

ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES et TECHNOLOGIES

UMR 6239 GICC : Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer

UMR 6005 ICOA : Institut de Chimie Organique et Analytique

THÈSE présentée par :

Renaud RESPAUD

soutenue le : **09 décembre 2011**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

**Etude de stabilité de médicaments anticancéreux
injectables : apports analytiques et pharmaceutiques**

THÈSE dirigée par :

Mme VIAUD-MASSUARD Marie-Claude

Professeur, Université François - Rabelais

Mme ELFAKIR Claire

Professeur, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Mr PEYRIN Eric

Professeur, Université de Grenoble

Mr ASTIER Alain

Professeur, Université de Paris XII

JURY :

Mr PROGNON Patrice

Professeur, Université de Paris XI

Mr PEYRIN Eric

Professeur, Université de Grenoble

Mr ASTIER Alain

Professeur, Université de Paris XII

Mr VIGNERON Jean

Praticien hospitalier, CHU Nancy

Mme ELFAKIR Claire

Professeur, Université d'Orléans

Mme VIAUD-MASSUARD Marie-Claude

Professeur, Université François – Rabelais

Remerciements

A Marie-Claude Viaud-Massuard :

Vous m'avez offert la possibilité de réaliser cette thèse au sein de votre laboratoire avec toute votre confiance sur le sujet et les moyens de parvenir à mes fins. Vous avez également tout mis en œuvre à la réalisation de mes projets et objectifs professionnels. Parallèlement à tout cela, vous avez également supporté mes baisses de moral ainsi que mes nombreuses descriptions culinaires... Pour tout cela, je vous remercie chaque jour depuis trois ans, aujourd'hui et pour tous les jours à venir, en espérant que cela suffise à vous rendre une partie de tout ce que je vous dois...

A Claire Elfakir :

Vous m'avez permis d'approfondir le peu de notions en chimie analytique que je possédais au début de ce travail et, par moment, je me revois dans votre bureau, écoutant vos conseils et analyses, en me disant « J'ai encore pas mal de choses à rectifier... ». Merci également pour votre soutien de chaque instant lors de la rédaction. Pour cela je vous remercie infiniment, mais également pour nos discussions moins scientifiques...Je ne regrette qu'une chose, c'est que votre laboratoire ne soit pas à côté du notre...

A Patrice Prognon :

Merci de faire, à nouveau, partie de mon jury de thèse. Un jour, dans votre bureau à l'HEGP, vous m'avez dit que tous les pharmaciens étaient des analystes, et depuis ce jour-là, j'essaye de faire passer le message aux étudiants qui croisent ma route...non sans mal !!! Merci d'avoir éclairé la mienne.

A Alain Astier, Eric Peyrin, Jean Vigneron :

Je vous remercie de prendre le temps de juger ce travail et de me faire l'honneur de faire partie du jury. Je vous témoigne toute ma gratitude.

A Jean-François :

Ce travail est aussi le tien... Merci de m'avoir supporté dans ton bureau et de m'avoir offert la possibilité de réaliser cette thèse. Merci de l'énergie déployée pour me confier des projets hospitaliers et des formations qui m'ont beaucoup apporté tant au point de vue professionnel que personnel. Enfin je te remercie pour cette amitié qui va bien au-delà de nos missions hospitalo-universitaires.

A mes parents :

Sur ma thèse d'exercice, j'écrivais à « Mon père », puis à « Ma mère »... Quel bonheur de pouvoir écrire à « Mes parents ». J'espère que vous êtes fiers de moi pour ce que j'ai réalisé. Par contre, c'est la dernière.....

A mes beaux-parents :

Merci pour votre soutien sans faille et d'avoir toujours cru en votre gendre, même s'il faut l'avouer, faire confiance à un étudiant (encore) de 32 ans pour s'occuper de sa fille et de ses petits-enfants, c'est très courageux de votre part !

A Cyril, Rodolphe, Magali, Emilie et Mélanie :

Merci pour votre amour sans limite et pour tous les bons moments passés ensemble. J'ai enfin fini mes études et, cette réussite, je vous la dois aussi.

A Séverine, Christelle, Christophe, Romain et Freddy

A Benjamin et Julia :

Merci d'avoir toujours pris des nouvelles et de toujours voir le verre à moitié plein.

A mes neveux et nièces :

Tonton vous expliquera sa thèse dans quelques années.

A mes amis d'enfance, de fac' et de chantier.

Au labo (Cécile, Charlotte, Abder, Agathe, Gildas, Angelo, Stéphanie) :

Merci à tous pour votre soutien. Un merci spécial à Cécile pour toute son aide.

Au labo chimie analytique de l'ICOA :

Merci à tous un merci particulier à Laetitia pour toute son aide sur la LC-MS et à Thomas pour m'avoir accompagné dans mon entreprise de sabotage de la masse... à coup de masse !!!

A l'UBCO et au service Pharmacie Bretonneau du CHRU de Tours :

Merci pour votre soutien et votre aide très précieuse dans la réalisation de ce travail.

A Hélène, Robin, Jules et Romane :

Sans vous, tout cela n'aurait pas de sens...

Résumé

La prise en charge des patients atteints de cancer fait intervenir le pharmacien hospitalier dans la préparation des médicaments anticancéreux injectables. Afin de limiter les coûts de cette prise en charge médicamenteuse, une des alternatives consiste à optimiser leur préparation en prenant en compte la stabilité physico-chimique des anticancéreux : 1- en utilisant les reliquats générés lors de la préparation. 2- en évaluant la possibilité de fabriquer à l'avance les préparations d'anticancéreux. L'absence de données de stabilité de ces médicaments nous a conduits à l'évaluer sur le pemetrexed et le methotrexate afin de répondre à cette double problématique et d'étudier le gain de coût associé.

Nous avons démontré, au cours de ce travail, la stabilité des reliquats de pemetrexed-Alimta[®] pendant 14 jours permettant ainsi leur réutilisation. Nous avons également montré la stabilité de solutions de méthotrexate conditionnées en seringues pendant 28 jours.

Une des conséquences de ces études est la réalisation d'économie pour la sécurité sociale par l'optimisation de la gestion des reliquats d'anticancéreux. Cette économie représente environ 10 % du budget annuel des anticancéreux injectables soit 750 k€.

Nous avons montré au cours de ce travail l'apport de la chimie analytique et organique ainsi que l'apport de la pharmacie dans la mise en place et l'exploitation des études de stabilité sur les médicaments anticancéreux injectables.

Résumé en anglais

Hospital pharmacists are involved in the management of cancer patients through preparation of intravenous anticancer drugs. To limit the costs of the chemotherapies, an alternative is to optimize their preparation by considering the physicochemical stability of anticancer drugs. This can be done by using the leftovers generated during the preparation and by preparing in advance the devices to be used for administration. The lack of data on the stability of anticancer drugs has led us to evaluate pemetrexed and methotrexate with the aim of answering both the above issues. In parallel, we studied the associated cost savings.

In this thesis, we have demonstrated the stability of leftovers of pemetrexed-Alimta[®] for 14 days allowing their use for subsequent preparations. We also showed the stability of solutions of methotrexate packaged in syringes for 28 days.

One consequence of these studies is its translation in cost-savings for our Healthcare Funding Organization by managing leftover anticancer drugs. These cost-savings (about 750 k€) represent about 10 % of the total annual expenditure of anticancer drugs.

Our work illustrates the contribution of analytical and organic chemistry and the role pharmacists can have in improving costs by performing stability studies of anticancer drugs.

Table des matières

Remerciements	2
Résumé	4
Résumé en anglais	5
Liste des abréviations	9
Liste des annexes	11
INTRODUCTION GENERALE	12
CHAPITRE I BESOIN D'UNE MEILLEURE GESTION DE L'UTILISATION DES ANTICANCEREUX DANS LES UNITES DE RECONSTITUTION DES PUI	17
I.1 Contextes réglementaires de la pharmacie hospitalière	18
I.1.1. Les missions de la Pharmacie à Usage Intérieur (PUI)	18
I.1.2. La tarification à l'activité (T2A)	19
I.1.3. Le contrat de Bon Usage (CBU)	21
I.2. L'unité de Biopharmacie Clinique et Oncologique (UBCO) du CHRU de Tours – Hôpital Bretonneau	24
I.3. Stabilité physico-chimique des médicaments anticancéreux injectables	27
I.3.1. Définitions	28
I.3.2. Facteurs influençant la stabilité :	29
I.3.2.1. Composition de la spécialité	29
I.3.2.2. Forme chimique du principe actif	29
I.3.2.3. Solvants de dilution	30
I.3.2.4. Concentration en principe actif dans la solution	30
I.3.2.5. Conditions de conservation	31
I.3.2.5.1. Température	31
I.3.2.5.2. Exposition à la lumière	31
I.3.2.5.3. Contenant final	32
I.3.2.5.4. Incompatibilités	34
I.3.3. Conclusion	34
I.4. Conclusion sur le contexte de cette thèse	35
CHAPITRE II ETUDES DE STABILITE ET IDENTIFICATION DES PRODUITS DE DEGRADATION D'UN ANTICANCEREUX : LE PEMETREXED-ALIMTA®	38
II.1. Connaissances actuelles sur la molécule	39
II.1.1. Propriétés physico-chimiques	39

II.1.2. Mécanisme d'action	40
II.1.3. Indications.....	42
II.1.4. Formes et présentations	43
II.1.5. Connaissances disponibles sur la stabilité en solution	44
II.1.6. Le point sur les méthodes d'analyses chromatographiques publiées dans le cadre de l'étude de stabilité du pemetrexed.....	46
II.2. Développement d'une nouvelle méthodologie d'analyse du pemetrexed.....	48
II.2.1 Fonctionnement du DEDL	49
II.2.2. Principe de la chromatographie d'appariements d'ions	50
II.2.3. Développement de la méthode chromatographique pour l'étude de stabilité du pemetrexed	52
II.2.3.1. Etude des conditions isocratiques de séparation entre le mannitol, les ions chlorure et sodium et l'acide glutamique.....	53
II.2.3.2. Etude des conditions de gradient de solvant organique pour l'élution du pemetrexed	58
II.3. Validation de la méthode chromatographique.....	61
II.4. Etude de stabilité du pemetrexed-Alimta® à 25 mg.mL ⁻¹	77
II.4.1. Préparation des solutions	77
II.4.2.Stabilité physique	78
II.4.3. Stabilité chimique.....	78
II.5. Identification des produits de dégradation du pemetrexed par chromatographie d'appariements d'ions couplée à la spectrométrie de masse.....	81
II.5.1. Principe de la spectrométrie de masse	81
II.5.1.1. Les sources d'ionisation à pression atmosphérique	82
II.5.1.2. L'interface à rideau de gaz.....	84
II.5.1.3. L'analyseur quadripolaire.....	84
II.5.1.3. Analyseur triple quadripôle	85
II.5.2. Optimisation des paramètres SM/SM en vue de l'analyse des solutions de pemetrexed.....	86
II.5.3. Couplage chromatographie-spectrométrie de masse simple.....	92
II.5.4. Couplage chromatographie-spectrométrie de masse tandem.....	98
II.5.4.1. Etude du produit de dégradation 2.....	99
II.5.4.2. Etude du produit de dégradation 1.....	102

II.5.4.3. Chromatographie semi-préparative et RMN	102
II.6. Conclusion.....	102
CHAPITRE III ETUDE DE STABILITE DU METHOTREXATE.....	104
III.1. Connaissances actuelles sur la molécule.....	105
III.1.1. Propriétés physico-chimiques	105
III.1.2. Mécanisme d'action	106
III.1.3. Indications	107
III.1.4. Formes et présentations	107
III.1.5. Connaissances disponibles sur la stabilité en solution	107
III.2. Développement méthodologique et optimisation de la méthode chromatographique.....	108
III.3. Validation de la méthode	111
III.4. Etude de stabilité du méthotrexate	114
III.4.1. Préparation des seringues	114
III.4.2. Stabilité physique.....	114
III.4.3. Stabilité chimique	114
III.5. Conclusion	116
CHAPITRE IV IMPACT ECONOMIQUE DE LA GESTION DES RELIQUATS D'ANTICANCEREUX INJECTABLES AU CHRU DE TOURS	117
IV.1. Méthodologie de travail.....	121
IV.1.1. Gestion des reliquats.....	121
IV.1.2. Données de stabilité	121
IV.1.3. Données analysées	122
IV.1.4. Recommandations.....	123
IV.2. Résultats.....	123
IV.3. Conclusion	129
CONCLUSION GENERALE	131
Bibliographie.....	136
Annexes	141

Liste des abréviations

Pharmacie Hospitalière

AFFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ARS	Agence Régionale de Santé
CBU	Contrat de Bon Usage
CHRU	Centre Hospitalier Régional Universitaire
CNHIM	Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament
ETP	Equivalent Temps Plein
GHS	Groupe Homogène de Service
HAS	Haute Autorité de Santé
HT	Hors Taxe
INCa	Institut National du Cancer
JO	Journal Officiel
PTT	Protocole Temporaire de Traitement
PUI	Pharmacie à Usage Intérieur
RBU	Référentiel de Bon Usage
RCP	Résumé Caractéristiques Produit
SFPO	Société Française de Pharmacie Oncologique
UBCO	Unité de Biopharmacie Clinique et Oncologique
ZAC	Zone à Atmosphère Contrôlée

Chimie

ACN	Acétonitrile
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
DEDL	Détecteur Evaporatif à Diffusion de Lumière
DHFR	Dihydrofolate Réductase
ESI	Electrospray Ionization
EVA	Ethylvinylacétate
GARFT	Glycinamide Ribonucléotide Formyltransférase
Glu	Acide Glutamique
ICH	International Conference of Harmonization
NFPA	Acide Nona-fluoropentanoïque
PE	Polyéthylène
pH	potentiel Hydrogène
PMTX	Pemetrexed
POF	Polyoléfine
PP	Polypropylène

PVC	Polychlorure de vinyle
SFSTP	Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques
SM	Spectrométrie de Masse
T2A	Tarifcation A l'Activité
TDFHA	Acide Trideca-fluoroheptanoïque
TFA	Acide Tri-fluoroacétique
TS	Thymidilate Synthétase
uma	unité de masse atomique
UV	Ultra-Violet

Liste des annexes

Annexe I : Référentiel de bon usage du pemetrexed-Alimta[®].

Annexe II : Appareillage et réactifs utilisé lors de la mise au point des méthodes et des études de stabilité.

Annexe III : Brevet déposé le 18/03/2010 par la société Eli Lilly and Company, n°WO 2010/030598 A2. (p1 et 9).

INTRODUCTION GENERALE

La volonté d'améliorer la qualité de la prise en charge du patient à l'hôpital a entre autre, contribué à la mise en place du circuit du médicament (Figure 1). Le circuit du médicament commence par la prescription et se poursuit par la dispensation, étape qui comprend l'analyse pharmaceutique et la délivrance des médicaments. Il s'achève par leur administration au patient.

En amont, ce circuit est consolidé par des étapes purement pharmaceutiques telles que :

- La gestion des médicaments : commandes aux laboratoires, gestion des stocks, des périmés, des retraits de lots (tant à la pharmacie que dans les armoires des services),
- Le choix des médicaments disponibles à l'hôpital et la constitution du livret du médicament.

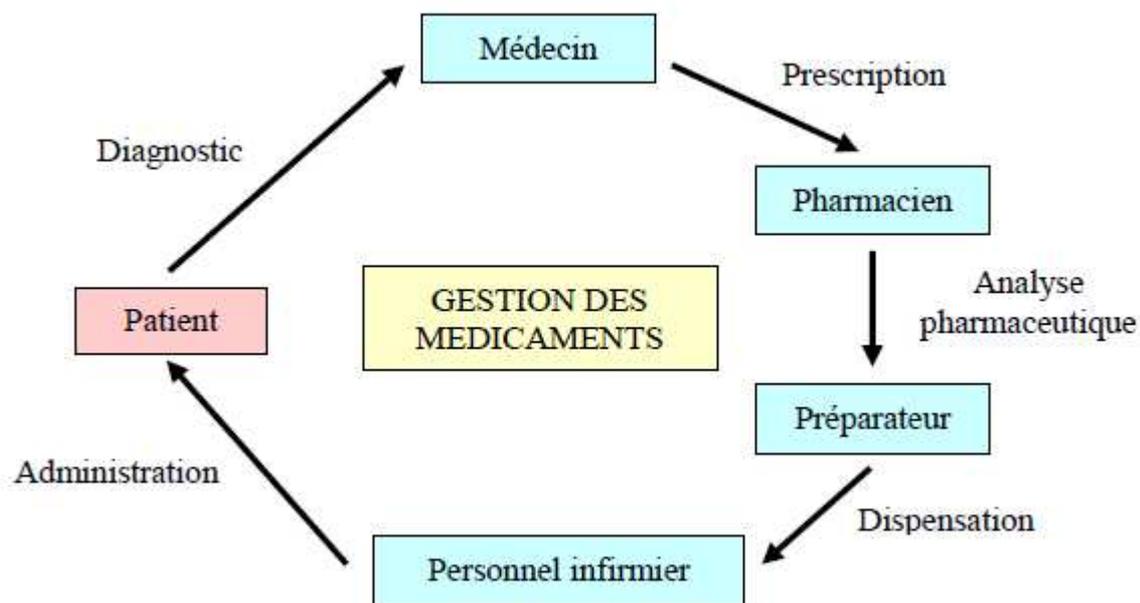


Schéma 1 : Schéma du circuit du médicament

La préparation des médicaments injectables est une étape parfois nécessaire voire obligatoire lorsqu'il s'agit de traitements injectables d'anticancéreux pour des patients hospitalisés. Cette préparation est sous la responsabilité du pharmacien hospitalier de l'établissement qui doit proposer entre autres des conditions de conservation des

préparations en fonction des données de stabilité physico-chimiques disponibles. Ces données dépendent de nombreux critères tels que :

- Les conditions de conservation (température, abri de la lumière...),
- Les conditions d'administration (matériaux)
- Les concentrations finales des médicaments dilués, ainsi que des solvants de dilution (Glucose 5 %, NaCl 0,9 %).

La combinaison de ces critères, principalement liés aux doses adaptées pour chaque patient (voire volumes et temps de perfusion) rend l'exercice délicat et complexe.

Certaines données de stabilité sont disponibles dans les Résumés Caractéristiques du Produit (RCP), d'autres dans la littérature, mais restent parfois inadaptées à la pratique quotidienne hospitalière.

De plus, les méthodes d'analyse utilisées telles que la CLHP-UV (Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à une détection Ultra-Violette) sont peu spécifiques et les méthodologies décrites sont hétérogènes et peu explicites. Il est également important de constater que la plupart des études se focalise uniquement sur le suivi du déficit en principe actif des solutions reconstituées, conduisant ainsi à leur potentielle perte d'efficacité. Par ailleurs pour les anticancéreux mis en solution, peu d'études ont envisagé la possibilité de relargage de produits de dégradation qui pourraient se révéler actifs ou surtout toxiques. Les études de stabilité des chimiothérapies anticancéreuses sont donc essentielles dans la prise en charge des patients atteints de cancer afin de garantir une utilisation non délétère des médicaments. Ces études sont d'autant plus indispensables que les produits sont extrêmement coûteux (jusqu'à 8 000 € la préparation) et que toute déviation, par rapport au RCP, de stockage ou de préparation conduirait à la destruction d'une telle préparation.

Un des cinq axes de travail de la Société Française de Pharmacie Oncologique (SFPO) concerne « La stabilité des médicaments anticancéreux » dans le but d'harmoniser et de valider les différentes études de stabilité d'anticancéreux injectables publiées dans des revues internationales. L'objectif visé est de disposer d'une base de données des stabilités d'anticancéreux injectables permettant de gérer au mieux, au quotidien, l'activité des différentes unités de préparation des médicaments anticancéreux des établissements de santé en France. A l'heure actuelle, en effet il n'existe pas de recommandations officielles de la part des autorités sur l'utilisation des données de stabilité physico-chimiques issues de la littérature scientifique. Ces stabilités sont éditées et mentionnées dans les dossiers du CNHIM et constituent un véritable support fiable pour le terrain [1].

L'Institut National du Cancer (INCa), de son côté, insistait dans son compte-rendu de réunion du 15 novembre 2005, sur la difficulté rencontrée par l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) pour obtenir de l'industrie pharmaceutique des études de stabilité des médicaments anticancéreux après dilution.

« Des études de stabilité des anticancéreux mis en solution doivent être engagées par les industriels du médicament car les durées de stabilité figurant dans le Résumé des Caractéristiques du Produit sont souvent très limitées. La difficulté est le pouvoir de contrainte dont peut disposer l'AFSSAPS dans ce domaine ».

Outre les pertes d'efficacité ou l'apparition de toxicité, ces études ont un impact économique non négligeable puisqu'elles permettraient l'utilisation des reliquats d'anticancéreux si ces derniers sont conservés dans des conditions optimales.

Pour pallier ce manque reconnu d'informations disponibles sur la stabilité des médicaments et assister malgré tout, l'Unité de Biopharmacie Clinique et Oncologique du CHRU de Tours dans sa démarche volontaire vers une meilleure gestion des reliquats de médicaments, notre équipe de recherche s'est focalisée en premier lieu sur deux aspects complémentaires du problème:

- D'une part, l'étude de stabilité physico-chimique, dans les conditions d'utilisation au sein de l'Unité de Biopharmacie Clinique et Oncologique du CHRU de Tours, de deux préparations d'anticancéreux, très largement administrés et l'identification des produits de dégradation apparus au cours de cette étude de stabilité.
- D'autre part, l'évaluation de l'impact économique de telles études dans la pratique quotidienne de l'unité de reconstitution des anticancéreux au sein du CHRU.

Après une présentation, du contexte hospitalier, économique et scientifique dans lequel se situe la problématique de stabilité physico-chimique des anticancéreux injectables, nous développerons, la mise au point d'une méthode analytique permettant le suivi de stabilité chimique d'une préparation d'anticancéreux très largement administré en pneumologie, le pemetrexed-Alimta[®], ainsi que les méthodes analytiques mises en œuvre pour caractériser les produits de dégradation apparus au cours de cette étude. Nous exposerons ensuite les résultats d'une deuxième étude de stabilité répondant à une problématique de notre unité concernant un anticancéreux de la même famille que le pemetrexed-Alimta[®], le methotrexate, résultats

obtenus en ajustant les conditions chromatographiques optimisées pour l'analyse de la première molécule.

Le troisième chapitre sera dédié à l'étude que nous avons réalisée sur l'impact économique de la gestion des reliquats des anticancéreux au quotidien au sein de notre service hospitalier.

Le manuscrit s'achèvera sur une conclusion générale et sur les nombreuses perspectives de ce travail. En effet, un grand nombre d'anticancéreux injectables sont développés à l'heure actuelle et les informations concernant leur stabilité physico-chimique restent toujours parcellaires. De plus, pour les nouvelles thérapies ciblées qui font appel de plus en plus à des molécules telles que les anticorps monoclonaux il sera nécessaire de développer de nouvelles techniques d'analyses, différentes de celles adaptées actuellement à l'analyse des molécules chimiques classiques, afin de caractériser leur structure tridimensionnelle en solution.

CHAPITRE I

**BESOIN D'UNE MEILLEURE GESTION DE
L'UTILISATION DES ANTICANCEREUX DANS
LES UNITES DE RECONSTITUTION DES PUI**

Depuis une vingtaine d'années, la pharmacie hospitalière connaît un essor et une diversification de ses activités sans précédent. La loi du 8 décembre 1992 définit pour la première fois la Pharmacie à Usage Intérieur (PUI) des établissements de santé ainsi que les activités dont elle a la charge [2]. Cette loi s'est vue consolider par la loi du 1^{er} juillet 1998 qui introduit l'obligation pour les établissements de santé de mettre en place un système permettant d'assurer la qualité de la stérilisation des dispositifs médicaux [3]. Dans la suite de ce premier chapitre, nous allons présenter le contexte réglementaire lié au fonctionnement de la PUI, puis, en nous plaçant dans le contexte de la pratique de la cancérologie, nous allons tenter de mettre en évidence les enjeux économiques induits par la gestion des anticancéreux utilisés au quotidien. En effet, ces traitements représentent un budget important au sein des PUI en France, avec des conséquences directes sur le budget d'un hôpital mais aussi sur celui des organismes payeurs (Sécurité Sociale).

I.1 Contextes réglementaires de la pharmacie hospitalière

I.1.1. Les missions de la Pharmacie à Usage Intérieur (PUI)

Les missions de la PUI sont de plusieurs natures [4] :

- D'une part, les missions légales selon l'Article L. 5126-5 du Code de la santé publique qui réunissent la gestion, l'approvisionnement, la préparation, le contrôle des médicaments, des produits et objets du monopole pharmaceutique, la détention des dispositifs médicaux stériles, la dispensation, l'information sur ces articles, la promotion du bon usage, la pharmacovigilance et la matériovigilance,
- Et d'autre part, une action sur la qualité et la sécurité des soins.

Ces missions légales sont complétées par des activités réglementaires divisées en 2 parties :

- Les activités obligatoires :
 - gestion
 - approvisionnement
 - contrôle
 - détention des médicaments, des produits du monopole pharmaceutique et des dispositifs médicaux stériles
 - réalisation des préparations magistrales, division des produits officinaux

- Les activités optionnelles soumises à autorisation :
 - o réalisation des préparations hospitalières
 - o réalisation des préparations pour essais cliniques
 - o délivrance des aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales
 - o stérilisation des dispositifs médicaux
 - o préparation des médicaments radiopharmaceutiques
 - o dispensation des médicaments aux patients ambulatoires

Enfin, la PUI doit remplir des missions pratiques : dispensation des articles pharmaceutiques ; suivi thérapeutique ; approvisionnement des articles pharmaceutiques (interne (dont pharmacotechnie et stérilisation) et externe) ; minimisation et analyse des coûts ; prévision et anticipation d'une situation sanitaire critique ; enseignement des pratiques pharmaceutiques ou para-pharmaceutiques, formation, information ; recherche appliquée en pharmacie. Toutes ces missions doivent être réalisées selon des principes de respect de la réglementation, de sécurité sanitaire, de traçabilité des articles et des opérations, de qualification des intervenants et dans un souci permanent de satisfaction du patient.

Afin de définir clairement les conditions de mise en œuvre de toutes ces missions, le décret n°2000-1316 du 26 décembre 2000, paru au JO du 30 décembre 2000, relatif aux pharmacies à usage intérieur prévoit que celles-ci fonctionnent conformément aux bonnes pratiques de pharmacie hospitalière (article R. 5104-20 du code de la santé publique) [5-6]. Ces bonnes pratiques ont été éditées en juin 2001 afin de définir, dans le cadre des activités de pharmacie hospitalière, la gestion de la qualité, du personnel, des locaux et du matériel [7].

I.1.2.La tarification à l'activité (T2A)

Parallèlement à ces règles définissant la pharmacie hospitalière et afin de limiter l'augmentation du déficit de la sécurité sociale (23,2 milliards d'€ en 2010), l'Etat Français a entamé une profonde réforme du financement des établissements de santé en votant la loi du 18 décembre 2003 (art. 22 à 34) [8]. Cette loi définit la Tarification à l'Activité (T2A) pour les établissements de santé titulaires d'autorisations de médecine, chirurgie et obstétrique (MCO). Dans le secteur public, cette loi permet de substituer le financement par la dotation globale et ainsi, d'allouer des financements en fonction de la nature et du volume de l'activité réellement réalisée. Dans le cadre de cette Tarification à l'Activité (T2A), le financement des

médicaments administrés au cours d'un séjour hospitalier est assuré selon plusieurs modalités (Figure I.1) :

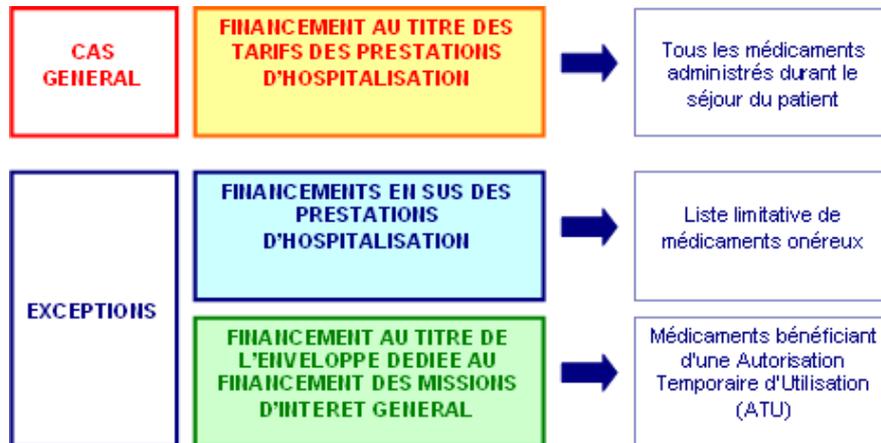


Figure I.1. : Modalités de financement des médicaments administrés au cours d'un séjour hospitalier

En règle générale, le financement des médicaments lors d'un séjour de patient à l'hôpital est inclus dans ce que l'on appelle les Groupes Homogènes de Service (GHS). Les tarifs de ces GHS englobent ainsi l'ensemble des prestations d'hospitalisation, y compris les médicaments. Cependant, le traitement de certaines pathologies, notamment cancéreuses, nécessite l'utilisation de molécules très onéreuses dont le coût n'entre pas dans le GHS correspondant à la pathologie traitée. Un dispositif dérogatoire, décrit à l'article L162-22-7 du code de la sécurité sociale, a donc été mis en place pour ces médicaments qui sont inscrits sur la liste dite « liste des médicaments facturables en sus des prestations d'hospitalisation » [9]. Ainsi, chaque utilisation de ces médicaments fait l'objet d'une facturation spécifique, supplémentaire du séjour concerné.

Cette liste n'est pas définitive et chaque ajout ou retrait de spécialités pharmaceutiques est évalué afin de s'assurer d'un accès continu des patients aux médicaments concernés. Toute modification de cette liste est publiée au Journal Officiel par un arrêté du Ministre en charge de la Santé et de la Sécurité Sociale pris en application de l'article L.162-22-7 du code de la sécurité sociale. Ceci est réalisé après recommandation du Conseil de l'Hospitalisation, et après consultation des fédérations représentatives des établissements de santé publics et privés.

L'arrêté du 4 avril 2005 publié au Journal Officiel du 10 mai 2005 fixe la liste des spécialités pharmaceutiques prises en charge en sus des prestations d'hospitalisation [10]. Par la suite, l'ensemble des modifications est apporté par publication d'arrêtés au Journal Officiel, modifiant l'arrêté du 4 avril 2005. Ces prix publiés représentent la base de remboursement des médicaments par la sécurité sociale aux établissements de santé : c'est le tarif de responsabilité.

I.1.3. Le contrat de Bon Usage (CBU)

Afin de rendre les établissements de santé responsables, notamment sur les dépenses de médicaments en sus des GHS, l'Etat a mis en place par le décret du 25 août 2005 le contrat de bon usage (CBU) des médicaments, des produits et prestations [11]. Ce contrat est établi entre les établissements, le Directeur de l'Agence Régionale de Santé (ARS) et l'assurance maladie. Il permet, par un engagement formalisé, aux établissements de s'engager à améliorer et sécuriser le circuit du médicament et des produits et prestations. Ce contrat permet également de favoriser les pratiques pluridisciplinaires ou en réseau et le respect des référentiels, notamment dans le domaine de la cancérologie. Enfin, il permet de formaliser des engagements spécifiques aux spécialités pharmaceutiques et aux produits et prestations mentionnés au premier alinéa de l'article L. 162-22-7 [9].

Il est important de considérer les deux premiers objectifs (améliorer le circuit du médicament et favoriser les pratiques pluridisciplinaires) de ce contrat par rapport à la pratique de la cancérologie afin de comprendre les enjeux économiques de la gestion de ces médicaments utilisés au quotidien.

Au titre du contrat de bon usage, l'établissement souscrit à des engagements relatifs aux médicaments, produits et prestations portant *a minima* sur les cinq points suivants :

1. L'informatisation du circuit du médicament et du circuit des produits et prestations ;
2. Le développement de la prescription et de la dispensation à délivrance nominative ;
3. La traçabilité de la prescription, soit à l'administration pour les médicaments, soit à l'utilisation pour les produits et prestations ;

4. Le développement d'un système d'assurance-qualité ;
5. La centralisation de la préparation sous la responsabilité d'un pharmacien des traitements anticancéreux, pour autant que l'établissement de santé soit concerné.

Ce dernier et cinquième point est très important quant aux responsabilités engagées sur l'utilisation de tel ou tel anticancéreux dans des conditions non décrites par l'AMM mais nécessaires à la pratique hospitalière, notamment dans la gestion des restes d'anticancéreux.

Sur le versant des pratiques pluridisciplinaires, notamment en cancérologie, l'établissement s'engage sur l'organisation et la traçabilité de celles-ci afin de proposer aux patients une stratégie thérapeutique concertée s'appuyant sur des protocoles validés et actualisés. Il s'engage également sur la participation à un réseau régional de cancérologie permettant le partage, l'actualisation et la validation, voire l'évaluation des référentiels de pratiques en chimiothérapie. A ce titre, les réseaux de cancérologie et les sociétés savantes de pharmacie oncologique ont un rôle primordial à jouer dans la mise en place de référentiels validés de stabilités physico-chimiques de médicaments anticancéreux afin d'offrir au patient une prise en charge de qualité.

Pour garantir aux patients un accès aux médicaments anticancéreux dans des nouvelles indications reconnues non précisées dans l'AMM, le CBU stipule que, dès sa signature, l'utilisation des spécialités pharmaceutiques (en sus des GHS), doit être conforme soit à l'AMM, soit aux protocoles définis par l'AFSSAPS, l'HAS ou l'InCa. Dans le cas où exceptionnellement, le prescripteur ne respecte pas les dispositions précédentes, celui-ci doit porter au dossier médical l'argumentation nécessaire basée sur les recommandations de sociétés savantes ou sur les publications dans des revues internationales à comité de lecture et doit le faire valider en Réunion de Consultation Pluridisciplinaire. A noter qu'à aucun moment ne sont précisées des recommandations quant à l'utilisation pharmaceutique des médicaments non reconnues par l'AMM, l'AFSSAPS, l'HAS ou l'InCa. Pour empêcher les dérives d'utilisation et de prescription et pour assurer le respect des engagements du CBU, le taux de remboursement de ces médicaments est assuré à 100 % par les régimes obligatoires d'assurance maladie si le contrat est respecté. Mais ce taux de remboursement peut être fixé pour l'année suivante dans une fourchette comprise entre 70 % et 100 % si au moins un des engagements du CBU n'est pas respecté. Dans tous les cas, la différence entre le montant remboursable et le montant remboursé ne peut être facturée aux patients.

Enfin, pour limiter la consommation des médicaments en sus des GHS, l'article 47 de la loi n° 2008-1330 du 17 décembre 2008 de financement de la sécurité sociale pour 2009 stipule que l'Etat fixe un taux prévisionnel d'évolution des dépenses d'assurance maladie liées à ces médicaments [12]. « *Lorsqu'elle estime, compte tenu des référentiels et recommandations élaborés par la Haute Autorité de santé, l'Institut national du cancer et l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, que le dépassement de ce taux par un établissement de santé n'est pas justifié, l'agence régionale de l'hospitalisation conclut, pour une durée d'un an, avec les autres signataires du contrat de bon usage des médicaments et des produits et prestations mentionné à l'article L. 162-22-7, un plan d'actions visant à maîtriser l'évolution des dépenses par l'amélioration des pratiques de cet établissement* ». « *En cas de refus de l'établissement de signer ce plan ou si l'établissement ne respecte pas le plan auquel il a souscrit, le remboursement de la part prise en charge par l'assurance maladie est réduit à concurrence de 10 %, pour une durée d'un an, en fonction des manquements observés, après que l'établissement a été mis en mesure de présenter ses observations. Le cas échéant, cette réduction se cumule avec celle résultant de l'article L. 162-22-7, dans la limite maximale de 30 %. La différence entre le montant remboursable et le montant remboursé ne peut être facturée aux patients.* ». Pour l'année 2011, l'arrêté du 14 mars 2011 pris pour l'application de l'article L. 162-22-7 fixe à 3 % le taux d'évolution, par rapport à 2010, des dépenses pharmaceutiques et de dispositifs médicaux en sus des GHS après avoir été à 8 % (en 2010) et 10 % (en 2009) [13].

Toutes ces mesures ont pour but de limiter les dépenses de santé en agissant sur la prescription des traitements, notamment anticancéreux, mais aucune mesure réglementaire n'est prise quant à l'optimisation de l'utilisation des anticancéreux dans les unités de reconstitution des PUI. Afin de préciser comment les unités de reconstitution de chimiothérapies peuvent intervenir sur le plan économique et sur la maîtrise des dépenses de santé de l'hôpital, nous allons prendre l'exemple de l'Unité de Biopharmacie Clinique et Oncologique (UBCO) du CHRU de Tours à l'hôpital Bretonneau en présentant son mode de fonctionnement et montrer dans ce contexte, tout l'intérêt de minimiser les coûts, et donc de faire une étude approfondie de la stabilité des médicaments anticancéreux reconstitués en solution .

I.2. L'unité de Biopharmacie Clinique et Oncologique (UBCO) du CHRU de Tours – Hôpital Bretonneau

Une des activités principales des PUI est la reconstitution des anticancéreux dans des unités dédiées sous la responsabilité d'un pharmacien. Le CBU prévoit cette organisation et oblige les établissements signataires à constituer une telle unité.

Au sein du CHRU de Tours, à l'hôpital Bretonneau, l'Unité de Biopharmacie Clinique et Oncologique (UBCO) a été créée en 2005 dans le centre régional de cancérologie Henry Kaplan. L'unité est ainsi détachée physiquement de la PUI de l'hôpital Bretonneau mais se retrouve au cœur de l'activité de cancérologie du CHRU afin de mieux répondre aux exigences d'un tel centre en termes de nombre de patients suivis et capacité d'accueil. Le centre régional de cancérologie dispose de 16 lits d'Hôpital de jour en onco-hématologie, 55 lits d'hospitalisation en onco-hématologie et radiothérapie, et accueille de ce fait, un grand nombre de patients, environ 5600 patients par an (chiffres 2009). L'UBCO possède quant à elle, 3 isolateurs (2 postes par isolateur) et un automate de contrôle pour les préparations d'anticancéreux. Son personnel inclut 1,6 équivalent temps plein (ETP) de pharmacien praticien hospitalier, 0,8 ETP de pharmacien assistant, 2 internes en pharmacie hospitalière, 5 préparateurs hospitaliers, un ouvrier professionnel et un livreur pour transporter les chimiothérapies dans l'hôpital.



Figure I.2. : Photo de l'Unité de Biopharmacie Clinique et Oncologique du CHRU de Tours

Comme toutes les activités pharmaceutiques, la préparation de médicaments anticancéreux est soumise à des obligations réglementaires : Les Bonnes Pratiques de Préparation (1^{ère} édition Décembre 2007) et validées par l'inspection régionale de la pharmacie afin d'obtenir l'arrêté préfectoral d'exercice. Les unités telles que l'UBCO sont, notamment, concernées par le chapitre 6 « Préparations de médicaments stériles » et le chapitre 7 « Préparations de médicaments contenant des substances dangereuses pour le personnel et l'environnement » de ces bonnes pratiques. Ce texte rappelle les obligations en termes de préparation aseptique, environnement de travail, protection du personnel et contrôle qualité.

Chaque année, environ 23 000 préparations anticancéreuses sont fabriquées à l'UBCO avec, pour chacune d'entre elles, une traçabilité de la prescription jusqu'à l'administration au patient. En effet, la démarche de certification de cette unité a permis une qualification ISO 9001, depuis 2007, permettant ainsi de garantir une prise en charge identique pour chaque patient quelque soit le lieu d'activité (3 PUI au sein du CHRU de Tours).

Pour mieux comprendre les conséquences de la réglementation sur l'activité journalière de l'UBCO et le circuit d'une préparation selon la qualification ISO 9001 il nous faut décrire le circuit d'une préparation anticancéreuse.

Le circuit de fabrication débute dans les services d'oncologie par la prescription effectuée par les médecins à partir de référentiels régionaux et nationaux, et d'une base, le thésaurus de chimiothérapie du CHRU. Au sein de l'UBCO (Figure I.2.), un double circuit s'organise autour d'une part, des prescriptions validées (dite en "OK chimio"), d'autre part des préparations en attente. A noter que toutes ces opérations se déroulent dans un local classé en zone d'atmosphère contrôlée (ZAC) ISO 8 avec une température et une humidité maîtrisée. L'envoi de la prescription déclenche les opérations pharmaceutiques suivantes :

- Validation de la prescription au regard de l'indication, du thésaurus des protocoles, du respect de l'intercycle et de l'adéquation des doses, mais aussi du médicament en prenant en compte la stabilité dans le solvant de dilution, la concentration et la durée de cette stabilité en fonction des conditions de conservation, et d'autre part, la rédaction des fiches de fabrication des préparations nominatives,
- Rédaction et signature par le pharmacien des fiches de fabrication,
- Préparation d'un plateau par un premier opérateur,

- Contrôle et conditionnement en panier par un opérateur différent. Ce plateau comporte le produit de chimiothérapie, le solvant d'administration, les matériels de transferts et autres consommables,
- Chargement et stérilisation : les paniers étant prêts, ils sont disposés sur un chariot d'accostage en vue d'être stérilisés. Chaque charge est constituée de 1 à 12 paniers, elle est accostée dans le SAS de bio-décontamination après ouverture de la porte. L'originalité de l'installation réside également dans l'informatisation de chaque opération concernant les isolateurs alliant à la fois liberté et sécurité par l'intermédiaire d'une supervision. Quinze minutes de stérilisation et la charge peut être transférée dans l'enceinte de travail,
- Réalisation des préparations une par une par du personnel qualifié et expérimenté ayant reçu une formation interne adéquate. Après affichage de la fiche de fabrication, le second contrôle est réalisé par le préparateur qui s'apprête à opérer. La préparation peut commencer avec ses opérations de reconstitution et dilution. Il faut en moyenne 12 minutes pour réaliser la préparation. Suivant la complexité, les temps de dissolution et le nombre de flacons, une préparation peut prendre de 5 à 60 minutes. Les déchets sont éliminés dans un conteneur spécifique original, muni d'une double porte étanche et garantissant la stérilité des enceintes lors de la connexion mais surtout évitant une exposition du personnel lors de la déconnexion,
- Réalisation du dernier contrôle visuel par une tierce personne (numéros de lot, numéro d'ordonnancier, patient, service). Une fois la préparation contrôlée, un système de sortie dynamique permet la récupération de la préparation dans son panier,
- Réalisation d'un contrôle analytique effectué sur un échantillon de la préparation par un automate de contrôle permettant de vérifier la molécule, la concentration et le solvant de dilution. Ce contrôle terminal est essentiel dans la libération des préparations,
- Libération par un pharmacien,
- Envoi dans le service et administration : le jour de l'administration, les préparations sont acheminées dans le service par un livreur de la pharmacie. Une fois dans le service, l'infirmière signe la réception et l'administration peut commencer.

