

Guide technique

pour l'élaboration des monographies
de peptides synthétiques et
protéines ADN recombinants

Pharmacopée Européenne

Direction Européenne de la Qualité du Médicament

1^e Edition - 2006

© Conseil de l'Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France - 2006

La reproduction de ce fichier à des fins commerciales ou sa publication sur un site ouvert à la consultation publique est strictement interdite.

TABLE DES MATIÈRES

1.	CHAMP D'APPLICATION	5
2.	MÉTHODES ANALYTIQUES : PRINCIPES GÉNÉRAUX	5
2.1	VALIDATION DES PROCÉDURES ANALYTIQUES.....	5
2.2	ÉTALONS DE RÉFÉRENCE	5
3.	PROTÉINES PRODUITES PAR LA MÉTHODE DE L'ADN RECOMBINANT	6
3.1	DÉFINITION.....	6
3.2	PRODUCTION	6
3.3	IDENTIFICATION	6
3.3.1	Considérations générales	6
3.3.2	Dosage biologique	7
3.3.3	Cartographie peptidique.....	7
3.3.4	Chromatographie liquide.....	7
3.3.5	Autres identifications	7
3.4	ESSAI.....	8
3.4.1	Essais de pureté	8
3.4.2	Essai des endotoxines bactériennes / pyrogènes	8
3.5	DOSAGE	8
3.6	ÉTIQUETAGE ET CONSERVATION	9
4.	PEPTIDES SYNTHÉTIQUES	9
4.1	DÉFINITION.....	9
4.2	CARACTÈRES	10
4.3	IDENTIFICATION	10
4.3.1	Considérations générales	10

4.4	ESSAI.....	10
4.4.1	Peptides apparentés.....	10
4.4.2	Aspect, pouvoir rotatoire et absorbance	11
4.4.3	Acide acétique, perte à la dessiccation, teneur en eau.....	11
4.4.4	Essai des endotoxines bactériennes / pyrogènes	11
4.5	DOSAGE	11
5.	PRODUITS D'ORIGINE NATURELLE	11

GUIDE TECHNIQUE POUR L'ÉLABORATION DES MONOGRAPHIES DE PEPTIDES SYNTHÉTIQUES ET PROTÉINES ADN RECOMBINANTS

1. CHAMP D'APPLICATION

Le présent guide technique couvre l'élaboration des monographies de peptides synthétiques et protéines ADN recombinants. Il ne couvre pas les domaines des produits du sang et des vaccins.

2. MÉTHODES ANALYTIQUES : PRINCIPES GÉNÉRAUX

2.1 VALIDATION DES PROCÉDURES ANALYTIQUES

Les méthodes d'analyse prescrites dans les monographies doivent avoir été validées selon les principes définis dans le chapitre 3 du *Guide technique pour l'élaboration des monographies* et les *guidelines* ICH Q2A *Validation of analytical procedures: definitions and terminology* et Q2B *Validation of analytical procedures: methodology*, compte tenu des spécificités liées aux essais particuliers utilisés pour l'analyse des produits biologiques ou biotechnologiques.

2.2 ÉTALONS DE RÉFÉRENCE

Les dosages biologiques sont réalisés par référence aux étalons internationaux de l'OMS, aux étalons Ph. Eur. ou à des étalons "internes" dont la traçabilité jusqu'à l'étalon primaire de l'OMS est assurée. S'il n'existe pas d'étalon OMS ou Ph. Eur, le fabricant doit avoir lui-même établi un matériel biologique de référence convenablement caractérisé.

Les analyses physico-chimiques sont réalisées à l'aide de Substances Chimiques de Référence de la pharmacopée établies pour la substance active et, le cas échéant, pour des impuretés spécifiées.

