

Cycle de vie des méthodes, vers une maîtrise intégrée des performances quantitatives

**Cédric Hubert^a, Pierre Lebrun^b,
Bruno Boulanger^b, Philippe Hubert^a**

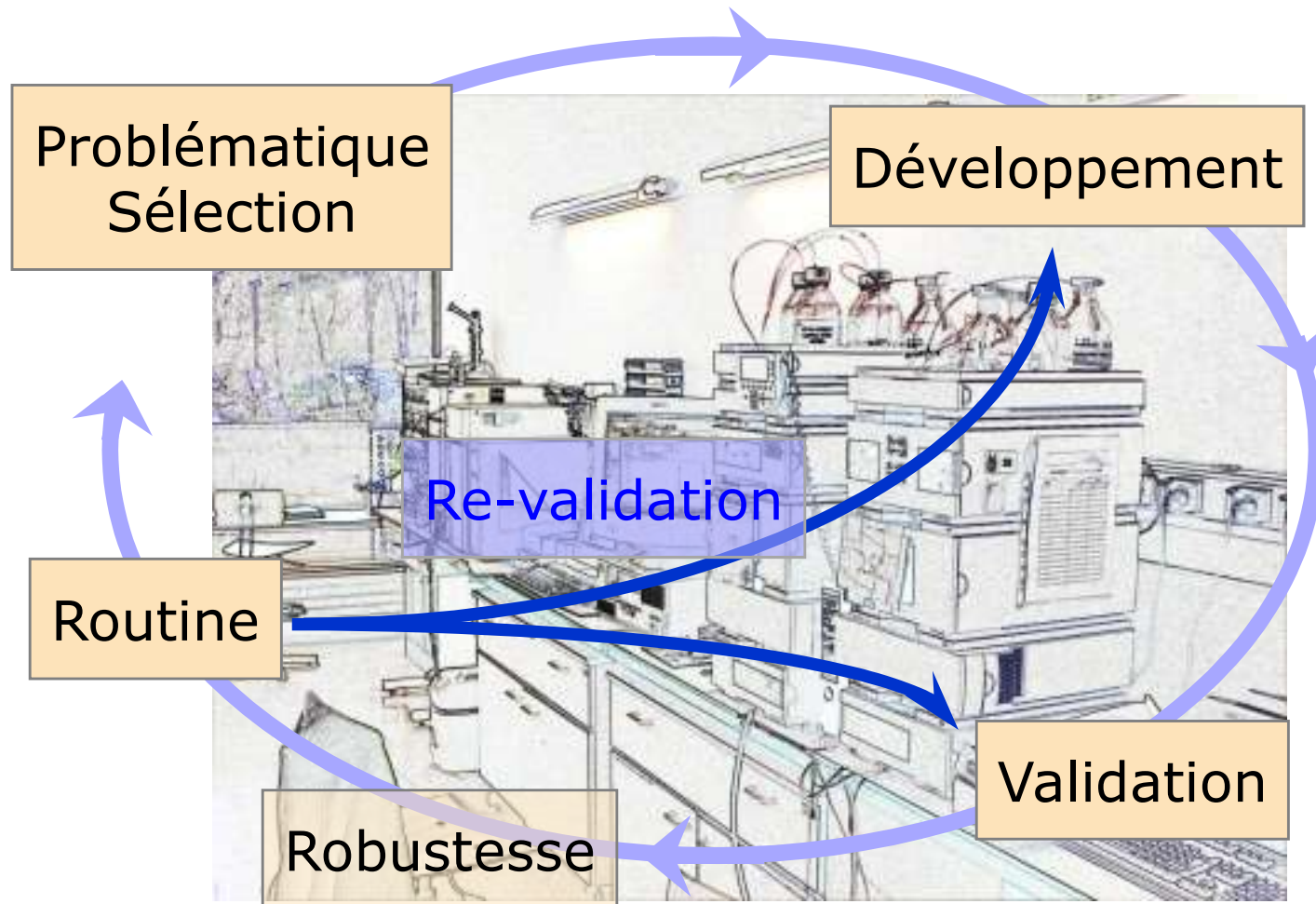
^a Laboratory of Pharmaceutical Analytical Chemistry, CIRM,
Department of Pharmacy, University of Liege (ULg), Liège, Belgium

^b Arlanda S.A., Saint-Georges, Belgium

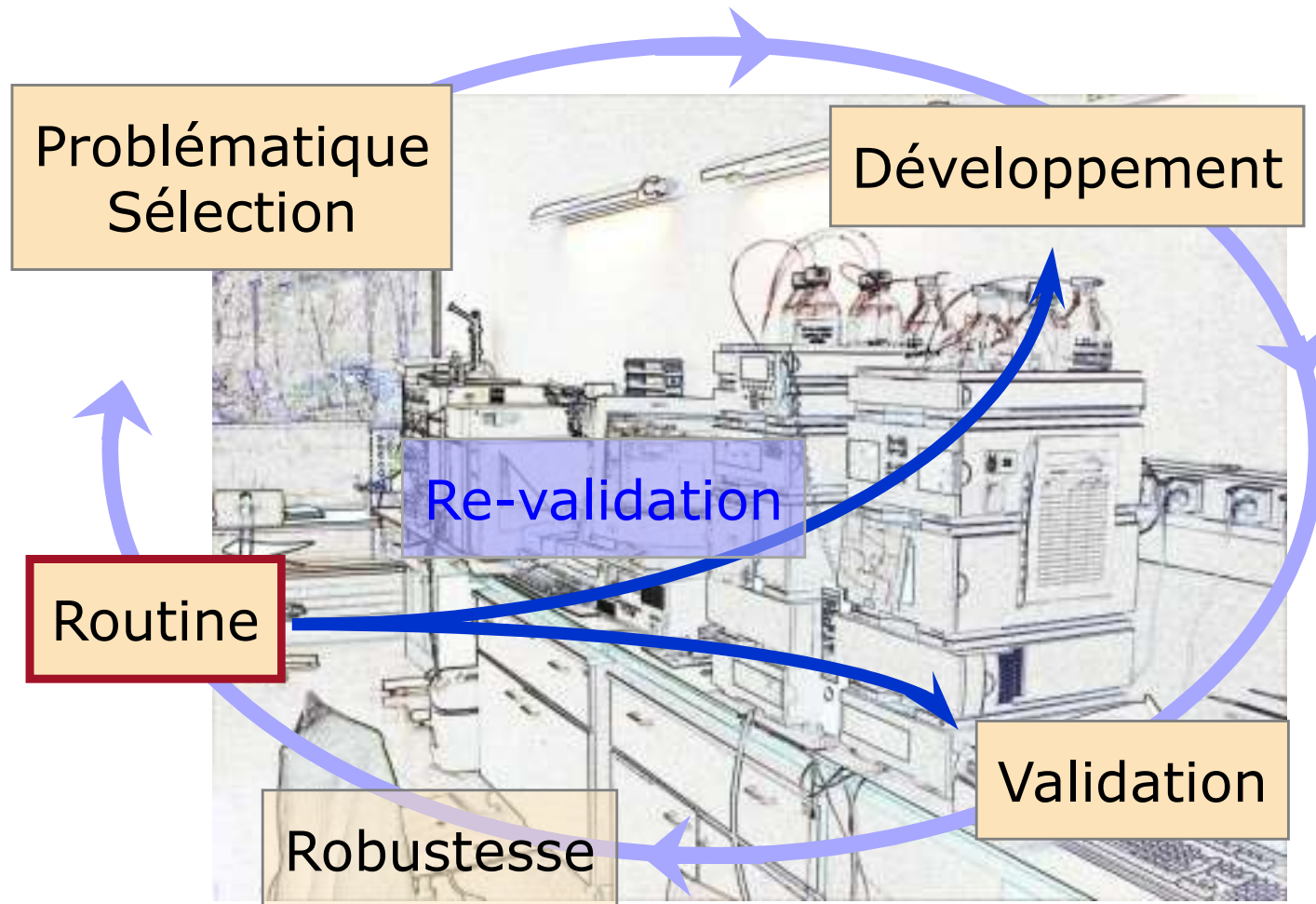
1. Cycle de vie des méthodes analytiques
2. Développement et optimisation
Approche Analytical Quality-by-Design (AQbD)
3. Validation
Profil d'exactitude
Confirmation du caractère prédictif
4. Maîtrise des performances quantitatives
Stratégie d'intégration des différentes étapes

1. **Cycle de vie des méthodes analytiques**
2. **Développement et optimisation**
Approche Analytical Quality-by-Design (AQbD)
3. **Validation**
Profil d'exactitude
Confirmation du caractère prédictif
4. **Maîtrise des performances quantitatives**
Stratégie d'intégration des différentes étapes

Méthodes analytiques

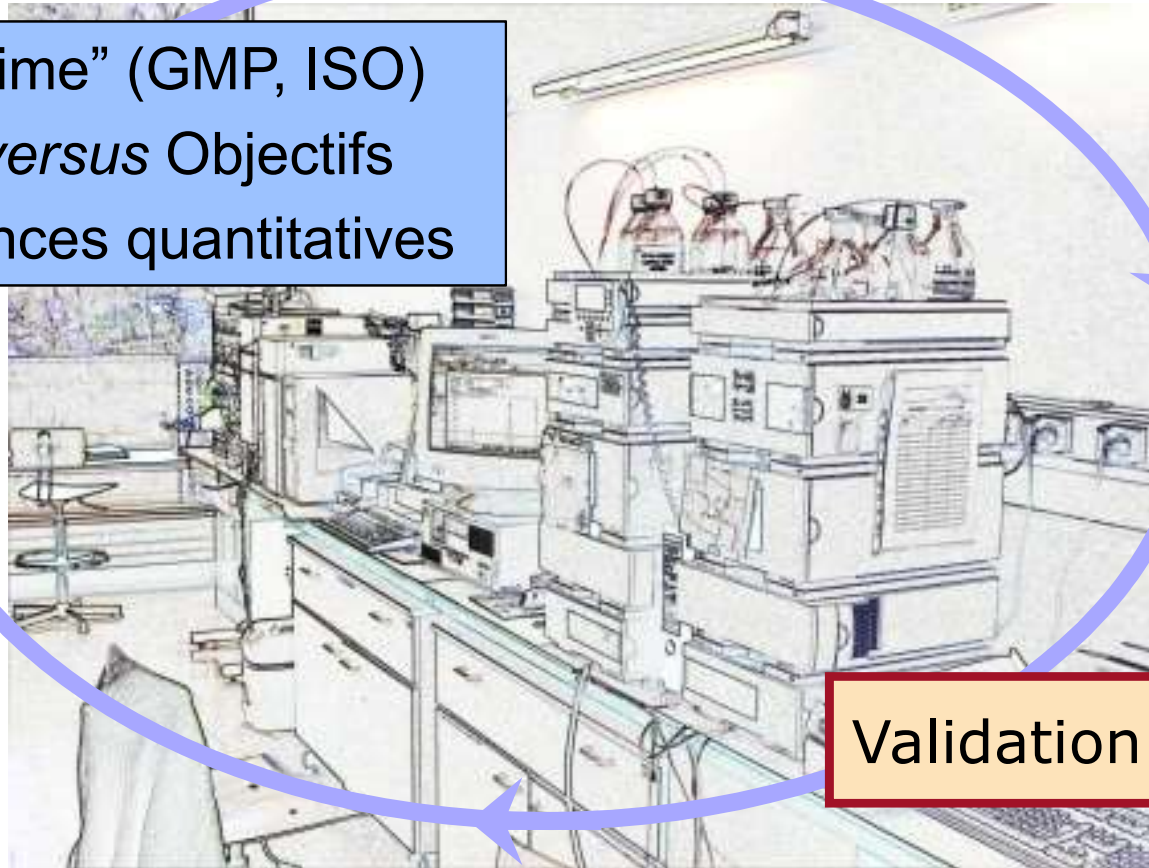


Méthodes analytiques : Routine



Méthodes analytiques : Validation

- Etape “ultime” (GMP, ISO)
- Aptitude *versus* Objectifs
- Performances quantitatives



→ **International Conference
on Harmonisation ICH Q2
R1 (1995 > 2005)**

- **Texte ICH (Q2A)**
*"Validation of a
procedures :
terminology and*
- **Texte ICH (Q2B)**
*"Validation of a
procedures :
methodology"*

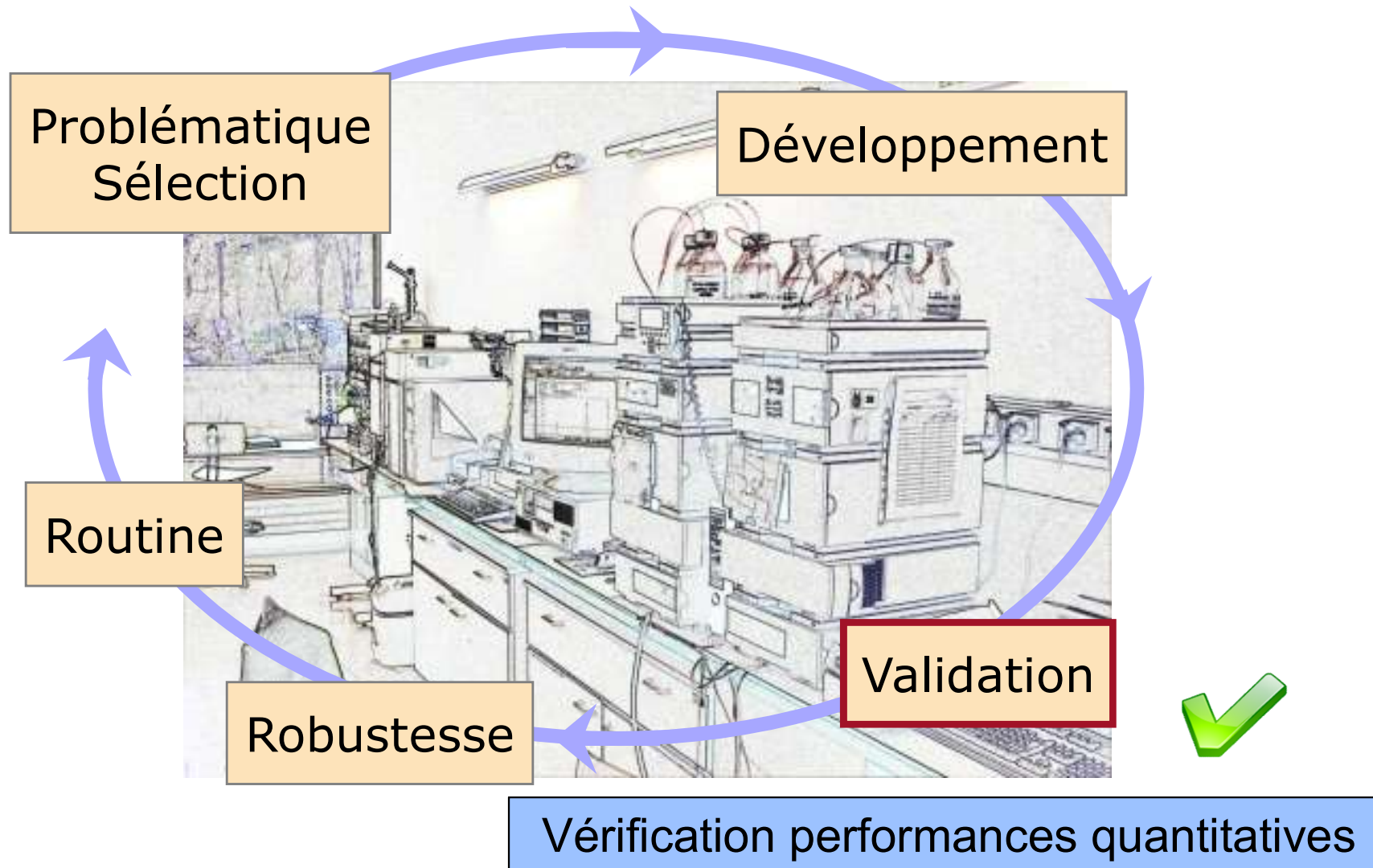
Documents...

