



Eurofins ADME BIOANALYSES

Introduction à l'immunogénicité

PROTEINOV 2016

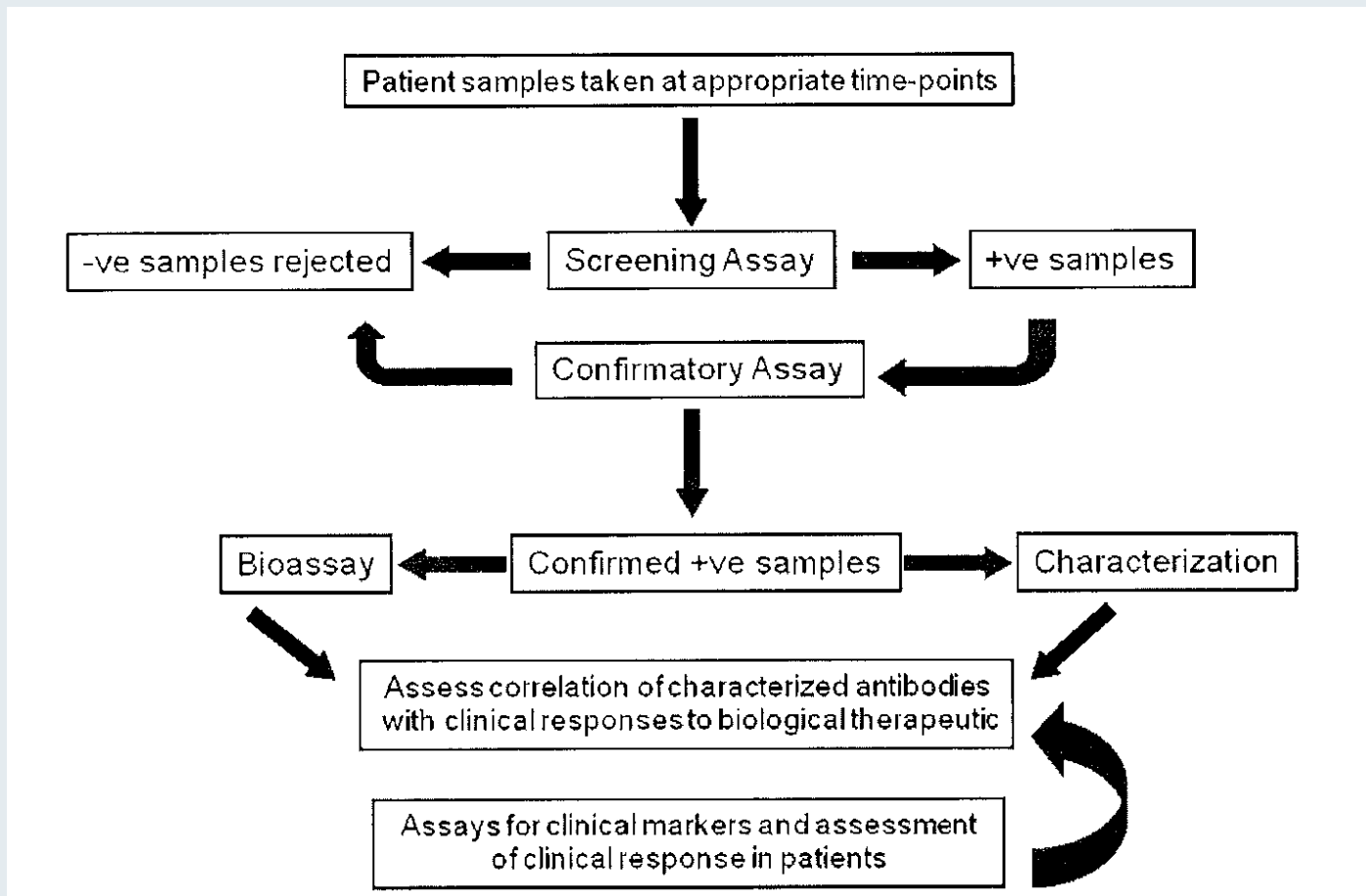
Jean Paul FRECHE

- Capacité d'induire la production d'anticorps
 - Réponse immunitaire spécifique
- La conséquence d'une réponse immunitaire va être la circulation d'anticorps.
- L'immunogénicité va être recherchée pour des approches de types vaccinales (AVA).
- Elle devra être évitée pour toutes autres approches (ADA).

