

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE
BLIDA -1

جامعة سعد دحلب البليدة - 1



FACULTE DE
MEDECINE

DEPARTEMENT DE PHARMACIE
قسم الصيدلة

Thèse en vue de l'obtention du Diplôme de Docteur en Pharmacie

Thème

***Contrôle physicochimique
d'un médicament issu de la biotechnologie
Cas de l'énoxaparine sodique***

Présenté et soutenu par :

M^{elle} Ismahane DRAOUI

M^{elle} Iman Nour Elhouda BENNILI

Session

Juillet 2021

Jury d'évaluation:

Présidente de Jury : **Dr. Arar. K** Maitre-assistante en Pharmacognosie.

Examinatrice : **Dr. Bouhekchoukh. A** Maitre-assistante en Chimie minérale.

Encadreur: **Dr. BELAIDI. F** Maitre-assistante en Chimie analytique.

Année universitaire 2020 – 2021



Dédicaces

A NOS PARENTS

Vous nous avez appris à balbutier nos premières paroles, à faire nos premiers pas dans la vie, à sourire, vous avez fait tant de sacrifices pour notre éducation et nos études. Vous nous avez comblé par votre soutien et votre générosité.

Ces quelques lignes ne sauraient exprimer toute l'affection et l'amour que nous vous portons.

Aujourd'hui, nous déposons entre vos mains le fruit de votre patience et de vos innombrables sacrifices, soit-il l'exhaussement de vos vœux tant formulés et vos prières.

Puisse dieu vous prêter longue vie, avec bonne santé, afin que nous puissions vous combler.



Remerciements

A notre Présidente de jury : Docteur K . Arar

À notre maitre présidente de jury Dr K. Arar

Vous nous avez accordé un immense honneur et un grand privilège en acceptant la présidence de notre jury de thèse.

Nous vous remercions aussi pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu diriger ce travail.

Nous vous prions, cher Maitre, d'accepter dans ce travail le témoignage de notre haute considération, de notre profonde reconnaissance et de notre sincère respect.

A notre promotrice de thèse : Docteur F. Belaidi

Nous vous remercions vivement de nous avoir fait l'honneur de diriger ce travail sans jamais épargner aucun effort pour nous guider dans le chemin sinueux de la recherche.

Sans votre clairvoyance, vos corrections méticuleuses, ce travail n'aurait pu être préparé et dirigé dans des conditions favorables.

Nous n'oublierons jamais la gentillesse et la disponibilité dont vous avez fait preuve en nous accueillant en toutes circonstances.

Veillez cher Maître, trouvez dans ce travail l'expression de notre grande estime et nos sentiments les plus sincères.

A notre juge : Docteur A. Boucekchoukh

À notre maître et juge de thèse Dr A. Boucekchoukh; nous vous remercions de nous avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie de notre jury de thèse, nous vous exprimons nos profondes gratitudees et nos sincères remerciements.

Merci pour votre sympathie, votre gentillesse et votre disponibilité.



*Liste des
abréviations*

Liste des abréviations

- **AA** : acides aminés.
- **AAS** : acide acétylsalicylique.
- **Ac** : anticorps.
- **AD** : association déconseillée.
- **ADN** : Acide Désoxyribonucléique.
- **ADN-r** : ADN recombinant.
- **AINS** : anti-inflammatoires non stéroïdiens.
- **AMM** : l'Autorisation de Mise sur le Marché.
- **ANSM** : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé.
- **AVC** : Accident Vasculaire Cérébrale.
- **CCE** : circuit de circulation extracorporelle.
- **CD** : dichroïsme circulaire.
- **CI**: association contre-indiquée.
- **CQ** : contrôle de la qualité.
- **EFPIA** : Fédération européennes des associations de l'industrie pharmaceutique.
- **ELISA** : enzyme-linked immunosorbent assay - technique d'immunoabsorption par enzyme liée.
- **EMA** : European Medicines Agency- Agence européenne des Médicaments.
- **EP** : Embolie Pulmonaire.
- **FDA** : U.S Food and Drug Administration - agence americaine des médicaments et des produits alimentaires.
- **FTIR** : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.
- **HBPM** : l'héparine de bas poids moléculaire.
- **HPIC** : chromatographie ionique haute performance.
- **HPLC** : chromatographie liquide haute performance.
- **HPV** : Papillomavirus humain.
- **IA**: inta-artérielles.
- **IC** : chromatographie ionique.
- **ICH** : International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use – Conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain.

- **ICP** : intervention coronarienne percutanée.
- **IEC** : chromatographie échangeuse d'ions – Ion exchange chromatography
- **IEF** : focalisation isoélectrique - Iso-Electric Focussing.
- **IM**: intramusculaire.
- **IR** : insuffisance rénale.
- **IV**: intraveineuse.
- **GAG** : GlycosAminoGlycanes.
- **MALDI-TOF**: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight) - spectrométrie de masse à désorption / ionisation laser assistée par matrice.
- **MP** : matière première.
- **MS** : spectrométrie de masse – Mass spectroscopy.
- **MTEV** : la maladie thromboembolique veineuse.
- **NSTEMI** : d'un infarctus du myocarde sans élévation du segment ST.
- **OCDE** : l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques.
- **OGM** : Organismes génétiquement modifiés.
- **OMS** : l'Organisation Mondiale de la Santé – **WHO** : World Health Organization.
- **PA** : principe actif.
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction.
- **PD** : pharmacodynamique.
- **PF** : produit fini.
- **Ph. Eur.** : La Pharmacopée européenne.
- **PK** : pharmacocinétique.
- **PM** : poids moléculaire.
- **QSE** : Qualité Sécurité Efficacité.
- **RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire.
- **SAA** : La spectrométrie d'absorption atomique.
- **SC** : Sous-cutanée.
- **SCA** : Syndrome Coronarien Aigu.
- **SCR** : Substance chimique de référence.
- **SDS-PAGE** : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis.
- **SEC** : Chromatographie d'exclusion stérique – Size exclusion chromatography.
- **SRAS** : Syndrome respiratoire aigu sévère.
- **STEMI** : infarctus du myocarde avec sus-décalage (élévation) du segment ST.

- **TIH** : Thrombopénie induite par l'héparine.
- **TP** : taux de prothrombine.
- **TVP** : Thrombose veineuse profonde.
- **UE** : L'union européenne
- **US FD&C** : United States Food, Drug, and Cosmetic Act.



*Liste des
figures*

Liste des figures

Figure II.1: Karl Ereky	7
Figure II.4.1: histoire de développement de la biotechnologie	10
Figure III.1: La répartition des différentes classes des médicaments biologiques	11
Figure IV.1: Les Onze Couleurs de la Biotechnologie	15
Figure V.1: Worldwide prescription Drug & OTC Pharmaceutical Sales: Biotech vs Conventional Technology	16
Figure VI.1: Classification des produits biologiques	19
Figure VII.1: La production de protéines thérapeutiques via la technique de l'ADN-r ...	20
Figure VIII.1: Complexité des médicaments biologiques.....	21
Figure I.1.1: Place des guidelines ICH dans le procédé de fabrication.....	27
Figure II.1.1.1: Les Principaux paramètres physicochimiques à évaluer et les méthodes utilisées pour la caractérisation des MP des produits issus de la biotechnologie.....	32
Figure II.1.4.1: Hétérogénéité du mélange produit.....	34
Figure II.1.4.2 : Le profil de pureté des produits issus de la biotechnologie ainsi que les méthodes utilisées pour la détermination	36
Figure II.2.1.1.B.1 : Les différentes isoformes d'une protéine issue d'un même gène et les méthodes analytiques utilisés pour la détermination de leur distribution.....	38
Figure II.3.1: Etude de stabilité des médicaments issus de la biotechnologie et les méthodes analytiques utilisées.....	42
Figure II.4.1 : Les études de comparabilités lors du développement d'un biosimilaire par rapport au médicament de référence	44
Figure III.1: Formule moléculaire de l'énoxaparine sodique	51
Figure IV.1: Mécanisme d'action de l'énoxaparine.....	52
Figure II.1.1: Partie du spectre 1H RMN de l'héparine muqueuse porcine (spectre inférieur, rouge) et (spectre bleu supérieur) de l'héparine muqueuse bovine	60
Figure III.1: Schéma général du processus de fabrication des HBPM.....	62
Figure III.1.1: Description des étapes de procédé de fabrication des héparines	64
Figure III.2.1: La production des HBPM	65
Figure II.2.2: Le procédé de dépolymérisation utilisé pour obtenir l'énoxaparine.....	66
Figure I.1.1.1 : Le spectre RMN 13C de l'énoxaparine sodique	69

Figure I.1.2.1: Principe de l'identification B basée sur la digestion par l'héparinase de l'énoxaparine sodique	70
Figure I.1.2.2 : Chromatogramme des disaccharides d'énoxaparine produits par digestion enzymatique par les héparinases	73
Figure I.1.3.1 : Un chromatogramme représentatif de la CES du Lovenox®	78
Figure I.2.4.1 : Chromatogrammes HPLC typiques de: (a) L'étalon d'alcool benzylique (b) Echantillon de mélange réactionnel provenant de l'hydrolyse de l'héparine benzylate. (c) Un chromatogramme HPLC d'alcool benzylique avec le benzaldéhyde est donné à titre de comparaison	84
Figure II.1.2.1 : Spectre UV-visible de la solution de l'énoxaparine sodique	93
Figure II.2.1.1 : Graphe représentant la régression de l'absorbance par rapport aux logarithmes décimaux des concentrations des solutions échantillons et des solutions étalons	98
Figure II.4.3.1 : Graphe représentant la régression de l'absorbance par rapport aux logarithmes décimaux des concentrations des solutions échantillons et des solutions étalons	104
Figure II.4.6.1: Le principe de test de comptage de particules d'obscurité de la lumière	108
Figure II.2.1.1 : Spectres RMN de l'héparine contaminée	113
(A) Comparaison des régions carbonyl (i), sucre (ii) et N-acétyl (iii) des spectres RMN ¹ H de l'héparine standard, de l'héparine contenant du dermatane sulfate naturel et de l'héparine contaminée. Les signaux dus au contaminant sont mis en évidence par des astérisques.	
(B) Spectre issu de la spectroscopie de cohérence quantique unique hétéronucléaire de l'échantillon contaminé superposé à celui d'un échantillon d'héparine de contrôle.	
Figure III.2.2.1 : Analyse de quatre échantillons de l'héparine pour révéler les contaminants possibles par chromatographie liquide haute performance: Échantillons: (A) héparine sodique enrichie avec 10% de SD et 10% d'SCSS. (B) héparine sodique contaminée par SCSS enrichie avec 2,5% de DS. (C) Héparine sodique contaminée par SCSS. (D) L'héparine sodique disponible dans le marché	114
Figure VI.1 : Schéma représentant les études de comparabilités exigées lors du développement d'un biosimilaire de l'énoxaparine sodique	123

Figures des annexes

Figure 1: Le principe de l'IEC	132
Figure 2: Le principe de la CPG	133
Figure 3: Le principe de l'HPLC	134
Figure 4: Le principe de la SEC	135
Figure 5: Le principe de l'HPIC	136
Figure 6: Schéma de principe d'un spectromètre RMN	136
Figure 7: Schéma de principe du CD	137
Figure 8: Le principe de la MS	138
Figure 9: Le principe de la Spectroscopie UV-Vis	138
Figure 10: Le principe de la SAA	139
Figure 11: Le principe du CE	140
Figure 12: Le principe de la SDS-PAGE	141
Figure 13: Le principe de la cartographie peptidique	141
Figure 14: Le principe de l'IEF	142



*Liste des
tableaux*

Liste des tableaux

➤ Tableau V.1: Les 10 produits les plus vendus dans le monde en 2019	17
➤ Tableau VIII.1: Différences entre les médicaments chimiques et les médicaments biologiques	22
➤ Tableau II.2.1.1 : Les tests préconisés par la Ph. Eur. 8e Edition pour le contrôle physicochimique des produits finis des médicaments issus de la biotechnologie.....	41
➤ Tableau I.1: Renseignement sommaires sur L'énoxaparine sodique.....	49
➤ Tableau II.1: Composition des seringues préremplie	49
➤ Tableau II.2: Composition des flacons multidoses	50
➤ Tableau IX.1: Caractéristiques des HBPM selon la pharmacopée US 2010	56
➤ Tableau X.1: L'énoxaparine sodique: posologies et surveillance des traitements curatifs.....	57
➤ Tableau I.1.2.1: Le programme d'élution par gradient.....	72
➤ Tableau I.1.2.2 : Corrélation entre la rétention relative des pics des chromatogrammes obtenus avec les solutions d'énoxaparine dépolymérisée et réduite, par rapport au dérivé Δ IS réduit (temps de rétention = environ 30 min), et la masse moléculaire de ces dérivés de l'énoxaparine	75
➤ Tableau I.1.3.1 : La distribution de la masse moléculaire de l'énoxaparine sodique...	78
➤ Tableau I.2.1.2.1 : Les solutions témoins B	80
➤ Tableau I.2.6.1 : Les limites des solvants résiduels.....	86
➤ Tableau I.2.11.1 : Les limites de la contamination microbienne	89
➤ Tableau I.1 : Les identifications et les essais effectués sur la MP énoxaparine sodique	90
➤ Tableau II.2.1.1 : Les différentes solutions utilisées dans le dosage de l'activité anti-Xa	96
➤ Tableau II.2.1.2 : Préparation des solutions standards et des solutions d'essai	97
➤ Tableau II.2.1.3 : Résultats de l'absorbance par rapport aux logarithmes décimales des concentrations des solutions échantillons et des solutions étalons	98
➤ Tableau II.4.3.1 : Les différentes solutions utilisées dans le dosage de l'activité anti-IIa	102
➤ Tableau II.4.3.2 : Préparation des solutions standards et des solutions d'essai	103

➤ Tableau II.4.3.3 : Résultats de l'absorbance par rapport aux logarithmes décimales des concentrations des solutions échantillons et des solutions étalons	104
➤ Tableau II.1 : Les identifications et les essais effectués sur le PF énoxaparine sodique injection	109
➤ Tableau IV.1.1 : Les données de stabilité pour trois lots de validation d'énoxaparine sodique	116
➤ Tableau IV.1.2 : Les données de stabilité pour les lots de routine d'énoxaparine sodique	116
➤ Tableau IV.1.3 : Les spécifications et les critères d'acceptation des études de stabilité.....	117
➤ Tableau IV.1.4 : Les données de stabilité pour le lot 1.....	118



*Table des
matières*

Table des matières

Dédicaces	I
Remerciements	II
Liste des abréviations	V
Liste des figures	IX
Liste des tableaux	XIII
Table des matières	XVI
Introduction	1

Première partie: La Biotechnologie

Chapitre I : Généralités sur la Biotechnologie	5
I. Définition de la biotechnologie	6
II. Histoire des biotechnologies	8
II.1. Les prémices des biotechnologies « Proto-biotechnologie »	8
II.2. Biotechnologies intermédiaire (XIXe siècle)	9
II.3. Biotechnologies modernes (XXe siècle)	9
II.4. Biotechnologies de nos jours	10
III. Notions de Biomédicaments et de Biosimilaires	12
IV. Champs d'application de La Biotechnologie	14
V. Le Marché des Biomédicaments et des Biosimilaires	18
VI. Catégories de produits biologiques	20
VII. Processus de fabrication des médicaments issus de la biotechnologie	22
VIII. Complexité des médicaments biologiques	24

Chapitre I : Exigences réglementaires et contrôle de la qualité des médicaments issus de la biotechnologie	27
I. Exigences réglementaires des médicaments issus de la biotechnologie	29
I.1. Lignes directrices internationales ICH	29
I.2. Réglementation des médicaments issus de la biotechnologie au sein de l'Union Européenne	31

I.2.1. Guidelines de l'EMA	31
I.2.2. La pharmacopée Européenne	31
I.3. Réglementation des médicaments issus de la biotechnologie en dehors de l'Union Européenne	32
I.3.1. Organisation Mondiale de la Santé « OMS »	32
I.3.2. United States Food, Drug, and Cosmetic Act (US FD&C)	32
I.3.3. La pharmacopée Américaine ou The United States Pharmacopea (USP).	32
II. Contrôle de la qualité des médicaments issus de la biotechnologie	34
II.1. Contrôle des matières premières	34
II.1.1. Caractéristiques physicochimiques	34
II.1.2. Activité biologique	36
II.1.3. Propriétés immunochimiques	37
II.1.4. Pureté, impuretés et contaminants	37
II.1.4.1. Impuretés liées au produit	38
II.1.4.2. Impuretés et contaminants liés au procédé de fabrication	39
II.2. Contrôle du produit fini	41
II.2.1. Contrôle physicochimique	41
II.2.1.1. Identifications	41
A. Analyse des acides amines	41
B. Distribution des isoformes	41
C. Profile électrophorétique	38
II.2.1.2. Essais	39
A. pH	39
B. Détermination de l'eau	39
C. Impuretés et substances apparentés	39
D. Perte à la dessiccation	40
E. Sels inorganiques	40
F. Cendres sulfuriques	40
G. Activité biologique	40
II.2.1.3. Dosage	40
II.3. Etude de stabilité des médicaments issus de la biotechnologie	42
II.4. Les études de comparabilités lors du développement d'un biosimilaire	43

Deuxième partie: L'énoxaparine sodique

Chapitre I : Généralités sur l'énoxaparine sodique	46
I. Formes posologiques, présentations et conditionnement	48
II. Composition de la seringue / flacon d'énoxaparine sodique	49
III. Structure de l'énoxaparine sodique	50
IV. Mécanisme d'action de l'énoxaparine sodique	51
V. Indications de l'énoxaparine sodique	52
VI. Les effets indésirables de l'énoxaparine sodique	53
VII. Les interactions médicamenteuses	54
VIII. Contre-indications de l'énoxaparine sodique	55
IX. Précautions d'emploi de l'énoxaparine sodique	55
X. Surveillance biologique	57
Chapitre II : Le procédé de fabrication de l'énoxaparine sodique ...	58
I. Aspects réglementaires liés à l'approvisionnement du matériel de départ	59
II. Sources d'obtention de l'héparine	60
II.1. Sources porcines et bovines	60
II.2. Autres sources de mammifères	61
III. Processus de fabrication	61
III.1. La Production de l'héparine non fractionnée	62
III.2. La production des HBPM (Enoxaparine) à partir de l'HNF	65
Chapitre III : Le contrôle de la qualité physicochimique de l'énoxaparine sodique	67
I. Contrôle qualité de la matière première « Enoxaparine sodique »	68
I.1. Identifications	68
I.1.1. Identification A	68
I.1.2. Identification B.....	69
I.1.3. Identification C	76

I.1.4. Identification D	79
I.2. Essais	79
I.2.1. Aspect de la solution	79
I.2.1.1 La limpidité	79
A. METHODE VISUELLE	79
B. METHODES INSTRUMENTALES	80
I.2.1.2. Le degré de coloration	80
I.2.2. Le pH	81
I.2.3. L'absorbance spécifique	81
I.2.4. L'alcool benzylique	82
I.2.5. Chlorure de benzéthonium	85
I.2.6. Solvants résiduels “ méthanol et le chlorure de méthylène ”	85
I.2.7. Azote	86
I.2.8. Sodium	86
I.2.9. Perte à la dessiccation.....	87
I.2.10. Endotoxines bactériennes	87
I.2.11. La contamination microbienne	
II. Contrôle de la qualité du Produit Fini « Enoxaparine sodique injectable » ...	92
II.1. Identifications	92
II.1.1. Identification A	92
II.1.2. Identification B	92
II.1.3. Tests d'identification – Général	93
II.1.3.1. Sodium	93
II.2. Essais	94
II.2.1. Activité Anti-Facteur Xa	94
II.2.2. Le Rapport anti-facteur Xa / anti-facteur IIa	99
II.3. Autres Composants	99
II.3.1. La teneur en alcool benzylique	99
II.4. Les Tests Spécifiques	100
II.4.1. Le pH	100
II.4.2. Le Test des endotoxines bactériennes	100
II.4.3. Activité anti-facteur IIa	100

II.4.4. Le Contenu en sulfate libre	105
II.4.5. Les Tests de Stérilité	107
II.4.6. Les Particules dans les injections	108
III. Les impuretés	110
III.1. Les acides nucléiques et les protéines	110
III.1.1. Les impuretés nucléotidiques	110
III.1.2. Les impuretés protéiques	110
III.2. Sulfate de chondroïtine sursulfaté (SCSS)	111
III.2.1. Analyse par la spectroscopie RMN du proton (¹ H)	112
III.2.2. La Chromatographie Liquide Haute Performance	114
III.3. La galactosamine dans l'héxosamine totale	115
IV. Les études de stabilité de l'énoxaparine sodique	115
IV.1. Etudes de stabilité de la MP Enoxaparine sodique	115
IV.2. Etudes de stabilité du PF Enoxaparine sodique injectable	118
IV.2.1. Etude de stabilité anti-Xa de l'énoxaparine diluée pour usage pédiatrique	118
IV.2.1.1 L'objectif de l'étude	118
IV.2.1.2. Mode opératoire	119
IV.2.1.3. Les résultats	119
IV.2.1.4. Conclusion	119
IV.2.2. Compatibilité et activité de l'énoxaparine sodique en solution injectable de chlorure de sodium à 0,9% pendant 48 heures	120
IV.2.2.1 L'objectif de l'étude	120
IV.2.2.2. Mode opératoire	120
IV.2.2.3. Les résultats	120
IV.2.2.4. Conclusion	120
IV.2.3. L'étude de stabilité et de stérilité de la solution injectable d'énoxaparine 8 mg / mL	121
IV.2.3.1 L'objectif de l'étude	121
IV.2.3.2. Mode opératoire	121
IV.2.3.3. Les résultats	121
IV.2.3.4. Conclusion	121

V. Défis	122
VI. Etudes de comparabilité et de similitude	122
Conclusion	125
Résumés	127
Annexes	131
Références	143



Introduction

Introduction

La biotechnologie a permis de découvrir et de développer une nouvelle génération de médicaments qui traitent les pathologies graves avec une grande efficacité et peu d'effets secondaires, c'est le cas du cancer, de la sclérose en plaques ou de la polyarthrite rhumatoïde.

