



De la validation de méthodes bioanalytiques à l'analyse d'échantillons réels

Annick Ménétrey Tacheron

CCCTA 18 septembre 2008

fully funded drug development & innovation

Bioanalyse

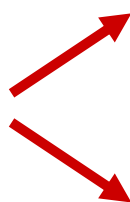


→ Objectif:

→ **déterminer la concentration d'une ou de plusieurs molécules dans un échantillon biologique (ou milieu biologique: plasma, sang, urine...)**

- ▶ Dans le cas de l'industrie pharmaceutique, lors des études précliniques et cliniques

→ 2 aspects principaux



validation de la méthode bioanalytique



en fonction de **guidelines**

application à l'analyse en routine

La validation: Guidelines



→ Paramètres et critères d'acceptation réglementés

- ▶ “Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, May 2001, US Department of Health and Human Services, FDA”
- ▶ ICH Q2A, Terminology and Definition, 1995
- ▶ ICH Q2B, Methodology, 1996

→ **2006:**

- ▶ Nouvelle réunion FDA sur la bioanalyse
- ▶ Clarifications et nouvelles exigences pour la validation des méthodes bioanalytiques et pour leur application en routine
 - Référence: Viswanathan C.T., The AAPS Journal, 2007

Validation, paramètres fondamentaux

« Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, May 2001 »



- Exactitude (« accuracy »)
- Précision
- Sensibilité (« low limit of quantification, LLOQ »)
- Courbe de Calibration (« linearity »)
- Spécificité (« selectivity »)
- Rendement (« recovery »)
- Stabilité

Calibration Curve (Linearity)		
Minimum coefficient of correlation (Finnigan, LC Quan, version 1.3)	[r ²]	0.990
Minimum number of valid C levels (LLOQ & ULOQ included)	[n]	6
Limit for bias and over-all bias at LLOQ	[Bias, Bias _{mean}]	Within ± 20%
Limit for bias and over-all bias above LLOQ	[Bias, Bias _{mean}]	Within ± 15%
Limit for inter-day precision at LLOQ	[CV]	≤ 20%
Limit for inter-day precision above LLOQ	[CV]	≤ 15%
Extrapolation below LLOQ or above ULOQ		0%

Quality Control Samples (Accuracy / Precision)		
Minimum number of levels (including LLOQ)	[n]	4
Number of replicates per level	[N]	6
Minimum number of valid replicates per level	[N]	5
Intra- & Inter-day accuracy at LLOQ	[RE, RE_wb]	Between 80 & 120%
Intra- & Inter-day accuracy above LLOQ	[RE, RE_wb]	Between 85 & 115%
Intra- & Inter-day precision at LLOQ	[CV, CV_wb]	≤ 20%
Intra- & Inter-day precision above LLOQ	[CV, CV_wb]	≤ 15%

Validation, paramètres fondamentaux

« Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, May 2001 »



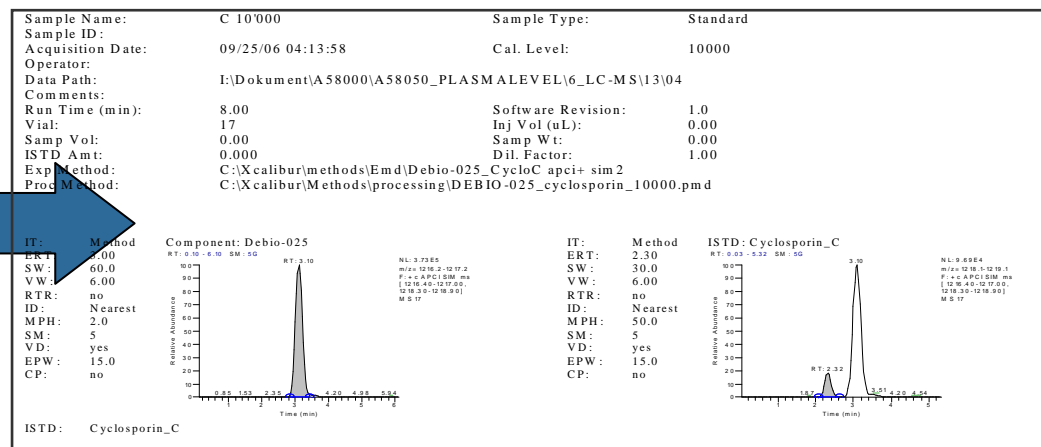
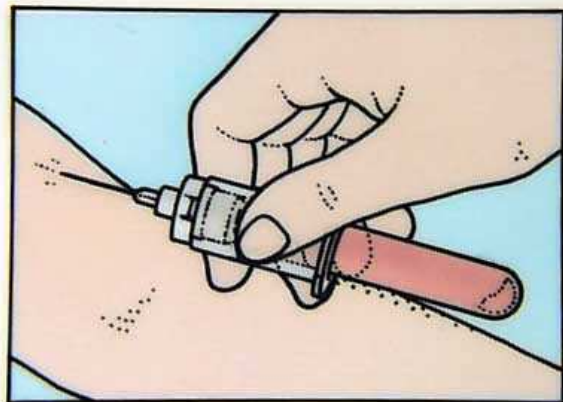
- Exactitude (« accuracy »)
- Précision
- Sensibilité (« low limit of quantification, LLOQ »)
- Courbe de Calibration (« linearity »)
- Spécificité (« selectivity »)
- Rendement (« recovery »)
- Stabilité
 - ▶ d'échantillons enrichis (« spiked »)

Validation: principes

« Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, May 2001 »



→ L'effet de chaque étape depuis le prélèvement de la matrice jusqu'à la fin de l'analyse doit être investigué.