Il faut entre 10 minutes et 1 heure entre le “OK chimio” et l’administration pour les préparations planifiées des services d’hôpitaux de jour, 1 heure 30 sont nécessaires pour les services d’hospitalisation complète. Il est important de préciser que la méthode de préparation dans ces unités (isolateur, hotte à flux d’air laminaire) permet de s’affranchir de la stabilité microbiologique et donc de toutes contaminations microbiologiques des préparations médicamenteuses.

Certains protocoles nécessitent une administration quotidienne d’un médicament anticancéreux pendant 3, 4 voire 5 jours consécutifs. Il est donc essentiel pour une unité de reconstitution de chimiothérapies de pouvoir anticiper la préparation de ces médicaments afin d’éviter des pics d’activité et un retard dommageable, notamment pour l’hôpital de jour, et afin de respecter le délai de livraison imposé dans notre démarche de certification. Pour toutes ces raisons, étudier de façon plus approfondie la stabilité des molécules dans les conditions d’administration des anticancéreux injectables et dans le conditionnement d’origine est apparu pour l’UBCO comme un élément clé pour assurer une meilleure gestion de la production des anticancéreux au quotidien.

La suite de ce chapitre va donc être consacrée à définir les notions de stabilité physico-chimique des anticancéreux injectables et à répertorier les différents facteurs intervenant sur cette stabilité.

I.3. Stabilité physico-chimique des médicaments anticancéreux injectables

Les médicaments anticancéreux prêts à l’emploi ou reconstitués subissent des contraintes de fabrication, livraison et administration.

La réalisation de préparations injectables de médicaments anticancéreux nécessite de disposer de données de stabilité permettant de garantir la qualité des médicaments préparés. De nombreux paramètres influencent la stabilité du produit intermédiaire ou final : la composition de la spécialité (excipients), la forme chimique du principe actif, le solvant de dilution ou de reconstitution, la concentration finale du principe actif, les conditions de conservation (température, exposition à la lumière), les matériaux en contact avec les solutions [14].

Les durées de stabilité fournies par les laboratoires pharmaceutiques dans les RCP des médicaments anticancéreux sont minimales, en général limitées à 24h, afin d’éviter

principalement tout risque de contamination bactériologique. La préparation de ces traitements dans des conditions aseptiques, en permettant de s'affranchir de toute contamination microbiologique, rend indispensables de nouvelles données de stabilité plus complètes pour permettre au pharmacien hospitalier d'organiser, de valider la fabrication des préparations dans des conditions optimales et de mieux gérer leur administration la nuit et le week-end.

Les études de stabilité complémentaires doivent informer sur le comportement des préparations finales au cours de leur stockage, de leur livraison dans le service de soins ou à domicile et prendre en compte les durées de perfusion qui peuvent parfois s'effectuer sur 24 heures. Ainsi, le pharmacien informé optera pour des conditions de conservation optimales et à défaut, des conditions satisfaisantes pour l'utilisation en toute sécurité des préparations.

Enfin, des situations rencontrées de façon moins systématique nécessitent la connaissance de données non précisées dans les RCP : fortes concentrations en pédiatrie pour limiter les volumes injectés, température corporelle pour les administrations avec diffuseurs portables, solvants peu courants, conditions de conservation non respectées [15].

Le choix de l'utilisation d'une stabilité d'un médicament préparé prêt à l'administration représente une des contraintes majeures associée à la prise en charge thérapeutique et reste sous la responsabilité du pharmacien hospitalier.

Nous utilisons 60 molécules anticancéreuses dans notre unité. Parmi ces molécules figurent 54 molécules chimiques et 6 anticorps monoclonaux. Ces deux familles de médicaments ont des comportements différents et les techniques d'analyse, de suivi de stabilité physico-chimique sont différentes. Dans la suite de ce chapitre, nous ne nous intéresserons qu'à la stabilité physico-chimique des anticancéreux « classiques » et n'aborderons pas les anticorps monoclonaux.

I.3.1. Définitions

La stabilité physico-chimique peut être définie comme le temps pendant lequel le principe actif prêt à l'emploi ou reconstitué conserve son intégrité sur les plans qualitatif et quantitatif. La dégradation chimique du principe actif résulte généralement de réactions d'hydrolyse, d'oxydation ou de photolyse. La dégradation physique résulte de phénomènes de précipitation, complexation ou adsorption pouvant être corrélés à des incompatibilités de solvant, pH ou contenant [15]. La compatibilité physique relève d'un examen visuel pour

détecter un éventuel précipité, un changement de couleur, une formation de gaz ; la turbidité est également évaluée ainsi que la taille des particules, un comptage particulaire complète l'examen.

La stabilité chimique est déterminée uniquement avec une méthode séparative telle que la CLHP [16]. Les méthodes non séparatives telles que la spectrophotométrie d'absorption moléculaire sont plus rapides et simples mais ne différencient pas toujours les produits de dégradation de la molécule initiale.

L'objectif en matière de stabilité physico-chimique est de pouvoir garantir la stabilité de chaque médicament de la réception de la spécialité à la fin de l'administration. Cette stabilité est multiparamétrique.

I.3.2. Facteurs influençant la stabilité :

I.3.2.1. Composition de la spécialité

Un même principe actif formulé avec des excipients différents peut présenter des durées de stabilité différentes (ex : changement de formulation du 5-fluorouracile (Figure I.3.)). L'extrapolation d'une donnée de stabilité d'un principe actif d'une spécialité à une autre n'est donc possible que si la formulation est strictement identique. De plus la mise en forme galénique du principe actif peut influencer sa stabilité.



Figure I.3. : Formule développée du 5-fluorouracile

I.3.2.2. Forme chimique du principe actif

Certains médicaments sont commercialisés soit sous leur forme neutre, nécessitant un solvant non aqueux afin de les solubiliser, soit sous forme d'un sel permettant une meilleure solubilisation en milieu aqueux. A titre d'exemple l'étoposide (Figure I.4.) se comporte très

différemment du phosphate d'étoposide. Il n'est donc pas possible d'extrapoler une donnée de stabilité de différentes formes chimiques du même principe actif.

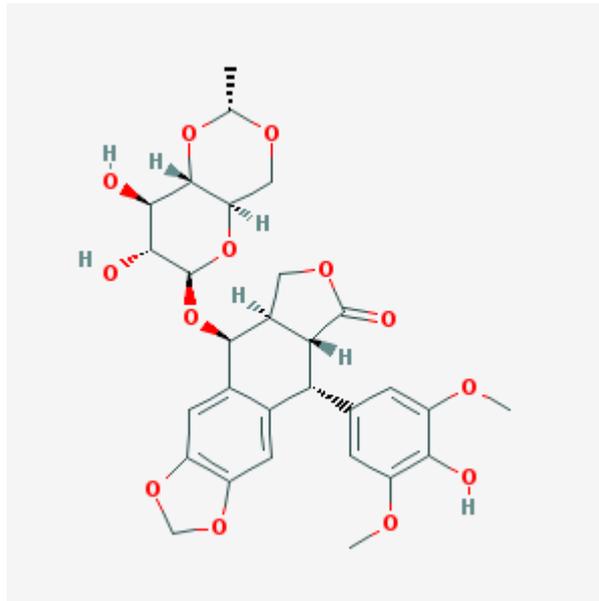


Figure I.4. : Formule développée de l'Etoposide

I.3.2.3. Solvants de dilution

En pratique courante, les solvants utilisés sont les solutions aqueuses de chlorure de sodium à 0,9 % ou de glucose à 5 %, plus rarement le Ringer lactate. Ces solvants peuvent interagir soit par interaction directe soit par effet pH. Les solutions de glucose 5 % et les solutions de chlorure de sodium 0,9 % sont acides. Le Ringer lactate, dont le pH est compris entre 5 et 7, est composé de chlorure de sodium, chlorure de potassium, chlorure de calcium dihydraté et lactate de sodium en solution aqueuse.

I.3.2.4. Concentration en principe actif dans la solution

La concentration finale de la solution administrée est évidemment variable puisque dépendante du protocole et du patient. Pour garantir la stabilité du produit fini, il est nécessaire de placer le principe actif à une concentration identique ou la plus proche d'une concentration pour laquelle la donnée de stabilité est connue.

I.3.2.5. Conditions de conservation

I.3.2.5.1. Température

Si classiquement, la conservation au froid permet d'améliorer la durée de stabilité du produit fini, certains principes actifs voient leur stabilité compromise au froid, c'est le cas du 5-fluorouracile qui précipite au réfrigérateur (à +2 °C - +8 °C) [17].

Par ailleurs, certains auteurs préconisent la congélation mais l'utilisation en routine s'avère difficile en raison des conditions de congélation/décongélation qui doivent être maîtrisées pour éviter la dégradation lors du processus. L'utilisation de ce procédé peut s'avérer nécessaire lorsque l'anticancéreux n'est stable ni à température ambiante, ni au réfrigérateur. C'est le cas de l'azacitidine – Vidaza® (Figure I.5.) [18].

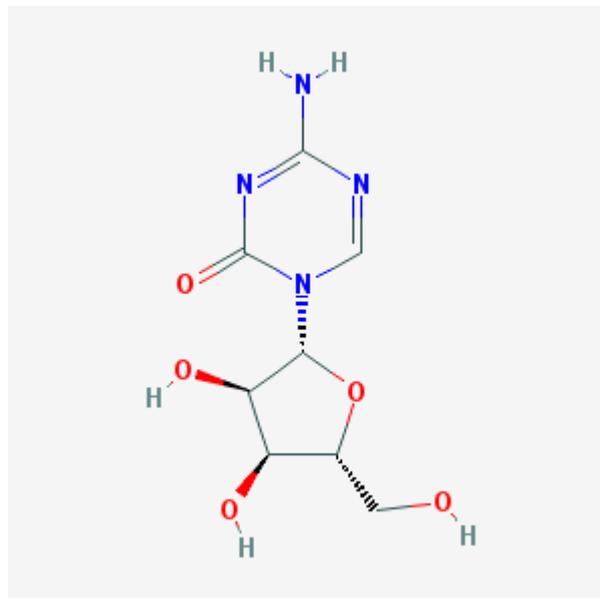


Figure I.5. : Formule développée de l'Azacitidine

I.3.2.5.2. Exposition à la lumière

L'exposition à la lumière est également à prendre en compte pour les principes actifs photosensibles (comme la dacarbazine (Figure I.6.)) [19]. La photodégradation des molécules photosensibles dépend à la fois de la longueur d'onde de la radiation lumineuse et de son intensité. La lumière solaire est la plus agressive [20]. Cette notion d'exposition doit être corrélée au temps d'administration et au temps d'exposition. En effet, dans tous les cas, une substance photosensible doit bénéficier de conditions de stockage à l'abri de la lumière.

Cependant, si l'administration est courte, il est inutile d'utiliser des matériels d'administration opaques.

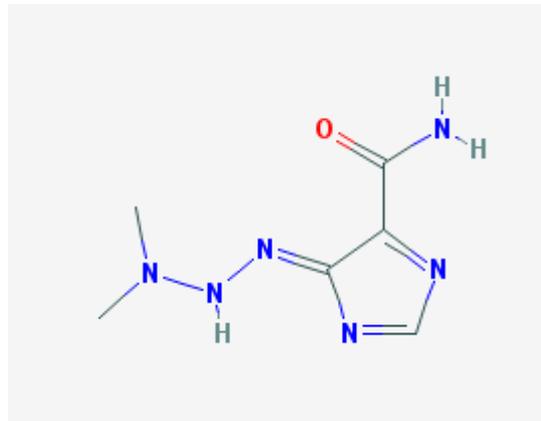


Figure I.6. : Formule développée du Dacarbazine

I.3.2.5.3. Contenant final

Les matériaux utilisés pour la fabrication des contenants des médicaments (poches, perfuseurs, diffuseurs...) peuvent être à l'origine d'interactions avec les solutions mises à leur contact. Différents matériaux plastiques peuvent interagir avec la solution du principe actif. Deux types de phénomènes doivent être considérés :

- les interactions dans le sens contenu-contenant qui consistent en la fixation plus ou moins importante des principes actifs sur les matériaux (adsorption, absorption et perméation), résultant en une diminution de la dose injectée.

- les interactions dans le sens contenant-contenu qui consistent en une migration d'un constituant du matériau dans la solution médicamenteuse. Ce phénomène, beaucoup plus grave, se produit par exemple avec des solvants non aqueux qui, en présence de Polychlorure de Vinyle (PVC), entraînent le relargage dans la solution de plastifiants, les DEHP (di-2-ethylhexyl phtalates) hépatotoxiques [21]. Ces différents éléments indiquent qu'il n'est pas possible d'extrapoler les données de stabilité d'un contenant à l'autre.

Les différents matériaux utilisés pour les contenants sont les suivants :

- Le verre

Le verre est un solide non cristallin, constitué d'un mélange d'oxydes. Ses avantages sont l'inertie chimique, la transparence, l'imperméabilité aux gaz et à la vapeur d'eau. Les inconvénients du verre sont : son poids, sa fragilité, son encombrement et sa difficulté à être

manipulé. Toutes ces raisons ont conduit à utiliser de plus en plus les matériaux plastiques en remplacement du verre.

- Le Polyéthylène (PE)

Le PE est translucide, inerte, facile à manier. Il existe différents polyéthylènes classés en fonction de leur densité. On distingue 2 familles : le PE basse densité plus souple (exemple : poche Ecoflac®) et le PE haute densité plus rigide. Ses avantages sont une basse perméabilité à la vapeur d'eau, une absence de relargage de plastifiants dans la solution, une grande inertie chimique (adsorption, absorption et perméation réduites), un faible poids et une élimination sans risque pour l'environnement.

- Le Polypropylène (PP)

Le PP est un polymère résistant qui n'absorbe pas l'eau et qui possède les mêmes avantages que le PE (exemple : poche Freeflex®).

- L'Éthylvinylacétate (EVA)

L'EVA est un matériau perméable à l'évaporation ce qui peut poser problème à température corporelle. L'évaporation d'eau se traduit par une augmentation de la concentration pouvant masquer une perte non négligeable en principe actif lors d'étude de stabilité.

- Le Polychlorure de vinyle (PVC)

Le PVC est un matériau dit « amorphe », dont les longues chaînes en désordre permettent aux molécules de médicaments de s'inclure progressivement dans le matériau polymérique. De plus, le principal inconvénient du PVC est de contenir du DEHP comme plastifiant qui peut être relargué en présence de solvants non aqueux [21].

- Le Polyoléfine (POF)

Les polyoléfines sont une famille de matières plastiques regroupant entre autres le PE et le PP (exemples : poches Clearflex®, Viaflo®).

- L'élastomère

Les élastomères sont des matériaux très élastiques et très utilisés dans la composition des diffuseurs portables où cette propriété va permettre une régulation du débit.

I-3.2.5.4. Incompatibilités

- Filtration

Les contenants des filtres (ester de cellulose, nylon) utilisés lors de la préparation des solutions peuvent provoquer des interactions avec certaines molécules comme la vincristine qui est adsorbée sur une membrane de cellulose.

- Aluminium

L'aluminium contenu dans certaines aiguilles utilisées au moment de la reconstitution de la préparation est incompatible avec certaines molécules et notamment les sels de platine.

I.3.3. Conclusion

Il apparaît clairement qu'une étude de stabilité en solution nécessite de prendre en considération un grand nombre de paramètres expérimentaux et est très chronophage pour être menée à bien.

Une des conséquences directe de ces critères de stabilité, mise à part l'optimisation de la production, est l'utilisation des reliquats d'anticancéreux, autrement dit : les restes. Encore une fois, les laboratoires pharmaceutiques préconisent l'utilisation des restes d'anticancéreux, après ouverture, dans les 24 heures. Cependant, certaines molécules sont très onéreuses (jusqu'à 8000 € la préparation) et l'utilisation de ces reliquats peut générer des économies non négligeables. Pour augmenter les durées de conservation des reliquats d'anticancéreux et réutiliser ces derniers pour la préparation de traitements de nouveaux patients, le pharmacien hospitalier doit donc s'appuyer sur la littérature scientifique ou doit participer à générer de nouvelles données dans le cas d'absence d'informations mises à disposition.

I.4. Conclusion sur le contexte de cette thèse

Ma formation de pharmacien hospitalier et des collectivités au cours de mon internat, et notamment les stages au sein des unités de reconstitution et de contrôle des chimiothérapies anticancéreuses, m'ont conduit et incité à m'intéresser à la problématique, lourde de conséquences, de la stabilité des médicaments anticancéreux injectables après reconstitution.

Mon travail de doctorat a été consacré à la notion de stabilité physico-chimique des médicaments anticancéreux autant du point de vue analytique, avec la mise au point de méthodes de dosage et d'identification, que du point de vue du pharmacien hospitalier, avec l'impact de ces études de stabilité sur la gestion des reliquats d'anticancéreux et l'utilisation au quotidien de ces médicaments. Il s'agit d'une thèse de chimie analytique à l'interface chimie-pharmacie hospitalière qui s'est déroulée dans le cadre de l'unité de biopharmacie clinique et oncologique du CHRU de Tours (Hôpital Bretonneau).

Dans ce premier chapitre, nous avons décrit la place de la pharmacie hospitalière dans le système de santé français et l'importance, notamment du point de vue économique, de l'activité spécifique de reconstitution des chimiothérapies anticancéreuses. Nous avons également abordé la problématique de la stabilité physico-chimique des médicaments anticancéreux injectables, en définissant celle-ci mais également en soulignant l'absence de recommandations réglementaires la concernant et l'absence de données fournies par les fabricants. Cette absence de données contraints les pharmaciens hospitaliers à réaliser les études de stabilité de ces médicaments afin d'organiser au mieux l'activité quotidienne et réaliser des économies.

Dans ce contexte à l'UBCO du CHRU de Tours, nous avons décidé d'étudier en premier lieu, la stabilité physico-chimique d'un médicament largement utilisé en pneumologie : le pemetrexed-Alimta[®] (Figure I.7.) et pour lequel, certaines données de stabilité étaient manquantes (conditions d'utilisation des reliquats, apparition ou non en fonction du temps de produits de dégradation). Les résultats de cette étude de stabilité feront l'objet du chapitre suivant (chapitre II). Nous développerons dans ce chapitre II, la méthode chromatographique d'appariement d'ions que nous avons optimisée et validée en couplage avec une double détection (UV et détection par diffusion de la lumière (DEDL)) pour réaliser l'étude de stabilité des reliquats après reconstitution du pemetrexed-Alimta[®] dans les conditions d'utilisation quotidiennes à l'UBCO. Afin de caractériser les produits de dégradation apparus au cours de cette étude de stabilité, nous développerons ensuite la

transposition de méthode que nous avons effectuée en vue de son couplage avec la spectrométrie de masse.

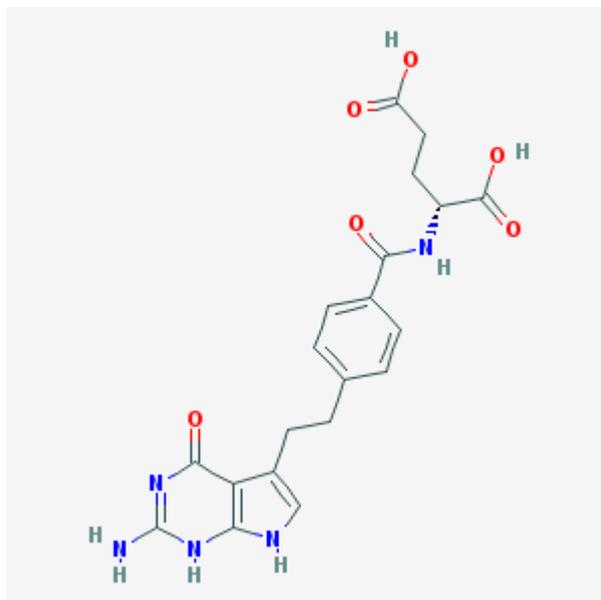


Figure I.7. : Formule du Pemetrexed

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la stabilité physico-chimique d'un autre médicament de la même classe médicamenteuse, le methotrexate (Figure I.8.). De nombreuses études de stabilité décrivent le comportement de ce médicament, mais les données concernant son utilisation dans le cas des traitements de grossesses extra-utérines étaient manquantes. Après avoir adapté la méthode mise au point pour le pemetrexed, nous avons réalisé l'étude de stabilité dans des conditions que nous décrirons dans le troisième chapitre.

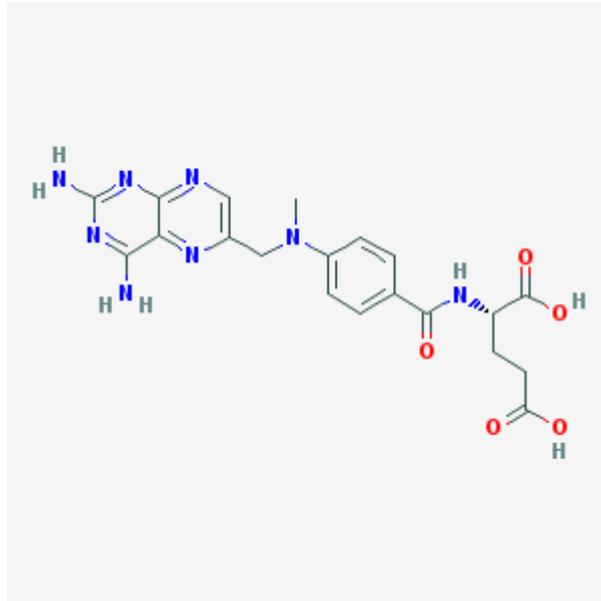


Figure I.8. : Formule du Methotrexate

Enfin, dans le dernier chapitre, nous avons évalué les conséquences économiques pour les organismes payeurs (la sécurité sociale) et pour le CHRU de Tours de la gestion des reliquats d'anticancéreux dans la préparation des chimiothérapies. Cette évaluation a été réalisée sur les reliquats utilisés au cours de l'année 2009 dans l'UBCO de l'hôpital Bretonneau du CHRU de Tours.

CHAPITRE II
ETUDES DE STABILITE ET IDENTIFICATION
DES PRODUITS DE DEGRADATION D'UN
ANTICANCEREUX : LE PEMETREXED-
ALIMTA[®]

Dans le but d'optimiser la gestion des reliquats d'anticancéreux, nous nous sommes intéressés en premier lieu à ceux dont les durées de péremption sont les plus courtes et nous avons privilégié l'étude de stabilité physico-chimique de l'anticancéreux directement dans son conditionnement d'origine. Dans ce contexte et pour initier notre démarche, le choix stratégique que nous avons fait au sein de l'UBCO s'est porté sur la gestion de l'utilisation du pemetrexed-Alimta[®]. Ce produit pharmaceutique est conditionné en flacons de 500 mg dont le coût s'élève à environ 1200 € HT (prix unitaire) avec une durée de péremption après reconstitution dans son conditionnement d'origine de 24 heures à température ambiante et/ou à +4 °C (RCP). En 2009, le pemetrexed-Alimta[®] représentait un budget de 540 000 € environ, soit environ 6 % du budget annuel des anticancéreux de l'unité. Ceci représente environ 450 flacons utilisés par an soit l'équivalent du traitement d'un patient par jour (Données 2009 de l'UBCO Bretonneau).

II.1. Connaissances actuelles sur la molécule

II.1.1. Propriétés physico-chimiques

La forme utilisée en thérapeutique est le pemetrexed disodique dont le nom chimique est le sel disodique de l'acide *N*-[4-[2-(2-amino-4,7-dihydro-4-oxo-1*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)éthyl]benzoyl]-*L*-glutamique (Figure II.1.).

Sa formule brute est $C_{20}H_{19}N_5O_6 \cdot 2Na \cdot 7H_2O$ et sa masse molaire est 597,49 g.mol⁻¹.

Il se présente sous forme de poudre blanche à blanchâtre et est très soluble dans l'eau, soluble dans le méthanol, mais très peu soluble dans l'éthanol.

Les pKa de la molécule sont : 11,34 ; 4,37 ; 3,23 ; 2,22.

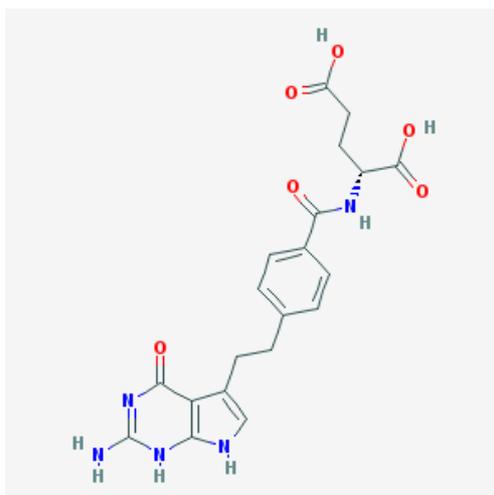


Figure II.1. : Formule développée du Pemetrexed

II.1.2. Mécanisme d'action

Le pemetrexed (Alimta™) est un analogue de l'acide folique (Figure II.2.), faisant partie des antifolates polyvalents doté d'une puissante activité inhibitrice à l'égard de la thymidilate-synthétase, mais aussi d'autres enzymes du métabolisme des synthèses de bases pyrimidiques et puriques telles que la dihydrofolate reductase et la glycinamide ribonucléotide formyltransférase [22-23].

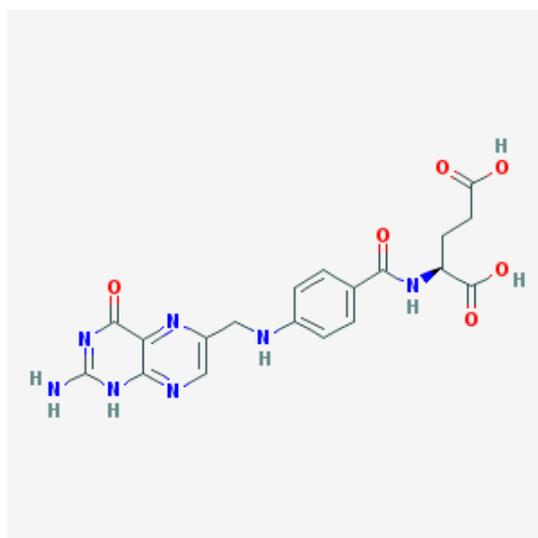


Figure II.2. : Formule développée de l'acide folique

Une des premières cibles du pemetrexed est la thymidylate synthétase qui catalyse la transformation du dUMP en dTMP, réduisant ainsi la quantité de thymidine nécessaire à la synthèse de l'ADN.

Une autre enzyme, importante pour la synthèse des bases puriques, est aussi atteinte par le pemetrexed : la glycinamide ribonucléotide formyltransférase (GARFT) [22, 24]. La compétition au niveau de ces deux enzymes explique l'activité du pemetrexed sur des lignées cellulaires résistantes au raltitrexed ou au 5-fluorouracile. (Figure II.3.).

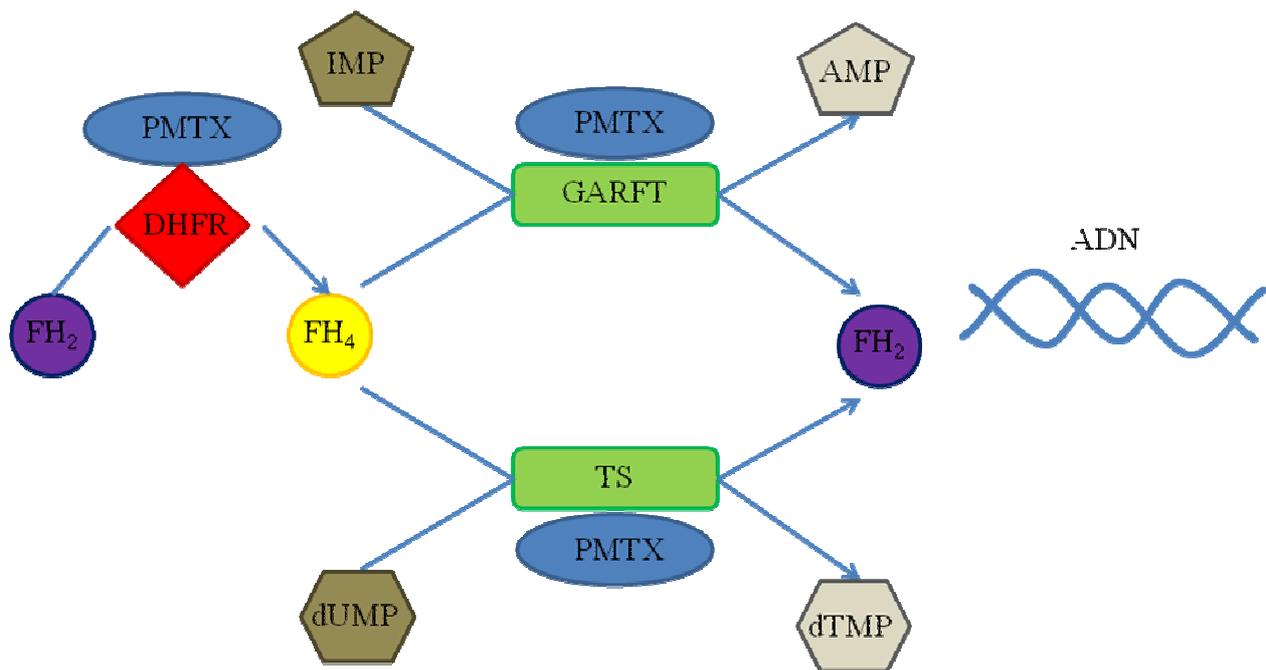


Figure II.3. : Mécanisme d'action du pemetrexed au niveau cellulaire. (IMP : Inosine monophosphate ; AMP : Adenosine monophosphate ; dUMP : désoxyuridine monophosphate ; dTMP : désoxythymidine monophosphate ; ADN : acide désoxyribonucléique ; FH₂ : acide dihydrofolique ; FH₄ : acide tetrahydrofolique).

Des études *in vitro* ont montré que le pemetrexed se comporte comme un anti-folate multi-cible en inhibant la thymidylate synthétase (TS), la dihydrofolate réductase (DHFR) et la glycinamide ribonucléotide formyltransférase (GARFT), qui sont des enzymes folate-dépendantes clés pour la biosynthèse de novo de la thymidine et des nucléotides puriques. Le pemetrexed est transporté dans les cellules à la fois par les systèmes de transport des folates réduits et les protéines membranaires transporteuses de folates. Une fois dans la cellule, le pemetrexed est rapidement et efficacement converti en formes polyglutamates par la folyl-

polyglutamate synthétase. Ces formes polyglutamates sont retenues dans les cellules et sont des inhibiteurs encore plus puissants de la TS et de la GARFT. La polyglutamation est un processus temps et concentration-dépendant qui se déroule dans les cellules tumorales et, dans une moindre mesure, dans les tissus normaux. Les métabolites polyglutamés ont une demi-vie intracellulaire augmentée, prolongeant l'action du produit dans les cellules tumorales [24-25].

II.1.3. Indications

En France, l'AFSSAPS, l'HAS et l'INCa ont décidé de publier pour chaque médicament anticancéreux un référentiel de bon usage (RBU) afin de regrouper toutes les situations envisageables pour l'utilisation d'un médicament dans le traitement du cancer. Dans le cas du pemetrexed, les autorités ont rappelé les indications dans le cadre de l'autorisation de mise sur le marché (AMM) et les situations temporairement acceptables (PTT : protocole thérapeutique temporaire). Ces dernières sont la conséquence d'essais cliniques réalisés mais ne faisant pas l'objet d'une nouvelle demande d'AMM pour les indications étudiées. Il est également rappelé les situations dans lesquelles l'utilisation de ce médicament n'est pas acceptable (Annexe I).

Pour le pemetrexed-Alimta[®], les indications de l'autorisation de mise sur le marché sont :

- En association avec le cisplatine, dans le traitement en première ligne des patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules localement avancé ou métastatique, dès lors que l'histologie n'est pas à prédominance épidermoïde [26].
- En monothérapie dans le traitement de maintenance du cancer bronchique non à petites cellules, localement avancé ou métastatique immédiatement à la suite d'une chimiothérapie à base de sel de platine, dès lors que l'histologie n'est pas à prédominance épidermoïde chez les patients dont la maladie n'a pas progressé. Le traitement en première ligne doit être un doublet de platine avec la gemcitabine, le paclitaxel ou le docétaxel [26].

- En monothérapie dans le traitement en seconde ligne des patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules, localement avancé ou métastatique, dès lors que l'histologie n'est pas à prédominance épidermoïde [26].
- En association avec le cisplatine, dans le traitement des patients atteints de mésothéliome pleural malin non résécable et qui n'ont pas reçu de chimiothérapie antérieure [27-28].

Les situations temporairement acceptables (PTT) :

- Mésothéliome pleural malin non résécable chez des patients qui n'ont pas reçu de chimiothérapie antérieure, en association au carboplatine en cas de contre-indication documentée au cisplatine [29-31].

Les situations non acceptables :

- Cancer bronchique à petites cellules [32-33].

II.1.4. Formes et présentations

Le pharmacien hospitalier dispose pour préparer les solutions injectables de pemetrexed de deux conditionnements commerciaux possibles :

- **ALIMTA 100 mg** poudre pour solution à diluer pour perfusion. Poudre lyophilisée de couleur blanche à jaune pâle ou jaune verdâtre.
- **ALIMTA 500 mg** poudre pour solution à diluer pour perfusion. Poudre lyophilisée de couleur blanche à jaune pâle ou jaune verdâtre.

La recommandation pour la préparation des solutions injectables de chacune des 2 formes est la suivante :

- **ALIMTA 100 mg :**

Chaque flacon contient 100 mg de pemetrexed (sous forme de pemetrexed disodique). Chaque flacon doit être reconstitué avec 4,2 ml de solution de chlorure de sodium à 9 mg.mL⁻¹ (0,9 %) pour préparations injectables ce qui donne une solution contenant 25 mg.mL⁻¹ de principe

actif. Le volume approprié pour la dose requise est prélevé dans le flacon puis est ensuite dilué dans 100 ml de solution de chlorure de sodium à 9 mg.mL^{-1} (0,9 %) pour préparations injectables.

- **ALIMTA 500 mg :**

Chaque flacon contient 500 mg de pemetrexed (sous forme de pemetrexed disodique). Chaque flacon doit être reconstitué avec 20 ml de solution de chlorure de sodium à 9 mg.mL^{-1} (0,9 %) pour préparations injectables ce qui donne une solution contenant 25 mg.mL^{-1} de principe actif. Le volume approprié pour la dose requise est prélevé dans le flacon puis est ensuite dilué dans 100 ml de solution de chlorure de sodium à 9 mg.mL^{-1} (0,9 %) pour préparations injectables.

Excipients : Mannitol, acide chlorhydrique, hydroxyde de sodium.

Afin de ne pas multiplier les références disponibles au CHRU de Tours, la décision de ne pas référencer Alimta 100 mg a été prise. Toutes les études que nous avons effectuées et qui font l'objet du développement méthodologique présenté dans ce chapitre, ne concernent donc que la référence ALIMTA 500 mg.

II.1.5. Connaissances disponibles sur la stabilité en solution

La stabilité physico-chimique du pemetrexed-Alimta[®] a été précédemment évaluée par Zhang *et al.* [34-36] dans les conditions suivantes :

- +4 °C et +23 °C à la lumière et à l'abri de la lumière. La concentration étudiée est 25 mg.mL^{-1} après reconstitution par du NaCl 0,9 % dans des seringues en PVC.
- -20 °C à une concentration de 25 mg.mL^{-1} après reconstitution par du NaCl 0,9 % dans des poches en PVC.
- +4 °C et +23 °C à la lumière et à l'abri de la lumière. Les concentrations étudiées sont 2 ; 10 ; 20 mg.mL^{-1} après dilution par du NaCl 0,9 % ou par du Glucose 5 %, et après reconstitution de la poudre par du NaCl 0,9 % à 25 mg.mL^{-1} .

Malgré une stabilité chimique démontrée dans les différentes conditions étudiées pour des durées allant de 2 à 31 jours, il apparaît des particules pour les conditions étudiées à +4 °C pour les concentrations à 2 ; 10 ; 20 mg.mL^{-1} dans du NaCl 0,9 % et dans du Glucose 5 % à

-20 °C. La congélation n'est donc pas recommandée et la conservation prolongée à +4 °C non plus pour ces concentrations.

Dans notre pratique quotidienne, l'utilisation du pemetrexed-Alimta[®] s'effectue quasi-exclusivement en hôpital de jour de pneumologie. Etant donné les indications très ciblées du pemetrexed-Alimta[®] et le coût de chaque flacon de 500 mg (environ 1200 € Hors Taxes), nous ne fabriquons pas ce traitement à l'avance. En pratique, nous attendons la validation clinique et biologique du médecin hospitalier pour reconstituer la préparation. Les études de stabilité aux concentrations de 2 – 10 et 20 mg.mL⁻¹ ne nous sont donc que très rarement utiles.

En revanche, sur ce type de médicament dont le coût est très élevé, les données de stabilité sur la poudre reconstituée à 25 mg.mL⁻¹ par du NaCl 0,9 % sont très utiles afin de pouvoir conserver les reliquats non utilisés pour d'autres préparations. Dans le cas du pemetrexed-Alimta[®], les données disponibles font état d'une stabilité physico-chimique de la solution reconstituée à 25 mg.mL⁻¹ dans du NaCl 0,9 % pendant 2 jours à 23 °C et 31 jours à +4 °C [34]. Cependant ces données ne sont valables que dans des seringues en PVC et pour des raisons pratiques (perte de temps, risque de piqûres augmenté...), nous préférons laisser les reliquats d'anticancéreux dans le conditionnement d'origine.

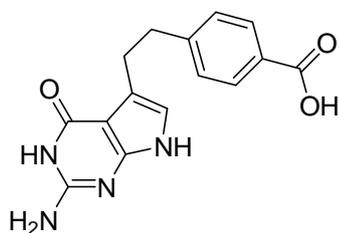
Un article faisant état de la conservation du pemetrexed-Alimta[®] dans son conditionnement d'origine a été publié mais les résultats nous ont paru discutables [37]. En effet, l'étude n'est réalisée que sur un flacon de 500 mg reconstitué alors que la majorité des études de stabilité se réalisent sur au moins 3 prélèvements par condition étudiée. De plus, la diminution de concentration observée au J2 dans le flacon est expliquée par « an analytical problem », sans plus de précisions. Nous n'avons donc pas tenu compte de cette étude pour conserver les reliquats de pemetrexed-Alimta[®].

Dans ces conditions d'insuffisance de données fiables sur la stabilité du pemetrexed dans son conditionnement, nous nous sommes fixés comme objectif de développer une méthode d'analyse par chromatographie liquide permettant d'une part, de réaliser l'étude de stabilité chimique du pemetrexed dans les conditions manquantes en séparant le principe actif de ses impuretés et d'autre part, d'effectuer un couplage avec la spectrométrie de masse (SM) en vue d'une identification structurale complémentaire des produits de dégradation potentiels. Pour atteindre ce but, il est nécessaire de prendre en compte pour le choix du système chromatographique, les contraintes liées à l'exigence de volatilité de la phase mobile imposée par un mode de détection tel que la spectrométrie de masse.

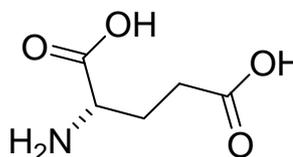
II.1.6. Le point sur les méthodes d'analyses chromatographiques publiées dans le cadre de l'étude de stabilité du pemetrexed

D'après notre étude bibliographique, très peu de travaux se rapportent à la séparation du pemetrexed et de ses potentielles impuretés. En 2007, Saravanan *et al.* [38] ont publié une étude de stabilité du pemetrexed poudre (et non médicament sous sa forme commerciale) en se basant sur une séparation par chromatographie liquide à polarité de phase inverse utilisant une colonne ACE C18 (150 mm x 4,6 mm, 3 μ m) à 25 °C, une phase mobile isocratique constituée d'une solution aqueuse à 0,1 % v/v d'acide phosphorique et d'acétonitrile (85/15 v/v) et un détecteur UV réglé à 230 nm. A partir de la méthode analytique développée, l'étude de stabilité du pemetrexed (Figure II-1) a été conduite selon différentes conditions de dégradation forcée : lumière UV (254 nm), chauffage à 60 °C, acide chlorhydrique 0.5 N, soude 0.5 N et eau oxygénée à 10 %. Une dégradation du pemetrexed en impureté A (figure II.4.) a été observée après 24 heures dans les conditions basiques (0,5 N NaOH) et acides (0,5 N HCl).

Il n'est cependant pas fait état par les auteurs, de l'apparition dans les solutions de dégradation, d'acide glutamique (Glu) (Figure II.4.) comme pouvait le laisser prévoir la rupture de la liaison conduisant à la formation de l'impureté A.



