

# Stabilité physico-chimique d'un mélange intradermique de Bléomycine– Lidocaine– Adrénaline dilué en poche de NaCl 0,9 %

*Michael Chaussard, Christelle Elias, Antoine Petit, Patrice Bellenger, Nathalie Jourdan, Pierre Faure, Nabil El Kateb*

Présentée par : **El Kateb Nabil**

**HOPIPHARM Lyon 2013**

**Service de Pharmacie  
Unité de préparation des  
anti-cancéreux  
Hôpital St-Louis**

# Introduction (1)

## LA Bléomycine intradermique

### ∞ **Traitement des chéloïdes (Années 90) :**

Trouble de la cicatrisation - Inflammation

⇒ Prolifération dermique (dépôt exubérant de collagène)



← Cicatrices chéloïdiennes →

# Introduction (2)

## LA préparation magistrale BLA

### ☞ **Traitement ambulatoire des chéloïdes sur peau noire** **(Dermatologie st-Louis – depuis 2007)**

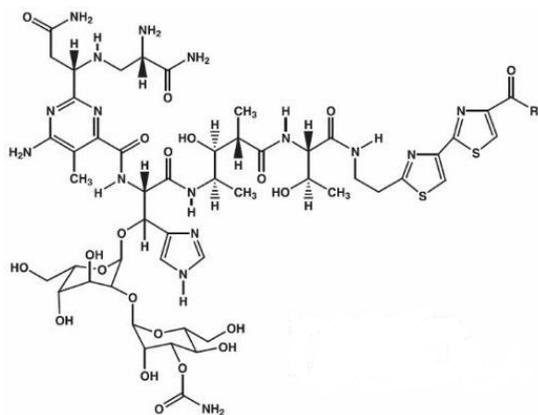
⇒ 0,5 à 2 mL (0,38 mg à 1,5 mg B) en plusieurs injections intra-lésionnelles

Sulfate de Bléomycine

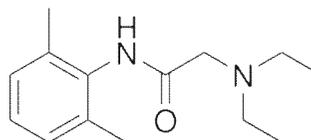
Lidocaïne

Adrénaline

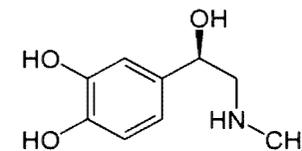
- Glycopeptide cytotoxique



- Anesthésique local  
- ↑ l'action cytotoxique



- vasoconstricteur



# Introduction (3)

## LA préparation magistrale BLA

### Matières premières

#### Solvant :

- Bleomycine®Bellon

15 mg (Sanofi Aventis)

- Lidocaine Adrénaline®,  
200 mg / 0,2 mg par flacon  
de 20 mL (Aguettant).

- NaCl 0,9 %, poches en  
polypropylene (PP) (Fresenius  
Kabi)

### Protocole de préparation :

- ∞ Reconstitution du flacon de bléomycine 15 mg-5 mL de NaCl 0,9 %
- ∞ Transfert dans une poche en PP de 50 mL (poche de NaCl 0,9 % préalablement vidée)
- ∞ Ajout de 7 mL de la solution de Lidocaïne/Adrénaline prête à l'emploi
- ∞ NaCl 0,9 % qsp 20 mL.



### Concentrations finales en S.A :

- α **Bleomycine** .....0,75 mg/mL
- α **Lidocaïne** .....3,5 mg/mL
- α **Adrénaline** .....3,5 mg/L

# Introduction (4) - Contexte

## ∞ Lieu de préparation :

\* Préparation extemporanée en Z.A.C au sein de l'unité de préparation des anti-cancéreux (UPAC)

\* UPAC (plus de 300 prép./j)

⇒ ↑ Contraintes de préparation, de dispensation et d'administration



**Préparation et conservation entre 2 et 8°C  
jusqu'à 5 j à l'avance**

# Introduction (5) - Contexte

⇒ Préparation de BLA 5 jours à l'avance :

En se basant sur les données de stabilité déjà disponibles :

\* 28 jours à T° C ambiante bléomycine à 0,6 mg/mL, à l'abri de la lumière.

