

BIOEQUIVALENCE – ENJEUX ET DEFIS
Congrès International du Laboratoire National du
Contrôle des Médicaments
Tunis 5-6 avril 2019

LA BIOANALYSE

A. NICOLAS, PU-PH honoraire, Université de Lorraine, F-NANCY
amh.nicolas@gmail.com

CONTEXTE

- **Garantir la haute qualité des méthodes de bioanalyse est d'importance critique.**
- **Il est essentiel que les méthodes bioanalytiques utilisées dans les études de bioéquivalence soient :**
 - **bien caractérisées,**
 - **validées,**
 - **documentées**

afin d'assurer la fiabilité des données à l'appui des décisions réglementaires.

BUT DU DEVELOPPEMENT DE METHODES

- **Définir la conception, les conditions opératoires, les limitations et l'adéquation de la méthode aux fins prévues.**
- **S'assurer que la méthode est optimisée pour la validation.**
- **Une fois la méthode développée et optimisée, la validation bioanalytique prouve que la méthode convient à l'analyse des échantillons de l'étude.**

LES ETAPES

- Nature du milieu biologique et mode de prélèvement de l'échantillon
- Sélection des analytes
- Choix de la méthode d'analyse : CL-SM/SM ou immunoanalyse
- Dans le cas de la **CL-SM/SM** :
 - traitement de l'échantillon,
 - maîtrise de l'effet de matrice,
 - choix de l'étalon interne.

ECHANTILLON : NATURE ET MODE DE PRELEVEMENT

- Tous les référentiels (FDA, Europe, ICH) préconisent de travailler sur des échantillons de **plasma** issu du **sang total**.
- Dans des cas particuliers et justifiés, des **prélèvements urinaires** peuvent être effectués.
- Les anticoagulants peuvent influencer la réponse en ESI/SM par **suppression/augmentation** de l'ionisation des analytes.
- **Héparine** semble préférable à l'EDTA et au citrate.

SELECTION DE(S) ANALYTE(S)(1/2)

- Les entités à mesurer sont soit :
 - la **substance active**,
 - ou la **partie active de la molécule parent**,
 - ou le **métabolite actif**, si approprié.
- Dans les études de bioéquivalence, il est préférable de déterminer la **substance active ou la partie active** plutôt que le(s) **métabolite(s)** car le **profil concentration/temps** est plus sensible au **changement de performance de la forme pharmaceutique** que dans le cas d'un métabolite.

SELECTION DE(S) ANALYTE(S) (2/2)

- La détermination d'un métabolite actif ou inactif peut être nécessaire en cas de :
 - **concentration de la substance active trop faible** pour être déterminée avec précision dans la matrice biologique,
 - **limitations** de la méthode analytique,
 - **instabilité** de la substance active,
 - substance active avec **faible demi-vie**,
 - **pro-drogue**.
- **Cas des énantiomères**
 - En règle générale, des **méthodes achirales** sont utilisées dans les études de bioéquivalence.

CHOIX DE LA METHODE

- **CL-SM/SM**

- Nécessite :
 - une phase pré-analytique,
 - le choix d'un **étalon interne**,
 - un **traitement d'échantillon**.

- **IMMUNOANALYSE**

- **Analyse directe** sans traitement d'échantillon
- Nature du signal **fonction du marqueur** utilisé :
radioactivité, fluorescence, fluorescence résolue
dans le temps, chimiluminescence,
électroluminescence, ...

