

AVIS

Mesure de l'activité de la L-asparaginase

(Référence-2017.02.005)

Transmission au ministre : 20 avril 2018

Publication officielle : 19 juin 2018

Une production de l'Institut national
d'excellence en santé
et en services sociaux (INESSS)

MESURE DE L'ACTIVITÉ DE LA L-ASPARAGINASE (RÉFÉRENCE–2017.02.005)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

1.1 Demandeur : CHU Sainte-Justine

1.2 Date de transmission de l'avis au ministre : 20 avril 2018

1.3 Date de publication de l'avis : 19 juin 2018

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information fournie par les personnes responsables de l'analyse dans les laboratoires concernés ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

Conflit d'intérêts

Tous les membres du comité ont participé aux délibérations et aucun ne s'est retiré au moment de formuler la recommandation.

Lecture externe et accompagnement scientifique

La lecture externe et l'accompagnement scientifique sont des mécanismes utilisés par l'INESSS pour assurer la qualité de ses travaux. Les lecteurs externes et les experts accompagnateurs valident les aspects méthodologiques de l'évaluation, de même que l'exactitude du contenu, en fonction de leur domaine d'expertise respectif.

Aux fins de validation du présent avis, les experts consultés sont :

- D' Richard Le Blanc, interniste et hématologue, CIUSSS de l'Estrie – CHUS
- D^{re} Danuta Maria Balicki, hématologue, interniste et oncologue médicale, Clinique Médic Elle, Montréal
- D' Bruno Michon, hématologue et oncologue médical pédiatrique, CHU de Québec - Université Laval

2 RÉSUMÉ

La mesure quantitative de l'activité enzymatique de la L-asparaginase (ASNase) dans le plasma ou le sérum de patients ayant reçu un traitement à l'ASNase permet de suivre l'appauvrissement adéquat de l'asparagine. Il est recommandé de viser l'atteinte du seuil thérapeutique de 0,1 UI/ml pour l'activité résiduelle de l'ASNase.

La mesure de l'activité résiduelle de l'ASNase s'adresse à tous les patients recevant au moins une dose d'ASNase pour traiter :

- la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) et les lymphomes;
- le myélosarcome, le myélome multiple, le lymphome T-NK extra-ganglionnaire de type nasal.

La prise en charge pharmaco-thérapeutique individualisée s'avère importante chez un certain nombre de patients pour lesquels un seuil thérapeutique optimal en ASNase ne peut être atteint en raison notamment d'une hypersensibilité cliniquement détectable (allergie) ou silencieuse (anticorps anti-ASNase). De plus, la survenue d'effets secondaires tels des pancréatites ou des thromboses liés au traitement pourrait être réduite par un ajustement posologique basé sur la mesure de l'activité de l'ASNase.

Quatre publications traitant de la valeur thérapeutique de la mesure de l'activité de l'ASNase sérique, de la personnalisation de la dose d'ASNase administrée ainsi que de la détection de l'hypersensibilité et de la prédiction des effets secondaires liés à la mesure de l'activité de l'ASNase ont été retenues. Selon ces études, il existe une variabilité interindividuelle élevée des valeurs de l'activité résiduelle de l'ASNase chez les patients. Des études montrent aussi que les doses d'ASNase administrées pourraient être individualisées et réduites pour le même bénéfice. D'autres résultats présentés montrent la capacité de l'analyse à distinguer les deux formes d'hypersensibilité et le pouvoir de prédire certains effets secondaires liés au traitement.

Selon l'analyse budgétaire, l'ajout du test permettant la mesure de l'activité résiduelle de l'ASNase pourrait générer des coûts supplémentaires d'environ 76 000 \$ pour le total des trois premières années.

Au Québec, tous les patients diagnostiqués avec une LLA ou un lymphome sont traités avec une des trois formulations d'ASNase (*E. coli* ASNase, *Erwinia* ASNase, ASNase PEG). La prescription d'une dose d'une de ces formulations en absence de suivi de l'activité enzymatique de l'ASNase pourrait porter préjudice au patient en augmentant les risques de ne pas déceler une inactivation silencieuse et en augmentant les risques d'occurrence des effets secondaires. L'analyse de l'activité de l'ASNase garantirait une optimisation du traitement qui se traduirait par les bénéfices suivants : une amélioration de l'issue thérapeutique et une réduction du rapport coût/bénéfice.

Selon un consensus d'experts de l'European Hematology Association, la mesure de l'activité de l'ASNase est le meilleur indicateur de l'efficacité du traitement.

3 ANALYSE ET TECHNIQUE ÉVALUÉE

3.1 Nom et objectif de l'analyse

Analyse quantitative visant à mesurer l'activité de la L-asparaginase (ASNase) dans le plasma ou le sérum de patients ayant reçu un traitement à l'ASNase.

L'objectif du traitement à l'ASNase est d'appauvrir le sérum du patient en asparagine. Le degré d'appauvrissement de l'asparagine ainsi que le temps requis pour causer la mort des cellules leucémiques ne sont pas connus. Afin de s'assurer d'un épuisement adéquat de l'asparagine, il est recommandé de viser l'atteinte du seuil thérapeutique de 0,1 UI/ml pour l'activité de l'ASNase [Ahlke *et al.*, 1997; Boos *et al.*, 1996].

3.2 Description de la méthode

La mesure de l'activité enzymatique de l'ASNase, telle que résumée dans la figure 1, repose sur une réaction enzymatique entre l'ASNase présente dans l'échantillon du patient et un substrat ajouté, l'acide L-aspartique β -hydroxamate (AHA).

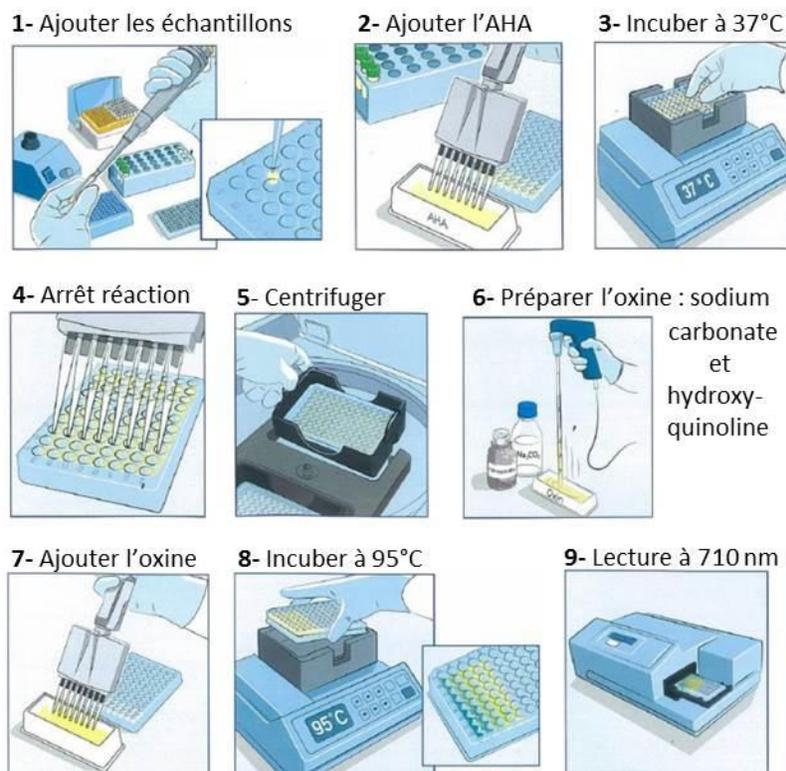


Figure 1 Méthode de dosage de l'activité de l'ASNase

Source : schéma adapté du *Asparaginase assay manual—Assay protocol for the measurement of asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia*, Erasmus MC (University Medical Center Rotterdam), POLaR (Paediatric Oncology Laboratory Rotterdam)

Abréviation : AHA : acide L-aspartique β -hydroxamate

L'ASNase hydrolyse l'AHA en acide L-aspartique et en hydroxylamine (figure 2).

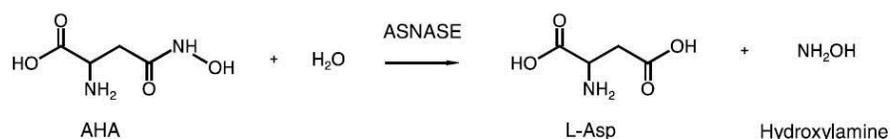


Figure 2 Hydrolyse de l'AHA en acide L-aspartique et en hydroxylamine par l'ASNase

Source : adapté de Lanvers *et al.*, 2002.

Abréviations : AHA : acide L-aspartique β-hydroxamate; ASNASE : Asparaginase; L-Asp : acide L-aspartique

L'ajout de 8-hydroxyquinoléine à l'hydroxylamine formée crée une réaction d'oxydation qui génère de l'indoxine (figure 3).

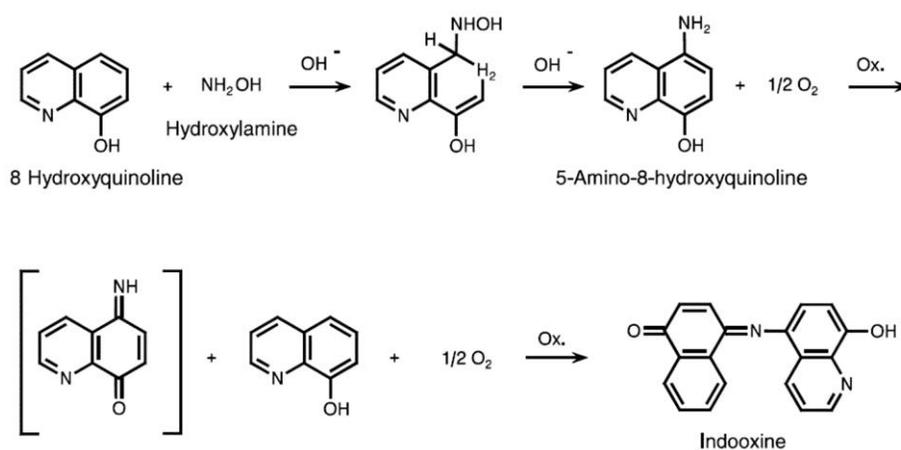


Figure 3 Formation de l'indoxine à partir de l'hydroxylamine et de 8-hydroxyquinoléine

Source : adapté de Lanvers *et al.*, 2002.

Abréviation : Ox. : réaction d'oxydation

La formation d'indoxine est détectable par spectrophotométrie à 710 nm [Lanvers *et al.*, 2002].

3.3 Modalité d'administration du test selon le demandeur

Lorsqu'un enfant est suivi au CHU Sainte-Justine, le prélèvement (plasma ou sérum) s'effectue soit à la clinique externe, soit à l'unité de soins du Service d'hématologie-oncologie, puis est immédiatement mis sur glace pour ensuite être acheminé au laboratoire central où il sera décanté et congelé à -80°C si l'analyse n'est pas effectuée immédiatement.

Une procédure pré-entreposage relativement similaire doit être suivie pour les prélèvements qui proviennent d'autres centres de santé. Cependant, les échantillons doivent être acheminés sur glace sèche au Laboratoire central du CHU Sainte-Justine.

Le temps de réponse prévu est de 3 à 7 jours. Ce délai peut varier selon la formulation d'ASNase pour laquelle l'analyse de l'activité enzymatique est requise.

3.4 Société ou concepteur

Protocole maison

3.5 Homologation

Cette analyse et les technologies utilisées n'ont fait l'objet d'aucune homologation auprès de Santé Canada ou de la Food and Drug Administration (FDA). Toutefois, le demandeur est présentement en attente d'une certification délivrée par le Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA)¹.

3.6 Valeur pondérée : 38,90

¹ Organisme fédéral américain qui a comme fonction de s'assurer du respect des normes qui s'appliquent à tous les tests de laboratoire cliniques effectués chez les humains (Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) [site Web], disponible à : <https://www.cms.gov/Regulations-and-Guidance/Legislation/CLIA/index.html>).

4 CONTEXTE

4.1 Patients ciblés

Patients recevant au moins une dose d'AS Nase pour traiter :

- la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA);
- les lymphomes;
- le myélosarcome, le myélome multiple, le lymphome T-NK extraganglionnaire de type nasal.

4.2 Description de la maladie visée

Épidémiologie

Au Québec, en 2016, on estimait à 1 320 le nombre de nouveaux cas de leucémie et à 2 140 le nombre de nouveaux cas de lymphomes. La leucémie est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les enfants de 0 à 14 ans dans une proportion de 32 % suivi des lymphomes dans 11 % des cas [SCC, 2017].

Le type de leucémie le plus fréquemment diagnostiqué chez les enfants est la LLA. Elle représente 75 % à 80 % de tous les cas de leucémie infantile. Environ 50 % des patients reçoivent le diagnostic avant l'âge de 20 ans [SLLC, 2017].

Les progrès en matière de diagnostic et de traitement des cancers du sang ont permis d'observer la chute du taux de mortalité chez les personnes atteintes. Actuellement, on estime que 90 % des enfants et 40 % des adultes atteints de LLA pourront profiter d'une rémission complète sans récurrence [SLLC, 2017].

Leucémie lymphoblastique aiguë

Ce cancer de type hématologique touche les cellules lymphoïdes; les lymphoblastes demeurent au stade immature et se reproduisent de façon désorganisée, entraînant une hématopoïèse inefficace causée par des cellules leucémiques qui envahissent la moelle osseuse. Une telle atteinte se traduit par les symptômes suivants : la fatigue, de la fièvre, des infections persistantes, des ecchymoses ou des saignements, des douleurs osseuses, des arthralgies, ou des adénopathies [Therrien *et al.*, 2013].

Lymphome

Le lymphome est un cancer hématologique qui provient des lymphocytes. Il se divise en 2 principales catégories : lymphome de Hodgkin et lymphome non hodgkinien. Le lymphome de Hodgkin est associé à un type particulier de lymphocyte présent dans les ganglions lymphatiques. Le lymphome non hodgkinien peut prendre naissance dans les lymphocytes B, les lymphocytes T ou encore les cellules NK et ce, à différents stades de leur maturation. La majorité des patients atteints par ce lymphome présentent une forme de grade élevé accompagnée de masses plus fréquemment retrouvées à l'abdomen, au médiastin ou au cou. Les

lymphomes non hodgkiniens les plus répandus chez les enfants comprennent le lymphome de Burkitt et le lymphome lymphoblastique [Therrien *et al.*, 2013].

