Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας

Κλινική Φαρμακευτική Ανάλυση

Μεταπτυχιακό Φαρμ. Ανάλυσης

Ιωάννης Ντότσικας
Αν. Καθηγητής

Επικύρωση βιοαναλυτικών μεθόδων

Αντίστοιχα με τις αναλυτικές εφαρμογές σε άλλα δείγματα (πρώτες ύλες, φαρμακοτεχνικά σκευάσματα κτλ) στη βιοανάλυση υπάρχουν συγκεκριμένα κριτήρια για την επικύρωση των μεθόδων.

Λόγω της **πολυπλοκότητας** των δειγμάτων και της **υποχρεωτικής προκατεργασίας**, τα κριτήρια που πρέπει να πληρούνται είναι πιο ελαστικά.

Βασική διαφορά: η εισαγωγή εσωτερικού προτύπου για τις χρωματογραφικές τεχνικές

Μέθοδος εσωτερικού προτύπου

Αποτελεί τη μέθοδο εκλογής για ποσοτικούς προσδιορισμούς σε βιολογικά υγρά, κυρίως λόγω των διαφοροποιήσεων από δείγμα σε δείγμα, που οφείλονται στα στάδια προκατεργασίας τους.

Στο διάγραμμα βαθμονόμησης η μετρούμενη παράμετρος είναι τώρα ο **λόγος** εμβαδών ή εντάσεων αναλύτη-εσωτερικού προτύπου.

Τα εσωτερικά πρότυπα κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες:

Α) στα ισοτοπικά επισημασμένα δομικά ανάλογα (MS),

Β) τα δομικά ομόλογα και

Γ) τις ουσίες που ανήκουν στην ίδια χημική κατηγορία με τον αναλύτη.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY
SCIENCE MEDICINES HEALTH

21 July 2011
EMEA/CHMP/EWP/192217/2009
Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)

Guideline on bioanalytical method validation

Draft agreed by the Efficacy Working Party	September 2009
Adoption by CHMP for release for consultation	19 November 2009
End of consultation (deadline for comments)	31 May 2010
Agreed by Pharmacokinetics Working Party (PKWP)	June 2011
Adoption by CHMP	21 July 2011
Date for coming into effect	1 February 2012

Guidance for Industry

Bioanalytical Method Validation

DRAFT GUIDANCE

This guidance document is being distributed for comment purposes only.

Comments and suggestions regarding this draft document should be submitted within 90 days of publication in the *Federal Register* of the notice announcing the availability of the draft guidance. Submit electronic comments to http://www.regulations.gov. Submit written comments to the Division of Dockets Management (HFA-305), Food and Drug Administration, 5630 Fishers Lane, rm. 1061, Rockville, MD 20852. All comments should be identified with the docket number listed in the notice of availability that publishes in the *Federal Register*.

For questions regarding this draft document contact (CDER) Brian Booth, 301-796-1508 or (CVM) John Kadavil, John.Kadavil@fda.hhs.gov

U.S. Department of Health and Human Services
Food and Drug Administration
Center for Drug Evaluation and Research (CDER)
Center for Veterinary Medicine (CVM)

September 2013
Biopharmaceutics

Revision 1

Επικύρωση (validation)

Ο όρος επικύρωση (validation) αποσκοπεί στον έλεγχο της **αξιοπιστίας** και της **καταλληλότητας** μιας αναλυτικής μεθόδου για να γίνει νομικά αποδεκτή από ένα επιστημονικό, κρατικό ή διεθνή φορέα.

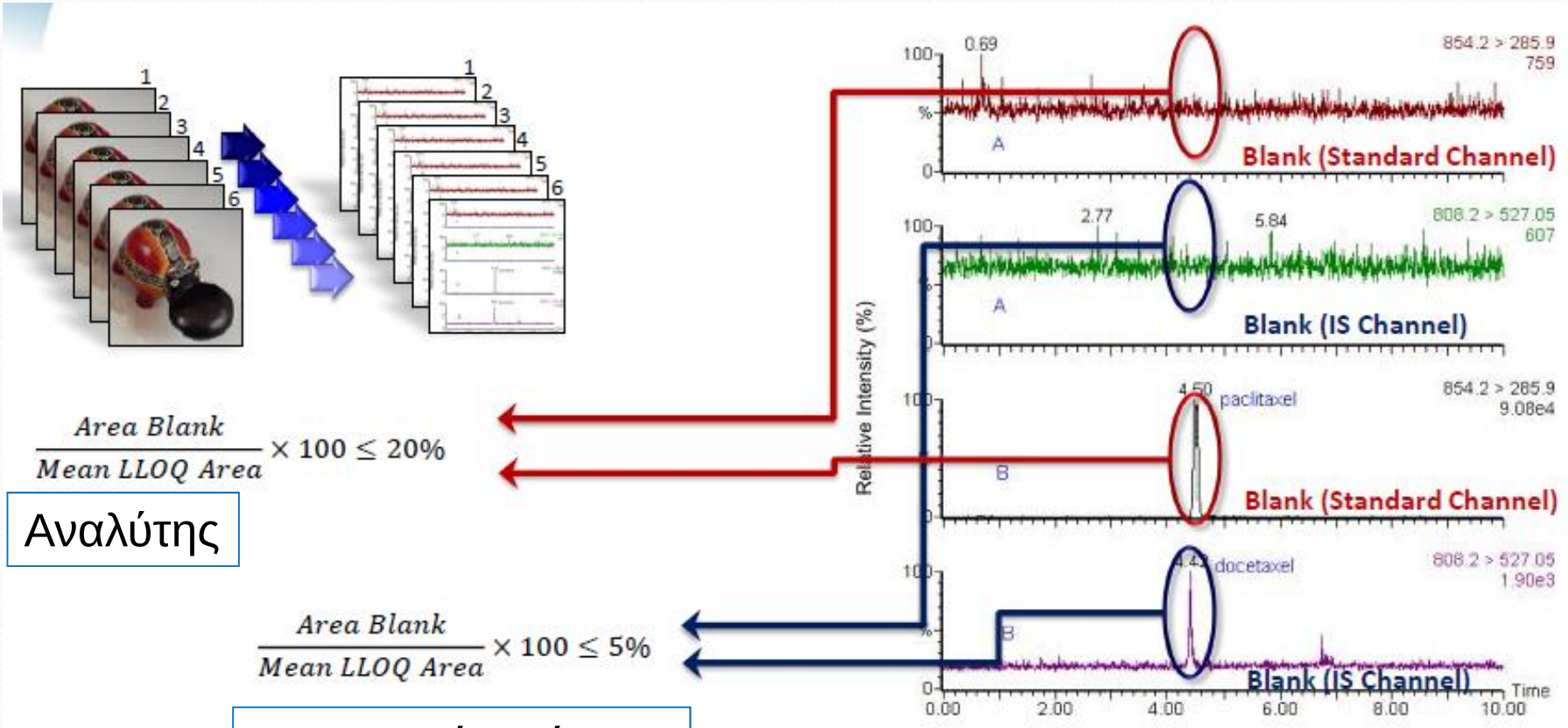
Η επικύρωση πρέπει να έχει **προηγηθεί** του κυρίως αναλυτικού μέρους (ποσοτικοποίηση αγνώστων δειγμάτων) εκτός ίσως από τη σταθερότητα μακράς διάρκειας

