

Perfil de impureza do peptídeo sintético LL-37 utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com UV combinado e detecção de espectrômetros de massa de quadrupolo único

Autor

Sylvia Grosse, Martin Samonig, Mauro De Pra, Frank Steiner; Thermo Fisher Scientific, Germering, Alemanha

Palavras-chave

Perfil de impureza, peptídeo sintético, espectrômetro de massa de quadrupolo único, cromatografia líquida de alta eficiência, UHPLC binário Vanquish Flex, LL-37, controle de qualidade, LC-MS, UHPLC

Objetivo

Beneficiar-se da detecção UV na determinação dos níveis de impureza e da detecção de massa na identificação do ingrediente farmacêutico ativo (IFA) e outras impurezas relacionadas ao produto usando um método rápido para obter o perfil de impureza do peptídeo.

Vantagens da aplicação

- Para obter um perfil de impureza do peptídeo sintético, foi utilizado um método rápido com UV combinado e detecção de espectrômetros de massa de quadrupolo único.
- A faixa de massa ampliada do espectrômetro de massa de quadrupolo único Thermo Scientific™ ISQ™ EM com m/z de até 2000 permite a detecção de espécies de peptídeo de baixa carga e aumenta a confiança da identificação.

Introdução

Para garantir a alta qualidade na produção de peptídeos sintéticos, são necessários métodos simples, rápidos e confiáveis para determinar a pureza do peptídeo produzido. A análise muitas vezes é realizada com cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção ultravioleta (UV). Entretanto, às vezes pode ser difícil separar e detectar impurezas relacionadas ao processo e ao produto que foram formadas juntamente com o componente principal durante a produção já que podem estar presentes em concentrações bem menores e podem ser estruturalmente bastante semelhantes. Além disso, as impurezas relacionadas ao produto muitas vezes são desconhecidas e devem ser identificadas, o que leva à necessidade de técnicas analíticas avançadas adicionais, como a espectrometria de massas (MS). Os peptídeos sintéticos são na maior parte produzidos por uma das duas abordagens técnicas diferentes, a síntese de peptídeo em fase sólida (SPPS) ou a síntese de peptídeo em fase de solução (SPS). O método preferido atualmente é a SPPS já que esse processo pode ser completamente automatizado. De forma simplificada, na SPPS, um aminoácido é acoplado ao próximo, lavado e o processo se repete até obter o peptídeo desejado¹.

Conhecer os produtos químicos envolvidos, inclusive as resinas, aminoácidos e reagentes usados no acoplamento e desproteção é algo que ajuda bastante na avaliação das impurezas resultantes durante a produção. Além disso, o êxito do processo de fabricação deve ser controlado.

No presente trabalho, foram demonstrados o perfil de impureza do peptídeo e a confirmação do composto derivado de massa para o peptídeo LL-37 humano antimicrobiano, um composto de extrema importância médica devido à sua atividade antibacteriana, antimicótica, antiviral, cicatrizante, anticancerígena e imunomoduladora.² A sequência é composta por 37 aminoácidos com massa de peptídeo de aproximadamente 4500 Da. O nível das impurezas foi determinado com a detecção UV e a identidade foi verificada simultaneamente por espectrometria de massas. A faixa de massa ampliada do novo espectrômetro de massa de quadrupolo único ISQ EM permitiu a detecção de estados de carga mais baixa dos peptídeos selecionados e aumentou a confiança de identificação.

Experimental

Consumíveis

- Água deionizada, resistividade de 18,2 MΩ•cm ou superior (nº de peça N/A)
- Acetonitrila Fisher Scientific™ grau LC/MS (nº de peça 10001334)
- Ácido fórmico Fisher Scientific™ grau LC/MS (nº de peça 10596814)
- Coluna C18 Thermo Scientific™ Acclaim™ RSLC 120, 50 x 2,1 mm 2,2 µm (nº de peça 068981)

Os peptídeos LL-37 (ingrediente farmacêutico ativo; IFA) e os dois fragmentos relacionados LL-37 RKS e LL-37 SKE foram obtidos de um fornecedor idôneo.

