

Využití LC/MS v analýze malých molekul a bioléciv



Altium

Jitka Zrostlíková

LC/MS ve farmaceutické analýze

LC/MSD XT



- **Profilování nečistot a konfirmace hmoty** pro malé molekuly, proteiny, peptidy mAB a oligonukleotidy

LC/MS QQQ



- Mutagenní nečistoty: **nitrosaminy**

LC/QTOF 6545XT
AdvanceBio



- **Screening nečistot** malé molekuly
- Screening látky **extrahovatelné a vyluhovatelné**
- **Podrobná charakterizace** bioléciv a oligonukleotidů



Altium

Mutagenní nečistoty: nitrosaminy

Požadavky na analýzu nitrosaminů dle FDA

- V září 2024 FDA vydala finální příručku [Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs](#), kde se rozlišují tzv. **small-molecule nitrosamines** a **NDSRI's**: N-Nitroso Drug Substance Related Impurities.
- Jsou stanoveny **AI (Acceptable Intake)** podle třídy rizika sloučeniny, seznam obsahuje 1271 nitrosaminů (včetně hypotetických) včetně třídy rizika
- Převod AI limitů na povolenou koncentraci v ppm závisí na maximální denní dávce (MDD) léčiva

$$\text{ppm} = \text{AI (ng)}/\text{MDD (mg)}$$

FDA Recommended Acceptable Intake (AI)
pro klíčové nitrosaminy

Nitrosamine	AI Limit (ng/day)
NDMA	96
NDEA	26.5
NMBA	96
NMPA	26.5
NIPEA	26.5
NDIPA	26.5

EMA
18

Požadavky na analýzu nitrosaminů dle FDA

- LOQ analytické metody musí **odpovídat povolené koncentraci sumy nitrosaminů**, vypočtené z AI a MDD

Například:

AI = 26,5 mg (povolená suma nitrosaminů), MDD = 880 mg/den

$\Rightarrow \text{LOQ} \leq 0,03 \text{ ppm}$

- ALE: pro léčiva s vyšší MDD nebo pro přítomnost více nitrosaminů se požadované **LOQ adekvátně snižuje**
- To vede k **vyšším nárokům na analytickou metodu** než dle dřívějších norem

Agilent LC/MS analýza nitrosaminů



APCI

Agilent 6495D LC/TQ

- **High- end LC/MS QQQ** s nejvyšší citlivostí
- Čtvrtá generace **iFunnel**
- Možnost samostatného nastavení iFunnel pro jednotlivé přechody – **prevention of unstable ion fragmentation**

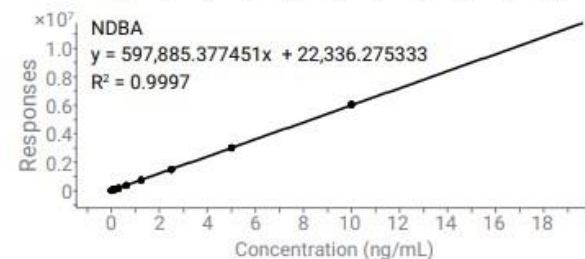
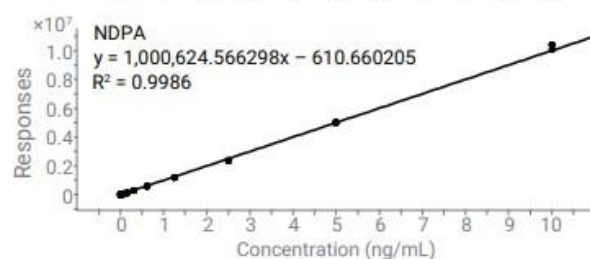
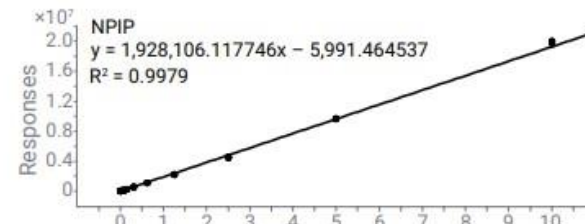
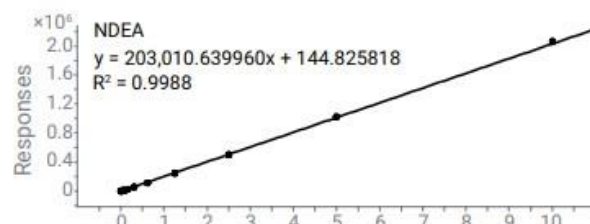
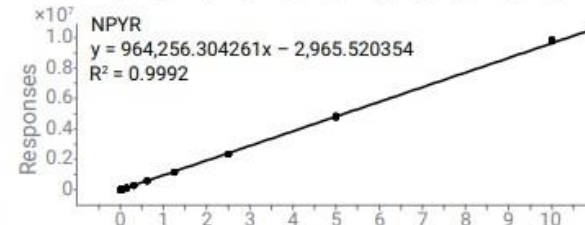
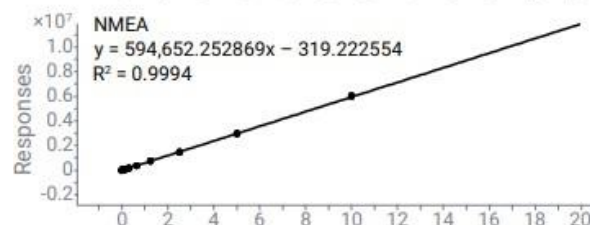
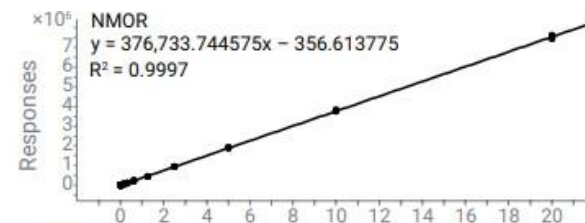
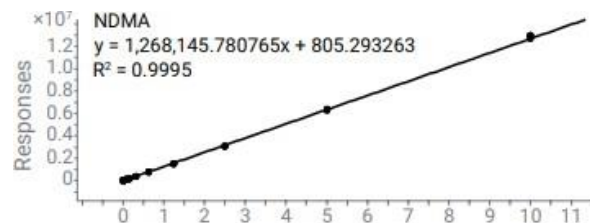


