



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 16 janvier 2015

par

Mme de VAUJANY Angélique

Née le 04/11/1990

à Vénissieux (Rhône)

**MISE SOUS FORME PHARMACEUTIQUE DU LÉVÉTIRACÉTAM DANS LE CADRE D'UN
ESSAI CLINIQUE INSTITUTIONNEL :
FORMULATION GALÉNIQUE ET ÉTUDE DE STABILITÉ DES PRODUITS FINIS**

JURY

M. PIROT Fabrice, Docteur en Pharmacie

Mme PIVOT Christine, Docteur en Pharmacie

M. TALL Mamadou-Lamine, Docteur en Pharmacie

Mme PETER Laure, Docteur en Médecine

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- | | |
|---|------------------------|
| • Président de l'Université | M. François-Noël GILLY |
| • Vice-Président du Conseil d'Administration | M. Hamda BEN HADID |
| • Vice-Président du Conseil Scientifique | M. Germain GILLET |
| • Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire | M. Philippe LALLE |

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

- | | |
|---|--|
| • UFR de Médecine Lyon Est | Directeur : M. Jérôme ETIENNE |
| • UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux | Directeur : Mme Carole BURILLON |
| • Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques | Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA |
| • UFR d'Odontologie | Directeur : M. Denis BOURGEOIS |
| • Institut des Techniques de Réadaptation | Directeur : M. Yves MATILLON |
| • Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine | Directeur : Anne-Marie SCHOTT |

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

- | | |
|--|----------------------------------|
| • Faculté des Sciences et Technologies | Directeur : M. Fabien DE MARCHI |
| ❖ UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) | Directeur : M. Yannick VANPOULLE |
| ❖ Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL) | Directeur : M. Pascal FOURNIER |
| ❖ I.U.T. LYON 1 | Directeur : M. Christophe VITON |
| ❖ Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA) | Directeur : M. Nicolas LEBOISNE |
| ❖ ESPE | Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE |

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ISPB -Faculté de Pharmacie Lyon

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUES ET PHARMACIE
GALENIQUE**

❖ **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)
Monsieur Pierre TOULHOAT (Pr - PAST)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU)
Madame Christelle MACHON (AHU)

❖ **PHARMACIE GALENIQUE - COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDY-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Monsieur Damien SALMON (AHU)

❖ **BIOPHYSIQUE**

Monsieur Richard COHEN (PU – PH)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU – PH)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU - HDR)
Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

❖ **DROIT DE LA SANTE**

Monsieur François LOCHER (PU – PH)
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

❖ **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)
Madame Carole SIANI (MCU – HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)

❖ **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

❖ **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

❖ **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**

Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)

❖ **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**

Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (MCU)
Monsieur Vincent GROS (MCU-PAST)
Madame Audrey JANOLY-DUMESNIL (MCU-PH)
Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)

❖ **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**

Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU)
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
Madame Marie-Paule PAULTRE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

❖ **CHIMIE ORGANIQUE**

Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)
Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)
Madame Christelle MARMINON (MCU)
Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)

❖ **CHIMIE THERAPEUTIQUE**

Monsieur Roland BARRET (Pr)
Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)
Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU - HDR)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

❖ **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**

Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)
Madame Marie-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
Madame Isabelle KERZAON (MCU)
Monsieur Serge MICHALET (MCU)

❖ **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**

Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)
Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)
Madame Céline PRUNET-SPANNO (MCU)
Madame Catherine RIOUFOL (MCU- PH-HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

❖ **TOXICOLOGIE**

Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)
Madame Léa PAYEN (PU-PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH)

❖ **PHYSIOLOGIE**

Monsieur Christian BARRES (Pr)
Monsieur Daniel BENZONI (Pr)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)

❖ PHARMACOLOGIE

Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Monsieur Olivier CATALA (Pr-PAST)
Madame Corinne FEUTRIER (MCU-PAST)
Madame Mélanie THUDEROZ (MCU-PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

❖ IMMUNOLOGIE

Monsieur Jacques BIENVENU (PU – PH)
Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)
Monsieur Sébastien VIEL (AHU)

❖ HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE

Madame Christine TROUILLOT-VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
Monsieur Olivier ROUALDES (AHU)

❖ MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES

Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Monsieur Didier BLAHA (MCU)
Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU-HDR)

❖ PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE

Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

❖ BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE

Madame Pascale COHEN (Pr)
Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)

❖ BIOLOGIE CELLULAIRE

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

❖ **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
Madame Alexandra MONTEBAULT (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Valérie VOIRON (MCU - PAST)

❖ **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**

Madame Emilie BLOND
Madame Florence RANCHON

❖ **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**

Madame Sophie ASSANT 85^{ème} section
Monsieur Benoit BESTGEN 85^{ème} section
Madame Marine CROZE 86^{ème} section
Madame Mylène HONORAT MEYER 85^{ème} section

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

Remerciements

Au jury de thèse,

À Monsieur Fabrice PIROT

Professeur des universités et Praticien hospitalier à la Pharmacie de l'hôpital Edouard Herriot.

Pour l'honneur que vous me faites en présidant cette thèse, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

À Monsieur Mamadou-Lamine TALL

Pharmacien Assistant à la Pharmacie de l'hôpital Edouard Herriot.

Pour votre disponibilité que ce soit pendant mon stage à la pharmacie ou après, par vos relectures qui m'ont permis de rendre ce travail meilleur, et de m'avoir fait partager votre savoir. Veuillez trouver ici mes sincères remerciements.

À Madame Christine PIVOT

Pharmacien chef de service à la Pharmacie de l'Hôpital Edouard Herriot.

Pour m'avoir proposé ce sujet et pour avoir accepté de diriger cette thèse. Merci de m'avoir accueillie dans vos locaux durant ces six mois de stage où j'ai pu découvrir la pharmacie hospitalière et enrichir mes connaissances. Merci également pour votre disponibilité et vos conseils. Veuillez trouver ici mes sincères remerciements.

À Madame Laure PETER

Docteur en Médecine, Praticien hospitalier à l'Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer.

Merci infiniment d'avoir accepté de siéger parmi les membres du jury. Votre recherche clinique est l'essence même de mon travail, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Mes remerciements s'adressent également au personnel de la pharmacie de l'HEH,

À Mélanie, Brigitte et Michelle

Techniciennes au laboratoire de contrôle de la Pharmacie de l'Hôpital Edouard Herriot.

Un très grand merci à vous pour votre disponibilité à chaque instant. J'ai vraiment passé un excellent stage en votre compagnie.

Mélanie, un jour peut-être je m'essaierai à ton sport favori. En tout cas, tu es une professionnelle du montage des colonnes HPLC.

Brigitte, je n'oublierai pas ton rire.

Michelle, tes récits de voyages m'ont mis l'eau à la bouche.

À Carole DHELENS, Diane LALEYE et Cécile GÉRARD

Pharmaciens Assistants du secteur Essais cliniques de la Pharmacie de l'Hôpital Edouard Herriot.

Pour votre aide dans la rédaction des documents relatifs aux essais cliniques.

Merci particulièrement à Carole DHELENS pour vos conseils en informatique et pour votre aide dans la réglementation des essais cliniques.

À El Hadji DIOUF

Pharmacien Attaché de la Pharmacie de l'Hôpital Edouard Herriot.

Pour votre aide dans la mise en œuvre des préparations et dans la rédaction des documents relatifs aux préparations injectables.

Aux préparateurs et aux ouvriers professionnels de la Pharmacie

Merci de m'avoir aidé dans la réalisation des différentes préparations, aussi bien pour la technique que pour la préparation du matériel.

Aux internes en Pharmacie

Pour leurs conseils.

Aux secrétaires de la Pharmacie

Pour avoir géré quelques papiers administratifs et quelques rendez-vous.

Je dédie cette thèse :

À ma famille,

À mes parents

Merci d'avoir cru en moi durant toutes ces années. Merci pour votre soutien de tous les instants, qu'il soit moral ou financier, et pour ne m'avoir jamais forcé dans quoi que ce soit. À toi maman, pour m'avoir concocté de bons petits plats quand le temps manquait. À toi papa, pour qui les études sont un mystère. Recevez ce travail comme le fruit de vos sacrifices.

À mon frère

MERCI pour ta relecture de dernière minute. Tu as su resté présent à chaque instant, même à 9000 km. Merci de m'avoir aidée dans ma vie scolaire ou lors de ma recherche de stage, et d'avoir toujours su rester objectif. Merci de m'avoir donné le goût du travail bien fait.

À mes grands-parents

Même si vous n'êtes plus de ce monde, je pense à vous très souvent. La vie n'a pas toujours été facile pour vous, mais vous avez toujours su donner de l'affection à vos petits-enfants. Je suis convaincue qu'aujourd'hui vous seriez fière d'un bon nombre d'entre-nous.

À ma marraine

Merci pour ta présence à plusieurs étapes de ma vie, même lorsque tu étais loin. Je garde et garderai toujours en tête ce splendide voyage au pays du sirop d'érable.

À mon parrain

Merci d'avoir été présent à chaque événement de ma vie, dès ma très jeune enfance.

À mes grands-parents d'adoption : Dany et Francisque

Nos liens ne sont pas familiaux mais vous êtes considérés comme tel. Merci pour votre soutien tout au long de mes études, et pour la location de votre sous-sol en temps de révisions. Le calme était de rigueur. Merci également d'avoir cru en moi depuis mon enfance.

A mes amies et amis du lycée, de la Faculté de Pharmacie, de CPE Lyon et d'ailleurs...

Pour m'avoir fait garder le sourire, même dans les moments difficiles.

SOMMAIRE

<i>Liste des annexes</i>	12
<i>Liste des figures</i>	13
<i>Liste des tableaux</i>	14
<i>Liste des abréviations</i>	15
<i>Introduction</i>	16
<i>Définitions</i>	18
I. Code de la Santé Publique	19
II. Essai clinique portant sur un médicament	19
III. Médicament	19
IV. Médicament expérimental	20
V. Placebo.....	20
VI. Protocole de recherche biomédicale	20
PARTIE 1 : Essais cliniques, généralités et environnement réglementaire	21
1. Généralités sur les essais cliniques et l'expérimentation sur l'Homme	22
1.1. Historique ⁽⁷⁾	22
1.2. Réglementation des essais cliniques	24
a) La Directive 2001/20/CE du 4 avril 2001 ⁽⁶⁾ :	25
b) Les Bonnes Pratiques Cliniques (BPC) ⁽¹³⁾ :	26
c) Les Bonnes Pratiques de Préparation (BPP) ⁽¹⁵⁾ :	26
d) Les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) ⁽¹⁶⁾ :	28
e) La loi Jardé du 5 mars 2012 ⁽¹⁷⁾ :	28
f) Le nouveau règlement européen relatif aux essais cliniques ⁽²¹⁾ :	30
2. Les différents types de recherche clinique en France	31
2.1. Les différentes catégories de recherche clinique en France	31
2.2. La mise en insu	32
3. Les principaux acteurs des essais cliniques en France	33
3.1. Les autorités compétentes	33
a) L'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) :	33
b) Le Comité de Protection des Personnes (CPP) :	34
c) La Commission Nationale des Recherches Impliquant la Personne Humaine (CNRIPIH) ⁽¹⁷⁾ :	36
3.2. Le promoteur	37
3.3. L'investigateur	38
3.4. Le participant	39

4.	Déroulement d'une recherche clinique.....	40
4.1.	Les formalités à accomplir en amont ⁽³⁶⁾	41
a)	Obtention d'un numéro EudraCT et souscription à une assurance :	41
b)	Dossier de demande d'Autorisation d'Essai Clinique (AEC) :	41
4.2.	La chronologie d'une recherche clinique	43
4.3.	La recherche clinique et après... ..	43
PARTIE 2 : Cas particulier d'un essai clinique promu par les HCL.....		45
1.	Présentation et justification clinique de la recherche	46
1.1.	La pathologie étudiée.....	46
1.2.	L'état de l'art	47
1.3.	L'objectif principal de l'étude	48
1.4.	La méthodologie de l'étude ⁽⁴⁴⁾	48
1.5.	Le traitement étudié	49
2.	Molécule à l'étude : le lévétiracétam.....	50
2.1.	Historique	50
2.2.	Données physico-chimiques	50
2.3.	Données cliniques	52
2.4.	Médicament expérimental et BPP ⁽¹⁵⁾	54
2.5.	Médicament expérimental et BPF ⁽¹⁶⁾	55
3.	Etude de faisabilité d'un essai clinique portant sur le lévétiracétam réalisé au sein de la PUI de l'Hôpital Edouard Herriot (HEH).....	56
3.1.	Faisabilité clinique.....	56
a)	Intérêt pharmacothérapeutique :	57
b)	Circonstances de la réalisation de l'étude :	57
c)	Recevabilité du protocole de l'essai clinique :	58
3.2.	Faisabilité technique	59
a)	Les moyens humains requis selon la réglementation :	59
b)	Les moyens matériels requis selon la réglementation :	61
c)	Evaluation des coûts :	63
3.3.	Cas particulier de la faisabilité technique : le contrôle analytique	64
a)	Les moyens humains requis selon la réglementation :	64
b)	Les moyens matériels requis selon la réglementation :	65
3.4.	Les moyens humains et matériels disponibles à la PUI de l'HEH	66
4.	Conclusion.....	68
PARTIE 3 : Développement pharmaceutique et étude de stabilité		69
1.	Formulation des médicaments expérimentaux	70
1.1.	Approvisionnement en matières premières et en articles de conditionnement.....	70
1.2.	Formulation de la solution injectable	72
a)	Recueil des données bibliographiques pour la forme injectable :	72
b)	Les adaptations effectuées pour le ME :	74

1.3. Formulation de la forme orale	78
a) Recueil des données bibliographiques pour la forme orale :.....	78
b) Les adaptations effectuées pour le ME :	80
2. Contrôle qualité des médicaments	85
2.1. Contrôle des matières premières.....	86
2.2. Contrôle qualité des produits finis	87
a) Contrôles de routine réalisés sur les solutions injectables de lévétiracétam et de placebo :.....	87
b) Contrôles de routine réalisés sur les gélules de lévétiracétam et de placebo :.....	90
3. Développement d'une méthode d'analyse par HPLC	91
3.1. Théorie sur l'HPLC	92
3.2. Démarche expérimentale pour la mise au point du dosage	95
a) Le matériel :.....	95
b) Le développement de la méthode de dosage :	96
3.3. Validation de la méthode de dosage par HPLC.....	102
a) Quelques définitions ⁽¹⁰⁵⁾ :.....	102
b) Validation de la méthode de dosage du lévétiracétam seul et de la forme pharmaceutique reconstituée :	103
c) Résultats :	106
d) Discussion et comparaison des résultats :	109
3.4. Comparaison de cette méthode avec d'autres méthodes existantes.....	111
4. Etude de stabilité	112
4.1. Etude de stabilité sur la forme injectable de lévétiracétam à 100 mg/mL.....	113
4.2. Etude de stabilité sur les formes orales.....	117
5. Rédaction du dossier de spécifications du ME.....	119
6. Conclusion.....	120
PARTIE 4 : Valorisation scientifique	122
1. Rédaction d'un article scientifique	123
2. Communication affichée au congrès Hopipharm	123
<i>Discussion</i>	124
<i>Conclusions générales</i>	126
<i>Annexes</i>	129
<i>Bibliographie</i>	185

LISTE DES ANNEXES

<i>Annexe I. Etude de faisabilité d'un essai clinique avec mise sous forme pharmaceutique</i>	130
<i>Annexe II. Procédé de fabrication de la solution injectable de lévétiracétam dosée à 100 mg/mL.....</i>	133
<i>Annexe III. Procédé de fabrication des gélules de lévétiracétam 500 mg.....</i>	137
<i>Annexe IV. Protocole de validation du dosage du lévétiracétam par HPLC</i>	141
<i>Annexe V. Protocole de validation du dosage du lévétiracétam en présence de lactose par HPLC.....</i>	147
<i>Annexe VI. Rapport de validation du dosage du lévétiracétam par HPLC</i>	153
<i>Annexe VII. Rapport de validation du dosage du lévétiracétam en présence de lactose par HPLC.....</i>	157
<i>Annexe VIII. Comparaison des différentes méthodes de dosage du lévétiracétam par HPLC.....</i>	161
<i>Annexe IX. Protocole de stabilité de la solution injectable de lévétiracétam à 100 mg/mL</i>	162
<i>Annexe X. Protocole de stabilité des gélules de lévétiracétam à 500 mg et de son placebo</i>	166
<i>Annexe XI. Article scientifique.....</i>	170
<i>Annexe XII. Poster</i>	184

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Interaction des principaux acteurs des essais cliniques.....	40
Figure 2. Le cerveau humain	48
Figure 3. Structure de la molécule de lévétiracétam ⁽⁵⁰⁾	51
Figure 4. Flacons de solution injectable de lévétiracétam à 100 mg/mL	75
Figure 5. Etiquette des flacons de solution injectable de lévétiracétam/ placebo 100 mg/mL.....	76
Figure 6. Gélules de lévétiracétam dosées à 500 mg (à gauche) et à 250 mg (à droite) avec leur conditionnement en polyéthylène	83
Figure 7. Etiquette des piluliers de gélules dosées à 500 mg ou 250 mg	84
Figure 8. Lecteur de microplaque pour le dosage des endotoxines bactériennes	88
Figure 9. Schéma de principe de l'HPLC.....	93
Figure 10. Séparation des pics sur un chromatogramme.....	94
Figure 11. Chaîne HPLC disponible à la PUI de l'HEH	95
Figure 12. Chromatogramme du lévétiracétam dans phase mobile méthanol/eau/acétonitrile (210 nm)	97
Figure 13. Chromatogrammes du lévétiracétam à 200 µg/mL dans le méthanol seul et dans la phase mobile méthanol/eau à une longueur d'onde de 210 nm	97
Figure 14. Chromatogrammes des essais de dégradation (t_R lévétiracétam = 2,65 ± 5 %).....	99
Figure 15. Chromatogrammes impureté A dans la phase mobile avec et sans acide	100
Figure 16. Chromatogrammes phase mobile acidifiée seule et lactose seul.....	101
Figure 17. Chromatogramme lévétiracétam seul.....	101

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Structure des quatre impuretés du lévétiracétam ⁽⁵²⁾	51
Tableau 2. Codification du lévétiracétam selon le système ATC ⁽⁵⁴⁾	53
Tableau 3. Excipients de la formule commercialisée du Kepra [®] solution injectable ⁽⁶⁰⁾	73
Tableau 4. Excipients de la formule commercialisée du Kepra [®] comprimés ^{(67),(45),(68)}	78
Tableau 5. Taille des gélules vides selon leur volume de remplissage ⁽⁸⁷⁾	82
Tableau 6. Normes applicables pour l'uniformité de masse ⁽⁹⁴⁾	91
Tableau 7. Comparaison des caractéristiques de l'HPLC en phase normale et en phase inverse	92
Tableau 8. Conditions chromatographiques optimisées	102
Tableau 9. Gamme d'étalonnage pour l'étude de la linéarité	104
Tableau 10. Critères d'acceptation et résultats des différents paramètres pour la validation de la méthode	106
Tableau 11. Valeurs des limites de détection et de quantification	109
Tableau 12. Etude statistique de la linéarité.....	110
Tableau 13. Fréquence des contrôles pour la solution injectable de lévétiracétam à 100 mg/mL	113
Tableau 14. Résultats de stabilité pour la forme injectable dosée à 100 mg/mL	115
Tableau 15. Fréquence des contrôles pour les gélules de lévétiracétam à 500 mg et les gélules de placebo.....	117
Tableau 16. Résultats de stabilité pour la forme orale de lévétiracétam dosée à 500 mg	118
Tableau 17. Résultats de stabilité pour la forme orale de placebo 500 mg	118

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ❖ AEC : Autorisation d'Essai Clinique
- ❖ AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
- ❖ ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
- ❖ ATC : Anatomique, Thérapeutique et Chimique
- ❖ AVC : Accidents Vasculaires Cérébraux
- ❖ BPC : Bonnes Pratiques Cliniques
- ❖ BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication
- ❖ BPP : Bonnes Pratiques de Préparation
- ❖ BPPH : Bonnes Pratiques de Pharmacie Hospitalière
- ❖ CCPPRB : Comités Consultatifs de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale
- ❖ CEP : Certificate of suitability to the monograph of the European Pharmacopoeia
- ❖ CNRIPH : Commission Nationale des Recherches Impliquant la Personne Humaine
- ❖ CPP : Comités de Protection des Personnes
- ❖ CSP : Code de la Santé Publique
- ❖ DLU : Date Limite d'Utilisation
- ❖ EEN : Excipient à Effet Notoire
- ❖ EMA : European Medicines Agency (Agence européenne du médicament)
- ❖ HCL : Hospices Civils de Lyon
- ❖ HEH : Hôpital Edouard Herriot
- ❖ HPLC : Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance
- ❖ HR : Humidité Relative
- ❖ ICH : International Conference on Harmonisation
- ❖ IV : Intraveineuse
- ❖ ME : médicament expérimental
- ❖ MP : Matière Première
- ❖ MPUP : Matières Premières à Usage Pharmaceutique
- ❖ PE : Pharmacopée Européenne
- ❖ PPI : Pour Préparation Injectable
- ❖ PUI : Pharmacie à Usage Intérieur
- ❖ qsp : quantité suffisante pour
- ❖ RCP : Résumé des Caractéristiques du Produit
- ❖ RP : Reverse Phase
- ❖ t_R : temps de Rétention
- ❖ UF : Unités Fonctionnelles
- ❖ UV : Ultraviolet
- ❖ ZAC : Zones d'Atmosphère Contrôlée

INTRODUCTION

Les recherches cliniques impliquent de nombreux acteurs à tous les niveaux de l'étape du projet et jusqu'à son application. Dans ce contexte, les centres hospitalo-universitaires peuvent intervenir en tant que promoteurs ou investigateurs. Selon le Code de Santé Publique, les pharmaciens hospitaliers sont tenus d'assurer la gestion, la préparation, l'approvisionnement, le contrôle, la détention et la dispensation des médicaments expérimentaux destinés à l'essai clinique.

Les Hospices Civils de Lyon sont parmi les acteurs majeurs de la recherche clinique en France. Ainsi, pour son expertise dans le domaine des essais cliniques, la Pharmacie à Usage Intérieur (PUI) du groupement de l'Hôpital Edouard Herriot a été sollicitée pour participer à une nouvelle recherche clinique institutionnelle. Cette étude de phase III, multicentrique, randomisée et en double-aveugle, a pour objectif d'évaluer l'efficacité d'un traitement antiépileptique prophylactique systématique par lévétiracétam versus *placebo* à la phase aigüe des hémorragies intracérébrales spontanées sustentorielles. La PUI a pour rôle de mettre au point les deux formes pharmaceutiques utilisées pour cette recherche, ainsi que leur *placebo*, et assurer la gestion et la dispensation des traitements, tout en respectant le double-aveugle. La PUI est donc responsable de la mise sous forme pharmaceutique mais également du contrôle qualité des médicaments expérimentaux, qui doivent satisfaire aux exigences de qualité, d'efficacité et de sécurité au regard des recommandations en vigueur.

Dans cette thèse, une première partie sera consacrée à la description de l'histoire et de l'environnement réglementaire des essais cliniques. Il conviendra également d'avoir une idée de l'organisation et des acteurs intervenant lors d'une recherche biomédicale. Dans une deuxième partie, il s'agira d'étudier la faisabilité clinique et pharmaceutique de ce protocole de recherche au sein de l'Hôpital Edouard Herriot. Les différentes étapes de mise sous forme pharmaceutique des médicaments expérimentaux avec leur contrôle qualité seront abordées dans une troisième partie.

DÉFINITIONS

I. Code de la Santé Publique

Le Code de la Santé Publique (CSP) regroupe l'ensemble des textes législatifs régissant les questions de la santé publique en France⁽¹⁾.

Il est subdivisé en six parties abordant les thèmes suivants :

- La protection générale de la santé
- La santé de la famille, de la mère et de l'enfant
- La lutte contre les maladies et dépendances
- Les professions de santé
- Les produits de santé
- Les établissements et services de santé

La première partie traite en particulier des droits des personnes malades et des usagers du système de santé, ainsi que des recherches biomédicales. Elle est donc particulièrement importante dans le cadre d'un essai clinique.

II. Essai clinique portant sur un médicament

D'après l'article R1121-1 du CSP, les recherches biomédicales portant sur un médicament sont définies comme « tout essai clinique d'un ou plusieurs médicaments visant à déterminer ou à confirmer leurs effets cliniques, pharmacologiques et les autres effets pharmacodynamiques ou à mettre en évidence tout effet indésirable, ou à en étudier l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination, dans le but de s'assurer de leur innocuité ou de leur efficacité »⁽²⁾.

III. Médicament

L'article L5111-1 du CSP, modifié par la loi n°2007-248 du 26 février 2007 - article 3 du Journal officiel de la République française du 27 février 2007, définit un médicament comme « toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique »⁽³⁾.

IV. Médicament expérimental

Un médicament expérimental (ME) est défini, selon l'article L5121-1-1 du CSP, de la manière suivante : « tout principe actif sous une forme pharmaceutique ou *placebo* expérimenté ou utilisé comme référence dans une recherche biomédicale, y compris les médicaments bénéficiant déjà d'une autorisation de mise sur le marché, mais utilisés ou présentés ou conditionnés différemment de la spécialité autorisée, ou utilisés pour une indication non autorisée ou en vue d'obtenir de plus amples informations sur la forme de la spécialité autorisée »⁽⁴⁾.

V. Placebo

La notion de *placebo* n'est pas fixée juridiquement mais a fait l'objet de multiples définitions au cours du temps. Le Dr. DuBois⁽⁵⁾ a distingué, en 1946, trois types de *placebo*. Le premier est le *placebo* dit « pur » ou « inerte » évoquant un objet ou une procédure thérapeutique n'ayant pas en soi-même une action pharmacodynamique. À l'inverse, le second type est le *placebo* qualifié d'« impur », correspondant à une substance ayant une activité pharmacodynamique mais qui n'est pas efficace dans la pathologie où elle est utilisée. Enfin, le troisième groupe fait référence à l'effet plaisant, autrement appelé « effet *placebo* », qui accompagne chaque prescription.

VI. Protocole de recherche biomédicale

Selon l'article 2 de la directive 2001/20/CE du 4 avril 2001 publiée au Journal officiel des Communautés européennes⁽⁶⁾, un protocole est un « document décrivant le ou les objectifs, la conception, la méthode, les aspects statistiques et l'organisation d'un essai. Le terme protocole recouvre le protocole, ses versions successives et ses modifications ».

***PARTIE 1 : ESSAIS CLINIQUES, GÉNÉRALITÉS ET
ENVIRONNEMENT RÉGLEMENTAIRE***

1. Généralités sur les essais cliniques et l'expérimentation sur l'Homme

Les essais cliniques existent depuis de très nombreuses années et n'ont cessé d'évoluer en termes de pratiques et de réglementations.

1.1. Historique⁽⁷⁾

❖ Les expérimentations :

Les premières expérimentations sur l'Homme datent de l'Antiquité, plus précisément de 5000 ans avant Jésus Christ, avec la découverte d'un crâne présentant une cicatrice. Cette trace caractéristique atteste d'une trépanation, toujours utilisée de nos jours pour retirer un hématome ou une tumeur.

Ensuite, à l'époque gréco-romaine, Hippocrate instaure le concept de non-universalité des traitements, en écrivant : « Toute expérience est incertaine : les traitements qui ont réussi précédemment peuvent bien être inefficaces dans ce cas-ci »⁽⁸⁾.

La Renaissance marque quant à elle les débuts de l'observation du corps humain à l'état mort. Ces changements seront poursuivis par Claude Bernard, médecin et physiologiste français du 19^{ème} siècle, qui développa le raisonnement expérimental visant à observer des faits puis énoncer des hypothèses pour ensuite les confirmer ou les infirmer. Il mit à profit cette démarche dans des domaines aussi variés que la neurologie, la digestion ou encore la régulation endocrinienne et a permis ainsi de faire progresser la physiologie et la médecine⁽⁹⁾.

Le 19^{ème} siècle fut également marqué par Ignace-Philippe Semmelweis, médecin hongrois, initiateur des mesures d'antisepsie et de prévention des infections nosocomiales. Par sa découverte, il montra que le lavage des mains était indispensable pour diminuer les fièvres puerpérales survenant après des accouchements.

Archie Cochrane, médecin britannique du 20^{ème} siècle, expérimenta la supplémentation alimentaire en utilisant la méthodologie actuelle des essais cliniques, à savoir la création de deux groupes. Il donna des « levures » à l'un des deux groupes et constata ses effets sur le bérubéri, grande maladie des soldats de l'époque⁽¹⁰⁾.

❖ **La réglementation**⁽¹¹⁾ :

Un des moments phares est le procès de Nuremberg en 1946-1947, qui a permis d'élaborer des normes dans l'expérimentation sur l'Homme. Il n'a cependant pas été le point de départ de la réflexion sur les questions bioéthiques. Elle avait commencée bien avant, avec notamment Claude Bernard, qui évoquait dans son livre *l'Introduction à l'étude de la médecine expérimentale* (1865) que « l'expérimentation n'est moralement acceptable (et juridiquement licite), dans cette conception, que si elle profite au malade, si elle est lisible comme un acte thérapeutique ». Le « Code de Nuremberg », à valeur internationale, a néanmoins permis de définir les expériences médicales acceptables et la limite entre sujet et victime. Ce Code restera pendant longtemps gravé dans le droit international, mais également national, car les réglementations qui seront établies par la suite dériveront de ce modèle.

Ce n'est qu'à partir de 1964 que des normes n'ont cessé de se succéder pour améliorer la réglementation des expérimentations. Cette date est marquée par la déclaration d'Helsinki faisant suite au scandale de la thalidomide, un médicament n'ayant pas été suffisamment testé et responsable d'une atrophie des membres inférieurs. Cette déclaration, établie par l'Association Médicale du Médicament, donne les recommandations aux médecins et aux patients dans la recherche biomédicale touchant aux sujets humains. Malgré les multiples révisions, son objectif principal a toujours été de protéger les personnes impliquées, pour ne plus avoir à subir les expérimentations ayant eu lieu pendant la Seconde Guerre mondiale.

En 1979 est édité le « rapport Belmont » qui pose les trois principes éthiques de base ; à savoir : le **respect des personnes** qui passe par le recueil de leur consentement éclairé, la **bienfaisance** par l'évaluation du rapport bénéfices/risques de la recherche, et la **justice** par la sélection équitable des sujets.

Dès 1965, pour obtenir l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) d'un médicament, il est nécessaire de fournir les résultats des tests effectués sur l'être humain⁽⁶⁾. Or, à cette date, les tests sur êtres humains ne sont pas légalement autorisés. Il faudra attendre 1988 pour voir apparaître, en France, la première loi autorisant textuellement les essais biomédicaux sur l'être humain, en particulier les essais sur volontaires sains. Cette loi, portée par les deux sénateurs Huriet et Sérusclat, ainsi nommée « Loi Huriet-Sérusclat », a permis en particulier de⁽¹²⁾ :

- ✓ proclamer la primauté de la protection des personnes ;
- ✓ affirmer l'obligation d'un consentement libre, exprès et éclairé ;
- ✓ définir le statut des deux acteurs principaux : promoteur et investigateur ;
- ✓ établir une distinction entre les recherches avec ou sans bénéfice individuel direct ;
- ✓ créer les Comités Consultatifs de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPPRB).

Les CCPPRB avaient pour mission d'autoriser ou non le projet de recherche, en évaluant⁽¹²⁾ :

- ✓ la pertinence de la recherche ;
- ✓ la qualité méthodologique ;
- ✓ les bénéfices attendus et les risques encourus ;
- ✓ la qualité de l'information du participant ;
- ✓ la qualité du formulaire de consentement.

Puis en 2001, une directive européenne est mise en place. Cette directive 2001/20/CE vise à protéger davantage les patients participant à une recherche comportant des soins médicaux. La France transposera cette directive en droit interne en 2004 et supprimera alors la distinction entre recherche à but thérapeutique et non thérapeutique. Suite à cette loi, le CCPPRB sera remplacé par le Comité de Protection des Personnes (CPP) dont la responsabilité et les compétences seront élargies par rapport à son prédécesseur.

1.2. Réglementation des essais cliniques

Les textes réglementant les essais cliniques se fondent sur la loi Huriet-Sérusclat de 1988, à laquelle différentes améliorations ont été apportées. Les versions en vigueur à l'heure actuelle sont la directive 2001/20/CE du 4 avril 2001 du Parlement Européen et du Conseil de l'Union Européenne, ainsi que la décision du 24 novembre 2006 du Ministère de la santé et des solidarités. À celles-ci s'ajoutent deux guides établis par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), traitant des Bonnes Pratiques de Préparation et de Fabrication des médicaments, faisant suite respectivement aux décisions du 5 novembre 2007 et du 4 décembre 2013.

a) La Directive 2001/20/CE du 4 avril 2001⁽⁶⁾ :

La directive 2001/20/CE a été établie par le Parlement Européen et le Conseil de l'Union Européenne, dans le but de rapprocher les dispositions législatives, réglementaires et administratives des Etats membres. Elle traite des Bonnes Pratiques dans la conduite d'essais cliniques de médicaments à usage humain, mais ne s'applique pas aux essais cliniques non interventionnels.

Cette directive protège les personnes participant à un essai clinique. En d'autres termes, les risques encourus doivent être mesurés, le respect de la vie privée mais également de l'intégrité physique et mentale de la personne sont garantis. Le participant doit pouvoir obtenir, à tout moment, des informations complémentaires sur l'essai clinique. De plus, les soins médicaux doivent être apportés par un médecin qualifié.

Elle précise également le rôle du comité d'éthique. Il doit émettre un avis sur l'essai clinique en prenant en compte « la pertinence de l'essai et de sa conception ; le protocole ; l'aptitude de l'investigateur et de ses collaborateurs ; la qualité des installations ».

La directive décrit la conduite d'un essai clinique, ainsi que les conditions et les délais à respecter pour pouvoir le débiter.

Un autre thème abordé est la fabrication et l'importation des médicaments expérimentaux, qui doivent être soumises à une autorisation répondant aux exigences édictées dans la directive 2001/20/CE.

La conformité des médicaments expérimentaux aux Bonnes Pratiques Cliniques et aux Bonnes Pratiques de Fabrication, doit également être vérifiée par des inspecteurs communautaires.

Enfin, un autre grand sujet abordé est la notification des événements indésirables graves au promoteur qui, à son tour, est chargé de diffuser l'information aux Etats membres concernés. En cas d'événement indésirable grave inattendu, l'Etat membre doit s'assurer que l'Agence Européenne du Médicament (EMA) en a été informée.

Cette directive a donc pour objectif d'assurer la qualité des essais cliniques tout en respectant les droits de l'Homme et la dignité humaine. Toutefois, ni la responsabilité du promoteur ni celle de l'investigateur, au titre civil ou pénal, ne sont préjugées.

b) Les Bonnes Pratiques Cliniques (BPC)⁽¹³⁾ :

Les Bonnes Pratiques Cliniques concernent les recherches biomédicales portant sur des médicaments à usage humain. Elles ont été transcrites en droit français par la décision du 24 novembre 2006 et ont été élaborées en se basant sur la directive européenne 2005/28/CE de la Commission du 8 avril 2005 et sur les ICH E6. Ces ICH E6 correspondent aux lignes directrices pour les BPC au niveau de l'Union européenne, du Japon et des Etats-Unis⁽¹⁴⁾. À l'issue de la transposition en droit français de ces deux textes, ces Bonnes Pratiques ont été publiées au Journal officiel de la République française. Elles sont reconnues à l'international et forment un ensemble d'exigences de la qualité dans les domaines éthique et scientifique, qui doivent être respectées.

Ce texte dicte le principe d'un essai clinique, mais aussi le rôle et les obligations du CPP, de l'investigateur et du promoteur. Cette décision précise entre autres que, pour toute recherche biomédicale, le promoteur doit obtenir l'avis favorable du CPP avant de pouvoir la lancer. Les documents requis, que ce soit avant, pendant ou après l'essai clinique, sont également détaillés dans ces Bonnes Pratiques.

La finalité de ces recommandations est de rendre le plus fiable et le plus reproductible possible les données issues des essais cliniques, mais également d'assurer la protection des personnes y participant. Cela passe par une conservation de leurs droits et par une confidentialité des informations les concernant.

c) Les Bonnes Pratiques de Préparation (BPP)⁽¹⁵⁾ :

Les Bonnes Pratiques de Préparation, établies par la décision du 5 novembre 2007, sont publiées au Journal officiel de la République française et, par conséquent, constituent un référentiel opposable. Elles s'appliquent aux préparations pharmaceutiques réalisées en pharmacies de ville ou à l'hôpital. Ces préparations sont réalisées dans le cas où la spécialité pharmaceutique est indisponible ou inadaptée. Elles peuvent alors être destinées à un ou plusieurs malades.

Ce texte s'adresse donc aux pharmacies de ville et aux pharmacies à usage intérieur pour garantir la qualité de leurs préparations pharmaceutiques. Il est divisé en trois parties :

- ✓ la première partie traite des généralités sur les préparations ; les contrôles ; la gestion de la qualité et la documentation ; la gestion des anomalies, retours, réclamations et rappels de lots ; les conditions de sous-traitance des préparations, des contrôles et du transport ;
- ✓ la deuxième partie aborde les lignes directrices particulières à la préparation de médicaments stériles et de médicaments contenant des substances dangereuses pour le personnel et l'environnement ;
- ✓ la troisième partie concerne spécifiquement les préparations rendues nécessaires par les recherches biomédicales ainsi que les préparations de médicaments radiopharmaceutiques.

Conformément aux BPP, seules les Matières Premières à Usage Pharmaceutique (MPUP) répondant aux spécifications de la Pharmacopée peuvent être utilisées dans une préparation pharmaceutique. Les MPUP sont relatives aux substances actives, aux excipients y compris l'eau, et aux éléments de mise en forme destinés à être administrés chez l'Homme, comme les gélules par exemple. Les MPUP correspondent donc à tous les composants présents dans une préparation réalisée à l'hôpital.

Ces matières premières doivent être fabriquées par des établissements pharmaceutiques autorisés et déclarés à l'ANSM. Si une matière première est nommée dans la Pharmacopée, il faut que celle-ci réponde aux exigences décrites dans la Pharmacopée. Les CEP (*Certificate of suitability to the monograph of the European Pharmacopoeia*) détenus par le fournisseur sont utiles dans ce cas. En effet, ils démontrent l'efficacité des méthodes d'analyse de la monographie à contrôler la matière première dudit certificat. De plus, seuls les excipients décrits à la Pharmacopée peuvent être utilisés pour réaliser une préparation.

Pour les préparations stériles, les matières premières doivent, d'une part, être soit des MPUP soit des spécialités pharmaceutiques stériles. Elles doivent, d'autre part, être conformes aux spécifications de la Pharmacopée, relatives à la contamination microbiologique et aux endotoxines bactériennes.

d) Les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF)⁽¹⁶⁾ :

La décision du 4 décembre 2013, publiée au Journal officiel de la République française, constitue un ensemble de recommandations opposables relatives aux Bonnes Pratiques de Fabrication. Elles servent notamment de support aux autorités compétentes, lors de l'inspection des établissements pharmaceutiques.

Les BPF sont constituées de trois parties :

- ✓ la première partie, traitant des BPF des médicaments à usage humain, comporte une ligne directrice qui se concentre sur la fabrication des médicaments expérimentaux ;
- ✓ la deuxième partie, énonçant les BPF pour les substances actives utilisées comme matières premières dans les médicaments, contient une sous-partie spécifique aux substances actives utilisées en essai clinique ;
- ✓ la troisième partie traite des documents relatifs aux BPF.

Les BPF comportent une ligne directrice (LD.13) spécifique à la fabrication des médicaments expérimentaux à usage humain, dont l'objectif est de sécuriser chacune des étapes du circuit du ME.

Le respect de ces BPF est indispensable car elles garantissent à la fois la qualité, l'efficacité et la sécurité des médicaments, aussi bien par leur fabrication que par leur contrôle.

e) La loi Jardé du 5 mars 2012⁽¹⁷⁾ :

La loi du 5 mars 2012 dite « loi Jardé », publiée au Journal officiel du 6 mars 2012, est relative aux recherches impliquant la personne humaine. Après la loi Huriet de 1988, qui avait été la première loi à encadrer la recherche sur le médicament, il restait encore des « vides juridiques »⁽¹⁸⁾. Cette loi a permis de réformer la précédente et d'uniformiser les règles. En effet, les essais non interventionnels, qui jusqu'alors étaient mis à l'écart, ont été intégrés. Ainsi, tous les projets de recherche doivent passer par le CPP et la désignation d'un promoteur.

Diverses autres modifications peuvent être notées dans cette loi, comparativement au texte précédent⁽¹⁹⁾ :

- ✓ le terme de « Recherches biomédicales » est remplacé par « Recherches impliquant la personne humaine » ; et les mots « accord des personnes concernées » par « absence d'opposition des personnes concernées dûment informées » ;
- ✓ la définition de trois catégories de recherche impliquant la personne humaine ;
- ✓ la qualification du promoteur en tant que « responsable » de la recherche ;
- ✓ les personnes non affiliées au régime de la sécurité sociale peuvent participer à une étude si les fins sont justifiées ;
- ✓ la première administration d'un médicament à l'homme dans le cadre d'une recherche ne peut être effectuée que dans des lieux ayant obtenu l'autorisation ;
- ✓ les résultats des recherches impliquant la personne humaine sont rendus publics ;
- ✓ la définition de « recherches à finalité non commerciale » est précisée ;
- ✓ la création d'une Commission Nationale des Recherches Impliquant la Personne Humaine (CNRIPH), chargée de la coordination, de l'harmonisation et de l'évaluation des pratiques des CPP ;
- ✓ les conditions de validité de la recherche vis-à-vis du CPP sont étayées ;
- ✓ l'ANSM a accès à toute information utile relative aux recherches, sur demande auprès du CPP ;
- ✓ dans le cas « d'une urgence vitale immédiate », il sera désormais possible de démarrer la recherche sans l'autorisation préalable de la personne de confiance, de la famille ou des proches, même s'ils sont présents ;
- ✓ après consentement, « l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins de recherche scientifique peut être réalisé à partir d'éléments du corps ».

Par ailleurs, la loi Jardé simplifie la mise en œuvre des recherches biomédicales. La recherche sur l'Homme ayant eu tendance à décroître ces dernières années, cette loi a donc été créée dans le but de l'encourager, tout en augmentant la protection des participants et

en les impliquant davantage. Effectivement, tel que l'énonce l'article L1122-1 du Code de la santé publique modifié suite à cette loi⁽²⁰⁾, « préalablement à la réalisation d'une recherche impliquant la personne humaine, une information est délivrée à la personne qui y participe par l'investigateur ou par un médecin qui le représente ».

L'impact de cette loi reste pour le moment relatif, tant que les décrets d'application n'ont pas été publiés au Journal officiel. Cependant, ils risquent de ne jamais sortir, car un nouveau règlement européen relatif aux essais cliniques est paru à posteriori.

f) Le nouveau règlement européen relatif aux essais cliniques⁽²¹⁾ :

Le nouveau règlement européen relatif aux essais cliniques a été publié au Journal officiel de l'Union européenne le 27 mai 2014. Il a été adopté par le Parlement européen le 2 avril 2014 et par la Commission européenne le 14 avril 2014⁽²²⁾. La proposition de règlement va désormais être discutée au Conseil. Il faut préciser que ce texte pose des problèmes de transposition en France, car il modifie profondément la loi Jardé.

Son entrée en vigueur est prévue six mois après la publication, par la Commission européenne, d'un document relatif au bon fonctionnement de la base de données sur les essais de l'Union européenne. Ce règlement sera donc applicable en 2016. Une fois adopté, ce texte abrogera la directive 2001/20/CE dans un délai de deux ans à compter de sa publication, et sera directement applicable dans tous les Etats membres, comme tout règlement européen. Pour les essais qui seront déposés avant la date de mise en application de ce règlement, des mesures transitoires seront détaillées.

L'objectif majeur de cette nouvelle réglementation est de rendre plus attractive la recherche biomédicale en Europe, donc d'en augmenter le nombre⁽²³⁾. Ainsi, plus de patients pourraient bénéficier de traitements innovants.

Cette évolution passera par une simplification du processus d'approbation ; une prise de décision unique par Etat membre européen et non plus une double approbation des comités d'éthique et des autorités ; une évaluation commune des essais multinationaux pour les aspects scientifiques mais pas pour les aspects éthiques ; un raccourcissement des délais à

une durée de 60 jours avant une approbation tacite ; une harmonisation des règles pour le consentement éclairé⁽²⁴⁾.

Grâce à ce texte, un encadrement des recherches en situation d'urgence sera désormais mis en place. Pour pouvoir être effectuées, il faudra prouver le bénéfice direct que ces recherches pourront apporter au participant. Ce texte tiendra compte des risques encourus selon le type d'essai clinique. Il exclura les "études non interventionnelles" de son champ d'application, mais créera une nouvelle catégorie appelée "essais cliniques à faible intervention"⁽²⁵⁾. Par ailleurs, ce règlement introduira plus de transparence sur les données et les résultats des essais cliniques, puisque ceux-ci devront être rendus publics au plus tard un an après la fin de l'essai. La confidentialité des données sera elle aussi plus claire.