\* Compatibilité basée sur le pH  
(stabilité chimique)

{  
α Bléomycine pH 4-10  
α Lidocaïne pH 5-7

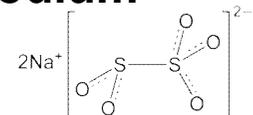
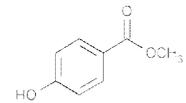
\* Données d'efficacité clinique : Bléomycine + Lidocaïne

# Introduction (6) - Limites

∞ Mélange BLA- différent de ceux étudiés dans la littérature - plus complexe ⇒ Réactivité chimique importante à Prédire

∞ Autres excipients : conservateurs

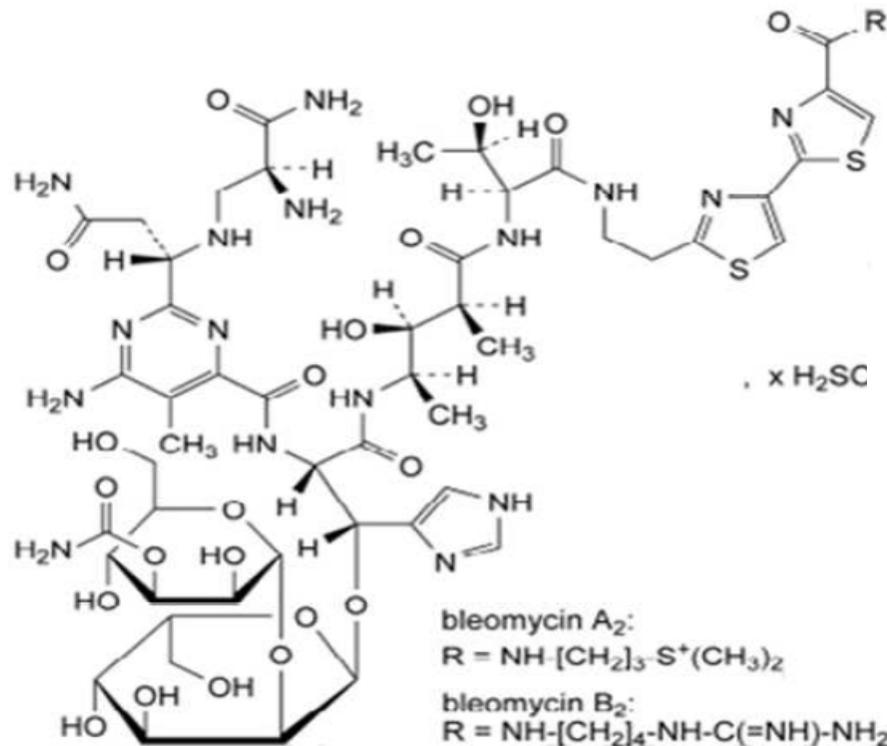
{ Méthylparaben  
Métabisulfite de sodium



∞ Bléomycine = 13 fractions chromatographiques (Ph. EU.)

# Introduction (6) - Limites

- ☞ Fractions actives ( $\geq 85\%$ ) : Bléomycine A<sub>2</sub> (BA<sub>2</sub>) – Bléomycine B<sub>2</sub> (BB<sub>2</sub>)
- ☞ Fractions inactives : Déméthylbléomycine (DBA<sub>2</sub>) :  $< 5,5\%$



$R = \text{OH}$ : bleomycinic acid,

$\cdot x \text{H}_2\text{SC}$   $R = \text{NH}[\text{CH}_2]_2\text{NH}[\text{CH}_2]_4\text{NH}_2$ : bleomycin A<sub>5</sub>,

$R = \text{NH}[\text{CH}_2]_4\text{NH-C(=NH)-NH}[\text{CH}_2]_4\text{NH-C(=NH)-NH}_2$ :  
 bleomycin B<sub>4</sub>,

$R = \text{NH}[\text{CH}_2]_3\text{S-CH}_3$ : demethylbleomycin A<sub>2</sub>.

