

# Master en Pharmacie

## Travail Personnel de Recherche

Etude de stabilité des solutions de melphalan  
destinées à l'administration intra-vitréenne dans le  
traitement du rétinoblastome

présenté à la

Faculté des Sciences de  
L'Université de Genève

par

**Sarah Wellnitz**

Unité de recherche

**Pharmacie centrale du CHUV**

Directeur de l'unité

**Prof. Farshid Sadeghipour**

**Responsable**

Prof. Farshid Sadeghipour

**Superviseurs**

Dr. Lina Berger

Dr. Gregory Podilsky

Genève  
2015

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Lina Berger, pharmacienne responsable de l'unité de contrôle qualité de la pharmacie centrale du CHUV, pour son aide et ses nombreux conseils avisés qui m'ont permis d'appréhender au mieux ce travail de recherche. Je tiens également à lui exprimer ma reconnaissance pour tout le temps qu'elle m'a accordé et pour son implication personnelle.

Je remercie le Professeur Farshid Sadeghipour, pharmacien-chef de la pharmacie centrale du CHUV, pour son accueil chaleureux au sein de son service et également pour ses appréciables suggestions et pour son encouragement à la réalisation de ce projet.

Je souhaite remercier le Docteur Grégory Podilsky, pharmacien responsable de l'unité de fabrication de la pharmacie centrale du CHUV pour sa collaboration au cours de ce stage.

Merci à toute l'équipe du laboratoire de contrôle qualité pour leur gentillesse et leur bonne humeur qui ont facilité mon intégration dans l'unité. Je les remercie chaleureusement pour leurs nombreuses indications qui m'ont éclairées tout au long de la pratique inhérente à ce travail de recherche.

Je tiens également à remercier Jean-Christophe Devaud, pharmacien responsable de l'unité de logistique pharmaceutique de la pharmacie centrale du CHUV, pour ses précieux conseils et pour le temps qu'il m'a accordé.

Mes remerciements vont également à Perrine, pour son soutien durant la dernière ligne droite au laboratoire, ainsi que pour la relecture de mon travail.

Un grand merci à mes chers camarades Maxime et Najat ainsi qu'à Dorothée et Elodie, pour l'aide et le soutien qu'ils m'ont apporté au cours de ce stage et tout au long de mes études.

Je remercie mes parents et ma sœur qui m'ont épaulée depuis le début de l'aventure.

## Résumé

### **Introduction**

Le rétinoblastome est une pathologie cancéreuse agressive dont le diagnostic est généralement posé durant les cinq premières années de vie. Il s'agit du cancer intraoculaire juvénile le plus courant. Il existe d'une part les traitements chirurgicaux et invasifs, et d'autre part les traitements conservateurs dont la chimiothérapie. Le traitement avec Alkeran® ophtalmique est une stratégie thérapeutique de choix. A la demande de l'hôpital ophtalmique de Lausanne, l'Alkeran® destiné à la voie intravitréenne est régulièrement préparé par l'unité de fabrication de la pharmacie centrale du CHUV. Le melphalan présentant un problème de stabilité, il est indispensable de minimiser l'intervalle de temps entre la production et l'administration du médicament. Au vu de ces données, une étude de stabilité est mise en place.

### **Matériel et méthodes**

La technique analytique utilisée au cours du travail est la chromatographie liquide à haute performance en phase inverse utilisant une détection par ultra-violet à l'aide un détecteur à barrettes de diodes. La méthode utilisée est celle de la Pharmacopée Européenne 8.5. Sa spécificité est démontrée d'une part avec des solutions de standard Ph. Eur. de melphalan pur, et de conformité du système ainsi que sur des solutions d'Alkeran® ayant subi une dégradation forcée. L'intervalle de mesure pour la stabilité a été déterminé par un suivi de solutions de standard Ph. Eur. et d'Alkeran®. La validation de la méthode n'a pas pu être effectuée dans les conditions expérimentales actuelles, du fait la très grande instabilité du produit. De ce fait, toutes les mesures ont été effectuées en triplicat afin de pouvoir estimer l'erreur propre à la méthode. La stabilité de la préparation commerciale d'Alkeran® dans son conditionnement final à 15µg/mL et 300µg/mL a été mesurée à température ambiante et à température du réfrigérateur, à l'abri de la lumière. Des essais indicatifs sur une modification du protocole de fabrication et sur la stabilité aux températures de congélation ont été effectués.

### **Résultats et discussion**

Après étude du comportement général de l'Alkeran® vis-à-vis de la méthode utilisée, la spécificité a été confirmée. L'observation du comportement du melphalan sur 7h a montré que ce produit subit une dégradation très rapide à température ambiante, ainsi qu'à 4°C. L'intervalle entre chaque injection pour l'étude de stabilité a donc été fixé à 2h. L'étude de stabilité de l'Alkeran® ophtalmique à température ambiante, à l'abri de la lumière a permis de confirmer les données du fabricant : le produit est stable sur une période inférieure à 2h (300µg/mL : 86.44% ± 2.42% et 15µg/ml : 91.94% ± 0.10%). A température du réfrigérateur, la stabilité de la solution à 15µg/mL se prolonge jusqu'à 12h (94.22% ± 1.45%). En revanche, pour une concentration de 300µg/mL la stabilité n'est probable que jusqu'à 8h (91.05% ± 0.70%).

### **Conclusion et perspectives**

L'étude de stabilité à température du réfrigérateur a montré que le médicament est stable sur une période de 8h. Etant donné que l'unité de fabrication annonce une stabilité de l'Alkeran® ophtalmique pour 3h maximum, le résultat de la présente étude permet de prolonger le délai entre la reconstitution et le moment de l'administration. Les essais indicatifs pour le changement de protocole de fabrication montrent des résultats probants, ce dernier pourrait être utilisé à l'avenir. Au vu des résultats des essais indicatifs à température du congélateur, il serait envisageable d'effectuer une étude complète de stabilité à -20°C voire -80°C afin de prolonger ce délai. Effectivement, la stabilité au congélateur des préparations de l'Alkeran® dénote une perspective d'avenir quant au stockage prolongé des seringues prêtes à l'emploi.

## **Liste des abréviations**

ADN : Acide desoxyribonucléique

ACN : Acétonitrile de qualité HPLC

CHUV : Centre Hospitalier Universitaire Vaudois

CV : Coefficient de Variation

DAD : Diode Array Detector

DOH : Dihydroxymelphalan

EDQM : European Directorate for the Quality of Medicines

GC : Chromatographie en phase Gazeuse

HCl : Acide Chlorhydrique

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

LC : Liquid Chromatography

MOH : Monohydroxymelphalan

MS : Spectrométrie de Masse

NaCl : Chlorure de sodium

Ph. Eur. : Pharmacopée Européenne 8.5

RP : Reverse Phase

Rs : Résolution

$t_r$  : temps de rétention

UV : Ultra-Violet

## Table des matières

1.Introduction.....	1
1.1. Contexte et objectifs du travail de recherche.....	1
1.2. Le rétinoblastome : généralités et traitements .....	1
1.3. Chimie du melphalan.....	3
1.4. Technique analytique utilisée .....	6
2.Matériel et méthode.....	9
2.1. Produits chimiques.....	9
2.2. Matériel.....	9
2.3. Appareillage et conditions analytiques .....	9
2.4. Essais préliminaires.....	10
2.5. Validation de la méthode .....	11
2.6. Etude de stabilité .....	11
2.7. Mesures indicatives de la stabilité du melphalan.....	12
3.Résultats et discussion .....	13
3.1. Développement de la méthode.....	13
3.2. Essais préliminaires sur le comportement général de l'Alkeran® vis-à-vis de la méthode.....	13
3.3. Essais de spécificité de la méthode .....	15
3.4. Paramètres de la méthode.....	17
3.5. Suivi sur une journée des solutions d'Alkeran® et des solutions de standard Ph. Eur. ....	20
3.6. Etude de stabilité .....	22
3.7. Essais indicatifs.....	27
4.Conclusion et perspectives .....	29
5.Bibliographie .....	30
6.Annexes .....	33

# 1. Introduction

## 1.1. Contexte et objectifs du travail de recherche

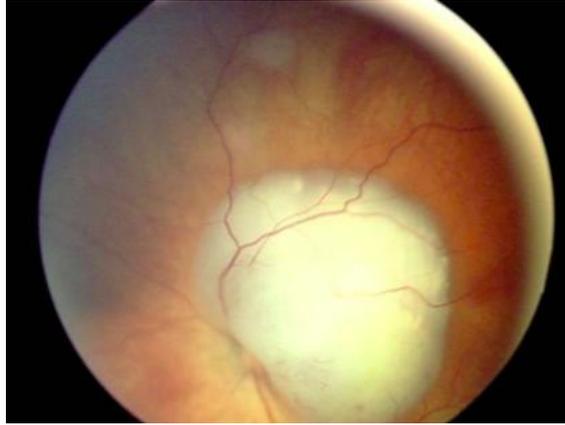
Les traitements concernant les pathologies liées à l'œil, sont essentiellement administrés à l'hôpital ophtalmique de Lausanne. L'Alkeran® sous forme de préparation injectable destinée à la voie intravitréenne étant un traitement de choix pour le rétinoblastome, il est de ce fait fréquemment préparé par l'unité de fabrication de la pharmacie centrale du CHUV à la demande du service d'oncologie de l'hôpital ophtalmique. L'Alkeran® présentant un problème de stabilité sur le moyen et long terme, la question de sa stabilité durant le processus allant de la production à l'administration du médicament (processus de fabrication, transport de la pharmacie centrale à l'unité de soin, et temps nécessaire à l'administration) se pose. En effet, pour assurer la qualité du traitement il est nécessaire d'assurer la stabilité de la substance active jusqu'à la fin de l'administration du médicament. De ce fait, une étude de stabilité de la préparation d'Alkeran® pour injection intra-vitréenne s'impose. Le but de ce travail est donc dans un premier temps de développer une méthode analytique de dosage par HPLC-UV/DAD, afin de mener une étude de stabilité sur des solutions d'Alkeran® aux concentrations extrêmes préparées par le CHUV (300µg/mL et 15µg/mL) dans leur conditionnement final, soit des seringues de 1mL stériles en polypropylène.

## 1.2. Le rétinoblastome : généralités et traitements

Le rétinoblastome est une pathologie cancéreuse qui touche la rétine. Elle se déclare dans les premières années de la vie, typiquement avant l'âge de 5 ans. Il existe différentes formes de la maladie. En effet, la pathologie peut toucher un ou deux yeux, elle est ainsi qualifiée de unilatérale ou multilatérale respectivement. Elle peut être aussi soit unifocale soit multifocale.

Le diagnostic se fait très tôt dans la vie, par l'observation de différents signes : premièrement, la leucocorie, aussi appelée œil de chat, est un signe typique de rétinoblastome. L'œil de l'enfant est marqué d'une empreinte blanchâtre, particulièrement visible lorsque l'œil est exposé à une lumière intense comme celle d'un flash. Deuxièmement l'observation de strabisme dans les premiers mois de la vie peut aussi être un signe de rétinoblastome (1). Il est important d'être attentif à ces symptômes et ne pas les considérer comme anodins, car plus le diagnostic est précoce, plus le pronostic est favorable. (2).

Le diagnostic de rétinoblastome est confirmé par un examen du fond de l'œil sous anesthésie générale, et permet de visualiser la tumeur en relief. En complément de cet examen une échographie oculaire permet de mesurer l'étendue de la masse tumorale.



**Figure 1 : fond de l'œil au moment du diagnostic d'un rétinoblastome plurifocal (image par caméra RETCAM®, ophtalmoscopie indirecte)**

Le rétinoblastome est une maladie qui possède une composante génétique dominante. En effet, la mutation du gène Rb1, situé sur le chromosome 13, entraîne une forte prédisposition à la maladie. 90% des malades sont atteints de cette mutation qui inactive le gène suppresseur de tumeur Rb1. Ce dernier est le seul gène connu pour la prédisposition génétique. Les mutations effectuées sur ce gène sont transmises à la descendance de manière autosomale et dominante. (3)

Différentes classes de traitements sont disponibles. Il est possible de les classer de la manière suivante. Tout d'abord, les traitements conservateurs. Premièrement ceux qui concernent les tumeurs antérieures à l'équateur de l'œil : la cryothérapie (réduction de la température de la tumeur jusqu'à  $-80^{\circ}\text{C}$ ) et la curiethérapie (implantation d'un disque d'or qui émet des grains d'iode radioactif actifs contre les cellules tumorales). Deuxièmement ceux qui concernent les tumeurs postérieures à l'œil : la thermo-chimiothérapie (réchauffement de la tumeur par un laser), la photo-coagulation (projection d'un rayon lumineux intense et étroit sur les néo-vaisseaux) et la radiothérapie externe (traitement utilisé en dernière intention, en cas d'échec des autres thérapies. Elle consiste en une irradiation de l'œil de l'enfant de quelques minutes quotidiennement sur une période de 1 mois environ). Ensuite, une prise en charge chirurgicale est envisageable, mais celle-ci porte préjudice au confort du patient. Elle peut même conduire à l'énucléation. Les traitements médicamenteux de type chimiothérapies constituent une part importante de la prise en charge des malades atteints de rétinoblastome. (1) (4) En effet, ils permettent une diminution de l'utilisation des traitements impliquant des radiations, qui peuvent entraîner des effets indésirables conséquents comme une déformation cranio-faciale, une cataracte, le syndrome de l'œil sec ou encore des risques de tumeurs secondaires (5).

Le but d'une chimiothérapie dans le traitement du rétinoblastome réside tout d'abord dans le fait de diminuer le volume de la tumeur. Un des traitements classiques consiste en l'administration de différents agents chimiothérapeutiques à la fois. Une association de vincristine, etoposide et de carboplatine est administrée le premier jour, suit une dose d'etoposide le jour 2. Le patient est suivi sur plusieurs semaines de traitement d'affilée. Les doses sont définies selon l'âge et le poids du patient et varient selon le degré de l'atteinte. (6).

Le melphalan, quant à lui, représente un traitement de choix en ce qui concerne le rétinoblastome. Néanmoins, il a été découvert que ce dernier présente une certaine toxicité systémique ce qui limite son emploi en administration locale (7).

Ce médicament fait partie des agents alkylants et peut être utilisé seul ou en association avec d'autres agents cytotoxiques. Les voies d'administration sont multiples, en effet il est possible d'administrer le melphalan par voie orale (sous forme de comprimé), par voie intraveineuse, sous forme d'injection simple ou de perfusion, ou encore par injection intra-vitréenne. Cette dernière voie d'administration est particulièrement intéressante dans le cadre du traitement du rétinoblastome, puisque le principe actif est directement injecté sur le lieu où il est supposé exercer son action. Ceci diminue l'impact des effets secondaires par rapport à une administration systémique.

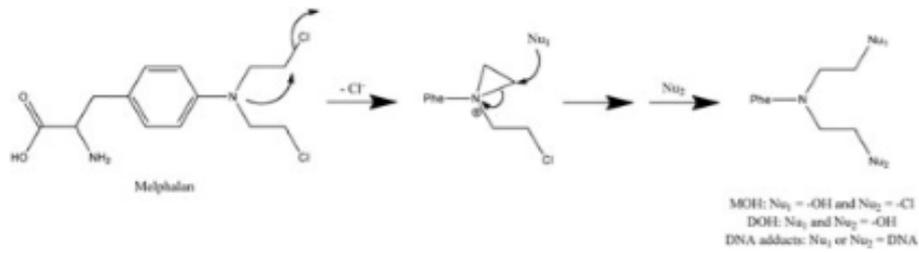
L'utilisation du melphalan en administration intra-vitréenne a été introduite dans les années 1990 par Kaneko et Suzuki (8) . Malgré d'énormes progrès depuis, la principale cause de l'échec demeure la persistance ou la réapparition du « *vitreous seeding* ». Ce phénomène résulte de la sélection clonale de cellules de rétinoblastome qui sont capables de proliférer dans le milieu vitreux. Les cellules survivant dans des conditions hypoxiques peuvent développer des propriétés de chimiorésistance. Les études pharmacocinétiques ont montré que, si les nouvelles voies d'administration ont grandement amélioré la pénétration oculaire des médicaments par rapport à la chimiothérapie systémique, la concentration tumoricide est à peine atteinte au niveau de la cavité vitréenne, et ne persiste pas suffisamment longtemps pour un contrôle optimal de la tumeur. (9)

La chimiothérapie intra-vitréenne présente également un risque de propagation loco-régionale et systémique de la tumeur. Effectivement, dans le cas d'une tumeur très agressive telle que le rétinoblastome, il y a un risque que des cellules tumorales se trouvant dans la cavité vitréenne soient entraînées le long du parcours de l'aiguille. Celles-ci peuvent éventuellement venir se greffer à l'extérieur du corps vitré et créer une atteinte orbitaire. (10)

Néanmoins, cette voie d'administration a été ré-évaluée récemment, décrivant une procédure d'injection avec une sécurité renforcée, un ajustement de la dose du melphalan, et des rapports d'efficacité en termes de contrôle de la tumeur. La pratique d'une paracentèse dans la chambre antérieure de l'œil, ainsi que l'extraction d'humeur aqueuse (volume identique à celui du médicament qui sera par la suite administré) grâce à l'emploi d'une aiguille extrêmement fine traversant la conjonctive et la sclère permet de limiter la dissémination des cellules tumorales. (10)

### 1.3. Chimie du melphalan

Cependant, d'un point de vue chimique, le principal inconvénient de cette substance est son instabilité. En effet, le melphalan est un produit instable qui spontanément va être hydrolysé et former du monohydroxymelphalan (MOH), un produit de dégradation instable. Ce dernier, va à son tour être hydrolysé et donner du dihydroxymelphalan (DOH), quant à lui stable. (11)

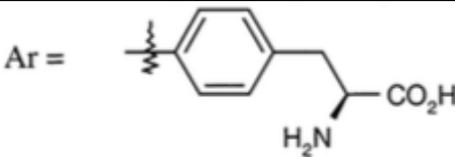
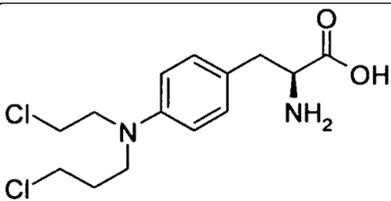
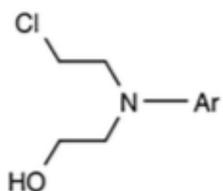
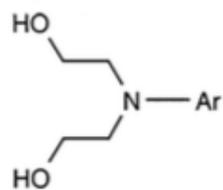
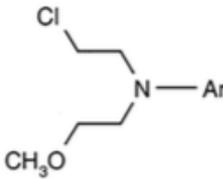
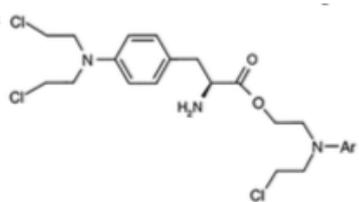


**Figure 2 : mécanisme de réaction de l'attaque nucléophile sur le melphalan menant à la formation de MOH et de DOH ou adduits de l'ADN (11)**

Des réactions de méthylation peuvent également avoir lieu sur le melphalan, le remplacement d'un des deux chlores du melphalan par un groupement méthoxy donne le méthoxymelphalan.

