Thèse d'exercice

Université de Limoges

Faculté de Pharmacie

Année 2024 Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 13 novembre 2024

Par

Richard Newton

La mise en place de méthodes analytiques alternatives : Démonstration de conformité aux attentes des pharmacopées

Thèse dirigée par Gaëlle Bégaud

Examinateurs :

Dr. Gaëlle Bégaud, Maitre de Conférences	Président
Dr. Karine Beaubrun-Giry, Maitre de Conférences	Juge
Dr. Sophie Crouchet, Docteur en Pharmacie	Juge
Pr. Dominique Clédat, Maitre de Conférences	Juge

Thèse d'exercice

Université de Limoges

Faculté de Pharmacie

Année 2024 Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 13 novembre 2024

Par Richard Newton

La mise en place de méthodes analytiques alternatives : Démonstration de conformité aux attentes des pharmacopées

Thèse dirigée par le Docteur Gaëlle Bégaud

Examinateurs :

Dr. Gaëlle Bégaud, Maitre de Conférences	Président
Dr. Karine Beaubrun-Giry, Maitre de Conférences	Juge
Dr. Sophie Crouchet, Docteur en Pharmacie	Juge
Pr. Dominique Clédat, Maitre de Conférences	Juge

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Personnel enseignant de la Faculté de Pharmacie de Limoges

Le 1er octobre 2024

Doyen de la Faculté

Monsieur le Professeur COURTIOUX Bertrand

Vice-doyen de la Faculté

Monsieur le Professeur LÉGER David

Assesseurs de la Faculté

Monsieur le Professeur BATTU Serge, Assesseur pour la Formation Continue

Monsieur le Professeur PICARD Nicolas, Assesseur pour l'Innovation Pédagogique

Professeurs des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. BARRAUD Olivier	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. JOST Jérémy	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. PICARD Nicolas	Pharmacologie
Mme ROGEZ Sylvie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. SAINT-MARCOUX Franck	Toxicologie

Professeurs des Universités – Universitaires

M. BATTU Serge	Chimie analytique et bromatologie
M. COURTIOUX Bertrand	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. DUROUX Jean-Luc	Biophysique et mathématiques
Mme FAGNÈRE Catherine	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. LÉGER David	Biochimie et biologie moléculaire
M. LIAGRE Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MAMBU Lengo	Pharmacognosie
Mme POUGET Christelle	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. TROUILLAS Patrick	Biophysique et mathématiques

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Mme VIANA Marylène	Pharmacie galénique

Maitres de Conférences des Universités – Hospitalo-Universitaires

Mme. CHAUZEIX Jasmine	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
Mme DEMIOT Claire-Élise (*)	Physiologie et pharmacologie

Maitres de Conférences des Universités – Universitaires

Mme AUDITEAU Émilie	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
Mme BEAUBRUN-GIRY Karine	Pharmacie galénique
Mme BÉGAUD Gaëlle (*)	Chimie analytique et bromatologie
M. BILLET Fabrice	Physiologie et pharmacologie
Mme BONAUD Amélie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. CALLISTE Claude	Biophysique et mathématiques
M. CHEMIN Guillaume	Biochimie et biologie moléculaire
Mme CLÉDAT Dominique	Chimie analytique et bromatologie
M. COMBY Francis	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
Mme DAMOUR Alexia	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. FABRE Gabin	Biophysique et mathématiques
M. LABROUSSE Pascal (*)	Botanique et cryptogamie
Mme LAVERDET Betty	Pharmacie galénique
M. LAWSON Roland	Physiologie et pharmacologie
Mme MARRE-FOURNIER Françoise	Biochimie et biologie moléculaire
M. MERCIER Aurélien	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
Mme MILLOT Marion (*)	Pharmacognosie
Mme PASCAUD-MATHIEU Patricia	Pharmacie galénique
M. TOUBLET François-Xavier	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. VIGNOLES Philippe (*)	Biophysique et mathématiques

(*) Titulaire de l'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR)

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Professeur associé en service temporaire

M. FOUGÈRE Édouard	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Assistant Hospitalo-Universitaire des disciplines pharmaceutiques

Mme MARCELLAUD Élodie	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche

Mme RAKOTOMANGQ Iharilanto Patricia Andrianjaky	Chimie analytique et bromatologie
Mme SALMI Djouza	Pharmacognosie, Botanique et Mycologie

Enseignants d'anglais

M. HEGARTY Andrew	Chargé de cours
Mme VERCELLIN Karen	Professeur certifié

Professeur émérite

M. DESMOULIÈRE Alexis	Physiologie et pharmacologie

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Remerciements

Aux membres de mon jury,

Je remercie tout particulièrement le professeur Gaëlle Bégaud, mon directeur de thèse. Je vous remercie de m'avoir introduit au monde de la chimie analytique. Merci d'avoir accepté le rôle de directeur de thèse, de votre soutien et encouragement ainsi que de votre disponibilité tout au long de ce travail.

Au Docteur Karine Beaubrun-Giry, je vous remercie également pour les enseignements que vous avez pu nous donner, de m'avoir apporté votre savoir sur l'assurance qualité. Merci de bien vouloir faire partie de mon jury de thèse.

A Dominique Clédat, je vous remercie également pour les enseignements que vous avez pu nous donner, de m'avoir soutenu dès le début de mes études. Merci de bien vouloir faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier très chaleureusement le Docteur Sophie Crouchet. Premièrement je te remercie grandement d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Un grand merci pour toutes les discussions sur la qualité, ça a toujours été mon plus grand plaisir de pouvoir travailler sur le même projet que toi.

A mes professeurs et collègues,

Je tiens particulièrement à remercier Dr Julie Bernard, experte QC et mon maître d'apprentissage. Elle m'a transmis son savoir sur les méthodes analytiques des formes inhalées avec passion et patience. Toujours disponible, elle m'a aidé à me développer tant au niveau personnel qu'au niveau professionnel.

Au Professeur Philippe Cardot, merci de m'avoir enseigné la chimie analytique avec le professeur Bégaud, ces premiers cours m'ont orienté vers l'industrie pharmaceutique et m'ont mis sur le chemin vers cette thèse.

A Mathieu Delavaud merci d'avoir relu mon manuscrit et corrigé les fautes (quelle idée d'avoir des accords aussi…), pour m'avoir aidé à supporter les autres membres du bureau A2. Merci encore à toi et Estelle Arnould pour les rappels hebdomadaires pendant deux mois.

Un grand merci également à Damien Chevailler, Corinne Motte, Maxime Dubois, Sophie Monnet, Ludovic Dreux, Valentin Charles Dominique, Stéphane Goutines, Carine Vergnaud ainsi que toutes les autres personnes qui m'ont accompagné depuis le début de mes études à aujourd'hui, et à tous les professeurs qui m'ont enseigné leur savoir.

A mes proches,

Hannah, merci pour les heures passes à m'écouter au sujet des statistiques, à essayer de suivre ma logique et de me supporter. Merci pour ton soutien et ta patience lorsque j'avais besoin de motivation.

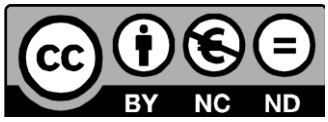
Mum, merci pour tout ce que tu as fait pour nous, tous les aller-retours sans question, les déménagements, le soutien moral, et tout ce que tu m'as appris.

Merci à mes neveux Oscar et Sasha pour les pauses forcées lorsque vous ne me laissez pas de choix autre que de joueur au combat ou au foot. C'est toujours avec le grand sourire que vous débarquez m'interrompre et je peux que dire oui.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Droits d’auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :
« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »
disponible en ligne : *http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/*



Licence CC BY-NC-ND 3.0

Liste des abréviations

GSK : GlaxoSmithKline

FDA : Food and Drug Administration

EMA : European Medicines Agency

BP : British Pharmacopoeia

JP : Japanese Pharmacopoeia

PE : Pharmacopée Européenne

USP : United States Pharmacopoeia

BPFs : Bonnes Pratiques de Fabrication

R&D : Recherche et Développement

VMP : Validation Master Plan

QI : Qualification d'Installation

QO : Qualification Opérationnelle

QP : Qualification de Performance

ICH : International Conference for Harmonisation

OOS : Out Of Specifications

HPLC : High-Performance Liquid Chromatography

API : Principe actif

RP-HPLC : Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography

TOST : Two One-Sided T-Test

DUSA : Dosage Unit Sampling Apparatus

CTD : Common Technical Document

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Table des matières

Introduction 14

I. LES PHARMACOPEES 16

I.1. Organisation des pharmacopées 17

I.2. L'utilisation de méthodes alternatives 19

I.2.1. Qu'est-ce qu'une méthode alternative 19

I.2.2. Les différences entre les pharmacopées 20

I.2.3. Comparaison entre une méthode alternative et une méthode pharmacopée 22

I.2.3.1. La méthode Britannique 22

I.2.3.2. La méthode alternative GSK 25

I.2.3.3. Choix de la stratégie 25

I.2.4. Stratégie de mise en conformité avec les pharmacopées 27

II. LE TRANSFERT ANALYTIQUE 29

II.1. Echange d'informations 30

II.2. Vérification de la méthode et des équipements 30

II.2.1. Qualification des équipements 31

II.2.1.1. Définition 31

II.2.1.2. La revue de la qualification 34

II.2.2. La revue de la validation de la méthode 35

II.3. Vérification de la méthode et des équipements 38

II.4. Définition de la stratégie de transfert 42

II.5. Protocole de transfert 45

II.6. Exercice de familiarisation 48

II.7. Rapport de transfert 51

II.8. Conclusion du transfert 51

III. ETUDE D'EQUIVALENCE 52

III.1. Faisabilité de la méthode 52

III.1.1. Méthode 1 : Rinçage classique 53

III.1.2. Méthode 2 : Rinçage par « volume exact » 54

III.1.3. Comparaison des méthodes de rinçage 54

III.2. Qu'est-ce qu'une étude d'équivalence 55

III.2.1. Les tests statistiques 55

III.2.1.1. Les conditions 55

III.2.1.2. Les différents tests statistiques 58

III.2.1.2.1. Test T de Student 58

III.2.1.2.2. Test F 59

III.2.2. Les recommandations Pharmacopées 60

III.2.2.1. Les recommandations de l'USP 60

III.2.2.1.1. La précision 60

III.2.2.1.2. L'exactitude 61

III.2.2.1.3. La taille de l'échantillon 62

III.2.2.2. Les recommandations de la PE 63

III.2.2.2.1. L'étude de comparabilité 63

III.2.2.2.2. Evaluation des données 64

III.2.2.2.3. Conclusion 66

Licence CC BY-NC-ND 3.0

III.3. Etude d'équivalence – Méthode Pharmacopée 66
III.3.1. Le déroulement des tests d'équivalence 68
III.3.1.1. Méthode 68
III.3.1.2. Résultats 71
III.3.1.3. Conclusion 73
III.3.2. Rational d'utilisation 73
Conclusion 74
Références bibliographiques 75
Annexes 77
Serment De Galien 79

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Table des illustrations

Figure 1 : Présentation d'une monographie de la pharmacopée [3] 18
Figure 2 : Organigramme d'un transfert de méthode analytique 29
Figure 3 : Diagramme en V de la qualification d'un équipement [14] 33
Figure 4 : Précision et exactitude [16] 36
Figure 5 : Définitions des paramètres suite à l'analyse d'écart 40
Figure 6 : Etude de familiarisation 50
Figure 7 : Tube collecteur DUSA[20] 53
Figure 8 : Distribution Normale[22] 56
Figure 9 : Représentation de différentes courbes selon la moyenne et la variance[23] 56
Figure 10: Distribution de type F[30] 59
Figure 11 : Les différents cas de figure d'équivalence 65
Figure 12 : Matrice d'étude - Méthode alternative 69
Figure 13 : Matrice d'étude - Méthode pharmacopée 70
Figure 14: Analyse d'équivalence des moyennes 72

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Table des tableaux

Tableau 1 : Comparaison méthode JP et International Pharmacopée [5,6] 20
Tableau 2 : Echantillonnage d'uniformité de dose délivrée 22
Tableau 3 : Comparaison entre la méthode pharmacopée et la méthode alternative de GSK 26
Tableau 4 : Validation de méthode analytique 37
Tableau 5 : Exemple d'écart mineur entre les pratiques des différents sites 39
Tableau 6 : Exemple d'écart majeur entre les pratiques des différents sites 39
Tableau 7 : Exemple d'écart majeur entre les pratiques des différents sites 40
Tableau 8 : Définition du niveau de transfert 42
Tableau 9 : Exemple de l'évaluation du risque - Raska (2010) *Risk-Based Analytical method transfer : Application to Large Multi-Product Transfers*[12] 43
Tableau 10 : Exemple de déroulement de transfert en fonction du type de transfert[12] 45
Tableau 11 : Exemple de Design d'étude "GSK" 49
Tableau 12 : Résultats de l'étude de familiarisation 50
Tableau 13 : Préparation de l'échantillon 53
Tableau 14 : Nombre de répétitions nécessaires pour des études à puissance acceptable, basé sur le θ/su valeur pour la méthode à tester 69
Tableau 15 : Résultats de la méthode alternative 71
Tableau 16 : Résultats de la méthode pharmacopée 71
Tableau 17 : Résultats de l'étude d'équivalence théorique 72
Tableau 18 : Résultats du Test F 72

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Introduction

L'industrie pharmaceutique est une industrie mondiale, avec plusieurs acteurs présents dans tous les pays du monde. Ces acteurs jouent un rôle important dans le développement, la production et le contrôle des produits de santé.

Ces acteurs sont :

- Les organismes de réglementation : les agences gouvernementales, telles que la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis ou l'Agence Européenne des Médicaments (EMA), jouent un rôle crucial en évaluant la sécurité et l'efficacité des médicaments avant qu'ils ne soient mis sur le marché. Elles élaborent aussi les différentes pharmacopées (US Pharmacopoeia par la FDA ou la Pharmacopée Européenne par l'EMA) qui décrivent les différentes méthodes pour contrôler les substances présentées.

- Les entreprises pharmaceutiques (laboratoires pharmaceutiques) : ces entreprises sont au cœur de l'industrie. Elles sont responsables de la recherche, du développement, de la fabrication et de la commercialisation des médicaments.

- Les sociétés de biotechnologie : ces entreprises se concentrent souvent sur le développement de médicaments basés sur la biologie moléculaire, les anticorps monoclonaux et d'autres technologies émergentes. Ces sociétés peuvent faire appel à des sous-traitants ou à des laboratoires pharmaceutiques pour des productions plus importantes c'est le cas du vaccin du Covid développé par Moderna dont la production a été réalisée par Pfizer.

- Les universités et instituts de recherche : la recherche académique joue un rôle fondamental dans la découverte de nouvelles molécules et le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Ces instituts font appel aux différentes entreprises pour produire le médicament. C'est le cas du vaccin du Covid développé par l'Université d'Oxford dont la production a été réalisé par Astra Zeneca.

- Les sous-traitants et fabricants de produits pharmaceutiques : ces entreprises fournissent des services de fabrication, de recherche, de développement clinique, de conditionnement. Ce sont des intermédiaires qui interviennent pour d'autres acteurs de l'industrie et ne réalisent que certaines étapes de la vie du médicament.

En 2019, 50% des ventes de produits pharmaceutiques fabriqués en France ont été vendus dans d'autres pays [(1)]. Les sites de productions peuvent être amenés à produire des médicaments pour plusieurs marchés dans le monde entier, par exemple le site d'Evreux de GlaxoSmithKline (GSK) exporte 80% de sa production vers 120 pays différents. Afin d'exporter vers les différents pays, il faut répondre aux réglementations applicables.

Les autorités des différents pays demandent aux producteurs de suivre les réglementations en vigueur dans leur pays. Cela implique, pour des sites comme GSK Evreux, que certains tests doivent être réalisés plusieurs fois selon différentes méthodologies. Ces analyses peuvent être complexes, chronophages, et demandent un personnel formé sur toutes les méthodes.

Afin de réduire le nombre de tests à réaliser sur un produit, et harmoniser le contrôle du produit, certaines pharmacopées, autorisent l'utilisation de méthodes alternatives.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Premièrement, une présentation des pharmacopées permettra de mettre en avant les attendus réglementaires ainsi que les différences et les accords entre les autorités compétentes. Ensuite, le transfert de méthode sera décrit afin d'expliquer une démarche possible pour transférer une méthode entre site, ce transfert est d'autant plus important en vue des nombreux acteurs dans l'industrie pharmaceutique. Enfin, une explication des études d'équivalence démontrant la possible corrélation entre la méthode alternative et la méthode pharmacopée sera présentée pour finaliser la mise en place d'une méthode alternative.

Une étude de cas concernant l'implémentation d'une méthode alternative à la monographie de la pharmacopée britannique pour la réalisation du test d'uniformité de dose délivrée sur le Salbutamol (Sulfate de) en poudre inhalée sera utilisée pour illustrer les différentes étapes nécessaires à la mise en place d'une méthode alternative à la pharmacopée.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

I. LES PHARMACOPEES

Le mot “Pharmacopée” est dérivé du grec : φαρμακοποιΐα / farmakopoiía, « l'art de préparer les médicaments », lui-même issu de φάρμακον / pharmakon = médicament, suivi par la racine verbale ποι- / poi- = faire et enfin de la terminaison abstraite –ια / -ia

A l’origine, la pharmacopée est un recueil encyclopédique qui recense l’ensemble des plantes à propriétés thérapeutiques. Au premier siècle, Pedanius Dioscoride écrivit une des premières pharmacopées sous le nom « *De Materia Medica* » qui décrivait les utilisations médicales de plus de 800 substances. Cet ouvrage fut la référence jusqu’au XVIe siècle en Europe.

Pendant la même période, le “Shennong bencao jing” fut écrit en Chine, contenant environ 365 plantes. Il possédait une notice type pour chaque plante décrite qui, contrairement aux pharmacopées gréco-latines, n’offrait aucune description des plantes mais adoptait un format standard très concis présentant : la saveur, la nature, une liste d’indications, puis d’autres appellations de la plante et enfin le milieu dans lequel on la trouve.

A partir de la renaissance, “De Materia Medica” fut remplacée par des pharmacopées universelles telle que celle publiée par Antoine Jacques Louis Jourdan. Ces nouveaux recueils sont les précurseurs des pharmacopées modernes d’aujourd’hui [(2)].

De nos jours, le terme “Pharmacopée” désigne un recueil à caractère officiel et règlementaire des matières premières et parfois produits finis autorisés dans un pays pour la fabrication de médicaments. Ces pharmacopées peuvent être nationales, comme la Pharmacopée française, ou internationales comme “The International Pharmacopoeia” publiée par l’OMS ou la Pharmacopée Européenne.

Il existe des pharmacopées classifiées comme majeures et des pharmacopées dites mineures. Les pharmacopées majeures sont la Pharmacopée Européenne, le Japanese Pharmacopoeia et the United States Pharmacopoeia. Ces trois ouvrages, utilisés dans plusieurs pays, sont en cours d’harmonisation en raison de la mondialisation dans le domaine du médicament, qui rend nécessaire des normes qualités applicables partout dans le monde. De plus, les normes des différentes pharmacopées sont un élément important pour l’autorisation de mise sur le marché des médicaments et le transfert de médicaments entre pays et régions.

Les pharmacopées mineures font référence aux pharmacopées majeures dans leurs textes. Par exemple, pour les monographies de matières premières, la British Pharmacopoeia nécessite le suivi de la monographie de la Pharmacopée Européenne pour une molécule donnée.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

I.1. Organisation des pharmacopées

Les pharmacopées sont séparées en plusieurs parties commençant par une brève introduction, des chapitres généraux contenant toutes les informations pouvant être nécessaires pour réaliser des tests sur un produit ainsi que les descriptions d'équipements.

A la suite des chapitres généraux sont présentés les monographies. Ces monographies sont propres à chaque pharmacopée. Certaines pharmacopées comme la Pharmacopée Européenne et la Japanese Pharmacopoeia n'incluent que les monographies de matières premières alors que d'autres pharmacopées tel que l'United States Pharmacopoeia et la British Pharmacopoeia contiennent à la fois les monographies de matières premières et de produits finis.

Ces monographies présentent les essais à réaliser afin de s'assurer de la qualité du produit utilisé. Pour chaque produit présent dans la pharmacopée, il est obligatoire de suivre ces tests d'identification, de caractérisation (pureté, métaux lourds, cendres sulfuriques, perte à la dessication) et d'essai (les substances apparentés) comme décrit par la pharmacopée.

Une monographie de la Pharmacopée Européenne [3] se présente de la façon suivante (Figure 1) :

Les essais d'identification assurant l'identité du produit testé sont au début. Il y a plusieurs possibilités selon la molécule pour l'identifier avec notamment des tests de spectroscopie IR, de spectroscopie UV/Visible, de chromatographie sur couche mince et des tests spécifiques qui peuvent être demandés. Tous les tests ne sont pas forcément nécessaires mais ils peuvent tous être utilisés.

Les autres tests requis sont décrits par la suite, ils peuvent faire référence aux chapitres généraux et nécessiter un équipement spécifique tel que le test de perte à la dessiccation dans la figure 1 qui indique le chapitre général. Ils permettent le dosage ou caractérisation de la matière première ou du produit par exemple le pourcentage pureté de la matière première (en %m/m de la matière première).

Tous les tests obligatoires sont indiqués et décrit dans la monographie ainsi que les différents composés qui peuvent être présent en tant qu'impuretés.

Cependant, la Pharmacopée Européenne ne présente pas de monographie de produit fini mis à part les préparations pharmaceutiques réalisables en officine. Il existe des pharmacopées présentant des monographies de produits finis, comme la Pharmacopée Britannique. Ces monographies se présentent de la même façon, en commençant par une identification du principe actif, puis des tests de teneur et des dosages en citant des méthodes décrites dans les chapitres généraux. La pharmacopée britannique décrit une monographie sur le Salbutamol sulfate en poudre inhalée pour laquelle une méthode alternative a été développée.

Dans le cas de la monographie de la pharmacopée britannique du produit fini : salbutamol (sulfate de) en poudre inhalée, l'uniformité de la dose délivrée nécessite un équipement spécifique afin de prélever une quantité de produit donné pour comparer avec un standard de référence. Cette méthode est une méthode manuelle nécessitant l'utilisation d'un équipement de taille conséquente et demandant une agitation de celui-ci. Elle est facile d'utilisation mais nécessite du temps et une force physique conséquente.

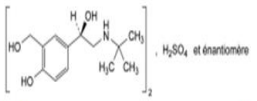
La pharmacopée étant un référentiel normatif, il est obligatoire de suivre les méthodes indiquées dans celle-ci. Cependant, les différentes pharmacopées permettent l'utilisation d'une méthode alternative à celle indiquée dans les pharmacopées.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

01/2024:0687

SALBUTAMOL (SULFATE DE)

Salbutamoli sulfas



$C_{26}H_{44}N_2O_{10}S$ M_r 576,7

[51022-70-9]

DÉFINITION

Sulfate de bis[4-[(1*RS*)-2-(*tert*-butylamino)-1-hydroxyéthyl]-2-(hydroxyméthyl)phénol].

Teneur : 98,0 pour cent à 101,0 pour cent (substance desséchée).

CARACTÈRES

Aspect : poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche.

Solubilité : facilement soluble dans l'eau, pratiquement insoluble ou très peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans le chlorure de méthylène.

IDENTIFICATION

Première identification : A, C.

Seconde identification : B, C.

A. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (2.2.24).

Comparaison : *sulfate de salbutamol SCR*.

B. Chromatographie sur couche mince (2.2.27).

Solution à examiner. Dissolvez 12 mg de sulfate de salbutamol dans de l'*eau R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

Solution témoin. Dissolvez 12 mg de *sulfate de salbutamol SCR* dans de l'*eau R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

Plaque : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

Phase mobile : *ammoniaque concentrée R, eau R, acétate d'éthyle R, 2-propanol R, méthylisobutylcétone R* (3:18:35:45:50 *V/V/V/V/V*).

Dépôt : 1 µL.

Développement : sur les 2/3 de la plaque.

Séchage : à l'air.

Détection : pulvérisez une solution à 1 g/L de *chlorhydrate de méthylbenzothiazolone-hydrazone R* dans une solution à 90 pour cent *V/V* de *méthanol R*, puis une solution à 20 g/L de *ferricyanure de potassium R* dans un mélange de 1 volume d'*ammoniaque concentrée R1* et de 3 volumes d'*eau R*. Pulvérisez à nouveau la solution à 1 g/L de *chlorhydrate de méthylbenzothiazolone-hydrazone R* dans une solution à 90 pour cent *V/V* de *méthanol R*.

Résultats : la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à sa position, sa coloration et ses dimensions à la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

C. Le sulfate de salbutamol donne la réaction (a) des sulfates (2.3.1).

ESSAI

Solution S. Dissolvez 0,25 g de sulfate de salbutamol dans de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R* et complétez à 25 mL avec le même solvant.