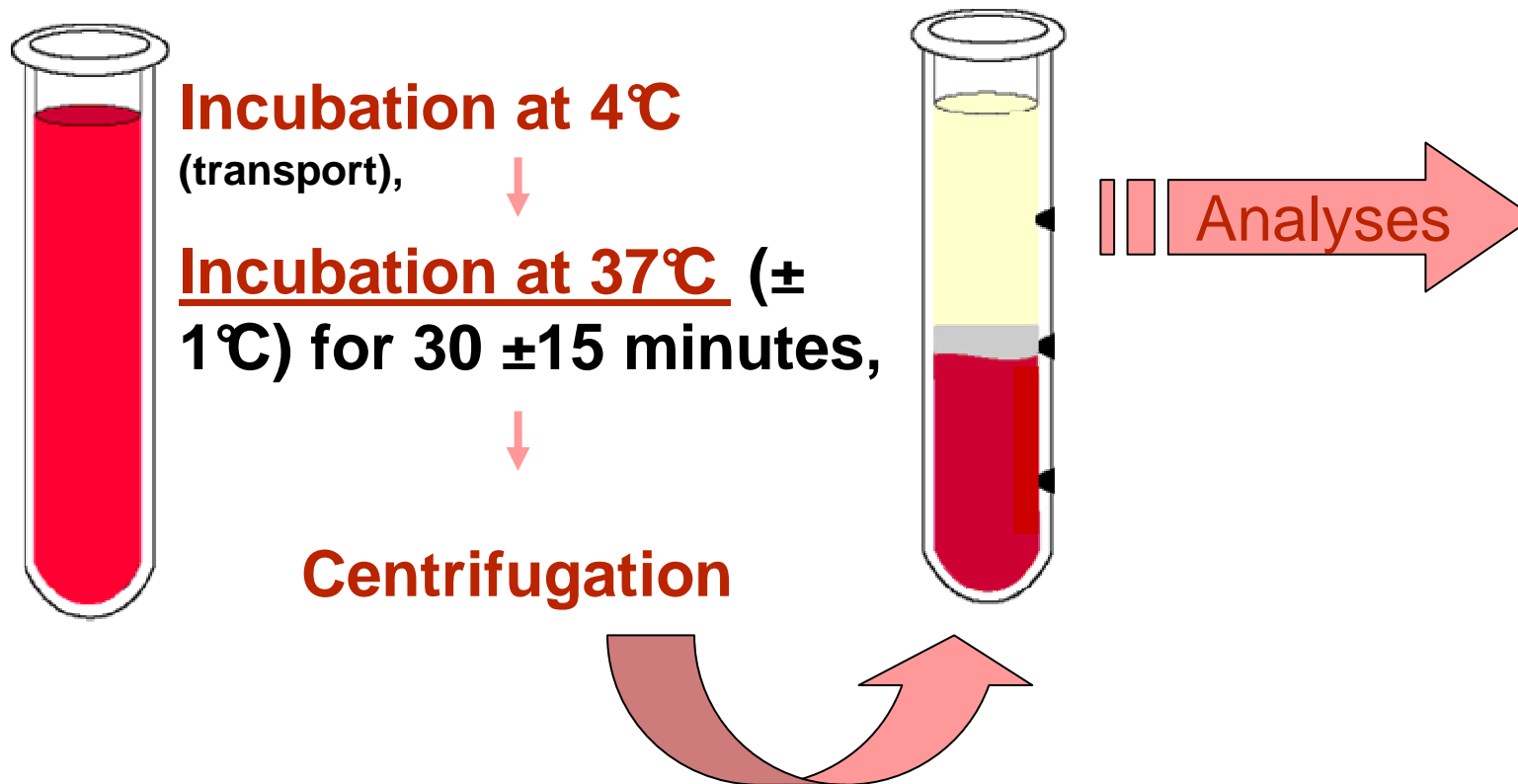


Exemple: EB101

Procédure de préparation du plasma



→ Procédure standardisée de préparation du plasma pour la détermination du EB101:



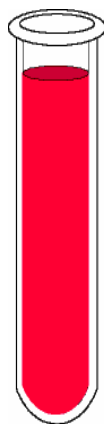
Problèmes bioanalytiques



- Les paramètres de validation ne sont pas toujours suffisants pour obtenir des résultats exacts et précis dans les **échantillons « réels »** (incurred samples)

Problèmes bioanalytiques

**Standards
QCs**



≠



Echantillons

Pourquoi?

- ▶ présence de métabolites
- ▶ présence des excipients
- ▶ différence de liaison aux protéines
- ▶ différence de rendement d'extraction
- ▶ inhomogénéité des échantillons
- ▶ adsorption aux tubes de prélèvement/stockage, libération de composés
- ▶ ...

Exemple: EB102

Influence d'un métabolite



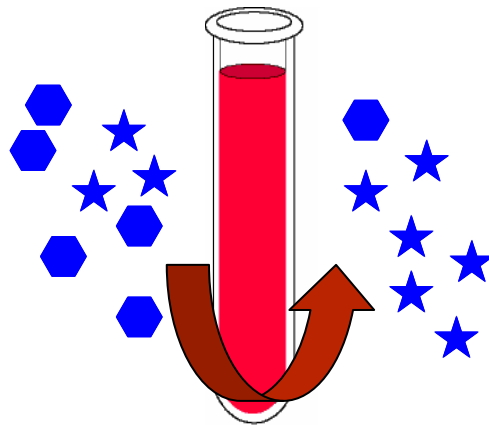
- Mise en évidence récente d'un **métabolite conjugué(s) du EB102** dans l'urine des volontaires d'une étude clinique de phase 1.
- Investigation en cours notamment sur la présence de ce conjugué dans le sang
- Conséquences pour la partie bioanalytique du projet et les précédents résultats PK?
 - ▶ est-ce que ces conjugués, si ils sont présents dans le sang, interfèrent avec le dosage?