# Objectif

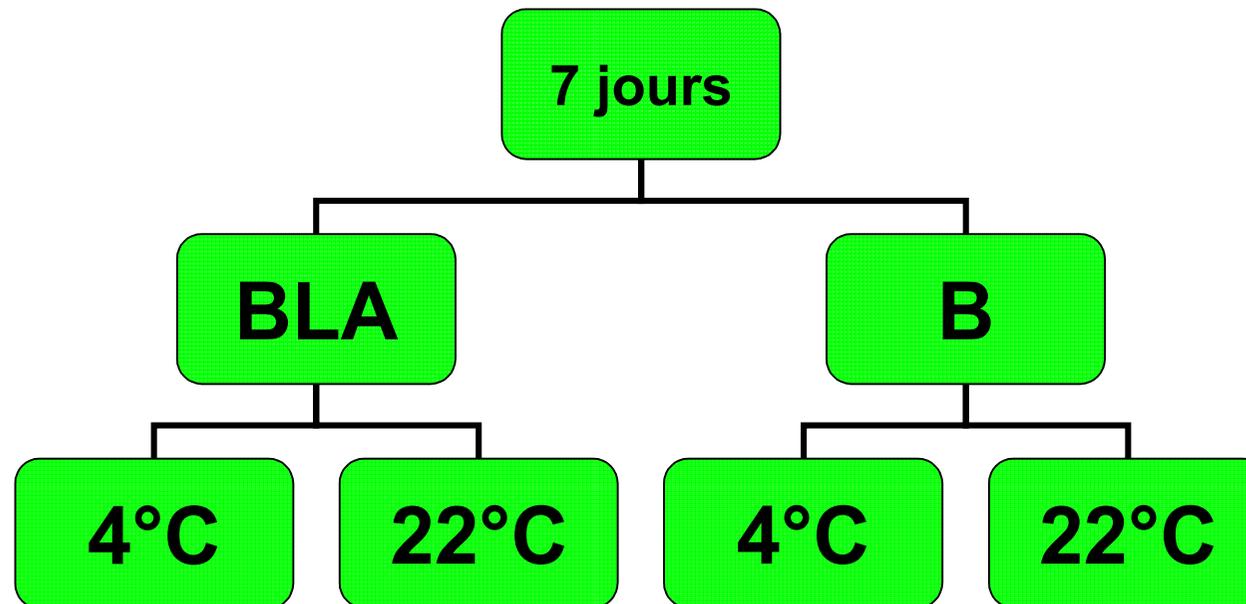
Déterminer les conditions optimales de conservation du mélange BLA, afin d'étendre et de valider sa durée de conservation à plus de 24h.

- ⇒ Effet de la durée
  - ⇒ Effet des composants de BLA
  - ⇒ Effet de la température
- Efficacité + Compatibilité chimique de la Bléomycine** avec les autres composants

# Matériels et méthodes (1) – Protocole de stabilité

## Échantillons

- En polypropylène (PP), à l'abri de la lumière
- Total 12 poches : (n=3) x 4



# Matériels et méthodes (2) – Protocole de stabilité

## Essais

**Prélèvement / 24 h – 7 jours**

**Stabilité physique (pH + Inspection visuelle)**

- \* Suivi du pH  $\Rightarrow$  papier pH
- \* Coloration
- \* Précipitation
- \* Formation de gaz

**Dosage des composants par HPLC – UV barrette de diodes**

- \* BA2, BB2, DBA2 – Signal à  $\lambda$  290 nm
- \* Lidocaïne, Méthylparaben– Signal à  $\lambda$  254 nm
- \* Adrénaline – Signal à  $\lambda$  280 nm

# Matériels et méthodes (3) - Dosage

**Méthode HPLC par formation de paires d'ions, Détection UV à barrette de diodes**

**HPLC LaChrom Hitachi, Merck**

	Essai de la Pharmacopée européenne	Adaptation pour l'étude de stabilité
Phase stationnaire	C18, 7 $\mu$ m, 25cm	C18, 5 $\mu$ m, 10cm Chromolith®
Phase mobile	Débit : 1.2 l/min A: méthanol (10% - 40%) B: pentane sulfonate de Na, a. acétique, EDTA, ammoniac (pH 4.3) (90% - 60%)	Débit : 1.2 l/min A: méthanol (33% - 40%) B: heptane sulfonate de Na, a. acétique, EDTA, ammoniac (pH 4.3) (67% - 60%)
Durée d'analyse	80 minutes	30 minutes
Volume d'injection	20 $\mu$ L	5 $\mu$ L
Détection UV	254 nm	254, 280 & 290 nm

# Matériel et méthodes (4) – Étude de compatibilité chimique

- ∞ Tubes à essais fermés,  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , à l'abri de la lumière
- ∞ 24h (T0, T3h, T6h, T24h) ⇒ **Améliorer la formulation**

**Bléomycine 0,75 g/L**

C1

**Lidocaïne**

**3,5 g/L**

C2

**Methylparaben**

**0,4 g/L**

C3

**Adrénaline**

**3,5 mg/L**

C4

**Métabisulfite**

**175 mg/L**

C5

**Adrénaline + Métabisulfite**

# Résultats (1) – Stabilité

## Stabilité physique :

- pH stable : **valeur entre 6 – 7.**
- Aspect visuel non modifié : **solutions limpides**, pas de précipité, pas de gaz.