Un autre type de réaction peut se produire avec le melphalan. Ce dernier peut subir une réaction de dimérisation. La formation du dimère rend la molécule inefficace.

Tableau 1 : Structures et nom du melphalan et de ses différents produits de dégradation (12)

Nom	Structure	Poids moléculaire [Da]
Groupe aryle	Ar = 	
Melphalan		305.2
Monohydroxymelphalan		286.7
Dihydroxymelphalan		268.3
Methoxymelphalan		300.7
Dimère de melphalan		

Le melphalan est un agent alkylant. Il possède un groupe amine tertiaire substitué par un chlorure d'alkyle. Ce dernier possède la capacité de former un groupement électrophile puissant et de réagir avec des groupements nucléophiles puissants. Le chlore possédant une charge partielle négative, il induit une charge partielle positive au carbone. Après le départ du chlore, il y a formation d'un cycle aziridine instable avec une amine quaternaire, fortement réactif. Un des carbones de ce cycle possède une charge partielle fortement positive qui va subir une attaque nucléophile des bases de l'ADN et entraîner une ouverture du cycle. Dès lors, il y a formation d'adduits sur l'ADN, ce qui va en changer la structure. L'alkylation cause des dommages à l'ADN qui doivent être réparés. Trois cas de figure sont observés : premièrement, lorsque les dommages sont trop importants, le cycle cellulaire peut être interrompu. Deuxièmement, une réparation de l'ADN est envisageable (dans le meilleur des cas les conséquences de l'alkylation sont

réparées et aussi celles à l'origine du cancer, ce qui permet à la cellule de retourner dans son état primordial). Troisièmement, la cellule peut entrer en apoptose, car les dommages sont irréparables. (13)

#### 1.4. Technique analytique utilisée

Le dosage du melphalan peut être réalisé à l'aide de différentes techniques analytiques, comme décrit dans la littérature.

La chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à un spectromètre de masse (impact électronique et ionisation chimique) a été utilisée par une équipe de recherche en 1997 (14). La GC-MS avec ionisation chimique est également utilisée pour les recherches de *Pallante et al.* (15). Une étude du melphalan a été réalisée par *Mirkou et al.* en utilisant l'HPLC couplée à un spectromètre de masse en tandem (16). D'autres types de détections sont utilisées en combinaison avec l'HPLC, notamment la détection électrochimique (17), la fluorescence (18) (19) ou encore l'UV-DAD (20). Dans le cadre de cette recherche, le choix s'est tourné vers l'HPLC couplée à un détecteur UV-DAD.

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC – *High Performance Liquid chromatography*) est une méthode analytique largement utilisée dans le domaine pharmaceutique (21). Elle permet de séparer des composés d'un mélange complexe en vue de leur identification ou quantification. Ce derniers sont entraînés au travers d'une colonne chromatographique (phase stationnaire) à l'aide de la force éluante de solvants (phase mobile) (22).

Au cours de ce travail c'est la chromatographie liquide en phase inverse qui est utilisée (RP-HPLC – *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography*). La phase stationnaire est le plus souvent constituée de silice (SiOH) greffée de groupements alkyles (C4, C8, C18, phényle, cyanopropyle). Elle est donc apolaire. La phase mobile est quant à elle plutôt de nature polaire. Elle est généralement composée d'un mélange d'eau et d'un modificateur organique comme le méthanol ou encore l'acétonitrile.

Les paramètres influençant la séparation des composés en HPLC sont nombreux. Des variations sur les paramètres de colonne, la longueur et le diamètre, sur ceux ayant trait au greffage de la silice ou encore le diamètre des pores ont une importance sur la rétention des analytes. La phase mobile est une variable importante du système chromatographique, son débit, son pH, sa composition sont des variables qui influencent fortement les analyses. La composition de la phase mobile joue un rôle important, car en effet, chaque combinaison de solvants a une force éluante différente et permet d'entraîner plus ou moins fortement et rapidement les différents analytes selon leur nature physico-chimique. Le pH de la phase mobile influence l'état d'ionisation des analytes, qui modifie leur affinité pour les différentes phases du système (23).

Un système HPLC se constitue d'une pompe à haute pression, d'un injecteur, d'une colonne chromatographique, d'un détecteur et enfin d'un système informatique permettant le traitement des données.

Le résultat d'une analyse HPLC est obtenu sous forme d'un chromatogramme. Cette courbe représente la variation de la concentration de l'analyte à la sortie de la colonne en fonction du temps. Dans le meilleur des cas, le chromatogramme doit être une suite de pics gaussiens, clairement séparés les uns des autres, dont la silhouette est fine, et se situant au-dessus de la ligne de base.

Des grandeurs chromatographiques permettent de caractériser les chromatogrammes obtenus.

Premièrement le temps de rétention,  $t_R$ , il correspond au temps nécessaire à l'élution d'un produit exprimé en minutes. Le volume de rétention,  $V_R$ , correspondant au volume de phase mobile nécessaire pour l'élution d'un composé. Il peut être calculé avec la formule suivante :

$$V_R = t_R \times F$$

**Équation : expression du volume de rétention en fonction du temps de rétention et le débit**

Avec  $V_R$ , volume de rétention en millilitres ;  $t_R$ , temps de rétention en minutes ;  $F$ , le débit exprimé en millilitres par minute.

Deuxièmement, le facteur de rétention,  $k$ , est défini comme étant le rapport entre la quantité de composant dans la phase stationnaire sur la quantité de composant dans la phase mobile. Il est aussi appelé facteur de capacité  $k'$  ou encore coefficient de distribution massique,  $D_M$ . Il peut être défini à partir du chromatogramme avec l'équation décrite ci-après :

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

**Équation 1 : expression du facteur de rétention en fonction du temps de rétention et du temps mort**

Avec  $t_R$ , le temps de rétention de l'analyte, exprimé en minutes.  $t_M$ , représente le temps mort, ou « *hold-up time* » correspondant au temps nécessaire à l'élution d'un composé non retenu dans la colonne (exprimé en minutes)

Le nombre de plateaux théoriques ou efficacité,  $N$ , est exprimée par le rapport entre la longueur de colonne,  $L$  sur la hauteur équivalente à un plateau théorique,  $H$ , comme le montre l'équation ci-après :

$$N = \frac{L}{H}$$

**Équation 2 : expression de l'efficacité en fonction de l'hauteur équivalente à un plateau théorique et à longueur de la colonne**

Elle correspond à l'efficacité apparente peut être calculée lorsque les conditions sont isothermes, isodenses et isocratiques en appliquant l'équation suivante.

$$N = 5,54 \times \left(\frac{t_R}{w_h}\right)^2$$

**Équation 3 : expression de l'efficacité en fonction du temps de rétention et de la largeur du pic à la mi-hauteur**

Avec  $t_R$  le temps de rétention, et  $w_h$  la largeur du pic à mi-hauteur.

La résolution :  $R_s$ . Elle définit la qualité de la séparation, elle est décrite par les équations ci-après.

$$R_s = \frac{1.18 \times (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

**Équation 4 : expression de la résolution en fonction des temps de rétention et de la largeur du pic à mi-hauteur des différents analytes**

$$R_s = 0.25 \times \frac{k'}{k' + 1} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \sqrt{N_2}$$

**Équation 5 : expression de la résolution en fonction du facteur de rétention, du facteur de sélectivité et de l'efficacité**

Avec  $t_R$  le temps de rétention et  $w_h$  la largeur du pic à mi-hauteur ;  $k'$  le facteur de rétention,  $\alpha$  la sélectivité (ou facteur de sélectivité) et  $N$  l'efficacité.

Les pics sont résolus lorsque  $R_s \geq 1.25$ .

Ensuite, le facteur de sélectivité  $\alpha$ , qui détermine si le composé a été correctement séparé ou non. Elle correspond au rapport des facteurs de rétention  $k'$  des deux composés qui se suivent sur le chromatogramme. Selon l'équation suivante :

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} = \frac{k'2}{k'1}$$

**Équation 6 : expression du facteur de sélectivité en fonction des facteurs de rétention des analytes**

Avec  $t_R$  le temps de rétention,  $t_M$ , le temps mort, tout deux exprimés en minutes.  $k'$  représente le facteur de capacité ou facteur de rétention de chacun des composés.

Les temps de rétention des composés en LC permettent d'identifier le composé qui est détecté. Avec le même appareillage, les mêmes conditions chromatographiques, le temps de rétention de chacun des analytes est toujours le même. (24)

Les résultats obtenus en LC se présentent sous la forme de valeurs représentatives de l'aire sous le pic dans le chromatogramme. Cette valeur est reliée à la concentration de l'analyte. Dans le cas d'un dosage, une droite de calibration utilisant des échantillons d'étalonnage à des concentrations fixées permet de déterminer la concentration de l'analyte. Il est aussi possible de faire des dosages relatifs, en comparant toutes les aires de l'analyte à son aire au temps zéro.

Le système de détection utilisé au cours de ce travail est un détecteur UV-DAD (*Ultra Violet - Diode Array Detector*). Il mesure l'absorbance de la lumière UV par l'analyte, et permet ainsi de le quantifier. Ce n'est pas un détecteur universel puisqu'il nécessite la présence d'un chromophore sur la molécule d'intérêt. Néanmoins, son plus grand avantage est qu'il permet d'effectuer un balayage de nombreuses longueurs d'ondes différentes à la fois, et ainsi permet non seulement de déterminer la longueur d'onde d'absorption maximale pour les différents composés compris dans le mélange à analyser, mais encore permet de faire les mesures de tous les composés du mélange en même temps. Ceci présente le grand avantage de diminuer le temps des analyses en détectant tous les composants du mélange en même temps.

## 2. Matériel et méthode

### 2.1. Produits chimiques

L'eau et l'acétonitrile tous deux de qualité HPLC sont fournis par Merck (Merck, Darmstadt, Allemagne). L'acétate d'ammonium et l'acide acétique glacial sont respectivement fournis par Fluka (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, Etats-Unis) et Merck (Merck, Darmstadt, Allemagne). La triéthylamine est obtenue chez Sigma (Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri, Etats-Unis).

La solution de chlorure de sodium 0.9% est fournie par Bichsel (Bichsel AG, Interlaken, Suisse).

Les standards de melphalan chlorhydrate et le standard de melphalan pour la conformité du système sont obtenus auprès des laboratoires de la Pharmacopée Européenne (EDQM, Pharmacopée Européenne, Strasbourg, France).

L'Alkeran® pour injectable est fourni par les laboratoires ProConcepta (ProConcepta AG, Zug, Suisse).

### 2.2. Matériel

Les seringues Luer-Lock™Tip en polypropylène de capacité de 1mL, 3mL, 5mL et 10mL sont fournies par BD (BD, Franklin Lakes, New-Jersey, Etats-Unis). Les seringues Luer-Lock™Tip en polypropylène de capacité 60mL sont quant à elles fournies par B. Braun (B. Braun, Melsungen, Allemagne). Les bouchons pour seringues Combi-Lock stériles en polypropylène sont fournis par Codan (Codan pvb Medical GmbH, Lensahn, Allemagne). Les aiguilles (0.9 x 55mm) sont obtenues chez Terumo (Terumo Europe N. V., Leuven, Belgique).

Les poches pour perfusion de capacité de 150mL sont obtenues chez Fresenius (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Allemagne). Celles de 250mL sont obtenues chez Sweco (Sweco S.A., Suisse). Les poches pour perfusion de capacité 1000mL remplies de NaCl 0.9%, Ecobag®, sont fournies par B. Braun (B. Braun Medical AG, Sempach, Luzern, Suisse).

Les dispositifs de prélèvement et de reconstitution sont fournis par Baxter (Baxter Healthcare SA, Deerfield, Illinois, Etats-Unis).

La balance analytique utilisée au cours de ce travail est la suivante : Mettler Toledo AX205 DeltaRange® (Mettler-Toledo, Columbus, Ohio, Etats-Unis).

### 2.3. Appareillage et conditions analytiques

Tous les essais ont été effectués sur l'appareillage de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) décrit ci-après.

Le système HPLC Varian ProStar est composé des modules suivants : une pompe pour solvant (ProStar 230 Solvent Delivery Module), un injecteur automatique (ProStar 410 Autosampler), et un détecteur UV-DAD (ProStar UV-DAD 335 Photodiode Array Detector). La phase stationnaire utilisée pour cette étude consiste en deux colonnes en ligne, phase inverse, de silice post-greffée avec des chaînes alkyls C18 (Merck, Chromolith RP-18e, 100-4.6mm). La phase mobile utilisée est celle prescrite par la Pharmacopée Européenne 8.5, il s'agit d'une méthode gradient impliquant deux phases mobiles, la phase A et la phase B dont la composition exacte est décrite ci-après.

La phase A se compose de 5 volumes d'acétonitrile, pour 95 volumes d'eau contenant : 0.01% v/v de triéthylamine, 0.05% v/v d'acide acétique et de 0.05% m/m d'acétate d'ammonium.

La phase B se compose quant à elle, de 60 volumes d'acétonitrile pour 40 volumes d'eau contenant : 0.01% v/v de triéthylamine, 0.05% v/v d'acide acétique et de 0.05% m/m d'acétate d'ammonium.

Le gradient utilisé lors des analyses est présenté dans le Tableau 2 ci-dessous :

**Tableau 2 : Gradient de la méthode HPLC-UV/DAD utilisé pour les analyses de solutions de melphalan (Alkeran®) prescrit e par la Pharmacopée Européenne 8.5**

intervalle [minutes]	phase A [% v/v]	phase B [% v/v]
0-20	100 → 0	0 → 100
20-25	0	100

Le volume d'injection est de 20µL, le débit est de 1.5mL/min. Le temps d'équilibration de la méthode est fixé à 15 minutes.

La détection se fait à une longueur d'onde égale à 260nm.

Le logiciel LC-Workstation Multi Instrument Version 6.41 Varian ProStar est utilisé pour gérer la chaîne HPLC, l'acquisition ainsi que le traitement des données.

La dilution des échantillons d'analyse est effectuée systématiquement dans une solution de NaCl 0.9%.

## 2.4.Essais préliminaires

Les essais préliminaires d'une part sur le comportement général de l'Alkeran® ont été effectués sur des échantillons d'Alkeran® à une concentration de 200µg/mL puis 20µg/mL ainsi que 300µg/mL puis 30µg/mL. D'autre part, les essais préliminaires concernant la spécificité de la méthode utilisée ont été fait d'abord sur un échantillon de la matrice (propylèneglycol et NaCl 0.9%), et ensuite avec des solutions de standard de melphalan Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.) ainsi que sur des solutions de melphalan standard Ph. Eur. pour conformité du système. Ces dernières ont été analysées avant et après dégradation forcée à l'étuve à 60°C pendant 15 minutes. De plus, un essai sur des solutions d'Alkeran® de concentration égale à 30µg/mL ayant subi une dégradation forcée (15min, 60°C) est effectué afin de confirmer la spécificité de la méthode.

Les mesures pour la détermination du temps d'équilibre des phases mobiles, permettant d'obtenir des temps de rétention reproductibles d'une injection à l'autre pour le melphalan, ont été effectuées sur les échantillons d'Alkeran® aux concentrations de 200 et 20 µg/mL.

Les instructions pour la reconstitution de l'Alkeran® et la préparation des échantillons pour les essais préliminaires pour le comportement général du médicament vis-à-vis de la méthode de la Pharmacopée Européenne sont présentées en annexe 1.

Le protocole de préparation des échantillons des standards de la Ph. Eur. est présenté en annexe 2 et en annexe 3.

L'instruction pour la reconstitution de l'Alkeran® et la préparation des échantillons de 30µg/mL ayant subi la dégradation forcée est présentée en annexe 4.

Des essais pour l'amélioration de la résolution du pic du melphalan avec celui d'une de ses impuretés sont effectués sur des solutions de standard Ph. Eur. de melphalan pour conformité du système ayant subi une dégradation forcée afin de créer une impureté supplémentaire répertoriée dans la monographie du melphalan de la Pharmacopée Européenne. Des modifications sur différents paramètres de la méthode tels que l'étendue du gradient et la longueur de la phase stationnaire sont opérées. Le protocole de préparation des solutions de standard Ph. Eur. de melphalan pour conformité du système est décrit en annexe 3.

