UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 1992 THESE N° 348

VALIDATION D'UN PROCEDE DE PURIFICATION D'UNE PROTEINE RECOMBINANTE

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

---

présentée et soutenue publiquement le 26 Octobre 1992
par
Fabienne BARRANDON
née le 12 Novembre 1966 à Limoges

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur le Professeur PENICAUT	Président
Madame DREYFUSS	Juge
Monsieur REY	Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur RABY

ASSESSEURS : Monsieur le professeur GHESTEM (1er Assesseur)

Monsieur DREYFUSS, Maître de Conférences (2ème Assesseur)

PERSONNEL ENSEIGNANT : PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BENEYTOUT Jean-Louis	Biochimie
BERNARD Michel	Physique-Biophysique
BOSGIRAUD Claudine	Microbiologie
BROSSARD Claude	Pharmacotechnie
BUXERAUD Jacques	Chimie Organique, Chimie Thérapeutique
CHULIA Albert	Pharmacognosie
CHULIA Dominique	Pharmacotechnie
DELAGE Christiane	Chimie Générale et Minérale
GALEN François Xavier	Physiologie
GHESTEM Axel	Botanique et Cryptogamie
GUICHARD Claude	Toxicologie
HABRIOUX Gérard	Biochimie
LEFORT DES YLOUSES Daniel	Pharmacie Galénique
NICOLAS Jean Albert	Bactériologie et Virologie, Parasitologie
OUDART Nicole	Pharmacodynamie
PENICAUT Bernard	Chimie Analytique et Bromatologie
RABY Claude	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
TIXIER Marie	Biochimie

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

Je remercie Monsieur PENICAUT, Professeur de Chimie Analytique et de Bromatologie, d'avoir accepté de superviser cette thèse en qualité de Président du Jury.
Je le prie de trouver ici le témoignage de ma reconnaissance pour les conseils qu'il m'a prodigués dans un esprit très pédagogique.

Je remercie Madame DREYFUSS, Maître de conférence de Chimie Analytique et de Bromatologie, d'avoir bien voulu, en qualité de Juge, participer à l'évaluation de ce travail.

Je remercie le laboratoire ROUSSEL UCLAF et tout particulièrement Monsieur REY, responsable du secteur "Recherche et Développement des Protéines", de m'avoir accueillie dans son service et épaulée dans mes recherches. Sa patience et son professionnalisme m'ont permis d'acquérir l'assurance nécessaire à la réalisation de cette étude.

Je tiens également à remercier mes parents, qui ont su m'entourer de leur affection, et m'apporter un soutien précieux tout au long de mes études.

PLAN

INTRODUCTION

1. LES PROTEINES RECOMBINANTES
    1.1. GENERALITES
        1.1.1. Définition
        1.1.2. Principe
        1.1.3. Les différents systèmes de production
        1.1.4. Le choix du système de production
        1.1.5. Les médicaments recombinants
        1.1.6. Le bilan scientifique et économique
    1.2. PROTEINE RECOMBINANTE : UN PRODUIT A PART
        1.2.1. Une nouvelle technologie
        1.2.2. Une technologie pleine d'espoir mais qui fait peur
        1.2.3. La biotechnologie en plein essor
        1.2.4. La législation européenne des spécialités pharmaceutiques
        1.2.5. La législation européenne des produits recombinants

2. PURIFICATION
    2.1. Le produit à purifier
    2.2. Les impuretés à éliminer
    2.3. Différentes techniques chromatographiques de purification
        2.3.1. Chromatographie par gel filtration
        2.3.2. Chromatographie par échanges d'ions
        2.3.3. Chromatographie d'affinité
        2.3.4. Chromatographie par interactions hydrophobes
        2.3.5. Chromatographie en phase inverse
    2.4. La technique retenue pour purifier le RU

3. VALIDATION
3.1. La validation en général selon la CEE et la FDA
3.1.1. La validation en général
3.1.2. La validation appliquée aux produits recombinants
3.2. Application pratique de la validation
3.2.1. L'installation
3.2.2. Le matériel
3.2.3. Le procédé

4. DISCUSSION

5. CONCLUSION

6. ANNEXES

7. BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

L'industrie pharmaceutique fabrique un produit particulier : le médicament, qui doit répondre à la définition qu'en donne le code de la santé publique à l'article L 511 : "On appelle médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques."

Pour commercialiser son produit, l'industriel devra recevoir, du ministère de la santé, une Autorisation de Mise sur le Marché, ou AMM, pour laquelle il devra faire preuve de l'activité, de l'innocuité, et de l'intérêt thérapeutique de son médicament par rapport à ceux déjà sur le marché.
Pour ce faire, il devra établir un dossier qui doit contenir toutes sortes d'informations sur l'identité et les caractéristiques du produit, sur le procédé de fabrication et les méthodes mises en oeuvre pour assurer la constance de sa qualité, et sa reproductibilité.

L'assurance de la qualité est un concept qui englobe tout ce qui peut influencer la qualité d'un produit.
Dans le processus de fabrication, l'assurance de la qualité se concrétise par l'application des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) qui proposent un schéma général de gestion de la qualité qui s'intéresse à la production et au contrôle des médicaments, et dont la mise en oeuvre passe par la rédaction de documents clairs relatifs : à l'entretien et la maintenance des locaux et du matériel (procédures), au procédé de fabrication et de conditionnement (mode opératoire), à la production de lots identiques correctement contrôlés (dossiers de lots).

L'assurance de la qualité se conçoit également en amont de la production.
Toutes les caractéristiques d'un médicament ne peuvent pas se vérifier par les contrôles de routine (sur chaque lot) effectués sur le produit fini. Il est donc important de prouver, au cours d'études préliminaires, que le procédé de fabrication garantit l'obtention d'un médicament conforme à toutes les caractéristiques d'identité, de pureté, d'innocuité et d'activité pour lesquelles il reçoit une AMM.
Ces études préliminaires sont menées dès la phase de développement du procédé et conduisent à sa **validation.**

Nous nous proposons ici d'aborder la validation de façon concrète, en développant l'exemple qu'il nous a été permis d'analyser pendant le stage de fin d'études de pharmacie au sein du laboratoire Roussel-Uclaf dans le service de recherche et de développement des protéines : le procédé de purification du RU (voir note en bas de page).
Le RU est une cytokine, obtenue par recombinaison génétique, dont le dossier d'AMM est en cours d'élaboration.

L'intérêt de cette étude porte sur son caractère concret, mais également sur la particularité de la molécule étudiée de par son appartenance à une catégorie de médicaments encore peu développée : les protéines recombinantes, mettant en pratique des technologies récentes : les biotechnologies.

Note: RU signifie ROUSSEL UCLAF. Ce sigle désigne ici la molécule étudiée que l'on ne nomme pas pour des raisons de confidentialité.

1. LES PROTEINES RECOMBINANTES

1.1. GENERALITES

1.1.1. **Définition** (GROS,1986)

"Le principe du génie génétique repose sur le transfert d'un gène étranger dans des cellules en culture ou dans le tissu (somatique ou germinal) d'un animal ou d'une plante de façon à obtenir la manifestation d'une nouvelle propriété liée au gène ainsi transféré."

1.1.2. **Principe** (DODET,1990)

Un système de production résulte de la combinaison d'un vecteur d'expression (virus ou plasmide) et d'un hôte (microorganisme, cellule en culture ou organisme multicellulaire).

= Le vecteur d'expression a pour rôle d'introduire un gène étranger dans les cellules hôtes et de le faire exprimer. C'est donc une construction qui comprend le gène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur, des signaux de fin de copie ou de traduction et, éventuellement, des signaux de secrétion.
Le vecteur idéal doit permettre une abondante production de la protéine d'intérêt. Pour cela, le vecteur doit :

- contenir un promoteur "fort",
- pouvoir pénétrer en plusieurs exemplaires dans la cellule hôte,
- être stable et persister dans les cellules.

= L'hôte idéal doit exécuter correctement les instructions fournies par le gène étranger et réaliser les modifications post-traductionnelles permettant d'obtenir une protéine identique à la protéine naturelle.
Pour cela, les cellules hôtes doivent :

- se prêter à la culture de masse en fermentation,
- être résistantes au stress de la culture en masse,
- être capables de se multiplier à densité élevée,
- être peu exigeantes en éléments nutritifs.

1.1.3. Les différents systèmes de production (DODET,1990)

Trois grands systèmes se disputent actuellement la production de protéines recombinantes thérapeutiques : La bactérie *Escherichia coli* (*E.coli*), la levure *Saccharomyces cerevisiae* (*S.cereviviae*) ,les *cellules d'ovaire de hamster chinois* (*cellules CHO*).

Avantages et inconvénients de ces trois systèmes :

Escherichia coli

- très étudié, il est donc bien connu,
- il accepte toute une série de vecteurs plasmidiques stables,
- peut recevoir un grand nombre de copies du plasmide,
- se prête bien à la culture de masse,
- possède des taux d'expression élevés (plusieurs grammes par litre),
  MAIS
- incapable de réaliser les maturations post-traductionnelles (elles ne sont pas toujours nécesaires à l'activité de la protéine)
- mauvaise secrétion des protéines qui s'accumulent dans le cytoplasme : il faudra alors casser la bactérie pour extraire les protéines ce qui impliquera une purification ultérieure poussée pour éliminer les débris cellulaires et les protéines de l'hôte (*E.coli* contient plus de 1500 protéines),
- *E.coli* est une entérobactérie possédant des endotoxines qu'il faudra aussi éliminer au cours de la purification.

Saccharomyces cerevisiae

- il existe de bons vecteurs d'expression (moins que pour *E.coli*),
- le nombre de copie par cellule reste acceptable (plus faible que pour *E.coli*),
- les taux d'expression sont moyens (de l'ordre de 100 milligrammes par litre),
- la levure est capable d'assembler correctement les polypeptides synthétisés,
- elle peut aussi réaliser certaines maturations post-traductionnelles.

Les cellules CHO

- sont capables de produire des molécules complexes et de grande taille (supérieures à 50 kDa), correctement maturées et repliées,
  MAIS
- sont fragiles,
- nécessitent des milieux de culture coûteux,
- les taux d'expression sont faibles (1 à 10 milligrammes par litre),
- l'optimisation de ces cultures reste délicate.

Citons d'autres systèmes qui, pour la plupart, sont déjà connus des industriels dans des systèmes de production agro-alimentaires et qui sont à l'étude (plus ou moins avancée) dans leur application à la production de protéines recombinantes thérapeutiques.

Bactéries : - genre *bacillus*
- genre *streptomyces*

Ces deux genres bactériens possèdent des capacités de secrétion bien supérieures à *E.coli* mais uniquement pour l'expression de gènes homologues.

Levures : - *Pichia pastoris*
- *Kluyveromyces lactis*
- *Yarrowia lipolytica*

Possèdent de meilleures capacités de secrétion que *S.cerevisiae.*

Champignons : *Aspergillus*
Ils sont capables d'assurer la maturation des protéines, sont de bons sécréteurs et, ne produisant qu'un nombre limité de protéines propres, leur production protéique recombinante est plus facile à purifier. Toutefois, les forts taux de sécrétion (de l'ordre du gramme par litre) rencontrés lors de l'expression de gènes homologues chutent de façon drastique (quelques dizaines de milligrammes par litre) avec des gènes de mammifères.

Cellules d'insectes : *Spodoptera frugiperda*
Elles sont capables d'effectuer toutes les opérations de maturation des protéines et de les secréter, mais leur besoin élevé en oxygène et leur grande sensibilité aux forces de cisaillement compliquent leur culture en fermenteur.

Animaux transgéniques : surtout lapines et brebis
Pour la production de molécules de grande taille parfaitement maturées secrétées dans le lait.

Plantes recombinantes : plants de tabac, pommes de terre, graines de colza.
Les taux d'expression sont très faibles et la purification n'est pas encore résolue.

1.1.4. Le choix du système de production (DODET,1990)

Pour les industriels, il se fait essentiellement entre les trois systèmes principaux : *E.coli, S.cerevisiae, cellules CHO.* Les industriels ont en effet acquis ces dix dernières années un grand savoir faire dans leur exploitation. Ils attendent que les nouveaux systèmes fassent leur preuve avant de les adopter.

Les éléments de décision sont le taux d'expression (qui varie d'un système à l'autre pour une même protéine, et d'une protéine à l'autre pour un même système), mais aussi et surtout le temps et les moyens à mettre en oeuvre pour les opérations en aval : extraction, purification, contrôle de la qualité.

NB : Le simple respect des normes des bonnes pratiques de fabrication multiplie par trois le prix des produits recombinants.

1.1.5. Les médicaments recombinants (DODET,1991)

Ce sont des "reproductions" de substances organiques de l'organisme.

On peut les diviser en trois catégories :

- Les médicaments de substitution : remplacent à plus ou moins long terme un médicament identique ou un traitement équivalent.
- Les traitements additifs : viennent s'ajouter aux thérapies existantes dans le traitement des cancers et des maladies cardiovasculaires.
- Les nouveaux traitements : produits dont l'apparition a permis de traiter des affections pour lesquelles il n'existait pas de médicaments.

Médicaments de substitution :

Insuline humaine

(premier médicament recombinant commercialisé)

"remplace" l'insuline d'extraction du pancréas de porc ou de boeuf.

Hormone de croissance humaine

"remplace" l'hormone de croissance humaine d'extraction d'hypophyse de cadavre.

facteur VIII de la coagulation

"remplace" le traitement par le produit d'extraction du plasma humain, (monopole des centres de transfusions sanguines).

Vaccin contre l'hépatite B

"remplace" le vaccin préparé à partir d'une fraction virale antigénique non infectante provenant du plasma de porteurs sains de l'antigène HBs.

La base d'évaluation de ces médicaments de substitution repose sur la comparaison avec les médicaments préexistants : il y a un intérêt à les remplacer si l'amélioration porte sur au moins l'un des trois critères suivants : l'efficacité thérapeutique, l'innocuité ou le coût.
Or le bilan est assez décevant : ils n'apportent pas de bénéfice thérapeutique remarquable et sont au moins aussi coûteux, voire plus, que ceux qu'ils remplacent.

Traitements additifs :

Activateur tissulaire du plasminogène (tPA)

Vient renforcer l'arsenal thérapeutique des thrombolytiques (streptokinase, anistreplase et urokinase) avec une efficacité comparable mais un coût beaucoup plus élevé !

Interféron α (IFN α) et interleukine-2 (IL-2)

produits efficaces dans certaines formes de cancers en monochimiothérapie, et à l'étude, associés entre eux et à d'autres thérapies (chimiothérapie ou radiothérapie).

Facteur stimulant de la colonie des granulocytes (G-CSF)

Facteur stimulant de la colonie des macrophages (GM-CSF)

Ces facteurs sont utilisés pour lutter contre les neutropénies fébriles faisant suite à la chimiothérapie cancéreuse. Ils sont également à l'étude dans les greffes de moelle.

Nouveaux traitements :

Interféron α (IFN α)

Permet de lutter contre l'hépatite B contre laquelle il n'existait aucun traitement.

Erythropoïétine (EPO)

Traite l'anémie par carence en érythropoïétine due à une insuffisance rénale (touche environ 30 % des dialysés), traitée jusqu'à présent par des transfusions répétées avec les contraintes et les risques de contamination virale que cela représente.

1.1.6. Le bilan scientifique et économique

(LEVEQUE,1990)

Le bilan scientifique et technique est remarquable : de la copie de molécules simples déjà extraites et connues, l'expérience s'est étendue à la modification de protéines complexes. De la biosynthèse en laboratoire par des souches bactériennes recombinées, on est passé à la production industrielle en continu à partir de lignées cellulaires transgéniques de mammifères.

En revanche, le bilan commercial est plus contrasté et incertain. Le succés clinique des médicaments recombinants s'est révélé et reste aléatoire. Les coûts de développement, de production et de création de marchés sont toujours très élevés.

Les autorités publiques cherchent à réduire les dépenses pharmaceutiques, alors que les applications du génie génétique coûtent très cher.

On devrait s'attendre à un déclin des investissements, or ce n'est pas le cas. Cependant la stratégie n'est plus la même : les principaux efforts des firmes portent maintenant sur le développement et l'accès au marché de molécules connues telles que l'IL-2 ,le TNF (Tumor Necrosis Factor), le facteur VIII de la coagulation, et moins sur la recherche de nouvelles molécules.

Par ailleurs, les possibilités thérapeutiques des médicaments recombinants déjà sur le marché n'ont pas encore été entièrement explorées et font l'objet de nombreuses études cliniques.

1.2. PROTEINE RECOMBINANTE : UN PRODUIT A PART.

1.2.1. Une nouvelle technologie

Le génie génétique et ses applications doivent leur salut à l'invention du microscope et au développement de la chimie. En effet, les biologistes ont pu ainsi découvrir la structure des cellules, puis pénétrer plus avant dans la composition du noyau, trouver le rôle joué par l'ADN et mettre à jour les lois de l'hérédité et les principes de décodage du support génétique.(DOROZYNSKI,1980)

Le génie génétique peut remercier une bactérie somme toute banale : *Escherichia coli*, car l'histoire de ce colibacille se confond avec celle de la biologie moderne, non seulement pour la quantité d'informations qu'il a livrée, par la connaissance de sa structure simple, sur des cellules beaucoup plus complexes, mais aussi pour la quantité de produits utiles qu'il permet aujourd'hui de produire.(ESCANDE,1980)

1.2.2. Une technologie pleine d'espoir mais qui fait peur (ANDRIEU,1980)

Les années 70 furent celles de tous les espoirs, mais aussi de toutes les angoisses. Les recherches biologiques prenaient une autre dimension : on "manipulait" des gènes, supports de l'hérédité, de l'identité de chaque individu ; l'excitation était grande tellement les perspectives s'avéraient considérables, mais la peur d'exploiter une technique peu connue donc peu maîtrisée débouchait sur des interrogations plus ou moins alarmantes.

La communauté scientifique, consciente des risques encourus par une mauvaise exploitation d'une telle technologie, se mobilise : c'est la conférence d'Asilomar en Californie en février 1975. Elle fixe les conditions technologiques et déontologiques de recherche et impose aux laboratoires des règles de sécurité plus ou moins sévères en fonction des expérimentations effectuées (annexe 1).

On se rend rapidement compte que le contrôle des souches bactériennes "manipulées" est parfaitement réalisable et que l'on avait à Asilomar outrepassé largement les risques potentiels, dans l'ignorance de ce qui se passait réellement dans une bactérie recombinée.

1.2.3. La biotechnologie en plein essor

Dès lors, l'industrie pharmaceutique a développé des médicaments recombinants, et devant les problèmes d'éthique et de sécurité inhérents à la nature du produit obtenu, les états producteurs mettent peu à peu en place des dispositions particulières relatives aux conditions de recherche, de production et de contrôle des produits issus de la biotechnologie.

C'est ainsi que la Food and Drug Administration (FDA) américaine et la Communauté Economique Européenne (CEE) se mettent à éditer des directives spécifiques aux produits recombinants que l'industriel doit respecter s'il veut que son produit soit mis sur le marché.

Le but d'un tel intérêt est de tendre à "verrouiller" tout le processus de fabrication de la protéine recombinante depuis l'introduction du gène d'intérêt dans le vecteur jusqu'à l'obtention d'une protéine purifiée ,en passant par la fermentation dont les conditions (température,pH,temps,agitation...) sont figées et vérifiées et l'extraction qui permet d'obtenir une protéine intacte et conforme à celle que l'on voulait "copier".

1.2.4. La législation européenne des spécialités pharmaceutiques

Afin d'harmoniser les dispositions relatives à l'AMM des spécialités pharmaceutiques, la commission européenne a publié, en 1989, une série de cinq volumes intitulée :

"La règlementation des médicaments dans la communauté européenne"

Volume I : "La règlementation des médicaments à usage humain dans la communauté européenne".

Il renferme les directives officielles qui font état des textes communautaires de nature juridique concernant les médicaments à usage humain.

Ces directives font force de lois dans les états membres ; elles sont rédigées en termes relativement généraux afin de ne pas imposer de contraintes législatives excessives du point de vue du progrès scientifique, mais elles sont, de ce fait, peu concrètes et peu spécifiques.

Volume II : "Avis aux demandeurs d'autorisation de mise sur le marché de médicaments à usage humain dans les états membres de la communauté européenne".
Ce volume décrit les aspects pratiques des procédures communautaires d'enregistrement, et fournit les indications nécessaires à la préparation et à la présentation des demandes d'AMM nationales ou communautaires dans les douze états membres.
Ce document a été élaboré par un groupe de travail du Conseil des Spécialités Pharmaceutiques (CSP) en vue de faciliter la constitution du dossier d'AMM et afin de permettre à l'industrie pharmaceutique d'utiliser pleinement la procédure d'enregistrement dite "multi-états" qui donne la possibilité à une firme de demander l'AMM dans plusieurs pays de la CEE simultanément, après avoir obtenu l'avis favorable de la commission de Bruxelles (avis non contraignant).
Ce document n'a aucune portée légale, mais toute demande d'AMM qui n'y serait pas conforme prend le risque d'être rejetée et l'obtention de l'AMM d'être retardée.
Annexe 2 : Format standard pour les demandes d'AMM déposées dans la CEE.

Volume III : "Notes explicatives sur la qualité, la sécurité et l'efficacité des médicaments à usage humain".
Il rassemble les notes explicatives adoptées par le CSP, qui ont été rédigées en étroite collaboration avec toutes les autorités compétentes au sein de différents groupes de travail intitulés :
- "qualité",
- "sécurité",
- "efficacité",
- "biotechnologie/pharmacie",

qui permettent à l'industriel en quête d'une AMM d'interpréter et d'appliquer de façon concrète les directives qui, nous l'avons vu précédemment, sont d'un abord délicat.
Comme pour l'avis au demandeur, ces notes explicatives sont sans force légale, cependant, lorsqu'un demandeur décide de ne pas appliquer une note explicative, ce choix doit être justifié dans les rapports d'experts soumis par la firme à l'appui de sa demande d'AMM.

Volume IV : "Guide des bonnes pratiques de fabrication des médicaments".
Ce guide représente le concensus actuel des services nationaux d'inspection pharmaceutiques quant aux exigences relatives aux bonnes pratiques de fabrication (BPF).

Volume V : "Les médicaments vétérinaires dans la communauté européenne".
Ce volume renferme les directives qui traitent des dispositions relatives aux médicaments vétérinaires.

En Juillet 1990, le CSP a publié un "addendum" au volume III qui contient de nouvelles notes explicatives qui sont : soit une mise à jour des anciennes en fonction des progrès scientifiques réalisés, c'est le cas pour celles relatives aux biotechnologies, soit d'autres notes explicatives sur des sujets non abordés dans la première édition, tels que les bonnes pratiques cliniques par exemple ou l'évaluation des médicaments anticancéreux chez l'homme.

1.2.5. La législation européenne des produits recombinants

- Directive 87/22/CEE du conseil des communautés européennes
(J.O. des communautés européennes n°15/38 du 17/01/87)
"portant rapprochement des mesures nationales relatives à la mise sur le marché des médicaments de haute technologie, notamment ceux issus de la biotechnologie"
Cette directive donne entre autre la liste des produits dits de haute technologie : annexe 3

- Avis au demandeur remanié pour les produits biotechnologiques :
Modification mise au point par un groupe de travail du CSP considérant que les particularités de fabrication du produit recombinant nécessitaient un remaniement de la partie II B (mode de préparation) du format standard du dossier de demande d'AMM, où l'accent est mis sur les étapes propres au produit recombinant : fermentation, extraction, purification.

- Notes explicatives relatives à la biotechnologie :

(élaborées par le groupe de travail "biotechnologie/pharmacie" du CSP)

= "Production et contrôle de la qualité des médicaments obtenus par la technologie de l'ADN recombinant" (Juin 1987, révisée en Février 1990).

= "Production et contrôle de la qualité des anticorps monoclonaux d'origine murine" (Juin 1987, révisée en Juillet 1990).

= "Essais de sécurité biologiques précliniques des médicaments issus de la biotechnologie" (Septembre 1988).

2 PURIFICATION

Une fois que l'expression de la protéine recombinante a eu lieu, il est important de l'isoler et de la purifier rapidement parce que les cellules productrices contiennent des protéases qui peuvent endommager la protéine recombinante. (GRIFFITHS,1990)

Dans un premier temps, il est important de connaitre le produit et son système de production et de connaitre les différentes étapes qui l'ont amené jusqu'à ce stade de sa fabrication.
Ceci permettra de répertorier les impuretés que la purification devra éliminer.
NB : le terme "impureté" est ici pris dans le sens d'une substance qui fait baisser le degré de pureté de la protéine produite.
On passera ensuite en revue les différentes possibilités de purification qui sont à notre disposition et on justifiera le choix du procédé retenu.

2.1 Le produit à purifier

Comment les cellules productrices nous restituent-elles leur produit recombinant ?
Il y a deux types de production - extracellulaire,
- intracellulaire.

- Les cellules eucaryotes (levures, cellules de mammifères) permettent une production extracellulaire, c'est à dire une sécrétion des protéines recombinantes dans le milieu de culture, ce qui a de nombreux avantages :
- la purification ultérieure est simplifiée,
- le milieu de culture contient peu de protéases,
- le milieu de culture constitue un large espace de production dans lequel la protéine peut s'accumuler.

- Les cellules procaryotes (bactéries) ne sécrètent pas les protéines recombinantes qu'elles produisent : celles-ci s'accumulent au sein du cytoplasme cellulaire ou dans le périplasme de la bactérie, et souvent, s'agrègent pour former des corps d'inclusion. Ce phénomène d'agrégation n'est pas encore totalement éclairci, mais il est clair qu'il est en relation avec

la cellule hôte, les conditions de croissance et les propriétés mêmes de la protéine recombinante.
Ces agrégats présentent deux avantages non négligeables :
- la première étape d'extraction sera relativement facile à exécuter : on pourra effectuer une lyse mécanique des bactéries, puis centrifuger afin de séparer les corps d'inclusion des autres constituants cellulaires (débris cellulaires, protéines solubles propres à la bactérie).
- les protéases bactériennes attaquent plus difficilement la protéine recombinante dans sa forme agrégée.
Il existe un problème majeur : il faut, pour récupérer la protéine, solubiliser ces agrégats. Pour cela, la protéine doit être dénaturée, ce qui implique que ce système est fonctionnel uniquement pour les protéines qui pourront être renaturées après solubilisation.
(GRIFFITHS,1990)

Il faut noter que cette opération de renaturation sera souvent incomplète, elle entrainera donc la formation d'impuretés supplémentaires qui viendront alourdir le nombre des contaminants à éliminer au cours de la purification.

L'opération de purification est donc une étape cruciale dans la fabrication de protéines recombinantes à partir de cellules procaryotes.

Il est important de connaître les étapes qui précèdent la purification, car elles nous éclairent sur les types d'impuretés susceptibles d'être rencontrés et devant donc être éliminés.

SCHEMA DES ETAPES D'EXTRACTION (Exemple d'une protéine produite sous forme d'agrégats intracellulaires par *E.coli*)

BOUILLON DE CULTURE

|

|

lyse bactérienne

1- lyse mécanique

2- centrifugation

|

|

CULOT BACTERIEN LYSÉ

|

|

dissolution des agrégats

1- solubilisation par urée ou chlorhydrate de guanidine

2- centrifugation

|

|

SURNAGEANT :

EXTRAIT PROTÉIQUE DÉNATURÉ

|

|

renaturation

dilution de l'extrait

|

|

SOLUTION DE PROTÉINE NATIVE

(A PURIFIER)

2.2. Les impurétés à éliminer

Avant de poursuivre, il est important de préciser que chaque protéine aura ses propres contaminants à éliminer, et ceci, en fonction de sa structure (analogues de biosynthèse), mais aussi du système de production qui aura été choisi. Ainsi des virus seront-ils recherchés dans un système utilisant des cellules de mammifère alors que cela ne sera pas nécessaire dans un système utilisant une bactérie : le virus est en effet incapable de se reproduire sur des milieux inertes de type bactériologiques, il a besoin du système enzymatique et énergétique plus complexe des cellules eucaryotes pour sa propre biosynthèse.

Exemple d'une protéine produite par *E. coli.*

==> contaminants liés à la cellule productrice:
- ADN génomique et plasmidique,
- protéines d'*E.coli*,
- endotoxines bactériennes.

