Université de Paris

École doctorale **Médicament Toxicologie Chimie Imageries 563**

Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS) CNRS UMR8258 - Inserm U1267

Développement analytique combiné à l'approche prédictive ASAP pour l'étude de la stabilité de produits pharmaceutiques chimiques et biologiques

Par Pauline Legrand

Thèse de doctorat de Chimie Analytique

Dirigée par Pr. Pascal Houzé

Présentée et soutenue publiquement le 22 mars 2022

Devant un jury composé de :

Pr. Marie Claude MENET, PU	Université Paris Saclay	Rapporteur
Dr. Yannis FRANCOIS, MCU-HDR	Université de Strasbourg	Rapporteur
Pr. Pascal HOUZE, Pu-PH	Université de Paris	Directeur de thèse
Pr. Karine ANDRIEUX, PU	Université de Paris	Examinateur
Pr. Patrice PROGNON, PU-PH	Université Paris Saclay	Examinateur
Dr. Jean-Roch FABREGUETTES	AGEPS, AP-HP	Examinateur
Dr. Syntia FAYAD	Servier	Examinateur
Dr. Rabah GAHOUAL, MCU	Université de Paris	Examinateur
Dr. Sophie DUFAY, co-encadrante	AGEPS, AP-HP	Membre invité
Pr. Jean-Hugues TROUVIN, PU-PH		Membre invité

Except where otherwise noted, this is work licensed under https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/

REMERCIEMENTS

Je n'aurais jamais imaginé ce qui m'attendait lorsque je me suis lancée dans cette aventure, passionnante et intense, que représente une thèse de sciences. Loin d'être une expérience solitaire, la thèse est un projet collaboratif, impliquant l'énergie et le temps de nombreux acteurs, et je tiens ici à remercier l'ensemble des personnes que j'ai eu la chance de côtoyer au cours de ces quatre années et qui ont contribué à la réalisation de ce projet.

Je tiens à remercier, en tout premier lieu, mon directeur de thèse, le professeur Pascal Houzé. Merci d'avoir accepté de diriger ce travail, et d'avoir porté ce projet d'AHU. L'écoute et la patience que vous avez toujours eues pour moi ont été très précieuses, et m'ont permis de ne pas lâcher, et d'arriver au bout de cette thèse !

Je remercie ma co-encadrante de thèse, le docteur Sophie Dufaÿ. Les années passées au laboratoire de R&D analytique de l'AGEPS furent une riche expérience tant professionnelle que personnelle.

Je tiens aussi à remercier le Dr Rabah Gahoual qui a également encadré ce travail. Merci infiniment pour m'avoir transmis, toujours avec disponibilité et bonne humeur, ton savoir sur les mAbs, la MS, le travail de recherche, la rédaction d'article, etc… Merci aussi de m'avoir soutenue quand cela était nécessaire. Cela a été un vrai plaisir de travailler à tes côtés !

Je tiens à remercier le professeur Marie-Claude Menet et le Dr Yannis François d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Merci aussi à Yannis François pour m'avoir accueilli dans son laboratoire à Strasbourg et fait découvrir la CE-MS. Merci également à Marie Claude Menet pour les discussions que nous avons pu partager.

Je remercie les autres membres du jury : les professeurs Karine Andrieux, Patrice Prognon et Jean-Hugues Trouvin, et les docteurs Jean-Roch Fabreguettes et Syntia Fayad d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse, et d'avoir accepté de juger ce travail.

Une partie de ce travail a été le fruit de collaborations enrichissantes. Les travaux sur la caractérisation structurale du cFEE ont été réalisés en collaboration avec le Pr Mahmoud Ghomi et le Dr Belén Hernandez du groupe de biophysique moléculaire au sein de l'université santé-médecine-biologie humaine Paris 13. Merci à vous de m'avoir initiée au Raman et au dichroïsme circulaire. Les travaux en A4F ont été réalisés en collaboration avec les Dr Frédéric Violleau, Estelle N'tsiba et Marie Hennetier, de l'école d'ingénieurs de Purpan. Merci à vous pour cette collaboration, et en particulier à Marie d'avoir pris le temps de m'expliquer la A4F et pour la semaine de travail à Toulouse qui aura été intense.

Merci à Nathalie Mignet et à l'ensemble du laboratoire UTCBS. Même si je n'étais là qu'à mi-temps, ce fut un vrai plaisir de travailler au sein du labo ces quatre années. Merci notamment à Khair pour les discussions échangées, et pour avoir mis en place le PhD club. J'en ai loupé quelques un mais ces moments de partage étaient très plaisants et instructifs ! Merci à l'ensemble des autres doctorants. Cela est toujours agréable de partager les montagnes russes émotionnelles qui accompagne la thèse. Je pense en particulier à Gabriel, co-thésard à l'AGEPS et à l'UTCBS, merci pour les tips et les webinars de la DLS !

Une pensée très forte pour toutes les personnes croisées à l'AGEPS. Merci à Vincent pour l'accueil au sein du DRDP. A mes collègues de bureau Gaétan et Frédéric. Merci à vous de m'avoir – longuement – écouté parler de ma thèse (entre autres) ! Gaétan, merci pour tous tes conseils. Merci à Emmanuel pour les échanges toujours intéressants autours des mAbs et du travail de recherche. Merci aussi à tous les techniciens avec qui cela a toujours été un plaisir de travailler. Christel, Estelle(s), Rémi, Fanny : MERCI ! Pour les discussions (pro et perso) autour du café. Une pensée bien sûr pour la galénique, chez qui j'ai pas mal squatté ! Merci aussi à Amélie pour tous les échanges que l'on a eus. Merci également à Claude Bernard d'avoir toujours pris le temps de m'écouter et de me conseiller. Difficile de citer tout le monde, mais sachez que vous avez tous eu une part importante pendant ces années à l'AGEPS.

Un immense merci à Balthazar, mon « vrai-faux » co-doctorant et ami. Quelles années on aura passées ! Merci à toi d'avoir été là.

Merci aussi à mes amis et ma famille pour leur soutien durant cette période intense. Votre écoute et votre amitié ont contribué fortement à la finalisation de ce travail. Se sentir épaulé par ses proches est un sentiment précieux. Une pensée particulière pour Caro : merci d'avoir été aussi présente.

Une pensée émue pour mes grands-parents Charles, Yvonne, Henri et Nicole.

Merci à mon frère Guillaume. Une sœur ne peut rêver meilleur frère que toi. Je t'admire infiniment et t'aime profondément.

Merci à mes parents Claude et Jean-Charles. Merci à vous d'être toujours aussi présents, attentifs et bienveillants. Je vous aime.

Merci à Maxime. Merci à toi pour tout le soutien que tu m'as apporté. Un chapitre se clôt. Et c'est le début d'une nouvelle aventure. J'ai hâte de voir ce qui nous attend.

Et merci à Io, dont les ronrons ont accompagné la rédaction de ce manuscrit.

LISTE DES PUBLICATIONS

Articles dans des revues internationales avec comité de relecture :

- Disorder-to-order structural markers of cFEE, a synthetic cyclic hexapeptide inspired from the binding site of fertilin β involved in fertilization process, ACS Omega, 2019. DOI: 10.1021/acsomega.9b01885

- Comprehensive and quantitative stability study of ascorbic acid using capillary zone electrophoresis with ultraviolet detection and high-resolution tandem mass spectrometry, Journal of separation sciences, 2020. DOI: 10.1002/jssc.202000389

- Accelerated Stability Assessment Program to Predict Long-term Stability of Drugs: Application to Ascorbic Acid and to a Cyclic Hexapeptide, AAPS PharmSciTech, 2021. DOI: 10.1208/s12249-021-02121-8

- Modelization and study of long-term stability of monoclonal antibody and biosimilarity assessment of Infliximab using LC-MS/MS and SEC-UV-MALS/RI, Analytical Bioanalytical Chemistry (soumis pour publication)

Publications affichées :

- Quantification simultanée de l'acide ascorbique et ses produits de dégradation dans les préparations hospitalières par CZE-UV, DIM Analytics, Paris, Mai 2018

- Biosimilarité d'anticorps monoclonaux après dégradation forcée et en conditions de stabilité « in-use » : évaluation des modifications post traductionnelles par UPLC-MS/MS, Paris, SEP 2021

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS 1

LISTE DES PUBLICATIONS 3

TABLE DES MATIERES 4

LISTE DES ABRÉVIATIONS 8

LISTE DES FIGURES 10

LISTE DES TABLEAUX 15

INTRODUCTION GENERALE 17

PARTIE 1 : ETAT DE L'ART 20

Chapitre 1 : Evaluation de la stabilité des produits thérapeutiques 20
A. Evaluation de la stabilité des produits pharmaceutiques conventionnels 21
B. Les produits pharmaceutiques d'origine biologique 25
C. Analyse et évaluation de la stabilité des molécules biologiques 29
D. Approches prédictives pour l'évaluation de la stabilité des produits pharmaceutiques 33

Chapitre 2 : Stratégie de recherche et agents thérapeutiques étudiés 40
A. Approche générale : développement analytique et approche prédictive de la stabilité 40
B. Acide ascorbique 42
C. Peptide cFEE 46
D. Infliximab 50

Chapitre 3 : Techniques analytiques 63
A. Techniques séparatives 63
1. L'électrophorèse capillaire de zone 63
2. La chromatographie d'exclusion stérique 67
3. Méthodes de fractionnement par flux-force 69
B. Techniques spectroscopiques 73
1. Techniques de diffusion de la lumière 73
2. Réfractométrie différentielle 76
3. Spectroscopie Raman 78
4. Dichroïsme circulaire 79
5. Spectrométrie de masse 82

PARTIE 2 : CARACTERISATION ET QUANTIFICATION SIMULTANEE DE L'ACIDE ASCORBIQUE ET DE SES PRODUITS DE DEGRADATION PAR CZE-UV. APPLICATION A LA PREDICTION DE STABILITE DE L'ACIDE ASCORBIQUE PAR ASAP 90

I. Introduction 90

II. Partie expérimentale 90
A. Développement et validation de la méthode en électrophorèse capillaire 90
1. Origine des produits chimiques et matières premières 90
2. Electrophorèse capillaire 91
3. Développement de la méthode 91
4. Méthode finale 92
5. Validation de la méthode 92
6. Application de stress forcés pour l'évaluation du caractère indicateur de stabilité de la méthode ... 93
B. Identification du produit de dégradation inconnu majoritaire par spectrométrie de masse 93
1. Echantillons analysés 93
2. Spectrométrie de masse 94
C. Produits pharmaceutiques analysés 94
D. Analyse ASAP 95
1. Produits analysés 95
2. Stress appliqués 95
3. Prédiction de la stabilité 96

III. Résultats 96
A. Développement et validation de la méthode en électrophorèse capillaire 96
1. Influence de la concentration du BGE 97
2. Influence du pH du BGE 97
3. Influence du voltage 98
4. Conditions finales 98
5. Validation de la méthode 99
B. Dégradation forcée de l'acide ascorbique 100
C. Identification du produit de dégradation majoritaire en spectrométrie de masse. 101
1. Analyse par spectrométrie de masse 101
2. Ordre de migration en CZE 103
D. Application à l'analyse de différents produits pharmaceutiques 104
E. Application pour une étude ASAP 106
1. Dégradation forcée 106
2. Construction du modèle 107
3. Vérification de la validité du modèle 109
4. Comparaison des données prédites et expérimentales 109

IV. Conclusion 110

PARTIE 3 : CARACTERISATION DE LA CONFORMATION DU PEPTIDE CFEE PAR SPECTROSCOPIE RAMAN ET DICHROISME CIRCULAIRE, ET ANALYSE PREDICTIVE DE SA STABILITE PAR LC-MS/MS 111

I. Introduction 111

II. Partie expérimentale 111
A. Peptide cFEE 111
B. Analyse en spectroscopie Raman 111
C. Analyse par dichroïsme circulaire 112
D. Calcul de mécanique quantique pour la résolution des spectres 112
E. Analyse par LC-MS/MS 112
F. Etude de stabilité et analyse ASAP 113
1. Peptide cFEE 113
2. Stress appliqués 114

3. Analyse ASAP 114

III. Résultats 115
A. Caractérisation de la structure secondaire du peptide cFEE par spectroscopie Raman et dichroïsme circulaire 115
1. Analyse UV-CD 115
2. Analyse en spectroscopie Raman 116
3. Model de structure de type -II'β-Turn proposé pour le peptide cFEE 120
4. Arguments structurels pouvant expliquer l'activité biologique du peptide cFEE 123
B. Analyse de la stabilité du peptide cFEE par LC-MS/MS et modélisation prédictive de sa stabilité par une étude ASAP 123
1. Analyse du peptide cFEE par LC-MS/MS 123
2. Essais de stress 124
3. Identification des produits de dégradation 125
4. Modélisation ASAP pour le PDD A 129
5. Modélisation ASAP pour le PDD B 130
6. Comparaison avec les données de stabilité long terme 132

IV. Conclusion 134

PARTIE 4 : CARACTERISATION MULTINIVEAUX DE LA STABILITE DE L'INFLIXIMAB EN CONDITIONS HOSPITALIERES ET DES BIOSIMILAIRES ASSOCIES. 135

I. Introduction 135

II. Stratégie de caractérisation multi-technique de l'infliximab 135

III. Partie expérimentale 136
A. Echantillons analysés 136
B. Reconstitution et préparation des échantillons pour l'étude de stabilité 137
C. Dégradation forcée 138
D. Analyses par UPLC-MS/MS 139
1. Préparation des échantillons et digestion à la trypsine 139
2. Conditions chromatographique et paramètres du spectromètre de masse 139
3. Traitement des données 140
4. Structure tridimensionnelle et localisation des modifications post traductionnelles 140
E. Analyses par SEC-UV-MALS-RI 141
1. Conditions analytiques 141
2. Traitement des données 141
F. Analyses par FFF-UV-MALS-RI 142
1. Conditions analytiques 142
2. Traitement des données 142
G. Analyse par DLS 143
H. Indice d'agrégation (IA) 143
I. Etude ASAP 143

IV. Evaluation des modifications post traductionnelles 144
A. Résultats expérimentaux des analyses en UPLC-MS/MS 144
1. Recouvrement de la séquence d'infliximab 144
2. Evaluation des oxydations 145
3. Evaluation des déamidations d'intérêt 149
B. Discussion 154

1. Analyses dans les conditions initiales 154
2. Analyses en conditions forcées 155
3. Analyse dans les conditions d'utilisation hospitalière 157
C. Conclusion 158
D. Perspectives 159

V. Evaluation de l'agrégation 160
A. Résultats expérimentaux 160
1. Analyse par SEC-UV-MALS/RI 160
2. Indice d'agrégation en UV 171
3. Analyse par DLS 172
4. Analyse par A4F-UV-MALS/RI 174
B. Discussion 181
1. Impact des différents stress sur la dégradation de l'infliximab 181
2. Stabilité de l'infliximab dans les conditions d'utilisation hospitalière 182
3. Complémentarité des techniques pour l'évaluation de l'agrégation 183
C. Conclusion 184

VI. Analyse ASAP de l'infliximab 184
A. Produits de dégradation analysés 184
B. Analyse ASAP appliquée à la déamidation N57 185
C. Analyse ASAP appliquée à la fragmentation 188
D. Conclusion 190

VII. Conclusion 191

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 192

REFERENCES 201

ANNEXE 1: LISTE DES PEPTIDES OBTENUS APRES DIGESTION A LA TRYPSINE POUR L'INFLIXIMAB ET PARAMETRES ASSOCIES A L'ANALYSE EN LC-MS/MS 213

ANNEXE 2: SPECTRES DE MASSE DES PEPTIDES LC6, HC2, HC22 ET HC42 PORTEURS D'OXYDATION 214

ANNEXE 3 : PROFIL DE GLYCOSYLATION DE L'INFLIXIMAB 216

Liste des abréviations

A4F: *asymetrical flow field flow fractionnation*

ADAM : *A Disintegrin And Metalloprotease*

ADCC : cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ASAP : *Accelerated Stability Assessment Program*

BGE : électrolyte support

CD: dichroïsme circulaire

CDC : voie du complément

CDR : *complementary determining region*

CID : dissociation par collision induite

CQ : contrôle qualité

CZE : électrophorèse capillaire de zone

DLS : diffusion dynamique de la lumière

DFT : théorie fonctionnelle de la densité

DTT : dithiothréitol

EMA : Agence Européenne des Médicaments

EOF : flux électroosmotique

ESI : ionisation par électronébullisation

Fab : *fragment antigen binding*

Fc : Fragment cristallisable

FcRn : récepteur néonatal au fragment Fc

FDA : Food and Drug Administration

FFF : fractionnement par couplage flux-force

FIV : fécondation *in vitro*

H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène

HILIC : chromatographie d'interaction hydrophile

HPLC: chromatographie liquide haute performance

HR : humidité relative

HMWS : agrégats de hauts poids moléculaires

IA: indice d'agrégation

ICH : *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*

IgG : Immunoglobulines G

kDa : kilodaltons

LOD : limite de détection

LOQ : limite de quantification

M : méthionine

mAbs : anticorps monoclonal

MALS : diffusion de la lumière multi angles

MS : spectrométrie de masse

MS/MS : spectrométrie de masse en tandem

N : asparagine

NA : normalisation d'aire

PTMs : modifications post-traductionnelles

PUI : Pharmacie à Usage Intérieure

RCP : résumé des caractéristiques du produit

RI : Réfractométrie différentielle

SEC : chromatographie d'exclusion stérique

TNF α : facteur de nécrose tumorale

USP : Pharmacopée Américaine

W : tryptophane

Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique des étapes de la vie d'un médicament 18
Figure 2 : Représentation schématique des différents niveaux de structure protéique [24]..... 27
Figure 3 : Représentation schématique de la structure d'un mAb entier et de ses différentes régions. 28
Figure 4 : Représentation des quatre types d'anticorps monoclonaux en fonction de l'origine murine (en rouge) et humaine (en bleu). 28
Figure 5 : Exemple de différentes techniques analytiques permettant l'analyse des anticorps monoclonaux en fonction du niveau de structure étudié [28] 30
Figure 6 : Exemple de protocole de dégradation forcée pour les produits biologiques [42] 32
Figure 7 : Représentation schématique des différences entre le développement d'un produit de référence et un biosimilaire. 33
Figure 8 : Représentation graphique de l'équation d'Arrhénius sous sa forme logarithmique..... 36
Figure 9 : Représentation graphique de l'équation d'Arrhénius modifiée 37
Figure 10 : Représentation schématique de la variabilité associée à la détermination des paramètres de l'équation d'Arrhenius..... 39
Figure 11 : Formule développée de l'acide ascorbique 42
Figure 12 : Voie de dégradation de l'acide ascorbique en absence (A) et en présence (B) d'oxygène. 43
Figure 13 : Structure en acide aminés du peptide cFEE 46
Figure 14 : Représentation schématique de la voie de signalisation liée au TNFα et le mode d'action des anticorps anti-TNFα [98] 51
Figure 15 : Structure générale de l'infliximab [104]..... 53
Figure 16 : Mécanisme de formation des agrégats d'anticorps monoclonaux [106] 54
Figure 17 : Réactions d'oxydation des méthionines (A) et de déamidation des asparagines en acide aspartique (B) 55
Figure 18 : Localisation des méthionines et tryptophanes d'intérêts..... 56
Figure 19 : Localisation des asparagines d'intérêts..... 58
Figure 20 : Exemples de techniques analytiques permettant l'analyse des agrégats de protéines, et gamme de taille associée à chaque technique..... 59
Figure 21: Schéma d'un appareil d'électrophorèse capillaire. 64
Figure 22: Schéma représentant la double couche de charge dans un capillaire de silice vierge 66
Figure 23: Schéma représentant le principe de séparation en électrophorèse capillaire de zone. 67
Figure 24 : Représentation schématique d'une colonne de SEC et de la séparation des molécules en fonction de leur taille 68
Figure 25 : Exemple de gamme de calibration en SEC [149]..... 69
Figure 26 : Représentation schématique d'une cellule d'A4F..... 70
Figure 27 : Représentation schématique du fractionnement en A4F 72
Figure 28 : Représentation de l'étape de focus pendant l'injection et la focalisation..... 72
Figure 29 : Représentation schématique du phénomène de diffusion de la lumière..... 73
Figure 30 : Représentation de la fluctuation d'intensité diffusée en fonction du temps (en haut) et du graphique d'autocorrélation (en bas) pour des petites et plus grosses molécules 75
Figure 31 : Représentation du diagramme de Zimm..... 76
Figure 32 : Représentation du phénomène de diffraction de la lumière..... 77
Figure 33 : Représentation schématique du principe de la diffusion Raman (diagramme de Jablonski) 78
Figure 34 : Liaison peptidique entre deux acide aminés et liaison amide en Raman, ... 79

Figure 35 : Représentation schématique de l'effet du CD, adapté de [167]..... 80
Figure 36 : Représentation schématique du champ électrique à la traversée d'un milieu optiquement actif..... 81
Figure 37 : Spectre de CD de référence pour les hélices α, les feuillets β et les structures désordonnées..... 82
Figure 38 : Spectre de CD mesuré pour différents hexapeptides possédant une structure de type I β turn (1 et 4), de type II β turn (2) et désordonnée (3) [171]..... 82
Figure 39 : Représentation schématique de la formation de gouttelettes chargées en ESI..... 84
Figure 40 : Représentation schématique de la formation des ions à l'état gazeux selon le modèle de Dole et le modèle d'Irbane et Thomson..... 85
Figure 41 : Représentation schématique d'une cellule d'Orbitrap..... 86
Figure 42 : Représentation schématique des différentes stratégies de caractérisation des mAbs par spectrométrie de masse..... 88
Figure 43 : Représentation des différents ions obtenus après fragmentation d'un peptide en MS/MS 88
Figure 44 : Spectre MS/MS d'un peptide digéré montrant l'enchainement d'ions y correspondant à la fragmentation du peptide, dont la méthionine est non oxydée (A) ou oxydée (B)..... 89
Figure 45 : Electrophérogramme obtenu dans les conditions d'analyse optimisées. 98
Figure 46 : Electrophérogramme obtenus après analyse de l'AA (3) après A/ stress oxydant (H_20_2 0,1%) pendant 50 min et 70 min et après B/ stress à la température (80°C) pendant 2h30 et 5h. ... 101
Figure 47 : Spectre MS de A/ acide ascorbique non dégradé et B/ acide ascorbique dégradé. Le pic de 175 corresponds à l'ion $[M-H]^-$ de l'acide ascorbique, le pic de m/z 147 corresponds à l'ion parent TKV. C/ profil isotopique de l'ion parent $[M-H]^-$ de l'acide ascorbique et simulé. D/ profil isotopique de l'ion parent $[M-H]^-$ de du TKV et simulé..... 102
Figure 48 : Spectre MS/MS de l'acide ascorbique (A) et du TKV (B) 103
Figure 49 : Electrophérogramme de l'AA à 5mg/mL (3), du furfural (1) et de l'acide furoïque (5) à 5 µg/mL (ratio de 0,1% m/m) et DHAA (2) à 50 µg/mL (ratio de 1.0% m/m). 104
Figure 50 : Electrophérogramme de a/ Laroscorbine® non périmé et b/ Laroscorbine ® après 4 mois de péremption..... 106
Figure 51 : Teneur en TKV (%NA) obtenus pour chaque condition de stress 107
Figure 52 : Graphique d'isoconversion obtenus lors de l'étude ASAP de l'AA dans les conditions suivantes ; 45°C (A), 50°C (B), 55°C (C), 60°C (D), 65°C (E), 70°C (F) et 80°C (G). 108
Figure 53 : Graphique des résidus montrant la performance du modèle ASAP pour la formation de TKV..... 109
Figure 54 : Comparaison entre les données de stabilité expérimentales de la Laroscorbine® et les données prédites par le modèle ASAP..... 110
Figure 55 : Spectres UV-CD du peptide cFEE entre 190 et 280 nm, dans (A) le méthanol à 200 µM et (B) dans l'eau à 300 µM à pH 3 et pH 6..... 115
Figure 56 : Spectre Raman du peptide cFEE dans l'eau a pH 3 (A) et à pH 7 (B)..... 118
Figure 57 : Spectre Raman des acides aminés serine (A), Phénylalanine (B), Acide glutamique déprotoné (C) ou protoné (D). 119
Figure 58 : Déconvolution des régions amide I (A, B) et III (C, D) du spectre Raman du peptide cFEE à pH 3 (A, C) et pH 7 (B, D). 119
Figure 59 : Déconvolution de la région correspondante au pont disulfure du spectre Raman du peptide cFEE, à 120
Figure 60 : Représentation graphique du peptide cFEE dans un milieu mimant le méthanol, soit avec un pont disulfure de type left handed (A) ou right handed (B). 122

Figure 61: Détail du pont disulfure du peptide cFEE, soit en conformation Left handed (A,C) soit en conformation Righ handed (B,D). 122
Figure 62 : Chromatogramme (mode SIM) du peptide cFEE dans les conditions initiales (T0) ou après un ou deux jours à 75°C 124
Figure 63 : Spectre MS (A) et MS/MS (C) du produit de dégradation A. L'interprétation du spectre MS/MS est indiqué (B) 127
Figure 64 : Spectre MS (A) et MS/MS (C) du produit de dégradation B. L'interprétation du spectre MS/MS est indiqué (B) 128
Figure 65 : Schéma représentant la dégradation du peptide cFEE en DP A et DP B 128
Figure 66 : Graphiques d'isoconversion, c'est à dire le temps nécessaire (en violet) pour atteindre la limite de spécification du PDD A (1.00%NA, en jaune) à 50°C (A), 55°C (B), 60°C (C), 65°C (D) et 75°C (E) 129
Figure 67 : Graphique des résidus, présentant l'adéquation du model pour le PDD A 130
Figure 68 : Graphiques d'isoconversion, c'est à dire le temps nécessaire (en violet) pour atteindre la limite de spécification du PDD B (1.00%NA, en jaune) à 50°C (A), 55°C (B), 60°C (C), 65°C (D) et 75°C (E) 131
Figure 69 : Graphique des résidus, présentant l'adéquation du model pour le PDD B 132
Figure 70 : Projection de la teneur en PDD A prédit par le modèle, pour une température de conservation de 4°C (A), 25°C (B) et 40°C (C) , et de la teneur en PDD B pour une température de conservation de 4°C (D), 25°C (E) et 40°C (F). 133
Figure 71 : Projection de la teneur en PDD A et PDD B prédit par le modèle pour une température de 4°C pendant 3 ans. 134
Figure 72 : Méthodes analytiques mises en jeu pour l'analyse de la stabilité de l'infliximab 136
Figure 73 : Présentation des différentes conditions de conservation des poches d'infliximab mises en œuvre lors de l'étude 138
Figure 74 : Recouvrement de la séquence d'infliximab par analyse UPLC-MS/MS. 145
Figure 75 : Pourcentage d'oxydation des M et W à l'état initial pour chaque référence d'infliximab 145
Figure 76 : Pourcentage de M et W sensibles à l'oxydation, à l'état initial et après exposition à H_2O_2 0,05 % suite à une incubation pendant 24h et 48h 146
Figure 77 : Pourcentage de M et W non sensibles à l'oxydation, à l'état initial et après exposition à H_2O_2 0,05 % suite à une incubation pendant 24h et 48h 147
Figure 78 : Evaluation de l'oxydation de M18, M55, M255 et M431 de Remicade® (rouge), Remsima® (vert) et Flixabi® (bleu) conservés en conditions d'utilisation hospitalière à 4°C pendant 90 jours dans les poches Freeflex (trait plein) ou Ecoflac (trait pointillé) 148
Figure 79 : Evaluation de l'oxydation de M18, M55, M255 et M431 de Remicade® (rouge), Remsima® (vert) et Flixabi® (bleu) conservés en conditions d'utilisation hospitalière à 25°C, à l'abri de la lumière pendant 90 jours dans les poches Freeflex (trait plein) ou Ecoflac (trait pointillé) 148
Figure 80 : Evaluation de l'oxydation de M18, M55, M255 et M431 de Remicade® (rouge), Remsima® (vert) et Flixabi® (bleu) conservés en conditions d'utilisation hospitalière à 25°C, exposées la lumière pendant 90 jours dans les poches Freeflex (trait plein) ou Ecoflac (trait pointillé) 149
Figure 81 : Chromatogramme du peptide HC7 : SIN_{57}SATHYAESVK (A) et des spectres de masse de sa forme non déamidée (B) et déamidée (C) 150
Figure 82 : Comparaison du taux de déamidation observé sur trois expériences indépendante, exemple du Flixabi® 151
Figure 83 : Pourcentage de déamidation de N57 l'état initial pour chaque référence d'infliximab 152
Figure 84 : Pourcentage de déamidation de N57 à 40°C pendant 90 jours déterminé par UPLC-MS/MS pour Remicade® (rouge), Remsima® (vert) et Flixabi® (bleu) 153

Figure 85 : Evaluation de la déamidation de N57 en conditions d'utilisation hospitalière de Remicade® (rouge), Remsima® (vert) et Flixabi® (bleu) dans les poches Freeflex (trait plein) ou flacons Ecoflac (trait pointillé) 153
Figure 86 : Modélisations moléculaires de l'infliximab illustrant la localisation des méthionines sur la structure de la protéine. 155
Figure 87 : Modélisation moléculaire de l'infliximab illustrant la localisation de l'asparagine N57 sur la structure de la protéine..... 156
Figure 88 : Analyse d'un mélange de protéine témoin de poids moléculaires connus en SEC-UV..... 161
Figure 89 : Temps de rétention des protéines en fonction de leur poids moléculaire, selon un axe linéaire (A) ou logarithmique (B) pour représenter la masse molaire. 161
Figure 90 : Chromatogramme du Remicade® après reconstitution en SEC-UV-MALS-RI 163
Figure 91 : Chromatogramme du Remicade® à T0 et après 5 minutes à pH 12 en SEC-UV-MALS-RI. 165
Figure 92 : Chromatogramme du Remicade® à T0 et après 3 cycles de congélation/décongélation en SEC-UV-MALS-RI 165
Figure 93 : Chromatogramme du Remicade® à T0 et après 3 cycles de congélation/décongélation en SEC-UV-MALS-RI 166
Figure 94 : Chromatogramme du Remicade® exposé à 55°C pendant 3 jours (A) et 40°C pendant 3 mois (B) par SEC-UV-MALS-RI..... 167
Figure 95 : Chromatogramme du Remicade dilué dans du Glucose 5% à T0 et exposé 30 jours à 40°C par SEC-UV-MALS-RI 168
Figure 96 : Proportion des différentes formes : monomère, dimères, trimères et fragments, des trois références d'infliximab exposés à 40°C pendant 3 mois en SEC-UV-MALS-RI 170
Figure 97 : Proportion des différentes formes : monomère, dimères, trimères et fragments, des trois références d'infliximab en condition d'utilisation hospitalière en SEC-UV-MALS-RI..... 171
Figure 98 : Evolution de l'Indice d'agrégation des trois références d'infliximab dans les conditions d'utilisation hospitalière..... 172
Figure 99 : Analyse de l'infliximab en DLS dans différentes conditions de stress..... 174
Figure 100 : Evolution de la taille (A) et du z average (B) des trois références d'infliximab dans les conditions d'utilisation hospitalière 174
Figure 101 : Evaluation de l'impact de l'étape de focalisation. 175
Figure 102 : Evaluation de l'impact du flux croisé sur l'analyse de l'infliximab 176
Figure 103 : Fractogramme du mélange de protéines témoin 177
Figure 104 : Fractogramme de l'infliximab témoin 178
Figure 105 : Fractogramme du Remsima® à T0 et après 24h à 55°C 179
Figure 106 : Fractogramme du Remsima® à T0 et après 24h, 48h et 72h à 55°C (A), avant et après sédimentation (B) 179
Figure 107 : Fractogramme du Remsima® à T0 et après 90 jours à 40°C 180
Figure 108 : Fractogramme UV (A) et MALS (B) de 3 échantillons de phase mobile (blanc) injectés au début, au milieu et à la fin de la séquence..... 180
Figure 109 : Teneur en N57 obtenue pour chaque condition de stress..... 185
Figure 110 : Graphiques d'isoconversion, c'est à dire le temps nécessaire (en violet) pour atteindre la limite de spécification de la N57d (5.00%NA, en jaune) à 30°C (A), 35°C (B), 40°C (C) et 45°C (D))... 186
Figure 111 : Graphique des résidus, présentant l'adéquation du model pour N57d 187
Figure 112 : Projection de la teneur en N57d prédit par le modèle, pour une température de conservation de 4°C (A), 25°C (B) et 40°C (C). 187
Figure 113 : Teneur en fragments obtenue pour chaque condition de stress..... 188

Figure 114 : Graphiques d'isoconversion, c'est à dire le temps nécessaire (en violet) pour atteindre la limite de spécification de fragments (1,00%NA, en jaune) à 30°C (A), 35°C (B), 40°C (C), et 45°C (D). 189
Figure 115 : Graphique des résidus, présentant l'adéquation du model pour la fragmentation de l'infliximab 190
Figure 116 : Projection de la teneur en fragments prédit par le modèle, pour une température de conservation de 4°C (A), 25°C (B) et 40°C (C). 190

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification et teneurs en impuretés acceptées dans le produit fini [3] 22
Tableau 2 : Principales propriétés physico chimiques de l'acide ascorbique 42
Tableau 3 : Principales propriétés physico chimiques du peptide cFEE..... 47
Tableau 4 : Les différentes formes d'infliximab titulaire d'une AMM en Europe..... 50
Tableau 5 : Liste des méthionines (M) et tryptophanes (W) présents dans la séquence de l'infliximab 56
Tableau 6 : Liste des Asparagines (N) présents dans la séquence de l'infliximab..... 57
Tableau 7 : Etudes disponibles évaluant la stabilité de l'infliximab en condition d'utilisation hospitalière..... 61
Tableau 8 : Lots de Laroscorbine® et échéances de stabilité analysées 95
Tableau 9: Conditions et temps de stress pour l'étude ASAP de la Laroscorbine® 95
Tableau 10 : Optimisation de la concentration du BGE de son pH et du voltage pour améliorer la résolution entre les deux molécules les plus proches : AA et DHAA, et le temps total de run représenté par le temps de migration de l'acide furoïque. 97
Tableau 11 : Résultats statistiques de la validation quantitative pour le furfural, le DHAA, l'acide ascorbique et l'acide furoique..... 100
Tableau 12 : Quantification de l'acide ascorbique dans les différents produits pharmaceutiques et évaluation de leurs produits de dégradation..... 105
Tableau 13 : Temps et ratio d'isoconversion obtenus lors de l'étude ASAP de l'AA 108
Tableau 14 : Paramètres du modèle obtenu lors de l'étude ASAP de l'AA..... 108
Tableau 15 : Paramètre de source pour l'analyse du peptide cFEE en LC-MS/MS 113
Tableau 16 : Conditions de conservation pour l'étude de stabilité du peptide cFEE..... 114
Tableau 17 : Conditions de conservation pour l'étude ASAP du peptide cFEE 114
Tableau 18: Contribution (exprimée en pourcentage) des structures secondaires déterminées pour les régions amide I et III..... 120
Tableau 19 : Teneurs en produit de dégradation A et B observées dans les différentes conditions de stress 125
Tableau 20 : Temps et ratio d'isoconvertion déterminés pour chaque condition de stress pour le PDD A..... 129
Tableau 21 : Paramètres du modèle ASAP pour le PDD A 130
Tableau 22 : Temps et ratio d'isoconvertion déterminés pour chaque condition de stress pour le PDD B..... 131
Tableau 23 : Paramètres du modèle ASAP pour le PDD B..... 131
Tableau 24 : Stress forcés appliqués à l'infliximab pour l'analyse des PTMs en LC-MS/MS..... 138
Tableau 25 : Stress forcés appliqués à l'infliximab pour l'analyse de l'agrégation..... 139
Tableau 26 : Paramètre de la source pour l'analyse en UPLC-MS/MS de l'infliximab..... 140
Tableau 27 : Conditions de conservation pour l'étude ASAP de l'infliximab 144
Tableau 28 : Temps de rétention théorique du monomère et des agrégats de l'infliximab par SEC . 162
Tableau 29 : Evaluation par MALS-RI des masses molaires et des taux de recouvrement des protéines du mélange protéique..... 162
Tableau 30 : Proportion des différentes formes : monomère, dimères, trimères et HWMS, des trois références d'infliximab après reconstitution déterminées en SEC-UV-MALS-RI 164
Tableau 31 : Proportion des différentes formes : monomère, dimères, trimères, HWMS et fragments, du Remicade en fonction des différents stress forcé en SEC-UV-MALS-RI..... 169
Tableau 32 : Indice d'agrégation de l'infliximab dans les différentes conditions de stress..... 172

Tableau 33 : Analyse de l'infliximab par DLS dans différentes conditions de stress..... 173
Tableau 34 : Evaluation par MALS-RI des masses molaires et des taux de recouvrement des protéines du mélange protéique..... 177
Tableau 35 : Temps et ratio d'isoconvertion déterminés pour chaque condition de stress pour la déamidation N57..... 185
Tableau 36 : Paramètres du modèle ASAP pour N57d..... 186
Tableau 37 : Temps et ratio d'isoconvertion déterminés pour chaque condition de stress pour les fragments..... 188
Tableau 38 : Paramètres du modèle ASAP pour la fragmentation de l'infliximab..... 189

INTRODUCTION GENERALE

Le développement d'un médicament est une succession d'étapes allant de la recherche et découverte d'une molécule possédant une potentielle activité thérapeutique, jusqu'à la commercialisation du médicament sous sa forme finale, ayant démontré son efficacité et sa qualité.

Les grandes étapes jalonnant la vie du médicament sont représentées schématiquement sur la Figure 1. L'étape de recherche est axée sur l'identification de molécules présentant un intérêt thérapeutique. A ce stade, plusieurs milliers de molécules sont testées comme potentiels candidats. Seule une partie des molécules testées, une centaine environ, passera à l'étape pré clinique consistant en des essais en culture cellulaire *in vitro* et sur animal *in vivo*. Ces essais pré cliniques visent à démontrer l'activité thérapeutique des molécules sélectionnées, et à appréhender leur toxicité. La ou les quelques molécules présentant un réel intérêt seront alors brevetées et sélectionnées pour des essais cliniques sur l'homme.

Les essais cliniques réalisés avant la mise sur le marché sont constitués de trois étapes :

- Les essais de phase I correspondent à la première administration à l'homme et permettent classiquement de définir la dose et la fréquence d'administration optimale du médicament.
- Les essais de phase II ont pour objectif de confirmer l'activité thérapeutique du médicament à la dose définie précédemment. A ce stade, seul un nombre restreint de patients sont inclus dans les essais.
- Les essais de phase III englobent un nombre plus conséquent de patients, et ont pour intérêt de comparer le médicament au traitement de référence.

A l'issu de cette étape clinique, le médicament pourra être commercialisé sous couvert d'obtenir une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) délivrée par les autorités compétentes. Le dossier d'AMM reprend l'ensemble des résultats de développement, d'essais pré-cliniques et cliniques, afin d'apporter la preuve de la qualité, de l'efficacité et de la sécurité du nouveau médicament. Si le médicament est commercialisé, les possibles effets indésirables seront suivis *via* la pharmacovigilance, aussi appelée essais de phase IV.

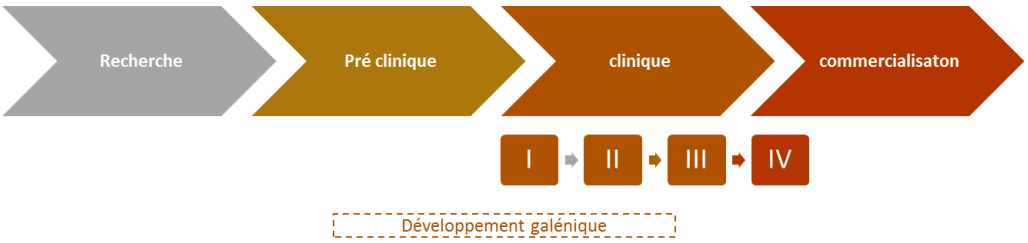


Figure 1: Représentation schématique des étapes de la vie d'un médicament

Alors qu'à l'étape pré cliniques les études sont réalisées directement avec la molécule identifiée, il est nécessaire d'avoir une forme administrable à l'homme pour réaliser les essais cliniques. C'est pourquoi en parallèle des essais pré cliniques, des études de mise en forme galénique de la substance active sont réalisées. Cette étape de formulation regroupe des essais de pré formulation d'une part, permettant de connaître les caractéristiques physico chimiques de la substance active, et de formulation d'autres part, avec pour objectif d'obtenir la forme galénique souhaitée regroupant la substance active et les excipients associés. Cette étape de formulation galénique est une part très importante dans le développement du médicament, permettant d'aboutir à une forme administrable chez l'homme.

La mise en forme galénique de la substance active va de pair avec le développement des outils analytiques nécessaires pour caractériser la substance active d'une part et contrôler le produit pharmaceutique d'autre part qui devra répondre aux exigences réglementaires de qualité pharmaceutique. Cela concerne les caractéristiques physico-chimiques de la substance active (solubilité, polymorphisme, granulométrie, voies de dégradation, …) et différentes propriétés du produit pharmaceutique (vitesse de dissolution, biodisponibilité, stabilité …).

Les médicaments doivent répondre à une exigence de qualité pharmaceutique tout au long de leur durée de vie afin de démontrer que le niveau d'efficacité et d'innocuité reste acceptable jusqu'à péremption. Afin de garantir cette qualité, de nombreux contrôles sont réalisés à la fois sur les matières premières rentrant dans la fabrication du produit, et à la fois sur le médicament fini lors de sa fabrication et à différentes échéances au cours de sa vie par des études de stabilité. En effet, de nombreux facteurs peuvent contribuer à une détérioration de la stabilité du produit :

- Des facteurs environnementaux comme la température, l'humidité, la lumière
- Des facteurs propres au produit, liés aux propriétés physico chimiques du principe actif ou des excipients, à la forme pharmaceutique, son conditionnement ou encore au procédé de fabrication.

La nécessité d'amélioration constante de la qualité des médicaments produits, ainsi que l'arrivée sur le marché de nouveaux types de médicaments issus des biotechnologies, entrainent de fait une nécessaire amélioration des pratiques et la recherche d'outils analytiques permettant un meilleur contrôle des médicaments. Ceci dans l'objectif de s'assurer de la qualité – efficacité et innocuité – des médicaments produits et distribués aux patients.

Les coûts élevés du développement d'un médicament associés à la limite de temps des brevets contribuent à l'intérêt d'obtenir un médicament répondant aux critères de qualité et ayant une stabilité satisfaisante dès le début de son développement. Ceci demande alors la mise en place de méthodologies permettant de prévoir de façon précoce la stabilité du produit en développement.

Dans le domaine de l'évaluation de la stabilité des médicaments, trois aspects sont ainsi à prendre en compte :

- L'évolution des médicaments, avec l'apparition de molécules de plus en plus complexes, associée à des voies de dégradation multiples et des produits de dégradation variés,
- L'évolution nécessaire des techniques : liée d'une part à l'évolution des molécules analysées, et d'autres part à l'évolution des normes réglementaires,
- La recherche de méthodologies toujours plus prédictives afin de développer en amont la forme la plus stable possible du médicament.

PARTIE 1 : ETAT DE L'ART

Chapitre 1 : Evaluation de la stabilité des produits thérapeutiques

Les médicaments doivent répondre aux critères d'efficacité et d'innocuité. Ces deux aspects sont évalués dès la phase pré clinique du développement du médicament, et continuent d'être contrôlés après la commercialisation du produit, par le biais de la maitrise de la qualité pharmaceutique du médicament et de ses constituants. Ces deux paramètres doivent être garantis pendant toute la durée de vie du produit, et sont contrôlés au cours des études de stabilités *via* des tests analytiques physico-chimiques et microbiologiques. Ces études permettent d'étudier le devenir du produit pharmaceutique dans les conditions de conservation de longue durée, et d'évaluer s'il conserve sa qualité et son efficacité, sans apparition d'une toxicité dans le temps. Les études de stabilité peuvent être divisées en deux groupes :

- Les études « ICH », qui sont réalisées avant la demande d'AMM et qui ont pour objectif de définir la durée de péremption du médicament, ainsi que ses conditions de conservation.
- Les études post-commercialisation, appelé programme de suivi de la stabilité, qui ont pour objectif de vérifier, après l'obtention de l'AMM et lors de la commercialisation du produit, que le niveau de qualité reste le même.

La première partie de ce chapitre présente le cas général d'évaluation de la stabilité des produits pharmaceutiques. Le cas « classique » étant représenté par les produits thérapeutiques ici appelés « conventionnels » et correspondant aux petites molécules chimiques. La seconde et troisième partie de ce chapitre sont consacrées aux produits thérapeutiques issus des biotechnologies. Une partie est consacrée à la définition et la description de la structure de ces produits, avec un focus particulier sur le cas des mAbs. Une autre partie est consacrée plus en détail sur leur analyse et le contrôle de leur stabilité. Enfin, la quatrième partie de ce chapitre présente les approches prédictives utilisées pour l'évaluation de la stabilité des produits pharmaceutiques.

A. Evaluation de la stabilité des produits pharmaceutiques conventionnels

1. Cadre réglementaire

Les Etats-Unis, l'Europe et le Japon se sont regroupés en 1990 pour créer des *guidelines* internationales, les *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), permettant l'homogénéisation des développements pharmaceutiques et faciliter la soumission concomitante des dossiers d'AMM (*common technical document*, CTD) dans ces trois régions du monde. Parmi ces guidelines, les ICH Qualité (ICH Q) englobent les études de stabilité et le système de management de la qualité, et en particulier :

- Les ICH Q1 concernent l'étude de la stabilité (ICHQ1A(R2)) [1] et de la photo stabilité (ICHQ1B) [2] des substances actives et des produits finis.
- Les ICH Q3B concernent les teneurs en impuretés de dégradation acceptées dans le produit fini [3] et dans la matière première [4]. Ces guidelines donnent quelques explications et guident sur la façon de documenter les études de stabilité exigées par la réglementation.

Les ICH Q1A(R2) décrivent de façon détaillée les études de stabilité à réaliser dans le cadre du développement d'une nouvelle formulation pharmaceutique. Les échéances et temps de prélèvement, les températures et conditions d'humidité relative (HR) à évaluer selon la zone géographique sont décrites. Les études de stabilité sont réalisées sur la matière première seule, et sur le produit fini dans son conditionnement final.

Dans le cas général, c'est-à-dire dans le cas d'un médicament à conserver dans des conditions de température et d'humidité ambiantes, les conditions d'études sont les suivantes :

- 25 °C ± 2 °C / 60 % HR ± 5 % HR : ces conditions sont dites « long terme », un minimum de 12 mois de recul est nécessaire avant de pouvoir soumettre un dossier d'AMM
- 30 °C ± 2 °C / 65 % HR ± 5 % HR : ces conditions sont dites « intermédiaires », un minimum de 6 mois de recul est nécessaire avant de pouvoir soumettre un dossier d'AMM
- 40 °C ± 2 °C / 75 % HR ± 5 % HR : ces conditions sont dites « accélérées », un minimum de 6 mois de recul est nécessaire avant de pouvoir soumettre un dossier d'AMM

Ces conditions peuvent être différentes dans certains cas : conditionnement primaire semi perméable, produits à conserver au froid etc… Avec des données de stabilité à 12 mois, la durée de péremption qui pourra alors être accordée dans le cadre de l'AMM ne pourra dépasser 12 à 24 mois, en fonction du profil obtenu [5]. La stabilité devra ensuite être suivie sur toute la durée de vie du produit et des données en temps réel devront être apportées afin d'étendre la date de péremption du médicament.

Par ailleurs, des études de stabilité complémentaires seront nécessaires chaque fois que la composition, le procédé de fabrication, le conditionnement ou la méthode de préparation subissent des modifications importantes. Il sera également toujours possible de modifier les durées de validité une fois les données de stabilité disponibles, à l'aide de dépôt de variations d'AMM [1].
A la suite de ces études de stabilité « ICH », un programme de suivi de la stabilité doit être mis en place post-commercialisation, comme exigé par les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) [6] dans le cadre du programme de surveillance de la stabilité. Ce programme approprié et continu permet la détection de tout problème de stabilité dans les conditions réelles de production relatif à la formulation du produit dans son conditionnement final (par exemple, tout changement du taux des impuretés ou du profil de dissolution). L'objet du programme de suivi de la stabilité est de surveiller le produit pendant toute sa commercialisation et de déterminer s'il est toujours conforme aux spécifications définies par les études de développement du dossier d'AMM. Au moins un lot par an doit être ajouté à ce programme de surveillance.

Une impureté est définie comme toute substance autre que la substance active et les excipients [3]. Les ICH Q3B font état des teneurs maximales en impuretés acceptées dans le produit fini. Le tableau 1 détaille ces recommandations. En fonction de sa teneur dans le produit fini, l'impureté devra être soit reportée, soit identifiée, soit qualifiée. La qualification d'une impureté permet de justifier des teneurs supérieures aux seuils de qualification à l'aide de données toxicologiques après expériences, études *in silico* ou bibliographiques. On distingue les impuretés de synthèse, générées au cours du process de fabrication de la substance active, et les impuretés de dégradation ou produits de dégradation, qui sont définies comme résultant d'un changement chimique de la substance active pendant la fabrication du produit pharmaceutique ou lors de sa conservation. On cite par exemple l'effet de la température, de la lumière, de l'humidité, ou encore de l'interaction avec un excipient ou du conditionnement primaire [3]. Au cours des études de stabilité, le profil de dégradation du produit pharmaceutique est réalisé pour chaque échéance, pour déterminer les teneurs en impuretés dans le produit au cours du temps.

Tableau 1 : Classification et teneurs en impuretés acceptées dans le produit fini [3]

	Dose journalière maximale	Seuil à appliquer
Seuil de report	≤ 1g > 1 g	0,1% 0,05%
Seuil d'identification	< 1 mg 1 mg – 10 mg > 10 mg – 2 g > 2 g	1,0% ou 5 µg 0,5% ou 20 µg 0,2% ou 2 mg 0,10%
Seuil de qualification	< 10 mg 10 mg – 100 mg > 100 mg – 2 g > 2 g	1,0% ou 50 µg 0,5% ou 200 µg 0,2% ou 3 mg 0,15%

Pour l'évaluation des produits de dégradation, il est nécessaire d'analyser le produit *via* une méthode indicatrice de stabilité, comme indiqué par les ICHQ 1 [1, 3] ou également par d'autres *guidelines* comme l'USP (Pharmacopée Américaine) dans le paragraphe concernant les études de stabilité dans la fabrication (*Stability Studies in Manufacturing*) [7]. Les méthodes indicatrices de stabilité correspondent à des méthodes analytiques permettant de détecter les changements au cours du temps des propriétés chimiques, physiques ou microbiologiques de la substance active ou du produit pharmaceutique. Ces méthodes doivent avoir été validées pour la détection et si besoin la quantification des produits de dégradation, selon la réglementation décrite par les ICH Q2 [8]. Il est également nécessaire de montrer que ces méthodes sont spécifiques pour l'évaluation des différents produits de dégradation. Pour cela, les ICH recommandent la réalisation d'études de dégradations forcées, aussi appelées études de stress forcés. Cependant, la méthodologie pour valider les aspects indicateurs de stabilité des méthodes analytiques n'est pas clairement énoncée par les réglementations. Par exemple, les ICHQ1A indiquent que la nature de ces essais sera dépendant de chaque substance, et que l'effet de la température, de l'humidité, de l'oxydation, de l'hydrolyse à différent pH doivent être évalués. Seules les conditions opératoires de dégradation par photostress sont décrites dans les ICH Q1B [2].

2. Etudes de dégradations forcées et méthodes indicatrices de stabilité

Les études de dégradations forcées ont pour objectifs [9]:

- La connaissance des voies de dégradation du principe actif et du produit fini
- La formation des produits de dégradation, en vue d'un possible isolement et identification
- La mise au point de méthode analytique permettant l'analyse des produits de dégradation du principe actif et du produit fini. Ces méthodes sont à distinguer des méthodes décrites dans les pharmacopées (Pharmacopée Européenne, Américaine (USP), Anglaise, Japonaise) qui ne s'intéressent qu'aux impuretés de synthèse et non de dégradation.

Malgré l'absence de *guidelines* officielles, il existe de nombreuses recommandations de sociétés savantes [9] ou de revues de littérature [10-12], décrivant la méthodologie classiquement acceptée pour la réalisation de ce type d'étude, et permettant d'identifier des conditions optimales de stress. Les différents stress appliqués sont généralement les suivants :

- Température

- Stress oxydant. La majorité des essais de stress oxydant est réalisée avec du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en concentration de 0,1 à 10% (v/v). D'autres agents oxydants sont parfois utilisés (par exemple Fe^{2+}, Cu^{3+}, ou le monoperoxyphthalate de magnésium).
- Hydrolyse à différent pH. Classiquement, ces essais sont réalisés par l'ajout de solution de NaOH et de HCl à différentes molarités (de 0,1 à 1M)
- Hydrolyse à pH natif
- Stress à la lumière. Les conditions opératoires sont décrites dans les ICH Q1B [2].

L'objectif de ces stress est d'obtenir une dégradation d'environ 10% du principe actif [9]. Une telle dégradation permet d'obtenir la formation de produits de dégradation dans des proportions suffisantes, sans être trop importantes afin d'éviter d'obtenir des produits de dégradation secondaires voir tertiaires. Ceci compliquerait fortement le développement de la méthode analytique alors que ces produits de dégradation ont peu de chance d'être retrouvés dans le médicament final. Ainsi, la concentration du principe actif, le niveau de stress, la durée de stress, doivent donc être adaptés en fonction du niveau de dégradation obtenu et à la sensibilité de la substance active. Des essais préliminaires sont généralement nécessaires. Dans sa revue bibliographique [11], Singh *et al* indiquent différents niveaux et durées de stress qui peuvent être testés, et proposent des niveaux maximaux de stress à partir duquel le produit peut être déclaré stable si aucune dégradation n'est observée.

Après dégradation de la substance active tel que décrit, l'objectif est de développer une méthode analytique permettant une séparation suffisante et une analyse des produits de dégradation générés et qui pourraient potentiellement être observés au cours des études de stabilité. Bakshi *et al* [13] décrivent une méthodologie classique pour ce type de développement, allant de la connaissance physico chimique de la substance active jusqu'à la validation de la méthode, et qui peut être résumée comme ceci :

- Etude de la structure de la molécule et de ses possibles voies de dégradation,
- Réalisation des dégradations forcées,
- Développement de la méthode analytique et optimisation de la séparation des produits de dégradation générés,
- Identification des produits de dégradation,
- Validation de la méthode

La grande majorité des méthodes indicatrices de stabilité sont des méthodes chromatographiques, principalement en chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur UV (HPLC-UV) ou un spectromètre de masse (LC-MS). Ces méthodes séparatives permettent d'obtenir généralement

une résolution acceptable (résolution >1,5) entre la substance active et les impuretés générées au cours des études de dégradation forcées. Par ailleurs, l'HPLC est connue comme étant répétable, robuste, sensible, et permet l'analyse de molécules très variées (plus ou moins polaires, ioniques, etc…). D'autres techniques séparatives sont utilisées mais moins couramment comme la chromatographie en phase gazeuse pour les molécules volatiles et stables thermiquement, ou encore l'électrophorèse capillaire [13].

Les essais de dégradation forcés sont réalisés sur la substance active seule. Néanmoins, la stabilité réelle d'un produit pharmaceutique dépend non seulement de la stabilité intrinsèque du principe actif, mais également de sa formulation et du conditionnement. Lors de la mise au point du produit fini (principe actif + excipients + contenant primaire), d'autres types d'études en conditions forcées sont réalisées afin d'appréhender la stabilité du médicament : les études d'interaction principe actif/ excipients et les études d'interaction contenant/contenu [14, 15]. Les études d'interactions entre le principe actif et les excipients permettent de choisir dès le stade du développement, parmi les excipients qui sont nécessaires à la forme pharmaceutique souhaitée, ceux qui sont compatibles avec le principe actif et ainsi obtenir la formulation la plus adaptée au profil du produit et la plus stable dans le temps. Les études d'interaction contenant/contenu permettent d'évaluer l'impact du conditionnement primaire sur la stabilité du médicament.

B. Les produits pharmaceutiques d'origine biologique

1. Définition

Le Code de la Santé Publique définit par l'article L.5121-1 les médicaments biologiques ou biomédicaments comme "*tout médicament dont la substance active est produite à partir d'une source biologique ou en est extraite et dont la caractérisation et la détermination de la qualité nécessitent une combinaison d'essais physiques, chimiques et biologiques ainsi que la connaissance de son procédé de fabrication et de son contrôle*" [16].

Les produits pharmaceutiques d'origine biologique, aussi appelé médicaments biologiques ou biomédicaments, sont issus des biotechnologiques et sont produits à partir d'une source biologique. Dans son guide de bonnes pratiques de fabrication pour les produits biologiques [17], l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) indique que les médicaments biologiques incluent les allergènes, les hormones, certaines cytokines, les enzymes, les mAbs, les produits issus de process de fermentation

(comme des produits dérivés des ADNr) ou encore des médicaments dérivés du sang ou du plasma humain, des vaccins, ou encore des produits de thérapie génique (ARN messager,…) et cellulaire.

Le développement des procédés biotechnologiques dans les années 70 a permis d'ouvrir la voie à l'industrialisation et la commercialisation des médicaments biologiques. Par exemple, la synthèse artificielle d'un acide désoxyribonucléique (ADN) codant une protéine d'intérêt thérapeutique issue du vivant et sa production à une échelle industrielle ont permis le développement de l'insuline [18]. Un autre exemple est la possibilité de produire des mAbs thérapeutiques par la technique d'hybridome. Cette technique permet la production en grande quantité d'un type spécifique et défini de mAbs par une lignée cellulaire, et a été développée par Kohler et Milstein [19]. Depuis, les médicaments biologiques connaissent un vrai essor et représentent une part sans cesse croissante dans l'industrie ainsi que de nouvelles voies thérapeutiques. Le marché des biomédicaments suit une évolution exponentielle et l'avènement des mAbs thérapeutiques apparait comme le moteur de cette croissance. Par exemple, en 2017, 40% des nouveaux médicaments sont des médicaments biologiques, et en 2019, parmi les 10 médicaments les plus vendus dans le monde, 7 sont des médicaments biologiques, dont 5 sont des mAbs [20]. En 2019, 79 mAbs étaient approuvés au total aux Etats Unis [21] et ce marché ne fait que s'accroitre : le nombre de mAbs approuvés en Europe et aux Etats unis augmente, avec 3 à 5 produits approuvés chaque année dans la première moitié des années 2010, contre 10 à 19 depuis [22], tandis que 88 mAbs étaient aux dernières étapes de phase clinique en 2020 [23]. Ceci est notamment lié à la fin des brevets et donc à l'arrivée de plus en plus importante des biosimilaires. Par exemple, le mAbs Humira® (Adalimumab), premier biomédicament vendu dans le monde, a perdu sa protection en 2016 aux Etats Unis et en 2018 en Europe, offrant à d'autres acteurs de produire des produits biosimilaires. L'intérêt de ces traitements a également été observé lors de la crise du COVID 19 actuelle, avec plus de 120 mAbs anti-SARS-CoV-2 en développement en novembre 2020 [23].

2. Structure des médicaments biologiques et cas des anticorps monoclonaux

La majorité des médicaments biologiques est représentée par des protéines (hormones, cytokines, facteurs de croissance, mAbs). Il s'agit ainsi de macromolécules de masse moléculaire allant de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de kilodaltons (kDa). Comparativement aux molécules issues de synthèse chimique, les produits biopharmaceutiques ont des structures plus complexes. Ils possèdent une organisation spatiale en trois dimensions qui doit être conservée pour le maintien de leur activité biologique.

Les différents niveaux de structures des protéines peuvent être classés en quatre niveaux :

- Structure primaire : elle correspond à la séquence en acides aminés constituant la chaîne polypeptidique
- Structure secondaire : elle correspond au repliement local de la chaîne polypeptidique. Parmi les structures secondaires possibles, on peut trouver notamment les hélices α et les feuillets β
- Structure tertiaire : elle correspond à la compaction des structures secondaires entre elles, qui donne la structure en trois dimensions de la protéine
- Structure quaternaire : elle correspond à l'association de plusieurs sous-unités protéiques

La Figure 2 présente schématiquement les différents niveaux de structure rencontrées.

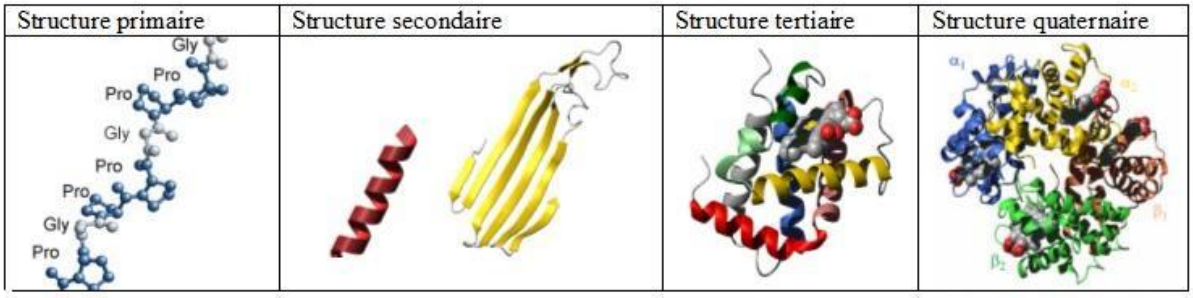


Figure 2 : Représentation schématique des différents niveaux de structure protéique [24]

Les mAbs, principales protéines thérapeutiques, sont des glycoprotéines de la catégorie des immunoglobulines. La majorité appartient à la classe des Immunoglobulines G (IgG), représentée Figure 3. Leur structure en Y, de masse d'environ 150 kDa, se compose de :

- Deux chaînes lourdes (HC) identiques, composées de 4 domaines : VH, CH1, CH2 et CH3
- Deux chaines légères identiques (LC), composées de 2 domaines : VL et CL

Et chaque chaîne comprend :

- Une partie constante (CR) qui est commune à tous les anticorps et qui permet la reconnaissance avec le système immunitaire ;
- Une partie variable (VR) qui permet la reconnaissance entre l'épitope de l'antigène et l'anticorps. Chaque partie variable contient des régions hypervariables : les *complementary determining region* (CDR), qui permettent une spécificité optimale entre l'épitope de l'antigène et l'anticorps.

Les chaines sont reliées entre elles par des ponts disulfures, lui conférant une certaine flexibilité et sa forme caractéristique en Y. Le nombre de ponts disulfures varie en fonction du type d'IgG : 2 ponts disulfures pour les IgG1 et IgG4, 4 pour les IgG2, plus de 15 pour les IgG3. La partie supérieure du mAb (partie Fab : *fragment antigen binding*) est impliquée dans la liaison entre l'antigène et l'anticorps. La partie inférieure du mAb (Fc : Fragment cristallisable) est impliquée dans les fonctions effectrices de

l'anticorps. Les fonctions effectrices correspondent à la fixation de l'anticorps au complément permettant l'élimination du complexe antigène/anticorps, ou à d'autres types cellulaires. Enfin, les mAbs sont des protéines glycosylées, qui possèdent, au niveau de leur domaine CH2 un motif oligosaccharidique (N-glycosylation).

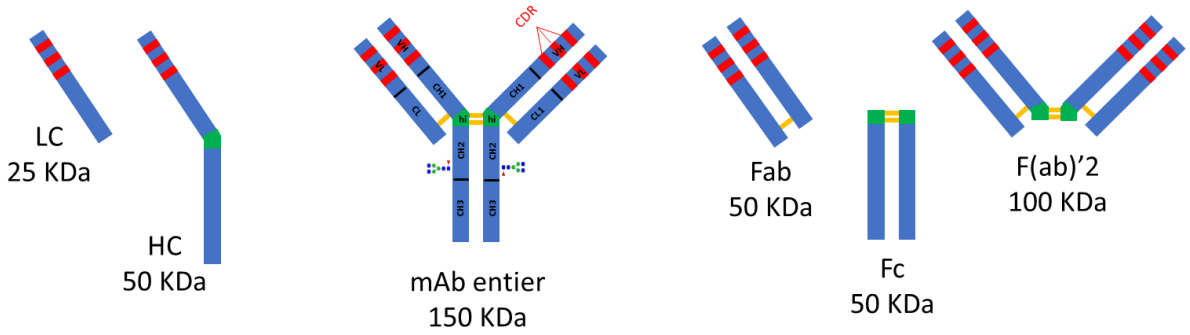


Figure 3 : Représentation schématique de la structure d'un mAb entier et de ses différentes régions. Au centre, la structure du mAb entier de forme caractéristique en Y. A gauche, les différentes chaines qui le compose et à droite les différents fragments rencontrés. Les masses approximatives sont indiquées pour chaque forme. Adaptée de [25]

Les premiers mAbs thérapeutiques produits à partir des années 1970 étaient d'origine totalement murines. C'est le cas du Muromomab, le premier mAb thérapeutique à avoir reçu une AMM en 1984. La partie Fc de l'anticorps était alors reconnu comme étant « étranger » et entrainait la réaction du système immunitaire chez les patients [26]. Les innovations et améliorations des process de production des mAbs a permis de développer des mAbs de plus en plus humanisés, afin de diminuer cette réponse immunitaire, et d'améliorer les paramètres pharmacocinétiques et pharmacologiques des traitements. La Figure 4 présente les différents types de mAbs en fonction de leur origine humaine et murine. Pour chaque mAbs, le suffixe de son appellation indique sa provenance. Par exemple, l'infiximab est un mAb chimérique, le trastuzumab est un mAb humanisé, et l'adalimumab est un mAb humain. Actuellement, des formes chimériques, humanisées et intégralement humaines existent sur le marché.

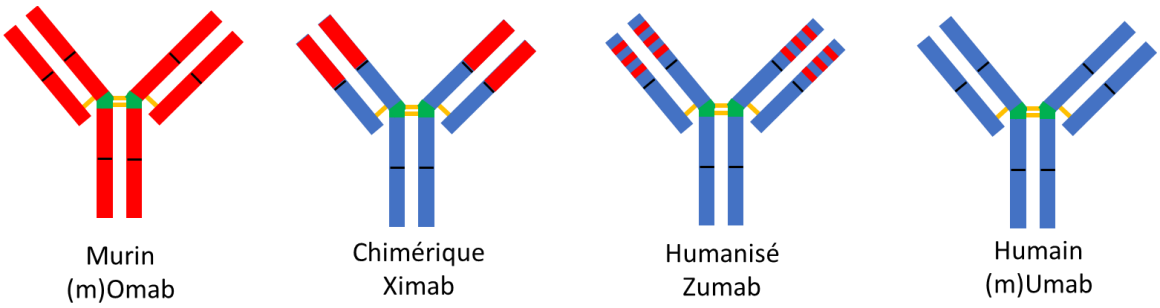


Figure 4 : Représentation des quatre types d'anticorps monoclonaux en fonction de l'origine murine (en rouge) et humaine (en bleu).
Adaptée de [27]

Les indications thérapeutiques des mAbs sont relativement variées. On peut classer leur utilisation dans deux catégories : utilisation en cancérologie, et dans les autres indications. En cancérologie, ils font partie de l'arsenal thérapeutique dans le traitement de différents cancers, par exemple : sein (Trastuzumab), colorectal (Cetuximab), gastrique (Ramucirumab), ou encore le mélanome (Nivolumab). Dans d'autres indications on le retrouve dans le traitement de pathologie du système immunitaire : maladie de Crohn, psoriasis, polyarthrite rhumatoïde par exemple. Plus récemment, environ une vingtaine de mAbs ont obtenu une AMM ou sont impliqués dans des essais cliniques en phase avancée pour le traitement du COVID-19 [23].

C. Analyse et évaluation de la stabilité des molécules biologiques

Comme vu précédemment, les produits thérapeutiques biologiques représentent des structures bien plus complexes que les molécules issues de synthèse chimique. Leur caractérisation, leur contrôle et le suivi de leur stabilité nécessitent la mise en œuvre de plusieurs techniques analytiques complémentaires, permettant d'accéder à l'analyse de l'ensemble des niveaux de structure de ces molécules. La Figure 5 présente un listing de différentes techniques pouvant être mises en œuvre pour caractériser les différents niveaux de structure d'une protéine, en prenant l'exemple des mAbs. De plus, les produits biologiques ne sont pas seulement définis par leur structure, mais également par leur processus de production. Ceci implique une production non homogène du produit, avec un nombre important de micro-hétérogénéités. L'évaluation de la pureté d'un produit biologique apparait donc complexe. L'arrivée de ces nouveaux produits pharmaceutiques sur le marché a entrainé l'arrivée de *guidelines* et réglementations spécifiques à ces produits.

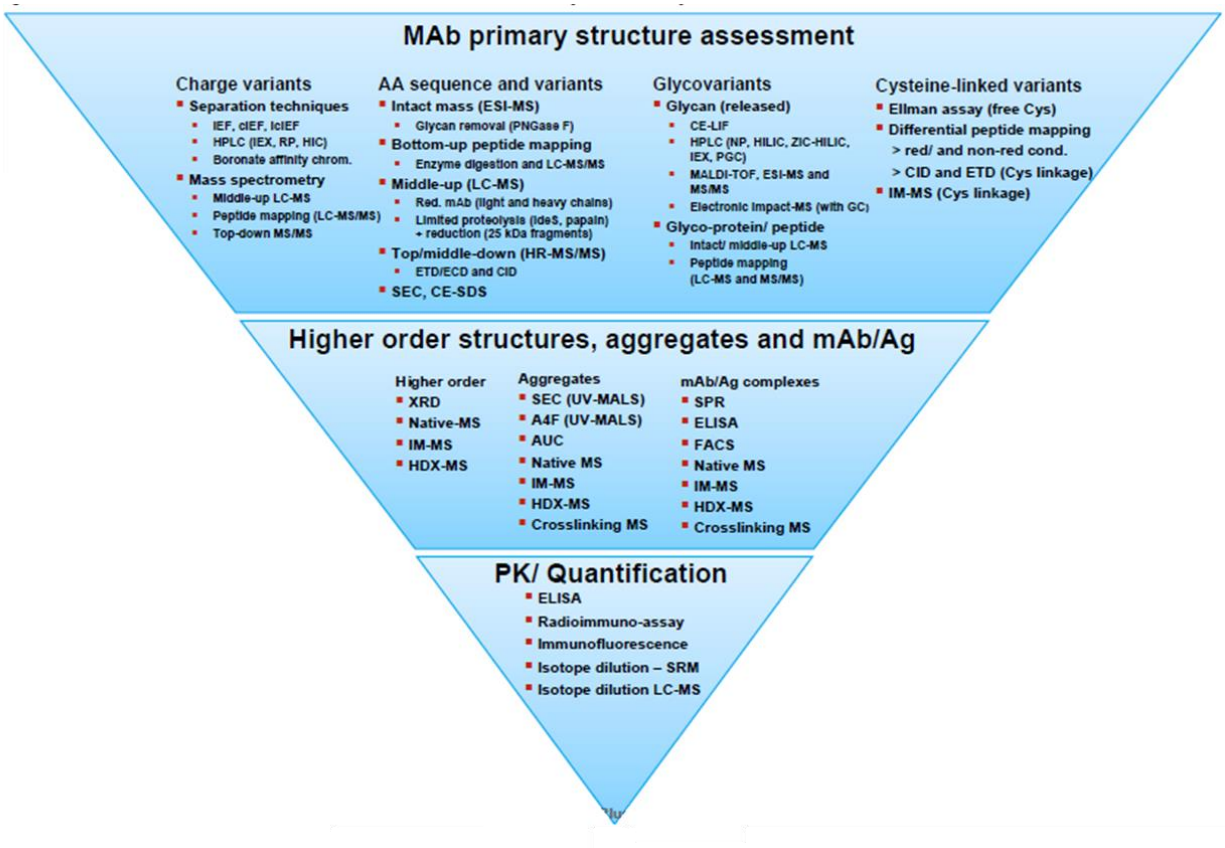


Figure 5 : Exemple de différentes techniques analytiques permettant l'analyse des anticorps monoclonaux en fonction du niveau de structure étudié [28]

1. Cadre règlementaire

Les *guidelines* ICH Q5 [29-31] et les ICHQ6B [32] sont spécifiques aux produits issus des biotechnologies. Les produits biologiques étant issus d'une synthèse liée au vivant, de légères modifications du produit sont attendues au cours de la production (micro hétérogénéités ou micro variants). Le produit fabriqué sera ainsi relativement hétérogène. Les ICH distinguent :

- Le produit désiré (*desired product*) : c'est-à-dire le produit ayant la structure attendue
- Les substances apparentées (*substance related product*) : qui correspondent à des variants du produit désiré, qui sont formés lors de sa fabrication ou de sa conservation, mais qui n'entrainent pas d'effet délétère en termes d'efficacité et de sécurité. Ce ne sont pas des impuretés car ils possèdent la même activité biologique.
- Les impuretés : qui peuvent être issues du procédé ou du produit.

L'évaluation de la pureté d'un produit biologique est complexe, et sera surtout définie en termes de qualité du produit. Le fabricant doit pouvoir caractériser l'hétérogénéité du produit, et vérifier qu'elle soit constante selon les lots produits. Les micro hétérogénéités qui impactent la qualité et la sécurité

du produit, et qui sont ainsi considérées comme des attributs critiques de qualité (*critical quality attribute*, CQA) tels que définis par les ICH Q8(R2) doivent en particulier être caractérisées et leurs teneurs dans les produits finis doivent être définies [33].

Les ICH Q5C décrivent les essais relatifs à l'évaluation de la stabilité des produits biologiques [29]. De la même façon que pour les produits issus de synthèse chimique, les études de stabilité permettent de définir les conditions de conservation et la durée de validité du produit. Cependant, aucune recommandation sur les températures et humidité relative pour réaliser les études de stabilité ICH ne sont données. Les produits biologiques étant de nature très variable, les conditions dans lesquelles mener les études de stabilité doivent être adaptées au cas par cas. De la même façon que pour les produits thérapeutiques issus de synthèse chimique, la stabilité doit être évaluée *via* des méthodes indicatrices de stabilité. Par contre, il est nécessaire d'évaluer la stabilité des produits biologiques *via* un panel de techniques adaptées, et les seuils acceptés concernant les impuretés (produit de dégradation) sont analysés au cas par cas. Par exemple, des produits de dégradation qui ont les mêmes propriétés que le produit désiré (en termes d'activité, d'efficacité et de sécurité) sont considérés comme des substances apparentées. Leur teneur dans le produit thérapeutique doit surtout être constant d'un lot à l'autre, et c'est cette teneur qui définira le seuil accepté.

De façon similaire aux produits non biopharmaceutiques, les essais de dégradation forcée sur le produit doivent permettre :

- Le développement de méthodes indicatrices de stabilité
- La connaissance du profil de dégradation du produit
- De déterminer les tests les plus indicateurs de la stabilité du produit

D'autres *guidelines* officielles de la FDA (Food and Drug Administration) [34] et de l'EMA (Agence Européenne des Médicaments) [35] concernant le contrôle des produits biologiques recommandent, dans la même ligne directrice que les ICH, la réalisation de dégradations forcées et l'analyse des produits via des méthodes indicatrices de stabilité. Des textes spécifiques au contrôle des mAbs sont également disponibles au niveau de l'EMA [36] et de la Pharmacopée Européenne [37].

2. Dégradations forcées appliquées aux produits biologiques

Il n'existe pas de réglementations spécifiques concernant les études de dégradations forcées à appliquer aux produits biologiques. Certaines recommandations existent dans la littérature pour déterminer les conditions de stress qui peuvent être appliquées, et les méthodes associées à chaque

produit de dégradation potentiel [38-42]. De façon similaire aux produits issus de synthèse chimique, il est recommandé de réaliser les dégradations forcées incluant l'effet de la température, de la lumière, du pH et de l'oxydation. En plus de ces stress communs, il est recommandé d'évaluer l'impact de l'agitation et de la congélation/décongélation sur le produit. Ces deux derniers entrainant en général une agrégation du produit [40]. Un exemple de protocole issu de la *European Biopharmaceutic Entreprise*, association représentant les entreprises biopharmaceutiques européenne est donné Figure 6.

Critical Quality Attribute	Examples of Analytical method	Temperature Conditions	Typical Oxidation Agents	Agitation Conditions	Light Conditions	pH & deamidation conditions
Size Variants	SE-HPLC / UPLC*	**Temperature:** 25°C **Time points:** 0, 1, 2, 6, 12 weeks **Temperature:** 40°C **Time points:** 0, 1, 2, 4, 8 weeks	**Agent:** 0.1 to 1% H_2O_2, **Temperature:** 25°C **Time points;** 0 to 3 days	**Speed:** 700 to 1500 RPM **Temperature:** 2-8°C **Time points:** 24 Hours	**ICH Q1B***** **Temperature:** 25°C **Light:** NLT 1.2 million lux hours	**pH:** 3-11 **Temperature:** 40°C **Time points:** 1, 2, 3, 7 Days
	Non-Reduced or reduced CE-SDS / SDS-PAGE*					
	Native-SDS*					
	AUC					
Charge Variants	cIEF / IEF					
	CEX-HPLC / UPLC					
Primary structure Deamidation Oxidation	Peptide Map / LC-MS-MS					
	Specific Techniques (e.g. IE-HPLC, LC-MS, OxyBlot)					
PTM	Oligosaccharide Profile					
	Glycation					
Higher Order Structure	DSC					
	CD					
	FTIR					
	DLS					
	Fluorescence					
	Raman					
	HDX					
Biological Activity	Product Specific Methods					
Others	Appearance – Visible & Sub-visible Particles**					
	Apperance – Clarity (Turbidity)					
	Appearance - Color					
	Pegylation					

Figure 6 : Exemple de protocole de dégradation forcée pour les produits biologiques [42]

3. Particularité des biosimilaires

Avec le succès rencontré sur le marché des mAbs, et la fin des brevets des premiers mAbs développés dans les années 1990, sont arrivés des équivalents de ces produits, appelés biosimilaires. L'EMA définit le médicament biosimilaire comme un médicament biologique qui présente une forte ressemblance, en termes de structure, d'activité biologique, d'efficacité et de sécurité, avec un autre médicament biologique déjà commercialisé et appelé «médicament de référence» [43]. La FDA donne une

définition similaire [44]. Le mode de production des molécules biologiques ne permet pas d'obtenir, pour une autre compagnie, exactement le même produit d'origine. La production « identique » lot à lot est permise uniquement lorsque la production est faite par la même lignée cellulaire. L'EMA a édité des directives concernant les essais à mettre en place pour le développement d'un biosimilaire [45, 46]. Elle décrit en particulier les points critiques devant être communs aux deux produits afin d'être considérés comme biosimilaires. Ces critères concernent notamment la structure de la molécule à différents niveaux et ses propriétés physico-chimiques. L'objectif est de démontrer une grande similarité avec le médicament de référence par une caractérisation fine et complète de la structure et des caractéristiques physico-chimiques du candidat biosimilaire, sans pour autant avoir à réaliser l'ensemble des essais cliniques nécessaire au développement d'un nouveau produit. L'approche classique limitée à des études de bioéquivalence pour les molécules issues de synthèse chimique n'est pas suffisante dans le cas des produits biologiques. Une représentation schématique des différences entre le développement d'un produit de référence et un biosimilaire est présentée Figure 7. Si des différences entre le candidat biosimilaire et le produit de référence sont observées, l'impact sur la sécurité et l'efficacité du produit doit être documenté.

