


NT-1386

Desenvolvimento de Método de HPLC Otimizado de Tirzepatida Utilizando a Coluna Kinetex PS C18: Ensaio, Perfil de Impureza e Indicador de Estabilidade para Produtos de Degradação

Arunkumar DN¹, Rajesh Babu Dandamudi, PhD¹, e Sean Orlovicz ²
¹ India Phenologix Lab, Phenomenex India, Hitech Defence and Aerospace Park Industrial Area, Mahadeva Kodigehalli, Hobli, Jala Taluka, Bengaluru 562149, Índia.

² Phenomenex, Inc., 411 Madrid Ave., Torrance, CA 90501 USA


Introdução

A Tirzepatida atua como um agonista duplo dos receptores do polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) e do peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1 (GLP-1). O interesse crescente nesses agonistas duplos GIP/GLP-1 decorre de seu potencial como terapias inovadoras para a regulação da glicemia e o controle do peso corporal, demonstrando desempenho superior em comparação aos agonistas seletivos do receptor GLP-1.

Trata-se de um peptídeo linear sintético composto por 39 aminoácidos, quimicamente modificado por meio da incorporação de um diácido graxo de cadeia C20. A separação das impurezas associadas à Tirzepatida representa um desafio significativo devido à natureza complexa das impurezas relacionadas a peptídeos, que frequentemente incluem sequências truncadas, formas oxidadas ou reduzidas, além de variantes resultantes de desaminação, fosforilação e glicosilação. Para alcançar uma separação eficiente, é indispensável empregar uma estratégia sistemática de desenvolvimento de método e selecionar cuidadosamente a fase estacionária. Retenção e seletividade aprimoradas são essenciais para diferenciar impurezas estruturalmente semelhantes.

Nessa nota técnica de aplicação, foram desenvolvidas técnicas precisas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise quantitativa da Tirzepatida e de nove substâncias relacionadas, utilizando a coluna Kinetex PS C18. A coluna Kinetex PS C18 é caracterizada pela alta eficiência e estabilidade 100% aquosa, oferecendo seletividade de múltiplas interações devido à modificação superficial positiva. Ela oferece formato de pico superior para compostos básicos e maior retenção para analitos ácidos. Sua estrutura de partícula núcleo sólido reduz a difusão dos analitos, resultando em picos mais finos e proporcionando excelente resolução e formato de pico, um fator crítico para a separação de moléculas peptídicas.

Foram realizados estudos de degradação forçada para avaliar a capacidade indicadora de estabilidade do método. A Tirzepatida foi submetida às seguintes condições de estresse:

- Degradação ácida (0,1 mL de ácido clorídrico 1 N à temperatura ambiente por 4 dias)
- Degradação básica (0,1 mL de hidróxido de sódio 0,1 N à temperatura ambiente por 1 hora)
- Degradação oxidativa (0,1 mL de peróxido de hidrogênio a 10% à temperatura ambiente por 4 dias)
- Degradação térmica (banho-maria a 80 °C por 18 horas)

Com essa abordagem, foi possível isolar a Tirzepatida de suas nove impurezas de degradação identificadas, além de pelo menos 18 impurezas não identificadas, demonstrando alta especificidade do método e sua capacidade de indicar estabilidade. A avaliação da pureza do pico por detector PDA confirmou a homogeneidade do pico de Tirzepatida em todas as amostras submetidas às condições de estresse.

Condições Cromatográficas

Parâmetro	Ensaio			Substâncias relacionadas			Indicador de Estabilidade		
Coluna:	Kinetex PS C18 2,6 µm Referência: 00F-4780-E0			Kinetex PS C18 2,6 µm Referência: 00F-4780-E0			Kinetex PS C18 2,6 µm Referência: 00G-4780-E0		
Dimensões:	150 x 4,6mm			150 x 4,6 mm			250 x 4,6 mm		
Fase Móvel:	A: 0,1% de Ácido Trifluoroacético (TFA) em água B: 0,1% de Ácido Trifluoroacético (TFA) em Acetonitrila								
Diluyente:	Acetonitrila e água (50:50 v/v).								
Gradiente:	Tempo (min)	FM A (%)	FM B (%)	Tempo (min)	FM A (%)	FM B (%)	Tempo (min)	FM A (%)	FM B (%)
	0,0	65	35	0,0	67	33	0,0	67	33
	3,0	65	35	3,0	67	33	5,0	67	33
	9,0	56	44	9,0	57	43	15,0	57	43
	30,0	56	44	48,0	56	44	80,0	56	44
	35,0	30	70	55,0	54	46	90,0	54	46
	40,0	30	70	60,0	40	60	100,0	40	60
	41,0	65	35	68,0	30	70	104,0	30	70
	45,0	65	35	69,0	67	33	105,0	67	33
				72,0	67	33	112,0	67	33
Fluxo:	1,2 mL/min			1,0 mL/min			1,0 mL/min		
Temperatura:	60 °C			60 °C			60 °C		
Volume de Injeção:	10 µL			10 µL			10 µL		
Sistema HPLC:	Waters Arc HPLC								
Detector:	215 nm			215 nm			215 nm		