Un médicament issu de la biotechnologie est tout produit pharmaceutique fabriqué, extrait ou semi-synthétisé à partir de sources biologiques. Les produits biologiques peuvent être composés de sucres, de protéines, d'acides nucléiques ou de combinaisons complexes de ces substances.

Aujourd'hui, les médicaments biologiques occupent une part importante du marché global des médicaments, C'est de loin la partie de l'industrie qui connaît la croissance la plus rapide.

La chute de nombreux brevets de biomédicaments innovants dans le domaine public, à l'origine d'un chiffre d'affaires conséquent et attractif, a entraîné le développement de versions non innovantes appelées biosimilaires. De plus, en raison de la variabilité constante qui existe au sein d'un système biologique vivant, il est impossible de créer un biosimilaire identique. Puisque les biosimilaires ne sont pas identiques au médicament original qu'ils imitent, ils n'en sont pas des versions génériques.

Devant cette expansion des médicaments issus de la biotechnologie, les organismes réglementaires ont vu nécessaire d'élaborer des guidelines et des essais de contrôle de qualité permettant de réguler cet essor.

Une personne sur quatre dans le monde meurt des complications de la thrombose, ce qui en fait une des principales causes mondiales de décès et d'handicape motrice. Lorsqu'un caillot sanguin se forme dans une artère ou une veine, il peut entraîner une crise cardiaque, un accident vasculaire cérébral (AVC) ou un caillot potentiellement mortel dans les poumons ou la jambe, provoquant une thromboembolie veineuse (TEV).

Face à ce fléau, les industriels se sont penchés vers la production des anti-thrombotiques dont la classe la plus utilisée est les héparines, plus précisément les héparines de bas poids

moléculaire offrant ainsi plusieurs molécules efficaces au traitement de la maladie. Parmi ces molécules, l'énoxaparine est la plus largement utilisée.

Ce travail a pour objectifs, d'une part, de connaître l'importance de la biotechnologie moderne et de l'énoxaparine, et d'autre part, d'avoir un aperçu sur la méthode dont ces biomédicaments sont contrôlés sur le plan réglementaire et sur le plan contrôle de la qualité.

De ce fait, la première partie de ce travail aura comme objectifs de présenter le marché des médicaments biologiques et des biosimilaires, les principales différences entre les médicaments chimiques et biologiques, puis décrire la production des médicaments biologiques, la réglementation spécifique des biosimilaires mise en place en Europe ainsi que dans d'autres pays acteurs du marché et enfin leurs contrôles de la qualité.

La deuxième partie sera consacrée à l'établissement des différentes caractéristiques du produit Enoxaparine sodique, ainsi que le procédé par lequel cette molécule est produite, et enfin, les différentes étapes de son contrôles de la matière première au produit fini citées dans les monographies afin de prouver sa qualité.



Première partie
La Biotechnologie



Chapitre I

Généralités sur la Biotechnologie

I. Définition de la biotechnologie

La biotechnologie est un domaine qui recouvre l'ensemble des technologies et applications ayant recours à l'utilisation ou à la modification de matériaux vivants dans un objectif de recherche scientifique pour accroître les connaissances humaines, ou dans un objectif commercial afin de créer un produit ou un service.

De nombreuses organisations internationales se sont engagées à établir des définitions, traitant en particulier des incidences de la biotechnologie sur la santé, l'environnement, l'agriculture, le commerce, les aspects éthiques et socio-économiques; En 1982, un groupe d'experts a proposé une définition commune de la biotechnologie pour les pays membres de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques "OCDE", dans laquelle elle était considérée comme « **l'application de principes scientifiques et techniques au traitement de matériaux par des agents biologiques pour fournir des biens et des services** ». Cette définition est encore largement citée et reste la plus informative.

En 2005, les membres du Groupe ad hoc des statistiques de la biotechnologie de l'OCDE ont élaboré une définition unique de la biotechnologie: « **l'application de la science et de la technologie aux organismes vivants, ainsi qu'aux pièces, produits et modèles, celui-ci pour modifier des matériaux vivants ou non vivants pour la production de connaissances, des biens et des services** »^[1].

Selon l'article 2 de la Convention des Nations Unies sur la diversité biologique de 1992, la biotechnologie est définie comme: «**toute application technologique qui utilise des systèmes biologiques, des organismes vivants ou des dérivés de ceux-ci, pour fabriquer ou modifier des produits ou des procédés à usage spécifique** ».

La U.S Food and Drug Administration "FDA" définit la biotechnologie comme: « **l'application des systèmes biologiques et des organismes à des processus techniques et industriels** ».

L'Oxford English Dictionary définit la biotechnologie comme «**l'exploitation de processus biologiques à des fins industrielles et autres, en particulier la manipulation génétique de micro-organismes pour la production d'antibiotiques, d'hormones...etc**».

Le petit Larousse ILLUSTRÉ 2000 définit la biotechnologie comme: « **Technique produisant par manipulations génétiques des molécules biologiques ou des organismes transgéniques en vue d'applications industrielles (agroalimentaire, pharmacie, chimie ...etc) ».**

En 1996; Robbers et al. ont inventé une terminologie tout à fait nouvelle appelée *pharmaco-biotechnologie* afin de se référer spécifiquement à la large application de la biotechnologie au développement des produits pharmaceutiques ou de substances pharmaceutiquement actives. [2]

Toutefois, la définition de la biotechnologie est assez large qu'elle englobe les techniques ancestrales utilisées par l'homme depuis des siècles pour la fermentation ou la domestication des plantes et animaux. C'est pourquoi on identifie séparément les « biotechnologies modernes », issues du génie génétique après la découverte de l'Acide Désoxyribonucléique "ADN" en 1953 et aux innombrables recherches ultérieures qui en ont découlé.

II. Histoire des biotechnologies

Selon Robert Bud (*Science Museum London, UK*); Le terme «**Biotechnologie**» a été utilisé par **Karl Ereky** en 1919 dans un livre intitulé « *La biotechnologie de la viande, la graisse et la production de lait dans une agriculture à grande échelle* ». [3]

Pour Ereky: Le terme «biotechnologie» indique le processus par lequel les matières premières pourraient être améliorées biologiquement en produits socialement utiles.



Figure II.1: Karl Ereky

Même si le terme a été fondé en XX^{ème} siècle, l'Homme utilisait depuis des millénaires certains procédés biotechnologiques sans connaître ni comprendre les tenants et aboutissants.

Hormis la dimension de "contrôle" qui est récente, les biotechnologies sont beaucoup plus anciennes et datent des débuts de l'humanité.

II.1. Les prémices des biotechnologies « Proto-biotechnologie »

Il s'agit là d'une période caractérisée par une pratique purement empirique (et initialement magique) de ce que nous savons maintenant être les micro-organismes, sans connaissances théoriques. Cette période aura duré jusqu'au milieu du XIX^e siècle.

- **2000 A.J:** Fermentation de la bière (Egypte), la production de fromage (Sumer, Chine, Egypte).
- **500 A.J:** Premier antibiotique: caillé de soja moisi (tofu) utilisé pour traiter les furoncles (Chine).
- **100 A.J:** Premier insecticide: chrysanthèmes en poudre (Chine)
- **1797:** Première vaccination: Edward Jenner prélève du pus d'une lésion de la varicelle.

- **XVIII^{ème} siècle:** Développement de la pharmacie et de la préparation de composés chimiques; préparation artisanale par les pharmaciens. [4]

II.2. Biotechnologies intermédiaire (XIX^e siècle)

C'est la période de Pasteur et de ses successeurs, où sont découverts et étudiés les micro-organismes. Vient alors une nouvelle discipline qui est **la microbiologie**.

- **1822 -1895:** Travaux de Pasteur: naissance et développement de la microbiologie. Identification de microorganismes responsables des fermentations alcoolique et lactique.
- **1863:** découverte d'une méthode qui par le chauffage à une température donnée suffit à inactiver les microorganismes sans en dénaturer le goût: c'est la **Pasteurisation**.
- **1865:** Travaux de Mendel: mise en évidence des lois de l'hérédité. [5]

Toutes ces découvertes majeures au cours du XIX^e siècle ont permis de mieux comprendre cette discipline et va donner lieu à de nouveaux procédés et de nouvelles recherches sur le sujet.

II.3. Biotechnologies modernes (XX^e siècle)

C'est au début de cette période qu'on évoque enfin la notion de **biotechnologie** mais aussi les notions d'enzymes (zymase) et de coenzymes, de vitamines, de gènes et d'ADN.

Les biotechnologies modernes reposent sur une accumulation des connaissances théoriques (biochimie, biologie cellulaire et moléculaire) et sur des applications de plus en plus maîtrisées. La naissance de la biotechnologie moderne est associée au développement du génie génétique et des procédés de fabrication de la pénicilline à l'échelle industrielle.

- **1921:** Découverte de l'insuline par BANTING et BEST et dès les années suivantes production d'insuline par méthode extractive.
- **1928:** Alexander Fleming découvre l'antibiotique pénicilline par hasard lorsqu'il se rend compte que la moisissure *Penicillium* tue les bactéries.
- **1972 – 1974:** Création des premiers Organismes génétiquement modifiés (OGM) par Paul Berg et son équipe en réalisant la première molécule d'ADN recombinant "ADN-r".

- **1979:** Obtention pour la première fois de premier micro-organisme génétiquement modifié d'intérêt industrielle pour la production d'insuline, de l'hormone de croissance et d'interféron (1980) par l'entreprise Genentech.
- **1983:**Elaboration de la PCR (Polymerase Chain Reaction) qui permet de copier de manière importante une molécule d'ADN. [6]

Grâce à ces progrès, les biotechnologies permettent de produire aujourd'hui à grande échelle des hormones, des vaccins, des facteurs de coagulation du sang et des enzymes.

II.4. Biotechnologies de nos jours

Les biotechnologies modernes ont encore beaucoup à apporter pour lutter contre les maladies à venir. Mais avec le séquençage complet du génome humain depuis l'an 2000, on entre dans une nouvelle ère où les expérimentations portent entre autre sur les thérapies géniques.

Cependant, cela pose évidemment des soucis, notamment au niveau de l'éthique de ces expériences, du point de vue de la légalité et toujours sur les brevets pour protéger et encourager la recherche sur les biotechnologies. [7]

- **2003:** Le virus du SRAS (syndrome respiratoire aigu sévère) est séquencé trois semaines après sa découverte.

Le SRAS, qui a commencé en Chine, se propage rapidement et sème la peur dans tout l'Extrême-Orient et dans le monde. Les derniers cas signalés sont survenus en 2004 et résultaient d'infections acquises en laboratoire.

- **2006:** Un vaccin recombinant contre le papillomavirus humain (HPV) reçoit l'approbation de la FDA. [8]

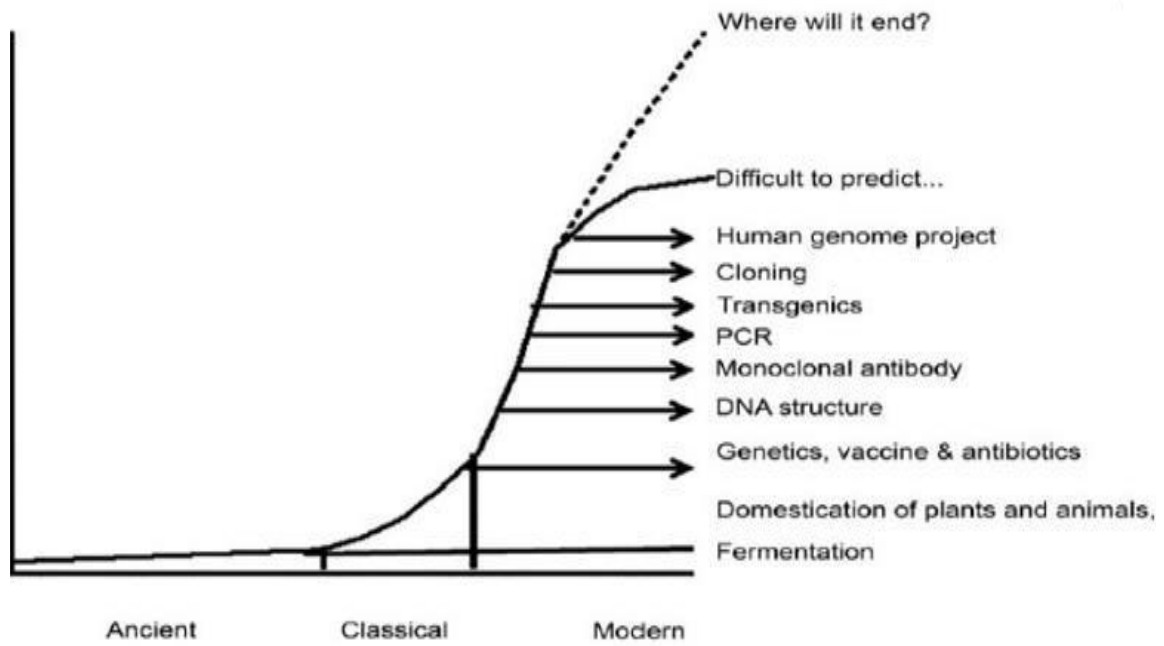


Figure II.4.1: histoire de développement de la biotechnologie [9].

III. Notions de Biomédicaments et de Biosimilaires

Les médicaments peuvent être fabriqués de deux façons. Ils peuvent être de provenance chimique ou biologique; ceux de provenance chimique sont des médicaments dont le principe actif découle de la synthèse chimique, donc à partir de matière non vivante. Les **médicaments de provenance biologique** proviennent d'organismes vivants ou de leurs cellules, d'où apparaît la notion de "biomédicament" qui est un produit biotechnologique, pharmaceutiquement actif et synthétisé par une source biologique (cellule vivante) ou extraite d'elle, et non obtenue par la chimie de synthèse. Ceci inclut des protéines (par exemple hormones, cytokines, anticorps, vaccins ... etc.) et des glycanes (anticoagulants tels que les héparine), c'est-à-dire des macromolécules généralement très complexes (par leur formule chimique, leur taille et configuration spatiale). [10]

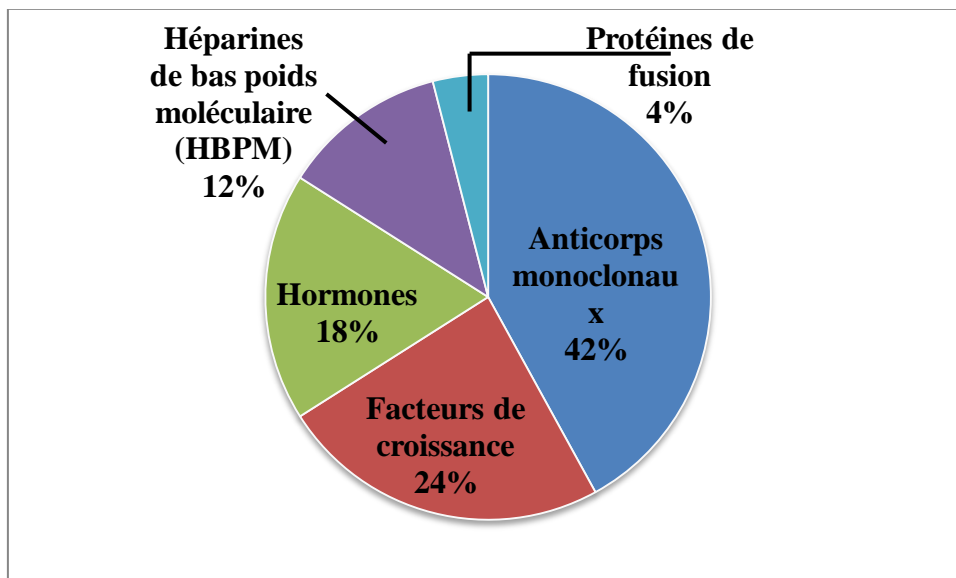


Figure III.1: La répartition des différentes classes des médicaments biologiques. [11]

Selon la FDA un biomédicament est: « un produit biopharmaceutique, également connu sous le nom de produit biologique est un produit pharmaceutique fabriqué, extrait ou semi-synthétisé à partir de sources biologiques. Différent des produits pharmaceutiques totalement synthétisés, ils peuvent être composés de sucres, de protéines ou d'acides nucléiques ou d'une combinaison de ces substances. Ils peuvent également être des entités vivantes, telles que des cellules et des tissus » [12].

Le Code de la Santé Publique de la France définit par l'article L.5121-1 les médicaments biologiques ou biomédicaments comme **“tout médicament dont la substance active est produite à partir d'une source biologique ou en est extraite et dont la caractérisation et la détermination de la qualité nécessitent une combinaison d'essais physiques, chimiques et biologiques ainsi que la connaissance de son procédé de fabrication et de son contrôle”** [13].

Les biosimilaires sont des produits ayant montré leur similarité avec le traitement biologique de référence, selon un cahier des charges strict imposé par les agences d'enregistrement, la FDA et l'EMA (European Medicines Agency). Leur développement et leur utilisation sont justifiés par le coût très élevé des biomédicaments. Le trastuzumab a marqué l'histoire des traitements du cancer du sein, quatre biosimilaires étant désormais disponibles pour une utilisation en routine.

