

향상된 펩타이드 특성 규명 및 안정성 평가

Agilent Cary 3500 Multicell UV-Vis 분광 광도계를
이용한 UV-Vis 2차 미분 분광법

저자

Suresh Babu C. V.
Agilent Technologies, Inc.

개요

펩타이드 치료제의 안정성 모니터링은 바이오 의약품 개발에 필수적입니다. 안정성 연구에 일반적으로 사용되는 기존의 자외선-가시광선(UV-Vis) 흡수 분광법은 충분한 파장 분해능을 제공하지 못하는 경우가 많습니다. 특히 단백질이나 DNA와 같이 일반적으로 넓은 피크를 갖는 생물학적 분자의 경우 더욱 그렇습니다. 이로 인해 특히 스펙트럼이 겹치는 경우에 미세한 구조적 변화를 감지하기가 어려워집니다. 이 응용 자료에서는 Agilent Cary Multicell 3500 UV-Vis 분광 광도계와 함께 UV-Vis 2차 미분 분광법을 사용하여 펩타이드 특성 규명과 안정성 평가를 개선할 수 있음을 보여줍니다. 멀티셀 측정 및 내장된 미분 계산을 포함한 Cary 3500 Multicell UV-Vis 분광 광도계의 고급 기능은 데이터 수집과 분석을 간소화하여 바이오 의약품 응용 분야에서 펩타이드 안정성 연구를 위한 귀중한 도구로 이용됩니다.

소개

합성 펩타이드는 성장 중인 생물학적 치료제입니다. 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1) 작용제는 천연 GLP-1 호르몬을 모방하는 합성 펩타이드로, 대사 조절에 중요한 역할을 하며 인슐린 분비와 체중 감량 촉진에 도움을 줍니다.¹ GLP-1 분자는 다양한 분해 경로를 거치는 경향이 있기 때문에 GLP-1 기반 치료제의 품질과 안정성 평가는 효과를 보장하는 데 매우 중요합니다.

펩타이드 안정성은 일반적으로 자외선 분광법에 의해 생성된 흡광도 스펙트럼의 변화를 관찰하여 측정합니다.² 이 기술은 비파괴적이기 때문에 워크플로에 상당한 이점을 제공합니다. 예를 들어, 귀중한 시료가 분석 후에도 그대로 남아 있어 이후에 액체 크로마토그래피-질량 분석법과 같은 보완적 기술로 분석할 수 있습니다. 또한, UV-Vis 분광법은 빠르고 사용하기 편리하여 다양한 사용자가 이용할 수 있습니다.

그러나 기존의 UV-Vis 흡수 스펙트럼은 피크 위치의 작은 변화나 사소한 강도 변화와 같은 미묘한 변화를 모니터링할 때 해석하기 어려울 수 있으며, 특히 산화 스트레스와 같은 환경적 요인에 노출된 생체 분자의 경우 더욱 그렇습니다. 생체 분자 스펙트럼이 여러 개의 겹치는 성분으로 구성되어 있는 경우 스펙트럼 요소의 분해능이 낮은 것도 문제가 됩니다. 미분 분광법은 미세한 요소를 강화하여 기존 흡수 스펙트럼에서는 구별할 수 없는 겹치는 피크를 분해함으로써 이러한 한계를 극복하는 강력한 기술입니다.

멀티셀 모듈이 장착된 Agilent 3500 Multicell UV-Vis 분광 광도계는 2차 미분 측정을 사용하여 생체 분자를 분석하는 강력한 도구입니다. 이 기기를 사용하면 동일한 조건에서 표준 물질, 시료, 대조군 등 여러 시료를 동시에 측정할 수 있습니다. Cary 3500 Multicell UV-Vis 분광 광도계를 제어하는 Agilent Cary UV Workstation 소프트웨어에는 흡광도 측정 후 자동으로 2차 미분 스펙트럼을 생성하는 방정식 함수가 내장되어 있어 계산 오류를 최소화하고 데이터 처리를 간소화합니다.

