

**ARK™ Methotrexate Assay**

Il est impératif de lire attentivement la présente notice ARK Diagnostics, Inc. relative au produit ARK Methotrexate Assay avant toute utilisation. Les instructions de cette notice doivent être suivies scrupuleusement. La fiabilité des résultats du dosage ne peut pas être garantie en cas de non-respect de ces instructions.

**Service clientèle**

**ARK Diagnostics, Inc.**

48089 Fremont Blvd  
 Fremont, CA 94538 États-Unis  
 Tél. : 1-877-869-2320  
 Fax : 1-510-270-6298  
 customersupport@ark-tdm.com  
 www.ark-tdm.com





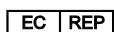







**EC REP**

Emergo Europe  
 Westervoortsedijk 60  
 6827 AT Arnhem  
 Pays-Bas

**CH REP**

MedEnvoy Switzerland  
 Gotthardstrasse 28  
 6302 Zoug  
 Suisse

**Légende des symboles utilisés**

|   |  |  |                                     |
|---|--|--|-------------------------------------|
|  | Code de lot                                  | <br>JJ/MM/A<br>AAA  | Utiliser avant le/Date d'expiration |
|  | Référence catalogue                          |   | Fabricant                           |
|  | Représentant autorisé                        |   | Label CE                            |
|  | Dispositif médical de diagnostic in vitro    |   | Limite de température               |
|  | Consulter les instructions d'utilisation     | <br> | Réactif 1/Réactif 2                 |
| <b>Rx Only</b>  | Pour utilisation sur prescription uniquement |  |                                     |

## 1 Dénomination

**ARK<sup>TM</sup> Methotrexate Assay**

## 2 Utilisation prévue

ARK Methotrexate Assay est un essai immunologique enzymatique homogène destiné à la détermination quantitative de méthotrexate dans le sérum ou le plasma humain sur les analyseurs de biochimie clinique automatisés. Les mesures obtenues permettent de surveiller les niveaux de méthotrexate afin de vérifier que le traitement est approprié.

Les prélèvements effectués sur des patients ayant reçu de la glucarpidase (carboxypeptidase G2) comme antidote électif dans le cadre d'une thérapie au méthotrexate à haute dose ne doivent pas être testés à l'aide du produit ARK Methotrexate Assay.

## 3 Résumé et explication du test

Le méthotrexate (acide [N-[4-[[[(2,4-diamino-6-pteridiny] méthyl]méthylamino] benzoyl]-L-glutamique), anciennement améthoptérine, est un antimétabolite utilisé dans le traitement de certaines maladies néoplasiques, de certains cas de psoriasis sévère, et de la polyarthrite rhumatoïde chez l'adulte.<sup>1-3</sup> Le méthotrexate présente un degré de toxicité élevé. Les patients sous traitement par méthotrexate doivent faire l'objet d'une surveillance étroite afin de détecter rapidement les effets toxiques. Il est primordial de consulter les directives relatives à l'application d'une thérapie au méthotrexate en employant la leucovorine comme antidote électif.<sup>1</sup> La pratique consistant à alterner l'administration de doses importantes de méthotrexate (environ 35 mg/m<sup>2</sup> - 12 g/m<sup>2</sup>) et de leucovorine (facteur citrovorum) comme antidote électif a permis d'obtenir de bons résultats dans le cas des traitements contre les ostéosarcomes, la leucémie, les lymphomes malins non hodgkiniens et les cancers des poumons et du sein.<sup>4-8</sup>

## 4 Principes de la procédure

ARK Methotrexate Assay est un essai immunologique homogène basé sur la concurrence entre le médicament dans l'échantillon et le méthotrexate marqué à l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) pour la liaison au réactif anticorps. À mesure que ce dernier lie l'anticorps, l'activité enzymatique diminue. En présence de médicament dans l'échantillon, l'activité enzymatique augmente et est directement proportionnelle à la concentration médicamenteuse. L'enzyme active convertit la coenzyme nicotamide-adénine-dinucléotide (NAD)

en NADH qui est mesurée par spectrophotométrie en tant que taux de variation d'absorption. Le sérum endogène G6PDH n'interfère pas avec les résultats car la coenzyme NAD réagit uniquement avec l'enzyme bactérienne utilisée pour l'essai.

## 5 Réactifs

| RÉF.         | Description du produit  | Quantité/Volume  |
|--------------|---|------------------|
| 5026-0001-00 | <b>ARK Methotrexate Assay</b>   |                  |
| 5026-0001-02 | <b>Réactif R1 – Anticorps/substrat</b><br>Anticorps polyclonaux du lapin au méthotrexate, glucose-6-phosphate, nicotamide-adénine-dinucléotide, albumine de sérum bovin, azoture de sodium, conservateurs et stabilisateurs | <b>1 x 16 ml</b> |
| 5026-0001-03 | <b>Réactif R2 – Enzyme</b><br>Méthotrexate marqué à l'enzyme G6PDH bactérienne, tampon, albumine de sérum bovin, azoture de sodium, conservateurs et stabilisateurs   | <b>1 x 8 ml</b>  |

### Manipulation et stockage des réactifs

Les réactifs ARK Methotrexate Assay sont fournis sous forme liquide, prêts à l'emploi, et peuvent être utilisés dès la sortie du réfrigérateur. Lorsqu'ils ne sont pas utilisés, les réactifs doivent être stockés à une température comprise entre 2 et 8 °C (36 et 46 °F), en position verticale et avec les bouchons à vis correctement fermés. S'ils sont stockés dans les conditions indiquées, les réactifs restent stables jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette. Ne pas congeler les réactifs. Éviter toute exposition prolongée à des températures supérieures à 32 °C (90 °F). **Le stockage incorrect des réactifs peut affecter les performances du système de dosage.**

## 6 Avertissements et précautions

- Pour un usage **diagnostic in vitro**. Pour utilisation sur prescription uniquement.
- Les réactifs **R1** et **R2** sont fournis ensemble et ne doivent pas être interchangeables avec des réactifs provenant de numéros de lot différents.

