



HAL
open science

Etude de stabilité d'une suspension d'Azacitidine à 25mg/mL en seringues de polypropylène après congélation à -20°C. Application à la production en Unité de Reconstitution Centralisée des Cytotoxiques.

Audrey Duriez

► **To cite this version:**

Audrey Duriez. Etude de stabilité d'une suspension d'Azacitidine à 25mg/mL en seringues de polypropylène après congélation à -20°C. Application à la production en Unité de Reconstitution Centralisée des Cytotoxiques.. Sciences pharmaceutiques. 2010. hal-01732717

HAL Id: hal-01732717

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732717>

Submitted on 14 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I

2010

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES de
PHARMACIE HOSPITALIERE et des
COLLECTIVITES

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 1^{er} octobre 2010

Par Melle DURIEZ Audrey
née le 12 février 1981

Conformément aux dispositions de l'arrêté

du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

Titre

Etude de stabilité d'une suspension d'azacitidine à 25 mg/mL
en seringues de polypropylène après congélation à -20°C
Application à la production en Unité de Reconstitution Centralisée des
Cytotoxiques

Membres du Jury

Président : M. GIBAUD Stéphane

Maître de Conférences, Université Henri Poincaré – Nancy 1

Directeur de thèse : M. VIGNERON Jean

Praticien Hospitalier, CHU Nancy

Juges : Mme NOIREZ Véronique

Praticien Hospitalier, CHR Metz-Thionville

M. FAGNONI Philippe

Maître de Conférences, Université de Bourgogne - Dijon

UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2009-2010

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Mobilité ERASMUS et Communication

Francine KEDZIEREWICZ

Hygiène Sécurité

Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine :

Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD,
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement :
Pharmaceutique Hospitalier**

Jean-Michel SIMON

DOYEN HONORAIRE

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Marie-Madeleine GALTEAU

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES
HONORAIRES**

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANT HONORAIRE

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

Gilles AULAGNER	Pharmacie clinique
Alain BAGREL	Biochimie
Jean-Claude BLOCK	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL.....	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Christophe GANTZER	Microbiologie environnementale
Max HENRY	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD	Pharmacologie cardiovasculaire
Dominique LAURAIN-MATTAR	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	Biochimie
Pierre LEROY	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	Chimie thérapeutique
Patrick MENU	Physiologie
Jean-Louis MERLIN.....	Biologie cellulaire oncologique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	Biochimie, Biologie moléculaire
Jean-Michel SIMON	Economie de la santé, législation pharmaceutique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	Parasitologie
Mariette BEAUD	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	Communication et santé
Isabelle BERTRAND	Microbiologie environnementale
Michel BOISBRUN	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	Chimie Physique
Cédric BOURA.....	Physiologie
Jean-Claude CHEVIN	Chimie générale et minérale
Igor CLAROT	Chimie analytique
Joël COULON	Biochimie
Sébastien DADE.....	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	Chimie analytique
Béatrice DEMORE.....	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Florence DUMARCAY.....	Chimie thérapeutique
François DUPUIS.....	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	Hématologie - Génie Biologique
Adel FAIZ.....	Biophysique-acoustique
Luc FERRARI	Toxicologie
Stéphane GIBAUD	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	Chimie organique
Frédéric JORAND	Santé et environnement

FACULTÉ DE PHARMACIE**PRÉSENTATION**

Olivier JOUBERT	Toxicologie, sécurité sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	Hématologie biologique
Christophe MERLIN	Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU	Pharmacognosie
Maxime MOURER	Pharmacochimie supramoléculaire
Francine PAULUS	Informatique
Christine PERDICAKIS	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	Pharmacologie
Virginie PICHON	Biophysique
Anne SAPIN.....	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY	Santé publique
Gabriel TROCKLE	Pharmacologie
Marie-Noëlle VAULTIER.....	Biodiversité végétale et fongique
Mohamed ZAIYOU	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER

Sémiologie

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD

Anglais

**Bibliothèque Universitaire Santé - Lionnois
(Pharmacie - Odontologie)**

Anne-Pascale PARRET

Directeur

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

Ɖ' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

Ɖ'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

Ɖe ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

A mon président de thèse

*Monsieur GIBAUD Stéphane
Maître de Conférences de pharmacie clinique à
la faculté de pharmacie de Nancy*

Vous me faites l'honneur de présider cette thèse, je vous en remercie très sincèrement. Que cette thèse soit l'expression de toute ma reconnaissance à votre égard.

A mon directeur de thèse

*Monsieur VIGNERON Jean
Praticien Hospitalier dans le service Pharmacie
du CHU de Nancy*

Je vous remercie pour avoir accepté de diriger cette thèse et pour m'avoir guidé dans mes recherches. Je vous adresse ma plus profonde gratitude et mon plus grand respect.

A mes juges

*Monsieur FAGNONI Philippe,
Maître de Conférences de pharmacie clinique à
la faculté de pharmacie de Dijon*

Je vous adresse mes remerciements les plus sincères pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

*Madame NOIREZ Véronique,
Praticien Hospitalier dans le service Pharmacie
du CHR de Metz-Thionville*

Veillez trouver ici l'expression de mes plus vifs remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.

***A Monsieur ZENIER Hubert, Madame
SOBALAK Nathalie et Monsieur BLAISE
Franck,***

Pour votre aide, vos précieux conseils et votre
bonne humeur au sein du laboratoire de contrôle.

A Jean-Yves,

Pour ton amour, ta présence, et pour ta patience
pendant ces longs mois de rédaction.
Avec tout mon amour, pour que nous soyons
toujours heureux ensemble.

A ma mère,

Pour ton aide, ton soutien et tes encouragements
durant ces neuf années d'études de pharmacie.
Avec tout mon amour.

***A mon frère Thibaut, ma belle-sœur Janis, mon
filleul Noan,
A toute ma famille,***

Pour votre soutien et votre présence.
Pour la place que vous tenez tous dans mon cœur.

A mes amis du Nord et d'ailleurs,

Pour votre amitié.
Qu'elle reste toujours si sincère.

À la mémoire de mon père

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AR : Anémie Réfractaire

AREB : Anémie Réfractaire avec Excès de Blastos

ARN : Acide Ribo Nucléique

ARSC : Anémie Réfractaire avec Sidéroblastes en Couronne

ASMR : Amélioration du Service Médical Rendu

ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation

AUC : Aire sous la Courbe

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CRDM : Cytopénie Réfractaire avec Dysplasie Multilignée

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

DNMT : ADN Méthyl Transférase

EMA : Agence Européenne du Médicament

HAS : Haute Autorité de Santé

HCl : acide chlorhydrique

IPSS : International Prognostic Scoring System

LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde

LMMC : Leucémie Myélomonocytaire Chronique

NaOH : hydroxyde de sodium

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PDg : Produit de Dégradation

RCP : Résumé des Caractéristiques du Produit

RR : Rétention Relative

SC : Sous-Cutané

SMD : Syndrome Myélodysplasique

SMR : Service Médical Rendu

URCC : Unité de Reconstitution Centralisée des Cytotoxiques

Introduction

Depuis quelques années, l'azacitidine est administrée chez les patients ne pouvant pas prétendre à une greffe de cellules souches hématopoïétiques et présentant un syndrome myélodysplasique, une leucémie myélomonocytaire chronique ou une leucémie aiguë myéloblastique avec des pourcentages de blastes médullaires bien définis. La reconstitution d'un flacon de 100 mg de Vidaza® avec 4 mL d'eau pour préparations injectables permet d'obtenir une suspension d'azacitidine à 25 mg/mL. La stabilité de la suspension d'azacitidine donnée par le laboratoire est de 45 minutes à température ambiante et de 8 heures conservée entre 2°C et 8°C. La stabilité courte de l'azacitidine oblige le pharmacien hospitalier à mobiliser du personnel pharmaceutique pour la préparation des seringues le week-end ou les jours fériés. De plus, étant donné que Vidaza® est un produit très coûteux, la préparation implique d'éviter au maximum la perte de suspension.

Les différentes données bibliographiques ne permettent pas d'allonger la durée de stabilité. En effet, les concentrations étudiées ne sont pas équivalentes à celle de notre étude et elles étaient destinées à une administration en perfusion intraveineuse, alors que l'azacitidine est administré par voie sous-cutanée à l'heure actuelle. Cependant, l'une d'entre elles étudiait la stabilité de l'azacitidine après congélation, ce qui nous prouve la possibilité de ce mode de conservation.

La stabilité de l'azacitidine a été étudiée à une concentration de 25 mg/mL après congélation à -20°C. Nous avons évalué les variations de la concentration d'azacitidine d'une part, et du pourcentage de produits de dégradation d'autre part. Le but de cette étude est de régler le problème de la préparation des seringues d'azacitidine le week-end et de faire d'avantage d'économies de flacons de Vidaza®.

Première partie : L'azacitidine : monographie et modalités d'utilisation au CHU de Nancy

I L'azacitidine

I-1. Présentation de la molécule

L'azacitidine est une molécule qui a pour formule brute $C_8H_{12}N_4O_5$. D'un poids moléculaire de 244 Da, son nom chimique est 4-amino-1-β-D-ribofuranosyl-1,3,5-triazin-2(1H)-one [1] et sa formule développée est représentée sur la figure 1.

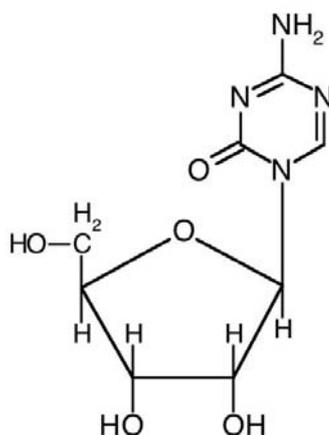


Figure 1 : Schéma de la molécule d'azacitidine

L'azacitidine est commercialisée sous le nom Vidaza®. Cette spécialité est présentée en flacons en verre blanc. Entrent dans sa composition 100 mg d'azacitidine et un seul excipient, le mannitol. Vidaza® se présente sous la forme d'une poudre blanche lyophilisée pour suspension injectable.

I-2. Indications thérapeutiques

Le traitement par l'azacitidine est réservé aux patients adultes non éligibles pour une transplantation de cellules souches hématopoïétiques.

Les indications relevées dans la littérature sont précises [2-6] et concernent les patients présentant 3 pathologies distinctes.

I-2.1. Syndrome myélodysplasique de risque intermédiaire-2 ou élevé selon l'index pronostique international

L'azacitidine est indiquée dans les syndromes myélodysplasiques (SMD) de mauvais pronostic, soit de risque intermédiaire-2 ou élevé selon l'index pronostique international (IPSS).

Le niveau de risque est déterminé grâce à 3 paramètres : le pourcentage de blastes dans la moelle osseuse, l'étude cytogénétique et le nombre de cytopénies, définis dans le tableau I [7].

Selon le score total obtenu par la somme des 3 paramètres, on distingue les patients :

- à faible risque : score 0
- à risque intermédiaire 1 : score 0,5 à 1
- à risque intermédiaire 2 : score 1,5 à 2
- à haut risque : score 2.

Tableau I : International Prognostic Scoring System dans les syndromes myélodysplasiques

Paramètres	Critères	Score
Blastose médullaire	< 5 %	0
	5-10 %	0,5
	11-20 %	1,5
	21-30 %	2
Caryotype	<i>Favorable</i> : normal, del 5q, del 20q, -Y comme anomalie isolée	0
	<i>Intermédiaire</i> : toutes les autres anomalies	0,5
	<i>Défavorable</i> : -7, +8, anomalies complexes (3 anomalies au moins)	1
Nombre de cytopénies - neutrophiles < 1500/mm ³ - hémoglobine < 10 g/dL - plaquettes < 100 000/mm ³	0 ou 1	0
	2 ou 3	0,5

Différenciés anciennement selon la classification FAB [8], les syndromes myélodysplasiques sont désormais classés selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [9] représentée dans le tableau II. Cette classification prend en compte le nombre de lignées dysplasiques, et différents niveaux de prolifération de blastes.

Tableau II : Classification OMS des syndromes myélodysplasiques

SMD	Sang	Moelle osseuse
Anémie réfractaire (AR)	<ul style="list-style-type: none"> • Anémie • Pas ou peu de blastes (< 1%) 	<ul style="list-style-type: none"> • Dysplasie érythroïde isolée • < 5% de blastes • < 15% de sidéroblastes en couronne
Anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne (ARSC)	<ul style="list-style-type: none"> • Anémie • Pas de blastes 	<ul style="list-style-type: none"> • Dysplasie érythroïde isolée • < 5% de blastes • ≥ 15% de sidéroblastes en couronne
Cytopénie réfractaire avec dysplasie multilignée (CRDM)	<ul style="list-style-type: none"> • Cytopénies (2 ou 3) • Pas ou peu de blastes (< 1%) • Pas de corps de Auer • < 1x10⁹ monocytes/L 	<ul style="list-style-type: none"> • Dysplasie concernant ≥ 10% des cellules de 2 ou + lignées cellulaires myéloïdes • < 5% de blastes • Pas de corps de Auer • ± 15% de sidéroblastes en couronne
Anémie réfractaire avec excès de blastes 1 (AREB-1)	<ul style="list-style-type: none"> • Cytopénies (2 ou 3) • < 5% de blastes • Pas de corps de Auer • < 1x10⁹ monocytes/L 	<ul style="list-style-type: none"> • Dysplasie uni ou multilignée • 5-9% de blastes • Pas de corps de Auer
Anémie réfractaire avec excès de blastes 2 (AREB-2)	<ul style="list-style-type: none"> • Cytopénie • 5-19% de blastes • ± corps de Auer • < 1x10⁹ monocytes/L 	<ul style="list-style-type: none"> • Dysplasie uni ou multilignée • 10-19% de blastes • ± corps de Auer
SMD inclassables	<ul style="list-style-type: none"> • Cytopénie • < 1% de blastes 	<ul style="list-style-type: none"> • Dysplasie concernant < 10% des cellules de 2 ou + lignées cellulaires myéloïdes accompagnée d'une anomalie cytogénétique considérée comme une preuve diagnostique de SMD • < 5% de blastes
SMD avec une anomalie del 5q isolée	<ul style="list-style-type: none"> • Anémie • Nombre de plaquettes généralement normal ou élevé • Pas ou peu de blastes (< 1%) 	<ul style="list-style-type: none"> • Nombre de mégacaryocytes hypolobés normal ou élevé • < 5% de blastes • Anomalie cytogénétique isolée : 5q- • Pas de corps de Auer

Les syndromes myélodysplasiques ont pour complication fréquente la capacité de se transformer en leucémie aiguë myéloblastique.

I-2.2. Leucémie myélomonocytaire chronique avec 10 à 29 % de blastes médullaires sans syndrome myéloprolifératif

Selon les classifications, la leucémie myélomonocytaire chronique fait partie ou non des syndromes myélodysplasiques. En effet, elle est classée dans les syndromes myélodysplasiques dans la classification FAB, alors qu'elle est attribuée aux syndromes myéloprolifératifs dans la classification OMS.

I-2.3. Leucémie aiguë myéloblastique avec 20 à 30 % de blastes et dysplasie de lignées multiples, selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé

La leucémie aiguë myéloïde est le type de leucémie aiguë le plus fréquent chez l'adulte.

I-2.4. Place occupée par l'azacitidine dans la stratégie thérapeutique

Le seul traitement connu de ces maladies, permettant d'obtenir une rémission prolongée dans environ 1 cas sur 2 en moyenne, est un traitement lourd utilisable pour une minorité de malades : l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.

Chez les malades présentant un syndrome myélodysplasique de haut risque non candidats à une allogreffe, les traitements conventionnels comportent soit des traitements de support seuls (transfusions, facteurs de croissance hématopoïétiques), soit la cytarabine à faible dose, soit la chimiothérapie intensive comprenant de la cytarabine associée à d'autres médicaments cytotoxiques. Plusieurs études [10-12] ont montré que le traitement par l'azacitidine augmente la durée de survie de plusieurs mois chez ces patients : par exemple 24,5 mois versus 15 mois [13].

De même, l'azacitidine est utilisée pour traiter les leucémies aiguës myéloïdes de mauvais pronostic. Cependant, son association à d'autres agents cytotoxiques permet d'obtenir de meilleurs résultats en terme de rémission complète que son utilisation seule [14].

Pour les patients non éligibles à une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, l'azacitidine associée aux traitements symptomatiques est donc une option de traitement d'un grand intérêt. Mais ce n'est pas un traitement curatif, le seul étant l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.

I-3. Posologie

Chez tous les patients, la dose initiale recommandée pour le premier cycle de traitement est de 75 mg/m² de surface corporelle. L'administration est effectuée par injection sous-cutanée (SC). Le rythme d'administration est quotidien pendant 7 jours, puis suivi d'une période de repos de 21 jours. Un cycle de traitement a une durée totale de 28 jours. [15]

Il est recommandé d'administrer au patient un minimum de 6 cycles de traitement. Le traitement doit être poursuivi tant qu'il apporte des bénéfices au patient ou jusqu'à progression de la maladie.

A partir du deuxième cycle de traitement, la posologie peut être réduite de 33 % à 50 % de la dose initiale en fonction de la toxicité hématologique.

Chez les insuffisants rénaux, une étude a montré que l'utilisation de l'azacitidine est possible mais les doses doivent être ajustées en fonction des valeurs hématologiques sous peine d'une incidence accrue de la toxicité [16].

Chez les insuffisants hépatiques, l'utilisation est possible sous surveillance stricte des patients. Les ajustements posologiques se font sur la base des valeurs hématologiques. Ce médicament est contre-indiqué chez les patients atteints de tumeurs hépatiques malignes à un stade avancé, chez lesquels des rares cas de coma hépatique et de décès ont été signalés.

I-4. Modalités de reconstitution et d'administration

Chaque flacon de 100 mg d'azacitidine est reconstitué avec 4 mL d'eau pour préparations injectables pour obtenir une suspension contenant 25 mg/mL d'azacitidine. Le produit reconstitué se présente sous la forme d'une suspension trouble homogène dépourvue d'agglomérats. Sa stabilité est de 45 minutes lorsqu'il est conservé à température ambiante et de 8 heures conservé entre 2 et 8°C.

Etant donnée la nature cytotoxique de l'azacitidine, des précautions particulières doivent être employées lors de sa préparation conformément aux Bonnes Pratiques de Préparation [17]. Les procédures de manipulation et d'élimination propres aux médicaments anticancéreux doivent être respectées.