Selon l'article L.5121-1 15° du code de la santé publique de la France:« **Un médicament biosimilaire est un médicament biologique de même composition qualitative et quantitative en substance active et de même forme pharmaceutique qu'un médicament biologique de référence mais qui ne remplit pas les conditions pour être regardé comme une spécialité générique en raison de différences liées notamment à la variabilité de la matière première ou aux procédés de fabrication et nécessitant que soient produites des données précliniques et cliniques supplémentaires dans des conditions déterminées par voie réglementaire** ». [14]

Le médicament biosimilaire est défini par l'OMS comme« **un produit biologique qui est similaire en terme de qualité, de sécurité et d'efficacité à un produit biologique de référence déjà autorisé**». [15]

IV. Champs d'application de La Biotechnologie

Devant les innombrables et intéressants champs d'étude de la biotechnologie, des industriels et certains laboratoires ont proposé de classer les biotechnologies en catégories qui suivent les couleurs de l'arc-en-ciel:

➤ **La biotechnologie verte** ou biotechnologie végétale recouvre tous les procédés biotechnologiques du secteur agricole. Plantes transgéniques et OGM, antioxydants, culture fruitière et maraîchère (techniques de culture), levure et bactéries transgéniques (utilisées pour la fermentation du vin et de la bière), bioréacteurs (systèmes qui maintiennent un milieu biologiquement vivant) ou agents insecticides, sont quelques exemples des nombreux domaines englobant la biotechnologie verte.

➤ **La biotechnologie bleue** est la biotechnologie relative à la mer et aux océans, à l'exploration et à l'exploitation des organismes marins. Additifs et colorants pour l'alimentation, nutraceutiques pour le traitement de l'arthrite ou l'amélioration de la mémoire, compléments alimentaires, cosmétiques et crèmes rajeunissantes en sont quelques applications.

➤ **La biotechnologie blanche** est liée au secteur industriel. Les procédés catalysés par des enzymes pour augmenter la rapidité de l'obtention de produits constituent la biotechnologie blanche. L'exemple le plus connu est celui du procédé d'Haber-Bosch pour l'obtention de l'ammoniaque; ou le « bio-pulping », le traitement aux enzymes xylanases pour prévenir la formation de dérivés toxiques dans la lignine pour la fabrication du papier.

➤ **La biotechnologie rouge** ou biotechnologie sanitaire est celle qui rassemble les procédés bio-sanitaires dont le but est de soigner des maladies à travers la modification de gènes défectueux à partir, par exemple, de l'insertion de gènes remplaçant ceux qui sont endommagés. On inclut dans cette branche la découverte de nouveaux médicaments et vaccins (grâce à la mise en place de la nanotechnologie dans la médecine et à la pharmacogénétique), la médecine régénératrice (avec la génie tissulaire), la thérapie génique et les nouvelles techniques d'analyse et de diagnostic.

➤ **La biotechnologie grise** se concentre sur les écosystèmes et les sciences de l'environnement. Il s'agit de la décontamination des sols et des gaz polluants, l'épuration et

l'assainissement des eaux résiduelles, le maintien de la qualité de l'air, le recyclage de produits vivants comme inertes et l'élimination de métaux lourds, hydrocarbures et espèces dégradants la biosphère. Elle a pour but la soutenabilité entre personnes et écosystèmes grâce à de nouveaux procédés biotechnologiques d'origine énergétique et microbiologique à partir de l'utilisation d'êtres vivants tels que des champignons, algues et plantes.

➤ **La biotechnologie marron**, très proche de la biotechnologie grise, concerne le traitement des sols arides et désertiques à partir d'espèces hautement résistantes aux sols salins et secs.

➤ **La biotechnologie dorée** recouvre tout ce qui est en lien avec la bioinformatique, tant concernant les logiciels que le matériel informatique, utilisés pour les analyses de données dans les procédés biologiques. Ses usages sont infinis: recherche d'amorces, séquences de péptides, recherche de mutations de l'ADN, de transcriptions erronées de l'ADN ou d'analyses phylogénétiques (relations évolutives entre différentes espèces).

➤ **La biotechnologie noire** est liée au bioterrorisme et aux guerres biologiques. Il s'agit des recherches sur les micro-organismes pathogènes, virulents et résistants, pour les convertir en armes biologiques ou neutraliser leurs effets nocifs (les bactéries *Bacillus anthracis* ou *Coxiella burnetii*, par exemple, peuvent être à l'origine de maladies mortelles au niveau pulmonaire).

➤ **La biotechnologie violette** recouvre l'étude des aspects légaux qui entourent cette science: mesures de sécurité telles que la protection des données du patient, les brevets (régulation juridique), les problèmes bioéthiques et de législation. Les recherches récentes ainsi que les formes innovantes de progrès redéfinissent les principes moraux et éthiques: procréation médicalement assistée, thérapie génique de la lignée germinale, recherches sur les animaux ou clonage.

➤ **La biotechnologie jaune**, domaine émergent, représente l'industrie alimentaire. Les huiles culinaires sont formées par des acides gras dont l'étude vise à réduire la saturation. Cela concerne également les acides gras saturés, d'origine animale principalement, et les acides gras insaturés. Elle concerne également l'étude des procédés d'hydrogénation qui provoquent des maladies cardiovasculaires; ou l'élaboration d'aliments modifiés par

augmentation des apports caloriques et supplément de vitamines dans les pays en voie de développement, pour combattre, de manière rapide et efficace, la malnutrition infantile.

➤ **La biotechnologie orange** c'est le domaine de divulgation de la biotechnologie. Son enseignement émerge avec force dans les centres universitaires du monde entier. Les connaissances qu'elle apporte et son intégration interdisciplinaire la convertissent en une technologie destinée à offrir des biens et des services et à satisfaire nos nécessités dans un futur que l'on peut déjà appeler présent.^[16]



Figure IV.1: Les Onze Couleurs de la Biotechnologie.

V. Le Marché des Biomédicaments et des Biosimilaires

Une nouvelle économie du biomédicament prend de plus en plus d'importance, remodelant le paysage de l'industrie pharmaceutique mondiale et redéfinissant les systèmes et les pratiques de soins.

Dans un monde dont les besoins en matière de santé évoluent tant quantitativement que qualitativement et au sein d'une industrie pharmaceutique en mutation, les biotechnologies et les biomédicaments qui en sont issus apparaissent de plus en plus sur le devant de la scène, focalisant tous les enjeux et les espoirs de guérison clinique mais aussi de croissance économique et de compétitivité internationale.

40 ans c'est l'âge de l'industrie des biotechnologies. Depuis les années 1980, ce sont plus de 350 millions de patients qui ont pu être traités grâce aux quelque 250 produits issus des biotechnologies déjà commercialisées.

L'innovation biologique se substitue donc peu à peu à l'innovation chimique. Les biomédicaments sont à l'heure actuelle reconnus comme le principal moteur de la croissance du marché pharmaceutique et l'un des moyens, avec les opérations de restructuration, de renforcer le positionnement stratégique et la compétitivité des grands groupes.^[17]

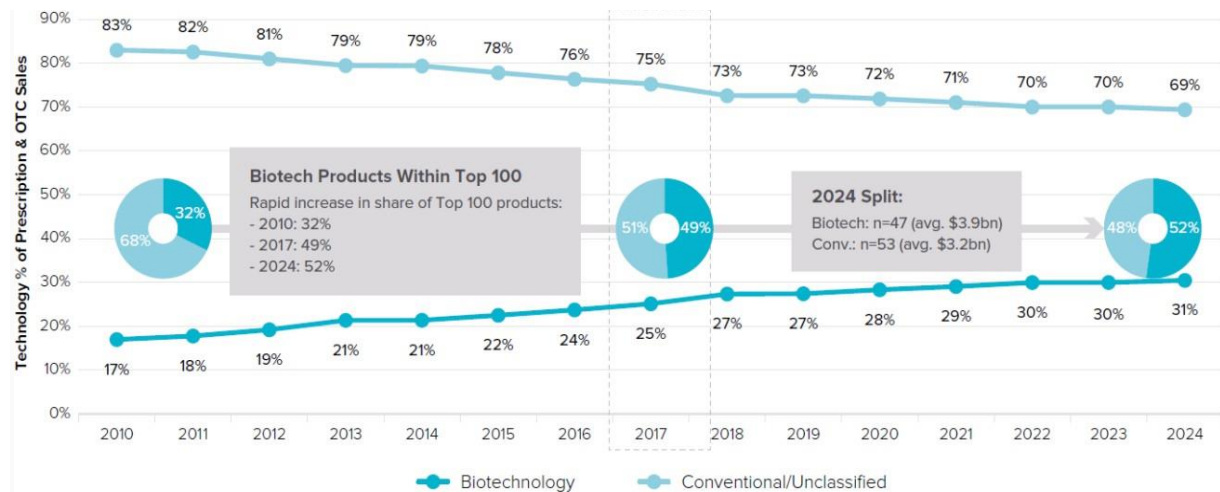


Figure V.1: Worldwide prescription Drug & OTC Pharmaceutical Sales: Biotechvs.Conventional Technology.

La Figure V.1 représente l'évolution des proportions de ventes des médicaments biologiques au sein des ventes totales de médicaments soumis à prescription médicale et en vente libre, au niveau mondial. Elle met en évidence la croissance prévisible du marché des médicaments biologiques dans le monde, entre 2010 et 2024. En 2017, les médicaments biologiques représentent 25% des ventes de médicaments, et correspondent à 49% du top 100 médicaments les plus vendus. Il est estimé qu'en 2024 les médicaments biologiques représenteront 52% du top 100 médicaments les plus vendus avec 31% des parts de marché. [18]

Parmi les biomédicaments, certains utilisés dans des pathologies répandues sont parmi les médicaments les plus vendus. Ainsi, selon les données de la société IQVIA, **sur les 10 produits les plus vendus dans le monde en 2019, on retrouve 5 biomédicaments** (en rouge dans le tableau V.1 ci-dessous).

Tableau V.1: Les 10 produits les plus vendus dans le monde en 2019.

Rang	Produit	Classe	Part de marché mondial en 2019
1	HUMIRA® (adalimumab)	Immunosuppresseur	2,4%
2	ELIQUIS® (apixaban)	Anticoagulant	1,2%
3	KEYTRUDA® (pembrolizumab)	Anticancéreux	1,0%
4	XARELTO® (rivaroxaban)	Anticoagulant	0,9%
5	LANTUS® (insuline glargine)	Antidiabétique	0,9%
6	ENBREL® (étanercept)	Immunosuppresseur	0,9%
7	STELARA® (ustékinumab)	Immunosuppresseur	0,8%
8	OPDIVO® (nivolumab)	Anticancéreux	0,7%
9	JANUVIA® (sitagliptine)	Antidiabétique	0,7%
10	TRULICITY® (dulaglutide)	Antidiabétique	0,7%

VI. Catégories de produits biologiques

Le secteur de la santé fait de plus en plus appel aux biotechnologies pour découvrir, tester et produire de nouveaux traitements, ex: vaccins, protéines recombinantes, anticorps monoclonaux, thérapie cellulaire et génique, vecteurs viraux, les anticoagulants ... etc. Les biotechnologies sont également très utilisées pour diagnostiquer et pour mieux comprendre les causes des maladies. On cite:

✓ LES HORMONES

- Hormone de croissance: Somatotropine
- Hormone de la stérilité féminine: la FSH et la LH recombinante
- La TSH (thyreostimuline hormone)
- l'Insuline.

✓ LES ANTICORPS MONOCLONAUX

- Traitement du cancer, de la polyarthrite rhumatoïde, du psoriasis.
- Le rejet de transplantation.

✓ LES CYTOKINES BIOSYNTHETIQUES et médicaments agissant sur les cytokines

- Ciclosporine et Tacrolimus: immunosuppresseur
- Interleukine -2 humaine recombinante
- Interférons recombinants (sclérose en plaque, traitement des hépatites)
- Erythropoietine: traitement de l'anémie des insuffisants rénaux chroniques

✓ LES ENZYMES

- Utilisés principalement dans le domaine de l'hématologie eg: Streptokinase, altérase.

✓ LES Biomédicaments de la coagulation

- Facteur de la coagulation obtenu par génie génétique

✓ LES Vaccins Recombinants

- Ils font partie des premiers biomédicaments.[¹⁹]

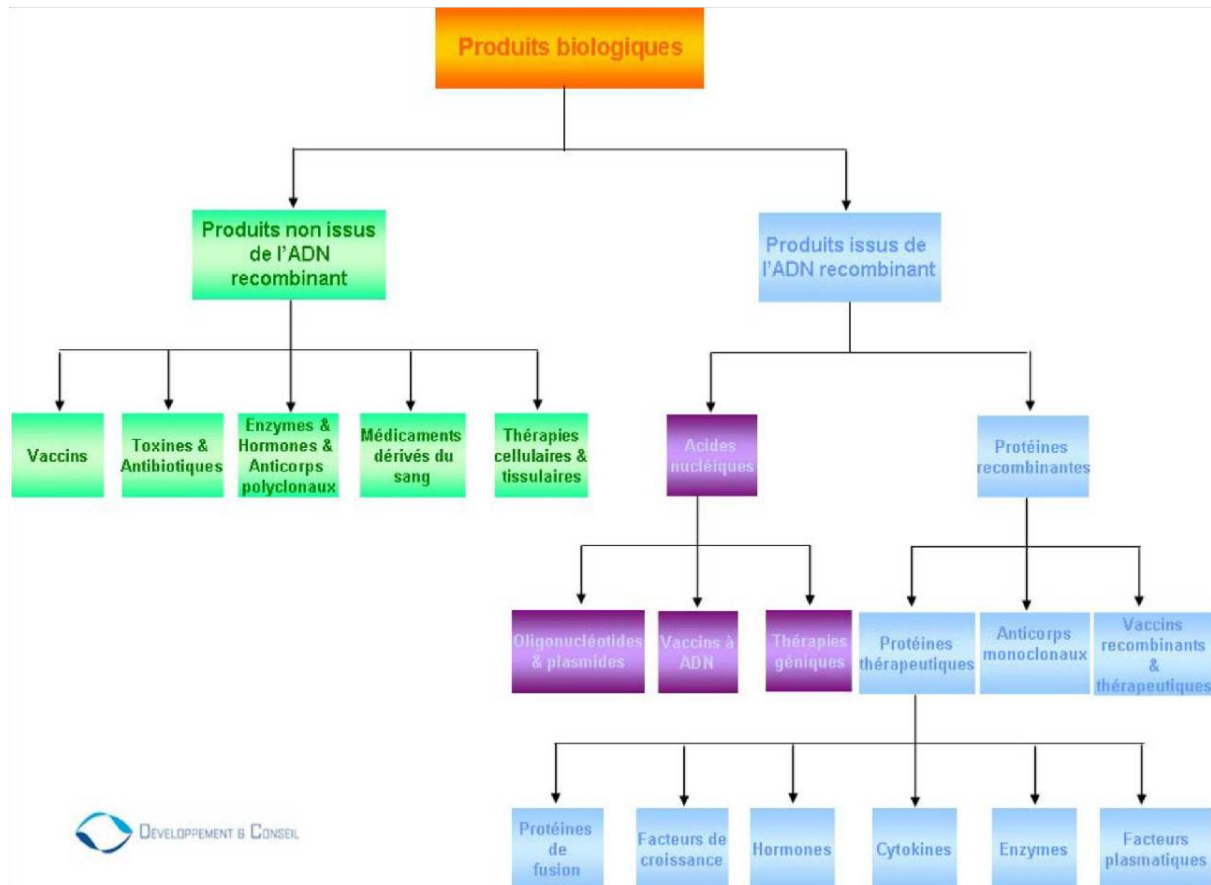


Figure VI.1: Classification des produits biologiques.

VII. Processus de fabrication des médicaments issus de la biotechnologie

En raison des caractéristiques des biomédicaments (grande taille, structure complexe...), ils ne peuvent être produits par synthèse chimique.

La technologie prédominante en biotechnologie depuis les années 1980 à ce jour reste la technologie ADN-r: C'est par l'utilisation d'organismes vivants (micro-organismes ou cellules) qu'ils vont être obtenus, en y introduisant un gène et en le faisant s'exprimer, qui a été le processus utilisé pour créer plus de 60 produits.[²⁰]

Le processus de fabrication va comporter de multiples étapes:

La première étape consiste en l'obtention d'un clone cellulaire de production qui a intégré le gène codant pour la protéine d'intérêt. Pour ce faire, il va d'abord y avoir sélection du gène d'intérêt, qui sera introduit dans un vecteur (on parle de « vectorisation ») tels qu'un plasmide, un virus, un chromosome artificiel...etc, pour le transférer dans le système d'expression (cellule, bactérie...).

Les systèmes ayant intégré le gène d'intérêt vont être sélectionnés et amplifiés par culture cellulaire afin de constituer des banques de cellules qui ne comportent que les clones cellulaires sélectionnés. Ensuite, ces banques vont subir des expansions successives pour arriver à une masse cellulaire suffisante en bioréacteur, afin de rendre possible la production de la protéine d'intérêt.

Le milieu de culture va être récolté, et la protéine d'intérêt est séparée des débris cellulaires grâce à des techniques de centrifugation et de filtration. La protéine est ensuite purifiée par des techniques chromatographiques, afin d'assurer une pureté finale proche de 99,5 %.

La substance active purifiée est finalement mise sous forme pharmaceutique avec des excipients assurant la stabilité et la biodisponibilité du médicament, ainsi que le maintien de sa qualité tout au long de sa vie.[²¹]

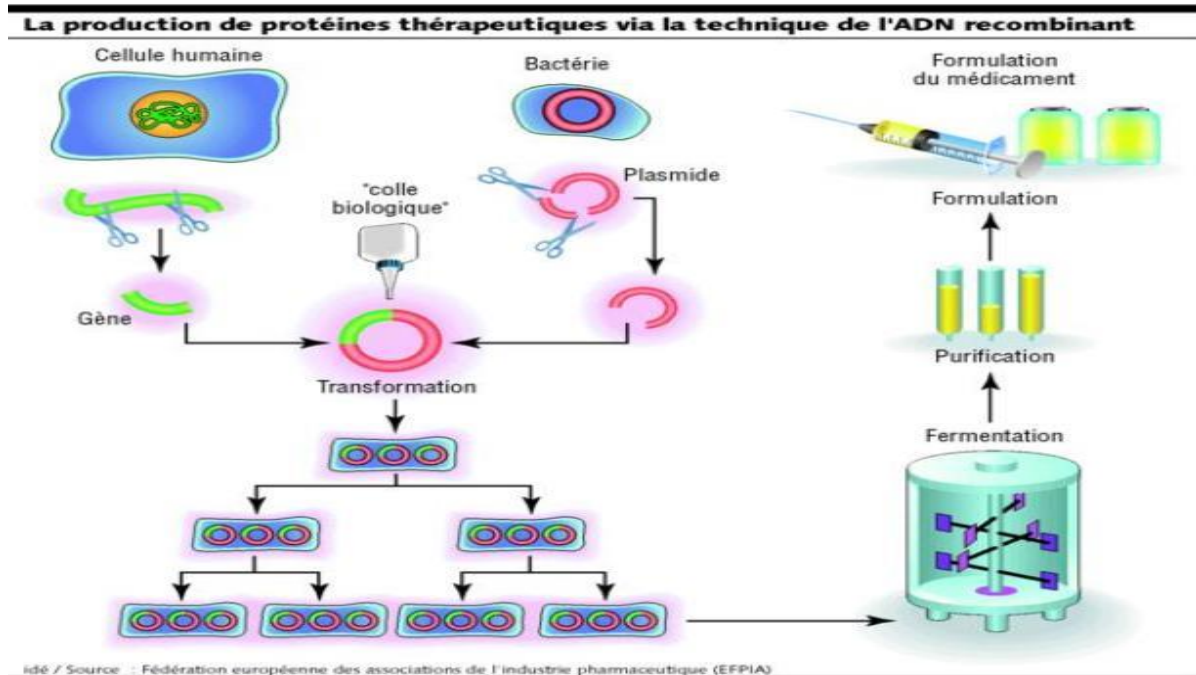


Figure VII.1: La production de protéines thérapeutiques via la technique de l'ADN-r

VIII.Complexité des médicaments biologiques

Les médicaments biologiques sont des molécules complexes et de taille importante comme le montre la figure VIII.1 (ci-dessous). Le poids moléculaire de l'Aspirine® est de seulement 180 Dalton, il s'agit d'une toute petite molécule comparée à un anticorps monoclonal dont le poids moléculaire atteint environ les 150 000 Dalton.