Agilent 6495D LC/TQ analýza nitrosaminů v losartanu

Navážka 100 mg Losartanu, naředěno do 10 ml rozpouštědla

LLOQ < 0,01 ng/ml = **0,001 ppm** v léčivu

	Concentration				LLOQ (ng/mL)
	0.01 ng/mL (n = 3)				
Name	Response	S/N	RSD (%)	Accuracy (%)	
NDMA	13035	48.8	1.30	103.0	0.01
NMOR	3286	102.1	0.01	89.4	0.01
NMEA	5121	136.7	0.02	93.8	0.01
NPYR	6792	66.9	0.01	103.6	0.01
NDEA	1752	149.51	0.05	81.3	0.01
NPIP	14630	162.5	0.02	109.5	0.01
NDPA	8745	305.6	0.02	95.8	0.01
NDBA	28666	586.8	0.02	108.4	0.01





Altium

Analýza bioléciv

Bioléčiva

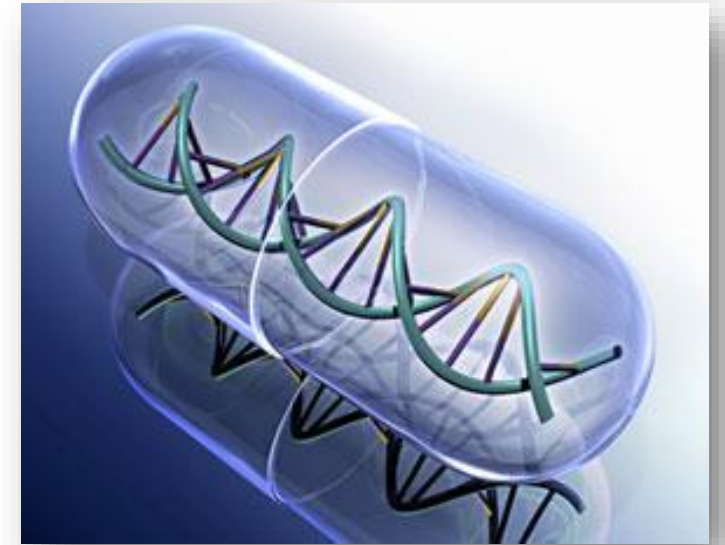
Léčiva na bázi velkých molekul, která nepůsobí plošně, ale dovedou vyhledat cílené struktury v organismu a interagovat s nimi

A) *Biotechnologická výroba*

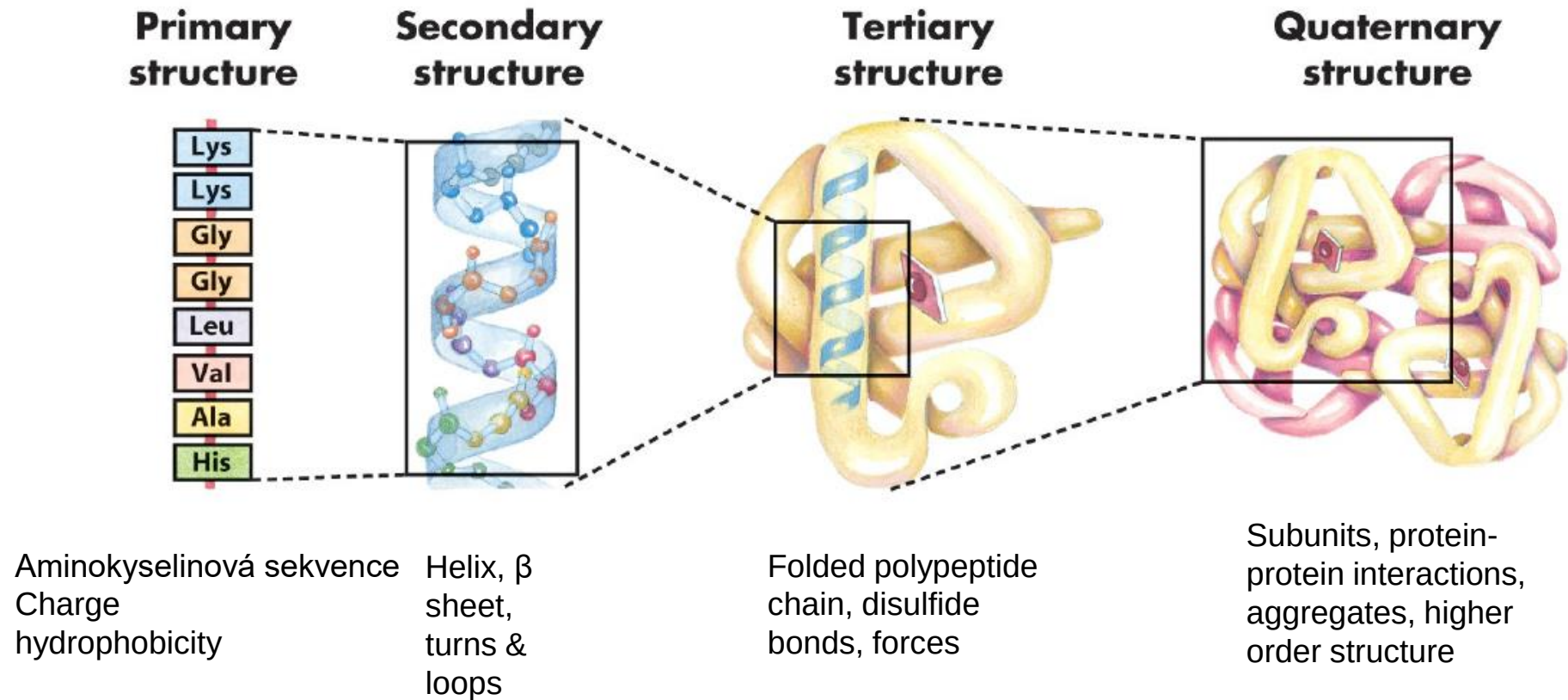
- technologie rekombinantní DNA: **DNA**, která kóduje cílovou molekulou léčiva je **uměle zabudována** do buněčných linií, které následně slouží k její výrobě
- Peptidy, proteiny a protilátky

