

Chimia 46 (1992) 107–110
© Schweiz. Chemiker-Verband; ISSN 0009–4293

Dosages biopharmaceutiques et automatisations

Daniel Chollet* et Maurice Wermeille

Abstract. Pharmacokinetic and drug metabolism studies request the development and implementation of efficient, fast, validated analytical methods. Through the application of flexible and cartesian robots to the sample preparation, considerable progress is being made in automating both the development and the routine use of analytical methods in biopharmaceutical analysis.

Introduction

Dans cet article, nous nous proposons d'aborder le domaine des dosages biopharmaceutiques en pharmacocinétique, dans le but de donner au lecteur une vue générale de l'implication des méthodes de chimie analytique dans ce champ d'activité.

Etudes de pharmacocinétique

La pharmacocinétique, du grec pharmakon (remède) et kinema (mouvement), est l'essence même de l'étude du devenir des médicaments dans les organismes vivants. Toutefois, le suivi d'un médicament dans l'organisme est tout d'abord un problème d'analyse chimique englobant les domaines de la séparation, de l'identification et des dosages.

Lorsqu'un médicament est administré chez l'animal ou chez l'homme, il est, en fonction de sa nature, plus ou moins transporté par le système circulatoire, dilué dans divers fluides biologiques, lié de manière réversible ou irréversible à divers tissus, transformé et excrété. Sa transformation, le métabolisme, peut être faible et mener à des dérivés proches du médicament administré, ou intense avec une dégradation complète de la molécule. Les structures de ces dérivés, les métabolites, doivent être élucidées. De plus, des méthodes analytiques permettant le suivi de

ces derniers et/ou du médicament inchangé doivent être développées. Des quantités parfois infimes doivent alors être dosées, c'est-à-dire libérées des fluides biologiques ou des tissus les ayant adsorbées ou complexées, puis séparées des produits endogènes constituant la matrice. Finalement, les produits séparés sont quantifiés. Les résultats permettent alors de calculer les informations recherchées, soit les profils et les paramètres pharmacocinétiques.

Ces procédures fondamentales sont indispensables à la connaissance du devenir d'un médicament dans le corps. Ces dernières années, des demandes croissantes d'études pré-cliniques et cliniques ont émané des autorités sanitaires de chaque pays. Pour l'industrie pharmaceutique, il s'agit principalement des études et travaux cités dans la *table 1* qui s'apparen-

tent, dans une certaine mesure, aux travaux de contrôle anti-doping et de médecine légale.

Dosages biopharmaceutiques

L'essence des études de pharmacocinétique repose donc, dans une large mesure, sur les séries de dosages dans les fluides biologiques. Ces dosages sont appelés biopharmaceutiques par opposition aux analyses pharmaceutiques qui concernent l'analyse des médicaments et de leurs composants.

Les méthodes analytiques utilisées doivent impérativement être spécifiques, précises et exactes dans le domaine de sensibilité requis. Elles doivent être validées et répondre aux exigences GLP (Good Laboratory Practices) et GCP (Good Clinical Practices). Un nouveau facteur, moins familier pour le chimiste, est le facteur économique. Aujourd'hui, l'endiguement des coûts, l'assurance de la qualité, l'utilisation optimale des ressources humaines, la réponse aux attentes des autorités d'enregistrement sont autant d'éléments qui préoccupent les laboratoires d'analyse biopharmaceutique. Placé devant des centaines d'échantillons à analyser et la nécessité imposée de développer un nouveau médicament dans un minimum de temps, un tel laboratoire doit disposer de techniques d'analyse performantes et rapides pouvant travailler nuit et jour. Une réponse à ce défi est l'automatisation. Si l'automatisation de l'instrumentation est disponible depuis plusieurs années (passeurs d'échantillon, intégrateurs) celle de la préparation des échantillons d'origine biologique n'a été développée que récemment. Elle a pour but d'augmenter la productivité,

Table 1. Etudes génératrices de dosages biopharmaceutiques

<i>Industrie pharmaceutique</i>
Etudes de pharmacocinétique chez l'animal
Etudes de pharmacocinétique chez l'homme sain, chez le patient
Etudes de bioéquivalence
Etudes de corrélation entre données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques
Etudes de corrélation entre effets toxicologiques et concentrations sanguines
Mesures de compliance dans les études toxicologiques et cliniques
Etudes du métabolisme
<i>Médecine légale et sportive</i>
Contrôle anti-doping
Analyses d'échantillons d'origine biologique

*Correspondance: D. Chollet
Zyma SA
Case postale
CH-1260 Nyon

té, en terme de nombre d'analyses par unité de temps et en terme de diminution du temps nécessaire à leur exécution, tout en conservant une précision et une exactitude égale ou supérieure aux méthodes manuelles. Elle doit permettre de libérer le personnel de laboratoire pour des tâches plus gratifiantes que l'extraction routinière et ennuyeuse d'échantillons. De même, elle doit réduire les risques engendrés par la manipulation de réactifs chimiques et de fluides biologiques.