==> contaminants liés à la protéine recombinante :
- analogues plus ou moins proches de la protéine

Ces analogues pourront apparaitre au cours de la traduction génique, mais aussi juste après, dans le cytoplasme bactérien, ou encore au cours des traitements nécessaires pour soustraire la protéine à sa bactérie productrice (= lyse bactérienne, extraction).

==> autres contaminants :
- divers constituants du milieu de culture,
- réactifs utilisés pour extraire et renaturer la protéine.

Remarque : si la protéine a été renaturée, elle ne doit pas être dénaturée à nouveau au cours de la purification.

2.3. Différentes techniques de purification

Un produit est dit pur quand il n'est pas en mélange avec d'autres substances. En purifiant, on isole physiquement le produit des autres substances éventuellement présentes : purifier, c'est avant tout séparer.

Les techniques de purification des protéines recombinantes les plus largement décrites dans la littérature, et les plus couramment utilisées en pratique sont celles qui exploitent le principe de la **chromatographie liquide**.

Définition générale de la chromatographie liquide :
(Pharmacopée Européenne : V.6.20.4.)
"La chromatographie liquide est un procédé de séparation où la phase mobile est un liquide et où la phase stationnaire, contenue dans une colonne, est constituée par un solide de fine granulométrie ou par un solide imprégné d'un liquide ou par un solide sur lequel des groupes organiques ont été greffés.
L'appareillage est généralement constitué par un système de pompage, un injecteur, une colonne à chromatographie, un détecteur, un enregistreur.
La composition de la phase mobile peut, soit rester constante pendant toute la durée de la chromatographie (élution isocratique), soit varier selon un programme défini (gradient d'élution)."

La chromatographie liquide repose dans son principe sur l'inégalité des coefficients de distribution des substances entre la phase liquide mobile et la phase solide stationnaire (WAJCMAN,1989).
Traditionnellement, les protéines étaient séparées à l'aide de phases fixes plus ou moins rigides constituées de particules assez grosses ayant peu de résistance mécanique impliquant l'utilisation de faibles débits, ce qui donnait de faibles résolutions et des longues durées de séparation. L'analyse des protéines était alors dominée par les techniques d'électrophorèse.
Avec le développement des systèmes de pompage à haute pression qui ont permis d'obtenir des débits réguliers, et l'apparition de phases solides résistantes à de fortes pressions constituées de microparticules (silice), la chromatographie liquide devient la chromatographie liquide haute pression (CLHP ou HPLC en anglais), qui permet d'obtenir des résolutions bien supérieures et des temps de traitement beaucoup plus courts (BANSAL, 1990).

Les différentes techniques chromatographiques utilisées pour la séparation des protéines :
Les propriétés des protéines qui peuvent être utilisées dans leur séparation, se trouvent à leur surface.

Certaines zones sont hydrophobes, d'autres hydrophiles. Indépendamment de cela, des zones différentes peuvent porter des groupes chargés. La taille de la protéine est aussi une propriété discriminante. La propriété la plus spécifique de la protéine est bien sûr son activité biologique qui peut être exploitée par sa capacité à se lier avec un ligand spécifique.
Les quatre propriétés des protéines disponibles pour leur séparation correspondent chacune à une ou plusieurs méthodes chromatographiques :

Séparation par	Méthode chromatographique
TAILLE	Chromatographie par gel filtration
CHARGE	Chromatographie par échange d'ions
ACTIVITE BIOLOGIQUE	Chromatographie d'affinité
SOLUBILITE	Chromatographie par interactions hydrophobes
	Chromatographie en phase inverse

2.3.1. Chromatographie par gel filtration

Principe : cette technique sépare en fonction de l'encombrement stérique des protéines.
Les particules de la phase fixe possèdent des pores de taille relativement uniforme. La taille des pores est choisie de façon à ce que les grosses molécules passent entre les particules sans pénétrer dans les pores, alors que les molécules plus petites s'y arrêtent avant d'être éluées à leur tour.
Application : c'est une technique qui est souvent employée en fin ou plus rarement en début de purification, elle sera en général complétée par une autre technique.

2.3.2. Chromatographie par échange d'ions (CEI)

Principe : La rétention de la protéine dépend ici de l'interaction des charges situées à sa surface avec les groupements ioniques gréffés sur la phase fixe. Il existe deux types d'échangeurs d'ions : échangeurs anioniques (forts ou faibles) contenant par exemple des groupes diéthylaminoéthyle (DEAE) et les échangeurs cationiques (forts ou faibles) : par exemple des groupes carboxyméthyle (CM).
Application : cette technique est très utilisée du fait du nombre de paramètres qui influencent la force des interactions ioniques : il y a le nombre de charges que la protéine met en jeu, la densité ionique de la phase fixe et la force ionique de la phase mobile.

2.3.3. Chromatographie d'affinité (WAJCMAN,1989)

Principe : La séparation se fait en deux étapes. Lors de la première étape, la protéine à séparer est fixée sur un ligand spécifique alors que les autres composants du mélange traversent la colonne sans être retenus. Dans la seconde étape, cette protéine est sélectivement éluée en modifiant judicieusement la composition de la phase mobile (par exemple : gradient croissant de force ionique, modification du pH, ou encore ligand entrant en compétition avec le complexe protéine-phase stationnaire).

Application : cette technique est assez peu développée en production bien qu'en théorie elle combine la simplicité et la vitesse d'opération de l' HPLC à la sélectivité exceptionnelle de son principe. Ce faible succès est dû au coût élevé des supports utilisés, à leur fragilité et à la difficulté de les valider par rapport aux supports classiques.

2.3.4. Chromatographie par interactions hydrophobes (HIC-HPLC)

Principe (WAJCMAN,1989): Cette technique utilise l'hydrophobicité des protéines pour les séparer. Des groupes fonctionnels hydrophobes (chaînes alkyles de C1 à C5 ou groupes phényls) sont greffés sur la phase stationnaire. En présence d'une force ionique élevée (par exemple : sulfate d'ammonium 2 M), la protéine interagit avec le support. Dans ce phénomène, seuls les groupes hydrophobes localisés à la surface de la protéine interviennent. Sa désorption sera réalisée par un gradient de force ionique décroissant.

Application : il existe peu d'exemples de purification industrielle effectuée par cette technique.

2.3.5. Chromatographie en phase inverse (RP-HPLC)

Principe (BANSAL,1990): au départ, il est le même que pour la HIC-HPLC : interactions hydrophobes entre la protéine et la phase stationnaire, mais ici, les groupes alkyles greffés sont plus longs (C4,C8,C18) et plus nombreux. Les interactions hydrophobes mises en jeu dans la RP-HPLC sont donc plus fortes. Il en résulte l'utilisation d'une phase mobile qui obéit à un gradient dont la polarité diminue au cours de la chromatographie : en début de gradient (mélange plutôt polaire), la protéine est retenue sur la colonne, et lorsque la phase mobile devient suffisamment apolaire, elle décroche la protéine qui est éluée.

La phase mobile est un mélange, en proportions variables, d'eau et d'un solvant organique (méthanol, propanol, acétonitrile...). Elle est souvent

additionnée de 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) : c'est un acide fort très volatil qui, même à faible concentration, protone les fonctions carboxyles de la protéine et permet, de ce fait, d'augmenter l'affinité de celle-ci pour la silice greffée ; c'est également un excellent agent solubilisant.

Application : La RP-HPLC est indiscutablement l'une des méthodes de séparation les plus efficaces. Son potentiel repose sur sa capacité à séparer des protéines de structures relativement proches.

L'introduction de cette technique en préparatif a été longtemps limitée du fait de l'utilisation de solvants organiques inflammables en haute pression.

2.4. La technique retenue pour purifier le RU

La technique par échanges d'ions a été essayée : pour bien séparer, il faut travailler à un pH proche du point isoélectrique (pi) de la protéine à purifier ; le pi du RU est voisin de 8, il faut donc chromatographier en milieu basique, seulement, le RU est instable en milieu basique (précipitation, agrégation). L'échange d'ions n'a donc pas été retenu.

C'est la technique en phase inverse qui a été choisie : elle s'effectue en milieu acide (zone de stabilité de la molécule) et permet de séparer des structures protéiques très voisines.

==> Combinaison de deux chromatographies en phase inverse en milieu acide : la première en gradient eau / acétonitrile (ACN), l'autre en gradient eau / isopropanol (ISO).

Pour chacune des deux chromatographies, la purification s'effectue par fractionnement de l'éluat sous la conduite d'un spectrophotomètre (principe : Annexe 4).

Les protéines sont détectées à 280 nm. A cette longueur d'onde, l'ACN et l'ISO n'absorbent pas (Annexe 5) . On suivra donc sur le détecteur UV l'élution de la protéine (= pic) dont on connaît le temps de rétention approximatif (fonction du gradient et du débit d'élution). La fraction de l'éluat correspondant à la sortie de la protéine est alors collectée et fractionnée en trois :

- fraction "tête" (début d'absorption),
- fraction "coeur" (maximum d'absorption),
- fraction "queue" (fin d'absorption).

Chacune des fractions est ensuite analysée ; seule la fraction coeur est retenue.

Remarque : des essais préliminaires ont permis de déterminer les seuils de coupure par un suivi CLHP analytique.

description de l'installation :

-un système de commande informatisé,

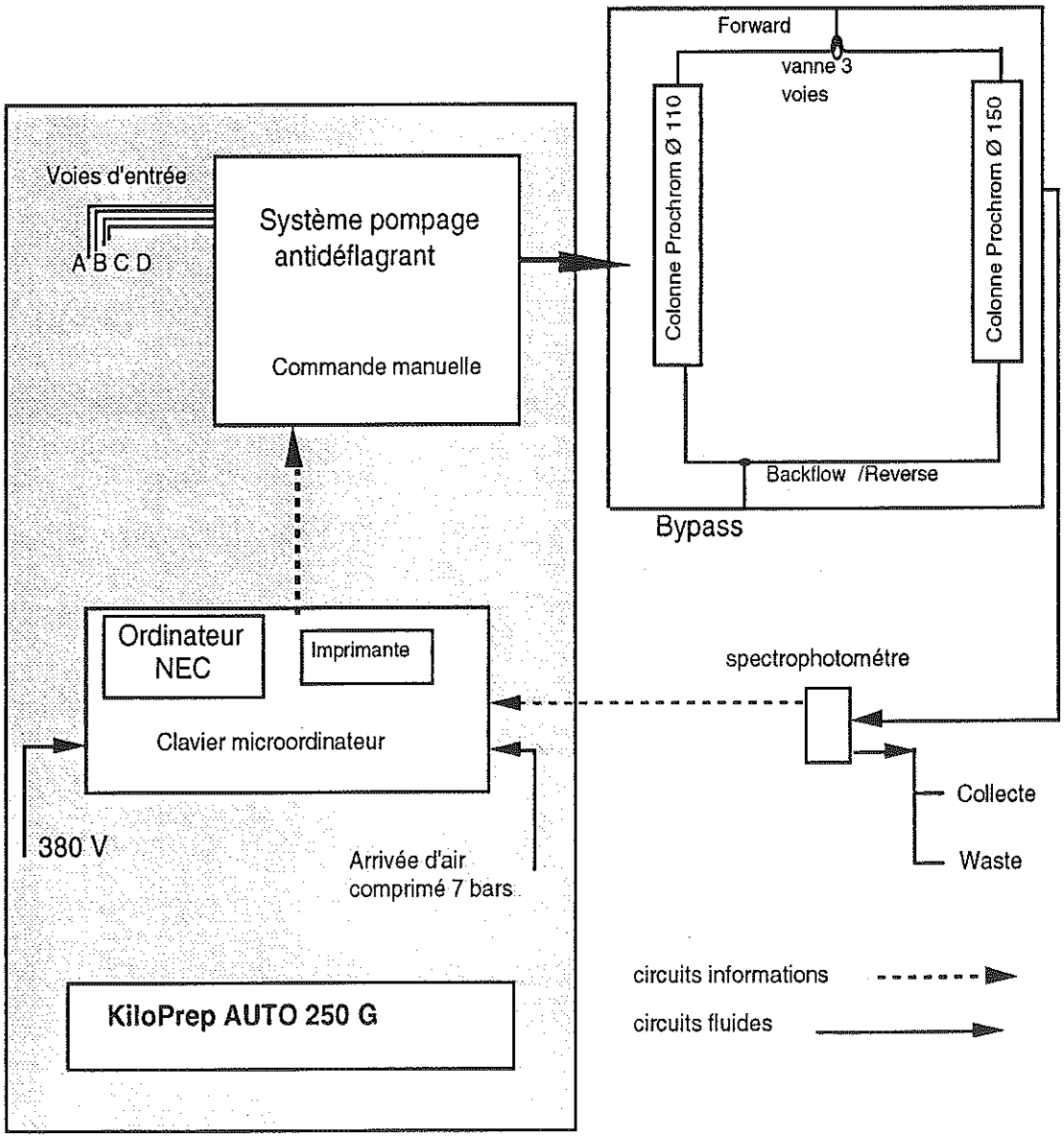
-un système de pompage des solvants d'élution et de formation des gradients,

-une colonne chromatographique de diamètre 110 mm,

-une colonne chromatographique de diamètre 150 mm,

-un spectrophotomètre UV

schéma de l'installation :



3. VALIDATION

3.1. La validation selon la CEE et la FDA

3.1.1. La validation en général

La validation a toujours été partie intégrante de la fabrication des médicaments, les entreprises avaient leurs propres protocoles de validation pour assurer la qualité de leurs produits.
Vers la fin des années 70, la FDA commence à étudier les protocoles de validation utilisés, et ce, à cause d'inspections qui révèlent des pratiques de fabrication non conformes aux GMP (Good Manufacturing Practices : Bonnes Pratiques de Fabrication) répertoriées dans la partie 21 du "Code of Federal Regulations" (CFR).
Initialement, la FDA s'est intéressée aux opérations de stérilisation, puis le concept s'est peu à peu imposé à toute opération participant à la fabrication d'un médicament.(GIORGIO,1988).

Il est cependant entendu que le degré de validation doit correspondre à l'importance de l'opération à valider, quant à son impact sur la qualité du produit fabriqué.

Le document le plus spécifique édité par la FDA sur la validation s'intitule : "Guidelines on general principles of process validation" (lignes directrices des principes généraux du procédé de validation). Il nous enseigne que le fabricant doit préparer un plan de validation qui doit décrire en détail les opérations à effectuer et les données à recueillir. Il doit spécifier le nombre d'essais qui démontreront la reproductibilité de l'opération à valider, et devra fournir une évaluation précise de la variabilité entre les différents essais. Le document de validation doit également contenir la démonstration de l'adéquation des équipements avec leur utilisation et la performance de leur fonctionnement (GIORGIO,1988).

Tout ceci reste assez général, ce qui se comprend étant donné la diversité des méthodes de fabrication des médicaments.

3.1.2. La validation appliquée aux produits recombinants

Lignes directrices européennes

(note explicative relative à la biotechnologie : "production et contrôle de la qualité des cytokines obtenues par des procédés biotechnologiques: paragraphe 3.4.2. Validation du procédé de purification).

"La capacité du procédé de purification à éliminer des protéines, des acides nucléiques, des virus et d'autres impuretés indésirables dérivées de la cellule hôte doit faire l'objet d'une étude approfondie, de même que la reproductibilité du procédé de purification en ce qui concerne sa capacité à éliminer des agents contaminants spécifiques, ainsi que la constance de la composition du produit purifié quant à toute impureté qu'il pourrait contenir. Des études pilotes qui miment les conditions de production et utilisant, par exemple, des groupes de virus judicieusement sélectionnés pour leurs caractéristiques physicochimiques différentes et conditionnant leur comportement à la purification, ou de l'ADN marqué et mélangé intentionnellement à la préparation brute (spiking) doivent être entreprises. Un facteur de réduction pour chaque stade de la purification et pour l'ensemble du processus doit être établi en utilisant, si nécessaire, des concentrations d'ADN et des virus dépassant celles prévues au cours de la production normale."

Lignes directrices américaines

(Points to consider in the production and testing of new drugs and biologicals produced by DNA technology :
paragraphe VI. purification).

Les méthodes de récolte, d'extraction et de purification doivent être décrites en détail, et l'élimination de toute substance chimique indésirable introduite par ces opérations doit être démontrée.

Il faut démontrer que les produits recombinants sont purs (par exemple à 99%) par des caractérisations physicochimiques, et on doit faire particulièrement attention à l'élimination de certains contaminants qui pourraient être présents en très petite quantité.

Le procédé de purification doit être conçu pour éliminer de façon spécifique les contaminations virales, microbiologiques détectables, les acides nucléiques et les substances antigéniques indésirables.

3.2. Application pratique de la validation

La validation d'un procédé permet d'établir qu'il donnera la possibilité d'obtenir un produit dont les caractéristiques correspondent aux exigences de départ (identité, pureté, activité) et cela de façon reproductible.
Elle est l'amorce des BPF puisqu'elle garantit avant toute production que l'installation, le matériel, et le procédé sont en mesure de fabriquer un produit de bonne qualité.

Dans la pratique,la validation a trois sujets d'intérêt :
- l'installation,
- le matériel,
- le procédé.

1- l'installation : cette première étape dans le processus de validation s'intéresse à l'adéquation du matériel avec son environnement. On s'emploie ici à vérifier que chaque instrument du système pourra fonctionner correctement et en toute sécurité.
2- le matériel : c'est la vérification que les spécifications de chaque appareil sont en adéquation avec l'utilisation prévue (avec mise en évidence des limites d'utilisation). C'est la qualification du matériel.

En fait, les deux premiers volets de la validation sont liés. Il en ressort un matériel installé conformément aux spécifications requises par le constructeur; l'utilisateur en connait le fonctionnement, les limites, et il met en place un protocole d'entretien, d'étalonnage et de maintenance pour chaque constituant du système en fonction de son impact sur le produit final (notion d'instrument critique).

3- le procédé : à ce stade, la validation cherche à établir la preuve que la technique choisie (ici l'HPLC phase inverse) et le mode opératoire retenu sont efficaces (permettent la purification du RU) de façon reproductible (d'un lot à l'autre).

3.2.1. L'installation

Différents objectifs :

--> vérification de l'adéquation du matériel avec son environnement : ex : local climatisé ou antidéflagrant en fonction des nécessités.

--> vérification que l'alimentation électrique et les différents fluides (eau, azote,dioxyde de carbone, air comprimé) nécessaires au fonctionnement du système sont disponibles en quantité et en qualité voulues.

--> inventaire de la documentation du constructeur qui renseignera le futur utilisateur sur :

- les caractéristiques techniques de l'appareil et les performances qu'il est susceptible d'en attendre,
- sur les conditions d'utilisation et d'entretien des appareil et l'aidera ainsi dans la mise en place ultérieure des procédures d'entretien, de maintenance et d'étalonnage.

Cette opération peut être facilitée par la rédaction d'un document interne sur chaque appareil . Plan possible :

1. **OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION**
   (sert à la chromatographie en phase inverse du RU)
2. **DOCUMENTS DE REFERENCE**
   - **2.1. documentation du fournisseur**
   - **2.2. documents internes (procédures)**
3. **MATERIEL**
   - **3.1. désignation**
   - **3.2. localisation**
   - **3.3. constructeur**
   - **3.4. description de l'installation**
   - **3.5. schéma de l'installation**
4. **MATIERES PREMIERES**
5. **PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT**
6. **MODE OPERATOIRE**
   - **6.1. utilisation**
     - 6.1.1. programmation informatique
     - 6.1.2. mise en route
     - 6.1.3. fonctions d'intervention rapide
     - 6.1.4. arrêt du système
   - **6.2. nettoyage**
   - **6.3. conservation**
7. **DELAIS D'EXECUTION**
   - **7.1. mise en route**
   - **7.2. utilisation**
   - **7.3. nettoyage avant arrêt**
8. **MAINTENANCE**
9. **SECURITE**
10. **ANNEXES**

La rédaction de ces procédures permet de mieux connaître le matériel et d'apprendre à l'utiliser : c'est une excellente base de formation.

L'importance de cette première étape est souvent sous-estimée, pourtant il suffit de se rendre compte des problèmes ultérieurs qui pourront émerger si le matériel reçu n'a pas été scrupuleusement vérifié, quant à sa parfaite intégration dans l'environnement prévu.

3.2.2. Le matériel

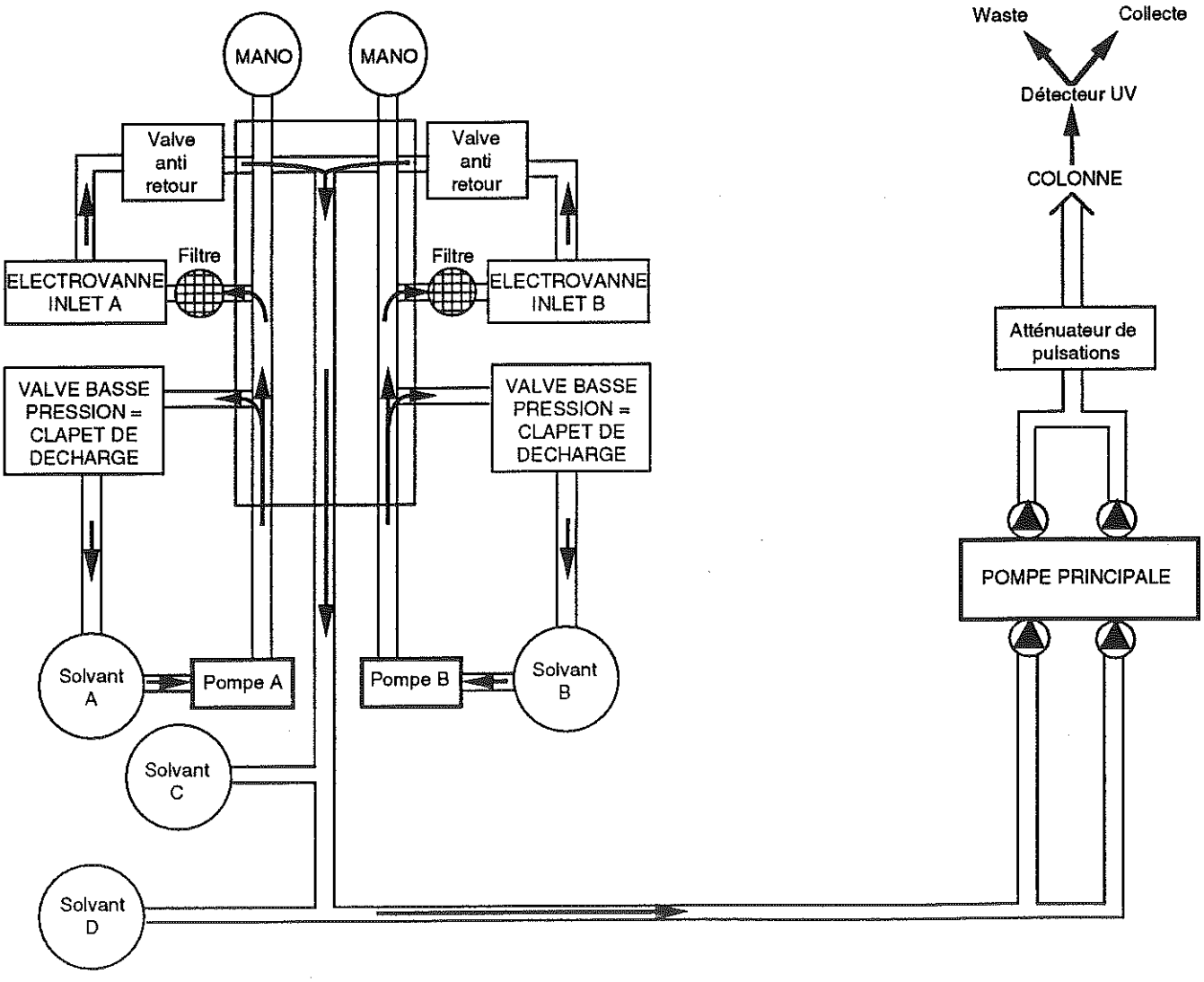
Ici est effectué ce qui est communément appelé la **qualification** du matériel, dont la définition est donnée par le guide des BPF 1992 :
"opération destinée à démontrer qu'un matériel fonctionne correctement et donne réellement les résultats attendus."

En fait, il faut vérifier que chaque appareil constituant du système chromatographique correspond, aussi bien individuellement que dans son ensemble, à ce que l'on attend.

Principe de fonctionnement du système chromatographique :

schéma de l'installation : p 26

schéma du principe de fonctionnement :



Le formeur de gradient comprend :

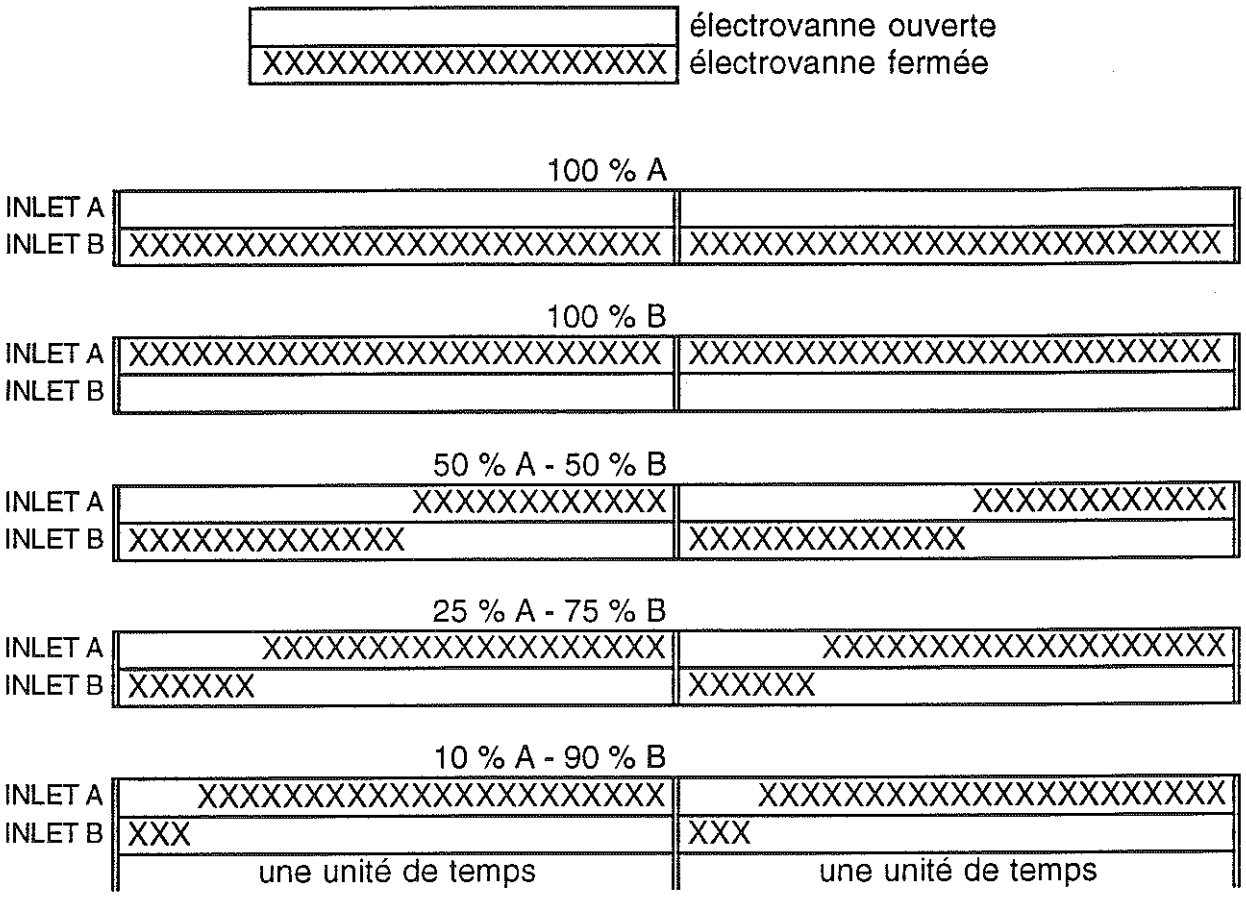
- **Quatre voies d'alimentation : A, B, C, D.**
- Seules les voies A et B participent à la formation du gradient (entrées A et B modulables de 0 à 100 %).
- les voies C et D sont ouvertes (100 %) ou fermées (0 %), indépendamment l'une de l'autre.
  - voie D : voie d'injection
  - voie C : voie d'appoint
- On doit toujours avoir : A + B + C + D = 100 %
  Ex : voie C ouverte (100 %) ---> voies A, B et D fermées
  Ex : voie A ouverte à 10 % ---> voies B ouverte à 90 %
  ---> voies C et D fermées.

