

Production d'immunoglobulines thérapeutiques hautement purifiées (ITHP) : analyse d'un procédé de purification

Ludovic Nguyen

Sanofi Pasteur, Opérations Industrielles, 69280 Marcy l'Étoile, France

Auteur correspondant : Ludovic Nguyen, Ludovic.Nguyen@sanofipasteur.com

Reçu le 23 septembre 2009

Résumé – Les immunoglobulines hétérologues sont utilisées depuis plus d'un siècle chez l'Homme à des fins thérapeutiques. L'introduction d'étapes de fractionnement et de purification dans la production de ces immunoglobulines hétérologues a permis d'améliorer la tolérance de ces traitements. Historiquement, les étapes de fractionnement et de purification consistaient en une précipitation avec 30 % de sulfate d'ammonium suivie d'une hydrolyse à la pepsine à pH acide. L'ajout plus récent d'étapes de purification, comme la chromatographie d'échange d'ions et d'étapes de sécurité virale comme la pasteurisation, a permis d'augmenter la pureté de ces produits et de limiter les risques de réactions secondaires. Les procédés de purification les plus performants permettent aujourd'hui d'atteindre une proportion en fragments F(ab')₂ de l'ordre de 95 % avec moins de 0,5 % de polymères et agrégats assurant une innocuité optimale de ces traitements.

Mots clés : Immunoglobulines thérapeutiques / procédé de purification / contrôles qualité

Abstract – Production of Highly Purified Therapeutic Immunoglobulins (HPTI): analysis of a purification process.

Heterologous immunoglobulins have been used for more than a century for human therapeutic use. Introduction of fractionation and purification steps for the production of these heterologous immunoglobulins has allowed an improvement in their tolerance. Historically, the fractionation and purification steps consisted in one precipitation with 30% of ammonium sulfate followed by a hydrolysis with pepsin at acid pH. More recently, the addition of purification steps like ion-exchange chromatography and the addition of viral safety steps like pasteurization have allowed to improve the purity of these products and to reduce the risk of adverse events. Today, the more efficient processes are able to reach a proportion of about 95% in F(ab')₂ fragments with less than 0.5% of aggregates and polymers ensuring an optimal safety profile of these products.

Key words: Therapeutic immunoglobulins / purification process / quality control

Introduction

Depuis la naissance de la sérothérapie avec Émile Roux en 1894, des progrès considérables ont été réalisés et ont permis d'améliorer la tolérance liée à l'utilisation d'immunoglobulines hétérologues (d'origine animale) chez l'Homme. Ces immunoglobulines hétérologues sont indispensables pour la prophylaxie d'infections comme la rage ou le tétanos et le traitement des envenimations où elles constituent le seul

outil thérapeutique spécifique. Alors que les premiers traitements étaient des sérums bruts administrés directement aux patients sans précaution particulière, les immunoglobulines thérapeutiques produites aujourd'hui font appel à des procédés de fractionnement et de purification dont les plus efficaces permettent de limiter au maximum les risques de réactions secondaires et d'assurer la sécurité virale du traitement.

Il existe de nombreuses méthodes de purification des immunoglobulines hétérologues (Chulasugandha,

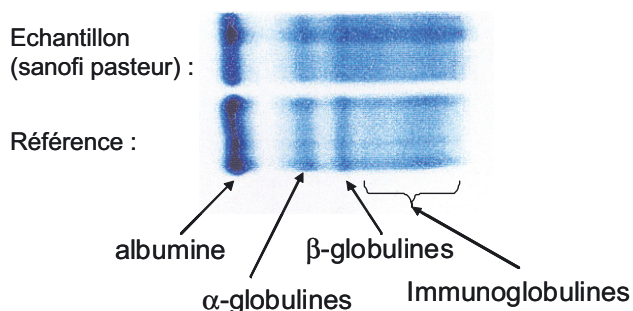


Fig. 1. Électrophorèse d'un plasma hyperimmun avant purification.