Αφού επικυρωθεί μία μέθοδος συνεχίζει να ελέγχεται με δείγματα ελέγχου ποιότητας (λιγότερες επαναλήψεις) σε κάθε αναλυτική δοκιμασία (καμπύλη αναφοράς, δείγματα ελέγχου ποιότητας, άγνωστα δείγματα)

Ελεγχόμενες παράμετροι:

•**Εκλεκτικότητα (selectivity)**
Μια μέθοδος θεωρείται πλήρως εκλεκτική, εάν παρέχει ορθά αναλυτικά αποτελέσματα για τα διάφορα συστατικά του δείγματος χωρίς καμία αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Εκφράζει την ικανότητα της αναλυτικής μεθόδου να διακρίνει τον αναλύτη από γνωστές προσμίξεις, υπολείμματα πρώτων υλών, μεταβολίτες, προϊόντα διάσπασης και συστατικά του μητρικού υλικού

Η εκλεκτικότητα ελέγχεται σε 6 διαφορετικές παρτίδες μητρικού υλικού (από διαφορετική προέλευση), χωρίς συνένωση (pooling)


1
2
3
4
5
6
1
2
3
4
5
6
$\frac{Area\ Blank}{Mean\ LLOQ\ Area} \times 100 \leq 20\%$
Αναλύτης
$\frac{Area\ Blank}{Mean\ LLOQ\ Area} \times 100 \leq 5\%$
Εσωτερικό πρότυπο
Relative Intensity (%)
100
%
0
0.69
854.2 > 285.9
759
A
Blank (Standard Channel)
2.77
5.84
808.2 > 527.05
607
A
Blank (IS Channel)
4.50
paclitaxel
854.2 > 285.9
9.08e4
B
Blank (Standard Channel)
4.42
docetaxel
808.2 > 527.05
1.90e3
B
Blank (IS Channel)
Time
0.00
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00

- **Μόλυνση εκ μεταφοράς (carry-over)**

Πρέπει να διασφαλίζεται πως δεν υπάρχει επίδραση στο σήμα από προηγούμενα δείγματα. Ελέγχεται εισάγοντας ένα λευκό δείγμα, αμέσως μετά το standard με την υψηλότερη συγκέντρωση (ULOQ). Πρέπει να έχει σήμα < 20% του σήματος του LLOQ (χαμηλότερο standard) για τον αναλύτη και < 5% του σήματος του εσωτερικού προτύπου.

- **Χαμηλότερο πρότυπο δείγμα (Lower Limit of Quantitation)**

Πρέπει να αντιστοιχεί σε συγκέντρωση ≥ LOQ (θεωρητική τιμή, S/N > 10). Στις μελέτες βιοϊσοδυναμίας πρέπει να επιλεγεί LLOQ < 5% του Cmax.

- **Καμπύλη αναφοράς (calibration curve)**

Αποτελείται από τουλάχιστον 6 σημεία (LLOQ……ULOQ) ή τόσα πρέπει να απομένουν μετά την αφαίρεση κάποιων σημείων.

Τα πρότυπα διαλύματα που την αποτελούν παρασκευάζονται στο ίδιο μητρικό υλικό με αυτό των αγνώστων (προσοχή στο αντιπηκτικό)

Η επιλογή του εύρους των συγκεντρώσεων γίνεται από τα δεδομένα της βιβλιογραφίας ή κάποια προκαταρκτικά πειράματα (για νέα δραστική ουσία). Π.χ. Η τιμή του ULOQ να είναι τουλάχιστον διπλάσια του Cmax, ώστε να λαμβάνεται υπόψιν η μεταβλητότητα ανά ασθενή

Μαζί με τα πρότυπα πρέπει να υπάρχει ένα λευκό δείγμα (blank) και ένα δείγμα που θα περιέχει μόνο το εσωτερικό πρότυπο (zero sample)

- **Καμπύλη αναφοράς (calibration curve)**

Οι υπολογισθείσες (μέσω της καμπύλης αναφοράς) συγκεντρώσεις των προτύπων (back calculated) πρέπει να έχουν <**15%** απόκλιση από την ονομαστική τιμή, εκτός από την LLOQ (<**20%**).

Δεν μπορούν να αφαιρεθούν οι LLOQ & ULOQ, καθώς ορίζουν το εύρος των συγκεντρώσεων.

Η καμπύλη αναφοράς, δεν είναι υποχρεωτικό να περιέχει επαναλήψεις των σημείων. Αν περιέχει, τα παραπάνω όρια πρέπει να πληρούνται τουλάχιστον στο 50% των σημείων.