En conclusion sur l'environnement réglementaire, nous pouvons spécifier que les essais cliniques portant sur les médicaments seront régis par le nouveau règlement européen. Tandis que tous les autres essais seront encadrés par la loi Jardé.

2. Les différents types de recherche clinique en France

Suite aux nombreuses réglementations précédemment citées, trois catégories de recherche clinique se retrouvent en France. Ces recherches peuvent être mises en insu ou non, selon les objectifs de l'étude.

2.1. Les différentes catégories de recherche clinique en France

La loi Jardé du 5 mars 2012 relative aux recherches impliquant la personne humaine, définit trois catégories de recherches cliniques⁽¹⁷⁾ :

- ✓ Catégorie 1 : Les **recherches interventionnelles** qui comportent une intervention sur la personne non justifiée par sa prise en charge habituelle.
Les **risques et contraintes** sont considérés **supérieurs aux risques et contraintes minimales**. Dans ce cas, le recueil du consentement libre et éclairé doit se faire par écrit⁽²⁶⁾.
- ✓ Catégorie 2 : Les **recherches interventionnelles** qui ne portent pas sur des médicaments et ne comportent que des **risques et des contraintes minimales**, dont

la liste est fixée par arrêté du ministre chargé de la santé, après avis du directeur général de l'ANSM.

Pour cette catégorie, le recueil du consentement libre et éclairé doit se faire de façon expresse, autrement dit à l'oral ou à l'écrit⁽²⁶⁾.

- ✓ **Catégorie 3** : Les **recherches non interventionnelles** dans lesquelles tous les actes sont pratiqués et les produits utilisés de manière habituelle, conformément aux conditions fixées dans l'AMM⁽²⁷⁾, sans procédure supplémentaire ou inhabituelle de diagnostic, de traitement ou de surveillance. La randomisation est dans ce cas impossible. L'affectation du patient à une stratégie thérapeutique donnée n'est pas fixée à l'avance par un protocole d'essai, elle relève de la pratique courante et la décision de prescrire le médicament est clairement dissociée de celle d'inclure le patient dans l'étude.

Le droit d'opposition de la personne qui participe à l'étude est clairement énoncé pour cette catégorie⁽²⁶⁾.

Par ailleurs, dans les trois types de recherche, une information individuelle de la personne est obligatoire.

2.2. La mise en insu

Selon les BPC⁽¹³⁾, la mise en insu se définit de la façon suivante : « Procédure dans laquelle une ou plusieurs parties intervenant dans la recherche ne sont pas informées de l'identité des traitements attribués aux personnes qui se prêtent à la recherche ».

Deux types de mise en insu sont possibles :

- ✓ Le premier est la mise en insu dite « **simple insu** » ou « **simple aveugle** » dans laquelle « la personne qui se prête à la recherche n'est généralement pas informée de l'identité du traitement qui lui est attribué ».
- ✓ Le second est la mise en insu qualifiée de « **double insu** » ou encore « **double aveugle** », pour laquelle « ni la personne qui se prête à la recherche, ni l'investigateur, ni le moniteur, ni même parfois la personne qui analyse les données ne sont informés de l'identité des traitements attribués ».

« Pour un médicament expérimental, la mise en insu consiste à cacher délibérément l'identité du produit conformément aux instructions du promoteur »⁽¹³⁾. Si aucune mise en insu n'est réalisée, l'essai est alors « conduit en ouvert ».

3. Les principaux acteurs des essais cliniques en France

Hormis les BPP et les BPF qui concernent plus les médicaments, tous les textes réglementaires précisent la définition des deux personnes les plus importantes dans un essai clinique, à savoir le promoteur et l'investigateur. Les autorités compétentes ont clairement été redéfinies dans la loi du 5 mars 2012 qui a même donné naissance à la CNRIPH.

3.1. Les autorités compétentes

a) L'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) :

En France, l'ANSM a été créée par la loi du 29 décembre 2011 relative au renforcement de la sécurité sanitaire des médicaments et des produits de santé. Elle s'est substituée à l'Agence française de sécurité sanitaire du médicament et des produits de santé (Afssaps) le 1^{er} mai 2012. Elle a alors repris ses missions, droits et obligations et a été dotée de responsabilités et de missions nouvelles, mais aussi de pouvoirs et de moyens renforcés. Sa compétence s'applique à tous les médicaments y compris les médicaments expérimentaux, aux produits biologiques, aux dispositifs médicaux, aux produits cosmétiques et de tatouage, et à d'autres produits de santé tels que les biocides ou les produits diététiques destinés à des fins médicales spéciales. Elle a été créée afin de garantir la sécurité des produits de santé tout au long de leur cycle de vie⁽²⁸⁾.

De plus, l'ANSM est la seule autorité compétente pour l'autorisation des recherches sur l'être humain⁽²⁹⁾. Elle assure la gestion et l'évaluation des recherches biomédicales, que celles-ci portent sur les produits de santé ou non. Elle contrôle la sécurité et la qualité des produits utilisés au cours de la recherche.

L'ANSM est en charge⁽¹⁷⁾ de :

- ✓ vérifier que les conditions d'utilisation des produits dans les recherches, sont conformes à leur destination et à leurs conditions d'utilisation courantes ;
- ✓ vérifier le respect des BPC ;
- ✓ transmettre les informations recueillies sur la recherche à l'organisme gérant la base de données européenne.

Les dossiers de demande d'autorisation d'essai clinique (AEC) et d'autorisation des modifications substantielles (AMS) sont évalués de façon à garantir la sécurité des personnes participant à la recherche biomédicale⁽²⁹⁾. Une évaluation des effets indésirables graves et inattendus, des faits nouveaux, qu'ils soient cliniques ou non, est également mise en œuvre. À côté de cela, des rapports annuels de sécurité sont rédigés pour avoir plus de lisibilité.

L'ANSM prend en compte sa propre expertise pour l'évaluation de ces dossiers, mais également celle d'experts externes réunis en tant que groupes d'externes compétents en matière de recherche impliquant la personne humaine.

b) Le Comité de Protection des Personnes (CPP) :

Le CPP est un comité d'éthique qui a été créé par la loi du 9 août 2004 relative à la politique de santé publique⁽³⁰⁾. Si l'on considère la France et les territoires d'outre-mer, quarante CPP sont agréés à l'heure actuelle⁽³¹⁾. Tant que les décrets d'application de la loi Jardé ne sont pas publiés, chaque CPP peut étendre sa compétence au niveau de l'inter-région de recherche clinique dans laquelle il siège. Après application de la loi Jardé, le CPP sera « désigné de manière aléatoire par la commission nationale »⁽¹⁷⁾.

L'activité et le fonctionnement des CPP sont réglementés par les articles R.1123-1 à 1123-19 qui abordent les points suivants⁽³²⁾ :

- ✓ les conditions d'agrément du CPP ;
- ✓ la composition et la nomination des membres du CPP ;
- ✓ l'organisation et le fonctionnement des CPP.

Les CPP ont pour rôle de s'assurer que tout projet de recherche biomédicale, mené en France sur l'être humain, respecte les mesures médicales, éthiques, sociales, psychologiques et juridiques, visant à assurer la protection des participants à la recherche⁽³⁰⁾. Ils ont donc pour mission de formuler des avis sur les projets de recherche biomédicale portant sur les médicaments et les dispositifs médicaux⁽³²⁾. Chaque projet de recherche biomédicale sur l'être humain doit être soumis à l'avis d'un CPP avant toute réalisation⁽³³⁾.

Pour rendre son avis, le CPP évalue en particulier les points suivants⁽²⁹⁾ :

- ✓ la protection des personnes, notamment la protection des participants ;
- ✓ l'adéquation, l'exhaustivité et l'intelligibilité des informations écrites à fournir, ainsi que la procédure à suivre pour obtenir le consentement éclairé, et la justification de la recherche sur des personnes incapables de donner leur consentement éclairé ;
- ✓ la nécessité éventuelle d'un délai de réflexion ;
- ✓ la nécessité éventuelle de prévoir, dans le protocole, une interdiction de participer simultanément à une autre recherche, ou une période d'exclusion ;
- ✓ la pertinence de la recherche, le caractère satisfaisant de l'évaluation des bénéfices et des risques attendus et le bien-fondé des conclusions ;
- ✓ l'adéquation entre les objectifs poursuivis et les moyens mis en œuvre ;
- ✓ la qualification du ou des investigateur(s) ;
- ✓ les montants et les modalités d'indemnisation des participants ;
- ✓ les modalités de recrutement des participants.

Les CPP sont constitués à la fois de professionnels et d'usagers, pour être plus aptes à comprendre les différents points, et comportent deux subdivisions appelées « collègues ».

Le **premier collègue** est composé de :

- quatre personnes ayant une qualification et une expérience approfondie en matière de recherche biomédicale, dont au moins deux médecins et une personne qualifiée en raison de sa compétence en matière de biostatistique ou d'épidémiologie ;
- un médecin généraliste ;
- un pharmacien hospitalier ;
- un infirmier.

Le **deuxième collège** est composé de :

- une personne qualifiée en raison de sa compétence à l'égard des questions d'éthique ;
- un psychologue ;
- un travailleur social ;
- deux personnes qualifiées en raison de leur compétence en matière juridique ;
- deux représentants des associations agréées de malades et d'usagers du système de santé.

c) La Commission Nationale des Recherches Impliquant la Personne Humaine (CNRIPH)⁽¹⁷⁾ :

La CNRIPH a été créée par la loi du 5 mars 2012 relative aux recherches impliquant la personne humaine. Elle sera effective lorsque le décret d'application aura été publié au Journal officiel. Cette commission sera instaurée « auprès du ministre chargé de la santé »⁽¹⁷⁾ et sera « chargée de la coordination, de l'harmonisation et de l'évaluation des pratiques des comités de protection des personnes »⁽¹⁷⁾. Elle agira donc en concertation avec les CPP et devra désigner les comités chargés d'examiner les projets de recherches et les demandes de modification substantielle.

Elle devra remettre « chaque année au ministre chargé de la santé des recommandations concernant les conséquences, en matière d'organisation des soins, des recherches dont les résultats présentent un intérêt majeur pour la santé publique »⁽¹⁷⁾.

Elle sera également « consultée sur les projets de loi ou de décret concernant les recherches impliquant la personne humaine »⁽¹⁷⁾.

La CNRIPH est composée de vingt et un membres nommés par arrêté du ministre chargé de la santé. Parmi eux se trouvent :

- sept personnes désignées parmi les membres des CPP, appartenant aux collèges de ces comités composés de professionnels de santé et de personnes ayant une qualification et une expérience approfondie en matière de recherche biomédicale ;
- sept personnes désignées parmi les membres des CPP, appartenant aux collèges de ces comités composés de personnes qualifiées en raison de leurs compétences à l'égard des questions éthiques, sociales, psychologiques et juridiques, ainsi que de

représentants des associations agréées de malades ou d'usagers du système de santé ;

- sept personnes qualifiées dont l'une d'elles sera élue président de la Commission nationale par les autres membres.

L'ANSM et les CPP ont donc un rôle décisionnel dans la mise en place de recherche impliquant la personne humaine. L'ANSM, avec le CNRIPH, sera également consultée plus en amont des essais cliniques, à savoir sur les projets de loi ou de décrets concernant les recherches impliquant la personne humaine.

3.2. Le promoteur

L'article L1121-1 du CSP définit le promoteur comme « la personne physique ou la personne morale qui est responsable d'une recherche impliquant la personne humaine, en assure la gestion et vérifie que son financement est prévu ». Cette personne, ou son représentant légal, doit faire partie de l'Union européenne.

Si le promoteur n'est pas établi au sein de l'Union européenne, il a l'obligation de désigner un représentant légal établi dans l'Union européenne ou dans l'Espace économique européen pour réaliser une recherche biomédicale⁽³⁴⁾.

Il peut être⁽²⁹⁾ un laboratoire pharmaceutique (français ou étranger), un prestataire de services, une association, un établissement de soins, une personne physique (par exemple un médecin).

Dans le cas où plusieurs personnes prennent l'initiative d'une même recherche biomédicale, elles doivent désigner une personne physique ou morale qui aura la qualité de promoteur et assumera les obligations correspondantes.

Le promoteur est chargé⁽¹⁷⁾ :

- ✓ de mandater les personnes en charge du contrôle qualité de la recherche ;
- ✓ de soumettre le projet ou toute modification substantielle à l'avis d'un CPP ;
- ✓ d'adresser une copie de l'avis émis par le CPP et un résumé de la recherche à l'autorité compétente ;

- ✓ de rendre publics les résultats de sa recherche ;
- ✓ de notifier les effets indésirables à l'autorité compétente ;
- ✓ de prendre les mesures de sécurité appropriées au cours de la recherche ;
- ✓ d'informer le CPP et l'autorité compétente du début et de la fin de la recherche ;
- ✓ d'indiquer les motivations d'un arrêt prématuré de la recherche si celui-ci doit avoir lieu.

Par ailleurs, il est tenu de fournir gratuitement à l'investigateur les médicaments expérimentaux, dispositifs médicaux ou tout autre produit faisant l'objet de la recherche⁽¹⁷⁾. Si cela n'était pas le cas, le promoteur se verrait contraint à payer une amende.

Une autre personne, appelée **moniteur, assistant** ou **attaché de recherche clinique**, est importante auprès du promoteur. Il s'agit d'une « personne mandatée par le promoteur, chargée d'assurer pour ce dernier le suivi de la recherche biomédicale et le contrôle de sa qualité »⁽¹³⁾.

3.3. L'investigateur

D'après l'article L1121-1 du CSP, « La ou les personnes physiques qui dirigent et surveillent la réalisation de la recherche sur un lieu sont dénommées investigateurs »⁽³⁴⁾.

Il est possible d'apporter quelques précisions sur ce terme. En effet, si une recherche biomédicale est confiée à plusieurs investigateurs, un « investigateur coordonnateur » est alors désigné par le promoteur⁽¹⁷⁾. Par ailleurs, si la recherche est réalisée par une équipe, l'investigateur en est le responsable et est dénommé « investigateur principal ».

L'investigateur, désigné par le promoteur, doit posséder une expérience appropriée dans le domaine à l'étude⁽²⁹⁾. Il s'agit d'un médecin si les recherches portent sur un médicament. Néanmoins, dans le cas d'une recherche biomédicale en odontologie, il sera accompagné d'un chirurgien-dentiste ayant une expertise plus approfondie dans ce domaine.

L'investigateur a pour rôle⁽¹⁷⁾ :

- ✓ d'inclure les patients dans l'étude ;
- ✓ de notifier les événements indésirables au promoteur ;

- ✓ de prendre les mesures de sécurité appropriées au cours de la recherche, en collaboration avec le promoteur ;
- ✓ s'il est qualifié, de donner des informations en amont de la recherche clinique à la personne qui participe à l'étude ;
- ✓ de délivrer des informations concernant la santé des participants, au cours de la recherche ou à la fin.

3.4. Le participant

Le participant est défini comme toute « personne qui participe à un essai clinique, qu'il reçoive le médicament expérimental ou serve de témoin »⁽⁶⁾.

Depuis la loi du 5 mars 2012, même les personnes non affiliées au régime de la sécurité sociale peuvent participer à une étude, à condition que les fins soient justifiées⁽¹⁷⁾. En d'autres termes, toute personne, malade ou non, peut participer à une recherche impliquant la personne humaine. Elle peut être sollicitée lors d'une consultation chez le médecin ou par voie d'affichage, ou alors elle peut directement se porter volontaire auprès de structures dédiées à la recherche clinique⁽³⁵⁾. Par ailleurs, il est nécessaire de spécifier que tout participant pourra à tout moment se retirer de l'étude⁽¹⁷⁾.

Dans un souci de protection de la personne, tout participant à une recherche clinique bénéficie d'un examen médical avant l'inclusion effective. Les résultats lui sont ensuite communiqués soit directement soit par un médecin de son choix⁽³⁵⁾.

Bien que le participant n'ait pas un rôle décisionnel dans la mise en œuvre d'une étude clinique, il doit néanmoins donner son consentement « libre et éclairé »⁽¹⁷⁾ pour y prendre part. Il peut ainsi être considéré comme acteur des essais cliniques car, sans lui, un bon nombre de recherches ne pourraient avoir lieu.

Les différents acteurs n'interviennent donc pas au même niveau des essais cliniques mais chacun a sa part de responsabilité dans le bon déroulement et le respect des règles. La figure ci-dessous présente les principaux acteurs des essais cliniques et leurs interactions.

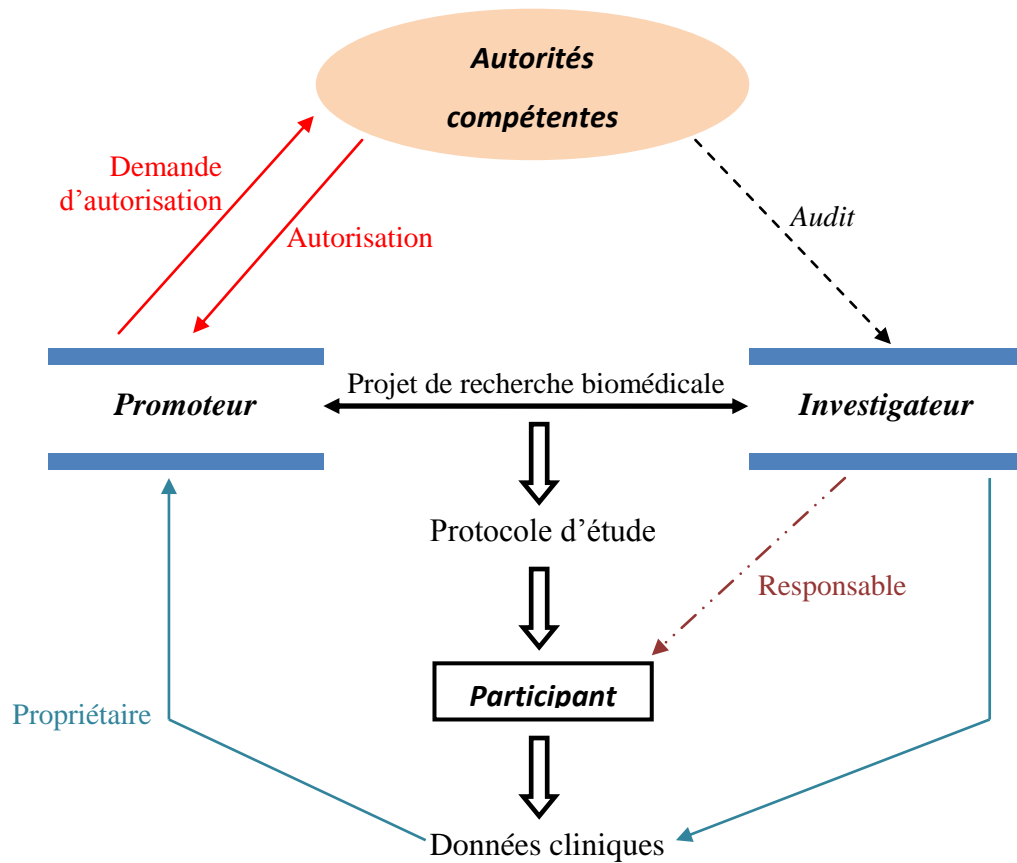


Figure 1. Interaction des principaux acteurs des essais cliniques

4. Déroulement d'une recherche clinique

Malgré les catégories de recherches cliniques existantes, toutes suivent une organisation semblable. La première étape est l'élaboration du projet de recherche clinique puis vient la rédaction du protocole et des autres documents de l'étude. Ensuite, ce protocole est soumis à l'avis des autorités compétentes. Après leur accord, la recherche peut alors être mise en place et est suivie pendant une durée déterminée par le protocole. Ce suivi consiste par exemple en l'analyse des échantillons, et des données qui peuvent être générés. Enfin, la publication des résultats clôture la recherche.

4.1. Les formalités à accomplir en amont⁽³⁶⁾

a) Obtention d'un numéro EudraCT et souscription à une assurance :

Avant tout dépôt du dossier de demande d'autorisation d'essai clinique ou de modification substantielle, le promoteur doit obtenir un numéro d'enregistrement de la recherche appelé numéro EudraCT.

Ce numéro permet de fournir un identifiant unique aux essais cliniques ayant au moins un site dans la Communauté européenne. Il est attribué à chaque essai et doit être inclus dans toutes les demandes d'autorisation d'essais cliniques, voire dans les autres documents relatifs aux essais, comme par exemple la déclaration d'effets indésirables graves inattendus.

EudraCT est une base de données européenne, établie conformément à la directive 2001/20/CE, regroupant tous les essais cliniques interventionnels portant sur des médicaments.

En ce qui concerne les recherches interventionnelles, le promoteur doit souscrire à une assurance responsabilité civile⁽¹⁷⁾ couvrant les éventuels préjudices causés aux personnes se prêtant à la recherche.

b) Dossier de demande d'Autorisation d'Essai Clinique (AEC) :

Le dossier de demande d'AEC, soumis à l'ANSM, doit être accompagné d'une copie de l'avis final du CPP et doit être envoyé par le promoteur. Il est constitué de différents dossiers⁽³⁷⁾ :

- Un **dossier administratif** comprenant un courrier accompagné du formulaire de demande d'autorisation, ainsi que le reçu de confirmation du numéro EudraCT et le justificatif de paiement des taxes à l'ANSM.
- Un **dossier sur l'essai clinique** comprenant essentiellement le protocole de recherche et son résumé en français, ainsi que la brochure pour l'investigateur ou le résumé des caractéristiques du produit (RCP) s'il dispose d'une AMM, la copie

d'attestation d'assurance et le document de référence permettant de déterminer le caractère attendu ou inattendu d'une suspicion d'évènement indésirable grave.

- Un **dossier technique** relatif aux produits utilisés. Dans le cas d'un ME ne disposant pas d'AMM, le promoteur doit déposer un dossier du ME. La nature des données à fournir dans ce dossier dépend notamment du type de ME, de son stade de développement, de la dose administrée, de la durée d'exposition à ce ME, de ses modalités d'administration, de sa voie d'administration, de la population visée, de la nature et de la sévérité de la maladie étudiée⁽³⁸⁾.

Ce dossier du ME doit comporter notamment⁽³⁸⁾ :

- Une partie relative à la qualité pharmaceutique, chimique et biologique du ME. Parmi ces données concernant la substance active et le produit fini peuvent être retrouvés, selon les cas :
 - des données relatives à la sécurité virale du ME ;
 - une copie de l'autorisation d'ouverture de l'établissement de fabrication du ME ;
 - une copie de l'autorisation d'ouverture de l'établissement importateur du ME et une attestation du respect des principes de BPF ou équivalents ;
 - un certificat d'analyse du médicament expérimenté.
- Une partie traitant des données non cliniques : telles que des données de pharmacologie et de toxicologie, une liste des études réalisées et des références bibliographiques appropriées, et une attestation des Bonnes Pratiques de Laboratoire.
- Une partie avec les données cliniques : un résumé de l'ensemble des données disponibles relatives au(x) ME concerné(s) issues de précédents essais cliniques et de leur utilisation chez l'Homme, et une attestation des BPC.
- Une partie faisant une analyse critique de l'évaluation des bénéfices et des risques.

La liste énumérée ci-dessus n'est ni limitative ni exhaustive. Cependant, toute absence doit être justifiée. Son contenu pourra varier en fonction du produit et de son niveau de développement. Ces informations doivent constituer une base permettant d'évaluer si le lot de produit répond aux conditions de certification et de libération en France par le pharmacien responsable⁽¹⁶⁾.

4.2. La chronologie d'une recherche clinique

Après accord du CPP et de l'ANSM, la recherche clinique peut démarrer et comporte différentes étapes successives⁽³⁹⁾ :

- **Le screening** : il consiste à recruter les patients sur la base de leur dossier médical tout en vérifiant rigoureusement les critères d'inclusion.
- **La pré-inclusion/ l'inclusion** : après description de l'essai au patient, l'investigateur lui propose d'y participer. Une note d'information à lire et à signer est alors remise au patient, accompagnée du formulaire de consentement.
Lors de l'inclusion, un numéro d'inclusion est attribué au patient et la date d'inclusion est relevée.
- **La randomisation** : il s'agit d'attribuer de façon aléatoire, autrement dit de tirer au sort, le traitement qui sera donné à un patient ou le groupe dans lequel il sera inclus. La randomisation permet d'éviter les biais, en garantissant une répartition équilibrée entre les groupes de patients ayant des variables susceptibles d'interférer avec la mesure ou l'analyse des résultats de l'essai. Ainsi, elle permet de constituer des groupes « homogènes » de patients.
- **Le suivi** : cette étape comprend les visites et le recueil des données dans le cadre de la recherche. Il peut s'agir également de déceler les éventuelles baisses de motivation, pour agir en amont et éviter ainsi les sorties prématurées d'étude.
- **La fin de participation/ le suivi hors protocole** : elle comprend les visites de fin d'étude ainsi que les rappels téléphoniques effectués pour évaluer la qualité de vie et connaître les nouveaux effets indésirables possibles. Le plus difficile lors de cette étape est de ne pas perdre de vue les patients.
Le suivi hors protocole s'applique aux patients ne recevant plus de traitement.

4.3. La recherche clinique et après...

Tel que l'énonce la directive européenne du 4 avril 2001⁽⁶⁾, « après le commencement de l'essai clinique, le promoteur peut apporter des modifications au protocole. Lorsque ces modifications sont substantielles et de nature à avoir des incidences sur la sécurité des participants ou à changer l'interprétation des pièces scientifiques qui viennent appuyer le

déroulement de l'essai, ou si elles sont significatives de quelque autre point de vue que ce soit, le promoteur notifie les raisons et le contenu de ces modifications aux autorités compétentes du ou des États membres concernés et en informe le ou les comités d'éthique concernés ».

Le promoteur a une autre obligation quand il lance une recherche clinique. En effet, d'après la loi Jardé, « le promoteur de la recherche s'engage à rendre publics les résultats de sa recherche »⁽¹⁷⁾. Par ailleurs, lorsque le nouveau règlement européen relatif aux essais cliniques sera accepté, il fixera une limite temporelle pour la publication de ces résultats.

Les résultats peuvent être communiqués sur la base de données EudraCT depuis 2011. Avant cette date, une publication dans une revue scientifique avait parfois lieu pour informer la communauté scientifique des résultats, le plus souvent quand ils étaient satisfaisants. La valorisation apportée à la recherche clinique par ce type de publication, et le caractère international, en font un moyen de communication toujours utilisé de nos jours.

Toute recherche clinique doit donc suivre un enchaînement particulier défini par la réglementation dans le but de cadrer les démarches.

***PARTIE 2 : CAS PARTICULIER D'UN ESSAI CLINIQUE
PROMU PAR LES HCL***

1. Présentation et justification clinique de la recherche

L'essai clinique que les HCL ont choisi de promouvoir concerne une pathologie très connue de nos jours et pour laquelle de nombreux traitements sont disponibles. Cependant, comme pour bon nombre de pathologies, toutes les pistes ne sont pas explorées et laissent encore beaucoup de choses à découvrir, aussi bien dans le domaine de la pharmacie que dans celui de la médecine.

1.1. La pathologie étudiée

Depuis plus d'un siècle, les Accidents Vasculaires Cérébraux (AVC) sont connus pour provoquer des crises d'épilepsie⁽⁴⁰⁾. Celles-ci se définissent comme la « manifestation clinique d'une hyperactivité paroxystique hypersynchrone d'un groupe plus ou moins étendu de neurones, et de son éventuelle propagation sur le cortex cérébral »⁽⁴¹⁾. La plupart des crises surviennent au plus tard dans les 24 heures suivant les AVC⁽⁴²⁾. Par ailleurs, des études ont montré que les AVC hémorragiques, comparés aux AVC ischémiques, sont associés à un taux plus important de crises précoces. Le taux de crises dans la phase aiguë est estimé entre 2 % et 33 % selon les études.

Bien que les causes des crises d'épilepsie précoces provoquées suite à un AVC hémorragique ne soient pas encore bien élucidées, il est tout de même possible de spécifier qu'elles sont dues à un dysfonctionnement biochimique cellulaire. Une des explications probables⁽⁴⁰⁾ est l'intervention du stress-oxydatif résultant d'un AVC hémorragique. En effet, un AVC hémorragique provoque la libération de sang, donc de fer, qui va se déposer au niveau du cerveau. Ce fer intervient en tant que catalyseur d'une réaction, appelée réaction de Haber-Weiss, qui entraîne une surproduction des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Ces espèces, toxiques pour l'organisme, induisent la peroxydation des membranes lipidiques des neurones et perturbent l'assimilation de l'acide glutamique par les astrocytes. Ainsi, la transmission neuronale est amplifiée et les neurones hyperstimulés. C'est alors que survient la crise d'épilepsie.

Les AVC hémorragiques représentent 10 à 15 % de tous les AVC et sont associés à une mortalité de 40 à 50 %, avec seulement 38 % des patients qui survivent la première année⁽⁴²⁾. Les hémorragies intracérébrales sont également responsables de séquelles neurologiques à long terme. Il est donc important d'agir sur tout facteur susceptible de réduire la morbi-mortalité. Cela passe entre autres par la prévention des crises épileptiques

car des crises survenant plus de deux semaines après l'AVC auront plus de risques de conduire à des épilepsies à long terme⁽⁴²⁾.

1.2. L'état de l'art

À l'heure actuelle, quelques médicaments ont été testés dans le cadre des AVC et des crises qui en résultent.

Une étude en double-aveugle réalisée avec l'acide valproïque⁽⁴²⁾ a montré que ce médicament ne permettait pas de prévenir les crises mais permettait d'en réduire le nombre à la phase précoce. Néanmoins, cette étude a été réalisée avec un effectif relativement faible puisque seulement 36 patients étaient inclus dans chaque bras. Le seul médicament à avoir été testé sur une grande population est la gabapentine⁽⁴³⁾, qui a montré des effets à long terme dans les crises d'épilepsie.

Une étude antérieure, effectuée sur la phénytoïne, a évalué l'impact d'un traitement prophylactique sur la survenue de crises précoces. Cette étude n'a pas mis en évidence d'effet positif. Cependant, il s'agissait d'une étude non randomisée et non contrôlée d'un sous-groupe de patients ayant pris de la phénytoïne. Or, cette molécule est connue pour provoquer des effets secondaires neurologiques, en particulier des troubles cognitifs⁽⁴⁴⁾.

Le lévétiracétam montre, quant à lui, des caractéristiques favorables pour être un bon candidat-médicament⁽⁴³⁾. En effet, son rôle de protection cérébrale est fortement suspecté dans le cas des épilepsies post-AVC. De plus, il possède un faible potentiel d'interaction, ne génère pas de métabolite actif, a une demi-vie d'élimination courte, n'est pas néfaste pour le sommeil, et n'a pas d'effet négatif majeur sur la cognition. Outre cette sécurité d'emploi, le lévétiracétam est connu⁽⁴³⁾ pour posséder une assez bonne balance efficacité/tolérance.

Des études ont déjà montré l'effet du lévétiracétam sur les crises survenant à long terme. Cependant, ces études étaient réalisées uniquement chez des patients âgés, nécessitant une dose plus faible que des sujets jeunes car leur clairance est moindre. Par conséquent, ces études n'étaient pas représentatives de la population générale.

Donc, aucune étude fiable n'a pour l'instant été réalisée en administrant systématiquement le médicament après une hémorragie intracérébrale, dans le but de prévenir les crises précoces.

1.3. L'objectif principal de l'étude

Pour améliorer la prise en charge des patients, les HCL ont choisi de promouvoir un essai clinique ayant pour objectif d'évaluer l'efficacité d'un traitement antiépileptique prophylactique systématique par lévétiracétam versus *placebo* à la phase aigüe des hémorragies intracérébrales spontanées sus-tentorielles, sur la survenue d'au moins une crise épileptique clinique ou électrique, enregistrée par électroencéphalogramme continu pendant 48 heures⁽⁴⁴⁾. L'espace sus-tentorial est la zone située au-dessus de la tente du cervelet, correspondant au lobe occipital qui peut être visualisé sur la figure ci-après.

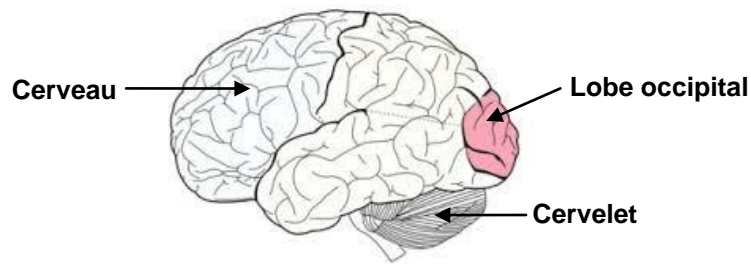


Figure 2. Le cerveau humain

1.4. La méthodologie de l'étude⁽⁴⁴⁾

❖ Type d'essai :

L'essai clinique à l'étude est un essai clinique de phase III, multicentrique, randomisé, en double-aveugle, effectué contre *placebo*.

Deux groupes parallèles sont donc inclus dans l'étude :

- un groupe « intervention » recevant le *verum* ;
- un groupe « contrôle » recevant le *placebo*.

Dans chacun des deux groupes, l'administration sera débutée dans les 24 heures après l'établissement du diagnostic d'hémorragie intracérébrale spontanée sus-tentorielle, qui reposera sur les données cliniques et l'imagerie cérébrale.

❖ **Effectif :**

Chacun des bras comportera 52 patients. Au total, 104 patients âgés de plus de 18 ans seront donc inclus dans l'étude, ce qui représente une assez grande population. Ce nombre a été estimé en tenant compte du nombre de patients susceptibles d'avoir au moins une crise dans chacun des groupes, en considérant le seuil de significativité, la puissance statistique et le nombre de perdus de vue.

❖ **Durée de l'étude :**

La durée totale de l'étude sera de 3 ans. La phase d'inclusion des patients sera de 2 ans et la durée du suivi après l'arrêt du traitement sera de 1 an.

1.5. Le traitement étudié

❖ **Indications actuelles du lévétiracétam⁽⁴⁵⁾ :**

Le lévétiracétam est prescrit dans le traitement de différentes formes d'épilepsie dont :

- ✓ les crises d'épilepsie partielles, avec ou sans généralisation secondaire, en monothérapie ou en association chez l'adulte et l'adolescent à partir de 16 ans, et en association chez l'enfant et le nourrisson à partir de 1 mois ;
- ✓ les crises d'épilepsie myocloniques, en association et à partir de l'âge de 12 ans ;
- ✓ les crises d'épilepsie généralisées tonico-cloniques primaires, en association et à partir de l'âge de 12 ans.

❖ **Modalités d'administration et posologie⁽⁴⁴⁾ :**

Dans cette étude, l'administration du lévétiracétam ou du *placebo* aura lieu en deux temps et fera intervenir une forme intraveineuse (IV) et une forme orale (*per os*) :

- ✓ La phase de traitement : le traitement par voie IV sera débuté dans les 24 heures suivant l'inclusion, à la posologie de 500 mg/12 h pendant au moins 48 heures et pendant 5 jours maximum. Ensuite, un relais sous forme *per os* sera proposé, dès que l'administration par voie orale sera possible, à la posologie de 500 mg/12 h (1g/jour en deux prises). Si le patient n'est pas apte à déglutir, au moment du relais

par voie orale, le médicament lui sera administré par sonde nasogastrique. La durée totale de traitement sera de 30 jours.

- ✓ La phase de décroissance : elle se déroulera en deux temps.
 - 7 jours de lévétiracétam/*placebo* 250 mg/12 h soit 2 gélules par jour
 - 7 jours de lévétiracétam/*placebo* 250 mg/24 h soit 1 gélule par jour.

Une levée d'insu est prévue si une crise d'épilepsie survient entre la randomisation et la fin du premier mois. Il conviendra alors d'adapter le traitement antiépileptique, en administrant au patient du Kepra® en solution injectable dosée à 100 mg/mL.

2. Molécule à l'étude : le lévétiracétam

Le lévétiracétam est une molécule qui se distingue des autres antiépileptiques aussi bien par sa structure que par son mécanisme d'action.

2.1. Historique

Le lévétiracétam a été approuvé par la Food and Drug Administration (FDA : Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux) en 1999⁽⁴⁶⁾. C'est seulement le 1^{er} décembre 2009 que la monographie du lévétiracétam a été adoptée par la Commission européenne de Pharmacopée⁽⁴⁷⁾. Elle a ensuite été introduite dans la Pharmacopée européenne 7^{ème} édition 7.0 du 1^{er} janvier 2011. Puis, une correction a été apportée dans le supplément de la Pharmacopée européenne du 1^{er} janvier 2012⁽⁴⁸⁾.

Après une dizaine d'année passée sur le marché, cette molécule s'est positionnée comme un traitement de première ligne dans l'épilepsie⁽⁴⁹⁾.

2.2. Données physico-chimiques

❖ Structure :

Le lévétiracétam, de formule brute C₈H₁₄N₂O₂, et représenté dans la figure ci-dessous, est un dérivé de la pyrrolidone : (2S)-2-(2-oxopyrrolidin-1-yl)butanamide. La pyrrolidone est constituée d'un cycle pyrrolidine auquel est attachée une cétone. Cette molécule n'est pas chimiquement apparentée aux substances actives anticancéreuses existantes⁽⁴⁵⁾.

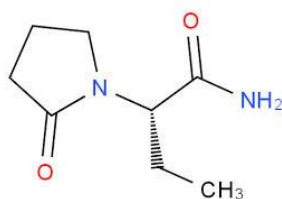
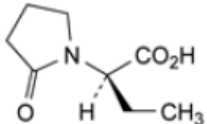
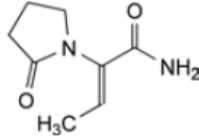
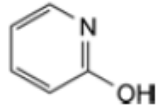
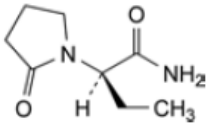


Figure 3. Structure de la molécule de lévétiracétam⁽⁵⁰⁾

Sa masse molaire⁽⁵¹⁾ est de 170,21 g.mol⁻¹.

Les quatre impuretés du lévétiracétam⁽⁵²⁾ sont représentées dans le tableau ci-dessous, avec leur nomenclature.

Tableau 1. Structure des quatre impuretés du lévétiracétam⁽⁵²⁾

<p>Impureté A : acide (2RS)-2-oxopyrrolidin-1-yl)butanoïque</p> 	<p>Impureté B : (2Z)-2-(2-oxopyrrolidin-1-yl) but-2-énamide</p> 
<p>Impureté C : Pyridin-2-ol</p> 	<p>Impureté D : (2R)-2-(2-oxopyrrolidin-1-yl)butanamide = (R)étiracétam</p> 

❖ Propriétés organoleptiques :

Le lévétiracétam est⁽⁵²⁾ :

- une poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche ;
- très soluble dans l'eau, soluble dans l'acétonitrile, pratiquement insoluble dans l'hexane.

Son point de fusion est de 117 °C⁽⁵¹⁾.

❖ Données de sécurité⁽⁵¹⁾ :

Le lévétiracétam s'avère être toxique en cas d'ingestion orale. Les symptômes sont de la fatigue, de la faiblesse, de la somnolence, une bouche ou une langue irritée, ou encore un

changement de comportement. En cas d'ingestion, il faut immédiatement rincer la bouche, voire appeler un centre anti-poison si la quantité ingérée est importante.

Le lévétiracétam peut également provoquer des irritations oculaires. En cas de contact avec les yeux, il faut alors rincer immédiatement la zone avec de l'eau, pendant quelques minutes, et retirer les éventuelles lentilles de contact si cela est possible.

En cas de contact avec la peau, il faut rincer immédiatement et abondamment la zone.

En cas d'inhalation, la personne doit être amenée dans un air frais, voire à l'extérieur, et elle doit rester en position confortable pour respirer profondément.

Ce produit doit donc être manipulé avec des gants et des lunettes de sécurité pour limiter le risque d'exposition. Il doit également être manipulé et stocké dans un endroit bien ventilé. Le stockage doit se faire dans des conteneurs fermés hermétiquement. Ces conteneurs, une fois vides, doivent être emmenés dans un centre de déchets spécialisé dans la destruction de produits chimiques.

Le lévétiracétam émet des fumées toxiques en cas d'incendie. Cependant, aucune mesure particulière au lévétiracétam n'existe en cas de feu. Les mesures générales doivent donc être appliquées ; autrement dit, le feu doit être éteint avec des jets d'eau, de substances chimiques sèches ou de mousse.

Le lévétiracétam est stable dans des conditions normales. De même, aucune réaction dangereuse n'est connue dans des conditions normales d'utilisation.

2.3. Données cliniques

❖ Mécanisme d'action⁽⁴⁵⁾ :

Le mécanisme d'action du lévétiracétam n'est pas complètement élucidé mais semble être différent des mécanismes d'action des médicaments antiépileptiques existants.

Le lévétiracétam ne modifierait pas les caractéristiques cellulaires de base ni la neurotransmission normale, mais il serait un inhibiteur partiel des canaux calciques de type N. Outre cela, il réduirait la libération du calcium des réserves intra-neuronales. Ce mécanisme conduit donc à une modification des concentrations calciques intra-neuronales.

Le lévétiracétam agirait également en inversant partiellement l'effet inhibiteur du zinc et des bêta-carbolines sur les canaux GABAergiques et GLYCINergiques.

Par ailleurs, la dernière découverte concerne la liaison du lévétiracétam à un site spécifique du tissu cérébral⁽⁵³⁾. Ce site de liaison est la protéine 2A de la vésicule synaptique (SV2A), qui semble être impliquée dans la fusion vésiculaire et l'excrétion cellulaire des neurotransmetteurs.

Ainsi, le lévétiracétam préviendrait sélectivement l'hyper-synchronisation neuronale, et empêcherait la propagation des crises épileptiformes.

❖ Classifications :

Le lévétiracétam est un médicament appartenant à la classe pharmacothérapeutique des antiépileptiques.

Selon le système de classification Anatomique, Thérapeutique et Chimique (ATC), établi par l'OMS et détaillé dans le tableau ci-dessous, le lévétiracétam est ainsi codifié : N03AX14⁽⁴⁵⁾.

Tableau 2. Codification du lévétiracétam selon le système ATC⁽⁵⁴⁾

Niveau	Caractéristique	Dénomination
1	<i>Groupe anatomique :</i> système nerveux	<i>Une lettre :</i> N
2	<i>Groupe thérapeutique principal :</i> antiépileptique	<i>Deux chiffres :</i> 03
3	<i>Sous-groupe pharmacologique :</i> antiépileptique	<i>Une lettre :</i> A
4	<i>Sous-groupe chimique :</i> autres antiépileptiques	<i>Une lettre :</i> X
5	<i>Sous-groupe pour la substance chimique :</i> lévétiracétam	<i>Deux chiffres :</i> 14

À cette codification peut être rajoutée la dose journalière usuelle ou DDD (Defined Daily Doses), qui se définit de la façon suivante⁽⁵⁴⁾ : « dose d'entretien moyenne supposée, par jour, pour un médicament, utilisée dans son indication principale chez l'adulte ».

Pour le lévétiracétam, cette DDD est de 1500 mg⁽⁴⁵⁾. Il faut noter⁽⁵⁴⁾ que la DDD est une unité de mesure qui ne reflète pas nécessairement la dose journalière recommandée ou prescrite. Cette dernière doit être basée sur les caractéristiques individuelles des patients, comme leur âge, leur poids, et sur les considérations pharmacocinétiques.

La classification EphMRA (European Pharmaceutical Research Association), utilisée par l'industrie pharmaceutique, ne conserve, quant à elle, que les quatre premiers caractères de la classification ATC, soit N03A pour le lévétiracétam.

2.4. Médicament expérimental et BPP⁽¹⁵⁾

La ligne directrice 8, faisant référence à la préparation des médicaments expérimentaux, s'applique dans le cadre de tout essai clinique nécessitant la réalisation d'une préparation pharmaceutique à l'hôpital.

Ce chapitre précise que « toute préparation ne peut être effectuée que sur demande du promoteur au pharmacien ». Cette demande doit se faire par écrit. Et, conformément à ce texte, le promoteur de l'essai clinique doit également donner à la PUI les éléments nécessaires à la préparation des médicaments, à leur contrôle et à la rédaction des procédures et instructions. De plus, ces informations sont indispensables pour procéder à l'analyse de faisabilité nécessaire avant toute préparation.

Ces BPP précisent que les préparations de médicaments expérimentaux sont en général conditionnées individuellement pour chaque personne qui se prête à la recherche biomédicale.

Par ailleurs, des procédures décrivant les modes d'obtention, de sécurisation, de diffusion, d'utilisation et de conservation de tout code de randomisation doivent être utilisées pour le conditionnement des préparations de médicaments expérimentaux ainsi que le système de levée de l'insu.

