

ストレス条件下でのチルゼパチドの不純物プロファイリング

Agilent Pro iQ Plus を使用

著者

Mahsan Miladi, PhD
Agilent Technologies, Inc.

概要

グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 作動薬の需要と使用が拡大していることから、それらの医薬品の安全性と効能に影響を及ぼしうる不純物をスクリーニングするための堅牢な分析メソッドのニーズが高まっています。合成 GLP-1 ペプチドは、ストレス条件下において、酸化などの経路により劣化する可能性があります。¹ この研究では、高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) システムに Agilent InfinityLab Pro iQ Plus 質量検出器を組み合わせ、多様な pH と保存条件の下でチルゼパチドの不純物をモニタリングしました。高感度シングル四重極 LC/MS システムを使用して低濃度のペプチド不純物の検出とモニタリングを効率化することが可能で、ルーチン品質管理 (QC) および品質保証 (QA) 環境に導入するのに最適なシステムであることが、研究で実証されています。

はじめに

グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 作動薬は、2 型糖尿病 (T2DM) や肥満の治療に利用される化合物クラスです。GLP-1 作動薬は、血清グルコースレベルを下げ、患者の代謝を管理する作用があります。GLP-1 とグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (GIP) はどちらも、ジペプチジルペプチダーゼ-4 によって不活性化されるインクレチンホルモンです。これらのホルモンは、経口グルコース負荷の後にインクレチン効果によってインスリンの分泌を刺激します。^{2,3} T2DM ではこのプロセスが鈍くなったり、欠如したりする可能性があります。ただし、薬理学的なレベルの GLP-1 により、インスリンの分泌を回復させることが可能です。

アメリカ食品医薬品局（FDA）は、対象のジェネリック医薬品に含まれる不純物の種類と量について、参照リスト薬（RLD）との比較で検討しています。FDA では、対象のジェネリック合成ペプチドに、(i) RLD に含まれるよりも高濃度の不純物、または (ii) 0.5 % 以上の原薬を含む、新たに指定されたペプチド関連不純物が含まれていてはならないと規定しています。⁴

デュアル GIP および GLP-1 受容体作動薬、チルゼパチドは、有望な治療の可能性を秘めていますが、脱アミド化、酸化、ペプチド骨格切断など、化学的劣化の影響を受けやすいため、分析において課題が伴います。劣化の経路などをモニタリングすることは、製品の完全性、安全性、効能を確保するために不可欠です。

Agilent InfinityLab Pro iQ Plus シングル四重極質量分析計 (MS) は、低アバンダンス (sub-ppm) 不純物の検出に対し、優れた感度とダイナミックレンジを実現します。Agilent 1290 Infinity II LC システムと Pro iQ Plus LC/MS 機器の組み合わせは、QC ラボに対し、ルーチン分析のためのコスト効率に優れた質量検出ワークフローを提供します。このアプリケーションノートでは、さまざまな pH と保存条件下における、チルゼパチドとその関連不純物の分析の結果について、詳しく説明します。

実験方法

試薬および標準試料の調製

- ギ酸、98 % (LC-MS グレード LiChropur)、Millipore Sigma (部品番号 5.33002)
- InfinityLab アセトニトリル (LC/MS グレード)、1 × 1 リットル、Agilent (部品番号 5191-5101-001)
- チルゼパチド、AstaTech (部品番号 AT40456)
- ギ酸アンモニウム (LC-MS グレード LiChropur)、Millipore Sigma (部品番号 70221)
- 水酸化アンモニウム、HPLC 用、35 % 水溶液、Thermo Fisher Scientific (カタログ番号 460801000)

サンプル調製

チルセパチド原液は 15 % アセトニトリル/脱イオン水を用いて 2 mg/mL で調製しました。希釈標準溶液は、pH 5、7、9 に調整したバッファ溶液で 50 ng/μL に希釈しました。サンプルは追加の精製なしで直接注入しました。アリコートはオートサンプラで 5 °C で保管し、最大 7 日間の保管後まで、異なる日に分析しました。

