La determinazione della presenza di acido ialuronico in preparati che contengono aminoacidi: La caratterizzazione del peso molecolare

- A. Bellomaria[a, b, 1],
- R. Nepravishta[a, 1, 2],
- U. Mazzanti[b, 3],
- M. Marchetti[c, 4],
- P. Piccioli[c, 4],
- M. Paci[a, 5]

[a] Dipartimento delle Scienze e Tecnologie Chimiche / Università Roma Tor Vergata, Via della Ricerca Scientifica, 1, 00133 Roma, Italia

[b] Cooperativa di Ricerca Finalizzata, Via della Ricerca Scientifica, 1, 00133 Roma

[c] Italfarmacia srl, Via Tor Sapienza, 7, Roma, Italia

Abstract

Molte preparazioni farmaceutiche contengono acido ialuronico con la presenza di una vasta gamma di molecole a basso peso molecolare come gli aminoacidi. In questi composti è particolarmente difficile determinare la concentrazione ed il peso molecolare dei frammenti di acido ialuronico. Infatti i composti zwitterionici ad alta concentrazione si comportano mascherando l'acido ialuronico tramite le interazioni elettrostatiche tra gli aminoacidi e l'acido ialuronico. In tali circostanze il normale test colorimetrico per la determinazione dell'acido ialuronico risulta inefficace e negli spettri ^{1}H NMR i picchi del polimero scompaiono completamente. La presenza di acido ialuronico è stata rivelata dal test DMAB e ^{1}H NMR con una semplice procedura di separazione mentre il suo peso molecolare medio nel prodotto finale è stato determinato solamente con la spettroscopia NMR DOSY soltanto. Quest'ultima determinazione è molto importante a causa degli effetti benefici di alcune grandezze dei frammenti di questo polimero.

Abbreviazioni

- HYA, acido ialuronico
- DMAB, p-Dimetilamminobenzaldeide;
- DOSY, Spettroscopia basata sulla diffusione;
- LMW-HYA, acido ialuronico a basso peso molecolare;
- ADS, deprivato di aminoacidi e sottoposto ad azione di ultrasuoni;
- AD, deprivato di aminoacidi

Parole chiave

- Acido ialuronico;
- Separazione;
- DOSY;
- NMR spettroscopia

1. Introduzione

L'acido ialuronico (HYA) è un polisaccaride lineare costituito da unità di acido D-glucuronico e DN-acetilglucosamina a ripetizione, [→ 4) -beta-D-GlcpA- (1 → 3) -beta-D-GlcpNAc- (1 →] , estratto da una varietà di tessuti animali. Grazie alle sue particolari proprietà fisico-chimiche e le rilevanti attività

