

D-Biotine 3-Suflo-N-Hydroxysuccimide grade GMP:

Nouvel outil de choix pour le marquage des cellules sanguines humaines

XIII^e Congrès National
d'Hémovigilance et de
Sécurité Transfusionnelle

21 au 23 novembre 2018
Palais du Grand Large

Saint-Malo

SFVTT
Société Française de Vigilance
et de Thérapeutique Transfusionnelle



Proteomic &
Biochemistry
Consulting

Déclaration de Conflit d'Intérêt	
Employment	No conflict of interest to disclose
Research support	No conflict of interest to disclose
Scientific advisory board	No conflict of interest to disclose
Consultancy	No conflict of interest to disclose
Speakers bureau	No conflict of interest to disclose
Major stockholder	No conflict of interest to disclose
Patents	No conflict of interest to disclose
Honoraria	No conflict of interest to disclose
Travel support	No conflict of interest to disclose
Other	ChemConnection/Ardena Group, BV, Oss, The Netherlands McSAF, Tours, France

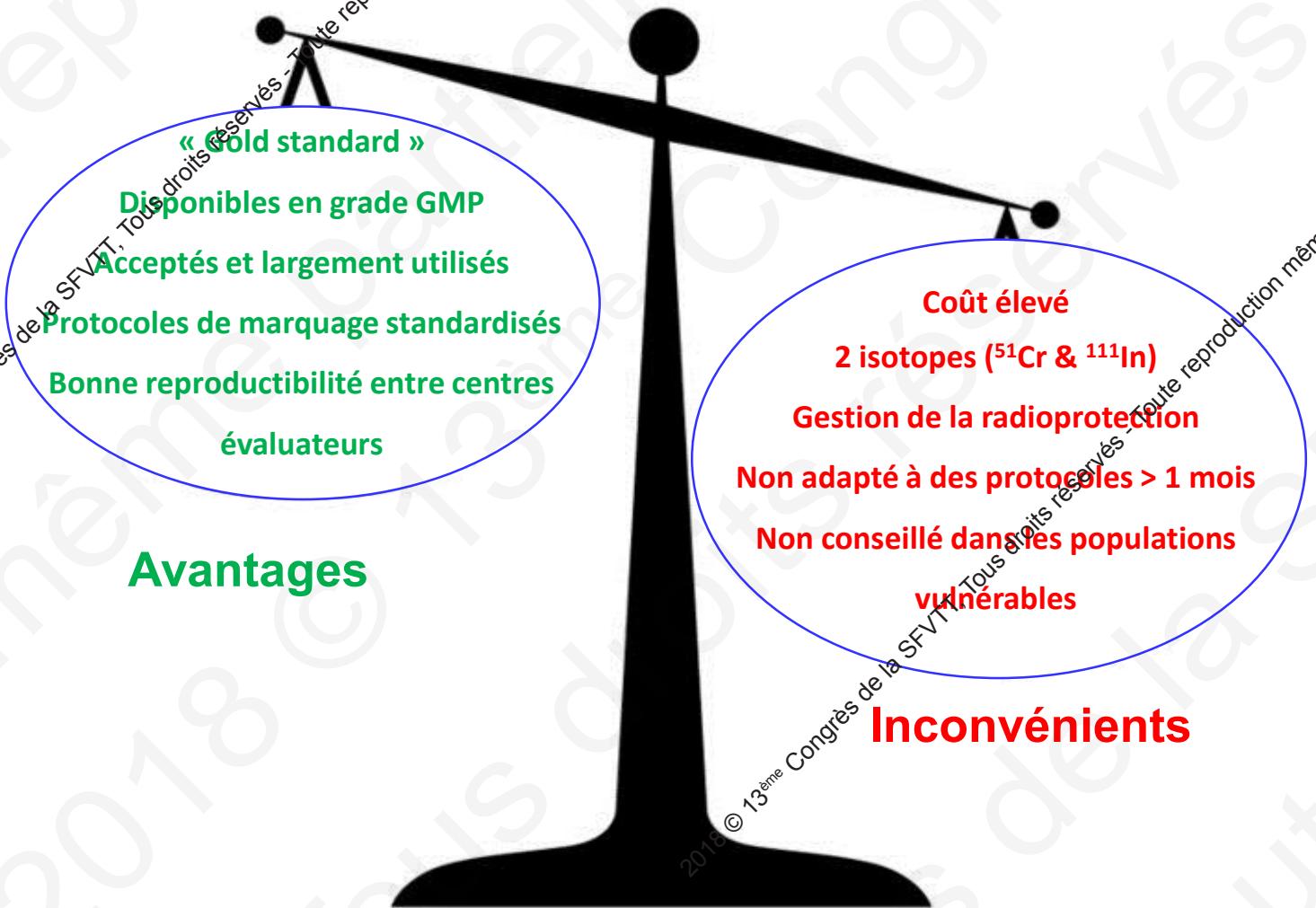


2018 © 13^{ème} Congrès de la SFVT. Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