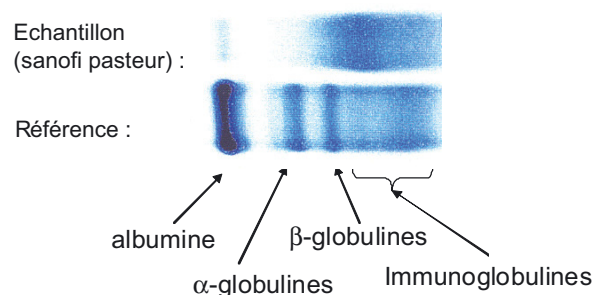


Fig. 2. Électrophorèse d'une solution d'immunoglobulines issue d'un plasma hyperimmun après élimination de l'albumine.

2003). Une des plus anciennes et toujours utilisée par les producteurs d'immunoglobulines thérapeutiques hétérologues est celle décrite par Pope en 1938. Cette méthode de purification est basée d'une part sur des précipitations fractionnées en sulfate d'ammonium qui permettent d'éliminer les protéines indésirables et d'autre part sur une étape de digestion des immunoglobulines à la pepsine afin de limiter les risques de réactions secondaires liés à la présence du fragment Fc (Pope, 1963). Certains producteurs d'immunoglobulines thérapeutiques hétérologues comme Sanofi Pasteur ont enrichi le procédé décrit par Pope par différentes étapes supplémentaires, comme la chromatographie d'échanges d'ions qui permet d'augmenter la pureté du produit, et une ou plusieurs étapes permettant d'assurer sa sécurité virale telles que la pasteurisation ou la nanofiltration.

Cet article présente un procédé de type « Pope » amélioré et optimisé, utilisé chez Sanofi Pasteur pour la production à l'échelle industrielle d'immunoglobulines thérapeutiques hautement purifiées (ITHP).

Production d'immunoglobulines thérapeutiques hautement purifiées (ITHP)

La production d'ITHP hétérologues repose sur l'hyperimmunisation (c'est-à-dire la répétition d'immunisations à doses croissantes d'antigène) d'un animal, comme le cheval, avec un antigène donné. Cet antigène peut être par exemple le virus rabique inactivé, la toxine tétanique, ou encore les toxines et enzymes du venin d'une espèce pour laquelle on a besoin de disposer d'un traitement antivenimeux. Le plasma d'un animal ainsi hyperimmunisé contient des immunoglobulines (γ -globulines de type G ou IgG) dirigées contre l'antigène visé mais aussi d'autres protéines hétérologues que l'on ne souhaite pas retrouver dans le traitement administré au patient, comme l'albumine, les α - et β -globulines. Une électrophorèse sur acétate

de cellulose permet de voir les différents constituants du plasma hyperimmun (*cf.* figure 1).

Le procédé de purification utilisé par Sanofi Pasteur pour la production d'ITHP hétérologues comporte cinq grandes étapes détaillées ci-après : élimination de l'albumine, hydrolyse peptidique, précipitation des F(ab')₂ et diafiltration, chromatographie d'échange d'ions et pasteurisation associée à une filtration stérilisante 0,2 μ m. À chaque étape, une analyse est réalisée afin de contrôler la qualité du produit.

Élimination de l'albumine

En 1893, Brieger et Ehrlich (Pope, 1963) ont montré qu'une addition d'environ 30 % de sulfate d'ammonium solide permet de précipiter les immunoglobulines. Le surnageant ainsi obtenu contient une grande majorité de l'albumine contenue dans le plasma hyperimmun ainsi qu'une partie des α - et β -globulines. Il est éliminé par un procédé de séparation solide/liquide de type centrifugation ou filtration-presse selon les volumes de produit à traiter. Une électrophorèse sur acétate de cellulose permet de confirmer l'absence d'albumine dans le produit (la présence de traces est encore possible à ce stade) ainsi que la présence d'une majorité d'immunoglobulines (*cf.* figure 2).

