

Master en Pharmacie

Travail Personnel de Recherche

Etude de stabilité des solutions de Topotécan dans des seringues utilisées dans le traitement du rétinoblastome

présenté à la

Faculté des sciences de
L'Université de Genève

par

Asho Hassan

Unité de recherche

Pharmacie centrale du CHUV

Directeur de l'unité

Prof. Farshid Sadeghipour

Autres responsables

Dr. Markoulina (Lina) Berger

Genève
Année académique 2019

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier le Professeur Farshid Sadeghipour, Pharmacien-Chef du service de la pharmacie du CHUV, de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ce travail de master dans l'unité de contrôle qualité de la pharmacie centrale du CHUV. Je le remercie aussi pour son accueil et pour tout le temps qu'il m'a consacré lors de ce travail de recherche.

Ensuite, je souhaite remercier chaleureusement le Docteur Markoulina Berger, Pharmacienne responsable de l'unité de contrôle qualité de la pharmacie centrale du CHUV. Je la remercie pour son aide, ses précieux conseils et aussi le temps qu'elle m'a accordé.

Je remercie le Doctorant William Bello qui a su répondre à mes questions. Ses remarques pertinentes m'ont aidé à mener à bien ce travail de recherche. J'ai apprécié son soutien.

Je remercie le Docteur Laurent Carrez, pharmacien responsable de l'unité de fabrication de la pharmacie centrale du CHUV, pour sa collaboration au cours de ce travail.

Je remercie les laborantines de l'unité de contrôle qualité et aussi toute l'équipe de la pharmacie centrale du CHUV pour leur accueil.

Aussi, je remercie ma très chère collègue et amie, Ming-Yan, pour son soutien sans faille et ses nombreux conseils.

Enfin et surtout je souhaite remercier ma famille et mes amis qui m'ont soutenu tout au long de ce travail et sans qui il n'aurait pas été le même. Par la même occasion, je les remercie de m'avoir soutenu tout au long de mes études.

Résumé

Introduction

Le rétinoblastome est un cancer rare de la rétine qui est principalement diagnostiqué dans les cinq premières années de vie de l'enfant. Cette maladie génétique représente la plus fréquente des tumeurs intraoculaires. Elle existe sous une forme sporadique et une forme héréditaire. Deux types de traitements existent : les traitements chirurgicaux et les traitements conservateurs. Parmi les traitements conservateurs, on retrouve la chimiothérapie. L'Hycamtin® contient comme principe actif, le topotécan, un agent antinéoplasique. Il est régulièrement reconstitué par l'unité de production de la pharmacie du CHUV pour l'Hôpital ophtalmique Jules-Gonin qui l'administre sous forme intra-artérielle. A l'heure actuelle, les seringues de topotécan sont préparées directement pour un patient donné en urgence et ne peuvent pas être préparées à l'avance et stockées car la stabilité de ce dernier n'est pas connue. Le développement et la validation d'une méthode indiquant la stabilité est donc nécessaire. Cette méthode sera par la suite utilisée pour une étude de stabilité.

Matériels et méthode

Une méthode isocratique en phase inverse (RP-LC) indiquant la stabilité du topotécan a été développée en utilisant le détecteur à barrettes diodes (UV-DAD) et le détecteur MS (simple quadripôle). Elle a été effectuée avec une colonne Acquity BEH C18 (130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 100 mm) et une phase mobile constituée d'une solution tampon bicarbonate d'ammonium – acide acétique (pH=6.5) et d'acétonitrile (85 :15). Le débit est de 0.2 mL/min avec un temps d'analyse total de 10 minutes. La détection a été effectuée à une longueur d'onde de 228 nm. Elle permet la détermination quantitative de la forme active du topotécan (lactone) au sein d'une préparation reconstituée d'Hycamtin® sous forme de seringue injectable.

Résultats et discussion

L'étude des résultats de la dégradation accélérée montre que le topotécan est fortement sensible à l'hydrolyse basique. Il est aussi sensible à l'oxydation chimique, à la chaleur et à l'exposition à la lumière / aux UV alors qu'il est stable en milieu acide.

La méthode développée a été validée avec un modèle de régression linéaire après une transformation à la racine carrée. Les résultats de la validation montrent que la méthode pourra être utilisée pour quantifier des échantillons avec une concentration d'analyte allant de 10 à 200 µg/mL avec une limite d'acceptation de ±6% et un niveau de risque maximal de 5%. Cette méthode pourra alors être utilisée lors de l'étude de stabilité du topotécan au sein de l'unité de contrôle qualité de la pharmacie du CHUV.

Conclusion et perspectives

Aucune des 3 méthodes sélectionnées à partir de la littérature n'a permis la mise en évidence simultanée des deux formes du TPT (lactone et carboxyle) dans un même chromatogramme. C'est pourquoi, une grande partie de ce travail a été consacré au développement d'une nouvelle méthode indiquant la stabilité. Une méthode isocratique en mode RP-LC utilisant le détecteur UV-DAD a été développée et validée. Elle pourra alors être utilisée lors de l'étude de stabilité du topotécan au sein de l'unité de contrôle qualité de la pharmacie du CHUV.

Liste des abréviations

ACN : Acétonitrile
AUC : Aire sous la courbe (Area under curve)
CCM : Chromatographie sur couche mince
CPT : Camptothécine
CV : Coefficient de variation
CHUV : Centre hospitalier universitaire vaudois
DAD : Détecteur à barrettes diodes (Diode Array Detector)
FDA : Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (Food and Drug administration)
GC : Chromatographie gazeuse
HCl : acide chlorhydrique
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée)
HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance
ICH : Conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain
LC : Chromatographie liquide
MeOH : Méthanol
Min : minute
mL : millilitre
µg : microgramme
MS : Spectrométrie de masse (masse spectrometry)
m/z : Rapport masse m sur charge z
NaCl 0.9% : sérum physiologique (Chlorure de sodium 0.9%)
Ph. Eur. : Pharmacopée Européenne
pKa : Constante d'acidité
R_s : Résolution
SAR : Relation structure-activité (Structure-Activity-Relationship)
SIM : Surveillance d'un ion sélectionné (Selected ion monitoring)
SPC : Chromatographie supercritique
STD : Standard
TFA : Acide trifluoroacétique
TPT : Topotécan
T_r : temps de rétention
UHPLC : Chromatographie liquide ultra haute performance
USP : Pharmacopée américaine (United States Pharmacopeia)
UV : Ultra-violet
XIC : Extracted-ion chromatogram
°C : Degrés Celsius

Table des matières

1. INTRODUCTION	1
1.1. Le rétinoblastome	1
1.1.1. Rétinoblastome	1
1.1.2. Signaux d'alertes et symptômes	2
1.1.3. Diagnostic.....	2
1.1.4. Options thérapeutiques	2
1.2. Topotécan	3
1.2.1. Origine du topotécan	3
1.2.2. Chimie du topotécan.....	4
1.2.3. Structure-Activity-Relationship (SAR) du topotécan (TPT).....	5
1.3. Méthode analytique	5
1.4. Contexte et objectif de cette recherche	6
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	7
2.1. Matériels	7
2.1.1. Propriétés physicochimiques du topotécan.....	7
2.1.2. Appareillage	7
2.1.3. Substances de références	8
2.1.4. Solvants	8
2.1.5. Matériels	9
2.1.6. Manipulation de cytotoxiques	9
2.1.7. Reconstitution du topotécan	9
2.2. Méthodes	10
2.2.1. Etapes chromatographiques	10
2.2.2. Méthode indiquant la stabilité.....	10
2.2.3. Dégradation forcée	10
2.2.3.1. Essais préliminaires	10
2.2.3.2. Dégradation acide	11
2.2.3.3. Dégradation basique	11
2.2.3.4. Dégradation oxydative	11
2.2.3.5. Dégradation thermique	11
2.2.3.6. Dégradation à l'UV et à la lumière	11
2.2.4. Conditions expérimentales :	12
2.2.5. Validation de la méthode.....	13
2.2.5.1. Effet de matrice	13
2.2.5.2. Standard d'étalonnage	13
2.2.5.3. Standard de validation	13
4. RÉSULTATS ET DISCUSSION	14
4.1. Développement de la méthode	14
4.1.1. Topotécan forme lactone.....	14
4.1.2. Topotécan forme carboxyle	15

2.1.3.	Impureté A	16
2.1.4.	Impureté C	18
4.2.	Dégradation accélérée	19
4.2.1.	Essai préliminaire (milieu acide, basique, neutre)	19
4.2.2.	Dégradation acide	19
4.2.3.	Dégradation basique	19
4.2.4.	Dégradation thermique	19
4.2.5.	Dégradation oxydative	20
4.2.6.	Photodégradation (UV et lumière)	20
4.3.	Validation de la méthode	21
4.3.1.	Spécificité	21
4.3.2.	Effet de matrice	21
4.3.3.	Fonction de réponse	22
4.3.4.	Justesse	22
4.3.5.	Précision	22
4.3.6.	Exactitude	23
4.3.7.	Linéarité	24
4.3.8.	Limite de détection (LOD), limite de quantification (LOQ), intervalle de dosage	25
5.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	26
6.	BIBLIOGRAPHIE	28
7.	ANNEXES	31

Table des figures

Figure 1 : Rétinoblastome photographié pendant un examen du fond de l'œil.....	1
Figure 2 : Photo illustrant une leucocorie ainsi qu'un léger strabisme.....	2
Figure 3 : Structure chimique du topotécan (forme lactone=cycle fermé)	4
Figure 4 : Illustration de la forme lactone à gauche et la forme carboxyle (cycle ouvert) à droite	4
Figure 5 : SAR du TPT comparé à CPT (15,20)	5
Figure 6: Structure chimique du topotecan	7
Figure 7 : Échantillon pour l'analyse de la dégradation à la lumière.....	11
Figure 8 : TPT forme lactone (Hycamtin 200µg/ml dans NaCl 0.9%), en UV	15
Figure 9 : TPT forme lactone, analyse en MS (XIC)	15
Figure 10 : TPT forme carboxyle obtenu grâce une reconstitution en milieu basique, en UV.....	16
Figure 11 : TPT forme carboxyle, analyse en MS	16
Figure 12 : Impureté A (Imp A USP 250µg/ml dans H ₂ O), en UV	17
Figure 13 : TPT forme carboxyle, analyse MS (Full scan)	17
Figure 14: TPT forme lactone, analyse MS (Full scan)	18
Figure 15 : Différentes formes du TPT en fonction du pH, analyse en UV	19
Figure 16 : Analyse de la matrice en UV.....	21
Figure 17 : Profil d'exactitude obtenue avec une régression linéaire après une transformation à la racine carrée.....	24
Figure 18 : Profil de risque	24
Figure 19 : Linéarité - concentration recalculée en fonction de la concentration introduite....	25
Figure 20 : Profil de linéarité.....	25
Figure 21 : Reconstitutions Hycamtin® avec NaOH, HCl, H ₂ O ₂	45
Figure 22 : Chauffage au bain marie	45
Figure 23 : Système a reflux pour la dégradation thermique.....	46
Figure 24 : Echantillon pour l'analyse de la dégradation à la lumière.....	47
Figure 25 : Impureté C dans DMSO, analyse en UV	50
Figure 26 : Impureté C dans ACN/H ₂ O, analyse en UV	51
Figure 27 : Impureté C dans phase mobile, analyse en UV	52
Figure 28 : Blanc NaOH, en UV.....	53
Figure 29 : Dégradation NaOH sans chauffage, en UV	53
Figure 30 : Dégradation NaOH avec chauffage, en UV	54
Figure 31 : Blanc HCl, en UV.....	55
Figure 32 : Dégradation HCl sans chauffage, en UV	55
Figure 33 : Dégradation HCl avec chauffage, en UV	56
Figure 34 : Blanc H ₂ O ₂ , en UV	57
Figure 35 : Dégradation H ₂ O ₂ sans chauffage, en UV	57
Figure 36 : Dégradation H ₂ O ₂ avec chauffage.....	58
Figure 37 : Agrandissement impureté H ₂ O ₂	58
Figure 38 : Blanc H ₂ O, en UV	59
Figure 39 : Dégradation thermique, en UV	59
Figure 40 : Zoom impureté dégradation thermique, en UV	60

Table des tableaux

Tableau 1 : Liste des impuretés.....	8
Tableau 2 : Listes des solvants	8
Tableau 3 : Liste du matériels utilisés.....	9

Tableau 4 : Paramètres utilisés pour l'analyse chromatographique	12
Tableau 5 : Résultats de la sélectivité entre les différentes formes de TPT et Imp A	18
Tableau 6 : Pourcentage de l'impureté en fonction de l'AUC totale.....	20
Tableau 7 : Résultats de la fonction de réponse	22
Tableau 8 : Résultats de la justesse	22
Tableau 9 : Résultats de la fidélité.....	23
Tableau 10 : Résultats de l'exactitude	23

1. Introduction

1.1. Le rétinoblastome

1.1.1. Rétinoblastome

Le rétinoblastome est un type rare de cancer de l'œil qui se développe habituellement avant l'âge de 5 ans. C'est rare cependant, cela reste tout de même la tumeur intraoculaire la plus fréquente chez l'enfant (1). Cette maladie concerne 1 naissance sur 20'000 ce qui équivaut à 4-5 nouveaux cas diagnostiqués chaque année en Suisse (2). C'est une tumeur maligne qui prend naissance dans la rétine. C'est la raison pour laquelle un patient atteint d'un rétinoblastome risque d'avoir une atteinte de l'acuité visuelle.

