

PROSPECTS

IN PHARMACEUTICAL SCIENCES

Prospects in Pharmaceutical Sciences, 21 (3), 57-63
<https://prospects.wum.edu.pl/>

Review Article

ICH M10 GUIDELINE - A HARMONIZED GLOBAL APPROACH TO BIOANALYSIS

WYTYCZNA ICH M10 - JEDNOLITE PODEJŚCIE DO BIOANALIZY NA CAŁYM ŚWIECIE

Elżbieta Gniazdowska*^{1,2}, Edyta Gilant¹, Katarzyna Buś-Kwaśnik¹

¹ *Lukasiewicz Research Network - Industrial Chemistry Institute, Pharmaceutical Analysis Laboratory, 8 Rydygiera, 01-793 Warsaw, Poland*

² *Department of Drug Chemistry, Doctoral School, Medical University of Warsaw, 61 Żwirki i Wigury, 02-091 Warsaw, Poland.*

* Correspondence, e-mail: elzbieta.gniazdowska@ichp.lukasiewicz.gov.pl

Received: 19.06.2023 / Accepted: 28.08.2023 / Published: 22.09.2023

ABSTRACT

Bioanalytical methods are used in research on small-molecule and large-molecule drug products to determine analytes and their metabolites in biological matrices such as blood, plasma, serum, urine, feces, saliva, other biological fluids, or tissues. Validation of a bioanalytical method is the essential step before the implementation of the method into routine use in toxicokinetic or pharmacokinetic studies. Harmonization of recommendations for the validation of bioanalytical methods has been advocated for many years. In 2022, The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) finished the work on final version of the ICH M10 guideline, as a combination of four regional guidelines (American, European, Brazilian and Japanese). The document unifies rules for the performance of the bioanalytical method validation and documentation of sample analysis from clinical and non-clinical studies in most countries around the world, which are submitted to registration authorities.

KEYWORDS: bioanalytical method validation, reliability, harmonization, bioavailability, pharmacokinetics.

STRESZCZENIE

Metody bioanalityczne wykorzystywane są w badaniach produktów leczniczych do oznaczania stężeń analitów i ich metabolitów w matrycach biologicznych (krew, osocze, surowica, mocz, kał, ślina, inne płyny biologiczne lub tkanki). Metody przed zastosowaniem do rutynowych analiz w badaniach farmakokinetycznych i toksykokinetycznych powinny być zwalidowane. Od wielu lat dążono do ogólnosięwiatowego ujednoczenia zaleceń dotyczących zakresu i sposobu przeprowadzania walidacji metod bioanalitycznych. W 2022 roku Międzynarodowa Rada Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi (*ang. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use - ICH*) ukończyła prace nad ostateczną wersją wytycznej ICH M10 będącą połączeniem 4 regionalnych wytycznych (amerykańskiej, europejskiej, brazylijskiej i japońskiej). Dokument scala zasady przeprowadzania walidacji metod bioanalitycznych i dokumentowania wyników z badań klinicznych i nieklinicznych prowadzonych w większości krajów na całym świecie na potrzeby rejestracji produktów leczniczych.

SŁOWA KLUCZOWE: walidacja metod bioanalitycznych, wiarygodność, harmonizacja, biodostępność, farmakokinetyka.

Article is published under the CC BY license.

1. Zastosowanie metod bioanalitycznych i znaczenie harmonizacji

Metody bioanalityczne są stosowane w badaniach rozwojowych produktów leczniczych zawierających substancje drobnocząsteczkowe i wielkocząsteczkowe, do oznaczania substancji czynnych i/lub metabolitów w materiale

biologicznym zwierzęcym lub ludzkim. Opracowywane są w matrycach biologicznych takich jak krew, osocze, surowica, mocz, kał, ślina, inne płyny biologiczne lub tkanki [1]. Oznaczenia analitu w materiale biologicznym należy przeprowadzić z zastosowaniem zwalidowanej metody bioanalitycznej. Spełnienie kryteriów akceptacji dla

wszystkich testów walidacyjnych potwierdza, że metoda jest adekwatna do zamierzonego celu, a otrzymane wyniki analizy próbek badanych są wiarygodne i powtarzalne [1-3]. Z procesu walidacji metody sporządzany jest raport przygotowany zgodnie z formatem Wspólnego Dokumentu Technicznego (*ang. Common Technical Document - CTD*) dla badań prowadzonych na materiale biologicznym ludzkim (CTD 5.3.1.2) i zwierzęcym (CTD 4.2.2.1)[4], które następnie przez Sponsora badania przedkładane są organom regulacyjnym w procesie dopuszczenia leku do obrotu [1].

Walidacja metod bioanalitycznych była do 23.01.2023 prowadzona zgodnie z wytyczną obowiązującą na danym obszarze i wydaną przez następujące instytucje:

- w USA przez amerykańską Agencję ds. Leków i Żywności (*ang. Food and Drug Administration, US FDA*) z 2018 r. [3],
- w Europie przez Europejską Agencję Leków (*ang. European Medicines Agency, EMA*) z 2011 r. [2],
- w Brazylii przez Narodową Agencję Nadzoru Zdrowia (*ang. The National Health Surveillance Agency, ANVISA*) [5],
- w Japonii przez Ministerstwo Zdrowia i Opieki Społecznej (*ang. Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, MHLW*) z 2013 r. dla małych cząsteczek [6] oraz z 2014 r. dla związków wielkocząsteczkowych [7],
- w Kanadzie przez EMA [2] oraz uzupełnioną przez *Health Canada*.