Hydrolyse peptidique

L'injection d'immunoglobulines hétérologues entières peut entraîner de graves réactions secondaires dues à la présence du fragment Fc. L'ajout de pepsine dans le produit permet de scinder les immunoglobulines en fragments F(ab')₂ (principe actif) et Fc (à éliminer). Cette étape est réalisée à un pH acide, entre 3 et 4 (Pope, 1963). La durée de cette étape doit être ajustée de manière à hydrolyser l'ensemble des immunoglobulines et à ne pas trop fragmenter la partie F(ab')₂

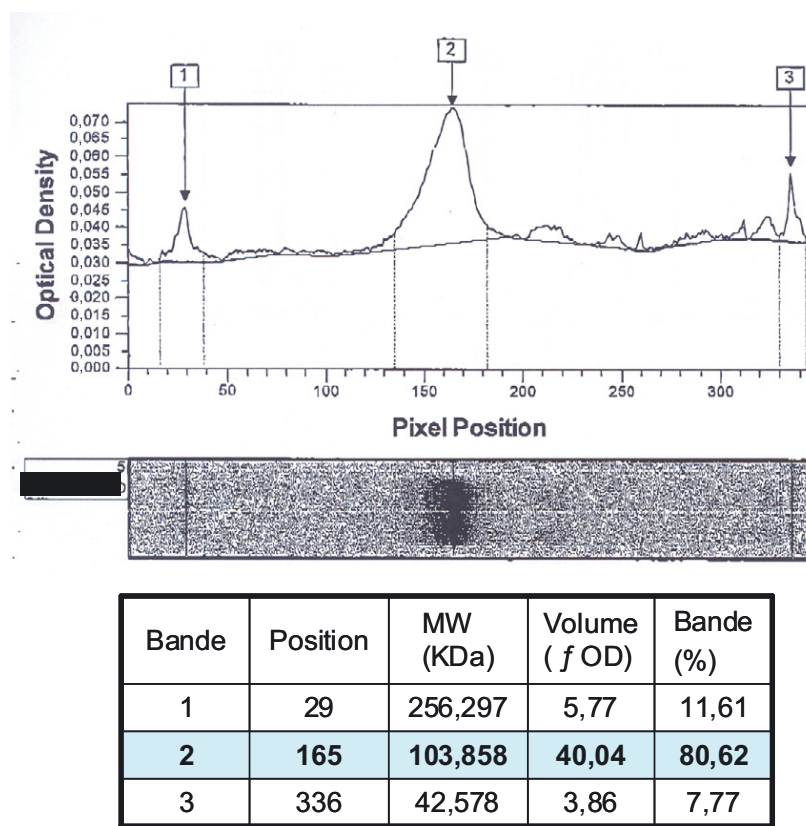


Fig. 3. Électrophorèse *SDS-page* d'une solution d'immunoglobulines issue d'un plasma hyperimmun après hydrolyse peptidique : observation d'une bande majoritaire en position 165 (*pixel position*) qui correspond à des immunoglobulines d'environ 100 KDa (103,858 KDa).

en fragments Fab'. Ces derniers sont moins efficaces du fait de la présence d'un seul site de reconnaissance de l'antigène contre deux sites pour les F(ab')₂ et du fait de leur faible demi-vie dans l'organisme. Une électrophorèse *SDS-page*, réalisée à l'issue de l'hydrolyse peptidique, montre la présence d'une bande à environ 100 KDa, masse moléculaire des F(ab')₂, et l'absence de bande à 150–160 KDa, masse moléculaire des immunoglobulines intactes (*cf.* figure 3). Cette étape d'hydrolyse est suivie d'une thermocoagulation (dénaturation sélective à la chaleur) à pH acide en présence de sulfate d'ammonium, afin de précipiter certaines protéines résiduelles instables. Ce précipité est éliminé par un procédé de séparation solide/liquide de type centrifugation ou filtre-press.