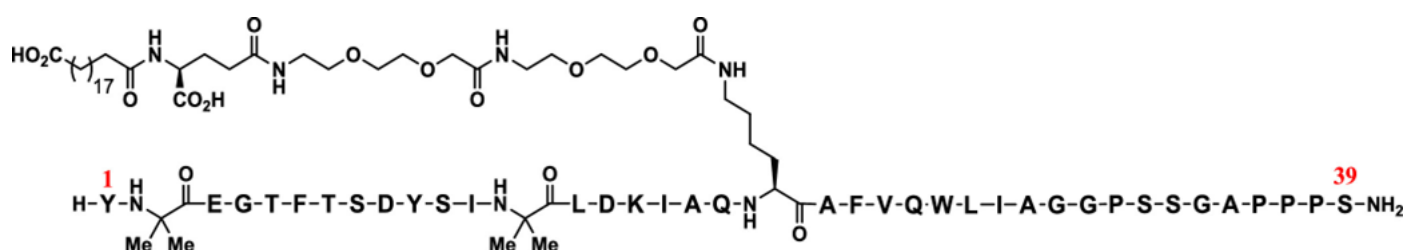


図 1. チルゼパチドアミノ酸組成⁵

装置構成

LC/MS 分析は、Agilent 1290 Infinity II bio LC システムに Pro iQ Plus 質量検出器を組み合わせで実施しました。Agilent ZORBAX RRHD 300 Å StableBond C18 カラムでクロマトグラフィーによる分離を行いました。詳細な LC および MS 操作パラメータを表 1 および表 2 に示します。

表 1. LC メソッドパラメータ

1290 Infinity II Bio LC システム		
カラム	ZORBAX RRHD 300 Å StableBond C18, 2.1 × 150 mm, 1.8 µm (部品番号 863750-902)	
移動相 A	LC/MS グレードの水 + 0.1 % 酢酸	
移動相 B	アセトニトリル + 0.1 % 酢酸	
流量	0.400 mL/min	
注入	標準	
注入量	1 µL	
カラム温度	60 °C	
グラジエントプログラム	時間 (分)	%B
	0	20
	5	48
	10	58
	11	60
	12	80
	14	80
	14.1	20
	15	20

表 2. MS パラメータ

Pro iQ Plus シングル四重極 LC/MS	
イオン源	
イオン源	Agilent Jet Stream ESI イオン源
極性	正
ガス温度	300 °C
乾燥ガス流量	11 L/min
ネブライザ	30 psi
シースガス温度	250 °C
シースガス流量	12 L/min
キャピラリー電圧	3,500 V
ノズル電圧	0 V
Pro iQ Plus	
フラグメンタ	95 V
スキャンタイプ	スキャン
スキャン時間	500 ms
データ保存	プロファイル
MS スペクトル範囲	m/z 500 ~ 2,500

ソフトウェアおよびデータ分析

Pro iQ Plus LC/MS システムは、GLP-1 ペプチドデータを処理するためのスペクトルデコンボリューション機能が搭載された、Agilent OpenLab CDS 2.8 ソフトウェアを使用して操作しました。OpenLab CDS のデコンボリューションアルゴリズムは、特にユニット質量分解能装置を使用して取得したものなど、多価イオンから生成された複雑なスペクトルをシンプル化するために最適化されています。表 3 に、この研究で使用した特定のデータ処理パラメータの概要を示します。

表 3. GLP-1 ペプチドの分析のために OpenLab CDS 2.8 で使用したデータ処理パラメータ

パラメータ	設定値
スペクトル抽出タイプ	ピーク頂点スペクトル
バックグラウンドモード	ピークの開始と終了のスペクトル
使用 m/z 範囲	無効
自動デコンボリューションの実行	有効化
低分子量	500
高分子量	10,000
最大電荷	6
セット中の最小ピーク	3
MW の一致度 (0.01 %)	5
絶対ノイズスレッショールド	1,000
相対アバンドンススレッショールド (%)	10
MW アルゴリズム	カーブフィット
MW アルゴリズムスレッショールド	40
エンベロープスレッショールド	50

結果と考察

チルゼパチド分解生成物は、pH および保存期間に大きく依存していました。Pro iQ Plus シングル四重極 LC/MS システムでは、微量レベルの不純物関連生成物を検出することに成功しました。