Substances chimiques de référence : détermination de la teneur

Les procédures suivies pour déterminer une teneur nominale à la substance chimique de référence (milligrammes de peptide ou de protéine par milligramme de substance ou par ampoule) diffèrent significativement pour les deux classes de produits considérées. Dans le cas des peptides synthétiques, la teneur des substances de référence est généralement déterminée sur la base de la quantité totale de matière moins la valeur combinée de la perte à la dessiccation (ou la teneur en eau), de la teneur en acétate (ou autre ion) et des peptides apparentés.

Pour les protéines, cette approche n'est pas applicable, et une détermination absolue est nécessaire. Parmi les méthodes utilisables à cet effet figurent l'analyse de la composition en acides aminés et le dosage de l'azote.

1 **3. PROTÉINES PRODUITES PAR LA MÉTHODE DE L'ADN RECOMBINANT**

2 **3.1 DÉFINITION**

3 La rubrique DEFINITION indique :

4 — la formule du monomère,

5 — la masse moléculaire,

6 — la forme physique,

7 — la séquence primaire (acides aminés) de la chaîne protéique,

8 — l'identité et l'activité biologique de la substance et de son analogue naturel,

9 — l'activité biologique spécifique,

10 — le mode de production.

11 **3.2 PRODUCTION**

12 La rubrique PRODUCTION indique :

13 — les détails appropriés du procédé de production,

14 — l'activité biologique spécifique si elle n'est pas couverte par un dosage décrit dans la
15 monographie,

16 — les procédures utilisées pour réduire ou éliminer les agents infectieux,

17 — l'emploi éventuel de stabilisants et substances auxiliaires,

18 — les procédures de validation du procédé de production mises en œuvre conformément à la
19 monographie *Produits obtenus par la méthode dite de l'ADN recombinant (0784)*.

20 **3.3 IDENTIFICATION**

21 **3.3.1 Considérations générales**

22 Les essais d'identification doivent être spécifiques du produit et fondés sur les aspects
23 univoques de sa structure moléculaire et/ou d'autres propriétés distinctives. La combinaison
24 de plusieurs identifications (physico-chimique, biologique et/ou immunochimique) est
25 indispensable pour l'établissement de l'identité ; toutefois, des méthodes utilisées pour la
26 détermination de l'activité ou de la pureté peuvent également servir, au besoin après
27 adaptation, comme critères d'identification.

28 Bien que la gamme d'essais nécessaire à l'identification dépende de la nature du produit, et ne
29 puisse donc être spécifiée *a priori*, on peut considérer que la rubrique IDENTIFICATION d'une
30 monographie comprend de façon générale des techniques permettant de vérifier la taille de la
31 molécule, sa séquence primaire, son profil isoélectrique, ses propriétés chromatographiques et
32 l'adoption par la molécule de la configuration fonctionnelle correcte. Cet ensemble d'essais
33 peut comprendre :

- 1 — un dosage biologique,
- 2 — une cartographie peptidique,
- 3 — une analyse de la séquence *N*-terminale,
- 4 — une analyse de la séquence *C*-terminale,
- 5 — une chromatographie liquide (CL) en phase inversée,
- 6 — une chromatographie d'exclusion,
- 7 — une focalisation isoélectrique et/ou une électrophorèse capillaire,
- 8 — pour les glycoprotéines, une analyse de la chaîne latérale glucidique.

9 **3.3.2 Dosage biologique**

10 En règle générale, pour les produits ADNr, le renvoi à un dosage biologique constitue un
11 critère d'identification important. Le dosage biologique comme critère d'identité ne peut être
12 totalement remplacé par des méthodes physico-chimiques que dans les cas où :

- 13 — ces méthodes permettent d'obtenir à elles seules des informations physico-chimiques
14 suffisantes sur la substance, y compris la structure d'ordre supérieur ; une corrélation
15 pertinente avec l'activité biologique est dans ce cas établie,
- 16 — l'activité biologique des protéines apparentées présentes dans le produit est connue,
- 17 — on dispose d'un historique de fabrication convenablement documenté.