## 7 Prélèvement et préparation des échantillons pour analyse

- Il est nécessaire de disposer de sérum ou de plasma. Par souci de cohérence, il est recommandé d'utiliser la même matrice d'échantillon pour chaque patient.
- L'heure du prélèvement du méthotrexate dépend de la dose administrée, de la durée de la perfusion et de l'état clinique du patient. Consulter les protocoles de traitement spécifiques pour déterminer l'heure de prélèvement.

- Il n'est pas possible d'utiliser du sang total. Les anticoagulants suivants peuvent être utilisés avec ce système de dosage.
  - Héparine de sodium
  - Héparine de lithium
  - EDTA de potassium
- Le prélèvement sanguin doit être effectué à l'aide de tubes compatibles avec le suivi thérapeutique pharmacologique (STP).
- Éviter la formation de mousse et les cycles de congélation/décongélation répétés afin de préserver l'intégrité de l'échantillon entre son prélèvement et son analyse.
- La fibrine, les globules rouges et autres particules peuvent entraîner un résultat erroné. Assurer une centrifugation adéquate.
- Les échantillons clarifiés peuvent être stockés jusqu'à deux semaines à une température comprise entre 2 et 8 °C. Si les tests sont différés, les échantillons doivent être stockés congelés ( $\leq -10$  °C) avant d'être testés. Des précautions doivent être prises afin de limiter le nombre de cycles de congélation/décongélation. Il a été démontré que les échantillons résistent à 3 cycles de congélation-décongélation lorsqu'ils sont stockés à -20 °C.
- **Manipuler tous les échantillons de patient comme s'ils étaient potentiellement infectieux.**

## 8 Procédure

### Matériel fourni

ARK Methotrexate Assay – RÉF. 5026-0001-00

ARK Methotrexate Assay, pack Roche® cobas c – RÉF. 5026-0001-02

ARK Methotrexate Assay, pack Roche® cobas c vert – RÉF. 5026-0001-03

### Matériel requis – Fourni séparément

ARK Methotrexate Calibrator – RÉF. 5026-0002-00

Contrôles qualité – ARK Methotrexate Control – RÉF. 5026-0003-00

ARK Methotrexate Dilution Buffer – RÉF. 5026-0004-00

### Instruments

Il peut s'avérer nécessaire de transférer les réactifs R1 et R2 dans les flacons de réactif spécifiques à l'analyseur avant utilisation. Éviter toute contamination croisée de R1 et R2.

### Séquence de dosage

Pour effectuer ou étalonner le dosage, consulter le manuel de l'opérateur spécifique à l'instrument.

### Étalonnage

Effectuer une procédure d'étalonnage complète (6 points) en utilisant ARK Methotrexate Calibrator A, B, C, D, E et F ; calibrateurs de test en double. Un

étalonnage est nécessaire pour chaque nouveau numéro de lot de kit de réactifs. Vérifier la courbe d'étalonnage sur au moins deux niveaux de contrôle qualité conformément au plan d'assurance qualité de laboratoire établi.

### **Quand procéder au réétalonnage**

- Chaque fois qu'un nouveau numéro de lot de réactifs est utilisé
- Chaque fois que les résultats de contrôle qualité l'exigent
- Chaque fois que les protocoles de laboratoire standard l'exigent

### **Contrôle qualité**

Les laboratoires doivent établir les procédures de contrôle qualité pour le produit ARK Methotrexate Assay. Tous les contrôles qualité requis et les tests doivent être réalisés conformément aux réglementations locales, nationales et/ou fédérales ou aux conditions d'accréditation.

Les bonnes pratiques de laboratoire suggèrent qu'au moins deux niveaux (critères de décision médicale supérieur et inférieur) de contrôle qualité soient testés chaque jour où des prélèvements patient sont analysés et chaque fois qu'un étalonnage est effectué. Surveiller les valeurs de contrôle afin d'identifier les tendances ou variations éventuelles. Si des tendances ou variations sont identifiées, ou si les valeurs ne se situent pas dans la plage spécifiée, examiner tous les paramètres de fonctionnement conformément aux procédures qualité clinique du laboratoire. Contacter le service clientèle pour obtenir de l'aide.

### **Protocole de dilution manuelle**

La plage de mesure du système de dosage ARK Methotrexate Assay s'étend de 0,04 à 1,20  $\mu\text{mol/l}$ . Les échantillons et contrôles contenant du méthotrexate à des concentrations plus élevées ( $>1,20 \mu\text{mol/l}$ ) sont analysés par dilution des échantillons et des contrôles dans la plage de mesure.