Cette maladie affecte le plus souvent un seul œil (unilatéral), cependant 1 enfant sur 3 est tout de même affecté aux deux yeux (bilatérale). Il est aussi possible d'avoir un rétinoblastome trilatéral lorsque la tumeur se propage en dehors de l'œil et atteint la glande pinéale (3).

Le rétinoblastome est une maladie d'origine génétique, le gène concerné est le RB1 (sur le chromosome 13) qui intervient lors du contrôle de la division cellulaire dans les rétinoblastes. Le gène RB1 est en fait un gène suppresseur de tumeur (4).

Il semblerait que deux mutations au niveau de ce gène soient nécessaires pour induire l'apparition d'un rétinoblastome (deux allèles mutés). Ces mutations empêchent le gène RB1 de produire des protéines fonctionnelles ainsi la régulation de la division cellulaire ne pourra pas se faire de manière efficace. Le RB1 muté va induire une croissance anormale des rétinoblastes se traduisant par la formation d'une tumeur (5). Cette tumeur peut se présenter sous forme unilatérale ou bilatérale et peut être d'origine héréditaire, familiale ou encore sporadique.

Les formes prédominantes de cette maladie sont ; la forme héréditaire, souvent bilatérale et multifocale représentant 30 à 40% des cas et, la forme sporadique, toujours unilatérale, non transmissible à la descendance représentant 60% à 70% des cas (6). La majorité des cas concerne donc des enfants avec des parents sains. La forme héréditaire apparaît suite à une première mutation dans les cellules germinales, elle est transmissible selon un mode autosomique dominant (7). Toutes les cellules du corps porteront donc cette mutation, c'est ce qui rend ces patients plus à risque de cancers secondaires (7). La deuxième mutation est somatique, elle a lieu durant le développement de la rétine spécifiquement dans les cellules de la rétine donc pendant la vie fœtale ou durant les premiers mois de vie. Dans le cas du rétinoblastome non héréditaire, les deux occurrences ont lieu dans les cellules de la rétine ainsi la mutation est confinée à un seul type de cellule (8).

Lorsque le rétinoblastome est diagnostiqué de façon précoce, il présente d'excellente chance de guérison. Toutefois, s'il n'est pas traité rapidement, il peut se propager dans d'autres parties du corps ce qui engage le pronostic vital de l'enfant.

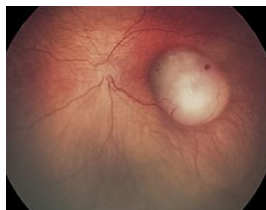


Figure 1 : Rétinoblastome photographié pendant un examen du fond de l'œil

1.1.2. Signaux d'alertes et symptômes

Les deux principaux signaux d'alertes sont le strabisme et la leucocorie (8,9). La leucocorie aussi appelé œil de chat est caractérisée par un reflet blanchâtre anormal de la pupille observable quand une source lumineuse comme un flash est dirigée vers l'œil (9). Au début, ce symptôme est uniquement visible sous certains éclairages et dans certaines directions du regard. Avec le temps, ce symptôme devient permanent. Le strabisme peut être décelé lorsque l'un des yeux ne semble pas regarder la cible visée mais est tourné vers l'extérieur (divergent) ou vers l'intérieur (convergent). C'est pourquoi, il est important pour les parents d'observer très tôt les yeux des nourrissons, en effet, un diagnostic précoce améliore le pronostic vital.

Il existe aussi d'autres symptômes qui apparaissent tardivement ; la buphtalmie (augmentation du volume oculaire, avec proéminence de la cornée), l'hétérochromie irienne (différence de coloration entre les iris), le pseudohypopion (formation de pus dans la chambre antérieure de l'œil) et dans les formes les plus évoluées l'exophtalmie tumorale (yeux exorbités). Ces symptômes représentent en fait des signes inflammatoires, dus à des complications évolutives tardives (10).

Cependant, les deux drapeaux rouges (strabisme et leucocorie) peuvent être la manifestation d'autres pathologies oculaires, par conséquent un examen complet par un ophtalmologue est essentiel.



Figure 2 : Photo illustrant une leucocorie ainsi qu'un léger strabisme.

1.1.3. Diagnostic

Le diagnostic repose sur un examen du fond de l'œil, réalisé sous anesthésie générale après dilatation maximale. Une échographie permettant de visualiser l'extension des lésions peut être réalisée. Une imagerie par résonance magnétique (IRM) permet de confirmer un diagnostic, montrer des calcifications, et préciser si le nerf optique et la partie cérébrale sont atteints (11).

1.1.4. Options thérapeutiques

Le choix du traitement dépend de la gravité (son volume, sa localisation et son étendu) et du type de rétinoblastome à traiter, à savoir s'il est héréditaire ou non (bilatérale/unilatérale et unifocale/multifocale) (12). La probabilité de sauver la vision de l'œil est aussi prise en considération. Si cette dernière est faible, il faut tout d'abord s'assurer de sauver la vie de l'enfant.

On peut séparer les traitements en deux principales catégories ; les traitements dits « conservateurs » et les traitements chirurgicaux (13). Les traitements conservateurs vont attaquer la tumeur et vont permettre de conserver l'organe atteint, donc l'œil.

La thérapie au laser ou la cryothérapie (geler les cellules cancéreuses en allant jusqu'à une température de -80°C) peuvent être une option pour les patients ayant une forte probabilité de conserver une partie ou l'intégralité de leur vision.

Parmi les traitements dits conservateurs, il existe aussi la radiothérapie qui est employée en dernière intention en raison de son risque d'endommager les tissus sains et la possibilité d'engendrer une nouvelle tumeur non oculaire. Il existe aussi la chimiothérapie systémique ou locale qui s'emploie soit seule, soit en combinaison avec d'autres traitements, afin de réduire le volume de la tumeur. La chimiothérapie est l'approche thérapeutique la plus couramment utilisée pour conserver l'œil du patient. En thérapie locale, elle peut être administrée de manière sous-conjonctivale (périoculaire), intra-artérielle et intra-vitréenne. Le topotécan se trouve dans cette catégorie de traitement.

Finalement, l'énucléation, ou l'ablation chirurgicale de l'œil, est pratiquée en dernier recours et seulement si la vision de l'enfant ne peut être préservée ou s'il existe un risque élevé de propagation du cancer.

1.2.Topotécan

1.2.1.Origine du topotécan

En 1960, la camptothécine, un alcaloïde végétal présent chez plusieurs espèces d'arbres est découverte et extraite principalement de la tige de bois de « *Camptotheca acuminate*, Nyssaceae », que l'on trouve principalement en Chine (14).

Suite à cela, l'activité antinéoplasique in vitro est détectée puis confirmée par des études cliniques. Cependant, à cause de ses effets indésirables imprévisibles et graves, et suite à des résultats d'études cliniques décevants son développement en tant qu'agent cytotoxique a été abandonné (15). C'est en 1980, que son nouveau mécanisme d'action a été découvert, à savoir son inhibition de la topoisomérase I (enzyme). Dès lors, le développement de cette molécule a repris. Principalement deux dérivés semi-synthétiques ont été cliniquement développés à savoir le topotécan et l'irinotecan.

Ces deux substances ont été développées à cause des propriétés physicochimiques défavorables de la camptothécine (CPT). En effet, la forme carboxyle de la CPT se lie à l'albumine sérique ce qui diminue la concentration sanguine de CPT sous forme lactone. En plus, sa très faible hydrosolubilité (2.5 µg/ml) rend compliqué son administration. Donc, le topotécan a été développé principalement pour remédier à la solubilité médiocre de la CPT dans l'eau mais aussi dans la plupart des solvants organiques (15).

1.2.2. Chimie du topotécan

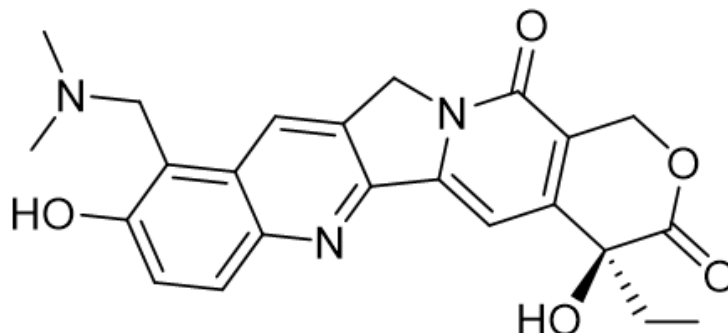


Figure 3 : Structure chimique du topotécan (forme lactone=cycle fermé)

Le topotécan est une petite molécule soluble dans l'eau (PM = 421.451 g/mol) avec des propriétés antinéoplasiques (bloque la prolifération des cellules cancéreuses) tout comme la substance mère. Il se lie à la topoisomérase I et l'inhibe. La topoisomérase est une enzyme nucléaire responsable de la relaxation de l'ADN super-enroulé, elle provoque une coupure transitoire d'un brin d'ADN pour permettre cette détorsion (16). L'inhibition provoquée par le topotécan va induire la stabilisation de cette coupure transitoire du brin d'ADN, ce qui va provoquer une apoptose (mort cellulaire) (17).

Cette molécule existe sous deux formes ; la forme lactone (pharmacologiquement active) et la forme carboxyle (forme inactive). La réaction qui permet le passage entre ces deux formes (hydrolyse) est pH-dépendante, c'est-à-dire qu'à pH acide on retrouvera principalement la forme lactone (pH<4) alors qu'à pH basique on retrouve la forme carboxyle. La contrainte de cette molécule est donc son instabilité (18).

La forme carboxyle n'a pas la capacité de diffuser passivement à travers la membrane cellulaire contrairement à la forme lactone (19). De plus, elle ne stabilise pas le complexe entre l'ADN et la topoisomérase I. Ce sont ces deux principales différences qui confèrent à la forme lactone son activité pharmacologique. Il sera donc essentiel de s'assurer que le produit se trouve sous forme lactone au moment de l'administration. Le milieu doit donc obligatoirement être acide (pH=3), ce qui favorise la réaction vers la gauche.

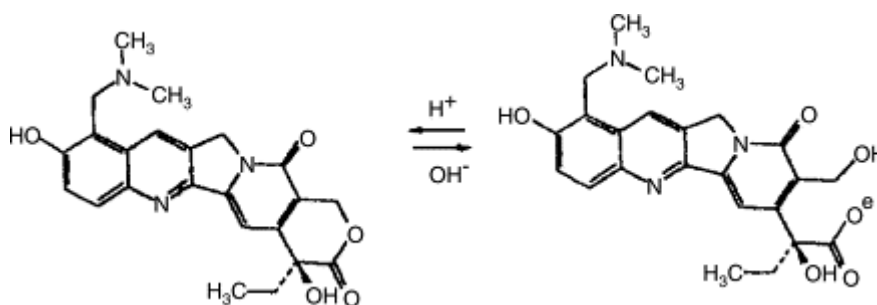


Figure 4 : Illustration de la forme lactone à gauche et la forme carboxyle (cycle ouvert) à droite

1.2.3. Structure-Activity-Relationship (SAR) du topotécan (TPT)

SAR du Topotecan en comparaison à la camptothécine

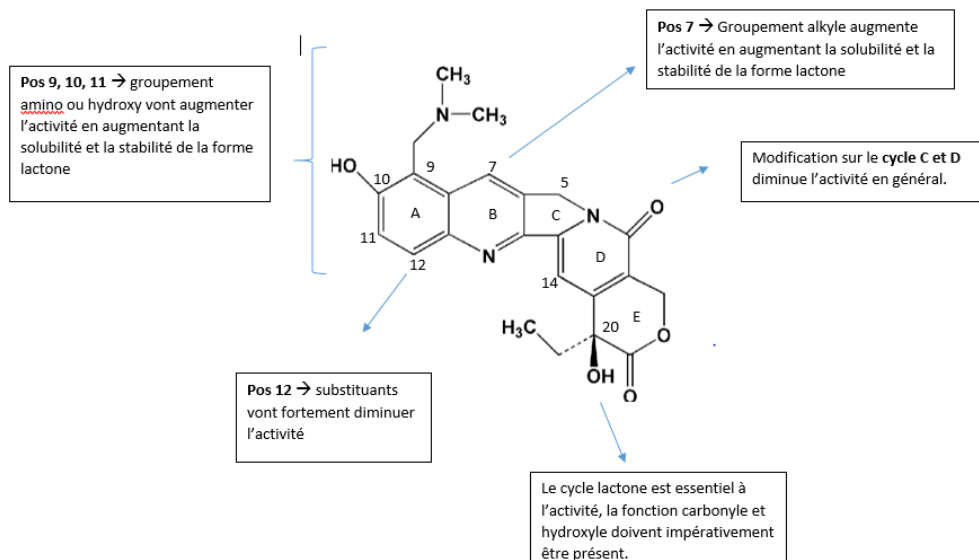


Figure 5 : SAR du TPT comparé à CPT (15,20)

La seule différence entre le TPT et la CPT se trouve en position 9 et 10. En effet, ces substituants sont absents chez la CPT (substance mère). C'est donc grâce à ces deux substitutions (groupement hydroxyle + amine) que la molécule mère a été améliorée pour donner naissance au topotécan (TPT).