이 응용 자료에서는 Cary 3500 Multicell UV-Vis 분광 광도계와 UV-Vis 2차 미분 분광법의 고급 기능을 사용하여 펩타이드와 방향족 아미노산에서 수집한 중첩 흡수 피크의 분해능을 개선하는 방법을 설명합니다.

실험

재료

트립토판(W), 티로신(Y), 페닐알라닌(F), α -멜라닌세포 자극호르몬(MSH), 멜리틴, 리라글루티드, 안지오텐신 II, 30%(v/v) 과산화수소(H_2O_2) 및 인산나트륨은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입했습니다.

시료 전처리

트립토판(0.15mM), 티로신(0.5mM), 페닐알라닌(4.0mM)을 포함한 모든 펩타이드 시료는 농도 1mg/mL의 인산나트륨 완충액(pH 7.4)에서 준비했습니다. 스트레스 조건의 경우, 펩타이드를 0.07% H_2O_2 와 함께 실온에서 하룻밤 동안 배양했습니다. UV-Vis 분석 전에 다른 시료 전처리는 필요하지 않습니다.

기기

데이터 수집은 표 1에 나타낸 파라미터를 사용하여 Cary Workstation 소프트웨어가 장착된 Cary 3500 Multicell UV-Vis 분광 광도계를 통해 수행했습니다. 멀티셀 설계 덕분에 기존 시료와 함께 최대 7개의 시료를 동시에 측정할 수 있습니다. 경로 길이가 10mm인 초미세 부피 직사각형 큐벳(Agilent 부품 번호 5062-2496)을 사용하여 측정을 수행했습니다. 재현성을 보장하고 노이즈를 줄이기 위해 여러 번의 실행($n = 5$)에서 얻은 스펙트럼을 평균화했습니다.

표 1. Agilent Cary 3500 Multicell UV-Vis 분광 광도계 파라미터.

파라미터	값
수집 모드	스캔
스캔 범위	200-500nm
평균화 시간	0.02초
데이터 간격	1.00nm
스캔 속도	3,000nm/min
스펙트럼 대역폭	2.00nm
유도체	2차 미분
평활화 필터	9

결과 및 토의

방향족 아미노산의 UV-가시광선 스펙트럼

트립토판, 페닐알라닌, 티로신은 펩타이드와 단백질에서 흔히 발견되는 방향족 아미노산으로, 특징적인 자외선-가시광선 흡수 프로파일을 가지고 있습니다. 그림 1A는 트립토판, 페닐알라닌, 티로신의 UV-Vis 0차 스펙트럼을 보여줍니다. 0차 스펙트럼에서 겹치는 피크로 인해 아미노산의 미묘한 스펙트럼 특징을 구별하기 어렵습니다.

흡수 스펙트럼의 분해능과 정확도를 높이기 위해 Savitzky-Golay 방법을 기반으로 2차 미분 스펙트럼을 분석했습니다. 그림 1B, 1C 및 1D는 티로신, 페닐알라닌 및 트립토판의 2차 미분 UV-Vis

스펙트럼을 보여줍니다. 시료 측정이 완료된 후, Cary UV Workstation 소프트웨어에 내장된 계산 기능을 사용하여 2차 스펙트럼이 자동으로 생성되었습니다. 2차 미분 스펙트럼은 최대값과 최소값(변곡점)이 있는 피크를 표시하는데, 이를 사용하여 다양한 방향족 아미노산의 서로 다른 스펙트럼 흡광 대역을 구별할 수 있으며, 생체 분자가 스트레스 조건에 놓일 때 발생하는 미세한 스펙트럼 변화를 연구할 수 있습니다. 아미노산의 흡광 최대치는 다음과 같습니다.