- **Deux prépompes A et B**
- Elles approvisionnent les deux circuits d'alimentation en solvants A et B.
- Elles fonctionnent à débit constant : 150 l/h (débit théorique)
- Elles sont connectées à un système de recyclage qui permet de récupérer les quantités de solvants non utilisées (voir chapitre : clapets de décharge).

- **La pompe principale**
- C'est elle qui commande le débit de sortie (qui ira sur la colonne).
- Son débit maximal (72 l/h) est inférieur au débit (fixe) des prépompes.
- C'est une pompe à membrane possédant deux têtes hydrauliques montées en opposition.
- Chaque tête est équipée d'un piston dont la course engendre le déplacement de la membrane dans la chambre de dosage, par l'intermédiaire d'un système hydraulique.
- C'est la variation de la course du piston qui règle le débit.

- **Les électrovannes (INLET A et INLET B)**
- Elles permettent de sélectionner les quantités de A et de B pour former le gradient.
- Elles sont soit ouvertes, soit fermées (pas de position intermédiaire).
- Quand l'une est ouverte, l'autre est fermée.
- Quel que soit le gradient choisi, un cycle "ouverture/fermeture" s'effectue toujours sur une même unité de temps ; c'est la durée d'ouverture d'une électrovanne par rapport à l'autre qui varie avec le gradient.

Schéma du cycle "ouverture-fermeture" des électrovannes
(sur deux unités de temps)



- Elles sont précédées de filtres de porosité de 0,2 µm.
- Elles sont suivies de valves anti-retour.

- Les clapets de décharge

- Ce sont des valves basse-pression qui sont réglées sur le solvant le plus visqueux (celui qui offre le plus de résistance).
- Quand la pompe principale n'est pas en marche (= électrovannes fermées), ils permettent de recycler la totalité des solvants pompés par les prépompes
- Quand la pompe principale fonctionne (= intervention des électrovannes), les quantités de solvant entrant dans la formation du gradient sont "captées" par la pompe principale au moment où les électrovannes s'ouvrent. Les clapets de décharge permettent alors de recycler les quantités de solvants n'entrant pas dans la formation du gradient (pompées en excès par les prépompes).

Le système est piloté par ordinateur, sont programmés : les gradients, la mise en route, la collecte des données brutes (absorbance, pourcentage du solvant A, pourcentage du solvant B, pression au sein du système, débit) qui peuvent se visualiser simultanément en temps réel (au cours d'un essai) sur le moniteur (sous la forme d'un graphe).
La collecte des différentes fractions est pour l'instant effectuée sous contrôle humain : l'opérateur déclenche la collecte en fonction de l'absorbance qu'il visualise sur le détecteur du système ; mais par la suite, elle sera automatisée et se fera sous contrôle informatique.

Lors de ces essais de qualification, quand une visualisation sur le spectrophotomètre sera nécessaire, le solvant utilisé sera marqué avec de l'acétone. Cette dernière a été choisie car :
- elle absorbe à la longueur d'onde de travail : 280 nm,
- c'est un solvant courant,
- elle est peu toxique : DL_{50} sur rats per os = 10,7 ml/kg (le Merck Index 1989),
- elle se dose facilement en chromatographie phase gazeuse.

3.2.2.1. QUALIFICATION DES PREPOMPES

Identification

pompes VEDEL à engrenages à entraînement magnétique.

Spécifications

pompes à débit constant théorique de 150 l/h

But

Vérification des débits :

- chiffrer l'écart du débit réel par rapport au débit théorique.
- s'assurer que l'écart, s'il existe, permet de donner un débit qui reste très supérieur à celui de la pompe principale.

Matières premières

- eau apyrogène

Mode opératoire

- les tuyaux d'alimentation et de recyclage des 2 pompes sont dans un récipient d'eau
- la collecte est faite pendant 36 secondes dans une éprouvette de 2 litres (36 secondes à un débit théorique de 150 l/h correspondent à 1,5 litre)
- les volumes obtenus sont notés
- trois essais sont effectués pour chaque pompe
- les pressions sont inscrites pour chaque pompe

Résultats

	volume sur 36 s			volume moyen	volume moyen	débit	pression
	1	2	3	(ml) sur 36 s	ramené à 1 min	(l/h)	(bars)
prépompe A	1400	1400	1400	1400	2333	**140**	1,8
prépompe B	1480	1480	1510	1490	2483	**149**	2

Ecarts par rapport à la valeur théorique de 150 l/h (2500 ml/min)

Prépompe A : 6,67 %

Prépompe B : 0,67 %

Conclusion

Les écarts constatés sur les débits des prépompes ne mettent pas en danger l'efficacité et la précision du système de formation du gradient puisque ces prépompes alimentent indirectement le circuit ; c'est la pompe principale qui commande le débit de travail.

Le seul impératif de ces prépompes est d'alimenter toujours en excès la pompe principale :

Etant donné que le débit maximal de la pompe principale est de 72 l/h, les débits de 140 l/h pour la prépompe A et de 149 l/h pour la prépompe B assurent avec une grande marge de sécurité l'alimentation de la pompe principale.

3.2.2.2. QUALIFICATION DE LA POMPE PRINCIPALE

Identification

pompe doseuse BRAN LUEBBE

Spécifications

Pompe à membrane possédant deux têtes hydrauliques montées en opposition.

Chaque tête de pompe est équipée d'un piston, qui, par son déplacement, permet le remplissage de la chambre de dosage.

Le débit de la pompe est réglé par la course du piston.

Débit maximum : 72 l/h

But

Vérification des débits avec intervention : - de la prépompe A
ou - de la prépompe B
ou - des 2 prépompes A et B

Matières premières

- eau apyrogène

Mode opératoire

Des mesures de débit sont effectuées en 100% de A, en 100% de B, et en mélange 50/50 de A et de B.:

- les tuyaux d'alimentation et de recyclage des 2 prépompes sont dans un récipient contenant de l'eau apyrogène,
- les prépompes et la pompe principale sont en marche,
- la collecte se fait en sortie "waste" pendant 1 minute,
- les volumes sont notés,
- la moyenne est faite sur 3 mesures,
- les débits de recyclage, pour les débits 300 et 600 ml/min (débits de travail), sont également notés, afin de vérifier que la somme du débit de recyclage et du débit de la pompe principale corresponde au débit de la prépompe.

Résultats

débit affiché (ml)	volume moyen sur 1 minute (moyenne des 3 mesures 100%A,100%B,50%A50%B)	variation en pourcentage du débit réel par rapport au débit théorique
150	101	-32,7 %
300	298	-0,7 %
600	686	+14,3 %
900	1105	+22,8 %

débit affiché (ml/min)	pompe principale volume moyen sur 1 minute (moyenne sur 3 mesures)	recyclage(ml) volume moyen sur 1 minute (moyenne sur 3 mesures)		débit des prépompes (ml/min)
100% A				
150	101			
300	305	prépompe A 2078	+ 305 =	**2383**
		prépompe B 2489		**2489**
600	685	prépompe A 1731	+ 685 =	**2416**
		prépompe B 2478		**2478**
900	1095			
100% B				
150	101			
300	297	prépompe A 2406		**2406**
		prépompe B 2211	+297 =	**2508**
600	693	prépompe A 2431		**2431**
		prépompe B 1800	+693 =	**2493**
900	1110			
50A/50B				
150	101			
300	293	prépompe A 2278	+147 =	**2425**
		prépompe B 2356	+147 =	**2503**
600	680	prépompe A 2086	+340 =	**2426**
		prépompe B 2100	+340 =	**2440**
900	1100			

Conclusions

1er Tableau

Des quatre débits testés, le débit de 300 ml/min est le plus juste.
Plus on s'éloigne de cette valeur, plus l'erreur est grande ; un débit inférieur donne un résultat par défaut, alors qu'un débit supérieur donne un résultat en excès.
==> Les deux débits de travail : 300 et 600 ml/min sont les débits les moins entachés d'erreur,on peut cependant noter que l'erreur sur le débit de 600 ml/min de +14,3 % n'est pas négligeable. Dans ce cas, il faudra soit tenir compte de l'erreur dans l'exploitation des résultats, soit faire intervenir le constructeur pour réajuster la précision de la pompe.

2ème Tableau

Comparaison entre le résultat théorique obtenu par addition du débit de la pompe principale et du débit du recyclage et le résultat réel obtenu lors de la qualification des prépompes :

	théorique	réel	variation
moyenne des débits de A :	2414 ml/min	2333	**3,46 %**
moyenne des débits de B :	2483 ml/min	2483	**0,08 %**

==> Compte tenu de l'imprécision due à la mesure des débits à l'aide d'une éprouvette, les variations détectées dans les débits des prépompes sont négligeables.
Ce test permet donc de détecter une fuite conséquente, et de s'assurer du bon fonctionnement global de l'alimentation et du recyclage des prépompes.

3.2.2.3. QUALIFICATION DU FORMEUR DE GRADIENT

Identification
KILOPREP Auto 250
MILLIPORE

Spécifications
Module de chromatographie antidéflagrant.
Formeur de gradient composé d'un ensemble de pompes qui peuvent être alimentées par 4 solvants différents (voies A,B,C,D).

But
Vérification de la qualité des mélanges effectués par le KILOPREP 250.

Matières premières
- eau apyrogène
- acétone

Matériel d'appui
- spectrophotomètre LKB

Principe
Il s'agit de rendre compte de la fidélité du mélange par rapport au gradient programmé. Pour cela, un gradient en "escaliers" est réalisé à l'aide de 2 solvants A et B (qui ici sont tous les deux de l'eau apyrogène) en prenant la précaution de "marquer" le solvant B avec de l'acétone pour permettre de suivre le mélange en UV à 280 nm.

Des prélèvements sont effectués à intervalles réguliers puis passés sur un spectrophotomètre annexe après étalonnage à partir de dilutions du solvant B. ==> Absorbance = f (% de B)

Ensuite une comparaison est établie entre :
1- l'enregistrement théorique du gradient (= sa programmation informatique)
2- l'enregistrement UV, en continu, du mélange par le détecteur du Kiloprep (spectrophotomètre WATERS)
3- le profil du gradient obtenu par la détection UV du détecteur annexe des prélèvements effectués en cours d'essai (spectrophotomètre LKB).

Mode opératoire

solvant A : eau apyrogène

solvant B : eau apyrogène + acétone QSP obtenir une absorbance de 0,5 sur le détecteur du Kiloprep (afin d'obtenir une absorbance de 0,5 quand le gradient est à 100% de B).

Gradient : - sur 50 minutes,
- augmentation du solvant B par paliers

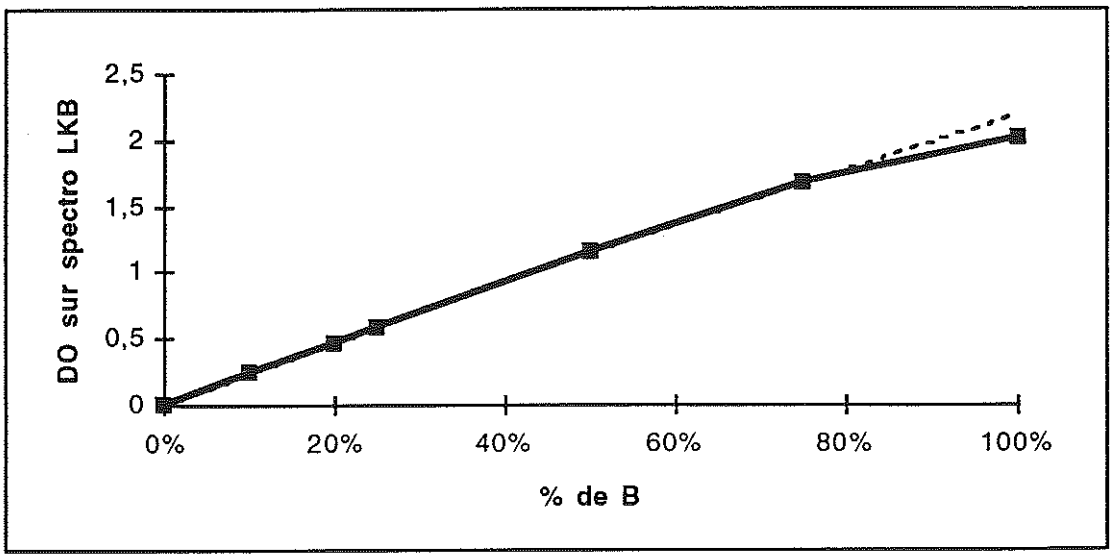
GRADIENT TABLE EDITOR

FILE-Filename: TEST DIR-DIRECTORY PRINT-TO FILE

	TIME min	FLOW ml/min	A%	B%	C%	D%	CURVE CODE
	----	---	---	---	---	---	-----
1	INITIAL	400	100	0	0	0	--
2	5.00	400	90	10	0	0	11
3	10.00	400	80	20	0	0	11
4	15.00	400	75	25	0	0	11
5	20.00	400	50	50	0	0	11
6	25.00	400	25	75	0	0	11
7	30.00	400	0	100	0	0	11
8	35.00	400	0	100	0	0	6
9	45.00	400	100	0	0	0	6
10	50.00	400	100	0	0	0	6

La courbe étalon des dilutions du solvant B correspondant aux différents plateaux du gradient (0,10,20,25,50,75,100%), lues sur le spectrophotomètre LKB annexe, permet de calculer l'absorbance moyenne pour 1 % de B

% de B	absorbance LKB
0	0
10	0,229
20	0,462
25	0,576
50	1,154
75	1,669
100	2,025



Le point 100 %, correspondant à une absorbance (DO) >2, est exclu du calcul car il sort de la zone de linéarité.

% de B	absorbance	absorbance divisée par le % de B
10	0,229	0,0229
20	0,462	0,0231
25	0,576	0,02304
50	1,145	0,02308
75	1,669	0,02225

==> moyenne des absorbances ramenées à 1 % de B = **0,023**

Résultats

Pour chaque prélèvement, l'absorbance est affichée sur le spectrophotomètre WATERS, puis lue sur le spectrophotomètre LKB.

Le pourcentage de B est calculé à partir :

-des absorbances obtenues sur le spectrophotomètre LKB

et -de la valeur d'absorbance correspondant à 1 % de B : 0,023.

Les trois profils sont superposés pour être comparés, mais les deux détecteurs ayant des cuves différentes donc des trajets optiques différents :

- WATERS: trajet optique de 2,1 mm
- LKB : trajet optique de 10 mm

il faut les ramener au même trajet optique pour comparer les mesures d'absorbance:

==> on multiplie les absorbances du spectrophotomètre WATERS par le rapport des deux trajets optiques (4,76) pour les intégrer dans le graphe comparatif.

En fait, cette comparaison permet d'évaluer si les trois profils sont cohérents les uns par rapport aux autres

prélèvement (temps en min par rapport au début du gradient)	absorbance WATERS (valeurs multipliées par 4,76 sur le graphe comparatif)	absorbance LKB	% de B calculé (Abs. LKB / 0,023)	% de B attendu (par rapport au gradient théorique)
3	0	0,002	0,087	0
5	0	0,001	0,043	0
9	0,52	0,238	10,35	10
14	0,102	0,464	20,17	20
19	0,126	0,580	25,21	25
24	0,248	1,129	49,08	50
29	0,372	1,648	71,65	75
34	0,493	2,222	96,60	100
39	0,338	1,534	66,69	-
44	0,96	0,468	20,35	-
49	0,01	0,014	0,61	0

représentation graphique des trois profils: **annexe 6**

Conclusion

La comparaison des trois profils nous permet de constater une bonne adéquation entre la théorie et la réalité. A noter toutefois que les valeurs calculées pour 75 et 100 % sont un peu faibles.

3.2.2.4. QUALIFICATION DES COLONNES CHROMATOGRAPHIQUES

Identification

1- colonnes chromatographiques préparatives

- colonne PROCHROM LC.110.VE.1000.70
- colonne PROCHROM LC.150.VE.1000.70

2- gel de silice TOUZART et MATIGNON

VYDAC 214TPB1520

Spécifications

1-Des colonnes

- colonnes à compression axiale dynamique .
- elles diffèrent par leur diamètre intérieur : 110 mm / 150 mm.

2- Du gel de remplissage des colonnes

- particules sphéroïdales de silice, de 15 à 20 microns de diamètre.
- diamètre des pores : 300 Å
- volume des pores : 0,6 ml/g
- greffage : C_4

3- De l'ensemble colonne + gel

	Prochrom Ø 110	Prochrom Ø 150
section de la colonne (cm^2)	95	176
hauteur du gel (m)	0,62 à 0,65	0,47 à 0,50
volume du gel (l)	6	8,5

But

Détermination de l'efficacité des colonnes (le gel est conditionné dans les colonnes par l'utilisateur).

Matières premières

- alcool éthylique dénaturé (butanol 4%, isopropanol 1 %)
- acétone

Principe

La mesure de la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) est effectuée à partir du passage sur la colonne d'une solution absorbant en UV : solution éthanolique à 10 % d'acétone.

Mode opératoire

Manipulation

- préparer la solution éthanolique d'acétone à injecter
- injecter 10 ml de cette solution sur la colonne
- lancer l'élution (éluant : éthanol)
- détecter la sortie de l'acétone à 280 nm

calculs (**annexe 7**)

$$N = 5{,}54 \times \left(\frac{t_R}{W_{1/2}}\right)^2$$

$$HEPT = \frac{L}{N}$$

Nombre de plateaux théoriques par m de colonne : $\frac{N}{L}$

Facteur d'asymétrie : $As = \frac{b}{a}$

critères d'acceptation

	Prochrom 110	Prochrom 150
Nbre de plateaux théoriques N	>4300	>3300
Nbre de plateaux théoriques par mètre : N/L	>7000	>7000
HEPT (cm) : L/N	$< 1{,}4.10^{-4}$	$< 1{,}4.10^{-4}$
facteur d'asymétrie à 10 % : $As_{10\%}$	0,8 à 1,2	0,8 à 1,2

Résultats

	Prochrom 110	Prochrom 150
Tr (mm)	127	106
$W_{1/2}$ (mm)	4	3,5
L (m)	0,645	0,47
N	5585	5081
N/L	8658	10811
HEPT	$1{,}16.10^{-4}$	$9{,}25.10^{-5}$
As 10 %	1,2	1,2

Conclusion

Les résultats sont conformes aux critères d'acceptation.

Maintenance

Le gel des colonnes est remplacé (les colonnes sont "repackées") lorsque le nombre de plateaux théoriques par mètre de colonne : $\frac{N}{L}$, est inférieur à7000.

Il existe une fiche de suivi (**annexe 8**) par colonne qui répertorie les "repackages" effectués. Pour chaque "package" la fiche de suivi indique la hauteur du gel dans la colonne (utile pour le calcul de l'HEPT) et répertorie les essais effectués et la quantité de produit traité (en détail et en cumulé) ce qui permet d'évaluer la performance des "packages" les uns par rapport aux autres.

3.2.2.5. QUALIFICATION DU DETECTEUR UV

Identification

Spectrophotomètre WATERS
Lambda (λ) Max 481

Spécifications

- monochromateur : photodiode
- gamme de longueur d'onde : de 190 nm à 700 nm
- lampe au deutérium
- cuve optique: micro-cuve de 2,1 mm de largeur (volume = 645 µl, pression maxi = 70 bars)

Buts

- vérification de la linéarité de la détection UV à 280 nm,
- contrôle des mesures affichées par le détecteur avec celles collectées par l'ordinateur,

Matières premières

- eau apyrogène
- acétone

Principe

- une gamme de solutions aqueuses de concentrations croissantes en acétone est réalisée,
- l'entrée du spectrophotomètre est connectée à une tubulure reliée à un entonnoir qui permettra d'alimenter le circuit du détecteur avec les différentes solutions d'acétone,
- les absorbances des solutions de concentrations croissantes en acétone sont mesurées.

Résultats

% d'acétone	Absorbances enregistrées par l'ordinateur	Absorbances lues sur le détecteur	différence (enregistrées-lues)
0,5	0,221	0,205	0,016
1,0	0,414	0,400	0,014
1,5	0,609	0,590	0,019
2,0	0,817	0,799	0,018
2,5	1,000	0,980	0,020
3,0	1,227	1,209	0,018
3,5	1,399	1,380	0,019
4,0	1,564	1,545	0,019
4,5	1,759	1,740	0,019
5,0	1,860	1,840	0,020
5,5	2,018	1,999	0,019
6,0	2,073	-	-
7,5	2,213	-	-
10,0	2,377	-	-

Graphique : **Annexe 9**

Conclusion

- le spectrophotomètre WATERS n'affiche plus de valeurs d'absorbance au delà de 1,999, alors que l'ordinateur poursuit la collecte des absorbances.
- la différence de lecture n'excède pas 0,020.
- la réponse est linéaire jusqu'à 1,999 d'absorbance.
- Il aurait été utile de tester les valeurs d'absorbance inférieures à 0,205 pour élargir le test et déterminer le seuil de détection. Cependant, l'important dans cet essai, est que les valeurs de fractionnement soient dans les valeurs testées.

3.2.2.6. DETERMINATION DES VOLUMES MORTS DU SYSTEME CHROMATOGRAPHIQUE

But

La connaissance des volumes morts amène à une connaissance "physique" du système par détermination de l'espace vide (occupé par l'éluant) des différentes parties du système :

- du système de pompage (sortie de la pompe principale),
- de l'espace entre la sortie de la pompe principale et la sortie du Kiloprep,
- de l'espace entre le Kiloprep et les colonnes,
- des colonnes.

Cette manipulation effectuée après tout changement important dans la configuration du système, permet de déterminer par avance, si des changements dans les temps de rétention peuvent apparaître.

Matières premières

- eau apyrogène
- acétone

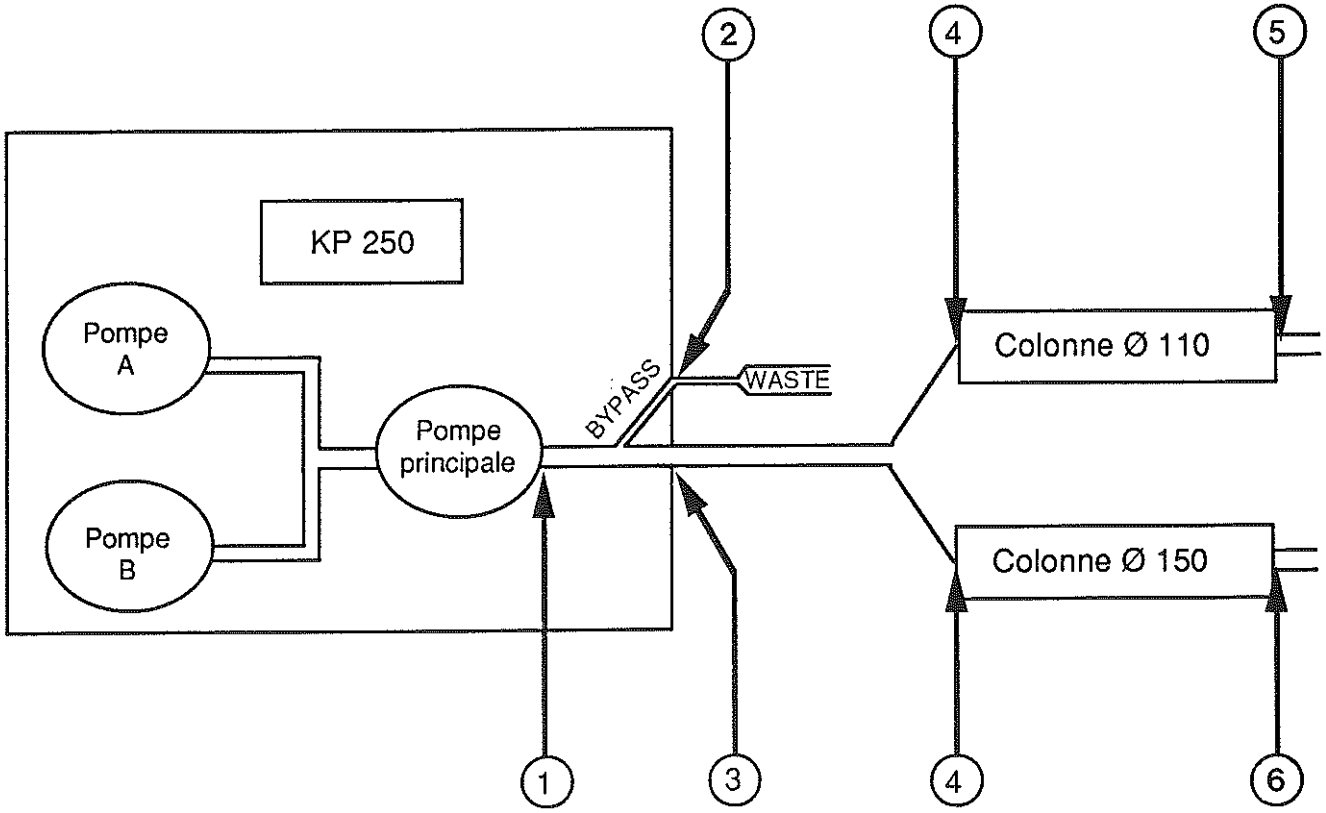
Principe

Cet espace vide provoque un retard dans la sortie de l'éluant (retard proportionnel au volume de l'espace)

Pour matérialiser ce retard, on effectue un gradient en "escaliers" mettant en jeu des paliers successifs d'une solution marquée à l'acétone (détectable en UV), et on place le détecteur UV en différents endroits du système :

- sortie du système de pompage (1)
- sortie bypass (2)
- sortie Kiloprep (3)
- entrée colonnes (4)
- sortie colonne 110 (5)
- sortie colonne 150 (6)

SCHEMA DES DIFFERENTS POINTS D'IMPLANTATION DU DÉTECTEUR



On peut ainsi déterminer les volumes morts du système en faisant la différence entre l'enregistrement théorique (témoins des changements mécaniques au niveau des électrovannes) et le graphe réel (détection UV). Cette différence est mesurée aux changements de paliers.

Résultats

	retard aux changements de paliers	volume (débit réel: 290 ml/min)
(1)	36 s	**174 ml**
(2)	56 s	**271 ml**
(3)	56 s	**271 ml**
(4)	1 min 18 s	**377 ml**
(5)	18 min 36 s	**5,394 l**
(6)	27 min 25 s	**7,950 l**

Conclusion

Les résultats sont fiables jusqu'à l'essai (4).

Pour les essais (5) et (6), les volumes morts des colonnes, déduits des temps de rétention, sont un peu élevés. En fait, on n'est pas certain que l'acétone ne soit pas un peu retenue sur le gel chromatographique ce qui expliquerait la majoration des résultats obtenus.

3.2.2.7. REGLAGE DES CLAPETS DE DECHARGE

But

Vérifier que les clapets de décharge qui participent directement à la formation du gradient (décrits p 34), recyclent correctement les différents solvants utilisés pour purifier le RU.