Selon les BPP, le pharmacien est tenu d'établir un inventaire détaillé des dispensations qu'il effectue.

Les modalités de réclamations, rappels, retours et destruction des préparations doivent être définies et rédigées. Chaque flux de médicament doit être enregistré, comptabilisé et

vérifié dans chaque centre d'étude par le promoteur. La destruction peut alors avoir lieu et doit être certifiée par écrit.

Enfin, l'échantillothèque doit contenir un échantillon de chaque lot et doit être conservée jusqu'à ce que le rapport final de la recherche biomédicale soit rédigé. Ainsi, le produit pourra être identifié si des incohérences dans les résultats venaient à être décelées.

2.5. Médicament expérimental et BPF⁽¹⁶⁾

Les Bonnes Pratiques relatives à la fabrication des médicaments à usage humain sont divisées en 9 chapitres, auxquels s'ajoutent 19 lignes directrices particulières.

La ligne directrice 13 concerne spécifiquement la fabrication des médicaments expérimentaux. Dans un premier temps, cette ligne directrice traite de la gestion de la qualité, des moyens en personnel, en matériel et en locaux nécessaires pour assurer la fabrication des ME. Dans un deuxième temps, ce texte précise la documentation attendue, de même que les opérations de fabrication et le contrôle de la qualité spécifiques aux ME. Dans un troisième temps, cette ligne directrice rappelle les modalités de libération et d'expédition des lots, ainsi que les modalités de réclamations, rappels et retours de lots, auxquels fait suite leur destruction.

Les personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales peuvent courir un risque supplémentaire par rapport aux patients traités avec des médicaments déjà mis sur le marché. L'application des BPF à la production des ME est donc destinée à garantir, d'une part, que les personnes qui se prêtent à la recherche ne sont pas mises en danger, et, d'autre part, que les résultats de la recherche biomédicale ne sont pas affectés par des conditions de fabrication non satisfaisantes ayant un impact sur la sécurité, la qualité ou l'efficacité. De la même façon, ces BPF visent à garantir l'homogénéité des divers lots d'un même ME utilisé dans le cadre d'une recherche biomédicale ou dans le cadre de plusieurs recherches biomédicales différentes. Ces bonnes pratiques de fabrication sont également utilisées pour documenter et justifier de façon adéquate toute modification apportée au ME lors de son développement.

3. Etude de faisabilité d'un essai clinique portant sur le lévétiracétam réalisé au sein de la PUI de l'Hôpital Edouard Herriot (HEH)

La PUI de l'HEH a été sollicitée, dans le cadre de ce nouvel essai clinique portant sur le lévétiracétam, pour prendre en charge la gestion, l'approvisionnement, la préparation, le contrôle, la détention et la dispensation des ME. Deux secteurs présents au sein de la PUI de l'HEH sont impliqués dans cet essai, à savoir les secteurs « Essais cliniques » et « Préparation et contrôle des médicaments ».

Cependant, une étude de faisabilité préalable est nécessaire avant d'accepter ou de refuser la réalisation de toute préparation pharmaceutique. La faisabilité est l'« appréciation, en vue de sa réalisation, de la conformité d'une préparation à l'état des connaissances scientifiques, médicales et techniques »⁽¹⁵⁾.

Les critères analysés pour une étude de faisabilité sont les suivants⁽¹⁵⁾ :

- ✓ le bon usage de la préparation en termes d'objectif thérapeutique, d'ajustement thérapeutique, de meilleure acceptabilité, d'observance renforcée, de diminution des risques, de traçabilité de la prise ;
- ✓ le risque sanitaire vis-à-vis du patient ;
- ✓ la galénique et le contrôle en termes de réalisation technique (formulation, personnel, matériels, locaux) ;
- ✓ les textes en vigueur (interdictions, restrictions, substances vénéneuses, disponibilité de spécialités pharmaceutiques adaptées).

Après analyse de ces différents critères, le pharmacien pourra alors accepter ou non de participer au projet.

Dans les différentes parties qui suivent vont être détaillés les points qui sont jugés essentiels, par la PUI de l'HEH, dans l'analyse de faisabilité de ce nouvel essai clinique.

3.1. Faisabilité clinique

La faisabilité clinique est le premier critère à évaluer dans la faisabilité d'un essai clinique.

a) Intérêt pharmacothérapeutique :

L'intérêt pharmacothérapeutique de ce nouvel essai clinique a été présenté dans les parties « La pathologie étudiée » et « L'état de l'art ». Rappelons tout de même les principaux points. Cette recherche biomédicale a pour objectif de prévenir une pathologie dont la prévalence est non négligeable. De plus, la molécule à l'étude possède de nombreux avantages comparée à d'autres traitements existants. Par ailleurs, des études déjà réalisées ont montré que cette molécule pourrait jouer un rôle important dans la protection cérébrale⁽⁴³⁾.

b) Circonstances de la réalisation de l'étude :

Selon l'article L5126-5 du CSP⁽⁵⁵⁾, une PUI « est chargée de répondre aux besoins pharmaceutiques de l'établissement où elle est créée, et notamment :

- d'assurer, dans le respect des règles qui régissent le fonctionnement de l'établissement, la gestion, l'approvisionnement, la préparation, le contrôle, la détention et la dispensation des médicaments, produits ou objets mentionnés à l'article L4211-1 ainsi que des dispositifs médicaux stériles et, le cas échéant, des **médicaments expérimentaux** tels que définis à l'article L5121-1-1 et d'en assurer la qualité ;
- de mener ou de participer à toute action d'information sur ces médicaments, matériels, produits ou objets, ainsi qu'à toute action de promotion et d'évaluation de leur bon usage, de contribuer à leur évaluation et de concourir à la pharmacovigilance et à la matériovigilance et à toute action de sécurisation du circuit du médicament et des dispositifs médicaux stériles ;
- de mener ou de participer à toute action susceptible de concourir à la qualité et à la sécurité des traitements et des soins dans les domaines relevant de la compétence pharmaceutique. »

La méthodologie d'évaluation de la faisabilité d'un projet de recherche n'est pas cadrée par la réglementation. C'est donc pour cette raison que la PUI du groupement hospitalier Edouard Herriot a mis en place une grille de faisabilité, qui se trouve en Annexe I.

c) Recevabilité du protocole de l'essai clinique :

Le contenu et les modalités de présentation d'un protocole de recherche biomédicale, portant sur un médicament à usage humain, sont fixés par l'arrêté du 22 septembre 2011⁽⁵⁶⁾ et doivent être conformes aux indications détaillées dans la communication de la Commission européenne (« CT-1 »). Par ailleurs, le contenu du protocole est fixé par les ICH E6 (CPMP/ ICH/135/95) de la « Guideline on Good Clinical Practice »⁽¹⁴⁾.

Un protocole doit donc satisfaire aux exigences suivantes⁽⁵⁷⁾ :

- ✓ décrire le ou les objectifs, la conception, la méthode, les aspects statistiques et l'organisation d'un essai ;
- ✓ être identifié par le titre, le numéro de code de protocole du promoteur, une date et un numéro de version qui seront mis à jour lorsqu'il sera modifié ainsi que le titre ou intitulé court qui lui a été attribué ;
- ✓ comprendre une définition claire et non ambiguë de la fin de l'essai en question, ainsi qu'une description du plan relatif à la fourniture de tout soin supplémentaire aux participants à l'essai, une fois leur participation à l'essai terminée ;
- ✓ contenir les informations utiles à l'évaluation de l'essai clinique par le comité d'éthique, autrement dit :
 - une analyse de la pertinence de l'essai clinique et de sa conception ;
 - une évaluation des bénéfices et des risques attendus ;
 - une justification de la participation de personnes incapables de donner leur consentement éclairé ou d'autres populations spéciales ;
 - une description détaillée de la procédure de recrutement et de consentement éclairé ;
- ✓ identifier les événements indésirables ou les résultats d'analyse anormaux, déterminants pour les évaluations de la sécurité et qui doivent être notifiés au promoteur ;
- ✓ être accompagné d'un synopsis du protocole ;
- ✓ être signé par le promoteur et l'investigateur.

Le protocole clinique, transmis à la PUI de l'HEH par le promoteur, est en cohérence avec les BPC. L'analyse de faisabilité peut donc se poursuivre au sein de la Pharmacie.

3.2. Faisabilité technique

Selon les BPP, l'analyse de faisabilité technique d'une préparation doit se faire avant la réalisation de cette préparation. Cette analyse s'effectue par le pharmacien assurant la gérance de la PUI. Il a le droit de refuser d'effectuer cette préparation « s'il estime que celle-ci n'est pas conforme à l'état des connaissances scientifiques, médicales et techniques et/ou que celle-ci est dangereuse. S'il n'est pas en mesure de la réaliser, il le notifie au prescripteur et propose, si possible, une alternative »⁽¹⁵⁾.

Le pharmacien « peut éventuellement proposer au prescripteur, selon les indications de la préparation, des modifications pour une optimisation de la formule. En toutes circonstances, le pharmacien engage pleinement sa responsabilité dans la réalisation et la délivrance de la préparation »⁽¹⁵⁾.

La faisabilité technique est aussi évaluée par les moyens en personnel, en matériel et en locaux qui doivent être satisfaisants pour garantir la qualité des préparations et la réalisation des contrôles. Les exigences sont fixées par les BPP, les BPF ainsi que les Bonnes Pratiques de Pharmacie Hospitalière (BPPH).

a) Les moyens humains requis selon la réglementation :

Selon les BPP⁽¹⁵⁾, il est nécessaire d'avoir un personnel qualifié, en nombre suffisant, et formé de façon appropriée pour réaliser les différentes préparations. Leur savoir-faire se base avant tout sur l'expérience pratique. De plus, les BPP⁽¹⁵⁾ stipulent que l'organisation, l'hygiène, la protection et la formation du personnel réalisant des préparations doivent être conformes aux principes généraux des BPPH.

L'accès aux zones de fabrication doit être limité au personnel autorisé⁽¹⁶⁾. Par ailleurs, toutes les personnes, y compris le personnel de nettoyage et de maintenance, employées dans les zones d'atmosphère contrôlée (ZAC) doivent recevoir une formation appropriée et évaluée⁽¹⁵⁾ comportant des notions d'hygiène et de microbiologie. Toute personne extérieure susceptible de pénétrer au sein de ces ZAC, comme le personnel de sociétés d'entretien par exemple, doit aussi être formée et surveillée attentivement⁽¹⁵⁾.

Les procédures relatives à la santé, à l'hygiène et à l'habillement du personnel doivent être détaillées et adaptées aux différentes activités⁽¹⁵⁾. De plus, l'affectation à des activités ayant une incidence sur la qualité des prestations doit tenir compte de l'état de santé du personnel⁽⁵⁸⁾.

Dans une PUI, chaque personne occupant un poste à responsabilité doit avoir ses propres tâches à accomplir : celles pour lesquelles elle possède les qualifications adéquates. Un organigramme de l'établissement, ainsi que des « fiches de fonction » doivent donc être rédigés afin de connaître exactement la mission de chacun des membres du personnel. Toute fonction déléguée doit alors être faite à une personne de qualification équivalente⁽¹⁶⁾.

Un personnel ayant une connaissance particulière et approfondie des fournisseurs doit être réservé à l'achat de matières premières. De même qu'un personnel chargé de l'échantillonnage doit être apte à le faire⁽¹⁶⁾.

Toute personne absente, pour cause de formation par exemple, doit être remplacée. Ce remplacement doit cependant être assuré par un personnel de qualification équivalente⁽⁵⁸⁾. Et si cela est nécessaire, il est possible d'affecter d'autres catégories de personnel à la PUI pour y effectuer, sous la responsabilité du pharmacien, des tâches particulières⁽⁵⁸⁾. Ce personnel peut être constitué par exemple de cadres infirmiers, d'agents hospitaliers, ou encore de techniciens de laboratoire.

Les **médicaments stériles** étant une catégorie de produits à part entière, il va de soi qu'une formation du personnel impliqué doit être organisée, au même titre qu'une évaluation régulière⁽¹⁵⁾. Car la garantie de la stérilité des produits passe, entre autres, par cette qualification du personnel. Selon les BPF, « la qualité dépend dans une grande mesure du savoir-faire, de la formation et du comportement du personnel impliqué »⁽¹⁶⁾.

D'une manière générale, pour n'importe quel type de préparation, la mise en place et le maintien d'un système d'assurance de la qualité satisfaisant, de même que la qualité de la fabrication des médicaments, reposent sur l'ensemble du personnel⁽¹⁶⁾. Pour arriver à cela, les responsabilités de chacun doivent être clairement comprises par les intéressés et mises par écrit. Par exemple, tous les membres du personnel doivent être conscients des principes de BPF qui les concernent⁽¹⁶⁾.

Les **ME** étant, eux aussi, une classe particulière de médicaments, il convient d'avoir un personnel ayant reçu une formation adaptée et ayant parfaitement compris l'application des BPP à la production de ME⁽¹⁵⁾. Les BPF précisent que « même dans les cas où le personnel impliqué est en petit nombre, il doit y avoir, pour chaque lot, des personnes distinctes responsables de la production et du contrôle de la qualité »⁽¹⁶⁾.

Des opérations de fabrication spécifiques doivent être mises en œuvre pour la fabrication des ME. En effet, le personnel doit adapter en permanence les instructions en fonction des connaissances acquises lors de la production⁽¹⁶⁾.

De plus, dans le cas des ME stériles, les conditions d'asepsie sont à maîtriser surtout au niveau des opérations de remplissage ou de fermeture, qui sont des opérations manuelles ou semi-automatisées très délicates. La formation du personnel et la validation de la technique aseptique de chaque opérateur doit donc être surveillée très attentivement. Cette formation du personnel doit aider à minimiser les risques de confusion, d'erreur ou de contamination croisée⁽¹⁶⁾.

Pour terminer, un personnel autorisé doit aussi être disponible pour constituer, approuver et signer les dossiers de lots des ME⁽¹⁶⁾.

b) Les moyens matériels requis selon la réglementation :

On entend par locaux et matériels, les « sols, cloisons, plafonds, mobiliers, éclairage, ventilation, traitement d'air, température, humidité »⁽¹⁵⁾ et tous les autres dispositifs pouvant entrer dans la préparation ou le contrôle des médicaments. Ils doivent tous être « exclusivement réservés à l'exécution et au contrôle des préparations »⁽¹⁵⁾. Par ailleurs, ils doivent être « adaptés aux opérations effectuées » et être « nettoyés et désinfectés »⁽¹⁵⁾ régulièrement.

Selon les BPF, « les locaux et le matériel doivent être situés, conçus, construits, adaptés et entretenus de façon à convenir au mieux aux opérations à effectuer. Leur plan, leur agencement, leur conception et leur utilisation doivent tendre à minimiser les risques d'erreurs et à permettre un nettoyage et un entretien efficaces en vue d'éviter les contaminations, dont les contaminations croisées, le dépôt de poussières ou de saletés et, de façon générale, toute atteinte à la qualité des produits. »⁽¹⁶⁾. Plus particulièrement, les

locaux et matériels d'une PUI doivent être conformes aux dispositions précisées dans les BPPH.

❖ **Le matériel :**

Le matériel doit être propre, qualifié si besoin et en bon état de fonctionnement⁽¹⁵⁾. Les surfaces de travail du préparatoire doivent d'une part être « lisses, imperméables, sans fissures », et d'autre part être « facilement nettoyables »⁽¹⁵⁾. De plus, une zone ou un local de nettoyage du matériel, adapté à l'activité, doit être installé à proximité immédiate du préparatoire⁽⁵⁸⁾.

Pour chaque préparation, il est nécessaire de s'assurer d'avoir tout le matériel qui sera adapté à l'usage prévu⁽¹⁵⁾. Ce matériel ne doit néanmoins présenter aucun risque, que ce soit pour le personnel ou les produits⁽⁵⁸⁾, et doit être régulièrement requalifié. Pour ne donner qu'un exemple, le matériel qui sert aux pesées ou aux mesures volumétriques doit subir un étalonnage régulier, « en interne à une fréquence définie, et par un organisme agréé une fois par an au minimum »⁽¹⁵⁾.

Concernant les **préparations stériles**, elles sont à effectuer soit avec « du matériel stérile et non réutilisable »⁽¹⁵⁾, soit avec du matériel réutilisable après stérilisation. Par ailleurs, l'intervalle de temps entre le lavage, le séchage et la stérilisation des accessoires, des récipients et du matériel, ainsi qu'entre la stérilisation et l'utilisation, doit être le plus court possible pour éviter au maximum les contaminations⁽¹⁵⁾.

Pour la fabrication des **ME**, les risques de confusion, d'erreur ou de contamination croisée sont à minimiser, entre autres, par l'utilisation d'équipements adaptés⁽¹⁶⁾.

❖ **Les locaux :**

Les locaux doivent eux aussi être propres⁽¹⁵⁾, convenables et suffisamment spacieux⁽¹⁶⁾. Ils sont constitués de ZAC dont les qualités microbiologique et particulaire sont maîtrisées. Ces ZAC sont placées en surpression par rapport à l'environnement extérieur. Cette surpression, qui est surveillée régulièrement, varie de 10 à 15 Pascals entre des locaux adjacents de classes différentes⁽¹⁵⁾.

Une gradation de la qualité particulaire et microbiologique est également respectée entre les différents locaux, afin que la zone de préparation située sous un flux d'air laminaire présente les qualités particulaire et microbiologique les plus élevées (classe A)⁽¹⁵⁾. Cette classe est utilisée pour la préparation de médicaments stériles qui doit, par ailleurs, avoir lieu dans des locaux spécifiques et réservés à cette activité⁽⁵⁸⁾. Les accessoires, les récipients, le matériel et tout autre article nécessaire en ZAC lors de préparations aseptiques, sont stérilisés et introduits dans la zone selon un système validé de transfert, ne permettant pas l'introduction de contaminants⁽¹⁵⁾.

Dans la mesure du possible, les matériels, les appareils et les installations techniques sont conçus et installés afin que les interventions, l'entretien et les réparations soient effectués à l'extérieur de la ZAC⁽¹⁵⁾.

Une zone de quarantaine doit également être prévue dans les locaux d'une PUI, pour les produits en attente de contrôle⁽⁵⁸⁾.

Outre les conditions de bonne conservation et de protection des médicaments, l'isolation, l'éclairage, la température, l'hygrométrie et la ventilation des locaux sont aussi essentiels afin d'assurer de bonnes conditions de travail du personnel⁽⁵⁸⁾.

Enfin, les ME n'étant pas toujours complètement connus, il convient de minimiser tous les risques de contamination croisée⁽¹⁶⁾. C'est pourquoi « la conception du matériel et des locaux, les méthodes d'analyse et de contrôle et les limites d'acceptation à utiliser après nettoyage doivent refléter la nature de ces risques. »⁽¹⁶⁾. Le nettoyage étant primordial, il faut bien évidemment tenir compte de la solubilité du produit⁽¹⁶⁾.

c) Evaluation des coûts :

L'étude de faisabilité technique se termine par l'évaluation des coûts engendrés par la fabrication des ME. Cette évaluation se base sur la procédure générale qui a été validée au sein de la PUI de l'HEH.

Le premier coût est celui des consommables et représente les matières premières utilisées pour chacune des préparations pharmaceutiques, les réactifs nécessaires aux contrôles des préparations terminées, les articles de conditionnement, l'utilisation des différents

appareils, de même que l'intégralité des dispositifs stériles et habillages nécessaires à la préparation et aux contrôles des ME.

À ce coût s'ajoute le temps lié au personnel réalisant la désinfection du matériel, les préparations, les contrôles, ou assurant la gestion de la qualité ainsi que la libération des lots.

Le coût final correspond alors à ces deux coûts auxquels on additionne les frais de structure et de logistique.

Il est de rigueur de préciser qu'à l'étape de l'évaluation, les coûts maximaux sont envisagés pour ne pas manquer de budget au cours de l'étude. Dès le départ, le promoteur, l'investigateur et toute autre personne concernée doivent, selon les BPC⁽¹³⁾, se mettre d'accord sur les aspects financiers de la recherche.

L'analyse de coût, au même titre que l'analyse des moyens humains et financiers, doit être effectuée en amont, c'est-à-dire avant de donner un avis favorable aux investigateurs de l'essai clinique.

3.3. Cas particulier de la faisabilité technique : le contrôle analytique

Le dernier point le plus important à étudier est la faisabilité des contrôles analytiques. Les exigences sont fixées, comme pour les aspects techniques, par les BPP, les BPF ainsi que les BPPH. Les BPP exigent en particulier d'avoir des moyens suffisants en personnel, en matériel et en locaux, afin de garantir la mise en œuvre efficace et fiable des contrôles analytiques⁽¹⁵⁾.

a) Les moyens humains requis selon la réglementation :

De façon semblable aux préparations, la réalisation de contrôles nécessite un personnel qualifié et régulièrement formé⁽¹⁵⁾. Dans la mesure du possible, les contrôles sont à effectuer par une personne différente de celle ayant préparé le produit. Par ailleurs, ils sont placés sous l'autorité d'une personne possédant les qualifications requises et une expérience suffisante dans le domaine analytique.

Dans la PUI, un pharmacien désigné est chargé de la libération - acceptation ou refus - des préparations terminées, au vu des différents contrôles effectués⁽¹⁵⁾.

Il est possible de sous-traiter des opérations de contrôles, dans le cas où la PUI ne possède pas le matériel nécessaire à la réalisation de ceux-ci, ou dans le cas où les contrôles requièrent des compétences particulières. Cependant, le pharmacien de la PUI réalisant la dispensation restera la seule personne apte à libérer le produit, sauf mention contraire sur le contrat de sous-traitance⁽¹⁵⁾.

Du reste, le personnel en charge de la validation des procédés doit lui aussi être formé pour de telles activités⁽¹⁶⁾.

b) Les moyens matériels requis selon la réglementation :

❖ Le matériel :

Le matériel étant on ne peut plus important pour réaliser des opérations de contrôle analytique, il convient alors d'avoir établi une qualification des appareillages, des équipements et des installations de contrôle, avant utilisation⁽¹⁵⁾.

Les BPF précisent que le matériel de contrôle doit être conçu, installé et entretenu en fonction de sa destination⁽¹⁶⁾. Les balances et le matériel de mesure doivent, par exemple, être de portée et de précision appropriées aux opérations de contrôle⁽¹⁶⁾.

Conformément aux BPPH, le matériel de contrôle doit, d'une part, être installé de façon à éviter tout risque d'erreur ou de contamination. D'autre part, la conception et l'installation de ces matériels doivent permettre un nettoyage facile et minutieux⁽⁵⁸⁾.

Enfin, des procédures écrites et validées détaillant les opérations à effectuer doivent être mises à disposition du personnel⁽¹⁵⁾.

❖ Les locaux :

Les locaux destinés au contrôle analytique ne sont accessibles qu'au personnel autorisé et doivent répondre aux exigences de la réglementation en vigueur⁽⁵⁸⁾.

Selon les BPPH, les contrôles physico-chimiques, ainsi que les dosages de médicaments et recherches de toxiques sont réalisés dans des locaux séparés des zones de production⁽¹⁶⁾ et adaptés à l'activité. Le laboratoire de contrôle microbiologique est lui aussi cloisonné. Ainsi, les différentes activités réalisées au sein de ces locaux sont clairement délimitées et séparées les unes des autres⁽⁵⁸⁾.

Les BPF énoncent que les laboratoires de contrôle doivent être conçus en vue de leur usage. Ils doivent donc être suffisamment spacieux pour permettre d'éviter les confusions et les contaminations croisées. Par ailleurs, une zone de stockage convenable doit être prévue pour les échantillons et les dossiers⁽¹⁶⁾.

Comme les locaux de préparation, ceux de contrôle doivent être dotés de murs, plafonds, sols et paillasse en matériaux appropriés à leurs fonctions et résistants, faciles à nettoyer et à désinfecter⁽⁵⁸⁾. Les surfaces en contact avec les produits ne doivent donc pas réagir avec ceux-ci, ni les absorber, ni libérer d'impuretés⁽⁵⁸⁾. De plus, une zone ou un local de nettoyage et de désinfection, adapté à l'activité, doit être installé à proximité immédiate des locaux de contrôle⁽⁵⁸⁾.

Des locaux distincts peuvent s'avérer nécessaires pour protéger des appareils sensibles des vibrations, des interférences électriques ou de l'humidité par exemple⁽¹⁶⁾.

3.4. Les moyens humains et matériels disponibles à la PUI de l'HEH

La PUI de l'HEH est composée d'un ensemble d'unités fonctionnelles (UF) regroupant différents secteurs. Chaque secteur qui va être détaillé ci-après est indispensable dans la conduite d'un essai clinique.

✓ UF « Essais cliniques » :

Ce secteur est chargé de la dispensation des unités de traitements, selon les besoins, dans les centres investigateurs. Il est responsable du conditionnement unitaire et de l'étiquetage des produits. Il assure également la gestion et la dispensation des traitements.

À la PUI de l'HEH, le secteur « Essais cliniques » comprend des pharmaciens, un interne en pharmacie ainsi qu'un préparateur.

✓ **UF « Préparation et contrôle de médicaments » :**

Dans cette UF de la PUI de l'HEH, le secteur Pharmacotechnie et Galénique compte des pharmaciens, un interne, des préparateurs et des ouvriers professionnels. Le secteur contrôle comprend un interne en pharmacie et des techniciens de laboratoire.

- **Le secteur « Pharmacotechnie » :**

Ce secteur réalise la préparation des solutions injectables.

- **Le secteur « Galénique » :**

Le rôle de ce secteur est la fabrication de toutes les préparations non stériles et toutes les préparations stériles mais non injectables. En effet, il réalise principalement la préparation des gélules, des collyres, des crèmes, des pommades, des gels et des suppositoires.

Les formes les plus fréquemment rencontrées restent tout de même les gélules, qui sont fabriquées dans le laboratoire de galénique.

Ce secteur est bien évidemment sollicité dans le cadre de cet essai clinique.

- **Le secteur « Laboratoire de contrôle » :**

Ce secteur réalise les analyses physico-chimiques et microbiologiques des MPUP et des préparations pharmaceutiques.

Le « Laboratoire de contrôle » regroupe précisément deux locaux. Le premier est le lieu dans lequel sont réalisés tous les contrôles physico-chimiques. Et le second correspond à la salle des contrôles microbiologiques (essais de stérilité et dosage des endotoxines bactériennes).

Au sein de la PUI de l'HEH, le laboratoire analyse également les eaux pharmaceutiques et les eaux d'hémodialyse.

Il faut préciser que toutes les analyses sont effectuées conformément aux monographies de la Pharmacopée européenne (PE) et aux monographies des MPUP.

4. Conclusion

Au vu des données cliniques versées dans le protocole, nous avons estimé que l'intérêt pharmacothérapeutique de ce nouvel essai clinique portant sur le lévétiracétam était justifié.

Concernant la préparation, le contrôle, la gestion et la dispensation des ME, la PUI dispose des moyens matériels et humains requis selon les BPP. Par ailleurs, la PUI dispose d'une autorisation des autorités pour la réalisation des préparations pharmaceutiques, y compris les ME.

Ainsi, tous les critères étaient réunis pour que la PUI de l'HEH réponde favorablement à la faisabilité des ME. La PUI va donc assurer le développement pharmaceutique des ME destinés à cet essai clinique, de même que leur gestion, et leur dispensation aux PUI des centres concernés par l'étude.

***PARTIE 3 : DÉVELOPPEMENT PHARMACEUTIQUE ET
ÉTUDE DE STABILITÉ***

1. Formulation des médicaments expérimentaux

Les étapes préalables à toute formulation, dans un ordre chronologique, sont :

- effectuer une revue bibliographique sur la formulation et la stabilité du produit fini ;
- s'approvisionner en matières premières (MP) de grade pharmaceutique ;
- s'approvisionner en articles de conditionnement de qualité pharmaceutique ;
- effectuer des essais de mise sous forme pharmaceutique ;
- réaliser la mise en place du contrôle qualité ;
- conduire une étude de stabilité.

Pour une question de présentation, cette démarche ne sera pas tout à fait appliquée dans les parties qui vont suivre mais les étapes resteront les mêmes.

1.1. Approvisionnement en matières premières et en articles de conditionnement

La réalisation de préparations pharmaceutiques nécessite l'utilisation de MPUP et d'articles de conditionnement de qualité pharmaceutique.

Conformément aux BPP, une MPUP se définit comme « tout composant utilisé dans la réalisation d'une préparation (substances actives, excipients, éléments de mise en forme pharmaceutique destinés à être utilisés chez l'homme ou à lui être administrés) »⁽¹⁵⁾.

Les **articles de conditionnement**, quant à eux, se définissent comme « tout élément utilisé lors du conditionnement d'une préparation, à l'exclusion de l'emballage destiné au transport. Les articles de conditionnement sont appelés primaires ou extérieurs selon qu'ils sont respectivement destinés ou non à être en contact direct avec la préparation »⁽¹⁵⁾.

Conformément à l'article L5138-1 du CSP, « toute activité de fabrication, d'importation ou de distribution de MPUP est soumise à une déclaration effectuée par l'établissement dans lequel s'exerce cette activité, auprès de l'ANSM »⁽⁵⁹⁾.

Les BPP⁽¹⁵⁾ décrivent donc les **fournisseurs de MPUP** vers lesquels il faut s'approvisionner, par ordre de priorité:

1°) « Matières premières entrant dans la composition d'une spécialité pharmaceutique autorisée, fournies par l'établissement pharmaceutique de fabrication autorisé et étant du même fournisseur et de la même qualité que celle de ladite spécialité » ;

2°) « Matières premières fabriquées en France ou dans l'Union européenne et provenant d'établissements ayant des activités de fabrication (complète ou partielle ou réalisant divers procédés de division ou de conditionnement) ou de distribution (ayant des activités de reconditionnement et de réétiquetage) de MPUP, déclarés auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé ou bien déclarés ou autorisés auprès des autorités compétentes des pays de l'Union européenne et détenteurs d'un certificat de Bonnes Pratiques délivré par l'Afssaps ou par les autorités compétentes des pays de l'Union européenne » ;

3°) « Matières premières provenant d'autres établissements pharmaceutiques autorisés ou provenant de distributeurs (n'ayant pas d'activité de reconditionnement ou de réétiquetage) ou d'importateurs de MPUP déclarés auprès de l'Afssaps ou bien déclarés ou autorisés auprès des autorités compétentes dans les pays de l'Union européenne » ;

4°) « Lorsque la matière première en vrac n'est pas disponible et sous réserve d'une étude de faisabilité le pharmacien peut utiliser en tant que matières premières des spécialités pharmaceutiques ».

Le pharmacien, responsable de la mise sous forme pharmaceutique, doit veiller à ce que son fournisseur dispose d'un système d'assurance de la qualité permettant de garantir la reproductibilité et l'homogénéité de la qualité, et la traçabilité des lots qui lui sont livrés⁽¹⁵⁾. Ceci peut, par exemple, être attesté par la présentation du certificat de conformité aux Bonnes Pratiques, délivré par l'ANSM ou par les autorités compétentes des pays de l'UE.

Il est possible de définir **trois types de MP**, selon les BPP⁽¹⁵⁾ :

- Les MP décrites à la Pharmacopée : la conformité à la monographie doit être démontrée. La conformité à la monographie de la pharmacopée suppose que la monographie soit adaptée au contrôle de la matière première, en fonction du mode de préparation. Les CEP, disponibles chez le fournisseur, sont réputés démontrer la

capacité des méthodes de la monographie à contrôler efficacement la matière première objet du certificat.

- Les MP qui ne sont pas décrites à la Pharmacopée : elles ne peuvent être utilisées qu'en cas d'impossibilité d'approvisionnement par les différents fournisseurs précédemment cités et elles doivent avoir fait l'objet d'une expertise physico-chimique et toxicologique adaptée.
- Les MP à usage alimentaire : elles sont utilisables en dernier recours pour les préparations qui ne sont ni parentérale ni stérile ni pour inhalation. Leurs conditions d'approvisionnement et de contrôle doivent cependant être conformes aux BPP.

En ce qui concerne les **articles de conditionnement**, leur approvisionnement doit faire l'objet de la même attention que celle apportée aux matières premières, qu'il s'agisse de conditionnement primaire ou extérieur⁽¹⁵⁾.

Afin de choisir des articles de conditionnement de qualité satisfaisante, il faut s'assurer que toute ouverture inopportune ou altération du conditionnement des préparations terminées soit facilement décelable⁽¹⁵⁾. De plus, le pharmacien doit effectuer une vérification de la conformité des articles de conditionnement aux monographies de la Pharmacopée européenne, quand elles existent, et aux spécifications requises⁽¹⁵⁾.

1.2. Formulation de la solution injectable

Le secteur « Pharmacotechnie » est impliqué dans la réalisation de l'une des préparations, à savoir la réalisation de la solution injectable de lévétiracétam et de son *placebo*.

a) Recueil des données bibliographiques pour la forme injectable :

❖ La formule :

Le lévétiracétam est commercialisé en solution dosée à 100 mg/mL pour la voie intraveineuse ou parentérale⁽⁶⁰⁾. Cette solution à perfuser est composée des excipients détaillés dans le tableau ci-après.

Tableau 3. Excipients de la formule commercialisée du Keppra® solution injectable⁽⁶⁰⁾

Excipients	Quantité ⁽⁶¹⁾	Fonction(s) ⁽⁶²⁾
Acétate de sodium	1,64 mg/mL	Préservateur antimicrobien, agent tampon, agent stabilisant
Acide acétique glacial	qsp* pH 5,0 - 6,0	Agent acidifiant
Chlorure de sodium	9 mg/mL	Agent isotonisant
Eau PPI	qsp 1 mL	Solvant

*qsp : quantité suffisante pour

Parmi les génériques⁽⁶³⁾, un excipient supplémentaire, l'hydroxyde de sodium, a parfois été ajouté pour ajuster le pH à 5,5.

Le seul excipient à effet notoire⁽⁶⁴⁾ (EEN) présent dans la formulation du Keppra® est le sodium apporté par le chlorure de sodium et par l'acétate de sodium.

❖ Le procédé de fabrication :

Pour justifier le choix du mode de préparation de la solution injectable, un rapport de l'Agence européenne du médicament (EMA)⁽⁶⁵⁾ précise que le procédé de fabrication utilisé est la stérilisation terminale à l'autoclave du produit fini.

❖ Le conditionnement :

La spécialité pharmaceutique commercialisée⁽⁶⁰⁾ est conditionnée en flacons en verre de type I de 5 mL, avec un bouchon en téflon. Les flacons sont ensuite scellés par une capsule Aluminium/Polypropylène.

Par ailleurs, la monographie de certains médicaments génériques précise que le bouchon présente un revêtement en bromobutyl gris⁽⁶¹⁾ avec un diamètre de 20 mm⁽⁶⁶⁾.

Par contre, dans la monographie d'un autre médicament générique⁽⁶³⁾, il est mentionné que ce dernier n'est pas conditionné en flacons mais en ampoules de 5 mL.

Enfin, les données bibliographiques précisent que le conditionnement secondaire de ces flacons ou ampoules est un carton⁽⁶⁰⁾.

❖ **Les données de stabilité et de conservation :**

La monographie de la spécialité commercialisée⁽⁶⁰⁾ fixe une durée de conservation de 2 ans à température ambiante.

De plus, la monographie d'un des médicaments génériques⁽⁶¹⁾ précise que la stabilité physico-chimique de la solution diluée dans les solutions de perfusion a été démontrée pendant 24 heures à 25°C. Cependant, d'un point de vue microbiologique, il est recommandé d'utiliser le produit immédiatement après dilution.

Le rapport de l'EMA⁽⁶⁵⁾ fait part d'une étude de stabilité réalisée sur le produit à différentes températures et selon différentes conditions d'humidité (25°C/60% HR (Humidité Relative) ; 30°C/65% HR ; 40°C/75% HR) pendant respectivement 9 mois, 12 mois et 6 mois, à la fois en position verticale et retournée. Les résultats n'ont montré aucune différence significative par rapport aux spécifications ni aucune dégradation du produit. Par ailleurs, des études de photostabilité n'ont révélé aucune sensibilité à la lumière ou à la température à la suite de cycle de congélation-décongélation.

b) Les adaptations effectuées pour le ME :

La mise sous forme pharmaceutique de la solution injectable de lévétiracétam destinée à l'essai clinique a nécessité quelques adaptations par rapport à la spécialité commercialisée. Ces adaptations ont porté sur la formule, le procédé de fabrication, le conditionnement, l'étiquetage ou encore le mode de conservation.

❖ **Pour la forme injectable de lévétiracétam - solution à 100 mg/mL :**

○ **Adaptation de la formule :**

La formule retenue pour un volume de 1 mL est la suivante :

Lévétiracétam.....100 mg/mL
Acétate de sodium.....1,64 mg/mL
Chlorure de sodium 0,9 %.....qsp 1mL
Acide acétique glacial.....qsp pH 5,0 - 6,0

Les BPP⁽¹⁵⁾ recommandent dans le cas de préparations injectables - nutrition parentérale, médicaments cytotoxiques -, et chaque fois que l'étude de faisabilité le permet, de réaliser les préparations à partir des spécialités pharmaceutiques présentées sous formes injectables telles que des solutions, des lyophilisats ou encore des poudres.

Dans le cas de cet essai clinique, nous avons choisi de fabriquer entièrement la préparation injectable à partir des MPUP, et non de reconditionner simplement la spécialité. En effet, ce choix facilite la mise en œuvre du double-aveugle pour cet essai clinique. Nous pouvons ainsi aisément avoir le même conditionnement, le même étiquetage, le même volume de remplissage et le même aspect macroscopique de la solution entre le *verum* et le *placebo*.

Néanmoins, pour être au plus proche des recommandations des BPP, la formule que nous avons choisie est celle de la spécialité pharmaceutique Kepra[®].

○ **Adaptation du procédé de fabrication :**

Le procédé de préparation choisi est la stérilisation terminale des flacons avec un plateau de stérilisation à 121°C pendant 20 minutes. Selon les BPP⁽¹⁵⁾, cette méthode est en effet la méthode de choix pour stériliser une préparation injectable.

Le procédé de fabrication de cette solution injectable de lévétiracétam à 100 mg/mL est détaillé en Annexe II. La taille de lot maximale est limitée à 300 unités selon les BPP⁽¹⁵⁾.

○ **Adaptation du conditionnement primaire et de l'étiquetage:**

Nous avons conditionné la solution de lévétiracétam pour l'essai clinique en flacons en verre blanc de type II de 15 mL remplis à 5 mL (cf. Figure 4). Ces flacons sont bouchés par des bouchons rouges en chlorobutyl et scellés par une capsule en aluminium. Le bouchon et la capsule sont d'un diamètre de 20 mm.



Figure 4. Flacons de solution injectable de lévétiracétam à 100 mg/mL

Nous avons choisi le conditionnement en fonction du conditionnement de la spécialité et des articles de conditionnements disponibles à la PUI de l'HEH. Par ailleurs, il doit répondre aux exigences de la Pharmacopée.

Nous n'avons pas choisi les ampoules car elles présentent un risque trop important lors de la manipulation par le personnel soignant, avec notamment le risque de retrouver des morceaux de verre dans l'ampoule lors de la cassure du col. Qui plus est, le contrôle d'ampoules nécessite obligatoirement le test d'étanchéité qui n'est à ce jour pas validé à la PUI de l'HEH.

Conformément aux BPF⁽¹⁶⁾, l'étiquetage doit garantir la protection de la personne qui se prête à la recherche et doit garantir la traçabilité du produit. De plus, il doit permettre l'identification du produit et de la recherche, et faciliter l'usage adéquat du ME. L'étiquetage que nous avons retenu pour la solution injectable est donc le suivant.

Pharmacie - Hôpital E. Herriot 69437 Lyon cedex 03
Etude: XXX (Dr XXX)
Promoteur: Hospices Civils de Lyon, 3 quai des Célestins, 69229 Lyon Cedex 02
LEVETIRACETAM / PLACEBO
500 mg – 5 ml
(100 mg/ml)
Solution pour perfusion à diluer – Voie IV
PATIENT n ° : [][][][] Initiales : ... / ...
N° de lot: AAMMJJ (<i>verum</i>)-AAMMJJ (<i>placebo</i>) DLU: 1 an
Conservation entre 15°C et 25°C
Médicament pour essai clinique – à utiliser selon le protocole de l'étude
Ne pas laisser à la portée des enfants

Figure 5. Etiquette des flacons de solution injectable de lévétiracétam/ placebo 100 mg/mL

Cette étiquette comporte bien les informations obligatoires, à savoir⁽¹⁶⁾ :

- le nom du promoteur ;
- la forme pharmaceutique, la voie d'administration, le nombre d'unités de prise ainsi que l'identification du produit et son dosage ;
- le numéro de lot et de code permettant d'identifier le contenu et l'opération de conditionnement ;
- le code de référence de la recherche biomédicale permettant d'identifier la recherche ;

- le numéro d'identification de la personne qui se prête à la recherche ;
- le nom de l'investigateur ;
- une référence faite au protocole de l'étude ;
- la mention « Médicament pour essai clinique » ;
- les conditions de stockage ;
- la date limite d'utilisation (DLU).

La mention « Ne pas laisser à la portée des enfants » n'est pas obligatoire car les ME sont utilisés exclusivement à l'hôpital⁽¹⁶⁾.

○ **Adaptation du mode de conservation :**

Les données bibliographiques n'ayant révélé aucune instabilité à température ambiante, les flacons ont donc été conservés entre 15°C et 25°C.

❖ **Pour la forme injectable *placebo* :**

Pour répondre à la définition d'un médicament *placebo*, la forme injectable *placebo* doit être en tout point identique au médicament contenant le principe actif, autrement appelé *verum*, que ce soit pour l'aspect macroscopique de la solution ou pour son conditionnement.

Ainsi, la solution injectable *placebo* est composée uniquement de chlorure de sodium 0,9 % et est stérilisée avec le même procédé que la solution injectable de lévétiracétam.

L'essai clinique étant conduit en double aveugle, il ne doit y avoir aucune différence d'aspect macroscopique. C'est pourquoi le conditionnement primaire, le volume de remplissage et l'étiquetage des flacons ont été identiques entre le *placebo* et le *verum*.

Au vu des spécialités pharmaceutiques commercialisées, soit en flacons soit en poches contenant du NaCl 0,9 %, et des données bibliographiques satisfaisantes, nous avons estimé qu'une nouvelle étude de stabilité n'était pas nécessaire.

1.3. Formulation de la forme orale

Le secteur « Galénique » est responsable de la préparation des gélules de lévétiracétam et de leur *placebo*.

a) Recueil des données bibliographiques pour la forme orale :

❖ La formule :

Les spécialités pharmaceutiques sont commercialisées sous forme de comprimés pelliculés sécables, de forme oblongue, de couleur bleue⁽⁶⁷⁾, jaune⁽⁴⁵⁾ ou blanche⁽⁶⁸⁾ pour les comprimés dosés respectivement à 250 mg, 500 mg et 1000 mg. Il s'avère que ces comprimés sont composés de multiples excipients, puisque certains se retrouvent dans le noyau et d'autres dans le pelliculage du comprimé. La liste détaillée des excipients se trouve dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4. Excipients de la formule commercialisée du Keppra® comprimés ^{(45),(67),(68)}

Excipients du noyau	Fonction(s) ^{(62),(69)}	Excipients du pelliculage	Fonction(s) ^{(62),(69)}
Croscarmellose sodique	Désagrégant	Alcool polyvinylique	<ul style="list-style-type: none"> • Agent d'enrobage • Lubrifiant • Agent stabilisant • Agent augmentant la viscosité
Macrogol 6000	<ul style="list-style-type: none"> • Agent augmentant la dissolution • Agent solubilisant • Agent stabilisant 	Macrogol 3350	<ul style="list-style-type: none"> • Agent augmentant la dissolution • Agent solubilisant • Agent stabilisant
Silice colloïdale anhydre	<ul style="list-style-type: none"> • Adsorbant • Agent anti-collage • Désagrégant • Stabilisateur thermique • Agent lissant • Agent augmentant la viscosité 	Dioxyde de titane	<ul style="list-style-type: none"> • Agent d'enrobage • Opacifiant • Pigment
Stéarate de magnésium	Lubrifiant	Talc	Agent lissant
		<ul style="list-style-type: none"> • Oxyde de fer jaune (comprimés 500 mg) • Carmin indigo laque aluminique (comprimés 250 mg) 	Colorant

Par ailleurs, la monographie des différents médicaments génériques se rapproche de celle du Keppra®. Quelques excipients ne se retrouvent pas dans la formulation des génériques. Par exemple, le croscarmellose sodique est parfois remplacé par la crospovidone⁽⁷⁰⁾, et le macrogol 6000 par la polyvinylpyrrolidone⁽⁷¹⁾ – PVP ou Povidone K30 – ayant des propriétés identiques. Dans certaines formes est rajoutée de la cellulose microcristalline⁽⁷²⁾, ayant les propriétés suivantes⁽⁶⁹⁾ : adsorbant, agent de suspension, diluant, désagrégeant. Dans le noyau sont parfois retrouvés de l'amidon de maïs ou encore du talc purifié. Dans le pelliculage, le type de macrogol peut varier selon la solubilité désirée. Le colorant utilisé est, lui aussi, changeant selon les génériques, et peut être seul ou combiné à un ou deux autres colorants. Dans ce pelliculage, d'autres excipients sont rencontrés, tels l'hypermellose⁽⁷³⁾, la triacétine⁽⁷²⁾ ou bien l'hydroxypropyl cellulose⁽⁷⁴⁾, qui sont principalement des agents d'enrobage.