1.3. Méthode analytique

La chromatographie est une technique utilisée pour la séparation des différents constituants d'un mélange, dans le but d'analyser, identifier, purifier et/ou quantifier les composés présents dans le mélange.

Les différents constituants du mélange sont séparés en fonction du temps qu'ils mettent à parcourir la phase stationnaire (fixe) en étant véhiculés par la phase mobile. Il existe 4 types de chromatographie : la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie liquide (LC), la chromatographie gazeuse (GC) et la chromatographie supercritique (SPC).

La HPLC en phase inverse (RP-HPLC) est une méthode couramment utilisée lors des analyses dans le milieu pharmaceutique, c'est d'ailleurs cette technique qui sera utilisée lors de cette étude.

En HPLC, les résultats d'une analyse sont obtenus sous forme d'un chromatogramme. Ce graphique représente l'intensité du signal détecté (mAU) en fonction du temps (min). Il existe quelques grandeurs fondamentales en chromatographie, qui sont expliqués en Annexe 14.

Selon la littérature, il existe plusieurs méthodes indiquant la stabilité du topotécan mais la technique la plus utilisée est l'HPLC couplée à un détecteur UV, (21–23). La HPLC associée à un fluorimètre a aussi été utilisée pour le dosage simultané de la forme lactone et carboxyle

(24,25) Finalement, l'HPLC-MS a été utilisée lors de la quantification du TPT dans les intestins de rats (26).

Dans le cadre de cette recherche, c'est la chromatographie en phase liquide qui sera utilisée et plus précisément en phase inverse (RP-HPLC) avec un détecteur UV-DAD. En phase inverse, la colonne est composée de silice greffée de groupements alkyles (C18), ce qui la rend apolaire. La phase mobile, quant à elle, est plutôt polaire (plus que la colonne) et elle est la plupart du temps composée d'eau ainsi que d'un modificateur organique tel que l'acétonitrile ou le méthanol. En mode inverse, les composés polaires sortiront en premiers alors que les composés moins polaires seront plus retenus par la colonne, avec comme conséquence des temps de rétention plus longs.

1.4. Contexte et objectif de cette recherche

Le but principal et crucial de ce travail de recherche consiste à développer une méthode d'analyse indiquant la stabilité capable de distinguer la forme active du topotécan de sa forme inactive et de ses impuretés. C'est cette méthode qui sera par la suite validée et utilisée durant l'étude de stabilité.

Une étude de stabilité du topotécan devra être conduite pour déterminer la stabilité de cette molécule dans une préparation sous forme de seringue injectable prête à l'emploi. Il est essentiel que le topotécan soit sous sa forme active lors de son injection. C'est pourquoi, les conditions telles que la température, le pH, l'exposition à la lumière/UV ou encore la concentration seront étudiées afin d'établir les paramètres adéquats pour la conservation dans sa forme stable et active.

L'idéal serait que le topotécan sous forme de seringues prêtes à l'emploi se conserve le plus longtemps possible à température ambiante, au réfrigérateur ou encore au congélateur. Ainsi, il sera possible de le produire et de le stocker dans des conditions facilement réalisables.

Le Service de pharmacie du CHUV qui assure l'approvisionnement de l'hôpital en produits pharmaceutiques est composé de 4 unités : logistique pharmaceutique, production, contrôle qualité et assistance pharmaceutique & pharmacie clinique.

L'unité de production de la pharmacie centrale du CHUV réalise régulièrement cette préparation de topotécan 200 µg/mL et 20 µg/mL dans du sérum physiologique (NaCl 0.9%) pour l'Hôpital Ophtalmique Jules-Gonin qui l'utilise dans le cadre du traitement du rétinoblastome. L'unité de contrôle qualité sera chargée de contrôler et garantir la qualité de cette fabrication, en utilisant la méthode analytique développée et validée lors de ce travail de recherche.

Dans l'unité de production, les seringues de 1mL sont préparées et sont immédiatement emmenées à l'hôpital Ophtalmique Jules-Gonin dans des bacs de glaces pour éviter toute dégradation (protocole de préparation en Annexe 1 et 2). Cette préparation est administrée au patient dans les 7 jours.

Ce travail de recherche a donc une importance cruciale pour le CHUV puisque continuer de faire ces préparations en urgence pour un patient donné représentent un temps et un coût considérables qui pourront être évité à l'avenir.

2. Matériels et méthodes

Ce travail s'est déroulé dans le laboratoire de contrôle qualité du service de pharmacie du CHUV.

2.1. Matériels

2.1.1. Propriétés physicochimiques du topotécan

Le topotécan se présente sous la forme d'une poudre jaune clair à verdâtre. Sa formule chimique est $C_{23}H_{23}N_3O_5$. Son nom IUPAC est le suivant : (19S)-8-[(diméthylamino)méthyl]-19-éthyl-7,19-dihydroxy-17-oxa-3,13-diazapentacyclo[11.8.0.02,11.04,9.015,20]hénicosal(21),2,4(9),5,7,10,15(20)-heptaène-14,18-dione (27).

Le point de fusion est de 213°C et 218°C. soluble dans l'eau, jusqu'à une valeur d'environ 1mg/ml, sa solubilité dans l'eau diminue avec l'augmentation du pH. Le topotécan est peu soluble dans les solvants organiques sauf dans le méthanol ou dans le DMSO. Son coefficient de partage (Log P octanol/water) est égal à 0.8. Il possède plusieurs constantes de dissociation, concernant la fonction amine $pK_a3 = 9.9$ à 20°C, concernant la la fonction alcool benzylique, $pK_a2 = 8$ et finalement la fonction imine a un pK_a1 de 1.8.

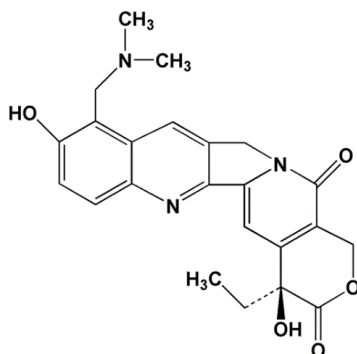


Figure 6: Structure chimique du topotécan

2.1.2. Appareillage

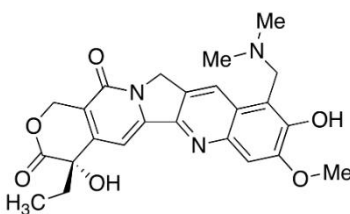
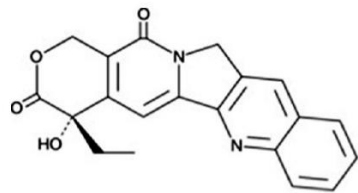
L'appareil utilisé est une UHPLC Dionex Ultimate 3000 (ThermoScientific®) comportant une pompe (RSpump) servant à alimenter la colonne de phase mobile liquide et un autosampler (RSautosampler). Il est couplé à un détecteur UV-visible, le détecteur à barrettes d'iode (DAD). Ce dernier permet de fournir une détection à une seule longueur d'onde ou à plusieurs longueurs d'ondes. Il a aussi la capacité d'acquérir plusieurs spectres et de les stocker (28). Le détecteur simple quadripôle MSQplus (ThermoScientific®) a lui aussi été employé pour certaines analyses. Ce système est construit de 4 tiges métalliques circulaires assemblé de manière symétrique et parallèle. Si la fréquence radio (RF) est la seule tension appliquée alors l'analyse se fera en mode balayage (full scan) et une large plage d'ions avec différents m/z traversera le quadripôle. Lorsqu'une tension continue est ajoutée à la tension RF, seulement les ions avec une m/z spécifique seront analysés par le détecteur. Ce type d'analyse (Single ion monitoring SIM) est plus spécifique et plus sensible (29).

La colonne utilisée est une C18 (Acquity® UHPLC BEH C18, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 100 mm). Le logiciel Chromeleon 7.0 a servi au traitement des données.

2.1.3. Substances de références

Le topotécan standard a été obtenu chez le fournisseur Sigma-Aldrich Chemie GmbH® (N°article 1672257, N°lot R093L0, India). C'est chez ce même fournisseur que les deux impuretés standard ont été commandées. La première étant « Topotecan related compound A », un standard de référence USP (N°article 1672268, N° lot F0M019, India). La deuxième étant « Topotecan related compound C », la camptothécine qui figure également dans l'USP comme standard de référence (N°article 1672280, N° lot F0M028, Taiwan).

Tableau 1 : Liste des impuretés

Molécule	Structure	Fournisseur	N° Lot	Origine	Usage
Impureté A		Sigma-Aldrich Chemie GMBH®	F0M019	Inde	Standard
Impureté C		Sigma-Aldrich Chemie GMBH®	F0M028	Taiwan	Standard

2.1.4. Solvants

Tous les solvants utilisés dans ce travail sont de qualité UHPLC.

Tableau 2 : Listes des solvants

Solvants	Fournisseur	N° Lot	Origine	Usage
Acétonitrile (qualité UHPLC)	Biosolve Chimie	1283181 1309611	Dieuze, FR	Phase organique UHPLC
Eau Ultra-filtrée (qualité UHPLC)	Biosolve Chimie	1284121 1329051	Dieuze, FR	Phase aqueuse UHPLC
Peroxyde d'hydrogène, H ₂ O ₂ 3 %	Bichsel AG	181707	Unterseen, CH	Dégradation oxydative
Hydroxyde de sodium, NaOH	Merck	1.09141.1000	Darmstadt, DE	Dégradation basique et ajustement du pH
Acide chlorhydrique, HCl	Merck	1.09060.1000	Darmstadt, DE	Dégradation acide et ajustement du pH

2.1.5. Matériels

Tableau 3 : Liste du matériels utilisés

Matériels	Fournisseur	Origine
Balance analytique XPE206 DeltaRange®	Metler Toledo	USA
Bain à ultrasons 5800	Branson	France
Plaque chauffante	HuberLab	Suisse
Micropipettes	Socorex Isba SA	Suisse
Seringues Luer-Lock™	BD	USA
Seringues Omnifix®-F Tuberculin	BBraun	Allemagne
Aiguilles Microlance 3	BD	USA
Tubes de 10 mL	Sarstedt	Allemagne
Gants Ansell	Micorflex	Malaisie
Vial / Bouchon	Macherey-Nagel/ Infochroma	Suisse
Papier pH MColorpHast™	Merck	Allemagne
Réfrigérateur & congélateur Medline	Fors AG	Suisse
pH mètre	Metrohm AG	Suisse

2.1.6. Manipulation de cytotoxiques

Pour la manipulation des cytotoxiques, dans le cas présent la manipulation du topotécan ainsi que ses impuretés, il est important d'avoir l'équipement de protection adéquat. Il faut porter une paire de gants en nitrile, une blouse jetable puis des manches de protection jetables et finalement une deuxième paire de gants. Toutes les manipulations doivent être réalisées sous une hotte de sécurité (a1SafeTech, N° HSF-1737-0101, Pratteln, CH).

