

Quantifizierung von koeluiierenden Neben- und Abbauprodukten in peptidischen Wirkstoffen mittels LC-MS

Selami Agron

Bachelor-Thesis, Molecular Life Sciences, Chemie

Auftraggeber: Bachem AG; betreut durch Dr. Patrik Plattner

Expert/in: Dr. Markus Ehrat, EK Biosciences

Begleitdozent/in: Prof. Dr. Götz Schlotterbeck, Fachhochschule Nordwestschweiz

ZUSAMMENFASSUNG

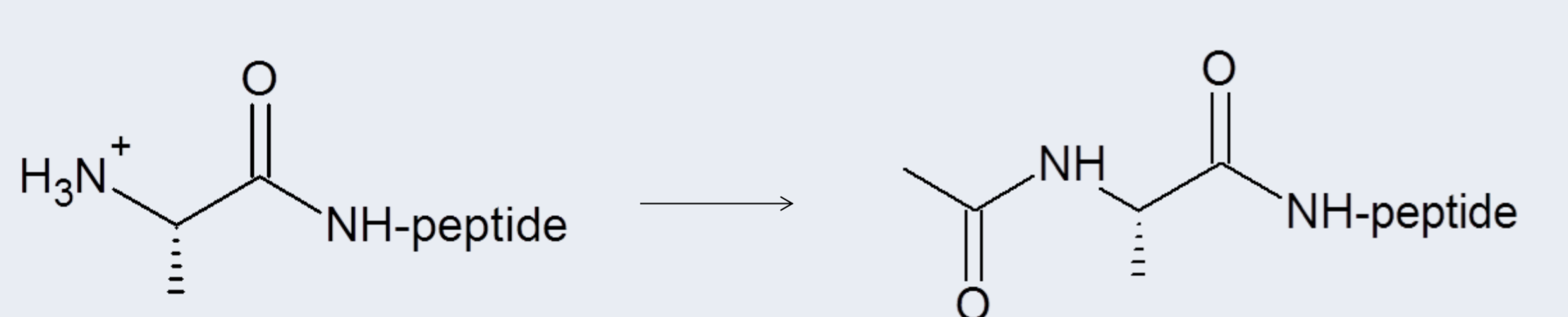
Die Analyse von peptidischen Wirkstoffen ist eine grosse Herausforderung aufgrund der Komplexität der Moleküle und den strukturell ähnlichen Verunreinigungen. Neben- und Abbauprodukte, die sich chromatographisch nicht trennen lassen, können über ihren Massenunterschied im Massenspektrometer differenziert und damit quantifiziert werden.^[1] In dieser Arbeit wurde die Quantifizierung mittels MS von vier häufig vorkommenden peptidischen Verunreinigungen untersucht und evaluiert. Im Konzentrationsbereich von 0.1-3.6 mol-% der Verunreinigungen konnte eine einheitliche Signalwiederfindung von 75-95% festgestellt werden mit der Ausnahme einer Verunreinigung mit unterschiedlicher Nettoladung zum Produkt. Diese zeigte ein unterschiedliches Ionisierungsmuster welche die Quantifizierung am intensivsten Signal beeinflusst. Für alle getesteten, koeluiierenden Verunreinigungen konnte für ein Gehalt $\geq 0.1\%$ gezeigt werden, dass durch eine Kalibrierung der Daten zuverlässig mit einer Richtigkeit von 95-106% quantifiziert werden kann.

EINLEITUNG

Bei der Synthese von Peptiden entstehen durch die vielen Möglichkeiten zu Seitenreaktionen entsprechend viele Nebenprodukte. Dabei treten häufig solche mit fehlenden oder doppelt eingebauten Aminosäuren in der Peptidsequenz auf. Nach der Herstellung und Aufreinigung können neue Verunreinigungen während der Lagerung durch Abbaumechanismen gebildet werden.^[2] Beispiele dafür sind Oxidationen oder eine Acetylierung von Aminosäuren. Um strukturelle Unterschiede zu untersuchen, die potenziell einen Einfluss auf die Ionisierung im MS haben, wurden insgesamt vier Beispiele ausgewählt (Tab. 1).

