 86) アミド酢酸塩 (酢酸エキセナチド、 $\geq 95\%$)、およびチルゼパチドナトリウム塩 ($\geq 95\%$) は Cayman Chemical 社から入手しました。

サンプル調製

セマグルチドは DMSO で 1 mg/mL に調製し、加熱して溶解しました。エキセナチドおよびチルゼパチドは 50/50 (v/v) のアセトニトリル:水に 1 mg/mL の濃度で溶解しました。

メチオニンの酸化を誘起するために、エキセナチドを 0.004 % 過酸化水素中で、室温で 3 時間インキュベーションしました。その後、1 mM L-メチオニンを加えて反応をクエンチしました。

機器とメソッド

今回の研究では、1290 Infinity III Bio LC と InfinityLab LC/MSD iQ を使用しました。機器構成の詳細を表 2 に示します。また、メソッドパラメータを表 3 にまとめます。データの取り込みおよび処理には Agilent OpenLab CDS バージョン 2.7 を使用しました。

表 2. 機器構成の詳細

モジュール	詳細
ポンプ	Agilent 1290 Infinity III Bio ハイスピードポンプ (G7132A)
オートサンプラ	Agilent 1290 Infinity III Bio マルチサンプラ (G7137A)、一体型サンプルサーモスタット付き
カラムコンパートメント	Agilent 1290 Infinity III マルチカラムサーモスタット (G7116B)、Agilent クイックコネクト Bio 熱交換器、標準フロー (G7116-60071) を装着
検出器 (DAD)	Agilent 1290 Infinity III ダイオードアレイ検出器 (G7117B)
フローセル	Agilent Max-Light カートリッジセル LSS、10 mm (G7117-60020)、アーバーチャなし
検出器 (MS)	Agilent InfinityLab LC/MSD iQ (G6160A)

表 3. LC-MS メソッドパラメータ

パラメータ	設定値
カラム	ウルトライナートテクノロジー搭載 Agilent Altura Poroshell HILIC-Z、2.1 × 150 mm、2.7 μ m (p/n 227215-924)
流量	0.4 mL/min
移動相	A = 100 mM ギ酸アンモニウム、pH 3 B = アセトニトリル
グラジェント	0 ~ 1 分 : 90 % B 1 ~ 19 分 : 90 ~ 45 % B 19 ~ 20 分 : 45 ~ 90 % B 20 ~ 30 分 : 90 % B
カラム温度	40 °C
オートサンプラ温度	10 °C
注入	1 μ L
ニードル洗浄	10 秒間、50:50 (v/v) のアセトニトリル:水
DAD 検出	280/4 nm、リファレンス波長 360/100 nm、2.5 Hz
MS 検出	モード: ESI ポジティブ ガス温度 : 325 °C ガス流量 : 11 L/min ネプライザ = 50 psi キャビラリ電圧 : 3,500 V スキャン範囲 : m/z 500 ~ 1450 フラグメント電圧 : 120 V ゲイン係数 : 1 1 秒あたりのターゲットポイント数 : 1 Hz スキャン時間 : 997 ms データ収集 : セントロイド ダイバータバルブ : 0 ~ 1.5 分 : 廃液へ、1.5 ~ 20 分 : MS へ、20 ~ 30 分 : 廃液へ

結果と考察

HILIC では、極性およびイオン性の溶質が、固定相に固定化された水性層と有機移動相との間での溶質の分配と、それに重なって起こる静電結合や水素結合などその他の相互作用（固定相の化学的性質および移動相の条件により異なる）にもとづいて保持・分離されます⁴。HILIC は、治療用ペプチドやそれに関連する不純物の「標準」分析法である RPLC の相補的分離プラットフォームとして機能します。GLP-1 受容体作動薬であるチルゼパチド、セマグルチド、およびエキセナチドを前述の HILIC メソッドで分離した結果を図 2 に示します³。これらのクロマトグラムの測定には UV 280 nm を使用していますが、これより短い波長（UV 214 nm など）では移動相の異常な吸光により十分な情報が得られないからです。非特異的相互作用を防ぐため、HILIC には、コーティングされたステンレス製ハードウェアに表面多孔質粒子を充填した両性イオン相を使用しました（HILIC-Z）⁵。ペプチドの溶出は、