OpenLab CDS によるペプチド分析

OpenLab CDS ソフトウェアは、ペプチドの特性解析と不純物の評価を対象に、統一されたプラットフォームを提供します。図 2 に、5 °C および pH 7 における 7 日間の保存後のチルゼパチドのデータ確認を示します。図 2 に示されているように、不純物のピークは微量レベルで検出され、メインのチルゼパチド ピークの近くで溶出しています。正確なデコンボリューションは、高品質の質量スペクトルの取得に依存しているという点に留意する必要があります。Pro iQ Plus 質量検出器は、微量不純物に対しても、このような高品質の質量スペクトルを提供できます。

ソフトウェアレイアウトには、クロマトグラム表示、MS スペクトルウィンドウ、スペクトルデコンボリューション結果などの便利なツールが含まれており、メインのペプチドと低濃度不純物の両方を効率的に確認できます。

トータルイオンクロマトグラム (TIC) は、チルゼパチドとその関連不純生成物に対応するピークを示しています。7.89 分での質量スペクトルで、+3、+4、+5 電荷状態の存在により、チルゼパチドの溶出が確認されます (図 2)。デコンボリューションした質量スペクトルは 4,813.1 Da の分子量を示しており、チルゼパチドの理論上の平均質量 (4,813.5 Da) に一致し、機器の予測質量精度 (±0.3 Da) に収まっています。