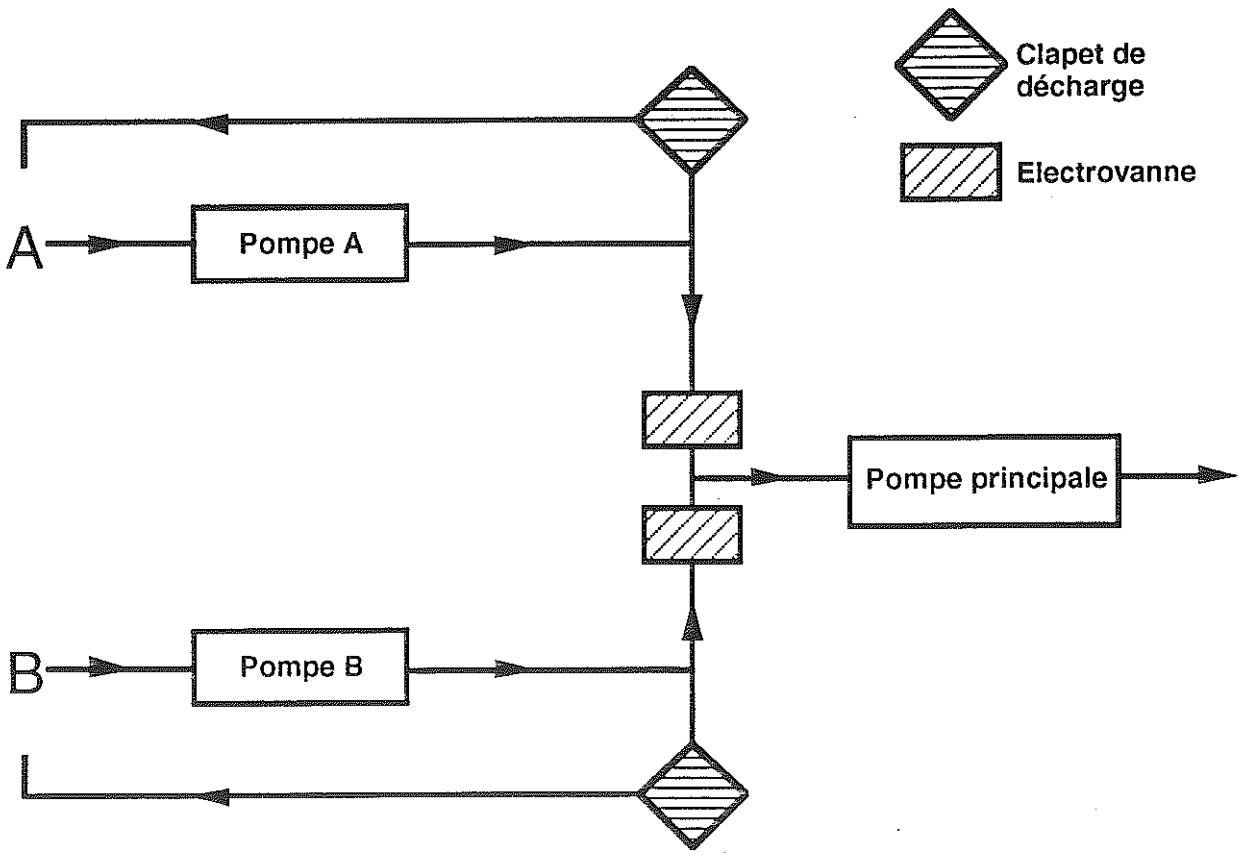
Principe

Le RU est purifié par deux chromatographies successives :

- sur deux colonnes de dimensions différentes
- avec des solvants différents : 1ère: solvant A : eau
  solvant B : acétonitrile (ACN)
  2ème: solvant A : eau
  solvant B : isopropanol (ISO)

Le système de pompage (KP 250) est le même pour les deux chromatographies, donc pour les deux couples de solvants.

Schéma du système de pompage



Les solvants A et B sont pompés à 150 l/ h et sont recyclés par des clapets de décharge en fonction du débit (imposé par la pompe principale) et du gradient (commandé par la fréquence d'ouverture des électrovannes).
Le clapet de décharge du circuit A participe au recyclage de l'eau pour les deux chromatographies, par contre,celui du circuit B participe dans un cas au recyclage de l'acétonitrile et dans l'autre cas au recyclage de l'isopropanol.

L'isopropanol est plus visqueux que l'acétonitrile :

HANDBOOK	-ACN ==>	viscosité à 15°C = 0,375 mpa
(71ème édition)		viscosité à 25°C = 0,345 mpa
	- ISO ==>	viscosité à 15°C = 2,86 mpa
		viscosité à 30°C = 1,77 mpa

Le clapet de décharge est réglé sur l'isopropanol.

Il s'agit ici de vérifier l'influence du déréglage de ce clapet de décharge sur un mélange 50/50 de A et de B selon que B est de l'ACN ou de l'ISO.

Matières premières
- eau apyrogène
- acétonitrile
- isopropanol
- acétone

Matériel d'appui
- spectrophotomètre LKB (trajet optique de 10 mm)

Manipulation

1- Des dilutions aqueuses d'ISO et d'ACN à 0, 25, 50, 75 et 100 %sont réalisées, les solutions mères (100 %) contenant de l'acétone en quantité suffisante pour obtenir une densité optique de 0,5 sur le détecteur UV du Kiloprep.
2- Ces solutions sont passées sur un autre spectrophotomètre, ainsi une courbe étalon est tracée pour chaque solvant, ce qui fait correspondre une absorbance à un pourcentage de dilution de B.

% de B	Absorbance sur spectro. LKB	
	ISO	ACN
0	0	0
25	0,505	0,542
50	1,089	1,143
75	1,670	1,695
100	2,130	2,142

<== Abs.=0,5 sur spectro.du KP 250 (spectro.WATERS)

courbe étalon : **annexe 10**

Cette courbe permet de déterminer le pourcentage de B obtenu dans un mélange 50%A/50%B dans les conditions initiales (avant déréglage du clapet de décharge), puis après déréglage, et ceci, pour les deux solvants ACN et ISO.
En effectuant un déréglage volontaire sur le clapet de décharge, il est possible de vérifier que le réglage initial était correct, et qu'il peut être reproduit.

Résultats

1- manipulation initiale (avant déréglage du clapet de décharge du circuit B)

	100 % de B	50% A / 50% B		
	absorbance WATERS	absorbance WATERS	absorbance LKB	**% B** (courbe étalon)
ISO	0,5	0,244	1,126	**53 %**
ACN	0,498	0,250	1,169	**52 %**

2- Après déréglage (=desserrage de la membrane du clapet)

	100 % de B	50% A / 50% B		
	absorbance WATERS	absorbance WATERS	absorbance LKB	**% B** (courbe étalon)
ISO	0,502	0,2	0,915	**43 %**
ACN	0,504	0,240	1,075	**50 %**

3- Nouveau réglage du clapet sur l'ISO

- absorbance à 100 % d'ISO = 0,509
- à 50%A/50%B, on resserre le clapet jusqu'à obtenir une absorbance d'environ $\frac{0,509}{2}$

	100 % de B	50% A / 50% B		
	absorbance WATERS	absorbance WATERS	absorbance LKB	**% B** (courbe étalon)
ISO	0,509	0,252	1,115	**52 %**
ACN	0,503	0,254	1,188	**53 %**

Conclusion

- au cours du déréglage, le comportement de l'ACN a peu varié (- 2% par rapport au réglage initial), alors que l'ISO chute à 43 % (- 10 % par rapport au réglage initial).
- Le nouveau réglage permet d'obtenir les mêmes pourcentages qu'au départ à 1 % près, ce qui, compte tenu de l'imprécision de la méthode employée est satisfaisant.

3.2.2.8. LE GRADIENT AVEC LES SOLVANTS DE TRAVAIL

But

Le premier essai de qualification du KP 250 (p 41) a permis de vérifier la qualité d'un mélange entre deux solvants de même nature (eau / eau + acétone) à l'aide d'un gradient en escaliers.

Ce nouvel essai est en fait l'application de la qualification aux conditions d'utilisation ==> gradient eau / ACN

==> gradient eau / ISO

Ces essais sont nécessaires du fait que les couples de solvants mis en jeu présentent des différences de viscosité (ce qui n'était pas le cas dans le premier essai).

Ces essais sont effectués avec et sans colonne pour mettre en évidence d'éventuelles différences.

Matières premières

- eau apyrogène
- acétonitrile
- isopropanol
- acétone
- acide trifluoroacétique
- acide x (il n'est pas mentionné car il entre dans la formulation du produit fini)

- Matériel annexe

- spectrophotomètre LKB

Principe

- lecture UV d'un gradient dont l'un des solvants est "marqué" par de l'acétone
- prélèvements à intervalles réguliers au cours de l'essai, lus sur un spectrophotomètre annexe pour établir une courbe d'équation : Absorbance = f (% de B)
- comparaison de l'enregistrement théorique du gradient, de l'enregistrement UV par le spectrophotomètre du KP 250, et du profil obtenu par les prélèvements ponctuels au cours de l'essai.

La comparaison des trois profils s'effectue selon le même principe que lors des essais à l'eau (voir : résultats p 43).

Mode opératoire

a-Gradient ACN

solvant A : eau apyrogène + TFA 0,1%
solvant B : acétonitrile + TFA 0,1% + acétone QSP obtenir une absorbance de 0,5 sur le détecteur du KP 250 (spectrophotomètre WATERS)
gradient :

GRADIENT TABLE EDITOR

FILE-Filename: TEST DIR-DIRECTORY PRINT-TO FILE

	TIME min	FLOW ml/min	A%	B%	C%	D%	CURVE CODE
1	INITIAL	600	100	3	0	0	11
2	2.00	600	70	30	0	0	6
3	32.00	600	20	80	0	0	6
4	37.00	600	20	80	0	0	6
5	42.00	600	100	0	0	0	6
6	60.00	600	100	0	0	0	6

a_1-Détermination de l'absorbance correspondant à 1 % de B à partir de dilutions du solvant B

% de B	absorbance	absorbance divisée par le % de B
0	0	
20	0,442	0,0221
40	0,906	0,02265
60	1,371	0,02285
80	1,759	0,02199

==> moyenne des absorbances ramenées à 1 % de B = **0,0224**

a_2-Résultats

Sans colonne (bypass)

prélèvement (temps en min par rapport au début du gradient)	absorbance WATERS (valeurs multipliées par 4,76 sur legraphe comparatif)	absorbance LKB	% de B calculé (Abs. LKB divisée par 0,0224)
5	0,168	0,761	33,97
10	0,209	0,948	42,32
15	0,257	1,168	52,14
20	0,298	1,349	60,22
25	0,340	1,523	67,99
30	0,384	1,700	75,89
35	0,405	1,791	79,96
40	0,209	0,974	43,48
45	<0,02	0,004	0,178
50	<0,02	0,002	0,089
55	<0,02	0,003	0,134
60	<0,02	0,002	0,089

graphique représentant les trois profils à comparer : **annexe 11**

Avec colonne (Prochrom diamètre 150 mm)

prélèvement (temps en min par rapport au début du gradient)	absorbance WATERS (valeurs multipliées par 4,76 sur legraphe comparatif)	absorbance LKB	% de B calculé (Abs.LKB divisée par 0,0224)
5	0,001	0,001	0,045
10	0,001	0,001	0,045
15	0,169	0,787	35,13
20	0,225	1,009	45,04
25	0,266	1,195	53,35
30	0,308	1,378	61,52
35	0,358	1,585	70,76
40	0,389	1,719	76,74
45	0,404	1,782	79,55
50	0,205	0,919	41,03
55	0,010	0,039	1,74
60	0,002	0,004	0,178

graphique représentant les trois profils à comparer : **annexe 12**

a_3-Conclusion

Avec ou sans colonne, les trois profils sont semblables.

Le mélange eau / ACN suivant le gradient retenu est satisfaisant.

b- Gradient ISO

solvant A : eau apyrogène + acide x 0,5%
solvant B : isopropanol +acide x 0,5%+ acétone QSP obtenir une absorbance de 0,5 sur le spectrophotomètre.WATERS

gradient :

GRADIENT TABLE EDITOR

FILE-Filename: TEST DIR-DIRECTORY PRINT-TO FILE

	TIME min	FLOW ml/min	A%	B%	C%	D%	CURVE CODE
1	INITIAL	400	100	0	0	0	--
2	0.10	300	100	0	0	0	11
3	1.00	300	80	20	0	0	6
4	21.00	300	80	20	0	0	6
5	61.00	300	30	70	0	0	6
6	66.00	300	30	70	0	0	6
7	71.00	300	100	0	0	0	6
8	75.00	300	100	0	0	0	6
9	90.00	300	100	0	0	0	6

b_1-détermination de l'absorbance correspondant à 1 % de B à partir des dilutions du solvant B

% de B	absorbance	absorbance divisée par le % de B
0	0	
20	0,428	0,0214
40	0,887	0,022175
60	1,341	0,02235
80	1,775	0,0221875

==> moyenne des absorbances ramenées à 1 % de B = **0,022**

b_2-Résultats

Sans colonne (bypass)

prélèvement (temps en min par rapport au début du gradient)	absorbance WATERS (valeurs multipliées par 4,76 sur le graphe comparatif)	absorbance LKB	% de B calculé (Abs.LKB divisée par 0,022)
5	0,133	0,409	18,59
10	0,114	0,408	18,54
15	0,114	0,408	18,54
20	0,112	0,405	18,4
25	0,167	0,472	21,45
30	0,236	0,6	27,27
35	0,167	0,745	33,86
40	0,190	0,856	38,90
45	0,227	1,018	46,27
50	0,262	1,170	53,13
55	0,295	1,316	59,81
60	0,330	1,466	66,64
65	0,345	1,542	70,09
70	0,140	0,698	31,72

graphique représentant les trois profils à comparer : **annexe 13**

Avec colonne (prochrom diamètre 110 mm)

prélèvement (temps en min par rapport au début du gradient)	absorbance WATERS (valeurs multipliées par 4,76 sur le graphe comparatif)	absorbance LKB	% de B calculé (Abs.LKB divisée par 0,022)
5	0		
10	0		
15	0		
20	0		
25	0,090	0,400	18,18
30	0,088	0,400	18,18
35	0,090	0,403	18,31
40	0,0089	0,406	18,45
45	0,113	0,501	22,77
50	0,140	0,626	28,45
55	0,170	0,748	34
60	0,198	0,881	40,04
65	0,230	1,032	46,90
70	0,264	1,188	54
75	0,300	1,330	60,45
80	0,333	1,478	67,18
85	0,239	1,112	50,54
90	0,035	0,172	7,82

graphique représentant les trois profils à comparer : **annexe 14**

b_3-Conclusion

Sans colonne

Au cours de la chromatographie, le profil UV enregistré est anormal (l'allure générale est celle du gradient mais la ligne de base est très perturbée) : il semble qu'il y ait un dégazage des solvants dans la cuve du spectrophotomètre.

==> Le dégazage d'un mélange de solvants s'opère quand celui-ci rencontre une zone de pression inférieure à celle où il a été mélangé ; l'ajout d'une tuyauterie de diamètre inférieur à la sortie du circuit (= sortie prélèvement), crée une augmantation de pression en amont (= au niveau du détecteur UV) : le dégazage ne s'effectue plus dans la cuve du spectrophotomètre, mais à la sortie du circuit ==> le profil redevient alors normal.

Remarque : Pour éviter cette perturbation, il faudrait dégazer les solvants avant leur mélange (avant leur entrée dans le KP 250), mais ce dégazage des solvants est une manipulation dangereuse, et la quantité de solvant à traiter est telle, que l'on préfère éviter cette opération qui somme toute se révèle inutile en fonctionnement normal c'est à dire en présence de la colonne (c'est elle qui assure la surpression qui évite le dégazage dans la cuve du détecteur).

Avec colonne

Au début du palier à 20 % de B, on observe un pic anormal qui atteint 40 % de B, confirmé par un 2ème gradient (reproductible) : il semble que l'isopropanol soit retenu sur la colonne un court instant au moment de son apparition, puis soit relargué d'un coup : pic.

Ceci est à vérifier en prélevant l'éluat au moment où le pic apparaît, et en l'analysant en chromatographie phase gazeuse.

Il faudrait également enchaîner plusieurs gradients pour voir si ce pic persiste, et si oui, si il évolue (cette étude serait à faire en analytique).

Sinon, le gradient théorique est bien reproduit par le formeur de gradient, le retard entre les deux étant dû au volume mort du système.

3.2.2.9. Discussion des essais de qualification

Les prépompes

Ce sont des pompes de "gavage". Il faut qu'elles délivrent les solvants en quantité suffisante pour alimenter la pompe principale, ce qui est le cas.

La pompe principale

L'écart d'environ 14 % constaté sur le débit de 600 ml/min était jusqu'à présent uniquement pris en considération dans les résultats, cependant, le contact a été pris avec le constructeur afin qu'il intervienne pour réajuster la précision de la pompe.

Le formeur de gradient

Il a été testé avec de l'eau, puis avec les solvants de purification, avec et sans colonne. Les problèmes soulevés (avec l'isopropanol) doivent être expliqués voire résolus si cela est possible, mais l'important est déjà de les connaitre et de savoir qu'ils n'affectent pas la qualité de la purification.

Il faut que, dans les conditions normales d'utilisation (avec la colonne), la formation du gradient soit fidèle, afin que notre produit soit élué au moment attendu.

La détermination des volumes morts donne accès aux différents volumes des constituants du système chromatographique. Cet essai est à effectuer après un changement dans la configuration du système car une variation de volume mort entraîne une variation des temps de rétention

La vérification du réglage des clapets de décharge des circuits d'alimentation de la pompe principale permet de juger de leur état.

Le conditionnement des colonnes chromatographiques est vérifié par le calcul du nombre de plateaux théoriques par mètre de colonne et la détermination du coefficient d'asymétrie à 10 %. Des valeurs limites sont établies en dessous desquelles il faut reconditionner ou changer le gel des colonnes .

Le détecteur UV

C'est un instrument critique, car c'est par les valeurs d'absorbance que l'éluat est fractionné, et par conséquent, la protéine purifiée. Une attention particulière doit donc être apportée à cet appareil, ce qui est le cas, puisque la lampe est changée tous les six mois, quelle que soit sa durée d'utilisation, et le calage de la longueur d'onde est vérifié à cette occasion.

Cet appareil possède une large gamme de longueurs d'onde (de 170 nm à 700 nm) : le calage sur 280 nm, effectué avant chaque manipulation se fait manuellement, par l'intermédiaire d'un bouton à vis (susceptible de se

dérégler facilement), en production, il faudra utiliser un détecteur muni d'un filtre à longueur d'onde qui calera définitivement l'appareil sur 280 nm.

Fréquence des essais de qualification

La totalité des essais est à mettre en oeuvre après un arrêt prolongé du système (un trimestre) et après tout changement important dans sa configuration (comme le remplacement d'un des appareils).

Pour ce qui est des essais de routine, il est bon de mettre en place un protocole de contrôle la veille de l'utilisation du système. Ce protocole pourra comprendre :

- un essai à blanc avec acétone pour visualiser sur le détecteur UV le bon déroulement du gradient, ce qui permet de vérifier :
  - le réglage des clapets de décharge,
  - la formation du gradient,
  - le fonctionnement du détecteur UV.
- la détermination du nombre de plateaux théoriques par mètre de colonne et l'évaluation de la symètrie d'un pic d'acétone, qui permettent de vérifier le bon conditionnement des colonnes.

Conclusion

Une fois que la parfaite connaissance du matériel (ses caractéristiques, ses limite) est acquise, l'étape suivante consistera à effectuer les essais avec le RU : c'est la phase de mise au point du procédé.

Ce procédé devra être validé : trois lots de RU (au minimum) seront fabriqués selon ce procédé . Ils subiront des contrôles d'identité, de pureté et d'activité.

3.2.3. le procédé

La validation du procédé de purification passe par :

- sa description détaillée, qui amène à la détermination d'opérations et d'instruments critiques qui influencent directement la pureté et la stabilité du produit.
- l'inventaire des contaminants et l'évaluation de leur importance ainsi que les méthodes qui permettent de les détecter,
- les études de clearance et de surcharge pour certains contaminants,
- la détermination de la durée de vie d'un "package" pour les colonnes,
- l'étude de reproductibilité du procédé sur un nombre minimum de lot.

3.2.3.1. Description du procédé

Cette description s'effectue par la rédaction d'un document qui décrit le mode opératoire détaillé.
Dans une phase de développement, ce document doit être mis à jour régulièrement pour faire état des changements apportés à la mise au point du procédé.

Contenu d'un tel document :

1- Référence du produit fabriqué :
= la protéine recombinante RU
L'identification des charges de fermentation qui ont permis la rédaction du document doit être précisée.

2- Stade de fabrication : permet de situer le stade décrit dans le document par rapport au procédé complet de fabrication de la protéine.
= purification de la solution brute de RU
- stades précédents : fermentation, extraction.
- stades suivants : distillation, formulation, lyophilisation.

La référence des documents de même nature correspondant à ces différents stades est fournie.

3- Numéro de version du document : permet de situer le document dans la mise au point du procédé.

4- Principe : énoncé du principe des différentes étapes du stade décrit.
Purification : a- chromatographie en phase inverse sur silice greffée en C4 avec élution par un gradient eau/ACN/TFA.
b- chromatographie en phase inverse sur silice greffée en C4 avec élution par un gradient eau/ISO/acide x.

5- Rôle de la purification :
Améliore le degré de pureté de la protéine : de l'ordre de 90% pour la solution brute, il passe à 97 % pour la solution purifiée, ceci par l'élimination des pyrogènes et des analogues de biosynthèse, et poursuite de l'élimination de l'ADN, des protéines bactériennes, des constituants du milieu de fermentation et des réactifs d'extraction.

6- Critères d'acceptation du lot purifié :
- test d'efficacité des colonnes (effectué avant et après la purification).
- profil des chromatogrammes (ils doivent être réguliers).
- pureté HPLC de la solution purifiée : > 96%.
- contrôles d'identité et de pureté qui doivent être conformes au standard.

7- Description des modifications apportées à cette version du document par rapport à la précédente
Ex : introduction d'un essai à blanc en début de manipulation qui permet :
- de vérifier qu'il n'y a pas de pics parasites (relargage de contaminants)
- un meilleur équilibrage du gel,
- de vérifier le bon fonctionnement de tout le matériel.
- de bien éliminer le solvant de conservation : l'éthanol.

8- Le procédé :
8.1. matières premières (nom, référence, numéro de lot)
- réactifs
- gel chromatographique
- solution brute (pureté, titre, masse)

8.2. matériel utilisé (nom, références des procédures)
- matériel de purification (chaîne chromatographique préparative)
- matériel utilisé pour l'analyse immédiate (chaîne chromatographique analytique)
- matériel annexe (balances, système de production d'eau apyrogène..)

8.3. mode opératoire détaillé de la purification

Remarque : Pour ne pas rentrer dans les détails du procédé, qui est la propriété exclusive de Roussel Uclaf, il ne sera fait état ici que de la description nécessaire à sa compréhension générale.

SOLUTION BRUTE DU RU

|

1. Chromatographie acétonitrile

(colonne : diam.150 mm)

|

- essai à blanc
- injection
- élution

(gradient eau / ACN / TFA)

| | |

fraction tête | fraction coeur | fraction queue

|

SOLUTION D'ACETONITRILE DU RU

|

2. Chromatographie isopropanolique

(colonne : diam.110 mm)

|

- essai à blanc
- injection
- élution

(gradient eau / ISO / acide faible)

| | |

fraction tête | fraction coeur | fraction queue

|

SOLUTION ISOPROPANOLIQUE DU RU

|

Distillation
Formulation
Lyophilisation

Il est intéressant à ce stade de mettre en évidence certaines opérations critiques qui concourent directement à la pureté et à la stabilité de la protéine comme :

==> la clarification de la solution brute avant de l'injecter sur la colonne : filtration pour éviter un colmatage (encrassement) précoce de la colonne.
==> le remplissage correct des colonnes (rédaction d'une procédure de conditionnement des colonnes avec description des tests effectués pour le vérifier et les critères d'acceptation)
==> l'optimisation de l'unité opératoire des colonnes : c'est à dire le chargement en protéine à purifier par essai chromatographique.
==> Le détecteur UV est un instrument critique puisque c'est par les valeurs d'absorbance que l'éluat est fractionné.

9- Contrôles :
identité, pureté du lot ayant servi à la rédaction du document :
- sur la solution brute,
- sur la solution d'acétonitrile,
- sur la solution isopropanolique,

avec mise en évidence de la diminution des contaminants au cours de la purification.

10-Rendements :
- de chaque étape par rapport à l'étape précédente,
- de chaque étape par rapport à la première étape.

3.2.3.2. Les contaminants, leur importance, leurs méthodes de détection

A. Les pyrogènes

définition :
On appelle substance pyrogène toute substance susceptible de provoquer par injection dans l'organisme une brusque élévation de température.
La plupart des pyrogènes sont exogènes et ne provoquent pas directement l'élévation de température.
Une fois introduits dans l'organisme, les pyrogènes exogènes provoquent la libération de substances pyrogènes endogènes qui gagnent le centre de thermorégulation hypothalamique et provovoquent l'élévation de température.

Les endotoxines :
Elles constituent la partie lipopolysaccharidique des bactéries gram négatif.
Les endotoxines sont relativement thermostables (elles résistent à l'autoclavage, elles sont détruites par une exposition prolongée à la chaleur sèche : 180 à 200 °C) et relativement insensibles aux variations de pH. Les mammifères y sont sensibles, et l'homme tout particulièrement.
Elles agissent à de très faibles doses : de l'ordre du microgramme.
Il a été démontré que la dose hyperthermisante était très éloignée de la dose létale, les accès fébriles qu'elles provoquent sont donc en général bénins ; cependant, elles peuvent être responsables d'accidents graves chez les grands malades. (LE HIR,1992)

Méthodes de détection :
(essais inscrits à la Pharmacopée européenne)

1-Etude de la réaction thermique du lapin à l'injection de la substance à analyser (Annexe 15)
sensibilité : - un lapin réagit en moyenne à une injection de un nanogramme de substance pyrogène par kg de poids (POOLE,1991),
avantages : - le test détecte tous les pyrogènes.

inconvénients : - la sensibilité est variable d'un animal à l'autre,
- la réponse n'est pas standardisable,
- la réponse n'est pas quantitative,
- l'entretien d'une animalerie est coûteux,
- l'essai est long à mettre en oeuvre et à réaliser,
- la tendance est à la diminution de l'utilisation d'animaux d'expérimentation.

2- le limulus test (annexe 16) : les endotoxines provoquent à très faible dose la lyse des amoebocytes d'un crustacé : le Limulus polyphemus.

sensibilité : - 3 picogrammes par ml

avantages : - très sensible,
- très facile à mettre en oeuvre (il existe dans le commerce des kits prêts à l'emploi),
- très rapide : quelques heures.

inconvévients : - ne détecte que les endotoxines,
- ne permet pas de mimer la réaction physiopathologique comme lors du test avec le lapin.

Remarque : ces deux essais très différents sont complémentaires, ils sont donc souvent effectués conjointement.

<u>sources de pyrogènes</u>:
- *E. coli*,
- matières premières,
- personnel,
- gel chromatographique.

<u>Comment les éviter</u> :
Dans une production mettant en jeu *E. coli*, il est impossible de les éviter.
Leur taux peut toutefois être diminué en jouant sur les autres paramètres de contamination :
- matières premières : en commandant des produits apyrogènes.
- personnel : en limitant au maximum les manipulations manuelles,
- gel chromatographique : en mettant au point des techniques de nettoyage des colonnes qui permettent d'empêcher leur contamination : l'éthanol employé pour rincer les colonnes après utilisation et pour les conserver entre deux utilisations, empêche toute contamination bactérienne génératrice de pyrogènes.

B. Acide désoxyribonucléique (ADN)

source : cellule hôte
Pour *E. coli* :
- ADN génomique : ADN de la bactérie
- ADN plasmidique: ADN introduit

risque : de malignité que pourrait présenter à long terme un ADN contaminant hétérogène.
Ce risque est fonction de la voie d'administration, de la fréquence d'administration et des doses employées, plusieurs facteurs qui varient selon la nature et l'application thérapeutique du produit biologique considéré.
L'OMS et la FDA ont établis des quantités d'acceptation par dose unitaire :
- limite supérieure admise par l'OMS : 100 pg/dose (voie parentérale). (OMS, 1987)
- limite supérieure admise par la FDA : 10 pg/dose (voie parentérale). (office of biologics research and review, FDA, 1985)

méthodes de détection :
Il est essentiel d'effectuer ces dosages en veillant à ce qu'aucune contamination extérieure (microorganismes du laboratoire par exemple) ne vienne fausser les résultats.