Exemple: EB102

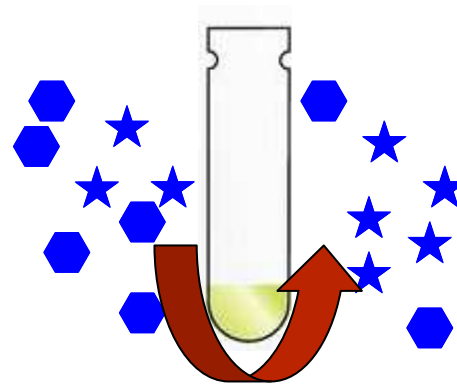
Influence d'un métabolite



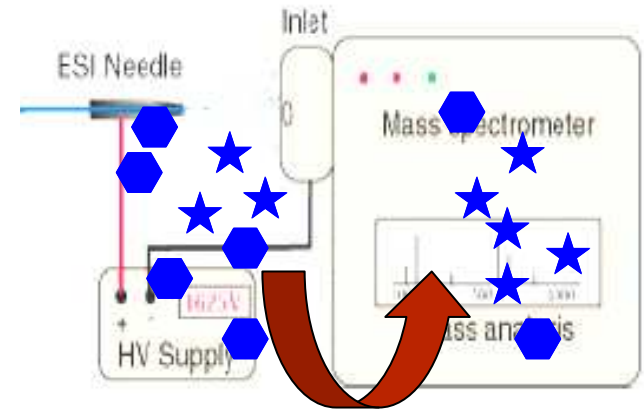
→ Instabilité du métabolite ◆



Stockage



Préparation de l'échantillon



Analyse

→ Concentration de EB102 « réelle » : 4.3 ng/mL

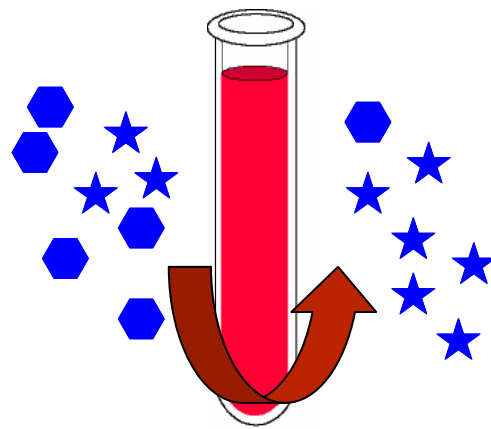
→ Concentration de EB102 mesurée : 8.4 ng/mL

Exemple: EB102

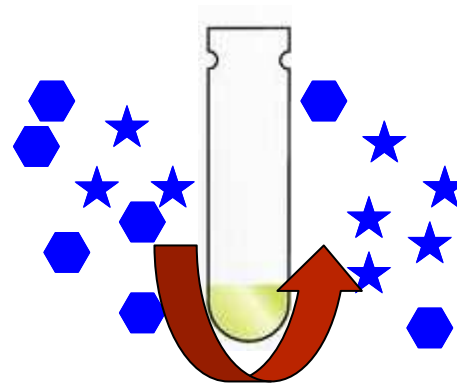
Influence d'un métabolite



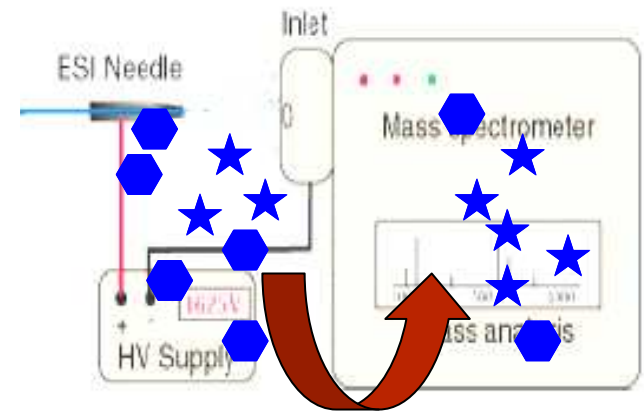
→ Instabilité du métabolite ◆



Stockage



Préparation de l'échantillon



Analyse

- Concentration de EB102 « réelle » : 4.3 ng/mL
- Concentration de EB102 mesurée : 8.4 ng/mL
- Concentration de EB102 après 3 mois de stockage : 12.6 ng/mL

