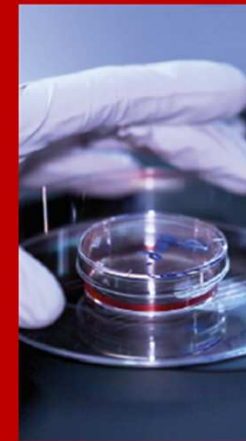




MESURE DE L'ACTIVITÉ ANTICOMPLÉMENTAIRE (AAC) DES IGIVs :



UNE MÉTHODE BIOLOGIQUE PERTINENTE POUR LE SUIVI DE STABILITÉ (DES IGIVs)



G.Perret
perretg@lfb.fr

Responsable du Laboratoire de Caractérisation Biomoléculaire (LFB Biotechnologie -Développement Pharmaceutique)
Responsable de la Plateforme Bioprocédés Innovants (LFB Biotechnologie -Innovation et Affaires Scientifiques)

LFB
L'ENGAGEMENT ÉTHIQUE

CONTEXTE ET PROBLÉMATIQUE

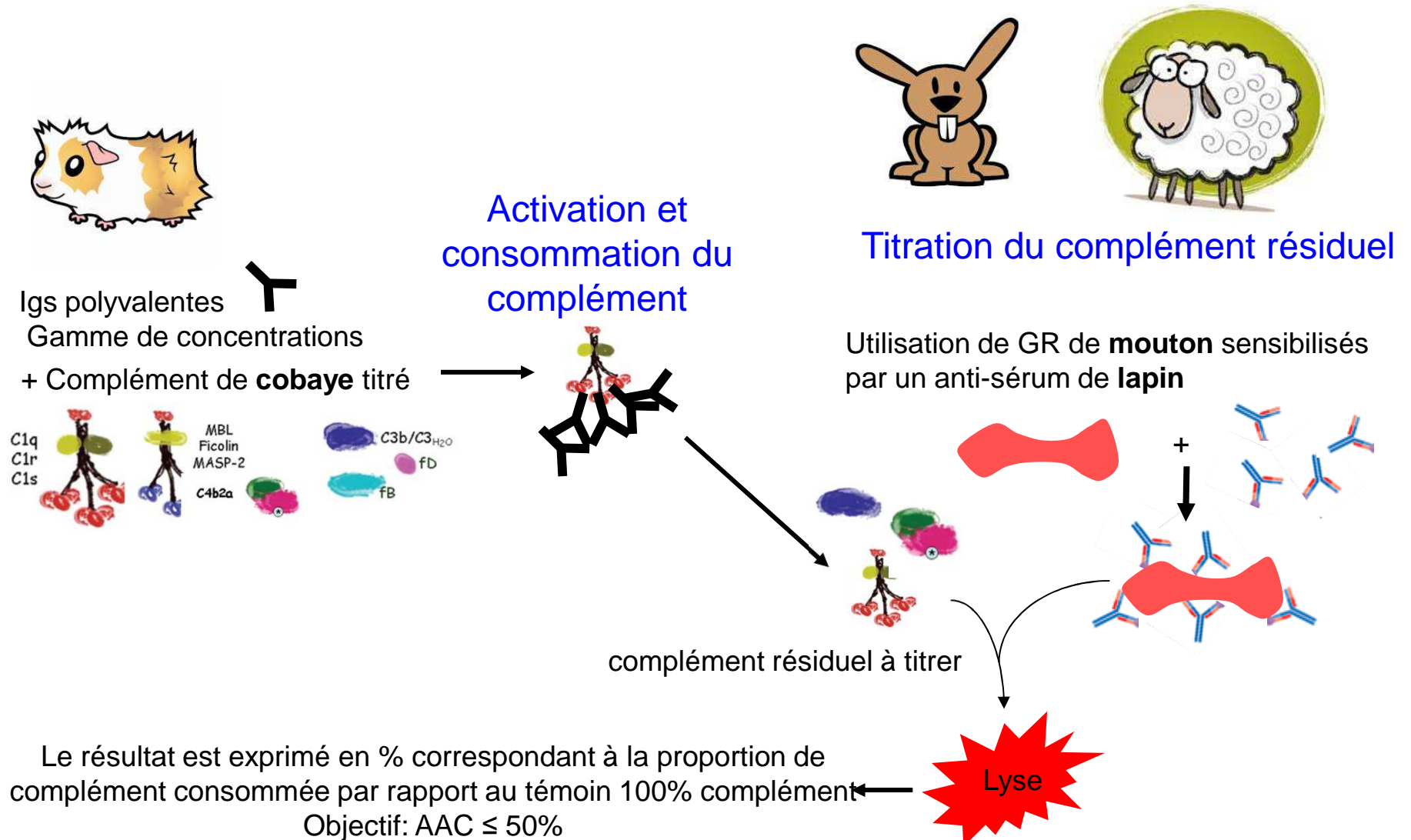
■ Le test de mesure de l'Activité AntiComplémentaire (AAC) est un requis de la pharmacopée européenne pour les Immunoglobulines IV depuis les années 60 (Barandun *et al.* 1962, Vox Sanguinis) et l'injection des Ig IM par voie IV.

