

Caractérisation améliorée des peptides et évaluation de la stabilité

Spectroscopie UV-visible de dérivée seconde sur un spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicuves

Auteur

Suresh Babu C. V.
Agilent Technologies, Inc.

Résumé

La surveillance de la stabilité des produits biothérapeutiques peptidiques est essentielle pour le développement biopharmaceutique. Les techniques traditionnelles de spectroscopie d'absorption ultraviolette-visible (UV-Vis) couramment utilisées dans les études de stabilité n'offrent souvent pas une résolution suffisante en matière de longueur d'onde, en particulier pour les molécules biologiques telles que les protéines et l'ADN, qui présentent généralement des pics larges. Il est donc difficile de détecter des changements structuraux subtils, en particulier lorsque les caractéristiques spectrales se chevauchent. Cette note d'application démontre les avantages de l'utilisation de la spectroscopie UV-Vis de dérivée seconde avec le spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicuves pour améliorer la caractérisation et l'évaluation de la stabilité des peptides. Les fonctions avancées du spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 Multicuves, notamment la mesure multicuves et le calcul intégré des dérivées, rationalisent la collecte et l'analyse des données, ce qui en fait un outil précieux pour les études de stabilité des peptides dans les applications biopharmaceutiques.

Introduction

Les peptides synthétiques constituent une classe croissante de produits biothérapeutiques. Les agonistes du peptide-1 de type glucagon (GLP-1) sont des peptides synthétiques qui imitent l'hormone GLP-1 naturelle et jouent un rôle important dans la régulation métabolique et aident à la sécrétion d'insuline et à la promotion de la perte de poids.¹ La molécule de GLP-1 étant sujette à divers mécanismes de dégradation, l'évaluation de la qualité et de la stabilité des produits thérapeutiques à base de GLP-1 est cruciale pour garantir leur efficacité.

La stabilité des peptides est généralement mesurée en observant les changements dans les spectres d'absorbance produits par la spectroscopie ultraviolette.² Puisqu'elle est non destructive, cette technique offre des avantages considérables en matière de processus. Par exemple, les échantillons de valeur restent intacts après l'analyse et peuvent être analysés ultérieurement par des techniques complémentaires telles que la chromatographie en phase liquide et la spectrométrie de masse. De plus, la spectroscopie UV-Vis est rapide et facile, ce qui la rend accessible à un large éventail d'utilisateurs.

Cependant, les spectres d'absorption UV-Vis conventionnels peuvent être difficiles à interpréter lorsqu'il s'agit de surveiller des changements subtils tels que de petits décalages dans le positionnement de pics ou des variations mineures d'intensité, en particulier pour les biomolécules exposées à des facteurs environnementaux tels que le stress oxydatif. La mauvaise résolution des caractéristiques spectrales constitue également un défi lorsque les spectres des biomolécules sont constitués de plusieurs composants qui se chevauchent. La spectroscopie dérivée est une technique puissante qui répond à ces limitations en améliorant les caractéristiques subtiles, ce qui permet de résoudre des problèmes de pics qui se chevauchent et qui seraient impossibles à distinguer dans un spectre d'absorption traditionnel.

Le spectrophotomètre UV-Vis Agilent 3500 Multicuves avec son module multicuves est un outil puissant pour l'analyse des biomolécules en utilisant des mesures de dérivée seconde. L'instrument permet de mesurer simultanément plusieurs échantillons, y compris des étalons, des échantillons et des contrôles, dans les mêmes conditions. Le logiciel de la station de travail Agilent Cary UV qui contrôle le spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 Multicuves comprend une fonction d'équation intégrée qui produit automatiquement des spectres de dérivée seconde après la mesure de l'absorbance afin de minimiser les erreurs de calcul et de rationaliser le traitement des données.

Cette note d'application démontre l'utilisation des capacités avancées du spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 Multicuves et de la spectroscopie UV-Vis de dérivée seconde pour améliorer la résolution des pics d'absorption qui se chevauchent, recueillis à partir de peptides et d'acides aminés aromatiques.

Méthode expérimentale

Matériaux

Le tryptophane (W), la tyrosine (Y), la phénylalanine (F), l'hormone α -mélanocytaire stimulante (MSH), la méltittine, le liraglutide, l'angiotensine II, 30 % (v/v) de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le phosphate de sodium ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, États-Unis).