Pour finir, un suivi des concentrations de melphalan sur une journée (sept heures) est effectué d'une part sur une solution d'Alkeran®, et d'autre part sur une solution de standard de melphalan Ph. Eur., toutes deux de concentration égale à 30µg/mL. Cette étape permet de déterminer les intervalles de temps pour l'étude de stabilité de la préparation dans son conditionnement final.

L'instruction pour la préparation de ces échantillons d'analyses est jointe en annexe 1 et 5.

## 2.5. Validation de la méthode

Une validation au sens propre du terme n'a pas pu être effectuée au cours de ce travail de recherche, dû à la très grande instabilité du produit étudié. De plus, le standard interne décrit par *Wu et al.* (19), n'a pas pu être obtenu dans le temps imparti pour ce travail de recherche. Néanmoins, afin de déterminer l'erreur propre à la méthode, toutes les mesures lors de l'étude de stabilité de la préparation dans son conditionnement final sont reproduites trois fois à l'identique dans l'optique de faire des mesures statistiques (coefficient de variation) sur la variation des résultats donnés par la machine d'une série à l'autre.

## 2.6. Etude de stabilité

L'étude de stabilité de la préparation d'Alkeran® dans son emballage final, soit des seringues en polypropylène de capacité égale à 1mL, est effectuée sur les deux concentrations extrêmes préparées par le CHUV : 15µg/mL et 300µg/mL. Afin de limiter la saturation du détecteur DAD, les solutions dosées à 300µg/mL sont diluées dix fois juste avant l'injection avec une solution de NaCl 0.9%. L'instruction pour la préparation des échantillons est jointe en Annexe 6. Le suivi est effectué d'une part à température ambiante et d'autre part à la température du réfrigérateur (2°C à 8°C). Les prélèvements d'échantillons sont effectués chaque deux heures, et ce jusque huit heures (T0+8h). Puis trois mesures supplémentaires sont effectuées à 12h, 24h et 48h pour la température du réfrigérateur.

## **2.7.Mesures indicatives de la stabilité du melphalan**

Un essai de modification du protocole fourni par l'unité de fabrication de la pharmacie centrale du CHUV est effectué sur des solutions d'Alkeran® de 15µg/mL suivie à température du réfrigérateur à l'abri de lumière, dans leur conditionnement final, soit des seringues de 1mL en polypropylène.

Des mesures à titre indicatif sur la stabilité de l'Alkeran® de concentration de 15µg/mL dans son conditionnement final sont effectuées pour des températures de congélation. D'une part à -20°C, et d'autre part à -80°C.

Le protocole de reconstitution et de préparation de ces échantillons d'analyse est décrit en annexe 7.

## 3. Résultats et discussion

### 3.1. Développement de la méthode

#### 3.1.1. Choix de la technique analytique

Le choix de la technique s'est porté sur l'HPLC couplée à un détecteur DAD. D'une part, parce que l'analyte répond correctement à cette technique, et d'autre part car l'appareillage correspondant est disponible dans le laboratoire de l'unité de contrôle qualité de la Pharmacie centrale du CHUV.

#### 3.1.2. Choix et optimisation de la méthode

Le choix de la méthode s'est tourné vers la méthode HPLC-UV/DAD décrite dans la monographie du melphalan de la Ph. Eur. L'optimisation de la méthode a tout d'abord consisté en l'amélioration de la résolution entre le pic du melphalan et celui d'une de ses impuretés de synthèse. Pour ce faire, la longueur de la colonne a été augmentée. Ensuite, la conformité du système a été démontrée, à l'aide de l'analyse spectrale avec le DAD sur différents échantillons (standard Ph. Eur de melphalan pur, et de conformité du système ainsi que sur Alkeran®).

### 3.2. Essais préliminaires sur le comportement général de l'Alkeran® vis-à-vis de la méthode

#### 3.2.1. Solutions d'Alkeran® dosées à 200µg/mL et 20µg/mL

Afin d'observer le comportement général de l'Alkeran® commercial vis-à-vis de la méthode HPLC choisie dans le présent travail de recherche, un essai préliminaire sur des solutions d'Alkeran® de concentration égales à 200µg/mL a été effectué. Le choix de la concentration de travail s'est fait sur la base des travaux de *Munier et al.* (25). Les analyses solutions sont effectuées à température ambiante à l'abri de la lumière (à l'aide de poches jaunes et de vials HPLC en verre teinté).

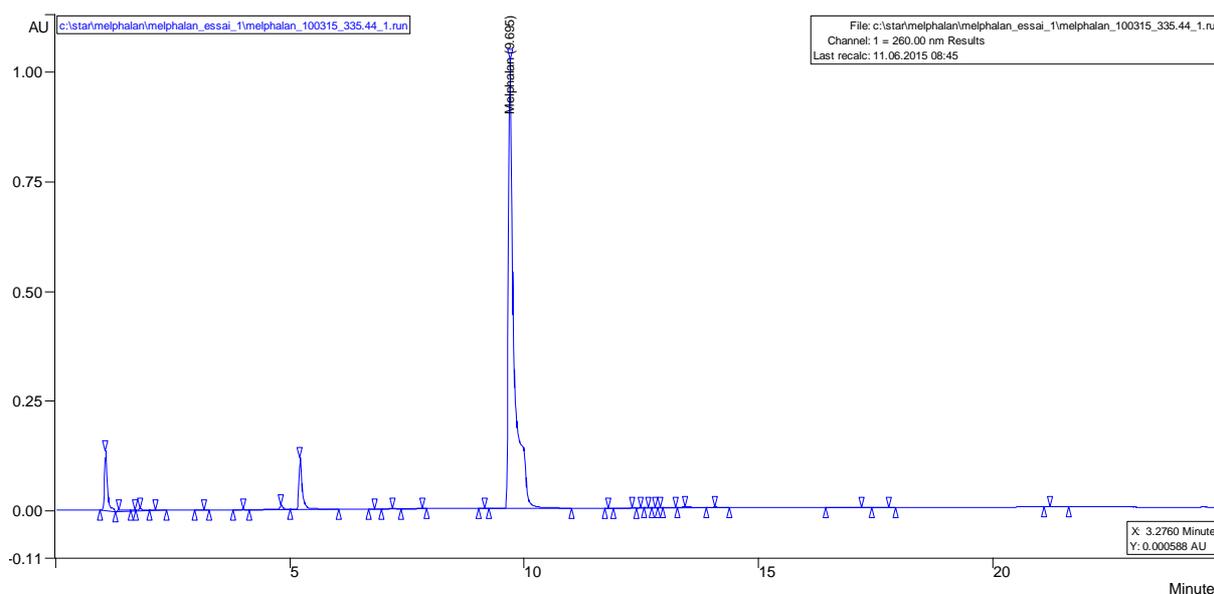


Figure 3 : Chromatogramme de Alkeran® 200µg/mL

On observe que le pic de melphalan présente un épaulement (Figure 3). Ceci est dû soit à une surcharge de la colonne soit une élution simultanée avec une substance interférente. L'analyse du spectre avec le DAD a démontré que c'est bien une surcharge de la colonne et non une élution interférente. Afin d'optimiser l'aspect du pic de melphalan, les échantillons ont été dilués dix fois.

Un deuxième essai est donc effectué sur les solutions d'Alkeran® avec une concentration de 20µg/mL.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 3).

**Tableau 3 : Temps de rétention ( $t_r$ ) et aire sous le pic de melphalan obtenus pour les échantillons d'Alkeran® de concentration égale à 20µg/mL**

Alkeran® 20µg/mL	jour 1				jour 2			
	heure d'injection	$t_r$ [min]	aire du pic	aire relative au run 1	heure d'injection	$t_r$ [min]	aire du pic	aire relative au run 1
run 1	11:57	9.747	10557108	100.00%	18:13	9.759	6242345	100.00%
run 2	12:39	9.724	9779401	92.63%	18:55	9.744	6220912	99.66%
run 3	13:21	9.716	9697316	91.86%	19:37	9.733	6099216	97.71%
run 4	17:29	9.695	7769791	73.60%	20:19	9.733	5983771	95.86%
run 5	18:10	9.684	7511032	71.15%	21:01	9.735	5796426	92.86%
run 6	-	-	-	-	21:43	9.717	5521531	88.45%
<b>moyenne</b>		9.713	9062930	85.85%		9.737	5977367	95.76%
<b>écart-type</b>		0.025	1344334	0.13		0.014	277468	0.04
<b>CV</b>		0.25%	14.83%	14.83%		0.14%	4.64%	4.64%

On observe que l'aire correspondant au pic de melphalan diminue rapidement au cours du temps. En effet, on observe qu'en environ 1h30, la concentration en melphalan a perdu plus de 8% de sa valeur initiale. Ceci permet de donner une indication claire quant à la rapidité de la dégradation du melphalan lorsqu'il est mis en solution.

### 3.2.2. Solutions d'Alkeran® et de standard Ph. Eur. de melphalan dosées à 300µg/mL

Les solutions à étudier au CHUV ont une concentration de 300µg/mL. Les échantillons ont été dilués dix fois, pour éviter la surcharge au niveau de la colonne.

Les résultats relatifs aux échantillons d'Alkeran® et de standard Ph. Eur. de melphalan (300µg/mL et 30µg/mL) obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 4).

**Tableau 4 : Aire sous le pic de melphalan obtenues pour les échantillons d'Alkeran® et de standard Ph. Eur. de melphalan de concentration égale à 300µg/mL et 30µg/mL**

	Standard Ph.Eur				Alkeran			
	30 µg/mL	% restant	300 µg/mL	% restant	30 µg/mL	% restant	300 µg/mL	% restant
<b>jour 1</b>	12866591	100.00%	113279640	100.00%	14804627	100.00%	127774896	100.00%
<b>jour 2</b>	5919671	<b>46.01%</b>	52704336	<b>46.53%</b>	5670045	<b>38.30%</b>	50200484	<b>39.29%</b>

On observe qu'après 24h d'exposition à température ambiante, à l'abri de la lumière, il reste 38.30% et 39.29% pour les solutions d'Alkeran®, respectivement de 30µg/mL et

300µg/mL. Dans le cas des solutions de standard Ph. Eur. de melphalan, les taux de melphalan restant après 24h s'élèvent à 46.01% (30µg/mL) et 46.53% (300µg/mL). Ces observations dénotent une dégradation rapide et conséquente du melphalan.

### 3.3.Essais de spécificité de la méthode

#### 3.3.1. Solution de blanc

Un échantillon de la matrice du médicament a été analysé et a permis de démontrer qu'aucun de ses composants n'interfère avec le pic principal de melphalan. En effet, ni les excipients contenus dans le solvant de reconstitution ni la solution de NaCl 0.9% permettant de diluer les solutions d'analyse ne présente d'éluion simultanée avec le melphalan. Il est important de noter ici que la matrice complète n'a pas pu être reproduite. Le blanc se composant du solvant commercial Alkeran® et de NaCl 0.9% mais ne contenant pas la povidone K12 présente dans la poudre Alkeran®. En effet, cet excipient n'a pas pu être obtenu.

Le chromatogramme obtenu pour le blanc est présenté ci-dessous (Figure 4).

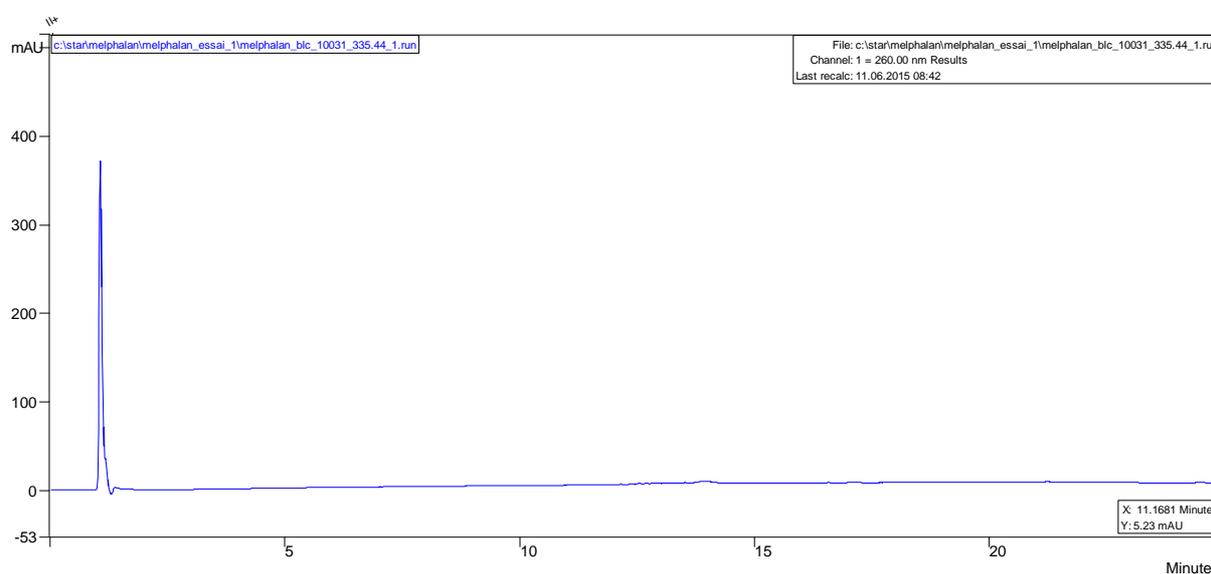


Figure 4 : Chromatogramme du blanc pour Alkeran®

#### 3.3.2. Standard Ph. Eur. de melphalan

Les solutions de standard Ph. Eur. de melphalan de concentration 30µg/mL, sont analysées afin de démontrer la spécificité de la méthode pour le dosage de melphalan.

Le rapport Polyview™ obtenu est joint en Annexe 8.

Sur le spectre Polyview™ obtenu, le coefficient de di-similarité pour le pic de melphalan est égal à 0.010381, celui de similarité est égal à 0.999946. Ces valeurs sont respectivement inférieure à 0.2 et supérieure à 0.99, cela démontre que le pic ne contient pas de pic parasite. En effet, sur tout le spectre UV, aucune autre substance n'est détectée à ce temps de rétention. Le pic de melphalan est donc le seul à être détecté à ce temps de rétention.

#### 3.3.3. Standard Ph. Eur. de melphalan pour conformité du système

Les solutions de standards Ph. Eur. de melphalan pour conformité du système de concentration égale à 30µg/mL av après dégradation forcée (60°C, 15min) sont analysées afin de montrer que la méthode est spécifique.

Le rapport Polyview™ relatif à ces analyses est présenté en annexe 9.

Pour l'échantillon ayant subi la dégradation forcée on relève un coefficient de di-similarité égal à 0.004883 et un coefficient de similarité de 0.999988. Sur tout le spectre UV, il n'y a pas de substance autre que le melphalan qui est détectée à ce temps de rétention. Ceci est corrélé par la valeur des coefficients de di-similarité et de similarité obtenus : ceux-ci sont dans les deux cas inférieurs à 0.2 et supérieurs à 0.99 respectivement. Au vu de ces constatations, il est possible d'affirmer qu'il n'y a pas d'interférence au niveau du pic du melphalan, que ce soit de la part d'une impureté de synthèse (présente directement dans le standard pour conformité du système) ou d'une impureté de dégradation (obtenues ici par dégradation forcée).

### 3.3.4. Solutions d'Alkeran® de concentration égale à 30µg/mL ayant subi une dégradation forcée (60°C, 15min)

L'analyse de solutions d'Alkeran® ayant subi une dégradation forcée a permis de démontrer que la méthode est aussi spécifique pour le médicament lui même. Un chromatogramme obtenu pour cet échantillon est présenté ci-dessous (Figure 5).

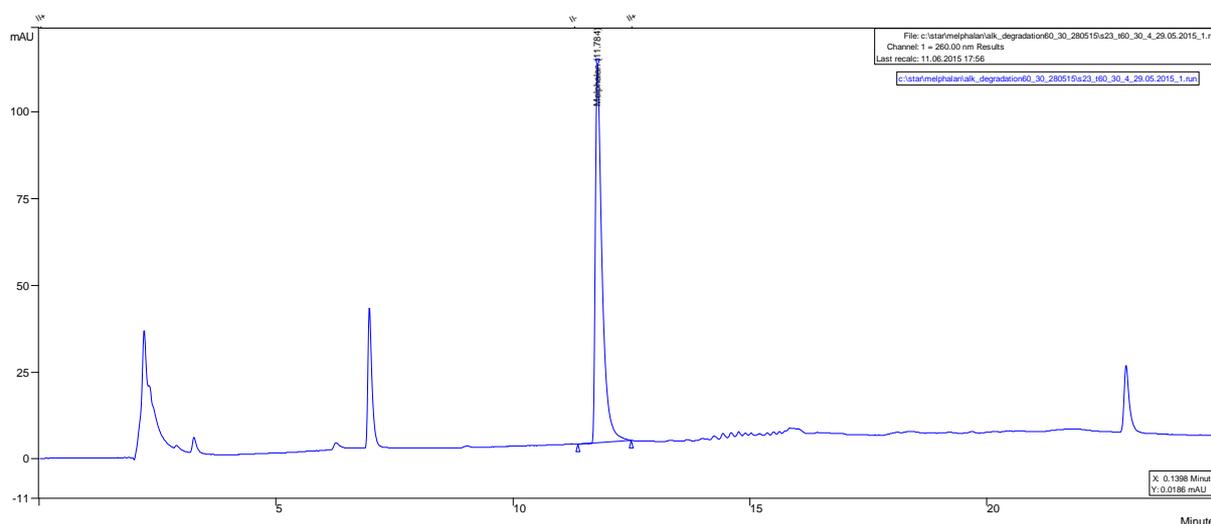


Figure 5 : Chromatogramme obtenu pour Alkeran® ayant subi une dégradation forcée 30µg/mL

Afin de pouvoir attester de la spécificité de la méthode quant aux solutions d'Alkeran® commercial, les spectres Polyview™ sont analysés dans le but de vérifier qu'aucun pic ne parasite celui du melphalan. Le rapport Polyview™ d'un échantillon de ce type est joint en annexe 10.

