

Production et standardisation des extraits allergéniques en 2011

Production and standardization of allergen products in 2011

V. Leduc

Laboratoire ALK–Abelló France, 7, place de la Défense, 92240 Courbevoie, France

Disponible sur Internet le 25 février 2011

Résumé

La standardisation des extraits allergéniques implique une production reproductible de lots uniformes. La nature biologique des matières premières (pollens, acariens, moisissures, poils et squames, aliments) rend nécessaire le développement de procédés de fabrication et d'outils analytiques permettant la délivrance de produits de composition et de concentration constantes. La standardisation consiste en la comparaison des extraits allergéniques produits à une référence interne par mesure de l'activité allergénique par IgE-inhibition. La référence interne est préalablement testée par la technique du prick-test dans une étude in vivo. Le dosage des allergènes moléculaires permet également de déterminer la concentration de l'allergène moléculaire des extraits. Le cadre réglementaire national et européen a évolué très récemment, clarifiant le concept de groupe homologue, et précisant les données à fournir pour l'évaluation pharmaceutique d'une référence allergénique à usage diagnostique et thérapeutique.

© 2011 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Standardisation ; Extraits allergéniques ; APSI ; Production ; Qualité ; Réglementation

Abstract

The aim of the standardization of allergen products for diagnosis and immunotherapy of allergy is to deliver batches, qualitatively and quantitatively reproducible. As allergens are extracted from natural sources (pollen, mites, molds, danders, venoms, food), the objective of the production is to reflect the complexity of the allergens present in the source materials. The biological standardization is based on comparison of each production batch with a qualified In-House Reference (IHR) by IgE-binding assays. The IHR is formerly calibrated by in vivo by skin prick-test on sensitized patients. Major allergen assays are also developed to measure relevant molecular allergens in the different batches. French and European regulation issues have been recently updated, according to the recent evolution of the scientific knowledge about allergens. Homologous groups have been defined, clarifying the set of pharmaceutical data needed for the representative allergen of a group, and therefore for non-grouped allergens, used for diagnosis and immunotherapy of allergy.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Standardization; Allergens; Allergenic extracts; Production; NPP; Quality; Regulatory

Les extraits allergéniques, actuellement disponibles et commercialisés en France sous le statut d'allergène spécialement préparé pour un individu (APSI) [1], sont produits à partir de matières premières d'origine naturelle et sont caractérisés par une composition complexe. Par conséquent, une connaissance approfondie des allergènes associée au développement d'outils de production et d'analyse spécifiques, est nécessaire pour garantir la qualité des produits, tant au niveau de la production que du contrôle ou de la standardisation des extraits allergéniques.

Les différentes phases nécessaires à l'obtention d'extrait allergéniques standardisés sont définies et l'avancée des connaissances scientifiques, le développement de l'allergologie moléculaire et la démarche des fabricants de suivre ces avancées ont permis d'améliorer les étapes-clés de la production et de la standardisation des extraits allergéniques, dans un cadre réglementaire évolutif [2].

1. La réglementation

Au niveau national, les monographies spécifiques aux matières premières allergéniques ont été révisées ou sont en

Adresse e-mail : v.leduc@alk-abello.com.

cours de révision (venins, pollens et acariens) et d'implémentation (moisissures, phanères). Ces monographies ont pour but de préciser de manière approfondie les techniques d'identification, d'analyse des impuretés, et de mettre en place des spécifications de ces matières premières. Une révision récente de la monographie générale « *Producta allergenica* » de la pharmacopée européenne [3] augmente les exigences réglementaires en adéquation avec l'évolution des connaissances et outils disponibles.

L'European Medicines Agency (EMA) a publié une nouvelle note explicative européenne sur les produits allergènes [4], décrivant les divers aspects de la qualité et de la production des extraits allergéniques. Cette note explicative s'applique aux spécialités pharmaceutiques (AMM), aux APSI et aux allergènes recombinants, utilisés dans le cadre du diagnostic in vivo et celui du traitement de l'allergie par immunothérapie.