18 **3.3.3 Cartographie peptidique**

19 La cartographie peptidique apporte une preuve directe de la séquence et est actuellement
20 considérée, en règle générale, comme essentielle. Il existe une tendance à perfectionner la
21 technologie de la cartographie peptidique en utilisant un couplage chromatographie liquide /
22 spectrométrie de masse.

23 **3.3.4 Chromatographie liquide**

24 Le renvoi à une ou plusieurs méthodes CL (généralement une chromatographie en phase
25 inversée et une chromatographie d'exclusion) est généralement considéré comme un critère
26 d'identification. Lorsque, de par sa nature, la protéine n'est pas séparable par ces méthodes
27 (par exemple dans le cas de protéines de très grande taille, ou de glycoprotéines hétérogènes),
28 on peut envisager leur remplacement par des techniques d'électrophorèse ou de
29 chromatographie à échange d'ions.

30 **3.3.5 Autres identifications**

31 Les autres méthodes susceptibles d'être utilisées aux fins d'identification comprennent :
32 — les méthodes électrophorétiques fondées sur la taille ou la charge,

- 1 — les méthodes de liaison à des anticorps, seules ou associées à des méthodes
- 2 électrophorétiques (immunotransfert),
- 3 — des méthodes spectroscopiques, notamment la spectrométrie de masse.

4 **3.4 ESSAI**

5 **3.4.1 Essais de pureté**

6 Les méthodes analytiques applicables aux protéines sont habituellement développées sur la
7 base de la taille, de la charge et du caractère hydrophobe (par exemple : chromatographie
8 d'exclusion, CL à échange d'ions, CL en phase inversée, SDS-PAGE, focalisation
9 isoélectrique, électrophorèse capillaire). Lors de l'élaboration des monographies, il est
10 généralement possible de faire l'économie d'une de ces méthodes en démontrant sa
11 redondance (par exemple : la CL à échange d'ions peut être couverte par la CL en phase
12 inversée ou l'électrophorèse capillaire). Des essais complémentaires tels que le dosage de
13 l'acide sialique sont introduits si l'on sait qu'ils sont nécessaires pour mettre en évidence
14 certaines impuretés spécifiques, ou si la combinaison CL en phase inversée et
15 chromatographie d'exclusion ne couvre pas toutes les impuretés à considérer. Si une SDS-
16 PAGE est prescrite, les conditions opératoires doivent être celles décrites dans le chapitre
17 *2.2.31. Electrophorèse* de la Ph. Eur., sauf démonstration du caractère inapproprié de ces
18 conditions pour le produit à examiner.

19 Lorsque l'on sait que des impuretés spécifiques exercent un effet clinique ou reflètent le
20 respect des bonnes pratiques de fabrication, les méthodes utilisées pour leur détection doivent
21 être transparentes et des matériels de référence ou procédures appropriés pour la validation du
22 système doivent être fournis à l'appui.

23 La chromatographie d'exclusion pour le dosage des dimères et des impuretés de masse
24 moléculaire supérieure reste un essai de pureté important dans la mesure où les molécules
25 agrégées possèdent généralement un caractère immunogène. Cet essai doit si possible être
26 réalisé dans des conditions non dénaturantes (tampons aqueux neutres) pour éviter la
27 dissociation et la non-détection résultante des agrégats non covalents.

28 **3.4.2 Essai des endotoxines bactériennes / pyrogènes**

29 La monographie comporte normalement un essai des endotoxines bactériennes. Dans des
30 circonstances exceptionnelles où la nature du produit rend cet essai inapplicable ou
31 inapproprié, il est admis de recourir à l'essai des pyrogènes sur lapin.