biologiche, l'acido ialuronico è stato utilizzato in una vasta gamma di prodotti, come negli alimenti, nelle biomedicine, nei biomateriali e cosmetici. Viste le risorse limitate ed il rischio di infezione virale, l'acido viene ora prodotto attraverso fermentazione microbica ottimizzata, con alta capacità di decontaminazione, bassi costi di produzione e basso rischio di infezione virale da specie (Izawa et al., 2011 e Liu et al., 2010). La caratterizzazione del peso molecolare appare particolarmente importante in quanto i frammenti degli acidi ialuronici a basso peso molecolare (LMW-HYA) rivelano attività biologiche differenti (Stern et al., 2006, Forrester and Balazs, 1980 e McKee et al., 1996). Infatti i pesi molecolari medi nella fascia da 45,2 - 145 frammenti kDa mostrano delle chiare attività antiossidanti e di eliminazione dei radicali liberi a differenza di quelle realizzate dall' acido ialuronico con MW molto alto(Ke et al., 2001) Gli LMW-HYA agiscono anche come veri fattori angiogenici (Cui et al., 2009) e possono aiutare la guarigione di ferite da taglio attraverso una angiogenesi migliorata (Gao et al., 2006). Altre verifiche indicano che LMW-HYAs blocca la crescita del carcinoma del colon-retto, diminuendo la proliferazione delle cellule tumorali e stimolando la risposta immunitaria (Alaniz et al., 2009). Il loro uso è stato anche descritto come un nuovo possibile coadiuvante nella preparazione dei vaccini antitumorali basati su cellule dendritiche con forti proprietà immuno-stimolanti (Alaniz et al., 2001). Infatti per questo motivo appare importante ridurre il peso molecolare alto dell' acido ialuronico nel LMW-HYA e molti metodi di abbassamento sono stati proposti (Stern et al., 2007) incluso il metodo fisico (Gu et al., 2010, Kubo et al., 1993, Kwon et al., 2009; and Miyazaki et al., 2001, l'approccio chimico (Rychly et al., 2006, Soltes et al., 2007 e Yamazaki et al., 2003) ed il processo enzimatico (Chen et al., 2009, El-Safory et al., 2010, Alkrad et al., 2003, Lenormand et al., 2011 e Liu et al., 2009). I frammenti sono stati anche prodotti tramite irradiazione da un fascio di elettroni, da irradiazione di raggi gamma, irradiazione a microonde e il trattamento termico (Choi et al., 2010). In prodotti farmaceutici che contengono aminoacidi e altre molecole, il contenuto di HYA è difficile da rilevare e da quantificare. Infatti, la grande quantità di interazioni tra questo polimero polielettrolita e le molecole a basso carico o zwitterioniche crea una varietà di interazioni chimico-fisiche non selettive con il risultato di un grande complesso di elementi. L'obiettivo di questo studio era la determinazione del peso molecolare di HYA utilizzando una tecnica NMR rapida, specifica e semplice. Il rilevamento di HYA è stato effettuato mediante spettroscopia NMR, affiancata da un test colorimetrico specifico.

Mediante una spettroscopia basata sulla diffusione NMR (DOSY) la determinazione di MW è stata effettuata direttamente in un esperimento veloce. È stato analizzato il prodotto commerciale AAA ,Italia (una forma farmaceutica per la somministrazione sottocutanea) che contiene 0,1% w / v di HYA e vari aminoacidi. Per la rilevazione del HYA sono stati utilizzati il test di routine diretto DMAB (Reissig et al., 1955) e la spettroscopia ^{1}H NMR. Entrambe le tecniche non sono riuscite a rivelare l'eventuale presenza di HYA nel prodotto intero. Questo lavoro riporta quindi i risultati ottenuti sul prodotto AAA con l'applicazione di una particolare procedura di purificazione parziale attraverso una quasi completa privazione del contenuto degli aminoacidi. La procedura adoperata ha permesso la caratterizzazione della presenza di HYA mediante un test colorimetrico e la spettroscopia 1H NMR e la determinazione del caratteristico MW del polimero attraverso la DOSY NMR.

2. Materiali e metodi

Il campione AAA usato per l'analisi era composto di 0,1% HYA sotto forma di sale di sodio, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-prolina, L-valina, glicina, L-serina, L-alanina, L-cisteina, bicarbonato di sodio , collocato in fiale sterili da 5 mL gentilmente offerto dal produttore italiano. DMAB, tetraborato di sodio e HYA a 13, 50, e 208 kDa medio MW sono stati forniti da Sigma Aldrich (USA). Il mini kit di dialisi a 1000 Da cut-off è stato acquistato da Amersham Biosciences (USA).