Historique

Au 18ème siècle, *Descroizilles* disposait exclusivement de la gravimétrie et de la titrimétrie comme méthodes analytiques. Il effectua pour la première fois une titration en utilisant un cylindre gradué de sa fabrication. *Mohr* en 1855 standardisait ces outils en inventant les pipettes calibrées et la burette [1]. Avec l'apparition des méthodes spectroscopiques, la chimie analytique prenait lentement son essor.

Les premières investigations sur le métabolisme furent effectuées sur la quinine dans la seconde moitié du 19ème siècle. *Tswett* découvrait la chromatographie en 1903. L'année 1932 vit *Widmark* publier ses résultats sur l'étude de l'élimination de l'alcool qui constitue la première étude de pharmacocinétique telle qu'elle est comprise aujourd'hui [2]. Après la deuxième guerre mondiale, les fantastiques progrès réalisés par les techniques d'analyses modernes, assistées depuis par la technologie du microprocesseur et par l'informatique, ont révolutionné la chimie analytique.

Techniques analytiques

De nos jours, le chimiste dispose d'un éventail de techniques de séparation telles que la chromatographie en phase gazeuse (GLC), la chromatographie liquide (HPLC), la chromatographie en phase supercritique (SFC) et les techniques électrochromatographiques. En fonction de la nature de l'analyte et de la sensibilité requise, il couple ces techniques avec un moyen de détection permettant sa quantification (*fig. 1*). Il dispose également de techniques de biochimie analytique. Citons, par exemple, les dosages immuno-chimiques ou enzymatiques utilisant ou non les radioéléments (radio immunoassay, RIA; enzyme linked immunosorbent assay, ELISA). Ces diverses techniques ont été passées en revue récemment [3].

Les progrès réalisés sont tels qu'il est aujourd'hui possible de suivre chez l'animal la cinétique sanguine d'un médicament en continu. L'analyse s'effectue alors au moyen d'un système HPLC relié à une sonde de microdialyse implantée dans une veine.

La HPLC est aujourd'hui la méthode de choix pour l'analyse biopharmaceutique. Son succès est principalement dû à sa capacité de traiter, en solution aqueuse, des échantillons thermiquement instables, à ses possibilités de séparation énantiosélective ainsi qu'à sa compatibilité avec les nouvelles techniques d'extraction et de dérivation 'on-line'.

Automatisation

Jusqu'à l'introduction récente des techniques de préparation automatisées, la préparation de l'échantillon s'est effectuée manuellement. Elle consistait le plus souvent en une suite d'opérations (*table 2*) effectuées dans le but de libérer un analyte de la matrice biologique, d'éliminer les produits endogènes la constituant, ou encore d'augmenter la sélectivité et la sensibilité du dosage. La HPLC et l'extraction

