

Sara HATIM, Gaëtan BOCCADIFUOCO, Frédéric ROSA, Vincent BOUDY, Sophie DUFAÏ  
 Unité de Recherche et Développement Analytique, Département Recherche et Développement Pharmaceutique, AGEPS (AP-HP), 7 rue du Fer à Moulin, 75005, Paris, France.

## INTRODUCTION

DRDP →  
AGEPS

Développement de médicaments pour les maladies orphelines non couvertes par l'industrie concurrentielle (ex: Le kit Histidine/Cuivre APHP pour la maladie de Menkes)



Le kit Histidine/Cuivre AP-HP

1 ampoule CuCl (6 mg/mL)  
1 ampoule Histidine 117,2 (mg/3mL)  
Durée de conservation: 24mois

## OBJECTIFS

- Démontrer le caractère indicateur de stabilité de la méthode de recherche des Produits de dégradation (PDD) de l'histidine.
- Identifier les voies de dégradation de l'Histidine et générer des PDD de la substance active (Histidine).
- Démontrer l'intérêt de l'inertage dans la production des ampoules d'Histidine : sélection d'un PDD représentatif de la dégradation dont l'évolution est évaluée avec une méthode prédictive de la stabilité.

## MATERIELS ET METHODES

### ❖ Dégradation forcée dans les conditions suivantes :

Stress	Conditions expérimentales	Température	Echéances	
<b>Thermique</b>	Flacon verre ambré Enceinte climatique	90°C	1, 2	
<b>Lumière</b>	Flacon verre transparent UV Visible	25°C	8, 13, 20	
<b>Oxydatif</b>	Flacon verre ambré Enceinte climatique	0,1 à 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 à 5% MMPP	60°C 60°C	1
<b>Hydrolytique</b>	Flacon verre ambré Enceinte climatique	1M NaOH 1M HCl	60°C 60°C	8, 29, 57 8, 29, 57

Tableau 1 : Conditions de dégradation de la solution d'Histidine (sans inertage) préparée selon la formulation de la préparation hospitalière

### ❖ Recherche des impuretés par CLHP-PDA phase inversée et identification LC-MS

### ❖ Justification de l'inertage des ampoules d'Histidine.

- Plan d'expérience avec le logiciel de prédiction de la stabilité selon la loi d'Arrhénius (ASAPPrime®).
  - TO : J0 (4 échantillons)
  - 45°C : J12 (2), J15 (2), J18 (3), J21 (3)
  - 55°C : J5 (2), J8 (2), J13 (2), J21 (3)
  - 65°C : J2 (2), J4 (2), J8 (2), J17 (3)
  - 75°C : J1 (2), J2 (2), J4 (2), J7 (3)
  - 90°C : J1 (4), J2 (5)
- x 2 séries
- Non inertée  
Inertée
- Evaluation de la durée de péremption prospective de chaque série.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### DÉGRADATION FORCÉE

Facteur de stress	Contrôle	Thermique	Oxydation moléculaire	Oxydation radicalaire	Oxydation par la lumière	Hydrolyse basique	Hydrolyse acide
Conditions de stress	Aucun	90 °C	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% à 60 °C	MMPP 5% à 60 °C	UV à 25 °C	1M NaOH à 60 °C	1M HCl à 60 °C
Aspect	Incolore	Incolore à jaune	Jaune à brun clair	Jaune à brun + précipité	Incolore à jaune	Incolore à jaune	Incolore à jaune
Echéance	J0	J2	J1	J1	J21	J57	J57
Histidine (tr = 5,80 min)	100%	97,96%	94,96%	95,74%	98,69%	97,21%	98,91%
Pic 2 (trr = 0,62)	0%	0,52%	3,83%	1,27%	0,86%	0,54%	0,43%
Pic 4 (trr = 2,86)	0%	0,65%	0,47%	2,03%	1,31%	1,34%	0,46%
Nombre de pic	0	15	35	23	31	13	11

Tableau 2 : Exemples de résultats en pourcentage d'aire normalisée de PDD de l'Histidine (Pic 1 trr = 0,43, Pic 2 trr = 0,62, Pic 3 trr = 2,00 et Pic 4 trr = 2,80)