Asparaginase

La synthèse cellulaire de l'asparagine est réalisée via l'action enzymatique de l'asparagine synthétase. Des niveaux insuffisants d'asparagine cellulaire conduisent à une réduction de la synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines, à une inhibition de la croissance cellulaire, et finalement l'activation des mécanismes de mort cellulaire apoptotique (figure 4).

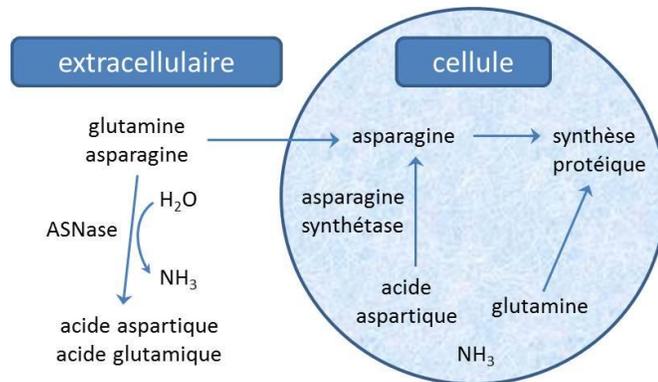


Figure 4 Mécanisme d'action de l'ASNase

Source : schéma adapté et tiré de Asselin et Rizzari, 2015.

Abréviation : ASNase : asparaginase

Les cellules leucémiques n'expriment pas ou peu l'asparagine synthétase. Par conséquent, elles sont incapables de synthétiser l'asparagine par elles-mêmes et dépendent donc de l'asparagine exogène pour assurer la synthèse des protéines et la croissance cellulaire. L'ASNase a la propriété d'hydrolyser l'asparagine en acide aspartique, rendant ainsi la cellule leucémique incapable d'utiliser les sources exogènes d'asparagine. L'épuisement complet et durable de l'asparagine est essentiel au succès à long terme de la thérapie par ASNase [Asselin et Rizzari, 2015].

Les avantages de l'ASNase dans le traitement de la LLA et des lymphomes sont démontrés. Cependant, une certaine toxicité y est associée. L'injection d'ASNase provoque des réactions d'hypersensibilité chez jusqu'à 30 % des patients [Hijiya et van der Sluis, 2016]. Deux formes d'hypersensibilité à l'ASNase sont reconnues : l'hypersensibilité clinique qui cause des réactions allergiques diverses allant de l'urticaire à la réaction anaphylactique, puis l'hypersensibilité immunologique dite silencieuse (sans symptômes apparents) qui consiste au développement d'anticorps anti-ASNase qui ont pour effet de neutraliser l'enzyme. La survenue d'une hypersensibilité silencieuse est une des principales raisons qui entraînent l'arrêt du traitement ou le changement de formulation d'ASNase [Lanvers-Kaminsky, 2017; Hijiya et van der Sluis, 2016]. À cet effet, Lanvers-Kaminsky [2017] a élaboré un algorithme, présenté à l'annexe A, permettant d'évaluer les réactions d'inactivation silencieuse en fonction de la mesure de l'activité de l'ASNase, de la présence

d'anticorps et de la sévérité des réactions. En présence d'une hypersensibilité, des algorithmes, comme celui de Bleyer et ses collaborateurs [2015] présenté à l'annexe B, permettent de suivre et de modifier le plan thérapeutique grâce à la mesure de l'activité de l'ASNase.

Outre l'hypersensibilité, des effets secondaires tels la pancréatite ou la thrombose peuvent survenir conséquemment au traitement à l'ASNase. Ces effets secondaires sont principalement causés par la diminution de la synthèse protéique engendrée par l'appauvrissement en asparagine mais aussi par son interférence avec le métabolisme de la glutamine [Lanvers-Kaminsky, 2017]. L'incidence de la pancréatite oscille entre 2 % et 18 % des patients traités avec l'ASNase et ce, indépendamment de la formulation administrée [Hijiya et van der Sluis, 2016]. Quant à l'incidence de la thrombose, une récente méta-analyse montre que 5,2 % des enfants traités avec l'ASNase en seraient atteints [Caruso *et al.*, 2006].

4.3 Nombre d'analyses prévues et de patients visés

Le demandeur mentionne que chaque année, c'est environ 100 nouveaux cas de LLA qui sont diagnostiqués au Québec. Parmi eux, 70 % sont des enfants de moins de 18 ans et 30 % sont des adultes. Annuellement, environ 10 analyses par patient seraient nécessaires pour effectuer le suivi thérapeutique.

4.4 Situation actuelle

Tous les patients, adultes et enfants, diagnostiqués avec la LLA recevront une formulation d'ASNase, qu'ils soient inclus dans un programme de recherche ou non, puisqu'il s'agit d'un traitement standard pour ce type de maladie. Les formulations d'ASNase disponibles actuellement au Canada sont l'*E. coli* ASNase (Kidrolase^{MC}), l'*Erwinia* ASNase (Erwinase^{MC}) et l'ASNase PEG (Oncaspar^{MC}).

Selon le demandeur, plus de 60 % des enfants nouvellement diagnostiqués avec la LLA rejoignent les programmes de recherche du Dana Farber Cancer Institute (DFCI) et du Children's Oncology Group (COG) pour recevoir un traitement à l'ASNase. Le dosage de l'activité de l'ASNase s'effectue présentement uniquement dans le cadre des protocoles de recherche du DFCI puisqu'aucune étude ne semble en cours pour le COG. Pour les adultes et les enfants qui n'intègrent pas les protocoles de recherche, la mesure de l'activité de l'ASNase est alors effectuée dans le laboratoire clinique, hors programme de recherche, et à la demande du clinicien.

4.5 Données médico-administratives

Cette analyse ne figure pas au *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale*. L'analyse n'a fait l'objet d'aucun envoi hors Québec.

4.6 Brève description des avantages allégués de l'analyse proposée

Selon le demandeur, la variabilité intra et interindividuelle entre la dose d'ASNase administrée et l'activité mesurée de l'ASNase justifie la mise en place de cette

nouvelle analyse. De plus, une prise en charge pharmaco-thérapeutique individualisée s'avère importante chez un certain nombre de patients pour lesquels un seuil thérapeutique optimal en ASNase ne peut être atteint en raison notamment d'une hypersensibilité cliniquement détectable (allergie) ou silencieuse (anticorps anti-ASNase). Par ailleurs, la survenue d'effets secondaires tels des pancréatites ou des thromboses chez des patients traités avec l'ASNase serait liée au traitement et pourrait être réduite par un ajustement posologique basé sur la mesure de l'activité de l'ASNase.

4.7 Assurance qualité

Aucune épreuve de compétence externe n'est actuellement disponible pour cette analyse. Des démarches ont été entreprises pour mettre sur pied un programme de contrôle de qualité externe conjointement avec le Laboratoire d'Oncologie pédiatrique au Centre Médical Universitaire Erasmus à Rotterdam (D^r Inge van der Sluis). Le demandeur a également entrepris des discussions avec la Dutch Foundation for Quality Assessment in Medical Laboratories (SKML), un organisme sans but lucratif qui parraine plus d'une centaine de programmes de contrôle de la qualité reliés à l'analyse des médicaments et à la toxicologie. Finalement, le demandeur échange présentement avec un groupe torontois du Hospital for Sick Children (D^r David Colantonio) qui développe lui aussi une méthode d'analyse de l'activité de l'ASNase. En attendant qu'un programme de contrôle de la qualité soit mis en place, le laboratoire demandeur prévoit utiliser des contrôles de qualité interne (préparation indépendante des courbes d'étalonnage) auxquels seront comparés des échantillons résiduels de patients traités avec une des formes d'ASNase.

5 DONNÉES PUBLIÉES

5.1 Valeur diagnostique

Aucune étude n'a été retenue puisque l'analyse proposée par le centre demandeur n'a pas pour objectif d'établir ou de préciser un diagnostic.

5.2 Valeur pronostique

Aucune étude n'a été retenue puisque l'analyse proposée par le centre demandeur n'a pas pour objectif de prévoir l'évolution de la maladie ou d'anticiper un changement futur de l'état de santé.

5.3 Valeur thérapeutique

La recherche documentaire a permis de repérer quatre études portant sur la capacité d'effectuer un suivi thérapeutique avec l'analyse de l'activité de l'ASNase par la méthode à l'indooxine. Les études présentées dans cette section sont résumées dans l'annexe C. De ces études, une traite à la fois de la variabilité interindividuelle et de la personnalisation des doses [Sassen *et al.*, 2017], une traite à la fois de la variabilité entre les patients et de la réduction des doses [Schrey *et al.*, 2010], une traite à la fois de la variabilité entre les individus et de la distinction entre les formes d'hypersensibilité [Kloos *et al.*, 2016] et, finalement, une traite des effets secondaires du traitement [Tong *et al.*, 2014].

5.3.1 Variabilité interindividuelle de l'activité enzymatique résiduelle des patients traités avec l'ASNase

Un certain nombre de facteurs influencent l'activité de l'ASNase et les concentrations d'asparagine après l'administration d'une dose d'ASNase. La formulation d'ASNase, la formation d'anticorps anti-ASNase, les médicaments concomitants et même la méthode d'administration (par voie intramusculaire ou intraveineuse) peuvent avoir un impact important sur la dynamique de l'activité de l'ASNase et engendrer une variabilité entre les patients [Asselin et Rizzari, 2015].

Les trois études retenues comportent des données relatives à la variabilité interindividuelle du dosage sérique de l'activité de l'ASNase observée lors de la phase d'induction du traitement avec l'une des trois formulations d'ASNase (tableau 1). Les résultats présentent une variabilité élevée entre les patients pour tous les traitements administrés. En considérant la valeur seuil thérapeutique de 0,1 UI/ml nécessaire afin d'appauvrir suffisamment le sang en asparagine, des niveaux d'activité d'*Erwinia* ASNase jusqu'à 3 fois inférieurs (0,0299 UI/ml) [Sassen *et al.*, 2017] et des niveaux d'*E. coli* ASNase jusqu'à 150 fois supérieurs (1,497 UI/ml) ont été observés [Schrey *et al.*, 2010].

Tableau 1 Variabilité interindividuelle de l'activité résiduelle de l'ASNase déterminée par la méthode à l'indoxine lors de la phase d'induction du traitement à l'*E. coli* ASNase à l'ASNase PEG et à l'*Erwinia* ASNase

ÉTUDE	POPULATION n, ÂGE	TRAITEMENT	ACTIVITÉ RÉSIDUELLE D'ASNase, UI/ml
Sassen [2017]	51 patients LLA Âge médian : 6 ans (1,9-17,7)	<i>Erwinia</i> ASNase : 20 000 UI/m ² IV	Après 42-50 hres : 0,1662 (0,1034-0,2701)* Après 65-80 hres : 0,0484 (0,0299-0,1047)*
Kloos [2016]	9 patients LLA avec réaction allergique (symptômes)	<i>E. coli</i> ASNase : 5 000 UI/m ²	Après 48 hres : 0,137-0,749 Après 72 hres : 0,037-0,089
Schrey [2010]	318 patients LLA Âge médian : 5 ans (0,8-23)	<i>E. coli</i> ASNase : 5 000 UI/m ²	Après 48 hres : 0,0405 (0-1,199) Après 72 hres : 0,229 (0-1,497)
	416 patients LLA Âge médian : 6 ans (0,2-22)	ASNase PEG : 1 000 UI/m ²	Après 48 hres : 0,618 (0-1,306) Après 72 hres : 0,6205 (0-1,029))
	29 patients LLA Âge médian : 5 ans (2-17)	<i>Erwinia</i> ASNase : 10 000 UI/m ² IV et IM	IV, après 48 hres : 0,115 (0-0,884) IM, après 48 hres : 0,152 (0-0,750)

Abréviations : ASNase : L-asparaginase; *E. coli* : *Escherichia coli*; IM : intramusculaire; IV : intraveineux; LLA : leucémie lymphoblastique aiguë; PEG : pégylé; UI : unité internationale
* écart interquartile

En conclusion, la grande variabilité interindividuelle du niveau de l'activité résiduelle de l'ASNase dans le sérum renforce la nécessité d'un suivi thérapeutique.

5.3.2 Le schéma posologique des patients atteints de LLA traités avec l'ASNase pourrait être personnalisé en fonction du poids corporel

L'étude de Sassen [2017] avait comme objectif secondaire de déterminer l'association entre les caractéristiques des patients et la pharmacocinétique de l'*Erwinia* ASNase administrée par voie intraveineuse. Ils ont mesuré l'activité résiduelle de l'ASNase chez 51 patients âgés de moins de 18 ans recevant tous une dose fixe d'*Erwinia* ASNase de 20 000 UI/m² pendant 2 semaines à raison de 3 injections par semaine. Un modèle pharmacocinétique permettant de prédire l'activité résiduelle de l'ASNase en fonction du poids corporel a été développé à l'aide des données recueillies.

Les échantillons prélevés chez 36 patients ont pu être analysés. Les résultats montrent que 39 % des patients de poids inférieur à 50 kg et 20 % de ceux ayant un poids supérieur à 50 kg atteignent le seuil thérapeutique (tableau 2).

Tableau 2 Niveaux sériques d'ASNase déterminés par la méthode à l'indooxine lors de la phase d'induction d'un traitement à l'*Erwinia* ASNase

TRAITEMENT	POIDS kg	PATIENTS n (%)	ACTIVITÉ RÉSIDUELLE D'ASNase, UI/ml
<i>Erwinase</i> ASNase 20 000 UI/m ²	< 50	12 (39)	< 0,1
		19 (61)	> 0,1
	≥ 50	1 (20)	< 0,1
		4 (80)	> 0,1

Source : informations provenant de Sassen *et al.*, 2017.

Abréviations : ASNase : L-asparaginase; UI : unité internationale

Selon le modèle pharmacocinétique développé et considérant la dose de départ du traitement de 20 000 UI/m², approximativement 75 % des patients ayant un poids corporel de plus de 50 kg auraient un niveau d'ASNase résiduel supérieur au seuil thérapeutique de 0,1 UI/ml après 48 heures. Le modèle suggère une dose de traitement de départ de 25 000 UI/m² pour les patients ayant un poids entre 30 kg et 50 kg et de 25 000 UI/m² à 37 000 UI/m² pour ceux dont le poids se situe entre 10 kg et 30 kg afin que 75 % d'entre eux atteignent le seuil thérapeutique 48 heures après l'injection.

