

Toussaint B.^{1,2}, Jaccoulet E.^{1,3}, Abdalla J.¹, Prognon P.^{1,4}, Caudron E.^{1,4}.

¹: Laboratoire de contrôle - HEGP ; ²: Laboratoire de pharmacologie-toxicologie - HEGP ; ³: Institut Galien UMR CNRS 8612 - Université Paris-Sud ;
⁴: Chimie Analytique Pharmaceutique - Université Paris-Sud .

Introduction:

Les **anticorps monoclonaux** (Ac) à visée anticancéreuse occupent une **place importante** en thérapeutique. Les Ac reconstitués nécessitent un **contrôle qualité** avant administration au patient. Ils constituent des **échantillons précieux** car très coûteux.

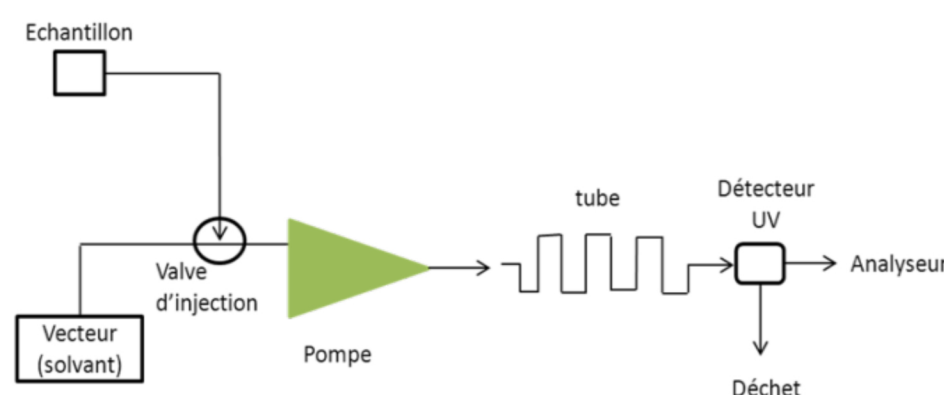
Actuellement, à l'HEGP, il n'existe pas de méthode analytique destinée au contrôle qualité des Ac après reconstitution. C'est pourquoi nous avons développé une **méthode originale** adaptée à la production en **flux tendu**, fondée sur l'**analyse par injection en flux continu** couplée à un **détecteur à barrette de diodes**, permettant d'effectuer un dosage **rapide** du bevacizumab, et avec un **faible volume d'injection**.

Matériels & Méthodes:

HPLC Prostar Varian®;
Diluteur Hamilton Microlab 615;
Bevacizumab (Avastin®) 25 mg/mL.

- FIA:
Vinj 2 à 25 µL
Débit 0,5 - 1,0 mL/min
Liquide vecteur : eau milliQ - NaCl 0,9%

- Détecteur à barrette de diodes:
Page 190-400 nm
Calcul ASC à 280 nm (mUA.min)- Absorbance maximale au pic (mUA)



- Bevacizumab dans NaCl 0,9%, préparation des échantillons au **diluteur**:
Points de **gamme étalon**: 1,67 - 2,50 - 7,50 - 12, 50 - 17,50 mg/mL
Points de **contrôle** : 1,875 - 8,75 - 16,25 mg/mL

- Critère d'évaluation de la **gamme d'étalonnage**:
ASC = f (C)
Erreur relative < 7,5 %

- Validation (ICH Q2 R1), 3 niveaux de CQ tripliqués (=9 résultats/gamme)
Linéarité
Justesse
Précision intra et inter-jour (3j)

Optimisation des conditions analytiques: Validation des conditions opératoires - Appréciation de la répétabilité

Plan d'expériences:

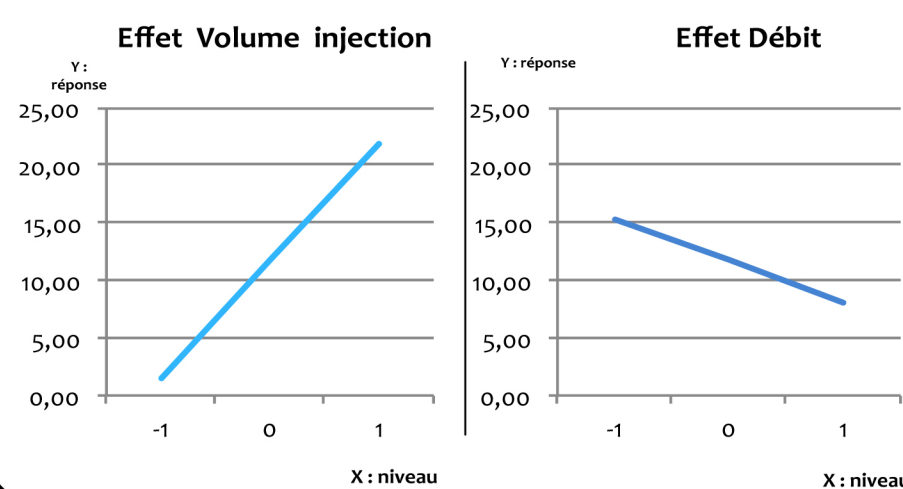
Bevacizumab 0,5 mg/mL
Exp 1 : 2 µL / 0,5 mL/min
Exp 2 : 25 µL / 0,5 mL/min
Exp 3 : 2 µL / 1 mL/min
Exp 4 : 25 µL / 1 mL/min