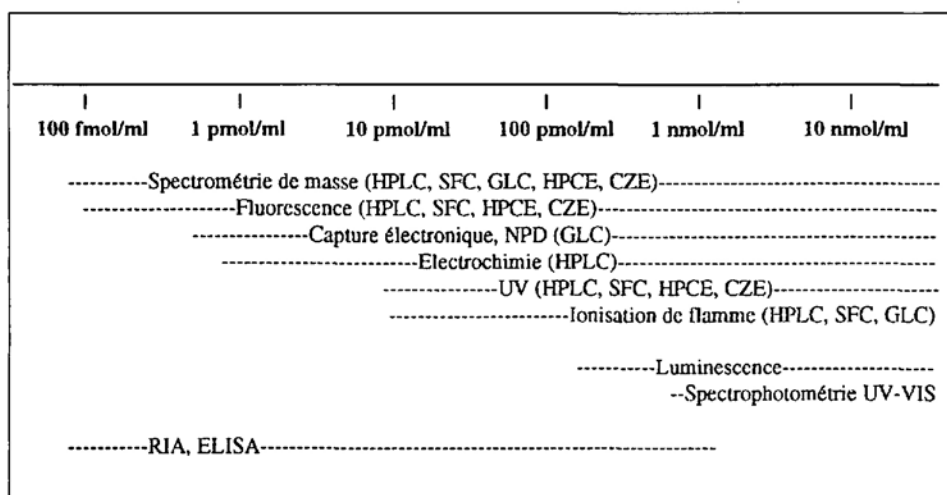


Fig. 1. Sensibilités approximatives des méthodes analytiques pour les dosages biopharmaceutiques. Les techniques couplées au moyen de détection sont données entre parenthèses (HPCE = High Performance Capillary Electrophoresis, CZE = Capillary Zone Electrophoresis, NPD = Nitrogen Phosphorus Detector).

Table 2. Opérations courantes de préparation d'échantillons biologiques

<i>Manipulation de liquides</i>
Aspiration, centrifugation, dilution, évaporation, filtration, congélation, mélange, pipetage, saturation, séparation
<i>Libération d'un analyte de la matrice biologique</i>
Hydrolyses acide, basique, enzymatique (protéases, lipases, β-glucuronidase, arylsulphatase)
<i>Elimination de produits endogènes</i>
Extractions liquide-liquide, liquide-solide (SPE), immunologique
Précipitation (solvants organiques, acides et sels inorganiques)
Ultrafiltration, dialyse
Saponification
Lyophilisation
Chromatographie liquide (LC, HPLC conventionnelle, HPLC multidimensionnelle)
<i>Augmentation de la sélectivité et de la sensibilité du dosage</i>
Dérivation pré-colonne
Dérivation post-colonne
Modes de détection sélectifs

solide-liquide (SPE) sont les techniques présentant le plus fort potentiel d'automatisation. D'autres techniques peuvent être automatisées par la robotique moderne. Toutefois, elles ne sont pas justifiables économiquement à la vue des récents développements obtenus par la combinaison HPLC-SPE.

Plusieurs critères sont déterminants pour l'élaboration d'une méthode automatisée [4]. La précision, l'exactitude et la sensibilité nécessaires détermineront la technique analytique et l'instrumentation à employer. La capacité et la vitesse d'exécution requises influenceront la manière d'effectuer les opérations individuelles de la procédure analytique et la configuration du système. Les opérations individuelles doivent se dérouler de manière identique pour tous les échantillons. Cependant, lorsque des séries d'échantillons sont à analyser, ils peuvent être traités soit séquentiellement, soit par batch, ou encore de manière plus performante par batches parallèles ou par séquences concurrentes [4]. Un système permettant l'autocontrôle et la coordination des opérations en cours est requis. Il devrait être à même de stopper une installation lorsqu'un problème apparaît tout en permettant à l'opérateur un redémarrage aisé. Ce point est particulièrement important lorsqu'un seul échantillon de fluide biologique de volume limité est disponible. La durée totale d'une série doit être définie. Elle s'échelonne généralement d'une nuit (16 h) à un week-end (64 h). L'utilisation rationnelle du temps disponible dépend du temps nécessaire pour une analyse et de la capacité du système (éluants, réactifs, filtres, cartouches d'extraction). La stabilité des analytes dans les conditions expérimentales d'analyse doit impérativement être déterminée. Le degré de flexibilité du système se base sur une anticipation des besoins futurs. D'une manière générale, une augmentation de la flexibilité se traduit par une diminution de la vitesse d'exécution. Les robots dotés d'un bras imitant le travail de l'homme sont très maniables mais lents comparés aux robots cartésiens qui présentent, pour leur part, une flexibilité moindre. Finalement, la manière d'automatiser une méthode analytique doit être évaluée en termes de vitesse requise, de flexibilité ainsi que de justification économique et stratégique.

L'automatisation des méthodes analytiques peut se diviser en deux domaines principaux, l'automatisation du traitement des résultats et l'automatisation de l'instrumentation.

