



Guide technique pour
l'élaboration des monographies

DE PEPTIDES SYNTHÉTIQUES ET DE PROTÉINES RECOMBINANTES



Pharmacopée Européenne

EDQM

Edition 2018

Guide technique pour l'élaboration des monographies de peptides synthétiques et de protéines recombinantes

Pharmacopée Européenne

2^e révision, Édition 2018

Version française

2018

La reproduction de ce fichier à des fins commerciales ou sa publication sur un site internet payant est strictement interdite. En cas de réutilisation de ce fichier, totale ou partielle, il est demandé d'indiquer clairement la source et d'informer l'EDQM (publications.info@edqm.eu).

Direction européenne de la qualité
du médicament & soins de santé (EDQM)

Conseil de l'Europe

7, allée Kastner

CS 30026

F-67081 STRASBOURG

FRANCE

Directeur de la Publication : Dr S. Keitel

Mise en page : EDQM

www.edqm.eu

Images de couverture :

(1) © Sergey Nivens – Fotolia

(2) © EDQM

© Conseil de l'Europe, 2018

Table des matières

1. Objet du guide	5
2. Statut et portée du guide	5
3. Informations générales	6
3.1. Exigences de pharmacopée	6
3.2. Méthodes alternatives	6
4. Méthodes d'analyse : principes généraux	7
4.1. Validation de procédures analytiques	7
4.2. Étalons de référence	7
5. Monographies de protéines recombinantes	8
5.1. Monographie générale	8
5.2. Monographies spécifiques	8
5.2.1. Titre, <i>page 8</i>	
5.2.2. Définition, <i>page 8</i>	
5.2.3. Production, <i>page 8</i>	
5.2.4. Caractères, <i>page 9</i>	
5.2.5. Identification, <i>page 9</i>	
5.2.6. Essai, <i>page 11</i>	
5.2.7. Titrage, <i>page 12</i>	
5.2.8. Conservation, <i>page 12</i>	
5.2.9. Étiquetage, <i>page 12</i>	
5.3. Flexibilité	13
6. Peptides synthétiques	14
6.1. Titre	14
6.2. Définition	14
6.3. Caractères	14
6.4. Identification	14
6.5. Essai	15
6.5.1. Peptides apparentés, <i>page 15</i>	
6.5.2. Pouvoir rotatoire et absorbance, <i>page 15</i>	
6.5.3. Contre-ion, <i>page 15</i>	
6.5.4. Perte à la dessiccation, teneur en eau, <i>page 16</i>	
6.5.5. Endotoxines bactériennes, <i>page 16</i>	
6.6. Dosage	16
6.7. Conservation	16
6.8. Étiquetage	16

Technical guide for the elaboration of monographs on synthetic peptides and recombinant DNA proteins

1. Objet du guide

Le présent document est destiné à guider les auteurs, contributeurs et utilisateurs de la Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.) en matière d'élaboration de monographies de substances actives relatives à des peptides synthétiques et des produits obtenus par la méthode de l'ADN recombinant (ADNr), désignés ci-après par le terme « protéines recombinantes ». Il s'adresse plus particulièrement :

1. au Groupe d'Experts n° 6 (Substances biologiques), ainsi qu'aux Groupes de Travail MAB (Anti-corps monoclonaux) et P4 Bio,
2. aux autorités accordant les autorisations de mise sur le marché de peptides synthétiques et de protéines recombinantes,
3. aux laboratoires officiels de contrôle des médicaments (OMCL),
4. aux fabricants de peptides synthétiques et de protéines recombinantes,
5. aux laboratoires d'analyse publics et privés travaillant pour les entités ci-dessus,
6. au Secrétariat de la Ph. Eur. et à tout autre service concerné de la Direction européenne de la qualité du médicament & soins de santé (EDQM).

Il convient de le lire en parallèle du *Guide technique pour l'élaboration des monographies* et du *Guide de rédaction de la Pharmacopée Européenne*.

2. Statut et portée du guide

Les monographies et chapitres généraux de la Ph. Eur. établissent les normes officielles régissant la qualité des médicaments. Le présent guide fournit des informations sur l'élaboration et l'utilisation de ces normes, mais ne dispose d'aucun statut officiel. En cas de doute ou de litige, l'arbitrage final doit se baser sur le texte de la Ph. Eur. uniquement.

Les monographies de produits finis dérivés de peptides synthétiques ou de protéines recombinantes ne sont pas couvertes par ce document.

Le présent guide ne couvre pas le domaine des produits du sang ni celui des vaccins. Les principes s'appliquant aux protéines recombinantes dans le présent guide (voir section 5) peuvent, s'il y a lieu, s'appliquer également aux protéines d'origine humaine ou animale.