Le coefficient de di-similarité observé pour le pic de melphalan est égal à 0.016381, celui de similarité à 0.999866. Ces valeurs étant respectivement inférieure à 0.2 et supérieure à 0.99, cela signifie qu'aucune autre substance n'est détectée dans l'entièreté du spectre UV au même temps de rétention que le melphalan.

La spécificité de la méthode a été contrôlée d'une part avec les solutions de standard Ph. Eur., et d'autre part avec les solutions de standard Ph. Eur. de melphalan pour conformité du système. L'observation des spectres Polyview™ des différents échantillons a permis de constater que les coefficients de di-similarité et de similarité sont respectivement inférieurs à 0.2 et supérieurs à 0.99. C'est en s'appuyant sur ces résultats

qu'il est possible d'affirmer que les impuretés du melphalan (de synthèse et de dégradation) n'interfèrent pas avec son pic.

L'analyse des solutions d'Alkeran® ayant subi une dégradation forcée a démontré, avec des coefficients de di-similarité inférieurs à 0.2 et des coefficient de similarité supérieurs à 0.99, que les excipients, et leur éventuels produits de dégradation, présents dans la formulation commerciale, n'interfèrent pas avec le pic du principe actif.

Ces observations permettent de confirmer que la méthode utilisée est spécifique pour le melphalan, et est adaptée pour le doser dans sa forme Alkeran® ophtalmique.

### 3.4. Paramètres de la méthode

#### 3.4.1. Mesure du temps d'équilibre optimal pour les phases mobiles

Le temps d'équilibre des phases mobiles est testé sur des solutions d'Alkeran® de concentration égale à 20µg/mL. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 3. Les temps de rétention obtenus pour les différentes injections du même échantillon le premier jour, donnent un CV de 0.25%. Quant aux temps de rétention des échantillons du deuxième jour, le CV est égal à 0.14%. Ces deux valeurs dénotent une excellente précision et reproductibilité des temps de rétention. De ce fait, une durée d'équilibre de 15 minutes est suffisante afin de rétablir correctement la composition en phases mobiles à sa valeur initiale. Ceci a pour conséquence une bonne reproductibilité des temps de rétention du melphalan.

#### 3.4.2. Amélioration de la résolution du pic de melphalan avec celui d'une des ses impuretés

Lors de l'analyse des solutions de standard Ph. Eur. pour conformité du système, il a été observé que le pic de melphalan n'est pas correctement résolu avec celui d'une de ses impuretés, comme le montre le chromatogramme présenté ci-après (Figure 6).

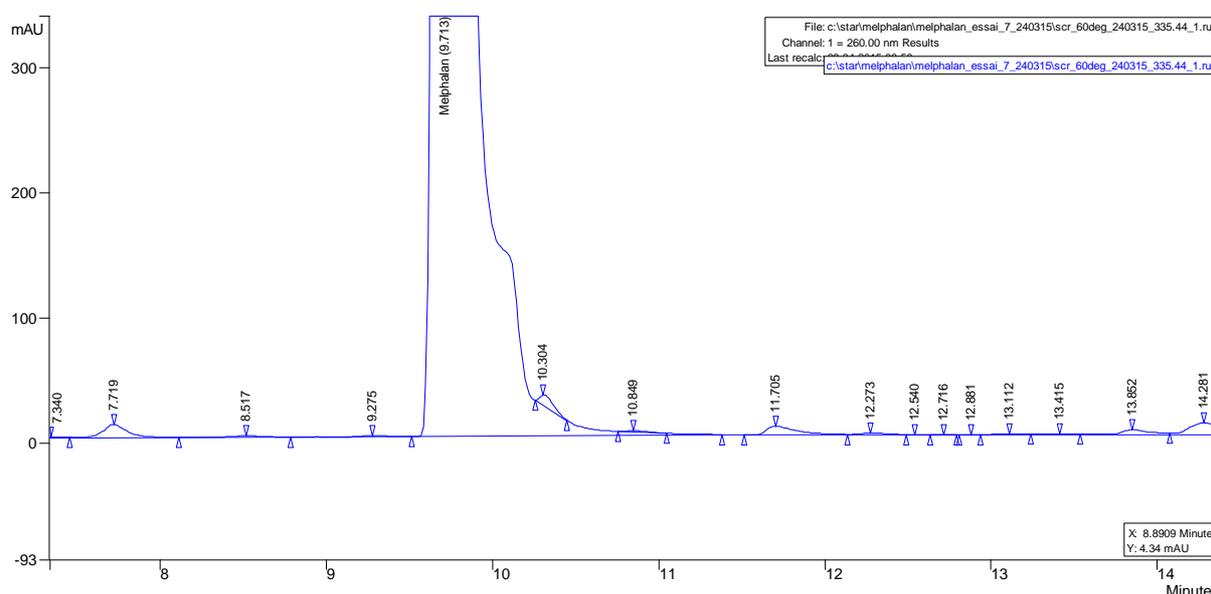


Figure 6 : Chromatogramme obtenu pour le standard Ph. Eur. de melphalan pour la conformité du système avec une seule colonne (300µg/mL)

Cette dernière sort sur le chromatogramme, immédiatement après le melphalan. Après comparaison du chromatogramme obtenu avec celui de fourni dans la fiche de produit de la Ph. Eur. (joint en annexe 11), l'impureté en question a été identifiée comme étant la

4-[[2-(2-chloroéthoxy)éthyl](2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanine. Sa formule développée est présentée dans la figure ci-dessous (Figure 7).

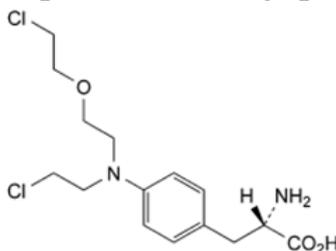


Figure 7 : structure de la 4-[[2-(2-chloroéthoxy)éthyl](2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanine

Il est important de noter ici, que cette impureté est due à la synthèse du produit et non pas à sa dégradation. En effet, elle n'est contenue que dans le standard pour la conformité du système et n'apparaît en aucun cas dans les autres types d'échantillons même ayant subi une dégradation forcée.

Du fait de son temps de rétention plus élevé que celui du melphalan lui-même, on peut dire qu'il s'agit d'une impureté à caractère plus apolaire que le principe actif. En effet, cette dernière est davantage retenue par la phase stationnaire.

La résolution en HPLC est liée à l'efficacité  $N$  comme le montre l'Équation 5. Or, l'efficacité est dépendante de la longueur de la colonne (selon l'Équation 2). De ce fait, lorsque la longueur de la colonne est augmentée, il en va de même de l'efficacité. Lorsque l'on parvient à augmenter l'efficacité, en conséquence la résolution augmente elle-aussi.

Dans le cas présent, une colonne de 10cm a été utilisée. Or, dans la monographie de la Ph. Eur. la longueur de la phase stationnaire utilisée est de 15cm. On peut donc supposer que la résolution insuffisante entre le pic du melphalan et son impureté nommée *supra* est due à une colonne trop courte. Sur la base de cette supposition, une deuxième colonne de 10cm est installée en ligne. Ce changement a permis d'augmenter clairement la résolution entre les deux produits concernés. Ceci est montré sur le chromatogramme ci-après (Figure 8).

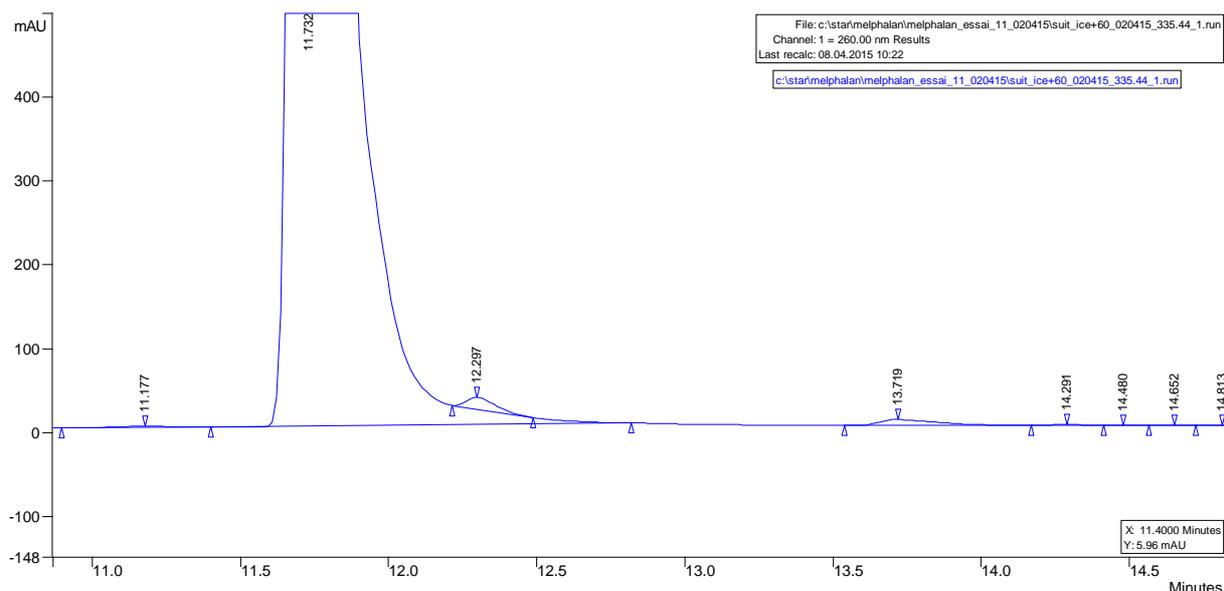


Figure 8 : Chromatogramme obtenu pour le standard Ph. Eur. de melphalan pour conformité du système avec deux colonnes en ligne (30µg/mL)

Ce chromatogramme présente une résolution optimale, égale à 1.69, entre le melphalan et son impureté sortant immédiatement après. Les paramètres de la méthode sont à présents choisis et permettent de correctement détecter le melphalan et toutes ses impuretés (de synthèse et de dégradation), et permettent également de doser précisément le melphalan.

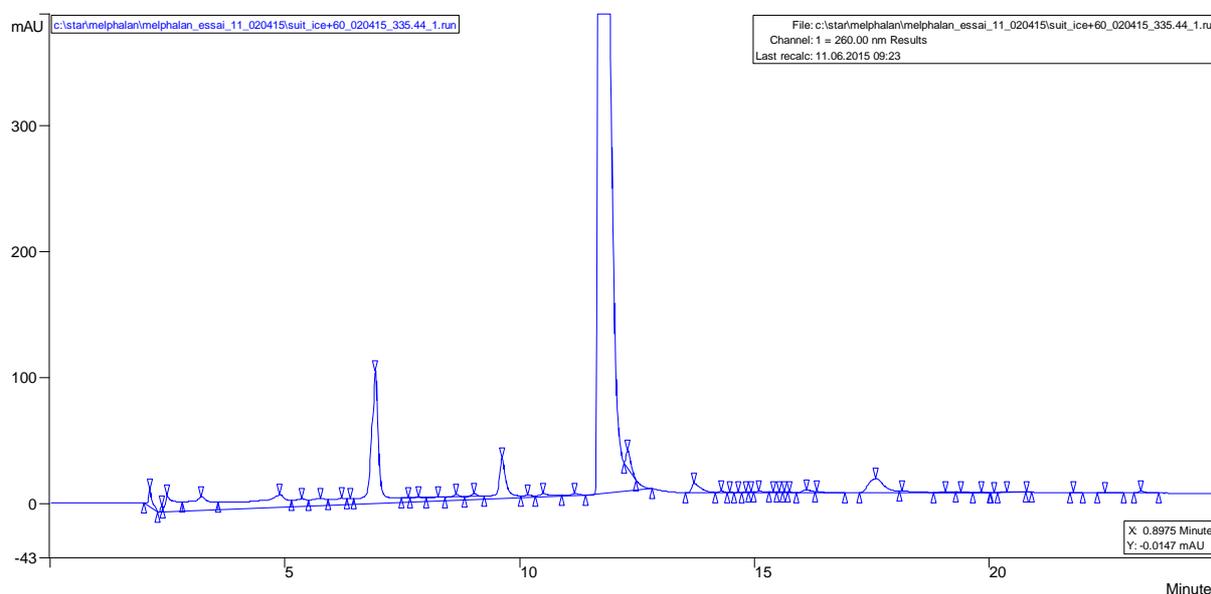
Néanmoins, il est possible d'évoquer ici un autre paramètre qui aurait pu être modifié afin d'améliorer la résolution de ces deux pics. En effet, l'étendue du gradient aurait pu être une alternative. Le fait de prolonger l'étendue du présent gradient de 5min aurait retardé l'augmentation de la proportion de l'acétonitrile dans la phase mobile et de ce fait aurait permis à l'impureté de rester plus longtemps accrochée à la phase stationnaire. Ce qui aurait eu pour conséquence de séparer les deux composés et d'améliorer la résolution sur le chromatogramme. Cette alternative n'a pas été privilégiée du fait de son caractère chronophage. De plus, la méthode décrite par la Ph. Eur. donne des résultats satisfaisants telle quelle.

Le paramètre qui posait donc un problème de résolution entre le melphalan et son impureté nommée *supra*, est la longueur de la colonne étant donné que la colonne utilisée initialement mesurait 5cm de moins que la phase stationnaire préconisée par la méthode de la Pharmacopée Européenne.

### 3.4.3. Conformité du système

La conformité du système a été vérifiée en analysant des solutions de standard Ph. Eur. de melphalan pour conformité du système. Ces échantillons contiennent toutes les impuretés de synthèse ainsi que de dégradation (après application du protocole de dégradation forcée décrit dans la Ph. Eur.).

Toutes les impuretés décrites dans la monographie Ph. Eur. du melphalan, ont été identifiées. Le chromatogramme obtenu est présenté ci-dessous (Figure 9).



**Figure 9 : Chromatogramme obtenu pour le standard Ph. Eur. de melphalan pour conformité du système ayant subi une dégradation forcée, 30µg/mL**

Le chromatogramme de référence fourni avec les échantillons de standard par la Ph. Eur., ainsi que le tableau détaillant la nature des impuretés sont joints en annexe 11. Après comparaison avec les indications de la Ph. Eur. quant à la rétention relative par rapport au melphalan, tous les pics de toutes les impuretés ont été identifiés. Les résultats détaillés sont joints en annexe 12.

### 3.5. Suivi sur une journée des solutions d'Alkeran® et des solutions de standard Ph. Eur.

#### 3.5.1. Solutions de standard Ph. Eur. de melphalan de concentration égale à 30µg/mL

Les solutions de standard Ph. Eur. de melphalan de 30µg/mL ont été suivies pour la concentration de melphalan sur un intervalle de temps allant de 0 à 7 heures, à température ambiante. On observe, qu'au cours de la première heure l'échantillon perd 3.03% de sa valeur initiale et qu'après 7 heures, le recouvrement des aires de melphalan est égal à 71.33%. Le détail des résultats obtenus est présenté en Annexe 13. Le graphique ci-dessous illustre le phénomène de dégradation rapide du melphalan (Figure 10).

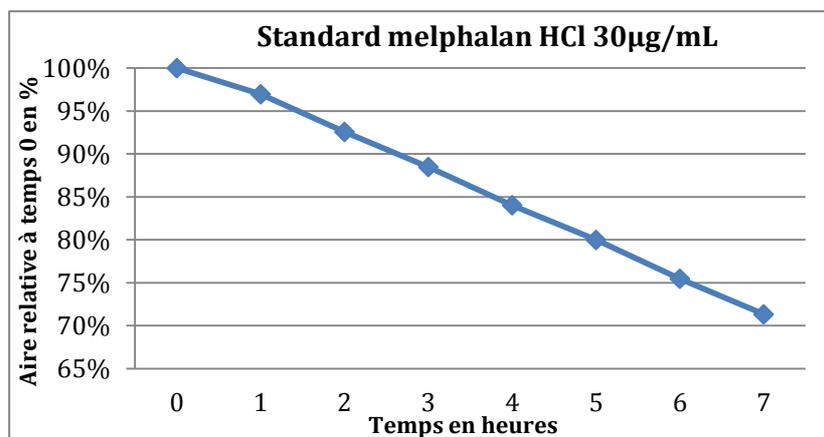


Figure 10 : Graphique du suivi de standard Ph. Eur. de melphalan de 30µg/mL sur une période de 7 heures à température ambiante

Au vu de ces résultats, il semble possible de dire que le melphalan se dégrade rapidement lorsqu'il est laissé à température ambiante.

Ce résultat indicatif doit être corrélé dans le cas de la préparation commerciale en elle-même.

#### 3.5.2. Solutions d'Alkeran® de concentration égale à 30mg/mL

Les solutions d'Alkeran® de concentration égale à 30µg/mL ont été suivies pour la concentration de melphalan sur un intervalle de temps allant de 0 à 7 heures, à température ambiante. On observe qu'au cours de la première heure la solution perd 6.06% de sa valeur initiale en melphalan, et qu'au terme des 7 heures le recouvrement des aires du pic de melphalan est égal à 65.22%. Le détail des résultats obtenus pour cette série de données est joint en Annexe 13. Le graphique présenté ci-après exprime la rapidité de la dégradation de la préparation médicamenteuse lorsque celle-ci est exposée à température ambiante pendant une journée (Figure 11).