Η τιμή του συντελεστή r πρέπει να είναι > 0.98

Η καμπύλη ΔΕΝ είναι υποχρεωτικό να είναι γραμμική

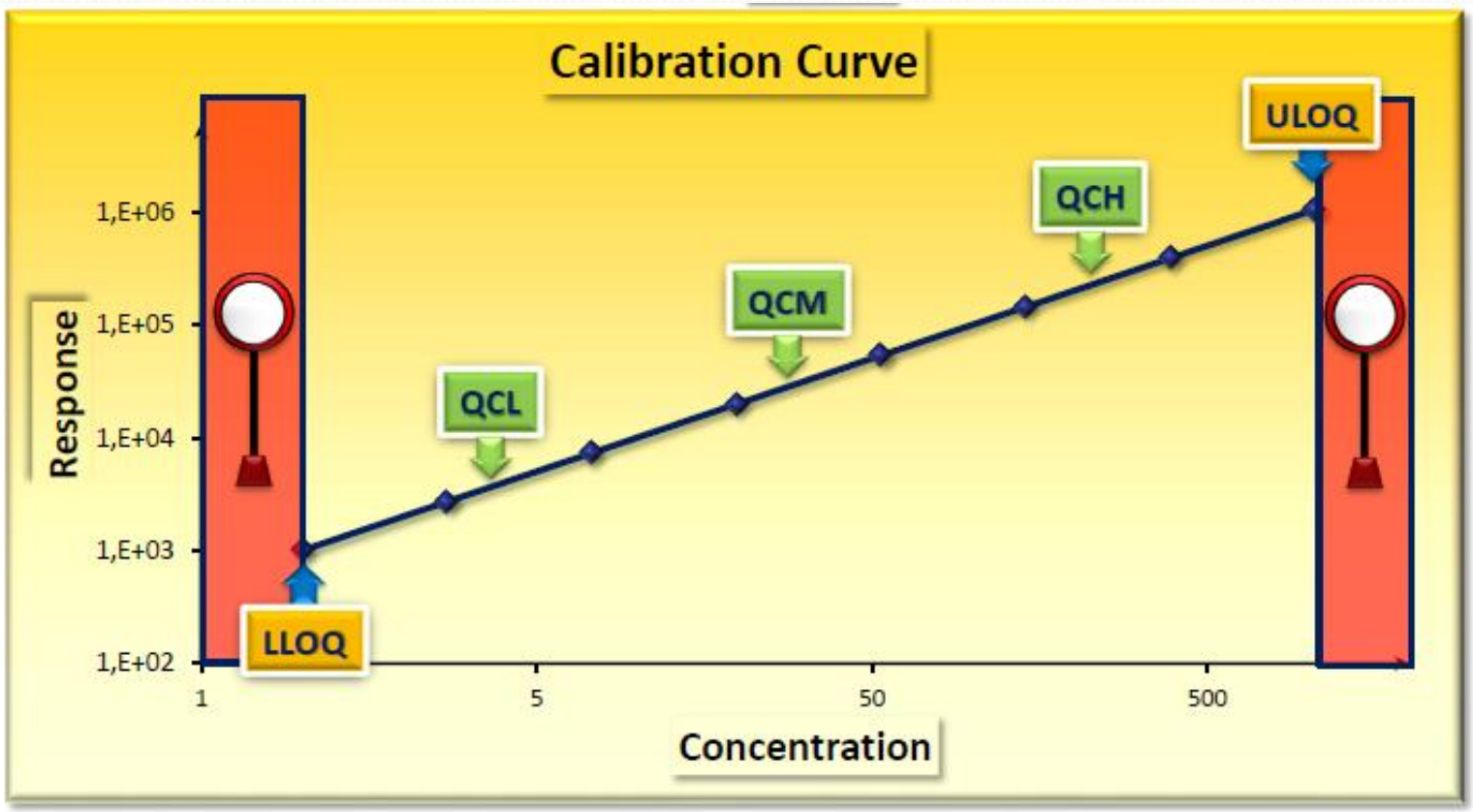
LLOQ=Lower limit of quantification

QCL=Low Quality Control

QCM=Medium Quality Control

QCH=High Quality Control

ULOQ=Upper Limit of quantification



- **Ορθότητα ή ακρίβεια (accuracy)**

Για την επικύρωση των μεθόδων και την αξιολόγηση των αναλυτικών προσδιορισμών είναι απαραίτητο να παρασκευαστούν από διαφορετικό διάλυμα παρακαταθήκης (stock solution) 4 ή 3 διαλύματα ελέγχου ποιότητας (Quality Control, QC samples) αντίστοιχα.

QC_L = LLOQ
QC_1 = 3 x LLOQ
QC_2 = ~ 50% ULOQ
QC_3 = > 75% ULOQ

Η ορθότητα εκφράζεται μέσω της % ανάκτησης (recovery %) ή της απόκλισης από την ονομαστική τιμή (% bias, % RE).

•**Ορθότητα ή ακρίβεια (accuracy)**

Για να είναι αποδεκτή η δοκιμασία (run) πρέπει τα 2/3 των επαναλήψεων* ΑΝΑ ΕΠΙΠΕΔΟ να είναι εντός των ορίων :

85-115% για τα επίπεδα 1-3
80-120% για το επίπεδο L

Τα αποτελέσματα δίνονται τόσο για έναν προσδιορισμό (intra-assay) όσο και μεταξύ των προσδιορισμών (inter-assay)

*Ενδεικτικά 6 για τις δοκιμασίες επικύρωσης και 3 για τους ποσοτικούς προσδιορισμούς με άγνωστα δείγματα

- **Πιστότητα (precision)**

Η πιστότητα εκφράζεται μέσω της τυπικής απόκλισης (Standard Deviation, SD) και κυρίως μέσω της % σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD)

Για να είναι αποδεκτή η δοκιμασία (run) πρέπει η πιστότητα ΑΝΑ ΕΠΙΠΕΔΟ να είναι εντός των ορίων :

15% για τα επίπεδα 1-3
20% για το επίπεδο L

Τα αποτελέσματα δίνονται τόσο για έναν προσδιορισμό (intra-assay) όσο και μεταξύ των προσδιορισμών (inter-assay)

- **Ακεραιότητα αραίωσης (dilution integrity)**

Οι πιθανές αραιώσεις των δειγμάτων με λευκό βιολογικό υλικό δεν πρέπει να επηρεάζουν την ορθότητα και την πιστότητα. Αφορά διαλύματα που ποσοτικοποιούνται σε τιμή > ULOQ

Για τα 'νέα' δείγματα μετά την ποσοτικοποίηση πρέπει να ισχύει:

Accuracy 85-115% ως προς την τιμή αναφοράς
Precision <15%

- **Ανάκτηση από εκχύλιση (Extraction Recovery)**

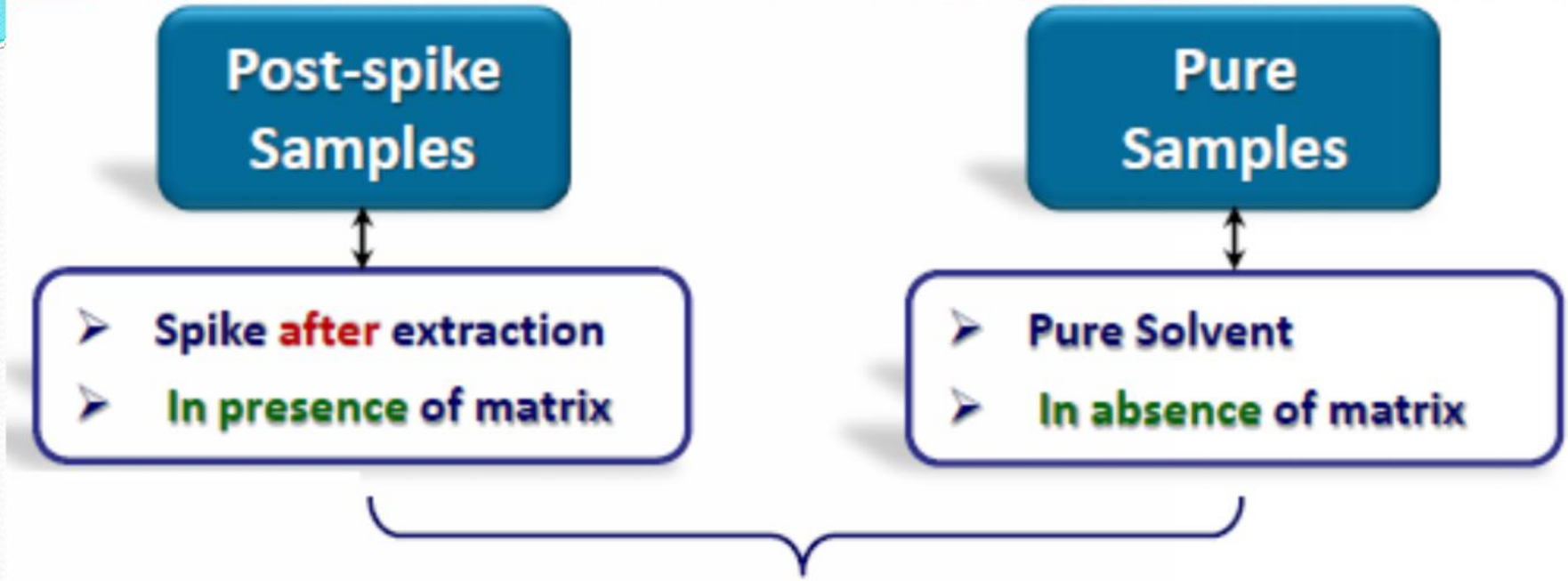
Δεν υπάρχουν κατώτερα όρια. Αυτό που πρέπει να ελέγχεται είναι η ομοιόμορφη συμπεριφορά σε όλο το μήκος της καμπύλης αναφοράς (3 επίπεδα τιμών)

•Επίδραση μητρικού υλικού (matrix effect)

Αφορά κυρίως αναλύσεις που γίνονται με **φασματόμετρα μαζών** ως ανιχνευτές.
Ο έλεγχος γίνεται με χρήση **6** διαφορετικών παρτίδων βιολογικού υλικού.
Η επίδραση του μητρικού υλικού προσδιορίζεται συγκρίνοντας το εμβαδό που προκύπτει από διάλυμα (post-spike sample) που έχει παρασκευαστεί από την ανασύσταση λευκού (blank) βιολογικού δείγματος με το εμβαδό δείγματος σε κινητή φάση (pure sample).

