

Miglioramento della caratterizzazione e della valutazione della stabilità dei peptidi

Spettroscopia UV-visibile in derivata seconda su uno spettrofotometro UV-Vis multicella Cary 3500

Autore

Suresh Babu C. V.
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

Il monitoraggio della stabilità delle terapie peptidiche è fondamentale nello sviluppo dei prodotti biofarmaceutici. Le tecniche di spettroscopia di assorbimento nell'ultravioletto-visibile (UV-Vis) tradizionali, comunemente utilizzate negli studi di stabilità, spesso non forniscono una risoluzione di lunghezza d'onda sufficiente, soprattutto per le molecole biologiche quali proteine e DNA che di norma presentano picchi ampi. Ciò rende difficile rilevare sottili cambiamenti strutturali, in particolare in caso di sovrapposizione delle caratteristiche spettrali. La presente nota applicativa illustra i benefici della spettroscopia UV-Vis in derivata seconda con lo spettrofotometro UV-Vis multicella Agilent Cary 3500 per migliorare la caratterizzazione dei peptidi e la valutazione della stabilità. Le funzioni avanzate dello spettrofotometro UV-Vis multicella Cary 3500, tra cui la misurazione multicella e il calcolo derivativo integrato, semplificano la raccolta e l'analisi dei dati, rendendolo uno strumento prezioso per gli studi di stabilità dei peptidi per applicazioni biofarmaceutiche.

Introduzione

I peptidi sintetici rappresentano una classe crescente di farmaci bioterapeutici. Gli agonisti del GLP-1 (glucagon-like peptide-1) sono peptidi sintetici che imitano l'ormone GLP-1 naturale e svolgono un ruolo importante nella regolazione metabolica, contribuendo sia alla secrezione di insulina sia alla promozione della perdita di peso.¹ Poiché la molecola GLP-1 è soggetta a vari percorsi di degradazione, la valutazione della qualità e della stabilità delle terapie a base di GLP-1 è fondamentale per garantirne l'efficacia.

La stabilità dei peptidi viene comunemente misurata osservando i cambiamenti negli spettri di assorbimento prodotti mediante spettroscopia nell'ultravioletto.² Essendo non distruttiva, questa tecnica offre notevoli vantaggi nel flusso di lavoro: per esempio, i preziosi campioni rimangono intatti dopo l'analisi e possono essere successivamente analizzati mediante tecniche complementari come la cromatografia liquida-spettrometria di massa. Inoltre, la rapidità e la semplicità della spettroscopia UV-visibile la rendono accessibile a un'ampia varietà di utenti.

Tuttavia, gli spettri di assorbimento UV-Vis convenzionali possono essere difficili da interpretare quando si tratta di monitorare minimi cambiamenti, come piccoli spostamenti delle posizioni dei picchi o lievi variazioni di intensità, soprattutto per le biomolecole esposte a fattori ambientali come lo stress ossidativo. La scarsa risoluzione delle caratteristiche spettrali rappresenta una difficoltà anche quando gli spettri delle biomolecole sono costituiti da più componenti sovrapposti. La spettroscopia derivata è una tecnica potente che supera queste limitazioni migliorando piccole funzioni, consentendo la risoluzione di picchi sovrapposti che sarebbero indistinguibili in uno spettro di assorbimento tradizionale.

Lo spettrofotometro UV-Vis multicella Agilent 3500 con il suo modulo multicella è un potente strumento per l'analisi biomolecolare che utilizza misurazioni in derivata seconda. Lo strumento consente la misurazione simultanea di molteplici campioni, compresi standard, campioni e controlli, alle stesse condizioni. Il software Agilent Cary UV Workstation che controlla lo spettrofotometro UV-Vis multicella Cary 3500 include una funzione di equazione integrata che produce automaticamente spettri in derivata seconda dopo la misura di assorbimento per ridurre al minimo gli errori di calcolo e semplificare l'elaborazione dei dati.