Le contenu de la seringue doit être remis en suspension immédiatement avant l'administration. Au préalable, si elle a été conservée au réfrigérateur, elle doit être laissée à température ambiante pendant 30 minutes avant l'administration jusqu'à ce qu'elle atteigne une température d'environ 20-25°C.

L'administration est effectuée par voie sous-cutanée en alternant les sites d'injection : le haut du bras, la cuisse ou l'abdomen ; et au moins à 2 cm du site précédent. Les doses supérieures à 4 mL sont injectées dans deux sites différents.

I-5. Propriétés pharmacologiques

I-5.1. Propriétés pharmacodynamiques

Le mécanisme d'action de l'azacitidine est partiellement connu et pas encore totalement élucidé [3,18-19]. Cette molécule agirait en partie comme une chimiothérapie et, en partie en réactivant certains gènes des cellules myélodysplasiques.

L'azacitidine exerce tout d'abord une activité cytotoxique. C'est un analogue nucléosidique, et plus particulièrement un analogue de la pyrimidine. Cette structure serait à l'origine de ses effets cytotoxiques qui résulteraient de :

- son incorporation dans l'Acide Ribo Nucléique (ARN) et l'Acide Désoxyribo Nucléique (ADN),
- l'inhibition de la synthèse de l'ADN, de l'ARN et de protéines,
- l'arrêt du cycle cellulaire et la mort cellulaire par activation des voies de dégradation de l'ADN.

La deuxième activité pharmacologique de l'azacitidine est l'inhibition de la méthylation de l'ADN, d'où son nom d'agent déméthylant.

L'expression des gènes de contrôle du cycle cellulaire est déclenchée par la fixation d'un complexe de facteurs de transcription au niveau des régions promotrices des gènes, pour la plupart composées d'îlots CpG qui sont des séquences dinucléotidiques. La méthylation aberrante d'îlots CpG par l'ADN méthyltransférase (DNMT) inhibe la transcription génique. La méthylation des îlots CpG entraîne une compaction de la chromatine qui bloque l'accès au complexe de facteurs de transcription. Plus le niveau de méthylation des îlots CpG présents dans les régions régulatrices d'un gène est élevé, plus le taux de transcription de ce gène sera faible.

L'incorporation de l'azacitidine dans l'ADN entraîne l'inactivation de DNMT par la création d'une liaison covalente avec l'enzyme, ce qui engendre une inhibition irréversible de ses fonctions enzymatiques. Ceci induit une hypométhylation de l'ADN des gènes présentant une méthylation aberrante et la restauration de l'expression des gènes impliqués dans la régulation, la différenciation et les voies de destruction du cycle cellulaire normal.

Les cellules non prolifératives sont relativement insensibles à l'azacitidine.

Les leucémies et myélodysplasies sont caractérisées par l'hyperméthylation de multiples gènes de contrôle du cycle cellulaire, gènes dont l'inactivation joue un rôle dans la progression de la maladie. Cette caractéristique explique l'intérêt de l'usage des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN dans la stratégie thérapeutique de ces hémopathies.

I-5.2. Propriétés pharmacocinétiques

L'azacitidine est rapidement absorbée suite à l'administration sous-cutanée. La concentration plasmatique atteint un pic 30 minutes après l'administration. La biodisponibilité absolue après injection sous-cutanée par rapport à l'intraveineuse est d'approximativement 89 % d'après l'aire sous la courbe.

Le volume de distribution est de 76 L et la clairance systémique de 147 L/h.

L'azacitidine est métabolisée par hydrolyse spontanée et par désamination par la cytidine désaminase.

L'élimination de l'azacitidine se fait principalement par voie urinaire et de façon rapide avec une demi-vie d'élimination de 41 minutes.

I-6. Effets indésirables

De nombreux effets indésirables sont décrits dans la littérature [3-5]. 97 % des patients traités par Vidaza® ont au moins ressenti un effet indésirable. Les principaux effets indésirables de l'azacitidine sont associés à une toxicité sur l'ADN des cellules à renouvellement rapide, telles que les cellules hématologiques et les cellules des muqueuses, notamment du tube digestif.

Ainsi, les troubles hématologiques sont les plus fréquents (71,4 %). Il s'agit de troubles de type anémie, neutropénie, leucopénie, thrombocytopénie. Ils peuvent être à l'origine de formes plus graves : neutropénies fébriles, septicémie sur neutropénie, pneumonies, ou hémorragies...

Pour la même raison, des troubles gastro-intestinaux sont également fréquemment décrits (60,6 %) en association avec un traitement par l'azacitidine : nausées, vomissements, douleurs abdominales, constipation et diarrhées.

Les évènements cutanés indésirables concernent principalement des réactions au site d'injection, observés chez 77,1 % des patients. Les troubles signalés sont de type éruption cutanée, inflammation, prurit, érythème, ecchymose ou induration.

Les autres effets indésirables ont été plus rarement observés, de l'ordre de 0,1 % à 10 %, et sont les suivants :

- troubles du système immunitaire : réactions d'hypersensibilité,
- troubles du système nerveux : vertiges, céphalées, léthargie,
- troubles psychiatriques : confusions, anxiété, insomnie,
- troubles musculo-squelettiques : arthralgie, myalgies,
- troubles généraux : fatigue, pyrexie, perte de poids...

I-7. Interactions médicamenteuses

L'azacitidine n'est pas métabolisée par les isoenzymes du cytochrome P450, les UDP-glucuronyl-transférases, les sulfotransférases et les glutathion transférases. Elle n'a donc pas d'effet inducteur ou inhibiteur connu sur ces isoenzymes. Cela laisse prévoir un faible risque d'interactions médicamenteuses.

Aucune étude formelle n'a été réalisée concernant les interactions médicamenteuses avec l'azacitidine.

I-8. Contre-indications

L'azacitidine est contre-indiquée dans trois situations :

- chez les patients présentant une hypersensibilité connue à l'azacitidine ou au mannitol,
- chez les patients souffrant de tumeurs hépatiques malignes à un stade avancé,
- chez les femmes qui allaitent.

L'azacitidine ne doit pas être utilisée chez l'enfant de moins de 18 ans en l'insuffisance de données concernant sa sécurité et son efficacité.

I-9. Conditions de prescriptions et de délivrance

L'azacitidine était un médicament sous Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU) nominative depuis 2004 puis sous ATU de cohorte. L'Agence Européenne du Médicament (EMA) a accordé l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) centralisée au Vidaza® le 17 décembre 2008. N'ayant plus lieu d'être, l'ATU a été arrêtée en date du 16 mars 2009.

En France, l'azacitidine a le statut de médicament orphelin [20]. Inscrit sur la liste I des substances vénéneuses, ce médicament est soumis à prescription hospitalière, la prescription étant réservée aux spécialistes en oncologie ou en hématologie ou aux médecins compétents en cancérologie [4].

Il a reçu l'agrément à l'usage des collectivités et divers services publics le 20 janvier 2009, et il est inscrit sur la liste des médicaments rétrocédables depuis le 17 février 2009. De plus, il est inscrit sur la liste des médicaments « hors GHS » facturés en sus de la Tarification à l'Activité.

Le service médical rendu par un médicament (SMR) correspond à son intérêt en fonction notamment de ses performances cliniques et de la gravité de la maladie traitée.

L'amélioration du service médical rendu (ASMR) correspond au progrès thérapeutique apporté par un médicament par rapport aux traitements existants. La Commission de la transparence de la Haute Autorité de Santé (HAS) évalue le niveau d'ASMR, cotée de I, majeure, à IV, mineure.

La Commission de la transparence de la HAS a accordé un SMR important pour Vidaza® et une ASMR importante de niveau II [4]. Vidaza® fait partie des 5 médicaments ayant obtenu l'ASMR de niveau II en 2009.

I-10. Méthodes de dosage dans la littérature

Il n'existe dans la littérature aucune étude de stabilité de la suspension d'azacitidine à la concentration de 25 mg/mL que nous souhaitons étudier. Cependant, plusieurs auteurs ont étudié la stabilité de l'azacitidine par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP).

Mais à la différence de la notre, les auteurs étudiaient des stabilités de solutions diluées de concentration allant de 0,2 à 2 mg/mL. De plus, l'azacitidine y était administrée en perfusion intraveineuse.

Cheung et al ont testé la stabilité de l'azacitidine dans 4 solvants de perfusion : NaCl 0,9 %, glucose 5 %, Ringer lactate, et Normosol-R à des concentrations de 0,2 et 2 mg/mL à 25°C [21]. La phase mobile était composée d'un tampon phosphate 0,01M pH 6, le débit d'élution était de 2 mL/min, et la détection du signal était réalisée à 254 nm. Une perte de 10 % de la concentration initiale d'azacitidine a été observée de 0,7 heures à 3 heures, résultat comparativement semblable à une autre étude qui retrouvait cette perte en 2 à 3 heures à température ambiante dans du Ringer lactate [22]. Dans tous les solvants de perfusion, l'azacitidine était plus stable à une concentration de 2 mg/mL qu'à une plus faible concentration.

L'étude de Den Harting et al [23] a testé la stabilité de l'azacitidine diluée dans du Ringer lactate. La stabilité a été étudiée à des concentrations de 0,5 et 2 mg/mL à 37°C, 20°C, 0-4°C et -20°C. La colonne utilisée était en phase inverse avec une longueur de 100 mm et un diamètre interne de 3 mm, la phase mobile était un tampon phosphate 0,01M pH 6,5, le débit d'élution de 0,4 mL/min, et la détection à une longueur d'onde de 240 nm. L'étude a montré la stabilité de l'azacitidine reconstituée avec du Ringer lactate au moins deux semaines après congélation à -20°C en seringues de polypropylène, mais surtout elle démontre que la congélation est possible pour notre étude.

De plus faibles concentrations d'azacitidine peuvent être dosées notamment pour réaliser des études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Ainsi, Zhao et al [24] ont validé une méthode associant la CLHP à la spectrométrie de masse dont la limite de quantification de l'azacitidine est de 5 ng/mL.

II Pratiques d'utilisation de l'azacitidine au Centre Hospitalier Universitaire de Nancy

L'étude des pratiques d'utilisation de l'azacitidine a été réalisée en deux temps : par l'étude des prescriptions des patients suivant ce traitement et par l'étude des consommations de Vidaza®. La période d'étude sélectionnée est identique pour les 2 études : elle débute à partir de l'obtention de l'AMM du Vidaza® et s'étend donc du 1^{er} janvier 2009 au 15 juillet 2010.

II-1. Etude des prescriptions des patients traités par l'azacitidine

Le recensement des patients a été effectué à partir des sorties nominatives du Vidaza® sur le logiciel PHARMA® sur l'ensemble du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nancy. Pour chaque patient, les données recueillies ont été l'indication thérapeutique, la posologie prescrite et le nombre d'injections par jour.

Pendant la période sélectionnée, une liste de 25 patients traités par Vidaza® a été établie. On distingue 16 hommes (64 %) pour 9 femmes (36 %), soit un sexe ratio de 1,8/1.

La moyenne d'âge est de 67,5 ans. Les 25 patients ont un âge compris entre 28 ans et 84 ans, dont 22 sont âgés d'au moins 60 ans.

Les patients sont répartis au sein de deux services principaux : 23 patients dans le Service d'Hématologie et médecine interne, et 2 patients dans le Secteur de Transplantations Médullaires.

L'azacitidine est utilisée pour la prise en charge thérapeutique de :

- syndromes myélodysplasiques (SMD) pour 11 patients (44 %),
- leucémies aiguës myéloïdes (LAM) pour 13 patients (52 %),
- évolution pré-leucémique d'une splénomégalie myéloïde pour 1 patient (4 %).

Aucun patient n'est traité pour une leucémie myélomonocytaire chronique, autre indication de l'AMM.

De plus, parmi les 13 patients atteints de LAM, la leucémie est secondaire à un SMD pour 6 patients (46 % des cas). Donc 17 patients sur 25 reçoivent l'azacitidine pour un diagnostic initial de SMD.

Parmi les 11 patients atteints de SMD sans évolution leucémique, la répartition des différents types de SMD selon la classification OMS [22] est présentée sur la figure 2.

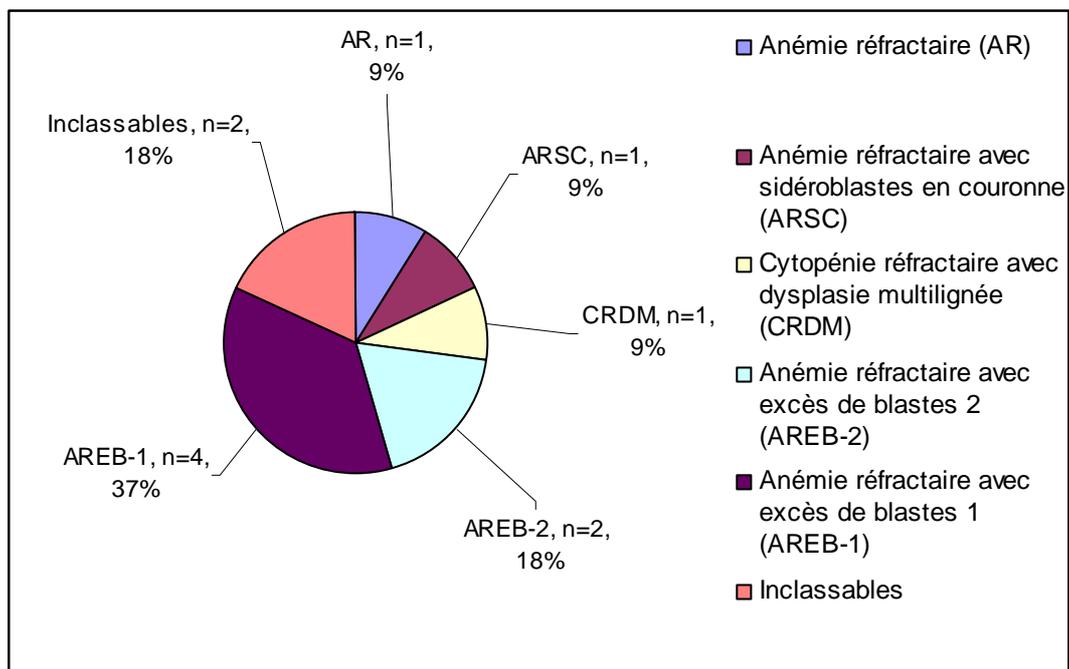


Figure 2 : Répartition des patients traités pour syndrome myélodysplasique en fonction des différents types selon la classification OMS

La surface corporelle des patients s'étend de 1,41 à 2,13 m² avec une moyenne de 1,78 m².

L'étude des posologies montre que 24 patients (96 %) sont traités avec une posologie de 75 mg/m² d'azacitidine 7 jours consécutifs. La posologie a dû être réduite à 40 mg/m² pendant 5 jours sur 7 pour un patient.

Pour tous les patients, la dose quotidienne d'azacitidine est administrée en deux injections SC par jour. La figure 3 représente les doses unitaires administrées au patient et leurs volumes correspondants exprimés par tranches égales.

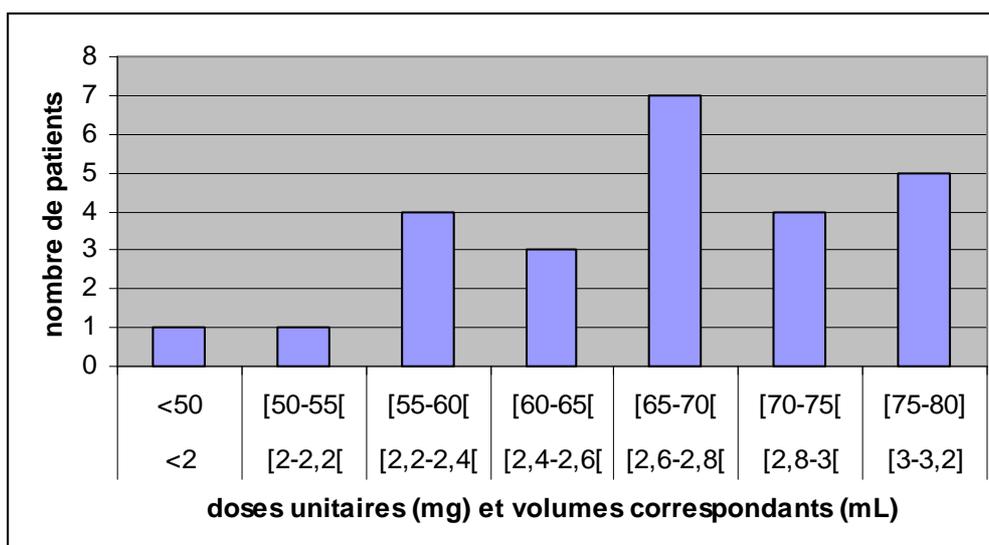


Figure 3 : Répartition du nombre de patients par tranche de dose unitaire et de volume correspondant

Les seringues d'azacitidine dispensées ont majoritairement un volume compris entre 2,6 et 3,2 mL. Cependant, elles ne représentent qu'une dose unitaire : la dose quotidienne est doublée. Le volume nécessaire pour la posologie quotidienne est donc supérieur à 4 mL pour 24 patients. L'administration est toujours réalisée en deux injections en deux sites différents conformément au Résumé des Caractéristiques du Produit (RCP).

II-2. Etude des consommations de Vidaza®

Les consommations de Vidaza® ont été extraites à partir du logiciel PHARMA®.

Dans un premier temps, nous avons étudié les consommations mensuelles pendant la période d'étude sélectionnée qui sont exposées sur la figure 4.