B) *Syntetická výroba*

- Syntetické oligonukleotidy



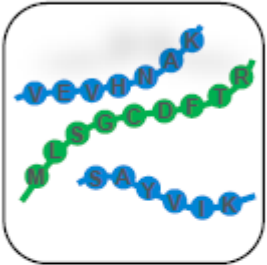
Strukturní a funkční charakterizace bioléciv



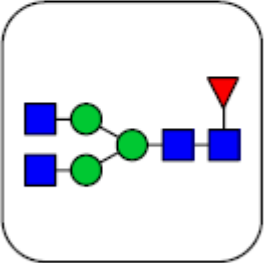
Charakterizace bioléciv: Agilent nástroje a řešení



Intaktní proteiny a subjednotky
vynikající citlivost a kvalita
spekter



Mapování peptidů a PTM rutinní
konfirmasi nebo hlubší
charakterizace pomocí Iterativního
MS/MS



Profilování glykanů:
plný workflow v BioConfirm SW



Konjugáty léčivo protilátka:
Kalkulátor Drug-to-Antibody
(DAR) v BioConfirm



Charakterizace oligonukleotidů:
Target plus impurities
Konfirmace sekvence

Charakterizace bioléciv: Agilent nástroje a řešení

Příprava vzorku

Separace

Detekce

Zpracování dat a reporting



AssayMAP Bravo



**Infinity III Bio LC
AdvanceBio LC columns**



**6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
LC/MSD XT**



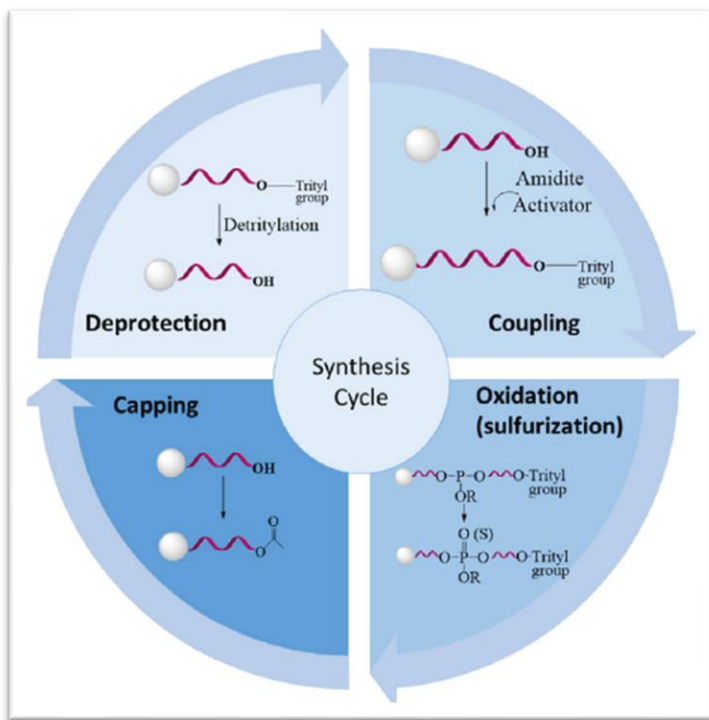
MassHunter BioConfirm



Altium

Analýza oligonukleotidů

Výzvy ve výrobě syntetických oligonukleotidů



- Výrobní šarže obsahuje jak **cílenou sekvenci** tak i **chybné sekvence** strukturně blízké
- Nepravidelnosti ve výrobě vedou k tvorbě nečistot

Shortmery (N-1) –
chybí jeden nebo více
nukleotidů

Longmery (N+1) –
zahrnují více
nukleotidů než je
zamýšleno

Chránící skupiny jako
benzoyl, isobutyryl,
dimethylformamidyl, a
cyanoethyl

Ostatní produkty
pocházející z
depurinace,
depyrimidace, oxidace,
PS to PO, and
degradace nucleáz

LC/MS pro analýzu oligonukleotidů

Single quadrupole MS (SQ)



LC/MSD XT

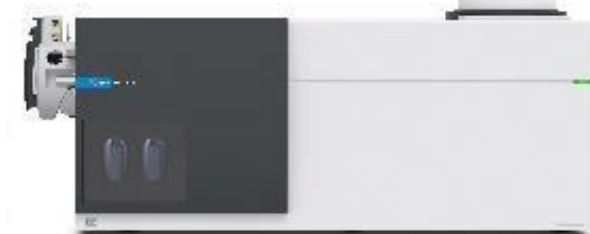
- Nižší cena
- Robustní, jednoduché použití
- Jednotkové rozlišení $\leq 0,7$ u (Da)
- Rozsah hmot do 3000 Da
- Potvrzení hmoty
- Profilování nečistot

Software: **OpenLab CDS 2.8**

Nová funkce dekonvoluce!