Précipitation des fragments F(ab') et diafiltration

Après l'étape d'hydrolyse et de thermocoagulation, l'ajout d'environ 20 % de sulfate d'ammonium permet de précipiter les fragments F(ab')₂ que l'on souhaite conserver. Les petits fragments protéiques issus de l'action enzymatique de la pepsine restent

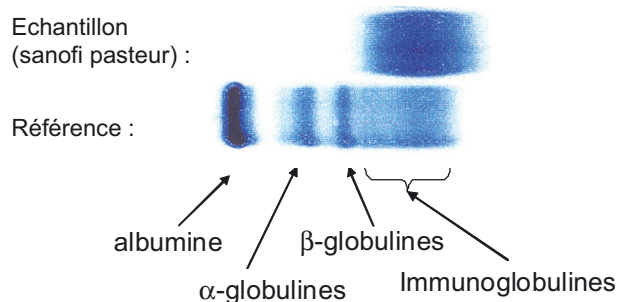


Fig. 4. Électrophorèse *SDS-page* d'une solution d'immunoglobulines issue d'un plasma hyperimmun après ajout d'environ 20 % de sulfate d'ammonium et diafiltration.

dans le surnageant et sont éliminés par filtration. Le sulfate d'ammonium potentiellement présent dans le précipité contenant les fragments F(ab')₂ est éliminé par diafiltration (ultrafiltration à volume constant). À ce stade, une électrophorèse sur acétate de cellulose confirme l'absence d'albumine, d' α - et de β -globulines résiduelles : la figure 4 montre une unique bande symétrique de fragments F(ab')₂ purifiés.

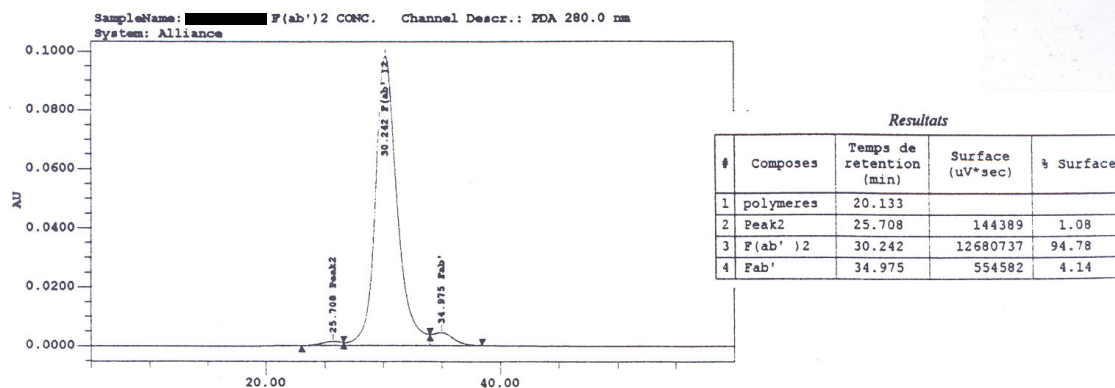


Fig. 5. Analyse HPLC d'une solution d'immunoglobulines issue d'un plasma hyperimmun après chromatographie d'échange d'ions.

Chromatographie

Une chromatographie d'échange d'anions est ensuite réalisée afin d'éliminer les polymères, agrégats et autres impuretés éventuellement présents. Au cours de cette étape de purification, le pH et la conductivité sont ajustés de façon à ce que les composés à éliminer soient chargés négativement et soient donc retenus sur la matrice échangeuse d'anions de la colonne de chromatographie, tandis que les fragments $F(ab')_2$, chargés positivement, ne sont pas retenus. À la suite de cette étape, une analyse HPLC (chromatographie liquide haute performance) d'exclusion stérique réalisée sur un échantillon de produit montre l'absence de polymères et agrégats, et la présence d'environ 95 % de fragments $F(ab')_2$ dans le produit (*cf.* figure 5). La proportion de fragments $F(ab')_2 + Fab'$ dans le produit est proche de 99 %, ce qui montre un très haut niveau de pureté de la solution d'immunoglobulines thérapeutiques qui sera injectée au patient.

Pasteurisation et filtration stérilisante 0,2 μ m

Afin d'assurer la sécurité virale du produit, la solution de $F(ab')_2$ est chauffée à 60 °C pendant 10 heures. Ces conditions opératoires permettent d'inactiver les virus éventuellement présents avec une dénaturation minimum des protéines (Grandgeorge *et al.*, 1996; Burnouf *et al.*, 2004). Il est à noter que conformément aux exigences de la Pharmacopée Européenne, l'absence de virus est vérifiée sur l'ensemble des plasmas hyperimmuns entrant en production. Un respect strict des conditions d'hygiène des animaux hyperimmunisés et un suivi sanitaire régulier sont des facteurs clés pour limiter les risques de contamination des plasmas hyperimmuns par des agents pathogènes.