COMPARAISON

CHROMATOGRAPHIE/IMMUNOANALYSE

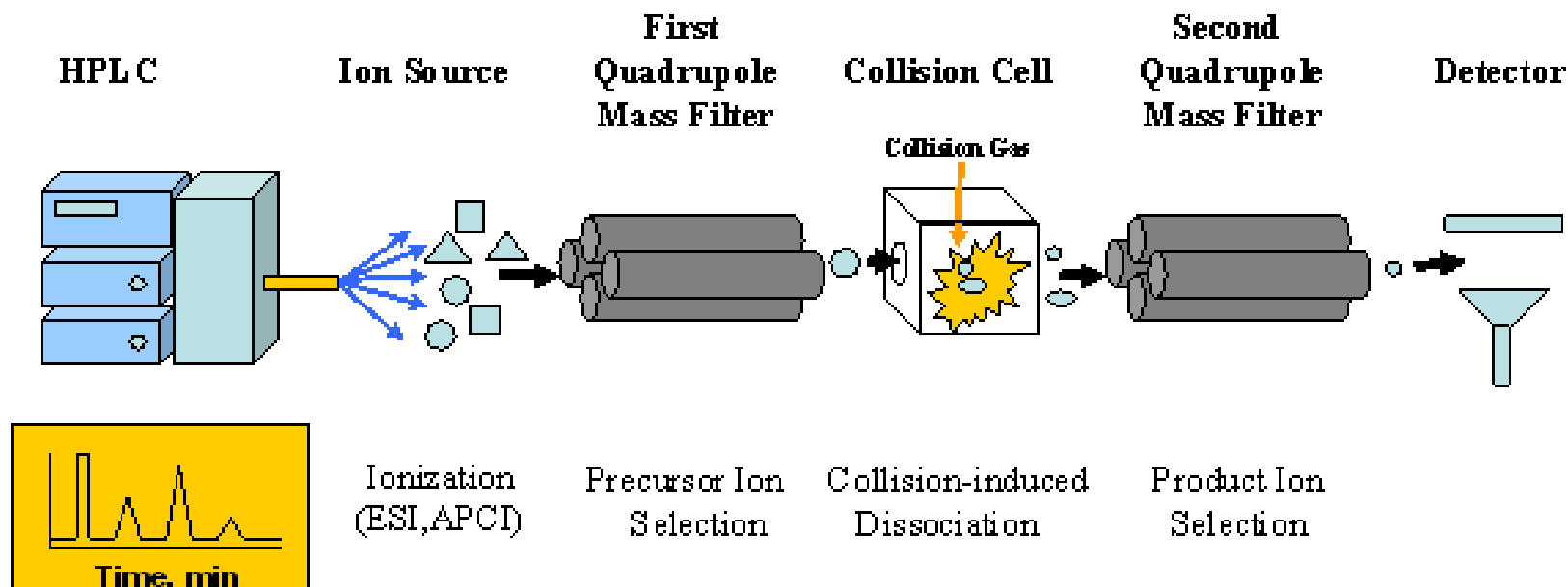
	CHROMATOGRAPHIE	IMMUNOANALYSE
Principe	Propriétés physico-chimiques de l'analyte	Réaction Ag-Ac
Réactifs	Bien caractérisés et disponibles	Unique et peu disponible
Analytes	Petites molécules	Petites et macro-molécules
Traitement échantillon	OUI	NON
Etalon interne	OUI	NON
Fonction d'étalonnage	Linéaire	Non linéaire
Milieu réactionnel	Hydro- organiques	Aqueux
Durée du développement	Semaines	Mois (anticorps)
Précision inter-dosage	max 15 % (ICH M10)	max 20 % (ICH M10)
Domaine d'analyse	Important	Limité
Coût de l'équipement	Elevé	Peu élevé
Débit d'analyse	Bon	Excellent

CLHP ou UHPLC COUPLÉE À UNE DÉTECTION PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE (LC-SM/SM)



CL-SM/SM : SCHEMA GENERAL

LC/MS/MS法による分析の原理



PHASE PRE-ANALYTIQUE EN CL-SM/SM (1/3)

- **Avant prélèvement sanguin**
 - **Variation** de certains paramètres en fonction du **moment de la journée** (lipides fonction de la nature du repas ingéré)
- **Sélection des tubes de prélèvement et choix de l'anticoagulant** : EDTA, héparine, citrate, fluorure
 - **Faire pré-étude** car le **type de plastique** et les **additifs** utilisés dont la pureté peut varier peuvent être à l'origine d'une **augmentation du bruit** et d'une **modification de l'ionisation**.

PHASE PRE-ANALYTIQUE EN CL-SM/SM (2/3)

- **Effet de l'hémolyse**
 - Risque principal lors du prélèvement
 - Libération de **composés intracellulaires**
- **Traitement des tubes après prélèvement**
 - **Température** avant centrifugation (eau glacée max 2 h)
 - **Centrifugation** : vitesse, température (4°C idéal)

PHASE PRE-ANALYTIQUE EN CL-SM/SM (3/3)

- **Conservation des échantillons de plasma/stabilité des analytes**
 - Stabilisation des analytes par **ajustement de pH** ou **inhibiteurs** de réactions enzymatiques (estérases)
 - **Température** : ambiante, réfrigérateur, congélateur (**-80°C est la condition préférable**)
 - **Eviter les cycles congélation/décongélation**

CHOIX DE L'ETALON INTERNE (EI)

- Utilisation d'un **étalon interne marqué par isotope stable** (^2H , ^{13}C , ^{15}N) si disponible (synthèse pas toujours possible)
- Supposé **corriger la variabilité** durant les étapes d'extraction et d'analyse, notamment le **degré d'ionisation** car il co-élue avec l'analyte d'intérêt
- En principe, **le rapport surfaces pic analyte/surface pic EI n'est pas affecté** par les variations et rend la méthode **exacte, précise et robuste**
- **Ne mime pas toujours le comportement de l'analyte** dans les méthodes de CL-SM/SM, notamment durant l'étape d'ionisation