3. Informations générales

3.1. Exigences de pharmacopée

L'interprétation des monographies et des chapitres généraux de la Ph. Eur. est régie par les Prescriptions générales. Tous les utilisateurs de la Ph. Eur. doivent connaître ces prescriptions.

Sauf indication contraire, les spécifications des monographies constituent des exigences obligatoires. Les Prescriptions générales stipulent :

« Les chapitres généraux deviennent d'application obligatoire dès lors qu'une monographie y fait référence sauf si la référence est faite d'une manière qui indique que l'intention est de citer le texte à titre d'information. »

(9^e Édition de la Ph. Eur.)

Concernant la conformité à la Ph. Eur., les Prescriptions générales précisent que :

« (1) [Les articles faisant l'objet d'une monographie] ne sont de qualité "Pharmacopée" que s'ils sont conformes à toutes les exigences décrites dans les monographies. Ceci n'implique pas qu'il soit obligatoire pour un fabricant d'effectuer l'ensemble des essais de la monographie pour évaluer la conformité à la Pharmacopée avant libération d'un produit. Le fabricant peut également obtenir l'assurance que le produit est de qualité "Pharmacopée" en se basant sur la conception du produit, ainsi que sur la stratégie de contrôle appliquée et les données obtenues, par exemple, à partir des études de validation du procédé de fabrication.

(2) Une approche renforcée du contrôle qualité pourra consister à utiliser des stratégies de contrôle analytique des procédés (ou PAT, pour "Process Analytical Technology") et/ou de contrôle de la libération en temps réel (notamment la libération paramétrique) comme solutions alternatives aux seuls essais sur le produit final. La nécessité de satisfaire aux exigences de la Pharmacopée n'exclut donc pas la possibilité de recourir à des essais liés à la libération en temps réel dans certaines situations jugées appropriées par l'Autorité compétente. »

(9^e Édition de la Ph. Eur.)

3.2. Méthodes alternatives

En ce qui concerne l'utilisation de méthodes alternatives, les Prescriptions générales précisent que :

« [L]es essais et dosages décrits sont les méthodes officielles à partir desquelles sont établies les normes de la Pharmacopée Européenne. D'autres méthodes d'analyse peuvent être utilisées à des fins de contrôle avec l'accord de l'Autorité compétente, à condition que les méthodes permettent de juger, sans équivoque, que les normes des monographies seraient satisfaites si les méthodes officielles étaient appliquées. En cas de doute ou de litige, seules font autorité les méthodes d'analyse de la Pharmacopée Européenne. »

(9^e Édition de la Ph. Eur.)

UTILISATION D'ANIMAUX À DES FINS SCIENTIFIQUES

L'introduction de la 9^e Édition de la Ph. Eur. stipule que :

« [c]onformément à la Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques (Série des traités européens n° 123¹), élaborée sous l'égide du Conseil de l'Europe, la Commission [européenne de Pharmacopée] s'est engagée à réduire le nombre d'animaux nécessaires dans les essais de pharmacopée, chaque fois que possible, et elle encourage tous ceux qui contribuent à ses travaux à rechercher des méthodes alternatives ne nécessitant pas l'utilisation d'animaux. Un essai sur animaux n'est introduit dans une monographie que lorsqu'il a été démontré qu'il est indispensable pour assurer un contrôle de pharmacopée satisfaisant. »

Par ailleurs, comme indiqué dans les Prescriptions générales, en démontrant la conformité à la Ph. Eur. les fabricants peuvent envisager d'établir des systèmes supplémentaires de surveillance de la reproductibilité de la production. Dans le cas où une monographie prescrit des essais sur animaux et avec l'accord de l'Autorité compétente, le choix des essais effectués pour évaluer la conformité à la Ph. Eur. est fait de manière à réduire, autant que possible, l'emploi d'animaux.

Compte tenu de ce qui précède, les recommandations générales sur le principe des 3R ne sont généralement pas reprises dans les monographies spécifiques.

4. Méthodes d'analyse : principes généraux

4.1. Validation de procédures analytiques

Les méthodes d'analyse prescrites dans les monographies doivent avoir été validées selon les principes définis dans le chapitre III du *Guide technique pour l'élaboration des monographies* et dans le guideline ICH Q2 (R1) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* (anciennement, Q2A (R1) *Validation of analytical procedures: definitions and terminology* et Q2B (R1) *Validation of analytical procedures: methodology*), en prenant en compte la spécificité et les particularités des essais utilisés pour l'analyse des produits biologiques ou biotechnologiques.