Le concept de « groupes homologues » remplace celui de « famille taxonomique ». Le regroupement est basé sur les quatre critères suivants :

- comparabilité des propriétés physicochimiques et biologiques de la matière première ;
- procédé de fabrication de l'extrait allergénique et produits finis identiques ;
- formulation identique du produit fini ;
- réactivité croisée/homologie de structure entre les allergènes moléculaires.

Ce dernier critère est équivoque car une homologie de structure peut s'étendre à la protéine entière (fonction moléculaire commune) tandis qu'une réactivité croisée allergénique est la conséquence d'homologie de structure locale (épitope(s) commun(s)).

Au sein de chaque groupe homologue, un allergène représentatif est choisi par le laboratoire et les données pharmaceutiques complètes développées sur ce représentant (données de validation, données de stabilité de la matière première, des produits intermédiaires et du produit fini. . .) sont en partie extrapolables aux autres membres du groupe. Les groupes homologues d'ores et déjà reconnus en termes de réactivité croisée/homologie de structure sont ceux de la classification de Lorenz [5], détaillés en annexe de la note explicative européenne.

En l'absence de définition de groupe homologue, les données pharmaceutiques complètes devront être générées pour chaque référence allergénique ce qui oblige les laboratoires-fabricants à d'importants développements pharmaceutiques complémentaires (cas en particulier des moisissures, des phanères et des pollens et acariens non regroupés. . .).

2. La production des extraits allergéniques

2.1. Les matières premières

Les matières premières utilisées pour la production des extraits sont d'origine biologique et de ce fait, doivent satisfaire à de nombreux critères de traçabilité. La sélection et la

qualification de chaque fournisseur sont requises. Si plusieurs fournisseurs sont sélectionnés, la démonstration de l'équivalence des matières en termes de qualité (origine, traçabilité, impuretés, traitements, allergènes. . .) doit être démontrée. De plus, les traitements potentiellement appliqués aux matières premières utilisées (délipidation, séchage, inactivation. . .) doivent être étudiés afin de démontrer le maintien de la qualité allergénique de la matière première au cours de ces traitements.

Les impuretés à tester dépendent de la source allergénique considérée : pour les pollens, la présence d'éléments étrangers (spores, débris), de pollen étrangers, de métaux lourds et de pesticides doit être évaluée. Pour les moisissures, l'absence de mycotoxines doit être démontrée. Pour les acariens, le milieu nutritif résiduel est déterminé, ainsi que la présence d'acariens étrangers. La contamination microbiologique est également un critère de qualité, ajouté dans les dernières versions des monographies nationales sur les matières premières allergènes.

Il n'en reste pas moins que les sources allergéniques sont soumises à des variations et influences diverses (climat, environnement, mode de culture, de prélèvement, croissance. . .) qui conduisent à des variabilités inhérentes aux matières premières dites biologiques.

Les matières premières allergéniques sont donc caractérisées par des méthodes comparables à celle des extraits allergéniques utilisés pour la production des APSI (activité allergénique totale, teneur protéique, allergènes majeurs, profil protéique). Leur extraction permet de définir si la matière première satisfait aux critères qualitatifs et quantitatifs de qualité allergénique.

2.2. La production des extraits

Certains paramètres déterminants pour les caractéristiques finales du produit peuvent varier d'un fabricant à l'autre, à savoir : le rapport d'extraction, la durée d'extraction, les solutions extractives, les procédés de purification, la nature et la concentration des excipients. Les paramètres d'extraction (rapport et durée), le seuil de coupure d'ultrafiltration ont été étudiés et définis pour chaque allergène représentatif, puis appliqués aux autres références allergéniques du même groupe. Le mélange des matières allergéniques au stade de l'extraction n'est pas recommandé. En effet, la fabrication d'un mélange d'extraits allergéniques doit s'effectuer à partir de plusieurs extraits individuels issus de matières premières isolées. La validation des procédés de fabrication est réalisée de manière à suivre l'évolution des paramètres qualitatifs (diversité protéique/allergénique) ou quantitatifs (activité allergénique, allergène majeur, teneur protéique) à chaque étape. Cette validation doit être réalisée pour chaque procédé et chaque représentant de groupe homologue, tels que définis dans la note explicative européenne [4].