2018 © 13^{ème} Congrès de la SFVT. Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

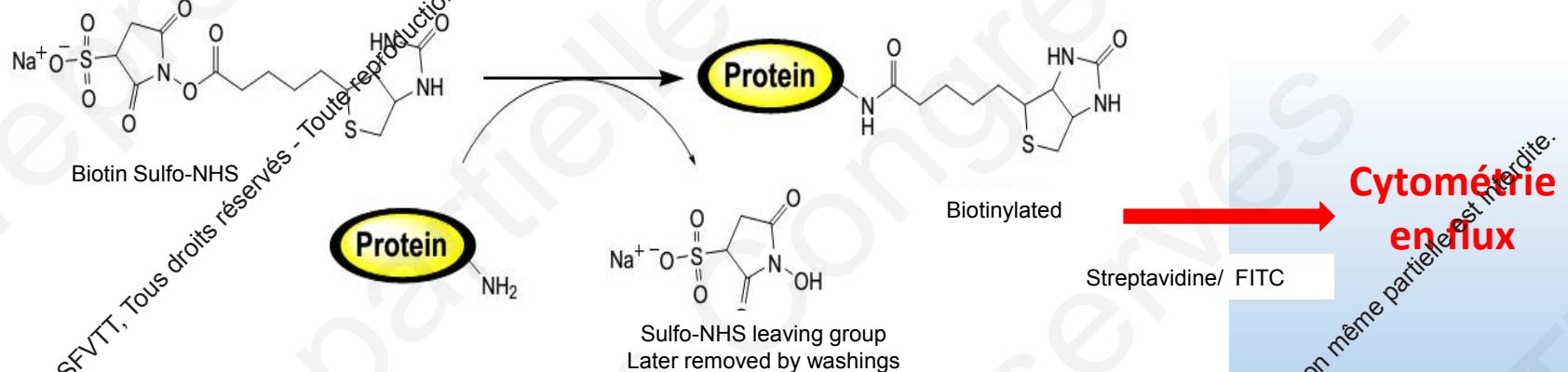
Marquage des cellules sanguines humaines et suivi *in vivo*: état de l'art

Depuis 1950, l'étude de la survie des cellules sanguines a été évaluée en utilisant des marqueurs radioactifs



Marquage des cellules sanguines humaines et suivi *in vivo*: état de l'art

Depuis 1990, un nouveau marqueur non radioactif est apparu: la Biotine Sulfo-NHS



Senescence of Canine Biotinylated Erythrocytes: Increased Autologous Immunoglobulin Binding Occurs on Erythrocytes Aged In Vivo for 104 to 110 Days

By John A. Christian, Alan H. Rebar, G. Daniel Boon, and Philip S. Low

Blood, Vol 82, No 11 (December 1), 1993: pp 3469-3473

Comparison of radioisotope methods and a non-radioisotope method to measure platelet survival in the baboon*

C. Robert Valeri *, Hollace Macgregor, Albert Giorgio, Gina Ragni

Naval Blood Research Laboratory, Boston University School of Medicine, 615 Albany Street, Boston, MA 02118, USA

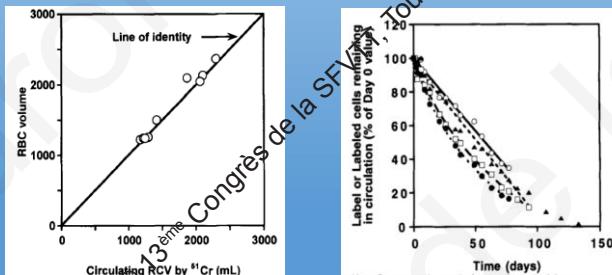
Received 4 May 2004; accepted 7 May 2004

Chez l'homme

Measurement of circulating red cell volume using biotin-labeled red cells: validation against ^{51}Cr -labeled red cells