Produkt	Neben- bzw. Abbauprodukt	Art der Verunreinigung
1 Bivalirudin	Des-Gly ⁵ -Bivalirudin	fehlendes Glycin
2 Bivalirudin	Endo-Gly ^{5a} -Bivalirudin	zusätzliches Glycin
3 Tetracosactid	[Met(O) ⁴]Tetracosactid	oxidiertes Methionin
4 Somatostatin	Ac-Somatostatin	acetylierter N-Terminus*

*



Tab. 1: Verwendete Peptidgenerika (Produkte) und ausgewählte Verunreinigungen für die Quantifizierung

Die Produkte wurden mit den entsprechenden Verunreinigung in einem Konzentrationsbereich von 0.1-3.6% versetzt. Diese chromatographisch mit dem Produkt koeluiierenden Verunreinigungen wurden im Massenspektrometer gegenüber dem Hauptprodukt quantifiziert. Dabei wurde die relative Häufigkeit des Signals und die relative Fläche der extrahierten Ionenchromatogramme (EIC) des intensivsten Signals untersucht. Die Messresultate wurden auf ihre Signalsuppression sowie gemäss ICH guideline Q2(R1) auf Linearität, Präzision, Richtigkeit und Sensitivität überprüft.

RESULTATE

Verunreinigungen mit gleicher Nettoladung wie das Produkt (Tab.1 Nr. 1-3) zeigten eine durchschnittliche Signalwiederfindung von 75-95% mit Linearitäten von $R^2 > 0.996$ (Abb. 1). Im Vergleich dazu zeigte Ac-Somatostatin eine deutlich erhöhte Ionisierungseffizienz mit 121% gegenüber dem Produkt Somatostatin. Dieses Ergebnis wurde auf die unterschiedliche Nettoladung zwischen Verunreinigung und Produkt zurückgeführt. Bei Berücksichtigung aller Mehrfachladungen fiel die Richtigkeit mit 93% niedriger aus und war damit wieder im Bereich der anderen Beispiele (Abb. 2 B).

Anhand von Signalkorrekturen mithilfe der Regressionsgeradengleichung können Verunreinigungen $\geq 0.1\%$ unter dem Hauptpeak zuverlässig quantifiziert werden. Die Richtigkeit mit Kalibration liegt für Verunreinigungen um 0.5% in dem Bereich von 95-106% (Abb. 2 C). Die Reproduzierbarkeit konnte anhand von einer zweiten Messung zu einem späteren Zeitpunkt mit frischen Proben gezeigt werden. Es wurde der Nachweis erbracht, dass eine Suppression einerseits durch die Koelution in Produktmatrix entsteht und andererseits kann von einer niedrigeren Ionisierungseffizienz bei Konzentrationen von $< 8\%$ ausgegangen werden.