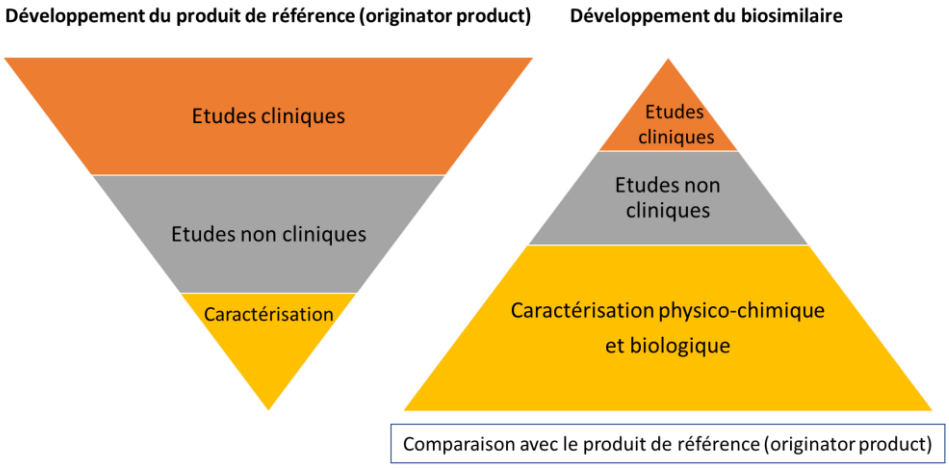


Figure 7 : Représentation schématique des différences entre le développement d'un produit de référence et un biosimilaire. Adaptée du cours de Laure de Ligniville, IFSBM, 2019

D. Approches prédictives pour l'évaluation de la stabilité des produits pharmaceutiques

1. Introduction

Au cours du développement d'un médicament, l'un des enjeux est de diminuer au maximum le temps (et donc le coût) du développement. L'un des leviers est d'identifier dès le début de la mise en forme

galénique, la formulation qui sera la plus stable, permettant d'atteindre une durée de péremption longue, souvent de plusieurs années. En effet, la durée de péremption du produit est déterminée par rapport aux données réelles obtenues pendant les études de stabilité ICH. C'est-à-dire avec les données long terme, donc après plusieurs années. Si au cours des études de stabilité, une instabilité du médicament, comme l'apparition de produits de dégradation, est observée, cela peut entrainer des études de re-formulation. Selon les cas, cela peut également nécessiter de réaliser des études de bio équivalence entre les deux formulations. Au final, les délais et le coût de développement sont augmentés.

Afin d'anticiper ces problématiques, plusieurs types d'études peuvent être réalisées. D'une part, des dégradations forcées sur le principe actif ou sur le médicament final sont réalisées pour identifier les risques d'instabilités en fonction des conditions de conservation, et peuvent permettre de comparer différentes formulations. D'autre part, des études d'interaction entre le principe actif et les excipients candidats afin de sélectionner les plus inactifs par rapport au principe actif [14]. Enfin, des études d'interaction contenant-contenu permettent d'identifier un conditionnement adapté [15]. Au-delà de permettre d'identifier et d'anticiper des risques d'instabilités des médicaments développés, ces études sont nécessaires à la soumission d'un dossier de demande d'AMM. Cependant, ces approches sont uniquement qualitatives, et ne permettent pas, sur la base de ces stress « court-terme » de réaliser des modélisations et de prédire une date de péremption.

D'autres types d'études de stress court-terme, regroupés sous le terme de « Stabilité Prédictive Accélérée », ou « *Accelerated Predictive Stability* » en anglais, apparaissent intéressants. La dénomination « ASAP » pour « *Accelerated Stability Assessment Program* » est aussi communément rencontrée, et a été popularisée par Waterman et son équipe qui a beaucoup travaillé sur ce sujet [47, 48] . Ce type d'études ASAP correspond à des essais de stress court terme sur le médicament, en le soumettant à des températures et humidités élevées, mais en incluant une analyse statistique et la modélisation des données générées, afin de permettre une prédiction de la stabilité du produit dans des conditions réelles de conservation.

2. Aspects théoriques

Les études ASAP sont basées sur les deux principes suivants : l'utilisation de l'équation d'Arrhenius modifiée et l'utilisation d'une approche d'isoconversion, associés à une analyse statistique et la modélisation des données générées [49].

a. L'équation d'Arrhenius modifiée

Il est bien connu que la température entraine en général une accélération de la dégradation des produits. En 1889, Svante August Arrhenius a décrit la relation existant entre la vitesse d'une réaction chimique et la température, appelée loi d'Arrhenius, et définie par l'équation 1. Elle est souvent rencontrée sous sa forme logarithmique (équation 2).

$$k = A \times e^{(-Ea/RT)} \quad (1)$$

$$Ln(k) = LnA - \frac{Ea}{RT} \quad (2)$$

k : vitesse de réaction

A : Facteur pré-exponentiel

Ea : Energie d'activation

R : constante des gaz parfaits

T : température

Le facteur pré exponentiel, aussi appelé facteur de fréquence, est proportionnel à la fréquence des chocs entre molécules. L'énergie d'activation correspond à l'énergie qui doit être apportée pour que la réaction puisse se produire.

A partir de l'équation 2, il est possible de représenter Ln(k) en fonction de l'inverse de la température (1/T). En théorie, on obtient une droite, dont la pente correspond à (Ea/R) et dont l'ordonnée à l'origine correspond à lnA. Pour construire cette droite, la vitesse de réaction est déterminée à différentes températures (en générale, des températures élevées). Ainsi, la vitesse de la réaction peut être extrapolée pour d'autres températures, généralement plus faibles. Un exemple de graphique est donné Figure 8.

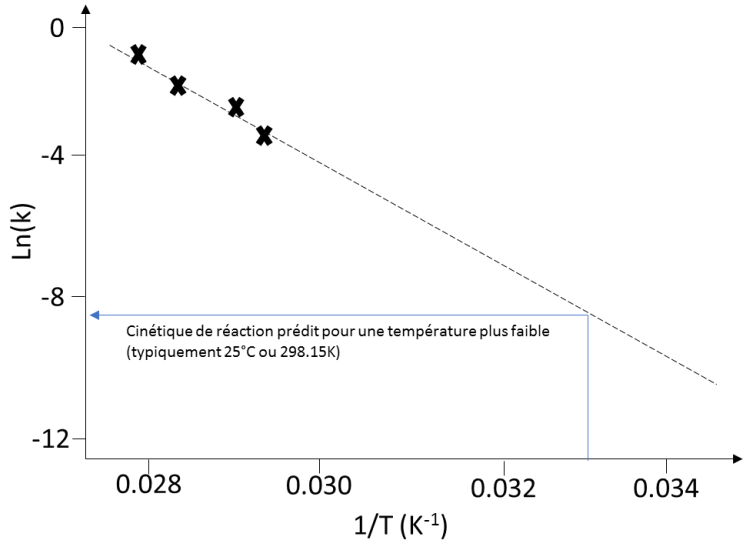


Figure 8 : Représentation graphique de l'équation d'Arrhénius sous sa forme logarithmique

Ainsi, l'équation d'Arrhenius peut être utilisée pour modéliser des réactions de dégradation des principes actifs. Dans le cas des médicaments sous formes liquides, l'équation d'Arrhenius est généralement applicable. Dans le cas des médicaments sous formes solides, la seule équation d'Arrhenius apparait peu exploitable. En effet, dans le cas des réactions chimiques à l'état solide, des paramètres autres que la température doivent être pris en compte, et en particulier l'impact de l'humidité, connue pour affecter la cinétique d'une réaction. L'humidité peut par exemple augmenter la mobilité moléculaire, elle peut être un réactif de réaction (cas des réactions d'hydrolyse), un catalyseur etc.. Plusieurs études ont pu montrer des cinétiques de dégradation différentes en fonction de la teneur en humidité [50-52].

L'équation 3, ou sous sa forme logarithmique, équation 4, permet de relier la cinétique de réaction avec la teneur en humidité [49]. A température constante, il existe une relation linéaire entre Ln(k) et l'humidité relative.

$$k = constante + e^{B(HR)} \quad (3)$$

$$Ln(k) = constante + B(HR) \quad (4)$$

Avec B: Paramètre sensible à l'humidité

HR : Humidité relative

Ainsi, l'impact de la température et de l'humidité sur la cinétique de réaction peuvent être combinés. L'équation 5, appelée équation d'Arrhenius modifiée, a ainsi été proposée [47, 50]. Une représentation graphique de cette équation est donnée Figure 9. Les paramètres LnA, Ea et B peuvent ainsi être déterminés par régression linéaire multiple, à partir de données expérimentales déterminant Ln(k) à différentes températures et humidités relatives. L'utilisation de cette approche a permis de correctement modéliser la dégradation de différents produits pharmaceutiques. Par exemple, Naveršnik *et al* ont obtenu une prédiction sur 24 mois en accord avec les données réelles de stabilité pour des comprimés de vitamines, à partir de données issues de 35 jours de stress [51].

$$Lnk = LnA - \frac{Ea}{RT} + B(HR) \quad (5)$$

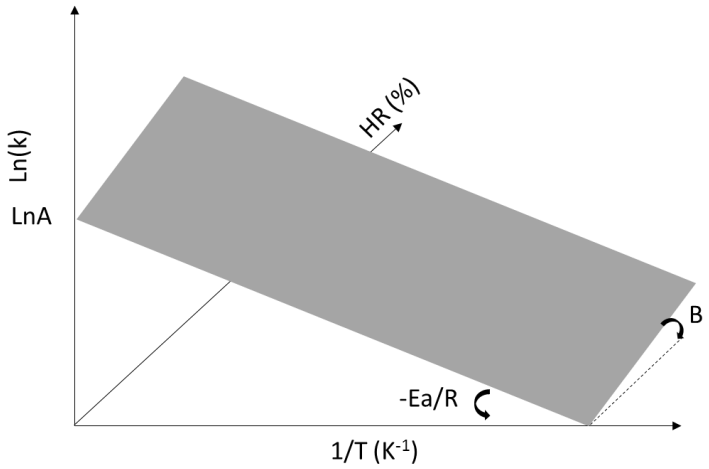


Figure 9 : Représentation graphique de l'équation d'Arrhénius modifiée

b. L'approche par isoconversion

Dans les équations 2 et 5 exprimant l'équation d'Arrhénius et l'équation d'Arrhénius modifiée, k représente la vitesse de réaction. Dans le contexte d'évaluation de la stabilité d'un médicament, k représente soit la dégradation du principe actif en fonction du temps, soit l'apparition d'un produit de dégradation (PDD) en fonction du temps. Dans le cas d'une réaction d'ordre zéro, k peut être obtenu par l'équation 6 suivante :

$$k = \frac{\%Deg(t)}{Temps} \quad (6)$$

Avec %Deg(t): Dégradation du principe actif ou apparition d'un PDD, obtenu après un temps t, exprimé en pourcentage par rapport au total de produit.

Il est rare qu'un produit présente une dégradation d'ordre zéro. Des cinétiques d'ordre 1 ou 2 sont plus communément rencontrées. De plus, et en particulier dans le cas de médicaments sous formes solides, le profil de dégradation peut être non linéaire, avec par exemple la présence d'états physiques différents, présentant des profils de dégradation différents dans les différentes conditions de stress [48, 53]. Également, dans le cas de réactions multiples, avec un produit A donnant le produit B (réaction 1), lui-même dégradé en produit C (réaction 2), les cinétiques des réactions 1 et 2 peuvent être différentes en fonction de la température et ou de l'humidité. Dans ces cas, les profils de dégradation seront alors différents en fonction des conditions de stress, avec un profil de dégradation ne suivant pas l'équation d'Arrhénius, et entrainant des prédictions fausses.

L'approche par isoconversion permet de s'affranchir de la connaissance du profil de dégradation du produit étudié. Le point d'isoconversion, ou le temps d'isoconversion, correspond au temps nécessaire, pour chaque condition de stress, pour obtenir un niveau de dégradation d'intérêt (%Deg(intérêt)). En général, ce niveau de dégradation d'intérêt correspond au niveau maximal toléré dans le produit pharmaceutique, déterminé par les ICH Q3B, reporté dans le tableau 1 [3]. Dans l'approche par isoconversion, il s'agit alors de déterminer, pour chaque condition de stress, la vitesse de dégradation k_{iso} permettant d'obtenir %Deg(interêt) (équation 7). La difficulté dans cette approche d'isoconversion est donc de d'obtenir, pour chaque condition de stress, une dégradation proche de ce niveau de dégradation d'intérêt.

$$k_{iso} = \frac{\%Deg(intérêt)}{Temps} \quad (7)$$

c. Modélisation des données

Par régression linéaire simple (cas de l'équation d'Arrhenius ; un facteur : température) ou multiple (cas de l'équation d'Arrhenius modifiée ; deux facteurs : température et humidité relative), il est possible de déterminer la cinétique de réaction dans d'autres conditions de températures et d'humidités relatives que celles utilisées lors des études de stress court terme. Il est donc possible de déterminer la cinétique de réaction et la vitesse de dégradation du produit d'intérêt dans les différentes conditions de conservation définies par les ICH [3], et ainsi de modéliser la dégradation du produit dans le temps dans les conditions ICH.

L'utilisation d'une approche statistique permet d'estimer la variabilité associée à la dégradation prédite (intervalle de confiance). En effet, il est important d'obtenir à la fois la quantité de produit de

dégradation prédit à chaque temps, et l'intervalle de distribution estimé. Cet intervalle doit prendre en compte la variabilité de la mesure expérimentale, notamment de la méthode analytique utilisée pour mesurer la dégradation du produit. D'autres sources de variabilité existent comme la variabilité de la température ou de l'humidité relative lors des stress, ou encore la durée d'exposition. La majorité des logiciels utilisés pour traiter des données ASAP déterminent les intervalles de confiance *via* la méthode de simulation Monte Carlo. Ils permettent d'évaluer la variabilité associée aux temps d'isoconversion déterminés pour chaque condition de stress, et la variabilité associée aux paramètres Ea, B et LnA du model. Pour chacun des paramètres, un certain nombre de simulations aléatoires sont faites à partir des données expérimentales, afin d'associer une distribution statistique à chaque paramètre. Plus le nombre de simulations est important, plus le model sera précis. La Figure 10 schématise différentes simulations pour déterminer les paramètres du model d'Arrhénius (cas de la température uniquement). Un certain nombre de point sélectionnés de façon aléatoire dans l'intervalle de Lnk_{iso}±SD pour chaque température de stress permet de tracer une série de droites de pente (Ea/R) et d'intersection LnA, et ainsi de déterminer la variabilité associée à ces paramètres.

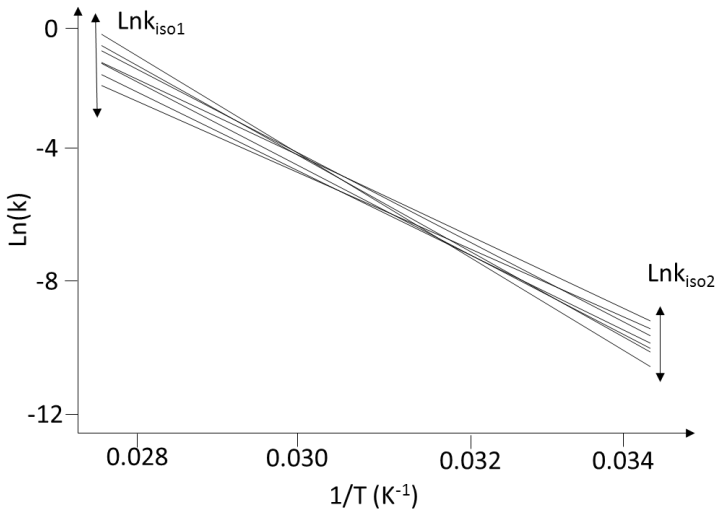


Figure 10 : Représentation schématique de la variabilité associée à la détermination des paramètres de l'équation d'Arrhenius

Chapitre 2 : Stratégie de recherche et agents thérapeutiques étudiés

A. Approche générale : développement analytique et approche prédictive de la stabilité

Dans un contexte aussi crucial que la production et l'administration de produits à visée thérapeutiques, **les études effectuées au cours de ces travaux de thèse ont pour but de développer une méthodologie intégrée permettant l'évaluation et la modélisation de la stabilité de différents produits pharmaceutiques**. Ainsi l'approche méthodologique développée se structure, pour une molécule donnée, autour de trois éléments fondamentaux.

Dans un premier temps, il convient d'effectuer le développement et la validation de méthodes analytiques permettant l'identification et l'évaluation des produits de dégradation issus de la molécule étudiée. Il convient de noter que les méthodes analytiques mises en œuvre doivent être adaptées et en adéquation avec les caractéristiques physico-chimique de la molécule étudiée et des produits de dégradation générés. Cette étape permet également d'évaluer en première approche l'impact de différents types de stress sur la dégradation de la molécule thérapeutique, et de déterminer les produits de dégradation principaux de la molécule.

Dans un second temps, une méthodologie prédictive de type ASAP a été appliquée à la molécule d'intérêt afin de générer une modélisation à long terme par rapport à la formation des principaux produits de dégradation. Les données permettant la modélisation sont issues d'expériences de dégradations forcées effectuées sur des périodes courtes. De ce fait, elles ne peuvent être obtenues que par l'intermédiaire de méthodes analytiques spécifiquement adaptées à la caractérisation des produits de dégradations visés.

Enfin, les travaux effectués se sont concentrés sur la confrontation systématique de la modélisation ASAP aux données expérimentales obtenues en conditions réelles de conservation de l'agent thérapeutique étudié. Cette comparaison permet de valider le caractère prédictif de la modélisation ASAP générée lors des études de dégradation forcée et d'évaluer en parallèle les limitations de ce type de prédiction long terme de la stabilité de la molécule thérapeutique étudiée.

Au cours des travaux de thèse présentés dans cet ouvrage, cette approche méthodologique intégrée a été appliquée à l'étude de différents types de molécules pharmaceutiques :

- L'acide ascorbique (Partie 3).
- Le peptide cFEE, un hexapeptide cyclique (Partie 4)
- L'anticorps monoclonal infliximab ainsi que deux biosimilaires associés (Partie 5)

Ainsi la comparaison systématique des données expérimentales issues de la conservation en conditions réelles avec la modélisation ASAP a pour but la pertinence et l'adéquation de l'approche méthodologique développée à l'étude de la stabilité de différents types de molécules thérapeutiques. De plus les travaux se sont concentrés sur les spécificités et les limitations inhérentes aux différents types de molécules thérapeutiques étudiés.

Le chapitre suivant a pour objectif de définir de manière détaillée les différents produits thérapeutiques étudiés au cours de ces travaux de thèse, notamment afin de fournir les informations concernant la structure et les propriétés des différentes molécules étudiées. Ces informations et la revue bibliographique permettent aussi de définir les problématiques en termes de stabilité inhérent à chacune des molécules étudiées, ainsi que des méthodes analytiques décrites dans la littérature.

B. Acide ascorbique

1. Introduction

L'acide ascorbique, aussi connu sous le nom vitamine C, fait partie des vitamines hydrosolubles essentielles au fonctionnement de l'organisme. Elle a été découverte en 1928 par Albert Szent-Györgyi qui a reçu le prix Nobel de médecine en 1937 pour ces travaux [54]. La Figure 11 présente sa structure.

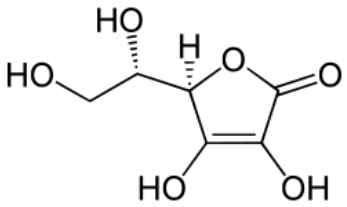


Figure 11 : Formule développée de l'acide ascorbique

Il s'agit d'un cofacteur enzymatique impliqué dans de nombreux processus biologiques: synthèse des globules rouges [55], système immunitaire [56], absorption du fer [57], action antioxydante [58] ou encore dans la synthèse du collagène [59]. Les êtres humains ne sont pas capables de synthétiser l'acide ascorbique. Il doit donc être absorbé par l'alimentation. Sans cela, des carences sont observées, qui vont de la simple asthénie jusqu'au scorbut, forme grave et fatale de déficience en vitamine C [60]. Des médicaments ayant pour principe actif la vitamine C sont ainsi disponibles sous forme de comprimés afin de lutter contre « la fatigue passagère » ou sous forme de solution injectable dans le cadre du scorbut. Par son action antioxydante, l'acide ascorbique est également présent dans des produits pharmaceutiques en tant qu'excipient, et non en tant que principe actif, afin d'éviter l'oxydation du principe actif auquel il est associé.

L'acide ascorbique se présente sous forme d'une poudre blanche cristallisée, inodore et particulièrement hydrosoluble. Ses propriétés physico chimiques sont présentées dans le Tableau 2

Tableau 2 : Principales propriétés physico chimiques de l'acide ascorbique

Propriétés	Valeurs
Masse molaire (g/mol)	176,12
Solubilité dans l'eau à 25°C (g/L)	330
Log P	- 1,85
pKa	4,17 ; 11,57

2. Voies de dégradation

L'ascorbique suit deux voies de dégradation, en fonction de la présence ou de l'absence d'oxygène, comme présenté Figure 12. En absence d'oxygène (Figure 12 A), l'acide ascorbique est hydrolysé et décarboxylé en différents produits de dégradations intermédiaires et *in fine* en furfural. En présence d'oxygène (Figure 12 B), il est oxydé en acide déhydroascorbique (DHAA), puis dégradé en acide 2,3 diketoglucuronic, en tri-hydroxy-keto-valeraldehyde (TKV) (aussi appelé L-xylosone) et *in fine* dégradé en acide furoïque ou en 3-hydroxy-2-pyrone [61]. Ces voies de dégradation sont accélérées par la température.

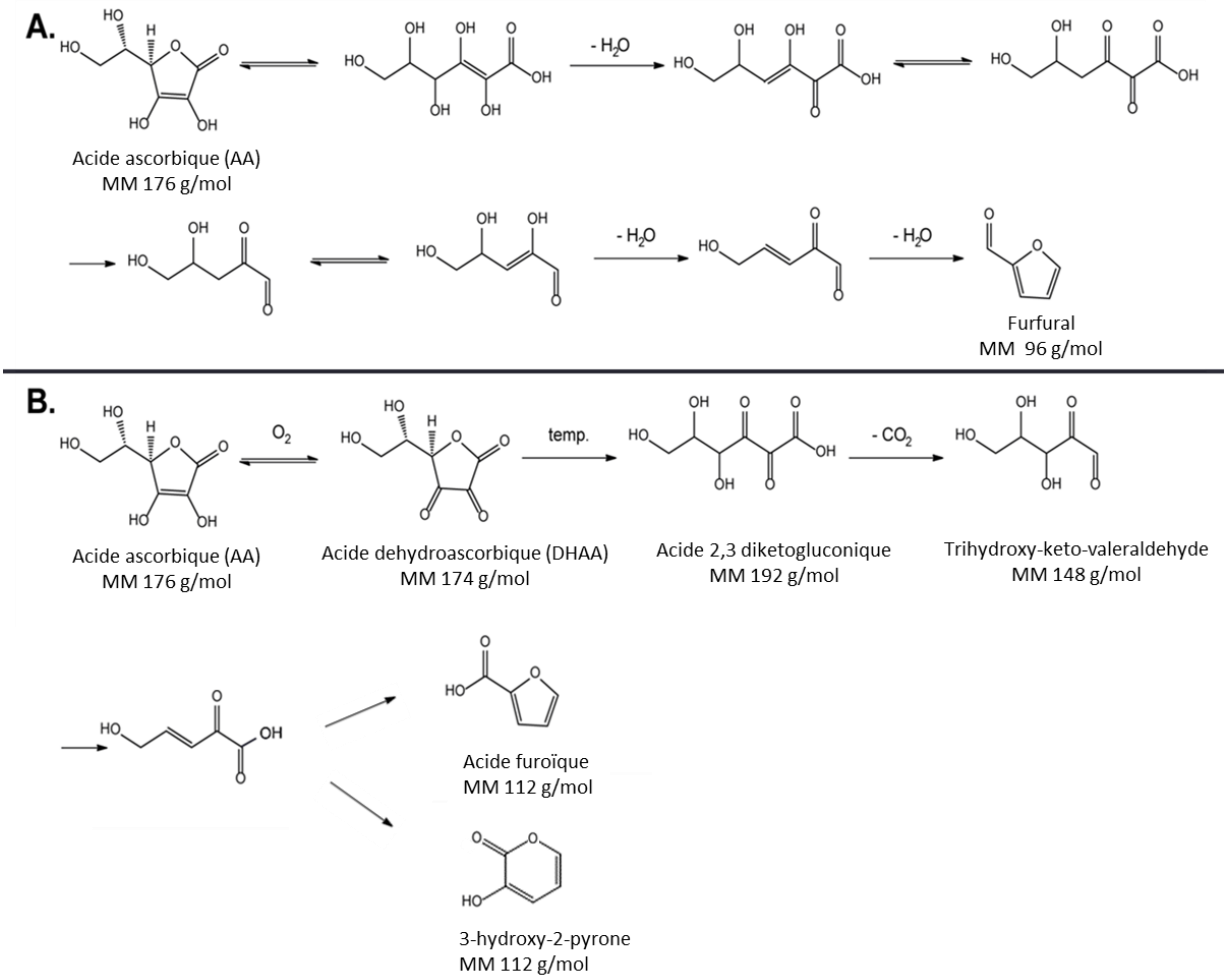


Figure 12 : Voie de dégradation de l'acide ascorbique en absence (A) et en présence (B) d'oxygène. Adapté de [61]

3. Méthodes analytiques

Le dosage et le suivi de la stabilité des produits pharmaceutiques sont principalement réalisés par des techniques chromatographiques, en particulier de type chromatographie liquide en phase inverse. Néanmoins, l'acide ascorbique est une molécule polaire. Dans ce cas, il peut s'avérer difficile d'obtenir une rétention et une séparation suffisante des principes actifs et des produits de dégradations ou impuretés de synthèse associées. Deux types de techniques séparatives apparaissent intéressantes pour l'analyse de composés polaires : la chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) et la CZE, qui ont ainsi été appliquées à l'analyse de l'acide ascorbique.

La CZE est une technique analytique particulièrement adaptée à la séparation de molécules polaires, permettant également d'obtenir une bonne séparation de molécules ayant des différences de structures mineures [62, 63]. La CZE a déjà été appliquée pour l'étude de l'acide ascorbique, associée à la détection par ampérométrie / conductimétrie [64, 65], ou à la détection UV dans des matrices variées : plantes [66], fruits et légumes [67-69] ou encore dans des matrices biologiques comme le plasma humain [70], et des produits pharmaceutiques [71]. Cependant, les méthodes décrites concernent surtout l'analyse et le dosage de l'acide ascorbique seul ou avec le dosage d'autres vitamines hydro solubles. L'aspect dégradation de l'acide ascorbique et l'analyse de ses produits de dégradation ne sont pas forcément pris en compte, excepté certains articles mentionnant l'analyse du DHAA. Dans ces cas, l'analyse est réalisée principalement par la quantification de l'acide ascorbique totale après réduction du DHAA [66, 69, 72]. De ce fait, les méthodes décrites dans la littérature ne permettent pas d'analyser de façon complète la dégradation de l'acide ascorbique, et ne sont pas applicables au suivi de sa stabilité dans les produits pharmaceutiques. Neuberger *et al* ont développé une méthode en CZE-CZE-MS utilisant un couplage de deux CZE pour la détection de l'acide ascorbique et de l'acide acétylsalicylique, ainsi que de leurs produits de dégradations dans des produits pharmaceutiques de type comprimés [71]. Cependant, les produits de dégradation qui sont décrits dans cette publication concernent uniquement ceux issus de l'acide acétylsalicylique et ne concernent pas l'acide ascorbique.

L'analyse de composés polaires peut être également réalisée par HILIC. Plusieurs méthodes d'analyse de l'acide ascorbique en HPLC-HILIC sont décrites dans la littérature [73-76]. La méthode décrite à la Pharmacopée Européenne pour l'analyse des impuretés de synthèse de l'acide ascorbique est également une méthode par HPLC-HILIC [77]. Cependant la chromatographie HILIC est une technique qui peut apparaitre complexe, qui demande des temps de développement relativement longs, et qui comprend globalement un temps conséquent de stabilisation de la colonne, une robustesse faible, et une consommation de solvant organique très importante. Au contraire, la CZE apparait comme une

technique plus simple, rapide, permettant d'obtenir de très bonnes résolutions, avec des coûts en termes de consommables ou de solvants moins importants, ainsi qu'un impact environnemental faible [78]. Par contre, la CZE souffre d'un manque de sensibilité lié à la faible dimension du trajet optique au niveau du détecteur. Cet aspect peut être limitant lorsque l'on considère la recherche de produits de dégradation. Une méthode de recherche d'impureté doit en effet être capable de détecter les produits de dégradation à des seuils très faibles (0,05% à 1,00%) [3]. Ceci peut expliquer que peu de méthodes en CZE sont décrites dans la littérature pour la recherche de produits de dégradation de produits pharmaceutiques. Néanmoins, Mufumasa *et al* ont décrit récemment une méthode de recherche de produit de dégradation de l'amodiaquine en CZE-UV montrant l'applicabilité d'une telle technique pour le suivi de stabilité des produits pharmaceutiques [79].

4. Cadre du travail

Une méthode en CZE-UV a été développée et validée pour l'analyse de la stabilité de l'acide ascorbique dans différents produits pharmaceutiques, et ce travail a fait l'objet d'une publication [80]. Dans un second temps, une étude prédictive de stabilité a été réalisée sur l'un des produits pharmaceutiques disponibles sur le marché (Laroscorbine® IV 1g/5mL). L'analyse des échantillons a été réalisée par la méthode en CZE-UV développée.

C. Peptide cFEE

1. Introduction

Le peptide cFEE est un peptide cyclique de six acides aminés : FEECCS (Phénylalanine (Phe), Acide glutamique (Glu), Acide glutamique (Glu), Cystéine (Cys), Cystéine (Cys), Sérine (Ser)). Il est cyclisé au niveau des deux cystéines par un pont disulfure. Sa structure est présentée Figure 13.

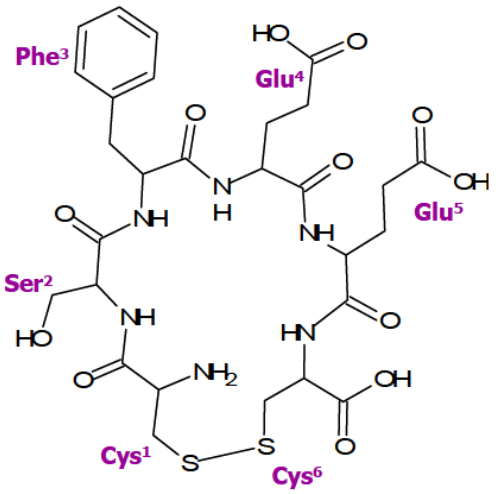


Figure 13 : Structure en acide aminés du peptide cFEE

Le peptide cFEE fait actuellement l'objet d'un essai clinique afin d'évaluer son intérêt pour favoriser le taux de réussite de fécondation *in vitro* (FIV) [81]. Ce peptide est synthétisé pour mimer le site de fixation entre la fertiline β et l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$. La fertiline β, aussi appelée ADAM2 fait partie de la famille des désintégrines et métalloprotéases (ADAM : *A Disintegrin And Metalloprotease*). Il s'agit d'une famille de protéines transmembranaires impliquées dans divers processus d'interactions entre cellules ou entre les cellules et la matrice extracellulaire [82, 83]. Elles possèdent un large domaine extracellulaire composé de 5 domaines, parmi lesquelles le domaine désintégrine, impliqué dans les phénomènes d'interactions. La fertiline β est localisée à la surface des spermatozoïdes. Son récepteur, l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ se situe à la surface des ovocytes. L'interaction entre ces deux protéines a été identifiée comme un paramètre clef dans le processus de fertilisation et de fusion des gamètes [84, 85]. En effet, de nombreuses études *in vitro* montrent que l'inhibition spécifique de l'interaction entre ces deux protéines empêche le processus de fusion des gamètes [85-88]. Cette inhibition *in vitro* est réalisée par l'ajout dans le milieu d'un peptide mimant le site de fixation de la protéine fertiline β

à l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$, agissant alors comme agent compétiteur. Lors de l'ajout de ce peptide compétiteur dans le milieu, l'interaction entre la fertiline β et l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ est diminuée. Les résultats de ces études ont montré une diminution de la fusion entre spermatozoïdes et ovocytes. Des essais réalisés *in vivo* montrent également l'importance de la fertiline β dans la fécondation : Cho *et al* ont montré que sur les souris dont le gène codant pour la fertiline β était supprimé, les individus étaient rendus stériles [89].

Les études *in vitro* citées précédemment ont été réalisées sur des gamètes de souris. Ziyyat *et al* ont souhaité évaluer l'importance de l'interaction entre la fertiline β et l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ sur des gamètes humains [90]. La séquence d'acides aminés impliquée dans l'interaction avec l'intégrine est spécifique à l'espèce : QDE chez la souris, FEE chez l'homme [91]. Afin de réaliser cette étude *in vitro* sur des gamètes humains, le peptide cFEE a été développé. Le site de liaison entre la Fertiline β et l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$, c'est-à-dire le domaine désintégrine de la fertiline β, se situe au niveau d'une structure en épingle à cheveux. Afin de se rapprocher de cette structure, le peptide a été cyclisé par l'ajout de 2 cystéines de part et d'autre de la séquence FEE, et la formation d'un pont disulfure [90]. De façon inattendue, Ziyyat *et al* n'ont pas observé une inhibition mais une augmentation de la fusion entre les spermatozoïdes et les ovocytes lors de l'ajout du peptide cFEE dans le milieu de FIV [90]. La même équipe a ensuite montré, en utilisant l'équivalent murin du peptide cFEE (peptide cQDE), une augmentation du taux de grossesse après une FIV [81]. L'action inattendue du peptide pourrait être liée à la fois à sa composition en acides aminés et à sa structure. D'autres exemples d'activités différentes en fonction de la conformation d'un peptide sont retrouvés dans la littérature : le peptide linéaire CAQDEC diminue la fusion des gamètes, tandis que sa forme cyclisée ne présente pas d'effet inhibiteur [92].

Le peptide cFEE se présente sous forme de lyophilisat de couleur blanc à blanc cassé. Le Tableau 3 présente les propriétés physico chimiques disponibles du peptide cFEE.

Tableau 3 : Principales propriétés physico chimiques du peptide cFEE

Propriétés	valeurs
Formule moléculaire	$C_{28} H_{38} N_6 O_{12} S_2$
Composition en acides aminés	FEECCS
Masse molaire (g/mol)	714,79 (masse moyenne)
Contre ion	Acide trifluoroacétique

2. Voies de dégradation

De par sa nature peptidique, le peptide cFEE peut subir différents mécanismes de dégradation chimiques ou physiques. Compte tenu de sa structure chimique, les modifications chimiques peuvent inclure des hydrolyses de la liaison peptidiques ou des chaînes latérales, des oxydations, des racémisations, des isomérisations, des β éliminations, des ruptures du pont disulfure. Les modifications physiques comprennent l'agrégation, la précipitation, ou le changement de conformation du peptide [93]. Certaines modifications chimiques sont liées à la présence de certains acides aminés. Par exemples, les oxydations concernent les acides aminés cystéine, méthionine, histidine, tyrosine et tryptophane. Les β éliminations (élimination du groupement situé en β du carbone asymétrique d'un acide aminé) concernent en particulier les acides aminés cystéine, sérine, lysine, phénylalanine et thréonine [93].

Un travail réalisé précédemment au laboratoire de l'AGEPS a étudié les voies de dégradation majoritaire du peptide cFEE, par la réalisation de dégradation forcée [94]. La voie de dégradation majoritaire est une hydrolyse de la liaison peptidique entrainant la linéarisation du peptide. Cette réaction est potentialisée par la température et le pH acide. En fonction de la localisation de la rupture de la liaison peptidique, 5 produits de dégradation ont été identifiés : FEECCS, SFEECC, CCSFEE, ECCSFE et EECCSF. Une autre voie de dégradation potentialisée par le pH alcalin est l'hydrolyse des liaisons peptidiques associée à une β élimination au niveau des deux acides glutamiques. Les 5 produits de dégradation sont : FE(-Rβ)E(-Rβ)CCS, SFE(-Rβ)E(-Rβ)CC, CCSFE(-Rβ)E(-Rβ), E(-Rβ)CCSFE(-Rβ) et E(-Rβ)E(-Rβ)CCSF. Par ailleurs, Rotival *et al* ont évalué la dégradation du peptide après 6 mois à 25°C à la concentration de 7,2 mg/mL [95]. Les seuls produits de dégradation obtenus sont liés à l'hydrolyse de la liaison peptidique, avec la présence du produit de dégradation majoritaire ECCSFE, résultant de la rupture de la liaison peptidique entre les deux acides glutamiques.

3. Méthodes analytiques

La majorité des méthodes analytiques appliquées à l'analyse des peptides sont des méthodes chromatographiques en phase inverse [96], permettant l'analyse de la structure primaire du peptide. Concernant le peptide cFEE, une seule méthode publiée par Rotival *et al [95]* est décrite dans la littérature. Il s'agit d'une méthode en chromatographie liquide couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), utilisant une séparation en HPLC en phase inverse.

Cette méthode permet l'analyse du peptide et de ses produits de dégradation. Cette même méthode a été utilisée dans le cadre de ce travail, et est détaillée en Partie 2.II.B.

4. Cadre du travail

Dans un premier temps, la structure spatiale du peptide cFEE, non encore décrite, a été évaluée par dichroïsme circulaire et spectroscopie Raman. Cette structure est directement reliée à la séquence et au maintien de la cyclisation du peptide. Dans un deuxième temps, l'analyse du peptide a été réalisée en LC-MS/MS, technique plus sensible pour évaluer le maintien de l'intégrité de la séquence lors de l'étude de stabilité du peptide. Une étude prédictive de la stabilité du peptide a été réalisée, *via* la méthodologie ASAP.

D. Infliximab

1. Introduction

L'infliximab est un mAbs chimérique (Figure 4). Il a d'abord été développé par l'entreprise Janssen Biologics et a obtenu une AMM en 1998 aux USA et en 1999 en Europe sous la dénomination commerciale Remicade®. Depuis 2013, quatre biosimilaires ont obtenu une AMM en Europe : Remsima® (Celltrion), Inflectra® (Pfizer) et Flixabi® (Samsung Biopis), et plus récemment Zessly® (Sandoz). Leurs caractéristiques sont présentées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Les différentes formes d'infliximab titulaire d'une AMM en Europe

Nom commercial	Laboratoire titulaire de l'AMM	Présentation	Excipients	Lignée cellulaire
Remicade®	Janssen Biologics	100 mg / lyophylisat	saccharose, polysorbate 80, phosphate monosodique, phosphate disodique	Sp2/0
Remsima®	Celltrion Healthcare	100 mg / lyophylisat	saccharose, polysorbate 80, phosphate monosodique monohydrate, phosphate disodique dihydrate	Sp2/0
		120mg/1mL en seringue préremplie	acide acétique, acétate de sodium trihydraté, sorbitol, polysorbate 80, eau pour préparations injectables	Sp2/0
		120mg/1mL en stylo prérempli	acide acétique, acétate de sodium trihydraté, sorbitol, polysorbate 80, eau pour préparations injectables	Sp2/0
Inflectra®	Pfizer Europe	100 mg / lyophylisat	saccharose, polysorbate 80, phosphate monosodique monohydrate, phosphate disodique dihydrate	Sp2/0
Flixabi®	Samsung Bioepis	100 mg / lyophylisat	saccharose, polysorbate 80, phosphate monosodique monohydrate, phosphate disodique heptahydrate	CHO
Zessly®	Sandoz GmbH	100 mg / lyophylisat	Succinate disodique hexahydraté Acide succinique Saccharose Polysorbate 80	CHO

a. Mécanisme d'action

L'infliximab est un immunosuppresseur utilisé dans le traitement des différentes maladies auto-immunes suivantes : maladie de Crohn, spondylarthrite ankylosante, psoriasis, arthrite rhumatoïde et colite ulcéreuse [97]. Son mécanisme d'action est lié à l'antigène ciblé : l'infliximab est un anti TNF α (*Tumor necrosis factor*, facteur de nécrose tumorale). Le TNF α est une cytokine principalement produite par les macrophages lors du processus inflammatoire, qui intervient dans l'activation de

l'apoptose, la survie cellulaire et dans l'activation d'autres cytokines et protéines lors de la phase aigüe de l'inflammation [98]. Dans le cas des maladies auto-immunes, également appelées maladies inflammatoires chroniques, le TNF α est surexprimé. L'administration d'infliximab permet alors de bloquer les cascades de signalisation cellulaire induite par le TNFα, comme présenté dans la Figure 14. Le TNF α existe sous forme soluble (sTNF) et sous forme précurseur, transmembranaire (tmTNF). Lorsque les cellules productrices de TNF α sont activées, le sTNF est libéré dans le milieu par action de la TACE (*TNF α converting enzyme*) à partir du tmTNF. Les deux formes de TNF α sont actives biologiquement et peuvent se lier aux récepteurs TNFR1 et TNFR2 entrainant alors une réponse cellulaire, aboutissant soit à une apoptose ou à l'activation de la voie du NF-κB et des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire [98].

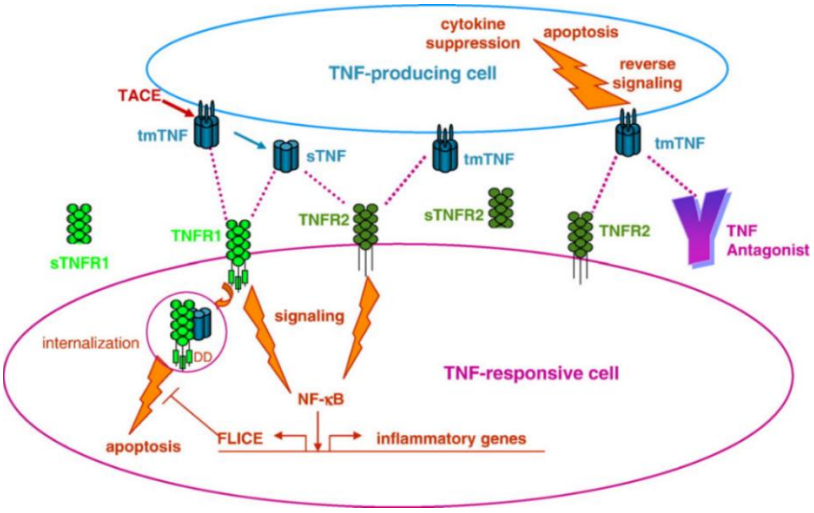


Figure 14 : Représentation schématique de la voie de signalisation liée au TNFα et le mode d'action des anticorps anti-TNFα [98]

L'infliximab peut se lier à la forme soluble et transmembranaire du TNF α avec une grande affinité. En effet, il possède une constante de dissociation de l'ordre du picomolaire de $2{,}73 \times 10^{-11}$ M [99]. La formation des complexes infliximab-TNFα empêche la liaison entre le TNFα et ses récepteurs cellulaires, et inhibe donc l'activation de la cascade cellulaire correspondante [98, 100]. L'infliximab peut également entrainer la lyse des cellules effectrices de TNFα *via* l'activation de la voie du complément (CDC : *cell-dependent cytotoxicity*) ou de la voie appelée cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC : a*ntibody-dependent cell-mediated cytotoxicity).* L'activation de ces deux voies sont liées aux fonctions effectrices de l'infliximab.

b. Fonctions effectrices

Comme tous les mAbs, l'infliximab possède une partie Fc (Figure 3) composée des domaines CH2 et CH3, qui porte les fonctions effectrices du mAbs. Ces fonctions effectrices sont médiées par la liaison du mAbs avec les récepteurs spécifiques FcγR (voie ADCC) et le complément C1q (voie CDC). Lorsque le mAbs se fixe sur sa cible via son fragment Fab, il y a modification du fragment Fc. Celui-ci devient alors capable d'activer la voie du complément CDC par l'intermédiaire du complexe C1. L'activation de cette voie entraine une suite d'étapes aboutissant à la création de pores dans la membrane de la cellule cible, et à sa lyse. Dans le cas de la voie ADCC, la lyse cellulaire induite par l'anticorps est liée au recrutement de cellules portant des récepteurs FcγR, comme les macrophages ou les cellules NK (*natural killer*), qui vont phagocyter ou entrainer la lyse de la cellule cible.

Par ailleurs, le fragment Fc des IgG peut également se lier au récepteur néonatal au fragment Fc (FcRn, *neonatal Fc receptor*), exprimé à la surface de nombreux types cellulaires. L'une des fonctions importantes du FcRn est le recyclage : la liaison entre le mAbs et le FcRn entraine l'endocytose du mAbs. Il est ensuite restitué intact dans la circulation plasmatique. Ceci le protège du catabolisme plasmatique. Ce processus de recyclage explique la demi-vie relativement longue des IgG d'environ 3 semaines [101]. Le FcRn peut se lier aux IgG endogènes comme aux IgG thérapeutiques tel que l'infliximab. La capacité de l'anticorps thérapeutique à lier le FcRn influence alors fortement sa pharmacocinétique. La structure de l'anticorps, ainsi que la glycosylation portée par le fragment Fc peut influencer l'affinité de liaison avec le FcRn [102].

2. Propriétés physico-chimiques

L'infliximab est un mAbs chimérique de type IgG1. La partie variable est d'origine murine, la partie constante est d'origine humaine. La formule chimique de sa chaîne peptidique est la suivante : $C_{6428}H_{9912}N_{1694}O_{1987}S_{46}$, avec une masse molaire de 144,2 kDa et un point isoélectrique (pI) de 7,2. La Figure 15 présente les caractéristiques principales de l'infliximab. La glycosylation est portée par l'asparagine N300 au niveau du domaine CH2. Les glycosylations majeures correspondent à G0F et Man5. La séquence d'acides aminés est détaillée en annexe 1. La chaine légère et la chaine lourde possèdent respectivement 214 et 450 ou 451 acides aminés, en fonction de la présence ou non de la lysine K en C-terminale.

En tant que produit thérapeutique biologique, l'infliximab possède un certain nombre de micro-hétérogénéités, qualifiées aussi de modifications post-traductionnelles (PTMs). Ces PTMs peuvent

avoir lieu au cours du process de fabrication du produit, de sa formulation, ou lors de sa conservation. Parmi les PTMs d'intérêts, on retrouve [103] :

- La déamidation des asparagines
- L'oxydation des méthionines
- L'oxydation des tryptophanes
- Les glycosylations
- Le clivage de la lysine en C-terminale

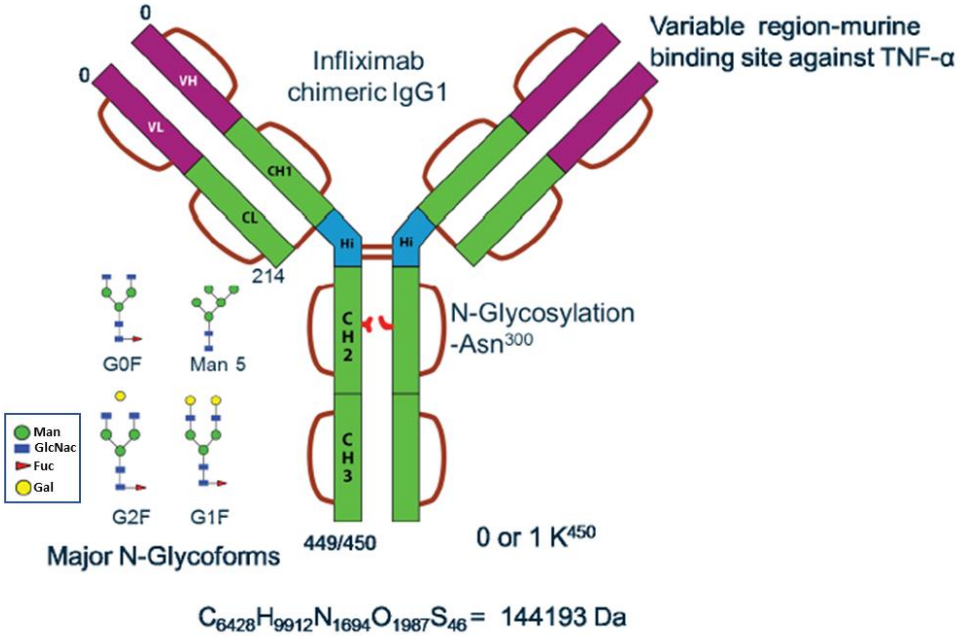


Figure 15 : Structure générale de l'infliximab [104]

3. Voies de dégradation

L'infliximab est sujet aux différentes voies de dégradations classiques des mAbs. Au niveau de la structure tertiaire, il peut s'agir de l'agrégation, de la fragmentation ou de la dénaturation de la protéine. Au niveau de la structure primaire, l'infliximab peut, en particulier, subir des oxydations et des déamidations [28, 40, 105].

a. Agrégation et fragmentation

L'une des voies majeures de dégradation des mAbs est l'agrégation. Ce phénomène correspond à l'association de deux (dimère), trois (trimère) ou plus (multimère, ou HMWS : *high molecular weigh species*) anticorps natifs ou dénaturés. L'association de plusieurs anticorps peut se faire *via* des liaisons non covalentes ou covalentes qui peuvent conduire à la formation d'agrégats solubles ou insolubles

[105]. Ce processus est par ailleurs rarement réversible. La Figure 16 présente le mécanisme de formation des agrégats, à partir de l'anticorps natif (*fold*). Dans les conditions où l'anticorps est dénaturé (*unfold*) ou partiellement dénaturé (*partly unfold*), des parties auparavant protégées deviennent exposées (en rouge sur la figure). Ces parties peuvent être hydrophobes et vont favoriser un rapprochement des anticorps dans un solvant aqueux [105]. Le pH et la force ionique du milieu impactent également la formation des agrégats. En effet, par exemple, le pH impacte la charge net et la répartition des charges au niveau de l'anticorps, ce qui modifie alors les phénomènes de répulsions ou attractions entre les anticorps [106].

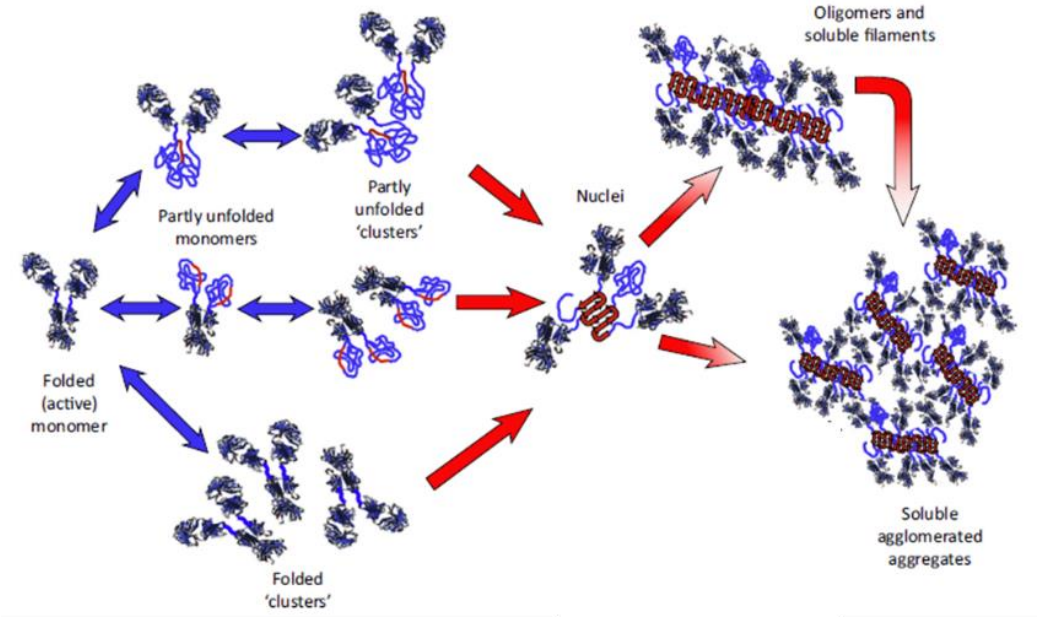


Figure 16 : Mécanisme de formation des agrégats d'anticorps monoclonaux [106]

Lors du développement des anticorps thérapeutiques, d'importants efforts sont réalisés pour éviter l'agrégation du produit. En effet, au-delà de la nécessité d'obtenir un produit « pratiquement exempt de particules » et avec des teneurs inférieures aux seuils réglementaires pour les particules de taille inférieure à 25 µm [37], les agrégats sont connus pour entrainer des réactions immunitaires chez les patients [107, 108].

En parallèle de l'agrégation, il est possible d'observer une fragmentation de l'anticorps, par rupture au niveau de la chaine peptidique, ou des ponts disulfures. La fragmentation du mAbs peut entrainer une dissociation de sa structure secondaire avec, par exemple, perte de la partie LC uniquement. Ce phénomène induit ainsi une perte d'activité totale du mAbs et une élimination rapide de celui-ci [105].

b. Oxydation et déamidations des acides aminés

Deux PTMs décrites pouvant survenir lors de la conservation du produit sont l'oxydation des méthionines (M) et des tryptophanes (W), et la déamidation des asparagines (N). Il s'agit des deux PTMs étudiés dans le cadre de ces travaux. La Figure 17 présente les réactions mises en jeu dans les deux cas. Dans le cas de la méthionine, l'oxydation entraine la formation d'un sulfoxyde. Dans le cas de l'asparagine, la déamidation correspond à la perte d'un NH_3, avec formation de succinimide, intermédiaire instable, suivi d'addition d'H_2O pour former l'acide aspartique ou isoaspartique [28].

En fonction de leur localisation, ces modifications peuvent modifier la qualité du produit. En effet, lorsqu'elles sont situées au niveau des sites du fragment Fab de liaisons à l'antigène ou au niveau des sites impliqués dans les fonctions effectrices sur le fragment Fc, ces PTMs peuvent avoir une influence sur l'affinité de liaison [105]. Lorsque la modification survient au niveau du site de liaison entre l'infliximab et le récepteur FcRn, la pharmacocinétique de l'infliximab peut être modifiée, avec une diminution de sa demi-vie si l'affinité avec le FcRn est réduite.

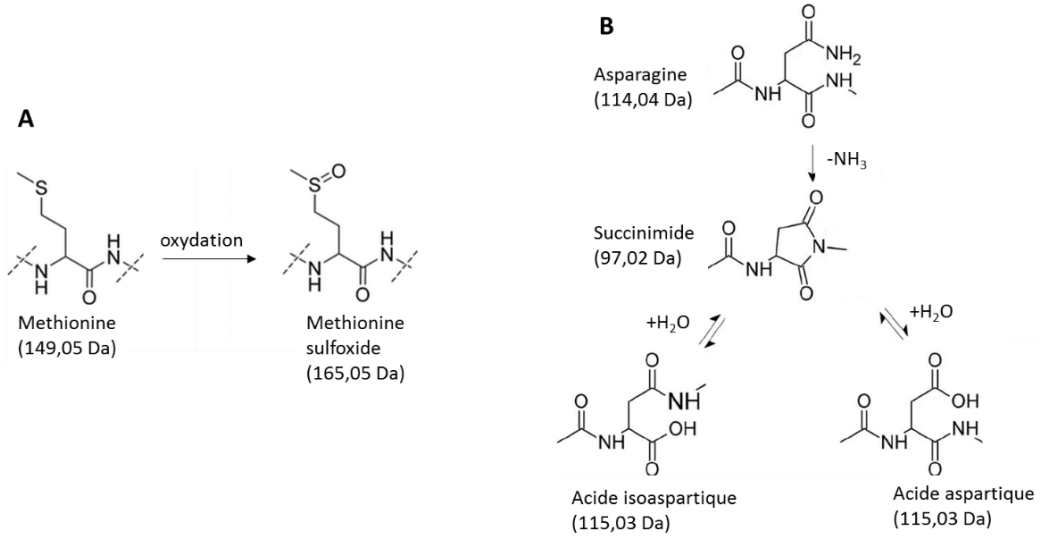


Figure 17 : Réactions d'oxydation des méthionines (A) et de déamidation des asparagines en acide aspartique (B)

Les méthionines et tryptophanes présents dans la séquence d'acide aminés de l'infliximab sont présentés dans le Tableau 5. Ils sont numérotés en fonction de leur position dans la séquence. Seuls les méthionines et tryptophanes dont l'oxydation est susceptible d'avoir un impact en termes d'activité ont été recherchés dans ces travaux de thèse. Les méthionines et tryptophanes présents au niveau des domaines variables (VR, *variable region*) et hypervariables (CDR, *complementary determining region*) sont impliqués dans la liaison entre l'anticorps et l'antigène. M255 et M431 sont situées sur la partie

constante et sont impliquées dans la liaison au récepteur FcRn et à la demi-vie plasmatique du mAb [109]. Sur la chaine lourde, W33 et M34, situés au niveau du CDR, sont situés sur le même peptide. L'oxydation a lieu sur le résidu M34 [110]. Au total, les dix acides aminés susceptibles d'avoir un impact en terme d'activité sont identifiés en rouge dans le Tableau 5. La Figure 18 permet de situer ces acides aminés au niveau de la structure tridimensionnelle de l'infliximab.

Tableau 5 : Liste des méthionines (M) et tryptophanes (W) présents dans la séquence de l'infliximab

Peptide	Acide aminé	Domaine	Impact connu
LC3	W35	VR	Liaison à l'antigène
LC6	M55	CDR	Liaison à l'antigène
LC7	W94	CDR	Liaison à l'antigène
LC12	W148	CR	
HC2	M18	VR	Liaison à l'antigène
HC3	W33	CDR	Liaison à l'antigène
HC3	M34	CDR	Liaison à l'antigène
HC3	W36	VR	Liaison à l'antigène
HC5	W47	VR	Liaison à l'antigène
HC11	M85	VR	Liaison à l'antigène
HC13	W110	VR	Liaison à l'antigène
HC16	W161	CR	
HC22	M255	CR	Liaison au récepteur FcRn
HC24	W280	CR	
HC27	W316	CR	
HC38	W384	CR	
HC42	W420	CR	
HC42	M431	CR	Liaison au récepteur FcRn

LC : chaîne légère, HC : chaîne lourde, VR : domaine variable, CDR : domaine hypervariable, CR : domaine constant, en rouge : M et W analysés

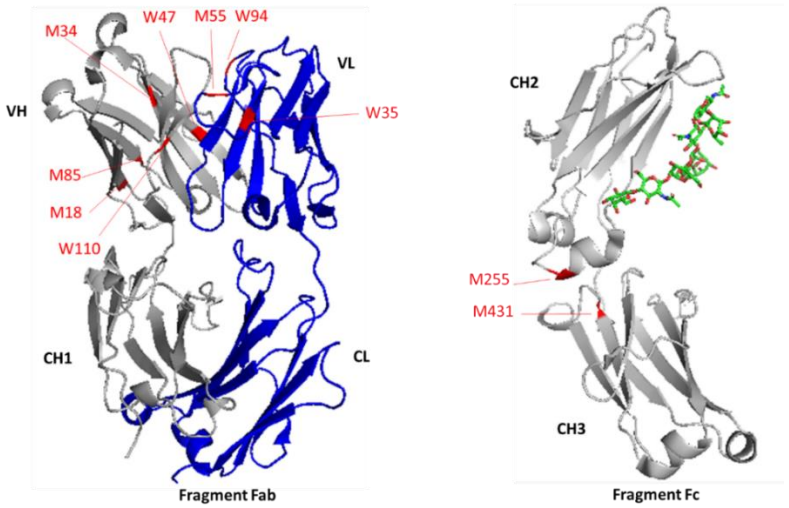


Figure 18 : Localisation des méthionines et tryptophanes d'intérêts.

Concernant les déamidations, 27 asparagines sont présentes dans la séquence de l'infliximab. Elles sont détaillées dans le Tableau 6 et numérotées en fonction de leur position dans la séquence. Les asparagines dont la déamidation est susceptible d'avoir un impact en termes d'activité sont indiquées en rouge. Comme pour les oxydations, il s'agit des asparagines positionnées au niveau des domaines VR, CDR ou au niveau de la région constante et impliquées dans la liaison au FcRn et au récepteur FcγRIIIa lié à l'activation de la voie du complément ADCC: N328, N387 et N392 [111, 112]. La Figure 19 permet de situer ces acides aminés au niveau de la structure tridimensionnelle de l'infliximab.

Tableau 6 : Liste des Asparagines (N) présents dans la séquence de l'infliximab

Peptide	Acide aminé	Domaine	Impact connu
LC4	N41	VR	Liaison à l'antigène
LC7	N76	VR	Liaison à l'antigène
LC7	N103	VR	Liaison à l'antigène
LC10	N137	CR	
LC10	N138	CR	
LC13	N152	CR	
LC13	N158	CR	
LC18	N210	CR	
HC3	N31	CDR	Liaison à l'antigène
HC3	N35	CDR	Liaison à l'antigène
HC7	N57	CDR	Liaison à l'antigène
HC13	N101	CDR	Liaison à l'antigène
HC16	N162	CR	
HC16	N204	CR	
HC16	N206	CR	
HC16	N211	CR	
HC24	N279	CR	
HC24	N289	CR	
HC26	N300	CR	
HC27	N318	CR	
HC30	N328	CR	Liaison au récepteur FcγR
HC37	N364	CR	
HC38	N387	CR	Liaison aux récepteurs FcRn et FcγR
HC38	N392	CR	Liaison aux récepteurs FcRn et FcγR
HC38	N393	CR	
HC42	N424	CR	
HC42	N437	CR	

LC : chaîne légère, HC : chaîne lourde, VR : domaine variable, CDR : domaine hypervariable, CR : domaine constant, en rouge : N d'intérêts

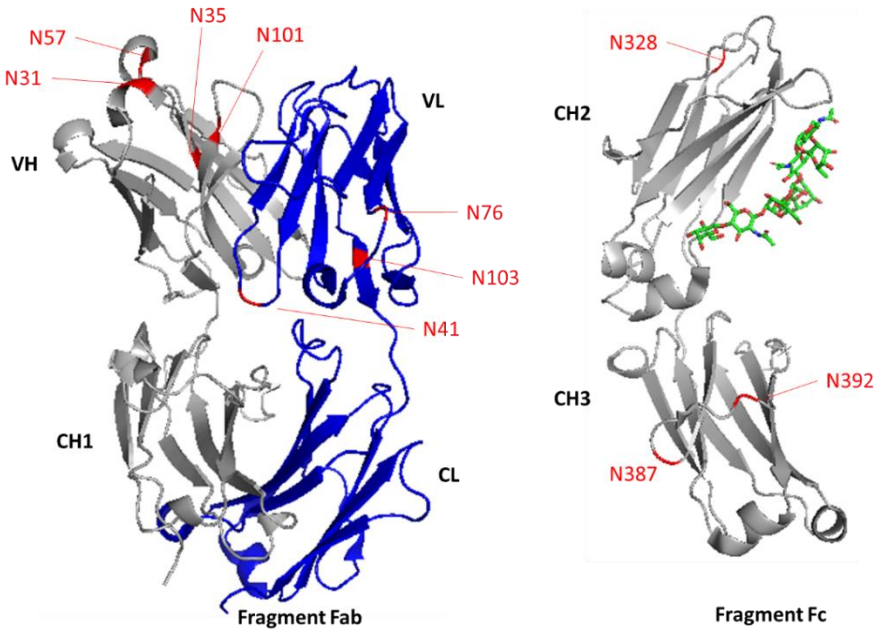


Figure 19 : Localisation des asparagines d'intérêts.

4. Méthodes analytiques

Comme évoqué en *partie 1, chapitre 1, C,* l'analyse des mAbs thérapeutiques requiert un panel de techniques analytiques (Figure 5) permettant de caractériser les différents niveaux de structures de ces produits. Plusieurs revues de la littérature détaillent les techniques les plus utilisées [28, 105, 113-115]. On peut classer les techniques en fonction du niveau de structure analysée. La structure primaire des mAbs et les PTMs sont généralement analysées par MS couplée à une technique séparative comme l'HPLC ou la CZE. L'analyse des modifications de la structure secondaire est classiquement évaluée par CD ou infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). La calorimétrie à balayage (DSC) est aussi couramment utilisée afin d'accéder à la conformation de la protéine. La structure quaternaire et l'agrégation des mAbs sont évaluées par plusieurs techniques orthogonales permettant de rechercher une large gamme de taille de particules. Enfin, des techniques enzymatiques de type ELISA et l'analyse par résonance plasmon de surface (*surface plasmon resonance*, SPR) permettent d'évaluer l'activité biologique, notamment en permettant de déterminer *in vitro* les constantes de dissociation avec l'épitope ciblé. Lors de la caractérisation des mAbs, l'ensemble ces niveaux de structure doit être analysé. C'est par exemple le cas de l'étude de Jung *et al* qui a analysé l'ensemble des niveaux de structure du Remsima® [116].

Concernant l'analyse de l'agrégation, la technique de référence est la SEC. La sélectivité fournie par la SEC permet de séparer et de quantifier les différentes formes selon leur taille [117]. Elle permet ainsi la séparation chromatographique des agrégats, des fragments et du monomère des mAbs. Néanmoins,

la SEC présente certaines limitations : limite de taille des agrégats pouvant être analysés, possibilité d'adsorption non spécifique avec la phase stationnaire, possibilité de dissociation des agrégats lors de l'analyse [118]. Au vu de ces limites, il est recommandé d'analyser les agrégats par une seconde technique, orthogonale à la SEC. Parmi les techniques orthogonales décrites, on trouve l'AUC (ultracentrifugation analytique) [119], , l'électrophorèse capillaire en gel (CGE) ou encore la FFF [120]. D'autres techniques, non séparatives, sont également employées comme la diffusion dynamique de la lumière (DLS) [121] ou la spectroscopie UV par la mesure de la turbidimétrie [122]. L'analyse par microscopie des agrégats est également employée, notamment à l'aide de l'imagerie par microscopie à flux continue (MFI, *micro-flow imaging*) [123]. Les agrégats pouvant être de tailles variées, il est important d'associer plusieurs techniques permettant de couvrir une gamme de taille la plus large possible (Figure 20). Les techniques de SEC, FFF et DLS ont été utilisées lors de ce travail de thèse et sont détaillées au chapitre 3.

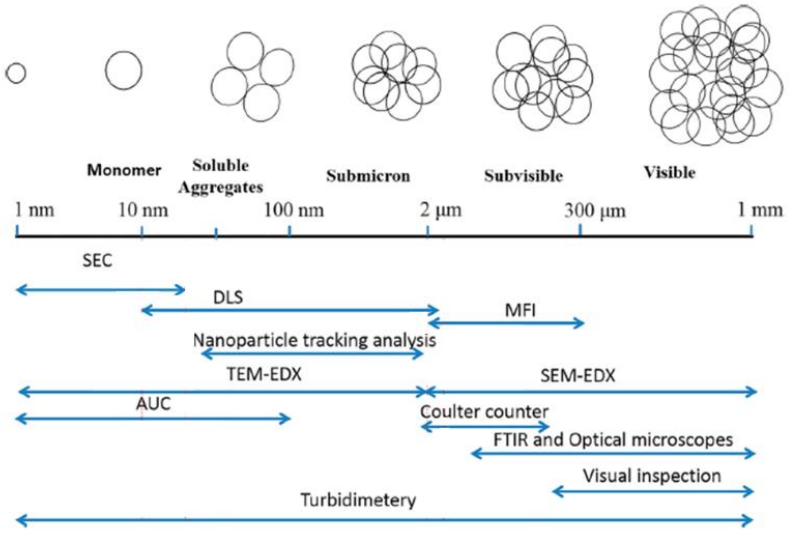


Figure 20 : Exemples de techniques analytiques permettant l'analyse des agrégats de protéines, et gamme de taille associée à chaque technique.
Adapté de [123]

5. Stabilité en condition hospitalière de l'infliximab

Les mAbs sont des traitements qui s'administrent à l'heure actuelle exclusivement en milieu hospitalier par voies injectables. La majorité d'entre eux demande une préparation au niveau de la Pharmacie à Usage Intérieure (PUI) de l'hôpital avant d'être administré au patient. La préparation de ces produits se fait dans des locaux spécifiques garantissant la sécurité des préparateurs et le maintien de la stérilité du produit, indispensable à une administration intraveineuse. Les mAbs sont préparés selon les recommandations du résumé des caractéristiques du produit (RCP). Dans le cas de l'infliximab, il se présente sous forme d'un lyophilisat à reconstituer dans des poches de perfusion. Après reconstitution dans la poche de perfusion, la stabilité de l'infliximab est garantie par les fournisseurs uniquement

pendant 24h. Ce délai relativement court implique une organisation adaptée au niveau de la PUI, à savoir une préparation de la poche de perfusion la veille ou le jour même de son administration au patient. Dans le cas où le patient ne pourrait pas recevoir son traitement, par exemple dans le cas d'une contre-indication suite au bilan biologique, ou à sa non-présentation au rendez-vous, le traitement doit alors être éliminé. La nécessité d'une préparation juste avant l'administration entraine plusieurs contraintes au niveau hospitalier :

- Organisationnelle : la préparation doit être réalisée en fonction des rendez-vous des patients, la veille ou le jour même.
- Coût : les mAbs sont des produits onéreux. Dans le cas où un patient ne se présente pas à son rendez-vous ou s'il ne peut finalement pas recevoir son traitement, la préparation de mAb doit être jetée.

Dans ce contexte, de nombreuses études s'intéressent à la stabilité *in use* des mAbs. Le Basle *et al* ont récemment publié une revue sur la stabilité physico-chimique des mAbs, en s'intéressant particulièrement aux études de stabilité *in use* de ces produits. Plusieurs études montrent une stabilité des mAbs supérieure à 24h dans les conditions d'utilisation hospitalière [105]. Concernant l'infliximab, le Tableau 7 synthétise l'ensemble des études disponibles dans la littérature relative à son analyse en condition *in-use* hospitalière, classées par référence commerciale, et par année de publication. On peut voir que les études les plus récentes utilisent un panel de techniques analytiques permettant d'analyser un certain nombre de produits de dégradation de l'Infliximab. Par exemple, dans la majorité des études, plusieurs techniques comme la SEC, la DLS et la turbidimétrie sont utilisées pour évaluer l'agrégation. Néanmoins, on peut noter qu'aucune étude n'a été réalisée en LC-MS/MS avec pour objectif d'identifier l'apparition de PTMs. Tokhadze *et al* ont réalisé une étude en peptide mapping, mais en HPLC-UV, suggérant un manque de spécificité et de sensibilité [124]. Hermosilla *et al* et Young *et al* ont réalisé une étude en LC-MS conditions natives, ne permettant pas dans ce cas l'identification des possibles PTMs [125, 126]. Il apparait donc pertinent de compléter ces études par l'analyse des PTMs en LC-MS/MS.

Un autre aspect apparaissant complexe quant à l'analyse de l'infliximab en condition *in-use* est la définition des seuils à partir desquels le produit sera considéré comme non stable. En effet, ils doivent être évalués au cas par cas, ce qui peut rendre compliqué l'interprétation et la conclusion de ces études de stabilité.

Tableau 7 : Etudes disponibles évaluant la stabilité de l'infliximab en condition d'utilisation hospitalière

Nom commercial	Conditionnement et concentration	Durée et conditions de stabilité	Essais	Référence Date de publication
Remicade®	50 et 10 mg/mL Flacon	35 jours à 5°C	Immuno-essai	[127] 2010
	0,4 mg/mL Poche IV NaCl 0,9% en PVC	14 jours à 5°C	ELISA	[128] 2012
	0,5 ; 2 et 10 mg/mL Flacon	31 jours à 5°C	HPLC-PDA	[129] 2018
	10 mg/mL Flacon	15 jours à 5°C et 25°C	SEC	[130] 2018
	0,5 et 2 mg/mL Flacon à l'abri de la lumière			
	0,4 mg/mL Poche IV NaCl 0,9% en polyolefine			
Remsima®	0,6 ; 0,84 et 1,88 mg/mL Poche IV NaCl 0,9% en Polyoefin (freeflex)	7 jours à 5°C 24h à 25°C exposé à la lumière	Observation visuelle SEC-UV Electrophorèse sur gel DLS CD HPLC-MS (native) Cytotoxicité	[126] 2015
	0,7 et 1,6 mg/mL Poche IV NaCl 0,9% en polypropylene (freeflex)	30 jours à 5°C et 25°C à l'abri de la lumière	Turbidité Spectroscopie UV DLS DSC SEC-UV Chromatographie d'échange d'ion Microscopie optique	[131] 2017
Inflectra®	0,4 et 2 mg/mL Poche IV NaCl 0,9% en polypropylène	90 jours, à l'abri de la lumière 5°C et 25°C	Observation visuelle Turbidité Compteur de particules DLS SEC-UV Chromatographie d'échange d'ion Peptide mapping (UV) FTIR Spectroscopie UV pH Osmolalité	[124] 2018
	10 mg/mL Flacon	30 jours, à l'abri de la lumière 5°C et 25°C		
Flixabi®	10 mg/mL Flacon	60 jours à 5°C 7 jours à 25°C	Observation visuelle Compteur de particules SEC-UV CE-SDS Iso électrofocalisation capillaire Spectroscopie UV pH Osmolalité Activité biologique	[132] 2018
	0,96 ; 1,28 et 1,6 mg/mL Poche IV NaCl 0,9% en polyéthylène	7 jours à 5°C et 25°C		
Zessly®	0,4 et 4 mg/mL Poche IV NaCl 0,9% en polyéthylène	30 jours à 5°C et 25°C	Apparence, pH, osmolarité, Compteur de particules Spectroscopie UV Iso électrofocalisation capillaire SEC-UV CE-SDS Activité biologique	[133] 2019
	10 mg/mL Flacon	30 jours à 5°C et 14 jours à 25°C		
Remicade® et Remsima®	2 et 10 mg/mL Flacon	14 jours à 5°C	Observation visuelle CD Fluorescence DLS SE/UHPLC-UV-[Native] MS RP/UHPLC-UV ELISA	[125] 2019
	0,4 mg/mL Poche IV NaCl 0,9% en polyolefine			

6. Cadre du travail

Le travail a porté dans un premier temps sur l'analyse de la stabilité de l'infliximab dans les conditions d'utilisation hospitalière, en complément des études déjà existantes. Deux types de poche de perfusion utilisées pour l'administration IV ont été évalués en tant que contenant, afin de considérer des conditions *in use* les plus diverses possibles et étudier l'influence de matériaux sur la stabilité du mAbs. Les travaux de recherche se sont ainsi intéressés à deux aspects nous paraissant critiques : l'analyse des PTMs par LC-MS/MS, et l'analyse des agrégats, produits de dégradation connus comme étant immunogènes. L'agrégation a été évaluée par les techniques classiques comme la SEC et la DLS, et par une seconde technique séparative la FFF. Le caractère de biosimilarité vis-à-vis de leur stabilité *in use* a également été évalué pour trois références d'infliximab au cours de ces études de stabilité : Remicade® (produit de référence), Flixabi® et Remsima® (biosimilaires).

Dans un second temps, la méthodologie ASAP a été appliquée au Remicade®. En effet, le coût et l'importante concurrence du marché des mAbs dans le milieu pharmaceutique nécessitent d'autant plus des méthodologies permettant de diminuer le temps de développement de ces produits. Dans ce contexte, la méthodologie ASAP apparait particulièrement intéressante afin d'évaluer, de façon prédictive et en un temps relativement court, la stabilité des mAbs.

Chapitre 3 : Techniques analytiques

Dans ce chapitre, les principales techniques analytiques utilisées dans ce travail de thèse sont détaillées. Dans une première partie, les techniques séparatives utilisées : la CZE, la SEC et la FFF. Dans une deuxième partie, sont présentées les techniques spectroscopiques : les techniques de diffusion de la lumière statique (MALS, *multi angle light scattering*) et dynamique (DLS), la réfractométrie différentielle (RI), le Raman, le CD ainsi que la technique de MS.

A. Techniques séparatives

1. L'électrophorèse capillaire de zone

a. Introduction

L'électrophorèse capillaire est une technique séparative utilisée pour séparer des espèces chargées en solution selon le principe de l'électrophorèse. Son principe repose sur la migration d'ions (espèces chargées positivement ou négativement) sous l'action d'un champ électrique. En fonction de leur caractéristique propre, la vitesse de migration de ces ions sera différente, permettant ainsi leur séparation.

Arne Tiselius (1902-1971), biochimiste suédois, et lauréat du prix Nobel de chimie en 1948, introduit l'utilisation de l'électrophorèse pour la séparation d'analytes, en particulier pour la séparation des protéines sanguines [134]. L'électrophorèse capillaire, c'est-à-dire l'application du phénomène d'électrophorèse appliqué dans un capillaire est attribuée à James Jorgensen dans les années 1970-1980, qui a réalisé l'électrophorèse dans des capillaires en verre de faibles diamètres (de 0.3 mm à moins de 100 µm) [135]. L'utilisation de capillaire de faibles diamètres permet la dissipation de la chaleur générée par effet Joule lors de l'application du champ électrique et de haut voltage et limite l'élargissement des pics provoqué par diffusion longitudinale et permet alors une efficacité de séparation optimale [136].

L'électrophorèse capillaire a depuis montré son efficacité pour la séparation et l'analyse de nombreux analytes, démontrant son utilité dans des applications diverses : petites molécules [137], ions inorganiques [138], molécules chirales [139], acides aminés [140], peptides et protéines entières [141, 142], glucides et polysaccharides [143].

b. Principe et instrumentation

La Figure 21 présente schématiquement un instrument d'électrophorèse capillaire. Les extrémités du capillaire, dans lequel a lieu la séparation des analytes, sont immergées dans un réservoir contenant l'électrolyte support (BGE, *background electrolyte*). Deux électrodes reliées à un générateur à haute tension sont également immergées dans le BGE. Le générateur permet d'appliquer une différence de potentiel entre les deux électrodes, et la génération d'un champ électrique. Les analytes chargés migrent alors à l'intérieur du capillaire, rempli de BGE, jusqu'au système de détection. Le plus classique est une détection UV. La détection est réalisée directement sur le capillaire au niveau de la fenêtre de détection.

