



TD2014EPO

Résumé des principales modifications

Le Document technique sur l'harmonisation de l'analyse et des rapports des érythropoïétines recombinantes et analogues par des techniques d'électrophorèse a fait l'objet d'une révision de la part du Groupe de travail EPO de l'AMA. Le document modifié, TD2014EPO, rebaptisé « Harmonisation de l'analyse et des rapports des agents stimulants de l'érythropoïèse (ASE) par des techniques d'électrophorèse », a été mis à jour afin de refléter les récents progrès effectués dans la détection des ASE, y compris les érythropoïétines recombinantes et leurs analogues.

1.0 Introduction

- Le nom du produit Omontys[®], d'Affymax Inc., a été changé et est passé du terme hématide à son nom international non protégé de péginésatide.
- L'Aranesp[®] a été identifié comme un exemple de darbépoétine- α selon la définition du NESP, puisqu'il existe d'autres analogues de la darbépoétine- α , tels que Cresp.

2.0 Analyse

2.1 Méthodes d'électrophorèse

2.1.1 Procédure d'analyse initiale

- Les mêmes méthodes sont appliquées pour la détection des ASE dans l'urine et dans le sang.
- Une différenciation a été établie pour l'analyse par électrophorèse des ASE présentant une structure chimique liée à l'EPO (par ex. rEPO, NESP, CERA, EPO-Fc) et du péginésatide, un peptide pégylé ne présentant pas de relation structurelle avec l'EPO. Pour les premiers, il convient d'appliquer les méthodes IEF et/ou SAR-PAGE, alors que pour le dernier, les laboratoires doivent appliquer la méthode SDS-PAGE ou SAR-PAGE.
- Pour la procédure d'analyse initiale des EPO recombinantes (rEPO), les laboratoires peuvent appliquer la méthode IEF ou la méthode SAR-PAGE, ou une combinaison des deux (à la libre appréciation du laboratoire).
- Il a été clarifié que le laboratoire doit démontrer que la méthodologie d'enrichissement en EPO utilisée avant l'application de méthodes d'électrophorèse ne modifie pas les profils d'isoformes IEF ni le comportement SDS/SAR-PAGE de l'EPO endogène et des ASE analysés.

2.1.2 Procédure de confirmation

- Les mêmes méthodes s'appliquent à la détection des ASE dans l'urine et dans le sang.
- Des sous-paragraphes spécifiques ont été inclus pour préciser les méthodes de confirmation pour différents ASE (rEPOs, NESP, CERA, EPO-Fc et péginésatide). Dans chaque cas, il est précisé que des méthodes spécifiques (par ex. IEF ou SAR-PAGE) peuvent être appliquées à la fois pour la procédure d'analyse initiale et pour la procédure de confirmation. Cette règle est conforme à la disposition 5.2.4.3.1.3 du SIL pour l'application de deux essais différents de liaison par affinité, parce que la spécificité de la substance détectée est garantie par l'application de méthodes d'électrophorèse qui reposent sur la détection des ASE par le biais de deux principes différents : i) le comportement électrophorétique des substances (point isoélectrique pour IEF, masse moléculaire différente pour SDS-/SAR-PAGE) et ii) la liaison ciblée de l'ASE avec des anticorps spécifiques (immunoblotting). En outre, tous les échantillons soumis à des analyses de confirmation doivent être immunopurifiés avant la confirmation à l'aide d'anticorps différents de ceux utilisés pour l'immunoblotting.
- Il a été établi que pour la confirmation de la rEPO, les laboratoires ne doivent plus appliquer la méthode IEF. La présence de rEPO doit être confirmée par SDS-PAGE ou SAR-PAGE, qui permettent une fenêtre temporelle de détection de l'administration de rEPO plus longue. En outre, avec l'application de SDS-PAGE ou de SAR-PAGE, le test de stabilité n'est plus nécessaire pour l'identification des urines « actives », parce que dans ces urines, la bande d'EPO se déplace jusqu'à la plage de masse moléculaire de l'EPO endogène, voire au-dessous, ce qui aboutit à un échantillon « négatif » pour la rEPO.
- En raison de sa plus faible sensibilité, l'application de la méthode SDS-PAGE n'est pas recommandée pour la confirmation de CERA (on doit utiliser à la place IEF ou SAR-PAGE).