❖ Le procédé de fabrication :

Le procédé de fabrication appliqué pour la fabrication des comprimés⁽⁷⁵⁾ ne sera pas détaillé ici car nous n'allons pas l'utiliser dans le cadre de cet essai clinique.

❖ Le conditionnement :

Les comprimés sont de couleur variable selon les colorants utilisés, de forme oblongue et sécables. Ils sont conditionnés en plaquette(s) thermoformée(s) PVC/ Aluminium de 60 comprimés^{(45),(67),(68)}.

❖ Les données de stabilité et de conservation :

Selon les monographies de la spécialité^{(45),(67),(68)} et de la majorité des génériques, la durée de conservation des comprimés est fixée à 36 mois à température ambiante. Certains médicaments génériques n'annoncent qu'une durée de conservation de 30 mois⁽⁷²⁾, voire de 24 mois⁽⁷³⁾ à température ambiante.

Un rapport de l'EMA⁽⁷⁵⁾ mentionne des essais de stabilité effectués sur des lots de comprimés conditionnés dans leur emballage final, selon deux conditions. L'une à long terme, c'est-à-dire pendant 24 mois à 25°C et 60 % de HR ; l'autre de façon accélérée, autrement dit 6 mois à 40°C et 75 % de HR.

Les résultats de ce rapport confirment une stabilité des comprimés à la suite d'une dégradation forcée. De plus, ces essais ont montré une photostabilité des comprimés et une résistance à l'humidité lorsqu'ils sont conditionnés dans leur emballage final.

b) Les adaptations effectuées pour le ME :

La mise sous forme pharmaceutique de la forme orale de lévétiracétam destinée à l'essai clinique a nécessité quelques adaptations par rapport à la spécialité commercialisée. Ces adaptations ont porté sur la formule, le procédé de fabrication, le conditionnement, l'étiquetage ou encore le mode de conservation.

❖ Pour la forme orale - gélules de lévétiracétam dosées à 500 mg et 250 mg :

La forme orale destinée à l'essai clinique devait se présenter sous deux dosages différents. En effet, nous devons formuler des gélules dosées à 500 mg pour obtenir l'effet pharmacothérapeutique, et des gélules dosées à 250 mg pour la phase de décroissance du traitement.

○ **Adaptation de la formule :**

La formule définie pour une gélule dosée à 500 mg est la suivante :

Lévétiracétam.....500 mg
Lactose monohydraté.....66 mg
Carmin de cochenille.....Pointe

Les gélules dosées à 250 mg sont formulées ainsi :

Lévétiracétam.....250 mg
Lactose monohydraté.....51 mg
Carmin de cochenille.....Pointe

La PUI disposant des moyens humains et matériels pour la réalisation de gélules, cette forme a donc été choisie. Nous avons de suite éliminé la forme comprimé car la PUI de l'HEH ne dispose pas de l'équipement approprié pour la fabrication de cette forme

pharmaceutique. De plus, les données de la littérature précisent que l'enrobage du comprimé ne sert qu'à masquer le goût et ne joue aucun rôle dans le traitement⁽⁷⁶⁾.

Par ailleurs, nous avons choisi la forme gélule car elle présente de nombreux avantages⁽⁷⁷⁾. En effet, la formulation et les contrôles sont beaucoup plus simples car ils ne font intervenir qu'un excipient permettant de diluer le principe actif et ainsi de remplir la gélule. De plus, la formulation se fait toujours à sec et le principe actif est libéré plus rapidement au niveau de l'estomac.

Après avoir choisi la forme gélule, nous avons alors réfléchi à une autre formule qui soit adaptée à la réalisation de gélules. Seul un excipient diluant était nécessaire en plus du lévétiracétam. Les diluants relevés dans les comprimés de la spécialité ou des génériques sont :

- l'amidon de maïs
- la cellulose microcristalline
- le stéarate de magnésium
- le talc purifié.

Selon le protocole de l'essai clinique, les gélules doivent pouvoir être administrées par sonde nasogastrique en cas de problème de déglutition chez le patient. Le contenu de ces gélules doit donc être dissout dans l'eau⁽⁷⁸⁾. Or, l'amidon de maïs est insoluble dans l'eau sauf à une très haute température, de l'ordre de 100°C⁽⁷⁹⁾. La cellulose microcristalline est quant à elle pratiquement insoluble dans l'eau⁽⁸⁰⁾, de même que le stéarate de magnésium⁽⁸¹⁾ et le talc purifié⁽⁸²⁾. Nous n'avons donc pas retenu ces trois excipients pour la formulation.

Nous avons alors fait des recherches plus approfondies afin de trouver un autre excipient qui puisse être utilisé dans la formulation de gélules. L'excipient le plus adapté pour l'administration par sonde nasogastrique était le lactose monohydraté grâce à sa solubilité⁽⁸³⁾, mais aussi pour sa compatibilité avec le lévétiracétam. En effet, le lactose monohydraté fait partie des excipients rapportés dans un brevet⁽⁸⁴⁾, en association avec le lévétiracétam. Il faut cependant noter que cet excipient est un EEN pour les personnes intolérantes au galactose ou présentant une galactosémie ou encore un syndrome de malabsorption du glucose et du galactose⁽⁶⁴⁾. La dose seuil de lactose est fixée à 5 g par jour⁽⁶⁴⁾.

Malgré sa classification parmi les EEN, nous avons retenu le lactose monohydraté pour formuler les gélules car cet excipient est très bien adapté au mélange et au remplissage des gélules. Cependant, nous avons fait des recherches dans la littérature pour savoir si des données étaient disponibles concernant la compatibilité du lactose et du lévétiracétam. Le lactose est connu pour provoquer des réactions de Maillard lorsqu'il est en contact avec une amine⁽⁸⁵⁾. Cependant, un article précise que le lactose réagit avec les composés possédant une amine primaire ou secondaire⁽⁸⁶⁾. Or, le lévétiracétam possède dans sa structure une amine tertiaire et une fonction amide dont la réactivité est totalement différente de celle des amines. En conclusion, le lévétiracétam a très peu de chances d'interagir avec le lactose. De plus, il est précisé dans ce même article que le lactose sous forme amorphe rend les interactions ayant besoin d'humidité plus favorables, car le lactose amorphe est hygroscopique. C'est pourquoi nous avons choisi le lactose monohydraté afin de minimiser ce type d'interaction.

La formulation quantitative des gélules a été définie par volumétrie à partir de la taille de la gélule souhaitée. Les gélules vides commercialisées correspondent à un volume précis de poudre, qui est détaillé dans le tableau ci-dessous.

Tableau 5. Taille des gélules vides selon leur volume de remplissage⁽⁸⁷⁾

Taille des gélules	Volume de remplissage
000	1,37 mL
00	0,91 mL
0	0,68 mL
1	0,50 mL
2	0,37 mL
3	0,30 mL
4	0,21 mL
5	0,13 mL

○ **Adaptation du procédé de fabrication :**

Le mode de préparation est le remplissage semi-automatique avec écoulement et arasage de poudre. Ce procédé est retrouvé de façon détaillé en Annexe III.

Sachant que les gélules sont fabriquées par petites séries pour l'essai clinique, seulement 300 gélules par lot peuvent être réalisées⁽¹⁵⁾.

○ **Adaptation du conditionnement primaire et de l'étiquetage :**

Nous avons choisi le conditionnement de façon à ce qu'il contienne la totalité de la poudre de principe actif mais ne contienne pas une quantité trop importante de lactose, sachant qu'il s'agit d'un EEN.

Suite aux essais réalisés selon la méthode précédemment décrite, nous avons choisi la taille 00 pour les gélules à 500 mg et la taille 1 pour les gélules à 250 mg. De plus, afin qu'il n'y ait pas de confusion entre les deux dosages, nous les avons différenciés par leur couleur. Les gélules dosées à 500 mg sont de couleur ivoire et celles dosées à 250 mg de couleur bleue et blanche.

Ces gélules sont conservées dans des piluliers inviolables opaques en polyéthylène haute densité. Cette modalité de conservation est également proposée dans le rapport de l'EMA⁽⁷⁵⁾, qui précise que le polyéthylène n'influence pas la stabilité de la forme orale de lévétiracétam.



Figure 6. Gélules de lévétiracétam dosées à 500 mg (à gauche) et à 250 mg (à droite) avec leur conditionnement en polyéthylène

Tout comme la solution injectable, l'étiquetage de la forme orale doit garantir la protection de la personne qui se prête à la recherche ainsi que la traçabilité du produit⁽¹⁶⁾. Il doit également permettre l'identification du produit et de la recherche, et faciliter l'usage adéquat du ME.

2. Contrôle qualité des médicaments

Le contrôle des préparations pharmaceutiques est une activité exigée par les Bonnes Pratiques qui s'inscrit dans le système de gestion de la qualité⁽¹⁵⁾. En effet, il garantit que les analyses nécessaires et appropriées ont été effectuées, et que les préparations seront libérées seulement lorsque leur qualité aura été jugée conforme aux exigences réglementaires.

Afin de réaliser au mieux les opérations de contrôle, des procédures écrites et validées, décrivant précisément les opérations à effectuer, doivent être mises à disposition du personnel⁽¹⁵⁾.

Par ailleurs, toutes les méthodes d'analyses utilisées pour contrôler les médicaments ou les matières premières doivent être validées. De même, tous les résultats doivent être datés, signés et conservés dans le dossier de lot de la préparation⁽¹⁵⁾, après avoir rigoureusement vérifié tous les calculs.

Selon les BPP⁽¹⁵⁾, les enregistrements des analyses doivent comprendre au moins les données suivantes :

- le nom du produit, son dosage ;
- le numéro de lot et le nom du fournisseur ;
- les références aux spécifications correspondantes et aux procédures écrites de contrôle ;
- les références des réactifs utilisés ;
- les résultats datés et signés des analyses, y compris les observations et les calculs, ainsi que les références à tout certificat d'analyse externe ;
- les dates des contrôles ;
- l'identification des opérateurs ;
- une décision d'acceptation ou de refus datée et signée.

Chaque contrôle effectué doit faire l'objet d'un rapport daté et signé⁽¹⁵⁾, tel que :

- des contrôles physico-chimiques pour les MP et pour les préparations terminées ;
- des contrôles microbiologiques mentionnés par la Pharmacopée pour les formes stériles et lorsque cela est nécessaire ;
- des contrôles mentionnés dans les monographies de la Pharmacopée pour les MP ;

- des contrôles galéniques mentionnés par la Pharmacopée pour les différentes formes pharmaceutiques des préparations terminées ;
- tout autre contrôle possible rendu nécessaire par le caractère de la préparation terminée, notamment la teneur en substance(s) active(s) ;
- le contrôle du conditionnement et de l'étiquetage de la préparation terminée.

2.1. Contrôle des matières premières

À réception de chaque lot de MP et avant tout contrôle analytique, l'intégrité des emballages ou des récipients doit être contrôlée, de même que leur fermeture⁽¹⁶⁾. De plus, la correspondance entre le bon de livraison et l'étiquette du fournisseur doit être vérifiée.

Une fois ces premiers contrôles effectués, un échantillon est prélevé pour subir des contrôles physico-chimiques et/ou microbiologiques. Quand plusieurs lots du même produit sont réceptionnés, chaque lot doit faire l'objet d'un échantillonnage et d'un contrôle qualité⁽¹⁶⁾. Pour chaque lot de MP réceptionné, au moins un test d'identification doit être réalisé⁽¹⁶⁾. Les différents lots étant livrés avec un certificat d'analyse, celui-ci peut être utilisé en remplacement des autres contrôles à effectuer à condition que le fabricant dispose d'un certificat BPF.

Pour les substances actives en particulier, les spécifications définies doivent être conformes aux standards acceptés et être cohérentes avec le procédé de fabrication⁽¹⁶⁾. Elles doivent notamment inclure un contrôle des impuretés. Par ailleurs, si la substance active est dotée d'une pureté microbiologique, un contrôle des germes totaux et des germes indésirables doit être effectué. De même, si la substance active possède une spécification pour les endotoxines, celles-ci doivent être contrôlées.

Pour chaque MP, la première étape consiste à vérifier la conformité du bulletin d'analyse au regard des BPP.

❖ Contrôles du lévétiracétam :

Chaque lot de MP est livré avec un bulletin d'analyse rédigé selon les BPP et conforme aux contrôles physico-chimiques décrits dans la Pharmacopée européenne⁽⁵²⁾.

Une identification par spectrométrie infrarouge et un essai des endotoxines bactériennes sont également réalisés.

Par ailleurs, une vérification des caractères organoleptiques et de la solubilité dans l'eau, dans l'acétonitrile et dans l'hexane est réalisée.

❖ **Contrôles de l'acétate de sodium trihydraté et de l'acide acétique glacial :**

En plus de la conformité du bulletin d'analyse, un dosage des endotoxines bactériennes est réalisé pour l'acétate de sodium.

❖ **Contrôles du chlorure de sodium 0.9 % :**

La solution de chlorure de sodium ne fait l'objet d'aucun contrôle physico-chimique ou microbiologique car il s'agit d'une spécialité pharmaceutique commercialisée par le laboratoire CHAIX et DU MARAIS.

❖ **Contrôles du lactose monohydraté et du carmin de cochenille :**

Une vérification des caractères organoleptiques et une identification par spectrométrie infrarouge sont effectuées à réception.

2.2. Contrôle qualité des produits finis

Le contrôle des préparations terminées est obligatoire selon la législation pharmaceutique⁽¹⁶⁾. Chaque lot doit donc être conforme aux spécifications du produit pour garantir une qualité satisfaisante.

a) Contrôles de routine réalisés sur les solutions injectables de lévétiracétam et de placebo :

Le contrôle qualité, obligatoire d'un point de vue réglementaire, porte sur des analyses physico-chimiques et microbiologiques⁽⁸⁸⁾, à savoir :

- La **détermination de la teneur** : nous avons mis au point le dosage du lévétiracétam par HPLC ou CLHP (High-Performance Liquid Chromatography)

ou Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance) dans le cadre de cet essai clinique.

La solution injectable de lévétiracétam doit théoriquement contenir 500 mg/5mL soit 100 mg/mL en substance active.

- **Le comptage des particules non visibles** : il est réalisé à l'aide d'un compteur optique automatique, selon la Pharmacopée européenne 7^{ème} édition 2013. Le nombre de particules $\geq 10 \mu\text{m}$ doit être $\leq 1200/\text{mL}$; et le nombre de particules $\geq 25 \mu\text{m}$ doit être $\leq 120/\text{mL}$.

- **Le dosage des endotoxines bactériennes** :

Les endotoxines sont des toxines de nature lipopolysaccharidique (LPS) et thermostables⁽⁸⁹⁾. Elles sont situées dans la membrane externe de certaines bactéries Gram négatif, et sont capables de provoquer un choc toxique entraînant la mort dans 50 % des cas. Ce choc toxique n'a lieu qu'en présence de fortes doses d'endotoxines. C'est pour cela qu'il est fixé un seuil acceptable, appelé CMTE (Concentration Maximale Tolérée en Endotoxines) selon les recommandations de la Pharmacopée européenne 7^{ème} édition 2013. Pour ces préparations injectables de lévétiracétam, le seuil a été fixé à 0,5 UI/mL.

Le laboratoire de contrôle de la pharmacie de l'HEH utilise la méthode colorimétrique cinétique qui nécessite un lecteur de microplaque (cf. Figure 8).

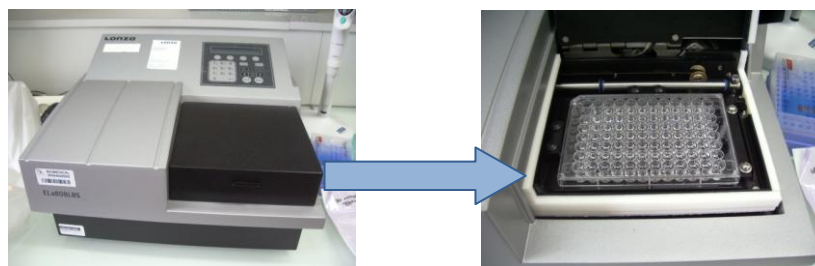


Figure 8. Lecteur de microplaque pour le dosage des endotoxines bactériennes

Cette technique, appelée « Méthode D » dans la Pharmacopée européenne, consiste à « mesurer la quantité de chromophore libéré par un peptide chromogène approprié lors de la réaction des endotoxines avec le lysat »⁽⁹⁰⁾.

Cette méthode s'applique en effectuant des dilutions en cascade de l'échantillon, déposé sur une microplaque, pour obtenir une gamme. Une surcharge est également appliquée dans certains puits, afin d'avoir un témoin de mesure.

« La colorimétrie cinétique (méthode D) mesure le temps requis pour atteindre une absorbance prédéfinie dans le mélange réactif, ou bien la vitesse de développement de la coloration. L'essai est effectué à la température d'incubation recommandée par le fabricant du lysat (généralement $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) »⁽⁹⁰⁾.

- L'**essai de stérilité** : il est réalisé sous hotte à flux laminaire horizontal (Classe A) par la technique de filtration sur membrane à l'aide d'une pompe. Les échantillons prélevés pour cet essai doivent être représentatifs de l'ensemble du lot⁽¹⁶⁾.

En ce qui concerne la manipulation, l'échantillon est filtré à travers une membrane puis placé secondairement dans deux milieux de culture différents, à savoir un milieu composé de thioglycolate et de résazurine liquides révélant la présence de bactéries aérobies ou anaérobies, et un milieu composé d'hydrolysate de caséine et de soja mettant en évidence des bactéries aérobies et des champignons. Les deux milieux sont incubés pendant 14 jours ; le premier milieu à 30-35°C, donc dans une étuve, et le second à 20-25°C. La vérification macroscopique d'une possible croissance microbienne est effectuée à 24 heures, à 48 heures, à 7 jours et à 14 jours.

- La **mesure de l'osmolalité** : l'osmolalité est le nombre de moles de particules osmotiquement actives présentes en solution, rapporté au kg d'eau⁽⁹¹⁾. Elle est mesurée par un osmomètre dont le principe est basé sur l'abaissement du point de congélation. L'osmomètre disponible à la PUI de l'HEH est capable de mesurer des osmolalités allant de 0 à 4000 mOsm/kg.

La solution injectable de lévétiracétam doit, en théorie, avoir une osmolalité de 968 mOsm/kg $\pm 10 \%$.

La solution injectable de *placebo* doit théoriquement avoir une osmolalité de 290 mOsm/kg $\pm 10 \%$.

- La **mesure du sodium** : cette mesure est réalisée à l'aide d'un photomètre de flamme à émission, dont le principe est le suivant : une partie des ions présents en solution passent dans un état excité sous l'effet de la flamme. Le retour à l'état fondamental se fait par une émission caractéristique de l'ion en présence. L'intensité de l'émission est alors proportionnelle au nombre d'atomes

retournés à leur état fondamental. Ainsi, la lumière émise est proportionnelle à la concentration de l'échantillon⁽⁹²⁾. Cette concentration nous est donnée automatiquement par l'appareil en mmol/L.

Dans le cas de la solution injectable de lévétiracétam, cette valeur doit théoriquement être de 166,1 mmol/L \pm 10 %.

Pour la solution injectable de *placebo*, la concentration en sodium doit, en théorie, être de 154 mmol/L \pm 10 %.

- La **mesure du pH** : cette mesure est effectuée grâce à un appareil multiparamétrique pouvant être utilisé comme pH-mètre. Il est calibré avant chaque mesure avec des solutions tampons de pH 4, de pH 7 et de pH 10. La mesure est réalisée simplement en plongeant la sonde dans la solution, puis la lecture du pH est faite sur l'écran de l'appareil.

Pour le produit fini injectable de lévétiracétam, le pH doit être compris entre 5,0 et 6,0 conformément aux spécifications du RCP du lévétiracétam⁽⁶⁰⁾.

En ce qui concerne la solution injectable de placebo, les valeurs limites du pH sont fixées à 4,5 et 7,0 conformément aux spécifications du RCP du chlorure de sodium 0,9 %⁽⁹³⁾.

Pour la solution injectable de *placebo*, tous les contrôles cités précédemment sont réalisés, mis à part le dosage du lévétiracétam.

La taille de l'échantillon pour chaque analyse est en cohérence avec la Pharmacopée européenne 7^{ème} édition 2013.

b) Contrôles de routine réalisés sur les gélules de lévétiracétam et de placebo :

Comme pour les préparations injectables, les contrôles des gélules se basent d'une part, sur les contrôles exigés par la Pharmacopée européenne et d'autre part, sur les contrôles effectués en interne.

- **L'uniformité de masse :**

Conformément à la Pharmacopée européenne⁽⁹⁴⁾, l'uniformité de masse doit être vérifiée sur 20 gélules. La masse de 5 gélules vides est relevée puis chaque gélule est pesée

séparément. Toutes ces valeurs sont ensuite répertoriées dans un fichier informatique qui calcule automatiquement le pourcentage d'erreur, ainsi que le nombre de gélules dont la masse varie de 7,5 % et celles dont la masse varie de 15 % par rapport à la valeur théorique.

Les normes applicables pour les gélules de lévétiracétam dosées à 250 mg et à 500 mg sont détaillées dans le Tableau 6.

Tableau 6. Normes applicables pour l'uniformité de masse⁽⁹⁴⁾

Critères	Normes
% erreur	≤ 7,5 %
M ± 7,5 %	≤ 2
M ± 15 %	0

- La **détermination de la teneur** : le dosage du lévétiracétam est également effectué par HPLC, avec la même méthode de dosage que celle utilisée pour la solution injectable. Chacune des gélules doit théoriquement contenir 250 mg ou 500 mg de principe actif, selon le dosage souhaité.
- L'**aspect macroscopique de la gélule** : il s'agit de contrôler la couleur et l'aspect visuel de la gélule.
- L'**identification du lactose** : elle consiste à dissoudre 0,25 mg de poudre dans 5 mL d'eau R, puis d'ajouter 5 mL d'ammoniac R, et enfin de laisser chauffer dans un bain-marie à 80°C pendant 10 minutes⁽⁵²⁾. La présence de lactose monohydraté est attestée par un changement de couleur de la poudre vers le rouge.

Cette identification permet de contrôler la présence du lactose dans les gélules.

3. Développement d'une méthode d'analyse par HPLC

La molécule de lévétiracétam contient dans sa structure une fonction amine aliphatique. De ce fait, elle ne possède pas un groupement chromophore permettant son dosage par spectrophotométrie ultra-violet (UV).

Une méthode de dosage par HPLC, indicatrice de stabilité⁽⁹⁵⁾ du lévétiracétam, était alors nécessaire pour conduire l'étude de stabilité. En effet, il fallait une méthode qualitative et quantitative capable de mettre en évidence les produits de dégradation et les impuretés provenant du lévétiracétam. De plus, cette nouvelle technique devait être capable de déterminer la teneur en lévétiracétam dans les produits finis.

3.1. Théorie sur l'HPLC

❖ Description de la technique :

L'HPLC est une technique séparative permettant soit simplement de séparer, soit de purifier un ou plusieurs composés d'un mélange complexe⁽⁹⁶⁾. Ainsi, les composés peuvent être identifiés et quantifiés.

Il existe deux types d'HPLC ; la première est la technique classique dite « HPLC en phase normale » où la phase stationnaire est polaire, et la seconde est la technique « HPLC en phase inverse » ou « RP-HPLC » (Reverse Phase - HPLC) dans laquelle la phase stationnaire est apolaire. Dans le tableau suivant sont répertoriées les caractéristiques de chacune de ces deux techniques.

Tableau 7. Comparaison des caractéristiques de l'HPLC en phase normale et en phase inverse

	HPLC en phase normale	HPLC en phase inverse
<i>Phase stationnaire</i>	Polaire	Apolaire
<i>Phase mobile</i>	Peu polaire	Polaire
<i>Composés élués en premier</i>	Les plus apolaires	Les plus polaires

La phase stationnaire, autrement appelée phase fixe, se trouve à l'intérieur d'une colonne. Dans cette colonne sont injectés les composés à séparer qui ont été préalablement mis en solution dans un solvant⁽⁹⁷⁾. À l'instant initial, le mélange injecté va être dilué dans la phase mobile et cette dernière, sous l'effet d'une pression, va l'entraîner à travers la colonne. Selon leur polarité, et donc leur affinité pour la phase stationnaire, les composés seront plus ou moins retenus. Ce phénomène de rétention variant d'un composé à l'autre permet ainsi de les séparer. Puis, un détecteur placé en sortie de colonne et couplé à un enregistreur retransmet ces temps sur un chromatogramme, où les différents pics correspondant aux divers composés sont représentés.

Par définition, le temps de rétention – noté t_R – est le temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté⁽⁹⁷⁾. Ce temps caractéristique permet de qualifier le composé, tandis que l'aire des pics, déterminée en reportant chacun de ces pics sur la ligne de base du chromatogramme, permet de quantifier chaque composé. La ligne de base est tracée suite au passage de la phase mobile seule à travers la colonne. Voici une figure permettant de mieux visualiser l'ensemble du système.

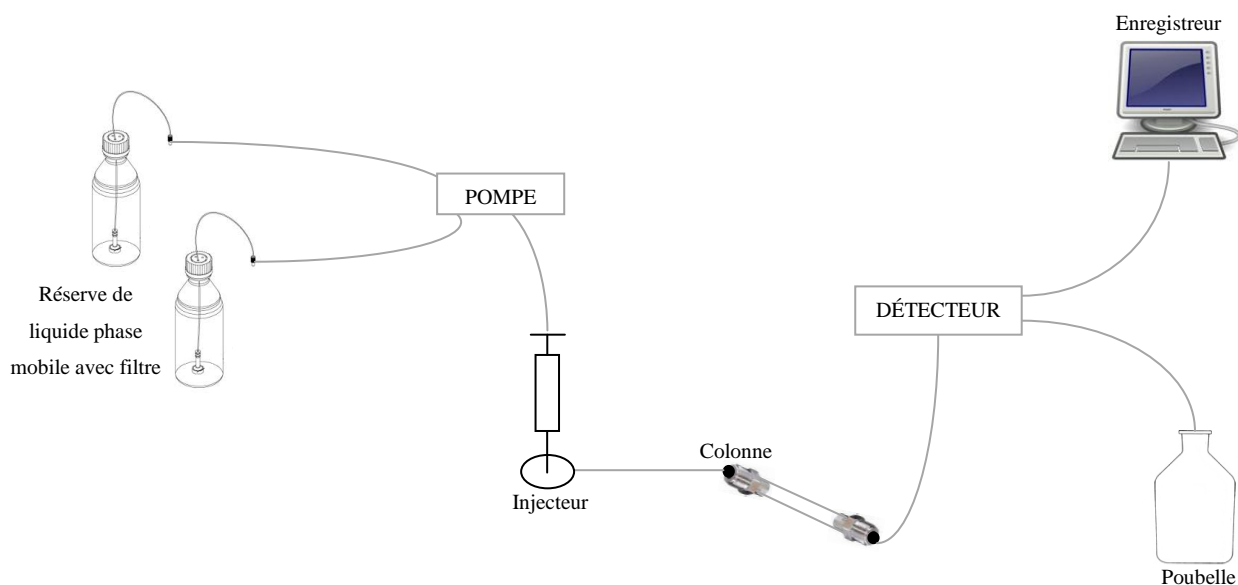


Figure 9. Schéma de principe de l'HPLC

❖ Quelques précisions sur le matériel utilisé :

Tout d'abord, il est de rigueur de qualifier la colonne utilisée. En effet, dans le cas de la technique en phase normale⁽⁹⁸⁾, cette colonne est souvent composée de fines particules de gel de silice portant des fonctions silanols polaires. Avec ce matériau, il est possible d'avoir des problèmes de reproductibilité des résultats car il se dégrade dans le temps. Par contre, la technique en phase inverse⁽⁹⁸⁾ utilise de fines particules de gel de silice sur lesquelles ont été greffées des chaînes apolaires sur les fonctions –OH. Ainsi, le matériau est plus stable dans le temps.

Ensuite, le choix de la phase mobile est primordial pour permettre une bonne séparation des composés en fonction de la colonne choisie. Le pouvoir d'éluion est ajusté en mélangeant plusieurs solvants dans la phase mobile⁽⁹⁸⁾. Ainsi, la phase mobile est soit binaire soit ternaire, selon si l'on utilise un ou deux solvants organiques. Le solvant polaire est le plus souvent de l'eau, tandis que le choix pour les solvants organiques est large.

Une fois le mélange choisi, il est possible de faire varier les proportions relatives de ce mélange au cours du temps⁽⁹⁸⁾. Si c'est le cas, il est courant de parler de « mode gradient », sinon le terme « mode isocratique » est employé.

❖ Analyse qualitative des résultats :

Le premier paramètre à considérer pour l'analyse d'un chromatogramme est la séparation des composés. Une bonne séparation se traduit par des pics bien distincts, correspondant à chacun des composés. La figure qui suit montre la séparation des pics requise et celle qui n'est pas acceptable. Un facteur donné par l'appareil de mesure, appelé « résolution » et noté R , permet de qualifier la séparation. En effet, si $R > 1$ la séparation est bonne, alors que si $R < 1$ la séparation est mauvaise⁽⁹⁷⁾.

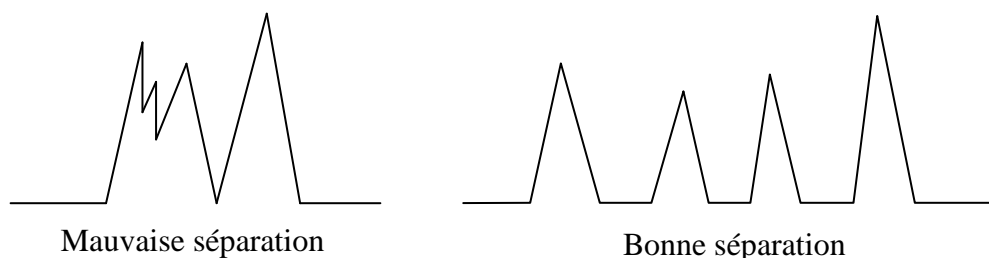


Figure 10. Séparation des pics sur un chromatogramme

Diverses solutions à différentes concentrations et comportant le produit d'intérêt sont préparées puis éluées à travers la colonne. Il s'agit donc de comparer les différents chromatogrammes obtenus et de repérer le pic qui correspond au produit d'intérêt. Dès lors, son t_R caractéristique peut lui être attribué.

La forme du pic est également très importante dans l'analyse d'un chromatogramme. Il faut que ce pic soit le plus gaussien possible. Cela peut se vérifier par la valeur du facteur d'asymétrie. Si ce facteur est égal à $1 \pm 0,1$, alors le pic est gaussien et peut être considéré dans l'analyse des résultats.

❖ Analyse quantitative des résultats :

Comme il a été dit précédemment, l'aire des pics chromatographiques sert à quantifier les composés. En effet, l'aire du pic est proportionnelle à la concentration du produit analysé. La méthode dite « de l'étalonnage externe » est très souvent choisie en HPLC car elle est la plus précise⁽⁹⁷⁾. Pour cela, il est nécessaire de réaliser une courbe d'étalonnage avec

différentes concentrations du produit d'intérêt. Grâce à cette courbe, en reportant l'aire du pic obtenue, il sera possible de connaître la concentration en produit d'intérêt présent dans tout échantillon analysé ultérieurement.

3.2. Démarche expérimentale pour la mise au point du dosage

a) Le matériel :

Le lévétiracétam est une molécule possédant une amine primaire dans sa structure. Cette molécule est donc très polaire, ce qui rend la technique d'analyse par HPLC difficile. En effet, si la technique classique était choisie, le composé serait retenu par la phase stationnaire polaire et ne serait pas élué. C'est pourquoi nous avons utilisé la technique en phase inverse pour l'analyse du lévétiracétam. Nous avons donc choisi une colonne RP, qui permet l'élution des composés polaires en premier. Cette colonne possède les caractéristiques suivantes :

- **C18 classique** : PHENOMENEX SYNERGI 4 μ FUSION-RP 80 Å ;
- Dimensions : longueur = **100 mm** ; diamètre = **4,6 mm** ;
- Phase stationnaire : **gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R (4 μ m)**.

La chaîne HPLC comprend une pompe binaire, un système d'injection automatique, un thermostat, et un détecteur à barrettes de diodes dont la longueur d'onde peut être programmée. Le système est piloté grâce à un ordinateur équipé du logiciel ChemStation[®].



Figure 11. Chaîne HPLC disponible à la PUI de l'HEH

b) Le développement de la méthode de dosage :

Le choix de la méthode doit être un compromis entre les différents paramètres qui peuvent être ajustés en HPLC, l'objectif final étant d'obtenir une méthode rapide, résolutive, spécifique, fidèle et exacte.

Les données de la littérature ont montré l'existence de techniques RP utilisant comme phase mobile un mélange de méthanol, d'eau et d'acétonitrile en proportion 30:10:60, selon Jignesh S. Shah et al.⁽⁹⁹⁾. Ces trois composés présentent en effet un très fort pouvoir d'éluion dû à leur très haute polarité⁽⁹⁷⁾. Un tel pouvoir d'éluion est nécessaire pour analyser la molécule de lévétiracétam car elle est aussi très polaire. Nous avons donc réalisé des premiers essais sur des solutions injectables commercialisées de lévétiracétam, avec cette phase mobile, et dans les conditions suivantes :

- débit = 1 mL/min ;
- température de colonne = 50 °C ;
- température de l'échantillon = 25 °C ;
- volume d'injection = 10 µL.

Ces conditions de départ ont donc été fixées par les données de la littérature. La température de l'échantillon a été fixée à 25°C car il s'agit de la température de conservation du lévétiracétam dans des conditions normales. Pour ce premier essai, la longueur d'onde de détection n'a pas été parfaitement définie. En effet, nous avons effectué des détections à différentes longueurs d'ondes comprises entre 205 nm et 290 nm. Nous avons préparé des échantillons en diluant la solution dans le méthanol seul pour obtenir des concentrations de 0,1 ; 1,0 et 1,5 µg/ml, et dans la phase mobile à des concentrations de 2 ; 20 et 30 µg/ml. Ces essais ont montré, d'une part, que la phase mobile méthanol/eau/acétonitrile n'était pas appropriée car les pics n'étaient pas bien séparés (cf. Figure 12). D'autre part, que l'aire sous les pics était très faible donc que les concentrations choisies pour les standards étaient insuffisantes. Les dilutions réalisées dans la phase mobile ont également montré une meilleure résolution que les dilutions faites dans le méthanol seul.

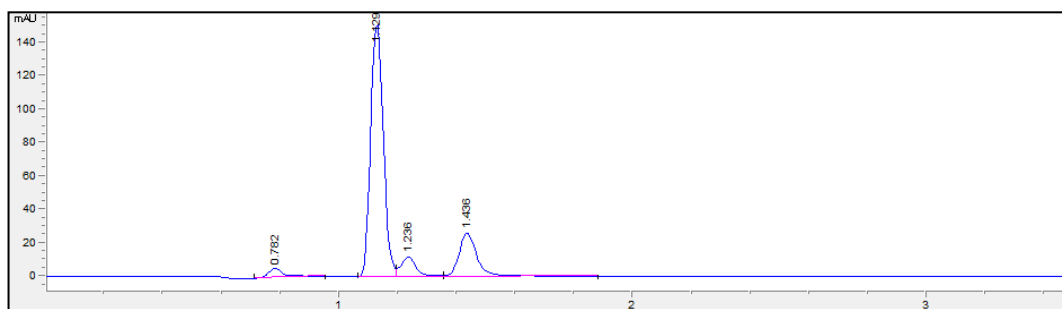


Figure 12. Chromatogramme du lévétiracétam dans phase mobile méthanol/eau/acétonitrile (210 nm)

Suite à ces premiers essais, nous avons exclu l'acétonitrile et nous avons testé la phase mobile méthanol/eau (25:75) dans les mêmes proportions que celles choisies par Abdullah Al Masud et al⁽¹⁰⁰⁾. Pour cela, nous avons préparé des standards à des concentrations plus élevées (40 ; 200 et 400 µg/ml). Les dilutions ont encore été effectuées à la fois dans le méthanol seul et dans la phase mobile pour confirmer les premières remarques. Il s'avère qu'une fois de plus, les **dilutions réalisées dans la phase mobile** ont montré une meilleure résolution par rapport aux dilutions effectuées dans le méthanol seul. La Figure 13 confirme que la **phase mobile méthanol/eau** s'est révélée être beaucoup plus appropriée pour l'analyse du lévétiracétam. Nous avons alors pu obtenir le t_R du lévétiracétam à **2,65 ± 5 %**. Ce deuxième essai nous a également permis de choisir la longueur d'onde de détection à **210 nm**. Les autres conditions chromatographiques n'ont, quant à elles, pas été modifiées par rapport aux conditions initiales.

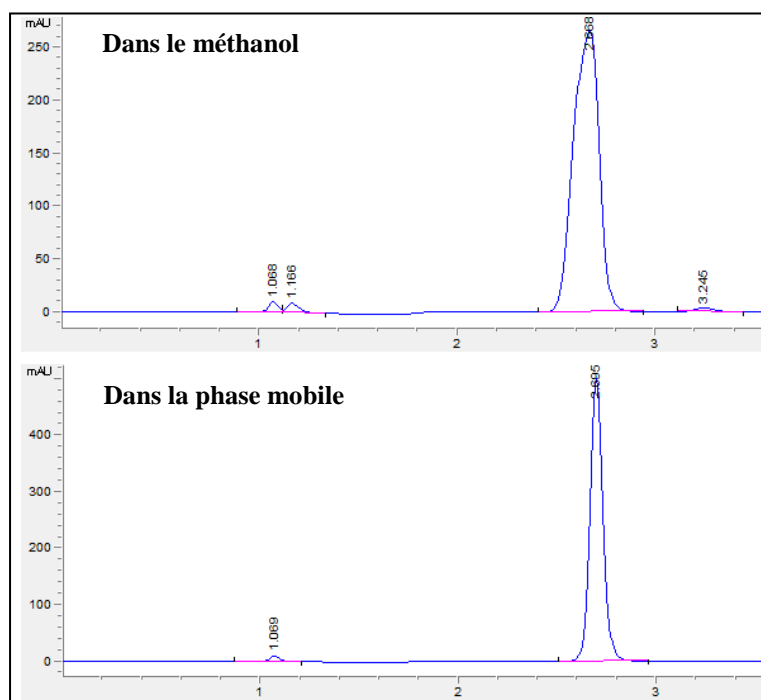


Figure 13. Chromatogrammes du lévétiracétam à 200 µg/mL dans le méthanol seul et dans la phase mobile méthanol/eau à une longueur d'onde de 210 nm

Dans les mêmes conditions et aux mêmes concentrations, nous avons effectué des essais en rajoutant 200 mg de lactose avec du carmin de cochenille dans chaque solution, afin de simuler la composition des gélules pour l'essai clinique. Cela n'a pas modifié significativement le temps d'élution du lévétiracétam.

Nous avons également mené des dégradations forcées sur la solution injectable, conformément aux ICH Q1A(R2)⁽⁹⁵⁾. Elles ont pour objectif de mettre en évidence les produits de dégradation et les impuretés susceptibles d'apparaître lors de l'étude de stabilité. En d'autres termes, les essais de dégradation consolident la spécificité et permettent de valider la capacité indicatrice de stabilité de la méthode.

Ces dégradations ont été réalisées selon différentes conditions ; à savoir, avec HCl à 0,1N, avec NaOH à 0,1N, avec H₂O₂ 10V, sous rayonnement ultraviolet (UV) pendant 2 heures et à 60°C pendant 10 minutes. Tous les échantillons à une concentration finale de 100 µg/mL ont été chauffés à 60°C pendant 10 minutes. Ces essais ont montré une dégradation insuffisante avec HCl et NaOH 0,1N. L'eau oxygénée a, quant à elle, beaucoup dégradé le produit. Cependant, la température et les UV (365 nm) n'ont eu aucun effet car l'aire des pics chromatographiques est restée inchangée.

Des dégradations plus fortes ont donc été conduites avec HCl et NaOH à 1N, et avec une température de 80°C pendant 20 minutes. Par contre, nous avons allégé la dégradation avec H₂O₂ 10V en diluant l'eau oxygénée au demi. Les résultats ont montré une dégradation toujours insuffisante avec HCl et NaOH 1N. La température n'a toujours pas eu d'impact sur le produit. Cependant, le produit de dégradation était encore trop important avec H₂O₂ dilué au demi.

Nous avons alors effectué des essais supplémentaires dans les conditions suivantes : HCl et NaOH 0,1N, H₂O₂ 10V dilué au dixième, et la température a été augmentée à 100°C pendant 30 minutes. Ces essais ont permis de conclure que la température n'avait pas d'effet sur le lévétiracétam. Mais également, que le principal produit de dégradation, situé à 1,15 minute, était moins important avec H₂O₂ dilué 10 fois. Les différents essais de dégradation sont représentés sur la Figure 14.

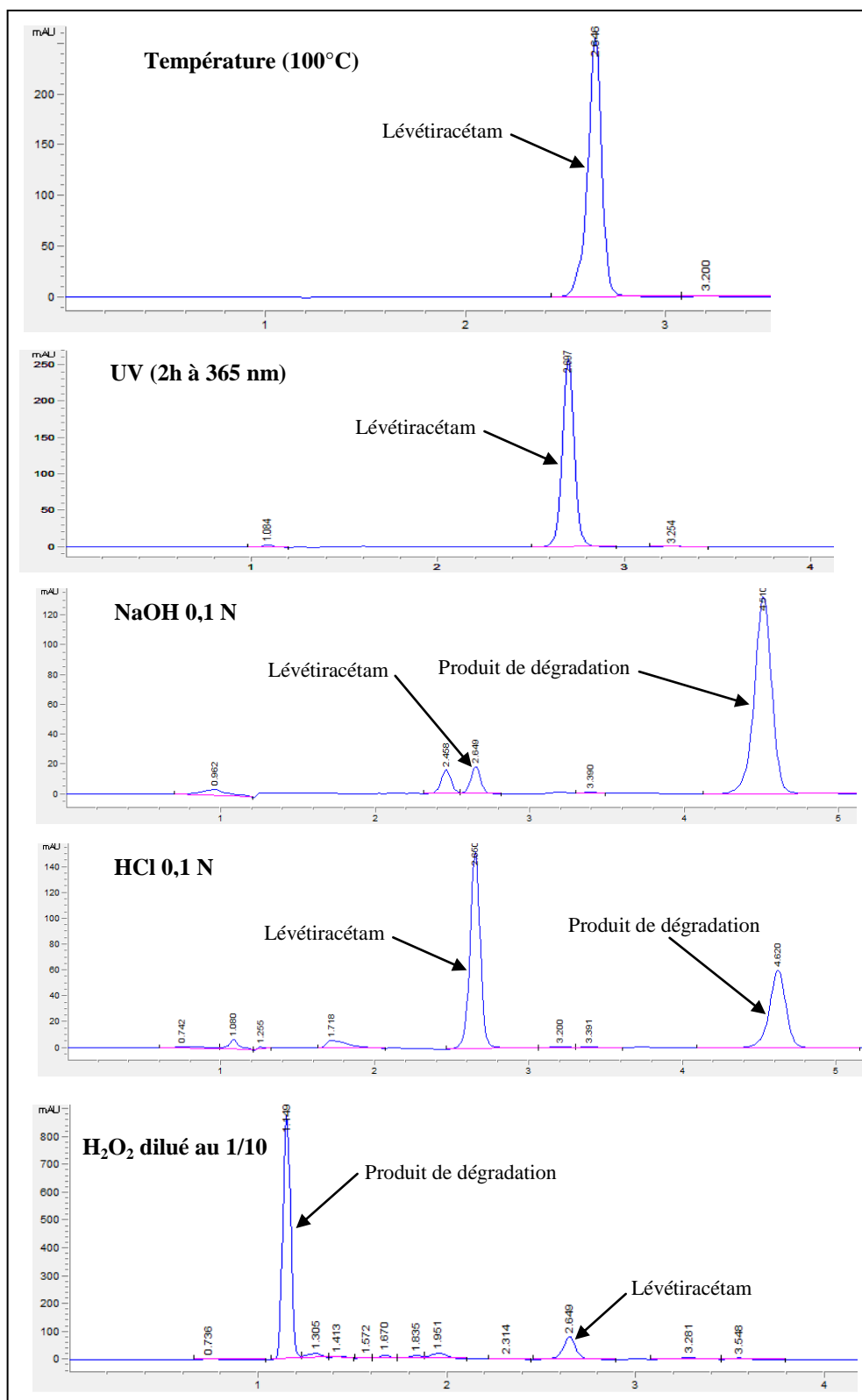


Figure 14. Chromatogrammes des essais de dégradation (t_R lévétiracétam = 2,65 ± 5 %)

Ces essais ont été consolidés par des analyses effectuées sur les impuretés du lévétiracétam, à savoir les impuretés dénommées A et D. Lors de ces essais, un standard de travail du lévétiracétam, fourni par le même laboratoire que les impuretés, a été utilisé comme référence. Trois types d'échantillons ont été préparés en faisant les dilutions dans la phase mobile :

- ✓ Trois viales à une concentration de 1 mg/mL : deux viales contenant chacune une impureté et une vial contenant le standard de travail.
- ✓ Une vial contenant un mélange des deux impuretés et du standard de travail en proportion 50:50:50.
- ✓ Une vial contenant un mélange des deux impuretés, du standard de travail et du standard de la Pharmacopée européenne.