32 **3.5 DOSAGE**

33 En règle générale, la substance possède une activité spécifique déclarée, exprimée en Unités
34 Internationales par milligramme de protéine. Le rubrique DOSAGE de la monographie
35 comprend donc deux procédures : la détermination de la teneur en protéine, généralement
36 effectuée par une procédure CL comparative par rapport à une substance chimique de

1 référence définie, et un dosage biologique *in vivo* réalisé par comparaison à l'Etalon
 2 International. Les limites du dosage biologique sont calculées comme spécifié dans le
 3 chapitre 5.3. *Analyse statistique des résultats des dosages et essais biologiques* de la Ph. Eur.,
 4 et sont typiquement exprimés en termes d'intervalles acceptables pour l'activité estimée
 5 (exemple : 80-125 % de l'activité indiquée) et pour les limites de confiance de l'activité
 6 estimée (exemple : 64-156 % de l'activité indiquée).

7 Dans des cas exceptionnels, des stratégies différentes peuvent être adoptées.

8 — Lorsque la gamme des essais physico-chimiques ne permet pas de caractériser
 9 convenablement les aspects structurels de la molécule dont on sait qu'ils affectent l'activité
 10 biologique *in vivo* (par exemple la glycosylation), la monographie peut comprendre un
 11 dosage biologique *in vivo*. Lorsqu'un dosage *in vivo* est utilisé pour évaluer le degré de
 12 glycosylation, il ne peut être remplacé par un dosage *in vitro* que s'il a été démontré que
 13 l'analyse physico-chimique permet de cerner convenablement le profil de glycosylation.

14 — Lorsqu'il a été établi que la gamme des essais physico-chimiques permet de caractériser la
 15 molécule, selon les critères décrits dans la section 3.3.2, un dosage physico-chimique peut
 16 être utilisé seul. Si l'étiquetage reste en unités biologiques, l'activité spécifique intrinsèque
 17 de la substance, en unités par milligramme, doit être indiquée dans la monographie.

18 — Lorsqu'un dosage physico-chimique est utilisé, les limites sont typiquement asymétriques,
 19 la limite supérieure étant fixée à 100 % + écart de répétabilité admis (généralement
 20 jusqu'à 5,0 % pour une CL en phase inversée) et la limite inférieure à 100 % – (écart de
 21 répétabilité admis + teneur maximale admise en impuretés).

22 3.6 ÉTIQUETAGE ET CONSERVATION

23 Ces rubriques donnent des informations sur les exigences d'étiquetage et les conditions de
 24 conservation. Les autres paramètres sont déterminés au cas par cas.

25 4. PEPTIDES SYNTHÉTIQUES

26 4.1 DÉFINITION

27 La rubrique DEFINITION indique :

28 — la formule élémentaire,

29 — la masse moléculaire,

30 — la forme physique,

31 — la formule développée,

32 — l'identité et l'activité biologique de la substance et, éventuellement, de son analogue
 33 naturel,

34 — les spécifications de teneur,

35 — le mode de production,

- 1 — la forme saline,
- 2 — toute modification chimique telle qu'une estérification ou une amidation.

3 **4.2 CARACTÈRES**

4 L'aspect du peptide synthétique à l'état solide est décrit. La solubilité est le cas échéant
5 indiquée.

6 **4.3 IDENTIFICATION**

7 **4.3.1 Considérations générales**

8 Deux aspects affectant la structure de la monographie différencient les peptides synthétiques
9 des produits ADNr :

- 10 — leur petite taille, typiquement inférieure à 5000 D,
- 11 — le fait qu'ils puissent présenter des structures chimiques n'existant pas à l'état naturel dans
12 des protéines ou des peptides.

13 Ces particularités ont une double conséquence sur l'élaboration des monographies :

- 14 – la gamme des essais physico-chimiques suffit généralement à caractériser le produit sans
15 qu'il soit besoin de recourir à un dosage biologique,
- 16 – il peut être nécessaire de compléter les méthodes conventionnelles fondées sur l'analyse
17 de la composition en acides aminés ou le séquençage par l'emploi de méthodes
18 spectroscopiques telles que la résonance magnétique nucléaire.

19 La rubrique IDENTIFICATION de la monographie comprend typiquement :

- 20 — une analyse de la composition en acides aminés,
- 21 — une CL en phase inversée,
- 22 — un spectre de résonance magnétique nucléaire.