Structure de l'Impureté A



Structure de l'acide glutamique

Figure II.4. : Produits de dégradation du pemetrexed selon Saravanan *et al* [38]

Ceci peut en partie s'expliquer par le fait que l'acide glutamique est un acide aminé polaire qui, dans les conditions chromatographiques développées par Saravanan *et al.* [38], est élué en volume mort et très peu détectable à 230 nm du fait de l'absence de groupement chromophore dans sa structure. Outre le fait que le système chromatographique proposé par Saravanan *et al.* n'est pas adapté à la rétention des impuretés polaires, il n'est pas compatible avec un couplage avec la spectrométrie de masse puisqu'il utilise dans la phase mobile, un additif non volatil : l'acide phosphorique. Dans ces conditions, nous avons voulu développer

une méthode chromatographique permettant de séparer et détecter le pemetrexed, l'impureté A et l'acide glutamique, pour d'une part, confirmer la voie de dégradation décrite pour le pemetrexed dans sa forme commercialisée (Figure II.6.) et d'autre part, détecter des produits de dégradation potentiellement non détectables avec des détecteurs spécifiques comme le détecteur UV (composés sans chromophore) et/ou non retenus dans des systèmes chromatographiques de type phase inverse.

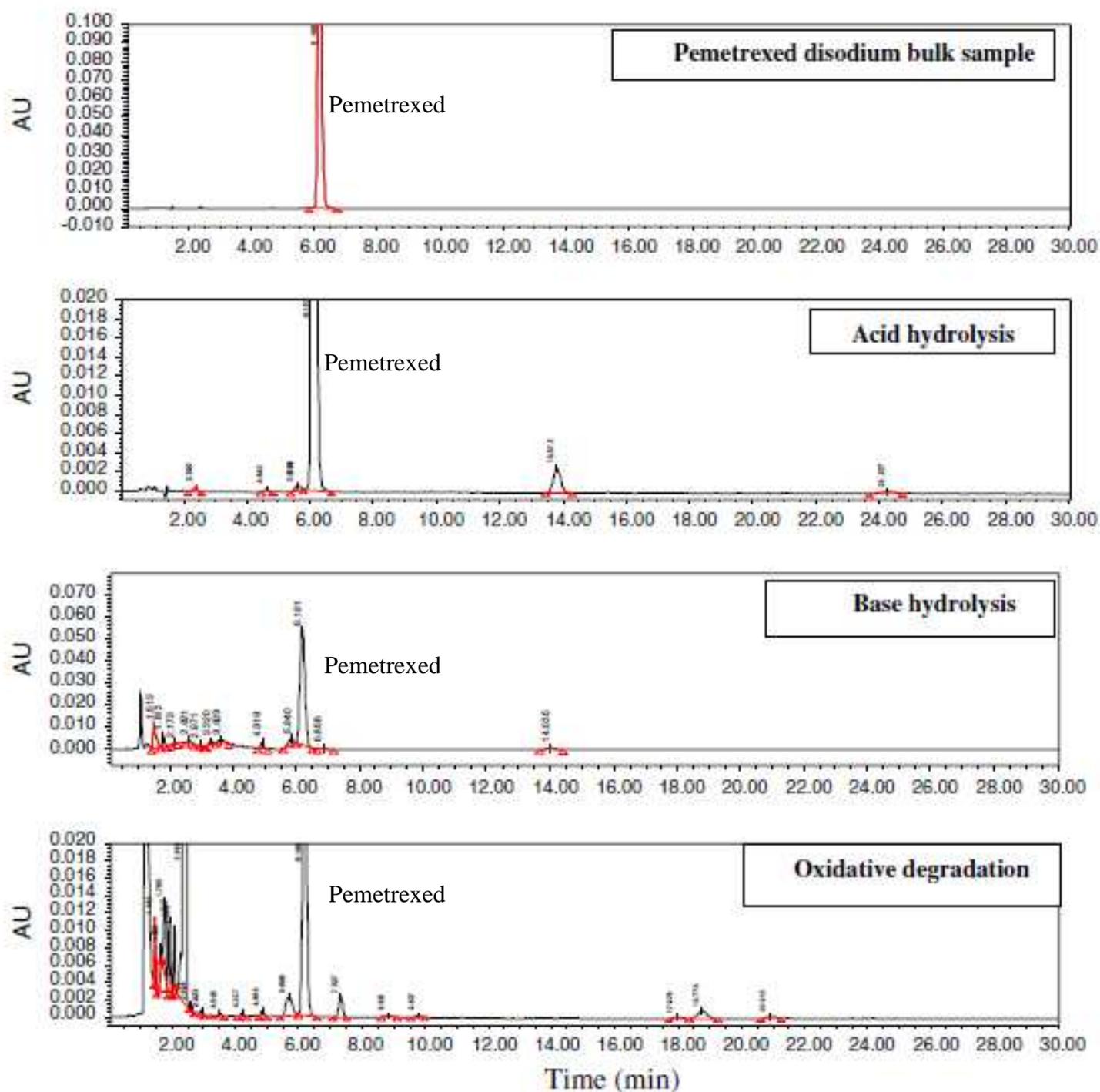


Figure II.5. : D'après [17], analyse des échantillons de pemetrexed dans des conditions de dégradation forcée. Conditions chromatographiques : colonne ACE C18 (150 x 4.6 mm ID, 3 μ m) ; phase mobile solution aqueuse d'acide phosphorique 0,1 % v/v : acetonitrile (85:15 v/v) ; débit 1.5 mL.min⁻¹ ; longueur d'onde 230 nm.

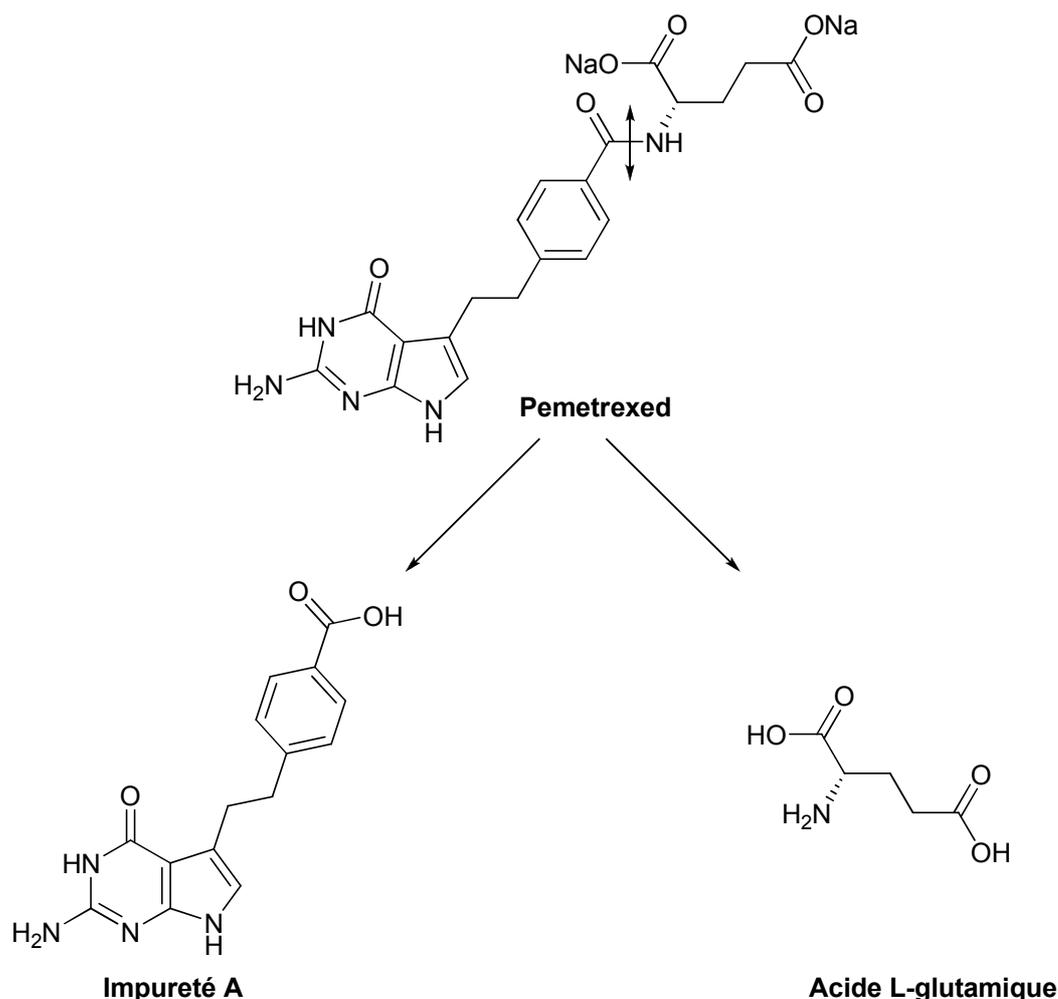


Figure II.6. : Voie de dégradation du pemetrexed en acide L-glutamique et Impureté A selon Saravanan *et al.* [38].

II.2. Développement d'une nouvelle méthodologie d'analyse du pemetrexed

Prenant en compte l'absence de disponibilité commerciale de l'impureté A contrairement à l'acide glutamique, nous nous sommes attachés, pour confirmer la voie de dégradation du pemetrexed dans sa forme commerciale, à développer une méthode chromatographique permettant d'avoir de la rétention pour l'acide glutamique tout en permettant l'élution du principe actif et de ses impuretés plus hydrophobes. Le caractère fortement polaire de l'acide glutamique et son statut d'ionisation sur un large domaine de pH, nous ont conduit à envisager une méthode par chromatographie d'appariement d'ions.

L'absence de groupement chromophore dans la structure de l'acide glutamique a orienté par ailleurs le choix du mode de détection vers un mode de détection plus universel que la détection UV et adapté aux solutés non volatils à savoir le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL). L'intérêt par ailleurs, de développer une méthode avec une détection par DEDL est la transposition aisée de cette méthode à une détection par spectrométrie de masse. En effet, les exigences de phase mobile, en termes de volatilité, sont identiques pour ces deux modes de détection.

Après un bref rappel du principe de fonctionnement du DEDL et de la chromatographie d'appariement d'ions, nous présenterons les étapes d'optimisation de la méthode chromatographique et finirons par la présentation de la publication de nos travaux retraçant, notamment, les paramètres de validation de la méthode dans les conditions optimisées.

II.2.1 Fonctionnement du DEDL

Un détecteur évaporatif à diffusion de lumière peut être considéré comme étant composé de trois étages où ont lieu successivement la nébulisation de la phase mobile, son évaporation et la détection des solutés (Figure II.7.). Le premier étage transforme la phase mobile en un aérosol grâce à un courant de gaz (N_2 le plus souvent). Puis cet aérosol est évaporé dans un tube chauffé. En sortie du tube se situe le système de détection. Si l'évaporation du nébulisât conduit à la formation exclusive de molécules en phase gazeuse, il n'y a pas de phénomène de diffusion de lumière. Les rayons lumineux de la source ne sont pas diffusés, n'arrivent pas jusqu'au photomultiplicateur et aucun signal n'est produit. En revanche, si l'évaporation du nébulisât conduit à la production de fines particules solides en suspension, la lumière est diffusée et un signal détecté. Ainsi, le choix raisonné d'une phase mobile volatile pour le système chromatographique conduira à minimiser le niveau de bruit de fond du détecteur pour satisfaire des conditions optimales de détection du soluté tandis que les solutés analysés devront être idéalement non volatils pour que lors de la phase d'évaporation, la formation de particules susceptibles de diffuser la lumière soit assurée. L'intensité de la lumière déviée constitue le signal de détection pour le soluté. Le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière est caractérisé par une réponse non pas linéaire mais logarithmique en fonction de la quantité de soluté injecté [39-41]. Une droite d'étalonnage peut cependant être établie selon l'équation logarithmique suivante [42] :

$$\log A = b \log C + \log a$$

où C est la concentration de l'analyte et A l'aire du pic chromatographique.

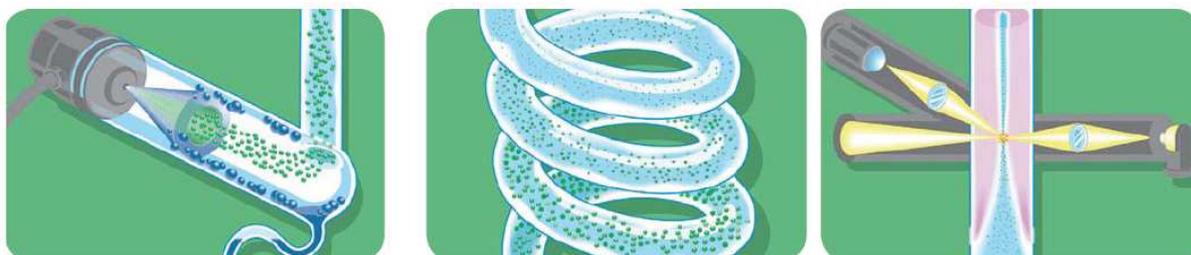


Figure II.7. : Schéma de principe du DEDL (Sedex 85). Le détecteur est composé de trois étages. Les étages de nébulisation et de chauffage (serpentin) ont pour but de volatiliser la phase mobile. Le dernier étage est le système de détection proprement dit. Celui-ci fonctionne sur le principe de la diffusion de lumière. (D'après la documentation SEDERE, <http://www.sedere.com>).

II.2.2. Principe de la chromatographie d'appariements d'ions

La chromatographie de paire d'ions ou d'appariement d'ions, tout comme la chromatographie d'échange d'ions, a été largement utilisée pour l'analyse d'espèces ioniques ou ionisables et en particulier pour les acides aminés en milieu acide [43-44]. Son principe consiste à transformer ces solutés, hydrophiles et cationiques, en des entités neutres plus hydrophobes et capables d'interagir avec la phase stationnaire apolaire. Pour cela, il est nécessaire d'introduire dans la phase mobile un agent d'appariement d'ions (ou contre-ion) capable de constituer une paire d'ions forte avec le soluté.

Classiquement, le système chromatographique en paires d'ions est constitué d'une phase stationnaire apolaire de type silice greffée avec des chaînes alkyles (dodecyl dans notre cas) et d'une phase mobile, mélange binaire eau-solvant organique contenant le contre-ion. Ce contre-ion est le plus souvent un ion organique comportant une ou plusieurs chaînes hydrophobes et une charge nette opposée à celle du soluté. Ainsi en milieu acide, pour les espèces cationiques à analyser, cela peut être soit des acides alkylsulfoniques soit des acides n-alkylcarboxyliques perfluorés comme dans notre cas.

Il existe alors une distribution du contre-ion, des solutés ionisés et des paires d'ions entre la phase mobile et la phase stationnaire apolaire. Le mécanisme de rétention dans ce type de chromatographie est de deux types :

- Le contre-ion est absorbé par les chaînes alkyles de la silice et la paire d'ions se forme au sein de la phase stationnaire, on parle alors d'échange d'ions dynamique (Figure II.8.A).

- Le soluté et le contre-ion forment une paire d'ions, au sein de la phase mobile, qui est adsorbée par la phase stationnaire apolaire (Figure II.8.B).

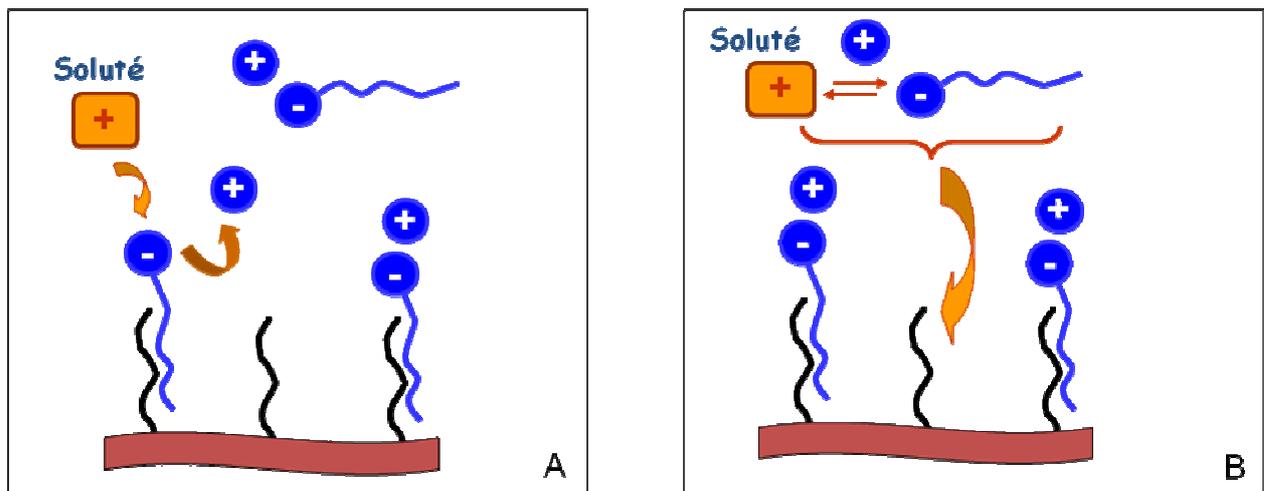


Figure II.8. : Mécanismes de rétention de la chromatographie d'appariement d'ions. A/Echange d'ions dynamique. B/Paire d'ions, formée au sein de la phase mobile, adsorbée par la phase stationnaire apolaire.

On génère ainsi un échangeur d'ions dynamique dont la capacité dépend de la concentration du contre-ion et de la proportion de solvant organique dans la phase mobile. Cependant, il est important de préciser que seulement 30 % des chaînes alkyles de la phase stationnaire sont concernées par ce type de phénomène. Il reste donc une majorité de chaînes alkyles libres permettant ainsi la rétention des solutés apolaires par des effets hydrophobes [45].

Pour l'analyse des acides aminés sous forme cationique, les agents d'appariement d'ions les plus communément utilisés sont les acides n-alkylsulfoniques sous forme de sels de sodium. Les phases mobiles sont alors non évaporables et sont donc incompatibles avec le DEDL ou la SM. Depuis les années 2000, de nombreux travaux ont montré que l'emploi des acides n-alkylcarboxyliques perfluorés comme agents d'appariement d'ions volatils était une

alternative très performante pour l'analyse CPL-DEDL des acides aminés protéiques les plus hydrophiles [43-44]. Ces systèmes, compatibles avec une transposition en couplage avec la spectrométrie de masse ont montré tout leur intérêt. Nous nous sommes appuyés sur ces travaux pour faire notre développement méthodologique d'analyse du pemetrexed et de ses produits de dégradation.

En chromatographie d'appariement d'ions, il est établi que la quantité de contre ions en interactions avec la phase stationnaire est d'autant plus importante que la chaîne carbonée de celui-ci est plus longue et que la teneur en solvant organique de la phase mobile est plus faible [45]. Nous pouvons donc agir sur ces deux paramètres afin d'obtenir la rétention souhaitée, notamment pour l'acide glutamique.

II.2.3. Développement de la méthode chromatographique pour l'étude de stabilité du pemetrexed

Comme nous l'avons indiqué précédemment, le pemetrexed-Alimta[®] est une poudre à reconstituer avec du sérum physiologique (NaCl 0,9 %). Le médicament est composé de pemetrexed comme principe actif (sous forme cationique) et de mannitol, acide chlorhydrique et soude comme excipients (RCP).

Le mannitol et les ions chlorure ne devraient pas gêner la détection de traces de Glu dans un système chromatographique d'appariement d'ions en milieu acide dès lors que la rétention de Glu sera suffisante. En effet, ces deux composés devraient être élués tous les deux en volume mort : le mannitol de par son absence de charge et sa polarité élevée n'aura pas de rétention sur une phase stationnaire de type phase inverse et le chlorure, ion inorganique, de par sa charge négative sera exclu du système chromatographique. Cependant, ces composés, non volatils ou semi-volatils (pour les ions chlorure), seront détectés par le mode de détection quasi-universel que nous avons retenu : le DEDL.

Le système chromatographique développé devra donc permettre une rétention suffisante de Glu tout en assurant sa séparation des autres constituants de la préparation médicamenteuse. La limite de la méthode développée réside en sa capacité à permettre une rétention satisfaisante de Glu tout en assurant une résolution importante avec les ions Na⁺. En effet, la méthode doit permettre de détecter et doser des traces de Glu potentiellement présentes dans le cas d'un début de dégradation du pemetrexed en solution et de séparer les ions Na⁺ largement majoritaires en solution (provenant de la solution de NaCl à 0,9 % servant

à reconstituer le médicament). Enfin, cette méthode doit permettre de retenir et détecter le pemetrexed, l'impureté A et d'autres impuretés potentielles hydrophobes afin de réaliser une étude exhaustive de stabilité la physico-chimique du médicament.

La première étape de notre démarche méthodologique a été d'optimiser les conditions de rétention et de séparation de l'acide glutamique en présence de mannitol, des ions chlorure et sodium en mode d'élution isocratique.

L'appareillage utilisé et les conditions chromatographiques sont décrits en Annexe II. Les changements de conditions sont précisés dans la légende des figures, le cas échéant.

II.2.3.1. Etude des conditions isocratiques de séparation entre le mannitol, les ions chlorure et sodium et l'acide glutamique

L'objectif de cette étude est d'obtenir une rétention suffisante de l'acide glutamique qui permettra d'une part, son élution hors du volume mort dans lequel seront élués le mannitol et les chlorures, non visibles en UV à 254 nm, mais détectés avec le DEDL et d'autre part, une séparation suffisante entre Glu et Na⁺. (Figure II.9.).

Pour cela nous avons testé comme agents d'appariement d'ions 3 acides perfluorés C_nF_{2n+1}COOH de longueur de chaîne carbonée croissante : l'acide trifluoroacétique (TFA) (n = 1), l'acide nonafluoropentanoïque (NFPA, n = 4) et l'acide tridecafluoroheptanoïque (TDFHA, n = 6). Nous avons par ailleurs utilisé l'acétonitrile (ACN) comme solvant organique en phase mobile.

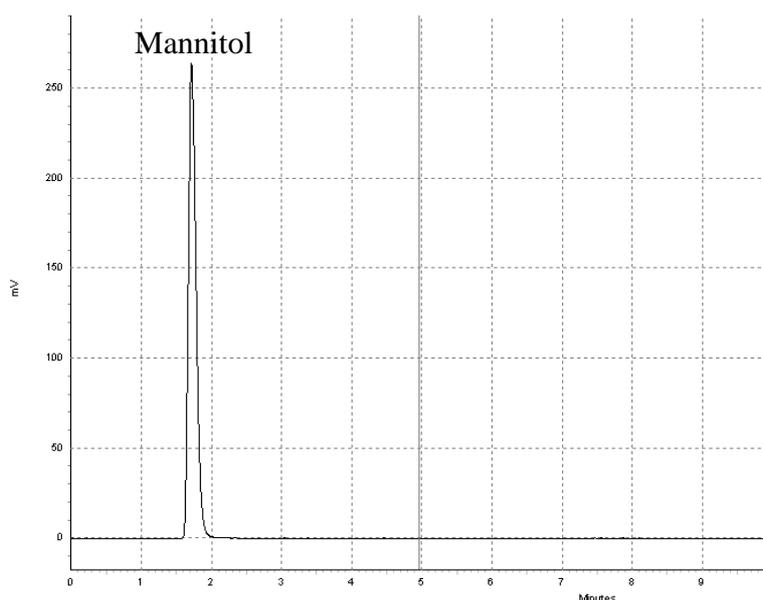


Figure II.9. : Chromatogramme d'une solution aqueuse de Mannitol 1 mM. Composition de la phase mobile : mélange de solution aqueuse de TDFHA 1 mM et ACN (85/15 v/v). Débit 1 mL.min⁻¹. Détection DEDL.

A - Choix de l'agent d'appariement d'ions. Influence de la longueur de la chaîne carbonée.

L'acide glutamique est un des acides aminés les plus polaires (présence de 2 fonctions acide carboxylique et une fonction amine – Figure II.4.). De ce fait, la rétention d'une paire d'ions formée entre le TFA et cet acide aminé reste faible car le groupement -CF₃ du TFA est beaucoup trop court pour engendrer une paire d'ions suffisamment hydrophobe.

Les premiers essais réalisés avec une phase mobile constituée d'une solution 100 % aqueuse de TFA à 0,1 % (v/v) nous ont conduits à observer une rétention très faible de l'acide glutamique ($k = 0,47$) et des ions sodium ($k = 0,18$) donc trop proche du volume mort.

Le remplacement du TFA dans la phase mobile aqueuse par la même quantité de NFPA a permis d'obtenir une séparation satisfaisante de l'acide glutamique ($k = 5,06$) et des ions sodium ($k = 3,06$) suffisamment séparés du volume mort.

L'utilisation du TDFHA, à la concentration de 1 mM en phase aqueuse, dans la phase mobile a également permis d'obtenir une séparation satisfaisante de l'acide glutamique ($k = 4,9$) et des ions sodium ($k = 19,6$). Le TDFHA a permis une meilleure sélectivité entre l'acide glutamique et les ions sodium ($\alpha = 4$) que ne l'avait permis le NFPA ($\alpha = 1,7$), permettant ainsi de s'affranchir de l'influence d'une grande quantité d'ions sodium (dans la solution à analyser) sur la rétention de l'acide glutamique.

Le tableau II.1. récapitule pour les 2 composés Glu et Na⁺, les différentes valeurs obtenues pour leurs facteurs de rétention et facteurs de séparation en fonction de la nature de l'agent d'appariement d'ions en phase mobile.

Tableau II.1. : Facteur de rétention et sélectivité pour les deux solutés, de Glu et Na⁺, en fonction de la composition de la phase mobile

Phase mobile	Facteur de rétention, k		Facteur de séparation, α
	Glu	Na ⁺	
Solution aqueuse de TFA à 0,1 % (v/v)	0,47	0,18	2,6
Solution aqueuse de NFPA à 0,1 % (v/v)	5,06	3,06	1,7
Solution aqueuse de TDFHA à 0,1 % (v/v)	4,9	19,6	4
Solution aqueuse de NFPA à 0,1 % / Acétonitrile 85/15 (v/v)	1,5	1,2	1,3
Solution aqueuse de TDFHA 1 mM / Acétonitrile 85/15 (v/v)	1,4	7	5

Il est intéressant de noter l'inversion d'élution entre l'acide glutamique et les ions sodium en fonction de l'agent d'appariement d'ions utilisé. En effet, en utilisant le NFPA, les ions sodium sont élués en premier et avec le TDFHA, l'acide glutamique est élué en premier. L'allongement de la chaîne hydrophobe de l'agent d'appariement d'ions en phase mobile a ainsi un effet plus marqué sur l'augmentation de rétention de Na⁺ par rapport à celle de Glu.

B - Influence de la proportion d'acétonitrile

L'ajout d'acétonitrile dans la phase mobile est nécessaire pour permettre d'éluer le pemetrexed, molécule hydrophobe, non élué avec une phase mobile 100 % aqueuse.

L'utilisation d'une phase mobile composée d'une solution aqueuse de NFPA à 0,1 % et d'acétonitrile dans les proportions 85/15 v/v nous a permis d'obtenir une rétention suffisante des ions sodium ($k = 1,2$) et de l'acide glutamique ($k = 1,5$) mais avec une sélectivité insuffisante entre eux ($\alpha=1,3$). (Figure II.10.).

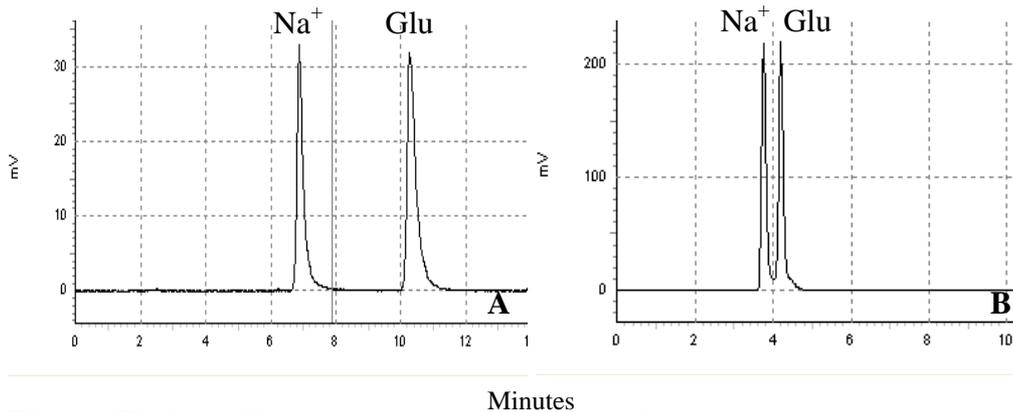


Figure II.10. : Chromatogramme d'une solution aqueuse de glutamate de sodium 1 mM. Composition de la phase mobile : A : solution aqueuse de NFPA 0,1 %. B : mélange solution aqueuse de NFPA 0,1 % et ACN (85/15 v/v). Débit 1 mL.min⁻¹. Détection DEDL.

L'utilisation d'une phase mobile composée d'une solution aqueuse de TDFHA 1 mM et d'acétonitrile dans les proportions 85/15 v/v nous a permis d'obtenir une rétention suffisante des ions sodium et de l'acide glutamique avec une sélectivité satisfaisante ($\alpha = 5$), l'acide glutamique ayant un facteur de rétention de 1,4 et les ions sodium, un facteur de rétention de 7. (Figure II.11.).

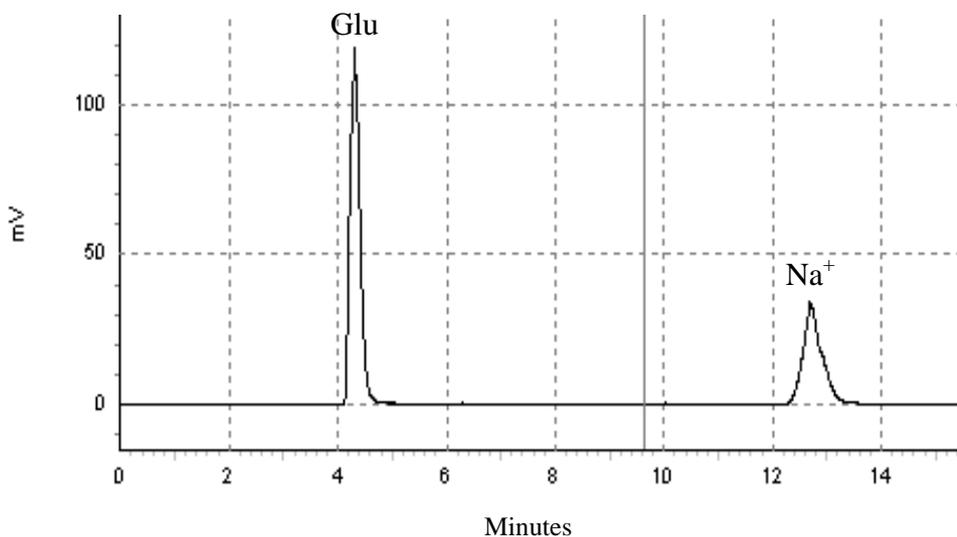


Figure II.11. : Chromatogramme d'une solution aqueuse de glutamate de sodium 1 mM. Composition de la phase mobile : mélange solution aqueuse de TDFHA 1 mM et ACN (85/15 v/v).. Débit 1 mL.min⁻¹. Détection DEDL.

Au vu de ces résultats, nous avons choisi de continuer l'optimisation de la méthode avec le TDFHA et non plus le NFPA, en faisant varier la proportion d'acétonitrile de 10 % à 30 % afin d'évaluer l'influence de l'acétonitrile sur l'élution de l'acide glutamique et des ions sodium. Dans le premier cas (10 % d'ACN), le temps d'analyse pour éluer le pemetrexed serait trop important (>25 minutes). Dans le deuxième cas (30 % d'ACN), les ions sodium et l'acide glutamique ont des facteurs de rétention trop faibles, respectivement de 0,12 et 0,65 ne permettant pas l'utilisation de cette phase mobile. (Figure II.12.).

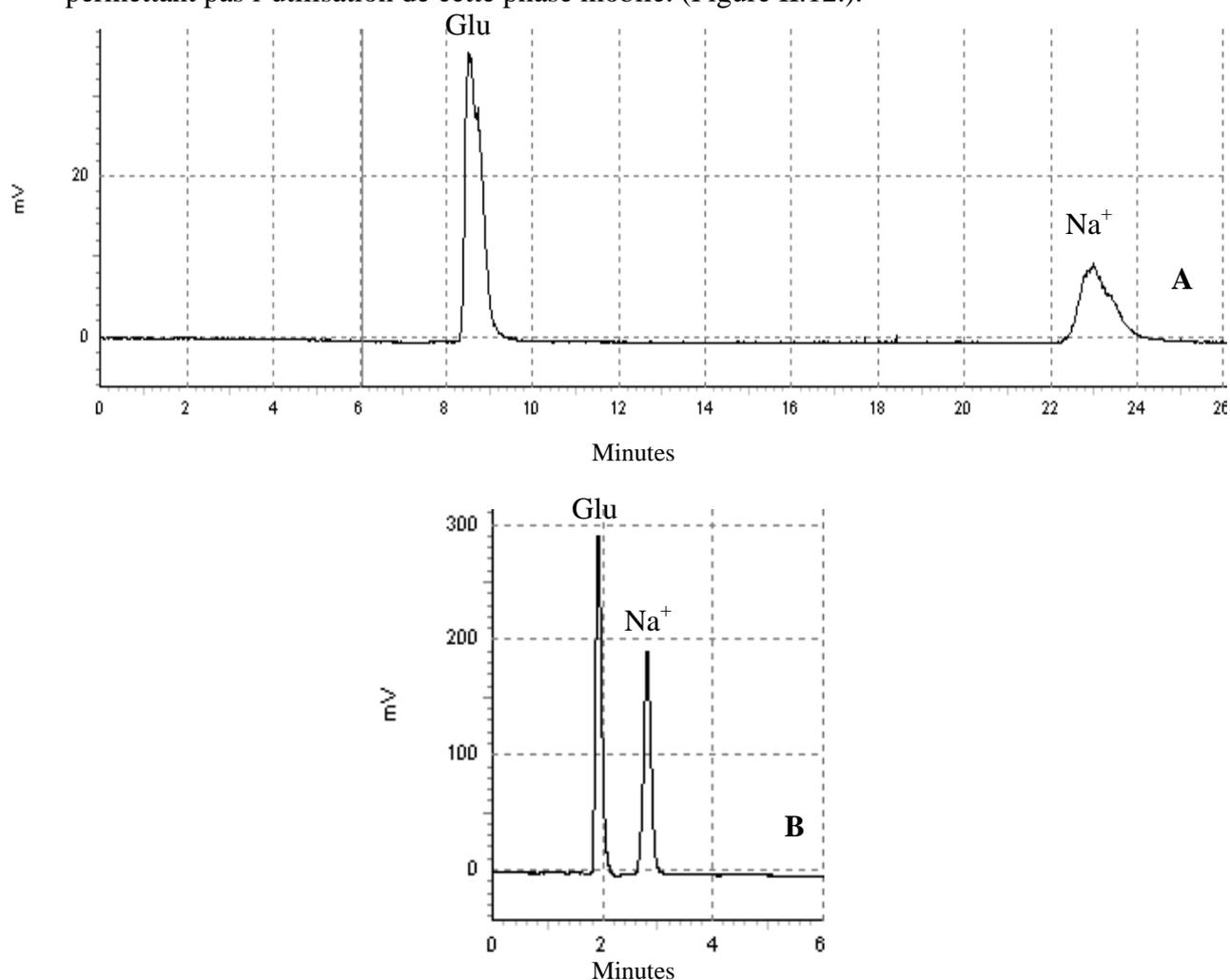


Figure II.12. : Chromatogramme d'une solution aqueuse de glutamate de sodium 1 mM. Composition de la phase mobile : A : mélange solution aqueuse de TDFHA 1 mM et ACN (90/10 v/v). B : mélange solution aqueuse de TDFHA 1 mM et ACN (70/30 v/v). Débit 1 mL.min⁻¹. Détection DEDL.

C – Conditions de séparation optimisées

Au final, nous utiliserons pour le développement de la méthode le TDFHA comme agent d'appariement d'ions à une concentration de 1 mM en solution aqueuse en mélange avec l'acétonitrile dans une proportion 85/15 v/v. En effet, cette composition de phase mobile présente, dans notre cas, le meilleur compromis entre résolution, rétention et temps d'analyse de l'acide glutamique, des ions sodium, ions chlorures et du mannitol. (Figure II.13.).

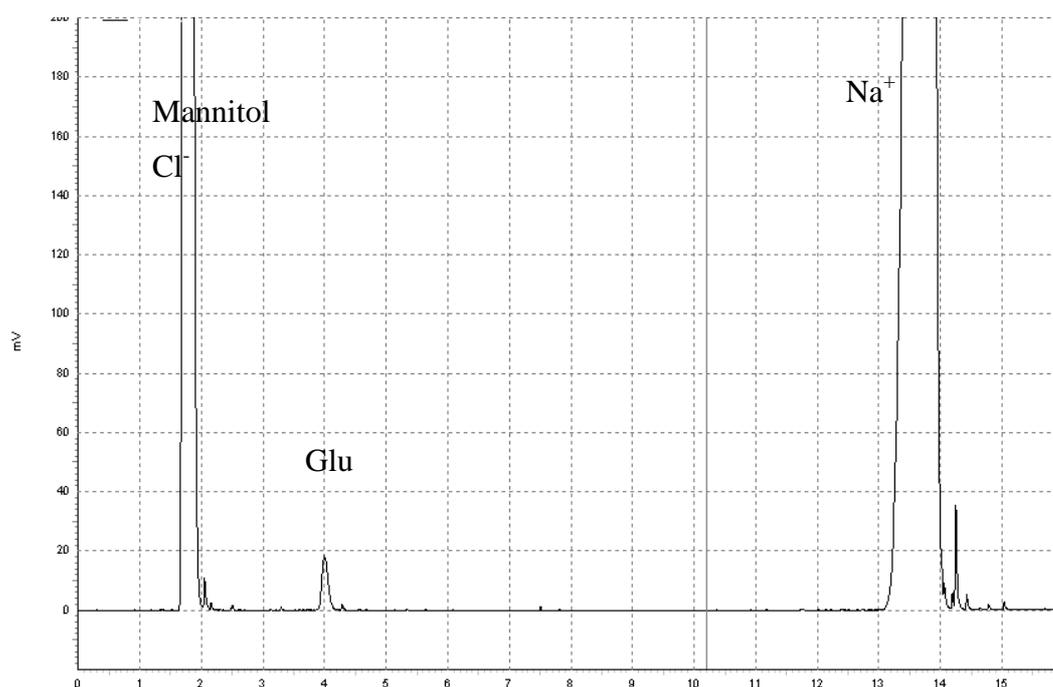


Figure II.13. : Chromatogramme d'une solution aqueuse d'acide glutamique ($15 \mu\text{g/mL}^{-1}$) en présence de mannitol et ions sodium. Composition de la phase mobile : mélange solution aqueuse de TDFHA 1mM et ACN (85/15 v/v). Débit $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Détection DEDL.

II.2.3.2. Etude des conditions de gradient de solvant organique pour l'élution du pemetrexed

L'analyse du pemetrexed dans ces conditions isocratiques conduit à une rétention trop importante de ce composé. En effet, le pemetrexed est hydrophobe et a des interactions très fortes avec les chaînes alkyles greffées (C12) libres (non appariées avec l'agent de paire d'ions en phase mobile) de la colonne chromatographique utilisée. La quantité de solvant

organique (15 % d'ACN) utilisée dans la phase mobile isocratique n'est donc pas suffisante pour éluer le composé d'intérêt dans un temps d'analyse satisfaisant.

Afin de permettre l'élution du pemetrexed dans un temps d'analyse n'excédant pas 30 minutes, nous avons donc travaillé en gradient croissant d'acétonitrile tout en conservant pendant les 6 premières minutes une composition constante de la phase mobile pour assurer une rétention suffisante pour Glu.

La figure II.14. présente un chromatogramme d'une solution de pemetrexed commerciale diluée à $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans la phase mobile de départ et dopée par de l'acide glutamique à $15 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Le chromatogramme A a été obtenu avec une détection DEDL et le chromatogramme B avec une détection UV 254 nm. En comparant les deux modes de détection, nous confirmons l'intérêt d'un détecteur comme le DEDL pour les études de stabilité et la détection des produits de dégradation puisque le DEDL met en évidence la présence des solutés n'absorbant pas en UV (mannitol, ions chlorure et sodium et l'acide glutamique).

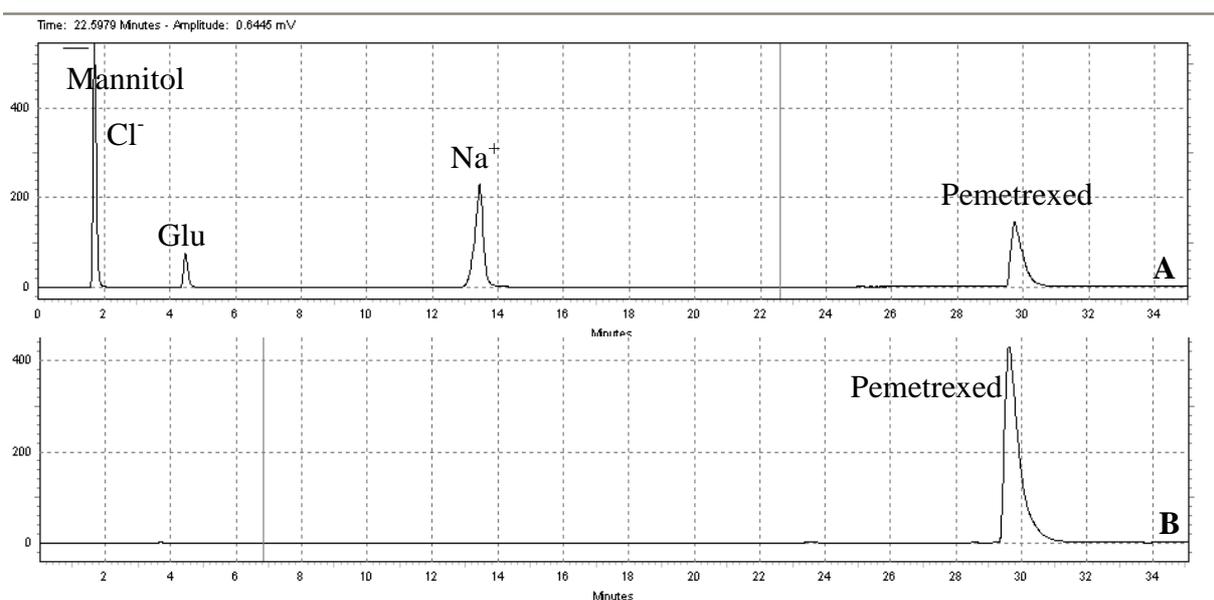


Figure II.14. : Chromatogramme d'une solution de pemetrexed ($0,5 \text{ mg/mL}$) et d'acide glutamique ($15 \text{ }\mu\text{g/mL}$). Composition de la phase mobile : Solvant A (solution aqueuse de TDFHA 1 mM) et solvant B (acétonitrile) établi de la façon suivante : 15 % (v/v) de solvant B pendant 6 minutes, puis jusqu'à 30 % (v/v) de solvant B en 28 minutes suivi d'un retour aux conditions initiales en 0,1 minute. Débit $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Détection DEDL (A) et UV à 254 nm (B).