HRMS (QTOF)

- Vyšší rozlišení a přesnost hmoty
- Charakterizace nízkých koncentrací nečistot
- Informace o sekvenci (MS/MS)



LC/QTOF 6545 XT

Software: **MassHunter BioConfirm**

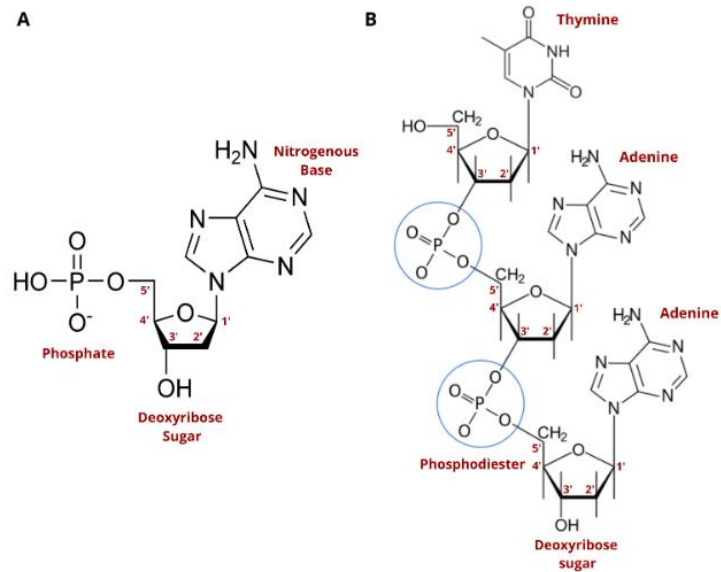
Dvě automatická workflow pro oligonukleotidy



Altium

LC/MSD pro QC analýzu oligonukleotidů

Jaká přesnost hmoty je třeba?



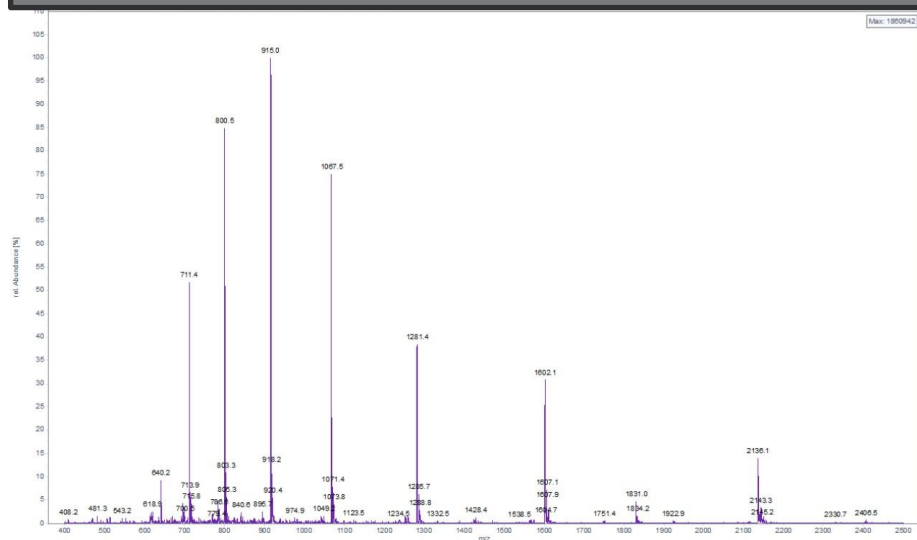
- Nukleotidová jednotka má hmotu cca **350 Da**
- Záměna báze rozdíl hmot **16 Da**
- Dithioate nečistota má hmotu **16 Da**

CATTAG = 1791 Da

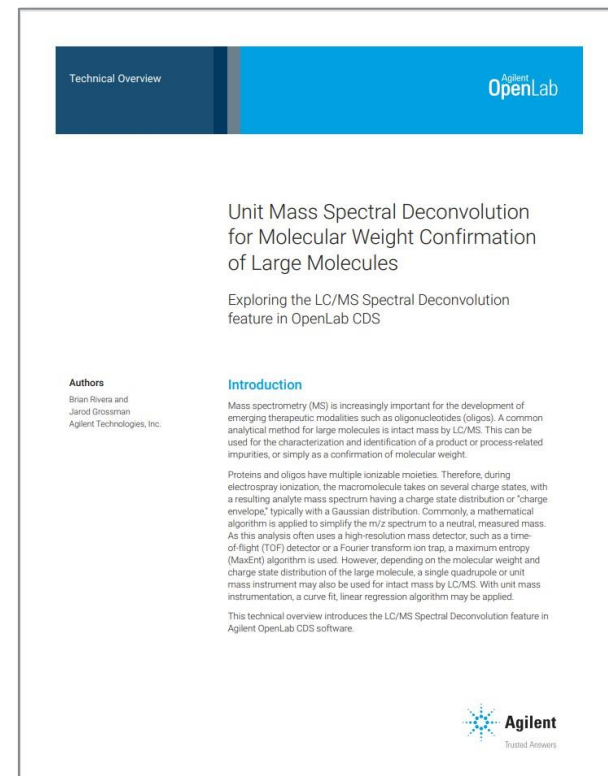
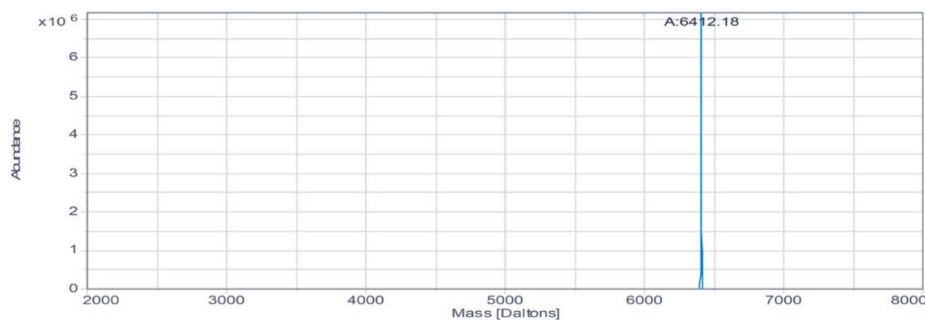
CATTAA = 1775 Da