- Pharmacopées
- Documents FDA
- Washington
- ISO 57005
- ISO 17025
- Eurachem
- SANCO

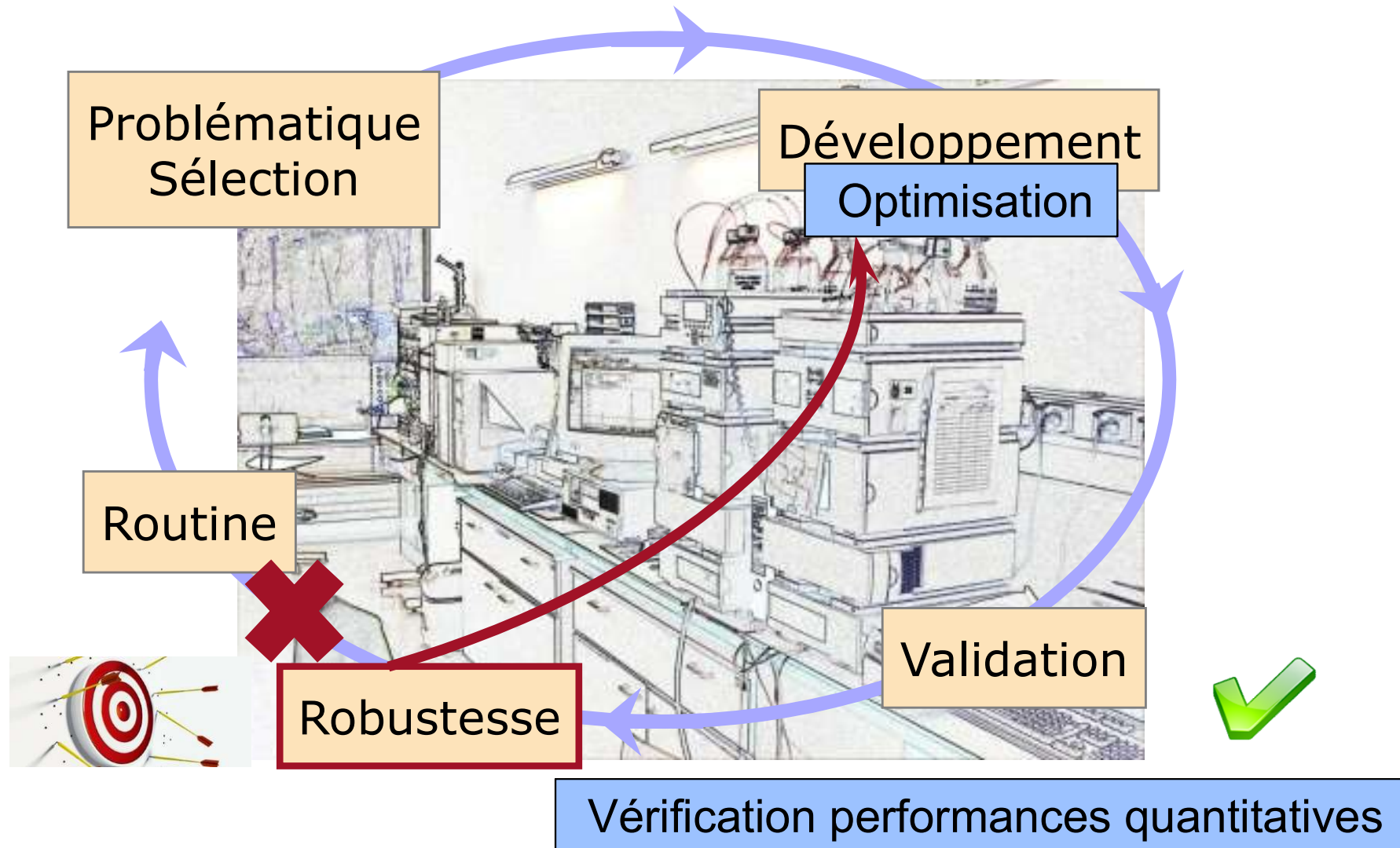
Guides

- SFSTP 92
- SFSTP 97
- SFSTP 03

Méthodes analytiques : Validation

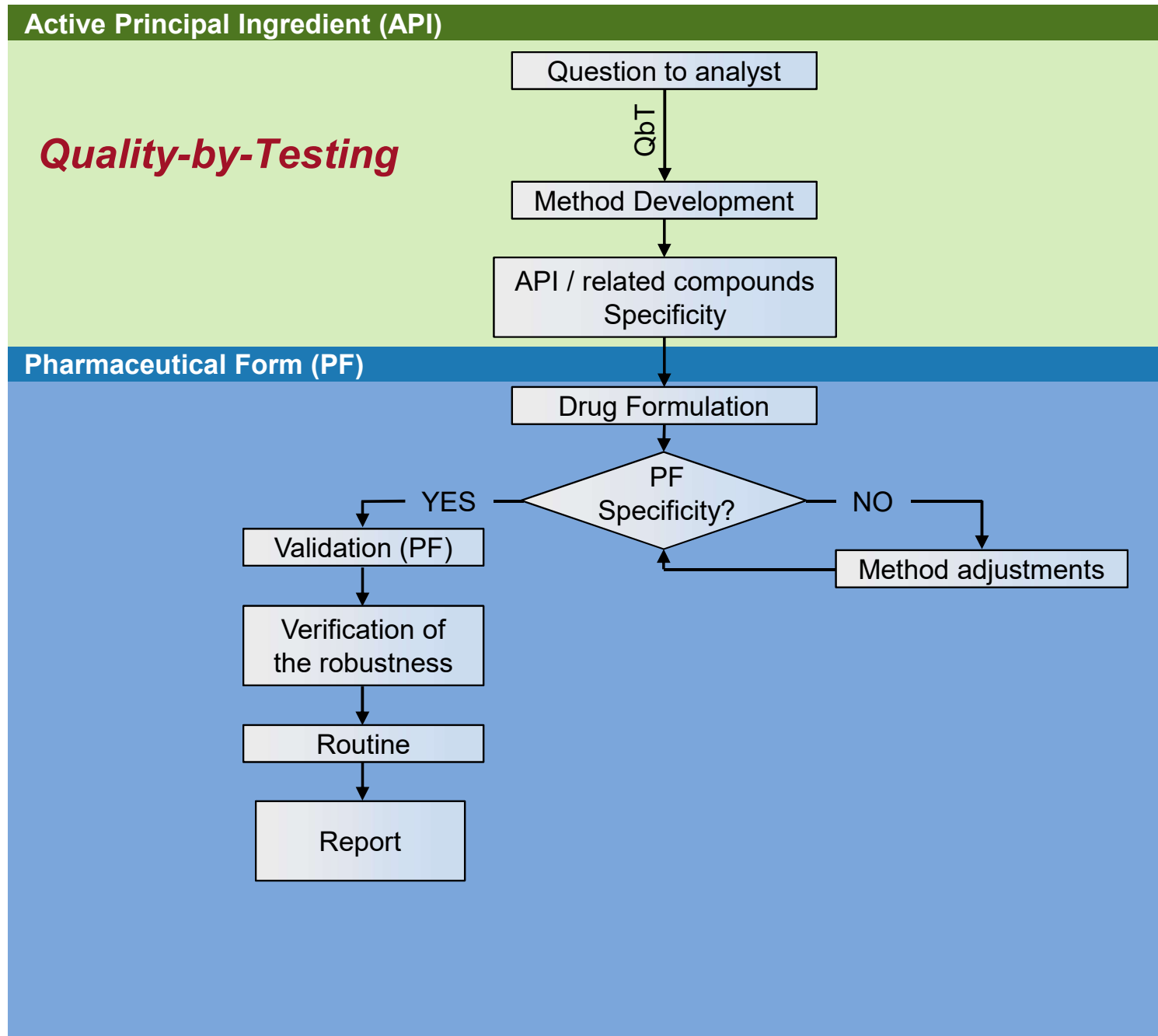


Méthodes analytiques : Robustesse



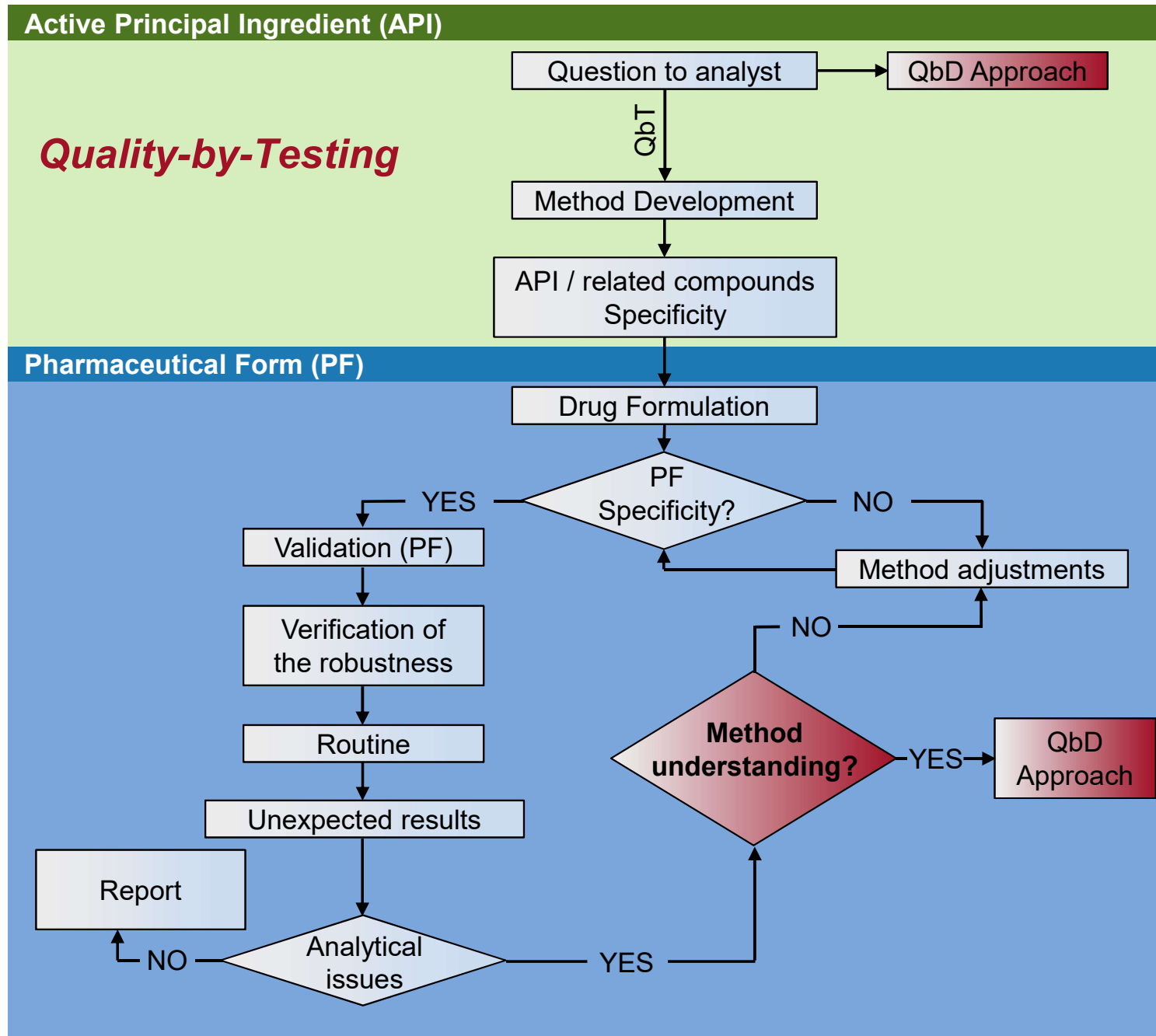
Développement et optimisation

Approche QbT



Développement et optimisation

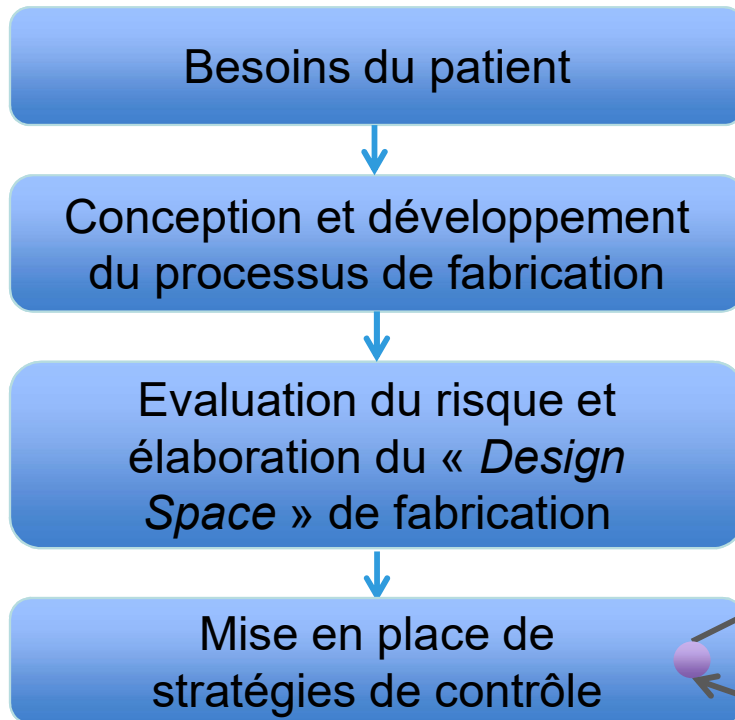
Approche QbT



1. Cycle de vie des méthodes analytiques
2. **Développement et optimisation**
Approche Analytical Quality-by-Design (AQbD)
3. Validation
Profil d'exactitude
Confirmation du caractère prédictif
4. Maîtrise des performances quantitatives
Stratégie d'intégration des différentes étapes

Contexte réglementaire (ICH Q8)

« *Quality-by-Design* » pour les processus de fabrication



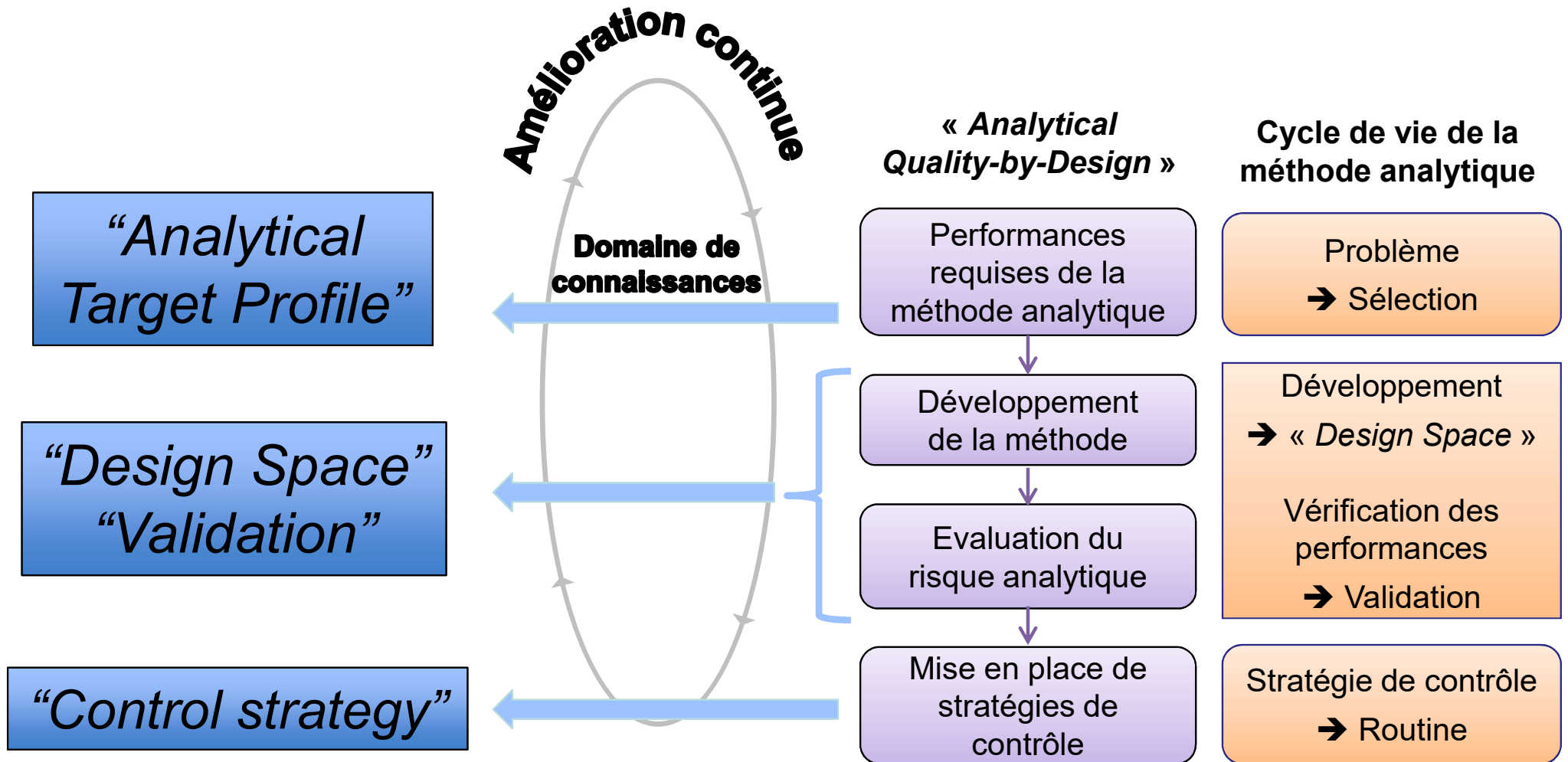
Amélioration continue

Domaine de connaissances

« *Analytical Quality-by-Design* »



Contexte réglementaire

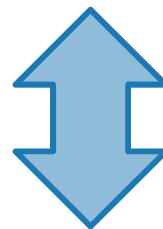


Contexte réglementaire

International Conference on Harmonization (ICH)

- ICH Q8(R2): Pharmaceutical development
 - ➔ Quality by Design (QbD)
 - ➔ Design Space (DS)

"travailler au sein du **DS** n'est pas considéré comme un changement."