Toutes ces analyses ont été réalisées avec une colonne thermostatée à 20 °C.

Le contrôle de la température de la colonne est absolument nécessaire pour éviter une forte variabilité des temps de rétention et en particulier celui de l'acide glutamique.

Les conditions chromatographiques optimales que nous avons sélectionnées pour l'étape suivante de validation de la méthode sont les suivantes :

Colonne Synergi MAX-RP C12 (4 µm, 150 mm x 4,6 mm) munie d'une pré-colonne MAX-RP (4 mm x 3 mm) (Phenomenex), thermostatée à 20 °C.

La phase mobile est un gradient binaire : solvant A (solution aqueuse de TDFHA 1 mM) et solvant B (acetonitrile) établi de la façon suivante : 15 % (v/v) de solvant B pendant 6 minutes, puis jusqu'à 30 % (v/v) de solvant B en 28 minutes suivi d'un retour aux conditions initiales en 0,1 minute. Le débit de la phase mobile est de 1 mL/min. Entre chaque injection, un temps de rééquilibrage du système de 21 minutes est nécessaire. Une double détection UV à 254 nm puis DEDL (3,5 bar (air comprimé) ; température 50 °C ; gain 10) permet de suivre l'élution du mélange injecté.

Afin de garantir l'utilisation d'une méthode analytique spécifique, nous avons réalisé au laboratoire la synthèse de l'impureté A (Figure II.4.) décrite par Saravanan *et al.* selon la synthèse publiée par Barnett *et al.* [38, 46]. Nous avons ensuite analysé une solution contenant de l'acide glutamique, du pemetrexed reconstitué et de l'impureté A selon la méthode mise au point (Figure II.15.).

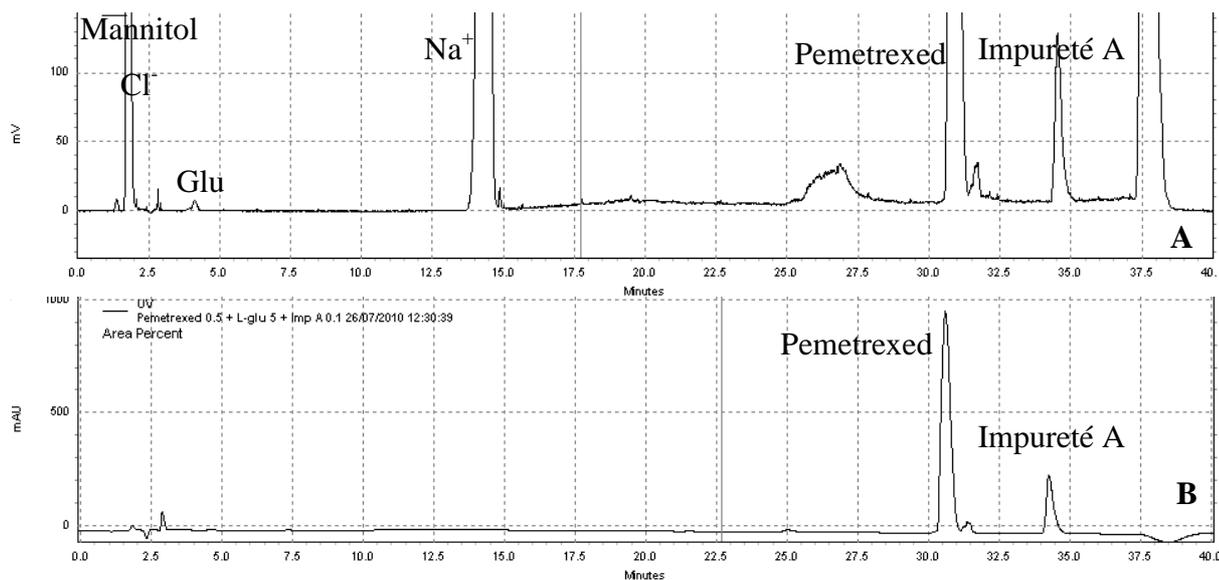


Figure II.15. : Chromatogramme d'une solution de pemetrexed (0,5 mg/mL), d'acide glutamique (5 μ g/mL) et d'impureté A (0,1 mg/mL). Solvant A (solution aqueuse de TDFHA 1 mM) et solvant B (acetonitrile) établi de la façon suivante : 15 % (v/v) de solvant B pendant 6 minutes, puis jusqu'à 30 % (v/v) de solvant B en 28 minutes suivi d'un retour aux conditions initiales en 0,1 minute. Débit 1 mL.min⁻¹. Détection DEDL (A) et UV à 254 nm (B).

La figure II.15. nous montre que tous les composés présents potentiellement dans la solution à analyser sont séparés (excipients, principe actif, impureté A, acide glutamique). La méthode mise au point étant donc spécifique sa validation a été entreprise et les résultats présentés dans le paragraphe suivant.

II.3. Validation de la méthode chromatographique

La validation de la méthode présentée ci-après a fait l'objet d'une publication dans le Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [47]. La méthode chromatographique a été validée en termes de précision, linéarité de réponse, profil d'exactitude, limites de détection et stabilité des solutions. Plusieurs méthodes de validation de méthode chromatographique sont décrites, parmi lesquelles figurent les recommandations ICH (International Conference of Harmonization) et les recommandations de la SFSTP (Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques) [48-52]. Bien que les recommandations ICH soient largement utilisées dans le domaine pharmaceutique, nous avons opté pour la validation selon les recommandations de la SFSTP qui permet, après le

calcul des différents paramètres de validation, de définir le profil d'exactitude de la méthode analytique développée. Ce profil d'exactitude permet de visualiser la validation ou non d'une méthode dans la gamme de concentration utilisée. Au final, les deux recommandations pour la validation d'une méthode de dosage sont très proches, mais les recommandations SFSTP permettent une lecture plus aisée de la validité d'une méthode analytique.

Titre de l'article :

Development of an ion-pairing reversed-phase liquid chromatography method using a double detection analysis (UV and evaporative light scattering detection) to monitor the stability of Alimta[®]-pemetrexed preparations: identification and quantification of L-glutamic acid as a potential degradation product.

Abstract

A new method based on high-performance liquid chromatography coupled to ultraviolet and evaporative light scattering detection (HPLC-UV-ELSD) was developed for the determination of L-glutamic acid, a potential degradation product of pemetrexed, and for the quantification of pemetrexed itself. This is an ion-pairing, reversed-phase method. The column was a Synergi MAX-RP C12 4 μm (150 mm x 4.6 mm). The mobile phase was 1 mM tridecafluoroheptanoic acid in aqueous solution and acetonitrile under gradient elution mode. L-glutamic acid was detected by ELSD, and pemetrexed by UV at 254 nm. Good resolution was achieved between pemetrexed and L-glutamic acid. The HPLC method was validated according to SFSTP and ICH guidelines, and applied the accuracy profile procedure with a five-level validation experimental design. For pemetrexed, the decision criteria selected consisted of the acceptability limits ($\pm 3\%$) and the proportion of results within the calculated tolerance intervals (95%). In conclusion, the proposed analytical procedures were validated over the selected validation domains for L-glutamic acid (0.005 to 0.025 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and pemetrexed (0.4 to 0.6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and shown to provide a very effective method.

Key words

Pemetrexed, L-glutamic acid, ion-pairing agents, HPLC, ELSD

Introduction

Pemetrexed disodium has the chemical name L-glutamic acid, *N*-[4-[2-(2-amino-4,7-dihydro-4-oxo-1*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)ethyl]benzoyl] disodium salt, heptahydrate (Fig II.16.A) and is a multitargeted antifolate that has demonstrated antitumor activity against various tumor types, both as a single agent and in combination with other chemotherapeutic agents [53-54]. Pemetrexed is used in the treatment of malignant pleural mesothelioma in combination with cisplatin in patients with unresectable disease, or for whom curative surgery is not an option [27-28]. It is also approved as a second-line, single-agent treatment for locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC) [54]. The role of pemetrexed as maintenance therapy after first-line therapy for advanced NSCLC has been evaluated in a phase-III trial [55]. Pemetrexed is currently registered for first-line therapy in combination with cisplatin, at a dose of 500 mg/m², diluted in 0.9% physiological saline, on day 1 of a 3-week schedule, and, as a single-agent for the second-line treatment of patients with non-squamous NSCLC [56].

Although the stability of pemetrexed solutions for intravenous administration has been extensively studied [34-36], there are no extensive data available concerning the identification and/or quantification of the potential degradation products. Moreover, analytical methods described in the literature, such as HPLC coupled with UV detection (recommended by the European Pharmacopoeia [57]), may not be specific enough for this type of analysis when the drugs or the degradation products, such as most amino acids, are lacking a chromophore [38, 58].

Saravanan *et al.* have developed a method with UV detection based on the quantification of pemetrexed (Fig II.16.A) and the detection of impurity A (Fig II.16.C), a potential degradation product [38]. Nevertheless, this method is not exhaustive since L-glutamic acid is also a potential degradation product of pemetrexed, and indeed pemetrexed is obtained by peptide chemistry between the carboxylic moiety of impurity A and the amine group of L-glutamic acid [46]. We have therefore focused our analysis on L-glutamic acid (Fig II.16.B) *versus* impurity A, because they should appear in a 1/1 ratio, and so this could provide some indication of the degradation pathway of pemetrexed.

L-glutamic acid is a polar molecule with no strong chromophore group (weak absorbance near 220 nm), and several studies have been published on the use of ELSD or Corona detector to determine polar underivatized amino-acids [43-44, 59]. Furthermore ELSD is viewed as suitable for the detection for non-absorbing analytes [60]. The chromatographic mobile phase

is nebulized with an inert gas, and evaporated in a drift tube. The response does not depend on the optical properties of the solute, and any compound less volatile than the mobile phase can be detected. This method can be used advantageously to search for the degradation products of pharmaceutical products. Moreover to obtain structural information about the degradation products formed, the chromatographic conditions developed using ELSD detection could be transposed directly to an HPLC-MSⁿ method, as these two detection modes share the same chromatographic requirements (essentially a volatile mobile phase).

The objective of this study was to develop an HPLC method for determining stability that is able to separate pemetrexed, Na⁺, L-glutamic acid and impurity A, which could be used to quantify pemetrexed and L-glutamic acid, a commercially available by-product, and to separate and detect all potential degradation products. Furthermore, the method described here could be used for routine stability studies of pemetrexed in hospital pharmacies.

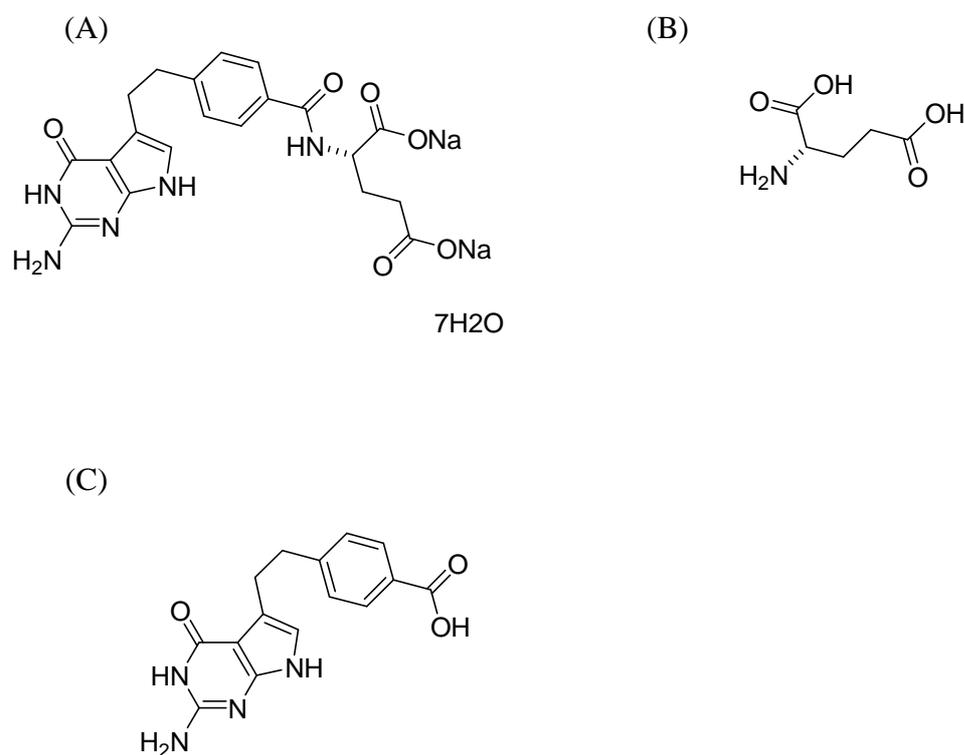


Figure II.16. : Chemical structures of pemetrexed (A), L-glutamic acid (B), and Impurity A (C).

Experimental procedure

Chemicals and Reagents

Alimta[®]-pemetrexed (Fig II.16.A) was purchased from the hospital pharmacy at the Tours Teaching Hospital (Lilly, local preparation). HPLC-grade acetonitrile and methanol were purchased from Carlo-Erba (Val de Reuil, France). Trifluoroacetic acid (TFA, 99% purity), nonafluoropentanoic acid (NFPA, 97% purity), and tridecafluoroheptanoic acid (TDFHA, 99% purity) were purchased from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France) as was L-glutamic-acid (Fig 1B). Ultra-pure water produced by a Millipore (Molsheim, France) system was used throughout. Impurity A was synthesized in our laboratory in six steps, and used as a 0.5 mg.mL⁻¹ solution in methanol [46].

Instrumentation

HPLC analyses were carried out with a LaChrom Elite system equipped with a VWR L-2130 pump, a VWR L-2200 autosampler at 4°C, a VWR L-2400 UV detector from Merck (Fontenay sous bois, France) and a SEDEX 85 evaporative light scattering detector (ELSD) purchased from SEDERE (Alfortville, France). The chromatographic data handling was accomplished using EZChrom Server software (Merck, Darmstadt, Germany). The UV detection was carried out at 254 nm. The usual ELSD settings were as follows: photomultiplier, 10; evaporative tube temperature, 50°C; air pressure, 3.5 bar.

The column was a Synergi MAX-RP C12 column (Phenomenex, 4 µm, 150 mm x 4.6 mm) from Phenomenex (Le Pecq, France) connected to a guard-column MAX-RP (4 mm x 3 mm), thermostated at 20°C.

The mobile phase was filtered and degassed before use. A gradient of eluent A (TDFHA 1 mM in aqueous solution) and eluent B (acetonitrile) was established as follows: 85% (v/v) eluent A over 6 min, then to 70% (v/v) eluent A over 28 min and, finally, a return to the initial conditions in 0.1 min. The flow rate throughout was 1 mL/min.

Procedures

Quantification

Pemetrexed

Alimta[®]-pemetrexed was dissolved in 0.9% physiological saline (NaCl 0.9%) solution to obtain a concentration of 25 mg.mL⁻¹. This solution was then diluted with the mobile phase to

provide an intermediate solution containing 1 mg.mL^{-1} of pemetrexed (solution A). UV detection at 254 nm was used to quantify pemetrexed.

L-glutamic acid

This amino acid was dissolved in water to obtain a 0.1 mg.mL^{-1} stock solution (solution B). ELSD detection was used to quantify L-glutamic acid.

An external standard calibration curve with five calibration points of L-glutamic acid and pemetrexed was obtained with mixtures of solution A and solution B diluted in the mobile phase. For L-glutamic acid, the calibration points ranged from 0.005 to 0.025 mg.mL^{-1} (0.005 , 0.010 , 0.015 , 0.020 , 0.025 mg.mL^{-1}) and for pemetrexed, they ranged from 80 to 120% of the assay concentration (0.4 , 0.45 , 0.5 , 0.55 , 0.6 mg.mL^{-1}). The point at 0.005 mg.mL^{-1} of L-glutamic acid was near to the limit of detection that we wanted to achieve (1% (w/w) for monitoring the degradation of a solution of pemetrexed).

Method validation

The method was validated according to SFSTP and ICH guidelines [48-52].

Selectivity

The selectivity of the method was established by determining the resolution of the pemetrexed peak from those of the potential degradation products, L-glutamic acid and impurity A.

Precision

Three injections of five different solutions (containing 0.4 , 0.45 , 0.5 , 0.55 , 0.6 mg.mL^{-1} of pemetrexed and 0.005 , 0.010 , 0.015 , 0.020 , 0.025 mg.mL^{-1} of L-glutamic acid), were carried out on the same day, and the values of the relative standard deviation (R.S.D.) were calculated to determine the intra-day precision. These determinations were also repeated on three different days to determine the inter-day precision.

The inter-day precision of the retention time of the L-glutamic acid was also evaluated.

Accuracy profile

The following experimental design was applied: five levels and two replicates over a three-day period for the calibration standards, and five levels and three replicates over a three-day period for validation standards. All calibration standards and validation standards were independent.

Limit of detection

This value for L-glutamic acid was estimated mathematically from the standard curve equation. The LOD was calculated based on the concentration exhibiting a signal-to-noise ratio of 3 [52].

Stability

The stability of pemetrexed and L-glutamic acid was studied under different conditions:

- One set of samples (n=3) of the stock solutions was stored at +2°C - +8°C for 48h. The stability of the stock solutions was assessed by duplicate determinations of samples diluted immediately on day 0 (containing 0.5 mg.mL⁻¹ pemetrexed and 0.015 mg.mL⁻¹ L-glutamic acid), and 24 and 48 hours later.
- The post-dilution stability (i.e. stability in the autosampler) was assessed by duplicate determinations of samples (containing 0.5 mg.mL⁻¹ pemetrexed and 0.015 mg.mL⁻¹ L-glutamic acid; n=3) immediately after dilution, and after 24 h and 48h in the injector.

Finally, different concentrations of 0.9% physiological saline (NaCl 0.9%) were added to the sample analyzed to evaluate their influence on the quantification of pemetrexed (0.5 mg.mL⁻¹) and of L-glutamic acid (0.005 mg.mL⁻¹) in the concentration assay.

Results and discussion

Development of the chromatography method

The goal of our work was to identify a chromatographic system that would be able to exclude L-glutamic acid, a highly polar compound, from the void volume, to separate this compound from sodium ions, and to elute both pemetrexed and impurity A within an acceptable analysis time (less than 35 minutes). The pemetrexed solution was reconstituted and diluted in the hospital pharmacy using 0.9% physiological saline (NaCl 0.9%), which meant that sodium and chloride were both present in all the samples analyzed. Sodium is a non-volatile cation that can be detected by ELSD, whereas chloride is a semi-volatile anion, and consequently poorly detected by ELSD. Moreover, the fact that ELSD was necessary to detect L-glutamic acid, a solute with no strong chromophore group, made it impossible to use any non-volatile reagents in the mobile phase. The methods previously described for the quantification of pemetrexed in liquid pharmaceutical preparations were not compatible with these requirements, as they use either non-volatile salts (phosphate buffer) in the mobile phase [34,

38] or acetic acid, which is a volatile reagent, but one unsuitable for the retention of L-glutamic acid [34-36].

In an attempt to obtain good separation between pemetrexed, L-glutamic acid, sodium ions and impurity A, we used a Synergi MAX-RP C12, 4 μm column. This column has lower steric hindrance than a C18 column, and covers 25% more of the silica surface, thus shielding more free silanols. Moreover, due to its high specific surface area (475 m^2/g), the Synergi Max-RP gives similar hydrophobic retention and methylene selectivity to a C18 column, but with sharper peaks, less peak tailing, and excellent reproducibility [61]. For the mobile phase, various perfluorinated carboxylic acids (TFA, NFPA, TDFHA) were tested as ion pairing reagents in the mobile phase [43-44]. We first evaluated the acidic mobile phase using 0.1% trifluoroacetic acid-acetonitrile (85:15), and found that under these conditions L-glutamic acid was not retained on the column. When TFA was replaced by NFPA in the mobile phase, this did not provide sufficient resolution between sodium ions and L-glutamic acid (Table II.2.). Finally, we resolved this problem by using a mobile phase consisting of a combination of 1 mM tridecafluoroheptanoic acid aqueous solution and acetonitrile (85:15), which gave the best resolution between sodium ions and L-glutamic acid, with a good and reproducible retention time (4 minutes) (Table II.2. and II.2.3.). As shown in Table II.2., the length of the carboxylic chain of the perfluorinated carboxylic acid influences the retention of sodium ions more than that of L-glutamic acid. In order to elute pemetrexed and impurity A within an acceptable analysis time, it was then necessary to carry out 15% to 30% acetonitrile gradient elution over 28 minutes, starting 6 minutes after the beginning of the run. For routine quantification experiments, the injection sequence started with two blank injections, which were subsequently discarded, in order to equilibrate the column. An equilibration time of 21 minutes was allowed between successive injections.

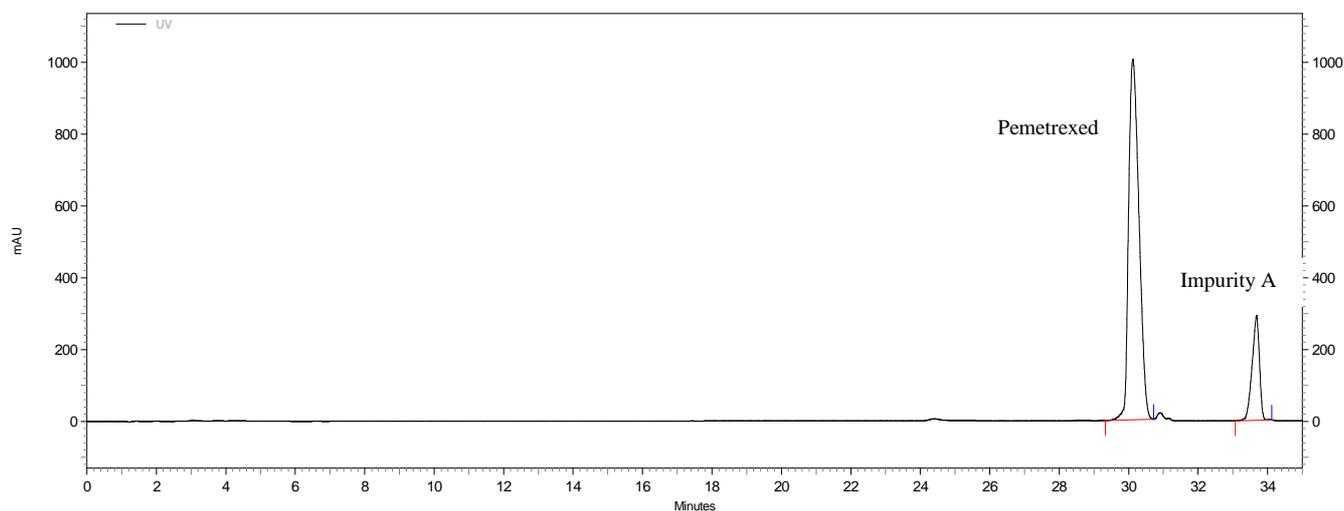
Table II.2. : Influence of the perfluorinated acid nature and the acetonitrile percentage in mobile phase on the resolution between L-glutamic acid and sodium ion.

Mobile phase (v/v)	Retention time of L-glutamic acid (min)	Retention time of the sodium ion (min)	Resolution
NFPA 6.2mM/ACN (100/0)	10.3	6.9	2.3
NFPA 6.2mM/ACN (99/1)	10.2	6.9	2.4
NFPA 6.2mM/ACN (98/2)	8.8	7.1	1.3
NFPA 6.2mM/ACN (85/15)	4.2	3.7	0.8
TDFHA 1mM/ACN (90/10)	8.5	23	7.4
TDFHA 1mM/ACN (85/15)	4.0	13.6	9.6
TDFHA 1mM/ACN (80/20)	3.0	6.8	5.1
TDFHA 1mM/ACN (70/30)	1.9	2.8	1.5

Figure II.17. shows the optimized LC-UV-ELSD analysis of a solution of pemetrexed (0.5 mg.mL^{-1}) spiked with 0.005 mg.mL^{-1} L-glutamic acid and 0.1 mg.mL^{-1} impurity A. Pemetrexed and impurity A were detected by both detectors, but L-glutamic acid and Na^+ could only be detected by ELSD. Under the conditions described above, the retention time for L-glutamic acid was about 4 min; pemetrexed and impurity A were eluted at about 30 and 34 min respectively (Fig II.17.). The modification of the baseline observed between 24 and 28 minutes is due to acetonitrile gradient elution and associated to a system peak. It has been previously demonstrated that the ion-pairing agent added to mobile phase induces a dynamic modification of the surface of the reversed-phase packing material [44]. So, by increasing the acetonitrile percentage in the mobile phase, some amounts of TDFHA, hydrophobic agent which is more soluble in ACN than in water, were desorbed from the stationary phase and migrated towards the detector. This phenomenon can be observed with ELSD due to differences in mobile phase volatility when TDFHA concentration increases suddenly. The proposed method therefore provides satisfactory separation of the drug (pemetrexed) from its potential degradation products (L-glutamic acid and Impurity A). It is important to point out that all the methods published hitherto for this drug [34-36, 38] have involved the use of UV detection of the degradation products at 254 nm, and so are non-exhaustive methods, because some of its degradation products do not absorb in UV (e.g. L-glutamic acid), and so would not be detected. ELSD is able to detect such products, and moreover, it is already being used in

several methods for detecting impurities in pharmaceutical products [60, 62-63], which is an advantage for the development of an HPLC method suitable for determining drug stability.

A : UV detection



B: ELSD

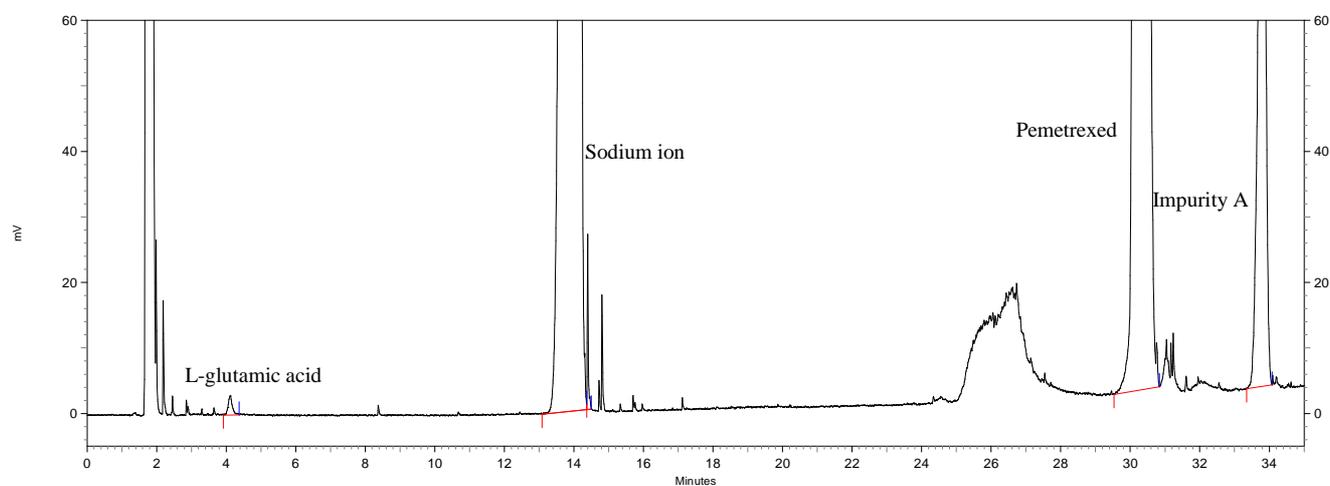


Figure II.17. : HPLC analysis of a solution of pemetrexed (0.5 mg.mL^{-1}) spiked with L-glutamic acid (0.005 mg.mL^{-1}) and Impurity A (0.1 mg.mL^{-1}).

Column: Synergi MAX-RP C12 $4\mu\text{m}$ ($150 \times 4.6 \text{ mm I.D.}$). Gradient elution: solvent A: 1 mM TDFHA in water, solvent B: acetonitrile; 0 – 6 min 15% B, 6 – 34 min linear gradient to 30% B. Flow rate: 1 ml.min^{-1} ; injection volume: $20\mu\text{L}$; 2 A: UV detection at 254 nm . 2 B: ELSD detection ($P=3.5 \text{ bar}$; $T=50^\circ\text{C}$; Gain 10)

Method validation

Precision

The data obtained from the intra- and inter-day and retention time precision experiments for pemetrexed and L-glutamic acid are shown in Table 2. The R.S.D. values for the intra-day and inter-day precision of the quantification of pemetrexed were <1%. For L-glutamic acid, the R.S.D. values for the intra-day and inter-day precision were <4.0%, and the inter-day precision of its retention time was <1%. The method is therefore sufficiently precise for stability studies (Table II.3.).

Linearity of the response

Regarding the calibration data, the UV response for pemetrexed was strictly linear in the concentration range from 0.4 to 0.6 mg.mL⁻¹; the ELSD response for L-glutamic acid has been shown to be linear on double logarithmic coordinates in the concentration range from 0.005 to 0.025 mg.mL⁻¹. Knowing the theoretical concentrations of the samples, the trueness and tolerance intervals were computed for each concentration of pemetrexed and L-glutamic acid (Table II.3.). The accuracy profiles are shown in Fig II.18.

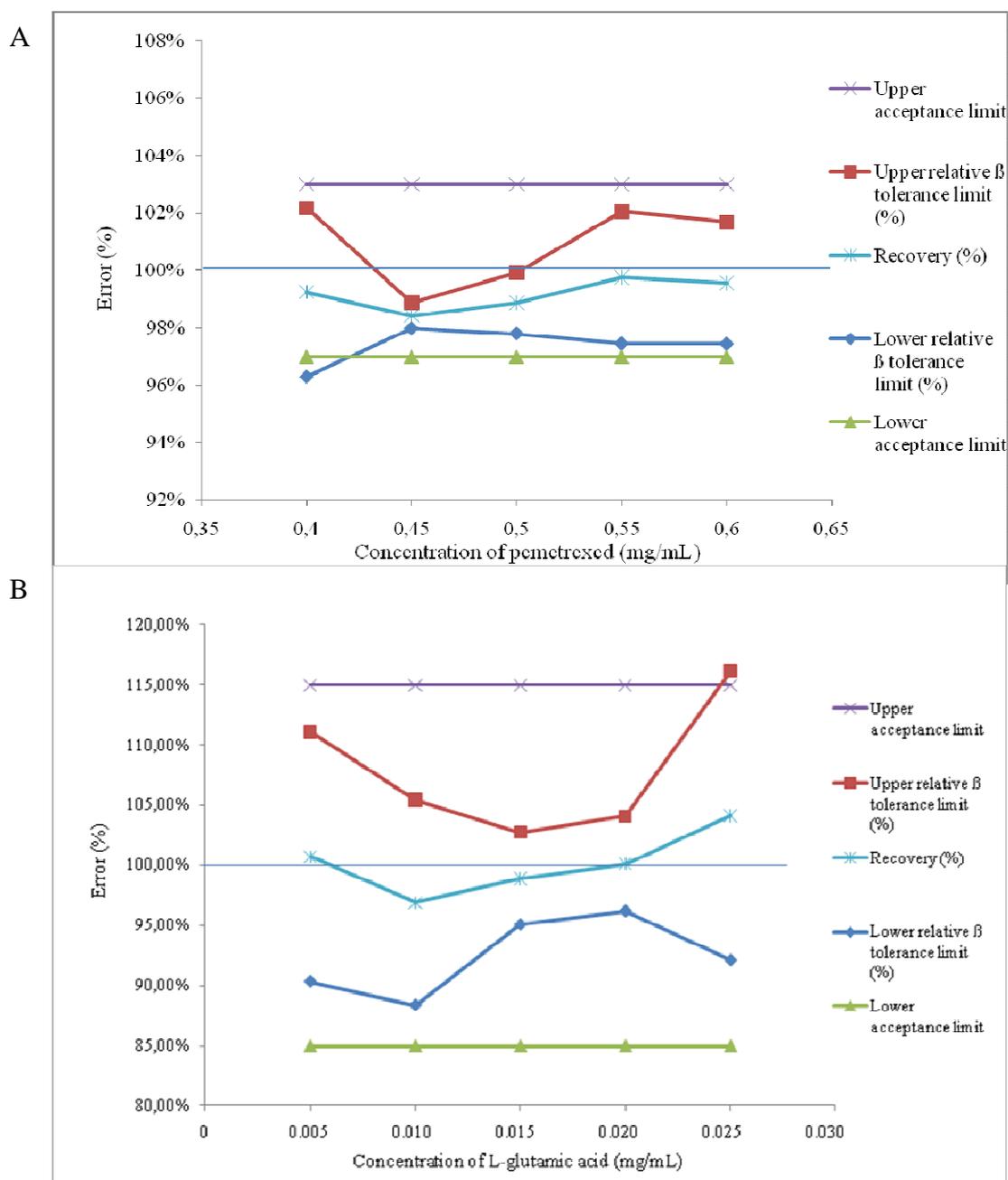


Figure II.18. : Pemetrexed determination in $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ with UV detection at 254 nm (acceptance limits $\pm 3\%$) (A) and L -glutamic acid determination in $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ with ELSD (acceptance limits $\pm 15\%$) (B).

For pemetrexed, the tolerance interval was within the $\pm 3\%$ acceptance limit at all concentrations except at $0,4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (80% of the assay concentration), where the lower acceptance limit value found was 96.3%. This validation provides sufficient guarantee that the method will provide results $\pm 3\%$ of the true value in at least 95% of cases, when the

concentration is between 0.45 and 0.6 mg.mL⁻¹ (i.e. from 90% to 120% of the concentration assay). Despite the lower acceptance limit at 80% of the assay concentration, this method is therefore validated for stability studies. Indeed, it is accepted that a drug can be defined as being stable if not less than 90% of the initial drug concentration remains in the solution [34]. For L-glutamic acid, the tolerance interval was within the ±15% acceptance limit at all concentrations. This validation provides sufficient guarantee that the method will provide results at ±15% of the true value in at least 95% of cases, when the concentration is between 0.005 and 0.025 mg.mL⁻¹ (i.e. from 5% to 20% (w/w) degradation of a 0.5- mg.mL⁻¹ solution of pemetrexed (assay concentration)). The limit of detection was calculated to be 0.0018 mg.mL⁻¹, so the method should detect 1.5% (w/w) degradation of a 0.5 mg.mL⁻¹ solution of pemetrexed (assay concentration).

Stability and influence of the dilution solvent

Pemetrexed and L-glutamic acid both remained stable under the conditions studied (CV<2%), and the concentration of NaCl 0.9% did not influence the quantification of L-glutamic acid or pemetrexed at the concentrations studied (Data not shown).

Table II.3. : Validation results for the determination of pemetrexed (mg.mL⁻¹) (A) and L-glutamic acid as a potential degradation product (mg.mL⁻¹) (B).

A

Validation criterion	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Mean introduced concentration	0.40	0.45	0.50	0.55	0.60
Mean predicted concentration	0.397	0.443	0.494	0.549	0.597
Absolute bias	-0.003	-0.007	-0.006	-0.001	-0.003
Relative bias (%)	-0.75	-1.57	-1.14	-0.24	-0.43
Recovery (%)	99.3	98.4	98.9	99.8	99.6
Repeatability standard deviation	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001
Intermediate precision standard deviation	0.003	0.001	0.002	0.003	0.003
Repeatability RSD (%)	0.50	0.15	0.21	0.17	0.20
Intermediate precision RSD (%)	0.86	0.17	0.33	0.51	0.50
Lower β tolerance limit	0.385	0.441	0.489	0.536	0.585
Upper β tolerance limit	0.409	0.445	0.500	0.561	0.610
Lower relative β tolerance limit (%)	96.3	98.0	97.8	97.5	97.4
Upper relative β tolerance limit (%)	102.2	98.9	99.9	102.1	101.7

B

Validation criterion	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Mean introduced concentration	0.005	0.010	0.015	0.020	0.025
Mean predicted concentration	0.0050	0.0097	0.0148	0.0200	0.0260
Absolute bias	0.00004	-0.00031	-0.00016	0.00003	0.00104
Relative bias (%)	0.72	-3.09	-1.10	0.14	4.14
Recovery (%)	100.7	96.9	98.9	100.1	104.1
Repeatability standard deviation	0.00017	0.00027	0.00023	0.00032	0.00024
Intermediate precision standard deviation	0.00019	0.00032	0.00023	0.00032	0.00068
Repeatability RSD (%)	3.3	2.8	1.6	1.6	0.9
Intermediate precision RSD (%)	3.9	3.3	1.6	1.6	2.5
Lower β tolerance limit	0.0045	0.0088	0.0143	0.0192	0.0230
Upper β tolerance limit	0.0056	0.0106	0.0154	0.0208	0.0290
Lower relative β tolerance limit (%)	90.3	88.4	95.1	96.2	92.1
Upper relative β tolerance limit (%)	111.1	105.5	102.7	104.1	116.2
Mean retention time (min)	4.014	4.011	4.004	3.998	3.994
Intermediate precision standard deviation (min)	0.011	0.011	0.010	0.010	0.013
Intermediate precision RSD (%)	0.28	0.28	0.26	0.27	0.33

Conclusion

As we have stated, it is accepted that a drug can be classified as being stable if not less than 90% of the initial drug concentration remains in solution if the degradation products are less toxic than the drug itself, or not less than 95% of the initial drug concentration remains in solution if the degradation products are more toxic than the drug. The method described here can detect a 1.5% level of a potential non-toxic degradation product, and so could also be used to provide some indication of the degradation pathway of pemetrexed. L-glutamic acid is known to be non-toxic - but what about impurity A and all the other potential degradation products? The HPLC-UV-ELSD method could be combined with MSⁿ detection to confirm the degradation pathway of pemetrexed under conditions of hospital use, and to give an indication of the structure of the degradation products other than L-glutamic acid and impurity A. Moreover, this ion-pairing HPLC-UV-ELSD method could be used for assessing the stability of solutions of pemetrexed in hospital centers.

Acknowledgments

The Laboratory of Organic and Therapeutic Chemistry would like to thank Dr Antier and the hospital pharmacy of the Tours Teaching Hospital. Thanks also to Monika Ghosh for help with the English text.

Nous disposons donc maintenant d'une méthode optimisée et validée satisfaisant aux objectifs que nous nous étions fixés à savoir : séparation du principe actif, des excipients présents simultanément en solution et de ses différents produits de dégradation potentiels, notamment l'acide glutamique et l'impureté A décrite par Saravanan *et al.* [38]. Un suivi de stabilité du pemetrexed en évaluant la perte de principe actif au cours du temps peut être maintenant envisagé par cette méthode.

Afin de répondre à une problématique de notre unité concernant l'utilisation des reliquats de pemetrexed-Alimta[®], nous avons réalisé l'étude de stabilité de ce médicament après reconstitution par du sérum physiologique (NaCl 0,9 %) à une concentration de 25 mg.mL⁻¹ dans son conditionnement original.

II.4. Etude de stabilité du pemetrexed-Alimta[®] à 25 mg.mL⁻¹

Le coût élevé du pemetrexed dans son conditionnement commercial, a limité nos essais et les a orienté vers l'étude de stabilité de la solution reconstituée dans les conditions les plus souvent rencontrées au cours de la pratique quotidienne hospitalière : à +4 °C et à température ambiante (+22 °C) [64].

L'étude de stabilité a été réalisée à deux plages de températures différentes (de +2 °C – à +8 °C d'une part et à +22 °C d'autre part) et à l'abri de la lumière. La composition de chaque solution a été vérifiée immédiatement après reconstitution puis aux jours J1, J2, J7 et J14. Trois solutions reconstituées ont été suivies en parallèle pour chaque température.

II.4.1. Préparation des solutions

Les différents flacons de Pemetrexed-Alimta[®] 500 mg ont été fournis par l'UBCO du CHRU de Tours et reconstitués selon les indications du fabricant avec une solution de NaCl 0,9 % au sein de cette unité dans les conditions d'asepsie requises pour la préparation de médicaments anticancéreux. La solution de pemetrexed ainsi reconstituée est à la concentration requise de 25 mg.mL⁻¹ dans le flacon.

L'étude de stabilité physico-chimique est réalisée en analysant à différents moments des solutions diluées (0,5 mg.mL⁻¹) à partir de la solution reconstituée dite concentrée. Les

prélèvements de 0,5 mL de solution concentrée ont été effectués immédiatement après reconstitution, puis aux jours 1, 2, 7 et 14 dans chaque flacon en conditions d'asepsie strictes.

II.4.2. Stabilité physique

La stabilité physique de chaque solution a été évaluée par mirage des solutions aux différents temps de prélèvement afin de repérer d'éventuelles particules en suspension ou un changement de couleur de la préparation.

II.4.3. Stabilité chimique

La méthode analytique de CLHP utilisée est celle décrite et développée ci-dessus. Tous les échantillons ont été dilués avant analyse avec la phase mobile (TDFHA 1mM/ACN 85/15 v/v) pour obtenir une concentration injectée de pemetrexed à 0,5 mg.mL⁻¹.

La concentration de pemetrexed mesurée au temps J0 est définie comme constituant la valeur initiale de référence (le 100 %) puis pour chaque prélèvement analysé aux temps suivants la concentration de pemetrexed est exprimée en pourcentage par rapport à cette concentration initiale. La solution de pemetrexed sera considérée comme stable si la perte de pemetrexed au cours du temps n'excède pas 5 % de la quantité initiale [36, 64].