Préparation d'échantillons

Tous les échantillons de peptides, y compris le tryptophane (0,15 mM), la tyrosine (0,5 mM) et la phénylalanine (4,0 mM), ont été préparés dans un tampon de phosphate de sodium, pH 7,4, à une concentration de 1 mg/mL. Pour les conditions de stress, les peptides ont été incubés avec 0,07 % de H_2O_2 pendant une nuit à température ambiante. Aucune autre préparation d'échantillons n'a été nécessaire avant l'analyse UV-Vis.

Instruments

L'acquisition des données a été effectuée par le spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 Multicuves équipé du logiciel de la station de travail Cary en utilisant les paramètres énumérés dans le tableau 1. La conception multicuves permet de mesurer simultanément jusqu'à sept échantillons ainsi qu'un échantillon de référence. Les mesures ont été effectuées à l'aide d'une cuve rectangulaire ultramicrovolumique avec un trajet optique de 10 mm (réf. Agilent 5062-2496). La moyenne des spectres a été calculée à partir de plusieurs analyses ($n = 5$) afin de garantir la reproductibilité et de réduire le bruit.

Tableau 1. Paramètres de la méthode du spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicuves.

Paramètre	Valeur
Mode de collecte	Balayage
Gamme de balayage	200 à 500 nm
Durée d'intégration	0,02 s
Intervalle de données	1,00 nm
Taux de balayage	3 000 nm/min
Bande passante spectrale	2,00 nm
Dérivée	Dérivée seconde
Filtre de lissage	9

Résultats et discussion

Spectres UV-visible des acides aminés aromatiques

Le tryptophane, la phénylalanine et la tyrosine sont des acides aminés aromatiques généralement trouvés dans les peptides et les protéines et qui présentent des profils d'absorption UV-Visible caractéristiques. La figure 1A montre les spectres UV-Vis d'ordre zéro du tryptophane, de la phénylalanine et de la tyrosine. Le chevauchement des pics dans les spectres d'ordre zéro rend difficile la distinction des caractéristiques spectrales subtiles des acides aminés.

Des spectres de dérivées de second ordre ont été analysés sur la base de la méthode Savitzky-Golay pour améliorer la résolution et la précision des spectres d'absorption. Les figures 1B, 1C et 1D montrent les spectres UV-Vis des dérivées du second ordre de la tyrosine, de la phénylalanine et du

tryptophane. Après l'acquisition des mesures de l'échantillon, les spectres de second ordre ont été générés automatiquement à l'aide de la fonction de calcul intégrée dans le logiciel de la station de travail Cary UV. Les spectres des dérivées de second ordre présentent des pics avec des maxima et des minima (points d'inflexion) qui peuvent être utilisés pour distinguer les différentes bandes d'absorption spectrale des divers acides aminés aromatiques, ce qui permet d'étudier les changements spectraux mineurs qui se produisent lorsque les biomolécules sont soumises à des conditions de stress. Les maxima d'absorption des acides aminés étaient :

- **Tryptophane** : absorption maximale à environ 273, 280 et 288 nm
- **Tyrosine** : absorption maximale à environ 275 et 282 nm
- **Phénylalanine** : absorption maximale à environ 246, 252, 257, 264 et 268 nm