L'impureté A présentait un pic trop large et une aire trop élevée (cf. Figure 15). Nous avons donc dû ajuster la méthode pour obtenir un pic présentant une forme correcte. Les données de la littérature précisent que l'acide orthophosphorique n'interfère pas avec le lévétiracétam^{(101),(102)}. C'est grâce à cela que nous avons pu acidifier la phase aqueuse avec de l'acide orthophosphorique, jusqu'à obtenir un pH de 2,8 - 3. La phase mobile acidifiée seule, ainsi que le lactose seul, ont été analysés afin d'avoir des références et pouvoir identifier les différents pics sur les spectres. Ces chromatogrammes sont représentés sur la Figure 16. Les essais que nous avons conduits avec cette nouvelle phase mobile acidifiée ont montré un pic gaussien pour l'impureté A (cf. Figure 15).

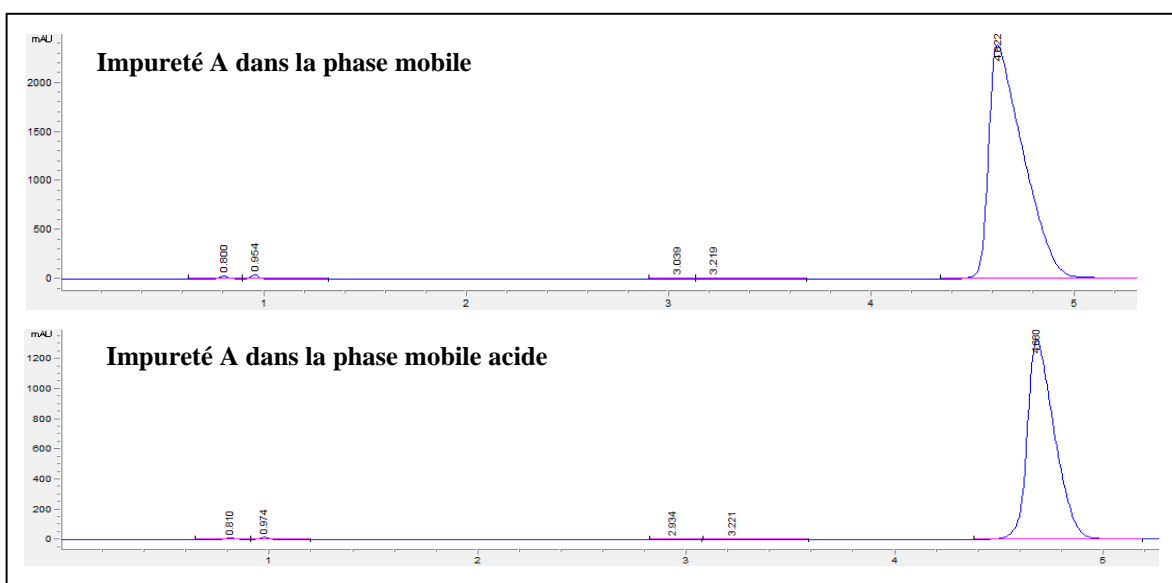


Figure 15. Chromatogrammes impureté A dans la phase mobile avec et sans acide

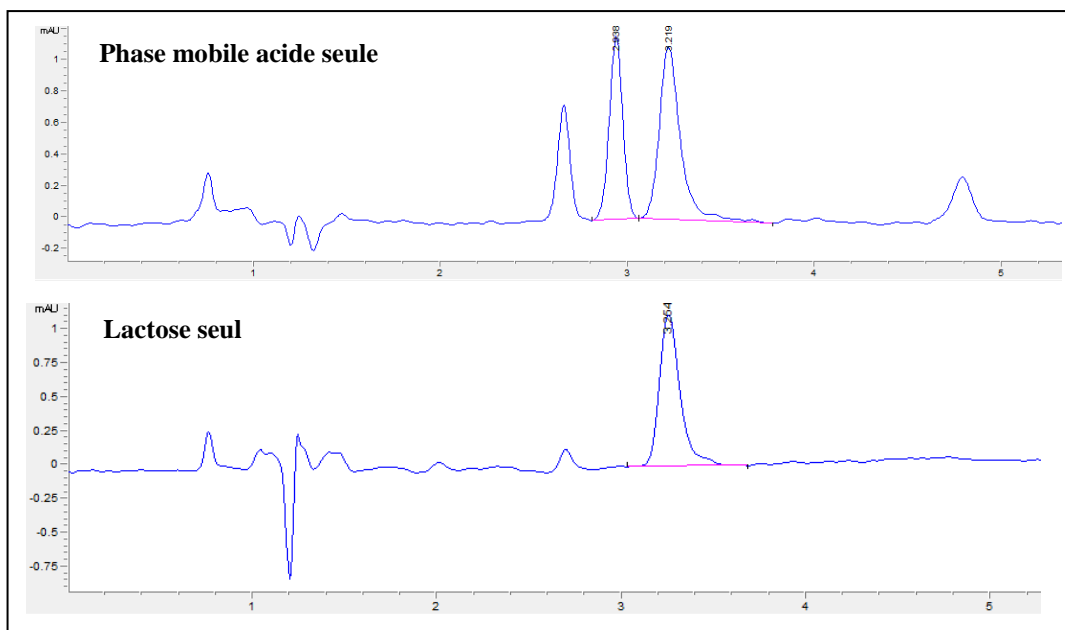


Figure 16. Chromatogrammes phase mobile acidifiée seule et lactose seul

Légende : Phase mobile acide seule : 1^{er} pic à 2,938 ; 2^e pic à 3,219

Lactose seul : pic à 3,264

t_R lévétiracétam = $2,65 \pm 5 \%$

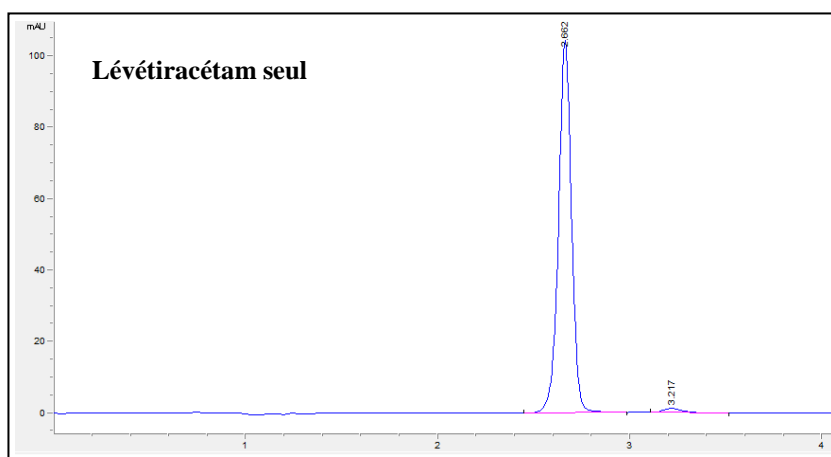


Figure 17. Chromatogramme lévétiracétam seul

Tous les essais effectués, à la fois sur la solution injectable avec et sans lactose et sur les impuretés, ont permis d'optimiser la méthode d'analyse par HPLC. Le tableau qui suit reprend l'ensemble des conditions chromatographiques déterminées suite à tous ces essais de développement de la méthode.

Tableau 8. Conditions chromatographiques optimisées

Paramètres	Méthode
Phase stationnaire (colonne)	Colonne C-18, Phenomenex Synergi Gi 4 μ Fusion-RP 80 Å (100 mm x 4,6 mm)
Phase mobile	Méthanol / eau + tampon acide orthophosphorique (25:75)
Débit (mL/min)	1,0
Pression de la colonne (bar)	89 \pm 10
Temps d'analyse (min)	3,5
Température de la colonne (°C)	50
Volume d'injection (μ L)	10
Longueur d'onde de détection (nm)	210
t _R du lévétiracétam (min)	2,65 \pm 5 %

3.3. Validation de la méthode de dosage par HPLC

La validation de la méthode de dosage du lévétiracétam par HPLC a été conduite selon les recommandations des ICH Q2B⁽¹⁰³⁾ et de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP)⁽¹⁰⁴⁾. Pour cette validation, il nous a fallu considérer les critères de linéarité, d'exactitude, de fidélité, ainsi que les seuils de détection et de quantification. Dans le cadre de l'essai clinique, nous avons validé la méthode à la fois sur le principe actif seul – en utilisant le standard de référence de la Pharmacopée européenne – et sur la forme pharmaceutique reconstituée (lévétiracétam + lactose + carmin de cochenille). Les protocoles détaillés de validation se trouvent respectivement en Annexe IV et en Annexe V.

a) Quelques définitions⁽¹⁰⁵⁾ :

- ❖ **Linéarité** : la linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité (à l'intérieur d'un certain intervalle) d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon.
- ❖ **Exactitude** : elle exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie (standard interne de la firme), soit comme une valeur de référence acceptée (standard international), et la valeur trouvée (valeur moyenne) obtenue en appliquant la procédure d'analyse un certain nombre de fois.

- ❖ **Fidélité** : elle exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans les conditions prescrites.
- ❖ **Sensibilité** : il s'agit de la capacité de la méthode d'analyse à enregistrer de faibles variations de concentration.
- ❖ **Seuil de détection** : c'est la plus petite quantité d'une substance à examiner dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte.
- ❖ **Seuil de quantification** : c'est la plus petite quantité d'une substance à examiner pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites, avec une fidélité et une exactitude définies.

b) Validation de la méthode de dosage du lévétiracétam seul et de la forme pharmaceutique reconstituée :

La méthode de dosage a été validée dans le but de pouvoir déterminer la teneur en lévétiracétam dans la solution injectable et dans les gélules de lévétiracétam, mais également pour pouvoir conduire l'étude de stabilité sur ces deux formes pharmaceutiques. Pour cela, nous avons étudié les différents paramètres cités précédemment. Grâce à la validation effectuée sur la forme pharmaceutique reconstituée, nous avons pu apprécier la spécificité du dosage.

Dans le cadre de la validation, les études de la linéarité, de l'exactitude et de la fidélité sont réalisées de façon concomitante, à partir du principe actif seul et de la forme pharmaceutique reconstituée au laboratoire.

❖ **La linéarité :**

L'étude de la linéarité a consisté en l'établissement d'une gamme d'étalonnage par jour et par opérateur pendant 3 jours. L'étude de la linéarité a été réalisée sur le standard Pharmacopée Européenne seul et sur la forme pharmaceutique reconstituée.

Tableau 9. Gamme d'étalonnage pour l'étude de la linéarité

	60 %	80 %	100 %	120 %	140 %
J1	0,6 mL	0,8 mL	1 mL	1,2 mL	1,4 mL
J2	0,6 mL	0,8 mL	1 mL	1,2 mL	1,4 mL
J3	0,6 mL	0,8 mL	1 mL	1,2 mL	1,4 mL
Prélever le volume indiqué de solution mère de lévétiracétam ± lactose à 1 mg/mL et compléter à 10 mL avec un mélange de méthanol/eau ppi acidifiée par H ₃ PO ₄ (pH 2,8 - 3) (25/75)					
Concentration théorique (µg/mL)	60	80	100	120	140

❖ L'exactitude :

L'étude de l'exactitude représente la somme de la justesse et de la fidélité. Elle est réalisée sur 3 jours à tous les points de la gamme d'étalonnage.

❖ La fidélité :

La fidélité peut être évaluée à deux niveaux. En effet, elle s'exprime par la mesure de la fidélité intermédiaire et par la mesure de la répétabilité. La fidélité intermédiaire évalue des essais effectués dans des conditions très variables c'est-à-dire, dans le cas de cette étude, à des jours différents, avec un matériel différent et avec des opérateurs différents. Tandis que la répétabilité considère des essais de la même grandeur effectués dans des conditions aussi stables que possibles et à de courts intervalles de temps. La fidélité intermédiaire permet donc de mesurer la variabilité maximale des résultats, alors que la répétabilité mesure leur variabilité minimale.

Par ailleurs, dans le cas de l'analyse de la fidélité intermédiaire, six échantillons, correspondant à 100 % de la concentration théorique, sont préparés pour évaluer la variation intra-laboratoire, tandis que pour l'analyse de la répétabilité, qui concerne l'appareil, le même échantillon est analysé six fois.

❖ **Le seuil de détection :**

Le seuil de détection noté LD, se calcule grâce à la formule suivante :

$$\mathbf{LD = 3,3 \sigma/P}$$

Avec σ : écart-type de l'ordonnée à l'origine des gammes d'étalonnage ;

P : moyenne des pentes des gammes d'étalonnage.

❖ **Le seuil de quantification :**

La formule qui suit permet de calculer le seuil de quantification, noté LQ :

$$\mathbf{LQ = 10 \sigma/P}$$

Avec σ : écart-type de l'ordonnée à l'origine des gammes d'étalonnage ;

P : moyenne des pentes des gammes d'étalonnage.

c) **Résultats :**

Tableau 10. Critères d'acceptation et résultats des différents paramètres pour la validation de la méthode

	Paramètres	Critères d'acceptation	Résultats : lévétiracétam seul	Résultats : forme pharmaceutique reconstituée
Spécificité	t_R et aires sous la courbe	Superposition des chromatogrammes avec t_R et surfaces identiques	Oui	Oui
Linéarité	Coefficient de corrélation	$r \geq 0,99$ (5 points)	$r = 0,997$	$r = 0,997$
	Test de l'ordonnée à l'origine	$K < t$ (0,05 ; ddl = N-2)	$1,10 < t = 2,16$	$0,39 < t = 2,16$
	Existence d'une pente	$F_1 > F$ (0,05 ; 1 ; ddl = N-2) Si F_1 est significatif, on conclut à l'existence d'une pente significativement différente de zéro donc à une dépendance linéaire au seuil de probabilité considéré.	$F_1 = 2282,12 >$ $F = 4,67$	$F_1 = 2527,13 >$ $F = 4,67$
	Validité de la droite	$F_2 < F$ (0,05 ; k-2 ; N-k) Si F_2 n'est pas significatif, l'ajustement est considéré comme valide au seuil de probabilité considéré.	$F_2 = 1,22 <$ $F = 3,71$	$F_2 = 0,34 <$ $F = 3,71$
Exactitude	Pourcentage de recouvrement	95 – 105 %	100,5 – 102,7 %	100,3 – 102,3 %
Fidélité	Répétabilité	Coefficient de variation $\leq 5,0$ %	1,37 %	1,86 %
	Fidélité intermédiaire	Coefficient de variation $\leq 5,0$ %	1,87%	1,48 %

Légende : r : coefficient de corrélation

F_1 et F_2 : valeurs décisionnelles selon le test de Fisher

K : valeur décisionnelle selon le test de Student

N : nombre de points expérimentaux

k : nombre de jours

Tous les résultats statistiques ont été obtenus grâce à un traitement automatique des données par le logiciel Excel[®] et sont en accord avec les recommandations de la SFSTP 92⁽¹⁰⁴⁾.

❖ **La linéarité :**

La linéarité est évaluée par l'analyse de la régression linéaire. Pour cela, il a été déterminé :

- L'équation de la droite : elle suit un modèle linéaire du type $y = b.x + a$
 Où "y" représente le signal du lévétiracétam en unité arbitraire (A) ;
 "b" est la pente de la droite ;
 "a" est l'intercepte à l'origine ;
 "x" est l'équivalent concentration en $\mu\text{g/mL}$.

L'équation de la droite obtenue pour chacune des gammes est :

- Gamme pour le principe actif seul : $y = 11,72.x - 28,00$
- Gamme pour la forme pharmaceutique reconstituée : $y = 11,56.x + 9,26$
- Le coefficient de corrélation linéaire : il est noté r.
- Le test de l'ordonnée à l'origine est basé sur un test de Student :
 $a/S_a < t(0,05 ; \text{ddl} = N-2) = t(0,05 ; 13) = 2,16$
 Où S_a = écart type de l'ordonnée à l'origine.
- L'existence d'une pente significative est évaluée suite à un test de Cochran qui permet de vérifier, en premier lieu, l'homogénéité des variances :

Test de Cochran : C est calculé selon la formule suivante : $C = \frac{S_{\max}^2}{\sum_{j=1}^k S_j^2}$

Où S_{\max}^2 = variance la plus élevée des k groupes j ;
 S_j^2 = variance du groupe j.

Les valeurs de C trouvées sont :

- Pour le lévétiracétam seul : $C = 0,014$
- Pour la forme pharmaceutique reconstituée : $C = 0,102$

Dans les deux cas $C < C_{0,05}^{5,2} = 0,841$ (valeur limite de décision), donc il y a homogénéité des variances des 5 groupes de concentrations différentes au risque de 5 %. Le test de l'existence d'une pente significative peut alors être appliqué.

Test de l'existence d'une pente significative :

$F = S^2_I / S^2_R > F(0,05 ; 1 ; ddl = N-2) = F(0,05 ; 1 ; 13) = 4,67$ (valeur limite de décision)

Où S^2_I = variance due à la variation de la régression ;

S^2_R = variance résiduelle.

On rejette l'hypothèse nulle $b = 0$.

- La validité de la droite de régression est confirmée par un test de Fischer :

$F = S^2_L / S^2_E < F(0,05 ; k-2 ; N-k) = F(0,05 ; 3 ; 10) = 3,71$ (valeur limite de décision)

Où S^2_L = variance des erreurs d'ajustement ;

S^2_E = variance des erreurs expérimentales.

Tous les résultats de l'étude de la linéarité sont regroupés dans le Tableau 10.

❖ L'exactitude :

Un *test de Cochran* est effectué, dans un premier temps, pour vérifier l'homogénéité des variances. Les valeurs de C qui ont été trouvées sont :

- Pour le lévétiracétam seul : $C = 0,515$
- Pour la forme pharmaceutique reconstituée : $C = 0,287$

Dans les deux cas $C < C_{0,05}^{5,2} = 0,841$ (valeur limite de décision), donc il y a homogénéité des variances des 5 groupes de concentrations différentes au risque de 5 %. L'intervalle de confiance du recouvrement moyen peut alors être estimé en pourcentage. Ce pourcentage de recouvrement est calculé automatiquement sur l'ensemble des points de gamme. L'intervalle de confiance estimé dans chacun des cas se trouve dans le Tableau 10.

❖ La fidélité :

Les résultats de l'analyse de la fidélité sont regroupés dans le Tableau 10.

❖ **Le seuil de détection et le seuil de quantification :**

Le Tableau 11 rassemble, pour chacune des deux méthodes, les valeurs déterminées pour le seuil de détection et le seuil de quantification.

Tableau 11. Valeurs des limites de détection et de quantification

Type d'échantillon	Résultats : lévétiracétam seul	Résultats : forme pharmaceutique reconstituée
LD (µg/mL)	7,18	6,82
LQ (µg/mL)	21,75	20,67

Les deux méthodes, l'une pour le lévétiracétam seul et l'autre pour la forme pharmaceutique reconstituée, ont été validées. Les rapports de validation du lévétiracétam et de la forme pharmaceutique reconstituée sont respectivement présentés en Annexe VI et en Annexe VII. La méthode développée par HPLC pour le dosage du lévétiracétam est une méthode spécifique, exacte et fidèle.

d) Discussion et comparaison des résultats :

Nous avons appliqué le même protocole que ce soit pour le principe actif seul ou la forme pharmaceutique reconstituée. Il est donc possible de comparer les linéarités obtenues pour chacune des deux méthodes. Cette comparaison a été effectuée par une évaluation statistique des résultats, selon les critères définis dans le tableau ci-dessous.

Tableau 12. Etude statistique de la linéarité

Tests effectués	Résultats : lévétiracétam seul	Résultats : forme pharmaceutique reconstituée	Valeurs théoriques constantes statistiques au risque 5%
(1) Pente des droites d'ajustement	11,72	11,56	
(2) Ordonnée à l'origine des droites d'ajustement	-28,00	9,26	
(3) Coefficient de corrélation	0,997	0,997	
(4) Test de comparaison des ordonnées à l'origine avec 0 (<i>Test de Student</i>)	1,10 (NS)	0,39 (NS)	t (0,05; 13) = 2,16
(5) Test d'homogénéité des variances (<i>Test de Cochran</i>)	0,01 (NS)	0,10 (NS)	C (0,05; 5; 2) = 0,68
(6) Test de l'existence des pentes (<i>Test de Fischer</i>)	2282,84 (HS)	2527,13 (HS)	F (0,05; 1; 13) = 4,67
(7) Validité des ajustements (<i>Test de Fischer</i>)	1,22 (NS)	0,34 (NS)	F (0,05; 3; 10) = 3,71
(8) Test de comparaison des ordonnées à l'origine (<i>Test de Student</i>)	1,879 (NS)		t (0,05; 26) = 2,056
(9) Test de comparaison des pentes des droites d'ajustement (<i>Test de Student</i>)	0,376 (NS)		t (0,05; 26) = 2,056

Légende : NS : valeur non significative au risque 5 %

HS : valeur hautement significative au risque 5 %

Dans ce tableau, les valeurs calculées doivent être inférieures aux valeurs théoriques sauf pour le test (6). Il est possible de constater que toutes les valeurs retrouvées sont non significativement différentes des valeurs théoriques au risque de 5 %. L'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de 0, les variances sont homogènes et les ajustements sont corrects. De même, les ordonnées à l'origine et les pentes des droites d'ajustement ne sont pas significativement différentes au risque de 5 %. Le test de l'existence des pentes montre, quant à lui, une valeur hautement significative. Il est donc possible de conclure à une dépendance linéaire au risque de 5 %.

Les résultats trouvés pour les deux méthodes ne sont donc pas significativement différents au risque de 5 %. Tout effet matrice lié au lactose a alors pu être éliminé. Qui plus est, la pureté du pic chromatographique moyenne était d'environ 999 et restait ainsi conforme aux critères d'acceptations (995 – 1005).

3.4. Comparaison de cette méthode avec d'autres méthodes existantes

Les méthodes trouvées dans la littérature présentent certains points communs, comme le débit, qui se situe entre 1,0 et 1,5 mL/min. La longueur d'onde de détection est également similaire et est comprise entre 205 et 214 nm. Le volume d'injection utilisé est soit de 10 µL soit de 20 µL. De même, la variation inter-jour et intra-jour n'est pas significativement différente d'une méthode à l'autre. Le pourcentage de recouvrement de chacune des méthodes est d'environ 100 % ± 2 %.

Cependant, quelques différences peuvent être notées entre les méthodes. Il est possible de relever une variation de l'intervalle de mesure considéré, ainsi qu'une variation de la limite de détection et de la limite de quantification trouvées. Le temps de rétention est aussi très dépendant de la méthode utilisée. Le coefficient de corrélation est satisfaisant pour chacune des méthodes car sa valeur n'est jamais inférieure à 0,994.

En conclusion, la méthode développée dans le cadre de l'essai clinique promu par les HCL peut être considérée comme un bon compromis de toutes les méthodes trouvées dans la littérature. Le tableau comparatif de ces méthodes est présenté en Annexe VIII. En effet, le temps de rétention est parmi les plus bas, sachant qu'il se situe à $2,65 \pm 5$ %, et qu'aucune méthode n'a révélé de t_R inférieur à 2,5 minutes. L'étude de la linéarité se fait dans des limites déjà étudiées dans de précédentes études et donne une bonne corrélation, avec un coefficient $r = 0,997$. Les seuls paramètres qui se sont révélés significativement différents par rapport à d'autres méthodes sont les LD et LQ. Les valeurs de ces deux paramètres sont étroitement liées au domaine de linéarité choisi. La méthode développée est donc rapide, spécifique, répétable et reproductible pour le dosage du lévétiracétam.

4. Etude de stabilité

Malgré l'existence de données bibliographiques sur la stabilité des spécialités, nous avons réalisé une nouvelle étude sur la préparation injectable, ainsi que sur les gélules. Les protocoles de stabilité pour la forme injectable et les formes orales de lévétiracétam 500 mg et de son *placebo* sont présentés respectivement en Annexe IX et en Annexe X.

Conformément aux BPP⁽¹⁵⁾, une étude de stabilité était nécessaire pour s'assurer de la stabilité des produits fabriqués, du fait que les procédés de fabrication et les conditionnements primaires diffèrent entre les ME et les spécialités commercialisées. Pour cela, un programme de suivi de la stabilité a été rédigé dans un protocole mentionnant⁽¹⁶⁾ :

- « le nombre de lot(s) par dosage et, le cas échéant, les différentes tailles de lots ;
- les méthodes appropriées de contrôles physico-chimiques, microbiologiques et biologiques ;
- les critères d'acceptation ;
- les références aux méthodes de contrôle ;
- la description des conditionnements primaire et extérieur;
- les intervalles de fréquence des contrôles (échéances d'analyses);
- la description des conditions de stockage ;
- tout autre paramètre spécifique du médicament ».

Cette étude de stabilité a été planifiée à partir des lots pilotes, sur 2 ans pour la forme injectable de lévétiracétam à 100 mg/mL, et sur 3 ans pour la forme orale de lévétiracétam et de *placebo* 500 mg.

L'étude de stabilité sur la forme injectable de *placebo* n'a pas été réalisée dans le cadre de cette étude, car les données de stabilité du NaCl 0,9 % étaient déjà disponibles au sein de la PUI de l'HEH. L'étude de stabilité sur les gélules de lévétiracétam dosées à 250 mg et sur leur *placebo* n'a également pas été effectuée, car les quantités en principe actif et en excipient sont proportionnellement identiques aux gélules dosées à 500 mg. Nous avons estimé, dans ce dernier cas, que la stabilité des gélules à 500 mg pourrait être extrapolée aux gélules de 250 mg.

Les échéances prévues pour l'étude ont été fixées selon les recommandations des ICH Q1A(R2)⁽⁹⁵⁾ à J0 (jour de la production), M3 (3 mois après la production), M6, M12, M18, M24 pour toutes les formes et devraient se poursuivre à M30 et M36 pour les deux formes orales. De la même façon, les ICH Q1A(R2)⁽⁹⁵⁾ fixent les conditions de conservation en enceinte climatique pour une étude de stabilité à long terme, à savoir $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, avec une humidité relative de $60\% \pm 5\%$.



Durant l'étude de stabilité, tous les contrôles physico-chimiques et microbiologiques détaillés dans la partie *Contrôle qualité des produits finis* sont réalisés.

4.1. Etude de stabilité sur la forme injectable de lévétiracétam à 100 mg/mL

❖ La fréquence des différents contrôles :

Tableau 13. Fréquence des contrôles pour la solution injectable de lévétiracétam à 100 mg/mL

	J0	M3	M6	M12	M18	M24
Dosage du lévétiracétam						
Mesure du pH						
Mesure du sodium						
Mesure de l'osmolalité						
Comptage des particules non visibles						
Dosage des endotoxines bactériennes						
Essai de stérilité						

Légende :  Contrôles réalisés
 Contrôles non réalisés

De ce tableau, il ressort que la majorité des contrôles sont effectués à chaque échéance, sauf le dosage des endotoxines bactériennes et l'essai de stérilité. Ces deux contrôles n'ont été réalisés qu'au début, au milieu et à la fin de l'étude de stabilité.

❖ Critères d'acceptation :

La stabilité sera jugée satisfaisante si tous les résultats restent conformes aux critères d'acceptation.

❖ **Résultats :**

L'ensemble des résultats de ces analyses physico-chimiques et microbiologiques de la solution injectable de lévétiracétam dosée à 100 mg/mL sont présentés dans le Tableau 14. Ces résultats correspondent aux données de stabilité sur 12 mois.

Chacune des données fournies dans ce tableau correspond à une valeur unique ou à une moyenne calculée suite à 4 ou 10 déterminations expérimentales.

Tableau 14. Résultats de stabilité pour la forme injectable dosée à 100 mg/mL

Conditions de conservation	Lévétiracétam		Sodium (mM)	pH	Osmolalité (mOsm/kg)	Dosage des endotoxines bactériennes (UI/mL)	Essai de stérilité	Comptage des particules non visibles (nb/mL)
	Dosage (mg/mL)	Recouvrement (%)						
25°C ± 2°C, 60 % HR ± 5 % HR								
Critères d'acceptation	100 ± 10 %	100 % ± 10 %	166,1 ± 10 %	5,0 – 6,0	968 ± 10 %	0,5	Stérile	≥ 10 µm : ≤ 1200 ≥ 25 µm : ≤ 120
J0	96,2 ^a	100,0	151,2	5,82	911	< 0,05	Stérile	8 < 1
M3	95,1 ^a	98,9	154,0	5,91	919	NR	NR	29 1
M6	99,7 ^a	103,6	152,5	5,30	935	NR	NR	4 < 1
M12	95,3 ^a	99,1	151,0	5,94	921	< 0,05	Stérile	5 < 1

Légende : ^a Moyenne sur 4 flacons

NR : Non Réalisé

M : Période de stabilité définie en mois

$$\% \text{ recouvrement} = \frac{[\text{lévétiracétam}]_t}{[\text{lévétiracétam}]_{t_0}} \times 100$$

Les résultats des analyses physico-chimiques et microbiologiques obtenus montrent que tous les échantillons analysés ont été conformes aux spécifications fixées de J0 à M12.

Durant l'étude de stabilité, aucune diminution significative de la concentration en lévétiracétam et en sodium, ni de variation importante de l'osmolalité et du pH en dehors des spécifications fixées, n'a été mise en évidence.

Les concentrations en lévétiracétam se situent dans la limite acceptable pour tous les échantillons, c'est-à-dire à $\pm 10\%$ de la valeur théorique. Par ailleurs, le recouvrement varie entre 98,9 et 103,6 %. Il est donc conforme aux critères d'acceptation fixés à $100\% \pm 10\%$.

L'aspect visuel des chromatogrammes est inchangé à J0, à M3, M6 et M12. Aucun produit de dégradation n'a été détecté entre J0 et M12.

Le pH est aussi conforme aux spécifications à chaque échéance de l'étude de stabilité.

Le dosage du sodium et l'osmolalité montrent que toutes les valeurs obtenues durant l'étude de stabilité ont été en accord avec les limites fixées, autrement dit, se situent à $\pm 10\%$ de la valeur théorique.

L'aspect macroscopique des flacons est resté inchangé au cours de l'étude de stabilité. De même, le nombre de particules invisibles, l'essai de stérilité et le dosage des endotoxines bactériennes sont restés conformes aux spécifications de la Pharmacopée européenne 7^{ème} édition 2013 de J0 et M12.

Au vu des résultats, la stabilité physico-chimique et microbiologique de la préparation hospitalière injectable de lévétiracétam a été jugée satisfaisante pour une durée de 12 mois.

Cette étude de stabilité est toujours en cours, pour une durée totale de 2 ans.

4.2. Etude de stabilité sur les formes orales

❖ La fréquence des différents contrôles :

Tableau 15. Fréquence des contrôles pour les gélules de lévétiracétam à 500 mg et les gélules de *placebo*

<i>Gélules 500 mg</i>	J0	M3	M6	M12	M18	M24	M30	M36
Uniformité de masse								
Identification du lactose								
Aspect de la gélule								
Uniformité de teneur								

<i>Gélules placebo</i>	J0	M3	M6	M12	M18	M24	M30	M36
Uniformité de masse								
Identification du lactose								
Aspect de la gélule								

Légende : Contrôles réalisés
 Contrôles non réalisés

Ce tableau montre que la détermination de la teneur et l'aspect de la gélule ont été contrôlés à chaque échéance pendant 12 mois.

Par contre, les contrôles pour l'uniformité de masse et l'identification du lactose n'ont été effectués qu'à J0, soit au début de l'étude de stabilité.

Par ailleurs, pour le suivi de stabilité du *placebo*, l'identification du lactose a été réalisée à chaque échéance.

❖ Critères d'acceptation :

La stabilité sera jugée satisfaisante si tous les résultats restent conformes aux critères d'acceptation.

❖ Résultats :

Les résultats des analyses physico-chimiques des gélules de lévétiracétam dosées à 500 mg sont présentés dans le Tableau 16 et ceux des gélules de *placebo* 500 mg dans le Tableau 17. Ces résultats correspondent aux données de stabilité sur 12 mois.

Comme pour la solution injectable de lévétiracétam, chacune des données fournies dans ces tableaux correspond à une valeur unique ou à une moyenne calculée suite à 4 ou 10 déterminations expérimentales.

Tableau 16. Résultats de stabilité pour la forme orale de lévétiracétam dosée à 500 mg

Conditions de conservation 25°C ± 2°C, 60 % HR ± 5 % HR	Uniformité de masse	Lévétiracétam		Lactose	Aspect gélule
		Dosage (mg/mL)	Recouvrement (%)		
Critères d'acceptation	% erreur ≤ 7,2 % M ± 7,5 % ≤ 2 M ± 15 % = 0	500 ± 10 %	100 % ± 10 %	Conforme	Ivoire
J0	0 % 0 0	490,0 ^a	100,0	Conforme	Conforme
M3	NR	476,3 ^b	97,2	NR	Conforme
M6	NR	506,2 ^b	103,3	NR	Conforme
M12	NR	504,8 ^a	103,0	NR	Conforme

Tableau 17. Résultats de stabilité pour la forme orale de placebo 500 mg

Conditions de conservation 25°C ± 2°C, 60 % HR ± 5 % HR	Uniformité de masse	Lactose	Aspect gélule
Critères d'acceptation	% erreur ≤ 7,2 % M ± 7,5 % ≤ 2 M ± 15 % = 0	Conforme	Ivoire
J0	-1 % 0 0	Conforme	Conforme
M3	NR	Conforme	Conforme
M6	NR	Conforme	Conforme
M12	NR	Conforme	Conforme

Légende Tableaux 16 et 17 : ^a Moyenne sur 10 gélules

^b Moyenne sur 4 gélules

NR : Non Réalisé

M : Période de stabilité définie en mois

$$\% \text{ recouvrement} = \frac{[\text{lévétiracétam}]_t}{[\text{lévétiracétam}]_{t_0}} \times 100$$

Les résultats des contrôles physico-chimiques pour les gélules de lévétiracétam et de *placebo* ont été conformes aux spécifications de J0 à M12.

Pour l'ensemble des échantillons testés, la concentration en lévétiracétam se situe à $\pm 10\%$ de la valeur théorique, avec une variation de la concentration allant de 97,2 % à 103,3 % par rapport à la concentration initiale. Aucun produit de dégradation n'a été mis en évidence durant l'étude de stabilité.

L'examen visuel des gélules et de la poudre avant chaque analyse n'a montré aucun changement d'aspect macroscopique.

L'uniformité de masse et l'identification du lactose ont également été en conformité avec les spécifications.

Comme pour la solution injectable, aucun produit de dégradation n'a été observé sur les chromatogrammes obtenus de J0 à M12.

La stabilité physico-chimique du produit fini peut donc être jugée satisfaisante, pour une durée de 12 mois, au regard des résultats physico-chimiques.

Cette étude de stabilité est toujours en cours, pour une durée totale de 3 ans.

5. Rédaction du dossier de spécifications du ME

La mise en place d'un essai clinique nécessite obligatoirement les autorisations de l'ANSM et du CPP. Ces autorisations ne sont délivrées qu'après expertise du protocole clinique et du dossier de spécification du ME.

Dans le cadre de notre étude clinique, le dossier de spécifications a été élaboré par la PUI, en faisant référence aux BPP⁽¹⁵⁾, aux BPF⁽¹⁶⁾ et aux BPC⁽¹³⁾.

Ce dossier contient différentes parties apportant notamment les informations suivantes :

- une présentation générale de l'étude et du rôle de la PUI de l'HEH dans celle-ci ;
- des informations sur l'approvisionnement ainsi que sur le contrôle qualité des MP et des articles de conditionnement ;
- une description du mode de préparation des ME ;
- une description des contrôles réalisés sur les préparations terminées ;

- une description de l'étude de stabilité ;
- des données de stabilité, autrement dit toutes les données importantes permettant de justifier la qualité des ME ;
- des données sur le circuit du ME, à savoir la préparation des ME, leur conditionnement, leur étiquetage et leur stockage, mais aussi la mise à disposition des unités thérapeutiques aux PUI de centres et la dispensation des traitements ;
- des données bibliographiques.

La demande d'autorisation pour cet essai clinique est en cours, auprès de l'ANSM.

6. Conclusion

Nous avons formulé les ME dans le but de répondre aux besoins de l'essai clinique institutionnel au regard des exigences des BPP et des BPF, tant sur le plan de l'approvisionnement des MP et des articles de conditionnement, que sur la préparation des ME et le contrôle qualité.

Une étude de stabilité était nécessaire à la fois sur la forme injectable et sur la forme orale de lévétiracétam et de *placebo*, pour s'assurer du maintien de la qualité pharmaceutique des ME durant toute la durée de conservation. Cette étude de stabilité nécessitait la mise au point d'une méthode de dosage du lévétiracétam, spécifique, exacte et fidèle. Cette méthode était nécessaire pour conduire l'étude de stabilité mais aussi pour pouvoir effectuer le contrôle qualité des produits finis lors de la libération des lots cliniques. Les résultats des analyses obtenus par HPLC durant la validation de la méthode n'ont montré aucun effet matrice dû aux excipients. Ces résultats ont permis de démontrer que la nouvelle méthode est indicatrice de stabilité.

Pour conduire l'étude de stabilité, nous avons fabriqué trois lots pilotes, respectivement pour la solution injectable de lévétiracétam à 100 mg/mL, pour les gélules de lévétiracétam à 500 mg et pour les gélules de *placebo* 500 mg. Ces lots ont ensuite été stockés, durant toute l'étude de stabilité, dans une enceinte climatique à $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ avec une humidité relative de $60\% \pm 5\%$.

Dans le cas d'un ME, les résultats obtenus suite aux différents contrôles permettent de confirmer les conditions de stockage mais également de fixer une DLU. L'étude de

stabilité réalisée jusqu'à ce jour a permis de confirmer une stabilité physico-chimique et microbiologique de la solution injectable de lévétiracétam à 100 mg/mL, ainsi qu'une stabilité physico-chimique des gélules de lévétiracétam à 500 mg et des gélules de *placebo* 500 mg pour une durée de 12 mois minimum. Les données de stabilité étant satisfaisantes pour les deux formes pharmaceutiques, nous avons donc fixé une DLU initiale de 12 mois après préparation. Cette DLU sera prolongée au fur et à mesure des données de l'étude de stabilité.

L'analyse devrait se poursuivre jusqu'à 18 mois voire 24 mois pour la forme injectable, et jusqu'à 36 mois pour la forme orale. À l'issue de l'étude de stabilité, les résultats devront faire l'objet d'un rapport conformément aux BPF⁽¹⁶⁾.

PARTIE 4 : VALORISATION SCIENTIFIQUE

1. Rédaction d'un article scientifique

Pour valoriser le travail mis en œuvre durant cette thèse, nous avons rédigé un article scientifique en anglais, qui sera soumis à une revue pharmaceutique.

Cet article, retrouvé en Annexe XI, s'intitulera : « Stability study of levetiracetam as injectable solution (500 mg/ 5mL) and capsules (500 mg) as part of a hospital clinical research program ».

2. Communication affichée au congrès Hopipharm

La validation de la méthode de dosage du lévétiracétam par HPLC dans le cadre de l'essai clinique a également fait l'objet d'un poster. Ce poster (cf. Annexe XII) a été présenté lors du congrès francophone HOPIPHARM 2014 ayant réuni les pharmaciens hospitaliers à La Rochelle.

DISCUSSION

Les médicaments expérimentaux, faisant l'objet de l'étude de stabilité, ont été conformes aux spécifications fixées durant toute la durée de conservation.

Pour la forme injectable, au cours de l'étude de stabilité, aucune différence significative de concentration en lévétiracétam ou en sodium, ni de variation significative du pH ou de l'osmolalité, n'ont été mises en évidence durant 12 mois. Sur l'ensemble des échantillons analysés de J0 à M12, aucun produit de dégradation n'a été détecté. Les mesures du pH et de l'osmolalité n'ayant pas évolué au cours du temps, cela plaide donc en faveur de l'absence d'interaction entre la solution injectable et son contenant.

L'absence de particules visibles à l'œil nu, le nombre très faible de particules invisibles ($\geq 0,5 \mu\text{m}$ et $\leq 5 \mu\text{m}$) et l'aspect macroscopique des flacons, qui est resté inchangé en terme de couleur et de turbidité, permettent de confirmer la stabilité physique du produit. Les résultats de l'essai de stérilité et le dosage des endotoxines bactériennes à J0 et M12 sont en accord avec les recommandations de la Pharmacopée européenne 7^{ème} édition 2013. Ils confirment donc la qualité microbiologique du produit et le maintien de son état stérile durant toute la durée de conservation.

Les gélules n'ont montré aucune modification d'aspect macroscopique, ni d'altération physico-chimique, durant les 12 mois d'étude. Les conditionnements primaire et secondaire de ces gélules ont donc contribué significativement au maintien de la qualité pharmaceutique de ce produit fini.

En ce qui concerne la méthode de dosage, les critères de linéarité, d'exactitude, de fidélité, et de spécificité étaient très satisfaisants au regard des ICH Q2B et de la SFSTP. De plus, les résultats des dégradations forcées, obtenus au cours de la détermination de la spécificité, confirment que la méthode peut être considérée comme une méthode indicatrice de stabilité.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

CONCLUSIONS

THESE SOUTENUE PAR : Mme de VAUJANY Angélique

La Pharmacie à Usage Intérieur (PUI) de l'Hôpital Edouard Herriot a été sollicitée pour participer à une recherche clinique institutionnelle dans le domaine de la neurologie. Comme toute recherche clinique, elle implique un cadre réglementaire très strict, notamment pour la mise à disposition des médicaments expérimentaux, sur le plan de la qualité, de l'efficacité et de la sécurité.

Pour répondre aux besoins de cet essai clinique, de nouveaux médicaments expérimentaux de qualité pharmaceutique ont été développés. Afin de pouvoir évaluer la qualité de ces produits finis, un contrôle qualité a également été mis en œuvre. Ce contrôle qualité prévoit des analyses physico-chimiques et microbiologiques conformément aux recommandations en vigueur. Les analyses physico-chimiques ont porté sur le dosage du lévétiracétam, la mesure du pH, du sodium, de l'osmolalité et le comptage des particules non visibles pour la forme injectable, et sur l'uniformité de masse, l'identification du lactose et l'aspect des gélules pour la forme orale. Les analyses microbiologiques ont porté sur le dosage des endotoxines bactériennes et l'essai de stérilité.

Pour le respect du double aveugle, la mise sous forme pharmaceutique du *verum* et du *placebo* était en tout point identique, concernant le mode de préparation et le conditionnement primaire. Les formulations galéniques des gélules et de la solution injectable ont été développées en faisant référence aux spécialités pharmaceutiques commercialisées et à la revue bibliographique.

Aux vus des moyens humains et matériels dont dispose la Pharmacie à Usage Intérieur, la forme orale en gélules s'imposait, malgré l'existence de spécialités pharmaceutiques commercialisées sous forme de comprimés. Le choix du lactose, comme excipient dans les gélules, a une double importance. D'une part, il s'agit d'un excipient qui favorise une formulation semi-automatique, de par la rhéologie de la poudre. D'autre part, il permet une dissolution du contenu de la gélule avec de l'eau, pour une

administration par sonde pour les patients présentant un problème de déglutition. Pour la solution injectable, notre mode de préparation en classe A, associant une filtration stérilisante et un autoclavage, permet d'avoir un niveau d'assurance de stérilité optimal. Ce mode de préparation est préconisé en première intention par les Bonnes Pratiques de Préparation, car il permet d'apporter une garantie de la qualité microbiologique des produits finis.

Pour se conformer à la réglementation pharmaceutique et disposer de médicaments expérimentaux prêts à l'emploi, une étude de stabilité s'imposait. Cette étude de stabilité, effectuée sur la solution injectable (100 mg/mL) et sur les gélules (500 mg), a été conduite selon les directives ICH (International Conference on Harmonisation). Aux vus des résultats des analyses physico-chimiques et microbiologiques, la stabilité des médicaments expérimentaux a été jugée satisfaisante au regard des critères d'acceptation pour une durée de 12 mois. Par ailleurs, la conduite de l'étude nécessitait la validation préalable d'une nouvelle méthode de dosage du lévétiracétam par Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance. Cette méthode de dosage a démontré une bonne linéarité, une fidélité satisfaisante et une bonne exactitude. Cette validation, confirmée avec les données statistiques, permettra de mettre en évidence toute formation d'impuretés ou de produits de dégradation provenant du lévétiracétam. Les avantages de cette méthode se trouvent dans sa simplicité et sa rapidité de mise en œuvre, ainsi que dans la courte durée d'analyse.