## Stabilité Chimique :

- Aires des pics de Lidocaïne, de l'adrénaline et du méthylparaben : **stables 7j.**

# Résultats (2) – Stabilité chimique de la Bléomycine

## B seule

## Teneur en BA2 et BB2

## Mélange BLA

Tableau 1.  
Pourcentages restants de BA2 et BB2 (%)

Temps (Jours)	Moyenne ± S.D.			
	4 °C		22 °C	
	BA2	BB2	BA2	BB2
0	100,00 ± 0,57	100,00 ± 0,79	100,00 ± 0,98	100,00 ± 1,07
1	96,73 ± 0,21	96,75 ± 0,47	97,46 ± 0,65	97,56 ± 0,91
2	99,49 ± 1,31	99,41 ± 1,45	96,76 ± 2,94	97,51 ± 3,37
3	99,14 ± 0,46	99,41 ± 0,63	99,94 ± 0,42	100,57 ± 0,41
4	98,56 ± 2,32	98,75 ± 2,25	95,05 ± 0,75	95,62 ± 1,25
5	98,27 ± 2,81	98,73 ± 3,46	95,77 ± 1,31	95,75 ± 1,35
6	99,61 ± 0,25	100,16 ± 0,46	99,53 ± 1,14	99,60 ± 0,69
7	97,92 ± 1,98	98,91 ± 2,12	97,32 ± 2,49	97,19 ± 2,62

Tableau 2.  
Pourcentages restants de BA2 et de BB2 (%)

Temps (Jours)	Moyenne ± S.D.			
	4 °C		22 °C	
	BA2	BB2	BA2	BB2
0	100,00 ± 2,37	100,00 ± 2,58	100,00 ± 1,42	100,00 ± 1,46
1	98,29 ± 1,29	98,41 ± 1,18	96,03 ± 1,19	95,94 ± 1,09
2	100,47 ± 1,44	101,11 ± 1,13	99,61 ± 1,64	99,41 ± 1,52
3	97,98 ± 1,52	98,50 ± 1,98	97,30 ± 2,10	97,45 ± 2,18
4	99,78 ± 2,31	100,45 ± 1,82	98,98 ± 1,48	98,99 ± 1,38
5	100,96 ± 1,58	101,65 ± 2,00	98,62 ± 1,61	98,45 ± 1,12
6	98,36 ± 1,85	99,4 ± 1,40	97,37 ± 1,50	97,03 ± 1,48
7	100,83 ± 1,58	101,31 ± 2,16	95,58 ± 1,33	96,09 ± 1,38

**Perte de BA2 et BB2 < 10 %**, après 7 j  
de conservation (4 °C ~ 22 °C)

# Résultats (3) – Stabilité chimique de la Bléomycine

## Les Fractions de Bléomycine

- Conformité aux spécifications de la Ph.EU.