Od momentu implementacji wytycznej ICH M10 [1] będącej połączeniem [8] wytycznych FDA, EMA i MHLW [2,3,6,7] w większości krajów na świecie obowiązują jednolite zasady przeprowadzania walidacji metod bioanalitycznych i dokumentowania analizy próbek z wszystkich faz badań klinicznych, w tym z porównawczych badań dostępności biologicznej/ równoważności biologicznej (*ang. bioavailability/bioequivalence study - BA/BE study*) oraz nieklinicznych badań z zakresu toksykokinetyki lub farmakokinetyki [1].

Ujednolicenie rekomendacji dotyczących walidacji metod bioanalitycznych było postulowane od wielu lat [9]. Harmonizacja umożliwiła stosowanie wspólnych zaleceń przez większość organów dopuszczających produkty lecznicze do obrotu, co niesie korzyści dla firm oraz pacjentów:

- poprawę efektywności procesu oceny dokumentacji rejestracyjnej,
- skrócenie czasu wprowadzenia produktu leczniczego do obrotu,
- zmniejszenie kosztów dla pacjenta wynikających z niepotrzebnego powielania badań klinicznych [10].

Harmonizacja wytycznej wpisuje się także w zasadę 3R (*ang. Reduce, Refine, Replace*) [11] prowadzącą do zmniejszenia liczby niepotrzebnych badań na zwierzętach bez uszczerbku dla badania oceny bezpieczeństwa i skuteczności leczenia.

Wytyczne organów rejestracyjnych, tworzone przez ekspertów z komitetów naukowych i grup roboczych, zapewniają spójne zasady rozwoju produktów leczniczych zgodnie z najwyższymi standardami jakości i spójności danych bioanalitycznych. Wytyczne są zbiorami zaleceń służących zapewnieniu dostępności wysokiej jakości, skutecznych i bezpiecznych produktów leczniczych z korzyścią dla pacjentów. Prace nad zarysem i koncepcją wytycznej ICH M10 rozpoczęto w 2016 roku [8]. Następnie w okresie 14.03-01.09.2019 projekt wytycznej poddano konsultacjom społecznym przeprowadzonym przez 10 organów rejestracyjnych (ICH, EMA, FDA, MHLW/PMDA, Health Canada, Swissmedic, ANVISA, MFDS, NMPA, TFDA) [12]. Wdrożenie ICH

M10 w poszczególnych rejonach rejestracyjnych na dzień opracowania niniejszej pracy przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Wdrożenie wytycznej ICH M10 przez niektórych członków ICH [13].

Nazwa członka ICH	Data implementacji/ planowanej implementacji*
Health Canada (Kanada)	20 stycznia 2023
EC - Komisja Europejska / EMA (Europa)	21 stycznia 2023
Swissmedic (Szwajcaria)	25 maja 2022
US FDA (Stany Zjednoczone)	7 listopada 2022
MFDS (Republika Korei)	1 października 2023*
NMPA (Chiny)	29 czerwca 2023

2. ICH M10 - zmiany w prowadzeniu testów walidacyjnych w bioanalizie

Wytyczna ICH M10 [1] wprowadza modyfikacje w testach prowadzonych podczas walidacji metod bioanalitycznych w porównaniu z wytyczną EMA [2] oraz FDA [3]. W Tabeli 2 opisano najważniejsze zmiany w ocenie parametrów walidacyjnych dla leków chemicznych i biologicznych analizowanych metodami chromatograficznymi z pominięciem wymagań dla techniki wiązania ligandów ze względu na specyfikę badań prowadzonych przez autorów pracy. Laboratoria pracujące dotychczas zgodnie z wytyczną FDA [3] powinny zaktualizować lub zmodyfikować Standardowe Procedury Operacyjne w opisie testów: specyficzność, selektywność, wpływ matrycy, powtarzalność ponownego dozowania oraz stabilność. Dla laboratoriów prowadzących walidację metod bioanalitycznych zgodnie z wytyczną EMA [2] zmianie ulegnie sposób postępowania podczas oceny wpływu matrycy, specyficzności, selektywności, stabilności oraz dodatkowo wprowadzony zostanie opis dotyczący oceny odzysku i powtarzalności dozowania.

2.1. Selektywność, specyficzność

Zalecenia dotyczące oceny selektywności metody bioanalitycznej w obecności matrycy i substancji interferujących, wstecznej konwersji i wpływu matrycy zawarte były w jednym punkcie *Selektywność* w przypadku wytycznej EMA [2] lub *Selektywność i Specyficzność* w przypadku wytycznej FDA [3]. Test selektywności i specyficzności w wytycznej ICH M10 [1] zostały rozdzielone na osobne punkty.

Test selektywności zgodnie z nową wytyczną dotyczy tylko używanej matrycy biologicznej, a mianowicie obecnych w niej substancji zakłócających. Metoda analityczna powinna wykazywać selektywność w danej matrycy wobec oznaczanych analitów i wzorców wewnętrznych [1]. Wytyczna ICH M10 [1] zaleca wykonanie testu na minimum 6 różnych źródłach osocza niehemolizowanego, nielipemicznego oraz dodatkowo na minimum 1 źródle osocza hemolizowanego i lipemicznego. Nowością w wytycznej jest wprowadzenie definicji wyżej wspomnianych osoczy oraz sposobu ich przygotowania. Problem braku jednoznacznej definicji obu rodzajów osocza był poruszany już w 2014 roku przez Europejskie Forum Bioanalityczne (*ang. European Bioanalysis Forum*) [14].