23 Il est souvent souhaitable de spécifier plusieurs CL, ou une procédure chromatographique
24 complémentaire telle qu'une chromatographie sur couche mince. La présence de plusieurs
25 identifications chromatographiques est spécialement importante s'il n'est pas décrit de
26 méthode spectroscopique.

27 **4.4 ESSAI**

28 **4.4.1 Peptides apparentés**

29 En règle générale, les monographies de peptides synthétiques comportent une CL en phase
30 inversée pour l'essai des peptides apparentés. Ces essais sont validés pour des impuretés
31 spécifiées connues comme contaminants potentiels et sont, si possible, transparents au regard
32 de ces impuretés. Le cas échéant, des substances de référence sont fournies pour certaines

1 impuretés spécifiées. Si nécessaire, des impuretés spécifiées peuvent être quantifiées
2 séparément par des méthodes indépendantes. Lorsqu'une monographie repose sur un seul
3 essai de pureté, il convient de démontrer l'aptitude de la méthode à mesurer l'ensemble des
4 impuretés à considérer.

5 **4.4.2 Aspect, pouvoir rotatoire et absorbance**

6 Ces essais sont utiles et doivent être spécifiés dans les cas appropriés. La chromatographie
7 chirale peut parfois utilement remplacer la mesure du pouvoir rotatoire.

8 **4.4.3 Acide acétique, perte à la dessiccation, teneur en eau**

9 La détermination des teneurs en acide acétique et en eau fait partie des exigences
10 d'application générale pour les peptides. En règle générale, la forme saline sous laquelle se
11 présente le peptide n'est pas mentionnée dans le titre de la monographie, et la teneur en acide
12 acétique est contrôlée par une essai. La méthode utilisée pour la détermination de la teneur en
13 acide acétique est celle décrite dans le chapitre 2.5.34. *Acide acétique dans les peptides*
14 *synthétiques*, sauf démonstration du caractère inapproprié de cette méthode pour le peptide à
15 examiner.

16 La perte à la dessiccation est de moins en moins utilisée car elle requiert l'utilisation
17 d'importantes quantités de produit. Elle est souvent remplacée par une détermination de la
18 teneur en eau. La méthode utilisée à cet effet est soit celle décrite dans le chapitre 2.5.12.
19 *Semi-microdosage de l'eau* (Karl Fisher) soit celle décrite dans le chapitre 2.5.32.
20 *Microdosage de l'eau* (titrage coulométrique).

21 **4.4.4 Essai des endotoxines bactériennes / pyrogènes**

22 La monographie comporte normalement un essai des endotoxines bactériennes. Dans des
23 circonstances exceptionnelles où la nature du produit rend cet essai inapplicable ou
24 inapproprié, il est admis de recourir à l'essai des pyrogènes sur lapin.

25 **4.5 DOSAGE**

26 Le dosage des peptides synthétiques est généralement effectué par des procédures
27 chromatographiques comparatives, par rapport à une substance chimique de référence définie
28 servant d'étalon. Les résultats sont normalement exprimés en quantité de substance anhydre et
29 exempte d'acide acétique. Les limites de teneur spécifiées sont typiquement asymétriques, la
30 limite supérieure étant fixée à 100 % + écart de répétabilité admis (généralement $\pm 2,0$ %) et
31 la limite inférieure à 100 % – (écart de répétabilité admis + teneur maximale admise en
32 impuretés).

33 **5. PRODUITS D'ORIGINE NATURELLE**

34 Les produits d'origine naturelle constituent un groupe de substances hétérogène, auquel il est
35 impossible d'appliquer un ensemble de critères commun dans le cadre du présent guide. Il se

- 1 pose pour ces substances le problème de la transmission d'agents infectieux, auquel doivent
- 2 répondre les monographies par le biais de spécifications appropriées.
- 3