TRAITEMENT D'ECHANTILLON



TRAITEMENT DE L'ÉCHANTILLON (1/4)

- **Etape limitante** en terme de rapidité d'analyse
- Partie de la méthode analytique la plus **sujette aux erreurs**
- Actuellement, existent des efforts pour améliorer la préparation d'échantillon **en diminuant** :
 - **le temps** de préparation,
 - **le coût** de l'analyse,
 - **le volume** d'échantillon et la consommation de solvant,
 - **le nombre d'étapes** et en adaptant la **totalité du traitement à l'automatisation.**

TRAITEMENT DE L'ÉCHANTILLON (2/4)

- Les **échantillons biologiques** (sang total, plasma, sérum, urines, salive,...) **ne sont pas adaptés à une analyse directe** en CL-SM/SM du fait de leur complexité et de la présence de **nombreux composés interférents**
- Les **analytes cibles** sont souvent en **très faible concentration** par rapport aux composés interférents
- Les **sels et les phospholipides** sont responsables d'effet de matrice en CL-SM/SM

TRAITEMENT DE L'ÉCHANTILLON (3/4)

- Les **protéines** s'adsorbent sur les **phases stationnaires** de façon plus ou moins irréversible et sont à l'origine de **perte d'efficacité**, **d'augmentation de pression** et de **colmatage** lors de l'étape de **chromatographie**.
- Pour prévenir ces problèmes, la **préparation d'échantillon** est **obligatoire** dans les **méthodes de bioanalyse par CL-SM/SM**.

TRAITEMENT DE L'ÉCHANTILLON (4/4)

- Une étape de préparation bien conçue peut conduire à :
 - **isoler, purifier et concentrer** les analytes d'intérêt,
 - **éliminer** des composés interférents.
- Le traitement d'échantillon influence toutes les étapes ultérieures de l'analyse avec un **impact crucial sur la précision et l'exactitude des résultats finaux**.
- Les méthodes conventionnelles sont :
 - **précipitation des protéines (PP), extraction liquide-liquide (ELL) et extraction liquide-solide (ELS).**

PRÉCIPITATION DES PROTÉINES

- Généralement suivie d'une étape de **centrifugation**
- Très largement utilisée bien que **peu sélective** et **peu efficace en terme de purification** de l'échantillon
- **Avantages**
 - Rapide, facile à optimiser, nombre minimum d'étapes, ne nécessite pas d'équipements spéciaux
- **Inconvénients**
 - Peut compromettre la sensibilité et être à l'origine d'effets de matrice
 - Pas automatisable
 - Evolution plutôt vers ELS

EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE (1/2)

- Basée sur le **transfert de l'analyte de la phase aqueuse de l'échantillon vers la phase organique d'un solvant non miscible**
- **Quelques avantages**
 - Élimination des **substances ionisées et des sels non extractibles**
 - Pas d'équipement ni de compétences particulières

EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE (2/2)

- **Beaucoup d'inconvénients**
 - **Consommation de solvants organiques potentiellement toxiques**
 - **Pas adaptée à l'extraction de composés polaires et hydrophiles**
 - **Formation possible d'émulsion**
 - **Etape d'évaporation souvent nécessaire pour concentrer les analytes avant reprise dans la phase mobile pour injection compatible avec système chromatographique**
- **Amélioration possible : miniaturisation**
 - **Echantillon (50-100 μL) Solvant (600-2 000 μL)**