En conclusion, la faisabilité technique et analytique qui était sous la responsabilité de la PUI a été satisfaisante, conformément aux Bonnes Pratiques de Préparation et aux Bonnes Pratiques Cliniques. Les résultats de l'efficacité du lévétiracétam, dans le cadre de l'essai clinique, ne seront connus qu'à la fin de l'étude.

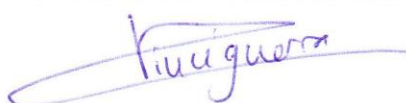
Le Président de la thèse,
Nom : M. PIROT Fabrice

Signature :



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le 11 DEC. 2014
Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie

Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,



Professeure C. VINCIGUERRA

ANNEXES

Annexe I.

Etude de faisabilité d'un essai clinique avec mise sous forme pharmaceutique

Référence du protocole :			Promoteur :
CRITÈRES	Oui	Non	Commentaire
I. CONFORMITÉ RÉGLEMENTAIRE			
A. Protocole de recherche			
1. Faisabilité chronologique du protocole			
2. Protocole compatible avec les pratiques d'éthiques et les exigences réglementaires en vigueur			
B. Faisabilité clinique			
1. Intérêt pharmaco-thérapeutique de la préparation			
2. Bon usage de la préparation : objectif thérapeutique, d'ajustement thérapeutique, de meilleure acceptabilité, d'observance renforcée, de diminution des risques, de traçabilité de la prise			
3. Risque sanitaire vis-à-vis du patient évalué			
4. Pertinence de la préparation (balance bénéfique / Risque évaluée)			
5. Utilisation de la préparation définie : <ul style="list-style-type: none"> - Indication thérapeutique ; - Profils des patients (nourissons, enfants, personnes âgées...); - Posologie justifiée ; - Dosage adapté ; - Voie d'administration. 			
II. DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES			
1. Disponibilité de spécialités pharmaceutiques			
2. Données toxicologiques et cliniques relatives au(x) substance(s) active(s) et excipients de la préparation			
3. Données sur les voies d'administration			
4. Données sur la stabilité et sur la formulation des MP			
5. Données sur la fabrication			
6. Données sur le contrôle de la substance active et MP			
III. FAISABILITÉ TECHNIQUE			
A. Formulation galénique			
1. Choix des excipients			
2. Inertie des excipients			
3. Excipients à effet notoire			
4. Compatibilité physico-chimique de la substance active et excipients			
5. Formulation galénique validée			
6. Similitude <i>VERUM/PLACEBO</i> respectée			
7. Composition qualitative et quantitative déterminée			
8. Procédé de fabrication défini et validé			
B. Personnel			
1. Personnel qualifié et disponible tout au long de l'essai			
2. Formation spécifique nécessaire			
3. Recrutement supplémentaire nécessaire			
4. Protection du personnel			
5. Mise en place d'une organisation et de moyens pour mettre en œuvre les mesures de protection nécessaires			

<p>C. Matériel et locaux</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Locaux de fabrication, de contrôle, de stockage et de mise en quarantaine disponibles 2. Matériel adapté disponible 3. Achat équipements supplémentaires nécessaire 4. Autres contraintes spécifiques sur les locaux et les équipements à prévoir ? 5. Risque vis-à-vis de l'environnement et précautions spécifiques (à préciser) 			
<p>D. Circuit des Matières Premières et Articles de Conditionnement</p> <p>1. Matière première (MP) : PRINCIPE ACTIF EXIPIENTS :.....</p> <ul style="list-style-type: none"> - Provenance de la MP - MP décrits à la Pharmacopée européenne (PE) - Le fournisseur est européen possède un certificat GMP et/ou CEP pour chaque MP fournie - Fournisseur est un distributeur ou importateur européen possédant un certificat GMP - Fabricant ou importateur non européen avec certificat GMP et/ou CEP, certificat ASMF ou DMF - MP Non décrits à la PE donc demande d'une méthode d'identification et de dosage en vu - Demande d'un certificat d'analyse au fournisseur - Non disponibilité des MP en vrac : utilisation des spécialités pharmaceutiques existantes comme source de MP - Données de péremption MP vérifiées - MP à Usage Pharmaceutique disponibles chez un ou plusieurs fournisseurs, lesquels <p>2. Articles de Conditionnement (AC)</p> <ul style="list-style-type: none"> - AC adaptés à la préparation, à lister - AC décrits à la PE - Interactions contenu-contenant réalisées ou, le cas échéant, documentées - Inviolabilité du conditionnement - AC résistants aux conditions de conservation - Autres exigences spécifiques au protocole (à préciser) 			
<p>E. Faisabilité des contrôles</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Contrôle de la MP 2. Contrôle du Produit Fini (PF) 3. Mise au point et validation d'une méthode de dosage 4. Contrôle réalisable sur site ? 5. Contrôle à sous-traiter, à préciser ? 6. Cas particuliers : <ul style="list-style-type: none"> ✓ Si MP apyrogène, contrôle des endotoxines bactériennes à réaliser ✓ Si utilisation d'isotopes stables : Contrôles adéquats prévus : dosage, enrichissement isotopique, toxicité anormale, spectre IR, analyse des schémas de synthèse de la MP 			
<p>F. Stabilités</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Données bibliographiques existantes ou exploitables 			

2. Etude de stabilité nécessaire			
3. Méthode de dosage adaptée au suivi des stabilités			
4. Conditions de conservation déterminées et validées			
IV. ANALYSE DES RISQUES			
1. Procédures et instructions de fabrication rédigées et approuvées			
2. Stockage : capacité suffisante, adapté aux conditions de conservation définies			
3. Délai de fabrication, contrainte spécifique (urgence...)			
V. PLANIFICATION DES FABRICATIONS			
1. Délai de mise à disposition des unités thérapeutiques en cours d'étude			
2. Adéquation de la fabrication avec les exigences du protocole (engagement de la fabrication sur la durée du protocole faisable)			
VI. FAISABILITÉ DES OPÉRATIONS DE CONDITIONNEMENT			
1. Opérations de conditionnement faisables			
2. Prise en compte de stabilité de la préparation			
VII. FAISABILITÉ DES DISTRIBUTIONS			
1. Opérations de distribution faisables			
VIII. FAISABILITÉ ÉCONOMIQUE			
1. Coûts déterminés			
2. Dispositions en cas d'arrêt momentané ou définitif du projet sont prévues			
3. Promoteur non HCL, convention / contrat à signer			
IX. AUTRES			
1. Périodicité acceptable			
2. Durée de l'étude faisable			
3. Quantité d'unités thérapeutiques estimée, schéma général prévisionnel			
4. Autres points spécifiques			

N.B : documents et preuves utiles en annexe.

Date	Signature
-------------	------------------

Annexe II.

Procédé de fabrication de la solution injectable de lévétiracétam dosée à 100 mg/mL

FABRICATION D'UNE SOLUTION INJECTABLE DE LÉVÉTIRACÉTAM À 100 MG/ML POUR L'ESSAI CLINIQUE XXX	« Mot clef » : Fabrication, lévétiracétam Réf. : Pagination : 1/5
---	--

Nom complet	Fabrication d'une solution injectable de lévétiracétam à 100 mg/ml pour l'essai clinique XXX
Code HCL	Néant
Indication du produit	Étude Clinique XXX : Prévention des crises épileptiques à la phase aiguë des accidents vasculaires cérébraux hémorragiques
Voie d'administration	Voie injectable

Type de document :	
Procédure	x
Protocole	o
Instruction/Enregistrement	o
Assurance Qualité	o
Annexe (0)	o

	RÉDACTION	VÉRIFICATION	APPROBATION
Nom - Fonction	Angélique de VAUJANY <i>Stagiaire 5 AHU</i>	El Hadji DIOUF <i>Praticien Attaché</i>	Fabrice PIROT <i>Pharmacien responsable UF</i>
Date	23/08/2013	23/08/2013	23/08/2013
Signature			

	Date de la version	Destinataires	Date de diffusion	Date d'archivage
Date de mise en application		Pharmaciens		
Date de 1^{ère} modification		Préparateurs		

1. OBJET

Cette procédure définit les modalités de fabrication de la solution injectable stérile de lévétiracétam à 100 mg/ml conditionnée dans des flacons blancs de type II de 15 ml remplis à 5 ml pour l'essai clinique « Prévention des crises épileptiques à la phase aiguë des accidents vasculaires cérébraux hémorragiques ».

2. DOMAINES D'APPLICATION ET RESPONSABILITÉS

La fabrication des flacons est effectuée dans le secteur Pharmacotechnie dans la pièce des injectables.

Les ouvriers professionnels effectuent le lavage des flacons, des bouchons et capsules et participent également dans la chaîne de conditionnement.

Les préparateurs du secteur réalisent le mélange de la solution aqueuse, la mise en place du matériel nécessaire pour la fabrication et le remplissage aseptique des flacons.

Les techniciens de laboratoire réalisent les contrôles physico-chimiques et microbiologiques.

Les pharmaciens du secteur valident les contrôles, la production et libèrent le lot.

3. DOCUMENTS DE REFERENCE

- Bonnes Pratiques de Préparation 2007/ 7 bis
- Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition 2013
- Bonnes Pratiques de Fabrication 2011/ 8 bis
- Manuel Assurance Qualité « édition en vigueur »
- Procédure des procédures «PR-UF-01-2»
- Normes ISO 9001 : version 2008

4. DESCRIPTION DE L'ACTIVITÉ

4.1 Catégorie de produit

Préparation hospitalière pour essai clinique

4.2 Réglementation des toxiques

Liste 1

4.3 Conditionnement

- Conditionnement primaire :

- Flacons de 15 ml, verre blanc type II col 20 mm
- Bouchons rouges en chlorobutyl pour perfusion, de diamètre 20 mm
- Capsules en aluminium de diamètre 20 mm

- Conditionnement secondaire : cartons

4.4 Étiquetage

Voir modèle ci-dessous.

Pharmacie - Hôpital E. Herriot 69437 Lyon cedex 03

Etude: XXX (Dr XXX)

Promoteur: Hospices Civils de Lyon, 3 quai des Célestins, 69229 Lyon Cedex 02

LEVETIRACETAM / PLACEBO

500 mg – 5 ml

(100 mg/ml)

Solution pour perfusion à diluer – Voie IV

PATIENT n ° : [][][][] Initiales : ... / ...

N° de lot: AAMMJJ (*verum*)-AAMMJJ (*placebo*) DLU: 1 an

Conservation entre 15°C et 25°C

Médicament pour essai clinique – à utiliser selon le protocole de l'étude

Ne pas laisser à la portée des enfants

4.5 Durée de validité

- 1 an, étude de stabilité en cours.

4.6 Précautions particulières / sécurité du personnel

- Gants stériles
- Combinaisons départiculées
- Combinaisons stériles.

4.7 Production et Contrôle

A / Formule qualitative et quantitative du lot de 300 flacons

<i>Matières premières</i>	<i>Quantités théoriques en Poids ou Volume</i>
Lévétiracétam	185 g
Acétate de sodium trihydraté	3,034 g
Chlorure de sodium 0,9 %	QSP 1850 ml
Acide acétique glacial	Ajustement pH 5,0 à 6,0

B / Matériel

- 1 container inox de 5 litres
- 1 éprouvette de 2 litres
- 1 barreau magnétique
- 1 agitateur magnétique
- 1 ligne de filtration LR 209
- 1 papillon de connexion
- 4 tuyaux « souple » 3,2 mm
- 2 connecteurs « Y » 3,2 mm
- 1 buse de remplissage diamètre 3,2 mm
- 1 éprouvette de 100 ml (pour calibrage pompe)
- 1 béccher de 250 ml (pour purger la pompe avant calibration)
- 2 bécchers de volume minimum de 150 ml
- 1 baldaquin (classe A dans un environnement B)
- 1 sertisseuse.

C / Mode opératoire

- Peser 185 g de lévétiracétam et 3,034 g d'acétate de sodium trihydraté dans deux béchers différents
- Introduire les poudres dans l'éprouvette de 2 litres
- Rincer les béchers avec un petit volume de NaCl 0.9 % puis transférer le liquide dans l'éprouvette
- Introduire 1500 ml de NaCl 0,9 %
- Mélanger jusqu'à dissolution totale à l'aide de l'agitateur magnétique et du barreau magnétique
- Retirer le barreau magnétique
- Faire un QSP à 1850 ml, homogénéiser puis ajuster si besoin le pH entre 5 et 6 avec l'acide acétique glacial
- Transvaser la solution dans le container de 5 litres.
- Mettre en marche la hotte à flux laminaire vertical (baldaquin)
- Placer la ligne de filtration LR 209 et le papillon de connexion sous le baldaquin de façon stérile
- Installer la pompe péristaltique de remplissage PD10i sous le baldaquin
- Installer l'unité centrale MC 10 sous le baldaquin
- Connecter les tuyaux de la pompe avec les connecteurs « Y »
- Installer ces tuyaux dans la pompe péristaltique de remplissage PD10i sous le baldaquin
- Insérer le tuyau au niveau du 1^{er} raccord connecteur « Y » au papillon de connexion et le fixer à l'aide de colring
- Connecter la sortie de la ligne de filtration de l'autre côté du papillon de connexion.
- Connecter l'entrée de la ligne de filtration LR 209 (filtration stérilisante 0,22 µm) à la sortie du container inox de 5 litres
- Fixer un colring sur la sortie du container inox pour éviter les fuites
- Réaliser le remplissage unitaire des flacons à **5,5 mL** avec la pompe péristaltique
- Boucher les flacons avec les bouchons rouges en chlorobutyl
- Placer les capsules en aluminium puis sertir
- Tous les flacons sont stérilisés à l'autoclave (plateau de stérilisation : 121°C / 20 mn)
- Mirage et étiquetage des flacons.

NB : l'ensemble du matériel en contact avec la solution aqueuse est préalablement lavé, désinfecté (flacons, bouchons) et dépyrogénéisé (éprouvette et container en inox).

D / Modalités de conservation

Les flacons doivent être conservés à température ambiante entre 15°C et 25°C.

E / Contrôle Qualité

Les contrôles physico-chimiques et microbiologiques sont réalisés sur 22 flacons.

F / Echantillothèque

Les échantillons (20 flacons) pour l'échantillothèque sont conservés dans le local échantillothèque.

5 GESTION DES DOCUMENTS ASSOCIES

5.1. Enregistrements

Enregistrer la fabrication dans :

- Le tableau de suivi des consommations des fabrications
- Le planning prévisionnel des libérations

Annexe III.

Procédé de fabrication des gélules de lévétiracétam 500 mg

INSTRUCTION DE FABRICATION DES GELULES DE LÉVÉTIRACÉTAM DANS LE CADRE DE L'ESSAI CLINIQUE XXX	« Mots clefs » : Lévétiracétam, Gélules, Fabrication, Essai Clinique XXX
	Réf. : Pagination : 1/6

Nom complet	Instruction de fabrication des gélules de lévétiracétam dans le cadre de l'essai clinique XXX
Code HCL	NA
Indication du produit	Étude Clinique XXX : Prévention des crises épileptiques à la phase aiguë des accidents vasculaires cérébraux hémorragiques
Voie d'administration	Voie orale

Type de document :	
Procédure	o
Protocole	o
Instruction/Enregistrement	x
Assurance Qualité	o
Annexe	o

	RÉDACTION	VÉRIFICATION	APPROBATION
Nom - Fonction	Angélique de VAUJANY <i>Stagiaire 5 AHU</i>	Lamine TALL <i>Pharmacien Assistant</i> Sylvain BASSET <i>Préparateur en Pharmacie</i>	Fabrice PIROT <i>Pharmacien responsable du secteur</i> Christine PIVOT <i>Pharmacien Chef de service</i>
Date	23/08/2013	23/08/2013	
Signature			

	Date de la version	Destinataires	Date de diffusion	Date d'archivage
Date de mise en application		▪ Pharmacie Edouard HERRIOT		
Date de 1^{ère} modification				

1. OBJET

Cette instruction a pour objet de décrire les différentes étapes pour la fabrication des gélules de lévétiracétam utilisées pour l'essai clinique XXX.

2. DOMAINES D'APPLICATION

Cette instruction s'applique exclusivement à la fabrication des gélules lévétiracétam dosées à 500 mg.

Elle concerne le personnel formé et habilité dans l'UF « Préparation et Contrôle de médicaments »:

- Préparateurs en Pharmacie
- Pharmaciens
- Internes en pharmacie.

3. DOCUMENTS DE REFERENCE

- Articles L.5212 -2 et R5212-14 et suivants du code de santé publique
- Bonnes Pratiques de Préparation, bulletin officiel N°2007/7Bis
- Pharmacopée Européenne, 7^{ème} édition, 2013
- Procédure des procédures « **PR-UF-01-2** »
- Guide du préparateur en Pharmacie
- Abrégé de Pharmacie Galénique - formes pharmaceutiques : le HIR

4. DESCRIPTION DE L'ACTIVITE

4.1 Précautions particulières

Pour la réalisation de cette fabrication, le personnel doit s'astreindre à des règles d'hygiène des mains et d'habillement spécifique :

- Port de sur-chaussures
- Port des lunettes de protection
- Port d'une charlotte
- Port d'un masque
- Lavage simple des mains + désinfection
- Port d'une tenue adaptée
- Port de gants stériles

L'accès aux ZAC et le lavage des mains sont effectués conformément aux instructions en vigueur dans l'unité fonctionnelle « Préparation et contrôle de médicaments ».

4.2 Matériels :

Poudre de lévétiracétam
Poudre de lactose monohydraté
Poudre de carmin de cochenille
Gélulier semi-automatique
Champs stériles 75*90 cm
Champs stériles 45*75 cm
Lunettes de protection
Mortier porcelaine 2000 mL
Pilon en porcelaine pour mortier 2000 mL
Cure mortier
Balance SARTORIUS LA4200S

Gants stériles
Charlotte
Sarrau stérile ou une combinaison adaptée
Sur-chaussures
Masque
Chariot inox
Pots inviolables 250 mL en Polyéthylène
Couvercles pour pots 250 mL
Compresse stériles
Alcool 70°
Poudrier
Sachets transparents
Spatules
Gélules n°00 ivoires

4.3 Formule qualitative et quantitative de la fabrication

Formule exacte pour	1 gélule	300 gélules
Lévétiracétam	500 mg	150 g
Lactose monohydraté	66 mg	19,8 g
Carmin de cochenille		Pointe

4.4 Enregistrement de la préparation

Inscrire sur ordonnancier :

- Date de préparation
- Numéro d'ordonnancier
- Intitulé de la préparation : nom, dosage et forme galénique
- Identification de l'opérateur.

Remplir la fiche de fabrication et éditer les étiquettes à partir du logiciel AMETIS :

- Coller des étiquettes sur la fiche de fabrication et sur tous les pots en polyéthylène destinés à conditionner les gélules remplies.

4.5 Fabrication des gélules

- Mettre une paire de gants stériles
- Désinfecter tout le matériel susceptible d'être en contact avec les produits
- Calibrer la balance de précision choisie
- Peser individuellement les poudres (penser à garder le ticket de pesée) pour une série de 300 gélules
- Ajouter les poudres les unes après les autres, dans un mortier en porcelaine préalablement passé à l'alcool
- Pour obtenir l'homogénéité, triturer le mélange pulvérulent en remuant plusieurs fois avec la carte
- Prévoir 3 demi feuilles A4 pour la triple pesée de la poudre totale
- Sur chacune des demi-feuilles A4, tarer la balance et réaliser ensuite une pesée avec le tiers de la quantité de poudre pour 100 gélules (penser à garder le ticket de pesée)
- Placer les corps des gélules vides taille 00 de couleur ivoire sur le gélulier
- Remplir les gélules avec la poudre à l'aide d'une carte (remplissage par série de 100 gélules à chaque fois avec la poudre pesée sur chaque demi-feuille A4)
- Nettoyer le support du gélulier à l'aide d'une compresse
- Répéter les quatre dernières étapes pour les deux autres pesées de poudre se trouvant sur les demi-feuilles A4

- Pour les gélules destinées au contrôle, prélever 9 gélules pleines pour les deux premières séries de 100 gélules fabriquées et 8 gélules pour la dernière série
- Nettoyer l'extérieur des gélules avec des compresses stériles
- Conditionner dans les pots inviolables blancs toutes les gélules fabriquées
- Mettre dans un bac, le gélulier, le cure mortier, le mortier, le pilon et les spatules pour le nettoyage
- Mettre un élastique autour des trois pots inviolables et apposer ensuite une étiquette « EN CONTROLE »
- Transmettre au secteur laboratoire contrôle dans des sachets blancs étiquetés, 26 gélules pleines et 5 gélules vides pour les contrôles physico-chimiques.

4.6 Modèle d'étiquette provisoire

Pharmacie Edouard Herriot- 69437 Lyon cedex 03	
Essai clinique XXX – Promoteur HCL	
Gélules LEVETIRACETAM « 500 mg »	
Gélules ivoires taille 00 – Voie Orale	
Lévétiracétam :.....	500 mg
Lactose monohydraté :.....	66 mg
Carmin de cochenille :.....	Pointe
Lactose monohydraté : excipient à effet notoire	
N° ordonnancier :	N° de lot :
Date de fabrication :	Date de péremption :
Conservation dans un endroit sec à température ambiante	
Respecter les doses prescrites	
Uniquement sur ordonnance	

4.7 Traçabilité

- La fiche de fabrication doit être remplie correctement
- Le tableau de suivi des consommations des fabrications est complété
- Le tableau de traçabilité des matières premières est mis à jour.

4.8 Conservation

- Les gélules de lévétiracétam sont conservées dans un endroit sec à température ambiante.

4.9 Contrôles réalisés

Les contrôles physico-chimiques réalisés par l'unité « Préparation et Contrôles de Médicaments » de l'Hôpital Edouard Herriot :

- Aspect macroscopique des gélules : taille 00 ivoire
- Uniformité de masse
- Dosage du lévétiracétam
- Identification du lactose monohydraté.

Les lots de gélules de lévétiracétam sont placés en quarantaine dans le local des Essais Cliniques, pendant la durée des analyses physico-chimiques.

4.10 Libération du lot

La libération finale des lots de gélules est effectuée par deux pharmaciens du secteur « Préparation et Contrôle du Médicament ».

Après libération, l'original du dossier de lot est transmis au secteur Essais cliniques pour archivage et une copie est conservée dans le secteur Galénique.

5 GESTION DES DOCUMENTS ASSOCIES

- Fiche de fabrication des gélules de lévétiracétam.

Annexe IV.

Protocole de validation du dosage du lévétiracétam par HPLC

METHODE DE DOSAGE DU LÉVÉTIRACÉTAM PAR HPLC	« Mot clef » : Validation analytique, lévétiracétam, dosage, HPLC
	Réf. : Pagination : 1/7

Nom complet	Méthode de dosage du lévétiracétam par HPLC
Code HCL	
Indication du produit	Essai Clinique « XXX » : Prévention des crises épileptiques à la phase aiguë des accidents vasculaires cérébraux hémorragiques
Voie d'administration	Orale ou intraveineuse

Type de document :	
Procédure	o
Protocole	x
Instruction/Enregistrement	o
Assurance Qualité	o
Annexe	o

	RÉDACTION	VÉRIFICATION	APPROBATION
Nom - Fonction	Angélique de VAUJANY <i>Stagiaire 5 AHU</i>	Lamine TALL <i>Pharmacien Assistant</i>	Fabrice PIROT <i>Pharmacien responsable du secteur</i>
Date	23/08/2013		
Signature			

	Date de la version	Destinataires	Date de diffusion	Date d'archivage
Date de mise en application		<ul style="list-style-type: none"> ✓ Techniciens de laboratoire ✓ Pharmaciens 		
Date de 1^{ère} modification		<ul style="list-style-type: none"> ✓ Internes en Pharmacie 		

1. OBJET

Description du protocole de validation analytique du lévétiracétam dans des gélules dosées à 500 mg ou dans des solutions injectables dosées à 100 mg/ml.

2. DOMAINES D'APPLICATION

Ce protocole s'applique aux gélules dosées à 500 mg ou à la solution injectable dosée à 100 mg/ml. Ce protocole concerne le personnel habilité pour la réalisation du dosage par la chromatographie liquide :

- Techniciens du laboratoire de contrôle HEH et les techniciens du laboratoire de Pharmacie Galénique de la faculté de Pharmacie
- Pharmaciens
- Internes en Pharmacie
- Etudiants en Pharmacie.

3. DOCUMENTS DE REFERENCE

- Procédure générale de validation analytique : **PR-CQ-P-Q-16-2**
- Instruction d'utilisation de la chaîne HPLC
- Guide de validation analytique de la SFSTP
- ICH Q2B : méthodologie de la validation analytique
- Procédure des procédures « PR-UF-01-2 »
- Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition 2013
- Bonnes Pratiques de Préparation 2007/7bis

4. PLAN EXPERIMENTAL

La validation consiste en l'évaluation des critères suivants :

- Spécificité
- Linéarité
- Fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire)
- Exactitude
- Limite de détection
- Limite de quantification

Pour toute modification de la méthode ou du matériel, une revalidation complète ou partielle peut être nécessaire.

La validation est réalisée dans les conditions chromatographiques suivantes :

- ✓ Colonne :
 - C18 classique : PHENOMENEX SYNERGI 4 μ FUSION-RP 80 Å
 - Dimensions : L = 100 mm, diamètre : 4,6 mm
 - Phase stationnaire : gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie *R* (4 μ m)
- ✓ Phase mobile : méthanol/eau acidifiée par H₃PO₄ (pH 2,8-3) (25/75)
- ✓ Débit : 1 mL/min
- ✓ Détection UV: spectrophotomètre à **210 nm**
- ✓ Injection : 10 μ L de la solution à examiner
- ✓ Enregistrement : 5 min
- ✓ Temps de rétention : lévétiracétam = 2.65 \pm 0.1 mn
- ✓ Température échantillon : 25°C
- ✓ Température colonne : 50°C

✓ **Composition qualitative et quantitative d'une gélule**

	Dosage à 500 mg
Lévétiracétam (mg)	500
Lactose (mg)	66

✓ **Composition qualitative et quantitative d'une solution injectable**

	Dosage à 100 mg/ml
Lévétiracétam	100 mg
Acétate de sodium trihydraté	1,64 mg
Chlorure de sodium 0,9 % spécialité pharmaceutique	Qsp 1 mL
Acide acétique glacial	Ajustement pH 5,0 à 6,0

Préparation de la solution mère à 1 mg/mL :

- ✓ Peser 15 mg de l'étalon Pharmacopée Européenne de lévétiracétam.
- ✓ Dissoudre la poudre dans 15 mL d'eau ppi.

A. Spécificité

La spécificité consiste à vérifier que le chromatogramme obtenu est caractéristique de la substance à analyser.

Il faut réaliser 3 chromatogrammes différents :

- un chromatogramme d'une solution de lévétiracétam seul à 1 mg/mL (15 mg dans 15 mL d'eau) diluée au 1/10 dans un mélange de méthanol/eau acidifiée par H₃PO₄ (pH 2,8-3) (25/75) (solution à 100 µg/mL en lévétiracétam)
- un chromatogramme d'une solution d'un mélange de 15 mg de lévétiracétam avec 200 mg de lactose en respectant le protocole ci-dessus (solution à 100 µg/mL en lévétiracétam)
- un chromatogramme d'une solution de lévétiracétam (1 mg/ml) préparée à partir de la forme pharmaceutique reconstituée de la solution. Cette solution est ensuite diluée au 1/10 dans un mélange de méthanol/eau acidifiée par H₃PO₄ (pH 2,8-3) (25/75) (solution à 100 µg/mL en lévétiracétam).

La superposition des 3 chromatogrammes (temps de rétention et aires sous la courbe identiques) montre l'absence d'interférence.

B. Linéarité

La linéarité d'une procédure est sa capacité, à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage, d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en substance dosée.

Préparer 3 gammes d'étalonnage à raison d'une gamme par jour et par opérateur.

	60 %	80 %	100 %	120 %	140 %
J1	0,6 mL	0,8 mL	1 mL	1,2 mL	1,4 mL
J2	0,6 mL	0,8 mL	1 mL	1,2 mL	1,4 mL
J3	0,6 mL	0,8 mL	1 mL	1,2 mL	1,4 mL
Prélever le volume indiqué de solution mère de lévétiracétam à 1 mg/mL et compléter à 10 mL avec un mélange de méthanol/eau ppi acidifiée par H ₃ PO ₄ (pH 2,8-3) (25/75)					
Concentration théorique (µg/mL)	60	80	100	120	140

La linéarité est évaluée par l'analyse de la régression linéaire, on détermine pour cela :

- L'équation de la droite
- Le coefficient de corrélation
- Test de l'ordonnée à l'origine
- Existence d'une pente
- Validité de la droite.

Les représentations graphiques de la droite moyenne sont réalisées.

C. L'exactitude

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur théorique attendue.

L'étude est réalisée sur 3 jours à tous les points de la gamme d'étalonnage.

Le résultat de l'exactitude est exprimé en % de recouvrement.

$$\text{Taux de recouvrement} = \frac{\text{Concentration essai}}{\text{Concentration théorique}} \times 100$$

D. Fidélité : répétabilité et fidélité intermédiaire

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions précises.

La fidélité peut être évaluée à 2 niveaux :

- Fidélité intermédiaire (Variation intra laboratoire)
- Répétabilité.

❖ Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire permet d'étudier les variations liées au jour, à l'opérateur et au matériel. Cette étude est réalisée en même temps que celle de la linéarité sur 3 jours.

Pour cela, préparer trois séries de six solutions différentes à 100 % de la concentration théorique en lévétiracétam à raison d'une série par jour et par opérateur.

	100 %	
J1	1 mL	x6
J2	1 mL	x6
J3	1 mL	x6
Prélever le volume indiqué de solution mère de lévétiracétam à 1 mg/mL et compléter à 10 mL avec un mélange de méthanol/eau ppi acidifiée par H ₃ PO ₄ (pH 2,8-3) (25/75)		
Concentration théorique (µg/mL)	100	

❖ Répétabilité

Effectuer une série de six mesures à 100 % de la concentration théorique en lévétiracétam. Cette étude est réalisée en même temps que celle de la linéarité sur 3 jours.

	100 %
Volume de solution mère de lévétiracétam à 1 mg/mL à prélever	1 mL
Compléter à 10 mL avec un mélange de méthanol/eau ppi acidifiée par H ₃ PO ₄ (pH 2,8-3) (25/75)	
Concentration théorique (µg/mL)	100

E. Limite de détection

La limite de détection (LD) permet de déterminer la valeur la plus faible détectable mais non quantifiable.

$$LD = 3,3 \sigma/P$$

Avec :

σ : écart-type de l'ordonnée à l'origine des gammes d'étalonnage

P : moyenne des pentes des gammes d'étalonnage.

F. Limite de quantification

La limite de quantification (LQ) permet de déterminer la plus faible quantité détectable et quantifiable avec précision.

$$LQ = 10 \sigma/P$$

Avec :

σ : écart-type de l'ordonnée à l'origine des gammes d'étalonnage

P : moyenne des pentes des gammes d'étalonnage.

G. Statistiques et arbres de décision

Le traitement statistique est effectué selon les recommandations de la procédure générale de validation analytique (version en vigueur).

H. Rapport de validation

Toute validation analytique doit faire l'objet d'un rapport de validation.

Le rapport devra être structuré selon la procédure générale de validation analytique (version en vigueur).

5. CRITERES D'ACCEPTATION

Les critères d'acceptations sont définis dans le tableau suivant :

		Paramètres	Critères d'acceptation
Spécificité		Temps de rétention et aires sous la courbe	Superposition des chromatogrammes avec Tr et surfaces identiques
Linéarité		Coefficient de corrélation	$r \geq 0,99$ (5 points)
		Test de l'ordonnée à l'origine	$K < t (0,05 ; ddl = N-2)$
		Existence d'une pente	$F_1 > F (0,05 ; 1 ; ddl = N-2)$ Si F_1 est significatif, on conclut à l'existence d'une pente significativement différente de zéro donc à une dépendance linéaire au seuil de probabilité considéré
		Validité de la droite	$F_2 < F (0,05 ; k-2 ; N-k)$ Si F_2 n'est pas significatif, l'ajustement est considéré comme valide au seuil de probabilité considéré
Exactitude		Pourcentage de recouvrement	95 – 105 %
Fidélité	Répétabilité	Coefficient de variation	$\leq 5,0 \%$
	Fidélité intermédiaire	Coefficient de variation	$\leq 5,0 \%$

F_1 et F_2 : valeurs décisionnelles selon le test de Fisher

K : valeur décisionnelle selon le test de Student

k : nombre de jours

N : nombre de points expérimentaux

r : coefficient de corrélation

Tr : temps de rétention

Annexe V.

Protocole de validation du dosage du lévétiracétam en présence de lactose par HPLC

METHODE DE DOSAGE DU LÉVÉTIRACÉTAM EN PRESENCE DE LACTOSE	« Mot clef » : Lévétiracétam, lactose, dosage, HPLC
	Réf. : Pagination : 1/7

Nom complet	Méthode de dosage du lévétiracétam en présence du lactose par HPLC
Code HCL	
Indication du produit	Essai Clinique « XXX » : Prévention des crises épileptiques à la phase aiguë des accidents vasculaires cérébraux hémorragiques
Voie d'administration	Orale

Type de document :	
Procédure	o
Protocole	x
Instruction/Enregistrement	o
Assurance Qualité	o
Annexe	o

	RÉDACTION	VÉRIFICATION	APPROBATION
Nom - Fonction	Angélique de VAUJANY <i>Stagiaire 5 AHU</i>	Lamine TALL <i>Pharmacien Assistant</i>	Fabrice PIROT <i>Pharmacien responsable du secteur</i>
Date	23/08/2013		
Signature			

	Date de la version	Destinataires	Date de diffusion	Date d'archivage
Date de mise en application		✓ Techniciens de laboratoire ✓ Pharmaciens ✓ Internes en Pharmacie		
Date de 1^{ère} modification				

1. OBJET

Description du protocole de validation analytique du lévétiracétam avec lactose dans des gélules dosées à 500mg.

2. DOMAINES D'APPLICATION

Ce protocole s'applique aux gélules dosées à 500 mg. Ce protocole concerne le personnel habilité pour la réalisation du dosage par la chromatographie liquide :

- Techniciens du laboratoire de contrôle HEH et les techniciens du laboratoire de Pharmacie Galénique de la faculté de Pharmacie
- Pharmaciens
- Internes en Pharmacie
- Etudiants en Pharmacie.

3. DOCUMENTS DE REFERENCE

- Procédure générale de validation analytique : **PR-CQ-P-Q-16-2**
- Instruction d'utilisation de la chaîne HPLC
- Guide de validation analytique de la SFSTP
- ICH Q2B : méthodologie de la validation analytique
- Procédure des procédures « PR-UF-01-2 »
- Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition 2013
- Bonnes Pratiques de Préparation 2007/7bis

4. PLAN EXPERIMENTAL

La validation consiste à l'évaluation des critères suivants :

- Spécificité
- Linéarité
- Fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire)
- Exactitude
- Limite de détection
- Limite de quantification.

Pour toute modification de la méthode ou du matériel, une revalidation complète ou partielle peut être nécessaire.

La validation est réalisée dans les conditions chromatographiques suivantes :

- ✓ Colonne :
 - C18 classique : PHENOMENEX SYNERGI 4 μ FUSION-RP 80 Å
 - Dimensions : L = 100 mm, diamètre : 4,6 mm
 - Phase stationnaire : gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R(4 μ m)
- ✓ Phase mobile : méthanol/eau acidifiée par H₃PO₄ (pH 2,8-3) (25/75)
- ✓ Débit : 1 mL/min
- ✓ Détection UV: spectrophotomètre à **210 nm**
- ✓ Injection : 10 μ L de la solution à examiner
- ✓ Enregistrement : 5 min
- ✓ Temps de rétention : lévétiracétam = environ 2.65 \pm 5 % mn
- ✓ Température échantillon : 25°C
- ✓ Température colonne : 50°C

✓ **Composition qualitative et quantitative d'une gélule**

	Dosage à 500 mg
Lévétiracétam (mg)	500
Lactose monohydraté (mg)	66

Préparation de la solution mère à 1 mg/mL :

- ✓ Peser 15 mg de l'étalon Pharmacopée Européenne de lévétiracétam et 200 mg de lactose.
- ✓ Dissoudre la poudre dans 15 mL d'eau ppi.

A. Spécificité

La spécificité consiste à vérifier que le chromatogramme obtenu est caractéristique de la substance à analyser.

Il faut réaliser :

- d'une part un chromatogramme d'une solution de lévétiracétam seul à 1 mg/mL (15 mg dans 15 mL d'eau) diluée au 1/10 dans un mélange de méthanol/eau acidifiée par H₃PO₄ (pH 2,8-3) (25/75) (solution à 100 µg/mL en lévétiracétam)
- d'autre part un chromatogramme d'une solution d'un mélange de 15 mg de lévétiracétam avec 200 mg de lactose en respectant le protocole ci-dessus (solution à 100 µg/mL en lévétiracétam)

La superposition des deux chromatogrammes (temps de rétention identiques) montre l'absence d'interférence.

B. Linéarité

La linéarité d'une procédure est sa capacité, à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage, d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en substance dosée.

Préparer 3 gammes d'étalonnage à raison d'une gamme par jour et par opérateur.

	60 %	80 %	100 %	120 %	140 %
J1	0,6 mL	0,8 mL	1 mL	1,2 mL	1,4 mL
J2	0,6 mL	0,8 mL	1 mL	1,2 mL	1,4 mL
J3	0,6 mL	0,8 mL	1 mL	1,2 mL	1,4 mL
Prélever le volume indiqué de solution mère de lévétiracétam avec lactose à 1 mg/mL et compléter à 10 mL avec un mélange de méthanol/eau ppi acidifiée par H ₃ PO ₄ (pH 2,8-3) (25/75)					
Concentration théorique (µg/mL)	60	80	100	120	140

La linéarité est évaluée par l'analyse de la régression linéaire, on détermine pour cela :

- L'équation de la droite
- Le coefficient de corrélation
- Test de l'ordonnée à l'origine
- Existence d'une pente
- Validité de la droite.

Les représentations graphiques de la droite moyenne sont réalisées.

C. L'exactitude

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur théorique attendue.

L'étude est réalisée sur 3 jours à tous les points de la gamme d'étalonnage.

Le résultat de l'exactitude est exprimé en % de recouvrement.

$$\text{Taux de recouvrement} = \frac{\text{Concentration essai}}{\text{Concentration théorique}} \times 100$$

D. Fidélité : répétabilité et fidélité intermédiaire

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions précises.

La fidélité peut être évaluée à 2 niveaux :

- Fidélité intermédiaire (Variation intra laboratoire)
- Répétabilité.

❖ Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire permet d'étudier les variations liées au jour, à l'opérateur et au matériel. Cette étude est réalisée en même temps que celle de la linéarité sur 3 jours.

Pour cela, préparer trois séries de six solutions différentes à 100 % de la concentration théorique en lévétiracétam à raison d'une série par jour et par opérateur.

	100 %	
J1	1 mL	x6
J2	1 mL	x6
J3	1 mL	x6
Prélever le volume indiqué de solution mère de lévétiracétam avec lactose à 1 mg/mL et compléter à 10 mL avec un mélange de méthanol/eau ppi acidifiée par H ₃ PO ₄ (pH 2,8-3) (25/75)		
Concentration théorique (µg/mL)	100	

❖ Répétabilité

Effectuer une série de six mesures à 100 % de la concentration théorique en lévétiracétam. Cette étude est réalisée en même temps que celle de la linéarité sur 3 jours.

	100 %	
Volume de solution mère de lévétiracétam avec lactose à 1 mg/mL à prélever	1 mL	X6
Compléter à 10 mL avec un mélange de méthanol/eau ppi acidifiée par H ₃ PO ₄ (pH 2,8-3) (25/75)		
Concentration théorique (µg/mL)	100	

E. Limite de détection

La limite de détection (LD) permet de déterminer la valeur la plus faible détectable mais non quantifiable.

$$LD = 3,3 \sigma/P$$

Avec :

σ : écart-type de l'ordonnée à l'origine des gammes d'étalonnage

P : moyenne des pentes des gammes d'étalonnage.

F. Limite de quantification

La limite de quantification (LQ) permet de déterminer la plus faible quantité détectable et quantifiable avec précision.

$$LQ = 10 \sigma/P$$

Avec :

σ : écart-type de l'ordonnée à l'origine des gammes d'étalonnage

P : moyenne des pentes des gammes d'étalonnage.

G. Statistiques et arbres de décision

Le traitement statistique est effectué selon les recommandations de la procédure générale de validation analytique (version en vigueur).

H. Rapport de validation

Toute validation analytique doit faire l'objet d'un rapport de validation.

Le rapport devra être structuré selon la procédure générale de validation analytique (version en vigueur).

5. CRITERES D'ACCEPTATION

Les critères d'acceptations sont définis dans le tableau suivant :

		Paramètres	Critères d'acceptation
Spécificité		Temps de rétention et aires sous la courbe	Superposition des chromatogrammes avec Tr et surfaces identiques
Linéarité		Coefficient de corrélation	$r \geq 0,99$ (5 points)
		Test de l'ordonnée à l'origine	$K < t (0,05 ; ddl = N-2)$
		Existence d'une pente	$F_1 > F (0,05 ; 1 ; ddl = N-2)$ Si F_1 est significatif, on conclut à l'existence d'une pente significativement différente de zéro donc à une dépendance linéaire au seuil de probabilité considéré
		Validité de la droite	$F_2 < F (0,05 ; k-2 ; N-k)$ Si F_2 n'est pas significatif, l'ajustement est considéré comme valide au seuil de probabilité considéré
Exactitude		Pourcentage de recouvrement	90 – 110 %
Fidélité	Répétabilité	Coefficient de variation	$\leq 5,0 \%$
	Fidélité intermédiaire	Coefficient de variation	$\leq 5,0 \%$

F1 et F2 : valeurs décisionnelles selon le test de Fisher

K : valeur décisionnelle selon le test de Student

k : nombre de jours

N : nombre de points expérimentaux

r : coefficient de corrélation

Tr : temps de rétention

Annexe VI.

Rapport de validation du dosage du lévétiracétam par HPLC

RAPPORT DE VALIDATION ANALYTIQUE DU DOSAGE DU LÉVÉTIRACÉTAM	« Mot clef » : Validation, Dosage, lévétiracétam, HPLC
	Réf. : Pagination : 1/5

Nom complet	Rapport de validation analytique du dosage du lévétiracétam par HPLC
Code HCL	
Indication du produit	Etude Clinique XXX : Prévention des crises épileptiques à la phase aiguë des accidents vasculaires cérébraux hémorragiques
Voie d'administration	Orale

Type de document :	
Procédure	o
Protocole	o
Instruction/Rapport validation	x
Assurance Qualité	o
Annexes (Fichiers Excel)	x

	RÉDACTION	VÉRIFICATION	APPROBATION
Nom - Fonction	Angélique de VAUJANY <i>Stagiaire 5 AHU</i>	Lamine TALL <i>Pharmacien Assistant</i>	Fabrice PIROT <i>Pharmacien Responsable de l'UF</i>
Date	23/08/2013		
Signature			

	Date de la version	Destinataires	Date de diffusion	Date d'archivage
Date de mise en application		<ul style="list-style-type: none">• Techniciens de laboratoire• Pharmaciens• Internes et étudiants en Pharmacie		
Date de 1^{ère} modification				

I. OBJET

Démarche de validation d'une méthode analytique appliquée au dosage du lévétiracétam dans des gélules à 500 mg et dans une solution injectable à 100 mg/mL utilisés dans l'essai clinique XXX « Prévention des crises épileptiques à la phase aiguë des accidents vasculaires cérébraux hémorragiques ».

Présentation des données expérimentales permettant de valider la technique de dosage du lévétiracétam par HPLC.

II. DOMAINES D'APPLICATION

Dosage du **lévétiracétam** aux concentrations théoriques de 60 – 80 – 100 – 120 – 140 µg/mL.

III. PRÉSENTATION DE LA DÉMARCHE DE VALIDATION

Le mode opératoire est présenté dans le document : « Méthode de dosage du lévétiracétam en solution par HPLC ».

Il a été réalisé 3 gammes d'étalonnage et des essais de répétabilité par trois opérateurs différents sur 3 jours. Les données brutes sont présentées en annexe de ce document.

Les résultats des différents essais ont été utilisés pour valider la linéarité, l'exactitude et la fidélité intermédiaire.

1. SPÉCIFICITÉ

La superposition des deux chromatogrammes (temps de rétention et aires sous la courbe identiques) montre l'absence d'interférences.