Les auteurs concluent que selon les simulations réalisées avec le modèle pharmacocinétique développé pour l'*Erwinia* ASNase, la dose de départ du traitement fixée à 20 000 UI/m² pour tous les patients semble trop faible pour les enfants de poids inférieur à 50 kg. Toutefois, l'augmentation de la dose pour l'ensemble du groupe pourrait entraîner des concentrations inutilement élevées chez la majorité des patients dont la concentration est déjà supérieure à 0,1 UI/m², engendrant potentiellement des effets secondaires (à long terme) et des coûts inutiles, d'où l'importance d'un suivi thérapeutique de l'activité résiduelle de l'ASNase afin de personnaliser le traitement.

5.3.3 Des doses réduites d'ASNase administrées aux patients atteints de LLA pourraient s'avérer suffisantes pour maintenir une activité enzymatique au-dessus du seuil thérapeutique

Schrey et ses collaborateurs [2010] avaient comme objectif d'estimer l'intensité du traitement à l'ASNase chez des patients diagnostiqués et traités pour la LLA. Sur une période de 7 ans, 763 patients (2 074 échantillons) traités selon le protocole ALL-BFM-2000 ont été suivis dans le cadre de cette étude. Les patients recevaient l'*E. coli* ASNase en phase d'induction à raison de 5 000 UI/m² (n = 318), suivi d'une réinduction de 10 000 UI/m² pour certains patients (n = 62), puis l'ASNase PEG en phase d'intensification à raison de 1 000 UI/m² (n = 416), ou une réintensification à l'*Erwinia* ASNase (n = 29) à raison de 10 000 UI/m² pour les patients ayant montré une hypersensibilité. L'activité de l'ASNase a été mesurée grâce au dosage spectrophotométrique de l'indooxine.

Les résultats de l'étude montrent que l'activité de l'ASNase est supérieure au seuil thérapeutique visé chez 80 % des patients 3 jours suivant l'administration de la dose d'induction d'*E. coli* ASNase de 5 000 UI/m² avec 1,4 % des patients dont les valeurs sont sous la limite inférieure de quantification de 0,005 UI/ml. Les patients qui ont ensuite reçu la dose supérieure de 10 000 UI/m² ont montré des valeurs supérieures au seuil thérapeutique (dans 85 % des cas) de façon semblable aux patients ayant reçu au préalable la dose de 5 000 UI/m². Toutefois, chez les patients ayant reçu 10 000 UI/m², une plus grande proportion (8,1 %) présentaient une activité enzymatique sous la limite inférieure de quantification. Ceci peut s'expliquer par le développement d'anticorps qui est supérieur durant la phase de réinduction par rapport à la phase d'induction, et ce, malgré qu'il s'agisse de la même formulation d'ASNase.

Trois jours après l'administration de l'ASNase PEG à 1 000 UI/m², 90 % des patients montraient des valeurs au-dessus du seuil thérapeutique cible alors qu'après 7 et 14 jours, c'est respectivement 69 % et 47 % des patients qui présentaient des valeurs supérieures au seuil thérapeutique avec 22 % et 37 % des patients pour qui les valeurs d'activité enzymatique étaient en deçà de la limite inférieure de quantification. Quant à l'activité de l'ASNase suite à l'administration de l'*Erwinia* ASNase à 10 000 UI/m², l'injection par voie intramusculaire ou par voie intraveineuse montre des valeurs d'activité enzymatique semblables (tableau 3).

Tableau 3 Détermination de l'activité de l'ASNase par la méthode à l'indoxine après l'administration de traitements à l'*E. coli* ASNase, à l'*Erwinia* ASNase ou à l'ASNase PEG

APRÈS DOSE	INJECTION	PATIENTS n	ACTIVITÉ* DE L'ASNase UI/ml	PATIENTS (%)	
				ASNase > 0,1 UI/ml	sous LIQ
Phase d'induction : <i>E. coli</i> 5 000 UI/m ²					
Jour 1	s.o.	30	1,185 (0-2,127)	30 (85)	3 (10)
Jour 2	s.o.	69	4,005 (0-1,199)	71 (94)	1 (1,5)
Jour 3	s.o.	291	0,229 (0-1,497)	232 (80)	4 (1,4)
Phase de réinduction : <i>E. coli</i> 10 000 UI/m ²					
Jour 3	s.o.	62	0,540 (0-1,250)	53 (85)	5 (8,1)
Phase d'intensification : ASNase PEG 1 000 UI/m ²					
Jour 3	s.o.	67	0,621 (0-1,029)	60 (90)	4 (6,0)
Jour 7	s.o.	256	0,333 (0-0,947)	178 (69)	58 (22)
Jour 14	s.o.	62	0,130 (0-0,367)	29 (47)	23 (37)
Phase de réintensification : <i>Erwinia</i> 10 000 UI/m ²					
Jour 2	IM et IV	97	0,142 (0-,0884)	16 (55)	3 (10)
Jour 2	IV	58	0,115 (0-0,884)	7 (47)	2 (13)
Jour 2	IM	39	0,152 (0-0,750)	9 (64)	1 (7,1)

Source : tiré de Schrey *et al.*, 2010.

Abréviations : ASNase : L-asparaginase; *E. coli* : *Escherichia coli*; IM : intramusculaire; IV : intraveineux; LIQ : limite inférieure de quantification; PEG : pégylé; s.o. : sans objet; UI : unité internationale

* activité médiane

Les auteurs de l'étude concluent que la dose réduite de 5 000 UI/m² d'*E. coli* ASNase dans le cadre d'un traitement d'induction a suffi à atteindre un niveau d'activité de l'ASNase supérieur à 0,1 UI/ml chez environ 90 % des patients. De plus, les doses réduites de 1 000 UI/m² et de 10 000 UI/m² d'ASNase PEG et d'*Erwinia* ASNase pour la phase d'intensification et de réintensification suffisent également pour atteindre le seuil thérapeutique cible. Le suivi thérapeutique de l'activité résiduelle de l'ASNase peut permettre de réduire les doses administrées aux patients.

5.3.4 La capacité du dosage de l'activité de l'ASNase à distinguer les réactions d'hypersensibilité permet d'adapter le traitement

Kloos et ses collaborateurs [2016] avaient comme objectif de décrire les différents types de réactions allergiques survenues chez des patients inclus dans les protocoles de traitement CoALL 08-09 et DCOG ALL-10 ou ALL-11, puis de les comparer dans le but de trouver des différences qui pourraient permettre de les distinguer facilement en clinique. Les patients traités selon le protocole CoALL 08-09 recevaient 3 ou 4 doses d'ASNase PEG de 2 500 UI/m², puis 1 ou 2 doses pour la phase de réinduction. Le protocole DCOG ALL-10 consistait en 8 doses d'*E. coli*

ASNase de 5 000 UI/m², puis 15 doses d'ASNase PEG de 2 500 UI/m². Les patients suivant le protocole DCOG ALL-11 recevaient 3 doses d'ASNase PEG de 1 500 UI/m². Pour les protocoles DCOG ALL, les patients présentant des allergies étaient orientés vers un traitement à l'*Erwinia* ASNase de 20 000 UI/m².

Pour chaque réaction allergique qui survenait, les données concernant les symptômes, le moment de leur apparition, la poursuite du traitement, la présence d'anticorps anti-ASNase et le niveau d'activité de l'ASNase étaient compilées. L'activité de l'ASNase a été mesurée grâce au dosage spectrophotométrique de l'indooxine. Parmi les patients qui ont subi une réaction allergique (avec présence de symptômes), les auteurs ont considéré que celle-ci était « réelle » lorsqu'associée à un niveau d'activité de l'ASNase non mesurable (inactivation enzymatique) et qu'elle était plutôt « fausse » lorsque l'activité enzymatique était mesurable, donc au-dessus du seuil de quantification.

Des 24 patients à l'étude ayant éprouvé des réactions allergiques avec symptômes, 9 ont eu une réaction allergique dite fausse et n'ont pas développé d'anticorps anti-ASNase alors que 15 ont eu une réaction allergique dite réelle avec présence d'anticorps et donc inactivation de l'enzyme (tableau 4).

Tableau 4 Distinctions entre les réactions allergiques réelles (inactivation de l'enzyme) et fausses chez tous les patients présentant des symptômes subséquents au traitement

OBSERVATIONS	ALLERGIE FAUSSE (n = 9)	ALLERGIE RÉELLE (INACTIVATION) (n = 15)	VALEUR p
Temps d'apparition, min (médiane)	29 (12-47)	2 (1-5)	< 0,001
Symptômes :			
-cutanés	69 %	93 %	0,153
-pulmonaires	23 %	40 %	0,435
-gastro-intestinaux	46 %	33 %	0,700
Présence d'anticorps	14 % (n = 1/7)	100 % (n = 13/13)	0,001
Activité* de l'ASNase, UI/ml	Après dose : 0,037-0,749 48 hres : 0,032-0,294 72 hres : 0,037-0,089 1 sem : 0,083-1,657	Après dose : 0	s.o.

Source : tiré de Kloos *et al.*, 2016.

Abréviations : ASNase : L-asparaginase; s.o. : sans objet; sem : semaine; UI : unité internationale
* gamme des activités médianes

Les résultats de l'étude montrent que les réactions allergiques fausses surviennent relativement tardivement lorsque comparées aux réactions allergiques réelles dont l'enzyme est inactivée dès l'administration du traitement. Cependant, la nature des symptômes survenus chez les patients ne permet pas de distinguer ceux ayant une réaction allergique fausse de ceux ayant une réaction allergique réelle.

Les auteurs de l'étude concluent que la mesure des niveaux d'activité de l'ASNase est une manière fiable de distinguer les réactions allergiques fausses de l'inactivation enzymatique et justifie le suivi thérapeutique des patients traités.

5.3.5 La capacité du dosage de l'activité de l'ASNase à prédire la probabilité de survenue des effets secondaires dont la pancréatite et la thrombose

L'étude de Tong [2014] avait comme objectif d'évaluer l'association entre les niveaux d'activité de l'ASNase et la survenue de pancréatite, de thrombose, de neurotoxicité, d'hyperammoniémie et de dyslipidémie (hypercholestérolémie, hypertriglycéridémie). Un total de 89 patients de moins de 18 ans a été recruté et traité selon le protocole DCOG ALL-10 d'une durée de 30 semaines. Tous les participants recevaient 8 doses d'*E. coli* ASNase à raison d'une dose de 5 000 UI/m² tous les 3 jours pendant la phase d'induction, suivies de 15 doses d'ASNase PEG à raison de 2 500 UI/m² toutes les 2 semaines pendant la phase d'intensification, ou une dose d'*Erwinia* ASNase de 20 000 UI/m² 2 à 3 fois par semaine en cas d'hypersensibilité à l'ASNase PEG. Vingt-deux patients ont développé une allergie ou une inactivation silencieuse et ont dû recevoir de l'*Erwinia* ASNase.

Parmi tous les patients traités, 35 % et 60 % vont développer respectivement une hypercholestérolémie et une triglycéridémie, 50 % vont présenter une hyperammoniémie, 9 % une neurotoxicité, 7,9 % une pancréatite et 4,5 % une thrombose (tableau 5). Tous traitements confondus, les triglycérides et le cholestérol atteignent des niveaux significativement élevés ($p < 0,001$) dès les semaines 3 et 5. Ces niveaux élevés sont maintenus pendant toute la durée de la phase d'intensification pour ensuite retourner à des niveaux normaux à la semaine 37. Il en va de même pour les niveaux mesurés d'ammoniaque qui augmentent dès la première injection du traitement de la phase d'intensification pour rejoindre des niveaux normaux à la semaine 37.

Tableau 5 Corrélation entre les niveaux d'activité de l'ASNase déterminés par la méthode à l'indooxine et les effets secondaires relatifs au traitement à l'ASNase PEG et à l'*Erwinia* ASNase durant la phase d'intensification

EFFETS SECONDAIRES	OCCURRENCE n (%)	CORRÉLATION* AVEC L'ACTIVITÉ DE L'ASNase	VALEUR p
Thrombose	4 (4,5)	aucune	s.o.
Pancréatite	7 (7,9)	aucune	s.o.
Neurotoxicité	8 (9,0)	aucune	s.o.
Hyperammoniémie	45 (50)	aucune	s.o.
Hypercholestérolémie	31 (35)	0,35	0,01
Hypertriglycéridémie	53 (60)	0,36	0,005

Source : tiré de Tong *et al.*, 2014.

Abréviations : ASNase : L-asparaginase; s.o. : sans objet

* coefficient de corrélation de Spearman

Les résultats de cette étude montrent une étroite corrélation entre les niveaux d'activité élevés de l'ASNase mesurés par méthode à l'indooxine et les niveaux élevés de triglycérides et de cholestérol (tableau 5). Bien que les niveaux d'ammoniaque soient augmentés durant le traitement, aucune corrélation n'a pu être démontrée avec l'activité de l'ASNase. Également, aucune corrélation n'a pu être décelée entre l'activité de l'ASNase et l'occurrence accrue de pancréatite, de thrombose ou de neurotoxicité.

Les auteurs de l'étude concluent que la dyslipidémie survient chez près de la moitié des patients et qu'il y a une forte corrélation entre les niveaux élevés de triglycérides et de cholestérol et les niveaux élevés d'activité de l'ASNase. Cependant, les résultats montrent que cet état est temporaire et prend fin avec le traitement. Les auteurs affirment que la présence de dyslipidémie ne justifie pas une modification du traitement à l'ASNase. Ils concluent également qu'aucune corrélation entre les niveaux d'activité de l'ASNase et l'occurrence de pancréatite ou de thrombose n'a pu être démontrée. En outre, dans cette étude, la dyslipidémie s'avère être le seul effet secondaire relatif au traitement qui puisse être associé à la mesure de l'activité de l'ASNase.

5.4 Validité analytique

La recherche documentaire a permis de retenir une seule étude [Lanvers *et al.*, 2002] comportant des données de validation analytique du dosage de l'ASNase par la méthode à l'indooxine. Un résumé de cette étude est présenté à l'annexe C.

Lanvers et ses collaborateurs [2002] ont développé et validé une méthode de quantification de l'ASNase sérique basée sur l'hydrolyse de l'AHA (méthode à l'indooxine). Les méthodes traditionnellement utilisées pour mesurer l'activité de l'ASNase telles le dosage spectrophotométrique du NADPH et la Nesslerisation ont une limite inférieure de quantification de 0,02 UI/ml alors que la méthode à l'indooxine peut détecter une activité plus faible de l'ordre de 0,001 UI/ml.