LC/MSD analýza intaktních velkých molekul

Spektrum 21- meru oligo, dominantní nábojový stav 7-



Nábojová dekonvoluce

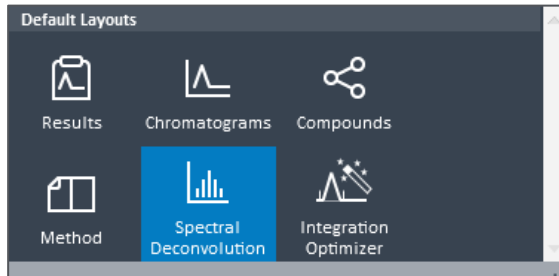


Pro více info:

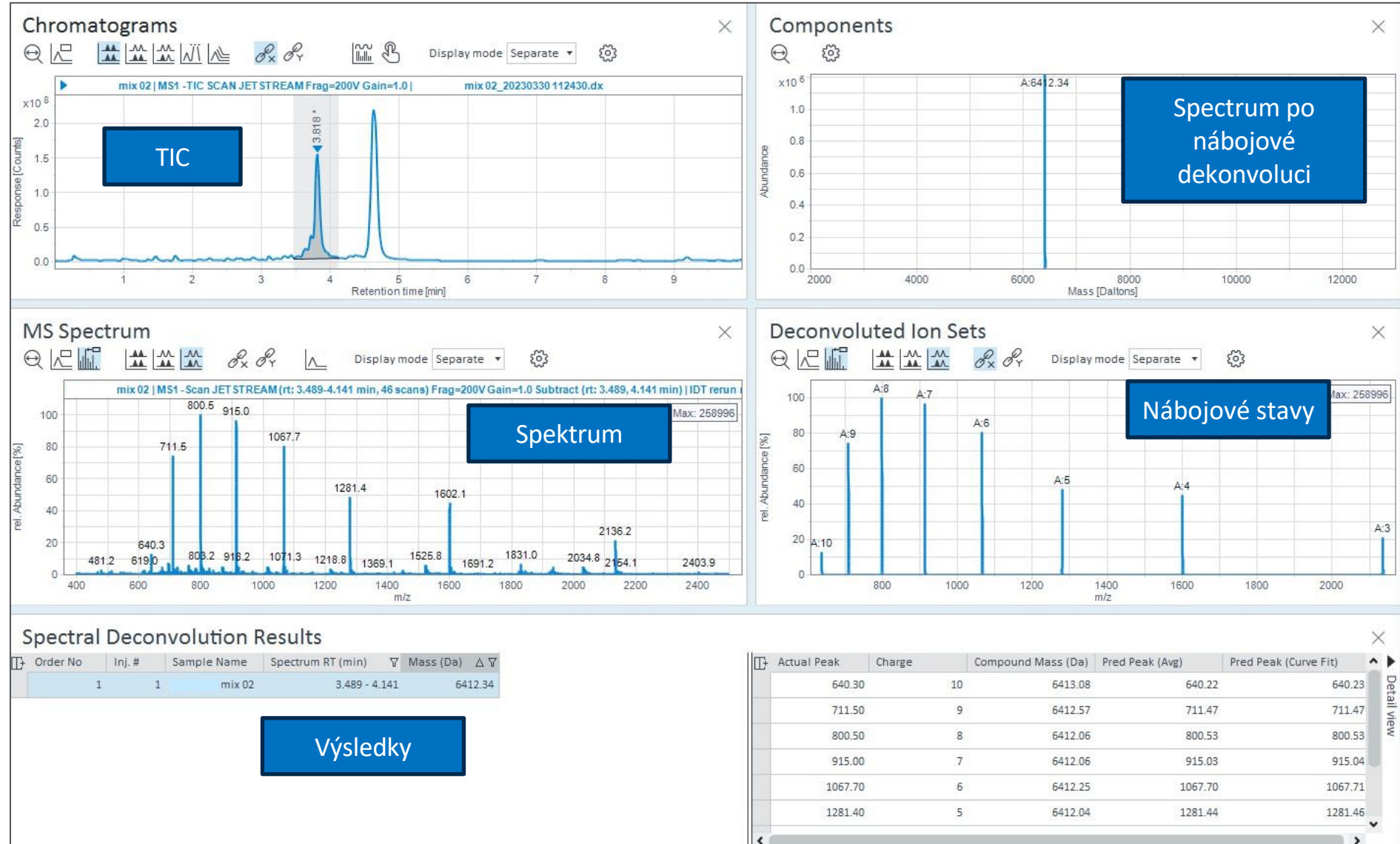
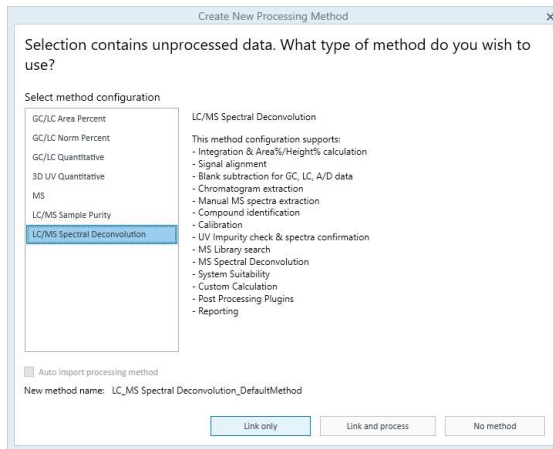
Application Note 5994-6928EN