### IDENTIFICATION D'UNE IMPURETÉ EN COUPLAGE MS

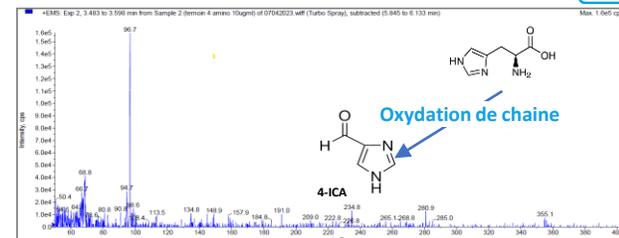


Figure 1 : Scan MS en ESI+ du 4-Imidazolcarboxaldéhyde (4-ICA), spécificité de la transition MRM 97/69

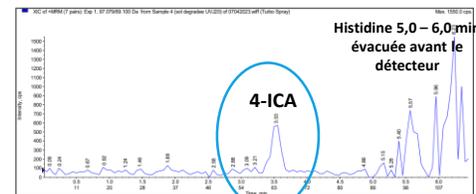


Figure 2 : Transition MRM 97/69 retrouvée au TR 3,5 min dans une solution d'histidine dégradée à la lumière pendant 20 jours

L'analyse LC-UV a montré que le 4-Imidazolcarboxaldéhyde (4-ICA) est élué au même temps de rétention que le Pic 2. (Figure 3)  
L'identification du Pic 2 a été confirmée en couplage LC-MS. (Figure 2 et 3)  
Le pic 2 à 3,5 min est le 4-ICA.

Il est prévu de reproduire cette méthodologie avec un témoin d'oxo-histidine, un autre produit de dégradation indiqué dans la bibliographie<sup>1,2</sup>

### PRÉDICTION DE DÉGRADATION

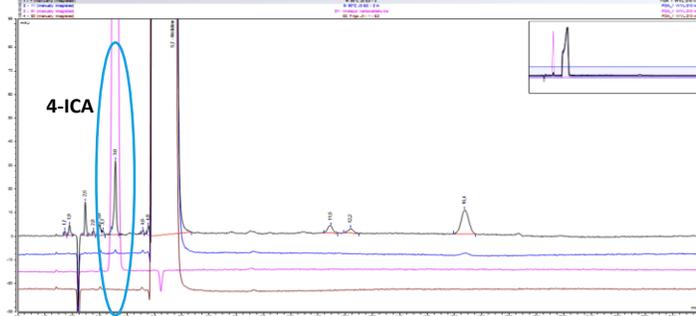
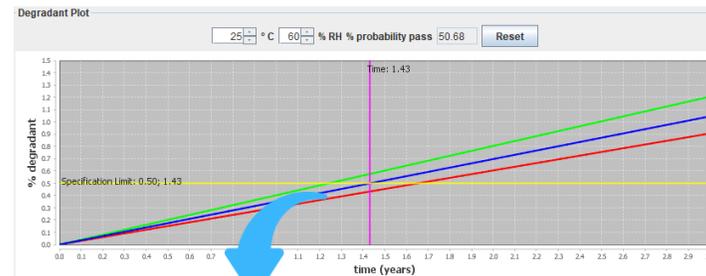


Figure 3 : Chromatogrammes des solutions d'histidine dégradées en 21 à 90 °C, inerté (bleu) et non inerté (noir), solution histidine non dégradée J0 (marron), témoin 4-ICA (rose)



Prédiction de conservation  
1,43 ans

Très peu de dégradation (Figure 5) suggérant une péremption largement supérieure à 24 mois = durée de conservation des ampoules d'histidine

➤ Cette étude comparative démontre l'efficacité de l'inertage dans le procédé de fabrication des ampoules d'histidine.

## CONCLUSION

La méthode utilisée dans les études de stabilité permet de visualiser et de séparer les différents PDD obtenus par dégradation forcée. L'identification du 4-imidazolcarboxaldéhyde a permis d'obtenir un indicateur représentatif de la dégradation de la solution d'histidine. Le programme ASAPPrime® a permis de prédire la stabilité de la formule d'histidine en moins d'un mois et de justifier l'utilisation d'un procédé d'inertage des ampoules d'Histidine. Cette étude illustre les méthodologies analytiques de stabilité mises en œuvre dans le processus de développement d'un médicament.