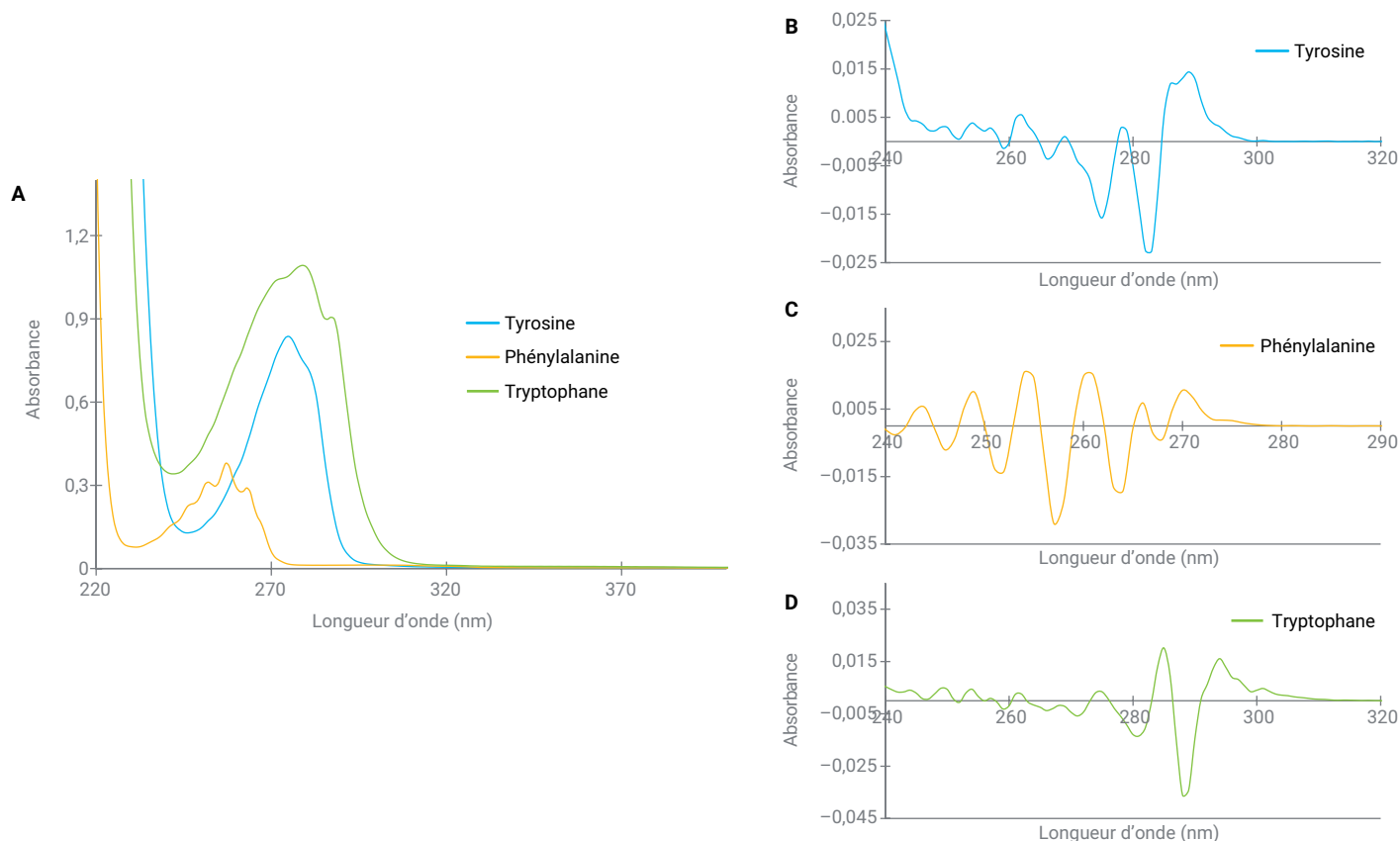


Figure 1. Spectres d'absorption UV-Vis des acides aminés aromatiques. (A) Spectres d'absorption UV-Vis d'ordre zéro et (B, C et D) de dérivées d'ordre second.

Spectres UV-visible des peptides

Pour générer différents spectres d'absorption à des fins de comparaison, les peptides sélectionnés pour l'étude présentaient des proportions variables d'acides aminés aromatiques. La figure 2 montre les spectres d'absorption de la dérivée de second ordre des quatre peptides (mélittine, MSH, angiotensine II et liraglutide). L'emplacement des pics dans les spectres des dérivées de second ordre correspond bien aux caractéristiques d'absorption connues des acides aminés aromatiques qui les composent. Dans l'ensemble, les spectres

de dérivées de second ordre ont fourni une vision plus résolue des caractéristiques spectrales des peptides. Le nombre d'acides aminés aromatiques présents dans les peptides étudiés est résumé dans le tableau 2. La mélittine présente des pics caractéristiques à 291, 283 et 275 nm, qui sont principalement attribués au tryptophane. La MSH et le liraglutide présentaient des pics à 290, 283 et 266 nm, reflétant les contributions des trois acides aminés aromatiques. L'angiotensine II présentait des pics à 283, 276, 264, 258 et 252 nm, ce qui correspondait à la présence de tyrosine et de phénylalanine.

Tableau 2. Composition en acides aminés des peptides analysés.