L'esame p-dimethylaminobenzaldeide (DMAB) è un test UV-Vis per oligosaccaridi contenenti N-acetilglucosamina allo scopo di riduzione. In questo lavoro abbiamo utilizzato un metodo leggermente modificato rispetto a quello precedentemente descritto da Reissig et al., 1955 Per l'esame sono stati utilizzati due soluzioni di lavoro: una soluzione di tetraborato, preparata sciogliendo 3 g di tetraborato di sodio in 10 mL di H_2O a pH 9, e una soluzione DMAB, preparata sciogliendo 0,5 g DMAB in una miscela costituita da 0,6 mL di HCl 12 N e 4,4 ml di acido acetico glaciale . Entrambe le soluzioni di lavoro sono state preparate immediatamente prima dell'uso. Per effettuare l'esame DMAB è stato introdotto 0,1 mL del campione AAA in 0,1 ml di soluzione di tetraborato agitato in un tubo di vetro, riscaldato per 5 minuti e poi

posto in acqua fredda. A questo punto è stato aggiunto 0,8 mL di DMAB alla soluzione e il campione è stato incubato per 30 min a 37 ° C. Le misurazioni UV-Vis sono state effettuate su uno spettrofotometro Lambda Bio di Perkin Elmer ,trasferendo il campione in una cuvetta di quarzo di 1 cm di lunghezza di percorso e l'assorbenza è stata misurata con λ = 544 nm.

La privazione degli aminoacidi del campione è stato ottenuta tramite precipitazione di 5 mL del campione AAA con 100 mL di metanolo che è stato poi rimosso mediante evaporazione. Il sedimento è stato solubilizzato in 0.6 mL di H_2O e dializzato per 48 ore utilizzando il kit di mini-dialisi a 1000 Da cut-off per la completa privazione degli aminoacidi. Durante la dialisi la privazione degli aminoacidi dal campione è stato esaminata mediante spettroscopia ^{1}H NMR seguendo la diminuzione di specifiche risonanze degli aminoacidi fino alla loro completa assenza e la conseguente comparsa di risonanze caratteristiche di NMR HYA.

La sonicazione del campione è stato effettuata in un bagno ad ultrasuoni che funziona a 28 kHz per 6 ore in modo da ottenere la frammentazione del HA.

Gli esperimenti NMR sono stati effettuati su uno strumento Bruker Avance che funziona a 700,13 MHz. Tutti i campioni sono stati preparati dissolvendoli in H_2O contenente 10% di D_2O per il segnale di blocco e sono stati trasferiti in tubi NMR di 5 mm. Per eludere il segnale dell' acqua, gli esperimenti ^{1}H NMR sono stati acquisiti a 4,7 ppm utilizzando la sequenza di impulsi zgpr con 32 K e 64 scansioni a 298 K.

La curva di calibrazione DOSY di HYA è stata eseguita con diversi MW al fine di correlare il MW delle molecole HYA con il loro coefficiente di diffusione. Per il limite più basso della curva è stato preso in considerazione il coefficiente di diffusione delle molecole d'acqua (MW = 18 Da). Per questo sono stati acquistati da Sigma Aldrich tre campioni HYA con una MW medio di rispettivamente 13 kDa, 50 kDa e 208 kDa. I campioni di riferimento HYA sono stati sciolti in acqua e la concentrazione del 10% D_2O a 0.1% w / v trasferito in tubi NMR di 5 mm; per ciascuno di essi sono stati acquisiti i spettri DOSY a 298 K. Il coefficiente di diffusione (log D) è stato poi correlato al log MW delle molecole HYA dando un R^2 di 0,99. Tutti gli spettri DOSY sono stati eseguiti utilizzando la sequenza di impulsi ledbpgppr2s per cancellare il segnale di acqua a 4,7 ppm. Durante l'esperimento DOSY sono stati ottenuti 32 mono spettri dimensionali con 64 scansioni in un gradiente crescente lineare oscillando da 5% a 95% con un Δ di 70 ms e un δ di 2 ms. Gli spettri sono stati poi analizzati utilizzando il modulo DOSY attivato nel software Bruker TOPSPIN 3.1.