アミノ酸の組成と共に脂肪酸にもとづきます。MS に対応した移動相を使用しているため、メインピークの同定を、四重極マスアナライザ

を用いてピーク上で収集した電荷エンベロープから計算した MW により容易に確認できます（図 3）。

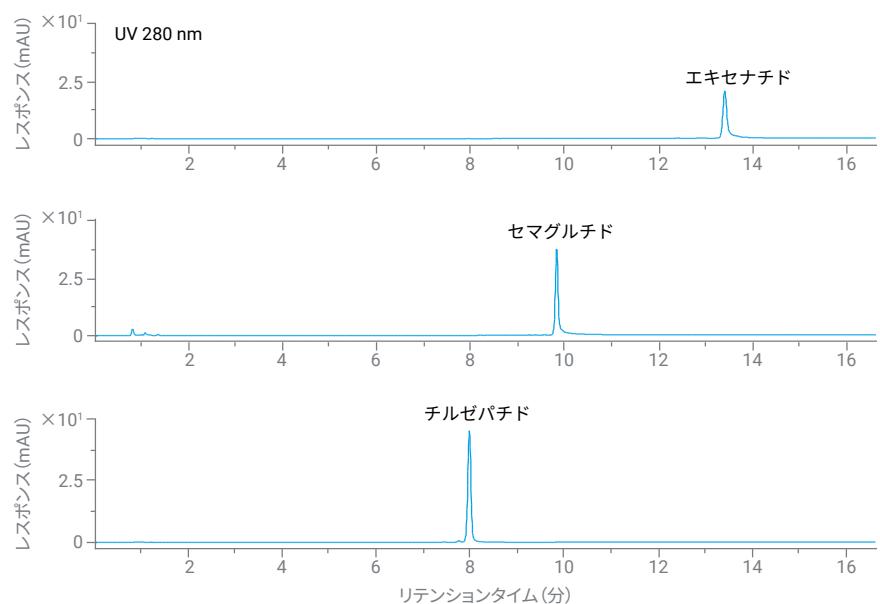


図 2. GLP-1 受容体作動薬であるエキセナチド、セマグルチド、およびチルゼパチド（1 mg/mL）の HILIC-UV 280 nm クロマトグラム

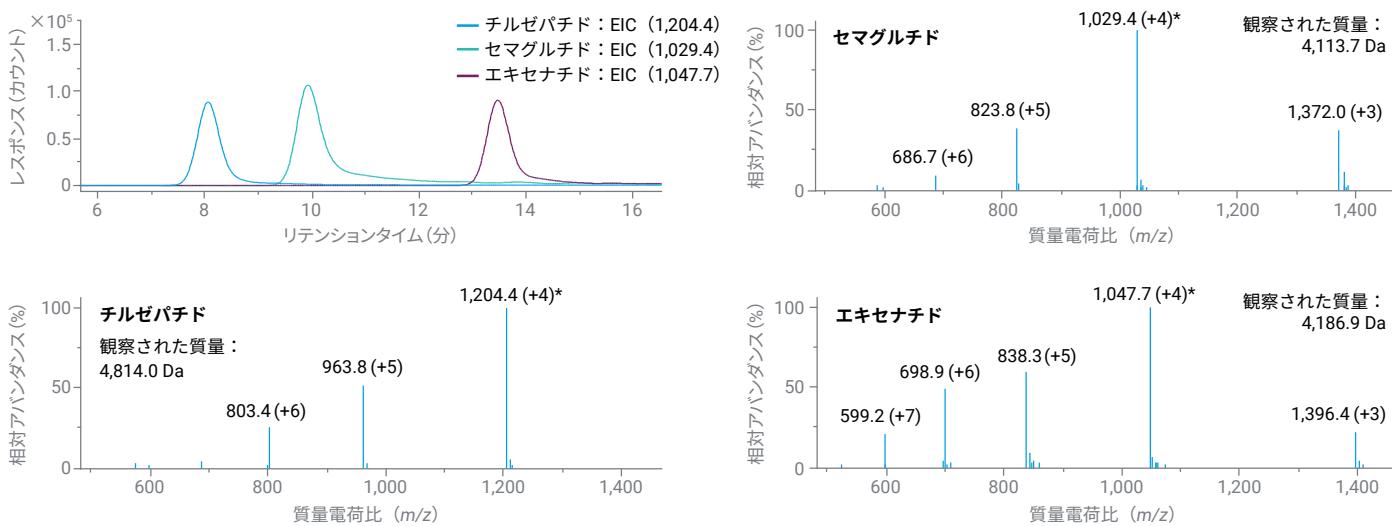


図 3. チルゼパチド、セマグルチド、およびエキセナチド（1 mg/mL）のベースピーク (*) の抽出イオンクロマトグラムの重ね表示とシングル四重極質量スペクトル。電荷状態をカッコ内に記載しています。