Le premier domaine est responsable du traitement des résultats et de leur transfert. Il est généralement confié à l'informatique par le biais des 'expert systems' et

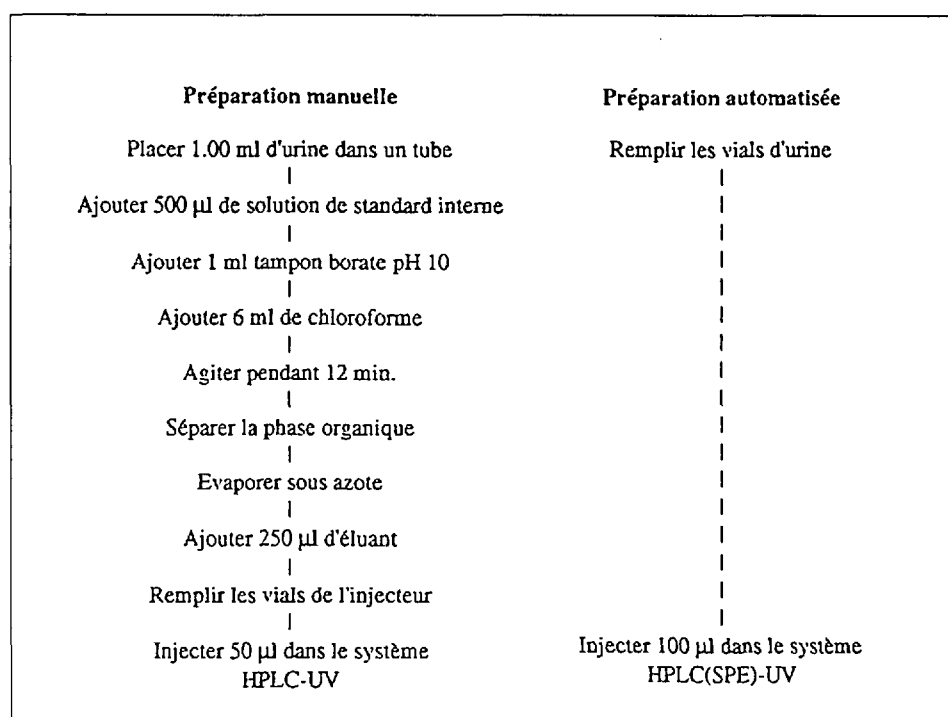


Fig. 2. Préparations manuelle et automatisée de l'échantillon pour les dosage urinaire du cebaracetam

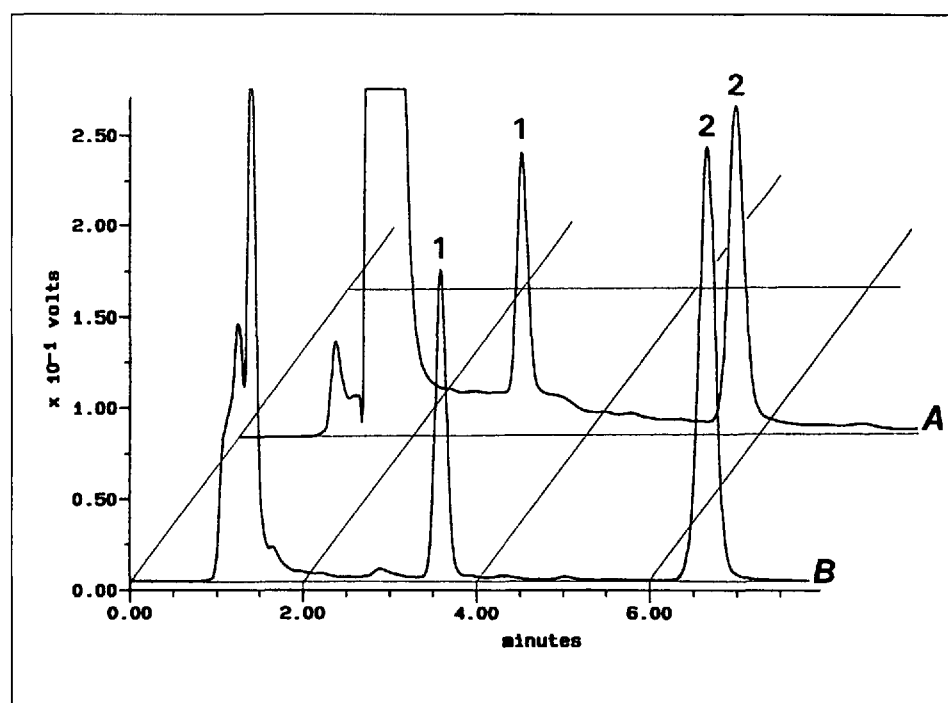


Fig. 3. Chromatogrammes typiques obtenus pour une urine dopée à 10 µg/ml. A) Préparation automatisée (OSP-2), injection de 100 µl d'urine; B) Extraction liquide-liquide, injection: 50 µl de l'extrait organique de 1 ml d'urine repris dans 250 µl d'éluant. Détection dans l'UV à $\lambda = 210$ nm. Standard interne (ajouté dans l'urine du chromatogramme A pour une meilleure comparaison), 2 = Cebaracetam.

des systèmes LIMS (Laboratory Information Management System).