Η σύγκριση γίνεται σε **2 επίπεδα συγκεντώσεων**, ένα χαμηλό και ένα υψηλό.

Συνιστάται ακόμη η χρησιμοποίηση 'μη φυσιολογικών' βιολογικών δειγμάτων, όπως: αιμολυμένο ή υπερλιπιδαιμικό πλάσμα

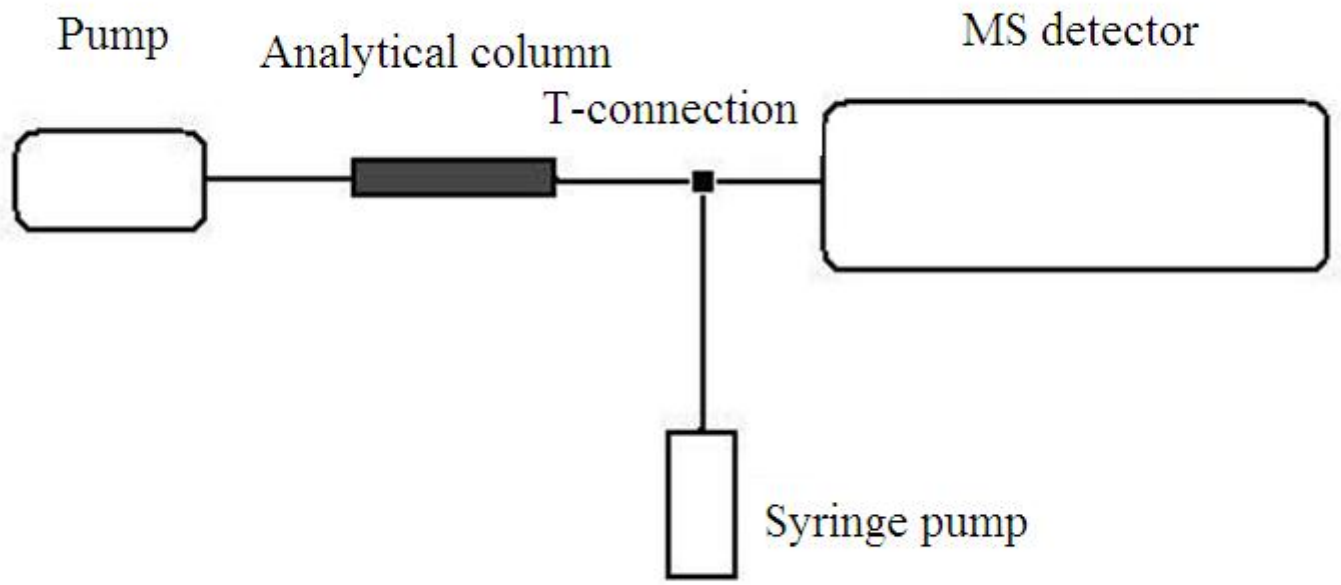


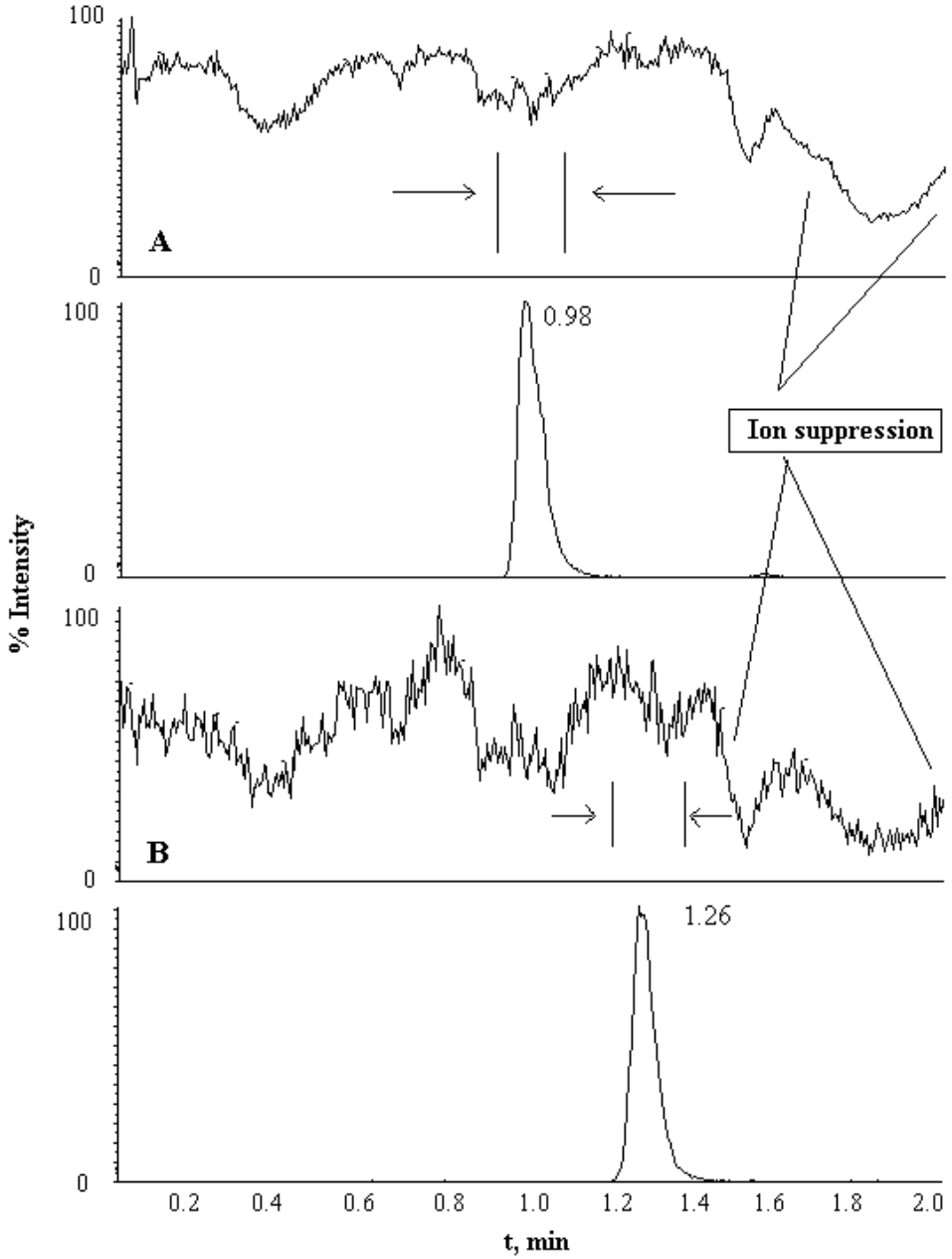
$$\text{Matrix Factor}(MF) = \frac{Area_{Post-Spike}}{Area_{Pure}}$$

