

STABILITE DE SOLUTIONS DILUEES DE BEVACIZUMAB EN FONCTION DE LA TEMPERATURE

**K. MORAND¹, M. PAUL¹, A. LAHLOU¹, B. BLANCHET¹,
A.ASTIER^{1,2}**

¹Service de Pharmacie-Toxicologie, APHP

²UMR CNRS 7054,

CHU Henri Mondor 94010 Créteil

Problématique

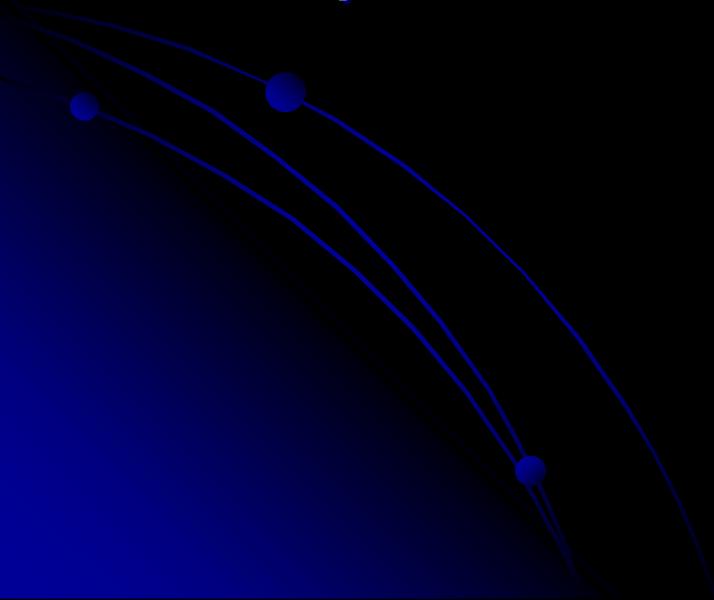
- La stabilité thermique des anticorps monoclonaux (mAbs) utilisés en cancérologie est peu documentée.
- La structure complexe de ces molécules induit des propriétés particulières de réponses aux stress mécaniques et thermiques.
- L'instabilité physique se traduit par la formation d'agrégats solubles et insolubles pouvant entraîner une baisse d'efficacité et/ou induire des réactions de type immunoallergiques.
- L'instabilité chimique se traduit par des modifications au niveau de la structure primaire (oxydation, désamidation, formation de liaisons covalente...) entraînant des modifications de la structure secondaire et tertiaire.

Problématique du Bévacizumab

- Instructions du fabricant : stabilité 24 H à 4°C
- Difficulté d'anticiper les préparations
- Préparation pour le week-end impossible
- Optimisation des coûts
- Préparations hospitalières?
 - détermination d'une date de péremption.

Objectifs

- Etudier la stabilité du bevacizumab en solution diluée (2 et 16 mg/ml) dans du NaCl 0.9% au long terme (6 mois) à 3 températures (4, 22 et 37°C).

