

PEPTIDES THÉRAPEUTIQUES ET CONTRÔLE DE LEUR CHIRALITÉ : UN ENJEU MAJEUR EN SCIENCES ANALYTIQUES

THERPEUTIC PEPTIDES AND THE CONTROL OF THEIR CHIRALITY : UN MAJOR CHALLENGE IN ANALYTICAL SCIENCES

Etablissement **Université de Montpellier**

École doctorale **Sciences Chimiques Balard**

Spécialité **Ingénierie Biomoléculaire**

Unité de recherche **IBMM - Institut des Biomolécules Max Mousseron**

Encadrement de la thèse **Christine ENJALBAL**

Co-Encadrant **Catherine PERRIN**

Financement du 01-10-2024 au 30-09-2027 origine **ANR Employeur** **Université de Montpellier**

Début de la thèse le **1 octobre 2024**

Date limite de candidature (à 23h59) **21 juin 2024**

Mots clés - Keywords

Techniques séparatives, Spectrométrie de masse, Peptides, Chiralité, Pharmacopée

Separative techniques, Mass spectrometry, Peptides, Chirality, Pharmacopoeia

Description de la problématique de recherche - Project description

Cette thèse s'inscrit dans un projet de recherche d'envergure visant à sonder le chiralité de peptides thérapeutiques en fédérant la grande majorité de l'équipe Sciences Analytiques de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (5 enseignants-chercheurs, 3 personnels techniques). Des travaux préliminaires ont été conduits dans le cadre de deux stages de master 2 et d'une thèse qui arrive à échéance de sa première année. La personne recrutée rejoindra ce collectif de recherche.

En raison de propriétés biologiques différentes, le contrôle de la chiralité des médicaments est un enjeu central dans l'industrie pharmaceutique. Pour les peptides thérapeutiques (soit 7 % des médicaments commercialisés de 2015 à 2019), l'épimérisation d'un acide aminé de série L en sa forme D représente une difficulté majeure lors du contrôle des impuretés de synthèse ou générées post-administration. Ainsi, toute impureté qui proviendrait d'une altération d'un centre stéréogénique doit être détectée à l'état de trace ce qui constitue une difficulté majeure à surmonter nécessitant des méthodes analytique stéréosélectives. En effet, la vérification de l'homochiralité des peptides synthétiques constitués de nombreux résidus implique la séparation efficace des diastéréoisomériques à très faible niveau de contamination (<0,1%) ce qui constitue un important défi analytique dans le développement d'un médicament. Bien que beaucoup d'efforts aient été consacrés aux séparations de diastéréoisomères par chromatographie liquide (LC) et électrophorèse capillaire (CE) d'une part, et plus difficilement par spectrométrie de masse (MS) d'autre part, de telles approches, assez peu appliquées aux peptides, n'ont pas réussi à fournir la sensibilité requise. Ce sujet de thèse a donc pour but de développer des méthodes analytiques très robustes capables de détecter et de quantifier un résidu épimérisé (% de forme D) quel que soit le peptide considéré. Parmi les acides aminés qui, au sein d'un peptide, sont sujets à cette conversion optique, nous avons plus particulièrement ciblé l'histidine (His) et l'acide aspartique (Asp). Alors que l'histidine présente une chaîne latérale qui implique une réactivité accrue par rapport aux autres résidus vis à vis de la racémisation lors des protocoles de synthèse en phase solide, l'acide aspartique n'est pas stable in vivo pouvant évoluer sous l'action de l'isomérase L-to-D. L'enjeu est donc double: mettre en place des méthodologies analytiques qui permettront de vérifier l'intégrité optique de peptides thérapeutiques contenant un ou plusieurs résidus histidine pour satisfaire la réglementation de la pharmacopée européenne et par ailleurs de contrôler la stabilité optique de peptides thérapeutiques contenant de l'acide aspartique après administration (profil de dégradation).

Le(la) thésard(e) recruté(e) travaillera au sein de l'équipe Sciences analytiques (F12) de l'IBMM (UMR5247). En s'appuyant sur les expertises de l'équipe en spectrométrie de masse et en techniques séparatives pour l'analyse de peptides de synthèse, une approche intégrative sera proposée pour la détection et la quantification des traces d'épimérisation de diverses séquences peptidiques. Elle combinera les méthodes séparatives LC/CE chirales couplées à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), et expériences de mobilité ionique (IM). Le parc instrumental requis est disponible dans l'équipe (LC, EC) et à la plateforme LMP (couplages LC/MS/MS). Des tripeptides contenant les résidus His ou Asp serviront de modèles pour établir les méthodes analytiques afin de les déployer et de

les optimiser sur des peptides thérapeutiques d'intérêt sélectionnés pour preuve de concept. L'équipe dispose d'une collection de peptides qui peuvent être étudiés pour le développement de méthode. De plus, la plateforme SynBio 3 de l'IBMM pourra être sollicitée pour préparer des peptides qui seraient nécessaires aux études analytiques selon le déroulement de la thèse et les avancées obtenues.