### B seule

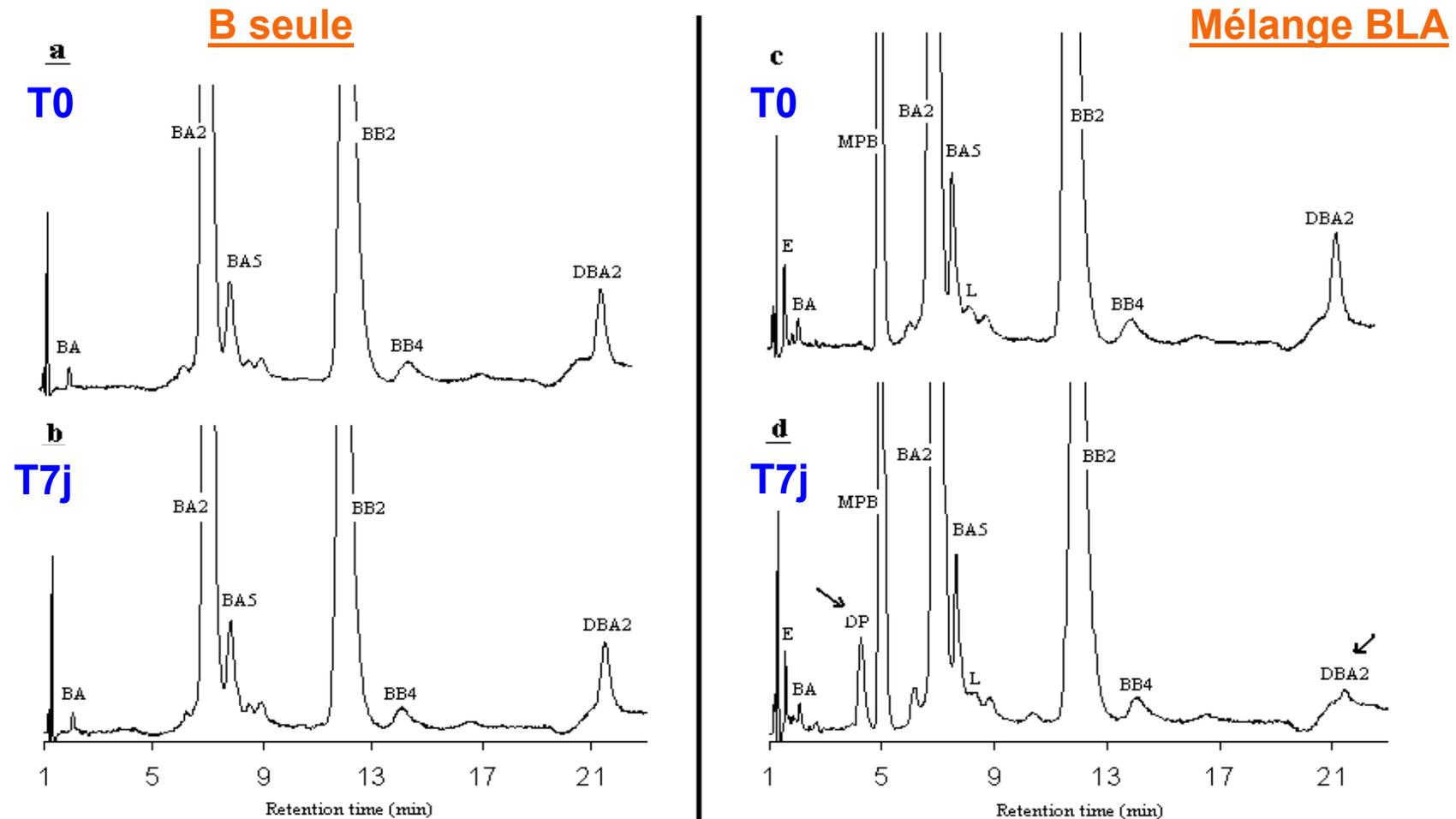
	% fractionnel = (aire du pic/total des fractions) x 100		
	BA2	BB2	DBA2
Spécifications Ph.Eu.	55-70	25-32	< 5,5
4°C – J7	64,61 ± 0,15	29,43 ± 0,09	2,12 ± 0,04
22°C – J7	65,09 ± 0,16	29,43 ± 0,22	2,14 ± 0,02

### Mélange BLA

	% fractionnel = (aire du pic/total des fractions) x 100		
	BA2	BB2	DBA2
Spécifications Ph.Eu.	55-70	25-32	< 5,5
4°C – J7	64,68 ± 0,23	29,61 ± 0,09	0,86 ± 0,06 *
22°C – J7	64,25 ± 0,10	29,74 ± 0,08	0,43 ± 0,02 *

(\*) 2,2 % à T0;  $p = 0,0004$

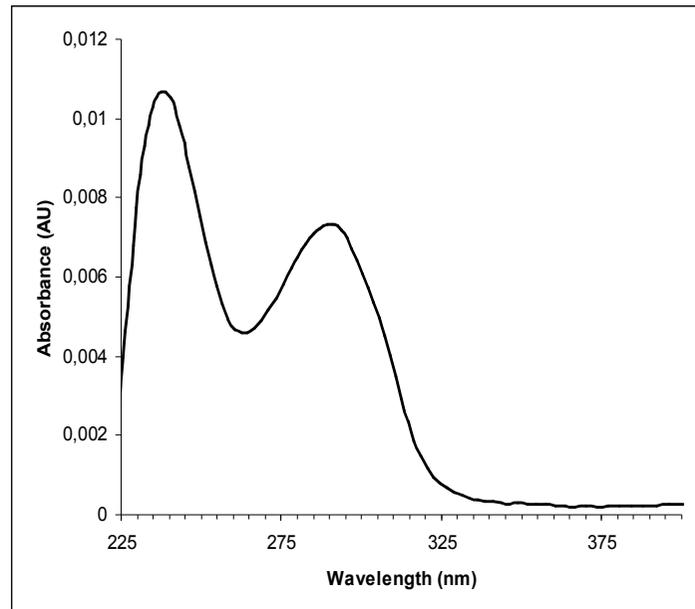
# Résultats (4) – Mise en évidence d'un produit de dégradation DP