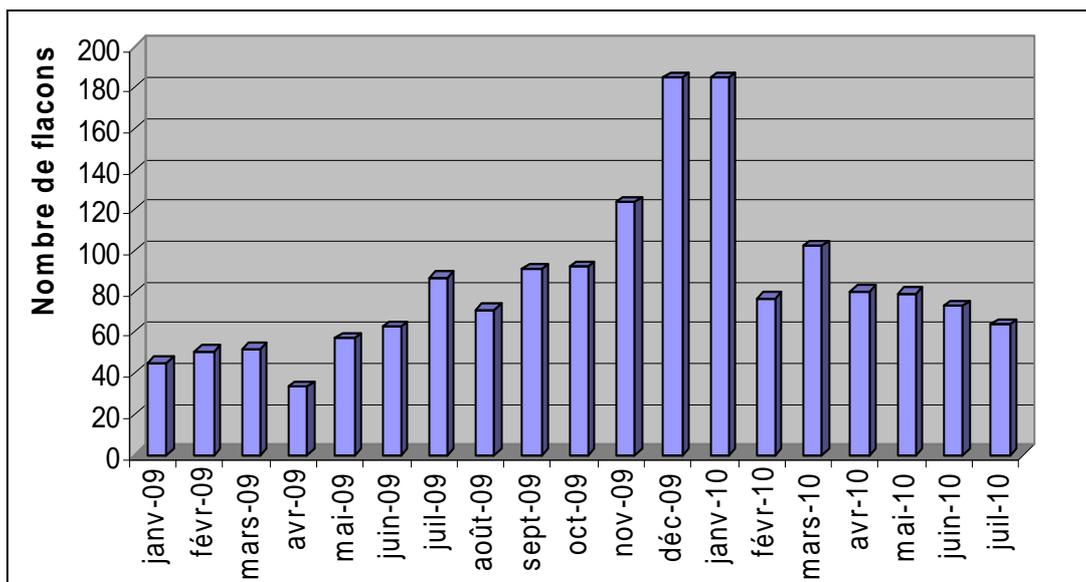


Figure 4 : Consommations mensuelles de Vidaza® en 2009 et 2010

Nous observons une augmentation régulière de la consommation de Vidaza® en une année, de janvier 2009 jusqu'à un pic en janvier 2010. Puis elle diminue et reste à un niveau stable de février à juin 2010. Le mois de juillet ne prend en compte que la consommation sur les 15 premiers jours.

La deuxième partie de l'étude des consommations de Vidaza® a consisté à dénombrer les flacons utilisés par jour de traitement pendant la période d'étude sélectionnée pour chaque patient traité. Les données ont été recueillies sur le logiciel PHARMA® : elles concernent pour chaque patient le nombre de jours de traitement et le nombre total de flacons utilisés. A partir de ces données, le nombre de flacons utilisés par jour de traitement a été calculé. Les résultats sont présentés dans le tableau III.

Tableau III : Nombre de flacons de Vidaza® utilisés par patient et par jour de traitement

	<i>Nombre de flacons utilisés par patient</i>	<i>Nombre de jours de traitement par patient</i>	<i>Nombre de flacons par jour de traitement</i>
<i>Total</i>	1468	825	-
<i>Minimum</i>	10	7	1
<i>Maximum</i>	220	128	2
<i>Moyenne</i>	58,72	33	1,78
<i>Ecart-type</i>	52,83	28,87	0,25

L'azacitidine est administrée en deux injections SC par jour à la posologie de 75 mg/m². En théorie, deux flacons de Vidaza® sont utilisés pour la préparation des seringues par jour de traitement. Cependant, l'étude des consommations montre que 1,78 +/- 0,25 flacons sont utilisés en moyenne par jour de traitement, avec un nombre de flacons utilisés variant de 1 à 2 par jour de traitement.

Ce chiffre est inférieur au nombre théorique de 2 flacons par jour de traitement. Cela peut être expliqué par des économies de volume réalisées pour la fabrication de plusieurs seringues. Le volume restant du flacon est réutilisé pour un même patient ou plusieurs patients.

Cependant, ces économies de volume sont limitées par la durée de stabilité courte de la suspension d'azacitidine donnée par le laboratoire. Elles pourraient encore être plus importantes si des données de stabilité sur une période plus étendue étaient connues. Les différentes données bibliographiques ne permettent pas d'allonger la durée de stabilité [21-24]. En effet, les concentrations étudiées s'étendaient de 0,2 à 2 mg/mL et sont très inférieures à la concentration de 25 mg/mL que nous souhaitons étudier. De plus, la littérature décrit la stabilité de l'azacitidine pour une administration en perfusion intraveineuse, alors que l'azacitidine est administrée par voie sous-cutanée à l'heure actuelle. Cependant, Den Harting et al nous démontrent la possibilité de la congélation de l'azacitidine en étudiant sa stabilité après ce moyen de conservation [23]. Nous avons donc souhaité étudier la stabilité de l'azacitidine à 25 mg/mL après congélation à -20°C.

Deuxième partie : Etude de stabilité de l'azacitidine à 25 mg/mL **après congélation à -20°C**

I Objectif de l'étude

Le RCP mentionne une stabilité de l'azacitidine après sa reconstitution de 45 minutes à température ambiante et de 8 heures au réfrigérateur. L'administration ayant lieu 7 jours consécutifs, les patients reçoivent leurs injections du samedi et du dimanche en hospitalisation de jour. Cependant, la faible durée de stabilité rend impossible la préparation des seringues d'azacitidine en avance à la pharmacie. L'organisation retenue au CHU de Nancy est de mobiliser du personnel pharmaceutique pour réaliser ces préparations le week-end ou de donner des kits de préparation avec système sécurisé pour les infirmières si la préparation pharmaceutique est impossible.

L'objectif de cette étude est de rechercher des données de stabilité sur une période plus étendue que celle mentionnée par le laboratoire. La stabilité de la suspension d'azacitidine à 25 mg/mL conditionnée en seringues de polypropylène a été étudiée après leur congélation à une température de -20°C par Chromatographie Liquide Haute Performance. Un cycle de traitement ayant une durée de 7 jours consécutifs, nous avons choisi de tester la stabilité sur une durée de 8 jours.

Si la suspension d'azacitidine s'avérait stable, la préparation des seringues pourrait être réalisée d'avance et donc suspendue pendant le week-end. D'autre part, des économies potentielles pourraient être faites durant la semaine sur le nombre de flacons de Vidaza® utilisés.

II Matériel et méthodes

II-1. Appareillage

L'appareil pour chromatographie liquide haute performance Spectrasystem Spectra Physics Analytical associait une pompe P2000, un injecteur automatique AS3000, un détecteur UV2000 et une interface SN4000 qui met en relation la pompe, l'injecteur et le détecteur avec le logiciel d'acquisition et de traitement des données ChromQuest. La détection du signal se fait en spectrophotométrie UV-visible.

Pour être analysés, les échantillons étaient introduits dans des flacons teintés pour CLHP ThermoFinnigan, 1,8ml, 12 x 32mm avec des bouchons à vis pour CLHP ThermoQuest.

L'eau ultrapure était obtenue avec le purificateur d'eau Purelab ultra.

Les poudres étaient pesées avec la balance Mettler Toledo AG 204.

Le pH était mesuré avec le pH-mètre Bioblock Scientific relié à deux électrodes combinées Fischer Scientific.

La phase mobile était filtrée sur des filtres de nitrocellulose 0,22 µm Millipore (lot R8NN30701) avec un Büchner.

Les réactifs volatiles étaient manipulés sous hotte aspirante.

En raison de la nature cytotoxique de l'azacitidine, les manipulations comprenant l'azacitidine ont été effectuées sous une hotte à flux d'air laminaire vertical munie d'une évacuation vers l'extérieur conformément aux Bonnes Pratiques de Préparation [17]. Le manipulateur portait les protections nécessaires : blouse à usage unique stérile, masque, charlotte et deux paires de gants stériles. De plus, le matériel de laboratoire utilisé à cet effet était à usage unique.

II-2. Réactifs, principes actifs et solvants

Tous les réactifs utilisés étaient de qualité analytique ou pour chromatographie :

- Dihydrogénophosphate de sodium lot 7C226277D per 03/2013,
laboratoire Carlo Erba Reactifs SA,
- Hydrogénophosphate de sodium lot 7G115317H per 07/2013,
laboratoire Carlo Erba Reactifs SA,
- Hydroxyde de sodium 1N lot 100114,
- Acide chlorhydrique 1N lot 100131,
- Uracile lot 027K0719,
laboratoire Sigma-Aldrich,
- Uridine lot 067K11031,
laboratoire Sigma-Aldrich,
- Nitrate de sodium lot 0508594 per 08/12/2010,
laboratoire VWR International,
- Diméthylsulfoxyde lot 075180531 per 10/2012,
laboratoire VWR International,
- Vidaza® 100 mg lots 0900837 per 02/2011, 8K027AA per 10/2012, 8L029AA
per 11/2012, 1599061A per 01/2013, 9C043AA per 02/2013,
laboratoire Celgene,
- Mannitol lot 09L040010 per 10/2014,
laboratoire VWR International,
- Eau pour préparations injectables PROAMP 5 mL lot 0900837 per 02/2011,
laboratoire Aguettant,
- Acétonitrile lot I462530847 per 30/11/2011,
laboratoire Merck.

III Validation de la méthode

III-1. Méthode de dosage

III-1.1. Choix de la méthode de dosage

Aucune méthode de dosage de l'azacitidine n'est mentionnée à la Pharmacopée Européenne [25]. Elle a donc été choisie à partir des données retrouvées dans la littérature.

La méthode de dosage a été adaptée de la méthode de Den Harting et al [23]. Dans cette étude, la colonne utilisée avait une longueur de 100 mm pour un diamètre interne de 3 mm. Nous avons à notre disposition une colonne différente d'une longueur de 150 mm et d'un diamètre interne de 4,6 mm, ce qui nous a amené à adapter le protocole. Les modifications portent sur :

- le débit d'élution initialement prévu à 0,4 mL/min, porté à 2 mL/min de manière à obtenir des grandeurs chromatographiques acceptables,
- le volume d'injection qui passe de 10 μ L à 20 μ L,
- la longueur d'onde de détection qui passe de 240 nm à 200 nm, dont l'explication de sa détermination est détaillée dans le paragraphe suivant.

III-1.2. Détermination de la longueur d'onde de détection

La longueur d'onde de détection a été déterminée par spectrophotométrie UV. Le spectre UV d'une solution d'azacitidine à 100 μ g/mL, présenté sur la figure 5, a montré deux pics d'absorption à 202 et 242 nm.

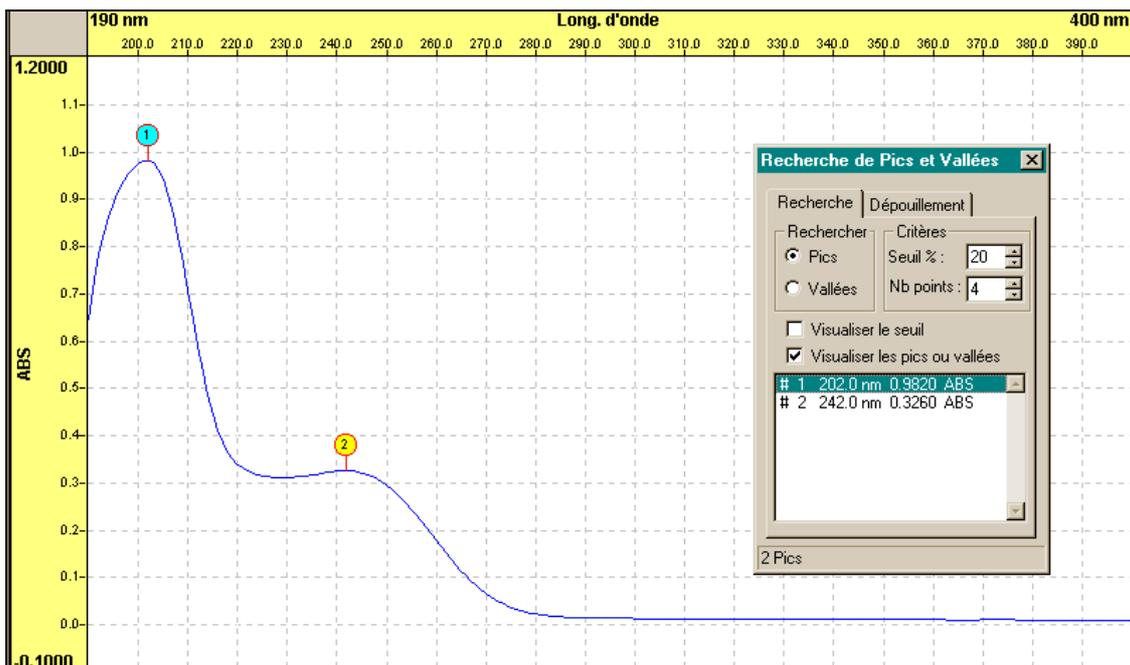


Figure 5 : Spectre d'absorption UV d'une solution d'azacitidine à 100 µg/mL

Après un essai en double longueur d'onde à 200 et 240 nm dans le système chromatographique, nous avons observé que les produits de dégradation de l'azacitidine étaient plus nombreux à 200 nm. Donc la longueur d'onde de détection retenue pour l'étude a été de 200 nm.

III-1.3. Conditions chromatographiques

La colonne, représentant la phase stationnaire, utilisée pour cette étude est la référence UP50DB-15QS du laboratoire Interchim, numéro de série 8301102. D'une longueur de 15 cm, d'un diamètre intérieur de 4,6 mm et d'une porosité de 120 angstroms, elle est constituée d'une silice greffée en C18 composée de particules de 5 microns.

La phase mobile est un tampon phosphate à 10 mMol de pH égal à 6,5. Elle se compose de 1154,8 mg de dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4 , H_2O) et de 584,48 mg d'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4 , $12\text{H}_2\text{O}$), le volume est ensuite amené à 1000 mL avec de l'eau ultrapure.

Le pH est ensuite ajusté à 6,5 avec de l'hydroxyde de sodium 1N.

Avant l'analyse, la phase mobile subit une phase de dégazage à l'hélium pendant 5 minutes.

Le débit d'élution est de 2 mL/min.

Le volume de la boucle d'injection est de 20 μ L.

La détection du signal est réalisée à une longueur d'onde de 200 nm.

L'étude est effectuée en régime isocratique, à température ambiante pendant 8 minutes.

Avant chaque série d'analyse, la colonne était équilibrée avec la phase mobile pendant 60 minutes. Puis un contrôle de la ligne de base était effectué avant de débiter l'analyse.

De même, un contrôle de la pression dans la colonne et de la température était effectué pour s'assurer d'être dans les mêmes conditions pour chaque série d'analyse.

Après l'analyse, la colonne était reconditionnée sous un mélange acétonitrile (70%) / eau (30%) selon les instructions du fabricant.

III-1.4. Détermination du volume mort

Le volume mort a été déterminé à l'aide d'une solution de nitrate de sodium. Un millilitre d'une solution de nitrate de sodium à 40 mg/L a été mélangé à 1 mL d'une solution d'azacitidine à 400 μ g/mL et 2 mL d'eau ultrapure avant d'être analysé.

III-2. Grandeurs chromatographiques

Les performances des colonnes sont exprimées en fonction de deux paramètres fondamentaux : l'efficacité et la sélectivité.

III-2.1. Efficacité

L'efficacité de la colonne exprime la finesse des pics des composés sortant de la colonne. Elle s'exprime en nombre de plateaux théoriques N, chiffre calculé selon l'équation :

$$N = 16 (t_R / \omega)^2 = 5,54 (t_R / \omega_{0,5})^2$$

t_R : temps de rétention du soluté mesuré à partir de l'injection

ω : largeur du pic à la base

$\omega_{0,5}$: largeur du pic à mi-hauteur

III-2.2. Facteur de symétrie

Dans des conditions thermodynamiques optimales, les pics devraient être des gaussiennes symétriques. En pratique, ce n'est pas souvent le cas.

On calcule le facteur de symétrie par le rapport a/b des demi-largeurs à 10 % de la hauteur totale du pic. En principe, a/b doit être compris entre 0,85 et 1,3.

III-2.3. Facteur de capacité

Le facteur de capacité k' , ou coefficient de distribution massique, permet de vérifier que le système chromatographique distingue bien le soluté injecté.

Il est calculé au moyen de la relation suivante :

$$k' = (t_R - t_0) / t_0$$

t_R : temps de rétention du soluté mesuré à partir de l'injection

t_0 : volume mort de la colonne

Les valeurs idéales de k' sont comprises entre 1 et 10.

III-2.4. Sélectivité

La sélectivité α mesure l'aptitude d'un système chromatographique à séparer les composés injectés. Elle est égale à l'équation :

$$\alpha = k'_2 / k'_1$$

k'_1 et k'_2 : facteurs de capacité des 2 solutés à séparer

Les valeurs de α sont en général comprises entre 1,05 et 2.

III-2.5. Résolution

La résolution R permet d'apprécier l'efficacité de la séparation des composés.

On calcule la résolution par le rapport suivant :

$$R = 2 (t_{R2} - t_{R1}) / (\omega_1 + \omega_2)$$

t_{R1} et t_{R2} : temps de rétention des 2 solutés à séparer

ω_1 et ω_2 : largeur des pics à la base des 2 solutés à séparer

La séparation des composés est complète lorsque la résolution est supérieure ou égale à 1.

Les différentes grandeurs chromatographiques sont liées entre elles, comme l'indique la relation suivante :

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} [(\alpha-1) / \alpha] [k' / (1+k')]$$

La résolution est augmentée en améliorant la sélectivité ou bien l'efficacité de la colonne.

III-3. Linéarité

Les gammes d'étalonnage sont constituées de 5 concentrations croissantes correspondant de 60 à 140 % de la valeur cible théorique. Trois échantillons sont prélevés et dosés pour chaque concentration.

La stabilité de l'azacitidine est étudiée à une concentration théorique de 100 µg/mL. La gamme d'étalonnage de l'azacitidine comprend des échantillons dosés à 60, 80, 100, 120 et 140 µg/mL.

Etant donné le coût élevé d'un flacon de Vidaza® (354 euros TTC), il n'était pas envisageable d'utiliser un flacon pour chaque journée de manipulation. Donc pour remédier à ce problème, l'alternative retenue a été d'utiliser une solution d'azacitidine diluée dans le DiMéthylSulfOxyde (DMSO) pour réaliser les étalons et l'étape de reproductibilité. Nous nous sommes basés sur la publication de Den Harting et al [23] qui a montré la stabilité d'une solution d'azacitidine dans le DMSO un mois conservée au réfrigérateur.

Les échantillons de la gamme d'étalonnage étaient réalisés à partir d'une solution mère d'azacitidine dans le DMSO. Cette solution était préparée en diluant un flacon de Vidaza® 100 mg avec du DMSO dans une fiole jaugée de 100 mL, pour obtenir une solution d'une concentration de 1 mg/mL. Puis cette solution était diluée extemporanément avec la phase mobile de manière à obtenir les différentes concentrations de la gamme d'étalonnage, les dilutions sont précisées dans le tableau IV.

Tableau IV : Préparation de la gamme d'étalonnage de l'azacitidine

Concentration du standard (µg/mL)	60	80	100	120	140
Solution d'azacitidine dans le DMSO 1 mg/mL (mL)	1,5	2	2,5	3	3,5
Phase mobile qsp (mL)	25	25	25	25	25

Ces gammes sont à l'origine d'une droite d'étalonnage. Quinze points de gamme (3 mesures pour chaque standard) ont été réalisés pour construire cette droite sous la forme $y = a x + b$.