■ Quel est l'utilité de ce test ?

Théoriquement ⇒ Identifier la présence de tous contaminants susceptibles d'activer le complément de façon inadaptée en dehors de ses objectifs anti-infectieux : en particuliers les agrégats et les IgM.

CONTEXTE ET PROBLÉMATIQUE

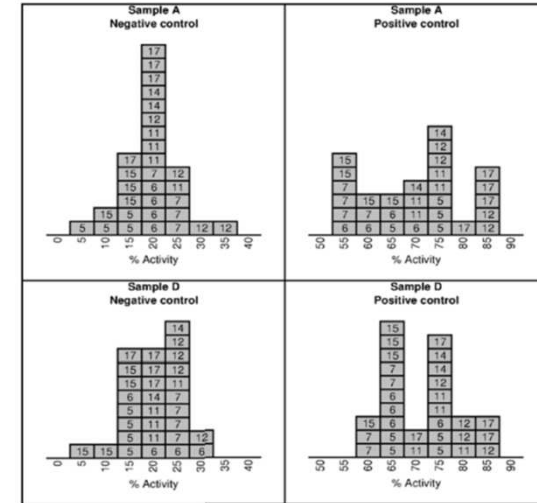
PRINCIPE DU TEST AAC SELON LA PE




CONTEXTE ET PROBLÉMATIQUE

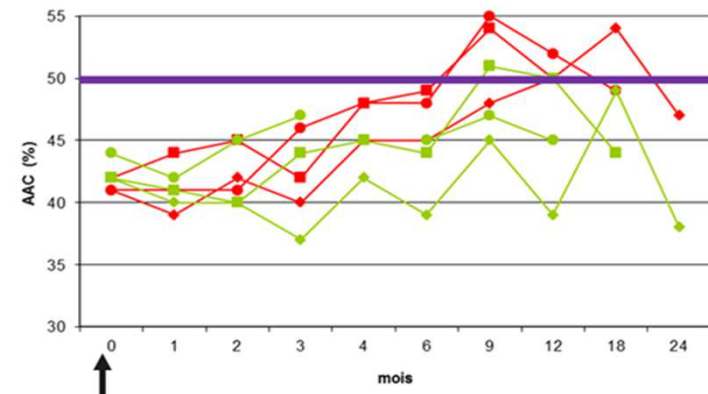
L'AAC : UN TEST LARGEMENT CRITIQUÉ

- Test qui n'existe que dans la PE
- Test complexe
- Peu robuste
- Protocole interprétable



Numbers in boxes represent the laboratory codes.

- Inadapté aux Ig liquides formulées à pH acide : biais pH avec « consommation artificielle » démontrée au LFB
- Biologiquement pertinent ? 
- Origine et rationnel du seuil 50% inconnu....
Et...dont le ou les biais peuvent conduire à des valeurs hors spécifications :



LA STRATÉGIE

La méthode AAC apparaissait plus comme un problème qu'un atout pour garantir la qualité du produit...