E : Adréline; BA : Acide bléomycinique ; MPB: méthylparaben ; BA2: bléomycine A2 ; BA5: bléomycine A5 ; L : Lidocaïne ; BB2: bléomycine B2, BB4: bléomycine B4, DBA2: déméthylbléomycine.

# Résultats (5) – Mise en évidence d'un produit de dégradation

## DP

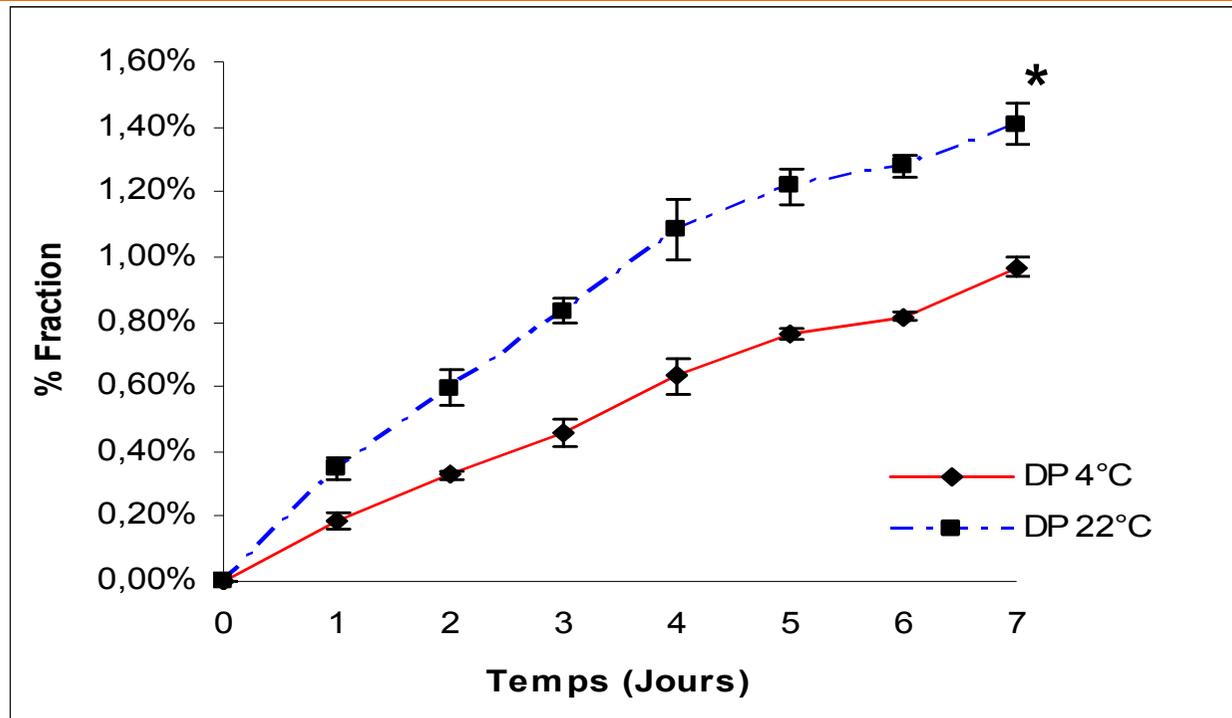


- Spectre UV identique à celui des fractions de Bléomycine
- Même chromatogramme obtenu sous  $H_2O_2$