2.1.7. Reconstitution du topotécan

L'ampoule perforable d'Hycamtin® 1mg sous forme de lyophilisat (N° lot H22G, Novartis Pharma Schweiz) est le produit utilisé au CHUV. C'est donc sur celui-là que portera toutes les analyses préliminaires ainsi que l'étude de stabilité. Ce produit est reconstitué avec 1.1 ml de solution physiologique, NaCl 0.9% (Lot 534534, BBraun, CH) car il y a dans chaque fiole de 1mg, un supplément de remplissage de 10%. Ceci n'est pas le cas pour les fioles de 4mg donc ces dernières sont reconstituées normalement avec 4mL pour obtenir une concentration finale de 1mg/mL. Cette solution est ensuite diluée à la concentration d'intérêt.

Un volume de 250 µL est prélevé à l'aide d'une seringue (BD syringe Luer-lok™ Tip, N°lot 8248834, USA) et d'une aiguille (BD Microlance™ 3 N°lot 1902 26, Spain). Puis, le contenu est déversé dans un vial pour petit volume. Il est ensuite mis à vortexer juste avant d'être analysé. Chaque vial contenant une solution de topotécan ou de ses impuretés sont potentiellement thermo et photosensibles. Pour éviter la formation de dégradés, ces solutions sont placées dans des conditions de stockage approprié, c'est-à-dire au réfrigérateur entre 2-8° et à l'abri de la lumière.

2.2. Méthodes

2.2.1. Etapes chromatographiques

La technique qui sera utilisée par l'unité de contrôle qualité de la pharmacie du CHUV pour l'analyse du topotécan en routine est une chromatographie liquide en ultra haute performance (UHPLC) en phase inverse avec une phase stationnaire apolaire et une phase mobile polaire (RP-UHPLC).

C'est une technique qui sépare les constituants d'un mélange grâce à leurs différentes affinités vis-à-vis de la phase stationnaire et de la phase mobile.

2.2.2. Méthode indiquant la stabilité

Un aspect essentiel de ce travail est le développement d'une méthode chromatographique indiqué pour la stabilité qui puisse mettre en évidence de façon distincte le topotécan et ses produits de dégradation. Cette même méthode doit être capable de faire la distinction entre les deux formes du topotécan donc la forme active (lactone) et la forme inactive (carboxyle). Selon la *Food and Drug administration* (FDA), une méthode indiquant la stabilité est définie comme une procédure analytique validée qui mesure avec précision les substances actives exempt d'impuretés, de produits de dégradation ou encore d'excipients (30). L'objectif principal de ce type de méthode est d'analyser des échantillons en cours d'étude de stabilité

Pour développer une méthode indiquant la stabilité, il suffit de 3 étapes ; générer des produits de dégradation pour tester la sélectivité de la méthode, développer la méthode en évaluant la sélectivité et la spécificité, et finalement effectuer la validation de cette dernière (31).

D'après la littérature, le topotécan se trouve majoritairement sous sa forme lactone (cycle fermé) à $\text{pH} < 4$ alors que la forme carboxyle est majoritaire à $\text{pH} > 9$. Entre ces valeurs de pH, on retrouve les deux formes dans une réaction d'équilibre qui dépend du pH. En effet, il faut savoir que c'est une réaction réversible (hydrolyse) pH-dépendante qui relie les 2 formes (18).

2.2.3. Dégradation forcée

Pour démontrer la spécificité de la méthode développée, plusieurs échantillons servant à la dégradation forcée sont préparés.

La dégradation forcée va reposer sur la modification de plusieurs paramètres tels que le pH (acide/basique), l'oxydation, l'exposition à la lumière (normal/UV) ou encore la température.

La dégradation forcée acide, basique, thermique, oxydative ou lumineuse consiste à programmer des conditions extrêmes pour générer de manière accélérée des produits de dégradations qui seraient susceptibles de se former naturellement durant la réalisation de cette préparation (seringue d'Hycamtin®) ou durant son stockage.

C'est l'étude de la dégradation forcée qui donnera des indices sur les conditions de stockage/conservation du produit afin d'éviter sa dégradation.

2.2.3.1. Essais préliminaires

Avant cela, 3 séries d'échantillons ont été préparées à différents pH et ceci pour observer le comportement du topotécan dans ces différents milieux. La première en milieu acide, la suivante en milieu neutre et la dernière en milieu basique. Les chromatogrammes de ces différentes analyses devraient montrer en milieu acide la présence de la forme lactone uniquement, pour ce qui est du milieu basique, on devrait retrouver uniquement la forme

carboxyle. En milieu neutre, les deux formes doivent être présentes et les pics doivent être séparés.

La préparation des échantillons subissant la dégradation accélérée est explicitée ci-dessous et dans le protocole de préparation se trouvant en Annexe 9.

Toutes les dégradations sauf la dégradation thermique et lumineuse sont faites en deux fractions ; une fraction subissant la dégradation en question et l'autre fraction subissant la dégradation en question dans un milieu chauffé à 60°C.

2.2.3.2. *Dégradation acide*

Lors de la dégradation acide, l'échantillon est reconstitué avec le HCl 0.5M. A partir de cette reconstitution, une fraction est mise au bain marie durant 1 heure à 60° et l'autre fraction reste à température ambiante. Après une heure, les deux préparations sont diluées avec la phase mobile puis injectées afin de suivre la dégradation du produit.

2.2.3.3. *Dégradation basique*

L'échantillon est reconstitué avec du NaOH 0.5M pour procéder à la dégradation en milieu basique. La préparation est effectuée comme expliqué au point 2.2.3.1.

2.2.3.4. *Dégradation oxydative*

L'échantillon est reconstitué avec un oxydant fort, le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ 3% pour la dégradation oxydative. La préparation est effectuée comme expliqué au point 2.2.3.1.

2.2.3.5. *Dégradation thermique*

L'échantillon est soumis à une dégradation thermique, en mettant l'échantillon reconstitué avec de l'eau dans un système à reflux à 100°C pendant 45 minutes.

2.2.3.6. *Dégradation à l'UV et à la lumière*

L'échantillon est cette fois-ci reconstitué avec de l'eau et est placée dans une enceinte climatique afin de la soumettre à une dégradation forcée par la lumière blanche et par les UV pendant 48 heures à température ambiante. L'enceinte climatique ne permet qu'un mode à la fois, c'est pourquoi la dégradation a d'abord lieu en mode lumière puis deux jours après la dégradation en mode UV a lieu. L'échantillon exposé à la photodégradation est conditionné dans une seringue Omnifix-F Luer Solo 0.1-1mL (Braun, 19E06C8, Germany, Exp 01.05.24) pour se rapprocher au maximum du conditionnement réel du produit final. Une autre fraction de l'échantillon est mise dans un vial transparent pour comparer la dégradation à travers le verre et à travers le plastique (poly)

Un échantillon contrôle est aussi préparé comme indiqué ci-dessus puis ce dernier est mis dans une pochette de protection Opabag® (BBraun, N°article 0049050R, origine). Grâce à cette pochette, cette préparation est protégée contre la lumière et les rayons du soleil. Cependant, il se trouve dans les mêmes conditions d'humidité et de température que les deux autres échantillons.



Figure 7 : Échantillon pour l'analyse de la dégradation à la lumière

2.2.4. Conditions expérimentales :

Plusieurs méthodes de la littérature ont tout d'abord été sélectionnées. Ces méthodes sont présentées sous forme de tableau dans en Annexe 4. Elles ont ensuite été classées, et parmi elles, trois ont été sélectionnées selon leur niveau de preuve attribué par le site internet Stabilis® (32). Le niveau de preuve attribué par Stabilis® sert à guider les utilisateurs de ce site et doit être utilisé à titre indicatif. Les méthodes sélectionnées ont un niveau de preuve A ou B. La grille de cotation est en Annexe X. C'est donc à l'aide de ces 3 articles scientifiques (33–35) que le développement de la méthode a débuté.

Enfin, la méthode présentée ci-dessous a permis la mise en évidence des 2 formes du TPT ainsi que de l'impureté A. Elle a permis une bonne séparation des pics. C'est une méthode simple et rapide avec un temps d'analyse total de 10 minutes. Elle peut être utilisée tant avec le détecteur UV qu'avec le détecteur MS.

Colonne : C18 (Acquity UHPLC BEH C18, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 100 mm)

Détecteur : MS (simple quadripôle en mode positif) et UV (DAD)

Phase mobile :

1. Eau
2. Tampon bicarbonate d'ammonium avec acide acétique CH₃COOH (pH=6.5)
3. Acétonitrile

Paramètres chromatographiques :

Mode isocratique avec 85% de B et 15% de C

Durée de l'analyse = 10 min

Tableau 4 : Paramètres utilisés pour l'analyse chromatographique

Temp. colonne	Débit (ml/min)	Détection (nm)	Volume d'injection (µL)	Temps de rétention (min)
25° C	0.2	220	5	UV/MS
		224		
		227		
		228		Lactone = 7.9
		260		
		267		Carboxyle =1.8
		380		

Lavage de l'aiguille et lavage des joints de pompe : ACN/Eau 10:90

Lavage de la colonne : ACN/Eau 60:40

2.2.5. Validation de la méthode

La validation d'une méthode analytique est le processus consistant à démontrer qu'une procédure analytique est adaptée à l'objectif auquel elle est destinée. Les paramètres étudiés lors d'une validation de méthodes sont les suivantes (30,36,37) :

- Spécificité
- Linéarité
- Exactitude
- Précision (répétabilité, précision intermédiaire, et reproductibilité)
- Intervalle de dosage
- Limite de détection et de quantification

Durant ce travail de recherche, la validation a été effectuée selon les recommandations ICH Q2(R1) (37) et ceux de la FDA (30). Le document de la commission de la société française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques a aussi été utilisé comme guide (38). Le traitement des données a été effectué avec le logiciel e-noval.

2.2.5.1. Effet de matrice

L'effet de matrice représente l'influence d'un ou de plusieurs composants de la matrice d'échantillon, sur la mesure de la concentration ou de la masse de l'analyte. L'effet de matrice peut donc résulter en une diminution ou augmentation de réponses comparées à la réponse d'un échantillon simple contenant uniquement l'analyte dans un solvant (sans matrice) (30,39,40).

2.2.5.2. Standard d'étalonnage

Les standards d'étalonnage ont été préparés à partir du TPT standard. Les différentes dilutions ont été effectuées grâce au diluant contenant une matrice identique à celle de l'Hycamtin® en termes de composé mais pas en termes de quantité. Les dosages exacts d'excipients contenus dans la préparation commerciale de Novartis (Hycamtin®) ne sont malheureusement pas disponibles au public. Novartis ayant refusé de communiquer ces informations, la matrice a été reproduite selon les quantités présentées dans un article (41).

Les cinq niveaux de concentrations suivants ont été préparés : 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 20 µg/mL, et 10 µg/mL. Six séries de ces standards ont été préparés, avec deux replicats pour chaque concentration et deux analyses par vial. Le protocole de préparation des standards d'étalonnage est présenté en Annexe 11.

2.2.5.3. Standard de validation

La démarche pour la préparation des standards de validation est identique à celle citée ci-dessus. Les standards de validation ont donc aussi été fait à partir du TPT STD.

La préparation commerciale ne peut pas être utilisée en tant que standard de validation car la composition exacte en excipients n'est pas connue, par conséquent, les résultats ne seraient pas comparables. Le protocole de préparation des standards de validation est présenté en Annexe 11.

4. Résultats et discussion

4.1. Développement de la méthode

Le développement de la méthode a débuté avec une colonne Chromolith C18 mais une colonne plus performante a été sélectionnée pour la suite des analyses, il s'agit de la colonne Acquity BEH C18.

Après de multiples essais, il s'avère qu'aucune des 3 méthodes sélectionnées à partir de la littérature n'a pu mettre en évidence les deux formes du topotécan. En effet, la plupart de ces méthodes utilise l'acide trifluoroacétique comme additif. Même à de très faibles proportions comme 0.1% de TFA, la phase mobile résultante a un pH très acide (environ $\text{pH}_{\text{phase mobile}} = 1$). C'est pareil pour l'utilisation de l'acide formique (FA) en tant qu'additif à 0.1%, il rend la phase mobile acide même s'il est beaucoup moins fort que le TFA ($\text{pH}_{\text{phase mobile}} = 3$). Ce milieu acide ne peut pas permettre la mise en évidence de la forme carboxyle. En effet, le TPT est très sensible au pH. C'est pourquoi, plusieurs essais ont été menés pour comprendre comment observer le TPT sous ses deux formes grâce à une seule et même méthode. L'analyse a tout d'abord été effectuée avec différents additifs (TFA, FA). Les résultats n'étant pas concluants car ils ne permettaient pas la mise en évidence de la forme carboxyle, l'analyse a été faite sans additifs. Ce choix a été fait dans l'espoir de pouvoir observer les deux formes du TPT et aussi éviter toute influence de pH. Malheureusement, une analyse sans additif n'a pas permis d'avoir une méthode avec des pics fins. Dès lors, l'essai suivant a été fait avec différentes solutions tampons à différents pH et à différentes concentrations (pH acide : tampon acide formique et formate d'acétate, neutre : bicarbonate d'ammonium et acide acétique et basique : triéthylamine et acide acétique ou encore bicarbonate d'ammonium et ammoniac). Il faut savoir que chaque analyse a été faite avec le détecteur UV et avec le détecteur MS. C'est pourquoi le choix des différents tampons a dû être fait en prenant en compte les contraintes de la MS. La volatilité de la solution était un critère primordial pour l'utilisation de la MS.