Tabela 1. Sequências de aminoácidos do peptídeo e a massa molecular teórica

Composto	Sequência de aminoácidos	Massa média teórica [Da]	Massa monoisotópica teórica [Da]	Massa isotópica mais abundante teórica [Da]
LL-37 (IFA)	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	4493,299	4490,565	4492,582
LL-37 RKS (fragmento 1)	RKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	3800,488	3798,211	3799,225
LL-37 SKE (fragmento 2)	SKEKIGKEFKRIVQRIKDFLR	2619,130	2617,544	2618,558

Preparo dos padrões

Uma visão geral das sequências de aminoácidos do peptídeo utilizadas no estudo é mostrado na tabela 1. Foi preparada uma solução de 1 mg/mL de cada peptídeo na fase móvel A (água + 0,1% de ácido fórmico). Os peptídeos do fragmento LL-37 RKS (fragmento 1) e LL-37 SKE (fragmento 2) foram enriquecidos com uma concentração de 150 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente, na solução de peptídeo LL-37 de 500 µg/mL (IFA) para simular uma amostra contendo impurezas relacionadas ao produto.

Instrumentação

Foi utilizado para a análise um sistema de UHPLC binário Thermo Scientific™ Vanquish™ Flex equipado com um espectrômetro de massa de quadrupolo único ISQ EM.

- Base do Sistema Thermo Scientific™ Vanquish™ Vanquish Horizon/Flex (nº de peça VH-S01-A-02)
- Bomba Binária Thermo Scientific™ Vanquish™ F (nº de peça VF-P10-A-01)
- Amostrador de Divisão Thermo Scientific™ Vanquish™ (nº de peça VF-A10-A-02)
- Compartimento de Coluna Thermo Scientific™ Vanquish™ H (nº de peça VH-C10-A-02)
- Detector de Comprimento de Onda Variável Thermo Scientific™ Vanquish™ (nº de peça VF-D40-A)
- Semi-Micro Célula de Fluxo de 2,5 µL, caminho óptico 7 mm (SST) (nº de peça 6077.0360)
- Espectrômetro de massa ISQ EM (nº de peça SQEM-ESI)

Condições da cromatografia líquida

Coluna	Acclaim RSLC 120 C18, 50 x 2,1 mm, 2,2 µm	
Fase móvel	A: Água + ácido fórmico 0,1% B: Acetonitrila + ácido fórmico 0,1%	
Taxa de fluxo	0,5 mL/min	
Gradiente	Tempo (min)	%B
	0	20
	2	50
	2,1	20
	5,5	20
Volume do misturador	10 + 25 µL	
Temperatura da coluna	50°C (modo de ventilação forçado, velocidade da ventoinha 5)	
Temperatura do amostrador automático	4 °C	
Comprimento de onda UV	214 nm	
Taxa de coleta de dados UV:	10 Hz	
Tempo de resposta UV	0,5 s	
Volume de injeção	1 µL	

Configurações da espectrometria de massas

Parâmetros da fonte da MS

Pressão do gás de impulsão	49,9 psig
Pressão do gás auxiliar	5,7 psig
Pressão do gás de varredura	0,5 psig
Temperatura do vaporizador	282° C
Temperatura do tubo de transferência de íons	300°C
Tensão da fonte	3000 V

Parâmetros do método de MS

Tipo de método	Verificação completa
Polaridade dos íons	Positiva
Faixa de massa	m/z 500–2000
Tempo de residência	0,2 s
Tensão da fonte CID	10 V

Processamento de dados

O sistema de dados de cromatografia (CDS) Thermo Scientific™ Chromeleon™ 7.2.9 foi utilizado para a obtenção e processamento de dados.

Resultados e discussão

No presente estudo, os dados UV serviram para a determinação dos níveis de impureza e dos dados da MS primeiramente para a identificação das impurezas relacionadas ao produto em uma amostra de peptídeo sintético. As áreas relativas dos picos das impurezas associadas foram calculadas e avaliadas com base nas diretrizes publicadas pela Conferência Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para o Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (ICH).³ Consequentemente, foram comparadas às áreas relativas obtidas com UV, a corrente total de íons (TIC) e os cromatogramas de íons extraídos (XIC). O método também permite a verificação das impurezas desconhecidas e aumenta a confiança nos resultados.