Dans cette équation, x représente la concentration de l'échantillon, et y la surface du pic. Le coefficient de corrélation de la droite d'étalonnage doit être proche de 1 pour prouver la linéarité.

III-4. Précision

III-4.1. Répétabilité

La répétabilité est calculée à partir des échantillons de reproductibilité d'une série de mesures réalisées aux différents temps de l'étude à partir d'une solution-mère.

Elle est appréciée par la moyenne, l'écart-type de répétabilité, le coefficient de variation intra-série [26].

Six mesures sont effectuées sur une solution d'azacitidine à 100 µg/mL préparée à partir de la solution à 1 mg/mL dans le DMSO.

La répétabilité a également été évaluée sur une suspension d'azacitidine. Nous avons analysé six échantillons à 100 µg/mL différents dilués à partir de la même suspension d'azacitidine à 25 mg/mL. Cette étape était nécessaire pour pouvoir étudier si l'analyse de la suspension était effectivement répétable et n'entraînait pas de phénomènes incompatibles avec l'analyse chromatographique.

III-4.2. Reproductibilité

La reproductibilité est calculée à partir de tous les échantillons de reproductibilité des différentes séries de mesure à partir de différentes solutions-mères réalisées dans les mêmes conditions aux différents temps de l'étude.

Elle est appréciée par la moyenne, l'écart-type de reproductibilité, le coefficient de variation inter-série [26].

Six mesures sont effectuées trois jours différents sur trois solutions différentes d'azacitidine à 100 µg/mL préparées à partir de la solution à 1 mg/mL dans le DMSO.

III-5. Spécificité

Les essais de dégradation forcée visent à valider la capacité indicatrice de stabilité (« stability indicating capability ») de la méthode chromatographique testée. Ils visent à démontrer que les conditions chromatographiques sont aptes à séparer l'azacitidine de ses produits de dégradation sans phénomène de co-élution. La recherche des produits de dégradation s'effectue par soumission de l'azacitidine à des conditions drastiques. Le but est de dégrader 10 à 20% de la molécule et d'obtenir un chromatogramme avec la molécule restante et les produits de dégradation clairement séparés. [27]

La spécificité a pour objectif de démontrer qu'aucun produit n'interfère avec l'azacitidine. Elle est étudiée vis-à-vis des excipients et des produits de dégradation.

III-5.1. Spécificité vis-à-vis de l'excipient

Le seul excipient présent dans les flacons de Vidaza® est le mannitol.

Une solution de mannitol à 1 mg/mL a été analysée.

III-5.2. Spécificité vis-à-vis des produits de dégradation

Les échantillons ont été soumis à trois types de dégradation forcée :

- une dégradation physique : par action de la chaleur,
- une dégradation chimique : en milieu acide et basique par l'ajout respectivement d'acide chlorhydrique et de soude.

III-5.2.1. Dégradation à la chaleur

La dégradation par la chaleur était étudiée par la soumission de l'azacitidine à 37°C pendant 3 heures.

Les échantillons étaient préparés à partir d'une solution d'azacitidine à 400 µg/mL préparée de la façon suivante : 100 mg d'azacitidine étaient dissous dans une fiole jaugée avec de l'eau ultrapure jusqu'à un volume de 250 mL.

Cette solution d'azacitidine à 400 µg/mL était diluée à une concentration de 100 µg/mL. L'échantillon était prélevé et analysé immédiatement après la préparation.

L'analyse était effectuée à t_0 , puis 30 minutes (t_{30}), 1, 2 et 3 heures (t_{1h} , t_{2h} , t_{3h}) après le passage à l'étuve.

III-5.2.2. Dégradation en milieu acide ou basique

La dégradation de l'azacitidine par l'acide chlorhydrique (HCl) 0,1N et l'hydroxyde de sodium (NaOH) 0,1N pendant une heure a été étudiée.

Le tableau V présente les modalités de préparation des échantillons. Un millilitre de la solution d'azacitidine à 400 µg/mL était mélangé à 1 mL de HCl 0,1N ou NaOH 0,1N. Après un temps de contact adéquat, la solution était neutralisée avec 1 mL de NaOH 0,1N ou HCl 0,1N. Et enfin elle était diluée avec 1 mL d'eau ultra pure pour obtenir une solution de concentration finale de 100 µg/mL.

Tableau V : Préparation des échantillons de dégradation par HCl 0,1N et NaOH 0,1N

	Dégradation en milieu acide	Dégradation en milieu basique
Azacitidine 400 µg/mL	1 mL	1 mL
HCl 0,1N	1 mL	+ 1 mL (neutralisation)
NaOH 0,1N	+ 1 mL (neutralisation)	1 mL
Eau ultrapure	1 mL	1 mL

L'échantillon était analysé à t_0 , puis 15, 30, 45 minutes (t_{15} , t_{30} , t_{45}), 1 heure (t_{60}) après le contact en milieu acide ou basique.

Pour la dégradation forcée à la chaleur et en milieu acide ou basique, la limite d'exclusion a été fixée arbitrairement à $1/2000^{\text{ème}}$ de la surface initiale du pic principal d'azacitidine.

IV Stabilité de la suspension d'azacitidine

IV-1. Réalisation de l'étude

IV-1.1. Détermination des temps d'analyse

La stabilité de l'azacitidine à 25 mg/mL a été étudiée sur une période de huit jours.

Les échantillons ont été prélevés et analysés à J0 immédiatement après leur préparation puis tous les jours à 24 h d'intervalle jusque J4, puis à J7 et J8 après conservation à -20°C .

D'après les recommandations ICH Q1A(R2) [28], l'analyse doit être effectuée sur trois fabrications différentes : « Data from formal stability studies should be provided on at least three primary batches of the drug substance. » Trois séries différentes ont été analysées aux différents temps d'analyse juste après décongélation 20 minutes à température ambiante.

Dans le but de vérifier la stabilité de 8 heures après conservation au réfrigérateur décrite dans le RCP, trois autres séries ont été analysées après décongélation, 20 minutes à température ambiante, et conservation 8 heures au réfrigérateur.

Afin d'optimiser la stabilité des préparations entre la reconstitution et le stockage au congélateur, tout le matériel a été stocké entre 2 et 8°C : flacons de Vidaza® et eau pour préparations injectables. Dans ce cas, l'étude pourra être applicable pour les équipes pharmaceutiques préparant l'azacitidine dans une Unité de Reconstitution Centralisée des Cytotoxiques (URCC) équipée d'une hotte à flux d'air laminaire.

Cependant, lorsque l'URCC est équipée d'un isolateur, le matériel doit subir un cycle de stérilisation dans le sas réservé à cet effet et le maintien au réfrigérateur n'est pas possible. D'où dans un deuxième temps, la stabilité de l'azacitidine a également été étudiée lorsque la suspension était préparée avec du matériel conservé à température ambiante. Les échantillons ont été analysés uniquement à J0 et à J8.

IV-1.2. Préparation des seringues

Les seringues à analyser ont été préparées sous hotte à flux laminaire vertical conformément à la législation et de la façon suivante.

Une prise d'air est disposée sur le flacon de Vidaza® 100 mg. La reconstitution du flacon avec 4 mL d'eau pour préparations injectables permet d'obtenir après agitation, une suspension blanche à 25 mg/mL.

Pour une même série, les 7 échantillons doivent être prélevés dans le même flacon. Limité par le volume de 4 mL d'un flacon, six seringues en polypropylène de 0,4 mL ont donc été prélevées, puis étiquetées avant d'être stockées immédiatement au congélateur. Le reste du flacon a permis de réaliser le dosage du J0. Les seringues congelées ont été analysées à J1, J2, J3, J4, J7 et J8.

En raison du coût élevé de 354 euros par flacon de Vidaza®, le nombre de flacons utilisés pour l'étude a dû être limité. C'est pourquoi des seringues de volume de 0,4 mL ont été

congelées. Des volumes de 2 à 3 mL habituellement prescrits en hématologie auraient nécessité un nombre trop important de flacons.

Le RCP mentionne que la stabilité de la suspension d'azacitidine est de 8 heures conservée entre 2 et 8°C. Ainsi de manière à s'affranchir d'une dégradation rapide de la suspension durant la préparation des seringues, plusieurs dispositions ont été mises en œuvre : le flacon de Vidaza® était maintenu dans un bain d'eau glacée entre deux prélèvements, les seringues en attente d'étiquetage étaient conservées sur un bloc de congélation.

Afin de pouvoir transposer les résultats de l'étude à l'activité de préparation pour le service d'hématologie, nous avons employé les mêmes seringues que celles utilisées dans la pratique quotidienne. D'un volume de 3 mL, les seringues ont un embout Luer-lock et sont composées de trois pièces avec le corps et le piston en polypropylène et le joint de piston en isoprène (lot 8H25048 per 08/2013, laboratoire Soft-ject).

IV-2. Stabilité physique

La stabilité physique a été étudiée par une inspection visuelle des seringues à chaque temps d'analyse à l'œil nu.

IV-3. Stabilité chimique

IV-3.1. Préparation des dilutions

Les échantillons à analyser ont été préparés selon la procédure suivante.

Le contenu de chaque seringue a été versé dans un tube à essais à usage unique de 5 mL.

Un volume de 100 µL de la suspension à 25 mg/mL était prélevé à la pipette Gilson puis introduit dans une fiole jaugée de 25 mL. L'intérieur de l'embout de la pipette Gilson était

rincé plusieurs fois avec de la phase mobile. La fiole jaugée était complétée à un volume de 25 mL avec de la phase mobile de manière à obtenir une solution dosée à 100 µg/mL. Cette solution était analysée immédiatement après la préparation.

Pour la détermination du J0, les seringues ont été analysées immédiatement après leur préparation.

Les seringues congelées ont préalablement été décongelées 20 minutes à température ambiante avant d'être analysées.

Cette dilution était réalisée sur trois séries différentes. La moyenne des 3 mesures constituait la valeur de chaque point d'analyse.

IV-3.2. Interprétation des résultats

La stabilité chimique est définie par les recommandations ICH Q1A(R2) [28] : « The ability of an active ingredient or a drug product to retain its properties within specified limits throughout its shelf-life. The chemical, physical, microbiological and biopharmaceutical aspects of stability must be considered. »

« In general, “significant change” for a drug product is defined as :

- a 5 % change in assay from its initial value ; or failure to meet the acceptance criteria for potency when using biological or immunological procedures ;
- any degradation product's exceeding its acceptance criterion. »

L'azacitidine n'étant pas incluse dans la Pharmacopée Européenne, nous n'avons donc pas de critères d'acceptation pour les produits de dégradation.

La suspension d'azacitidine était donc considérée comme stable si les variations de concentration d'azacitidine étaient inférieures à 5 % par rapport à la valeur initiale.

V Résultats

V-1. Validation de la méthode

V-1.1. Volume mort

Le chromatogramme d'une solution de nitrate de sodium mélangée à une solution d'azacitidine a montré deux pics. Le pic de nitrate de sodium a un temps de rétention de 0,78 minutes représentant le volume mort, celui du pic d'azacitidine est de 3,01 minutes. La rétention relative de l'azacitidine rapportée au volume mort est donc de 0,259.

V-1.2. Grandeurs chromatographiques

Sous les conditions chromatographiques définies précédemment, le chromatogramme d'une solution d'azacitidine à 100 µg/mL a montré un pic principal. Ce chromatogramme est présenté sur la figure 6.

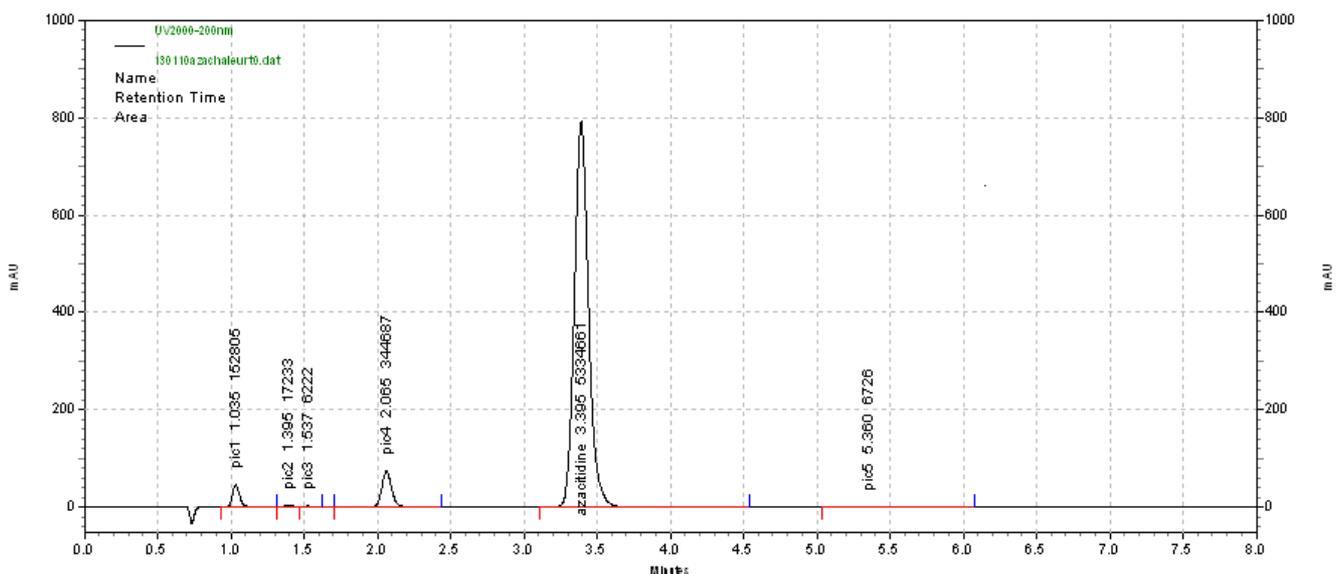


Figure 6 : Chromatogramme d'une solution d'azacitidine à 100 µg/mL dans l'eau ultrapure

L'efficacité de la colonne était de 6234 plateaux théoriques.

Le facteur de symétrie était égal à 1,16. Compris entre 0,8 et 1,3, le pic était donc bien symétrique.

Le facteur de capacité était de 3,14. Il est compris dans l'intervalle des valeurs idéales. Le système chromatographique était capable de bien détecter le pic d'azacitidine.

La résolution était égale à 9,774. La séparation avec d'autres composés était donc complète.

V-1.3. Linéarité

La droite d'étalonnage, calculée à partir des quinze points de gamme, est sous la forme :

$$y = a x + b.$$

La pente a est de 60604,09 avec un intervalle de confiance égal à [59482 ; 61726].

L'intersection à l'origine b est de 4504,93 avec un intervalle de confiance égal à [-112073 ; 121083].

Le coefficient de corrélation r est égal à 1.

La méthode est donc linéaire.

V-1.4. Précision

V-1.4.1. Répétabilité

Six mesures ont été effectuées sur une solution à 100 µg/mL d'azacitidine dans le DMSO.

Les résultats des trois séries de six mesures sont présentés dans le tableau VI.

Tableau VI : Résultats des mesures de répétabilité de la solution d'azacitidine dans le DMSO

	Concentrations mesurées (µg/mL)	Moyenne des concentrations (µg/mL)	Ecart-type de répétabilité	Coefficient de variation intra-série (%)
Série 1	101,47 98,53 98,86 97,11 97,22 97,52	98,45	1,64	1,67
Série 2	99,86 100,43 100,27 100,18 100,11 99,03	99,98	0,46	0,46
Série 3	99,68 99,47 100,02 100,20 99,71 99,73	99,80	0,24	0,24

La moyenne des concentrations mesurées d'azacitidine est de 98,45 +/- 1,64 à 99,98 +/- 0,46 µg/mL avec des coefficients de variation variant de 0,24 à 1,67 %. Les coefficients de variation sont inférieurs à 2 %.

La méthode est répétable pour la solution d'azacitidine dans le DMSO.

La répétabilité de la méthode a aussi été vérifiée pour une suspension d'azacitidine à 100 µg/mL. Les six concentrations mesurées varient de 99,08 à 102,02 µg/mL avec une moyenne de 99,95 µg/mL. Le coefficient de variation reste inférieur à 2 %, étant égal à 1,07 %.

La méthode est donc répétable pour la suspension d'azacitidine à 25 mg/mL.

V-1.4.2. Reproductibilité

Six mesures ont été effectuées trois jours différents sur trois solutions différentes à 100 µg/mL d'azacitidine dans le DMSO.

Sur les 18 mesures réalisées, la moyenne des concentrations mesurées est de 99,41 µg/mL avec un écart-type de reproductibilité de 1,17 µg/mL et un coefficient de variation inter-série de 1,18 %.

La méthode est donc reproductible.

V-1.5. Spécificité

V-1.5.1. Spécificité vis-à-vis du DMSO

La linéarité et la précision sont calculées à partir d'échantillons d'une solution d'azacitidine dans le DMSO dont le chromatogramme correspondant est présenté en figure 7.

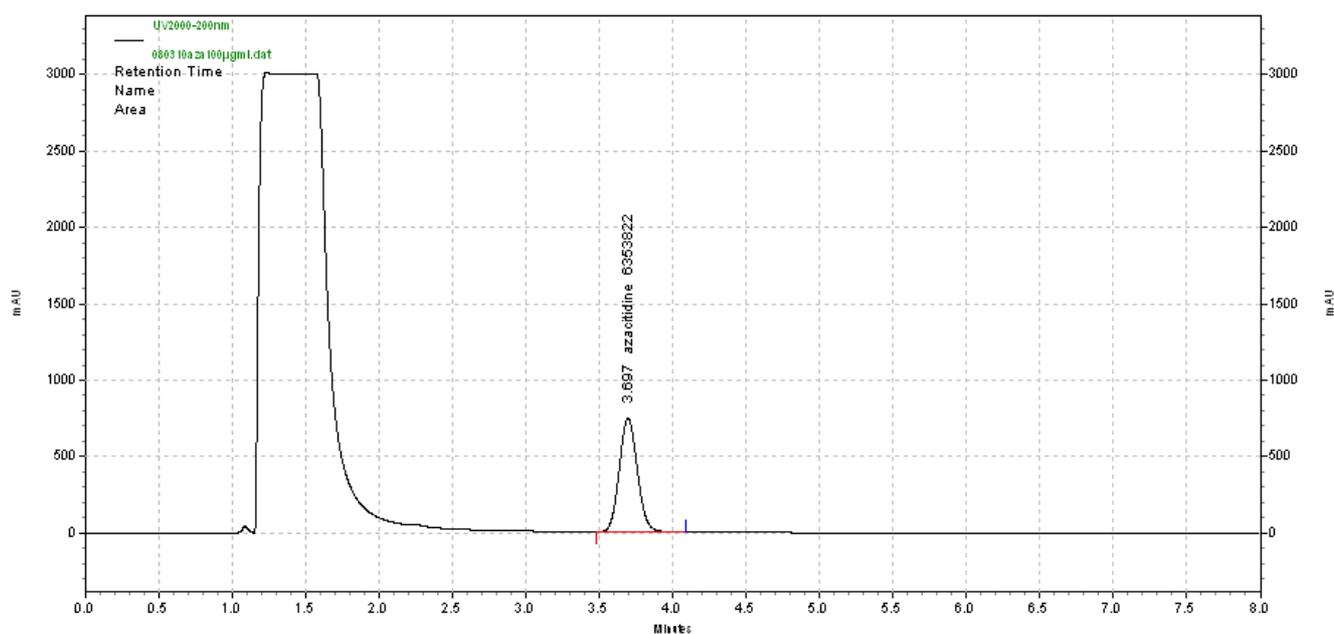


Figure 7 : Chromatogramme de l'azacitidine à 100 µg/mL dans le DMSO

Le pic de DMSO, le premier pic sur le chromatogramme, n'interfère pas avec celui de l'azacitidine qui a un temps de rétention de 3,7 minutes.