Le domaine de pH acceptable pour la colonne en question est aussi pris en compte. La colonne utilisée possédant un grand domaine de pH ($\text{pH} = 1-12$), c'est la volatilité qui a été un grand facteur de sélection des différents tampons testés.

Le détecteur MS a été un précieux outil car il a permis à de nombreuses reprises de confirmer l'attribution des pics grâce à l'information qu'il fournit sur la masse du composé relatif à un certain pic.

Finalement, la méthode présentée au point 2.2.1 a été sélectionnée pour l'étape suivante qui est la validation. Cette méthode permet la mise en évidence de la forme lactone du TPT mais aussi de la forme carboxyle. Elle met aussi en évidence l'impureté A.

4.1.1 Topotécan forme lactone

Le chromatogramme ci-dessous porte sur un échantillon d'Hycamtin®, une préparation tamponnée à pH acide. Comme attendu, uniquement la forme lactone (active) est présente. Ce pic fin sort à $t_r = 7.9$ min avec le détecteur UV. Le facteur de rétention correspond à $K = (7.9 - 1.55) / 1.55 = 4.0$.

Si les deux formes étaient présentes sur le même chromatogramme (comme dans la figure 15) alors la sélectivité α serait égale à $\alpha = 7.9 / 1.8 = 4.4$ ce qui démontre une excellente séparation.

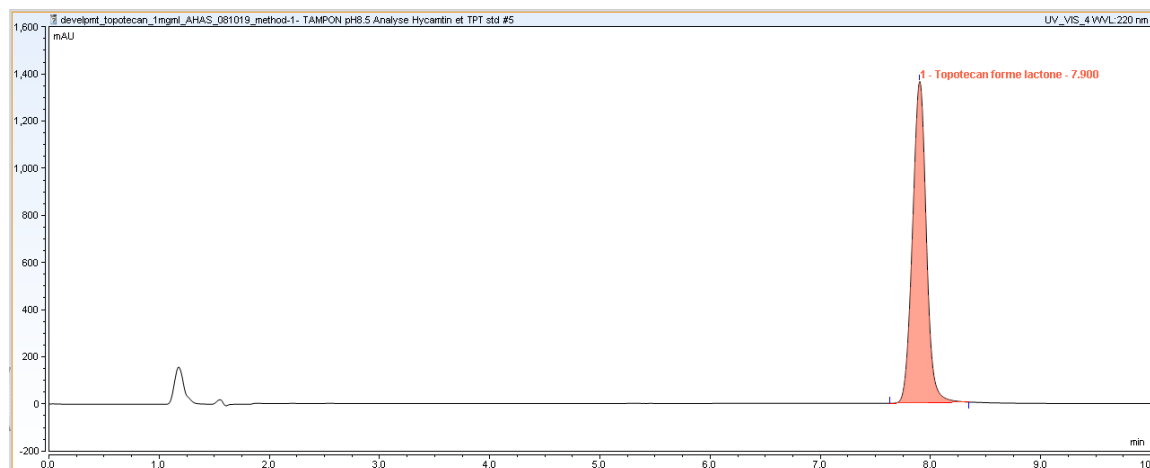


Figure 8 : TPT forme lactone (Hycamtin 200µg/ml dans NaCl 0.9%), en UV

Le chromatogramme obtenu grâce à la MS vient confirmer que le pic obtenu en UV à $t_r=7.9$ min correspond bien à la forme lactone du TPT. Le détecteur MS a permis de mettre en évidence la forme lactone grâce à une analyse effectuée en full scan. Il a aussi permis de démontrer l'absence de la forme carboxyle grâce à deux SIM (single ion monitoring) mené avec les masses de la forme lactone et de la forme carboxyle.

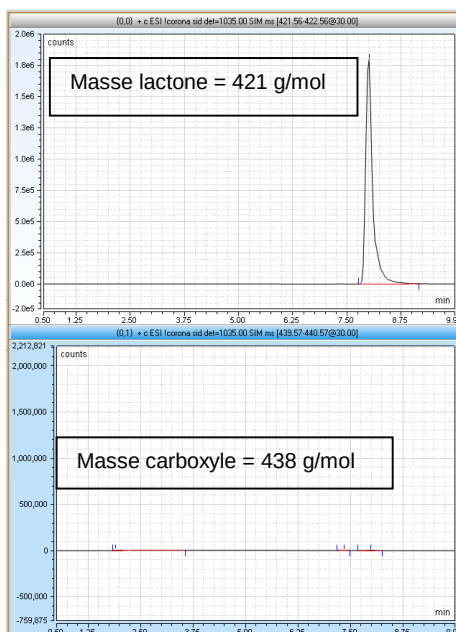


Figure 9 : TPT forme lactone, analyse en MS (XIC)

4.1.2. Topotécan forme carboxyle

Le chromatogramme ci-dessous a été obtenu en analysant un échantillon reconstitué dans un milieu basique (NaOH) pour forcer la réaction d'hydrolyse vers la droite et être en présence de la forme carboxyle uniquement. Un pic fin avec un $t_r = 1.8$ min est observé. Ce pic est loin du t_r de la forme lactone ce qui est un avantage comparé aux autres méthodes essayées. La forme carboxyle possède toujours un t_r plus bas que la forme lactone car elle est plus polaire et donc beaucoup moins retenue par la colonne apolaire.

De plus, il faut savoir que le produit commercial d'Hycamtin®, une fois reconstitué se trouve à un pH acide = 3. En réalité, cette forme ne devrait donc jamais être observée à part s'il y a une

erreur et que le lyophilisat est reconstitué avec une solution de NaOH à la place d'une solution de NaCl 0.9% par exemple.

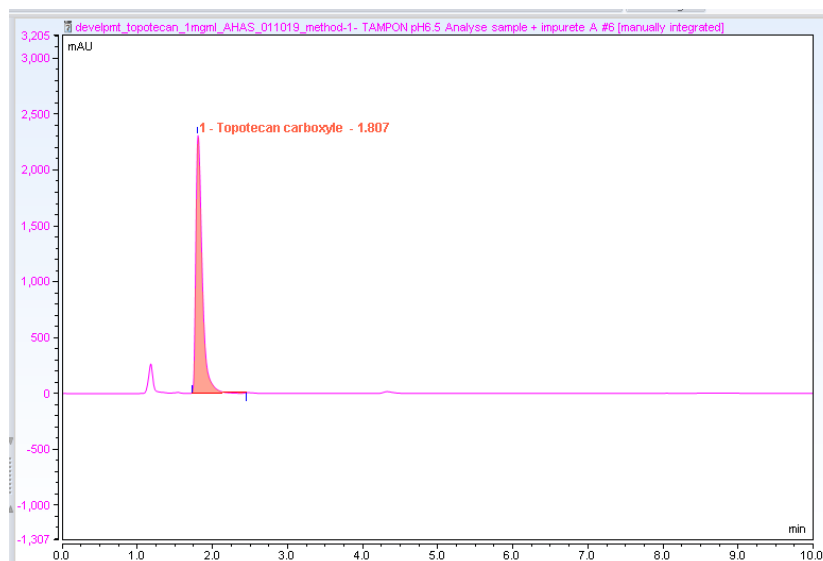


Figure 10 : TPT forme carboxyle obtenu grâce une reconstitution en milieu basique, en UV

Encore une fois, le détecteur MS a pu démontrer que le pic attribué à la forme carboxyle en UV correspond bien à la masse de la forme carboxyle.

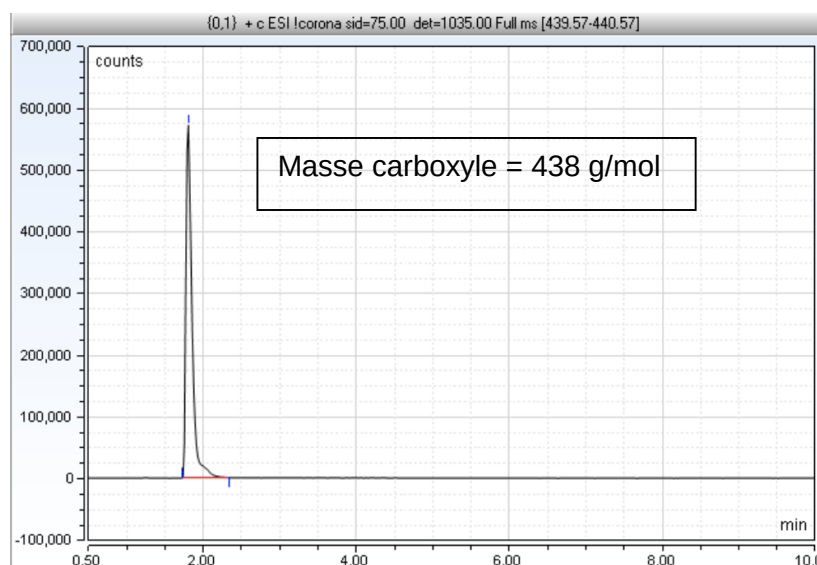


Figure 11 : TPT forme carboxyle, analyse en MS

2.1.3. Impureté A

L'impureté A a pu être observée grâce à la méthode développée. Elle présente deux pics, l'un pour la forme carboxyle ($t_r=1.633\text{min}$) et l'autre pour la forme lactone ($t_r=6.127\text{min}$).

Le pic qui se trouve à $t_r=2.507$ n'a pas pu être identifié car il n'est pas visible en MS (sa masse n'a donc pas pu être identifiée).

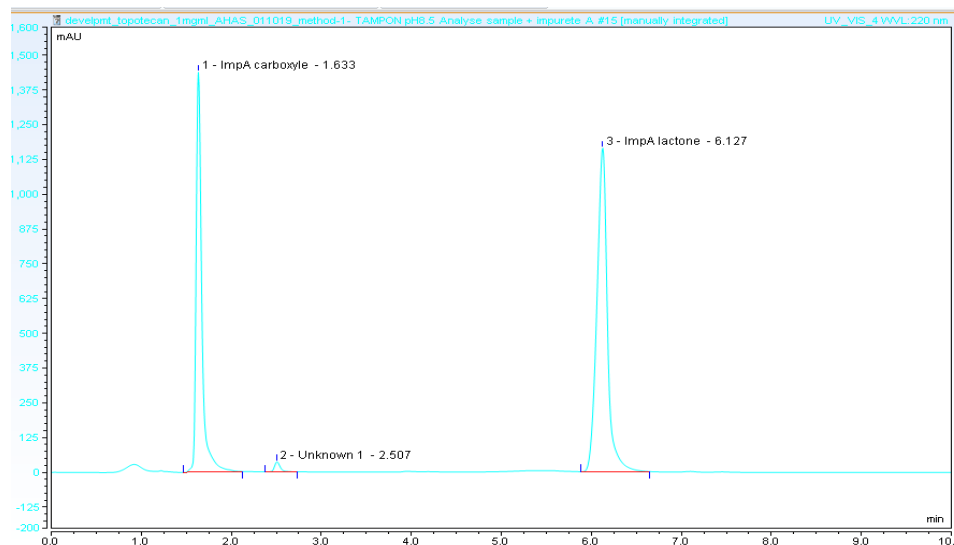


Figure 12 : Impureté A (Imp A USP 250µg/ml dans H₂O), en UV

L'attribution de ces deux pics a été confirmée par une analyse en MS (figure 13 et 14). Le résultat de cette analyse démontre que le premier pic appartient à $470 [M/Z]^{2+}$, ce qui correspond à la forme carboxyle de l'impureté A (masse 468 g/mol). Le deuxième pic appartenant à $452 [M/Z]^{1+}$ correspond à la forme lactone (masse 451 g/mol).