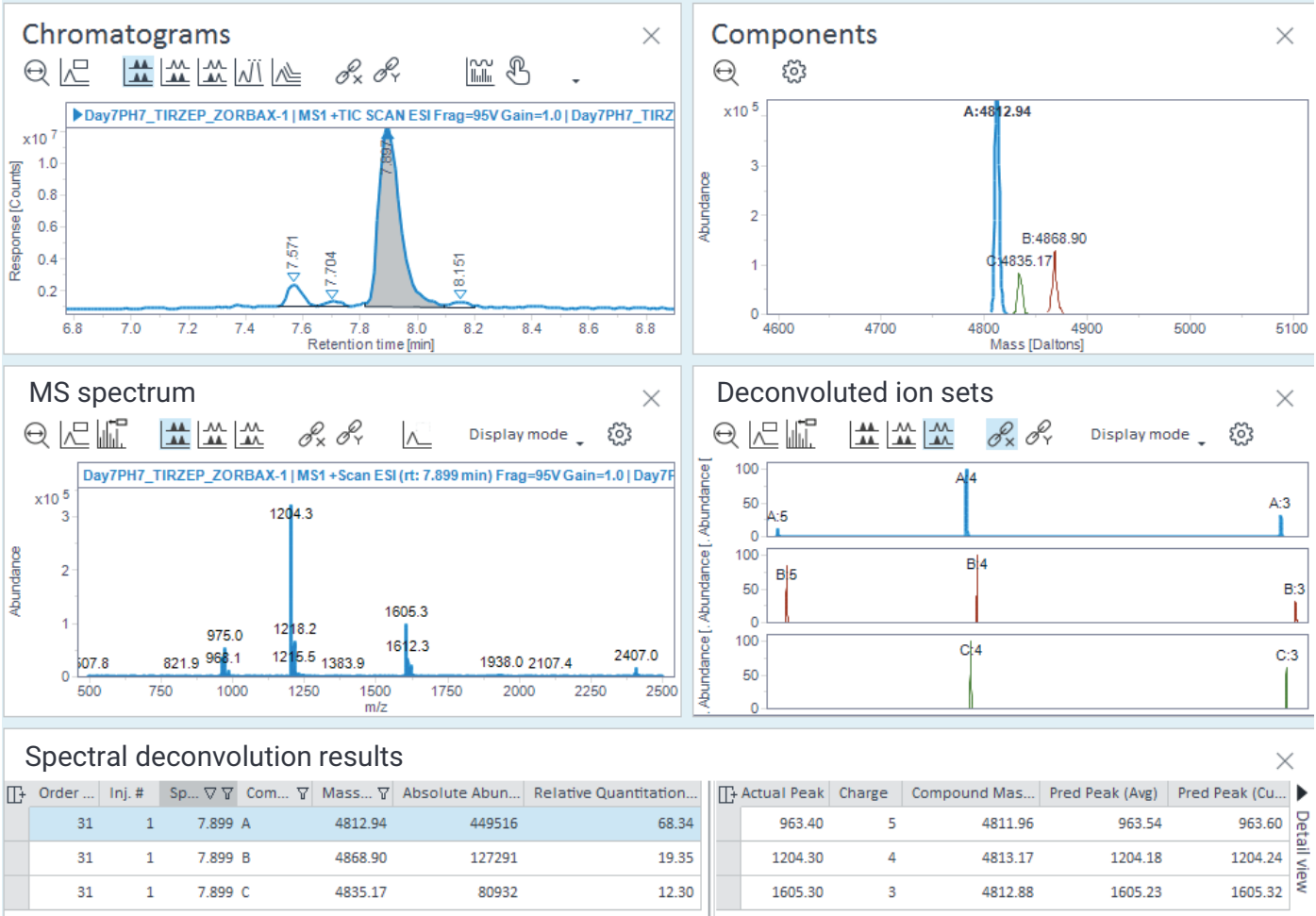


図 2. 5 °C および pH 7 における 7 日間の保存後のチルゼパチドのデータ確認

Pro iQ Plus LC/MS システムでは、チルゼパチドサンプルに含まれる低濃度不純物の高感度検出と特性解析が可能です。図 3 に、(図 2 に示すように) 7.57 分と 7.71 分で溶出した 2 つの不純物の質量スペクトルと、それぞれ 4,845.2 Da および 4,817.9 Da のデコンボリューションした質量を示します。これらの種は、非標識チルゼパチドの理論上の平均質量 (4,813.5 Da) に対する +32 と +4.4 Da のマスシフトに相当します。マスシフトは、ストレス条件下におけるペプチドの一般的な劣化の経路である、酸化修飾と一致しています。メチオニン、トリプトファン、ヒスチジンなどのアミノ酸は、特に酸化の影響を受けやすい成分です。特にトリプトファンの酸化は、特定の構造修飾 (+O₂-CO) により、+4 Da のシフトを生じさせる可能性があります。⁶

表 4 に、酸化型および未知の不純物を含む、チルゼパチドとその関連不純物のデコンボリューションした分子量を示します。

表 4. チルゼパチドとその関連不純物のデコンボリューションした分子量

GLP-1 ペプチド ネイティブ型ペプチド分子量 (Da)		不純生成物		
		酸化 (+O ₂)	酸化 (O ₂ -CO)	未知不純物
チルゼパチド	4,813.1	4,845.2	4,817.9	4,689.6

酸化関連不純物に加え、未知の種が 8.15 分のリテンションタイムにおいて検出されました。この種のデコンボリューションした質量スペクトルは約 4,689.6 Da の分子量を示しており、非標識チルゼパチドには対する +124 Da の質量差に相当します。この不純物を同定するために、さらに MS 特性解析 (MS/MS) が必要です。

Pro iQ Plus LC/MS 機器の高感度とダイナミックレンジにより、1 回の分析で多量および微量の種を確実に検出できます。重要な点は、MS により、2 % 未満の相対ピーク面積において存在する不純物を検出することが可能であるということです。これは、ペプチドサンプルに含まれる少量の分解生成物のモニタリングに対して Pro iQ Plus LC/MS が最適であることを示しています。また、OpenLab CDS に搭載されたスペクトルデコンボリューション機能が、多価スペクトルの解析を容易化することでデータ分析を促進します。外部ソフトウェアは不要です。