==> emploi de sondes nucléaires (dot blot) : la détection est basée sur l'hybridation entre l'ADN à doser et un ADN homologue radiomarqué qui constitue la sonde ; après lavage (pour éliminer l'ADN marqué qui ne s'est pas fixé), la radioactivité détectée est proportionnelle à la quantité d'ADN dans l'échantillon de départ. Le seuil de détection est de l'ordre du picogramme.
==> PCR (Polymérase Chain Reaction) technique d'amplification.
Cette méthode permet de doser de très petites quantités d'ADN.

Remarque :il sera discuté ultérieurement de l'intérêt d'envisager des études de surcharge pour l'ADN.

C. Protéines bactériennes (*E.coli*)

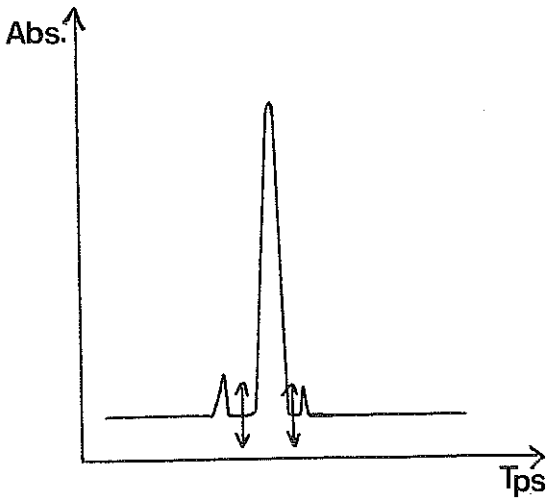
Normalement, elles sont éliminées lors de la phase d'extraction.
Si quelques protéines subsistent, on espère qu'elles seront éliminées au cours des coupes de purification lors des deux chromatographies.
Leur élimination devra être mise en évidence au cours des différentes étapes de la purification.

Méthode de détection :
test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) :
A partir de la bactérie non recombinée que l'on met en culture, on récupère ses propres protéines. On développe un antisérum en immunisant des animaux avec différentes fractions du mélange de protéines. Il suffit ensuite d'utiliser l'antisérum ainsi fabriqué en dosage immunologique contre les protéines de la bactérie contenues dans le produit.

D. Les analogues de structure de la protéine recombinante

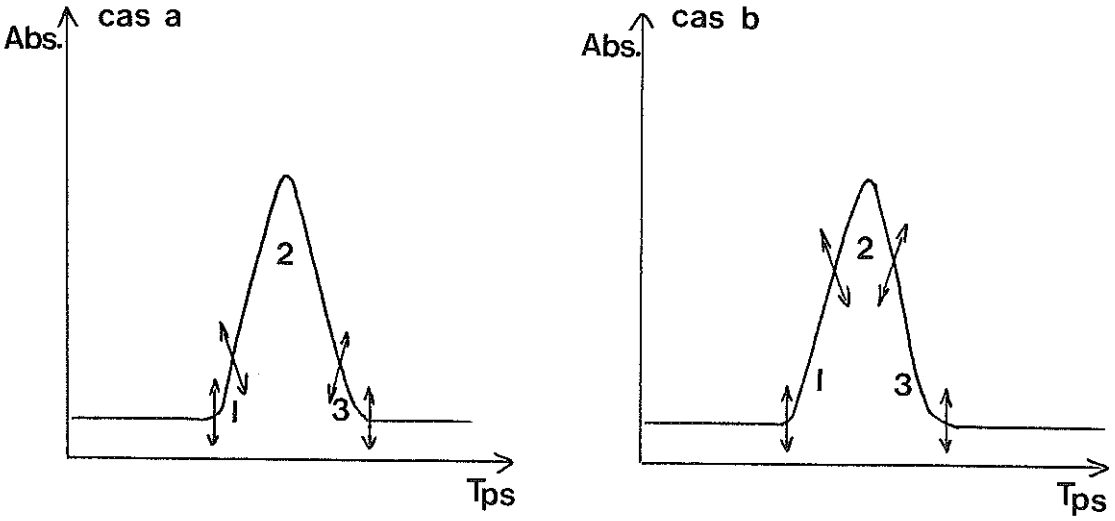
Ici, sont regroupées les protéines issues de la traduction génique recombinante, mais qui sont différentes de la protéine d'intérêt.
Elles sont différentes parce qu'elles ont été l'objet d'une mauvaise traduction ou parce qu'elles se sont transformées au cours des traitements qui ont suivi leur synthèse.
Si elles sont dépourvues de l'activité biologique recherchée, on cherchera à les éliminer au maximum au cours des coupes de purification.
Dans le cas contraire, leur tolérance dans le produit final sera plus grande.

On doit porter une attention particulière aux proches analogues de la protéine: ceux qui s'éluent juste avant et juste après la protéine d'intérêt. En effet, les coupes effectuées pour fractionner l'éluat ne garantissent pas une élimination totale de ces proches analogues.
Ceci est dû à l'adaptation de la méthode de purification à l'échelle de la production.
L'idéal serait le profil de séparation que l'on obtient en chromatographie analytique :



Là, il est facile de couper l'éluat pour ne récupérer que la protéine principale (= pic principal).
Or, en préparatif, du fait de la surcharge de la colonne et de l'utilisation de silice de granulométrie plus grossière, la résolution, donc la séparation, est beaucoup moins bonne, les trois pics observés en analytique se retrouvent confondus. L'éluat sera donc plus délicat à fractionner.

Examinons deux cas extrêmes (dans chaque cas de figure, on fractionne le pic en trois, et on récupère la fraction centrale) :



<u>cas a</u> : on récupère une grande quantité de protéine,
mais, la pureté est faible (la fraction 2 retenue contient encore une grande quantité d'analogues)

<u>cas b</u> : la pureté de la fraction récupérée est élevée,
mais, le rendement est faible (les fractions 1 et 3 non récupérées contiennent une grande quantité de la protéine d'intérêt).

Il faut donc trouver un juste milieu entre le degré de pureté du produit et le rendement de l'opération.
Pour cela, il faut tenir compte du rapport bénéfices/risques pour décider du pourcentage en analogues que l'on peut considérer comme acceptable dans la fraction retenue.
La validation, c'est-à-dire l'acceptation de ce pourcentage, passera par l'identification de ces analogues et l'évaluation de leur activité : il est important de mettre en évidence leur innocuité ou de démontrer que la concentration à laquelle ils se retrouvent dans le produit, ne gène pas l'activité biologique du futur médicament.

E. Les constituants du milieu de culture et les réactifs d'extraction

- Milieu de culture : levures, glycérol, sels minéraux, propylène glycol, eau déminéralisée.
  Ces constituants sont éliminés avant la purification, et ne constituent de toute façon aucun danger pour l'activité et la stabilité de la protéine recombinante.
- Réactif d'extraction : chlorhydrate de guanidine.
  C'est un produit chimique dénaturant ; il est donc impératif de ne pas le retrouver dans le produit final (méthode de dosage à l'étude)

F. Les réactifs de la purification

- acétonitrile (ACN)
- isopropanol (ISO)
- acide trifluoroacétique (TFA)
- acide x
- acétone (utilisé comme marqueur dans les essais qui précèdent la purification)

L'ACN et le TFA sont éliminés au cours de la deuxième chromatographie,
l'ISO est éliminé après la purification par distillation,
l'acide x entre dans la formulation finale du produit, donc on ne cherche pas à l'éliminer,
l'acétone est éliminé par rinçage des colonnes.

Leur élimination est suivie par chromatographie phase gazeuse.

3.2.3.3. Les études de clearance

Il peut arriver qu'un contaminant soit difficilement détectable dans le produit purifié, ou alors que l'essai à mettre en place pour le détecter ne puisse pas être intégré dans le procédé de contrôle de routine ; il est alors intéressant, par une étude de clearance, de déterminer son facteur de réduction : une quantité connue du contaminant est ajoutée à la solution protéique à purifier, de sorte qu'il soit détectable dans la solution purifiée, puis le rapport entre la quantité introduite et la quantité retrouvée dans la solution purifié renseigne sur la capacité d'élimination du système vis-à-vis du contaminant considéré.

Cette étude de clearance est préconisée pour l'évaluation de l'élimination de l'ADN.
Dans ce cas, de l'ADN marqué avec un élément radioactif est mélangé à la solution à purifier, l'évolution du produit marqué est suivie par comptage.
La mise en oeuvre de cette étude implique de repasser à une échelle inférieure : en effet, il serait inconcevable de rester à l'échelle préparative pour deux raisons majeures : par le danger que représente la manipulation de produits radiomarqués et par le coût occasionné du fait de l'impossibilité à réutiliser le matériel après l'essai (contaminé par les produits radiomarqués).

Deux éléments sont importants à considérer, pour pouvoir exploiter les résultats de l'étude :

1- le niveau de surcharge du contaminant ne doit pas faire varier de façon significative la concentration totale de la solution à purifier.

2- la transposition d'échelle doit se faire en veillant à conserver les mêmes caractéristiques chromatographiques de façon à reproduire le plus possible les conditions réelles :

- même gel chromatographique,
- même charge protéique par volume de colonne,
- débits, pression, vitesse linéaire identiques,
- etc.

3.2.3.4. Le gel chromatographique

A. Potentiel générateur de contaminants

Un gel est choisi pour ses spécifications : porosité, granulométrie, nature et densité des groupements fonctionnels greffés.
L'utilisateur doit s'entendre avec son fournisseur pour déterminer les spécifications particulières que nécessite l'opération pour laquelle il prévoit le gel, par exemple : absence de microorganismes, absence de pyrogènes, absence de métaux lourds.
Le fournisseur doit également renseigner l'utilisateur sur les conditions d'utilisation optimale et les méthodes d'entretien appropriées de son produit, sur la nature chimique des groupements fonctionnels greffés, leur toxicité et la façon de les doser, et doit lui faire part de la stabilité du gel dans des conditions extrèmes d'utilisation.

Avec toutes ces données, l'utilisateur est alors en mesure de tester la stabilité du gel dans le cadre de son emploi.
Il doit mettre en évidence la stabilité du gel (= constance de l'homogénéité du lit chromatographique, pas de décrochement de groupements fonctionnels greffés) au cours de la purification, mais aussi pendant les opérations de régénération, de nettoyage et durant les phases de conservation.

1- l'homogénéité de remplissage des colonnes est facile à vérifier:
par le calcul du nombre de plateaux théoriques et l'examen de la symétrie des pics.
2- le décrochement de ligands est plus délicat à gérer :
- il faut d'abord développer une méthode analytique de dosage qui permette de les détecter et de les quantifier (à partir des données du fournisseur),
- si un tel phénomène est détecté, il faut identifier l'opération responsable (purification,régénération,conservation),
- il faut déterminer l'éventuelle toxicité qu'ils engendrent en fonction de la quantité détectée.
- puis déterminer s'ils peuvent être éliminés par une étape ultérieure.

Remarque : il faut pendant cette phase d'étude prendre en compte le rapport toxicité/rendement qui permettra de juger de l'attitude à adopter face au cas de figure observé qui est toujours un cas particulier. (par exemple, si

l'opération permettant de les éliminer s'avère trop complexe ou trop coûteuse, définir une quantité acceptable en fonction de leur toxicité peut être définie).

Cette étude est à mener au moment du choix du gel, mais peut éviter bien des surprises si elle est également entreprise à la réception de chaque lot de gel chromatographique (des variations des caractéristiques du gel d'un lot à un autre peuvent apparaître).
Pour parer à l'éventualité d'une rupture d'approvisionnement du gel choisi (rupture du stock du fournisseur), il peut être judicieux d'avoir effectué cette étude sur d'autres gels.

B. Evaluation de la "durée de vie" du gel

Il est quasiment impossible de déterminer par avance le nombre de cycles de purification que pourra effectuer un "package", même si le fournisseur a mené une étude de vieillissement du gel qui renseigne sur ses capacités de purification, car cette étude n'aura pas été menée dans les conditions de l'utilisation (selon le procédé) et avec la protéine à purifier (qui possède son propre degré de contamination).
Il est donc intéressant de mener une étude de vieillissement avec le RU dans les conditions du procédé. Cette étude se fait à petite échelle (sur une colonne de quelques cm^3) : plusieurs dizaines de cycles de purification sont réalisés puis les éluats sont analysés. Le nombre approximatif de cycles successifs que le gel peut traiter efficacement est ainsi défini.
Remarque : comme pour l'étude de surcharge de l'ADN, la transposition d'échelle doit se faire de façon à reproduire le plus possible la manipulation en préparatif.

Une maintenance préventive doit être mise en place pour diminuer la fréquence de changement du gel :
==> Le remplacement du gel dans une colonne doit être effectué selon une procédure qui garantira l'homogénéité de la phase (vérifiée par le calcul du nombre de plateaux théoriques).
==> Une rééquilibration de la colonne après chaque cycle de purification doit être faite afin de se mettre dans les conditions initiales du cycle suivant. Pour cela, plusieurs volumes de colonne du solvant de départ sont passés sur la colonne.

==> Doit être mise en oeuvre une opération de régénération de la colonne entre deux utilisations afin que le gel retrouve son état fonctionnel initial : par exemple en rinçant la colonne avec plusieurs fois son volume d'éthanol. Ceci pour éliminer la plupart des protéines contaminantes fortement liées au gel qui n'ont pas été éluées.
==> La régénération peut être complétée par une opération de nettoyage plus "drastique" du gel afin de décrocher les contaminants qui auraient résisté. Ici, le choix du procédé sera souvent limité par le gel lui-même (le traitement ne doit pas affecter ses capacités). On pourra faire passer des sels ou des détergents ou tout simplement faire passer le solvant de régénération dans le sens inverse de la colonne.
==> La colonne doit être conservée, entre deux utilisations, dans un solvant qui la préserve des contaminations, sans altérer le gel : par exemple de l'éthanol.

En plus de cette maintenance préventive, il faut savoir être à l'affût d'indicateurs qui peuvent être témoins de la détérioration du gel, comme des variations :
- de débit ou de pression,
- du profil d'élution (Tr, symétrie du pic)
- du volume de l'éluat pour un même rendement,
- du rendement .

3.2.3.5. Etude de reproductibilité

A. But

Prouver que le procédé retenu permet d'obtenir un produit conforme de façon reproductible.

Une protéine recombinante est un produit issu d'une fermentation, qui met en jeu des microorganismes très sensibles aux caractéristiques chimiques (composition du milieu nutritif) et physiques (température,agitation) de leur milieu de croissance. Même si les paramètres de fermentation sont rigoureusement établis et contrôlés, il existera toujours des variations qualitatives ou quantitatives plus ou moins faciles à mettre en évidence d'une charge à l'autre, du fait de la nature biologique du produit (variations qui n'existent pas dans une synthèse chimique).
Cette étude de reproductibilité va permettre de mettre en évidence que ces variations n'empêchent pas d'obtenir un produit conforme à un standard.

B. Le standard interne

C'est le produit de référence.
Son activité biologique est établie par rapport à un standard international.
Sa pureté est établie par le fabricant, qui s'imposera ici un degré de rigueur en fonction du rapport bénéfices/risques, ou plus exactement coût/avantage .

A l'échelle de la production, le facteur coût est très important :
Obtenir une protéine pure à 99,99%, par exemple, nécessitera une purification très poussée et augmentera les coûts de production. Il peut être intéressant de montrer qu'une pureté de 98% est suffisante dès l'instant que l'on aura prouvé que les 2% d'impuretés contenues dans le produit final ne compromettent pas l'innocuité ni l'activité biologique de la protéine.

Les critères d'acceptation des lots auront donc été judicieusement choisis afin de tenir compte des limites de la production (il serait absurde de prendre un standard interne pur à 99,99% si le procédé choisi ne peut jamais donner une telle pureté).

C. Contenu de l'étude

Cette étude de reproductibilité consiste à produire des lots successifs de validation (trois au minimum) qui seront analysés de la façon la plus complète possible afin de déterminer la constance de la qualité du produit.
Cette analyse devra comporter des méthodes biologiques, chimiques et immunologiques pour caractériser et doser la protéine, ainsi que des méthodes permettant de détecter et d'identifier les impuretés (addendum au volume III de la règlementation des médicaments dans la communauté européenne : note explicative relative aux protéines recombinantes).

Pour que cette étude soit fiable, il faut que ces lots soient produits dans les mêmes conditions. Pour cela, il faut déterminer les paramètres critiques du procédé, et on s'assure, en cours de fabrication, qu'ils sont à l'intérieur d'un intervalle d'acceptation.

C_1 paramètres critiques :

- préparation :
  - hauteur du gel dans la colonne chromatographique,
  - nombre de plateaux théoriques,
  - unité opératoire par essai chromatographique.
- injection :
  - volume,débit,
  - durée.
- élution :
  - débit,
  - pression,
  - vitesse linéaire,
  - temps de rétention de la protéine,
  - composition du gradient au moment où la protéine s'élue
- coupes :
  - absorbance des coupes,
  - temps de recueil des différentes fractions,
  - volume des fractions,
  - absorbance, titre, masse des fractions,
  - rendement.

En pratique, la mise au point d'un document de travail qui suivra chaque lot est utile pour le recueil de ces informations.
La conception d'un tel document est délicate : il doit donner un maximum d'informations sur le mode opératoire sans être trop compliqué ou rébarbatif pour que l'utilisateur puisse le consulter et le remplir sans ambiguïté.

C_2. contenu du document de travail:

a- liste du matériel utilisé.

b- liste des matières premières avec leurs références et les quantités approximatives nécessaires.

c- liste des procédures qui concernent directement ou indirectement la purification et qui pourront être consultées à tout moment.

Elles décrivent :
- le matériel utilisé (chaque constituant du système chromatographique, mais aussi le système de production d'eau apyrogène...),
- les techniques mises en jeu (pour tester les colonnes avant utilisation, pour préparer les solvants d'élution...),
- les règles de sécurité (ex : récupération et traitement des solvants résiduels).

d- renseignements sur la solution brute à purifier (poids, volume, masse de protéine engagée) et détermination de l'unité opératoire par essai, qui sera fonction de la quantité totale de protéine à purifier, et qui sera déterminée de façon à obtenir un nombre entier d'essais chromatographiques (tout en veillant à rester dans les limites du chargement optimal théorique).

e- mode opératoire décrit chronologiquement de façon détaillée avec mise en évidence des réglages à effectuer (longueur d'onde et sensibilité du détecteur UV, débit de l'élution...) , et les quantités à mettre en jeu. (solvants..). En parallèle de ces données théoriques, l'opérateur inscrit les données réelles, c'est à dire ce qu'il fait.

exemple : **annexe 17.**

f- tableau réunissant les données recueillies au moment du fractionnement de l'éluat ainsi que les analyses (chromatographie, spectrophotomètrie) immédiatement effectuées sur les fractions des différents essais.

g- bilan de l'opération :

tableau récapitulatif des caractéristiques des trois fractions (les fractions des différents essais étant réunies entre elles).

h- caractéristiques (titre, masse, volume, pourcentage de pureté) de la fraction coeur retenue pour l'opération suivante, après prélèvement d'une quantité suffisante de la solution pour effectuer des analyses plus poussées.

Remarque: certaines annotations devront figurer sur chaque feuille de ce document de travail : date, numéro du lot traité, nom et signature de l'opérateur.

C_3, analyse complète du vrac purifié

Cette analyse est faite par un laboratoire de contrôle indépendant de la struture de production.

a-identité

- CLHP phase inverse : identification par letemps de rétention,
- spectrophotométrie,
- IEF (isoélectrofocalisation) : identification par son point isoélectrique,
- SDS PAGE : identification par sa masse moléculaire
- détermination de la composition en amino-acides : hydrolyse des liaisons peptidiques, puis séparation des amino-acides et détermination de leur abondance relative.
- carte peptidique : après digestion enzymatique (trypsine, chymotrypsine, pepsine), les petits peptides obtenus sont séparés par CLHP.
- détermination de la séquence partielle en amino-acides : dégradation d'Edman par l'extrémité N-terminale à l'aide du phénylisothiocyanate.
- détermination de la séquence totale en amino-acides : technique par recouvrement à partir de plusieurs séquences partielles issues de clivages différents.
- structure tertiaire par dichroïsme circulaire.
- mise en évidence des maturations post-traductionnelles qui peuvent être:
    - -> glycosylation (O- et N-),
    - -> acétylation,
    - -> phosphorylation,
    - -> amidation,
    - -> phénylation,
    - -> formation de ponts disulfures,
    - -> suppression de la méthionine initiatrice...

b-pureté

comparaison par rapport aux profils obtenus avec le standard interne en :

- CLHP,
- spectrophotométrie,
- IEF,
- SDS PAGE.

c-dosage protéique

- protéines totales :
  - méthode BCA (acide bicinchonique): met en jeu une solution d'acide bicinchonique et une solution de sulfate de cuivre. La méthode est basée sur la réduction des ions Cu^{2+} en ions Cu^{+} par les protéines en milieu alcalin, la solution réduite est ensuite lue à 562 nm.
  - méthode de Lowry : utilise le réactif de Folin et Colciateu (dont le constituant actif est l'acide phosphomolybdotungstique), l'acide est réduit par les protéines en donnant une couleur bleue caractéristique dont le maximum d'absorption est à 745-750 nm.
  - méthode de Bradford : mise en jeu du bleu de coomassie, c'est un colorant qui existe sous trois formes (anionique, neutre, cationique) ayant chacune son spectre d'absorption caractéristique. Les protéines se fixent préférentiellement sur la forme anionique. La détection se fait à 595 nm.
  - spectrophotomètre : annexe 4.
- RU : CLHP phase inverse.
- protéines autres que RU : par différence entre les protéines totales et le RU.

d-activité biologique

Elle est déterminée par la capacité du RU à induire la prolifération de cellules T murines dépendantes de la protéine naturelle que mime le RU. Ces cellules sont mises à incuber pendant 20 heures en présence de différentes quantités de RU. La prolifération cellulaire est mesurée par spectrophotométrie d'un colorant dont la concentration est proportionnelle au nombre de cellules qui se sont multipliées.

Par définition, l'unité biologique représente la quantité de RU nécessaire pour assurer 50 % de la prolifération maximale pendant 20 heures, de cellules dépendantes de la protéine pour leur croissance. Il est alors possible de calculer l'activité par rapport à un standard étalonné (délivré par le National Institute for Biological Standard and Control).

e-contaminants

- ADN : sonde nucléaire, PCR
- pyrogènes : test du lapin et limulus test
- protéines d'*E.coli* : test ELISA
- ACN : chromatographie phase gazeuse
- groupements fonctionnels de la silice
- guanidine
- acétone : chromatographie phase gazeuse

C_4. contrôles sur le produit fini

Les étapes qui suivent la purification (distillation, formulation, répartition, lyophilisation) seront menées avec la même rigueur (rédaction d'un document de travail) puis les contrôles sur le produit fini, c'est à dire le lyophilisat seront effectués:

- les mêmes contrôles que sur la solution purifiée :
  - identité,
  - pureté,
  - dosage protéique,
  - activité,
  - contaminants.
- sur l'état du lyophilisat :
  - teneur en eau,
  - uniformité des masses de lyophilisat,
  - essai de dissolution.
- sur la solution reconstituée :
  - pH,
  - aspect,
  - coloration,
  - turbidité.
- identification des excipients.

C_5. les dossiers des lots de validation

Le dossier de lot réunit les documents de travail des différentes étapes de fabrication de la protéine ainsi que tous les contrôles réalisés sur le produit intermédiaire et sur le produit fini.

Ce sont les résultats effectués sur le produit fini qui déterminent l'acceptation du lot comme lot de validation.

C_6. choix des contrôles de routine

Tous les contrôles effectués sur les lots de validation ne seront pas faits en routine : il faut écarter ceux qui tendent à la "surqualité", c'est-à-dire ceux qui représenteraient une surcharge en temps et en coût pour un bénéfice non mesurable.

Certains contrôles sont éliminés d'office ; par exemple, si la validation établit que les groupements fonctionnels de la phase stationnaire ne se décrochent pas au cours de la purification, et que la vérification en est faite sur les lots de validation (après avoir mené l'étude préliminaire qui vérifie les spécifications du gel chromatographique sur chaque lot utilisé), il sera inutile d'intégrer ce paramètre dans les contrôles de routine.

Par contre, même si la validation établit que la purification élimine correctement les pyrogènes, le limulus test et le test sur le lapin seront conservés en routine, car le taux de pyrogènes initial (avant purification) ne sera pas forcément toujours le même d'un lot à l'autre .De plus, le caractère critique de ce paramètre exige qu'il soit vérifié en routine sur le produit fini.

Pour les autres paramètres, la restriction des contrôles sera guidée par deux facteurs limitants qui sont leur coût et leur facilité de mise en oeuvre :

- Le contrôle du profil protéique (RU + analogues) par rapport au standard se fera par CLHP, SDS PAGE et IEF.
- Le contrôle d'identité ne comprendra pas la détermination de la séquence totale en amino-acides, ni le dichroïsme circulaire.
- Le dosage de l'ADN est effectué en sous-traitance par un laboratoire extérieur, il ne sera donc sans doute pas effectué sur tous les lots, mais l'examen des lots de validation et l'étude de surcharge auront prouvés que le procédé permet de rester dans les normes d'acceptation.

4. DISCUSSION

Lorsqu'un dossier d'AMM est élaboré pour un produit recombinant, il faut avoir à l'esprit qu'il sera examiné par des spécialistes, dont le rôle est de s'assurer que le fabricant est en mesure de garantir l'obtention d'un médicament efficace, en toute sécurité, et cela, sans variation de qualité.
En donnant un avis favorable, ces spécialistes engagent leur responsabilité, c'est pourquoi ils seront intransigeants si le moindre doute apparaît à la lecture du dossier quant à cette garantie, et ils suspendront la procédure, en soumettant au demandeur une série de questions auxquelles il devra répondre dans un delai qui retardera d'autant l'obtention de l'AMM.
Il faut donc adopter une attitude critique, en essayant de devancer les questions, et bien sûr en apportant les réponses (c'est l'objet de la validation):

- quel type de séparation est utilisé ?
- donner une description détaillée des étapes.
- les contaminants éventuels sont-ils éliminés ? à quelle dose sont ils acceptés ?
- l'identité des protéines analogues contenues dans le produit final est-elle connue? En quelles proportions sont-elles acceptées ?
- quels sont les paramètres critiques du procédé ? sont-ils vérifiés ?
- à quelle fréquence le gel est-il nettoyé ? remplacé ? comment ?
- à quelle fréquence l'efficacité du gel est-elle testée ? comment ?
- les spécifications du gel sont-elles vérifiées sur chaque lot ?
- le gel est-il apyrogène ? comment peut-on le rendre apyrogène ?
- est-il prévu un autre gel au cas où le premier viendrait à manquer ?
- l'activité du standard interne est-elle conforme au standard internation--nal ? ses caractéristiques correspondent-elles aux indications thérapeutiques du futur médicament ?
- est-ce que les contrôles effectués sur le produit fini garantissent sa conformité avec le standard interne ?
- quelles sont les méthodes employées pour ces contrôles ? les décrire.
- les techniques de dosage sont-elles validées?

Cette liste de questions n'est absolument pas exhaustive, elle offre toutefois un aperçu de la complexité de la démarche de validation, mais elle n'est que le reflet de l'attitude, somme toute logique, qui doit être adoptée pour commercialiser un médicament en toute sécurité pour le malade.

En médecine humaine, les caractéristiques fondamentales d'un médicament sont : - identité,
- activité,
- stabilité,
- sécurité.

En biotechnologie, c'est la dernière de ces quatre caractéristiques qui est la plus délicate, du fait des risques inhérents à l'obtention d'un produit par recombinaison génétique. Et même si ces risques sont de plus en plus minimisés par l'affinement des connaissances biotechnologiques, il est difficile de garantir qu'un microorganisme synthétisera toujours exactement le produit désiré.

La sécurité d'emploi d'un médicament recombinant, c'est à dire son innocuité, est en jeu lorsque la question suivante est posée : le matériel utilisé et le procédé mis en application permettent-ils d'obtenir, d'un lot à l'autre, un produit dont la pureté est en accord avec l'application thérapeutique du futur médicament ?

Valider le procédé de purification c'est y répondre par l'affirmative.