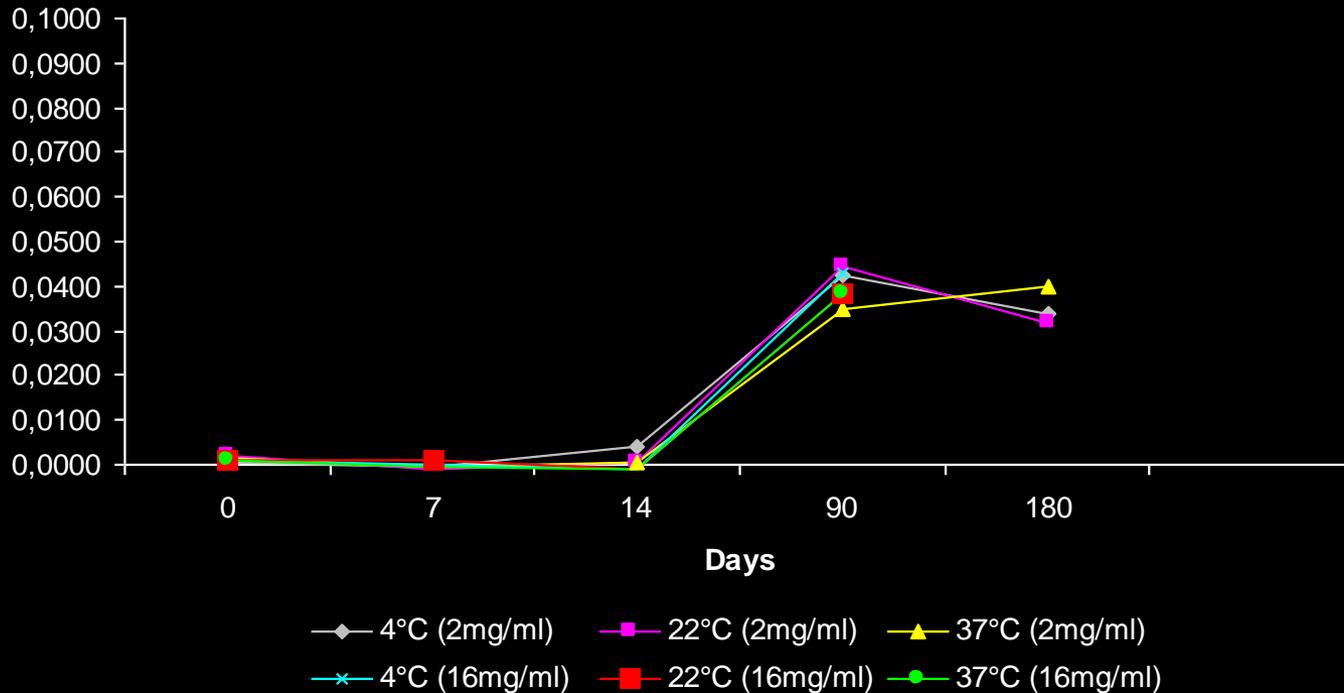


Méthodes

- Les solutions ont été préparées aseptiquement dans des poches polyoléfines et stockées à 4°, 22° et 37°C durant 6 mois (n=3 par concentration et temps).
- Aux intervalles étudiés (0,7, 15, 30, 90 et 180 jours), la dégradation de l'anticorps a été suivie par plusieurs méthodes complémentaires :
 - **Instabilité physique**
 - Formation d'agrégats insolubles et solubles : turbidimétrie à 350 nm, ratio $\lambda_{\max}/\lambda_{\min}$ avant et après centrifugation,
 - Formation d'agrégats solubles : diffraction dynamique laser et chromatographie d'exclusion stérique (CE-CLHP).
 - **Instabilité chimique**
 - Chromatographie ionique en gradient (cation, CEX-CLHP)
 - Dosage spectrophotométrique à 279 nm
 - Carte peptidique après hydrolyse trypsine/endoprotéase et CLHP des peptides générés sur C18 en gradient (TFA/CH₃CN) .

Stabilité physique (1)

Turbidance à 350 nm



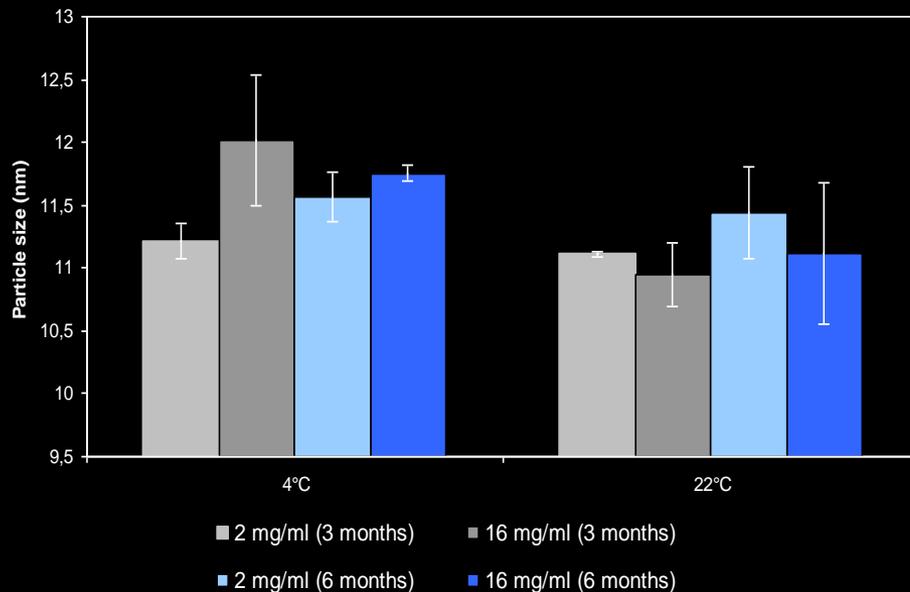
- Légère augmentation de l'absorbance à partir de 14 jours
- Pas de différence quelle que soit la température
- Absorbance faible même après 6 mois de conservation à 37°C
- Pas d'agrégation visible sur 6 mois