2. LINEARITÉ

a) Régression linéaire :

La relation linéaire entre les aires sous la courbe (u.a.) et le dosage des solutions préparées (µg/mL) se vérifie par une régression :

La droite d'étalonnage suit un modèle linéaire du type $y = b.x + a$

Où "y" représente le signal du lévétiracétam en unité arbitraire (A)

"b" est la pente de la droite

"a" est l'intercepte à l'origine

"x" est l'équivalent concentration en µg/mL

L'équation établie par la régression est : $y = 11,724.x - 28,004$

(Avec $r = 0,9972$)

Test de validité de la droite de régression

$F = S_L^2/S_E^2 = 1,22 < F_{0,05}^{3,10} = 3,71$ (valeur limite de décision)

Où S_L^2 = variance des erreurs d'ajustement

S_E^2 = variance des erreurs expérimentales

⇒ L'ajustement de la droite de régression est considéré comme valide au risque de 5 %.

b) Test de comparaison de « a » avec zéro :

$$a/S_a = 1,10 < t(0,05, 13) = 2,16$$

Où S_a = l'écart type de l'ordonnée à l'origine

⇒ L'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de zéro au risque de 5 %.

c) Test de validité de la droite

Test de Cochran :

$$C = \frac{S_{\max}^2}{\sum_{j=1}^k S_j^2} = 0,014 < C_{0,05}^{5,2} = 0,841 \text{ (valeur limite de décision)}$$

Où S_{\max}^2 = variance la plus élevée des k groupes j
 S_j^2 = variance du groupe j

⇒ Homogénéité des variances des 5 groupes de concentrations différentes au risque de 5%

⇒ Nous pouvons donc tester l'existence d'une pente significativement différente de zéro.

Test de l'existence d'une pente significative ($b \neq 0$)

$$F = \frac{S_I^2}{S_R^2} = 2282,12 > F_{0,05}^{1,13} = 4,67 \text{ (valeur limite de décision)}$$

Où S_I^2 = variance due à la variation de la régression
 S_R^2 = variance résiduelle

On rejette l'hypothèse nulle $b = 0$.

⇒ Il existe une pente significativement différente de zéro au risque de 5 %.

3. EXACTITUDE

Elle représente la somme de la justesse et de la fidélité.

a) Test d'homogénéité des variances :

$$C = \frac{S_{\max}^2}{\sum_{j=1}^k S_j^2} = 0,515 < C_{0,05}^{5,2} = 0,841 \text{ (valeur limite de décision)}$$

Où S_{\max}^2 = variance la plus élevée des groupes
 S_j^2 = variance du groupe j

⇒ Les variances Y_{ij} des 5 groupes sont considérées comme homogènes au risque de 5 %.

b) Estimation du recouvrement moyen :

$$Y = 1,016$$

$$\text{Intervalle de confiance : } 1,005 < Y < 1,027$$

⇒ Le recouvrement moyen est à 101,6 % avec un IC allant de 100,5 % à 102,7 %.

4. FIDÉLITÉ

- Répétabilité : le coefficient de variation est de **1,37 %** (< 5 %).
- Fidélité intermédiaire : le coefficient de variation est de **1,87%** (< 5 %).

La fidélité intermédiaire est conforme aux spécifications car les coefficients de variation sont inférieurs à 5 %.

5. LIMITE DE DÉTECTION

$$LD = 7,18 \mu\text{g/mL}$$

6. LIMITE DE QUANTIFICATION

$$LQ = 21,75 \mu\text{g/mL}$$

IV. CONCLUSION

La méthode de dosage du lévétiracétam est validée selon les recommandations des ICH et de la STP Pharma.

Annexe VII.

Rapport de validation du dosage du lévétiracétam en présence de lactose par HPLC

RAPPORT DE VALIDATION ANALYTIQUE DU DOSAGE DU LÉVÉTIRACÉTAM EN PRESENCE DE LACTOSE	« Mot clef » : Rapport de validation, Dosage, lévétiracétam, Lactose, HPLC
	Réf. : Pagination : 1/5

Nom complet	Rapport de validation analytique du dosage du lévétiracétam en présence de lactose par HPLC.
Code HCL	
Indication du produit	Etude Clinique XXX : Prévention des crises épileptiques à la phase aiguë des accidents vasculaires cérébraux hémorragiques
Voie d'administration	Orale

Type de document :	
Procédure	o
Protocole	o
Instruction/Rapport validation	x
Assurance Qualité	o
Annexes (Fichiers Excel)	x

	RÉDACTION	VÉRIFICATION	APPROBATION
Nom - Fonction	Angélique de VAUJANY <i>Stagiaire 5 AHU</i>	Lamine TALL <i>Pharmacien Assistant</i>	Fabrice PIROT <i>Pharmacien Responsable de l'UF</i>
Date	23/08/2013		
Signature			

	Date de la version	Destinataires	Date de diffusion	Date d'archivage
Date de mise en application		<ul style="list-style-type: none"> • Techniciens de laboratoire • Pharmaciens • Internes et étudiants en Pharmacie 		
Date de 1^{ère} modification				
Date de 2^{ème} modification				

I. OBJET

Démarche de validation d'une méthode analytique appliquée au dosage du lévétiracétam avec lactose en gélules de 500 mg utilisées dans l'essai clinique XXX « Prévention des crises épileptiques à la phase aiguë des accidents vasculaires cérébraux hémorragiques ».

Présentation des données expérimentales permettant de valider la technique de dosage du lévétiracétam avec lactose par HPLC.

II. DOMAINES D'APPLICATION

Dosage du **lévétiracétam** aux concentrations théoriques de 60 – 80 – 100 – 120 – 140 µg/mL.

III. PRÉSENTATION DE LA DÉMARCHE DE VALIDATION

Le mode opératoire est présenté dans le document : « Méthode de dosage du lévétiracétam en solution par HPLC ».

Il a été réalisé 3 gammes d'étalonnage et des essais de répétabilité par trois opérateurs différents sur 3 jours. Les données brutes sont présentées en annexe (Rapport de validation analytique : dosage par HPLC).

Les résultats des différents essais ont été utilisés pour valider la linéarité, l'exactitude et la fidélité intermédiaire.

1. SPÉCIFICITÉ

La superposition des 3 chromatogrammes (temps de rétention et aires sous la courbe identiques) montre l'absence d'interférences.

2. LINÉARITÉ

a) Régression linéaire :

La relation linéaire entre les aires sous la courbe (u.a.) et le dosage des solutions préparées (µg/mL) se vérifie par une régression :

La droite d'étalonnage suit un modèle linéaire du type $y = b.x + a$

Où "y" représente le signal du lévétiracétam en unité arbitraire (A)

"b" est la pente de la droite

"a" est l'intercepte à l'origine

"x" est l'équivalent concentration en µg/mL

L'équation établie par la régression est : $y = 11,560.x + 9.264$

(Avec $r = 0,9974$)

Test de validité de la droite de régression

$F = S_L^2 / S_E^2 = 0,340 < F_{0,05}^{3,10} = 3,71$ (valeur limite de décision)

Où S_L^2 = variance des erreurs d'ajustement

S_E^2 = variance des erreurs expérimentales

⇒ L'ajustement de la droite de régression est considéré comme valide au risque de 5 %.

b) Test de comparaison de « a » avec zéro :

$$a/S_a = \mathbf{0,388} < t(0,05, 13) = 2,16$$

Où S_a = l'écart type de l'ordonnée à l'origine

⇒ L'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de zéro au risque de 5 %.

c) Test de validité de la droite

Test de Cochran :

$$C = \frac{S_{\max}^2}{\sum_{j=1}^k S_j^2} = \mathbf{0,102} < C_{0,05}^{5,2} = 0,841 \text{ (valeur limite de décision)}$$

Où S_{\max}^2 = variance la plus élevée des k groupes j
 S_j^2 = variance du groupe j

⇒ Homogénéité des variances des 5 groupes de concentrations différentes au risque de 5%

⇒ Nous pouvons donc tester l'existence d'une pente significativement différente de zéro.

Test de l'existence d'une pente significative ($b \neq 0$)

$$F = \frac{S_I^2}{S_R^2} = \mathbf{2527,13} > F_{0,05}^{1,13} = 4,67 \text{ (valeur limite de décision)}$$

Où S_I^2 = variance due à la variation de la régression
 S_R^2 = variance résiduelle

On rejette l'hypothèse nulle $b = 0$.

⇒ Il existe une pente significativement différente de zéro au risque de 5 %.

3. EXACTITUDE

Elle représente la somme de la justesse et de la fidélité.

a) Test d'homogénéité des variances :

$$C = \frac{S_{\max}^2}{\sum_{j=1}^k S_j^2} = \mathbf{0,287} < C_{0,05}^{5,2} = 0,841 \text{ (valeur limite de décision)}$$

Où S_{\max}^2 = variance la plus élevée des groupes
 S_j^2 = variance du groupe j

⇒ Les variances Y_{ij} des 5 groupes sont considérées comme homogènes au risque de 5 %.

b) Estimation du recouvrement moyen :

$$Y = 1,013$$

$$\text{Intervalle de confiance : } 1,003 < Y < 1,023$$

⇒ Le recouvrement moyen est à 101,3 % avec un IC allant de 100,3 % à 102,3 %.

4. FIDÉLITÉ

- Répétabilité : le coefficient de variation est de **1,86 %** (< 5 %).
- Fidélité intermédiaire : Le coefficient de variation est **1,48 %** (< 5 %).

La fidélité intermédiaire est conforme aux spécifications car les coefficients de variation sont inférieurs à 5 %.

5. LIMITE DE DÉTECTION

$$LD = 6,82 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

6. LIMITE DE QUANTIFICATION

$$LQ = 20,67 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

IV. CONCLUSION

La méthode de dosage du lévétiracétam est validée selon les recommandations des ICH et de la STP Pharma.

Annexe VIII. Comparaison des différentes méthodes de dosage du lévétiracétam par HPLC

Phase mobile (proportions)	Débit (mL/min)	λ (nm)	t_R (min)	Linéarité ($\mu\text{g/mL}$)	Recouvrement (%)	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)	Variation inter-jour (%)	R^2	V_{inj} (μL)
Acétonitrile/ KH_2PO_4 ⁽¹⁰⁶⁾ (50:50)	1,5	210	2,5	5 - 350	98,46-100,62	0,438	1,462	< 1	0,9999	20
KH_2PO_4 0.05 M (pH 3 ajusté avec acide orthophosphorique)-méthanol ⁽¹⁰¹⁾ (70:30)	1,2	210	3,727	20 - 120	100,038	0,0104	0,0317	1	0,9998	10
Eau-méthanol ⁽¹⁰⁰⁾ (75:25)	1,0	205	5,192 \pm 0,001	40 - 400	> 100	0,00422	0,01266	< 2	0,9989	20
Méthanol- Eau-TEA ⁽¹⁰⁷⁾ (75:25:05)	1,0	214	2,59	10 - 80	99,49	0,05	0,15	< 2	0,997	20
Acétonitrile / NH_4COOH 2 mM (pH 3.0) ⁽¹⁰⁸⁾ (dosage dans fluide biologique)	0,270	—	3,60 \pm 0,12	0,5 - 200	—	0,150 - 0,200	0,500	13,3	0,994	—
Tampon phosphate de sodium - acétonitrile ⁽¹⁰⁹⁾ (80:20)	1,5	205	2,77	80 - 130	98,37	0,015	0,047	—	0,9994	10
Méthanol-eau-acétonitrile ⁽⁹⁹⁾ (30:10:60)	1,0	212	5,351	0,01 – 1,5	99,86 \pm 0,4206	0,005	0,01	< 2	0,999	20
Méthode développée: eau ppi + H_3PO_4 (pH 2,8-3) - méthanol	1,0	210	2,65 \pm 5%	60 - 140	101	Seul : 7,18 + lactose: 6,82	Seul : 21,75 + lactose: 20,67	< 2	0,997	10

Légende :

λ : longueur d'onde

t_R : temps de rétention

LD : limite de détection

LQ : limite de quantification

R^2 : coefficient de corrélation

V_{inj} : volume d'injection

Annexe IX.

Protocole de stabilité de la solution injectable de lévétiracétam à 100 mg/mL

ÉTUDE DE STABILITÉ DE LA SOLUTION INJECTABLE DE LÉVÉTIRACÉTAM À 100 MG/ML DANS LE CADRE DE L'ESSAI CLINIQUE XXX	« Mots clefs » : Étude de stabilité, lévétiracétam, solution injectable, essai clinique XXX
	Réf. : Pagination : 1/5

Nom complet	Étude de stabilité de la solution injectable de lévétiracétam à 100 mg/ml dans le cadre de l'essai clinique XXX
Code HCL	NA
Indication du produit	Étude Clinique XXX : Prévention des crises épileptiques à la phase aiguë des accidents vasculaires cérébraux hémorragiques
Voie d'administration	Voie injectable

Type de document :	
Procédure	o
Protocole	x
Instruction/Enregistrement	o
Assurance Qualité	o
Annexes	o

	RÉDACTION	VÉRIFICATION	APPROBATION
Nom - Fonction	Angélique de VAUJANY <i>Stagiaire 5 AHU</i>	Lamine TALL <i>Pharmacien Assistant</i>	Fabrice PIROT <i>Pharmacien responsable du secteur</i> Christine PIVOT <i>Pharmacien Chef de service</i>
Date	23/08/2013		
Signature			

	Date de la version	Destinataires	Date de diffusion	Date d'archivage
Date de mise en application		▪ Pharmacie Edouard HERRIOT		
Date de 1^{ère} modification				

1. OBJET

Ce protocole décrit la méthodologie utilisée pour étudier la stabilité de la solution injectable de lévétiracétam à 100 mg/mL.

2. DOMAINES D'APPLICATION

Ce protocole s'applique exclusivement à l'étude de stabilité de la solution injectable de lévétiracétam à 100 mg/ml dans le cadre de l'essai clinique XXX. Cette étude clinique en double aveugle permettra d'étudier l'effet préventif du lévétiracétam dans la survenue de crises épileptiques à la phase aiguë des accidents vasculaires cérébraux hémorragiques.

Ce protocole doit être respecté par toute personne habilitée à réaliser une analyse dans le cadre de cette étude.

3. RESPONSABILITÉS

La mise en œuvre de cette étude est à la charge du secteur laboratoire de contrôle et de la Pharmacotechnie. Le responsable de l'UF Préparation et Contrôle des médicaments ou le chef de service vérifie la faisabilité de l'étude et approuve le protocole et le rapport de stabilité.

4. DOCUMENTS DE REFERENCE

- Bonnes Pratiques de Fabrication, édition 2011
- Bonnes Pratiques de Préparation, édition 2007/7 Bis
- Ligne directrice ICH Q1A (R2) – Essais de stabilité des nouveaux produits et substances médicamenteux
- Ligne directrice ICH Q2B : validation des procédures analytiques
- Procédure des procédures : **PR-UF-01-2**
- Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition 2013
- **Procédure de fabrication de la solution injectable de lévétiracétam**

5. DESCRIPTION DE L'ACTIVITÉ

a. Préparation de la solution injectable de lévétiracétam

La solution injectable de lévétiracétam a été préparée selon la procédure de fabrication. Toutes les solutions injectables préparées sont conservées à température ambiante durant toute l'étude de stabilité.

La formule qualitative et quantitative est présentée dans le tableau ci-dessous.

FORMULE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DE LA SOLUTION INJECTABLE DE LÉVÉTIRACÉTAM			
COMPOSANTS	QUANTITÉ THÉORIQUE POUR 1 FLACON	QUANTITÉ SUFFISANTE POUR 60 FLACONS	MESURES EXACTES
LÉVÉTIRACÉTAM	550 mg	33 g	g
ACÉTATE DE SODIUM TRIHYDRATÉ	9.02 mg	541.2 mg	g
CHLORURE DE SODIUM 0,9 %	(QSP) 5.5 mL	(QSP) 330 mL	
ACIDE ACÉTIQUE GLACIAL	Ajustement pH 5,0 à 6,0	Ajustement pH 5,0 à 6,0	

b. Principe de l'étude de stabilité

L'étude de stabilité est basée sur l'évaluation des critères qualité à différentes périodes (J0 à M24) sur un lot test. Ces critères sont les suivants :

- Mesure du pH
- Mesure de l'osmolalité
- Mesure du sodium
- Dosage du lévétiracétam
- Dosage des endotoxines bactériennes
- Comptage des particules non visibles
- Essai de stérilité.

Pour toute modification de la méthode, du procédé de fabrication ou du matériel, une nouvelle étude complète ou partielle peut être nécessaire en fonction de la nature de l'impact.

c. Matériels et méthodes

- La mesure du pH est réalisée grâce à un pH-mètre
- La mesure de l'osmolalité est réalisée grâce à un osmomètre
- La mesure du sodium est réalisée grâce à un photomètre de flamme
- Le dosage du lévétiracétam est réalisé par chromatographie liquide
- Le dosage des endotoxines bactériennes est fait grâce à une réaction colorimétrique cinétique
- Le comptage des particules non visibles est effectué grâce à un compteur à particules
- L'essai de stérilité se fait par filtration sur membrane.

d. Planning des analyses

✓ *Solution injectable de lévétiracétam*

Périodes de stabilité	Analyses réalisées	Conditions de conservation
J0 et M24	- Mesure du pH - Mesure de l'osmolalité - Mesure du sodium - Dosage du lévétiracétam - Dosage des endotoxines bactériennes - Comptage des particules non visibles - Essai de stérilité	Enceinte climatique à 25°C ± 2°C / 60 % HR ± 5 % HR
M3, M6, M12, M18	- Mesure du pH - Mesure de l'osmolalité - Mesure du sodium - Dosage du lévétiracétam - Comptage des particules non visibles	Enceinte climatique à 25°C ± 2°C / 60 % HR ± 5 % HR

e. Spécifications fixées pour la préparation

Analyses réalisées	Spécifications	
Mesure du pH	5,0 - 6,0	
Mesure de l'osmolalité	968 mOsm/kg	
Mesure du sodium	166,1 mmol/L	
Dosage du lévétiracétam	100 mg/mL \pm 10 %	
Dosage des endotoxines bactériennes	0,5 UI/mL	
Comptage des particules non visibles	Taille particules	Nombre autorisé
	$\geq 10 \mu\text{m}$	$\leq 1200 /\text{mL}$
	$\geq 25 \mu\text{m}$	$\leq 120 / \text{mL}$
Essai de stérilité	Selon Pharmacopée Européenne	

f. Recueil de données et archivage

L'original du dossier de stabilité est conservé dans le secteur « Préparation et contrôle de médicaments » et des copies sont transmises au secteur « Essais cliniques » et au Service de neurologie fonctionnelle et d'épileptologie de l'Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer de Bron (69 677).

Toutes les données de stabilité sont sous la responsabilité de la Pharmacie du Groupement Hospitalier Edouard Herriot.

Annexe X.

Protocole de stabilité des gélules de lévétiracétam à 500 mg et de son *placebo*

ÉTUDE DE STABILITÉ DES GÉLULES DE LÉVÉTIRACÉTAM ET DE SON PLACEBO (ESSAI CLINIQUE XXX)	« Mots clefs » : Étude de stabilité, lévétiracétam, gélules, essai clinique XXX
	Réf. : Pagination : 1/5

Nom complet	Étude de stabilité des gélules de lévétiracétam dosées à 500 mg et de son <i>placebo</i> « Essai clinique XXX »
Code HCL	NA
Indication du produit	Etude Clinique XXX : Prévention des crises épileptiques à la phase aiguë des accidents vasculaires cérébraux hémorragiques
Voie d'administration	Voie orale

Type de document :	
Procédure	0
Protocole	x
Instruction/Enregistrement	0
Assurance Qualité	0
Annexes	0

	RÉDACTION	VÉRIFICATION	APPROBATION
Nom - Fonction	Angélique de VAUJANY <i>Stagiaire 5 AHU</i>	Lamine TALL <i>Pharmacien Assistant</i>	Fabrice PIROT <i>Pharmacien responsable du secteur</i> Christine PIVOT <i>Pharmacien Chef de service</i>
Date	23/08/2013		
Signature			

	Date de la version	Destinataires	Date de diffusion	Date d'archivage
Date de mise en application		▪ Pharmacie Edouard HERRIOT		
Date de 1^{ère} modification				

1. OBJET

Ce protocole décrit la méthodologie utilisée pour étudier la stabilité des gélules de lévétiracétam dosées à 500 mg et de son *placebo*.

2. DOMAINES D'APPLICATION

Ce protocole s'applique exclusivement à l'étude de stabilité des gélules de lévétiracétam et de son *placebo* dans le cadre de l'essai clinique XXX. Cette étude clinique en double aveugle permettra d'étudier l'effet préventif du lévétiracétam dans la survenue de crises épileptiques à la phase aiguë des accidents vasculaires cérébraux hémorragiques.

Ce protocole doit être respecté par toute personne habilitée à réaliser toute analyse dans le cadre de cette étude.

3. RESPONSABILITÉS

La mise en œuvre de cette étude est à la charge du secteur laboratoire de contrôle et de la Galénique. Le responsable de l'UF Préparation et Contrôle des médicaments ou le chef de service vérifie la faisabilité de l'étude et approuve le protocole et le rapport de stabilité.

4. DOCUMENTS DE RÉFÉRENCE

- Bonnes Pratiques de Fabrication, édition 2011
- Bonnes Pratiques de Préparation, édition 2007/7 Bis
- Ligne directrice ICH Q1A (R2) – Essais de stabilité des nouveaux produits et substances médicamenteux
- Ligne directrice ICH Q2B : validation des procédures analytiques
- Procédure des procédures « édition en vigueur »
- Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition 2013
- Instruction de fabrication des gélules de lévétiracétam
- Instruction de fabrication des gélules de placebo

5. DESCRIPTION DE L'ACTIVITÉ

a. Préparation des gélules de lévétiracétam et de son *placebo*

Les gélules de lévétiracétam et de son *placebo* ont été préparées respectivement selon les instructions citées dans le chapitre 4. Toutes les gélules préparées sont conservées dans l'enceinte climatique à 25°C ± 2°C 60 % HR ± 5 % HR durant toute l'étude de stabilité.

Les deux formules qualitatives et quantitatives sont présentées dans les tableaux ci-dessous.

FORMULE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES GÉLULES DE LÉVÉTIRACÉTAM			
COMPOSANTS	QUANTITÉ THÉORIQUE POUR 1 GÉLULE	QUANTITÉ SUFFISANTE POUR 300 GÉLULES	MESURES EXACTES
LÉVÉTIRACÉTAM	500 mg	150 g	g
LACTOSE MONOHYDRATÉ	66 mg	19.8 g	g
CARMIN DE COCHENILLE			

FORMULE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES GÉLULES <i>PLACEBO</i>			
COMPOSANTS	QUANTITÉ THÉORIQUE POUR 1 GÉLULE	QUANTITÉ SUFFISANTE POUR 300 GÉLULES	MESURES EXACTES
LACTOSE MONOHYDRATÉ	566 mg	169,8 g	g
CARMIN DE COCHENILLE			

b. Principe de l'étude de stabilité

L'étude de stabilité est basée sur l'évaluation des critères qualité à différentes périodes (J0 à M36) sur un lot test. Ces critères sont les suivants :

- Aspect macroscopique des gélules
- Uniformité de masse des gélules de lévétiracétam et de son *placebo*
- Identification du lactose monohydraté dans les gélules de lévétiracétam et de son *placebo*
- Dosage du lévétiracétam dans les gélules de lévétiracétam.

Pour toute modification de la méthode, du procédé de fabrication ou du matériel, une nouvelle étude complète ou partielle peut être nécessaire en fonction de la nature de l'impact.

c. Matériels et méthodes

- Les gélules utilisées sont de taille 00 de couleur ivoire et elles sont fournies par les laboratoires COOPER
- Le dosage du lévétiracétam est réalisé par HPLC
- L'identification du lactose monohydraté et la détermination de l'uniformité de masse sont effectuées selon la Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition.

d. Planning des analyses

✓ *Gélules de lévétiracétam*

Périodes de stabilité	Analyses réalisées	Conditions de conservation
J0, M3, M6, M12, M18, M24, M30, M36	- Aspect macroscopique des gélules - Uniformité de masse (M0 uniquement) - Identification du lactose monohydraté (M0 uniquement) - Dosage du lévétiracétam sur 4 gélules différentes	Enceinte climatique à 25°C ± 2°C / 60 % HR ± 5 % HR

✓ *Gélules Placebo*

Périodes de stabilité	Analyses réalisées	Conditions de conservation
J0, M3, M6, M12, M18, M24, M30, M36	- Aspect macroscopique des gélules - Uniformité de masse (M0 uniquement) - Identification du lactose monohydraté sur 4 gélules	Enceinte climatique à 25°C ± 2°C / 60 % HR ± 5 % HR

e. **Spécifications fixées pour les deux préparations**

Analyses réalisées	Spécifications
Aspect macroscopique des gélules	Gélules ivoires taille 00
Uniformité de masse	Selon Pharmacopée Européenne
Identification du lactose monohydraté	Selon Pharmacopée Européenne
Dosage du lévétiracétam	100 mg/mL \pm 10 %

f. **Recueil de données et archivage**

L'original du dossier de stabilité est conservé dans le secteur « Préparation et contrôle de médicaments » et des copies sont transmises au secteur « Essais cliniques » et au Service de neurologie fonctionnelle et d'épileptologie de l'Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer de Bron (69 677).

Toutes les données de stabilité sont sous la responsabilité de la Pharmacie du Groupement Hospitalier Edouard Herriot.

Annexe XI.

Article scientifique

Stability study of levetiracetam as injectable solution (500 mg/ 5mL) and capsules (500 mg) as part of a hospital clinical research program

Authors: A. de Vaujany, ML Tall, E. Diouf, C. Gérard, C. Dhelens, D. Laleye, D. Salmon, F. Pirot, C. Pivot.

Abstract:

Introduction: As part of a hospital clinical research program on the prevention of epilepsy attack during the acute phase of hemorrhagic strokes, two new hospital preparations were performed. These preparations are an injectable solution and capsules with a respective dosage of 100 mg/mL and 500 mg of levetiracetam. The purpose of this work consists into the validation of a new dosage method of levetiracetam by High-performance liquid chromatography (HPLC) followed by a stability study of the finished products.

Material and methods: After the validation of the “stability indicating” method, the injectable solution and the capsules have been produced according to the pharmaceutical legislation applicable in France. All units prepared have been stored during one year in a climatic chamber at 25°C ± 2°C, with a relative humidity of 60 % ± 5 % and away from light.

To evaluate the stability of the injectable solution, physico-chemical (pH, osmolality, sodium, uniformity of content and sub-visible particle count) and microbiological (bacterial endotoxins and sterility) controls have been realized. For the capsules, the physico-chemical controls focused on the uniformity of mass, the identification of lactose and the uniformity of content.

Results and discussion: For the injectable solution, no noticeable change has been noticed for the pH, the osmolality, or the color of the solution, neither significant variation of levetiracetam concentration nor of sodium. Levetiracetam concentration was situated between 98.9 - 103.6 % compared to the initial concentration. Moreover, the microbiological and particulate quality was consistent with the European Pharmacopoeia. For the capsules, the levetiracetam content was between 97.2 - 103.3 % compared to the initial concentration for all tested samples and no modification of the macroscopical appearance was detected.

Conclusion: Both hospital preparations remain stable during one year, allowing their safe administration to Humans as part of this clinical trial.

Keywords:

- Levetiracetam;
- Hospital clinical research program;
- High-performance liquid chromatography;
- Capsules;
- Injectable preparation;
- Stability study.

Introduction

Levetiracetam ($C_8H_{14}N_2O_2$) is a derivate of pyrrolidone¹ which is regularly used for adults in combination or sole to treat partial attacks in new or long term epilepsy, whether or not there is a secondary spread. Its chemical structure could be seen below.

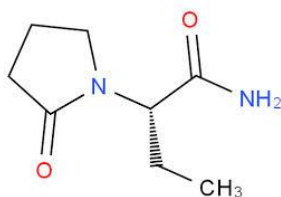


Figure 1. Levetiracetam structure

The purpose of this multicentric, double-blind, placebo-controlled trial, including 52 patients in each arm, is to give a new indication to this drug, allowing its use to prevent epilepsy attack during the acute phase of hemorrhagic strokes. This antiepileptic's action is not completely known but some studies revealed that it acts on intraneuronal calcium concentration being partially a calcium channel-blocker of type N and reduces calcium release from intraneuronal reserves. It also partially reverses the inhibitory effect of zinc and betacarbolines on GABAergic and GLYCINergic channels. Then, levetiracetam shows a high-affinity for 2A protein belonging to the synaptic vesicle. This latter is linked with the protection strength toward attacks and may be involved in vesicular fusion and cellular excretion of neurotransmitter.

Levetiracetam is commercially available in tablets for the oral route and in solution for injection (500 mg/ 5mL). Capsules are not commercially available and both of the previous types do not fit for the double-blind clinical trial. That is why two new hospital preparations for the two galenic formulations have been developed by the hospital pharmacy. The purpose of this work was to present a new stability indicating method by high performance liquid chromatography (HPLC) for levetiracetam concentration determination, followed by a stability study for the injectable solutions and the capsules during one year in a climatic chamber at $25^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$, with a relative humidity of $60 \% \pm 5 \%$ and away from light². For that, capsules were packed in a polyethylene pot and injectable preparations in white glass flasks of type II sealed with a chlorobutyl cap and an aluminum top. Both were stored in the climatic chamber during all the time of the stability study.

Material and method

1. Method validation

1.1. Reagents

Levetiracetam reference standard from the European Pharmacopoeia with a chemical purity up to 99.5 % was used at each assay to assure the results.

The reagents were all analytical grades and included methanol HPLC (Carlo Erba reagents-SDS, Val-de-Reuil, France) as well as orthophosphoric acid (Carlo Erba reagents-SDS, Val-de-Reuil, France). Water for injections (C.D.M. Lavoisier, Paris, France) was also used for samples and standard preparations.

1.2. Chromatographic conditions

An HPLC method was available in the European Pharmacopoeia, nevertheless this latter fits for levetiracetam as a raw material but not for a pharmaceutical form. And no HPLC method was available at the hospital pharmacy for levetiracetam, hence a new “stability indicating” method was necessary to determine the levetiracetam content. The HPLC technique was first developed with the method of Jignesh S. Shah et al.³ consisting in a mobile phase of methanol, water and acetonitrile (30/10/60). Results were not convincing, thus acetonitrile was removed (25/75) but results were still not satisfactory for the analysis of impurities. Hence, water phase was adjusted to pH 2.8 - 3.0 with orthophosphoric acid. According to several articles⁴⁻⁵ orthophosphoric acid does not interfere with levetiracetam. The system consisted of a Spectra-Physics Analytical HPLC chain (Agilent, Les Ulis, France) characterized by an Infinity VL 1290 Binary Pump, an Infinity 1290 automatic injection device and an Infinity DAD 1260 programmable wavelength detector. All this system is managed by a personal computer with the Agilent HPLC Open LAB Chemstation software (Agilent, Les Ulis, France). The column used was a C-18 Synergi Gi 4 μ Fusion-RP 80 Å (100 mm x 4.6 mm) commercialized by Phenomenex[®] (Le Pecq, France) and the mobile phase was methanol : water for injections adjusted to pH 2.8 - 3.0 with orthophosphoric acid (25 : 75, v/v). The flow rate was set at 1 mL/min and the column temperature was maintained at 50°C \pm 1°C. The sample injection volume was 10 μ L, the detection wavelength was 210 nm and the analysis time was 3.5 minutes at each measure.

1.3. Method development

One method was developed to determine the levetiracetam content as well in capsules as in injectable preparations. The validation was performed in agreement with the International Conference on Harmonisation guidelines⁶ (ICH Q2(R1)) and French Society of Pharmaceutical Science and Technology⁷ (SFSTP).

1.3.1. System suitability test

The system suitability parameters (retention time, amount, area, tailing factor, symmetry, number of theoretical plates, resolution), reported in European Pharmacopoeia 7th Edition⁸, were calculated by HPLC software. These parameters have been estimated on a sample which has undergone forced degradation.

1.3.2. Specificity

In order to evaluate the specificity of the method, levetiracetam alone and levetiracetam with its excipients of the capsules and of the injectable preparation were studied compared to the *placebo*. Then, forced degradations were achieved according to different conditions during 50 min at 100°C, with hydrochloric acid 0,1N, with sodium hydroxide 0,1N, with H₂O₂ 10 V (1/10 dil.). The chemical degradation by exposure to ultraviolet radiation in the wavelength of 365 nm was performed for 2 hours.

The specifications for specificity are: the presence of levetiracetam and the absence of any interference between excipients and degradation products. The acceptance criteria for purity peak were fixed between 995 and 1005.

1.3.3. Linearity

A stock solution of levetiracetam was prepared at 1 mg/mL by dissolving 15 mg in 15 mL of the mobile phase with a precision pipette BIOHIT Proline[®] (Sartorius, Dourdan, France). Then, a range including concentrations of 60, 80, 100, 120, 140 μ g/mL was

prepared with the mobile phase. The range was determined considering concentrations from 60 to 140 % of the target concentration. Three experiments by three different analysts were made on three days. Linearity was evaluated by linear regression analysis, which was calculated by the least square regression method.

1.3.4. Precision

Precision was evaluated with a repeatability experiment and with intermediate precision. The repeatability was determined by three operators on three days using six determinations at 100 % of the test concentration (100 µg/mL).

The intermediate precision was determined by six injections of six different solutions of the 100 % test solution on three days.

In order to evaluate precision, we determined the inter-day (intermediate precision) and the intra-day (repeatability) Relative Standard Deviation (RSD).

1.3.5. Accuracy

Accuracy was demonstrated considering the recovery method which compares the weight found and the one introduced, for each sample, on the three days and at each concentration of the range.

1.3.6. Limit of detection and limit of quantification

Both were calculated with the appropriate formula, for each method (with and without the excipient). The ICH guidelines give us the equation to calculate the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ). These latter may be expressed as $LOD = 3.3 \sigma/S$ and $LOQ = 10 \sigma/S$, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve which may be estimated from the calibration curve of the analyte.

1.3.7. Statistical analysis

Excel[®] software (Microsoft Office, France, 2010) was used to treat data statistically with a risk $\alpha = 5 \%$. Linearity was validated with Cochran test, ANOVA test and statistic homogeneity distribution. To estimate confidence limits of the slope and of the intercept for linearity and confidence limits of accuracy, a Student t-test was completed.

2. Stability study

Stability of injectable flasks and of capsules has been evaluated according to the ICH guidelines: ICH Q2(R1)⁶, and a program for stability analyses has been established as following: samples were analyzed by HPLC on day 0 and on months 3, 6, 12, 18, 24, 30 and 36. Excipients of pharmaceutical grade used for the formulation were either raw materials for pharmaceutical use or pharmaceutical specialties.

Flasks and capsules prepared for the clinical trial have been stored in a climatic chamber (Meditest 1300H, Froilabo, Meyzieu, France) at $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, with a relative humidity of $60\% \pm 5\%$ and away from light, during all the time of the stability study.

2.1. Stability of injectable preparation (500 mg/ 5 mL)

The pilot batch for the stability study counted 60 injection flasks, as many as we needed for one year of study.

Physico-chemical and microbiological controls were performed at different time: D0, M3, M6 and M12.

2.1.1. Preparation of levetiracetam injection flasks

Levetiracetam powder (Divi's Laboratories, Vishakhapatnam Dist., India) was used to prepare the injectable solutions. The excipients of pharmaceutical grade used for the formulation of injectable preparations were sodium acetate trihydrate (INRESA, Bartenheim, France), sodium chloride 0.9 %[®] (CHAIX ET DU MARAIS, Paris, France) and anhydrous acetic acid (COOPER, Melun, France) to adjust the pH.

The injection solution was prepared under aseptic conditions in a vertical laminar flow hood (class A) in a class B followed with a terminal sterilization (121°C - 20 min). All the containers and the glassware used for the preparation were depyrogenated in an oven at 250°C for one hour. The solutions were made by dissolving levetiracetam and sodium acetate trihydrate powders in sodium chloride 0.9 %. Then pH was adjusted between 5 and 6 with anhydrous acetic acid. The solution was filtered with a Millex[®] 0.22 µm filter. To finish, white glass flasks of 15 mL were filled with 5 mL of the filtered solution, then closed with a chlorobutyl rubber stopper and sealed with an aluminum capsule. In view of the stability of the solution to the temperature, a terminal steam sterilization of flasks was performed in order to get a high level of sterility assurance. Each sterilization cycle was validated with the outline of the autoclave which specifies the physical conditions (temperature and pressure). After the mirage of every flask, the labeling was made according to the recommended practices, in other words the Good Manufacturing Practices⁹. The labeling of the primary container was also made according to the requirements^{10,11,12}.

The excipients are quite similar to those used for the commercialized injection solution but the packing and the preparation process are different. Whereas levetiracetam is commercialized in flasks of type I, closed with a Teflon stopper and sealed with an aluminum/polypropylen cap, our injection solution is made in flasks of type II, closed with a chlorobutyl rubber stopper and sealed with an aluminum cap.

Three batches of injectable solutions are planned throughout the clinical trial. The qualitative and quantitative composition of levetiracetam injectable preparation of 500 mg/ 5 mL can be seen in Table 1.

Table 1. Composition of levetiracetam injectable preparation of 500 mg/ 5 mL

Raw materials	Quantities (1 flask)	Quantities (60 flasks)
Levetiracetam	500 mg	30 g
Sodium acetate	8.2 mg	492 mg
Sodium chloride 0.9 %	qsp 5 mL	qsp 300 mL
Glacial acetic acid	qsp pH 5.0 - 6.0	qsp pH 5.0 - 6.0

2.1.2. Physico-chemical stability of injection flasks

For the physico-chemical controls, we made a visual examination of the solution and we measured the pH, the osmolality, the sodium, the uniformity of content and the number of sub-visible particle.

pH was controlled with a pH-meter (Hach Lange, Marne la Vallée, France) equipped with a temperature probe. Osmolality was measured with an osmometer Fiske[®] (Massachusetts, USA) using the lowering of the freezing point technique. The amount of sodium was controlled with a flame-photometer (Sherwood[®] 425, Cambridge, United Kingdom).

The uniformity of content was performed by HPLC (Agilent, Les Ulis, France). The count of sub-visible particles was made using a particle counter (Hiac/Royco 9703+, Pacific Scientific, USA).

All physicochemical analyzes were performed on days 0, M3, M6, M9 and M12.

The physico-chemical controls require 6 flasks for the counting of sub-visible particles and a pool of 2 flasks for pH, osmolality and sodium. The control for the uniformity of content requires 4 flasks.

pH specifications were set by the summary of product characteristics of levetiracetam.

The values found for osmolality and sodium should be at $\pm 10\%$ of the theoretical one according to our specifications.

Specifications for levetiracetam content were set at $\pm 10\%$ for the percentage error and its value should be between 95 - 105 % compared to the initial concentration.

Specifications for the other physico-chemical controls were set in agreement with the requirements of the European Pharmacopoeia 7th Edition.

2.1.3. Microbiological stability of injection flasks

The microbiological controls are based on the bacterial endotoxins dosage and on the sterility.

For the bacterial endotoxins dosage, the chromogenic kinetic method (method D) was used with different reagents such as E.coli O55:B5 Endotoxin (Lonza[®], USA), Limulus Amebocyte Lysate Kinetic-QCL reagent (Lonza[®], USA) and LAL Reagent Water (Lonza[®], USA).

The sterility was performed with a membrane filtration using a culture medium made of a cellulose ester membrane 0.45 μm (Millipore[®], Molsheim, France) and a SteritestTM Equinox Pump for Laminar Flow Hoods (Millipore[®], Molsheim, France).

Microbiology was controlled at D0 and M12. The bacterial endotoxins dosage and the sterility respectively require 1 flask and 10 flasks.

Specifications for microbiological controls were set in agreement with the requirements of the European Pharmacopoeia 7th Edition.

2.2. Stability of capsules (500 mg)

As well as for the injectable preparations, 60 capsules were made for the stability study. Such quantity was needed for one year of study involving physico-chemical controls at different times: D0, M3, M6 and M12.

2.2.1. Preparation of levetiracetam capsules

Levetiracetam powder (Divi's Laboratories, Vishakhapatnam Dist., India) was used to prepare the capsules. The excipients used for the capsules were monohydrate lactose (Cooper, Melun, France) and cochineal (Cooper, Melun, France).

The capsules (500 mg) were made by mixing in a mortar with a pestle levetiracetam, monohydrate lactose and a bit of cochineal to visualize the homogeneity of the mixture. Then, the powder was equally distributed to have the same amount in each ivory capsule (Capsugel[®], Colmar, France). Finally, capsules were closed with their caps and secondary placed in a polyethylene pill dispenser. The labeling of the primary container was made according to the requirements^{10,11,12}.

Our formulation is different from the commercialized drug whether it is for the excipients used or for the pharmaceutical form. Indeed, levetiracetam is commercialized in pills and not in capsules.

Fourteen batches of capsules are planned throughout the study period. The qualitative and quantitative composition of levetiracetam capsules of 500 mg can be seen in Table 2.

Table 2. Composition of levetiracetam capsules of 500 mg

Raw materials	Quantities (1 capsule)	Quantities (60 capsules)
Levetiracetam	500 mg	30 g
Monohydrate lactose	66 mg	3.96 g
Cochineal	Insignificant	0.2 mg

2.2.2. Physico-chemical stability of capsules

The physico-chemical controls were based on the uniformity of mass, the identification of lactose, the uniformity of content and visual examination of the capsules.

The uniformity of content was performed by HPLC (Agilent, Les Ulis, France).

The uniformity of mass and the identification of lactose were realized at D0, whereas the uniformity of content was controlled from D0 to M12.

The number of capsules was 20 for the uniformity of mass, 10 for the uniformity of content and 2 for the identification of lactose.

The uniformity of mass was controlled with a precision balance (Sartorius, Dourdan, France) as the European pharmacopoeia requests it.

Each control was made in accordance with the requirements of the European Pharmacopoeia 7th Edition.

2.3. Preparation of samples for uniformity of content

All capsules and injection solutions were stored under dark conditions and at room temperature in a climatic chamber.

A sample at a concentration of 100 µg/mL was prepared by dissolving the content of a capsule into a 50 mL volumetric flask with water for injection, followed by a 1/10 dilution in water for injection and to finish a 1/10 dilution in the mobile phase.

For the injection solution, a sample was prepared at the same concentration. Thus, 1 mL was diluted in a 100 mL volumetric flask with water for injection. Then 1 mL of the obtained solution was diluted in 10 mL of the mobile phase.

Results and discussion

1. Method validation

1.1. System suitability test

The retention time (t_R) of levetiracetam was approximately 2.6 min \pm 5 % (Figure 2a) in chromatographic conditions. The same t_R was found for the pharmaceutical form on Figure b.

The asymmetry is in the confident limits. So it shows that we have a gaussian peak.

The number of theoretical plates is very high, indicating a very efficient column.

A very good resolution has been found, with a value 3 times higher than the recommended value. Thus, we can note a very good separation between the different peaks.

Table 3. System suitability parameters

Parameters	Observed values	Recommended values
Retention time	2.6	$\pm 5 \%$
Asymmetry	0.99	1 ± 0.1
Theoretical plates	7906	> 2000
Resolution	5.09	1.5

1.2. Specificity

For this wavelength, no interference from the sample could be observed. So, the excipients in the capsules (monohydrate lactose and cochineal) and in the injectable formulation (sodium acetate, glacial acetic acid and sodium chloride 0.9 %) do not interfere with levetiracetam for the dosage.

Some degradation was carried in order to use our method for a stability study. The temperature (100°C; Figure 2d) and UV (365 nm; Figure 2e) did not affect the retention time, neither the peak. In basic conditions (NaOH 0.1N; Figure 2f) and acidic conditions (HCl 0.1N; Figure 2g), the peak decreased a lot and we observed new peaks with a high resolution. With H₂O₂ (Figure 2h) we were able to make the same comment except that more degradation products were observed. The chemical degradation with HCl acid (0.1 N) generated a degradation product with a t_R of 4.6 min that could corresponds to the impurity A (Figure 2c).

The chromatographic purity of all the chromatograms was greater than 999.

Results for specificity being satisfactory, all other stages for the validation had thus been realized only with the chemical reference (levetiracetam of the European Pharmacopoeia).