LC/MSD nábojová dekonvoluce v OpenLab CDS 2.8

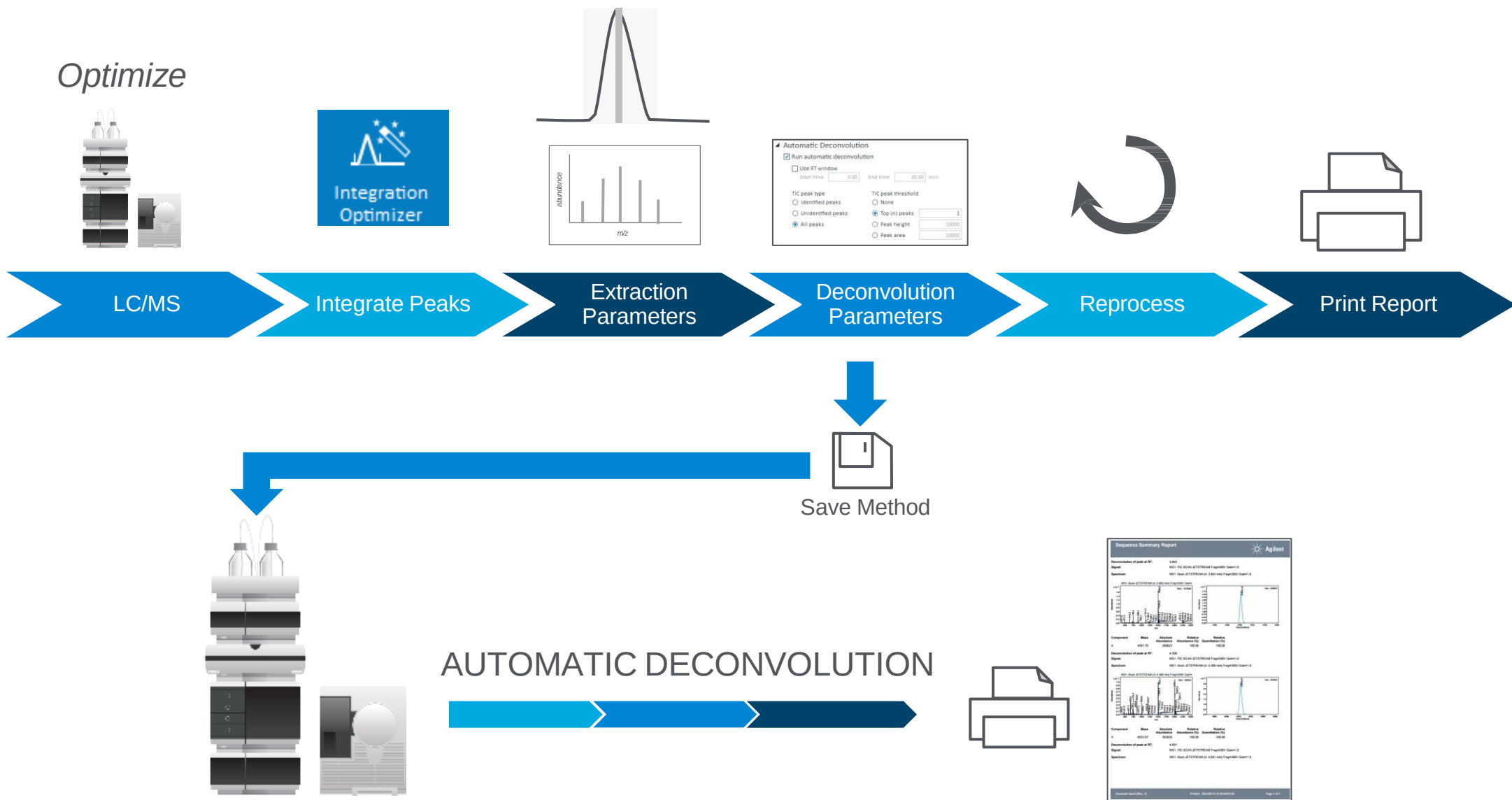
Základní SW rozhraní



Vyberte typ dekonvoluce



Automatický workflow nábojové dekonvoluce



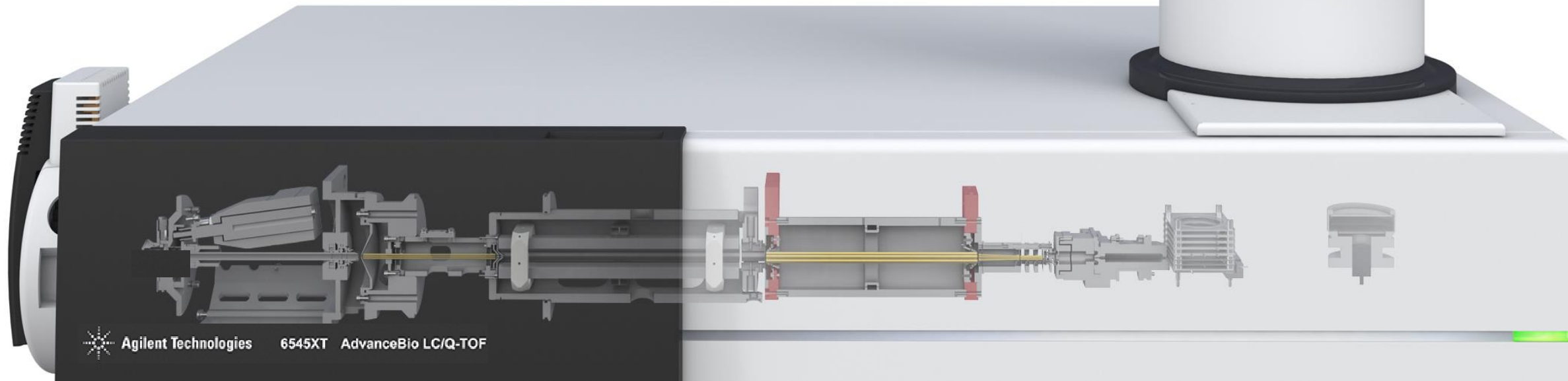


Altium

LC/MS QTOF pro strukturní analýzu oligonukleotidů

6545XT AdvanceBio dedikovaný LC/Q-TOF pro biopharmu

- **Ultra nízké vakuum** $10E^{-8}$ Torr pro minimální kolize a maximální transmissi velkých molekul
- Vynikající kvalita měření pro intaktní (velké) proteiny, i malé peptidy nebo glykany
- **SWARM autotune**: více módů optimalizace pro velké molekuly NEBO peptidy
- Hmotnostní rozsah **do m/z 30k**
- MS rozlišovací schopnost **50 000** díky lepší iontové optice



Workflow pro charakterizaci oligonukleotidů v MassHunter BioConfirm 12

A) Target Plus Impurities (TPI)

Potvrzení přítomnosti hlavní sekvence a nalezení nečistot

LC/QTOF

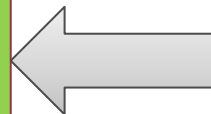
SW Bioconfir:

Uživatel

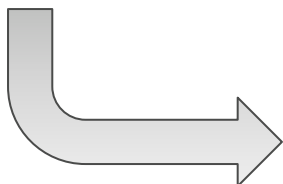
HRMS Data
(MS1 bez fragmentace)