Il existe plusieurs modes de séparations par électrophorèse capillaire : isotachophorèse, électrophorèse capillaire en gel, électrochromatographie capillaire, isoelectrofocalisation capillaire, électrochromatographie en phase micellaire. Dans cette partie n'est détaillée que l'électrophorèse capillaire de zone (CZE), ou électrophorèse capillaire libre, qui a été utilisée lors de ces travaux de thèse. Il s'agit du mode d'électrophorèse le plus simple et le plus utilisé parmi les modes d'électrophorèse capillaire.

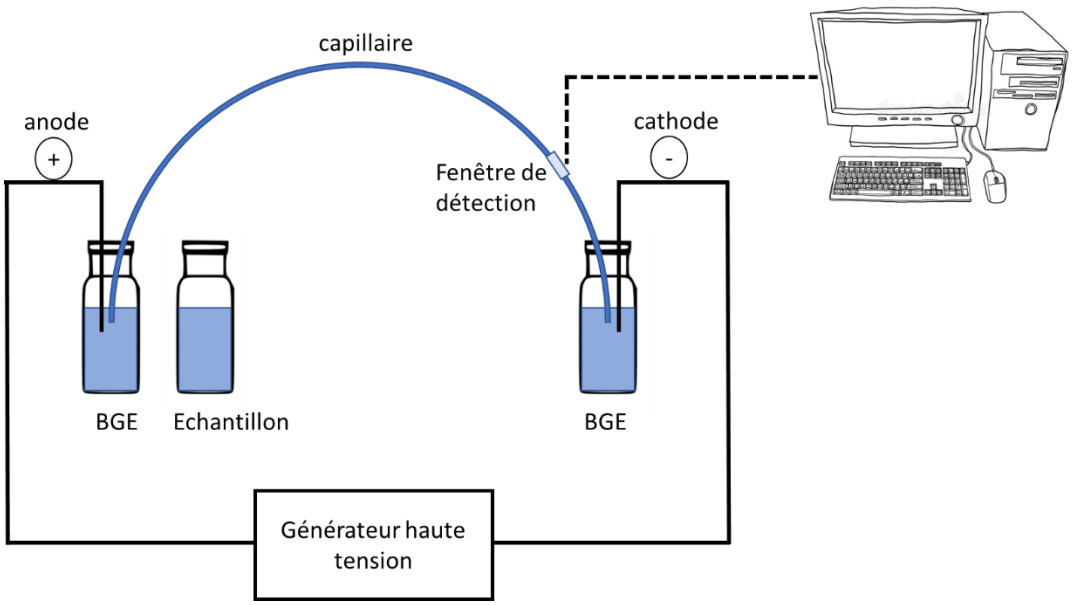


Figure 21: Schéma d'un appareil d'électrophorèse capillaire. Adapté de [144]

La séparation des analytes dans le capillaire est liée à l'association de deux phénomènes : l'électrophorèse et l'électroosmose.

i. L'électrophorèse

L'électrophorèse est le paramètre physique principal en électrophorèse capillaire. Il résulte du déplacement d'une molécule chargée lorsqu'elle est soumise à un champ électrique. Les cations migrent en direction de l'anode, et les anions migrent en direction de la cathode. La vitesse de déplacement de la molécule chargée est régie par la relation suivante :

$$v_{ep}=\mu_{ep}xE \quad (8)$$

avec v_{ep} : vitesse électrophorétique ($cm.s^{-1}$)

μ_{ep} : mobilité électrophorétique ($cm^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$)

E : intensité du champ électrique ($V.cm^{-1}$)

La vitesse de migration des molécules est liée à l'intensité du champ électrique, ainsi que de leur mobilité électrophorétique propre. Celle-ci est fonction de la charge de la molécule et de sa taille : la mobilité électrophorétique d'un ion est d'autant plus grande que sa charge est élevée et sa taille petite. Il en résulte que le pH et la force ionique du BGE, impactant la charge de la molécule, auront un impact sur la mobilité électrophorétique de la molécule. D'autres paramètres comme la température auront également un impact sur la mobilité de l'analyte.

ii. L'électroosmose

L'électroosmose ou électroendosmose correspond à l'écoulement du liquide contenu dans le capillaire, dont la paroi interne possède une charge de surface, lors de l'application d'un champ électrique tangentiel. Dans le cas d'un capillaire en silice vierge, un BGE ayant un pH supérieur à 2 entraine la déprotonation des groupements silanols. La surface interne du capillaire est alors chargée négativement, permettant une interaction avec les cations présents dans le BGE, et conduisant à la formation d'une double couche de charge lors de l'application du champ électrique (Figure 22). Cette double couche est caractérisée par son potentiel de surface, aussi appelé potentiel zeta ζ ayant pour formule :

$$\zeta = \frac{\delta\sigma}{\varepsilon} \quad (9)$$

avec : δ: épaisseur de la double couche

σ : densité de charges par unité de surface

ε : constante diélectrique du milieu

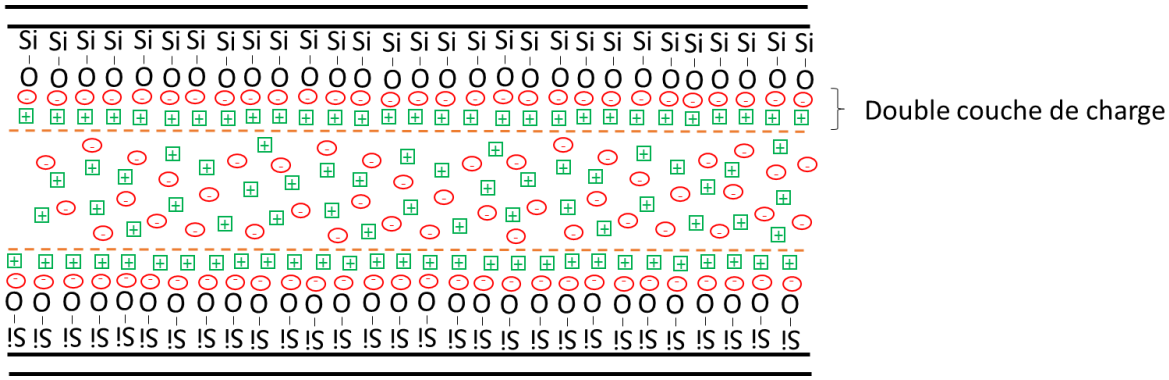


Figure 22: Schéma représentant la double couche de charge dans un capillaire de silice vierge

Sous l'effet du champ électrique, les cations présents dans le BGE et composant la double couche de charge migrent vers la cathode. Ce phénomène entraine la mise en mouvement de l'ensemble du liquide contenu dans le capillaire, et avec lui la mise en mouvement de l'ensemble des espèces et molécules contenues dans capillaire. Ce phénomène d'écoulement du BGE est appelé flux électroosmotique (EOF). La vitesse du EOF dépend de l'intensité du champ électrique et de la mobilité électroosmotique, elle est régie par l'équation suivante :

$$v_{eo} = \mu_{eo} x E \qquad (10)$$

avec v_{eo} : vitesse électroosmotique ($cm.s^{-1}$)

μ_{eo} : mobilité électroosmotique ($cm^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$)

E : intensité du champ électrique ($V.cm^{-1}$)

La mobilité électroosmotique étant définie par l'équation suivante :

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{4\pi\eta} \qquad (11)$$

avec μ_{eo} : mobilité électroosmotique ($cm^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$)

ε : constante diélectrique du milieu

ζ : potentiel zeta (V)

η : viscosité du milieu (P)

La vitesse électroosmotique est ainsi dépendante du potentiel zeta, de la viscosité et de la constante diélectrique du BGE. Par ailleurs, le potentiel zeta est directement lié à la densité de charge et à l'épaisseur de la double couche de charge (équation 9). De ce fait, le pH, la force ionique ou encore la nature des cations du BGE influeront directement sur la vitesse électroosmotique. L'ajustement de ces paramètres permet d'augmenter ou de réduire, voire de supprimer le EOF [145].

iii. Migration apparente

La vitesse de migration des analytes est ainsi liée aux deux phénomènes d'électrophorèse et d'électroosmose, et correspond à la somme des vitesses de ces deux contributions :

$$v_{app}=v_{eo}+ v_{ep} \quad (12)$$

Ou encore :

$$v_{app}=\mu_{app}xE \quad (13)$$

avec $\mu_{ap}= \mu_{eo}+ \mu_{ep}$

La Figure 23 présente le principe de séparation en CZE. Les cations migreront vers la cathode, sous l'influence des deux mobilités électrophorétique et électroosmotique, qui sont orientées dans la même direction. Dans le cas des anions, les deux mobilités sont de directions opposées : ils ne migreront vers la cathode uniquement si la mobilité électroosmotique est supérieure à la mobilité électrophorétique. Dans le cas des molécules neutres, leur mobilité est uniquement liée à l'influence de l'EOF et elles ne seront pas séparées les unes des autres.

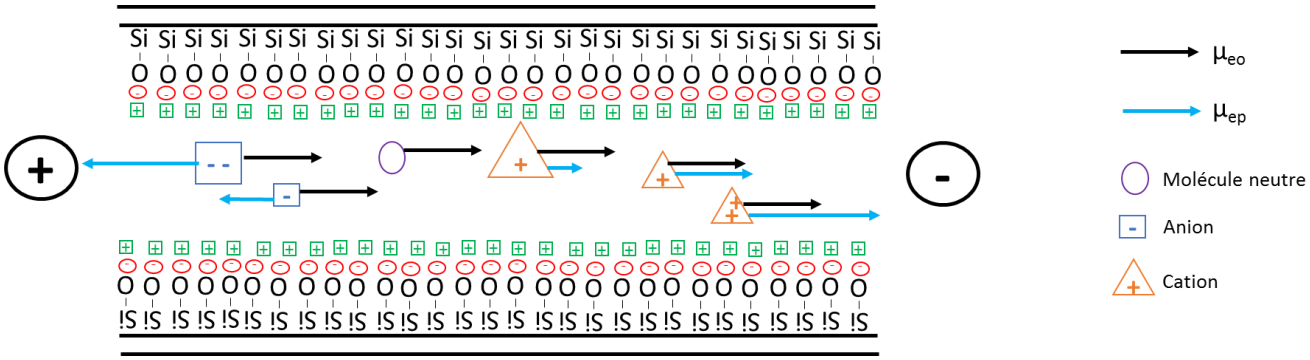


Figure 23: Schéma représentant le principe de séparation en électrophorèse capillaire de zone. Adapté de [146]

2. La chromatographie d'exclusion stérique

a. Introduction

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC), aussi appelée chromatographie sur gel perméable, est une technique de chromatographie liquide permettant de séparer les molécules en fonction de leur rayon hydrodynamique. Cette technique est utilisée notamment pour la caractérisation de protéines, de polymères, de nanoparticules [117, 147, 148] Concernant l'analyse de protéines pharmaceutiques,

la SEC est actuellement la technique de référence pour l'analyse des dimères, trimères et oligomères notamment pour les mAbs [117].

b. Principe

Comme pour toute chromatographie liquide, les molécules vont être réparties entre une phase liquide et une phase stationnaire lors de l'analyse en SEC. La phase stationnaire se compose de particules sphériques de porosité définie. La phase mobile est généralement constituée d'une phase aqueuse tamponnée. La Figure 24 représente schématiquement une colonne de SEC et le mécanisme de séparation des molécules. En fonction de leur rayon hydrodynamique (c'est-à-dire leur taille et leur géométrie), les molécules vont diffuser à l'intérieur des pores de ces particules. Le mécanisme de rétention est basé sur l'équilibre thermodynamique entre le volume mort de la colonne (V_0) et le volume poreux (V_p).

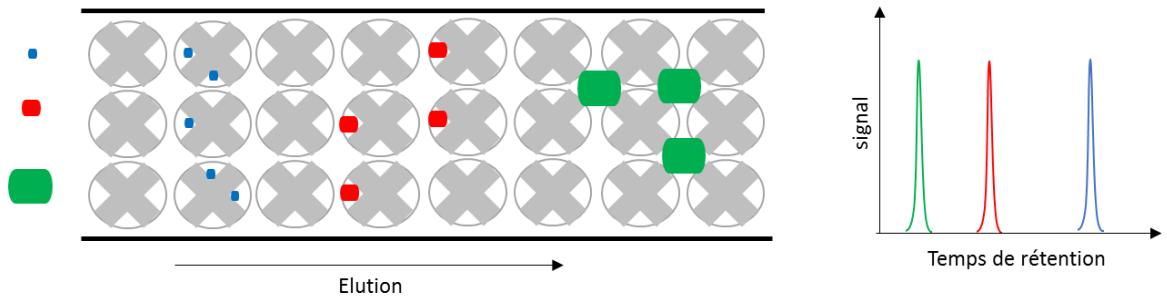


Figure 24 : Représentation schématique d'une colonne de SEC et de la séparation des molécules en fonction de leur taille

En SEC, cet équilibre thermodynamique est régi par la relation suivante :

$$lnK_d = -\frac{\Delta S_0}{R} \quad (14)$$

Avec :

K_d : le coefficient de partage

S_0 : Entropie du système

R : constante des gaz parfaits

Le coefficient de partage K_d représente la fraction du volume poreux accessible aux molécules. La relation entre le volume d'élution (V_e) d'une molécule, K_d , V_0 et V_p est défini par l'équation suivante :

$$V_e = V_0 + K_d \times V_p \quad (15)$$

Ce coefficient de partage varie entre 0 et 1. Pour les molécules de rayons hydrodynamiques importants qui ne peuvent pas accéder aux pores des particules, $K_d = 0$ et $V_e = V_0$ [149]. Ces molécules sont éluées

au niveau du volume mort de la colonne, sans rétention aussi appelé volume d'exclusion. Au niveau de la Figure 24, il s'agit de l'exemple de la molécule verte. Plus les molécules sont petites, plus elles diffuseront au niveau des pores des particules (K_d proche de 1), et auront un volume et donc un temps d'élution plus important. Au niveau de la Figure 24, il s'agit de l'exemple des molécules rouges et bleues.

Ainsi, en SEC, l'ordre d'élution suit généralement la masse moléculaire des molécules, notamment pour les polymères et les protéines. La gamme de porosité de la colonne chromatographique déterminera la gamme de taille des molécules qui pourront être analysées. Par ailleurs, l'utilisation de témoins de masses moléculaires connues permet de construire une gamme de calibration, ce qui permet en théorie de déterminer la masse moléculaire d'une molécule inconnue. Un exemple de gamme de calibration est présenté Figure 25. Cependant, il s'agit d'une extrapolation car le mécanisme de rétention étant lié au rayon hydrodynamique, celui-ci peut ne pas être totalement corrélé à la masse moléculaire [117].

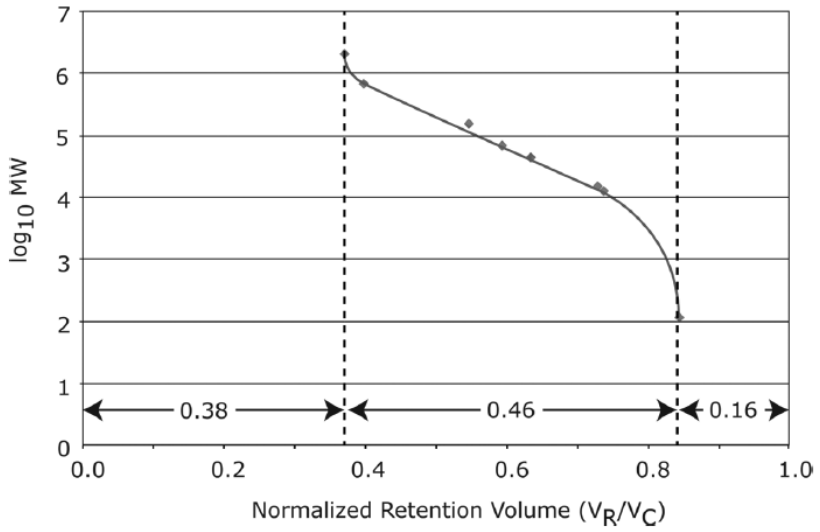


Figure 25 : Exemple de gamme de calibration en SEC [149]

3. Méthodes de fractionnement par flux-force

Les méthodes de fractionnement par flux-force (FFF) sont également des techniques permettant la séparation des molécules en fonction de leur taille. Décrites pour la première fois dans les années 1960 par le professeur Calvin Giddings [150], il s'agit de techniques basées sur l'action simultanée de l'écoulement d'un liquide dans un canal de faible épaisseur, et l'application d'un champ externe perpendiculaire au canal. Il existe différents types de fractionnement en fonction du type de champ

externe appliqué. L'*electrical FFF* utilise un champ électrique comme champ externe, la *sedimentation FFF* utilise la force centrifuge comme champ externe, la *thermal FFF* utilise un gradient de température, la *flow FFF* utilise un flux croisé perpendiculaire au flux d'écoulement. La *flow FFF* est la technique de FFF la plus commune, et permet de séparer des molécules de 1 nm jusqu'à 100 µm de diamètre.

Parmi ces techniques, la plus utilisée est l'*asymetrical flow field flow fractionnation* (A4F), et il s'agit de la technique qui a été utilisée lors de ces travaux de thèse. Elle a été développée par Wahlund et Giddings [151]. Le fractionnement est basé sur une séparation en fonction du rayon hydrodynamique des molécules. Elle est dite asymétrique en lien avec la forme de la cellule de séparation. La cellule de séparation est constituée d'un bloc inférieur doté d'un fritté et d'un bloc supérieur imperméable. Entre les deux blocs, sont ajoutés une membrane d'ultrafiltration et un spacer. Une représentation schématique d'une cellule d'A4F est représentée Figure 26. La membrane d'ultrafiltration est composée généralement de cellulose ou de polyethersulfone. Cette membrane permet de laisser passer le solvant d'élution créant ainsi un flux orthogonal de phase mobile, et de retenir les analytes dans la cellule. La membrane possède généralement un *cut-off* de 5 à 10 kDa et correspond à la limite inférieure de la taille des molécules qui seront séparées. Le spacer est une fine lamelle, de forme trapézoïdale qui est déposé sur la membrane d'ultrafiltration est qui est serré entre les 2 blocs. Son épaisseur, entre 125 et 490 µm, fixe le volume de fractionnement ainsi que la forme de la cellule de séparation. La séparation des analytes se fait à l'intérieur de ce spacer : contrairement à la SEC, il n'y a pas de phase stationnaire en FFF.

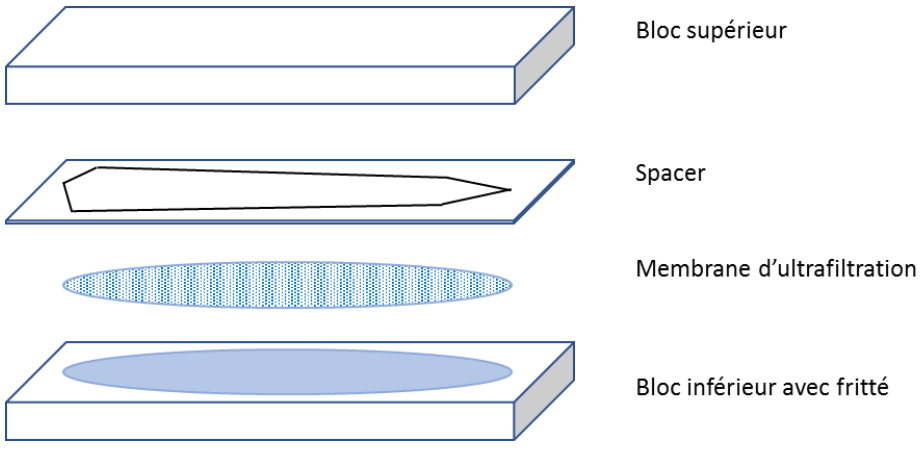


Figure 26 : Représentation schématique d'une cellule d'A4F

La Figure 27 présente schématiquement les différentes étapes et le principe du fractionnement en A4F en mode normal, soit le cas le plus classique. Trois étapes se succèdent :

- Injection et focus : l'échantillon est introduit dans la cellule. Le flux d'injection s'ajoute au flux axial de la phase mobile. De plus, pour éviter une dispersion trop importante des analytes dans la cellule, l'appareil est mis en mode *focus*. C'est-à-dire qu'un flux opposé au flux axial est activé, ce qui permet de concentrer l'échantillon en tête de cellule. La Figure 28 représente cette étape de *focus*.
- Focalisation et *focus* : après l'étape d'injection, le mode *focus* est maintenu pendant quelques minutes, au cours de l'étape de focalisation. Il s'agit d'une étape de concentration et de relaxation de l'échantillon. Lors de cette étape, les molécules sont soumises au mouvement brownien, fonction du coefficient de diffusion D de chaque molécule. Le coefficient de diffusion D est lié au rayon hydrodynamique de la molécule, d'après l'équation approximée de Stockes Einstein :

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H} \quad (16)$$

k : constante de Boltzmann

T : température (K)

η : viscosité de l'éluant

R_H : rayon hydrodynamique de la molécule

Les grosses molécules présentent un coefficient de diffusion plus faible que les plus petites molécules. Les grosses molécules se trouvent alors plus proches de la membrane d'ultrafiltration tandis que les plus petites molécules seront plus éloignées à la fin du processus.

- Elution : lors de la phase d'élution (de fractionnement), l'épaisseur de la cellule étant très faible (125 à 490 µm), le flux est laminaire et présente un profil parabolique. Le temps de rétention t_R de chaque molécule est alors lié au coefficient de diffusion D selon l'équation suivante :

$$t_R = \frac{t_0 V_x w^2}{6 V_0 D} \quad (17)$$

t_0 : temps mort

V_x : débit de flux croisé

w : épaisseur de la cellule

V_0 : volume de la cellule

D : coefficient de diffusion

Le temps de rétention t_R des molécules en A4F en mode normal est donc relié au rayon hydrodynamique par la relation 17. Ainsi, en mode normal, plus le rayon hydrodynamique R_H d'une molécule est important, plus le temps de rétention t_R sera important.

$$t_R = \frac{t_0 V_x w^2 \pi \eta}{V_0 kT} R_H \qquad (18)$$

A noter, dans le cas de molécule de taille très importante (> 1 µm), un mode différent du mode normal peut apparaitre. Il s'agit du mode stérique. Dans ce cas, la diffusion est négligeable et l'ordre d'élution est inversé : les molécules plus grosses sont éluées avant les plus petites [152].

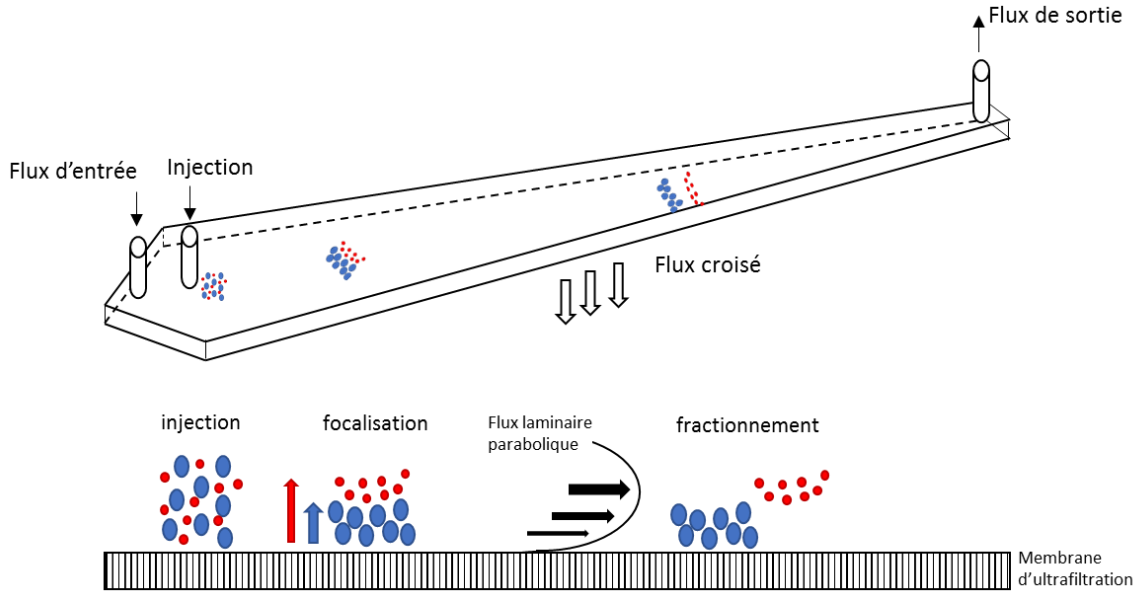


Figure 27 : Représentation schématique du fractionnement en A4F

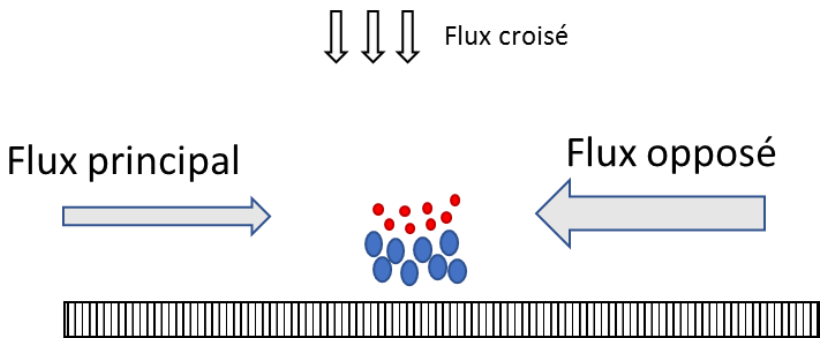


Figure 28 : Représentation de l'étape de focus pendant l'injection et la focalisation

La FFF apparait surtout utilisée pour l'analyse de protéines [153, 154], comme par exemple les anticorps monoclonaux [155]. La FFF est aussi appliquée à l'analyse d'autres macromolécules telles

que les acides nucléiques [156], les polysaccharides [152], les lipoprotéines [157], ou encore des nanoparticules comme les liposomes [158].

B. Techniques spectroscopiques

1. Techniques de diffusion de la lumière

Les techniques de diffusion de la lumière statique, le MALS, ou dynamique, la DLS, permettent de déterminer de façon absolue la taille des molécules d'un échantillon. Ces techniques peuvent être éventuellement couplées en amont à des techniques séparatives [159]. Classiquement, le MALS est couplé à une technique séparative comme la SEC ou la FFF, tandis que la DLS est non couplée. Ces techniques sont basées sur la propriété qu'ont les molécules soumises à un rayonnement électromagnétique à se polariser et à diffuser de la lumière. Dans le cas des petites molécules, dont la taille est inférieure au vingtième de la longueur d'onde du laser, la diffusion de la lumière se fait de façon isotrope, c'est-à-dire égale dans toutes les directions. Dans le cas de molécules dont le rayon est plus important, l'intensité de la lumière diffusée est dépendante de l'angle de diffusion, comme représenté à la Figure 29.

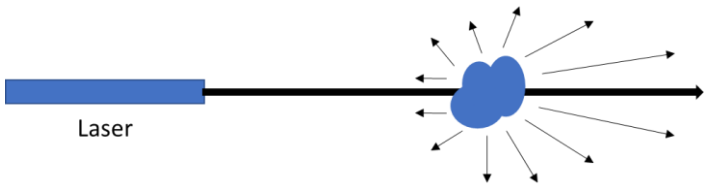


Figure 29 : Représentation schématique du phénomène de diffusion de la lumière

a. Diffusion dynamique de la lumière

En diffusion dynamique de la lumière (DLS), la diffusion de la lumière est mesurée en fonction du temps, pour un angle fixe. L'intensité de la lumière diffusée est mesurée au cours du temps. En solution, les molécules sont soumises au mouvement brownien. Ceci entraine des interférences et des modifications de l'intensité de la lumière diffusée en fonction du temps. Les modifications d'intensité sont ainsi liées au mouvement brownien des particules. Le mouvement brownien est directement lié au coefficient de diffusion des molécules, lui-même directement relié au rayon hydrodynamique des molécules par la relation de Stockes-Einstein [160] :

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H} \quad (19)$$

k : constante de Boltzmann

T : température (K)

η : viscosité de l'éluant

R_H : rayon hydrodynamique de la molécule

Plus le rayon hydrodynamique de la molécule est grand, plus le coefficient de diffusion est faible. Les fluctuations d'intensité seront alors moins rapides pour les plus grosses molécules, en comparaison avec de plus petites molécules, comme illustré Figure 30. La fluctuation d'intensité est représentée par la fonction d'autocorrélation suivante :

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau)\rangle}{\langle I(t)\rangle^2} \quad (20)$$

I(t) : intensité de la lumière diffusée au temps t

I(t+τ) : intensité de la lumière diffusée au temps t+τ

⟨ ⟩ : représente la moyenne temporelle

La fonction d'autocorrélation représente le degré de similitude entre deux instants séparés par un temps τ, et est généralement décroissante lorsque τ augmente. La Figure 30 représente le graphique d'autocorrélation obtenu pour deux types de molécules.

La fonction d'autocorrélation peut également être représentée par l'équation suivante :

$$g^{(2)}(\tau) = B + \beta e^{-2\Gamma\tau} \quad (21)$$

B : ligne de base de la fonction d'autocorrélation pour τ infini

β : ligne de base de la fonction d'autocorrélation pour τ 0

Γ : taux de décroissance

Enfin, le taux de décroissance Γ est relié au coefficient de diffusion, permettant le calcul du rayon hydrodynamique de la molécule par la relation suivante :

$$D = \frac{\Gamma}{q^2} \quad (22)$$

q : vecteur de diffusion

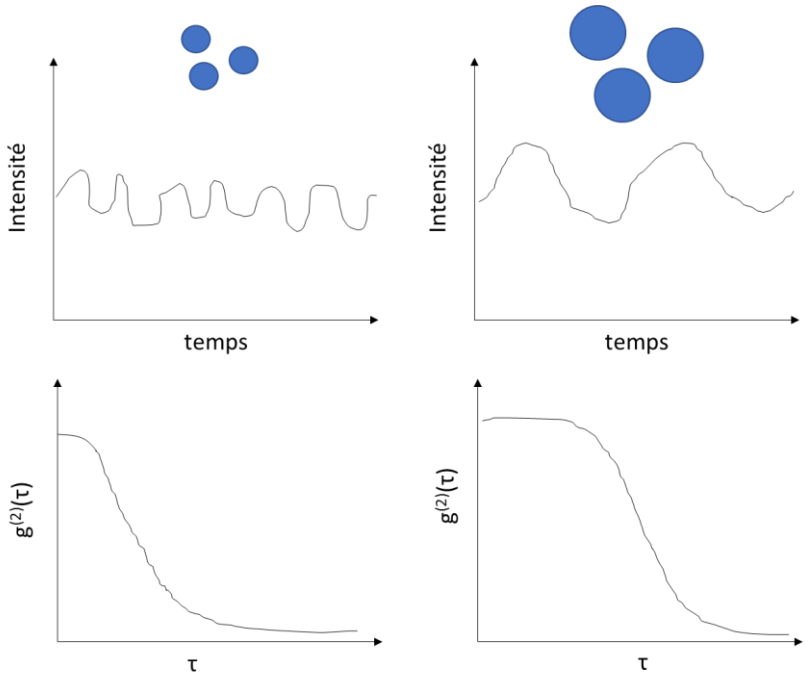


Figure 30 : Représentation de la fluctuation d'intensité diffusée en fonction du temps (en haut) et du graphique d'autocorrélation (en bas) pour des petites et plus grosses molécules

b. Diffusion de lumière statique multi-angles

Le détecteur à diffusion de lumière statique multi-angles (MALS) permet de mesurer la diffusion de la lumière sous différents angles. L'intensité de la lumière diffusée est dépendante de l'angle d'observation θ, de la masse molaire moyenne M_w et du rayon de gyration r_g de la molécule. L'équation de Zimm permet de relier ces différents paramètres [161] :

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w P(\theta)} + 2A_2 c \qquad (23)$$

K : constante optique

c : concentration de l'échantillon

R_θ : rapport d'excès de Rayleigh, dépendant de l'intensité de la lumière diffusée aux différents angles

M_w : masse molaire moyenne

P(θ) : facteur de forme

A_2 : deuxième coefficient du viriel

Lorsque la concentration de l'échantillon est faible, le facteur $2A_2c$ est négligeable et on obtient alors l'équation suivante de Zimm :

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w P(\theta)} \quad (24)$$

Le facteur de forme P(θ) est dépendant de la taille et de la forme de la molécule et représente la dépendance angulaire de la lumière diffusée. Il est défini par l'équation suivante :

$$P(\theta) = \frac{1}{1+\frac{16\pi^2}{3\lambda^2} r_g^2 sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)} \quad (25)$$

λ : longueur d'onde du laser

r_g : rayon de gyration de la molécule

Par extrapolation à l'angle θ = 0, la masse molaire et le rayon de gyration de la molécule peuvent être obtenus à partir du diagramme de Zimm (Figure 31) défini par l'équation suivante :

$$\frac{Kc}{R_\theta} = f\left(sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)\right) \quad (26)$$

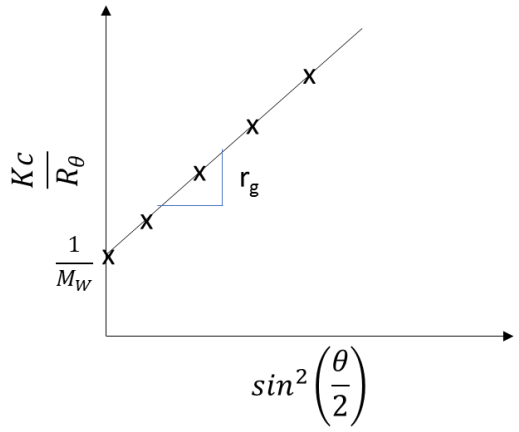


Figure 31 : Représentation du diagramme de Zimm

La mesure de la masse molaire nécessite également la connaissance de la concentration de l'échantillon. Ceci nécessite le couplage du détecteur MALS avec un détecteur quantitatif, classiquement le réfractomètre différentiel ou l'UV.

2. Réfractométrie différentielle

Les détecteurs par réfractométrie différentielle (RI) sont considérés comme universel. Ainsi ils peuvent détecter tous types de molécule dont l'incrément de l'indice de réfraction (dn/dc) est différent de zéro.

La vitesse d'un faisceau lumineux change lorsque le faisceau passe d'un milieu à un autre. Si l'angle d'incidence entre les deux milieux n'est pas perpendiculaire, le faisceau sera dévié, on dit qu'il est réfracté. L'ampleur de la réfraction est donnée par l'indice de réfraction (noté n). Les facteurs influençant l'indice de réfraction d'un milieu sont notamment la température, la pression et sa composition.

Les détecteurs RI mesurent en continu la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile de référence (indice de réfraction n_1) et la phase mobile en sortie de colonne, contenant l'échantillon analysé (indice de réfraction n_2), selon la loi de Snell :

$$n_1 \sin i_1 = n_2 \sin i_2 \quad (27)$$

Avec i_1 l'angle d'incidence dans le milieu de référence et i_2 l'angle de réfraction dans le milieu contenant l'analyte. La Figure 32 présente le phénomène de diffraction entre deux milieux d'indices de réfraction différents.

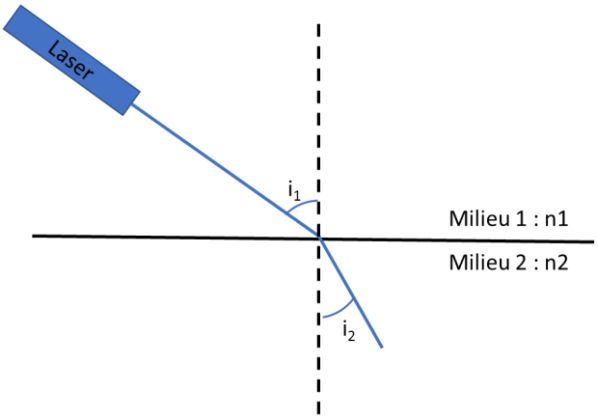


Figure 32 : Représentation du phénomène de diffraction de la lumière

Le détecteur RI détecte la position du faisceau lumineux réfracté. A température et pression égales, les variations d'indices de réfraction mesurées sont proportionnelles aux variations de concentration de l'échantillon. Lorsque la valeur du dn/dc de l'échantillon analysé est connue, le réfractomètre permet d'obtenir la concentration absolue de l'échantillon. De plus, la détection RI permet la détection d'un large panel de molécules notamment celles ne fournissant pas d'absorbance significative dans le domaine de l'UV-visible tels que les carbohydrates ou les lipides [162, 163].

3. Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une technique d'analyse vibrationnelle basée sur la diffusion inélastique d'une radiation monochromatique par une substance donnée. Ce phénomène a été découvert par le physicien indien C.V. Raman en 1928 [164]. Le rayonnement émis par des molécules bombardées contient des photons de fréquence égale au rayon incident, et des photons de fréquence différente. La majorité des photons émis sont transmis, réfléchis ou absorbés. Seule une infime partie des photons incidents sont diffusés, selon deux types de diffusion, présentées Figure 33 :

- Diffusion de Rayleigh (diffusion élastique) : les photons sont émis à la même fréquence que les photons incidents. La diffusion de Rayleigh est beaucoup plus intense que la diffusion Raman. Elle est éliminée par un filtre lors de l'enregistrement du spectre.
- Diffusion Raman (diffusion inélastique) : les photons sont émis à une fréquence inférieure (stockes) ou supérieure (anti stockes) aux photons incidents.

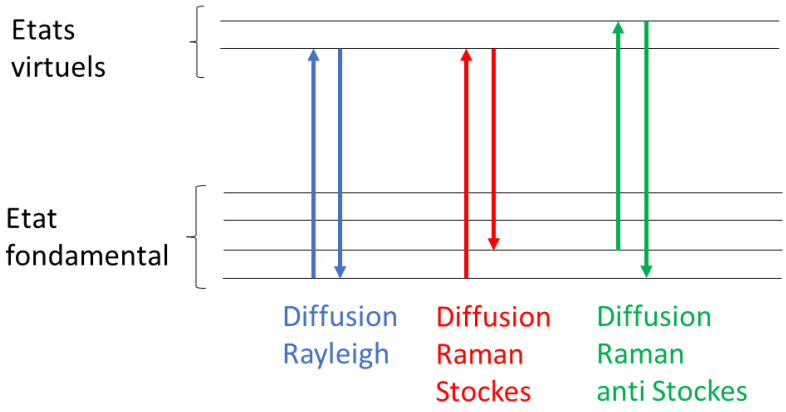


Figure 33 : Représentation schématique du principe de la diffusion Raman (diagramme de Jablonski)

Le spectre Raman représente l'intensité de la radiation diffusée inélastiquement (proportionnelle à la quantité de molécules diffusantes) en fonction du déplacement Raman (décalage ou shift Raman) exprimé en nombre d'onde, proportionnel à la fréquence et défini par la relation suivante :

$$\bar{\upsilon} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} \quad (28)$$

$\bar{\upsilon}$ = nombre d'onde (cm^{-1})

λ = longueur d'onde (cm)

ν = fréquence (s)

c : vitesse de la lumière ($3.10^{10} cm.s^{-1}$)

Le déplacement Raman est caractéristique de la nature et de la structure spatiale de chaque liaison et fournit des informations chimiques et structurelle sur la molécule. Dans le cas des protéines et des peptides, le spectre Raman peut renseigner sur [165]:

- La composition en acide aminés par la présence de marqueurs caractéristiques d'acide aminé. Par exemple le doublet à 860-830 cm^{-1} est caractéristique du groupement phénol de la tyrosine.
- La chaine polypeptidique par la présence des liaisons amides I correspondant à la vibration du carbonyle C=O (vers 1650 cm^{-1}) et amide III correspondant à la vibration du N-H et du C-N (vers 1250 cm^{-1}). La Figure 34 présente la liaison peptidique entre 2 acides aminés, et les liaisons amides I et III.
- La structure secondaire, par décomposition des bandes amides I et III :

La structure secondaire des protéines et des peptides est définie par le repliement local de la chaine peptidique. Ce repliement est lié à des arrangements de liaisons hydrogènes entre les groupements carbonyle -CO et amine -NH du squelette peptidique. Les principales structures secondaires sont les hélices α, les feuillets β et les coudes (*turn* en anglais). Ces structures sont définies en fonction des valeurs des angles dièdres ϕ (autours de la liaison C-N) et Ψ (autours de la liaison C-CO). Les bandes amides du spectre Raman sont larges et complexes et peuvent être décomposées en plusieurs composantes dont la position renseigne alors sur la structure secondaire de la molécule.

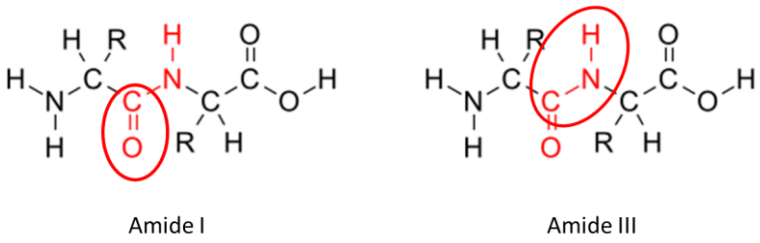


Figure 34 : Liaison peptidique entre deux acide aminés et liaison amide en Raman, R représente la chaîne latérale de chaque acide aminé

4. Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (CD) mesure la différence d'absorption d'un échantillon entre une onde polarisée circulairement droite et une onde polarisée circulairement gauche [166]. Pour des molécules chirales (par la présence de carbone asymétrique), la lumière polarisée circulaire droite et gauche est absorbée différemment. Ces molécules sont dites « optiquement actives », et possède un coefficient d'extinction molaire différent pour la lumière polarisée gauche ε_g et pour la lumière polarisée droite

ε_d. La Figure 35 représente schématiquement cet effet. La différence entre les deux coefficients est notée Δε. En CD, cette différence d'absorption ΔA est mesurée :

$$\Delta A = A_g - A_d = \Delta\varepsilon . l . c \quad (29)$$

l : longueur du trajet optique

c : concentration de l'échantillon

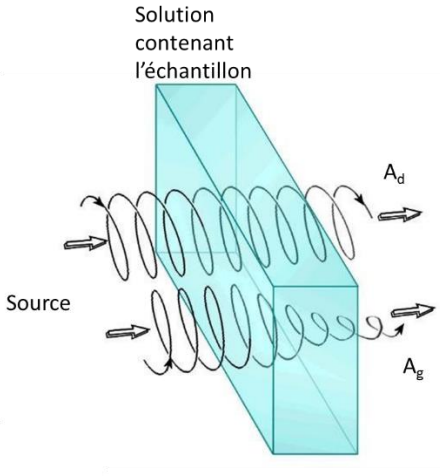


Figure 35 : Représentation schématique de l'effet du CD, adapté de [167]

La mesure de CD peut être reportée en ΔA, mais est généralement reportée en termes d'ellipticité θ. Comme présenté Figure 36, le vecteur champ électrique $\vec{E}$ de l'onde lumineuse peut être décomposé en deux vecteurs $\vec{Ed}$ et $\vec{Eg}$. Après la traversée de l'échantillon, les deux composantes $\vec{Ed}$ et $\vec{Eg}$ n'ont plus la même amplitude. La polarisation du faisceau n'est donc plus rectiligne mais elliptique. L'ellipticité θ est définie par l'équation suivante :

$$\tan\theta = \frac{E_d - E_g}{E_d + E_g} \quad (30)$$

L'ellipticité et la différence d'absorption ΔA sont reliées par l'équation suivante :

$$\psi = \frac{180}{4\pi}\ln(10) \times \Delta A \quad (31)$$

$$\psi = 32{,}98\ \Delta A \text{ (en degrés)} \quad (32)$$

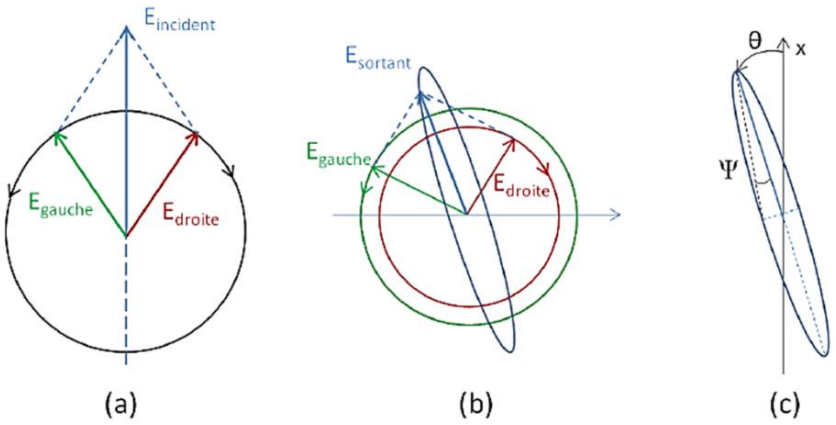


Figure 36 : Représentation schématique du champ électrique à la traversée d'un milieu optiquement actif. a) champ électrique incident polarisé en onde circulaire droite et gauche. b) Les ondes se recomposent en une onde elliptique inclinée. c) la direction du grand axe de polarisation elliptique est incliné d'un angle Θ par rapport à l'angle de polarisation incidente. L'ellipticité est donnée par l'angle Ψ [168]

Les protéines et les peptides possèdent des carbones asymétriques et sont optiquement actifs. De ce fait, leur analyse par CD est possible, et est utilisée pour caractériser leur structure secondaire. En dessous de 240 nm, l'absorption UV est liée à la liaison peptidique des fonctions amides. Cette absorption est principalement liée à deux types de transitions : n – π* (autours de 220 nm) et π-π* (autours de 190 nm) [169]. L'intensité et l'énergie de ces transitions sont dépendantes des angles de liaisons peptidiques (ϕ et Ψ) et donc de la structure secondaire de la chaîne peptidique. La Figure 37 présente les spectres de CD caractéristiques pour les structures secondaires hélice α, feuillet β et structure désordonnée (absence de structure secondaire). Concernant les structures en coudes, il existe de nombreuses structures possibles. Les principales sont les coudes ϒ et les coudes β (12 sous types). Différents exemples de spectre pour ce type de structure peuvent être trouvés dans la littérature. Un exemple est donné Figure 38.

Entre 260 et 320 nm, l'absorption UV est liée à la chaine latérale et aux ponts disulfures, avec un signal de CD plus faible.

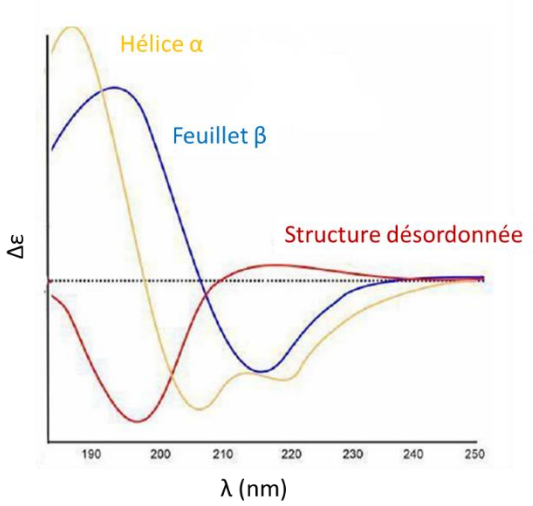


Figure 37 : Spectre de CD de référence pour les hélices α, les feuillets β et les structures désordonnées. Adapté de [170]

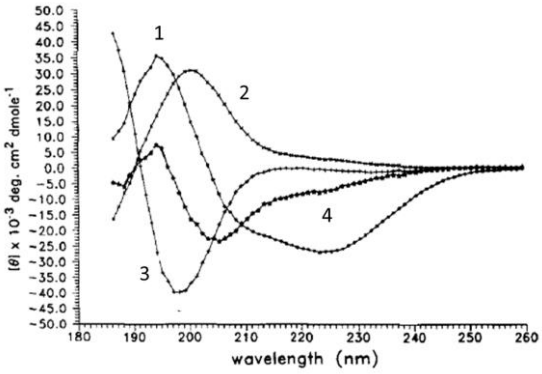


Figure 38 : Spectre de CD mesuré pour différents hexapeptides possédant une structure de type I β turn (1 et 4), de type II β turn (2) et désordonnée (3) [171]

5. Spectrométrie de masse

a. Principe et instrumentation

La spectrométrie de masse (MS) est une technique analytique permettant de détecter, d'identifier et de quantifier les molécules d'un échantillon, par la mesure de leur rapport masse sur charge (m/z). Cette technique repose sur la séparation en phase gazeuse des molécules, préalablement ionisées, en fonction de leur m/z. L'analyse en MS est schématiquement réalisée en trois étapes : l'ionisation de la molécule, la séparation des ions selon leur m/z, et la détection des ions. Un spectromètre de masse est composé de quatre parties :

- La source d'ionisation qui permet de transférer en phase gazeuse si nécessaire et d'ioniser les molécules de l'échantillon à analyser

- L'interface qui permet la transmission des ions entre la source d'ionisation et l'analyseur de masse.
- L'analyseur de masse qui permet de déterminer et de séparer les ions selon leur m/z.
- Le détecteur qui permet la production de signaux électriques à partir des ions. Le traitement de ces signaux permettra la génération des spectres de masses.

Parmi les différents types de spectromètres de masse, nous ne présentons dans ce travail que l'instrumentation qui a été utilisée lors de ces travaux de thèse.

i. La source d'ionisation

La source d'ionisation permet de nébuliser et d'ioniser les molécules de l'échantillon à analyser. Il existe différents types de source d'ionisation. Trois catégories peuvent être distinguées :

- Impact électronique et ionisation chimique : ces deux types d'ionisation sont adaptés à des échantillons à l'état gazeux. Il s'agit des sources d'ionisation utilisées dans le couplage de la MS avec la chromatographie gazeuse.
- Désorption-ionisation
- Nébulisation-ionisation

Ces deux dernières catégories sont adaptées à des échantillons non volatiles. Dans le cas de la désorption-ionisation, l'échantillon est sous forme solide et/ou déposé sur une matrice solide. La technique la plus commune est le MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption*). Dans le cas de la nébulisation-ionisation, l'échantillon est sous forme liquide. Cette technique d'ionisation est utilisée dans le couplage avec l'électrophorèse capillaire et la chromatographie liquide. L'ionisation par électronébullisation (ESI pour *electrospray ionisation*) est un type de source classique de nébulisation-ionisation. Il s'agit de la source utilisée dans ce travail de thèse, et sera donc plus précisément détaillée.

En ESI, la production d'ions est réalisée à pression atmosphérique, *via* la production de gouttelettes chargées. Les gouttelettes sont ensuite évaporées de leur solvant, donnant des ions en phase gazeuse. Les gouttelettes chargées sont formées à partir de l'échantillon liquide qui s'écoule lentement (débit de l'ordre de 1 à 10 µL/min) au travers d'un tube capillaire soumis à un fort champ électrique (entre 3 et 6kV). Le processus d'ionisation en ESI peut se diviser en trois étapes : la formation de gouttelettes chargées ; leur désolvatation et la formation de microgouttelettes chargées ; et la formation d'ions en phase gazeuse. Les sources d'ionisation par ESI sont dites ionisation douce, en effet ce mode d'ionisation n'entraine pas ou peu de fragmentation de la molécule ionisée. L'ionisation ESI peut être réalisée en mode positif et en mode négatif, de plus il possède la particularité de générer des ions multi-chargés. L'ionisation ESI est particulièrement adaptée à l'ionisation de composés polaires.

L'introduction de l'échantillon sous forme liquide permet un couplage direct avec la chromatographie, ce qui explique le développement quasi hégémonique du couplage LC-MS utilisant une source d'ionisation par ESI.

- Etape 1 : Formation de gouttelettes chargées

Le champ électrique appliqué au niveau du capillaire entraine l'accumulation de charge au niveau de la surface du liquide à l'extrémité du capillaire. Ce phénomène entraine une perturbation de la surface du liquide, appelé cône de Taylor [172]. Sous la contrainte du champ électrique, le cône de Taylor finit par céder entraînant l'émission de gouttelettes chargées en leur surface (Figure 39). Un gaz de nébulisation composé d'azote est émis de façon coaxiale au flux de liquide afin d'augmenter la stabilité du flux.

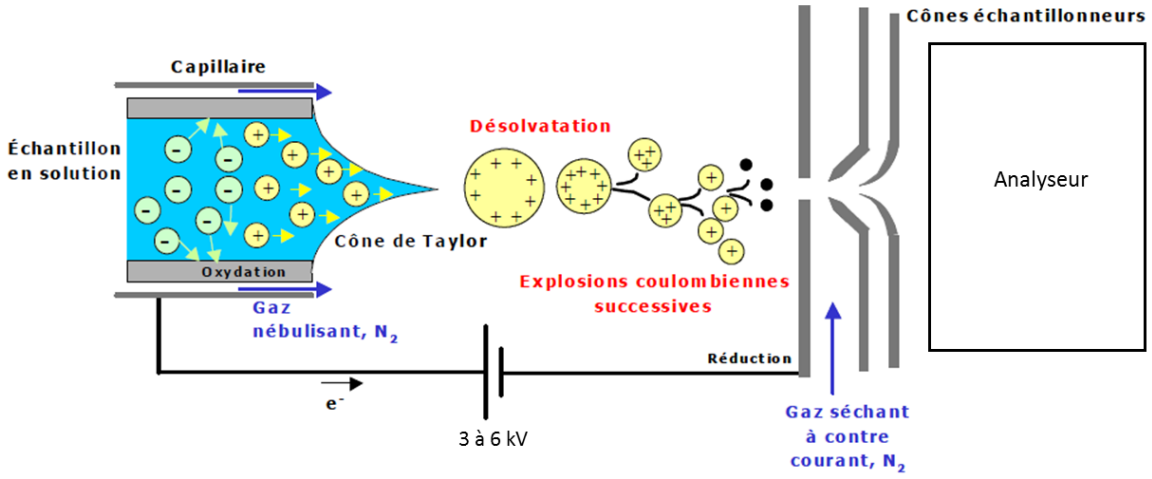


Figure 39 : Représentation schématique de la formation de gouttelettes chargées en ESI. Adapté du cours de William Buchmann, M2 RDSA, 2015

- Etape 2 : Désolvatation et formation de microgouttelettes chargées

La gouttelette chargée émise par le cône de Taylor est désolvatée par évaporation du solvant, ce qui entraine la diminution de son rayon, sa charge nette demeurant constante (Figure 39). Cette désolvatation est facilitée en chauffant l'atmosphère présente dans la source, ou en diminuant la pression. La taille de la gouttelette diminue jusqu'à atteindre le rayon critique de Rayleigh. L'équation de Rayleigh relie le rayon critique de la gouttelette à sa charge [173]:

$$q = 8\pi\sqrt{(\varepsilon\gamma R^3)} \quad (33)$$

q : charge de la gouttelette

ε : permittivité du vide

γ : tension superficielle du liquide

R : Rayon critique de Rayleigh

Lorsque le rayon critique de Rayleigh est atteint, les répulsions coulombiennes entre les charges de surface deviennent plus importantes que la tension de surface du liquide. Ceci entraine l'explosion des gouttelettes en plusieurs microgouttelettes de tailles variables plus petites. Ces microgouttelettes subissent à leur tour des explosions coulombiennes successives sous l'effet de l'évaporation du solvant [174, 175].

- Etape 3 : Formation d'ions à l'état gazeux

Le mécanisme de formation des ions en phase gazeuse à partir des microgouttelettes n'est pas totalement élucidé. Deux mécanismes sont avancés pour expliquer ce phénomène : le modèle de Dole et le modèle d'Iribarne et Thomson. Dans le modèle de Dole [176], également soutenu par les travaux de Röllgen [177], il se forme à l'issu de la cascade de fission des microgouttelettes extrêmement fines, d'environ 1 nm et ne contenant qu'un seul ion solvaté. L'évaporation du solvant résiduel entraine l'émission de l'ion en phase gazeuse. Dans le modèle d'Iribarne et Thomson [178], les ions sont émis en phase gazeuse à partir d'une gouttelette de charge très élevée. Lorsque la densité de charge est très élevée, un ion est désorbé, et la densité de charge de la gouttelette diminue. La Figure 40 schématise les deux modèles.

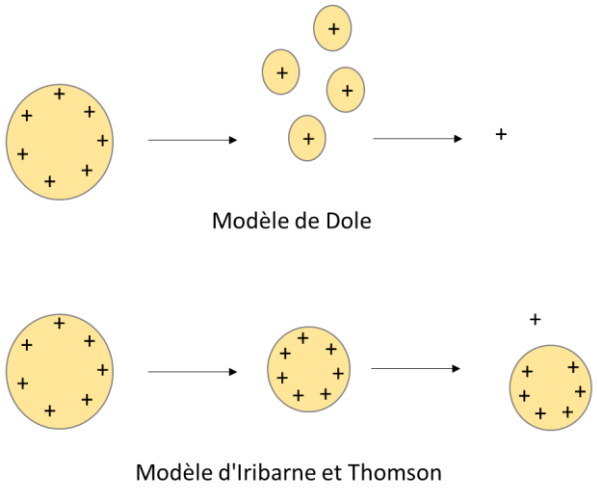


Figure 40 : Représentation schématique de la formation des ions à l'état gazeux selon le modèle de Dole et le modèle d'Irbane et Thomson

ii. L'interface

L'interface du spectromètre de masse permet d'acheminer les ions produits dans la source, à pression atmosphérique, jusque dans l'analyseur, où le vide est poussé. L'interface est ainsi généralement composée de plusieurs sections permettant de réduire graduellement la pression. Les ions sont guidés vers l'analyseur *via* la différence de pression entre deux sections, et par la différence de potentiels électriques appliqués par le biais de lentilles électrostatiques. L'interface permet généralement en

parallèle de refocaliser les ions produits dans un espace réduit afin d'augmenter l'intensité du signal MS et mécaniquement la sensibilité. De plus, l'interface inclut en général des éléments permettant la sélection et la fragmentation des ions permettant des analyses de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

iii. L'analyseur de masse

L'analyseur de masse permet de séparer et de mesurer les ions en fonction de leur rapport m/z basé sur des phénomènes physiques différents. Il existe différents types d'analyseur de masse dont les caractéristiques varient notamment en fonction de la gamme de masse analysable, la résolution, la précision sur la mesure de masse et la sensibilité. Lors de ce travail de thèse, le spectromètre de masse utilisé est équipé d'un analyseur à piège à ion linéaire et d'un analyseur orbitrap.

L'orbitrap est un analyseur de haute résolution (entre 7500 et 100 000), et permet l'analyse de m/z comprises entre 50 et 4000 Da. Il est constitué d'une électrode centrale en forme de fuseau, enfermée dans une électrode externe (Figure 41). Un champ électrostatique est maintenu entre les deux électrodes et permet le piégeage des ions au sein de la cellule. Les ions à l'intérieur de la cellule suivent une trajectoire en orbite autour de l'électrode centrale. Leur trajectoire est caractérisée par la fréquence de rotation suivant l'axe φ, la fréquence d'oscillations radiales selon l'axe r, et la fréquence d'oscillations axiales (ω_z) selon l'axe z. Le mouvement des ions selon l'axe z est uniquement dépendant du rapport m/z (équation 34), et permet ainsi la séparation des ions de m/z différents.

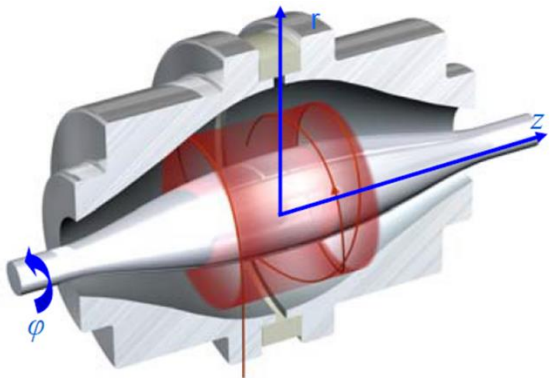


Figure 41 : Représentation schématique d'une cellule d'Orbitrap

$$\omega_z = \sqrt{\frac{q}{m} \times k} \qquad (34)$$

ω_z : fréquence d'oscillations axiales

m : masse

q : charge

k : constante instrumentale

iv. Le détecteur

Le détecteur convertit les m/z détectées en signal pouvant être traité afin de générer le spectre de masse. Les ions issus de l'analyseur sont captés par le détecteur, qui émet alors un signal incident. Il existe différents types de détecteurs : le collecteur de Faraday et le multiplicateur d'électrons. Ce dernier est le plus utilisé à l'heure actuelle, car plus sensible.

b. Analyse de protéines par spectrométrie de masse

En couplage avec l'HPLC ou l'électrophorèse capillaire, la MS est particulièrement intéressante pour l'analyse des mAbs. En effet, la MS permet la caractérisation des différents niveaux de structures des mAbs, en fonction de la stratégie analytique utilisée. La Figure 42 représente les trois grandes approches analytiques pour la caractérisation des mAbs par MS : *top down, middle-up* et *bottom-up* [28].

L'approche *top down* consiste en l'analyse de la protéine entière. Ce type d'analyse permet d'accéder à la masse exacte des différents variants afin, par exemple, d'identifier les différentes glycoformes présentes dans un échantillon et obtenir le profil de glycosylation global du mAbs. L'analyse top down peut également être utilisée avec une fragmentation par transfert d'électrons (ETD) pour obtenir des informations sur la séquence d'acide aminés [179].

L'approche *middle up* consiste en l'analyse de fragments de grandes tailles après soit digestion enzymatique limitée ou après ajout d'un agent de réduction tel que le dithiothréitol (DTT) entrainant la rupture des ponts disulfures. L'analyse de fragments facilite l'analyse par rapport à l'analyse de la protéine entière [28]. Ce type d'approche permet de focaliser la caractérisation uniquement sur certaines parties de la protéine, comme par exemple le fragment Fab.

L'approche *bottom-up* est directement dérivée de l'analyse protéomique. Elle consiste en l'analyse des peptides issus de la digestion enzymatique de la protéine. Il s'agit de l'approche qui a été réalisée pour l'analyse des mAbs lors de ce travail de thèse. Après réduction et alkylation des ponts disulfures, le mAbs subit une digestion enzymatique afin d'obtenir un mélange de peptides. Les peptides générés sont dépendants de l'enzyme utilisée. Les plus classiquement utilisées sont la trypsine, la Lys-C, l'Asp-N et la glu-C [28]. L'approche *bottom up* permet en particulier l'analyse de la séquence en acide aminés de la protéine aussi appelée *peptide mapping*. L'analyse de la séquence en acide aminés des mAbs permet de confirmer sa séquence, l'analyse des glycosylations, ou encore l'analyse des PTMs, et permet ainsi une caractérisation fine de la structure primaire du mAbs [28]

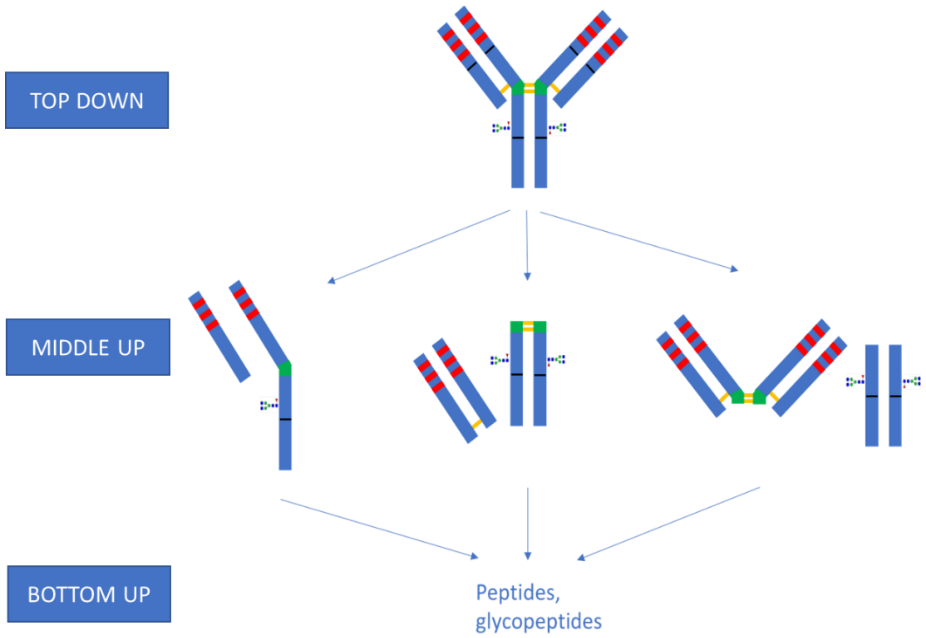


Figure 42 : Représentation schématique des différentes stratégies de caractérisation des mAbs par spectrométrie de masse. Adaptée de [28]

L'analyse de la séquence peptidique peut être réalisée par une analyse en MS/MS. L'identification des peptides générés après digestion enzymatique de l'échantillon est basée sur l'analyse de la valeur de m/z du peptide en MS, et des fragments générés du peptide en MS/MS. Les ions générés en MS sont isolés et fragmentés en MS/MS à tour de rôle. Pour l'analyse des peptides, le mode de fragmentation généralement utilisé est la dissociation par collision induite (CID). Les valeurs de m/z obtenues expérimentalement en MS et MS/MS sont comparées aux valeurs théoriques de m/z du peptide et de ses fragments. La fragmentation du peptide se fait au niveau des liaisons peptidiques, et permet ainsi d'obtenir sur le spectre MS/MS l'enchainement des acides aminés composant la séquence du peptide. En fonction de l'endroit où est fragmenté la liaison peptidique, plusieurs ions peuvent être obtenus (Figure 43). En CID, la fragmentation du peptide se fait au niveau des liaisons peptidiques pour générer des fragments y et b, et permet ainsi d'obtenir sur le spectre MS/MS l'enchainement des acides aminés composant la séquence du peptide (Figure 44A).

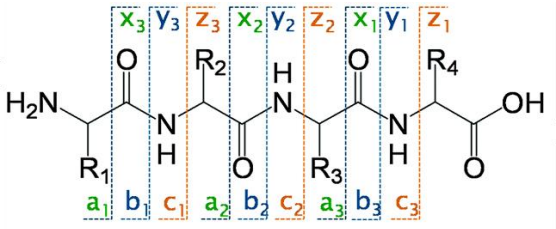


Figure 43 : Représentation des différents ions obtenus après fragmentation d'un peptide en MS/MS

Les PTMs entrainant une modification de la masse des acides aminés peuvent alors être caractérisées par l'intermédiaire des spectres MS/MS. Par exemple, l'oxydation d'une méthionine entraine une modification de +16 Da de la masse du peptide, qu'il est possible de mesurer sur le spectre MS du peptide, et sur le spectre MS/MS du peptide fragmenté. Un exemple est présenté à la Figure 44. On observe le spectre MS/MS du peptide non modifié permettant de distinguer les fragments correspondant à l'enchaînement des acides aminés (Figure 44A) et le spectre du peptide modifié démontrant l'oxydation de la méthionine (Figure 44B).

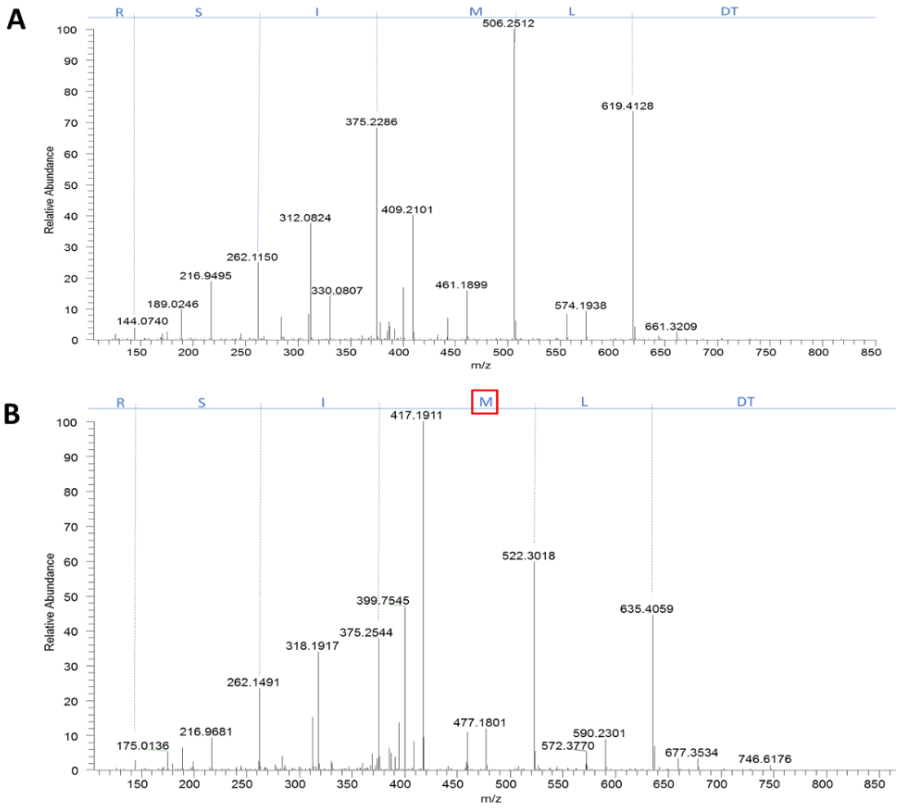


Figure 44 : Spectre MS/MS d'un peptide digéré montrant l'enchainement d'ions y correspondant à la fragmentation du peptide, dont la méthionine est non oxydée (A) ou oxydée (B)

PARTIE 2 : CARACTERISATION ET QUANTIFICATION SIMULTANEE DE L'ACIDE ASCORBIQUE ET DE SES PRODUITS DE DEGRADATION PAR CZE-UV. APPLICATION A LA PREDICTION DE STABILITE DE L'ACIDE ASCORBIQUE PAR ASAP

I. Introduction

Dans ce travail, une méthode en CZE-UV a été développée pour l'analyse quantitative de l'acide ascorbique et des trois produits de dégradation principaux suivants : DHAA, acide furoïque et furfural. L'étude inclut le développement et l'optimisation des paramètres de la méthode, ainsi que la validation statistique de la quantification pour les quatre molécules. Cette méthode a été appliquée dans un premier temps au dosage de l'acide ascorbique dans différents produits pharmaceutiques, et à l'analyse de leurs produits de dégradation. Le produit de dégradation majoritaire observé lors de stress forcés de l'acide ascorbique à la température ou en condition oxydante, et retrouvé dans un produit pharmaceutique après sa date de péremption a été identifié par MS. Dans un deuxième temps, une étude ASAP a été réalisée sur l'un des produits pharmaceutiques : Laroscorbine®. Le produit a été soumis à différentes conditions de stress, et analysé par la méthode en CZE-UV développée. Le même produit de dégradation majoritaire a été observé et utilisé pour construire le modèle ASAP. Les données long terme de stabilité prédites par le modèle ont ensuite été comparées aux données réelles de stabilité, sur une période de 3 ans.

II. Partie expérimentale

A. Développement et validation de la méthode en électrophorèse capillaire

1. Origine des produits chimiques et matières premières

L'acide ascorbique, le DHAA, le furfural, l'acide furoïque, l'acide benzoïque, le methyl parahydroxybenzoate (E218), le propyl parahydroxybenzoate (E216), le phosphate de sodium monobasique monohydraté et le phosphate de sodium dibasique dihydraté utilisés au cours de l'étude sont de grade analytique et proviennent de chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin, France). L'eau milliQ utilisée a été préparée *via* le système de purification Milli-Q (Merck Millipore, Molsheim, France).

2. Electrophorèse capillaire

L'étude a été réalisée sur une électrophorèse capillaire de modèle PACE-MDQ (Sciex separations, les Ulis, France). La détection se fait par détection UV avec quatre longueurs d'ondes disponibles : 200 nm, 214 nm, 254 nm et 280 nm. L'électrophorèse capillaire est pilotée par le logiciel 32 Karat version 7.0 (Sciex Separations, Les Ulis, France).

3. Développement de la méthode

La séparation des analytes est réalisée dans un capillaire de silice vierge, de diamètre interne de 75 µm et de longueur totale de 38 cm (28 cm de longueur effective jusqu'à la fenêtre de détection). La séparation est effectuée à température ambiante. Chaque nouveau capillaire a été conditionné selon le protocole suivant : méthanol (5 min), eau (5 min), NaOH 1M (5 min), eau (5 min), HCl 1M (5 min), eau (5 min), BGE (5 min). Entre chaque analyse, le capillaire est rincé 1 minute à 75 psi avec le BGE. La détection se fait à la longueur d'onde 214 nm afin d'avoir une bonne sensibilité pour l'ensemble des analytes. Le volume d'injection a été fixé proche de 2% du volume total du capillaire (1679 nL) *via* une injection hydrodynamique de 0,5 psi pendant 4 secondes. Cela correspond à un volume d'injection de 31,64 nL (1.9% du volume total du capillaire). Un volume maximal d'injection a été choisi afin de maximiser la sensibilité.

Les paramètres évalués lors de l'optimisation de la méthode ont été :

- La nature du BGE : tampon borate ou tampon phosphate
- La concentration du BGE : de 50 à 100 mM
- Le pH du BGE: de 5,7 à 8,0
- Le voltage appliqué : de +5 kV à + 20 kV

Les critères d'évaluation ont été la résolution entre les différentes molécules (résolution évaluée sur les 2 molécules ayant les temps de migration les plus proches) ainsi que le temps de migration, afin d'obtenir une méthode suffisamment résolutive (résolution > 1,5), dans un temps relativement rapide (temps d'analyse < 20 minutes). Lors de l'optimisation de la méthode, un mélange des quatre produits recherchés et de l'étalon interne a été analysé : acide ascorbique (200 mg/L), DHAA (200 mg/L), acide furoïque (45 mg/L), furfural (30 mg/L) et acide benzoïque, étalon interne (30 mg/L).

4. Méthode finale

Le BGE optimisé est le suivant : tampon phosphate 75mM, pH 8. Pour sa préparation, des solutions mères à 200 mM de phosphate de sodium monobasique monohydraté (solution A) et de phosphate de sodium dibasique dihydraté (solution B) sont préparées. L'électrolyte final est composé de 199 µL de solution A et 3551 µL de solution B, et complété à 10 mL avec de l'eau ultra pure. La préparation des tampons est déterminée en utilisant le logiciel Buffer Maker v1.1 (ChemBuddy, Marki, Pologne). Le voltage choisi est de + 15 kV, et le temps d'analyse final est de 10 minutes.

5. Validation de la méthode

La méthode développée a été validée vis-à-vis de sa spécificité, linéarité, répétabilité, fidélité intermédiaire et justesse pour les quatre molécules.

- La spécificité de la méthode a été vérifiée par comparaison avec l'analyse d'un témoin d'eau Milli-Q. Également, lors de l'analyse des produits pharmaceutiques, la spécificité a été vérifiée au regard des excipients des formulations.
- La sensibilité de la méthode a été évaluée en déterminant la limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ) pour chacune des molécules. La LOD et la LOQ sont déterminées par le *ratio* signal sur bruit (S/N) via les équations suivantes :

  LOD= 3x S/N

  LOQ= 10 xS/N
- La linéarité a été évaluée sur les gammes de concentration suivantes :
  - Acide ascorbique: 50 à 800 mg/L
  - DHAA: 50 à 800 mg/L
  - Acide furoïque : 11,25 à 180 mg/L
  - Furfural : 7,5 à 120 mg/L

  La gamme de calibration est préparée à partir d'une solution mère des quatre molécules (800 mg/L d'acide ascorbique et de DHAA, 180 mg/L d'acide furoïque, 120 mg/L de furfural) préparée chaque jour d'analyse. La solution mère est ensuite diluée dans l'eau milli-Q pour obtenir les cinq niveaux de concentrations. Après dilution, l'étalon interne est ajouté à l'échantillon à la concentration de 30 mg/L. Le *ratio* entre l'aire de l'analyte et l'aire de l'étalon interne est utilisé comme signal. Les gammes de calibration sont construites *via* régression linéaire. L'analyse a été répétée trois fois (1 gamme par jour, sur 3 jours).

- La justesse, la répétabilité et la fidélité intermédiaire sont évaluées par l'analyse de contrôle qualité (CQ), sur trois niveaux de concentrations : pour l'acide ascorbique et le DHAA : 50, 200, 800 mg/L ; pour l'acide furoïque : 11,25 ;45 ; 180 mg/L ; pour le furfural : 7,5 ; 30 and 120 mg/L. Les CQ sont préparés chaque jour d'analyse et indépendamment de la gamme de concentration. Chaque niveau de CQ a été analysé en triplicat chaque jour, sur trois jours. La justesse a été évaluée par rapport au *ratio* entre la concentration calculée et la concentration théorique sur les trois jours (n=9 CQ / niveau). La répétabilité et la fidélité intermédiaire ont été évaluées par analyse de variance (single way ANOVA) par rapport aux concentrations calculées (n=3 CQ / niveau / jour) après vérification de l'homogénéité des variances entre chaque jour (Test de Cochran, alpha = 0,05).

6. Application de stress forcés pour l'évaluation du caractère indicateur de stabilité de la méthode

Deux types de stress ont été réalisés afin de générer des produits de dégradation de l'acide ascorbique: un stress à la température et un stress oxydatif. Pour étudier l'effet de la température, une solution d'acide ascorbique à 500 mg/L a été conservée à 80°C pendant 0, 2h30 et 5h00 dans des flacons fermés hermétiquement. Pour le stress oxydatif, une solution d'acide ascorbique à 500 mg/L a été mise au contact de H_20_2 0,1% (v/v) pendant 0, 50 et 70 minutes à température ambiante.

B. Identification du produit de dégradation inconnu majoritaire par spectrométrie de masse

1. Echantillons analysés

Afin d'identifier le produit de dégradation inconnu majoritaire obtenu lors des stress forcés, une solution d'acide ascorbique non dégradée et une solution d'acide ascorbique dégradée ont été analysées par MS. Les deux solutions ont été préparées à une concentration en acide ascorbique de 500 µg/mL. La solution non dégradée est préparée directement avant l'analyse. La solution dégradée est conservée 5h à 80°C avant analyse dans un flacon hermétiquement fermé. Les échantillons ont été analysés par MS en infusion directe.

2. Spectrométrie de masse

Le spectromètre de masse utilisé est un LTQ Orbitrap XL® (ThermoFischer Scientific, Les Ulis, France) piloté par le logiciel Xcalibur® (ThermoFischer Scientific, version 2.2). L'analyse est réalisée par infusion directe à 10 µL/min. L'ionisation est réalisée *via* une source ESI. Les paramètres de la source sont les suivants :

- Mode d'ionisation : négatif
- Voltage : + 4.0 kV
- Débit du sheath gas : 5 psi
- Température de la source: 55°C
- Température du capillaire : 280°C
- Voltage du capillaire : 35 V
- Tube lens voltage : 90 V.