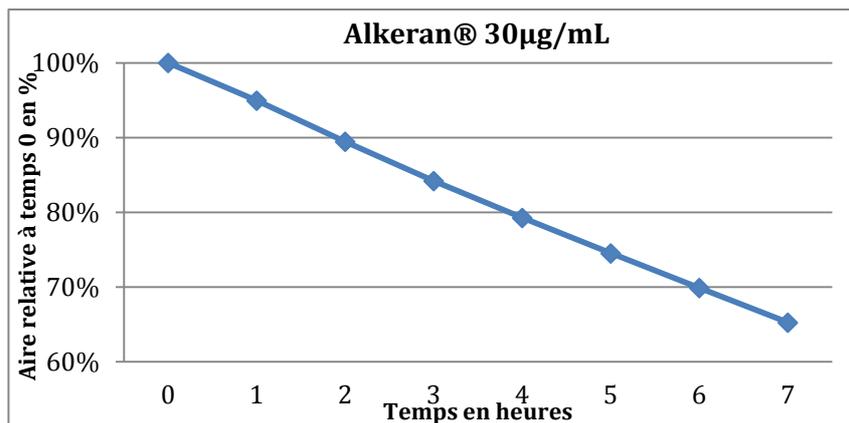


Figure 11 : Graphique du suivi d'Alkeran® de 30µg/mL sur une période de 7 heures à température ambiante

Les résultats obtenus pour la série d'Alkeran® de 30µg/mL, permettent de corrélérer les observations faites sur les solutions de standard précédemment discutées (§3.5.1). En effet, dans le cas présent la concentration en melphalan diminue drastiquement avec le temps.

Les observations faites d'une part sur les échantillons de standard Ph. Eur. de melphalan et d'autre part sur les solutions d'Alkeran® (30µg/mL) suivis à température ambiante, permettent de conclure que dans de telles conditions expérimentales, il ne sera pas possible de faire une droite de calibration. La grande instabilité du produit est un frein à la mise en place d'un protocole de dosage classique. Une injection prenant au total 25min et le temps d'équilibre des phases mobiles 15min, les solutions étalons souffrent d'une variation conséquente de leur concentration initiale, la concentration effective ne pourra donc pas être confirmée. Ceci serait responsable d'un biais conséquent et imprévisible pour les mesures.

### 3.5.3. Solutions de standard Ph. Eur. de melphalan de concentration égale à 30µg/mL, suivi avec auto-sampler refroidi

A la lumière des observations faites précédemment, il semble nécessaire de tester des modifications sur le protocole, afin d'essayer de maintenir la concentration des étalons à leur valeur initiale pendant toute la durée de l'analyse par HPLC. Ceci dans le but de pouvoir doser le melphalan à l'aide d'une droite de calibration. Pour cette raison, un suivi de la concentration de solutions de standard Ph. Eur. de melphalan est effectué sur une journée, en programmant le refroidissement de l'auto-injecteur, et ce afin de refroidir les vials disposés sur l'HPLC pendant toute la durée de l'analyse.

Les résultats obtenus pour le suivi des solutions de standard Ph. Eur. de concentration 30µg/mL suivi sur une période de 6 heures sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 5).

**Tableau 5 : Temps de rétention ( $t_r$ ), aires, et aires relatives au temps zéro du pic de melphalan obtenus pour le suivi des échantillons de standard Ph. Eur. de melphalan 30 $\mu$ g/mL sur auto-sampler froid**

temps [h]	$t_r$ [min]	aire	aire relative à temps 0
0	11.771	13958657	100.00%
1	11.741	13832313	99.09%
2	11.709	13668063	97.92%
3	11.728	13520234	96.86%
4	11.727	13486905	96.62%
5	11.720	13336462	95.54%
6	11.727	13296732	95.26%

On observe qu'après la première heure le recouvrement des aires n'est plus égal qu'à 99.09% et qu'au terme des 6 heures il est égal à 95.26%.

On peut déduire de cette observation, que les solutions de melphalan malgré un refroidissement de l'auto-injecteur ne se conservent pas correctement. En effet, après une heure, la perte observée de 0.91% de la concentration initiale de melphalan démontre bien que le temps d'une injection, l'échantillon ne peut pas être correctement conservé. Donc la concentration effective n'est plus celle qui a été établie au départ, et donc le biais est important et imprévisible. Dans de telles conditions de dégradation, il n'est pas possible d'établir une droite de calibration fiable. La mise en place d'un protocole classique de dosage est donc compromise.

Une solution à ce problème aurait pu être de faire les mesures à l'aide d'un standard interne afin de s'affranchir des erreurs propres à la méthode. Les différents standards internes dans la littérature (19) n'ont pas pu être obtenus dans le temps imparti pour ce travail de recherche.

La plupart des travaux disponibles sur le melphalan décrivent des solutions méthanoliques (12) (18). Car, en effet ce solvant organique permet de solubiliser le melphalan et permet de le maintenir stable. Le méthanol étant toxique, il ne peut pas être utilisé dans le cadre de ce travail puisqu'il s'agit d'une analyse pharmaceutique. Et ce même pour effectuer les solutions étalon, car l'influence du méthanol sur la détection est non négligeable. Cette alternative ne peut donc pas être exploitée dans le cas présent.

### 3.6. Etude de stabilité

#### 3.6.1. Température ambiante

Au cours d'un travail visant à étudier la stabilité d'un médicament, il est important de confirmer les données du fabricant afin de pouvoir s'appuyer sur ces affirmations.

Dans le cas de l'Alkeran® pour injection, le fabricant annonce une stabilité maximale du produit reconstitué et à température ambiante et à l'abri de la lumière de 1h30. L'unité de fabrication de la pharmacie centrale du CHUV assure l'efficacité de sa préparation ophtalmique pour une durée de 3h, à température ambiante et à l'abri de la lumière (dans des poches jaunes), ce laps de temps s'étendant du moment de la reconstitution jusqu'à la fin de l'administration du médicament.

Des échantillons d'Alkeran® dans leur conditionnement final, soit des seringues stériles en polypropylène de capacité 1mL, aux concentrations extrêmes préparées par le CHUV (15 $\mu$ g/mL et 300 $\mu$ g/mL) sont donc suivis à température ambiante et à l'abri de la lumière, dans des poches jaunes.

### 3.6.1.1. Solutions d'Alkeran® 15µg/mL à température ambiante

Trois séries de mesures pour des échantillons d'Alkeran® de 15µg/mL dans le conditionnement final sont effectuées afin de pouvoir s'affranchir au maximum de l'erreur analytique.

Un graphique représentant les aires relatives au temps zéro pour le pic de melphalan en fonction du temps est présenté ci-dessous (Figure 12).

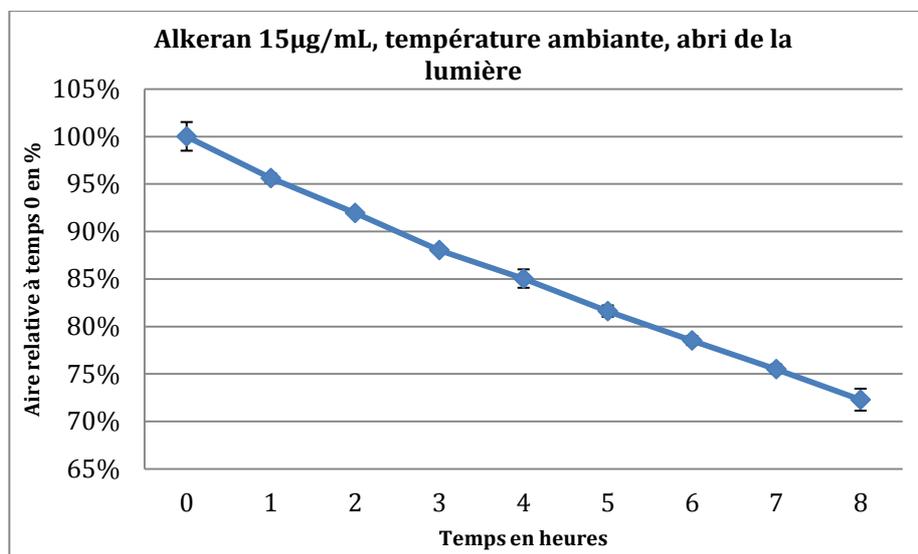


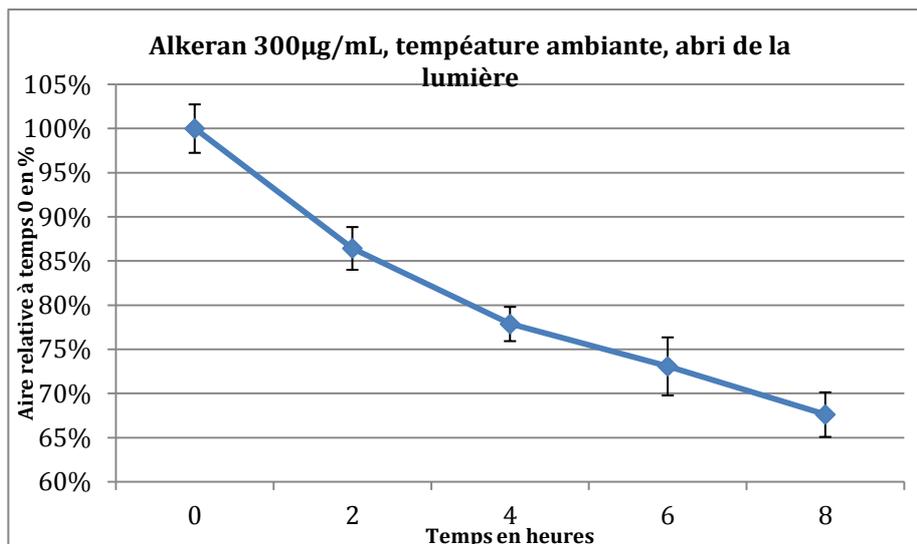
Figure 12 : Graphique du suivi des échantillons d'Alkeran® 15µg/mL à température ambiante et à l'abri de la lumière

En moyenne, sur les 3 séries on observe une perte de 4.39% en une heure de la concentration initiale en melphalan avec un CV égal à 0.48%. Après 2 heures de dégradation le recouvrement moyen n'est plus égal qu'à 91.94%, en prenant en compte l'erreur (0.10%) on obtient une valeur minimale de recouvrement des aires de 91.84%. Le recouvrement minimum accepté pour estimer que la préparation pharmaceutique est intègre est égal à 90%. Or, on constate qu'après 3 heures, le recouvrement des aires passe en dessous de ce seuil (moyenne sur les trois séries égale à 88.03% ± 0.16%). Si l'on tient compte de l'erreur de la méthode, on peut affirmer que le produit n'est plus intègre entre la deuxième et la troisième heure lorsqu'il est exposé à température ambiante. Ces observations rejoignent les recommandations du fabricant, qui annonce une stabilité restreinte de son produit à température ambiante, ainsi que celles de la pharmacie centrale du CHUV qui annonce une stabilité de 3 heures au maximum. Les résultats obtenus sont détaillés en Annexe 14.

### 3.6.1.2. Solutions d'Alkeran® 300µg/mL à température ambiante

3 séries de mesures pour des échantillons d'Alkeran® de 300µg/mL dans le conditionnement final sont effectuées afin de pouvoir s'affranchir au maximum de l'erreur analytique.

Un graphique représentant les aires relatives au temps zéro pour le pic de melphalan en fonction du temps est présenté ci-dessous (Figure 13).



**Figure 13 : Graphique du suivi des échantillons Alkeran® 300µg/mL à température ambiante et à l'abri de la lumière**

On observe que le recouvrement moyen des aires relatives au temps zéro pour le pic de melphalan de l'Alkeran® ophtalmique à une concentration de 300µg/mL s'élève à 86.44% ± 2.42% après 2 heures d'exposition à la température ambiante. Après quatre heures le recouvrement moyen des aires n'est plus égal qu'à 77.88% ± 1.94%. Le recouvrement des aires minimum toléré pour les concentrations en principe actif d'une préparation pharmaceutique est de 90%. On peut donc en déduire que dès 2 heures d'exposition à la température ambiante, l'Alkeran® ophtalmique ne peut plus être considéré comme étant intègre et il n'est donc théoriquement plus possible de l'administrer au patient.

Ces résultats viennent à corréliser les recommandations du fabricant qui annonce une stabilité de sa préparation reconstituée d'au maximum 1h30 à température ambiante. Le détail des résultats est joint en Annexe 14.

### 3.6.2. Température du réfrigérateur (2°C à 8°C)

Les résultats obtenus pour les séries étudiées à température ambiante dénotent une dégradation rapide de l'Alkeran® ophtalmique dans son conditionnement final. En effet, les solutions de concentration égale à 15µg/mL sont stables jusqu'à 2 heures et celles de concentration égale à 300µg/mL le sont pendant une période inférieure à 2 heures. Au vu de cette dégradation rapide, il est intéressant de maintenir l'Alkeran® ophtalmique sur une période plus longue. Ceci est rendu possible par la diminution de la température de stockage des seringues. Un essai préliminaire concernant la floculation des solutions est effectué. L'Alkeran® ophtalmique ne flocule pas lorsqu'il est exposé au froid. Un suivi de stabilité des solutions d'Alkeran® ophtalmique est donc fait à température du réfrigérateur et à l'abri de la lumière.

#### 3.6.2.1. Solutions d'Alkeran® de 15µg/mL à température du réfrigérateur

Les résultats du suivi à température du réfrigérateur obtenus pour les solutions d'Alkeran® ophtalmique de concentration égale à 15µg/mL sont détaillés en Annexe 15. Après deux heures d'exposition à la température du réfrigérateur, le recouvrement des aires pour le pic de melphalan est égal à 98.01% ± 1.49%. 12 heures après, le recouvrement des aires est égal à 94.22% ± 1.45%. C'est après 24 heures que les taux de

melphalan détectés par l'analyse HPLC approchent de la limite inférieure tolérée pour les préparations pharmaceutiques (90%), soit  $91.72\% \pm 0.64\%$ .

Le graphique ci-dessous (Figure 14) représente les aires relatives au temps zéro pour le pic de melphalan en fonction du temps en heure.

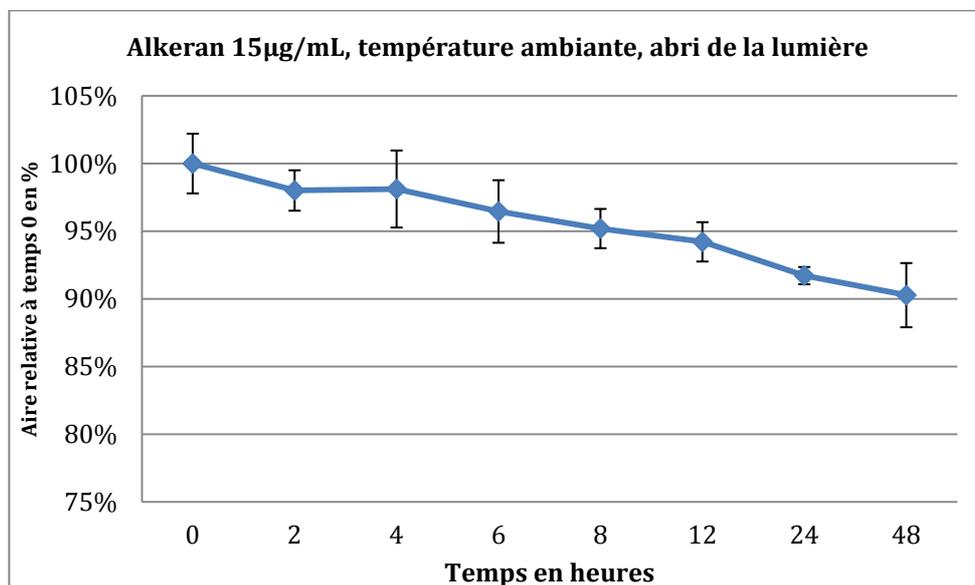


Figure 14: Graphique du suivi des échantillons Alkeran® 15µg/mL, à température du réfrigérateur et à l'abri de la lumière

Pour une concentration de 15µg/mL la préparation de l'Alkeran® ophtalmique est stable pour un maximum de 12 heures dans le réfrigérateur.

#### 3.6.2.2. Solutions d'Alkeran® de 300µg/mL à température du réfrigérateur

Les résultats du suivi à température du réfrigérateur obtenus pour les solutions d'Alkeran® ophtalmique de concentration égale à 300µg/mL sont détaillés en Annexe 15.

Après 2 heures d'exposition à la température du réfrigérateur, le recouvrement moyen des aires par rapport au temps zéro est égal à  $93.52\% \pm 0.74\%$ . Après 6 heures celui-ci est égal à  $92.34\% \pm 1.40\%$ . C'est à partir de 8 heures, que le recouvrement moyen des aires sous le pic de melphalan par rapport au temps zéro se rapproche de la limite inférieure tolérée pour les médicaments (90%), soit  $91.05\% \pm 0.70\%$ .

Le graphique ci-dessous illustre les résultats obtenus (Figure 15). Il représente les aires relatives par rapport au temps zéro pour le pic de melphalan en fonction du temps.