4.2. Étalons de référence

Les titrages biologiques sont étalonnés à l'aide des étalons internationaux de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), des étalons de la Ph. Eur. ou d'étalons établis en interne et dont la traçabilité jusqu'à l'étalon primaire de l'OMS est assurée. S'il n'existe pas d'étalon OMS ou Ph. Eur., le fabricant doit avoir lui-même établi un matériau biologique de référence convenablement caractérisé.

Les analyses physicochimiques sont qualifiées et étalonnées à l'aide des substances chimiques de référence (SCR) de la Ph. Eur., établies pour la substance active et, s'il y a lieu, pour des impuretés spécifiées.

Pour en savoir plus sur l'établissement des étalons de référence, voir Chapitre général *Étalons de référence* (5.12).

¹ Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques. Série des traités européens n° 123. Conseil de l'Europe (1986).

5. Monographies de protéines recombinantes

5.1. Monographie générale

La monographie générale *Produits obtenus par la méthode dite de l'ADN recombinant (0784)* énonce des spécifications générales sur la fabrication et le contrôle des produits recombinants, et comprend des exigences relatives à la substance active présente dans ces produits. Les substances actives produites selon la méthode ADNr sont supposées répondre aux exigences spécifiées dans la section correspondante de la monographie générale.

5.2. Monographies spécifiques

5.2.1. Titre

Le titre de la monographie reprend généralement la Dénomination commune internationale (DCI) établie par l'OMS.

Les monographies de substances à l'état solide prennent pour titre le nom de la substance.

Le titre des monographies de substances à l'état liquide comprend la mention « solution concentrée ». Il convient d'éviter d'utiliser le terme « solution » seul dans un titre, afin d'écartier toute erreur d'interprétation consistant à penser qu'il est question d'un produit formulé (produit fini). Les informations sur l'état physique couvert par une monographie peuvent figurer dans la section *Définition*.

5.2.2. Définition

La section *Définition* indique :

- la formule brute (monomère ou protomères uniques dans le cas de protéines homo- et hétéro-multimères, respectivement) et le numéro CAS correspondant, le cas échéant,
- la masse moléculaire approximative. Pour les glycoprotéines, la valeur indiquée au début de chaque monographie correspond à la protéine glycosylée ; pour les glycoprotéines complexes (sites de N- et de O-glycosylation multiples, par exemple), la valeur indiquée correspond à la protéine non glycosylée et la mention « sans glycosylation » figure entre parenthèses, alors que la masse moléculaire (apparente) de la protéine glycosylée est donnée dans la partie descriptive de la section,
- la forme physique,
- la séquence primaire (acides aminés) de la ou des chaînes protéiques, les résidus modifiés et les sites de glycosylation (prédominants/potentiels), indiqués soit dans la formule développée soit, s'il y a lieu, sous forme de liste (en précisant clairement qu'elle n'est pas exhaustive, le cas échéant),
- les ponts disulfure, indiqués soit dans la formule développée soit sous forme de liste (en précisant clairement qu'elle n'est pas exhaustive, le cas échéant),
- l'identité et l'activité biologique de la substance et de son analogue naturel,
- la teneur en protéines en masse par volume (milligrammes par millilitre) ou en masse par masse (intervalle en pourcentage),
- l'activité biologique spécifique en unités d'activité par masse de protéine.

5.2.3. Production

Comme indiqué dans les Prescriptions générales, les dispositions de la section *Production* attirent l'attention sur des aspects particuliers du procédé de fabrication, mais ne sont pas

nécessairement exhaustives. Sauf indication contraire, elles constituent des normes obligatoires pour les fabricants. Elles peuvent avoir trait, par exemple, aux matières premières ; au procédé de fabrication lui-même, ainsi qu'à sa validation et à son contrôle ; aux essais en cours de fabrication ou aux essais à effectuer par le fabricant sur le produit fini, soit sur des lots sélectionnés, soit sur chaque lot avant de le libérer. Ces dispositions peuvent ne pas être toujours vérifiables par un expert extérieur à l'établissement de production, sur un échantillon du produit fini. Il revient à l'Autorité compétente de s'assurer que les instructions ont été respectées, par exemple en examinant les données soumises par le fabricant, en inspectant la fabrication ou en procédant à la vérification d'échantillons appropriés.