Erreur expérimentale calculée ± 0,70 mUA.min
Effet de A = 10,21 mUA.min
Effet de B = -3,68 mUA.min

	A = V inj (µL)	B = Débit (mL/min)
Niveau -	2	0,5
Niveau +	25	1

Calcul des effets de l'interaction

A\B	-	+
-	Ymoy : 1,88 Effet Inter : -3,30	Ymoy : 1,11 Effet Inter : 3,30
+	Ymoy : 28,90 Effet Inter : 3,30	Ymoy : 14,94 Effet Inter : -3,30

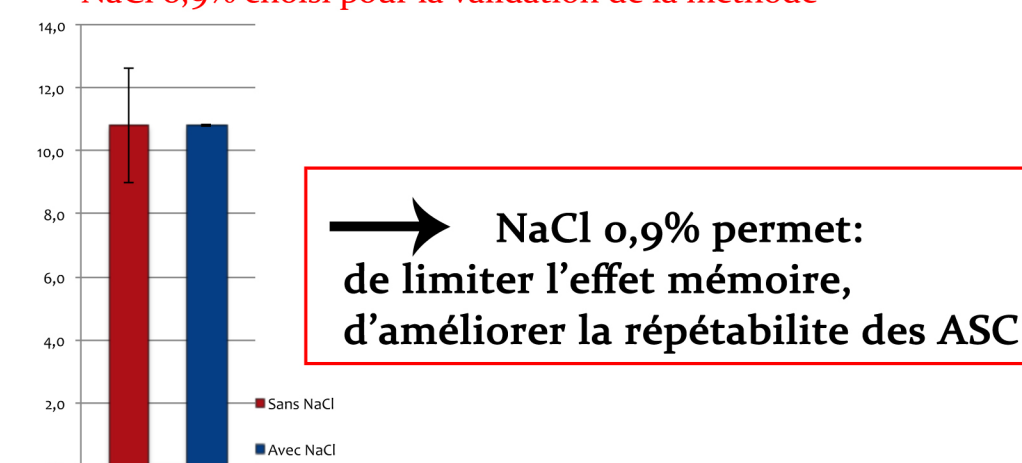


→ **Volume d'injection: paramètre le plus influent pour ces conditions**

Choix du liquide vecteur:

- Eau comme vecteur
Bevacizumab 0,5 mg/mL
Volume d'injection de 5 µL, Débit de 1,0 mL/min
CV% de l'ASC (n = 3) > 6,5%
Effet mémoire aux fortes concentrations (nécessitant 3 inj NaCl 0,9%)
Non envisageable en flux tendu

- NaCl 0,9% comme vecteur, conditions identiques
CV% de l'ASC (n = 3) à 0,2%
Affranchissement de l'effet mémoire
NaCl 0,9% choisi pour la validation de la méthode

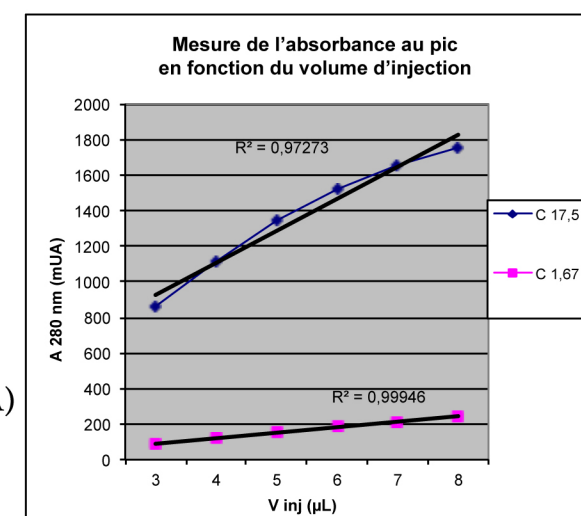


→ **NaCl 0,9% permet: de limiter l'effet mémoire, d'améliorer la répétabilité des ASC**

Optimisation du volume d'injection:

- Débit 1,0 mL/min
Vecteur = NaCl 0,9%
Variation du volume d'injection de 3 à 8 µL
Mesure de l'absorbance au pic.