- L'apparition d'ADA va dépendre :
 - De la taille et de la structure de la molécule
 - Les médicaments chimique ne provoque pas la production d'ADA (taille réduite)
 - Du mode d'administration
 - Du nombre d'administration
 - De la dose administrée
 - De la formulation
 - De la pureté de la molécule
 - Du patient (facteurs génétiques, âge, pathologie)
 - De ses traitements associés (immunosuppresseur)
 - Précédente exposition à une protéine relativement similaire

- La recherche d'ADA devra être faite dans les études précliniques et cliniques.
- Les résultats obtenus dans les études précliniques ne sera pas prédictif de la réponse chez l'homme.
- Des méthodes analytiques validées seront utilisées pour détecter les immunoglobulines de façon spécifique, elles devront être sensibles, précises et reproductibles.
 - Détection \neq Quantification

- Stratégie décrite dans le texte EMEA/CHMP/BMWP/14327/2006

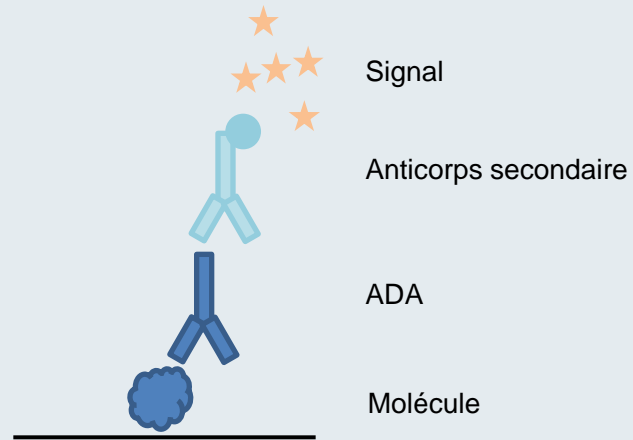


- **Dosage: Détection ≠ Quantification**

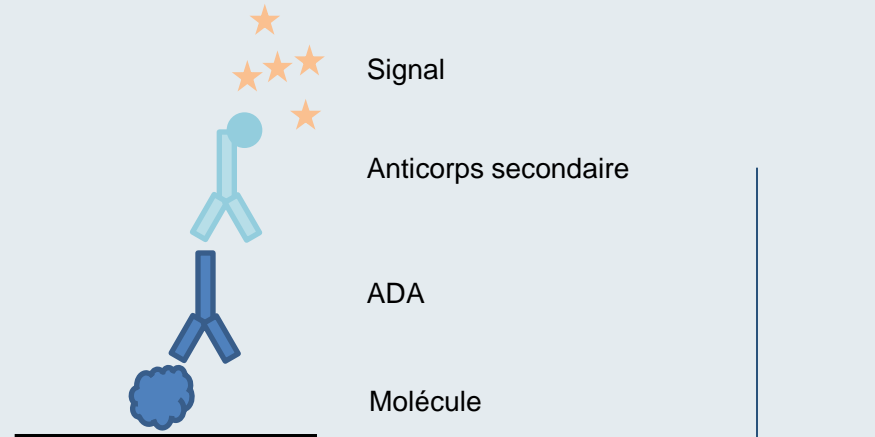
Cut point

- Niveau de réponse permettant de classer les échantillons en positif ou négatif
- Valeur du signal pour laquelle un échantillon ayant une réponse inférieure sera considéré comme négatif.
- Screening cut point (SCP) & Confirmatory cut point (CCP)