Stabilité physique (2)

● Ratio $\lambda_{\max}/\lambda_{\min}$

- Non différent des contrôles et identiques pour toutes les températures testées (2.45 ± 0.05) → Acides aminés aromatiques non modifiés (confirmé par spectrométrie dérivée II°).

● DLS

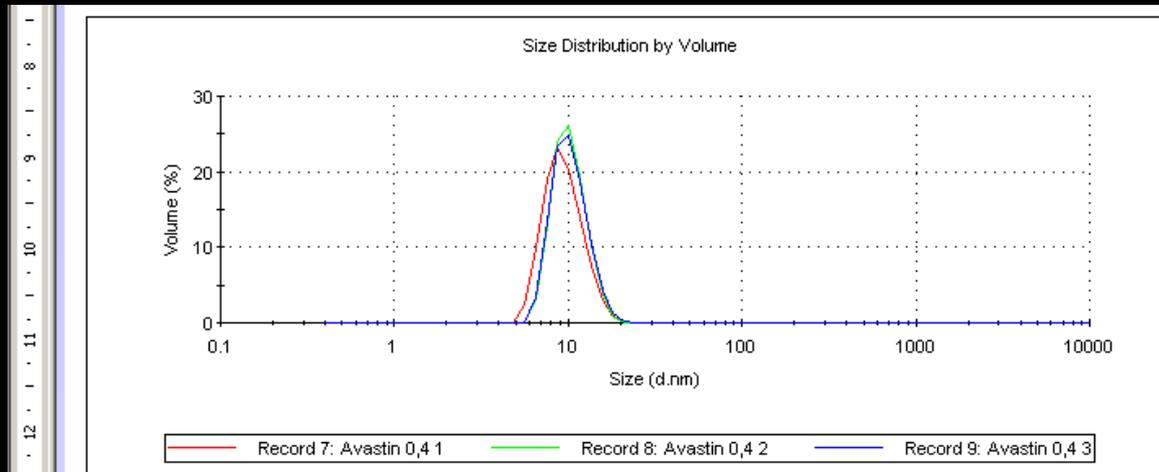


Le diamètre à J0 = 11.6 ± 0.5 nm (forme monomérique).