Stratégie proposée: Développer un test ou plusieurs tests alternatifs de mesure de l'AAC pour :

1. Appuyer la démonstration de stabilité du produit
2. Proposer des modifications sur la mise en œuvre de la méthode AAC-PE et les valider (fusion de deux étapes pour limiter la manipulation des Ig à pH neutre)
3. Vérifier l'intérêt de cette mesure

Et...obtenir un test plus fiable et plus facile de mesure de l'AAC pour remplacer la méthode PE

Approches alternatives de mesure de l'AAC

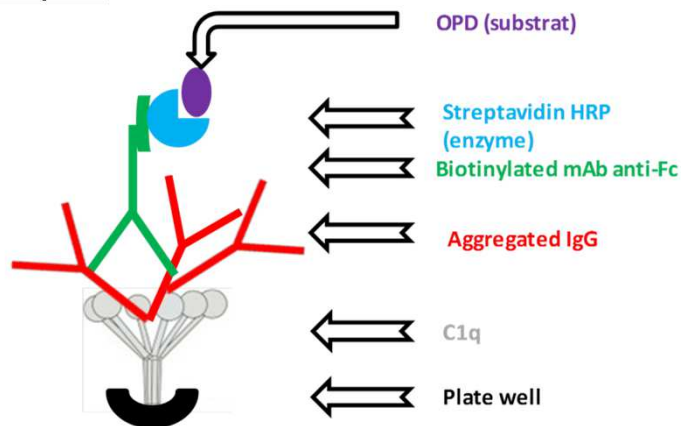
L'ELISA C1q



Principe : Mesurer la capacité des IgGs (dénaturées, agrégées, engagées dans un complexe immun) à fonctionnellement lier le C1q immobilisé sur une plaque.

Révélation des IgGs liées par un anti-Fc couplé peroxydase.

Etapes :



Libération du C5a



Principe : Mesurer l'activation du complément par la préparation IgG à tester dans du sérum humain.

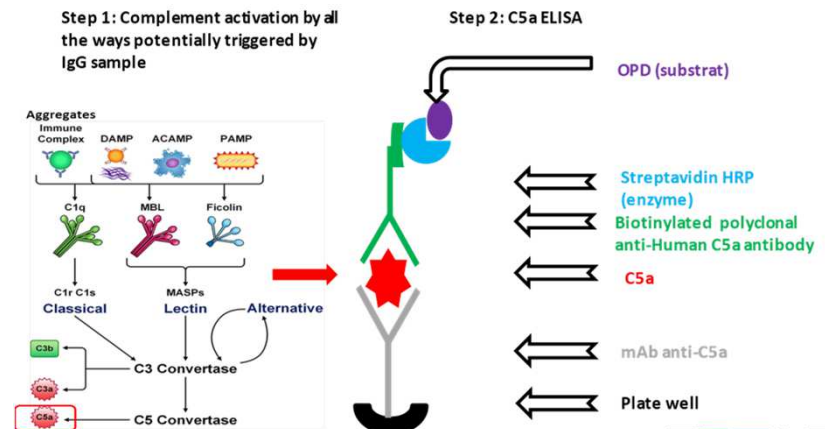
Dilution appropriée du sérum humain pour favoriser la sensibilité à l'activation.