- **트립토판:** 약 273, 280, 288nm에서 흡광 최대치
- **티로신:** 약 275nm 및 282nm에서 흡광 최대치
- **페닐알라닌:** 약 246, 252, 257, 264 및 268nm에서 흡광 최대치

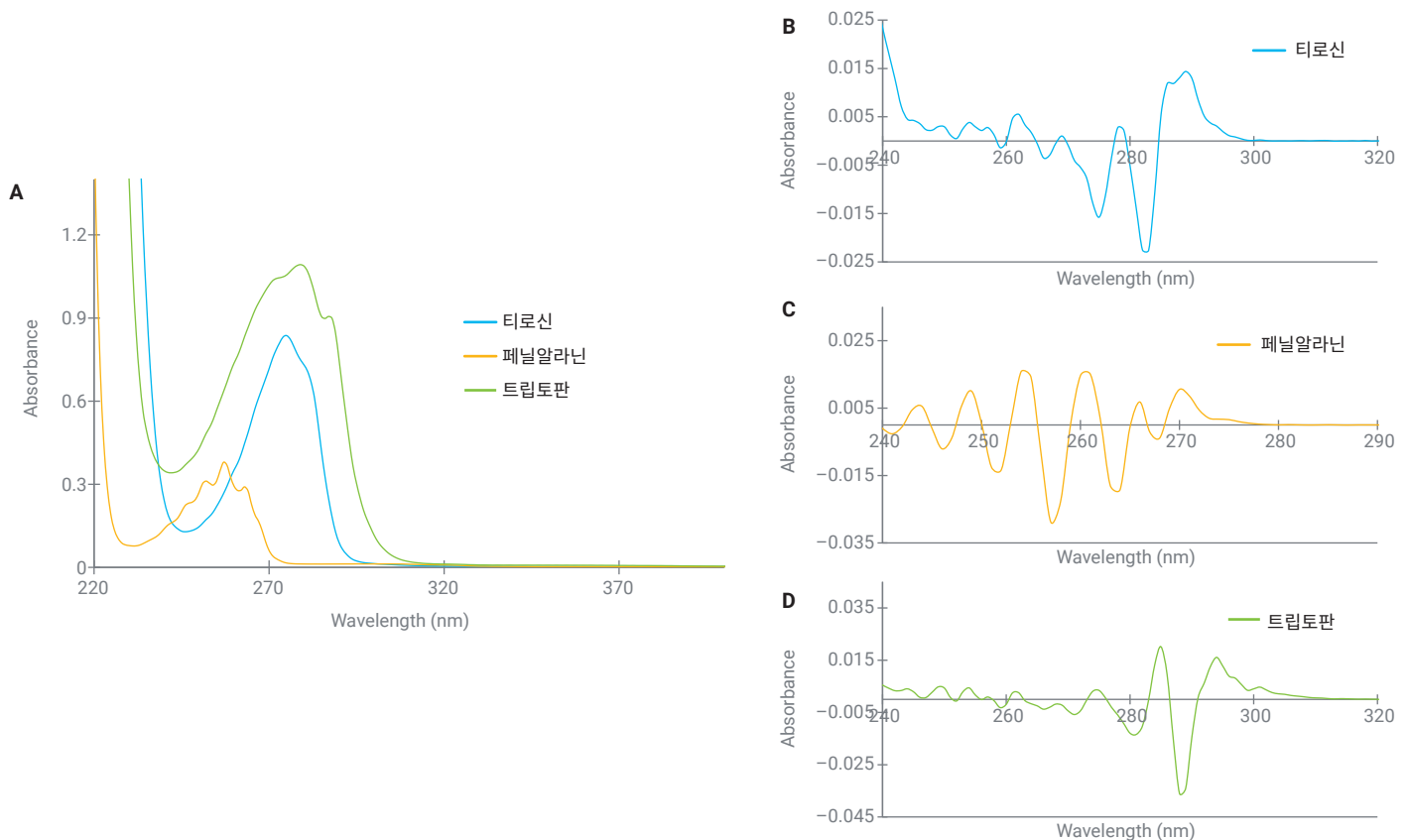


그림 1. 방향족 아미노산의 UV-Vis 흡광 스펙트럼. (A) 0차 및 (B, C, D) 2차 미분 UV-Vis 흡광 스펙트럼.

