

STABILITE D'UN ANTICORPS MONOCLONAL D'INTERET THERAPEUTIQUE APRES RECONSTITUTION:

LE RITUXIMAB

E. Jaccoulet¹, S. Guirao¹, K. Morand¹, A. Astier^{1,2}, M. Paul¹.

¹ Service Pharmacie, Hôpital Henri-Mondor, AP-HP, Créteil
² CNRS UMR 7054, Faculté de Médecine Paris 12, Créteil



Introduction

La préparation du rituximab est prise en charge par l'Unité de Préparation des Chimiothérapies. La consommation croissante du rituximab dans les CHU engendre une gestion lourde quant à la préparation, le délai d'administration et la gestion des aléas cliniques tardifs. Une alternative serait de gérer les préparations du rituximab dans le cadre des préparations hospitalières afin de fabriquer des poches de rituximab à l'avance à diverses doses. Afin de mener à bien ce projet, il est donc indispensable d'étudier la stabilité du rituximab une fois dilué.

Objectif

L'objectif de ce travail était d'évaluer la stabilité du rituximab dilué conservé à différentes températures pendant trois mois.

Matériel et Méthodes

- Le Rituximab (Mabthera®) a été dilué avec du NaCl 0,9% stérile à 2 concentrations (1 mg/ml et 4 mg/ml) correspondant aux extrêmes des dilutions en pratique.
- Les solutions diluées ont été préparées sous hotte à flux laminaire et conditionnées dans des poches stériles en polyoléfine (échantillons) et conservées à 4°C, 22°C, 40°C à l'abri de la lumière et en hygrométrie contrôlée (60 et 75 %).
- Pour chaque couple de concentration et de condition de conservation, 3 échantillons ont été préparés à partir de flacons de Mabthera® d'un même lot.
- Chaque triplicata a été analysé aux jours J0, J7, J14, J30 et J90 et 1 échantillon contrôle a été fraîchement reconstitué à chaque point d'analyse.
- L'étude de l'instabilité physique et chimique a été réalisée par : CLHP d'exclusion stérique (CLHP SE), spectrométrie UV à 279 nm et dérivée II^e, turbidimétrie par spectrométrie UV à 350, 440 et 550 nm, diffraction dynamique de la lumière (DLS), CLHP ionique (CLHP CEX) et peptide mapping.

Résultats

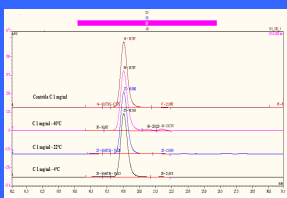


Figure 1

En CLHP SE : Aucun changement n'a été détecté dans les chromatogrammes des échantillons conservés à 4°C et 22°C après trois mois comparativement à l'échantillon contrôle. La figure 1 montre les chromatogrammes des échantillons de rituximab dilués à 1 mg/ml et conservés 3 mois à différentes températures. Seul le rituximab conservé à 40°C a présenté deux pics supplémentaires de poids moléculaires inférieure au pic principal.

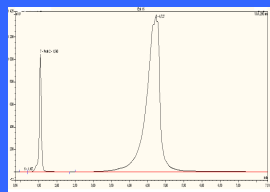


Figure 2

En CLHP CEX: Les chromatogrammes des échantillons conservés à 4°C et 22°C après trois mois est identique à celui de l'échantillon contrôle. La figure 2 montre l'apparition d'un pic supplémentaire en aval du pic principal signifiant une modification de la charge globale et l'apparition d'un nouvel isotype lorsque le rituximab est soumis à une conservation à 40°C.

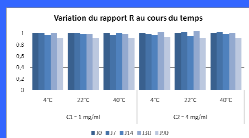


Figure 3

Le rapport des densités optiques des échantillons à 279 nm avant et après centrifugation (10 000g, 5 min) est identique au cours du temps quelle que soit la concentration et la condition de conservation (Figure 3). Les spectres dérivés II^e ne sont pas modifiés suggérant l'absence d'altération des acides aminés aromatiques (Tryp, Tyr ou Phe)

	350 nm			
	J7	J14	J30	J90
C=1 mg/ml	0,0326±0,001	0,0306±0,003	0,0313±0,0007	0,034±0,001
	0,0321±0,001	0,0306±0,001	0,0326±0,001	0,0343±0,0001
C=4 mg/ml	0,0334±0,0003	0,0307±0,0003	0,0301±0,001	0,0382±0,002
	0,0367±0,001	0,043±0,0004	0,03±0,002	0,035±0,0019
C=4 mg/ml	0,0367±0,001	0,037±0,001	0,03±0,002	0,045±0,006
	0,037±0,0001	0,036±0,0026	0,029±0,0001	0,04±0,0004

Tableau 1

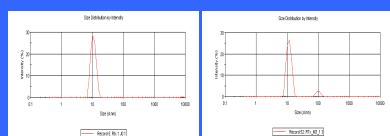


Figure 4

Turbidimétrie: Pas de différence significative quelle que soit la concentration et quelle que soit les conditions de conservation après 3 mois. Le Tableau 1 montre les valeurs de la turbidité à 350 nm au cours du temps.

DLS: Aucune modification du profil des graphes entre le contrôle et les échantillons à 4°C et 22°C n'a été détectée. La distribution de la population est homogène (fig.4) et le diamètre moyen apparent des particules est de 11,48 ± 0,71 nm. Par contre à 40°C, une sous-population est apparue avec un diamètre apparent moyen de l'ordre de 150 nm. Elle peut être considérée comme un précurseur de nucléation pouvant conduire à des agrégats de taille submicronique.

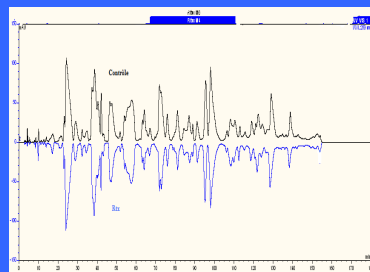


Figure 5

Peptide mapping (CLHP C18): Les chromatogrammes obtenus après digestion à la trypsine et à l'endopeptidase, du contrôle et du rituximab dilué (quelle que soit la concentration) et conservé à 4°C sont superposables après trois mois (Figure 5). Tandis qu'à 40°C, les graphes ne sont pas superposables. Les sites de clivage ont totalement changé. La température a donc modifié la structure protéique I^e et II^e.

CONCLUSION

Le rituximab dilué dans une solution de NaCl 0,9% est stable dans des conditions de conservation optimale (4°C) sur une période de 3 mois. Sa bonne stabilité constatée à 22°C permet d'accepter d'éventuelles ruptures de chaîne du froid en cours de manipulation ou de transport.