Questa nota applicativa dimostra l'uso delle funzionalità avanzate dello spettrofotometro UV-Vis multicella Cary 3500 e della spettroscopia UV-Vis in derivata seconda per migliorare la risoluzione dei picchi di assorbimento sovrapposti raccolti da peptidi e aminoacidi aromatici.

Condizioni sperimentali

Materiali

Triptofano (W), tirosina (Y), fenilalanina (F), ormone melanotropo (α -melanocyte-stimulating, MSH), melittina, liraglutide, angiotensina II, perossido di idrogeno al 30% (v/v) (H_2O_2) e fosfato di sodio sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Stati Uniti).

Preparazione del campione

Tutti i campioni di peptidi, compresi triptofano (0,15 mM), tirosina (0,5 mM) e fenilalanina (4,0 mM) sono stati preparati in tampone fosfato di sodio, pH 7,4, a una concentrazione di 1 mg/mL. Per le condizioni di stress, i peptidi sono stati incubati con H_2O_2 allo 0,07% durante la notte a temperatura ambiente. Non è stata necessaria nessun'altra preparazione del campione prima dell'analisi UV-Vis.

Strumentazione

L'acquisizione dei dati è stata eseguita con lo spettrofotometro UV-Vis multicella Cary 3500 dotato del software Cary Workstation, utilizzando i parametri elencati nella Tabella 1. Il design multicella consente di misurare simultaneamente fino a sette campioni insieme a un campione di riferimento. Le misurazioni sono state eseguite utilizzando una cuvetta rettangolare per ultra-microvolumi con una lunghezza del percorso pari a 10 mm (codice Agilent 5062-2496). Gli spettri sono stati mediati da più corse ($n = 5$) per garantire la riproducibilità e ridurre il rumore.

Tabella 1. Parametri del metodo con lo spettrofotometro UV-Vis multicella Cary 3500 di Agilent.

Parametro	Valore
Modalità di raccolta	Scansione
Intervallo di scansione	Da 200 a 500 nm
Tempo per la media	0,02 s
Intervallo dati	1,00 nm
Velocità di scansione	3.000 nm/min
Larghezza di banda spettrale	2,00 nm
Derivata	Derivata seconda
Filtro di liscio	9

Risultati e discussione

Spettri nell'UV-visibile di aminoacidi aromatici

Triptofano, fenilalanina e tirosina sono aminoacidi aromatici che si trovano comunemente nei peptidi e nelle proteine e che presentano profili di assorbimento caratteristici nell'UV-visibile. La Figura 1A mostra gli spettri UV-Vis di ordine zero di triptofano, fenilalanina e tirosina. I picchi sovrapposti negli spettri di ordine zero rendono difficile distinguere le sottili caratteristiche spettrali degli aminoacidi.

Per migliorare la risoluzione e l'accuratezza degli spettri di assorbimento, sono stati analizzati gli spettri in derivata di secondo ordine in base al metodo Savitzky-Golay. Le Figure 1B, 1C e 1D mostrano gli spettri UV-Vis in derivata di secondo ordine di tirosina, fenilalanina e triptofano. Dopo l'acquisizione

delle misurazioni del campione, gli spettri di secondo ordine sono stati generati automaticamente utilizzando la funzione di calcolo integrato nel software Cary UV Workstation. Gli spettri in derivata di secondo ordine mostrano picchi con massimi e minimi (punti di inflessione) che possono essere utilizzati per distinguere le diverse bande di assorbimento spettrale dei vari aminoacidi aromatici, consentendo di studiare i piccoli cambiamenti spettrali che si verificano quando le biomolecole sono sottoposte a condizioni di stress. I massimi di assorbimento degli aminoacidi erano:

- **Triptofano:** massimo assorbimento a circa 273, 280 e 288 nm
- **Tirosina:** massimo assorbimento a circa 275 e 282 nm
- **Fenilalanina:** massimo assorbimento a circa 246, 252, 257, 264 e 268 nm