펩타이드의 UV-가시광선 스펙트럼

비교를 위한 다양한 흡광 스펙트럼을 생성하기 위해 이 연구에서는 다양한 비율의 방향족 아미노산을 갖는 펩타이드를 선택했습니다. 그림 2는 멜리틴, MSH, 안지오텐신 II, 리라글루티드의 네 가지 펩타이드에 대한 2차 미분 흡광 스펙트럼을 보여줍니다. 2차 미분 스펙트럼의 피크 위치는 구성 방향족 아미노산의 알려진 흡광 특성과 잘 들어 맞았습니다. 전반적으로 2차 미분 스펙트럼은 펩타이드의 스펙트럼 특성을 더욱 잘 분리하여 보여주었습니다.

연구한 펩타이드에 존재하는 방향족 아미노산의 수를 표 2에 요약했습니다. 멜리틴은 291, 283, 275nm에서 특징적인 피크를 나타냈으며, 이는 주로 트립토판에 기인하는 것으로 나타났습니다. MSH와 리라글루티드는 290, 283, 266nm에서 피크를 보였으며, 이는 세 가지 방향족 아미노산 모두의 영향을 반영합니다. 안지오텐신 II는 283, 276, 264, 258, 252nm에서 피크를 나타냈으며, 이는 티로신과 페닐알라닌의 존재와 일치합니다.

표 2. 펩타이드의 아미노산 조성 분석.

펩타이드	서열	트립토판의 수(W)	티로신의 수(Y)	페닐알라닌의 수(F)
리라글루티드	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEE FI AWLVRGRG	1	1	1
멜리틴	GIGAVLKVLTTGLPALIS WIKR KRQQ	1	0	0
α-멜라닌 세포 자극 호르몬(MSH)	SYSMEH FRWG KPV	1	1	1
안지오텐신 II	DRV YI H PF	0	1	1
P 물질	RPKPQQ FF GLM	0	0	2