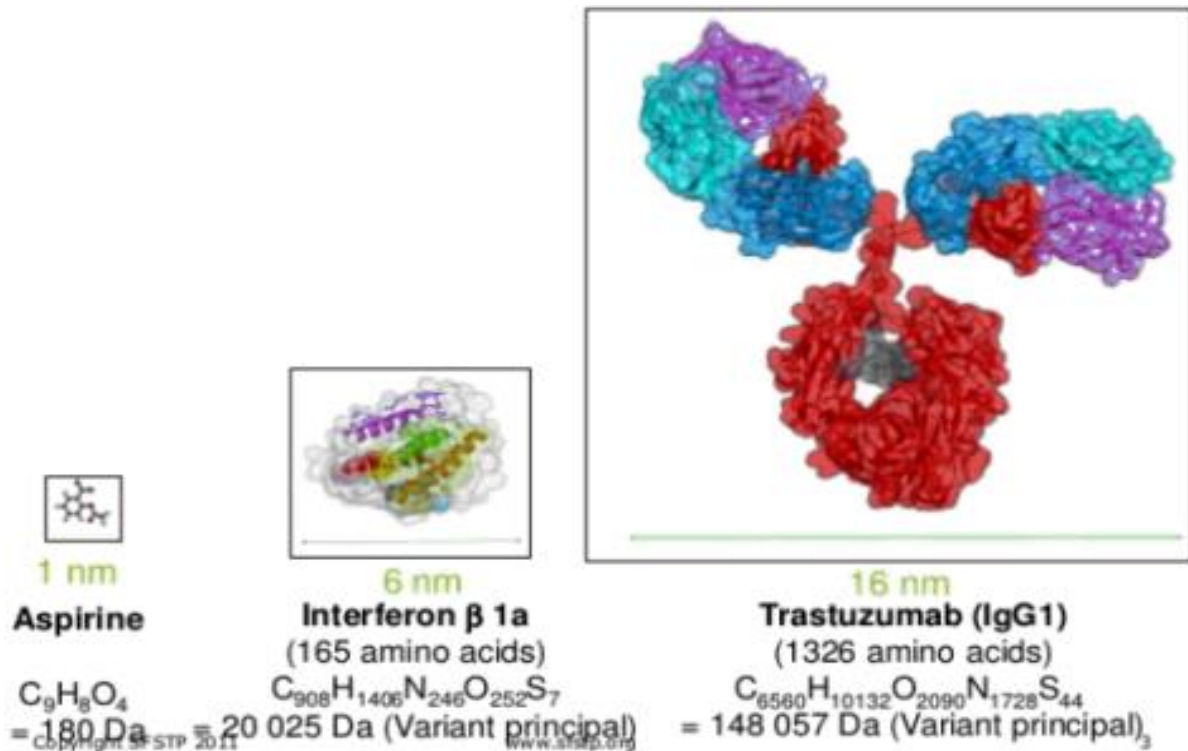


Figure VIII.1: Complexité des médicaments biologiques.

Contrairement aux molécules chimiques, les médicaments biologiques sont des molécules très complexes, difficiles à caractériser, avec une variabilité importante et un procédé de production complexe (Tableau VIII.1 ci-dessous). [22]

Tableau VIII.1: Différences entre les médicaments chimiques et les médicaments biologiques.

Caractéristiques	Médicaments chimiques	Médicaments biologiques
Structure	Simple	Complexe
Taille	Petite, bas poids moléculaire	Grande, haut poids moléculaire
Facilité de caractérisation	Facilement caractérisé	Caractérisation complète difficile
Procédé de fabrication	Simple, prédictible, contrôlé, réactions chimiques organiques connues	Complexe, impliquant des systèmes vivants
Pureté et stabilité du produit	Haute pureté et stabilité	Produit hétérogène avec de nombreuses impuretés, vulnérable aux facteurs environnementaux et impropre à la manipulation
Immunogénicité	Faible	Haute

La complexité de la production réside dans le fait que les médicaments biologiques sont produits à partir de systèmes biologiques vivants, comme par exemple des cellules, tissus ou animaux et qu'elle utilise la technologie de l'ADN-r consistant à manipuler le génome.

La synthèse chimique permet d'obtenir facilement une population homogène et reproductible contrairement à un système de production biologique. Les molécules obtenues à partir du système du vivant sont hétérogènes, le procédé n'est pas facilement reproductible et

apporte de nombreuses impuretés. Les matières premières ainsi obtenues sont de composition et de qualité plus variables. Aujourd'hui, les techniques issues des biotechnologies ne sont pas aussi bien connues et maîtrisées que la chimie classique à l'origine de la plupart de nos médicaments, comme l'Aspirine®.

De plus, lors de la levée du brevet du médicament biologique de référence, le procédé de fabrication n'est souvent pas rendu public par la firme pharmaceutique et reste confidentiel, ce qui rajoute une difficulté à la complexité de cette étape. Les fabricants de biosimilaires sont alors obligés d'identifier eux-mêmes les modalités de fabrication et de contrôle de leur produit qui revendique le statut de similaire à un produit de référence. Il est alors plus compliqué de créer une "copie" de haute qualité lorsque le procédé de fabrication n'est pas connu.

Par ailleurs, les connaissances actuelles en analyse physico-chimique et biologique ne permettent pas non plus de caractériser aussi facilement et précisément les molécules biologiques que les molécules thérapeutiques chimiques, plusieurs méthodes doivent souvent être combinées pour analyser un même critère de qualité.

Par conséquent, du fait de la complexité des produits biologiques et de leur procédé de fabrication, de la variabilité des matières premières et de la difficulté d'analyse, il est "impossible" pour un fabricant de produire une "copie identique" à un médicament biologique de référence comme l'est un générique à sa référence. [23]



Chapitre II

Exigences réglementaires

et

contrôle de la qualité

des médicaments issus de la biotechnologie

Les médicaments biosimilaires sont des produits biothérapeutiques dont la qualité, la sécurité et l'efficacité sont similaires aux produits biothérapeutiques de référence précédemment enregistrés [24]. La méthode de production exacte du produit biologique de référence n'étant pas connue, différents procédés sont principalement utilisés dans la production de médicaments biosimilaires.

Le moindre changement à n'importe quelle étape de la production peut entraîner des différences dans le produit, donc chaque facteur qui peut affecter la production doit faire l'objet de contrôle (la cellule hôte et le vecteur d'expression, les banques cellulaires et les milieux de culture, pH, température ... etc) [25] [26] [27].

Les principales sources internationales pour les méthodes de CQ des produits biopharmaceutiques peuvent être données sous forme de pharmacopées [28] ; parmi eux, la pharmacopée européenne, la pharmacopée des États-Unis, la pharmacopée britannique et la pharmacopée japonaise sont les plus acceptées.

I. Exigences réglementaires des médicaments issus de la biotechnologie

La nature, la variabilité ainsi que la complexité de la fabrication et du CQ des médicaments issus de la biotechnologie, la procédure d'enregistrement allégée particulière aux génériques ne peut être appliquée aux médicaments biosimilaires. En effet, cette procédure est adaptée à des molécules chimiques bien définies dont la science est maîtrisée et facilement reproductible, mais dans le cas des biomédicaments, elle induirait le risque de voir apparaître sur le marché des produits trop variables par rapport à la référence et donc un risque sur la santé du patient.

La mise en place d'une réglementation spécifique aux biosimilaires, distincte de celle des médicaments classiques et plus poussée, a donc été nécessaire pour encadrer l'enregistrement et garantir la mise sur le marché de produits de qualité, de sécurité et d'efficacité (QSE) démontrés.

I.1. Lignes directrices internationales ICH

Le conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain (ICH) a été créé dans le but de définir des normes à appliquer pour l'enregistrement de nouveaux médicaments. L'ICH a publié 7 lignes directrices (ou guidelines) concernant le CQ des produits issus de la biotechnologie :

- *Q5A(R1) Evaluation de la sécurité virale des produits biotechnologiques dérivés des lignées cellulaires d'origine humaine ou animale.*

- *Q5B Analyse de la construction d'expression dans les cellules utilisées pour la production de produits protéiques dérivés de l'ADN recombinant*

- *Q5C Etudes de stabilité des produits biotechnologiques/biologiques*

- *Q5D Dérivation et caractérisation des substrats cellulaires utilisés pour la production des produits biotechnologiques/biologiques*

- Q5E Comparabilité des produits biotechnologiques/biologiques sous réserve de modifications dans leur procédé de fabrication
- Q6B Méthodes analytiques et critères d'acceptation pour les produits biotechnologiques/biologiques
- S6(R1) Evaluation préclinique de la sécurité des produits pharmaceutiques issus des biotechnologies. [29]

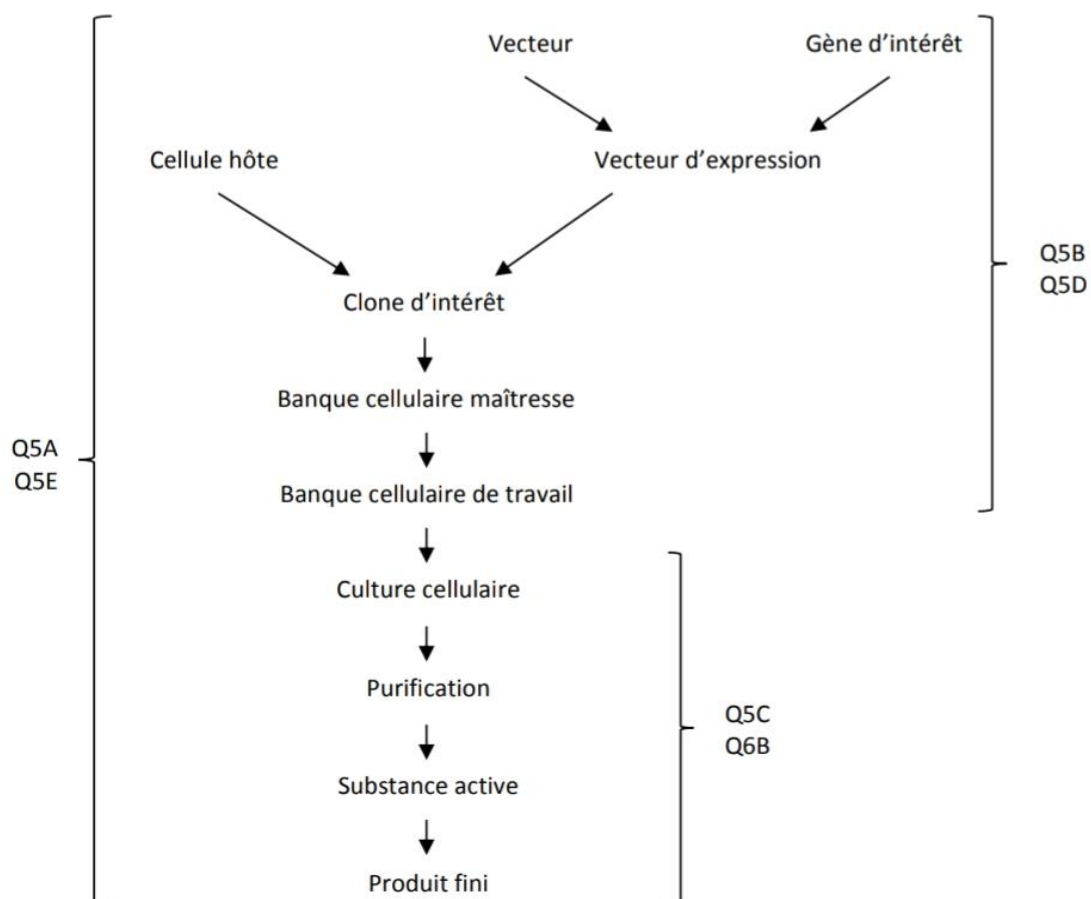


Figure I.1.1 : Place des guidelines ICH dans le procédé de fabrication. [30]

I.2. Réglementation des médicaments issus de la biotechnologie au sein de l'Union Européenne

L'Europe a été la première dans le monde à élaborer un cadre réglementaire pour les médicaments biologiques similaires appelés plus communément biosimilaires. C'est la Directive 2001/83/EC, amendée par la Directive 2004/27/EC, qui introduit le concept de médicament biologique similaire à un médicament de référence. Elle donne une définition importante du médicament biosimilaire le différenciant du médicament générique. [31]

I.2.1. Guidelines de l'EMA

C'est en octobre 2005 que prend effet la première guideline concernant les biosimilaires en Europe intitulée "**Similar biological medicinal products**". L'objectif de cette guideline est d'introduire le concept de médicament biologique similaire et de définir les principes généraux à appliquer pour l'enregistrement de ces médicaments. Elle est suivie ensuite en 2006 par des guidelines portant sur la qualité et les données non cliniques et cliniques des biosimilaires.

La guideline "**Similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues**" a pour objectif d'établir les exigences en termes de qualité pour les médicaments biologiques similaires concernant l'exercice de comparabilité à un médicament biologique de référence.

En 2008 entre en application la guideline "**Immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins**" pour fixer des recommandations générales à appliquer pour la réalisation de l'évaluation de l'immunogénicité des biosimilaires en vue de l'obtention de l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). [32].

I.2.2. La pharmacopée Européenne

De nos jours, les produits biologiques sont également préparés à l'échelle industrielle et soumis à des critères de qualité comparables à ceux qui s'appliquent aux médicaments chimiques, donc ils font l'objet de monographies. D'important travaux ont également été engagés sur les produits issus de la biotechnologie ; c'est ainsi qu'ont été publiées dès la 4^{ème}

édition de la Ph. Eur ; c'est le cas de Filgrastim, une forme recombinante du facteur de croissance hématopoïétique spécifique de la lignée granulocytaire.[³³].

I.3. Réglementation des médicaments issus de la biotechnologie en dehors de l'Union Européenne

I.3.1. Organisation Mondiale de la Santé « OMS »

L'OMS a publié en 2009 une guideline sur les biosimilaires intitulée “**WHO Guidelines on Evaluation of Similar Biotherapeutic Products**” afin de faciliter l'harmonisation mondiale de la réglementation des biosimilaires. L'approche de l'OMS est identique à celle de l'EMA.[³⁴]

I.3.2. United States Food, Drug, and Cosmetic Act (US FD&C)

Aux Etats-Unis, les molécules chimiques sont réglementées par le *Food, Drug, and Cosmetic Act* tandis que les molécules biologiques sont réglementées par le *Public Health Service Act*. Mais, historiquement, quelques petites molécules biologiques comme la somatropine, l'insuline ou le glucagon ont été approuvées par la FDA sous la section 505 du FD&C Act. [³⁵]

I.3.3. La pharmacopée Américaine ou The United States Pharmacopeia (USP)

L'USP établit des normes pour les biomédicaments utilisées par les organismes de réglementation et les fabricants pour aider à garantir que ces produits ont l'identité appropriée, ainsi que l'efficacité, la qualité et la sécurité. Elle contient tout un chapitre concernant les produits issus de la biotechnologie intitulé “<1045> **Biotechnology-derived articles**”, ainsi que des monographies spécifiques aux différents médicaments issus de la biotechnologie. [³⁶]

Les biosimilaires, comme d'autres produits biologiques, nécessitent une surveillance réglementaire efficace pour la gestion de leurs risques potentiels et afin de maximiser leurs bénéfices. Leur réglementation évolue rapidement, en raison de l'augmentation de la demande en médicaments moins coûteux; de plus, la technologie scientifique qui continue à s'améliorer, ainsi, les régulateurs et les différentes parties prenantes acquièrent de plus en plus d'expérience avec ces molécules complexes au fil des années.

II. Contrôle de la qualité des médicaments issus de la biotechnologie

La principale mission du CQ est de vérifier que les médicaments fabriqués correspondent à ce qui est attendu et qu'ils sont conformes aux spécifications définies. Le CQ des médicaments biologiques et biosimilaires repose, comme pour tout médicament, sur les contrôles des matières premières (MP) et du produit fini (PF).

II.1. Contrôle des matières premières

Le CQ des MP utilisées pour la fabrication des médicaments issus de la biotechnologie repose sur la caractérisation complète de la protéine recombinante principalement effectuée lors du développement d'un nouveau biomédicament ou d'un biosimilaire à une référence choisie pour la soumettre à comparaison auprès des autorités compétentes.

Les propriétés physicochimiques, l'activité biologique, les propriétés immunochimiques et le profil de pureté/impuretés font partis des caractéristiques à étudier de manière approfondie afin de garantir le profil de QSE du médicament [37].

II.1.1. Caractéristiques physicochimiques

La caractérisation des médicaments issus de la biotechnologie est basée sur l'analyse de plusieurs critères qui sont la séquence peptidique, le poids moléculaire, la conformation spatiale et les éventuelles modifications post-traductionnelles. D'autres spécificités peuvent être évaluées comme la charge, le point isoélectrique ou l'hydrophobicité de la protéine.

La séquence peptidique ou structure primaire est obtenue grâce à l'identification des fragments peptidiques par des méthodes de spectrométrie de masse (MS) (Annexe 8) ou par des méthodes de fragmentation enzymatique / chimique de la protéine suivie d'une analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC) (Annexe 3). Il peut être nécessaire de coupler diverses méthodes pour obtenir une analyse détaillée du fait de la complexité moléculaire de la protéine recombinante par exemple LC-MS, MALDI-TOF MS ou Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight) qui est un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, Matrix-

Assisted Laser Desorption / Ionization) et un analyseur à temps de vol (TOF, time-of-flight mass spectrometry).

La cartographie peptidique (Annexe 13) par MS permet également de déterminer le poids moléculaire (PM) de la protéine recombinante.

Après avoir déterminé la structure primaire de la protéine, il est nécessaire d'étudier les modifications post-traductionnelles et la conformation tridimensionnelle de la protéine dans l'espace indispensables à son activité biologique. Les modifications post-traductionnelles de type glycosylation (modification de la protéine, ayant eu lieu après la traduction, consistant à y ajouter des sucres) sont les plus fréquentes, elles sont analysées par une combinaison de clivages enzymatiques ou chimiques suivis de méthodes séparatives comme l'HPLC (Annexe 3) ou l'électrophorèse capillaire (CE) (Annexe 11). La conformation spatiale est analysée par des méthodes de détection telles que la MS (Annexe 8), la spectroscopie d'absorption UV-visible (Annexe 9), la spectroscopie de fluorescence ou la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Il est important d'analyser les profils de glycosylation car ils peuvent influencer le profil immunogène de la protéine et être à l'origine d'effets indésirables potentiellement graves chez le patient.

Les structures d'ordre supérieur (secondaire, tertiaire et quaternaire) de la protéine peuvent être analysées par diffraction des rayons X ou par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) (Annexe 6).

A cause de la complexité et l'importance des structures d'ordre supérieur dans l'activité thérapeutique d'une protéine, l'utilisation seule de techniques physicochimiques ne suffit pas pour la caractérisation. L'étude de la conformation spatiale doit être complétée par des tests biologiques afin de confirmer l'activité biologique.