同様に、低濃度の製品関連の不純物についても、今回使用した HILIC-MS プラットフォーム調査できます。UV 280 nm での吸光度にもとづくと、図 4 に示すように、チルゼパチド中に不純物 1 が 1.1 % のレベルで存在しています。このレベルでは、同定と定量により生物学的安全性を確立することを、どの規制機関も一様に義務付けています^{2, 6}。MS データから、質量差がチロシン (Tyr) の付加に相当する +163 Da であることが判明しました。この付加によってチルゼパチドの疎水性が高くなり、HILIC で早期に溶出したものと考えられます。アミノ酸の付加/挿入は、固相ペプチド合成中のカップリング試薬の過剰使用と、結合反応後のその不完全な除去が原因です。

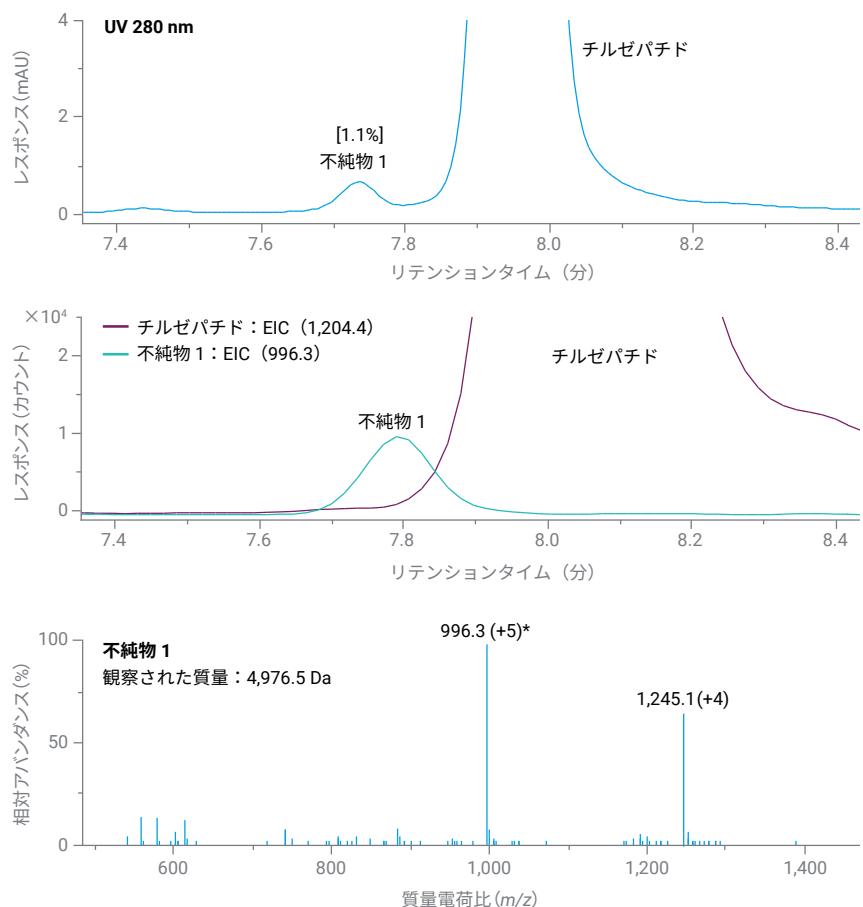


図 4. チルゼパチド (1 mg/mL) の HILIC-UV 280 nm クロマトグラムの拡大図と、チルゼパチド (m/z 1204.4) および不純物 1 (m/z 996.3、Tyr の付加に相当) の抽出イオンクロマトグラム (EIC) の重ね表示。また、不純物の MS スペクトルを示しています。メインピークのスペクトルは図 3 を参照してください。(*) EIC 用に選択したベースピーク。電荷状態 (MS) と不純物の割合 (UV 280 nm) をカッコ内に記載しています。