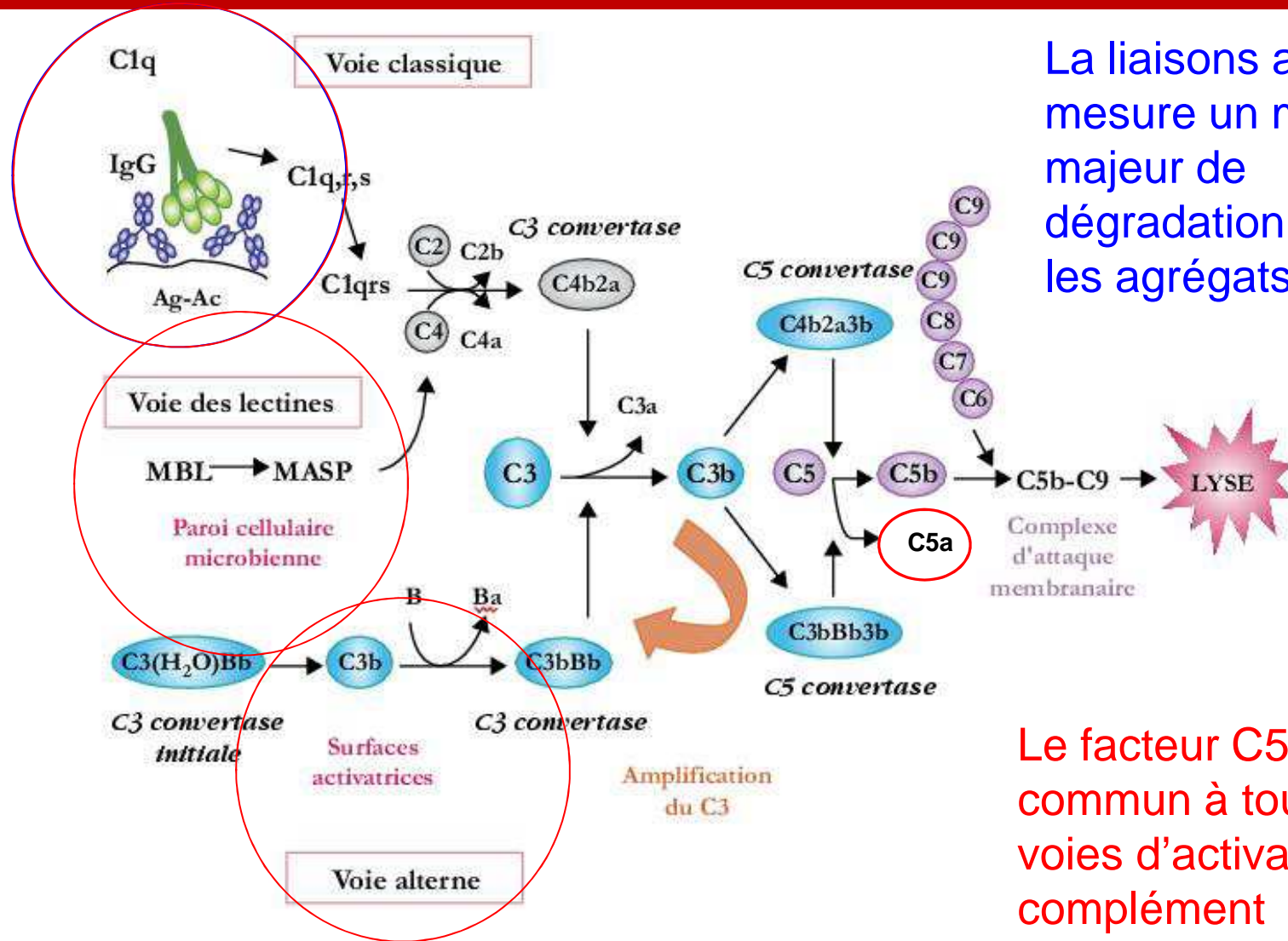
Test en 2 étapes :

- 1) Incubation dans le sérum
- 2) Dosage du C5a libéré par un ELISA

Etapes :



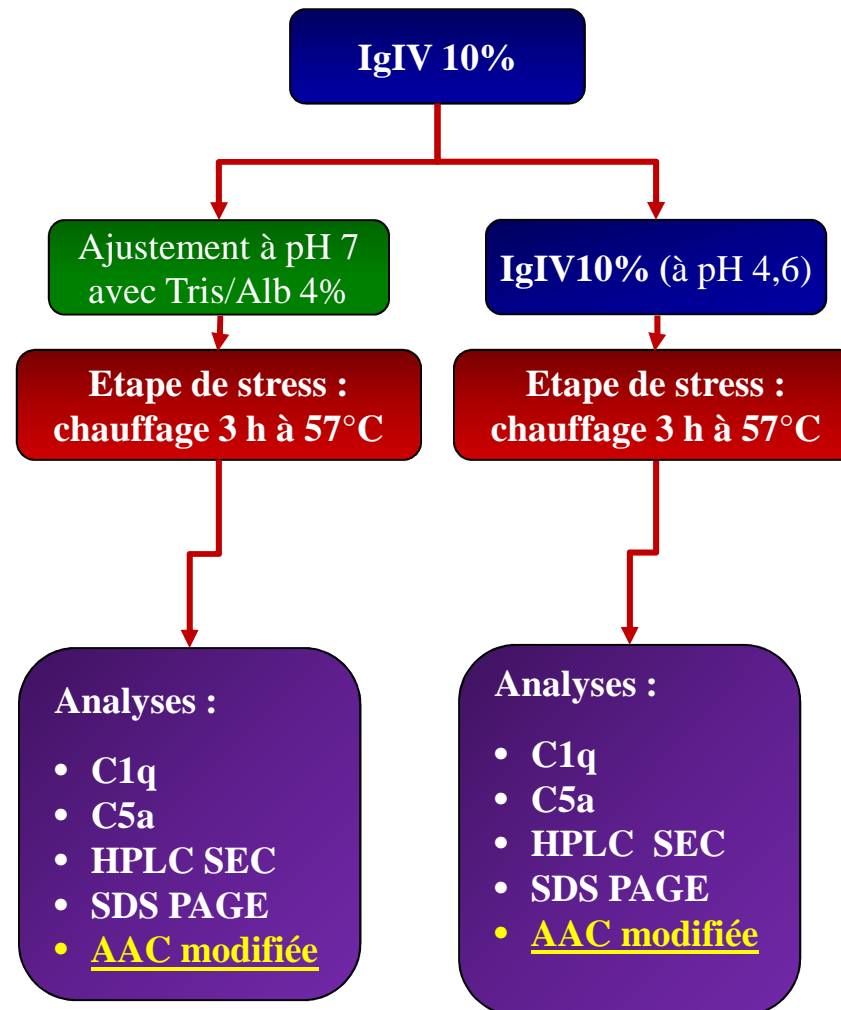
Voies d'activation du complément regardées en fonction des tests