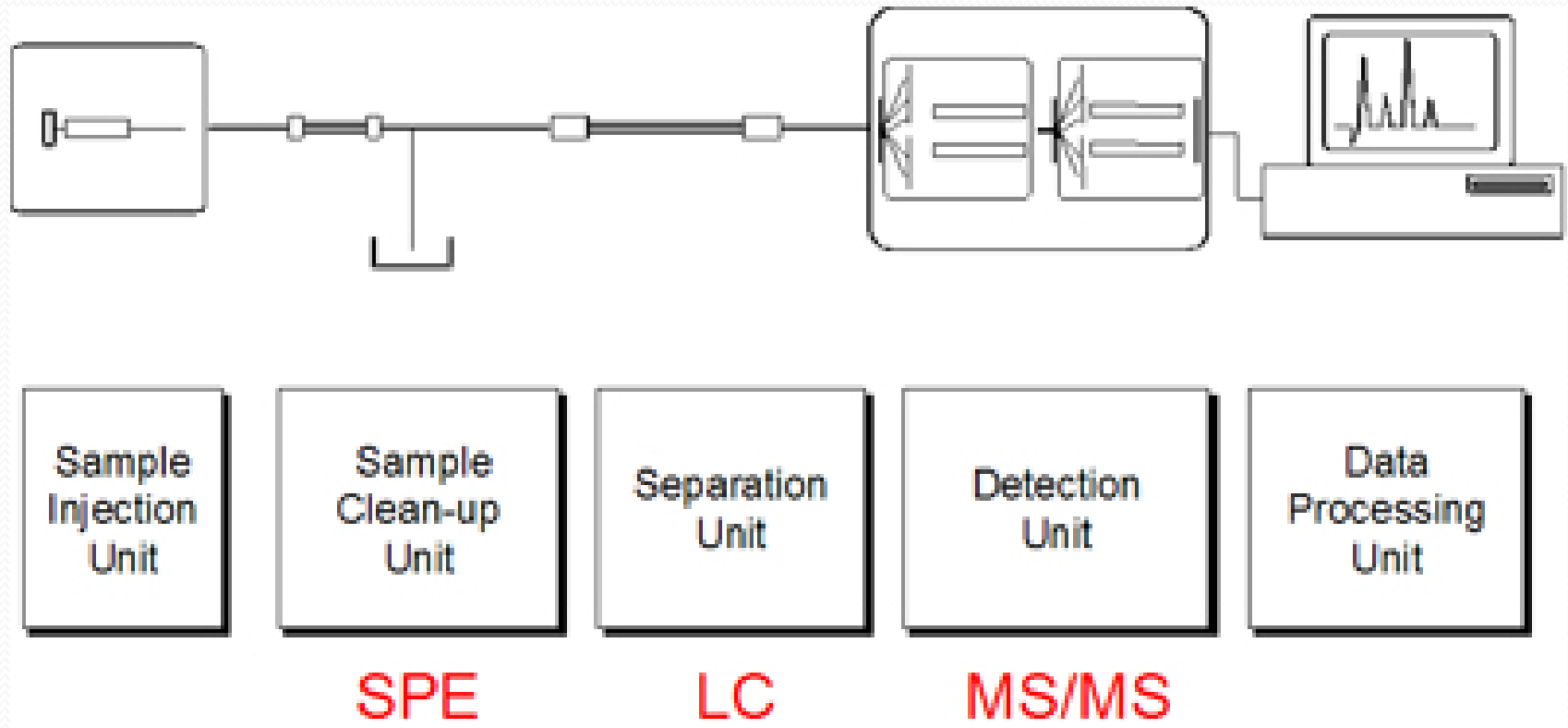
EXTRACTION LIQUIDE-SOLIDE (1/2)

- Technique qui recueille une **opinion** très favorable
- Elle permet un **nettoyage** de l'échantillon et une **pré-concentration** des analytes
- L'extraction est basée sur un **principe de partage** entre une **phase solide** (cartouches, disques, microplaques) et une **phase liquide** (échantillon) :
 - **procédé multi-étapes** (chargement, lavage(s), élution) relativement coûteux,
 - **évolution vers miniaturisation et automatisa-**

EXTRACTION LIQUIDE-SOLIDE (2/2)

- **Point clé : sélection de la phase solide sur des principes analogues à la chromatographie.** Elle conditionne :
 - la sélectivité,
 - la capacité de charge,
 - étapes de lavage possible,
 - faible consommation de solvants organiques,
 - bon taux de récupération.

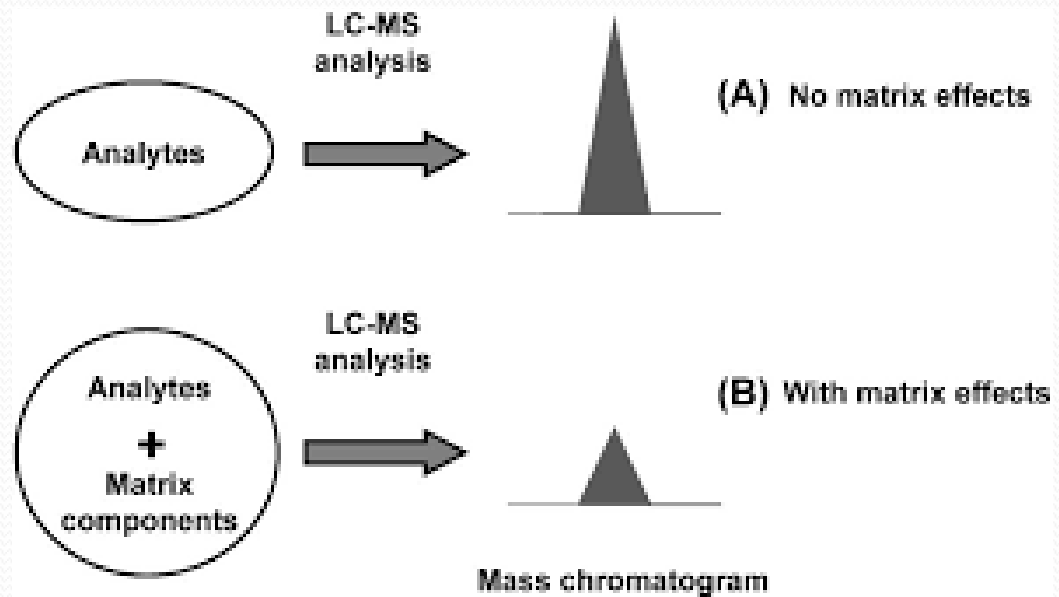
TRAITEMENT EN LIGNE (1/2)