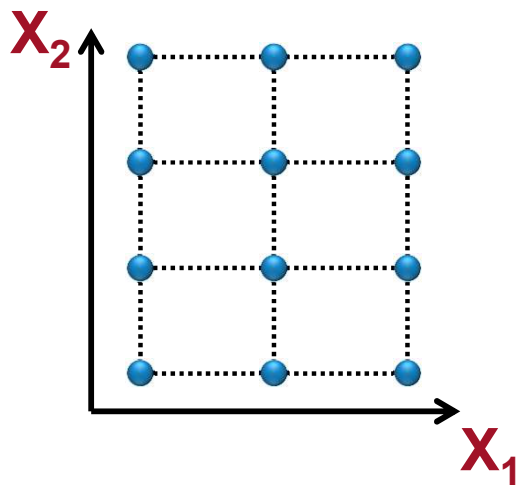


ICH Q2(R1): Analytical validation

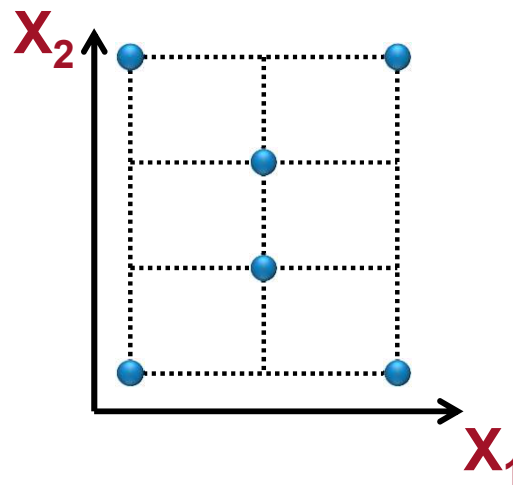
"La **robustesse** est une mesure de la capacité d'une méthode à **rester inchangée** face à des faibles **variations délibérées des paramètres** affectant le procédé ou la méthode analytique."

Développement et optimisation

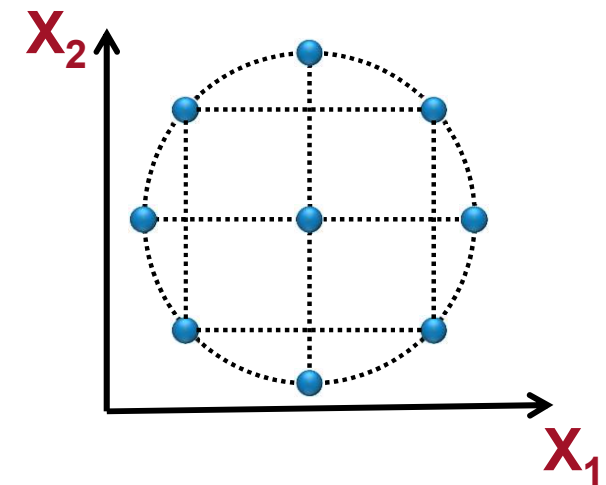
Modélisation des comportements chromatographiques
par la **planification expérimentale**.



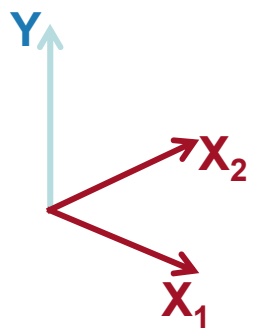
Plans factoriels
complet et
fractionnaire



Plan optimal
(d-optimal)



Plan central
composite



$$Y = \beta_0 + \beta_1 \times X_1 + \beta_2 \times X_2 + \dots + \epsilon$$

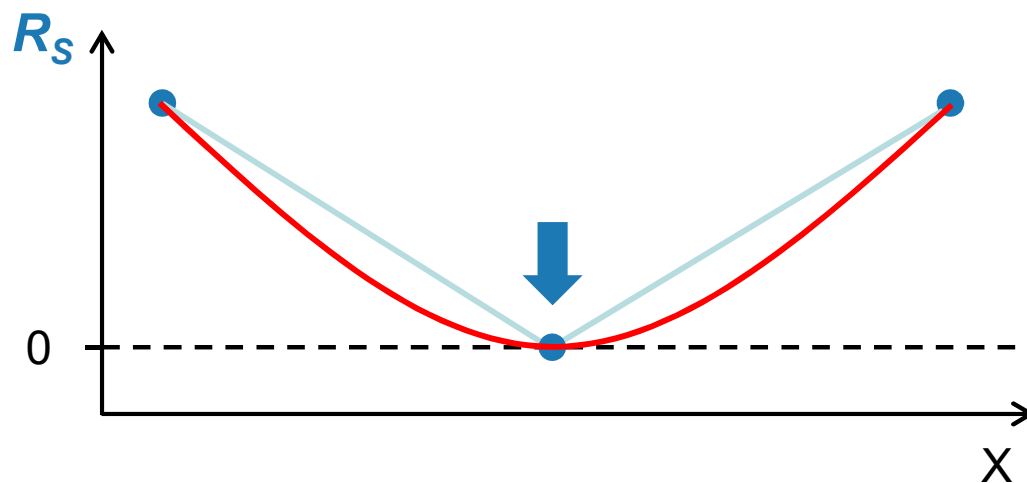
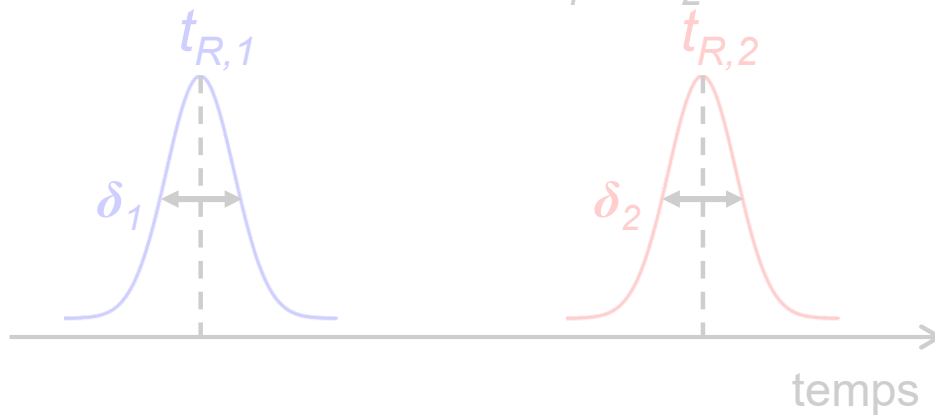
↓
↓
↓

réponse
facteurs
erreur

Sélection d'une réponse

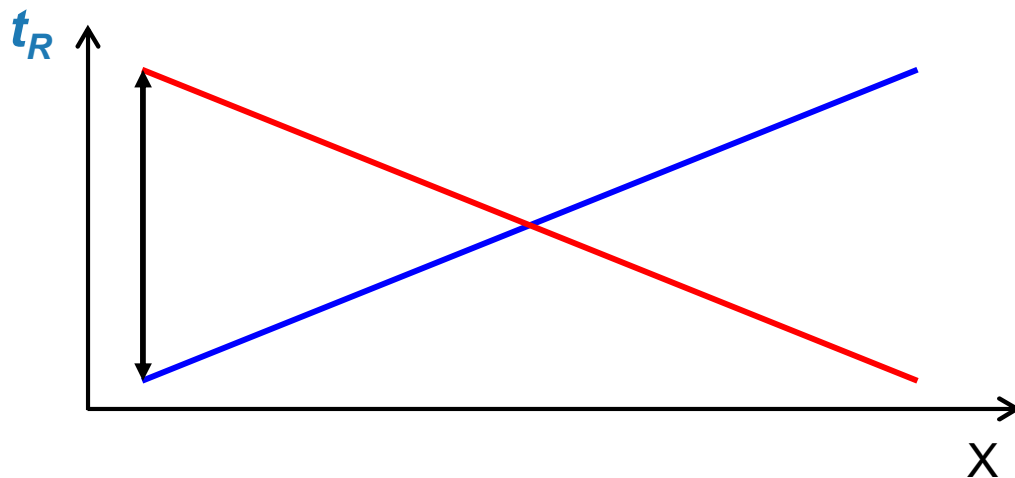
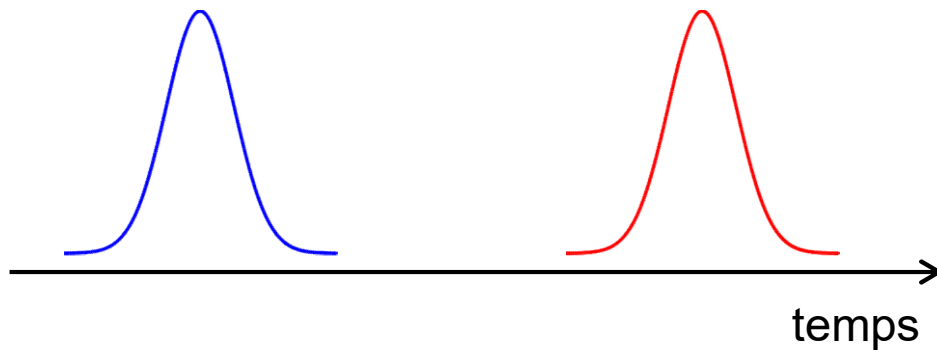
Sélection des facteurs

$$R_S = 1,18 \times \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{\delta_1 + \delta_2}$$



Sélection d'une réponse

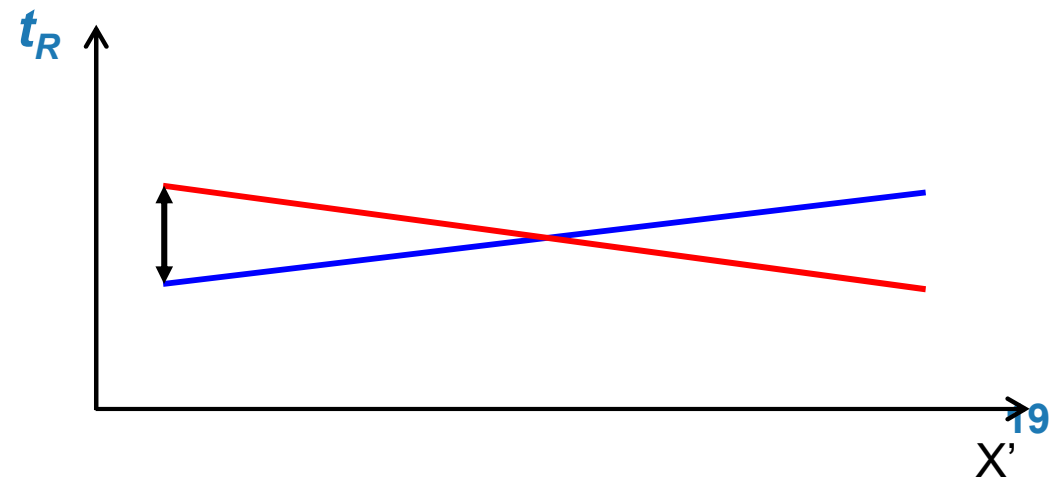
$$t_R = f(X)$$

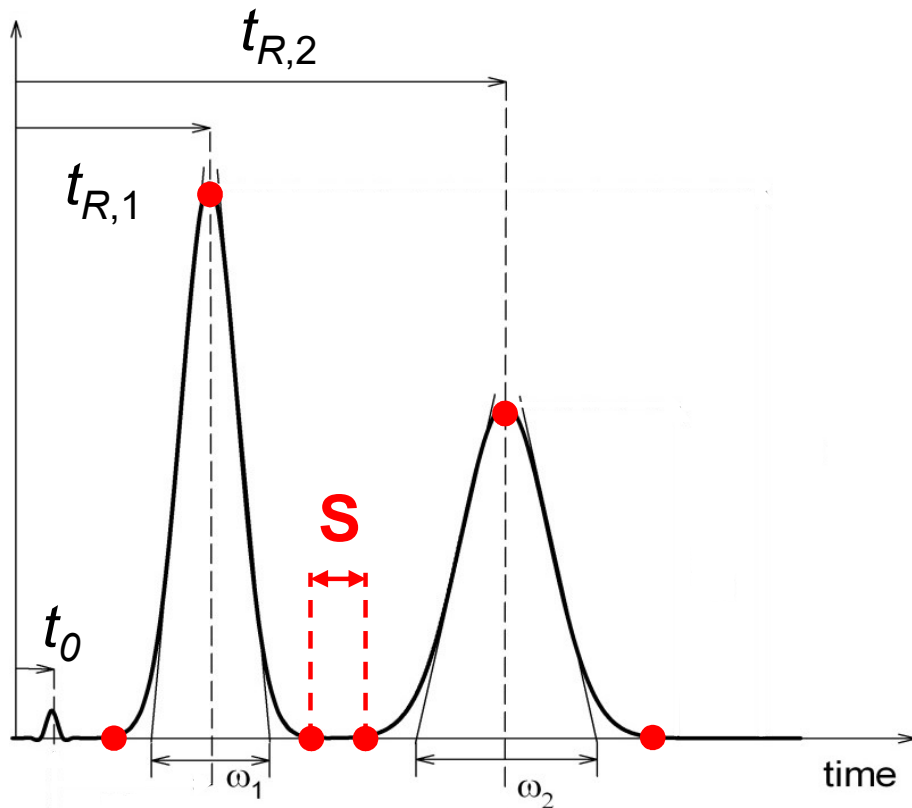


Sélection des facteurs

Facteurs ayant le plus d'effet :

- Phase stationnaire
- Modificateur organique
- pH
- Temps de gradient
- Température
- ...





Réponses modélisées

- $\log(k)$ $k = (t_R - t_0)/t_0$
- $\log(\omega_{/2 \text{ gauche}})$
- $\log(\omega_{/2 \text{ droite}})$

Modèles mathématiques

(équation linéaires multiples)

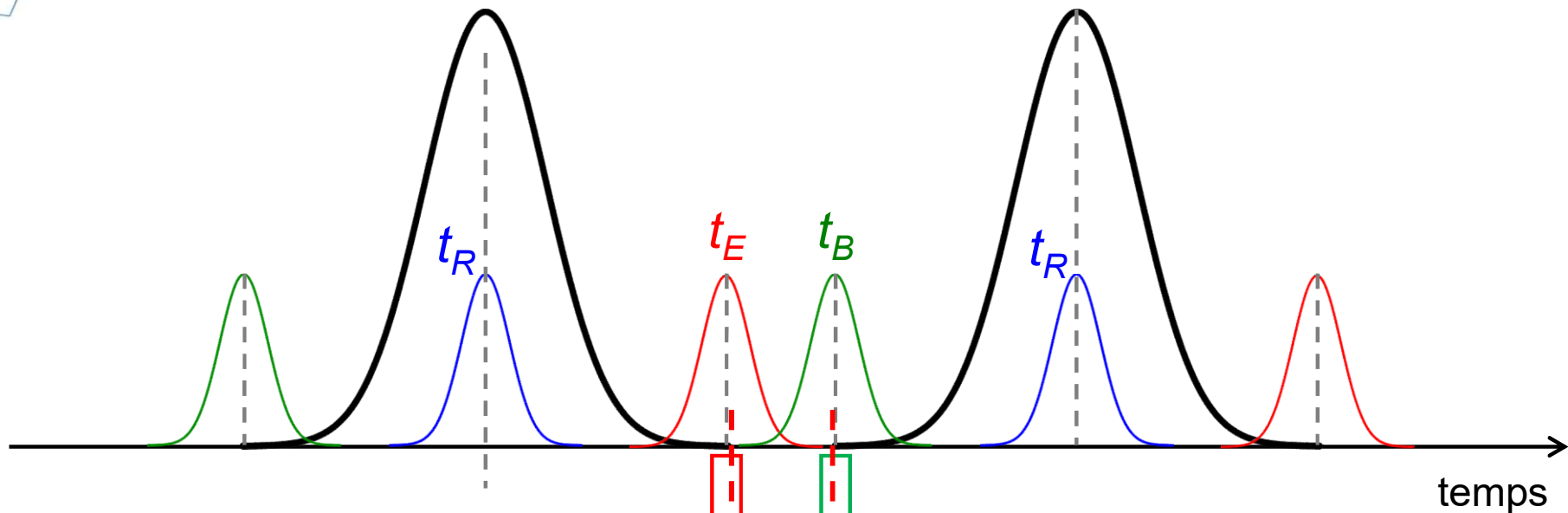
p.ex. temps de gradient (t_G) et pH

$$\log(k) = \beta_0 + \beta_1 \cdot t_G + \beta_3 \cdot t_G^2 + \beta_4 \cdot pH + \beta_5 \cdot pH^2 + \beta_6 \cdot pH^3 + \beta_7 \cdot pH^4 + \beta_8 \cdot t_G \cdot pH + \varepsilon$$

Critères optimisés

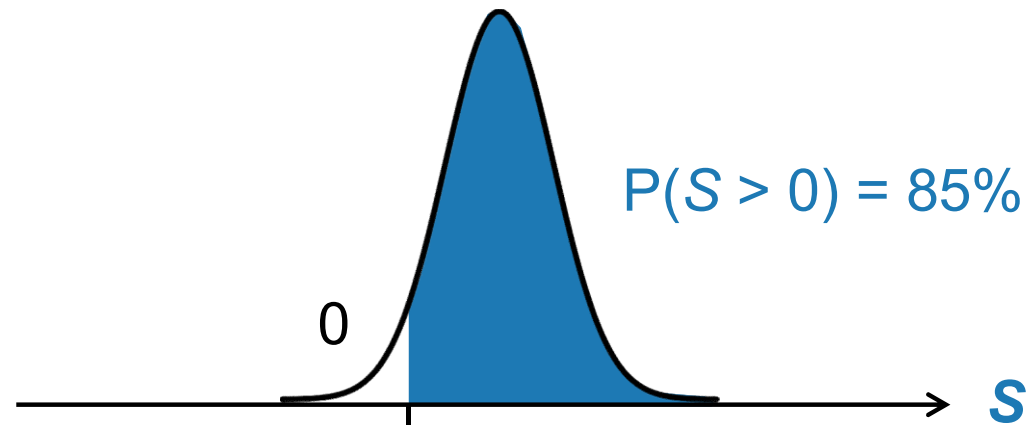
- $S = t_{R,\text{début}} - t_{R,\text{fin}}$
- R_S
- Temps d'analyse ...