Diluer manuellement les échantillons ou les contrôles présentant des concentrations élevées avec le tampon de dilution ARK Methotrexate Dilution Buffer en préparant la dilution en série au dixième comme indiqué ci-dessous.

| <b>Volume d'échantillon</b>            | <b>Volume de tampon de dilution</b> | <b>Dilution</b> | <b>Facteur de dilution</b> |
|--|-------------------------------------|-----------------|----------------------------|
| 50 $\mu\text{l}$ Échantillon non dilué | 450 $\mu\text{l}$                   | 1/10            | 10                         |
| 50 $\mu\text{l}$ Échantillon de 1/10   | 450 $\mu\text{l}$                   | 1/100           | 100                        |
| 50 $\mu\text{l}$ Échantillon de 1/100  | 450 $\mu\text{l}$                   | 1/1000          | 1000                       |
| 50 $\mu\text{l}$ Échantillon de 1/1000 | 450 $\mu\text{l}$                   | 1/10000         | 10000                      |

$$\text{Facteur de dilution manuelle} = \frac{(\text{Volume d'échantillon} + \text{Volume de tampon de dilution})}{\text{Volume d'échantillon}}$$

Multiplier le résultat obtenu par le facteur de dilution.

## 9 Résultats

Pour convertir les résultats exprimés en  $\mu\text{mol/L}$  en unités  $\mu\text{g/mL}$ , diviser la valeur obtenue par le facteur de conversion 2,2005.

## 10 Limites de la procédure

Cet essai est conçu pour être utilisé avec du sérum ou du plasma uniquement ; consulter la section Prélèvement et préparation des échantillons pour analyse. Il est généralement recommandé d'utiliser systématiquement la même méthode (et la même matrice) pour les soins individuels apportés aux patients en raison des risques de variabilité d'une méthode à une autre. Consulter la section Valeurs attendues ci-après.

Comme pour toute détermination à partir de substance à analyser, la valeur de méthotrexate doit être utilisée en combinaison avec les informations disponibles à partir des évaluations cliniques et d'autres procédures de diagnostic.

**IMPORTANT :** Les prélèvements effectués sur des patients ayant reçu de la glucarpidase (carboxypeptidase G2) comme antidote électif dans le cadre d'une thérapie au méthotrexate à haute dose ne doivent pas être testés à l'aide du produit ARK Methotrexate Assay. Ces prélèvements présentent des niveaux de sérum plus élevés d'acide 4-[[2,4-diamino-6-(ptéridinyl)méthyl]-méthylamino]-benzoïque (DAMPA)<sup>10-12</sup> résultant du métabolisme du méthotrexate par la glucarpidase. Le DAMPA interagit avec l'anticorps de méthotrexate utilisé pour le test, et peut continuer à circuler pendant au moins cinq à sept jours avant que des mesures précises de méthotrexate puissent être obtenues.<sup>13</sup> Les oncologues de l'équipe clinique doivent signaler l'administration de glucarpidase au laboratoire afin que des concentrations de méthotrexate anormalement élevées ne soient pas relevées, concentrations qui seraient le résultat d'une interférence avec le DAMPA et qui amoindriraient les effets d'une thérapie à la glucarpidase.<sup>13</sup> Bien que la glucarpidase soit bien tolérée et réduise rapidement le MTX circulant, le retardement de l'élimination du MTX par voie rénale peut être un problème chez les adultes et les patients plus âgés.<sup>14</sup>

## 11 Valeurs attendues

Les taux sériques de méthotrexate dépendent des indications d'utilisation, de la posologie, du mode d'administration, du schéma thérapeutique, de la pharmacocinétique individuelle, du métabolisme et d'autres facteurs cliniques.<sup>1,3</sup> Alors que le taux sérique peut généralement atteindre environ 10 à 100  $\mu\text{mol/l}$

dans le traitement du cancer du sein (par exemple),<sup>15</sup> les concentrations peuvent dépasser 1000  $\mu\text{mol/l}$ <sup>16</sup> dans le cas d'une thérapie à haute dose contre l'ostéosarcome, et des niveaux jusqu'à 3100  $\mu\text{mol/l}$  de méthotrexate ont été atteints après une perfusion de 4 heures chez des patients pédiatriques atteints d'ostéosarcome.<sup>17</sup> Pour le traitement de l'ostéosarcome,<sup>16</sup> la courbe de décroissance du méthotrexate présente d'importantes variations : 24 heures, 30 à 300  $\mu\text{mol/l}$  ; 48 heures, 3 à 30  $\mu\text{mol/l}$  ; et 72 heures, moins de 0,3  $\mu\text{mol/l}$ . Une dose de 10 mg de leucovorine est généralement administrée par voie intraveineuse 24 heures après le début de la perfusion de MTX. Les doses suivantes sont ajustées et administrées en fonction des taux de MTX obtenus après 24, 48 et 72 heures. Des taux de méthotrexate supérieurs à 50  $\mu\text{mol/l}$  après 24 heures, 10  $\mu\text{mol/l}$  après 48 heures et 0,5  $\mu\text{mol/l}$  après 72 heures indiquent une toxicité potentielle et sont généralement corrigés par une augmentation de la dose de leucovorine conformément aux algorithmes jusqu'à ce que le taux de MTX soit inférieur à 0,1  $\mu\text{mol/l}$ . Les directives relatives à l'application d'une thérapie au méthotrexate en employant la leucovorine comme antidote électif recommandent généralement l'utilisation continue de la leucovorine jusqu'à ce que le taux de méthotrexate soit inférieur à 0,05  $\mu\text{mol/l}$ .<sup>1, 9</sup> Certains centres vont jusqu'à un taux  $\leq 0,10 \mu\text{mol/l}$ .<sup>16, 18</sup>