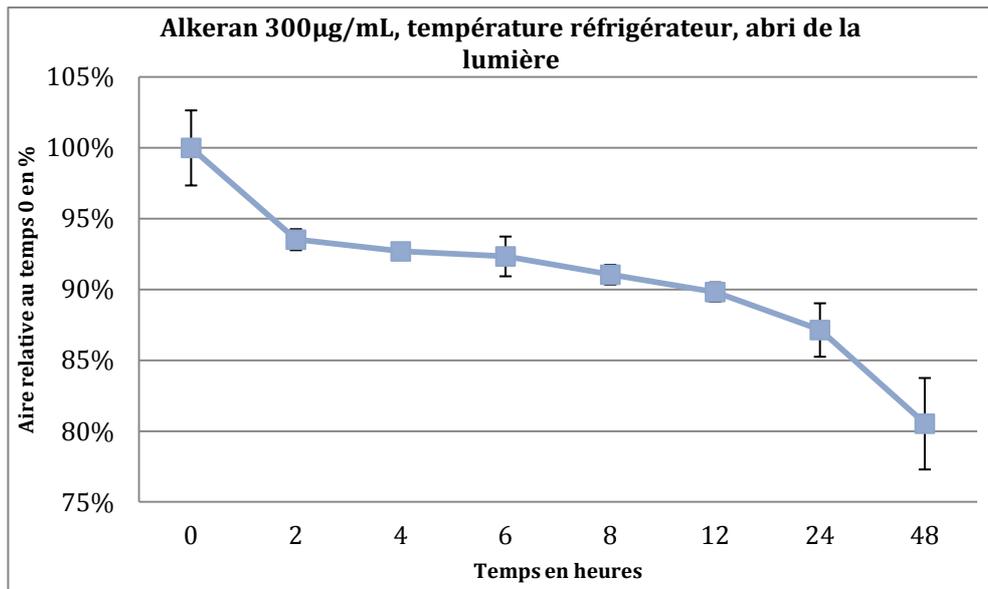


Figure 15: Graphique du suivi des échantillons Alkeran® 300µg/mL, à température du réfrigérateur et à l'abri de la lumière

Au vu de ces résultats, on peut estimer que l'Alkeran® ophtalmique à une concentration de 300µg/mL, est stable au réfrigérateur pour au maximum 8h. Il est néanmoins possible d'émettre une réserve quant à ce résultat. En effet, la deuxième série de mesures pour les échantillons de 300µg/mL exposés au réfrigérateur présente des résultats en de çà des deux autres séries. Ceci est expliqué par le temps nécessaire à la procédure allant de la reconstitution de l'Alkeran® à la fin de l'échantillonnage. Cette série a été préparée du début à la fin par un seul opérateur contre deux pour les autres séries. Une perte de temps pour l'échantillonnage et l'acheminement des seringues au réfrigérateur a été observée, celle-ci représente environ 15min. Un quart d'heure semble être un petit laps de temps, mais pour ce type de préparation il a un impact sur les concentrations mesurées. Il est important de noter que les différences de concentrations mesurées sont observées à partir de l'échantillon T0+2h (2 heures après le temps zéro), et que l'échantillon pris pour le temps zéro ne souffre pas de cette différence marquée. En effet, ce dernier est placé pour analyse par HPLC en priorité dès l'obtention de la solution correspondant à la dernière dilution, l'échantillonnage et le transport se faisant donc dans un second temps.

Les résultats obtenus pour les deux concentrations de melphalan pour les échantillons d'Alkeran® ophtalmique montrent une stabilité prolongée lorsqu'ils sont exposés à des températures du réfrigérateur. On en déduit donc que la diminution de la température permet de mieux conserver l'Alkeran® ophtalmique.

Des différences sont observées entre les échantillons de concentration différente. En effet, on observe que la solution de 300µg/mL se dégrade plus vite que celle de 15µg/mL. Les solutions préparées ne sont pas tamponnées donc leur pH varie. Ce dernier peut bien entendu influencer la vitesse de la dégradation du melphalan.

En effet, la conversion plus rapide du melphalan en dihydroxymelphalan (produit de dégradation principal) pour la solution à 300µg/mL par rapport à celle à 15µg/mL, est influencée par le pH de la solution. A volume constant, la solution de melphalan à 300 µg/mL est plus basique que celle à 15 µg/mL. Aucune preuve d'une catalyse acide/base n'a été démontrée. Cependant, l'effet du pH sur la stabilité peut s'expliquer grâce au degré de protonation du melphalan et sa capacité à former l'ion

ethyleneimmonium. Ce dernier subit ensuite une attaque nucléophile, ce qui, dans le cas d'une solution aqueuse, conduit au mono- puis au di-hydroxymelphalan. De plus, le chlorure de sodium, présent en plus grande quantité dans la solution à 15µg/mL, a un effet stabilisant du fait de sa compétition avec l'eau pour la formation de l'ion ethyleneimmonium (26).

Cette hypothèse peut donc expliquer que la solution la plus concentrée se dégrade plus rapidement que la solution la moins concentrée.

### **3.7. Essais indicatifs**

#### **3.7.1. Essais indicatif de modification de protocole avec suivi à température du réfrigérateur**

L'Alkeran® subissant une dégradation dès sa reconstitution, le protocole de fabrication du médicament doit être le moins chronophage possible. De ce fait, un protocole différent a été testé. Afin de diminuer le temps nécessaire à l'obtention de la concentration voulue pour l'Alkeran® ophtalmique, une dilution en une étape a été effectuée.

Il est important de relever ici que le fabricant recommande de ne pas refroidir la solution commerciale d'Alkeran® (5mg/mL), car celle-ci flocule. Il a été observé qu'après réfrigération et congélation, cette dernière n'est effectivement plus limpide. Le floculat formé ne se redisperse pas, même après retour à température ambiante et agitation prolongée. Une perspective ici serait d'analyser le floculat à l'aide d'un spectre de masse afin de déterminer la nature de sa composition.

Un essai quant à la dispersibilité de la solution d'Alkeran® commerciale dans un solvant froid a été préalablement effectué, et a permis de démontrer que la solution Alkeran® 5mg/mL ne flocule pas au contact d'un solvant froid.

De ce fait, la solution de NaCl 0.9% utilisée pour la dilution est préalablement refroidie.

Le protocole ainsi modifié a pu être appliqué.

L'aire sous le pic de melphalan obtenue à temps zéro est comparée à l'aire moyenne obtenue à temps zéro pour les 6 séries 15µg/mL discutées auparavant. Le recouvrement des aires est de 121.89%. On observe donc une diminution des pertes en produit d'intérêt. En effet, le nouveau protocole permet d'obtenir une aire plus élevée de 21.89% sur le chromatogramme pour le pic de melphalan. On peut donc estimer que le changement du protocole initial par un protocole à dilution unique en diminuant le temps de préparation, permet de diminuer les pertes en melphalan.

Les résultats de suivi à température du réfrigérateur pour cette série au protocole modifié sont joints en Annexe 16.

Après 24 heures, il reste 97.68% de la concentration initiale en melphalan. Ce résultat indicatif permet d'orienter la mise au point d'un nouveau protocole allant de la fabrication à l'échantillonnage de l'Alkeran® ophtalmique.

#### **3.7.2. Essai indicatif sur la stabilité de l'Alkeran® ophtalmique exposé aux températures de congélation (-20°C et -80°C)**

L'Alkeran® ophtalmique présentant une meilleure stabilité lorsque la température de stockage diminue, un essai sur deux températures de congélation est effectué à titre indicatif. Une étude de stabilité avec trois séries de mesures n'a pas pu être effectuée au cours de cette étude sur la congélation, car le temps imparti n'a pas permis d'effectuer les trois répétitions requises pour une étude de stabilité complète. De plus, le

congélateur -80°C était en cours de réparation et maintenance durant la majeure partie de ce travail de recherche, donc n'a pas pu être utilisé.

Les résultats obtenus dénotent une meilleure conservation des préparations que pour la température de réfrigérateur. Le détail des résultats est présenté en Annexe 17.

Après 24 heures, en moyenne il reste 96.07% et 97.54% de melphalan dans les seringues, respectivement stockées à -20°C et -80°C. Après 48 heures, ces taux s'élèvent à 95.85% (-20°C) et 98.59% (-80°C).

Ces résultats viennent corrélérer l'hypothèse selon laquelle l'Alkeran® ophtalmique est plus stable lorsque la température diminue. Il est important de noter ici que la température de -80°C donne de meilleurs taux de melphalan que ceux obtenus pour -20°C. Ceci s'expliquant notamment par le fait que la vitesse de congélation est plus rapide à cette température. En effet, la vitesse de congélation peut avoir une forte influence sur la concentration en principe actif dans une solution. Une congélation trop lente peut provoquer une précipitation de l'analyte.

## 4. Conclusion et perspectives

L'objectif de ce travail de recherche était dans un premier temps, de mettre en place une méthode permettant d'effectuer une étude de stabilité du melphalan dans une préparation pharmaceutique, l'Alkeran® ophtalmique.

Le choix de la méthode s'est tourné vers celle décrite par la Pharmacopée Européenne 8.5, soit de l'HPLC-UV/DAD avec détection à 260nm. En effet, la conformité du système a été démontrée ainsi que sa spécificité pour le melphalan.

Dans un deuxième temps, l'objectif a été de mesurer la stabilité de l'Alkeran® ophtalmique aux concentrations extrêmes préparées par le CHUV, soit 15µg/mL et 300µg/mL. Différentes conditions de stockage ont été testées. Tout d'abord, les données du fabricant ont été confirmées avec un essai à température ambiante et à l'abri de la lumière. Il en ressort que l'Alkeran® ophtalmique n'est plus considéré comme stable au-delà de 2h dans ces conditions. Les taux de melphalan restant après 2h, stocké dans les conditions décrites, sont de  $91.94\% \pm 0.10\%$  (15µg/mL) et  $86.44\% \pm 2.42\%$  (300µg/mL).

Ensuite, la stabilité de l'Alkeran® ophtalmique a été mesurée à la température du réfrigérateur, à l'abri de la lumière. La stabilité de la préparation est prolongée jusqu'à 8h pour la préparation à 300µg/mL ( $94.22\% \pm 1.45\%$ ), voire 12h pour la préparation à 15µg/mL ( $91.05\% \pm 0.70\%$ ).

Ces résultats représentent une avancée quant à la durée de stockage de l'Alkeran® ophtalmique, dans la mesure où l'unité de fabrication annonce une stabilité maximale de ce médicament de 3h.

Par la suite, des essais indicatifs relatifs à la modification du protocole de fabrication de la préparation ont été effectués. Il en ressort qu'en réduisant le nombre de dilutions à une seule, les taux de melphalan obtenus à la fin de la préparation sont nettement supérieurs à ceux obtenus en suivant le protocole actuel. Ces observations permettent de se projeter dans la mise en place d'un tel protocole.

Pour finir, un essai de la stabilité de l'Alkeran® ophtalmique 15µg/mL aux températures de congélation (-20°C et -80°C) a été effectué à titre indicatif. Les résultats obtenus représentent une perspective d'avenir encourageante quant à la prolongation de la durée de stockage des seringues prêtes à l'emploi.

## 5. Bibliographie

1. Doz F. [Retinoblastoma: a review]. Arch Pédiatrie Organe Off Société Fr Pédiatrie. oct 2006;13(10):1329-37.
2. Faranoush M, Hedayati Asl AA, Mehrvar A, Mehrvar N, Zangooei R, Abadi E, et al. Consequences of delayed diagnosis in treatment of retinoblastoma. Iran J Pediatr. août 2014;24(4):381-6.
3. Lohmann DR, Gallie BL. Retinoblastoma. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJ, et al., éditeurs. GeneReviews(®) [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 11 juin 2015]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1452/>
4. Jabbour P, Chalouhi N, Tjoumakaris S, Gonzalez LF, Dumont AS, Chitale R, et al. Pearls and pitfalls of intraarterial chemotherapy for retinoblastoma. J Neurosurg Pediatr. sept 2012;10(3):175-81.
5. Monroy JEG, Orbach DB, VanderVeen D. Complications of intra-arterial chemotherapy for retinoblastoma. Semin Ophthalmol. nov 2014;29(5-6):429-33.
6. Pandey AN. Retinoblastoma: An overview. Saudi J Ophthalmol Off J Saudi Ophthalmol Soc. oct 2014;28(4):310-5.
7. Peterson EC, Elhammady MS, Quintero-Wolfe S, Murray TG, Aziz-Sultan MA. Selective ophthalmic artery infusion of chemotherapy for advanced intraocular retinoblastoma: initial experience with 17 tumors. J Neurosurg. juin 2011;114(6):1603-8.
8. Ueda M, Tanabe J, Suzuki T, Sakai H, Mochizuki K, Kitano K, et al. [Conservative therapy for retinoblastoma--effect of melphalan on in vitro electroretinogram]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi. avr 1994;98(4):352-6.
9. Kaneko A, Suzuki S. Eye-preservation treatment of retinoblastoma with vitreous seeding. Jpn J Clin Oncol. déc 2003;33(12):601-7.
10. Munier FL, Gaillard M-C, Balmer A, Beck-Popovic M. Intravitreal chemotherapy for vitreous seeding in retinoblastoma: Recent advances and perspectives. Saudi J Ophthalmol Off J Saudi Ophthalmol Soc. juill 2013;27(3):147-50.
11. Boschmans J, de Bruijn E, Van Schil P, Lemièrre F. Analysis of novel melphalan hydrolysis products formed under isolated lung perfusion conditions using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom RCM. 15 avr 2013;27(7):835-41.
12. Brightman K, Finlay G, Jarvis I, Knowlton T, Manktelow CT. A stability-indicating method for the determination of melphalan and related impurity content by gradient HPLC. J Pharm Biomed Anal. juill 1999;20(3):439-47.

13. Pourquier P. [Alkylating agents]. *Bull Cancer (Paris)*. nov 2011;98(11):1237-51.
14. De Boeck G, Van Cauwenberghe K, Eggermont AMM, Van Oostertom AT, De Bruijn EA. Determination of melphalan and hydrolysis products in body fluids by GC-MS. *J High Resolut Chromatogr*. 1 déc 1997;20(12):697-700.
15. Pallante SL, Fenselau C, Mennel RG, Brundrett RB, Appler M, Rosenshein NB, et al. Quantitation by Gas Chromatography-Chemical Ionization-Mass Spectrometry of Phenylalanine Mustard in Plasma of Patients. *Cancer Res*. 7 janv 1980;40(7):2268-72.
16. Mirkou A, Vignal B, Cohen S, Guillaumont M, Glehen O, Guitton J. Assays for the quantification of melphalan and its hydrolysis products in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 1 oct 2009;877(27):3089-96.
17. Silvestro L, Viano I, Baiocchi C, Saini G, Marmont F, Ferro R. Quantitation of melphalan in plasma of patients by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Sci App*. 15 févr 1991;563(2):443-50.
18. Muckenschnabel I, Bernhardt G, Spruß T, Buschauer A. A versatile high-performance liquid chromatography method for the measurement of melphalan tailored to the optimization of hyperthermic isolated limb perfusion<sup>1</sup>. *Eur J Pharm Sci*. 1 mai 1997;5(3):129-37.
19. Wu ZY, Thompson MJ, Roberts MS, Addison RS, Cannell GR, Grabs AJ, et al. High-performance liquid chromatographic assay for the measurement of melphalan and its hydrolysis products in perfusate and plasma and melphalan in tissues from human and rat isolated limb perfusions. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 17 nov 1995;673(2):267-79.
20. Delmas A, Gordien JB, Bernadou JM, Roudaut M, Gresser A, Malki L, et al. Quantitative and qualitative control of cytotoxic preparations by HPLC-UV in a centralized parenteral preparations unit. *J Pharm Biomed Anal*. 12 juill 2009;49(5):1213-20.
21. Nussbaumer S, Bonnabry P, Veuthey J-L, Fleury-Souverain S. Analysis of anticancer drugs: a review. *Talanta*. 15 oct 2011;85(5):2265-89.
22. Skoog DA, West, Donald M., Holler FJ, Crouch SR, Buess-Herman, Claudine, Dauchot-Weymeers J. *Chimie analytique*. Bruxelles: De Boeck; 2012.
23. *Pharmacopée Européenne*. 8.5 éd. 2015.
24. Mermet J-M, Kellner RA, éditeurs. *Analytical chemistry: a modern approach to analytical science*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2004. 1181 p.

25. Munier FL, Gaillard M-C, Balmer A, Soliman S, Podilsky G, Moulin AP, et al. Intravitreal chemotherapy for vitreous disease in retinoblastoma revisited: from prohibition to conditional indications. *Br J Ophthalmol.* août 2012;96(8):1078-83.
26. Stout SA, Riley CM. The hydrolysis of l-phenylalanine mustard (melphalan). *Int J Pharm.* mai 1985;24(2-3):193-208.