Développement et optimisation



$$S = t_B - t_E$$

Simulations de Monte-Carlo

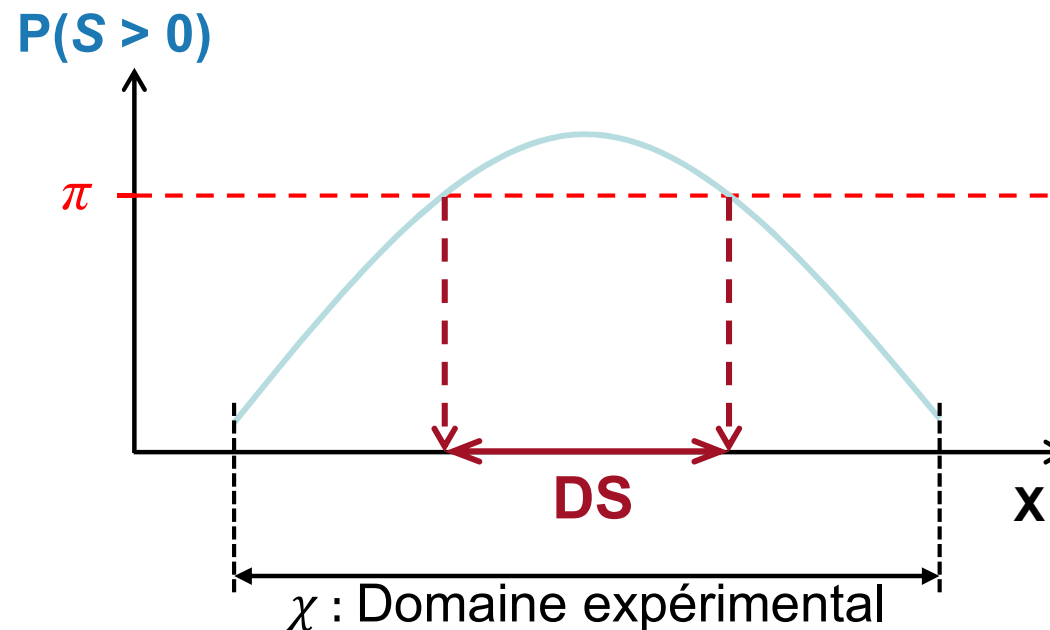


Analytical Quality-by-Design

Le design space \rightarrow zone de probabilité de succès

$$DS = \{ \underline{x_0 \in \chi} \mid \underline{E_{\hat{\theta}} [P(S > \lambda) | \hat{\theta}]} \geq \underline{\pi} \}$$

$\hat{\theta} = (\beta_1, \dots, \beta_{10}, \varepsilon)$



9 composés :

Prazepam (IS)

CBDA, CBGA

CBD, CBG

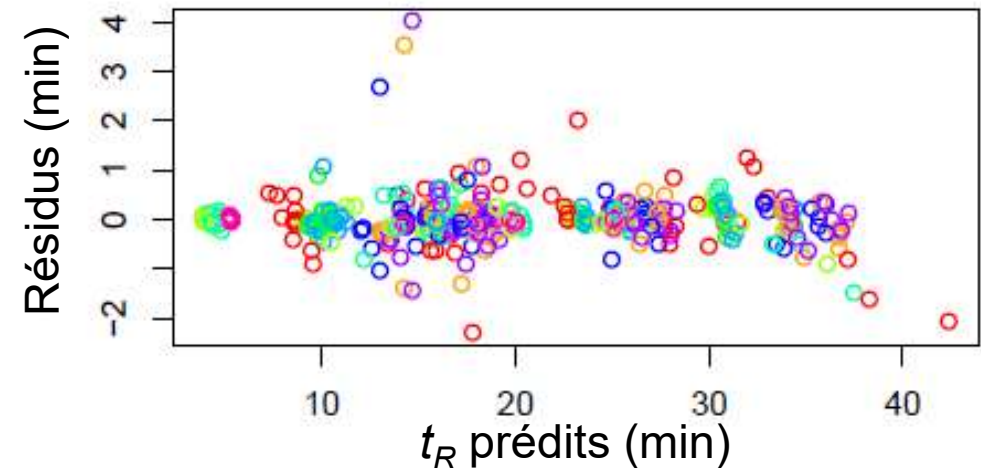
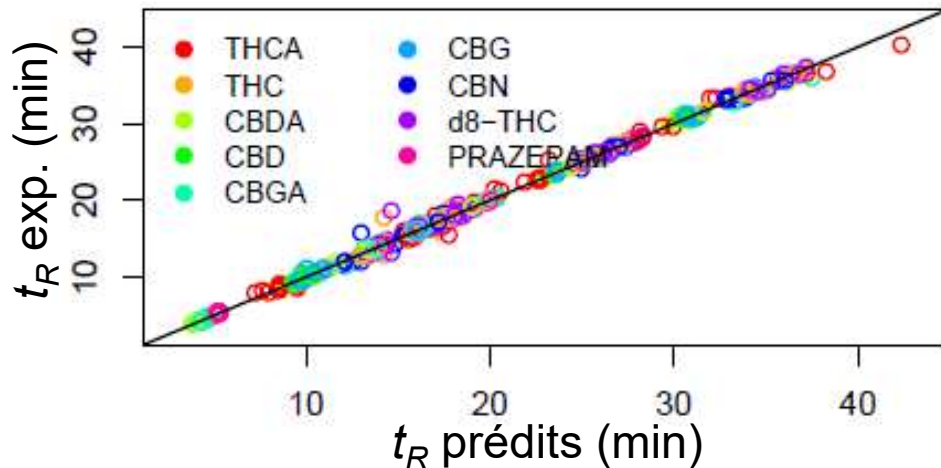
THCA, d9-THC, d8-THC

CBN

Plan factoriel complet

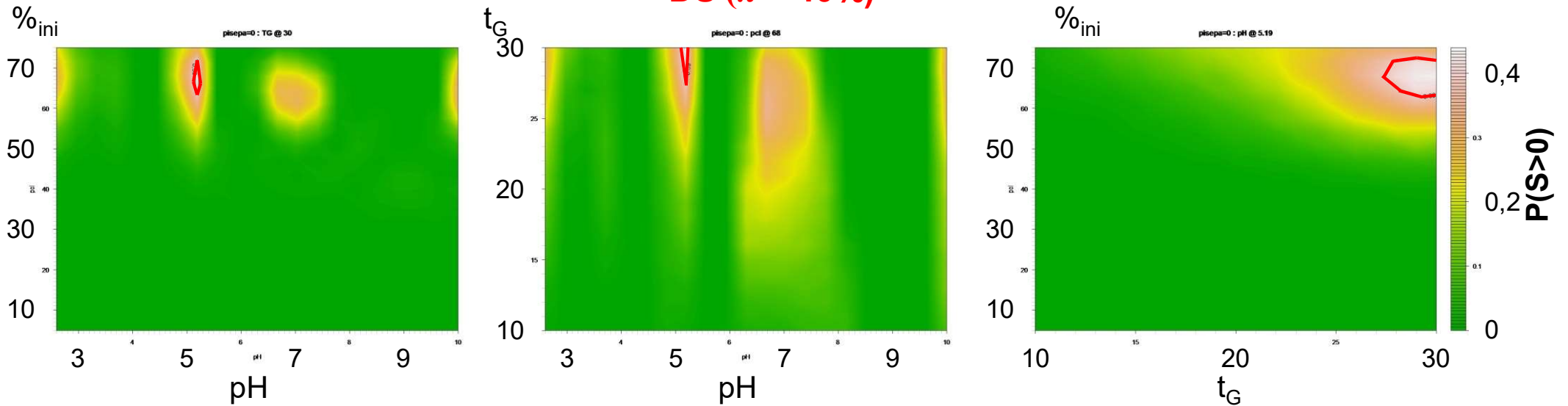
Facteurs	Niveaux				
pH	2,6	4,45	6,3	8,15	10
T_G (min, % _{ini} → 95%)	10	20	30		
% _{ini} (MeOH)	5	40	75		

XBridge C18 150 mm × 4.6mm, 5 μ m

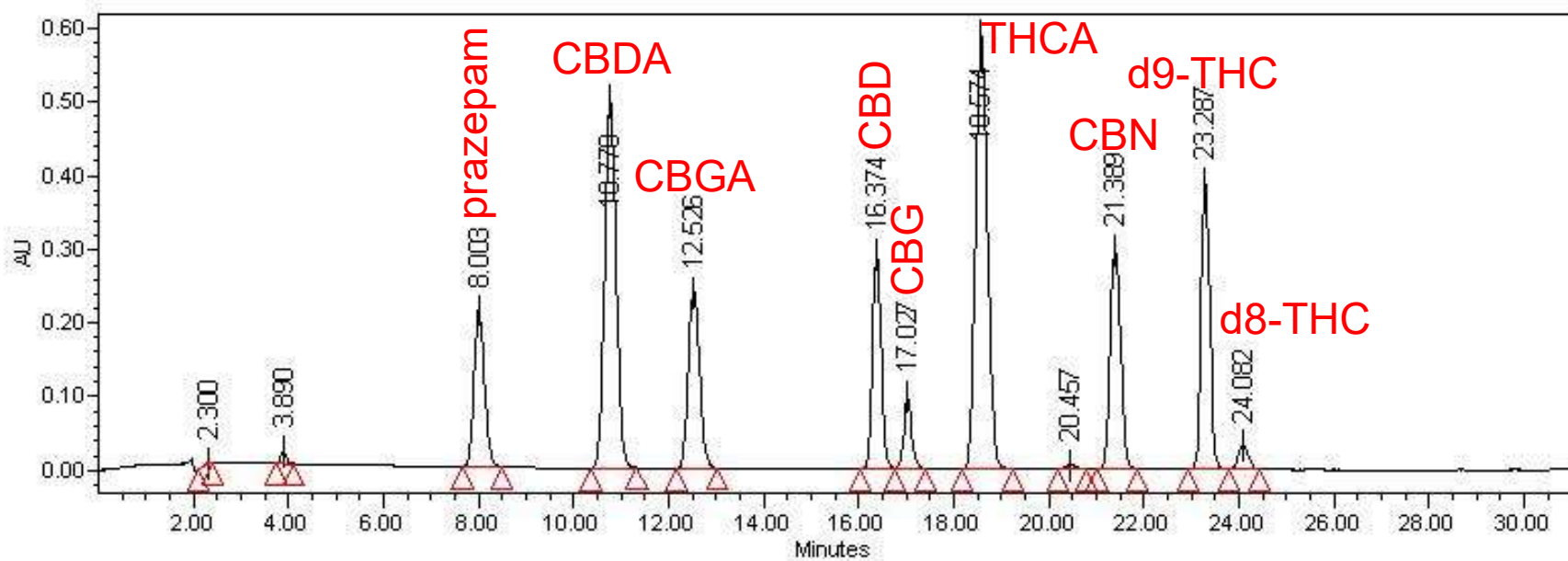


Analytical Quality-by-Design

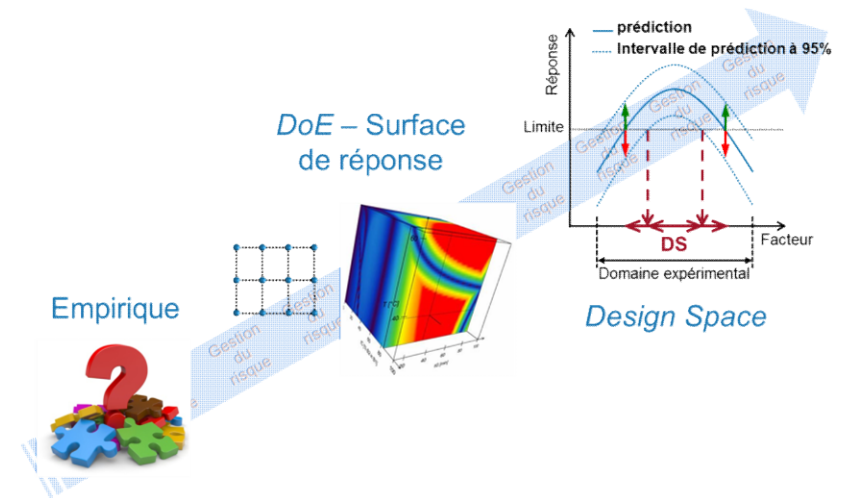
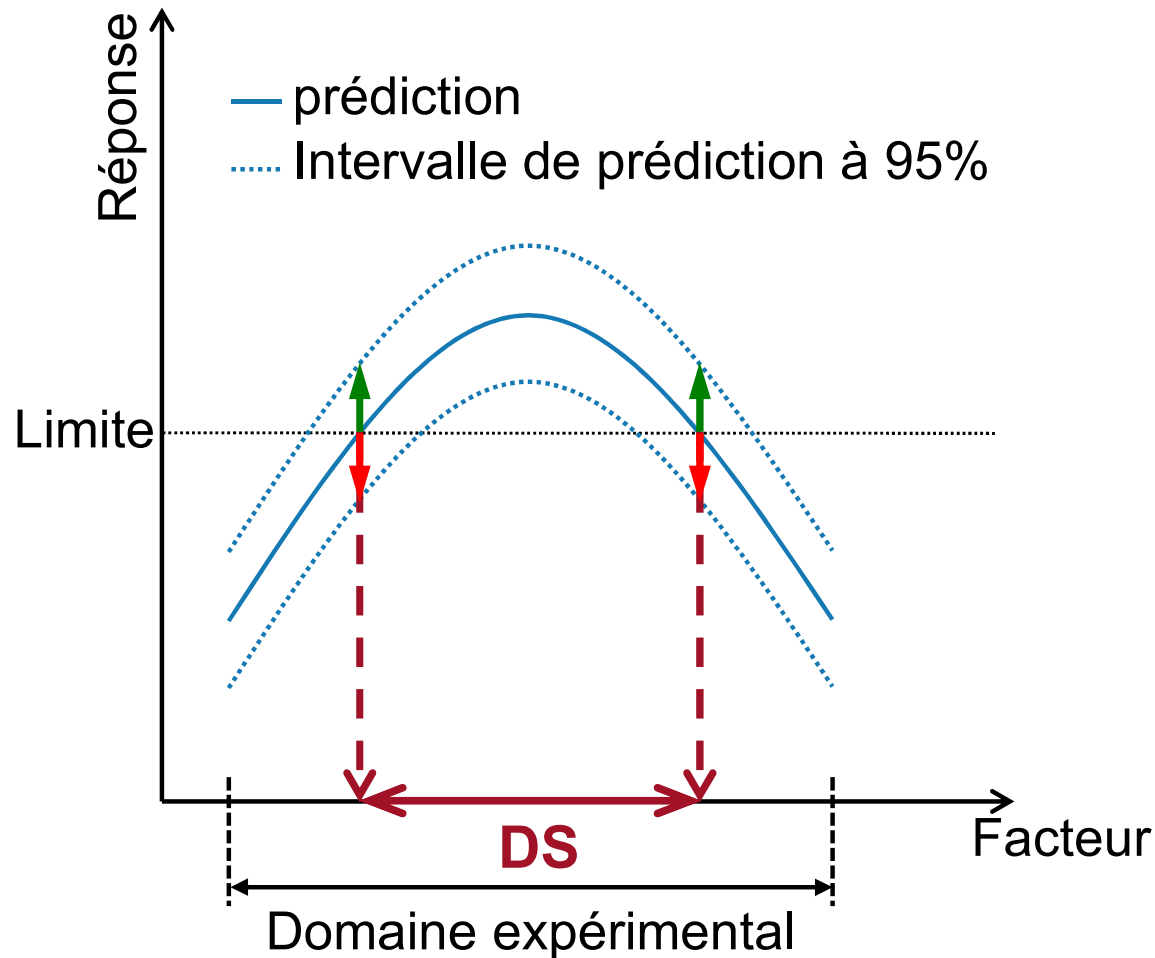
DS ($\pi = 40\%$)



Condition optimale: pH 5.2 - %ini = 68% - t_G = 30 min



Méthodologie DoE-DS :



- Plan d'expériences
- *CMP*
- *CQA*
- Réponses
- Modèle statistique
- Incertitude estimée

$$DS = \{ \mathbf{x}_0 \in \chi \mid E_{\theta} [P(\mathbf{CQAs} \in \Lambda) \mid \mathbf{X} = \mathbf{x}_0, \theta] \geq \pi \}$$

1. Cycle de vie des méthodes analytiques
2. Développement et optimisation
Approche Analytical Quality-by-Design (AQbD)
3. **Validation**
Profil d'exactitude
Confirmation du caractère prédictif
4. Maîtrise des performances quantitatives
Stratégie d'intégration des différentes étapes

Analyses
de routine

Résultats analytiques

en unité de concentration (ex.: $\mu\text{g/ml}$)
ou quantité (ex.: μg)

Utiliser pour prendre des
décisions critiques

Réaliser seulement
1 analyse
et non pas **100 analyses**
du même échantillon pour
prendre une décision ...