3. Risultati

Come precedentemente riportato, la presenza di aminoacidi e altre molecole hanno avuto come risultato sia la completa assenza di reattività nel test DMAB e l'assenza della risonanza HYA nello spettro NMR. Infatti nello spettro NMR in Fig. 1 compaiono solo le risonanze degli aminoacidi contenuti nel campione mentre le risonanze provocate dal HYA non sono visibili. Infatti è ben noto che le risonanze di HYA si trovano a circa 5,2 ppm e tra 3,9 e 3,2 ppm nello spettro ^{1}H NMR con un limite ben delimitato (Scott et al., 1984). Evidentemente l'alta concentrazione di aminoacidi rispetto al HYA può mascherare i picchi di HYA; inoltre, le interazioni intermolecolari che HYA è in grado di stabilire con gli aminoacidi cambiano in gran parte la caduta della macromolecola, mentre le risonanze NMR si allargano fino a diventare impercettibili. È importante ricordare che il campione originale di AAA sotto studio è stato preparato con HYA (MW di 1,7 MDa) ad una concentrazione di circa 0,1%. w / v con l'aggiunta di quantità di aminoacidi come: L-isoleucina, L-leucina, L-lisina cloridrato, L-prolina, L-valina, glicina, L-serina, L-alanina, L-cisteina e sodio bicarbonato. Questa soluzione è stata sterilizzata in autoclave con cicli di 20 minuti a 121 ° C e una pressione di 2 bar. Il prodotto finale è stato inserito in fiale monouso per l'uso diretto come preparazione farmaceutica.

3.1. *L'analisi di acido ialuronico con il metodo colorimetrico DMAB*

Per rivelare HYA nel campione AAA, è stato eseguita l'analisi DMAB e lo sviluppo di un prodotto di colore rosso a causa della reazione dell'unità terminale N-acetilglucosamina di HYA con il reagente DMAB

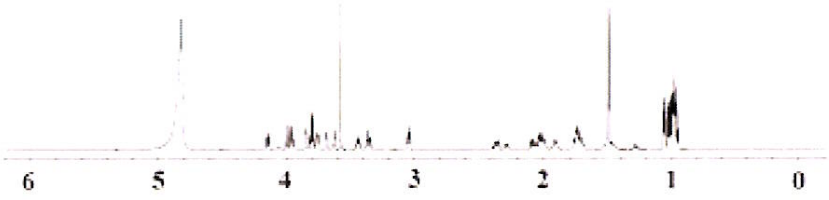

Fig. 1 Spettro NMR del campione AAA.

(Hynes and Ferretti, 1994) controllato con spettrofotometro. Anche in questo caso il test non ha avuto successo, indicando la presenza di trascurabili quantità di HYA libero nella preparazione, molto lontano dalla concentrazione dichiarata di 0,1% w / v di HYA nel prodotto originale.

Poiché la presenza di HYA nel prodotto AAA era garantita, una procedura di purificazione per la privazione degli aminoacidi dei campioni è stata adottata come riportato alla sezione 2 (lo schema è in Fig. 2). Inoltre una delle fiale di AAA sotto studio è stato esposto ad ultrasuoni per 6 h in modo da esaminare gli effetti degli ultrasuoni sulla distribuzione del MW (vedi in basso). I campioni sono stati etichettati rispettivamente come Aminoacidi Privo e Sonicato (ADS) e Aminoacidi Privo (AD).