Aspect de la solution. La solution S est limpide (2.2.1) et n'est pas plus fortement colorée que la solution témoin JB_6 (2.2.2, *Procédé II*).

Acidité ou alcalinité. A 10 mL de solution S, ajoutez 0,15 mL de *solution de rouge de méthyle R* et 0,2 mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*. La solution est jaune. Le virage de l'indicateur au rouge ne nécessite pas plus de 0,4 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M*.

Substances apparentées. Chromatographie liquide (2.2.29). *Protégez les solutions de la lumière.*

Solution à examiner. Dissolvez 25,0 mg de sulfate de salbutamol dans la phase mobile A et complétez à 50,0 mL avec la phase mobile A.

Solution témoin (a). Prélevez 1,0 mL de solution à examiner et complétez à 100,0 mL avec la phase mobile A. Prélevez 1,0 mL de solution et complétez à 10,0 mL avec la phase mobile A.

Solution témoin (b). Dissolvez 2 mg de *salbutamol pour identification des pics SCR* (contenant les impuretés C, F, N, O et P) dans 5 mL de phase mobile A.

Solution témoin (c). A l'aide d'ultrasons, dissolvez le contenu d'un flacon d'*impureté J de salbutamol SCR* dans 1 mL de solution à examiner.

Colonne :

- *dimensions* : *l* = 0,15 m, Ø = 4,6 mm,
- *phase stationnaire* : *gel de silice octylsilylé à noyau solide, postgreffé, pour chromatographie R* (2,7 µm),
- *température* : 30 °C.

Phase mobile :

- *phase mobile A* : dissolvez 3,45 g de *phosphate monosodique monohydraté R* dans environ 900 mL d'*eau pour chromatographie R* et ajoutez 0,5 mL de *triéthylamine R* ; ajustez à pH 3,0 avec de l'*acide phosphorique dilué R* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau pour chromatographie R* ;
- *phase mobile B* : *méthanol R, acétonitrile R* (35:65 *V/V*) ;

Intervalle (min)	Phase mobile A (pour cent *V/V*)	Phase mobile B (pour cent *V/V*)
0 - 5	95	5
5 - 25	95 → 70	5 → 30
25 - 27	70	30
27 - 30	70 → 10	30 → 90
30 - 35	10	90

Débit : 1,0 mL/min.

Détection : spectrophotomètre à 273 nm.

Injection : 20 µL.

Identification des impuretés : utilisez le chromatogramme fourni avec le *salbutamol pour identification des pics SCR* et le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) pour identifier les pics dus aux impuretés C, F, N, O et P ; utilisez le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) pour identifier le pic dû à l'impureté J.

Rétention relative par rapport au salbutamol (temps de rétention = environ 5 min) : impureté J = environ 0,92 ; impureté C = environ 2,3 ; impureté N (isomère 1) = environ 2,84 ; impureté N (isomère 2) = environ 2,86 ; impureté P = environ 2,91 ; impureté F = environ 3,03 ; impureté O = environ 3,07.

Conformité du système :

- *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus aux impuretés F et O dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) ;
- *rapport pic/vallée* : au minimum 2,0, avec H_p = hauteur au-dessus de la ligne de base du pic dû à l'impureté J et H_v = hauteur au-dessus de la ligne de base du point le plus bas du tracé entre ce pic et celui dû au salbutamol dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) ; au minimum 2,0, avec H_p = hauteur au-dessus de la ligne de base du pic dû à l'impureté N (isomère 1) et H_v = hauteur au-dessus de la ligne de base du point le plus bas du tracé entre ce pic et celui dû à l'impureté N (isomère 2) dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) ; au minimum 2,0, avec H_p = hauteur au-dessus de la ligne de base du pic dû à l'impureté N (isomère 2) et H_v = hauteur au-dessus de la ligne de base du point le plus bas du tracé entre ce pic et celui dû à l'impureté P dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b).

Calcul des teneurs pour cent :

- pour chaque impureté, utilisez la concentration du sulfate de salbutamol dans la solution témoin (a).

Limites :

- *impureté F* : au maximum 0,3 pour cent,
- *impuretés C, O* : pour chaque impureté, au maximum 0,15 pour cent,
- *impureté N* : pour la somme de la surface des 2 pics d'isomères, au maximum 0,15 pour cent,
- *impuretés non spécifiées* : pour chaque impureté, au maximum 0,10 pour cent,
- *total* : au maximum 1,0 pour cent,
- *seuil de déclaration* : 0,05 pour cent.

Bore : au maximum 50 ppm.

Solution à examiner. A 50 mg de sulfate de salbutamol, ajoutez 5 mL d'une solution contenant 13 g/L de *carbonate de sodium anhydre R* et 17 g/L de *carbonate de potassium R*. Evaporez à siccité au bain-marie et séchez à 120 °C. Calcinez rapidement le résidu jusqu'à destruction de la substance organique, laissez refroidir et ajoutez 0,5 mL d'*eau R*, puis 3,0 mL d'une solution à 1,25 g/L de *curcumine R* dans l'*acide acétique glacial R* récemment préparée. Chauffez doucement pour dissoudre. Laissez refroidir et ajoutez 3,0 mL d'un mélange préparé en ajoutant lentement et en agitant 5 mL d'*acide sulfurique R* à 5 mL d'*acide acétique glacial R*. Mélangez et laissez reposer pendant 30 min. Complétez à 100,0 mL avec de l'*éthanol à 96 pour cent R*. Filtrez et utilisez le filtrat.

Solution témoin. Dissolvez 0,572 g d'*acide borique R* dans 1000,0 mL d'*eau R*. Prélevez 1,0 mL de solution et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*. A 2,5 mL de cette solution, ajoutez 5 mL d'une solution contenant 13 g/L de *carbonate de sodium anhydre R* et 17 g/L de *carbonate de potassium R* et procédez selon les indications données pour la solution à examiner.

Mesurez l'absorbance (2.2.25) de la solution à examiner et de la solution témoin au maximum d'absorption à environ 555 nm. L'absorbance de la solution à examiner n'est pas supérieure à celle de la solution témoin.

Perte à la dessiccation (2.2.32) : au maximum 0,5 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de sulfate de salbutamol.

Cendres sulfuriques (2.4.14) : au maximum 0,1 pour cent, déterminé sur 1,0 g de sulfate de salbutamol.

DOSAGE

Dissolvez 0,400 g de sulfate de salbutamol dans 5 mL d'*acide formique R* et ajoutez 35 mL d'*acide acétique anhydre R*. Titrez par l'*acide perchlorique 0,1 M*. Déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (2.2.20).

1 mL d'*acide perchlorique 0,1 M* correspond à 57,67 mg de $C_{26}H_{44}N_2O_{10}S$.

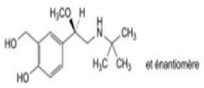
CONSERVATION

A l'abri de la lumière.

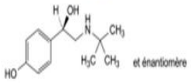
IMPURETÉS

Impuretés spécifiées : *C, F, N, O.*

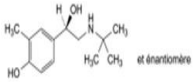
Autres impuretés décelables (si elles sont présentes à une teneur suffisante, les substances suivantes seront détectées par l'un des essais de la monographie. Elles sont limitées par le critère général d'acceptation applicable aux autres impuretés ou impuretés non spécifiées, ou par les dispositions de la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)*. Il n'est donc pas nécessaire de les identifier pour démontrer la conformité de la substance. Voir également chapitre *5.10. Contrôle des impuretés dans les substances pour usage pharmaceutique*) : *A, B, D, E, G, H, I, J, K, L, M, P, Q.*



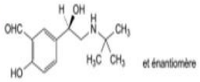
A. 4-[(1*RS*)-2-(*tert*-butylamino)-1-méthoxyéthyl]-2-(hydroxyméthyl)phénol,



B. 4-[(1*RS*)-2-(*tert*-butylamino)-1-hydroxyéthyl]phénol,



C. 4-[(1*RS*)-2-(*tert*-butylamino)-1-hydroxyéthyl]-2-méthylphénol,



D. 5-[(1*RS*)-2-(*tert*-butylamino)-1-hydroxyéthyl]-2-hydroxybenzaldéhyde,

Monographies 2.0

Figure 1 : Présentation d'une monographie de la pharmacopée [3]

Licence CC BY-NC-ND 3.0

I.2. L'utilisation de méthodes alternatives

I.2.1. **Qu'est-ce qu'une méthode alternative**

Une méthode alternative à une pharmacopée est une méthode qui diverge de la méthode décrite dans la monographie de la pharmacopée en question. La variation entre la méthode alternative et la méthode pharmacopée peut être faible, ne modifiant qu'une partie de préparation de l'échantillon, ou forte avec une modification complète de la méthode.

Cette nouvelle méthode développée pour un produit donné peut être utilisée uniquement si elle respecte les critères définis pour les méthodes alternatives.

- La Pharmacopée Européenne [3] définit une méthode alternative par le paragraphe ci-dessous :

"Alternative methods

The tests and assays described are the official methods upon which the standards of the Pharmacopoeia are based. With the agreement of the competent authority, alternative methods of analysis may be used for control purposes, provided that the methods used enable an unequivocal decision to be made as to whether compliance with the standards of the monographs would be achieved if the official methods were used. In the event of doubt or dispute, the methods of analysis of the Pharmacopoeia are alone authoritative."

- L'United States Pharmacopoeia [4] définit dans son chapitre 6.30 la méthode alternative :

"6.30. Alternative and Harmonized Methods and Procedures

An alternative method or procedure is defined as any method or procedure other than the compendial method or procedure for the article in question. The alternative method or procedure must be fully validated (see Validation of Compendial Procedures ⟨1225⟩) and must produce comparable results to the compendial method or procedure within allowable limits established on a case-by-case basis. Alternative methods or procedures can be developed for any one of a number of reasons not limited to simplification of sample preparation, enhanced precision and accuracy, improved (shortened) run time, or being better suited to automation than the compendial method or procedure. Only those results obtained by the methods and procedures given in the compendia are conclusive.

For evaluation as a potential replacement or addition to the standard, alternative methods and procedures should be submitted to USP (see section 4.10 Monographs).

Certain general chapters contain a statement that the text in question is harmonized with the corresponding text of the *European Pharmacopoeia* and/or the *Japanese Pharmacopoeia* and that these texts are interchangeable. Therefore, if a substance or preparation is found to comply with a requirement using an interchangeable method or procedure from one of these pharmacopeias, it should comply with the requirements of the *USP–NF*. When a difference appears, or in the event of dispute, only the result obtained by the method and/or procedure given in the *USP–NF* is conclusive. "

- La Japanese Pharmacopoeia [5] définit aussi les méthodes alternatives dans les notices générales

Licence CC BY-NC-ND 3.0

> **14.** The test methods specified in the Japanese Pharmacopoeia can be replaced by alternative methods which give better accuracy and precision. However, where a difference in test results is suspected, only the result obtained by the procedure given in the Pharmacopoeia is effective for the final judgment.

D'autres pharmacopées telles que l'Indian Pharmacopoeia et la British Pharmacopoeia (BP) définissent aussi les méthodes alternatives et donnent l'accord d'utiliser des méthodes alternatives sous condition que la méthode alternative soit équivalente.

Une méthode alternative utilisable doit :

- être différente de la méthode décrite dans la pharmacopée,
- être soumise et acceptée par les autorités compétentes pour son utilisation,
- présenter un résultat équivalent à celui obtenu par la méthode de référence.

Une méthode alternative peut être utilisées pour de multiples raisons telles que :

- la simplification de la préparation d'échantillon,
- l'amélioration de la précision et de la justesse d'une méthode,
- la diminution du temps d'analyse,
- une facilité à automatiser la méthode.

Cette possibilité permet aux entreprises de développer et utiliser des méthodes différentes et plus modernes que celles préconisées.

I.2.2. **Les différences entre les pharmacopées**

Pour les chapitres n'ayant pas eu d'harmonisation, les méthodes de tests peuvent être différentes d'une pharmacopée à une autre. Ces méthodes sont considérées comme des méthodes alternatives et sont soumises aux requis des paragraphes cités au-dessus. Cela veut dire qu'un produit exporté à plusieurs marchés différents nécessite la réalisation de tous les tests présents dans les différentes pharmacopées et lorsqu'un test est présent dans plusieurs pharmacopées, si les méthodes de test ne sont pas les mêmes, il convient de réaliser :

- plusieurs fois le test, en utilisant les différentes méthodes décrites dans les pharmacopées en fonction du marché du produit ;
- un seul test qui a été démontré comme étant équivalent aux différentes méthodes décrites dans les pharmacopées et donc interchangeable.

Lorsque le produit est destiné au monde entier, il est préférable de comparer les méthodes afin d'avoir une liste exhaustive des tests à réaliser et de pouvoir identifier la meilleure stratégie. Cette comparaison peut montrer une grande divergence dans les méthodes entre les pharmacopées. Un exemple de comparaison des méthodes de contrôle de l'Acetazolamide décrit dans la Japanese Pharmacopoeia [5] (JP) et dans l'International Pharmacopoeia [6] démontre le nombre et l'étendue des différences qui peuvent exister entre la monographie d'une même molécule dans deux pharmacopées différentes (Tableau 1).

Tableau 1 : Comparaison méthode JP et International Pharmacopée [5,6]

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Japanese Pharmacopoeia	International Pharmacopoeia	Commentaires
Identification (1) To 0.1 g of Acetazolamide add 5 mL of sodium hydroxide TS, then add 5 mL of a solution of 0.1 g of hydroxylammonium chloride and 0.05 g of copper (II) sulfate pentahydrate in 10 mL of water: a light yellow color develops. Then heat this solution for 5 minutes: a deep yellow color is produced gradually. (2) To 0.02 g of Acetazolamide add 2 mL of dilute hydrochloric acid, boil for 10 minutes, cool, and add 8 mL of water: this solution responds to Qualitative Tests ⟨*1.09*⟩ for primary aromatic amines. (3) To 0.2 g of Acetazolamide add 0.5 g of granulated zinc and 5 mL of diluted hydrochloric acid (1 in 2): the gas evolved darkens moistened lead (II) acetate paper.	**Identity tests** A. Carry out the examination as described under 1.7 Spectrophotometry in the infrared region. The infrared absorption spectrum is concordant with the spectrum obtained from acetazolamide RS or with the *reference spectrum* of acetazolamide. B. Dissolve 25 mg in 5 mL of water, add 0.15 mL of sodium hydroxide (1 mol/l) VS and 0.1 mL of copper(II) sulfate (80 g/l) TS; a bluish green colour or precipitate is formed. C. Triturate 0.5 g with a mixture of 5 mL of water and 1 mL of sodium hydroxide (1 mol/l) VS, add 0.2 g of zinc R powder and 0.5 mL of hydrochloric acid (~420 g/l) TS; hydrogen sulfide is evolved and may be detected by its odour (proceed with caution), or by the use of filter paper soaked in lead acetate (80 g/l) TS which turns black on exposure.	Les 3 méthodes d'identification de l'Acetazolamide sont différentes dans chaque pharmacopée, l'utilisation d'un spectre IR est acceptable pour l'identification selon l'International Pharmacopoeia cependant, il ne pourrait pas être utilisé comme méthode d'identification pour la poudre destinée au Japon.
(2) Chloride ⟨*1.03*⟩—To 1.5 g of Acetazolamide add 75 mL of water, and warm at 70°C for 20 minutes with occasional shaking. After cooling, filter, and to 25 mL of the filtrate add 6 mL of dilute nitric acid and water to make 50 mL. Perform the test using this solution as the test solution. Prepare the control solution with 0.20 mL of 0.01 mol/L hydrochloric acid VS (not more than 0.014%). (3) Sulfate ⟨*1.14*⟩—To 25 mL of the filtrate obtained in (2) add 1 mL of dilute hydrochloric acid and water to make 50 mL. Perform the test using this solution as the test solution. Prepare the control solution with 0.40 mL of 0.005 mol/L sulfuric acid VS (not more than 0.038%). (4) Heavy metals ⟨*1.07*⟩—Proceed with 1.0 g of Acetazolamide according to Method 2, and perform the test. Prepare the control solution with 2.0 mL of Standard Lead Solution (not more than 20 ppm).	**Heavy metals.** Use 1.0 g for the preparation of the test solution as described under 2.2.3 Limit test for heavy metals, Procedure 3; determine the heavy metal content according to Method A; not more than 20 µg/g. **Sulfates.** Dissolve 1.0 g in 40 mL of water, warm to 70°C for 5 minutes, cool and filter. Proceed with the filtrate as described under 2.2.2 Limit test for sulfates; the sulfate content is not more than 0.5 mg/g.	Les chlorures ne sont pas dosés dans l'International Pharmacopoeia. Les métaux lourds ne sont pas réalisés selon la même méthode Les méthodes générales sont différentes pour les tests de limites de métaux lourds entre les deux pharmacopées. Les sulfates dans le Japanese Pharmacopoeia nécessitent la réalisation du test des chlorures qui n'est pas réalisé dans l'International Pharmacopoeia
Loss on drying ⟨*2.41*⟩ Not more than 0.5% (0.5 g, 105°C, 3 hours).	**Loss on drying.** Dry to constant weight at 105°C; it loses not more than 5.0 mg/g.	La perte à la dessiccation est réalisée de la même façon dans les deux pharmacopées
Assay Weigh accurately about 0.15 g of Acetazolamide, and dissolve in 400 mL of water in a water bath by heating. After cooling, add water to make exactly 1000 mL. Pipet 5 mL of the solution, add 10 mL of 1 mol/L hydrochloric acid TS, and then add water to make exactly 100 mL. Determine the absorbance *A* of this solution at the wavelength of maximum absorption at about 265 nm as directed under Ultraviolet-visible Spectrophotometry ⟨*2.24*⟩. Amount (mg) of acetazolamide ($C_4H_6N_4O_3S_2$) = $A/474 \times 200{,}000$	**Assay.** Dissolve about 0.45 g, accurately weighed, in 90 mL of dimethylformamide R and titrate with tetrabutylammonium hydroxide (0.1 mol/l) VS determining the end-point potentiometrically as described under 2.6 Non-aqueous titration, Method B. Each mL of tetrabutylammonium hydroxide (0.1 mol/l) VS is equivalent to 22.22 mg of $C_4H_6N_4O_3S_2$.	L'essai utilise différentes méthodes afin de déterminer la teneur d'Acetazolamide La méthode définie dans la JP utilise du spectophotométrie en UV/Vis alors que l'International Pharmacopoeia demande un dosage potentiométrique.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Dans le cas d'un site produisant pour plusieurs pays, il peut être nécessaire de réaliser plusieurs fois la détermination des caractéristiques afin de répondre aux demandes de toutes les pharmacopées. L'utilisation de méthodes alternatives permises par les pharmacopées devient très intéressante dans une industrie pharmaceutique qui est mondialisée.

Il existe aussi des méthodes similaires qui ne varient que par l'échantillonnage ou des critères d'acceptation qui sont plus ou moins restrictifs. L'utilisation des critères plus restrictifs n'est pas considérée comme une différence ou une méthode alternative, cependant une modification d'échantillonnage est considérée comme une méthode alternative et ce changement doit être évalué.

La méthode de l'uniformité de dose délivrée propose des conditions différentes d'échantillonnage des doses selon la pharmacopée en vigueur pour le marché ciblé (Tableau 2).

Tableau 2 : Echantillonnage d'uniformité de dose délivrée

<table>
<tr><th>Pharmacopée</th><th>USP42-NF37 [4]</th><th>Ph. Eur.11.4 [3]</th><th>JP 18th Edition [5]</th></tr>
<tr><td>Systèmes à doses pré-conditionnées</td><td rowspan="2">1 dose collectée sur 10 inhalateurs</td><td>10 doses sur le même inhalateur</td><td rowspan="2">Aucun sampling est précisé pour ces tests</td></tr>
<tr><td>Systèmes à réservoir</td><td>1 dose en début d'utilisation sur 3 inhalateurs,
+ 1 dose en milieu d'utilisation sur 4 inhalateurs,
1 dose en fin d'utilisation sur 3 inhalateurs</td></tr>
</table>

La pharmacopée US ne différencie pas les systèmes à doses pré-conditionnées, qui sont constitués d'une poudre dans un blister qui est libérée et aspirée par la personne, des systèmes à réservoir dont une quantité de poudre est en suspension dans un gaz et qui est libérée par une action de pression.

La PE différencie ces deux systèmes puisque le système à doses pré-conditionnées se présente comme des cupules remplies puis blistérisées contrairement à une poudre dans un gaz qui peut potentiellement libérer des doses différentes entre la première utilisation et la dernière.

Pour vérifier la conformité de la dose délivrée, plusieurs échantillonnages peuvent être nécessaires en fonction du lot à moins d'avoir défini une méthode alternative.

I.2.3. **Comparaison entre une méthode alternative et une méthode pharmacopée**

I.2.3.1. **La méthode Britannique**

Les poudres inhalées peuvent être décrites comme des inhalateurs passifs, il n'y a pas besoin de coordination entre le déclenchement et l'inspiration par la bouche contrairement aux

Licence CC BY-NC-ND 3.0

dispositifs pressurisés. La dose délivrée est dépendante de la force et de la durée d'inhalation du patient.

Pour pouvoir être représentatif de la situation *in vivo* d'un patient, la pharmacopée britannique demande l'utilisation d'un équipement spécifique. Cet équipement est composé d'un tube collecteur, d'un filtre, d'une pompe à vide et d'un régulateur de débit (Figure 2).[7]

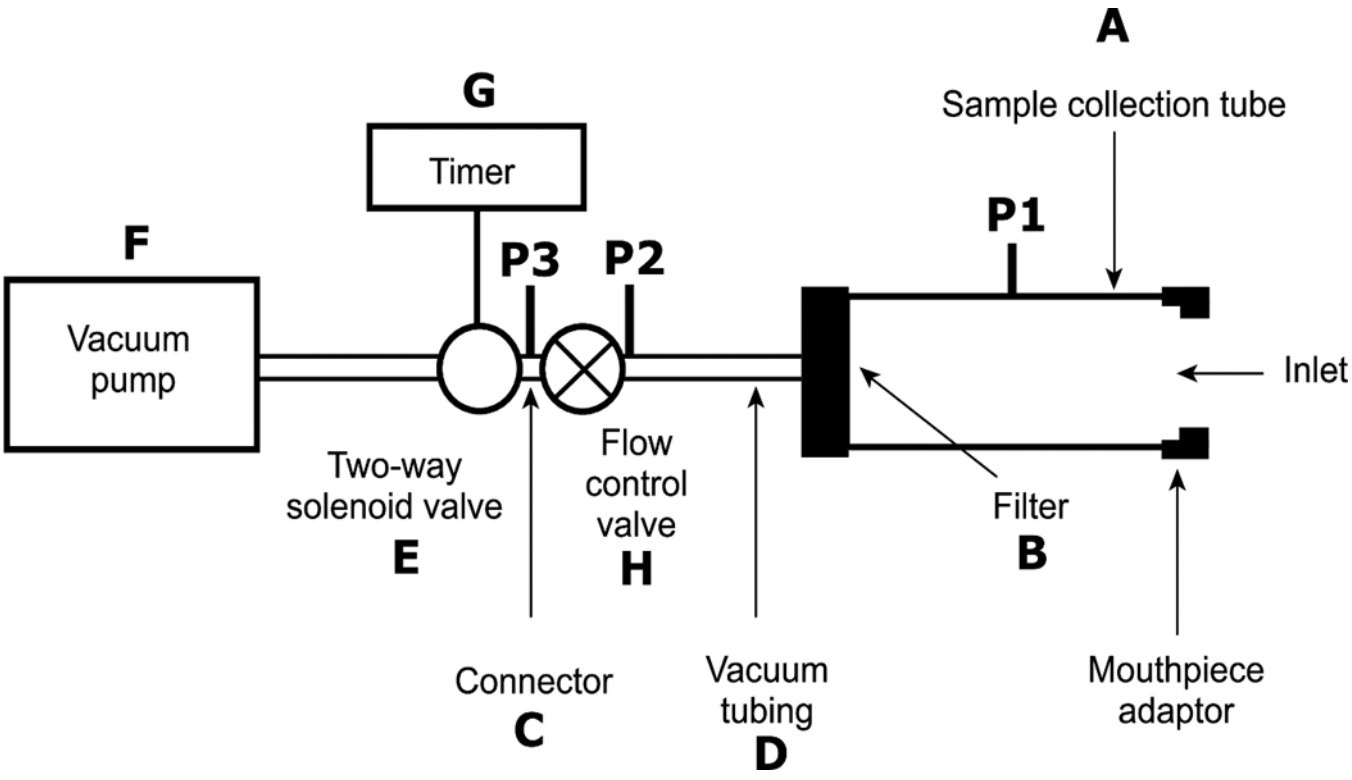


Figure 2 : Appareil pouvant être utilisé pour l'uniformité de la dose délivrée pour des poudres inhalées[7]