- Mise sur le marché
- Shelf life
- Etudes PK
- Etat d'un patient
- ...

Analyses
de routine

Résultats analytiques

en unité de concentration (ex.: $\mu\text{g/ml}$)
ou quantité (ex.: μg)

Utiliser pour prendre des
décisions critiques

Doivent être **fiables !**

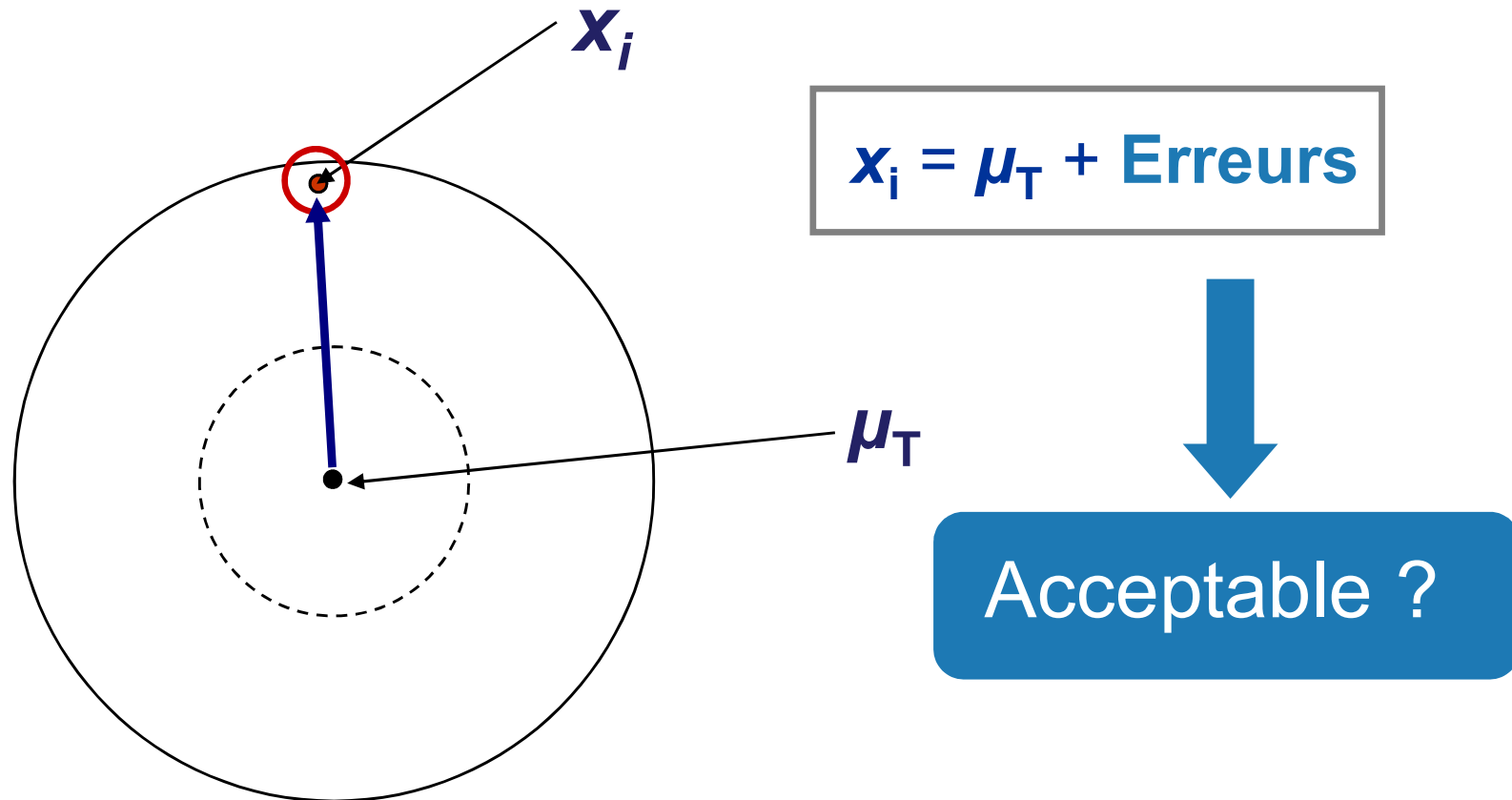
- Mise sur le marché
- Shelf life
- Etudes PK
- Etat d'un patient

**Le budget d'erreurs de la méthode
est-il acceptable ?**

Résultats en routine

x_i = résultat observé

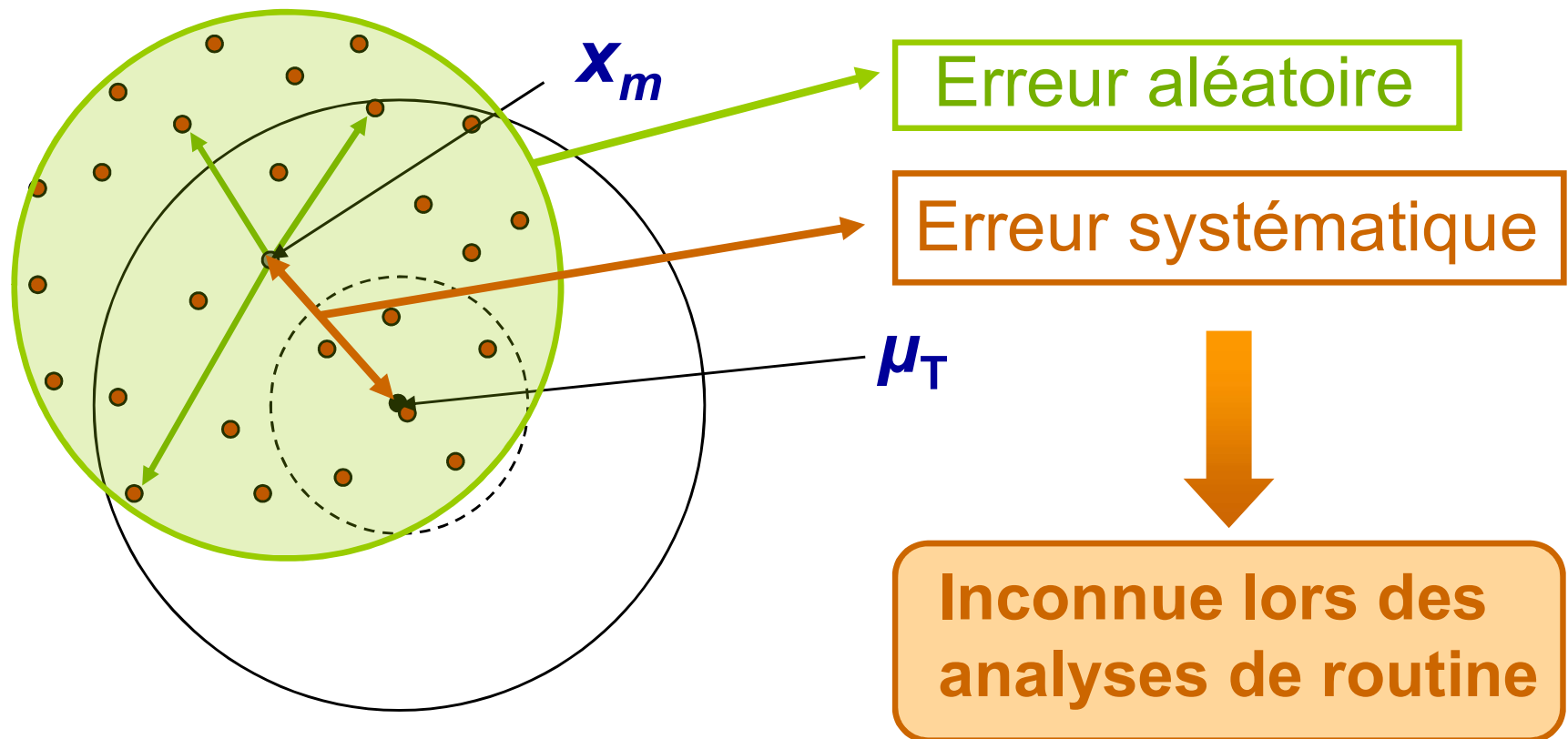
μ_T = vraie valeur inconnue



Erreurs analytiques

X_m = moyenne des résultats observés

μ_T = vraie valeur inconnue

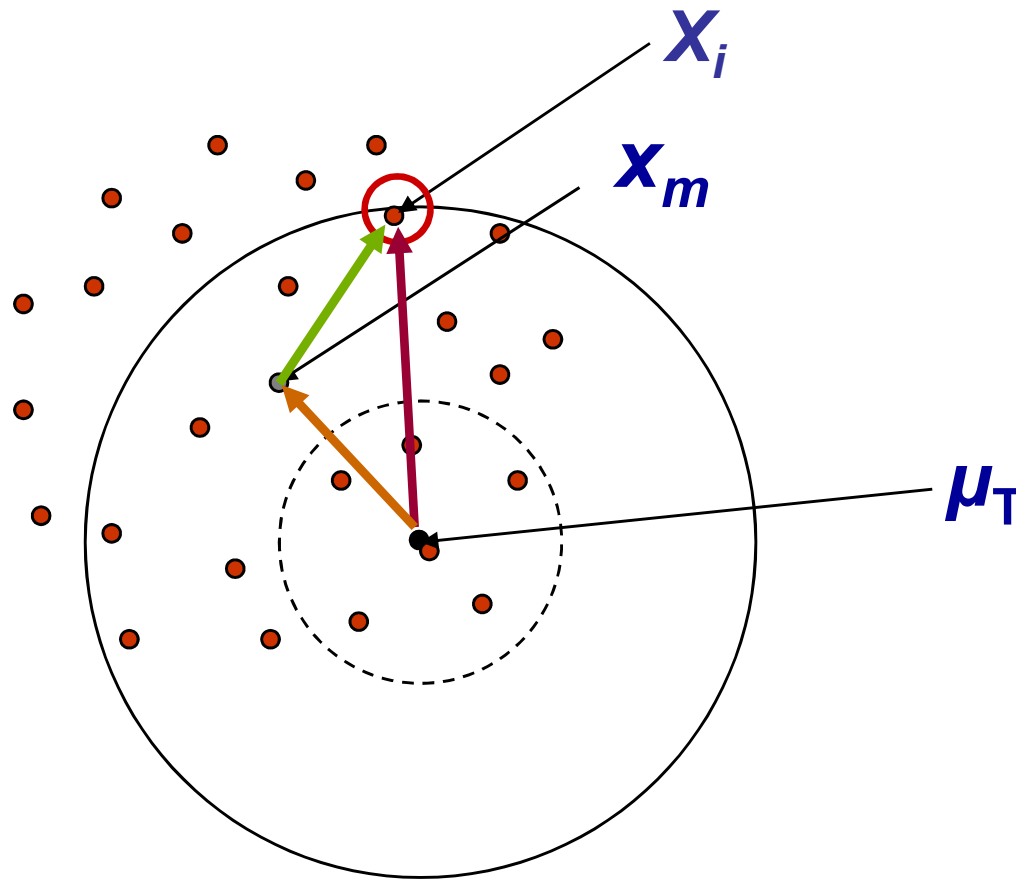


Erreurs analytiques

X_m = moyenne des résultats observés

μ_T = vraie valeur inconnue

X_i = résultat observé



$$x_i = \mu_T + \text{Erreurs}$$

Erreur totale



Erreur systématique



Erreur aléatoire

Exactitude (ICH Q2R1 – ISO 5725 – SFSTP)

L'exactitude d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre **la valeur conventionnellement vraie**, ou comme valeur de référence, et **la valeur trouvée**.

- **L'erreur totale** est en parfait accord avec la définition de l'exactitude.
- **L'erreur totale** est donc le **bon critère de décision** pour accepter la **validité** d'une méthode analytique **avant son utilisation en routine**.

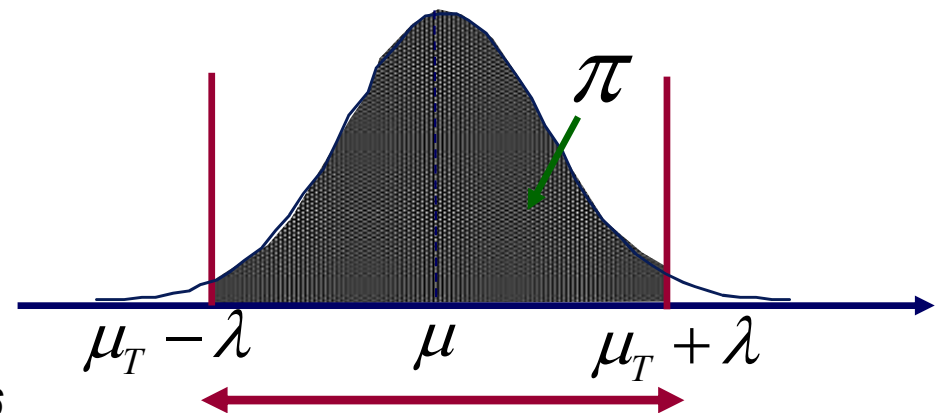
Objectif de la validation

est de donner au laboratoire ainsi qu'aux instances réglementaires des **garanties** que chaque résultat qui sera obtenu en routine sera **suffisamment proche** de la vraie valeur inconnue de l'analyte dans l'échantillon.

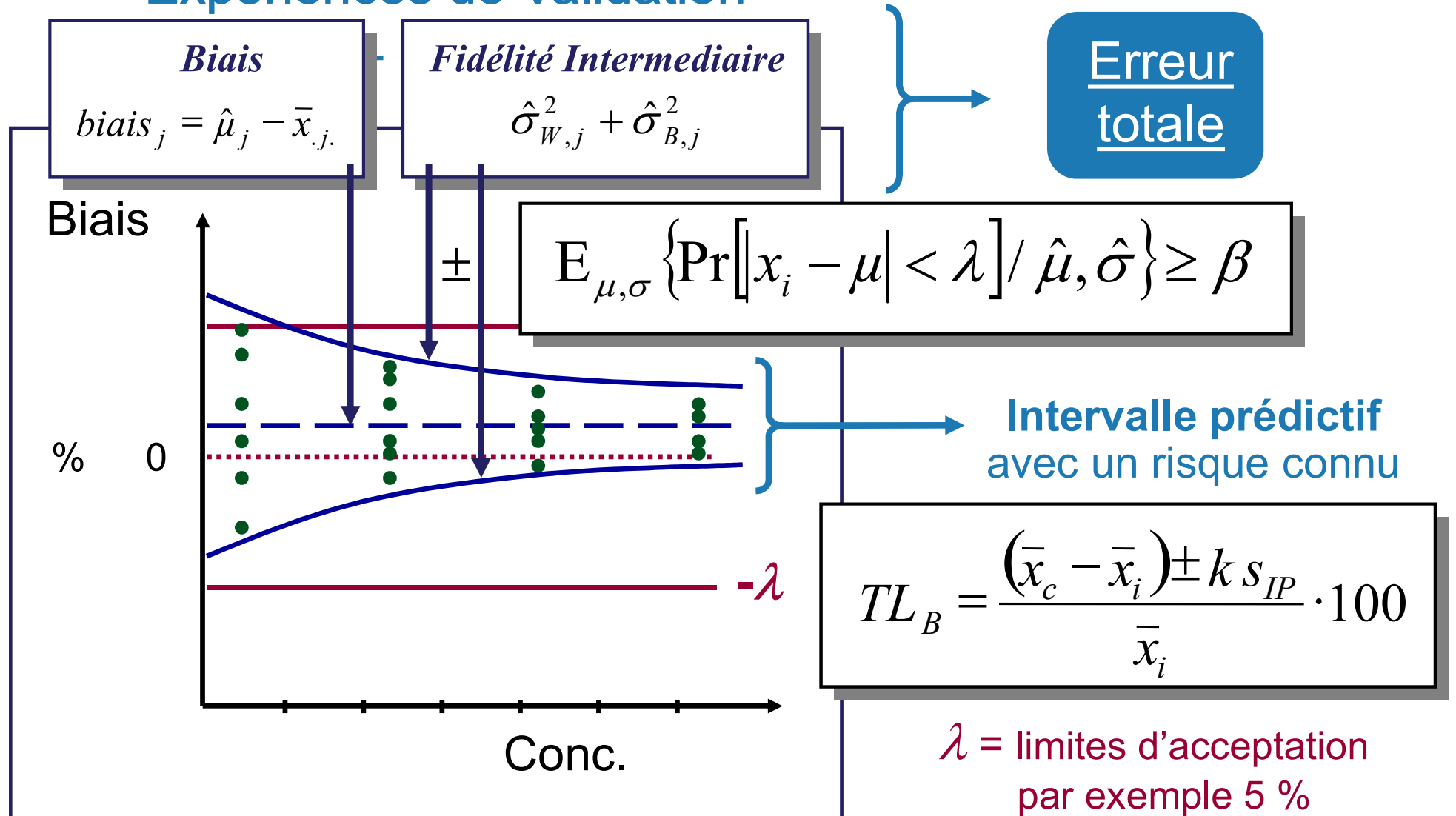
$$\pi = P \left[|X_i - \mu_T| < \lambda \right] \geq \pi_{\min}$$

λ = limites d'acceptation prédéfinies

π_{\min} = probabilité minimum qu'un résultat sera inclus dans $\pm \lambda$



Expériences de Validation



Objectif de la validation

L'objectif de la **validation** est l'évaluation de la probabilité que chaque futur résultat soit inclus dans les limites d'acceptations.