À partir de la prescription ou toute autre information : Indicateurs de toxicité suivant les programmes d'utilisation de leucovorine comme antidote électif avec des doses élevées de méthotrexate.<sup>1, 9, 19</sup>

| Situation clinique                          | Résultats de laboratoire                               |   |
|---|--|---|
|   | Taux de méthotrexate ( $\mu\text{mol/l}$ )             | Nombre d'heures après l'administration<br>n |
| Élimination normale de méthotrexate         | ~10  | 24  |
|   | ~1   | 48  |
|   | <0,2   | 72  |
| Élimination lente de méthotrexate différée  | >0,2   | 72  |
|   | >0,05  | 96  |
| Élimination rapide de méthotrexate différée | $\geq 50$  | 24  |
|   | $\geq 5$   | 48  |
| et/ou                                       | OU   |   |
| Signe de problème rénal aigu                | Hausse d'au moins 100 % de la créatinine dans le sérum | 24  |

La toxicité rénale est un risque important qui peut être exacerbé par l'administration concomitante d'autres médicaments,<sup>14, 19</sup> comme la vancomycine par exemple.<sup>20</sup> D'autres formes de toxicité peuvent apparaître, notamment des

troubles digestifs (nausées, vomissements, douleurs abdominales), des affections cutanées des muqueuses (et particulièrement la mucosite), des anomalies hématologiques (neutropénie et thrombocytopénie), des troubles des fonctions du foie et une certaine neurotoxicité.<sup>21-28</sup>

Compte tenu du profil de l'aspect du métabolite 7-hydroxyméthotrexate,<sup>15, 27</sup> son rapport molaire au méthotrexate pouvant atteindre jusqu'à 100 fois,<sup>29</sup> et une insolubilité relative en comparaison au médicament mère,<sup>14, 19</sup> une possible néphrotoxicité causée par la précipitation du métabolite dans les tubules rénaux<sup>29</sup> peut retarder l'élimination du méthotrexate lui-même.

Un traitement à la glucarpidase (disponible pour usage compassionnel) réduit rapidement le niveau de circulation du méthotrexate, et non celui du médicament intracellulaire. Un effet rebond sur le taux sérique de méthotrexate après un traitement par glucarpidase a été observé.<sup>14</sup> L'élimination du DAMPA peut durer plusieurs jours avant que ce dernier ne cesse d'interférer avec la surveillance du méthotrexate par essai immunologique.<sup>13</sup>

## 12 Caractéristiques de performance spécifiques

Chaque laboratoire est chargé de vérifier les performances à l'aide des paramètres d'instrument établis pour son analyseur. Les caractéristiques de performance suivantes ont été obtenues sur le système Beckman Coulter AU680.

### Limite de quantification (LDQ)

Les caractéristiques suivantes ont été déterminées selon le protocole EP17-A2 du CLSI pour l'essai ARK Methotrexate Assay. Les performances peuvent varier en fonction de l'analyseur.

| Critère   | Concentration de MTX (µmol/l) |
|---|-------------------------------|
| Limite de blanc (LB) ; N = 60<br>µB + 1,645 écart-type, où écart-type = 0,002     | 0,00                          |
| Limite de détection (LD) ; N = 60<br>LB + 1,652 écart-type, où écart-type = 0,012 | 0,02                          |
| Limite de quantification (LDQ) ; N = 40<br>LDQ - 2 écart-type > LD                | 0,04                          |



Chaque laboratoire est chargé de déterminer les critères de consignation des concentrations en méthotrexate. La recommandation suivante du protocole EP17-A2 du CLSI peut s'avérer appropriée :

|                         |  |
|-------------------------|--|
| Résultat $\leq$ LB      | indiquer « analyte non détectée ; concentration $<$ LD » |
| LB $<$ Résultat $<$ LDQ | indiquer « analyte détectée ; concentration $<$ LDQ »    |
| Résultat $\geq$ LDQ     | indiquer le résultat mesuré                              |

### **Plage de mesure**

La plage de mesure du système de dosage ARK Methotrexate Assay s'étend de 0,04 à 1,20  $\mu\text{mol/l}$ . Les prélèvements présentant des concentrations de méthotrexate plus élevées doivent être dilués avant d'être testés. Rapporter toute valeur de test dépassant la LD selon les informations fournies pour la LDQ. Multiplier le résultat du test par le facteur de dilution pour les prélèvements contenant un niveau de méthotrexate dépassant la plage de mesure.

## Récupération

La précision (récupération analytique) a été vérifiée en ajoutant du méthotrexate concentré dans du sérum humain négatif pour le méthotrexate. Un concentré de méthotrexate haute pureté certifié a été ajouté volumétriquement à du sérum humain négatif pour le méthotrexate, représentant ainsi les concentrations médicamenteuses sur l'ensemble de la plage d'étalonnage du système de dosage. Six réplicats de chaque prélèvement ont été testés sur un analyseur biochimique clinique automatisé. Les résultats ont été moyennés et comparés à la concentration cible, et le pourcentage de récupération a été calculé. Les résultats sont présentés ci-après.