La section *Production* peut comprendre les éléments suivants :

- détails appropriés concernant le procédé de production,
- activité biologique (spécifique) et des considérations relatives à la détermination de l'activité si elle n'est pas couverte par un titrage décrit dans la monographie,
- procédures de recherche des impuretés issues du procédé de production en amont (protéines de la cellule hôte et ADN, par exemple) ou en aval (protéine A, par exemple),
- pour les protéines conjuguées ou chimiquement modifiées, exigences relatives à la réduction des impuretés issues de la procédure de modification (sous-produits de la réaction de pégylation et réactifs, par exemple),
- exigences relatives à la qualité des réactifs utilisés dans le procédé de fabrication (réactif de pégylation, par exemple),
- considérations liées au procédé, par exemple exigences relatives à la démonstration de la reproductibilité de la production (attributs qualité liés au procédé tels que le taux d'occupation des sites de glycosylation),
- procédures d'essai mesurant l'hétérogénéité liée au procédé (analyse glycanique et détermination des variants chargés, par exemple),
- procédures de validation du procédé de production telles que décrites dans la monographie *Produits obtenus par la méthode dite de l'ADN recombinant (0784)*.

La section *Production des monographies spécifiques* peut, s'il y a lieu, comprendre une liste d'essais, précédée de la mention :

« Sauf dérogation accordée par l'Autorité compétente, les essais suivants sont effectués sur chaque lot de [nom de la substance], avant sa libération. »

5.2.4. Caractères

Comme précisé dans les Prescriptions générales, les indications figurant sous *Caractères* ne sont pas à interpréter au sens strict et ne sont pas considérées comme des exigences analytiques.

Il convient de décrire l'aspect de la substance sous forme solide ou liquide, et d'indiquer la solubilité des substances sous forme solide, le cas échéant.

5.2.5. Identification

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

La section *Identification*, dont l'objectif est de confirmer l'identité de la substance considérée, comprend des essais qui doivent être spécifiques à cette substance et fondés sur des aspects uniques de sa structure moléculaire et/ou d'autres propriétés spécifiques. La combinaison de plusieurs essais (physicochimiques, biologiques et/ou immunochimiques) est indispensable à l'établissement de l'identité de la substance. Des méthodes utilisées pour la détermination de

l'activité ou de la pureté peuvent également servir, après adaptation si nécessaire, comme critères d'identification.

Bien que l'ensemble des essais nécessaires à l'identification dépende de la nature du produit et ne puisse donc être précisément défini a priori, on peut considérer que la section Identification d'une monographie doit, de façon générale, comprendre des techniques permettant de vérifier la taille de la molécule, sa séquence primaire, son profil isoélectrique, ses propriétés chromatographiques et l'adoption par la molécule de sa conformation fonctionnelle. Habituellement, cet ensemble d'essais comprend :

- un titrage biologique,
- une cartographie peptidique,
- une chromatographie liquide (CL) en phase inversée,
- une chromatographie d'exclusion,
- une focalisation isoélectrique/électrophorèse capillaire à focalisation isoélectrique,
- une électrophorèse/électrophorèse capillaire.
- Généralement, les critères d'acceptation des procédures d'essai physicochimiques utilisées pour l'identification sont fondés sur une analyse comparative des résultats, par rapport à un étalon chimique de référence défini.

TITRAGE BIOLOGIQUE

Généralement, dans le cas des protéines recombinantes, la conformité aux exigences figurant sous *Titrage/activité* est un critère d'identification important. Il ne peut être totalement remplacé par des méthodes d'identification physicochimiques que dans les cas où :

- ces méthodes permettent d'obtenir à elles seules des informations physicochimiques suffisantes sur la protéine, y compris sa structure d'ordre supérieur ; une corrélation pertinente avec l'activité biologique est alors établie,
- l'activité biologique des protéines apparentées présentes dans le produit est connue,
- l'historique de fabrication est convenablement documenté.

CARTOGRAPHIE PEPTIDIQUE

La cartographie peptidique apporte une preuve directe de la séquence et est aujourd'hui généralement considérée comme essentielle. Les essais d'identification décrits dans les monographies reposent sur la comparaison de la « signature » obtenue pour la protéine avec celle d'un étalon de référence spécifique (SCR), c'est-à-dire qu'il faut obtenir des profils chromatographiques correspondants (en nombre de pics, rétention relative, surfaces de pics et rapports des surfaces de pics). Les critères de conformité du système décrits pour les pics servant de marqueurs (« peptides signatures ») font généralement référence à une similarité qualitative (c.-à-d. profil général d'élu-tion, nombre de pics, rétentions relatives, absence de pic supplémentaire) du chromatogramme obtenu avec l'étalon de référence et de celui fourni avec la SCR.

Il est souvent possible de coupler la cartographie peptidique à la spectrométrie de masse.

CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

Le renvoi à une ou plusieurs méthodes de chromatographie liquide (généralement une CL en phase inversée et une chromatographie d'exclusion) est souvent utilisé comme élément d'iden-tification. Lorsque, de par sa nature, la protéine ne se prête pas à la séparation par ces méthodes (dans le cas de protéines de très grande taille ou de glycoprotéines hétérogènes, par exemple), on peut envisager de remplacer la CL par l'électrophorèse ou la chromatographie à échange d'ions.

AUTRES ESSAIS

Les autres méthodes susceptibles d'être utilisées à des fins d'identification comprennent :

- les méthodes d'électrophorèse, fondées sur la taille ou sur la charge,
- les méthodes de liaison à des anticorps, seules ou associées à des méthodes d'électrophorèse (Western blot),
- des méthodes spectroscopiques, notamment la spectrométrie de masse,
- l'analyse de la séquence N-terminale,
- des techniques d'analyse glycanique dans le cas de protéines glycosylées.

5.2.6. Essai

ESSAIS DE PURETÉ

Les méthodes analytiques applicables aux protéines reposent habituellement sur la taille, la charge et le caractère hydrophobe de la molécule (chromatographie d'exclusion, CL à échange d'ions, CL en phase inversée, SDS-PAGE, focalisation isoélectrique et électrophorèse capillaire, par exemple). Lors de l'élaboration d'une monographie, il est généralement possible de faire l'économie d'une de ces méthodes en démontrant sa redondance (la CL à échange d'ions peut faire double emploi avec la CL en phase inversée ou l'électrophorèse capillaire, par exemple). Des essais complémentaires tels que l'analyse des monosaccharides (acide sialique, par exemple) ou, s'il y a lieu, d'autres techniques d'analyse sont utilisés si nécessaire pour mettre en évidence certaines impuretés/substances spécifiques liées au produit, ou dans les cas où la combinaison CL en phase inversée/chromatographie d'exclusion ne couvre pas toutes les impuretés et substances liées au produit à considérer. Si une SDS-PAGE est prescrite, les conditions opératoires doivent être celles décrites dans le chapitre *Électrophorèse* (2.2.31), à moins qu'il ne soit démontré que ces conditions sont inappropriées pour la substance à examiner.

La chromatographie d'exclusion, utilisée pour le dosage des dimères et impuretés de masse moléculaire supérieure, reste un essai de pureté important dans la mesure où les molécules agrégées peuvent posséder un caractère immunogène. L'essai doit, si possible, être réalisé dans des conditions non dénaturantes (tampons aqueux neutres) pour éviter la dissociation et la non-détection résultante des agrégats non covalents.

Les procédures spécifiques de détection et de quantification utilisées pour les impuretés spécifiques qui exercent un effet clinique connu et les critères d'acceptation les concernant figurent dans la monographie.

Généralement, les critères d'acceptation s'appliquant aux impuretés ou substances liées au produit sont exprimés sous forme de limites numériques ou d'intervalles. Ils peuvent également comprendre une comparaison avec les électrophorégrammes/chromatogrammes obtenus avec un étalon chimique de référence spécifique.

ENDOTOXINES BACTÉRIENNES

Lorsqu'une substance pour usage pharmaceutique est destinée à un usage parentéral, elle doit satisfaire à l'essai des endotoxines bactériennes (2.6.14), et le chapitre *Recommandations pour la réalisation de l'essai des endotoxines bactériennes* (5.1.10) donne des orientations relatives à l'établissement des limites. Cette exigence figurant dans la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique* (2034), il n'est pas indispensable qu'elle figure également dans les monographies spécifiques.

5.2.7. Titrage

La section *Titrage* de la monographie est généralement divisée en deux procédures : i) la détermination de la teneur en protéines et ii) un titrage biologique faisant référence à l'étalon international de l'OMS ou à un étalon de la Ph. Eur. étalonné en Unités Internationales. Dans le cas où la monographie fait référence à l'étalon OMS, la formulation type est la suivante :

« L'Unité Internationale correspond à l'activité d'une quantité donnée de l'étalon international. L'équivalence en Unités Internationales de l'étalon international est indiquée par l'Organisation mondiale de la Santé. »

La teneur en protéines peut être déterminée par spectrophotométrie UV (généralement à 280 nm) à l'aide de l'absorbance spécifique de la protéine considérée ou d'un étalon de référence spécifique ayant une teneur assignée. D'autres méthodes appropriées, notamment une CL avec comparaison à un étalon de référence défini, peuvent également être utilisées.