La gamme de m/z était de 100 à 500 m/z en MS et de 50 à 300 en MS/MS. L'analyse MS est réalisée en mode haute résolution au niveau de l'analyseur orbitrap (R = 30 000). Les ions sélectionnés (fenêtre d'isolation de 1 Da) sont fragmentés par une énergie de collision de 30 (unité arbitraire).

C. Produits pharmaceutiques analysés

Trois produits pharmaceutiques ont été analysés avec la méthode développée :

- Laroscorbine ® 1 g / 5 mL pour injection intra veineuse (Bayer, France). L'AA est sous forme de solution
- Laroscorbine® 1 g (Bayer, France). L'AA est sous forme de comprimé
- Vitascorbol® 500 mg (Cooper, France). L'AA est sous forme de comprimé

Dans le cas de la Laroscorbine ® 1g/5 mL pour injection intra veineuse, la solution est directement diluée dans l'eau Milli-Q à la concentration voulue et analysée par la méthode CZE-UV. Pour les deux autres produits, les comprimés ont été dissous dans l'eau milli-Q et passés aux ultrasons pendant 10 minutes. La solution a été filtrée sur des filtres 0,22µm (Corning, Allemagne) puis diluée dans l'eau milli-Q à la concentration voulue avant analyse. Le dosage de l'acide ascorbique a été fait à la concentration théorique de 200 mg/L et l'évaluation des produits de dégradation à la concentration de 5,0 mg/mL.

D. Analyse ASAP

1. Produits analysés

L'étude ASAP a été réalisée sur le produit fini Laroscorbine ® 1 g / 5 mL pour injection intra veineuse (Bayer, France). Un lot (F0675-1) venant d'être produit a été utilisé pour les essais de dégradation, et comme témoin d'un temps de stabilité initial. Différents lots ont été analysés à différents temps de stabilité. Le détail des lots et des temps de stabilité sont décrit dans le
Tableau 8 suivant.

Tableau 8 : Lots de Laroscorbine® et échéances de stabilité analysées

Echantillon (n° lot)	Date de péremption	Date de fabrication (déduite)	Date analyse	Temps de stabilité
F0542-1	Septembre 2018	Septembre 15	31/01/2019	40 mois
F0627-1	Octobre 2021	Octobre 18	31/01/2019	3 mois
F0627-1	Octobre 2021	Octobre 18	08/10/2020	24 mois
F0675-1	Mars 2023	Mars 2020	01/10/2020	7 mois

2. Stress appliqués

Trente ampoules de Laroscorbine ® 1 g / 5 mL ont été dédiées à l'étude ASAP. Trois ampoules ont été immédiatement congelées à – 20°C, et correspondent aux échantillons contrôle (« T0 »). Les 27 autres ampoules ont été placées dans des enceintes dont la température peut être modifiées (Binder, Tuttlingen, Allemagne). Un suivi en temps réel de la température des enceintes permet d'éviter tout risque d'excursion de température. Le Tableau 9 détaille les températures et les durées de stress utilisés pour l'étude. Pour chaque température, les ampoules de Laroscorbine ® 1 g/ 5 mL sont placées en même temps dans l'enceinte. A chaque échéance, une ampoule est retirée de l'enceinte et placée à -20°C en attente de l'analyse CZE-UV. L'ensemble des 30 ampoules a été analysé dans une même séquence.

Tableau 9: Conditions et temps de stress pour l'étude ASAP de la Laroscorbine®

Température de stress (°C)	Durée de stress (jours)
45	11, 14, 17, 21
50	7, 10, 14, 21
55	4, 5, 12, 21
60	3, 5, 10, 21
65	2, 4, 7, 14
75	1, 2, 4, 7
80	1, 2

3. Prédiction de la stabilité

Les résultats ont été analysés par le logiciel ASAPprime® version 5.0.3 (FreeThink Technologies, Brandford, USA). L'analyse est basée sur la quantité du produit de dégradation majoritaire TKV (tri-hydroxy-keto-valeraldehyde) retrouvé dans les ampoules après stress à la température (quantité en normalisation d'aire %NA). La LOD de la méthode était de 0,05% (%NA), avec un écart type de 10%. La méthode d'ajustement (*fit method*) pour évaluer le taux de dégradation est linéaire. L'intervalle de confiance pour estimer la durée de péremption est calculé *via* une approche Monte Carlo, avec un nombre de simulations de 2500. La limite de spécification pour le produit de dégradation TKV était de 1,0%.

III. Résultats

A. Développement et validation de la méthode en électrophorèse capillaire

Afin de pouvoir détecter l'ensemble des molécules d'intérêts, et notamment le DHAA dont l'absorbance en UV est relativement faible, il a été choisi de travailler à la longueur d'onde 214 nm.
L'analyse de l'acide ascorbique par CZE-UV est généralement réalisée avec un BGE composé d'un tampon borate ou d'un tampon phosphate [180]. De ce fait, des essais préliminaires au laboratoire portant sur ces deux tampons ont été réalisés. Le tampon phosphate permettait d'obtenir des courants plus faibles et une ligne de base plus stable par rapport à un tampon borate. La suite du développement a donc été réalisé avec un BGE constitué de tampon phosphate. Le Tableau 10 présente les résultats obtenus dans les différentes conditions testées. L'optimisation de la résolution est objectivée par la résolution entre l'acide ascorbique et le DHAA qui sont les deux molécules ayant le temps de migration les plus proches, et le temps total de l'analyse est objectivé par le temps de migration de l'acide furoïque, dernière molécule détectée.

Tableau 10 : Optimisation de la concentration du BGE de son pH et du voltage pour améliorer la résolution entre les deux molécules les plus proches : AA et DHAA, et le temps total de run représenté par le temps de migration de l'acide furoïque.

	Concentration en phosphate du BGE (pH 8.0 ; voltage +15kV)			Valeur du pH du BGE (75mM; voltage +15kV)			Voltage appliqué (BGE 75 mM; pH 8.0)		
	50 mM	75 mM	100 mM	5.7	7.0	8.0	5 kV	10 kV	15 kV
Résolution (acide ascorbique/DHAA)	1.0	2.2	NA1	NA2	2.3	2.2	2.5	1.9	2.2
Temps de migration de l'acide furoïque (min)	7.8	8.5	NA1	30.6	16.5	8.5	33.0	16.9	8.5

NA1: non applicable à cause d'un courant trop élevé
NA2: non applicable à cause du manque de séparation entre DHAA et AA

1. Influence de la concentration du BGE

Des concentrations entre 50 et 100 mM de tampon phosphate ont été testées. Pour une concentration de 100 mM, le courant généré était trop important, supérieur à 300 µA, et ne permettait pas de continuer l'analyse. Un courant trop important entraine une température trop élevée, liée à l'effet Joule, et une dégradation rapide du capillaire. L'augmentation de la concentration entre 50 et 75 mM permet d'améliorer la résolution entre l'acide ascorbique et le DHAA (1,0 à 2,2), le temps de migration étant en parallèle augmenté. Cet effet est attribué à la diminution du EOF, ce qui entraine une augmentation de la contribution de l'effet électrophorétique à la mobilité apparente des molécules. Une concentration de 75 mM a été sélectionnée, notamment car elle permet d'obtenir une séparation complète entre l'acide ascorbique et le DHAA, indispensable à la réalisation d'une quantification.

2. Influence du pH du BGE

Les pKa des différentes molécules analysées sont les suivants :

- Acide ascorbique : 4,1 ; 11,8
- DHAA : 3,9
- Acide furoïque : 3,1
- Furfural: absence de pKa

En CZE, la séparation des molécules est liée à leur différence de charge. Afin d'obtenir une bonne séparation, les molécules doivent se trouver sous formes ionisées, c'est-à-dire que le pH du BGE doit être supérieur à pKa + 1 (90% de la forme ionisée). Dans le cas présent, le pH devait ainsi être au moins supérieur à 5,1. Les différents pH testés étaient : 5,7 ; 7,0 et 8,0. A pH 5,7, l'acide ascorbique et le DHAA n'étaient pas séparés (Tableau 10). En augmentant le pH, la résolution a été améliorée. La résolution obtenue à pH 7 et à pH 8 est très similaire et satisfaisante (2,3 et 2,2 pour une concentration du BGE de 75mM). Par ailleurs, l'augmentation du pH a permis de diminuer significativement les temps

de migration des différentes molécules. L'augmentation du pH entraine une augmentation de la densité de charge à la surface du capillaire en silice. Cette augmentation de charge entraine une augmentation du flux électro osmotique, et donc une diminution du temps d'analyse.

3. Influence du voltage

En utilisant un voltage de +5kV, le temps de migration de l'acide furoïque était supérieur à 30 minutes. A l'extrême inverse, un voltage de +20kV engendrait un courant trop important. Un voltage de +10 ou +15kV permettait une bonne séparation de l'ensemble des molécules, dans un temps relativement rapide.

4. Conditions finales

Au final, les conditions permettant une bonne résolution tout en conservant un temps de run total rapide de moins de 10 minutes étaient les suivantes :

- pH du BGE : 8,0
- Concentration du BGE : 75mM
- Voltage : +15kV

La Figure 45 présente un électrophérogramme obtenu dans ces conditions.

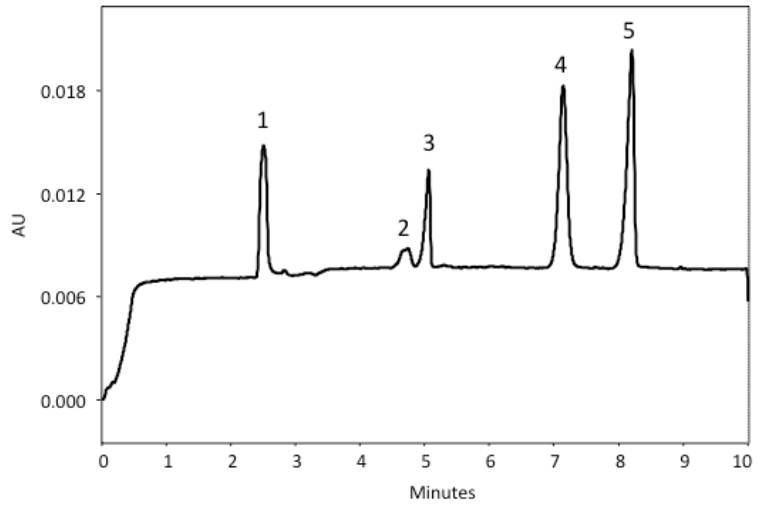


Figure 45 : Electrophérogramme obtenu dans les conditions d'analyse optimisées.
Les différents pics correspondent à 1/Furfural (30 mg/L), 2/ DHAA (200 mg/L), 3/Acide ascorbique (200 mg/L), 4/ acide benzoïque (étalon interne), 5/ acide furoïque (45 mg/L).

A notre connaissance, il s'agit de la première méthode en CZE montrant la séparation de l'acide ascorbique et de ses produits de dégradation. Par ailleurs, en comparaison avec des méthodes décrites en HPLC [61, 181], la CZE permet une séparation efficace de l'acide ascorbique et de ses produits de

dégradation, avec un temps d'analyse plus court. L'efficacité de la séparation électrophorétique peut être attribuée à l'absence de phase stationnaire qui entraine des phénomènes d'élargissement de pics, notamment issus des phénomènes de diffusion ou de résistance au transfert de charge.

5. Validation de la méthode

La méthode ainsi développée a été validée pour le dosage de l'AA et de ses trois produits de dégradation. La validation est réalisée sur les caractéristiques de spécificité, linéarité, justesse, précision, ainsi que la LOD et la LOQ pour chacune des 4 molécules. Les résultats sont présentés dans le Tableau 11.

- Spécificité:

L'évaluation de la spécificité de la méthode est validée par comparaison avec l'analyse d'un blanc contrôle. Aucun pic n'est apparu sur l'électrophérogramme du blanc, permettant ainsi de garantir l'absence d'interférence liée à la matrice. Également, les excipients utilisés dans les produits pharmaceutiques testés et disponibles ont des temps de migration différents des quatre molécules testées : propylparabene (E216), methylparabene (E218), acide citrique, acide malique.

- Linéarité:

La linéarité a été évaluée sur les gammes de concentration suivantes : 7,5 – 120 µg/mL pour le furfural, 11,25 – 180 µg/mL pour l'acide furoïque et 50 – 800 µg/mL pour l'acide ascorbique et le DHAA. Les coefficients de corrélation étaient supérieurs à 0,999 dans chaque cas.

- Justesse :

La justesse est évaluée via l'analyse des CQ sur 3 niveaux (concentration basse, moyenne et haute). Pour l'acide ascorbique, le biais est inférieur à 2%, ce qui est très satisfaisant pour le dosage d'un principe actif dans un produit pharmaceutique. Dans le cas des produits de dégradation, le biais est systématiquement inférieur à 10%, suffisant pour l'analyse des impuretés d'un produit pharmaceutique.

- Précision :

La précision intra-jour et inter-jour est évaluée par l'analyse de CQ, sur 3 niveaux, répétée 3 fois par jour, sur 3 jours. Concernant l'acide ascorbique, la précision intra jour et inter jours est systématiquement inférieure à 5%, satisfaisant pour le dosage d'un principe actif. Pour les produits de dégradation, un maximum de 5,6% est observé, satisfaisant pour l'analyse des impuretés.

- LOD et LOQ

La LOD et la LOQ sont évaluées en utilisant la méthode du *ratio* signal/bruit. Pour l'acide ascorbique, elles sont respectivement de 5 et 15 µg/mL. Elles sont plus faibles pour le furfural et l'acide furoïque

(0,7 et 0,8 ; 2,4 et 2,5 respectivement). Pour le DHAA, pour lequel l'absorbance en UV est plus faible, la LOD est de 15 µg/mL et la LOQ est de 45µg/mL.

Au total, la méthode a été validée pour les quatre molécules et peut donc être appliquée au dosage de l'acide ascorbique, ainsi que de ses 3 produits de dégradation.

Tableau 11 : Résultats statistiques de la validation quantitative pour le furfural, le DHAA, l'acide ascorbique et l'acide furoique

		Furfural	DHAA	Acide ascorbique	Acide furoique
Mobilité apparente ($cm^2.V^{-1}.s^{-1}$)		$4.73.10^{-4}$	$2.63.10^{-4}$	$2.36.10^{-4}$	$1.39.10^{-4}$
Gamme (µg/mL)		7.5 - 120	50 - 800	50 - 800	11.25 - 180
Equation		y = 0,012x +0,263	y = 0.001x -0.002	y = 0.002x -0.003	y = 0.024x -0.006
R^2		0.999	0.999	0.999	0.999
LOD (µg/mL)		0.7	15.0	5.0	0.8
LOQ (µg/mL)		2.4	45.0	15.0	2.5
Justesse (n=9 / niveau de CQ)	CQ1	99.5%	100.9%	100.6%	106.5%
	CQ2	97.7%	102.4%	98.7%	109.7%
	CQ3	101.2%	99.4%	100.5%	108.8%
Précision intra jour (n=3 / CQ)	CQ1	3.0%	1.9%	1.8%	4.8%
	CQ2	5.4%	4.7%	0.9%	0.7%
	cQ3	2.3%	3.6%	1.6%	1.4%
Précision inter jour (n=9 / CQ)	CQ1	4.4%	4.4%	4.6%	5.3%
	CQ2	5.6%	5.1%	1.2%	3.0%
	CQ3	3.0%	4.9%	3.0%	3.7%

B. Dégradation forcée de l'acide ascorbique

L'acide ascorbique est un produit connu, et sa dégradation a été largement étudiée. Elle est en particulier accélérée en présence d'oxygène et / ou avec la température [61, 182]. Afin d'utiliser la méthode développée pour évaluer la stabilité de l'acide ascorbique, il était nécessaire d'évaluer le caractère indicateur de stabilité de cette méthode. Pour cela, une solution d'acide ascorbique (500 mg/L) a été soumise à un stress oxydant (H_2O_2 0,1% (v/v), 50 et 70 minutes) et à la température (80°C, 2h30 et 5h00) puis analysée par la méthode développée. La Figure 46 présente les électrophérogrammes obtenus dans ces conditions. Dans le cas du stress oxydant, après 70 minutes, environ 25% d'acide ascorbique a été dégradée. De façon logique avec la voie de dégradation, du DHAA et de l'acide furoïque sont observés, avec des concentrations respectives de 8,6 % (m/m) et de 1,2% (m/m). D'autres produits de dégradation ont été observés, dont un produit de dégradation majoritaire. La dégradation de l'acide ascorbique en condition oxydante est très rapide, en accord avec ce qui est décrit dans la littérature [183]. Dans le cas du stress à la température (mais toujours avec le contact

de l'oxygène de l'air, donc non en condition anaérobie), après 5 heures à 80°C, il a été observé une dégradation de l'acide ascorbique d'environ 8%. Le même produit de dégradation majoritaire, non identifié, a été observé. Très peu, voir pas de DHAA n'a été observé. Ceci peut être en lien avec la faible absorbance du DHAA, alors que peu de dégradation d'acide ascorbique a été observé.

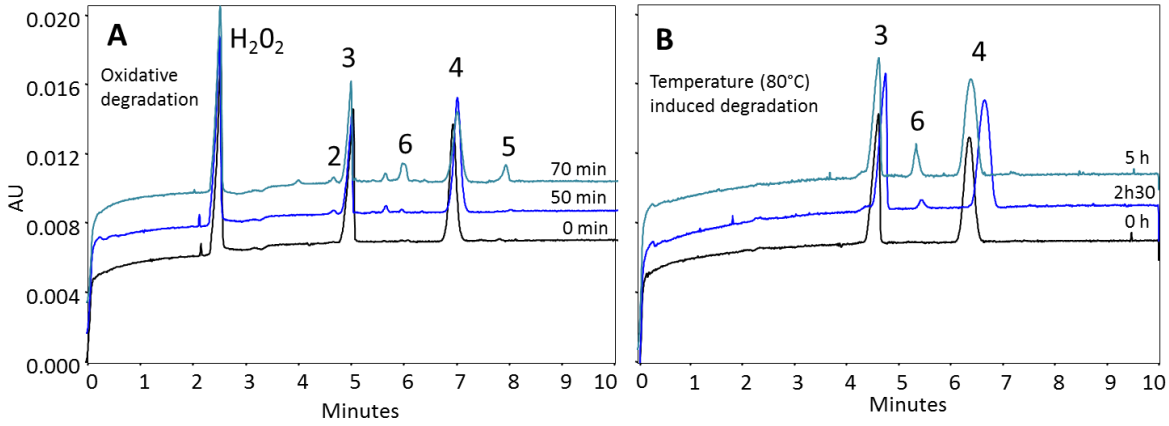


Figure 46 : Electrophérogramme obtenus après analyse de l'AA (3) après A/ stress oxydant (H_2O_2 0,1%) pendant 50 min et 70 min et après B/ stress à la température (80°C) pendant 2h30 et 5h.
Les pics correspondent au DHAA (2), acide furoïque (5), un produit de dégradation non identifié (6) et l'acide benzoïque (4).

C. Identification du produit de dégradation majoritaire en spectrométrie de masse.

Un produit de dégradation majoritaire a été observé dans les deux types de stress forcés réalisés (pic 6, Figure 46). Il est donc apparu important de l'identifier. Comme décrit Figure 12 (partie 1, Chapitre 2), différents produits de dégradation intermédiaires peuvent être observés. En présence d'oxygène, l'acide ascorbique s'oxyde en DHAA. Celui-ci est rapidement, et de façon irréversible, hydrolysé en acide 2,3 diketogluconique, puis dégradé en TKV [184, 185]. Le produit de dégradation inconnu pourrait ainsi correspondre à l'un ou l'autre de ces produits de dégradation. En l'absence de témoin disponible, l'identification de ce composé a été réalisé par MS. L'ordre de migration des composés en CZE a également été discuté.

1. Analyse par spectrométrie de masse

Des essais par MS/MS haute résolution ont été réalisés afin d'identifier le produit de dégradation inconnu. Les spectres MS et MS/MS d'une solution non dégradée ou après 5 heures à 80°C d'acide ascorbique ont été comparés. Ils sont présentés Figure 47. Concernant l'acide ascorbique non dégradé, le spectre MS présente un signal m/z de 175.0239, correspondant à l'ion parent $[M-H]^-$ de l'acide ascorbique. La précision obtenue est de 2,39 ppm, cohérent avec la performance de l'appareil. La

distribution isotopique est en accord avec le spectre MS théorique de l'acide ascorbique. L'échantillon ne contenant que de l'acide ascorbique en solution, les autres pics obtenus sur le spectre ont été attribués à une dissociation liée à l'ionisation dans la source. Concernant l'acide ascorbique dégradé, il n'a pas été observé de pic de m/z 191 qui correspondrait à l'acide 2,3 diketogluconique. Par contre, un pic de m/z 147,0296 non présent sur le spectre d'acide ascorbique non dégradé est observé. Ce pic correspond à l'ion parent $[M-H]^-$ du TKV, avec une précision de 2,04 ppm, en accord avec les performances de l'appareil. De plus, la distribution isotopique du pic est en accord avec la distribution isotopique théorique du TKV. Les spectres MS/MS de l'acide ascorbique et du TKV ont également été obtenus. Le spectre MS/MS de l'acide ascorbique est cohérent avec la structure de la molécule et avec ce qui est décrit dans la littérature [186, 187]. De la même façon, le spectre MS/MS du TKV est cohérent avec la structure de la molécule (Figure 48).

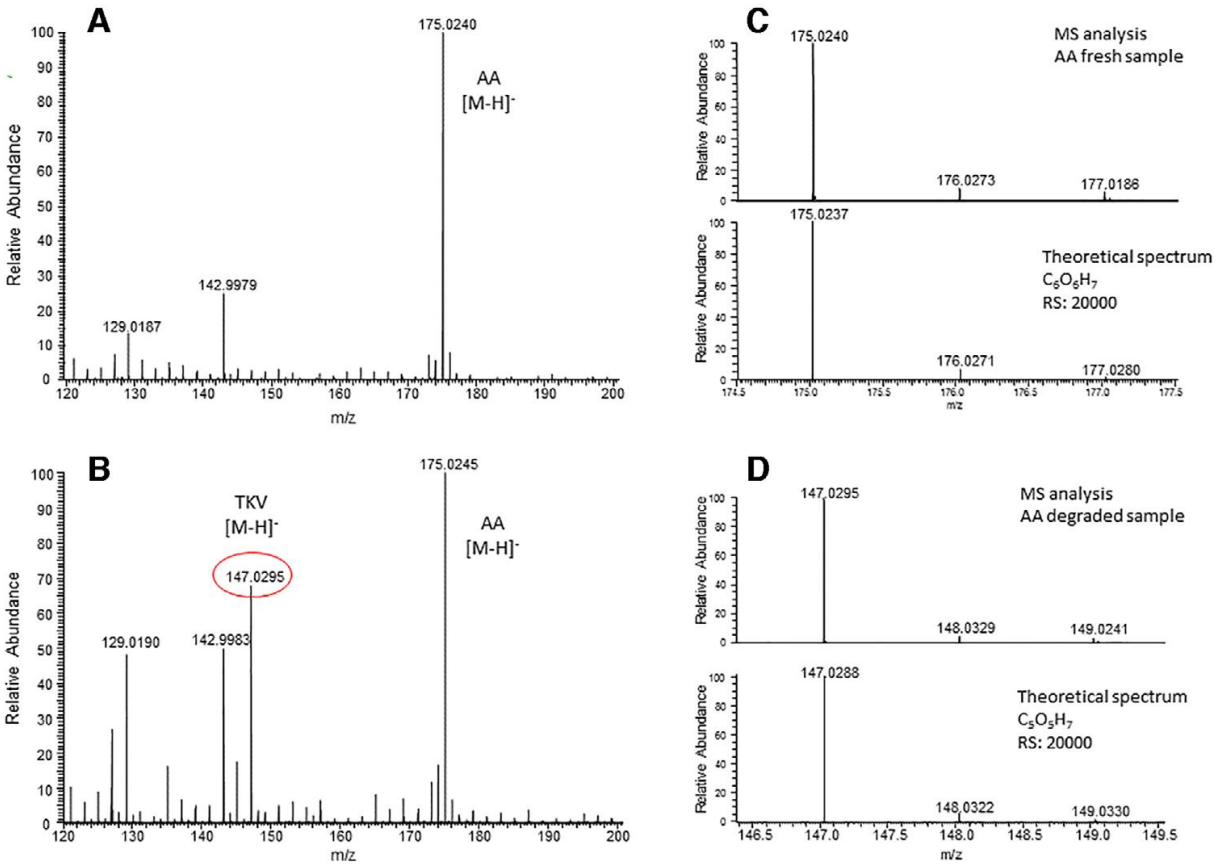


Figure 47 : Spectre MS de A/ acide ascorbique non dégradé et B/ acide ascorbique dégradé. Le pic de 175 corresponds à l'ion $[M-H]^-$ de l'acide ascorbique, le pic de m/z 147 corresponds à l'ion parent TKV. C/ profil isotopique de l'ion parent $[M-H]^-$ de l'acide ascorbique et simulé. D/ profil isotopique de l'ion parent $[M-H]^-$ de du TKV et simulé.

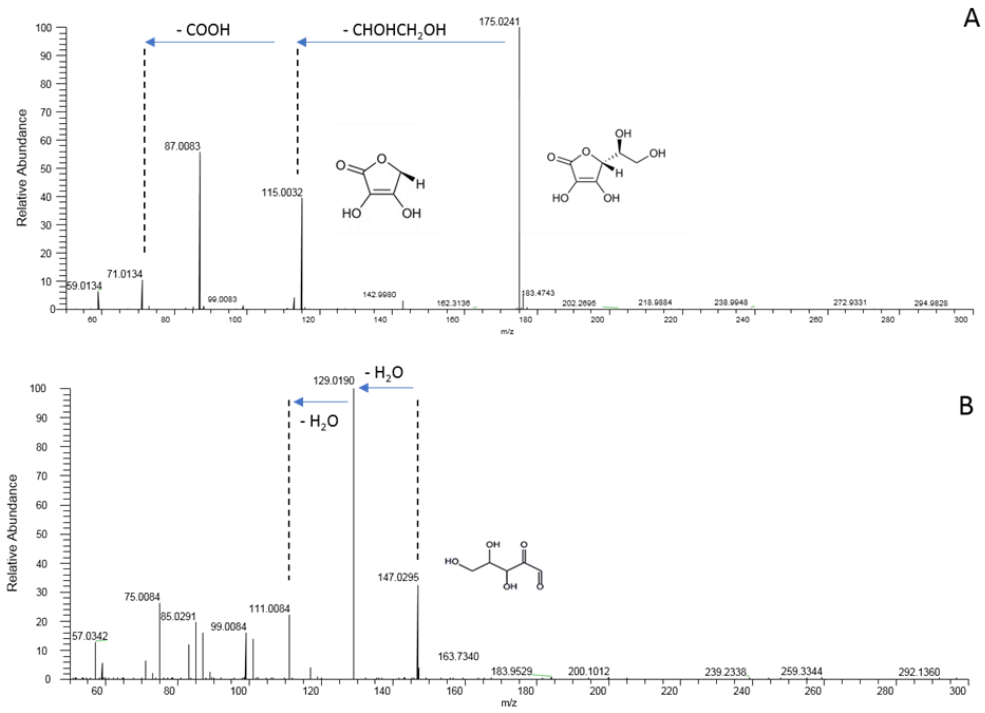


Figure 48 : Spectre MS/MS de l'acide ascorbique (A) et du TKV (B)

2. Ordre de migration en CZE

L'ordre de migration des composés en CZE permet également de confirmer l'identification du produit de dégradation inconnu. L'analyse en CZE est réalisée en mode normal. Dans ce cas, l'ordre théorique de migration est le suivant :

- En premier : les molécules chargées positivement. Plus les molécules sont petites et plusieurs fois chargées, plus elles migrent rapidement.
- Ensuite : les molécules neutres
- En dernier : Les molécules chargées négativement. Plus les molécules sont petites et plusieurs fois chargées, plus elles migrent lentement.

Dans notre cas, le furfural est le seul composé neutre. Il est élué en premier. Ensuite, les composés sont tous chargés une seule fois. L'ordre de migration sera donc lié à leur taille : DHAA et acide ascorbique (174 and 176 g/mol respectivement) sont élués de façon très proche, puis l'acide benzoïque (122 g/mol) et en dernier l'acide furoïque (112 g/mol). Le produit de dégradation inconnu est élué entre l'acide ascorbique et l'acide benzoïque. Ce temps de migration est cohérent avec la masse molaire du TKV (148 g/mol). Au contraire l'acide 2,3-diketogluconique (192 g/mol) devrait être élué avant le DHAA. Ces dernières observations, avec l'analyse par MS/MS, permettent de conclure à l'identification du produit de dégradation majoritaire comme étant le TKV. A notre connaissance, il s'agit de la première étude décrivant l'analyse en CZE-UV du TKV.

D. Application à l'analyse de différents produits pharmaceutiques

La posologie de l'acide ascorbique est de 1g/jour. D'après les ICH Q3B(R2), le seuil de report des impuretés pour cette posologie est de 0,1% [188]. Dans ce cas, l'approche qui peut être adoptée est d'analyser le produit à une concentration correspondant à 1000 fois la LOD. C'est-à-dire que dans le cas présent, l'analyse par CZE-UV de l'acide ascorbique sera réalisée pour une concentration de 5 mg/mL. Nous avons vérifié qu'à cette concentration, la séparation entre l'acide ascorbique et le DHAA restait acceptable. La Figure 49 présente l'électrophérogramme de l'acide ascorbique à la concentration de 5 mg/mL, avec l'acide furoïque et le furfural à la concentration de 5 µg/mL (0,1% m/m) et avec le DHAA à la concentration de 50 µg/mL (1,0% m/m). L'ensemble des composés sont correctement séparés. Du fait de la faible absorption en UV du DHAA, il n'est pas possible d'atteindre le seuil de 0,1% (LOD du DHAA 15µg/mL). Néanmoins, d'un point de vue réglementaire, la norme de 0,1% est destinée à des produits de dégradation non connus. Lorsque le composé est connu, sa concentration acceptée dans le produit fini est liée à sa toxicité potentielle. Le DHAA est un composé ne présentant pas de toxicité, et qui possède la même action biologique que l'acide ascorbique, similaire ou moins efficace selon les études [189, 190]. Un seuil de détection plus élevé apparait donc acceptable.

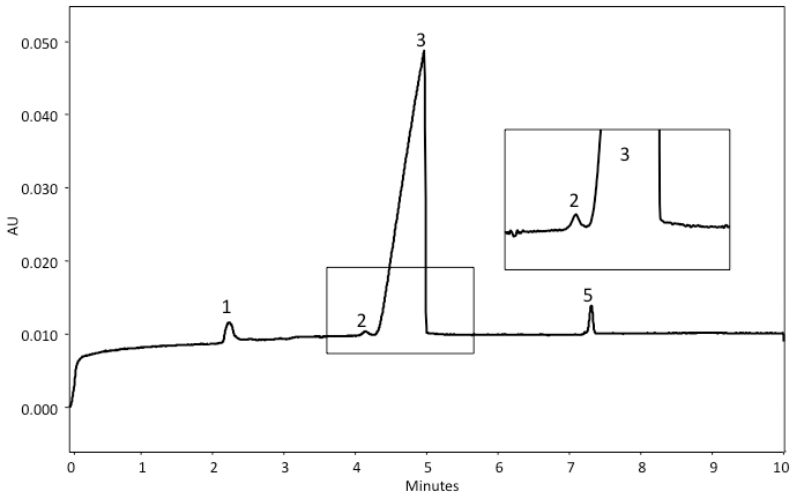


Figure 49 : Electrophérogramme de l'AA à 5mg/mL (3), du furfural (1) et de l'acide furoïque (5) à 5 µg/mL (ratio de 0,1% m/m) et DHAA (2) à 50 µg/mL (ratio de 1.0% m/m).

Différents produits pharmaceutiques ont été analysés par la méthode CZE-UV développée :

- Laroscorbine ® 1g/5mL : forme injectable d'acide ascorbique. Dans ce cas, il a été possible d'analyser le produit avant et après sa date de péremption.
- Laroscrobine® 1g : forme comprimé
- Vitascorbol ® 1g : forme comprimé

Nous avons également analysé les excipients disponibles utilisés dans ces produits pharmaceutiques. Ces excipients ne présentent pas d'interférences avec les molécules étudiées, et sont correctement séparés. Le propylparabene (E216) et le methylparabene (E218), excipients présents dans la Laroscorbine® injectable ont un temps de rétention de 3,0 minutes. Les autres excipients présents dans les comprimés sont également séparés de l'acide ascorbique et des produits de dégradation : l'acide citrique n'a pas été observé avec cette méthode, et l'acide malique a un temps de rétention de 4,0 minutes. Nous avons ensuite évalué le dosage de l'acide ascorbique ainsi que la recherche de produit de dégradation pour chaque produit pharmaceutique (Tableau 12). Dans tous les cas, y compris après péremption, la concentration d'acide ascorbique était dans les normes, c'est-à-dire entre 95-105% de la concentration théorique. Pour les produits analysés avant péremption, aucune impureté supérieure à la limite de 0,1% n'a été observée. Cependant, pour le lot de Laroscorbine® dont la date de péremption était dépassée de 4 mois, plusieurs produits de dégradation ont été observés (Figure 50). Ces pics additionnels ne sont pas présents dans le lot non périmé. L'un de ces produits de dégradation, présent en concentration relativement importante (0,9% NA) correspond au TKV identifié lors des essais de dégradations forcées.

Au total, la méthode en CZE-UV permet donc de doser l'acide ascorbique dans différentes préparations pharmaceutiques, tout en recherchant les produits de dégradation associés, avec une excellente séparation et résolution, en moins de 10 minutes d'analyse.

Tableau 12 : Quantification de l'acide ascorbique dans les différents produits pharmaceutiques et évaluation de leurs produits de dégradation

Produit commercial	Teneur en acide ascorbique théorique	Teneur en acide ascorbique mesuré	Pourcentage de recouvrement par rapport à la teneur théorique	Produit de dégradation dont la teneur est > 0,1%
Vitascorbol® (comprimé)	500 mg	493 mg	98.7%	Absence
Laroscorbine® (comprimé)	1000 mg	994 mg	99.4%	Absence
Laroscorbine® (solution)	200 mg/mL	204.7 mg/mL	102.3%	Absence Impureté 10: <0,1 %*
Laroscorbine (solution) 4 mois après la date de péremption	200 mg/mL	201.3 mg/mL	100.6%	Présence Impureté 6 (TKV): 0,9 %* Impureté 8: <0,1 %* Impureté 9: <0,1 %* Impureté 10: 0,2 %*

* quantité d'impureté (%) = (Aire de l'impureté / Σaire de tous les pics) x 100

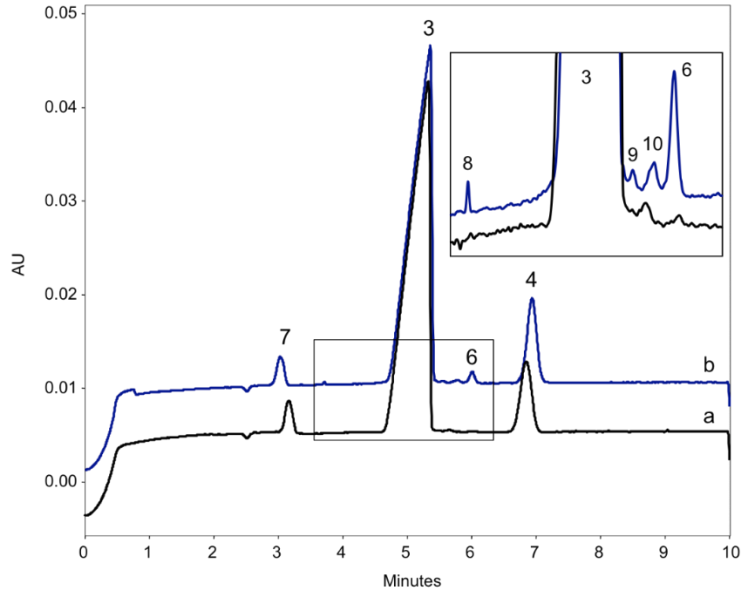


Figure 50 : Electrophérogramme de a/ Laroscorbine® non périmé et b/ Laroscorbine ® après 4 mois de péremption. Sont observés l'acide ascorbique (3), l'acide benzoïque (4), le TKV (6), les excipients E216 et E218 (7) et les autres produits de dégradation (8,9,10)

E. Application pour une étude ASAP

Dans un second temps, une étude de prédiction de la stabilité des ampoules de Laroscorbine® a été réalisée avec la méthode CZE-UV développée. Les ampoules IV de laroscorbine® ont été soumises à différentes températures pendant un maximum de trois semaines. A partir des teneurs en TKV observées dans chaque condition, le modèle ASAP a été construit. Après vérification de la validité de ce modèle, une prédiction de la teneur en TKV sur 3 ans a été réalisée, et comparée avec les données réelles.

1. Dégradation forcée

La teneur en TKV retrouvée pour chaque condition de stress est présentée Figure 51. Dans les échantillons non stressés, le TKV est retrouvé à des teneurs inférieures à la LOD de la méthode (0,04 à 0,07 %NA). Dans les échantillons stressés, cette teneur varie entre 0,17%NA (11 jours à 45°C) et 2,31% (7 jours à 75°C). Nous pouvons noter que les teneurs en TKV obtenues sont relativement proches (maximum 2,3 fois) de la limite de spécification déterminée (1,00%NA). Ceci est important pour permettre de construire le modèle ASAP.

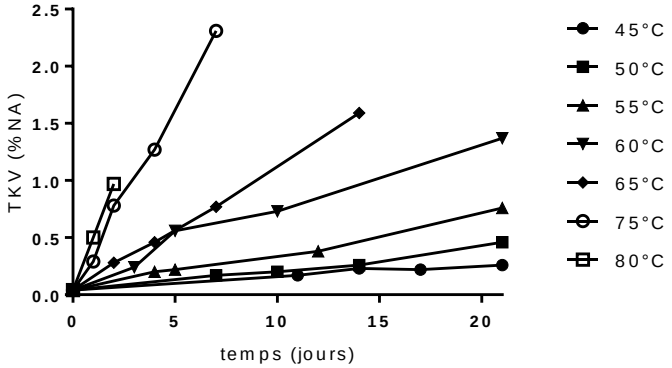


Figure 51 : Teneur en TKV (%NA) obtenus pour chaque condition de stress

2. Construction du modèle

Le modèle a été construit en utilisant le logiciel ASAPprime®. La Figure 52 présente, pour chaque température de stress, les courbes d'isoconversion obtenues. On observe que la teneur en TKV suit une cinétique d'ordre zéro dans les conditions de l'étude. Pour chaque condition, la durée pour atteindre 1,00% NA de TKV a été extrapolée et est représentée en violet. Cette teneur cible correspondant à la limite de spécification est appelé point d'isoconversion.

En parallèle, il est déterminé un *ratio* d'isoconversion, qui correspond au rapport entre la durée maximale de stress et la durée correspondant au point d'isoconversion pour chaque condition. Si l'extrapolation est importante, le ratio d'isoconversion sera proche de 0,0. Dans le cas de ratio d'isoconversion < 0,1, l'extrapolation peut être jugée trop importante et il est recommandé de retirer le jeu de données correspondant. Le Tableau 13 présente les temps et ratio d'isoconversion pour chaque condition de stress. Tous les ratios étant supérieurs à 0,1, l'ensemble des données a été conservée pour construire le modèle. Par ailleurs, il est important de ne pas obtenir une dégradation trop importante avec une teneur en produit de dégradation trop éloignée la limite de spécification [191]. Dans le cas présent, la teneur en TKV ne dépasse pas 2,5 fois la limite de spécification, ce qui est jugé acceptable. Les paramètres ln (A), B and Ea utilisés dans le modèle sont présentés

Tableau *14*. Le paramètre mesurant l'humidité résiduelle B n'est pas évalué, le produit étant une solution injectable, sa dégradation est donc non impactée par ce paramètre.

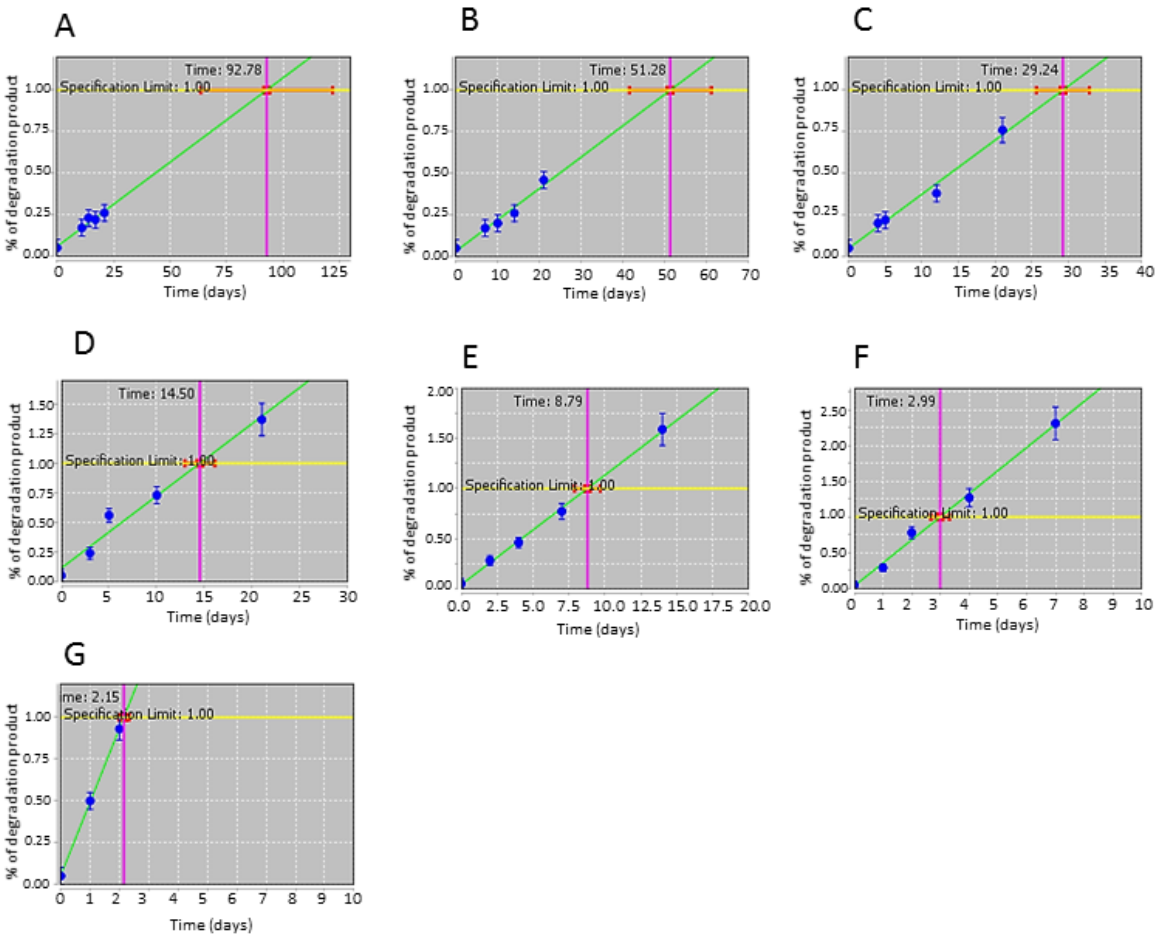


Figure 52 : Graphique d'isoconversion obtenus lors de l'étude ASAP de l'AA dans les conditions suivantes ; 45°C (A), 50°C (B), 55°C (C), 60°C (D), 65°C (E), 70°C (F) et 80°C (G).

Tableau 13 : Temps et ratio d'isoconversion obtenus lors de l'étude ASAP de l'AA

Conditions de stress	Durée de stress (jours)	Isoconversion (jours)	Isoconversion ratio
45°C	11, 14, 17, 21	92,783 ± 29,156	0,23
50°C	7, 10, 14, 21	51,275 ± 9,787	0,41
55°C	4, 5, 12, 21	29,237 ± 3,622	0,72
60°C	3, 5, 10, 21	14,505 ± 1,562	1,45
65°C	2, 4, 7, 14	8,787 ± 0,893	1,59
75°C	1, 2, 4, 7	2,987 ± 0,321	2,34
80°C	1, 2	2,153 ± 0,178	0,93

Tableau 14 : Paramètres du modèle obtenu lors de l'étude ASAP de l'AA

Paramètre d'équation	Valeur
Ln A	34,294 ± 3,412
E_a (kcal/mol)	24,552 ± 2,316
B	Non applicable
R^2	0,998
Q^2	0,994

3. Vérification de la validité du modèle

La validité du modèle est représentée par les valeurs du R^2 (0,998) et du Q^2 (0,994) (
Tableau 14) qui sont dans les deux cas supérieurs à 0,99. Des valeurs de $R^2 > 0,9$ et de $Q^2 > 0,8$ sont présentées comme acceptables [191]. Le graphique des résidus (Figure 53) permet également de montrer la bonne performance du modèle. En effet, pour chaque condition, les résidus sont proches de 0. L'extrapolation plus importante réalisée pour les températures plus faibles (45°C, 50°C) explique la plus grande variabilité observée à ces températures.

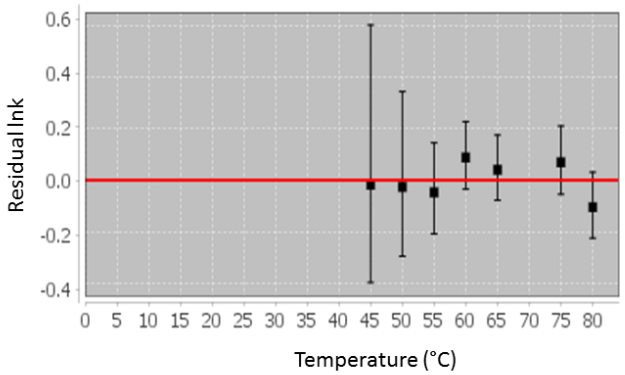


Figure 53 : Graphique des résidus montrant la performance du modèle ASAP pour la formation de TKV

4. Comparaison des données prédites et expérimentales

Le modèle généré a permis de modéliser la teneur en TKV dans les ampoules de Laroscorbine® sur une durée de 4 ans, à 25°C. La Figure 54 représente cette modélisation : la courbe bleue représente la teneur moyenne en TKV prédite, les courbes verte et rouge représentent respectivement les teneurs maximales et minimales prédites. Les données réelles expérimentales, à 3, 7, 24 et 40 mois à 25°C, sont représentées par les carrés noirs. Ces données réelles apparaissent dans les bornes prédites par le modèle. Ainsi, les données générées en seulement trois semaines de stress ont permis de correctement modéliser l'apparition du produit de dégradation majoritaire dans les ampoules IV de Laroscorbine®.

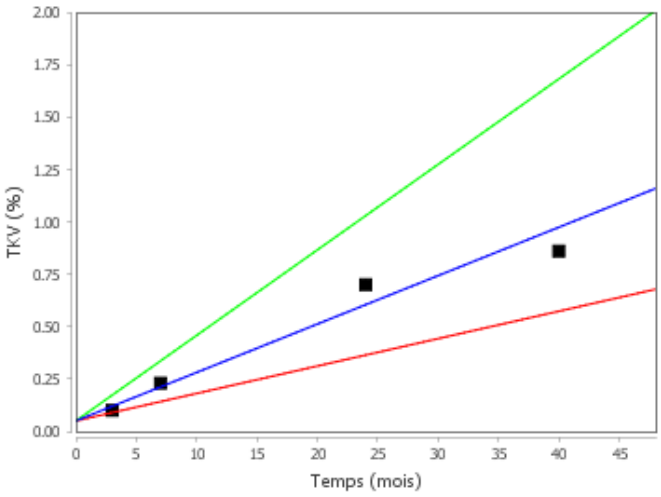


Figure 54 : Comparaison entre les données de stabilité expérimentales de la Laroscorbine® et les données prédites par le modèle ASAP.
Teneur en TKV prédites moyenne (bleu), maximale (vert) et minimale (rouge).

IV. Conclusion

La présente étude a permis de développer et valider une méthode indicatrice de stabilité en CZE-UV pour l'analyse et la quantification simultanée de l'acide ascorbique et de ses produits de dégradation : le DHAA, le furfural et l'acide furoïque. L'optimisation de la séparation des différents composés a permis de réduire le temps d'analyse à 10 minutes tout en conservant une bonne séparation des molécules. La méthode a été validée selon les standards ICH, au regard de la linéarité, justesse, répétabilité et reproductibilité. Cette méthode a permis le dosage de l'acide ascorbique et la recherche de ses produits de dégradation dans différents produits pharmaceutiques. L'ensemble des produits pharmaceutiques présentaient des teneurs en acide ascorbique dans la norme acceptée. Aucun des produits ne présentaient de produits de dégradation à des teneurs supérieures aux seuils limites. Dans le cas du produit pharmaceutique analysé après date de péremption, un produit de dégradation apparaissait à des teneurs élevées. Ce produit de dégradation majoritaire, TKV, observé en CZE-UV au cours de dégradation forcée et lors des études de stabilité de la Laroscorbine® 1g/5mL a été identifié par MS. La méthode CZE-UV développée apparait ainsi adaptée pour le dosage et la recherche des produits de dégradation de l'acide ascorbique. Cette méthode a été utilisée pour réaliser une étude prédictive de la stabilité ASAP du produit pharmaceutique Laroscorbine® 1g/5mL. Les données réelles expérimentales de stabilité se sont montrées totalement en adéquation avec les données prédites pour une période de plus de 3 ans, à température ambiante.

PARTIE 3 : CARACTERISATION DE LA CONFORMATION DU PEPTIDE CFEE PAR SPECTROSCOPIE RAMAN ET DICHROISME CIRCULAIRE, ET ANALYSE PREDICTIVE DE SA STABILITE PAR LC-MS/MS

I. Introduction

La structure spatiale du peptide cFEE n'ayant pas encore été décrite, une première partie de ce travail a consisté en sa caractérisation, afin de comprendre la spécificité de son action pour l'augmentation du taux de succès de FIV. D'autre part, la connaissance de sa structure conformationnelle peut aider à construire d'autres peptides avec un meilleur taux de succès de FIV. L'analyse de la structure du cFEE a été réalisée par deux techniques spectroscopiques : le CD et la spectroscopie Raman. La combinaison de ces deux techniques a déjà permis l'analyse des propriétés structurales de peptides linéaires et cycliques dans différents milieux aqueux, selon leur taille, leur concentration, leur force ionique et le pH. Par ailleurs, le rôle du solvant, et de sa force diéléctrique, qui peut favoriser les interactions intermoleculaires plutôt que les interactions intramoléculaires, a également été élucidé [192-195]. Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés à l'évaluation long terme de la stabilité de ce peptide en LC-MS/MS, et avons réalisé une étude prédictive de cette stabilité *via* la méthodologie ASAP.

II. Partie expérimentale

A. Peptide cFEE

Le peptide cFEE, sous forme lyophilisé, provient de chez Synprosis SA Laboratory (Fuveau, France). En fonction des analyses, il a été dilué soit dans l'eau milli-Q préparée par un système Millipore (Merck, Molsheim, France) soit dans le méthanol à différentes concentrations. Les conditions de préparation sont décrites dans les paragraphes correspondants B et C.

B. Analyse en spectroscopie Raman

Pour les essais en spectroscopie Raman, le peptide cFEE a été analysé à la concentration de 30 mM (21,5 mg/mL). Le pH a été ajusté à pH 3,0 et 7,0 par ajout de NaOH (1M). Par ailleurs, les acides aminés libres sérine, phénylalanine et acide glutamique analysés proviennent de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin- Fallavier, France) et ont été analysés à la concentration de 50 mM.

Les analyses en spectroscopie Raman ont été réalisées sur un spectrophotomètre Jobin-Yvon T64000® (Longjumeau, France) équipé d'une caméra CCD (charge couple device) comme détecteur (Spectrum One, Jobin-Yvon). Les analyses ont été réalisées à température ambiante. Les spectres Raman ont été acquis selon une vitesse d'acquisition de 1200 s. L'ouverture de la fenêtre de détection a été fixée à 5 cm^{-1}. Les échantillons ont été excités à 488 nm *via* un laser à argon d'une puissance de 200mW (Spectra Physics, Evry, France). Le traitement du spectre a été réalisé avec le software GRAMS/AI Z.00 (Thermo Galactic, Waltham, MA, USA) : le spectre du tampon a été soustrait et la déconvolution des spectres Raman a été réalisée en utilisant la fonction Gaussian-Lauretzien. Le spectre final a été réalisé via le software SigmaPlot package 6.10 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

C. Analyse par dichroïsme circulaire

Pour les essais en CD, le peptide cFEE a été analysé à la concentration de 300 µM, à pH 3,0 et 6,0. Les analyses par CD ont été réalisées sur un spectrophotomètre JASCO J-810® (Lisses, France), entre 190–300 nm. La fenêtre optique était de 1 mm, et la résolution spectrale de 0,2 nm. Chaque spectre correspond à la moyenne de 5 spectres, et a été enregistré à la vitesse de 100 nm/min. La mesure d'ellipticité pour chaque échantillon, [φ]obs, a été normalisée via l'équation suivante :

$$[\Phi] = \frac{[\Phi]\text{obs}}{ncl}$$

Avec n correspondant au nombre d'acides aminés du peptide, c correspondant à la concentration molaire, et l correspondant à la fenêtre optique. L'ellipticité est exprimée en deg. $cm^2.dmol^{-1}$.

D. Calcul de mécanique quantique pour la résolution des spectres

Les données énergétiques, géométriques et vibrationnelles du peptide cFEE ont été calculées par la méthode de calcul DFT (théorie fonctionnelle de la densité : density functional theory) en utilisant la fonctionnelle hybride B3LYP. Les calculs ont été réalisés en utilisant le logiciel Gaussian 09® (Gaussien inc, Wallingford, Royaume Uni).

E. Analyse par LC-MS/MS

L'analyse de la stabilité du peptide cFEE, ainsi que les essais ASAP ont été réalisés en LC-MS/MS. Le système chromatographique est constitué d'une chaîne UPLC Acquity (Waters, Manchester, UK). La séparation est réalisée sur une colonne Kinetex C18 (100 x 2,1 mm ; 2,6 µm) (Phenomenex, Le Pecq,

France), à la température de 40°C. Le débit de phase mobile est de 0,5 mL/min. La phase mobile est constituée d'eau (grade LC-MS) additionnée de 0.1% d'acide trifluoroacétique et d'acétonitrile, suivant le gradient suivant : 95/5 à 88/12 % (v/v) en 34 minutes, suivi de 6 minutes de reconditionnement aux conditions initiales. L'analyse a été réalisée avec un volume d'injection de 10 µL (correspondant à 5,5 µg). La détection est réalisée par un spectromètre de masse LTQ Orbitrap XL® ((ThermoFisher Scientific, Manchester, U.K.) équipé d'une source d'ionisation par électro spray (HESI-II, ThermoFisher Scientific) piloté par le logiciel Xcalibur® (ThermoFisher Scientific). Les paramètres de la source sont récapitulés dans le Tableau 15 suivant :

Tableau 15 : Paramètre de source pour l'analyse du peptide cFEE en LC-MS/MS

Voltage	- 4kV
sheath gas	40
auxiliary gas	12
Source Temperature	300°C
Capillary temperature	320°C
Capillary voltage	35V
Tuve lens voltage	90V

L'acquisition des spectres MS s'est faite en mode full scan dans la gamme de m/z de 100 à 800 (résolution 60 000), et en mode SIM pour la recherche des ions 303, 321, 612, 613, 715 et 733. Ces ions correspondent aux m/z des produits de dégradations du peptide cFEE précédemment observés [94]. Les spectres MS/MS de ces ions ont été obtenus par fragmentation CID (collision induced dissociation), avec une énergie de collision fixée à 35%, un temps d'activation de 30 ms, et une gamme de m/z de 200 à 800.

F. Etude de stabilité et analyse ASAP

1. Peptide cFEE

L'étude de stabilité et l'étude ASAP du peptide cFEE ont été réalisées sur une solution de peptide à 1 mg/mL, conditionnée dans des flacons bruns et scellés. Le peptide cFEE est dilué dans de l'eau milli Q, sans excipients. Une étude de stabilité sur 6 mois de cette solution a été réalisée. Le détail des conditions de conservation et des échéances est récapitulé dans le Tableau 16 suivant :

Tableau 16 : Conditions de conservation pour l'étude de stabilité du peptide cFEE

Condition de conservation	1 mois	1,5 mois	3 mois	6 mois
4°C			X	X
25°C	X		X	X
40°C	X	X	X	

2. Stress appliqués

Dix-huit flacons de cFEE 1mg/mL ont été dédiés à l'étude ASAP. Trois flacons ont été immédiatement congelés à – 20°C, et correspondent aux échantillons contrôle (« T0 »). Les 14 autres flacons ont été placés dans des enceintes dont la température peut être modifiée (Binder, Tuttlingen, Allemagne). Un suivi en temps réel de la température des enceintes permet d'éviter tout risque d'excursion de température. Le Tableau 17 détaille les températures et les durées de stress utilisées pour l'étude. Pour chaque température de stress, les flacons sont placés en même temps dans l'enceinte. A chaque échéance, un flacon est retiré de l'enceinte et placée à -20°C. L'ensemble des échantillons a été analysé dans une même séquence.

Tableau 17 : Conditions de conservation pour l'étude ASAP du peptide cFEE

Température de stress (°C)	Durée de stress (jours)
50	6,10,21
55	3,5,8,21
60	2,5,15
65	1,3,9
75	1, 2

3. Analyse ASAP

Le traitement des résultats pour évaluer de façon prédictive la stabilité du peptide cFEE 1 mg/mL a été réalisé par le logiciel ASAPprime® version 5.0.3 (FreeThink Technologies, Brandford, USA). L'analyse a été réalisée en utilisant la quantité des produits de dégradation majoritaire retrouvés dans les flacons après stress à la température (quantité en normalisation d'aire %NA). La LOD de la méthode était de 0,05% (%NA), avec un écart type de 10%. La méthode d'ajustement (*fit method*) pour évaluer le taux de dégradation est la méthode par défaut proposée par le logiciel. L'intervalle de confiance pour

estimer la durée de péremption est calculée *via* une approche Monte Carlo, avec un nombre de simulations de 2500. La limite de spécification pour le produit de dégradation était de 1,0%.

III. Résultats

A. Caractérisation de la structure secondaire du peptide cFEE par spectroscopie Raman et dichroïsme circulaire

1. Analyse UV-CD

Les spectres UV-CD obtenus dans le méthanol et dans l'eau sont présentés Figure 55. L'effet du solvant peut être clairement observé sur le spectre CD. Dans les deux milieux, les spectres sont caractérisés par un minima à environ 202 nm. Dans le méthanol on observe un épaulement distinct à environ 215 nm, non observé dans l'eau. Concernant l'effet du pH, on peut observer une diminution au niveau du signal négatif à 202 nm, associée à une augmentation du signal positif à 220 nm lorsque l'on passe d'un pH acide vers un pH neutre, sans modification de la forme générale du spectre CD. Pour rappel, le pKa des acides glutamiques est d'environ 4,1. C'est à dire qu'à pH 3 ils sont protonés, et à pH 6 ils sont déprotonés.

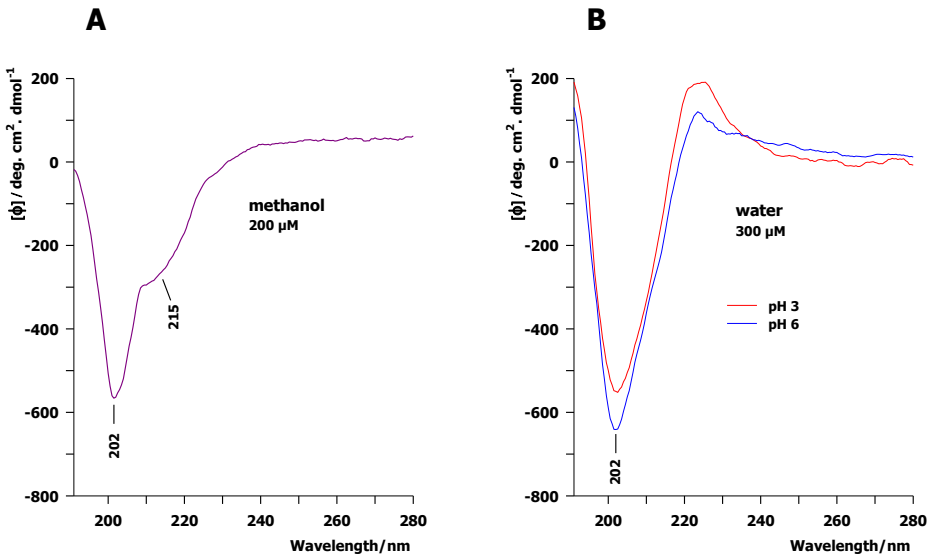


Figure 55 : Spectres UV-CD du peptide cFEE entre 190 et 280 nm, dans (A) le méthanol à 200 µM et (B) dans l'eau à 300 µM à pH 3 et pH 6

L'influence du solvant et de sa polarité sur la structure peptidique a déjà été détaillée dans la littérature [192, 193]. Certains peptides linéaires peuvent subir des transitions de type feuillet $\beta \rightarrow$ hélice α lorsqu'ils passent d'un solvant polaire comme l'eau à un solvant possédant une constante diélectrique inférieure (solvants organiques). Cet effet a été interprété par le fait que les solvants polaires favorisent plutôt les liaisons hydrogènes intermoléculaires plutôt que les liaisons hydrogènes intramoléculaires [192]. Au-delà de la polarité du solvant, l'influence de la taille, de la concentration et du temps d'exposition au solvant peut également influencer la structure du peptide [193, 194, 196]. En ce qui concerne les peptides cycliques, les contraintes structurales (comme par exemple imposées par un pont disulfure comme dans le cas du peptide cFEE), la taille, et la composition en acides aminés ont montré avoir une grande importance pour le comportement structurel de ces peptides [195, 197, 198].

En ce qui concerne les spectres UV-CD, une chaine désordonnée est caractérisée par une bande négative importante vers ~198 nm [171, 199], tandis qu'une structure de type boucle (*loops* ou *coils* en anglais) désordonnée (c'est-à-dire sujet à une conversion rapide entre différentes structures en coudes (*turn* en anglais) non stable) présente un décalage du signal vers le rouge ~202 nm [195]. Ainsi, le peptide cFEE dans l'eau, indépendamment du pH, présente une structure de type désordonnée/faiblement ordonnée en coude. La présence d'une double bande négative dans le méthanol montre la formation d'une structure en boucle [200]. De plus, le ratio dichroïque [Φ2]/ [Φ1] peut être utilisé comme indicateur pour la stabilité de la structure β-turn. [Φ2] correspond à l'ellipticité normalisée de la longueur d'onde la plus haute (ici 215 nm) et [Φ1] correspond à l'ellipticité normalisée de la longueur d'onde la plus faible (ici 202 nm) de cette partie caractéristique du spectre CD [200]. Plus ce ratio [Φ2]/[Φ1] est proche de 1, plus la structure de type-II' β-turn est compacte et stable [198]. Dans le cas du peptide cFEE, le ratio [Φ2]/[Φ1] est d'environ 0,4. Cette valeur indique que le peptide cFEE présente une structure de type-II' β-turn plutôt instable (mobile) dans le méthanol.

Dans le cas des autres types de β-turn, ils présentent des spectres CD différents : le type-I β-turn se caractérise par un double minima à 208/222 nm, un type- II β-turn présente une bande positive dans la région 190−210 nm, et le type-I' β-turn présente une bande négative à 215 nm [171].

2. Analyse en spectroscopie Raman

Le spectre Raman du peptide cFEE à la concentration 30 mM dans l'eau à pH 3 et pH 7 est présenté Figure 56. Afin d'assigner les bandes Raman, les spectres Raman des acides aminés Sérine,

Phénylalanine et Acide Glutamique ont été réalisés et sont présentés à la Figure 57 (A, B, C et D). Concernant la cystéine (dimère Cys-Cys relié par un pont disulfure), l'analyse complète est déjà décrite [201], permettant l'assignation des bandes correspondantes sur le spectre du cFEE. Pour l'analyse Raman des acides aminés libres, les valeurs de pH ont été sélectionnées afin d'obtenir les espèces zwitterions (présence de $NH3^+$ et COO^-). Cela est représenté, par exemple, par la présence de la bande à ~1602 cm^{-1} correspondant au groupement carboxylate COO^- (figure 56 A, C, D). Pour faciliter la comparaison des spectres, ils ont été normalisés selon l'intensité de la région 1500–1400 cm^{-1}, correspondant aux groupements aliphatiques (groupements CH2). La bande Raman la plus intense provient de l'acide aminé Phénylalanine, et des groupements aromatiques 1606, 1586, 1207, 1032, 1004, and 622 cm^{-1} (Figure 57 B).

Le spectre Raman de l'acide glutamique protoné à pH acide (pH 2,9) présente une bande large à ~1723 cm^{-1} qui peut être assignée au carbonyle (C=O) du groupement carboxyle (COOH) (Figure 57, D). A pH 6, lorsque l'acide glutamique est sous forme déprotonée (COO^-), cette bande à ~1723 cm^{-1} n'est pas présente (Figure 57 C). La comparaison des spectres de l'acide glutamique protonée et déprotonée permet de distinguer les bandes caractéristiques affectées par cette état protoné ou déprotoné. Trois régions apparaissent caractéristiques et sont indiquées par des flèches roses sur les figures 57 C et D : 1730–1700, 1350– 1300, et 950–850 cm^{-1}.

Au total, les bandes Raman observées au niveau des acides aminés libres permettent d'assigner les bandes Raman du peptide cFEE (Figure 56 A, B). Quel que soit le pH, l'intensité du spectre Raman observée est liée au résidu phénylalanine. L'intensité relative au niveau des bandes caractéristiques des résidus d'acide glutamique permet d'évaluer les changements liés à la protonation/ déprotonation du groupement carboxyle COOH (indiqué par les flèches roses Figure 56 A et B). Par exemple, l'épaulement à ~1727 cm^{-1} est visible à pH 3 et disparait à pH 7. Dans la région 950-900 cm^{-1}, on observe une bande à ~941 cm^{-1} a pH 7, qui est modifiée à pH 3 avec des bandes partiellement résolues à ~933, 922, and 906 cm^{-1} à pH 3.

Par ailleurs, la comparaison entre les spectres Raman des acides aminés libres par rapport au spectre Raman du peptide cFEE permet également d'analyser les vibrations issues du squelette du peptide, correspondant aux bandes amide I (1750–1625 cm^{-1}) et amide III (1320–1225 cm^{-1}). Chaque région amide présente des bandes larges et partiellement résolues, cohérentes avec la présence d'éléments de structure secondaire au niveau du peptide cFEE. La déconvolution de chaque bande amide I et III est présentée Figure 58. Le Tableau 18 détaille la contribution (en pourcentage) de chaque structure secondaire, pour les deux pH étudiés. Au total, peu de différences sont observées entre les 2 pH, excepté une légère augmentation d'éléments ordonnés (coudes (*turn*) et feuillets β (β*strand*)) et une

légère diminution des structures non ordonnées à pH 3 par rapport au pH 7 (74 vs 69% et 31 vs 26 % ; respectivement ; Tableau 18).

La région du spectre Raman 550–480 cm^{-1} correspond à la région du pont disulfure S-S entre les deux cystéines. La Figure 59 présente la déconvolution de cette partie du spectre. Deux éléments à ~509 et à ~525 cm^{-1} sont clairement identifiables, et sont indépendants du pH. Ils correspondent à deux rotamères autours du pont disulfure [201]. Le rotamère ~509 cm^{-1} est majoritaire et représente environ 80% du total, et le rotamère ~525 cm^{-1} représente environ 20%. La présence de deux rotamères permet de montrer une certaine flexibilité conformationnelle du peptide cFEE en solution.

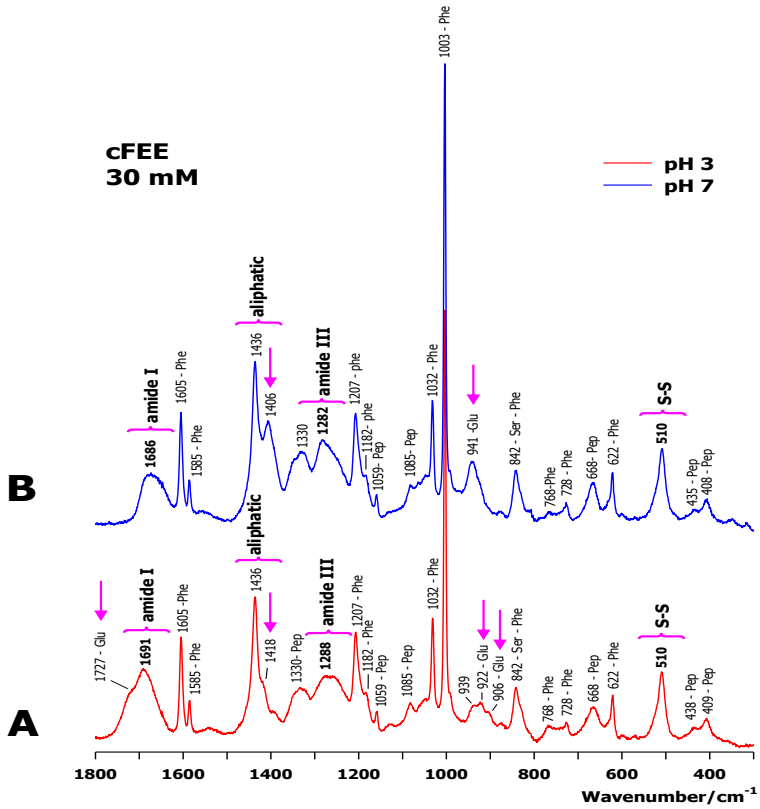


Figure 56 : Spectre Raman du peptide cFEE dans l'eau a pH 3 (A) et à pH 7 (B).
Les bandes Raman caractéristiques de la protonation / déprotonation des acides glutamiques sont indiquées par les flèches roses.

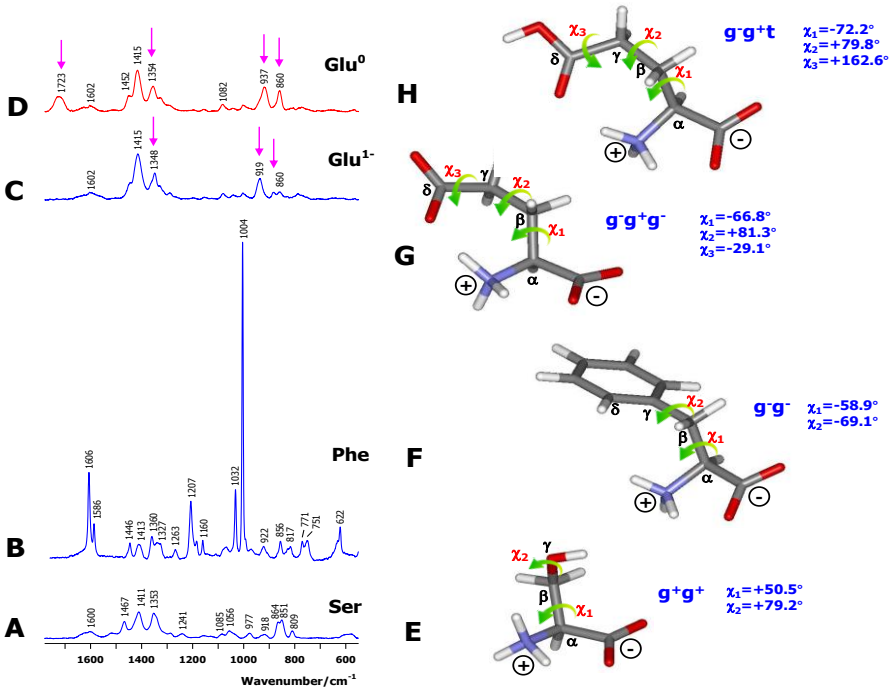


Figure 57 : Spectre Raman des acides aminés serine (A), Phénylalanine (B), Acide glutamique déprotoné (C) ou protoné (D). Les bandes Raman caractéristiques à la protonation / déprotonation de l'acide glutamique sont indiqués par les flèches roses. Les conformations de plus faible énergie de la sérine (E), de la phénylalanine (F), de l'acide glutamique déprotoné (G) et protoné (H) sont représentées. Les valeurs de torsion d'angles et l'orientation globale sont reportées à droites des représentations graphiques des acides aminés.

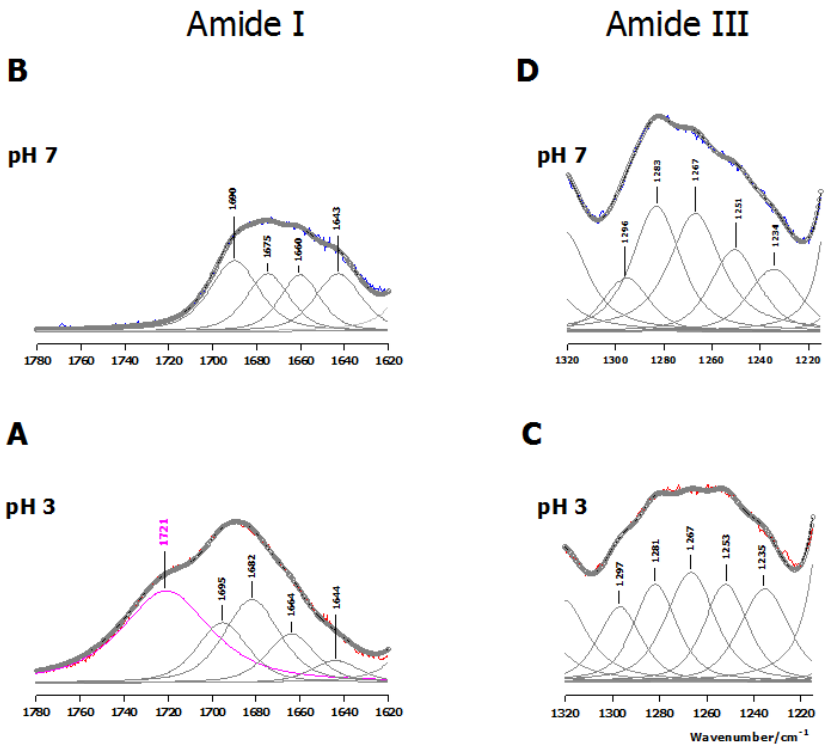


Figure 58 : Déconvolution des régions amide I (A, B) et III (C, D) du spectre Raman du peptide cFEE à pH 3 (A, C) et pH 7 (B, D). En rose (A), la bande à 1727 cm-1 est liée au carbonyle protoné de l'acide glutamique à pH 3

Tableau 18: Contribution (exprimée en pourcentage) des structures secondaires déterminées pour les régions amide I et III

Amide I (components)	**Turn** (%)	**β-strand** (%)	**Random** (%)
pH 3			
1695			27
1682	41		
1664		22	
1644	10		
pH 7			
1690			32
1675	23		
1660		21	
1643	24		

Amide III (components)	**Turn** (%)	**β-strand** (%)	**Random** (%)
pH 3			
1297	15		
1281	19		
1267			25
1253	20		
1235		21	
pH 7			
1296	11		
1283	28		
1267			30
1250	17		
1234		14	

Total	**Turn** (%)	**β-strand** (%)	**Random** (%)
amide I (pH 3)	51	22	27
amide III (pH 3)	54	21	25
amide I (pH 7)	47	21	32
amide III (pH 7)	56	14	30
Accuracy ±5%			

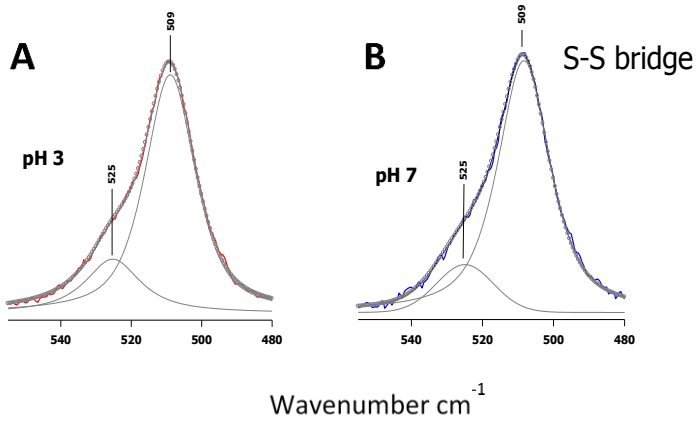


Figure 59 : Déconvolution de la région correspondante au pont disulfure du spectre Raman du peptide cFEE, à pH 3 (A) et pH 7 (B)

3. Model de structure de type -II'β-Turn proposé pour le peptide cFEE

L'analyse du spectre UV-CD du peptide cFEE permet de montrer la présence d'une structure de type -II' β - turn du peptide cFEE dans le méthanol (partie III.1). Il existe deux types de β -turns : le type-I' et

le type-II'. Chacun peut être rencontré dans les protéines [202, 203]. Les β -turns sont composés de quatre résidus acides aminés, généralement appelés i, i+1, i+2 et i+3. Pour chaque résidu, la torsion de la chaîne est possible par les valeurs de torsion d'angles (ϕ, Ψ) du squelette peptidique des résidus i+1 et i+2 du milieu [204, 205]. Pour le type -II'β-Turn, ces valeurs d'angles sont d'environ : ϕ i+1 ~ +60°, Ψ i+1 ~ −120°, ϕ i+2 ~ −80°, Ψ i+2 ~ 0°. Il a été supposé que le β -turn était formé autour des quatre acides aminés centraux du peptide cFEE (-Ser2-Phe3-Glu4-Glu5-), par comparaison avec la structure connue d'un autre peptide cyclique : l'octreotide (octopeptide cyclique) et pour lequel les données cristallographiques [206], RMN [207], CD et Raman [197, 208] et les calculs DFT [202] sont disponibles, et qui possèdent également un type-II' β -turn sur les quatre acides aminés centraux. Les données de torsion d'angle (ϕ, Ψ, ω) du squelette de l'octreotide ont été utilisées pour évaluer la structure du peptide cFEE.