セマグルチドでは、さらに低アバンダンスの不純物（0.2～0.4%）が観察されました（図5）。不純物1とメインピークは共通のm/z値を共有していることから、不純物1は異性体（立体異性体の可能性もあります）として分類できます。固相ペプチド合成中にはアミノ酸のラセミ化が頻繁に起こりますが、これはカッピング処理での側鎖保護アミノ酸

の使用が主な原因です。ラセミ化は処理条件、保護基の種類、およびアミノ酸に大きく依存します。立体異性体不純物の分離は、RPLCでは難しい可能性があり、分析対象のターゲット不純物のプロファイルをカバーするために複数の分析メソッドを実行する結果になることも珍しくありません。一方、セマグルチドの不純物2および3は、それぞれHis-環状-セマ

グルチド(+12 Da)と切断された[3-31]-セマグルチド(-222 Da)を示唆する質量シフトを示しています。不純物2は、この処理中にN末端の環化によって生じたものです。また、不純物3は中間生成物であり、N末端Glu残基を介して反応性His-Aib-OHフラグメントに結合すると、全長ペプチド配列になります。

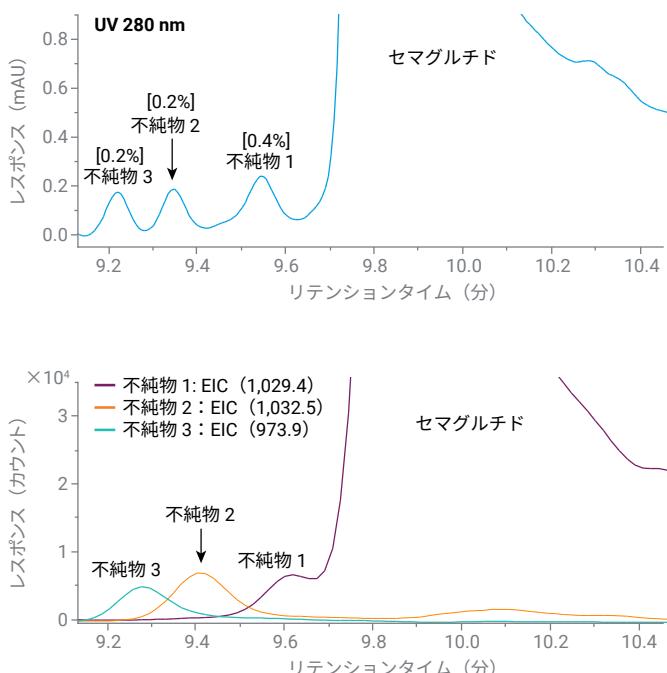
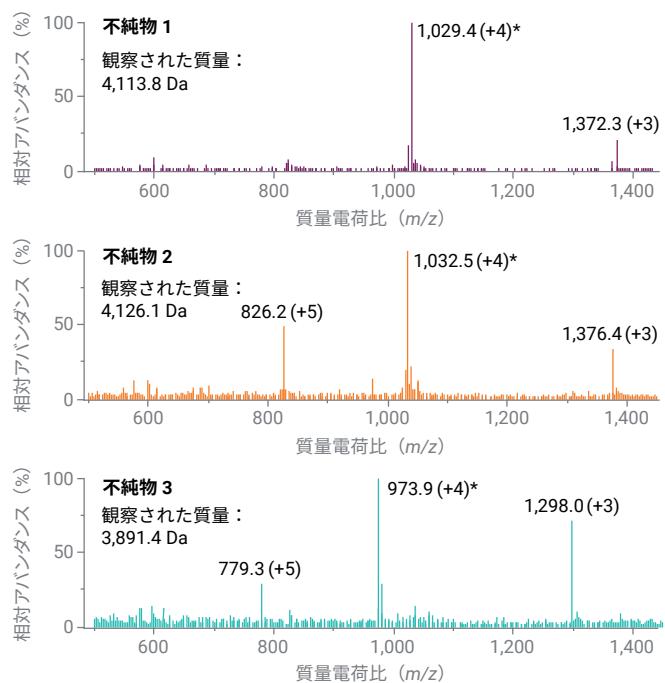