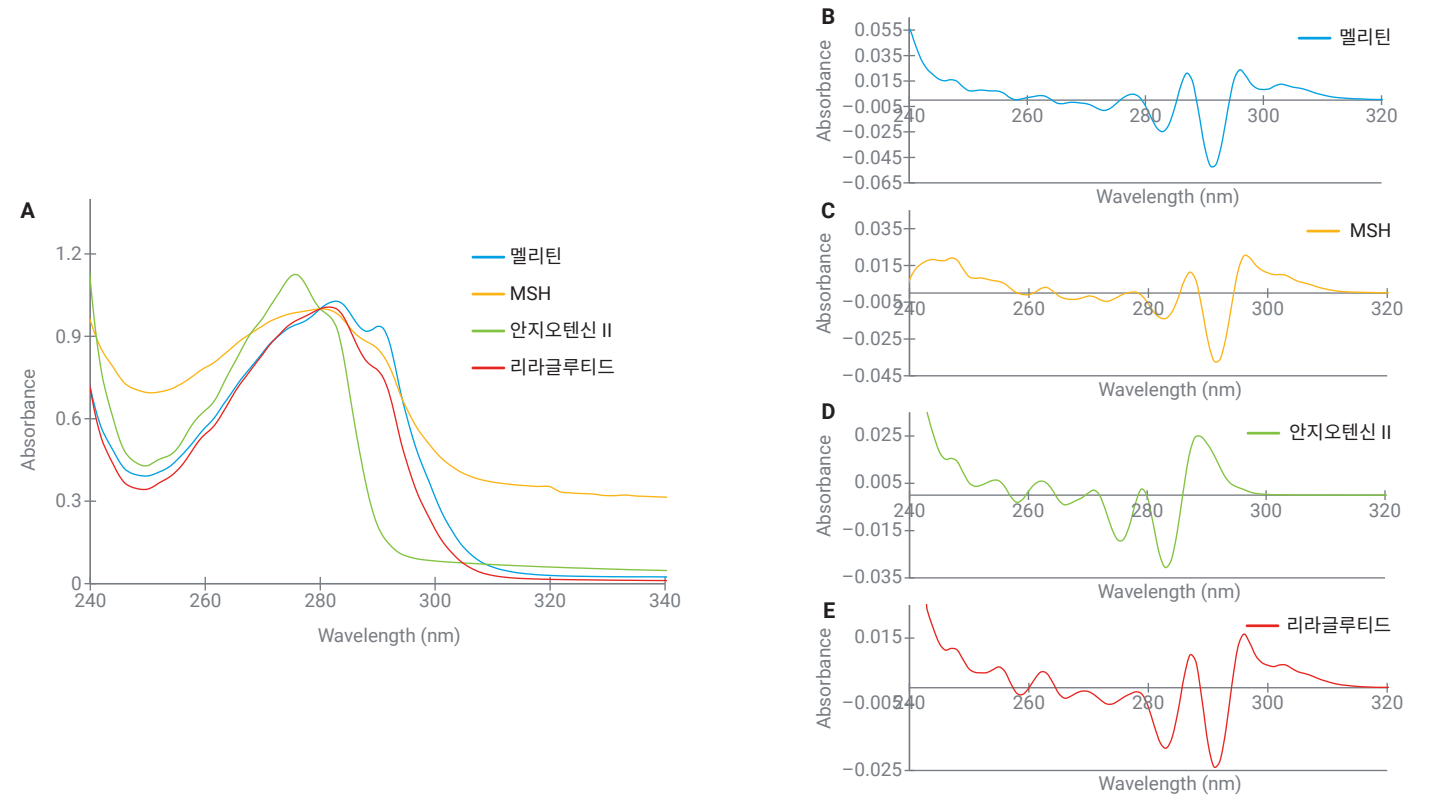


그림 2. 펩타이드의 UV-Vis 흡광 스펙트럼. (A) 0차 및 (B, C, D 및 E) 2차 미분 UV-Vis 흡광 스펙트럼.

산화 스트레스 하에서 펩타이드의 안정성 모니터링

안정성 모니터링에서 미분 분광법의 유용성을 평가하기 위해 펩타이드를 H_2O_2 로 처리했습니다. 그림 3은 미처리 펩타이드와 H_2O_2 처리 펩타이드의 2차 미분 UV-Vis 스펙트럼을 비교한 것입니다. H_2O_2 처리에 따른 펩타이드 파장 흡광도의 미세한 변화가 2차 미분 스펙트럼에서 효과적으로 포착되었습니다. 안지오텐신 II 펩타이드는 트립토판 잔류물이 없기 때문에 H_2O_2 처리 후 291nm 부근에서 유의미한 변화가 관찰되지 않았습니다. 멜리틴의 2차 미분 스펙트럼에서는 미소한 변화만 관찰되었으며, 이는 멜리틴이 잘 산화되지 않음을 나타냅니다. 트립토판을 함유한 MSH와 리라글루티드는 H_2O_2 처리 후 291nm 피크의

크기가 현저히 감소하는 것으로 나타났습니다. 이는 트립토판 잔류물에 주로 영향을 미치는 산화에 대한 화합물의 민감성을 나타내며, 트립토판 산화 검출에서 2차 미분법의 특이도가 잘 드러나는 대목입니다. 리라글루티드의 산화 상태를 추가적으로 확인하기 위해, H_2O_2 로 처리한 시료를 액체 크로마토그래피 TOF 질량 분석법(LC/Q-TOF-MS)으로 분석했습니다. 그림 4는 H_2O_2 로 처리한 리라글루티드의 총 이온 크로마토그램(TIC)을 보여줍니다. 분리된 질량 스펙트럼을 통해 각각 mono 및 di 산화 생성물에 해당하는 +16 Da 및 +32 Da의 질량 이동을 보이는 산화 형태가 확인되었습니다.³