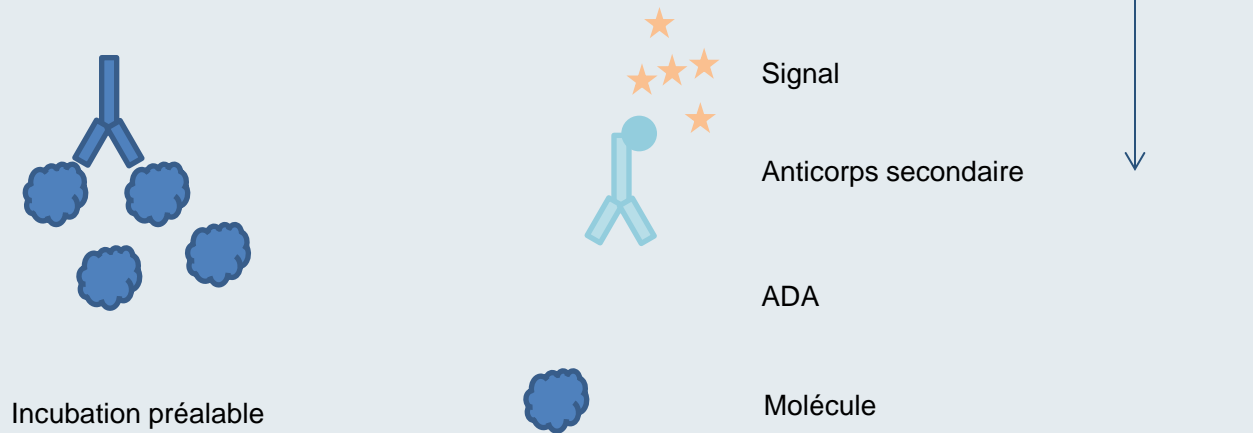
- **Méthode directe**



- **Screening cut point (SCP) :**



- **Confirmatory cut point (CCP) :**

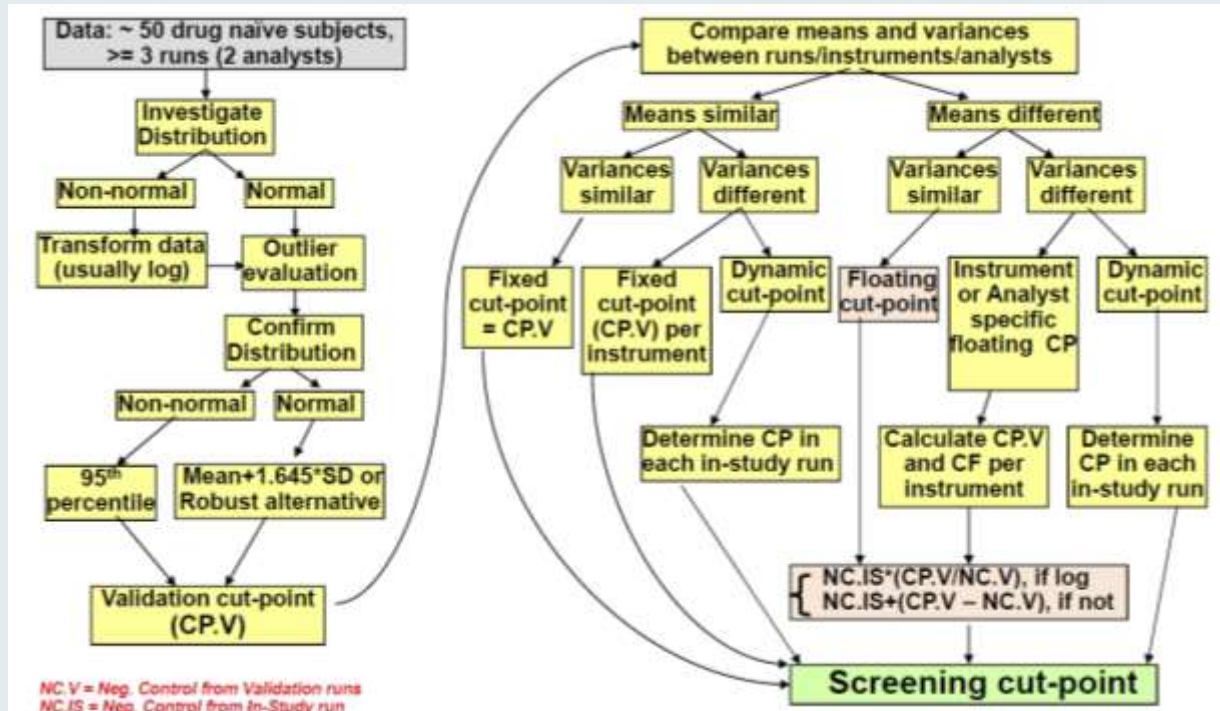


- Contrôle négatif
 - Clinique: Pool de matrice à partir de 10 sources individuelles
 - Non-clinique: Le pool peut être préparé à partir d'un nombre réduit de source individuelles (ex: 5).
- Contrôle positif
 - Doit refléter si possible la réponse immunitaire qui sera induite
 - Polyclonaux préférentiellement
 - Possibilité de production par immunisation d'animaux
 - A savoir: Les anticorps de singe croisent avec les anti anticorps humain