⇒ **Dégradation oxydative**

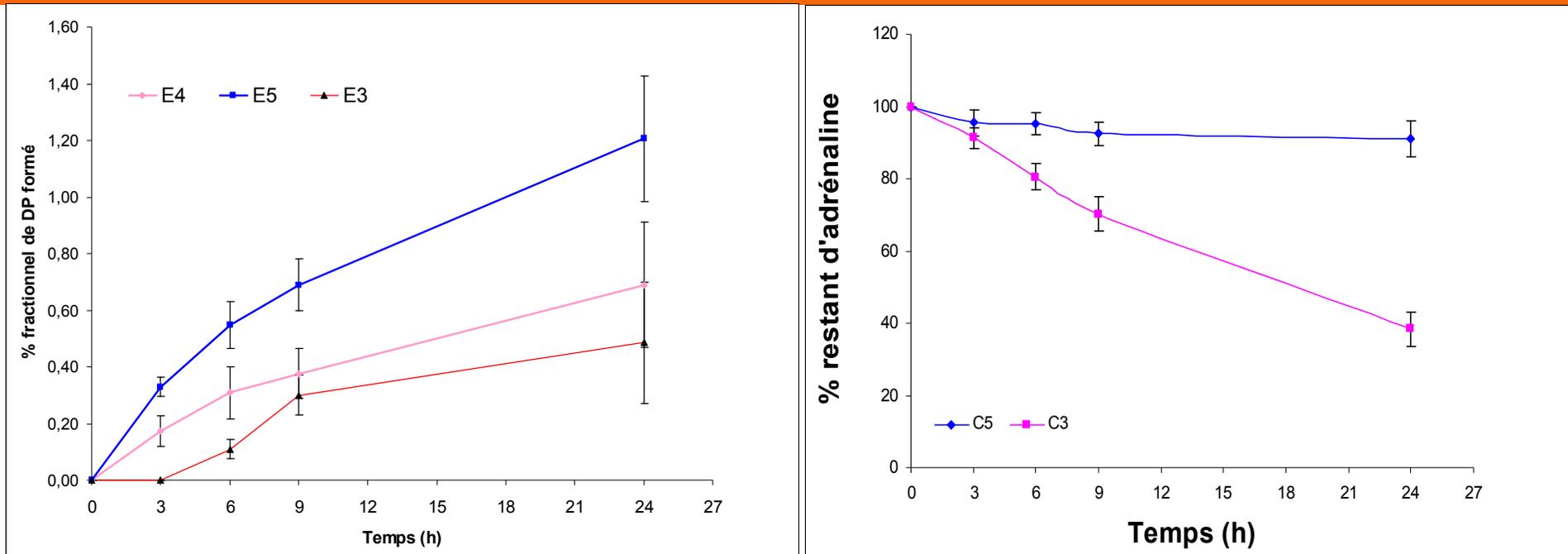
# Résultats (5) – Mise en évidence d'un produit de dégradation

## DP



- **Effet Température** = Formation plus significative à 22°C (\*  $p = 0,0004$ )
- Maximum DP atteint après disparition complète de DBA2
- Facteur de réponse de DP = à celui de DBA2

# Résultats (6) – Étude de compatibilité chimique



## ∞ Effet [adrénaline + métabisulfite] (C5)

- BA2/BB2 stables - ↓ DBA2
  - Formation de DP : C5 > C4 > C3 ⇒ Effet synergique
  - Stabilité de l'adrénaline C5 versus C3
- ⇒ Produits intermédiaire liés à l'oxydation : ERO, Fe, Cu ...

# Discussion (1) – Interprétation selon les guidelines ICH Q3B (R2)

## ∞ ICH, Q3B(R2) Impurities in New Drug Products (2006)

### Attachment 1: Thresholds for Degradation Products in New Drug Products Reporting Thresholds

<u>Maximum Daily Dose<sup>1</sup></u>	<u>Threshold<sup>2,3</sup></u>
≤ 1 g	0.1%
> 1 g	0.05%

### Identification Thresholds

<u>Maximum Daily Dose<sup>1</sup></u>	<u>Threshold<sup>2,3</sup></u>
< 1 mg	1.0% or 5 µg TDI, whichever is lower
1 mg - 10 mg	0.5% or 20 µg TDI, whichever is lower
>10 mg - 2 g	0.2% or 2 mg TDI, whichever is lower
> 2 g	0.10%

### Qualification Thresholds

<u>Maximum Daily Dose<sup>1</sup></u>	<u>Threshold<sup>2,3</sup></u>
< 10 mg	1.0% or 50 µg TDI, whichever is lower
10 mg - 100 mg	0.5% or 200 µg TDI, whichever is lower
>100 mg - 2 g	0.2% or 3 mg TDI, whichever is lower
> 2 g	0.15%