Tabela 2. Parametry walidacyjne dla metod bioanalitycznych oznaczania leków techniką chromatograficzną - najważniejsze zmiany pomiędzy ICH M10 i wytycznymi EMA i FDA

Parametr (Test) walidacyjny w ICH M10 [1]	Skrócone brzmienie oceny parametru w ICH M10 [1]	Różnice w wytycznej FDA [3] wobec ICH M10 [1]	Różnice w wytycznej EMA [2] wobec ICH M10 [1]
Selektywność (s. 8)	- minimum 6 źródeł matrycy dla osocza: dodatkowo minimum 1 źródło hemolizowane i minimum 1 źródło lipemicznego osocza	- w przypadku osocza, osocze hemolizowane i lipemiczne, nie jest wliczone w liczbę źródeł matrycy minimum 6 (s. 7)	- w przypadku osocza, osocze hemolizowane i lipemiczne, nie jest wliczone w liczbę źródeł matrycy minimum 6 (s. 5)
Specyficzność (s. 8)	- analiza próbek osocza z dodatkiem związków interferujących (lek, metabolit itp.) - ocena konwersji wstecznej metabolitu	- opis testu z kryteriami akceptacji opisano w punkcie <i>Selektywność i Specyficzność</i> (s. 7, Table 1, s. 22) - brak informacji o sposobie oceny konwersji wstecznej metabolitu dla metod LC-MS	- test opisano w ramach testu <i>Selektywność</i> (s. 5)
Wpływ matrycy (s. 9)	- próbki QC na niskim i wysokim poziomie stężenia w minimum 6 różnych źródłach matrycy, po minimum 3 powtórzenia dla każdego źródła - kryteria akceptacji jak w teście precyzja i dokładność	- informacja o teście zamieszczona w punkcie <i>Selektywność i Specyficzność</i> (s. 7), opis nie zawierał sposobu przeprowadzenia testu	- inny sposób przeprowadzenia testu, obliczano czynnik matrycowy
Krzywa kalibracyjna (s. 9-10) Zakres kalibracyjny (LLOQ-ULOQ) (s. 15)	- krzywa kalibracyjna z minimum 6 próbek kalibracyjnych - minimum 3 krzywe kalibracyjne pochodzące z niezależnych sekwencji analitycznych analizowanych na przestrzeni kilku dni	- brak informacji o minimalnej liczbie krzywych kalibracyjnych (s. 6)	x (s. 6-7, 12)
Precyzja i dokładność (s. 10-11)	- określone liczbowo zakresy stężeń próbek QC (niskie, średnie i wysokie) - precyzja i dokładność określona dla LLOQ i wszystkich poziomów stężeń próbek QC w minimum 5 powtórzeniach: a) w ramach jednej sekwencji analitycznej b) pomiędzy minimum 3 sekwencjami analitycznymi (w czasie nie krótszym niż 2 dni)	- brak określenia zakresu liczbowego dla próbek QC na poziomie stężenia średniego i wysokiego	x (s. 7-8)
Przeniesienie próbek (s. 11)	- analiza próbek BS po próbkach ULLOQ	- informacja o teście umieszczona w punkcie <i>Selektywność i Specyficzność</i> (s. 7), brak szczegółowego opisu wykonania testu	x (s. 6)
Test integralności rozcieńczenia (s. 11)	- analiza rozcieńczonej próbki QC (>ULOQ) w 5 powtórzeniach	- brak informacji o minimalnej liczbie powtórzeń dla rozcieńczonej próbki QC (>ULOQ)	x (s. 8)
Powtarzalność ponownego dozowania (s.13)	- 5 dozowań z jednego naczynka każdego stężenia próbki QC	- brak testu	- brak testu (wspomniano o możliwości wykonania testu w punkcie Powtórna analiza próbek (s. 13))
Odzysk (s.30)	- wydajność ekstrakcji - porównanie wyniku przeproszowanych próbek QC (niski, średni i wysoki) z odpowiednimi ekstraktami ślepych prób, do których po ekstrakcji dodano analit	x (s. 8-10, 25, Table 1)	- brak testu
Stabilność (s. 11-13)	<u>Stabilność w matrycy</u> z próbek QC po 1 na poziomie stężenia niskiego i wysokiego podzielona na minimum 3 części do badania: - <u>stabilność zamrażania i rozmrażania</u> odstęp między zamrażaniem i rozmrażaniem minimum 12 godzin - wykonać minimum 3 cykle rozmrażania - <u>stabilność krótkoterminowa</u> - <u>stabilność długoterminowa</u> - <u>stabilność analitu w przetworzonej/ przeproszowanej próbce</u> <u>Stabilność w roztworze</u> dla analitów i wzorców wewnętrznych w roztworach podstawowych i roboczych <u>Stabilność analitu w krwi pełnej</u>	- brak informacji o minimalnej liczbie cykli zamrażania - rozmrażania - brak oceny stabilności roztworów roboczych, wymagana analiza tylko roztworu podstawowego - brak testu stabilności analitu we krwi pełnej	- brak informacji o minimalnej liczbie próbek do badania - brak testu stabilności analitu we krwi pełnej

x - brak różnic; QC - próbka kontrolna (*ang. Quality Control*); s. - numer strony dokumentu wytycznej podanej w kolumnie

W celu otrzymania hemolizowanej matrycy (osocze, surowica), wytyczna ICH M10 dokładnie opisuje w jaki sposób należy wzbogacić matrycę krwią pełną (minimum 2% v/v). Definicja ta jest zgodna z podejściem *Global Bioanalysis Consortium* [14]. W przypadku osocza z oznakami lipemii nowa wytyczna zaleca, aby matryca pochodziła od osób lub zwierząt z hiperlipemią lub została przygotowana poprzez wzbogacenie osocza trójglicerydami, np. Interlipid [14].