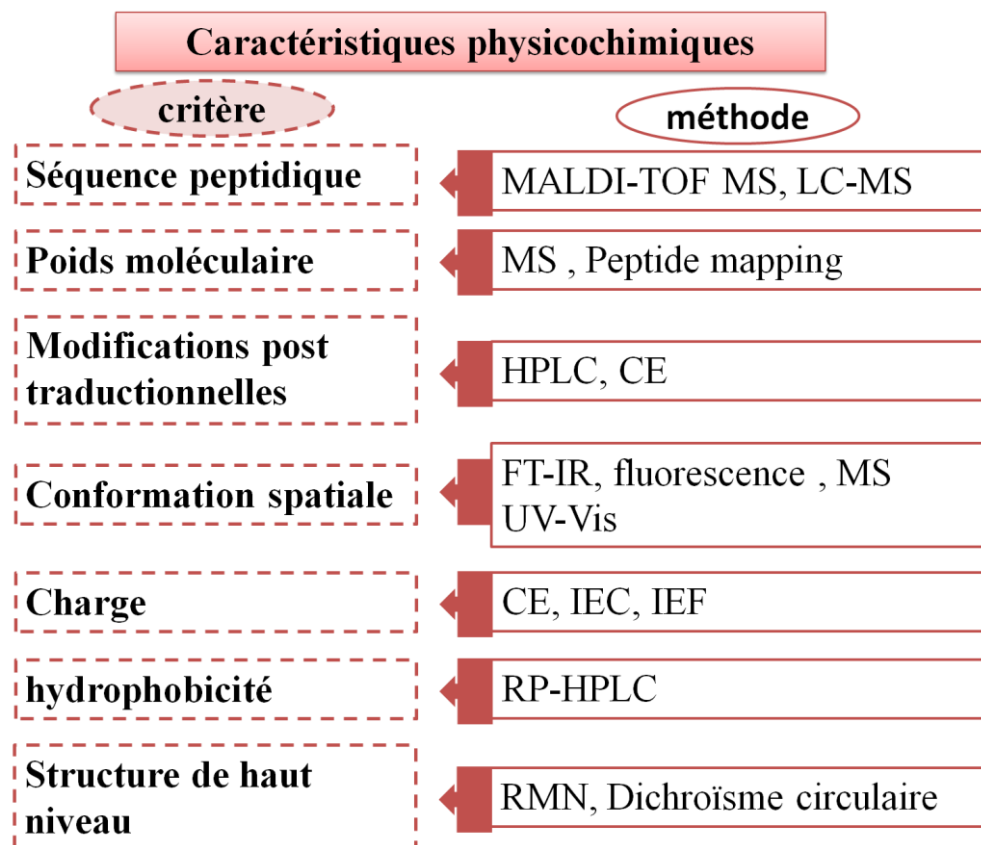


Figure II.1.1.1: Les Principaux paramètres physicochimiques à évaluer et les méthodes utilisées pour la caractérisation des MP des produits issus de la biotechnologie. [38]

II.1.2. Activité biologique

L'activité biologique décrit la capacité d'un produit à réaliser un effet biologique déterminé.

La puissance peut être évaluée par des essais biologiques *in vivo* chez l'animal qui consistent à mesurer la réponse de l'organisme suite à l'administration du produit et / ou par des essais biologiques *in vitro* qui consistent à mesurer la réponse au niveau cellulaire ou encore par des essais biochimiques tels que des réactions ligands-récepteurs ... etc.

Elle s'exprime par exemple en Unité Internationale (UI).

II.1.3. Propriétés immunochimiques

La caractérisation des propriétés immunochimiques concerne notamment les anticorps monoclonaux. Il est nécessaire de réaliser des tests de liaisons antigène-anticorps afin de déterminer l'affinité, l'avidité et l'immuno-réactivité de ces anticorps.

Les fonctions effectrices des anticorps et la structure de l'épitope de la molécule cible de l'anticorps monoclonal doivent être également caractérisées dans la mesure du possible.

II.1.4. Pureté, impuretés et contaminants

La substance active biologique contient la substance désirée mais aussi des isoformes et des variants ou produits de structure proche non éliminés lors de la purification, pouvant être dotés également d'une activité biologique équivalente ou proche du produit désiré. Elle contient également des impuretés de dégradation qui sont liées au produit et des impuretés liées au procédé de fabrication.

Le profil de pureté et d'impuretés d'un médicament biologique est complexe. En effet, il existe de nombreux variants qui sont dépourvus d'activité biologique et donc considérés comme des impuretés, associés à des impuretés de dégradation et à des impuretés liées au procédé de fabrication. Il est important d'évaluer ces impuretés, en s'aidant de la combinaison de plusieurs méthodes analytiques, pour définir des normes d'acceptation lors des contrôles en vue de la commercialisation du produit.

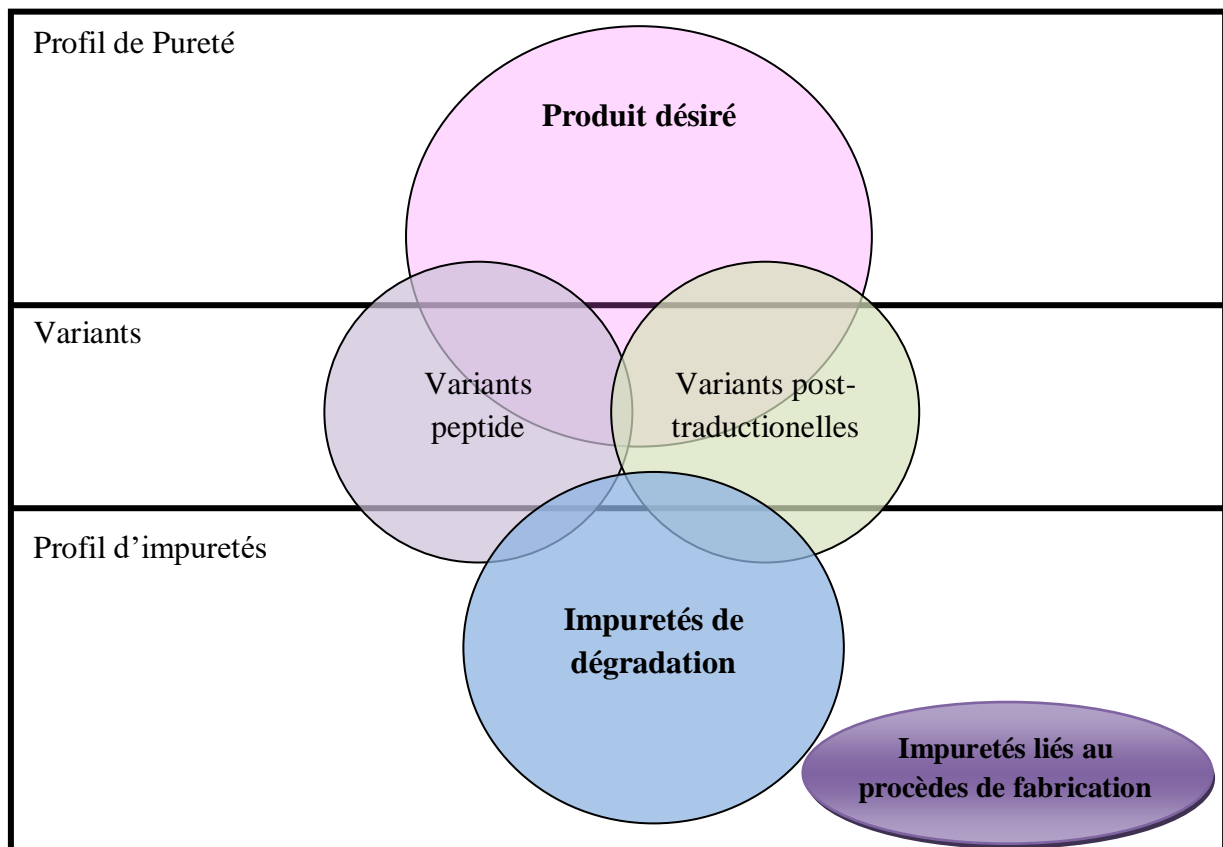


Figure II.1.4.1: Hétérogénéité du mélange produit [39].

II.1.4.1. Impuretés liées au produit

Les impuretés liées au produit peuvent apparaître lors de la production mais aussi lors de la conservation de la substance active, il s'agit des impuretés de dégradation.

Il est important d'identifier et de caractériser les variants de la substance active biologique afin de déterminer dans quel profil les classer. Si des variants sont dotés de propriétés comparables à la substance active en termes de QSE, ils peuvent alors être classés dans le profil de pureté et appartiennent au produit désiré. Dans le cas contraire, il s'agit d'impuretés dont la présence doit alors être limitée.

Il existe différents types de variants que l'on peut regrouper sous les appellations de variants de masse, variants de charge, variants conformationnels et variants du profil glycosidique.

Parmi les variants de charge, peuvent être retrouvées les formes tronquées et/ou les modifications d'acides aminés (substitution, déamidation, oxydation, etc.) qui influencent nettement la charge de la protéine. Ils peuvent être analysés par des méthodes comme CE (Annexe 11) couplée à la MS (Annexe 8), chromatographie échangeuse d'ions (IEC) (Annexe 1) et la focalisation isoélectrique ou Iso-Electric Focussing (IEF) (Annexe 14).

Les variants de masse, tels que les agrégats et les fragments, peuvent être analysés par la MS.

Les variants conformationnels sont analysés comme pour l'étude de la conformation spatiale de la protéine, par dichroïsme circulaire (CD) (Annexe 7), spectroscopie FTIR, MS ou spectroscopie de fluorescence.

Les variants du profil glycosidique peuvent être analysés par des techniques séparatives de type HPLC (Annexe 3), CE (Annexe 11) couplées à une détection par fluorescence ou par diffusion de la lumière.

II.1.4.2. Impuretés et contaminants liés au procédé de fabrication

Les impuretés liées au procédé de fabrication peuvent provenir des substrats cellulaires ainsi que du procédé de culture cellulaire, d'extraction et de purification. Il est possible de retrouver également des contaminants dans le produit tels que des virus exogènes qui ont été introduits de manière non intentionnelle lors de la fabrication.

Les impuretés dérivées des substrats cellulaires peuvent être des protéines issues de la cellule hôte ou des acides nucléiques issus par exemple du vecteur d'expression ou de la cellule hôte. Des immunoessais sont généralement employés pour détecter les protéines issues de la cellule hôte (ELISA), l'ADN résiduel issu de la cellule hôte et du vecteur est détecté par des méthodes d'hybridation de l'ADN ou d'autres techniques appropriées.

Les impuretés provenant du procédé de culture cellulaire (agents de sélection comme les antibiotiques ou le méthotrexate, composants bioactifs des milieux de culture comme les facteurs de croissance, etc.) sont à évaluer au cas par cas en se basant sur une analyse de risque pour la sécurité du patient. Ces impuretés sont fréquemment analysées par chromatographie liquide et/ou ELISA.

Enfin, les impuretés dérivées du procédé de purification sont également à évaluer au cas par cas. [40]

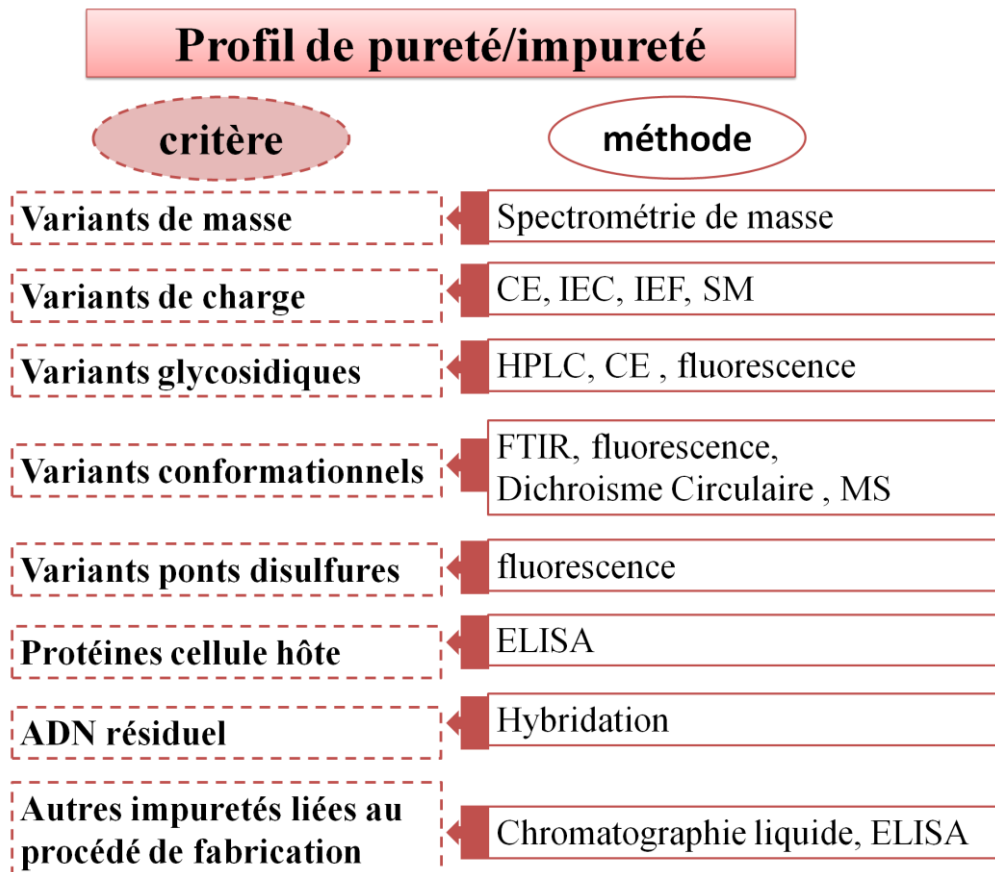


Figure II.1.4.2 : Le profil de pureté des produits issus de la biotechnologie ainsi que les méthodes utilisées pour la détermination. [41]

II.2. Contrôle du produit fini

II.2.1. Contrôle physicochimique

II.2.1.1. Identifications

A. Analyse des acides aminés

L'analyse des acides aminés (AA) fait référence à la méthodologie utilisée pour déterminer la composition ou la teneur en AA des protéines. La séquence des AA détermine les propriétés de la molécule.

Il est nécessaire d'hydrolyser la protéine en ses constituants d'AA individuels avant l'analyse. Après l'hydrolyse, les méthodes utilisées pour l'analyse sont généralement basées sur une séparation chromatographique des AA présents dans l'échantillon à tester.

B. Distribution des isoformes

Les isoformes de la protéine sont les différentes formes qu'elle prend lorsqu'elle est issue d'un même gène.

La détermination de la distribution des isoformes est généralement basée sur des méthodes appropriées telles que IEF (Annexe 14), MS (Annexe 8) ou CE (Annexe 11).

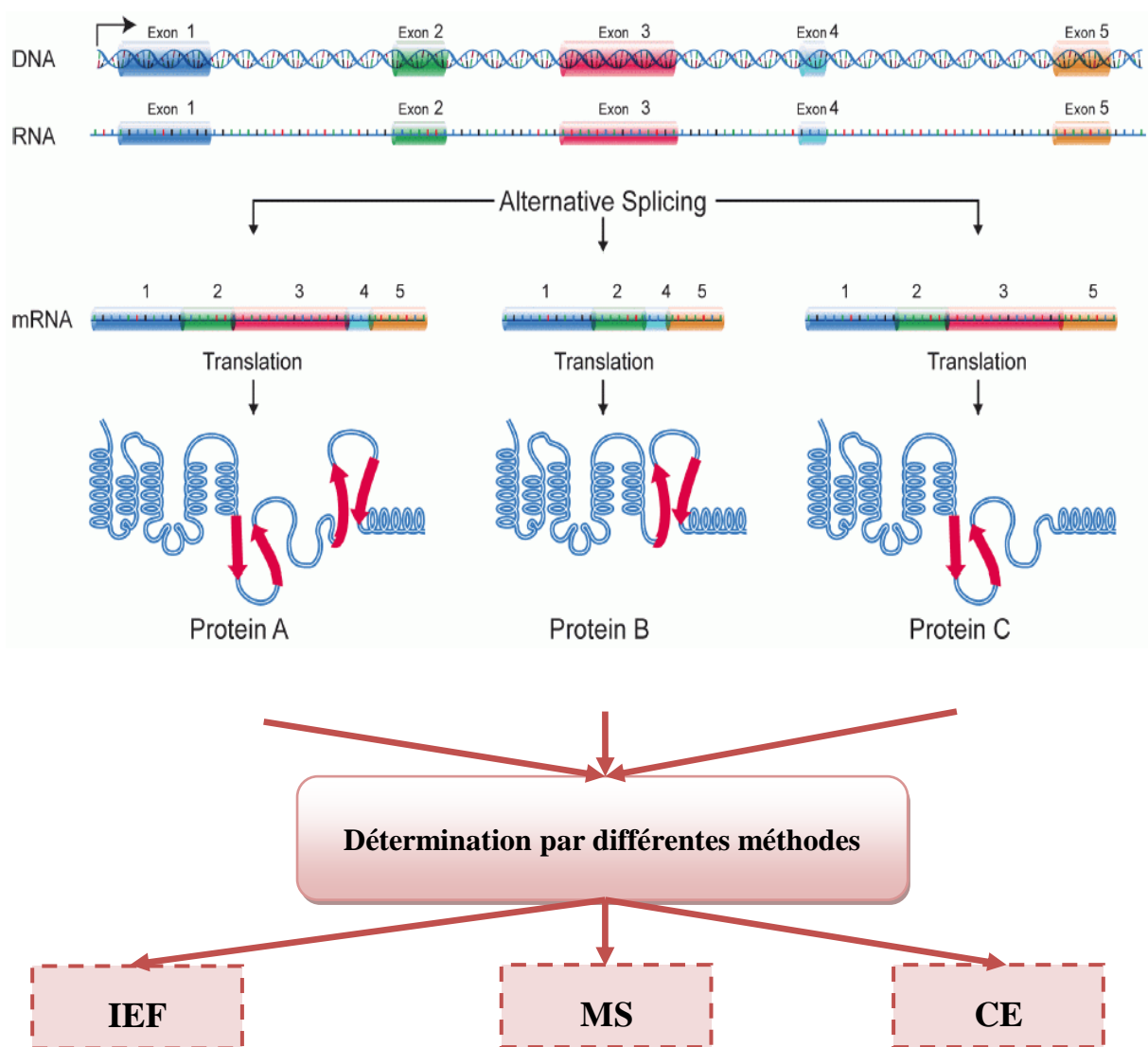


Figure II.2.1.1.B.1 : Les différentes isoformes d'une protéine issue d'un même gène et les méthodes analytiques utilisés pour la détermination de leur distribution.

C. Profile électrophorétique

L'électrophorèse des protéines est un examen très utilisé pour l'identification des médicaments issus de la biotechnologie de nature protéiques.

Parmi les techniques électrophorétiques les plus utilisées, on cite: CE, l'électrophorèse sur gel (d'agarose, de polyacrylamide (PAGE)), l'électrophorèse peut aussi être réalisées en conditions dénaturantes (détergents type SDS ou urée) (Annexe 12).

II.2.1.2. Essais

A. pH

Le pH d'une solution aqueuse est défini comme l'opposé du logarithme de l'activité des ions hydrogène présents, conventionnellement exprimée comme la concentration en ions hydrogène de la solution. Pour des raisons pratiques, sa définition est expérimentale. Le pH d'une solution à examiner s'exprime alors par rapport à celui d'une solution de référence (pH_s) suivant l'équation:

$$\text{pH} = \text{pH}_s - \frac{E - E_s}{k}$$

« E » est la tension exprimée en volts, de la cellule renfermant la solution d'énoxaparine sodique, « E_s » est la tension exprimée en volts, de la cellule renfermant la solution de pH connu (pH_s) et « k » est la variation de tension par variation d'une unité pH, exprimée en volts et calculée par l'équation de Nernst.