Les limites du titrage biologique sont calculées comme spécifié dans le chapitre général *Analyse statistique des résultats des dosages et essais biologiques* (5.3) et sont habituellement exprimées en termes d'intervalles acceptables, pour l'activité estimée (80-125 pour cent de l'activité déclarée², par exemple) et pour les limites de confiance de l'activité estimée (64-156 pour cent de l'activité déclarée, par exemple).

Dans certains cas exceptionnels, des stratégies différentes peuvent être adoptées :

- Lorsque l'ensemble des essais physicochimiques ne permet pas de caractériser convenablement certains aspects structurels de la molécule dont on sait qu'ils affectent l'activité biologique *in vivo* (la glycosylation, par exemple), la monographie peut comprendre un titrage biologique *in vivo*. Ce titrage *in vivo* utilisé pour évaluer le degré de glycosylation ne peut être remplacé par un titrage *in vitro* que s'il a été démontré que l'analyse physicochimique permet de cerner convenablement le profil de glycosylation. Une description détaillée des étapes à suivre pour réaliser le titrage, notamment les critères de conformité du système, peut être introduite. Pour les titrages complexes, un exemple de procédure appropriée peut être donné.
- Lorsqu'il a été établi que l'ensemble des essais physicochimiques permet de couvrir la qualité de la protéine, selon les critères définis dans la section *Titrage biologique* à la page 10 du présent guide, un dosage physicochimique peut être utilisé seul. Lorsqu'un dosage physicochimique est utilisé, les limites sont habituellement asymétriques, la limite supérieure étant fixée à 100 pour cent + écart de reproductibilité admis (généralement jusqu'à 5,0 pour cent pour une CL en phase inversée) et la limite inférieure à 100 pour cent – (écart de reproductibilité admis + teneur maximale admise en impuretés).

5.2.8. Conservation

Bien que les indications figurant dans cette section ne constituent pas des exigences de pharmacopée, il convient de fournir, s'il y a lieu, les informations utiles au maintien de la qualité de la substance au cours de sa conservation.

5.2.9. Étiquetage

Le statut de la section Étiquetage est défini dans les Prescriptions générales :

² Dans cet exemple, l'intervalle de 80-125 pour cent de l'activité déclarée a été dérivé en appliquant, comme méthode d'analyse des données, la transformation logarithmique. Cet intervalle est basé sur la multiplication par 1,25 de la limite inférieure (80 pour cent) à la cible (100 pour cent) et de la cible à la limite supérieure (125 pour cent).

« D'une manière générale, l'étiquetage des médicaments est régi par des accords internationaux et des règlements supranationaux ou nationaux. Les indications données sous Étiquetage ne constituent donc pas une liste exhaustive et, par ailleurs, seules sont obligatoires, aux fins de la Pharmacopée, les indications d'étiquetage nécessaires pour démontrer la conformité ou non-conformité à la monographie. Toute autre information est donnée à titre de recommandation. Lorsque le terme "étiquette" est employé dans la Pharmacopée, les indications peuvent figurer sur le récipient, l'emballage, une notice qui accompagne l'emballage ou un certificat d'analyse qui accompagne le produit, selon la décision de l'Autorité compétente. »

Les informations à faire figurer dans cette section sont déterminées au cas par cas.

5.3. Flexibilité

Dans les monographies de glycoprotéines complexes, les exigences relatives à l'hétérogénéité liée au procédé (glycosylation, profil de charge, par exemple) sont définies de sorte à permettre une certaine flexibilité.

Exemple : analyse glycanique

Généralement, cette approche en plusieurs étapes nécessite de recourir à une méthode appropriée, développée conformément à la section 2-3 du chapitre général *Analyse glycanique des glycoprotéines (2.2.59)*, qui prescrit trois étapes principales :

- libération des glycanes au moyen d'un des agents cités dans le tableau 2.2.59.-1,
- si nécessaire, marquage des glycanes libérés au moyen d'un des marqueurs fluorescents cités dans le tableau 2.2.59.-2,
- analyse des glycanes (marqués) par chromatographie liquide (2.2.29).

Une procédure appropriée, détaillant notamment les conditions de préparation de l'échantillon, la digestion enzymatique, l'étiquetage (s'il y a lieu) et la séparation chromatographique, est donnée à titre d'exemple.

Ces procédures requièrent généralement l'utilisation de deux types d'étalons de référence : 1) une SCR spécifique, qui sert à démontrer la performance de la méthode (conformité du système); 2) une préparation de référence appropriée, établie en interne et représentative des lots testés cliniquement et des lots utilisés pour démontrer la reproductibilité de la production, qui sert à évaluer les critères d'acceptation (habituellement par comparaison visuelle des chromatogrammes/électrophorégrammes).