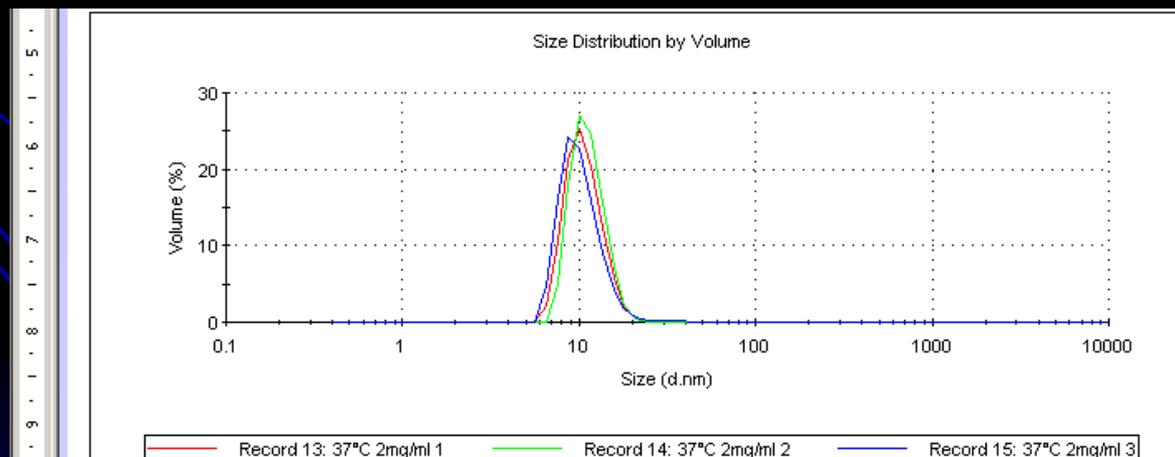
Taille des particules inchangée après 3 à 6 mois à 4 et 22°C (<12 nm).

Légère augmentation du diamètre à 37°C ($13.3 \text{ nm} \pm 0.26 \text{ nm}$) mais la population particulaire reste monodisperse.

Stabilité physique (3)

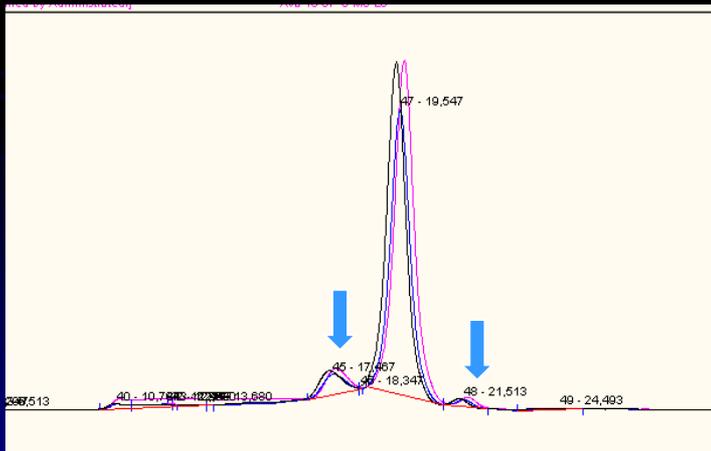
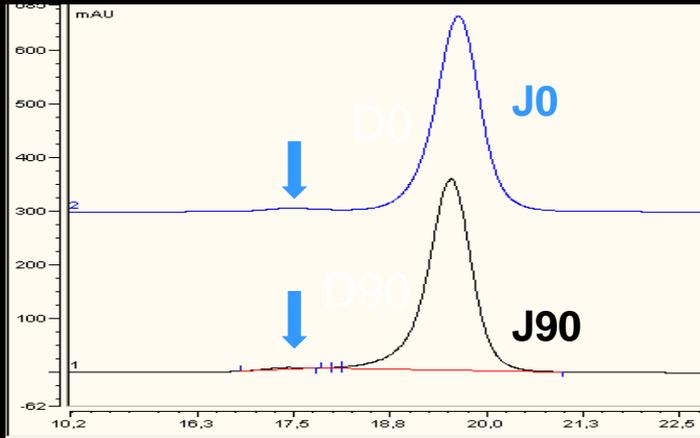


J0



J180

Stabilité physique (4)



Chromatographie d'exclusion stérique

- Pas de modification des chromatogrammes entre J0 et J180 à 4°C ou 22°C.
- Existence d'un pic de plus faible Tr → dimère natif (AUC < 1% de AUC totale).
- A 37°C, au bout de 3 mois, augmentation de l'AUC du pic du dimère (7% de l'AUC totale).
- Apparition d'un pic de fragmentation