I risultati ottenuti dal test DMAB dei campioni sono riportati in Fig.3.. L'assorbenza dovuta al colore sviluppato dalla reazione è chiaramente visibile. Come previsto il colore, sviluppato nei campioni in un MW medio conosciuto di 13, 50, e 208 kDa (campioni b, c, d in Fig. 3), aumenta in proporzione alla diminuzione di MW. Infatti la reazione interessa i punti estremi della riduzione della catena di HYA che, alla stessa molarità monomerica, è più concentrato nei campioni con basso MW. Entrambi i campioni micro- dializzati (e + g in Fig.3) hanno mostrato una assorbenza molto bassa, che è aumentata significativamente dopo molti passaggi di purificazione degli aminoacidi (f-ADS e h-AD in Fig.3). Inoltre, il campione sonicato (F-ADS in Fig.3) ha presentato il più alto valore di assorbenza. Infatti il tempo della sonicazione più lungo porta ad un HYA più frammentato. Negli spettri NMR appare anche evidente che nei campioni purificati le risonanze di HYA sono chiaramente visibili a circa 5,2 ppm e tra 3,9 e 3,2 ppm (vedi Fig. 4h. ed f). Il confronto degli spettri NMR di ADS e AD riportato in Fig. 4 mostra una leggera differenza tra il sonicato (Fig. 4f) e non-sonicato (Fig. 4h) nella linea di percorso delle loro risonanze. Questo è in linea con la frammentazione indotta da sonicazione sul campione AADS che diminuisce le linee di percorso delle risonanze a seconda del peso molecolare inferiore dei frammenti. Questi risultati, ottenuti dopo molti passi di purificazione confermano che un gran numero di molecole di aminoacidi si legano saldamente al polimero HYA interferendo nel test DMAB e aumentando la caduta molecolare e la flessibilità interna per ampliare le risonanze NMR oltre il rilevamento.

3.2. La caratterizzazione del peso molecolare di acido ialuronico con DOSY NMR

La caratterizzazione del peso molecolare dei campioni HYA è stata riportata anche da altri autori tramite altre tecniche come l' elettroforesi su SDS-PAGE e il gel di agarosio (Bhilocha et al., 2011);cromatografia di filtrazione di gel (Yeung and Marecak, 1999) dispersione della luce dinamica (Maleki et al., 2007). Altri metodi colorimetrici come la determinazione di carbazolo dell' acido uronico (Bitter and Muir, 1962), l'elettroforesi capillare ad alta prestazione (Plätzer et al., 1999), e, in misura minore, anche HPLC sono stati utilizzati per la quantificazione. Il nostro approccio è basato sulla tecnica DOSY-NMR, un metodo interessante, non distruttivo che rende possibile determinare il MW di un campione, misurando il suo coefficiente di diffusione con l'uso di piccole quantità; la tecnica è relativamente veloce e precisa in confronto ai metodi sopramenzionati.

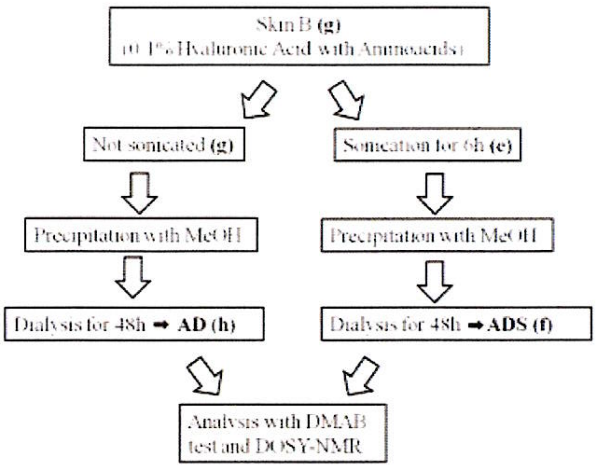

Fig. 2 Lo schema della procedura adottata per la privazione degli aminoacidi dei campioni di AAA come riportato alla sezione 2 . lettere sono utilizzati per identificare i campioni.

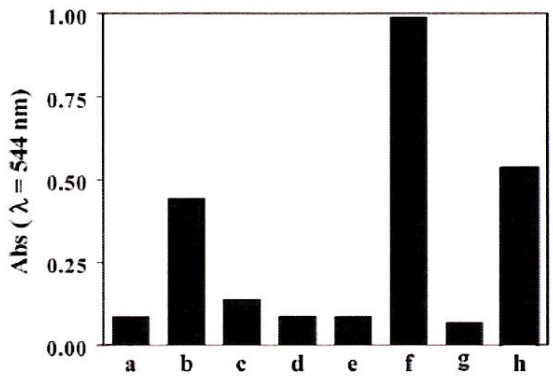

Fig. 3 I risultati del test colorimetrico DMAB. (a) AAA campione, (b) campione HYA di 13 kD, (c) campione HYA di 50 kD, (d) campione HYA di 208 kDa, (e) campione sonicato per 6 ore, (f) I campione ADS, (g) campione non-sonicato e (h) campione AD.