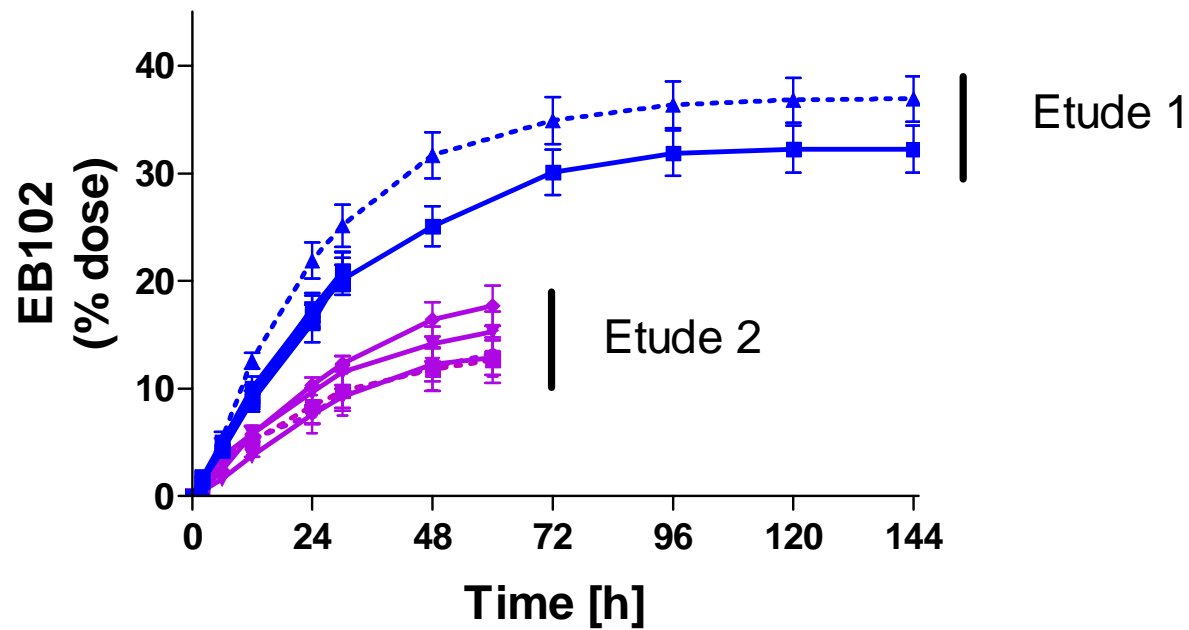
Exemple: EB102

Effet « matrice » sur le standard interne



→ Dosage dans les échantillons urine, avec un standard interne de structure analogue

Cumulated urine excretion after oral administration of EB102



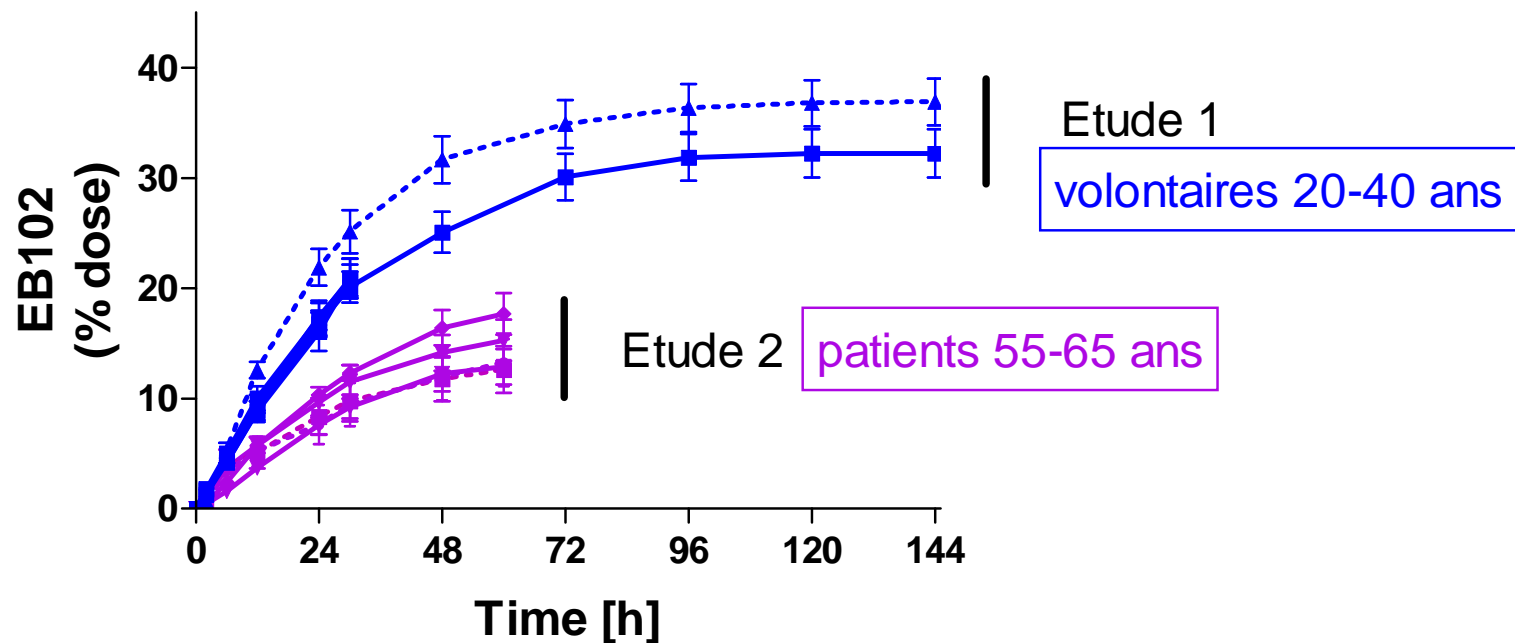
Exemple: EB102

Effet « matrice » sur le standard interne



→ Dosage dans les échantillons urine, avec un standard interne de structure analogue