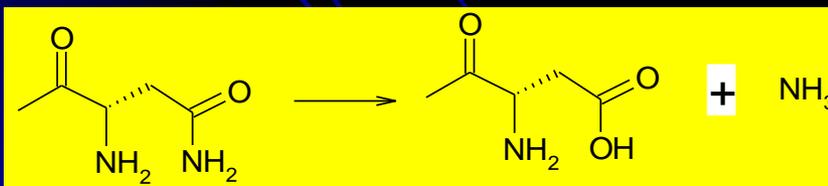
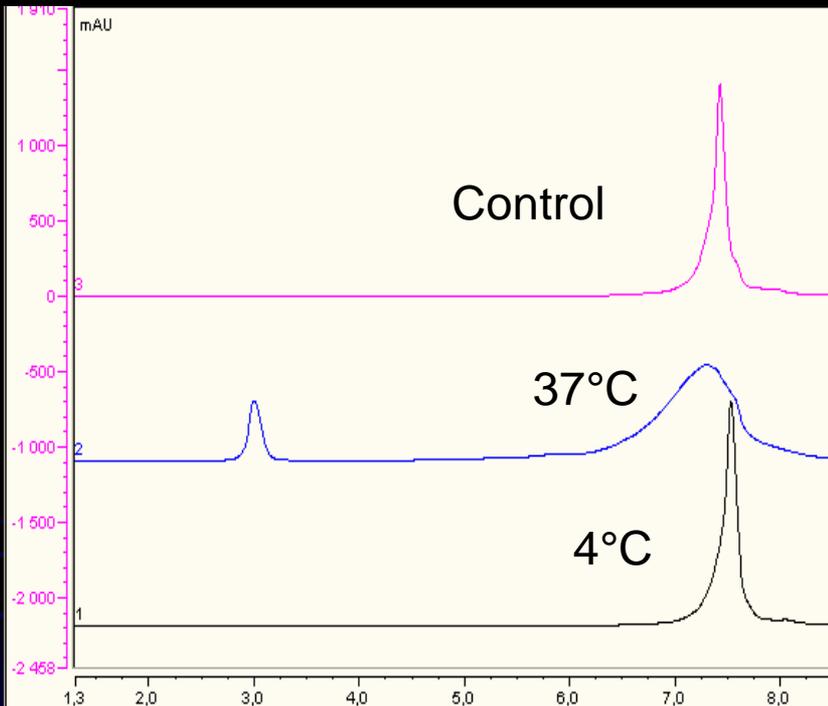
Dosage des protéines

- Pas de modification de la concentration en protéines J0 → J180 à 4° et 22°C.
- Problème d'évaporation au-delà de 3 mois à 37°C.

Stabilité chimique (1)