V-1.5.2. Spécificité vis-à-vis du mannitol

Le mannitol n'est pas retenu par le système chromatographique. Aucun pic n'apparaît sur le chromatogramme d'une solution de mannitol, chromatogramme non présenté dans ce mémoire.

V-1.5.3. Dégradation à la chaleur

Après 3 heures laissée à 37°C, l'analyse d'une solution d'azacitidine à 100 µg/mL donne le chromatogramme présenté sur la figure 8.

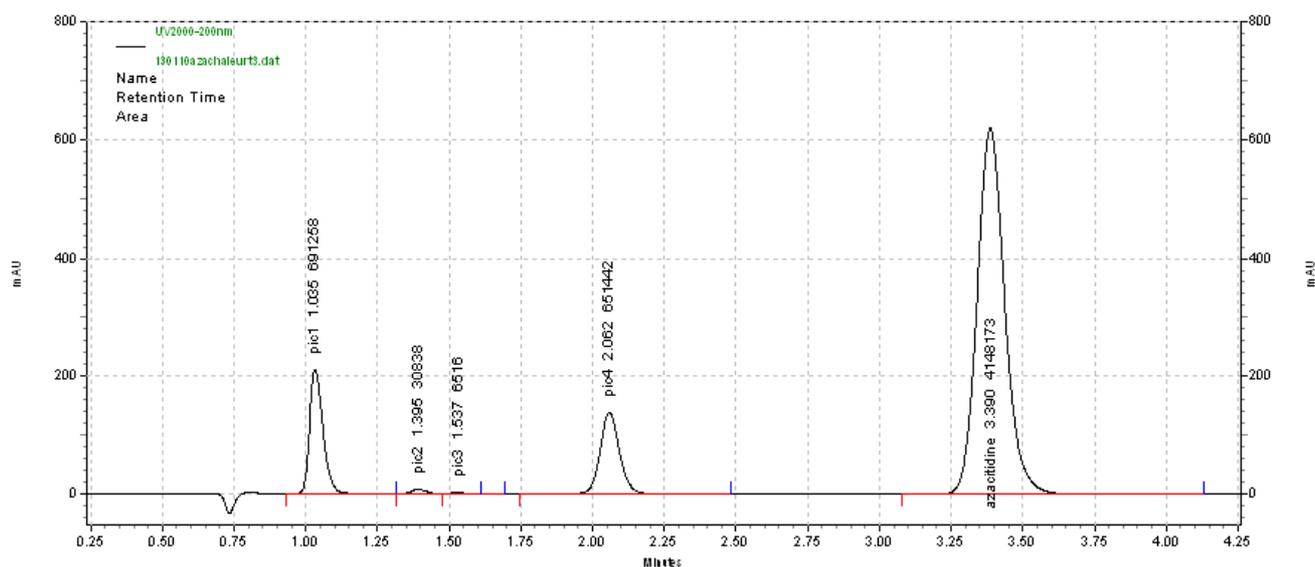


Figure 8 : Chromatogramme d'une solution d'azacitidine à 100 µg/mL après 3 heures à 37°C

Après l'exclusion des pics de surface inférieure à 2667, nous observons à t_{3h} le pic d'azacitidine à un temps de rétention de 3,390 min et 4 pics de dégradation principaux aux différents temps de rétention suivants : 1,035 min, 1,395 min, 1,537 min, et 2,062 min. Les

produits de dégradation ont les rétentions relatives (RR) suivantes : 0,305, 0,412, 0,453 et 0,608. D'après le tableau VII, l'azacitidine a été dégradée à un taux de 10 % par rapport à la valeur initiale 30 minutes après conservation à 37°C pour atteindre 22,24 % de dégradation après trois heures.

Tableau VII : Evolution de l'aire sous la courbe (AUC) du pic d'azacitidine après dégradation à 37°C

Temps d'analyse après conservation à 37°C	AUC du pic d'azacitidine	Pourcentage de dégradation
t ₀	5334661	0 %
30 minutes	4801429	10,00 %
1 heure	4396612	17,58 %
2 heures	4343817	18,57 %
3 heures	4148173	22,24 %

Le chromatogramme en figure 9 montre uniquement les 4 pics de dégradation de la solution et leur superposition immédiatement après la préparation et après chauffage à 37°C pendant 30 minutes, 1, 2 et 3 heures.

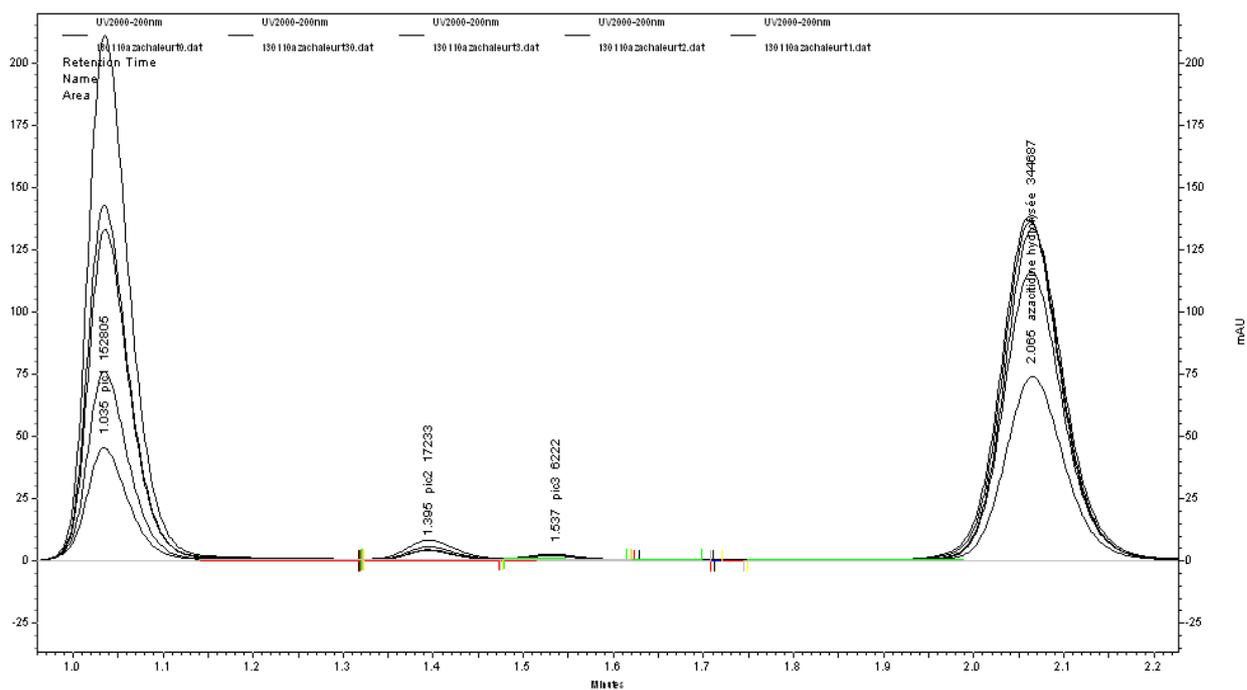


Figure 9 : Superposition des chromatogrammes avec agrandissement sur les 4 produits de dégradation de l'azacitidine à 37°C aux différents temps d'analyse

V-1.5.4. Dégradation en milieu acide

Le chromatogramme de l'azacitidine après une dégradation en milieu acide pendant une heure est représenté sur la figure 10.

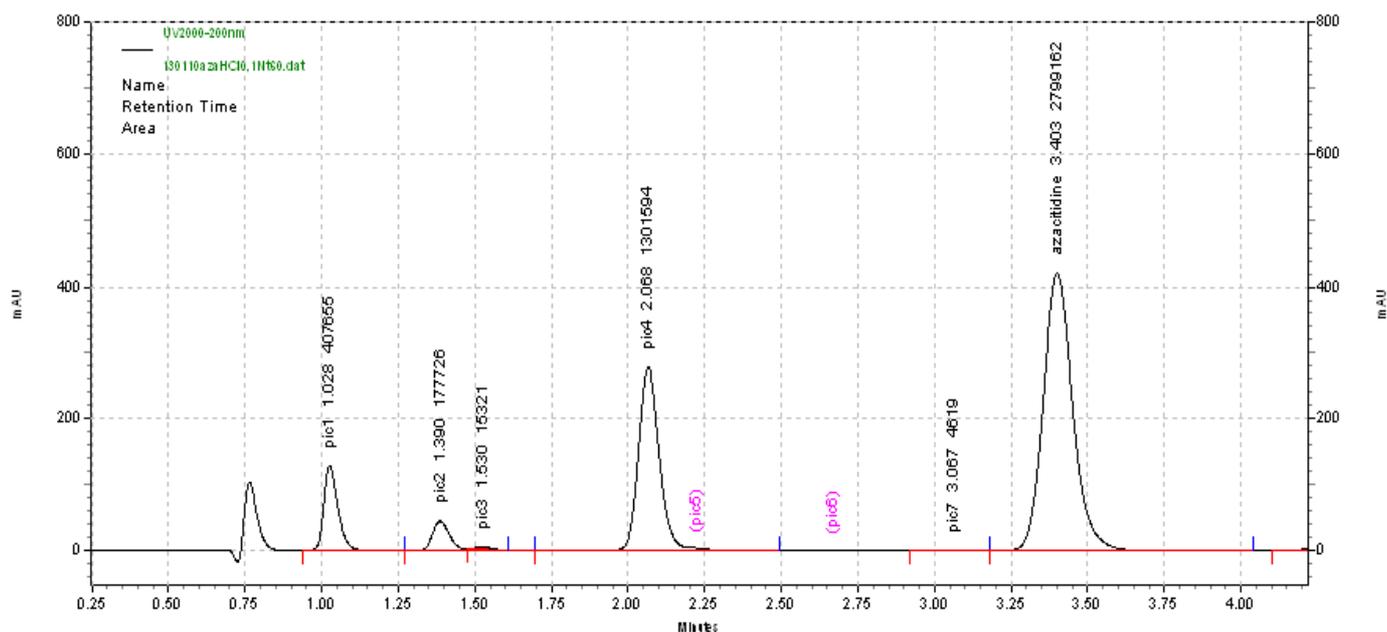


Figure 10 : Chromatogramme d'une solution d'azacitidine à 100 µg/mL après 1 heure en contact avec HCl 0,1N

Après l'exclusion des pics de surface inférieure à 2794, nous observons à t_{1h} le pic d'azacitidine à un temps de rétention de 3,403 min et 5 pics de dégradation aux différents de rétention suivants : 1,028 min, 1,390 min, 1,530 min, 2,068 min, et 3,067 min. Les RR correspondantes sont les suivantes : 0,302, 0,408, 0,450, 0,608 et 0,901.

Tableau VIII : Evolution de l'aire sous la courbe (AUC) du pic d'azacitidine après contact avec HCl 0,1N

Temps d'analyse après contact avec HCl 0,1N	AUC du pic d'azacitidine	Pourcentage de dégradation
t_0	5587888	0 %
15 minutes	3558337	36,32 %
30 minutes	2868862	48,66 %
45 minutes	2799162	49,91 %
1 heure	2512175	55,04 %

Le tableau VIII montre que l'azacitidine a été dégradée à 36,32 % après un temps de contact de 15 minutes avec HCl 0,1N pour atteindre 55,04 % de dégradation après une heure.

V-1.5.5. Dégradation en milieu basique

Le chromatogramme initial à t_0 montre le pic principal d'azacitidine à un temps de rétention de 3,420 min et un pic à 2,075 (RR de 0,607).

Quinze minutes après un contact avec NaOH 0,1N, le chromatogramme présenté en figure montre 2 pics aux temps de rétention 1,033 et 1,395 min, correspondant aux RR 0,302 et 0,408. Le pic correspondant à l'azacitidine n'est plus détecté, comme le montre le chromatogramme correspondant sur la figure 11.

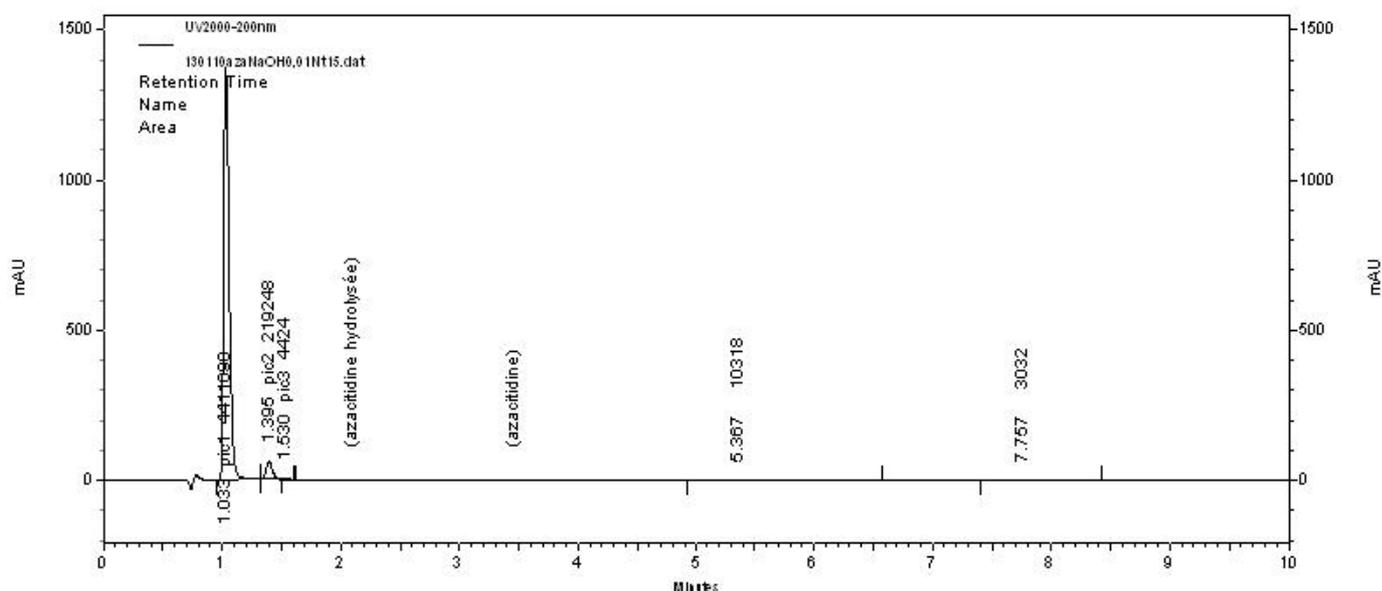


Figure 11 : Chromatogramme d'une solution d'azacitidine à 100 µg/mL après 15 minutes en contact avec NaOH 0,1N

En contact avec NaOH 0,1N, l'azacitidine est totalement dégradée au bout de 15 minutes.

Récapitulatif des produits de dégradation de l'azacitidine

La dégradation forcée de l'azacitidine dans différentes conditions drastiques amène à construire le tableau IX récapitulant les différents produits de dégradation (PDg).

Tableau IX : Rétention relative des différents produits de dégradation de l'azacitidine

	PDg 1	PDg 2	PDg 3	PDg 4	PDg 5	Azacitidine
Conservation à 37°C	0,305	0,412	0,453	0,608	-	1,000
Contact avec HCl 0,1N	0,302	0,408	0,450	0,608	0,901	1,000
Contact avec NaOH 0,1N	0,302	0,408	-	-	-	-

Au total, cinq produits de dégradation apparaissent après la dégradation forcée de l'azacitidine. D'après la publication de Den Harting [23], l'azacitidine subit une hydrolyse réversible pour donner le dérivé formylé, le N-formylribosylguanylurée, possédant une activité antitumorale. Ce produit hydrolysé est lui même dégradé de manière irréversible en ribosylguanylurée dépourvu d'activité cytotoxique. Nous pouvons donc supposer que ces deux produits de dégradation font partie des cinq retrouvés.

Aucun produit de dégradation n'interfère avec le pic d'azacitidine. De ce fait, la capacité indicatrice de stabilité de cette méthode de dosage est donc validée.

V-2. Stabilité physique

Aucune modification physique n'a été observée à l'œil nu. Chaque seringue avait l'aspect d'une suspension blanche.

V-3. Stabilité chimique

V-3.1. Stabilité de la suspension d'azacitidine à 25 mg/mL après conservation du matériel au réfrigérateur avant reconstitution

V-3.1.1. Etude de la concentration d'azacitidine

Les seringues en polypropylène d'azacitidine à 25 mg/mL ont été congelées à -20°C pendant 8 jours. Elles ont ensuite été décongelées pendant 20 minutes à température ambiante puis conservées ou non pendant 8 heures entre 2 et 8°C afin de vérifier les données de stabilité du RCP.

Les concentrations d'azacitidine ont été mesurées aux différents temps d'analyse : J0, J1, J2, J3, J4, J7 et J8. Les résultats sont répertoriés dans le tableau X qui mentionne les concentrations de chaque série, la moyenne des trois séries analysées et le pourcentage de produit restant. La figure 12 représente le pourcentage d'azacitidine par rapport à la concentration initiale après conservation à -20°C et avec ou sans conservation pendant 8 heures entre 2°C et 8°C.

