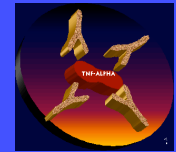




STABILITE DE L'INFLIXIMAB EN SOLUTIONS DILUÉES



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

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



Introduction



Les anticorps monoclonaux comme l'infliximab (Rémicade®) sont actuellement très utilisés en thérapeutique. Les recommandations laboratoires en termes de stabilité sont les suivantes : après reconstitution, 24h entre 2 et 8°C. Cette durée de stabilité autorisée uniquement la fabrication de préparations magistrales obligeant à travailler en flux tendu. La réalisation de préparations hospitalières, pour optimiser le flux de travail, nécessite d'évaluer la stabilité afin de déterminer une durée de conservation, ce qui est difficile pour les anticorps.



Objectif

L'objectif de ce travail a donc été d'étudier la stabilité physico-chimique de solutions diluées d'infliximab dans du NaCl à 0.9% aux concentrations de 0.7 et 1.6 mg/ml et à trois températures.

Matériels et méthodes

L'infliximab à 10mg/ml a été dilué dans du NaCl aux concentrations de 0.7 et 1.6 mg/ml. Ces solutions stériles ont été conditionnées dans des poches stériles de polyoléfine et conservées à 4°C, 22°C et 40°C. Pour chaque concentration et températures, 3 lots différents ont été préparés. Après 0, 7, 14 et 30 jours, des aliquots ont été prélevés dans chaque poche avant l'analyse.



L'agrégation a été mesurée par turbidimétrie UV avant et après centrifugation à 3 longueurs d'ondes : 350, 410 et 550nm.

L'anticorps a été dosé à 279 nm (λ_{max}), et le rapport $\lambda_{max}/\lambda_{min}$ (251 nm) a été calculé.

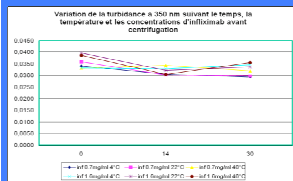
Le dosage des protéines a été réalisée par méthode Bio-rad.

La mise en évidence d'une éventuelle fragmentation ou la formation agrégats solubles ont été estimées par CLHP d'exclusion de gel (SEC) et la modification globale de la charge a pu être appréhender par CLHP ionique

La DLS (dynamic light scattering) a permis l'évaluation de la tailles des agrégats solubles.

Résultats

Turbidimétrie



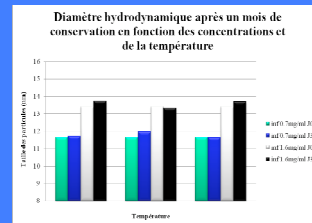
Les densités optiques (D_o) sont restées constantes quelques soit la longueur d'onde étudiée, les températures et les concentrations. Les spectres UV sont restés superposables. La figure ci-contre représente l'évolution des D_o à 350 nm pour les 2 concentrations testées et aux 3 températures en fonction du temps. Une D_o moyenne de 0.0321 ± 0.002 a été retrouvée.

Spectrométrie (ratio $\lambda_{max}/\lambda_{min}$)

Concentration	Température	Ratio $\lambda_{279}/\lambda_{251}$	
		Initial	1 mois
0.7mg/ml	4°C	Initial	2.3080 ± 0.0787
		1 mois	2.3117 ± 0.0032
	22°C	Initial	2.2776 ± 0.0163
		1 mois	2.3117 ± 0.0160
	40°C	Initial	2.3010 ± 0.0811
		1 mois	2.1957 ± 0.0060
1.6mg/ml	4°C	Initial	2.3663 ± 0.0219
		1 mois	2.3109 ± 0.0571
	22°C	Initial	2.2921 ± 0.0450
		1 mois	2.3020 ± 0.0523
	40°C	Initial	2.4352 ± 0.1143
		1 mois	2.2878 ± 0.0091

Les ratios A_{279}/A_{251} initiaux et à un mois n'ont pas été modifiés pour les deux concentrations à 4 et 22°C. Une légère diminution du ratio a été observée à 40°C due à une diminution de l'absorbance à 279 nm.

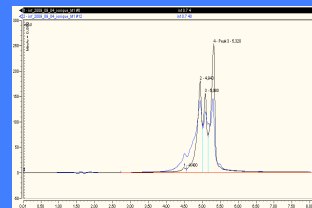
Dynamic light scattering



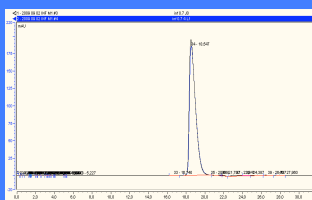
La conservation à différentes températures n'altère pas le diamètre hydrodynamique qui reste constant (de l'ordre de 11.5 nm pour la solution à 0.7 mg/ml et 13.5 nm pour la concentration à 1.6 mg/ml).

Au terme de 1 mois de conservation, même à 40°C, aucune autre populations particulière n'est apparue.

SEC and CEX HPLC



En HPLC ionique, le profil isotypique n'a pas été modifié à 4 et 22°C. Néanmoins, comme le montre la figure ci-contre, à 40°C, l'aspect s'est modifié. L'aire du premier pic est plus importante tandis que l'aire des trois autres pics est inférieure (4°C versus 40°C). De ce fait, les AUC totales ont été modifiées avec une diminution de l'AUC à 40°C passant ainsi de 92 à 76 nAUC*min.



En HPLC, d'exclusion de gel, aucun changement significatif du profil des chromatogrammes n'a été observé pour l'ensemble des poches conservées à 4°C, 22°C et 40°C, en comparaison au J0. Aucun pic additionnel de haut poids moléculaire ou de pics fragmenté n'a été observé.

La quantité d'infliximab, estimé par l'AUC totale (exprimée en nAUC*min) n'a pas diminué au cours du premier mois et ce, quelque soit la concentration ou la température.

Conclusion

Ces résultats démontrent que l'infliximab en solutions diluées dans du NaCl à 0.9% et conservé dans des poches en polyoléfine aux concentrations de 0.7 et 1.6 mg/ml est stable au moins un mois à 4° et 22°C. Des résultats à 3 et 6 mois compléteront ces résultats préliminaires.



Si ces résultats se confirment à 3 mois, la mise en œuvre de préparations hospitalières est envisageable.