Le terme « approprié » est conventionnel et défini dans les Prescriptions générales comme suit :

« Dans certaines monographies ou autres textes, les termes "approprié" et "convenable" sont employés pour qualifier un réactif, un microorganisme, une méthode d'essai, etc. Si les critères définissant ces qualificatifs ne figurent pas dans la monographie, le caractère approprié ou convenable du réactif, microorganisme, procédé, etc. utilisé est à démontrer à la satisfaction de l'Autorité compétente. »

L'exigence relative à l'utilisation d'une « méthode appropriée » (« procédure appropriée ») est généralement associée à des indications d'ordre général sur la procédure d'essai, notamment les principales étapes à suivre, le type de méthode/de titrage, la lecture du résultat, de cellules, de réactifs (grade), etc. Dans certains cas (procédures d'essai ou biotitrages complexes, par exemple), des protocoles précis avec des instructions spécifiques, concernant notamment la préparation des échantillons, la quantité, la concentration, la composition des réactifs et des tampons, les conditions chromatographiques, les plans d'expérience pour les essais sur plaques, la lecture du

résultat, ainsi que les critères de conformité du système peuvent être décrits comme exemples. Si tel est le cas, la phrase suivante précède généralement la procédure détaillée concernée : « La procédure suivante est décrite à titre d'exemple. »

Le terme « exemple » signifie que la méthode d'essai décrite peut être utilisée en tant que telle ou être remplacée par une autre procédure appropriée et validée, sans avoir à démontrer son équivalence avec la méthode donnée en exemple, sous réserve de l'approbation de l'Autorité compétente.

6. Peptides synthétiques

Les peptides synthétiques se différencient structurellement des protéines recombinantes par deux aspects structurels :

- leur taille habituellement petite (typiquement inférieure à 5 000 Da),
- le fait qu'ils puissent présenter des structures chimiques n'existant pas à l'état naturel dans des protéines ou des peptides.

Par conséquent, un ensemble d'essais physicochimiques suffit généralement à les caractériser, ce qui a des répercussions sur la structure des monographies de peptides synthétiques.

6.1. Titre

Le titre de la monographie reprend la Dénomination commune internationale (DCI) de la substance, établie par l'OMS.

En règle générale, la forme saline sous laquelle se présente le peptide n'est pas mentionnée dans le titre de la monographie. Si nécessaire, la section Définition donne les précisions utiles.

6.2. Définition

La section Définition indique :

- la formule brute et le numéro CAS correspondant,
- la masse moléculaire,
- la forme physique,
- la formule développée,
- l'identité et l'activité biologique de la substance et, le cas échéant, de son analogue naturel,
- les spécifications de teneur,
- le mode de production,
- la forme saline,
- les modifications chimiques éventuellement apportées (estérification ou amidation, par exemple).

6.3. Caractères

L'aspect du peptide synthétique sous forme solide est décrit et la solubilité est indiquée, s'il y a lieu.

6.4. Identification

Deux techniques sont généralement jugées suffisantes pour l'identification.

La section *Identification* de la monographie comprend typiquement :

- une analyse des acides aminés et/ou une RMN,

- une CL en phase inversée.

L'analyse des acides aminés et la résonance spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) peuvent être toutes deux décrites dans la monographie, en plus de l'autre identification (CL), mais la liberté est laissée aux utilisateurs de ne réaliser qu'un seul de ces essais.

La RMN est applicable aux peptides comportant jusqu'à une quinzaine d'acides aminés environ.

Dans certains cas, par exemple lorsque le peptide comporte des acides aminés non naturels ou que la monographie spécifique le prescrit, le recours à la RMN peut également être requis en plus des méthodes conventionnelles fondées sur l'analyse de composition ou de séquence des acides aminés.

Il est souvent souhaitable de prescrire plusieurs identifications par différentes méthodes de chromatographie liquide, notamment lorsque l'identification ne comporte pas de méthode spectrométrique.

Lorsque l'identification comporte une RMN, celle-ci est réalisée à l'aide d'un étalon de référence spécifique, établi à partir de la substance vrac et ne nécessitant pas de teneur assignée.

6.5. Essai

6.5.1. Peptides apparentés

En règle générale, les monographies de peptides synthétiques comportent une CL en phase inversée servant au contrôle des peptides apparentés. Les essais de ce type sont validés pour des impuretés spécifiées dont on sait qu'elles sont des contaminants potentiels, et sont transparents quant aux impuretés concernées.