Cumulated urine excretion after oral administration of EB102



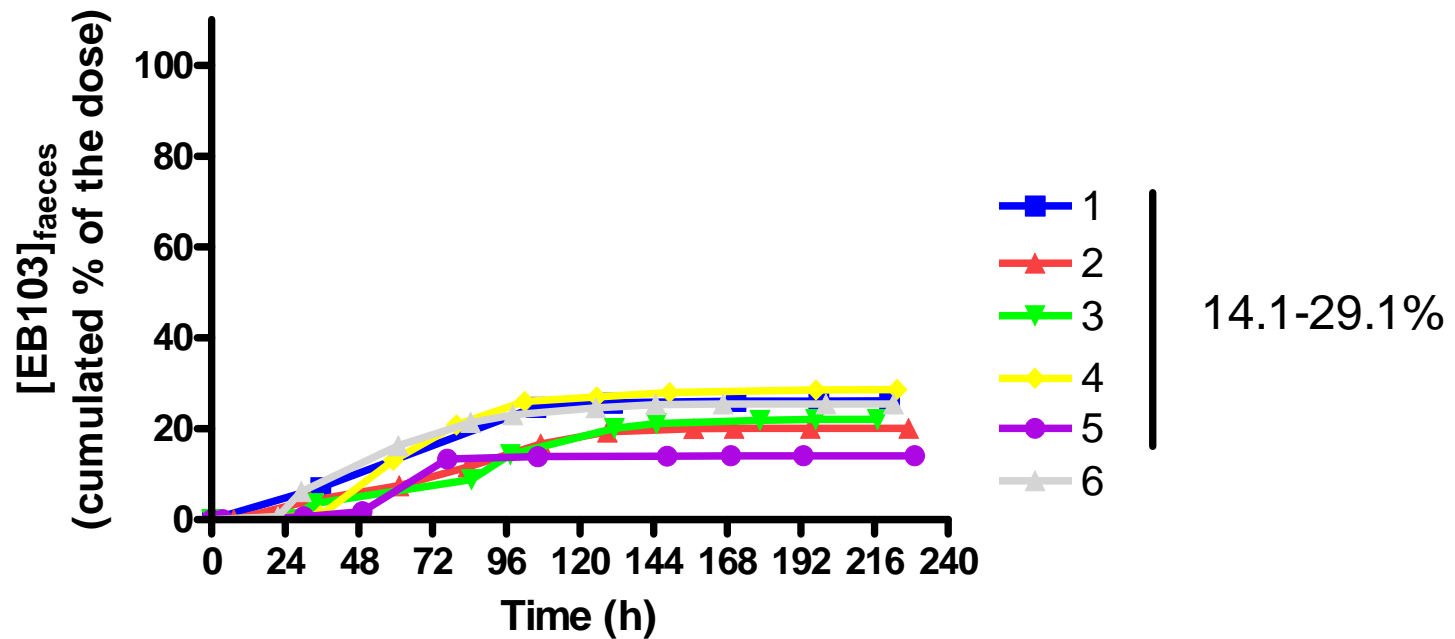
Exemple: EB103

Différence de rendement d'extraction (inhomogénéité)