Peptides	Séquence	Nombre de tryptophanes (W)	Nombre de tyrosines (Y)	Nombre de phénylalanines (F)
Liraglutide	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEEFIAWLVRGRG	1	1	1
Mélittine	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	1	0	0
Hormone α-mélanocytaire stimulante (MSH)	YSMEHFRWGKPV	1	1	1
Angiotensine II	DRVYIHPF	0	1	1
Substance P	RPKPQFFGLM	0	0	2

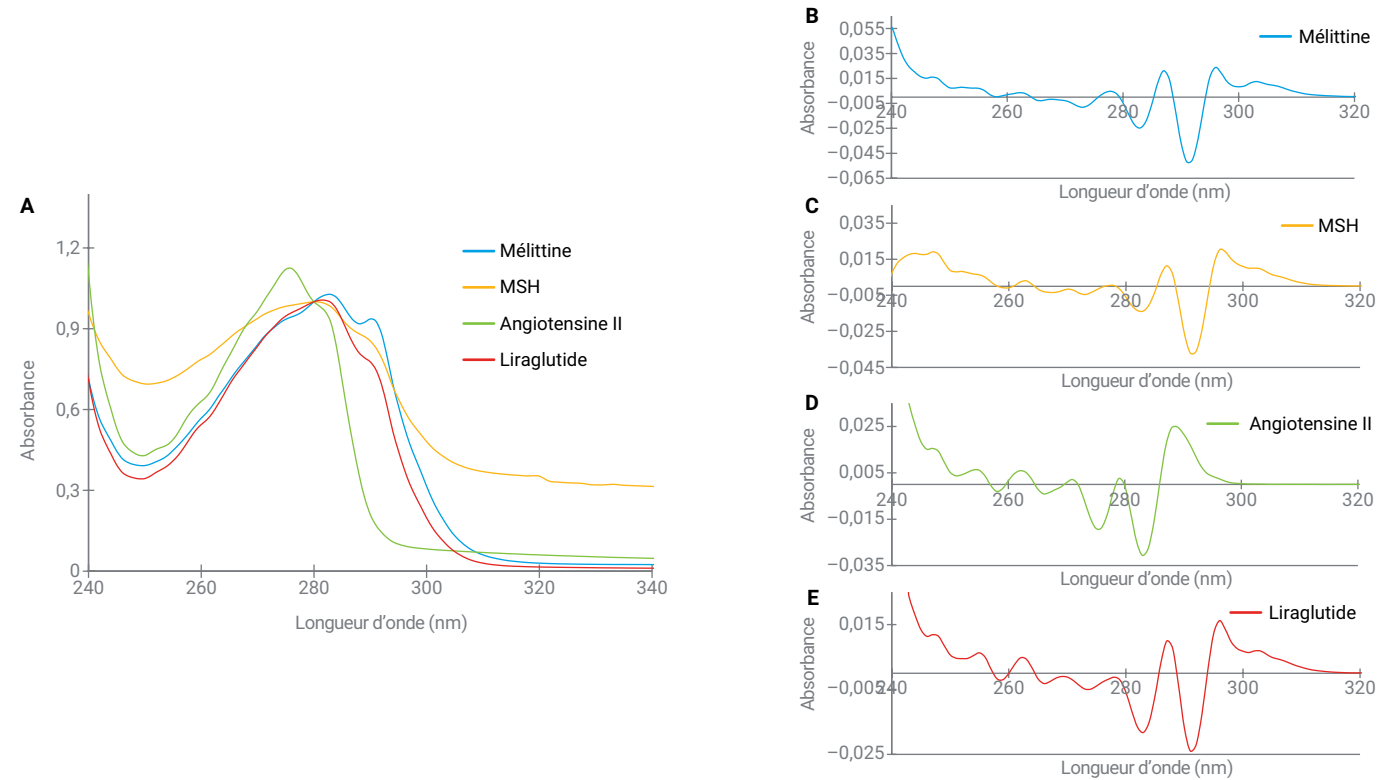


Figure 2. Spectres d'absorption UV-Vis des peptides. (A) Spectres d'absorption UV-Vis d'ordre zéro et (B, C, D et E) de dérivées d'ordre second.