A figura 1 mostra o cromatograma de UV do peptídeo LL-37 e o cromatograma de TIC correspondente para a faixa de verificação de m/z 500 a 2000. O peptídeo LL-37 pôde ser detectado no tempo de retenção (TR) 1,7 min. Somente a partir do cromatograma de UV que não se observaram picos, indicando que não há grande impurezas presentes na amostra. Contudo, as impurezas de co-eluição não puderam ser excluídas somente com base no traço UV. Uma grande vantagem em usar os dados dos espectros da MS é que a pureza do pico pode ser determinada ao fazer a corrida em modo de verificação completa. Entretanto, o espectro obtido também não exibiu picos de massa adicionais significantes que indicassem co-eluição do IFA com outras impurezas (figura 4).

O Chromeleon CDS oferece um recurso que usa colunas customizadas na lista da sequência para cálculo da massa teórica dos peptídeos e outros componentes químicos por meio de inserção da sequência de peptídeos ou da fórmula química. Ele também permite o cálculo de estados diferentes de carga e de várias massas de aduto (figura 2). É uma ferramenta útil na identificação de vários estados de carga nos espectros da massa de peptídeos e outras biomoléculas.

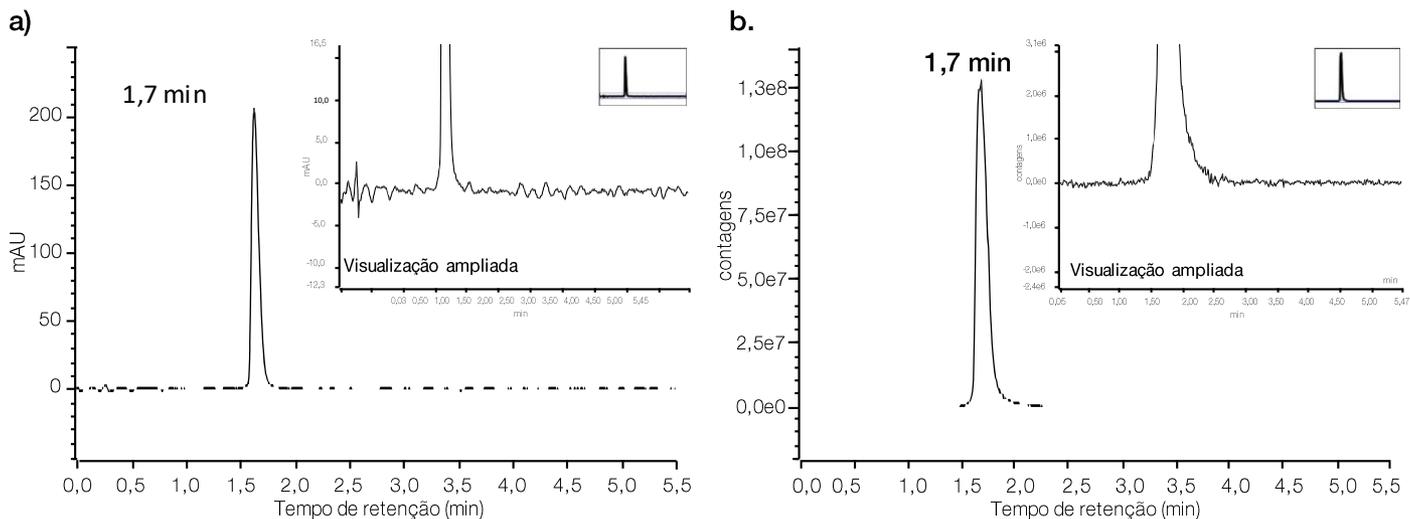


Figura 1. a) cromatograma UV a 214 nm e b) cromatograma TIC do peptídeo LL-37 com a linha de base ampliada.