Cet équipement permet de représenter la force et la durée d'inhalation grâce au débit de la pompe et au temps d'ouverture de la valve respectivement. La British Pharmacopoeia requiert un débit qui correspond à une chute de pression ΔP1 de 4,0 kPa correspondant à la différence entre la pression atmosphérique et la pression dans le tube collecteur DUSA (Dosage Unit Sampling Apparatus) au point P1 (celle-ci représente la force d'inspiration d'un patient masculin de 70 kg). Ce débit est fonction de l'inhalateur, par exemple l'accuhaler nécessite un débit de 50 L/min pour être à un ΔP1 de 4,0 kPa alors qu'un spinhaler a besoin d'un débit de plus de 100 L/min pour avoir cette chute de pression (Figure 3 [8]).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

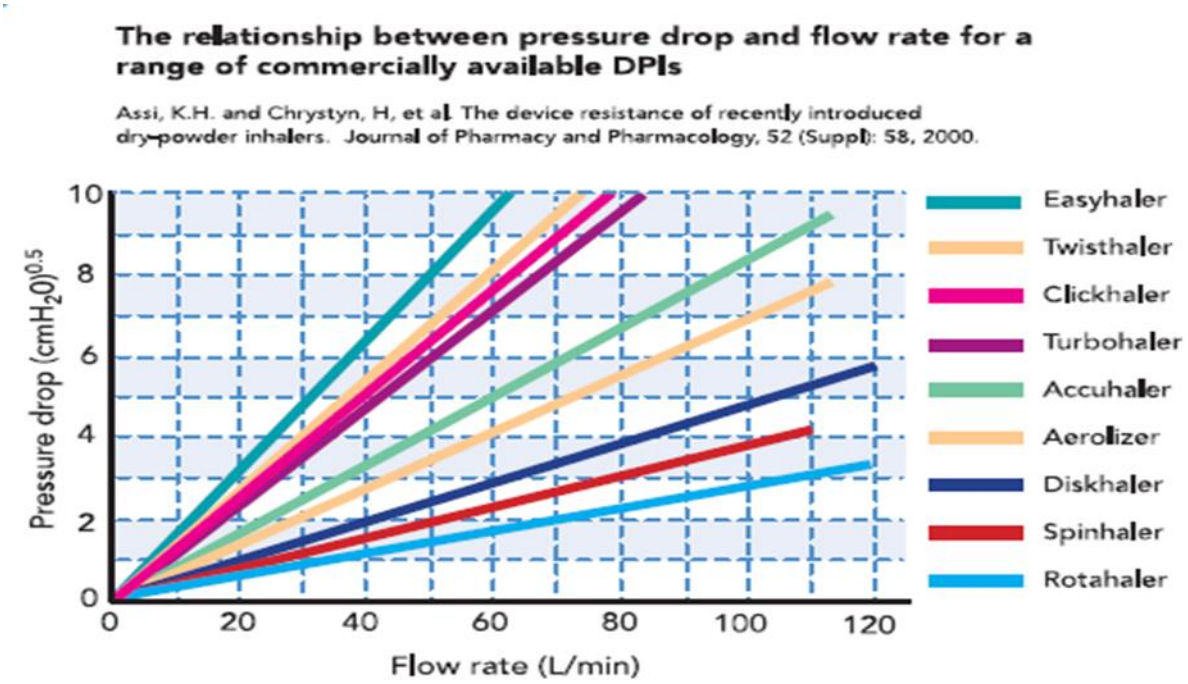


Figure 3 : Lien entre la diminution de pression et le débit

En pratique, à l'aide d'un dispositif vide, la chute de pression est placée à 4,0 kPa. Ensuite il est nécessaire de vérifier la conformité du débit qui doit être compris entre 30 et 100 ± 5L/min. Pour cela, un débitmètre est relié à la bouche qui est représenté par un embout en caoutchouc permettant d'assurer l'étanchéité avec le dispositif et la pompe est allumée. En cas de débit conforme, aucun changement au niveau de la pompe ne doit être observé. Lorsque le débit est supérieur à la limite maximale de 100 L/min, le débit doit être modifié grâce à la valve de contrôle du débit. Une fois le débit fixé, la durée du test peut être calculée. La quantité d'air aspiré doit être de 4 L.

Pour calculer la durée du test T :

$$T = \frac{4}{débit\ elevé}$$

Un autre paramètre à vérifier, avant de commencer l'uniformité de la dose délivrée, est le débit critique. Ce débit est représenté par le ratio de pression entre P3 et P2 (P3 : entrée et P2 : sortie de la valve contrôlant le débit). Ce ratio est représentatif du fonctionnement de la pompe. Il doit être inférieur à 0,5 pour s'assurer que la pompe n'influe pas sur la libération de la dose. Les conditions de débit critique sur la valve de contrôle du débit sont requises afin d'assurer que le débit d'air aspiré par la bouche n'est pas affecté par les fluctuations de la pompe et les changements de résistance du produit.

Une fois ces paramètres vérifiés, la dose peut être délivrée. L'inhalateur est placé au niveau de la bouche, la dose est amorcée, la valve solénoïde est ouverte pendant le temps nécessaire d'aspiration, ainsi la poudre est aspirée dans le tube collecteur. L'étape suivante consiste à retirer l'inhalateur de la bouche, puis à rincer le tube collecteur à l'aide de solvant de dilution pour récupérer la dose délivrée. [7]

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Cette méthode est une méthode manuelle contrairement à la méthode alternative que GlaxoSmithKline souhaite mettre en place et qui est détaillée dans le paragraphe ci-après.

I.2.3.2. **La méthode alternative GSK**

La méthode alternative est une méthode semi-automatique nécessitant seulement l'action du technicien pour déplacer le tube collecteur entre les stations :

- de libération de la dose qui contrôle l'alignement de l'inhalateur avec l'appareil et permet d'insérer rapidement le collecteur de dose à la pompe ;
- de rinçage permettant une façon simple et reproductible de recouvrement de la dose émise libérée dans le collecteur de dose en pompant le solvant de dilution au travers du collecteur jusqu'à une fiole de volume approprié ;
- de séchage du tube collecteur qui aspire de l'air filtré au travers du collecteur afin de retirer le solvant suite à l'utilisation de la station de rinçage.

Cette méthode est utilisée en routine pour de nombreux produits fabriqués sur le site en question mais pas pour le produit dont la BP propose une monographie.

Le principe de cette méthode est similaire à celui décrit dans la BP ; le débit dans le système est de 60 L/min pour être représentatif de l'aspiration du patient, la dose est libérée puis collectée dans une fiole jaugée via la station de rinçage.

I.2.3.3. **Choix de la stratégie**

L'utilisation de méthodes alternatives est décrite dans les pharmacopées comme étant autorisée à condition que la méthode permette de satisfaire les spécifications de la monographie. Il faut donc que la méthode donne des résultats similaires à ce qui est décrit dans la monographie et qu'elle soit validée.

La décision de mettre en place une méthode alternative est réalisée suite à une étude des avantages et des inconvénients des différentes méthodes. Les avantages et inconvénients ne s'appliquent pas uniquement à la qualité analytique de la méthode mais à tout le processus. En se basant sur la méthode 5M, il est possible de vérifier les optimisations possibles de la méthode. Cette étude pourrait se présenter sous le format de questions comme ci-dessous :

- Matières : la méthode alternative utilise-t-elle plus de solvant que la méthode pharmacopée ? Les solvants utilisés sont-ils moins dangereux pour le personnel ?
- Milieu : pour réaliser la méthode, est-ce qu'il faut des conditions particulières pour la préparation ? Peut-elle être réalisée dans une salle à température ambiante ? La lumière est-elle problématique ?
- Main d'œuvre : une automatisation de la méthode peut réduire les troubles automatiques et réduire les erreurs des manipulations cumulées mais demander une préparation plus longue et une maintenance supplémentaire ?
- Méthode : la méthode nécessite-t-elle des conditions particulières ?

Licence CC BY-NC-ND 3.0

- Matériel : l'équipement à utiliser est-il le même ? Est-ce qu'il y a des logiciels associés qui différent de celui ou ceux actuellement utilisé(s) ?

Les réponses à ces questions permettent de mettre en avant des avantages ou des inconvénients qui peuvent renforcer la décision de débuter la démarche de la mise en place de la méthode alternative.

Une méthode alternative ne sera pas mise en place s'il existe plus d'inconvénients que d'avantages.

Les deux méthodes présentées ci-dessous ont des avantages et des inconvénients détaillés dans le Tableau 3.

Le site de GSK produit plusieurs inhalateurs et n'utilise pas la méthode et l'équipement de la Pharmacopée Britannique pour réaliser les tests d'uniformité de dose délivrée sur leurs produits. Pour les autres produits fabriqués sur le site, l'équipement de la méthode semi-automatique est utilisé pour les tests d'uniformité de dose délivrée.

Tableau 3 : Comparaison entre la méthode pharmacopée et la méthode alternative de GSK

	Méthode manuelle de la BP	**Méthode semi-automatique GSK**
Avantages	**Méthode pharmacopée** ne nécessitant qu'une vérification de la faisabilité	Méthode simple, avec une maîtrise de l'équipement Moins de manipulations pouvant générées des problèmes de troubles musculosquelettiques
Inconvénients	**Méthode manuelle :** troubles musculosquelettiques possibles (agitation vigoureuse, tube collecteur de taille conséquente). **Nouvelle méthode pour le site :** Manque d'expertise sur la méthode.	**Méthode non-pharmacopée,** nécessitant de démontrer que sa performance est équivalente, voire supérieure, à celle de la BP
Méthode retenue		

La méthode simple semi-automatique est jugée plus avantageuse malgré l'obligation de réaliser une étude d'équivalence des performances entre les deux méthodes. Elle présente une facilité d'utilisation en routine qui est non négligeable. De plus, pour les techniciens, la méthode GSK permettrait de réduire le risque de troubles musculosquelettiques puisque

Licence CC BY-NC-ND 3.0

moins de mouvements répétitifs sont fait durant l'analyse. C'est pour ces raisons que la méthode GSK a été choisie comme la méthode à mettre en place pour ce besoin.

I.2.4. **Stratégie de mise en conformité avec les pharmacopées**

Les pharmacopées permettent l'utilisation de méthodes alternatives tel que décrit dans les chapitres généraux. Cependant pour mettre en œuvre cette nouvelle méthode, plusieurs étapes doivent être réalisées en amont.

Actuellement la majorité des méthodes ne sont pas développées sur un site de production. Ce sont des laboratoires de développement ou des pôles de recherches et de développement qui créent les méthodes pouvant être implémentées.

Il existe deux grandes étapes pour l'utilisation de ces méthodes dans le contexte des Bonnes pratiques de Fabrication (BPFs)[9] et l'adhérence aux demandes réglementaires : le transfert analytique de la méthode et l'étude d'équivalence entre la méthode alternative et la méthode pharmacopée.

En effet, dans l'exemple présenté ci-dessus, la méthode GSK n'est pas encore utilisée sur le site de production pour ce produit mais elle est utilisée sur le même produit sur un autre site de GSK. Elle ne peut pas être utilisée pour ce produit sans ces étapes préliminaires.

La première étape nécessaire à la mise en place de la méthode alternative consiste à transférer la méthode sur le site receveur. Ce transfert analytique permet d'implémenter la méthode sur site. Ce transfert peut être réalisé de deux façons différentes :

La revalidation de la méthode :

- la méthode est donnée au site receveur qui réalise la validation de la méthode sur leurs équipements. Cette méthode ne sera pas traitée en détail dans ce document puisqu'il consiste à réaliser la validation de la méthode comme présentée dans le II.2.1.2.

Le transfert analytique basé sur une analyse de risques qui est composé de plusieurs grandes parties :

- l'analyse d'écart qui met en évidence les différences entre la méthode transférée et la méthode décrite dans le dossier d'enregistrement. Cette analyse permet aussi de souligner les différences de pratiques entre le site transférant et le site receveur ;
- la familiarisation qui montre la capacité du site receveur à mettre en œuvre la méthode dans les conditions réelles d'utilisation des équipements et de mettre sous contrôle les paramètres importants de configuration d'instrument et/ou de la méthode.

Le transfert analytique proprement dit consiste à démontrer la compétence du site receveur à dérouler la méthode et à obtenir les résultats attendus.

La deuxième étape est l'équivalence afin de démontrer qu'une méthode alternative répond de la même manière que celle décrite dans la pharmacopée. Cette équivalence est composée de deux grandes parties :

Licence CC BY-NC-ND 3.0

- la faisabilité de la méthode pharmacopée : avant de démontrer une équivalence, la prise en main de la méthode permet de vérifier le bon fonctionnement sur site de cette méthode ;
- l'étude d'équivalence : qui sera formalisée par une comparaison statistique des résultats générés à l'aide de la méthode pharmacopée et de la méthode

Licence CC BY-NC-ND 3.0

II. LE TRANSFERT ANALYTIQUE

Par l'intermédiaire de la mondialisation de l'industrie pharmaceutique, il existe des sites de recherche et développement (R&D) et des sites de production des produits finis. Afin de mettre en place une méthode de contrôle développé sur un site de R&D, il faut réaliser un transfert de la méthode. De même, lors du transfert de fabrication entre sites de production [10,11].

Le transfert de méthode permet l'utilisation sur un site différent d'une méthode de contrôle. Ce processus qualifie un laboratoire à utiliser une procédure analytique. Le transfert est réalisé selon une méthode basée sur l'évaluation de risque qui identifie, évalue, atténue et gère les risques du transfert[12]. Ce transfert [13] se fait selon le processus détaillé ci-dessous. Dans le cas d'un produit connu et d'une méthode robuste, le transfert se déroule comme suit :

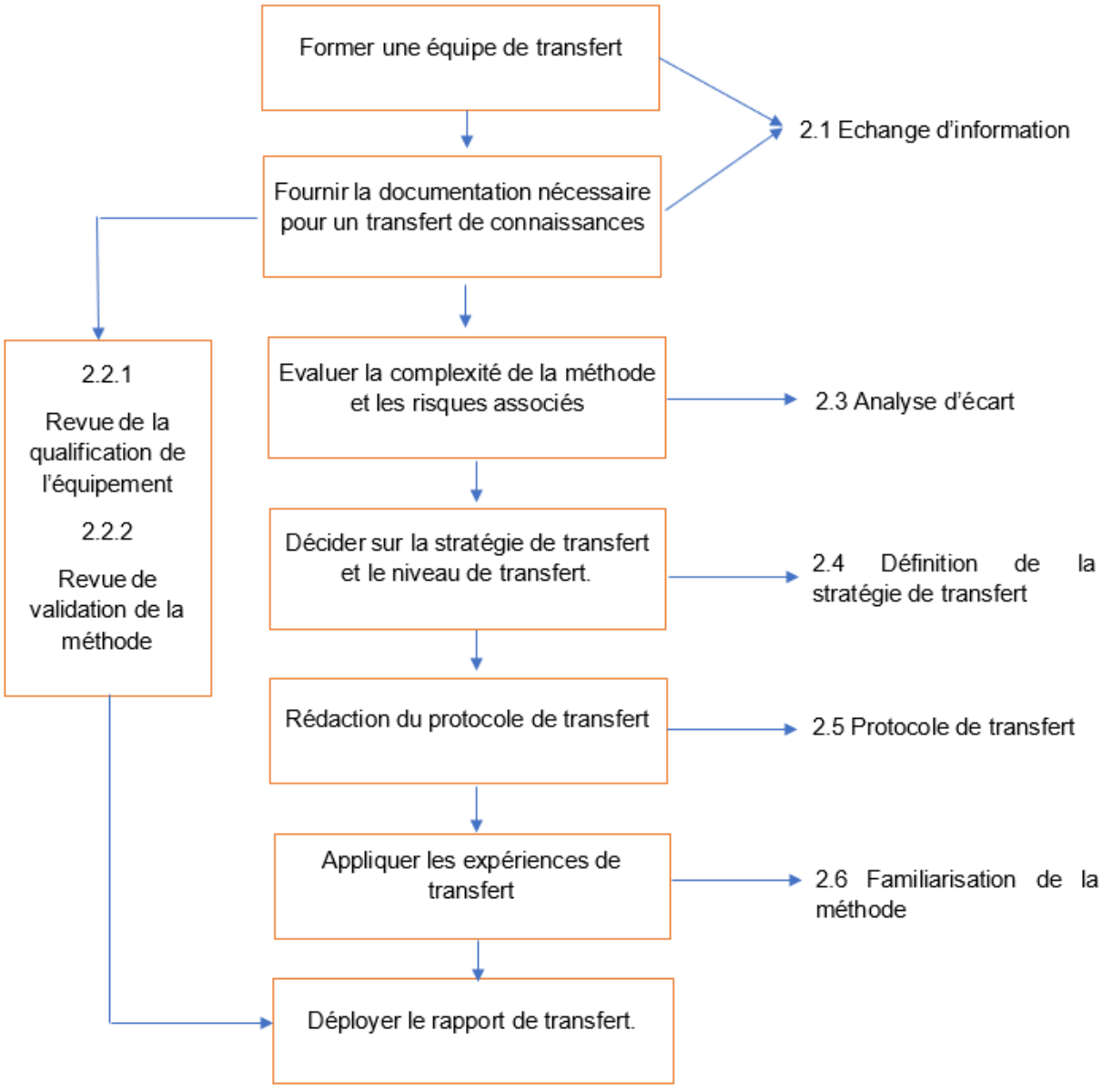


Figure 2 : Organigramme d'un transfert de méthode analytique

Licence CC BY-NC-ND 3.0

II.1. Echange d'informations

Les Bonnes Pratiques de Fabrication décrivent les attendus de vérification à réaliser avant de transférer une méthode de contrôle :

« 6.37. Avant de transférer une méthode de contrôle, le site à l'origine du transfert doit vérifier que la ou les méthode(s) de contrôle sont conformes à celles décrites dans l'autorisation de mise sur le marché ou le dossier technique correspondant. La validation initiale de la ou des méthodes de contrôle doit être passée en revue afin de s'assurer de sa conformité aux exigences ICH en vigueur. Une analyse des écarts doit être réalisée et documentée afin d'identifier toute validation supplémentaire éventuellement requise avant le lancement du processus de transfert technique »[9]

En pratique, avant de débuter un transfert, il est nécessaire de former une équipe de transfert qui sera responsable du bon déroulement du transfert. Cette équipe doit être composée de personnes représentant à la fois le site transférant et le site receveur. Les représentants du site transférant doivent avoir une connaissance approfondie de la méthode afin de pouvoir répondre à toute question des représentants du site receveur.

L'échange d'information est une étape clé du transfert de méthode. Elle permet aux deux sites d'avoir les informations nécessaires pour pouvoir débuter le transfert. Le site transférant fournit la procédure de la méthode ainsi que les documents de validation et les documents référencés dans la procédure par exemple les spécifications associées à la méthode ou des procédures générales d'utilisation. Il apporte aussi les connaissances de la méthode ainsi que les problèmes connus. Le site receveur, quant à lui, apporte les informations demandées par le site transférant à propos de l'équipement qui sera utilisé et de leur savoir-faire.

Lors de cet échange d'information, le site receveur prend connaissance des documents transférés par le site transférant et des échanges ont lieu régulièrement concernant la compréhension des documents, l'utilisation de nouveaux équipements ainsi que les pratiques des différents sites. De plus, cet échange d'information permet d'apporter des informations supplémentaires au site receveur, par exemple lorsqu'une méthode indique « agiter jusqu'à dissolution », les analystes qui réalisent régulièrement cette méthode peuvent préciser que cette étape nécessite 20 minutes d'agitation vigoureuse et qu'une dissolution incomplète aboutit à des résultats au moins 5% inférieure à la valeur attendue.[12]

Une fois les documents échangés et le transfert de connaissance réalisé, il sera possible de réaliser les étapes suivantes du transfert de méthode :

- l'analyse d'écart qui permet l'évaluation de la complexité de la méthode et les risques associés,
- la revue de qualification et la revue de la validation de la méthode, réalisé en parallèle qui permet de vérifier les différents paramètres de qualification de la méthode.

II.2. Vérification de la méthode et des équipements

Lors du transfert d'informations entre les sites, en plus des informations pratiques du matériel, de la méthode et des équipements, il faut pouvoir démontrer que le matériel entre les deux

Licence CC BY-NC-ND 3.0

sites n'a pas d'influence sur les résultats, que la méthode est validée et que les équipements sont qualifiés.

La qualification des équipements est vérifiée par l'intermédiaire d'un rapport de qualification pour s'assurer que les plages de fonctionnement utilisées ont été démontrées comme étant fonctionnelles. La vérification de la validation de la méthode est réalisée par l'intermédiaire de la revue de validation.

Le site transférant démontre l'état qualifié de ses équipements et peut aider le site receveur avec la qualification de nouveaux équipements si de nouveaux équipements sont mis en place pour ce transfert. Si le site receveur utilise des équipements déjà présents sur son site, il doit démontrer leur état qualifié.

II.2.1. **Qualification des équipements**

II.2.1.1. **Définition**

L'étape de qualification est définie par l'annexe 15 des BPF[9]. C'est un requis réglementaire. L'annexe 15 s'applique aux installations, aux équipements, aux utilités et aux procédés.

La qualification doit être réalisée selon l'impact qualité du système. Tout système ayant un impact qualité direct ou indirect doit être qualifié avant son utilisation. Cette qualification nécessite une connaissance approfondie de l'équipement et ne peut être réalisée que par du personnel formé et être chapeautée par un plan directeur de validation (Validation Master Plan : VMP)

Le VMP doit définir le système de qualification/validation incluant *a minima* :

- la politique de qualification et de validation,
- la structure organisationnelle incluant les rôles et responsabilités pour les activités de qualification et de validation,
- le récapitulatif des installations, des équipements, des systèmes et des procédés du site et leur statut de qualification et de validation,
- la maîtrise des changements et la gestion des déviations appliquées à la qualification et la validation,
- les recommandations pour le développement des critères d'acceptation,
- les références aux documents existants,
- la stratégie de qualification et de validation, incluant la requalification, le cas échéant.

La documentation des différentes étapes de qualification, les données générées et les résultats de la qualification doivent être approuvés et autorisés par le personnel compétent, en général, le service qualité.

Lorsqu'un système est défini comme ayant un impact qualité direct ou indirect et qu'une qualification est nécessaire, il convient de préparer un protocole de validation qui précise les attributs et paramètres critiques ainsi que les critères d'acceptation associés. Ce protocole

Licence CC BY-NC-ND 3.0

peut être fourni par un prestataire de service tel que l'entreprise fabricant l'équipement sous condition d'une confirmation du personnel compétent, de leur adéquation et de leur conformité aux procédures internes avant approbation et utilisation.

Les étapes de qualification interviennent dès le développement initial des cahiers des charges de l'utilisateur jusqu'à la dernière utilisation de l'équipement. Les étapes présentées ci-dessous sont le minimum à réaliser dans la qualification d'un équipement (Figure 6).

- Le cahier des charges de l'utilisateur ou URS (User Requirements Specification) est un document élaboré en amont permettant de définir les spécifications de l'équipement, il inclut une description fonctionnelle de l'équipement recherché et définit les éléments essentiels à la qualité, et au respect des Bonnes Pratiques de Fabrication.

Ce document sert de point de référence à la qualification et la validation. Les données indiquées correspondent aux attentes de l'équipement et les critères d'acceptation sont basés sur ces données. L'URS permet d'élaborer une analyse de criticité des différentes parties de l'équipement. L'analyse de criticité permet de mettre en avant les différents points critiques de l'équipement pour son utilisation dans un environnement BPF.
De cette analyse de criticité découlera les tests à réaliser pour mettre sous contrôle l'équipement et vérifier la conformité et le bon fonctionnement de l'équipement par rapport aux attendus.

- La qualification de conception ou DQ (Design Qualification) assure que l'équipement répond aux besoins de son utilisation, aux User Requirement Specifications ainsi que les différentes contraintes de l'environnement avant d'avoir l'équipement sur site. Cette étape permet de suivre une approche Quality by Design.

- La qualification d'installation ou QI comporte :

    - une vérification à réception de la conformité des pièces et des plans avec la présence et la conformité de la documentation (par exemple un certificat matière) à la réception,

    - une vérification de l'installation de l'équipement dans un endroit adapté et défini par un plan,

    - une vérification de la présence des besoins nécessaires au bon fonctionnement de l'équipement comme une arrivée d'eau pour un laveur ou une alimentation en vapeur pure pour autoclave. Cette vérification inclut la possibilité de raccorder l'équipement à ces utilités.

    - Une vérification métrologique peut aussi être un besoin de la qualification d'installation c'est-à-dire s'assurer que les pièces nécessitant un étalonnage ont été étalonnées. Par exemple, une vérification métrologique d'une sonde de température par l'intermédiaire d'une sonde calibrée et un bain à température contrôlé permet d'assurer que la température relevée par la sonde est correcte. Dans le cadre de la méthode alternative GSK, l'équipement de la méthode semi-automatique réalise une agitation qui dure un temps défini. La programmation du temps d'agitation est paramétrée sur l'équipement. Ce paramétrage du temps d'agitation doit être vérifié par un chronomètre étalonné pour assurer que le

Licence CC BY-NC-ND 3.0

temps paramétré correspond au temps réel d'agitation.