Surveillance de la stabilité des peptides en cas de stress oxydatif

Pour évaluer l'utilité de la spectroscopie des dérivées pour la surveillance de la stabilité, les peptides ont été traités avec du H_2O_2 . La figure 3 montre la comparaison des spectres UV-Vis de dérivées du second ordre des peptides non traités et traités par H_2O_2 . Des changements minimes dans l'absorbance de la longueur d'onde du peptide dus au traitement par H_2O_2 ont été efficacement capturés dans les spectres de dérivées de second ordre. Le peptide d'angiotensine II est dépourvu de résidu tryptophane, de sorte qu'aucun changement significatif n'a été observé autour de la région de 291 nm après traitement par H_2O_2 . Des changements minimes ont été observés dans le spectre de dérivées de second ordre de la mélotine, ce qui

indique qu'elle est moins sujette à l'oxydation. La MSH contenant le tryptophane et le liraglutide ont montré une perte notable de l'amplitude du pic de 291 nm après traitement par H_2O_2 . Cela indique que les composés sont sensibles à l'oxydation, qui affecte principalement les résidus de tryptophane, démontrant ainsi la spécificité de la méthode de dérivée seconde pour la détection de l'oxydation du tryptophane. Pour confirmer davantage l'état d'oxydation du liraglutide, les échantillons traités par H_2O_2 ont été analysés par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse quadripôle à temps de vol (LC/Q-TOF-MS). La figure 4 montre le chromatogramme d'ions totaux (TIC) du liraglutide traité par H_2O_2 . Le spectre de masse déconvolué a confirmé les formes d'oxydation en montrant des décalages de masse de +16 Da et +32 Da qui correspondent aux produits de mono et di-oxydation, respectivement.³