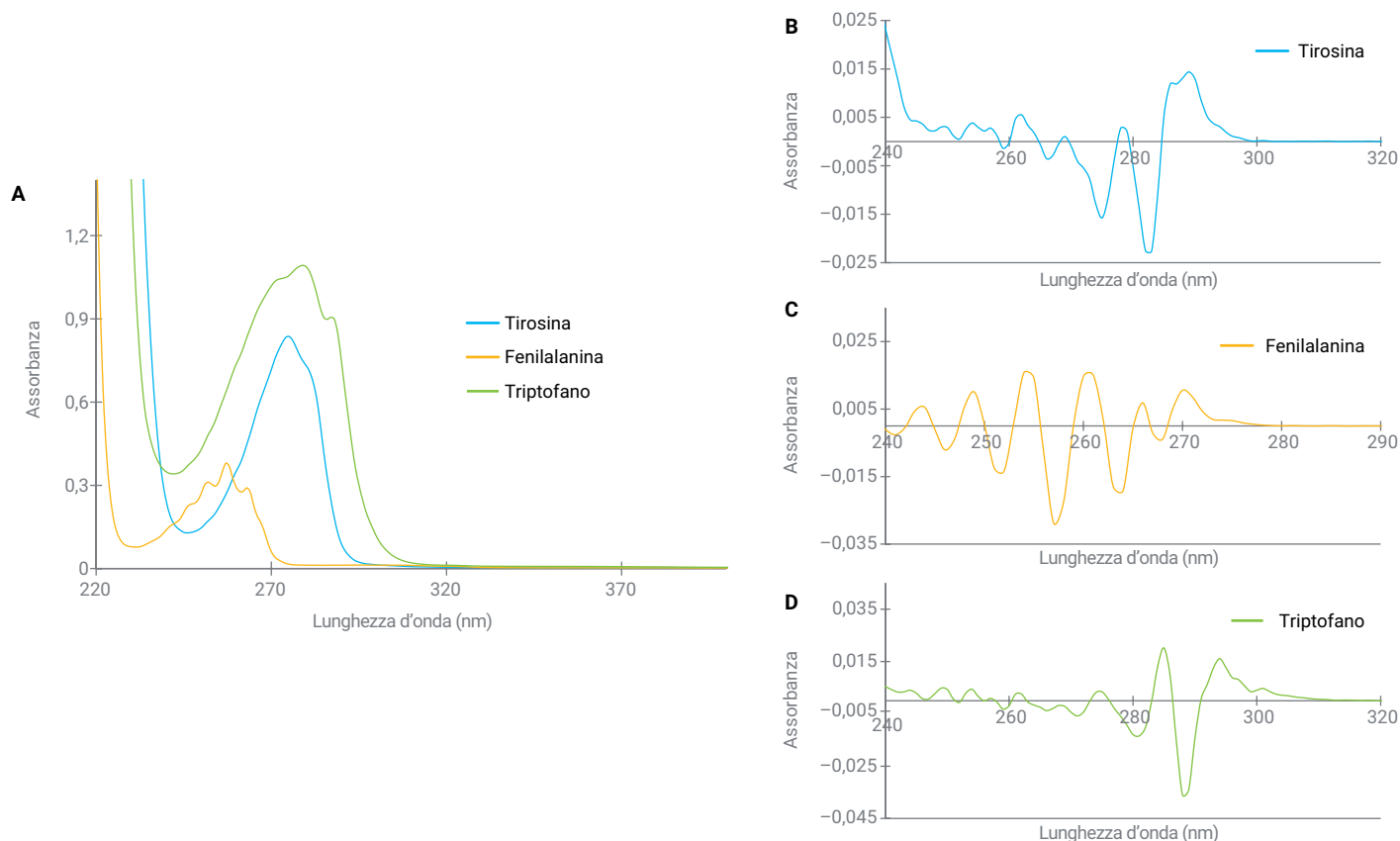


Figura 1. Spettri di assorbimento nell'UV-visibile di aminoacidi aromatici. Spettri di assorbimento nell'UV-visibile (A) di ordine zero e (B, C e D) in derivata di secondo ordine.