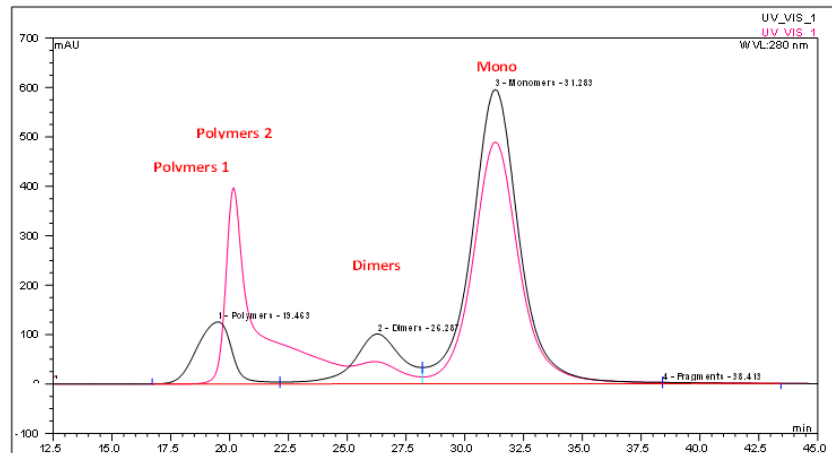
La liaisons au C1q mesure un marqueur majeur de dégradation des Ig : les agrégats

Le facteur C5a commun à toute les voies d'activation du complément

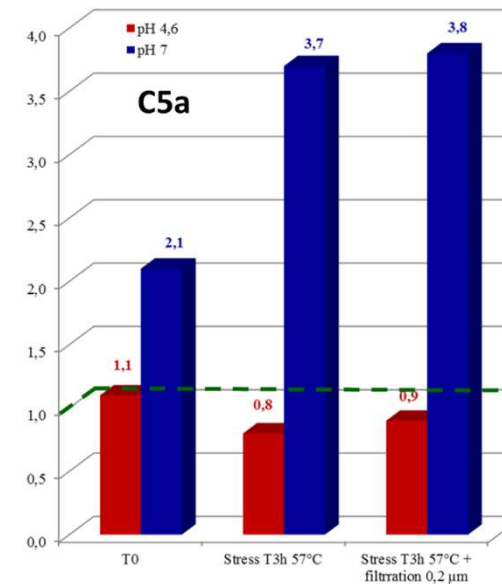
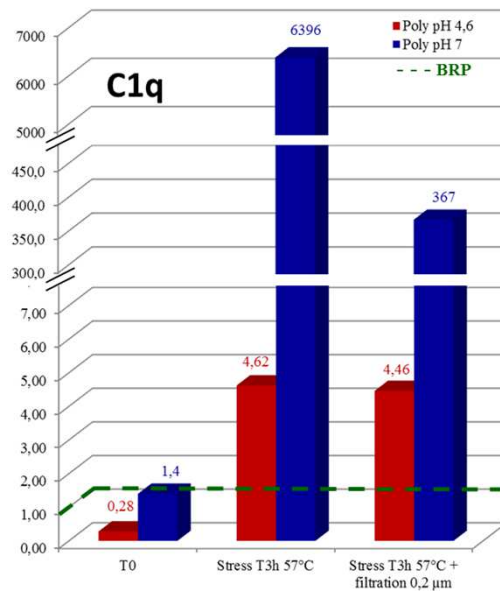
GÉNÉRATION D'ESPÈCES ACTIVATRICES