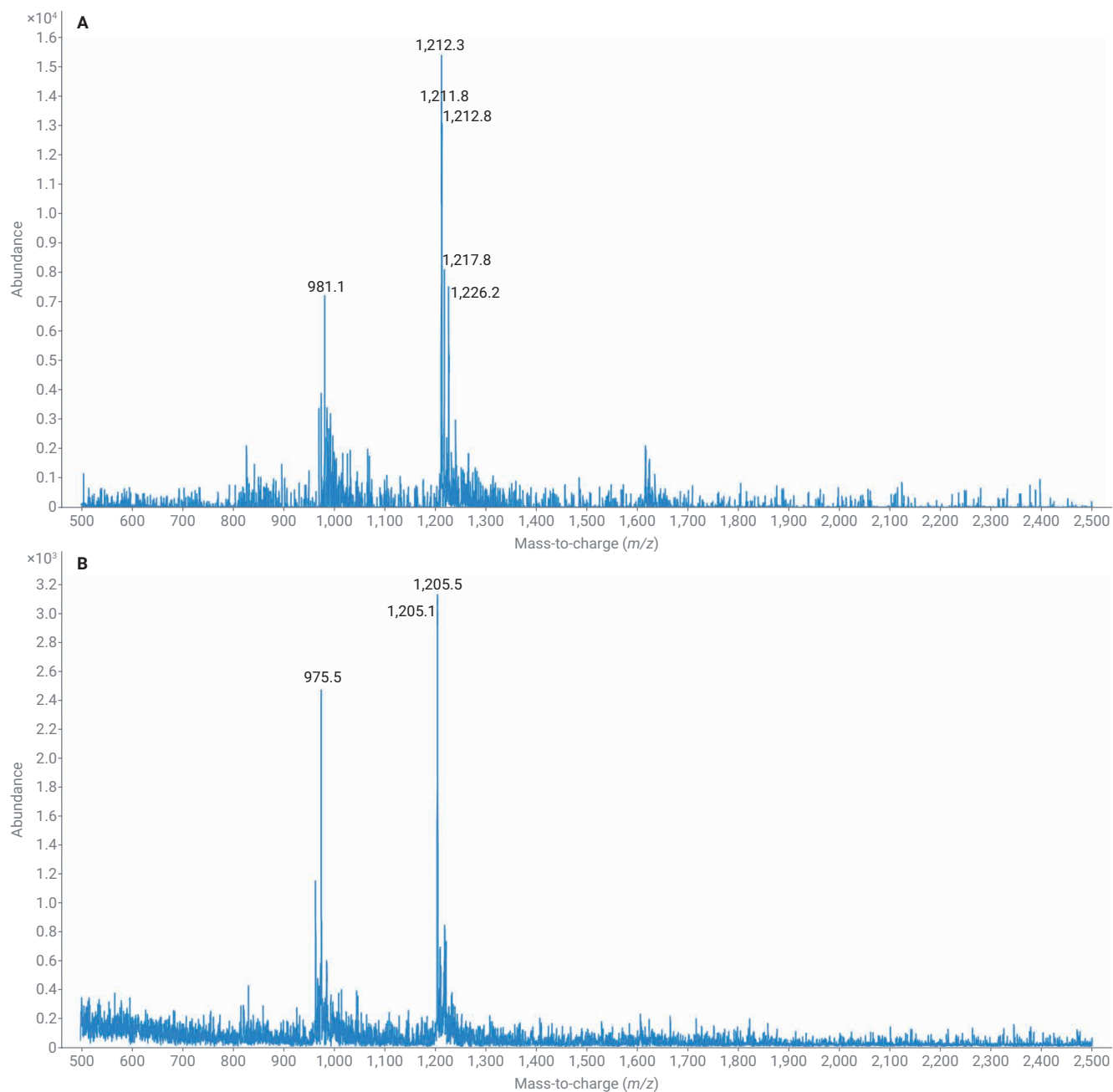


図 3. リテンションタイム 7.57 分（パネル A）と 7.71 分（パネル B）において溶出したチルゼパチド不純物の質量スペクトル。質量スペクトルのデコンボリューションにより、パネル A の不純物に対し 4,845.2 Da、パネル B の不純物に対し 4,817.9 Da の分子量が示されています。

不純物生成の時間的なモニタリング

GLP-1 医薬品の適切な保存と取り扱い、それらの安定性、効能、全般的な効果を維持するために不可欠です。不適切な保存条件は、劣化、治療効果の低下、潜在的な安全性リスクの原因となります。したがって、分解生成物の形成に対して、さまざまな保存期間と条件がどのように影響するかを評価することは、製品の品質と患者の安全性を確保するために重要です。

図 4 に、さまざまな溶液 pH 値におけるチルゼパチドの酸化生成物の生成の時間プロットを示します。図 4 のデータでは、チルゼパチドは pH 5 において最も不安定で、5 °C でも有意な酸化が生じる可能性があることが示されています。