La détermination potentiométrique du pH est effectuée par mesure de la différence de potentiel entre deux électrodes convenablement choisies plongeant dans la solution à examiner; l'une est une électrode sensible aux ions hydrogène, l'autre une électrode de référence.

B. Détermination de l'eau

De nombreux produits issus de la biotechnologie sont des hydrates ou contiennent de l'eau sous forme adsorbée. En conséquence, la détermination de la teneur en eau est importante pour démontrer la conformité aux normes de la pharmacopée.

En général, la teneur en eau est déterminée par méthode volumétrique ou coulométrique.

C. Impuretés et substances apparentés

Les substances apparentées sont des impuretés organiques qui proviennent des intermédiaires appelés aussi sous-produits de synthèses ou de produits de dégradation. Ces

substances une fois identifiées, possèdent un seuil d'acceptation lorsqu'elles sont présentes dans un produit pharmaceutique.

Les impuretés et substances apparentés sont analysés par plusieurs méthodes tels que les méthodes chromatographiques ou électrophorétiques.

D. Perte à la dessiccation

Cet essai permet de déterminer la quantité de matière volatile de toute nature qui est évacuée dans les conditions spécifiées ; il est réalisé à une température de 70°C. La prise d'essai est choisie de telle sorte à ce que la différence des masses avant/après dessiccation soit comprise entre 5 et 50 mg.

E. Sels inorganiques

Ils sont généralement analysés par spectroscopie d'absorption atomique (SAA) (Annexe 10).

F. Cendres sulfuriques

Le test des cendres sulfatées utilise une procédure pour mesurer la quantité de substance résiduelle non volatilisée à partir d'un échantillon, lorsque l'échantillon est enflammé en présence d'acide sulfurique.

G. Activité biologique

L'activité biologique des médicaments issus de la biotechnologie doit être analysée en déterminant leurs effets sur un organisme (méthode in vivo) ou sur un tissu vivant (méthode in vitro).

Cet essai représente une étape obligatoire dans le CQ pour tous produits biotechnologiques. [42]

II.2.1.3. Dosage

Il est nécessaire de doser la concentration de la substance active dans le PF en utilisant une méthode appropriée comme l'HPLC (Annexe 3), la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) (Annexe 4) ou l'absorbance UV-visible (Annexe 9).

Tableau II.2.1.1 : Les tests préconisés par la Ph. Eur. 8^e Edition pour le contrôle physicochimique des produits finis des médicaments issus de la biotechnologie. [43][44]

Attributs	Critère	méthode
Essais	pH	Potentiomètre
	Eau	Volumétrie Coulométrie
	Impuretés et substances apparentées	HPLC Electrophorèse IEC Peptide mapping (Annexe 13) CPG Electrospray Ionization/MS
	Perte à la dessiccation	Thermogravimétrie (Annexe 15)
	Sels inorganiques	SAA
	Cendres sulfuriques	Minéralisation acide
	Identification	Analyse des acides aminés
Distribution des isoformes		SM SDS-PAGE
Profilélectrophorétique		Electrophorèse HPLC
Dosage	Protéine	HPLC
		CES
		Spectrométrie UV-Visible

II.3. Etude de stabilité des médicaments issus de la biotechnologie

L'effet des différents facteurs comme la température, l'humidité, les conditions d'accélération et de stress, la lumière et le système de récipient / fermeture sur la stabilité est évalué en fonction des paramètres suivants, indiqués dans la directive ICH Q5C [45] :

- Puissance : test d'activité.
 - Pureté et caractérisation moléculaire
 - Autres caractéristiques :
- Aspect visuel (couleur et opacité pour les solutions / suspensions; couleur, texture et temps de dissolution pour les poudres).
 - Particules visibles (solutions ou après reconstitution de poudres).
 - pH.
 - Taux d'humidité (poudres et produits lyophilisés).
 - Test de stérilité ou alternatives (par exemple, test d'intégrité des contenants / fermetures)
 - L'effet des additifs (excipients, stabilisants, conservateurs, etc.) doit être évalué.
 - L'effet des systèmes de fermeture des conteneurs doit être évalué.

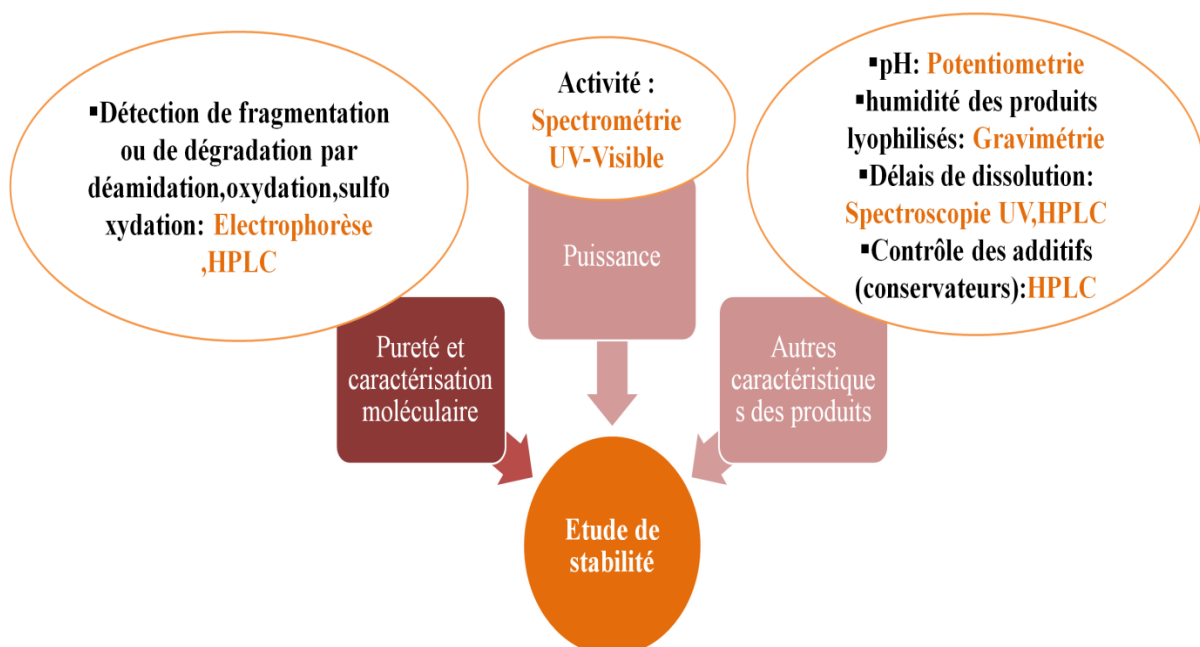


Figure II.3.1: Etude de stabilité des médicaments issus de la biotechnologie et les méthodes analytiques utilisées. [46]

II.4. Les études de comparabilités lors du développement d'un biosimilaire

Dû à la complexité et à la structure des produits issus de la biotechnologie, la démonstration de la similitude du biosimilaire par rapport à son médicament biologique de référence est importante pour mettre en évidence la nature similaire en termes de QSE.

Le but ultime des études de comparabilité des deux produits est d'exclure toutes les différences significatives pouvant apparaître chez le biosimilaire. De ce fait, il est indispensable de déterminer et de comparer les caractéristiques physico-chimiques, l'activité biologique, le profil d'impuretés, la nature des excipients utilisés ainsi que le profil pharmacocinétique et/ou pharmacodynamique pour s'assurer, par la collecte et l'évaluation des données pertinentes, que le profil QSE du produit biologique produit par le procédé de fabrication modifié n'a pas été affecté par le changement. ^[47]^[48].

D'après les données générées par l'exercice de comparabilité, il faut déterminer s'il est valable de conclure que les attributs de qualité du produit avant et après le changement sont "hautement similaires" comme vue dans la ligne directrice de l'ICH, la Q5E : *Comparabilité des produits biotechnologiques et biologiques dont les procédés de fabrication sont sujets à des modifications*: « La démonstration de la comparabilité ne signifie pas nécessairement que les attributs de qualité du produit avant et après le changement sont identiques, mais qu'ils sont très similaires et que les connaissances existantes sont suffisamment prédictives pour s'assurer que les différences dans les attributs de qualité n'ont aucun impact négatif sur la sécurité ou l'efficacité du produit médicamenteux. » ^[49]

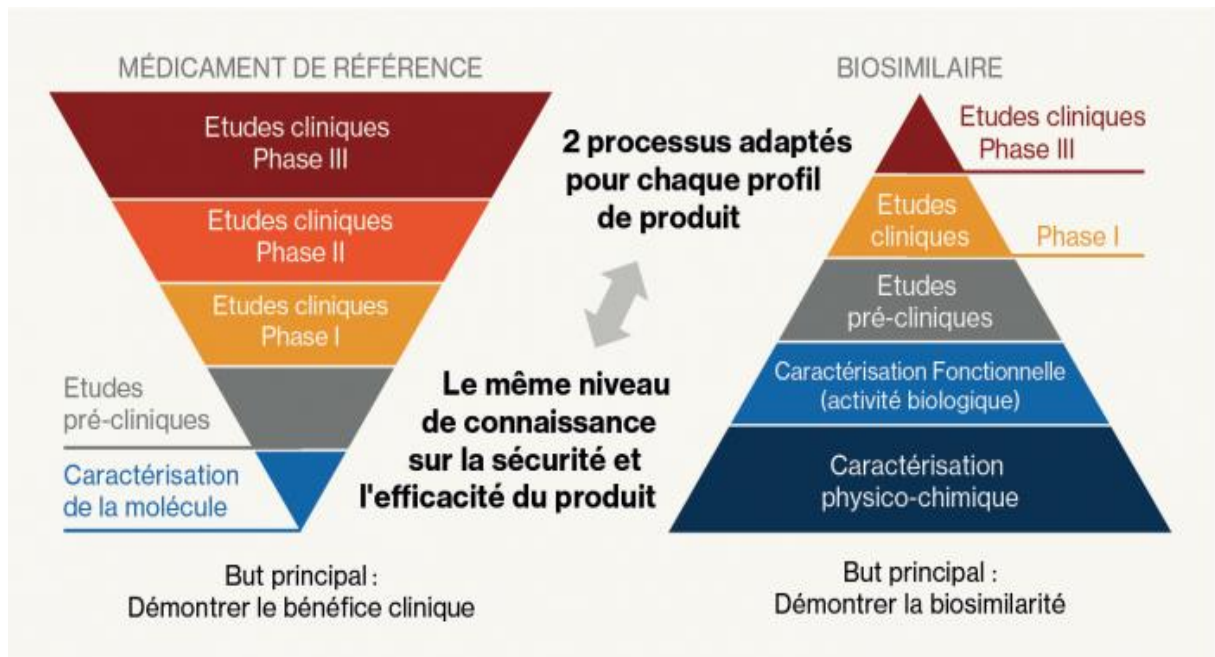


Figure II.4.1 : Les études de comparabilités lors du développement d'un biosimilaire par rapport au médicament de référence. [50]



Deuxième partie
L'énoxaparine sodique



Chapitre I

Généralités sur l'énoxaparine sodique

Il n'existe pratiquement pas de médicaments qui suscitent autant d'intérêt que l'héparine, pourtant sa découverte datant du début du vingtième siècle (1916), et qui occupe aujourd'hui une place de plus en plus importante dans notre arsenal thérapeutique.

Après sa découverte en 1916 par Jay Mac Lean, qui trouve dans un foie bovin une substance à forte activité anticoagulante. Le terme «héparine» a été inventé par Howell et Holt en 1918 (du grec «hépar», foie). Elle fait partie de la famille des GlycosAminoGlycanes (GAG). C'est une molécule d'origine naturelle présente dans les tissus des mammifères.

Cette classe thérapeutique est devenue le pilier de la prévention et du traitement de la maladie thromboembolique veineuse (MTEV). Dans les années 80, le développement des héparines de bas poids moléculaire (HBPM) a étendu et amélioré l'utilité de cette classe de médicaments et, pour de nombreuses indications, les HBPM ont remplacé leur composé d'origine car leurs caractéristiques pharmacologiques assurent une meilleure biodisponibilité et autorisent l'utilisation d'une seule ou au maximum deux injections sous-cutanée (SC) quotidienne (s). Cependant, leur élimination exclusivement rénale, nécessite un contrôle rigoureux de la créatininémie. Bien que probablement faible, le risque hémorragique des héparines persiste. Le risque de thrombopénie induite par l'héparine (TIH) impose la surveillance régulière de la numération plaquettaire.

Les traitements par héparine sont efficaces mais potentiellement dangereux et requièrent une parfaite connaissance des modalités de prescription et de surveillance.

Parmi les HBPM les plus utilisés aujourd'hui ; on distingue l'énoxaparine sodique, un anticoagulant issu de la muqueuse intestinale du porc, molécule naturelle et est actuellement l'un des antithrombotiques les plus utilisés. Il a été commercialisé par Rhône Poulenc puis par Aventis (résultat de la fusion Hoechst-HMR et Rhône-Poulenc) et aujourd'hui propriété de Sanofi.^[51]

I. Formes posologiques, présentations et conditionnement

La solution d'énoxaparine sodique injectable administrée par voie SC ou intraveineuse (IV) ou introduite dans la ligne artérielle (voie extracorporelle) du circuit au début de la séance de dialyse. Elle est présentée en seringue préremplie avec un dispositif qui protège l'aiguille après l'injection (système de sécurité) ainsi qu'en flacon multidose:

Chaque seringue préremplie avec protecteur d'aiguille (aiguille de calibre 27) et à usage unique contient 2 000 UI d'activité anti-Xa correspondant à 20 mg d'énoxaparine sodique dans 0,2 ml d'eau pour préparations injectables (EPPI) offerte en boîte de 2 et de 6.

Chaque seringue préremplie avec protecteur d'aiguille (aiguille de calibre 27) et à usage unique contient 4 000 UI d'activité anti-Xa correspondant à 40 mg d'énoxaparine sodique dans 0,4 ml d'EPPI offerte en boîte de 2 et de 6.

Chaque seringue préremplie avec protecteur d'aiguille (aiguille de calibre 27) et à usage unique contient 6 000 UI d'activité anti-Xa correspondant à 60 mg d'énoxaparine sodique dans 0,6 ml d'EPPI offerte en boîte de 2 et de 10.

Chaque seringue préremplie avec protecteur d'aiguille (aiguille de calibre 27) et à usage unique contient 8 000 UI d'activité anti-Xa correspondant à 80 mg d'énoxaparine sodique dans 0,8 ml d'EPPI offerte en boîte de 2 et de 10.

Chaque seringue préremplie contient 10 000 UI d'activité anti-Xa correspondant à 100 mg d'énoxaparine sodique dans 1,0 ml d'EPPI offerte en boîte de 10.^[52]^[53]

Un flacon multidose contient 30 000 UI d'activité anti-Xa correspondant à 300 mg / 3 ml d'énoxaparine sodique offerte en boîte unitaire.^[54]

Tableau I.1: Renseignement sommaires sur L'énoxaparine sodique. [55]

Voie d'administration	Forme posologique et concentration
Injection SC et IV	L'énoxaparine sodique-100mg/mL Seringues préremplies avec protecteur d'aiguille: 30 mg / 0,3 mL 40 mg / 0,4 mL 60 mg / 0,6 mL 80 mg / 0,8 mL 100 mg / mL Flacon multidose: 300 mg / 3 mL

II. Composition de la seringue / flacon d'énoxaparine sodique

Les seringues préremplies se composent du principe actif qui est l'énoxaparine sodique dont il existe une grande variabilité des doses accompagné d'un excipient classiques des préparations injectables qui est l'EPPI. D'autre part, les flacons multidoses se diffèrent des seringues préremplies par un excipient en excès qui est l'alcool benzylique utilisé comme conservateur.

➤ Solutions Injectables en seringues préremplies:

Tableau II.1: Composition des seringues préremplie.

Par seringue préremplie	2000 UI (20 mg) / 0,2ml	4000 UI (40 mg) / 0,4 ml	6000 UI (60 mg) / 0,6 ml	8000 UI (80mg) / 0,8 ml	10000 UI (100 mg) / 1 ml
Enoxaparine sodique	2000 UI Anti Xa	4000 UI Anti Xa	6000 UI Anti Xa	8000 UI Anti Xa	10000 UI Anti Xa
Soit	20mg	40mg	60mg	80mg	100mg

Excipients: EPPI.

➤ Solutions injectables en flacon multidose:

Tableau II.2: Composition des flacons multidoses.

Par flacon de 3 ml	
Enoxaparine sodique	30 000 UI anti-Xa
Soit	300 mg

Excipients: alcool benzylique (45 mg), EPPI. [56]

III. Structure de l'énoxaparine sodique

L'énoxaparine sodique est le sel d'une HBPM constitué d'un mélange de chaînes d'oligosaccharides sulfatés de longueurs variables et formées d'unités disaccharidiques. Selon les connaissances actuelles cette séquence complexe des oligosaccharides n'a pas encore été bien déterminée, la majorité de ses composants possèdent une structure « 4-énopyranose uronate à l'extrémité non réductrice de leur chaîne. 15 % à 25 % des composants possèdent une structure de type 1,6-anhydro à l'extrémité réductrice de leur chaîne ». [57]

La masse moléculaire se situe entre 3 800 et 5 000 daltons; la masse moyenne s'établit à environ 4 500 daltons. Le pourcentage des chaînes ayant une masse de 2 000 à 8 000 daltons se situe entre 68,0 % et 82,0 %. [58]

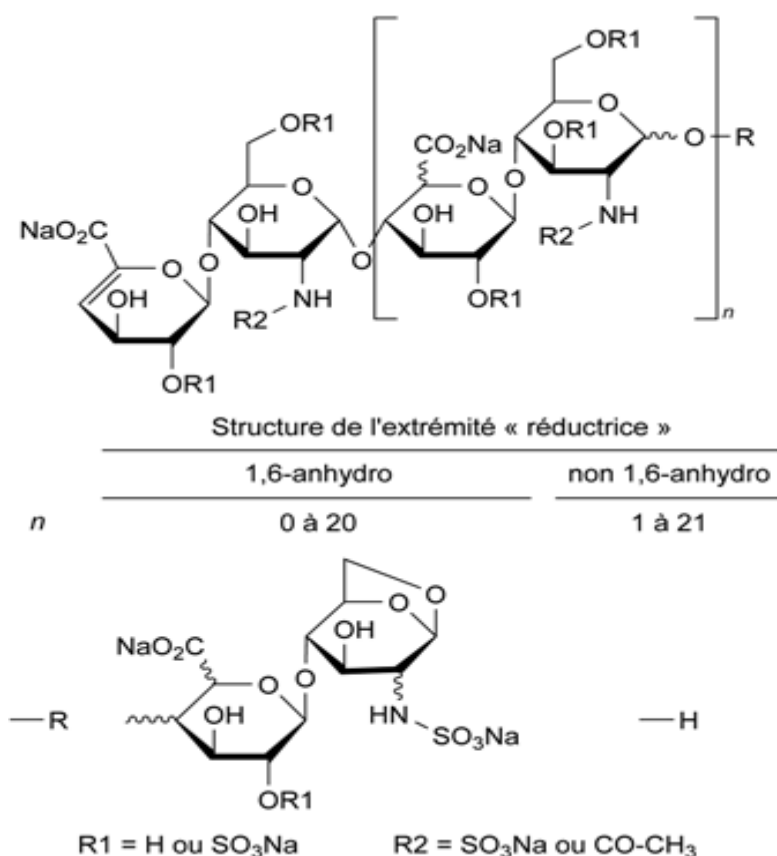


Figure III.1: Formule moléculaire de l'énoxaparine sodique.[59]

IV. Mécanisme d'action de l'énoxaparine sodique

L'énoxaparine est un fragment d'HBPM qui est obtenu par dépolymérisation contrôlée d'une héparine naturelle. Il se compose de molécules pourvues ou non d'une fraction pentasaccharidique spécialement caractérisée; il s'agit du site de liaison à l'antithrombine présente dans le plasma. En raison de sa masse moléculaire qui varie entre 3 800 et 5 000 daltons (comparativement à 15 000 daltons dans le cas de l'héparine), la molécule d'énoxaparine est trop petite pour se lier simultanément à la thrombine et à l'antithrombine, principal facteur anticoagulant dans le sang.