Les conformères de plus basse énergie des résidus serine, phénylalanine, acide glutamique non protonés et protonés sont présentés Figure 57 (E, F, G, H). A droite de chaque conformère, sont indiquées les valeurs de torsion d'angles pour la chaîne latérale χ1, χ2 pour la sérine et la phénylalanine et χ1, χ2, χ3 pour l'acide glutamique. Concernant les résidus cystéine (Cys1- Cys6), cinq angles de torsions χ1, χ2, χ3, χ2', χ1' sont définis correspondant aux cinq liaisons présentes (−Cα−Cβ−S−S−Cβ'− Cα'−). Pour construire la structure du peptide cFEE, il a été pris l'exemple de l'octreotide, pour lequel les valeurs étaient (χ1 = −166°, χ2 = +73°, χ3 = −97°, χ2'= +111°, χ1' =− 179°) [202]. La valeur négative du χ3 correspond à un pont disulfure de conformation « left handed ». Pour le peptide cFEE, un pont disulfure de conformation « right handed » avec une valeur χ3 positive a aussi été construite. La Figure 60 représente le peptide cFEE dans une conformation left-handed (L) et right-handed (R). Dans les deux cas, les acides glutamiques sont représentés protonés, reflétant le milieu méthanol possédant une constante diélectrique faible. Pour la même raison les groupements NH_2 et COOH au niveau du squelette peptidique sont supposés neutres. La conformation en type-II' β -turn est stabilisée pour la forme L et R du pont disulfure, néanmoins, une plus grande stabilité est prédite pour la conformation L (énergie plus faible). Les interactions qui stabilisent les conformères L et R sont les suivantes (et sont représentées en vert Figure 60) :

- Une liaison hydrogène entre la serine (Ser2) et l'acide glutamique (Glu5) : (Ser2)N−H···O− C(Glu5), de longueur entre 2.02 and 2.20 Å

-Trois autres liaisons hydrogène impliquant la sérine et l'acide glutamique *via* leur chaine latérale (O-H pour la sérine, C=O pour l'acide glutamique) et leur chaine principale (C=O pour la sérine, et N-H pour l'acide glutamique) avec des longueurs entre 1.99 and 2.23 Å.

La Figure 61 permet de montrer plus précisément les rotamères L et R. Les valeurs de torsion d'angles χ 1, χ2, χ3, χ2', χ1' y sont indiquées. Les conformations sont indiquées selon la terminologie de

Hogg et al [209] : "-LHStaple"- pour la conformation Left-handed ; et "-RHHook"- pour la conformation Right-handed. LH et RH correspondant à l'indication « left handed » et « right handed », les termes Staple et Hook font référence à leur forme dans l'espace, et le signe « - » reflète les valeurs négatives de $\chi 1$ et $\chi 1'$. D'autres types de notation permettent également de définir la conformation des ponts disulfure, en fonction de l'orientation g (gauche) et t (trans) des trois angles de torsion du milieu : $\chi 2$, $\chi 3$, $\chi 2'$. Si on prend cette notation, le pont disulfure de conformation left handed correspond au conformère « ggg », et le right handed correspond au conformère « ggt ».

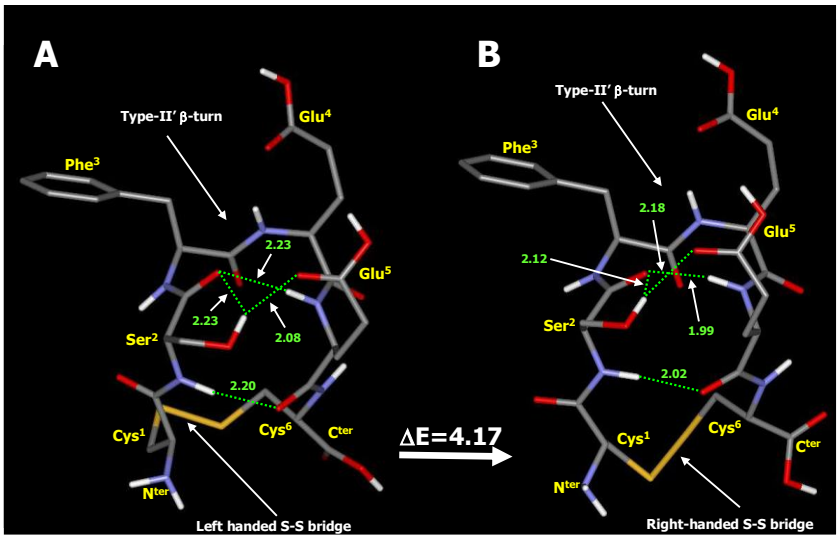


Figure 60 : Représentation graphique du peptide cFEE dans un milieu mimant le méthanol, soit avec un pont disulfure de type left handed (A) ou right handed (B).
Les liaisons hydrogènes intramoléculaires sont notées en vert. La différence d'énergie entre les deux structures est indiquée (ΔE, kcal/mol)

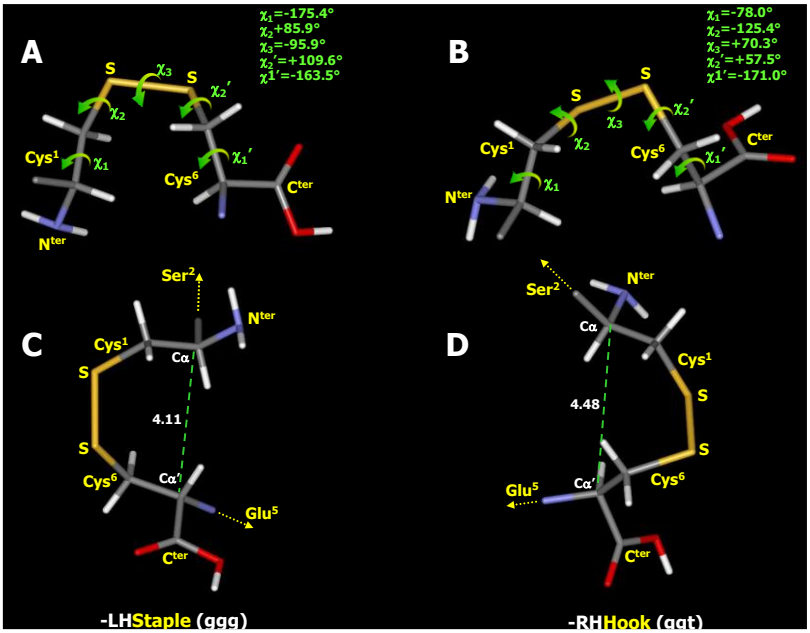


Figure 61: Détail du pont disulfure du peptide cFEE, soit en conformation Left handed (A,C) soit en conformation Righ handed (B,D).
L.es valeurs des 5 torsion d'angles sont indiqués.

4. Arguments structurels pouvant expliquer l'activité biologique du peptide cFEE

Le milieu de culture des FIV est un milieu aqueux de pH 7,3. De ce fait, l'activité particulière du peptide peut être liée à sa structure non ordonnée dans le milieu aqueux. Pour soutenir cette hypothèse de structure-activité, on peut prendre l'exemple de l'hormone naturelle Somatostatine-14 (SST-14). Cette hormone agit comme un inhibiteur de la sécrétion de l'hormone de croissance, via la liaison au récepteur SSTRi (i : 1 à 5) [210]. La SST-14 est un tétra-décapeptide cyclique, qui forme une large boucle de 12 acides aminés. Cette hormone présente une conformation non ordonnée confirmée par spectroscopie Raman et CD [195, 198, 208] ainsi que par RMN [211, 212]. En raison de sa demi-vie faible dans le plasma, des analogues synthétiques ont été élaborés [213, 214]. Parmi eux, on peut noter l'octreotide et le lanreotide qui possèdent une conformation de type -II' β -turn sur leurs quatre résidus centraux [197, 198]. De façon intéressante, ces deux analogues ont présenté une affinité sélective vis-à-vis de deux récepteurs SSTTR2 et SSTTR5, et une différence d'activité par rapport aux autres analogues de la SST-14. Alors que la SST-14, possédant une conformation non ordonnée peut interagir avec l'ensemble de ses cinq récepteurs [215], la restriction de conformation des deux analogues entraîne une modification de l'activité.

B. Analyse de la stabilité du peptide cFEE par LC-MS/MS et modélisation prédictive de sa stabilité par une étude ASAP

L'activité du peptide cFEE est liée à sa structure particulière, tant concernant sa structure cyclique que par la présence des différents acides aminés. Cette structure doit ainsi être conservée tout le long de la vie du produit, afin de garantir l'efficacité du produit. Dans cette deuxième partie, une étude de stabilité a été réalisée sur 6 mois, à 4°C, 25°C et 40°C. L'évaluation de la stabilité du peptide cFEE a été réalisée en LC-MS/MS. Par ailleurs, une étude ASAP a été appliquée à ce produit, afin d'évaluer l'intérêt de ce modèle pour des médicaments de nature peptidique.

1. Analyse du peptide cFEE par LC-MS/MS

L'analyse du peptide cFEE a été réalisée selon la méthode développée par Rotival *et al* [95], et décrite dans la partie instrumentale. Dans ces conditions, le temps de rétention du cFEE est de 14,0 minutes, avec une limite de détection de 275 ng/mL. Afin de pouvoir détecter les produits de dégradation à un seuil supérieur à 0,05%, la concentration injectée de cFEE a été de 550 mg/mL correspondant à 2000 fois la LOD.

2. Essais de stress

Les échantillons de cFEE, à la concentration 1 mg/mL, ont été placés dans différentes conditions de température, sur un maximum de 3 semaines. L'analyse par LC-MS/MS de ces échantillons a montré la présence de deux produits de dégradation majoritaires augmentant avec le temps et la température. Ils sont dénommés PDDA et PDDB dans la suite de l'étude. Leur temps de rétention est de 5.1 min et 6.0 min respectivement, et présentent une m/z de 733. Un exemple de chromatogramme obtenu (condition de stress 75°C) est présenté en Figure 62 et les teneurs en PDDA et PDDB obtenus lors des essais de stress sont présentés dans le Tableau 19. Il est noté que des pics entre 10 et 15 minutes sont observés, de m/z 715. Ils sont présents dans l'échantillon contrôle, et leur teneur n'évolue pas avec le temps ou la température. Ils sont donc considérés comme des impuretés du produit et non pas comme des produits de dégradation.

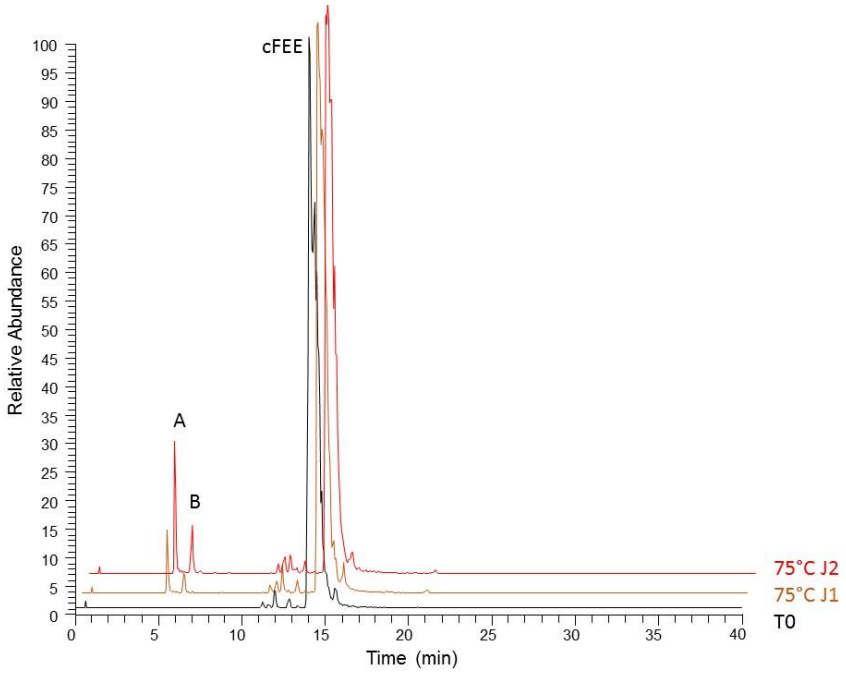


Figure 62 : Chromatogramme (mode SIM) du peptide cFEE dans les conditions initiales (T0) ou après un ou deux jours à 75°C. A et B représentent les 2 produits de dégradation observés

Tableau 19 : Teneurs en produit de dégradation A et B observées dans les différentes conditions de stress

Température de conservation (°C)	Durée de conservation (jour)	PDD A (%)	PDD B (%)
50°C	6	0,45%	0,35%
	10	0,84%	0,68%
	22	2,47%	1,45%
55°C	3	0,62%	0,31%
	5	2,23%	0,69%
	8	2,35%	1,19%
	21	5,52%	2,17%
60°C	2	0,70%	0,44%
	5	1,94%	1,31%
	15	7,09%	1,82%
65°C	1	0,71%	0,31%
	3	4,01%	0,98%
	8	8,94%	1,96%
75°C	1	2,26%	0,79%
	2	4,96%	1,92%

3. Identification des produits de dégradation

Les deux produits de dégradation présentent une m/z 733, soit un gain de +18Da par rapport au peptide cFEE (m/z 715). Rotival *et al* avaient observé l'apparition de 5 produits de dégradation, toutes de m/z 733, lors d'une précédente étude de stabilité du peptide cFEE (autre concentration, 7.2 mg/mL) [95]. Ces produits de dégradation sont issus de l'hydrolyse de différentes liaisons peptidiques du peptide cFEE, entrainant sa linéarisation. Dans cette précédente étude, une seule impureté majoritaire été retrouvée, correspondant à l'ouverture du cycle entre les deux acides glutamiques. Nous nous attendions à retrouver ce même produit de dégradation majoritaire dans notre étude, et avons vérifié par l'analyse des spectres MS/MS la structure de PDD A et B.

a. PDD A

Le produit de dégradation A présente un temps de rétention de 5,1 minutes, et une m/z de 733. Ses spectres MS et MS/MS ainsi que l'interprétation du spectre MS/MS sont présentés dans la Figure 63. Ce produit de dégradation est issu de l'hydrolyse de la liaison peptidique entre la sérine et la cystéine. Les fragments correspondants aux résidus b et y peuvent être retrouvés. Par ailleurs, des ions issus de

la perte de H_2O de certain fragments sont aussi retrouvés (m/z 481 correspondant à y4-H_20 ; m/z 352 correspondant à y3-H_20).

b. PDD B

Le produit de dégradation B présente un temps de rétention de 6,1 minutes, et une m/z de 733. Ses spectres MS et MS/MS ainsi que l'interprétation du spectre MS/MS sont présentés dans la Figure 64. Ce produit de dégradation est issu de l'hydrolyse de la liaison peptidique entre l'acide glutamique et la cystéine. De la même façon que pour DP A, les fragments correspondants aux résidus b et y peuvent être retrouvés, et des ions issus de la perte de H_2O de certain fragments sont aussi retrouvés (m/z 569 correspondant à b5-H_20).

La Figure 65 présente le schéma de dégradation du peptide cFEE en PDD A et PDD B. PDDA et PDDB correspondent aux produits de dégradation appelés DP 2 et DP 4 dans l'étude de stabilité précédente [95]. Il s'agissait de produits de dégradation minoritaires. Dans notre cas, il s'agit des deux produits de dégradation majoritaires, et il n'a pas été observé le produit de dégradation majoritaire qui avait été obtenu dans cette précédente étude. Il faut noter que ces trois produits de dégradation sont issus de l'hydrolyse du peptide cFEE, leur apparition est donc liée à des mécanismes de dégradation « concurrentielles ». Dans ce cas, la cinétique de chacune dégradation peut être influencée par différents paramètres, comme la concentration ou la température. Dans le cas présent, l'étude de stabilité à 25°C (conditions similaires à l'étude de Rotival *et al*) a également montré la présence de PDDA et PDDB. Ainsi, la concentration du produit pourrait être un paramètre important dans la cinétique d'apparition des différents produits de dégradation.

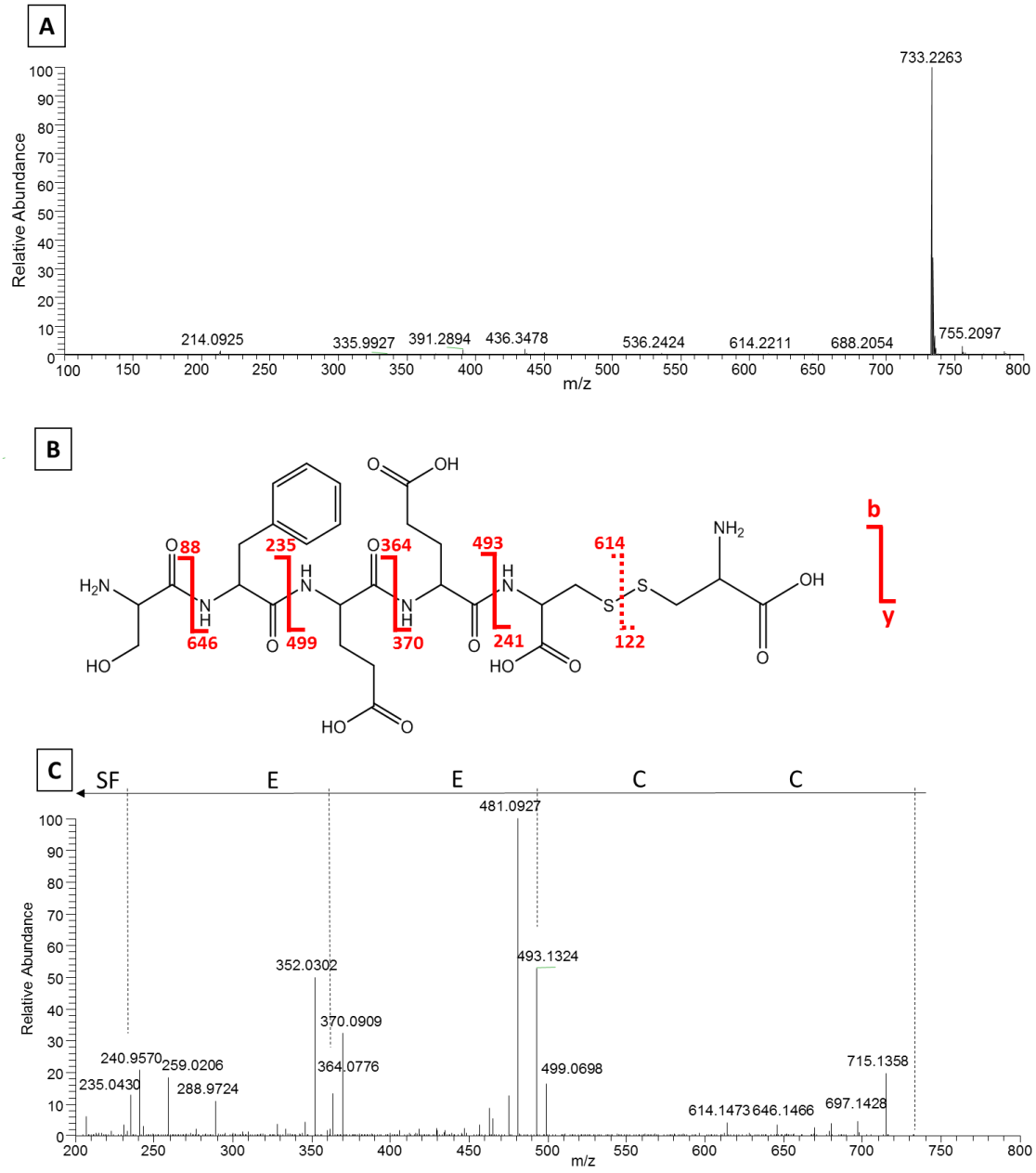


Figure 63 : Spectre MS (A) et MS/MS (C) du produit de dégradation A. L'interprétation du spectre MS/MS est indiqué (B)

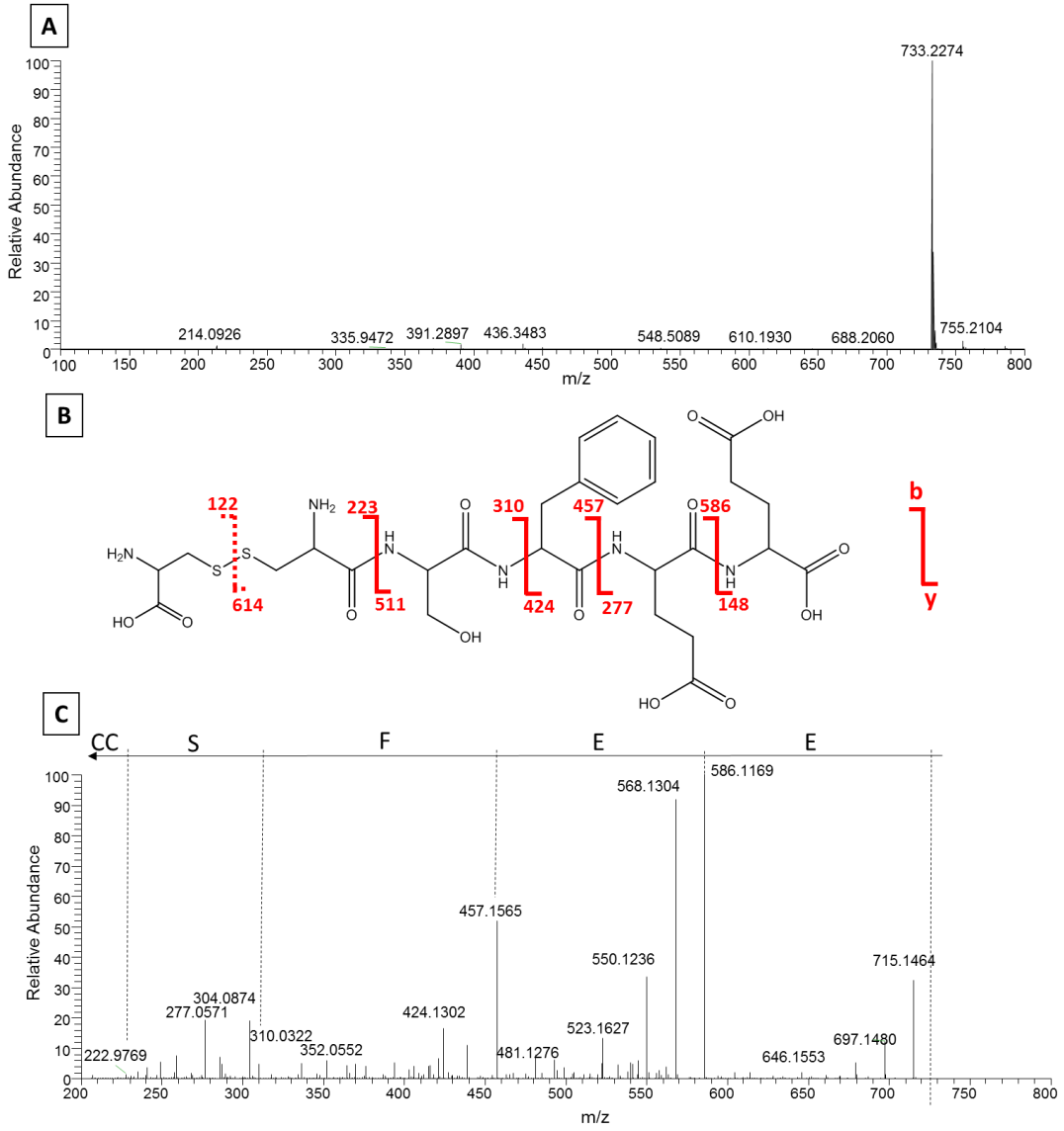


Figure 64 : Spectre MS (A) et MS/MS (C) du produit de dégradation B. L'interprétation du spectre MS/MS est indiqué (B)

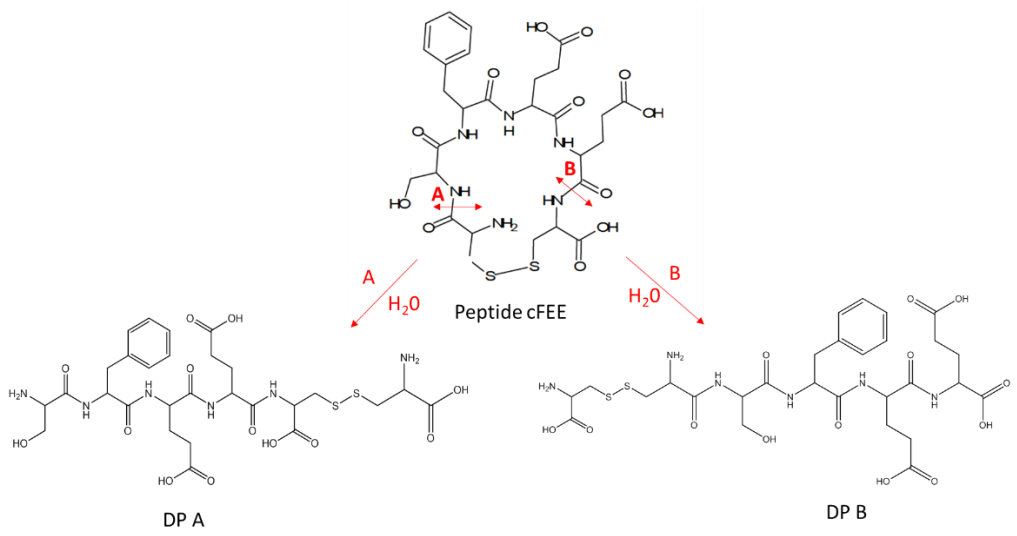


Figure 65 : Schéma représentant la dégradation du peptide cFEE en DP A et DP B

4. Modélisation ASAP pour le PDD A

Pour chaque condition de température, le temps d'isoconversion est déterminé (Tableau 20 et Figure 66). Pour rappel, le temps d'isoconversion représente le temps nécessaire, dans les conditions de température (et d'humidité si besoin), pour atteindre la teneur en produit de dégradation correspondant à la limite fixée de spécification. Dans le cas présent cette limite est de 1,00%. Dans le cas de PDD A, le point d'isoconversion se situe entre 10,687 (condition 50°C) à 0,457 jours (condition 75°C). Excepté pour la température de 75°C, les durées de stress ont permis d'encadrer cette valeur. Aucune extrapolation trop importante n'a été nécessaire. Ceci est représenté par les valeurs du *ratio* d'isoconversion (>1). La teneur en PDD A augmente de façon constante avec le temps, pour l'ensemble des conditions testées. Le modèle apparait donc linéaire. Aucune température n'a été enlevée pour établir le modèle.

Tableau 20 : Temps et ratio d'isoconvertion déterminés pour chaque condition de stress pour le PDD A

Conditions de stress	Durée de stress (jours)	Isoconversion (jours)	Isoconversion ratio
50°C	6, 10, 22	10,687 ± 0,997	2,06
55°C	3, 5, 8, 21	3,068 ± 0,690	6,84
60°C	2, 5, 15	2,692 ± 0,257	5,57
65°C	1, 3, 8	0,941 ± 0,174	8,51
75°C	1, 2	0,457 ± 0,053	4,38

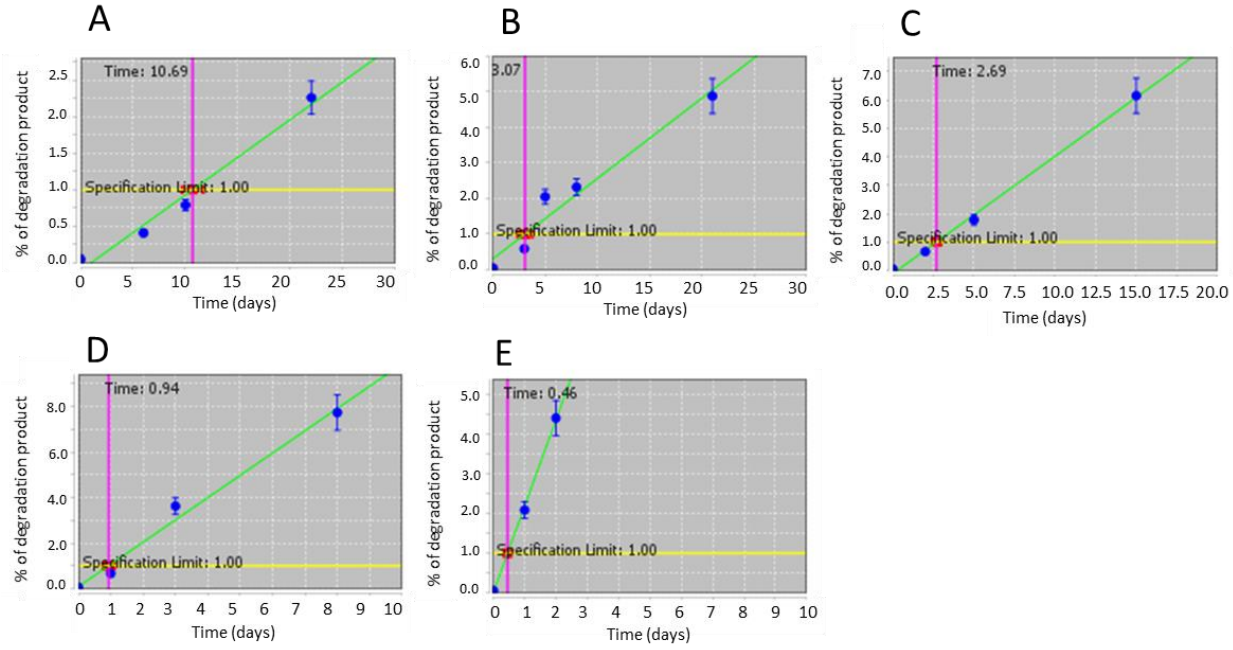


Figure 66 : Graphiques d'isoconversion, c'est à dire le temps nécessaire (en violet) pour atteindre la limite de spécification du PDD A (1.00%NA, en jaune) à 50°C (A), 55°C (B), 60°C (C), 65°C (D) et 75°C (E).
Les carrés bleus représentent les valeurs expérimentales, avec une barre d'erreur de 10% de cette valeur.

Les valeurs obtenues pour les différents paramètres de l'équation modifiée d'Arrhenius sont présentées Tableau 21. La validité du modèle est représentée par les valeurs acceptables des coefficients R^2 et Q^2 (R^2>0,9, Q^2>0,8 [191]), et par le graphique des résidus présenté Figure 67. Sur le graphique des résidus, on observe que les points sont répartis de part et d'autre de 0, et répartis entre + 0,6 et - 0,4, soulignant la validité du modèle. A titre de comparaison, certaines études présentent des résidus répartis entre -1,5 et +1,5 [216, 217].

Tableau 21 : Paramètres du modèle ASAP pour le PDD A

Paramètre	Valeur
Ln A	40.376 ± 2.297
E_a (kcal/mol)	27.293 ± 1.531
B	Non applicable
R^2	0.946
Q^2	0.812

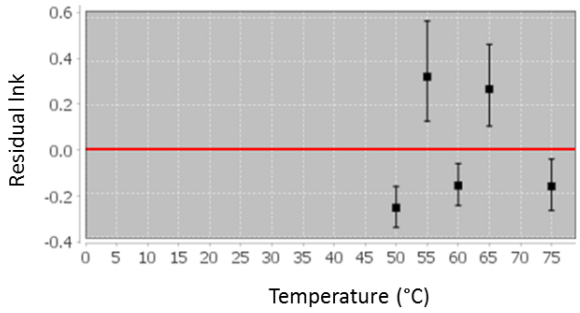


Figure 67 : Graphique des résidus, présentant l'adéquation du model pour le PDD A

5. Modélisation ASAP pour le PDD B

De la même façon que pour PDD A, pour chaque condition de température, le point d'isoconversion est déterminé pour PDD B (Tableau 22, Figure 68). La limite de spécification est également de 1.00%. Dans le cas de PDD B, le point d'isoconversion se situe entre 15,209 (condition 50°C) à 1,101 jours (condition 75°C). Pour l'ensemble des conditions, les durées de stress ont permis d'encadrer cette valeur. Aucune extrapolation trop importante n'a été nécessaire. Ceci est représenté par les valeurs du ratio d'isoconversion (>1), et est visualisé par la Figure 68. La teneur en PDD B augmente de façon constante avec le temps, pour l'ensemble des conditions testées, excepté pour la condition 60°C. Aucune température n'a été enlevée pour établir le modèle.

Tableau 22 : Temps et ratio d'isoconvertion déterminés pour chaque condition de stress pour le PDD B

Conditions de stress	Durée de stress (jours)	Isoconversion (jours)	Isoconversion ratio
50°C	6, 10, 22	15,177 ± 1,507	1,45
55°C	3, 5, 8, 21	8,659 ± 1,005	2,43
60°C	2, 5, 15	3,801 ± 0,372	3,95
65°C	1, 3, 8	3,736 ± 0,439	2,14
75°C	1, 2	1,086 ± 0,112	1,84

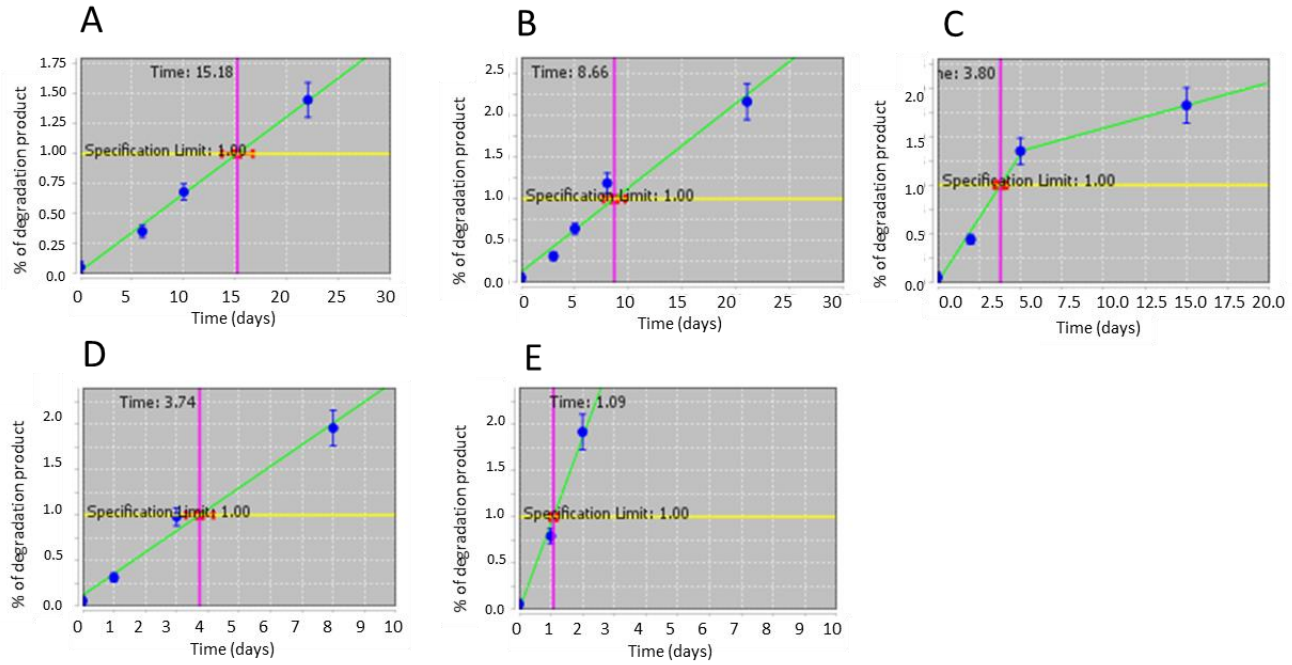


Figure 68 : Graphiques d'isoconversion, c'est à dire le temps nécessaire (en violet) pour atteindre la limite de spécification du PDD B (1.00%NA, en jaune) à 50°C (A), 55°C (B), 60°C (C), 65°C (D) et 75°C (E).
Les carrés bleus représentent les valeurs expérimentales, avec une barre d'erreur de 10% de cette valeur.

Les valeurs obtenues pour les différents paramètres de l'équation modifiée d'Arrhenius sont présentées Tableau 23. La validité du modèle est représentée par les valeurs acceptables des coefficients R^2 et Q^2 (R^2>0,9, Q^2>0,8 [191]), et par le graphique des résidus présenté Figure 69.

Tableau 23 : Paramètres du modèle ASAP pour le PDD B

Paramètre	Valeur
Ln A	32,888 ± 1,911
E_a (kcal/mol)	22,855 ± 1,268
B	Non applicable
R^2	0,968
Q^2	0,943

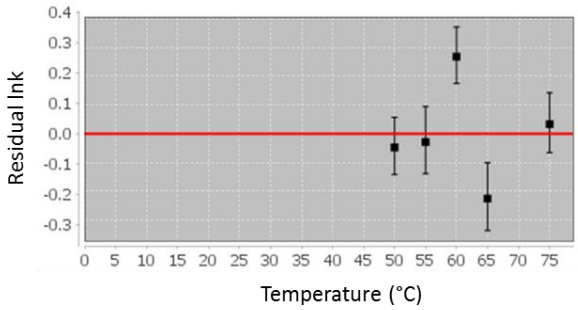


Figure 69 : Graphique des résidus, présentant l'adéquation du model pour le PDD B

6. Comparaison avec les données de stabilité long terme

La Figure 70 présente la comparaison entre les teneurs réelles de PDD A et PDD B obtenues lors de l'étude de stabilité long terme à 4°C, 25°C et 40°C par rapport aux teneurs prédites par les deux modèles ASAP. On peut observer une bonne corrélation entre les teneurs prédites et les teneurs réelles pour les deux produits de dégradation. Ceci permet de valider l'applicabilité d'ASAP pour ce type de molécule peptidique. Waterman *et al* avait également montré la bonne adéquation entre des données prédites par une méthodologie ASAP et les données réelles de stabilité pour un peptide, la bacitracine [217].

Par ailleurs, on peut observer que pour l'ensemble des stress réalisés (température de 50 à 75°C), le PDD A est systématiquement observé à des teneurs plus élevées (Tableau 19). C'est également le cas lors de l'étude de stabilité en conditions accélérées à 40°C (Figure 70). On pourrait donc supposer que PDD A soit le produit de dégradation limitant pour déterminer la limite de péremption, c'est-à dire que dans les conditions de stabilité long terme, il s'agit du produit apparaissant de façon la plus importante. Cela est également représenté par les valeurs de LnA et de Ea obtenues pour PDD A (Tableau 21), supérieures à celles obtenues pour le PDD B (Tableau 23). Néanmoins, pour des températures plus faibles (4°C et 25°C) il est observé une teneur plus importante en PDD B que pour PDD A (Figure 70). Ceci montre une différence de cinétique de dégradation du peptide cFEE en PDD A et PDD B avec la température. Scrivens *et al* [218] ont montré que dans un tel cas de dégradation compétitive en deux produits de dégradation d'un principe actif, la dégradation du produit pouvait ne pas suivre une dégradation de type Arrhenius. Dans ce cas l'approche par isoconversion utilisée dans la méthodologie ASAP permettait néanmoins d'obtenir une bonne corrélation entre les données prédites et les données long terme.

Par ailleurs, l'étude de stabilité du peptide cFEE montre que lorsqu'il est conservé à 4°C et à 25°C, la teneur en PDD A et PDD B ne dépasse pas le seuil fixé de 1% au bout de 6 mois. D'après les prédictions ASAP à 4°C, une stabilité de 3 ans pourrait être obtenue (PDD A et PDD B < 1%). La Figure 71 montre la projection réalisée à 4°C sur 3 ans. D'après le modèle la teneur en PDD A serait comprise entre 0,115 et 0,235%, et la teneur en PDD B seraient comprise entre 0,182 et 0,338%. Cela reste néanmoins à être confirmé par les données réelles long terme. Actuellement, les données ASAP seules ne permettent pas réglementairement de fixer une durée de péremption.

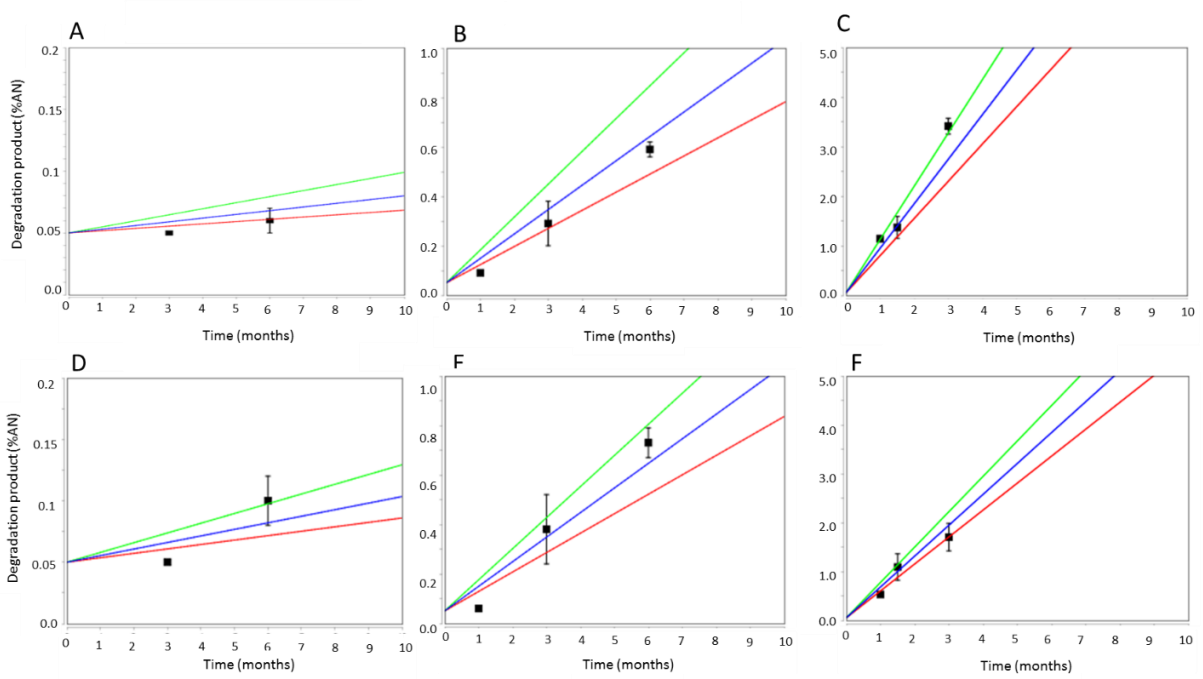


Figure 70 : Projection de la teneur en PDD A prédit par le modèle, pour une température de conservation de 4°C (A), 25°C (B) et 40°C (C) , et de la teneur en PDD B pour une température de conservation de 4°C (D), 25°C (E) et 40°C (F).
La teneur prédite est identifiée par la ligne bleue, encadrée par des valeurs maximales (vert) et minimales (rouge). Les carrés noirs représentent les valeurs expérimentales dans les conditions décrites.

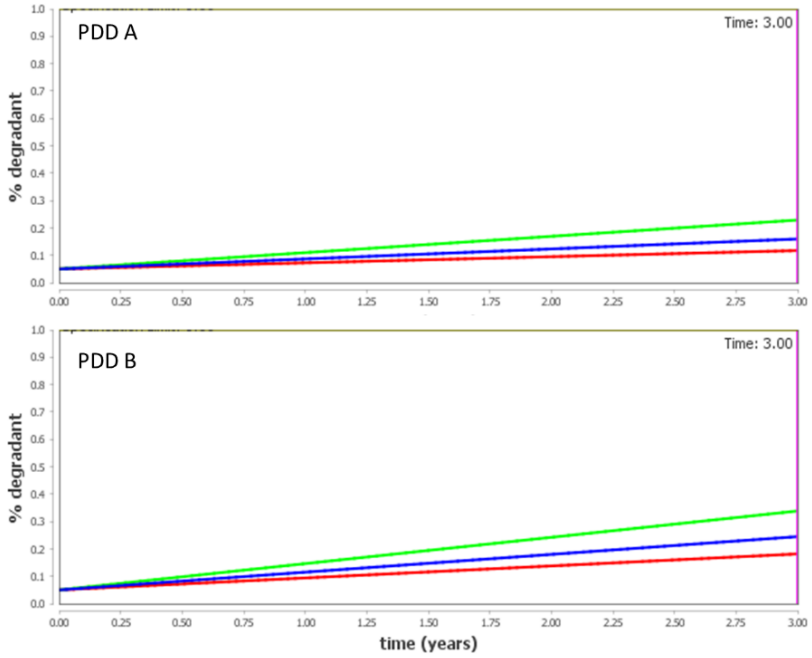


Figure 71 : Projection de la teneur en PDD A et PDD B prédit par le modèle pour une température de 4°C pendant 3 ans. La teneur prédite est identifiée par la ligne bleue, encadrée par des valeurs maximales (vert) et minimales (rouge).

IV. Conclusion

L'analyse en Raman et en CD a permis de caractériser la structure dynamique du peptide cFEE en solution. Le peptide cFEE présente une structure désordonnée en solution aqueuse et de type-II' β-turn dans une solution avec une constante diélectrique plus faible comme le méthanol.

La structure du peptide est étroitement liée à son activité. Toute modification de celle-ci peut entrainer une modification de son activité. L'étude de stress forcée du peptide en solution a montré que sa dégradation était liée à l'hydrolyse des liaisons peptidiques, entrainant une linéarisation de celui-ci. Les produits de dégradation générés présentent exactement la même structure en acides aminés mais ne sont pas de structure cyclique : on suppose donc qu'ils ont alors une activité différente du peptide cFEE. Il s'agit donc des produits de dégradation d'intérêt qui ont été suivis lors de l'étude de stabilité du peptide. L'étude de stabilité du peptide cFEE (1 mg/mL) a montré que les deux produits de dégradation majoritaires retrouvés présentaient des teneurs < 1 % au bout de 6 mois à 4°C et 25°C. Ces deux PDD ont été identifiées par LC-MS/MS et sont issus de l'ouverture du cycle par hydrolyse entre les acides aminés Serine et Cystéine (PDD A) et entre les acides aminés acide glutamique et cystéine (PDD B). Par ailleurs, l'étude ASAP a permis d'obtenir des données prédictives de stabilité cohérentes avec les données réelles de stabilité pour les deux produits de dégradation, démontrant l'applicabilité de cette méthodologie pour des produits pharmaceutiques de nature peptidique.

PARTIE 4 : CARACTERISATION MULTINIVEAUX DE LA STABILITE DE L'INFLIXIMAB EN CONDITIONS HOSPITALIERES ET DES BIOSIMILAIRES ASSOCIES.

I. Introduction

Cette quatrième partie se focalise sur la caractérisation fine de l'anticorps monoclonal Infliximab et sur l'application d'une modélisation ASAP pour apprécier la stabilité long terme de cette protéine thérapeutique. L'objectif de cette étude est double. Le premier objectif est d'évaluer la stabilité de l'infliximab dans les conditions d'utilisation hospitalière. En effet, actuellement, la durée d'utilisation des poches de perfusion d'infliximab est limitée par les recommandations fournisseurs à 24 heures. L'augmentation de cette durée de vie permettrait une flexibilité d'organisation au niveau des PUI, ainsi qu'une diminution des coûts associés. Pour cela, il est nécessaire d'évaluer la stabilité du produit dans les poches de perfusion. Le second objectif s'intéressait à l'évaluation de la biosimilarité de l'infliximab vis-à-vis de leur stabilité en conditions d'utilisation hospitalière entre le produit innovateur et différents biosimilaires associés. Pour cela, nous avons analysé le produit de référence Remicade® et deux de ses biosimilaires disponibles au moment de l'étude : Flixabi® et Remsima®.

Par ailleurs, le coût et l'intérêt sans cesse grandissant des mAbs dans le milieu pharmaceutique nécessite d'autant plus des méthodologies permettant de diminuer le temps de développement de ces produits. Dans cette optique, l'approche ASAP a été utilisée pour évaluer son applicabilité aux mAbs.

II. Stratégie de caractérisation multi-technique de l'infliximab

Comme cela a été évoqué, l'infliximab et les mAbs utilisés comme agent thérapeutique d'une manière générale, sont des protéines de la catégorie des IgG (cf. Partie 2. D.). De ce fait, elles représentent des macromolécules biologiques complexes, autant du point de vue de leur structure chimique composée de plusieurs milliers d'atomes, que de leur structure tridimensionnelle. La caractérisation complète de la structure des mAbs ne peut pas être effectuée par l'intermédiaire d'une unique technique analytique, mais nécessite l'application d'un panel défini de méthodes permettant de fournir des informations complémentaires concernant les différents niveaux définissant la structure d'un mAbs.

La complexité des mAbs en termes de structure mais également le fait que différents types de dégradation (cf. Partie 2. D.) puissent avoir lieu ont des conséquences mécaniques sur la caractérisation de la stabilité de mAbs. Par conséquent, de la même manière que pour l'analyse

structurale des mAbs, la caractérisation de la stabilité de ces protéines requiert l'utilisation de différentes méthodes analytiques en fonction du type de dégradation. Ainsi, lors de ces travaux, l'étude de la stabilité d'infliximab et ses biosimilaires s'est basée sur plusieurs méthodes analytiques complémentaires, réalisées en parallèle (Figure 72).

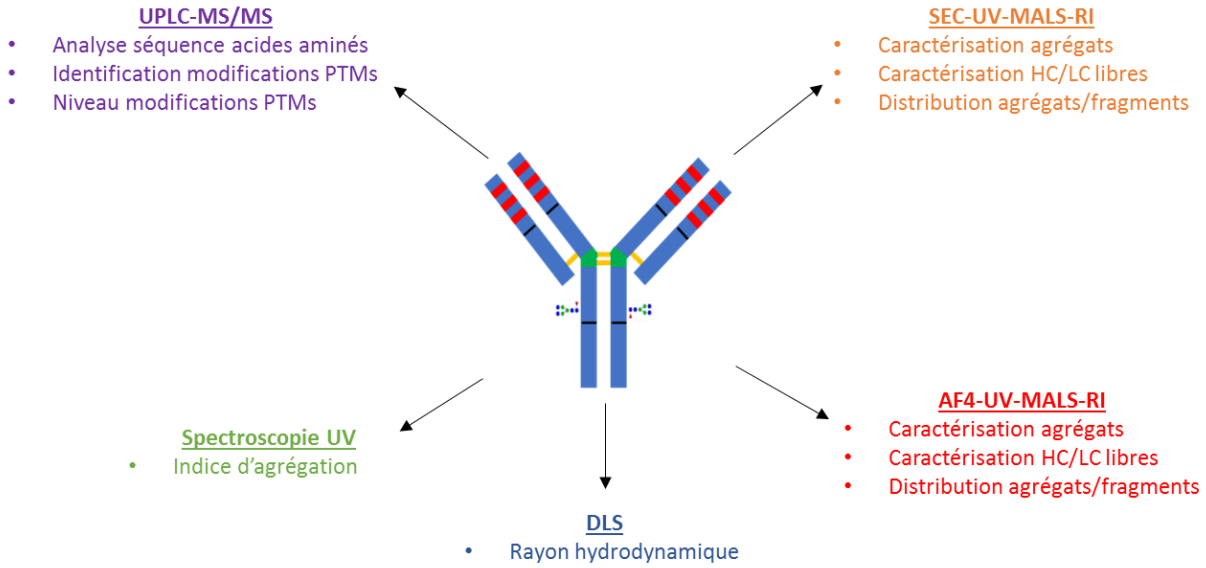


Figure 72 : Méthodes analytiques mises en jeu pour l'analyse de la stabilité de l'infliximab

Afin d'assurer un suivi de la stabilité au niveau de la structure primaire du mAbs, différentes PTMs d'intérêt ont été caractérisées par UPLC-MS/MS selon une stratégie *bottom-up*. L'agrégation et la fragmentation ont été évaluées selon plusieurs méthodes orthogonales : SEC et FFF couplées aux détecteurs UV-MALS/RI, DLS et par calcul de l'indice d'agrégation (IA) après analyse par spectroscopie UV.

Différents stress forcés ont été appliqués à l'infliximab pour démontrer le caractère indicateur de stabilité des méthodes misent en œuvre. L'impact de différents paramètres sur la stabilité du produit, tels que le type de poche de perfusion, la lumière, la température et le temps, ont été évalués.

III. Partie expérimentale

A. Echantillons analysés

Les essais ont porté sur l'analyse de l'anticorps monoclonal Infliximab, présent sous les dénominations suivantes :

- Remicade® 100 mg, poudre pour solution à diluer pour perfusion, Laboratoire Janssen Biologics
- Remsima® 100 mg, poudre pour solution à diluer pour perfusion, Laboratoire Celltrion Healthcare
- Flixabi® 100 mg, poudre pour solution à diluer pour perfusion, Laboratoire Samsung Bioepis

Par ailleurs, dans le cas de l'analyse par SEC et par FFF, l'analyse d'un mélange standard de protéines de poids moléculaire différents a été réalisée (*Protein Standard Mix 15 – 600 kDa for testing of SEC/GFC Columns*, Sigma-aldrich). Le mélange de protéines est constitué de :

- Thyroglobuline (masse molaire théorique : 670 kDa)
- Gamma globuline (masse molaire théorique : 150 kDa)
- Ovalbumine (masse molaire théorique : 44.3 kDa)
- Ribonucléase A (masse molaire théorique : 13.7 kDa)
- Acide para amino benzoique (pABA) : marqueur de bas poids moléculaire (137,1g/mol)

Le mélange est reconstitué avec 1 mL d'eau milli-Q, puis aliquoté en volume de 100 µL avant d'être congelé à -20°C.

B. Reconstitution et préparation des échantillons pour l'étude de stabilité

La préparation des différentes poches d'infliximab s'est faite selon les recommandations des fournisseurs, qui sont similaires pour chacun des produits. Chaque flacon est reconstitué avec 10 mL d'eau pour préparation injectable (PPI) à l'aide d'une seringue équipée d'une aiguille de 21 gauge (concentration : 10 mg/mL). L'eau PPI est introduite directement dans le flacon, puis le lyophilisat est dissout en mélangeant doucement par rotation. Après 5 minutes de repos, 1,5 mL de la solution est prélevé avec la même seringue et introduit dans une poche de NaCl 0.9% remplie à 13,5 mL, afin d'obtenir une concentration finale de 1 mg/mL. La poche est homogénéisée par retournement, sans agitation ou mélange énergique. Dès reconstitution, environ 3 mL de chaque poche est prélevé pour être conservé en tube eppendorff à 4°C. Il constitue le temps « T0 » de stabilité, ou l'échantillon « contrôle » non dégradé. Les poches sont ensuite mises dans les conditions de conservation pour l'étude de stabilité pendant 3 mois. Les conditions de conservation sont présentées Figure 73. A chaque échéance : 15 jours, 30 jours, 60 jours et 90 jours, environ 2 mL de chaque poche est prélevé pour analyse. Deux types de poches utilisées couramment à l'hôpital ont été évaluées : des poches « Freeflex® » (Fresenius Kabi, Sevres, France) et des poches « Ecoflac® » (Bbraun, Saint Cloud, France). La quantité de produit disponible n'a pas permis l'utilisation d'une poche par échéance. De ce fait, nous sommes conscients de la présence d'un biais relatif au prélèvement d'une certaine quantité de

produit dans la poche à chaque échéance, réduisant le volume totale restant. Nous avons néanmoins considéré que ce biais était négligeable, la concentration du produit restant constante. De plus, avant et après prélèvement, chaque poche a été pesée afin d'évaluer une possible perte de solution par évaporation.

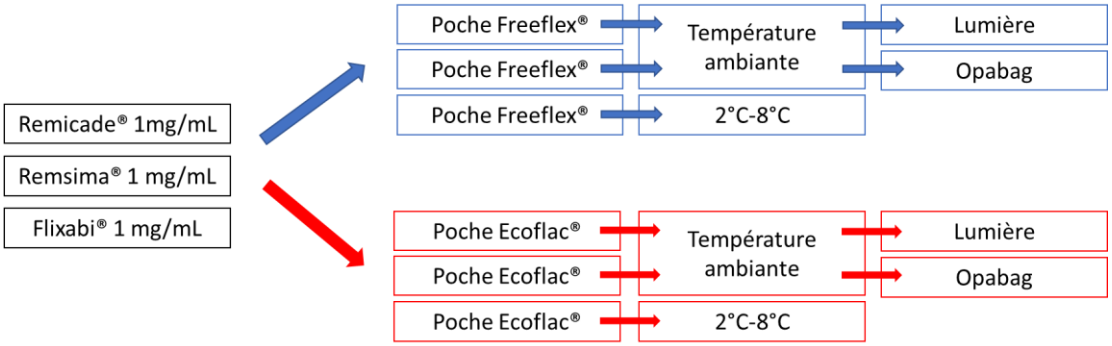


Figure 73 : Présentation des différentes conditions de conservation des poches d'infliximab mises en œuvre lors de l'étude

C. Dégradation forcée

A partir des échantillons contrôles non dégradés, différents stress forcés ont été appliqués afin d'accélérer la dégradation du mAb. Les différents stress appliqués sont présentés dans le Tableau 24 et le Tableau 25. Dans le cas des stress à la température, environ 1 mL de solution d'infliximab est placé dans des flacons bruns de 2 mL, scellés de façon hermétique afin d'éviter une évaporation ou une concentration de l'échantillon. Dans les autres cas, le stress est réalisé directement dans des tubes eppendorfs.

Tableau 24 : Stress forcés appliqués à l'infliximab pour l'analyse des PTMs en LC-MS/MS

Type de stress	Condition	Durée
Température	40°C	5 jours à 3 mois
	50°C	7 jours
pH	pH 10	7 jours
Oxydation	H_2O_2 0,05%	24 h et 48h

Tableau 25 : Stress forcés appliqués à l'infliximab pour l'analyse de l'agrégation

Type de stress	Condition	Durée
Température	40°C	5 jours à 3 mois
	50°C	7 jours
	55°C	1, 2 et 3 jours
pH	pH 3	7 jours
	pH 10	7 jours
	pH 12	5 min, 24h
Agitation	900 rpm	24 heures
Congélation / décongélation	3 cycles de 24h	
Oxydation	H_2O_2 0,05%	24 h
Glucose	Glucose 5%	30 jours

D. Analyses par UPLC-MS/MS

1. Préparation des échantillons et digestion à la trypsine

50 µL de chaque échantillon (50 µg) est dessalé sur filtre Amicon 30kDa (Merck Millipore), 3 cycles de rinçage avec de l'eau milli-Q sont réalisés. Ensuite, l'anticorps est partiellement dénaturé par ajout de 20 µL de bicarbonate d'ammonium 50 mM (pH 8) et incubation 10 minutes à 40°C. Puis la réduction des ponts disulfure est réalisée par l'ajout de 2 µL de dithiothréitol (DTT) (0,1M) avec chauffage 10 min à 80°C et les thiols sont alkylés par ajout de 2 µL de iodoacétamide (0,1M), 20 minutes dans le noir. Enfin, 1 µL de trypsine à 0,5 µg/µL est ajouté. La digestion est réalisée pendant environ 12h à température ambiante. La réaction est stoppée par ajout de 25 µL d'acide formique 0,1 M. La concentration finale en mAb est de 0,5 µg/µL

2. Conditions chromatographique et paramètres du spectromètre de masse

Les analyses sont réalisées en UPLC-MS/MS *via* l'instrumentation décrit précédemment (*cf. Partie 3, II, E*). La séparation des peptides est réalisée sur une colonne Waters BEH C18 (1,7 µm, 2,1 mm × 150 mm), maintenue à la température de 40°C. Le débit est fixé à 0,1 mL/min avec une phase mobile composée d'un mélange d'eau milli-Q additionnée de 0.1% d'acide formique (phase A) et d'acétonitrile additionné de 0,1% d'acide formique (phase B). Le gradient appliqué débute avec 5% de phase B, augmentant jusqu'à 80% en 38 min, maintenu ensuite 3 minutes. La colonne est ensuite

reconditionnée avec 5% de phase B pendant 20 minutes. Le volume d'injection est de 10 µL (5 µg d'échantillon). Concernant les paramètres de la source d'ionisation, ils sont récapitulés dans le Tableau 26. L'acquisition des spectres MS/MS s'est fait selon la méthode de *Data Dependant Analysis*, en sélectionnant les 5 ions les plus intenses. La fragmentation a été réalisée par CID (*collision induced dissociation*), avec une énergie de collision fixée à 35 et un temps d'activation de 30 ms. La gamme de m/z analysé était de 150 à 2000 (MS) et de 100 à 2000 (MS/MS). La résolution en MS était de 60 000.

Tableau 26 : Paramètre de la source pour l'analyse en UPLC-MS/MS de l'infliximab

ESI voltage	- 4kV
sheath gas	40
auxiliary gas	12
Source Temperature	300°C
Capillary temperature	320°C
Capillary voltage	35V
Tube lens voltage	90V

3. Traitement des données

L'analyse des données MS/MS s'est faite par le logiciel Xcalibur® (Thermo-Fisher Scientific). Les peptides sont identifiés en MS selon leur m/z, et en MS/MS par leur séquence peptidique. Le logiciel Proteomic Toolkit (fragment ion calculator) a été utilisé pour déterminer *in silico* les m/z et les fragments correspondant aux séquences peptidiques de chaque peptide [219]. Une masse de 57,02 Da a été ajoutée pour chaque cystéine, correspondant à l'alkylation de celle-ci lors de l'étape de digestion. Une précision sur la mesure de masse inférieure à 5 ppm a été considérée en MS pour l'identification des peptides.

4. Structure tridimensionnelle et localisation des modifications post traductionnelles

Les figures représentant la structure tridimensionnelle de l'infliximab ont été réalisées *via* le logiciel PyMOL (Shrödinger, LLC). Les fichiers utilisés sont issus de la banque de données RCSB protein [220]. Le fichier 5VH4 code pour le fragment Fab et le fichier HVH5 code le fragment Fc. Ces fichiers sont issus de l'étude de Lerch *et al* [221].

E. Analyses par SEC-UV-MALS-RI

1. Conditions analytiques

Les échantillons sont directement analysés, sans préparation ni dilution préalable. Les échantillons n'ont pas été filtrés pour éviter d'éliminer artificiellement des agrégats. Les analyses en SEC-UV-MALS-RI ont été réalisées sur une chaine HPLC Prominence® (Shimadzu, Marne-la-Vallée, France) reliée à un détecteur UV à barrette de diode, un détecteur MALS miniDawn Treos® (Wyatt technology, Santa Barbara, USA) et à un détecteur RI RID-20A® (Shimadzu, Marne-la-Vallée, France). L'ensemble est piloté par deux logiciels : LC Solution® (Shimadzu corporation) pour la partie HPLC-UV-RI, et Astra®, version 7.2 (Wyatt Technology, Santa Barbara, USA) pour la partie MALS. La séparation en SEC est réalisée sur une colonne Biozen SEC3® ; 1,8µm 300 x 4.6 mm (Phenomenex, Le Pecq, France), avec une phase mobile composée d'un tampon phosphate 50 mM pH 6,8 et de NaCl 300 mM, à un débit de 0,2 mL/min. La durée d'analyse est de 35 minutes, et le volume d'injection de 20 µL (correspondant à 20 µg d'échantillon). Dans ces conditions, le temps de rétention du monomère d'infliximab est d'environ 14 minutes. La détection en UV est faite à 280 nm. Le détecteur MALS est constitué de 3 angles (43,6°, 90° et 136,4°), un laser de longueur d'onde 661 nm. Le dn/dc fixé était de 0,185.

2. Traitement des données

Les données ont été traitées soit en prenant en compte l'aire sous la courbe obtenue via le détecteur UV, soit en prenant en compte la concentration absolue obtenue via l'analyse en MALS-RI :

- En UV, l'aire obtenue sur l'échantillon contrôle est pris comme référence (100%). Pour les échantillons dégradés ou les échantillons de stabilité, le calcul de la teneur (taux de recouvrement) se fait par rapport à cette valeur de référence, selon la formule suivante :

$$teneur(NA\%) = \frac{A_{échantillon}}{A_{contrôle}} \times 100$$

  De plus, la proportion de chaque forme (monomère, agrégats, fragments) est déterminée par normalisation d'aire par rapport à l'aire totale de l'ensemble des pics, selon la formule suivante :

$$forme(\%NA) = \frac{A_{forme}}{\sum A_{totale}} \times 100$$

- En MALS-RI, la concentration de chaque forme est calculée de façon absolue directement par le détecteur RI. Le taux de recouvrement est calculé en prenant en compte la concentration totale des formes présentes et déterminé par rapport à la concentration théorique injectée ou

par rapport au témoin contrôle. La proportion de chaque forme est calculée selon la formule suivante :

$$forme(\%) = \frac{C_{forme}}{\sum C_{totale}} \times 100$$

En parallèle, les masses molaires correspondantes aux pics analysés ont été déterminées à partir du logiciel Astra®

F. Analyses par FFF-UV-MALS-RI

1. Conditions analytiques

Les échantillons sont directement analysés, sans préparation ni dilution préalable. Les échantillons n'ont pas été filtrés pour éviter d'éliminer artificiellement des agrégats. Les analyses en FFF-UV-MALS-RI ont été réalisées sur une chaine HPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific) équipée du système Eclipse AF4 (Wyatt technology). Le système est couplé à un détecteur UV à barrette de diode, un détecteur MALS DAWN Heleos 8 et à un détecteur RI Optilab T-Rex (Wyatt technology). L'ensemble est piloté par deux logiciels : Chroméléon® (Thermo Fisher Scientific) et Astra® (Wyatt technology). La séparation en FFF a été réalisée en mode *Frit inlet*, avec une phase mobile constituée de NaCl 0.9%. Le débit du flux directeur (Vd) était de 1mL/min, et le débit du flux croisé (Vx) de 3 ml/min pendant 20 minutes, puis diminution du débit à 0,1 mL/min en 4 min et maintenu 10 min puis 0 mL/min pendant 10 minutes. La durée totale d'analyse est de 44 minutes. Le volume d'injection était de 30 µL (correspondant à 30 µg d'échantillon). Dans ces conditions, le temps de rétention du monomère est d'environ 10 minutes. La détection en UV est faite à 280 nm. Le détecteur MALS est constitué de 8 angles (20.7° à 149°) et d'un laser de longueur d'onde 658 nm. Le dn/dc fixé était de 0,185.

2. Traitement des données

Les données ont été traitées en prenant en compte la concentration absolue obtenue *via* l'analyse en RI. Afin de linéariser la ligne de base et annuler l'effet du gradient, la soustraction d'un blanc est réalisée pour chaque échantillon. Le taux de recouvrement est calculé en prenant en compte la concentration totale des formes présentes, et est déterminé par rapport à la concentration théorique injectée ou par rapport au témoin contrôle. La proportion de chaque forme est calculée selon la formule suivante :

$$forme(\%) = \frac{C_{forme}}{\sum C_{totale}} \times 100$$

G. Analyse par DLS

Les analyses en diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont été réalisées sur une DLS zetasizer® (Malvern Panalytical, Malvern, UK), équipée de 2 angles (13° et 173°) pilotée par le logiciel Zetasizer (Malvern Panalytical). L'analyse est réalisée en utilisant l'angle 13°. Environ 1 mL de solution est analysé, et pour chaque échantillon une nouvelle cuve est utilisée pour éviter des contaminations croisées. L'analyse se fait à 25°C, avec un temps d'équilibration de 3 minutes. L'acquisition est réalisée en triplicat, selon un mode automatique.

H. Indice d'agrégation (IA)

L'IA est réalisé sur un spectromètre UV specord 200 plus (Jena Analytik, Saint-Aubin, France). Le spectre de chaque échantillon est réalisé en triplicat entre 210 et 350 nm. L'IA est calculé avec la formule suivante [122]:

$$IA(\%) = \frac{A_{350nm}}{A_{280nm} - A_{350nm}} \times 100$$

I. Etude ASAP

L'étude ASAP de la stabilité de l'infliximab a été réalisée sur le produit de référence Remicade®. Une solution de Remicade® a été fraichement préparée tel que décrit section II.B. (concentration finale : 1mg/mL) et répartie dans 44 vials ambrés. Vingt-deux flacons sont dédiés à l'analyse SEC, 22 flacons sont dédiés à l'analyse en UPLC-MS/MS. Six flacons sont conservés à 4°C et correspondent à la condition initiale « T0 ». Les 38 autres flacons sont placés dans des enceintes dont la température peut être modifiée (Binder, Tuttlingen, Allemagne). Un suivi en temps réel de la température des enceintes permet d'éviter tout risque d'excursion de température. Le Tableau 27 détaille les températures et les durées de stress utilisées pour l'étude. Pour chaque température de stress, les flacons sont placés en même temps dans l'enceinte. A chaque échéance, deux flacons sont retirés de l'enceinte et placés à 4°C. L'ensemble des échantillons ont été analysés dans une même séquence soit en SEC-UV-MALS-RI soit en LC-MS/MS. Le traitement des résultats a été réalisé par le logiciel ASAPprime® (FreeThink Technologies, Brandford, USA). L'analyse a été réalisée en utilisant la quantité de fragments en SEC et de déamidations en LC-MS/MS retrouvés dans les flacons après stress. La méthode d'ajustement (*fit method*) pour évaluer le taux de dégradation est la méthode par défaut (dans le cas des déamidations) ou de diffusion (dans le cas de la fragmentation). L'intervalle de confiance pour estimer la durée de péremption est calculé *via* une approche Monte Carlo, avec un nombre de simulations de 2500. La

limite de spécification pour le produit de dégradation était de 5% (déamidation) ou 1% (fragmentation).

Tableau 27 : Conditions de conservation pour l'étude ASAP de l'infliximab

Température de stress (°C)	Durée de stress (jours)
30	3,7,10,15,30
35	3,7,10,15,30
40	3,7,10,15,30
45	3,7,10,15

IV. Evaluation des modifications post traductionnelles

A. Résultats expérimentaux des analyses en UPLC-MS/MS

1. Recouvrement de la séquence d'infliximab

La Figure 74 représente le recouvrement de la séquence peptidique de l'infliximab, avec, souligné en vert, les peptides identifiés. La méthode UPLC-MS/MS permet de caractériser 94,9% de la séquence en acide aminé : seulement 12 peptides représentant 34 acides aminés ne sont pas identifiés, sur un total de 62 peptides et 663 acides aminés. Le peptide HC26 (EEQYNSTYR) porte la glycosylation et n'est donc pas identifié sans glycan. Il est souligné en bleu sur la figure. Les autres peptides non caractérisés sont des peptides à un ou deux acides aminés (8 peptides). Leur faible masse et l'absence de MS/MS limite l'identification de ces peptides. Par ailleurs, trois peptides non retrouvés possèdent 3 ou 4 acides aminés. Les peptides courts ont tendance à être moins retenus sur la colonne. Les peptides non identifiés sont probablement élués dans le volume mort, ne permettant pas leur identification. Néanmoins, les peptides non détectés ne sont pas porteurs de modifications post traductionnelles (PTMs). L'annexe 1 détaille les temps de rétention pour chaque peptide.

Les données MS/MS obtenues lors des analyses des échantillons d'infliximab contrôle ont permis de montrer que la méthode UPLC-MS/MS offre une caractérisation étendue de la séquence d'acides aminés de la protéine. De ce fait, la méthode est compatible avec la caractérisation de l'ensemble des PTMs d'intérêt, identifiés comme des marqueurs de la stabilité de l'infliximab.



Figure 74 : Recouvrement de la séquence d'infliximab par analyse UPLC-MS/MS.
LC : Chaine légère, HC : chaine lourde. En bleu : région variable, en orange : CDR, en noir : région constante. Les peptides identifiés sont soulignés en vert.

2. Evaluation des oxydations

a. Degré d'oxydation dans les conditions initiales

Les données UPLC-MS/MS ont été exploitées afin de réaliser la caractérisation des oxydations d'intérêts (Tableau 5) et d'estimer le niveau d'oxydation indépendamment pour les différents acides aminés visés. La Figure 75 présente les taux d'oxydation observés après reconstitution (contrôle) du Remicade®, du Remsima® et du Flixabi®. Pour chaque méthionines et tryptophanes d'intérêt, on observe une faible proportion d'oxydation après reconstitution, systématiquement inférieure à 5%. Ces données sont en accord avec les résultats décrits dans la littérature [132, 222, 223]. Les résultats obtenus montrent ainsi que la méthode en UPLC-MS/MS développée permet d'identifier les oxydations présentes, et d'en estimer la teneur. Par ailleurs, les résultats obtenus montrent une forte similarité entre les trois références d'infliximab, dans les conditions initiales directement après reconstitution.

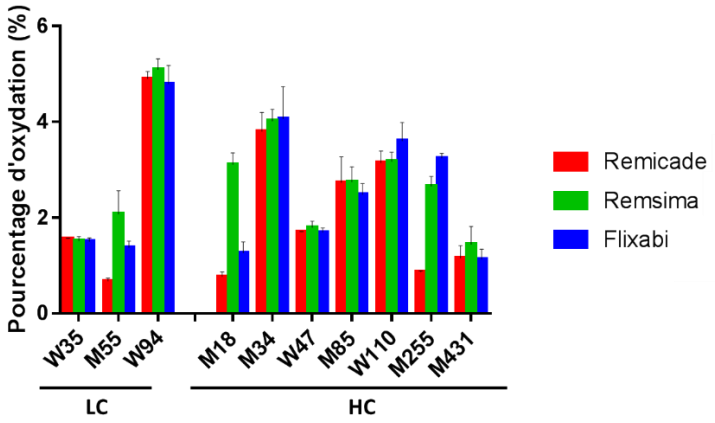


Figure 75 : Pourcentage d'oxydation des M et W à l'état initial pour chaque référence d'infliximab

b. Conditions de dégradation forcées

Afin d'accélérer l'oxydation des méthionines et tryptophanes, et d'identifier lesquelles sont les plus à risque d'oxydation, il est recommandé d'utiliser du H_2O_2 [40]. Ainsi, les échantillons d'infliximab ont été mis en contact avec de l'H_2O_2 0,05% pendant 24 et 48 heures.

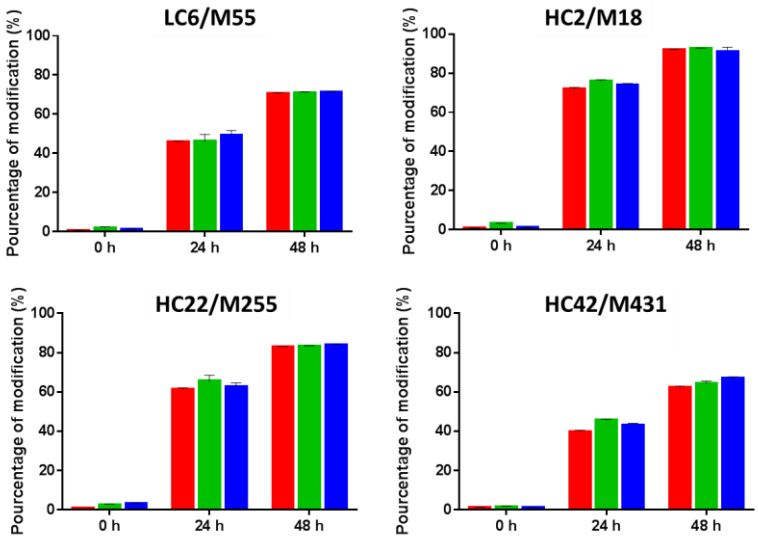


Figure 76 : Pourcentage de M et W sensibles à l'oxydation, à l'état initial et après exposition à H_2O_2 0,05 % suite à une incubation pendant 24h et 48h

On observe une augmentation de l'oxydation uniquement pour les M55, M18, M255 et M431 (Figure 76), avec respectivement environ 45%, 70%, 60% et 40% de forme oxydée après 24h. En annexe 2 sont présentés les spectres MS/MS des peptides oxydés, confirmant la localisation de l'oxydation. Le degré d'oxydation ne montre pas d'évolution significative pour les autres méthionines et tryptophanes, entre les échantillons contrôles et les échantillons ayant subi une incubation en conditions oxydantes (Figure 77). Les résultats obtenus lors des analyses UPLC-MS/MS des essais de dégradation montrent que l'incubation à l'aide de H_2O_2 permet de générer une oxydation importante du mAbs relativement rapidement. Dans l'ensemble des cas, les résultats sont comparables pour les trois références d'infliximab. La sensibilité des trois produits est donc similaire y compris en conditions forcées.

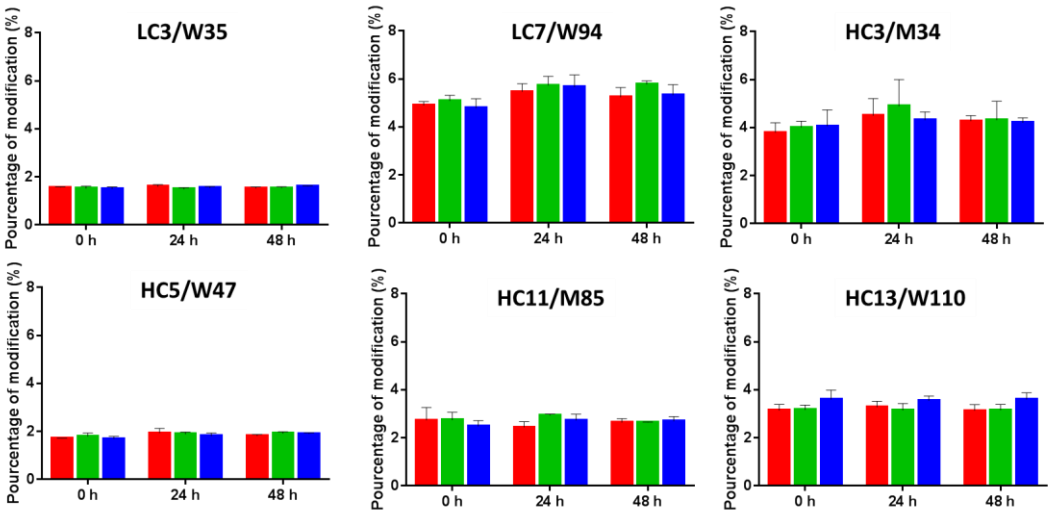


Figure 77 : Pourcentage de M et W non sensibles à l'oxydation, à l'état initial et après exposition à H_2O_2 0,05 % suite à une incubation pendant 24h et 48h

c. Conditions d'utilisation hospitalière

L'évolution de ces PTMs a été évaluée dans les conditions d'utilisation hospitalière, en étudiant l'influence de la température de conservation, de la lumière, et de deux types de poches intra veineuse utilisées en pratique. Chaque référence d'infliximab a été évaluée pour chaque condition pendant 3 mois. A notre connaissance, aucune étude s'intéressant à la stabilité de l'infliximab dans les conditions d'utilisation hospitalière (Tableau 7) n'a étudié les PTMs par peptide mapping en LC-MS/MS.

Les résultats ont montré une évolution de l'oxydation, dans au moins une condition, pour les quatre méthionines suivantes : M55, M18, M255 et M431. De la même manière, comme précédemment dans le cas des échantillons issus de dégradation forcée, les autres résidus potentiellement oxydés n'ont pas montré de variation du niveau d'oxydation.