L'automatisation de l'instrumentation se partage en deux catégories. La première est constituée par les systèmes flexibles tels que les robots de laboratoire à bras maniable (*Perkin-Elmer MasterLab*, *Zymark Zymate*, *HP ORCA*). La seconde, quant à elle, regroupe les robots cartésiens voués à une tâche particulière tels les systèmes de 'column switching' (*Merck OSP-2*, *Waters WAVS*, *Spark PROS-*

PEKT) et les passeurs/diluteurs d'échantillons se déplaçant dans les plans x , y , z (*Varian MSP*, *Gilson ASPEC*, *Waters Millilab*).

Si les systèmes flexibles imitant l'homme permettent d'automatiser la quasi totalité des opérations d'une procédure de préparation d'échantillon, ils n'en demeurent pas moins lents et très onéreux. De plus, ils nécessitent une programmation non justifiable en terme de coût/bénéfice pour des analyses de l'ordre de quelques

Reçu le 17 janvier 1992

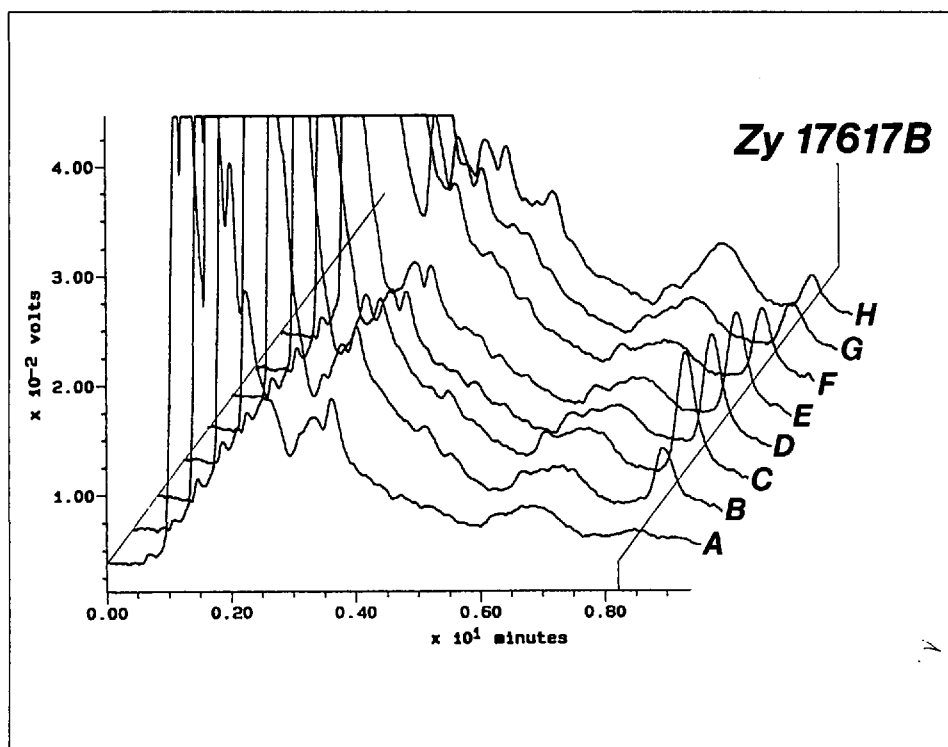


Fig. 4. Chromatogrammes des échantillons plasmatiques prélevés chez un volontaire avant administration orale de Zy 17617B (A), et après 0,5 h (B), 1 h (C), 1,5 h (D), 2 h (E), 2,5 h (F), 3 h (G) et 4 h (H). Analyse HPLC-SPE. Détection fluorescence, $\lambda_{exc.} = 285$ et $\lambda_{ém.} = 315$ nm. Domaine de concentration: pmol/ml.

centaines d'échantillons. Les robots cartésiens sont quant à eux particulièrement adaptés à la HPLC-SPE.