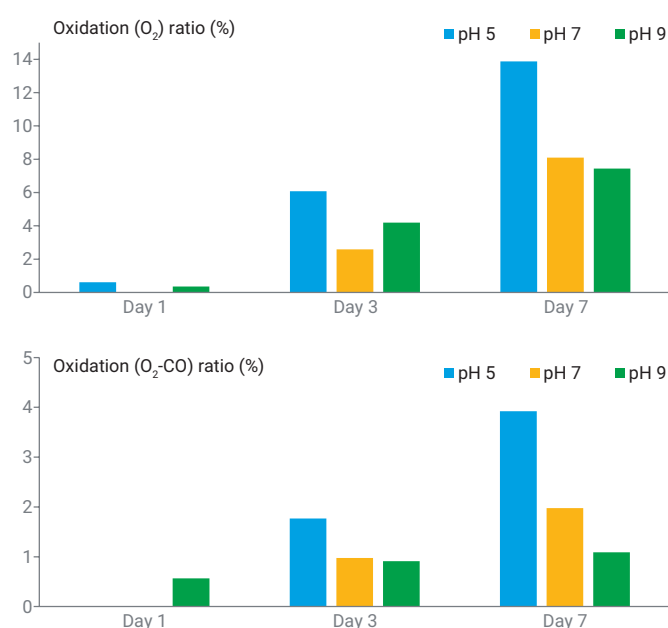


図 4. 異なる pH 条件下での経時的なチルゼパチド関連不純物の酸化物生成比

結論

結論として、Agilent Pro iQ Plus 質量検出器を使用したストレス条件下でのチルゼパチドの不純物プロファイリングにより、低濃度のペプチド不純物の検出とモニタリングのためのこの分析メソッドの有効性が実証されています。特に、このメソッドでは、2 % 未満の相対ピーク面積により不純物を検出することに成功しており、低濃度不純物の同定に対する感度を示しています。この研究では、特にさまざまな pH と保存条件下での、酸化によるチルゼパチドの劣化のしやすさに焦点を当てています。これらの研究結果は、GLP-1 医薬品の安定性と効能を維持するための適切な保存と取り扱いの重要性を示しています。このシングル四重極 LC/MS は、その高い感度、コスト効率性、シンプルさにより、ルーチン医薬品 QC/QA ワークフローのための実用的で便利なツールとなります。

参考文献

1. Badgujar, D.; Bawake, S.; Sharma, N. A Comprehensive Study on the Identification and Characterization of Major Degradation Products of Synthetic Liraglutide Using Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry. *J. Pept. Sci.* **2025**, 31, e3652. DOI: 10.1002/psc.3652.
2. Vilsbøll, T.; Christensen, M.; Junker, A. E.; Knop, F. K.; Gluud, L. L. Effects of Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists on Weight Loss: Systematic Review and Meta-Analyses of Randomised Controlled Trials. *BMJ* **2012**, 344, d7771. DOI: 10.1136/bmj.d7771.
3. Davidson, M. H. Cardiovascular Effects of Glucagonlike Peptide-1 Agonists. *Am. J. Cardiol.* **2011**, 108 (3 Suppl), 33B–41B. DOI: 10.1016/j.amjcard. 2011.03.002.
4. U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation Research. 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, May 19, **2021**. DOI: 10.1002/psc.3652.
5. Wang, J.; Berglund, M. R.; Braden, T.; Embry, M. C.; Johnson, M. D.; Groskreutz, S. R.; Sayyed, F. B.; Tsukanov, S. V.; White, T. D.; Jalan, A.; et al. Mechanistic Study of Diketopiperazine Formation during Solid-Phase Peptide Synthesis of Tirzepatide. *ACS Omega* **2022**, 7, 46809–46824. DOI: 10.1021/acsomega.2c06809.
6. Datola, A.; Pistacchio, A.; Simone, P.; Colarusso, L.; Melchiorre, M.; Rinaldi, G.; Amidi, M.; Politi, J.; Angiuoni, G. Characterization by LC-MS/MS of Oxidized Products Identified in Synthetic Peptide Somatostatin and Cetrorelix Submitted to Forced Oxidative Stress by Hydrogen Peroxide: Two Case Studies. *J. Mass Spectrom.* **2023**, 58(5), e4919. DOI: 10.1002/jms.4919.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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-006263

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2025
Printed in Japan, May 19, 2025
5994-8359JAJP