Or, une telle affirmation reste subjective, car même si le laboratoire demandeur adopte une démarche logique pour valider son procédé de fabrication, sa logique d'industriel n'est pas forcément celle des autorités compétentes du (ou des) pays dans le(s)quel(s) il formule sa demande d'AMM. Le choix des contrôles de routine, par exemple, peut être remis en question : un pays peut exiger un renforcement de ces contrôles sous peine de refus d'AMM ; le laboratoire demandeur devra alors apporter la preuve que ce renforcement n'est pas justifié, ou bien il devra obtempérer.

L'évolution rapide des techniques et des connaissances, l'expérience grandissante en matière de production industrielle de produits recombinants, et le développement des échanges entre les commissions d'AMM et les industriels , ont fait que, devant le vide législatif, des groupes de travail (de la CEE et de la FDA) se sont mis en place pour élaborer des recommandations exploitables par l'industriel. Ces textes font l'objet d'une réactualisation constante et entretiennent ainsi l'interaction indispensable à une compréhension mutuelle.

5. CONCLUSION

La démarche de validation du procédé de purification aura permis :

1- d'apporter tous les renseignements techniques sur le procédé, qui sont nécessaires à l'établissement du dossier d'AMM.

2- d'établir la liste des contrôles en cours de fabrication et des contrôles sur le produit fini à réaliser en routine, qui comprennent :

- la série de paramètres critiques et leurs intervalles d'acceptation,
- les contrôles sur le produit intermédiaire (solution purifiée) et sur le produit fini, qui auront été choisis parmis ceux réalisés sur les lots de validation, et cela, en garantissant qu'ils sont suffisants pour obtenir un produit final conforme au standard.

3- de mettre au point les feuilles de travail qui suivront la fabrication du médicament et faciliteront le recueil et l'exploitation des données.

4- de produire du RU conforme au standard (lots de validation), pour mener les études de stabilité et les études cliniques nécessaires à l'établissement du dossier d'AMM.

Parallèlement, une telle démarche est un enrichissement notable pour les personnes qui y auront participées, puisqu'elle aura permis, par les interrogations qu'elle aura suscitées, de promouvoir la communication, et aura amené tout un chacun à réfléchir sur sa propre implication dans le processus long et complexe qui conduit une molécule à devenir un médicament.

La législation reste assez vague quant à la démarche de validation à adopter; et même si les textes disponibles, en rapport avec les protéines recombinantes, sont de plus en plus nombreux et de plus en plus précis, c'est à chaque laboratoire d'élaborer sa propre stratégie. Il doit veiller à s'imposer le degré de rigueur nécessaire à la fabrication d'un médicament en toute sécurité, tout en intégrant les facteurs limitants inévitables en terme de production industrielle : coût, temps, efficacité, rendement.

6. ANNEXES

Annexe 1 : classification internationale des laboratoires menant des recherches biotechnologiques (conférence d'Asilomar, 1975)

Annexe 2 : format standard pour les demandes d'AMM dans la CEE

Annexe 3 : liste des médicaments de haute technologie

Annexe 4 : spectrophotométrie d'absorption (principe)

Annexe 5 : profils spectrophotométriques de l'acétonitrileet de l'isopropanol

Annexe 6 : test escaliers (comparaison des trois profils)

Annexe 7: grandeurs fondamentales utilisées en chromatographie

Annexe 8 : fiche de suivi des packages des colonnes chromatographiques

Annexe 9 : étude de linéarité du détecteur UV

Annexe 10 : courbes étalon d'ACN et d'ISO

Annexe 11 : gradient ACN sans colonne (comparaison des trois profils)

Annexe 12 : gradient ACN avec colonne (comparaison des trois profils)

Annexe 13 : gradient ISO sans colonne (comparaison des trois profils)

Annexe 14 : gradient ISO avec colonne (comparaison des trois profils)

Annexe 15 : recherche des substances pyrogènes

Annexe 16 : recherche des endotoxines

Annexe 17 : exemple de feuille de travail

Annexe 18 : glossaire

Annexe 19 : abréviations

Annexe 1 : Classification internationale des laboratoires menant des recherches biotechnologiques (conférence d'Asilomar, 1975)
(Science et vie, 1980, 133, 78-79)

Laboratoire P1
Laboratoire banal, celui qui accueille la plupart des expérimentations de la virologie.

Laboratoire P2
Laboratoire de bactériologie classique à circulation restreinte. La pièce d'entrée doit être limitée et seuls les personnels autorisés peuvent y pénétrer.

Laboratoire P3
Laboratoire qui doit disposer d'un sas avec système de dépression, et être équipé d'un autoclave à cheval entre l'intérieur et l'extérieur où tout le matériel et les vêtements de travail doivent être stérilisés avant d'être sortis.

Laboratoire P4
Laboratoire qui possède tous les équipements du P3, mais qui doit en outre être obligatoirement contenu dans des murs en voile de béton d'un seul tenant. La douche est obligatoire dans le vestiaire, et les vêtements de travail doivent rester consignés dans les locaux.

NB : Les expérimentations réalisées sur *Escherichia coli K12* relevaient de la plus haute sécurité.

Annexe 2 : Format standard pour les demandes d'AMM dans la CEE. (Volume III de la règlementation des médicaments européens dans la communauté européenne)

PARTIE I : RESUME DU DOSSIER.
I A Renseignements administratifs.
I B Résumé des caractéristiques du produit.
I C Rapports d'experts sur la documentation chimique, pharmaceutique, biologique, toxicologique, pharmacologique et clinique.
PARTIE II : DOCUMENTATION CHIMIQUE, PHARMACEUTIQUE ET BIOLOGIQUE.
II A Composition.
II B Mode de préparation.
II C Contrôle des matières premières.
II D Contrôle des produits intermédiaires.
II E Contrôle du produit fini.
II F Stabilité.
II Q Autres informations.
PARTIE III : DOCUMENTATION TOXICOLOGIQUE ET PHARMACOLOGIQUE.
III A Toxicité par administration unique.
III B Toxicité par administration réitérée.
III C Etudes de reproduction.
III D Pouvoirs mutagènes.
III E Pouvoirs carcinogène, oncogène.
III F Pharmacodynamie.
III G Pharmacocinétique.
III H Tolérance locale.
III Q Autres informations.
PARTIE IV : DOCUMENTATION CLINIQUE.
IV A Pharmacologie clinique.
IV B Expérience clinique.
IV C Autres informations.
PARTIE V : RENSEIGNEMENTS PARTICULIERS.
V A Présentation.
V B Echantillons.
V C Autorisation(s) de fabrication.
V D Autorisation(s) de mise sur le marché.

Annexe 3 : Liste des médicaments de haute technologie
(annexe de la directive 87/22/CEE)

A. Médicaments issus des procédés biotechnologiques suivants :

= technologie de l'acide désoxyribonucléique recombinant,
= expression contrôlée de gènes codant pour des protéines biologiquement actives dans des procaryotes et des eucaryotes, y compris des cellules transformées de mammifères,
= méthodes à base d'hybridomes et d'anticorps monoclonaux.

B. Autres médicaments de haute technologie :

= autres procédés biotechnologiques constituant, aux yeux de l'autorité compétente, une innovation signicative,
= médicaments dont le mode d'administration nouveau constitue, aux yeux de l'autorité compétente, une innovation significative,
= médicaments contenant une nouvelle substance ou une indication entièrement nouvelle qui, au yeux de l'autorité compétente, présente un intérêt significatif sur le plan thérapeutique,
= médicaments dont la fabrication repose sur des procédés qui, aux yeux de l'autorité compétente, présentent une avance technique significative comme, par exemple, l'électrophorèse bidimensionnelle en microgravité.

Annexe 4 : Spectrophotométrie d'absorption (principe)

(Pharmacopée Européenne V 6.19.)
En spectrophotométrie d'absorption, on mesure l'absorbance, ou densité optique, d'une solution.
L'absorbance d'une solution est le logarithme décimal de l'inverse de la transmittance pour une radiation monochromatique donnée.

$$A = \text{Log}\left(\frac{1}{T}\right)$$

$$T = \frac{I}{I_o}$$

A : absorbance
T : transmittance
I_o: intensité de la lumière monochromatique incidente
I: intensité de la lumière monochromatique transmise

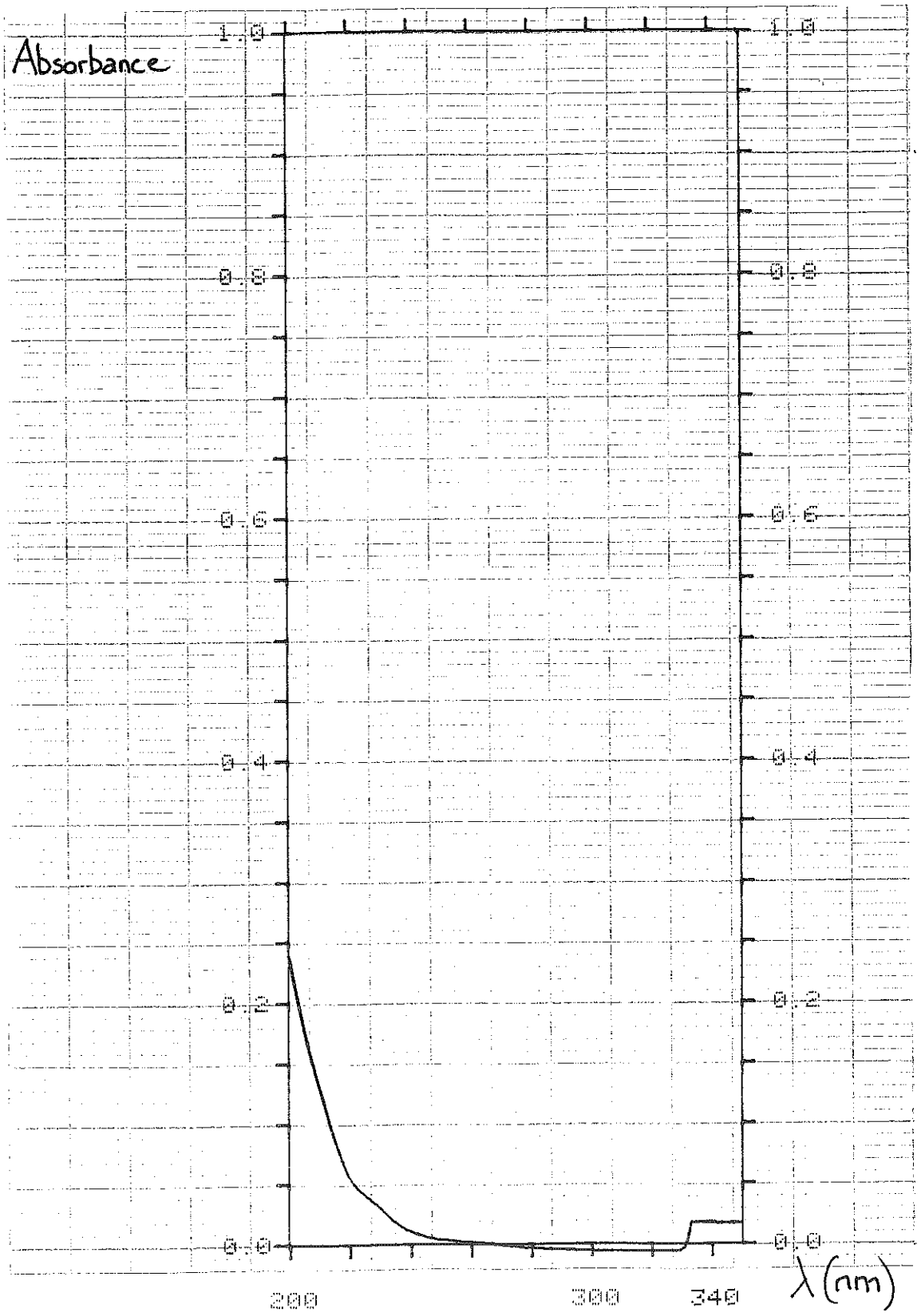
(DELOBETTE ,1991)
Les molécules qui absorbent en ultra-violet proche et en visible (200 nm à 800 nm) sont appelées des chromophores.
Dans le cas des protéines, les chromophores peuvent être les résidus d'amino-acides aromatiques (le tryptophane à 280 nm, la tyrosine à 275 nm, la phénylalanine à 257 nm) les liaisons peptidiques (à 190 nm) ou les ponts disulfures (à 250 nm).
L'absorption d'un chromophore à une longueur d'onde donnée dépend de sa nature, de sa concentration et de la longueur du trajet optique. C'est ce qui est représenté par la relation de Beer Lambert :

$$A = \varepsilon \, l \, c$$

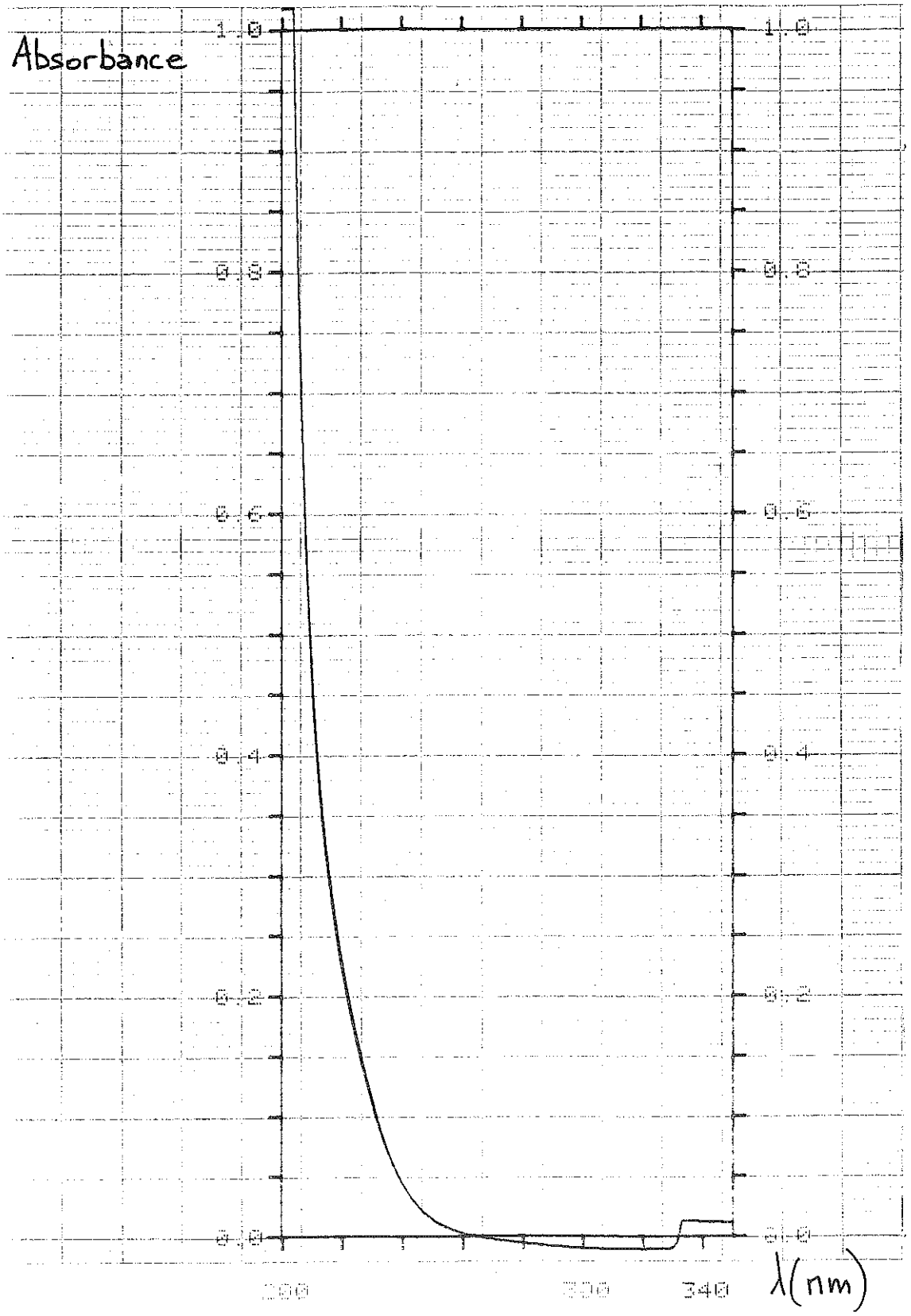
A : absorption du chromophore à une longueur d'onde donnée
ε: coefficient d'extinction molaire
l : longueur du trajet optique en cm
c : concentration en chromophore.

Annexe 5 : profils spectrophotométriques de l'acétonitrile et de l'isopropanol

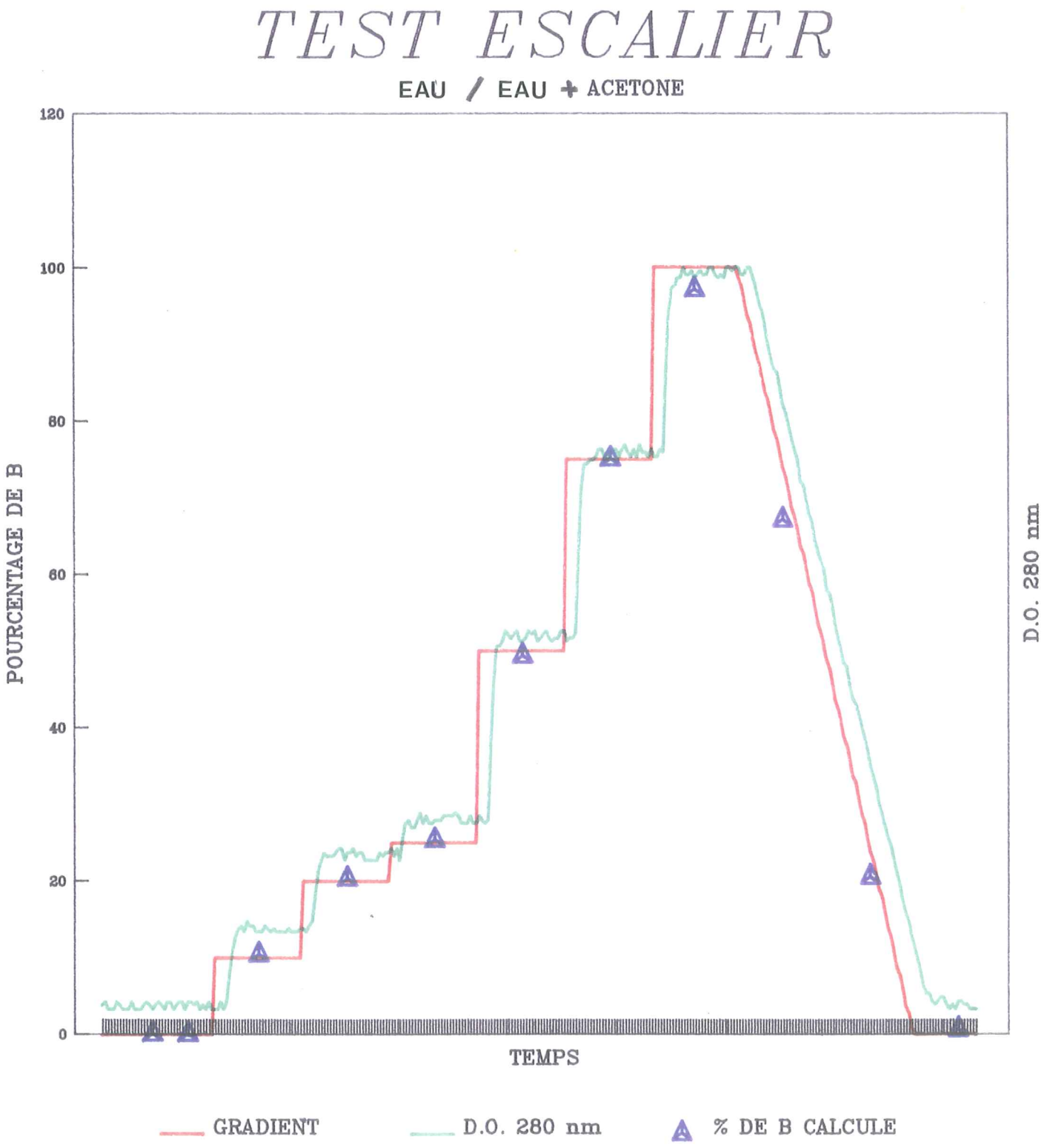
acétonitrile



isopropanol



Annexe 6 : Test escaliers (comparaison des trois profils)



Annexe 7:Grandeurs fondamentales utilisées en chromatographie

NB : certains paramètres présentés ici ne figurent pas dans la pharmacopée française mais sont des grandeurs couramment utilisées par les constructeurs de matériel chromatographique et les utilisateurs.

- Le **facteur de capacité** de la colonne, k', qui est le rapport entre le volume de solution dans la phase stationnaire et celle dans la phase mobile. Il exprime le nombre de volumes de colonne nécessaire à l'élution d'une solution.

$$k' = \frac{(Tr - To)}{To} = \frac{(Vr - Vo)}{Vo}$$

où - Tr est le temps de rétention du composé choisi (exprimé en min, mm ou cm),
- To est le temps de rétention d'un composé non retenu sur la colonne dans les conditions choisies,
- Vr est le volume de rétention du composé choisi,
- Vo est le volume de rétention d'un composé non retenu sur la colonne dans les conditions choisies.

- Le **nombre de plateaux théoriques**, N, qui est une mesure de la performance de la colonne, se calcule à partir de l'équation ci-dessous :

$$N = 5{,}54 \times \left(\frac{Tr}{W_{1/2}}\right)^2$$

où - W est la largeur du pic à la base, définie comme la distance entre les points d'intersection des tangentes d'inflexion avec la ligne de base,
- W1/2 est la largeur du pic à mi-hauteur.

- La **hauteur équivalente à un plateau théorique**, HEPT, se calcule simplement à partir de la longueur de la colonne et de N.

$$HEPT = \frac{L}{N}$$

où L est la longueur de la colonne en cm

- le **nombre de plateaux théoriques par mètre de colonne**

$$\frac{1}{HEPT} = \frac{N}{L}$$

- Le **facteur d'asymétrie**, As s'utilise pour exprimer les dérives par rapport aux pics de Gauss théoriques, et peut être employé pour exprimer la qualité de remplissage d'une colonne.

$$As = \frac{b}{a}$$

où - b est la distance entre la médiane et la pente descendante du pic à 5% ou à 10% de sa base.

- a est la distance entre la pente ascendante et la médiane du pic à 5% ou à 10% de sa base;

- La **résolution** (ou séparation) entre 2 pics (se recouvrant partiellement) se définit comme étant la distance entre les maxima des pics par comparaison à la largeur moyenne de la ligne de base des 2 pics.

$$Rs = 2 \times \left[\frac{(Tr_B - Tr_A)}{W_A + W_B} \right]$$

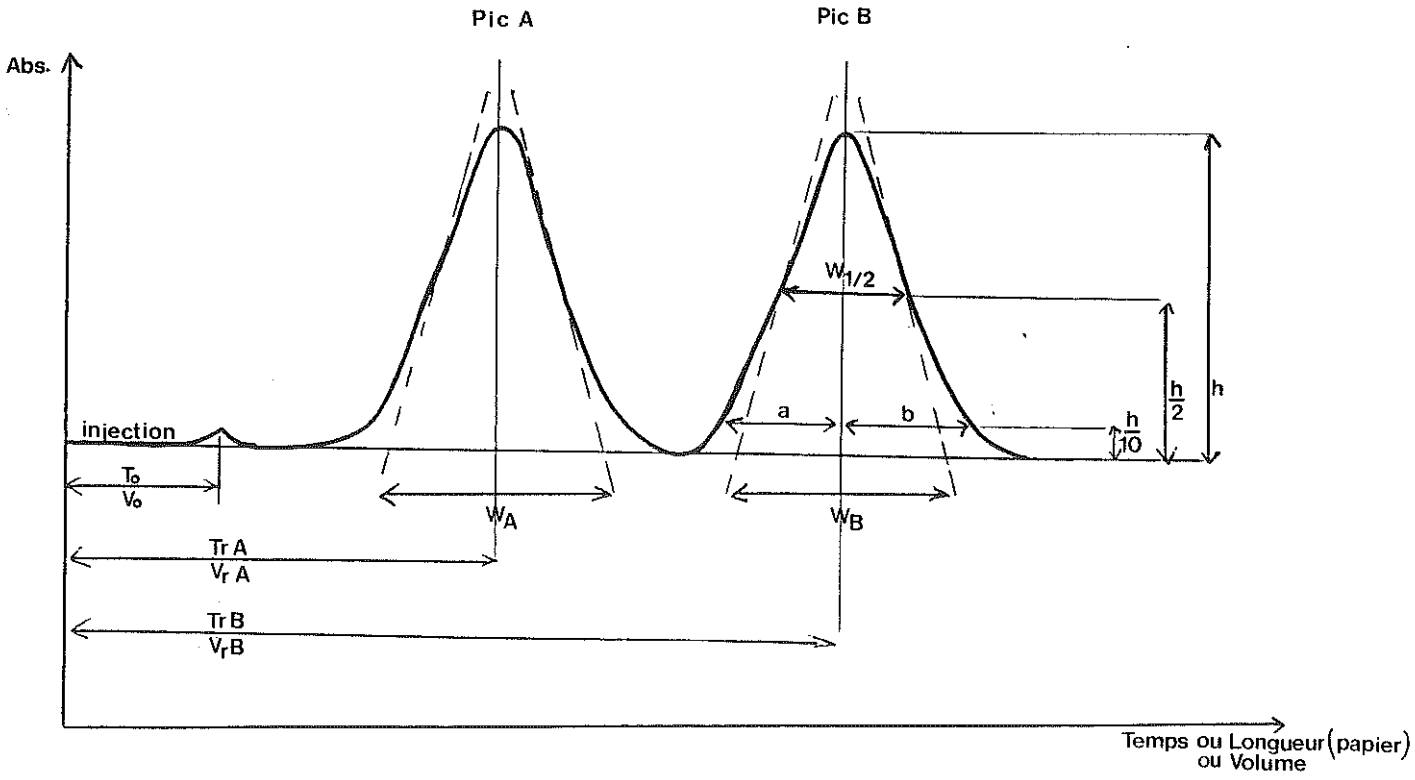
où - Tr_A est le temps de rétention du composé le moins retenu,

- Tr_B est le temps de rétention du composé le plus retenu,

- W_A est la largeur de la base du pic correspondant au composé le moins retenu,

- W_B est la largeur de la base du pic correspondant au composé le plus retenu.