TRAITEMENT EN LIGNE (2/2)

- Le traitement en ligne :
 - **diminue** les manipulations,
 - permet des facteurs de **pré-concentration** élevés,
 - présente des **taux de récupération** importants et **rapidité d'analyse**,
 - peut utiliser des **stations de travail entièrement automatisées** avec des microplaques à 96 ou 384 puits
- Couplage en ligne avec CL-SM/SM a progressé au cours des dernières années.

EFFET DE MATRICE



CL-SM/SM ET EFFET DE MATRICE

- **CL-SM/SM** : méthode sensible, fiable et rapide
- Principale limitation : **suppression d'ionisation par effet de matrice**
 - **Co-élution** de substances de la matrice avec l'analyte conduisant à une **perturbation du processus d'ionisation** et à une **variabilité du signal**
 - **Effets non reproductibles** car variabilité de la matrice
 - **Perturbation de l'exactitude et de la précision**

EFFET DE MATRICE : FACTEURS

- **Lipémie** plus ou moins importante
- **Nature de l'anticoagulant** : K_3EDTA , citrate de sodium, héparinate de sodium, héparinate de lithium
- **Milieu biologique** : plasma, urine, salive
- **Solvants organiques** : préparation d'échantillon, phase mobile (méthanol)
- **Polarité de l'ionisation** : positive ou négative
 - Détection en mode positif est plus sensible aux effets de matrice
- **Méthode d'ionisation (ESI vs APCI)** : APCI donne moins de phénomène de suppression d'ions que ESI

EFFET DE MATRICE ET PHOSPHOLIPIDES

- Essentiellement du à la présence de **phospholipides ionisés** (groupements phosphates)
- **Elimination des phospholipides endogènes** est très importante lors de la préparation de l'échantillon
- Perturbent le **phénomène d'ionisation** en ESI-SM (spectrométrie de masse avec ionisation par electrospray)