- La qualification opérationnelle ou QO, normalement effectuée après la qualification d'installation mais dans certains cas d'équipements complexes, peut être réalisée en simultanée. Elle assure le bon fonctionnement de l'équipement installé. Cette qualification comporte des tests fonctionnels permettant de confirmer le bon fonctionnement du système, les limites supérieure et inférieure d'utilisation et les conditions d'utilisation de l'équipement.

- La qualification de performance ou QP doit être réalisée après la conclusion de la qualification d'installation et la qualification opérationnelle. Une personne responsable doit donner son acceptation pour passer à cette étape.

Cette étape de qualification doit comporter des tests visant à simuler les conditions d'utilisation normales, avec les conditions « worst case », c'est-à-dire qu'on vérifie la capacité de produire des résultats reproductibles, dans les limites d'utilisation confirmées en QO, et le tout dans les conditions réelles d'utilisation.
Dans le cas d'un isolateur de production, un comptage particulaire est réalisé avec le chargement maximale et une activité définie comme étant la plus susceptible de générer des particules afin d'être dans les conditions réelles pire cas et assurer une performance acceptable

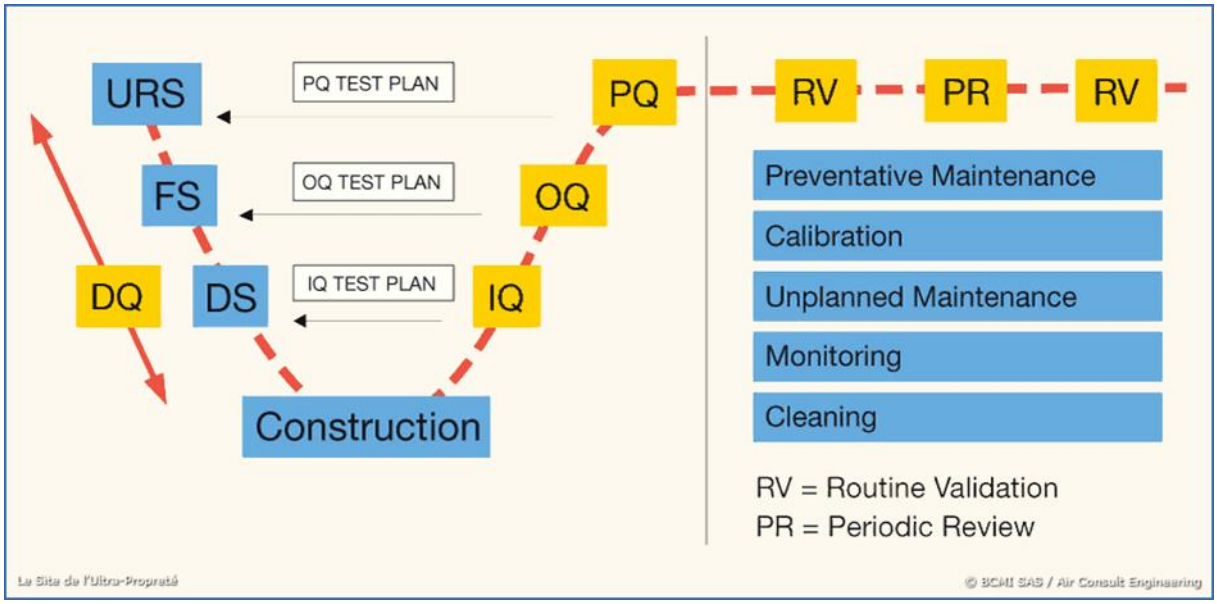


Figure 3 : Diagramme en V de la qualification d'un équipement [14]

Lorsque la qualification initiale a été réalisée et que l'équipement a été libéré pour utilisation dans un environnement BPF, il convient de suivre le fonctionnement de cet équipement et ses conditions d'utilisation afin d'assurer qu'aucune dérive n'a lieu pendant la vie de l'équipement. Ce suivi peut engendrer des tests de requalification qui confirme que l'équipement est bien

Licence CC BY-NC-ND 3.0

sous contrôle. En effet, pendant le cycle de vie d'un congélateur, la température de consigne peut varier pour maintenir la température souhaitée. Si aucune vérification n'est réalisée, ce problème ne peut être décelé.

Sa fréquence est définie selon plusieurs critères dont certains sont normés, par exemple la classification particulaire en zone à atmosphère contrôlée classe A doit être réalisée tous les 6 mois selon l'annexe 1 des BPF.

Lorsque le protocole de qualification a été réalisé, les résultats des différents tests réalisés sont acceptés par le service qualité, les modifications tracées et leur impact sont pris en compte et les résultats non-conformes sont investigués. Un rapport de qualification doit être rédigé pour conclure l'exercice de qualification.

Ce rapport répond au protocole et démontre la capacité de l'équipement à répondre aux besoins prévus dans le cahier de charges dans les conditions d'utilisation sur site. Il décrit les différentes investigations et les modifications réalisées lors de la qualification de l'équipement et répond à l'analyse de criticité du protocole de qualification.

Dans le cas de modification de paramètres après la qualification initiale de l'équipement, des tests supplémentaires peuvent être réalisés en fonction de la criticité du changement. Ces modifications doivent être tracées et les résultats des tests supplémentaires démontrent la capacité de l'équipement à répondre aux nouveaux besoins critiques.

Le rapport de qualification doit être transféré entre les sites afin de démontrer l'état de qualification des différents systèmes impliqués dans le transfert. Dans le cas de résultats non conforme, l'investigation doit être présentée pour expliquer le problème rencontré et évaluer son impact sur la difficulté du transfert.
Ces rapports de qualification sont présentés pour les équipements du site receveur et du site transférant.

II.2.1.2. **La revue de la qualification**

Le site transférant s'assure que les équipements du site receveur peuvent être utilisés avec la méthode et réduit le risque de non-conformité en raison d'un équipement non adapté aux essais qui seront réalisés

L'équipement utilisé pour la réalisation d'une méthode nécessaire au contrôle d'un produit pharmaceutique est considéré comme ayant un impact qualité. Le statut qualifié des équipements utilisés par le site transférant doit être vérifié afin de s'assurer du bon fonctionnement des équipements ayant permis de valider la méthode. De plus, cette vérification doit être réalisée pour les équipements du site receveur qui seront utilisés par la suite pour dérouler les étapes de transfert.

Lorsqu'il existe des écarts de qualification sur ces équipements, une analyse d'impact est réalisée afin de définir le risque apporté par cet écart et les actions permettant de clôturer les écarts ou de les réduire pour diminuer leur impact. Ces actions peuvent aller jusqu'à une requalification de l'équipement.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

II.2.2. **La revue de la validation de la méthode**

Tout procédé analytique non-pharmacopée doit être validé. Lors de la validation de la méthode il doit répondre aux critères de l'ICH Q2[15]. Cette guideline donne les recommandations pour évaluer les tests de validation pour chaque procédure analytique, ainsi que la définition des attendus. Cette guideline peut aussi s'appliquer dans une stratégie de contrôle selon une approche basée sur le risque.

Afin de répondre aux critères de l'ICH Q2 la revue de validation doit garantir que les paramètres suivants ont été validés :

- Spécificité.

La spécificité est la capacité de différencier le produit recherché de tout autre composant pouvant être présent. Ces autres composants peuvent être des impuretés, des produits de dégradation ou la matrice. Pour la méthode étudiée, la spécificité de l'uniformité de dose délivrée, permet de s'assurer que la méthode de séparation par HPLC sépare et différencie le sulfate de salbutamol de ses impuretés, des produits utilisées dans la production, des excipients utilisés, et des « leachables ». Ces « leachables » proviennent de la cupule contenant la poudre. La spécificité implique que le procédé analytique peut assurer l'identification du produit ainsi que fournir, dans le cas d'une méthode quantitative comme le dosage de Salbutamol Sulfate dans le salbutamol sulfate en produit inhalée, le résultat correspond uniquement au produit à doser.

- Précision.

La précision est la capacité de rendre des résultats similaires entre plusieurs essais de la même solution homogène. Elle est exprimée par la variance, l'écart-type ou le coefficient de variation. Cette précision peut être vérifié à trois niveaux :

- La répétabilité qui exprime la précision lorsque les mêmes conditions opératoires sont observées dans un court laps de temps (le même opérateur avec le même équipement répète l'essai plusieurs fois le même jour)
- La précision intermédiaire qui exprime la précision intra-laboratoire. La même solution fournit les résultats similaires avec des opérateurs différents, sur différents équipements pendant plusieurs jours.
- Reproductibilité représente la précision inter-laboratoire. Les tests sont réalisés avec la même solution dans des laboratoires différents. Ce niveau de précision n'est pas attendu dans la revue de validation de la méthode. Elle peut ne pas être réalisée lors de la validation d'une méthode.

- Exactitude.

L'exactitude représente la capacité du procédé analytique d'obtenir un résultat qui correspond à la valeur de référence acceptée. Une méthode exacte peut ne pas être précise. Il n'y a pas de notion de variance entre les résultats dans une méthode exacte.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

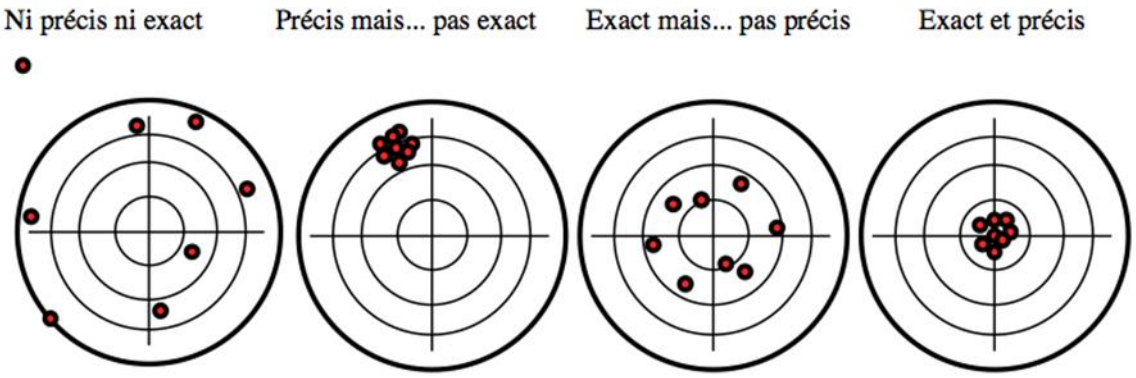


Figure 4 : Précision et exactitude [16]

- Linéarité.

Les résultats obtenus avec le procédé analytique doivent répondre de façon linéaire, c'est-à-dire qu'une augmentation de la quantité doit aussi augmenter la réponse d'un facteur x et ce sur toute la gamme de mesure. Ce paramètre est évalué à l'aide d'une inspection visuelle de la courbe de données ainsi qu'à l'aide de méthodes statistiques telles que le calcul de la régression par la méthode des moindres carrés. Afin de statuer sur la linéarité d'une procédure analytique, un minimum de 5 points est demandé.

- Limite de détection.

La limite de détection défini la quantité minimale nécessaire dans un échantillon pour être détecter sans avoir besoin d'être quantifier.

- Limite de quantification.

La limite de quantification correspond à la plus petite quantité de produit dans un échantillon qui peut être détectée et quantifiée avec une précision et une exactitude suffisante. Cette limite est notamment utilisée pour quantifier les impuretés majeures et/ou les produits de dégradation. Elle ne peut pas être inférieure à la limite de détection.

- Gamme de mesure.

La méthode analytique doit être validée sur un intervalle comprenant les concentrations maximales et minimales du produit à tester dans l'échantillon avec une précision suffisante, une exactitude suffisante et une linéarité suffisante.
Si un médicament se présente sous une forme contenant de 10 mg de principe actif et sous une forme contenant 100 mg de principe actif, la gamme de mesure validée doit encadrer ces quantités pour pouvoir appliquer une seule et même méthode sur les deux produits.

- Robustesse.

La robustesse d'une procédure analytique est la capacité d'une procédure de résister à des petites modifications dans les paramètres de la méthode ce qui permet de fournir une indication de sa fiabilité lors d'une utilisation en routine. Des exemples de modifications possibles sont une différence de température ou de pH d'une solution, ou encore un

Licence CC BY-NC-ND 3.0

changement de temps de préparation.

Les caractéristiques à valider sont dépendantes de la méthode (Tableau 4). Une méthode d'identification des impuretés n'a pas les mêmes requis pour la validation qu'une méthode de quantification. L'ICH définit les différentes caractéristiques à valider en fonction de la méthode :

Tableau 4 : Validation de méthode analytique

Caractéristiques de la procédure analytique	Identification	Test quantitative (essai)	Test quantitative (impuretés)	Test de limites pour impuretés
Spécificité	Oui	Oui	Oui	Oui
Précision	Non	Oui	Oui	Non
Exactitude	Non	Oui	Oui	Non
Linéarité	Non	Oui	Oui	Non
Limite de détection	Non	Non	Non[1]	Oui
Limite de quantification	Non	Non	Oui	Non
Gamme de mesure	Non	Oui	Oui	Non

[1]La limite de détection peut être nécessaire dans certains cas

Dans le cadre d'un transfert de méthode, il est indispensable de vérifier cet état de validation. Ceci se fait par l'intermédiaire de la revue de validation [17,18]. Cette revue doit être réalisée par le site receveur en parallèle du déroulement des autres étapes de transfert avant de pouvoir conclure le transfert avec son rapport. Les documents nécessaires à cette étape sont obtenus lors de l'échange d'informations. Le site transférant met à disposition les tendances de la méthode et les procédures.

La revue de validation est composée de deux parties :

- les performances de la méthode (si disponibles) regroupant les problèmes obtenus en routine avec la méthode, c'est-à-dire le nombre de résultats hors normes ou de résultats atypiques pouvant être corrélés à la méthode, les problèmes liés aux critères de conformité du système tel que les réinjections dans le cas d'une méthode HPLC, ou encore les changements à la procédure pouvant affectés les paramètres de validation ;
- la revue de validation de la méthode qui consiste à vérifier que les paramètres de validation ont été testés et qu'il n'y a pas d'écart entre les critères de validation actuels et les critères

Licence CC BY-NC-ND 3.0

définis au moment de la validation. Si des écarts sont identifiés, la revue inclus les actions à mettre en place pour justifier ou réduire ces écarts.

Afin de vérifier les performances de la méthode, le site receveur s'aide des *periodic performance review* afin de suivre la tendance des hors spécifications ou résultats atypiques puis doit rechercher les données de ces résultats atypiques afin de comprendre l'origine du résultat.

Un résultat atypique peut être dû à différentes causes telles que l'erreur humaine, ou un défaut d'équipement. La revue de l'origine de ces résultats permet de faire la différence entre un oubli d'une personne et une incompréhension de la méthode qui provient d'une mauvaise description de la manipulation.

Suite à la revue de validation, en cas d'écarts dans la validation de la méthode, il peut être nécessaire de réaliser des expériences supplémentaires afin de compléter ces données avant l'utilisation en routine de la méthode sur le site receveur. Ces expériences seront faites à la fin du transfert de la méthode.

II.3. Vérification de la méthode et des équipements

L'analyse d'écart de la méthode est un élément indispensable au transfert. Il permet de mettre en avant les risques liés à la méthode ainsi que la complexité. C'est un document traçant les écarts entre la méthode du site transférant et le dossier réglementaire et les différents pratiques entre le site transférant et le site receveur dans le cadre de la méthode transférée. Ces écarts peuvent être, entre autres, analytiques (un critère d'acceptation différent), dues aux pratiques de travail (utilisation ou non d'une solution pré-préparée), ou à l'équipement.

Chaque étape de la méthode est comparée pour présenter les différences afin de juger de leur impact sur la méthode. Les pratiques des différents sites peuvent aussi avoir un impact sur le transfert. L'objectif de l'analyse d'écart est d'évaluer les impacts de ces différences et de mettre en place des actions appropriées pour les réduire, voire les supprimer.

Cette analyse est faite à partir des données transférées dans l'étape précédente. L'équipe de transfert s'appuient sur cette analyse dans la définition du niveau de risque. Les équipes travaillent ensemble afin de définir l'impact et les actions à mettre en place.

Il existe plusieurs niveaux d'impact qui permettent d'affiner le niveau de risque lié au transfert :

- Pas d'impact : ce sont des modifications ou des différences de pratiques qui n'ont aucun impact sur la méthode ou le résultat obtenu. Ce serait le cas d'une différence d'échelle sur une graph de résultat.
- Impact mineur : la méthode ou les pratiques ne sont pas identiques et peut potentiellement avoir un impact sur la bonne réussite du transfert, cependant le risque d'avoir un impact est moindre.
  Dans le cadre de l'analyse d'écart sur le transfert de la méthode alternative de l'uniformité de la dose délivrée, les écarts suivants ont été observés et documentés :

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Tableau 5 : Exemple d'écart mineur entre les pratiques des différents sites

Exemples d'écart entre les pratiques du site transférant et celles du site receveur		Action
Mineur	**Site transférant :** La phase mobile doit être préparée lors de l'analyse. **Site receveur :** Une phase mobile prête à l'emploi est utilisée pour les analyses.	La phase mobile prête à l'emploi ne devrait pas engendrer de différence. Elle sera maintenue pour le site receveur
Mineur	**Site transférant :** Pour le release, 2 blisters sur 5 diskus sont testés (blisters allant du 1er au 52e) **Site receveur :** Pour le release, 2 blisters sur 5 diskus sont testés (blisters allant du 1er au 60e).	La stratification est différente mais la variabilité intra-inhalateur est vérifiée. Celle du site transférant ne devrait pas engendrer de problème et sera utilisée lors de la familiarisation. Toutefois, en routine les pratiques du site receveur seront gardées.

Le Tableau 5 reprend des différences documentées lors du transfert de la méthode d'uniformité de dose délivrée de GSK. La définition de l'impact de ces différences est expliquée dans la colonne « Action » et la pratique à appliquer est décrite dans cette colonne. De plus, une explication de la pratique en routine retenue peut être présentée.

- Impact majeur : l'écart observé peut avoir un impact sur la réussite du transfert. Ce sont des écarts qui peuvent rendre la méthode plus complexe ou une restriction de critères d'acceptation par exemple.

Tableau 6 : Exemple d'écart majeur entre les pratiques des différents sites

Exemples d'écart entre les pratiques du site transférant et celles du site receveur		Action
Majeur	**Site transférant :** Le taux de recouvrement doit être compris entre 80% et 120% **Site receveur :** Le taux de recouvrement doit être compris entre 75% et 125%	Le site receveur utilisera les critères d'acceptation du site transférant pour les essais de transfert. Les critères d'acceptation pour l'utilisation en routine seront déterminés en fonction des attendus réglementaires.

- Impact critique : défini par une différence importante entre les pratiques ou les méthodes présentés par le site transférant et le site receveur. Cet écart a une forte probabilité de modifier le résultat obtenu dans le cadre du transfert. L'équipement utilisé pour réaliser une analyse serait un écart avec un impact critique.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Tableau 7 : Exemple d'écart majeur entre les pratiques des différents sites

Exemples d'écart entre les pratiques du site transférant et celles du site receveur		Action
Critique	**Site transférant :** Utilisation de l'équipement semi-automatique pour les tests d'uniformité de dose délivrée **Site receveur :** L'équipement semi-automatique n'a jamais été utilisé.	Le site transférant sera en support pour l'utilisation de l'équipement, le technicien sera formé sur le site transférant à l'utilisation de l'équipement

Contrairement à l'écart à impact mineur, où l'objectif est de décider entre deux pratiques similaires pour leur utilisation à la fois lors du transfert et en routine, l'action associée à un écart à impact critique doit chercher à réduire l'impact de ces différences. Dans l'exemple cité, afin de combler au manque d'expérience et de connaissance sur le site receveur, une formation sur le site transférant peut-être programmée pour le technicien transfert du site receveur et une personne expérimentée peut être présent pour la réalisation des premiers essais sur le site receveur permettant de réduire le risque d'erreurs.

L'analyse d'écart permet d'avoir un paramètre essentiel à la définition du niveau de risque du transfert. La quantité d'écart et l'impact de ces écarts vont être pris en compte pour définir le risque de la méthode.

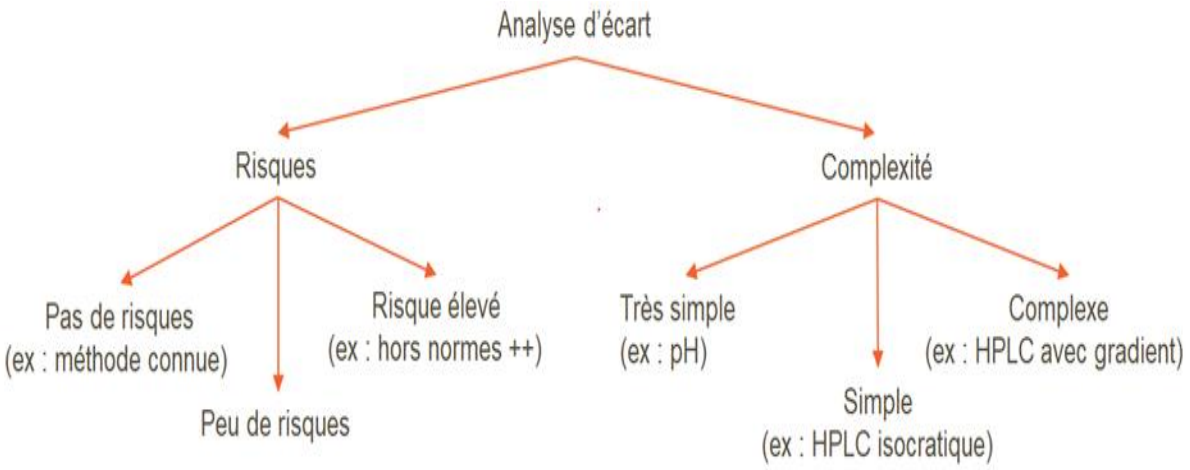


Figure 5 : Définitions des paramètres suite à l'analyse d'écart

Lorsque l'équipe de transfert valide l'analyse d'écart, elle définira le niveau de risque et la complexité de la méthode afin de passer à l'étape suivant. Ces deux paramètres sont définis de la façon suivante :

Licence CC BY-NC-ND 3.0

1) Le risque est évalué par rapport à la probabilité du site receveur de rencontrer des complications au niveau de la performance de la méthode lors de l'utilisation en routine. Certains paramètres qui peuvent augmenter le risque sont :

- Une fréquence élevée de résultats atypiques, ou d'OOS : Une méthode générant des OOS peut rendre le transfert plus risqué puisqu'il y aura des chances plus élevées d'avoir des non-conformités lors de l'utilisation de la méthode. La formation des techniciens doit être plus soutenu pour s'assurer que la méthode soit comprise et appliquée correctement afin de réduire le risque d'OOS.

- Des nouveaux réactifs : Chaque réactif a des conditions de stockage et utilisation. Dans le cas d'un nouveau réactif, ces conditions peuvent être nouveau pour le site. Par exemple, si le nouveau réactif est nocif, il faut s'assurer que la manipulation puisse se faire sous une hotte. Il peut aussi interagir avec d'autres produits utilisés sur le site et nécessité une vérification du nettoyage afin d'éviter des interactions parasites dans les méthodes déjà présentes. Ces possibilités augmentent les risques associés à un transfert de méthodes avec des nouveaux réactifs

- Des nouvelles techniques : Une technique utilisée par le site receveur est connu par les personnes qui l'applique permettent une réduction du risque du transfert puisque les personnes sont formées et habituées à la technique. Au contraire, lors de l'utilisation d'une nouvelle méthode, le personnel n'est pas formé à le réaliser et afin de s'assurer que le transfert soit possible, il faut s'assurer que le personnel puisse comprendre et appliquer la méthode. Le risque de résultats atypiques liées à la méthode en utilisation de routine dans le cas d'une nouvelle technique doit être diminuer pendant le transfert.

- Une différence de pratique entre les deux sites : comme dans le cas de nouvelles techniques, lorsque des pratiques différentes, la formation et le transfert de l'information sont primordial. Il existe 2 cas possible lors d'une différence de pratique :

    - Les pratiques du site transférant sont maintenues et le site receveur doit appliquer les nouvelles pratiques
    - Les pratiques du site receveur sont appliquées et l'impact de ces pratiques doit être déterminer.

2) La complexité de la méthode analytique est également évaluée et peut être classée selon les 3 niveaux ci-dessous :

- Niveau dit « Très simple » : ce sont des méthodes qui ont très peu d'étapes, qui utilisent des techniques de mesures simples (le pH) ou ne nécessitent pas de mesures (l'apparence).
- Niveau dit « Simple » : ce sont des méthodes utilisées en routine, qui sont faciles à mettre en œuvre avec peu de variations instrumentales possibles (HPLC isocratique, titration…).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

- Niveau dit « Complexe » : ce sont des techniques dont une configuration de l'instrumentation peut engendrer des différences de résultats (HPLC avec gradient, granulométrie laser). Les techniques simples peuvent devenir des méthodes complexes si le site receveur n'est pas familiarisé avec la technique ou si la préparation d'échantillon est compliquée.