図5. セマグルチド（1 mg/mL）のHILIC-UV 280 nmクロマトグラムの拡大図と、セマグルチドの不純物1（m/z 1029.4）、不純物2（m/z 1032.5）、および不純物3（m/z 973.9）の抽出イオンクロマトグラム（EIC）の重ね表示。右側は不純物のMSスペクトルです。セマグルチドのメインピーク（図3）と不純物1との間で共通のm/zイオンが観察されたことから、不純物1は異性体不純物（立体異性体である可能性もあります）に分類できます。不純物2と不純物3は、それぞれHis-環状-セマグルチドと切断された[3-31]-セマグルチドに相当します。（*）EIC用に選択したベースピーク。電荷状態（MS）と不純物の割合（UV 280 nm）をカッコ内に記載しています。



医薬品開発中に強制分解の研究を実施することで、ペプチド合成由来のもの以外の不純物がさらに明らかになる可能性があります。図6は、質量が16 Da増加していることからわかるように、 H_2O_2 によるストレスを与えたエキセナチドにおけるMet酸化の測定結果です。特に、HILICでは、部分的に分離された2つの

ピークがポストピークとして溶出している様子を観察できます。これはMetスルホキシドS-およびR-ジアステレオマーの形成によるものです。これらの種は、グラジエント勾配を適応させることで、さらに分離できる可能性があります。

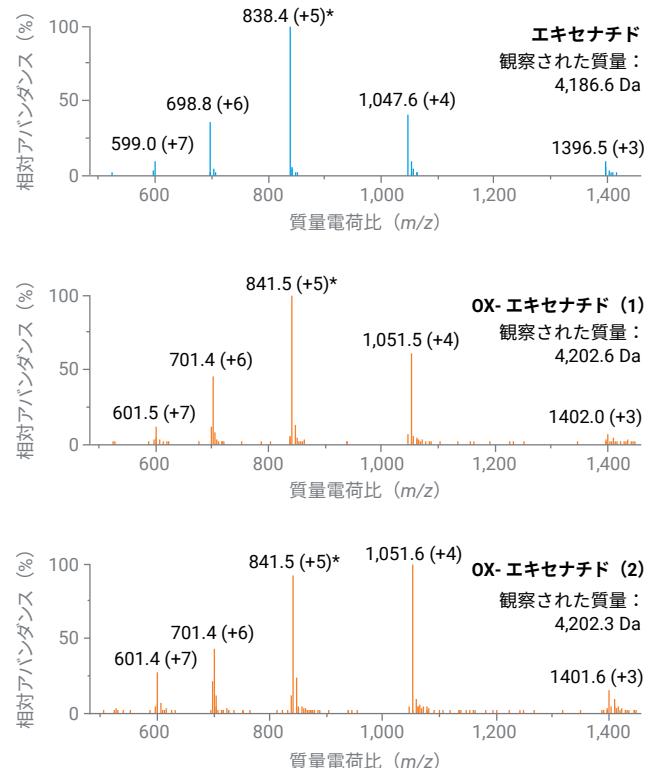
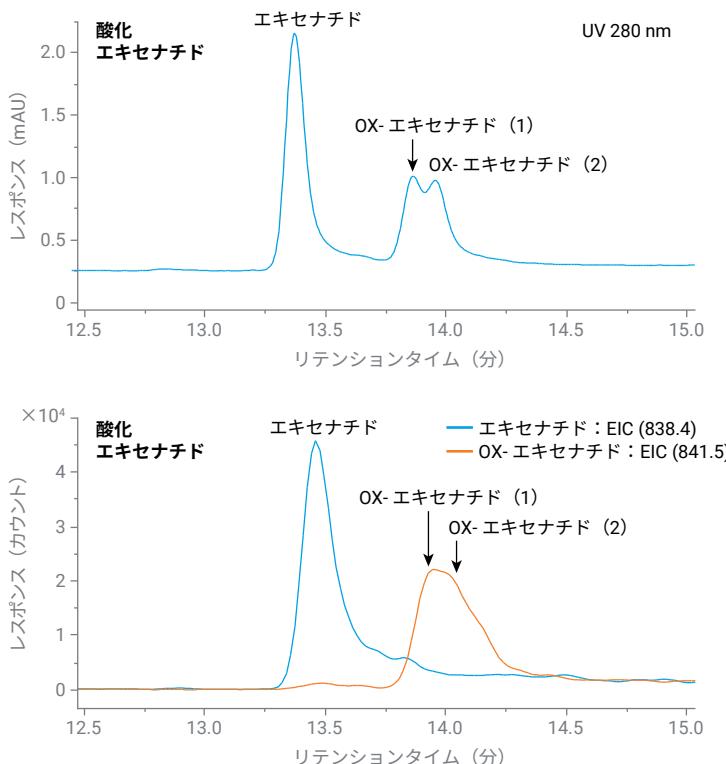