EFFET DE MATRICE : TRAITEMENT D'ÉCHANTILLON

- **PRECIPITATION PAR SOLVANT**

- Méthanol, acétonitrile
- Effet de matrice **le plus important**

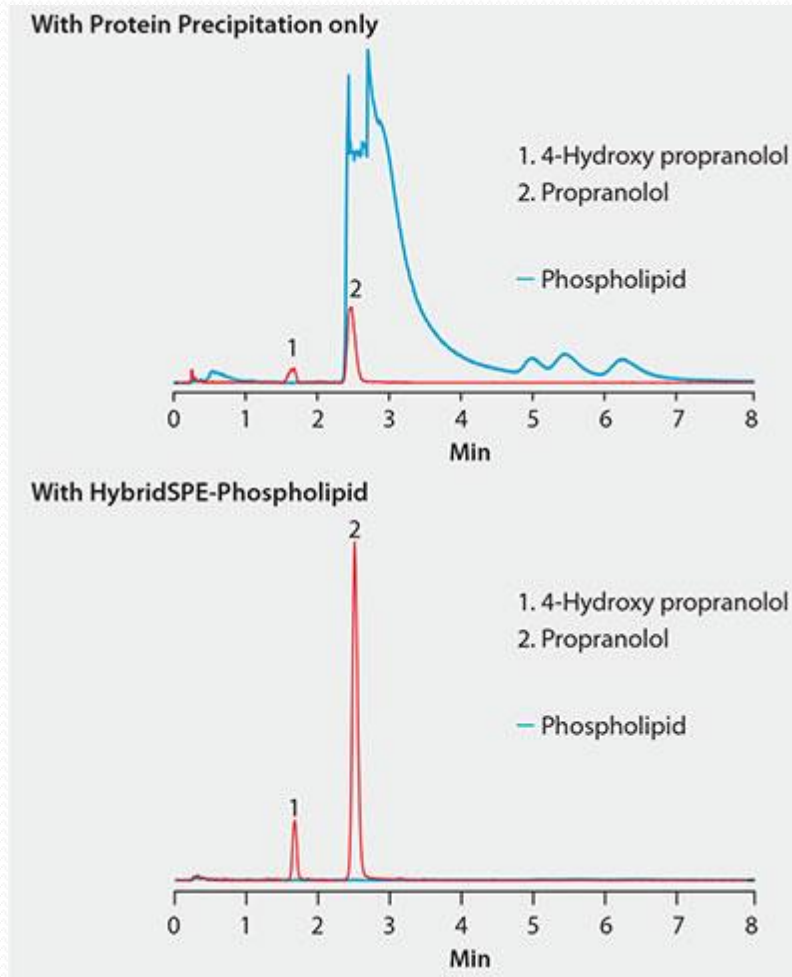
- **EXTRACTION L/L**

- **Solvants préférés** : chlorure de n-butyle, methyl-tert-butyl ether (MTBE)
- Effet de matrice **moindre**

- **EXTRACTION L/S**

- Plusieurs chimies disponibles : échange de cations fort, échange d'anions fort, mode mixte
- **Effet de matrice le plus faible**, échantillon « propre », élimination pratiquement totale des phospholipides

<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/bioanalytical/sample-prep-overcome-matrix-effect.html>



EFFET DE MATRICE : CLHP vs UHPLC

- Des études comparatives ont montré que l'effet de matrice était notablement **réduit en UHPLC** par rapport en CLHP
- **UHPLC** : pouvoir séparateur plus important, pics plus fins
- **Les substances interférentes co-éluent moins avec les analytes**

EFFET DE MATRICE ET ETALON INTERNE

- EI et analyte peuvent se comporter différemment durant l'étape d'ionisation.
- Phénomène plus fréquent avec les EI deutérés (doublement de la masse de l'atome d'hydrogène) qu'avec les EI marqués par ^{13}C ou ^{15}N .
- Par effet isotopique, une résolution partielle peut exister entre les pics de l'analyte et de l'EI deutéré d'où une correction imparfaite de l'effet de matrice et des problèmes de robustesse

IMMUNOANALYSE



IMMUNOANALYSE (1/2)

- Les immunodosages sont des méthodes bioanalytiques permettant la quantification des analytes basée sur une **réaction Ag/Ac**
- Le signal est généré par un marquage de l'Ac : **fluorescence, luminescence, radioactivité**
- **Pas de préparation d'échantillon** : analyse directe
- **Fonction de réponse particulière** : transformation mathématique nécessaire

IMMUNOANALYSE (2/2)

- **Questions analytiques spécifiques**
 - **Réactif critique** : l'anticorps et son mode de production. S'assurer de la constance de la réponse lors des changements de lots.
 - **Fonction de réponse** : existence possible d'un **effet crochet** à forte concentration
 - **Spécificité** est un point critique (absence d'extraction préalable)
 - Possibilité de **réactions croisées** avec **métabolites** et **analogues structuraux**
 - **Existence de kits commercialisés pour certains analytes**



VALIDATION

VALIDATION - REFERENTIELS

- **2001** : premier texte de la FDA « Guidance for Industry : Bioanalytical Method Validation »
- **2011** : EMA « Guideline on Bioanalytical Method Validation »
- **2018** : FDA Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry
- **2019** : ICH Harmonised Guideline : **Bioanalytical Method Validation M10**. Draft under public consultation. Step 2. **Adoption Step 4 prévue fin 2019**

NOUVEAU TEXTE : ICH M10

- Les recommandations de la FDA et de l'EMA sur la validation des méthodes bioanalytiques sont **similaires mais pas identiques**.
- **Plusieurs différences** existent et constituent un **obstacle** à l'utilisation des données bioanalytiques dans le développement mondial de médicaments.
- Le **document ICH M10** doit permettre d'éviter de conduire des essais inutiles pour concilier plusieurs lignes directrices