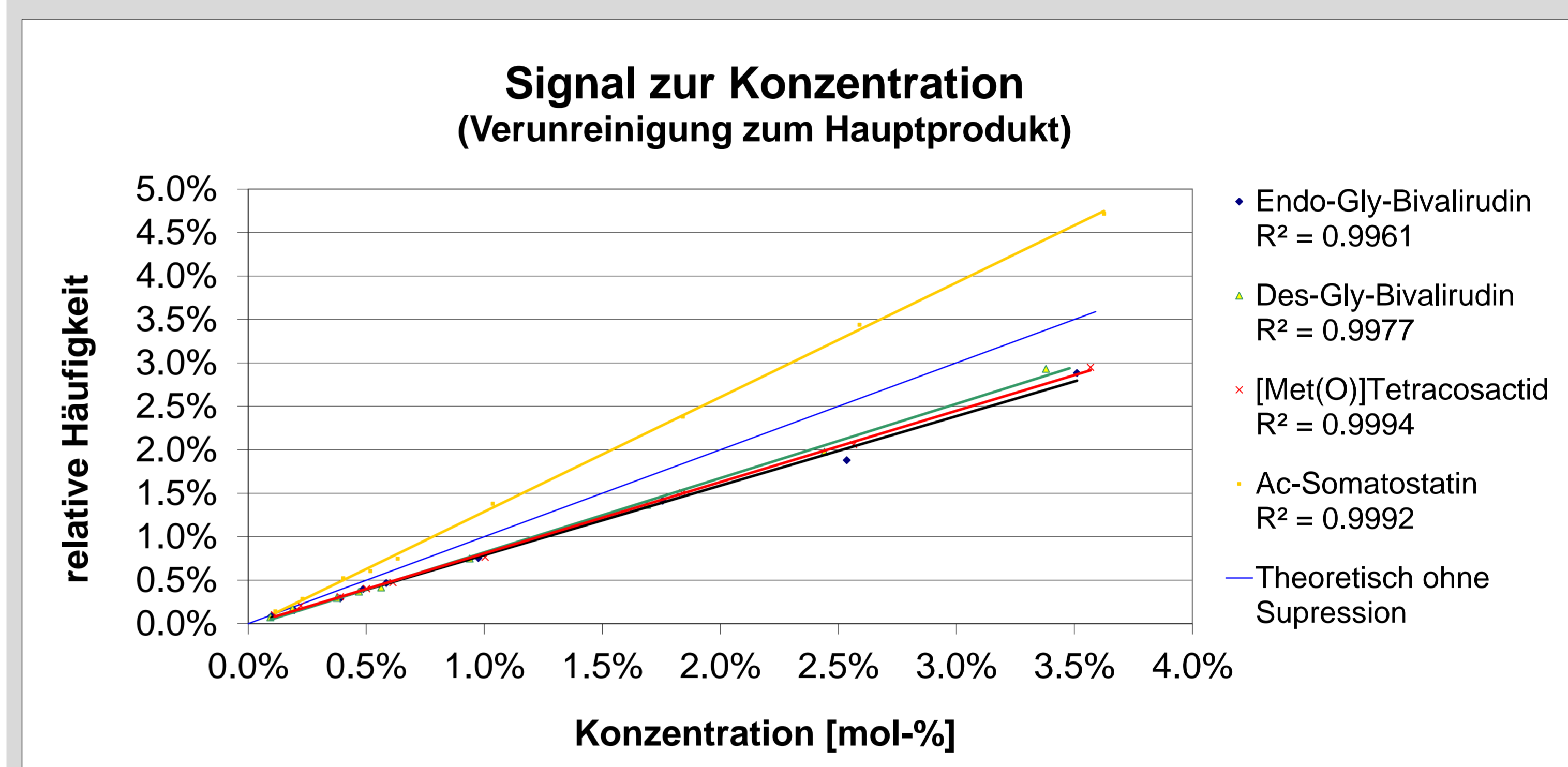


Abb. 1: Signalverhalten der verschiedenen Verunreinigungen von 0.1-3.6% (Verunreinigung zum Hauptprodukt), gemessen mit ESI-Ionenfalle LTQ XL von Thermo Scientific