Spettri UV-visibile dei peptidi

Per generare diversi spettri di assorbimento per il confronto, i peptidi selezionati per lo studio avevano percentuali variabili di aminoacidi aromatici. La Figura 2 mostra gli spettri di assorbimento in derivata di secondo ordine dei quattro peptidi melittina, MSH, angiotensina II e liraglutide. Le posizioni dei picchi negli spettri in derivata di secondo ordine erano ben correlate con le caratteristiche di assorbimento note degli aminoacidi aromatici che li compongono. Nel complesso,

gli spettri in derivata di secondo ordine hanno fornito una visione maggiormente risolta delle caratteristiche spettrali dei peptidi. Il numero di aminoacidi aromatici presenti nei peptidi studiati è riassunto nella Tabella 2. Melittina ha mostrato picchi caratteristici a 291, 283 e 275 nm, che sono stati attribuiti principalmente a triptofano. MSH e liraglutide presentano picchi a 290, 283 e 266 nm che riflettono i contributi di tutti e tre gli aminoacidi aromatici. Angiotensina II presenta picchi a 283, 276, 264, 258 e 252 nm, che erano in linea con la presenza di tirosina e fenilalanina.

Tabella 2. Composizione aminoacidica dei peptidi analizzati.

Peptidi	Sequenza	Numero di triptofano (W)	Numero di tirosina (Y)	Numero di fenilalanina (F)
Liraglutide	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEEFIAWLVGRG	1	1	1
Melittina	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	1	0	0
Ormone melanotropo (α-melanocyte-stimulating, MSH)	SYSMEHFRWGKPV	1	1	1
Angiotensina II	DRVYIHPF	0	1	1
Sostanza P	RPKPQGFGLM	0	0	2