→ Sur la base des estimations du biais et de la fidélité.

$$E_{\hat{\delta}, \hat{\sigma}} \left\{ P \left[|X_i - \mu_T| < \lambda \right] \middle| \hat{\delta}, \hat{\sigma} \right\} \geq \pi_{\min}$$

Objectif de la validation

L'objectif de la **validation** est l'évaluation de la **probabilité que chaque futur résultat** soit inclus dans les limites d'acceptations.

→ Sur la base des estimations du biais et de la fidélité.

$$E_{\hat{\delta}, \hat{\sigma}} \left\{ P \left[|X_i - \mu_T| < \lambda \right] \middle| \hat{\delta}, \hat{\sigma} \right\} \geq \pi_{\min}$$

Exactitude (erreur totale) **attendue** de chaque futur résultat

Objectif de la validation

L'objectif de la **validation** est l'évaluation de la **probabilité que chaque futur résultat** soit inclus dans les limites d'acceptations.

→ Sur la base des **estimations du biais et de la fidélité**.

$$E_{\hat{\delta}, \hat{\sigma}} \left\{ P \left[|X_i - \mu_T| < \lambda \right] \right\}_{\hat{\delta}, \hat{\sigma}} \geq \pi_{\min}$$

Exactitude (erreur totale) **attendue** de chaque futur résultat



Estimateurs des **performances** de la **méthode** obtenus en phase de **validation**

Lien manquant

Objectifs (routine)

- Chaque futur résultat individuel / pas les résultats antérieurs.
- Futurs résultats / pas sur les performances de la méthode.
- Performances passées de la méthode sont sans intérêt pour prendre une décision même s'il s'agit d'une source d'informations utiles sur la méthode.
- **Important de clarifier la façon dont la décision sera prise sur la base des résultats disponibles.**

Intervalles

→ Intéressants car englobent les **erreurs systématique et aléatoire** (= erreur total).

→ **Intervalle de confiance**

- Descriptif des résultats passés
- Centré sur la moyenne

$$IC = \mu \pm k.\sigma$$

→ **Intervalle de tolérance**

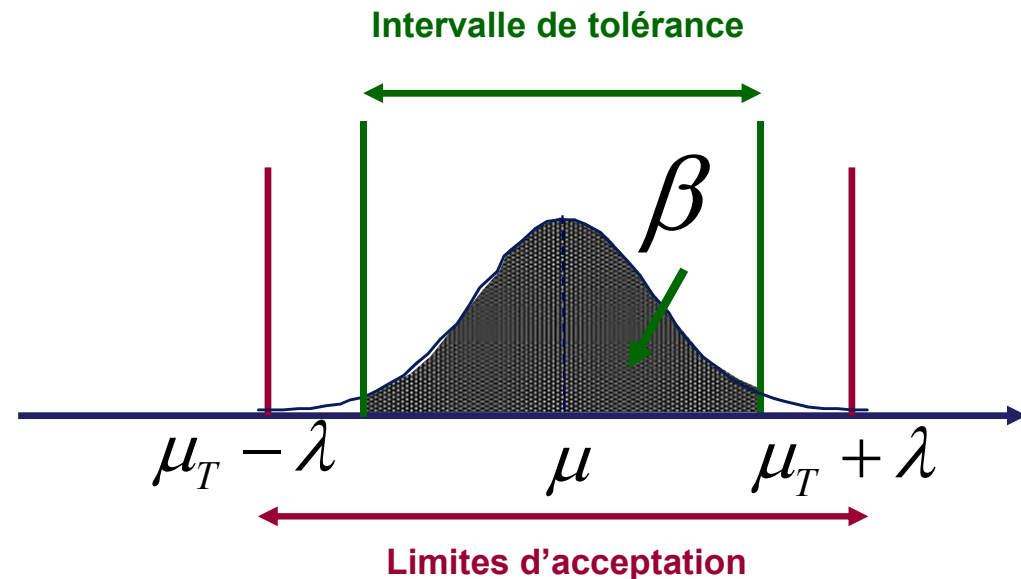
- Prédicatif des futurs résultats
- Considère l'incertitude sur la moyenne

$$IT = \mu \pm k.(\sigma + \sigma_{\mu})$$



β -Expectation Tolerance Interval (β TI)

permet de prédire où chaque futur résultat a des chances de se trouver (*Wald, 1942*).

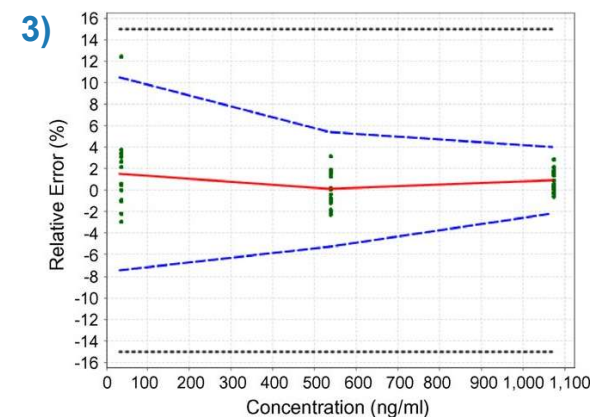
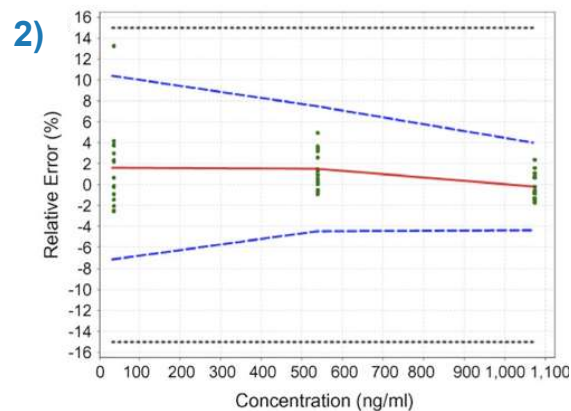
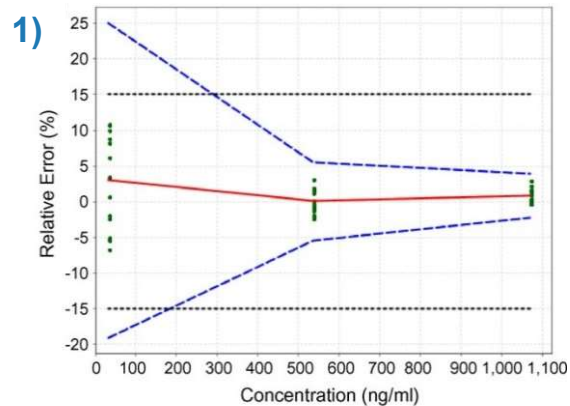


→ Si le β -expectation tolerance interval est inclus dans les limites d'acceptation, alors la **probabilité que chaque futur résultat soit dans les limites d'acceptation est au moins de β** (ex. 80%).

Confirmation du caractère prédictif

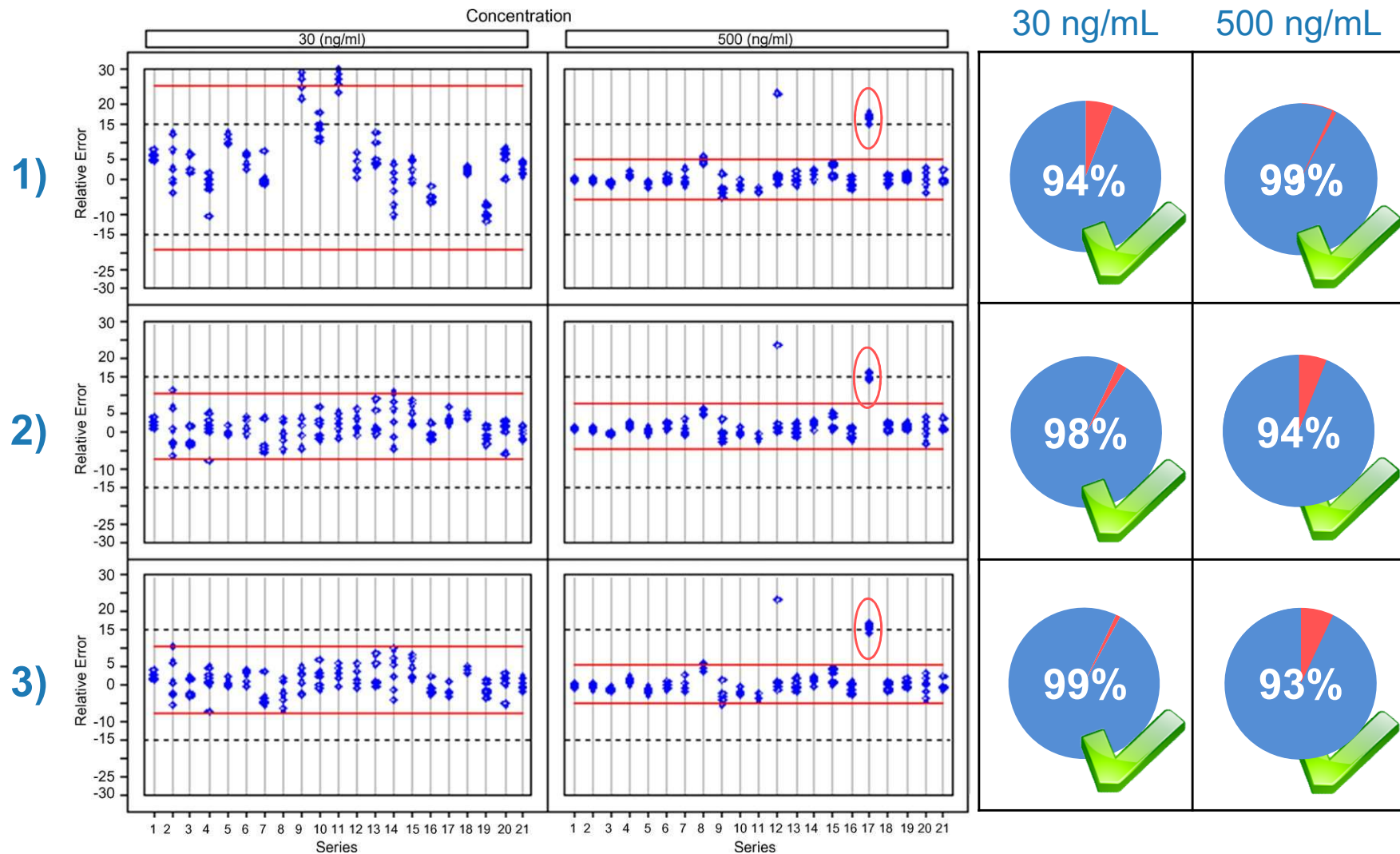
Lévonorgestrel (proportion (β) : 95%)

Méthode	Fonction de réponse (matrice)	Concentration (ng/mL)	Limite inférieure de β (%)	Limite supérieure de β (%)
LC-UV	1	30	-19,1	25,2
		500	-5,4	5,6
	2	30	-7,2	10,4
		500	-4,5	7,5
	3	30	-7,5	10,5
		500	-5,2	5,4

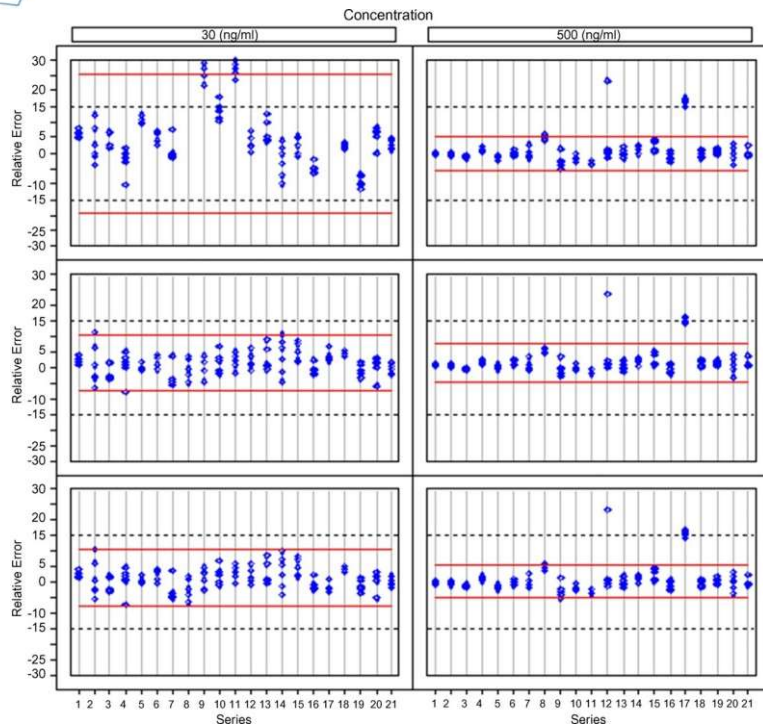


Confirmation du caractère prédictif

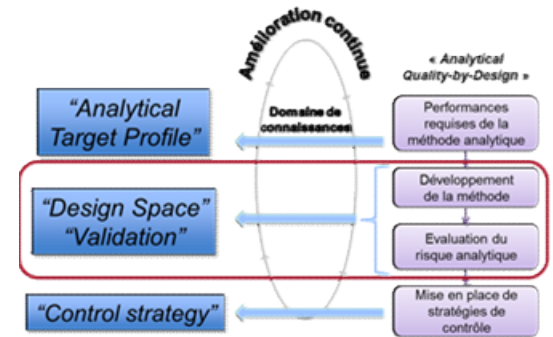
Routine : 252 QC ($m = 21$; $n = 6$; $k = 2$)



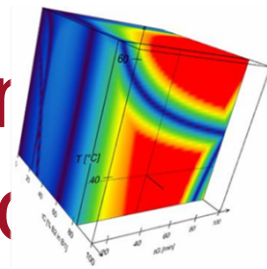
Intégration de ces 2 étapes



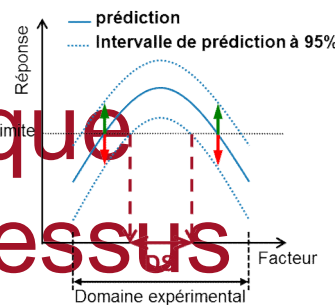
99%

gestion
statif



gestion
cessus



Empirique

Surface de réponse

Design Space

Gestion du risque Gestion du risque Gestion du risque Gestion du risque Gestion du risque Gestion du risque Gestion du risque Gestion du risque Gestion du risque Gestion du risque

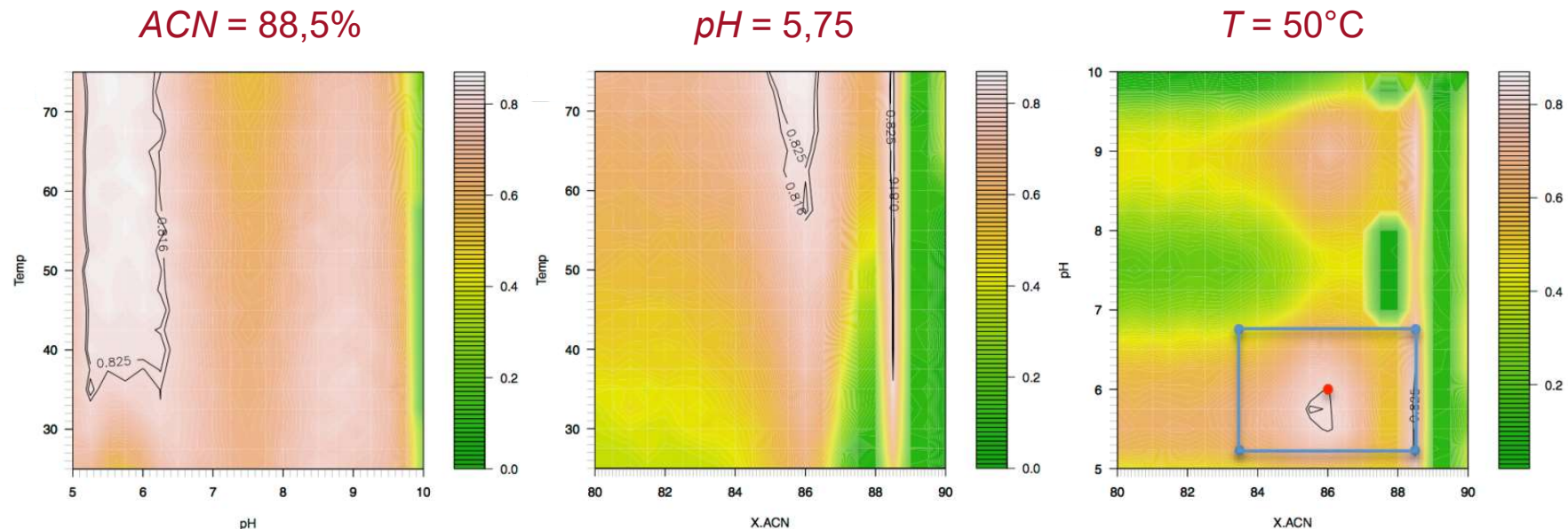


1. Cycle de vie des méthodes analytiques
2. Développement et optimisation
Approche Analytical Quality-by-Design (AQbD)
3. Validation
Profil d'exactitude
Confirmation du caractère prédictif
4. **Maîtrise des performances quantitatives**
Stratégie d'intégration des différentes étapes