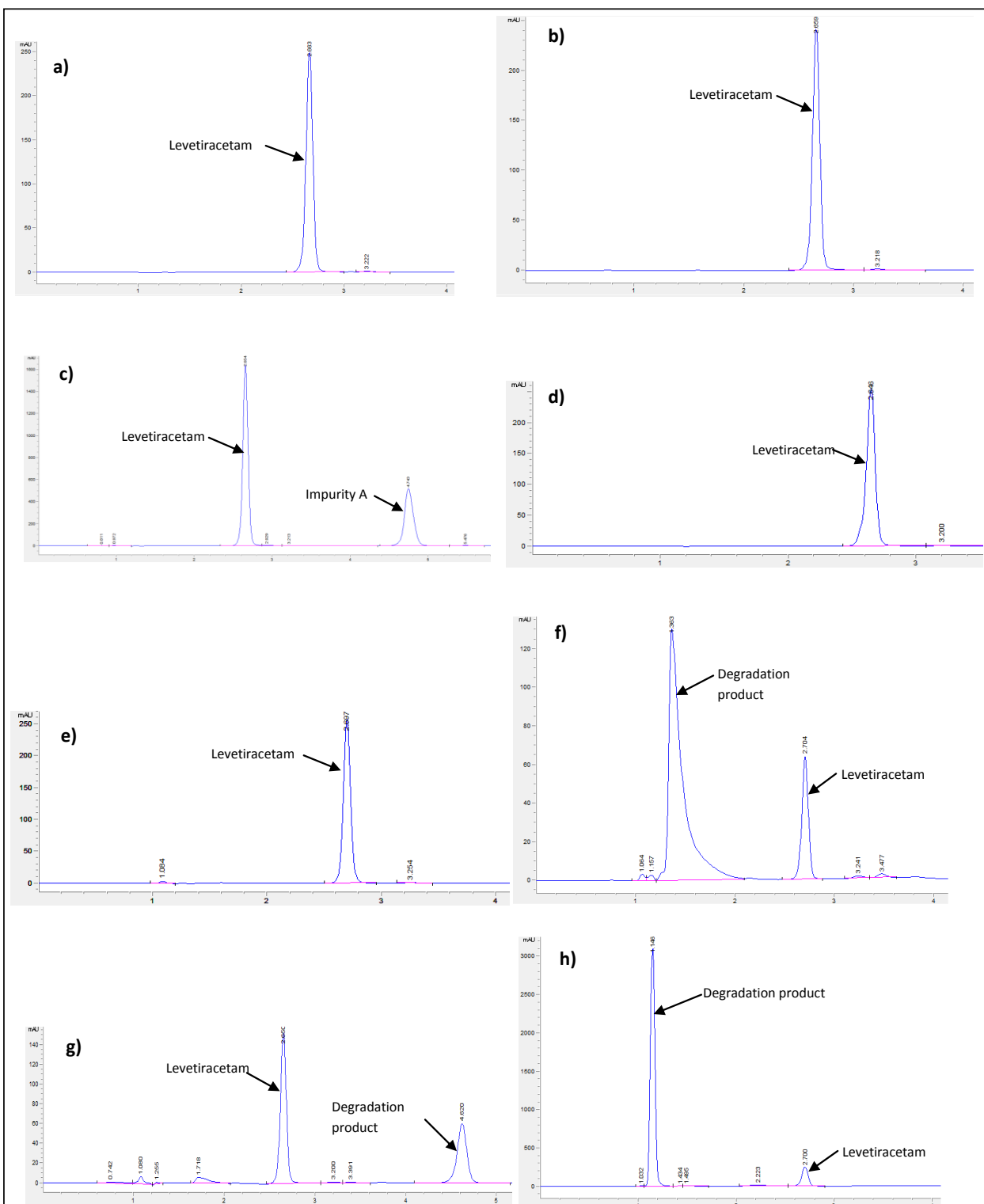


Figure 2. Analysis of levetiracetam and its degradation products by HPLC: t_R for levetiracetam was found at $2.6 \pm 5 \%$: a) Reference spectra with standard reference from the European Pharmacopoeia (100 µg/mL); b) Analysis of levetiracetam solution (100 µg/mL) by HPLC; c) Analysis of levetiracetam with impurity A; d) Analysis of levetiracetam (100 µg/mL) with temperature; e) Analysis of levetiracetam (100 µg/mL) with UV; f) Analysis of levetiracetam (100 µg/mL) with sodium hydroxide 0.1N; g) Analysis of levetiracetam (100 µg/mL) with hydrochloric acid 0.1N; h) Analysis of levetiracetam (100 µg/mL) with H₂O₂ 10 V (1/10 dil).

1.3. Linearity

A good linearity was obtained in the concentration range of 60 to 140 µg/mL with a mean correlation coefficient $r = 0.994$. No difference was shown between the analysis of levetiracetam alone and levetiracetam with excipients and for each sample. The regression equation was: $y = 11.7x - 28.0$.

1.4. Precision

To study the precision, samples with a concentration of 100 µg/mL of levetiracetam were used. The results expressed in µg/mL are shown in Table 4 for levetiracetam alone. Relative Standard Deviation (RSD) was lower than 2 % so the repeatability and the intermediate precision were demonstrated in each case. The method is thus precise for levetiracetam.

Table 4. Repeatability and intermediate precision data for levetiracetam alone

Sample n°	Repeatability (µg/mL)			Intermediate precision (µg/mL)		
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3
1	98.60	100.10	95.73	99.01	100.39	103.59
2	98.49	99.50	95.74	98.85	99.08	101.78
3	98.49	100.08	95.82	99.49	101.51	101.93
4	98.45	99.99	95.73	99.76	101.08	103.73
5	98.46	100.06	95.78	98.45	101.21	99.18
6	98.47	100.10	95.78	99.14	102.06	102.97
Mean (µg/mL)	98.49	99.97	95.76	99.12	100.89	102.20
RSD intra-day (%)	0.06	0.23	0.04	0.47	1.03	1.65

1.5. Accuracy

The method is accurate because the 100 % value was in the confidence limits. Indeed, as we could see in the Table 5, the recovery is about 102 %.

Table 5. Recovery analysis

Type of sample	Levetiracetam alone
Average recovery (n=15)	101.61
Standard deviation (%)	2.50
Confidence limits (%) ($\alpha = 95\%$)	[100.5 ; 102.7]

1.6. Limit of detection and limit of quantification

LOD and LOQ were found to be respectively 7.18 µg/mL and 21.75 µg/mL for levetiracetam alone.

2. Stability of levetiracetam injection flasks and capsules

The length of this stability study for both pharmaceutical forms corresponds to the suggestion of the French Society of Clinical Pharmacy (SFPC) and of the Evaluation and Research Group on the Protection in Controlled Atmosphere (GERPAC). Indeed, they

suggest one year for the maximal length in order to stay in the acceptable limits relating to the hospital practices¹³.

2.1. Physico-chemical and microbiological stability of levetiracetam injection flasks (500 mg/ 5 mL)

Results for all physico-chemical and microbiological controls from D0 to M12 were all conform to the specifications (Table 6).

During the stability study, no significant diminution of the concentration of levetiracetam and of sodium, no important variation on osmolality and pH out of the set specifications were evidenced.

Levetiracetam concentration for all samples was found in the $\pm 10\%$ limits of the theoretical value. A variation for the active substance concentration compared to the initial concentration at D0 was between 98.9 and 103.6%. No difference that could be seen by the naked eye was shown on chromatograms made at D0 and the ones made at M3, M6 and M12. So, it confirms the chemical stability of the finished product. Moreover, no degradation product has been detected between D0 and M12.

pH was conform to the required specifications at each month. Sodium dosage and osmolality showed that all the values obtained during the stability study were in accordance with the fixed limits ($\pm 10\%$ of the theoretical value). The absence of visible particles that could be seen by the naked eye, the very low number of sub-visible particles ($\geq 0.5\ \mu\text{m}$ and $\leq 5\ \mu\text{m}$) and the unchanged macroscopical aspect (color and turbidity) of flasks allow us to confirm the physical stability of the product.

The results of sterility and of bacterial endotoxins at D0 and M12 are in accordance with the requirements of the European Pharmacopoeia 7th Edition. Thus, they confirm the microbiological quality of the product and the maintenance of the product sterile state during the preservation.

Physico-chemical and microbiological results confirm the stability of the finished products at one year in our study conditions.

Table 6. Stability data for the injection solution of levetiracetam (500 mg/ 5 mL)

Storage time 25°C ± 2°C, 60 % HR ± 5% HR	Levetiracetam		Sodium (mM)	pH	Osmolality (mOsm/kg)	Bacterial endotoxins	Sterility	Sub-visible particles counting (nb/mL)
	Dosage (mg/mL)	Recovery (%)						
Specifications	100 ± 10 %	100 % ± 10 %	166.1 ± 10 %	5.0 – 6.0	968 ± 10 %	0.5	Sterile	≥ 10 µm : ≤ 1200 ≥ 25 µm : ≤ 120
D0	96.2 ^a	100.0	151.2	5.82	911	< 0.05	Sterile	8 < 1
M3	95.1 ^a	98.9	154.0	5.91	919	NR	NR	29 1
M6	99.7 ^a	103.6	152.5	5.30	935	NR	NR	4 < 1
M12	95.3 ^a	99.1	151.0	5.94	921	< 0.05	Sterile	5 < 1

^a Mean on 4 flasks
NR = Not Realized

M: Period of stability defined in months. Every datum is a unique value or an average from 4 to 10 experimental determinations. All final products were kept in a climatic chamber for a year at a temperature of 25 ° C ± 2 ° C and a relative humidity of 60 % ± 5 %. All final products were in accordance with the specifications, confirming thus the physico-chemical stability of the hospital preparation.

2.2. Physico-chemical stability of levetiracetam capsules (500 mg)

Results for all physico-chemical controls from D0 to M12 were all conform to specifications (Table 7).

Levetiracetam concentration for all samples was found in the $\pm 10\%$ limits of the theoretical value. A variation for the active substance concentration compared to the initial concentration at D0 was between 97.2 and 103.3%. No degradation product was evidenced during the stability study.

The visual examination of the capsules and the powder before each analysis showed no change in color even with the new capsule packing. The uniformity of mass and the presence of lactose were controlled only on day 0. They showed a perfect uniformity with 0% of error and lactose was found.

As for the injectable solution, no difference was shown on chromatograms made at D0 and the one made at M3, M6 and M12. Thus, the stability of the finished products was also confirmed.

Despite the new formula and the new pharmaceutical form, the capsules are stable for at least 12 months.

Table 7. Stability data for the capsules of levetiracetam (500 mg)

Storage time 25°C ± 2°C, 60 % HR ± 5 % HR	Uniformity of mass	Levetiracetam		Lactose	Capsule appearance
		Dosage (mg/mL)	Recovery (%)		
Specifications	% error $\leq 7.2\%$ M ± 7.5% ≤ 2 M ± 15% = 0	500 ± 10 %	100 % ± 10 %	Conform	Ivory
D0	0 % 0 0	490.0 ^a	100.0	Conform	Conform
M3	NR	476.3 ^b	97.2	NR	Conform
M6	NR	506.2 ^b	103.3	NR	Conform
M12	NR	504.8 ^a	103.0	NR	Conform

^a Mean on 10 capsules

^b Mean on 4 capsules

NR = Not Realized

M: Period of stability defined in months. Every datum is a unique value or an average from 4 to 10 experimental determinations. All final products were kept in a climatic chamber for a year at a temperature of 25 ° C ± 2 ° C and a relative humidity of 60% ± 5%. All final products were in accordance with the specifications, confirming thus the physico-chemical stability of the hospital preparation.

Conclusion

This “stability indicating” method developed in the purpose of carrying out a clinical trial is fast and simple. Then, its precision and accuracy, as well as its limits of detection and of quantification, make it applicable for quantitative analysis of levetiracetam in capsules or in injectable solutions. The previous parameters were all confirmed with a statistical analysis. Besides, the forced degradations validated the specificity with a good separation of levetiracetam and its degradation products.

This convenient HPLC method was also used for a stability study. Moreover, no matrix effect due to the excipients of capsules or of injectable solutions have been highlighted. Hence, the method proposed is suitable for routine quality control and stability indicating of levetiracetam in two pharmaceutical dosage forms.

For the stability study, all physico-chemical and microbiological controls performed on capsules and injectable preparations were conform to the required specifications. They confirmed that levetiracetam capsules and injection flasks were stable for at least one year. These two hospital preparations could thus be used safely for the clinical trial and a safe administration to humans can be done.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

Acknowledgement

- ✓ To Divi's laboratories for kindly providing the samples of levetiracetam.
- ✓ To the laboratory technicians for the physico-chemical and microbiological analysis.

References

- ¹ « KEPPRA 500MG - Monograph », cited 3 July 2013, <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=28780&info=INDIC>.
- ² Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2). 2003.
- ³ Jignesh S. Shah*, G. Vidyasagar and H. Barot, *Der Pharmacia Sinica*, 2012, 3 (5):576-589.
- ⁴ N.APPALA RAJU et al., *E-Journal of Chemistry*, 2008, 5(S2), 1098-1102.
- ⁵ A.LAKSHMANA RAO* and V.NAGA JAHNAVI, *E-Journal of Chemistry*, 2010, 7(2), 600-604.
- ⁶ International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). 2005.
- ⁷ SFSTP. *Pharma Pratiques* 2 (4) 205-226,1992.
- ⁸ Pharmacopée Européenne. 7^{ème} éd. 2013. Direction Européenne de la Qualité du médicament et des soins, Conseil de l'Europe; Strasbourg. <http://www.edqm.eu/>
- ⁹ Décision du 5 novembre 2007 relative aux bonnes pratiques de préparation, Bulletin officiel n°7/7 bis, 2007.
- ¹⁰ Décret du Ministère de la Santé n° 2012-1201 du 29 octobre 2012 relatif à l'étiquetage des préparations et d'autres produits pharmaceutiques : Entrée en vigueur Avril; 2013.
- ¹¹ Décision du 4 décembre 2013 relative aux bonnes pratiques de fabrication, Bulletin officiel 2011/8 bis - Ligne Directrice 13, 2014.
- ¹² Décision du 24 novembre 2006 fixant les règles de Bonnes Pratiques Cliniques pour les recherches biomédicales portant sur des médicaments à usage humain JORF n°277 du 30 novembre 2006 page 18033 texte n° 64.
- ¹³ Guide méthodologique des études de stabilité des préparations de la Société Française de Pharmacie Clinique et du Groupe d'Evaluation et de Recherche sur la Protection en Atmosphère Contrôlée - Edition 1; Avril 2013.

Annexe XII.

Poster



VALIDATION D'UNE MÉTHODE DE DOSAGE DE LEVETIRACETAM PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE DANS LE CADRE D'UNE ETUDE CLINIQUE

ML. TALL, D. LALEYE, A. DE VAUJANY, E. DIOUF, M. LENFANT, N. KOOG, B. DUCARRE, F. PIROT, C. PIVOT
PHARMACIE, GROUPEMENT HOSPITALIER EDOUARD HERRIOT, 5, PLACE D'ARSONVAL, 69437 LYON

INTRODUCTION

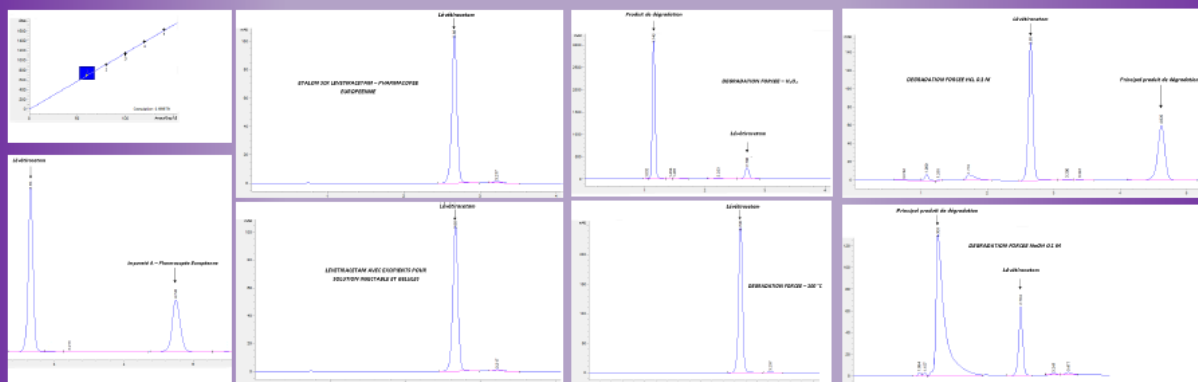
Dans le cadre d'une nouvelle étude clinique institutionnelle (ECI), la Pharmacie à Usage Intérieur (PUI) a été sollicitée pour la préparation et le contrôle qualité de deux médicaments expérimentaux (ME). Ces médicaments concernent des gélules et une solution injectable dosées respectivement à 500 mg et 100 mg/ml (500 mg/5 ml) en Lévétiracetam. Le but de cet ECI consiste en l'évaluation de l'efficacité d'un traitement antiépileptique prophylactique systématique par Lévétiracetam versus placebo à la phase aiguë de hémorragies intracérébrales spontanées. Ce travail a pour but de mettre au point et de valider la méthode de dosage du Lévétiracetam dans ces deux ME par Chromatographie Liquide Haute Performance.

MATÉRIELS ET MÉTHODE

La validation analytique a été conduite selon les recommandations de la Conférence Internationale d'Harmonisation (CIH) dans l'intervalle de mesure situé entre 60 et 140 µg/ml. Cette validation a été réalisée à partir d'un étalon de Lévétiracetam de pureté > 99,5% et a consisté à la détermination de la spécificité, de la linéarité (n=5), de la fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire), de l'exactitude, de la limite de détection et de la limite de quantification. Chaque critère de validation a été déterminé sur trois jours avec trois opérateurs différents. Pour évaluer la spécificité, des essais de dégradation forcée (HCl 0,1N, NaOH 0,1N et H₂O₂ 10 volumes, Température à 100°C et exposition aux rayons ultraviolets à 365 nm) et des essais portant sur la recherche d'un éventuel effet matrice dû aux excipients ont été effectués. La séparation chromatographique a été obtenue sur une colonne C18, 4 µm, 100 mm x 4,6 mm, thermostatée à 50°C. La phase mobile est composée d'eau acidifiée avec l'acide phosphorique (pH : 2,8-3,0) et du méthanol (75/25). Le débit de la pompe est fixé à 1 ml/min et la détection a été effectuée à 210 nm pour un volume d'injection de 10 µl.

RÉSULTATS

La méthode de dosage a montré une bonne linéarité entre 60 et 140 µg/ml avec un coefficient de corrélation moyen $r = 0,994$, une fidélité satisfaisante avec un coefficient de variation < 2% et une exactitude avec des taux de recouvrement situés entre 100 et 102 %. Les limites de détection et de quantification sont respectivement de 7 et 21 µg/ml. Les temps de rétention ont été stables pour toutes les injections à 2,65 min ± 5 % et la dégradation forcée a permis de valider le critère de spécificité avec une bonne séparation du Lévétiracetam et de ses produits de dégradation. Aucun effet matrice dû aux excipients des gélules et de la solution injectable n'a été mis en évidence.



CONCLUSION

Au vu de ces résultats, cette méthode a été validée selon les recommandations de la CIH. Après cette validation satisfaisante, une étude stabilité est actuellement en cours de réalisation pour ces deux ME.

HOPHARM, 14-15-16 Mai 2014, La Rochelle

BIBLIOGRAPHIE

1. Code de la santé publique | Legifrance [Internet]. [cité 3 juill 2014]. Disponible sur: <http://legifrance.gouv.fr/affichCode.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665>
2. Article R1121-1 du Code de la Santé Publique.
3. Article L5111-1 du Code de la Santé Publique.
4. Article L5121-1-1 du Code de la Santé Publique.
5. Wolff HG, DuBois EF, Gold H. Cornell Conferences on Therapy: Use of Placebos in Therapy. *New York J Med.* 1946;46:1718 - 27.
6. Directive 2001/20/CE du Parlement Européen et du Conseil du 4 avril 2001 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à l'application de bonnes pratiques cliniques dans la conduite d'essais cliniques de médicaments à usage humain. *JOCE.* 1 mai 2001;L121/34-L121/44.
7. RABALLAND J. Recherches Biomédicales et Dispositifs Médicaux: Historique et Réglementation. Thèse d'exercice: Pharmacie: Nantes; 2012.
8. Jonsen. p.125, citant HIPPOCRATE, Aphorismes, I, dans W.H.S. Jones (trad.), *Hippocrate with an English Translation*, Cambridge (Mass.), Harvard University Press. 1959. p. 99.
9. Claude Bernard : la médecine expérimentale - Claude Debru - Méthode scientifique / Pratiques scientifiques et épistémologie - Juillet 2013 - pse_Debru1.pdf [Internet]. [cité 4 juill 2014]. Disponible sur: http://www.academie-sciences.fr/activite/hds/textes/pse_Debru1.pdf
10. Gerry B. Hill. Archie Cochrane and his legacy, An internal challenge to physicians' autonomy?. *Journal of Clinical Epidemiology* 53. 2000;1189 - 92.
11. Amiel P. L'Expérimentation sur l'être humain. J - M Mouillie et al. (dir), *Médecine et sciences humaines. Manuel pour les études médicales du Collègue des enseignants en sciences humaines en médecine (COSHEM)*, Paris, Belles Lettres; 2011. p. 564 - 76. En ligne.
12. ...: Comité de Protection des Personnes (CPP) Sud-Méditerranée II [La loi Huriet-Sérusclat] ... [Internet]. [cité 7 juill 2014]. Disponible sur: <http://www.cpp-sudmed2.fr/La-loi-Huriet-Serusclat>
13. Décision du 24 novembre 2006 fixant les règles de bonnes pratiques cliniques pour les recherches biomédicales portant sur des médicaments à usage humain. *JORF n°277* texte n°64. 30 nov 2006;18033.
14. European Medicines Agency. ICH Topic E 6 (R1) Guideline for Good Clinical Practice, CPMP/ICH/135/95, Step 5. *juill 2002*;1 - 59.
15. Décision du 5 novembre 2007 relative aux bonnes pratiques de préparation. *JORF n°270* texte n° 23. 21 nov 2007;19029.
16. Décision du 4 décembre 2013 relative aux bonnes pratiques de fabrication. *JORF n°0005* texte n°2. 7 janv 2014;183.
17. LOI du 5 mars 2012 relative aux recherches impliquant la personne humaine (1). *JORF.* 7 mars 2012;N° 2012- 300.
18. Société Française d'Anesthésie et de Réanimation. SFAR - Ce que va changer la loi Jardé, si elle est appliquée un jour [Internet]. [cité 9 juill 2014]. Disponible sur: <http://www.sfar.org/accueil/article/1020/ce-que-va-changer-la-loi-jarde-si-elle-est-appliquee-un-jour>
19. Tableau comparatif de la Loi Jardé [Internet]. [cité 9 juill 2014]. Disponible sur: http://www.fondamentaux.org/wp-content/uploads/2012/03/loi_recherche_tableau_comparatif.pdf
20. Article L1122-1 du Code de la Santé Publique.
21. Résolution législative du Parlement européen du 2 avril 2014 sur la proposition de règlement du Parlement européen et du Conseil relatif aux essais cliniques de médicaments à usage humain et abrogeant la directive 2001/20/CE. *JOUE.* 2 avr 2014;COM(2012)0369-C7 - 0194/2012-2012/0192(COD).
22. Essais cliniques : publication d'un nouveau règlement européen - Point d'Information - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 9 juill 2014]. Disponible sur: <http://ansm.sante.fr/S-informer/Actualite/Essais-cliniques-publication-d-un-nouveau-reglement-europeen-Point-d-Information>
23. European Medicines Agency welcomes publication of the Clinical Trials Regulation. *JOUE.* 28 mai 2014;EMA/324129/2014.
24. Nouveau Règlement relatif aux essais cliniques - - AFMPS [Internet]. [cité 9 juill 2014]. Disponible sur: http://www.fagg-afmps.be/fr/news/news_reglement_essais_cliniques.jsp

25. Prescrire - Libre Accès > Les Cahiers Prescrire - Europe et Médicaments : Faire progresser les politiques de santé (récapitulatif), Règlement européen sur les essais cliniques : dernière ligne droite (3/2014) [Internet]. [cité 9 juill 2014]. Disponible sur: <http://www.prescrire.org/Fr/1/194/48278/3314/3305/SubReportDetails.aspx>
26. La loi Jardé: une approche basée sur le risque [Internet]. [cité 10 juill 2014]. Disponible sur: http://urcest.chusa.jussieu.fr/cours/fichiers/FIEC_loi%20Jard%20_MihaelaMatei.pdf
27. AFSSAPS. Mise en place et conduite en France d'essais cliniques portant sur les médicaments à usage humain - Avis aux promoteurs d'essais cliniques de médicaments. 1 janv 2009;Tome 1 - Texte, Version 2.
28. L'ANSM, agence d'évaluation, d'expertise et de décision - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 10 juill 2014]. Disponible sur: [http://ansm.sante.fr/L-ANSM2/Une-agence-d-expertise/L-ANSM-agence-d-evaluation-d-expertise-et-de-decision/\(offset\)/0](http://ansm.sante.fr/L-ANSM2/Une-agence-d-expertise/L-ANSM-agence-d-evaluation-d-expertise-et-de-decision/(offset)/0)
29. Les essais cliniques - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 10 juill 2014]. Disponible sur: [http://ansm.sante.fr/Activites/Essais-cliniques/Les-essais-cliniques/\(offset\)/0](http://ansm.sante.fr/Activites/Essais-cliniques/Les-essais-cliniques/(offset)/0)
30. Comité de Protection des Personnes Sud Est V [Internet]. [cité 10 juill 2014]. Disponible sur: <http://www.cppsudest5.fr/composition/index.html>
31. Comité de Protection des Personnes (CPP) Sud-Méditerranée II [Les CPP français] [Internet]. [cité 10 juill 2014]. Disponible sur: <http://www.cpp-sudmed2.fr/Les-CPP-francais,321#sw>
32. Comités de protection des personnes - CPP [Internet]. [cité 10 juill 2014]. Disponible sur: <http://www.ars.rhonealpes.sante.fr/Comites-de-protection-des-pers.136422.0.html>
33. Article L1123-6 du Code de la Santé Publique (introduit par la loi du 9 août 2004).
34. Article L1121-1 du Code de la Santé Publique.
35. Participants à une recherche sur les personnes [Internet]. [cité 15 juill 2014]. Disponible sur: <http://extranet.inserm.fr/recherche-clinique-et-en-sante/recherche-sur-les-personnes/participants>
36. Obtenir le numéro EudraCT - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 15 juill 2014]. Disponible sur: [http://ansm.sante.fr/Activites/Medicaments-et-produits-biologiques/Obtenir-le-numero-EudraCT/\(offset\)/6](http://ansm.sante.fr/Activites/Medicaments-et-produits-biologiques/Obtenir-le-numero-EudraCT/(offset)/6)
37. Mise en place et conduite en France d'essais cliniques portant sur les médicaments à usage humain - Fiches pratiques [Internet]. [cité 15 juill 2014]. Disponible sur: http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/10d6536febf4e0a2525ba4cceff347c8.pdf
38. Contenu du dossier de demande d'autorisation d'essai clinique de médicaments à soumettre à l'Afssaps [Internet]. [cité 16 juill 2014]. Disponible sur: http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/10d6536febf4e0a2525ba4cceff347c8.pdf
39. Gestion des inclusions [Internet]. [cité 15 juill 2014]. Disponible sur: http://www.recherchecliniquepariscentre.fr/wp-content/uploads/2012/01/Cours-DU_gestiondesinclusions_20120206_EMT.pdf
40. Chen T-C, Chen Y-Y, Cheng P-Y, Lai C-H. The incidence rate of post-stroke epilepsy: A 5-year follow-up study in Taiwan. *Epilepsy Research* 102. 2012;188 - 94.
41. Collège des enseignants en Neurologie - Sémiologie des crises épileptiques [Internet]. [cité 18 juill 2014]. Disponible sur: <http://www.cen-neurologie.fr/1er-cycle/propedeutique/analytique/epileptiques/index.phtml>
42. Gilad R, Boaz M, Dabby R, Sadeh M, Lampl Y. Are post intracerebral hemorrhage seizures prevented by anti-epileptic treatment? *Epilepsy Research* 95. 2011;227 - 31.
43. Belcastro V, Pierguidi L, Tambasco N. Levetiracetam in brain ischemia: Clinical implications in neuroprotection and prevention of post-stroke epilepsy. *Brain and Development* 33. 2011;289 - 93.
44. Dr Laure Peter. Protocole étude clinique. 2014.
45. KEPPRA 500MG - Monographie spécialité [Internet]. [cité 3 juill 2013]. Disponible sur: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=28780&info=INDIC>
46. FDA: Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations [Internet]. [cité 18 juill 2014]. Disponible sur: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/ob/docs/obdetail.cfm?Appl_No=021035&TABLE1=OB_Rx
47. Liste des textes adoptés Commission PhEur décembre 2009-fr-11566-2.pdf [Internet]. [cité 18 juill 2014]. Disponible sur: https://www.edqm.eu/site/Liste_des_textes_adoptes_Commission_PhEur_decembre_2009-fr-11566-2.html
48. Contenu du supplément 7.3 et 7.4 [Internet]. [cité 18 juill 2014]. Disponible sur: <http://static.decitre.fr/media/pdf/feuillestage/9/7/8/9/2/8/7/1/9789287169617.pdf>

49. Crepeau AZ, Treiman DM. Levetiracetam: a comprehensive review. *Expert Rev Neurother.* 10(2) éd. févr 2010;159 - 71.
50. Levetiracetam molecule [Internet]. [cité 18 juill 2014]. Disponible sur: <http://en.chembase.cn/Server/MolImages/49/BC/49BC169D-63E6-4F3D-AB60-0B86797551C9.png>
51. Safety data sheet levetiracetam [Internet]. [cité 21 juill 2014]. Disponible sur: <http://www.usp.org/pdf/EN/referenceStandards/msds/1359404.pdf>
52. Pharmacopée Européenne 7.3. Monographie lévétiracétam. janv 2012;4238 - 40.
53. Gillard M, Chatelain P, Fuks B. Binding characteristics of levetiracetam to synaptic vesicle protein 2A (SV2A) in human brain and in CHO cells expressing the human recombinant protein. *Eur J Pharmacol* 536(1-2). 24 avr 2006;102 - 8.
54. Le système ATC –DDD : Intérêt en pharmacovigilance [Internet]. [cité 18 juill 2014]. Disponible sur: http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/safety_efficacy/trainingcourses/10couve_atc.pdf
55. Article L5126-5 du Code de la Santé Publique.
56. Arrêté du 22 septembre 2011 relatif au contenu et aux modalités de présentation d'un protocole de recherche biomédicale portant sur un médicament à usage humain | Legifrance. [cité 22 juill 2014]; Disponible sur: http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do;jsessionid=53245C961B44C1841E12D27CB17F4448.tpdljo12v_3?cidTexte=JORFTEXT000024629105&dateTexte=29990101
57. Rectificatif à la communication de la Commission — Indications détaillées portant sur la demande présentée aux autorités compétentes en vue d'obtenir l'autorisation de procéder à l'essai clinique d'un médicament à usage humain, sur la notification de modifications substantielles et sur la déclaration de fin de l'essai clinique (« CT-1 »). *JOUE.* 19 mai 2011;C 148/9 - 27.
58. Arrêté du 22 juin 2001 relatif aux Bonnes Pratiques de Pharmacie Hospitalière. *Bulletin Officiel Spécial du ministère de l'emploi et de la solidarité* n° 2001- BOS 2 BIS.
59. Article L5138-1 du Code de la santé publique.
60. KEPPRA 100MG/ML SOL INJ FL 5ML - Monographie spécialité [Internet]. [cité 3 juill 2013]. Disponible sur: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=30619>
61. LEVETIRACETAM AGT 100MG/ML INJ FL5ML - Monographie spécialité [Internet]. [cité 3 juill 2013]. Disponible sur: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=28380&info=CONSV>
62. Raymond C Rowe, Paul J Sheskey, Marian E Quinn. *Handbook of Pharmaceutical Excipients.* Sixth Edition. 2009.
63. LEVETIRACETAM MYL 100MG/ML INJ FL5ML - Monographie spécialité [Internet]. [cité 3 juill 2013]. Disponible sur: [http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=27541&popup=1&imprimer=2&info\[\]=COMPO&info\[\]=CLASS&info\[\]=GENE&info\[\]=CHOIX&info\[\]=ADMIN&info\[\]=CONSV&info\[\]=INDIC&info\[\]=NON_INDIC&info\[\]=POSO&info\[\]=C_INDIC&info\[\]=PREC_EMP&info\[\]=N_C_INDIC&info\[\]=INTER&info\[\]=GROSSESSE&info\[\]=CONDUITE&info\[\]=EFFET](http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=27541&popup=1&imprimer=2&info[]=COMPO&info[]=CLASS&info[]=GENE&info[]=CHOIX&info[]=ADMIN&info[]=CONSV&info[]=INDIC&info[]=NON_INDIC&info[]=POSO&info[]=C_INDIC&info[]=PREC_EMP&info[]=N_C_INDIC&info[]=INTER&info[]=GROSSESSE&info[]=CONDUITE&info[]=EFFET)
64. Afssaps. Liste des Excipients à Effet Notoire. Mise à Jour de la liste et des libellés selon le Guideline européen 2003 - Deuxième révision du 3 mars 2009 [Internet]. [cité 16 juill 2013]. Disponible sur: http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/29aa941a3e557fb62cbe45ab09dce305.pdf
65. Scientific discussion - Keppra. 29 mars 2006;EMEA/H/C/277/X/46.
66. LEVETIRACETAM SUN 100MG/ML INJ FL5ML - Monographie spécialité [Internet]. [cité 3 juill 2013]. Disponible sur: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=27849>
67. KEPPRA 250MG CPR - Monographie spécialité [Internet]. [cité 31 juill 2014]. Disponible sur: [http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=15900&popup=1&imprimer=2&info\[\]=COMPO&info\[\]=CLASS&info\[\]=GENE&info\[\]=CHOIX&info\[\]=ADMIN&info\[\]=CONSV&info\[\]=INDIC&info\[\]=NON_INDIC&info\[\]=POSO&info\[\]=C_INDIC&info\[\]=PREC_EMP&info\[\]=N_C_INDIC&info\[\]=INTER&info\[\]=GROSSESSE&info\[\]=CONDUITE&info\[\]=EFFET](http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=15900&popup=1&imprimer=2&info[]=COMPO&info[]=CLASS&info[]=GENE&info[]=CHOIX&info[]=ADMIN&info[]=CONSV&info[]=INDIC&info[]=NON_INDIC&info[]=POSO&info[]=C_INDIC&info[]=PREC_EMP&info[]=N_C_INDIC&info[]=INTER&info[]=GROSSESSE&info[]=CONDUITE&info[]=EFFET)
68. KEPPRA 1000MG CPR - Monographie spécialité [Internet]. [cité 31 juill 2014]. Disponible sur: [http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=22313&popup=1&imprimer=2&info\[\]=COMPO&info\[\]=CLASS&info\[\]=GENE&info\[\]=CHOIX&info\[\]=ADMIN&info\[\]=CONSV&info\[\]=INDIC&info\[\]=NON_INDIC&info\[\]=POSO&info\[\]=C_INDIC&info\[\]=PREC_EMP&info\[\]=N_C_INDIC&info\[\]=INTER&info\[\]=GROSSESSE&info\[\]=CONDUITE&info\[\]=EFFET](http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=22313&popup=1&imprimer=2&info[]=COMPO&info[]=CLASS&info[]=GENE&info[]=CHOIX&info[]=ADMIN&info[]=CONSV&info[]=INDIC&info[]=NON_INDIC&info[]=POSO&info[]=C_INDIC&info[]=PREC_EMP&info[]=N_C_INDIC&info[]=INTER&info[]=GROSSESSE&info[]=CONDUITE&info[]=EFFET)
69. Overview of pharmaceutical excipients used in tablets and capsules | Drug Topics [Internet]. [cité 3 juill 2013]. Disponible sur: <http://drugtopics.modernmedicine.com/drug-topics/news/modernmedicine/modern-medicine-news/overview-pharmaceutical-excipients-used-tablets>

70. LEVETIRACETAM ACT 500MG CPR - Monographie spécialité [Internet]. [cité 31 juill 2014]. Disponible sur: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=28005>
71. LEVETIRACETAM ACC 500MG CPR - Monographie spécialité [Internet]. [cité 31 juill 2014]. Disponible sur: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=27847>
72. LEVETIRACETAM ALT 500MG CPR - Monographie spécialité [Internet]. [cité 31 juill 2014]. Disponible sur: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=28781>
73. LEVETIRACETAM RBX 500MG CPR - Monographie spécialité [Internet]. [cité 31 juill 2014]. Disponible sur: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=28886>
74. LEVETIRACETAM SDZ 500MG CPR - Monographie spécialité [Internet]. [cité 31 juill 2014]. Disponible sur: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=28287>
75. European medicines agency. Assessment report on levetiracetam. 21 juill 2011;EMA/CHMP/323600/2011.
76. Pharmacie des HUG. Bulletin d'information du CAPP - Couper ou écraser les comprimés: Oui ou non? De la théorie à la pratique. CAPP-Info-n°26-octobre 2003.
77. Galenique_Formes_pharmaceutiques_tableaux.pps [Internet]. [cité 1 août 2014]. Disponible sur: http://www.ifpvps.fr/IMG/ppt/Galenique_Formes_pharmaceutiques_tableaux.pps
78. Pharmacie des HUG. Administration des médicaments par sonde chez l'adulte [Internet]. [cité 17 juill 2013]. Disponible sur: http://pharmacie.hug-ge.ch/infomedic/utilismedic/admin_sonde_gener.pdf
79. Polysaccharides alimentaires - Comportement en milieu aqueux [Internet]. [cité 1 août 2014]. Disponible sur: http://biochim-agro.univ-lille1.fr/polysaccharides/co/Contenu_1_c.html
80. Pharmacopée européenne 8.0. Monographie cellulose microcristalline. juill 2013; 1968 - 71.
81. Pharmacopée européenne 8.0. Monographie stéarate de magnésium. juill 2013; 2885 - 88.
82. Pharmacopée européenne 8.0. Monographie talc purifié. juill 2013; 3601 - 03.
83. Pharmacopée européenne 8.0. Monographie lactose monohydraté. juill 2013; 2584 - 85.
84. Sandoz International GmbH, Global Patents Department. Pharmaceutical composition comprising levetiracetam. Patent EP 2 179 725 A1, 2010.
85. Sonali S. Bharate, Sandip B. Bharate, Amrita N. Bajaj. Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients : a comprehensive review. J Excipients and Food ChemI (3). 3 nov 2010;3 - 26.
86. Patrick Crowley, Dr Luigi G Martini. Drug-Excipient Interactions. Pharmaceutical Technology. :Mars 2001.
87. LGA : taille des gélules [Internet]. [cité 4 août 2014]. Disponible sur: http://www.lga.fr/classiques_c8_9.html
88. Pharmacopée européenne 8.0. Préparations injectables. juill 2013; 860-861.
89. Toxines.pdf [Internet]. [cité 7 août 2014]. Disponible sur: <http://fdanieau.free.fr/cours/bts/A1/microbiologie/chapitre16/Toxines.pdf>
90. Pharmacopée européenne 8.0. Essai des endotoxines bactériennes. juill 2013; 207-11.
91. Osmolarité et osmolalité [Internet]. [cité 8 août 2014]. Disponible sur: <http://efisio.online.fr/ensenhament11/PCI/osmolarite.pdf>
92. Photométrie de flamme [Internet]. [cité 8 août 2014]. Disponible sur: <http://www.lachimie.fr/analytique/photometrieflamme/>
93. Résumé des Caractéristiques du Produit NaCl à 0,9 % [Internet]. [cité 30 oct 2014]. Disponible sur: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0185842.htm>
94. Pharmacopée européenne 8.0. Capsules. juill 2013; 836-37.
95. ICH Q1A(R2) - Stability Testing of New Drug Substances and Products. 6 February 2003.
96. Biotechnologie & Biologie et Physiopathologie humaine - Académie de Rouen - HPLC Principe et appareillage [Internet]. [cité 11 août 2014]. Disponible sur: <http://biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article9>
97. CHAPITRE II: CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC) [Internet]. [cité 11 août 2014]. Disponible sur: http://www.ac-nancy-metz.fr/ensegn/physique/chim/jumber/hplc/chromatographie_en_phase_liquide_fichiers/hplc.html
98. La chromatographie [Internet]. [cité 11 août 2014]. Disponible sur: <http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/chromatographie/chromatographie.html>

99. Jignesh S. Shah, G. Vidyasagar, H. Barot. Stability indicating RP-HPLC method for estimation of levetiracetam in pharmaceutical formulation and application to pharmacokinetic study. *Der Pharmacia Sinica*; Oct 2012, Vol 3 Issue 5, p576.
100. Abdullah Al Masud, Md. Shamsul Arefeen, Mohammad Kaisarul Islam, Moynul Hasan. Development and validation of a RP-HPLC Method for the Estimation of Levetiracetam in Bulk and Pharmaceutical Formulation. *J Chem Pharm Res*, 2011, 3(1):324-329.
101. A.LAKSHMANA RAO, V.NAGA JAHNAVI. A Validated RP-HPLC Method for the Estimation of Levetiracetam in Bulk and Pharmaceutical Formulations. *E-Journal of Chemistry*, 2010, 7(2), 600-604.
102. N.APPALA RAJU et al. Estimation of Levetiracetam in Tablet Dosage Form by RP-HPLC. *E-Journal of Chemistry*, 2008, 5(S2), 1098-1102.
103. ICH Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. November 1996.
104. SFSTP. *Pharma Pratiques* 2 (4) 205-226, 1992.
105. ICH Q2A - Text on validation of Analytical Procedures [Internet]. [cité 13 août 2014]. Disponible sur: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm073381.pdf>
106. Ganesh.Akula, SaikrishnaKandikonda, SaikumarBhupathi, Ramesh Kumar Rasapelly. New RP HPLC method for the determination of Levetiracetamin bulk and prepared tablets. *IJPI's Journal of Analytical Chemistry*; Vol 1:3; 2011).
107. Narendra Devanaboyina, T.Satyanarayana and B.Ganga Rao. A novel RP-HPLC method for the analysis of levetiracetam in formulations. *Der Pharma Chemica*, 2011, 3 (6):112-117.
108. Antoine TRACQUI, Laurence LE GOURRIER et al. Dosage rapide et spécifique du lévétiracétam (Keppra®) par HPLC/MS. *Annales de Toxicologie Analytique*, vol XV, n° 1, 2003.
109. S.Gopalakrishnan, B. Jeyashree, A. Ramalakshmi and A. Chentilnathan. Analytical method development and validation for the determination of Levetiracetam in pharmaceutical formulations by using RP-HPLC. *Der Pharmacia Lettre*, 2011, 3(3): 194-201.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

de VAUJANY Angélique

Mise sous forme pharmaceutique du lévétiracétam dans le cadre d'un essai clinique institutionnel : formulation galénique et étude de stabilité des produits finis.

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2015, 191p.

RESUME

Les Centres Hospitalo-Universitaires (CHU) sont très souvent impliqués dans les essais cliniques institutionnels. La Pharmacie à Usage Intérieur (PUI) de ces CHU est généralement chargée d'assurer la gestion, l'approvisionnement, la préparation, le contrôle, la détention et la dispensation des médicaments expérimentaux destinés à la recherche biomédicale.

La recherche clinique concernée par cette étude a pour objectif d'évaluer l'efficacité d'un traitement antiépileptique prophylactique systématique par lévétiracétam versus *placebo*, à la phase aigüe des hémorragies intracérébrales spontanées sus-tentorielles. Pour la mise en place de cette nouvelle recherche clinique, la PUI avait pour responsabilité la formulation galénique et l'étude de stabilité des médicaments expérimentaux.

Dans un premier temps, une revue bibliographique sur les essais cliniques a été effectuée afin de connaître précisément les textes en vigueur opposables. Après avoir vérifié la faisabilité technique de cet essai clinique au sein de la PUI, une mise sous forme pharmaceutique d'une solution injectable (100 mg/mL) et de gélules (250 mg et 500 mg) de lévétiracétam a été effectuée, ainsi que leurs *placebo* respectifs, en respectant les conditions de l'essai et la réglementation pharmaceutique. Pour disposer d'un médicament expérimental avec une date limite d'utilisation (DLU), une étude de stabilité à long terme, sur la solution injectable et sur les gélules, a été effectuée à $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ avec une humidité relative de $60\% \pm 5\%$ et à l'abri de la lumière. Avant de conduire cette étude de stabilité, une nouvelle méthode de dosage par Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance (HPLC), indicatrice de stabilité, a été validée pour déterminer la teneur en lévétiracétam dans les deux formes pharmaceutiques.

Après un an d'étude de stabilité, tous les contrôles physico-chimiques et microbiologiques effectués sur les produits finis ont été conformes aux spécifications requises. Ces données permettent de fixer une DLU minimale de un an après fabrication. La stabilité physico-chimique et microbiologique de ces médicaments expérimentaux, élément crucial du bon usage, permet une administration à l'Homme en toute sécurité dans le cadre de toute étude clinique.

MOTS CLES

Essai clinique institutionnel
Epilepsie
Pharmacie à Usage Intérieur
Lévétiracétam
Mise sous forme pharmaceutique

JURY

M. PIROT Fabrice, Docteur en Pharmacie
Mme PIVOT Christine, Docteur en Pharmacie
M. TALL Mamadou-Lamine, Docteur en Pharmacie
Mme PETER Laure, Docteur en Médecine

DATE DE SOUTENANCE

Vendredi 16 janvier 2015

ADRESSE DE L'AUTEUR

2 Vie des mulets – 38300 RUY