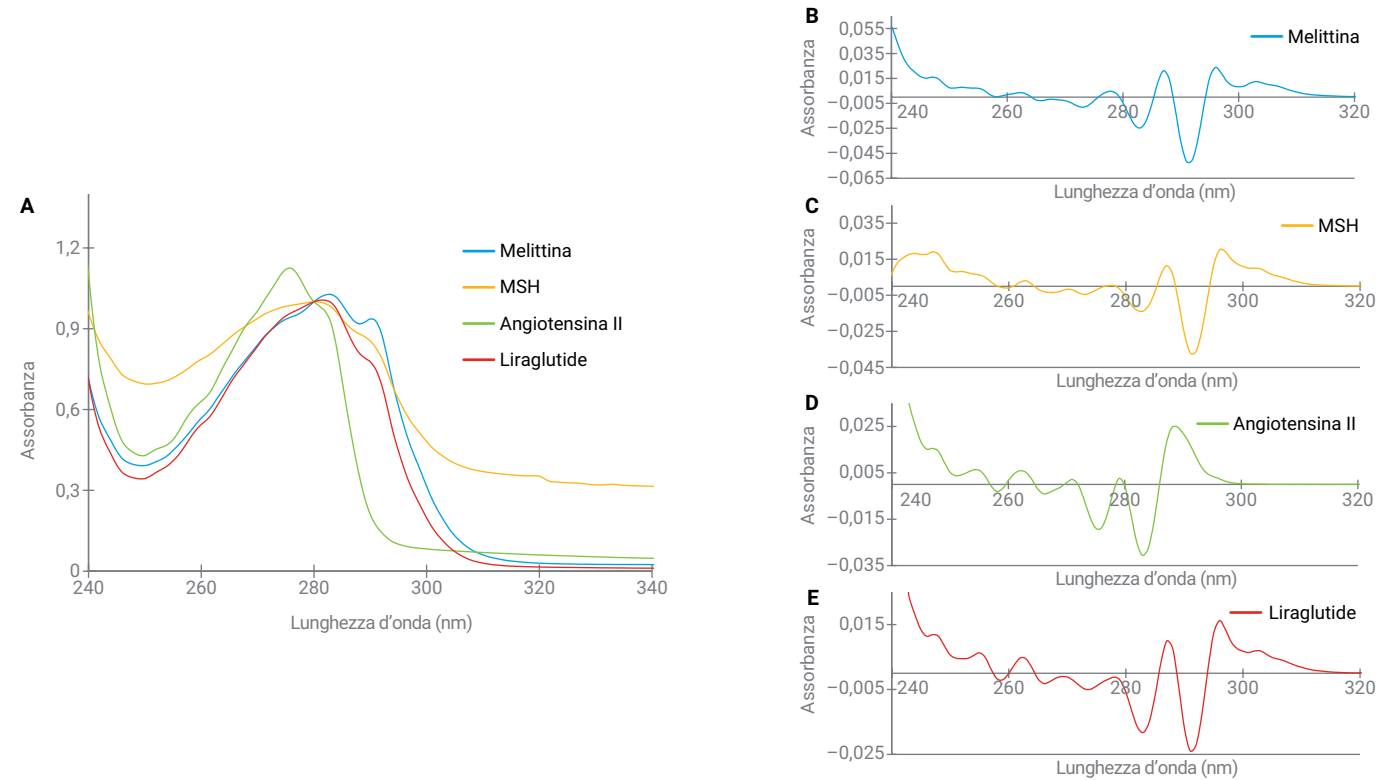


Figura 2. Spettri di assorbimento nell'UV-visibile dei peptidi. Spettri di assorbimento nell'UV-visibile (A) di ordine zero e (B, C, D ed E) in derivata di secondo ordine.

Monitoraggio della stabilità dei peptidi sotto stress ossidativo

Per valutare l'utilità della spettroscopia derivativa per il monitoraggio della stabilità, i peptidi sono stati trattati con H_2O_2 . La Figura 3 mostra il confronto tra gli spettri UV-Vis in derivata di secondo ordine di peptidi non trattati e trattati con H_2O_2 . Variazioni minime nell'assorbanza a lunghezza d'onda del peptide dovute al trattamento con H_2O_2 sono state acquisite efficacemente negli spettri in derivata di secondo ordine. Al peptide angiotensina II manca il residuo triptofano, pertanto non si sono osservati cambiamenti significativi intorno alla regione 291 nm dopo il trattamento con H_2O_2 . Sono stati osservati cambiamenti minimi nello spettro in derivata di secondo ordine di melittina, a indicare che questa è meno incline all'ossidazione. MSH e liraglutide contenenti triptofano

hanno mostrato una notevole perdita di grandezza del picco a 291 nm dopo il trattamento con H_2O_2 . Ciò indica la suscettibilità dei composti all'ossidazione, che colpisce principalmente i residui di triptofano, a ulteriore dimostrazione della specificità del metodo delle derivate seconde per rilevare l'ossidazione di triptofano. Per un'ulteriore conferma dello stato di ossidazione di liraglutide, i campioni trattati con H_2O_2 sono stati analizzati mediante cromatografia liquida/spettrometria di massa con quadrupolo a tempo di volo (LC/Q-TOF-MS). Figura 4 mostra il cromatogramma ionico totale (TIC) di liraglutide trattata con H_2O_2 . Lo spettro di massa deconvoluto ha confermato le forme di ossidazione mostrando spostamenti di massa pari a +16 Da e +32 Da che corrispondono rispettivamente ai prodotti di mono-ossidazione o di-ossidazione.³