- Bevacizumab 1,67 mg/mL
Linéarité A₂₈₀ = f(Vinj)
- Bevacizumab 17,5 mg/mL
Augmentation **non linéaire** de l'absorbance
Pas de saturation à Vinj ≤ 5 µL (Abs < 1400 mUA)

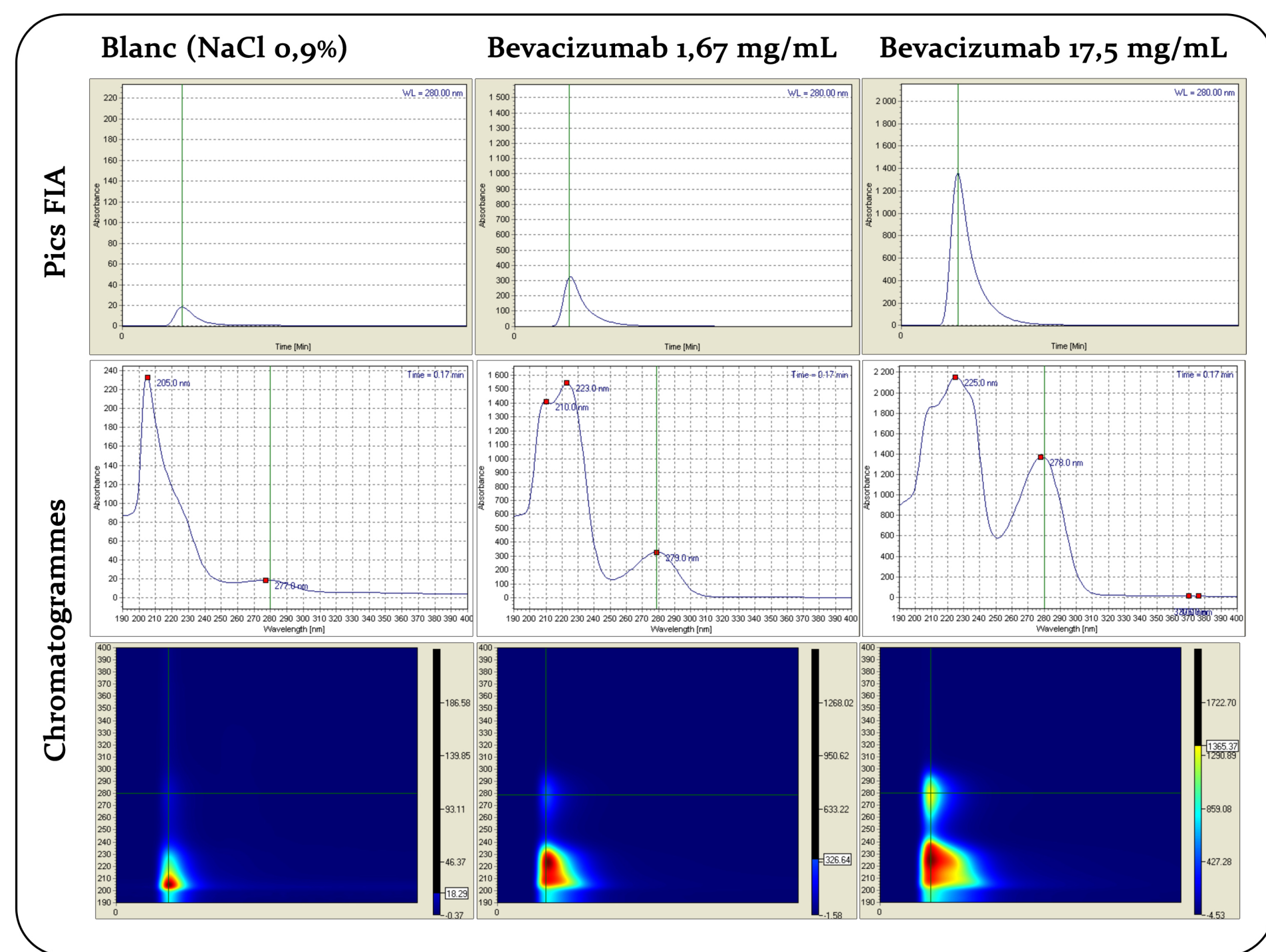


→ **Volume d'injection optimal: 5 µL**
Absence de saturation
Variabilité du signal acceptable (CV ASC < 1,0%)

Validation :