2.2 Autres méthodologies (non électrophorétiques)

- L'application de méthodes de détection propres à chaque substance au cours de la procédure d'analyse initiale n'est autorisée que pour l'analyse des ASE présentant une structure sans rapport avec l'EPO (par ex. péginésatide). Pour tous les autres ASE, les méthodes d'électrophorèse indiquées dans le Tableau 1 doivent être appliquées. Ainsi, par exemple, le dépistage spécifique de CERA à l'aide d'ELISA ne sera plus appliqué (puisque CERA pourrait être détecté, par exemple, avec SAR-PAGE, qui est une méthode spécifique et plus sensible qui permet la détection d'autres ASE lorsque ceux-ci sont présents dans l'échantillon).
- Pour les procédures de confirmation, des méthodes de détection propres à chaque substance peuvent être appliquées à la libre appréciation du laboratoire à titre de preuves scientifiques supplémentaires, en plus de celles fournies par les méthodes d'électrophorèse.
- De même, lorsqu'une méthode de spectrométrie de masse est disponible, aucune deuxième méthode indépendante n'est requise pour la procédure de confirmation (par ex. LC-MS pour la détection du péginésatide).

3.0 Description des méthodes

- Les méthodes IEF et SDS-/SAR-PAGE sont décrites dans 4 sous-sections, portant sur : i) la préparation de l'échantillon, ii) la séparation électrophorétique, iii) l'immunoblotting et iv) la détection.
- Pour la préparation de l'échantillon, il est spécifié que l'immunopurification de l'échantillon est requise avant d'utiliser la méthode d'électrophorèse lors des analyses de confirmation.
- Pour l'immunoblotting, il est spécifié qu'une procédure double-blotting est obligatoire après séparation IEF des échantillons d'urine ou de sérum/plasma ainsi que pour la confirmation des échantillons de sérum/plasma par SDS-PAGE ou SAR-PAGE. Pour l'analyse des échantillons d'urine par SDS-PAGE ou SAR-PAGE, il est possible d'appliquer le single-blotting ou le double-blotting. En outre, les anticorps anti-EPO humains présentant des caractéristiques de spécificité et de sensibilité similaires à ceux du clone AE7A5 principalement recommandé peuvent désormais être utilisés pour l'immunoblotting. Pour le pégénésatide, l'anticorps doit cibler la partie peptidique de la substance.

4.0 Évaluation et interprétation des résultats

Les critères d'acceptation et d'identification applicables aux procédures de confirmation lors de l'utilisation de techniques d'électrophorèse sont définis.

Puisque désormais seule une méthode (à savoir IEF ou SDS-PAGE ou SAR-PAGE, le cas échéant) est établie pour les procédures de confirmation des ASE, la référence à la co-application de deux méthodes de confirmation différentes ou au rapport de l'échantillon comme un *résultat atypique* (ce qui était applicable lorsque plus d'une méthode était employée et que les critères d'acceptation de la méthode n'étaient satisfaits que pour l'une d'elles) a été supprimée.

Méthode IEF :

- Il n'existe plus de critères d'identification pour la confirmation des rEPO puisque cette méthode ne doit plus être employée à cette fin. Cependant, des critères sont indiqués à titre de recommandation pour l'évaluation des résultats de la procédure d'analyse initiale, moyennant des modifications mineures par rapport à l'ancien TD2013EPO.
- Le deuxième critère pour NESP a été modifié et est désormais : « au moins une bande dans la « zone acide » doit être plus intense que la dernière bande de la zone endogène » (au lieu des deux bandes les plus intenses qui devaient être dans la zone acide), afin de tenir compte du schéma IEF légèrement différent d'autres préparations de darbépoétine- α .

Méthodes SDS-PAGE et SAR-PAGE :

- Le troisième critère du TD2013EAAS (2 bandes ou plus) a été transformé dans le paragraphe « 4.2.2.1. bande(s) unique(s) » en bandes uniques multiples.

5.0 Documentation et rapports

- Des notes de bas de page ont été incluses à titre d'explications afin de définir ce qu'il convient d'entendre par échantillons témoins et échantillons témoins positifs à utiliser dans les procédures de confirmation.
- Deux nouveaux membres du GT EPO ont été cités comme susceptibles de fournir un second avis :
 - Philipp Reihlen (Cologne)
 - Jean Francois Naud (Montréal)

6.0 Références

La liste des références a été mise à jour afin d'inclure des articles pertinents publiés récemment.