Nous avons également mesuré le pH à l'aide de bandelettes pH de précision (0,2 unité pH). En effet, une mesure précise du pH (au pHmètre par exemple) ne s'avère pas nécessaire. Dans le Résumé Caractéristiques du Produit (RCP) est précisé « *La solution ainsi obtenue est claire et sa couleur varie de l'incolore au jaune ou jaune verdâtre sans conséquence sur la qualité du produit. Le pH de la solution reconstituée varie de 6,6 à 7,8.* ».

Les résultats de notre étude de stabilité sur 14 jours sont reportés dans le tableau II.4.. Nous avons observé une perte négligeable de pemetrexed au cours de l'étude en fonction des différentes conditions.

Nous n'avons par ailleurs pas observé de particules visibles à l'œil nu et pas de changement de pH.

Tableau II.4. : Stabilité du Pemetrexed 25 mg.mL⁻¹ reconstitué avec du NaCl 0,9% dans son conditionnement d'origine.

Temps (jours)	Pemetrexed 25 mg.mL ⁻¹ % de la concentration initiale (n=3)	
	22 °C à l'abri de la lumière	+2-+8 °C à l'abri de la lumière
1	100,3 ± 0,5	100,6 ± 0,5
2	101,0 ± 1,8	100,2 ± 1,3
7	101,0 ± 0,9	99,7 ± 1,4
14	100,4 ± 0,5	98,7 ± 0,3

Au cours de cette étude de stabilité, nous avons montré que la pemetrexed-Alimta[®] reconstitué à 25 mg.mL⁻¹ avec du sérum physiologique (NaCl 0,9 %), selon les recommandations du fabricant, est stable physiquement et chimiquement pendant 14 jours quelque soit les conditions de conservation étudiées.

Nous n'avons pas identifié la présence d'acide glutamique lors de l'étude de stabilité de la solution de pemetrexed ce qui infirme nos hypothèses de départ lors du développement de la méthode [47] qui se basaient sur les travaux antérieurs de Saravanan et al. [38]. La voie de dégradation en solution du pemetrexed n'est donc pas celle que nous avons supposée. En revanche, au cours de l'étude de stabilité, nous avons mis en évidence l'apparition de traces de deux produits de dégradation principaux : produit de dégradation 1 (temps de rétention : 2,6 minutes) et produit de dégradation 2 (temps de rétention : 3,5 minutes). On note l'apparition progressive de ces deux produits de dégradation au cours des différents prélèvements (J0 en noir, J1 en cyan, J14 en rose, J28 en bleu et J56 en violet). Nous avons zoomé sur les produits de dégradation. (Figure II.19.).

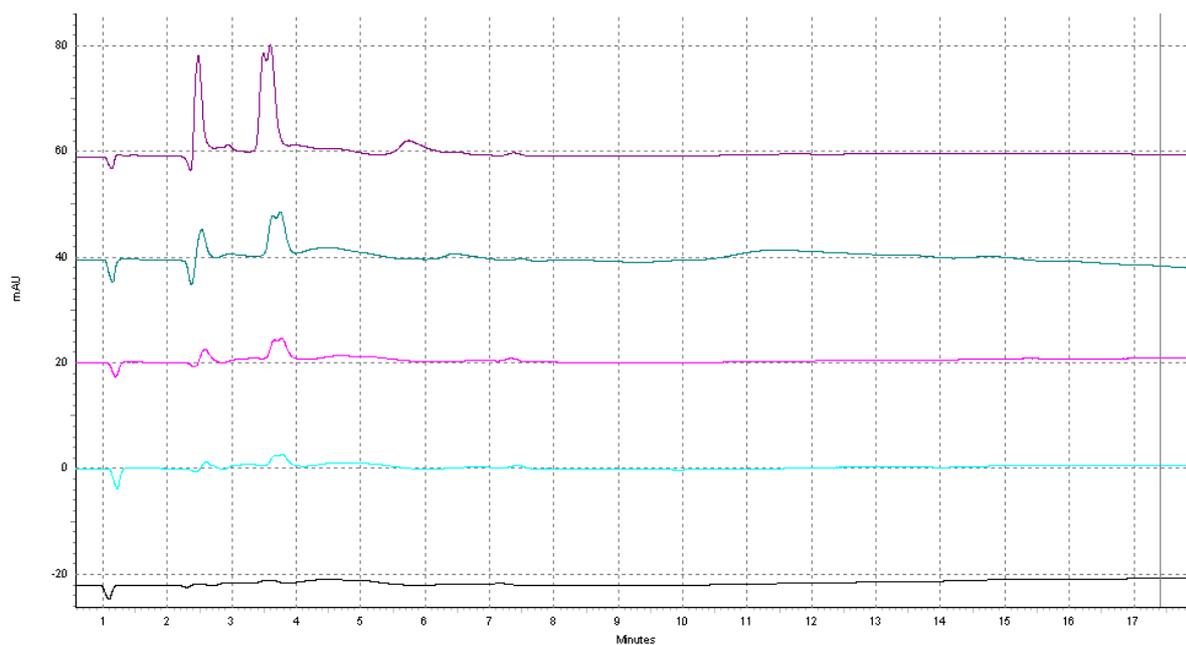


Figure II.19. : Chromatogramme des solutions analysées au cours de l'étude de stabilité (UV à 254 nm). Les analyses correspondent aux prélèvements de la solution 1 conservée à 22 °C, à l'abri de la lumière à J0 (noir), J1 (cyan), J14 (rose), J28 (bleu) et J56 (violet).

II.5. Identification des produits de dégradation du pemetrexed par chromatographie d'appariements d'ions couplée à la spectrométrie de masse

L'emploi du couplage en ligne de la spectrométrie de masse (SM ou SM/SM) et de la chromatographie en phase liquide, constitue un outil très performant pour obtenir une information rapide sur la masse des composés présents dans un échantillon donné sans étape préalable de purification et sans besoin d'une quantité importante d'échantillon.

Le spectromètre de masse, API 3000 (Applied Biosystem Sciex), dont nous avons disposé pour notre étude, est un spectromètre de masse caractérisé par une source d'ionisation à pression atmosphérique de type turbo-ion spray, d'une interface à rideau de gaz et d'un analyseur de type quadripolaire. Après avoir décrit le principe général de cet appareil, nous décrirons l'optimisation des paramètres de source (réglages des différentes tensions, des gaz, de la température de source..) pour la détection en SM et SM/SM de nos composés d'intérêt puis les résultats obtenus en couplage CPL-SM/SM apportant des informations pour l'identification des composés 1 et 2 de la figure II.19. qui sont les 2 produits de dégradation majoritairement apparus au cours de notre étude de stabilité.

II.5.1. Principe de la spectrométrie de masse

Le principe de l'analyse par spectrométrie de masse consiste à transformer des molécules échantillon en ions moléculaires et/ou en ions fragments. Les ions issus de la source sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) par un ou plusieurs systèmes analyseurs avant d'être détectés (Figure II.20.). Les ions transmis par l'analyseur jusqu'au détecteur reforment ainsi un circuit électrique. Le courant électrique créé est proportionnel à la quantité d'ions reçus par le détecteur. Sur le trajet menant au détecteur, différents champs de force (magnétiques, électriques...) sont appliqués, les uns servant à assurer la transmission des ions (par gradient de tension), les autres à filtrer les ions selon le rapport de leur masse m et de leur charge z . Le signal électrique enregistré lors d'un balayage des rapports m/z constitue un spectre de masse.

De façon simplifiée un spectromètre de masse se décompose en :

- une source d'ionisation dans laquelle les molécules sont ionisées à partir d'un échantillon vaporisé ;
- un ou plusieurs analyseurs qui consistent à séparer les ions formés en fonction de leur rapport m/z ;
- un détecteur qui mesure un courant électrique proportionnel à la quantité d'ions reçus aux différentes valeurs de m/z ;
- un système de traitement de données qui transforme le courant électrique en un signal chromatographique.

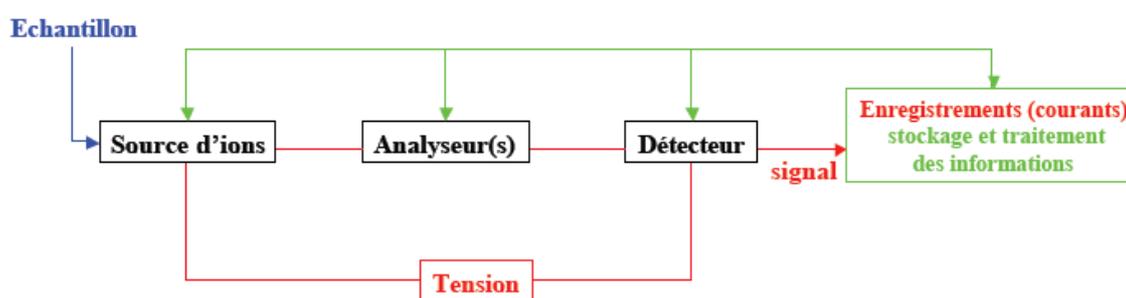


Figure II.20. : Schéma de principe d'un spectromètre de masse

II.5.1.1. Les sources d'ionisation à pression atmosphérique

Les sources d'ions fonctionnant à pression atmosphérique, plus communément appelées sources API (du terme anglais : Atmospheric Pressure Ionisation) sont particulièrement adaptées au couplage de la chromatographie en phase liquide avec la spectrométrie de masse. Ces sources d'ionisation sont réputées être des méthodes d'ionisation douce conduisant la plupart du temps à un spectre de masse riche en ion précurseur et généralement plus pauvre en fragments. Trois principales techniques API sont disponibles au laboratoire : l'électronébulisation ou électrospray (ESI), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et la photo ionisation à pression atmosphérique (APPI). Pour la sélection du mode d'ionisation le plus approprié à la détection des solutés d'intérêt, deux critères sont en premier lieu à prendre en compte : la masse moléculaire du composé et sa polarité. L'électrospray est bien adapté aux molécules polaires, ionisables ou ioniques et dont la masse peut aller jusqu'à 100 000 uma, l'ionisation chimique est plus appropriée à l'ionisation de petites molécules moins polaires dont la masse est souvent inférieure à 1000 uma et la photo ionisation, technique la plus récente, a été développée pour ioniser les

molécules les plus apolaires telles que les hydrocarbures aromatiques polyinsaturés (HAP) qui ne s'ionisent pas avec les deux autres types de source. Les travaux publiés dans la littérature sur l'analyse en couplage avec la spectrométrie de masse du pemetrexed [65] et de l'acide glutamique [66-67] étant réalisés avec une source d'ionisation de type ESI, c'est donc ce mode d'ionisation que nous avons privilégié pour notre travail expérimental.

L'ESI repose sur l'introduction d'une solution aqueuse ou hydro-organique de l'échantillon à analyser dans un capillaire porté à un potentiel élevé (positif ou négatif). Le champ électrique étant obtenu par application d'une différence de potentiel de 3 à 6 kV entre le capillaire et une contre-électrode séparés de 0,3 à 2 cm (largeur de champ électrique). Sous l'action combinée d'un gaz de nébulisation chauffé, qui évapore le solvant, et du champ électrique, des charges vont s'accumuler à la surface de l'effluent conduisant à la rupture de celui-ci et à la formation d'un spray de gouttelettes fortement chargées ou « cône de Taylor ». Les microgouttes ainsi formées vont progressivement diminuer en taille par perte de molécules de solvant, puis éclater sous l'effet d'une densité de charge trop importante, et au final, libérer des ions moléculaires protonés ou déprotonés. (Figure II.21.).

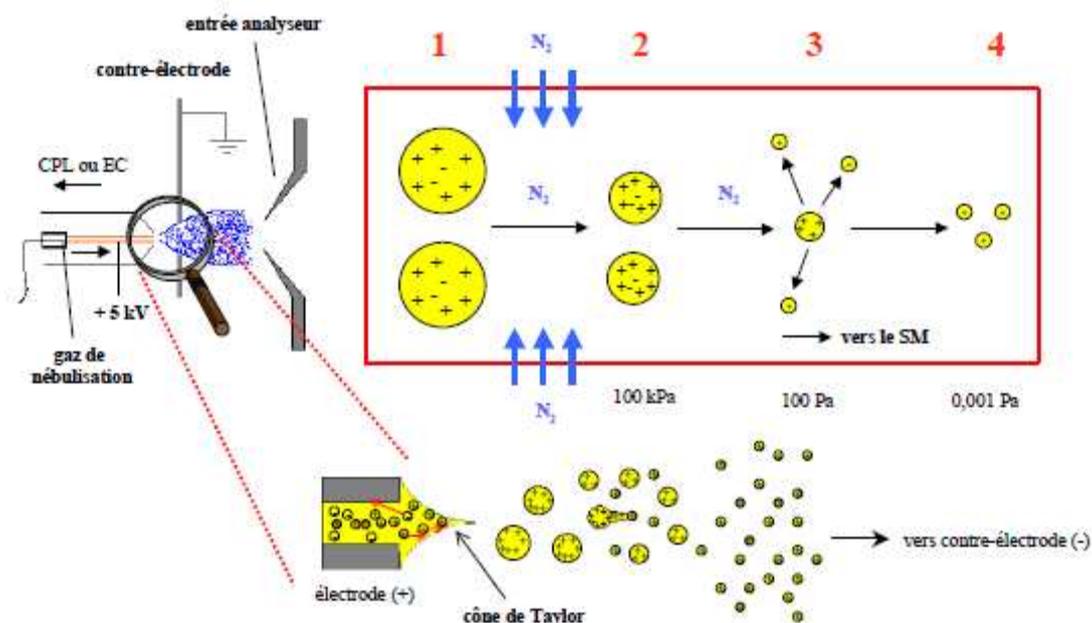


Figure II.21. : Principe de l'Electrospray d'après [68]

Lorsque le débit de la phase mobile est excessif ($> 200 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$), les gouttelettes sont trop grosses pour ioniser efficacement le soluté : la décharge du liquide est inefficace (les gouttelettes sont moins ioniques), l'effet de dilution est important et l'évaporation ionique se fait difficilement. En conséquence, la source ESI n'autorise pas le couplage direct avec les

colonnes chromatographiques de diamètre interne 4,6 mm car le débit de phase mobile utilisé avec ce type de colonne est alors trop élevé (classiquement 1 mL.min⁻¹). La seule solution possible dans ce cas, consiste à diviser le flux d'effluent (split) avant son arrivée dans la source.

L'electrospray est une technique d'ionisation particulièrement douce et permet d'obtenir principalement des ions pseudomoléculaires. Les ions générés, dans notre cas, en mode positif, en ESI-SM sont des molécules protonées [M+H]⁺ ou cationisées (par formation d'ions adduits avec NH₄⁺, Na⁺, K⁺, ...).

II.5.1.2. L'interface à rideau de gaz

Les ions produits par la source pénètrent le spectromètre de masse via l'interface et sont acheminés par un gradient de potentiel vers le détecteur (électromultiplicateur) en passant par l'analyseur quadripolaire où a lieu le filtrage des ions selon leur rapport masse/charge. L'interface d'un spectromètre de masse constitue une zone de transition entre la source à pression atmosphérique et l'analyseur maintenu sous un vide interne puissant d'environ 10⁻⁵ Torr. L'interface assure un vide intermédiaire (8.10⁻³ Torr) permettant de diminuer progressivement la pression dans le spectromètre de masse. L'interface entre la source ESI et l'analyseur est constituée d'une série de lentilles permettant de focaliser le faisceau d'ions formés vers l'entrée du spectromètre de masse. Dans l'interface du spectromètre de masse API 3000 dite « à rideau de gaz », la présence de gaz inerte (N₂) permet de plus, d'empêcher l'entrée des molécules neutres dans le cœur du spectromètre afin d'éviter toute pollution par dépôt sur les parois, de parfaire la désolvatation des ions formés dans la source et de leur transmettre une activation induite par collision (connue sous le sigle CID pour Collisionally Induced Ionisation). L'augmentation de l'énergie interne des ions par ce phénomène peut entraîner la fragmentation (in-source CID fragmentation) des ions pseudomoléculaires en apportant ainsi des informations structurales intéressantes.

II.5.1.3. L'analyseur quadripolaire

L'analyseur est placé sous vide poussé pour assurer une transmission optimale des ions. En couplage avec les méthodes séparatives, la totalité de l'échantillon élué, solutés et solvants, devra donc passer en phase gazeuse pour ne pas polluer l'intérieur du spectromètre de masse et de ce fait détériorer ses performances.

L'analyseur quadripolaire (Figure II.22.) est constitué de quatre électrodes métalliques hyperboliques ou de sections carrées couplées deux à deux. Les paires d'électrodes sont de polarité opposée et sont soumises à une tension possédant une composante continue (U) et une composante alternative ($V \cdot \cos \omega t$). Tout le long de leur parcours à travers l'analyseur, les ions sont attirés par l'électrode de signe opposé mais sont repoussés avant qu'ils ne l'aient atteinte à cause de son changement de signe. Les ions rentrent en résonance avec la radiofréquence appliquée et sont transmis par le quadripôle vers le détecteur (électro- ou photomultiplicateur).

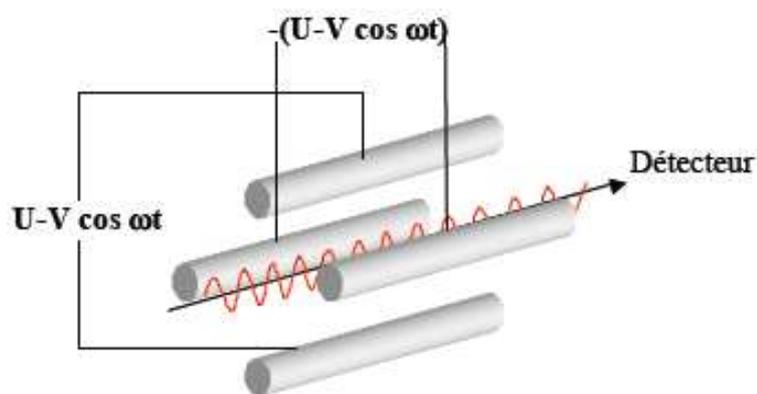


Figure II.22. : Schéma d'un quadripôle

II.5.1.3. Analyseur triple quadripôle

Bien que l'utilisation d'un simple analyseur quadripôle soit suffisante pour obtenir des données structurales sur les molécules étudiées, il est souvent nécessaire d'utiliser des spectromètres de masse en mode tandem (SM/SM) pour obtenir plus d'informations structurales. L'utilisation de trois quadripôles associés en série permet de réaliser la spectrométrie de masse en mode tandem (SM/SM). (Figure II.23.).

La spectrométrie de masse tandem exploite à des fins structurales le principe de la dissociation activée par collision (CAD). Elle consiste à focaliser un ion d'un rapport m/z choisi (ion parent ou ion précurseur) dans le premier analyseur (Q1). Cet ion subit des collisions avec des molécules de gaz (azote ou argon) dans le quadripôle central (Q2) et se fragmente. Un ion fragment (ion fils) est ensuite sélectionné au niveau du dernier analyseur (Q3) pour être transmis au détecteur.

Ce mode de balayage appelé mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) permet d'augmenter la spécificité de l'analyse en suivant non plus l'ion parent $[M+H]^+$ seul comme

en spectrométrie de masse simple mais une transition spécifique d'ions (ion parent>ion fragment). Ce mode de travail est très utile en couplage avec la chromatographie liquide car il permet très souvent d'augmenter la sensibilité de la détection en diminuant l'amplitude du bruit de fond.

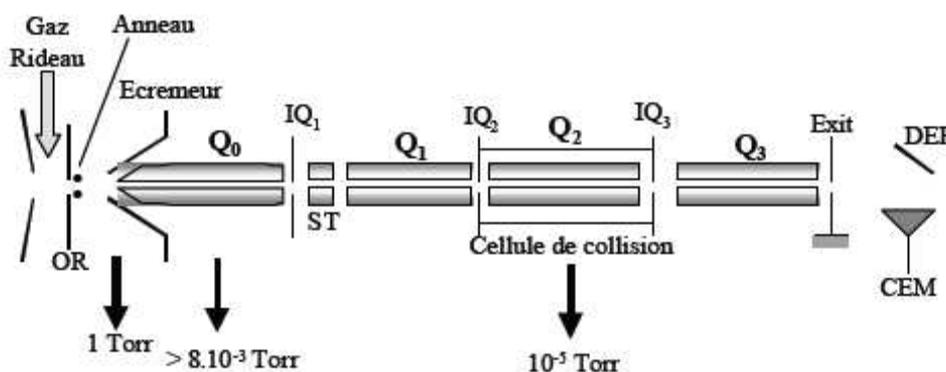


Figure II.23. : Schéma d'un appareil triple quadripôle

II.5.2. Optimisation des paramètres SM/SM en vue de l'analyse des solutions de pemetrexed

La mise au point d'une méthode de détection spécifique commence par l'optimisation du signal en SM (réglages des différents paramètres de source et d'interface) puis par une étude de fragmentation des molécules au cours de laquelle sont recherchés des ions typiques et suffisamment intenses pour apporter une bonne spécificité et une bonne sensibilité à l'analyse.

Ne disposant pas de standards purs correspondant au pemetrexed et aux produits de dégradation du pemetrexed, nous avons optimisé les paramètres de source à partir de solution fraîchement reconstituée de pemetrexed, de solution standard d'acide glutamique et de solution de l'impureté A.

Cette première étape a été entreprise en mesurant l'intensité de l'ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ de chacun de ces solutés en appliquant la procédure d'optimisation décrite pour les acides aminés [69] et en partant des réglages précédemment décrits par Bobin-Dubigeon *et al.* [65] pour l'analyse du pemetrexed en couplage CLHP-SM. Les auteurs ont développé une méthode de suivi thérapeutique du pemetrexed dans le sérum de patients pour réaliser des études de pharmacocinétiques. La phase mobile utilisée ne fait pas intervenir d'agent d'appariements d'ions mais de l'acide formique.

Cette opération a été réalisée en infusant directement vers le spectromètre de masse les solutions témoins à un débit de $20 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. L'optimisation a été réalisée en mode d'ionisation positif en raison du caractère anionique de l'agent d'appariement d'ions utilisé (TDFHA) présent dans la phase mobile de la méthode chromatographique développée. En effet, le mode positif d'ionisation, ne permet pas aux ions négatifs présents dans la phase mobile d'entrée à l'intérieur du spectromètre de masse contrairement au mode négatif.

Les analyses optimisées pour détecter l'acide glutamique en infusion ont été réalisées en couplant un appareil CLHP HP 1100 Agilent avec un triple quadripôle API 3000 API Sciex. Les données enregistrées d'un rapport m/z de 100 à 500 uma ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel Analyst 1.4.2. Les valeurs des paramètres pour obtenir un rapport signal/bruit optimal, en mode positif, sont les suivantes:

- une tension de capillaire de + 5 kV
- une tension d'orifice de + 15 V,
- une tension d'anneau de + 150 V,
- une température de source de 450°C ,
- un débit de gaz nébuliseur de 10 L/min
- un débit de gaz rideau de 8 L/min

Le gaz appliqué en sortie du capillaire pour évaporer la phase mobile est du di-azote.

Nous avons ensuite appliqué les mêmes paramètres pour détecter l'impureté A. Cependant, la faible quantité synthétisée au laboratoire nous a contraint à réaliser les essais en FIA (Flow Injection analysis) avec la phase mobile suivante : TDFHA 1mM / acétonitrile 85/15 v/v à un débit de 0,2 mL/min. Cette technique consiste à alimenter le spectromètre de masse par un flux continu de phase mobile en reliant directement la pompe CLHP à l'entrée de la source. La solution à analyser est ensuite injectée ($20 \mu\text{L}$ dans notre cas à une concentration de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) dans le flux de phase mobile sans être retenue sur une colonne de chromatographie.

Pour le pemetrexed, nous avons également réalisé les essais en FIA car dans la solution reconstituée les teneurs majoritaires de NaCl et du mannitol masquent le signal lié au pemetrexed en faible teneur lorsque le mélange est infusé directement. Les essais en FIA pour cette solution de pemetrexed ont été réalisés avec la même phase mobile que pour l'impureté A ($20 \mu\text{L}$ à une concentration de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Dans les conditions de source optimales, les ions observés pour les différents composés analysés sont :

- pour Glu : l'ion $[M+H]^+$ ($m/z = 148$),
- pour le pemetrexed, l'ion $[M+H]^+$ ($m/z = 428$)
- et pour l'impureté A, l'ion $[M+H]^+$ ($m/z = 299$).

Pour Glu et l'impureté A, nous n'avons pas observé de fragmentation importante dans la source ce qui n'induit pas de perte de signal. Nous pouvons donc espérer avoir une bonne sensibilité de détection pour ces deux composés. Pour le pemetrexed, nous observons une fragmentation dans la source en ion fils de rapport m/z égal à 299. Cela n'est pas préjudiciable pour la suite pour 2 raisons :

- Le pemetrexed est à une concentration que nous fixons par dilution et ce ne sont pas les traces de pemetrexed que nous rechercherons lors du couplage CLHP-SM mais les traces de ses produits de dégradation éventuels.
- L'ion fils du pemetrexed a le même rapport m/z que l'ion parent de l'impureté A, mais le temps de rétention de ces deux composés dans le système chromatographique est différent, ils n'arriveront donc pas simultanément dans la source. Il sera possible de détecter la présence de l'impureté A indépendamment de celle du pemetrexed (cf II.1.2.3.2.) grâce à la séparation chromatographique.

Après avoir optimisé les réglages de la source d'ionisation et de l'interface, nous avons étudié la fragmentation des solutés dans la cellule de collision. Notre objectif étant de développer une méthode avec une détection par SM/SM, le spectromètre de masse a été utilisé en mode product-ion scan (PIS) qui consiste à sélectionner l'ion $[M+H]^+$ comme ion parent dans le premier quadripôle, à le fragmenter dans la cellule de collision et à balayer dans le troisième quadripôle la gamme de masse $m/z = 50$ à $m/z = M+1$ pour la détermination des ions produits. Cette procédure a été réalisée avec des valeurs d'énergie de collision allant de 10 à 50 eV. L'étude de la fragmentation du pemetrexed et de l'acide glutamique nous permettra de comparer les ions fils à ceux des produits de dégradation mis en évidence et, ainsi, nous apportera des informations supplémentaires pour identifier la structure de composés de dégradation.

Les résultats de la fragmentation de l'acide glutamique en fonction de l'énergie de collision sont présentés dans la figure II.24. :

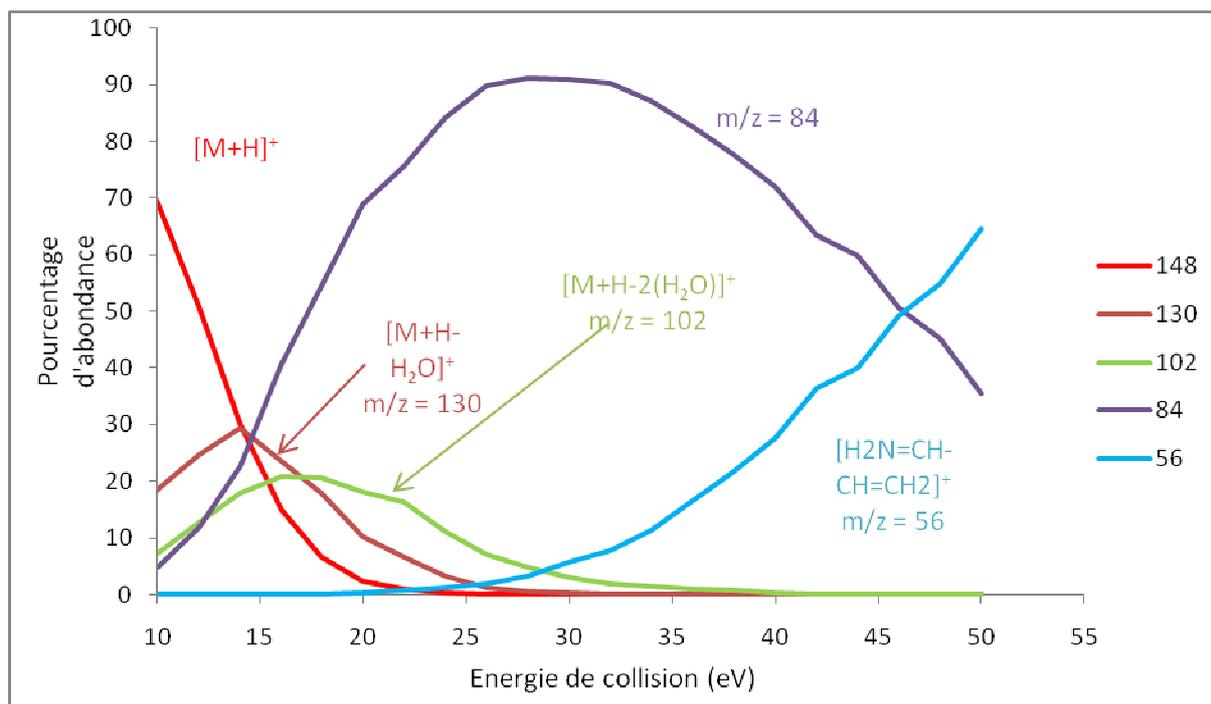


Figure II.24. : Diagramme d'abondance des ions fils de l'acide glutamique en fonction de l'énergie de collision.

La fragmentation de l'acide glutamique conduit à 4 fragments majoritaires dont le maximum d'intensité se situe à des valeurs d'énergie de collision distinctes, ce qui représente un avantage dans la mesure où il sera toujours possible de détecter un ion fragment pour Glu quelque soit la valeur compromise qui sera fixée pour l'énergie de la cellule de collision lors de l'analyse de la solution de pemetrexed en CLHP-SM/SM. La plus forte abondance pour le fragment majoritaire ($m/z = 84$) est obtenue dans une plage d'énergie de collision entre 25 et 30 eV.

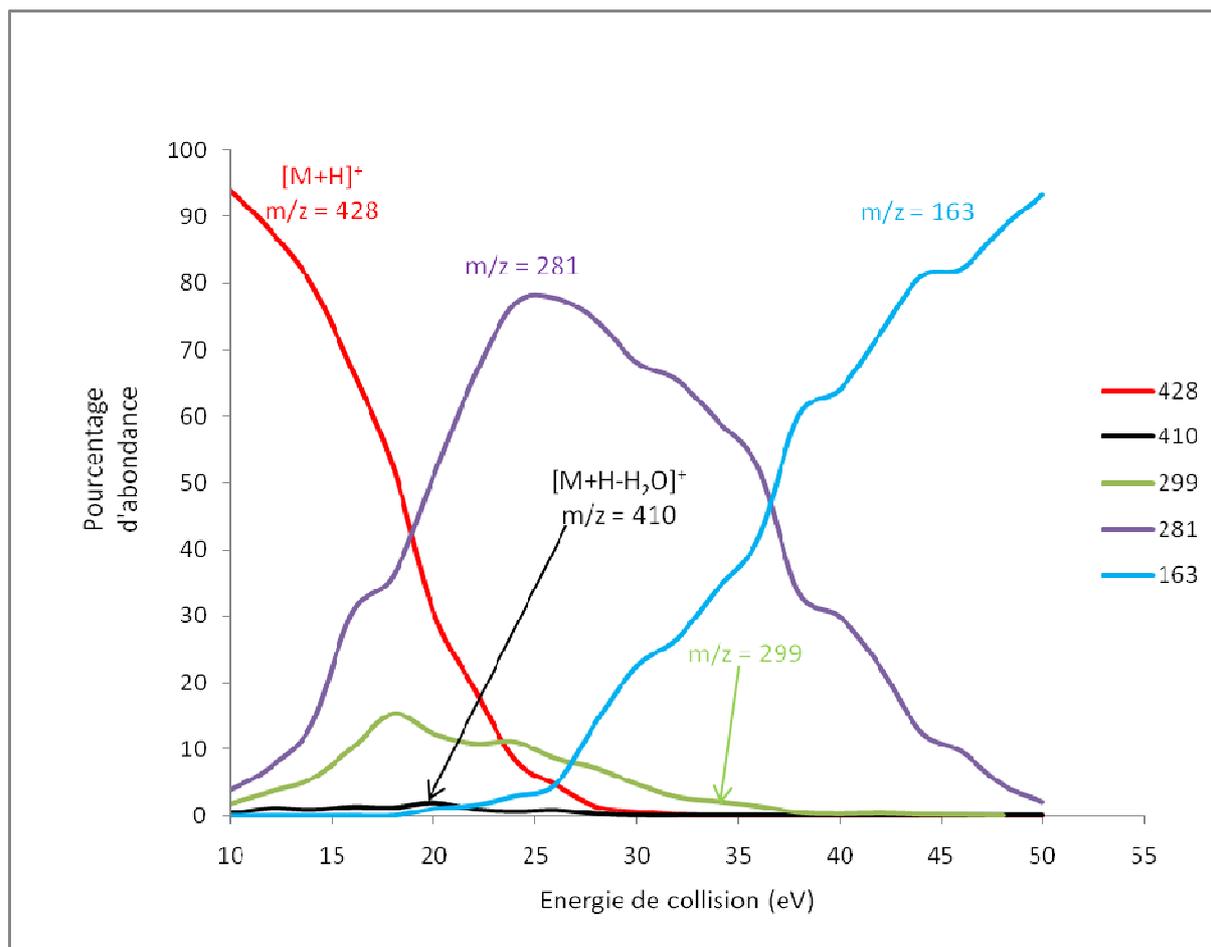


Figure II.25. : Diagramme d'abondance des ions fils du pemetrexed en fonction de l'énergie de collision.

Pour le pemetrexed, nous observons également 4 fragments principaux avec un fragment majoritaire ($m/z = 281$) de forte intensité dans la plage d'énergie de collision de 25 à 30 eV. (Figure II.25.).

Pour les analyses en couplage CLHP-SM/SM de solutions dégradées de pemetrexed, il apparaît d'après les diagrammes de fragmentation, qu'une valeur d'énergie de collision fixée à 25 eV est un bon compromis pour la fragmentation aussi bien du pemetrexed que celle de l'acide glutamique. Les transitions spécifiques suivies au cours de ces analyses seront respectivement pour Glu (148 > 84) et pour le pemetrexed (428 > 281).

Au vu des fragments détectés pour le pemetrexed, nous avons cherché à expliquer dans la figure II.26. les différents chemins de fragmentation possibles en précisant les pertes de neutres associées.

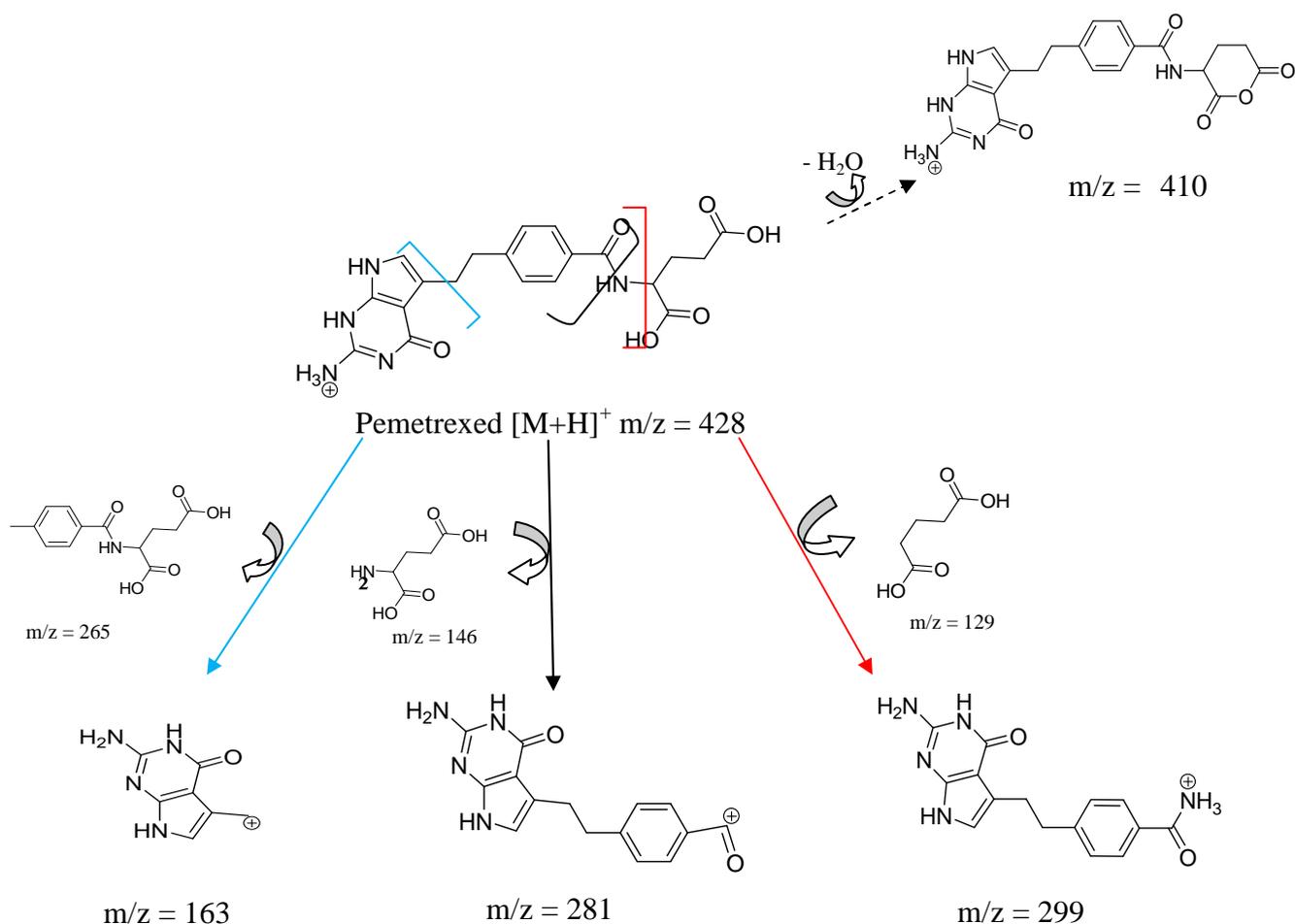


Figure II.26. : Fragmentation du pemetrexed.

Tous les ions fragments observés peuvent s'expliquer à partir d'une fragmentation de l'ion parent du pemetrexed : l'ion fragment de m/z 410 peut s'expliquer par la perte d'une molécule d'eau (perte de 18), celui correspondant à m/z 163 par perte d'un fragment neutre de 265 uma, celui correspondant à m/z 281 par perte d'une molécule d'acide glutamique (perte de 146) et celui de m/z 298 par perte d'une molécule d'acide glutarique (perte de 130).

Les paramètres du spectromètre de masse étant optimisés et les fragmentations du pemetrexed et de l'acide glutamique établies, nous nous sommes intéressés ensuite à l'analyse en couplage CLHP –SM des différentes solutions de pemetrexed analysées au cours de l'étude de stabilité réalisée en CLHP-UV-DEDL (cf II.4.3. ; Figure II.19.). L'analyse CLHP-SM doit nous permettre de déterminer la masse des produits de dégradation apparus au cours de l'étude et l'étude de leur fragmentation en couplage SM/SM devrait nous apporter des éléments nécessaires à leur identification structurale.

II.5.3. Couplage chromatographie-spectrométrie de masse simple

Nous avons tout d'abord analysé par couplage CLHP-SM simple, un mélange standard contenant l'acide glutamique (5 mg.L^{-1}), l'impureté A ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$) et le pemetrexed ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$). L'analyse a été effectuée en mode SIM (Single Ion Monitoring) qui consiste à analyser la solution en suivant les rapports m/z des 3 ions d'intérêt. La figure II.27. montre la superposition des chromatogrammes obtenus à partir de l'extraction des 3 courants ioniques composant le courant ionique total. Les trois solutés donnent des signaux parfaitement mesurables et les temps de rétention de ces 3 composés dans le système chromatographique optimisé en CLHP-DEDL sont confirmés : pour l'acide glutamique : 4,9 minutes ; pour le pemetrexed : 30 minutes ; et pour l'impureté A : 34 minutes.

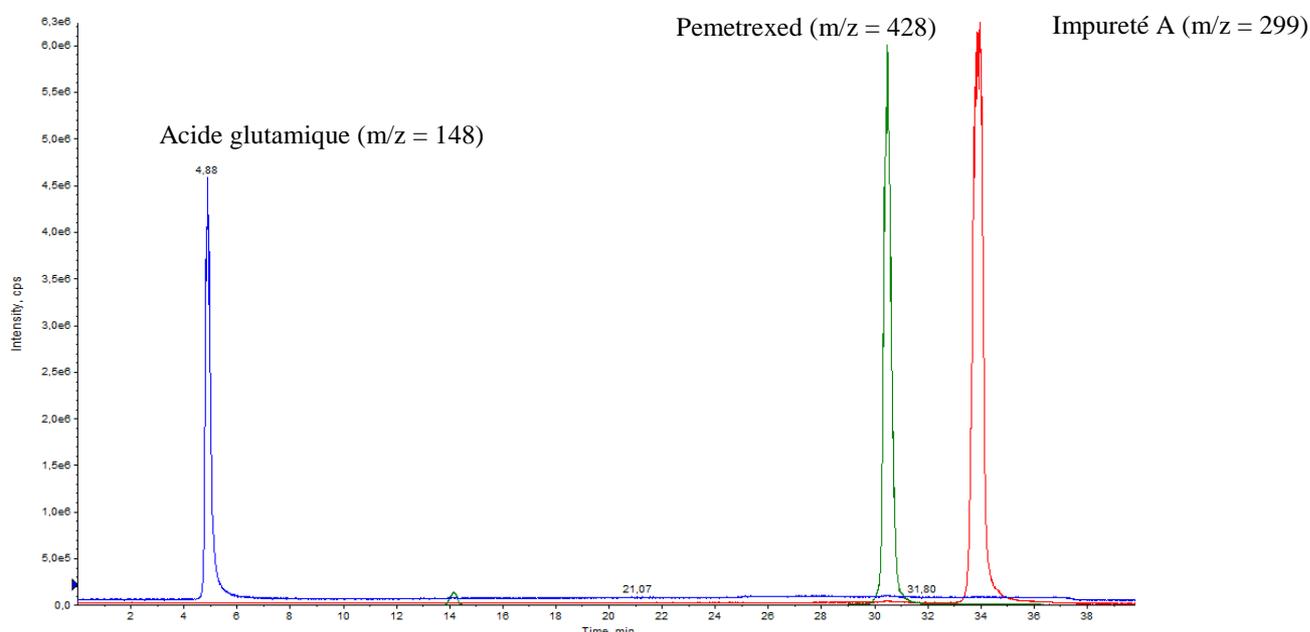


Figure II.27. : Injection d'une solution composée d'acide glutamique (5 mg.L^{-1}), impureté A ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$) et pemetrexed ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$). Analyse CLHP-SM (ions sélectionnés) des 3 standards sur colonne C18 et selon le gradient d'éluion (Solvant A : solution aqueuse de TDFHA 1 mM ; solvant B : acétonitrile décrit figure II.14.). Débit de la phase mobile : 1 mL.min^{-1} ; split : 1/5 ; ionspray : 5 kV ; tension d'orifice : 15 V ; tension d'anneau : 150 V.