A 4°C (Figure 78) ou à 25°C à l'abri de la lumière (Figure 79), les résultats des analyses UPLC-MS/MS ne permettent pas de distinguer d'évolution de l'oxydation des méthionines. En effet, les données MS/MS permettent d'obtenir un niveau d'oxydation systématiquement inférieur à 5% sur une durée de conservation allant jusqu'à 90 jours. Ainsi, la température de conservation entre 4°C et 25°C, à l'abri de la lumière, ne semble pas avoir d'impact sur l'oxydation des méthionines.

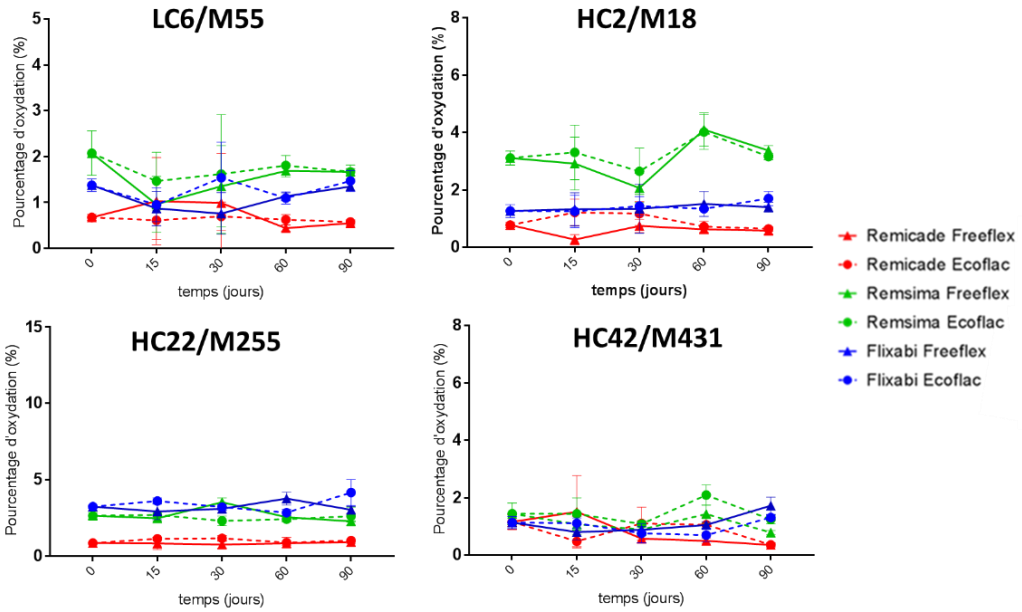


Figure 78 : Evaluation de l'oxydation de M18, M55, M255 et M431 de Remicade® (rouge), Remsima® (vert) et Flixabi® (bleu) conservés en conditions d'utilisation hospitalière à 4°C pendant 90 jours dans les poches Freeflex (trait plein) ou Ecoflac (trait pointillé)

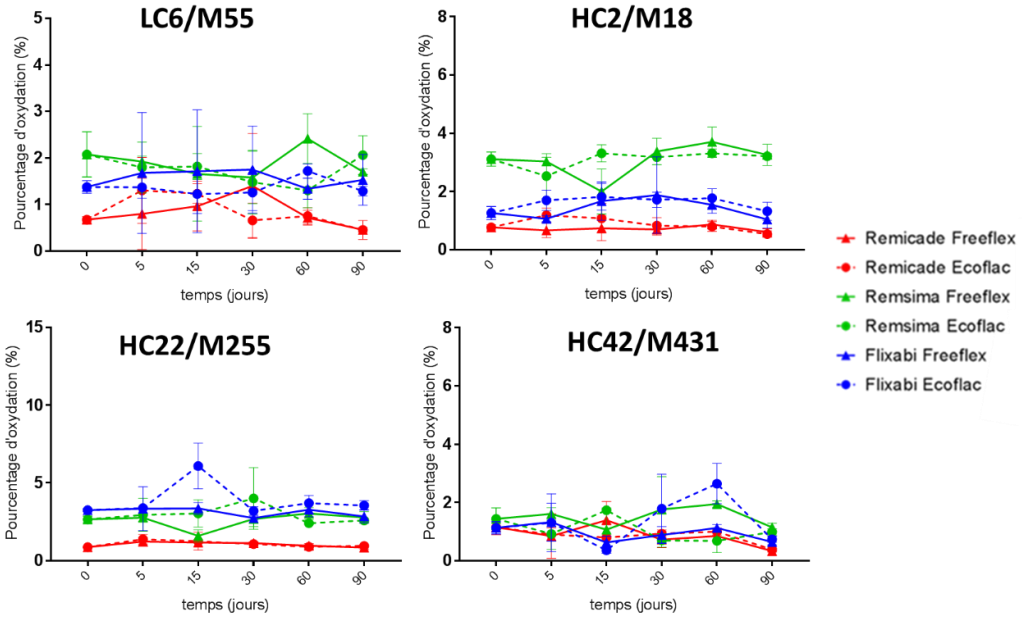


Figure 79 : Evaluation de l'oxydation de M18, M55, M255 et M431 de Remicade® (rouge), Remsima® (vert) et Flixabi® (bleu) conservés en conditions d'utilisation hospitalière à 25°C, à l'abri de la lumière pendant 90 jours dans les poches Freeflex (trait plein) ou Ecoflac (trait pointillé)

Par contre, lorsque l'infliximab est conservé à 25°C et exposé à la lumière (Figure 80), dans le cas de M255 le niveau d'oxydation mesuré initialement, de 1 à 3,5% en fonction du produit, augmente pour atteindre 5 à 12,5% à la fin de la durée d'incubation (Figure 80 C.). Dans le cas de M431, l'oxydation est initialement de 1,6%, et augmente pour atteindre des valeurs allant jusqu'à 7% (Figure 80 D.). On

observe un effet significatif de la lumière sur l'oxydation, avec un effet plus important sur M255 et M431, et moindre pour M55 et M18 (Figure 80 A.B.). Les trois références d'infliximab semblent avoir le même comportement vis-à-vis de l'oxydation. Le degré d'oxydation est variable à T0, mais l'évolution est similaire entre les trois références, ce qui est particulièrement visible sur M255. Il convient de noter que le produit Remicade® conservé en poche Ecoflac® à la lumière présente un comportement différent, pour les 4 méthionines étudiées : après 60 et 90 jours, l'oxydation semble accélérée dans cette condition. Cet effet n'est pas observé pour les deux autres références Remsima® et Flixabi®.

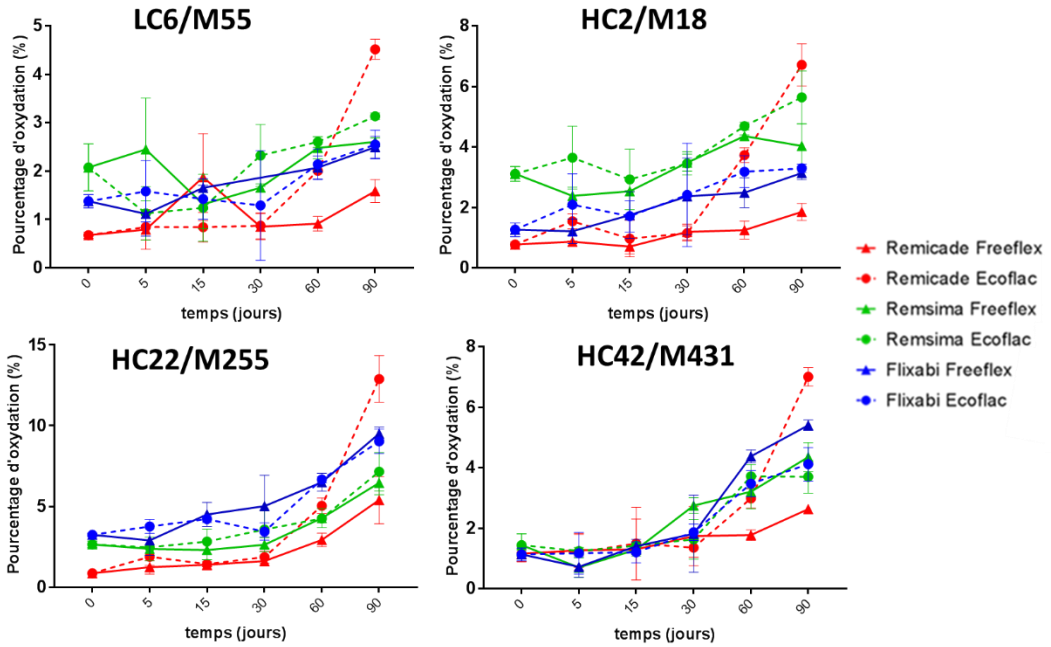


Figure 80 : Evaluation de l'oxydation de M18, M55, M255 et M431 de Remicade® (rouge), Remsima® (vert) et Flixabi® (bleu) conservés en conditions d'utilisation hospitalière à 25°C, exposées la lumière pendant 90 jours dans les poches Freeflex (trait plein) ou Ecoflac (trait pointillé)

3. Evaluation des déamidations d'intérêt

a. Problématique lié à l'analyse des déamidations par UPLC-MS/MS

La réaction de déamidation de l'asparagine (N) en acide aspartique (D) entraine la perte de NH_3 (-17,03 Da) et le gain de H_20 (+18,01 Da) soit un gain final de 0,98 Da (Figure 17). Dans le cas où les deux peptides sont co-élués, cette différence de masse ne permet pas de différencier les deux formes : même en haute résolution, les profils isotopiques sont confondus. Afin d'analyser les déamidations, il est donc nécessaire de séparer en amont de la détection la forme déamidée et non déamidée du peptide. Néanmoins, la différence d'hydrophobicité entre les deux formes est très faible, ce qui rend

difficile leur séparation en HPLC en phase inverse [224]. La séparation peut être améliorée en utilisant une phase mobile basique [224], mais avec un risque d'induire artificiellement des déamidations. Des publications présentent également des gradients très longs. Par exemple, Pisupati *et al* utilise un système nano LC avec une colonne de 50 cm et un gradient de 2 heures [225]. Une séparation entre les deux formes du peptide peut également être réalisée, par dérivatisation du groupement carboxyle [226].

Yan *et al* ont analysé 10 mAbs, dont l'infliximab, pour évaluer les asparagines d'intérêt les plus à risque d'être déamidées. Les asparagines sont réparties en 3 classes : risque faible, risque modéré ou risque élevé. Dans le cas de la région constante, trois hot spots sont identifiés : N328 (modéré), N387 et N392 (élevé). En ce qui concerne la région variable, le seul site identifié comme étant un hot spot est N57 [227]. Pisupati *et al* ont analysé l'évolution des déamidations de deux références d'infliximab : Remicade® et Remsima®, en condition de stress forcés. Trois asparagines ont présenté une augmentation supérieure à 5% : N57 (environ 20%), N392 (environ 10%) et N158 (environ 7,5%) [112]. Ainsi, la N57 semble être le hot spot le plus sensible. La méthode chromatographique utilisée pour l'analyse (cf. partie D.2) permet d'obtenir une séparation efficace entre la forme non déamidée et la forme déamidée de N57 (Figure 81). En revanche, les autres déamidations d'intérêts ne sont pas efficacement résolues avec cette méthode. L'allongement du temps d'analyse jusqu'à 120 minutes n'a pas amélioré la résolution des formes déamidées et non déamidées. L'analyse a été réalisée sur la déamidation du résidu N57 uniquement, et identifié comme le « hot spot » le plus sensible. Cette déamidation est localisée dans la partie CDR de la protéine, et est donc susceptible d'affecter l'interaction avec le récepteur TNF-alpha.

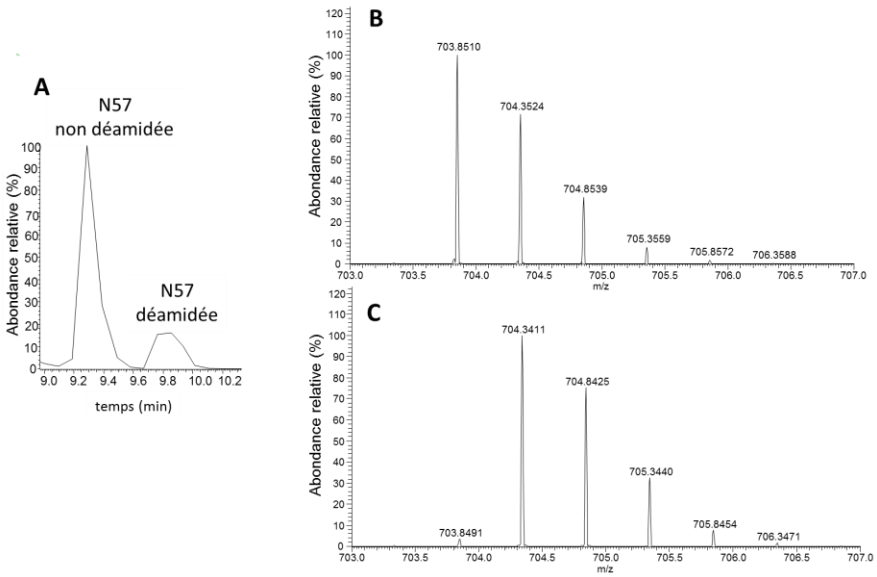


Figure 81 : Chromatogramme du peptide HC7 : SIN$_{57}$SATHYAESVK (A) et des spectres de masse de sa forme non déamidée (B) et déamidée (C)

b. Evaluation des déamidations dans les conditions initiales

La digestion enzymatique peut entrainer une déamidation endogène des asparagines [103]. Nous avons évalué sur trois expériences différentes l'impact de la digestion trypsique sur les taux de déamidation obtenus et la reproductibilité de ce phénomène. De plus, ces analyses ont permis de déterminer le degré de déamidation de l'acide aminé N57 après reconstitution et comparer les différents produits correspondant à infliximab. Les résultats obtenus par l'intermédiaire des analyses UPLC-MS/MS sont présentés Figure 82. Le taux de déamidation est similaire entre les différents essais, et similaire à ce qui peut être trouvé dans la littérature [112, 225]. La procédure de digestion apparait donc adaptée pour l'analyse de déamidations.

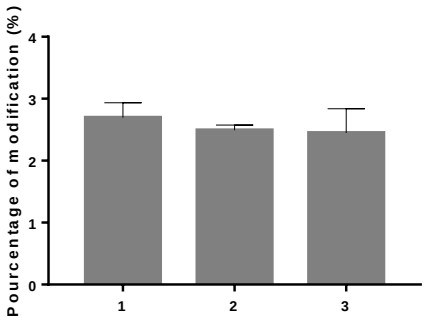


Figure 82 : Comparaison du taux de déamidation observé sur trois expériences indépendante, exemple du Flixabi®

La Figure 83 présente le taux de déamidation observé après reconstitution pour les trois références de l'infliximab. Le taux de déamidation est compris entre 1,5% ± 0,2 (Remicade®) et 2,4% ± 0,4 (Flixabi®). Les résultats sont cohérents avec ce qui peut être décrit dans la littérature pour le Remicade® et Remisma® [225]. Il n'a pas été décrit dans la littérature, à notre connaissance, l'analyse des déamidation du Flixabi®. D'après nos essais, il n'y a pas de différence significative avec les autres références. Ceci est en accord avec le rapport EPAR (*European public assessment report*) du Flixabi® qui indique la similarité du produit avec le Remicade® en termes de degré de déamidation [228].
Ainsi, les résultats obtenus montrent que la méthode UPLC-MS/MS permet de caractériser de manière fiable la déamidation de l'acide aminé N57 avec une robustesse satisfaisante. De plus, les données MS/MS ont montré que le taux de déamidation endogène potentiellement induit durant la préparation de l'échantillon est limité à 2%.

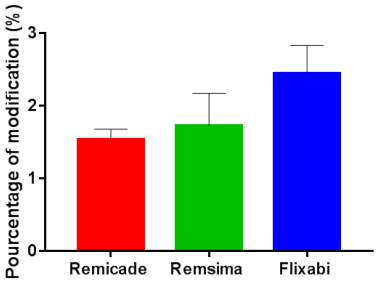


Figure 83 : Pourcentage de déamidation de N57 l'état initial pour chaque référence d'infliximab

c. Conditions de dégradations forcées

La réaction de déamidation est accélérée par la température et à pH basique. Parmi les recommandations que l'on peut trouver dans la littérature, Nowak *et al* propose des stress entre 40 et 50°C jusqu'à 4 jours, et à pH 9 et 10 à des températures entre 25 et 37°C jusqu'à 4 jours [40]. Les entreprises européennes des biomédicaments (EBE, *European biopharmaceutical entreprises*) recommandent les stress suivants : 40°C pendant 8 semaines, et pH 11 pendant 7 jours [42].

Des premiers essais ont été réalisés par incubation à 50°C pendant 7 jours et à pH 10 pendant 7 jours à température ambiante. Les résultats n'ont pas été concluants. En effet, à pH 10 il n'était pas observé d'augmentation des déamidations. Il convient cependant de noter qu'à 50°C, le signal en MS était très diminué, limitant la sensibilité de l'analyse. Dans ces conditions, la solution d'infliximab était particulaire, liée certainement à une forte agrégation de l'infliximab à cette température, et donc diminuant sa concentration en solution. Néanmoins, malgré la diminution du signal, nous avons observé environ 30% de forme déamidée de N57 après 7 jours à 50°C. Le stress à la température a donc été préféré à la dégradation par le pH.

De nouveaux essais d'incubation à une température de 40°C ont été réalisés pendant 12 semaines. Ces conditions n'ont pas entrainé d'observation visuelle de particules. La Figure 84 présentent le taux de déamidation de N57 observé pour les 3 références d'infliximab dans ces conditions. Le taux de déamidation augmente avec le temps, de façon similaire entre les 3 références, et atteint environ 25% après 12 semaines. Les résultats enregistrés pour une incubation à 40°C ont permis de mettre en évidence l'influence de la température sur la réaction de déamidation de l'acide aminé N57. De plus, ils ont permis de valider l'utilisation de ce type de stress pour forcer la dégradation de N57 en acide aspartique.

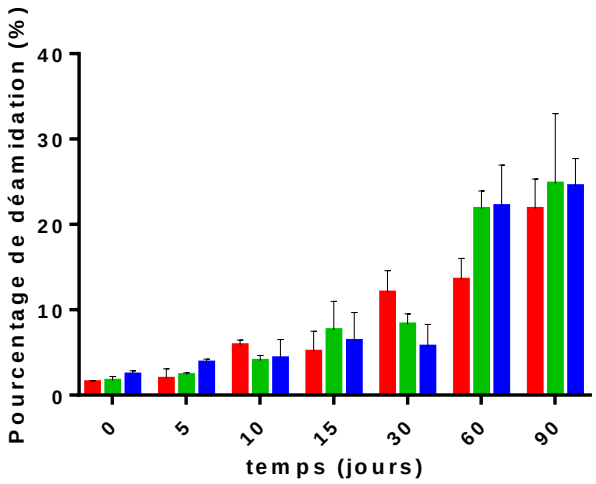


Figure 84 : Pourcentage de déamidation de N57 à 40°C pendant 90 jours déterminé par UPLC-MS/MS pour Remicade® (rouge), Remsima® (vert) et Flixabi® (bleu)

d. Conditions d'utilisation hospitalière

La Figure 85 présente les résultats de la déamidation de N57 lors de l'étude de stabilité en conditions hospitalières. Dans chaque condition, le taux de N57 déamidé est inférieur à 5% après 3 mois de stockage. A 4°C, le taux de déamidation apparait stable. A 25°C, on observe une augmentation du taux de déamidation, qui semble plus important lorsque le produit est exposé à la lumière. Par ailleurs, nous n'avons pas observé d'impact du type de poche, et le comportement de chaque référence d'infliximab apparait similaire.

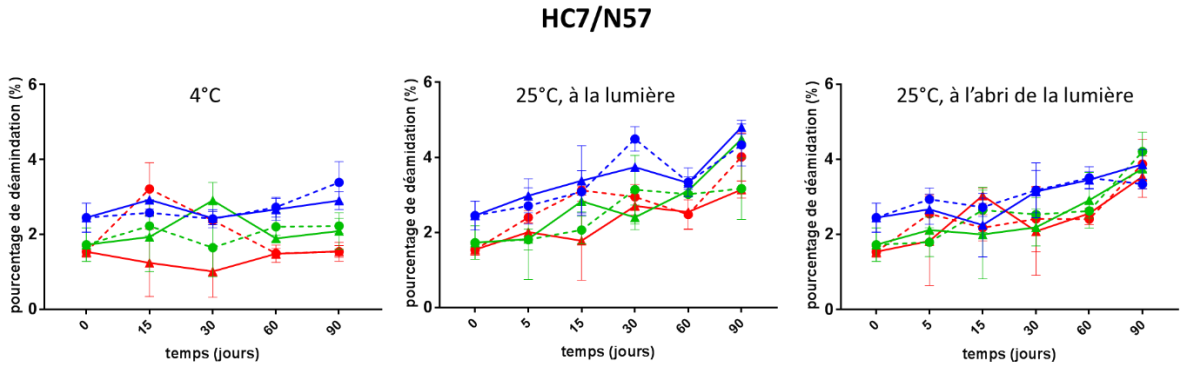


Figure 85 : Evaluation de la déamidation de N57 en conditions d'utilisation hospitalière de Remicade® (rouge), Remsima® (vert) et Flixabi® (bleu) dans les poches Freeflex (trait plein) ou flacons Ecoflac (trait pointillé)

B. Discussion

1. Analyses dans les conditions initiales

Concernant le degré d'oxydation après reconstitution dans les conditions initiales, les résultats obtenus par l'intermédiaire des analyses UPLC-MS/MS montrent un taux d'oxydation systématiquement inférieur à 5% pour les différentes méthionines et tryptophanes étudiés (Figure 75). Les résultats concernant le niveau d'oxydation des différents acides aminés sont en accord avec ce qui est décrit dans la littérature. Le rapport public EPAR du Remsima® indique que le degré d'oxydation est faible [229]. Également Kim *et al* ont évalué un degré d'oxydation inférieur à 5% des 6 mêmes méthionines pour le Remicade® et le Flixabi® [132]. Martin *et al* ont évalué ces 6 méthionines, montrant des niveaux d'oxydation inférieur à 5% excepté d'environ 13% pour M34 [222]. Giorgetti *et al* ont rapporté également des degrés d'oxydation similaire pour M255 et M431 (1,56% et 1,10% respectivement) pour le Remicade®[223].

Concernant l'acide aminé N57, les résultats obtenus lors des analyses UPLC-MS/MS ont permis d'estimer un niveau de déamidation inférieur à 3% pour les différents produits correspondant à l'infliximab. De la même manière que les oxydations, ces résultats sont en accord avec les informations décrites dans la littérature. Ainsi, concernant les déamidations, Pisupati *et al* ont observé des taux de déamidation pour N57 similaires : 1,7% ± 0,2 et 2,2% ± 0,1 pour le Remicade® et le Remsima® [225].
De plus, les niveaux de déamidation mesurés mettent en évidence que le traitement de l'échantillon n'induit pas de déamidation endogène significative de cet acide aminé, excluant ainsi d'éventuels biais analytiques lors de la quantification relative du niveau de modification.

Concernant la méthode analytique UPLC-MS/MS employée, les expériences réalisées ont montré pour principal avantage la possibilité de caractériser et d'estimer le niveau de modifications, pour les oxydations et déamidations d'intérêt, en une seule analyse. Cet aspect s'est avéré particulièrement intéressant pour la réalisation d'études de stabilité complètes qui ont eu recours à un nombre significatif d'analyses. Les données MS/MS fournissent des écart-types faibles pour les différents types de PTMs, inférieur à 0,5%, même lorsque leur niveau est inférieur à 2%, ce qui illustre la robustesse de la méthode de quantification relative. Finalement, la comparaison entre les différents produits correspondant à l'infliximab a permis de mettre en évidence une grande similarité suite à leur reconstitution du point de vue ces PTMs d'intérêt, attestant sur cet aspect de leur biosimilarité.

2. Analyses en conditions forcées

Dans le cas du suivi de l'oxydation des acides aminés M et W, après incubation avec H_2O_2 les analyses effectuées par UPLC-MS/MS ont montré que seules les méthionines M18, M55, M255 et M431 ont été oxydées dans les conditions forcées de l'étude. Ainsi d'après nos essais, les deux sites les plus sensibles de l'infliximab sont M18 et M255 avec un niveau d'oxydation pouvant aller jusqu'à 90% pour M18 et 80% dans le cas de M255 après 48h d'incubation (Figure 76). Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux publiés [40, 132, 230].

D'autre part, parmi les méthionines, seules M34 et M85 ne sont pas sensibles à l'oxydation dans les conditions de l'étude. Lorsque l'on s'intéresse à la structure tridimensionnelle de l'infliximab (Figure 86), on peut remarquer que les méthionines sensibles à l'oxydation (M55 sur la chaine légère et M18, M255 et M431 sur la chaine lourde) apparaissent facilement accessibles. A contrario, les méthionines M34 et M85 non sensibles à l'oxydation sont positionnées à l'intérieur de la structure formée par la protéine et de ce fait apparaissent difficilement accessibles. Cette observation peut expliquer les différences de réactivité des méthionines car ces résidus ne sont pas/peu accessibles aux molécules de H_2O_2.

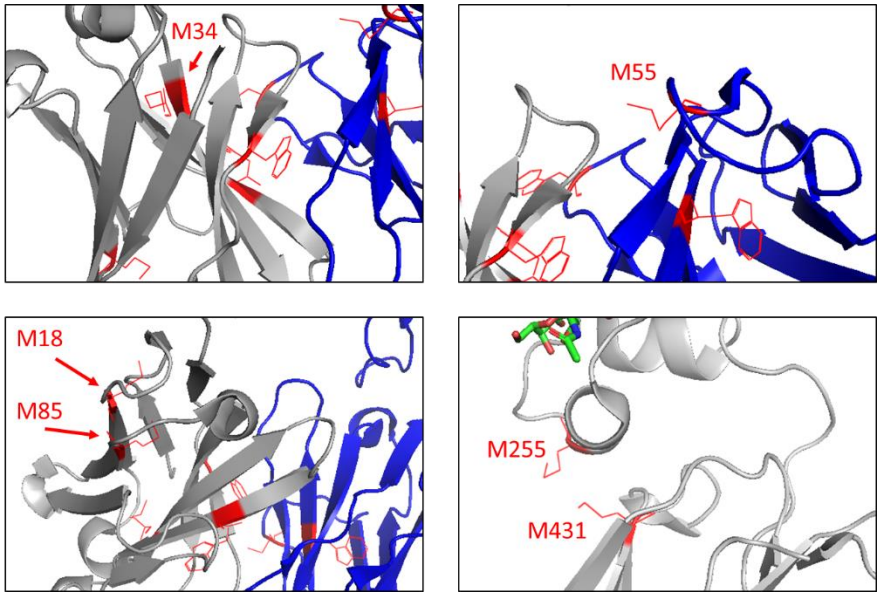


Figure 86 : Modélisations moléculaires de l'infliximab illustrant la localisation des méthionines sur la structure de la protéine.

On remarque qu'aucun tryptophane n'est sensible à l'oxydation dans les conditions de notre étude. Il semble donc que les méthionines soient plus réactives que les tryptophanes à l'H_2O_2. Plusieurs études mettent en évidence que l'oxydation par l'H_2O_2 n'entraine pas d'oxydation des tryptophanes [231,

232]. Ceci peut être lié au mécanisme d'oxydation des tryptophanes, *via* des radicaux libres tandis que le H_2O_2 entraine une oxydation par substitution nucléophile [231, 233]. Afin de forcer l'oxydation des tryptophanes, il peut être utilisé du 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) [110, 231, 232].

Différents stress ont été envisagés afin d'induire une déamidation de l'acide aminé N57, notamment en utilisant des conditions de pH basiques et une température relativement élevée. Les analyses effectuées par UPLC-MS/MS ont montré une augmentation du niveau de déamidation allant jusqu'à environ 25% lorsque l'échantillon est soumis à une température de 40°C. Ainsi les résultats des analyses des échantillons de dégradation forcée ont permis de mettre en évidence l'influence d'une température élevée sur la déamidation de N57. Il convient de noter que ce résidu est accessible à son environnement comme le montre la modélisation moléculaire présentée Figure 87. Ces conditions de dégradation ont ainsi été retenues pour la suite de l'étude de stabilité. Il convient de noter que les expériences réalisées ont montré une précipitation de la protéine lorsque des températures plus élevées sont employées.

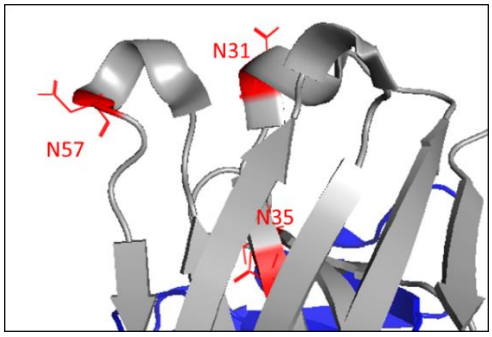


Figure 87 : Modélisation moléculaire de l'infliximab illustrant la localisation de l'asparagine N57 sur la structure de la protéine

Par l'intermédiaire des analyses UPLC-MS/MS effectuées sur les échantillons de dégradation forcée, il a été possible d'apprécier la biosimilarité entre les différents produits du point de vue de leur stabilité en condition de stress. Ainsi les profils obtenus concernant leur degré de modification se sont avérés proches entre les trois produits aussi bien pour les différentes oxydations (Figure 76) que pour la déamidation (Figure 84). Ces résultats permettent ainsi de conclure qu'en plus de leur similarité d'un point de vue structural, les différents produits Remicade®, Remsima® et Flixabi® présentent des comportements proches du point de vue de leur stabilité en condition de dégradations forcées.

3. Analyse dans les conditions d'utilisation hospitalière

Lors des analyses UPLC-MS/MS en conditions d'utilisation hospitalière, seules les quatre méthionines M18, M55, M255 et M431 ont montré une oxydation significative (Figure 80), notamment dans le cas d'une exposition à la lumière. Il s'agit des mêmes acides aminés oxydés lors des essais de stress oxydant. Dans la même mesure que les analyses effectuées suite aux stress de l'infliximab, ceci montre l'intérêt de l'H_2O_2 pour identifier les résidus à risque d'oxydation dans les conditions réelles d'utilisation, sans toutefois permettre de définir l'importance de l'oxydation de chaque résidu.

Lors des essais en conditions réelles de conservation, les taux d'oxydation les plus importants ont été obtenus pour M255 et M431 avec des niveaux d'oxydation allant jusqu'à 15% et 7% respectivement, à la fin de l'étude de stabilité en conditions hospitalières. Ces deux méthionines sont situées sur la partie constante du mAbs, et sont décrites comme étant impliquées dans l'interaction avec le récepteur FcRn dans le cas de M255 et dans l'activation de la voie du complément pour la M431. Un niveau d'oxydation important pourrait donc avoir un impact non négligeable sur les propriétés pharmacologiques de l'infliximab. Une augmentation de l'oxydation entraine une affinité réduite avec le récepteur FcRn, et donc une diminution de la demi-vie du mAbs. Stracke *et al* [234] et Gahoual *et al* [235] ont évalué l'impact de l'oxydation de ces méthionines sur l'affinité au récepteur FcRn, par chromatographie d'affinité. D'après ces deux études, l'oxydation de M431 ne semble pas avoir d'impact sur l'affinité du mAb avec le FcRn. Par contre, l'oxydation de M255 diminue l'affinité avec celui-ci. Liu *et al* ont montré par CD et RMN que l'oxydation de ces deux méthionines, avec une contribution majoritaire de M255, entraine une modification de la structure secondaire et tertiaire des domaines CH2 et CH3 sur lesquels elles sont situées, pouvant expliquer la modification de l'affinité avec le récepteur FcRn [236]. Aucune étude disponible dans la littérature n'a évalué l'impact d'une conservation à l'abri ou non de la lumière de l'infliximab. La comparaison entre les analyses des échantillons maintenus à l'abri de la lumière (Figure 79) et les échantillons exposés à la lumière ont permis de mettre en évidence une oxydation significative pour les résidus M255 et M431. L'impact principal d'un stockage à la lumière semble être une augmentation de l'oxydation des méthionines M255 et M431, pouvant donc entrainer une modification de la demi-vie de l'infliximab. Par contre, le stockage à la lumière n'a pas entrainé de modification significative de l'oxydation des méthionines impliquées dans la liaison au TNFα. L'impact sur l'activité de l'infliximab semble donc négligeable.

Concernant l'impact de la température de conservation, les résultats obtenus par UPLC-MS/MS montrent que le stockage à 25°C favorise les déamidations de l'asparagine N57, située sur un site CDR. Ainsi on observe un taux de déamidation d'environ 4% lorsque le mAbs est conservé à 25°C à la fin de

l'étude (Figure 85). L'augmentation du taux de déamidation peut donc potentiellement entrainer une modification de la l'interaction entre l'infliximab et l'antigène et donc impacter l'activité du produit. L'influence de la température sur l'augmentation des déamidations est également décrit dans différentes études [112]. Les études décrites dans la littérature, s'intéressant à la stabilité de l'infliximab dans les conditions d'utilisation hospitalières, ont réalisé uniquement des essais en chromatographie d'échange d'ions [124, 131]. La déamidation entraine une augmentation des variants acides et donc une modification du profil chromatographique. Cependant, cette approche n'est pas spécifique aux déamidations car d'autres types de modifications peuvent entrainer l'apparition de variants acides. Elle permet d'apporter uniquement une indication sur cet aspect. De façon similaire à nos résultats, Tokhadze *et al* ont observé une augmentation des variants acides de l'Inflectra® (biosimilaire d'infliximab) après 90 jours à 25°C, et l'absence de modification du profil chromatographie après 90 jours à 4°C [124].
Ainsi les analyses UPLC-MS/MS effectuées ont permis de mettre en évidence de manière précise le phénomène de déamidation de l'acide aminé N57 lorsque le produit est conservé à une température de 25°C pour une période prolongée.

Concernant le type de poche de perfusion, aucune étude n'a évalué leur impact sur la stabilité de l'infliximab ou bien tout autre type de mAbs. Par ailleurs, aucune recommandation concernant les poches de perfusion à utiliser n'est indiquée dans la notice fournisseur de chaque référence d'infliximab. Les résultats obtenus durant l'étude de stabilité effectuée en conditions d'utilisation hospitalière montrent un taux d'oxydation significativement supérieur pour les Met255 et Met431 lors du conditionnement dans la poche Ecoflac par rapport à la poche Freeflex, dans le cas du Remicade® (Figure 80). Ce résultat est d'autant plus intéressant car, d'une part la poche Ecoflac est plus opaque à la lumière, et d'autre part ce résultat est observé sur une seule référence d'infliximab. Cet effet pourrait être lié à des interactions contenant-contenu entre la poche Ecoflac et le produit, être lié à des additifs oxydants de la poche, ou à des interactions entre les excipients du produit et la poche.

C. Conclusion

Différentes études se sont focalisées sur la stabilité de l'infliximab en conditions d'utilisation hospitalière. Néanmoins, aucune étude auparavant n'a évalué l'évolution des PTMs par LC-MS/MS. D'après nos essais, il n'existe pas de modification significative, pour les PTMs étudiées, pour les trois références Remicade®, Remsima® et Flixabi® après 3 mois de stockage à 4°C, en poche Freeflex ou Ecoflac. Ceci permet d'envisager une augmentation de la durée de conservation des poches de perfusion d'infliximab. Les analyses LC-MS/MS ont permis de mettre en évidence une oxydation

significative lorsque le produit Remicade® est conservé durant une période prolongée dans des poches de type Ecoflac. Cet effet pourrait être potentiellement issu d'interactions contenant-contenu qui n'ont pas été décrites à ce jour, mais nécessitent des études plus approfondies. La méthode LC-MS/MS mise en œuvre dans le cadre de ces études de stabilité s'est avérée particulièrement pertinente avec la possibilité de caractériser et de localiser un nombre important de PTMs d'intérêt. Néanmoins, l'ensemble des PTMs n'ont pas été étudiés lors de ces travaux, notamment dans le cas de différentes déamidations. Cet effet est notamment dû à l'impossibilité d'obtenir une séparation chromatographique des peptides intacts et de leurs homologues modifiés. Ainsi, d'autres voies de dégradation des mAbs sont possibles et doivent être évaluées afin de garantir la stabilité du produit.

D. Perspectives

Il existe d'autres PTMs décrites dans la littérature qui n'ont pas pu être étudiées lors de ces travaux. Dans le cas du clivage des lysines en C-terminal et de la cyclisation de l'acide glutamique en acide pyroglutamique en N-terminal, ces modifications n'ont pas d'impact sur l'activité ou la pharmacocinétique des mAbs [103]. Au vu de l'absence d'impact de ces modifications, elles n'ont pas été étudiées.

Les glycosylations sont des PTMs qui impactent notamment la pharmacocinétique du mAb [237]. De ce fait, toute modification du profil glycosidique du mAb peut donc avoir un impact sur son efficacité, et il semble pertinent de l'évaluer. Des essais préliminaires ont été réalisés en CZE-MS/MS selon la méthode développée par l'équipe du Dr. Emmanuelle Leize-Wagner [25, 223]. Le profil glycosidique des trois références à l'état initial et lors d'un stress à 40°C pendant 2 mois sont présentés en annexe 3. A l'état initial, les profils apparaissent différents entre Remicade® et Remsima®, ce qui est cohérent avec la littérature [27, 225]. Concernant le profil du Flixabi®, il apparait assez similaire à celui du Remsima®, avec une proportion de G0F et G1F similaire. Les glycosylations sont reliées à la lignée cellulaire produisant le mAb et aux conditions de culture cellulaire, ces dernières ayant l'impact le plus important [28]. C'est ce qu'on observe également : Remicade® et Remsima® sont produits par le même type cellulaire (cellule SP2/0) tandis que Flixabi® est produit par les cellules CHO. Même si les glycosylations exprimées sont surtout reliées au process de fabrication, il peut être intéressant d'évaluer l'impact d'autres paramètres et du stockage sur celles-ci. Le profil glycosidique des trois références d'infliximab est apparu stable lors d'un stress à 40°C pendant 2 mois. Pisupati *et al* avait également montré que le profil de glycosylation du Remicade® et du Remsima®, sous forme lyophilisat et conservé à 40°C/97%HR pendant 4 semaines, était stable [112]. La température ne semble donc pas modifier le profil de glycosylation. L'impact d'autres facteurs comme le pH et l'oxydation serait

intéressant à évaluer, ainsi que l'impact de la lumière et du type de poche dans les conditions de conservation hospitalière.

V. Evaluation de l'agrégation

En parallèle de l'étude de la structure primaire de l'infliximab et de la caractérisation des PTMs d'intérêts, une étude concernant la stabilité du mAbs vis-à-vis de l'agrégation et de la fragmentation des chaînes lourdes/légères a été effectuée. L'agrégation fait partie des paramètres critiques de qualité, et de ce fait représente un marqueur important de la stabilité de la protéine. La fragmentation de l'IgG en chaînes lourdes et chaînes légères libres a également été étudiée. Ainsi, différentes méthodes analytiques ont été développées pour effectuer ce type de caractérisation :

- Chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur à diffusion de lumière (SEC-UV-MALS/RI)
- Fractionnement par flux-force couplée à un détecteur à diffusion de lumière (AF4-UV-MALS/RI)
- Diffusion dynamique de la lumière (DLS)
- Indice d'agrégation par mesure différentielle UV

A. Résultats expérimentaux

1. Analyse par SEC-UV-MALS/RI

    a. Analyse d'un mélange de protéines de poids moléculaires standards

L'analyse d'un mélange de protéines de poids moléculaires standards permet de relier le temps de rétention des molécules analysées à leur poids moléculaires. La Figure 88 présente le chromatogramme SEC-UV-MALS-RI obtenu. La courbe de calibration correspondante est présentée Figure 89. En représentation logarithmique, le temps de rétention est inversement proportionnel à la masse molaire. Cette courbe de calibration est intéressante lorsque seul un détecteur UV est utilisé, afin de pouvoir estimer la masse molaire des molécules détectées lors de l'analyse.

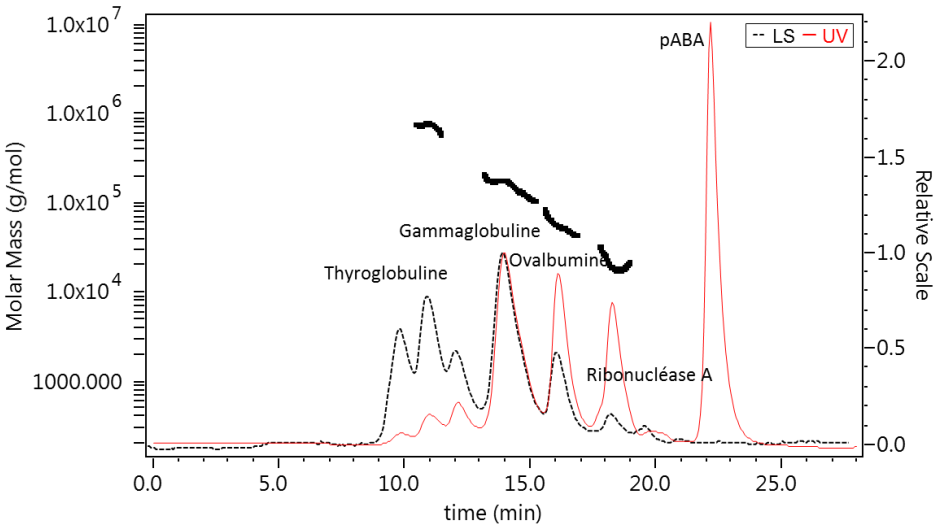


Figure 88 : Analyse d'un mélange de protéine témoin de poids moléculaires connus en SEC-UV (pABA : acide para-aminobenzoïque)

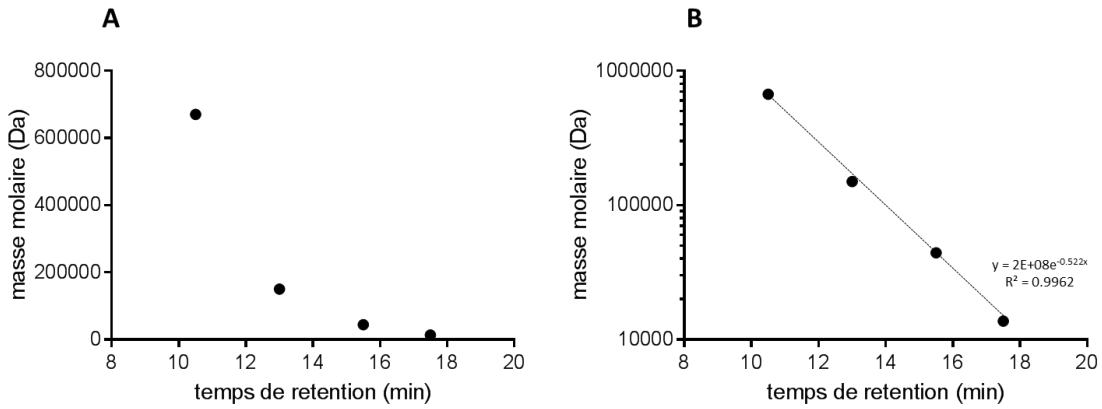


Figure 89 : Temps de rétention des protéines en fonction de leur poids moléculaire, selon un axe linéaire (A) ou logarithmique (B) pour représenter la masse molaire.

Le Tableau 28 présente les temps de rétention théoriques déduits de la courbe de calibration pour le monomère et les agrégats d'infliximab. Néanmoins, la séparation en SEC n'est pas strictement liée à la masse molaire mais également à la conformation et au rayon hydrodynamique des protéines. Des protéines de mêmes poids moléculaires mais de conformations différentes peuvent donc être séparées en SEC [238]. Par exemple, Ehkirch *et al* ont montré la présence de 3 pics de monomères lors de l'analyse en SEC du pembrolizumab [239]. L'utilisation d'une courbe de calibration reste donc une approche qualitative. L'analyse d'un mélange de protéines permet néanmoins d'évaluer les performances de la méthode chromatographique et la capacité de séparation de la phase stationnaire Elle permet également de vérifier le maintien de l'efficacité de la colonne au fur et à mesure du temps et des analyses. Le pABA (acide para-aminobensoïque) est un marqueur de bas poids moléculaire.

Tableau 28 : Temps de rétention théorique du monomère et des agrégats de l'infliximab par SEC

Infliximab	Masse molaire (Da)	Temps de rétention théorique (min)
monomère	144000	13,9
dimère	288000	12,5
trimère	432000	11,8
5x monomère	720000	10,8
10x monomère	1440000	9,5

L'utilisation du détecteur MALS-RI permet de déterminer directement la masse molaire et de quantifier de façon absolue les protéines analysées [117]. L'utilisation de ce détecteur permet ainsi de dépasser les limites de la SEC-UV concernant la détermination de la masse molaire. Le Tableau 29 présente les masses molaires obtenues pour les protéines du mélange, ainsi que leur taux de recouvrement par rapport à leur quantité théorique injectée. Pour des masses molaires supérieures à 150 kDa, les masses molaires calculées sont très proches de la masse molaire théoriques (< 10 %). Pour les masses molaires plus faibles, les différences sont plus importantes, notamment pour la ribonucléase A (46% de différence). Ceci est cohérent avec le fait que le MALS est plus sensible aux poids moléculaires élevés [117]. Par ailleurs, les taux de recouvrements sont proches de 60% ce qui est cohérent avec une analyse en SEC, pour laquelle une perte au niveau de la colonne est attendue. Concernant la thyroglobuline, le recouvrement apparait très faible (15,4%). Ceci peut être lié à la faible séparation avec les protéines éluées avant et après (Figure 88), non identifiées par le fournisseur, entrainant des difficultés pour l'intégration du pic.

Tableau 29 : Evaluation par MALS-RI des masses molaires et des taux de recouvrement des protéines du mélange protéique

Molécule	Thyroglobuline	Gamma globuline	Ovalbumine	Ribonuclease A
Masse molaire théorique (Da)	670000	150000	44300	13700
Masse molaire calculée (Da)	714200 (±2,4%)	148800 (±3,1%)	54600 (±5,1%)	20030 (±14,9%)
Différence entre la masse molaire théorique et calculée (%)	6,6	-0,8	23,2	46,2
Recouvrement (%)	15,4	67,0	62,2	57,6

b. Analyse de l'infliximab

i. Références d'infliximab

Dans un premier temps, la LOD de la méthode a été déterminée par analyse d'un échantillon d'infliximab dilué. La concentration d'infliximab pour laquelle la hauteur du pic correspondant est

supérieur à 3 fois la hauteur du bruit correspond à la LOD. A 280 nm, la LOD déterminée est de 0,5 µg/mL. L'échantillon est analysé directement sans dilution, à la concentration de 1 mg/mL soit à une concentration 2000 fois la LOD. En considérant que le coefficient d'absorption molaire est équivalent entre toutes les formes de l'infliximab (monomère, agrégats …), la méthode permet de détecter les agrégats à une concentration de 0,05% par rapport au monomère.

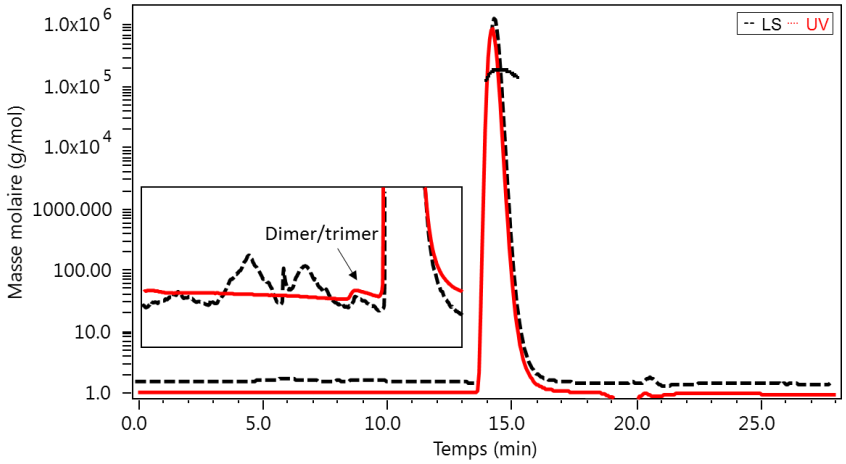


Figure 90 : Chromatogramme du Remicade® après reconstitution en SEC-UV-MALS-RI

Les trois références d'infliximab ont été analysées après préparation. Pour les trois produits, nous observons deux pics, aux temps de rétention 13,9 et entre 11,0 et 13,2 minutes (Figure 90). Le pic élué à 13,9 minutes présente une masse molaire de 150,2 (±1.865%), 140,7 (±3.659%) et 150,8 (±0.455%) kDa respectivement pour le Remicade®, le Remsima® et le Flixabi®. Ces résultats sont cohérents avec la masse molaire théorique du monomère de l'infliximab de 144,0 kDa. Concernant le pic ayant un temps de rétention entre 11,0 et 13,2 minutes, la proportion trop faible n'a pas permis d'obtenir une masse molaire par MALS-RI. D'après la courbe de calibration, il correspondrait potentiellement à un pic de dimères et de trimères. Le Tableau 30 présente les résultats obtenus pour les trois références d'infliximab après reconstitution. Le monomère représente plus de 99,2% de la totalité des pics en normalisation d'aire en UV, tandis que l'ensemble dimères/trimères représente entre 0,2% (Remicade®) et 0,8% (Remsima®) selon la référence. La présence d'une plus grande proportion d'agrégats pour le Remsima® est en accord avec les EPAR du produit [229]. Par ailleurs, les profils chromatographiques obtenus sont cohérents avec des études similaires décrites pour l'infliximab [124, 126, 131].

Tableau 30 : Proportion des différentes formes : monomère, dimères, trimères et HWMS, des trois références d'infliximab après reconstitution déterminées en SEC-UV-MALS-RI

Reference	Forme	AUC (%)[1]	AUC totale (%)[1]	Recouvrement (%)[2]
Remicade®	Monomère	99,8	100%	64,0
	Dimères/Trimères	0,2		ND
	HWMS	ND		ND
Remsima®	Monomère	99,2	100%	67,2
	Dimères/Trimères	0,8		ND
	HWMS	ND		ND
Flixabi®	Monomère	99,5	100%	65,6
	Dimères/Trimères	0,5		ND
	HWMS	ND		ND

[1] : Déterminer à partir du signal UV
[2] : Déterminer à partir de la quantification absolue en MALS-RI

ii. Dégradations forcées

Différents stress ont été appliqués sur l'un des produits, le Remicade®. L'objectif était de déterminer des conditions de stress permettant de générer des agrégats, et d'évaluer la sensibilité de l'infliximab vis-à-vis de ces différents stress. Enfin, la réalisation de ces expériences a pour but d'évaluer la biosimilarité des 3 références d'infliximab vis-à-vis de la formation d'agrégats. Les différents stress et leurs durées ont été sélectionnés en fonction des recommandations disponibles dans la littérature, comme celles de la *European Biopharmaceutic Entreprise* [42] ou de Nowak et al [40].

- Dégradation par le pH

Les stress ont été réalisés à température ambiante, afin de ne considérer que l'impact du pH sur la dégradation de l'infliximab. Après 7 jours à pH3 et pH10, il n'a pas été observé de dégradation de l'infliximab. Des stress plus importants ont donc été réalisés. Après 24h à pH 12 et pH 2, l'infliximab apparait totalement dégradé, avec l'absence du pic de monomère. Cette dégradation ne s'accompagne pas de l'observation d'agrégats ou d'autres formes sur le chromatogramme. Il faut noter que les solutions dégradées apparaissent limpides, sans présence de particules visibles. Après 5 minutes à pH12, 77% du monomère est dégradé (Figure 91). En parallèle, on observe l'apparition d'agrégats, élués entre 9,6 et 13,6 minutes, avec une masse molaire moyenne de 1 158,0 KDa (±1.8%), c'est-à-dire environ 8 monomères. Ceci est cohérent avec la courbe de calibration. La quantité d'agrégats correspond à environ 20% de la quantité totale de protéine. La quantité totale de protéine (monomère + agrégats) retrouvée après stress est d'environ 40% de la quantité initiale. C'est-à-dire que 60% de la protéine n'est pas observée sur le chromatogramme.

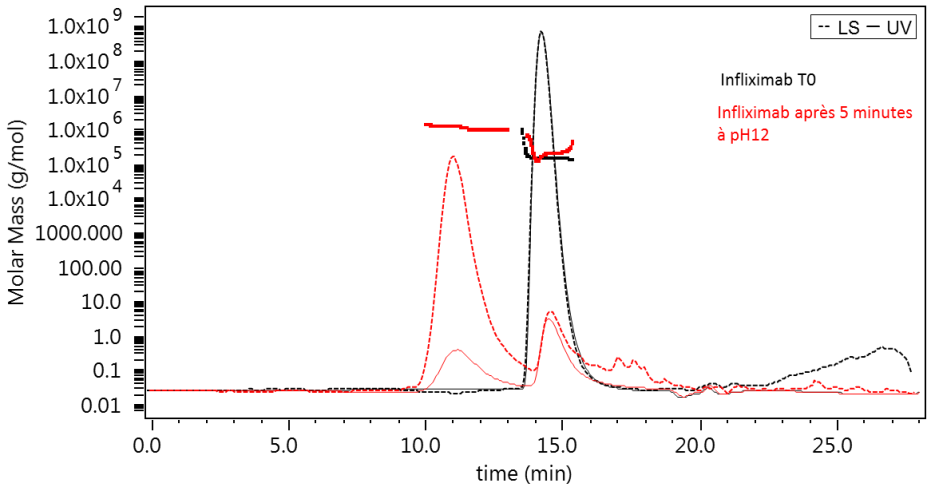


Figure 91 : Chromatogramme du Remicade® à T0 et après 5 minutes à pH 12 en SEC-UV-MALS-RI

- Dégradation par des cycles de congélation / décongélation

La congélation est décrite comme favorisant l'agrégation des mAbs [40]. Nowak *et al* recommande de réaliser 3 à 8 cycles de congélation/décongélation [40]. Lors de notre étude, 3 cycles de 24 heures ont été réalisés, entrainant une dégradation du pic de monomère d'environ 14% (%NA). Cette dégradation n'est pas accompagnée d'augmentation d'autres formes - agrégats ou fragments - visibles sur le chromatogramme, que ce soit en UV ou en MALS, plus sensible aux grosses particules (Figure 92). Également, la solution n'apparait pas trouble signant l'absence de particules visibles.

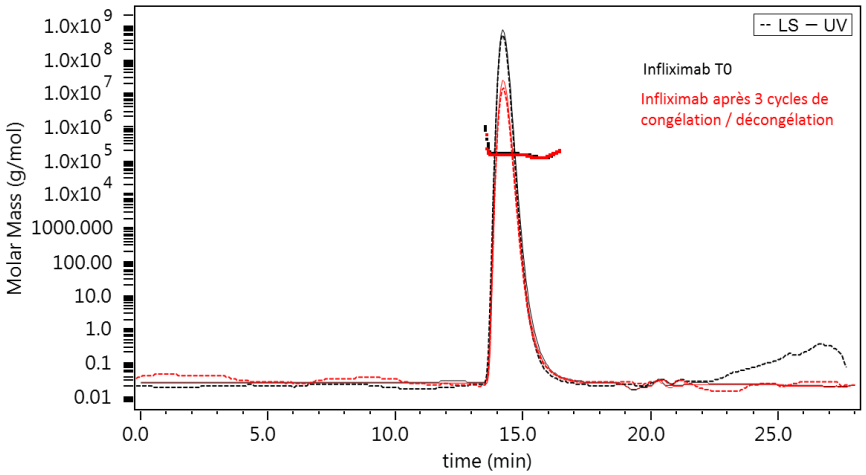


Figure 92 : Chromatogramme du Remicade® à T0 et après 3 cycles de congélation/décongélation en SEC-UV-MALS-RI

- Dégradation par l'agitation

La *European Biopharmaceutic Entreprise* recommande de dégrader les mAbs avec une agitation de 700 à 1500 rpm pendant 24h [42]. Nowak et al recommandent 200 rpm pendant 5 jours [40]. Nous avons

réalisé un stress à 900 rpm pendant 24h à température ambiante. Il n'a pas été observé de modification du chromatogramme, laissant supposer l'absence de dégradation de l'infliximab.

- Dégradation par l'oxydation

La *European Biopharmaceutic Entreprise* recommande de dégrader les mAbs avec H_2O_2 0,1 à 1% pendant 3 jours à température ambiante [42]. Nowak *et al* recommandent H_2O_2 0,02 à 1% pendant 4 heures à température ambiante [40]. Nous avons exposé le Remicade à H_2O_2 0,05% pendant 24h. Une dégradation de 8% du monomère a été observée, avec l'apparition, en faible proportion (0,6%NA) d'un pic dont le temps de rétention est de 15,4 min, et donc de poids moléculaire plus faible, potentiellement issu de fragments.

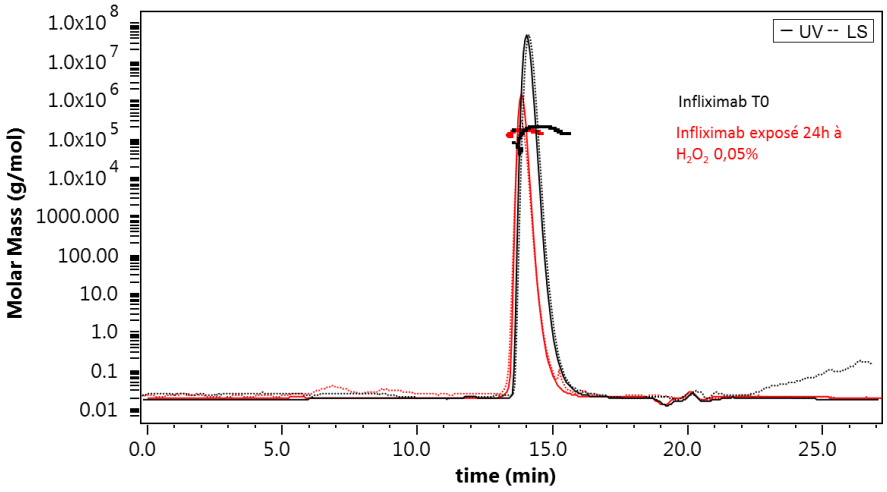


Figure 93 : Chromatogramme du Remicade® à T0 et après 3 cycles de congélation/décongélation en SEC-UV-MALS-RI

- Dégradation par la température

Afin d'induire un stress par la température, la *European Biopharmaceutic Entreprise* recommande de dégrader les mAbs à 40°C jusqu'à 8 semaines [42]. Nowak *et al* ont utilisé des températures de 40°C et 50°C pendant 1 à 4 jours [40]. Dans un premier temps, des essais ont été réalisés à 40°C et 50°C pendant 7 jours. A 40°C, on a observé la présence de fragments, sans autres modifications du chromatogramme. A 50°C, le pic de monomère est fortement diminué, et on observe la présence de fragments. Par ailleurs la solution apparait trouble avec la présence de nombreuses particules. Il semble donc qu'il existe une agrégation importante à 50°C, aboutissant à la formation de grosses particules visibles. Cependant, cette observation n'est pas associée à un pic d'agrégats sur le chromatogramme. Dans un second temps, des essais ont été réalisés à 55°C pendant 1, 2 et 3 jours, et à 40°C pendant 1, 2 et 3 mois. Différents temps de stress ont été réalisés afin d'obtenir une cinétique de formation des agrégats. La Figure 94 présente les chromatogrammes obtenus pour les différentes

conditions. Comme attendu, à 55°C, la solution apparait trouble dès 24h de stress. Cette dégradation visible est associée à une diminution de près de 40% du pic de monomère comme l'illustre la Figure 94A. Ceci n'est pas associé à l'augmentation du pic d'agrégats. Il est également observé l'apparition d'un pic de fragments (0,6%). Après 48h et 72h, de la même façon, on observe la diminution du pic de monomère, avec augmentation de la proportion des fragments, sans augmentation du pic d'agrégats (Figure 94A). A 40°C pendant 3 mois, les mêmes observations sont faites, avec une dégradation moins importante et la solution n'apparait pas trouble et ne présente pas de particules visibles (Figure 94B).

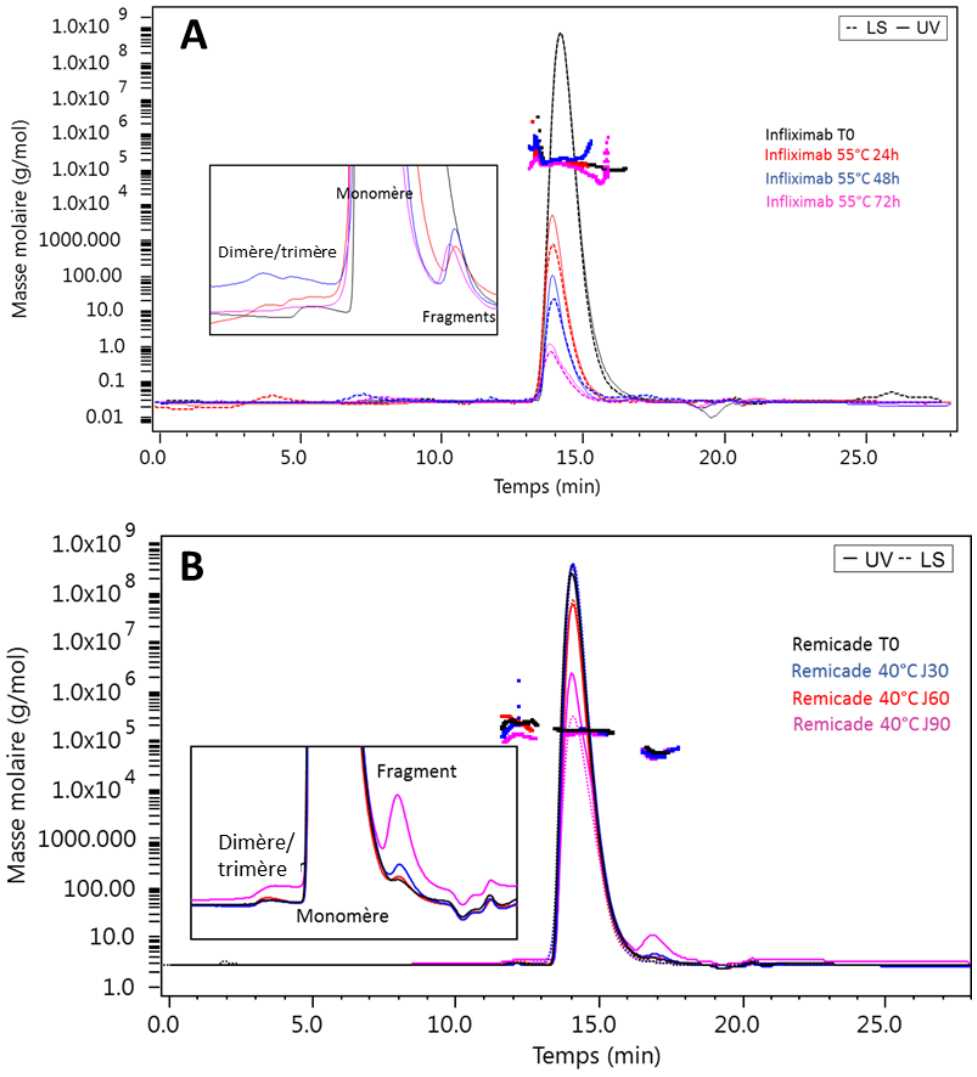


Figure 94 : Chromatogramme du Remicade® exposé à 55°C pendant 3 jours (A) et 40°C pendant 3 mois (B) par SEC-UV-MALS-RI

- Glucose 5%

Le solvant de dilution recommandé pour les trois références d'infliximab est le NaCl 0,9%. Il est indiqué de ne pas diluer le produit dans une solution de glucose 5%. En effet, le glucose 5% est décrit comme

pouvant entrainer l'agrégation des mAbs [240]. Des essais ont ainsi été réalisés dans du glucose 5% à la concentration de 1 mg/mL. Après 30 jours à 40°C, on observe une diminution du pic de monomère (-14,2%), associée à l'apparition d'un pic de fragments (0,4%) et l'augmentation du pic d'agrégats (13,2%) (Figure 95). Les quantités de fragments et d'agrégats correspondent à la perte du monomère, indiquant que l'ensemble des formes de la protéine sont observées sur le chromatogramme. D'après la mesure de la masse molaire, les agrégats correspondent à des dimères (299,4 KDa) et des trimères (477,1 KDa).

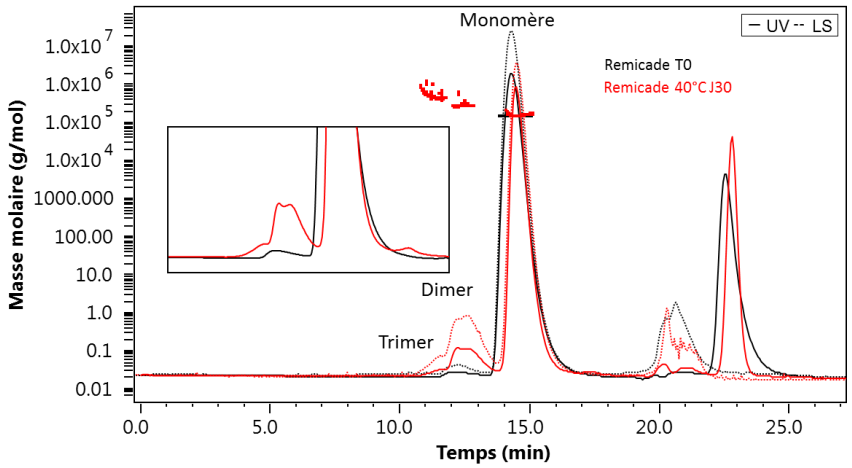


Figure 95 : Chromatogramme du Remicade dilué dans du Glucose 5% à T0 et exposé 30 jours à 40°C par SEC-UV-MALS-RI

- Synthèse des essais de stress forcés

Le

Tableau *31* synthétise les essais de dégradations forcées. Nous avons obtenu des dégradations intéressantes (>15%) pour l'ensemble des stress, excepté lors de l'agitation. Contrairement à ce qui était attendu, l'agitation de l'infliximab ne semble pas entrainer une importante agrégation. L'analyse par SEC nous a permis d'observer la dégradation du produit via la diminution du pic de monomère. Dans certains cas, cette dégradation est associée à l'apparition d'une fragmentation (oxydation, température), également visible en SEC. Également, nous avons observé dans certains cas l'apparition d'agrégats (stress basique, glucose 5%). Néanmoins, dans la majorité des stress, nous avons observé la diminution du pic de monomère sans augmentation du pic d'agrégats, ou sans une masse balance totale (stress basique, congélation/décongélation, oxydation, température). Cela est représenté par la valeur d'A_{totale} qui n'est pas égale à 100% (

Tableau *31*). Jaccoulet et al ont également observé ce phénomène [241]. Lors de la dégradation par congélation / décongélation, par stress mécanique et par stress thermique de deux autres mAbs, le Nivolumab et le Bevacizumab, la dégradation du pic de monomère ne correspondait pas au total des autres formes. De la même façon, Young et al [126] et Hernandez-Jimenez et al [130] n'observent pas un recouvrement total lors des essais de dégradations forcées en SEC de l'infliximab. Ce phénomène

est certainement lié à la formation d'agrégats de taille supérieure à 50 nm, non élués en SEC en raison du diamètre des pores de la phase stationnaire.

La méthode SEC mise au point permet la caractérisation des agrégats et des fragments. Cependant, il est nécessaire de recouper les chromatogrammes avec la quantité injectée afin de déceler une dégradation du monomère donnant lieu à la production d'espèces non séparées en SEC. Par ailleurs, afin de pouvoir observer la présence d'agrégats supérieurs à 50 nm, il semble nécessaire de compléter les essais en SEC par d'autres techniques. Dans ces travaux de thèse, l'analyse de l'agrégation de l'infliximab a été complétée par l'utilisation d'autres techniques : la FFF, la DLS et l'IA. Les résultats sont décrits dans les paragraphes 2, 3 et 4.

Tableau 31 : Proportion des différentes formes : monomère, dimères, trimères, HWMS et fragments, du Remicade en fonction des différents stress forcé en SEC-UV-MALS-RI

Stress	Forme	A (%)[1]	A_{totale} (%)[1]	Recouvrement (%)[2]
pH 12 / 5 min	Monomère	23,2	42,2	11,5
	Dimères/Trimères	19,0		9,2
	HWMS			
	Fragments	ND		ND
Congélation/ décongélation	Monomère	86,1	86,3	53,0
	Dimères/Trimères	0,2		ND
	HWMS	ND		ND
	Fragments	ND		ND
900 rpm / 24h	Monomère	95,0	95,2	40,1
	Dimères/Trimères	0,2		ND
	HWMS	ND		ND
	Fragments	ND		ND
H_2O_2 0,05% / 24h	Monomère	92,0	92,8	41,9
	Dimères/Trimères	0,2		0,2
	HWMS	ND		ND
	Fragments	0,6		1,0
55°C / 24h	Monomère	61,7	62,5	23,0
	Dimères/Trimères	0,2		ND
	HWMS	ND		ND
	Fragments	0,6		0,4
40°C/ 90 jours	Monomère	83,2	88,8	47,0
	Dimères/Trimères	0,3		1,4
	HWMS	ND		ND
	Fragments	5,3		3,6
Glucose 5% / 40°C/30 jours	Monomère	85,8	99,4	54,7
	Dimères/Trimères	13,2		8,1
	HWMS	ND		ND
	Fragments	0,4		0,8

[1] : Déterminer à partir du signal UV

[2] : Déterminer à partir de la quantification absolue en MALS-RI

ND : non détecté

- Comparaison des biosimilaires en conditions forcées

La comparaison des biosimilaires a été effectuée vis-à-vis du stress à la température. La Figure 96 présente, pour les trois références, la proportion de monomère, d'agrégats et de fragments observés lorsqu'ils sont exposés à 40°C pendant 3 mois. Les trois références présentent un comportement similaire. La dégradation du pic de monomère et la formation des fragments suivent des cinétiques équivalentes. Concernant les agrégats, on retrouve des proportions proches entre les trois produits. Des teneurs plus importantes en agrégats sont observées pour le Remsima® et le Flixabi®, ce qui peut être lié à un taux initial plus important.

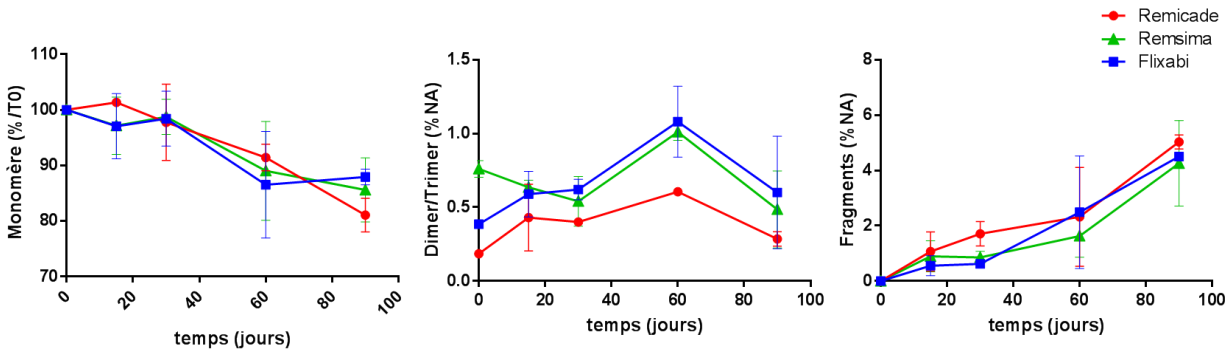


Figure 96 : Proportion des différentes formes : monomère, dimères, trimères et fragments, des trois références d'infliximab exposés à 40°C pendant 3 mois en SEC-UV-MALS-RI

iii. Stabilité en conditions hospitalières

La Figure 97 présente les résultats de SEC pour les 3 références dans les conditions d'utilisation hospitalière. Pour l'ensemble des conditions, le comportement des trois références apparait similaire. La concentration du monomère apparait relativement stable par rapport à sa concentration après reconstitution : à 4°C et à 25°C avec ou sans lumière, la concentration est systématiquement supérieure à 95%, limite basse acceptable. A 4°C, il n'est pas observé de modification concernant la proportion de fragments et d'agrégats en 3 mois. A 25°C, on peut observer l'augmentation de la proportion d'agrégats (jusqu'à 1%) et de fragments (jusqu'à 0,17%), plus importante lorsque le produit n'est pas protégé de la lumière.

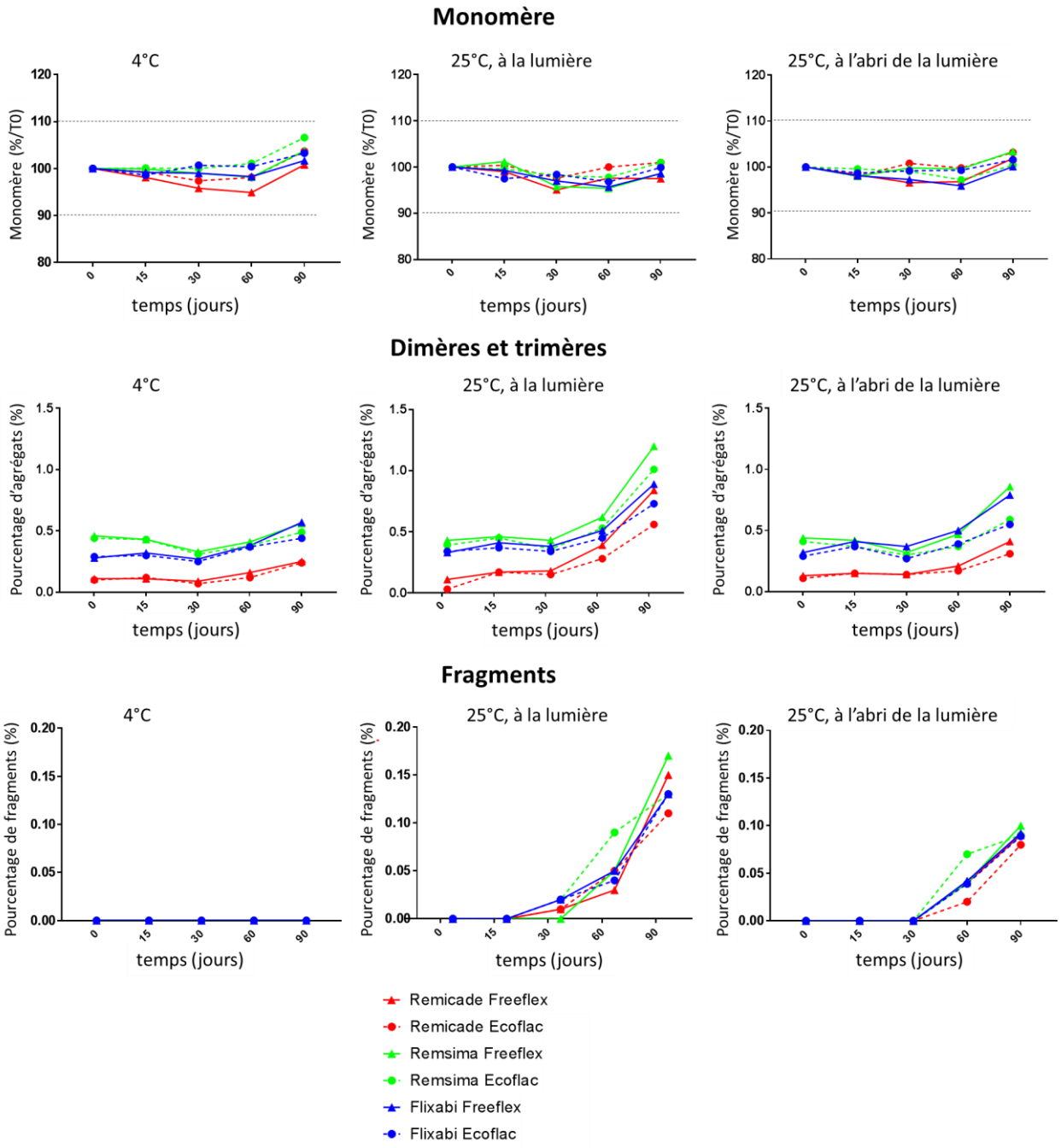


Figure 97 : Proportion des différentes formes : monomère, dimères, trimères et fragments, des trois références d'infliximab en condition d'utilisation hospitalière en SEC-UV-MALS-RI

2. Indice d'agrégation en UV

La détermination de l'IA par spectroscopie UV est une autre méthode d'évaluation de l'agrégation des protéines. Il s'agit d'une technique non destructive et non séparative de l'échantillon. L'IA évalue l'absorbance de l'échantillon à 350 nm, attribuée à la diffusion de la lumière liée aux agrégats [122]. L'IA a montré la possibilité d'observer une augmentation de l'agrégation, y compris lorsqu'aucune

évolution des agrégats en SEC n'était observée [122, 241]. Après reconstitution, l'IA pour le Remicade®, le Remsima® et le Flixabi® est respectivement de 0,57±0,04%, 0,54±0,05% et 0,53±0,01%, similaire entre les trois références. Ces valeurs sont similaires avec ce qui peut être retrouvé dans la littérature [124]. En condition de stress forcé, l'IA est augmenté (Tableau 32). L'IA le plus important est observé lors du stress à 55°C pendant 24h. Cela est cohérent avec l'aspect particulaire de l'échantillon dans cette condition. Dans d'autres conditions comme à pH 12 ou en présence de H_2O_2, l'IA est faiblement augmenté (respectivement 1,79 et 0,98 %). En condition hospitalière, les résultats sont présentés Figure 98. A 4°C, on n'observe pas d'évolution de l'IA, confortant les résultats précédents. A 25°C, une tendance à l'augmentation peut être observée, mais qui n'est cependant pas significative.