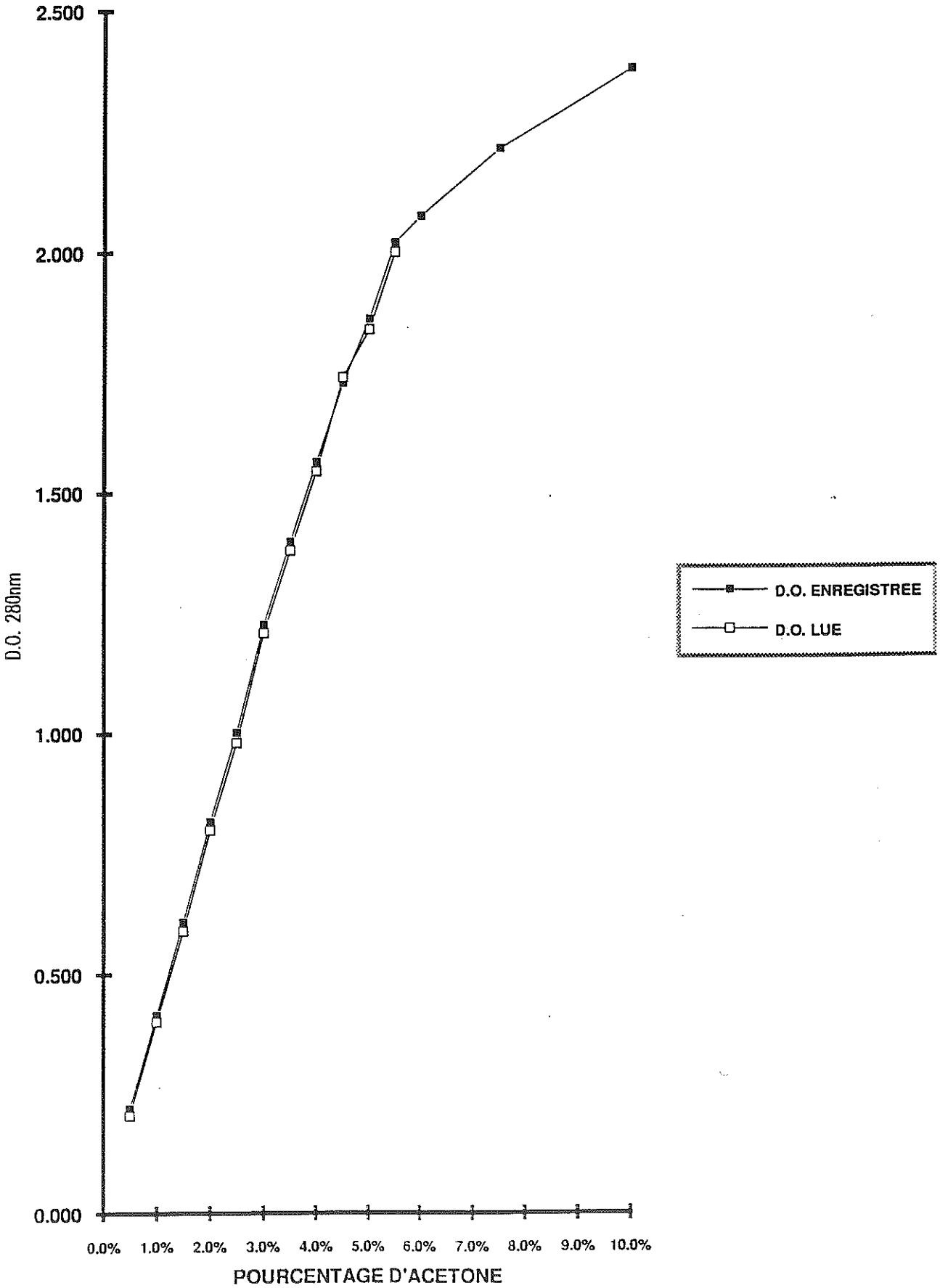
- Schéma de 2 pics chromatographiques



Annexe 8 : Fiche de suivi des packages des colonnes chromatographiques

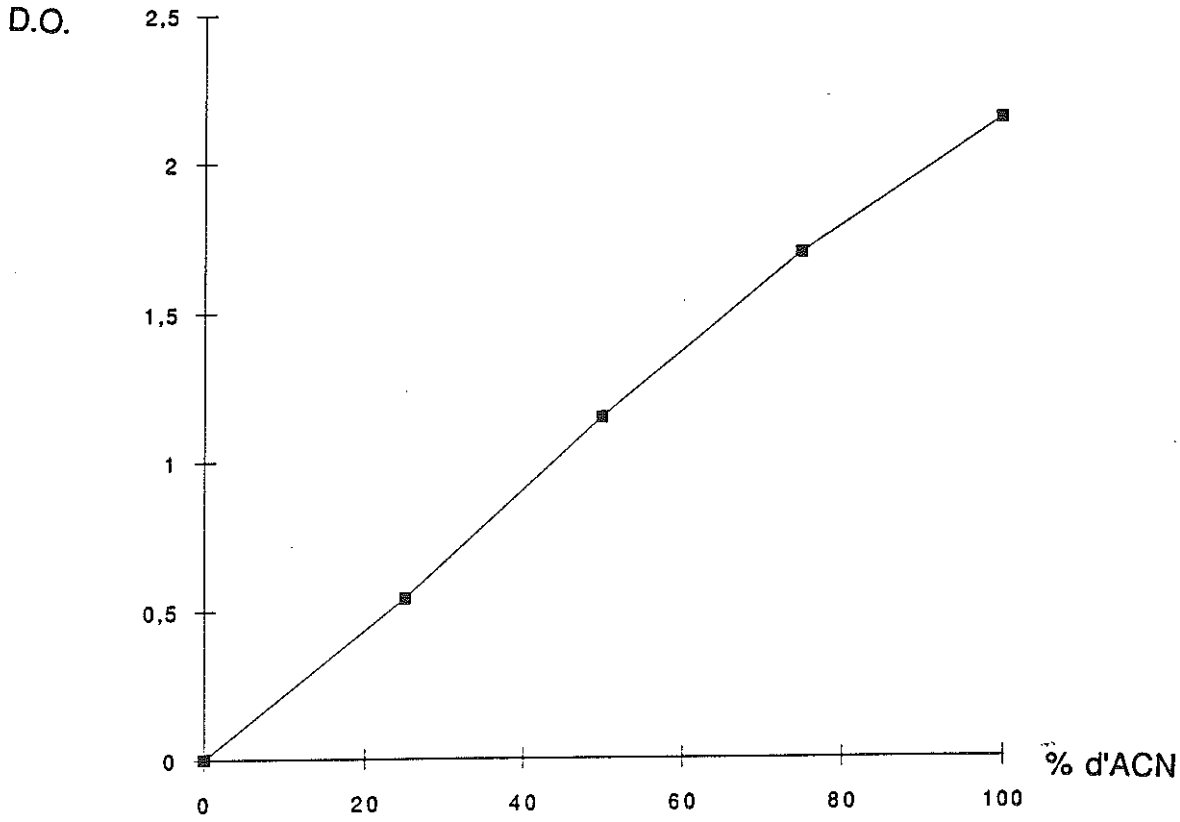
GEL			CHROMATOGRAPHIE : ACN								REMISE EN ETAT		
Date du package	Hauteur (cm)	Volume (L)	Charge	Date	Nb injections /charge	cumulé	Masse injectée /charge (g)	cumulée (g)	Volume injecté /run (L)	% / vol. de gel	Nettoyage/ sanétisation Date	Conservation sous éthanol pur Date	Test à l'acétone N/m Date

Annexe 9 : Etude de linéarité du détecteur UV

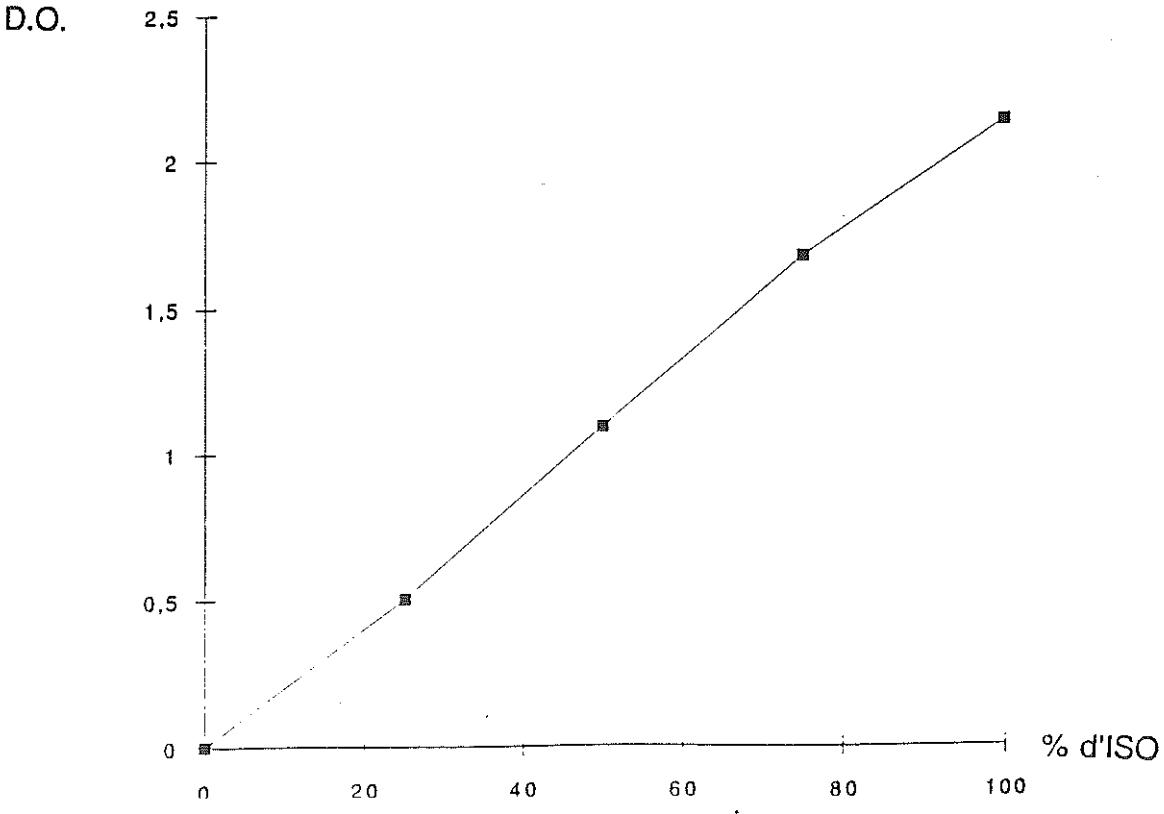


Annexe 10

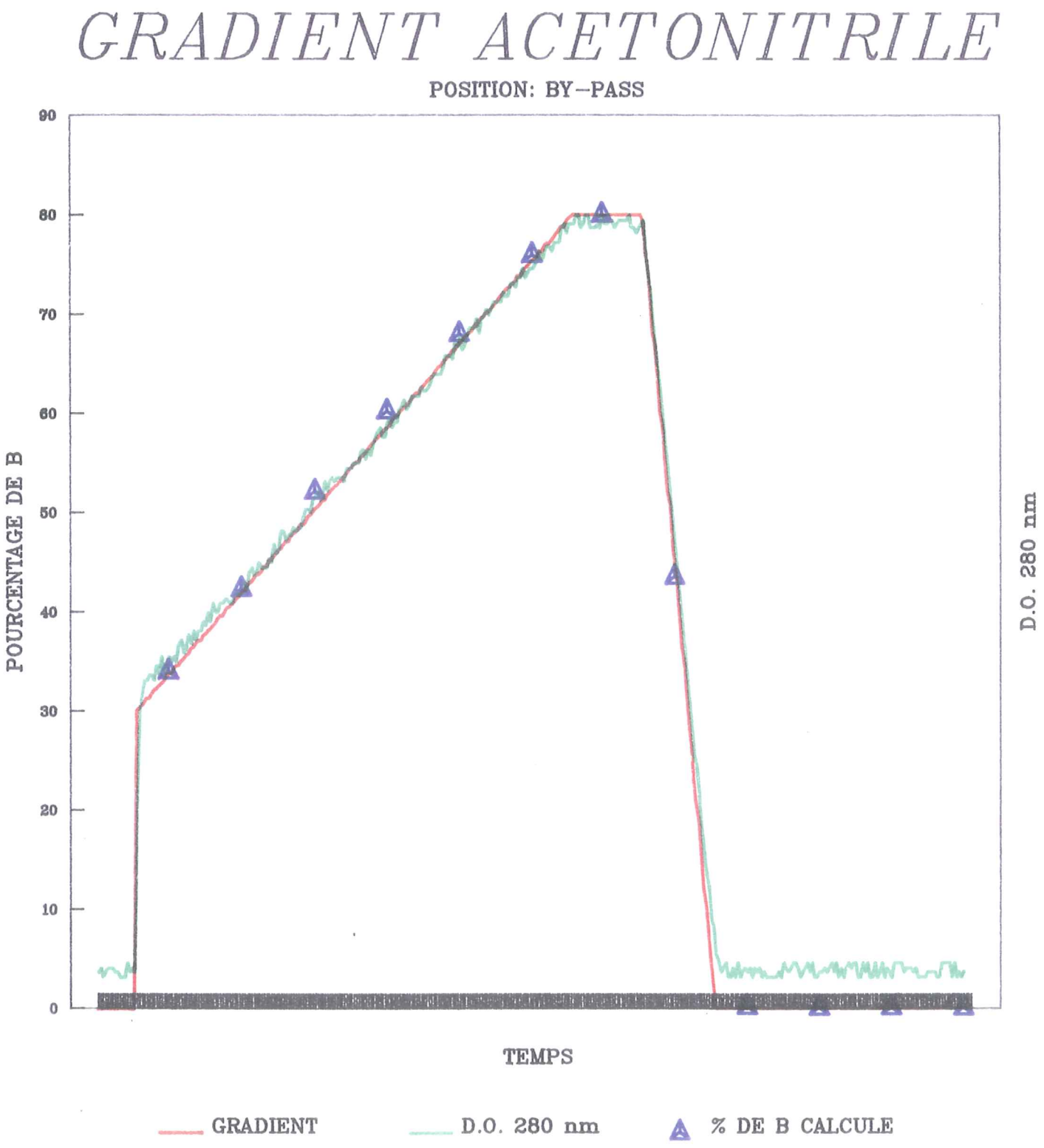
DILUTIONS D'ACETONITRILE LUES SUR LE SPECTRO. ANNEXE LKB
DO = f (% d'ACN)



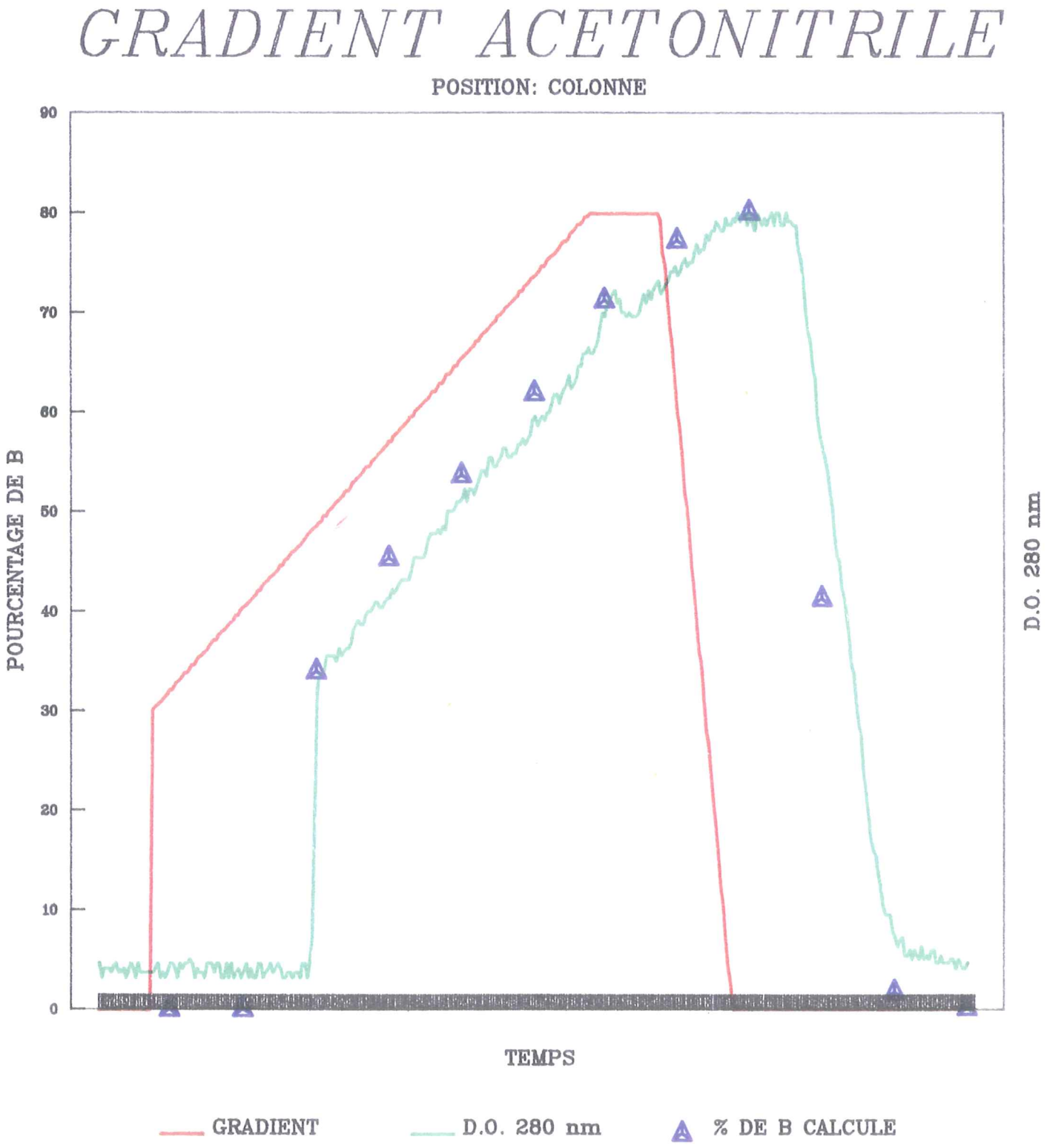
DILUTIONS D'ISOPROPANOL LUES SUR LE SPECTRO. ANNEXE LKB
DO = f (% d'ISO)



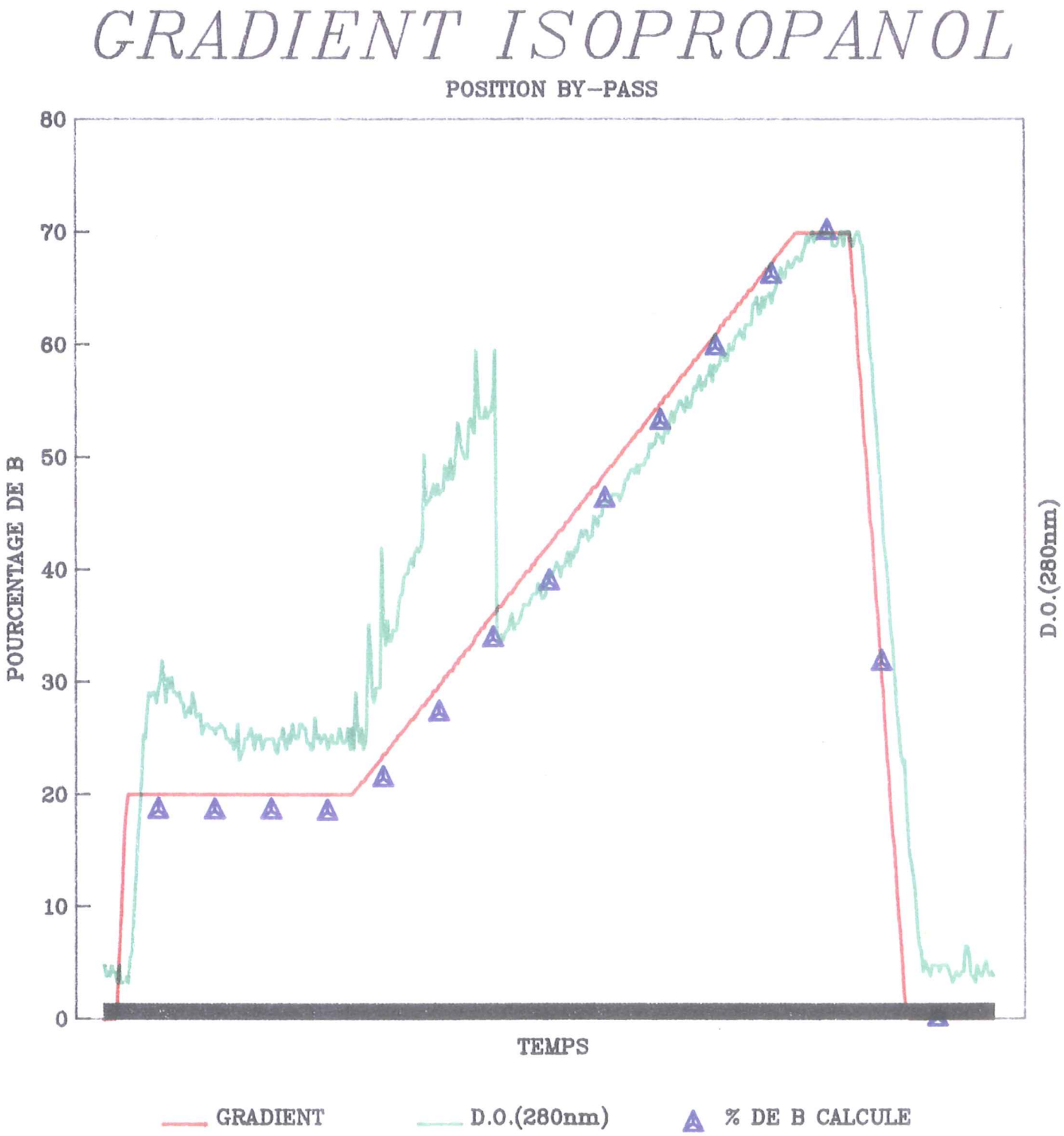
Annexe 11 : Gradient ACN sans colonne (comparaison des 3 profils)



Annexe 12 : Gradient ACN avec colonne (comparaison des 3 profils)

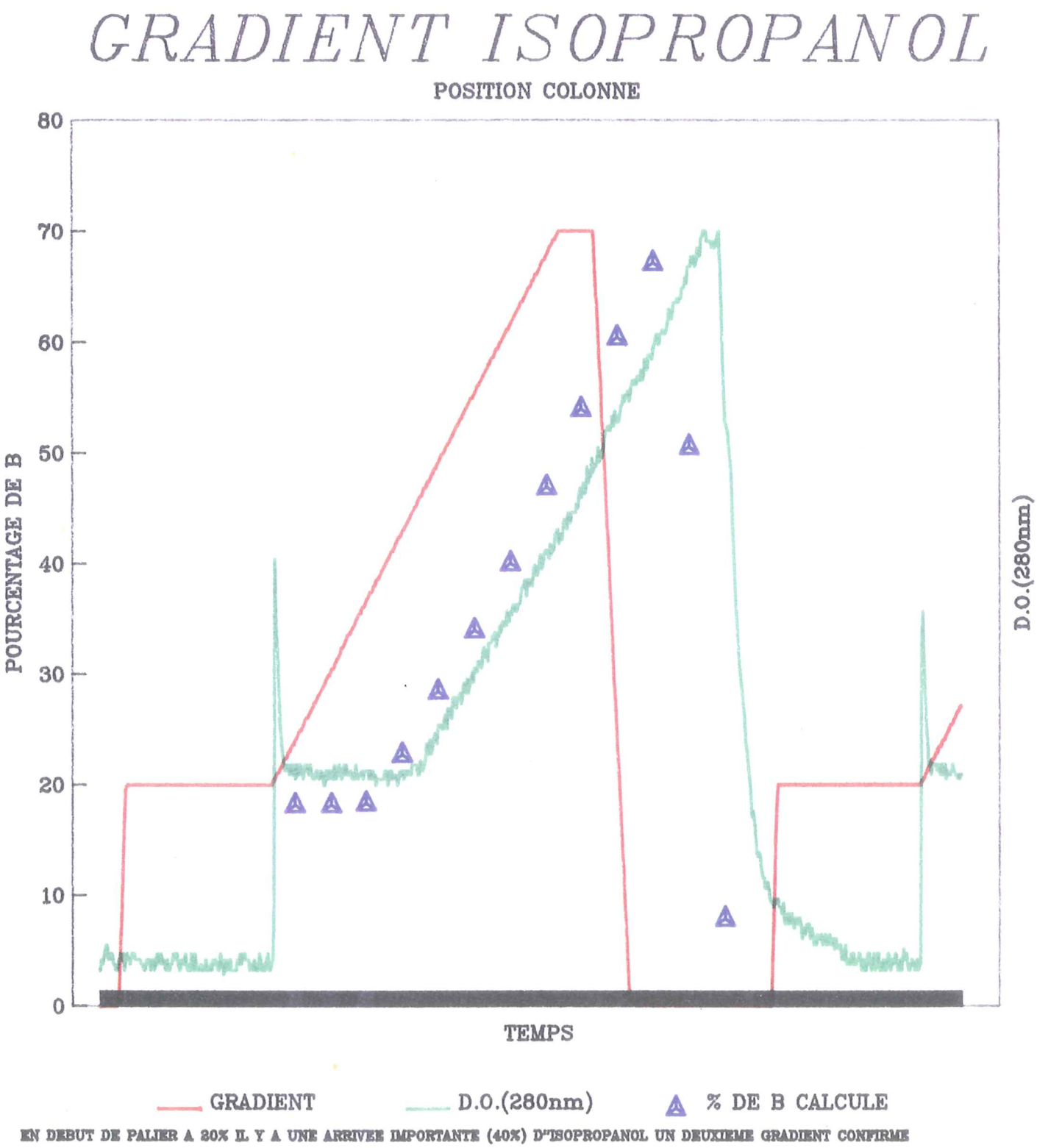


Annexe 13 : Gradient ISO sans colonne (comparaison des 3 profils)



A 35 minutes mise en place d'une contre pression a la sortie du spectrophotometre

Annexe 14 : Gradient ISO avec colonne (comparaison des 3 profils)



Annexe 15 : Recherche des substances pyrogènes : test du lapin.
(Pharmacopée Européenne)

V.2.1.4. PYROGÈNES

L'essai consiste à mesurer l'élévation de température provoquée chez le lapin par l'injection intraveineuse d'une solution stérile du produit à examiner.

Sélection des animaux. — L'essai est pratiqué sur des lapins adultes, en bonne santé, mâles ou femelles, dont la masse n'est pas inférieure à 1,5 kg, nourris suivant un régime complet, équilibré et exempt d'antibiotiques, et dont la masse corporelle n'a subi aucune diminution au cours de la semaine précédant l'essai. Ne pas retenir les lapins:

a) qui ont été utilisés dans une recherche négative de pyrogènes pendant les 3 jours précédents,

b) qui ont été utilisés dans les 3 semaines précédentes dans un essai ayant révélé la présence de pyrogènes,

Stabulation des animaux. — Maintenez les lapins individuellement dans un lieu tranquille à une température uniforme appropriée. Privez les lapins de nourriture pendant la nuit précédant l'essai et jusqu'à la fin de celui-ci; privez-les également d'eau pendant l'essai. Effectuez l'essai dans un lieu tranquille où aucune perturbation ne risque d'exciter les animaux et dont la température ambiante ne s'écarte pas de plus de 3 °C de celle de la pièce où les lapins ont séjourné pendant au moins les 18 h qui précèdent l'essai.

Appareillage. — Verrerie, seringues et aiguilles. — La verrerie, les seringues et les aiguilles utilisées dans l'essai sont lavées soigneusement avec de l'eau pour préparations injectables et stérilisées dans un four à air chaud à 250 °C pendant 30 min ou à 200 °C pendant 1 h.

Dispositif de fixation. — Les lapins, dont la température est mesurée au moyen d'un appareil électrique, sont placés dans des boîtes munies d'un dispositif qui maintient l'animal par la nuque à l'aide d'un collier spécial non serré. Ce dispositif laissant libre le reste du corps du lapin, lui permet de garder une position normale. Les animaux ne sont pas immobilisés par des courroies ou par des moyens analogues, susceptibles de présenter un danger pour eux. Ils sont placés dans les boîtes 1 h au moins avant le premier enregistrement de la température et y restent jusqu'à ce que l'essai soit achevé.

Thermomètres. — Le thermomètre ou le dispositif électrique utilisé indique la température avec une précision de 0,1 °C. Il est introduit dans le rectum du lapin à une profondeur de 5 cm environ, cette profondeur restant constante pour chaque lapin dans un essai donné. S'il s'agit d'un dispositif électrique, il peut être maintenu en position pendant toute la durée de l'essai.

Essai préliminaire. — Un à trois jours avant l'essai du produit, traitez, parmi les animaux sélectionnés au préalable, ceux qui n'ont pas été utilisés pendant les 2 dernières semaines, en leur injectant par voie intraveineuse et par kilogramme de masse corporelle, 10 ml d'une solution apyrogène de chlorure de sodium à 0,9 pour cent *m/V* chauffée à une température voisine de 38,5 °C. Mesurez la température de chaque lapin à partir de 90 min au moins avant l'injection et pendant les 3 h qui suivent. L'animal accusant une variation de température supérieure à 0,6 °C n'est pas utilisé.

Essai définitif. — Effectuez l'essai sur un groupe de 3 lapins.

Préparation et inoculation de l'échantillon. — Chauffez au préalable à 38,5 °C environ les liquides à examiner. L'échantillon à examiner peut être dissous ou dilué dans une solution apyrogène de chlorure de sodium à 0,9 pour cent *m/V* ou autre liquide prescrit. Injectez lentement la solution dans la veine marginale de l'oreille du lapin, la durée de l'injection ne dépassant pas 4 min sauf autre indication dans la monographie. La quantité à injecter varie suivant le produit à examiner et est indiquée dans la monographie. Cette quantité n'est pas inférieure à 0,5 ml, ni supérieure à 10 ml par kilogramme de masse corporelle de l'animal.