Le mode d'action de l'énoxaparine repose sur l'interaction avec l'AT. Il est principalement attribuable à l'accélération de la vitesse de neutralisation par l'AT de certains facteurs de coagulation activés, mais d'autres mécanismes pourraient être en cause. L'énoxaparine potentialise de façon sélective l'inhibition des facteurs de coagulation Xa et IIa et ne modifie que légèrement les autres mécanismes hémostatiques, comme le temps de céphaline activé (TCA). La corrélation entre son effet antithrombotique et l'inhibition du facteur Xa est bien établie.

Le ratio d'activité anti-Xa/ anti-IIa de l'énoxaparine varie entre 3.3 et 5.3 (tandis qu'il est égal à 1 dans le cas de l'héparine).

Outre cette activité anti-Xa/ anti-IIa, on a observé d'autres propriétés antithrombotiques et anti-inflammatoires de l'énoxaparine chez des sujets sains et des patients. [60] [61]

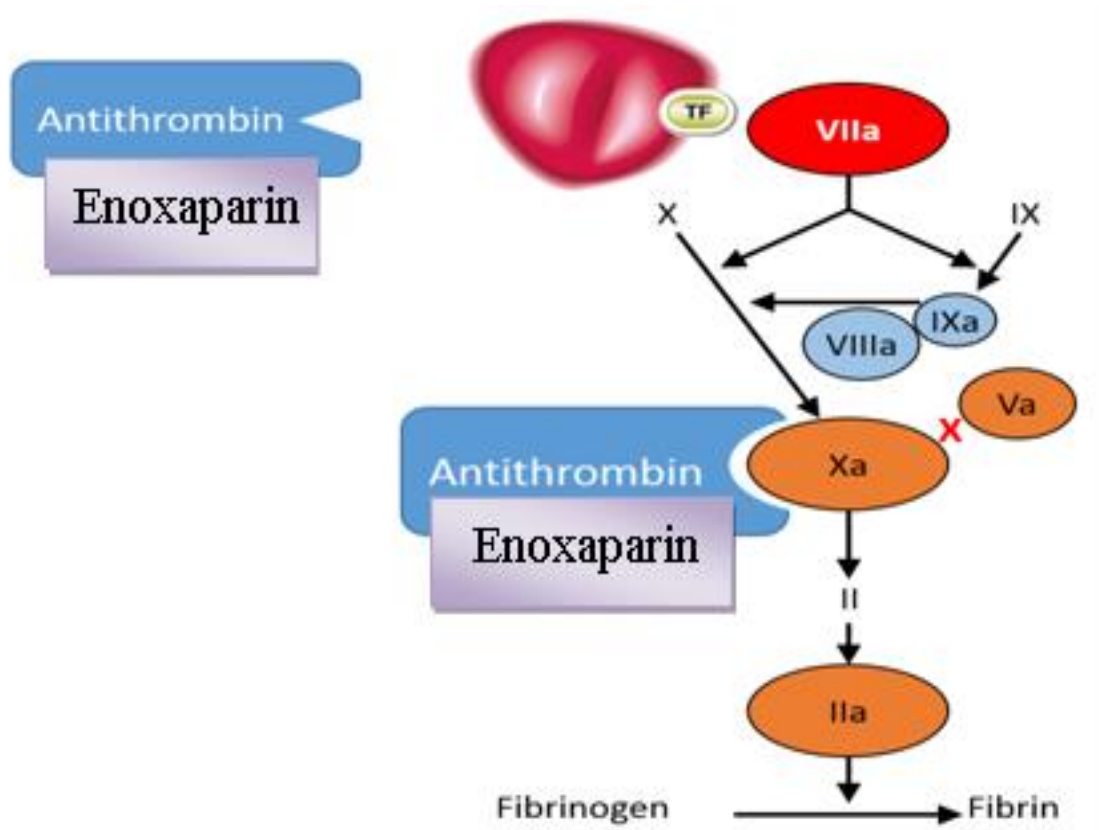


Figure IV.1: Mécanisme d'action de l'énoxaparine.

V. Indications de l'énoxaparine sodique

L'énoxaparine est un type d'HBPM qui appartient au groupe de médicaments appelés *anticoagulants* ou *agents antithrombotiques*. Ces médicaments diminuent la capacité de coagulation du sang et préviennent la formation de dangereux caillots dans les vaisseaux sanguins, il est indiqué dans les cas suivants :

➤ Traitement curatif et préventif de la maladie thromboembolique veineuse MTEV qui se manifeste en aigue par la thrombose veineuse profonde (TVP) et l'Embolie Pulmonaire (EP)». [62]

➤ Traitement préventif de l'apparition de la TVP chez les personnes qui sont confinées au lit à cause d'une grave maladie ou après qu'une personne ait subi certains types de chirurgie.

➤ Traitement curatif de l'angor instable ou les crises cardiaques sans onde Q en association avec l'acide acétylsalicylique (AAS).

➤ Prise en charge des personnes qui ont subi un type précis de crise cardiaque appelé infarctus du myocarde avec sus-décalage du segment ST (STEMI) de même que les personnes qui se soumettent à une intervention coronarienne percutanée (ICP) pour ouvrir les artères coronaires après une crise cardiaque. [63]

➤ Il y a d'autres indications pour cette HBPM comme la prophylaxie des thromboses artérielles et la prévention de la coagulation du circuit de circulation extracorporelle (CCE) lors d'une séance d'hémodialyse. [64]

VI. Les effets indésirables de l'énoxaparine sodique

Aucun médicament n'est totalement dépourvu de risques. Un effet secondaire est une réaction nocive et non voulue, se produisant aux posologies normalement utilisées chez un patient pour la prophylaxie, le diagnostic ou le traitement d'une maladie. Il peut être léger ou grave, temporaire ou permanent.

Parmi les effets signalés lors du traitement par l'énoxaparine sodique, on observe des réactions locales comme un durcissement de la peau ou une grosseur au point d'injection accompagnés ou non d'une douleur, une rougeur ou des ecchymoses.

Comme tout traitement anti-thrombotique, l'emploi de l'énoxaparine peut occasionner des manifestations hémorragiques dont les conséquences peuvent être très graves et même mortelles notamment rétro-péritonéales et intracrâniennes.

Suite à la surveillance après la mise de ce produit sur le marché, les centres de pharmacovigilances ont déterminés autres effets secondaires moins fréquents qui peuvent être extrêmement graves notamment la TIH ; une douleur thoracique ; des étourdissements ; une incapacité à bouger les mains, les pieds ou une autre partie du corps (paralysie) ou une dorsalgie soudaine ; des battements cardiaques ; une modification ou une perte de la vision subite et une confusion. [65]

L'énoxaparine sodique est un médicament généralement bien toléré si on l'utilise conformément aux directives.

VII. Les interactions médicamenteuses

L'énoxaparine peut réagir avec d'autres médicaments lors d'une administration concomitante ou successive, ces interactions peuvent mener à des conséquences plus au moins graves sur la santé des patients, ce qui a conduit les chercheurs à établir des règles d'associations pour éviter ces risques.

Ces associations sont réparties en trois catégories:

➤ **Les associations absolument contre-indiquées (CI)** : une association de l'énoxaparine avec tout médicament administré par voie intramusculaire (IM), ponctions et injections intra-articulaires ou intra-artérielles (IA) est contre-indiquée car elle peut causer un risque majeur d'hématome au point de ponction [66].

➤ **Les associations déconseillées (AD)** : il est recommandé d'arrêter certains médicaments qui modifient l'hémostase avant un traitement par l'énoxaparine sodique, à moins que cela ne soit strictement indiqué; si l'association est indiquée, l'énoxaparine sodique doit être utilisée sous surveillance clinique et biologique étroite lorsque nécessaire, c'est le cas des salicylés systémiques, l'AAS à des doses anti-inflammatoires et des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), y compris le kétorolac ; les thrombolytiques (par ex. altéplase, rétéplase, streptokinase, ténecteplase, urokinase) et les anticoagulants.

➤ **Administration avec prudence** : l'association de certains médicaments avec l'énoxaparine tels que les inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire, y compris l'AAS utilisé à une dose antiagrégante (cardioprotection), le clopidogrel, la ticlopidine et les antagonistes de la glycoprotéine IIb/IIIa indiqués dans le syndrome coronaire aigu, en raison du risque de saignement; le Dextran 40; les glucocorticoïdes systémiques ainsi que les médicaments hyperkaliémisants qui peuvent être administrés dans le cadre d'une surveillance clinique et biologique étroite. [67]

VIII. Contre-indications de l'énoxaparine sodique

L'énoxaparine sodique est contre indiqué en cas d'hypersensibilité au principe actif (PA) ou à l'un des ingrédients qui entre dans sa composition, y compris l'alcool benzylique dans le cas des flacons multidoses ou à toute autre HBPM ou autre forme d'héparine. En raison de la teneur en alcool benzylique, l'énoxaparine en flacons multidoses ne doit pas être donné aux nouveau-nés ou aux prématurés.

Tous antécédents, documentés ou soupçonnés, de thrombocytopénie immunitaire de l'héparine (TIH, thrombocytopénie grave retardée), au cours des 100 derniers jours ou résultat positif d'un test d'agrégation plaquettaire in vitro en présence d'énoxaparine (présence d'anticorps(Ac) circulants).

Cette molécule est également contre indiquée chez les patients souffrants d'une des états pathologiques suivantes: endocardite bactérienne aiguë ou subaiguë, hémorragie active, troubles graves de la coagulation sanguine, ulcère gastrique ou duodéal évolutif, hémorragie vasculaire cérébrale (sauf en présence d'embolie disséminée), hyper tension artérielle grave non maîtrisée, rétinopathie diabétique ou hémorragique, lésions au cerveau, à la moelle épinière, aux yeux ou aux oreilles ainsi que les interventions chirurgicales visant ces structures ou tout autres troubles ou affections entraînant une augmentation du risque hémorragique.

L'anesthésie épidurale ou rachidienne est contre-indiquée dans les cas où l'on doit répéter l'administration de l'énoxaparine (1 mg/kg à intervalle de 12 heures ou 1,5 mg/kg, 1 fois par jour), en raison du risque accru d'hémorragie. [68]

IX. Précautions d'emploi de l'énoxaparine sodique

L'énoxaparine sodique n'est pas interchangeable avec d'autres HBPM car ces médicaments diffèrent par leurs procédés de fabrication, leurs PM, leurs activités anti-Xa et anti-IIa, et le ratio anti-Xa / anti-IIa. Cela se traduit par des différences au niveau de leurs activités biologiques associées.

Tableau IX.1: Caractéristiques des HBPM selon la pharmacopée US 2010. [69]

Héparine	PM Moyen (Daltons)	anti-Xa/ anti-IIa	Activité Anti-Xa
HNF	15 000	1	193 UI/mg
Tinzaparine	6750	1.8	90 IU/mg
Dalteparine	6000	2,5	160 IU/mg
Enoxaparine	4200	3.6	100 IU/mg
Nadroparine	4500	3,2	95-130 IU/mg

L'utilisation d'énoxaparine sodique doit être avec une extrême prudence chez les patients ayant des antécédents de TIH sans Ac circulants.

Comme avec d'autres anticoagulants, des saignements peuvent se produire dans n'importe quel site. En cas de saignement, l'origine de l'hémorragie doit être recherchée et un traitement approprié doit être instauré.

Les anesthésies rachidiennes/péridurales ou les ponctions lombaires ne doivent pas être pratiquées dans les 24 heures suivant l'administration d'énoxaparine sodique à des doses curatives.

Chez les patients présentant une insuffisance rénale (IR), l'exposition à l'énoxaparine est augmentée du fait son accumulation dans l'organisme, par conséquent, il y aura élévation du risque hémorragique. Chez ces patients, une surveillance clinique étroite est recommandée, et une surveillance biologique par la mesure de l'activité anti-Xa pourrait être envisagée. [70][71]

X. Surveillance biologique

Avant tout traitement anticoagulant est réalisé un bilan biologique qui comprend un hémogramme, en particulier une numération des plaquettes en vue d'un éventuel diagnostic ultérieur de TIH, un bilan de coagulation avec les taux de prothrombine (TP), TCA. On réalise un dosage systématique de la créatinine chez les patients âgés plus de 75 ans avec détermination de la clairance de la créatinine pour évaluer la fonction rénale.

Pour la majorité des patients traités par l'énoxaparine à dose efficace, il n'y a aucune surveillance nécessaire de l'activité anti-Xa. Le seul intérêt de la mesure de l'activité anti-Xa plasmatique est de dépister le surdosage chez les patients à risque traités à dose curative.

Le premier contrôle doit être effectué de préférence après la deuxième ou troisième injection et la fréquence des contrôles ultérieurs sera discutée au cas par cas. Les valeurs moyennes d'anti-Xa au pic attendues propres à la molécule d'énoxaparine sont résumées dans le Tableau X.1.

Tableau X.1: L'énoxaparine sodique: posologies et surveillance des traitements curatifs.

Produit	Indications	Posologie	Activité anti-Xa au pic		Allongement du TCA
			Valeurs moyennes	Seuil de Surdosage	
Enoxaparine sodique	TVP avec ou sans EP SCA	100 UI/kg/12 h (1mg/kg/12h)	1,20± 0,17 UI/ml	ND	Peu allongé

En cas de surdosage, il convient de vérifier l'absence de mésusage:

- Fonction rénale non évaluée ou en aggravation.
- Posologie non calculée en fonction du poids.
- Volume d'injection ou poids du patient erronés.

En cas d'activité anti-Xa très basse, après avoir vérifié qu'elle était effectivement mesurée au pic, il ne faut pas augmenter la posologie si celle-ci est correctement adaptée en fonction du poids et si l'énoxaparine est correctement administrée. À noter qu'en dehors d'un surdosage, l'activité anti-Xa ne permet pas de prédire le risque de saignement et ne doit pas être interprétée pour adapter la posologie de l'énoxaparine. [72][73]



Chapitre II

Le procédé de fabrication

de

l'énoxaparine sodique

Les HBPM sont largement utilisées en thérapie comme anticoagulants. Ils sont obtenus à partir de tissus de mammifères, et sont des substances actives dans les médicaments biologiques.

L'HNF et les HBPM sont des glucides. Dans la nature, La biosynthèse complète de l'héparine a lieu dans les mastocytes qui sont abondantes dans la muqueuse intestinale et les poumons. À la suite de cette biosynthèse et des modifications ultérieures, il existe 32 disaccharides théoriquement possibles qui la composent, ce qui rend cette substance plus complexe et hétérogène que d'autres biopolymères. [74]

L'héparine dans les granules de mastocytes est liée de manière covalente à un noyau protéique. Au cours du processus de fabrication, une protéolyse est effectuée pour séparer la partie protéique, puis le squelette glucidique est purifié. Ce sucre purifié est un glycosaminoglycane hautement sulfaté (GAG), composé de diverses unités disaccharidiques répétitives. Ensuite, l'héparine est partiellement dépolymérisée pour obtenir les HBPM. [75][76]

I.Aspects réglementaires liés à l'approvisionnement du matériel de départ

Le matériel biologique utilisé pour la production d'héparine doit provenir d'animaux qui satisfont aux exigences sanitaires propres à la consommation humaine. Cela garantit que les animaux abattus sont en bonne santé et exempts de médicaments tels que les antibiotiques. Pour garantir cela, plusieurs producteurs d'héparine assurent une traçabilité complète de leur matière première jusqu'aux abattoirs et aux fermes. De plus, une réaction en chaîne par polymérase (PCR) ou une analyse immunochimique est suggérée par la FDA et la Ph.Eur. pour démontrer l'absence de tout matériel de ruminant dans le matériel de départ afin d'atténuer le risque de contamination par l'encéphalopathie spongiforme bovine ESB [77][78].

De plus, à partir de 2013, la chaîne d'approvisionnement complète de l'héparine, en commençant par la collecte de la matière première, relève d'EudraLex volume 4, annexe 2 des lignes directrices de l'UE pour les «BPF pour les médicaments à usage humain et vétérinaire» [79]. Cela indique que l'ensemble du processus relève du contrôle des BPF, bien qu'à des niveaux différents en fonction de l'étape du processus de fabrication.

II.Sources d'obtention de l'héparine

II.1. Sources porcines et bovines

Les premiers protocoles de production d'héparine utilisaient des foies canins ou bovins comme source. Plus tard, des muqueuses porcines et des poumons de bovins ont été principalement utilisés. Cependant, étant donné que la muqueuse intestinale porcine s'est avérée être une source beaucoup plus «propre» qui nécessitait moins de dégradation que les poumons des bovins et aussi en raison de l'épidémie d'encéphalopathie spongiforme bovine dans les années 1990, la seule source d'héparine approuvée par la FDA est actuellement la muqueuse porcine. Cependant, plusieurs pays autorisent toujours l'héparine d'origine bovine pour des raisons religieuses. Il existe cependant des différences structurales entre l'héparine porcine et bovine, ce qui pourrait expliquer la différence d'activité comme l'illustre la figure II.1.1. [80][81]

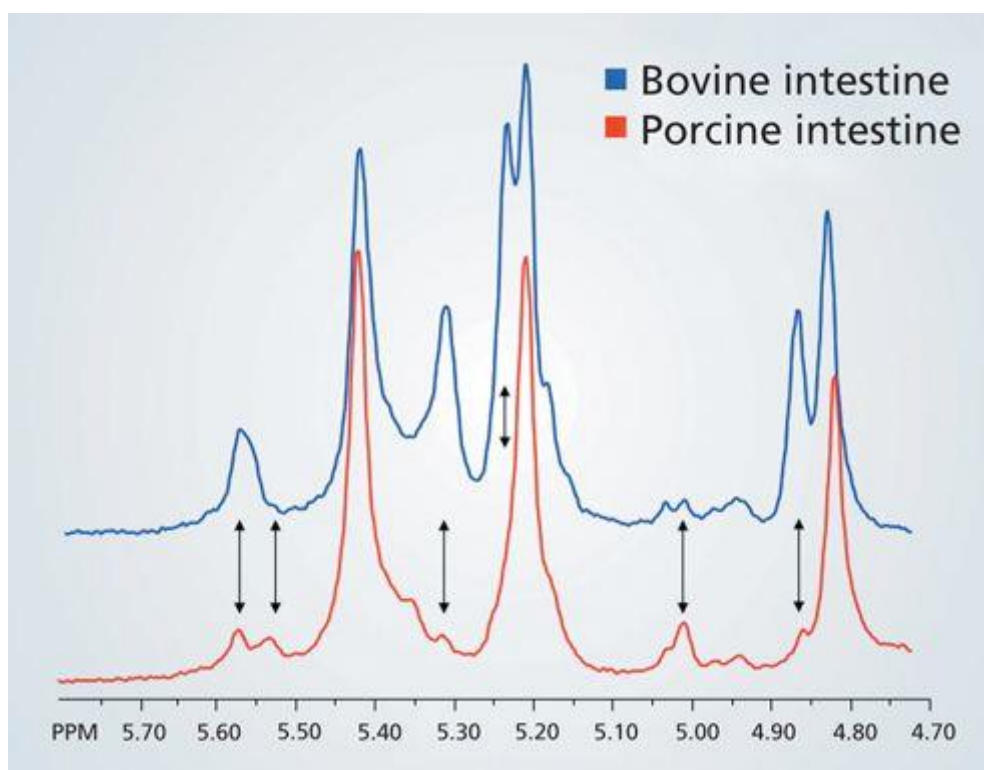


Figure II.1.1: Partie du spectre ^1H RMN de l'héparine muqueuse porcine (spectre inférieur, rouge) et (spectre bleu supérieur) de l'héparine muqueuse bovine. [82]

On remarque que les deux spectres soient similaires, ils ne sont pas exactement les mêmes; certaines différences sont indiquées par des flèches. Les spectres RMN reflètent les structures chimiques de l'héparine porcine et bovine, montrant que les échantillons d'héparine des deux sources sont similaires mais pas identiques.