#	TIC	Name	*API_peptide_sequence	#API_Calculated most abundant Mass [M] [Da]	#API_Calculated most abundant Mass [M+4H] [m/z]	*Fragment_1_peptide_sequence	#Fragment_1_Calculated most abundant Mass [M] [Da]	#Fragment_1_Calculated most abundant Mass [M+4H] [m/z]	*Fragment_2_peptide_sequence	#Fragment_2_Calculated most abundant Mass [M] [Da]	#Fragment_2_Calculated most abundant Mass [M+4H] [m/z]
1	None	Blank		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.
2	None	API + fragments	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIV...	4492.58213	1124.15281	RKSKEKIGKEFKRIVQRIKDF...	3799.22542	950.81363	SKEKIGKEFKRIVQRIKDFLR	2618.55776	655.64672
3	None	API + fragments	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIV...	4492.58213	1124.15281	RKSKEKIGKEFKRIVQRIKDF...	3799.22542	950.81363	SKEKIGKEFKRIVQRIKDFLR	2618.55776	655.64672
4	None	API + fragments	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIV...	4492.58213	1124.15281	RKSKEKIGKEFKRIVQRIKDF...	3799.22542	950.81363	SKEKIGKEFKRIVQRIKDFLR	2618.55776	655.64672
5	None	Blank		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.		n.a.	n.a.

Figura 2. Captura de tela da lista de inserção do Chromeleon com a adição das colunas customizadas para os cálculos da massa teórica dos componentes alvos (azul claro: IFA, verde claro: fragmento 1; vermelho claro: fragmento 2)

Para simular o perfil de impureza do produto, dois fragmentos do peptídeo em separado foram enriquecidos na solução do peptídeo LL-37 e medidos sob a mesma condição.

A separação na linha de base pôde ser obtida com um método de gradiente reduzido em 2 min, conforme demonstrado na figura 3.

Devido ao acoplamento ao espectrômetro de massa ISQ EM, os picos podem ser atribuídos ao respectivo peptídeo por meio de comparação entre a massas teórica e a massa observada. A atribuição dos picos não seria possível com base somente no sinal UV e sem experimentos adicionais.