- SCP & CCP calculés sur une population d'échantillons négatifs
 - Clinique: Au moins 50 échantillons analysés sur 3 séries
 - Non-clinique: Au moins 15 échantillons analysés sur 3 séries

- Ils sont statistiquement calculés afin de détecter:
 - SCP : 5% de faux positifs
 - CCP : 0.1% de faux positifs

Détermination du cut point



Calcul du cut point pour une validation (clinique)

- Eliminer les valeurs aberrantes
- Montrer que la distribution est normale
- Si la distribution n'est pas normale transformé en log
- Faire le calcul du cut point avec la formule

$$\text{ODcut-point} = \text{mean ODB} + 1.645 \times \text{SDB}$$

Les différents cut points

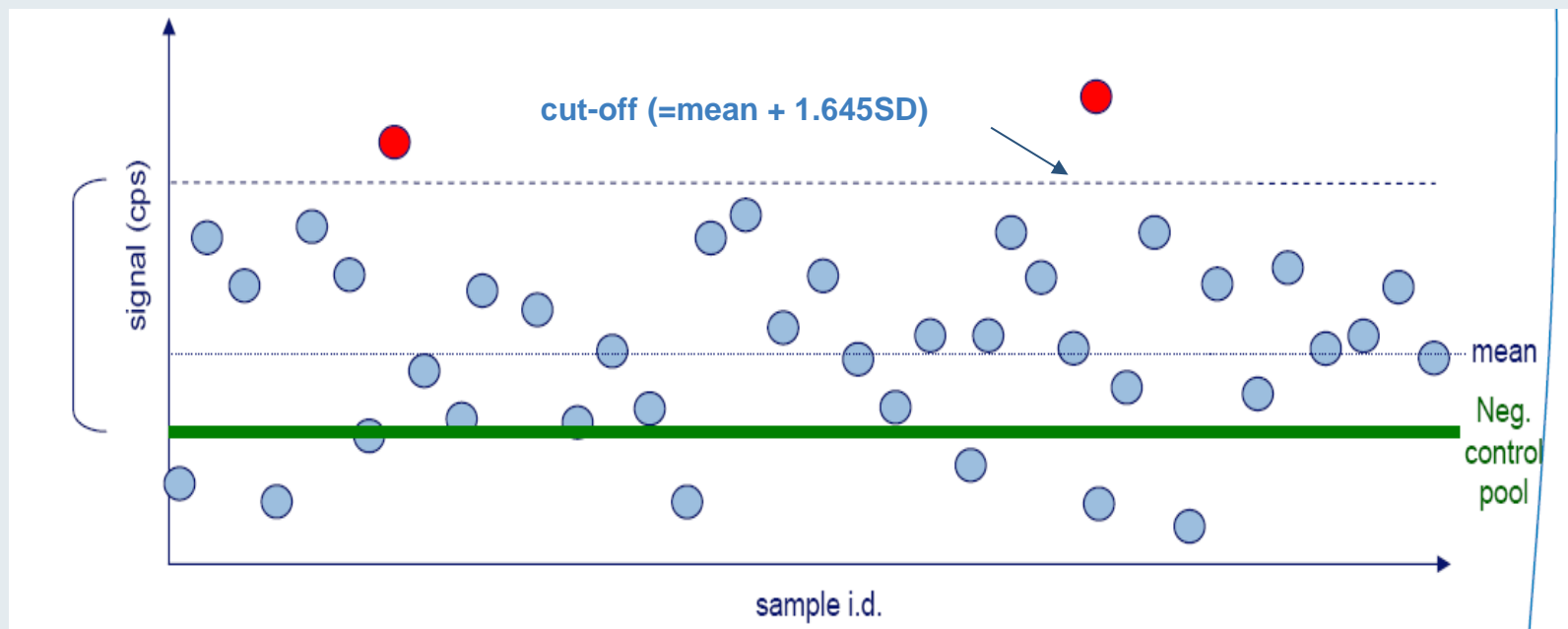
- **Fixed cut point** : il est calculé et fixé durant la validation. Il sera appliqué lors des études de détermination des ADA
- **Floating cut point** : il sera recalculer pour chaque étude en utilisant le facteur de normalisation
- **Dynamic cut point** : il est recalculé pour chaque plaque (à éviter, revenir éventuellement en développement du test).