Détermination des températures initiale et maximale. — La « température initiale » de chaque lapin est la moyenne de 2 valeurs déterminées à un intervalle de 30 min dans les 40 min précédant l'injection de la solution à examiner; la « température maximale » est la température la plus élevée notée dans les 3 h suivant l'injection de la solution à examiner. Mesurez la température de chaque lapin à des intervalles réguliers de 30 min au maximum à partir de 90 min au moins avant l'injection de la solution à examiner et pendant les 3 h qui suivent. La réponse de l'animal est définie par la différence entre la température maximale et la température initiale moyenne de chaque lapin. Lorsque cette différence de température est négative, le résultat doit être considéré comme étant zéro.

Excluez de l'essai les lapins accusant une variation de température dépassant 0.2 °C entre 2 lectures successives dans la détermination de la température initiale et utilisez seulement les lapins dont les températures initiales ne s'écartent pas les unes des autres de plus de 1 °C. Tout lapin dont la température initiale est supérieure à 39,8 °C ou inférieure à 38,0 °C doit être exclu de l'essai.

Interprétation des résultats. — Selon les résultats obtenus, l'essai effectué d'abord sur un groupe de 3 lapins peut être répété sur d'autres groupes de 3 lapins jusqu'à concurrence de 4 groupes. La substance

satisfait à l'essai si la somme des réponses du premier groupe n'est pas supérieure à la valeur indiquée dans la deuxième colonne du Tableau ci-après. Si la somme des réponses se situe au-delà de la valeur indiquée dans la deuxième colonne mais en-deçà de la valeur indiquée dans la troisième colonne du Tableau, répétez l'essai comme indiqué ci-dessus. Si la somme des réponses est supérieure à la valeur donnée dans la troisième colonne, le produit ne satisfait pas à l'essai.

Nombre de lapins	Le produit satisfait à l'essai si la somme des réponses n'est pas supérieure à:	Le produit ne satisfait pas à l'essai si la somme des réponses est supérieure à:
3	1,15 °C	2,65 °C
6	2,80 °C	4,30 °C
9	4,45 °C	5,95 °C
12	6,60 °C	6,60 °C

Les animaux utilisés dans un essai des pyrogènes où l'augmentation moyenne de la température est supérieure à 1,2 °C, sont éliminés définitivement.

Annexe 16 : Recherche des endotoxines : Limulus test.

(Pharmacopée Européenne)

V.2.1.9 ENDOTOXINES BACTÉRIENNES

L'essai des endotoxines bactériennes utilise un lysat d'amœbocytes de limule, *Limulus polyphemus* (essai LAL). L'addition d'une solution contenant des endotoxines à une solution du lysat provoque une turbidité, une précipitation ou une gélification du mélange. La vitesse de la réaction dépend de la concentration en endotoxines, du pH et de la température. La réaction nécessite la présence de certains cations bivalents, d'un système enzymatique favorisant la coagulation et de protéines coagulables dans le lysat.

La limite pour un produit donné, définie comme étant la concentration maximale admise en endotoxines, est exprimée en unités d'endotoxine par millilitre pour la solution décrite.

L'essai est effectué dans des conditions qui permettent d'éviter la contamination microbienne.

Avant de procéder à l'essai des endotoxines sur la préparation à examiner, il est nécessaire de vérifier:

— que le matériel utilisé n'adsorbe pas les endotoxines,

— la sensibilité du lysat,

— l'absence de facteurs d'interférence.

Si nécessaire, l'appareillage est soumis à un traitement destiné à éliminer les endotoxines.

La préparation de référence et les réactifs suivants sont utilisés dans l'essai:

Etalon d'endotoxine PBR. — L'étalon d'endotoxine PBR est étalonné en unités internationales à partir de l'étalon international.

Lysat d'amœbocytes de limules. — Reconstituez le lysat comme indiqué sur l'étiquette. Pour chaque lot, confirmez la sensibilité indiquée comme prescrit sous « Sensibilité du lysat ».

La sensibilité du lysat est définie comme étant la concentration minimale d'endotoxine qui donne un gel solide dans les conditions de l'essai; la sensibilité du lysat est exprimée en unités d'endotoxine par millilitre.

Eau LAL. — L'eau est de la qualité requise si elle donne un résultat négatif dans les conditions décrites sous « Essai des endotoxines sur la préparation à examiner ». Elle peut être préparée par une distillation de l'eau effectuée à 3 reprises dans un appareil muni d'un dispositif efficace pour empêcher le primage ou par un autre moyen qui permet d'obtenir de l'eau de la qualité requise.

Acide chlorhydrique 0,1N LAL et Hydroxyde de sodium 0,1N LAL. — Préparez ces solutions à partir respectivement d'acide chlorhydrique R et d'hydroxyde de sodium R en utilisant de l'eau LAL. Chacune de ces solutions peut être utilisée si, après ajustement de son pH à 6,5-7,5 au moyen de l'autre solution, elle donne un résultat négatif dans les conditions de l'essai.

1987.

Mode opératoire.

Sauf indication contraire, les solutions et dilutions utilisées dans l'essai sont préparées à partir d'eau LAL.

Si nécessaire, ajustez le pH de la solution à examiner à 6,5-7,5 par addition d'acide chlorhydrique 0,1N LAL ou d'hydroxyde de sodium 0,1N LAL ou d'un tampon approprié. Utilisez le nombre requis de supports, par exemple lames ou tubes appropriés, et maintenez-les à 37 ± 1 °C pendant l'essai. Ajoutez à chacun d'eux un volume de lysat adapté à la capacité du support choisi. A des intervalles de temps permettant la lecture de chaque résultat, ajoutez à chaque support le même volume de la solution à examiner et, immédiatement, mélangez avec précaution. Faites incuber chaque mélange pendant une période constante telle qu'elle a été définie dans les conditions expérimentales (habituellement de 20 min à 60 min). Veillez à ce que les mélanges ne subissent aucune vibration et évitez l'évaporation de l'eau pendant l'incubation. Lisez ensuite les résultats. Un résultat positif est caractérisé par la formation d'un gel solide qui ne se rompt pas lorsque le support est retourné lentement en position vericale, alors qu'un résultat négatif est caractérisé par l'absence de formation d'un tel gel.

Sensibilité du lysat. — Préparez au moins 4 séries d'au moins 3 dilutions, préparées chacune à partir de l'étalon d'endotoxine PBR de façon que, dans chaque série, au moins la dilution extrême donne un résultat négatif. Effectuez simultanément un contrôle négatif sur de l'eau LAL. Procédez comme indiqué sous « Mode opératoire ». Calculez la moyenne des logarithmes de la concentration la plus faible en endotoxines qui donne un résultat positif dans chaque série de dilutions. La sensibilité du lysat est déterminée par l'antilogarithme de la moyenne. Si cette valeur ne diffère pas de la sensibilité indiquée du lysat par plus d'un facteur 2, la sensibilité indiquée est confirmée et utilisée dans tous les essais effectués avec la même préparation du lysat.

Facteurs d'interférence. — Opérez comme prescrit sous « Sensibilité du lysat ». Cependant, pour préparer les dilutions de l'étalon d'endotoxine PBR, utilisez la préparation à examiner à la dilution maximale significative qui est calculée à partir de l'expression

$$\frac{\text{concentration maximale admise en endotoxines}}{\text{sensibilité du lysat}}$$

ces deux valeurs étant exprimées en unité d'endotoxine par millilitre.

Si la sensibilité du lysat déterminée en présence et en l'absence de la préparation à examiner ne diffère pas par plus d'un facteur 2, la préparation à examiner est considérée comme n'interférant pas dans l'essai dans les conditions expérimentales et peut être examinée sans traitement

particulier. Sinon la préparation à examiner est considérée comme interférant dans l'essai par inhibition ou activation et les facteurs d'interférence doivent être éliminés par un traitement approprié tel que dilution, filtration, neutralisation, dialyse, ou par addition de substances déplaçant les endotoxines adsorbées. L'utilisation d'un lysat plus sensible permet de procéder à une plus grande dilution de la préparation à examiner et contribue ainsi à l'élimination des facteurs d'interférence.

L'ultrafiltration peut être appliquée lorsque le facteur d'interférence passe à travers un filtre dont la limite nominale de séparation correspond à une masse moléculaire relative de 10 000 à 20 000; les filtres à membrane asymétrique en triacétate de cellulose ou en polysulfone sont appropriés. Les matières contenant des endotoxines, retenues sur le filtre, sont rincées à l'eau LAL ou avec un tampon approprié et les endotoxines sont recueillies dans de l'eau LAL ou un tampon approprié. Le volume d'essai et le volume final utilisé pour recueillir les endotoxines sont déterminés pour chaque préparation à examiner.

Afin de vérifier que le traitement choisi exclut effectivement les facteurs d'interférence sans éliminer les endotoxines, ajoutez la quantité appropriée de l'étalon d'endotoxine PBR à la préparation à examiner, soumettez le mélange au traitement choisi et répétez le contrôle des facteurs d'interférence.

Essai des endotoxines dans la préparation à examiner. — Opérez en double comme indiqué sous « Mode opératoire » en utilisant la dilution maximale significative de la préparation à examiner qui a été traitée, si nécessaire, pour éliminer les facteurs d'interférence. Effectuez simultanément un contrôle négatif sur de l'eau LAL et 2 contrôles positifs sur une solution d'étalon d'endotoxine PBR à une concentration correspondant à 2 fois la sensibilité indiquée du lysat, contenant, pour l'un d'eux, la préparation à examiner (traitée si nécessaire pour éliminer les facteurs d'interférence après addition de l'étalon d'endotoxine) à la concentration utilisée dans l'essai.

L'essai n'est valable que si le contrôle négatif et les 2 contrôles positifs donnent les résultats appropriés.

La préparation à examiner satisfait à l'essai si la réaction est négative dans les 2 échantillons examinés. La préparation à examiner ne satisfait pas à l'essai si la réaction est positive dans les 2 échantillons examinés. Si la réaction est négative dans l'un et positive dans l'autre, répétez l'essai. La préparation à examiner satisfait à l'essai si la réponse est négative dans les 2 échantillons examinés.

Annexe 17 : Exemple de feuille de travail

Date / horaire de	à	❶. 1. Préparation	TEC Théorie	FDT Pratique	Visa opérateur	Observations
		❶. 1. 1. Préparation du système Kiloprep Auto 250G (KP 250)				
...	...	Opération à effectuer la veille de la production				
		Imprimer et contrôler les programmes à utiliser :				
		❶. 1. 2. Préparation des colonnes (à effectuer la veille)				
		❶. 1. 2. 1. Colonne Prochrom Ø 150 conditionnée selon la procédure XXXXX				
		Hauteur du gel .....(m)	0,47-0,50	...		
		Soit volume du gel dans la colonne.....(forfait)	# 8,5 L	...		
		Date de mise sous alcool éthylique		...		
		Equilibrer le gel par l'intermédiaire de la pompe du KP 250 au débit de	600 ml.min^{-1}	...		
		avec alcool éthylique (# 18/25°C) soit au total.....	24 L	...		
...		par lévigation pendant.....	# 20 min	...		
	...	puis par percolation pendant	# 20 min	...		
...		Arrêter la pompe du KP 250 et inverser la vanne 3 voies en tête de colonne.				
	...	Faire un test de bon conditionnement du gel au débit de.....	600 ml.min^{-1}	...		
		après avoir vérifié les réglages du détecteur (λ 280 nm, sensibilité 0,05) et de l'enregistreur : sensibilité 0,100 V et déroulement du papier.....	10 mm.min^{-1}	...		
			Visa Fabrication :		Le :	

Annexe 18 : Glossaire

Biotechnologie (Norme AFNOR X 42-000)
Application des principes des sciences de la biotechnique et de l'ingénierie au traitement de matières par des agents biologiques dans la production de biens et de services.

Biotechnique (Norme AFNOR X 42-000)
Technique qui met en oeuvre un outil biologique (microorganisme, cellules animales ou végétales, ou composants, ou produits de ces cellules...), pour obtenir ou transformer des matières premières ou des sous produits.

Cellule hôte (Norme AFNOR X 42-004)
Cellule hébergeant un matériel génétique étranger apporté par un virus, un plasmide, un ADN recombiné in vitro, ou une cellule entière.

cellules procaryotes et cellules eucaryotes
(LECLERC, 1983)

La cellule eucaryote comprend un "vrai" noyau entouré d'une enveloppe nucléaire contenant deux jeux semblables de chromosomes (homologues) dépositaires du matériel génétique de la cellule, porteur des informations génétiques et responsables de leur transmission et de leur expression. Elle est diploïde. Son cytoplasme, siège des activités métaboliques de dégradation et de synthèse, est constitué d'un milieu homogène : le hyaloplasme, dans lequel baigne un grand nombre d'organites cellulaires : réticulum endoplasmique, mitochondries, appareil de Golgi, lysosomes...

La cellule procaryote ne posssède pas un "vrai" noyau, mais un appareil nucléaire diffus, non isolé par une membrane, avec un seul chromosome porteur de la grande majorité des informations génétiques de la cellule. Elle est dite haploïde. Le cytoplasme contient des éléments figurés en nombre réduit, les ribosomes et des inclusions ou substances de réserves. La cellule procaryote présente une structure et une organisation simples et rudimentaires.

Clone (Norme AFNOR X 42-004)
Ensemble des cellules dérivées d'une seule cellule initiale, qui possède la même constitution génétique.

Cytokines (CHARLEY,1991)
C'est l'ensemble des polypeptides produits par les cellules et agissant sur d'autres cellules.
Elles sont classées selon leur origine cellulaire :

- les monokines : provenant des macrocytes et macrophages,
- les lymphokines : produites par les lymphocytes,

C'est une classification commode, mais qui s'avère rapidement insuffisante quand on s'aperçoit qu'une même molécule peut être synthétisée par un lymphocyte ou un monocyte.
C'est pourquoi le terme d'interleukine suivi d'un numéro (interleukine 1,2...) a été proposé pour les cytokines nouvellement caractérisées et jouant un rôle de communication entre leucocytes (*inter-leu* kine).
Les molécules qui avaient déjà été caractérisées et baptisées avant que ne soit créé le terme d'interleukine, ont gardé leur première appellation : c'est le cas des interférons, des facteurs hématopoiétiques (CSF : Facteurs Stimulateurs des Colonies).

Contrôle en cours de fabrication (BPF 1992)
Contrôle effectué au cours de la fabrication d'un médicament en vue de s'assurer et si nécessaire d'ajuster le processus afin de s'assurer que le produit est conforme à ses spécifications. Le contrôle de l'environnement ou du matériel peut également être considéré comme un élément du contrôle en cours de fabrication.

Etalonnage (BPF 1992)
Ensemble des opérations qui établissent, sous certaines conditions précisées, la relation entre les valeurs indiquées par un appareil ou un système de mesure ou encore les valeurs données par une mesure matérielle, et les valeurs correspondantes d'un étalon.

Expression génétique (Norme AFNOR X 42-004)
Ensemble des mécanismes qui assurent la transcription (processus par lequel la séquence d'un gène est copiée en ARN) et la traduction (processus de synthèse d'une protéine à partir d'un ARN messager selon les lois du code génétique) de l'information génétique.

Génie génétique (Norme AFNOR X 42-004)
Ensemble des concepts, méthodes et techniques permettant de modifier le patrimoine héréditaire d'une cellule par la manipulation de gènes et/ou leur transplantation. Cette action permet ainsi de modifier, supprimer ou introduire certains caractères dans une cellule.

Lot (BPF 1992)
Quantité définie d'une matière première, d'un article de conditionnement ou d'un produit fabriqué en une opération ou en une série d'opérations, telle qu'elle puisse être considérée comme homogène.

Package- packer- repacker- prépacké.
Termes franglais couramment utilisés en chromatographie, appliqués au conditionnement d'un gel chromatographique dans une colonne.

Plasmide (Norme AFNOR X 42-004)
Molécule d'ADN extrachromosomique capable de se répliquer indépendamment et portant des caractères génétiques non essentiels à la cellule hôte.

Plasmide vecteur (Norme AFNOR X 42-004)
Plasmide dans lequel on peut introduire un segment d'ADN étranger et que l'on peut multiplier dans une cellule hôte donnée.

Procédure (BPF 1992)
Description des opérations à effectuer, des précautions à prendre ou des mesures à prendre dans un domaine, directement ou indirectement en rapport avec la fabrication des médicaments.

Vecteur (Norme AFNOR X 42-004)
Molécule d'ADN capable d'autoréplication et sur laquelle il est possible de cloner des fragments d'ADN qui peuvent ensuite être propagés dans une cellule hôte.

Annexe 19 : Abréviations

Abs.	Absorbance
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide Desoxyribonucléique
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ARN	Acide Ribonucléique
bar	unité de pression (1 bar = 10^5 Pa)
CEE	Communauté Economique Européenne
CFR	Code of Federal Regulation
CHO	Chinese Hamster Ovary
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance Chromatographie Liquide Haute Pression
Da	Dalton : unité de masse atomique (= 1,661 x 10^{-24} gramme)
DL50	Dose Létale à 50% : donnée toxicologique d'une substance qui indique la dose qui provoque la mort de la moitié des animaux expérimentés.
DO	Densité Optique (terme remplacé par absorbance)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration
g	gramme
GMP	Good Manufacturing Practices (bonnes pratiques de fabrication)
h	heure
HEPT	Hauteur équivalente à un plateau théorique
HPLC	High Performance Liquid Chromatography High Pression Liquid Chromatography
IEF	Isoélectrofocalisation
ISO	Isopropanol
l	litre
J.O.	Journal Officiel
KDa	Kilodalton
M	Mole - Molaire
Mano.	Manomètre
min	minute
ml	millilitre
ng	nanogramme = 10^{-9} g
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
p	page

Pa	Pascal : unité internationale de pression
PCR	Polymerase Chain Reaction
pg	picogramme : 10^{-12} g
pi	point isoélectrique
PM	Poids Moléculaire
psi	unité de pression : (1 bar = 10^5 Pa = 14,5 psi)
QSP	Quantité Suffisante Pour
RU	Roussel Uclaf
s	seconde
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
spectro.	spectrophotomètre
TFA	acide trifluoroacétique
Tps	Temps
Tr	Temps de rétention
UO	Unité opératoire
UV	Ultra violet

7. BIBLIOGRAPHIE

ANDRIEU I., La déontologie des manipulations génétiques.
Science et vie, 1980, 133, 78-83.

ASSOCIATION FRANCAISE DE NORMALISATION (AFNOR)
Norme NF X 42-000 : Biotechnologies - Vocabulaire - Termes généraux.
Norme NF X 42-004.: Biotechnologies - Vocabulaire - Génie génétique.

BANSAL S. S., High pressure liquid chromatography of proteins.
Polypeptide and protein drugs : production, characterization and formulation,
BARLOW et HIDER, Londres, 1991, 103-119.

BONNES PRATIQUES DE FABRICATION Janvier 1992
Ministère des affaires sociales et de l'intégration
Bulletin officiel n° 97 / 17 bis

CHARLEY B., BLECHA F., Les cytokines : leur rôle dans la régulation du système immunitaire, leur utilisation potentielle chez l'animal .
Le point vétérinaire, 1991, 23, 139, 731-737.

DELOBETTE H., FRIRY A., PLEWNIAK F., EGLY J.M., Le dosage des protéines, BIOFUTUR (le technoscope), 1991, 41, 3-11.

DODET B., Production de protéines recombinantes, quel système choisir ?
Biofutur, 1990, 91, 20-29.

DODET B., Médicaments recombinants, l'heure du bilan.
Biofutur, 1991, 105, 19-32.

DOROZYNSKI A., Les dimensions nouvelles des sciences de la vie.
Science et vie, 1980, 133, 4-15.

ESCANDE C., Escherichia coli, bacille martyr et vénéré.
Science et vie, 1980, 133, 52-57.

GRIFFITHS E., Polypeptide production by recombinant DNA technology. Polypeptide and protein drugs : production, characterization and formulation, BARLOW et HIDER, Londres, 1991, 82-102.

GROS F., Les secrets du gène, 1986,
Seuil, Paris.

HANDBOOK of CHEMISTRY and PHYSICS
71ème édition, 1990-1991, David R. LIDE.

LA REGLEMENTATION DES MEDICAMENTS DANS LA COMMUNAUTÉ EUROPEENE
Office des publications officielles de la communauté européenne
Volume I : La règlementation des médicaments à usage humain dans la communauté européenne. 1989, n°catalogue : CB-55-89-706-FR-C.
Volume II : Avis aux demandeurs d'autorisation de mise sur le marché de médicament à usage humain dans les états membres de la communauté européenne. 1989, n°catalogue : CB-55-89-293-FR-C.
Volume III : Notes explicatives sur la qualité, la sécurité,et l'efficacité des médicaments à usage humain. 1989, n°catalogue : CB-55-89-843-FR-C.
Addendum au volume III, 1990, n°catalogue : CB-59-90-936-FR-C.
Volume IV : Guide des bonnes pratiques de fabrication des médicaments. 1989, n°catalogue : CB-55-89-722-FR-C.
Volume V : Les médicaments vétérinaires dans la communauté européenne. 1989, n°catalogue : CB-55-89-972-FR-C.

LE HIR A., Abrégé de pharmacie galénique, 1992 (6ème édition),
Masson, Paris, 300-304.

LECLERC H.,IZARD D.,HUSSON M.O., WATTRE P.,JAKUBCZAK E.
Microbiologie générale, 1983, Doin, Paris.

LEVEQUE F., Les produits biotechnologiques à l'épreuve du marché.
La recherche, 1990, 217, 118-127.

OFFICE OF BIOLOGICS RESEARCH AND REVIEW, CENTER FOR DRUGS AND BIOLOGICS, Points to consider in the production and testing of new drugs and biologicals produced by recombinant DNA technology, Draft, FDA, Bethesda, 1985.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE, Acceptabilité des substrats cellulaires pour la production de substances biologiques, Genève 1987, série de rapports techniques 747.

PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2ème édition.

POOLE S., Pyrogen testing of polypeptide and protein drugs.
Polypeptide and protein drugs : production, characterization and formulation, BARLOW et HIDER, Londres, 1991, 146-153.

THE MERCK INDEX, An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals 11ème édition, 1989, MERCH & Co., Inc. RAHWAY,N.J., USA.

WAJCMAN H., Progrès récents de l'application de la CLHP à la séparation des protéines, Colloque INSERM, 1989, 175, 137-144.

TABLE DES MATIERES

pages

Liste du Corps Enseignant à la Faculté de Pharmacie de Limoges 1

Remerciements 2

Plan 3

INTRODUCTION 5

1. LES PROTEINES RECOMBINANTES 7
- **1.1. GENERALITES** 7
  - **1.1.1. Définition** 7
  - **1.1.2. Principe** 7
  - **1.1.3. Les différents systèmes de production** 8
  - **1.1.4. Le choix du système de production** 10
  - **1.1.5. Les médicaments recombinants** 10
  - **1.1.6. Le bilan scientifique et économique** 12
- **1.2. PROTEINE RECOMBINANTE : UN PRODUIT A PART** 13
  - **1.2.1. Une nouvelle technologie** 13
  - **1.2.2. Une technologie pleine d'espoir mais qui fait peur** 13
  - **1.2.3. La biotechnologie en plein essor** 14
  - **1.2.4. La législation européenne des spécialités pharmaceutiques** 14
  - **1.2.5. La législation européenne des produits recombinants** 16

2. PURIFICATION 18
- **2.1. Le produit à purifier** 18
- **2.2. Les impuretés à éliminer** 21
- **2.3. Différentes techniques chromatographiques de purification** 21
  - **2.3.1. Chromatographie par gel filtration** 23
  - **2.3.2. Chromatographie par échanges d'ions** 23
  - **2.3.3. Chromatographie d'affinité** 24
  - **2.3.4. Chromatographie par interactions hydrophobes** 24
  - **2.3.5. Chromatographie en phase inverse** 24
- **2.4. La technique retenue pour purifier le RU** 25

3. VALIDATION 27
3.1. La validation en général selon la CEE et la FDA 27
3.1.1. La validation en général 27
3.1.2. La validation appliquée aux produits recombinants 28
- Lignes directrices européennes
- Lignes directrices américaines

3.2. Application pratique de la validation 29
3.2.1. L'installation 30
3.2.2. Le matériel 32
3.2.2.1. Qualification des prépompes 36
3.2.2.2. Qualification de la pompe principale 38
3.2.2.3. Qualification du formeur de gradient 41
3.2.2.4. Qualification des colonnes chromatographiques 45
3.2.2.5. Qualification du détecteur UV 48
3.2.2.6. Détermination des volumes morts du système 50
3.2.2.7. Réglage des clapets de décharge 52
3.2.2.8. Le gradient avec les solvants de travail 56
3.2.2.9. Discussion des essais de qualification 62
3.2.3. Le procédé 64
3.2.3.1. Description du procédé 64
3.2.3.2. Détermination des paramètres critiques 67
3.2.3.3. Les contaminants : leur importance,leurs méthodes de détection 68
A. Les pyrogènes 68
B. L'acide désoxyribonucléique 70
C. Les protéines bactériennes 71
D. Les analogues de structure de la protéine 72
E. Les constituants du milieu de culture et les réactifs d'extraction 74
F. Les réactifs de la purification 74
3.2.3.4. Les études de clearance 75
3.2.3.5. Le gel chromatographique 76
A. Potentiel générateur de contaminants 76
B. Evaluation de la "durée de vie" du gel 77
3.2.3.6. Etude de reproductibilité 79
A. But 79
B. Le standard interne 79

C. Contenu de l'étude 80
- contenu du document de travail 81
- analyse complète du vrac purifié 82
- contrôles sur le produit fini 84
- les dossiers des lots de validation 84
- choix des contrôles de routine 85

4. DISCUSSION 86

5. CONCLUSION 88

6. ANNEXES 89
Annexe 1 : classification internationale des laboratoires menant des recherches biotechnologiques (conférence d'Asilomar, 1975) 90
Annexe 2 : format standard pour les demandes d'AMM dans la CEE 91
Annexe 3 : liste des médicaments de haute technologie 92
Annexe 4 : spectrophotométrie d'absorption (principe) 93
Annexe 5 : profils spectrophotométriques de l'acétonitrile 94
et de l'isopropanol 95
Annexe 6 : test escaliers (comparaison des trois profils) 96
Annexe 7: grandeurs fondamentales utilisées en chromatographie 97
Annexe 8 : fiche de suivi des packages des colonnes chromatographiques 99
Annexe 9 : étude de linéarité du détecteur UV 100
Annexe 10 : courbes étalon d'ACN et d'ISO 101
Annexe 11 : gradient ACN sans colonne (comparaison des trois profils) 102
Annexe 12 : gradient ACN avec colonne (comparaison des trois profils) 103
Annexe 13 : gradient ISO sans colonne (comparaison des trois profils) 104
Annexe 14 : gradient ISO avec colonne (comparaison des trois profils) 105
Annexe 15 : recherche des substances pyrogènes 106
Annexe 16 : recherche des endotoxines 109
Annexe 17 : exemple de feuille de travail 112
Annexe 18 : glossaire 113
Annexe 19 : abréviations 116

7. BIBLIOGRAPHIE 118

MOTS-CLES

Validation
Purification
Protéine recombinante

RESUME

Dans le processus de fabrication d'une protéine recombinante, l'étape de purification est primordiale, car elle permettra, non seulement d'obtenir un produit le moins immunogène possible, mais aussi de pallier les variations qualitatives et quantitatives propres à la production de produits biologiques.

La validation d'un procédé, participant à la fabrication d'un médicament, fait partie de l'assurance de la qualité future de celui-ci. Elle s'inscrit dans le processus d'élaboration du dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), en apportant la preuve que le matériel utilisé dans un environnement approprié, et que les techniques mises en oeuvre, concourent à la mise en application du procédé, en assurant l'obtention d'un produit conforme aux spécifications physiques, chimiques et thérapeutiques de départ, et ce, de façon reproductible.

La démarche, que le laboratoire demandeur de l'AMM adoptera pour valider son procédé, reste à sa discrétion. Elle doit toutefois lui permettre de garantir l'efficacité et la sécurité d'emploi de son futur médicament.