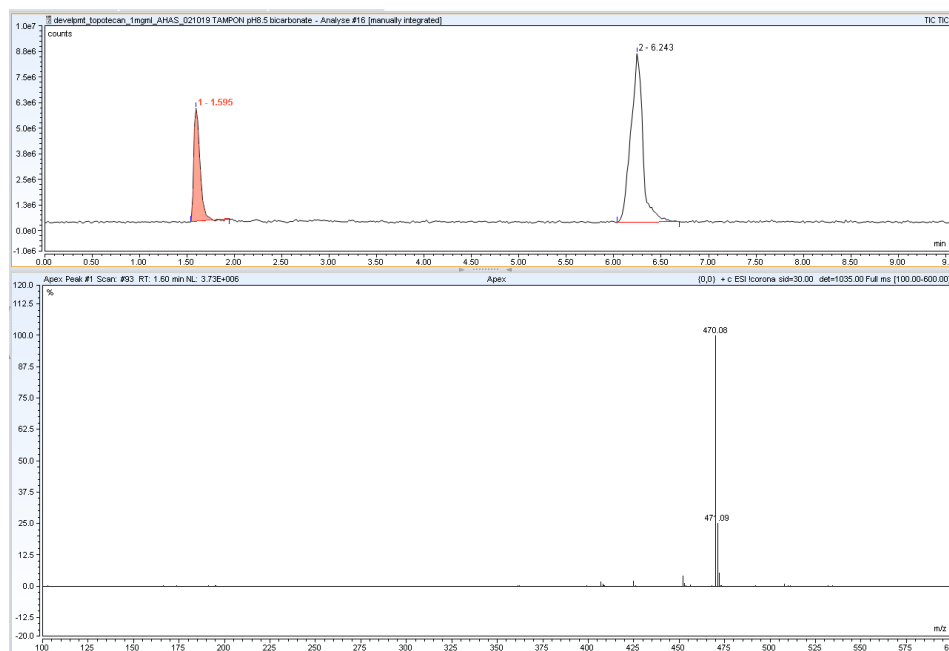


Figure 13 : TPT forme carboxyle, analyse MS (Full scan)

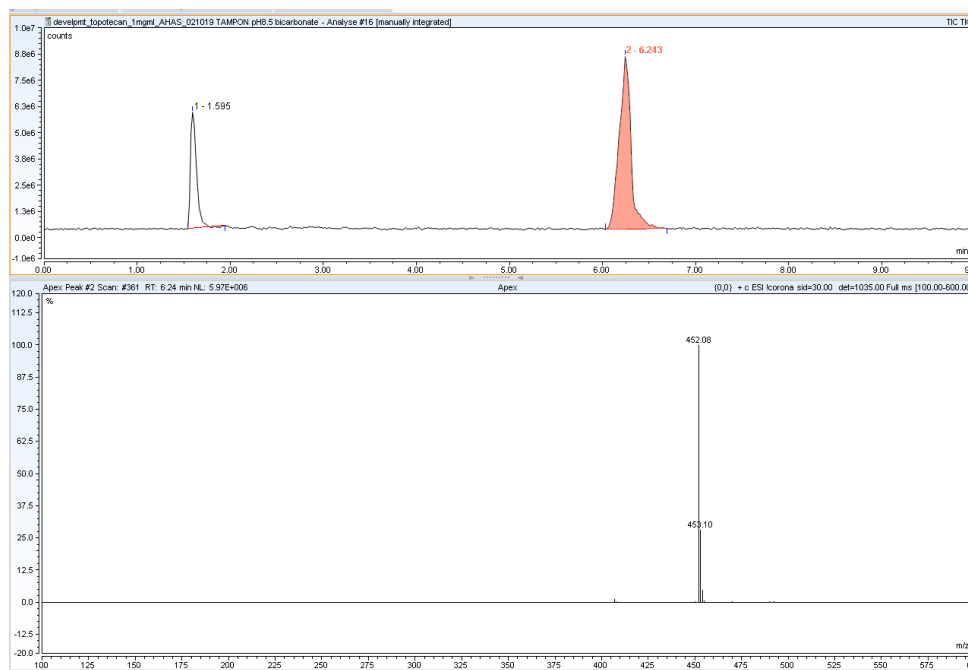


Figure 14: TPT forme lactone, analyse MS (Full scan)

Ci-dessous, se trouve un tableau avec les différentes sélectivités α entre le TPT sous forme lactone qui est le produit d'intérêt et les autres pics.

Tableau 5 : Résultats de la sélectivité entre les différentes formes de TPT et Imp A

	Temps de rétention (min)	Facteur k	Sélectivité
Imp A carboxyle	1,63	0,05	
TPT carboxyle	1,81	0,17	1,11
Imp A lactone	6,13	2,95	3,39
TPT lactone	7,90	4,10	1,29

2.1.4. Impureté C

L'impureté C n'a malheureusement pas pu être identifiée, ni observée via cette méthode, à cause d'un problème de solubilité. En effet, cette impureté est très peu soluble dans pratiquement tous les solvants organiques. Elle est insoluble dans l'eau.

Un test de solubilité a été effectué dans l'acétonitrile, dans le méthanol et dans le DMSO. Il s'avère qu'elle n'est soluble que dans le DMSO. Les chromatogrammes se trouvent en Annexe 8.

L'analyse de cet échantillon ne donne aucun résultat. Il faut savoir que le DMSO présente un large pic entre 1-3 min qui lui est propre. Il se peut que le pic de l'impureté C sorte à ce moment-là et qu'il soit masqué par le large pic du DMSO. L'utilisation de DMSO comme solvant permet donc la dissolution de l'impureté C mais ne permet pas son identification en UV/MS. L'identification de l'impureté C avec cette méthode a été abandonnée, cependant, la seringue d'Hycamtin® devra passer un test de particules visibles. En effet, cette solution doit d'office être exempte de particule pour satisfaire aux exigences de la Pharmacopée européenne en termes de solution injectable. Cette solution est composée majoritairement de NaCl 0.9%. Dès lors, si l'impureté C est présente, alors la présence de particules sera observable lors de l'inspection visuelle puisque cette dernière n'est pas hydrosoluble.

4.2. Dégradation accélérée

4.2.1. Essai préliminaire (milieu acide, basique, neutre)

Concernant l'essai préliminaire qui a été mené, il a permis d'observer la forme lactone dans le milieu acide, la forme carboxyle dans le milieu basique et finalement la présence des deux formes en milieu neutre.

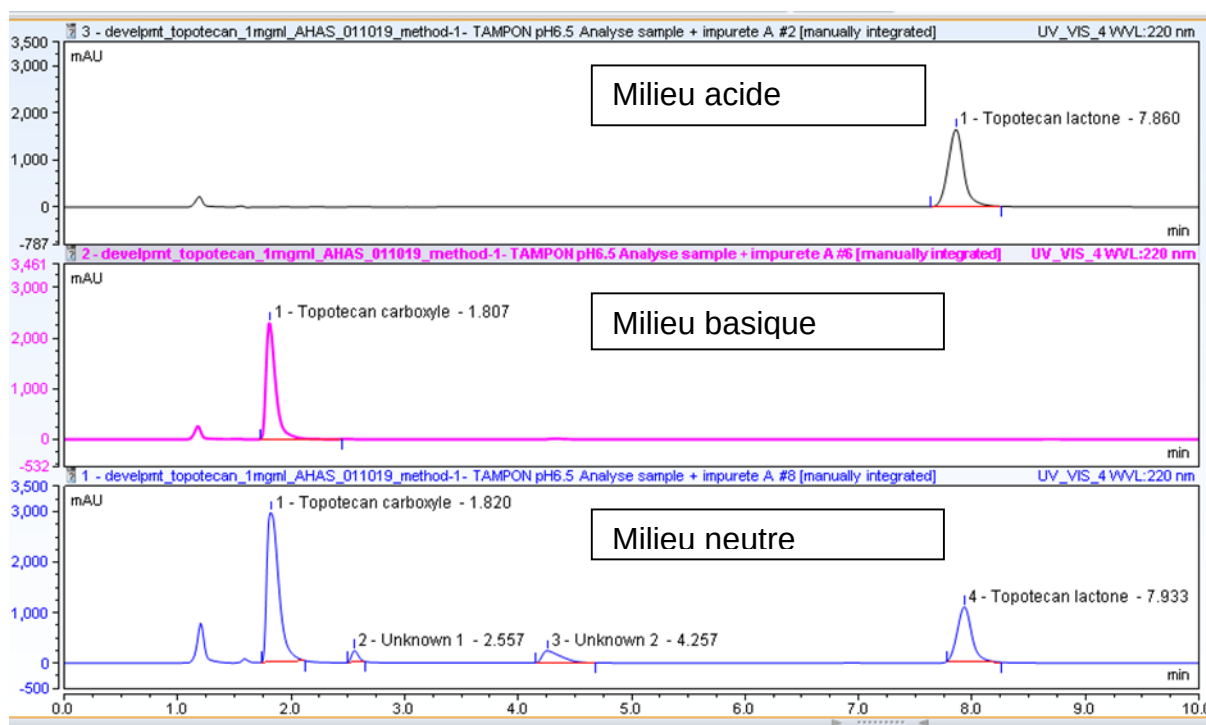


Figure 15 : Différentes formes du TPT en fonction du pH, analyse en UV

4.2.2. Dégradation acide

La dégradation accélérée en milieu acide a montré la présence du TPT sous forme lactone uniquement. Aucune impureté n'est présente dans ces conditions.

4.2.3. Dégradation basique

La dégradation accélérée en milieu basique montre la formation de la forme carboxyle du TPT. Elle représente la principale impureté observée. Le chromatogramme montre que la forme lactone n'est plus présente de ces conditions et que le TPT s'est totalement transformé en forme carboxyle.

4.2.4. Dégradation thermique

La dégradation thermique montre la formation d'une impureté avec un temps de rétention $t_r = 5.7$ min. Le TPT est cependant présent sous sa forme lactone. Une impureté est présente en très faible quantité avec un temps de rétention $t_r = 3.5$ min. Le pic du TPT sous forme carboxyle est présent mais en quantité minime.

4.2.5. Dégradation oxydative

La dégradation accélérée en milieu oxydatif montre la formation de quelques impuretés. Notamment les impuretés avec les temps de rétention suivant $t_{r1} = 3.5$ min, $t_{r2} = 5.6$ min et $t_{r3} = 6.7$ min.

Il est observable dans le chromatogramme en Annexe 13 que le TPT sous forme carboxyle est aussi présent mais en quantité négligeable.

4.2.6. Photodégradation (UV et lumière)

Un premier set d'échantillon a subi la dégradation à la lumière. Tandis que le deuxième set a subi la dégradation à l'UV. Les résultats sont similaires dans les deux environnements puisque tous deux présentent la formation de TPT sous forme carboxyle. Aucune autre impureté n'est présente.

Finalement, la dégradation accélérée montre que le TPT est totalement sous forme carboxyle dans un environnement basique. Il est donc clair que le TPT est totalement sensible au changement de pH. L'analyse ne montre pas la formation d'autres dégradants.

Concernant le milieu acide, seule la forme lactone du TPT est présente. Le TPT ne serait donc pas sensible à la formation d'impureté dans ce milieu. Cependant, il est observable que le TPT est susceptible à la formation d'impuretés lorsqu'il est dans un environnement oxydatif ou encore à haute température. Il est donc sensible à l'exposition aux oxydants fort comme le peroxyde d'hydrogène ou encore à la chaleur. Les trois impuretés reportées ici sont numérotées de 1 à 3 en fonction de leur temps de rétention. Leurs identités ne sont pas connues, sauf pour l'impureté 3 qui semble être l'impureté A "Related TPT compound impurity A USP". En effet, son temps de rétention (6.7min) est comparable à celui de l'impureté A sous forme lactone (6.2min), la légère différence des temps de rétention provient sûrement des différents milieux (l'un est dans le H_2O_2 tandis que l'autre se trouve dans l'eau). Aussi, on remarque que l'impureté 1 ($t_{r1} = 3.5$ min) et 2 ($t_{r2} = 5.6$ min) sont toutes deux présentes dans les échantillons ayant subi la dégradation thermique et oxydative.

Les résultats sont regroupés sous forme de pourcentage dans le Tableau 4. Ce tableau représente l'aire sous la courbe (AUC) de l'impureté en fonction de l'AUC total.