図6. H_2O_2 によるストレスを与えたエキセナチド (0.25 mg/mL) の HILIC-UV 280 nm クロマトグラムの拡大図と、エキセナチド (m/z 838.4) および酸化エキセナチド (m/z 841.5) の抽出イオンクロマトグラム (EIC) の重ね表示。右側は観察されたピークの MS スペクトルです。(*) EIC 用に選択したベースピーク。電荷状態をカッコ内に記載しています。

ストレスを与えていないエキセナチド中の特定の低アバンダンス不純物の測定結果を図 7 に示します。シングル四重極マスアナライザで提供される選択性により、不純物 1 (Met 酸化、+16 Da) と不純物 2 (Gly の付加、+57 Da) など、共溶出する不純物やメインピークのテールに隠れた不純物の検出が容易になります。UV 280 nm のクロマトグラムでこれらの不純物を個別に積分するのは不可能です。一方、

不純物 3 の頂点で収集した MS スペクトルから、共溶出している 2 つの種が明らかになりました。1 つは Leu/Ile の付加に相当する電荷エンベロープであり、もう 1 つはエキセナチドのメインピークと同じイオンであることを示し、異性化（立体異性化の可能性もあります）を示唆しています。さらに、不純物 4 は、さまざまな電荷状態のクリーンなスペクトルを示し、これは N 末端 His 切断 (-137 Da) と

合致しています。この事象は、保護基の不完全な除去、部分的に活性化されたアミノ酸の包含、またはペプチド合成時の樹脂との非効率な結合によるものと考えられます。

このアプリケーションノートで報告したすべての不純物の同定は Q-TOF MS により確認しました。

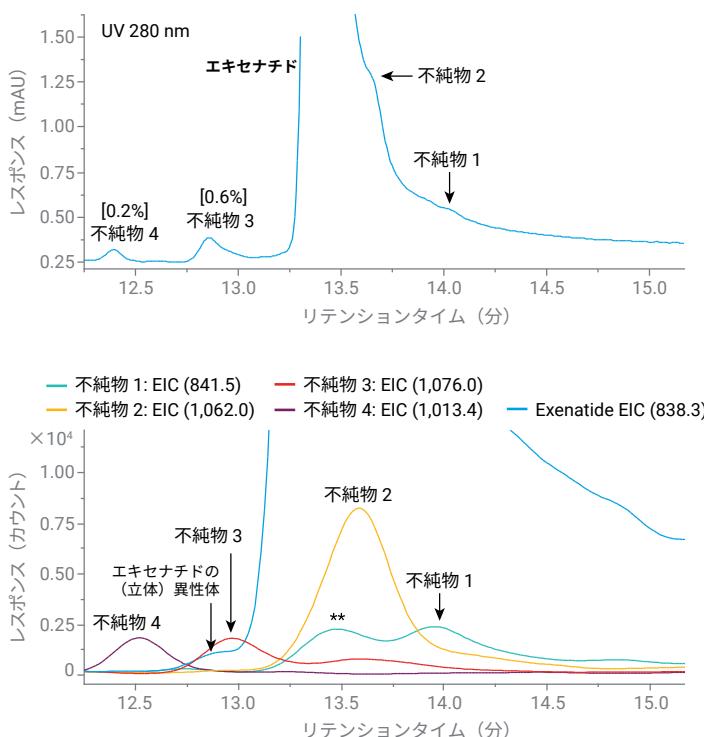
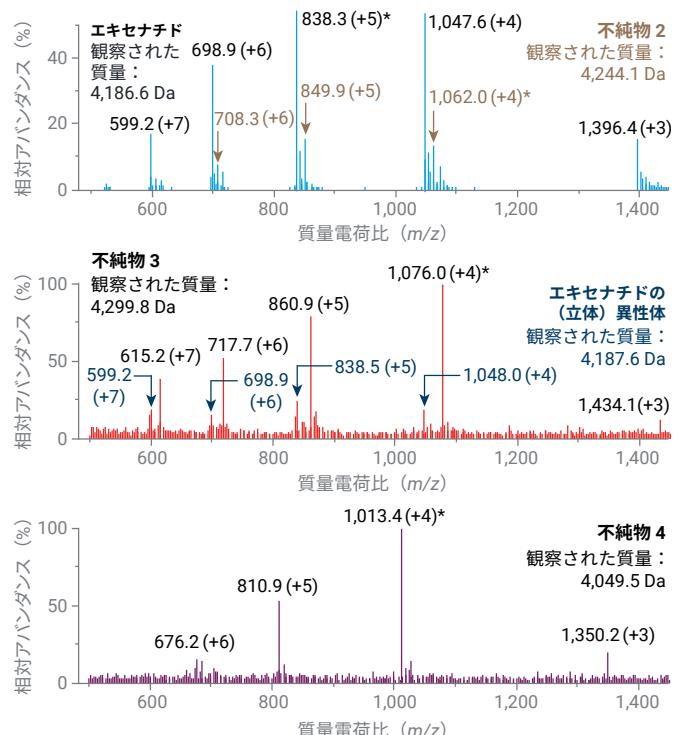