D.M. Mock, G.L. Lankford, J.A. Widness, L.F. Burmeister, D. Kakar, and R.G. Strauss

TRANSFUSION Volume 39, February 1999



Comparaisons méthodologiques des marquages Biotine vs ^{51}Cr

Caractéristiques méthodologiques	Biotine	^{51}Cr
Radioprotection (autorisations ASN, zone contrôlée, gestion des déchets radioactifs)	NON	OUI
Utilisable dans les populations vulnérables (nouveau-né, femme enceinte, personne âgée)	OUI	NON
Analyse simultanée de plusieurs populations de cellules	OUI	NON
Correction du comptage (décroissance radioactive)	NON	OUI
Durée de recirculation des cellules sanguines <i>in vivo</i>	>120 jours	30 jours
Développement d'anticorps (Biotine > 20µg/mL)	OUI	NON

D.M MOCK et al./ *Transfusion Medicine Reviews* (2014)

R.L. SCHMIDT et al./ *Transfusion* (2013)

D.M. MOCK et al./ *Transfusion* (2018)

Enjeu: obtention d'une Biotine en grade GMP

A ce jour.....

Biotine Sulfo-NHS injectable non disponible

- Les autorités de santé n'autorisent pas l'utilisation de **Biotine Sulfo-NHS grade (RUO)** actuellement disponible pour les protocoles de recherche cliniques transfusionnelles
- Désintérêt des grands groupes pharmaceutiques de proposer ce marqueur en grade GMP: marché de niche, échelle de production en grammes et non en kilos voir en tonnes



Synthèse de Biotine Sulfo-NHS grade GMP

ChemConnection: small chemical company using a pilot facility which complies to all Western QA, GMP standards to produce small batches of Active Pharmaceutical Ingredient (API).



EUROPEAN COMMISSION
ENTERPRISE AND INDUSTRY DIRECTORATE-GENERAL
Consumer goods
Pharmaceuticals

Brussels, 03 February 2010
ENTR/F/2/AM/an D(2010) 3374

EudraLex

The Rules Governing Medicinal Products in the European Union
Volume 4

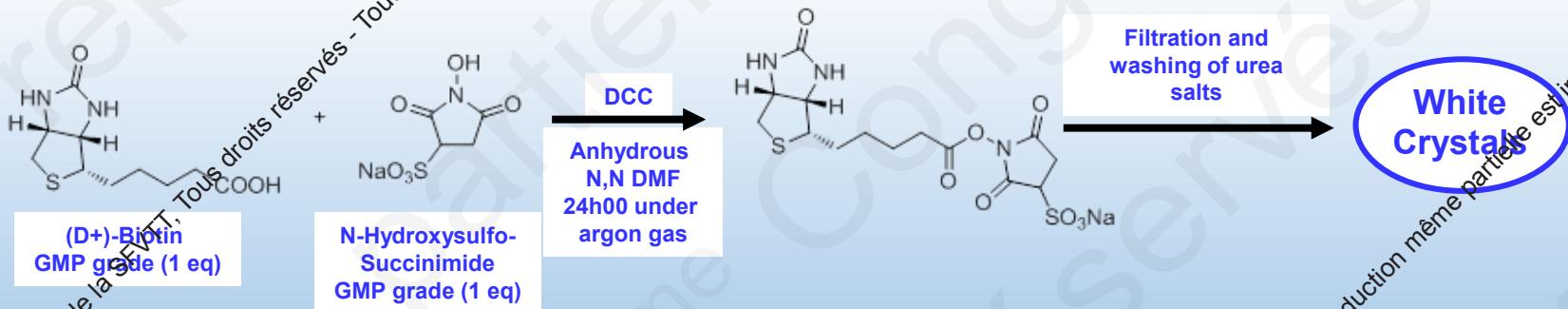
Good Manufacturing Practice

Medicinal Products for Human and Veterinary Use

Part II: Basic Requirements for Active Substances used as Starting Materials

- Originated from a former MERCK lab
- Operational since 2000
- 4 reactor suites, class D air quality
- Specialty lab
- 2 dry powder handling rooms
- Process R&D lab
- QC lab
- HVAC system