Après ce traitement à la chaleur, les fragments $F(ab')_2$ sont mis dans une solution isotonique (NaCl 0,14M) avec un stabilisant de type polysorbate 80. Le produit ainsi obtenu est filtré stérilement sur une membrane 0,2 μ m afin d'assurer l'absence de germes dans le traitement administré au patient.

Contrôles qualité

Comme cela a été décrit précédemment, des contrôles sont réalisés en cours de procédé (analyses HPLC, électrophorèse, ...) afin de s'assurer de la bonne qualité du produit après chaque étape de purification. Des contrôles libératoires sont également réalisés sur les produits finis qui seront administrés aux patients. Ces tests comprennent :

- la détermination de la concentration protéique (< 170 g/l),
- la mesure de l'activité du produit final contre le ou les antigènes visés,
- la vérification de l'hydrolyse de l'ensemble des immunoglobulines en fragments $F(ab')_2$ (test de type *SDS-page*),
- la vérification de l'absence d'albumine,
- la vérification de la stérilité bactérienne et fongique du produit final,
- l'analyse de la distribution de taille moléculaire par HPLC : $F(ab')_2 > 80 \%$; polymères + agrégats < 5 %,
- la vérification de l'absence d'effets pyrogènes.

Conclusion

La fabrication d'immunoglobulines thérapeutiques hautement purifiées (ITHP) hétérologues repose sur

une succession d'étapes de fractionnement et de purification qui permettent au final d'obtenir un produit de très haute qualité et sans risque pour le patient. Aux étapes traditionnelles de précipitations au sulfate d'ammonium viennent s'ajouter aujourd'hui des étapes de purification et de sécurité virale qui permettent d'augmenter la tolérance de ces produits grâce à l'élimination ou l'inactivation de composés indésirables.

Les ITHP hétérologues constituent un véritable enjeu de santé publique. Dans le cas d'envenimations, les ITHP constituent le seul moyen de soigner efficacement des patients (Chippaux *et al.*, 1998). Il est donc important que ces traitements soient de bonne qualité afin qu'ils soient bien tolérés lors de leur administration (Warrell, 2008). Dans le cas des envenimations, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) prépare un programme de pré-qualification afin d'appliquer des standards de qualité, d'efficacité et de sécurité pour le patient de façon uniforme chez tous les producteurs d'ITHP antivenimeuses (WHO, 2007a, 2007b).

References

- Burnouf T., Griffiths E., Padilla A., Seddik S., Stephano M.A., Gutiérrez J.M., Assessment of the viral safety of antivenoms fractionated from equine plasma. *Biologicals*, 2004, 117.
- Chippaux J.P., Goyffon M., Venoms, antivenoms and Immunotherapy. *Toxicon*, 1998, 36, 823-846.
- Chulasugandha P., Snake antivenoms: heterologous and polyclonal antisera. *J Toxicol*, 2003, 22, 1-14.
- Grandgeorge M., Véron J.L., Lutsch C., Makula M.F., Riffard P., Pepin S., Schermann J.M., Preparation of improved F(ab)'2 antivenoms. An example: new polyvalent European viper antivenom. *Envenomings and their treatments*, Fondation Marcel Mérieux, 1996, pp. 161-172.
- Pope C.G., Development of knowledge of antitoxins. *Brit Med Bull*, 1963, 19, 230-234.
- Warrell D.A., Unscrupulous marketing of snake bite antivenoms in Africa and Papua New Guinea: choosing the right product-“What's in a name?” *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2008, 102, 397-399.
- WHO, Prequalification program. A United Nations Program managed by WHO. WHO, Geneva, Switzerland, 2007a, <http://www.who.int/prequal>
- WHO, Rabies and Envenomings: A Neglected Public Health Issue – Consultative Meeting, WHO, Geneva, Switzerland, 2007b, http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/rabies_envenomings/en/index.html