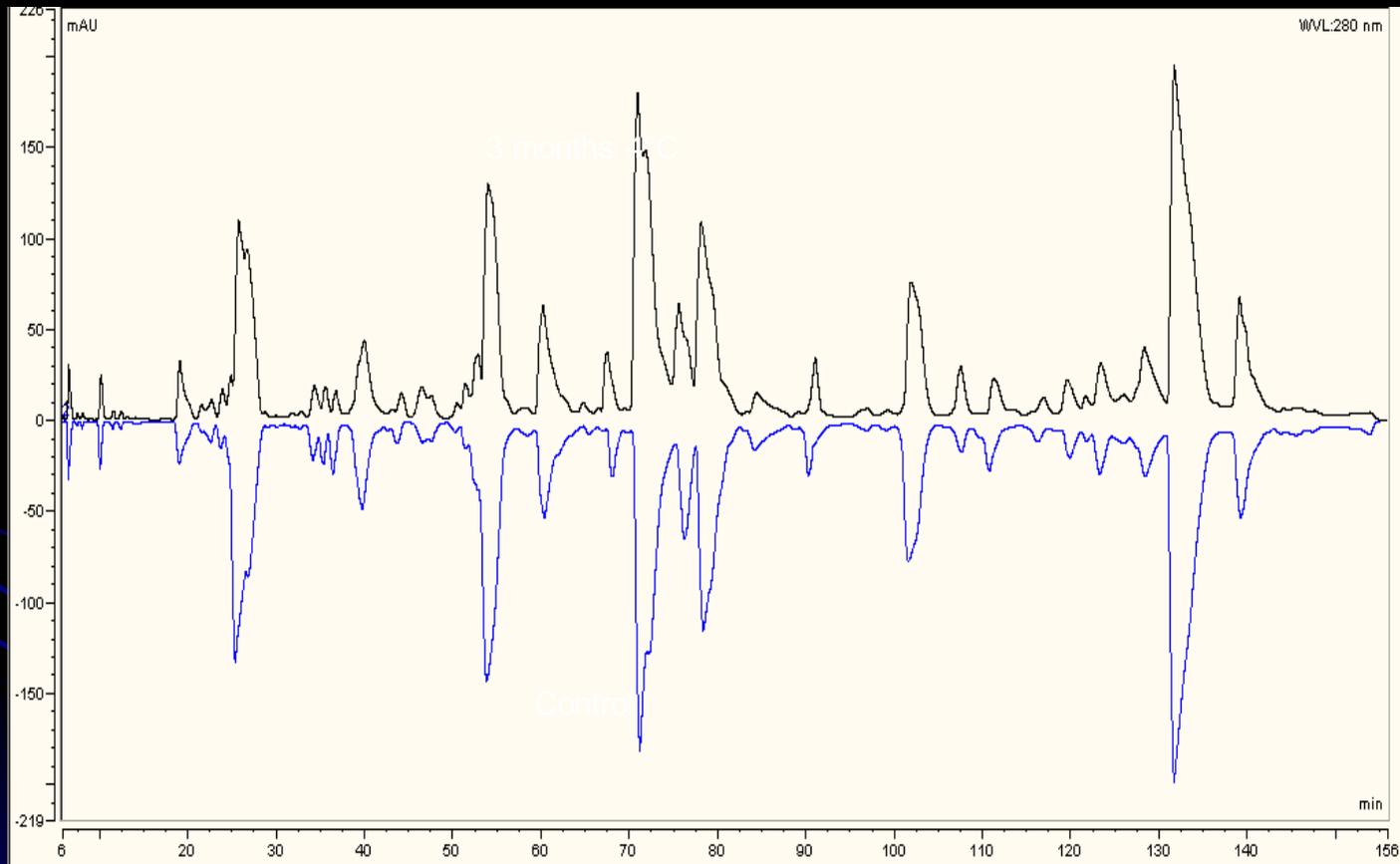
Chromatographie ionique

- Pas de modification des chromatogrammes entre J0 et J90 à 4°C ou 22°C.
- Pas de désamidation des résidus asparagines (Asn)
- A 37°C, modification importante du pic principal avec « shift acide » et apparition d'un pic d'espèce acide cohérent avec une désamidation des Asn



Stabilité chimique (2)

- Carte peptidique



Pas de modification de la carte peptidique après 3 à 6 mois à 4 et 22°C
Modification du profil peptidique à 37°C à 3 mois (altération de l'Ac).

Discussion

- Que ce soit à 4 ou à 22°C, les solutions diluées de bevacizumab sont stables au moins 3 mois (stabilité physico-chimique).
 - Absence d'agrégation
 - Dosage protéique inchangé
 - Absorbance à 279 nm inchangée
 - Les spectres dérivés II° ne sont pas modifiés suggérant l'absence d'altération des acides aminés aromatiques (Tryp, Tyr ou Phe)
 - Ratio $\lambda_{\max}/\lambda_{\min}$ constant
 - Pas de modification du profil ionique
 - Pas de pic de fragmentation ou d'augmentation de l'AUC du dimère
 - Carte peptidique inchangée
- A 37°C, des modifications apparaissent :
 - Apparition d'un pic supplémentaire en aval du pic principal signifiant une modification de la charge globale et l'apparition d'un nouvel isotype.
 - Augmentation de % du dimère.
 - Modification de la carte peptidique : site de clivage différents → modification de la structure I° et II°.

Conclusion

- Anticipation des doses
- Fabrication pour le week-end
- Optimisation des préparations → plus de flux tendu
- Préparation hospitalière possible avec une date de péremption : 3 mois à 4°C.

Il reste néanmoins à vérifier l'activité biologique de l'Ac sur culture cellulaire (en cours) pour entériner la date de péremption.