Test specyficzności zgodnie z ICH M10 [1], w odróżnieniu od selektywności, dotyczy zdolności metody do jednoznacznego określenia analitu w obecności substancji interferujących nie pochodzących z matrycy (np. metabolit, leki stosowane równocześnie w leczeniu, zanieczyszczenie itp.) [1]. Nowością w porównaniu do wytycznej FDA [3] jest test oceny konwersji wstecznej metabolitu, który wpisano w ramach testu selektywności [1]. Zjawisko wystąpienia konwersji wstecznej metabolitu, czyli przekształcania metabolitu do związku macierzystego, oceniane jest w przypadku wskazań danych literaturowych lub ze względu na obecność w budowie metabolitu substancji oznaczanej ugrupowań niestabilnych [1,15].

Wytyczna ICH M10 [1] oraz pytania i odpowiedzi do ICH M10 [16] opisują możliwość oceny specyficzności bez konieczności prowadzenia dodatkowych badań dla substancji potencjalnie interferujących z analitem na podstawie:

- wykluczenia takich samych mas cząsteczkowych,
- wykluczenia takich samych właściwości fizykochemicznych analitu i substancji pokrewnych,
- uzyskania rozdzielienia chromatograficznego [16].

Powyższa strategia była postulowana przez środowisko naukowe *European Bioanalysis Forum* już w 2016 roku [17]. W innych przypadkach może istnieć konieczność wykonania dodatkowych badań w ramach oceny specyficzności metody. W przypadku podejrzenia o możliwość współwymywania analitu i substancji pokrewnych (np. izomerów), konieczne będzie wykonanie badań wykazujących rozdzielenie chromatograficzne, a w przypadku niepowodzenia także przeprowadzenie testu wpływu matrycy oraz oceny konwersji wstecznej [16].

2.2. Wpływ matrycy

Wpływ matrycy dla analiz wykonywanych techniką LC-MS jest definiowany jako zmiana odpowiedzi aparatu wobec analitu lub wzorca wewnętrznego spowodowana zakłóceniami i często niezidentyfikowanymi składnikami matrycy [1]. Wystąpienie wpływu matrycy powoduje uzyskanie wyników niedokładnych i nieprecyzyjnych.

Sposób przeprowadzenia testu wpływu matrycy w ICH M10 [1] różni się znacznie od prezentowanego wcześniej w wytycznej EMA [2]. Zrezygnowano z wyznaczania znormalizowanego wzorcem wewnętrznym czynnika matrycowego i uproszczono sposób wykonania testu. Obie wytyczne zalecają wykonanie testu dla co najmniej 6 źródeł matrycy i dodatkowo dla osocza w źródle hemolizowanym i lipemicznym w przypadku możliwości wystąpienia takich warunków w badaniu.

Zgodnie z wytyczną EMA [2] do przeprowadzenia testu potrzebne były roztwory wzorcowe o stężeniu odpowiadającym dwóm poziomom stężeń próbek kontrolnych (*ang. Quality Control - QC*) po procesowaniu próbki przy założeniu 100% odzysku oraz próbki ślepej (bez dodatku analitu i wzorca wewnętrznego) po procesie izolacji z matrycy [1]. Taki sposób postępowania był dość trudny do wykonania i wymagał dużego skupienia analityka ze względu na pojawiającą się dużą ilość zmiennych.

W wytycznej FDA [3] w punkcie *Selektywność i Specyficzność* wspomniano o ocenie wpływu matrycy na metodę analityczną bez podania opisu postępowania sprawdzającego możliwości zaistnienia powyższego zjawiska.

W wytycznej ICH M10 [1] znajduje się dokładny opis sposobu oceny wpływu matrycy, który znacznie różni się od zaleceń EMA [2]. W nowej wytycznej [1] test wykonuje się poprzez ocenę porównania dokładności i precyzji pomiarów uzyskanych w różnych źródłach matrycy dla co najmniej 3 powtórzeń próbek QC o stężeniu niskim i wysokim. Postępowanie jest podobne do testu oceny dokładności i precyzji z tą różnicą, że w ocenie wpływu matrycy używane są różne źródła materiału biologicznego.

2.3. Powtarzalność ponownego dozowania nastrzyku

Powtarzalność ponownego dozowania powinna być oceniona w celu możliwości wykonania powtórnego dozowania próbki podczas badania bez jej kolejnego procesowania w przypadku wystąpienia np. awarii sprzętu. Test jest nowością dla laboratoriów pracujących zgodnie z wytycznymi EMA [2] lub/i FDA [3]. W wytycznej ICH M10 został wprowadzony test powtarzalności dozowania (*ang. reinjection reproducibility*) [1] uwzględniający przykładowe sytuacje uzasadniające ponowne dozowanie próbek, rodzaju analizowanych próbek w sekwencji analitycznej do wykonania testu oraz sposób wykonania testu. Ocenę należy wykonać poprzez wielokrotne dozowanie serii, co najmniej 5 powtórzeń z jednego naczynka każdego stężenia próbki QC [1]. Kryteria akceptacji testu są takie same jak w przypadku testu oceny dokładności i precyzji.

2.4. Stabilność

Związek oznaczany w badaniu może ulec degradacji na różnych etapach postępowania z próbką biologiczną, od momentu pobrania próbki materiału biologicznego z organizmu do momentu analizy próbki już po procesie izolacji związku z matrycy. W walidacji metody bioanalitycznej sprawdzane jest czy zastosowana procedura analityczna oraz warunki przechowywania minimalizują ryzyko rozkładu oznaczanych związków [1].