$$\% \text{ de récupération} = 100 \times \frac{\text{Concentration récupérée moyenne}}{\text{Concentration théorique}}$$

| <b>Concentration théorique</b>        | <b>Concentration récupérée moyenne</b> | <b>Pourcentage de récupération (%)</b> |
|---------------------------------------|--|--|
| <b>(<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b> | <b>(<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>  |  |
| 0,06                                  | 0,06                                   | 102,8                                  |
| 0,10                                  | 0,11                                   | 108,3                                  |
| 0,30                                  | 0,30                                   | 101,1                                  |
| 0,60                                  | 0,62                                   | 103,3                                  |
| 1,00                                  | 1,06                                   | 105,7                                  |

Pourcentage moyen de récupération : 104,2

## Linéarité

Des études de linéarité ont été menées selon le protocole EP6-A du CLSI. Un prélèvement sérique de 1,40 µg/ml a été préparé et des dilutions ont été effectuées proportionnellement au sérum humain négatif pour le méthotrexate. Les résultats du test ARK Methotrexate Assay étaient linéaires entre 0,03 et 1,20 µmol/l. Les résultats sont présentés ci-après.

| Valeurs théoriques (µmol/l) | Résultats observés (µmol/l) | Résultats de 1 <sup>er</sup> ordre prévus | Résultats de 2 <sup>nd</sup> ordre prévus | Différence (µmol/l ou %) |
|-----------------------------|-----------------------------|---|---|--------------------------|
| 0,00                        | 0,01                        | -0,002                                    | 0,010                                     | S.O.                     |
| 0,03                        | 0,04                        | 0,029                                     | 0,038                                     | 0,009 µmol/l             |
| 0,05                        | 0,06                        | 0,050                                     | 0,057                                     | 0,007 µmol/L             |
| 0,12                        | 0,13                        | 0,124                                     | 0,125                                     | 1,1 %                    |
| 0,24                        | 0,24                        | 0,250                                     | 0,243                                     | -2,7 %                   |
| 0,36                        | 0,36                        | 0,375                                     | 0,363                                     | -3,2 %                   |
| 0,48                        | 0,49                        | 0,501                                     | 0,486                                     | -3,0 %                   |
| 0,72                        | 0,72                        | 0,753                                     | 0,740                                     | -1,8 %                   |
| 0,96                        | 1,02                        | 1,005                                     | 1,003                                     | -0,2 %                   |
| 1,20                        | 1,27                        | 1,257                                     | 1,277                                     | 1,6 %                    |

Les échantillons contenant des niveaux de méthotrexate compris entre 2 et 1200 µmol/l ont été préparés proportionnellement dans du sérum humain mélangé, puis dilués sur la plage d'étalonnage à l'aide du tampon de dilution ARK Methotrexate Dilution Buffer. La baisse des niveaux de concentration de méthotrexate testés a été linéaire sur l'ensemble de la plage.

## Comparaison des méthodes

Des études de corrélation ont été réalisées selon le protocole EP9-A3 du CLSI. Les résultats du test de méthotrexate ARK sur l'analyseur Beckman Coulter AU680 ont été comparés aux résultats obtenus sur l'analyseur Roche/Hitachi 917.

Les concentrations de méthotrexate obtenues par l'analyseur Roche/Hitachi 917 se situaient entre 0,04 et 1050  $\mu\text{mol/l}$  ( $\mu\text{M}$ ). Celles obtenues sur l'analyseur Beckman Coulter AU680 se situaient entre 0,04 et 1070  $\mu\text{mol/l}$ . Les résultats de l'analyse de régression Passing-Bablok<sup>30</sup> pour cette étude sont présentés ci-dessous (avec une limite de confiance de 95 %) pour 112 prélèvements compris dans la plage de mesure, ainsi que pour l'ensemble des 142 prélèvements, y compris ceux qui sont au-dessus de la plage de mesure et qui nécessitent une dilution.

| Paramètre                            | Plage de 0,04 à 1,11 $\mu\text{M}$ |               | Plage de 0,04 à 1050 $\mu\text{M}$ |               |
|--------------------------------------|------------------------------------|---------------|------------------------------------|---------------|
| Pente                                | 0,99                               | (0,96 à 1,00) | 1,00                               | (1,00 à 1,02) |
| Ordonnée                             | 0,00                               | (0,00 à 0,01) | 0,00                               | (0,00 à 0,00) |
| Coefficient de corrélation ( $r^2$ ) | 0,98                               | (0,97 à 0,98) | 1,00                               | (1,00 à 1,00) |
| Nombre de prélèvements               | 112                                | S.O.          | 142                                | S.O.          |

## Précision

La précision a été déterminée tel que décrit dans le protocole EP5-A3 du CLSI. Le produit ARK Methotrexate Control à six niveaux ainsi que du sérum humain mélangé contenant du méthotrexate ont été utilisés dans l'étude. Chaque niveau a été analysé à quatre reprises deux fois par jour pendant 20 jours. Chacun des cycles effectués chaque jour était séparé d'au moins deux heures. Les valeurs en cours de cycle, d'un jour à l'autre, l'écart-type total et le pourcentage de CV ont été calculés. Les résultats sont présentés ci-après. Critères d'acceptation :  $\leq 10$  % du CV total à  $> 0,1 \mu\text{mol/l}$ , écart-type  $\leq 0,01$  à  $\leq 0,1 \mu\text{mol/l}$ .