Tableau 6 : Pourcentage de l'impureté en fonction de l'AUC totale

AUC de l'impureté en fct du total	TPT carboxyle	Impureté 1	Impureté 2	Impureté 3
Dégradation basique	100%	-	-	-
Dégradation basique avec chaleur	100%	-	-	-
Dégradation acide	-	-	-	-
Dégradation acide avec chaleur	-	-	-	-
Dégradation oxydative	-	-	-	-
Dégradation oxydative avec chaleur	-	0.21%	0.39%	0.03%
Dégradation thermique	-	0.18%	12.99%	-
Dégradation lumière seringue	0.47%	-	-	-
Dégradation lumière verre	6.76%	-	-	-
Dégradation UV seringue	1.44%	-	-	-
Dégradation UV verre	5.69%	-	-	-

L'impureté principale est bel et bien la forme carboxyle du TPT. Aussi, l'impureté 2 qui est apparue suite à la dégradation thermique, présente un pourcentage élevé (13%) comparé à l'AUC totale. L'impuretés 1 et 3 sont présentes avec des pourcentages inférieurs à 1%.

La dégradation accélérée a été faite en deux fractions pour le milieu acide, basique et oxydatif. En général, on remarque que les résultats sont similaires avec ou sans chaleur sauf pour le milieu oxydatif où la chaleur joue un rôle supplémentaire quant à la formation de dégradants.

Les résultats de la dégradation accélérée en milieux photolytique montrent que l'échantillon contenu dans un flacon en verre transparent est plus sensible à la dégradation que l'échantillon contenu dans une seringue en polypropylène / polystyrène.

4.3. Validation de la méthode

4.3.1. Spécificité

Pour prouver que la méthode en question est spécifique, une analyse a été effectuée avec tous les composants contenus dans l'échantillon sauf le principe actif (TPT). La matrice a donc été préparée avec les excipients suivants : mannitol et acide tartrique. Cet échantillon a été analysé avec la méthode qu'on souhaite valider.

Il est observable qu'aucun pic n'est détecté après le temps morts ($t_0=1.55\text{min}$). Il n'y a donc aucun composé dans la matrice qui pourrait interférer avec l'analyse de nos composés d'intérêts.

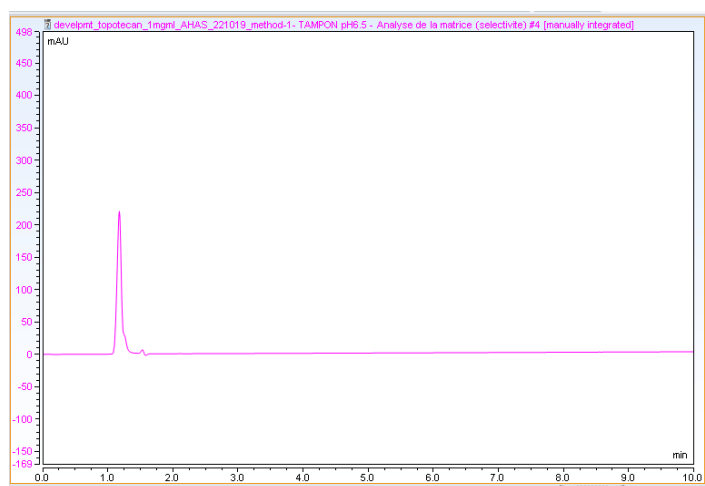


Figure 16 : Analyse de la matrice en UV

4.3.2. Effet de matrice

Un effet de matrice est suspecté dans cette préparation. Il faut savoir que la matrice est composée de mannitol, de NaCl 0.9%, d'acide tartrique et d'acide chlorhydrique. En injectant un échantillon avec la matrice et un second échantillon sans matrice, on observe la présence de la forme lactone uniquement dans le premier échantillon alors que dans le second on observe les deux formes du TPT. Une différence est aussi observable aux niveaux des AUC (aire sous la courbe) des pics qui sont notablement différentes.

Ces observations démontrent un effet de matrice et s'expliquent par la présence d'acide tartrique dans la matrice, ce dernier tamponne l'échantillon à pH acide, ce qui pousse la réaction d'hydrolyse vers la gauche et donc préconise la présence de la forme lactone uniquement. La présence ou non de mannitol, de NaCl peut aussi avoir un effet sur les différences observées avec les AUC.

La validation a alors été réalisée en utilisant un protocole préconisant un étalonnage avec la matrice. En effet, si les standards d'étalonnage étaient préparés sans matrice et les standards

de validation avec, un réel problème serait rencontré. Dès lors, les standards d'étalonnage et de validation sous tous deux préparés dans la matrice.

4.3.3. Fonction de réponse

La fonction de réponse d'une méthode analytique est la relation qui existe entre la réponse (le signal) et la concentration de l'analyte dans l'échantillon. Le modèle d'étalonnage sélectionné est la régression linéaire après une transformation à la racine carrée.

L'équation suivante a été utilisée :

$$\text{Racine carrée (Y)} = a + b \text{ Racine carrée (X)}$$

avec Y = réponse analytique (en mAU) et X = concentration (µg/mL).

Les graphiques de fonction de réponse pour chaque série sont présentés dans le rapport électronique en Annexe 15 au point 3. Les résultats de la fonction de réponse sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 7 : Résultats de la fonction de réponse

Série	Pente	Ordonnée à l'origine	r2
1	0.9908	-0.3190	0.9998
2	0.9875	-0.4224	0.9999
3	0.9841	-0.3998	0.9999
4	0.9919	-0.2547	0.9995
5	0.9971	-0.3161	0.9998
6	0.9848	-0.1695	0.9998

4.3.4. Justesse

La justesse représente l'étroitesse d'accord entre une valeur de référence et une moyenne de plusieurs valeurs expérimentales. Elle nous informe sur l'erreur systématique. Cette valeur est exprimée en terme de biais absolu (µg/mL) ou de biais relatif (%). Les résultats de la justesse sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 8 : Résultats de la justesse

Concentration [µg/mL]	Niveau	Biais relatif [%]
10	1	-1.454
20	2	-0.3226
50	3	0.4162
100	4	0.2448
200	5	-0.2618

4.3.5. Précision

La précision d'une méthode est le degré d'accord entre les résultats obtenus lors d'essais différents. Elle est mesurée par la dispersion des résultats individuels de part et d'autre de la moyenne et elle est généralement représentée par l'écart-type ou par le coefficient de variation (écart-type relatif), calculé après avoir appliqué la méthode complète de façon répétée à un

certain nombre d'échantillons identiques, prélevés sur le même lot homogène de produit à analyser. Elle nous informe sur l'erreur aléatoire et peut être évaluée à deux niveaux : la répétabilité et la précision intermédiaire.

Les résultats de la précision sont présentés dans le rapport de validation en Annexe 15 au point 5.

4.3.6.Exactitude

L'exactitude d'une méthode est le degré de concordance entre les résultats obtenus et la vraie valeur de la grandeur mesurée, l'exactitude prend en compte l'erreur total (l'erreur systématique et l'erreur aléatoire). Donc, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité. Les résultats de la fidélité et de l'exactitude sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 9 : Résultats de la fidélité

Concentration [$\mu\text{g/ml}$]	Niveau	Répétabilité [CV %]	Fidélité intermédiaire [CV %]
10	1	1.451	1.757
20	2	1.677	1.742
50	3	1.466	1.466
100	4	1.180	2.210
200	5	0.4962	1.065

Tableau 10 : Résultats de l'exactitude

Concentration [$\mu\text{g/ml}$]	Niveau	Limites de l'intervalle de tolérance au niveau β [%]	Risque [%]
10	1	[-5.612, 2.705]	1.899
20	2	[-4.338, 3.693]	0.7699
50	3	[-2.946, 3.778]	0.2656
100	4	[-5.402, 5.892]	4.084
200	5	[-3.031, 2.507]	0.1759

La limite d'acceptation a été fixée à 6%. Cette limite est généralement fixée à 5% pour les analyses pharmaceutiques. Par contre, concernant une étude de stabilité, une limite d'acceptation allant jusqu'à 10% peut être acceptable.

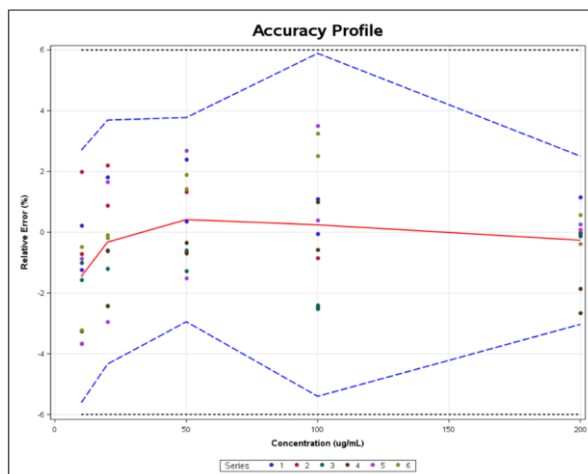


Figure 17 : Profil d'exactitude obtenue avec une régression linéaire après une transformation à la racine carrée

Sur la figure 17, la ligne continue rouge correspond au biais, les lignes discontinues bleues représentent les limites de l'intervalle de tolérance alors que les lignes pointillées noires représentent les limites d'acceptation fixées à 6%. Les lignes bleues sont bien comprises dans l'intervalle des lignes noires, ce qui démontre l'exactitude du modèle.

Ci-dessous, on retrouve le profil de risque lié à cette analyse. On remarque que le risque de mesurer des valeurs en dehors de la limite d'acceptation est le plus élevé, avec la concentration de 100 µg/mL.

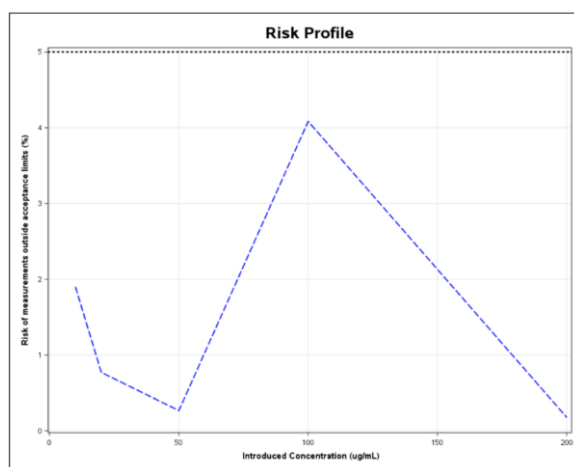


Figure 18 : Profil de risque

4.3.7. Linéarité

La linéarité d'une méthode analytique est la capacité dans un intervalle donné d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans l'échantillon.

L'équation suivante a été obtenue :

$$Y = 0.1054 + 0,9979 X$$

Avec Y = concentration recalculée (µg/mL) et X = concentration introduite (µg/mL).

Le coefficient de corrélation (r) obtenu est de 0.9998 et le coefficient de détermination (r^2) est de 0.9996. Le coefficient de corrélation peut varier entre -1 et 1. Plus il se rapproche de 1, plus la corrélation positive entre les deux variables est forte.

Le coefficient de détermination quant à lui varie entre 0 et 1, il permet de juger la qualité d'une régression linéaire. Plus ce facteur est proche de 1, plus le pouvoir de prédiction est fort.

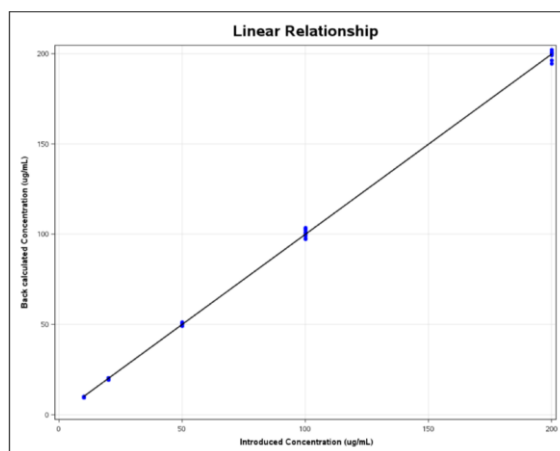


Figure 19 : Linéarité - concentration recalculée en fonction de la concentration introduite

La ligne continue sur la figure 20 représente la droite d'identité $Y=X$. Les lignes discontinues bleues correspondent au profil d'exactitude (avec limite de tolérance $\beta=6\%$ exprimé en valeur absolu) alors que les lignes pointillées noires représentent les limites d'acceptation.

La linéarité de la méthode est démontrée grâce à la figure 20 qui illustre que les limites de l'intervalle de tolérance (lignes discontinues bleues) sont comprises dans les limites d'acceptation (lignes pointillées noires).

Cette méthode est donc valide pour des concentrations allant de 10 à 200 $\mu\text{g/mL}$.