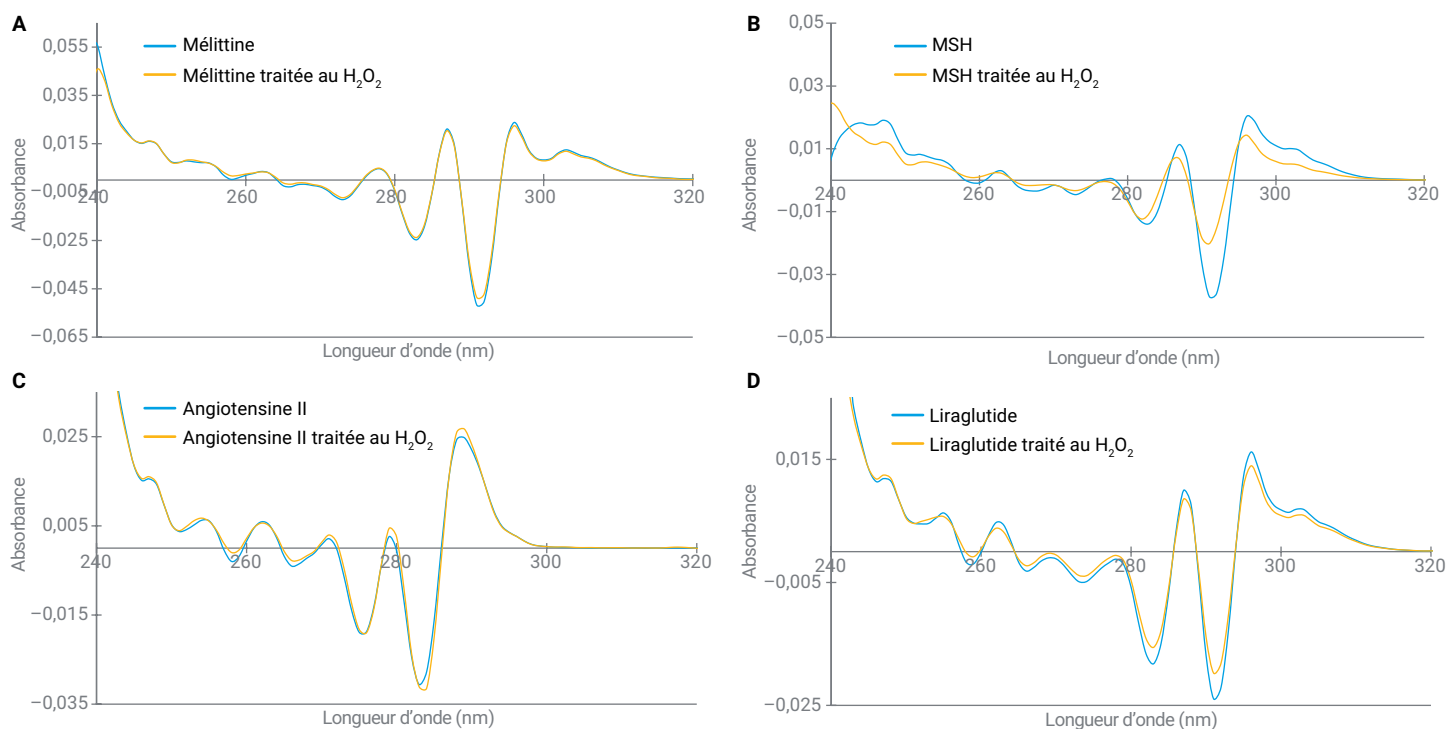


Figure 3. Spectres d'absorption UV-Vis de dérivées d'ordre second des peptides non traités et traités par H_2O_2 .

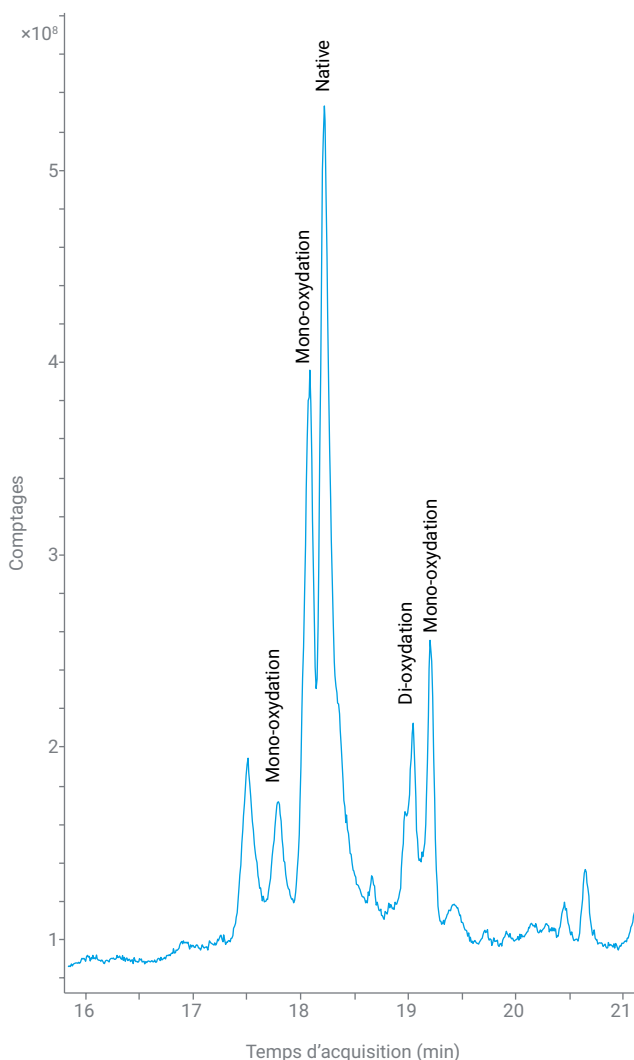


Figure 4. Chromatogramme LC/MS des ions totaux du liraglutide oxydé.

Conclusion

Les résultats de cette étude mettent en évidence la capacité de la spectroscopie UV-Vis de dérivée seconde à identifier et à surveiller avec précision les différences spectrales subtiles résultant de changements dans les résidus aromatiques des peptides, ce qui en fait un outil inestimable pour la surveillance de la stabilité des peptides. La fonction multicuves du spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicuves réduit le temps de mesure en permettant la surveillance simultanée de huit échantillons. La fonction de calcul intégrée rationalise l'analyse grâce à des calculs automatisés, ce qui facilite l'interprétation des données et la prise de décision. Cette capacité est particulièrement précieuse pour l'analyse biopharmaceutique, où la surveillance précise et efficace de la stabilité des peptides est cruciale pour le développement des médicaments et le contrôle-qualité. La spectroscopie UV-Vis non destructive préserve les échantillons pour des analyses ultérieures telles que l'analyse par LC-MS complémentaire. Le spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 Multicuves est un choix idéal pour les laboratoires de développement de médicaments et de contrôle-qualité (CQ), où la rapidité, la facilité d'utilisation et la possibilité de réutiliser des échantillons précieux sont primordiales.

Références

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 coll. 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. Note d'application d'Agilent Technologies 5994-7794EN. **2025**.