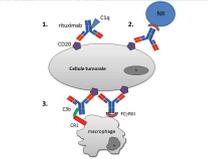


INTRODUCTION



Qu'est ce que le Rixathon® (Rituximab, 10mg/ml) ?

- Anticorps monoclonal anti-récepteurs CD-20 de lymphocytes B.
- Indiqué dans les lymphomes non-hodgkiniens (LNH), les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) et la polyarthrite rhumatoïde (PR).
- Actuellement, la durée de stabilité connue est de 30 jours une fois dilué dans du NaCl 0,9% entre 2 et 8°C, puis pendant 24 heures supplémentaires à 25°C.

Les poches de Rixathon® à 1 et 4 mg/mL peuvent-elles être conservées plus de 30 jours à 4°C ?

En cas d'excursion longue de la température à 25°C, la stabilité est-elle conservée ?

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Analyse de la stabilité physicochimique :

- pH / Osmolalité / densité
- Turbidimétrie : calcul de l'indice d'agrégation (AI) par spectrométrie UV à 350 et 280 nm
- Diffusion dynamique de la lumière (DLS)
- Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)
- Chromatographie ionique

$AI = A_{350} / (A_{280} - A_{350}) \cdot 100$



Analyse de la stabilité structurale :

- Analyse de la structure primaire par peptide mapping
- Analyse de la structure secondaire par spectrométrie infrarouge (FTIR-ATR)
- Analyse de la structure tertiaire par fluorescence et spectrométrie UV

Les analyses ont été réalisées en triplicate. Toutes les méthodes utilisées ont été démontrées comme indicatrices de stabilité pour les anticorps (Ph. Eur. 10.0, « Monoclonal Antibodies for Human Use »).

Les poches et flacons ont été conservés pendant 12 mois à 4°C avec une excursion à 25°C pendant 28 jours.

RÉSULTATS & DISCUSSION

Stabilité physicochimique

- ✓ L'osmolalité était comprise entre  $287 \pm 1$  et  $365 \pm 2$  mOsm/kg. Il n'y a pas eu de modifications dans les mesures d'osmolalité au cours du temps (variations < 10 mOsm/kg).
- ✓ Le pH reste constant dans le temps avec une valeur moyenne de  $6,5 \pm 0,05$ . La variation est inférieure à 0,5 unités de pH.
- ✓ Les variations de la densité n'excèdent pas  $0,01 \text{ g/cm}^3$  quelles que soient les conditions testées avec une valeur moyenne de  $1,004 \pm 0,0002 \text{ g/cm}^3$ .

- ✓ Les indices d'agrégation sont restés inférieurs à 10 au cours de l'étude, témoignant de l'absence de formation d'agrégats visibles et sub-visibles diffractant la lumière.

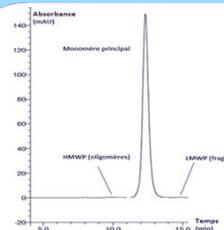
Indice d'agrégation moyen	J0	M12, 4°C	J28, 25°C
Poche 1mg/mL	0,24 ± 0,12	0,79 ± 0,48	0,34 ± 0,09
Poche 4mg/mL	1,73 ± 0,98	1,26 ± 0,07	0,58 ± 0,07
Flacon (10mg/mL)	4,18 ± 0,73	1,27 ± 0,09	0,41 ± 0,19

Tableau 1 : Indice d'agrégation moyen au cours du temps.

	Diamètre (nm)	pdi
Poche 1mg/mL	11,95 ± 0,34	0,07 ± 0,026
Poche 4mg/mL	12,07 ± 0,24	0,06 ± 0,01
Flacon (10mg/mL)	12,73 ± 0,08	0,06 ± 0,02

Tableau 2 : Diamètre hydrodynamique et pdi moyen.

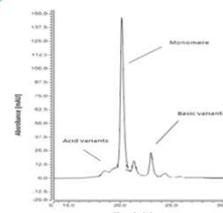
- ✓ Absence de modification du diamètre hydrodynamique mesuré par DLS au cours du temps. La répartition est restée monodisperse (pdi ≤ 0,1). Absence de sous-populations d'agrégats submicroniques, microniques ou de particules au cours du temps (0,3 nm à 10 µm)



- ✓ Absence de modification du profil chromatographique en SEC : pas de modification dans le temps des ratios des pics de monomère, ni d'augmentation du pic des HMWP (oligomères) et du pic des LMWP (fragment).

Tableau 3 : Pourcentage de répartition des isoformes en SEC au cours du temps.