| Échantillon              | N   | Moyenne<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | En cours de cycle |      | D'un jour à l'autre |      | Total      |      |
|--------------------------|-----|----------------------------------|-------------------|------|---------------------|------|------------|------|
|                          |     |                                  | Écart-type        | % CV | Écart-type          | % CV | Écart-type | % CV |
| ARK Methotrexate Control |     |                                  |                   |      |                     |      |            |      |
| FAIBLE                   | 160 | 0,08                             | 0,006             | 7,8  | 0,004               | 5,5  | 0,008      | 9,6  |
| MOYEN                    | 160 | 0,39                             | 0,009             | 2,2  | 0,007               | 1,7  | 0,012      | 3,1  |
| ÉLEVÉ                    | 160 | 0,78                             | 0,026             | 3,3  | 0,027               | 3,5  | 0,038      | 4,9  |
| 5                        | 160 | 5,2                              | 0,186             | 3,6  | 0,247               | 4,8  | 0,309      | 6,0  |
| 50                       | 160 | 48,7                             | 3,674             | 7,6  | 2,264               | 4,6  | 4,439      | 9,2  |
| 500                      | 160 | 516,8                            | 13,284            | 2,6  | 35,641              | 6,9  | 38,813     | 7,5  |
| Sérum humain             |     |                                  |                   |      |                     |      |            |      |
| FAIBLE                   | 160 | 0,08                             | 0,007             | 8,9  | 0,006               | 7,2  | 0,009      | 11,2 |
| MOYEN                    | 160 | 0,41                             | 0,011             | 2,6  | 0,008               | 2,1  | 0,015      | 3,7  |
| ÉLEVÉ                    | 160 | 0,82                             | 0,038             | 4,6  | 0,031               | 3,8  | 0,050      | 6,1  |
| 5                        | 160 | 5,2                              | 0,278             | 5,3  | 0,381               | 7,3  | 0,464      | 8,9  |
| 50                       | 160 | 53,0                             | 1,624             | 3,1  | 3,319               | 6,3  | 3,705      | 7,0  |
| 500                      | 160 | 507,9                            | 12,222            | 2,4  | 22,957              | 4,5  | 26,177     | 5,2  |

## Substances interférentes

Des études d'interférence ont été menées selon le protocole EP7-A2 du CLSI. Les concentrations cliniquement élevées des substances endogènes potentiellement interférentes suivantes dans le sérum avec niveaux de méthotrexate connus (environ 0,05 et 0,50  $\mu\text{mol/l}$ ) ont été évaluées. Chaque prélèvement a été analysé à l'aide de l'essai ARK Methotrexate Assay, avec un contrôle sérique du méthotrexate. Les mesures de méthotrexate n'ont pas été affectées aux niveaux de substances endogènes testés.

| Substance interférente     | Concentration interférente | Méthotrexate (~ 0,05 $\mu\text{mol/l}$ ) |      | Méthotrexate (~ 0,50 $\mu\text{mol/L}$ ) |                   |
|----------------------------|----------------------------|--|------|--|-------------------|
|                            |                            | Contrôle sérique                         | Test | Contrôle sérique                         | Test (% contrôle) |
| Albumine                   | 12 g/dl                    | 0,05                                     | 0,05 | 0,48                                     | 0,50 (103,5)      |
| Bilirubine - conjuguée     | 70 mg/dl                   | 0,05                                     | 0,06 | 0,48                                     | 0,49 (101,4)      |
| Bilirubine - non conjuguée | 70 mg/dl                   | 0,05                                     | 0,05 | 0,48                                     | 0,48 (101,4)      |
| Cholestérol                | 620 mg/dl                  | 0,05                                     | 0,04 | 0,47                                     | 0,48 (103,2)      |
| Gammaglobuline             | 12 g/dl                    | 0,05                                     | 0,06 | 0,48                                     | 0,49 (100,7)      |
| Hémoglobine                | 1000 mg/dl                 | 0,06                                     | 0,06 | 0,48                                     | 0,49 (101,4)      |
| Facteur rhumatoïde         | 1080 UI/ml                 | 0,06                                     | 0,07 | 0,46                                     | 0,45 (96,7)       |
| Triglycérides              | 835 mg/dl                  | 0,05                                     | 0,04 | 0,48                                     | 0,48 (98,6)       |
| Acide urique               | 30 mg/dl                   | 0,05                                     | 0,06 | 0,48                                     | 0,49 (100,7)      |

## Spécificité

Les métabolites de méthotrexate, les analogues de folate ainsi que d'autres composés disposant d'une structure similaire ont été testés afin de déterminer si ces composés affectent la quantification des concentrations de méthotrexate lors de l'utilisation du produit ARK Methotrexate Assay. Des niveaux élevés de ces composés ont été introduits dans les groupes de sérum ne contenant pas de méthotrexate, ou contenant 0,05  $\mu\text{mol/l}$  ou 0,50  $\mu\text{mol/l}$  de méthotrexate. Les échantillons ont été analysés et les concentrations de méthotrexate des échantillons contenant des composés interférents ont été comparées à un contrôle sérique.

### Activité hétérosécificique du 7-Hydroxyméthotrexate, le principal métabolite

Après l'administration de méthotrexate à forte dose (HDMTX), la concentration en 7-hydroxyméthotrexate du sérum/plasma dépasse généralement celle obtenue quelques heures plus tard. 12 à 48 heures après l'administration de HDMTX, il a été constaté que les niveaux de 7-hydroxyméthotrexate étaient 100 fois supérieurs à ceux de méthotrexate.<sup>15, 27, 29, 31, 33-34</sup>

L'activité hétérosécificique du 7-hydroxyméthotrexate dans la mesure de méthotrexate a été déterminée pour le produit ARK Methotrexate Assay en testant des échantillons appariés contenant (1) 0,05 µmol/ de méthotrexate et 5 µmol/l de 7-hydroxyméthotrexate et (2) 0,50 µmol/l de méthotrexate et 50 µmol/l de 7-hydroxyméthotrexate dans du sérum humain.