Nous confirmons ainsi que la méthode chromatographique développée est adaptée à la recherche de traces éventuelles d'acide glutamique et/ou d'impureté A dans les solutions de pemetrexed au cours de leur dégradation. Ces deux produits de dégradation sont bien séparés du pemetrexed et donnent des courants ioniques mesurables.

Les analyses des solutions fraîchement reconstituées et dégradées de pemetrexed à J28 et à J180 dans les conditions d'utilisation hospitalière (22 °C à l'abri de la lumière) sont reportées dans les figures II.28., II.29. et II.30.). La figure II.28. correspond à l'analyse de la solution de pemetrexed fraîchement reconstituée et les figures II.29. et II.30. correspondent à l'analyse de chaque solution dégradée en mode scan c'est-à-dire en balayant une gamme de masse comprise entre 100 et 500 uma toutes les deux secondes durant toute l'analyse. Ce mode d'acquisition du signal est peu sensible mais permet de stocker un maximum d'informations quand on ne connaît pas les masses des produits de dégradation recherchés. Pour les solutions, fraîche (J0) et à J28, des signaux plus intenses se dégagent du bruit de fond vers 14 min ; 29 min et 36 min (II.28.1 et II.29.1) tandis que pour J180 ces signaux sont autour de 13 min, 27,5 min et 35 min (II.30.1). En extrayant à partir de ces courants ioniques totaux, les courants spécifiques pour $m/z = 428$, $m/z = 148$ et $m/z = 299$, nous n'observons pas à J0, J 28 et à J180 de signal ni vers 5 min (tr de Glu) ni à 34 min (tr de l'impureté A), et nous observons un signal à 28 min (tr du pemetrexed) (Figures II.28.2.3.4, II.29.2.3.4 et II.30.2.3.4). La dégradation du pemetrexed dans les conditions d'utilisation hospitalière (définies lors de l'étude de stabilité) ne conduit pas à la libération en solution de l'impureté A et/ou de l'acide glutamique même après 6 mois (J 180). Le couplage à la détection massique confirme les résultats de l'étude de stabilité réalisée en CLHP-UV-DEDL.

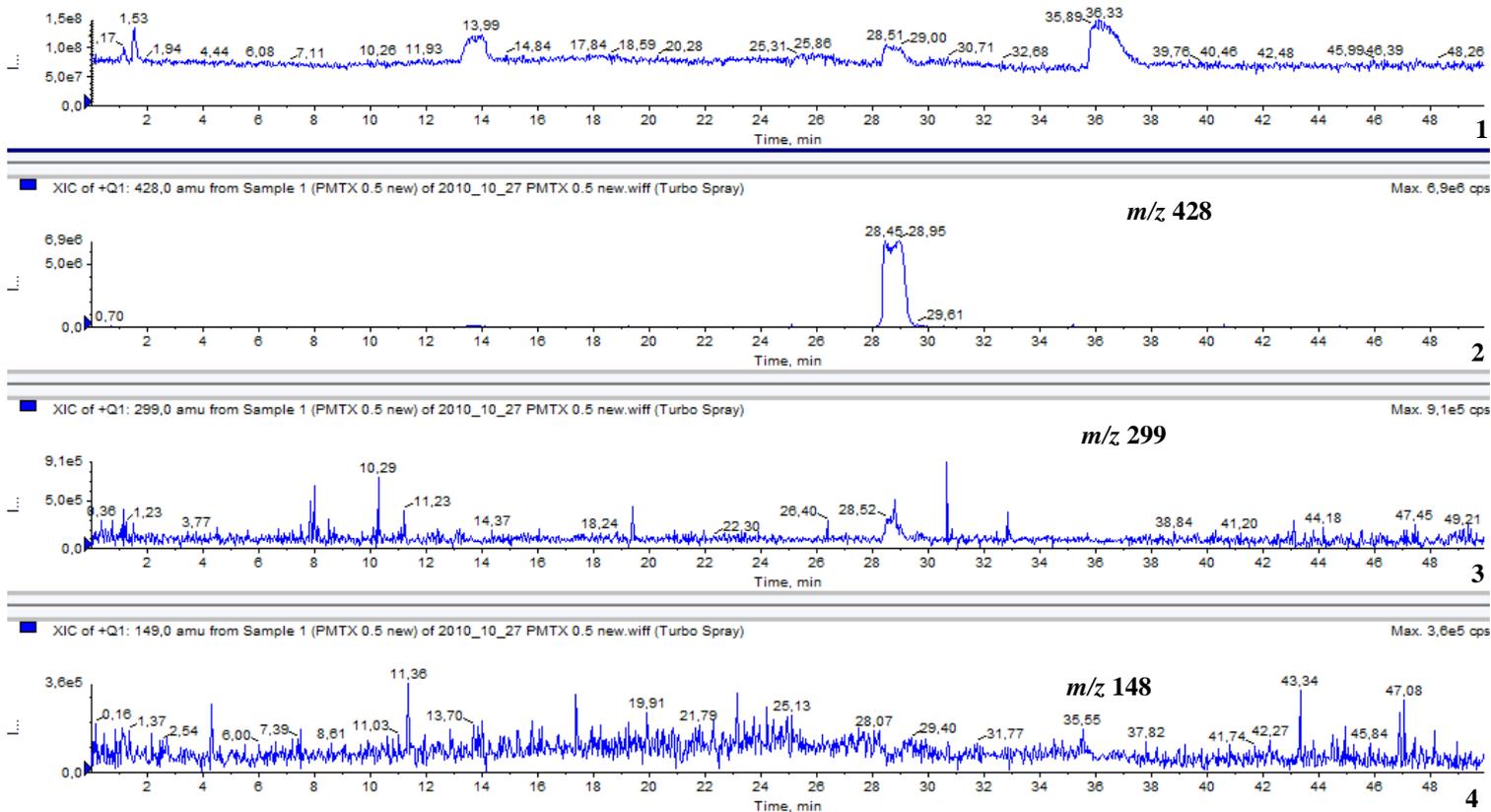


Figure II.28. : Analyse par CLHP –SM d’une solution de pemetrexed à J0 ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) ; 1/full scan 100-500 uma (dwell time : 2 sec / step : 0,5 uma). 2/ Extraction du signal à $m/z = 428$ uma. 3/ Extraction du signal à $m/z = 299$ uma (le signal autour de 30 minutes correspond à une fragmentation du pemetrexed dans la source). 4/ Extraction du signal à $m/z = 148$ uma. Débit de la phase mobile : 1 mL.min^{-1} (conditions décrite Figure II.25.) ; split : 1/5 ; Conditions SM : température de source : 450°C ; ionspray : 5 kV ; tension d’orifice : 15 V ; tension d’anneau : 150 V.

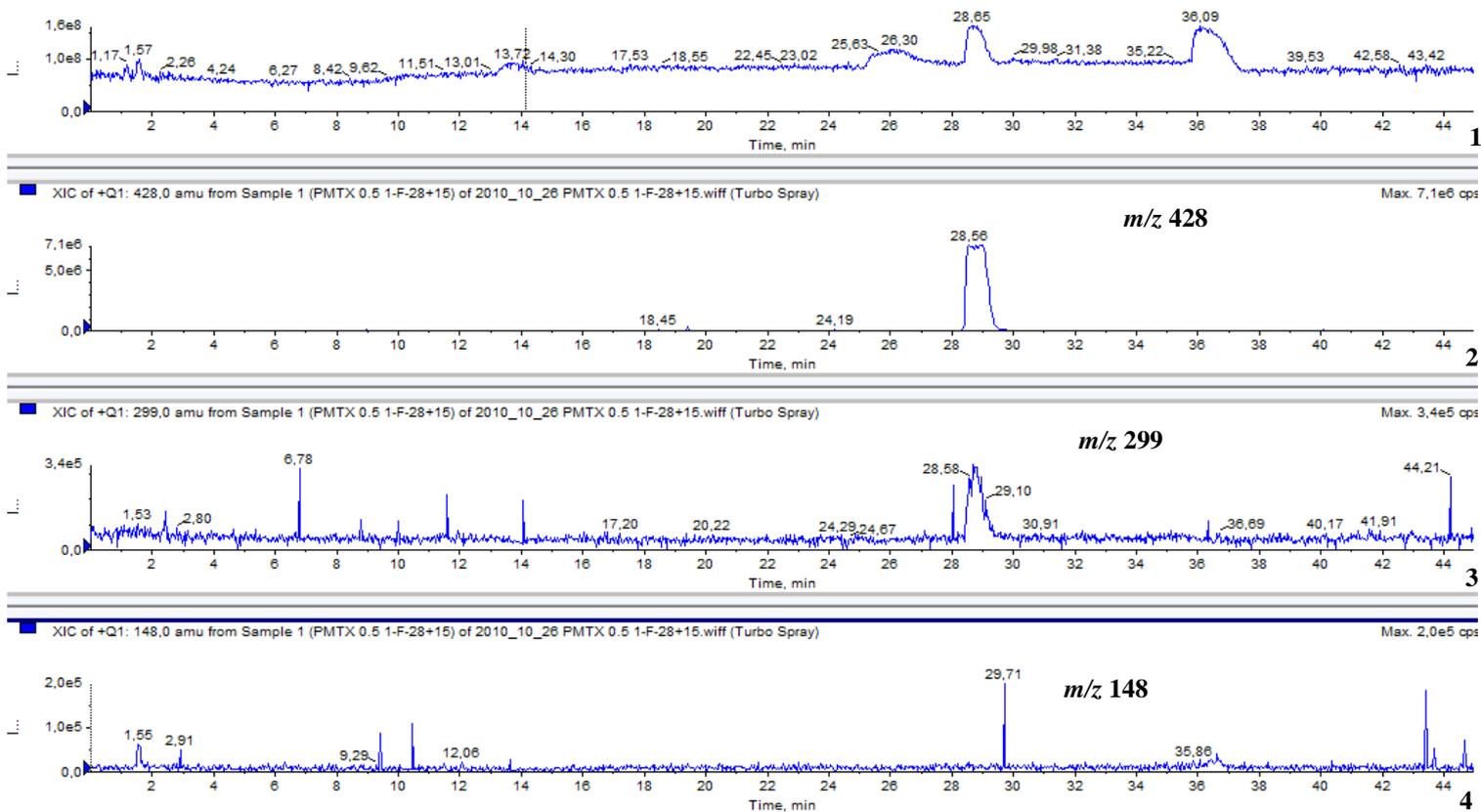


Figure II.29. : Analyse par CLHP –SM d’une solution de pemetrexed à J28 ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) ; 1/full scan 100-500 uma (dwell time : 2 sec / step : 0,5 uma). 3/ Extraction du signal à $m/z = 299$ uma (le signal autour de 30 minutes correspond à une fragmentation du pemetrexed dans la source). 4/ Extraction du signal à $m/z = 148$ uma. Débit de la phase mobile : 1 mL.min^{-1} (conditions décrite Figure II.25.) ; split : 1/5 ; Conditions SM : température de source : 450°C ; ionspray : 5 kV ; tension d’orifice : 15 V ; tension d’anneau : 150 V.

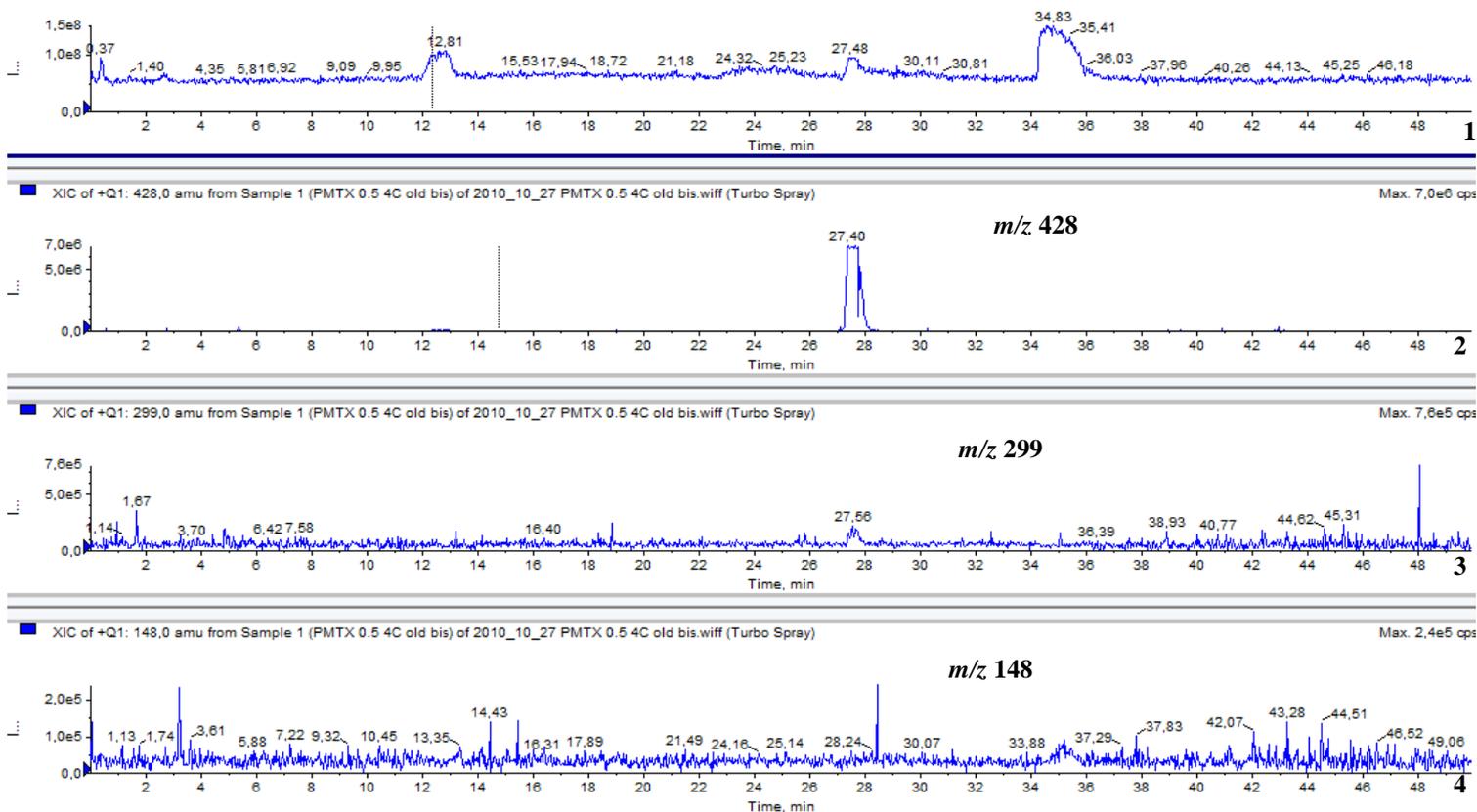


Figure II.30. : Analyse par CLHP –SM d’une solution de pemetrexed à J180 ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) ; 1/full scan 50-500 uma (dwell time : 2 sec / step : 0,5 uma). 2/ Extraction du signal à $m/z = 428$ uma. 3/ Extraction du signal à $m/z = 299$ uma (le signal à 29 minutes correspond à une fragmentation du pemetrexed dans la source). 4/ Extraction du signal à $m/z = 148$ uma. Débit de la phase mobile : 1 mL.min^{-1} (conditions décrite Figure II.25.) ; split : 1/5 ; Conditions SM : température de source : 450°C ; ionspray : 5 kV ; tension d’orifice : 15 V ; tension d’anneau : 150 V.

Par ailleurs, l’analyse en spectrométrie de masse simple nous a permis de mettre en évidence les deux produits de dégradation détectés en CLHP-UV-DEDL (Figure II.X.). Nous avons analysé les solutions à J28 et J180 en mode scan c’est-à-dire en balayant une plage de masse de 100 uma toutes les deux secondes durant toute l’analyse. Nous avons commencé les analyses entre 100 et 200 uma, puis entre 200 et 300 uma et de la même manière jusqu’à 500 uma. Cela nous a permis de gagner en sensibilité pour détecter les produits de dégradation que nous avons observés en détection UV aux temps de rétention :

- Produit de dégradation 1 : 1,4 minutes
- Produit de dégradation 2 : 2,5 minutes

Nous observons un temps de décalage d'une minute environ par rapport aux temps de rétention observés pendant l'étude de stabilité en CLHP-UV-DEDL. Ce temps de décalage est lié à l'absence de synchronisation automatique entre l'injection et le début d'acquisition du signal en spectrométrie de masse lors du couplage CLHP-SM contrairement à l'analyse effectuée en CLHP-UV-DEDL pour laquelle le logiciel pilote automatiquement l'ensemble du montage.

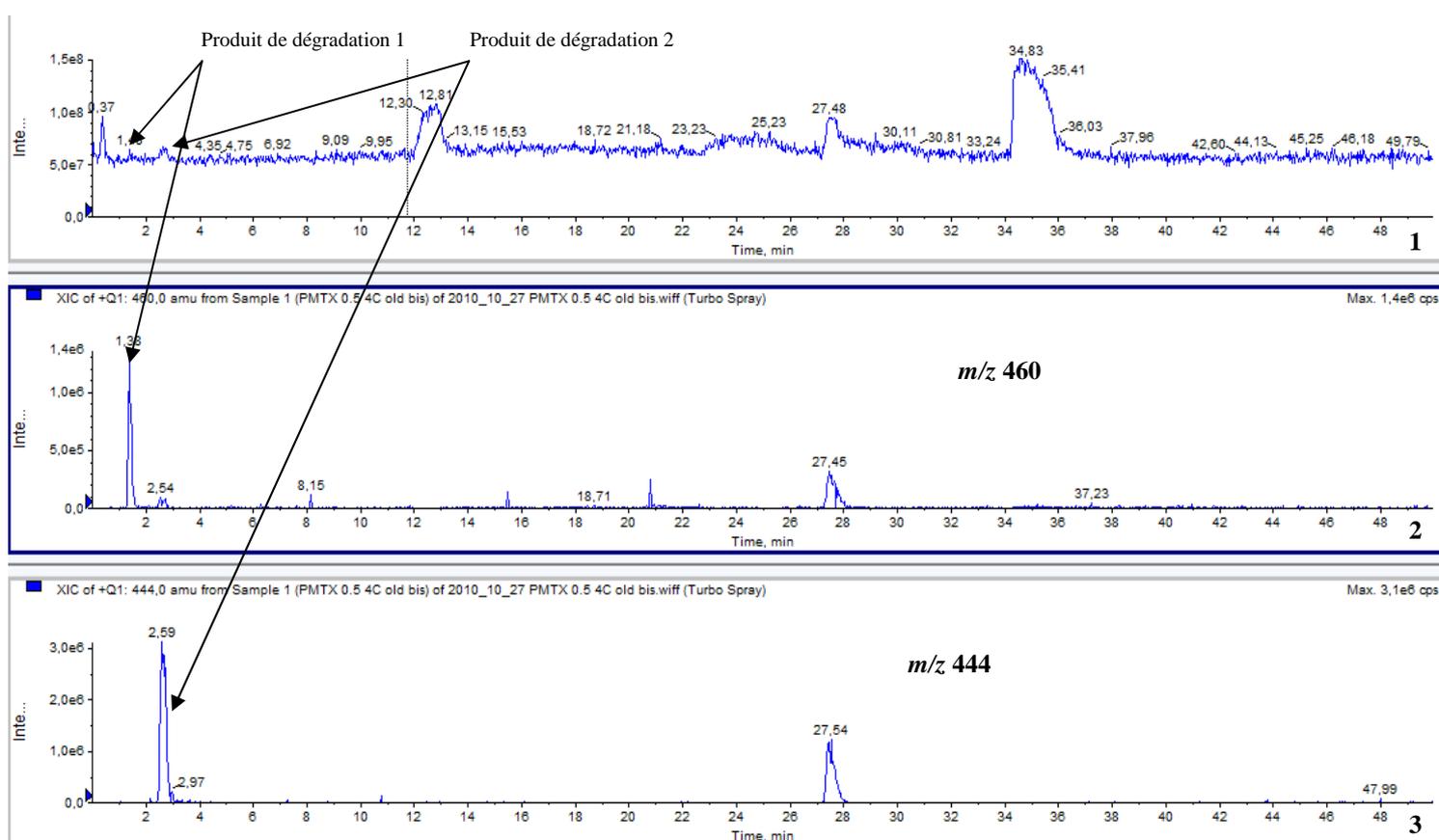


Figure II.31. : Solution de pemetrexed ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) à J180 ; 1/full scan 100-500 uma (dwell time : 2 sec / step : $0,5 \text{ uma}$). 2/ Extraction du signal à $m/z = 460 \text{ uma}$. 3/ Extraction du signal à $m/z = 444 \text{ uma}$. Débit de la phase mobile : $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (conditions décrite Figure II.25.) ; split : 1/5 ; Température : 450°C ; ionspray : 5 kV ; tension d'orifice : 15 V ; tension d'anneau : 150 V.

En conclusion, on ne retrouve pas d'acide glutamique ni d'impureté A dans les solutions obtenues par dégradation forcée du pemetrexed. L'hypothèse avancée par Saravanan *et al.* [38] n'est donc pas confirmée. Notre étude conduit à mettre en évidence 2 produits de dégradation principaux de masse $m/z = 444$ et 460 uma (Figure II.31.). Pour obtenir des informations complémentaires sur ces composés afin d'identifier leur structure, nous avons réalisé ensuite des analyses en couplant le système chromatographique à la spectrométrie de masse utilisée en mode tandem.

II.5.4. Couplage chromatographie-spectrométrie de masse tandem

L'analyse de la solution dégradée de pemetrexed, par introduction directe dans la SM aussi bien par infusion que par FIA, ne nous ayant pas permis de détecter les deux composés de dégradation majoritaires en raison de leur faible teneur et de la présence en grande quantité des excipients et du pemetrexed, nous avons donc réalisé le couplage du système chromatographique à la spectrométrie de masse tandem en nous focalisant sur l'obtention d'éléments nous permettant de définir la structure des produits de dégradation. Nous n'avons pas cherché à optimiser la sensibilité de la technique CLHP-SM mais plutôt cherché à diminuer la durée totale de l'analyse et pour cela, diminuer la rétention de la molécule de pemetrexed très hydrophobe par rapport à celle des deux composés d'intérêt.

La méthode chromatographique d'appariement d'ions précédemment optimisée conduit à utiliser comme agent de paires d'ions, le TDFHA en phase mobile ce qui impose l'utilisation d'un gradient d'élution pour éluer le pemetrexed et un temps de rééquilibrage entre chaque injection de 21 minutes. Ceci implique une durée d'analyse longue pour des molécules d'intérêt que nous cherchons à identifier dont le temps de rétention est proche du volume mort.

Nous avons ainsi analysé les solutions de pemetrexed de l'étude de stabilité (J180) en remplaçant dans la méthode CLHP, l'agent d'appariement d'ions TDHA en phase mobile, par le TFA, moins hydrophobe. Nous avons utilisé une phase mobile isocratique composée d'une solution aqueuse de TFA 0,1% et d'acétonitrile (85/15 v/v) délivrée, à un débit de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ dans la colonne et $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ dans le spectromètre de masse (split 1/5). Ceci nous a permis de réduire le temps total d'analyse à environ 20 minutes entre chaque injection sans période de rééquilibrage du système puisque il n'y a plus de modification de composition de la phase mobile. Dans ces nouvelles conditions, les temps de rétention des produits à analyser sont les

suivants : pour le pemetrexed environ 16 minutes ; produit de dégradation 1 : 3,0 minutes et produit de dégradation 2 : 4,4 minutes.

II.5.4.1. Etude du produit de dégradation 2

Le couplage CLHP-SM/SM nous a permis d'étudier la fragmentation du produit de dégradation 2 dont la masse est $m/z = 444$ uma. Nous avons trouvé comme ion fils les ions suivants : 426 ; 315 ; 297 ; 131.

Le produit de dégradation 2 perd donc une molécule d'eau puis successivement un fragment de 130 uma (acide glutarique), de 146 (perte d'acide glutamique) comme pour le pemetrexed. Nous supposons donc que pour ce produit 2, la partie « acide glutamique » de la molécule initiale est toujours présente et que la modification structurale se trouve plutôt sur le noyau purique de la molécule. En effet, la masse du produit de dégradation 2 correspond à la somme des masses du pemetrexed et d'un atome d'oxygène ($428 + 16 = 444$). Le produit 2 pourrait être un dérivé d'oxydation du pemetrexed. Plusieurs raisons nous orientent vers cette hypothèse :

- Dans les conditions CLHP de l'étude de stabilité, la rétention de ce composé, par rapport au pemetrexed se trouve très modifiée. Le temps de rétention pour le pemetrexed est 30 minutes alors que pour le produit de dégradation 2, le temps de rétention est de 3,5 minutes. Ceci pourrait traduire une augmentation de polarité apportée par un atome d'oxygène.
- Le noyau purique de la molécule se trouve sujet à l'oxydation avec la formation d'un N-oxyde sur les atomes d'azote de ce noyau (Figure II.32.)

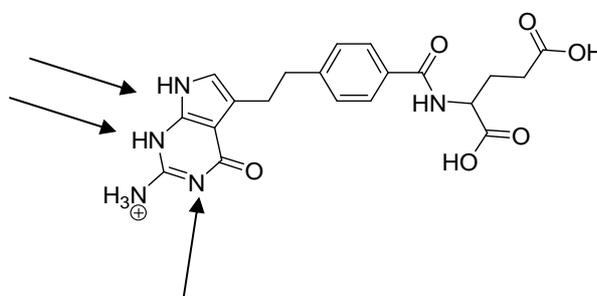


Figure II.32. : Formule du pemetrexed. Les flèches représentent les possibilités d'oxydation du noyau purique pour former un N-oxyde.

- Un brevet déposé le 18/03/2010 par la société Eli Lilly and Company (fabricant du pemetrexed), n°WO 2010/030598 A2 pour une nouvelle formulation du pemetrexed fait état de la possibilité d'oxydation du pemetrexed (Annexe III ; p9).
- Les conditions hospitalières d'utilisation lors de la reconstitution par du NaCl 0,9% nécessitent l'utilisation d'une prise d'air et donc l'introduction d'oxygène dans le flacon.
- L'analyse d'un reliquat de pemetrexed-Alimta[®] conditionné sous Argon (gaz inerte) a permis de montrer que les produits de dégradation 1 et 2 n'apparaissent pas au bout de 28 jours conservé à 22°C à l'abri de la lumière.

Afin de confirmer nos hypothèses, nous avons analysé le composé en couplage CLHP avec un spectromètre de masse haute résolution (spectromètre de masse UHR-QTOF maXis ETD équipé d'une source ESI couplé à une chaîne UHPLC Ultimate 3000 RSLC). Les résultats obtenus sont présentés figure II.33.

Analysis Info

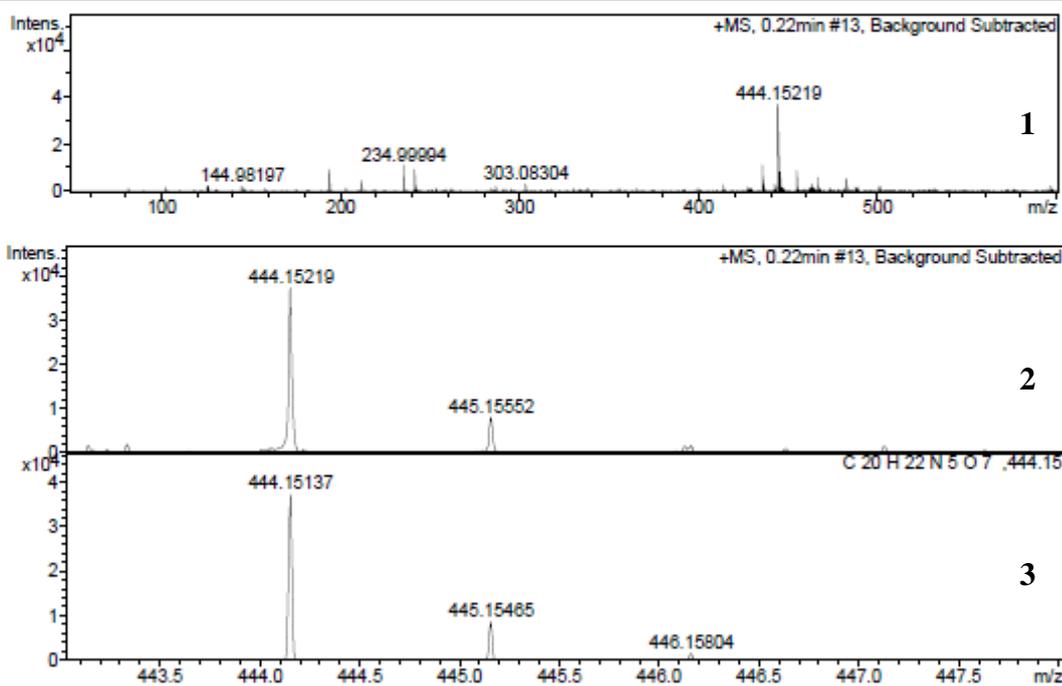
Sample Name F2' 26,04,11
 Analysis Name X000188CYC.d
 Method Positif.m

Acquisition Date 27/04/2011 21:09:38

Laboratory
 Instrument / Ser# maXis 86

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.6 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	7.0 l/min
Scan End	3000 m/z	Set Collision Cell RF	1000.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste



Meas. m/z	#	Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	rdb	e ⁻ Conf	N-Rule
444.15219	1	C 20 H 22 N 5 O 7	444.15137	-1.84	24.6	12.5	even	ok
	2	C 21 H 18 N 9 O 3	444.15271	1.17	31.3	17.5	even	ok

Figure II.33. : Spectre de masse haute résolution du produit de dégradation 2. **1/** Spectre de masse haute résolution du produit de dégradation 2. **2/** Spectre de masse haute résolution du produit de dégradation 2 dont le bruit de fond a été soustrait. **3/** Proposition de spectre de la bibliothèque et de formule brute pour le produit de dégradation 2.

L'analyse a confirmé la masse du composé et proposé la formule brute suivante : C₂₀ H₂₂ N₅ O₇, qui correspond au pemetrexed plus un oxygène.

II.5.4.2. Etude du produit de dégradation 1

Le couplage CLHP-SM/SM nous a permis d'étudier la fragmentation du produit de dégradation 1 dont la masse est $m/z = 460$ uma. Nous avons trouvé comme ion fils les ions suivants : 442 ; 313 ; 295 ; 131.

Le produit de dégradation 1 perd donc une molécule d'eau puis un fragment de 146 (perte d'acide glutamique) comme pour le pemetrexed. Nous pouvons supposer comme pour le produit 2, que la partie « acide glutamique » de la molécule initiale est toujours présente et que la modification structurale se trouve plutôt sur le noyau purique de la molécule. En effet, la masse du produit de dégradation 1 correspond à la somme des masses du pemetrexed et de deux atomes d'oxygène ($428 + 2 \times 16 = 460$). Le produit 1 pourrait donc être un autre dérivé d'oxydation du pemetrexed. Les raisons invoquées précédemment s'appliquent également pour ce produit dont le temps de rétention, dans les conditions CLHP de l'étude de stabilité, est de 2,5 minutes. Le temps de rétention de ce composé étant plus faible que celui du composé 2, cela confirme qu'il serait plus polaire (deux oxygènes pour le composé 1 contre un seul oxygène pour le composé 2).

Nous avons réalisé des analyses en HRMS qui se sont révélées malheureusement non concluantes. En effet, nous n'avons pas retrouvé le composé de masse $m/z = 460$ uma.

II.5.4.3. Chromatographie semi-préparative et RMN

Pour confirmer l'identification de ces composés, nous avons réalisé des recueils de fraction selon la méthode CLHP avec du TFA à 0,1 % en mode d'élution isocratique pour analyser les produits de dégradation en RMN. Cependant, nous n'avons pas recueilli assez de composés pour réaliser ces analyses. En effet, l'analyse en RMN nécessite des quantités importantes de molécules. Au minimum 5 milligrammes sont nécessaires. Des analyses complémentaires restent donc à effectuer pour confirmer nos hypothèses de structure.

II.6. Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons développé une méthode chromatographique en CLHP-UV-DEDL pour le suivi de la stabilité chimique du pemetrexed-Alimta[®], notamment des reliquats générés lors de la préparation des traitements pour les patients. Grâce à l'étude de stabilité que nous avons mise en place, nous avons pu augmenter la durée de péremption

des reliquats de pemetrexed-Alimta[®] de 24 heures à 14 jours (à +2 - +8°C et +22°C à l'abri de la lumière). Les premières analyses en vue d'identifier les produits de dégradation apparus au cours de cette étude de stabilité montrent que le pemetrexed serait sensible à l'oxydation. Nous devons confirmer ces résultats grâce à des techniques d'identification complémentaires (RM N) qui nécessitent le recueil de quantités importantes des deux produits de dégradation. Enfin, la réalisation de tests de toxicité cellulaire de ces produits permettrait de connaître leur toxicité par rapport au pemetrexed. Si ces produits s'avéraient non toxiques, nous pourrions prolonger la durée de péremption des reliquats jusqu'à 28 jours sans risque pour le patient.

CHAPITRE III
ETUDE DE STABILITE DU METHOTREXATE

Au cours de ce chapitre, nous nous sommes intéressés au methotrexate, autre anticancéreux injectable, dans une utilisation bien particulière : le traitement des Grossesses Extra-Utérines (GEU). Nous avons étudié la stabilité physico-chimique de deux solutions prêtes à l'emploi de ce médicament (25 mg.mL^{-1} et 100 mg.mL^{-1}) et reconditionnées dans des seringues en polypropylène (PP). En effet, la reconstitution de ce traitement doit être réalisée au sein de l'UBCO, ce qui, au regard du caractère urgent et aléatoire de cette pathologie, complique sa réalisation et augmente son coût. La préparation en avance des ces traitements en doses unitaires et stockées à la pharmacie dans des conditions adéquates permettrait un gain de temps et une souplesse de réalisation de ces traitements.

III.1. Connaissances actuelles sur la molécule

III.1.1. Propriétés physico-chimiques

La forme utilisée en thérapeutique est le methotrexate dont le nom chimique est l'acide (N-4-[[[(2,4-diamino-6-pteridiny)méthyl]méthylamino]benzoyl]-L-glutamique (figure III.1.).

Sa formule brute est $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_8\text{O}_5$ et sa masse molaire est $454,45 \text{ g.mol}^{-1}$.

Il se présente sous forme de poudre cristalline jaune à brun orangé. La solution parentérale est préparée avec le sel sodique, mais l'activité est toujours exprimée d'après l'acide. Le methotrexate est pratiquement insoluble dans l'eau, le chloroforme, l'éther et l'alcool, mais très soluble dans des solutions diluées d'acides minéraux, d'hydrates et de carbonates alcalins.

Les pKa de la molécule sont : 5,80 ; 4,80 ; 3,80.

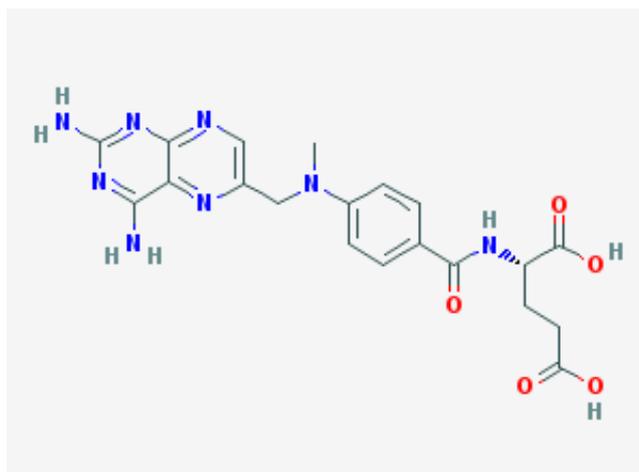


Figure III.1. : Formule du methotrexate

III.1.2. Mécanisme d'action

Le méthotrexate est un antagoniste des folates.

Le méthotrexate inhibe la dihydrofolate-réductase, l'enzyme qui réduit l'acide folique en acide tétrahydrofolique [70]. Le tétrahydrofolate doit être régénéré par le biais d'une réaction catalysée par la dihydrofolate-réductase pour maintenir le pool intracellulaire des dérivés monocarbonés de tétrahydrofolate afin qu'ait lieu la biosynthèse nucléotidique de thymidylate et de purines. L'inhibition de la dihydrofolate-réductase par les antagonistes des folates (méthotrexate) mène à une déficience du pool cellulaire de thymidylate et de purines ainsi qu'à une baisse de la synthèse d'acides nucléiques. De plus, le methotrexate inhibe la thymidilate synthétase [71]. Par conséquent, le méthotrexate entrave la synthèse et la réparation de l'ADN ainsi que la réplication cellulaire.

L'action du méthotrexate s'exerce préférentiellement contre les cellules à multiplication rapide, car ses effets cytotoxiques se font surtout sentir pendant la phase S du cycle de la cellule.

Par conséquent, les tissus en prolifération active comme les cellules de tumeur maligne, la moelle osseuse, les cellules du fœtus, les muqueuses buccale et intestinale et les cellules de la vessie sont en général plus sensibles aux effets inhibiteurs du méthotrexate sur la dihydrofolate-réductase.

III.1.3. Indications

Le methotrexate est utilisé depuis de nombreuses années dans le traitement du cancer, mais aussi dans d'autres pathologies, notamment inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde...). Etant donné l'intérêt ciblé de notre étude de stabilité pour ce médicament, nous ne développerons pas les nombreuses indications de celui-ci mais nous nous limiterons à celle employée en gynécologie. Le methotrexate est utilisé en monothérapie dans les grossesses extra-utérines (GEU) à la dose de 1 mg/kg de poids corporel par voie intra-musculaire [72-73].

III.1.4. Formes et présentations

Le pharmacien hospitalier dispose pour préparer les solutions injectables de méthotrexate dans le traitement de grossesse extra-utérine de deux conditionnements commerciaux possibles :

- Methotrexate 50 mg/2 mL : solution injectable prête à l'emploi.
- Methotrexate 100 mg.mL⁻¹ : solution injectable prête à l'emploi.

Excipients : chlorure de sodium, hydroxyde de sodium, eau pour préparations injectables.

III.1.5. Connaissances disponibles sur la stabilité en solution

Dans l'indication de traitement de grossesse extra-utérine, la solution prête à l'emploi est directement utilisée sans manipulation de dilution avec un solvant. En effet, l'injection de ce médicament étant intra-musculaire, il est nécessaire de limiter le volume de la solution à injecter afin de limiter la douleur au point d'injection.

Dans le cadre de l'engagement de l'UBCO à améliorer et sécuriser le circuit du médicament et des produits, nous envisageons pour cette indication de conditionner et stocker la solution prête à l'emploi dans des seringues en PP, afin de palier aux situations d'urgence non compatibles avec les périodes d'activité des unités de reconstitution de cytostatiques et d'éviter les déplacements coûteux de pharmaciens d'astreinte.

Une précédente étude réalisée en 1996 par Jacolot *et al.* [74] fait état d'une stabilité des solutions diluées de méthotrexate à la concentration de 2,5 mg.mL⁻¹ dans des seringues en PP à la température de +4 °C et +25 °C à l'abri de la lumière pendant une période de 7 jours

mais aucune information sur cette même stabilité dans des seringues en PP n'est disponible pour des solutions plus concentrées telles que celles correspondant aux deux conditionnements actuels commerciaux. La méthode développée par Jacolot *et al.* se base sur une séparation par chromatographie liquide à polarité de phase inverse utilisant une colonne Spherisorb® ODS-1 C18 (250 mm x 4,6 mm), une phase mobile isocratique constituée d'un tampon phosphocitrique de pH 6,5 et d'acétonitrile (92/8 v/v) et un détecteur UV réglé à 302 nm. Nous allons donc exposer dans la suite de ce chapitre, les résultats de notre étude de stabilité réalisée sur les solutions prêtes à l'emploi de methotrexate conditionnées dans des seringues en PP.

III.2. Développement méthodologique et optimisation de la méthode chromatographique

Le methotrexate étant de la même famille que le pemetrexed et possédant également une liaison amide engageant l'acide L-glutamique, nous nous sommes basés sur la méthode chromatographique par appariement d'ions précédemment optimisée pour l'analyse du pemetrexed pour développer une méthode adaptée à l'analyse du methotrexate et à l'identification de ses potentiels produits de dégradation.

Les différents composés à séparer dans le cadre de cette analyse sont l'acide glutamique, les ions Na⁺ et les ions Cl⁻, le methotrexate et son impureté connue, le 4-[N-(2,4-Diamino-6-pteridinylmethyl)-N-methylamino] acide benzoïque (figure III.2.) qui correspond à la partie de l'acide engagée avec l'acide L-glutamique dans la liaison amide. Ce produit, que nous appellerons impureté methotrexate, est commercialisé contrairement à l'impureté A du pemetrexed. Nous avons donc optimisé la méthode développée pour l'étude du pemetrexed en modifiant uniquement le profil du gradient d'élution.