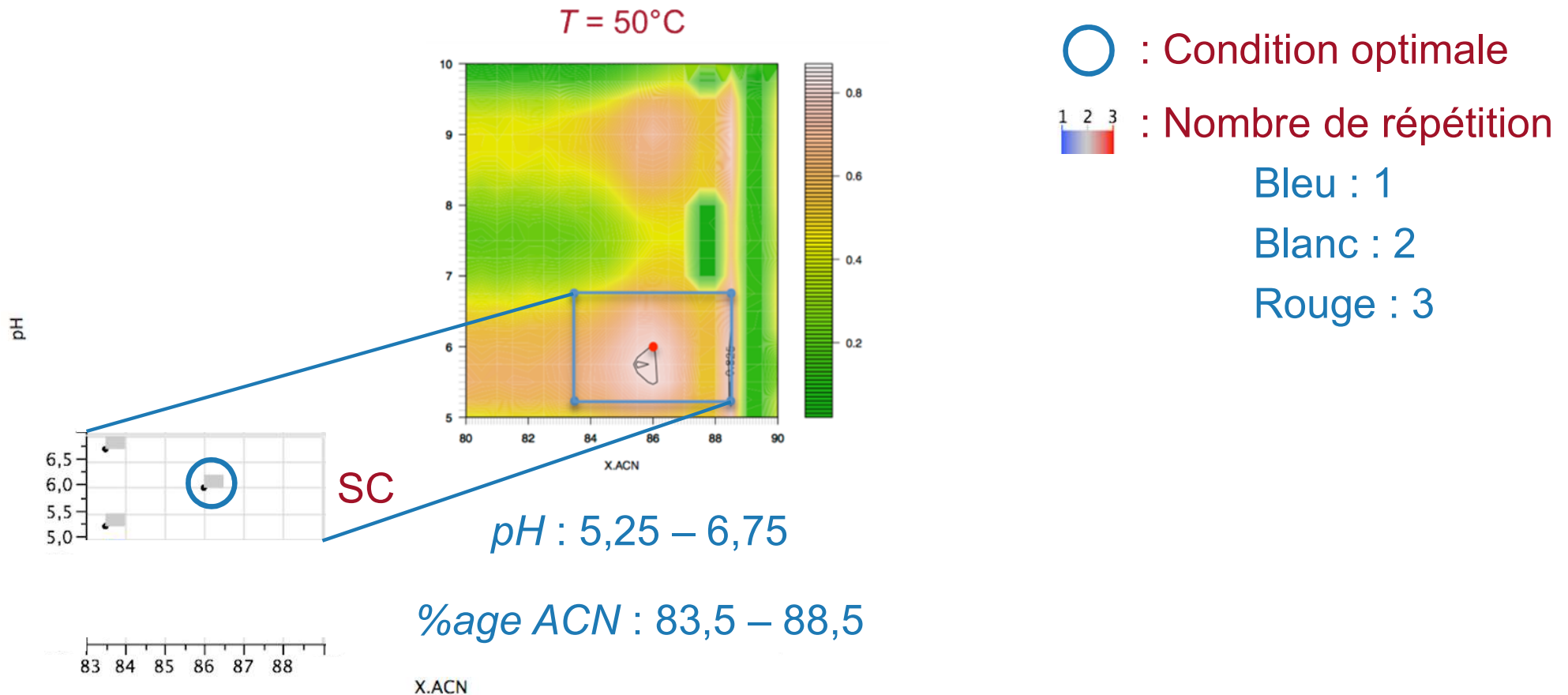
Définition de l'espace opérationnel

Glucosamine / galactosamine dans plasma humain (SPE-UHPLC-MS/MS)

- *CMPs* : ACN, pH, T.
- Acquity BEH Amide 2,1x100 mm (1,7 μm)
- *Custom central composite DoE* (n = 15)
- *CQAs* : $S_{\text{all compounds}} > 0,2$ min et $T_{\text{run}} < 30$ min.



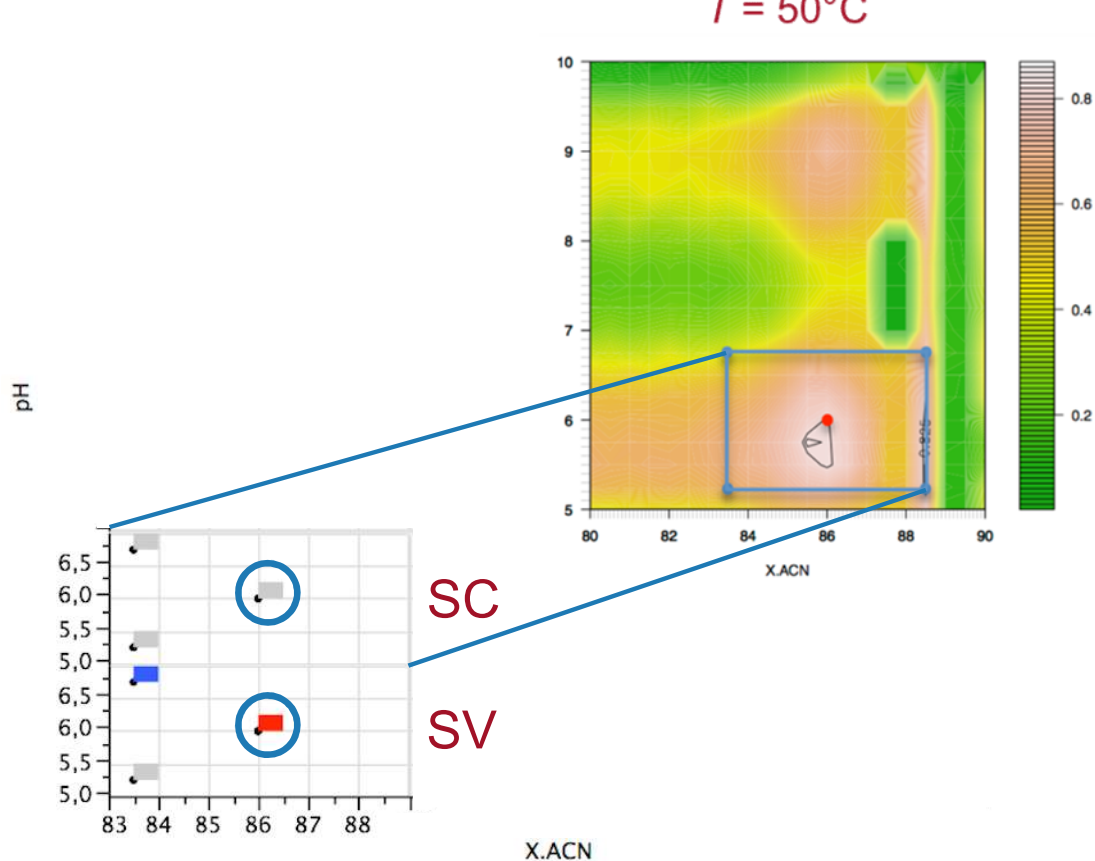
Protocole de validation de l'espace opérationnel ($T = 50^{\circ}\text{C}$)



Condition optimale : 86% ACN / pH : 6 / 50°C

Protocole de validation de l'espace opérationnel ($T = 50^{\circ}\text{C}$)

$T = 50^{\circ}\text{C}$



○ : Condition optimale

1 2 3 : Nombre de répétition

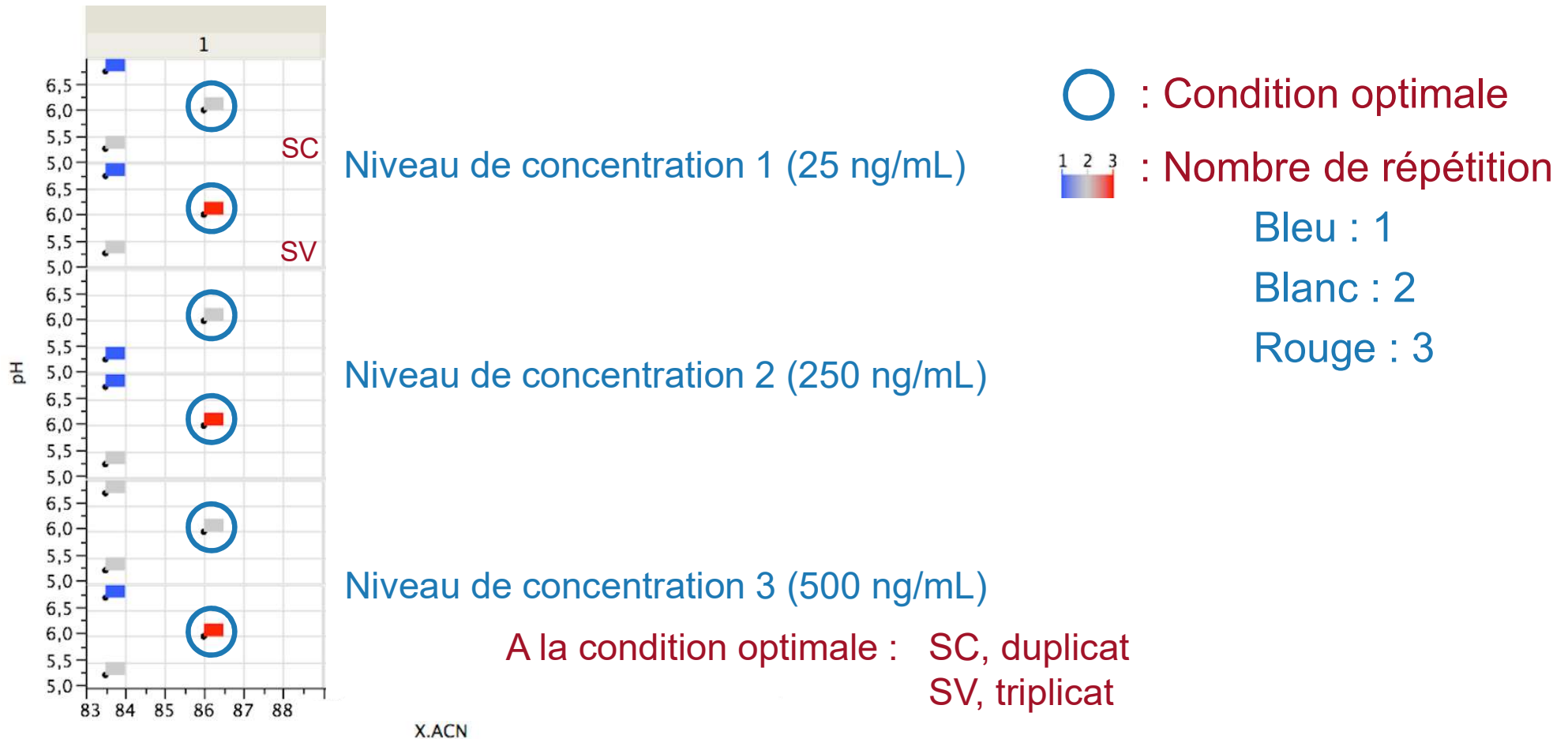
Bleu : 1

Blanc : 2

Rouge : 3

Condition optimale : 86% ACN / pH : 6 / 50°C

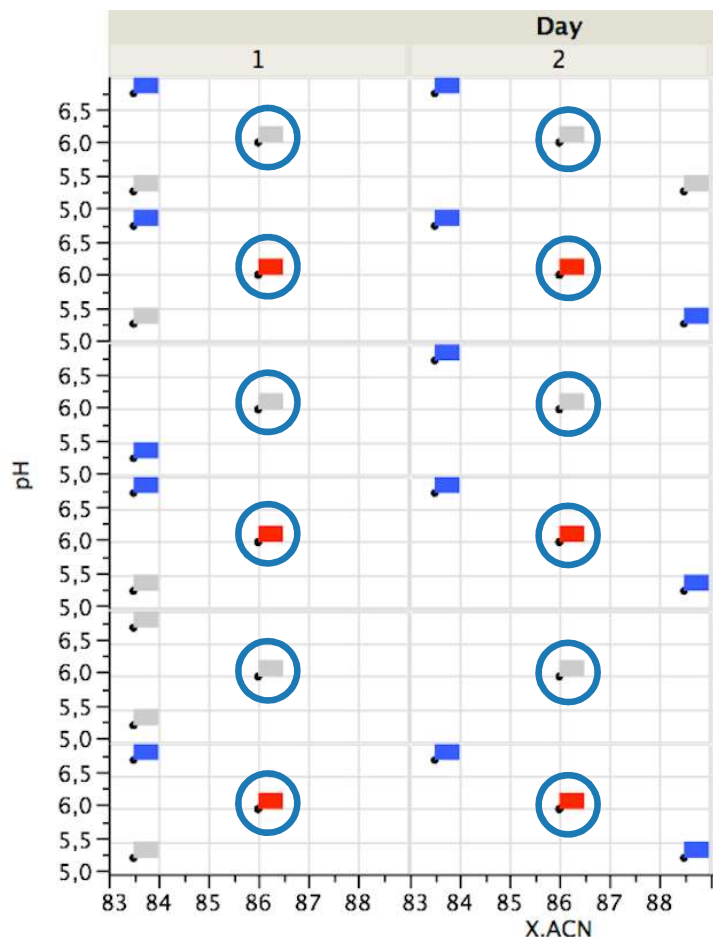
Protocole de validation de l'espace opérationnel ($T = 50^{\circ}\text{C}$)



Série 1

Condition optimale : 86% ACN / pH : 6 / 50°C

Protocole de validation de l'espace opérationnel ($T = 50^{\circ}\text{C}$)



○ : Condition optimale

1 2 3 : Nombre de répétition

Bleu : 1

Blanc : 2

Rouge : 3

A la condition optimale :

SC : duplicat

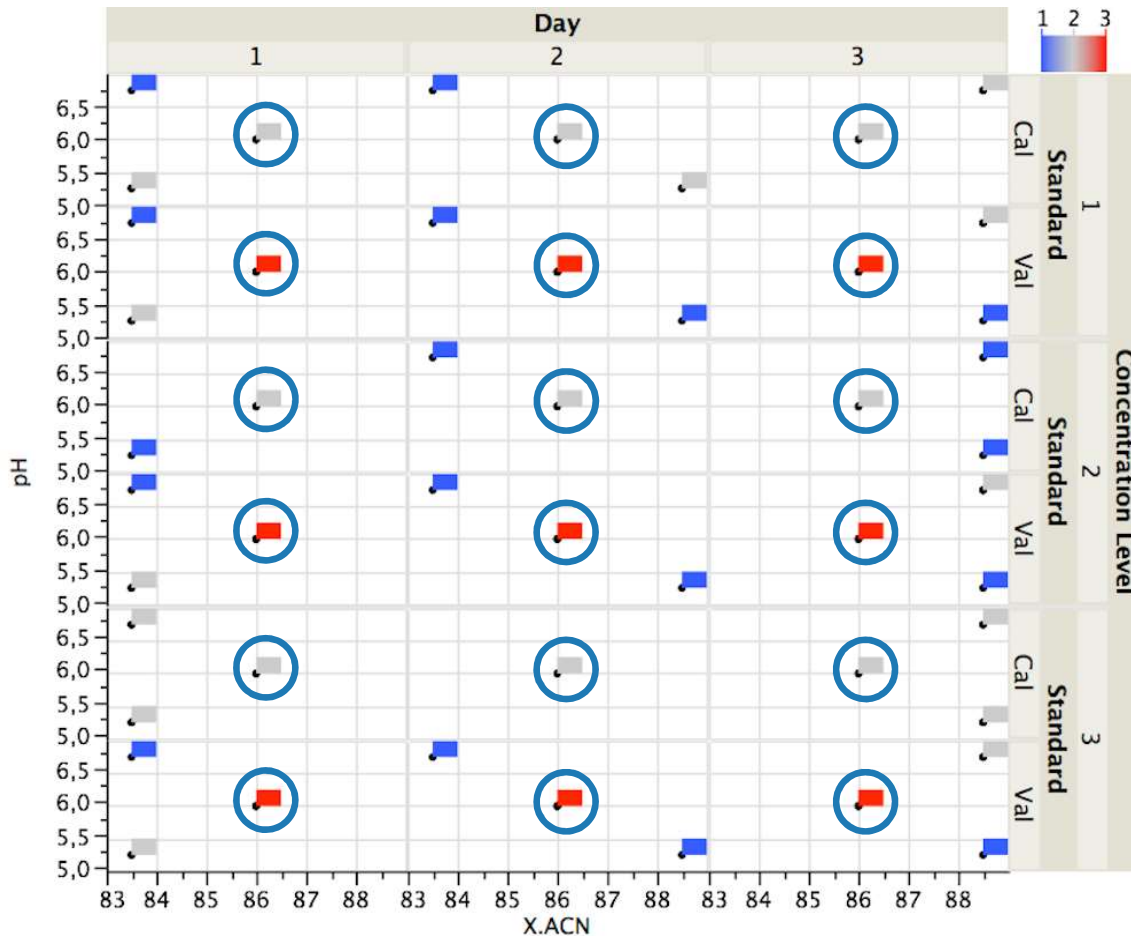
SV : triplicat

Design du protocole de validation :

3 séries X 3 répétitions / niv.