Le dernier né de cette classe est le système On-line Sample Preparator *OSP-2* de *Merck-ABS* (ILMAC 1990) dont les premiers résultats furent présentés dans le cadre de HPLC'91 Basel [5]. Ce système s'intègre sans problème sur n'importe quelle chaîne HPLC. Par un double système de vannes, il permet de mener une analyse HPLC et une extraction SPE de manière concomitante. L'échantillon, d'origine biologique ou non [6], est extrait sur une cartouche d'extraction en acier (longueur 4 mm, diamètre int. 4 mm) tandis que l'analyse de l'échantillon précédent se déroule sur la colonne analytique. Un carrousel de 72 cartouches permet l'utilisation d'une nouvelle cartouche pour chaque analyse. De par le nombre d'analyses pouvant être effectué sur une même cartouche, le coût de cette dernière par analyse est identique à celui occasionné par les cartouches d'extraction en plastique utilisées à basse pression par les autres systèmes commercialisés. Comparé à ces derniers, l'*OSP-2* présente l'avantage d'être plus rapide. Dans une large mesure, il évite les problèmes d'adsorption des analytes sur les surfaces de la verrerie ou des plastiques utilisés. Combiné au passeur/diluteur d'échantillon *Merck-Hitachi AS4000*, il permet l'automatisation complète d'analyses nécessitant une pré-dérivatisation et des dilutions.

Applications

L'application de *OSP-2* de *Merck* aux activités de notre laboratoire a permis d'automatiser de nombreux dosages dans le plasma et l'urine [5][7][8]. Les volumes de fluide biologique injectés varient de 100 μ l à 1000 μ l pour des concentrations mesurées variant entre pmol/ml et nmol/ml. Le dosage urinaire d'un nouveau nootropique, le cebaracetam, illustre par exemple le degré de simplification engendré par l'utilisation d'un tel système (fig. 2). Les chromatogrammes résultant des deux types de préparation sont donnés (fig. 3). Les chromatogrammes des échantillons plasmatiques d'un volontaire ayant reçu une dose unique d'un nouveau antidiarrhéique, le Zy 17617B, sont également donnés pour illustrer les résultats obtenus (fig. 4).

Selon notre expérience, tous les dosages biopharmaceutiques par HPLC incluant une extraction liquide-liquide avec les alcanes, les solvants chlorés, les éthers ou l'acétate d'éthyle peuvent être convertis en méthode HPLC-SPE entièrement automatisée. Les taux de récupération de l'étape d'extraction se situent entre 90 et 100%. Dans toutes les applications de notre laboratoire, ces taux étaient non seulement supérieurs à ceux mesurés pour l'extraction liquide-liquide mais également plus reproductibles. De plus, l'emploi d'un standard interne et, par conséquent, les recherches nécessaires à son obtention, s'est avéré superflu.

- [1] K. F. Mohr, 'Lehrbuch der chemisch-analytischen Titrimethode', 1855.
- [2] E. M. P. Widmark, 'Die theoretischen Grundlagen und die praktische Verwendbarkeit der gerichtlich-medizinischen Alkoholbestimmung', Urban u. Schwarzenberg, Berlin, 1932.
- [3] 'Special Topics in Biomedical Chromatography and Electrophoresis', Eds. Z. Deyl et U. Brinkman, *J. Chromatogr.* **1989**, 492.
- [4] D. C. Turnell, J. D. H. Cooper, *J. Chromatogr.* **1989**, 492, 59.
- [5] D. Chollet, M. Salanon, *J. Chromatogr.* **1992**, 593, 73.
- [6] M. Wotschokowsky, M. Witznacher, S. Godau, 'Automatic Sample Preparation with the *OSP-2* On-line SPE-HPLC for the Determination of Pesticides in Drinking Water', 5th International Symposium on Environmental and Biological Sample Handling in Chromatography, poster 36/91 P, Baden-Baden, 1991.
- [7] D. Chollet, P. Künstner, 'Fast Systematic Approach for the Determination of Drugs in Biological Fluids by Fully Automated HPLC with On-line Solid-phase Extraction and Automated Cartridge Exchange. Application to Cebaracetam in Urine', accepté pour publication dans *J. Chromatogr.*
- [8] D. Chollet, P. Künstner, M. Salanon, en préparation.