Linéarité

Dans le cadre de cette étude, la quantification de l'activité de l'ASNase par la méthode indooxine a été comparée à la méthode de Nessler qui consiste à mesurer l'ammoniaque produite par l'ASNase. L'analyse de la linéarité entre la concentration attendue et la concentration observée en ASNase a été effectuée à partir de dilutions d'échantillons de 0,075 UI/ml à 1,250 UI/ml provenant de prélèvements de patients atteints de LLA ou de lymphome non hodgkinien (n = 32) et de prélèvements enrichis en ASNase (n = 74). Cette analyse a révélé que la concentration attendue en fonction de la concentration observée en ASNase est maintenue jusqu'à la dilution 1:20 avec un $r^2 = 0,986$. De plus, les résultats ont également montré une bonne corrélation entre la détermination de l'activité de l'ASNase avec la méthode à l'indooxine et la méthode Nessler avec des $r^2 = 0,934$, $r^2 = 0,961$, et $r^2 = 0,977$ pour l'*E. coli* ASNase (n = 39), l'ASNase PEG (n = 121) et l'*Erwinia* ASNase (n = 42) respectivement. Cependant, la valeur intrinsèque de chaque échantillon présente une différence significative ($p < 0,001$) d'une méthode à l'autre avec un écart de 0,0351 UI/ml pour l'*E. coli* ASNase, 0,098 UI/ml pour l'ASNase PEG et -0,0221 UI/ml l'*Erwinia* ASNase. Comparée à la méthode à l'indooxine, la Nesslerisation surestime l'activité sérique de l'ASNase PEG.

Précision

La précision inter-essai (le même jour et à des jours différents) a été déterminée par l'analyse répétitive d'échantillons enrichis en *E. coli* ASNase, *Erwinia* ASNase et ASNase PEG à des concentrations variant de 0,0025 UI/ml à 1,250 UI/ml. Les résultats montrent que les coefficients de variation inter-essais le même jour oscillent entre 2,72 % et 6,53 % pour l'*E. coli* ASNase, entre 1,98 % et 5,70 % pour l'ASNase PEG, et entre 2,11 % et 8,77 % pour l'*Erwinia* ASNase (tableau 6).

Tableau 6 Répétabilité de la mesure de l'activité de l'*E. coli* ASNase, l'ASNase PEG et l'*Erwinia* ASNase

INTER-ESSAIS LE MÊME JOUR (n = 8)								
<i>E. coli</i> ASNase			ASNase PEG			<i>Erwinia</i> ASNase		
ASNase* (UI/ml)	CV (%)	PRÉCISION (%)	ASNase* (UI/ml)	CV (%)	PRÉCISION (%)	ASNase* (UI/ml)	CV (%)	PRÉCISION (%)
1,054	2,72	5,44	1,118	3,93	11,8	1,116	2,70	11,6
0,516	5,15	3,20	0,553	2,35	10,7	0,474	4,42	-5,25
0,0726	3,98	-3,22	0,0674	3,74	-10,2	0,0715	8,77	-7,74
0,0458	4,71	-8,34	0,0529	1,98	5,81	0,0518	2,11	3,60
0,0105	4,01	5,00	0,00997	2,22	-0,31	0,0101	2,49	1,45
0,00245	6,53	-2,13	0,00264	5,70	5,64	0,00284	4,77	13,8

Source : tiré de Lanvers *et al.*, 2002.

Abréviations : ASNase : L-asparaginase; CV : coefficient de variation; *E. coli* : *Escherichia coli*; PEG : pégylé; UI : unité internationale

* activité moyenne

Les coefficients de variation inter-essais à des jours différents se situent entre 2,12 % et 8,20 % pour l'*E. coli* ASNase, entre 1,73 % et 10,7 % pour l'ASNase PEG, et entre 2,81 % et 11,0 % pour l'*Erwinia* ASNase (tableau 7).

Tableau 7 Reproductibilité de la mesure de l'activité de l'*E. coli* ASNase, l'ASNase PEG et l'*Erwinia* ASNase

INTER-ESSAIS À DES JOURS DIFFÉRENTS (n = 20)								
<i>E. coli</i> ASNase			ASNase PEG			<i>Erwinia</i> ASNase		
ASNase* (UI/ml)	CV (%)	PRÉCISION (%)	ASNase* (UI/ml)	CV (%)	PRÉCISION (%)	ASNase* (UI/ml)	CV (%)	PRÉCISION (%)
Gamme de concentrations 0,0025-0,075 UI/ml								
0,0756	2,32	0,85	0,0729	1,73	-2,87	0,0740	3,7	-1,92
0,0484	2,12	-3,12	0,0501	2,23	0,014	0,0500	3,4	-0,02
0,0253	3,45	1,29	0,0267	2,97	6,95	0,0262	5,3	4,95
0,0114	5,96	14,0	0,0113	7,35	13,0	0,0110	8,0	10,1
0,00264	8,2	5,79	0,00259	7,17	3,67	0,00264	4,8	5,54
Gamme de concentrations 0,075-1,250 UI/ml								
1,197	3,78	-4,24	1,186	3,48	-1,53	1,200	2,8	-4,00
0,756	3,52	0,75	0,770	2,96	-0,33	0,764	3,0	1,82
0,540	3,73	8,18	0,519	5,91	8,25	0,531	3,3	6,19
0,280	3,73	12,0	0,274	9,63	8,97	0,277	4,1	10,9
0,0701	6,08	-6,44	0,0733	10,7	-5,4	0,0755	11,	0,7

Source : tiré de Lanvers *et al.*, 2002.

Abréviations : ASNase : L-asparaginase; CV : coefficient de variation; *E. coli* : *Escherichia coli*; PEG : pégylé; UI : unité internationale ; * activité moyenne

Recouvrement

La proportion de l'activité de l'ASNase recouvrée a été calculée en comparant l'activité mesurée dans les échantillons enrichis à la concentration attendue. Les résultats montrent que le pourcentage de recouvrement global pour les trois formulations d'ASNase est de 101 % \pm 9,92 pour la méthode indooxine. Les résultats montrent également que l'activité de l'ASNase PEG est surestimée avec la méthode de Nessler (tableau 8).

Tableau 8 Comparaison du recouvrement de la mesure de l'activité de l'ASNase selon 2 méthodes

ASNase	% RECOUVREMENT* \pm ÉCART-TYPE	
	MÉTHODE INDOOXINE	MÉTHODE NESSLER
<i>E. coli</i> ASNase	101 \pm 10,1	110 \pm 8,25
ASNase PEG	101 \pm 10,2	129 \pm 9,72
<i>Erwinia</i> ASNase	101 \pm 9,47	95,7 \pm 10,1

Source : tiré de Lanvers *et al.*, 2002.

Abréviations : ASNase : L-asparaginase; *E. coli* : *Escherichia coli*; PEG : pégylé

* recouvrement moyen

Stabilité

L'étude de la stabilité de l'enzyme a été effectuée à partir de solutions concentrées d'ASNase conservées à 4°C et diluées dans la saline 0,9 % à température ambiante. Des échantillons enrichis d'ASNase ont également été analysés après conservation à température ambiante et à -20°C. Les résultats montrent que l'activité de l'ASNase dans le sérum demeure stable pour au moins 7 jours à température ambiante (0,45 % \pm 8,40). Les solutions concentrées d'*Erwinia* ASNase demeurent stables pendant 7 jours à 4°C. Cependant, lorsque diluées dans la saline et conservées à température ambiante, leur activité chute d'environ 17 % après 3 jours. À l'opposé, les solutions concentrées d'*E. coli* ASNase et d'ASNase PEG gardées à 4°C ainsi que celles diluées dans la saline et gardées à température ambiante s'avèrent stables pour au moins 7 jours. Les résultats montrent aussi que l'*E. coli*, l'*Erwinia* ASNase et l'ASNase PEG conservées à -20°C dans le sérum sont stables jusqu'à 69 jours, 82 jours et 98 jours respectivement (tableau 9).

Tableau 9 Stabilité de l'ASNase à 4°C, -20°C et température ambiante

JOUR	% DIFFÉRENCE PAR RAPPORT À L'ÉCHANTILLON FRAIS ± ÉCART-TYPE		
	<i>E. coli</i> ASNase	ASNase PEG	<i>Erwinia</i> ASNase
Solution concentrée d'ASNase à 4°C			
1	14,6 ± 13,1	-0,5 ± 9,3	-3,5 ± 12,4
2	5,4 ± 6,8	5,0 ± 8,8	9,1 ± 23,8
3	5,4 ± 12,4	10,7 ± 10,7	-1,6 ± 11,5
4	4,1 ± 10,8	11,4 ± 7,5	11,8 ± 12,6
7	-1,3 ± 9,6	14,6 ± 13,4	7,5 ± 15,4
ASNase dans la saline 0,9 % à température ambiante			
1	-6,3 ± 7,9	3,4 ± 5,0	7,9 ± 5,6
2	3,3 ± 8,3	-3,6 ± 5,0	-2,7 ± 5,6
3	9,4 ± 7,9	7,1 ± 3,9	-17,5 ± 3,2
4	3,1 ± 7,3	1,4 ± 3,7	s.o.
7	-5,7 ± 8,0	-6,1 ± 9,0	s.o.
ASNase dans le sérum à température ambiante			
1	-3,5 ± 5,2	-2,0 ± 4,3	-0,2 ± 4,3
2	-0,4 ± 0,7	-1,5 ± 2,3	-0,1 ± 2,4
3	0,7 ± 2,7	0,9 ± 1,6	0,3 ± 2,4
4	0,7 ± 4,5	-3,0 ± 2,3	-2,2 ± 2,2
7	1,0 ± 4,3	-2,8 ± 3,1	-4,8 ± 2,6
ASNase dans le sérum à -20°C			
69	7,59 ± 8,10	s.o.	s.o.
82	s.o.	s.o.	-9,83 ± 12,6
98	s.o.	5,44 ± 7,99	s.o.

Source : tiré de Lanvers *et al.*, 2002.

Abréviations : ASNase : L-asparaginase; *E. coli* : *Escherichia coli*; PEG : pégylé; s.o. : sans objet

Les auteurs de l'étude concluent que dans une situation d'inactivation enzymatique, le dosage de l'activité de l'ASNase par la méthode à l'indoxine s'avère un outil efficace pour contrôler et assurer une intensité de traitement optimal.

5.5 Données fournies par le demandeur

Le demandeur a fourni des données de validation. Ces données ont d'ailleurs été soumises au CLIA pour l'obtention d'une certification.

Les données de validation des courbes de calibration pour les gammes de concentrations faibles et élevées se retrouvent détaillées dans l'annexe D. L'analyse de spécificité et de sélectivité concernant une interférence potentielle du substrat avec le dosage de l'ASNase est présentée à l'annexe E.

Exactitude

L'exactitude intra-essai a été déterminée en analysant dans une seule expérience un minimum de 3 échantillons pour un minimum de 3 concentrations de chacune des gammes de concentrations d'ASNase. La différence entre la valeur attendue et la valeur obtenue ne doit pas excéder 20 %, excepté pour la plus faible concentration pour laquelle un écart jusqu'à 25 % est acceptable. L'exactitude intra-essai pour la gamme de concentrations faibles de 0,01 UI/ml à 0,1 UI/ml est présentée au tableau 10.

Tableau 10 Exemple d'exactitude intra-essai pour la gamme de concentrations faibles d'ASNase PEG

ENRICHISSEMENT ASNase PEG, UI/ml	ACTIVITÉ ASNase PEG, UI/ml	% DIFFÉRENCE PAR RAPPORT A LA VALEUR ATTENDUE
0	0,001	s.o.
0	0,001	s.o.
0,01	0,011	10
0,01	0,01	0
0,01	0,01	0
0,05	0,049	-2
0,05	0,048	-4
0,05	0,048	-4
0,1	0,097	-3
0,1	0,102	2
0,1	0,1	0

Source : tiré des informations fournies par le demandeur.

Abréviations : ASNase : L-asparaginase; PEG : pégylé; s.o. : sans objet; UI : unité internationale

L'exactitude intra-essai pour la gamme de concentrations élevées de 0,15 UI/ml à 1,0 UI/ml est présentée au tableau 11.

Tableau 11 Exemple d'exactitude intra-essai pour la gamme de concentrations élevées d'ASNase PEG

ENRICHISSEMENT ASNase PEG, UI/ml	ACTIVITÉ ASNase PEG, UI/ml	% DIFFÉRENCE PAR RAPPORT A LA VALEUR ATTENDUE
0	< 0,055	s.o.
0,15	0,157	4,7
0,15	0,152	1,3
0,15	0,152	1,3
0,5	0,499	-0,2
0,5	0,491	-1,8
0,5	0,504	0,8
1,0	1,03	3
1,0	0,973	-2,7
1,0	0,995	-0,5

Source : tiré des informations fournies par le demandeur.

Abréviations : ASNase : L-asparaginase; PEG : pégylé; s.o. : sans objet; UI : unité internationale

L'exactitude inter-essais a été déterminée en analysant des échantillons de chacune des gammes de concentrations lors d'au moins 3 expériences indépendantes réalisées à différentes journées. La différence entre la valeur attendue et la valeur obtenue ne doit pas excéder 20 %, excepté pour la plus faible concentration pour laquelle un écart jusqu'à 25 % est acceptable. L'exactitude inter-essais pour la gamme de concentrations faibles de 0,01 UI/ml à 0,1 UI/ml est présentée au tableau 12.

Tableau 12 Exemple d'exactitude inter-essais pour la gamme de concentrations faibles d'ASNase PEG

JOUR	ENRICHISSEMENT ASNase PEG, UI/ml	ACTIVITÉ ASNase PEG, UI/ml	% DIFFÉRENCE PAR RAPPORT A LA VALEUR ATTENDUE
1	0	0,001	s.o.
	0	0,001	s.o.
	0,01	0,011	10
	0,01	0,01	0
	0,01	0,01	0
	0,05	0,049	-2
	0,05	0,048	-4
	0,05	0,048	-4
	0,1	0,097	-3
	0,1	0,102	2
	0,1	0,1	0
2	0	0,001	s.o.
	0	0,001	s.o.
	0,01	0,009	-10
	0,01	0,009	-10
	0,01	0,009	-10
	0,05	0,042	-16
	0,05	0,047	-6
	0,05	0,05	0
	0,1	0,104	4
	0,1	0,092	-8
	0,1	0,08	-20
3	0	0,002	s.o.
	0	0	s.o.
	0,01	0,009	-10
	0,01	0,01	0
	0,01	0,01	0
	0,05	0,046	-8
	0,05	0,046	-8
	0,05	0,044	-12
	0,1	0,092	-8
	0,1	0,097	-3
	0,1	0,1	0

Source : tiré des informations fournies par le demandeur.