Synthèse de Biotine Sulfo-NHS grade GMP



- ✓ Grade GMP
- ✓ D+ (enantiomère naturel: Vitamine B8)
- ✓ Très haute pureté (>98%)
- ✓ Soluble en phase aqueuse
- ✓ Sous forme de cristaux de sodium
- ✓ Peu sensible à l'humidité contrairement à la biotine commerciale (RUO) uniquement disponible sous forme lyophilisée



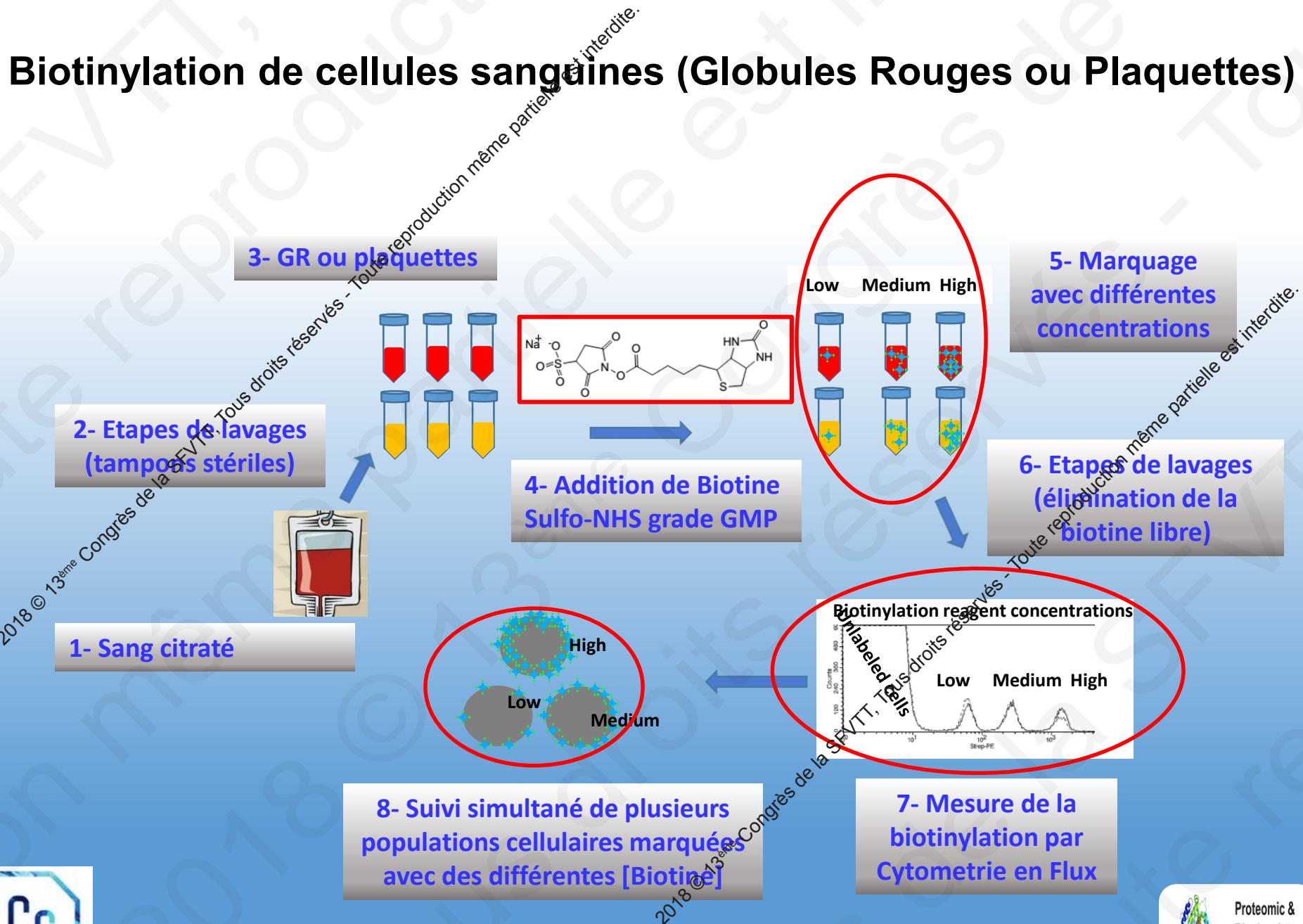
Contrôle Qualité selon les recommandations GMP