Tableau 32 : Indice d'agrégation de l'infliximab (Remicade®) dans les différentes conditions de stress

Stress	IA (%)
Non stressé	0,57±0,04%
pH 12 / 5 min	1,79±0,02%
Congélation/décongélation	4,53±0,10%
H_2O_2 0,05% / 24h	0,98±0,03%
55°C / 24h	40,29±1,81%
40°C/ 90 jours	2,99±0,09%
Glucose 5% / 40°C/30 jours	7,89±0,01%

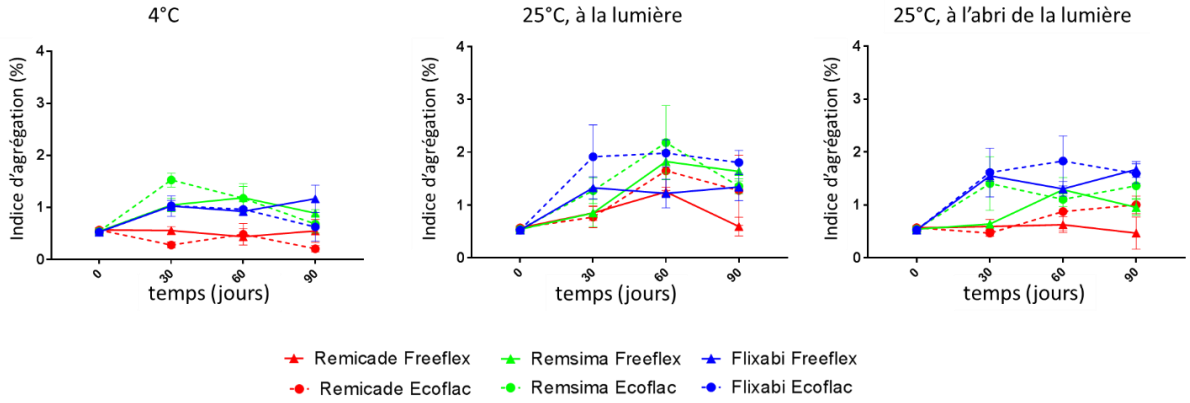


Figure 98 : Evolution de l'Indice d'agrégation des trois références d'infliximab dans les conditions d'utilisation hospitalière

3. Analyse par DLS

L'analyse par DLS permet d'évaluer le rayon hydrodynamique des particules présentes dans l'échantillon. La DLS peut être utilisée pour l'analyse des mAbs et pour évaluer leur agrégation [121]. Comme l'IA, il s'agit d'une technique non destructrice et non séparative de l'échantillon. Le Tableau 33

et la Figure 99 présentent les résultats des stress forcés. La taille (diamètre hydrodynamique) de la forme principale, la mesure du *z average* (moyenne de l'ensemble des tailles des particules) et la mesure du PDI (index de polydispersité, représentant la distribution de la taille des particules) sont récapitulés pour l'ensemble des conditions de stress. En l'absence de stress, les diamètres hydrodynamiques du Remicade®, du Remsima® et du Flixabi® sont de 17,4 ± 1,8, 16,4 ± 0,8 et de 15,0 ± 1,0 respectivement, cohérent avec les données de la littérature [124, 126]. Le *z average* est du même ordre de grandeur que la taille mesurée, indiquant l'absence de particules de plus grande taille. Dans le cas du stress à pH 12, on observe la présence de particules de 29,6 nm, avec très peu de particules de plus grosses tailles (<5%). Ceci est cohérent avec les résultats de SEC pour lesquels on observe un pic d'agrégats à pH 12. Pour les autres conditions de stress, on observe la présence de particules de taille > 100 nm (Figure 99), qui se traduit par une augmentation du *z average* et du PDI. Dans le cas du stress à 55°C, des particules de taille supérieure au micromètre sont observées, cohérent avec l'observation de particules visibles dans l'échantillon.

Dans les conditions d'utilisation hospitalière (Figure 100), la taille et le *z average* sont similaires entre T0 et après 90 jours, dans l'ensemble des conditions testées, indiquant l'absence d'agrégation dans l'ensemble des conditions *in use*.

Tableau 33 : Analyse de l'infliximab (Remicade®) par DLS dans différentes conditions de stress

Stress	Taille (nm)	z average (nm)	PDI
Non stressé	17,4 ± 1,8	14,2 ± 1,3	0,191 ± 0,008
pH 12 / 5 min	29,6 ± 2,1	29,5 ± 0,3	0,295 ± 0,021
Congélation/décongélation	8,00 ± 0,2	1053,0 ± 207,3	0,931 ± 0,060
H_2O_2 0,05% / 24h	14,2 ± 1,0	29,7 ± 21,2	0,341 ± 0,100
55°C / 24h	7,6 ± 1,3	5747 ± 1289	0,213 ± 0,230
40°C/ 90 jours	13,5± 0,3	71,8 ± 78,1	0,210 ± 0,093
Glucose 5% / 40°C/30 jours	12,7± 1,1	339,0 ± 25,7	0,546 ± 0,207

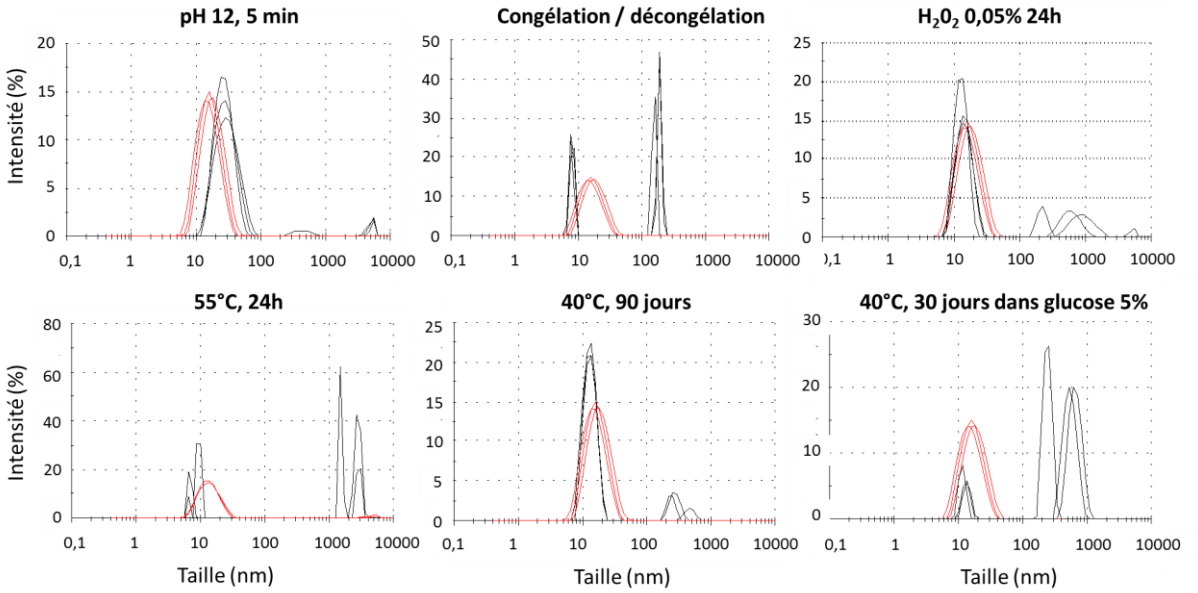


Figure 99 : Analyse de l'infliximab en DLS dans différentes conditions de stress.
En rouge : Infliximab non stressé, en noir : infliximab stressé

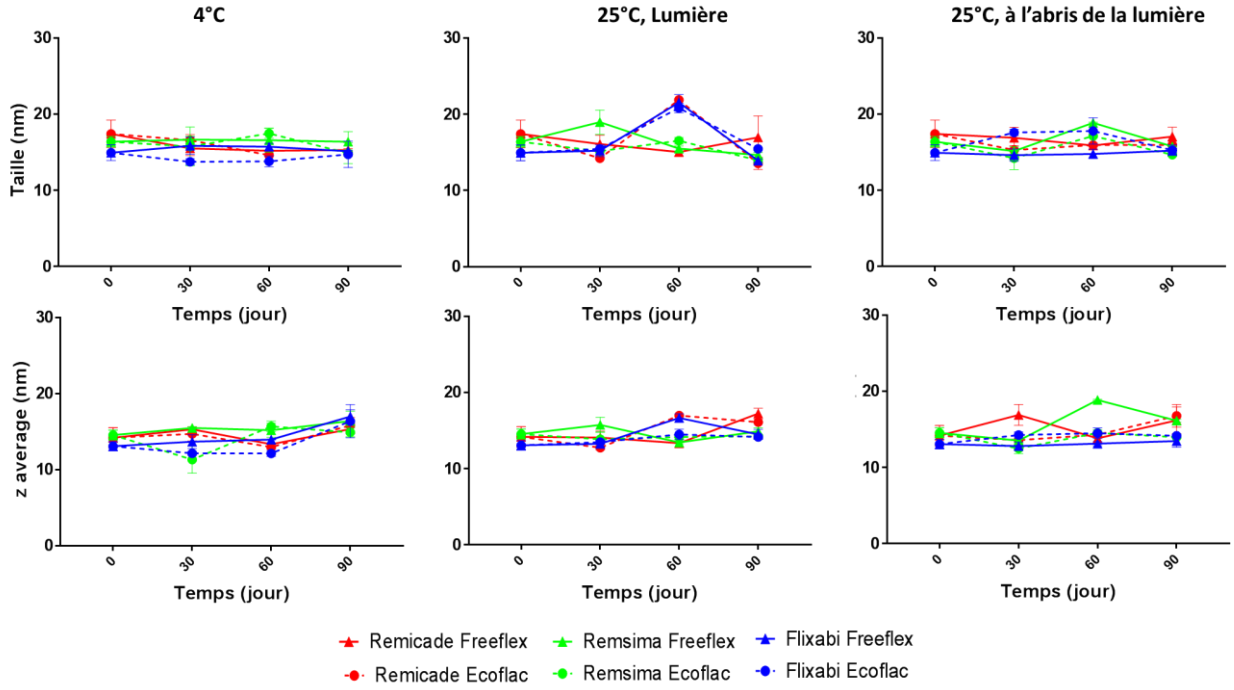


Figure 100 : Evolution de la taille (A) et du z average (B) des trois références d'infliximab dans les conditions d'utilisation hospitalière

4. Analyse par A4F-UV-MALS/RI

L'analyse des échantillons stressés en DLS et en spectroscopie UV a confirmé la présence d'agrégats, qui n'étaient pas détectés en SEC. Néanmoins, ces deux techniques ne sont pas séparatives, et ne

permettent pas la détection de chaque forme du mAbs. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la A4F. Cette technique a montré un intérêt pour la détection d'agrégats de mAbs [155, 242-244]. L'intérêt majeur de cette technique est l'absence, en théorie, de limite de taille détectable des particules.

a. Développement de la méthode

Les différents paramètres qui ont été évalués sont : le type de membrane, l'étape de focalisation et les débits des flux. La phase mobile est identique au solvant de reconstitution des échantillons, c'est-à-dire du NaCl 0,9%.

i. Choix de la membrane :

Les deux membranes testées ont été la cellulose et le polyethersulfone. L'analyse d'un échantillon d'infliximab non stressé a montré un meilleur recouvrement de l'échantillon avec la membrane en cellulose par rapport à la membrane en polyethersulfone (70,3% contre 47,2% respectivement). La suite des essais a alors été réalisée avec une membrane en cellulose.

ii. Etape de focalisation et choix du mode *frit inlet* :

Lors de l'étape de focalisation de l'échantillon, une perte importante de signal est observée (Figure 101). Cela indique une interaction importante de l'échantillon avec la membrane lors de cette étape de focus. Par ailleurs, l'étape de focus s'accompagnait de la formation artificielle d'agrégats, observée dans l'échantillon témoin. Face à ces limites, un mode alternatif a été testé : le mode *frit inlet*. Dans le mode *frit inlet*, il n'y a pas d'étape de focus, ce qui entraine également l'élargissement des pics et donc une diminution de la sensibilité et de la résolution de l'analyse.

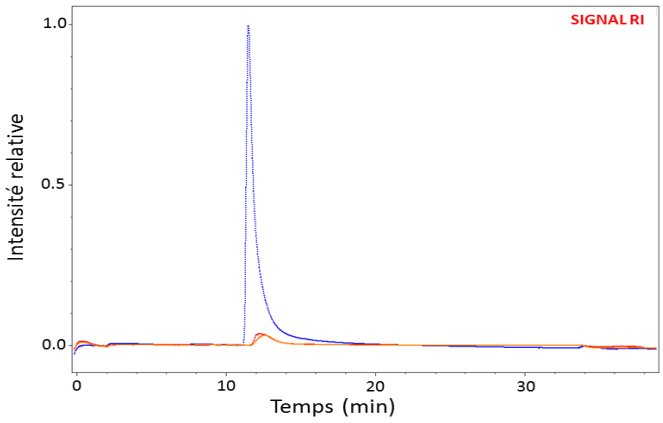


Figure 101 : Evaluation de l'impact de l'étape de focalisation.
En bleu : flux opposé 0mL/min. En rouge : flux opposé 1mL/min. En orange : flux opposé 2mL/min.

iii. Débit de flux

Le flux directeur (Vd) a été maintenu à 1 mL/min. Il s'agit d'un débit de flux Vd standard et classiquement appliqué en A4F [152]. Plusieurs débits de flux croisé ont été testés. La Figure 102 présente l'impact du débit du flux croisé sur l'analyse de l'infliximab. Plus le débit est important, plus le pic d'infliximab apparait séparé du volume mort. Néanmoins, cela entraine un élargissement très important du pic. Par ailleurs, un débit de flux croisé important augmente le risque d'entrainer une agrégation du produit ainsi que l'adsorption de l'échantillon sur la membrane. Néanmoins dans notre cas, le taux de recouvrement n'était pas diminué lors de l'augmentation du Vx (63,8% pour 2,5mL/min et 64,0% pour 4 mL/min).

Le compromis qui est apparu acceptable a été un débit de 3,0 mL/min pendant 20 minutes. Un gradient est ensuite appliqué : 0,1 mL pendant 10 minutes puis à 0 mL/min pendant 10 minutes. La diminution du Vx permet d'éluer les molécules de plus grosse taille rapidement, qui sont entrainées par le flux directeur.

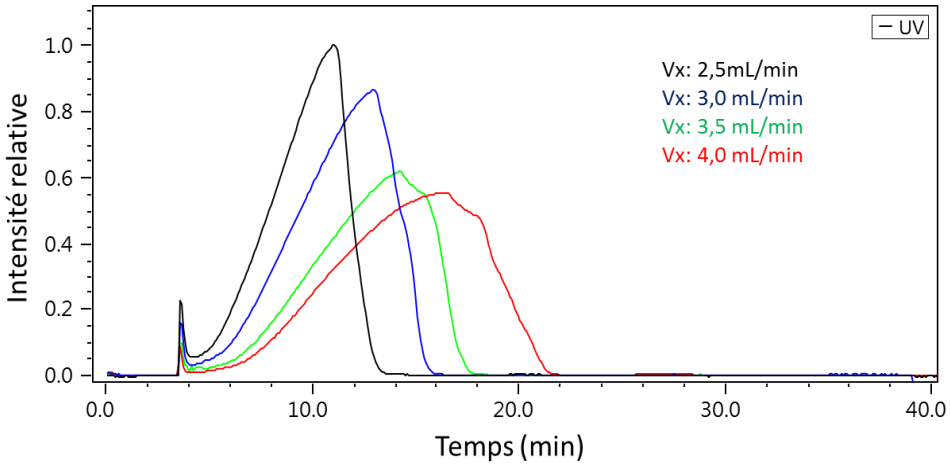


Figure 102 : Evaluation de l'impact du flux croisé sur l'analyse de l'infliximab

b. Analyse du mélange de protéines témoin

De façon similaire aux expériences en SEC, nous avons analysé le mélange de protéines témoin en A4F. Le fractogramme obtenu est présenté Figure 103. Par rapport à la SEC, l'ordre d'élution est inversé. En effet, en A4F, les molécules de plus faible poids moléculaire sont éluées en premier tandis que les molécules de plus haut poids moléculaire sont éluées plus lentement, en lien avec le flux laminaire parabolique au sein du *spacer* (cf Partie 1, chapitre 3, paragraphe 3). La résolution apparait moins efficace qu'en SEC. Ceci est lié à la méthode A4F développée. En effet, l'absence de l'étape de focus limite la diffusion des molécules et donc leur séparation. Par ailleurs, la méthode A4F a pour objectif

la séparation de molécules de très haut poids moléculaire, or le mélange de protéines disponible et utilisé possède une gamme de masse adaptée à une analyse en SEC.

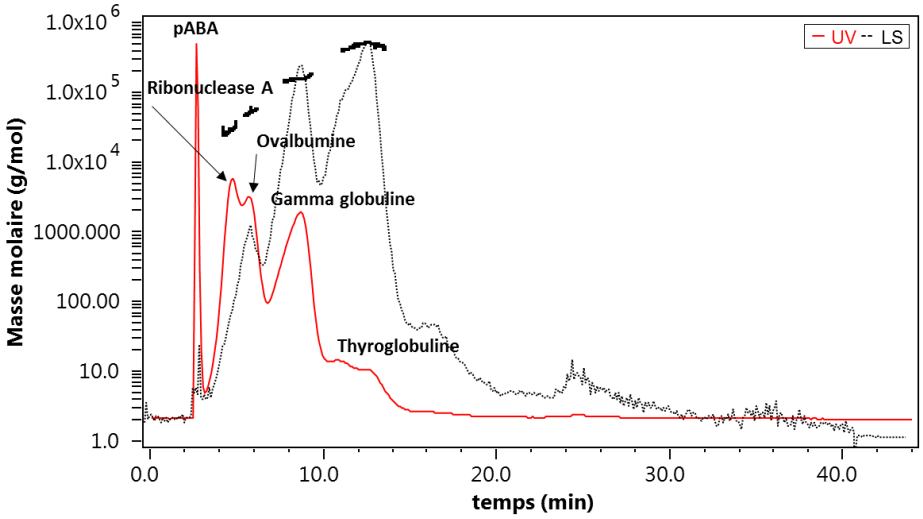


Figure 103 : Fractogramme du mélange de protéines témoin

Le Tableau 34 présente les masses molaires obtenues via le détecteur MALS ainsi que leur taux de recouvrement par rapport à leur quantité théorique injectée. En ce qui concerne les gamma-globulines, on retrouve une bonne adéquation entre la masse molaire calculée et la masse molaire théorique (0,2%). Pour les masses molaires plus faibles, les différences sont plus importantes, notamment pour la ribonucléase A, cohérent avec le fait que le MALS est plus sensible aux poids moléculaires élevés [117]. Concernant la thyroglobuline, une différence importante de masse est observée (38,4%), contrairement à ce qui était observé en SEC. Ceci peut être lié au fait qu'en A4F la thyroglobuline est faiblement séparée des autres protéines du mélange, entrainant un biais de la mesure en MALS. Les taux de recouvrements sont compris entre 62,6 % et 85,6%. Ces résultats sont supérieurs aux recouvrements obtenus en SEC. Ce résultat s'explique par l'absence de phase stationnaire en A4F, qui entraine une adsorption des protéines lors de l'analyse en SEC.

Tableau 34 : Evaluation par MALS-RI des masses molaires et des taux de recouvrement des protéines du mélange protéique

Molécule	Thyroglobuline	Gamma globuline	Ovalbumine	Ribonuclease A
Masse molaire théorique (Da)	670000	150000	44300	13700
Masse molaire calculée (Da)	412500 (±3,2%)	149700 (±1,7%)	55330 (±3,1%)	28950 (±4,2%)
Différence entre la masse molaire théorique et calculée (%)	-38,4	-0,2	24,8	111,3
Recouvrement (%)	85,6	73,7	62,6	67,4

c. Analyse de l'infliximab

i. Dans les conditions initiales

Lors des analyses en A4F seule la référence Remsima® a été analysée. Le fractogramme obtenu du produit dans les conditions initiales est présenté Figure 104. Le pic de monomère est élué après 10 minutes d'analyse. Le taux de recouvrement était de 71,9%, cohérent avec les essais de développement. La masse molaire obtenue était de 140,6 kDa (±1,4%), également cohérent avec la masse molaire théorique de l'infliximab. Aucun pic élué après le monomère n'a été observé, signant l'absence d'agrégats. A noter, il n'a pas été observé de pic de dimères. D'après les analyses en SEC, le Remsima® présente dans les conditions initiales une proportion de 0,8% de dimères. En A4F, la résolution étant limitée dans cette gamme de masse, les pics de monomère et de dimères sont co-élués. Un pic est élué au niveau du volume mort, et correspond aux excipients présents dans la formule du Remsima®.

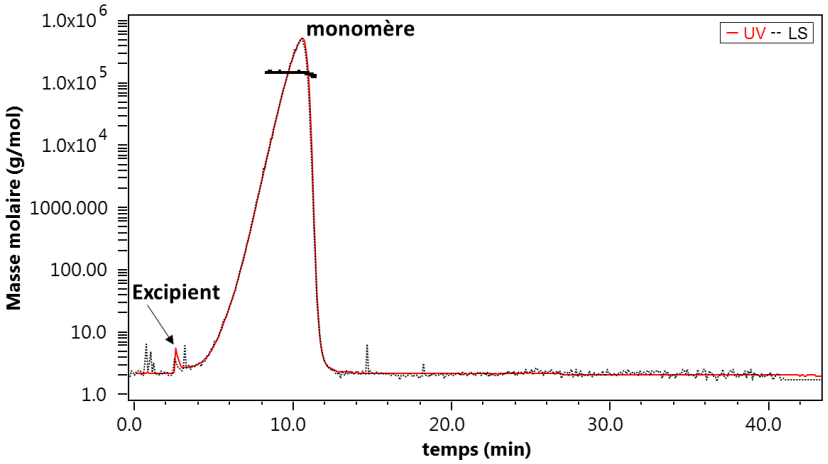


Figure 104 : Fractogramme de l'infliximab témoin

ii. Dans différentes conditions de stress

- Stress à la température

Les fractogrammes relatifs à l'analyse des échantillons stressés 24, 48 et 72 h à 55°C sont présentés Figure 105 et Figure 106. La Figure 105 présente le fractogramme UV et MALS du Remsima® non dégradé et après 24h à 55°C. On peut observer une diminution importante du pic du monomère dans l'échantillon dégradé par rapport au non dégradé (recouvrement de 26,3% et 71,9% respectivement). En parallèle, on observe l'apparition d'un pic élué en amont du monomère, présentant un signal MALS important. Ce pic est identifié comme étant un pic d'agrégats, de masse molaire moyenne 154,4 kDa

(±33.4%) et présentant un taux de recouvrement de 22,6%. Après 48h et 72h à 55°C, la dégradation du Remsima® est augmentée, comme illustré Figure 106 A. Les taux de recouvrement du pic de monomère sont de 14,6% et 9,7% respectivement, associés à des teneurs en agrégats de 36,1% et 41,0%. La masse molaire moyenne des agrégats augmente également : 4489 kDa (±175.2%) après 48h et 15260 kDa (±184.3%) après 72h à 55°C. Ainsi, de façon similaire à ce qui était observé en SEC (Figure 94), on observe à 55°C une dégradation importante de l'infliximab avec une diminution de la forme monomère. Cependant, il est possible en A4F d'observer l'apparition d'agrégats.

En A4F, les molécules sont éluées dans l'ordre croissant de leur masse molaire. Or les agrégats observés lors du stress à 55°C sont élués en amont du pic de monomère. Ceci est lié à la taille de ces agrégats. En effet, les particules de tailles supérieures au micromètre sont éluées en mode stérique (cf Partie 1, chapitre 3, paragraphe 3) [152]. Cette observation est cohérente avec l'aspect trouble de la solution d'infliximab chauffée à 55°C, reflétant la présence de grosses particules visibles. Par ailleurs, lors de l'analyse d'un échantillon dégradé 72h à 55°C après sédimentation des particules, les agrégats ne sont plus observés sur le fractogramme (Figure 106 B).

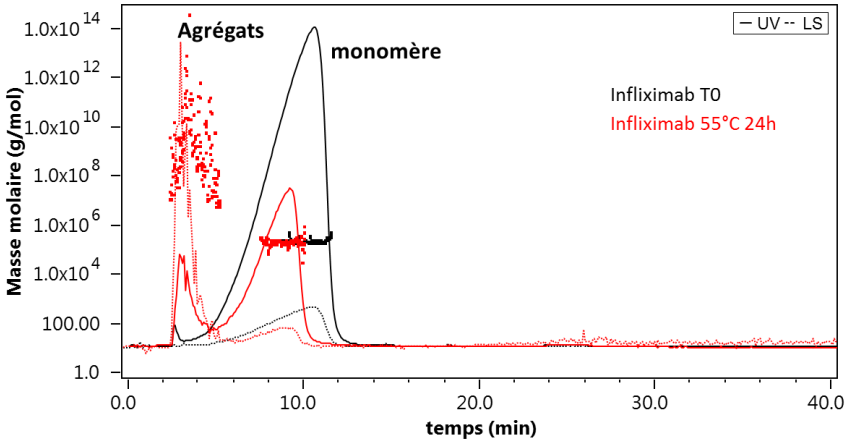


Figure 105 : Fractogramme du Remsima® à T0 et après 24h à 55°C

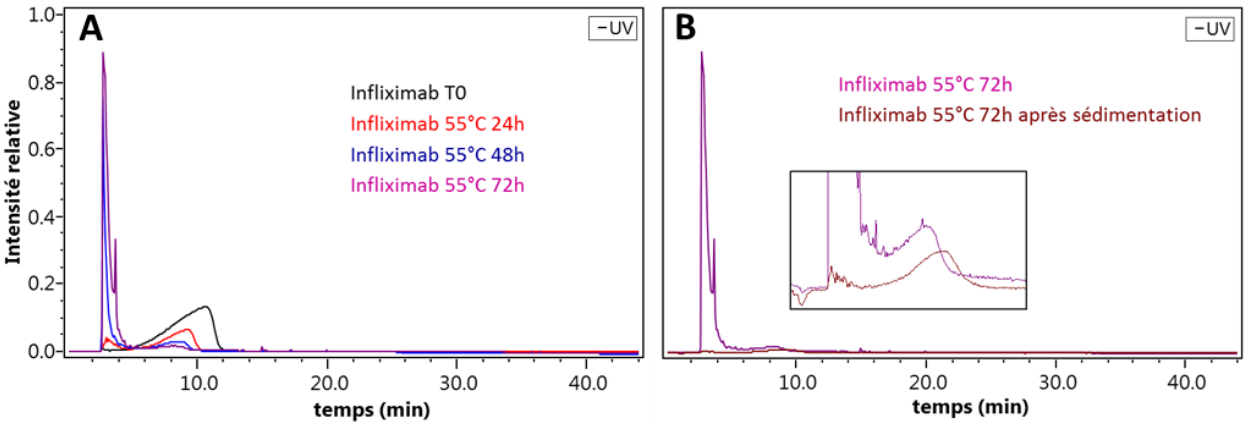


Figure 106 : Fractogramme du Remsima® à T0 et après 24h, 48h et 72h à 55°C (A), avant et après sédimentation (B)

De façon intéressante, il n'a pas été observé sur le fractogramme d'autres pics d'agrégats, indiquant l'absence d'agrégats de tailles intermédiaires. De la même façon, nous n'observons pas d'agrégats élués lors de l'analyse d'un échantillon de Remsima® stressé 90 jours à 40°C (Figure 107). En parallèle, nous nous sommes aperçus de la modification du signal du MALS au fur et à mesure de l'analyse des échantillons, avec l'apparition d'un signal « bruiteux ». La Figure 108 présente le signal UV et MALS des blancs au début, au milieu et en fin de séquence. On observe l'apparition de pics en UV et en MALS au fur et à mesure de l'avancée de l'analyse. Ce phénomène peut être lié à l'adsorption sur la membrane de A4F d'agrégats contenus dans les différents échantillons, relargués au fur et à mesure des analyses. Ceci est en faveur de la présence d'agrégats de tailles variables dans les échantillons analysés, y compris dans les échantillons ne présentant pas *a priori* d'agrégats sur leur fractogramme, comme c'est le cas pour l'échantillon stressé 90 jours à 40°C.

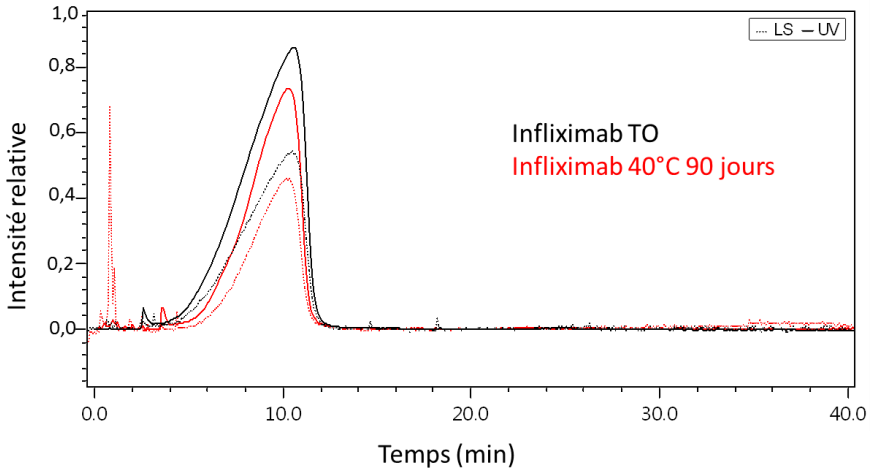


Figure 107 : Fractogramme du Remsima® à T0 et après 90 jours à 40°C

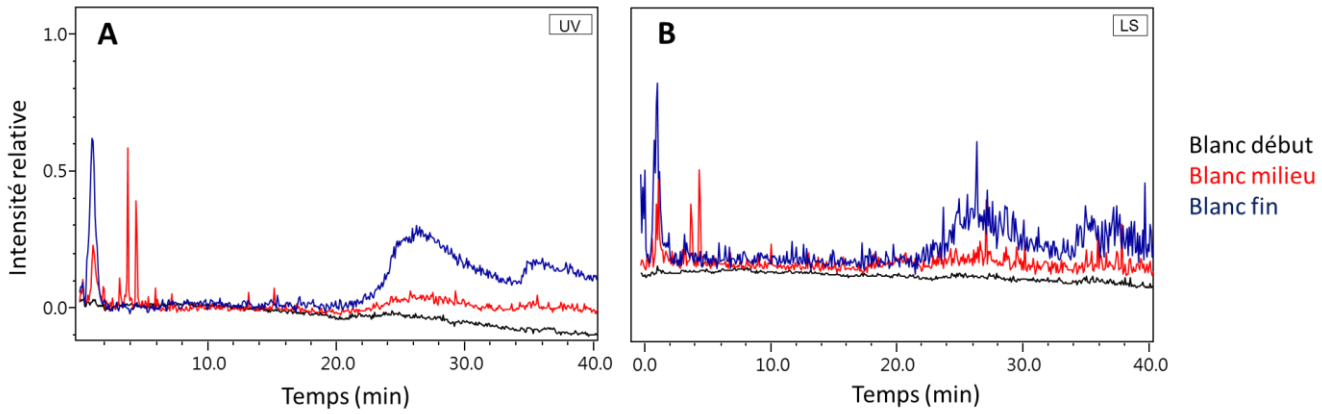


Figure 108 : Fractogramme UV (A) et MALS (B) de 3 échantillons de phase mobile (blanc) injectés au début, au milieu et à la fin de la séquence

d. Perspectives

La A4F permet l'analyse de molécules de taille supérieure à 50 nm, contrairement à la SEC. Néanmoins, nos différents essais n'ont pas permis l'analyse des agrégats de cette taille, probablement en raison d'une adsorption importante sur la membrane. D'autres essais seront nécessaires afin de dépasser cette problématique. L'une des approches qui pourrait être testée est l'ajout d'un surfactant dans la phase mobile, tel que du polysorbate 20 (tween 20) [153] ou du sodium dodécyl sulfate (SDS) [245]. L'adsorption des protéines à la membrane est également influencée par la force ionique du milieu et de la phase mobile. La modification de la force ionique de la phase mobile utilisée dans notre étude est donc une autre possibilité d'amélioration. Dans leur étude, Schachermeyer *et al* ont montré une diminution de l'adsorption d'une IgG sur la membrane de cellulose de FFF avec l'augmentation de la concentration en NaCl dans la phase mobile [246].

B. Discussion

1. Impact des différents stress sur la dégradation de l'infliximab

Les différents stress appliqués ont été déterminés à partir des recommandations de la littérature. Il faut noter que ces stress sont surtout destinés à évaluer la stabilité des mAbs lors des étapes de développement, et de comparer la stabilité de différentes formulations. Dans le cas de notre étude, les trois références d'infliximab étudiées sont déjà formulées, et relativement stables, en théorie. Les stress recommandés peuvent donc ne pas être adaptés. Par exemple, la présence dans la formulation de polysorbate 80 pourrait expliquer la difficulté que nous avons eu à produire des agrégats lors d'un stress par agitation. En effet, le polysorbate 80 est un agent stabilisant limitant la formation d'agrégats. Duchène *et al* ont montré, sur un autre anticorps monoclonal, l'absence d'agrégation après 6 mois d'agitation lorsque la formule du mAb contient du polysorbate 80. En l'enlevant de la formule, des agrégats étaient obtenus en quelques jours [247]. De même, nous avons observé des agrégats à pH extrême (pH 12). Des pH moins basiques n'ont pas entrainé de dégradation de l'infliximab. En comparaison, la *European Biopharmaceutic Entreprise* recommande de réaliser les dégradations à pH 3 et 11 à 40°C pendant 1 à 7 jours. Nowak *et al* recommandent quant à eux des stress moins importants : à pH acide 3,4 ou 5 et à pH basique 9 et 10 entre 0 et 4 jours, à 25,0 et 37°C.
Dans notre cas, le stress qui a permis d'obtenir le plus facilement des agrégats a été le stress à la température (Figure 94, Tableau 31). Pour des températures supérieures à 50°C, la solution devenait rapidement trouble, signant l'agrégation du produit jusqu'à la formation de particules visibles.

L'impact de la température sur l'agrégation est lié à la dénaturation du mAbs, lorsque l'on se rapproche de la température de fusion (T_m : *melting temperature*). La T_m correspond à la température à laquelle la moitié des protéines sont dénaturées. Ces changements conformationnels entrainent l'agrégation de la protéine par interactions hydrophobes par exemple (Figure 16). De plus, nous avons observé que la température entrainait en plus de son agrégation, la fragmentation de l'infliximab.
La biosimilarité des trois références d'infliximab a été évaluée en condition de stress forcé, dans le cas d'une exposition à une température de 40°C pendant 3 mois. Les mAbs sont connus pour avoir des une propension différente à l'agrégation [248], mais peu d'études existent sur cet aspect concernant les biosimilaires. Nous avons observé un comportement similaire entre le Remicade®, le Remsima® et le Flixabi® (Figure 96). Pisupati *et al* ont également montré un comportement similaire de Remicade® et de Remsima® en SEC, après exposition du lyophilisat 4 semaines à 40°C et 97%HR [112]. Il faut noter que les trois références étudiées dans notre étude ont des formulations avec les mêmes excipients (Tableau 4). Leur grande similarité en termes de séquence peptidique et de formulation peut expliquer leur grande similarité de comportement et de stabilité vis-à-vis de stress forcé.

2. Stabilité de l'infliximab dans les conditions d'utilisation hospitalière

La stabilité des trois références d'infliximab a été évalué dans différentes conditions d'utilisation hospitalière pendant 3 mois. Nous avons évalué l'agrégation des produits *via* trois techniques complémentaires : la SEC, la DLS et l'IA. A 4°C, nous n'avons pas observé d'agrégation, de fragmentation ou de diminution du pic de monomère en SEC, ni de modifications du signal en DLS et en IA. Ceci est cohérent avec d'autres études portant sur la stabilité de l'infliximab *in use* [124-126, 130-132]. La majorité des études portent sur des durées de stabilité inférieures à 1 mois. Seule une étude récente par Tokhadze *et al* évalue la stabilité sur 3 mois d'une autre référence d'infliximab : l'inflectra® [124]. De façon similaire à notre étude, ils n'ont pas observé d'évolution de l'agrégation à 4°C pendant 3 mois.

Lorsque l'infliximab est conservé à 25°C, nous avons observé une dégradation du produit, *via* l'apparition de fragments. Des observations similaires ont été observées dans d'autres études après 1 mois [131] et jusqu'à partir de 3 mois [124]. Par ailleurs, la dégradation des 3 références d'infliximab était similaire, confirmant leur biosimilarité en termes de stabilité.

Aucune autre étude n'avait évalué l'impact de la lumière au cours de la stabilité *in use* de l'infliximab. D'après nos essais en SEC, la lumière entraine une dégradation plus importante du produit. Ce qui implique de le protéger systématiquement de la lumière. De même, aucune étude n'avait évalué

l'impact du type de poche de perfusion sur la stabilité de l'infliximab. Or, il est connu que les interactions entre le plastique et les produits pharmaceutiques peuvent impacter la stabilité de ceux-ci. Par exemple, *via* le relargage d'additifs du plastique dans la solution [249]. Au cours de notre étude, nous n'avons pas observé de différence entre les poches : nous n'avons pas observé une augmentation de l'agrégation ou de la fragmentation de l'infliximab dans l'une ou l'autre poche. Également et de façon intéressante, nous n'avons pas observé d'adsorption de l'infliximab supérieure dans l'une ou l'autre poche de perfusion. L'adsorption des mAbs sur les conditionnement plastiques ou dans les tubings des systèmes d'administration peut engendrer une perte importante du produit [250] .

3. Complémentarité des techniques pour l'évaluation de l'agrégation

La SEC est décrite comme la technique de référence pour évaluer l'agrégation des mAbs. Dans la monographie des mAbs de la pharmacopée Européenne, il s'agit de la technique décrite pour l'évaluation des agrégats [37]. Néanmoins, lors des essais de stress forcés, nous avons observé que la SEC ne permettait pas l'analyse de l'ensemble des formes de l'infliximab, et en particulier des agrégats de taille importante, supérieure à 50 nm. De ce fait, au regard de l'agrégation, la méthode en SEC ne permet pas l'analyse complète des mAbs, et ne peut donc pas être considérée comme indicatrice de stabilité. Dans ce contexte, il est nécessaire de ne pas uniquement considérer la SEC pour évaluer la stabilité et l'agrégation des mAbs, comme recommandé par plusieurs études et revues de la littérature [105, 113, 118].

La majorité des études évaluant l'agrégation des mAbs complète les essais de SEC par des analyses en DLS et par le calcul de l'IA. Ces techniques ont l'avantage d'être simples d'utilisation, non destructrices et de ne pas avoir de limite de taille observable en théorie. Dans le cas de l'IA, on peut ajouter que l'instrumentation est facilement accessible (spectromètre UV). Lors des essais de dégradations forcées que nous avons réalisés, nous avons pu confirmer avec ces deux techniques la présence d'une agrégation de l'infliximab. En DLS, nous avons pu observer la présence d'agrégats de taille supérieure à 100 nm, que nous n'avions pas pu analyser en SEC. Ces résultats confirment l'intérêt de ces techniques. Néanmoins, ces techniques apparaissent moins sensibles que la SEC. Par exemple, aucune de ces techniques ne permet de montrer la proportion d'agrégats supérieurs, dans les conditions initiales, du Remsima® par rapport aux deux autres références. Ainsi, ces techniques ne paraissent pas suffisamment sensibles pour identifier de faible proportion d'agrégats qui seraient formés au cours du stockage du produit. D'autres part, ces techniques non séparatives ne permettent pas de caractériser les agrégats formés. La DLS permet d'identifier une gamme de tailles très larges présentes dans l'échantillon, mais manque de résolution.

Face à ces limites, il apparait important de compléter ces essais par d'autres techniques. Dans notre cas, nous avons envisagé des essais en FFF, qui apparait comme une technique d'intérêt en complément de la SEC [159]. Nos premiers résultats ont montré la possibilité d'observer la présence de particules de taille importante dans certains échantillons. Néanmoins, une adsorption importante du mAbs sur la membrane de FFF ne nous a pas permis de finaliser l'étude. Des essais complémentaires permettront d'améliorer la méthode actuelle.

Parmi les études s'intéressant à la stabilité *in use* de l'infliximab (Tableau 7), aucune n'évalue l'agrégation du mAbs par une autre technique que la SEC, l'IA ou la DLS. Certaines études évaluent en plus les particules sub-visibles et visibles, de tailles supérieures à 5µm, par l'utilisation d'un compteur de particules ou par l'observation visuelle. Compléter ces études par des essais en FFF apparait donc pertinent.

C. Conclusion

D'après nos essais, il n'existe pas de modification concernant l'agrégation ou la fragmentation pour les trois références Remicade®, Remsima® et Flixabi® après 3 mois de stockage à 4°C, en poche Freeflex ou Ecoflac. En complément des essais de LC-MS/MS, ces résultats permettent d'envisager une augmentation de la durée de conservation des poches de perfusion d'infliximab. Néanmoins, cette étude nécessitera d'être complétée par des essais en A4F afin de confirmer ces résultats. Par ailleurs, aucune étude n'avait évalué la biosimilarité des trois références d'infliximab dans ces conditions. Notre étude permet de montrer le comportement similaire de ces trois produits au regard de leur dégradation dans des conditions de stress forcé et dans les conditions d'utilisation hospitalière.

VI. Analyse ASAP de l'infliximab

A. Produits de dégradation analysés

D'après les essais de dégradations forcées et de stabilité dans les conditions d'utilisation hospitalière, nous avons pu observer que la température a un impact sur les déamidations et sur la fragmentation de l'infliximab. Cet impact semble proportionnel avec la durée d'exposition. Il semble donc possible de réaliser une étude ASAP sur ces deux paramètres. A l'inverse, l'agrégation de l'infliximab, bien qu'augmentée avec la température, ne semble pas suivre une loi d'Arrhénius. Nous avons donc réalisé une étude ASAP sur l'infliximab, pour évaluer les paramètres suivants :

- la déamidation de N57 (N57d)
- la fragmentation de l'infliximab

Cette étude a été réalisée sur le Remicade® uniquement, afin d'évaluer l'applicabilité de cette approche sur les mAbs. Par ailleurs, la température de stress maximale a été fixée à 45°C. En effet, à partir de 50°C, nous avons observé l'apparition de particules dans la solution, indiquant une dégradation très importante du produit, avec formation d'agrégats.

B. Analyse ASAP appliquée à la déamidation N57

1. Essais de stress

La Figure 109 présente le pourcentage de déamidation de N57 pour chaque condition de stress. Le pourcentage de N57d apparait proportionnel à la température et à la durée d'exposition.

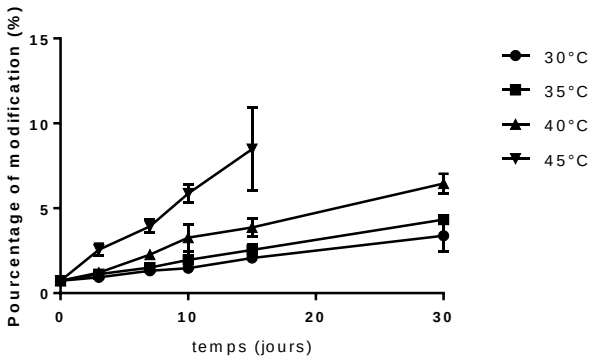


Figure 109 : Teneur en N57 obtenue pour chaque condition de stress

2. Modélisation ASAP

Pour chaque condition de température, le temps d'isoconversion est déterminé (Tableau 35 et Figure 110). Dans le cas présent cette limite a été fixée à 5,0 %. Dans le cas de N57d, le point d'isoconversion se situe entre 48 (condition 30°C) et 8 jours (condition 45°C).

Tableau 35 : Temps et ratio d'isoconvertion déterminés pour chaque condition de stress pour la déamidation N57

Conditions de stress	Durée de stress (jours)	Isoconversion (jours)	Isoconversion ratio
30°C	3,7,10,15,30	48,369 ± 12,178	0,62
35°C	3,7,10,15,30	35,590 ± 3,547	0,84
40°C	3,7,10,15,30	21,445 ± 2,799	1,40
45°C	3,7,10,15	8,343 ± 1,475	1,80

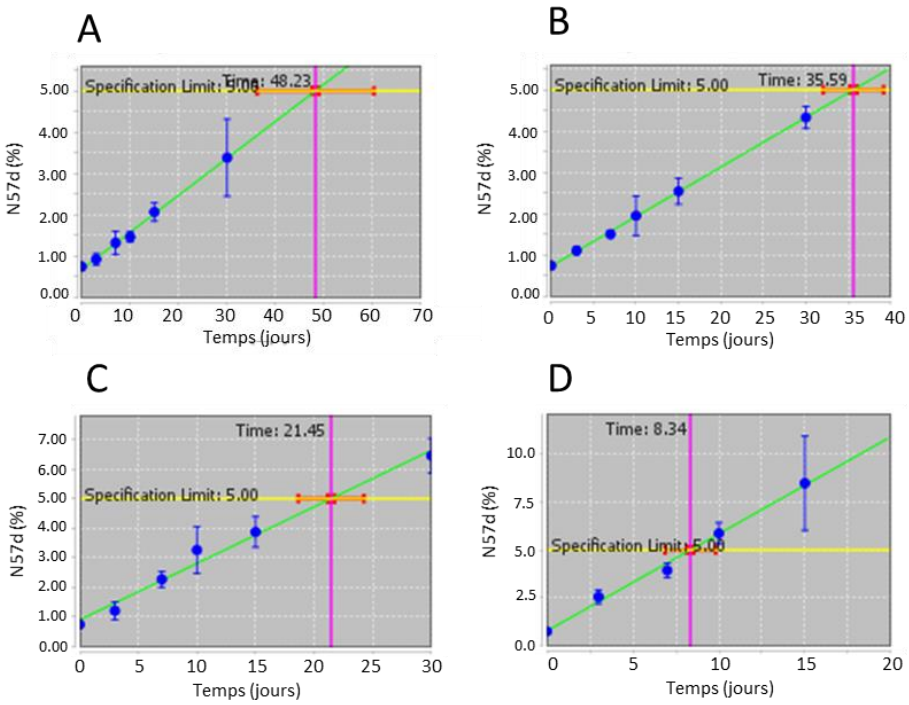


Figure 110 : Graphiques d'isoconversion, c'est à dire le temps nécessaire (en violet) pour atteindre la limite de spécification de la N57d (5.00%NA, en jaune) à 30°C (A), 35°C (B), 40°C (C) et 45°C (D)).
Les carrés bleus représentent les valeurs expérimentales, avec une barre d'erreur de 10% de cette valeur.

Les valeurs obtenues pour les différents paramètres de l'équation modifiée d'Arrhenius sont présentées Tableau 36. Le modèle apparait valide vis-à-vis de la valeur de R^2> 0,9 et par le graphique des résidus (Figure 111). La valeur de Q^2 est inférieure à 0,8, ce qui apparait donc plus faible que pour les autres modèles que nous avons réalisés. Avec les données expérimentales que nous avions, il n'a pas été possible d'améliorer le modèle. Malgré la valeur de Q^2, indiquant une robustesse limite du modèle, nous avons évalué le potentiel prédictif de celui-ci vis-à-vis des données de stabilité obtenus préalablement.

Tableau 36 : Paramètres du modèle ASAP pour N57d

Paramètre	Valeur
Ln A	34,050 ± 6,217
E_a (kcal/mol)	22,056 ± 3,850
B	Non applicable
R^2	0,934
Q^2	0,576

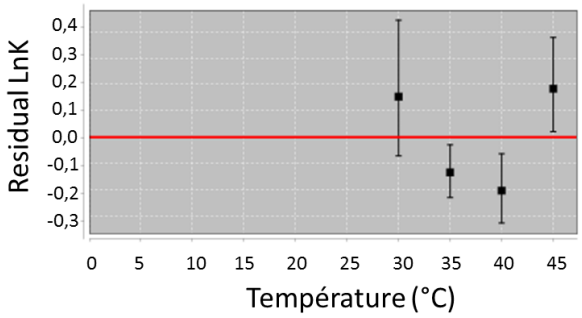


Figure 111 : Graphique des résidus, présentant l'adéquation du model pour N57d

3. Comparaison aux données réelles de stabilité

La Figure 112 compare les teneurs expérimentales de N57d obtenues lors de l'étude de stabilité du Remicade® à 4°C, 25°C et 40°C par rapport à la prédiction du modèle. On observe une relative bonne prédiction du modèle à 25 et 40°C. Par contre, à 4°C, le taux de déamidation expérimentale de N57 est systématiquement supérieur aux teneurs prédites par le modèle. Ceci peut être lié à la variabilité de la teneur observée à T0. En effet, lors de l'étude de stabilité, la teneur initiale en N57d était de 1,5 ± 0,1%. Lors de l'étude de stress ASAP, la teneur initiale était de 0,7 ± 0,1%. L'étude ASAP et l'étude de stabilité ont été réalisées sur deux lots de Remicade® différents, ce qui peut expliquer cette différence. Bien que le modèle prédise correctement l'absence d'augmentation de déamidation avec le temps à 4°C, la modélisation est réalisée à partir d'une teneur plus faible au départ que ce qui est observé dans l'étude de stabilité, entrainant une sous-estimation en N57d.

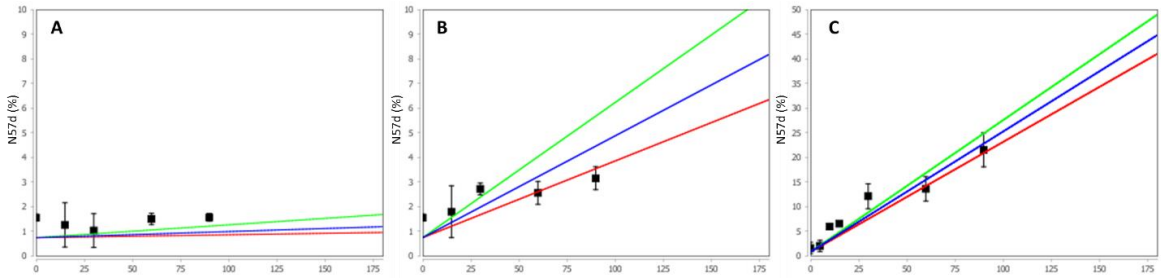


Figure 112 : Projection de la teneur en N57d prédit par le modèle, pour une température de conservation de 4°C (A), 25°C (B) et 40°C (C).
La teneur prédite est identifiée par la ligne bleue, encadrée par des valeurs maximales (vert) et minimales (rouge). Les carrés noirs représentent les valeurs expérimentales dans les conditions décrites.

C. Analyse ASAP appliquée à la fragmentation

1. Essais de stress

La Figure 113 présente les teneurs en fragments obtenues pour chaque condition de stress. On peut observer que la teneur en fragments augmente avec le temps et la température. La fragmentation de l'infliximab ne semble pas linéaire pour des durées de stress supérieures à 10 jours, avec apparition d'un plateau dans chaque condition.

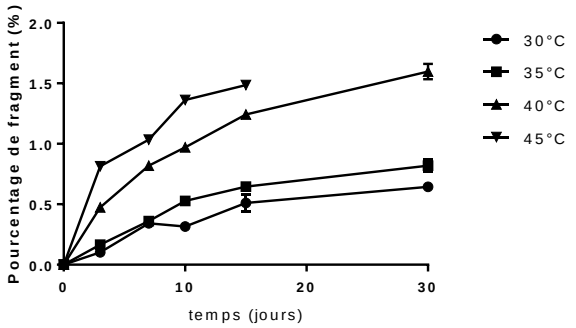


Figure 113 : Teneur en fragments obtenue pour chaque condition de stress

2. Modélisation ASAP

Pour chaque condition de température, le temps d'isoconversion est déterminé (Tableau 37 et Figure 114). Dans le cas présent cette limite a été fixée à 1,0 %. Le point d'isoconversion se situe entre 72 (condition 30°C) et 5 jours (condition 45°C). Aucune extrapolation trop importante n'a été nécessaire (ratio d'isoconversion > 0,1).

Tableau 37 : Temps et ratio d'isoconvertion déterminés pour chaque condition de stress pour les fragments

Conditions de stress	Durée de stress (jours)	Isoconversion (jours)	Isoconversion ratio
30°C	3,7,10,15,30	72,867 ± 14,888	0,41
35°C	3,7,10,15,30	42,951 ± 8,091	0,70
40°C	3,7,10,15,30	10,871 ± 1,989	2,76
45°C	3,7,10,15	5,843 ± 1,142	2,57

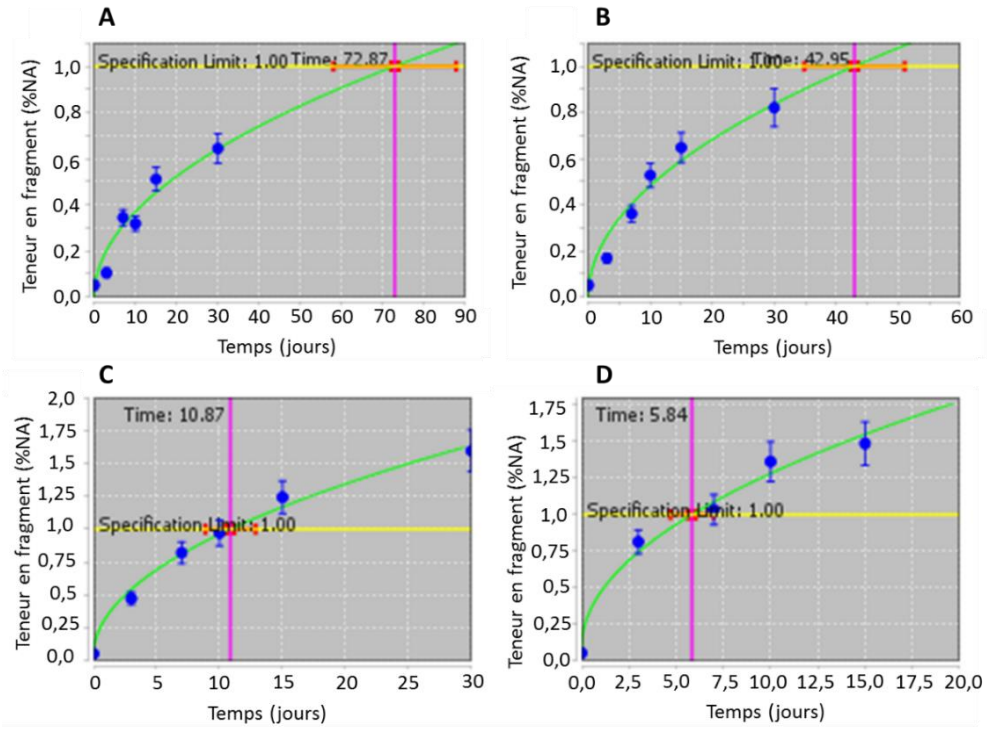


Figure 114 : Graphiques d'isoconversion, c'est à dire le temps nécessaire (en violet) pour atteindre la limite de spécification de fragments (1,00%NA, en jaune) à 30°C (A), 35°C (B), 40°C (C), et 45°C (D).
Les carrés bleus représentent les valeurs expérimentales, avec une barre d'erreur de 10% de cette valeur.

Les valeurs obtenues pour les différents paramètres de l'équation modifiée d'Arrhenius sont présentées Tableau 38. La validité du modèle est représentée par les valeurs acceptables des coefficients R2 et Q2 (R2>0,9, Q2>0,8 [191]), et par le graphique des résidus présenté Figure 115. Dans le cas de la fragmentation de l'infliximab, le modèle n'apparait pas linéaire (Figure 113, Figure 114). Une autre modélisation a alors été choisie par rapport aux cas précédents (acide ascorbique, fertiline et déamidation). Le modèle choisi est un modèle de diffusion. Waterman *et al* avait également utilisé ce modèle lors de l'analyse de la Bacitracine [217].

Tableau 38 : Paramètres du modèle ASAP pour la fragmentation de l'infliximab

Paramètre	Valeur
Ln A	52,426 ± 5,8
E_a (kcal/mol)	34,247 ± 3,577
B	Non applicable
R^2	0,968
Q^2	0,898

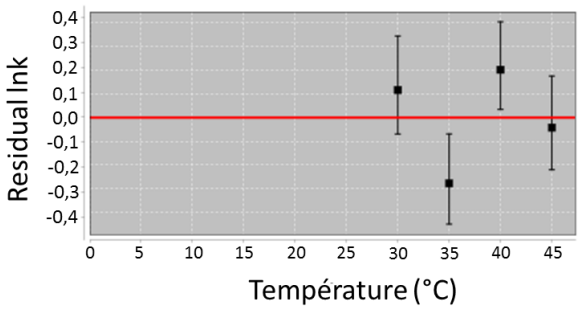


Figure 115 : Graphique des résidus, présentant l'adéquation du model pour la fragmentation de l'infliximab

3. Comparaison aux données réelles de stabilité

La Figure 116 présente la comparaison entre les données prédites et les données expérimentales pour la teneur en fragments dans les échantillons de Remicade®, à 4°C, 25°C et 40°C. A 4°C, le modèle est en adéquation avec les teneurs expérimentales, et prédit bien l'absence de fragmentation du mAb. A 25°C et 40°C le modèle semble légèrement surestimer la fragmentation de l'infliximab. Des essais de stabilité sur plus long terme permettrait de confirmer cette tendance. Williams *et al* avaient réalisé des études ASAP sur 10 produits pharmaceutiques dont l'actif est une petite molécule chimique. Lorsqu'un modèle ASAP avait pu être réalisé, le modèle avait tendance à surestimer la dégradation du produit [191], comme ce qui peut être observé dans le cas présent.

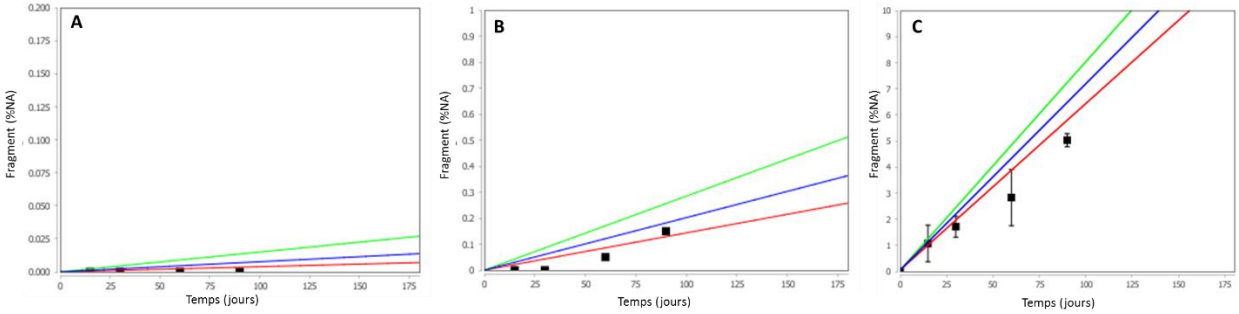


Figure 116 : Projection de la teneur en fragments prédit par le modèle, pour une température de conservation de 4°C (A), 25°C (B) et 40°C (C).
La teneur prédite est identifiée par la ligne bleue, encadrée par des valeurs maximales (vert) et minimales (rouge). Les carrés noirs représentent les valeurs expérimentales dans les conditions décrites.

D. Conclusion

La méthodologie ASAP a été appliquée à l'évaluation de la déamidation et à la fragmentation du Remicade®. Dans les deux cas, le modèle a permis de modéliser de façon relativement prédictive la dégradation du mAb selon ces deux aspects. Ces résultats ouvrent la voie à la possibilité d'appliquer cette méthodologie pour les protéines thérapeutiques et non seulement aux petites molécules

chimiques. Néanmoins, cette méthodologie n'a pas pu être appliquée à l'évaluation d'autres types de dégradation du mAb comme l'oxydation des méthionines et l'agrégation. Dans le cas des méthionines, la température n'a pas montré d'impact sur leur taux d'oxydation. Actuellement, ASAP ne permet pas de modéliser la dégradation d'un produit en fonction de l'oxydation. Il faudrait pour cela pouvoir mesurer par exemple la teneur en oxygène dans le conditionnement du produit. Dans le cas de l'agrégation, ASAP ne parait également pas adapté. En effet, bien que la température induise l'agrégation du mAb, il ne s'agit pas d'une réaction de type Arrhénius. C'est-à-dire que la vitesse de réaction n'est pas fonction de la température. D'autre part, la stabilité des mAbs doit être évaluée sur l'ensemble des produits de dégradation potentiels. Ces produits de dégradation ne se limitent pas aux seuls produits de dégradation cités ici. Les variants de charge et les glycosylations en sont d'autres exemples. Il serait donc intéressant d'évaluer le potentiel de ASAP sur la prédiction des teneurs de l'ensemble de ces possibles produits de dégradation.

VII. Conclusion

L'analyse de l'infliximab a porté sur la caractérisation de sa structure primaire en LC-MS/MS après digestion trypsique et de son agrégation et fragmentation par SEC-UV-MALS-RI, DLS, spectroscopie IA et FFF-UV-MALS-RI. La méthode en LC-MS/MS a permis l'analyse d'environ 95% de la séquence en acides aminés de l'infliximab, et de l'ensemble des acides aminés d'intérêts. La méthode en SEC-UV-MALS-RI a permis l'analyse des formes monomères, fragments, dimères et trimères. La SEC a montré une limite pour l'analyse d'agrégats de taille supérieure aux trimères. L'analyse des agrégats nécessitent des méthodes complémentaires comme la DLS et l'IA. La FFF offre la possibilité de caractériser et de quantifier les agrégats de taille supérieure aux trimères. Des essais complémentaires seront nécessaires afin d'optimiser la méthode en FFF, et de limiter l'adsorption des mAbs à la membrane. Au total, nous avons pu observer une grande similarité des 3 références au cours des études de stabilité et lors de stress forcé. Nous avons également montré la stabilité des 3 références à 4°C pendant 3 mois, dans chacune des poches de perfusion évaluées. Enfin, nous avons montré la possibilité d'utiliser l'approche ASAP dans la prédiction des paramètres fragmentations et déamidations de l'infliximab.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ces travaux de thèse avaient pour objectif de développer et mettre en œuvre une méthodologie intégrée permettant l'évaluation et la modélisation de la stabilité de différents produits pharmaceutiques, y compris de produits biopharmaceutiques. Pour cela, une approche méthodologique a été appliqué à trois produits pharmaceutiques témoins : l'acide ascorbique, le peptide cFEE et le mAbs infliximab. L'approche méthodologique a consisté en trois éléments :

- La sélection et le développement de méthodes analytiques indicatrices de stabilité pertinentes et adaptées à l'analyse de chaque molécule, et identification des principaux produits de dégradation
- La modélisation de la stabilité de chaque produit pharmaceutique étudié, *via* l'approche ASAP. Cette modélisation est basée sur les teneurs en produit de dégradation générées au cours du temps dans différentes conditions de stockage.
- La confrontation entre les données de stabilité prédites et les données expérimentales obtenues lors des études réelles de stabilité, afin d'évaluer la validité du modèle ASAP et ses limites.

Dans un premier temps, nous avons ainsi sélectionné et développé des méthodes analytiques adaptées aux suivis de la stabilité des différents principes actifs étudiés. La teneur en produit de dégradation est généralement le paramètre limitant lors du suivi de stabilité d'un produit pharmaceutique. En effet, les normes sont plus restrictives en ce qui concerne les produits de dégradation, entre 0,05 et 1,00% selon la posologie, par rapport à la concentration en principe actif qui peut varier de 95 à 105%. Les méthodes permettant l'analyse des produits de dégradation nécessitent d'être suffisamment sensibles et résolutives afin de détecter et de caractériser l'ensemble des produits de dégradation présents dans la formulation lors de la commercialisation du produit. Ces exigences impliquent le développement de méthodes analytiques dites indicatrices de stabilité, adaptées au produit pharmaceutique développé. En particulier, l'évolution des médicaments et l'apparition de molécules de plus en plus complexes, tels que les mAbs, associées à des voies de dégradation multiples et des produits de dégradation variés, impliquent le développement de méthodes indicatrices de stabilité adaptées à ces molécules.

Dans le cas des petites molécules chimiques, le développement de méthodes indicatrices de stabilité est un domaine largement connu. Nous avons suivi la méthodologie classique de développement de ce type de méthode pour l'analyse de l'acide ascorbique. Cependant, il s'agit d'une molécule très

polaire. Afin de pouvoir analyser de façon concomitante l'acide ascorbique et ses produits de dégradation, les méthodes classiques en RP-HPLC n'apparaissent pas adaptées. Nous avons alors choisi de développer une méthode en CZE-UV. La méthode CZE-UV développée dans le cadre de ces travaux a permis, en 10 minutes, l'analyse et la quantification simultanée de l'acide ascorbique et de ses produits de dégradations principaux : le DHAA, le furfural, l'acide furoïque ainsi que le TKV que nous avons identifié comme le produit de dégradation principal lors de l'étude de stabilité du produit. Mise à part pour le DHAA présentant une absorbance en UV limitée, la LOD de la méthode permet de répondre aux exigences réglementaires. La CZE apparait donc comme une méthode alternative intéressante pour le suivi de la stabilité de molécules pharmaceutiques polaires ou ionisées, pour lesquelles l'analyse en RP-HPLC ne permet pas une séparation efficace entre la molécule et ses produits de dégradation. La CZE est également une technique peu consommatrice en solvants, ce qui la rend pertinente d'un point de vue de la chimie verte. Outre l'analyse de petites molécules chimiques, la CZE a aussi montré son intérêt pour l'analyse et le suivi de la stabilité des produits pharmaceutiques de type peptides ou protéines [251]. En HPLC, les peptides de faibles masses molaires et fortement polaires peuvent être difficiles à séparer. Cet effet a notamment été observé lors de l'analyse en LC-MS, en peptide mapping, de mélange de peptides de l'infliximab (*cf. Partie 4, IV, A*). Au contraire, en CZE une séparation complète peut être obtenue [25]. Les protéines possèdent des propriétés qui peuvent être extrêmement variées, comme par exemple leur charge et leur taille. Également, elles se composent d'isoformes et de variants. Ces différences peuvent analysées en électrophorèse capillaire [252]. Par exemple, la CZE permet la séparation des variants de charge des mAbs, et apparait être une alternative à l'analyse classique en chromatographie d'échange d'ions, en offrant en particulier une efficacité de séparation supérieure et un temps d'analyse réduit [253]. L'analyse en électrophorèse capillaire offre une séparation efficace, et requiert de faibles volumes d'échantillon (de l'ordre du nL). Cet aspect est un avantage lors du développement de molécules pharmaceutiques biologiques, dont la production est couteuse. La CZE apparait donc comme une technique analytique intéressante pour le contrôle et le suivi de la stabilité de produits pharmaceutiques à la fois chimiques et biologiques.

Les produits de dégradation issus des petites molécules organiques correspondent à des modifications de leur structure chimique. Pour les molécules biopharmaceutiques, il existe différents niveaux de structures. Dans ce cas, leur analyse et le suivi de leur stabilité nécessite des méthodes permettant de caractériser l'ensemble des niveaux de structures. En effet, l'activité de ces molécules n'est pas uniquement liée à leur composition chimique, mais également à leur structure spatiale. Dans mes travaux, plusieurs méthodes analytiques permettant d'accéder à ces différents niveaux de structure ont été utilisées. L'analyse de la structure primaire a été réalisée par LC-MS/MS, soit sur le produit

entier (cFEE) ou après peptide mapping (infliximab). L'analyse de la structure secondaire et tertiaire a été réalisée par CD et spectroscopie Raman (cFEE). Enfin, l'analyse de la structure quaternaire a été réalisée par SEC associée à d'autres techniques orthogonales (infliximab).

La spectrométrie de masse est une technique de référence pour la caractérisation de la structure chimique des molécules. Elle est en particulier largement utilisée pour identifier la structure de molécules inconnues et de produits de dégradation observés lors des études de stabilité [13]. A titre d'exemple, au cours de ces travaux, nous avons identifié le TKV comme produit de dégradation de l'acide ascorbique par MS (Figure 47). D'autres approches par RMN et IR sont également classiquement mises en œuvre [13].

La LC-MS est également largement utilisée pour l'analyse de la structure primaire des peptides et des protéines, c'est-à-dire de leur séquence en acides aminés [28, 113]. L'analyse en LC-MS et LC-MS/MS permet de caractériser la séquence mais également d'identifier et de quantifier le taux de certaines PTMs. Dans les travaux présentés, nous avons analysé la structure primaire du peptide cFEE et de l'infliximab. Le cFEE étant composé de seulement 6 acides aminés, et donc de masse molaire relativement faible, il a été possible de l'analyser entier avec le spectromètre disponible au laboratoire. Pour les protéines de masse molaire plus importante telles que les mAbs, il est nécessaire de réaliser une digestion peptidique. L'utilisation d'autres types d'instruments MS, comme les spectromètres à temps de vol (MALDI-TOF ou ESI-TOF) permet l'analyse des mAbs entiers [103]. L'analyse de peptides et de protéines entiers permet de limiter l'impact du prétraitement de l'échantillon. Néanmoins, l'avantage de l'analyse par *peptide mapping* après digestion enzymatique est de pouvoir obtenir des informations précises concernant l'enchainement des acides aminés et de situer précisément les PTMs sur la chaîne peptidique. Ceci est intéressant car, en fonction de leur localisation, les PTMs peuvent avoir un impact différent sur l'activité biologique du produit.

Dans le cas de l'infliximab, nous avons identifié les méthionines sensibles et non sensibles à l'oxydation. Dans le cas du cFEE, nous avons identifié la localisation des liaisons peptidiques impliquées dans la linéarisation du peptide. Pour les deux produits étudiés, des stress forcés ont été réalisés afin d'évaluer la capacité des méthodes à analyser les produits de dégradation. Ces stress forcés ont été réalisés selon les méthodologies classiquement utilisées pour les petites molécules chimiques, et appliquées aux molécules biologiques [13, 40]. Dans les deux cas, les méthodes permettaient d'identifier les produits de dégradation d'intérêts. Une limite importante a été l'analyse des déamidations de l'infliximab. La déamidation N57 est décrite comme la plus importante, en particulier par rapport à sa sensibilité vis-à-vis des stress forcés comme la température. Cette déamidation N57 peut donc être considérée comme la déamidation « témoin » pour le suivi de la dégradation de

l'infliximab, au regard de cette voie de dégradation. Néanmoins, d'autres méthodes pourraient permettre le suivi d'un plus grand nombre de déamidation, par exemple en CE-MS [25].

Dans ces travaux, la structure spatiale du cFEE a été caractérisée par l'association des spectroscopies CD et Raman. Ces deux techniques sont classiquement utilisées pour évaluer la structure spatiale des peptides et des protéines [113, 254]. L'infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) est également une technique d'intérêt [255]. Dans un premier temps, nous avions comme objectif d'évaluer la dégradation du cFEE par Raman. Afin de dépasser la limite de cette technique en termes de sensibilité, nous avions envisagé de réaliser des essais en SERS-Raman, qui permet d'augmenter le signal obtenu, et qui a montré son intérêt pour le suivi de produits de dégradation dans le cas de petites molécules chimiques [256-258]. Néanmoins, les premiers essais initiés n'ont pas pu être suivis, et nous nous sommes tournés vers des essais en LC-MS pour évaluer la stabilité du cFEE. L'intérêt du Raman et du CD est de permettre de caractériser la structure spatiale des molécules biologiques. Lors du contrôle des lots fabriqués, cela permet de vérifier la conformité des lots, et l'absence de variabilité d'un lot à l'autre. Ce paramètre est d'autant plus important que les produits biopharmaceutiques sont produits par technologie recombinante et peuvent donc présenter des micro-variabilités inter-lots. Lors du suivi de la stabilité de ces produits, le contrôle de la structure spatiale par CD, Raman ou FT-IR apparait important. Néanmoins, ces techniques souffrent d'un manque de sensibilité pour l'évaluation de la dégradation des protéines [254]. Par exemple, Lin *et al* ont analysé par CD, FT-IR et par méthodes chromatographique SEC et échange d'ions la dégradation d'un mAbs. L'analyse par CD et FT-IR ne permettait pas d'observer une modification de structure du mAbs, y compris lorsque 10% de celui-ci était dégradé. Les méthodes chromatographiques étaient jugées plus pertinentes pour le suivi de stabilité du mAbs [254]. Or, les méthodes indicatrices de stabilité requièrent une sensibilité permettant d'observer les produits de dégradation à des niveaux correspondants aux exigences réglementaires. Même si ces normes sont définies de façon produit-dépendant, on peut estimer que les méthodes spectroscopiques CD, Raman et FT-IR ne peuvent être considérées comme suffisamment sensibles. D'ailleurs, concernant l'évaluation de la stabilité de différents mAbs dans les conditions d'utilisation hospitalière, aucune étude n'a montré de modification *via* ces méthodes [125, 126, 259, 260]. Dans ce contexte, l'analyse par ce type de méthode spectroscopique de la structure secondaire et tertiaire des molécules biologiques au cours des études de stabilité apparait peu pertinente. Cependant, une étude récente par McAvan *et al* a montré que l'utilisation d'outils chimiométriques permettait d'améliorer fortement la sensibilité des techniques CD et Raman pour l'analyse de la dégradation d'un mAbs [261], ouvrant la voie à un réel intérêt de ces techniques pour le suivi de stabilité des protéines.

L'analyse de l'agrégation est un autre niveau de caractérisation important concernant la stabilité des molécules biologiques. Dans le cas du cFEE, sa faible masse limite le risque d'agrégation. En revanche, dans le cas de l'infliximab, il s'agit d'un paramètre de stabilité qui apparait très important. En effet, l'impact en termes de toxicité de l'agrégation, en particulier par l'induction de réactions immunogènes, a été largement étudié [262-265]. Nous avons évalué l'agrégation par SEC, considérée comme la technique de référence. Néanmoins, lors des stress forcés, l'ensemble des agrégats n'étaient pas observés. L'utilisation en parallèle de la DLS a confirmé la présence dans les échantillons stressés d'agrégats de taille supérieure à 100 nm (Figure 99). L'hypothèse envisagée est que ces agrégats ne sont pas élués en SEC dont la porosité est de 300Å. De façon inattendue, lors de nos essais, nous n'avons pas observé l'augmentation des formes dimères et trimères de façon concomitante avec l'augmentation de formes de plus hauts poids moléculaires. On peut supposer que lorsque le processus d'agrégation a débuté, la formation d'agrégats de hauts poids moléculaires est plus rapide que la première étape du processus, à savoir la formation de dimères et trimères. Walchli *et al* ont récemment étudié la cinétique de formation des agrégats de deux mAbs [266]. Ils ont montré que les cinétiques étaient différentes en fonction de la température de stress. Globalement, deux étapes sont distinguées. La première étape de formation des agrégats correspond à la formation des dimères à partir de deux monomères. La seconde étape correspond aux additions successives de monomères sur l'agrégat déjà présent. A des températures élevées (40 et 50°C), la seconde étape a une cinétique plus rapide que la première. Ceci est cohérent avec ce que nous observons lors des stress forcés : l'absence d'augmentation de dimères/trimères, et l'apparition rapide d'agrégats de hauts poids moléculaires. Dans ce contexte, les travaux que nous avons pu réaliser concernant l'analyse des agrégats issus de l'infliximab suggèrent fortement que la SEC permet alors d'analyser la majorité des agrégats formés pour des températures de stockage faible. Les agrégats de plus grande taille, qui peuvent tout de même être présents, doivent être analysés par d'autres techniques. La FFF apparait être une technique intéressante complémentaire à la SEC. Néanmoins, des limites importantes restent à dépasser, comme l'adsorption de l'échantillon sur la membrane. D'autres techniques comme la *nanotracking particules analysis* (NTA) [267] ou la *microscopy flow imaging (MFI)* apparaissent également intéressantes pour observer les agrégats [268].

Lors de la demande d'AMM d'un biosimilaire, une caractérisation importante du biosimilaire est réalisée. Les résultats sont comparés et doivent être comparables au produit de référence. Lorsque les résultats sont significativement différents, l'absence d'impact sur la qualité du produit doit être démontrée. C'est le cas, par exemple, du profil de glycosylation qui est différent entre les trois références d'infliximab étudiées (annexe 3), ou de la teneur en agrégats plus importante dans les conditions initiales du Remsima® par rapport au Remicade® [229]. Au cours de notre étude, nous avons

pu observer un comportement similaire des 3 produits au cours des stress forcés et au cours de l'étude de stabilité en conditions hospitalières. Ceci confirme leur biosimilarité en termes de structure non seulement dans les conditions initiales, mais également lors de leur utilisation dans les conditions d'utilisation, ainsi que lors de leur stockage et face à un stress extérieur. Il est important de noter que les excipients présents dans les formulations du Remicade®,du Remsima® et du Flixabi® sont les mêmes, seules les concentrations de ces excipients, non répertoriées, sont susceptibles d'être différentes. Or les excipients ont un impact sur la stabilité des molécules, qu'elles soient chimiques ou biologiques. Il serait donc intéressant de comparer la stabilité de biosimilaires ayant des formules différentes. Dans le cas de l'infliximab, il serait intéressant d'étudier Zessly®, qui est formulé différemment (Tableau 4) mais auquel nous n'avons pas eu accès, afin d'évaluer l'impact de ce changement de formulation sur la stabilité du produit, vis-à-vis de stress forcé ou lors du stockage en conditions *in use*.

Après avoir sélectionné et développé les méthodes adaptées à l'analyse des produits de dégradation des produits étudiés, nous avons dans un second temps systématiquement réalisé une étude prédictive de la stabilité de ces différents produits. Enfin, dans un troisième temps, nous avons confronté la stabilité obtenue par modélisation et obtenue lors d'études de stabilité en conditions réelles de stockage afin d'évaluer l'intérêt de l'approche méthodologique adoptée dans ces travaux de thèse. L'approche prédictive utilisée lors de ces travaux de thèse est l'approche ASAP. Les méthodologies plus classiques consistent en la comparaison de différentes formules lors de stress forcés. Par exemple, dans le cas des petites molécules chimiques, l'association des techniques calorimétriques comme la DSC (calorimétrie différentielle à balayage) et chromatographiques sont classiquement utilisées [14, 269]. Pour les molécules biologiques comme les mAbs, la température de fusion Tm du mAbs dans plusieurs formulations est comparée en DSC. Plus le Tm est élevé, plus la formule est jugée stable [270, 271]. Ces types d'approches ont l'avantage de comparer la stabilité relative des formulations et de sélectionner la plus stable. Néanmoins, leur limite est qu'elles ne permettent pas de prédire la stabilité du médicament dans le temps. La formulation, même si elle est la plus stable, peut se dégrader dans le temps et entrainer la production d'un produit de dégradation au-dessus des seuils réglementaires. Une formulation plus simple ou moins couteuse à produire, mais moins stable qu'une autre, peut être éliminée alors qu'elle présenterait une stabilité satisfaisante dans les conditions normales de stockage.