Tableau X : Concentration d'azacitidine (en $\mu\text{g/mL}$) aux différents temps d'analyse en fonction du mode de conservation après reconstitution avec le matériel conservé au réfrigérateur

Congélation à -20°C		J0	J1	J2	J3	J4	J7	J8	% de produit restant à J8 par rapport à J0
	Série 1	101,64	98,32	95,95	96,34	96,55	97,44	97,72	96,14 %
	Série 2	95,63	98,93	94,30	96,10	96,59	96,68	97,74	102,21 %
	Série 3	96,71	97,6	100,96	103,86	94,86	99,37	99,03	102,40 %
	Moyenne	97,99	98,28	97,07	98,77	96,00	97,83	98,16	100,17 %

Congélation à -20°C , décongélation et conservation 8 heures entre 2 et 8°C		J0	J1	J2	J3	J4	J7	J8	% de produit restant à J8 par rapport à J0 après congélation
	Série 1	NA	99,78	94,68	98,18	99,04	100,59	96,30	98,28 %
	Série 2	NA	97,75	91,97	97,92	96,61	98,93	95,91	97,88 %
	Série 3	NA	101,36	93,33	98,19	98,20	97,78	93,58	95,50 %
	Moyenne	NA	99,63	93,33	98,10	97,95	99,10	95,26	97,21 %

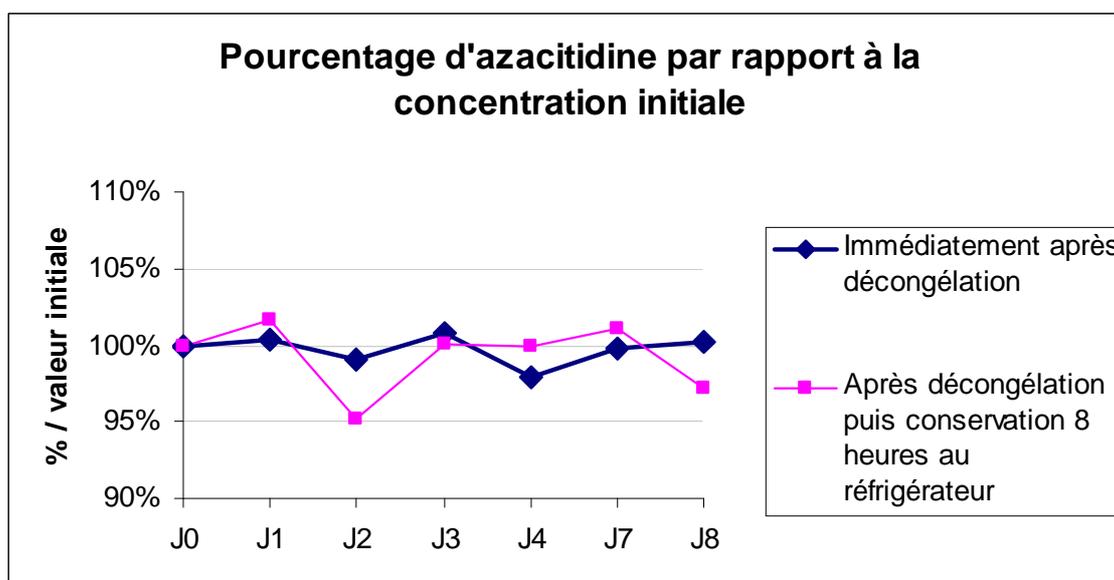


Figure 12 : Concentration moyenne d'azacitidine rapportée à la concentration initiale (en %) en fonction du temps et du mode de conservation après reconstitution avec le matériel conservé au réfrigérateur

La concentration d'azacitidine reste toujours au-dessus de 95 % de la concentration initiale pendant la période de l'étude. La perte maximale est de 3,86 % après 8 jours de congélation à -20°C et de 4,50 % après 8 jours de congélation à -20°C et 8 heures de conservation au réfrigérateur après décongélation. Néanmoins, cette perte est acceptable, la variation de la concentration par rapport à la valeur initiale restant inférieure à 5 %.

V-3.1.2. Etude des produits de dégradation

En fin d'analyse, au 8^{ème} jour, le chromatogramme d'une suspension d'azacitidine à 25 mg/mL après congélation, présenté en figure 13, montre le pic d'azacitidine au temps de rétention de 3,36 minutes. Quatre autres pics sont observés ayant les rétentions relatives suivantes :

- Pic 1 : 0,236,
- Pic 2 : 0,299,
- Pic 3 : 0,420,
- Pic 4 : 0,606.

Le pic n°1 a une rétention relative inférieure à 0,259. Il se trouve donc dans le volume mort. A ce titre, il n'a pas été pris en compte comme un produit de dégradation. Trois produits de dégradation ont donc été observés.

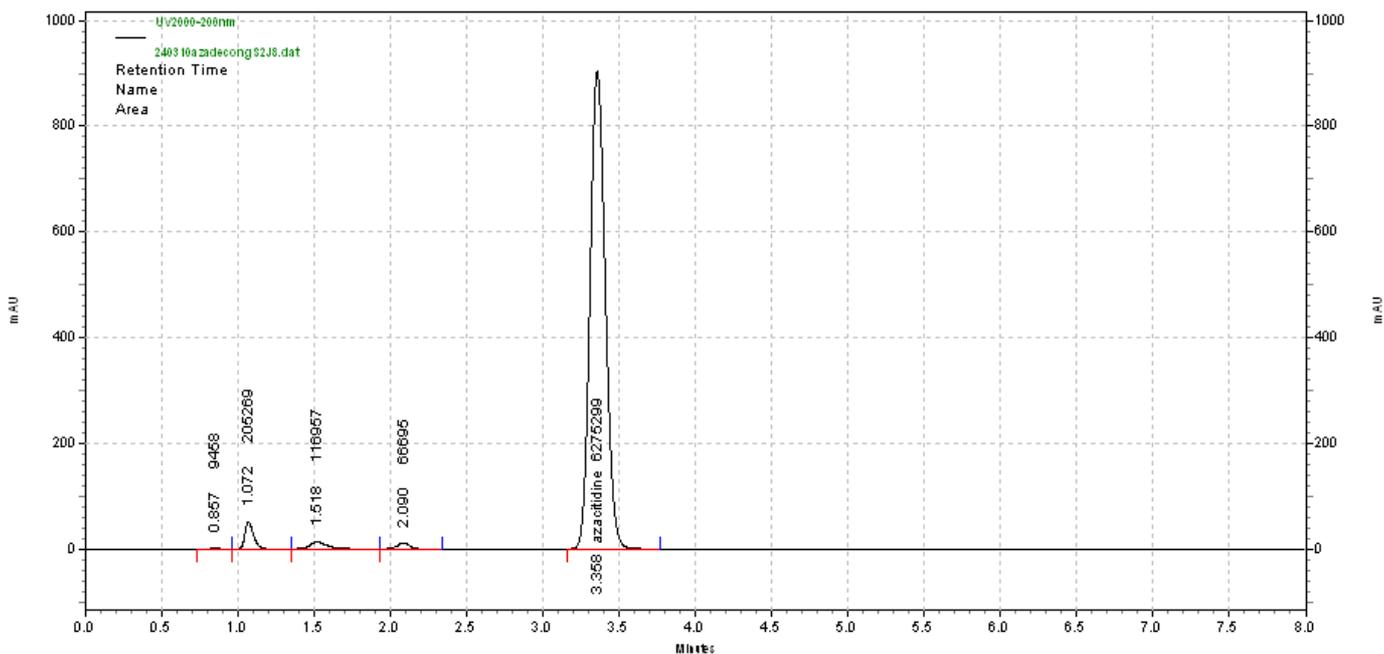


Figure 13 : Chromatogramme de l'azacitidine après congélation à -20°C en fin d'analyse (J8)

Les figures 14 et 15 montrent l'évolution des produits de dégradation (PDg) aux différents temps d'analyse, exprimée en pourcentage par leur surface par rapport à la surface de l'ensemble des pics, en fonction du mode de conservation.

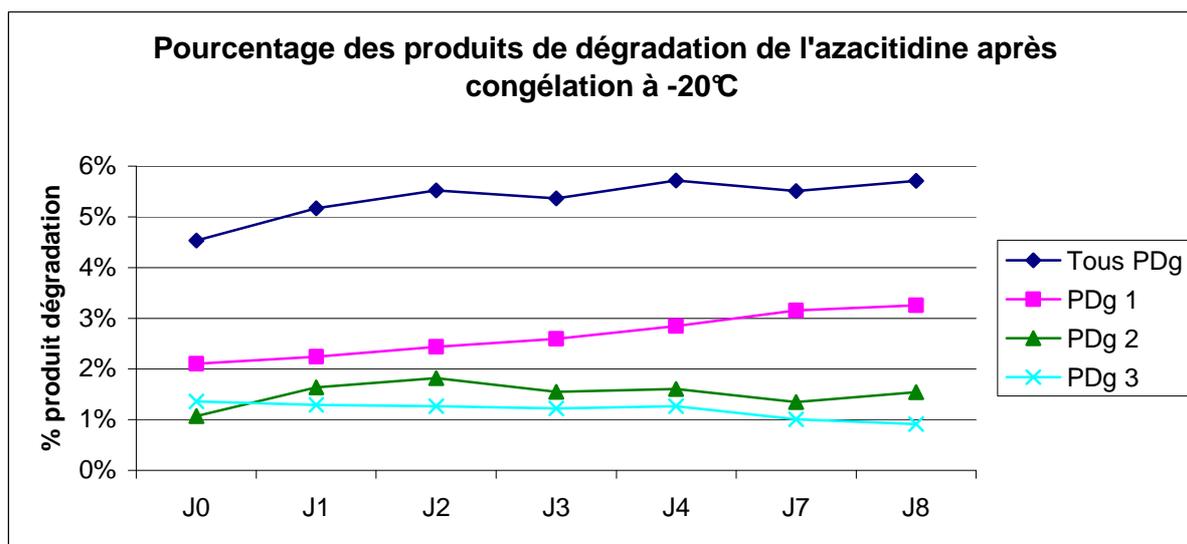


Figure 14 : Evolution des produits de dégradation de l'azacitidine après congélation à -20°C exprimée en pourcentage par rapport à la surface de l'ensemble des pics après reconstitution avec le matériel conservé au réfrigérateur

Immédiatement après la préparation, les trois produits de dégradation sont déjà retrouvés. Leur taux passe de 4,53 % à J0 et augmente progressivement jusque 5,71 % en fin d'analyse à J8. Un seul produit de dégradation (PDg 1) augmente significativement pendant la période d'étude, passant de 2,10 % à J0 à 3,25 % à J8. Les deux autres produits restent stables avec un taux moyen de 1,51 % pour PDg 2 et 1,19 % pour PDg 3.

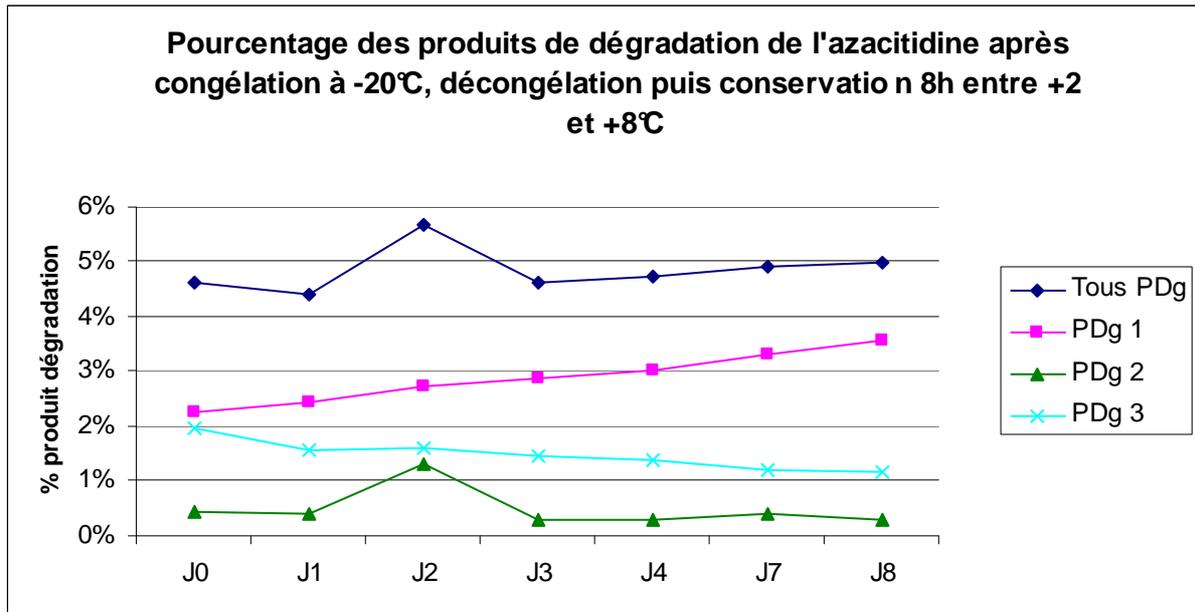


Figure 15 : Evolution des produits de dégradation de l'azacitidine après congélation à -20°C, décongélation puis conservation 8h au réfrigérateur exprimée en pourcentage par rapport à la surface de l'ensemble des pics après reconstitution avec le matériel conservé au réfrigérateur

Le taux des trois produits de dégradation passe de 4,63 % à J0 et augmente progressivement jusque 4,98 % en fin d'analyse à J8. Seul le produit de dégradation 1 augmente significativement pendant la période de l'étude, de 2,25 % à J0 à 3,56 % à J8. Cette observation avait déjà été remarquée lors de l'étude après congélation. Le produit PDg 2 reste stable à un taux de 0,34 %, et PDg 3 diminue légèrement de 1,96 % à J0 à 1,15 % à J8.

V-3.2. Stabilité de la suspension d'azacitidine à 25 mg/mL après conservation du matériel à température ambiante avant reconstitution

Les modalités de mise en œuvre de l'étude étaient rigoureusement les mêmes que pour l'étude précédente, hormis que le matériel nécessaire à la reconstitution de la suspension d'azacitidine (flacon de Vidaza® et eau pour préparations injectables) est laissé à température ambiante.

L'analyse a été effectuée uniquement à J0 et J8. Trois séries ont été analysées pour chaque jour d'analyse à partir du même flacon. Les concentrations d'azacitidine et les pourcentages de produits de dégradation relevés sont présentés dans le tableau XI et la figure 16.

Tableau XI : Concentration d'azacitidine (en µg/mL) aux différents temps d'analyse en fonction du mode de conservation après reconstitution avec le matériel conservé à température ambiante

Congélation à -20°C		J0	J8	% de produit restant à J8 par rapport à J0
	Série 1	94,51	97,40	103,06 %
	Série 2	94,32	96,04	101,82 %
	Série 3	93,59	95,13	101,65 %
	Moyenne	94,14	96,19	102,18 %

Congélation à -20°C, décongélation et conservation 8 heures entre 2 et 8°C		J0	J8	% de produit restant à J8 par rapport à J0
	Série 1	94,51	94,28	99,76 %
	Série 2	94,32	95,15	100,88 %
	Série 3	93,59	96,06	102,64 %
	Moyenne	94,14	95,17	101,09 %

Dès la reconstitution de la suspension d'azacitidine au J0, les concentrations sont inférieures à 95 µg/mL alors que l'analyse est effectuée immédiatement après la dilution dans la phase mobile. Après 8 jours de congélation à -20°C, les concentrations sont plus élevées avec un gain de 2,18 % après décongélation et de 1,09 % après conservation 8 heures au réfrigérateur. La variation de concentration par rapport à la concentration initiale étant inférieure à 5 %, ce gain est acceptable.

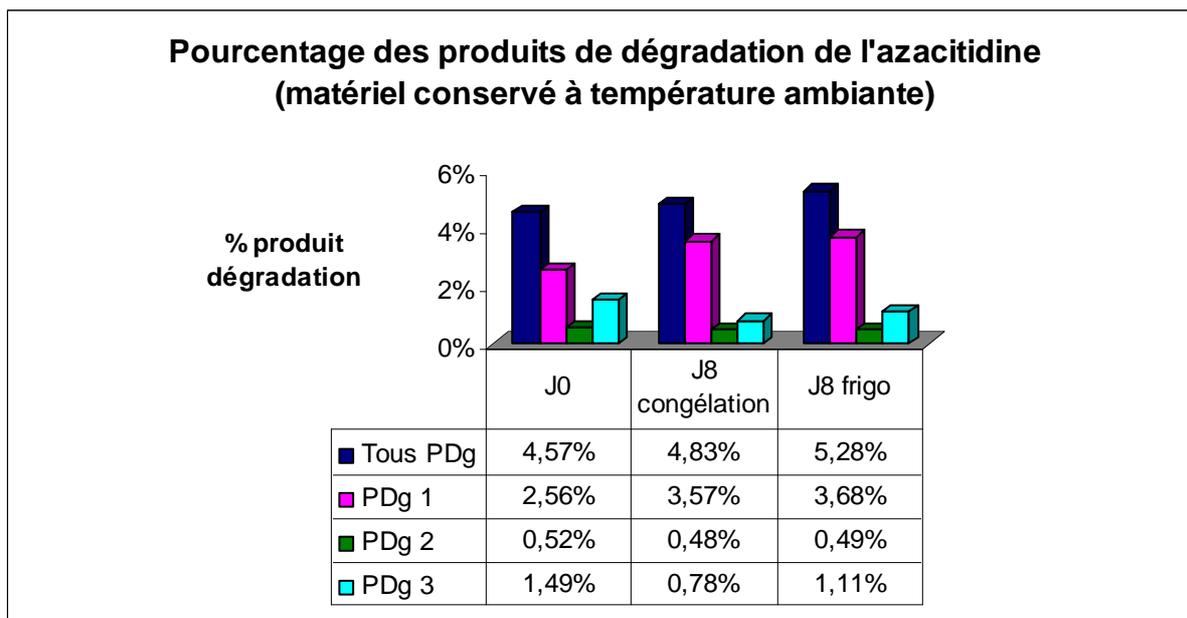


Figure 16 : Evolution des produits de dégradation de l'azacitidine en fonction du mode de conservation exprimée en pourcentage par rapport à la surface de l'ensemble des pics après reconstitution avec le matériel conservé à température ambiante

Trois produits de dégradation sont observés sur le chromatogramme avec les rétentions relatives suivantes : 0,346, 0,451 et 0,640. Equivalentes à celles des PDg retrouvés dans la première partie de l'étude, nous pouvons en déduire que ce sont les mêmes produits de dégradation. Aucun autre produit de dégradation n'est apparu.