ICH M10 (Draft). VALIDATION

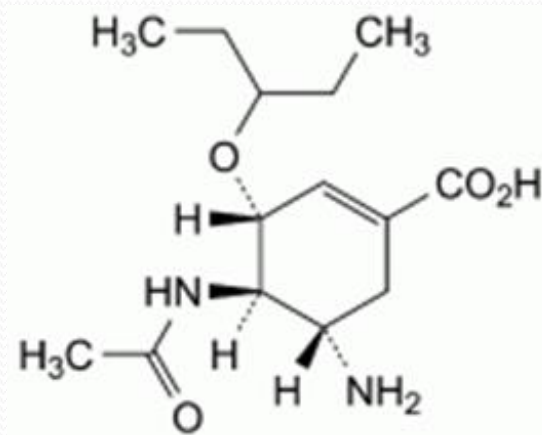
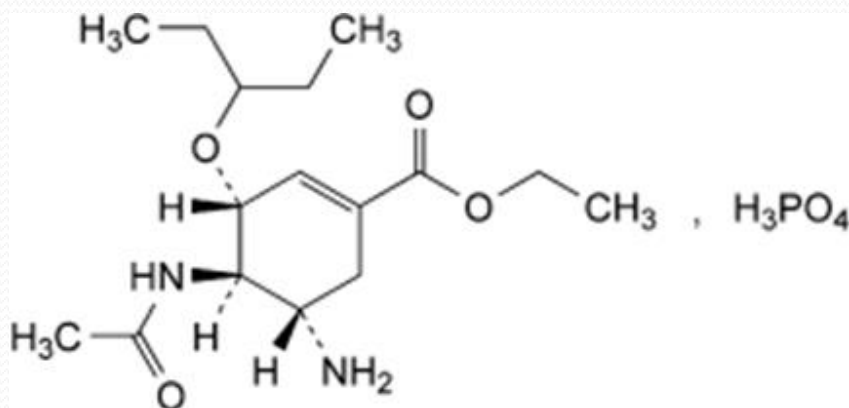
CHROMATOGRAPHIE		IMMUNOANALYSE	
3.2.1	Sélectivité	4.2.1	Spécificité
3.2.2	Spécificité	4.2.2	Sélectivité
3.2.3	Effet de matrice	4.2.3	Courbe d'étalonnage et domaine
3.2.4	Courbe d'étalonnage et domaine	4.2.4	Exactitude et précision
3.2.5	Exactitude et précision	4.2.5	Contamination inter-échantillon
3.2.6	Contamination inter-échantillon	4.2.6	Linéarité et effet crochet
3.2.7	Dilution	4.2.7	Stabilité
3.2.8	Stabilité		
3.2.9	Reproductibilité (Réinjection)		

ICH M10 – CHAMP D'APPLICATION

- ICH M10 s'applique à la **validation de méthodes bioanalytiques** utilisées pour mesurer les concentrations de **médicaments chimiques et biologiques** et leur(s) **métabolite(s)** dans des **échantillons biologiques** (p. ex., sang, plasma, sérum, autres liquides organiques ou tissus).
- L'information contenue dans ICH M10 s'applique à **l'analyse quantitative par liaison de ligand (LBA)** et par des **méthodes chromatographiques** telles que la chromatographie liquide (CL) ou gazeuse chromatographie (CG) généralement couplées à une **détection par spectrométrie de masse (SM)**.

SIMULTANEOUS QUANTIFICATION OF PRODRUG OSELTAMIVIR AND ITS METABOLITE OSELTAMIVIR CARBOXYLATE IN HUMAN PLASMA BY LC-MS/MS TO SUPPORT BIOEQUIVALENCE STUDY.

GUPTA A. et coll, J. Pharm. Analysis, 2013, 3 149-160



OSELTAMIVIR/OSELTAMIVIR CARBOXYLATE PAR CL-SM/SM (1/2)

- **Prélèvement**

- K₃EDTA; tubes placés à T < 10°C
- Plasma
- Conservation : - 70°C jusqu'à analyse

- **Traitement échantillon**

- 200 µL plasma + 50 µL EI + 500 µL acide formique 1 % dans eau
- Centrifugation : 3200 g, 2 min, 10°C
- SPE sur cartouches Orochem DVB-LP
- Conditionnement, lavage, **élution analytes** + EI par 200 µL mélange CH₃CN:eau, 70:30, V/V

- **Injection** : 10 µL

OSELTAMIVIR/OSELTAMIVIR CARBOXYLATE PAR CL-SM/SM (2/2)

- **Colonne** : Symmetry C₁₈ 100 mm x 4,6 mm ; 5 µm
 - Température : 40°C
- **Phase mobile** : formiate d'ammonium 10 mM - acétonitrile 30:70, v/v
- **Débit** : 1,0 mL/min
- **Temps d'analyse** : 2 min
- **Temps de rétention** : OST : 1,56 min, OSTC : 1,11 min
- **Détection** : triple quadrupole, ESI positif, oseltamivir, oseltamivir-d₅, oseltamivir carboxylate, oseltamivir carboxylate C₁₃-d₃