Obecnie obowiązująca wytyczna w porównaniu do wytycznych EMA [2] i FDA [3] wprowadziła niewielkie zmiany w testach oceny stabilności. Zarówno ICH M10 [1] jak i FDA [3] podkreślają ważność stabilności analitu we krwi pełnej. ICH M10 do opisu testu stabilności wprowadziła informację o minimalnej liczbie powtórzeń próbek QC na danym poziomie stężeń. Jest to wypełnienie luki informacyjnej w porównaniu z wytyczną EMA [2], która nie zawierała zapisów o liczbie powtórzeń. Dodatkowo w porównaniu z wytyczną EMA [2], ICH M10 wymaga przeprowadzenia testów stabilności analitu w matrycy biologicznej wzbogaconej o wszystkie dodatkowe związki zawarte w schemacie leczenia lub wynikające ze stosowania produktów wieloskładnikowych (*ang. fixed dose combination*) [1]. Nowością w ICH M10 [1] w porównaniu z wytyczną EMA [2] jest możliwość stosowania tego samego roztworu podstawowego do przygotowania próbek QC i próbek kalibracyjnych. Taki zapis pozwala na zminimalizowanie ilości używanych substancji wzorcowych, które w przypadku metabolitów substancji badanej i znakowanych izotopowo wzorców substancji badanej są bardzo drogie. Korzystanie z jednego roztworu podstawowego jest możliwe po potwierdzeniu dokładności sporządzenia i jego stabilności. Przygotowanie roztworów

podstawowych uznaje się za dokładne, gdy różnica nie przekracza 5% (Wzór 1) [16].

$$\% \text{ różnicy} = \frac{|\text{roztwór podstawowy 1} - \text{roztwór podstawowy 2}|}{\text{wartość średnia z pomiarów}} \times 100$$

Wzór 1. [16]

Nowością dla laboratoriów pracujących zgodnie z wytyczną FDA [3] jest poszerzenie badania stabilności analitu i wzorca wewnętrznego także o analizę roztworów roboczych, a nie jak dotychczas tylko roztworów podstawowych i roztworów o najniższym i najwyższym stężeniu przygotowanych w danym rozpuszczalniku. Dodatkowo nowa wytyczna zawiera informację o minimalnej liczbie cykli zamrażania-rozmrażania [1], której brakowało w wytycznej amerykańskiej. Zgodnie z badaniami przeprowadzonym przez Wagner-Golbs (2019), ilość cykli zamrażania-rozmrażania ma większy wpływ na starzenie się osocza niż czas przechowywania w warunkach zamrożenia [18].

2.5. Odzysk

Odzysk, rozumiany jako wydajność procesu ekstrakcji, jest oceniany na podstawie porównania wartości sygnału pomiarowego uzyskanego dla próbki z dodatkiem wzorców przed procesem izolacji z materiału biologicznego z wartością sygnału pomiarowego uzyskanego dla próbki z dodatkiem wzorców po przygotowaniu próbki do analizy. Test był wykonywany w ramach wytycznej FDA [3], w przeciwieństwie do wytycznej EMA [2], gdzie dokument nie zawierał zapisów dotyczących odzysku.

2.6. Raportowanie

Laboratoria prowadzące dotychczas walidację metod bioanalitycznych zgodnie z wytyczną EMA [2] będą potrzebowały uzupełnić raport walidacyjny metody bioanalitycznej m.in. o analizę trendów wykresów próbek QC [1].

Na końcu dokumentu ICH M10 wprowadzono przydatną tabelę z wypunktowaną zalecaną dokumentacją do przedłożenia organom regulacyjnym oraz dokumentacją, która powinna być dostępna w ośrodku analitycznym w czasie inspekcji/kontroli. Dodatkowo wymieniono zalecenia dotyczące przygotowania raportu. Tabela w ICH M10 w zaprezentowanej formie jest zmodyfikowaną tabelą z wytycznej FDA [3]. Tabelaryczne podsumowanie wymaganej dokumentacji jest dużym ułatwieniem dla analityków pracujących z wytyczną EMA, ze względu na brak w dokumencie przejrzystego podsumowania, które ułatwiałoby gromadzenie dokumentacji z badania i przygotowywanie raportu końcowego.

3. Nowe aspekty poruszone w wytycznej

Zalecenia wytycznej ICH M10 obejmują także walidację metod analitycznych dla produktów leczniczych zaliczanych do grupy związków endogennych, które szczegółowo nie były opisane w wytycznej FDA [3] i EMA [2].

Wytyczna ICH M10 wprowadza rekomendacje dotyczące nowych i alternatywnych metod pobierania próbek, np. suchych kropli matrycy (*ang. dried matrix methods - DMM*), wśród których można wyróżnić następujące rodzaje: suchej kropli krwi (*ang. dried blood spot - DBS*), suchej kropli osocza (*ang. dried plasma spot - DPS*), suchej kropli śliny (*ang. dried saliva spot - DSS*) i suchej kropli moczu (*ang. dried urine spot - DUS*) [19]. Metody te wpisują się

w zasadę 3R poprzez pobieranie mniejszych objętości matrycy [11].

ICH M10 [1] nie dopuszcza stosowania dwóch metod lub technologii w ramach badania równoważności biologicznej lub porównawczego badania dostępności biologicznej. W przypadku potrzeby zastąpienia metody bioanalitycznej, nową metodę można wprowadzić po wykonaniu walidacji krzyżowej dla obu metod. Szczególną uwagę należy zwrócić na przyczyny różnic, jakie mogą być obserwowane w stężeniach analitu uzyskanych poprzednią metodą i za pomocą wprowadzanej metody [1].