Pic ratio (%)	J0			M12, 4°C			J28, 25°C		
	HMWP	Monomère	LMWP	HMWP	Monomère	LMWP	HMWP	Monomère	LMWP
Poche 1mg/mL	0,48±0,03	99,5±0,03	0,02±0,01	0,44±0,02	99,5±0,02	0,06±0,01	0,45±0,01	99,5±0,01	0,05±0,01
Poche 4mg/mL	0,49±0,02	99,5±0,02	0,02±0,01	0,43±0,02	99,5±0,02	0,06±0,01	0,45±0,01	99,5±0,01	0,05±0,01
Flacon (10mg/mL)	0,49±0,03	99,5±0,03	0,03±0,01	0,44±0,02	99,5±0,02	0,07±0,01	0,45±0,01	99,5±0,01	0,05±0,01



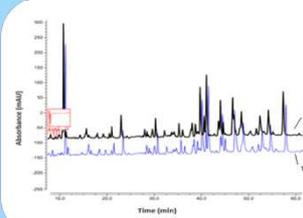
- ✓ La chromatographie ionique n'a pas montré de modification dans la répartition des variants ioniques, notamment l'absence de phénomènes de déamidation.

→ Absence d'instabilité chimique.

Tableau 4 : Pourcentage de répartition des variants ioniques au cours du temps.

Pic ratio (%)	J0			M12, 4°C			J28, 25°C		
	Variants acides	Monomère	Variants basiques	Variants acides	Monomère	Variants basiques	Variants acides	Monomère	Variants basiques
Poche 1mg/ml	2,58±0,25	79,16±1,9	18,26±2,1	2,96±0,14	78,84±2,01	18,2±2,1	4,56±0,36	78,96±1,6	15,49±1,92
Poche 4mg/ml	2,69±0,25	78,36±1,8	18,93±1,99	2,9±0,19	79,6±1,73	17,5±1,9	4,34±0,52	80,11±1,73	15,55±1,78
Flacon (10mg/mL)	2,61±0,23	78,26±2,1	19,12±2,24	2,61±0,22	80,67±1,74	16,73±1,92	4,73±0,22	81,34±1,39	13,93±1,57

Stabilité structurale

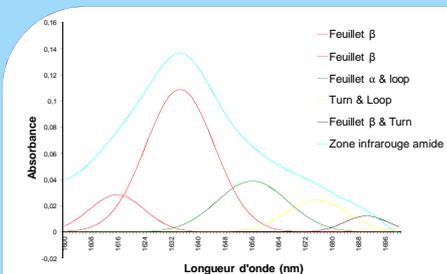
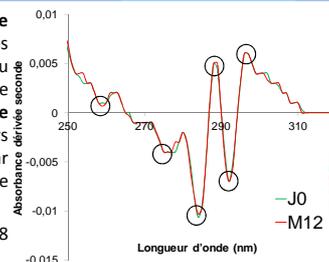


- ✓ Les spectres obtenus par la méthode du peptide mapping n'ont montré aucune modification au cours du temps de la structure primaire de l'anticorps à 215 et 280 nm.



- ✓ Les spectres en dérivée seconde sont restés superposables au cours du temps. Il n'y a donc pas de modification de la structure tertiaire de l'anticorps au cours du temps. Ceci est confirmé par l'analyse en spectrométrie de fluorescence.

Il en est de même après 28 jours à 25°C.



- ✓ L'analyse par spectrométrie infrarouge n'a pas mis en évidence de modification de la structure secondaire de l'anticorps au cours du temps.

	J0	M12, 4°C	J28, 25°C
Feuille β	67,1 ± 1,4 %	66,8 ± 0,1 %	65,6 ± 1,1 %
Hélice α & Loop	15,7 ± 0,6 %	15,7 ± 0,3 %	15,7 ± 0,8 %
Turn & Loop	9,5 ± 1,2 %	10,2 ± 0,9 %	11,5 ± 1,9 %
Feuille β & Turn	7,7 ± 0,4 %	7,2 ± 0,4 %	7,2 ± 0,2 %

Tableau 5 : Pourcentage des feuillets de la structure secondaire.

CONCLUSION

- Le Rixathon® est stable au minimum 12 mois à 4°C et 28 jours à 25°C après dilution dans du NaCl 0,9% en poche de polyoléfine. De plus, l'étude de stérilité n'a pas mis en évidence de croissance microbienne au cours de l'étude.
- Ces données vont permettre la fabrication des poches de Rixathon® à l'avance, sous le statut de préparation hospitalière, ainsi que le retour de poches suite à une non-administration.
- La préparation du Rixathon® à l'avance va permettre d'anticiper les besoins, améliorer la fluidité du circuit de préparation et d'administration et engendrer une économie financière.