→ Dosage de EB103 dans les homogénats de faeces

**Total EB103
excretion in faeces**



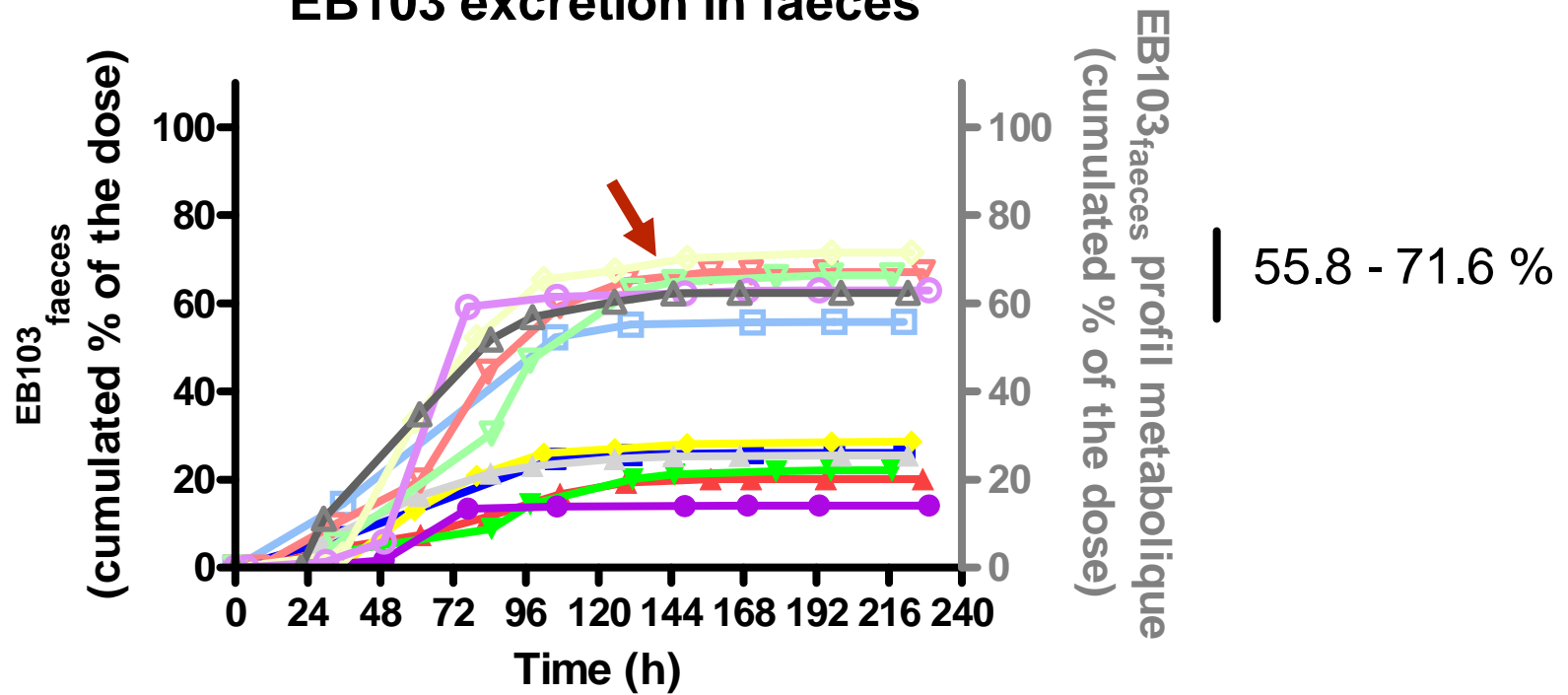
Exemple: EB103

Différence de rendement d'extraction (inhomogénéité)



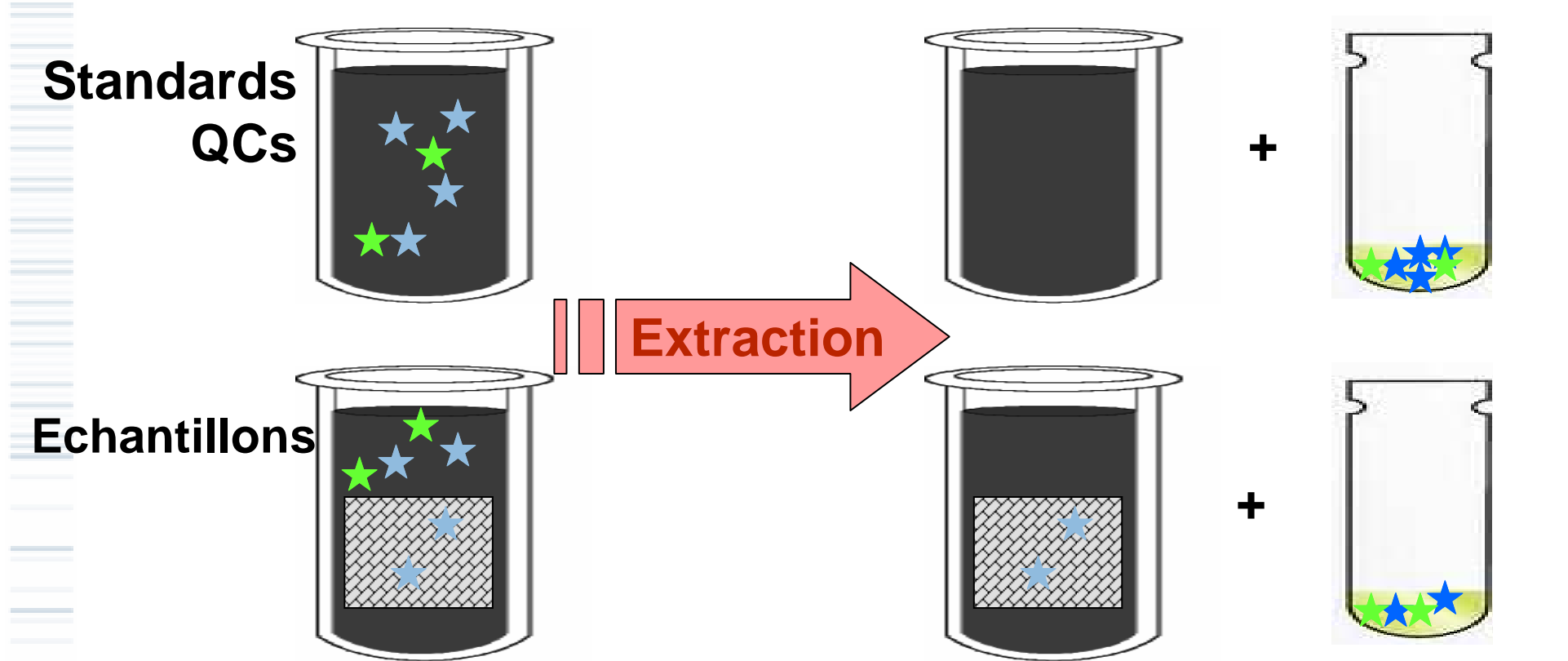
- Détermination de EB103 dans les homogénats de faeces lors de l'établissement du **profil métabolique**