Υπολογίζεται ο MF τόσο για τον αναλύτη, όσο και για το εσωτερικό πρότυπο. Ακολούθως επέρχεται κανονικοποίηση διαιρώντας τα 2 μεγέθη (**Normalized MF**)

Για να δειχθεί η απουσία επίδρασης μητρικού υλικού πρέπει να υπολογιστεί % **RSD** για το Normalized MF στις 6 παρτίδες < **15%**

Ποιοτική ανίχνευση της επίδρασης μητρικού υλικού




100
0
A
100
0.98
0
Ion suppression
% Intensity
100
0
B
100
1.26
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
t, min

- **Σταθερότητα (stability)**

Η σταθερότητα εξετάζεται σε διάφορα επίπεδα και πρέπει να διασφαλίζεται πριν την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων.
Η σύγκριση γίνεται με '**φρέσκα**' διαλύματα χρησιμοποιώντας **2** επίπεδα συγκεντρώσεων ή μόνο με δείγματα που έχουν υποβληθεί σε δοκιμασία σταθερότητας και τα οποία πρέπει να ποσοτικοποιούνται με accuracy 85-115%

1) **Σταθερότητα διαλυμάτων παρακαταθήκης** (3 μήνες) & **διαλυμάτων εργασίας** (1-2 εβδομάδες)

Επιτρεπόμενη απόκλιση < 5%

2) **Σταθερότητα μικρής διάρκειας** (6 h) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

Επιτρεπόμενη απόκλιση < 15%

3) **Σταθερότητα μακράς διάρκειας** (π.χ. 4 μήνες) σε καταψύκτη

Επιτρεπόμενη απόκλιση < 15%

4) **Σταθερότητα μετά από 3 κύκλους ψύξης-απόψυξης**

Επιτρεπόμενη απόκλιση < 15%

5) **Σταθερότητα εντός αυτόματου δειγματολήπτη** (για όσο χρόνο παραμένουν τα δείγματα)

Μερική επικύρωση (partial validation)

Λαμβάνει χώρα όταν έχουν συμβεί μικρές αλλαγές στην αναλυτική μέθοδο, π.χ.

-αλλαγή εξοπλισμού,
-αλλαγή εργαστηριακού χώρου,
-αλλαγή εύρους καμπύλης αναφοράς
-αλλαγή όγκου δείγματος
-αλλαγή (μικρή) στην κατεργασία
-αλλαγή στις συνθήκες αποθήκευσης

Μπορεί να περιλαμβάνει μία αναλυτική δοκιμασία, έως και σχεδόν όλες. Η αιτία της μερικής επικύρωσης πρέπει ρητά να αναφέρεται και να αιτιολογείται

Επανάληψη ανάλυσης (sample reanalysis)

Πραγματοποιείται στις ακόλουθες περιπτώσεις:

-Απόρριψη όλης της δοκιμασίας, λόγω μη εκπλήρωσης των κριτηρίων
-Αν η συμπεριφορά του εσωτερικού προτύπου είναι πολύ διαφορετική στα πρότυπα και στα άγνωστα δείγματα
-Προβληματική ένεση ή βλάβη στον εξοπλισμό
-Η συγκέντρωση είναι >ULOQ
-Προβληματική χρωματογραφία

Επανάληψη ανάλυσης για λόγους ελέγχου (incurred sample reanalysis, ISR)

Πρόκειται για νέα προσθήκη στις κατευθυντήριες οδηγίες και αφορά έναν επιπλέον έλεγχο μετά το πέρας των μετρήσεων των δειγμάτων.
Αν η μελέτη έχει < 1000 δείγματα πρέπει να επαναναλυθούν το **10%** των δειγμάτων, ενώ για > 1000 δείγματα το 5 % των δειγμάτων.

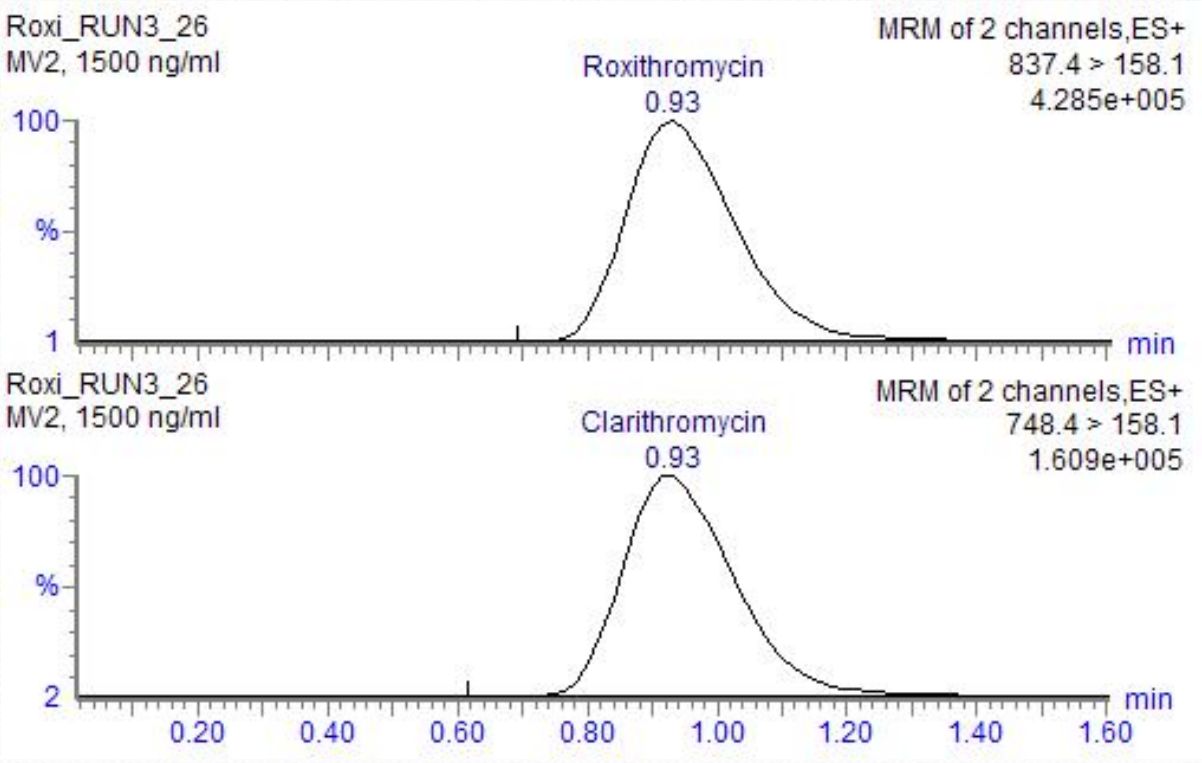
Η μέθοδος θεωρείται αξιόπιστη αν για τουλάχιστον στο **67%** των μετρήσεων ισχύει:

(repeat sample–original sample)*100/mean < 20%

Λόγοι αποτυχίας ISR

- Σ**ταθερότητα δείγματος**: μετατροπή του φαρμάκου σε μεταβολίτη και αντίστροφα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ή της κατεργασίας ή της ανάλυσης
- **Ανομοιογένεια δείγματος**: αναποτελεσματική ανάμειξη ή μικρός όγκος δείγματος
- **Επίδραση μητρικού υλικού**: ενίσχυση ή καταστολή σήματος
- **Διαφορετική εκχύλιση**: ειδικά σε ειδικές κατηγορίες πληθυσμού
- **Ανθρώπινο σφάλμα**

Σε περίπτωση χρήσης ανιχνευτή MS/MS δεν είναι απαραίτητος (πλην εξαιρέσεων) ο διαχωρισμός αναλύτη και εσωτερικού προτύπου



Αναλυτικοί προσδιορισμοί (analytical runs)

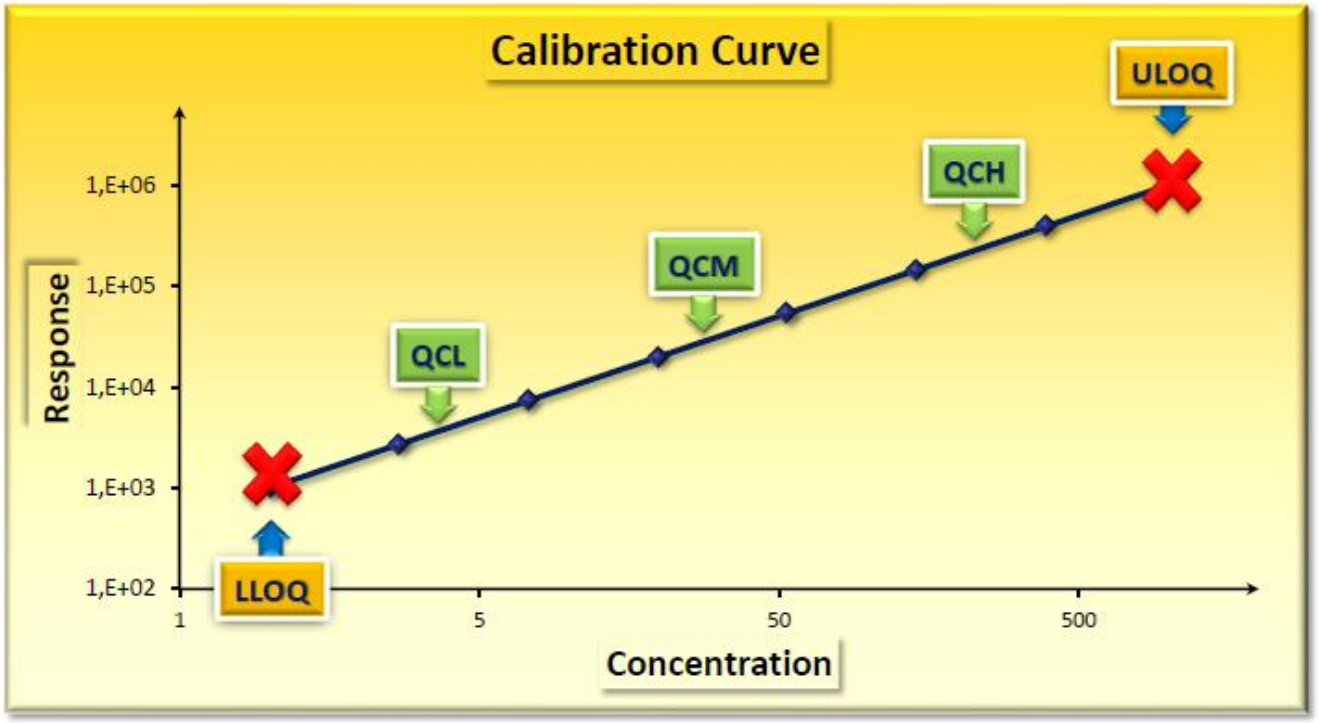
Αφορούν προσδιορισμούς για **ποσοτικοποίηση αγνώστων**. Περιλαμβάνουν:

1. Δείγμα καταλληλότητας συστήματος σε διαλύτη (system suitability)
2. Βιολογικό δείγμα λευκό (blank) και περιέχοντα μόνο το εσωτερικό πρότυπο (zero)
3. Καμπύλη αναφοράς
4. Δείγμα για επιμόλυνση (carry-over)
5. 2-3 σειρές δειγμάτων QCs, 3 επιπέδων (QC_1, QC_2, QC_3) που παρεμβάλλονται μεταξύ των αγνώστων

Σημειώσεις:

-Δεν ποσοτικοποιούνται 100άδες δείγματα με μία καμπύλη αναφοράς

-Η κατεργασία αγνώστων είναι ίδια με αυτής της καμπύλης/QCs, συμπεριλαμβανομένου του ίδιου αντιπηκτικού



Κριτήρια αποδοχής:

-Ισχύουν τα κριτήρια αποδοχής της καμπύλης αναφοράς και των QCs που αναφέρθηκαν στην επικύρωση της μεθόδου

-Ειδικά για τα QCs, πρέπει μεμονωμένα να είναι τουλάχιστον το 50% για κάθε επίπεδο εντός των προδιαγραφών ορθότητας (85-115%)

Παράγοντας ζύγισης (weighting factor)

Στις βιοαναλύσεις υπάρχουν **μεγάλα εύρη συγκεντρώσεων**.

Σε αυτές τις περιπτώσεις, η επίδραση των σημείων με μεγάλη συγκέντρωση στην καμπύλη αναφοράς είναι πολύ μεγάλη, με αποτέλεσμα την εμφάνιση σημαντικών αποκλίσεων στις τιμές των προτύπων με πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (από την καμπύλη αναφοράς).

Σε αυτές τις περιπτώσεις (και ας έχω άριστη τιμή R^2!!!!) επιβάλλεται μια διόρθωση με χρήση του παράγοντα ζύγισης.