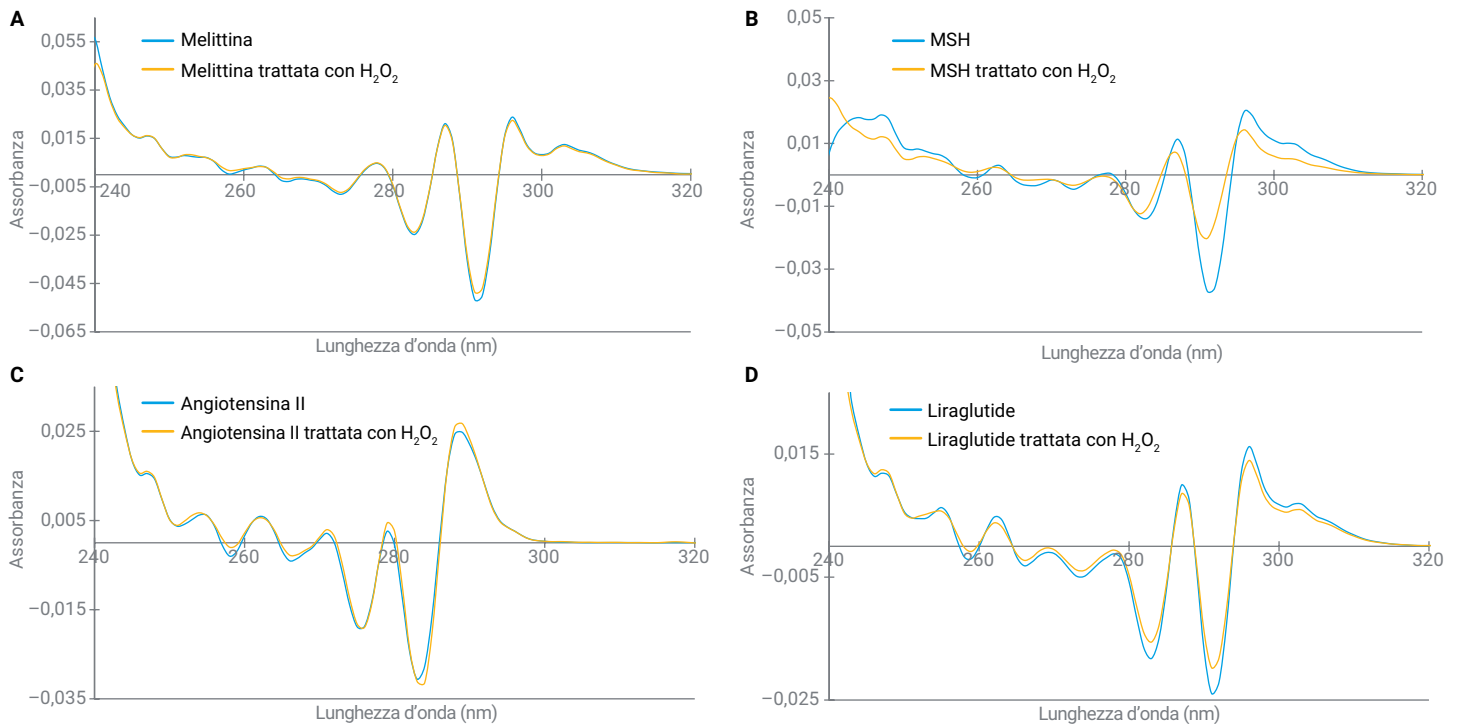


Figura 3. Spettri di assorbimento nell'UV-Vis in derivata di secondo ordine di peptidi non trattati e trattati con H_2O_2 .