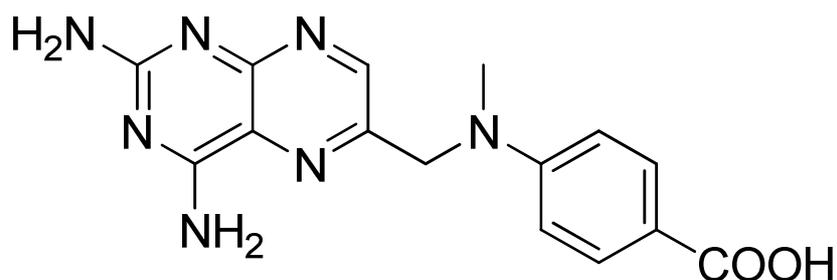


Figure III.2. : Formule du 4-[N-(2,4-Diamino-6-pteridinylmethyl)-N-méthylamino] acide benzoïque

Les conditions optimisées retenues afin de réaliser l'étude de stabilité du methotrexate sont les suivantes :

La colonne utilisée est une colonne Synergi MAX-RP C12 du laboratoire Phenomenex (4 μm , 150 mm x 4,6 mm) munie d'une pré-colonne MAX-RP (4 mm x 3 mm), thermostatée à 20 °C. La phase mobile est un gradient du solvant A (solution aqueuse de TDFHA 1 mM) et du solvant B (acetonitrile) établi de la façon suivante : 15 % (v/v) de solvant B pendant 5 minutes, puis jusqu'à 20 % (v/v) de solvant B en 1 minutes, puis jusqu'à 30 % (v/v) de solvant B en 13 minutes, puis 30 % (v/v) de solvant B pendant 7 minutes suivi d'un retour aux conditions initiales en 0,1 minute. Le débit de la phase mobile est de 1 mL.min⁻¹. Entre chaque injection, un temps de rééquilibrage du système de 25 minutes est nécessaire.

Une double détection : UV à 254 nm puis DEDL (3,5 bar (gaz de nébulisation : air comprimé) ; température 50 °C ; gain 10) permet de suivre l'élution des différents composés présents dans le mélange injecté.

La figure III.3. présente les chromatogrammes UV et DEDL obtenus dans ces conditions lors de l'analyse d'une solution commerciale de methotrexate, contenant du NaCl (0,49 % m/v) diluée à $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans de l'eau ultra-pure et dopée avec Glu ($5 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) et l'impureté methotrexate ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

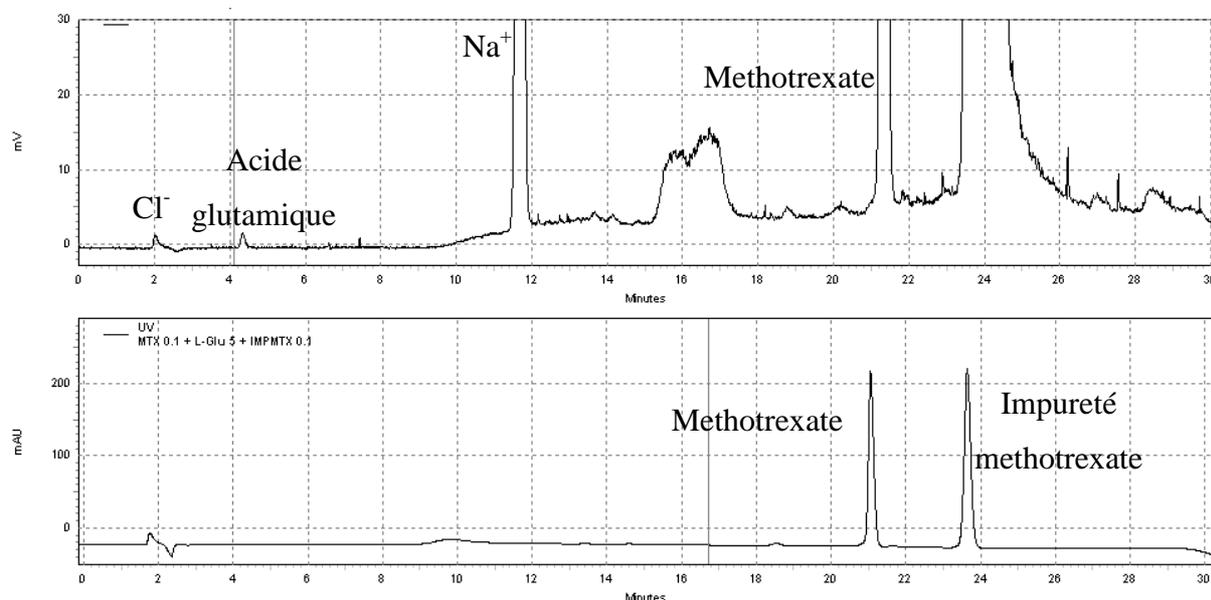


Figure III.3. : Chromatogramme d'une solution d'acide glutamique ($5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), de methotrexate ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) et d'impureté methotrexate ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) selon les conditions optimisées. A/ Détection DEDL. B/ Détection UV à 254 nm.

Le système chromatographique d'appariement d'ions en milieu acide permet d'éluer les ions chlorures dans le volume mort et donc de ne pas gêner la détection de traces de Glu dès lors que la rétention de Glu sera suffisante. En effet, le chlorure, ion inorganique, de par sa charge négative sera exclu du système chromatographique. Comme dans le cas du pemetrexed, Glu est élué suffisamment loin du volume mort et présente une résolution importante avec les ions Na^+ ($\alpha = 4,5$), ce qui permet sa détection sans interférence liée aux excipients de la solution (ions chlorures et sodium). La double détection UV-DEDL permet également de s'affranchir de possibles interférences pour le suivi de la concentration du methotrexate.

Enfin, cette méthode permet de retenir et détecter le methotrexate, l'impureté methotrexate et d'autres impuretés potentielles hydrophobes afin de réaliser une étude exhaustive de stabilité physio-chimique du médicament. Comme pour le pemetrexed, il existe

une grande différence de polarité entre, d'une part, le methotrexate et son impureté et, d'autre part, Glu, les ions chlorures et sodium.

Sur la figure III.3.A, on observe une dérive de la ligne de base vers 16 minutes et un pic intense à 24 minutes, dus à l'élution de l'agent d'appariement d'ions. Il a été démontré précédemment que l'agent d'appariement d'ions ajouté dans la phase mobile induit une modification des interactions à la surface de la phase inverse stationnaire [44]. En effet, l'augmentation de la proportion d'acétonitrile lors du gradient d'élution peut entraîner la désorption ponctuelle d'une quantité variable de TDFHA qui est un agent hydrophobe et donc plus soluble dans l'acétonitrile que dans l'eau. Ce phénomène est donc détecté par le DEDL en raison d'une variation soudaine de la volatilité de la phase mobile lorsque la concentration en TDFHA augmente subitement.

La détection UV permettra, dans ce cas, la détection de l'impureté methotrexate, le cas échéant, alors que la détection par le DEDL ne le permettra pas en raison d'une co-élution avec le pic système.

Au final, nous avons développé une méthode CLHP-UV-DEDL permettant le suivi de stabilité de solution de methotrexate dans les conditions d'utilisation hospitalière. Cette méthode permet de séparer les excipients du médicament, des différents produits de dégradation potentiels et de la molécule elle-même. Nous allons maintenant développer la validation de cette méthode afin de confirmer son utilisation pour réaliser des études de stabilité de solutions injectables de méthotrexate.

III.3. Validation de la méthode

Nous avons validé la méthode décrite en termes de fidélité intermédiaire, profil d'exactitude, taux de recouvrement, de la même façon que pour le pemetrexed et selon les recommandations de la SFSTP [48-51]. Nous nous sommes focalisés sur la validation du dosage du methotrexate et non de ses produits de dégradation potentiels. Les résultats préliminaires observés pour le pemetrexed nous ont conduits par ailleurs à ne pas développer la validation du dosage de Glu et de l'impureté methotrexate.

Nous avons dilué la solution commerciale dans l'eau ultra-pure pour obtenir une gamme de concentration faible (0,08 à 1,2 mg.mL⁻¹) afin de ne pas saturer les détecteurs utilisés au cours de cette étude.

Les paramètres de validation sont résumés dans le tableau III.1.

Tableau III.1 : Résultats de la validation de la méthode de dosage du methotrexate (mg.mL⁻¹)

Validation criterion	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3	Niveau 4	Niveau 5
Concentration théorique	0,080	0,090	0,100	0,110	0,120
Concentration (moyenne)	0,0803	0,0903	0,1004	0,1100	0,1203
Biais absolu	0,0003	0,0003	0,0004	0,0000	0,0003
Biais relatif (%)	0,39	0,37	0,41	0,03	0,29
Recouvrement (%)	100,4	100,4	100,4	100,0	100,3
Ecart-type de répétabilité	0,0002	0,0005	0,0003	0,0003	0,001
Ecart-type de fidélité intermédiaire	0,0004	0,001	0,0003	0,001	0,001
Répétabilité CV (%)	0,26	0,54	0,32	0,29	0,52
Fidélité intermédiaire CV (%)	0,48	0,67	0,33	0,50	0,52
Limite basse de tolérance β	0,079	0,089	0,100	0,108	0,119
Limite haute de tolérance β	0,082	0,092	0,101	0,112	0,122
Limite basse de tolérance relative β (%)	98,7%	98,5%	99,6%	98,3%	99,0%
Limite haute de tolérance relative β (%)	102,1%	102,2%	101,2%	101,8%	101,6%

La figure III.4. nous montre le profil d'exactitude de la méthode de dosage du methotrexate qui nous permet de visualiser que la méthode est validée dans les concentrations utilisées selon les bornes définies. Nous avons fixé, comme pour le pemetrexed, une limite d'acceptabilité de $\pm 3 \%$ par rapport à la valeur cible. Pour chacun des niveaux de concentration analysés, la limite haute et basse de tolérance se retrouve comprise dans les bornes fixées (limite d'acceptabilité).

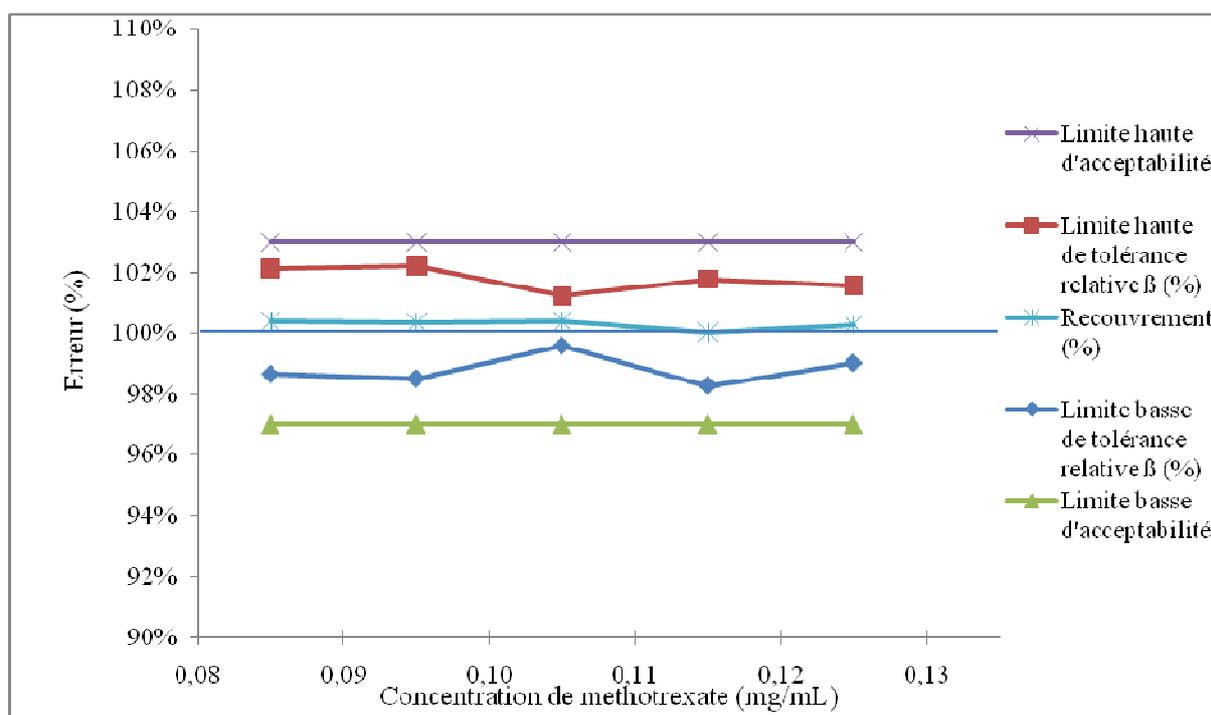


Figure III.4. : Profil d'exactitude de la méthode de dosage du methotrexate

Nous disposons donc maintenant d'une méthode optimisée et validée satisfaisant aux objectifs que nous nous étions fixés à savoir : séparation du principe actif, des excipients présents simultanément en solution et de ses différents produits de dégradation potentiels, notamment l'acide glutamique et l'impureté methotrexate. Un suivi de stabilité du methotrexate en évaluant la perte de principe actif au cours du temps peut être envisagé par cette méthode.

Afin de répondre à une problématique de notre unité concernant le traitement des GEU par le methotrexate, nous avons réalisé l'étude de stabilité de ce médicament sans dilution à une concentration de 25 mg.mL^{-1} et de 100 mg.mL^{-1} dans des seringues en PP.

III.4. Etude de stabilité du méthotrexate

L'étude de stabilité a été réalisée à deux plages de températures différentes (+2 °C - +8 °C et +22 °C) et à l'abri de la lumière pour les deux concentrations disponibles dans les seringues en PP. La composition de chaque solution a été vérifiée immédiatement après reconstitution puis aux jours J1, J7, J14 et J28. Trois seringues ont été suivies en parallèle pour chaque température et pour chaque jour de prélèvement.

III.4.1. Préparation des seringues

Les différents flacons de methotrexate 50 mg/2 mL et 100 mg.mL⁻¹ ont été fournis par l'UBCO du CHRU de Tours et reconditionnés dans des seringues en PP de 1 mL au sein de cette unité dans les conditions d'asepsie requises pour la préparation de médicaments anticancéreux.

L'étude de stabilité physico-chimique est réalisée à partir de solutions diluées dans de l'eau ultra-pure (0,1 mg.mL⁻¹) des solutions conditionnées dans les seringues. Les seringues de 1 mL de solution concentrée ont été analysées immédiatement après reconditionnement, puis aux jours 1, 7, 14 et 28.

III.4.2. Stabilité physique

La stabilité physique de chaque solution a été évaluée par mirage des solutions aux différents temps de prélèvement afin de repérer d'éventuelles particules en suspension ou un changement de couleur de la préparation.

III.4.3. Stabilité chimique

La concentration de méthotrexate mesurée au temps J0 est définie comme constituant la valeur initiale de référence (le 100 %) puis pour chaque prélèvement analysé aux temps suivants la concentration de méthotrexate est exprimée en pourcentage par rapport à cette concentration initiale. La solution de méthotrexate sera considérée comme stable si la perte de méthotrexate au cours du temps n'excède pas 5 % de la quantité initiale [36, 64].

Nous avons également mesuré le pH à l'aide de bandelettes pH de précision (0,2 unité pH).

Les résultats de notre étude de stabilité sur 14 jours sont reportés dans le tableau III.2.. Nous avons observé une perte négligeable de methotrexate au cours de l'étude en fonction des différentes conditions. (Tableau III.2.).

Nous n'avons par ailleurs pas observé de particules visibles à l'œil nu et pas de changement de pH. (pH = 8,5 à 8,9 pour la solution à 100 mg.mL⁻¹ et à 25 mg.mL⁻¹ d'après le RCP).

Tableau III.2. : Stabilité du Methotrexate 25 mg.mL⁻¹ et Methotrexate 100 mg.mL⁻¹ conditionné dans des seringues en PP

Temps (jours)	Methotrexate 25 mg.mL ⁻¹ % de la concentration initiale (n = 3)		Methotrexate 100 mg.mL ⁻¹ % de la concentration initiale (n = 3)	
	21°C à l'abri de la lumière	+2-+8°C à l'abri de la lumière	21°C à l'abri de la lumière	+2-+8°C à l'abri de la lumière
1	101,2 ± 1,6	101,2 ± 0,3	100,5 ± 0,0	98,9 ± 2,7
7	101,2 ± 0,3	100,3 ± 1,0	101,0 ± 2,6	99,3 ± 0,4
14	100,0 ± 1,0	99,0 ± 2,3	99,7 ± 1,7	98,4 ± 0,8
28	100,0 ± 0,8	99,2 ± 0,3	97,9 ± 1,5	96,9 ± 1,2

Au cours de cette étude de stabilité, nous avons montré que les solutions de methotrexate 50 mg/2 mL et 100 mg.mL⁻¹ reconditionnées dans des seringues en PP sont stables physiquement et chimiquement pendant 14 jours quelque soit les conditions étudiées.

Nous n'avons pas identifié la présence d'acide glutamique ni de l'impureté methotrexate lors de l'étude de stabilité de la solution de methotrexate confirmant comme pour le pemetrexed, la stabilité de la liaison amide de cette molécule dans nos conditions d'utilisation. Par ailleurs, nous n'avons pas mis en évidence l'apparition d'autres produits de dégradation principaux à J28, ni à J56. Nous n'avons donc pas réalisé d'études en spectrométrie de masse pour ce médicament.

III.5. Conclusion

Nous avons montré que la solution de methotrexate prête à l'emploi reconditionnée en seringues PP était stable dans les conditions étudiées et permettait d'envisager la réalisation en avance de seringues et leur stockage pendant 28 jours pour le traitement des GEU.

Nous avons choisi d'étudier les deux concentrations de methotrexate disponibles afin de proposer les deux solutions aux cliniciens du CHRU de Tours. En effet, l'injection intramusculaire est souvent douloureuse et la limitation de volume, permise par une solution plus concentrée, permet de diminuer cette douleur pour une même dose injectée.

A partir de ces résultats de stabilité avérée, il nous reste maintenant à étudier l'organisation au sein de notre PUI pour la préparation en avance de ces seringues et déterminer le lieu de leur stockage et les modalités de dispensation afin d'assurer notre engagement à améliorer et sécuriser le circuit du médicament d'une part et à limiter les dépenses de santé de l'hôpital d'autre part.

CHAPITRE IV

IMPACT ECONOMIQUE DE LA GESTION DES

RELIQUATS D'ANTICANCEREUX

INJECTABLES AU CHRU DE TOURS

Dans le contexte de maîtrise des dépenses de santé au sein des établissements hospitaliers, que nous avons exposé dans le chapitre I, la gestion des reliquats d'anticancéreux est une des solutions pour limiter les coûts de traitement mais également pour limiter l'augmentation des dépenses, définie par l'arrêté du 14 mars 2011 pris pour l'application de l'article L. 162-22-7 et liée aux produits pharmaceutiques en sus des GHS [13]. Même si l'impact direct de cette augmentation de dépenses pour l'établissement de santé est très limité, puisque tout médicament facturé en sus des GHS, à condition de sa bonne utilisation définie dans le cadre du CBU, est remboursé à 100 % de sa valeur par la sécurité sociale, il reste néanmoins que la nécessité de limiter la progression des dépenses de ces médicaments oblige les établissements et notamment les pharmaciens hospitaliers à trouver des solutions pour pallier ces augmentations.

L'incidence du cancer en France ne cesse d'augmenter alors que la mortalité liée à cette maladie diminue [75]. Le nombre de nouveaux cas de cancer en 2005 en France a été estimé à près de 320 000 pour les 2 sexes confondus, 180 000 chez les hommes et 140 000 chez les femmes. En 2005, les 3 cancers les plus fréquents chez l'homme sont le cancer de la prostate, le cancer du poumon et le cancer du colon-rectum. Chez la femme, les 3 cancers les plus fréquents sont le cancer du sein, le cancer du colon-rectum et le cancer du poumon.

Tableau IV.1. : Incidence et mortalité du cancer en France entre 1980 et 2005 d'après [75].

	Année	Hommes	Femmes	Total	Variation
Incidence	1980	96 819	73 358	170 177	+88%
	2005	183 485	135 895	319 380	
Mortalité	1980	75 264	49 880	125 144	+16%
	2005	86 489	59 273	145 762	

Les chiffres reportés dans le tableau IV.1. mettent en évidence qu'entre 1980 et 2005, le nombre de patients à traiter par an a augmenté de 88 % et l'augmentation du taux de mortalité par cancer dans le même temps, s'est limitée à 16 %. Ces chiffres s'expliquent d'une part par l'augmentation de la population (25 %) et d'autre part par son vieillissement (20 %). Enfin, l'augmentation du risque de cancer n'intervient que pour un peu plus de la moitié dans l'augmentation du nombre de cas (52 % chez l'homme et 55 % chez la femme). Cette augmentation du taux d'incidence depuis 1980 est ainsi moins importante que celle du nombre de cas [75].

Par ailleurs, le nombre de décès par cancer en 2005 a été estimé à 146 000, traduisant une augmentation de 13 % depuis 1980. Cette augmentation du nombre de décès par cancer n'est liée qu'aux changements démographiques, car le risque de mortalité par cancer a en fait diminué entre 1980 et 2005. Cette diminution du taux de mortalité par cancer est en moyenne de -1,1 % par an chez l'homme et -0,9 % chez la femme. Au final, pour l'ensemble des cancers, l'incidence et la mortalité évoluent de manière contraire au cours du temps. Ceci est en partie expliqué par l'augmentation de l'incidence de cancers de pronostics favorables tels que le cancer du sein chez la femme et le cancer de la prostate chez l'homme [75].

Il en résulte une augmentation de patients à traiter et donc des dépenses liées à des thérapeutiques de plus en plus onéreuses. Par ailleurs, l'explosion du marché des anticorps monoclonaux (ex : bevacizumab, trastuzumab, cetuximab), notamment, dans le traitement du cancer est une cause supplémentaire à l'augmentation des dépenses [76].

A titre d'exemple, le coût d'un cycle de chimiothérapie pour un patient ayant une surface corporelle de 1,7 m² peut être estimé entre 2400 € pour un traitement par pemetrexed à 4400 € pour traitement par bortézomib. Pour le même patient, un traitement par des anticorps monoclonaux, coûterait entre 1900 € pour le trastuzumab et 2900 € pour le bevacizumab.

Afin de limiter le coût de ces thérapeutiques, plusieurs stratégies ont été explorées :

- L'étude de Lewden-Bernadac *et al.* réalisée en 2008 [77] sur la population de la Région Pays de Loire a montré que *la prise en charge de la chimiothérapie anticancéreuse injectable à domicile* permettait de réaliser des économies par rapport à une prise en charge en hôpital de jour de cancérologie. Une différence par séance de 130 € est observée en moyenne.

- *La prévention et le diagnostic précoce du cancer* sont également des moyens de diminuer les coûts associés à cette maladie.

- *Le développement de marqueurs pronostiques, la pharmacogénétique* permettent aussi de cibler les patients répondeurs ou non à certaines chimiothérapies dans certains types de cancer. Par exemple, le cancer du sein chez certaines patientes dont la tumeur exprime un marqueur HER2 (récepteur-2 Human Epidermal Growth Factor) peut être traité par un agent spécifique de ce récepteur HER2, le trastuzumab. Dans certains cancers colorectaux avancés dont la tumeur exprime le gène KRAS muté, les patients ne répondent pas à un traitement par cetuximab et l'utilisation de ce traitement n'est donc pas justifiée pour ce type de tumeurs [78-79]. La connaissance de ces éléments permet ainsi de ne traiter que les patients susceptibles de répondre à la chimiothérapie anticancéreuse ciblée (anticorps monoclonaux).

- Enfin, certaines études ont montré l'impact de la réduction du gaspillage des médicaments anticancéreux lié à *l'utilisation raisonnée des reliquats de médicaments servant à la préparation de traitements pour d'autres patients* [80]. Cette notion a été utilisée dans d'autres domaines thérapeutiques, tels que l'anesthésie, afin de montrer que l'utilisation de restes de médicaments permettait, d'une part, de réaliser des économies et d'autre part, de ne pas altérer la qualité des soins et de prise en charge du patient [81-83].

Concernant plus précisément la gestion des reliquats de médicaments anticancéreux, plusieurs stratégies ont été adoptées. Le principe est de limiter le gaspillage des flacons de médicaments anticancéreux en optimisant au mieux leur utilisation. Fasola *et al.* ont cherché à réduire leur déchets, et donc réaliser des économies, au moyen de 4 mesures correctives : regrouper les pathologies et médicaments anticancéreux par session au cours de la semaine, utiliser, si possible, des flacons multi-doses, arrondir les doses et sélectionner le dosage le mieux adapté du médicament en fonction de son prix et de sa fréquence d'utilisation. Grâce à ce travail, ils ont réussi à identifier une perte de 4,8 % du budget annuel de 6 des principaux médicaments utilisés et à réduire cette perte à seulement 2,2 % du budget annuel après la mise en place de mesures correctives [80].

Aux Etats-Unis, Winger *et al.* ont calculé les économies générées par la réalisation d'arrondis de doses sur les prescriptions de chimiothérapies, permettant ainsi de réaliser des campagnes de production et donc de limiter le gaspillage de flacons d'anticancéreux. En extrapolant leur analyse sur trois mois, ils seraient en mesure d'économiser jusqu'à 12 % du budget annuel des anticancéreux [84].

Il est toutefois difficile d'appliquer ces stratégies à toutes les pharmacies hospitalières et tous les services de cancérologie. En effet, au CHRU de Tours, en accord avec les

prescripteurs, nous ajustons les prescriptions et la dose des anticancéreux à la surface corporelle et nous n'arrondissons pas les doses. De plus, le regroupement des activités est difficilement envisageable au vu de l'activité du centre de cancérologie, sauf quelques cas exceptionnels. Enfin, l'étude de Fasola *et al.* est difficilement transposable en raison de l'évolution des prix des médicaments (en général un marché est conduit pour 2 ans) et du temps que cette étude demande.

Au CHRU de Tours, nous avons décidé de réaliser une banque stérile de reliquats d'anticancéreux. Comme décrit précédemment, notre unité centralisée dispose d'un logiciel de gestion de l'activité de préparation des anticancéreux permettant l'optimisation du circuit de la préparation et de l'utilisation de ces reliquats. Avec la préparation d'environ 23 000 chimiothérapies injectables par an, la création et la gestion d'une telle banque paraît justifiée et pour en confirmer son intérêt, nous avons évalué les économies réalisées lors de sa mise en place au cours de l'année 2009 puis nous avons édité des recommandations quant à l'intérêt de gérer les reliquats des médicaments anticancéreux. Ce sont les résultats de cette étude que nous présentons maintenant dans la suite de ce chapitre.

IV.1. Méthodologie de travail

IV.1.1. Gestion des reliquats

Chaque reliquat d'anticancéreux généré lors d'une préparation est numéroté (n° d'ordonnancier de la préparation qui génère ce reliquat) et conservé dans des conditions de stockage stériles et appropriées à sa bonne conservation (selon les données de stabilité fournies). Ces données sont disponibles dans le logiciel de préparation et le reliquat généré est ainsi proposé lors d'une nouvelle préparation pouvant utiliser ce reliquat.

IV.1.2. Données de stabilité

La première étape de notre démarche a été de faire le point sur les études de stabilité sur les solutions diluées et reconstituées des anticancéreux injectables disponibles dans la littérature scientifique internationale. La revue des études de stabilité a été réalisée au sein de l'UBCO sur tous les anticancéreux disponibles et a donné lieu à une soutenance de thèse d'exercice de Pharmacie et à la validation d'un Diplôme d'Etudes Spécialisées de Pharmacie Hospitalière et des Collectivités [85]. Nous nous sommes basés sur ce travail pour augmenter

les durées de péremption des médicaments anticancéreux après ouverture ou reconstitution dans leur conditionnement d'origine en sélectionnant les études de stabilité des reliquats d'anticancéreux. Par ailleurs, Walker *et al.* [86] avaient montré dès 1994 que l'extension appropriée des durées de péremption des médicaments anticancéreux après ouverture permettaient de réduire les déchets sans affecter l'efficacité ni la toxicité de ces chimiothérapies.

IV.1.3. Données analysées

Nous avons réalisé notre étude sur les préparations réalisées au cours de l'année 2009 dans l'UBCO (CHRU de Tours – Hôpital Bretonneau). Nous avons extrait la forme, la quantité et le nom des médicaments de notre logiciel de préparation. Au sein de notre unité, nous gérons 60 molécules anticancéreuses correspondant à environ 100 spécialités médicamenteuses.

Nous avons sélectionné 37 molécules, parmi les 60 utilisées, pour lesquelles la gestion des reliquats nous paraissait rentable et adaptée. Cette sélection a été réalisée uniquement de manière empirique d'après notre expérience quotidienne. Le calcul des économies a été effectué en nombre de flacons non facturés à la sécurité sociale. Les flacons non facturés ont été déterminés en fonction des reliquats utilisés et des formes commerciales disponibles au CHRU de Tours.

Prenons l'exemple d'un patient mesurant 1,70 m et pesant 70 kg. Sa surface corporelle est de 1,8 m². Une prescription de pemetrexed-Alimta[®] à la posologie de 500 mg/m² entraîne la préparation d'une poche de pemetrexed à 900 mg. Deux solutions s'offrent à nous :

- nous n'avons pas de reliquat de pemetrexed disponible, nous utilisons donc deux flacons de 500 mg de pemetrexed-Alimta[®]. Notons que nous avons choisi à l'UBCO de n'utiliser que des flacons de 500 mg de pemetrexed-Alimta[®] afin de limiter les références disponibles.
- Nous avons un reliquat de 400 mg de pemetrexed disponible, nous utilisons donc ce reliquat et un nouveau flacon de 500 mg de pemetrexed-Alimta[®].

Dans le premier cas, nous facturons deux flacons de 500 mg de pemetrexed-Alimta[®] à la sécurité sociale (médicament en sus des GHS). Dans le deuxième cas, nous ne facturons qu'un seul flacon de 500 mg de pemetrexed-Alimta[®] à la sécurité sociale. Nous avons donc économisé la facturation d'un flacon au total.

Enfin, nous avons évalué le temps pharmacien (praticien hospitalier, assistant spécialiste, interne) et le temps préparateur hospitalier pour gérer cette banque de reliquats d'anticancéreux, du conditionnement à la rédaction de la fiche de fabrication utilisant un reliquat.

IV.1.4. Recommandations

Afin de pouvoir éditer des recommandations, nous avons séparé les 37 molécules analysées en 3 groupes :

- Molécules rentables : la gestion des reliquats de ces molécules a généré 90% du total des économies ;
- Molécules non rentables : la gestion des reliquats de ces molécules a généré moins de 1% du total des économies ;
- Molécules moyennement rentables : les molécules génèrent peu d'économies et le coût de gestion de leurs reliquats est relativement élevé par rapport aux économies réalisées.

IV.2. Résultats

Au cours de l'année 2009, nous avons réalisé 22 555 préparations anticancéreuses injectables qui ont générées 6 323 reliquats. Le budget annuel en médicaments anticancéreux est d'environ 8 millions d'€ pour l'UBCO. Grâce à la gestion raisonnée des reliquats, le service a été en mesure d'économiser l'utilisation et la facturation à la sécurité sociale de 4 379 flacons de médicaments anticancéreux correspondant à environ 750 k€. Le tableau suivant récapitule nos différents calculs pour évaluer l'économie réelle réalisée dans le service grâce à cette gestion des reliquats. Le coût de gestion des reliquats (Tableau IV.3.) est évalué en temps personnel : 150h (87,6h (Temps supplémentaire pour la saisie des fiches de fabrication avec un reliquat) + 63h (Temps consacré à diverses tâches liées aux reliquats (hors saisie des fiches de fabrication))) pour les pharmaciens et 194h (131,4h (Temps supplémentaire pour la saisie des fiches de fabrication avec un reliquat) + 63h (Temps consacré à diverses tâches liées aux reliquats (hors saisie des fiches de fabrication))) pour les préparateurs en pharmacie. Cela représente 9,5 k€, soit 1,8 € par reliquat utilisé. La dépense en temps homme liée à la gestion des reliquats représente donc 1,2 % des économies réalisées.

Au final, après avoir retiré ce coût humain, l'économie réalisée en réutilisant les reliquats d'anticancéreux est d'environ 740 k€, ce qui correspond à 9,2 % du budget annuel des médicaments anticancéreux de l'UBCO.

Tableau IV.3. : Calcul du coût de gestion des reliquats durant l'année 2009. A/ Nombre de reliquats générés au cours de l'année 2009. B/ Coût horaire du personnel de la PUI. C/ Temps et coût de gestion des reliquats par tâche. D/ Coût total de la gestion des reliquats.

A	Nombre de reliquats réutilisés pour des préparations	N_1	4 379
	Nombre de reliquats générés	$N_2 = N_1 \times 1,2^{(1)}$	5 255

⁽¹⁾ : facteur correctif pour tenir compte des reliquats générés mais non utilisés

B	Coût annuel moyen d'un Pharmacien Assistant Spécialiste pour le CHRU de Tours	CA_1	54 000 €	Coût annuel moyen d'un Préparateur en Pharmacie pour le CHRU de Tours	CA_2	38 797 €
	Temps de travail annuel d'un Pharmacien Assistant Spécialiste	$T = 47 \times 35$	1645 h	Temps de travail annuel d'un Préparateur en Pharmacie	$T = 47 \times 35$	1645 h
	Coût horaire moyen d'un Pharmacien Assistant Spécialiste pour le CHRU de Tours	$CH_1 = CA_1/T$	32,83 €	Coût horaire moyen d'un Préparateur en Pharmacie pour le CHRU de Tours	$CH_2 = CA_2/T$	23,58 €

C Temps supplémentaire pour la saisie d'une fiche de fabrication avec un reliquat	T_1	1 min	Temps supplémentaire pour l'étiquetage, l'emballage et le rangement d'un reliquat	T_2	1,5 min
Temps supplémentaire pour la saisie des fiches de fabrication avec un reliquat	$T'_1 = N_2 \times T_1 / 60$	87,6 h	Temps supplémentaire pour l'étiquetage, l'emballage et le rangement des reliquats	$T'_2 = N_2 \times T_2 / 60$	131,4 h
Coût de la saisie d'une fiche de fabrication avec un reliquat	$C_1 = T'_1 \times CH_1$	2 875,90 €	Coût de l'étiquetage, l'emballage et le rangement des reliquats	$C_2 = T'_2 \times CH_2$	3 098,40 €
Temps par jour consacré aux diverses tâches liées aux reliquats (hors saisie des fiches de fabrication)	T_3	15 min	Temps par jour consacré aux diverses tâches liées aux reliquats (hors étiquetage, emballage et rangement)	T_4	15 min
Temps consacré diverses tâches liées aux reliquats (hors saisie des fiches de fabrication)	$T'_3 = T_3 \times 251^{(2)} / 60$	63 h	Temps consacré aux diverses tâches liées aux reliquats (hors étiquetage, emballage et rangement)	$T'_4 = T_4 \times 251^{(2)} / 60$	63 h
Coût des diverses tâches liées aux reliquats (hors saisie des fiches de fabrication)	$C_3 = T'_3 \times CH_1$	2 068 €	Coût des diverses tâches liées aux reliquats (hors étiquetage, emballage et rangement)	$C_4 = T'_4 \times CH_2$	1 486 €

D Coût de la gestion des reliquats	$C = C_1 + C_2 + C_3 + C_4$	9 528,3 €
Coût de gestion par reliquats	$C' = C / N_2$	1,81 €

⁽²⁾ : nombre de jours d'activité

A noter que le calcul est effectué sur un nombre de jours de travail effectif sur l'année 2009 de 251 jours.

Le tableau IV.4. récapitule les 37 molécules divisées en 3 groupes : molécules rentables, moyennement rentables et non rentables.

Tableau IV.4. : Economies réalisées durant l'année 2009.

	Dénomination commune internationale (DCI)	Budget annuel (k€)	Economies totales (€)	Pourcentage des économies par rapport au total	Coût de gestion	Prix moyen d'un reliquat	Stabilité du reliquat	Commentaires
<u>Groupe 1:</u> Molécules rentables	Azacitidine	628	135228	17.82 %	828	123	8 hours	Nécessité de regrouper les patients
	Rituximab	1640	118547	15.63 %	706	53.8	30 days	
	Trastuzumab	994	115719	15.25 %	391	203	2 days	Nécessité de regrouper les patients
	Bortezomib	330	100969	13.31 %	189	320	5 days	
	Bevacizumab	1241	84371	11.12 %	404	68	30 days	
	Docetaxel	1251	52210	6.88 %	469	88	30 days	
	Doxorubicine Liposomale	234	27600	3.64 %	135	189	30 days	
	Topotecan	84	27567	3.63 %	195	153	24 hours	Nécessité de regrouper les patients
	Cetuximab	255	22191	2.92 %	222	38	30 days	
	Total			684403	90.21 %			

	Dénomination commune internationale (DCI)	Budget annuel (k€)	Economies totales (€)	Pourcentage des économies par rapport au total	Coût de gestion	Prix moyen d'un reliquat	Stabilité du reliquat	Commentaires
Groupe 2: Molécules moyennement rentables	Pemetrexed	543	13477	1.78 %	24	245.04	14 days	
	Irinotecan	101	12531	1.65 %	352	3.22	30 days	
	Alemtuzumab	31	9771	1.29 %	48	44.41	30 days	
	Paclitaxel	52	6985	0.92 %	738	1.58	30 days	
	Ifosfamide	60	4872	0.64 %	265	7.92	21 days	Temps de dissolution important
	Cytarabine	70	4131	0.54 %	367	1.79	30 days	
	Cyclophosphamide	26	2724	0.36 %	758	5.93	6 days	Temps de dissolution important
	Vindesine	9	2424	0.32 %	46	12.49	30 days	
	Idarubicine	37	2372	0.31 %	41	75.55	7 days	Etape de reconstitution évitée
	Bleomycine	10	2199	0.29 %	159	7.79	28 days	Etape de reconstitution évitée
	Mitoxantrone	12	1846	0.24 %	41	28.81	30 days	
	Oxaliplatine	22	1580	0.21 %	141	54.72	30 days	
	Etoposide	29	1265	0.17 %	565	0.51	30 days	
	Gemcitabine	157	1239	0.16 %	265	2.85	30 days	Etape de reconstitution évitée
	Carboplatine	16	1213	0.16 %	741	1.97	30 days	
	Total		68629	9.05 %				

	Dénomination commune internationale (DCI)	Budget annuel (k€)	Economies totales (€)	Pourcentage des économies par rapport au total	Coût de gestion	Prix moyen d'un reliquat	Stabilité du reliquat	Commentaires
Groupe 3: Molécules non rentables	Vinblastine	4	1091	0.14 %	156	7.38	21 days	
	Epirubicine	51	1041	0.14 %	267	2.04	30 days	
	Vinorelbine	10	907	0.12 %	215	2.5	30 days	
	Doxorubicin	47	870	0.11 %	497	0.54	30 days	
	Methotrexate	8	559	0.07 %	74	2.44	30 days	
	L-Asparaginase	16	398	0.05 %	13	40.91	2 days	
	Cladribine	7	306	0.04 %	2	245.03	30 days	
	Dacarbazine	7	216	0.03 %	91	1.43	3 days	
	Bendamustine	15	71	0.01 %	2	29.05	extemporané	
	Fluorouracile	1	71	0.01 %	76	0.44	30 days	
	Thiotepa	5	56	0.01 %	2	18.71	2 days	
	Daunorubicine	6	46	0.01 %	7	7.65	7 days	
	Vincristine	2	34	0.001 %	20	1.37	30 days	
	Total			5666	0.75 %			

Les molécules rentables contribuent pour plus de 90% des économies générées. Il s'agit de 9 molécules : l'azacitidine, le rituximab, le trastuzumab, le bortezomib, le bevacizumab, le docetaxel, la doxorubicine liposomale, le topotecan et le cetuximab. Ce groupe représente 77% du budget annuel (6,7 millions d'€) et correspond à 37 % des flacons économisés. Parmi ces molécules, le trastuzumab, l'azacitidine et le topotecan nécessitent de regrouper les patients afin de réaliser des campagnes de production en raison de la faible stabilité de la solution reconstituée dans le flacon d'origine. Les deux critères essentiels pour que les molécules soient dans ce groupe des molécules rentables est le prix élevé et la fréquence de prescription. Un cas particulier pour l'azacitidine qui est prescrit dans le traitement des syndromes myélodysplasiques et qui nécessite deux injections par jour pendant sept jours. Toutes ces molécules sont facturées en sus des GHS (très onéreuses) et sont parmi les traitements de choix de pathologies comme le lymphome non hodgkinien (rituximab), les syndromes myélodysplasiques (azacitidine), le cancer du sein (trastuzumab), le myélome multiple (bortezomib)...

Dans le groupe des molécules non rentables, nous retrouvons 13 molécules dont les économies générées représentent moins de 1 % des économies totales (5 666 €). Ces médicaments ne sont donc pas adaptés à ce type de gestion mais avec près de 650 flacons économisés, l'impact environnemental de l'arrêt de la gestion des reliquats de ces médicaments n'est pas négligeable et nécessite d'être rediscuté au sein de l'UBCO. Le critère important dans ce groupe est le prix très faible des médicaments.

Enfin, le dernier groupe de molécules moyennement rentables regroupe 15 molécules et contribue à réaliser 9 % des économies totales. La question du maintien de la gestion de ces reliquats est à définir en fonction de l'activité de cancérologie de l'hôpital et de l'unité de reconstitution des chimiothérapies. Pour certains médicaments, comme le cyclophosphamide et l'ifosfamide, l'intérêt d'utiliser les reliquats réside dans le fait que l'on s'affranchit de l'étape de dissolution qui est longue pour ces médicaments (15 minutes).

IV.3. Conclusion

Nous avons donc, pour ces raisons, opté pour la gestion d'une banque stérile de reliquats ce qui nous a permis de réaliser, à l'échelle de la sécurité sociale, une économie d'environ 750 k€, correspondant à environ 9 % du budget annuel des anticancéreux. Ce travail nous a permis d'optimiser cette gestion en regroupant les molécules en fonction de leur

rentabilité. En effet, certaines molécules génèrent peu d'économies pour un nombre important de reliquats gérés. Au contraire, d'autres molécules représentent la majorité des économies générées pour un nombre de reliquats moyen.