EB103 excretion in faeces



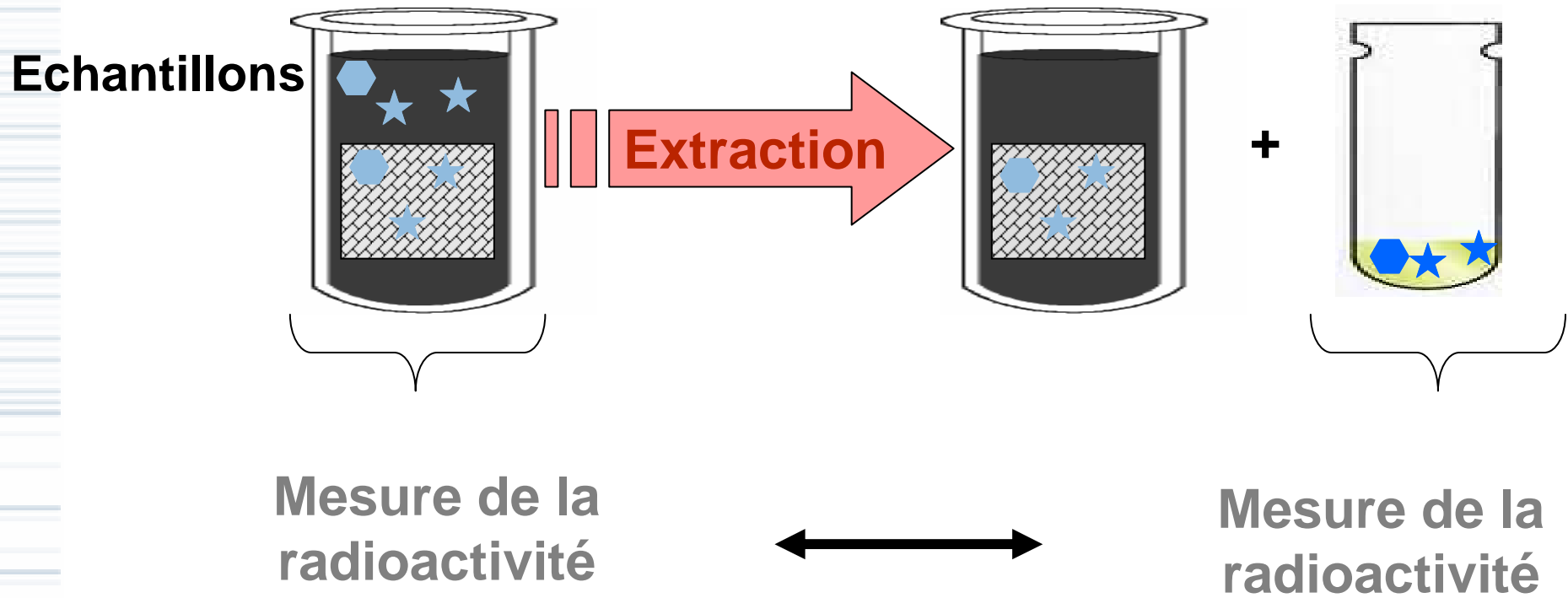
Exemple: EB103

Différence de rendement d'extraction (inhomogénéité)



Exemple: EB103

Différence de rendement d'extraction (inhomogénéité)



Nouvelles exigences, May 2006



→ La méthode doit être adaptée à
l'analyse des échantillons
« réels » (**incurred samples**)

Conséquences

1. réanalyse d'échantillons « réels »



- Démontrer la reproductibilité de la méthode avec des échantillons réels en effectuant des ré-analyses
- **Les résultats font partie intégrantes de la validation, et doivent être ajoutés au rapport de validation**

Conséquences

2. identification des métabolites



- **Rechercher et identifier les métabolites très tôt dans le développement des médicaments**
- **Les validations peuvent être “minimales” lors du développement préclinique, mais toutes les exigences réglementaires bioanalytiques doivent être suivies lors des phases cliniques pour la mesure des métabolites.**
 - ▶ **Problème d’une méthode “préliminaire”!**

Conséquences 3. Courbe de calibration et contrôles de qualité (QCs)



- Adapter la courbe de calibration et les contrôles de qualité aux concentrations des échantillons réels
 - ▶ pour un intervalle de valeurs plus étroit, valider une nouvelle courbe de calibration et de nouveaux QCs
 - ▶ stopper l'analyse en cours si nécessaire