Dans le cas de l'exemple de la méthode semi-automatique, l'analyse du risque réalisée dans le cadre du transfert de la méthode a permis de conclure à un risque considéré comme nul en raison de l'application d'une méthode similaire sur d'autres produits. De plus la procédure du site transférant comprend des conditions chromatographiques dites « simples », c'est une méthode isocratique, similaire à ce qui est déjà utilisé sur le site receveur. L'équipement étant le même que pour d'autres produits la préparation de l'échantillon n'est pas problématique. La complexité de cette méthode a été classée comme simple.

II.4. Définition de la stratégie de transfert

La stratégie de transfert sera fonction du niveau de transfert déterminé suite à l'analyse d'écart par la complexité de la méthode et le risque associé. En fonction de ces deux paramètres le niveau de transfert sera :

- Pas de transfert
- Niveau 1 ou Transfert de connaissance
- Niveau 2 ou Tests de confirmation
- Niveau 3 ou Tests de comparaison

Le choix du niveau est défini dans le Tableau ci-dessous :

Tableau 8 : Définition du niveau de transfert

Evaluation du Risque	**Complexité de la méthode**		
	Très Simple	**Simple**	**Complexe**
Pas de Risque	**Pas de Transfert**	**Niveau 1 (Transfert de connaissances)**	**Niveau 2 (Test de confirmation)**
Faible Risque	**Niveau 1 (Transfert de connaissances)**	**Niveau 2 (Tests de confirmation)**	**Niveau 3 (Test de comparaison)**
Haut Risque	**Niveau 2 (Test de confirmation)**	**Niveau 3 (Test de comparaison)**	**Niveau 3 (Test de comparaison)**

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Tableau 9 : Exemple de l'évaluation du risque - Raska (2010) *Risk-Based Analytical method transfer : Application to Large Multi-Product Transfers*[12]

Type de méthode	Technique	API /forme connue	Complexité de la technique	Risque	Rational	Type de transfert
Impuretés	RP-HPLC isocratique	Oui/oui	Simple	Faible	Site receveur a beaucoup d'expérience avec le produit, la méthode utilisée est identique	Transfert de connaissance seulement
Impuretés	RP-HPLC avec gradient	Oui/non	Complexe	Faible	Site receveur a de l'expérience avec l'API sous forme de comprimé mais pas sous la forme transférée. La méthode est performant sur le site transférant	Test de confirmation
Impuretés	RP-HPLC avec gradient	Non/non	Complexe	Faible	Site receveur n'a pas d'expérience avec l'API ou la méthode. Le site transférant indique qu'afin d'avoir une résolution conforme, la méthode peut nécessiter des modifications validées de la composition de la phase mobile.	Test de comparaison

Pas de transfert : lorsqu'il n'y a pas de risque et que la méthode est très simple, il n'y a pas de transfert de méthode. Une méthode comme l'apparence d'une poudre, nécessitant uniquement une vérification d'une couleur et d'une forme serait une méthode très simple avec aucun risque.

Transfert de connaissances :

Dans certaines circonstances, le laboratoire receveur n'a pas besoin d'une étude comparative et seulement un transfert documentaire et de connaissances suffisent telles que :

- le laboratoire receveur test déjà ce produit et connait les procédures utilisées,
- un principe actif ou produit fini avec une composition comparable, ou une concentration similaire du principe actif existe et est testé par le laboratoire receveur,
- la procédure analytique est la même ou très similaire à une procédure analytique du laboratoire receveur,
- les changements entre les méthodes ne modifient pas l'utilisation de la méthode, par exemple un passage de 10 mL à 15 mL n'est pas un changement significatif pour la méthode et ne nécessitera pas un transfert de méthode,
- le personnel ayant développé la méthode est dans le nouveau laboratoire, cela peut être le cas d'un changement de site de production ou d'un rachat d'entreprise

Licence CC BY-NC-ND 3.0

pharmaceutique. Le savoir-faire est présent au site receveur et ne nécessite pas de transfert.

C'est un transfert uniquement documentaire, il repose sur l'échange d'informations entre les sites transférant et receveur. Le site receveur s'assure que tous les documents ont été reçus et compris afin d'éviter des problèmes de compréhension lors de l'utilisation en routine de la méthode. Il ne nécessite pas de tests pour être complété puisque le risque d'avoir un problème est moindre. Le protocole et le rapport de transfert sont allégés, seul le choix du type de transfert est documenté puisqu'aucun test n'est réalisé.

Cependant, en cas de problèmes lors de l'utilisation en routine de la méthode, le site transférant pourra apporter leurs connaissances dans la résolution du problème.

Le transfert d'une méthode connue par le site, avec des conditions d'utilisation simples, comme dans notre exemple de procédure d'uniformité de dose, fera l'objet d'un transfert de connaissance.

Dans le cas de problèmes récurrent avec l'utilisation de la méthode, le niveau de transfert requis peut être augmenté au niveau supérieur.[10]

Test de confirmation.

Cette méthode de transfert est la plus fréquente dans l'industrie pharmaceutique. Le protocole de transfert est plus détaillé que dans le cas d'un transfert de connaissances. Les expériences à réaliser sont décrites dans le protocole ainsi que les critères d'acceptation qui permettent de statuer sur l'autorisation de l'utilisation de la procédure à transférer.

Les résultats de l'exécution des tests détaillés dans le protocole de transfert de méthode sont comparés aux critères d'acceptation. Ces critères sont généralement issus des tendances et des données historiques du site transférant. Les échantillons testés sont issus du site transférant et d'un lot ayant subi des tests de contrôle conformes, permettant la comparaison avec les données historiques du site transférant.

Cette méthode est utilisée dans le cas d'une méthode très simple à haute risque c'est-à-dire une méthode inconnue sur le site, qui nécessite de nouveaux réactifs et avec des pratiques nouvelles sur le site receveur, d'une méthode simple à faible risque, potentiellement une titration qui présente un nombre de résultats atypiques élevés, ou une méthode complexe qui ne présentent aucun risque tel qu'une méthode HPLC avec gradient utilisant de l'équipement déjà présent sur le site receveur et des conditions utilisées en routine pour d'autres produits.

Le site receveur démontre sa capacité d'obtenir les résultats attendus avec la méthode. Ces résultats sont comparés avec les données historiques du produit sur le site transférant.

Test de comparaison.

Dans cette approche, le site transférant participe de façon active au transfert en réalisant des expériences en même temps que le site receveur contrairement aux tests de confirmation qui se basent sur les données historiques et les tendances. Une matrice expérimentale est conçue pour cette étude. Les expériences sont réalisées en parallèle, par des techniciens différents

Licence CC BY-NC-ND 3.0

sur un même lot produit par les deux sites et les résultats du site receveur sont comparés à ceux obtenus par le site transférant soit par comparaison des moyennes soit par une équivalence statistique. Le transfert est finalisé lorsque les résultats démontrent une performance équivalente de la méthode entre les deux sites. Ces tests sont réalisés sur des échantillons produits et fournis par le site transférant, ces échantillons sont tous issus du même lot qui a été contrôlé et est conforme aux spécifications en routine. L'utilisation de ces échantillons diminue les possibles variations inter échantillon permettant ainsi de réduire les causes potentielles en cas de non-conformité.

Tableau 10 : Exemple de déroulement de transfert en fonction du type de transfert[12]

Type de transfert	Activités pré-transfert	Tests requis pour le site transférant	Tests requis pour le site receveur	Critère d'acceptation
Transfert de connaissance	Transfert de connaissance	Aucun	Aucun	N/A
Test de confirmation	Transfert de connaissance	Aucun	Un technicien prépare un nombre d'échantillons d'un seul lot, comme spécifié dans la méthode	• Test de system suitability conforme • Chromatographie typique obtenu • Résultats attendus obtenus
Test de comparaison	Transfert de connaissance, présentation de la méthode sur le site transférant, formation des techniciens du site receveur sur le site transférant	Deux analystes préparent des échantillons d'un seul lot avec n réplicats	Deux analystes préparent des échantillons d'un seul lots avec n réplicats.	• Test de system suitability conforme • Chromatographie typique obtenu • TOST ou autre mesure de comparaison de performance spécifiée dans le protocole atteint.

II.5. Protocole de transfert

Le protocole de transfert est un document écrit dans le cadre du transfert de méthode analytique assurant la traçabilité des différentes étapes de transfert. Ce protocole est une obligation et son contenu minimal est décrit dans les BPF [9] :

« 6.38. Le transfert des méthodes d'analyse d'un laboratoire (le laboratoire à l'origine du transfert) à un autre laboratoire (le laboratoire destinataire) doit être décrit dans un protocole détaillé.

6.39. Le protocole de transfert doit inclure notamment les paramètres suivants :

i. identification de l'analyse à effectuer et la ou les méthode(s) de contrôle à transférer ;

ii. identification des besoins de formation supplémentaires ;

iii. identification des substances de référence et des échantillons à contrôler ;

Licence CC BY-NC-ND 3.0

iv. identification de toute condition particulière de transport et de stockage des éléments de contrôle ;

v. les critères d'acceptation, qui doivent être basés sur l'étude de validation actuelle de la méthodologie et conformément aux exigences ICH/VICH. »

Dans ce document se trouvent les différents besoins pour réaliser le transfert. Il ne peut être élaboré sans les échanges entre le site receveur et le site transférant. En effet, l'analyse d'écart réalisée au préalable permet d'identifier les points critiques de cet exercice permettant de savoir s'il y a des besoins de formations pour le site receveur ainsi que de mettre en avant des différences de pratiques qui pourront avoir un effet sur le bon déroulement du transfert.

Le contenu décrit dans les BPF n'est pas exhaustive. Les parties clés de ce protocole sont :

- **But** : contenant une description de l'objectif du protocole et l'étendue du transfert.

- **Responsabilités** : définissant les différentes responsabilités de chaque site pour le déroulement du transfert ainsi que les personnes clés à ce transfert. Chaque responsabilité doit être cohérente avec la personne assignée.

Les responsabilités sont divisées entre les deux sites, le site transférant est responsable de :

- La formation du personnel du site receveur aux analyses à réaliser si nécessaire.
- Assister à l'analyse des résultats lorsque la méthode requiert des connaissances nouvelles sur le site receveur et à l'investigation en cas de résultats non conformes.
- Définir toutes les procédures nécessaires au transfert.
- Définir avec l'aide du site receveur, la matrice pour les tests, les méthodes d'échantillonnage et les critères d'acceptation pour la réussite du transfert.
- Présenter, les procédures de l'analyse ainsi que les rapports de validation des méthodes transférées afin de démontrer la robustesse de la méthode.
- Présenter les détails des équipements utilisés, les rapports de qualification des équipements ainsi que les standards de références nécessaire à l'analyse.
- La revue et l'approbation du rapport de transfert. Cette approbation démontre que le site transférant est confiant de la compréhension et l'utilisation de la méthode transférée.

Le site receveur quant à lui est responsable de :

- Revoir les méthodes analytiques du site transférant et donner son accord aux critères d'acceptation définis par le site transférant avant la finalisation du protocole de transfert.
- S'assurer que l'équipement requis pour l'analyse est disponible sur site et qualifié selon un protocole de qualification tel que défini dans le II.2.1.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

L'équipement doit être qualifié afin d'encadrer son utilisation dans les conditions de la méthode analytique. Un HPLC qui a été qualifié pour des débits entre 0,2 et 0,5 mL/min ne pourra pas être utilisé pour les tests nécessaire au transfert d'une méthode analytique demandant un débit à 1,0 mL/min.

- S'assurer que le personnel réalisant les tests a été formé et sont capable de réaliser les analyses.
- Fournir un système documentaire capable d'enregistrer des données brutes, des tickets, des résultats selon les spécifications de la méthode.
- L'exécution du protocole de transfert
- La réalisation de la validation de méthode lorsque la revue de validation démontre des écarts ou des besoins supplémentaires de validation.
- Générer et obtenir l'approbation du rapport de transfert avant la mise en place de la méthode sur le site receveur dans un contexte BPF.

- **Matériel, méthode et équipement** qui se composera de plusieurs sous parties où chaque site définira leur matériel, méthode et équipement ainsi que les différences relevées dans l'analyse d'écart préalablement réalisé. C'est dans cette partie qu'une définition des besoins de formation du site receveur est élaborée. Cette formation peut être uniquement documentaire, nécessiter des formations à distance avec une vérification de résultats par le site transférant, ou une formation sur le site transférant dans des cas particuliers de site receveur n'ayant pas d'expérience ou une différence importante de pratiques, équipements ou matériel.

- **Déroulement du transfert :** description des différentes étapes de transfert avec l'explication des étapes clés et les besoins pour l'avancement à l'étape suivante. Chaque étape est clairement définie et un schéma permettant de visualiser la progression peut être inclus afin de montrer les points critiques.

- **Conception d'expérience (Experimental Design) :** Les expériences qui seront réalisées, les conditions expérimentales tel que le nombre de personnes, le nombre d'essais et la localisation des tests sont décrites dans ce paragraphe ainsi que les critères d'acceptation des tests.

  Dans ce paragraphe sera décrit le choix des lots pour la formation du personnel, pour la qualification, pour la validation de la méthode en cas de besoin et pour les exercices de transfert (exercice de familiarisation et exercice de transfert proprement dite).

- **Change Control :** définissant les différentes étapes à réaliser en cas de résultats non conformes, de modifications au protocole. Toute déviation au protocole doit être investiguée avant la clôture du processus de transfert technique.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

- **Traitement des échantillons :** ce paragraphe trace les besoins en matière de stockage et maintien des échantillons ainsi que les informations concernant les standards de référence utilisés par le site transférant.

En annexe de ce protocole peut apparaître les fiches de tests expliquant le détail des méthodes à vérifier, les critères d'acceptation de la méthode, les résultats de ces tests une fois exécutés ainsi que les données brutes générées par les tests telles que :

- numéro de lot de l'échantillon utilisé,
- les solutions réalisées,
- les tickets de pesées,
- les résultats d'analyse,
- autres données de traçabilité.

Ces données récoltées lors de l'exécution permettent de comparer les résultats aux données du site transférant lors des investigations.

Ce protocole doit être signé par les différentes personnes du site receveur et du site transférant et être approuvé par le Project Manager responsable de ce transfert.
Le Project Manager est épaulé par une équipe comprenant des membres issus des différents secteurs impliqués (Membres de l'équipe de contrôle qualité, personnel de l'équipe Qualification et Validation etc.)

II.6. Exercice de familiarisation

L'exercice de familiarisation permet de réduire les risques d'échec dus à des différences de pratiques entre les deux sites et/ou l'utilisation de nouvelles méthodes ou de nouveaux produits. Il est préférable de le mettre en œuvre avant les analyses de test de comparaison et de test de confirmation. Il peut aussi être réalisé dans le cas d'un transfert de connaissances pour réduire le risque avant la mise en routine de la méthode.

Cette étape consiste à prendre en main la méthode qui sera transférée, dans les conditions d'utilisation habituelle et sur l'équipement du site receveur. Les résultats de ces tests sont internes au site receveur, ils ne sont communiqués avec le site transférant qu'en cas de problème.

En général, la familiarisation correspond à appliquer la méthode analytique, une fois, sur le produit venant du site transférant et les résultats doivent correspondre aux tendances du produit. Cette familiarisation peut être considéré comme une confirmation qui la méthode se déroule comme attendu dans le laboratoire du site receveur, équivalent à une qualification de performance pour un nouvel équipement.[12]

Dans le projet de mise en place de la méthode semi-automatique, la familiarisation de la méthode d'uniformité de la dose délivrée a été suivi par le site transférant qui a exigé la réalisation de la méthode par deux techniciens, sur deux appareils différents et que chaque analyste réalise en triple l'analyse. Les résultats ont également été partagés avec le site transférant.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

L’uniformité de teneur de la dose délivrée est vérifiée à travers 10 blisters sur 5 inhalateurs (2 blisters par inhalateur, Cf. Tableau 11). Le design d’étude de ce test est le suivant :

Tableau 11 : Exemple de Design d'étude "GSK"

Produit X 60 doses	
Device	N° de blister
1	1
	2
2	53
	54
3	19
	20
4	40
	41
5	3
	4

Ce design d’étude a été appliqué lors des essais de familiarisation suivant les demandes du site transférant. Les analyses ont été réalisées de la façon suivante avec le produit venant du site transférant :

Licence CC BY-NC-ND 3.0

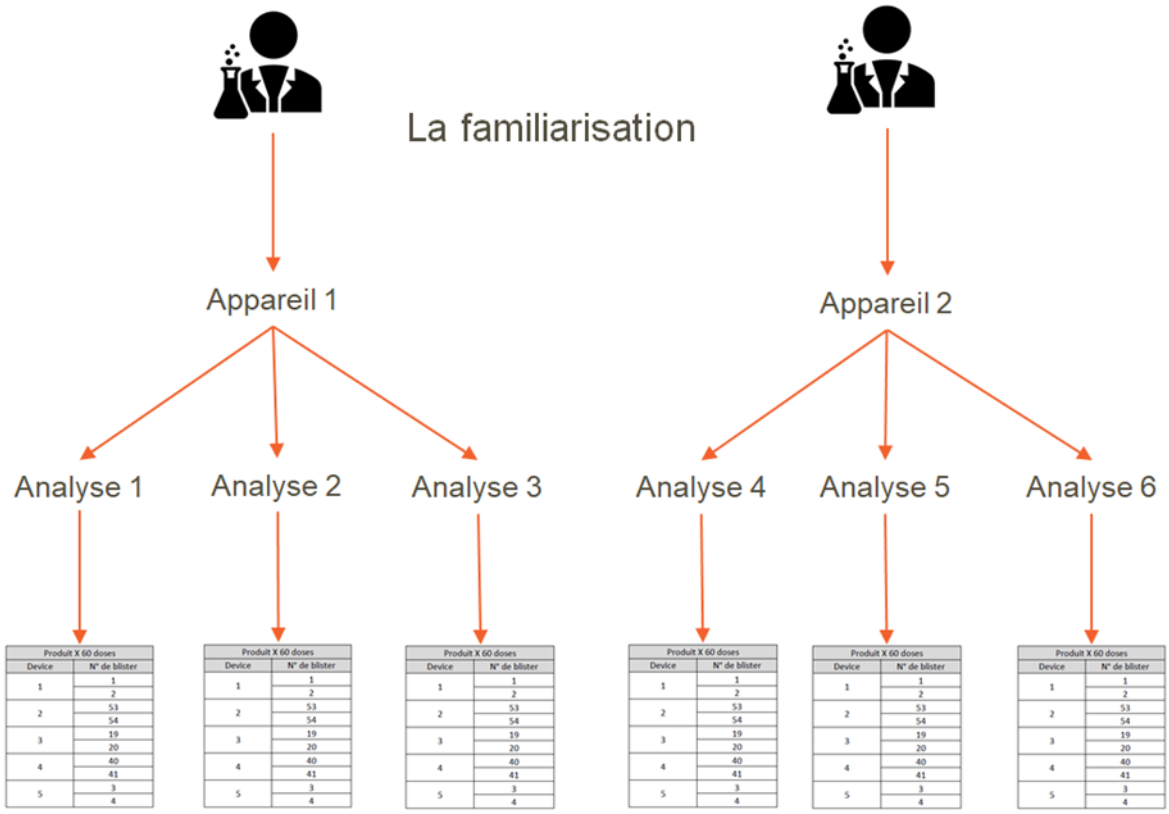


Figure 6 : Etude de familiarisation

Les résultats de ces analyses devaient être compris dans les critères d'acceptation de la méthode transférée pour correspondre aux tendances du site transférant.

Tableau 12 : Résultats de l'étude de familiarisation

	Analyse 1	Analyse 2	Analyse 3	Analyse 4	Analyse 5	Analyse 6
Moyenne (85 – 115%)	98	98	100	100	100	102
Nombre de blister sortant de l'intervalle 80 – 120 %	1	0	0	0	0	0
Nombre de blister sortant de l'intervalle 75 – 115%	0	0	0	0	0	0
Ecart-type	8	1	3	2	2	3

Lorsque le transfert nécessite des essais complémentaires réalisés par les techniciens de site recevant, une traduction de la méthode peut être réalisée afin d'assurer la compréhension des différentes étapes de la méthode.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Un protocole de transfert traçant la méthode doit être élaboré pour un suivi des différents tests, ce protocole est différent du protocole de transfert puisqu'il intègre uniquement les essais et la méthodologie pour les réaliser contrairement au protocole de transfert qui explique la démarche utilisée pour la conception d'expérience.

II.7. Rapport de transfert

Le rapport de transfert permet la clôture de l'exercice de transfert. Il répond au protocole de transfert et démontre la capacité du site receveur de suivre la méthode transférée et d'obtenir des résultats précis, justes et répétables.

Ce rapport récolte toutes les données des analyses et dans le cas de résultats atypiques, explique les conclusions de l'investigation. Le rapport de transfert technique doit documenter le résultat du processus de manière comparative et identifier les domaines nécessitant une nouvelle validation de la méthode de contrôle, le cas échéant. [9]

II.8. Conclusion du transfert

Le transfert de la méthode alternative sur site nécessite donc plusieurs étapes clés et une organisation complexe entre les différentes personnes et entre les différents sites. Cet exercice permet l'application de la méthode sur site selon la méthode décrite par le site transférant. Cependant, afin de tester son équivalence à la méthode pharmacopée, il faut réaliser un protocole de test ayant une explication de la méthode et la référence au test de la pharmacopée. Ce protocole définira la matrice décisionnelle et les tests statistiques qui permettront de démontrer l'équivalence entre les deux méthodes.

Des expériences lors du transfert ont démontré que la méthode alternative fonctionne correctement sur le site et permet d'avoir des résultats cohérents, corrects et fiables. Afin de s'assurer que la méthode pharmacopée peut être réalisée et donner des résultats fiables avant le déroulement du protocole de test, il peut être nécessaire de réaliser des tests préliminaires qui démontrent le bon fonctionnement des tests pharmacopée.

Il existe une autre démarche pour réaliser un transfert qui ne nécessite pas la revue de validation ni l'analyse d'écart, c'est la revalidation de la méthode. Cette démarche consiste pour le site receveur en la réalisation de la validation de la méthode comme définie par l'ICH Q2. Lorsque la méthode est validée [15,19], le site receveur est considéré comme qualifié pour cette méthode analytique.

Ces tests seront tracés dans le protocole et les résultats seront un pré-requis au lancement des tests d'équivalence. En effet, si la méthode pharmacopée n'est pas bien comprise et donne des résultats non fiables, la méthode alternative pourra être considérée comme équivalente ou meilleure par une mauvaise compréhension ou utilisation de la méthode pharmacopée.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

III. ETUDE D'EQUIVALENCE

L'objectif de cette équivalence est de démontrer que les résultats obtenus avec la méthode BP et les résultats obtenus avec la méthode semi-automatique de GSK ne présentent pas de différence significative. Avant de pouvoir réaliser l'étude d'équivalence, une étape préliminaire consiste à s'assurer que le site GSK est en capacité de mettre en œuvre la méthode proposée par la pharmacopée Britannique et que les résultats sont cohérents. Cette étape est plus communément appelée « Faisabilité de la méthode » et sera détaillée dans le paragraphe ci-après.

III.1. Faisabilité de la méthode

La faisabilité de la méthode consiste à suivre la méthode pharmacopée afin de s'assurer que les demandes de l'autorité réglementaire peuvent être réalisées et donner un résultat attendu avec la méthode décrite. Elle permet aussi de s'assurer que la méthode est fonctionnelle et qu'il n'y a pas d'erreur ainsi que de répondre aux possibles problèmes dû à une mauvaise interprétation avant de procéder à l'étude d'équivalence.
En effet, si la méthode est mal exécutée lors de l'étude d'équivalence, les résultats obtenus vont être faussés et l'étude ne va pas représenter la réalité et donc ne permettra pas l'application de la méthode alternative et pourra empêcher l'utilisation correcte en routine de la méthode pharmacopée.
Dans le cadre du produit inhalé, un essai de faisabilité est réalisé en suivant la monographie proposée pour le produit afin de s'assurer du bon fonctionnement de la méthode pharmacopée (annexe 1).
La méthode pharmacopée a été suivie pour ces essais mais avant la réalisation, deux points critiques ont été soulevés pour son utilisation :

L'équipement pourrait relarguer des substances qui co-éluent avec le principe actif. Il faut vérifier que les conditions chromatographiques permettent de séparer convenablement tous les pics.

Une étude antérieure a démontré que les filtres relarguent des substances qui pourraient être problématique lors de l'analyse. Ainsi, un rinçage des filtres du DUSA est requis avant de commencer les essais de faisabilité. Lors des essais, pour s'assurer que le nettoyage était suffisant, un blanc montage a été ajouté. Ce blanc a été réalisé selon la méthode pharmacopée mais sans une libération de dose avant le rinçage.