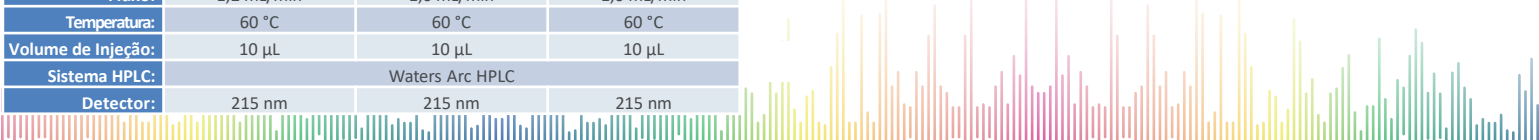
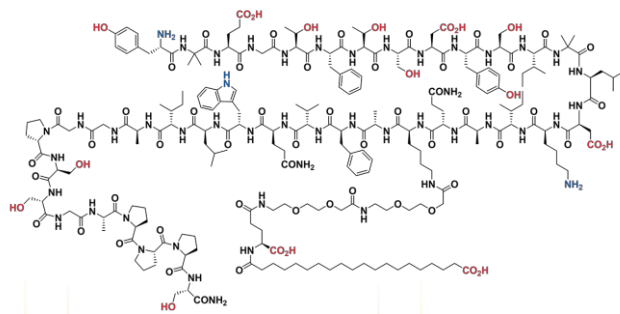
Preparação de Solução Padrão e de Padrão de Impurezas

Solução padrão:	Solução de Tirzepatida a 1,0 mg/mL no diluente (para análises de Substâncias Relacionadas) e 0,4 mg/mL (para o Ensaio).
Solução estoque de padrão de impurezas:	1,0 mg/mL em Diluente
Amostra fortificada:	0,3%, 0,6%, 1% e 1,5% de cada impureza fortificada ao padrão de Tirzepatida, considerando uma concentração de teste de 1,0 mg/mL.
Impurezas:	Os padrões de Semaglutida e suas impurezas foram adquiridos localmente das empresas ManoTri Pharma e Clearysynth Labs Limited.

Analitos

No S	Analito	IUPAC (Sequência)
1	Des Side chain-Tirzepatida	H-Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-NH2
2	Des Tyr (10)-Tirzepatida	H-Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Lys (AEEAc-AEEAc-γ-Glu-18-carboxi nonadecanóil)-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-NH2
3	Des-Tyr(1)-Aib(2)-Tirzepatida	H-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Lys (AEEAc-AEEAc-γ-Glu-18-carboxi nonadecanóil)-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-NH2
4	Endo-AEEAc-Tirzepatida	H-Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Lys(AEEAc-AEEAc-γ-Glu-18-carboxi nonadecanóil)-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-NH2
5	Endo-Gly(4)-Tirzepatida	H-Tyr-Aib-Glu-Gly-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Lys(AEEAc-AEEAc-γ-Glu-18-carboxi nonadecanóil)-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-NH2
6	Endo-Thr(5)-Tirzepatida	H-Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Lys (AEEAc-AEEAc-γ-Glu-18-carboxi nonadecanóil)-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-NH2
7	Endo-Tyr(1)-Tirzepatida	H-Tyr-Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Lys (AEEAc-AEEAc-γ-Glu-18-carboxi nonadecanóil)-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pr
8	Des-AEEAc-Tirzepatida	H-Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-D-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Lys(AEEAc-γ-Glu-18-carboxi nonadecanóil)-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pr
9	Des-γ-Glu-Tirzepatida	H-Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Lys(AEEAc-AEEAc-18-carboxi nonadecanóil)-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro

Estrutura da Tirzepatida



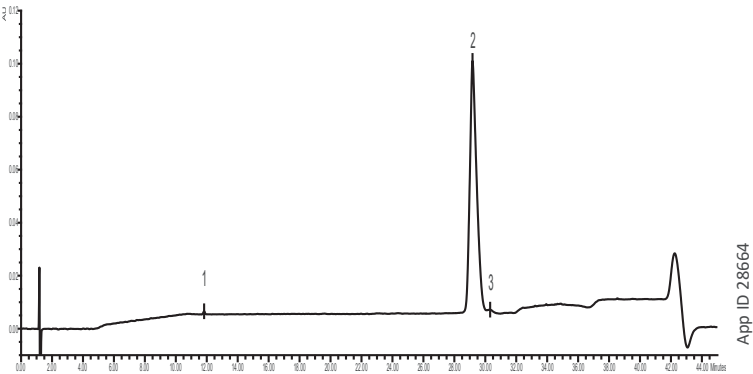


Resultados e Discussão

Ensaio

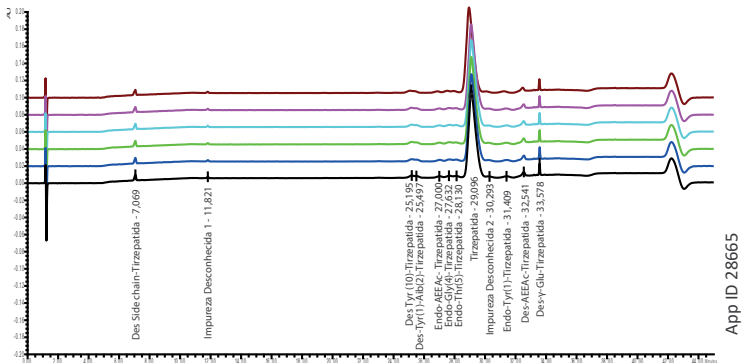
A coluna Kinetex PS C18 de 2,6 µm (150 × 4,6 mm) foi empregada para desenvolver um método para o ensaio de Tirzepatide. O objetivo desse ensaio é quantificar com precisão a Tirzepatide, exigindo a separação efetiva da Tirzepatide de suas impurezas. O cromatograma representativo do padrão de Tirzepatide é apresentado na **Figura 1**. Observou-se que o padrão exibiu duas impurezas não identificadas em baixas concentrações, as quais também foram separadas com sucesso da Tirzepatide. No desenvolvimento do método de ensaio, o padrão de Tirzepatide foi adicionado de nove impurezas conhecidas em uma concentração de 1%. A **Figura 3** ilustra a separação cromatográfica da Tirzepatide das nove impurezas conhecidas e das duas impurezas desconhecidas. Todas as impurezas identificadas foram nitidamente separadas do pico de Tirzepatide e confirmadas por meio de padrões individuais. Todos os picos apresentaram fatores de cauda dentro dos requisitos da USP, entre 0,8 e 1,8. A adequação do sistema foi validada por meio de seis injeções replicadas da solução amostra, demonstrando alta reprodutibilidade nos tempos de retenção e áreas de pico, conforme ilustrado na **Figura 2**.

Figura 1. Solução Padrão (0,4 mg/mL) para Ensaio na Coluna Kinetex PS C18 de 2,6 µm, 150 x 4,6 mm



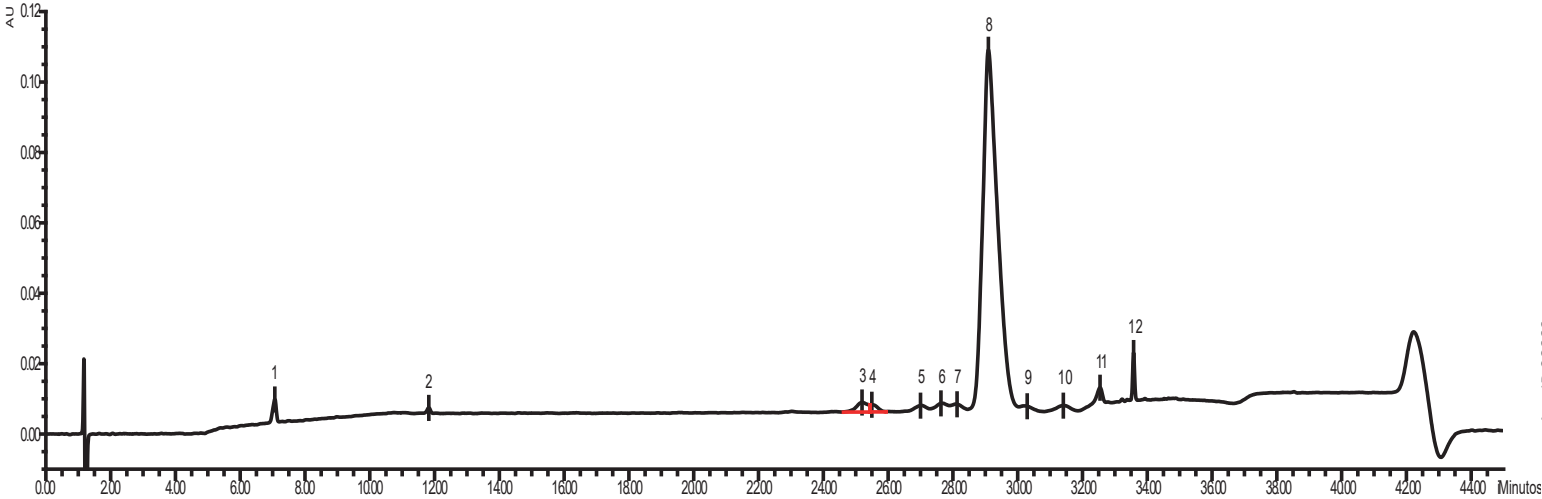
	Analito	Tempo de Retenção	Área	% de Área	USP Resolução	Fator de Cauda USP
1	Unknown impurity 1	11,830	9244	0,32	-	1,0
2	Tirzepatide	29,177	2872778	99,26	32,7	1,3
3	Unknown impurity 2	30,315	12074	0,42	1,7	1,3

Figura 2. Cromatogramas sobrepostos de seis injeções replicadas de impurezas fortificadas da solução padrão (0,4 mg/mL) na Coluna Kinetex PS C18 de 2,6 µm, 150 x 4,6 mm



Tirzepatida		
	Tempo de Retenção	Área
Média	29,177	3160054
DP	0,025	43199
DPR (%)	0,1	1,4
N=6 Injeções		

Figura 3. Cromatograma do padrão Tirzepatide fortificado em 1% com impurezas conhecidas na coluna Kinetex PS C18 de 2,6 µm, 150 x 4,6 mm