Les conséquences de la mise en place de cette banque stérile de reliquats et des économies générées sont directement bénéfiques pour la sécurité sociale. En effet, depuis la mise en place de la T2A, le remboursement est directement effectué par les caisses d'assurance maladie pour les médicaments en sus des GHS. Dans notre cas, toutes les molécules du groupe 1 (en 2009) faisaient partie de cette catégorie. L'hôpital ne peut donc pas bénéficier directement de l'effort réalisé par le personnel de l'UBCO. Cependant, cette gestion permet de limiter l'augmentation du budget de ces molécules, limité à 3 % pour l'année 2011 par rapport à l'année 2010 [13]. Sur le seul groupe 1, entre 2008 et 2009, l'absence d'une telle gestion des reliquats aurait provoqué une augmentation de budget de 22 % au lieu de 10 %. Il est difficile d'extrapoler cette limitation à tout le budget des molécules en sus des GHS, mais l'intérêt des pharmaciens hospitaliers et des établissements de santé est d'encourager ces initiatives simples de mise en œuvre et permettant de réaliser des économies pour la sécurité sociale, de limiter l'augmentation des dépenses des médicaments en sus des GHS et de limiter l'impact environnemental.

Enfin, la réalisation d'études de stabilité sur des médicaments dont les données ne sont pas disponibles permettrait d'effectuer des économies supplémentaires et entraînerait dans certains cas une souplesse d'utilisation (médicament nécessitant un temps important de dissolution). En effet, les RCP des médicaments mis sur le marché régulièrement ne font pas état d'une durée d'utilisation supérieure à 24 heures après ouverture. Après contact auprès de l'AFSSAPS, nous avons eu la confirmation que ces données de stabilité supérieures à 24 heures sont confidentielles et ne peuvent être divulguées aux pharmacies hospitalières.

L'étude de stabilité réalisée sur les reliquats de pemetrexed-Alimta[®] nous permettra de réaliser des économies supplémentaires et de considérer cette molécule comme rentable (groupe 1) en lieu et place du groupe 2. En effet, nous avons déjà pu générer des économies importantes en n'utilisant que les anciennes données de stabilité du pemetrexed (24 heures).

CONCLUSION GENERALE

L'étude de la stabilité des médicaments anticancéreux injectables dans le contexte hospitalier est devenue un axe de recherche incontournable pour les pharmaciens hospitaliers. Comme développé dans le chapitre I, l'apparition du circuit du médicament et l'obligation de centraliser la reconstitution de ces médicaments dans les PUI sous responsabilité pharmaceutique ont obligé la mise en place d'outils de production de chimiothérapies alliant sécurité pour le patient et productivité. En effet, l'augmentation du nombre de patients atteints de cancer et le nombre de traitements disponibles induit une occupation plus importante des hôpitaux de jour de cancérologie et des services d'hospitalisation complète, nécessitant une optimisation de toutes les étapes du traitement du patient. C'est dans cet objectif que nous avons obtenu une certification de notre unité qui impose, notamment, une durée maximale de livraison des chimiothérapies. Une des voies pharmaceutiques permettant de gagner en productivité est l'étude de la stabilité de certains médicaments anticancéreux injectables permettant une souplesse d'utilisation de plusieurs façons :

- Etude de la stabilité des médicaments après dilution dans le solvant d'administration (à des concentrations thérapeutiques) : cette connaissance permet la préparation de traitements en avance, une fois la validation donnée par le médecin.
- Etude de la stabilité des médicaments après reconstitution dans le conditionnement d'origine : cette connaissance permet de réutiliser les reliquats du médicament et donc de s'affranchir de l'étape de reconstitution, souvent consommatrice de temps (ex : cyclophosphamide, ifosfamide, pemetrexed...).

D'autres utilités sont envisageables pour ces études de stabilité, comme l'approche économique avec l'utilisation des reliquats d'anticancéreux ou encore la réponse à une demande de service clinique sur l'utilisation dans des conditions particulières de ces médicaments, le délai du transport dans le cas des chimiothérapies à domicile...

Malgré l'importance de ces études de stabilité, aucune disposition réglementaire n'est prévue par la loi pour l'utilisation de solutions injectables de médicaments anticancéreux hors référentiels (RCP), contrairement à l'utilisation de ces médicaments dans des indications non prévues par l'AMM. En effet, les industries pharmaceutiques publient des données de stabilité très parcellaires ne permettant pas une organisation optimale de la part des pharmaciens hospitaliers sur la réalisation des traitements. L'AFFSAPS, de son côté, n'incite pas les industries à produire ces données disponibles et ne peut, pour des raisons de confidentialité, fournir ces données aux pharmaciens hospitaliers. Il est donc impératif pour les pharmaciens

hospitaliers de réaliser les études de stabilité adéquates dans les conditions d'utilisation hospitalière afin de pouvoir, par la suite, utiliser ces données pour la pratique quotidienne dans les unités de reconstitution des anticancéreux. La Société Française de Pharmacie Oncologique en lien avec Stabilis[®] œuvre dans ce sens et permet, d'une part, de centraliser les études réalisées et d'autre part de promouvoir ces études de stabilités. Des recommandations pour la réalisation de ces études de stabilité viennent d'ailleurs d'être publiées afin de guider les pharmaciens hospitaliers. Cependant, rares sont les publications faisant état des produits de dégradation apparus au cours de ces études et de l'impact de ces produits.

Nous avons donc voulu répondre à quelques unes de ces questions en réalisant une étude de stabilité d'un médicament anticancéreux injectable dans son conditionnement d'origine après reconstitution : le pemetrexed-Alimta[®]. Au cours du deuxième chapitre, nous avons abordé le développement analytique d'une méthode CLHP-UV-DEDL permettant de réaliser une étude de stabilité de ce médicament. Une des contraintes imposées était de pouvoir réaliser cette étude mais aussi de pouvoir étudier les produits de dégradation, le cas échéant, en spectrométrie de masse. Nous avons donc développé une méthode satisfaisant à ces objectifs. L'étude de stabilité réalisée a permis d'augmenter la durée de péremption des reliquats de pemetrexed-Alimta[®] de 24 heures à 14 jours (à +2 - +8 °C et +22 °C à l'abri de la lumière). Nous avons également isolé deux produits de dégradation majoritaires apparus au cours de cette étude et cherché à les identifier par spectrométrie de masse (triple quadripôle et haute-résolution). Les premiers résultats indiquent que la molécule de pemetrexed, dans les conditions étudiées, est sensible à l'oxydation. Des travaux complémentaires sont nécessaires pour confirmer la structure des deux produits (chromatographie semi-préparative, RMN) et leur activité et/ou toxicité (chromatographie semi-préparative, purification, culture cellulaire). La connaissance de cette activité permettrait, dans le cas où ces produits seraient inactifs, de prolonger la durée de stabilité à 28 jours sans risque pour le patient.

Dans le chapitre III, nous avons répondu à une problématique locale concernant le methotrexate dans le traitement des GEU. La réalisation de seringues, le week-end notamment, engage une dépense importante pour un traitement très peu onéreux. Afin d'imaginer une organisation pratique autour de la prise en charge de ce traitement, nous avons réalisé une étude de stabilité des solutions de methotrexate injectable, utilisées dans cette indication, dans des seringues en PP. Le methotrexate étant de la même famille que le pemetrexed, nous avons optimisé la méthode CLHP-UV-DEDL développée pour le pemetrexed et ainsi réalisé l'étude de stabilité du methotrexate en seringue en PP. Nous

devons maintenant établir les conditions d'utilisation de ces seringues et la gestion à mettre en place au sein de notre PUI pour la dispensation de ces préparations anticancéreuses.

Nous avons finalement étudié l'impact économique de la réalisation de ces études de stabilité sur les reliquats des médicaments anticancéreux injectables. En effet, la gestion de ces reliquats d'anticancéreux nécessite un investissement important de la part de tout le personnel de l'UBCO, nous voulions donc connaître le réel bénéfice d'une telle organisation pour l'hôpital et pour la sécurité sociale. L'analyse des chiffres de l'année 2009 nous a permis de montrer que nous pouvions réaliser une économie représentant environ 9 % du budget annuel des anticancéreux de l'UBCO du CHRU de Tours (hôpital Bretonneau). Nous avons également montré que 90 % de ces économies étaient réalisées par la gestion de 9 médicaments listés en sus des GHS, permettant de réaliser une économie immédiate pour la sécurité sociale d'environ 650 k€. Par ailleurs, nous avons montré que la gestion de ces reliquats permettait, pour l'hôpital, de limiter la progression des dépenses liées à ces médicaments listés en sus des GHS afin de respecter les limites fixées par arrêté. La réalisation d'études de stabilité bien menées sur les nouveaux médicaments mis sur le marché pourra permettre la réalisation d'économies et de limiter la progression des dépenses sur ces nouveaux médicaments, tel que le Jevtana[®] dont le flacon coûte environ 5000 €.

Parmi ces nouvelles molécules mises sur le marché, une part importante est consacrée aux anticorps monoclonaux. On estime actuellement, à plus de 500 le nombre d'anticorps monoclonaux en développement et plus de 200 anticorps monoclonaux en essais cliniques. La réalisation d'études de stabilité devient importante d'un point de vue économique mais également d'un point de vue pharmaceutique. En effet, d'une part ces molécules sont très onéreuses et sont toutes, actuellement, sur la liste en sus des GHS et, d'autre part, leur comportement en solutions thérapeutiques et dans les conditions quotidiennes d'utilisation sont peu connues. De plus les méthodes nécessaires à l'analyse de leur comportement sont différentes que celles utilisées pour les molécules chimiques dites « classiques ». Cependant, la méthodologie acquise lors de ce travail nous permet d'envisager l'étude du comportement de ces anticorps dans des conditions optimales.

Nous avons montré au cours de ce travail l'apport de la chimie analytique et organique et l'apport de la pharmacie dans la mise en place et l'exploitation des études de stabilité sur les médicaments anticancéreux injectables. Le développement constant de nouvelles molécules par l'industrie pharmaceutique couplé à une confidentialité des dossiers de dépôts d'AMM conduisent les pharmaciens hospitaliers et les chimistes à mettre en commun leurs compétences afin de répondre au mieux à une réalité économique de notre système de santé français et à la prise en charge des patients atteints de cancer.

Bibliographie

1. *Anticancéreux : utilisation pratique 6ème édition*. Dossier du CNHIM, 2008.
2. *Loi n°92-1279 du 8 décembre 1992 modifiant le livre V du code de la santé publique et relative à la pharmacie et au médicament*. 1992.
3. *Loi n°98-535 du 1 juillet 1998 relative au renforcement de la veille sanitaire et du contrôle de la sécurité sanitaire des produits destinés à l'homme*. 1998.
4. *Article L5126-5 du Code de la santé publique*.
5. *Décret n°2000-1316 du 26 décembre 2000 relatif aux pharmacies à usage intérieur et modifiant le code de la santé publique 2000*.
6. *Article R5104-21 du Code de la Santé Publique*.
7. *Arrêté du 22 juin 2001 relatif aux bonnes pratiques de pharmacie hospitalière*. 2001.
8. *Loi n°2003-1199 du 18 décembre 2003 de financement de la sécurité sociale pour 2004*. 2003.
9. *Article L162-22-7 du Code de la sécurité sociale*.
10. *Arrêté du 4 avril 2005 modifiant la liste des spécialités pharmaceutiques remboursables aux assurés sociaux*. 2005.
11. *Décret n°2005-1023 du 24 août 2005 relatif au contrat de bon usage des médicaments et des produits et prestations mentionné à l'article L. 162-22-7 du code de la sécurité sociale*. 2005.
12. *LOI n° 2008-1330 du 17 décembre 2008 de financement de la sécurité sociale pour 2009*. 2008.
13. *Arrêté du 14 mars 2011 pris pour l'application de l'article L. 162-22-7-2 du code de la sécurité sociale*. 2011.
14. Gard, C., et al., *Isotechnie et Pharmacie hospitalière Application aux anticancéreux*. 2006.
15. Vigneron, J., *Stability studies of drugs used in oncology : the role of the hospital pharmacist*. EJHP Practice, 2006. **12**: p. 75-6.
16. Bakshi, M., et al., *Development of validated stability-indicating assay methods-critical review*. J Pharm Biomed Anal, 2002. **28**(6): p. 1011-1040.
17. Martel, P., et al., *Long-term stability of 5-fluorouracil stored in PVC bags and in ambulatory pump reservoirs*. J Pharm Biomed Anal, 1996. **14**(4): p. 395-9.
18. Duriez, A., et al., *Stability of azacitidine suspensions*. Ann Pharmacother, 2011. **45**(4): p. 546.
19. El Aatmani, M., et al., *Stability of dacarbazine in amber glass vials and polyvinyl chloride bags*. Am J Health Syst Pharm, 2002. **59**(14): p. 1351-6.
20. Husson, M.C., et al., *Médicaments anticancéreux*. ed. E.M. Internationales, 1995.
21. Waugh, W.N., et al., *Stability, compatibility, and plasticizer extraction of taxol (NSC-125973) injection diluted in infusion solutions and stored in various containers*. Am J Hosp Pharm, 1991. **48** (7): p. 1520-4.
22. Adjei, A.A., *Pharmacology and mechanism of action of pemetrexed*. Clin Lung Cancer, 2004. **5** (2): p. S51-5.
23. Schultz, R.M., et al., *Role of thymidylate synthase in the antitumor activity of the multitargeted antifolate, LY231514*. Anticancer Res, 1999. **19**(1A): p. 437-43.

24. Shih, C., *et al.*, LY231514, a pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-based antifolate that inhibits multiple folate-requiring enzymes. *Cancer Res*, 1997. **57**(6): p. 1116-23.
25. Mendelsohn, L.G., *et al.*, Enzyme inhibition, polyglutamation, and the effect of LY231514 (MTA) on purine biosynthesis. *Semin Oncol*, 1999. **26**(6): p. 42-7.
26. Baldwin, C.M., *et al.*, Pemetrexed: a review of its use in the management of advanced non-squamous non-small cell lung cancer. *Drugs*, 2009. **69**(16): p. 2279-302.
27. Burgin, M., *et al.*, First-line treatment with pemetrexed in association with cisplatin in patients with non-operable malignant pleural mesothelioma. *Rev Pneumol Clin*, 2009. **65**(2): p. 75-83.
28. Vogelzang, N.J., *et al.*, Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(14): p. 2636-44.
29. Ceresoli, G.L., *et al.*, Phase II study of pemetrexed plus carboplatin in malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(9): p. 1443-8.
30. Castagneto, B., *et al.*, Phase II study of pemetrexed in combination with carboplatin in patients with malignant pleural mesothelioma (MPM). *Ann Oncol*, 2008. **19**(2): p. 370-3.
31. Santoro, A., *et al.*, Pemetrexed plus cisplatin or pemetrexed plus carboplatin for chemo-naïve patients with malignant pleural mesothelioma: results of the International Expanded Access Program. *J Thorac Oncol*, 2008. **3**(7): p. 756-63.
32. Chee, C.E., *et al.*, Phase 2 trial of pemetrexed disodium and carboplatin in previously untreated extensive-stage small cell lung cancer, N0423. *Cancer*, 2010. **116**(10): p. 2382-9.
33. Socinski, M.A., *et al.*, Phase III study of pemetrexed plus carboplatin compared with etoposide plus carboplatin in chemotherapy-naïve patients with extensive-stage small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(28): p. 4787-92.
34. Zhang, Y., *et al.*, Physical and chemical stability of pemetrexed solutions in plastic syringes. *Ann Pharmacother*, 2005. **39**(12): p. 2026-8.
35. Zhang, Y., *et al.*, Physical instability of frozen pemetrexed solutions in PVC bags. *Ann Pharmacother*, 2006. **40**(7-8): p. 1289-92.
36. Zhang, Y., *et al.*, Physical and chemical stability of pemetrexed in infusion solutions. *Ann Pharmacother*, 2006. **40**(6): p. 1082-5.
37. Rondelot, G., *et al.*, Stability of pemetrexed 25 mg/mL in a glass vial and 5 mg/mL stored in a PVC container after storage for one month at 2-8°C. *EJHP Science*, 2007. **13**(1): p. 14-16.
38. Saravanan, G., *et al.*, A Stability-Indicating LC Assay Method for Pemetrexed Disodium. *Chromatographia*, 2007. **66**(5): p. 431-434.
39. Mourey, T.H., *et al.*, Principles of operation of an evaporative light-scattering detector for liquid-chromatography. *Anal Chem*, 1984. **56**(13): p. 2427-2434.
40. Stolyhwo, A., *et al.*, Study of the qualitative and quantitative properties of the light-scattering detector. *J Chromatogr A*, 1984. **288**(2): p. 253-275.
41. Dreux, M., *et al.*, The evaporative light scattering detector - A universal instrument for non-volatile solutes on LC and SFC. *LC.GC Int*, 1996. **9**: p. 148-156.
42. Fekkes, D., *et al.*, Validation of the determination of amino acids in plasma by high-performance liquid chromatography using automated pre-column derivatization with o-phthalaldehyde. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1995. **669**(2): p. 177-86.
43. Chaimbault, P., *et al.*, Ion-pair chromatography on a porous graphitic carbon stationary phase for the analysis of twenty underivatized protein amino acids. *J Chromatogr A*, 2000. **870**(1-2): p. 245-54.

44. Petritis, K.N., *et al.*, *Ion-pair reversed-phase liquid chromatography for determination of polar underivatized amino acids using perfluorinated carboxylic acids as ion pairing agent*. *J Chromatogr A*, 1999. **833**(2): p. 147-155.
45. Rosset, R., *et al.*, *Manuel pratique de chromatographie en phase liquide, 2^o édition revue*. 1995.
46. Barnett, C.J., *et al.*, *A Practical Synthesis of Multitargeted Antifolate LY231514*. *Org Proc Res Dev*. 1999. **3**(3): p. 184-188.
47. Respaud, R., *et al.*, *Development of an ion-pairing reversed-phase liquid chromatography method using a double detection analysis (UV and evaporative light scattering detection) to monitor the stability of Alimta((R))-pemetrexed preparations: identification and quantification of L-glutamic acid as a potential degradation product*. *J Pharm Biomed Anal*, 2011. **54**(2): p. 411-6.
48. Hubert, P., *et al.*, *Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal-Part I*. *J Pharm Biomed Anal*, 2004. **36**(3): p. 579-86.
49. Hubert, P., *et al.*, *Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal-part II*. *J Pharm Biomed Anal*, 2007. **45**(1): p. 70-81.
50. Hubert, P., *et al.*, *Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal-part III*. *J Pharm Biomed Anal*, 2007. **45**(1): p. 82-96.
51. Hubert, P., *et al.*, *Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: a SFSTP proposal-part IV. Examples of application*. *J Pharm Biomed Anal*, 2008. **48**(3): p. 760-71.
52. ICH, *Guideline Q2(R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. International Conference on Harmonisation*, <http://www.ich.org>. 2005.
53. Curtin, N.J., *et al.*, *Pemetrexed disodium, a novel antifolate with multiple targets*. *Lancet Oncol*. 2001. **2**(5): p. 298-306.
54. Rollins, K.D., *et al.*, *Pemetrexed: a multitargeted antifolate*. *Clin Ther*, 2005. **27**(9): p. 1343-82.
55. Ciuleanu, T., *et al.*, *Maintenance pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care for non-small-cell lung cancer: a randomised, double-blind, phase 3 study*. *Lancet*, 2009. **374**(9699): p. 1432-40.
56. Rossi, A., *et al.*, *Pemetrexed in the treatment of advanced non-squamous lung cancer*. *Lung Cancer*, 2009. **66**(2): p. 141-9.
57. Burke, M.J., *Drug free: How North Memorial tackled its pharmaceutical waste problem*. *Health Facil Manage*, 2008. **21**(10): p. 67-70.
58. Holzgrabe, U., *et al.*, *Alternatives to amino acid analysis for the purity control of pharmaceutical grade L-alanine*. *J Sep Sci*, 2010. **33**(16): p. 2402-10.
59. Holzgrabe, U., *et al.*, *Control of impurities in l-aspartic acid and l-alanine by high-performance liquid chromatography coupled with a corona charged aerosol detector*. *J Chromatogr A*, 2010. **1217**(3): p. 294-301.
60. Wang, J., *et al.*, *Determination of spectinomycin hydrochloride and its related substances by HPLC-ELSD and HPLC-MSn*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2006. **834**(1-2): p. 178-82.
61. Boisseree, V.R., *Drug waste in long-term care facilities: a costly problem*. *J Long Term Care Adm*, 1985. **13**(2): p. 55-60.
62. Douville, V., *et al.*, *Evaporative light scattering detection (ELSD): a tool for improved quality control of drug substances*. *Pharmeur Sci Notes*, 2006. **2006**(1): p. 9-15.

63. Vogel, R., *et al.*, *Determination of isepamicin sulfate and related compounds by high performance liquid chromatography using evaporative light scattering detection.* J Pharm Biomed Anal, 2001. **24**(3): p. 405-12.
64. Bardin, C., *et al.*, *Guidelines for the practical stability studies of anticancer drugs: a European consensus conference.* Ann Pharm Fr, 2011. **69**(4): p. 221-31.
65. Bobin-Dubigeon, C., *et al.*, *Development and validation of an improved liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of pemetrexed in human plasma.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009. **877**(24): p. 2451-6.
66. Piraud, M., *et al.*, *A new reversed-phase liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for analysis of underivatized amino acids: evaluation for the diagnosis and the management of inherited disorders of amino acid metabolism.* Rapid Commun Mass Spectrom, 2005. **19**(22): p. 3287-97.
67. Piraud, M., *et al.*, *Ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric analysis of 76 underivatized amino acids of biological interest: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism.* Rapid Commun Mass Spectrom, 2005. **19**(12): p. 1587-602.
68. Rouessac, F., *et al.*, *Analyse chimique : Méthodes et Techniques instrumentales modernes, 6ème éd., Dunod, Paris.* 2004: p. 341.
69. Petritis, K., *et al.*, *Parameter optimization for the analysis of underivatized protein amino acids by liquid chromatography and ionspray tandem mass spectrometry.* J Chromatogr A, 2000. **896**(1-2): p. 253-63.
70. Rajagopalan, P.T., *et al.*, *Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: ensemble and single-molecule kinetics.* Proc Natl Acad Sci USA, 2002. **99**(21): p. 13481-6.
71. Bonney, R.J., *et al.*, *Effect of methotrexate on thymidylate synthetase in cultured parenchymal cells isolated from regenerating rat liver.* Cancer Res, 1975. **35**(8): p. 1950-6.
72. Dialani, V., *et al.*, *Ectopic pregnancy: a review.* Ultrasound Q, 2004. **20**(3): p. 105-17.
73. Hajenius, P.J., *et al.*, *Randomised trial of systemic methotrexate versus laparoscopic salpingostomy in tubal pregnancy.* Lancet, 1997. **350**(9080): p. 774-9.
74. Jacolot, A., *et al.*, *Stability and compatibility of 2.5 mg/ml methotrexate solution in plastic syringes over 7 days.* Int J Pharm, 1996. **128**(1-2): p. 283-286.
75. Belot, A., *et al.*, *Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005.* Rev Epidemiol Sante Publique, 2008. **56**(3): p. 159-75.
76. *BIO³ : BIOTECHNOLOGIES - BIOPRODUCTION - BIOMÉDICAMENTS.* IMT Publications, 2010.
77. Lewden-Bernadac, B., *et al.*, *Outpatient chemotherapy and oncology network : Onco Pays-de-la-Loire experiment.* Bull Cancer, 2008. **95**(5): p. 543-9.
78. Lievre, A., *et al.*, *KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer.* Cancer Res, 2006. **66**(8): p. 3992-5.
79. Romond, E.H., *et al.*, *Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer.* N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1673-84.
80. Fasola, G., *et al.*, *Drug waste minimisation and cost-containment in Medical Oncology: two-year results of a feasibility study.* BMC Health Serv Res, 2008. **8**: p. 70.
81. Diehl, L.D., *et al.*, *Reducing waste of intravenous solutions.* Am J Hosp Pharm, 1992. **49**(1): p. 106-8.
82. Gillerman, R.G., *et al.*, *Drug use inefficiency: a hidden source of wasted health care dollars.* Anesth Analg, 2000. **91**(4): p. 921-4.

83. Nava-Ocampo, A.A., *et al.*, *Undocumented drug utilization and drug waste increase costs of pediatric anesthesia care*. *Fundam Clin Pharmacol*, 2004. **18**(1): p. 107-12.
84. Winger, B.J., *et al.*, *Cost savings from dose rounding of biologic anticancer agents in adults*. *J Oncol Pharm Pract*, 2011. **17**(3): p. 246-51.
85. Bousquet, C., *Stabilité des médicaments anticancéreux injectables après reconstitution et dilution*. These pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie - Université de Tours, 2008.
86. Walker, S.E., *et al.*, *Chemotherapy waste reduction through shelf-life extension*. *Can J Hosp Pharm*, 1994. **47**(1): p. 15-23.

Annexes

Annexe I : Référentiel de bon usage du pemetrexed-Alimta®.



▶ ALIMTA® - PEMETREXED	
Nom commercial	ALIMTA®
Dénomination commune internationale	PEMETREXED
Laboratoire exploitant ou titulaire de l'AMM	LILLY FRANCE
Présentation	Pdr. Inj. 100 mg et 500 mg
Publication	Juillet 2010

■ AUTORISATION DE MISE SUR LE MARCHÉ (AMM)

- ALIMTA®, en association avec le cisplatine, est indiqué dans le traitement en 1ère ligne des patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules localement avancé ou métastatique, dès lors que l'histologie n'est pas à prédominance épidermoïde.
- ALIMTA® est indiqué en monothérapie dans le traitement de maintenance du cancer bronchique non à petites cellules, localement avancé ou métastatique immédiatement à la suite d'une chimiothérapie à base de sel de platine, dès lors que l'histologie n'est pas à prédominance épidermoïde chez les patients dont la maladie n'a pas progressé. Le traitement en première ligne doit être un doublet de platine avec la gemcitabine, le paclitaxel ou le docétaxel.
- ALIMTA® est indiqué en monothérapie dans le traitement en 2nde ligne des patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules, localement avancé ou métastatique, dès lors que l'histologie n'est pas à prédominance épidermoïde.
- ALIMTA®, en association avec le cisplatine, est indiqué dans le traitement des patients atteints de mésothéliome pleural malin non résécable et qui n'ont pas reçu de chimiothérapie antérieure.

■ SITUATIONS TEMPORAIREMENT ACCEPTABLES (PTT)

- Mésothéliome pleural malin non résécable chez des patients qui n'ont pas reçu de chimiothérapie antérieure, en association à carboplatine en cas de contre-indication documentée à cisplatine.

■ SITUATIONS NON ACCEPTABLES

- Cancer bronchique à petites cellules.

ARGUMENTAIRE

■ SITUATIONS TEMPORAIREMENT ACCEPTABLES (PTT)

Mésothéliome pleural malin non résecable chez des patients qui n'ont pas reçu de chimiothérapie antérieure, en association à carboplatine en cas de contre-indication documentée à cisplatine

Ce protocole temporaire se base sur les données présentées par l'étude de Ceresoli et al, publiée en 2006 et dont le résumé est présenté ci-après :

Auteur	Type d'étude	Schéma thérapeutique	Critère d'évaluation	Toxicité
CERESOLI 2006 [1]	Phase II multicentrique non comparative 102 patients atteints d'un mésothéliome malin non résecable et non prétraités.	Pemetrexed 500 mg/m ² + carboplatine (AUC = 5) tous les 21 jours.	Survie globale : 12,7 mois Taux de réponse objective : 19 / 102 (18,6 %) Survie sans progression : 6,5 mois.	Neutropénie grade 3-4 : 9,7 % Anémie grade 3-4 : 3,5 %.

La toxicité a été principalement hématologique avec la survenue de neutropénies de grade 3 ou 4 dans 9,7 % du total de cycles ou d'anémies de grade 3 ou 4 dans 3,5 % du total de cycles.

Cet essai rapporte des résultats assez comparables par rapport à ceux observés chez des patients traités par l'association pemetrexed-cisplatine que ce soit en termes d'efficacité (médiane de survie de 12,1 mois et survie sans progression de 5,7 mois pour pemetrexed-cisplatine) ou de tolérance.

Un autre essai, incluant 1704 patients, a également évalué l'association pemetrexed-carboplatine en comparaison au traitement par pemetrexed-cisplatine, dans le mésothéliome pleural malin, en 1^{ère} ligne de chimiothérapie [3]. Le taux de réponse a été de 26,3 % dans le groupe pemetrexed-cisplatine versus 21,7 % dans le groupe pemetrexed-carboplatine et le taux de survie à 1 an a été similaire dans les deux groupes (63,1 % dans le groupe pemetrexed-cisplatine versus 64,0 % dans le groupe pemetrexed-carboplatine). Le temps médian jusqu'à progression a été de 7 mois dans le groupe pemetrexed-cisplatine versus 6,9 mois dans le groupe pemetrexed-carboplatine. Le taux de neutropénie grade 3-4 a été de 23,9 % dans le groupe pemetrexed-cisplatine et de 36,1 % dans le groupe pemetrexed-carboplatine.

L'essai de phase II de Castagneto et al, mené sur 76 patients, publié en 2008, a également eu pour objectif l'évaluation de l'activité et de la toxicité de l'association pemetrexed-carboplatine dans le mésothéliome pleural malin en 1^{ère} ligne de chimiothérapie [4]. Le taux de réponse partielle a été de 21 % et le taux de réponse complète de 4 %. Le taux de réponse globale a été de 25 % (IC 95 % : 15,3-34,7). Il a été observé une stabilisation de la maladie chez 29 patients soit 39 % des patients (IC 95 % : 28-48). La médiane de survie a été estimée à 14 mois et le temps jusqu'à progression de 8 mois. Les résultats ont montré un taux d'hématotoxicité grade 3 de 47,3 % et d'hématotoxicité grade 4 de 6,5 %.

Une autre étude de phase II, de Ceresoli et al, publiée en 2006 et portant sur 102 patients atteints de mésothéliome pleural malin, a évalué l'efficacité du pemetrexed associé au carboplatine en 1^{ère} ligne de chimiothérapie [5]. Une réponse objective a été observée chez 19 patients, avec 2 réponses complètes et 17 réponses partielles ; le taux de réponse a été de 18,6 % (IC 95 % : 55,6 à 74,8 %).

48 patients (soit 47,0 % ; IC 95 % : 37,1 % à 57,2 %) ont eu une stabilisation de la maladie après traitement. Au total, il a été observé un contrôle de la maladie chez 67 patients (65,7 % ; IC 95 % : 55,6 % à 74,8 %). Le temps médian jusqu'à progression a été de 6,5 mois et la médiane de survie globale de 12,7 mois. Il a été observé un taux de neutropénie grade 3-4 de 9,7 % et un taux d'anémie grade 3-4 de 3,5 % sur le total des cycles. Les toxicités non hématologiques ont été négligeables.

En conclusion, l'association pemetrexed- carboplatine peut être considérée comme une alternative acceptable en cas de contre-indication documentée à cisplatine dans le traitement du mésothéliome malin non résecable chez des patients non prétraités.

■ SITUATIONS NON ACCEPTABLES

Cancer bronchique à petites cellules

Dans une étude de phase II datant de 2006 (Hanna), le pemetrexed est jugé comme ayant une efficacité faible et donc ne présentant pas d'intérêt thérapeutique pour le patient [5].

Dans une étude de phase II présentée à l'ASCO en 2008 (Jett), le critère de jugement principal qui était le taux de réponse n'a pas été atteint sur une population de 48 patients. Il a donc été décidé de clore l'essai précocement [6].

Enfin, dans une étude de phase III, (Socinski et al) comparant un régime à base de pemetrexed à un régime à base d'etoposide, il a été démontré une efficacité inférieure pour le pemetrexed comparée à celle de l'etoposide [7]. L'inclusion des patients dans l'étude a donc été arrêtée pour un manque d'efficacité du pemetrexed.

A partir de ces données, on peut conclure que l'utilisation du pemetrexed chez les patients atteints d'un cancer bronchique à petites cellules peut être une perte de chance et correspond donc à une situation non acceptable.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. [Ceresoli GL, Zucali PA, Favaretto AG, Grossi F, Bidoli P, Del Conte G, Ceribelli A, Bearz A, Morenghi E, Cavina R, Marangolo M, Parra HJ, Santoro A. Phase II study of pemetrexed plus carboplatin in malignant pleural mesothelioma. J Clin Oncol. 2006 Mar 20;24\(9\):1443-8.](#)
2. [Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J, Denham C, Kaukel E, Ruffie P, Gatzemeier U, Boyer M, Emri S, Manegold C, Niyikiza C, Paoletti P. Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. J Clin Oncol. 2003 Jul 15;21\(14\):2636-44.](#)
3. [Santoro A, O'Brien ME, Stahel RA, Nackaerts K, Baas P, Karthaus M, Eberhardt W, Paz-Ares L, Sundstrom S, Liu Y, Ripoche V, Blatter J, Visseren-Grul CM, Manegold C. Pemetrexed plus cisplatin or pemetrexed plus carboplatin for chemo-naïve patients with malignant pleural mesothelioma: results of the International Expanded Access Program. J Thorac Oncol. 2008 Jul;3\(7\):756-63.](#)
4. [Castagneto B, Botta M, Aitini E, Spigno F, Degiovanni D, Alabiso O, Serra M, Muzio A, Carbone R, Buosi R, Galbusera V, Piccolini E, Giaretto L, Rebella L, Mencoboni M. Phase II study of pemetrexed in combination with carboplatin in patients with malignant pleural mesothelioma \(MPM\). Ann Oncol. 2008 Feb;19\(2\):370-3. Epub 2007 Dec 20.](#)
5. Hanna N, Bunn PA, Jr., Langer C, Einhorn L, Guthrie T, Jr., Beck T et al. Randomized phase III trial comparing irinotecan/cisplatin with etoposide/cisplatin in patients with previously untreated extensive-stage disease small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2006 May 1;24(13):2038-43.
6. [Jett JR, Bernath AM, Foster NR, Molina JR et al.: Phase II trial of pemetrexed \(P\) and carboplatin © in previously untreated extensive stage disease small cell lung cancer \(ED-SCLC\): A NCCTG Study. 2008 ASCO Annual Meeting J Clin Oncol 26: 2008 \(May 20 Suppl\): abst 8066](#)
7. Socinski MA, Smit EF, Lorigan P, Konduri K, Reck M, Szczesna A et al. Phase III study of pemetrexed plus carboplatin compared with etoposide plus carboplatin in chemotherapy-naïve patients with extensive-stage small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2009 October 1;27(28):4787-92.

Annexe II : Appareillage et réactifs utilisés lors de la mise au point des méthodes et des études de stabilité.

Appareillage :

CLHP : système LaChrom Elite équipé d'une pompe VWR L-2130, un injecteur automatique VWR L-2200 à 4 °C, un détecteur VWR L-2400 UV - Merck (Fontenay sous bois, France) et un DEDL SEDEX 85 - SEDERE (Alfortville, France). Le programme utilisé est EZChrom Server software (Merck, Darmstadt, Germany).

Colonne : Synergi MAX-RP C12 (4 µm, 150 mm x 4,6 mm) munie d'une pré-colonne MAX-RP (4 mm x 3 mm) (Phenomenex), thermostatée à 20 °C.

Une double détection UV à 254 nm puis DEDL (3,5 bar (air comprimé) ; température 50 °C ; gain 10).

Réactifs :

Alimta[®]-pemetrexed, Methotrexate Mylan 50mg/2mL et 100 mg/mL⁻¹ ont été fournis par l'UBCO du CHRU de Tours (Eli Lilly company).

L'acétonitrile et le méthanol qualité HPLC méthanol proviennent de la société Carlo-Erba (Val de Reuil, France).

L'acide trifluoroacétique (TFA, 99% pureté), l'acide nonafluoropentanoïque (NFPA, 97% pureté), et l'acide tridecafluoroheptanoïque (TDFHA, 99% pureté), l'acide L-glutamique et le 4-[N-(2,4-Diamino-6-pteridinylmethyl)-N-méthylamino] acide benzoïque proviennent de la société Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

L'eau ultra-pure est produite par un système Millipore (Molsheim, France).

Annexe III : Brevet déposé le 18/03/2010 par la société Eli Lilly and Company, n°WO 2010/030598 A2. (p1 et 9).

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
18 March 2010 (18.03.2010)

(10) International Publication Number
WO 2010/030598 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 9/28 (2006.01) A61K 47/30 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01) A61P 35/09 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2009/056211

(22) International Filing Date:
8 September 2009 (08.09.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
2207/CHE/2008 (11 September 2008) (11.09.2008) IN
61/139,189 (19 December 2008) (19.12.2008) US

(71) Applicants (for all designated States except US): **DR. REDDY'S LABORATORIES LIMITED** [IN/IN], 7-1-27 Annapur, Hyderabad 500 016, Andhra Pradesh (IN); **DR. REDDY'S LABORATORIES, INC.** [US/US], 200 Somerset Corporate Blvd., 7th Floor, Bridgewater, New Jersey 08807 (US).

(72) Inventors; and
(73) Inventors/Applicants (for US only): **KOCHERLAKOTA, Chandrasekhar** [IN/IN], Plot No. 50, BHEL Enclave, Akbar Road, Tarapur, Sacramento 95609, Andhra Pradesh (IN); **GORUVA, Raghuvra, Hanthibagal** [IN/IN], House No. HIG-31, Adhoni (M), Karnool, Andhra Pradesh (IN); **KOVORU, Krishnam, Raja** [IN/IN], Gajinapalli Pote, Katemkora Mandal, East Godavari 531 212, Andhra Pradesh (IN); **BANDA, Nagaraju** [IN/IN], c/o B. Gangi Ravi, 693 Vivekananda Nagar, Kotakapally, Hyderabad 502 072, Andhra Pradesh (IN).

(74) Agent: **FRANKS, Robert, Dr. Reddy's Laboratories, Inc.**, 200 Somerset Corporate Blvd., 7th Floor, Bridgewater, New Jersey 08807 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AI, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: PHARMACEUTICAL FORMULATIONS COMPRISING PEMETREXED

(57) Abstract: Pharmaceutical formulations comprising amorphous pemetrexed or its salts, and processes to prepare the formulations.

(FIG. 1)

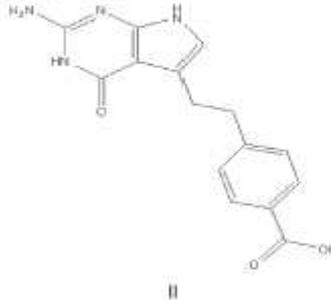
WO 2010/030598 A2

Pemetrexed appears to be susceptible to oxidation and the presence of moisture; hence its formulations should be processed and maintained at minimum levels of oxygen. The headspace of a vial should contain less than about 8% (eight percent) v/v oxygen, or in the range of about 2% to about 5% v/v oxygen, or in the range of about 3% to about 5% v/v oxygen. The headspace of the vial can be adjusted to minimize the formulation contact with oxygen. It is generally desired that the headspace is not more than about one-third of the total volume of the container, with the contents occupying at least about two-thirds of the total volume of the container. For example, 5 mL of product may be contained in a 7.5 ml vial. To avoid oxidation, antioxidants can be included. If a greater headspace ratio is desired, then the concentration of an antioxidant may be adjusted as necessary.

Common antioxidants that can be used in the formulation include, but are not limited to, monothioglycerol, L-cysteine, thioglycolic acid, sodium metabisulfite, ascorbic acid, sodium EDTA, monoethanolamine gentisate, sodium formaldehyde sulfoxylate, sodium bisulfite, and the like.

The following pemetrexed-related degradants or impurities have been observed:

- 1) "Pemetrexed Impurity 7," having a chemical name 4-[2-(2-amino-4-oxo-4,7-dihydro-3H-pyrrolo [2, 3-d] pyrimidin-5-yl)-ethyl]-benzoic acid, and represented by structural formula II.



- 2) "Pemetrexed Impurity 8," having a chemical name N-4-[2(2-amino-4,7-dihydro-4-oxo-1H-pyrrolo [2,3-d] pyrimidin-5-yl) ethyl] benzoyl-L-glutamic acid

La prise en charge des patients atteints de cancer fait intervenir le pharmacien hospitalier dans la préparation des médicaments anticancéreux injectables. Afin de limiter les coûts de cette prise en charge médicamenteuse, une des alternatives consiste à optimiser leur préparation en prenant en compte la stabilité physico-chimique des anticancéreux : 1-en utilisant les reliquats générés lors de la préparation. 2- en évaluant la possibilité de fabriquer à l'avance les préparations d'anticancéreux. L'absence de données de stabilité de ces médicaments nous a conduits à l'évaluer sur le pemetrexed et le methotrexate afin de répondre à cette double problématique et d'étudier le gain de coût associé.

Nous avons démontré, au cours de ce travail, la stabilité des reliquats de pemetrexed-Alimta[®] pendant 14 jours permettant ainsi leur réutilisation. Nous avons également montré la stabilité de solutions de méthotrexate conditionnées en seringues pendant 28 jours.

Une des conséquences de ces études est la réalisation d'économie pour la sécurité sociale par l'optimisation de la gestion des reliquats d'anticancéreux. Cette économie représente environ 10 % du budget annuel des anticancéreux injectables soit 750 k€.

Nous avons montré au cours de ce travail l'apport de la chimie analytique et organique ainsi que l'apport de la pharmacie dans la mise en place et l'exploitation des études de stabilité sur les médicaments anticancéreux injectables.

Hospital pharmacists are involved in the management of cancer patients through preparation of intravenous anticancer drugs. To limit the costs of the chemotherapies, an alternative is to optimize their preparation by considering the physicochemical stability of anticancer drugs. This can be done by using the leftovers generated during the preparation and by preparing in advance the devices to be used for administration. The lack of data on the stability of anticancer drugs has led us to evaluate pemetrexed and methotrexate with the aim of answering both the above issues. In parallel, we studied the associated cost savings.

In this thesis, we have demonstrated the stability of leftovers of pemetrexed-Alimta[®] for 14 days allowing their use for subsequent preparations. We also showed the stability of solutions of methotrexate packaged in syringes for 28 days.

One consequence of these studies is its translation in cost-savings for our Healthcare Funding Organization by managing leftover anticancer drugs. These cost-savings (about 750 k€) represent about 10 % of the total annual expenditure of anticancer drugs. Our work illustrates the contribution of analytical and organic chemistry and the role pharmacists can have in improving costs by performing stability studies of anticancer drugs.

Mots-clés : Anticancéreux injectables, stabilité physico-chimique, CLHP, économies, pemetrexed, methotrexate, pharmacie hospitalière.