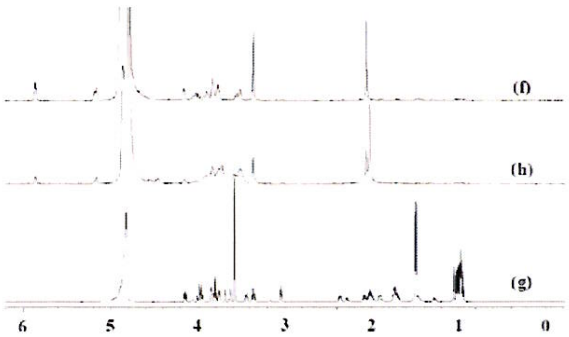

Fig. 4 Spettro NMR del campione AAA (g) spettro ^{1}H NMR prima di privazione di aminoacidi e (h) Spettro ^{1}H NMR dopo deprivazione di aminoacidi, senza sonicazione, e (f) Spettro ^{1}H NMR dopo deprivazione di aminoacidi e sonicazione come riportato al punto 2 e la procedura di Fig.2

La tecnica DOSY-NMR ci ha permesso di caratterizzare il MW del polimero HYA nei campioni di AAA. L'esame DOSY-NMR è uno strumento potente per gli studi strutturali delle macromolecole e le loro

interazioni , perché permette di misurare la diffusione traslazionale delle molecole disciolte. Infatti il valore del coefficiente di diffusione fornisce informazioni dirette sulle dinamiche traslazionali, comprese le interazioni intermolecolari (Brand et al., 2005 , Cohen et al., 2005)), l'aggregazione e cambiamenti conformazionali (Kvam et al., 1992 and Johnson, 1999). Inoltre, DOSY permette di misurare il coefficiente di diffusione senza separazione fisica dei componenti della miscela (Colthup et al., 1990 and Francis et al., 1972). Nel nostro caso questo approccio ha reso possibile determinare il MW dei frammenti HYA sempre che la curva di calibrazione sia stata misurata. Il risultato della curva di calibrazione è riportato in Fig.5 dove nella trama del registro grafico i coefficienti di diffusione molecolare sono riportati come fattori dipendenti dal MW dei polimeri studiati. (I polimeri di 15, 30, 200 kDa sono stati usati come modello). Per ampliare significativamente le misurazioni dei frammenti di HYA del MW fuori dall'intervallo di calibrazione, è stato inserito il coefficiente di Diffusione

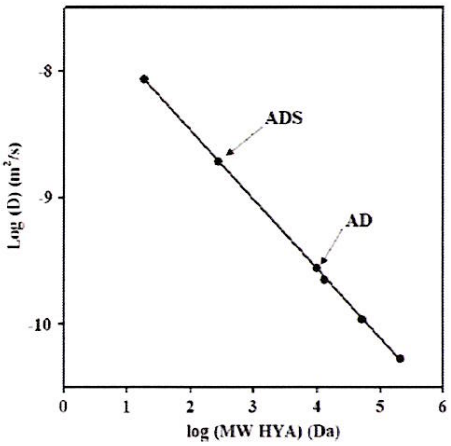

Fig.5 Curva di calibrazione del coefficiente di Diffusione di HYA con gli MW diverse dai standard commerciali. Il valore per la molecola d'acqua osservato negli spettri è stata inserito.