Conséquences

4. Effet matrice

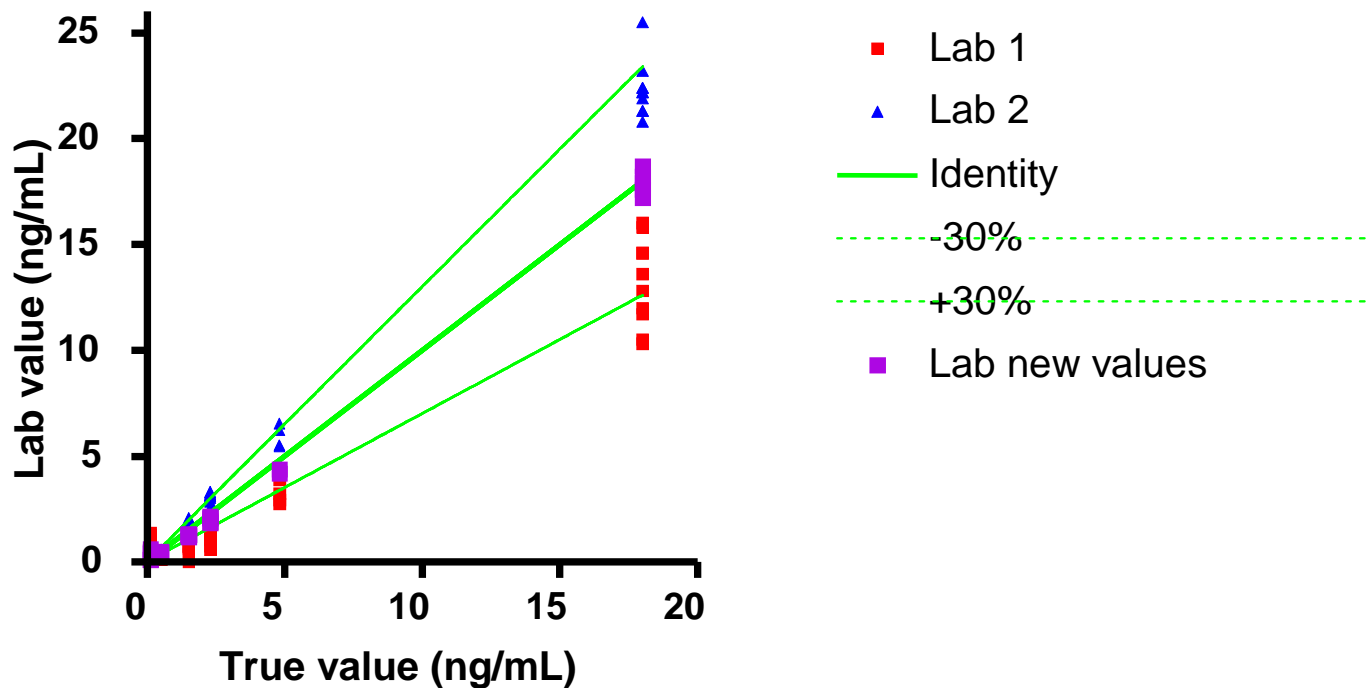


- Afin de diminuer les effets « matrices », utiliser un isotope stable comme standard interne, et ce dès le début du développement.

Exemple: EB102 : Standards internes deutérés



EB102

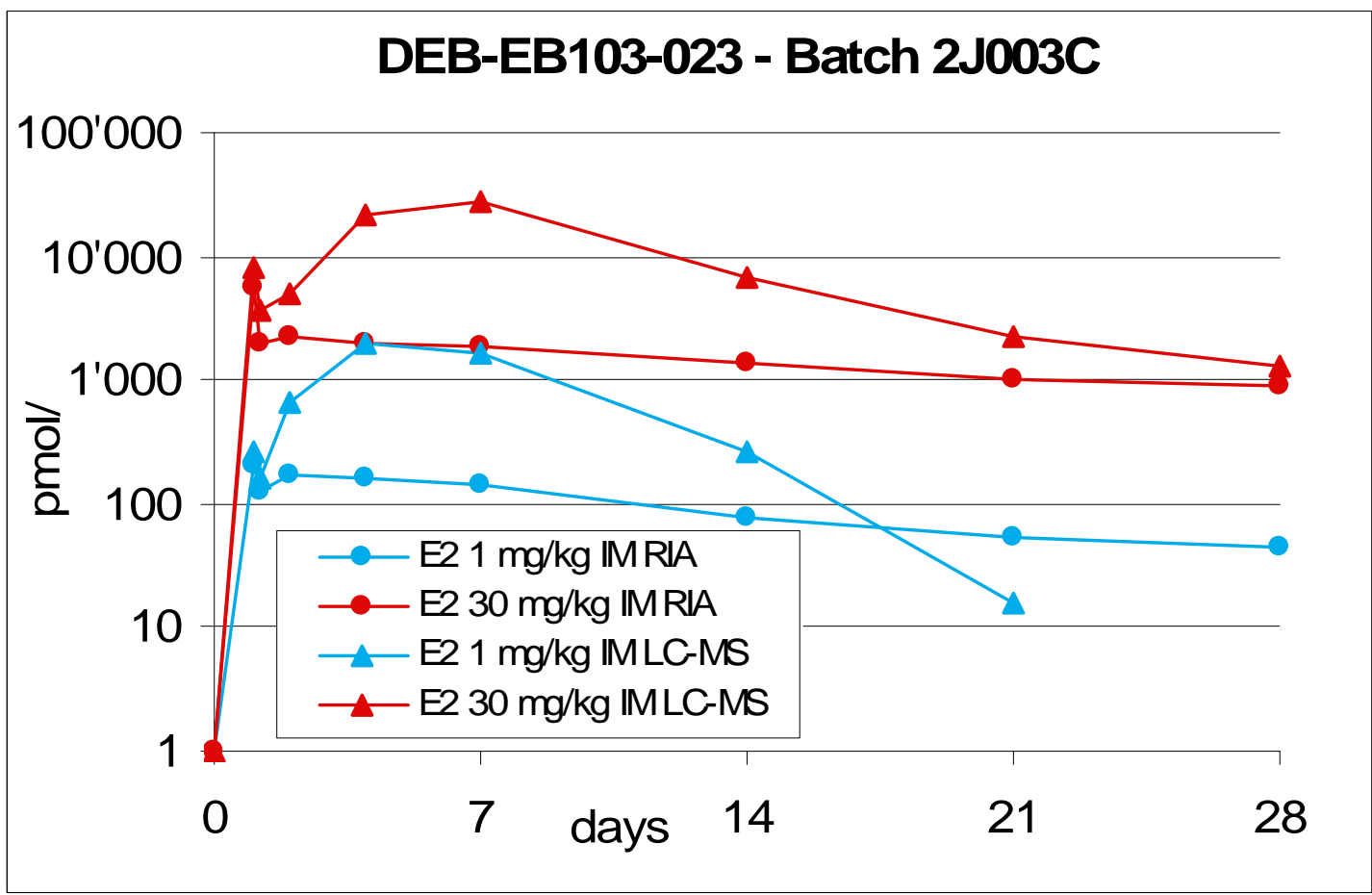


Nouvelles exigences, May 2006



→ la concentration exacte du composé dans les échantillons réels reste difficile à certifier avec une seule méthode de dosage

Exemple: le EB103



Conclusions



- Le développement et la validation de méthodes bioanalytiques n'est pas une tâche triviale.
- Une faille importante existe entre les résultats des méthodes validées selon les bonnes pratiques actuelles, dont le plan de validation se base sur l'analyse d'échantillons enrichis, et les résultats des échantillons réels, en raison de **la nature complexe des matrices.**