- Celle-ci indique qu'il faut collecter une dose du produit à examiner suivant le chapitre général « Preparations for Inhalation » donc en utilisant l'équipement de la pharmacopée et la dissoudre dans une solution A afin d'obtenir une solution contenante l'équivalent de 0.00025% m/v de principe actif.

Une dose correspondant à 50 µg de principe actif implique que le volume de rinçage à utiliser dans le cadre de cette analyse est de 20mL (Tableau 13).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Tableau 13 : Préparation de l'échantillon

Produit	Produit inhalé X 50 µg
Nombre de doses collectées	1
Concentration de la solution échantillon (µg/mL)	2.5
Volume de solvant de dilution (mL)	**20**

Ce volume de rinçage parait faible pour la taille de l'équipement demandé. En effet, le DUSA pour les poudres inhalées est un cylindre de 34.85 mm de diamètre intérieur et de 120 mm de longueur (Figure 10).

Figure 7 : Tube collecteur DUSA[20]

L'objectif du rinçage est de récupérer la totalité du produit qui a été libéré de la cupule. C'est cette quantité de principe actif qui sera dosée pour définir la dose délivrée. Pour trouver la méthode de rinçage efficace avec un volume de 20mL, deux méthodes de rinçage ont été testé, le rinçage « classique » et le rinçage par volume exact.

III.1.1. **Méthode 1 : Rinçage classique**

Le rinçage « classique » du site se fait près la libération de la dose, le filtre est placé dans un entonnoir qui surmonte une fiole jaugée de 20,0 mL. Ensuite, le DUSA et le filtre sont rincés au-dessus de l'entonnoir. Le volume utilisé pour le rinçage ne doit pas dépasser le trait de jauge de la fiole.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Un deuxième rinçage est réalisé de la même manière pour pouvoir calculer le taux de recouvrement. Ce taux permet de s'assurer que lors du premier rinçage la quasi-totalité de la dose a été récupérée.

$$\%R = \frac{Q\ (R2)}{Q\ (R1+R2)} \times 100$$

Q (R2) : Quantité totale de principe actif obtenue lors du second rinçage
Q (R1 + R2) : Quantité totale de principe actif obtenue lors du premier rinçage et du second rinçage

Le taux de recouvrement doit être inférieur à 1% pour s'assurer que le rinçage soit efficace.

III.1.2. **Méthode 2 : Rinçage par « volume exact »**

La deuxième méthode testée en parallèle est le rinçage par « volume exact ». Suite à la libération de la dose, le filtre est poussé à l'intérieur du tube collecteur à l'aide d'une pince sans le trouer. Ensuite, 20 mL de solvant de dilution sont introduits à l'aide d'une pipette jaugée. Une agitation vigoureuse est appliquée pour que tout le produit se retrouve en solution. Cette solution est récupérée ensuite dans un container. L'agitation du tube désagrège le filtre, la solution n'est pas limpide. Elle doit donc être filtrée avant d'être injectée. Cette méthode est considérée efficace si les critères d'acceptation demandées dans la BP sont respectés. Pour l'uniformité de teneur de la dose délivrée, 9 des 10 valeurs individuelles doivent être comprises entre 75 % et 125 % de la valeur moyenne et toutes les valeurs doivent être compris entre 65 % et 135 % de la moyenne. Dans le cas de ces expériences, aucune moyenne n'a été calculée, puisque seulement deux doses ont été testées. Il a été décidé d'appliquer la plage la plus restrictive pour ces essais, c'est-à-dire que la quantité de principe actif récupérée est comprise entre 75 % et 125 % de la dose attendue.

III.1.3. **Comparaison des méthodes de rinçage**

Lors de la réalisation de ces essais, il a été mis en avant que :
- les résultats montrent que le rinçage « classique » n'est pas suffisant pour récupérer la totalité de la dose,
- le taux de recouvrement pour les deux essais est autour de 10%.

Le rinçage par « volume exact » a été mis en œuvre et 2 blisters ont été testés selon cette méthode. Les résultats sont compris dans les critères d'acceptation demandés.
Ces résultats ont permis de mettre en évidence l'impossibilité d'utiliser la méthode « classique ». Le rinçage par « volume exact » sera appliqué pour l'étude d'équivalence.
En réalisant une familiarisation de méthode avant de commencer l'étude d'équivalence, le risque d'avoir des erreurs de manipulation ou de compréhension peut être réduit et le résultat de l'étude est renforcé. Dans le cas de l'exemple de la méthode de dose délivrée, en utilisant la méthode de rinçage « classique », la concentration de principe actif serait sous-estimée, permettant de conclure sur une amélioration de la méthode alternative qui est réellement dû à une mauvaise utilisation de la méthode pharmacopée.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

III.2. Qu'est-ce qu'une étude d'équivalence

L'étude consiste à effectuer l'uniformité de la dose délivrée selon les deux méthodes, la méthode BP avec un rinçage par « volume exact » et la méthode alternative de GSK. Ceci permettra de conclure ou non sur une performance équivalente des deux méthodes.
Dans le cas d'écarts mineurs, une évaluation théorique de l'équivalence peut être suffisante. Dans ce cas, les équipements et les conditions chromatographiques sont différents entre les deux méthodes. Une évaluation théorique ne sera pas suffisante. L'équivalence requiert alors une démonstration expérimentale de l'équivalence.
Les deux méthodes seront réalisées et les résultats obtenus seront comparés par test statistiques pour démontrer que les résultats générés avec la méthode semi-automatique permettent d'assurer une performance équivalente à la méthode BP selon des critères définis à l'avance.

Dans le cas de la mise en place d'une méthode alternative, l'étude d'équivalence consiste à vérifier s'il existe une différence significative entre les résultats obtenus avec la méthode alternative et les résultats obtenus avec la méthode pharmacopée.
Afin de savoir si une différence est significative ou non, des tests statistiques peuvent être réalisées. Il existe différents tests statistiques pour s'assurer qu'il n'y a pas de différence significative. Les plus fréquents sont le « Two One Sided T test » (TOST) pour comparer des moyennes et le Test F pour comparer des variances.
Si le test utilisé met en évidence une différence significative, la méthode alternative ne pourra pas être considérée comme équivalente à la méthode pharmacopée et ne sera pas applicable pour les analyses.
Dans le cadre d'une comparaison de méthode, une équivalence démontrée peut aussi correspondre à une amélioration de la performance par l'intermédiaire de résultats plus précis. Cela veut dire que lors de l'interprétation de l'étude statistique, uniquement le cas d'une méthode alternative ayant une performance significativement inférieure à la méthode pharmacopée doit être rejetée[21].

III.2.1. **Les tests statistiques**

III.2.1.1. **Les conditions**

La distribution théorique :
La plupart des tests statistiques reposent sur le principe que les données obtenues sur quelques échantillons sont représentatives de la population totale. Dans un cas pharmaceutique, tous les produits d'un lot ne sont pas testés, un échantillonnage représentatif est réalisé avant de commencer les tests.
La relation entre échantillon et la population est sujet à une incertitude et cette incertitude est prise en compte lors de l'utilisation de ces tests généralement par l'utilisation d'une distribution théorique. Cette distribution est définie mathématiquement et est utilisée pour calculer une probabilité théorique des différentes valeurs pouvant apparaitre et ainsi une fréquence de distribution.
La distribution la plus important en statistique est une distribution normale aussi connue sous le nom de distribution Gaussienne[22]

Licence CC BY-NC-ND 3.0

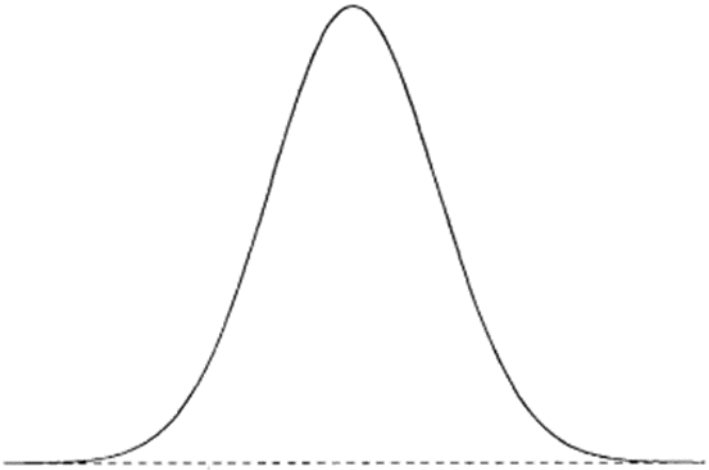


Figure 8 : Distribution Normale[22]

Une distribution qui suit la loi Normale se présente comme la Figure 11 ci-dessus, elle est unimodale et symétrique. En théorie, il n'y a pas de limite à une distribution Normale, elle s'étend de -∞ à +∞

La loi normale est définie par deux paramètres, la moyenne et l'écart type. Ces paramètres sont représentés par μ pour la moyenne et σ pour l'écart type. La Figure 12, ci-dessous, présente différentes représentations de distribution normale en fonction des différentes moyennes et variances.

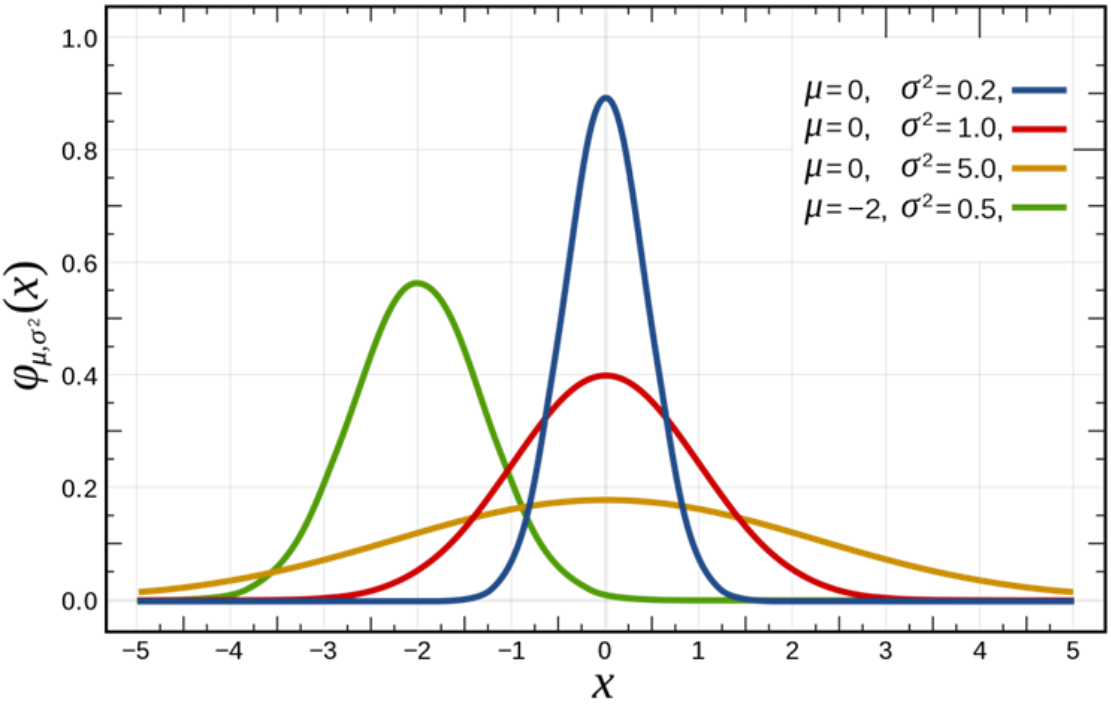


Figure 9 : Représentation de différentes courbes selon la moyenne et la variance[23]

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Ces courbes représentent la probabilité que la valeur X soit comprise dans un intervalle. La probabilité que les points de données se situent à moins d'un écart-type de la moyenne correspond à 68% tandis que 95% des points se situent à moins de deux écarts types de la moyenne. Plus la valeur d'écart-type est faible, plus les points sont centrés autour de la moyenne. Pour vérifier la différence entre deux méthodes, une comparaison de moyennes et écarts types permet de visualiser la probabilité que ce soit équivalent ou non.

La P Value :

Si l'on considère que les données de deux groupes d'échantillons ont des moyennes différentes, il existe deux cas de figures : les échantillons ont réellement des moyennes différentes ou bien que la différence observée soit un effet de l'échantillonnage aléatoire. Cependant il n'existe aucune possibilité de confirmer quel cas de figure est vrai.

La P value représente la probabilité d'observer une différence entre les moyennes des groupes d'échantillons. Cette P value est comprise entre 0 et 1 et plus la valeur est proche de zéro, moins il y a de chances que cette différence soit due à l'échantillonnage aléatoire donc que les groupes d'échantillon sont réellement différents. Il faut définir cette P value à l'avance pour identifier la plus petite valeur pour laquelle la différence sera considérée comme réelle.

La significativité d'un résultat statistique est la probabilité que le lien observé ou la différence dans un échantillon est de la chance et que dans la population dont les échantillons ont été pris, aucun lien ou différence existe. Un résultat significatif indique que le résultat peut être considéré comme représentatif de la population.

La P value représente la fiabilité d'un résultat c'est-à-dire la probabilité d'erreur incluse dans l'acceptation de notre résultat observé. Par exemple, une P-value de 0,05 représente une probabilité de 5% que la relation entre variables dans notre échantillon soit due hasard. En général, la P-value de 0,05 est prise comme attendue.[24–27]

L'hypothèse :

La question la plus importante dans la sélection d'un test statistique est « Quel est l'hypothèse posée et à étudier ? »

Dans le cas d'une étude d'équivalence, cette question a une réponse simple, l'hypothèse nulle est que les méthodes sont équivalentes et donc qu'il n'y a pas de différence entre les deux groupes. Cette hypothèse sera rejetée ou non en fonction des résultats de l'étude.

C'est aussi à ce niveau qu'il faut identifier les paramètres à utiliser pour comparer les groupes. Un test statistique calcule la probabilité d'obtenir les différences observées entre les deux groupes et permet de définir si la différence observée est due au hasard ou non (est ce que le résultat est significatif ou pas ?[25,27]

Les paramètres de test :

Dans le protocole de l'étude, le test statistique est défini afin d'assurer que les résultats trouvés lors des analyses n'influencent pas le choix du test. La décision est prise en fonction de l'analyse, des résultats attendus (par exemple est-ce une comparaison de moyennes ?) et du design de l'étude. Le niveau de significativité, défini par la P value, est aussi décrit dans le protocole ainsi que la décision d'unilatéralité ou bilatéralité du test.

Un test bilatéral indique qu'il n'y a pas de direction attendue des différences. Il n'est pas possible de savoir si la méthode sera plus efficace ou moins efficace par exemple.

Il existe trois critères majeurs pour choisir un test statistique qui sont [27]:

Licence CC BY-NC-ND 3.0

- **Le nombre de variables** : il existe des tests statistiques différents en fonction du nombre de variables à analyser. Les tests utilisés sur une variable sont des statistiques descriptives et ne pourront pas être utilisés dans le cas d'étude d'équivalence, cependant les autres tests le peuvent.
  Il existe aussi des tests utilisés pour analyser la relation entre deux variables et une autre série de tests pour l'analyse de plusieurs variables (la relation entre trois variables ou plus).

- **Le type de données** : les données peuvent être de deux types
  - **Continue** : il existe un nombre infini de résultats possibles dont la limite est uniquement définie par la précision de la méthode, par exemple une comparaison d'absorbance entre deux séries d'analyses ;

  - **Catégorique** : les données peuvent être classées selon des caractéristiques par exemple la présence d'un trouble suite à l'ajout d'un réactif. Il n'existe que deux possibles résultats, présence ou absence : ce sont des données catégoriques binaires.

- **Le type de design**, apparié ou non-apparié
  - **Apparié** : si les données peuvent être obtenues dans différents conditions de tests, le design est apparié. Dans le cas de deux méthodes HPLC qui différent par les conditions d'analyse (le débit, la température de la colonne, la colonne, la longueur d'onde…) mais qui utilisent la même phase mobile, et dont la préparation d'échantillon est identique, l'échantillon peut être injecté dans les deux systèmes d'HPLC et les résultats obtenus dans les différentes conditions.
    Le nombre d'échantillon par groupe est identique, s'il y a eu 10 échantillons testés pour la méthode A, ces 10 échantillons sont aussi testés sur la méthode B ;

  - **Non-apparié** : les données sont obtenues uniquement dans une condition de test. Dans l'exemple de l'HPLC, si la préparation d'échantillon est différente, il sera impossible. Puisque chaque échantillon ne pourra être testé qu'une seule fois, la comparaison se fait entre les différents échantillons. Le nombre d'échantillon par groupe peut varier.

III.2.1.2. **Les différents tests statistiques**

Les critères de distribution, de P Value, d'hypothèse nulle et les caractéristiques de test définis dans les précédents paragraphes sont nécessaires au choix du test statistique utilisé pour vérifier l'équivalence entre la méthode alternative et la méthode pharmacopée. Chaque test statistique comprend des conditions d'utilisation différentes pour être applicable. Les tests statistiques les plus utilisés sont le test T de Student et le test F. [26–28]

III.2.1.2.1. Test T de Student

Le test T de Student est une analyse statistique qui compare les moyennes de deux groupes de données afin de déterminer la probabilité que la variation entre les deux groupes soit aléatoire ou pas. Ce test nécessite que les données suivent une distribution normale.
L'hypothèse nulle de ce test est toujours la moyenne du groupe 1 est égale à la moyenne du groupe 2. En fonction de ce qui est recherché, l'hypothèse alternative peut varier.
Pour un test T bilatéral, l'hypothèse alternative est **: H1 : Moyenne du groupe 1 ≠ moyenne de groupe 2**

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Pour un test T unilatéral il existe deux possibilités d'hypothèse alternative : **H1 : Moyenne du groupe 1 ≤ moyenne de groupe 2** ou **H1 : Moyenne du groupe 1 ≥ moyenne de groupe 2**
Ce test peut être appliqué à :

- la comparaison de moyenne d'une loi normale à une valeur si la variance est connue,
- la comparaison entre deux moyennes issues de deux lois normales si leurs variances sont égales et inconnues,
- un test sur les coefficients dans le cadre d'une régression linéaire,
- un test sur des échantillons appariés.

III.2.1.2.2. Test F

Le test F représente tous les tests statistiques qui comparent les variances entre deux échantillons ou le ratio de variance entre plusieurs échantillons.
Une distribution F est une distribution de probabilité continue, pouvant tester l'hypothèse d'une équivalence de variance de deux populations. Comme le test de Student, les probabilités sont déterminées par le nombre de degrés de liberté. Cependant, pour les tests F, il existe deux types de degrés de liberté : le numérateur et le dénominateur.
La distribution F présente deux propriétés importantes. Ce n'est que pour des valeurs positives et ce n'est pas symétrique autour de la moyenne. En effet, la moyenne peut être plus grande que la médiane.[29]

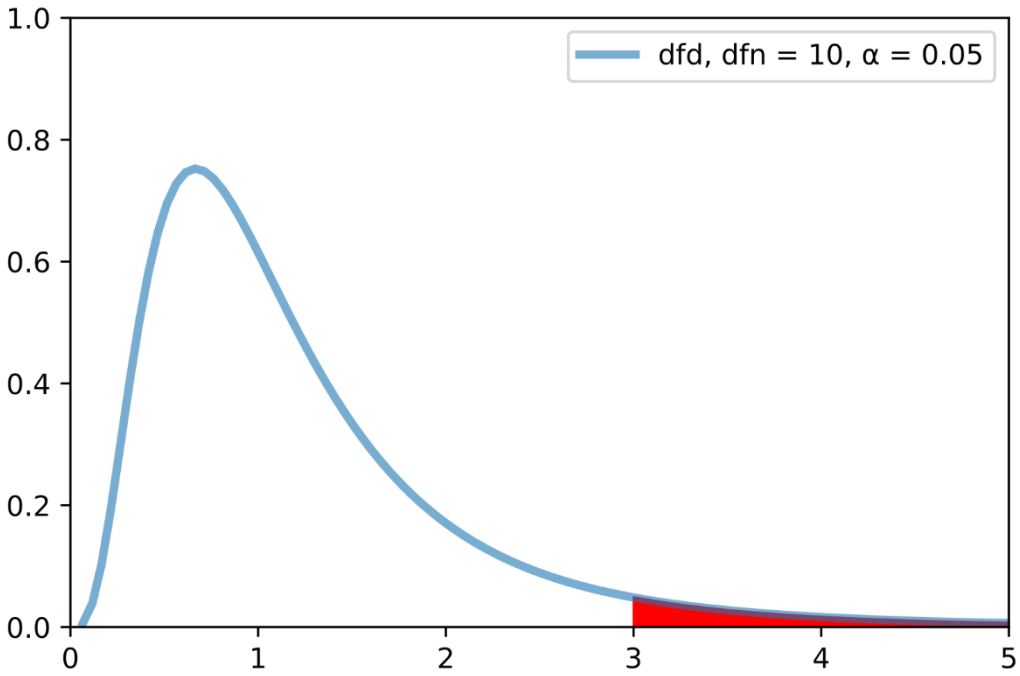


Figure 10: Distribution de type F[30]

Licence CC BY-NC-ND 3.0

L'hypothèse nulle dans le cas d'un test F est : **H0 : Variance du groupe 1 = variance de groupe 2**
L'hypothèse alternative est : **H1 : Variance du groupe 1 ≠ Variance de groupe 2**

Dans le cas d'une étude d'équivalence pour l'uniformité de dose délivrée, ce test permettrait de comparer la précision des deux méthodes en vérifiant s'il y a une différence significative entre les deux méthodes. Si l'hypothèse nulle est rejetée, les méthodes ont une variance significativement différente et n'ont pas la même précision. Cependant, lorsque l'hypothèse nulle n'est pas rejetée, ce n'est pas possible de conclure sur l'équivalence de précision.

III.2.2. **Les recommandations Pharmacopées**

Il devient nécessaire de comparer deux méthodes afin de déterminer si les moyennes obtenues ou la variabilité des différentes méthodes diffère de façon significative. Le but de l'étude d'équivalence est de générer une quantité de données suffisantes afin d'évaluer l'équivalence entre les deux méthodes sur une plage de concentrations.

III.2.2.1. **Les recommandations de l'USP**

L'USP(4) définit dans son chapitre <1010> « ANALYTICAL DATA - INTERPRETATION AND TREATMENT » certains aspects à prendre en compte lors de la réalisation d'une telle étude. Les aspects définis dans l'USP sont la précision, l'exactitude et la taille de l'échantillon.[(4)]

III.2.2.1.1. La précision

La précision, définit comme la capacité de rendre des résultats similaires entre plusieurs essais de la même solution homogène. Elle est exprimée par la variance, l'écart-type ou le coefficient de variation. Cette précision peut être vérifié à trois niveaux :

- **La répétabilité** qui exprime la précision lorsque les mêmes conditions opératoires sont observées dans un court laps de temps (le même opérateur avec le même équipement répète l'essai plusieurs fois le même jour).
- **La précision intermédiaire** qui exprime la précision intra-laboratoire. La même solution fournit les résultats similaires avec des opérateurs différents, sur différents équipements pendant plusieurs jours.
- **La reproductibilité** qui représente la précision inter-laboratoire. Les tests sont réalisés avec la même solution dans des laboratoires différents. Ce niveau de précision n'est pas attendu dans la revue de validation de la méthode. Elle peut ne pas être réalisée lors de la validation d'une méthode.

Pour qu'une méthode alternative soit considéré comme ayant une précision comparable à la méthode pharmacopée, sa précision ne doit pas être significativement moins bon que la méthode actuelle. Une diminution de la précision peut augmenter le nombre de résultats non conforme aux spécifications attendus. Une méthode alternative améliorant la précision est acceptable.
Il existe plusieurs façons de comparer la précision de deux méthodes :

- Une estimation de la variance de chaque méthode correspondant au carré de l'écart type des échantillons et le calcul d'un intervalle de confiance unilatéral pour le rapport

Licence CC BY-NC-ND 3.0

de variances. Le rapport est défini comme la variance de la méthode alternative sur la variance de la méthode pharmacopée. L'intervalle de confiance doit être défini et comparé à une limite supérieure acceptable choisie par le laboratoire analytique avant le début des tests. Si cet intervalle est inférieur à la limite acceptable du laboratoire, la précision de la méthode alternative est acceptable et il n'y a pas de perte de précision importante. De plus, si le rapport est inférieur à 1, la méthode alternative peut être considéré comme étant plus précis que la méthode pharmacopée.

- Two sample F test
  L'utilisation d'un Two sample F test, le rapport des variances calculé et comparé à une valeur critique définie dans le tableau de valeurs de la distribution F pour le niveau de confiance et les degrés de libertés de chaque variance. Si le rapport calculé est plus grand que cette valeur critique, il y a une différence statistiquement significative de précision entre les deux méthodes. Cependant, un rapport calculé qui est inférieur à la valeur critique ne permet pas de statuer, à lui seul sur l'équivalence de précision entre les méthodes. Cela indique qu'il n'y a pas assez de preuves qu'une différence statistiquement significative existe.