Le produit ARK Methotrexate Assay ne présente pas d'activité hétérosécificique ( $\leq 0,1$  %) avec le principal métabolite, le 7-hydroxyméthotrexate.

### Activité hétérosécificique de l'acide 2,4-diamino-N<sup>10</sup>-méthylptéroïque (DAMPA)

En tant que métabolite mineur du méthotrexate, le DAMPA n'est pas censé se trouver à des niveaux de concentrations qui pourraient interférer avec la mesure du méthotrexate.<sup>32</sup> Cependant, en cas d'utilisation de la glucarpidase comme antidote électif lors d'un traitement, la concentration sérique de DAMPA peut être très élevée.<sup>13, 14</sup> Le produit ARK Methotrexate Assay présente une forte activité hétérosécificique avec le métabolite mineur, le DAMPA. Les tests ont été effectués sans molécule mère de méthotrexate. L'activité hétérosécificique avec le DAMPA variait de 76,3 % à 100 % sur la base des données observées. Le test ne doit pas être utilisé dans le cadre de traitements compassionnels à la glucarpidase (carboxypeptidase G2) qui peuvent rapidement transformer le méthotrexate en DAMPA.

### Médicaments présentant une activité hétérosécificique

Le produit ARK Methotrexate Assay présente une légère activité hétérosécificique avec le triamtérene et le triméthoprime, mais ces médicaments peuvent être contre-indiqués pour le traitement du cancer au MTX en raison d'effets indésirables supplémentaires s'ils sont administrés par concomitance. Les structures de ces composés correspondent parfaitement à la fraction cyclique de ptéridine du méthotrexate. En l'absence de méthotrexate, une activité hétérosécificique avec le triamtérene (1,15 %) et le triméthoprime (0,01 %) a été observée. En présence de méthotrexate, une activité hétérosécificique avec le triamtérene ( $\leq 3,3$  %) et le triméthoprime ( $\leq 0,5$  %) a été observée sur la base des données observées.

Activité hétérospécifique avec les analogues de folate et d'autres composés

Le produit ARK Methotrexate Assay n'a pas présenté d'activité hétérospécifique ( $\leq 0,01\%$ ) avec des analogues de folate ou d'autres composés à  $\geq 1000 \mu\text{mol/l}$ .

| <b>Composé</b>                        | <b>Testé<br/>(<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b> |
|---------------------------------------|---|
| Adriamycine                           | 1000  |
| Cyclophosphamide                      | 1500  |
| Cytosine                              | 1000  |
| Acide dihydrofolique                  | 1000  |
| DL-6-Méthyl-5,6,7,8-Tétrahydroptérine | 1000  |
| Acide folique                         | 1000  |
| Acide folinique (leucovorine)         | 1000  |
| 5-Fluorouracile                       | 3000  |
| 6-Mercaptopurine                      | 1000  |
| Acide 5-méthyltétrahydrofolique       | 1000  |
| Prednisolone                          | 1000  |
| Pyriméthamine                         | 1000  |
| Sulfaméthoxazole                      | 1600  |
| Acide tétrahydrofolique               | 1000  |
| Vinblastine                           | 1000  |
| Vincristine                           | 1000  |



## 13 Références

1. Prescribing information. 2008. Methotrexate Injection, USP. Hospira, Inc. Lake Forest, IL.
2. Jonsson, O. G. et Kamen, B. A. 1991. Methotrexate and childhood leukemia. *Cancer Investigation* **9**:53 – 60.
3. Bleyer, W. A. 1978. The clinical pharmacology of methotrexate: New applications of an old drug. *Cancer* **41**:36 – 51.
4. Saeter, G. et al. 1991. Treatment of osteosarcoma of the extremities with the T-10 protocol, with emphasis on the effects of preoperative chemotherapy with single-agent high-dose methotrexate: A scandinavian sarcoma group study. *Journal of Clinical Oncology* **9**:1766 – 1775.
5. Abromowitch, M. et al. 1988. High-dose methotrexate improves clinical outcome in children with acute lymphoblastic leukemia: St. Jude total therapy study X. *Medical and Pediatric Oncology* **16**:297 – 303.
6. Hann, I. M. et al. 1990. 'MACHO' chemotherapy for stage IV B cell lymphoma and B cell acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *British Journal of Haematology* **76**:359 – 364.
7. Wheeler, C. A. et al. 1991. Cisplatin, continuous infusion 5-fluorouracil, and intermediate dose methotrexate in the treatment of unresectable non-small cell carcinoma of the lung. *Cancer* **67**:892 – 895.
8. Powles, T. J. et al. 1991. A randomized trial comparing combination chemotherapy using mitomycin C, mitozantrone and methotrexate (3M) with vincristine, anthracycline and cyclophosphamide (VAC) in advanced breast cancer. *Br J Cancer* **64**:406 – 410.
9. Leucovorin (Fusilev) Prescribing Information. 2008. Spectrum Pharmaceuticals, Inc. Irvine, CA.
10. Chabner, B. A. et al. 1972. Enzymatic cleavage of methotrexate provides a method for prevention of drug toxicity. *Nature* **239**:395 – 397.
11. Widemann, B. C. et al. 1995. Carboxypeptidase-G2 rescue in a patient with high dose methotrexate-induced nephrotoxicity. *Cancer* **76**:521 – 526.
12. Buchen, S. et al. 2005. Carboxypeptidase G2 rescue in patients with methotrexate intoxication and renal failure. *British Journal of Cancer* **92**:480 – 487.