Methode	Test Method	Criterion	Results
Appearance	Visual inspection	White to white powder	White powder
Identity	$^1\text{H-NMR}$	In agreement with structure	In agreement with structure
Assay	$^1\text{H-NMR}$	$\geq 95\% \text{ (m/m)}$	98 % (m/m)
Purity by UPLC	CC-AM-2016.490 v01	Report result % (a/a)	97.7 % (a/a)
Impurities by UPLC	CC-AM-2016.490 v01	$\leq 5\%$	2.3 % (a/a)
Biotin	$^1\text{H-NMR}$		0.9 % (m/m)
Residual solvent			
Diethyl ether by GC-HS	CC-AM-2014.034 v03	$\leq 5000 \text{ ppm (m/m)}$	<100 ppm (m/m)
Ethyl acetate by GC-HS	CC-AM-2014.034 v03	$\leq 5000 \text{ ppm (m/m)}$	<100 ppm (m/m)
Acetone by GC-HS	CC-AM-2014.034 v03	$\leq 5000 \text{ ppm (m/m)}$	336 ppm (m/m)
DMF	$^1\text{H-NMR}$	$\leq 880 \text{ ppm (m/m)}$	320 ppm (m/m)
Content of drug substance	$^1\text{H-NMR}$	N/A	98 % (m/m)
Content of active entity	$^1\text{H-NMR}$	N/A	93.1 % (m/m)
Bioburden*	EP 2.6.12	$\leq 100 \text{ CFU/g}$	<1 CFU/159.5mg
Endotoxin*	EP 2.6.14	$\leq 0.25 \text{ EU/mg}$	<0.06 EU/mg

* Data generated by bactimm, BV, The netherlands

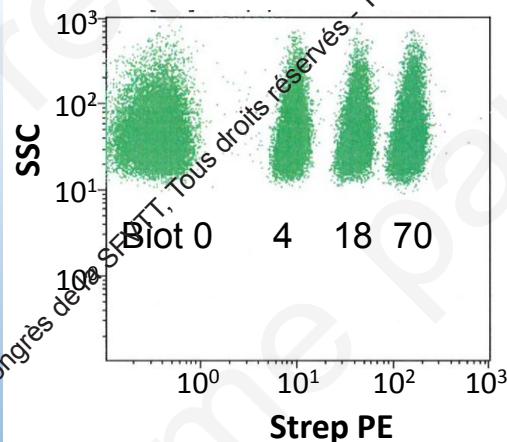
Classification des solvants selon les recommandations ICH Q3C (R5),
impuretés: recommandations pour les solvants résiduels

Biotinylation de cellules sanguines (Globules Rouges ou Plaquettes)

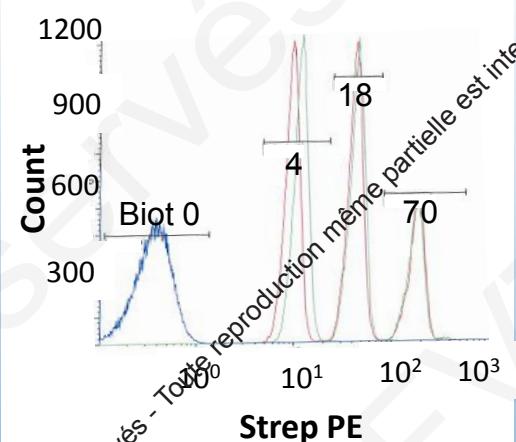
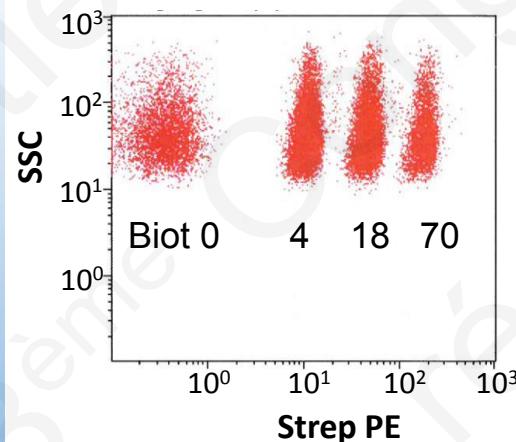