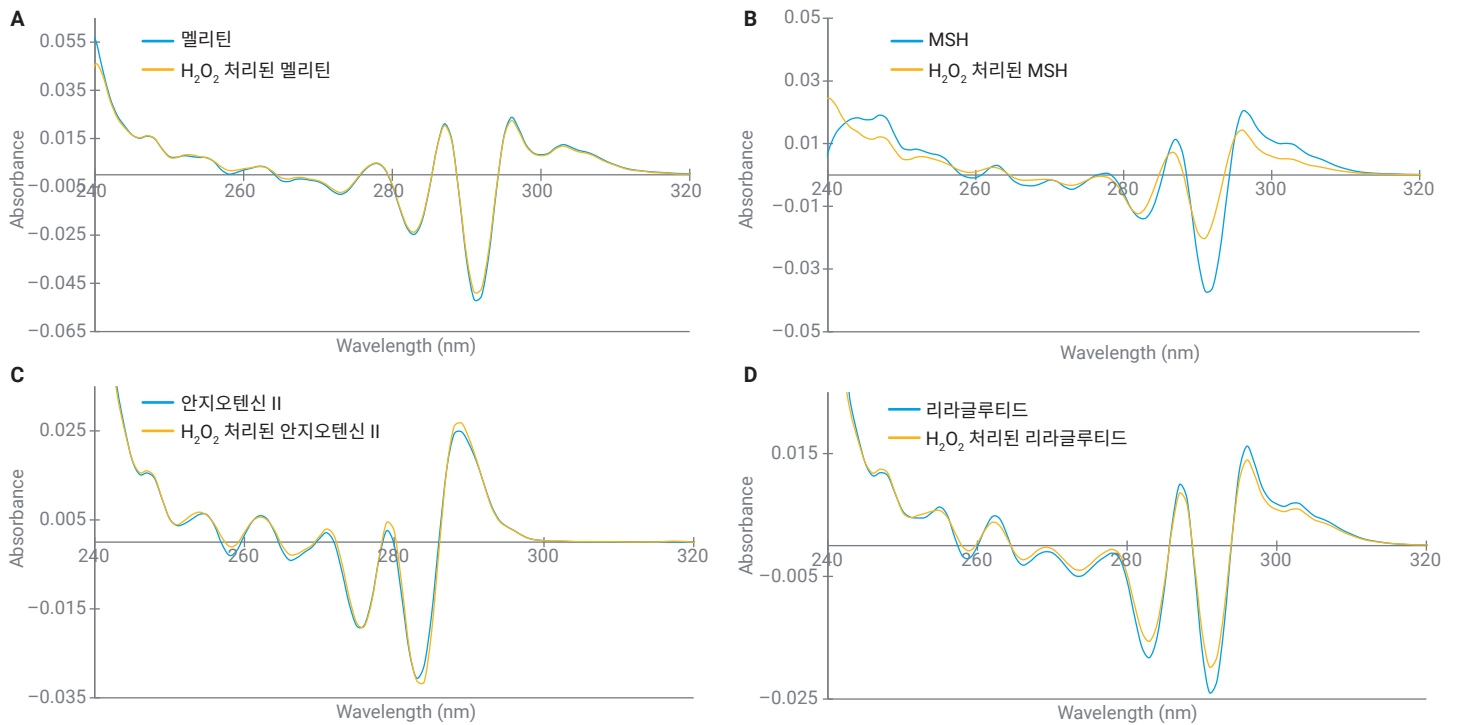


그림 3. 미처리 펩타이드와 H_2O_2 처리된 펩타이드의 2차 미분 UV-Vis 흡광 스펙트럼.