3. La standardisation des extraits allergéniques

L'objectif de la standardisation est d'obtenir des extraits allergéniques de composition et de concentration constantes et reproductibles. Pour ce faire, l'établissement d'une référence

interne et la détermination de sa réactivité cutanée *in vivo* est un pré-requis à la standardisation d'un extrait. Chaque laboratoire a développé sa propre référence et réalisé ses propres études *in vivo*. Les outils analytiques développés pour l'étape de la standardisation *in vitro* sont également spécifiques à chaque laboratoire.

3.1. Standardisation *in vivo*

L'unité indice de réactivité (IR) a été mise en place en France [6] et n'est pas comparable aux autres unités européennes. Il s'agit de déterminer la réactivité cutanée, *in vivo*, de trois dilutions décimales de la préparation de référence interne par la technique du prick-test, sur une population cible de 30 patients.

Les patients doivent présenter une histoire clinique évocatrice d'allergie à l'allergène considéré, et présentant un test cutané positif à cet extrait. Aucun critère quantitatif d'IgE spécifiques n'est imposé permettant ainsi d'inclure des sujets représentatifs de la population généralement sensibilisée et n'excluant pas les patients les moins sensibilisés. Les patients doivent présenter une bonne réactivité cutanée (témoin positif ≥ 4 mm) et une absence de dermographisme (témoin négatif ≤ 1 mm). Leur sensibilisation vis-à-vis des allergènes moléculaires de l'extrait est vérifiable a posteriori, ce qui permet de valider que les patients testés sont bien sensibilisés aux allergènes pertinents de l'extrait considéré.

Il est à noter que ces critères de recrutement de la population diffèrent selon les laboratoires. De ce fait, la sensibilité de la population ayant une influence sur la taille des papules mesurées, un extrait standardisé à 6 mm environ sur une population non présélectionnée par un taux d'IgE spécifiques par exemple, peut induire une papule de taille supérieure sur une population plus sensibilisée [7].

Pour certains cas spécifiques (allergènes tropicaux, pollens à localisation restreinte), les essais de standardisation *in vivo* doivent tenir compte de la localisation géographique des patients testés, qui doit être favorable à une sensibilisation spécifique de ces patients à l'extrait considéré.

3.2. Standardisation *in vitro*

La standardisation *in vitro* a pour but de comparer par des techniques qualitatives et quantitatives les extraits allergéniques produits à la référence interne, pour leur ajustement en IR/mL. Ces méthodes doivent être réalisables en routine, sur chaque lot produit afin de permettre sa libération.

3.2.1. Les critères qualitatifs

L'évolution des connaissances sur les allergènes, associées à la disponibilité des informations dans les bases de données protéiques et/ou allergéniques [8–10] permettent un état des lieux précis des molécules caractéristiques d'un extrait, qu'il soit standardisé ou non.

Les techniques d'identification les plus utilisées sont l'isoélectrofocalisation (IEF), qui permet de séparer les protéines selon leur point isoélectrique, et le SDS-PAGE,

qui permet la séparation des protéines selon leur masse moléculaire. L'identification des allergènes par IEF est complexifiée par la séparation de toutes les isoformes d'une protéine. Le SDS-PAGE est une technique favorisant l'identification des protéines des extraits complexes en les séparant par leur masse moléculaire. En complément, les immuno-empreintes permettent l'identification des allergènes à l'aide d'anticorps spécifiques ou de sérums humains sensibilisés. Des critères de comparabilité prédéfinis sont appliqués pour évaluer la présence des protéines d'intérêt dans un extrait. Des profils allergéniques de référence ont été ainsi générés en interne, permettant une identification qualitative précise des extraits produits.

3.2.2. Les critères quantitatifs

3.2.2.1. Détermination de l'activité allergénique totale. - L'activité allergénique totale d'un extrait, exprimée en IR/mL, est déterminée par sa capacité à inhiber une quantité fixe d'IgE spécifiques par comparaison à la référence interne. Les techniques IgE-inhibition par Elisa sont le plus souvent utilisées.