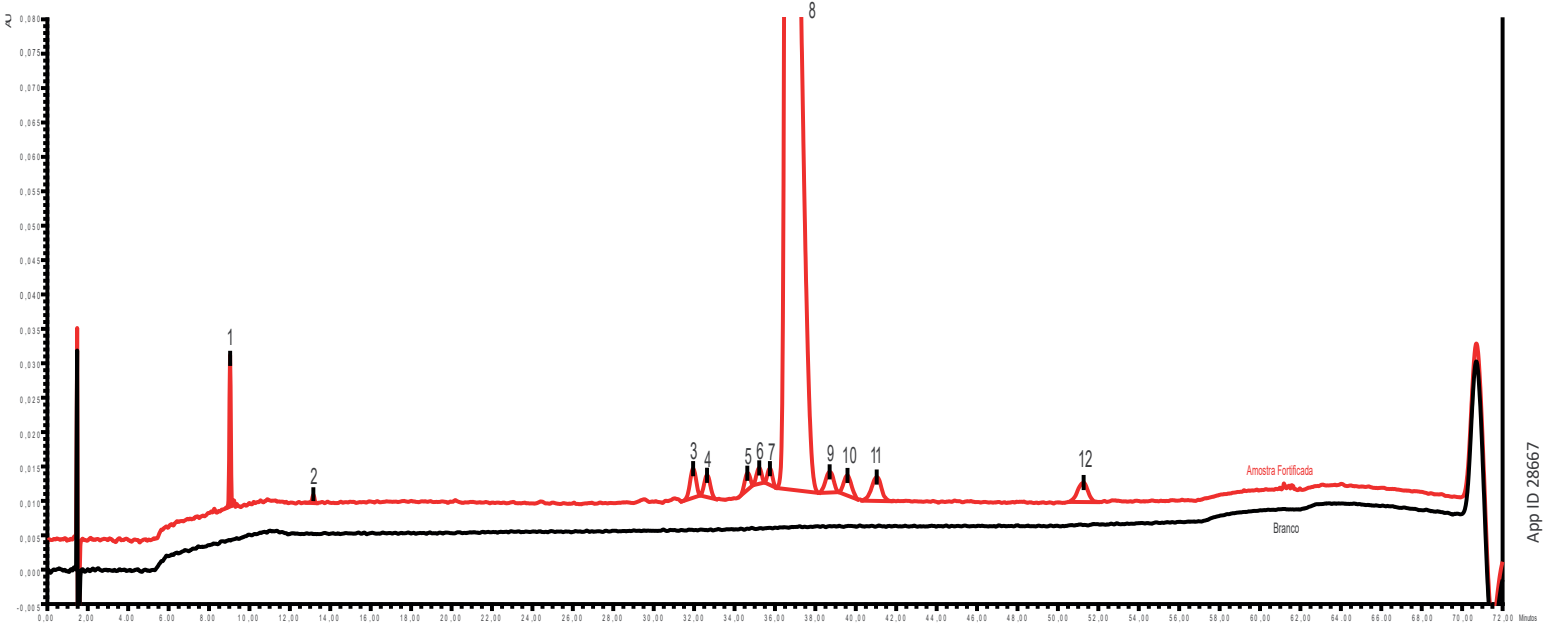
	Analito	Tempo de Retenção	Área	% de Área	Resolução USP	Fator de Cauda USP
1	Des Side chain-Tirzepatida	7,069	49157	1,36	-	0,8
2	Impureza Desconhecida 1	11,821	11195	0,31	23,3	0,9
3	Des Tyr (10)-Tirzepatida	25,195	70166	1,94	22,7	-
4	Des-Tyr(1)-Aib(2)-Tirzepatida	25,497	33309	0,92	0,1	-
5	Endo-AEEAc-Tirzepatida	27,000	25024	0,69	0,8	0,9
6	Endo-Gly(4)-Tirzepatida	27,632	17983	0,50	1,2	0,9
7	Endo-Thr(5)-Tirzepatida	28,130	14136	0,39	1,1	1,2
8	Tirzepatida	29,096	3226373	89,18	1,4	1,4
9	Impureza Desconhecida 2	30,293	13991	0,39	1,6	1,2
10	Endo-Tyr(1)-Tirzepatida	31,409	46693	1,29	1,7	0,9
11	Des-AEEAc-Tirzepatida	32,541	53235	1,47	2,1	0,8
12	Des-γ-Glu-Tirzepatida	33,578	56422	1,56	4,8	1,1