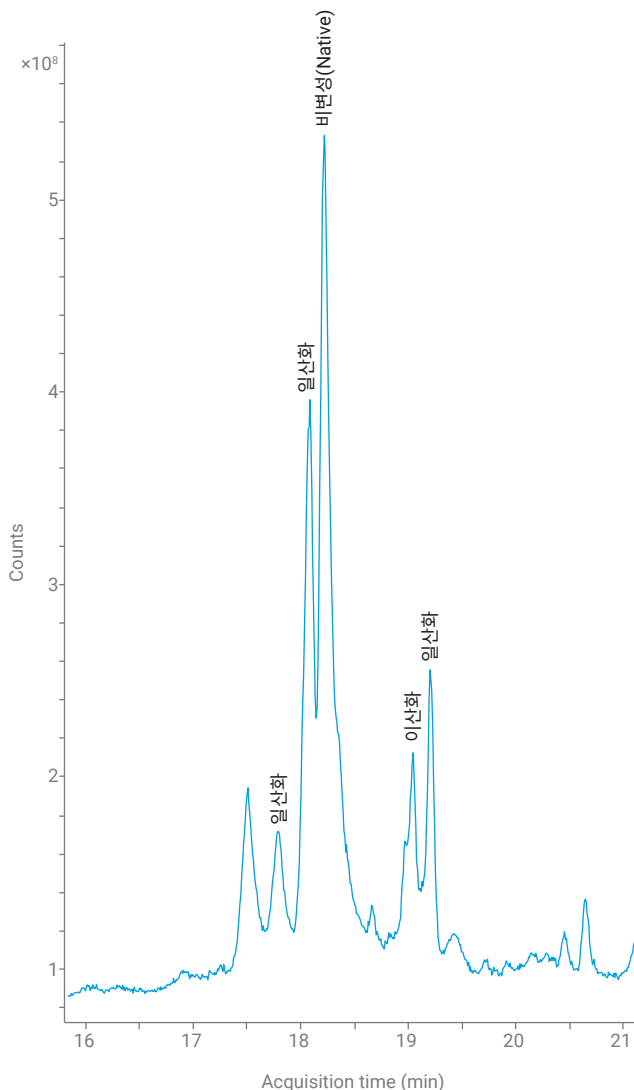


그림 4. 산화된 리라글루티드의 LC/MS 총 이온 크로마토그램.

결론

이 연구의 결과는 UV-Vis 2차 미분 분광법이 펩타이드의 방향족 잔류물 변화로 인해 발생하는 미묘한 스펙트럼 차이를 정확하게 식별하고 모니터링할 수 있음을 보여주었으며, 따라서 펩타이드 안정성 모니터링을 위한 매우 귀중한 도구로 이용될 수 있습니다. Agilent Cary Multicell 3500 UV-Vis 분광 광도계는 멀티셀로 설계되어 8개의 시료를 동시에 모니터링함으로써 측정 시간을 줄여줍니다. 내장된 계산 기능으로 자동 계산이 이루어지므로 분석이 간소화되고 사용자가 보다 쉽게 데이터를 해석하고 결정을 내릴 수 있습니다. 이러한 기능은 바이오 의약품 분석에 특히 중요한데, 약물 개발과 품질 관리를 위해 펩타이드 안정성을 정확하고 효율적으로 모니터링해야 하기 때문입니다. 비파괴 UV-Vis 분광법은 시료를 보존하므로 보완적인 LC-MS 분석과 같은 후속 분석에 이용할 수 있습니다. Cary 3500 Multicell UV-Vis 분광 광도계는 속도, 사용 편리성, 귀중한 시료의 재사용이 가장 중요한 약물 개발 및 품질 관리(QC) 테스트 실험실에 이상적인 선택입니다.

참고 자료

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. *Agilent Technologies 응용 자료* 5994-7794EN. **2025**.

www.agilent.com

DE-008586

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2025
2025년 8월 14일, 한국에서 인쇄
5994-8551KO

한국애질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
DF타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090(고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com