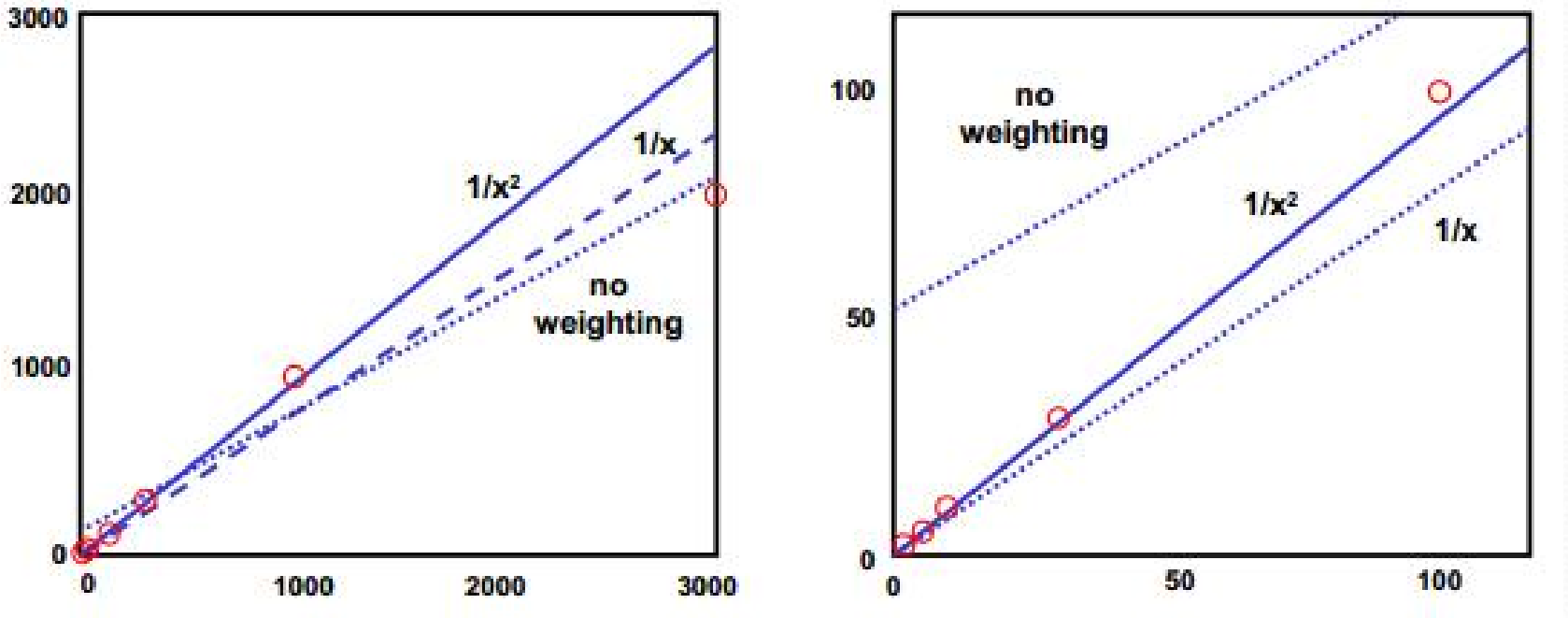
Υπάρχουν διάφορες διορθώσεις, με τις πλέον συνήθεις τους παράγοντες ζύγισης $1/x$, $1/x^2$, $1/y$, $1/y^2$.

Πώς ελέγχω αν χρειάζεται η εισαγωγή παράγοντα ζύγισης;

1) Με διαγράμματα υπολοίπων (ετεροσκεδαστικότητα)

2) Με *F*-test (ετεροσκεδαστικότητα)

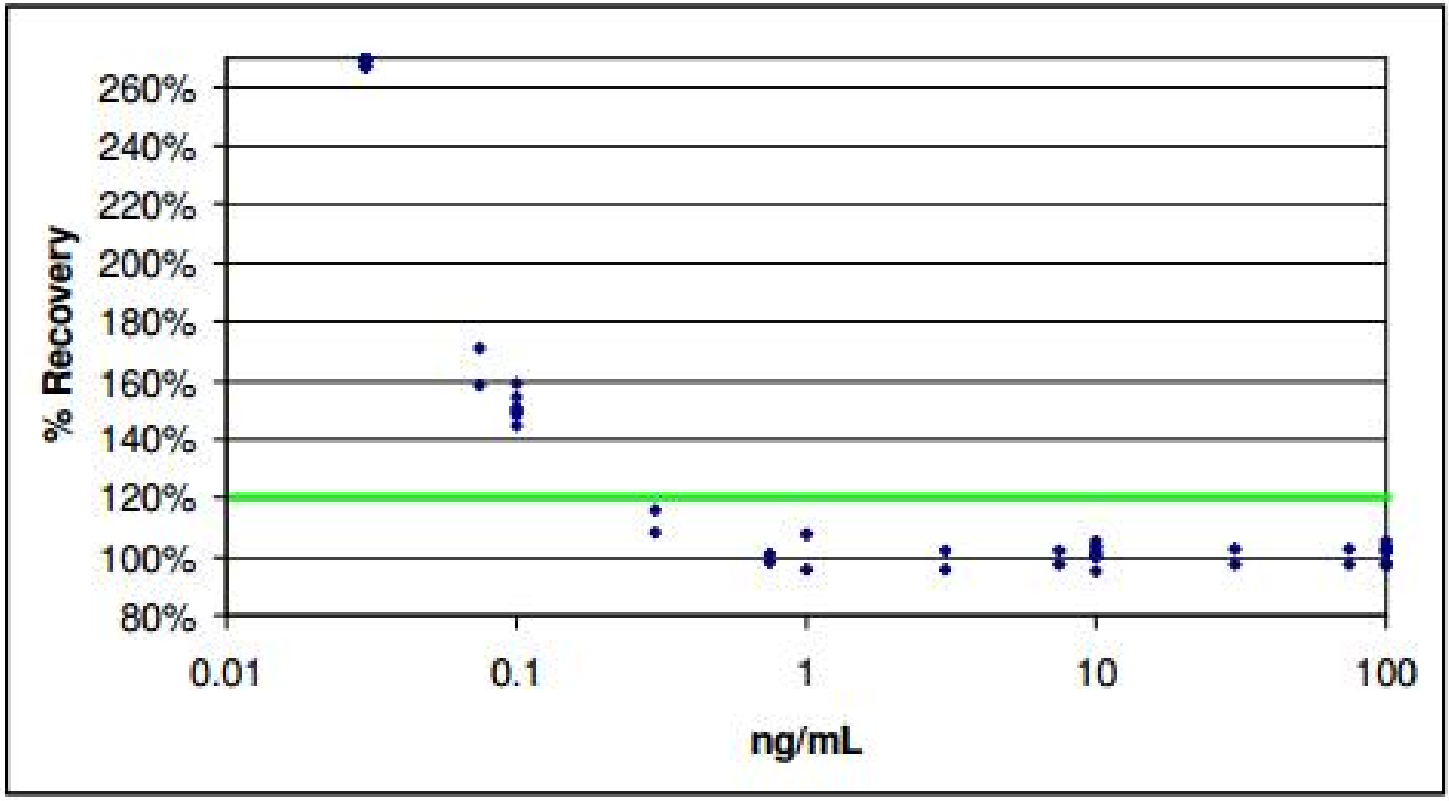
3) Με επαναποσοτικοποίηση των σημείων της καμπύλης αναφοράς. Συνήθως στα 2 πρώτα σημεία υπάρχει σημαντικό σφάλμα.



Στο δεξί γράφημα φαίνεται η ελαχιστοποίηση του σφάλματος στις μικρές συγκεντρώσεις με επιλογή του σωστού παράγοντα ζύγισης.