This thesis is part of a large-scale research project aiming at probing the chirality of therapeutic peptides. This project is bringing together the vast majority of the IBMM analytical team (5 teacher-researchers, 3 technical staff). Preliminary work was carried out as part of two master 2 internships and a thesis which is coming to the end of its first year. The recruited person will join this research consortium.

Due to different biological properties, controlling the chirality of drugs is a central issue in the pharmaceutical industry. For therapeutic peptides (i.e. 7% of drugs marketed from 2015 to 2019), the epimerization of an L series amino acid into its D form represents a major difficulty when controlling synthetic impurities or degradation compounds generated post-administration. Thus, any impurity which would come from an alteration of a stereogenic center must be detected at trace level, which constitutes a major difficulty to overcome requiring stereoselective analytical methods. Indeed, verifying the homochirality of synthetic peptides consisting of numerous residues involves the efficient separation of diastereoisomers at a very low level of contamination (<0.1%), which refers to an important analytical challenge in the development of a drug. Although much effort has been devoted to separations of diastereoisomers by liquid chromatography (LC) and capillary electrophoresis (CE) on the one hand, and more difficultly by mass spectrometry (MS) on the other hand, such approaches, quite rarely applied to peptides, have failed to provide the required sensitivity. This thesis subject therefore aims to develop very robust analytical methods capable of detecting and quantifying an epimerized residue (% of D form) whatever the peptide considered. Among the amino acids which, within a peptide, that are subject to this optical conversion, we particularly targeted histidine (His) and aspartic acid (Asp). While histidine presents a side chain which implies increased reactivity compared to other residues with respect to racemization during solid phase synthesis protocols, aspartic acid is not stable in vivo and can evolve under the action of L-to-D isomerase. The challenge is therefore twofold: to implement analytical methodologies which will make it possible to verify the optical integrity of therapeutic peptides containing one or more histidine residues to satisfy the regulations of the European Pharmacopoeia and also to control the optical stability of therapeutic peptides containing aspartic acid after administration to establish the degradation profile.

Thus, the recruited doctoral student will work within the Analytical Sciences team of the Max Mousseron Institute of Biomolecules. Drawing on the team's expertise in mass spectrometry and separation techniques for the analysis of synthetic peptides, an integrative approach will be proposed for the detection and quantification of epimerization traces of various peptide sequences. It will combine chiral LC/CE separation methods coupled with tandem mass spectrometry (MS/MS), and ion mobility (IM) experiments. The required instrumental equipment is available in the team (LC, EC) and at the LMP platform (LC/MS/MS couplings). Tripeptides containing His or Asp residues will serve as models to establish analytical methods in order to deploy and optimize them on therapeutic peptides of interest selected for proof of concept. The team has a collection of peptides that can be studied for method development. In addition, the IBMM's SynBio 3 platform may be used to prepare peptides which would be necessary for analytical studies depending on the progress of the thesis and the progress obtained.

Thématique / Domaine / Contexte

Séparations de stéréoisomères par différentes techniques séparatives (LC, CE) en couplage avec la spectrométrie de masse (IM-MS, MS/MS).

Chimie analytique, chimie des peptides, caractérisation des peptides, pharmacopée, réglementation en industrie pharmaceutique

L'équipe Sciences analytique de l'IBMM possède les expertises en techniques séparatives et spectrométrie de masse. Le sujet de thèse proposé est dans la continuité des travaux de recherche de l'équipe menés de longue date sur l'analyse qualitative et quantitative et la caractérisation de peptides. En particulier, cette thèse s'adosse à un contrat doctoral en cours (2024-2027) dont les recherches sont plus focalisées sur les aspects spectrométrie de masse résolue en énergie (ERMS) et études des fragmentations par complexations métalliques. Dans ce cadre, le résidu achiral glycine sert de contrôle négatif vis à vis des voies de fragmentation stéréosélectives recherchées pour les ions métallés. Les travaux de spectrométrie de masse qui seront menés lors de cette thèse seront en complémentarité en se concentrant plus particulièrement sur les approches de mobilité ionique.