Abréviations : ASNase : L-asparaginase; PEG : pégylé; s.o. : sans objet; UI : unité internationale

L'exactitude inter-essais pour la gamme de concentrations élevées de 0,15 UI/ml à 1,0 UI/ml est présentée au tableau 13.

Tableau 13 Exemple d'exactitude inter-essais pour la gamme de concentrations élevées d'ASNase PEG

JOUR	ENRICHISSEMENT ASNase PEG, UI/ml	ACTIVITÉ ASNase PEG, UI/ml	% DIFFÉRENCE PAR RAPPORT À LA VALEUR ATTENDUE
1	0	< 0,055	s.o.
	0	< 0,055	s.o.
	0,15	0,139	-7,3
	0,15	0,128	-14,7
	0,15	0,131	-12,7
	0,5	0,479	-4,2
	0,5	0,474	-5,2
	0,5	0,506	1,2
	1,0	0,986	-1,4
	1,0	0,934	-6,6
2	0	< 0,055	s.o.
	0	< 0,055	s.o.
	0,15	0,137	-8,7
	0,15	0,129	-14
	0,15	0,149	-0,7
	0,5	0,46	-8
	0,5	0,473	-5,4
	0,5	0,459	-8,2
	1,0	0,951	-4,9
	1,0	0,94	-6
3	0	< 0,055	s.o.
	0	< 0,055	s.o.
	0,15	0,15	0
	0,15	0,154	2,7
	0,15	0,147	-2
	0,5	0,49	-2
	0,5	0,509	1,8
	0,5	0,511	2,2
	1,0	1,001	0,1

JOUR	ENRICHISSEMENT ASNase PEG, UI/ml	ACTIVITÉ ASNase PEG, UI/ml	% DIFFÉRENCE PAR RAPPORT À LA VALEUR ATTENDUE
	1,0	1,029	2,9
	1,0	1,004	0,4

Source : tiré des informations fournies par le demandeur. Abréviations : ASNase : L-asparaginase; PEG : pégylé; s.o. : sans objet; UI : unité internationale

Précision

La précision intra-essai a été déterminée en analysant un minimum de 5 échantillons pour des gammes de concentrations d'ASNase dans la même expérience. La différence entre la valeur attendue et la valeur obtenue ne doit pas excéder 20 %, excepté pour la plus faible concentration pour laquelle un écart jusqu'à 25 % est acceptable. La précision intra-essai pour la gamme de concentrations faibles entre 0,01 UI/ml et 0,1 UI/ml est présentée au tableau 14.

Tableau 14 Exemple de précision intra-essai pour la gamme de concentrations faibles d'ASNase PEG

ÉCHANTILLON	ACTIVITÉ ASNase PEG, UI/ml		
	Concentration faible	Concentration moyenne	Concentration élevée
1	0,010	0,047	0,090
2	0,011	0,046	0,095
3	0,011	0,046	0,094
4	0,010	0,043	0,091
5	0,010	0,045	0,093
Moyenne	0,010	0,045	0,0926
Écart-type	0,000548	0,00152	0,00207
% CV	5,27	3,34	2,24

Source : tiré des informations fournies par le demandeur.

Abréviations : ASNase : L-asparaginase; CV : coefficient de variation; PEG : pégylé; UI : unité internationale

La précision intra-essai pour la gamme de concentrations élevées entre 0,1 UI/ml et 1,0 UI/ml est présentée au tableau 15.

Tableau 15 Exemple de précision intra-essai pour la gamme de concentrations élevées d'ASNase PEG

ÉCHANTILLON	ACTIVITÉ ASNase PEG, UI/ml		
	Concentration faible	Concentration moyenne	Concentration élevée
1	0,118	0,368	0,652
2	0,114	0,361	0,635
3	0,113	0,338	0,624
4	0,117	0,357	0,651
5	0,120	0,360	0,637
Moyenne	0,116	0,357	0,640
Écart-type	0,00288	0,01125	0,01177
% CV	2,48	3,15	1,84

Source : tiré des informations fournies par le demandeur.

Abréviations : ASNase : L-asparaginase; CV : coefficient de variation; PEG : pégylé; UI : unité internationale

La précision inter-essais a été déterminée en analysant des échantillons de chacune des gammes de concentrations lors d'au moins 3 expériences indépendantes réalisées à différentes journées. La différence entre la valeur attendue et la valeur obtenue ne doit pas excéder 20 %, excepté pour la plus faible concentration pour laquelle un écart jusqu'à 25 % est acceptable. La précision inter-essais pour la gamme de concentrations faibles entre 0,01 UI/ml et 0,1 UI/ml est présentée au tableau 16.

Tableau 16 Exemple de précision inter-essais pour la gamme de concentrations faibles d'ASNase PEG

JOUR	ACTIVITÉ ASNase PEG, UI/ml		
	Concentration faible	Concentration moyenne	Concentration élevée
1	0,0110	0,047	0,094
2	0,0095	0,038	0,082
Moyenne	0,0102	0,044	0,089
Écart-type	0,000764	0,00520	0,00611
% CV	7,51	11,81	6,89

Source : tiré des informations fournies par le demandeur.

Abréviations : ASNase : L-asparaginase; CV : coefficient de variation; PEG : pégylé; UI : unité internationale

La précision inter-essais pour la gamme de concentrations élevées entre 0,1 UI/ml et 1,0 UI/ml est présentée au tableau 17.

Tableau 17 Exemple de précision inter-essais pour la gamme de concentrations élevées d'ASNase PEG

JOUR	ACTIVITÉ ASNase PEG, UI/ml		
	Concentration faible	Concentration moyenne	Concentration élevée
1	0,118	0,343	0,650
2	0,160	0,437	0,728
3	0,134	0,402	0,724
4	0,117	0,349	0,671
Moyenne	0,1294	0,3798	0,685
Écart-type	0,0185	0,0393	0,0383
% CV	14,31	10,37	5,60

Source : tiré des informations fournies par le demandeur.

Abréviations : ASNase : L-asparaginase; CV : coefficient de variation; PEG : pégylé; UI : unité internationale

Le demandeur a également fourni des données de validation concernant la stabilité des échantillons de sérum ayant subi des cycles de gel/dégel et de sérum enrichi d'ASNase lorsque conservé à température ambiante, à 6°C et à -80°C (annexe F).

6 IMPACTS BUDGÉTAIRES

L'analyse d'impact budgétaire considère les coûts liés à l'ajout au *Répertoire* du test permettant de mesurer l'activité de l'ASNase. Les coûts sont projetés sur un horizon temporel de trois ans selon la perspective du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS). L'analyse repose sur des données épidémiologiques ainsi que sur des hypothèses appuyées par des études cliniques et l'opinion d'experts.

L'évaluation des coûts est présentée au tableau 18. Les principales hypothèses émises pour les fins de l'analyse sont les suivantes :

- Selon le demandeur, l'analyse proposée ciblerait principalement les patients atteints de LLA.
- Il est estimé qu'environ 100 nouveaux cas de LLA sont diagnostiqués chaque année au Québec dont 70 % chez les patients pédiatriques et 30 % chez les adultes.
- Selon le demandeur, 60 % des patients pédiatriques atteints de LLA au Québec seraient pris en charge par des établissements participant au protocole de recherche du DFCl. Notons que seuls les patients pédiatriques sont enrôlés dans ce programme de recherche.
- En considérant que tous les patients admissibles au protocole de recherche acceptent d'y participer, 40 à 45 patients pédiatriques seraient alors suivis par le programme d'étude du DFCl. Notons que le DFCl finance les analyses permettant le dosage de l'ASNase chez ces patients.
- Le demandeur estime qu'environ 20 % de ces patients développeraient une allergie à la forme d'asparaginase utilisée. Dans ce cas, le protocole ne prévoit pas fournir une autre formulation d'ASNase ni d'en faire le dosage et donc d'en supporter les coûts.
- Aucune étude du COG ne serait présentement en cours pour les nouveaux cas de LLA.
- Tous les patients atteints de LLA au Québec, qu'ils soient inclus ou non dans un protocole de recherche, recevraient un traitement avec l'ASNase.
- Ainsi, 25 à 30 patients pédiatriques atteints de LLA ne feraient pas partie d'un programme de recherche du DFCl ni d'aucun autre programme de recherche, en plus de 30 patients adultes qui n'y sont pas admissibles. De plus, parmi les enfants sous le protocole de recherche du DFCl, environ 8 patients présentant des allergies justifiant d'utiliser une autre forme d'ASNase devraient être pris en charge hors protocole.
- Le demandeur estime que 10 analyses seraient réalisées par patient traité avec l'ASNase.
- Ainsi, environ 650 analyses seraient requises au cours de chacune des trois prochaines années pour assurer le suivi du dosage de l'ASNase chez les

patients qui ne sont pas pris en charge par un protocole de recherche ou chez qui une réaction allergique est survenue en cours de protocole.

- Aucune analyse n'a fait l'objet d'envoi hors Québec en 2015-2016.
- La valeur pondérée proposée par le demandeur est de 38,90.

Tableau 18 Coûts liés à l'introduction au Répertoire de l'analyse permettant la mesure de l'activité de l'ASNase

	AN 1	AN 2	AN 3	TOTAL
Analyses de l'ASNase	650	650	650	1 950
Impact net	25 285 \$	25 285 \$	25 285 \$	75 855 \$
Analyses de sensibilité	Pour 3 ans, coûts les plus faibles			57 183 \$
	Pour 3 ans, coûts les plus élevés			96 861 \$

Ainsi, l'ajout de l'analyse permettant de mesurer l'activité de l'ASNase pourrait générer des coûts supplémentaires d'environ 75 855 \$ pour le total des trois premières années.

Advenant qu'aucun patient québécois atteint de LLA ne soit pris en charge par un programme de recherche, environ 1 000 analyses seraient réalisées annuellement pour des coûts supplémentaires évalués à 116 700 \$.

Par ailleurs, selon les experts consultés, les données publiées actuellement disponibles ne permettent pas un ajustement posologique précis de l'ASNase en fonction de la mesure de son activité sérique. Ainsi, l'impact économique lié à cet ajustement n'a pas été évalué.

7 ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

Le CHU Sainte-Justine participe depuis plusieurs années aux protocoles de recherche du DFCl et du COG visant à améliorer le traitement des leucémies pédiatriques.

Au Québec, la majorité des enfants diagnostiqués avec une LLA ou un lymphome sont traités au CHU Sainte-Justine avec une des trois formulations d'ASNase (*E. coli* ASNase, *Erwinia* ASNase, ASNase PEG). La prescription d'une dose d'une de ces formulations en absence de suivi de l'activité enzymatique de l'ASNase pourrait porter préjudice au patient en augmentant les risques de sous-dosage (inactivation silencieuse) ou de surdosage (pancréatite, thrombose). L'analyse de l'activité de l'ASNase garantirait une optimisation du traitement qui se traduirait par les bénéfices suivants : une amélioration de l'issue thérapeutique et une réduction du rapport coût/bénéfice.

8 POSITIONS OU ORIENTATIONS D'ORGANISATIONS D'INTÉRÊT CONCERNANT L'ANALYSE ÉVALUÉE

Selon un guide de pratique publié par un consensus d'experts de l'European Hematology Association dont The Hospital for Sick Children et le Dana-Farber Cancer Institute font partie, la mesure de l'activité de l'ASNase est le meilleur indicateur de l'efficacité du traitement à l'ASNase et le maintien de l'activité enzymatique égale ou supérieure à un seuil de 0,1 UI/ml assure un bénéfice thérapeutique [Van der Sluis *et al.*, 2016].

9 RECOMMANDATION DE L'INESSS

Mesure de l'activité de la L-asparaginase

La recommandation de l'INESSS

- Introduction de l'analyse dans le *Répertoire*
- Refus d'introduction de l'analyse dans le *Répertoire*

Précisions accompagnant la recommandation

- ✓ L'utilité de l'analyse proposée pour certaines applications cliniques particulières ainsi que l'expertise du centre demandeur sont reconnues.
- ✓ Il est suggéré au centre demandeur de mettre en place un mécanisme de contrôle de qualité externe.

RÉFÉRENCES

- Ahlke E, Nowak-Gottl U, Schulze-Westhoff P, Werber G, Borste H, Wurthwein G, et al. Dose reduction of asparaginase under pharmacokinetic and pharmacodynamic control during induction therapy in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1997;96(4):675-81.
- Asselin B et Rizzari C. Asparaginase pharmacokinetics and implications of therapeutic drug monitoring. *Leuk Lymphoma* 2015;56(8):2273-80.
- Bleyer A, Asselin BL, Koontz SE, Hunger SP. Clinical application of asparaginase activity levels following treatment with pegaspargase. *Pediatr Blood Cancer* 2015;62(6):1102-5.
- Boos J, Werber G, Ahlke E, Schulze-Westhoff P, Nowak-Gottl U, Wurthwein G, et al. Monitoring of asparaginase activity and asparagine levels in children on different asparaginase preparations. *Eur J Cancer* 1996;32A(9):1544-50.
- Caruso V, Iacoviello L, Di Castelnuovo A, Storti S, Mariani G, de Gaetano G, Donati MB. Thrombotic complications in childhood acute lymphoblastic leukemia: A meta-analysis of 17 prospective studies comprising 1752 pediatric patients. *Blood* 2006;108(7):2216-22.
- Hijiya N et van der Sluis IM. Asparaginase-associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2016;57(4):748-57.
- Kloos RQ, Pieters R, Escherich G, van der Sluis IM. Allergic-like reactions to asparaginase: Atypical allergies without asparaginase inactivation. *Pediatr Blood Cancer* 2016;63(11):1928-34.
- Lanvers C, Vieira Pinheiro JP, Hempel G, Wurthwein G, Boos J. Analytical validation of a microplate reader-based method for the therapeutic drug monitoring of L-asparaginase in human serum. *Anal Biochem* 2002;309(1):117-26.
- Lanvers-Kaminsky C. Asparaginase pharmacology: Challenges still to be faced. *Cancer Chemother Pharmacol* 2017;79(3):439-50.
- Sassen SD, Mathot RA, Pieters R, Kloos RQ, de Haas V, Kaspers GJ, et al. Population pharmacokinetics of intravenous Erwinia asparaginase in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients. *Haematologica* 2017;102(3):552-61.
- Schrey D, Borghorst S, Lanvers-Kaminsky C, Hempel G, Gerss J, Moricke A, et al. Therapeutic drug monitoring of asparaginase in the ALL-BFM 2000 protocol between 2000 and 2007. *Pediatr Blood Cancer* 2010;54(7):952-8.
- Société canadienne du cancer (SCC). Statistiques canadiennes sur le cancer 2017. Sujet particulier : Le cancer du pancréas. Toronto, ON : SCC; 2017. Disponible à : <http://www.cancer.ca/~media/cancer.ca/CW/cancer%20information/cancer%20101/Canadian%20cancer%20statistics/Canadian-Cancer-Statistics-2017-FR.pdf>.
- Société de leucémie et lymphome du Canada (SLLC). La leucémie lymphoblastique aiguë. Montréal, Qc : SLLC; 2017. Disponible à :

http://www.sllcanada.org/sites/default/files/National/CANADA/Pdf/InfoBooklets/FR/PNT4497-PS33_ALL_Booklet_8_16_V7_LR.pdf (consulté le 7 mars 2018).