Substâncias relacionadas

Para a análise das substâncias relacionadas, foi essencial garantir a separação clara de cada impureza em relação à substância ativa. Outro objetivo fundamental foi assegurar que a resolução permanecesse robusta mesmo com concentrações elevadas de impurezas. Nesse estudo, o gradiente cromatográfico foi cuidadosamente ajustado para proporcionar uma separação confiável em um tempo total de 72 minutos. Conforme apresentado na **Figura 4**, essa estratégia permitiu a separação eficaz de todas as impurezas avaliadas em relação ao pico da Tirzepatida, alcançando uma resolução mínima de 1,2, valor que evidencia excelente seletividade. Os padrões individuais de impurezas foram analisados para confirmar a identidade de cada pico por meio da comparação dos tempos de retenção. Os cromatogramas sobrepostos referentes a esses padrões encontram-se na **Figura 5**. Além disso, foram realizadas seis injeções replicadas da amostra fortificada com impurezas, a fim de avaliar a reprodutibilidade do método. Os resultados, mostrados na **Figura 6**, demonstraram alta consistência, com desvio padrão relativo (DPR) inferior a 5%, confirmando precisão adequada. Para examinar o efeito da concentração sobre a seletividade, foram avaliados quatro níveis de fortificação de cada impureza (0,3%, 0,6%, 1% e 1,5%). Os cromatogramas sobrepostos resultantes estão apresentados na **Figura 7**, e demonstram que, mesmo em concentrações mais elevadas, as resoluções obtidas permaneceram consistentes e satisfatórias.

Figura 4. Cromatogramas sobrepostos do branco e do padrão de Tirzepatida fortificado em 1% com impurezas conhecidas na coluna Kinetex PS C18 de 2,6 µm, 150 x 4,6 mm



Sl. No.	Analito	Tempo de Retenção	Área	% de Área	Resolução USP	Fator de Cauda USP
1	Des Side chain-Tirzepatida	9,044	109328	1,19		0,9
2	Impureza Desconhecida 1	13,164	10053	0,11	24,1	0,8
3	Des Tyr (10)-Tirzepatida	31,952	88852	0,97	48,1	0,9
4	Des-Tyr(1)-Aib(2)-Tirzepatida	32,641	67290	0,74	1,2	1,1
5	Endo-AEEAc-Tirzepatida	34,633	46171	0,50	3,6	0,9
6	Endo-Gly(4)-Tirzepatida	35,224	39846	0,44	1,2	0,9
7	Endo-Thr(5)-Tirzepatida	35,752	40037	0,44	1,1	1,1
8	Tirzepatida	36,619	8366507	91,43	1,0	2,6
9	Impureza Desconhecida 2	38,706	83919	0,92	2,1	0,9
10	Endo-Tyr(1)- Tirzepatida	39,588	78975	0,86	1,2	1,1
11	Des-AEEAc-Tirzepatida	41,035	118080	1,29	1,8	0,9
12	Des-γ-Glu-Tirzepatida	51,274	101246	1,11	11,3	0,9

Figura 5. Cromatogramas sobrepostos de impurezas individuais e padrão de Tirzepatida na coluna Kinetex PS C18 de 2,6 µm, 150 x 4,6 mm

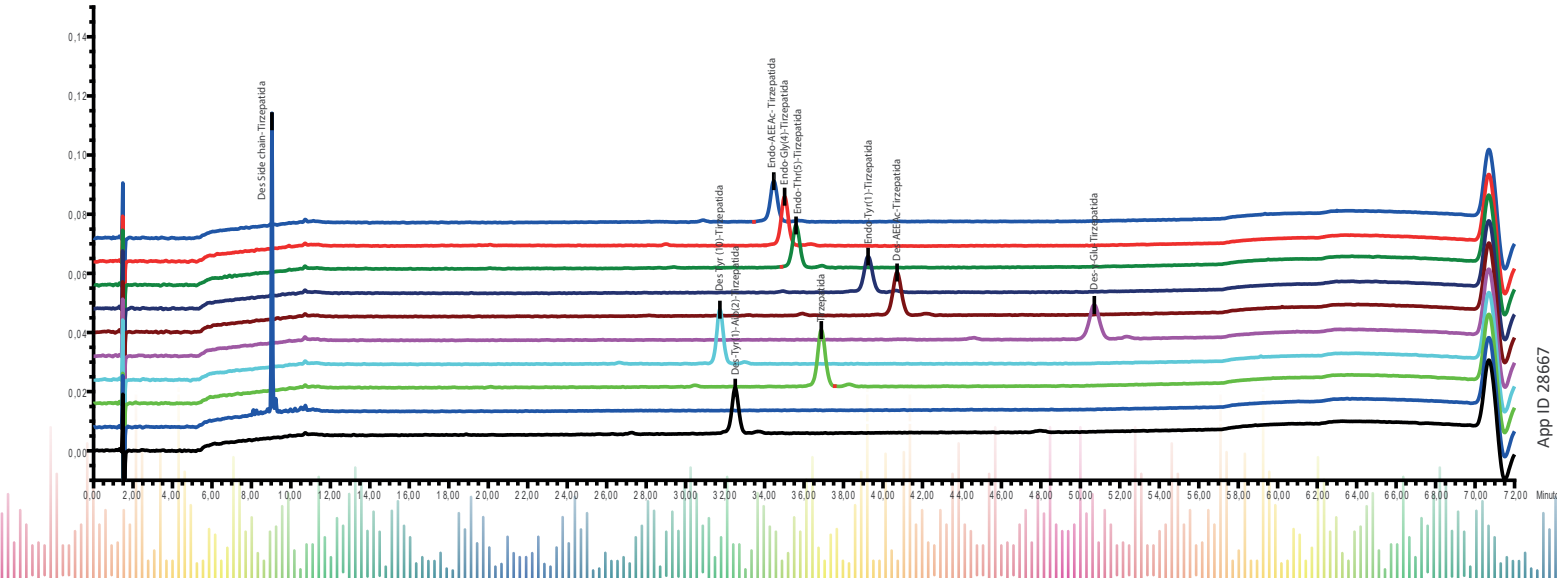




Figura 6. Cromatogramas sobrepostos de injeções replicadas (N=6) de amostra fortificada com 1% de impurezas conhecidas na coluna Kinetex PS C18 de 2,6 µm, 150 x 4,6 mm