13. Al-Turkmani, M. R. et al., 2010. Difficulty Measuring Methotrexate in a Patient with High-Dose Methotrexate–Induced Nephrotoxicity. *Clin Chem* **56**:1792 – 1796.
14. Schwarz, S. et al. 2007. Glucarpidase (Carboxypeptidase G2) intervention in adult and elderly cancer patients with renal dysfunction and delayed methotrexate elimination after high-dose methotrexate therapy. *The Oncologist* **12**:1299 – 1308.
15. Bore, P. et al. 1987. Pharmacokinetics of Methotrexate and 7-Hydroxy-Methotrexate After Methotrexate Infusions. *Cancer Drug Delivery* **4**:177 – 183.
16. Jaffe, N. and Gorlick, R. 2008. High-Dose Methotrexate in Osteosarcoma: Let the Questions Surcease—Time for Final Acceptance. *J Clin Oncol* **26**:4365 – 4366.
17. Colom, H. et al. 2009. Population Pharmacokinetics of High-Dose Methotrexate After Intravenous Administration in Pediatric Patients With Osteosarcoma. *Ther Drug Monit* **31**:76 – 85.
18. Dombrowsky, E. et al. 2011. Evaluating performance of a decision support system to improve methotrexate pharmacotherapy in children and young adults with cancer. *Ther Drug Monit* **33**:99 – 107.
19. Widemann, B. C. and Adamson, P. C. 2006. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist* **11**:694 – 703.
20. Blum, R. et al. 2002. Significant impairment of high-dose methotrexate clearance following vancomycin administration in the absence of overt renal impairment. *Annals of Oncology* **13**:327 – 330.
21. Martelli, N. et al. 2011. Methotrexate pharmacokinetics in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prognostic value? *J Clin Pharm Ther* **36**:237 – 245.
22. Mazanec, D. J. and Grisanti, J. M. 1989. Drug-induced osteoporosis. *Cleve Clin J of Med* **56**:297 – 303.
23. Chessells, J. M. et al. 1990. Neurotoxicity in lymphoblastic leukaemia: Comparison of oral and intramuscular methotrexate and two doses of radiation. *Archives of Disease in Childhood* **65**:416 – 422.
24. Allen, J. C. et al. 1980. Leukoencephalopathy following high-dose IV methotrexate chemotherapy with leucovorin rescue. *Cancer Treat Rep* **64**:1261 – 1273.
25. Jacobs, P. et al. 1991. Methotrexate encephalopathy. *Eur J Cancer* **27**:1061 – 1062.

26. Flombaum, C. D. and Meyers, P. A. 1999. High-Dose Leucovorin as Sole Therapy for Methotrexate Toxicity. *J Clin Oncol* **17**:1589 – 1594.
27. Collier, C. P. et al. 1982. Analysis of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate by high-performance liquid chromatography and preliminary clinical studies. *Ther Drug Monit* **4**:371 – 380.
28. Widemann, B. C. et al. 2010. Glucarpidase, leucovorin, and thymidine for high-dose methotrexate-induced renal dysfunction: clinical and pharmacologic factors affecting outcome. *J Clin Oncol* **28**:3979 – 3986.
29. Erttmann, R. et al. 1985. 7-Hydroxy-Methotrexate and Clinical Toxicity Following High-Dose Methotrexate Therapy. *J Cancer Res Clin Oncol* **109**:86 – 88.
30. Bablok, W. et al. 1988. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. Part III. *J. Clin Chem Clin Biochem* **26**:783 – 790.
31. Jacobs, S. A. et al. 1976. 7-Hydroxymethotrexate as a urinary metabolite in human subjects and rhesus monkeys receiving high dose methotrexate. *J Clin Invest* **57**:534 – 538.
32. Wolfrom, C. et al. 1990. Pharmacokinetic study of methotrexate, folinic acid and their serum metabolites in children treated with high-dose methotrexate and leucovorin rescue. *Eur J Clin Pharmacol* **39**:377 – 383.
33. Belz, S. et al. 1994. High-performance liquid chromatographic determination of methotrexate, 7-hydroxymethotrexate, 5-methyltetrahydrofolic acid and folinic acid in serum and cerebrospinal fluid. *J Chromatogr B Biomed Appl* **661**:109 – 118.
34. Breithaupt, H. and Kuenzlen, E. 1982. Pharmacokinetics of methotrexate and 7-hydroxy-methotrexate following infusions of high dose methotrexate. *Cancer Treat Rep* **66**:1733 – 1741.

## 14 Marques commerciales

**ARK<sup>TM</sup>** est une marque commerciale de ARK Diagnostics, Inc.

Tous les autres noms de marque ou de produit sont des marques commerciales de leurs propriétaires respectifs.



**ARK Diagnostics, Inc.**  
**Fremont, CA 94538 États-Unis**

Révision : novembre 2023  
1600-0213-00FR Rév. 10