- Therrien R, Delisle J-F, Ferland G, Larocque D, McMahon J, Pedneault L, et al. Le cancer chez l'enfant. *Pharmactuel* 2013;46(3):192-202.
- Tong WH, Pieters R, de Groot-Kruseman HA, Hop WC, Boos J, Tissing WJ, van der Sluis IM. The toxicity of very prolonged courses of PEGasparaginase or Erwinia asparaginase in relation to asparaginase activity, with a special focus on dyslipidemia. *Haematologica* 2014;99(11):1716-21.
- Van der Sluis IM, Vrooman LM, Pieters R, Baruchel A, Escherich G, Goulden N, et al. Consensus expert recommendations for identification and management of asparaginase hypersensitivity and silent inactivation. *Haematologica* 2016;101(3):279-85.

ANNEXE A

Diagnostic différentiel de l'hypersensibilité par le suivi de l'activité de l'ASNase

	<i>allergic reaction to asparaginase</i>	<i>silent inactivation</i>	<i>allergic-like reactions to asparaginase</i>	<i>ASE-antibodies without silent inactivation</i>
clinical symptoms of hypersensitivity	yes	no	yes	no
Ab-levels	yes	yes	no/yes	yes
ASE-activity	no	no	yes	yes

Switch of ASNASE preparation

←

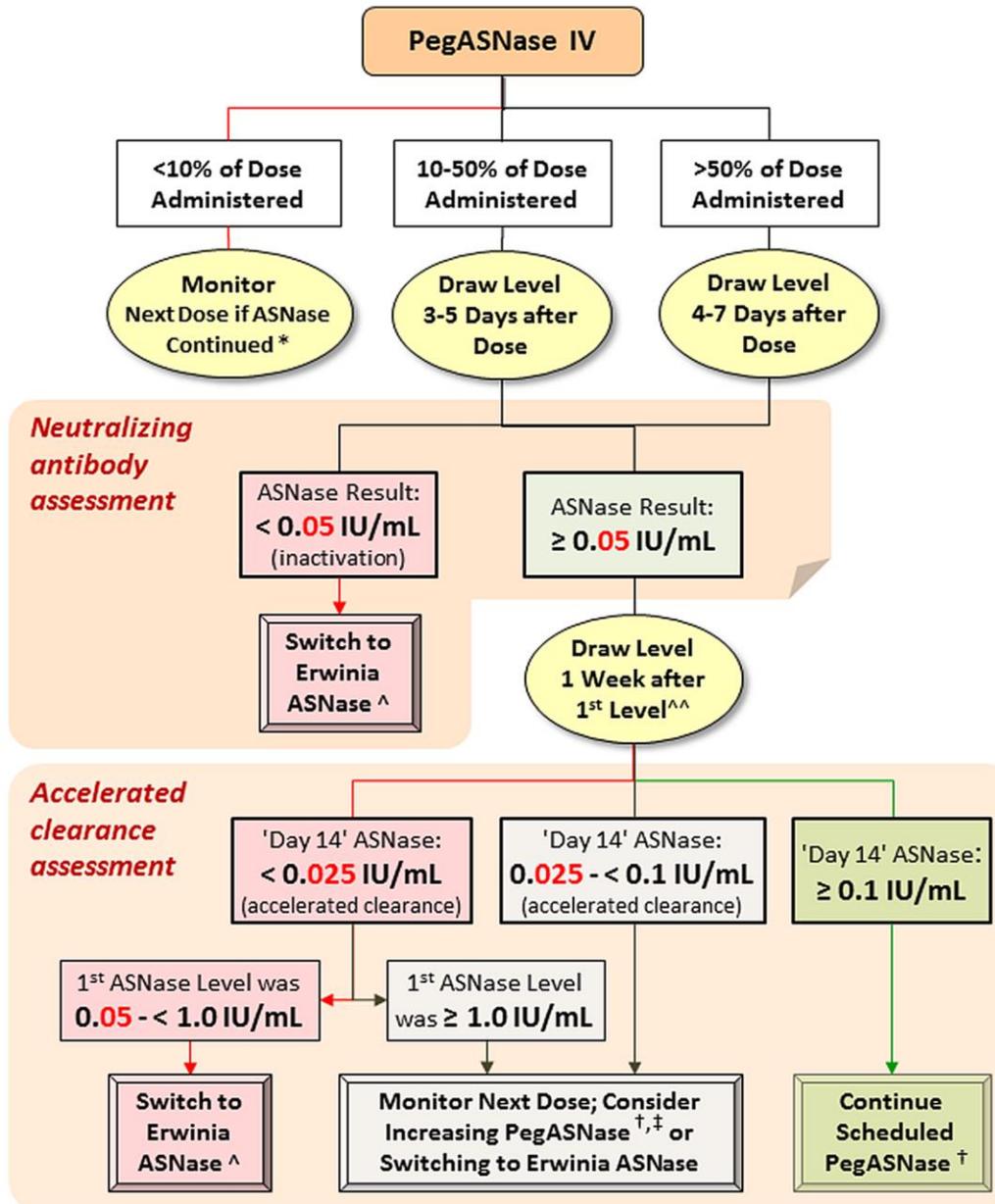
Avoidance of unnecessary switch of ASNASE preparation

→

Source : tiré de Lanvers-Kaminsky, 2017.

ANNEXE B

Détermination du plan de traitement avec l'ASNase peg suivie par la mesure de l'activité de l'ASNase



* In most instances, the ASNase preparation would be discontinued

^^ 7 days after 1st sample

^ 6 doses of 25,000 IU/m² IM at 2-3 day intervals for each scheduled dose of pegASNase

† With premedication to prevent a clinical allergic reaction if ASNase levels monitored

‡ Administering another dose of pegASNase should be considered,¹⁷ as well as monitoring future doses levels and continued accelerated terminal-phase disappearance

Source : tiré de Bleyer *et al.*, 2015.

ANNEXE C

Tableau d'extraction des données pertinentes pour les sections relatives à la valeur thérapeutique et à la validité analytique de l'analyse

ÉTUDE	BUTS	POPULATION	TRAITEMENT	ACTIVITÉ DE L'ASNASE	RÉSULTATS	CONCLUSIONS
Valeur thérapeutique						
Sassen [2017] Étude prospective multicentrique : 7 centres d'oncologie pédiatrique (Pays-Bas)	Décrire la pharmacocinétique de l' <i>Erwinia</i> ASNase administrée par voie intraveineuse chez des enfants diagnostiqués pour la LLA et déterminer l'association avec les caractéristiques des patients.	Patients âgés de 1 à 18 ans diagnostiqués LLA traités selon les protocoles : DCOG ALL-10 (1 ^{er} novembre 2004 au 1 ^{er} avril 2012) DCOG ALL-11 (depuis le 1 ^{er} avril 2012 et toujours en cours) 714 échantillons (51 patients) Suivi du 1 ^{er} mai 2009 au 5 février 2015	DCOG ALL-10 et ALL-11 <i>Erwinia</i> ASNase intraveineuse Dose les 2 premières sem : 20 000 UI/m ² 3 fois/sem Sem suivantes : si 72 hrs après la dose < 0,1 UI/ml, ajuster la dose et donner 2 fois/sem	Dosage spectrophotométrique de l'indooxine LIQ 0,005 UI/ml	<u>Activité médiane de l'ASNase durant les 2 premières sem</u> 48 hrs après la dose : 0,1662 UI/ml (75,4 % à ≥ 0,1 UI/ml) 72 hrs après la dose : 0,0484 UI/ml (26,4 % à ≥ 0,1 UI/ml) <u>Activité médiane de l'ASNase durant l'ajustement de la dose</u> 48 hrs après la dose : 0,1910 UI/ml (82,6 % à ≥ 0,1 UI/ml) 72 hrs après la dose : 0,0837 UI/ml (39,5 % à ≥ 0,1 UI/ml) <u>Variabilité interindividuelle :</u> 33 % (IC 95 % : 20) <u>Variabilité interocasion mensuelle :</u> 13 % (IC 95 % : 8)	Cette étude montre qu'avec la dose d' <i>Erwinia</i> ASNase administrée, environ 25 % des patients n'atteignent pas la concentration seuil de 0,1 UI/ml 48 heures après leur première dose. Ce phénomène est plus présent chez les patients ayant un faible poids corporel.
Schrey [2010] Programme de suivi, partie du protocole d'essai ALL-BFM 2000 (Allemagne)	Estimer l'intensité du traitement à l'ASNase en utilisant la mesure de l'activité de l'ASNase chez des patients diagnostiqués et traités pour la LLA.	Tous les patients diagnostiqués pour la LLA traités avec le protocole ALL-BFM-2000 Suivi de janvier 2000 à septembre 2007 : 2 074 échantillons (763 patients)	Protocole ALL-BFM 2000 <i>E. coli</i> ASNase : 5 000 UI/m ² (intensification 10 000 UI/m ²) <i>Erwinia</i> ASNase : 10 000 UI/m ² ASNase PEG : 1 000 UI/m ²	Dosage spectrophotométrique de l'indooxine	<u>Activité médiane de l'ASNase</u> <i>E coli</i> ASNase (n = 1 095) : Après 3 jrs : 0,229 UI/ml (11 % à ≤ 0,1 UI/ml) Intensification après 3 jrs : 0,540 UI/ml (7 % à ≤ 0,1 UI/ml) <i>Erwinia</i> ASNase (intraveineuse et intramusculaire, n = 97): Après 2 jrs : 0,142 UI/ml (33 % à ≤ 0,1 UI/ml) ASNase PEG (7 jrs n = 296, 14 jrs n = 69) Après 7 jrs : 0,333 UI/ml (28 % à ≤ 0,1 UI/ml) Après 14 jrs : 0,130 UI/ml (48 % à ≤ 0,1 UI/ml)	Cette étude montre que les données du suivi constituent la base d'une thérapie ciblée, c'est-à-dire une réduction de dose personnalisée.

ÉTUDE	BUTS	POPULATION	TRAITEMENT	ACTIVITÉ DE L'ASNASE	RÉSULTATS	CONCLUSIONS
Kloos [2016] Étude descriptive associée aux protocoles CoALL 08-09, DCOG ALL-11 et DCOG ALL-10	Décrire les réactions de type allergique et les comparer afin de trouver des différences utiles en pratique clinique pour les distinguer en mesurant l'activité de l'ASNase chez des patients diagnostiqués et traités pour la LLA.	Patients avec réactions allergiques (symptômes) sans inactivation de l'ASNase (protocoles CoALL 08-09 et DCOG ALL-11) : n = 9 Patients allergiques avec inactivation de l'ASNase (protocole DCOG ALL-10) : n = 15	Protocole CoALL 08-09 (3-4 doses ASNase PEG 1-2 doses 2 500 UI/m ²) Protocole DCOG ALL-11 (3 doses ASNase PEG 1 500 UI/m ²) Protocole DCOG ALL-10 (8 doses <i>E. coli</i> 5 000 UI/m ² et 15 doses ASNase PEG à 2 500 UI/m ² 2 fois/sem)	Dosage spectrophotométrique de l'indooxine	Les réactions de type allergique surviennent relativement tard après le début de la perfusion (5 min à 24 hres) comparativement aux allergies réelles (1 à 20 min). Chez tous les patients (sauf un) avec une réaction allergique fausses, les anticorps étaient absents, alors que des anticorps étaient détectés chez tous les patients avec une réaction allergique réelle. Les symptômes et le grade ne différaient pas entre les groupes.	Malgré ces différences cliniques, les réactions allergiques fausses peuvent être distinguées des allergies réelles uniquement en suivant les niveaux d'activité de l'ASNase.
Tong [2014] Étude prospective : 2 centres d'oncologie pédiatrique (Pays-Bas)	Évaluer l'incidence de la pancréatite, de la thrombose, de l'hyperammoniémie, de l'hypercholestérolémie et de l'hypertriglycéridémie et leur association avec les niveaux d'activité de l'ASNase.	Patients diagnostiqués LLA traités selon le protocole DCOG ALL-10 (juillet 2009 à octobre 2012) : 89 patients	Protocole DCOG ALL-10 (8 doses <i>E. coli</i> 5 000 UI/m ² aux 3 jrs et 15 doses ASNase PEG à 2 500 UI/m ² 2 fois/sem ou <i>Erwinia</i> ASNase à 20 000 UI/m ² si allergie ou inactivation), durée 30 sem	Dosage spectrophotométrique de l'indooxine LIQ 0,001 UI/ml	<u>Occurrence (% patients)</u> Thrombose 4,5 % Pancréatite 7,9 % Neurotoxicité 9,0 % Hyperammoniémie 50 % Hypercholestérolémie 35 % Hypertriglycéridémie 60 % <u>Corrélation avec l'activité de l'ASNase</u> Thrombose : aucune Pancréatite : aucune Neurotoxicité : aucune Hyperammoniémie : aucune Hypercholestérolémie : 0,35 (p = 0,01) Hypertriglycéridémie : 0,36 (p = 0,005)	Les niveaux élevés de l'activité de l'ASNase sont associés avec les niveaux élevés de triglycérides et de cholestérol mais ne sont pas associés avec la survenue de thrombose, de pancréatite ou de neurotoxicité.