misurato dalla risonanza delle molecole d'acqua dovuto alla condotta di alta linearità di tale valore. Infatti nella curva di calibrazione incluso il coefficiente di Diffusione di acqua, il coefficiente di correlazione di linearità era R^2 = 0.99. Il raggio idrodinamico deve essere rigorosamente riportato in ascissa al posto degli MW, ma a una prima approssimazione, si può considerare la corrispondenza tra i due valori. I risultati degli esperimenti DOSY eseguiti sul campione AD (pannello sinistro) e ADS (pannello destro) sono riportati in Fig.6 dove le risonanze dei due campioni sono facilmente distinguibili a diversi MW.

3.3. *Gli effetti della sonicazione sui pesi molecolari di HYA*

Gli spettri DOSY in Fig. 6 hanno indicato che i trattamenti ad ultrasuoni hanno portato ad una frammentazione dell'acido ialuronico nella preparazione dei campioni AAA. Infatti nei due campioni il MW medio di acido ialuronico appare decisamente diverso. In particolare, nel campione AD, il MW è stato valutato a circa 8.000-11.000 Da. Sul campione ADS il MW è stato valutato a circa 270-500 Da, dimostrando che nel nostro caso la sonicazione produce una frammentazione del polimero di HYA. Questo approccio può essere considerato complementare con i metodi già stabiliti per la determinazione di MW dell' acido ialuronico. I risultati qui riportati sono una dimostrazione dell'utilità della tecnica DOSY NMR. Ulteriori studi per una conferma definitiva di questa tecnica con i risultati ottenuti con altre tecniche è prevista nel prossimo futuro.

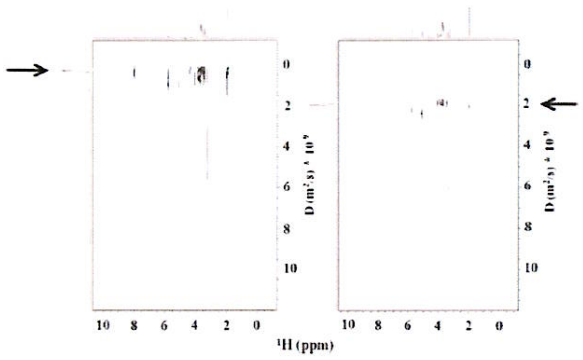

Fig.6 Gli spettri NMR DOSY del campione AD (a sinistra) e il campione ADS (a destra). Le frecce sono per la guida visiva.

4. Discussione e conclusione

In conclusione la procedura di purificazione e verifica mediante il test DMAB e mediante spettroscopia NMR di HYA contenuto in preparati commerciali per uso umano come il prodotto AAA si è rivelata un successo. Si deve concludere che la presenza di grandi quantità di aminoacidi è in grado di mascherare completamente il test colorimetrico e fallire nella determinazione dell'acido ialuronico tramite la spettroscopia NMR. La procedura di purificazione adottata ha portato con l'esame ^{1}H NMR ad una caratterizzazione completa di HYA presente nei campioni, eliminando l'interferenza di altri composti. Inoltre la spettroscopia DOSY-NMR ci ha permesso di determinare il peso molecolare dei frammenti di HYA presenti nel prodotto. Per di più, la sonicazione , nelle condizioni adottate , ha portato ad un ulteriore aumento di frammentazione del HYA, visibile dagli spettri DOSY.Perciò, la sonicazione di AAA migliora il processo di frammentazione e può trovare un'ampia applicazione per il raggiungimento di LMW-HYA. Infatti, sono stati studiati dei frammenti che sono stati scoperti essere in grado di stimolare attivamente molti tipi di cellule e facilitare l'eliminazione di frammenti residui o infettivi (Colthup et al., 1990, Francis et al., 1972 and Maharjan et al., 2011).

Riconoscimento:

siamo grati al signor Fabio Bertocchi per l'assistenza tecnica di NMR nel corso di questo lavoro.

Riferimenti