OSELTAMIVIR/OSELTAMIVIR CARBOXYLATE PAR CL-SM/SM - VALIDATION

- **Sélectivité** : pas de composés interférents
- **Linéarité** : $r^2 > 0,997$
 - **OST** : 0,5-200 ng/mL **OSTC** : 2,0- 800 ng/mL
- **LOD**
 - **OST** : 0,15 ng/mL **OSTC** : 0,62 ng/mL
- **Précision**
 - **OST** : 2,42 à 5,17 % ; **OSTC** : 1,87 à 4,57 %
- **Exactitude**
 - **OST** : 100,2 à 103,8 %; **OSTC** : 94,5 à 102,5 %
- **Taux de récupération** : > 90,0 % pour analytes et EI



IMMUNOANALYSE

BIOEQUIVALENCE/IMMUNOANALYSE

- Nombreuses publications sur **hormones thyroïdiennes**
- **Levothyroxine sodique** comprimés et solutions orales
- Utilisation de **kits commerciaux** : marqueurs radioactifs et chimiluminescents
- **Publication la plus récente**
 - Chattanachotikul W., Kongpatttanakul S., Vannasaeng S., Sathirakul K., Chatsiricharoenkul S.
 - Bioequivalence Study of 100 mcg Levothyroxine Sodium Tablets in Patients Who Have Hypothyroidism with Euthyroid in Steady State
 - Siriraj Med. J. **2015**,67, 128-133



CONCLUSION

CL-SM/SM - MINIATURISATION - AUTOMATISATION

- **Méthode CL-SM/SM sont les plus utilisées**
- **Traitement d'échantillon manuel**
 - long, laborieux,
 - diminuer les volumes de sang prélevé,
 - favoriser l'extraction L/S pour diminuer l'effet de matrice.
- **Evoluer vers l'automatisation**
 - débit élevé,
 - diminution de l'imprécision,
 - faible production de déchets de solvants dangereux et de matières biologiques à risque.

CHROMATOGRAPHIE

- **Evoluer vers les méthodes chromatographiques rapides**
 - Colonnes courtes,
 - Nouvelles phases stationnaires : **particules superficiellement poreuses**
- **Tenir compte des nouvelles exigences : intégrité des données**
- **Valider selon ICHM10**



REFERENCES

DI GIROLAMO G.; KELLER G.A.; R. DE LOS SANTOS A.; SCHERE D.; GONZALEZ C.D.
Bioequivalence of Two Levothyroxine Tablet Formulations Without and With
Mathematical Adjustment for Basal Thyroxine Levels in Healthy Argentinian Volunteers: A
Single-Dose, Randomized, Open-Label, Crossover Study.

Clin Ther. 2008, 30(11), 2015-23.

FDA. GUIDANCE FOR INDUSTRY

Levothyroxine Sodium Tablets — In Vivo Pharmacokinetic and Bioavailability Studies and
In Vitro Dissolution Testing december 2000

GHOSH C., CHAKRABORTY B.

LC-MS methods for regulated bioequivalence studies : do we need to worry about matrix
effects ?

Open Access Scientific Reports, 2012, 1, issue 9 doi:10.4172/scientificreports.424

**Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols, and
Regulations**

Wenkui Li (Editor), Jie Zhang (Editor), Francis L. S. Tse (Editor)

ISBN: 978-1-118-15924-8 December 2013 704 Pages

ICH M10. Bioanalytical Method Validation. Draft version. 26 february 2019. www.ich.org

JALALI R.K., RASAILY D.

Generic drug and bioequivalence studies.

Pharmaceutical Medicine and Translational clinical research, 2018, 327-339

KAZA M., KARAZNIEWICZ-LADA M., KOSICKA K., SIEMIATKOWSKA A., RUDZKI P.J.

Bioanalytical method validation: new FDA guidance vs. EMA guideline. Better or worse ?

J. Pharm. Biomed. Analysis, 2019, 165, 381-385

LEGGIO G.M., INCOGNITO T., PRIVITERA G., MARANO M.R. DRAGO F.

Comparative bioavailability of different formulations of levothyroxine and liothyronine in healthy volunteers.

J Endocrinol Invest.2006 Dec;29(11):RC35-8.

McGILVERAY I.J.

Bioavailability and Bioequivalence Studies

In **International Pharmaceutical Product Registration**, CRC Press, 2016, Chapter 31, 490-519

NOVAKOVA L.

Advances in sample preparation for biological fluids.

LC-GC, 2016, 29, 10, 9-15

YANNOVITS N., ZINTZARAS E., POULI A. ET AL.

A bioequivalence study of Levothyroxine tablets versus an oral Levothyroxine solution in healthy volunteers.

European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics , 2006, 31, 73-78

YIN P., LEHMANN R., XU G.

Effects of pre-analytical processes on blood samples used in metabolomics studies.

Anal. Bioanal. Chem, 2015, 407, 4879-4892