Condition optimale : 86% ACN / pH : 6 / 50°C

Protocole de validation de l'espace opérationnel ($T = 50^{\circ}\text{C}$)



○ : Condition optimale

1 2 3 : Nombre de répétition

Bleu : 1

Blanc : 2

Rouge : 3

A la condition optimale :

SC : duplicat

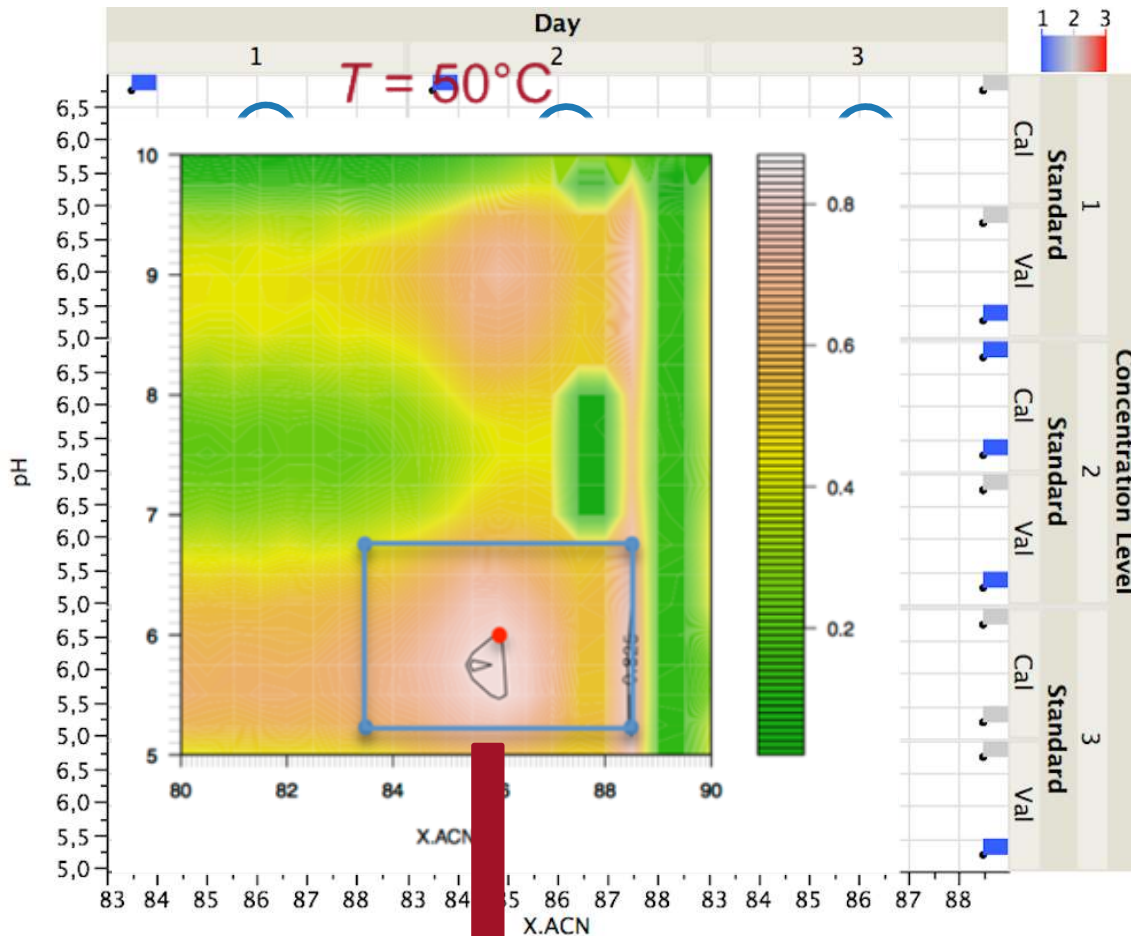
SV : triplicat

Design du protocole de validation :

3 séries X 3 répétitions / niv.

Condition optimale : 86% ACN / pH : 6 / 50°C

Protocole de validation de l'espace opérationnel ($T = 50^{\circ}\text{C}$)



○ : Condition optimale

1 2 3 : Nombre de répétition

Bleu : 1

Blanc : 2

Rouge : 3

A la condition optimale :

SC : duplicat

SV : triplicat

Design du protocole de validation :

3 séries X 3 répétitions / niv.

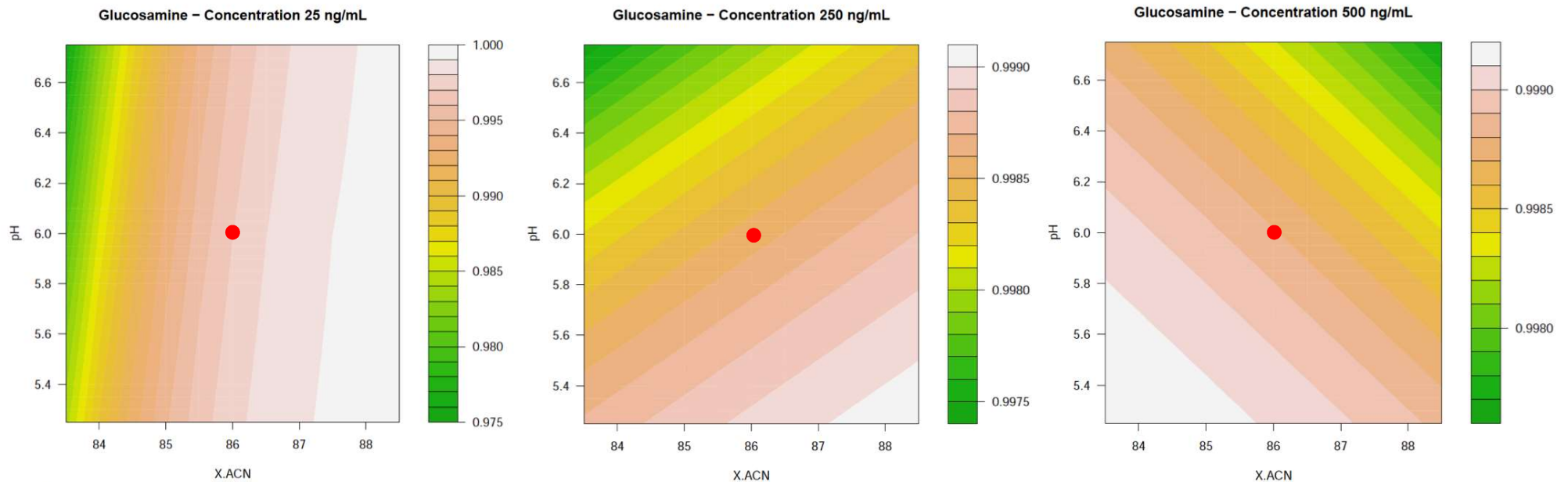
Surface de probabilité de succès de la validation

Condition optimale : 86% ACN / pH : 6 / 50°C

Probabilité de succès

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \times \text{pH} + \beta_2 \times \text{ACN} + \beta_3 \times \text{concentration} + \beta_4 \times \text{pH} \times \text{ACN} + \beta_5 \times \text{concentration} \times \text{pH} + \beta_6 \times \text{concentration} \times \text{ACN} + \varepsilon$$

Glucosamine (25 à 500 ng/mL) :

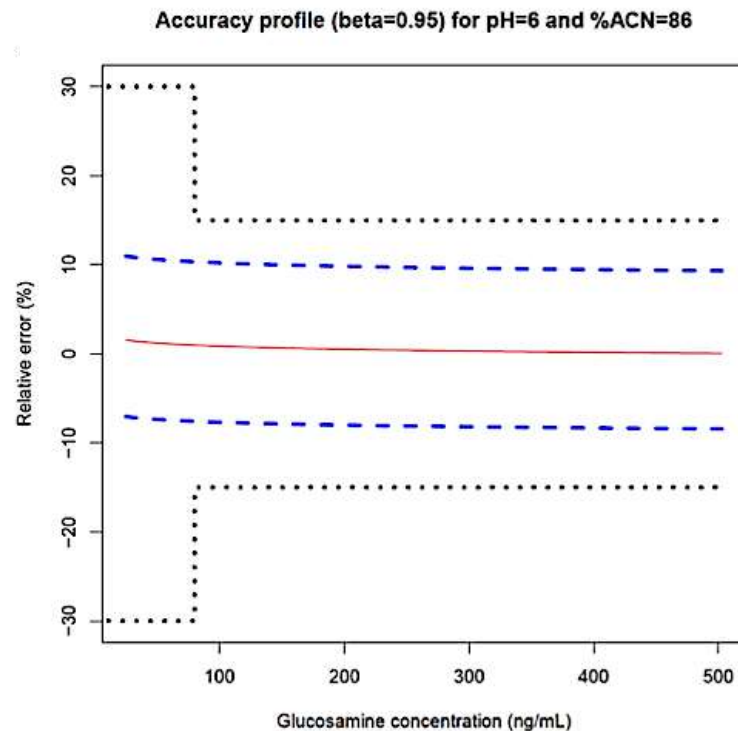


● Condition optimale

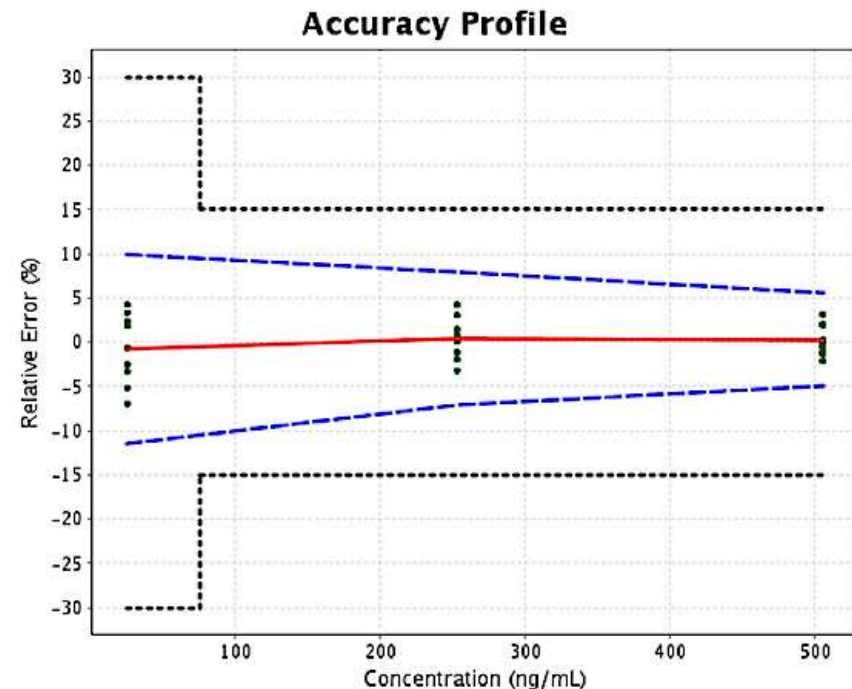
Validation de l'espace opérationnel

Glucosamine (condition optimale) ●

Validation à partir des données acquises sur **tous le domaine**

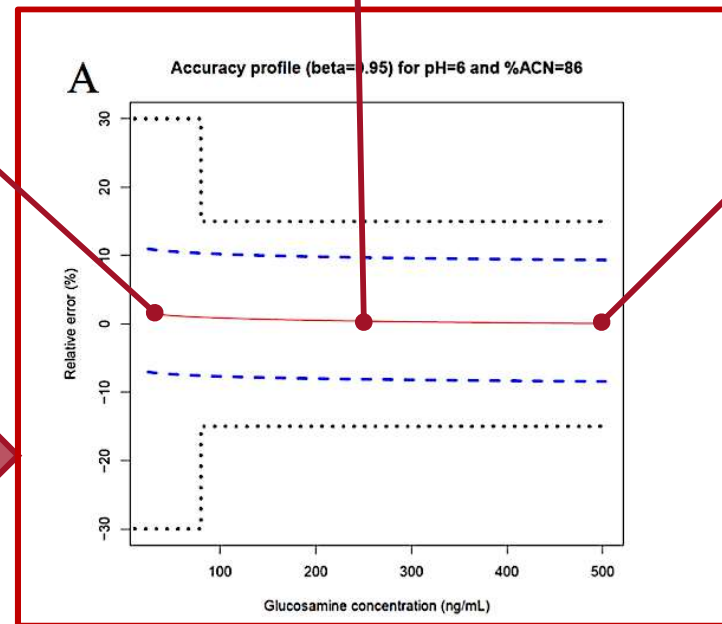
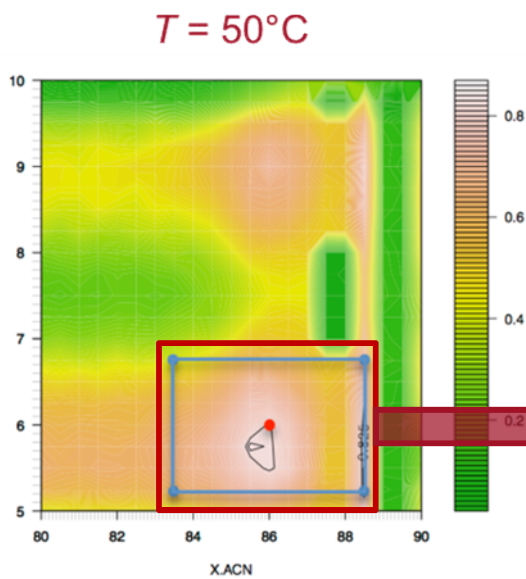
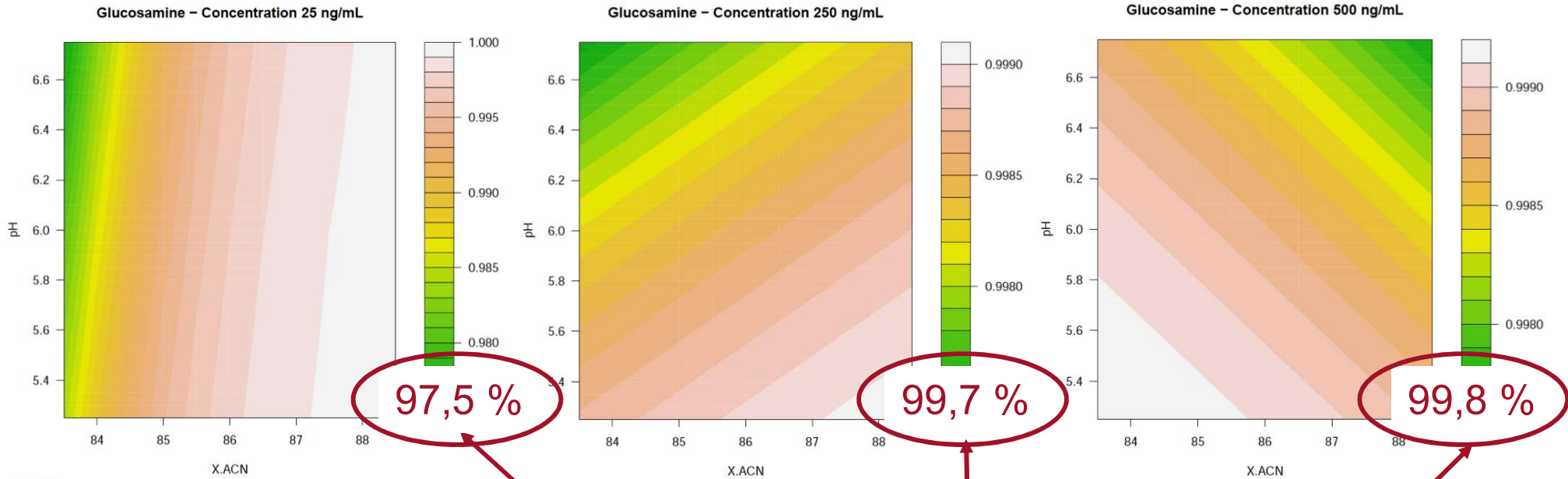


Validation à partir des données acquises à la condition optimale (classique)



Régression linéaire pondérée (1/X)

Vers une approche intégrée



Conclusions

- La **méthodologie DOE-DS** permet la modélisation de comportements chromatographiques
- L'étude de la propagation de l'erreur de prédiction permet de définir le **design space (AQbD)**.
- Cette méthodologie globale permet le développement de méthodes chromatographiques **optimales et robustes**.

Conclusions

- L'**erreur total** (exactitude) est le bon critère de décision pour accepter l'aptitude d'une méthode à quantifier (en routine).
- La **qualité des futurs résultats** ($\approx \lambda$) doit être l'objectif et non pas les performances passées de la méthode.
- Le **β -expectation tolerance interval** répond à cet objectif.
- Dans ces conditions, les **risques** sont connus au terme de la validation.

Conclusions

- **L'intégration** des étapes d'optimisation et validation en un seul exercice **est possible**.
- **L'évaluation approfondie du coût du DS quantitatif** devra encore être réalisée (nombres expériences *versus* la somme des expériences d'optimisation et de validation).
- **La vérification du caractère prédictif** de l'approche pour différentes conditions de l'espace opérationnel
- L'application à d'autres cas d'étude et à d'autres techniques séparatives

Cycle de vie des méthodes, vers une maîtrise intégrée des performances quantitatives

**Cédric Hubert^a, Pierre Lebrun^b,
Bruno Boulanger^b, Philippe Hubert^a**

^a Laboratory of Pharmaceutical Analytical Chemistry, CIRM,
Department of Pharmacy, University of Liege (ULg), Liège, Belgium

^b Arlanda S.A., Saint-Georges, Belgium