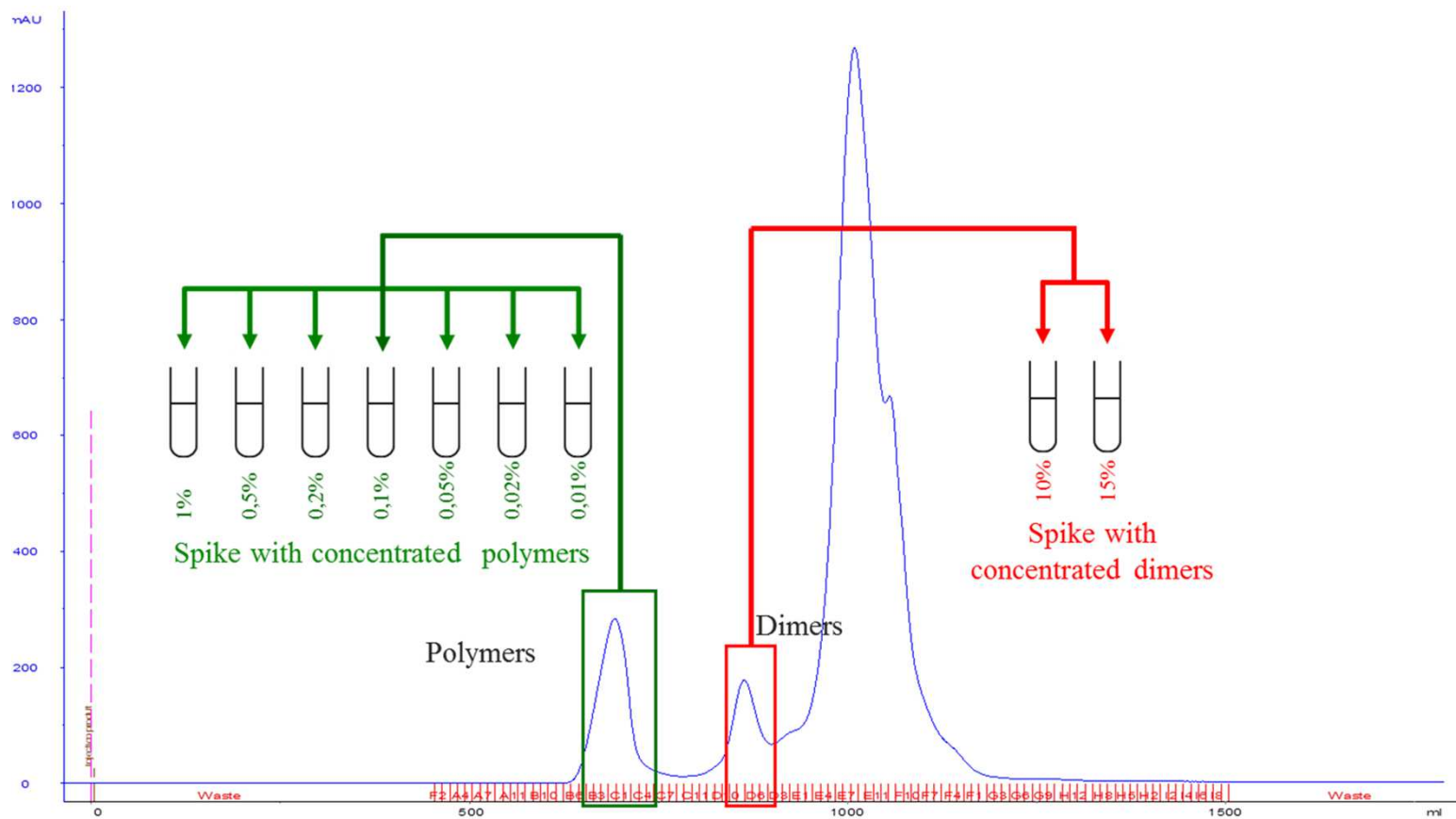
Identifications d'espèces polymériques différentes