## 6. Annexes

Annexe 1 : Instruction pour la reconstitution de préparation d'Alkeran® ophtalmique aux doses suivantes : 200µg/mL et 20µg/mL ainsi que : 300µg/mL et 30µg/mL.....	1
Annexe 2 : protocole de préparation des solutions de standards de melphalan HCl de la Pharmacopée Européenne utilisées pour les essais préliminaires de comportement du produit vis-à-vis de la méthode HPLC ainsi que la solution de blanc correspondant.....	2
Annexe 3 : Protocole de préparation de solutions de standard Ph. Eur. de melphalan pour conformité du système.....	3
Annexe 4 : Instruction pour la reconstitution de l'Alkeran® et protocole de préparation de solution de concentration 30µg/mL ayant subi une dégradation forcée afin de confirmer les données de spécificité de la méthode utilisée vis-à-vis de la préparation commerciale .....	4
Annexe 5 : Protocole de préparation des solution de melphalan HCl standard de la Ph. Eur.....	5
Annexe 6 : Instruction pour la reconstitution de l'Alkeran® et la préparation des échantillons destinés à l'étude de stabilité dans le conditionnement final, aux concentrations de 300µg/mL et 15µg/mL.....	6
Annexe 7 : Instruction de reconstitution de l'Alkeran® et protocole de préparation de la solution de concentration égale à 15µg/mL destinée aux essais indicatifs, concernant d'une part le protocole de fabrication des solutions et d'autre part une conservation aux températures de congélation (-20°C et -80°C) .....	7
Annexe 8 : Rapport Polyview™ pour le Standard Ph. Eur. de melphalan.....	8
Annexe 9 : Rapport Polyview™ pour le Standard Ph. Eur. de melphalan pour conformité du système.....	9
Annexe 10 : Rapport Polyview™ pour l'Alkeran® ayant subi une dégradation forcée ....	10
Annexe 11 : Chromatogramme de référence fourni par la Ph. Eur. pour le standard de melphalan pour conformité du système (Melphalan for system suitability CRS) .....	11
Annexe 12 : Résultats pour la conformité du système : temps de rétention, facteurs de rétention, identification des impuretés listées dans la monographie de la Ph. Eur. par analyse de la rétention relative au melphalan.....	13
Annexe 13 : Résultats (tableau et graphique) obtenus pour l'étude de suivi des solutions de standard Ph. Eur. de melphalan 30µg/mL et pour les échantillons d'Alkeran® 30µg/mL à température ambiante sur une période de 7 heures.....	14
Annexe 14 : Résultats du suivi de solutions d'Alkeran® ophtalmique 15µg/mL et 300µg/mL à température ambiante et à l'abri de la lumière (séries 1, 2, 3).....	15
Annexe 15 : Résultats du suivi de solutions d'Alkeran® ophtalmique 15µg/mL et 300µg/mL à température du réfrigérateur et à l'abri de la lumière (séries 1, 2, 3). .....	16
Annexe 16 : Résultats du suivi pour les solutions Alkeran® ophtalmique 15µg/mL, préparées avec le protocole modifié avec dilution unique, à température du réfrigérateur à l'abri de la lumière .....	17
Annexe 17 : Résultats pour les essais indicatifs de stabilité à température congélation (-20°C et -80°C), à l'abri de la lumière, pour Alkeran® ophtalmique 15µg/mL.....	18

**Annexe 1 : Instruction pour la reconstitution de préparation d'Alkeran® ophtalmique aux doses suivantes : 200µg/mL et 20µg/mL ainsi que : 300µg/mL et 30µg/mL**

Tableau 1 : instruction pour la préparation d'une dose de 0.2mg/mL et d'une dose de 0.02mg/mL d'Alkeran® ophtalmique

<b>1</b>	<b>préparation de la solution 1</b>
	reconstituer la fiole d'Alkeran® avec 10mL de solvant fourni (5mg/mL)
<b>2</b>	<b>Préparation de la solution 2</b>
	Prélever 1mL de la solution 1 (=5mg) et diluer ad 10mL de NaCl 0.9% (0.5mg/mL)
<b>3</b>	<b>Préparation de la solution 3</b>
	Prélever 4 mL de la solution 2 (=2mg) et diluer ad 10mL de NaCl 0.9% (0.3mg/mL = 300µg/mL)
<b>4</b>	<b>Préparation de la solution 4</b>
	Prélever 1mL de la solution 3 (=200µg/mL) et diluer ad 10mL de NaCl 0.9% (0.02mg/mL = 20µg/mL)

Tableau 2 : instruction pour la préparation d'une dose de 0.3mg/mL et d'une dose de 0.03mg/mL d'Alkeran® ophtalmique

<b>1</b>	<b>préparation de la solution 1</b>
	reconstituer la fiole d'Alkeran® avec 10mL de solvant fourni (5mg/mL)
<b>2</b>	<b>Préparation de la solution 2</b>
	Prélever 1mL de la solution 1 (=5mg) et diluer ad 10mL de NaCl 0.9% (0.5mg/mL)
<b>3</b>	<b>Préparation de la solution 3</b>
	Prélever 6 mL de la solution 2 (=2mg) et diluer ad 10mL de NaCl 0.9% (0.3mg/mL = 300µg/mL)
<b>4</b>	<b>Préparation de la solution 4</b>
	Prélever 1mL de la solution 3 (=300µg/mL) et diluer ad 10mL de NaCl 0.9% (0.03mg/mL = 30µg/mL)

Les prélèvements et les dilutions sont effectués à l'aide de seringues de 10mL et 1mL (selon le volume correspondant) en polypropylène stériles, afin de mimer le protocole appliqué au sein de l'unité de fabrication de la pharmacie centrale du CHUV.

**Annexe 2: protocole de préparation des solutions de standards de melphalan HCl de la Pharmacopée Européenne utilisées pour les essais préliminaires de comportement du produit vis-à-vis de la méthode HPLC ainsi que la solution de blanc correspondant**

Solution standard de melphalan HCl de la Ph. Eur.

50mg de standard de melphalan HCl de la Ph. Eur. ont été dissous dans un mélange 50:50 v/v de solvant commercial de l'Alkeran® (diluens : Natrii citras, Propylenglyolum, Ethanolum, Aqua ad solutionem pro 10mL) et de méthanol de qualité HPLC. La solution ainsi obtenue est agitée jusqu'à ce qu'elle soit limpide. La solution 1 ainsi obtenue a une concentration de 2.5mg/mL.

2mL de solution 1 sont prélevés et dilués ad 10mL de NaCl 0.9%. La solution 2 ainsi obtenue a une concentration de 0.5mg/mL.

6mL de solution 2 sont prélevés et dilués ad 10mL de NaCl 0.9%. La concentration de la solution 3 ainsi obtenue est de 0.3mg/mL (300µg/mL).

1mL de solution 3 est prélevé et dilué ad 10mL de NaCl 0.9%. La solution 4 ainsi obtenue a une concentration de 0.03mg/mL (30µg/mL).

La solution 4 est utilisée pour les analyses par HPLC.

Les dilutions sont effectuées dans des seringues de 10mL en polypropylène stériles.

Préparation de la solution de blanc

0.5mL de solvant commercial d'Alkeran® (diluens : Natrii citras, Propylenglyolum, Ethanolum, Aqua ad solutionem pro 10mL) ont été prélevés. Ce volume a été dissous jusqu'à 10mL avec du NaCl 0.9%. 0.5mL de la solution ainsi obtenue sont prélevés et dilués ad 5mL de NaCl 0.9%. 3mL de la solution ainsi obtenue sont prélevés et dilués ad 5mL de NaCl 0.9%.

Les dilutions sont effectuées dans des seringues de 10mL et 5mL en polypropylène stériles.

### Annexe 3 : Protocole de préparation de solutions de standard Ph. Eur. de melphalan pour conformité du système

Le protocole appliqué suit celui recommandé par la Ph. Eur.

5mg de melphalan pour conformité du système sont dissous ad 5mL de méthanol de qualité HPLC. La solution 1 ainsi obtenue a une concentration de 1mg/mL.

Un échantillon de solution 1 est analysé en HPLC.

La solution 2 est préparée de la manière suivante : un aliquot de solution 1 est placé à l'étuve pendant 15 minutes à une température fixée à 60°C. Cette étape permet de former une impureté du melphalan. Cette impureté est le 4-[(2-chloroéthyl)(2-méthoxyéthyl)amino]-L-phénylalanine, et correspond à un produit de dégradation du melphalan.

**Annexe 4: Instruction pour la reconstitution de l'Alkeran® et protocole de préparation de solution de concentration 30µg/mL ayant subi une dégradation forcée afin de confirmer les données de spécificité de la méthode utilisée vis-à-vis de la préparation commerciale**

La fiole d'Alkeran® est reconstituée avec 10mL de solvant fourni. La solution 1 ainsi obtenue a une concentration de 5mg/mL.

2mL de solution 1 sont prélevés et dilués ad 10mL de NaCl 0.9% à l'aide d'une seringue de 10mL. La solution 2 ainsi obtenue a une concentration égale à 1mg/mL.

Selon le protocole préconisé par la Ph. Eur., la solution 2 est placée à l'étuve à 60°C pendant 15min afin d'opérer une dégradation forcée.

La solution ainsi obtenue est diluée jusqu'à une concentration de 30µg/mL de la manière suivante : 3mL de la solution 2 dégradée à l'étuve sont prélevés et dilués ad 100mL de NaCl 0.9% dans une poche pour perfusion de capacité égale à 150mL.

#### **Annexe 5 : Protocole de préparation des solution de melphalan HCl standard de la Ph. Eur.**

50mg de melphalan HCl standard de la Ph. Eur. sont dissous dans 20mL de méthanol. La solution 1 ainsi obtenue a une concentration de 2.5mg/mL.

2mL de solution 1 sont prélevés et dilués ad 10mL de NaCl 0.9%. La solution 2 ainsi obtenue a une concentration de 0.5mg/mL.

6mL de solution 2 sont prélevés et dilués ad 10mL de NaCl 0.9%. La solution 3 ainsi obtenue a une concentration de 0.3mg/mL (300µg/mL).

1mL de solution 3 est prélevés et dilué ad 10mL de NaCl 0.9%. la concentration de la solution 4 ainsi obtenue est de 0.03mg/mL (30µg/mL).

La solution 4 est distribuée dans 8 vials différents pour analyse HPLC sur une période de 7 heures.

Les dilutions sont effectuées dans des seringues de 10mL en polypropylène stériles.

**Annexe 6 : Instruction pour la reconstitution de l'Alkeran® et la préparation des échantillons destinés à l'étude de stabilité dans le conditionnement final, aux concentrations de 300µg/mL et 15µg/mL**

Tableau 1 : instruction pour la reconstitution de l'Alkeran® et la préparations de concentrations égales à 300µg/mL et 15µg/mL, destinées à l'étude de stabilité dans le conditionnement final

<b>1</b>	<b>Préparation de la solution 1</b>
	Reconstituer la fiole d'Alkeran ® avec 10mL de solvant fourni. Agiter vigoureusement pour homogénéiser la solution. (5mg/mL)
<b>2</b>	<b>Préparation de la solution 2</b>
	Prélever 10mL de la solution 1 (=50mg) et diluer ad 100mL de NaCl 0.9% dans une poche pour perfusion de 150mL (0.5mg/mL)
<b>3</b>	<b>Préparation de la solution 3</b>
	Prélever 60mL de solution 2 (=30mg) et diluer ad 100mL de NaCl 0.9% dans une poche pour perfusion de 150mL (300µg/mL)
<b>4</b>	<b>Conditionnement des échantillons de solution 3</b>
	Dans une seringue de 1mL (Bbraun Omnifix-F), prélever 1mL de solution 3 (=300µg). Etiquetage des seringues mentionne : n°série, concentration, horaire de prélèvement
<b>5</b>	<b>Préparation de la solution 4</b>
	Prélever 10mL de solution 3 (=3mg) et diluer ad 200mL de NaCl 0.9% dans une poche pour perfusion de 250mL (15µg/mL)
<b>6</b>	<b>Conditionnement des échantillons de solution 4</b>
	Dans une seringue de 1mL (Bbraun Omnifix-F), prélever 1mL de solution 4 (=15µg). Etiquetage des seringues mentionne : n°série, concentration, horaire de prélèvement

Les poches pour perfusion destinées à effectuées les dilutions de l'Alkeran® commercial en mimant le protocole appliqué par l'unité de fabrication de la pharmacie centrale du CHUV sont remplies avant l'étape de reconstitution, dans le souci de limiter le temps de préparation des échantillons.

L'étape de remplissage des poches est effectuée comme suit :

Etape 2 : 90mL de NaCl 0.9% sont prélevés avec une seringue de 60mL en polypropylène stérile et mis dans la poche pour perfusion de capacité de 150mL.

Etape 3 : 40mL de NaCl 0.9% sont prélevés avec une seringue de 60mL en polypropylène stérile et mis dans la poche pour perfusion de capacité de 150mL.

Etape 5 : 190mL de NaCl 0.9% sont prélevés avec une seringue de 60mL en polypropylène stérile et mis dans la poche pour perfusion de capacité de 250mL.

**Annexe 7 : Instruction de reconstitution de l'Alkeran® et protocole de préparation de la solution de concentration égale à 15µg/mL destinée aux essais indicatifs, concernant d'une part le protocole de fabrication des solutions et d'autre part une conservation aux températures de congélation (-20°C et -80°C)**

Tableau 1 : Instruction de reconstitution de l'Alkeran® et protocole de préparation de la solution de concentration égale à 15µg/mL

<b>1</b>	<b>Préparation de la solution 1</b>
	Reconstituer la fiole d'Alkeran ® avec 10mL de solvant fourni. Agiter vigoureusement pour homogénéiser la solution. (5mg/mL)
<b>2</b>	<b>Préparation de la solution 2</b>
	Prélever 3.2mL de solution 1 et les injecter dans une poche pour perfusion contenant 1000mL de NaCl 0.9% froide (BBraun Ecobag, NaCl 0.9%) (15µg/mL)
<b>3</b>	<b>Conditionnement des échantillons de solution 2</b>
	Dans une seringue de 1mL (Bbraun Omnifix-F), prélever 1mL de solution 4 (=15µg). Etiquetage des seringues mentionne : n°série, concentration, horaire de prélèvement

La poche pour perfusion contenant 1000mL de NaCl 0.9% est placée au réfrigérateur la veille des manipulations afin de refroidir la solution qu'elle contient et pouvoir effectuer les dilutions à basse température.

## Annexe 8 : Rapport Polyview™ pour le Standard Ph. Eur. de melphalan

### PuP Statistics Report

Target: Std\_Melphalan PhEur

PuP: 257.140 nm Standard Deviation: 0.222 nm

No Filename tR (min) Spectrum Type Correction PuP (220.00->400.00 nm)

```
-----  
1 std_melph_pheur_30_335.44_1.run 9.733 Within Baseline 257.263(+0.  
2 std_melph_pheur_30_335.44_1.run 9.800 DownSlope Baseline 257.329(+0.  
3 std_melph_pheur_30_335.44_1.run 9.680 Upslope Baseline 256.829(-1.  
Best Correlation: 1 and 2 Sim: 0.999946 Dissim: 0.010381  
Worst Correlation: 2 and 3 Sim: 0.998650 Dissim: 0.051952  
Average PuP = 257.140 nm Standard Deviation = 0.222 nm
```

## Annexe 9 : Rapport Polyview™ pour le Standard Ph. Eur. de melphalan pour conformité du système

### PuP Statistics Report

Target: melphalan\_conformitesyst

PuP: 257.110 nm Standard Deviation: 0.106 nm

No Filename tR (min) Spectrum Type Correction PuP (220.00->400.00 nm)

```
-----  
1 suitdil2_ice_010415_335.44_1.run 11.680 PeakApex Baseline 256.968(-1  
2 suitdil2_ice_010415_335.44_1.run 11.627 Upslope Baseline 257.224(+1  
3 suitdil2_ice_010415_335.44_1.run 11.733 DownSlope Baseline 257.139(+0
```

Best Correlation: 2 and 3 Sim: 0.999988 Dissim: 0.004883

Worst Correlation: 1 and 2 Sim: 0.999847 Dissim: 0.017469

Average PuP = 257.110 nm Standard Deviation = 0.106 nm

## Annexe 10 : Rapport Polyview™ pour l'Alkeran® ayant subi une dégradation forcée

### PuP Statistics Report

Target: Alkeran\_stress\_test

PuP: 257.225 nm Standard Deviation: 0.389 nm

No Filename tR (min) Spectrum Type Correction PuP (220.00->400.00 nm)

```
-----  
1 s23_t60_30_4_29.05.2015_1.run 11.787 PeakApex Baseline 257.375(+0.39  
2 s23_t60_30_4_29.05.2015_1.run 11.720 Upslope Baseline 256.691(-1.37  
3 s23_t60_30_4_29.05.2015_1.run 11.840 DownSlope Baseline 257.609(+0.99  
Best Correlation: 1 and 3 Sim: 0.999866 Dissim: 0.016381  
Worst Correlation: 2 and 3 Sim: 0.998071 Dissim: 0.062078  
Average PuP = 257.225 nm Standard Deviation = 0.389 nm
```

**Annexe 11 : Chromatogramme de référence fourni par la Ph. Eur. pour le standard de melphalan pour conformité du système (Melphalan for system suitability CRS)**