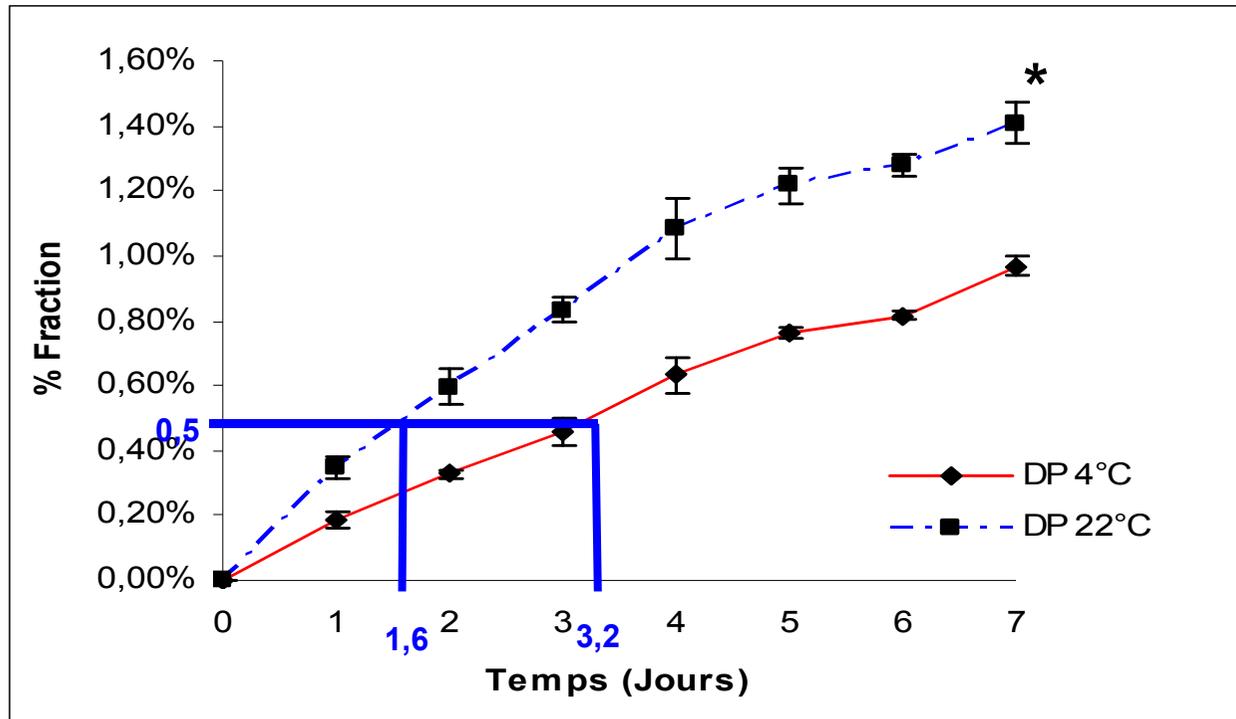
**D/j = 0,38mg à 1,5mg**

Rapport de mise en évidence

Détermination de la structure chimique

Evaluation biologique  
Test d'innocuité

# Discussion (2) – Durée optimale de conservation



Profils cinétiques de formation de DP dans le mélange BLA à 4°C (—) et à 22°C (- - -)

- DP ~ 0,75% à 5j à 4°C ⇒ Identification nécessaire - moyens plus poussés (SM)
- Limite d'identification de 0,5 % est atteinte : entre 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> jour à 4°C

entre le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>ème</sup> jour à 22°C

# Conclusion

- ∞ Stabilité de BLA est limitée à **3 j à 4°C** ou **1 j à 22°C**
  
- ∞ Stabilité de la bléomycine seule à **0,75 mg/mL** dans **NaCl 0,9 %** est démontrée sur **7 jours : 4 – 22°C**
  
- ∞ Alternatives :
  - \* Techniques chimiques plus poussées
  - ⇒ Conservation BLA 7 jours à 4°C.
  - \* Éviter les sulfites – Choix de spécialités « sulfites Free »
  - \* Administration préliminaire du mélange Lidocaïne / adrénaline (↑ du nombre d'injections, risque de dilution de la bléomycine)