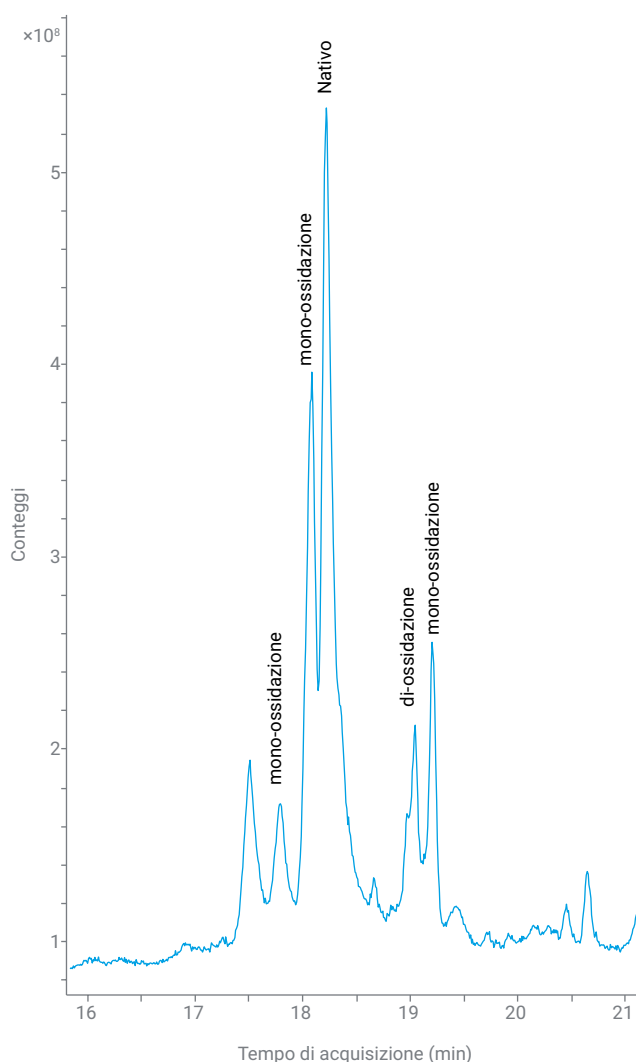


Figura 4. Cromatogramma ionico totale LC/MS di liraglutide ossidata.

Conclusione

I risultati di questo studio evidenziano la capacità della spettroscopia UV-Vis in derivata seconda di identificare e monitorare con precisione le piccole differenze spettrali derivanti da cambiamenti nei residui aromatici dei peptidi e la rendono uno strumento prezioso per il monitoraggio della stabilità dei peptidi. La funzione multicella dello spettrofotometro UV-Vis multicella Agilent Cary 3500 riduce il tempo di analisi consentendo il monitoraggio simultaneo di otto campioni. La funzione di calcolo integrato semplifica l'analisi con calcoli automatizzati, agevolando l'interpretazione dei dati e il processo decisionale degli utenti. Questa funzionalità è particolarmente preziosa per l'analisi dei prodotti biofarmaceutici, dove un monitoraggio accurato ed efficiente della stabilità dei peptidi è fondamentale per lo sviluppo di farmaci e il controllo qualità. La spettroscopia UV-visibile non distruttiva conserva i campioni per le analisi successive, come l'analisi LC-MS complementare. Lo spettrofotometro UV-Vis multicella Cary 3500 rappresenta una scelta ideale per i laboratori di analisi che si occupano di sviluppo farmaci e controllo qualità (QC), nei quali la velocità, la semplicità d'uso e la possibilità di riutilizzare campioni preziosi sono fondamentali.

Bibliografia

1. Müller, T. D.; Finan, B.; Bloom, S. R.; D'Alessio, D.; Drucker, D. J.; Flatt, P. R.; Fritsche, A.; Gribble, F.; Grill, H. J.; Habener, J. F.; et al. Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1). *Mol. Metab.* **2019**, *30*, 72–130.
2. Liyanage, M. R.; Bakshi, K.; Volkin, D. B.; Middaugh, C. R. Ultraviolet Absorption Spectroscopy of Peptides. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1088*, 225–236.
3. Suresh Babu, C.V. Characterization of Forced Degradation Impurities of Glucagon-Like Peptide-1 Agonists by LC/Q-TOF Mass Spectrometry. Nota applicativa di Agilent Technologies 5994-7794EN. **2025**.