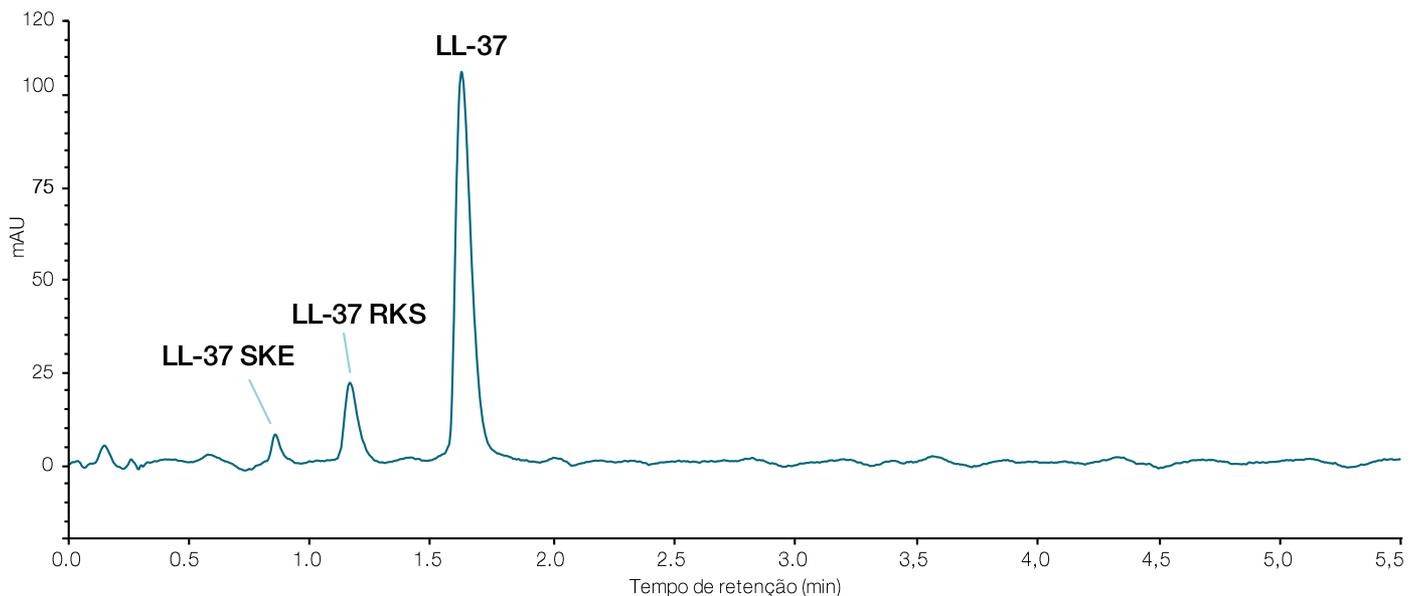


Figura 3. Cromatograma UV a 214 nm do perfil de impureza do peptídeo simulado

A faixa de massa ampliada do espectrômetro de massa ISQ EM permite a detecção de vários estados de carga entre 2 e 8 para os peptídeos utilizados no estudo (figura 4). Os espectrômetros de massa de baixa resolução como os espectrômetros de massa quadrupolo não solucionam satisfatoriamente as massas de isótopos em estado de alta carga. Portanto, usa-se a massa média ao invés da massa monoisotópica, já que é comum em espectros de massas de alta resolução.

A tabela 2 resume os valores medidos e teóricos m/z (média e isótopo mais abundante) de todos os estados de carga obtidos para o peptídeo LL-37 e os dois fragmentos. O desvio de massa entre a massa teórica média e a massa medida ($\Delta m/z$) foi de $\leq 0,4$ para todos os estados de carga. A massa média sem carga foi calculada para cada estado de carga usando a equação 1 e com o cálculo da média, resultando na massa média intacta na deconvolução. O desvio de massa para a molécula intacta foi de $\leq 0,5$ Da para todos os peptídeos.

$$M = z(m/z - H+)$$

Equação 1. Cálculo da massa sem carga com o valor m/z e o estado de carga correspondente