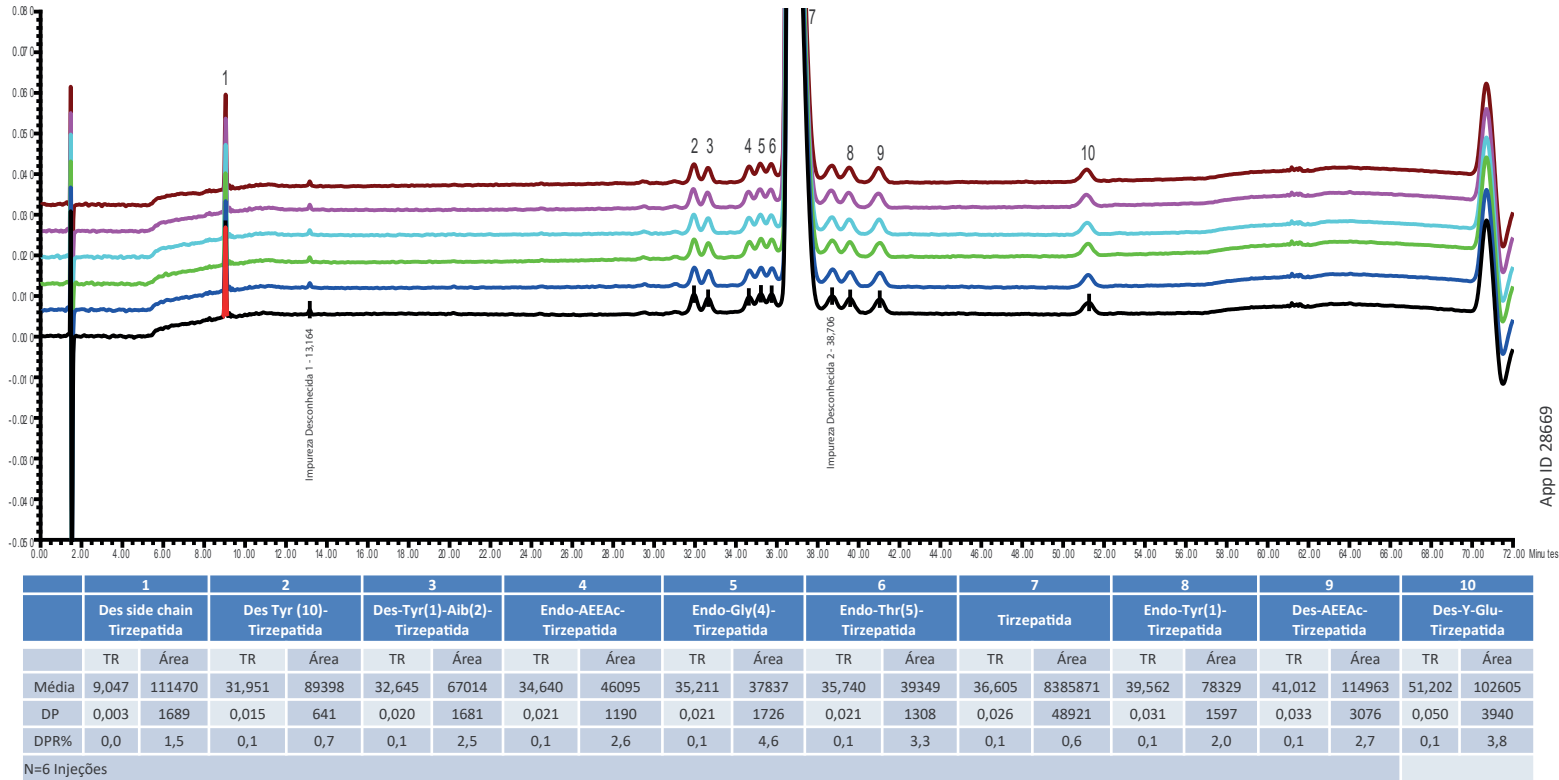
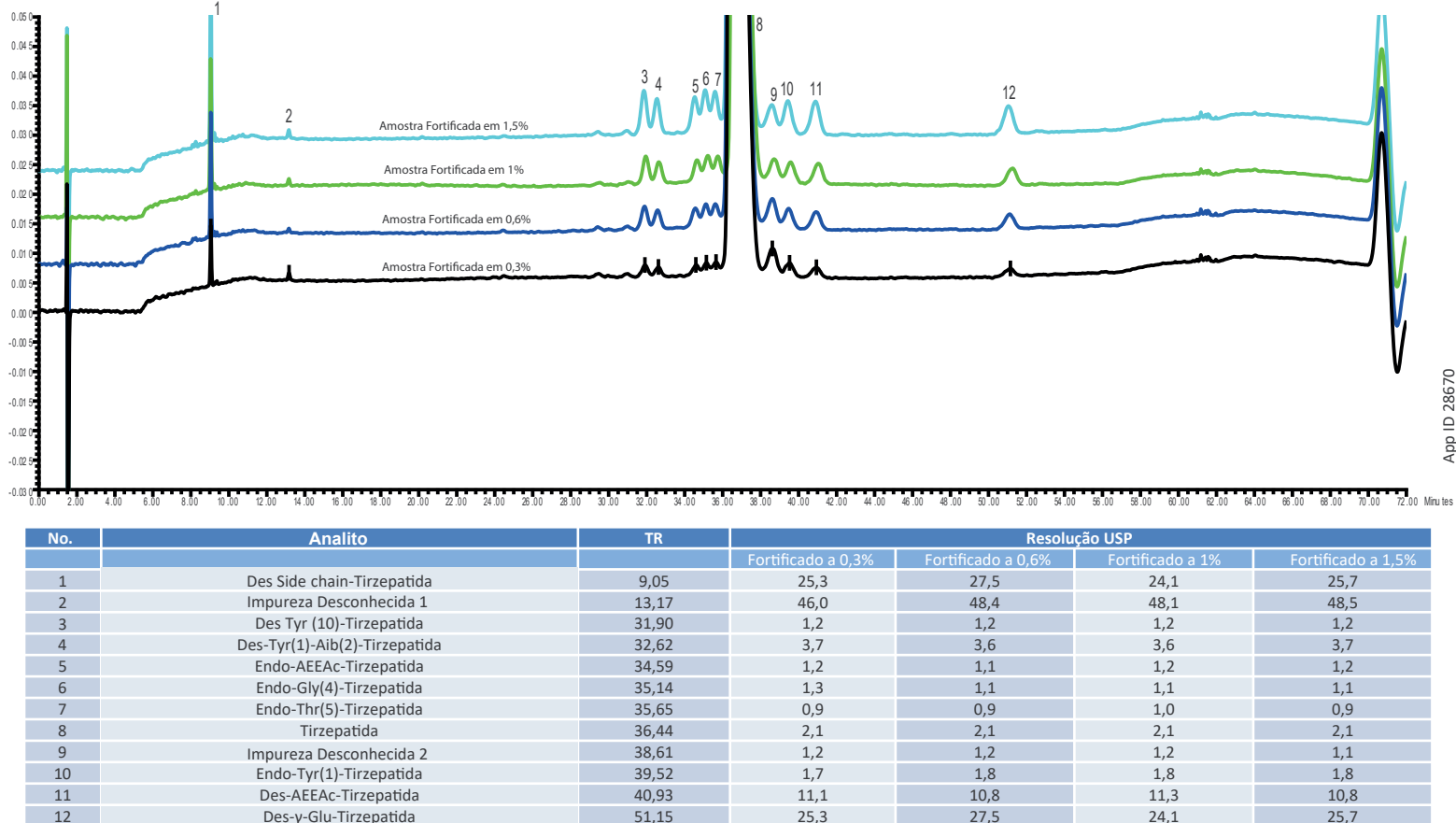