Le parc instrumental nécessaire à la conduite du projet de recherche est à disposition au sein de l'équipe ainsi qu'à la Plateforme de l'Université (Laboratoire de Mesures Physiques) localisé dans le même bâtiment. Le projet s'adosse aussi sur la plateforme SynBio3 de l'IBMM pour la préparation de peptides modèles qui seront requis pour le projet de thèse.

Objectifs

Développement de couplages LC-MS/MS, CE-MS/MS, LC-IM/MS/MS, CE-IM/MS/MS, pour la séparation de stéréoisomères de peptides (racémisation des résidus Asp et His) à un seuil de quantification de 0.1%.

Méthode

Le projet est divisé en 4 étapes (Work Package):

WP1: Préparation de peptides modèles contenant le résidu Asp et/ou His.

WP2: Détection d'épimérisation en spectrométrie de masse (fragmentation et mobilité ionique (IM-MS/MS))

WP3: Détection d'épimérisation en méthodes séparatives et mise en oeuvre des couplages (LC/EC-IM-MS/MS).

WP4 : Validation sur des séquences réelles de peptides thérapeutiques.

Résultats attendus - Expected results

Développement d'une technologie de couplage permettant la détection et la quantification de trace d'épimérisation au niveau des résidus Asp ou His.

Références bibliographiques

1. D.J. Triggle, Stereoselectivity of drug action, Drug Discovery Today, 1997, 2, 138 doi: 10.1016/S1359-6446(97)01010-6.
2. B.G. de la Torre et al., Peptide Therapeutics 2.0, Molecules 2021, 26, 627 doi:10.3390/molecules26030627.
3. P.S. Bansal et al., Substrate Specificity of Platypus Venom L-to-D-Peptide Isomerase, J Biol Chem 2008, 283, 8969doi:10.1074/jbc.M70976 2200.
4. A. Tarafder et al., Chiral chromatography method screening strategies: Past, present & future, J Chromatog A, 2021, 461878doi:10.1016/j.chroma.2021.461878.
5. S. Bernardo-Bermejo et al., Chiral capillary electrophoresis, TrAC, 2020, 124, 115807 doi:10.1016/j.trac.2020.115807.
6. D. Han et al., Chiral mass spectrometry: An overview, TrAC, 2020, 123, 115763 doi:10.1016/j.trac.2019.115763.

Précisions sur l'encadrement - Details on the thesis supervision

La thèse sera dirigée par la Professeure Christine ENJALBAL (pilotage des recherches en spectrométrie de masse), et encadrée par la Professeure Catherine PERRIN et par le Dr Adrien CHOUCOU qui apporteront leurs expertises en techniques séparatives. Le suivi de la formation et d'avancement des recherche se fera lors de réunions hebdomadaires (les 3 encadrants sont localisés sur le même site au 3ème étage du Bâtiment Balard Recherche) ainsi que par l'organisation de Comités de Suivi de Thèse (CSI) annuels.

Conditions scientifiques matérielles et financières du projet de recherche

Accès aux plateformes SynBio3 et LMP dans le cadre de la démarche Qualité (norme ISO9001:2015).

Financement ANR (ANR-23-CE09-0009, projet GLYMS ayant pour objet « Sonder la chiralité des peptides thérapeutiques : effet des résidus Asp, His et Gly ? », Responsable scientifique : Madame Christine Enjalbal)

Ouverture Internationale

La personne recrutée participera à un congrès de spectrométrie de masse international tel que IMSC (International Mass Spectrometry Conference) qui aura lieu à Lyon en Août 2026.

Objectifs de valorisation des travaux de recherche du doctorant : diffusion, publication et confidentialité, droit à la propriété intellectuelle,...

Publication dans des journaux à comité de lecture, présentation dans les congrès nationaux des communautés des techniques séparatives, de la spectrométrie de masse et des peptides.

Collaborations envisagées

Des collaborations avec des collègues experts en spectrométrie de masse disposant de technologies complémentaires à celles disponibles au laboratoire peuvent être envisagées selon les avancements des travaux et d'éventuels verrous en lien avec le parc instrumental.

Complément sur le sujet

<https://ibmm.umontpellier.fr/sciences-analytiques-des-biomolecules/> (<https://ibmm.umontpellier.fr/sciences-analytiques-des-biomolecules/>)

Profil et compétences recherchées - Profile and skills required

Diplômés d'un Master 2 en chimie organique, chimie des biomolécules avec des compétences en spectrométrie de masse et techniques séparatives,

Diplômés d'un Master 2 en chimie analytique.

M2 student in organic chemistry, peptide chemistry with expertise in mass spectrometry and separative techniques,

M2 student in analytical chemistry.

Dernière mise à jour le 31 mai 2024