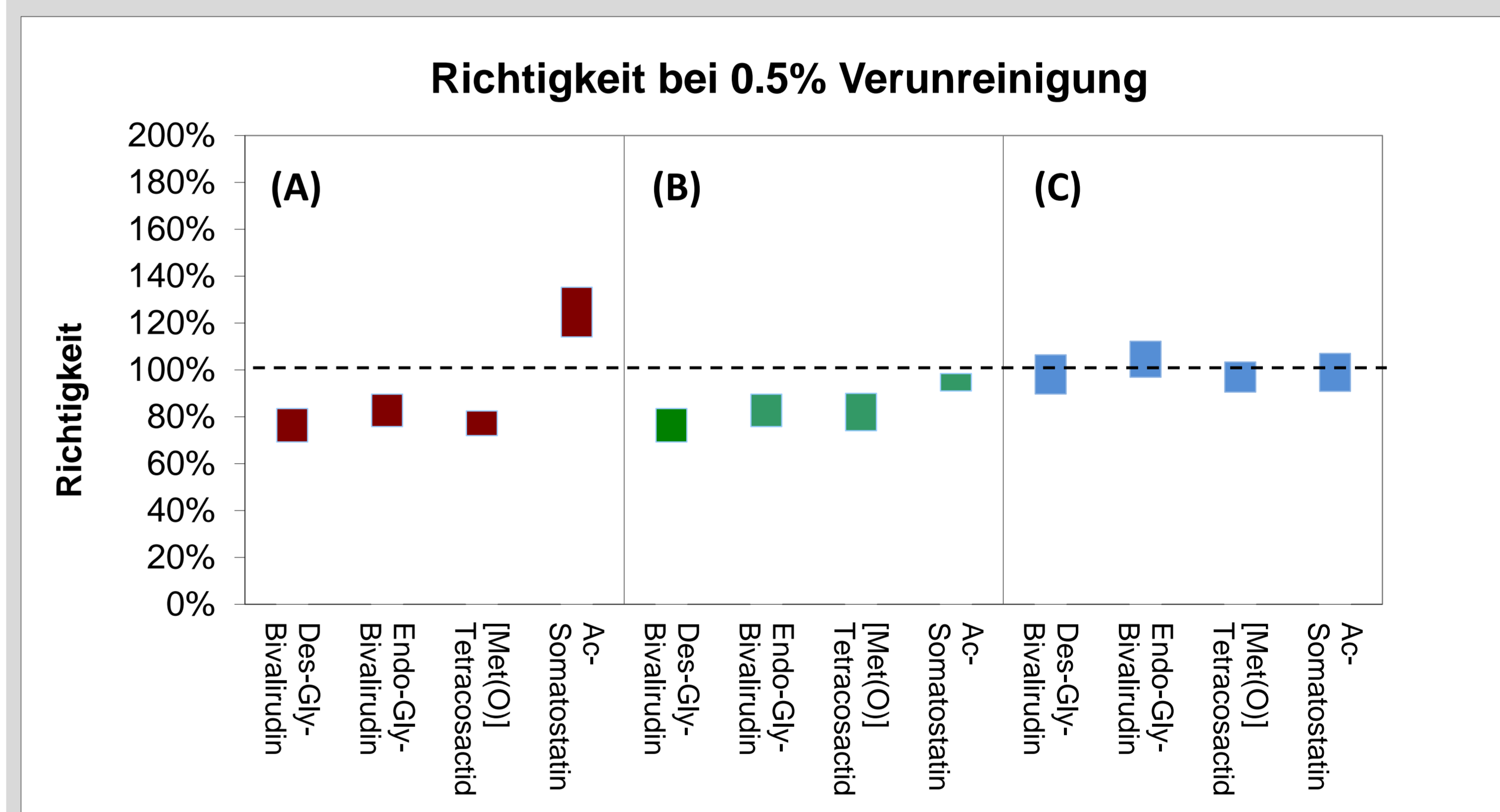


Abb. 2: Richtigkeit bei 0.5% Verunreinigung und unterschiedlicher Auswertung der relativen Häufigkeit; (A) am intensivsten Signal, (B) der Ionensummen, (C) korrigiert durch Regressionsgeradengleichung

SCHLUSSFOLGERUNG

LC-MS ermöglicht die Quantifizierung von koeluiierenden Verunreinigungen mit ausreichender Richtigkeit und Präzision. Die bestimmte Wiederfindung war für alle Verunreinigungen mit gleicher Nettoladung vergleichbar. Im Gegensatz dazu ergibt Ac-Somatostatin mit einer reduzierten Nettoladung zu seinem Produkt ein erhöhtes Signal. Durch eine Kalibrierung über die Regressionsgerade wurden Verunreinigungen, die sich chromatographisch nicht trennen lassen, mit einer Richtigkeit von 95-106% quantifiziert. Der Firma Bachem AG stehen nun Daten zur Beurteilung bisheriger quantitativer Bestimmungen sowie eine Grundlage zur weiteren Abklärung zur Verfügung.

REFERENZEN

- [1] Duncan K. Bryant, Michael D. Kingswood, Ana Belenguer, *Journal of Chromatography A*, 1996, 721, 41-51
[2] Norbert Sewald, Hans-Dieter Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002