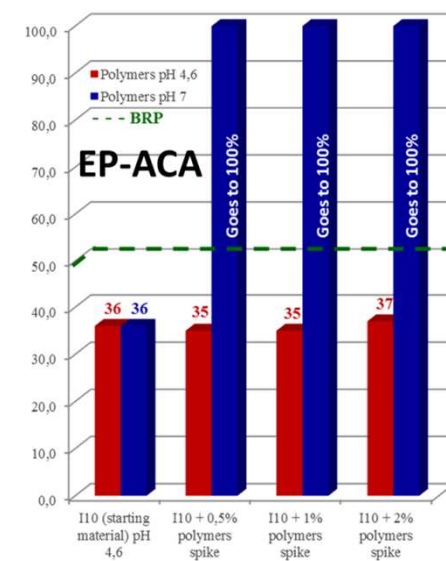
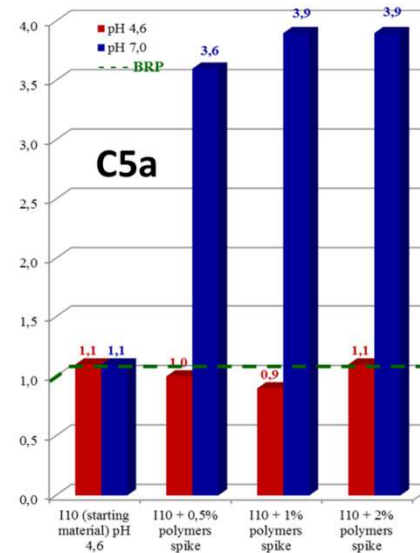
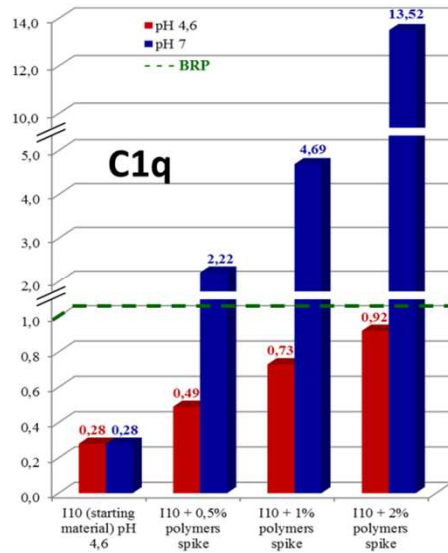
— pH = 4,6
— pH = 7



MODÉLISATION DE L'APPARITION D'ESPÈCES ACTIVATRICES « LE SPIKING »

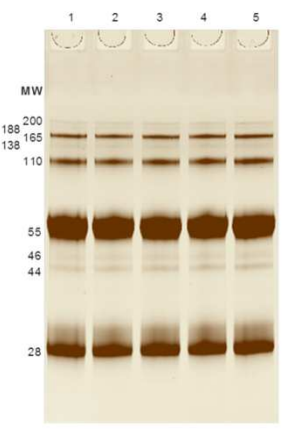
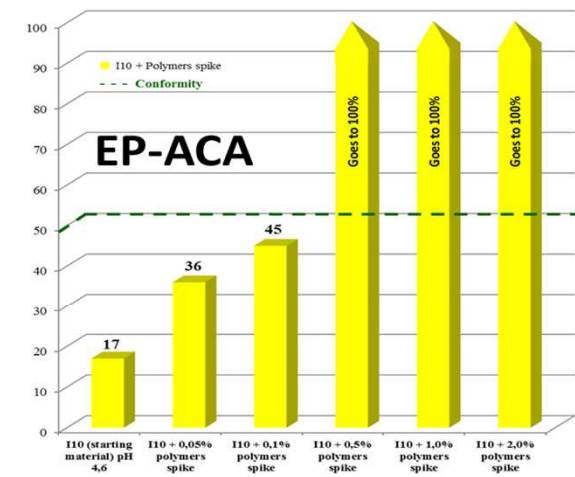
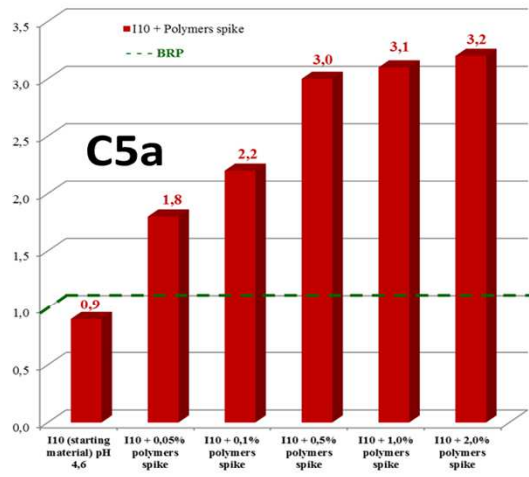
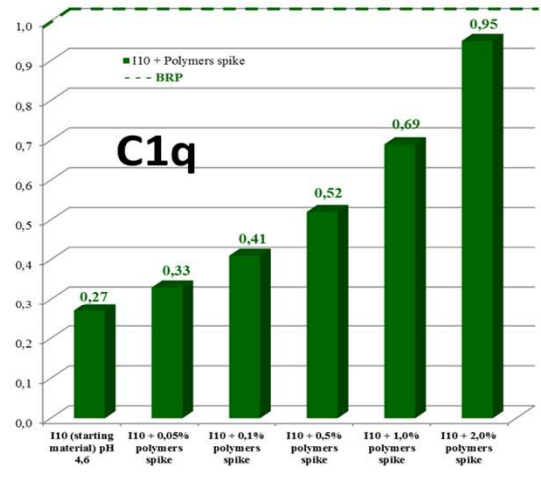