Seznam možných nečistot



- Známa sekvence oligonukleotidu
- Volba možných modifikací

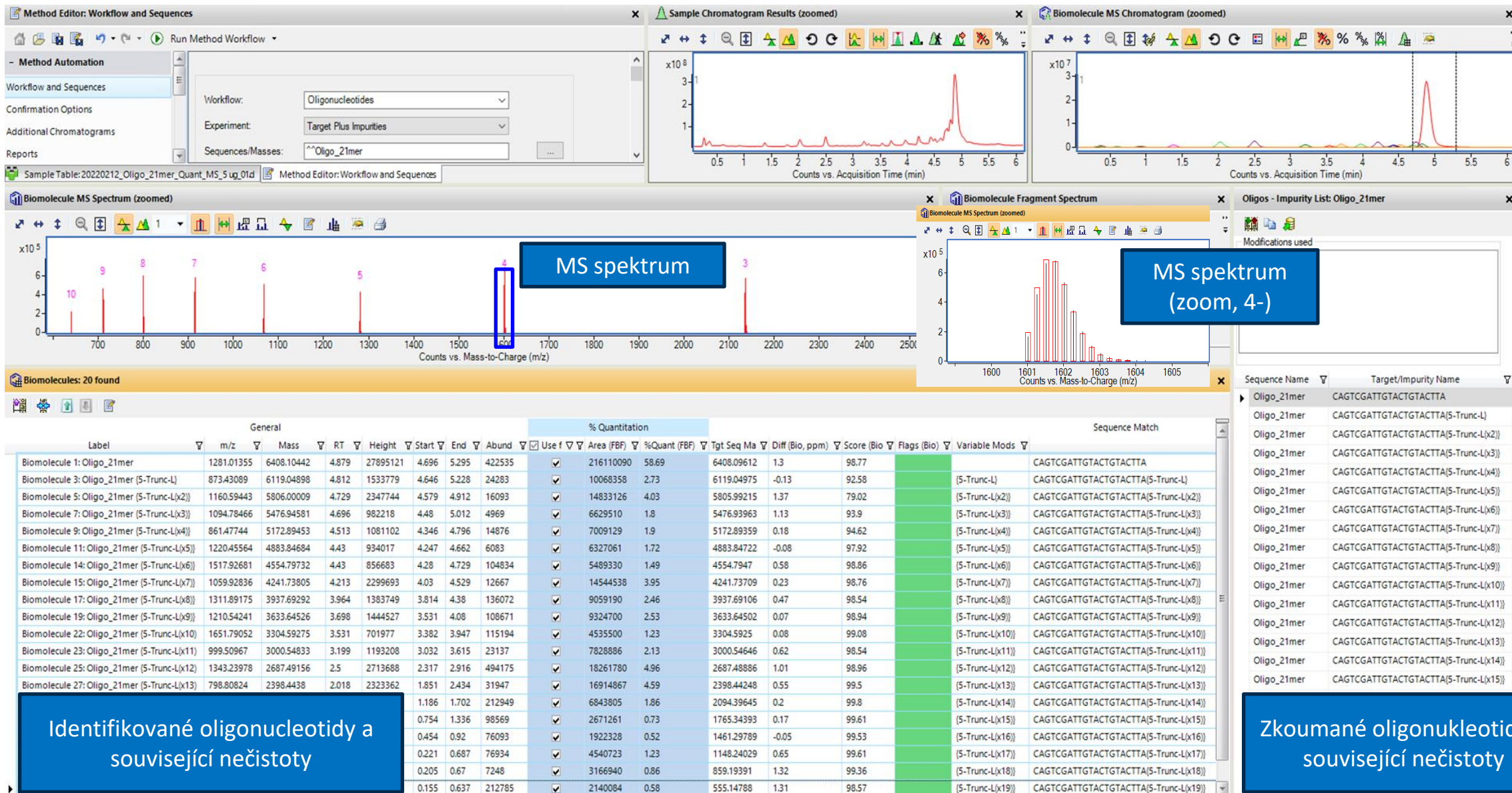


Potvrzení hmoty hlavního
oligonukleotidu a tabulka nečistot

Nastavení workflow

TIC

Chromatogram extrahovaných látek



Workflow pro charakterizaci oligonukleotidů v MassHunter BioConfirm 12

B) Sekvenace

Potvrzení oligonukleotidové sekvence

LC/QTOF

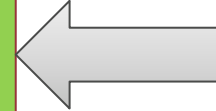
SW Bioconfirm:

Uživatel

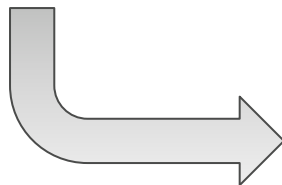
HRMS Data
(MS/MS)



Seznam možných fragmentů



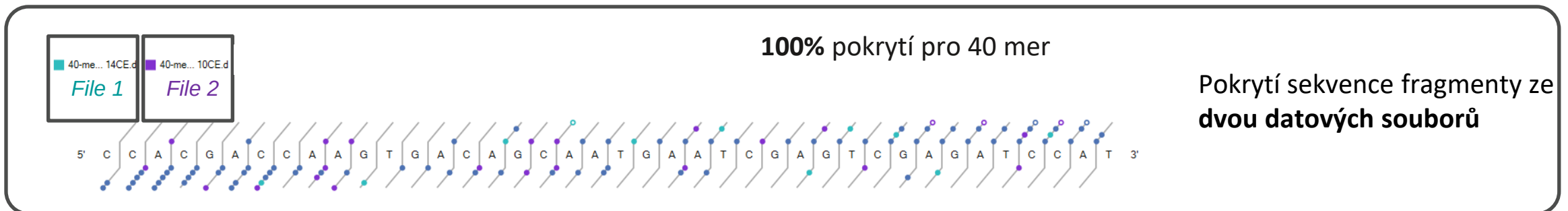
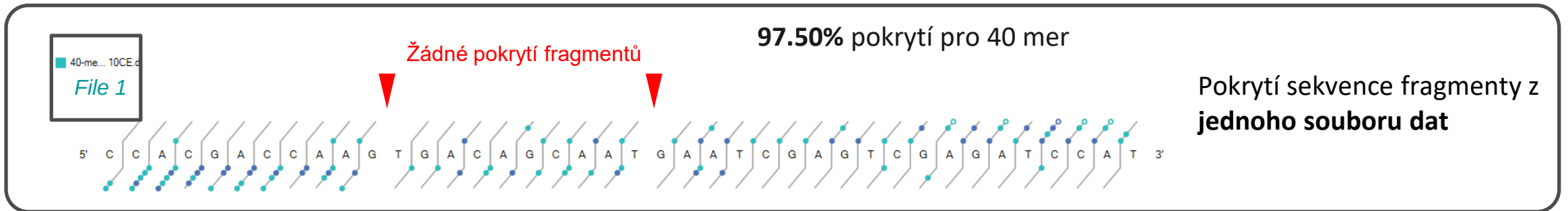
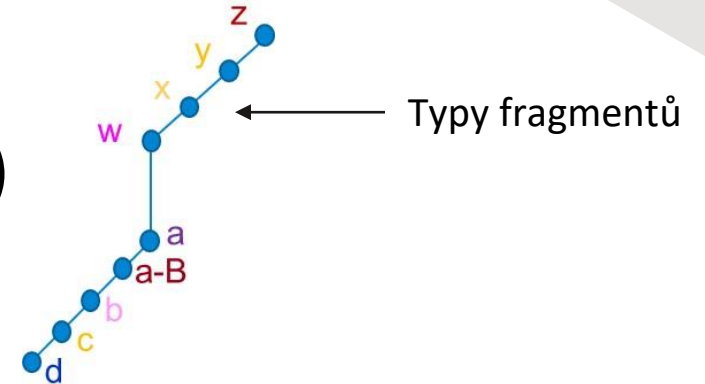
Známa sekvence oligonukleotidu



Potvrzení sekvence oligonukleotidu

Schematické znázornění pokrytí sekvence

- Puntíky označují **nalezené fragmenty**
- Pozice puntíků znázorňují typy fragmentů (d, c, b, etc)



Shrnutí

Nitrosaminy:

- Zvyšující se nároky na LOQ dle FDA: LC/QQQ analýza Agilent **LC/MS QQQ 6495D: LLOQ < 0,001 ppm v léčivu**

Biopharma aplikace:

- **LC/MSD XT** s rozsahem m/z do 3000 lze použít **pro kontrolu kvality, nábojová dekonvoluce v OpenLab CDS 2.8**
- **LC/MS QTOF 6545XT** pro **strukturní charakterizaci** proteinů, peptidů, mAB, oligonukleotidů
- **Bioconfirm 12.0:** Workflows pro Biopharmu včetně QC a **strukturní charakterizace oligonukleotidů**
- Všechna workflow lze **využít v regulovaném prostředí** plně v souladu s US FDA Part 11 in Title 21 of the Code of Federal Regulations (CFR), and jeho EU analogie, EudraLex Chapter 4, Annex 11



Děkuji za
pozornost...