La principale problématique de la mesure de l'activité allergénique est l'obtention de sérums de patients sensibilisés, en grande quantité et de spécificité adéquate. La spécificité des IgE des sérums utilisés pour la constitution des pools est vérifiée par SDS-PAGE suivi d'immuno-empreinte et par leur criblage vis-à-vis des allergènes moléculaires purifiés ou recombinants. L'utilisation de l'allergologie moléculaire permet donc d'affiner et d'améliorer l'étape primordiale de mesure d'une activité allergénique fiable. La note explicative européenne impose dans sa récente version, d'apporter la preuve que les pools de sérums sont spécifiques des allergènes pertinents de l'extrait à calibrer par les méthodes d'IgE-inhibition.

3.2.2.2. Le dosage de l'allergène majeur. La quantification des allergènes majeurs est un axe important de développement des méthodes analytiques dans le domaine de la standardisation. Ces techniques sont basées sur l'obtention d'anticorps mono-spécifiques d'un allergène moléculaire et de ses isoformes.

Co-existent dans les laboratoires, des méthodes de dosages aussi différentes que les Radial Immuno-Diffusion (RID), les Rocket Immuno-Diffusion (RIE) et les Elisa (de type compétitif ou sandwich) [11,12]. Lors d'une étude collaborative, le programme CREATE a été initiateur de la validation d'une méthode et d'un standard certifié pour le dosage de Phl p 5 et de Bet v 1, par Elisa de type sandwich [13].

Antérieurement à ce programme, les laboratoires-fabricants ont développé leur propre dosage et standard, rendant impossible la comparaison des teneurs en allergènes majeurs publiées dans la littérature. Toute valeur en allergènes majeurs doit être liée à un dosage et un standard, sous peine de ne pouvoir être comparée.

Cependant, si les valeurs interlaboratoires ne sont pas comparables, ces dosages permettent une amélioration de la caractérisation des extraits, un suivi de la corrélation entre

l'activité allergénique totale et la teneur en l'allergène majeur, et un suivi du comportement de ces allergènes lors des études de stabilité. Les extraits allergéniques contenant un principal allergène majeur montrent une très bonne corrélation entre l'activité allergénique totale mesurée par IgE-inhibition et la teneur en allergène majeur (squames de chat, pollen de Bouleau, *Alternaria alternata*...). Ces corrélations peuvent également être démontrées pour les extraits les plus complexes mais la définition de spécifications est plus ardue quand plus de deux critères doivent être simultanément quantifiés (activité allergénique, allergène(s) majeur(s), teneur protéique).

4. Conclusions

Le processus complexe de la standardisation des extraits allergéniques a suivi l'évolution de la connaissance moléculaire des allergènes. Les extraits allergéniques les plus fréquemment impliqués dans les allergies sont disponibles pour le praticien, en diagnostic et en thérapeutique. Les acariens *Dermatophagoides* sp. et *Blomia tropicalis*, les pollens de graminées, de Bétulacées, de Cupressacées, d'Ambroisie, de Pariétaire, d'Oléacées, *Alternaria*, phanères chat et chien, les venins d'hyménoptères, représentent les principaux extraits ayant fait l'objet d'une standardisation.

Le processus de standardisation n'est pas applicable aux extraits les moins fréquemment impliqués dans les allergies :

- le recrutement des patients est plus complexe. La difficulté de sélectionner des patients présentant une allergie vraie aux allergènes les moins fréquents est liée aux réactions croisées potentielles. Ainsi, la probabilité de standardiser un extrait sur des patients uniquement sensibilisés aux allergènes croissants ou non pertinents, est augmentée pour les allergies les moins prévalentes ;
- la disponibilité des outils analytiques (sérums humains contenant des IgE dirigées contre les allergènes pertinents de l'extrait, dosage de l'allergène majeur) ;
- la connaissance des allergènes moléculaires de certains extraits est encore faible voire méconnue et ce, malgré la très forte évolution des connaissances liées au développement de la biologie moléculaire et l'élaboration de bases de données complètes répertorient les allergènes moléculaires [9,10].