L'USP met en avant la méthode d'estimation de la variance de chaque méthode comme une méthode qui est plus sûre et plus efficace que le Two sample F test. Cependant, Schepers et Wätzig[31] démontre que cette méthode d'estimation de la variance nécessite un nombre d'échantillons plus élevé que la méthode de test F. En effet, avec un intervalle de confiance à 90%, pour accepter une méthode alternative ayant une précision (mesurée par la variance) inférieure à quatre fois la précision de la méthode actuelle, il faut 20 échantillons.

III.2.2.1.2. L'exactitude

L'exactitude qui représente la capacité du procédé analytique d'obtenir un résultat qui correspond à la valeur de référence acceptée.
La comparaison de l'exactitude de méthodes donne des informations permettant de déterminer si la nouvelle méthode est équivalente à la méthode actuelle. Il existe plusieurs méthodes pour le déterminer dont une méthode simple en calculant un intervalle de confiance pour la différence entre les deux moyennes où la différence est estimée et soustrayant la moyenne des échantillons testés avec la méthode pharmacopée à la moyenne des échantillons testés avant la méthode alternative.
Cet intervalle de confiance doit être comparé à une limite haute et une limite basse définies avant l'exercice par le laboratoire. Si l'intervalle de confiance déterminé est compris dans ces limites, les deux méthodes peuvent être considérées comme équivalentes, c'est-à-dire que la différence entre les deux méthodes n'est pas significative en pratique. Cependant, cette méthode ne statue pas sur la tolérance de la différence, elle ne fait que représenter la vraie différence permise.

Cette méthode d'intervalle de confiance est préférée par l'USP à l'application d'un test T de Student pour la significativité statistique de la différence des moyennes.
Le test T de Student permet de démontrer une différence significative statistiquement sur les moyennes. Cette différence peut être due à des données très précises ou une taille du groupe

Licence CC BY-NC-ND 3.0

d'échantillons trop importante. Dans ce cas, une méthode alternative pouvant avoir une exactitude suffisante ne sera pas retenue alors que l'importance de la différence n'est pas importante en pratique.
De même, le test peut démontrer aucune différence significative lorsqu'il y a réellement une différence en pratique. Ce problème peut être observé si les données sont très variables ou si la taille de l'échantillon est trop petite.

III.2.2.1.3. La taille de l'échantillon

La détermination de la taille du groupe d'échantillon pour la comparaison de méthodes analytiques est similaire à celle utilisée pour tester les hypothèses sur différences de moyennes (dans le cas de l'exactitude) et à celle utilisée pour les hypothèses sur le rapport des variances (dans le cas de la précision).
Le premier composant à être défini est δ, la plus grande différence acceptable entre les deux méthodes pour être jugées équivalentes. Si les méthodes ne différent pas plus de δ, elles sont considérées comme étant suffisamment similaires. Cette comparaison peut être bilatérale lorsque la différence de δ peut être appliquée dans les deux sens, telle que dans la comparaison de moyennes. Elle peut aussi être unilatérale pour une comparaison de variances lorsqu'une diminution de variabilité est acceptable et l'équivalence est acceptée si le rapport de variance (nouvelle méthode/méthode pharmacopée) n'est pas supérieur à 1,0 + δ.
Le δ doit être défini par l'intermédiaire de la connaissance et l'utilisation de la méthode pharmacopée, ou il peut être calculé. La différence entre la méthode alternative et la méthode pharmacopée ne doit pas créer de risque de générer des résultats hors spécifications. Un δ est choisi afin d'avoir une faible probabilité d'avoir ce risque, par exemple, en comparant la distribution de données avec la méthode pharmacopée aux critères d'acceptation. Cette détermination peut se faire par l'intermédiaire de graphe ou en utilisant un intervalle de tolérance
Les deux autres composants dans la détermination de la taille des échantillons sont liés à la probabilité d'erreur. Les données pourront amener à une conclusion d'équivalence lorsque les méthodes sont trop différentes. C'est un faux positif, le nombre d'échantillon ne permet pas de mettre en avant une différence qui est présente en routine.
L'erreur peut aussi exister dans l'autre sens, les données obtenues peuvent ne pas permettre une conclusion sur la similitude des résultats malgré une équivalence de méthodes. C'est un faux négatif, le nombre d'échantillon n'est pas suffisant pour assurer l'équivalence.

Les études statistiques ne permettent pas d'éliminer complétement la possibilité d'avoir un cas de faux positif ou de faux négatif, cependant en choisissant un nombre d'échantillon approprié, la probabilité de chacune de ces erreurs peut être rendue assez faible pour conclure sur l'équivalence. La probabilité maximale d'avoir une équivalence acceptée lorsque les méthodes ont réellement une différence est α = 5%. Pour les faux négatifs, la puissance du test statistique est considérée. Dans le cas des études d'équivalence, la puissance du test correspond à la probabilité de conclure que les deux méthodes sont équivalentes. En général, cette puissance est de 80% voire 90%.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Le protocole de l'étude d'équivalence doit spécifier les valeurs de δ, α et la puissance attendue. A partir de ces valeurs, la quantité d'échantillons à tester avec chaque méthode peut être définie.
L'utilisation d'un tableau pour définir le nombre d'échantillon permet de comparer les différentes possibilités pour démontrer l'équivalence ou non de la méthode. Le nombre d'échantillons peut augmenter significativement pour une petite diminution de risque. L'entreprise choisis l'équilibre entre risques et ressources.

III.2.2.2. **Les recommandations de la PE**

La PE présente, depuis la version 11.5, un chapitre général dédié à la comparabilité des procédures analytique alternative. Ce chapitre 5.27 présente les conditions de réalisation d'une étude de comparabilité ainsi que l'évaluation des données générées.
Ce chapitre explique les attendus dans la mise en place d'une méthode alternative, mais précise qu'en cas de contestation, la méthode pharmacopée reste la méthode de référence même après une acceptation d'une méthode alternative[32].

III.2.2.2.1. L'étude de comparabilité

L'étude de comparabilité démarre dès la rédaction d'un protocole d'étude. L'étendue de l'étude doit être décrite dans le protocole ainsi que les justificatifs associés. La méthode alternative faisant l'objet de cette étude doit au préalable avoir été validée.
Cette validation de méthode ne suffit pas à prouver l'équivalence entre les méthodes, cependant elle est nécessaire au bon déroulement de l'étude de comparabilité.
La méthode pharmacopée doit être implémentée et la vérification réalisée selon le chapitre 5.26 *« Implémentation des procédures pharmacopées »* de la PE.
La PE recommande une vérification de la comparabilité à partir de la validation de la méthode alternative et l'implémentation de la méthode pharmacopée. En effet, les données générées lors de ces tests permettent d'assurer la capacité de la méthode alternative à donner des résultats comparables au niveau de la spécificité, de la linéarité et du range.
Lorsque ces étapes ont été réalisées, l'étude de comparabilité peut commencer. Le but de l'étude est d'évaluer si les résultats et les performances d'une méthode analytique alternative sont comparable à la méthode pharmacopée associée. Cette comparabilité est réalisée en générant des données comparatives avec les deux méthodes. Dans le cas de méthode quantitative, il convient d'évaluer la précision et l'exactitude des données sur toute la gamme de mesure. Certaines méthodes peuvent nécessiter l'évaluation de différents critères de validation telles que la spécificité et sélectivité pour les méthodes de dosages des impuretés par exemple.
Si aucun test statistique permet de comparer les données obtenues, il convient de conclure de l'équivalence selon les preuves que la méthode alternative obtient le même résultat décisionnel que la méthode pharmacopée.
La Pharmacopée Européenne précise que le protocole d'étude doit contenir les tests et méthodes statistiques à utiliser, les critères d'acceptation et décrire la démarche lorsque l'étude d'équivalence utilisées ne permet pas de démontrer l'équivalence entre les deux méthodes avec la taille d'échantillon définie.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

En fonction des résultats attendus, différentes méthodes statistiques sont proposées. Contrairement à l'USP, le TOST est mentionné comme étant une option de premier choix pour les résultats quantitatifs.
Il est recommandé d'utiliser les mêmes échantillons pour les deux méthodes lorsque cela est possible. Cette possibilité permet de réduire les variations intra-échantillon et de comparer les deux méthodes sur un même résultat. Ces choix sont faits en fonction de la méthode, une comparaison de méthode de dosage d'impuretés peut nécessiter un dopage pour le test.
Le choix des échantillons représentative doit prendre en compte les points suivants :

- la variabilité attendue des valeurs du produit, par exemple toute la gamme de concentration doit être vérifiée. Si possible, inclure des échantillons qui sont proche de la limité des spécifications ;
- la variabilité de la matrice.
- lorsque la procédure génère plusieurs résultats telle que la détermination d'impuretés, le choix d'échantillon doit permettre la réalisation de test de comparabilité sur tous les résultats afin d'assurer que la méthode alternative est comparable à la méthode pharmacopée sur tous les produits d'intérêt.[32]

III.2.2.2.2. Evaluation des données

La PE propose l'utilisation de test TOST pour l'évaluation statistique des résultats. Cette évaluation est utilisée pour démontrer l'équivalence de performance entre les deux méthodes.
Avant la réalisation des calculs associés aux tests, la description des données et les hypothèses statistiques doivent être vérifiées.
La description des données peut être sous la forme d'une représentation graphique ainsi que les données telles que moyenne, maximum, minimum et écart type peuvent être rapportés sous forme de tableau.
La représentation graphique permet une visualisation de la distribution des données ainsi qu'une première idée de la différence entre les moyennes des deux méthodes à l'aide des avis d'experts et des données historiques, par exemple est ce que la moyenne obtenue lors de ces tests d'équivalence semble cohérente avec les résultats historiques obtenues avec cette méthode ?
Cette vérification peut permettre de déceler des problèmes avant l'application du test statistique.
Les hypothèses statistiques sont, comme indiqué lors de la description des tests statistiques, la vérification de la distribution normale des données et la comparaison de la variance expérimentale. Une méthode alternative peut être acceptable avec une variance plus faible cependant une variance plus élevée représente une précision plus faible qui remet en question la fiabilité de la méthode alternative.
L'intervalle de confiance est aussi pris en compte pour la détermination de l'équivalence. Dans le cas d'une équivalence de moyennes, l'intervalle de confiance doit être comparé aux critères définis pour l'équivalence.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

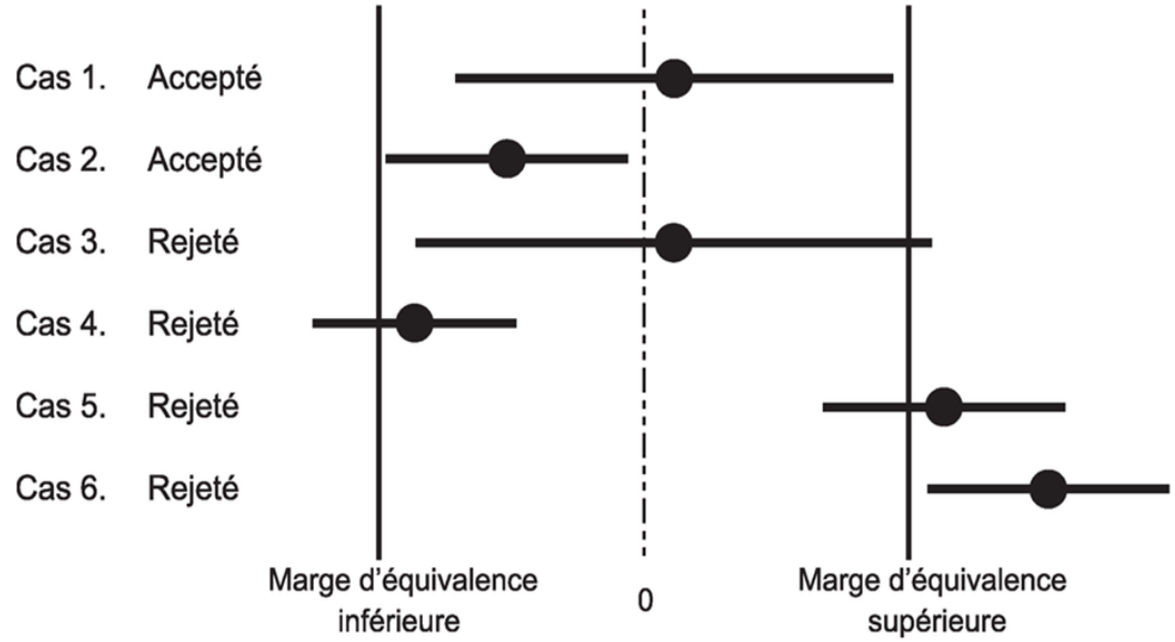


Figure 11 : Les différents cas de figure d'équivalence

- Dans les cas 1 et 2, les moyennes sont comparables et les intervalles de confiance sont compris dans les marges d'équivalence définies dans le protocole de l'étude. L'équivalence est acceptée pour ces deux cas.

- Le cas 3 représente une méthode alternative qui est comparable au niveau de la moyenne, cependant l'intervalle de confiance est très large et dépasse la marge d'équivalence supérieure. L'équivalence est rejetée.

- Le cas 4 représente une méthode qui présente une différence de moyenne et un intervalle de confiance relativement faible. Cet intervalle dépasse la marge d'équivalence inférieure donc l'équivalence est rejetée.

- Les cas 5 et 6 présentent une différence des résultats moyens de deux procédures qui se situe en dehors de l'intervalle d'équivalence. L'équivalence de méthode est rejetée.

Si les résultats de deux procédures présentent un biais ou une variabilité qui entraîne le rejet de l'équivalence, l'identification de ces sources de biais ou de variabilité permettra de mettre en place des mesures pour réduire leur impact et augmenter la probabilité de démontrer une équivalence dans un deuxième temps.
Ces mesures devront être décrites dans le rapport pour expliquer le raisonnement et la réexécution de l'étude d'équivalence.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

III.2.2.2.3. Conclusion

Les pharmacopées proposent différentes méthodes pour vérifier l'équivalence entre la méthode alternative et la méthode pharmacopée. Ces chapitres sont des guides pour réaliser ces études mais il est possible d'utiliser d'autres tests et d'autres méthodes pour prouver l'équivalence.
L'USP a depuis 2005 publié son chapitre sur l'interprétation et le traitement de données analytiques incluant une partie sur la comparaison de méthode analytiques.
La PE, quant à elle, a publié son chapitre 5.27 en 2024 afin de compléter son autorisation d'utilisation de méthodes alternatives décrit dans les chapitres généraux.
L'utilisation d'autres méthodes prouvant l'équivalence est accepté par les autorités compétentes si elle permet de démontrer l'équivalence.

III.3. Etude d'équivalence – Méthode Pharmacopée

L'étude d'équivalence permet, à travers ces différents tests et recommandations, de définir si une méthode alternative est équivalente à la méthode décrite dans les pharmacopées. Ayant transféré la méthode alternative du site transférant vers le site receveur et ayant montré la capacité de réaliser correctement la faisabilité de la méthode pharmacopée, une étude d'équivalence démontrant une équivalence des deux méthodes permettrait l'utilisation de la méthode semi-automatique en routine sur les lots de production de sulfate de salbutamol en poudre inhalée.
Un protocole de test définit les différentes étapes nécessaires pour comparer ces méthodes. Ce document présente à minima :

- **l'objectif de l'étude** : par exemple, l'objectif de ce protocole est d'étudier la possibilité d'une équivalence entre la méthode pharmacopée britannique et la méthode alternative semi-automatique pour le contrôle de l'uniformité de dose délivrée sur le salbutamol sulfate en poudre inhalée ;

- **les rôles et responsabilités des différents acteurs** : cette partie définie les différentes personnes qui sont impliquées dans cette étude allant des techniciens qui réalisent les tests jusqu'à la personne qui approuve les résultats et statue sur l'équivalence ou non et la décision de mise en place de la méthode alternative. Pour les responsabilités nécessitant une formation particulière, un prérequis à l'avancement de ces tests est la formation de ces personnes ;

- **le matériel et les méthodes** : elles décrivent à la fois les équipements nécessaires à la réalisation des tests et les différentes méthodes qui sont nécessaires au déroulement des tests. Ces méthodes peuvent être décrites dans le document ou faire référence à des procédures site. Dans le cas du sulfate de salbutamol en poudre inhalée, ce paragraphe décrit quelle HPLC utilisée pour injecter ainsi que la colonne pour la séparation, les différents composants nécessaires à la préparation de l'échantillon ainsi que les procédures site pour l'utilisation des fioles, de l'appareil semi-automatique et de l'HPLC. Cette liste n'est pas exhaustive. De plus il décrit les deux méthodes étape par étape pour la réalisation des tests incluant le rinçage retenu et les conditions chromatographies ;

Licence CC BY-NC-ND 3.0

- **la matrice de test** : consistant en une description des tests à réaliser, le nombre d'échantillons et de résultats à générer par méthode, le nombre de personnes nécessaires à la réalisation des tests ainsi qu'une explication du traitement des résultats pour comparer l'équivalence. Cette matrice se repose sur les principes expliqués en amont, c'est-à-dire les paramètres des tests statistiques ou les recommandations de l'USP. La démarche à suivre pour réaliser cette étude est décrite dans cette partie.

- **Les critères d'acceptation** : ces critères, pour la méthode, doivent être décrits. Lorsque les résultats des tests sont non-conformes selon la méthode, ce n'est pas possible de statuer sur l'équivalence. Par exemple, le critère de la pharmacopée britannique pour l'uniformité de teneur de la dose délivrée, est 9 des 10 valeurs individuelles doivent être comprises entre 75 et 125% de la valeur moyenne et toutes les valeurs doivent être comprises entre 65 et 135% de la moyenne.

  Si sur 10 échantillons testés pour l'équivalence, deux valeurs sortent de l'intervalle 75 à 125% de la moyenne, le critère de la méthode n'est pas respecté et l'équivalence ne pourra pas être réalisée. Il convient aussi de donner le critère d'acceptation du test d'équivalence puisque dans le cas où toutes les valeurs sont comprises dans l'intervalle, c'est ce critère qui est vérifié pour statuer sur la conformité de l'exercice.

  En plus des critères d'acceptation de la méthode, les critères d'acceptation de l'équivalence sont aussi décrits. Lors de l'utilisation d'un test TOST, le critère d'acceptation permet de définir les marges d'équivalence inférieure et supérieure.
  Pour déterminer ce critère, une connaissance scientifique de la méthode ainsi que les risques pour le patient sont nécessaires. Il existe différentes approches pour définir le critère d'acceptation :
  - Limentani[33] suggère un process dont le θ est choisi avec la taille de l'échantillon et l'intervalle de confiance pour une variance estimée et ensuite modifiée selon la variance obtenue sur le site receveur. Cette méthode peut entraîner une restriction de θ important si les données du site transférant ne sont pas suffisantes augmentant la possibilité de rejeter l'équivalence.
  - Hauck et al.[34] propose que les caractéristiques inacceptables ou les caractéristiques inattendues soit identifier par le critère d'acceptation. Le critère d'acceptation appliqué se base sur ce qui peut être réalisé mais il est aussi important de savoir ce qui est acceptable. Par exemple, le critère d'équivalence ne peut pas être à 2% pour une méthode de pureté avec comme critère d'acceptation 98% à 102%.
  - Une limite générique à partir des critères d'acceptation de la méthode peut être appliqué. Cette limite ne prend pas en compte les acceptations.

- **Le traitement des déviations** : expliquant les différentes étapes à réaliser pour investiguer des résultats non conformes ou des changements dans le processus décrit par ce protocole.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

III.3.1. **Le déroulement des tests d'équivalence**

En prenant un cas comme l'uniformité de dose délivrée pour le sulfate de salbutamol en poudre inhalée, la méthode pharmacopée et la méthode alternative ont été vérifiées sur le site et sont utilisables. Les résultats obtenus selon chaque méthode répondent aux critères d'acceptation de la méthode respective.

Dans l'exemple suivant les résultats décrits sont fictifs pour illustrer la démarche de l'étude d'équivalence.

La matrice de test utilisée dans cette étude d'équivalence consiste en une comparaison des variances entre la méthode alternative et la méthode pharmacopée. Cette comparaison est réalisée par une estimation de la variance de chaque méthode selon la méthode décrite dans l'USP.

Pour l'uniformité de teneur de la dose délivrée, 9 des 10 valeurs individuelles doivent être comprises entre 75 et 125% de la valeur moyenne et toutes les valeurs doivent être comprises entre 65 et 135% de la moyenne.

Afin de comparer les méthodes entre elles, il faut s'assurer que la variance obtenue par les deux méthodes est équivalente. En effet, l'uniformité de dose délivrée vérifie que la quantité de produit émis lors du test soit répétable. Pour ce protocole d'étude hypothétique, les méthodes sont considérées équivalentes si un test F ne rejette pas l'hypothèse nulle : la variance de la méthode pharmacopée et la variance de la méthode alternative sont égales.

De plus la méthode d'uniformité de dose délivrée de la BP définit les limites à partir de la moyenne des valeurs obtenues avec la méthode. La différence entre la méthode alternative et la méthode BP n'est qu'à la préparation d'échantillon. Pour assurer que les moyennes obtenues soient aussi équivalentes, un TOST est intégré dans la matrice. Ce test est une comparaison d'un intervalle de confiance de la différence des moyennes avec un critère d'acceptation défini au préalable dans le protocole d'étude. La définition du critère d'acceptation, noté θ, est réalisée à partir des connaissances de la méthode et les critères d'acceptation de la méthode pharmacopée. Pour illustrer ce test un exemple avec un θ = 5,0% est utilisé.

III.3.1.1. **Méthode**

Equivalence des moyennes.

Il est donc possible de commencer une étude d'équivalence. Les échantillons choisis pour cette étude sont issus d'un même lot de stabilité, qui a été produit et testé selon les attendus de la pharmacopée britannique lors de sa production. Les résultats obtenus lors de la libération du lot sont conformes.

Détermination du nombre d'échantillon pour la méthode : le nombre d'échantillons à tester est fonction de la matrice choisie. Dans le cas d'un test statistique ou une vérification de précision, plus le nombre d'échantillons est élevé plus le résultat du test est fiable.

Lorsqu'un seul échantillon est vérifié pour chaque méthode, il peut exister un écart important entre les résultats suggérant une différence entre les méthodes. Cependant, avec 1000 échantillons de chaque, les résultats peuvent avoir une variance qui montre que la différence n'est pas significative comme défini sur un seul échantillon.

La détermination du nombre d'échantillon pour le TOST se base sur le ratio du critère d'acceptation et l'écart type de la méthode alternative ainsi que la puissance attendue. L'écart type a été calculé par rapport aux moyennes obtenues dans la familiarisation de la

Licence CC BY-NC-ND 3.0

méthode lors du transfert. Pour cette étude θ/s_u= 2,5, l'application du Tableau 14 issu de Analytical Chemistry, Vol 81[21] définit le nombre d'échantillon à 6 par méthode pour une puissance à 95%.

Tableau 14 : Nombre de répétitions nécessaires pour des études à puissance acceptable, basé sur le θ/su valeur pour la méthode à tester

table shows replicate analysis (n) per method

	minimum power	recommended power	
θ/s_u	80%	90%	95%
0.7[b]	36	45	54
0.8	28	35	42
0.9	22	28	33
1.0	18	23	27
1.1	15	19	23
1.2	13	16	19
1.3	11	14	17
1.4	10	12	14
1.5	9[c]	11	13
1.6	8	10	11
1.7	7	9[c]	10
1.8	7	8	9[c]
1.9	6	7	8
2.0	6	7	8
2.25	4	6	6
2.5	4	5	6
≥3	4	4	4

L'étude inclut donc 6 essais par méthode. Le design de l'étude est décrit dans la Figure 15 et l'étude est réalisée de façon à réduire les facteurs pouvant influencer le résultat. Un seul technicien réalise les tests, sur la même chaîne HPLC pour les deux méthodes.