L'approche ASAP permet de dépasser cette limite, en modélisant la dégradation du produit dans les conditions normales de stockage. Nous avons montré l'applicabilité de cette approche pour l'acide

ascorbique, le cFEE et pour certains produits de dégradation de l'infliximab. Dans le cas des molécules chimiques, la prédiction est réalisée sur le ou les produits de dégradation majoritaires. C'est-à-dire sur le ou les produits de dégradation qui limiteront la durée de stabilité du médicament parce qu'ils atteindront le seuil règlementaire. Ces produits de dégradation sont observés sur la même méthode d'analyse et ne nécessite qu'une seule étude ASAP. C'est le cas par exemple de l'acide ascorbique. Dans les travaux présentés dans ce manuscrit, la modélisation ASAP a été réalisée à partir des analyses réalisées en CZE-UV. La modélisation a été basée sur la teneur en TKV, démontré comme étant le produit de dégradation majoritaire de l'AA. Les résultats obtenus à partir de la modélisation ont été parfaitement corrélés avec les données de stabilité long terme. Ainsi, nous avons montré qu'une méthode indicatrice de stabilité en CZE-UV est une technique adaptée à la réalisation d'étude ASAP. Dans le cas du peptide cFEE, la méthode en UPLC-MS a permis la réalisation d'une étude ASAP, basée sur le suivi de la teneur des deux produits de dégradation majoritaires en parallèle. Dans ce cas d'étude également, les teneurs en produits de dégradation modélisées étaient similaires aux teneurs obtenues lors des études de stabilité en conditions réelles, démontrant la validité de la méthodologie mise en place.

Dans le cas des protéines de structure complexe comme les mAbs, il semble nécessaire de réaliser une étude ASAP pour chaque voie de dégradation. Concernant l'infliximab, afin de construire la modélisation ASAP, nous avons pris le parti de considérer deux voies de dégradation de manière indépendante : la déamidation N57 et la fragmentation des chaînes lourdes et légères. Les résultats obtenus montrent qu'il est possible de réaliser des prédictions de stabilité sur des molécules complexes telles que les mAbs. Une autre étude très récente par Kuzman *et al* présente une étude similaire en utilisant une approche de type Arrhénius [272]. Dans cette étude, la corrélation entre la stabilité long terme et prédite a été satisfaisante pour les paramètres suivants : la concentration, les variants acides, la fragmentation, les agrégats et l'activité biologique. Dans notre cas, l'agrégation n'a pas pu être évaluée par ASAP car lors de stress pour l'étude ASAP nous n'avons pas observé l'augmentation des dimères et trimères. Cela peut s'expliquer par le fait que les mAbs présentent des comportements différents vis-à-vis de l'agrégation. D'autre part, Kuzman *et al* indiquent la nécessité, dans le cas de l'agrégation, de réaliser des stress à des températures inférieures à 40°C pour obtenir des prédictions exploitables. Dans leur cas, si les résultats des stress à 45°C étaient intégrés au model, ils n'obtenaient pas d'adéquation entre les résultats long terme et prédit [272]. Ceci est en lien avec la cinétique d'agrégation différente des mAbs dans les faibles ou les hautes températures [266]. Néanmoins, outre certaines voies de dégradation qui n'ont pas pu être modélisées, il est intéressant de montrer que les approches prédictives comme ASAP peuvent être appliquées aux mAbs, même s'il s'agit de molécules bien plus complexes que les petites molécules chimiques. De la même manière qu'il n'existe pas une seule méthode analytique permettant de caractériser l'ensemble des aspects

structuraux d'un mAbs, la méthodologie ASAP ne permet pas, en l'état actuel, une modélisation absolue de la stabilité d'un mAbs. Cependant, la mise en œuvre de cette approche dans ces travaux a permis de fournir des informations pertinentes concernant la stabilité du mAbs et cohérente avec les analyses en conditions hospitalières. Au vu du nombre exponentiel de mAbs et des molécules associées (protéines de fusion, bispécifiques …) arrivant sur le marché chaque année et de leur intérêt clinique, ce type d'approche prédictive pourrait permettre à la fois de diminuer le coût de leur développement et d'accélérer leur mise sur le marché. L'étude de Kuzman *et al* comme la nôtre s'est intéressée à la stabilité des mAbs en solution. Les modélisations sur les formes sèches sont plus compliquées à mettre en œuvre car elles nécessitent de prendre en compte le stress à l'humidité pour être suffisamment prédictives. L'approche ASAP permet de réaliser des modélisations sur des formes sèches. Il serait donc intéressant de réaliser une étude sur une forme sèche, par exemple sous forme lyophilisat, de mAbs.

Au cours du développement d'un médicament, la mise en place d'une méthodologie permettant la modélisation fine de sa dégradation et de sa stabilité dans le temps est un enjeu majeur. La mise en œuvre de ces méthodologies peut permettre de comparer différentes formulations candidates afin de sélectionner la plus stable, de proposer des durées de péremption prospectives en amont de la réalisation des études de stabilité réglementaires ICH, ou encore d'évaluer l'impact d'une excursion de température, dans le cas par exemple d'un stockage inadapté lors du transport. Ainsi, ces méthodologies prédictives de stabilité peuvent permettre de réduire les temps de développement, et d'accélérer la mise sur le marché d'un produit, tout en garantissant la qualité et la sécurité de celui-ci. Néanmoins, à l'heure actuelle, seule la réalisation d'études de stabilité réglementaires ICH long terme permet de définir la durée de péremption du médicament. La modélisation prédictive de la stabilité des produits pharmaceutiques ne peut se substituer à ces études réglementaires. Cependant, dans le cas de produits pharmaceutiques destinés à des essais cliniques, l'utilisation d'une approche prédictive a été acceptée par les autorités pour définir une durée de stabilité de ces produits [273]. Il s'agissait de produits pharmaceutiques dont le principe actif est une petite molécule chimique. Les travaux réalisés lors de ce travail de thèse contribuent à montrer la pertinence de ce type de méthodologie prédictive pour définir la stabilité d'un médicament. Notamment, dans le cas des molécules biologiques de structure complexe, ces travaux ont permis de montrer la possibilité de modéliser finement certaines voies de dégradation du produit et ouvrent ainsi la voie à l'utilisation d'une approche type ASAP pour définir de façon prospective la durée de stabilité des protéines pharmaceutiques. La réalisation de ce type d'étude sur d'autres mAbs ou d'autres molécules biologiques comme les anticorps monoclonaux conjugués, et l'application à d'autres produits de dégradation comme les variants de charges, permettront de contribuer à la possibilité d'utiliser ces

méthodologies prédictives pour les produits biologiques, au cours de leur développement et également lors de leur mise sur le marché.

REFERENCES

1. *ICH Q1A(R2) : Stability testing of new drug substances and products* International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, 2003.
2. *ICH Q1B : Stability testing: Photostability testing of new drug substances and products.* International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, 1996.
3. *ICH Q3B(R2) : Impurities in new drug products.* International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, 2003.
4. *ICHQ3A(R2) : Impurities in new drug substances.* International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, 2006.
5. *ICH Q1E: Evaluation for stability data.* International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, 2003.
6. *Bonnes Pratiques de Fabrication.* 2016.
7. USP, U.S.P., *Stability Studies in Manufacturing.*
8. *ICH Q2(R1) Validation of analytical procedures : text and methodology.* International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, 2005.
9. Ellie, C., *Etudes de dégradation forcée au cours du développement pharmaceutique.* STP Pharma Pratiques, 2007. **17**(2).
10. Blessy, M., et al., *Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs-A review.* J Pharm Anal, 2014. **4**(3): p. 159-165.
11. Singh S, B.M., *Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs.* Pharmaceutical Technology On-Line, 2000.
12. Singh, S., et al., *Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2013. **49**: p. 71-88.
13. Bakshi, M. and S. Singh, *Development of validated stability-indicating assay methods—critical review.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2002. **28**(6): p. 1011-1040.
14. Damien, G., *Mise au point d'une forme galénique solide: interactions principe actif-excipient.* STP Pharma Pratiques, 2004.
15. Lashi, N., et al., *Interaction contenant-contenu: methodologie.* STP Pharma Pratiques, 2007.
16. *Code de la Santé Publique Article L5121-1.*
17. Organisation, W.H., *Good manufacturing practices for biological products.*
18. Goeddel, D.V., et al., *Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(1): p. 106-10.
19. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.* Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
20. *Le Bilan économique des Entreprises du Médicament* Les entreprises du médicaments 2020.
21. Lu, R.M., et al., *Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases.* J Biomed Sci, 2020. **27**(1): p. 1.
22. Seymour, D.E.T.C.P., *The therapeutic monoclonal antibody product market*, in *BioProcess International*. 2020.
23. Kaplon, H. and J.M. Reichert, *Antibodies to watch in 2021.* MAbs, 2021. **13**(1): p. 1860476.
24. *http://eric.lacouture.free.fr/lycee/1ereS/cours_1ereS_ch9.htm*.
25. Gahoual, R., *Développement du couplage électrophorèse capillaire - spectrométrie de masse haute sensibilité : application à la caractérisation fine de protéines*. 2014.
26. Little, M., et al., *Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies.* Immunology Today, 2000. **21**(8): p. 364-370.

27. Giorgetti, J., *Caractérisation d'anticorps monoclonaux à différents niveaux à l'aide d'un couplage électrophorèse capillaire – spectrométrie de masse*. 2019.
28. Beck, A., et al., *Characterization of therapeutic antibodies and related products.* Anal Chem, 2013. **85**(2): p. 715-36.
29. *ICH Q5C: Stability testing of biotechnological/biological products.* International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, 1995.
30. *ICH Q5A(R1) : Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin.* International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, 1999.
31. *ICH Q5B : Analysis of the expression construct in cells used for production of r-dna derived protein products.* International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, 1995.
32. *ICH Q6B : Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products.* International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, 1999.
33. *ICH Q8(R2): Pharmaceutical development.* International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, 2009.
34. *Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics.* Food and Drug Administration, 2015.
35. *Guideline on the requirements for quality documentation concerning biological investigational medicinal products in clinical trials.* European Medicines Agency, 2016.
36. *Guideline on development, production, characterisation and specification for monoclonal antibodies and related products.* European Medicines Agency, 2016.
37. *Monoclonal antibodies for human use (monographie 2031).* Pharmacopée Européenne
38. Halley, J., et al., *An Industry Perspective on Forced Degradation Studies of Biopharmaceuticals: Survey Outcome and Recommendations.* J Pharm Sci, 2020. **109**(1): p. 6-21.
39. Tamizi, E. and A. Jouyban, *Forced degradation studies of biopharmaceuticals: Selection of stress conditions.* Eur J Pharm Biopharm, 2016. **98**: p. 26-46.
40. Nowak, C., et al., *Forced degradation of recombinant monoclonal antibodies: A practical guide.* MAbs, 2017. **9**(8): p. 1217-1230.
41. *A standard protocol for deriving and assessment of stability Part 2: Aseptic preparations (biopharmaceuticals).* Nationnal Health Service, 2017.
42. *Forced degradation studies for therapeutic proteins.* European biopharmaceutical entreprises, 2015.
43. *Guideline on similar biological medicinal products.* European Medicines Agency, 2014.
44. https://www.fda.gov/drugs/biosimilars/biosimilar-and-interchangeable-products#biosimilar.
45. *Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues.* European Medicines Agency, 2014.
46. *Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1).* European Medicines Agency, 2014.
47. Waterman, K.C. and R.C. Adami, *Accelerated aging: prediction of chemical stability of pharmaceuticals.* Int J Pharm, 2005. **293**(1-2): p. 101-25.
48. Waterman, K.C., *The application of the Accelerated Stability Assessment Program (ASAP) to quality by design (QbD) for drug product stability.* AAPS PharmSciTech, 2011. **12**(3): p. 932-7.
49. Scrivens, G., D. Clancy, and P. Gerst, *Theory and Fundamentals of Accelerated Predictive Stability (APS) Studies*, in *Accelerated Predictive Stability*. 2018. p. 33-73.
50. Genton, D. and U.W. Kesselring, *Effect of temperature and relative humidity on nitrazepam stability in solid state.* J Pharm Sci, 1977. **66**(5): p. 676-80.
51. Naversnik, K. and R. Jurecic, *Humidity-corrected Arrhenius equation: The reference condition approach.* Int J Pharm, 2016. **500**(1-2): p. 360-5.

52. Ball, M.C., *Solid-state hydrolysis of aspirin.* Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions, 1994. **90**(7).
53. Waterman, K.C., et al., *Improved protocol and data analysis for accelerated shelf-life estimation of solid dosage forms.* Pharm Res, 2007. **24**(4): p. 780-90.
54. Svirbely, J.L. and A. Szent-Gyorgyi, *The chemical nature of vitamin C.* Biochem J, 1932. **26**(3): p. 865-70.
55. Tu, H., et al., *Low Red Blood Cell Vitamin C Concentrations Induce Red Blood Cell Fragility: A Link to Diabetes Via Glucose, Glucose Transporters, and Dehydroascorbic Acid.* EBioMedicine, 2015. **2**(11): p. 1735-50.
56. Carr, A.C. and S. Maggini, *Vitamin C and Immune Function.* Nutrients, 2017. **9**(11).
57. Lynch, S.R. and J.D. Cook, *Interaction of vitamin C and iron.* Ann N Y Acad Sci, 1980. **355**: p. 32-44.
58. Padayatty, S.J., et al., *Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention.* J Am Coll Nutr, 2003. **22**(1): p. 18-35.
59. Moores, J., *Vitamin C: a wound healing perspective.* Br J Community Nurs, 2013. **Suppl**: p. S6, S8-11.
60. Szent-GyöRgyi, A. and W.N. Haworth, *'Hexuronic Acid"(Ascorbic Acid) as the Antiscorbutic Factor.* Nature, 1933. **131**(3297): p. 24-24.
61. Yuan, J.-P. and F. Chen, *Degradation of Ascorbic Acid in Aqueous Solution.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **46**(12): p. 5078-5082.
62. Azevedo, M.S., et al., *Screening and determination of aliphatic organic acids in commercial Brazilian sugarcane spirits employing a new method involving capillary electrophoresis and a semi-permanent adsorbed polymer coating.* Food Research International, 2014. **60**: p. 123-130.
63. Weinberger, R., *CHAPTER 2 - Capillary Zone Electrophoresis: Basic Concepts*, in *Practical Capillary Electrophoresis (Second Edition)*, R. Weinberger, Editor. 2000, Academic Press: San Diego. p. 25-71.
64. Yang, Z., et al., *Use of different buffers for detection and separation in determination of physio-active components in oolong tea infusion by CZE with amperometric detection.* J Sep Sci, 2010. **33**(9): p. 1312-8.
65. Ribeiro, M., et al., *Rapid method for simultaneous determination of ascorbic acid and zinc in effervescent tablets by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection.* J Sep Sci, 2019. **42**(3): p. 754-759.
66. Herrero-Martinez, J.M., et al., *Determination of L-ascorbic acid and total ascorbic acid in vascular and nonvascular plants by capillary zone electrophoresis.* Anal Biochem, 1998. **265**(2): p. 275-81.
67. Galiana-Balaguer, L., et al., *Determination of L-ascorbic acid in Lycopersicon fruits by capillary zone electrophoresis.* Anal Biochem, 2001. **296**(2): p. 218-24.
68. Gorbatsova, J., et al., *Comparison of the contents of various antioxidants of sea buckthorn berries using CE.* Electrophoresis, 2007. **28**(22): p. 4136-42.
69. Liao, T., et al., *Quantification ofL-ascorbic acid and total ascorbic acid in fruits and spinach by capillary zone electrophoresis.* Electrophoresis, 2001. **22**(8): p. 1484-1488.
70. Zinellu, A., et al., *Sodium glycylglycine as effective electrolyte run buffer for ascorbic and uric acid separation by CZE: a comparison with two other CE assays.* J Sep Sci, 2005. **28**(16): p. 2193-9.
71. Neuberger, S., et al., *Quantification of ascorbic acid and acetylsalicylic acid in effervescent tablets by CZE-UV and identification of related degradation products by heart-cut CZE-CZE-MS.* Anal Bioanal Chem, 2016. **408**(30): p. 8701-8712.
72. Chiari, M., et al., *Determination of total vitamin C in fruits by capillary zone electrophoresis.* Journal of Chromatography A, 1993. **645**(1): p. 197-200.
73. Novakova, L., et al., *Hydrophilic interaction liquid chromatography method for the determination of ascorbic acid.* J Sep Sci, 2008. **31**(9): p. 1634-44.

74. Novakova, L., D. Solichova, and P. Solich, *Hydrophilic interaction liquid chromatography--charged aerosol detection as a straightforward solution for simultaneous analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid.* J Chromatogr A, 2009. **1216**(21): p. 4574-81.
75. Corvis, Y., et al., *The role of stearic acid in ascorbic acid protection from degradation: a heterogeneous system for homogeneous thermodynamic data.* New Journal of Chemistry, 2013. **37**(3).
76. Maia, A.M., et al., *Validation of HPLC stability-indicating method for Vitamin C in semisolid pharmaceutical/cosmetic preparations with glutathione and sodium metabisulfite, as antioxidants.* Talanta, 2007. **71**(2): p. 639-43.
77. *Monographie de l'acide ascorbique* in *Pharmacopée Européenne 10.0*.
78. Hassan, S.A., et al., *Development and validation of HPLC and CE methods for simultaneous determination of amlodipine and atorvastatin in the presence of their acidic degradation products in tablets.* Acta Pharm, 2016. **66**(4): p. 479-490.
79. Mufusama, J.-P., et al., *Capillary zone electrophoresis for the determination of amodiaquine and three of its synthetic impurities in pharmaceutical formulations.* Electrophoresis, 2018. **39**(20): p. 2530-2539.
80. Legrand, P., et al., *Comprehensive and quantitative stability study of ascorbic acid using capillary zone electrophoresis with ultraviolet detection and high-resolution tandem mass spectrometry.* J Sep Sci, 2020. **43**(14): p. 2925-2935.
81. Barraud-Lange, V., et al., *Cyclic QDE peptide increases fertilization rates and provides healthy pups in mouse.* Fertil Steril, 2009. **91**(5 Suppl): p. 2110-5.
82. Wolfsberg, T.G., et al., *ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain.* Dev Biol, 1995. **169**(1): p. 378-83.
83. Wolfsberg, T.G., et al., *ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions.* J Cell Biol, 1995. **131**(2): p. 275-8.
84. Primakoff, P., H. Hyatt, and J. Tredick-Kline, *Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion.* J Cell Biol, 1987. **104**(1): p. 141-9.
85. Almeida, E.A.C., et al., *Mouse egg integrin α6β1functions as a sperm receptor.* Cell, 1995. **81**(7): p. 1095-1104.
86. Bigler, D., et al., *Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 2 (fertilin beta) and murine eggs. Role of the alpha(6) integrin subunit.* J Biol Chem, 2000. **275**(16): p. 11576-84.
87. Pyluck, A., et al., *ECD peptides inhibit in vitro fertilization in mice.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1997. **7**(8): p. 1053-1058.
88. Zhu, X., N.P. Bansal, and J.P. Evans, *Identification of key functional amino acids of the mouse fertilin beta (ADAM2) disintegrin loop for cell-cell adhesion during fertilization.* J Biol Chem, 2000. **275**(11): p. 7677-83.
89. Cho, C., et al., *Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta.* Science, 1998. **281**(5384): p. 1857-9.
90. Ziyyat, A., et al., *Cyclic FEE peptide increases human gamete fusion and potentiates its RGD-induced inhibition.* Hum Reprod, 2005. **20**(12): p. 3452-8.
91. Gupta, S., H. Li, and N.S. Sampson, *Characterization of fertilinβ-disintegrin binding specificity in sperm–egg adhesion.* Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2000. **8**(4): p. 723-729.
92. Evans, J.P., R.M. Schultz, and G.S. Kopf, *Mouse sperm-egg plasma membrane interactions: analysis of roles of egg integrins and the mouse sperm homologue of PH-30 (fertilin) beta.* Journal of Cell Science, 1995. **108**(10): p. 3267-3278.
93. Wu, L.C., et al., *Building parity between brand and generic peptide products: Regulatory and scientific considerations for quality of synthetic peptides.* Int J Pharm, 2017. **518**(1-2): p. 320-334.

94. Fourgeaud, M. *Analyse de la pureté et de la stabilité d'un peptide d'intérêt thérapeutique*. 2011.
95. Rotival, R., et al., *Comprehensive determination of the cyclic FEE peptide chemical stability in solution.* J Pharm Biomed Anal, 2014. **89**: p. 50-5.
96. D'Addio, S.M., et al., *New and Evolving Techniques for the Characterization of Peptide Therapeutics.* J Pharm Sci, 2016. **105**(10): p. 2989-3006.
97. *Remicade - Résumé des caractéristiques du produit*.
98. Tracey, D., et al., *Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review.* Pharmacol Ther, 2008. **117**(2): p. 244-79.
99. Kaymakcalan, Z., et al., *Comparisons of affinities, avidities, and complement activation of adalimumab, infliximab, and etanercept in binding to soluble and membrane tumor necrosis factor.* Clin Immunol, 2009. **131**(2): p. 308-16.
100. Szondy, Z. and A. Pallai, *Transmembrane TNF-alpha reverse signaling leading to TGF-beta production is selectively activated by TNF targeting molecules: Therapeutic implications.* Pharmacol Res, 2017. **115**: p. 124-132.
101. Magdelaine-Beuzelin, C., M. Ohresser, and H. Watier, *[Neonatal Fc receptor, key control of immunoglobulins biodistribution].* Med Sci (Paris), 2009. **25**(12): p. 1053-6.
102. Mitoma, H., et al., *Molecular mechanisms of action of anti-TNF-alpha agents - Comparison among therapeutic TNF-alpha antagonists.* Cytokine, 2018. **101**: p. 56-63.
103. Beck, A. and H. Liu, *Macro- and Micro-Heterogeneity of Natural and Recombinant IgG Antibodies.* Antibodies (Basel), 2019. **8**(1).
104. Pisupati, K., *Stability and structural analysis of hGH and infliximab for controlled release depots and biosimilars*. 2016, University of Michigan.
105. Le Basle, Y., et al., *Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review.* J Pharm Sci, 2020. **109**(1): p. 169-190.
106. Roberts, C.J., *Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control.* Trends Biotechnol, 2014. **32**(7): p. 372-80.
107. Singh, S.K., *Impact of product-related factors on immunogenicity of biotherapeutics.* J Pharm Sci, 2011. **100**(2): p. 354-87.
108. Rosenberg, A.S., *Effects of protein aggregates: an immunologic perspective.* AAPS J, 2006. **8**(3): p. E501-7.
109. Wang, W., et al., *Impact of methionine oxidation in human IgG1 Fc on serum half-life of monoclonal antibodies.* Mol Immunol, 2011. **48**(6-7): p. 860-6.
110. Folzer, E., et al., *Selective Oxidation of Methionine and Tryptophan Residues in a Therapeutic IgG1 Molecule.* J Pharm Sci, 2015. **104**(9): p. 2824-31.
111. Evans, A.R., et al., *Using bispecific antibodies in forced degradation studies to analyze the structure-function relationships of symmetrically and asymmetrically modified antibodies.* MAbs, 2019. **11**(6): p. 1101-1112.
112. Pisupati, K., et al., *Biosimilarity under stress: A forced degradation study of Remicade(R) and Remsima.* MAbs, 2017. **9**(7): p. 1197-1209.
113. Filipe, V., et al., *Analytical approaches to assess the degradation of therapeutic proteins.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2013. **49**: p. 118-125.
114. Fekete, S., et al., *Analytical strategies for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2013. **42**: p. 74-83.
115. Gahoual, R., et al., *Cutting-edge capillary electrophoresis characterization of monoclonal antibodies and related products.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016. **1032**: p. 61-78.
116. Jung, S.K., et al., *Physicochemical characterization of Remsima.* MAbs, 2014. **6**(5): p. 1163-77.
117. Fekete, S., et al., *Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates.* J Pharm Biomed Anal, 2014. **101**: p. 161-73.
118. Philo, J.S., *A critical review of methods for size characterization of non-particulate protein aggregates.* Curr Pharm Biotechnol, 2009. **10**(4): p. 359-72.

119. Berkowitz, S.A., *Role of analytical ultracentrifugation in assessing the aggregation of protein biopharmaceuticals.* AAPS J, 2006. **8**(3): p. E590-605.
120. Cao, S., J. Pollastrini, and Y. Jiang, *Separation and characterization of protein aggregates and particles by field flow fractionation.* Curr Pharm Biotechnol, 2009. **10**(4): p. 382-90.
121. Bhirde, A., et al., *High Performance Size Exclusion Chromatography and High-Throughput Dynamic Light Scattering as Orthogonal Methods to Screen for Aggregation and Stability of Monoclonal Antibody Drug Products.* J Pharm Sci, 2020. **109**(11): p. 3330-3339.
122. Padmanaban., A. and S. Menon., *Comparison of HPLC method and a quick method developed using the Cary 60 UV-Vis.* Application note Agilent.
123. Bansal, R., S. Gupta, and A.S. Rathore, *Analytical Platform for Monitoring Aggregation of Monoclonal Antibody Therapeutics.* Pharm Res, 2019. **36**(11): p. 152.
124. Tokhadze, N., et al., *Stability of infliximab solutions in different temperature and dilution conditions.* J Pharm Biomed Anal, 2018. **150**: p. 386-395.
125. Hermosilla, J., et al., *Comparative Stability Studies of Different Infliximab and Biosimilar CT-P13 Clinical Solutions by Combined Use of Physicochemical Analytical Techniques and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).* BioDrugs, 2019. **33**(2): p. 193-205.
126. Young, B.L., et al., *Evaluation of the physicochemical and functional stability of diluted REMSIMA(R) upon extended storage--A study compliant with NHS (UK) guidance.* Int J Pharm, 2015. **496**(2): p. 421-31.
127. Beer, P.M., et al., *Infliximab stability after reconstitution, dilution, and storage under refrigeration.* Retina, 2010. **30**(1): p. 81-4.
128. Ikeda, R., et al., *Stability of infliximab in polyvinyl chloride bags.* Am J Health Syst Pharm, 2012. **69**(17): p. 1509-12.
129. Martinez-Ortega, A., et al., *Validated reverse phase HPLC diode array method for the quantification of intact bevacizumab, infliximab and trastuzumab for long-term stability study.* Int J Biol Macromol, 2018. **116**: p. 993-1003.
130. Hernandez-Jimenez, J., et al., *Study of aggregation in therapeutic monoclonal antibodies subjected to stress and long-term stability tests by analyzing size exclusion liquid chromatographic profiles.* Int J Biol Macromol, 2018. **118**(Pt A): p. 511-524.
131. Vieillard, V., et al., *One-month stability study of a biosimilar of infliximab (Remsima((R))) after dilution and storage at 4 degrees C and 25 degrees C.* Ann Pharm Fr, 2017. **75**(1): p. 17-29.
132. Kim, J., et al., *Evaluation of the physicochemical and biological stability of reconstituted and diluted SB2 (infliximab).* Eur J Hosp Pharm, 2018. **25**(3): p. 157-164.
133. Vimpolsek, M., M. Gottar-Guillier, and E. Rossy, *Assessing the Extended In-Use Stability of the Infliximab Biosimilar PF-06438179/GP1111 Following Preparation for Intravenous Infusion.* Drugs R D, 2019. **19**(2): p. 127-140.
134. Tiselius, A., *The moving boundary method of studying the electrophoresis of proteins*. 1930.
135. Jorgenson, J. and K. Lukacs, *Capillary zone electrophoresis.* Science, 1983. **222**(4621): p. 266-272.
136. Jorgenson, J.W. and K.D. Lukacs, *Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries.* Analytical Chemistry, 1981. **53**(8): p. 1298-1302.
137. Holland, L.A., et al., *Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis.* Pharm Res, 1997. **14**(4): p. 372-87.
138. Blatný, P. and F. Kvasnicka, *Application of capillary isotachophoresis and capillary zone electrophoresis to the determination of inorganic ions in food and feed samples.* J Chromatogr A, 1999. **834**(1-2): p. 419-31.
139. Scriba, G.K., H. Harnisch, and Q. Zhu, *Enantiomer Separations by Capillary Electrophoresis.* Methods Mol Biol, 2016. **1483**: p. 277-99.
140. Hirayama, A., et al., *Amino Acid Analysis by Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry.* Methods Mol Biol, 2019. **2030**: p. 307-313.
141. Domínguez-Vega, E., R. Haselberg, and G.W. Somsen, *Capillary Zone Electrophoresis-Mass Spectrometry of Intact Proteins.* Methods Mol Biol, 2016. **1466**: p. 25-41.

142. Righetti, P.G., R. Sebastiano, and A. Citterio, *Capillary electrophoresis and isoelectric focusing in peptide and protein analysis.* Proteomics, 2013. **13**(2): p. 325-40.
143. Mantovani, V., et al., *Recent advances in capillary electrophoresis separation of monosaccharides, oligosaccharides, and polysaccharides.* Electrophoresis, 2018. **39**(1): p. 179-189.
144. Hagège., A. and T.N.S. Huynh., *Electrophorèse capillaire - appareillage.* Techniques de l'ingénieur, 2013.
145. Hayes, M.A., I. Kheterpal, and A.G. Ewing, *Effects of buffer pH on electroosmotic flow control by an applied radial voltage for capillary zone electrophoresis.* Anal Chem, 1993. **65**(1): p. 27-31.
146. Taverna., M., I.L. Potier., and P. Morin., *Electrophorèse capillaire - Principe.* Techniques de l'ingénieur, 2003.
147. Vancoillie, G., M. Vergaelen, and R. Hoogenboom, *Ultra-high performance size-exclusion chromatography in polar solvents.* J Chromatogr A, 2016. **1478**: p. 43-49.
148. Grabielle-Madelmont, C., S. Lesieur, and M. Ollivon, *Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography.* Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2003. **56**(1-3): p. 189-217.
149. Hong, P., S. Koza, and E.S. Bouvier, *Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates.* J Liq Chromatogr Relat Technol, 2012. **35**(20): p. 2923-2950.
150. Giddings, J.C., *A New Separation Concept Based on a Coupling of Concentration and Flow Nonuniformities.* Separation Science, 1966. **1**(1): p. 123-125.
151. Wahlund, K.G. and J.C. Giddings, *Properties of an asymmetrical flow field-flow fractionation channel having one permeable wall.* Anal Chem, 1987. **59**(9): p. 1332-9.
152. Chen, X., et al., *Applications of asymmetrical flow field-flow fractionation for separation and characterization of polysaccharides: A review.* J Chromatogr A, 2021. **1635**: p. 461726.
153. Fraunhofer, W. and G. Winter, *The use of asymmetrical flow field-flow fractionation in pharmaceutics and biopharmaceutics.* Eur J Pharm Biopharm, 2004. **58**(2): p. 369-83.
154. Roda, B., et al., *Field-flow fractionation in bioanalysis: A review of recent trends.* Anal Chim Acta, 2009. **635**(2): p. 132-43.
155. Litzen, A., et al., *Separation and quantitation of monoclonal antibody aggregates by asymmetrical flow field-flow fractionation and comparison to gel permeation chromatography.* Anal Biochem, 1993. **212**(2): p. 469-80.
156. Ashby, J., et al., *Probing and quantifying DNA-protein interactions with asymmetrical flow field-flow fractionation.* J Chromatogr A, 2014. **1358**: p. 217-24.
157. Moon, M.H., *Flow field-flow fractionation: Recent applications for lipidomic and proteomic analysis.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2019. **118**: p. 19-28.
158. Wagner, M., et al., *Asymmetric flow field-flow fractionation in the field of nanomedicine.* Anal Chem, 2014. **86**(11): p. 5201-10.
159. Wyatt, P.J., *Differential light scattering and the measurement of molecules and nanoparticles: A review.* Anal Chim Acta X, 2021. **7-8**: p. 100070.
160. Stetefeld, J., S.A. McKenna, and T.R. Patel, *Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences.* Biophys Rev, 2016. **8**(4): p. 409-427.
161. Zimm, B.H., *The Scattering of Light and the Radial Distribution Function of High Polymer Solutions.* The Journal of Chemical Physics, 1948. **16**(12): p. 1093-1099.
162. Ivanov, A.R., et al., *Direct determination of amino acids and carbohydrates by high-performance capillary electrophoresis with refractometric detection.* Journal of Chromatography A, 2000. **894**(1-2): p. 253-257.
163. Lee, K.W., C.J. Porter, and B.J. Boyd, *A simple quantitative approach for the determination of long and medium chain lipids in bio-relevant matrices by high performance liquid chromatography with refractive index detection.* AAPS PharmSciTech, 2013. **14**(3): p. 927-34.

164. Raman, C.V. and K.S. Krishnan, *A New Type of Secondary Radiation.* Nature, 1928. **121**(3048): p. 501-502.
165. Rygula, A., et al., *Raman spectroscopy of proteins: a review.* Journal of Raman Spectroscopy, 2013. **44**(8): p. 1061-1076.
166. Johnson, W.C., Jr., *Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy.* Annu Rev Biophys Biophys Chem, 1988. **17**: p. 145-66.
167. *https://scienceaid.net/Understand_Circular_Dichroism* 2021.
168. Mendonca, L., *Dynamique conformationnelle des protéines étudiée par dichroïsme circulaire résolu en temps*. 2013, Ecole Polytechnique X.
169. Hirst, J.D., K. Colella, and A.T.B. Gilbert, *Electronic Circular Dichroism of Proteins from First-Principles Calculations.* The Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107**(42): p. 11813-11819.
170. Dodero, V.I., Z.B. Quirolo, and M.A. Sequeira, *Biomolecular studies by circular dichroism.* Front Biosci (Landmark Ed), 2011. **16**: p. 61-73.
171. Perczel, A. and G.D. Fasman, *Quantitative analysis of cyclic beta-turn models.* Protein Sci, 1992. **1**(3): p. 378-95.
172. Taylor, G., *Disintegration of water drops in an electric field.* Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences, 1964. **280**(1382): p. 383-397.
173. Rayleigh, L., *XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity.* The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science, 1882. **14**(87): p. 184-186.
174. Kebarle, P. and L. Tang, *From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry.* Analytical Chemistry, 1993. **65**(22): p. 972A-986A.
175. Kebarle, P., *A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry.* Journal of Mass Spectrometry, 2000. **35**(7): p. 804-817.
176. Dole, M., et al., *Molecular Beams of Macroions.* The Journal of Chemical Physics, 1968. **49**(5): p. 2240-2249.
177. Schmelzeisen-Redeker, G., L. Bütfering, and F.W. Röllgen, *Desolvation of ions and molecules in thermospray mass spectrometry.* International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1989. **90**(2): p. 139-150.
178. Thomson, B.A. and J.V. Iribarne, *Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure.* The Journal of Chemical Physics, 1979. **71**(11): p. 4451-4463.
179. Ayoub, D., et al., *Correct primary structure assessment and extensive glyco-profiling of cetuximab by a combination of intact, middle-up, middle-down and bottom-up ESI and MALDI mass spectrometry techniques.* MAbs, 2013. **5**(5): p. 699-710.
180. Trenerry, V.C., *The application of capillary electrophoresis to the analysis of vitamins in food and beverages.* Electrophoresis, 2001. **22**(8): p. 1468-1478.
181. Szultka, M., et al., *Determination of ascorbic acid and its degradation products by high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry.* Electrophoresis, 2014. **35**(4): p. 585-92.
182. Van Bree, I., et al., *Modelling the degradation kinetics of vitamin C in fruit juice in relation to the initial headspace oxygen concentration.* Food Chemistry, 2012. **134**(1): p. 207-214.
183. Buettner, G.R. and B.A. Jurkiewicz, *Catalytic Metals, Ascorbate and Free Radicals: Combinations to Avoid.* Radiation Research, 1996. **145**(5).
184. Kang, S.-O., H. Sapper, and W. Lohmann, *The Oxidative Degradation of ʟ-Ascorbic Acid via an α-Ketoaldehyde.* Zeitschrift für Naturforschung C, 1982. **37**(11-12): p. 1064-1069.
185. Trommer, H., et al., *Role of ascorbic acid in stratum corneum lipid models exposed to UV irradiation.* Pharm Res, 2002. **19**(7): p. 982-90.
186. Wabaidur, S.M., Z.A. Alothman, and M.R. Khan, *A rapid method for the simultaneous determination of L-ascorbic acid and acetylsalicylic acid in aspirin C effervescent tablet by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2013. **108**: p. 20-5.

187. Baenas, N., et al., *New UHPLC-QqQ-MS/MS Method for the Rapid and Sensitive Analysis of Ascorbic and Dehydroascorbic Acids in Plant Foods.* Molecules, 2019. **24**(8).
188. Harmonisation, I.C.f., *Guideline Q3B(R2) Impurities in new drug products*. 2006.
189. Nkhili, E. and P. Brat, *Reexamination of the ORAC assay: effect of metal ions.* Anal Bioanal Chem, 2011. **400**(5): p. 1451-8.
190. Ogiri, Y., et al., *Very low vitamin C activity of orally administered L-dehydroascorbic acid.* J Agric Food Chem, 2002. **50**(1): p. 227-9.
191. Williams, H., *Predictive Stability Testing Utilizing Accelerated Stability Assessment Program (ASAP) Studies*, in *Methods for Stability Testing of Pharmaceuticals*. 2018. p. 213-232.
192. Awasthi, S.K., et al., *Solvent-induced ?-hairpin to helix conformational transition in a designed peptide.* Biopolymers, 2001. **58**(5): p. 465-476.
193. Hernandez, B., et al., *Secondary conformation of short lysine- and leucine-rich peptides assessed by optical spectroscopies: effect of chain length, concentration, solvent, and time.* Biopolymers, 2006. **81**(1): p. 8-19.
194. Guiffo-Soh, G., et al., *Vibrational analysis of amino acids and short peptides in hydrated media. 3. Successive KL repeats induce highly stable beta-strands capable of forming non-H-bonded aggregates.* J Phys Chem B, 2008. **112**(4): p. 1282-9.
195. Hernandez, B., et al., *Vibrational analysis of amino acids and short peptides in aqueous media. V. The effect of the disulfide bridge on the structural features of the peptide hormone somatostatin-14.* J Phys Chem B, 2009. **113**(38): p. 12796-803.
196. Guiffo-Soh, G., et al., *Vibrational analysis of amino acids and short peptides in hydrated media. II. Role of KLLL repeats to induce helical conformations in minimalist LK-peptides.* J Phys Chem B, 2007. **111**(43): p. 12563-72.
197. Hernandez, B., et al., *Octreotide used for probing the type-II' beta-turn CD and Raman markers.* J Phys Chem B, 2012. **116**(31): p. 9337-45.
198. Hernandez, B., et al., *Low concentration structural dynamics of lanreotide and somatostatin-14.* Biopolymers, 2014. **101**(10): p. 1019-28.
199. Kelly, S.M. and N.C. Price, *The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function.* Curr Protein Pept Sci, 2000. **1**(4): p. 349-84.
200. Gibbs, A.C., et al., *Probing the structural determinants of type II' beta-turn formation in peptides and proteins.* J Am Chem Soc, 2002. **124**(7): p. 1203-13.
201. Hernández, B., et al., *Disulfide linkage Raman markers: a reconsideration attempt.* Journal of Raman Spectroscopy, 2014. **45**(8): p. 657-664.
202. Hernandez, B., et al., *From bulk to plasmonic nanoparticle surfaces: the behavior of two potent therapeutic peptides, octreotide and pasireotide.* Phys Chem Chem Phys, 2016. **18**(35): p. 24437-50.
203. Hernandez, B., et al., *Privileged hydration sites in aromatic side chains: effect on conformational equilibrium.* Phys Chem Chem Phys, 2017. **19**(42): p. 28684-28695.
204. Sibanda, B.L. and J.M. Thornton, *Beta-hairpin families in globular proteins.* Nature, 1985. **316**(6024): p. 170-4.
205. Das, C., et al., *Designed ?-hairpin peptides with defined tight turn stereochemistry.* Biopolymers, 2001. **58**(3): p. 335-346.
206. Pohl, E., et al., *Structure of octreotide, a somatostatin analogue.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1995. **51**(Pt 1): p. 48-59.
207. Melacini, G., Q. Zhu, and M. Goodman, *Multiconformational NMR analysis of sandostatin (octreotide): equilibrium between beta-sheet and partially helical structures.* Biochemistry, 1997. **36**(6): p. 1233-41.
208. Hernandez, B., et al., *Dynamical Behavior of Somatostatin-14 and Its Cyclic Analogues as Analyzed in Bulk and on Plasmonic Silver Nanoparticles.* Adv Protein Chem Struct Biol, 2018. **112**: p. 81-121.
209. Schmidt, B., L. Ho, and P.J. Hogg, *Allosteric disulfide bonds.* Biochemistry, 2006. **45**(24): p. 7429-33.

210. Vale, W., et al., *Culture of enzymatically dispersed pituitary cells: functional validation of a method.* Endocrinology, 1972. **91**(2): p. 562-72.
211. Hallenga, K., et al., *The conformational properties of some fragments of the peptide hormone somatostatin.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure, 1979. **577**(1): p. 82-101.
212. Knappenberg, M., et al., *The conformational properties of somatostatin IV. The conformers contributing to the conformational equilibrium of somatostatin in aqueous solution as found by semi-empirical energy calculations and high-resolution NMR experiments.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1982. **700**(2): p. 229-246.
213. Weckbecker, G., et al., *Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects.* Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(12): p. 999-1017.
214. Bruns, C., et al., *SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile.* Eur J Endocrinol, 2002. **146**(5): p. 707-16.
215. Marshall, G.R., *Three-dimensional structure of peptide—protein complexes: implications for recognition.* Current Opinion in Structural Biology, 1992. **2**(6): p. 904-919.
216. Li, H. and R. Borjas, *ASAP Applications in Clinical Development: Prediction of Degradation and Dissolution Performance*, in *Accelerated Predictive Stability*. 2018. p. 369-382.
217. Waterman, R., J. Lewis, and K.C. Waterman, *Accelerated Stability Modeling for Peptides: a Case Study with Bacitracin.* AAPS PharmSciTech, 2017. **18**(5): p. 1692-1698.
218. Scrivens, G., M. Ticehurst, and J.T. Swanson, *Strategies for Improving the Reliability of Accelerated Predictive Stability (APS) Studies*, in *Accelerated Predictive Stability*. 2018. p. 175-206.
219. *Protein Toolkit*. Available from: http://db.systemsbiology.net:8080/proteomicsToolkit/FragIonServlet.html.
220. *RCSB protein data bank*.
221. Lerch, T.F., et al., *Infliximab crystal structures reveal insights into self-association.* MAbs, 2017. **9**(5): p. 874-883.
222. Martín., S.M., et al., *Comparability study for the determination of post-translational modifications of infliximab innovator and biosimilars by automated high-throughput peptide mapping analysis.* Thermoscientific application note 21849.
223. Giorgetti, J., et al., *Combination of intact, middle-up and bottom-up levels to characterize 7 therapeutic monoclonal antibodies by capillary electrophoresis - Mass spectrometry.* J Pharm Biomed Anal, 2020. **182**: p. 113107.
224. Liu, H., et al., *Peptide mapping with liquid chromatography using a basic mobile phase.* J Chromatogr A, 2008. **1210**(1): p. 76-83.
225. Pisupati, K., et al., *A Multidimensional Analytical Comparison of Remicade and the Biosimilar Remsima.* Anal Chem, 2017. **89**(9): p. 4838-4846.
226. Kawasue, S., et al., *Assessment method for deamidation in proteins using carboxylic acid derivatization-liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* J Pharm Biomed Anal, 2020. **181**: p. 113095.
227. Yan, Q., et al., *Structure Based Prediction of Asparagine Deamidation Propensity in Monoclonal Antibodies.* MAbs, 2018. **10**(6): p. 901-912.
228. *Flixabi, Assessment Report EMA/CHMP/272283/2016, https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/flixabi-epar-public-assessment-report_en.pdf*.
229. *Remsima, Assessment Report EMA/CHMP/589317/2013, https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/remsima-epar-public-assessment-report_en-0.pdf*.
230. Dyck, Y.F.K., et al., *Forced Degradation Testing as Complementary Tool for Biosimilarity Assessment.* Bioengineering (Basel), 2019. **6**(3).

231. Jacobitz, A.W., et al., *Tryptophan Oxidation of a Monoclonal Antibody Under Diverse Oxidative Stress Conditions: Distinct Oxidative Pathways Favor Specific Tryptophan Residues.* J Pharm Sci, 2021. **110**(2): p. 719-726.
232. Pavon, J.A., et al., *Selective Tryptophan Oxidation of Monoclonal Antibodies: Oxidative Stress and Modeling Prediction.* Anal Chem, 2019. **91**(3): p. 2192-2200.
233. Shah, D.D., et al., *Effect of Peroxide- Versus Alkoxyl-Induced Chemical Oxidation on the Structure, Stability, Aggregation, and Function of a Therapeutic Monoclonal Antibody.* J Pharm Sci, 2018. **107**(11): p. 2789-2803.
234. Stracke, J., et al., *A novel approach to investigate the effect of methionine oxidation on pharmacokinetic properties of therapeutic antibodies.* mAbs, 2014. **6**(5): p. 1229-1242.
235. Gahoual, R., et al., *Detailed Characterization of Monoclonal Antibody Receptor Interaction Using Affinity Liquid Chromatography Hyphenated to Native Mass Spectrometry.* Anal Chem, 2017. **89**(10): p. 5404-5412.
236. Liu, D., et al., *Structure and stability changes of human IgG1 Fc as a consequence of methionine oxidation.* Biochemistry, 2008. **47**(18): p. 5088-100.
237. Liu, L., *Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins.* J Pharm Sci, 2015. **104**(6): p. 1866-1884.
238. Goyon, A., et al., *Unraveling the mysteries of modern size exclusion chromatography - the way to achieve confident characterization of therapeutic proteins.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2018. **1092**: p. 368-378.
239. Ehkirch, A., et al., *A Novel Online Four-Dimensional SECxSEC-IMxMS Methodology for Characterization of Monoclonal Antibody Size Variants.* Anal Chem, 2018. **90**(23): p. 13929-13937.
240. Luo, S., et al., *Defining the right diluent for intravenous infusion of therapeutic antibodies.* MAbs, 2020. **12**(1): p. 1685814.
241. Jaccoulet, E., et al., *Forced Degradation of Monoclonal Antibodies After Compounding: Impact on Routine Hospital Quality Control.* J Pharm Sci, 2019. **108**(10): p. 3252-3261.
242. Hawe, A., et al., *Online fluorescent dye detection method for the characterization of immunoglobulin G aggregation by size exclusion chromatography and asymmetrical flow field flow fractionation.* Analytical Biochemistry, 2008. **378**(2): p. 115-122.
243. Demeule, B., et al., *Characterization of protein aggregation: the case of a therapeutic immunoglobulin.* Biochim Biophys Acta, 2007. **1774**(1): p. 146-53.
244. Demeule, B., et al., *New methods allowing the detection of protein aggregates: a case study on trastuzumab.* MAbs, 2009. **1**(2): p. 142-50.
245. Schwaferts, C., et al., *Nanoplastic Analysis by Online Coupling of Raman Microscopy and Field-Flow Fractionation Enabled by Optical Tweezers.* Anal Chem, 2020. **92**(8): p. 5813-5820.
246. Schachermeyer, S., et al., *Impact of carrier fluid composition on recovery of nanoparticles and proteins in flow field flow fractionation.* J Chromatogr A, 2012. **1264**: p. 72-9.
247. Duchêne, C., *Etude d'agrégats d'anticorps monoclonaux sous écoulemet microfluidique*. 2018.
248. Ito, T. and K. Tsumoto, *Effects of subclass change on the structural stability of chimeric, humanized, and human antibodies under thermal stress.* Protein Sci, 2013. **22**(11): p. 1542-51.
249. Bee, J.S., et al., *Effects of surfaces and leachables on the stability of biopharmaceuticals.* J Pharm Sci, 2011. **100**(10): p. 4158-70.
250. Kumru, O.S., et al., *Compatibility, physical stability, and characterization of an IgG4 monoclonal antibody after dilution into different intravenous administration bags.* J Pharm Sci, 2012. **101**(10): p. 3636-50.
251. Biacchi, M., et al., *Top-down and middle-down approach by fraction collection enrichment using off-line capillary electrophoresis - mass spectrometry coupling: Application to monoclonal antibody Fc/2 charge variants.* J Chromatogr A, 2017. **1498**: p. 120-127.
252. Kristoff, C.J., et al., *Challenging Bioanalyses with Capillary Electrophoresis.* Anal Chem, 2020. **92**(1): p. 49-66.

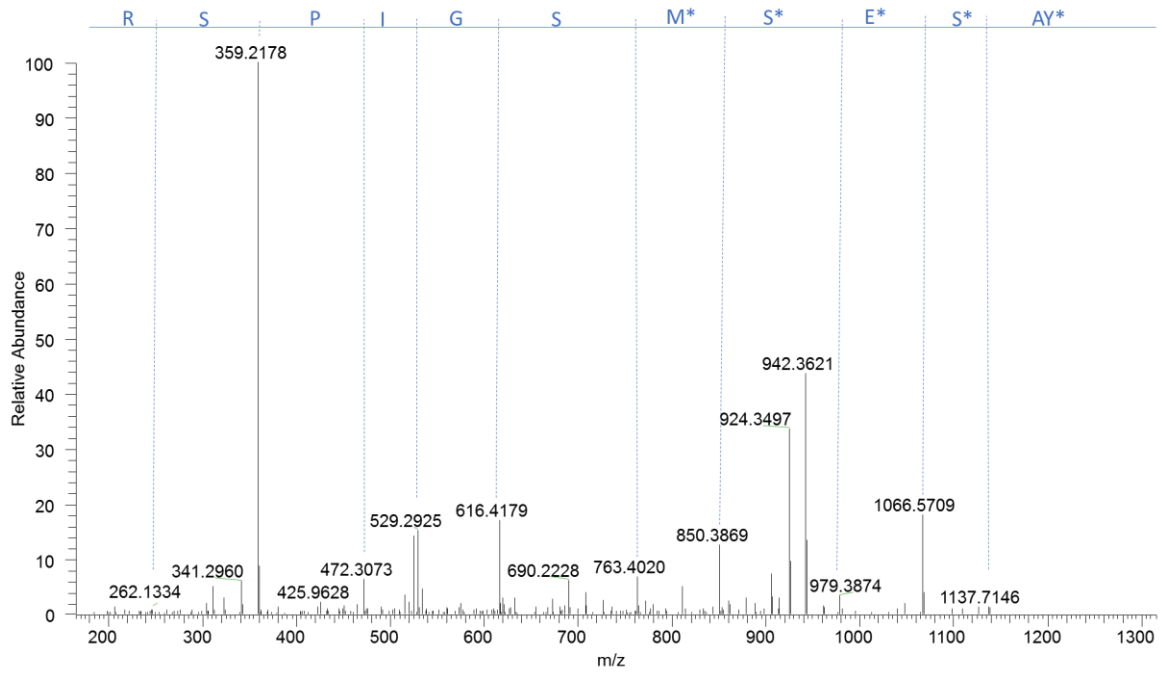
253. Kahle, J., et al., *Comparative charge-based separation study with various capillary electrophoresis (CE) modes and cation exchange chromatography (CEX) for the analysis of monoclonal antibodies.* J Pharm Biomed Anal, 2019. **174**: p. 460-470.
254. Lin, J.C., Z.K. Glover, and A. Sreedhara, *Assessing the Utility of Circular Dichroism and FTIR Spectroscopy in Monoclonal-Antibody Comparability Studies.* J Pharm Sci, 2015. **104**(12): p. 4459-4466.
255. Kong, J. and S. Yu, *Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures.* Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2007. **39**(8): p. 549-59.
256. Alharbi, O., Y. Xu, and R. Goodacre, *Simultaneous multiplexed quantification of caffeine and its major metabolites theobromine and paraxanthine using surface-enhanced Raman scattering.* Anal Bioanal Chem, 2015. **407**(27): p. 8253-61.
257. De Bleye, C., et al., *Determination of 4-aminophenol in a pharmaceutical formulation using surface enhanced Raman scattering: from development to method validation.* Talanta, 2013. **116**: p. 899-905.
258. Dowek, A., et al., *Discriminative and quantitative analysis of norepinephrine and epinephrine by surface-enhanced Raman spectroscopy with gold nanoparticle suspensions.* Anal Bioanal Chem, 2021.
259. Paul, M., et al., *Long-term physico-chemical stability of diluted trastuzumab.* Int J Pharm, 2013. **448**(1): p. 101-4.
260. Paul, M., et al., *Long-term stability of diluted solutions of the monoclonal antibody rituximab.* Int J Pharm, 2012. **436**(1-2): p. 282-90.
261. McAvan, B.S., et al., *Raman Spectroscopy to Monitor Post-Translational Modifications and Degradation in Monoclonal Antibody Therapeutics.* Anal Chem, 2020. **92**(15): p. 10381-10389.
262. Yin, L., et al., *Therapeutic outcomes, assessments, risk factors and mitigation efforts of immunogenicity of therapeutic protein products.* Cell Immunol, 2015. **295**(2): p. 118-26.
263. Ahmadi, M., et al., *Small amounts of sub-visible aggregates enhance the immunogenic potential of monoclonal antibody therapeutics.* Pharm Res, 2015. **32**(4): p. 1383-94.
264. Nabhan, M., M. Pallardy, and I. Turbica, *Immunogenicity of Bioproducts: Cellular Models to Evaluate the Impact of Therapeutic Antibody Aggregates.* Front Immunol, 2020. **11**: p. 725.
265. Joubert, M.K., et al., *Highly aggregated antibody therapeutics can enhance the in vitro innate and late-stage T-cell immune responses.* J Biol Chem, 2012. **287**(30): p. 25266-79.
266. Walchli, R., et al., *Accelerated Aggregation Studies of Monoclonal Antibodies: Considerations for Storage Stability.* J Pharm Sci, 2020. **109**(1): p. 595-602.
267. Vasudev, R., S. Mathew, and N. Afonina, *Characterization of submicron (0.1-1 mum) particles in therapeutic proteins by nanoparticle tracking analysis.* J Pharm Sci, 2015. **104**(5): p. 1622-31.
268. Sharma, D.K., et al., *Micro-flow imaging: flow microscopy applied to sub-visible particulate analysis in protein formulations.* AAPS J, 2010. **12**(3): p. 455-64.
269. Chadha, R. and S. Bhandari, *Drug-excipient compatibility screening--role of thermoanalytical and spectroscopic techniques.* J Pharm Biomed Anal, 2014. **87**: p. 82-97.
270. Webster, S., *Predicting Long-Term Storage Stability of Therapeutic Proteins.* Pharmaceutical Technology On-Line, 2013. **37**(11).
271. Svilenov, H.L., et al., *Orthogonal Techniques to Study the Effect of pH, Sucrose, and Arginine Salts on Monoclonal Antibody Physical Stability and Aggregation During Long-Term Storage.* J Pharm Sci, 2020. **109**(1): p. 584-594.
272. Kuzman, D., et al., *Long-term stability predictions of therapeutic monoclonal antibodies in solution using Arrhenius-based kinetics.* Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 20534.
273. Colgan, S.T., T. Mazzeo, and R. Orr, *Regulatory Expectations and Industry Practice on Stability Testing*, in *Accelerated Predictive Stability*. 2018. p. 15-32.

Annexe 1: Liste des peptides obtenus après digestion à la trypsine pour l'infliximab et paramètres associés à l'analyse en LC-MS/MS

Peptide	séquence	m/z théorique	Temps de rétention (min)	m/z expérimentale	précision (ppm)
HC01	EVK	375.2222	4.49	375.2233	2.72
HC02	LEESGGGLVQPGGSMK	1545.7562	10.66	1545.7568	0.39
HC03	LSCVASGFIFSNHWMNWVR	771.0327	18.66	771.0338	1.42
HC04	QSPEK	588.2967	4.68	588.2980	2.21
HC05	GLEWVAEIR	1072.5767	15.62	1072.5780	1.21
HC06	SK	233.1376	-	-	-
HC07	SINSATHYAESVK	1405.6838	9.18	1406.6902	0.49
HC08	GR	231.1331	-	-	-
HC09	FTISR	623.3496	9.80	623.3520	3.85
HC10	DDSK	464.1971	-	-	-
HC11	SAVYLQMTDLR	1296.6601	14.27	1296.6637	2.76
HC12	TEDTGVYYCSR	1350.5617	9.18	1350.5626	0.66
HC13	NYYGSTYDYWGQGTTLTVSSASTK	884.0680	14.38	884.0679	0.20
HC14	GPSVFPLAPSSK	1186.6451	13.75	1186.6470	1.58
HC15	STSGGTAALGCLVK	1321.6767	12.46	1321.6761	0.45
HC16	DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTK	1343.4671	18.66	1343.4651	1.48
HC17	VDK	361.2066	-	-	-
HC18	K	147.1055	-	-	-
HC19	VEPK	472.2750	4.68	472.2758	1.60
HC20	SCDK	509.2007	-	-	-
HC21	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	948.8223	16.82	948.223	0.67
HC22	DTLMISR	835.4327	10.98	835.4333	0.74
HC23	TPEVTCVVVDVSHEDPEVK	713.0123	13.21	713.010	3.31
HC24	FNWYVDGVEVHNAK	1677.8004	13.64	1677.7969	2.11
HC25	TKPR	501.3128	3.91	501.3141	2.55
HC26	EEQYNSTYR	1189.5104	n.c.	n.c.	n.c.
HC27	VVSVLTVLHQDWLNGK	1808.0049	17.82	1808.0029	1.14
HC28	EYK	439.2193	4.68	439.2182	2.29
HC29	CK	307.1441	-	-	-
HC30	VSNK	447.2546	3.99	447.2562	3.48
HC31	ALPAPIEK	838.5017	10.38	838.5026	1.01
HC32	TISK	448.2750	4.68	448.2758	1.69
HC33	AK	218.1484	-	-	-
HC34	GQPR	457.2502	4.59	457.2511	1.92
HC35	EPQVYTLPPSR	1286.6723	10.98	1286.6729	0.39
HC36	DELTK	605.3125	6.47	605.3127	0.25
HC37	NQVSLTCLVK	1161.6277	13.32	1161.6326	4.21
HC38	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	1272.5677	15.65	1272.5695	1.35
HC39	TTPPVLDSDGSFFLYSK	1873.9202	16.51	1873.9196	0.37
HC40	LTVDK	575.3383	7.33	575.3390	1.09
HC41	SR	262.1495	-	-	-
HC42	WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK	1401.1357	12.67	1401.1367	0.71
HC43	SLSLSPG	660.3547	11.71	660.3554	0.98
LC01	DILLTQSPAILSVSPGER	1896.0421	16.08	1896.0468	2.46
LC02	VSFSCR	698.3274	9.99	698.3299	3.45
LC03	ASQFVGSSIHWYQQR	1793.8702	12.78	1793.8705	0.13
LC04	TNGSPR	631.3142	4.68	631.3152	1.45
LC05	LLIK	486.3634	10.56	486.3644	1.93
LC06	YASESMSGIPSR	1284.5873	9.89	1284.5890	1.29
LC07	FSGSGSGTDFTLSINTVESEDIADYYCQQSHSWPFTFGSGTNLEVK	1014.0559	18.66	1014.0536	2.26
LC08	R	175.1195	-	-	-
LC09	TVAAPSVFIFPPSDEQLK	973.5177	16.82	973.5176	0.05
LC10	SGTASVVCLLNNFYPR	899.4518	18.25	899.452	0.22
LC11	EAK	347.1909	3.91	347.1925	4.37
LC12	VQWK	560.3175	8.77	560.3189	2.35
LC13	VDNALQSGNSQESVTEQDSK	1068.4864	8.66	1068.4868	0.33
LC14	DSTYSLSSTLTLSK	751.8834	27.32	751.884	0.80
LC15	ADYEK	625.2812	5.24	625.2811	0.24
LC16	HK	284.1702	-	-	-
LC17	VYACEVTHQGLSSPVTK	625.9810	10.21	625.9821	1.70
LC18	SFNR	523.2607	6.17	523.2614	1.16
LC19	GEC	365.1107	3.99	365.1119	3.28

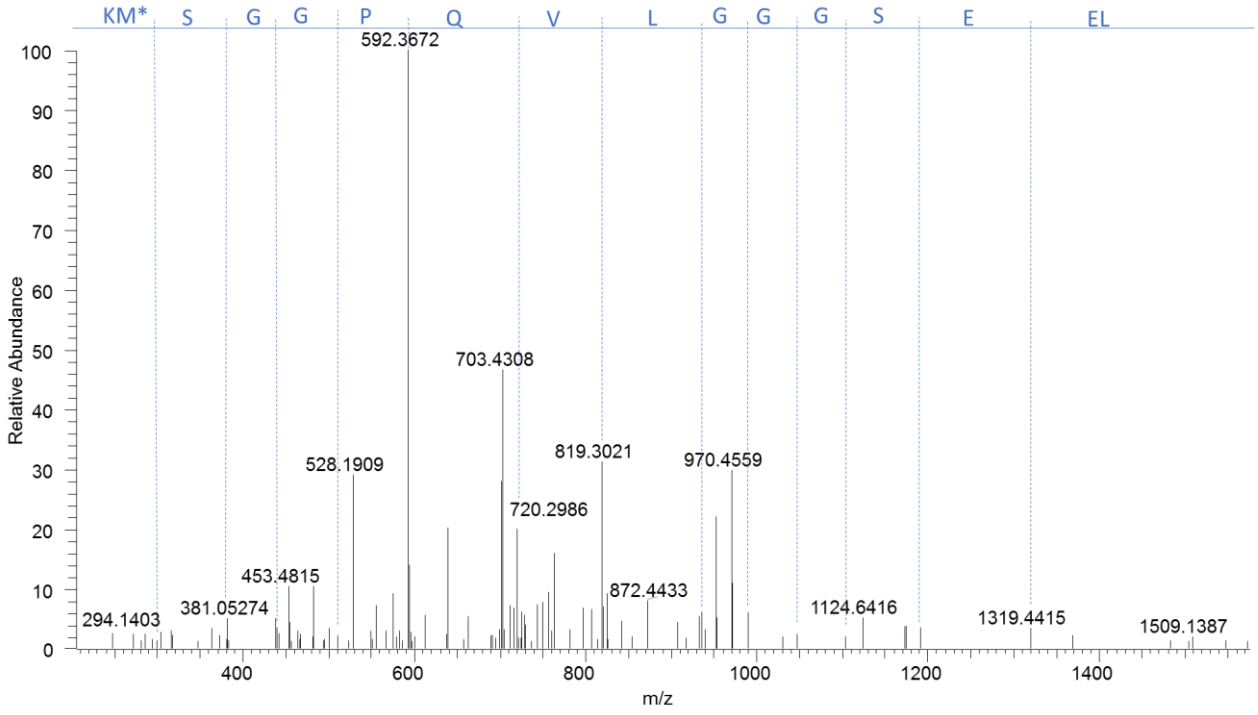
Annexe 2: Spectres de masse des peptides LC6, HC2, HC22 et HC42 porteurs d'oxydation

Peptide LC6 : YASESM$_{55}$SGIPSR



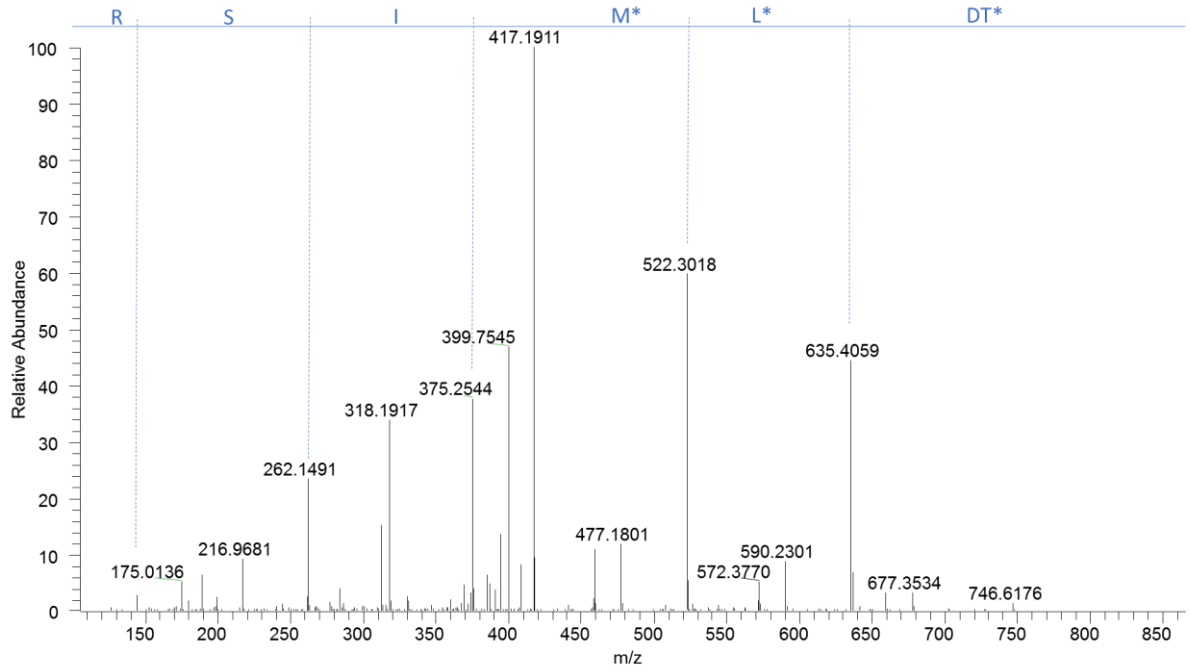
A partir de M : addition de 15,98 Da par rapport au peptide non oxydé, confirmant l'oxydation sur M55

Peptide HC2 : LEESGGGLVQPGGSM$_{18}$K



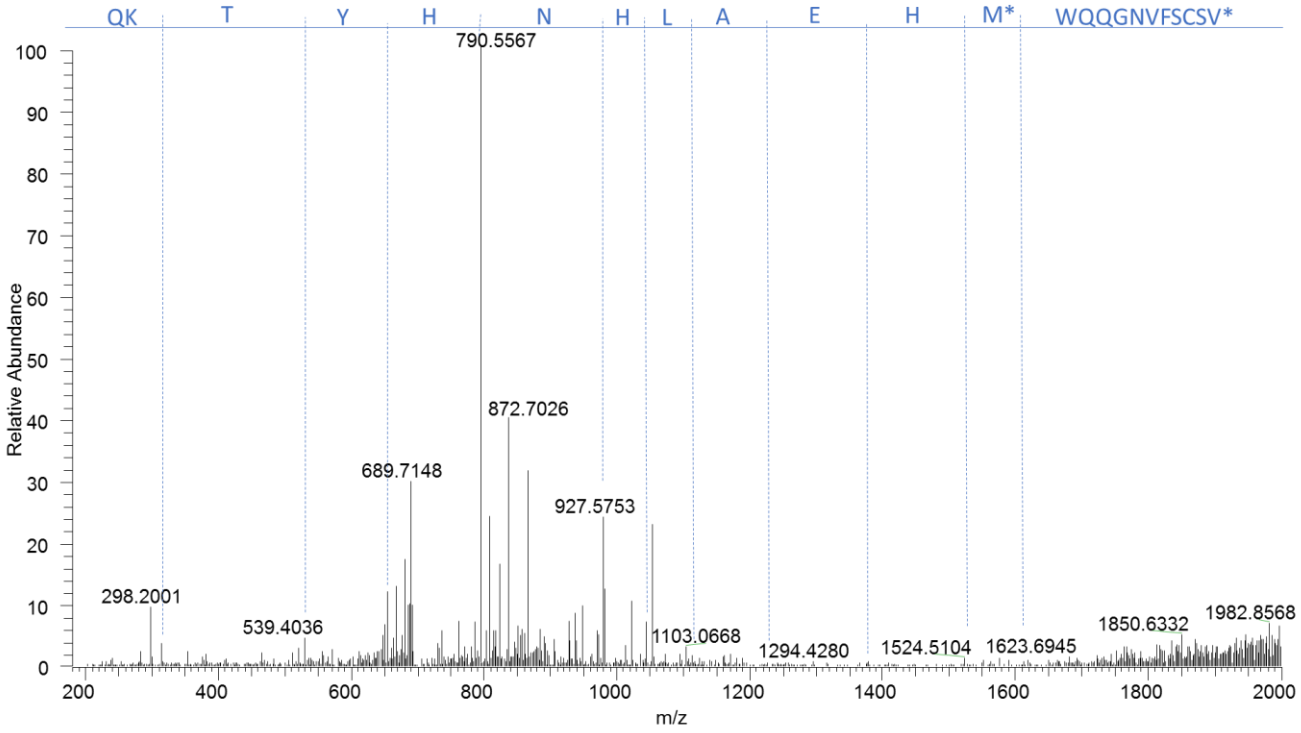
A partir de M : addition de 15,98 Da par rapport au peptide non oxydé, confirmant l'oxydation sur M18

Peptide HC22 : DTLM$_{255}$ISR



A partir de M : addition de 15,98 Da par rapport au peptide non oxydé, confirmant l'oxydation sur M255

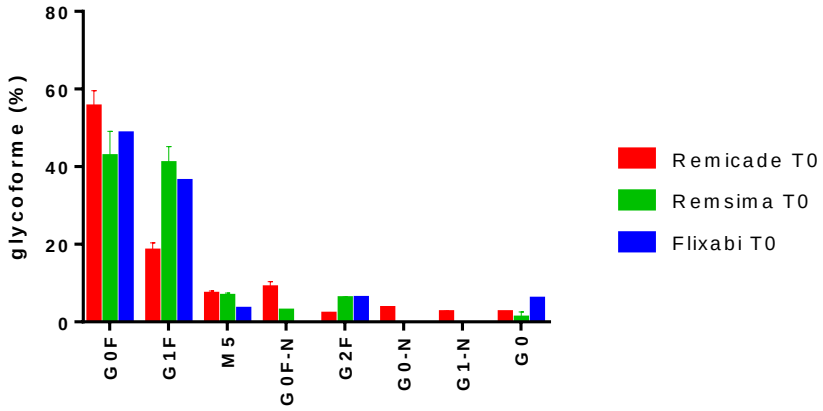
Peptide HC42 : WQQGNVFSCSVM$_{431}$HEALHNHYTQK



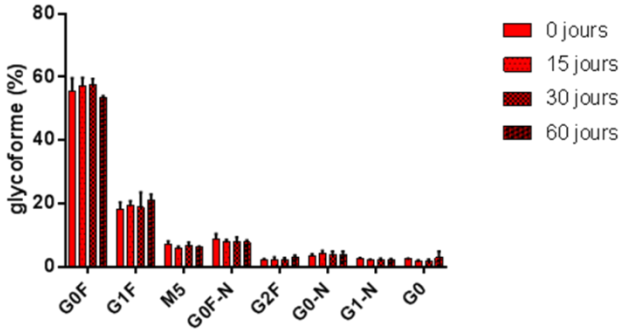
A partir de M : addition de 15,98 Da par rapport au peptide non oxydé, confirmant l'oxydation sur M431

Annexe 3 : Profil de glycosylation de l'infliximab

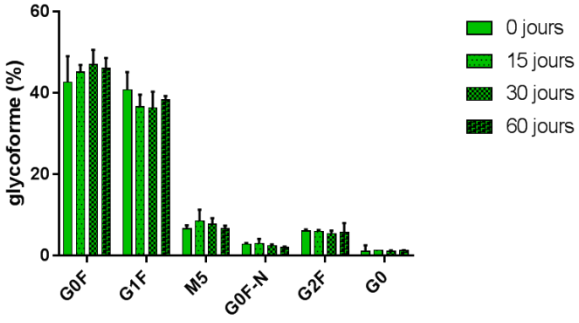
Profil de glycosylation dans les conditions initiales



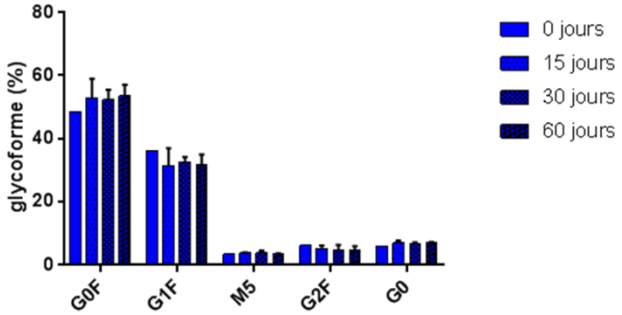
Profil de glycosylation du Remicade exposé à 40°C



Profil de glycosylation du Remsima exposé à 40°C



Profil de glycosylation du Flixabi exposé à 40°C



Développement analytique combiné à l'approche prédictive ASAP pour l'étude de la stabilité de produits pharmaceutiques chimiques et biologiques

Résumé : L'étude de la stabilité et la caractérisation des produits de dégradation (PDD) constitue un élément déterminant dans le processus d'autorisation de mise sur le marché de molécules pharmaceutiques. Ils nécessitent ainsi le développement de méthodes analytiques adaptées en fonction des propriétés physico-chimiques de la molécule. Les études effectuées au cours de ces travaux de thèse ont pour objectif le développement d'une méthodologie intégrée permettant l'évaluation et la modélisation de la stabilité à long terme de différents produits pharmaceutiques, y compris des produits biopharmaceutiques. Pour ces derniers, leur complexité de structure limite la mise en œuvre de ces approches prédictives. La méthodologie mise en œuvre lors de ces travaux se base sur 1) le choix et le développement de méthodes analytiques indicatrices de stabilité pertinentes et adaptées aux produits étudiés, 2) la modélisation de leur stabilité *via* l'approche dite *accelerated stability assessment program* (ASAP), 3) la corrélation entre les données modélisées par ASAP et expérimentales issues de l'analyse des échantillons de stabilité. Dans un premier cas, cette approche a été appliquée à l'acide ascorbique. Une méthode par électrophorèse capillaire de zone (CZE-UV) a été développée permettant la séparation et la quantification absolue simultanée de l'acide ascorbique et ses principaux PDD en moins de 10 min. De plus, cette méthode CZE-UV a permis l'identification d'un PDD majoritaire, non observé en RP-HPLC, dont la caractérisation structurale a été effectuée par spectrométrie de masse, le tri-hydroxy-keto-valeraldehyde. La modélisation ASAP a montré une parfaite adéquation entre la stabilité prédite et les données expérimentales sur trois ans. Un hexapeptide cyclique a constitué un second cas d'étude. La méthode UPLC-MS/MS mise en œuvre a permis l'analyse et l'identification des deux PDD majoritaires. L'évolution de leurs teneurs a été modélisée *via* l'approche ASAP et le modèle généré a montré une bonne adéquation entre les données expérimentales et prédites dans différentes conditions de conservation. Ces travaux de thèse ont également étudié la stabilité de l'anticorps monoclonal infliximab, par l'intermédiaire du produit de référence et deux biosimilaires approuvés pour usage thérapeutique. Une approche analytique multi-techniques a été appliquée afin de caractériser les PDD relatifs aux différents niveaux de structure de la protéine. Une méthode par UPLC-MS/MS, a été développée afin d'identifier et de déterminer le degré de déamidation et d'oxydation de plusieurs résidus d'intérêts. En parallèle, l'agrégation et la fragmentation de l'infliximab ont été évaluées de manière concomitante par SEC-UV-MALS/RI, A4F-UV-MALS/RI et DLS. Les trois types d'infliximab ont montré des niveaux relativement comparables de modifications dans les conditions initiales et lors des dégradations forcées. En simulant des conditions d'utilisation hospitalière, l'impact de la lumière, de la température et du type de poches de perfusion sur la stabilité de l'infliximab ont été évalués sur une période de 3 mois. Une modélisation ASAP avec une bonne corrélation entre données prédites et expérimentales a pu être obtenue pour les PDD issus de déamidation et de fragments de chaîne lourde/chaîne légère libres. Les résultats obtenus ont permis de démontrer la possibilité d'appliquer la modélisation ASAP pour les anticorps monoclonaux, en considérant les différentes formes de dégradation de manière indépendante. Ces travaux de thèse soulignent l'intérêt de la méthodologie appliquée pour une modélisation fine de la stabilité de différents produits pharmaceutiques, et notamment la possibilité d'appliquer cette approche à la modélisation de la stabilité de molécules complexes telles que les anticorps monoclonaux

Mots clefs : produits pharmaceutiques et biopharmaceutiques, modélisation, stabilité, spectrométrie de masse, électrophorèse capillaire, chromatographie d'exclusion stérique

Analytical developement associated with ASAP methodology for the stability evaluation of chemical and biological pharmaceutical products

Abstract : The stability study and the characterization of degradation products (DPs) represent an important step in the process of market authorization of pharmaceutical products. As such, stability studies require the development of analytical methods adapted to the physico-chemical properties of the drug. The research conducted during this PhD thesis aimed to develop an integrated methodology allowing the evaluation and the modelization of the long-term stability of different pharmaceutical products, including biopharmaceuticals. For the latter, their structural complexity limits the implementation of such predictive approaches. The methodology implemented during the presented work is based on 1) the selection and the development of stability indicative analytical methods adapted to the studied pharmaceutical products, 2) the modelization of their stability using the approach known as accelerated stability assessment program (ASAP), 3) the correlation between the predicted and the experimental data resulting from the analysis of the stability samples. In a first case, this methodology was applied to ascorbic acid. A capillary zone electrophoresis (CZE-UV) method has been developed allowing the separation and the quantification of ascorbic acid and its main DPs in less than 10 min. In addition, the CZE-UV method allowed the identification of a major DP, not observed in RP-HPLC, which structural characterization was carried out by mass spectrometry, the tri-hydroxy-keto-valeraldehyde. The ASAP modelization presented a perfect adequacy between the predicted and the experimental stability data over three years. A cyclic hexapeptide constituted a second case study. The UPLC-MS/MS method implemented allowed the analysis and the identification of the two major DPs. The evolution of their concentration was modelized using the ASAP approach and the generated model showed good fit between experimental and predicted data under different storage conditions. In a third case study, we evaluated the stability of the monoclonal antibody infliximab, through the reference product and two biosimilars approved for therapeutic use. A multi-technique analytical approach was implemented in order to characterize the DPs relating to the different levels of protein structure. An UPLC-MS/MS method has been developed to identify and to determine the degree of deamidation and oxidation of several amino acid of interest. In parallel, infliximab aggregation and fragmentation were assessed concomitantly by SEC-UV-MALS/RI, A4F-UV-MALS/RI and DLS. The three types of infliximab showed relatively comparable levels of modifications in the initial conditions and after forced degradations studies. By simulating hospital in-use conditions, the impact of light, temperature and the type of infusion bags on the stability of infliximab were evaluated for 3 months. ASAP modelization presented good correlation between predicted and experimental data for DPs linked to deamidation and free heavy chain/light chain fragments. The results obtained allowed to demonstrate the possibility to use ASAP stability modelization for monoclonal antibodies, considering the different forms of degradation independently. This thesis work underlines the interest of the methodology implemented for stability characterization and modelization of different pharmaceutical products and, in particular, the possibility to implement this approach for complex molecules such as monoclonal antibodies.

Key-words: pharmaceuticals and biopharmaceuticals products, modelization, stability, mass spectrometry, capillary zone electrophoresis, size exclusion chromatography