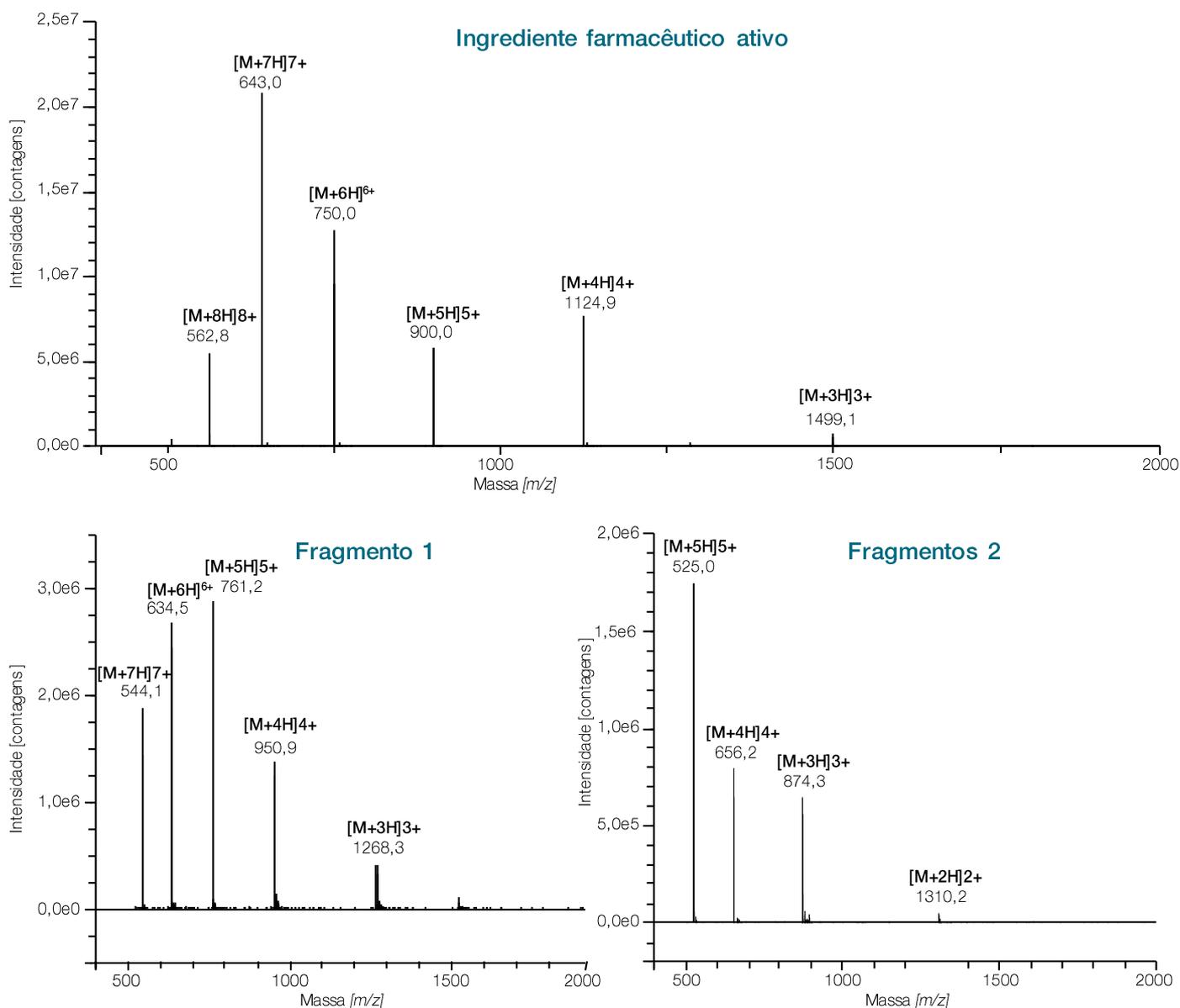


Figura 4. Espectros de massas obtidos para o IFA e os dois fragmentos

Tabela 2. Comparação das massas teórica e média com o desvio da massa absoluta correspondente de todos os estados de carga atribuídos em cada espectro do peptídeo para figura 4.

LL-37 (IFA)					
Estado de carga	Massa média medida [m/z]	Massa mais abundante medida [m/z]	Massa média teórica [m/z]	Delta [m/z]	Massa média calculada [Da]
[M]			4493,3		
[M+1H]1+	—	—	4494,3	—	—
[M+2H]2+	—	—	2247,7	—	—
[M+3H]3+	1498,4	1499,1	1498,8	0,4	4492,2
[M+4H]4+	1124,2	1124,9	1124,3	0,1	4492,8
[M+5H]5+	899,5	900,0	899,7	0,2	4492,5
[M+6H]6+	750,0	750,0	749,9	-0,1	4494,0
[M+7H]7+	643,0	643,0	642,9	-0,1	4493,9
[M+8H]8+	562,8	562,8	562,7	-0,1	4494,3
Massa média na deconvolução (n=6) [Da]					4493,3
Desvio de massa em relação à massa teórica [Da]					-0,02
LL-37 RKS (Fragmento 1)					
[M]			3800,5		
[M+1H]1+	—	—	3801,5	—	—
[M+2H]2+	—	—	1901,3	—	—
[M+3H]3+	1267,5	1268,3	1267,8	0,3	3799,5
[M+4H]4+	950,9	950,9	951,1	0,2	3799,6
[M+5H]5+	761,2	761,2	761,1	-0,1	3801,0
[M+6H]6+	634,5	634,5	634,4	-0,1	3801,0
[M+7H]7+	544,1	544,1	543,9	-0,2	3801,6
[M+8H]8+	—	—	476,1	—	—
Massa média na deconvolução (n=5) [Da]					3800,5
Desvio de massa em relação à massa teórica [Da]					0,04
LL-37 SKE (Fragmento 2)					
[M]			2619,1		
[M+1H]1+	—	—	2620,1	—	—
[M+2H]2+	1310,2	1310,2	1310,6	0,4	2618,4
[M+3H]3+	873,7	874,3	874,1	0,4	2618,1
[M+4H]4+	655,5	656,2	655,8	0,3	2618,0
[M+5H]5+	525,0	525,0	524,8	-0,2	2620,0
[M+6H]6+	—	—	437,5	—	—
[M+7H]7+	—	—	375,2	—	—
[M+8H]8+	—	—	328,4	—	—
Massa média na deconvolução (n=4) [Da]					2618,6
Desvio de massa em relação à massa teórica [Da]					-0,5