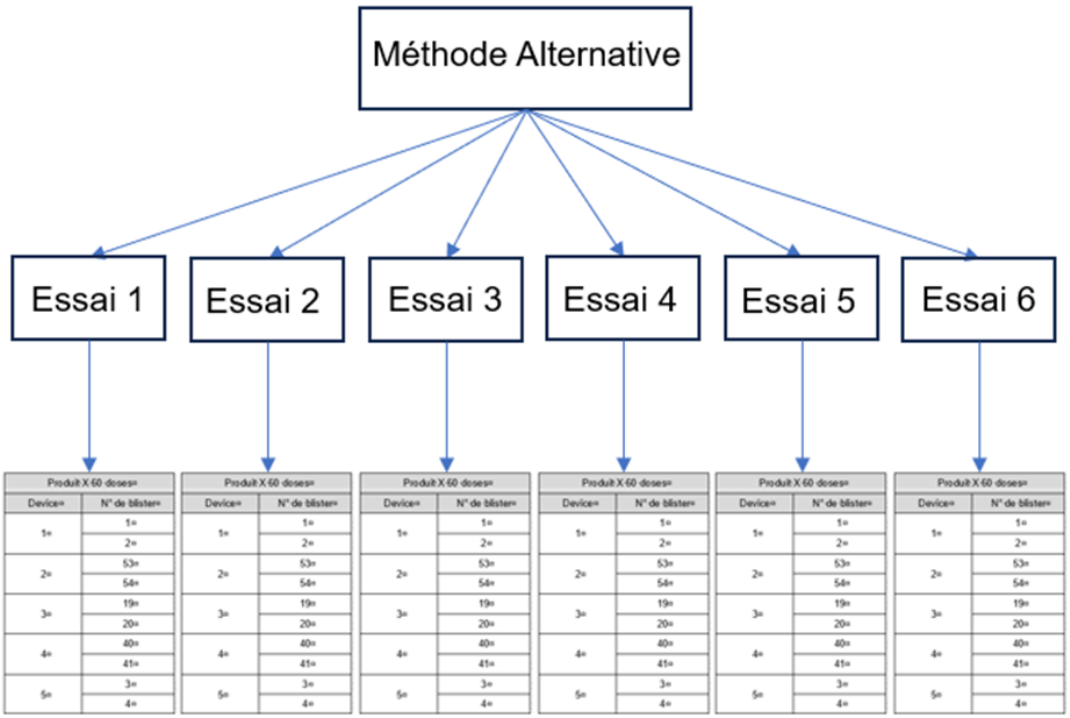


Figure 12 : Matrice d'étude - Méthode alternative

Licence CC BY-NC-ND 3.0

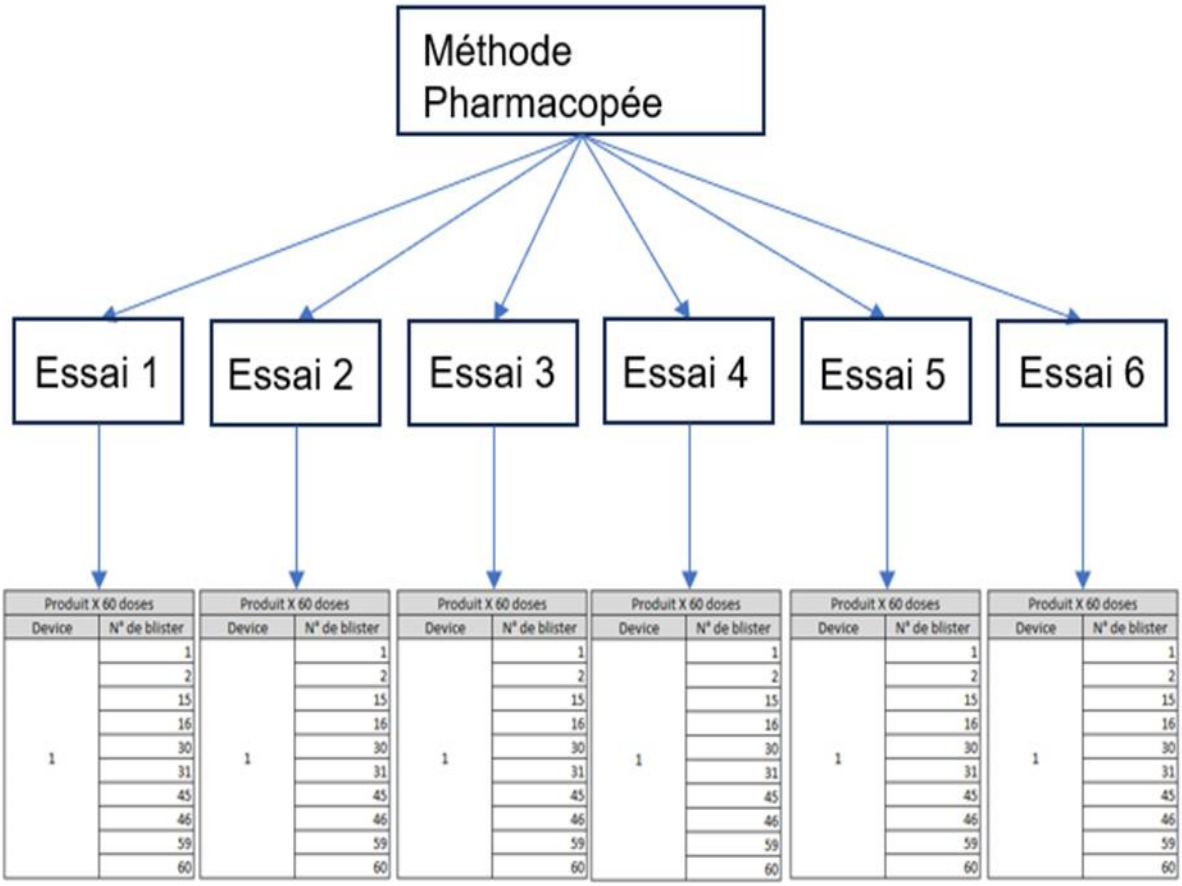


Figure 13 : Matrice d'étude - Méthode pharmacopée

Test F.

Le test F est réalisé sur 60 points pour chaque méthode. Les points obtenus lors de l'équivalence des moyennes sont utilisés. L'hypothèse nulle est $H_0 : \sigma^2_1 = \sigma^2_2$ et l'hypothèse alternative est $H_1 : \sigma^2_1 < \sigma^2_2$ avec σ^2_1 : la variance de la méthode pharmacopée britannique et σ^2_2 : la variance de la méthode semi-automatique.

Les méthodes sont considérées comme équivalentes si la méthode alternative ne génère pas une augmentation de la variance. Une diminution de la variance est acceptable pour l'équivalence de méthode puisque la méthode est plus précise.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

III.3.1.2. **Résultats**

L'équivalence des moyennes :

Tableau 15 : Résultats de la méthode alternative

Inhalateur	1	2	3	4	5	6
Blister 1	101	104	95	98	105	104
Blister 2	99	96	101	101	97	102
Blister 3	96	100	97	104	100	99
Blister 4	95	99	98	101	96	101
Blister 5	103	104	98	104	101	105
Blister 6	104	98	101	97	98	97
Blister 7	105	98	95	98	97	96
Blister 8	97	99	105	99	105	104
Blister 9	102	98	98	96	105	103
Blister 10	98	97	100	99	98	97
Moyenne	**100**	**99**	**99**	**100**	**100**	**101**
Ecart Type	**3.3**	**2.6**	**2.9**	**2.6**	**3.4**	**3.2**

Tableau 16 : Résultats de la méthode pharmacopée

Inhalateur	1	2	3	4	5	6
Blister 1	100	96	92	104	102	97
Blister 2	98	95	101	103	100	94
Blister 3	95	97	98	101	102	104
Blister 4	97	100	97	101	107	102
Blister 5	103	106	98	95	98	98
Blister 6	105	104	102	98	99	99
Blister 7	100	106	104	102	96	100
Blister 8	101	101	97	98	106	103
Blister 9	97	98	102	96	98	95
Blister 10	106	95	96	100	103	98
Moyenne	**100**	**100**	**99**	**100**	**101**	**99**
Ecart Type	**3.4**	**4.1**	**3.4**	**2.8**	**3.4**	**3.1**

Avec des résultats obtenus[1] comme indiqué dans le Tableau 15 (méthode alternative) et le Tableau 16 (méthode pharmacopée), la différence des moyennes ainsi que l'intervalle de confiance à 95% ont été calculé. Les résultats de l'étude d'équivalence théorique sont présentés dans le tableau 17.

L'analyse statistique est présentée dans le Tableau 16. La moyenne, l'intervalle de confiance et le critère d'acceptation sont documentés dans la Figure 14. L'intervalle de confiance à 95%

[1] Les résultats obtenus sont générés informatiquement par un générateur de nombres randomisés afin d'illustrer la démarche de l'étude d'équivalence. Aucun essai n'a été réalisé pour cette étape.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

est compris dans la limite d'acceptation haute et la limite d'acceptation basse ainsi les deux méthodes ont été déclarées comme équivalentes.

Tableau 17 : Résultats de l'étude d'équivalence théorique

Moyenne méthode pharmacopée	Moyenne méthode alternative	Différence des moyennes	Ecart-type	Intervalle de confiance inférieur	Intervalle de confiance supérieur	Critère d'acceptation
99.77%	99.80%	-0.03%	0.86	-0.72%	0.66%	5.0%

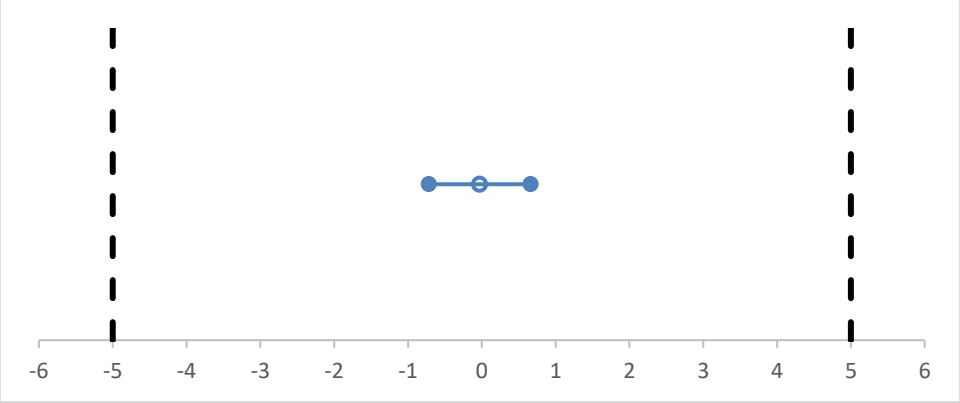


Figure 14: Analyse d'équivalence des moyennes

Test F :

Tableau 18 : Résultats du Test F

	Méthode pharmacopée Britannique	*Méthode semi-automatique*
Moyenne	99.76667	99.8
Variance	12.35141	9.654237
Observations	60	60
df	59	59
F	1.279377	
P(F<=f) unilatérale	0.173344	
F Critical unilatérale	1.539957	

Le Tableau 18 montre les résultats obtenus pour un test F sur les variances des deux méthodes. Si l'hypothèse nulle est rejetée, la variance de la méthode alternative semi-automatique est significativement différente de la variance de la méthode pharmacopée. De plus cette variance serait plus grande que la variance de la méthode pharmacopée. Cependant, la valeur P n'est pas inférieure à 0,05. Le résultat du test ne permet pas de rejeter l'hypothèse nulle, et ne met pas en évidence une différence significative entre les variances obtenues avec les deux méthodes.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

III.3.1.3. **Conclusion**

L'étude réalisée démontre que la méthode alternative est équivalente à la méthode pharmacopée britannique pour la détermination de la moyenne et n'a pas démontré une différence significative de variances entre les deux méthodes. Les deux méthodes peuvent être considérées comme équivalentes selon les critères définis dans le protocole d'étude.
Les résultats obtenus dans cette étude sont décrits dans le rational de l'étude (description ci-après) qui est envoyé aux autorités compétentes.

III.3.2. **Rational d'utilisation**

La méthode alternative a fait l'objet d'une étude d'équivalence avec la méthode pharmacopée. Il existe deux réponses possibles à cette étude d'équivalence. Soit la méthode alternative et la méthode pharmacopée sont équivalentes, soit elles ne le sont pas.
Lorsque l'équivalence n'est pas démontrée, la méthode alternative ne peut pas être utilisée pour le contrôle d'un produit en routine. La méthode pharmacopée doit être respectée pour les contrôles de routine. Un redéveloppement de la méthode doit être réalisée et toute la démarche de transfert et d'étude d'équivalence est nécessaire à l'implémentation de la méthode, peu importe le changement.
Dans le cas d'une méthode alternative qui répond aux critères de l'étude d'équivalence, la démarche continue. Le rapport de l'étude démontre l'équivalence entre les deux méthodes. La méthode peut potentiellement être utilisée pour les contrôles de routine.
Le site receveur écrit un rational explicatif qui présente la méthode alternative et décrit les écarts avec la méthode pharmacopée. Ce rational inclut aussi le design de l'étude et les résultats obtenus permettant de conclure sur l'équivalence entre les deux méthodes.
Ce rational est envoyé aux autorités compétentes pour validation avant l'utilisation en routine d'une nouvelle méthode. De plus, lorsque cette méthode est nouvelle, il convient de demander une modification du CTD pour introduire cette nouvelle méthode de contrôle.
Les étapes suivant l'étude d'équivalence et l'envoi du rational sont fonction de la situation :

- La méthode de contrôle a été rajoutée dans une mise à jour de la pharmacopée, mais une méthode de contrôle existe déjà dans le CTD. C'est le cas pour le Salbutamol (Sulfate de) en poudre inhalée. La BP ne demandait pas une vérification de l'uniformité de teneur, cependant lors d'une révision, ce test a été rajouté. Le contrôle existait déjà dans le CTD mais n'était pas réalisé selon la même méthode que la méthode pharmacopée. L'équivalence a été démontrée et une acceptation par les autorités britanniques suffit pour l'utilisation.

- La méthode alternative a été développée pour améliorer une méthode existante en utilisation de routine. L'amélioration peut s'appliquer à la précision ou l'exactitude de la méthode, la santé du personnel, par exemple le retrait de produits dangereux dans la méthode, ou des économies dans l'utilisation de la méthode. Le rational concernant cette méthode est accepté par les autorités compétentes et une modification du CTD pour ajouter cette méthode en plus de la méthode actuelle est demandée.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Conclusion

L'harmonisation entre la JP, la PE et l'USP réduit les écarts entre les méthodes d'analyse préconisées par ces pharmacopées. Cette harmonisation diminue la nécessité d'une démonstration d'équivalence entre les pharmacopées majeure. L'évolution technologique et le développement de nouveaux équipements pouvant être plus précis et plus intéressant pour une entreprise pharmaceutique entraînent le développement de méthodes analytiques alternatives qui généralement propose une amélioration pour l'entreprise utilisatrice. Dans le cas du sulfate de salbutamol, une méthode semi-automatique permet une réduction des charges et demandes sur le personnel et réduisent le risque de troubles musculo-squelettique qui est bénéfique pour GSK. En plus, la méthode diminue la différence interpersonnelle puisque les étapes pouvant démontrer une variation sont automatisées.

Les méthodes pharmacopées restent des méthodes de référence pour le contrôle qualité dans l'industrie pharmaceutique et l'équivalence doit être démontrée avant d'avoir l'accord des autorités compétentes pour l'utilisation de cette nouvelle méthode.

Le développement d'une nouvelle méthode, réalisé par des sites de recherche et développement, ne permet pas l'utilisation directe de cette méthode sur un site de production. Le transfert de méthode assure la compréhension et le bon fonctionnement de la méthode sur le site receveur.

Ce processus de transfert peut être remplacé par une revalidation complète de la méthode. Cette revalidation consiste à tester les critères de validation selon l'ICH Q2.

Le choix entre le transfert et la revalidation est laissé au site receveur. Cependant, dans les deux cas, une vérification par le site transférant est nécessaire. Lorsque l'utilisation d'une méthode alternative est souhaitée et que la méthode a été transférée, le site receveur doit démontrer l'équivalence entre les méthodes par le biais de différents tests possibles.

Suite à la réalisation des différentes étapes décrites précédemment, le rational peut être envoyé aux autorités compétentes pour avoir leur accord d'utilisation d'une méthode alternative et, si besoin, une modification du CTD peut être réalisée afin de mettre à jour les analyses de contrôle pour le produit en question.

L'utilisation de méthodes alternatives à la pharmacopée avec des nouvelles technologies devient de plus en plus importante, avec la publication en 2024 d'un chapitre dans la Pharmacopée Européenne qui informe du minimum attendu par les autorités compétentes pour conclure sur l'équivalence et qui donne des lignes directrices sur la procédure de réalisation d'une étude d'équivalence.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Références bibliographiques

1. Vaxelaire S. Bilan économique édition 2020. LEEM. 2020;11.
2. Pharmacopoeia. In: Wikipedia [Internet]. 2024 [cited 2024 Jun 24]. Available from: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Pharmacopoeia&oldid=1219877836
3. European Pharmacopoeia Online [Internet]. Available from: https://pheur.edqm.eu/app/11-4/search/
4. US Pharmacopeia (USP) [Internet]. Available from: https://www.usp.org/
5. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency [Internet]. Japanese Pharmacopoeia 18th Edition. Available from: https://www.pmda.go.jp/english/rs-sb-std/standards-development/jp/0029.html
6. The International Pharmacopoeia [Internet]. Available from: https://digicollections.net/phint/2022/index.html#d/b.1
7. What is the BP? - British Pharmacopoeia [Internet]. [cited 2024 Mar 2]. Available from: https://www.pharmacopoeia.com/about-us/the-bp/what-is-the-bp
8. ASSI K. H., CHRYSTYN H., et al. The device resistance of recently introduced dry-powder inhalers. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 52 (Suppl) 58, 2000.
9. 2019-guide-bpf-mai-2019-3.pdf.
10. Ermer J, Limberger M, Lis K, Wätzig H. The transfer of analytical procedures. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2013 Nov 1;85:262–76.
11. Swartz M, Krull I. Analytical Method Transfer. 2006 Nov 1;24:1204–14.
12. Raska CS, Bennett TS, Goodberlet SA. Risk-Based Analytical Method Transfer: Application to Large Multi-Product Transfers. Anal Chem. 2010 Jul 15;82(14):5932–6.
13. Analytical Method Knowledge Transfer. GSK; 2019.
14. Méthodologie de développement de projet en industrie pharmaceutique dans une optique de cycle de vie [Internet]. [cited 2024 Mar 2]. Available from: https://www.ultraproprete.com/dossiers-techniques/organisation-et-methodes/methodologie-de-developpement-de-projet-en-industrie-pharmaceutique-dans-une-optique-de-cycle-de-vie.html
15. ICH Q2(R2) Guideline on validation of analytical procedures - Step 5.pdf.
16. Précis/Exact [Internet]. [cited 2024 Sep 18]. Available from: https://media4.obspm.fr/AAS/pages_statistiques/html_images/precisexact.png.html
17. Validation des méthodes analytiques au contrôle qualité. GSK; 2019.
18. Davani B. Pharmaceutical Analysis for Small Molecules. John Wiley & Sons; 2017. 256 p.
19. Swartz M, Krull I. Method Validation and Robustness. 2006 May 1;24:480–90.
20. DUSA.pdf [Internet]. [cited 2024 Sep 18]. Available from: https://www.sanyo-si.com/wp-content/uploads/DUSA.pdf

Licence CC BY-NC-ND 3.0

21. Borman PJ, Chatfield MJ, Damjanov I, Jackson P. Design and analysis of method equivalence studies. Anal Chem. 2009 Dec 15;81(24):9849–57.

22. Ribeiro I. Gaussian Probability Density Functions: Properties and Error Characterization.

23. ResearchGate [Internet]. [cited 2024 Oct 13]. Figure 2: Normal Distribution Representation A random variable X~(μ,σ)... Available from: https://www.researchgate.net/figure/Normal-Distribution-Representation-A-random-variable-Xm-s-can-be-transformed-into-a_fig2_370656953

24. Andrade C. The P Value and Statistical Significance: Misunderstandings, Explanations, Challenges, and Alternatives. Indian Journal of Psychological Medicine. 2019 May;41(3):210–5.

25. Prel JB du, Hommel G, Röhrig B, Blettner M. Confidence Interval or P-Value?: Part 4 of a Series on Evaluation of Scientific Publications. Deutsches Ärzteblatt International. 2009 May;106(19):335.

26. McCrum-Gardner E. Which is the correct statistical test to use? British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2008 Jan 1;46(1):38–41.

27. Parab S, Bhalerao S. Choosing statistical test. Int J Ayurveda Res. 2010;1(3):187–91.

28. Geary RC. The Distribution of “Student’S” Ratio for Non-Normal Samples. Supplement to the Journal of the Royal Statistical Society. 1936 Jul 1;3(2):178–84.

29. Westgard JO, Hunt MR. Use and Interpretation of Common Statistical Tests in Method-Comparison Studies. Clinical Chemistry. 1973 Jan 1;19(1):49–57.

30. F-test. In: Wikipedia [Internet]. 2024 [cited 2024 Oct 13]. Available from: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=F-test&oldid=1245663184#cite_note-:0-1

31. Schepers U, Wätzig H. Application of the equivalence test for analytical method transfers: Testing precision using the United States Pharmacopoeia concept 〈1 0 1 0〉. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2006 Apr 11;41(1):290–2.

32. 5.27. Comparabilité des procéd... - European Pharmacopoeia 11.5 [Internet]. [cited 2024 Oct 14]. Available from: https://pheur.edqm.eu/app/11-5/content/11-5/52700F.htm

33. Limentani GB, Ringo MC, Ye F, Bergquist ML, MCSorley EO. Beyond the t-Test: Statistical Equivalence Testing. Anal Chem. 2005 Jun 1;77(11):221 A-226 A.

34. Hauck WW, Abernethy DR, Williams RL. Metrologic approaches to setting acceptance criteria: Unacceptable and unusual characteristics. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2008 Nov;48(3):1042–5.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Annexes

Annexe 1. La méthode de la Pharmacopée Britannique 78

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Annexe 1. La méthode de la Pharmacopée Britannique

TESTS

Uniformity of delivered dose

Complies with the requirements stated under Inhalation Powders using the following method of analysis. Carry out the method for liquid chromatography, Appendix III D, using the following solutions.

Solution A 30 volumes of water and 70 volumes of methanol.

(1) Collect single doses of the preparation being examined using the procedure described under Inhalation Powders, Uniformity of delivered dose and dissolve the collected dose in sufficient solution A to produce a solution containing the equivalent of 0.00025% w/v of salmeterol.

(2) 0.0004% w/v of salmeterol xinafoate EPCRS in solution A.

(3) 0.0005% w/v of salmeterol xinafoate for system suitability EPCRS in solution A.

CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS

(a) Use a stainless steel column (20 cm × 4.6 mm) packed with octadecylsilyl silica gel (5µm) (Hypersil ODS C18 is suitable).

(b) Use isocratic elution and the mobile phase described below.

(c) Use a flow rate of 1.5 mL per minute.

(d) Use a column temperature of 40°.

(e) Use a detection wavelength of 276 nm.

(f) Inject 200 µL of each solution.

MOBILE PHASE

0.5 volumes of formic acid, 35 volumes of 0.15M ammonium acetate and 65 volumes of methanol.

SYSTEM SUITABILITY

The test is not valid unless, in the chromatogram obtained with solution (3), the peak-to-valley ratio is at least 1.1, where Hp is the height above the baseline of the peak due to impurity E and Hv is the height above the baseline of the lowest point of the curve separating this peak from the peak due to salmeterol.

DETERMINATION OF CONTENT

Calculate the content of salmeterol, $C_{25}H_{37}NO_4$, per delivered dose using the declared content of $C_{36}H_{45}NO_7$ in salmeterol xinafoate EPCRS. Each mg of $C_{36}H_{45}NO_7$ is equivalent to 0.6880 mg of $C_{25}H_{37}NO_4$. Repeat the procedure as described for pre-metered systems under Powders for Inhalation, Uniformity of delivered dose.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Serment De Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Attention, ne supprimez pas le saut de section suivant (page suivante non numérotée)

Licence CC BY-NC-ND 3.0

La mise en place de méthodes analytiques alternatives : Démonstration de conformité aux attentes des pharmacopées

Les Pharmacopées présentent les méthodes de contrôle qualité qui sont applicables pour les régions nécessitant la conformité à la pharmacopée en question. Ces méthodes permettent d'assurer que la qualité des médicaments reste constante. Certaines pharmacopées, telles que la Pharmacopée Britannique, permettent l'utilisation de méthodes alternatives à celles décrites dans les pharmacopées. Des nouvelles méthodes, développées sur des sites de recherche et développement, doivent être transférées vers le site de production et prouvée comme étant équivalent statistiquement à la méthode pharmacopée afin d'assurer la qualité du médicament. Le but de cette thèse est de décrire les différentes étapes nécessaires à l'implémentation d'une méthode alternative développée sur un site secondaire suivant les recommandations des différentes pharmacopées majeures.

Mots-clés : Pharmacopée, méthode alternative, transfert de méthode, étude d'équivalence

Implementation of alternative analytical methods: Demonstration of compliance with pharmacopoeial expectations

Pharmacopoeias contain quality control methods which are robustly tested and applicable worldwide. These ensure that the quality of drugs remain consistent. Certain pharmacopoeias allow the use of alternative methods which differ from the original methods described in the pharmacopoeia. New methods, developed on research and developments sites, must be transferred to the production site and proven to be statistically equivalent to the original method ensuring that the quality of the manufactured drug is the same. The aim of this thesis is to outline the different procedures to implement alternative methods developed on a secondary site following the requirements set out by the pharmacopoeia.

Keywords : Pharmacopoeia, alternative methods, method transfer, equivalency study