La somme des trois produits de dégradation passe à un taux de 4,57 % à J0 à 4,83 % à J8 après congélation et 5,28 % après décongélation et conservation 8 heures au réfrigérateur. Un seul produit de dégradation (PDg 1) augmente significativement pendant la période d'étude passant de 2,56 % à J0 à 3,57 % à J8 après congélation et 3,68 % après décongélation et conservation 8 heures au réfrigérateur. Les deux autres produits PDg 2 et PDg 3 restent stables à des taux moyens respectivement de 0,49 % et 1,13 %.

VI Discussion

VI-1. Validation de la méthode de dosage

Grâce à la réalisation de gammes d'étalonnage trois jours différents, avec des solutions mères d'azacitidine différentes, la méthode de dosage de l'azacitidine par CLHP peut être validée.

En effet, le coefficient de corrélation de la droite d'étalonnage est proche de 1. La méthode de dosage est donc linéaire.

Après le dosage de six solutions d'azacitidine à 100 µg/mL trois jours différents, nous constatons que la répétabilité et la reproductibilité de la méthode de dosage sont acceptables, les coefficients de variation étant inférieurs à 2 %. Ce résultat a été vérifié pour une solution d'azacitidine dans le DMSO, mais également pour une suspension d'azacitidine à 25 mg/mL.

VI-2. Mise en évidence des produits de dégradation

La dégradation de l'azacitidine à des niveaux de force différents permet de mettre en évidence l'apparition de trois produits de dégradation de l'azacitidine lors de leur analyse par CLHP. Ces produits de dégradation n'ont pas les mêmes temps de rétention que l'azacitidine et n'interfèrent donc pas sur l'analyse des chromatogrammes pour le dosage de l'azacitidine.

De même, il a été vérifié que le mannitol, seul excipient présent dans Vidaza®, n'a aucune interférence avec le pic d'azacitidine.

VI-3. Stabilité de la suspension d'azacitidine à 25 mg/mL

Pour tous les lots d'azacitidine analysés dans notre étude, aucune modification physique n'est apparue entre J0 et J8 lors de l'observation des seringues à l'œil nu après leur remise en suspension : toutes avaient l'aspect d'une suspension blanche.

Les suspensions d'azacitidine à 25 mg/mL conditionnées en seringues de polypropylène, pour l'administration par voie sous-cutanée, présentent une concentration relativement stable entre le jour initial et 8 jours après congélation à -20°C. L'écart maximal observé de la concentration par rapport à J0 est de 4,5 %. Cependant, alors que l'analyse est effectuée immédiatement après la dilution des seringues, la concentration initiale d'azacitidine est plus faible lorsque le matériel nécessaire à la reconstitution du flacon est préalablement conservé à température ambiante : nous constatons une diminution de 3,93 % par rapport à la concentration initiale avec conservation du matériel au réfrigérateur. Du fait de la durée de stabilité courte de la suspension d'azacitidine, cela révèle l'importance d'optimiser au maximum la stabilité des préparations avant leur reconstitution, par exemple en stockant les flacons de Vidaza® au réfrigérateur.

Trois produits de dégradation ont été observés. Les variations de pourcentage ont un écart maximal de 1,18 % par rapport à J0 pour l'ensemble des produits de dégradation. Leur apparition est effective dès la reconstitution du Vidaza® avec l'eau pour préparations injectables : ceci s'explique par l'hydrolyse facile de l'azacitidine pour donner le dérivé formylé, le N-formylribosylguanylurée, tel que décrit dans la littérature [21,23]. Les 3 produits de dégradation étaient retrouvés dès la reconstitution de l'azacitidine. Aucun produit toxique n'est donc apparu durant les 8 jours de l'étude, ce qui assure la sécurité médicamenteuse pour le patient.

Notre étude de stabilité révèle que la suspension d'azacitidine à 25 mg/mL conditionnée en seringues en polypropylène peut être considérée comme stable après 8 jours de conservation à -20°C puis 8 heures au réfrigérateur après décongélation au point de vue du maintien de la suspension et de la concentration d'azacitidine. Cette durée de stabilité a été démontrée, que le matériel nécessaire à la reconstitution ait été préalablement conservé à température ambiante ou au réfrigérateur.

Les résultats de notre étude sont applicables pour toutes les Unités de Reconstitution Centralisée des Cytotoxiques, qu'elles soient équipées d'une hotte à flux d'air laminaire ou d'un isolateur.

Cette étude a présenté de nombreuses contraintes. Tout d'abord, la dégradation rapide de l'azacitidine impliquait que l'analyse des échantillons devait être immédiate après leur

dilution dans la phase mobile. Leur préparation à l'avance pour une analyse groupée ultérieure aurait engendré des résultats plus faibles liés à la dégradation de l'azacitidine, donc ininterprétables.

Une autre contrainte était de limiter le nombre de flacons de Vidaza® étant donné le coût élevé d'un flacon (354 euros). La littérature démontrait la stabilité de l'azacitidine pendant un mois au réfrigérateur dans le DiMéthylSulfOxyde [23]. Grâce à cette étude, nous avons utilisé une solution d'azacitidine diluée dans le DMSO pour effectuer les tests de linéarité, de reproductibilité et les gammes d'étalonnage pour chaque jour d'analyse. Au total, une vingtaine de flacons de Vidaza® a été utilisée pour la réalisation de l'étude de stabilité, alors qu'environ trois fois plus auraient été nécessaires sans la possibilité de diluer l'azacitidine dans le DMSO.

VI-4. Application à la dispensation des seringues de Vidaza®

Les résultats de cette étude de stabilité ont pu être exploités dans la pratique quotidienne de la préparation des seringues de Vidaza®. Une fiche de fabrication d'une seringue de Vidaza® est présentée en annexe 1. La pharmacie du CHU de Nancy s'est dotée d'un congélateur et la congélation des seringues a été mise en place vers le 15 juin 2010.

Néanmoins, le temps de décongélation des seringues a dû être adapté. En effet, le volume des seringues pour l'étude était de 0,4 mL ; le temps nécessaire à leur décongélation avait été calculé à 20 minutes à température ambiante. Mais pour une seringue de 2,2 mL à 3 mL de Vidaza®, volumes habituellement prescrits dans le service d'Hématologie, la décongélation nécessite 30 à 40 minutes à température ambiante en fonction du volume.

Les modalités de décongélation des seringues sont décrites en annexe 2. Cette fiche est destinée aux pharmaciens en charge de la préparation des cytotoxiques et aux internes en pharmacie. Afin de respecter le temps de décongélation préconisé et ne pas le dépasser, un moyen de déterminer le temps doit être employé, comme par exemple un chronomètre ou un minuteur.

La mise en évidence de la stabilité de la suspension d'azacitidine à 25 mg/mL après 8 jours de congélation a de nombreux avantages. Des économies supplémentaires de flacons de Vidaza®

peuvent être faites : désormais tout le volume du flacon peut être prélevé, alors qu'auparavant un flacon entamé était jeté. Voici présentés deux exemples pour illustrer les économies réalisées.

Exemple 1 : Un patient est traité par Vidaza® avec une posologie de 60 mg x 2/j, soit 120 mg par jour. Deux flacons sont nécessaires par jour ; il reste 80 mg dans le flacon après le prélèvement des 2 seringues du jour. 60 mg peuvent être prélevés et congelés pour la prise du lendemain : 1 flacon est économisé.

Exemple 2 : Deux patients P1 et P2 sont traités par Vidaza®, P1 à 60 mg x 2/j et P2 à 65 mg x 2/j. Trois flacons sont utilisés par jour pour le prélèvement des 4 seringues du jour. Il reste 50 mg dans le dernier flacon. Pour ne pas perdre ce volume, un autre flacon sera reconstitué pour prélever et congeler 2 seringues de 65 mg pour la prise du lendemain.

La mise en place de cette organisation a permis d'économiser 13 flacons de Vidaza® la deuxième quinzaine de juin, 26 flacons en juillet, et 19 flacons la première quinzaine d'août.

Cette organisation permet de plus de régler le problème de la dispensation le week-end ou les jours fériés. Les seringues peuvent être préparées à l'avance et il n'est donc plus nécessaire de mobiliser du personnel pharmaceutique.

La durée de stabilité des seringues d'azacitidine de 8 jours couvre la durée de traitement de 7 jours. Ainsi, une prise en charge totale du traitement pourrait être envisagée en ambulatoire. Avec l'aide des prestataires en hospitalisation à domicile, nous pourrions définir les modalités de transport et de conservation des seringues congelées.

Conclusion

Le but de cette étude était de rechercher des données de stabilité de la suspension d'azacitidine à 25 mg/mL sur une période plus étendue que celle mentionnée par le laboratoire, soit 45 minutes à température ambiante et 8 heures au réfrigérateur. La stabilité a été définie comme correspondant à une perte de principe actif inférieure à 5 %.

Notre étude a révélé que la suspension d'azacitidine à 25 mg/mL, conditionnée en seringues de polypropylène, est stable jusqu'à 8 jours après congélation à une température de -20°C. La décongélation des seringues s'effectuait à température ambiante. La stabilité a également été vérifiée pendant 8 heures de conservation entre 2°C et 8°C après décongélation, ce qui nous permet de vérifier les données de stabilité du laboratoire après la congélation de l'azacitidine. De plus, la stabilité a été démontrée lorsque le matériel nécessaire à la reconstitution a été préalablement conservé à température ambiante, mais également lorsqu'il a été conservé au réfrigérateur. Les résultats de notre étude sont donc applicables à la production en Unité de Reconstitution Centralisée des Cytotoxiques, qu'elle soit équipée d'une hotte à flux d'air laminaire ou d'un isolateur.

A la pharmacie du CHU de Nancy, la congélation des seringues de Vidaza® a été mise en place depuis la mi-juin 2010. De nombreuses économies de flacons ont ainsi pu être faites et la préparation des seringues peut désormais être effectuée à l'avance pour le week-end et les jours fériés.

Annexe 1

Fiche de fabrication d'une seringue de Vidaza®

C.H.U. NANCY		C.H.U. NANCY		C.H.U. NANCY	
Azacytidine 72.5 mg		Azacytidine 72.5 mg		Azacytidine 72.5 mg	
= 2.9 ml sous-cutanée		= 2.9 ml sous-cutanée		= 2.9 ml sous-cutanée	
[Redacted] - IP : 694499		[Redacted] - IP : 694499		[Redacted] - IP : 694499	
Hématologie hosp jo	DAGUINDAU	Hématologie hosp jo	DAGUINDAU	Hématologie hosp jo	DAGUINDAU
N° Ord.: 93 022	Adm. : 16/08/2010	N° Ord.: 93 022	Adm. : 16/08/2010	N° Ord.: 93 022	Adm. : 16/08/2010
A utiliser avant le : 16/08/2010 à 23:38		A utiliser avant le : 16/08/2010 à 23:38		A utiliser avant le : 16/08/2010 à 23:38	
Au réfrigérateur		Au réfrigérateur		Au réfrigérateur	
<small>Respecter les doses prescrites</small>		<small>Respecter les doses prescrites</small>		<small>Respecter les doses prescrites</small>	

Date préparation : 14/08/2010	FICHE DE FABRICATION	Service : Hématologie hosp jour
Heure préparation : 15:08	Numéro ordonnancier : 93 022	Prescripteur : DAGUINDAU
Patient : [Redacted]	Né(e) le : [Redacted]	Cycle : 1 Jour : 6
Dose prescrite : 72.50 mg (37,50mg/m ²)		Administration le : 14/08/2010
Spécialité utilisée : Azacytidine		
Protocole : Azacytidine 75 mg/m ² J1 à J7 (Classique)		S.C. : 1.93 m ²

RECONSTITUTION						
Produit	Dosage	Solvant	Vol. (ml)	Péremption	Numéro lot	Vol. Prél.
VIDAZA	100 mg	Eau P.P.I.	4.00	14/08/10 à 23:08	FGJHFGHA	2.90

PREPARATION						
Dispositif utilisé :			N° lot :			
Soluté vecteur utilisé :			N° lot :			
Volume à prélever : 2.90 ml de Azacytidine			Dose préparée : 72.50 mg			
Volume Préparation : 2.9 ml à 25.00 mg/ml			Péremption le : 14/08/2010 à 23:38			
Manipulation : VIGNERON Jean		Contrôle :		Validation :		

<p>Mode opératoire :</p> <p>Matériel :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Azacytidine 100 mg - Seringue de 5 ml - Aiguille 40-12 - Compresses stériles en non tissé - Prises d'air - Obturateur <p>Mode opératoire :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Reconstituer chaque flacon d'azacytidine 100 mg avec 4 ml d'eau ppi - Obtention d'une SUSPENSION - Prélever l'azacytidine - Adapter un obturateur 	<p>Matériel nécessaire :</p>
--	-------------------------------------

Annexe 2

Modalités de décongélation des seringues de Vidaza®

Conditions de conservation du Vidaza®

D'après le RCP, la suspension d'azacitidine à 25 mg/mL est stable 45 minutes à température ambiante et 8 heures au réfrigérateur.

Une étude locale a permis de montrer qu'elle est également stable après congélation à -20°C pendant 8 jours et conservation au réfrigérateur pendant 8 heures après décongélation.

Les seringues de Vidaza® à administrer le week-end ou les jours fériés sont préparées le vendredi. Elles sont étiquetées avec le nom du patient, la dose d'azacitidine prescrite et le jour d'administration. Après leur préparation, elles sont immédiatement congelées à -20°C.

Comment dispenser les seringues de Vidaza® après leur congélation à -20°C ?

Appeler le service de soins pour confirmer la poursuite de traitement par Vidaza® pour les patients désignés par le pharmacien en charge de la préparation des cytotoxiques.

Sortir du congélateur les seringues correspondantes au jour d'administration.

Afin de garantir la stabilité de la seringue en fonction des données à notre disposition, apposer l'étiquette suivante :

Azacitidine 25mg/mL A administrer le : Sortie du congélateur :h..... Maintien à température ambiante jusque :h..... Conserver au réfrigérateur A administrer avant :h.....

Compléter les mentions suivantes :

- A administrer le : **Jour d'administration**
- heure de sortie du congélateur : **H**
- maintien de la seringue à température ambiante jusque : **H + 35 minutes (H₃₅)** après la sortie du congélateur pour assurer la décongélation complète de la suspension d'azacitidine
- à administrer avant : **H₃₅ + 8 heures**

Une fois la seringue de Vidaza® décongelée, la stocker au réfrigérateur. La dispensation au service doit alors être effectuée dans les plus brefs délais.

Bibliographie

- [1] Sweetman SC et al. "Azacitidine" p 529. In : Martindale : The complete drug reference, 34th edition, Pharmaceutical Press, Suffolk, 2005.
- [2] Le dictionnaire Vidal 2009.
Résumé des Caractéristiques du Produit « Vidaza ».
85^{ème} édition ; Paris : édition Maloine ; 2009, 1893 pages.
- [3] Base de données Thériaque.
Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament (CNHIM).
<http://www.theriaque.org>, site consulté le 20/06/2010.
- [4] Haute Autorité de Santé, Direction de l'évaluation médicale, économique et de santé publique.
Commission de la transparence « Avis de la commission – Vidaza » 29 avril 2009 : 11 pages.
- [5] European medicines agency – CHMP « European Public Assessment Report (first published) Vidaza – Scientific discussion » : 55 pages
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000978/WC500050240.pdf, consulté le 23 juillet 2010.

- [6] Edlin R, Connock M, Tubeuf S, Round J, Fry-Smith A, Hyde C, Greenheld W.
Azacitidine for the treatment of myelodysplastic syndrome, chronic myelomonocytic leukaemia and acute myeloid leukaemia.
Health Technol Assess 2010 ; 14 : 69-74.
- [7] Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J.
International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes.
Blood 1997 ; 89 : 2079-88.
- [8] Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C.
Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes.
Br J Haematol 1982 ; 51 : 189-99.
- [9] Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview. In : WHO clasification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues.
Publication : International Agency for Research on Cancer.
4ème édition, Lyon 2008, 88-93.
- [10] Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, Stone RM, Powell BL, DeCastro CM, Ellerton J, Larson RA, Schiffer CA, Holland JF.
Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome : a study of the cancer and leukemia group B.
J Clin Oncol 2002 ; 20(10) : 2429-2440.

- [11] Guerci-Bresler A, Ades L, Gyan E, Mohty M, Legros L, Isnard F, Ame S, Stamatoullas A, Quesnel B, Rose C, Beynerauzy O, Recher C, Vey N, Dreyfus F, Fenaux P.
- Recommandations pour l'utilisation de l'azacitidine dans le traitement des syndromes myélodysplasiques de risque intermédiaire-2 ou élevé.
- Pour le Groupe Francophone des Myélodysplasies. Février 2010. 26 pages.
- http://www.gfmgroup.org/recommandation/recommandation_20100215182052.pdf,
site consulté le 01/07/2010.
- [12] Kornblith AB, Herndon JE, Silverman LR, Demakos EP, Odchimar-Reissig R, Holland JF, Powell BL, DeCastro C, Ellerton J, Larson RA, Schiffer CA, Holland JC.
- Impact of azacytidine on the quality of life of patients with myelodysplastic syndrome treated in a randomized phase III trial : a Cancer and Leukemia Group B study.
- J Clin Oncol 2002 ; 20(10) : 2441-52.
- [13] Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, Schoch R, Gattermann N, Sanz G, List A, Gore SD, Seymour JF, Bennett JM, Byrd J, Backstrom J, Zimmerman L, McKenzie D, Beach CL, Silverman LR.
- Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes : a randomised, open-label, phase III study.
- Lancet Oncol 2009 ; 10 : 223-32.
- [14] Zhu X, Ma Y, Liu D.
- Novel agents and regimens for acute myeloid leukemia : 2009 ASH annual meeting highlights.
- Journal of Haematology and Oncology 2010 ; 3 : 17.

- [15] Gryn J, Zeigler ZR, Shadduck RK, Lister J, Raymond JM, Sbeitan I, Srodes C, Meisner D, Evans C.
Treatment of myelodysplastic syndromes with 5-azacytidine.
Leuk Res 2002 ; 26(10) : 893-7.
- [16] Batty GN, Kantarjian H, Issa JP, Jabbour E, Santos FP, McCue D, Garcia-Manero G, Pierce S, O'Brien S, Cortes JE, Ravandi F.
Feasibility of therapy with hypomethylating agents in patients with renal insufficiency.
Clin Lymphoma Myeloma Leuk 2010 ; 10(3) : 205-10.
- [17] Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé.
Bonnes Pratiques de Préparation.
Bulletin officiel, décembre 2007, 78 pages.
- [18] Leone G, Teofili L, Voso MT, Lubbert M.
DNA methylation and demethylating drugs in myelodysplastic syndromes and secondary leukemias.
Haematologica 2002 ; 87(12) : 1324-41.
- [19] Herman JG, Baylin SB.
Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation.
N Engl J Med 2003 ; 349 : 2042-54.
- [20] « Listes des médicaments orphelins en Europe », Les cahiers d'Orphanet, Série Médicaments Orphelins, Juillet 2010, 26 pages.
http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/FR/liste_des_medicaments_orphelins_en_europe.pdf, site consulté le 11/07/2010.