L'application stricte de la note explicative européenne aux APSI aura certainement pour conséquence la diminution du portefeuille d'extraits allergéniques disponibles. En effet, les laboratoires-fabricants ne pourront pas fournir pour les extraits les moins fréquents, non inclus dans la classification des groupes homologues par Lorenz [5], toutes les données pharmaceutiques requises pour chaque référence, à savoir les validations des méthodes analytiques, les validations des procédés de fabrication, et les études de stabilité des préparations-mères et des produits finis, sous toutes les formes

et concentrations administrées. . . A fortiori, lorsque les outils analytiques sont indisponibles ou que les fonctions moléculaires des allergènes cliniquement pertinents sont encore inexplorés.

En 2011, les extraits standardisés permettent de satisfaire plus de 98 % des prescriptions d'immunothérapie spécifique en France et en Outre-mer. Il n'en reste pas moins que les extraits non standardisés ont un intérêt diagnostique, voire thérapeutique dans des pathologies professionnelles par exemple [14]. La disponibilité d'un large portefeuille de références allergéniques est indispensable à la pratique quotidienne de l'allergologue, pour une prise en charge satisfaisante du patient allergique dans sa diversité.

Conflit d'intérêt

L'auteur ne déclare aucun conflit d'intérêt.

Références

- [1] Décret n° 2004-188 du 23 fév. 2004 relatif aux allergènes préparés spécialement pour un seul individu et modifiant le Code de la santé publique, publié au Journal Officiel de la République française du 28 février 2004 et abrogeant le décret n° 60-548 du 7 juin 1960. JORF 28 février 2004. p. 4101.
- [2] Kaul S, Englert L, May S, Vieths S. Regulatory aspects of specific immunotherapy in Europe. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010;10:594–602.
- [3] Monograph on Allergen Products (01/2010:1063) Eur Ph 6.6.
- [4] Guideline on allergen products: production and quality issues EMEA/CHMP/BWP/304831/2007. Date for coming into effect: 20 May 2009.
- [5] Lorenz A, Lorenz D, Lüttkopf S, May S, Scheurer S, Vieths S. The principle of homologous groups in regulatory affairs of allergen products—A proposal. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;148:1–17.
- [6] Guerin L, Leduc V, Chabane H. Standardisation des produits allergènes. In: Vervloet D, Magnan A, editors. *Traité d'allergologie*. Médecine-Sciences, Flammarion; 2003. p. 939–56.
- [7] Leduc V, Lievre K, Aparicio C. Standardisation des extraits allergéniques : exemple des dermatophagoïdes. *Rev Fr Allergol* 2009;49:334.
- [8] AllFam—A database of allergen families. <http://www.meduniwien.ac.at/allergens/allfam>.
- [9] Allergen Nomenclature Subcommittee—IUIS – <http://www.allergen.org>.
- [10] Allergome: a plateforme for allergen knowledge – <http://www.allergome.org>.
- [11] Grier TJ, Hazelhurst DM, Duncan EA, West TK, Esch RE. Major allergen measurements: sources of variability, validation, quality assurance, and utility for laboratories, manufacturers, and clinics. *Allergy Asthma Proc* 2002;23:125–31.
- [12] Nedergaard Larsen J, Houghton CG, Lombardero Vega M, Løwenstein H. Manufacturing and standardizing allergen extract in Europe. In: Lockey RF, Ledford DK, editors. *Allergens and allergen immunotherapy* (4th Edition). Clinical Allergy and Immunological Series. New York: Informa Healthcare; 2008. p. 283–301.
- [13] Van Ree R, Chapman MD, Ferreira F, et al. The Create Project: development of certified reference materials for allergenic and validation of methods for their quantification. *Allergy* 2008;63:310–26.
- [14] de Blay F, Doyen V, Bloch-Morot E, Caillot D, Gayraud J, de Laval A, et al. Amélioration du processus décisionnel pour l'application du décret APSI : l'expérience française. *Rev Fr Allergol* 2010;50:141–5.