Tipicamente, a resposta do sinal UV é usada para a quantificação relativa na análise de impurezas uma vez que o sinal da MS depende bastante da eficiência da ionização para os analitos individuais e deve-se considerar também a supressão de íons, o que pode levar a uma estimativa inferior ou superior das concentrações de analitos. Entretanto, com base na sensibilidade mais alta, os dados da MS são muitas vezes usados para quantificar os níveis de concentração mais baixos, em que a detecção UV já está atingindo o seu limite. Na tabela 3, é exibida uma comparação das áreas relativas dos picos obtidas pelos traços UV, TIC e XIC. A variação dos resultados indica claramente como é difícil conseguir obter a quantificação das impurezas relacionadas ao produto. A resposta do sinal UV tem como base a forte absorção da ligação peptídica a 214 nm. No entanto, devido às sequências bem diferentes, a resposta UV não é uniforme para os três peptídeos. Dessa forma, o resultado obtido a partir das áreas relativas dos picos é diferente dos valores calculados de forma teórica, que devem ser 30% para o fragmento 1 e 10% para o fragmento 2 e servem apenas para uma estimativa aproximada. Para obter uma quantificação precisa com UV, deve-se realizar a calibração externa de cada analito individual ou será preciso determinar os fatores de resposta. No caso de quantificação na MS, se faz necessário quantificar de forma precisa os padrões de isótopo marcado, já que as respostas na MS também não são uniformes, podendo ocorrer a supressão de íons.

Conclusões

- A combinação da detecção UV e MS é benéfica na obtenção do perfil de impurezas do peptídeo graças às informações complementares obtidas sobre os analitos, por exemplo, a pureza do pico e a confirmação do composto derivado de massa.
- A faixa de massa ampliada de até 2000 m/z permite a detecção de espécies de baixa carga e permite a detecção dos perfis completos do estado de carga de biomoléculas de tamanho médio.
- Um método de gradiente rápido permitiu a separação do perfil de impurezas do peptídeo LL-37 em 2 min.

Referências

1. Wu, L.C.; Chen, F.; Lee, S.L.; Raw, A.; Yu, L.X. Construção da paridade entre peptídeos de marca e genéricos: Considerações regulatórias e científicas sobre a qualidade dos peptídeos sintéticos. *International Journal of Pharmaceutics* 2017, 518, 320–334.
2. Chen, Y.; Yang, S.; Ho, E.A. Desenvolvimento de um Método Analítico para Obter uma Quantificação Rápida dos Peptídeos Usados nas Fórmulas de Microbicidas. *Chromatographia* 2014, 77(23-24), 1713–1720.
3. Diretrizes da ICH, Diretrizes de Qualidade, Impurezas Q3A-Q3D.

Tabela 3. Dados para TR, Resolução e Área Rel. de impurezas simuladas comparando o traço UV, TIC e XIC com m/z 525,0 para LL-37 SKE (fragmento 2), m/z 634,5 para LL-37 RKS (fragmento 1) e m/z 643,0 para LL-37 (IFA)

Composto	Tempo de retenção [min]	Resolução	Área Rel. traço UV [%]	Área Rel. traço TIC [%]	Área Rel. traço XIC [%]
LL-37 SKE (fragmento 2)	0,9	3,54	4,4	4,3	5,9
LL-37 RKS (fragmento 1)	1,2	4,16	16,5	21,9	25,1
LL-37 (IFA)	1,7	—	100	100	100

Saiba mais em thermofisher.com/ISQEM

ThermoFisher
SCIENTIFIC