- [21] Cheung YW, Vishnuvajjala BR, Morris NL, Flora KP.
Stability of azacitidine in infusion fluids.
Am J Hosp Pharm 1984 ; 41: 1156-59.
- [22] Chatterji DC, Gallelli JF.
Stabilization of 5-azacytidine by nucleophilic addition of bisulfite ion.
J Pharm Sci 1979 ; 68 : 822-6.
- [23] Den Harting J, Brandenburg HCR, Vermeij P.
Stability of azacitidine in lactated Ringer's injection frozen in polypropylene syringes.
Am J Hosp Pharm 1989 ; 46: 2500-5.
- [24] Zhao M, Rudek M, He P, Hartke C, Gore S, Carducci M, Baker S.
Quantification of 5-azacytidine in plasma by electrospray tandem mass spectrometry coupled with high-performance liquid chromatography.
J Chromatogr B 2004 ; 813 : 81-8.
- [25] Pharmacopée Européenne 6.0.
Addendum 6.2 ; Strasbourg : Conseil de l'Europe, 2008, 6499 pages.
- [26] Hagan RL.
High-performance liquid chromatography for small-scale studies of drug stability.
Am. J. Hosp. Pharm. 1994; 51 : 2162-75.

[27] International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use.

ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of analytical procedures : Text and methodology Q2(R1), Current Step 4 version, 2005.

[28] International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use.

ICH Harmonised Tripartite Guideline, Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2), Current Step 4 version, 2003.

[29] International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use.

ICH Harmonised Tripartite Guideline, Evaluation of stability data Q1E, Current Step 4 version, 2003.

Liste des figures

FIGURE 1 : SCHÉMA DE LA MOLÉCULE D'AZACITIDINE	4
FIGURE 2 : RÉPARTITION DES PATIENTS TRAITÉS POUR SYNDROME MYÉLODYSPLASIQUE EN FONCTION DES DIFFÉRENTS TYPES SELON LA CLASSIFICATION OMS	17
FIGURE 3 : RÉPARTITION DU NOMBRE DE PATIENTS PAR TRANCHE DE DOSE UNITAIRE ET DE VOLUME CORRESPONDANT	18
FIGURE 4 : CONSOMMATIONS MENSUELLES DE VIDAZA® EN 2009 ET 2010.....	19
FIGURE 5 : SPECTRE D'ABSORPTION UV D'UNE SOLUTION D'AZACITIDINE À 100 µG/ML	25
FIGURE 6 : CHROMATOGRAMME D'UNE SOLUTION D'AZACITIDINE À 100 µG/ML DANS L'EAU ULTRAPURE	37
FIGURE 7 : CHROMATOGRAMME DE L'AZACITIDINE À 100 µG/ML DANS LE DMSO	40
FIGURE 8 : CHROMATOGRAMME D'UNE SOLUTION D'AZACITIDINE À 100 µG/ML APRÈS 3 HEURES À 37°C.....	41
FIGURE 9 : SUPERPOSITION DES CHROMATOGRAMMES AVEC AGRANDISSEMENT SUR LES 4 PRODUITS DE DÉGRADATION DE L'AZACITIDINE À 37°C AUX DIFFÉRENTS TEMPS D'ANALYSE	43
FIGURE 10 : CHROMATOGRAMME D'UNE SOLUTION D'AZACITIDINE À 100 µG/ML APRÈS 1 HEURE EN CONTACT AVEC HCL 0,1N.....	44
FIGURE 11 : CHROMATOGRAMME D'UNE SOLUTION D'AZACITIDINE À 100 µG/ML APRÈS 15 MINUTES EN CONTACT AVEC NaOH 0,1N	45
FIGURE 12 : CONCENTRATION MOYENNE D'AZACITIDINE RAPPORTÉE À LA CONCENTRATION INITIALE (EN %) EN FONCTION DU TEMPS ET DU MODE DE CONSERVATION APRÈS RECONSTITUTION AVEC LE MATÉRIEL CONSERVÉ AU RÉFRIGÉRATEUR	48
FIGURE 13 : CHROMATOGRAMME DE L'AZACITIDINE APRÈS CONGÉLATION À -20°C EN FIN D'ANALYSE (J8)	50
FIGURE 14 : ÉVOLUTION DES PRODUITS DE DÉGRADATION DE L'AZACITIDINE APRÈS CONGÉLATION À -20°C EXPRIMÉE EN POURCENTAGE PAR RAPPORT À LA SURFACE DE L'ENSEMBLE DES PICS APRÈS RECONSTITUTION AVEC LE MATÉRIEL CONSERVÉ AU RÉFRIGÉRATEUR	50
FIGURE 15 : ÉVOLUTION DES PRODUITS DE DÉGRADATION DE L'AZACITIDINE APRÈS CONGÉLATION À -20°C, DÉCONGÉLATION PUIS CONSERVATION 8H AU RÉFRIGÉRATEUR EXPRIMÉE EN POURCENTAGE PAR RAPPORT À LA SURFACE DE L'ENSEMBLE DES PICS APRÈS RECONSTITUTION AVEC LE MATÉRIEL CONSERVÉ AU RÉFRIGÉRATEUR	51
FIGURE 16 : ÉVOLUTION DES PRODUITS DE DÉGRADATION DE L'AZACITIDINE EN FONCTION DU MODE DE CONSERVATION EXPRIMÉE EN POURCENTAGE PAR RAPPORT À LA SURFACE DE L'ENSEMBLE DES PICS APRÈS RECONSTITUTION AVEC LE MATÉRIEL CONSERVÉ À TEMPÉRATURE AMBIANTE	53

Liste des tableaux

TABLEAU I : INTERNATIONAL PROGNOSTIC SCORING SYSTEM DANS LES SYNDROMES MYÉLODYSPLASIQUES	6
TABLEAU II : CLASSIFICATION OMS DES SYNDROMES MYÉLODYSPLASIQUES	7
TABLEAU III : NOMBRE DE FLACONS DE VIDAZA® UTILISÉS PAR PATIENT ET PAR JOUR DE TRAITEMENT.....	20
TABLEAU IV : PRÉPARATION DE LA GAMME D'ÉTALONNAGE DE L'AZACITIDINE	30
TABLEAU V : PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS DE DÉGRADATION PAR HCL 0,1N ET NAOH 0,1N.....	33
TABLEAU VI : RÉSULTATS DES MESURES DE RÉPÉTABILITÉ DE LA SOLUTION D'AZACITIDINE DANS LE DMSO	39
TABLEAU VII : EVOLUTION DE L'AIRES SOUS LA COURBE (AUC) DU PIC D'AZACITIDINE APRÈS DÉGRADATION À 37°C.....	42
TABLEAU VIII : EVOLUTION DE L'AIRES SOUS LA COURBE (AUC) DU PIC D'AZACITIDINE APRÈS CONTACT AVEC HCL 0,1N.....	44
TABLEAU IX : RÉTENTION RELATIVE DES DIFFÉRENTS PRODUITS DE DÉGRADATION DE L'AZACITIDINE	46
TABLEAU X : CONCENTRATION D'AZACITIDINE (EN µG/ML) AUX DIFFÉRENTS TEMPS D'ANALYSE EN FONCTION DU MODE DE CONSERVATION APRÈS RECONSTITUTION AVEC LE MATÉRIEL CONSERVÉ AU RÉFRIGÉRATEUR	48
TABLEAU XI : CONCENTRATION D'AZACITIDINE (EN µG/ML) AUX DIFFÉRENTS TEMPS D'ANALYSE EN FONCTION DU MODE DE CONSERVATION APRÈS RECONSTITUTION AVEC LE MATÉRIEL CONSERVÉ À TEMPÉRATURE AMBIANTE	52

Table des matières

LISTE DES ABRÉVIATIONS	1
INTRODUCTION.....	3
PREMIÈRE PARTIE : L'AZACITIDINE : MONOGRAPHIE ET MODALITÉS D'UTILISATION AU CHU DE NANCY	4
I L'AZACITIDINE	4
I-1. PRÉSENTATION DE LA MOLÉCULE.....	4
I-2. INDICATIONS THÉRAPEUTIQUES	5
I-2.1. <i>Syndrome myélodysplasique de risque intermédiaire-2 ou élevé selon l'index pronostique international</i>	5
I-2.2. <i>Leucémie myélomonocytaire chronique avec 10 à 29 % de blastes médullaires sans syndrome myéloprolifératif</i>	8
I-2.3. <i>Leucémie aiguë myéloblastique avec 20 à 30 % de blastes et dysplasie de lignées multiples, selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé</i>	8
I-2.4. <i>Place occupée par l'azacitidine dans la stratégie thérapeutique</i>	8
I-3. POSOLOGIE.....	9
I-4. MODALITÉS DE RECONSTITUTION ET D'ADMINISTRATION	10
I-5. PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES.....	10
I-5.1. <i>Propriétés pharmacodynamiques</i>	10
I-5.2. <i>Propriétés pharmacocinétiques</i>	12
I-6. EFFETS INDÉSIRABLES	12
I-7. INTERACTIONS MÉDICAMENTEUSES	13
I-8. CONTRE-INDICATIONS	13
I-9. CONDITIONS DE PRESCRIPTIONS ET DE DÉLIVRANCE	14
I-10. MÉTHODES DE DOSAGE DANS LA LITTÉRATURE	15
II PRATIQUES D'UTILISATION DE L'AZACITIDINE AU CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE NANCY.....	16
II-1. ETUDE DES PRESCRIPTIONS DES PATIENTS TRAITÉS PAR L'AZACITIDINE.....	16
II-2. ETUDE DES CONSOMMATIONS DE VIDAZA®	18
DEUXIÈME PARTIE : ETUDE DE STABILITÉ DE L'AZACITIDINE À 25 MG/ML APRÈS CONGÉLATION À -20°C.....	21
I OBJECTIF DE L'ÉTUDE.....	21
II MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	22
II-1. APPAREILLAGE	22
II-2. RÉACTIFS, PRINCIPES ACTIFS ET SOLVANTS	23
III VALIDATION DE LA MÉTHODE	24
III-1. MÉTHODE DE DOSAGE.....	24
III-1.1. <i>Choix de la méthode de dosage</i>	24
III-1.2. <i>Détermination de la longueur d'onde de détection</i>	24
III-1.3. <i>Conditions chromatographiques</i>	25
III-1.4. <i>Détermination du volume mort</i>	26
III-2. GRANDEURS CHROMATOGRAPHIQUES.....	26
III-2.1. <i>Efficacité</i>	27

III-2.2. Facteur de symétrie.....	27
III-2.3. Facteur de capacité.....	27
III-2.4. Sélectivité.....	28
III-2.5. Résolution.....	28
III-3. LINÉARITÉ.....	29
III-4. PRÉCISION.....	30
III-4.1. Répétabilité.....	30
III-4.2. Reproductibilité.....	31
III-5. SPÉCIFICITÉ.....	31
III-5.1. Spécificité vis-à-vis de l'excipient.....	31
III-5.2. Spécificité vis-à-vis des produits de dégradation.....	32
III-5.2.1. Dégradation à la chaleur.....	32
III-5.2.2. Dégradation en milieu acide ou basique.....	32
IV STABILITÉ DE LA SUSPENSION D'AZACITIDINE.....	33
IV-1. RÉALISATION DE L'ÉTUDE.....	33
IV-1.1. Détermination des temps d'analyse.....	33
IV-1.2. Préparation des seringues.....	34
IV-2. STABILITÉ PHYSIQUE.....	35
IV-3. STABILITÉ CHIMIQUE.....	35
IV-3.1. Préparation des dilutions.....	35
IV-3.2. Interprétation des résultats.....	36
V RÉSULTATS.....	37
V-1. VALIDATION DE LA MÉTHODE.....	37
V-1.1. Volume mort.....	37
V-1.2. Grandeurs chromatographiques.....	37
V-1.3. Linéarité.....	38
V-1.4. Précision.....	38
V-1.4.1. Répétabilité.....	38
V-1.4.2. Reproductibilité.....	40
V-1.5. Spécificité.....	40
V-1.5.1. Spécificité vis-à-vis du DMSO.....	40
V-1.5.2. Spécificité vis-à-vis du mannitol.....	41
V-1.5.3. Dégradation à la chaleur.....	41
V-1.5.4. Dégradation en milieu acide.....	43
V-1.5.5. Dégradation en milieu basique.....	45
V-2. STABILITÉ PHYSIQUE.....	46
V-3. STABILITÉ CHIMIQUE.....	47
V-3.1. Stabilité de la suspension d'azacitidine à 25 mg/mL après conservation du matériel au réfrigérateur avant reconstitution.....	47
V-3.1.1. Etude de la concentration d'azacitidine.....	47
V-3.1.2. Etude des produits de dégradation.....	49
V-3.2. Stabilité de la suspension d'azacitidine à 25 mg/mL après conservation du matériel à température ambiante avant reconstitution.....	52
VI DISCUSSION.....	54
VI-1. VALIDATION DE LA MÉTHODE DE DOSAGE.....	54
VI-2. MISE EN ÉVIDENCE DES PRODUITS DE DÉGRADATION.....	54
VI-3. STABILITÉ DE LA SUSPENSION D'AZACITIDINE À 25 MG/ML.....	54
VI-4. APPLICATION À LA DISPENSATION DES SERINGUES DE VIDAZA®.....	56
CONCLUSION.....	58
ANNEXE 1.....	59

ANNEXE 2	60
BIBLIOGRAPHIE	61
LISTE DES FIGURES.....	67
LISTE DES TABLEAUX	68
TABLE DES MATIÈRES	69

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 1^{er} octobre 2010**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE**

présenté par Audrey DURIEZ

Sujet :

Etude de stabilité d'une suspension d'azacitidine à 25 mg/mL
en seringues de polypropylène après congélation à -20°C.
Application à la production en Unité de Reconstitution
Centralisée des Cytotoxiques.

Jury :

Président :

M. GIBAUD Stéphane (Maître de conférence, Université
Henri Poincaré - Nancy 1)

Directeur :

M. VIGNERON Jean (Praticien Hospitalier, CHU Nancy)

Juges :

Mme NOIREZ Véronique (Praticien Hospitalier, CHR Metz
Thionville)

M. FAGNONI Philippe (Maître de conférence, Université de
Bourgogne - Dijon)

Vu,

Nancy, le 31/10/2010

Le Président du Jury

Le Directeur de Thèse

M. GIBAUD

M. VIGNERON

Vu et approuvé,

Nancy, le 31 AOUT 2010

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

Francine KEDZIEREWICZ
Vice-doyen

Francine PAULUS



Vu,

Nancy, le 10.09.2010

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

Pour le Président
et par Délégation,
La Vice-Présidente du Conseil
des Etudes et de la Vie Universitaire,

Catherine ELANKINSON

N° d'enregistrement :

3397-

N° d'identification :

TITRE :

**Etude de stabilité d'une suspension d'azacitidine à 25 mg/mL
en seringues de polypropylène après congélation à -20°C
Application à la production en Unité de Reconstitution Centralisée des Cytotoxiques**

Thèse soutenue le 1^{er} octobre 2010

Par Melle DURIEZ Audrey

RESUME :

L'azacitidine est administrée chez les patients non éligibles à une greffe de cellules souches hématopoïétiques et présentant un syndrome myélodysplasique, une leucémie myélomonocytaire chronique ou une leucémie aiguë myéloblastique avec des pourcentages de blastes médullaires bien définis. La stabilité de la suspension d'azacitidine à 25 mg/mL donnée par le laboratoire est de 45 minutes à température ambiante et de 8 heures conservée entre 2°C et 8°C. La stabilité courte de l'azacitidine oblige le pharmacien hospitalier à mobiliser du personnel pharmaceutique pour la préparation des seringues le week-end ou les jours fériés.

Dans le but d'envisager la préparation à l'avance, la stabilité de l'azacitidine a été étudiée à une concentration de 25 mg/mL après congélation à une température de -20°C. La stabilité a été définie comme correspondant à une variation de la concentration de principe actif inférieure à 5 %.

Notre étude a révélé que la suspension d'azacitidine à 25 mg/mL en seringues de polypropylène est stable jusqu'à 8 jours après congélation à -20°C. La stabilité a été démontrée immédiatement après décongélation à température ambiante, et pendant 8 heures de conservation au réfrigérateur après la décongélation. L'écart maximal observé de la concentration d'azacitidine par rapport à J0 est de 4,5 %. Les trois produits de dégradation observés étaient présents dès la reconstitution de l'azacitidine. Aucun autre produit n'est apparu après 8 jours de congélation. Leur pourcentage par rapport à la surface de l'ensemble des pics augmente progressivement de 4,53 % à J0 à 5,71 % à J8 ; l'écart maximal de 1,18 % est faible et n'a aucune incidence sur la pratique clinique.

De plus, la stabilité a été démontrée lorsque le matériel nécessaire à la reconstitution a été préalablement conservé à température ambiante, mais également lorsqu'il a été conservé au réfrigérateur. Les résultats de notre étude sont donc applicables à la production en Unité de Reconstitution Centralisée des Cytotoxiques, qu'elle soit équipée d'une hotte à flux d'air laminaire ou d'un isolateur.

La congélation des seringues d'azacitidine a été mise en place depuis la mi-juin 2010 à la pharmacie du CHU de Nancy. En raison du coût non négligeable de Vidaza® (354 euros), la préparation des seringues implique d'éviter au maximum la perte de produit. Leur congélation permet dans la production quotidienne de faire de nombreuses économies de flacons et d'effectuer à l'avance la préparation des seringues pour le week-end et les jours fériés.

MOTS CLES :

Azacitidine, stabilité, congélation, CLHP.

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
M. VIGNERON Jean	Pharmacie Brabois Adultes CHU Nancy	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> Bibliographique <input type="checkbox"/> Thème <input type="checkbox"/>

Thèmes

1 – Sciences fondamentales

3 – Médicament

5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement

4 – Alimentation – Nutrition

6 – Pratique professionnelle