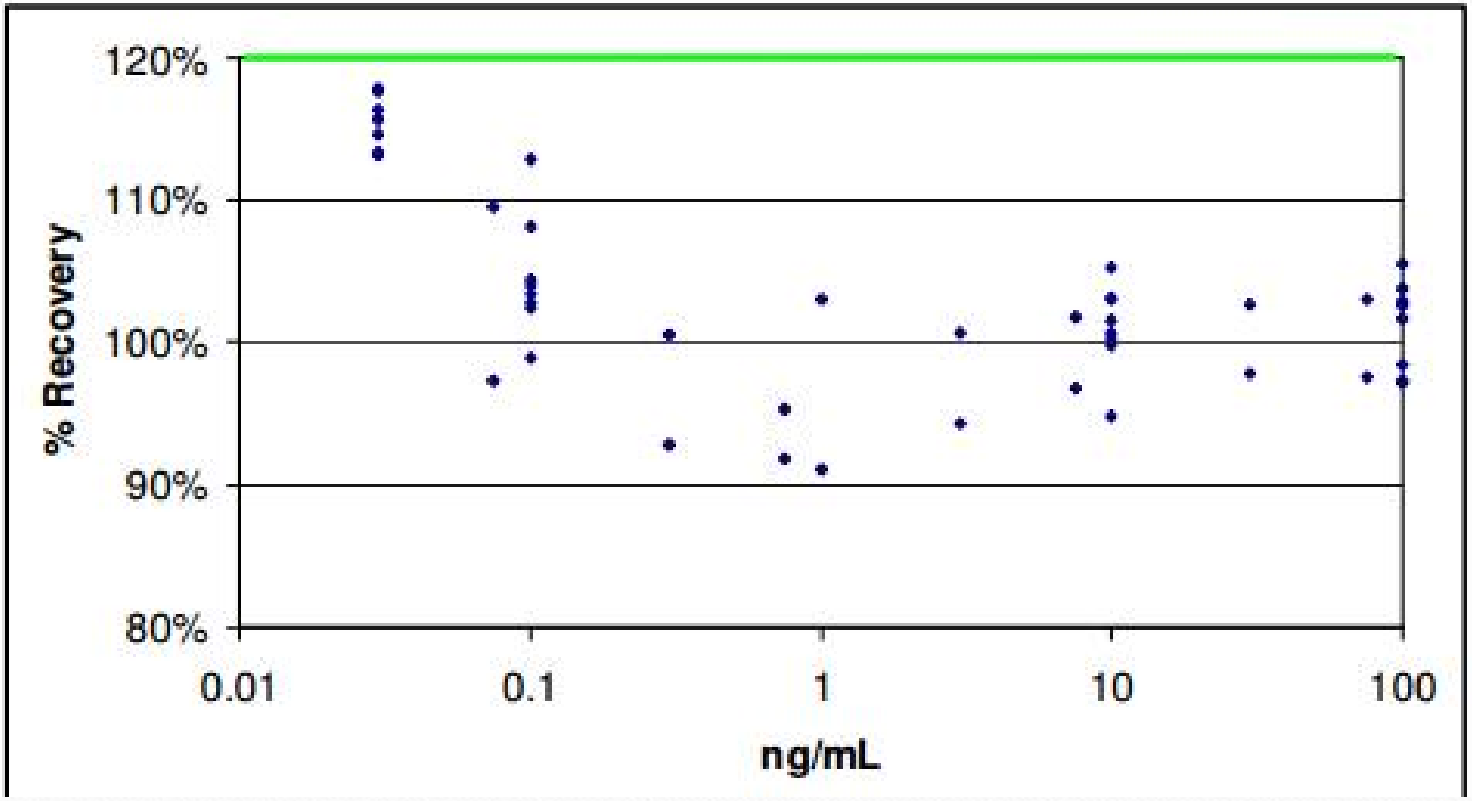
Η βελτίωση είναι εμφανής και από διαγράμματα υπολοίπων (residual plots)

Residuals (no weighting)

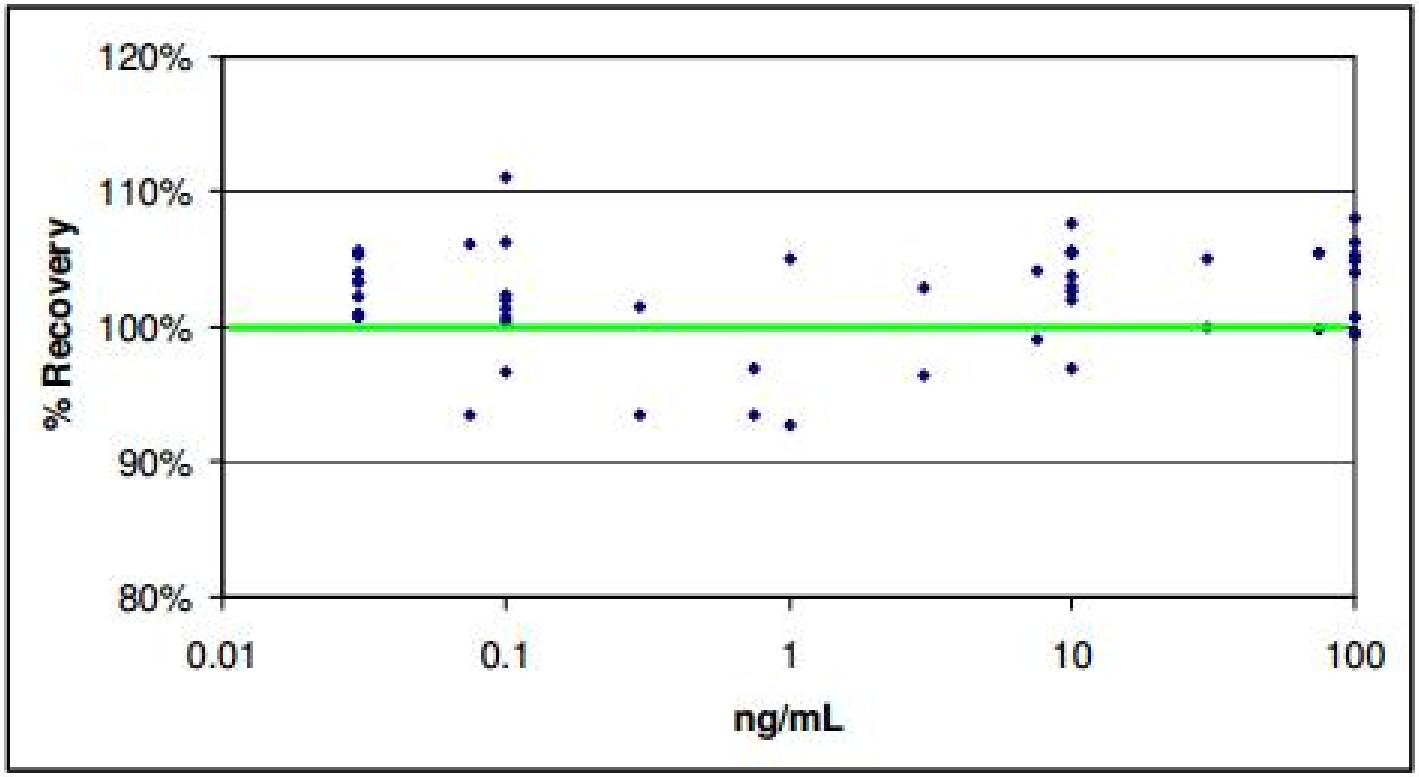


Ετεροσκεδαστικότητα

Residuals (1/x weighting)



Residuals ($1/x^2$ weighting)



Ομοσκεδαστικότητα

Πώς επιλέγω τον κατάλληλο παράγοντα ζύγισης (επί των ιδίων δεδομένων);

1) Υπολογίζω το %RE (σχετικό σφάλμα) για κάθε σημείο της καμπύλης αναφοράς

2) Τα αθροίζω για να λάβω το Σ%RE για ΚΑΘΕ παράγοντα ζύγισης

3) Επιλέγεται και 'καθιερώνεται' ο παράγοντας ζύγισης με τη μικρότερη τιμή για περισσότερες από μία καμπύλες