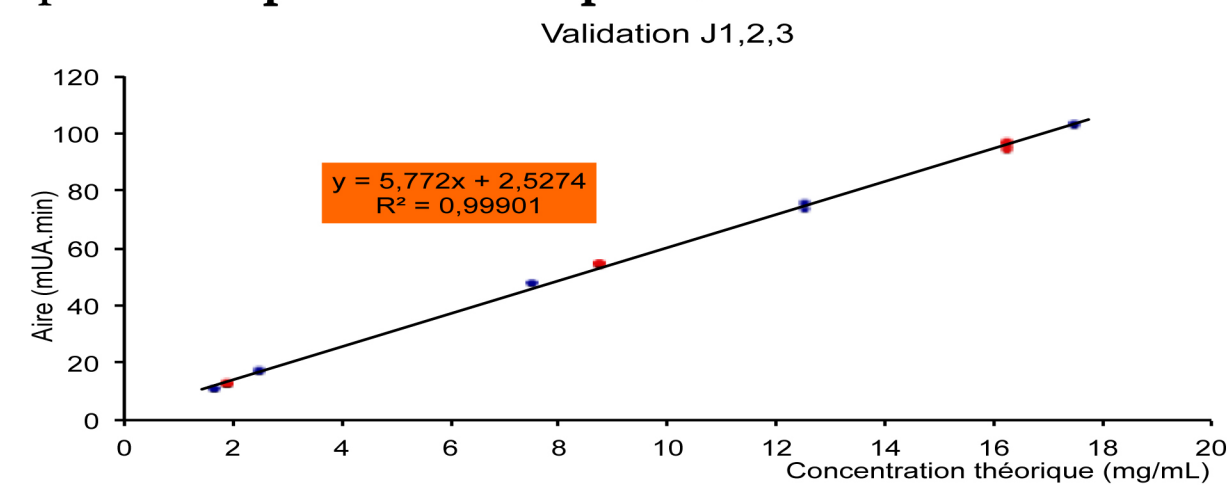
- Chromatogrammes et pics:

Obtention d'un signal analytique en 10 secondes

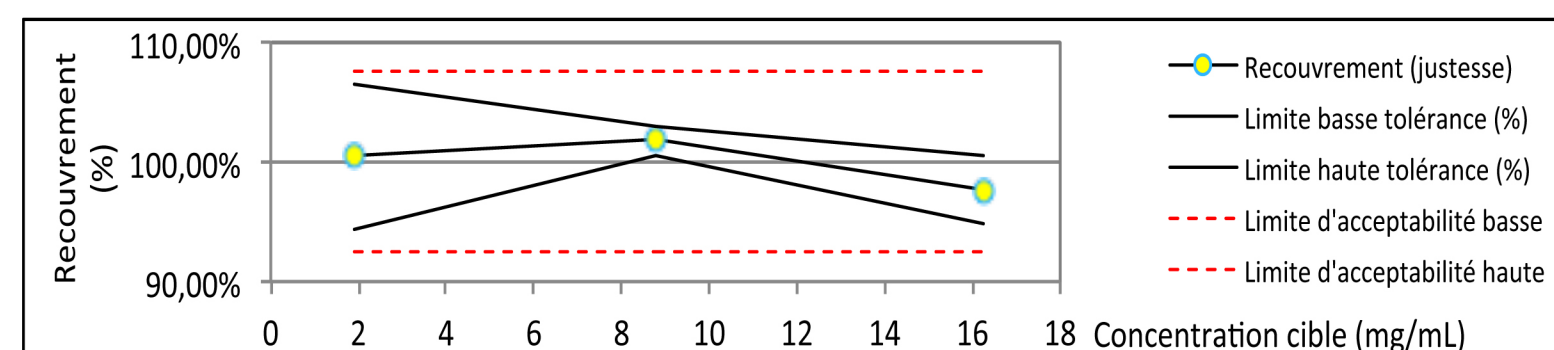


- Gamme moyenne des 3 jours:

Répétabilités avant/après chaque gamme < 1,0%;
Coefficients de **corrélation corrects** des **régressions linéaires**;
Valide pour une **pondération par 1/x²** des résidus



- Recouvrement des contrôles:



- Précision inter-jours: CQ1: 2,51% (CV%) CQ2: 0,51% CQ3: 1,17%

- Intervalle de confiance des contrôles:

	Moyenne	Ecart-type	t student (8ddl; 0,01; bilatéral)	IdC moyen
CQ1	1,884	0,042		1,884±0,050
CQ2	8,906	0,041	3,3554	8,906±0,048
CQ3	15,875	0,165		15,875±0,165

Discussion - Conclusion :

- Validation selon les critères ICH, méthode **quantitative** adaptée à une activité en **flux tendu** car **rapidité** d'analyse (< 1 minute);
- NaCl 0,9% permet un **affranchissement** du phénomène d'**adsorption** liée à la structure 2ndaire des **anticorps** (riche en **feuilletés β**), et l'amélioration de la répétabilité;
- **Faible volume d'injection** (µL), permettant un **contrôle qualité** quotidien;
- Méthodologie **adaptable** aux autres anticorps;
- Recherche de pistes d'identification.