Les dispositions relatives aux peptides synthétiques dans la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)* s'appliquent, sauf indication contraire, à tous les peptides synthétiques.

Les monographies doivent normalement spécifier des critères d'acceptation pour :

- chaque impureté spécifiée,
- les impuretés non spécifiées (le critère d'acceptation correspond normalement au seuil d'identification),
- les impuretés totales.

L'essai est réalisé au moyen d'étalons de référence constitués d'impuretés spécifiées, de mélanges d'impuretés spécifiées ou, le cas échéant, du peptide dopé avec des impuretés spécifiées. Il peut être nécessaire de quantifier séparément, par des méthodes indépendantes, certaines impuretés spécifiées. Lorsqu'une monographie repose sur un essai de pureté unique, il convient de démontrer l'aptitude de la méthode à contrôler l'ensemble des impuretés à considérer.

6.5.2. Pouvoir rotatoire et absorbance

Ces essais sont pertinents et doivent être prescrits dans les cas appropriés. La chromatographie chirale peut parfois utilement remplacer la mesure du pouvoir rotatoire.

6.5.3. Contre-ion

La détermination du contre-ion est une exigence générale pour les peptides. Dans le cas des peptides ayant l'acétate pour contre-ion, la méthode utilisée pour la détermination de la teneur

en acide acétique est celle décrite dans le chapitre général *Acide acétique dans les peptides synthétiques* (2.5.34), sauf s'il est démontré qu'elle n'est pas appropriée pour le peptide à examiner.

6.5.4. Perte à la dessiccation, teneur en eau

La perte à la dessiccation est de moins en moins utilisée, car elle requiert d'importantes quantités de produit. Elle est souvent remplacée par une détermination de la teneur en eau. La méthode utilisée à cet effet est soit la méthode 2.5.12. *Semi-microdosage de l'eau* (Karl Fischer) soit la méthode 2.5.32. *Microdosage de l'eau* (titrage coulométrique).

6.5.5. Endotoxines bactériennes

Lorsqu'une substance pour usage pharmaceutique est destinée à un usage parentéral, elle doit satisfaire à l'essai des endotoxines bactériennes (2.6.14), et le chapitre *Recommandations pour la réalisation de l'essai des endotoxines bactériennes* (5.1.10) donne des orientations relatives à l'établissement des limites. Cette exigence figurant dans la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique* (2034), il n'est pas indispensable qu'elle figure également dans les monographies spécifiques.

6.6. Dosage

Le dosage des peptides synthétiques est généralement effectué par chromatographie, selon des méthodes reposant sur la comparaison avec une substance chimique de référence définie. Les résultats sont normalement exprimés en quantité de substance anhydre et exempte de contre-ion. Les limites de teneur spécifiées sont habituellement asymétriques, la limite supérieure étant fixée à 100 pour cent + écart de reproductibilité admis (généralement $\pm 2,0$ pour cent) et la limite inférieure à 100 pour cent - (écart de reproductibilité admis + teneur maximale admise en impuretés).

6.7. Conservation

Bien que les indications figurant dans cette section ne constituent pas des exigences de pharmacopée, il convient de fournir, s'il y a lieu, les informations utiles au maintien de la qualité de la substance au cours de sa conservation.

6.8. Étiquetage

Le statut de la section Étiquetage est défini dans les Prescriptions générales :

« D'une manière générale, l'étiquetage des médicaments est régi par des accords internationaux et des règlements supranationaux ou nationaux. Les indications données sous Étiquetage ne constituent donc pas une liste exhaustive et, par ailleurs, seules sont obligatoires, aux fins de la Pharmacopée, les indications d'étiquetage nécessaires pour démontrer la conformité ou non-conformité à la monographie. Toute autre information est donnée à titre de recommandation. Lorsque le terme "étiquette" est employé dans la Pharmacopée, les indications peuvent figurer sur le récipient, l'emballage, une notice qui accompagne l'emballage ou un certificat d'analyse qui accompagne le produit, selon la décision de l'Autorité compétente. »

Les informations à faire figurer dans cette section sont déterminées au cas par cas.

www.edqm.eu

Le Conseil de l'Europe est la principale organisation de défense des droits de l'homme du continent. Sur ses 47 États membres, 28 sont aussi membres de l'Union européenne. La Direction européenne de la qualité du médicament et soins de santé (EDQM) est une direction du Conseil de l'Europe qui a pour mission de contribuer au droit essentiel des êtres humains d'avoir accès à des médicaments et des soins de santé de bonne qualité, ainsi que de promouvoir et de protéger la santé publique.