ÉTUDE	BUTS	POPULATION	TRAITEMENT	ACTIVITÉ DE L'ASNASE	RÉSULTATS	CONCLUSIONS
Validité analytique						
Lanvers [2002] Étude méthodologique	Décrire le développement et la validation d'une méthode de quantification d'ASNase dans du sérum humain basé sur l'hydrolyse du β-hydroxamate L-aspartique (méthode indooxine).	Variabilité intrajour 8 réplicas d'une gamme de concentrations (0,00245-1,250 UI/ml) Variabilité interjour 20 échantillons de faible concentration (0,00245-0,075 UI/ml) et de concentration élevée (0,075-1,250 UI/ml)	Recouvrement Échantillons enrichis d'ASNase Stabilité de l'ASNase -20°C, 4°C, et température ambiante	Dosage spectrophotométrique de l'indooxine* LIQ 0,001 UI/ml (comparé au dosage spectrophotométrique avec la solution de Nessler, LIQ 0,02 UI/ml)	<u>Reproductibilité : % CV intrajour (n = 8)</u> <i>E. coli</i> : 2,72 à 6,53 % ASNase PEG : 1,98 à 5,70 % <i>Erwinia</i> ASNase : 2,11 à 8,77 % <u>Précision : % CV interjour (n = 20)</u> <i>E. coli</i> : 2,12 à 8,20 % ASNase PEG : 1,73 à 10,7 % <i>Erwinia</i> ASNase : 2,81 à 11,0 % <u>% de recouvrement (E. coli, ASNase PEG, Erwinia ASNase)</u> Indooxine : 101 %, 101 %, 101 % Nessler : 110 %, 129 %, 95,7 % Stabilité de l'ASNase dans le sang 7 jrs à température ambiante à 4°C et 8-72 hres à température ambiante	Les résultats montrent que cette méthode permet le suivi des différentes préparations d'ASNase.

Abréviations : ALL : *acute lymphoblastic leukemia*; ASNase : L-asparaginase; CCG : Children's Cancer Group; COG : Children's Oncology Group; CV : coefficient de variation; DFCI : Dana-Farber Cancer Institute; DCOG : Dutch Childhood Oncology Group; *E.coli* : *Escherichia coli*; IC : intervalle de confiance; LIQ : limite inférieure de quantification; LLA : leucémie lymphoblastique aiguë; PEG : pégylé; sem : semaine; UI : unité internationale.

* méthode visée par cette nouvelle analyse

ANNEXE D

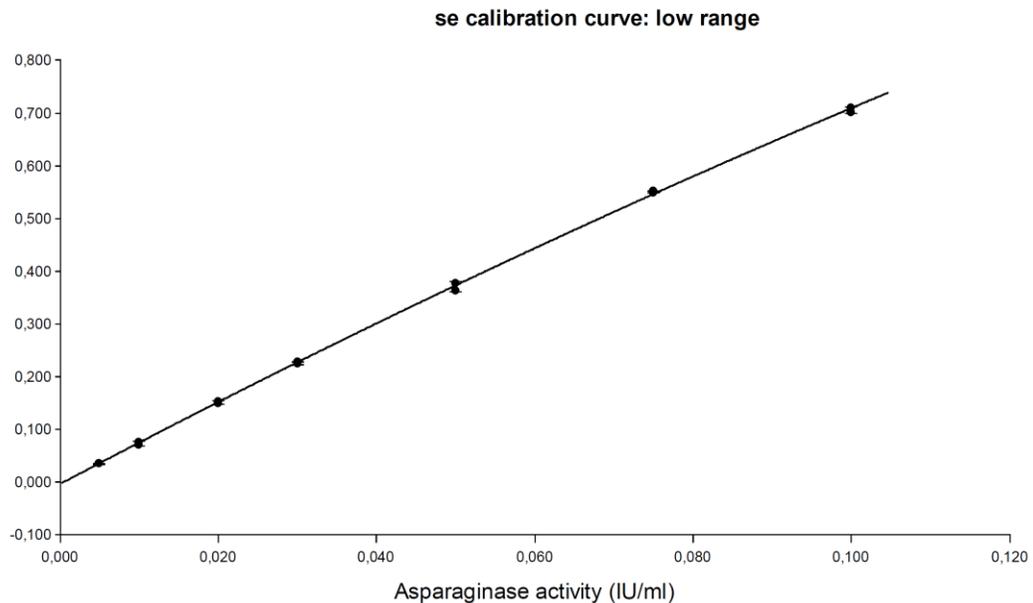
Données de validation des courbes de calibration

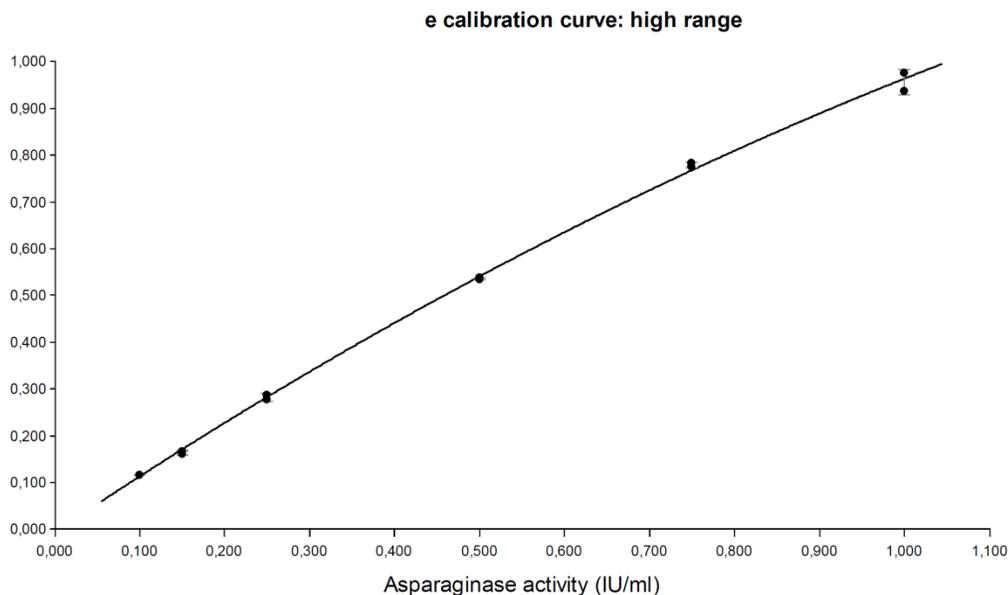
The calibration standards are prepared in serum, the same matrix as the matrix of the intended study samples, by spiking the blank matrix with known amounts of pegaspargase. The low calibration curve range is defined by the LLOQ being the lowest calibration standard (0.005 IU/ml) and the upper limit of quantification (ULOQ), being the highest calibration standard (0.1 IU/ml).. The high calibration curve range is defined by the LLOQ being the lowest calibration standard (0.1 IU/ml) and the upper limit of quantification (ULOQ), being the highest calibration standard (1 IU/ml). In addition to the blank sample (processed serum without pegaspargase), the following calibration levels are used:

- Low range pegaspargase: 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.075 and 0.1 IU/ml of serum
- High range pegaspargase: 0.1, 0.15, 0.25, 0.5, 0.75 and 1.0 IU/ml of serum

Each calibration standard is analysed in replicate.

Examples of low and high range calibration curve for pegaspargase:





Calibration curve parameters are calculated after absorbance of blank sample had been subtracted from the absorbance of each calibration standard. The calibration curve parameters are best reported using a quadratic curve fit:

- $y = A + Bx + Cx^2$

Low-range calibration curve parameter report (Gen5, V3.02.2, BioTek) for the low-range graph above

Curve Name	Curve Formula	Parameter	Value	Std. Error	95% CI min	95% CI max	R ²
Std Curve PEG	$y=A + Bx + Cx^2$	A	-0,00455	0,00136	-0,00756	-0,00155	0.999
		B	7,94	0,121	7,67	8,2	
		C	-8,1	1,36	-11,1	-5,11	

High-range calibration curve parameter report (Gen5, V3.02.2, BioTek) for the high-range graph above

Curve Name	Curve Formula	Parameter	Value	Std. Error	95% CI min	95% CI max	Fit F Prob
StdCurvePEG C	$Y=C*X^2+B*X+A$	A	-0,00773	0,0064	-0,0222	0,00674	?????
		B	1,22	0,0433	1,12	1,32	
		C	-0,249	0,0436	-0,347	-0,15	

The back calculated ASE activity of the calibration standards should be within $\pm 20\%$ of the nominal value, except for the LLOQ for which it should be within $\pm 25\%$. At least 75% of the calibration standards must fulfil this criterion. For replicates, the criteria (within $\pm 15\%$ or $\pm 20\%$ for LLOQ) should also be fulfilled for at least 50% of the calibration standards tested per activity level. In case a calibration standard does not comply with these criteria, this calibration standard sample should be rejected, and the calibration curve without this calibration standard should be re-evaluated, including regression analysis. In case all replicates of the LLOQ or the ULOQ calibration standard are rejected then the calibration curve could not be accepted. Then, the possible source of the failure should be determined. If the next calibration curve also fails, then the method should be revised before restarting ASE analysis.

Example of back-calculated ASE activity for pegaspargase low range calibration curve:

Well #	Name	Spiked PEG (IU/ml)	Absorbance (less average blank)	Measured ASE activity (IU/ml)	Back-calculated difference in ASE activity (%)	Pass/fail
A1	Blank	0	0,001	0,001	-	-
A4	Blank	0	-0,001	0,001	-	-
B4	Std PEG 0.005	0,005	0,035	0,005	0	Pass
B5	Std PEG 0.005	0,005	0,036	0,005	0	Pass
C4	Std PEG 0.01	0,01	0,076	0,01	0	Pass
C5	Std PEG 0.01	0,01	0,071	0,01	0	Pass
D4	Std PEG 0.02	0,02	0,154	0,02	0	Pass
D5	Std PEG 0.02	0,02	0,149	0,02	0	Pass
E4	Std PEG 0.03	0,03	0,227	0,03	0	Pass
E5	Std PEG 0.03	0,03	0,224	0,03	0	Pass
F4	Std PEG 0.05	0,05	0,377	0,051	+ 2	Pass
F5	Std PEG 0.05	0,05	0,364	0,049	- 2	Pass
G4	Std PEG 0.075	0,075	0,551	0,076	+ 1,3	Pass
G5	Std PEG 0.075	0,075	0,549	0,076	+ 1,3	Pass
H4	Std PEG 0.1	0,1	0,71	0,1	0	Pass
H5	Std PEG 0.1	0,1	0,701	0,099	- 1	Pass

Example of back-calculated ASE activity for pegaspargase high range calibration curve:

Well #	Name	Spiked PEG (IU/ml)	Absorbance (less average blank)	Measured ASE activity (IU/ml)	Back-calculated difference in ASE activity (%)	Pass/fail
A1	Blank	0	0,002	<0,055	-	-
A2	Blank	0	0	<0,055	-	-
A7	Blank	0	-0,002	<0,055	-	-
A8	Blank	0	-0,001	<0,055	-	-
A10	Blank	0	-0,001	<0,055	-	-
A11	Blank	0	0,003	<0,055	-	-
B10	Std PEG 0.1	0,1	0,115	0,103	+ 3	Pass
B11	Std PEG 0.1	0,1	0,116	0,104	+ 4	Pass
C10	Std PEG 0.15	0,15	0,167	0,147	- 2	Pass
C11	Std PEG 0.15	0,15	0,16	0,142	- 5,3	Pass
D10	Std PEG 0.25	0,25	0,288	0,256	+ 2,4	Pass
D11	Std PEG 0.25	0,25	0,277	0,245	- 2	Pass
E10	Std PEG 0.5	0,5	0,535	0,495	- 1	Pass
E11	Std PEG 0.5	0,5	0,538	0,498	- 0,4	Pass
F10	Std PEG 0.75	0,75	0,784	0,771	+ 2,8	Pass
F11	Std PEG 0.75	0,75	0,775	0,76	+ 1,3	Pass
G10	Std PEG 1.0	1	0,975	1,017	+1,7	Pass
G11	Std PEG 1.0	1	0,937	0,965	- 3,5	Pass

Although the calibration curve should preferably be prepared using freshly spiked samples, it is allowed to use previously prepared and stored calibration samples, if supported by appropriate stability data (see stability data below).

ANNEXE E

Données de validation de la spécificité et de la sélectivité (interférence potentielle avec le substrat)

The specificity of the microplate reader assay for the measurement of ASE activity refers to the ability of AHA (the substrate) to specifically react with pegaspargase. Ideally, AHA should be specific for pegaspargase, without cross-reactivity with other structurally or functionally related compounds that may be present in the sample. However, human serum is known to contain endogenous glycosylasparaginase, which due to similarities in the mechanism of action might also hydrolyze AHA. Although a mean (\pm SD) of $0,02 \pm 0,005$ IU/l glycosylasparaginase has been found in human serum of healthy individuals as determined by hydrolysis of L-aspartic β -(7-amido-4-methylcumarin) within 4 hours, no ASE activity above 0.0025 IU/ml was observed by Mononen et al (1994) in blank serum of patients prior to ASE therapy. Our data (see the three tables below) clearly showed that there is only a very limited hydrolysis of AHA when added (at a concentration of 2 mM and 10 mM for low and high range ASE activity, respectively) to blank serum of healthy individuals. The difference in mean absorbances between serum samples that contained or not AHA were 0,011 (2mM AHA) and 0,018 (10 mM AHA). Based on mean values, this 'endogenous' hydrolysis of AHA represents only a fraction of that associated with pegaspargase 0,005 IU/ml (LLOQ low range) and 0.1 IU/ml (LLOQ high range):

Low range: $(0,011 / 0,098 - 0,058) \times 100 = 27,5\%$

High range: $(0,018 / 0,181 - 0,065) \times 100 = 15,5\%$

Cross reactivity of AHA with compounds that may be present in serum: low-range asparaginase activity