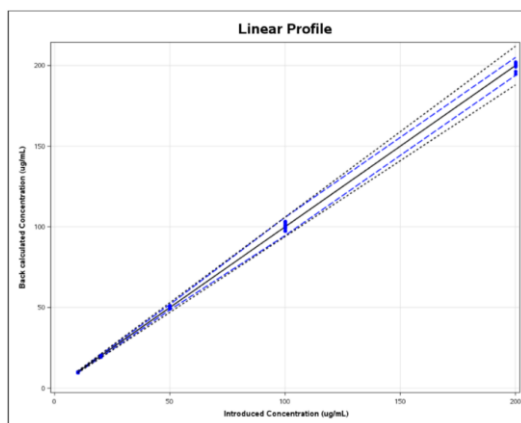


Figure 20 : Profil de linéarité

4.3.8. Limite de détection (LOD), limite de quantification (LOQ), intervalle de dosage

La limite de détection (LOD) représente la plus petite quantité de la substance d'intérêt qui peut être détectée mais pas forcément quantifiée. En dessous de cette valeur, il ne sera pas possible de détecter la présence du TPT grâce à cette méthode analytique.

Cette valeur a été définie comme suit :

$$\text{LOD} = 0.2650 \mu\text{g/mL}$$

La limite de quantification basse est la plus petite quantité de la substance d'intérêt dans l'échantillon qui peut être quantifiée dans les conditions expérimentales avec une exactitude bien définie. La limite de quantification haute représente l'inverse.

Les limites de quantifications (LOQ) sont obtenues en calculant la plus petite et la plus grande concentration au-delà desquelles les limites d'exactitude sont en dehors des limites d'acceptation.

Les deux limites hautes et basses de LOQ représentent l'intervalle de dosages avec laquelle la procédure permet d'avoir des résultats d'une exactitude acceptable. Elles ont été définies comme suit :

LOQ basse = 10 µg/mL

LOQ haute 200 µg/mL

La méthode pourra donc être utilisée pour quantifier des échantillons avec une concentration d'analyte allant de 10 à 200 µg/mL. Les deux dosages des seringues (200 et 20 µg/mL) contenant le TPT pourront donc être analysés avec cette méthode avec une exactitude adéquate.

5. Conclusion et perspectives

Une méthode chromatographique isocratique en phase inverse (RP-LC) indiquant la stabilité du topotécan a été développée en utilisant le détecteur à barrettes diodes (UV-DAD). Le détecteur MS a permis de confirmer les pics obtenus en UV grâce à l'information qu'il fournit sur la masse. Cette méthode est simple, sensible et rapide.

Elle permet la détermination quantitative de la forme lactone du topotécan (forme active) au sein d'une préparation reconstituée d'Hycamtin® sous forme de seringue injectable. Elle permet aussi la mise en évidence de l'impureté A et de la forme carboxyle du TPT (forme inactive). L'impureté C n'a pas pu être mise en évidence grâce à cette méthode à cause de sa solubilité médiocre. Il serait donc intéressant par la suite d'étudier sa solubilité de façon plus approfondie et ainsi de trouver un solvant dans lequel cette impureté est soluble et visible avec le détecteur UV-DAD. En effet, l'impureté C est soluble dans le DMSO mais ce solvant n'a malheureusement pas permis son identification avec le détecteur UV-DAD.

L'étude de la dégradation accélérée montre que le topotécan est sensible à l'hydrolyse basique, à l'oxydation chimique, à la chaleur et à l'exposition à la lumière / aux UV alors qu'il est stable en milieu acide. Les résultats de la validation montrent que la méthode pourra être utilisée pour quantifier des échantillons avec une concentration d'analyte allant de 10 à 200 µg/mL avec une limite d'acceptation de $\pm 6\%$ et un niveau de risque maximal de 5%. Cette méthode validée pourra donc être utilisée lors de l'étude de stabilité.

Par manque de temps, l'étude de stabilité n'a pas pu être menée. En effet, aucune des trois méthodes sélectionnées à partir de la littérature, n'a permis la mise en évidence simultanée des deux formes du TPT (lactone et carboxyle) avec une même méthode. C'est pourquoi, une grande partie de ce travail a été consacrée au développement d'une nouvelle méthode.

Le principal problème rencontré avec ces différentes méthodes est l'utilisation d'additif acide rendant la phase mobile acide. Cette acidité influence l'équilibre entre la forme lactone et carboxyle du TPT. La méthode développée et validée ne présente pas ce problème car elle utilise une solution tampon avec un pH neutre qui n'influence pas le topotécan.

Finaleme nt, la méthode développée permet mieux de visualiser les formes lactones du TPT ou de ses impuretés alors que les formes carboxyles sont peu retenues et sortent très tôt dans le chromatogramme. La méthode peut être légèrement modifiée en mettant en place un gradient qui fait varier au cours du temps les proportions de phase organique et aqueuse. Ceci afin d'obtenir une meilleure rétention pour les formes carboxyles. Suite à ce changement, le débit pourra être augmenté à 0.3 ml/min ce qui diminuera le temps d'analyse.

6. Bibliographie

1. Castillo B V., Kaufman L. Pediatric tumors of the eye and orbit. Vol. 50, Pediatric Clinics of North America. W.B. Saunders; 2003. p. 149–72.
2. Luo C, Deng YP. Retinoblastoma: Concerning its initiation and treatment. Vol. 6, International Journal of Ophthalmology. 2013. p. 397–401.
3. Antoneli CBG, Ribeiro K de CB, Sakamoto LH, Chojniak MM, Novaes PERS, Arias VEA. Trilateral retinoblastoma. *Pediatr Blood Cancer* [Internet]. 2007 Mar [cited 2019 Nov 6];48(3):306–10. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pbc.20793>
4. Mendoza PR, Grossniklaus HE. The Biology of Retinoblastoma. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier B.V.; 2015. p. 503–16.
5. Nichols KE, Walther S, Chao E, Shields C, Ganguly A. Recent advances in retinoblastoma genetic research. Vol. 20, *Current Opinion in Ophthalmology*. 2009. p. 351–5.
6. Rao R, Honavar SG. Retinoblastoma. *Indian J Pediatr* [Internet]. 2017;84(12):937–44. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12098-017-2395-0>
7. Balmer A, Zografos L, Munier F. Diagnosis and current management of retinoblastoma. Vol. 25, *Oncogene*. 2006. p. 5341–9.
8. Rao R, Honavar SG. Review article. *Indian J Pediatr*. 2017;84(12):937–44.
9. Dimaras H, Kimani K, Dimba EAO, Gronsdahl P, White A, Chan HSL, et al. Retinoblastoma. *Lancet*. 2012;379(9824):1436–46.
10. Balmer A, Munier F. Differential diagnosis of leukocoria and strabismus, first presenting signs of retinoblastoma. *Clin Ophthalmol* [Internet]. 2007 Dec [cited 2019 Nov 14];1(4):431–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19668520>
11. Aerts I, Lumbroso-Le Rouic L, Gauthier-Villars M, Brisse H, Doz F. Actualités du rétinoblastome. *Arch Pediatr*. 2016 Jan 1;23(1):112–6.
12. Lohmann DR, Gallie BL. Retinoblastoma [Internet]. *GeneReviews®*. 1993 [cited 2019 Oct 21]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301625>
13. Yanık Ö, Gündüz K, Yavuz K, Taçyıldız N, Ünal E. Chemotherapy in retinoblastoma: Current approaches. Vol. 45, *Türk Oftalmoloji Dergisi*. Turkish Ophthalmology Society; 2015. p. 259–67.
14. Shamma M, St Gerorgiev V. Camptothecin. Vol. 63, *Journal of Pharmaceutical sciences* FEBRUARY. 1974.
15. Bracher F, Tremmel T. From Lead to Drug Utilizing a Mannich Reaction: The Topotecan Story. Vol. 350, *Archiv der Pharmazie*. Wiley-VCH Verlag; 2017.
16. Delgado JL, Hsieh CM, Chan NL, Hiasa H. Topoisomerases as anticancer targets. Vol. 475, *Biochemical Journal*. Portland Press Ltd; 2018. p. 373–98.
17. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: Camptothecins and beyond. In: *Nature Reviews Cancer*. 2006. p. 789–802.
18. Herben VMM, ten Bokkel Huinink WW, Beijnen JH. Clinical Pharmacokinetics of Topotecan. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 1996 Aug [cited 2019 Nov 10];31(2):85–102. Available from: <http://link.springer.com/10.2165/00003088-199631020-00001>

19. Lopes-de-Araújo J, Reis S, Nunes C. Topotecan effect on the structure of normal and cancer plasma membrane lipid models: A multi-model approach. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2018;123(August):515–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.08.006>
20. Selassie CD, Garg R, Kapur S, Kurup A, Verma RP, Mekapati SB, et al. Comparative QSAR and the radical toxicity of various functional groups. *Chem Rev*. 2002;102(7):2585–605.
21. Craig SB, Bhatt UH, Patel K. Stability and compatibility of topotecan hydrochloride for injection with common infusion solutions and containers. *J Pharm Biomed Anal*. 1997;16(2):199–205.
22. Krämer I, Thiesen J. Stability of topotecan infusion solutions in polyvinylchloride bags and elastomeric portable infusion devices. *J Oncol Pharm Pract*. 1999;5(2):75–82.
23. Karbownik A, Szalek E, Urjasz H. The stability of topotecan (Teva) in concentrate after re-use and in dilute infusions in sodium chloride 0.9% in polyethylene bags. 2012;268–75.
24. Gravel E, Bourget P, Mercier L, Paci A. Fluorescence detection combined with either HPLC or HPTLC for pharmaceutical quality control in a hospital chemotherapy production unit: Application to camptothecin derivatives. *J Pharm Biomed Anal*. 2005 Sep 15;39(3–4):581–6.
25. Hubbard KE, Schaiquevich P, Bai F, Fraga CH, Miller L, Panetta JC, et al. Application of a highly specific and sensitive fluorescent HPLC method for topotecan lactone in whole blood. *Biomed Chromatogr*. 2009;23(7):707–13.
26. Arellano C, Gandia P, Bettuing L, Woodley J, Chatelut E. Quantification of topotecan by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Application to intestinal transport using rat everted gut sacs. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2010;878(7–8):645–52.
27. Topotecan | C₂₃H₂₃N₃O₅ - PubChem [Internet]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Topotecan>
28. CHROMacademy. Theory of HPLC [Internet]. Available from: www.chromacademy.com
29. Miller P, Bonner D. The Quadrupole Mass Filter: Basic Operating Concepts. *J Chem Educ*. 1986;63(7):617–23.
30. FDA. Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation. 2015.
31. Cione AP, Tonhi E, Silva P. 3 Stability Indicating Methods.
32. Stabilis 4.0 [Internet]. [cited 2019 Oct 28]. Available from: <https://www.stabilis.org/>
33. Craig SB, Bhatt UH, Patel K. Stability and compatibility of topotecan hydrochloride for injection with common infusion solutions and containers. *J Pharm Biomed Anal*. 1997 Oct;16(2):199–205.
34. Karbownik A, Szalek E, Urjasz H, Głęboka A, Mierzwa E, Grześkowiak E. The stability of topotecan (Teva) in concentrate after re-use and in dilute infusions in sodium chloride 0.9% in polyethylene bags. Vol. 6, *Anestezjologia i Ratownictwo*. 2012.
35. Krä I, Thiesen J. Stability of topotecan infusion solutions in polyvinylchloride bags and elastomeric portable infusion devices. 1078.
36. Organisation mondiale de la santé. Règles OMS de bonnes pratiques applicables par les laboratoires de contrôle qualité pharmaceutique. 2010.

37. Agency European Medicines. ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Step 5 NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY (CPMP/ICH/381/95) APPROVAL BY CPMP November 1994 DATE FOR COMING INTO OPERATION. 1995.
38. Commission SFSTP, Ph. Hubert JJN-H, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewe MF, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet LV. Validation des procédures analytiques quantitatives Harmonisation des démarches. STP Pharma Prat. 2003;
39. Guilbault GG, Hjelm M. Nomenclature for automated and mechanised analysis (Recommendations 1989). Vol. 61, Pure and Applied Chemistry. 1991. p. 1660.
40. Gosetti F, Mazzucco E, Zampieri D, Gennaro MC. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Vol. 1217, Journal of Chromatography A. 2010. p. 3929–37.
41. Raghu NS, Reddy YR, Naresh V, Rao VS. SEPARATION, IDENTIFICATION AND QUANTITATION OF DEGRADANTS OF TOPOTECAN AND ITS RELATED IMPURITIES IN TOPOTECAN INJECTION BY RP-HPLC AND LC-MS. J Liq Chromatogr Relat Technol. 2011;34(7):548–78.