Identifications d'espèces polymériques différentes



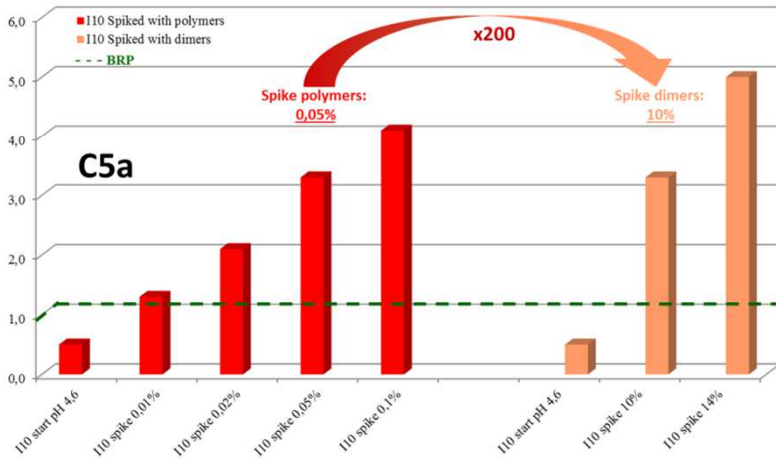
Espèces polymériques générées à pH neutre « hyperactivatrices » du complément: toute manipulation à ce pH doit absolument être limitée.

SENSIBILITÉS DES MÉTHODES CORRÉLATION AAC – C5A



Legend :

- 1: I10 start pH = 4,6
- 2: I10+ 0,01% Polymers
- 3: I10 + 0,02% Polymers
- 4: I10 + 0,05% Polymers
- 5: I10 + 0,1% Polymers



La méthode C5a apparaît comme la plus sensible pour mettre en évidence une augmentation de l'activité AAC et présente une belle corrélation avec la méthode de référence de l'EP.

CONCLUSION ET...PERSPECTIVES

- La mise en évidence de différentes formes de polymères activateur / non activateur aussi documentée est une première
 - Intérêt probable à affiner cette connaissance
- La nouvelle approche AAC qui met à profit le pouvoir tampon d'un milieu réactionnel modifié pour limiter le biais est pertinente et fonctionnelle
- La mesure de l'activité anticomplémentaire est **finalement utile**
 - Titre la présence de polymères particuliers activateurs du complément
 - Titre également tout autre activateur du complément (ADN bact, PL, sucre bactériens,...)
 - Sensibilité non permise par les méthodes physicochimiques classiques (HPLC-SEC, SDS-PAGES nitrate d'argent, DLS, Fluo)
- Les données d'apparition d'espèces actives à pH neutre confortent la pertinence d'une formulation acide
- Opportunité de proposer aux autorités réglementaires une alternative aussi performante mais plus simple, non sujette à interprétation variable et plus robuste : Libération C5a