Well #	Name	Spiked PEG (IU/ml)	Absorbance (710 nm)	Absorbance (less average blank)	Measured ASE activity (IU/ml)	Difference from the nominal value (%)	Pass/fail
A4	Blank (2 mM AHA)	0	0,059	0,001	0	-	-
B4	Blank (2 mM AHA)	0	0,058	0	<0,000	-	-
C4	Blank (2 mM AHA)	0	0,058	0	<0,000	-	-
D4	Blank (2 mM AHA)	0	0,057	-0,001	<0,000	-	-
A2	QC PEG 0,01	0,01	0,124	0,066	0,008	-20,0	Fail
A3	QC PEG 0,01	0,01	0,128	0,069	0,009	-10,0	Pass
B3	QC PEG 0,01	0,01	0,126	0,068	0,009	-10,0	Pass
C3	QC PEG 0,05	0,05	0,382	0,323	0,044	-12,0	Pass
D3	QC PEG 0,05	0,05	0,382	0,323	0,044	-12,0	Pass
E3	QC PEG 0,05	0,05	0,381	0,322	0,044	-12,0	Pass
F3	QC PEG 0,1	0,1	0,673	0,615	0,095	-5,0	Pass
G3	QC PEG 0,1	0,1	0,667	0,609	0,094	-6,0	Pass
H3	QC PEG 0,1	0,1	0,675	0,617	0,095	-5,0	Pass
B1	LLOQ PEG 0,005	0,005	0,096	0,038	0,005	0	Pass
B2	LLOQ PEG 0,005	0,005	0,100	0,042	0,005	0	Pass
A5	Blank without AHA	0	0,045	-0,013	<0,000	-	-
B5	Blank without AHA	0	0,046	-0,012	<0,000	-	-
C5	Blank without AHA	0	0,046	-0,012	<0,000	-	-
D5	Blank without AHA	0	0,045	-0,013	<0,000	-	-

Cross reactivity of AHA with compounds that may be present in serum: high-range asparaginase activity

Well #	Name	Spiked PEG (IU/ml)	Absorbance (710 nm)	Absorbance (less average blank)	Measured ASE activity (IU/ml)	Difference from the nominal value (%)	Pass/fail
E5	Blank (10 mM AHA)	0	0,066	-0,001	<0,055	-	-
F5	Blank (10 mM AHA)	0	0,065	-0,002	<0,055	-	-
G5	Blank (10 mM AHA)	0	0,066	-0,001	<0,055	-	-
H5	Blank (10 mM AHA)	0	0,068	0,001	<0,055	-	-
F3	QC PEG 0,15	0,15	0,221	0,154	0,134	11,7	Pass
G3	QC PEG 0,15	0,15	0,229	0,161	0,141	6,0	Pass
H3	QC PEG 0,15	0,15	0,235	0,168	0,147	2,0	Pass
F4	QC PEG 0,5	0,5	0,539	0,472	0,438	12,4	Pass
G4	QC PEG 0,5	0,5	0,562	0,495	0,462	7,6	Pass
H4	QC PEG 0,5	0,5	0,589	0,522	0,491	1,8	Pass
A5	QC PEG 1	1	0,894	0,827	0,868	-13,2	Pass
B5	QC PEG 1	1	0,91	0,843	0,89	11,0	Pass
C5	QC PEG 1	1	0,894	0,827	0,868	13,2	Pass
B1	LLOQ PEG 0,1	0,1	0,178	0,111	0,097	-3,0	Pass
B2	LLOQ PEG 0,1	0,1	0,183	0,116	0,101	1,0	Pass
A6	Blank without AHA	0	0,046	-0,021	<0,055	-	-
B6	Blank without AHA	0	0,048	-0,019	<0,055	-	-
C6	Blank without AHA	0	0,045	-0,022	<0,055	-	-
D6	Blank without AHA	0	0,045	-0,022	<0,055	-	-

Mean absorbance of blank serum enriched or not with AHA and pegaspargase LLOQ samples (low and high ranges)

	Blank low range (2 mM AHA)	Blank high range (10 mM AHA)	Blank (without AHA)	LLOQ low range (0,005 IU/ml)	LLOQ high range (0,1 IU/ml)
Mean Absorbance	0,0580	0,065	0,047	0,098	0,181

Specificity is sometimes related to the concept of cross reactivity. Even though AHA has been shown to specifically cross react with other commercially available bacterial forms of ASE (*E. Coli* native ASE and *Erwinia* ASE), this would not affect the specificity of the assay as these forms are not co-administered with pegaspargase. Although highly unlikely, the possibility of back-conversion of ASE-IgG antibody complexes into ASE (in serum samples of patients with silent inactivation to pegaspargase) during the successive steps of the analysis could not be ruled out.

The microplate reader assay is able to differentiate the level of ASE activity from endogenous components in the matrix or from other components in the sample. Selectivity has been demonstrated by using serum from at least 6 healthy individuals, not taking any medications at the time of sampling. The samples were individually analysed and evaluated for interference. Normally, absence of interfering components is accepted where the response is less than 20% of that of the lower limit of quantification for the pegaspargase. It was also necessary to investigate the extent of any interference caused by possible metabolites of asparaginase, interference from degradation products formed during sample preparation, and interference from possible co-administered medications. Although, co-medications normally used in the treatment (DFCI protocol) of children with ALL are unlikely to interfere with the microplate reader assay, this should be taken into account at the present stage of method validation. Since patients receive every 3-week, cycles of chemotherapy based on vincristine, dexamethasone, 6-mercaptopurine, methotrexate) until 24 months (104 weeks) from date of complete remission, we used some left-over serum samples collected for patients that had completed their ASE treatments to test possible interferences from these co-medications. Several other concomitant medications such as trimethoprim-sulfamethoxazole, non-steroidal anti-inflammatory drugs, antidepressant agents,... might also have been used. Testing for interference was carried out in blank serum samples of 6 healthy individuals and serum samples of 12 patients with ALL (samples were collected weeks after completion of *E Coli* ASE treatment). Serum samples of these two groups were also spiked with a low amount of peraspargase (0,05 IU/ml). As demonstrated in the table below, no interferences were seen in blank or spiked serum of healthy individuals. With the exception of patient #6 (which was found later on to had completed *E Coli* asparaginase treatment only days before sampling), no interferences were seen in serum of patients. The low accuracy in the measurement of ASE activity in spiked samples from patients is most likely related to very low finger prick left over serum volume (less than 50 µl) and their spiking with even lower volume of pergaspargase solution (2 µl).

Testing for interferences with ASE activity in serum samples from healthy individuals and patients with ALL

Well #	Name	Spiked PEG (IU/ml)	Absorbance (less average blank)	Measured ASE activity (IU/ml)	Difference from the expected value (%)	Pass/fail
A1	Blank	0	-0,008	<0,000	<-20% LLOQ	Pass
A4	Blank	0	0,008	<0,000	<20% LLOQ -	Pass
A5	QC PEG 0,01	0,01	0,076	0,008	-20	Fail
A6	QC PEG 0,01	0,01	0,07	0,007	-30	Fail
B6	QC PEG 0,01	0,01	0,092	0,009	-10	Pass
C6	QC PEG 0,05	0,05	0,36	0,045	-10	Pass
D6	QC PEG 0,05	0,05	0,34	0,042	-16	Pass
E6	QC PEG 0,05	0,05	0,348	0,043	-14	Pass
F6	QC PEG 0,1	0,1	0,645	0,1	0	Pass
G6	QC PEG 0,1	0,1	0,676	0,109	9	Pass
H6	QC PEG 0,1	0,1	0,626	0,095	-5	Pass
A7	Healthy Individual # 1	0	-0,003	<0,000	<20% LLOQ	Pass
C7	Healthy Individual # 1	0,05	0,343	0,042	-16	Pass
E7	Healthy Individual # 2	0	0,017	0,001	<20% LLOQ	Pass
G7	Healthy Individual # 2	0,05	0,453	0,06	20	Fail
A8	Healthy Individual # 3	0	-0,002	<0,000	<20% LLOQ	Pass
C8	Healthy Individual # 3	0,05	0,394	0,05	0	Pass
E8	Healthy Individual # 4	0	0,029	0,002	<20% LLOQ	Pass
G8	Healthy Individual # 4	0,05	0,382	0,048	-4	Pass
A9	Healthy Individual # 5	0	-0,009	<0,000	<20% LLOQ	Pass
C9	Healthy Individual # 5	0,05	0,349	0,043	-14	Pass

E9	Healthy Individual # 6	0	0,026	0,002	<20% LLOQ	Pass
G9	Healthy Individual # 6	0,05	0,379	0,048	-4	Pass
A10	Patient #1	0	-0,009	<0,000	<20% LLOQ	Pass
B10	Patient #1	0,05	0,169	0,019	-62	Fail
C10	Patient #2	0	-0,006	<0,000	<20% LLOQ	Pass
D10	Patient #2	0,05	0,34	0,042	-16	Pass
E10	Patient #3	0	-0,006	<0,000	<20% LLOQ	Pass
F10	Patient #3	0,05	0,342	0,042	-16	Pass
G10	Patient #4	0	-0,008	<0,000	<20% LLOQ	Pass
H10	Patient #4	0,05	0,298	0,036	-28	Fail
A11	Patient #5	0	-0,02	<0,000	<20% LLOQ	Pass
B11	Patient #5	0,05	0,344	0,042	-16	Pass
C11	Patient #6	0	0,302	0,036	>20% LLOQ	Fail
D11	Patient #6	0,05	0,575	0,083	66	Fail
E11	Patient #7	0	0,035	0,003	<20% LLOQ	Pass
F11	Patient #7	0,05	0,287	0,034	-32	Fail
G11	Patient #8	0	-0,02	<0,000	<20% LLOQ	Pass
H11	Patient #8	0,05	0,356	0,044	-12	Pass
A12	Patient #9	0	-0,015	<0,000	<20% LLOQ	Pass
B12	Patient #9	0,05	0,263	0,031	-38	Fail
C12	Patient #10	0	-0,009	<0,000	<20% LLOQ	Pass
D12	Patient #10	0,05	0,395	0,05	0	Pass
E12	Patient #11	0	-0,008	<0,000	<20% LLOQ	Pass
F12	Patient #11	0,05	0,291	0,035	-30	Fail
G12	Patient #12	0	0,001	<0,000	<20% LLOQ	Pass
H12	Patient #12	0,05	0,305	0,037	-26	Fail

ANNEXE F

Données de validation de la stabilité de l'échantillon

Stability evaluations should cover the expected sample handling (e.g., freeze-thaw cycles), analysis, and storage conditions (e.g., long-term, bench top, and room temperature (RT) storage) likely to be encountered during the conduct of the study through analysis, including conditions at the clinical site, during shipment, and at all secondary sites. If actual conditions are known to deviate from expected conditions, or if storage conditions of study samples are changed or exceed validated conditions, additional testing may need to be conducted to verify sample integrity under actual conditions.

Matrix-related stability experiments should be conducted by comparing the experimental stability samples against freshly prepared calibrators and/or QCs. To be considered freshly prepared, calibrators and/or QCs should be prepared (i.e., spiked) on the day of the stability experiment and not frozen prior to use. In addition, it is recommended that the stock solutions used to spike the matrix in preparing stability QC samples is prepared on the day of use or is within its known stability period. While use of freshly prepared calibrators and or QCs is the preferred approach, it is recognized that in some cases, for macromolecules, it may be necessary to freeze them overnight. In such cases, valid justification should be provided and freeze/thaw stability demonstrated. Matrix-related stability assessments should be conducted with at least three replicates at both low and high concentrations within the validated range of the assay. Assessments of analyte stability should be conducted in the same matrix as that of the study samples, except in cases of rare matrices where suitable surrogate matrices may be used. Matrix related stability results should be within $\pm 20\%$ of their nominal values. Final study results should not be reported until matrix stability is established.

Stability after multiple freeze (-80°C)-thaw cycles (FTC)

Well #	Name	Spiked PEG (IU/ml)	Absorbance (less average blank)	Measured ASE activity (IU/ml)	Difference from the nominal value (%)	Pass/fail	
Plate 1	A10	Blank	0	-0,004	<0,055	-	-
	A11	Blank	0	0,004	<0,055	-	-
	B3	QC PEG 0,15	0,15	0,161	0,158	5,3	Pass
	C3	QC PEG 0,15	0,15	0,156	0,153	2	Pass
	D3	QC PEG 0,15	0,15	0,152	0,149	-0,7	Pass
	E3	QC PEG 0,5	0,5	0,5	0,492	-1,6	Pass
	F3	QC PEG 0,5	0,5	0,513	0,506	1,2	Pass
	G3	QC PEG 0,5	0,5	0,503	0,496	-0,8	Pass
	H1	QC PEG 1	1,0	0,814	0,842	-15,8	Pass
	H2	QC PEG 1	1,0	0,825	0,856	-14,4	Pass
	H3	QC PEG 1	1,0	0,864	0,902	-9,8	Pass
	A7	FTC 0	0,5	0,461	0,452	-9,6	Pass
	B7	FTC 0	0,5	0,487	0,479	-4,2	Pass
	C7	FTC 1	0,5	0,421	0,411	-17,8	Pass
D7	FTC 1	0,5	0,41	0,4	-20	Fail	
Plate 2	A10	Blank	0	-0,001	<0,055	-	-
	A11	Blank	0	0,003	<0,055	-	-
	B3	QC PEG 0,15	0,15	0,164	0,142	-5,3	Pass
	C3	QC PEG 0,15	0,15	0,167	0,145	-3,3	Pass
	D3	QC PEG 0,15	0,15	0,161	0,139	-7,3	Pass
	E3	QC PEG 0,5	0,5	0,5	0,47	-6	Pass
	F3	QC PEG 0,5	0,5	0,518	0,489	-2,2	Pass
	G3	QC PEG 0,5	0,5	0,52	0,492	-1,6	Pass
	H1	QC PEG 1	1,0	0,967	1,018	1,8	Pass
	H2	QC PEG 1	1,0	0,991	1,056	5,6	Pass
	H3	QC PEG 1	1,0	0,97	1,021	2,1	Pass

A5	FTC 2	0,5	0,463	0,432	-13,6	Pass
B5	FTC 2	0,5	0,459	0,428	-14,4	Pass
C5	FTC 3	0,5	0,431	0,399	-20,2	Fail
D5	FTC 3	0,5	0,439	0,408	-18,4	Pass

Pegaspargase exists in a solution (used as stock solution) from a commercial and certified source (Oncaspar®, Sigma-Tau Pharmaceuticals Inc). It is supplied as a sterile solution in Type I single-use vial containing 3,750 IU of L-asparaginase (no preservatives) per 5 mL solution (NDC 57665-002-02). Oncaspar® vials should be stored at 2°C to 8°C (36°F to 46°F). The stock solution should be protected from light and should not be frozen. The expiration date on the vial should be respected. It should be noted that solutions in other solvents and buffers prepared from a stock solution may have different stability characteristics and as such need to have their stability determined.

*Institut national
d'excellence en santé
et en services sociaux*

Québec 

Siège social

2535, boulevard Laurier, 5^e étage
Québec (Québec) G1V 4M3
418 643-1339

Bureau de Montréal

2021, avenue Union, 12^e étage, bureau 1200
Montréal (Québec) H3A 2S9
514 873-2563
inesss.qc.ca