W teście selektywności oraz badaniu wpływu matrycy wytyczna zaleca użycie większej liczby osoczy. Do 6 różnych źródeł matrycy zalecane jest stosowanie dodatkowo kolejnych dwóch osoczy po minimum jednym z oznakami hiperlipemii i minimum jednym z hemolizą dla badań prowadzonych z wykorzystaniem osocza.

4. Dyskusja i podsumowanie

Zaletą wprowadzenia harmonizacji zasad prowadzenia walidacji metody bioanalitycznej jest możliwość stosowania jednej walidacji metody analitycznej z przeznaczeniem uzyskania pozwolenia na dopuszczenie danego leku na różnych rynkach światowych bez konieczności wprowadzania modyfikacji do rejestracji w agencjach regionalnych. Postępowanie takie jest bardziej etyczne zgodnie z zasadą 3R - *ang. Replace, Reduce, Refine* [11] i prowadzi do obniżenia kosztów ponoszonych przez podmioty odpowiedzialne, a w konsekwencji także przez pacjentów.

Zaskoczeniem jest zaproponowany nowy sposób oceny efektu matrycowego na podstawie oceny precyzji i dokładności. Pominięto ugruntowane podejścia oparte na analizie współczynnika zmienności (%CV) dla znormalizowanego wzorcem wewnętrznym czynnika matrycowego podobnego do sposobu zaproponowanego przez Matuszewskiego [20,21]. Sposób zaproponowany w nowej wytycznej ICH M10 uniemożliwia identyfikację źródła pochodzenia problemu zaobserwowanego w teście wpływu matrycy, a umożliwia jedynie ocenę wystąpienia tego zjawiska. Cortese i współpracownicy opisują wszystkie metody określania wpływu matrycy i sposoby jego korygowania [22]. Zaskoczeniem jest także możliwość wykorzystania jedynie 1 osocza lipemicznego, którego zróżnicowanie w zawartości składników matrycy jest bardzo duże pomiędzy różnymi źródłami [23] i według przeprowadzonych badań [24].

ICH M10 [1] tak jak FDA [3] podkreśla ważność stabilności analitu we krwi pełnej. Sposób przeprowadzenia tego testu oraz kryteria akceptacji pozostają wciąż niewyjaśnione, w aspekcie definiowania rodzaju użytej krwi - świeżej (nie określono jak długo krew od pobrania uważana jest za świeżą) czy zamrożonej [25]. Krew świeżą można definiować jako przechowywaną w lodówce nie dłużej niż 7 dni. Mrożenie krwi negatywnie wpływa na jej właściwości powodując znaczącą hemolizę [26]. Ledvina (2019) poleca do pierwszej oceny stabilności rozpoczęcie ekstrakcji i analizy próbek dopiero po odwirowaniu elementów morfotycznych z próbek krwi pełnej, natomiast ekstrakcję i analizę bezpośrednio z próbek krwi w przypadku wątpliwych wyników pierwszego sposobu postępowania [26].

Kolejnym problemem w tym badaniu stabilności jest zmiana matrycy z osocza na krew pełną, w której oznaczany jest analit, co w konsekwencji może dać inną odpowiedź aparatu lub wymagać opracowania nowej metody izolacji analitu. Do dyskusji pozostaje

zagadnienie, czy stężenia próbek przygotowanych we krwi pełnej odczytane wobec krzywej kalibracyjnej w osoczu pozwolą na uzyskanie wiarygodnych wyników przeprowadzonego testu.

Zaproponowana przez ICH M10 [1] liczba próbek QC do przeprowadzenia testu stabilności minimum 3 jest niewystarczająca, ponieważ według badań przeprowadzonych retrospektywnie i potwierdzonych metodą symulacji matematycznej testy powinny zostać wykonane na minimum 5 próbkach [27]. ICH M10 zaleca dla produktów leczniczych wieloskładnikowych i leków podawanych jednocześnie badanie stabilności w cyklach zamrażania - rozmrażania, krótkoterminowej i długoterminowej. Przeprowadzenie testów stabilności dla wszystkich analitów leków podawanych jednocześnie, w przypadku zapisu w protokole badania klinicznego i nieklinicznego zezwalającego na podawanie innych leków, jest kosztowne i czasochłonne [25]. DeChenne [28] uważa, że liczba testów stabilności dla próbek kontrolnych z lekami podawanymi jednocześnie powinna być ograniczona do testu stabilności krótkoterminowej i w cyklach zamrażania-rozmrażania. Próbkę QC dla leków podawanych jednocześnie przygotowuje się zazwyczaj w stężeniu blisko stężenia maksymalnego (*ang. Maximum concentration - C_{max}*) danego leku. Problem w wyborze stężenia leku w próbkach kontrolnych może pojawić się dla matryc takich jak np. mocz czy płyn mózgowo-rdzeniowy, dla których może brakować danych o wartości C_{max}. DeChenne [28] przy braku danych literaturowych proponuje, za zgodą sponsora badania, dwa sposoby na szacowanie C_{max} w innych matrycach: (1) wykorzystanie danych C_{max} z osocza pomnożonych przez 10 dla moczu jako matrycy lub (2) oszacowanie na podstawie danych C_{max} od innych gatunków. Kolejnym zagadnieniem wymagającym wyjaśnienia jest postępowanie w sytuacji, kiedy wykazana zostanie niestabilność leków podawanych jednocześnie. Ponadto, warto byłoby rozważyć wykorzystanie danych literaturowych o stabilności każdego z poszczególnych analitów osobno w obliczu braku solidnych dowodów naukowych, które wskazywałyby, że na stabilność jednego analitu w matrycy ma pozytywny lub negatywny wpływ obecność innego analitu [25]. Ograniczenie ilości prowadzonych badań stabilności byłoby postępowaniem bardziej zgodnym z zasadą 3R.