図 7. エキセナチド (1 mg/mL) の HILIC-UV 280 nm クロマトグラムの拡大図と、不純物 1 (m/z 841.5, Met の酸化)、不純物 2 (m/z 1062.0, Gly の付加)、不純物 3 (m/z 1076.0, Leu/Ile の付加および m/z 838.3, (立体) 異性体)、不純物 4 (m/z 1013.4, N 末端 His 切断) の抽出イオンクロマトグラム (EIC) の重ね表示。右側には、メインピークのショルダー部 (不純物 2) と不純物 3 および 4 のピーク頂点で収集した MS スペクトルです。(*) EIC 用に選択したベースピーク。(**) エキセナチドのソース内酸化。



結論

GLP-1 受容体作動薬の有効成分と製品関連の不純物を測定するための汎用 HILIC-MS メソッドを紹介しました。このメソッドのクロマトグラフィー条件は、特定の種の分解能を最適化するためにさらに微調整したり、ほかの治療用ペプチドにも対応できるように拡張することができます。その相補的な性質から、メソッドを RPLC および溶媒モジュレーションと組み合わせて多次元構成で適用することもできます。さらに、シングル四重極技術にもとづくコンパクト設計の積み重ね可能な MS を導入すれば、治療用ペプチドの不純物プロファイルリングが容易になるうえ、メソッド開発を支える資産として活用できるでしょう。

参考文献

1. Yu, M.; Benjamin, M. M.; Srinivasan, S.; Morin, E. E.; Shishatskaya, E. I.; Schwendeman, S. P.; Schwendeman, A. Battle of GLP-1 Delivery Technologies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, 130, 113-130.
2. D' Hondt, M.; Bracke, N.; Taevernier, L.; Gevaert, B.; Verbeke, F.; Wynendaele, E.; De Spiegeleer, B. Related Impurities in Peptide Medicines. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, 101, 2–30.
3. Alvarez, P.; Lecluyse, C.; Vandendriessche, I.; Sandra, P.; Sandra, K.; Schneider, S.; Huber, U. DAD および ELSD 搭載の Agilent 1290 Infinity III Bio LC による GLP-1 受容体作動薬の HILIC 分析. Agilent Technologies application note 5994-8308JAJP, **2025**.
4. McCalley, D. V. Understanding and Manipulating the Separation in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2017**, 1523, 49–71.
5. Guimaraes, G. J.; Bartlett, M. G. Managing Nonspecific Adsorption to Liquid Chromatography Hardware: a Review. *Anal. Chim. Acta* **2023**, 1250, 340994.
6. Draft guideline on the development and manufacture of synthetic peptides; European Medicines Agency, EMA/CHMP/CVMP/QWP/387541/2023.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カストマーコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE-005941

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, August 28, 2025

5994-8315JAJP