Calcul du facteur de normalisation

Facteur de normalisation (NF) = OD cut point/OD contrôles négatifs

OD contrôles négatifs sera la moyenne des signaux obtenus avec un pool d'échantillon négatifs (contrôle négatif) mesuré.

Calcul du facteur de normalisation



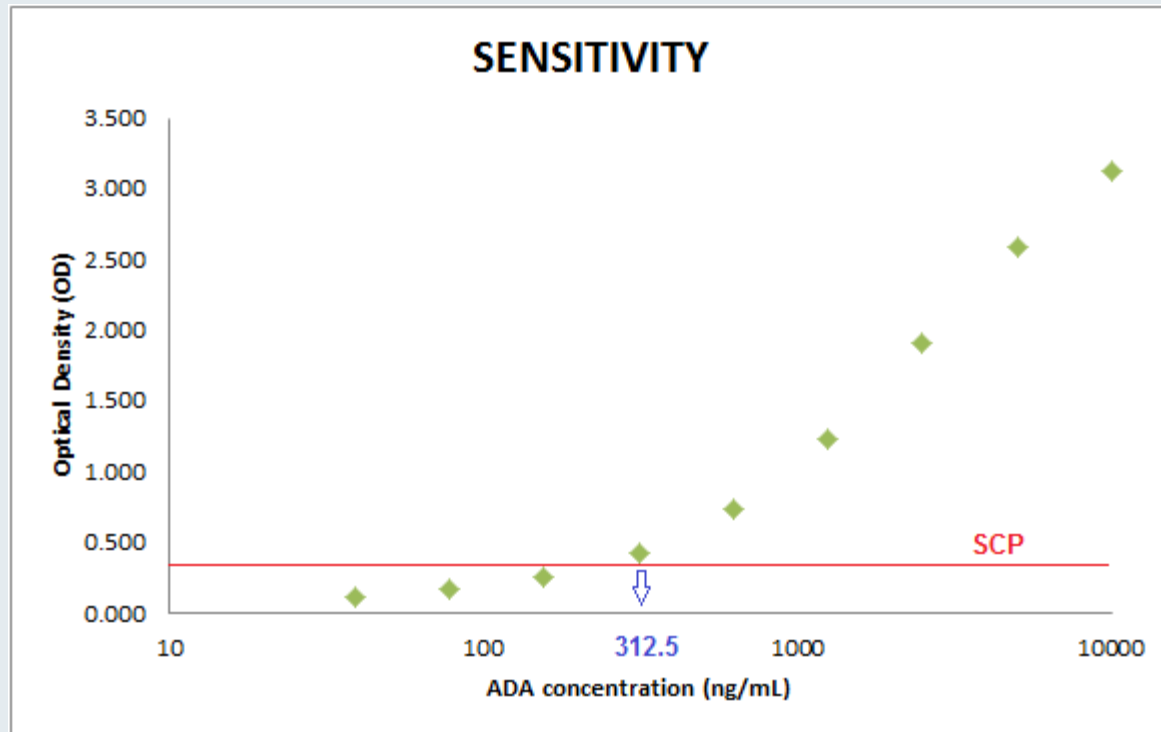
Calcul du % d'inhibition

% d'inhibition = 100 (1 – (signal avec surcharge/signal sans surcharge))

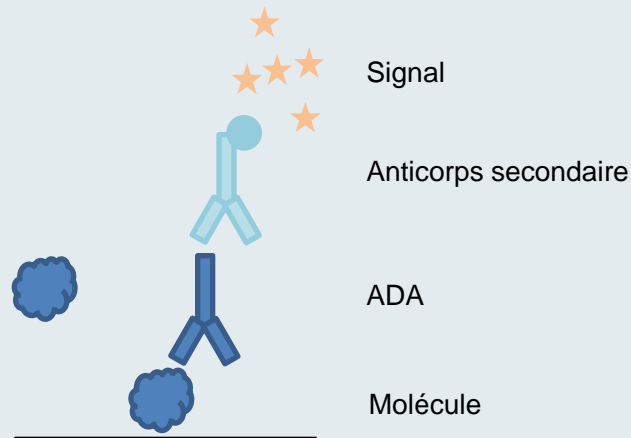
Un cut point de confirmation sera calculé avec les contrôles négatifs pour les études cliniques