Comparaison de marquage des Globules Rouges avec différentes biotines

Biotine Non GMP

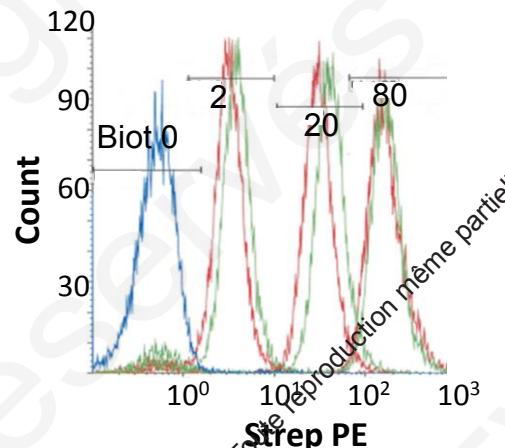
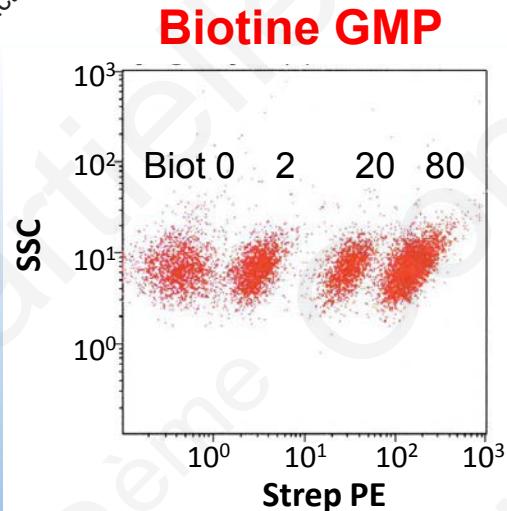
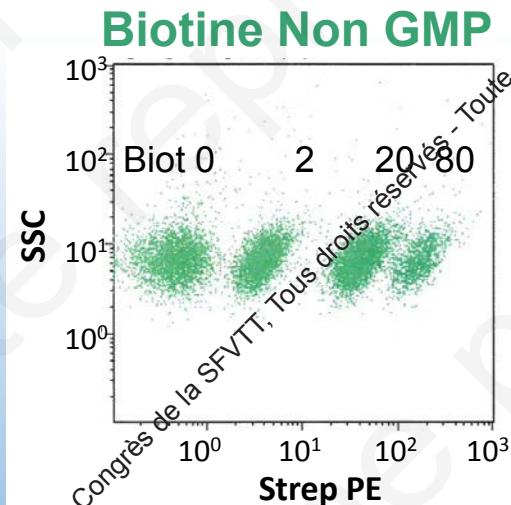


Biotine GMP



Biotin (µg/mL)	Non GMP Biotin (MFI)	GMP Biotin (MFI)
0	0.4	0.4
4	11.6	9.5
18	44.1	42.3
70	174.2	178.8

Comparaison de marquage des Plaquettes avec différentes biotines



Biotin ($\mu\text{g/mL}$)	Non GMP Biotin (MFI)	GMP Biotin (MFI)
0	0.4	0.4
2	3.7	3.3
20	34.5	32.6
80	232	232



L'utilisation de Biotine GMP dans un protocole de marquage doit respecter les règles de stérilité

Connections stériles

Prélèvement d'échantillon sanguin

Tampons de lavages (grade injectable)

Etapes de lavage cellulaire

Dilution de la Biotine Sulfo-NHS grade GMP (milieu et solution stérile)

Préparation des solutions de marquage

Incubation de la Biotine Sulfo-NHS grade GMP (milieu stérile)

Biotinylation

Tampons de lavages (grade injectable)

Arrêt de la biotinylation

Aliquotage stérile pour le CQ

Cellules marquées injectables

→ Contrôle par CMF

1) Culture Bactérienne
2) Test de pyrogénicité

Respect des règles transfusionnelles

Environnement

Glove-Box ISO 5



Biotine Sulfo-NHS de grade GMP: un nouveau marqueur offrant de nombreux avantages

- **Marqueur non-radioactif**
Sans danger et utilisable y compris dans les populations vulnérables (femmes enceinte, nouveau-né, personne âgée)
- *Devrait faciliter l'acceptation des autorités de santé pour l'utilisation dans les études de recherche clinique (première étude FDA approuvée en cours)*
- **Faible coût**
- **Utilisation d'un seul instrument (Cytomètre en Flux)**
- **Analyse simultanée de plusieurs populations cellulaires**
- **Large champ d'application:**
 - ❖ *Evaluation de nouveaux PSL*
 - ❖ *Médecine transfusionnelle*
 - ❖ *Hématologie et Onco-hématologie*