Wytyczna opisuje także walidację metod bioanalitycznych obejmujących nowe techniki pobierania próbek w postaci suchej kropli matrycy [19] oraz techniki mikropróbkowania [29,30], które są zgodne ze strategią korzyści 3R (redukcja, ponowne użycie i recykling) w badaniach nieklinicznych. Zastosowanie powyższych technik może poprawić dobrostan zwierząt zmniejszając liczbę zwierząt potrzebnych do badania ze względu na zmniejszenie objętości matryc biologicznych. Oprócz tego, przygotowanie mikropróbek wiąże się z oszczędnościami finansowymi wynikającymi ze zmniejszenia liczby zwierząt w hodowli i przechowywanych próbek, a także z kosztów wysyłki i analizy [31].

Wytyczna określa zasady dokumentowania walidacji i analizy bioanalitycznej próbek z badania. Zalecenia te zestawiono w tabelę z podziałem na miejsce opracowania metody (*Documentation at the analytical site*), raport z walidacji metody bioanalitycznej (*Validation report*) oraz raport bioanalityczny (*Bioanalytical report*) [1]. Oba raporty przygotowuje się zgodnie ze wzorem Wspólnego Dokumentu

Technicznego (CTD) [4], który przedkładany jest organom rejestracyjnym.

Twórcy wytycznej nie podali terminu okresu przejściowego, w jakim można stosować do badań próbek metody zwalidowane według wcześniej obowiązujących wytycznych. Nie wiadomo, czy laboratorium powinno przeprowadzać rewalidację metody bioanalitycznej według wymagań nowej wytycznej ICH M10 [1] dla metod używanych w badaniu, które rozpoczęło się przed wejściem w życie nowej wytycznej.

W niektórych krajach agencje regulacyjne nie wdrożą ICH M10, co będzie powodować różnice w podejściu do walidacji metod bioanalitycznych. Wytyczna ICH M10 jest sukcesem wieloletnich działań i współpracy światowych agencji regulacyjnych i globalnych społeczności bioanalitycznych na rzecz globalnego ujednoczenia zasad prowadzenia walidacji metod bioanalitycznych.

Udział autorów: Koncepcja, E.Gn.; metodologia, E.Gn.; badanie, E.Gn. i E.Gi.; zasoby, E.Gn.; pisanie - przygotowanie oryginalnej wersji roboczej, E.Gn. i E.Gi.; pisanie - recenzja i redakcja, K.B.; wizualizacja, E.Gn., E.Gi.; nadzorowanie, E.Gn.; nadzór nad projektem, E.Gn.; pozyskanie funduszy, E.Gn. Wszyscy autorzy zapoznali się i zgadzają się na publikowaną wersję manuskryptu.

Finansowanie: Projekt realizowany w ramach subwencji nr 84345A przyznanej dla Sieci Badawczej Łukasiewicz - Instytut Chemii Przemysłowej imienia Profesora Ignacego Mościckiego.

Podziękowania: Autorzy są wdzięczni Piotrowi J. Rudzkiemu (Celon Pharma S.A.) oraz Edycie Peście (Sieć Badawcza Łukasiewicz - Instytut Chemii Przemysłowej imienia Profesora Ignacego Mościckiego) za krytyczną recenzję manuskryptu.

Konflikt interesów: Autorzy deklarują brak konfliktów interesów.

Piśmiennictwo

1. European Medicines Agency, ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis, **2022**.
2. European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Product for Human Use (CHMP), Guideline on Bioanalytical Method Validation, **2011**.
3. U.S. Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, **2018**.
4. European Medicines Agency, ICH guideline M4 (R4) on common technical document, Amsterdam, 19 March 2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m4-r4-common-technical-document-ctd-registration-pharmaceuticals-human-use_en.pdf (data dostępu: 28.08.2023).
5. ANVISA, Ministry of Health, National Health Surveillance Agency, Resolution- RDC NO. 27 OF 17 MAY 2012, **2012**.
6. Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) of Japan. Guideline on Bioanalytical Method Validation in Pharmaceutical Development (25 July 2013, MHLW, Japan). http://www.nih.go.jp/drug/BMV/250913_BMV-GL_E.pdf (data dostępu: 28.08.2023).
7. The Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) of Japan. Guideline on Bioanalytical Method. (Ligand Binding Assay) Validation in Pharmaceutical Development. (1 April, 2014, MHLW, Japan), **2014**.

8. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Final endorsed Concept Paper M10: Bioanalytical Method Validation. 7 October 2016. https://database.ich.org/sites/default/files/M10EWG_Concept_Paper.pdf (data dostępu: 28.08.2023).
9. Timmerman, P.; Lowes, S.; Fast, D.M.; Garofolo, F. Request for Global Harmonization of the Guidance for Bioanalytical Method Validation and Sample Analysis. *Bioanalysis* **2010**, *2*, 683-683, doi:10.4155/bio.10.34.
10. Bansal, S.K.; Arnold, M.; Garofolo, F. International harmonization of bioanalytical guidance. *Bioanalysis* **2010**, *2*, 685-687, doi:10.4155/bio.10.39.
11. The 3Rs. <https://www.nc3rs.org.uk/who-we-are/3rs> (data dostępu: 28.08.2023).
12. Overcoming of ongoing ICH Topics - ICH Public Meeting Amsterdam 042919. <https://www.fda.gov/media/124548/download> (data dostępu: 28.08.2023).
13. ICH Guideline Implementation. <https://www.ich.org/page/ich-guideline-implementation> (data dostępu: 28.08.2023).
14. Ingelse, B.; Barroso, B.; Gray, N.; Jakob-Rodamer, V.; Kingsley, C.; Sykora, C.; Vinck, P.; Wein, M.; White, S. European Bioanalysis Forum: recommendation on dealing with hemolyzed and hyperlipidemic matrices. *Bioanalysis* **2014**, *6*, 3113-3120, doi:10.4155/bio.14.252.
15. Briscoe, C.J.; Hage, D.S. Factors affecting the stability of drugs and drug metabolites in biological matrices. *Bioanalysis* **2009**, *1*, 205-220, doi:10.4155/bio.09.20.
16. European Medicines Agency. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis - Questions and Answers. (EMA/CHMP/ICH/660315/2022), **2023**.
17. Zwart, M.d.; Lausecker, B.; Globig, S.; Neddermann, D.; Bras, B.L.; Guenzi, A.; White, S.; Scheel-Fjording, M.; Timmerman, P. Co-medication and interference testing in bioanalysis: a European Bioanalysis Forum recommendation. *Bioanalysis* **2016**, *8*, 2065-2070, doi:10.4155/bio-2016-0179.
18. Wagner-Golbs, A.; Neuber, S.; Kamlage, B.; Christiansen, N.; Bethan, B.; Rennefahrt, U.; Schatz, P.; Lind, L. Effects of Long-Term Storage at -80°C on the Human Plasma Metabolome. *Metabolites* **2019**, *9*, 99, doi:10.3390/metabo9050099.
19. Ayre, A.; Chaudhari, P.; Shaikh, J.; Jagdale, S.; Agrawal, O. Dried matrix spotting-an innovative sample preparation tool in bioanalysis. *Int J Pharm Sci Rev Res* **2018**, *9*, 3597-3607. doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.9(9).3597-07.
20. Matuszewski, B.K.; Constanzer, M.L.; Chavez-Eng, C.M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3019-3030, doi:10.1021/ac020361s.
21. Rudzki, P.J.; Gniazdowska, E.; Buś-Kwaśnik, K. Quantitative evaluation of the matrix effect in bioanalytical methods based on LC-MS: A comparison of two approaches. *J Pharm Biomed Anal* **2018**, *155*, 314-319, doi:10.1016/j.jpba.2018.03.052.
22. Cortese, M.; Gigliobianco, M.R.; Magnoni, F.; Censi, R.; Di Martino, P. Compensate for or Minimize Matrix Effects? Strategies for Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Technique: A Tutorial Review. *Molecules* **2020**, *25*, 3047, doi:10.3390/molecules25133047.
23. Xia, Y.Q.; Jemal, M. Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis: comparison of three tandem mass spectrometric techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on phospholipids elution and the association of phospholipids with matrix effects. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2009**, *23*, 2125-2138, doi:10.1002/rcm.4121.
24. Gniazdowska E.M., Giebułtowiec J., Rudzki P.J. How does the order of sample analysis influence matrix effect during LC-MS bioanalysis? *J. Chromatogr. B* **2023**, *1227*, 123800, doi: 10.1016/j.jchromb.2023.123800.
25. Amsterdam, P.v.; Companjen, A.; Brudny-Kloepfel, M.; Golob, M.; Luedtke, S.; Timmerman, P. The European Bioanalysis Forum community's evaluation, interpretation and implementation of the European Medicines Agency guideline on Bioanalytical Method Validation. *Bioanalysis* **2013**, *5*, 645-659, doi:10.4155/bio.13.19.
26. Ledvina, A.R.; Ewles, M.; Pang, Y.; Cape, S. Whole blood stability in quantitative bioanalysis. *Bioanalysis* **2019**, *11*, 1885-1897, doi:10.4155/bio-2019-0155.
27. Gniazdowska, E.; Goch, W.; Giebułtowiec, J.; Rudzki, P.J. Replicates Number for Drug Stability Testing during Bioanalytical Method Validation—An Experimental and Retrospective Approach. *Molecules* **2022**, *27*, 457, doi:10.3390/molecules27020457.
28. DeChenne, S.; Yahvah, K.; Zimmer, J. Validating stability and selectivity in the presence of co-administered compounds. *Bioanalysis* **2019**, *11*, 1819-1821, doi:10.4155/bio-2019-0150.
29. Pu, F.; Zhang, W.; Bateman, K.P.; Liu, Y.; Helmy, R.; Ouyang, Z. Using miniature MS system with automatic blood sampler for preclinical pharmacokinetics study. *Bioanalysis* **2017**, *9*, 1633-1641, doi:10.4155/bio-2017-0160.
30. Dillen, L.; Loomans, T.; Perre, G.V.d.; Versweyveld, D.; Wuyts, K.; Zwart, L.d. Blood microsampling using capillaries for drug-exposure determination in early preclinical studies: a beneficial strategy to reduce blood sample volumes. *Bioanalysis* **2014**, *6*, 293-306, doi:10.4155/bio.13.286.
31. Ingle, R.G.; Zeng, S.; Jiang, H.; Fang, W.-J. Current developments of bioanalytical sample preparation techniques in pharmaceuticals. *J Pharm Anal* **2022**, *12*, 517-529, doi:10.1016/j.jpha.2022.03.001.