- Validation analytique
 - SCP & CCP
 - Précision intra et inter essais
 - **Sensibilité**
 - Sélectivité
 - **Tolérance**
 - Effet prozone
 - Stabilité (*Short term, Freeze/thaw cycle, long term*)

- Paramètres de validation
 - Sensibilité
 - Limite de détection

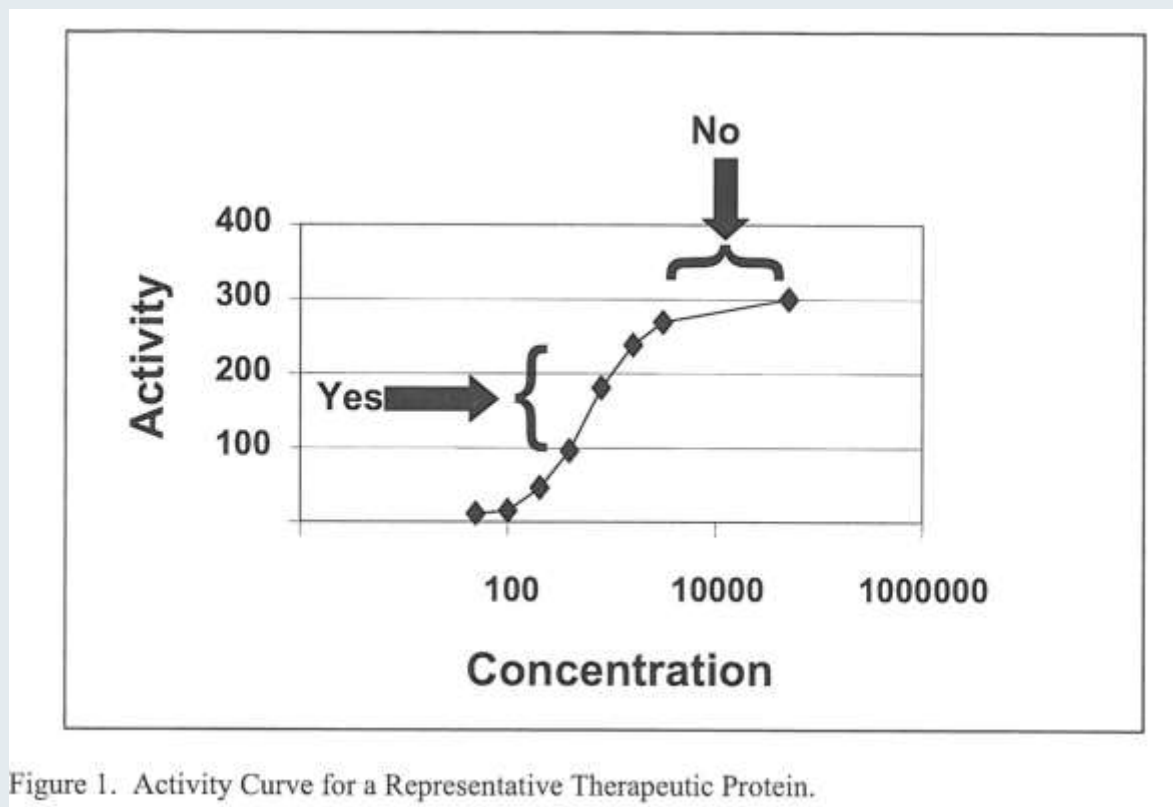


- Paramètres de validation
 - Tolérance
 - Détection de l'ADA en présence de la *Molécule*



- **Bioassay = Test de neutralisation**
- Réalisé sur des cellules
- Le test de neutralisation permettra de connaître le pouvoir neutralisant des ADA.
- Est-ce que les ADA empêchent l'activité du produit?

- La draft de la FDA préconise d'établir une courbe d'activité et de travailler dans une partie représentative.