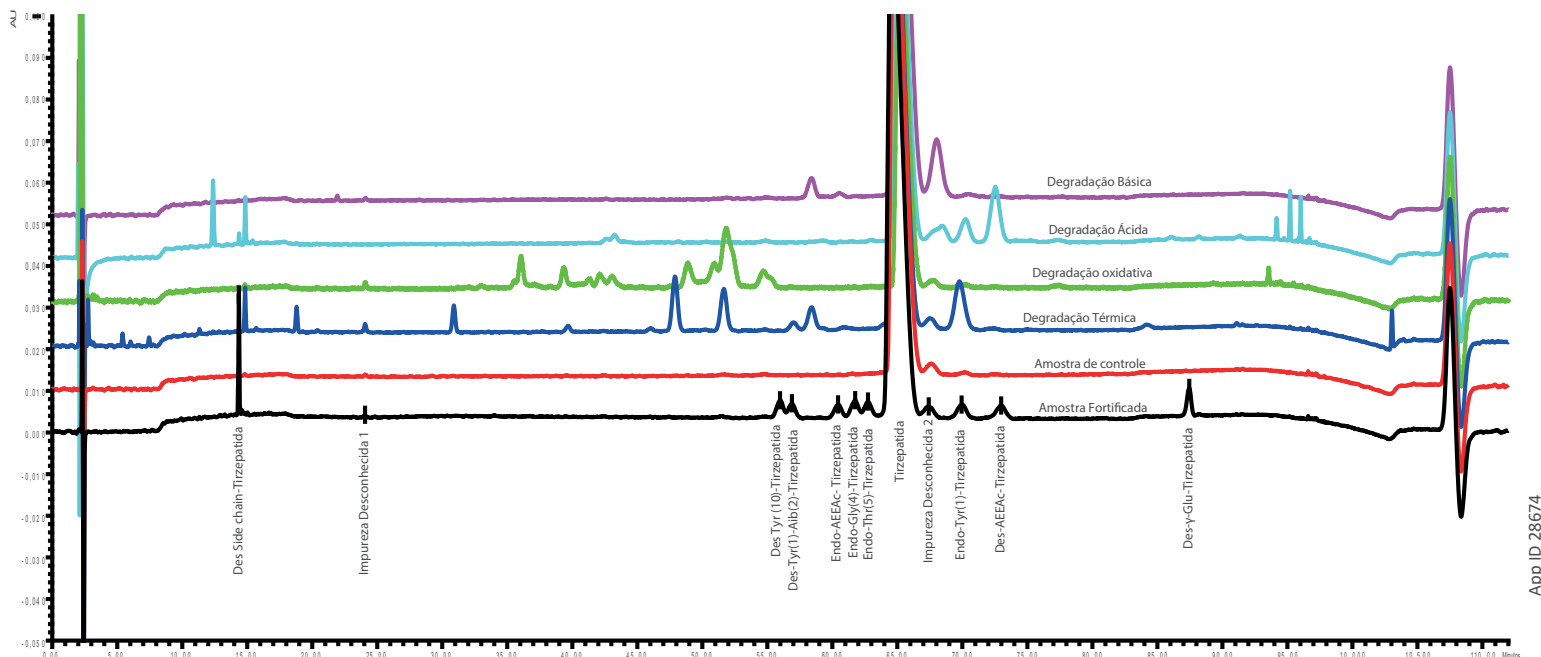
Figura 7. Cromatogramas sobrepostos do padrão de Tirzepatida fortificado com impurezas conhecidas nos níveis de 0,3%, 0,6%, 1% e 1,5%, com a coluna Kinetex 2,6 µm PS C18, 150 x 4,6 mm.