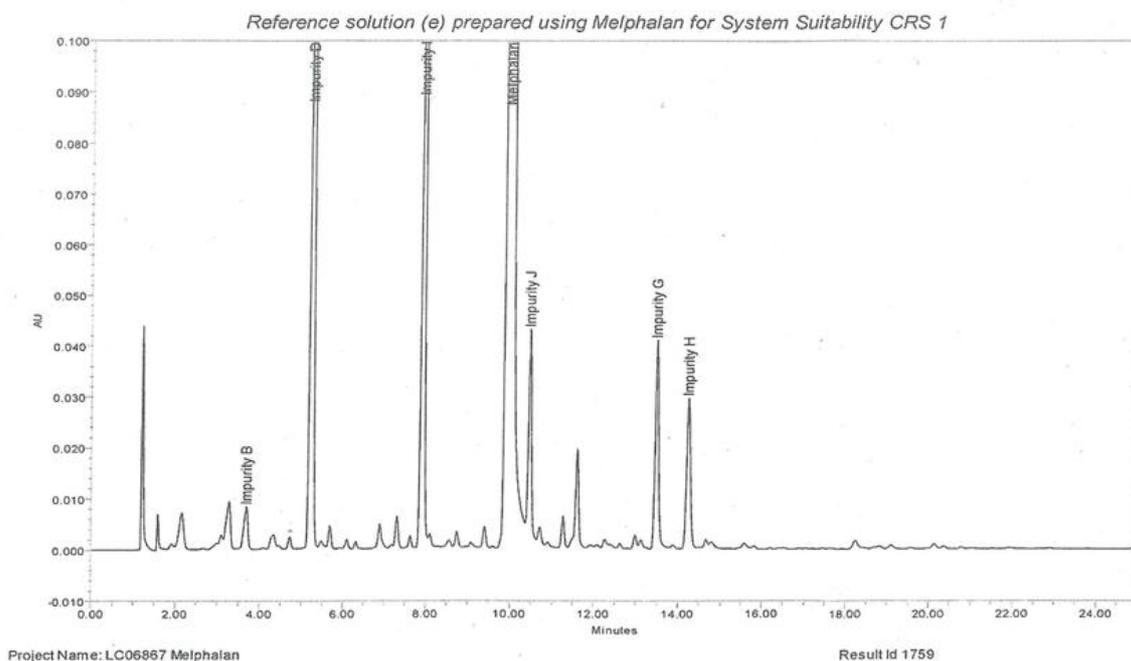
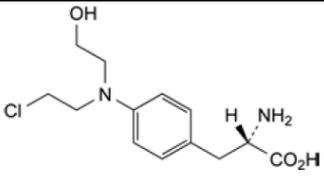
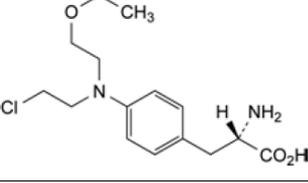
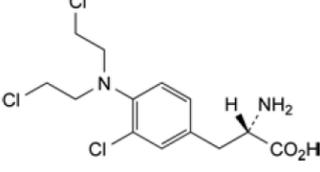
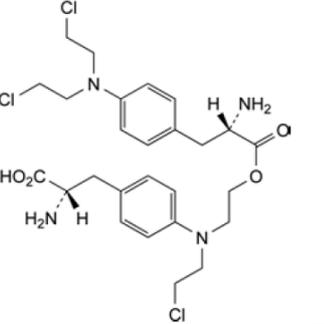
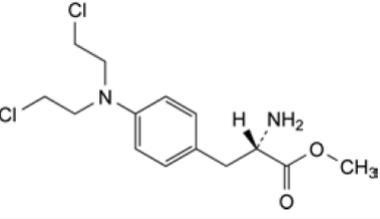
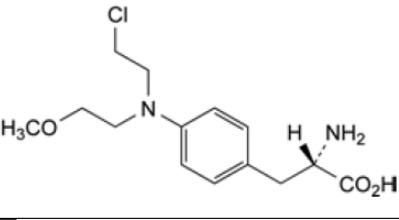
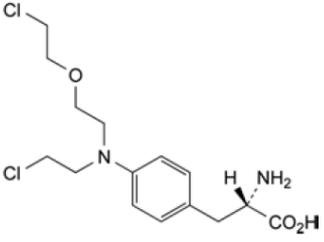
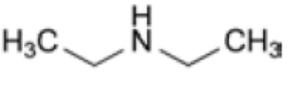


Figure 1 : chromatogramme de référence pour le standard Ph. Eur. melphalan pour conformité du système

Tableau 1 : Nom, structure, rétention relative par rapport au melphalan et dénomination Ph. Eur. des impuretés de synthèse et de dégradation répertoriées dans la Ph. Eur.

Nom	Structure	Rétention relative par rapport au melphalan / dénomination Ph. Eur.
4-[bis(2-hydroxyéthyl)amino]-L-phénylalanine		A
4-morpholin-4-yl-L-phénylalanine		0.3 B
4-[(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanine		C

4-[(2-chloroéthyl)(2-hydroxyéthyl)amino]-L-phénylalanine		0.6 D
4-[(2-chloroéthyl)(2-éthoxyéthyl)amino]-L-phénylalanine		E
4-[bis(2-chloroéthyl)amino]-3-chloro-L-phénylalanine		F
4-[[2-[[4-[bis(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylanyl]oxy]éthyl](2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanine		1.4 G
4-[bis(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalaninate de méthyle		1.5 H
4-[(2-chloroéthyl)(2-methoxyéthyl)amino]-L-phénylalanine		0.8 I
4-[[2-(chloroéthoxy)éthyl](2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanine		1.04 J
N-éthyléthanamine		K

**Annexe 12 : Résultats pour la conformité du système : temps de rétention, facteurs de rétention, identification des impuretés listées dans la monographie de la Ph. Eur. par analyse de la rétention relative au melphalan**

Tableau 1 : temps de rétention, facteur de rétention et identification des impuretés listées dans la Ph. Eur. par la rétention relative au melphalan

tr (min)	k	k relatif au melphalan	k théorique	nom Ph. Eur.
<b>2.117</b>	-	-		
2.384	0.126	0.028		
2.496	0.179	0.040		
2.967	0.402	0.089		
3.209	0.516	0.114		
4.88	1.305	0.289	0.3	B
5.387	1.545	0.341		
5.736	1.709	0.378		
6.156	1.908	0.422		
6.893	2.256	0.499	0.6	D
9.62	3.544	0.784	0.8	I
<b>11.693</b>	<b>4.523</b>	<b>1.000</b>		
12.297	4.809	1.063	1.04	J
13.68	5.462	1.207		
14.257	5.735	1.268		
14.659	5.924	1.310		
14.816	5.999	1.326		
15.088	6.127	1.355	1.4	G
15.393	6.271	1.386		
15.532	6.337	1.401		
16.169	6.638	1.467		
16.305	6.702	1.482	1.5	H
17.54	7.285	1.611		
18.5	7.739	1.711		
19.141	8.042	1.778		
19.823	8.364	1.849		
20.384	8.629	1.908		
22.489	9.623	2.127		
23.192	9.955	2.201		

Calculs effectués comme suit :

$$k = t_r - t_m$$

Avec : k : facteur de rétention ;  $t_r$  : temps de rétention [min] ;  $t_m$  : temps mort [min], ici égal à 2.117 min.

**Annexe 13 : Résultats (tableau et graphique) obtenus pour l'étude de suivi des solutions de standard Ph. Eur. de melphalan 30µg/mL et pour les échantillons d'Alkeran® 30µg/mL à température ambiante sur une période de 7 heures**

Tableau 1 : aire sous le pic de melphalan et aire relative à temps zéro [%] obtenues pour les échantillons de standard Ph. Eur. de melphalan 30µg/mL à température ambiante de 0 à 7h

temps [h]	aire	aire relative à temps 0
0	13939215	100.00%
1	13515511	96.96%
2	12904253	92.58%
3	12335405	88.49%
4	11714410	84.04%
5	11150980	80.00%
6	10521015	75.48%
7	9943404	71.33%
Standard melphalan HCl (PhEur)		

Tableau 2 : aire sous le pic de melphalan et aire relative à temps zéro [%] obtenues pour les échantillons d'Alkeran® 30µg/mL à température ambiante de 0 à 7h

temps [h]	aire	aire relative à temps 0
0	14928453	100.00%
1	14173656	94.94%
2	13353329	89.45%
3	12566825	84.18%
4	11830073	79.25%
5	11120889	74.49%
6	10429976	69.87%
7	9736665	65.22%
Alkeran®		

L'aire relative à temps zéro (injection juste après reconstitution et fin des dilutions) correspond au pourcentage de melphalan restant dans l'échantillon au terme de sa durée déterminée d'exposition à température ambiante.

**Annexe 14 : Résultats du suivi de solutions d'Alkeran® ophtalmique 15µg/mL et 300µg/mL à température ambiante et à l'abri de la lumière (séries 1, 2, 3)**

Tableau 1 : aire sous le pic de melphalan, aires relatives à temps zéro pour le pic de melphalan pour les échantillons d'Alkeran® 15µg/mL exposés à température ambiante, à l'abri de la lumière

	aire	aire relative	aire	aire relative	aire	aire relative	moyenne	écart-type	CV
T0	6426781	100.00%	6347186	100.00%	6236282	100.00%	6336750	95677	1.51%
T0+1	6176615	96.11%	6043252	95.21%	5956641	95.52%	95.61%	0.0046	0.48%
T0+2	5901959	91.83%	5837908	91.98%	5737924	92.01%	91.94%	0.0009	0.10%
T0+3	5661685	88.10%	5594002	88.13%	5480011	87.87%	88.03%	0.0014	0.16%
T0+4	5472799	85.16%	5444974	85.79%	5247929	84.15%	85.03%	0.0082	0.97%
T0+5	5216526	81.17%	5212958	82.13%	5083703	81.52%	81.61%	0.0049	0.60%
T0+6	5063135	78.78%	4994004	78.68%	4869793	78.09%	78.52%	0.0037	0.48%
T0+7	4857032	75.57%	4812614	75.82%	4683180	75.10%	75.50%	0.0037	0.49%
T0+8	4584334	71.33%	4627802	72.91%	4527189	72.59%	72.28%	0.0084	1.16%
	<b>S1_TA_15</b>		<b>S2_TA_15</b>		<b>S3_TA_15</b>				

Tableau 2 : aire sous le pic de melphalan, aires relatives à temps zéro pour le pic de melphalan pour les échantillons d'Alkeran® 300µg/mL exposés à température ambiante, à l'abri de la lumière

	aire	aire relative	aire	aire relative	aire	aire relative	moyenne	écart-type	CV
T0	13309922	100.00%	14026009	100.00%	13485209	100.00%	13607047	373267	2.74%
T0+2	11618782	87.29%	11788986	84.05%	11861662	87.96%	86.44%	0.0209	2.42%
T0+4	10218677	76.77%	10835654	77.25%	10733924	79.60%	77.88%	0.0151	1.94%
T0+6	9890117	74.31%	9861616	70.31%	10062383	74.62%	73.08%	0.0240	3.29%
T0+8	9146502	68.72%	9208246	65.65%	9235793	68.49%	67.62%	0.0171	2.53%
	<b>S1_TA_300</b>		<b>S2_TA_300</b>		<b>S3_TA_300</b>				

Les séries 1, 2 et 3 sont respectivement nommées dans le tableau : S1\_TA\_15, S2\_TA\_15 et S3\_TA\_15.

Les aires relatives sont les aires relatives par rapport à celle du pic de melphalan au temps zéro (T0). Elles correspondent au taux de melphalan restant après le laps de temps d'exposition à température ambiante défini dans la première colonne.

**Annexe 15 : Résultats du suivi de solutions d'Alkeran® ophtalmique 15µg/mL et 300µg/mL à température du réfrigérateur et à l'abri de la lumière (séries 1, 2, 3)**

Tableau 1 : aire sous le pic de melphalan, aires relatives à temps zéro pour le pic de melphalan pour les échantillons d'Alkeran® 15µg/mL exposés à température du réfrigérateur, à l'abri de la lumière

	aire	aire relative	aire	aire relative	aire	aire relative	moyenne	écart-type	CV
T0	6484438	100.00%	6205084	100.00%	6364033	100.00%	6351185	140119	2.21%
T0+2	6249611	96.38%	6156014	99.21%	6265029	98.44%	98.01%	0.01	1.49%
T0+4	6214032	95.83%	6037514	97.30%	6442347	101.23%	98.12%	0.03	2.85%
T0+6	6117601	94.34%	5972134	96.25%	6286995	98.79%	96.46%	0.02	2.31%
T0+8	6083430	93.82%	5907173	95.20%	6146241	96.58%	95.20%	0.01	1.45%
T0+12	6011150	92.70%	5917637	95.37%	6018910	94.58%	94.22%	0.01	1.45%
T0+24	5903811	91.05%	5715228	92.11%	5854963	92.00%	91.72%	0.01	0.64%
T0+48	5952066	91.79%	5507714	88.76%	-	-	90.28%	0.02	2.37%
	<b>S1_TF_15</b>		<b>S2_TF_15</b>		<b>S3_TF_15</b>				

Tableau 2 : aire sous le pic de melphalan, aires relatives à temps zéro pour le pic de melphalan pour les échantillons d'Alkeran® 300µg/mL exposés à température du réfrigérateur, à l'abri de la lumière

	aire	aire relative	aire	aire relative	aire	aire relative	moyenne	écart-type	CV
T0	13911482	100.00%	13914111	100.00%	14561049	100.00%	14128881	374271	2.65%
T0+2	13116295	94.28%	12929185	92.92%	13595280	93.37%	93.52%	0.01	0.74%
T0+4	12906665	92.78%	12861131	92.43%	13523788	92.88%	92.70%	0.002	0.25%
T0+6	12813840	92.11%	12686496	91.18%	13648933	93.74%	92.34%	0.01	1.40%
T0+8	12767623	91.78%	12606117	90.60%	13217939	90.78%	91.05%	0.01	0.70%
T0+12	12587917	90.49%	12482816	89.71%	12999553	89.28%	89.83%	0.01	0.68%
T0+24	11946822	85.88%	12043395	86.56%	12959918	89.00%	87.15%	0.02	1.89%
T0+48	11382374	81.82%	10788852	77.54%	11974274	82.23%	80.53%	0.03	3.23%
	<b>S1_TF_300</b>		<b>S2_TF_300</b>		<b>S3_TF_300</b>				

Les séries 1, 2 et 3 sont respectivement nommées dans le tableau : S1\_TF\_15, S2\_TF\_15 et S3\_TF\_15.

Les aires relatives sont les aires relatives par rapport à celle du pic de melphalan au temps zéro (T0). Elles correspondent au taux de melphalan restant après le laps de temps d'exposition à température du réfrigérateur défini dans la première colonne.

**Annexe 16 : Résultats du suivi pour les solutions Alkeran® ophtalmique 15µg/mL, préparées avec le protocole modifié avec dilution unique, à température du réfrigérateur à l'abri de la lumière**

Tableau 1 : résultats pour les échantillons Alkeran® 15µg/mL, suivis à température du réfrigérateur à l'abri de la lumière, préparés selon le protocole modifié avec dilution unique

temps [h]	aire	aire relative à temps 0
0	7732423	100.00%
1	7700614	99.59%
2	7683455	99.37%
4	7662106	99.09%
6	7618257	98.52%
8	7579319	98.02%
12	7557766	97.74%
24	7553340	97.68%

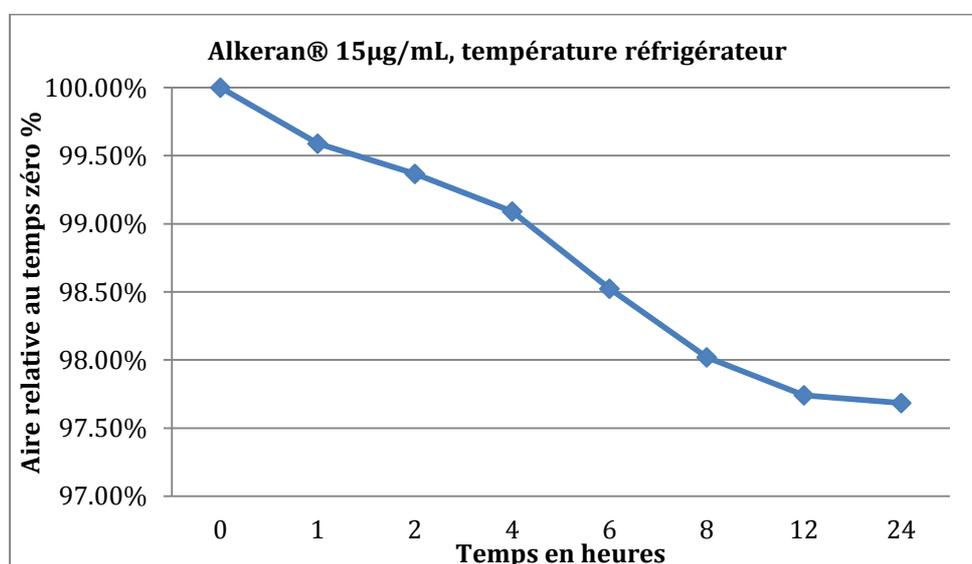


Figure 1 : aires relatives à temps zéro pour le pic de melphalan [%] en fonction du temps [h], stockage réfrigérateur et à l'abri de la lumière

**Annexe 17 : Résultats pour les essais indicatifs de stabilité à température congélation (-20°C et -80°C), à l'abri de la lumière, pour Alkeran® ophtalmique 15µg/mL.**

Tableau 1 : résultats pour les échantillons Alkeran® ophtalmique 15µg/mL, à l'abri de la lumière, stockés à -20°C

<b>24h</b>	<b>aire</b>	<b>aire relative à temps 0</b>	<b>48 h</b>	<b>aire</b>	<b>aire relative à temps 0</b>
T0	7152169	100.00%	T0	7152169	100.00%
1	6870373	96.06%	1	6931273	96.91%
2	6888232	96.31%	2	6929497	96.89%
3	6854328	95.84%	3	6705655	93.76%
<b>moyenne</b>		<b>96.07%</b>	<b>moyenne</b>		<b>95.85%</b>

Tableau 2 : résultats pour les échantillons Alkeran® ophtalmique 15µg/mL, à l'abri de la lumière, stockés à -80°C

<b>24h</b>	<b>aire</b>	<b>aire relative à temps 0</b>	<b>48h</b>	<b>aire</b>	<b>aire relative à temps 0</b>
T0	7152169	100.00%	T0	7152169	100.00%
1	7098462	99.25%	1	7046587	98.52%
2	6990792	97.74%	2	7087102	99.09%
3	6838566	95.62%	3	7021194	98.17%
<b>moyenne</b>		<b>97.54%</b>	<b>moyenne</b>		<b>98.59%</b>

Les aires relatives à temps zéro correspondent au taux de melphalan restant dans la préparation après exposition à la température de congélation (-20°C ou -80°C), après 24h ou 48h.

Chaque mesure a été faite trois fois à la suite afin de pouvoir établir un taux restant de melphalan moyen pour chaque lot de seringues.