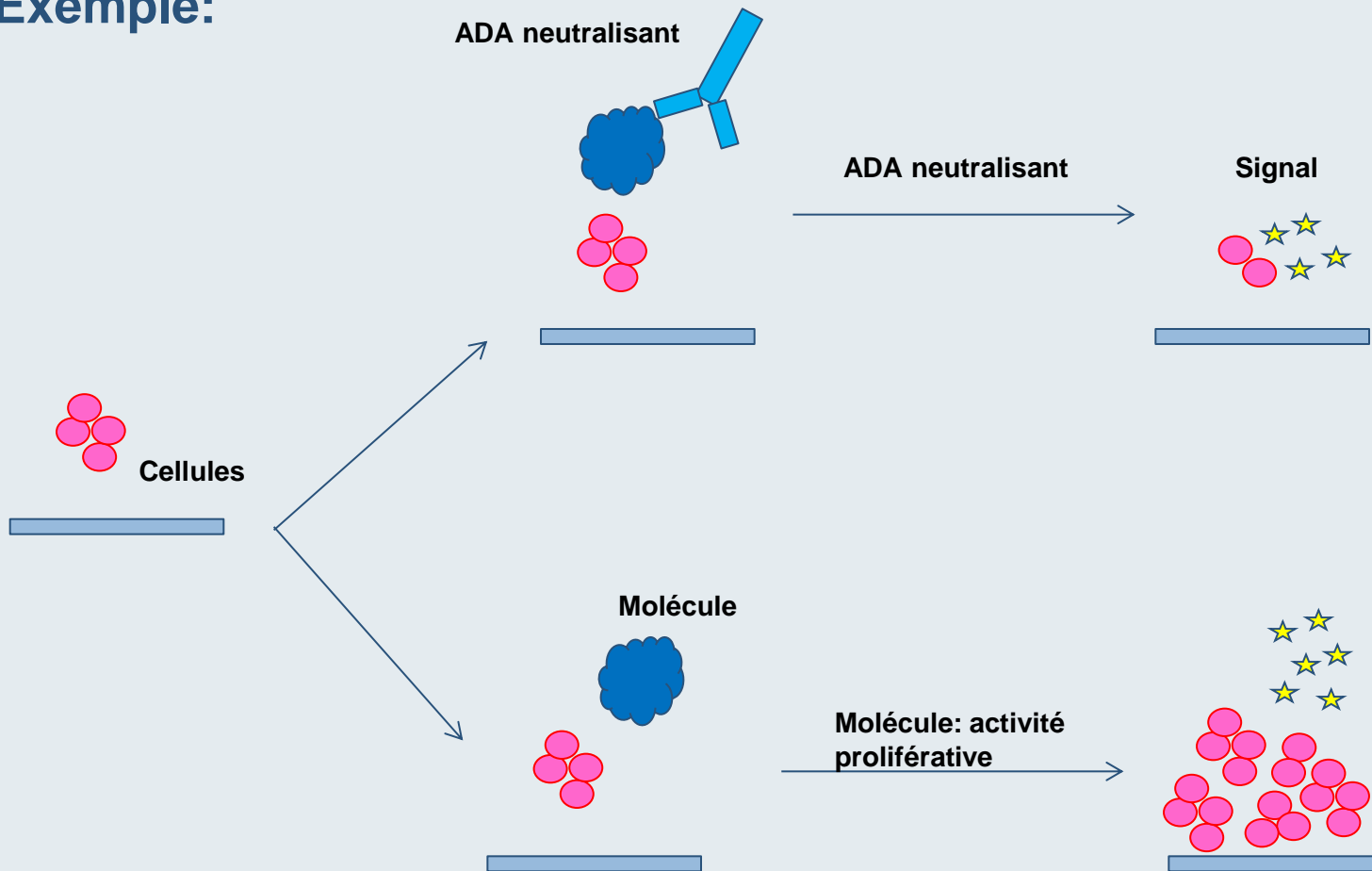


- Dosage: Détection \neq Quantification
- Résultats rendu concernant la présence d'ADA neutralisants:
 - Oui
 - Non
- Si présence d'interférences dans les pre-dose des patients le T0 du patient servira de référence pour les prélèvements T + x jours.

- Validation analytique
 - SCP & CCP
 - Précision intra et inter essais
 - Sensibilité
 - Sélectivité

- Utilisation de lignée cellulaire stable
 - Importance du nombre de passage, des lot de milieu de culture
 - Cellules immortalisées
 - Rigueur appliquée aux temps d'incubation
 - Minimisation des facteurs de variabilité

- Exemple:



- L'immunogénicité doit être évaluée:
 - chez l'homme
 - chez l'animal
- Avec des méthodes validées
- Elle peut impacter:
 - La pharmacocinétique,
 - La pharmacodynamie,
 - Choc anaphylactique,
 - Réaction sur une protéine endogène.
 - **La vie du produit!!!**