	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
	Des side chain Tirzepatida		Des Tyr (10)- Tirzepatida		Des-Tyr(1)-Aib(2)- Tirzepatida		Endo-AEEAc- Tirzepatida		Endo-Gly(4)- Tirzepatida		Endo-Thr(5)- Tirzepatida		Tirzepatida		Endo-Tyr(1)- Tirzepatida		Des-AEEAc- Tirzepatida		Des-y-Glu- Tirzepatida	
	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área
Média	14,365	110446	56,069	81430	57,014	63584	60,529	82284	61,816	81923	62,849	71097	64,615	9480152	70,085	136328	73,086	115170	87,481	117646
DP	0,006	1160	0,110	1986	0,106	1461	0,106	2138	0,115	3522	0,122	2563	0,134	58592	0,167	6630	0,157	4178	0,076	1040
DPR %	0,0	1,1	0,2	2,4	0,2	2,3	0,2	2,6	0,2	4,3	0,2	3,6	0,2	0,6	0,2	4,9	0,2	3,6	0,1	0,9
N=6 Injeções																				



Figura 11. Cromatogramas sobrepostos das amostras submetidas a diferentes tipos de condições de degradação forçada na coluna Kinetex PS C18 de 2,6µm



App ID 28674

Nome da Amostra	Condição	% de Degradação	Número total de Picos de impurezas de degradação
Amostra de controle	-	1,22	2
Degradação Ácida	0,1 mL de ácido clorídrico 1 N por 4 dias	17,94	17
Degradação Básica	0,1 mL de hidróxido de sódio 0,1 N por 1 hora	9,35	3
Degradação oxidativa	0,1 mL de peróxido de hidrogênio 10% por 4 dias	23,53	18
Degradação Térmica	Em banho-maria a 80 °C por 18 horas	20,71	18

Conclusões

Foi estabelecido um método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa utilizando uma coluna Kinetex PS C18 para a quantificação da Tirzepatida (Ensaio), de suas impurezas (Substâncias Relacionadas) e das impurezas provenientes de degradação. Para o método de Ensaio, foi desenvolvido um gradiente relativamente rápido empregando uma coluna Kinetex PS C18 de 2,6µm (150 × 4,6 mm). Todas as impurezas detectadas foram satisfatoriamente separadas do pico principal de Tirzepatida, permitindo quantificação confiável e reprodutível por HPLC. A otimização do método também possibilitou uma separação aprimorada de cada impureza, assegurando a quantificação adequada de todas as substâncias relacionadas. Tanto impurezas conhecidas quanto desconhecidas foram eficientemente resolvidas e separadas da Tirzepatida, demonstrando precisão e reprodutibilidade adequadas.

Adicionalmente, foi desenvolvido um método indicativo de estabilidade utilizando uma coluna Kinetex PS C18 de 2,6µm, com o objetivo de quantificar com exatidão as impurezas e os produtos de degradação da Tirzepatida sob diversas condições de estresse. Os estudos de degradação forçada, incluindo degradação ácida, básica, oxidativa (peróxido) e térmica, confirmaram a capacidade do método em resolver impurezas relacionadas ao processo e impurezas formadas durante o estresse químico e térmico. Esse método apresentou resolução eficaz entre a Tirzepatida e suas impurezas, além de excelente reprodutibilidade, consolidando-o como ferramenta confiável para estudos indicativos de estabilidade. Essa nota técnica representa o primeiro relato de um método para avaliação de impurezas da Tirzepatida e, portanto, constitui um marco inicial para o desenvolvimento de futuros métodos analíticos destinados a esse fármaco.