II.2. Autres sources de mammifères

Outre l'héparine bovine et porcine, les intestins de mouton ont été utilisés dans le passé pour produire de l'héparine pharmaceutique. L'héparine ovine ressemble plus étroitement à l'héparine porcine qu'à l'héparine bovine sur la base de la composition disaccharidique, de l'affinité à l'antithrombine et de leur PM. En raison de cette ressemblance, il a été mentionné que des programmes de fabrication d'héparine fractionnée à partir de sources ovines ont été lancés. Il n'y a pas de restrictions religieuses sur l'utilisation des moutons comme source d'héparine. [83]

En plus des sources mentionnées précédemment, il existe des sources non mammifères pour la production de l'héparine tels que les sous-produits de l'industrie de la volaille ainsi que les branchies et les intestins du saumon ... etc. Mais il n'existe actuellement aucune production commerciale d'héparine à partir de l'une de ces sources.

III. Processus de fabrication

Les MP des HBPM sont des tissus animaux, généralement des poumons ou des muqueuses intestinales bovines, porcines ou ovines. Actuellement, dans l'UE et aux États-Unis, les HBPM commercialisés ne sont obtenus qu'à partir de la muqueuse intestinale porcine. Le processus de fabrication de l'HBPM comprend deux phases: l'extraction et la purification de l'héparine sodique intermédiaire non fractionnée et la dépolymérisation ou la fragmentation de l'HNF pour obtenir l'HBPM (figure III.1).

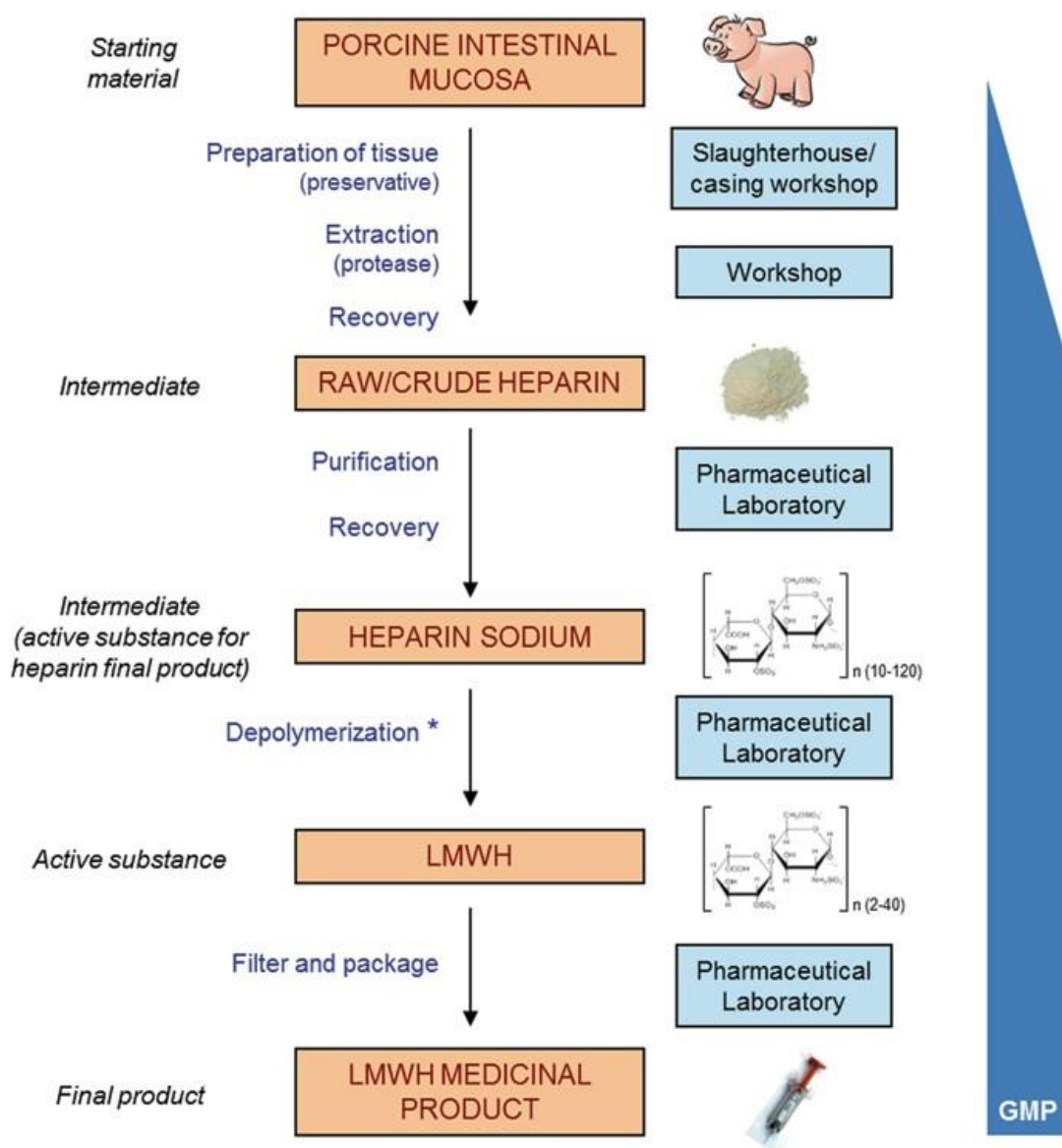


Figure III.1: Schéma général du processus de fabrication des HBPM. [⁸⁴]

III.1. La Production de l'héparine non fractionnée

La production d'HNF implique deux phases principales: l'extraction et l'isolement de l'héparine brute à partir de la muqueuse intestinale porcine pour obtenir de l'héparine brute et une purification supplémentaire de l'héparine. Le processus est illustré sur la figure III.1.1

Tout d'abord, la muqueuse intestinale porcine est prélevée sur des porcs sains dans les abattoirs. Des précautions particulières doivent être prises pour éviter la contamination, en particulier la contamination par du matériel provenant d'autres espèces animales qui pourrait coexister dans les abattoirs. En règle générale, les étapes suivantes pour produire ce que l'on appelle fréquemment l'héparine brute sont effectuées dans l'abattoir ou dans des ateliers à proximité des abattoirs.

La muqueuse porcine est ensuite traitée avec du métabisulfite de sodium ou du chlorure de sodium pour préserver les tissus. Puis, des protéases sont ajoutées pour solubiliser et séparer la partie protéique des molécules d'héparine, ce qui est généralement suivi d'une désactivation thermique de la protéase.

Ensuite, l'héparine est récupérée soit par précipitation avec un sel d'ammonium quaternaire, soit par une étape chromatographique utilisant une résine échangeuse d'anions. Après la résolubilisation, l'héparine peut être précipitée à nouveau avec de l'éthanol ou du méthanol. De cette manière, l'héparine brute est produite et peut être expédiée vers d'autres installations pour une purification supplémentaire. [85]

Les étapes suivantes de la fabrication de l'héparine doivent être effectuées dans le respect des BPF. Elles sont principalement consacrées à la purification supplémentaire de l'héparine brute [86]. Les impuretés à éliminer peuvent avoir été introduites lors de l'extraction de l'héparine brute ou peuvent provenir de la matière de départ. Ce sont d'autres GAG, comme le dermatane sulfate (DS), des protéines résiduelles ou des nucléotides, des cations étrangers, des métaux lourds, des solvants ou des sels autres que l'héparine, ainsi que d'éventuels résidus microbiologiques.

Des différentes procédures peuvent être utilisées pour purifier l'héparine. Généralement, l'héparine brute est dissoute dans l'eau et filtrée à pH bas pour éliminer les protéines résiduelles, suivie d'un blanchiment alcalin avec du peroxyde, du permanganate, de l'ozone ou

de l'hypochlorite, pour la désinfection et la dépyrogénéation du produit. L'échange de cations peut ensuite être effectué pour éliminer les cations étrangers, et la précipitation à l'éthanol peut être utilisée pour réduire les acides nucléiques résiduels. Les sels restants peuvent être éliminés par filtration sur membrane.

De cette manière, et après séchage et analyses appropriées, l'héparine non fractionnée serait prête à être utilisée comme substance active ou à être utilisée comme intermédiaire dans la fabrication des HBPM.

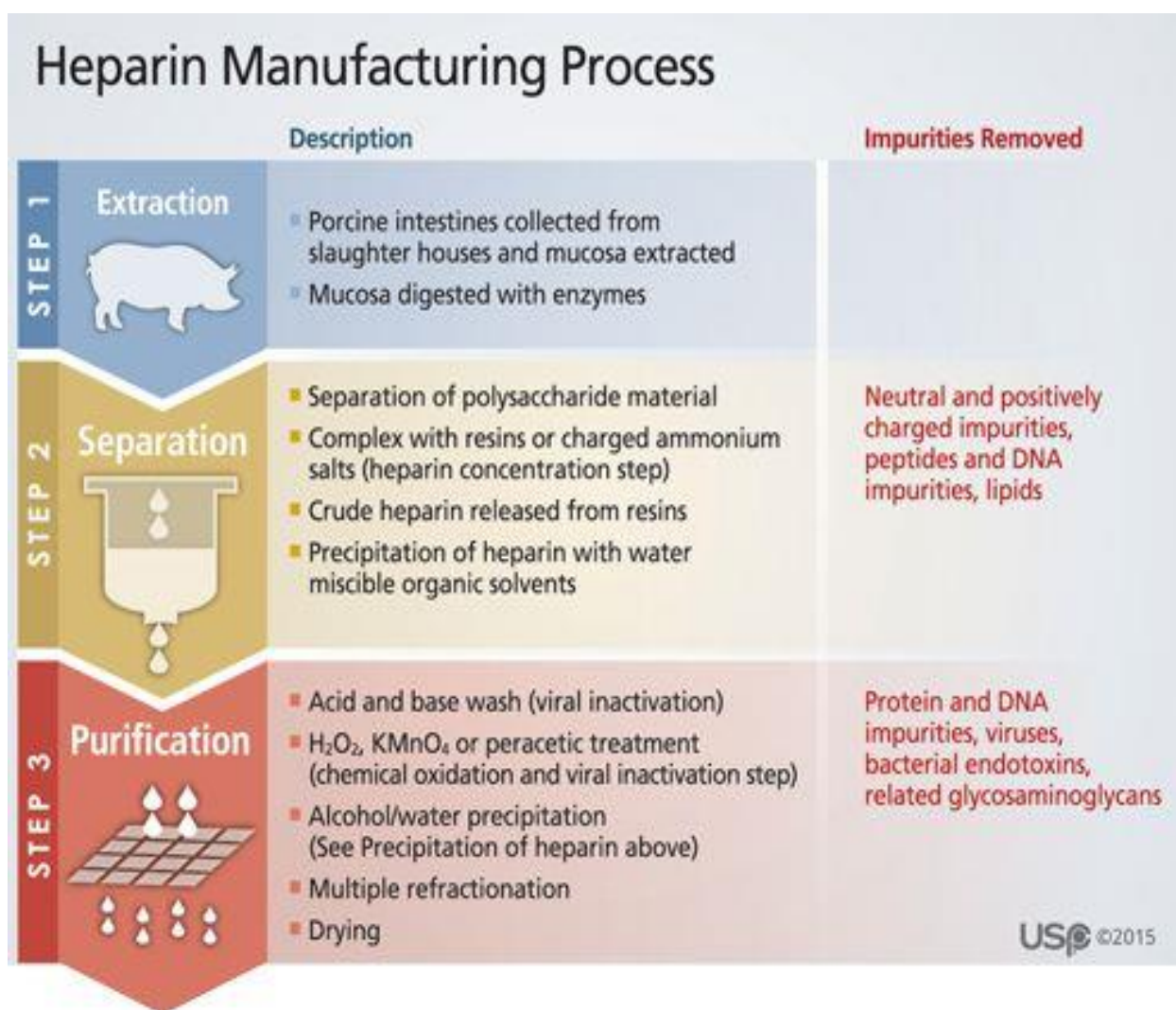


Figure III.1.1: Description des étapes de procédé de fabrication des héparines

III.2. La production des HBPM (Enoxaparine) à partir de l'HNF

Après l'obtention de l'héparine non fractionnée, les HBPM sont produites par dépolymérisation partielle chimique ou enzymatique. Cette partie du processus est réalisée dans un laboratoire pharmaceutique dans le respect des conditions BPF.

Selon la méthode de dépolymérisation utilisée, différentes HBPM sont obtenues avec des caractéristiques chimiques et biologiques différentes. La méthode la plus couramment utilisée est le clivage désaminant avec de l'acide nitreux ou un nitrite organique.

La deuxième méthode de dépolymérisation la plus courante est la bêta-élimination chimique ou enzymatique. Cela laisse un résidu d'acide uronique insaturé à l'extrémité non réductrice.

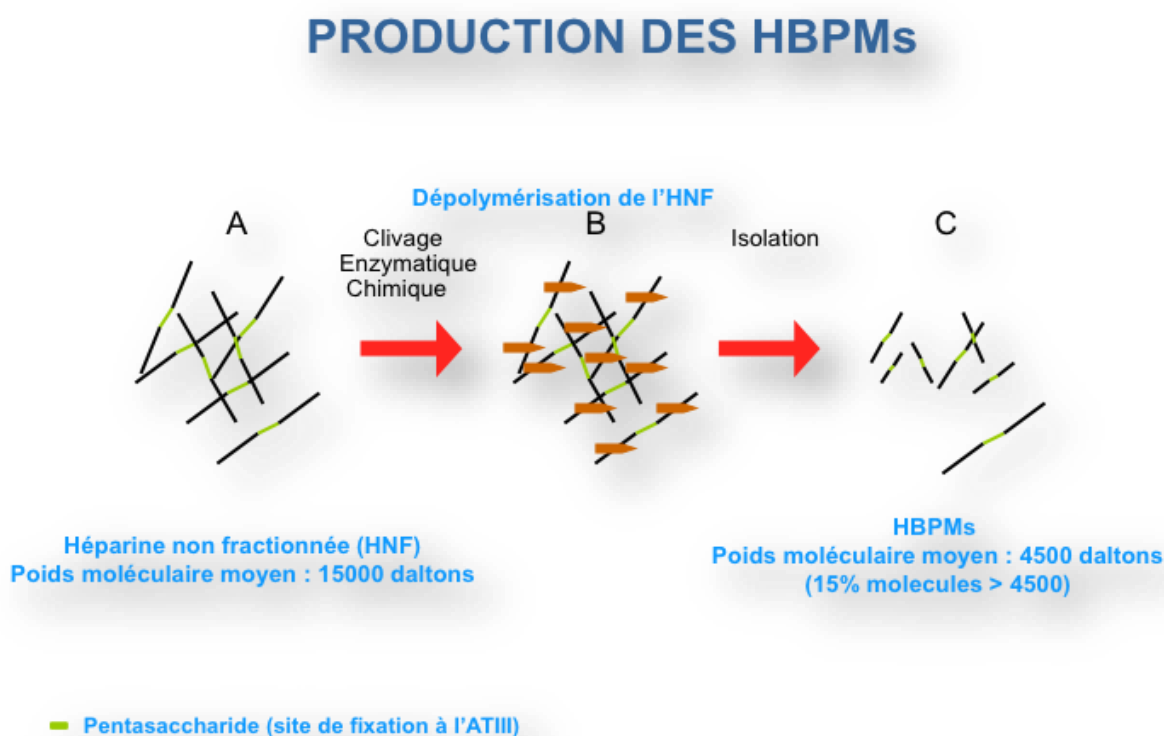


Figure III.2.1: La production des HBPM. [87]

La bêta-élimination chimique est réalisée avec un alcali sur l'ester benzylique d'héparine dans le cas de l'énoxaparine. Dans ce cas, l'héparinase de la bactérie *Pedobacter heparinus* est utilisée.

De cette manière, la substance active de l'énoxaparine sodique » est produite. La fabrication du produit final est alors un processus relativement simple, qui implique normalement la dissolution de la substance active, l'ajustement du pH, la filtration stérilisante et le remplissage aseptique dans des flacons ou des seringues préremplies. Parfois, des conservateurs (alcool benzylique).

Les procédés de fabrication entraînent des modifications spécifiques aux points de clivage : L'exemple de la structure 1,6 anhydro

β -Élimination chimique (enoxaparine)

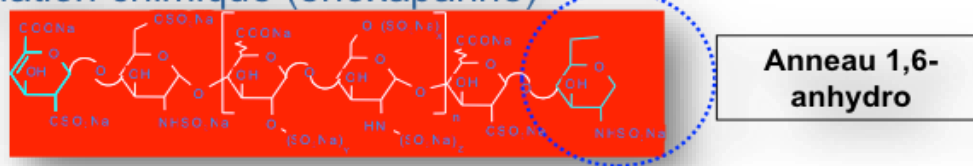
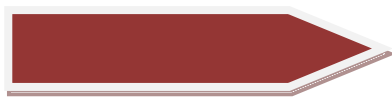


Figure II.2.2: Le procédé de depolymérisation utilisé pour obtenir l'énoxaparine. [88]



Chapitre III

Le contrôle de la qualité

physicochimique

de l'énoxaparine sodique

I. Contrôle de la qualité de la matière première « Enoxaparine sodique »

Tout ce qui rentre et tout ce qui sort d'une industrie pharmaceutique est prélevé pour faire l'objet d'une analyse. On entend par matière première à usage pharmaceutique tous les composants des médicaments: les principes actifs, les excipients, et les éléments de mise en forme pharmaceutique, destinés à être utilisés chez l'homme ou chez l'animal. Le CQ vérifie l'adéquation entre le produit commandé et le produit reçu par la mise en œuvre de réaction d'identification.

I.1. Identifications

Plusieurs méthodes d'identification sont recensées et recommandées par la « Ph. Eur. 9.0 », dans le but de démontrer la présence réelle de l'énoxaparine sodique dans la substance en vrac.

I.1.1. Identification A : décrite dans la monographie Héparines de basse masse moléculaire (0828) en utilisant l'énoxaparine sodique SCR et la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire comme méthode analytique (Annexe 6), le test de spectre de RMN ^{13}C est ajouté aux identifications d'énoxaparine sodique comme preuve de structure uniquement.

Ce test d'identification est effectué en cas de modification majeure du processus. Une technique équivalente a été développée pour être utilisée comme méthode alternative à la RMN ^{13}C : spectrophotométrie UV-visible (Annexe 9).

➤ Matériels et méthodes

Préparation : faire dissoudre 0,200 g de l'énoxaparine sodique dans un mélange de 0,2 mL d'oxyde de deutérium R et de 0,8 mL d'eau R.

Comparaison : faire dissoudre 0,200 g de l'étalon de référence de l'énoxaparine sodique approprié dans un mélange de 0,2 mL d'oxyde de deutérium R et de 0,8 mL d'eau R.

Conditions opératoires : —Intensité du champ: 75 MHz.
— Température: 40 °C.
— diamètre de la cellule: 5 mm.

Traitement :

- transformée de Fourier,
- signal de référence du méthanol deutérié réglé à 50,0 ppm.

➤ **Résultats**

Le spectre RMN ¹³C obtenu est semblable au spectre RMN ¹³C obtenu avec l'étalon de référence de l'énoxaparine sodique approprié. [89]

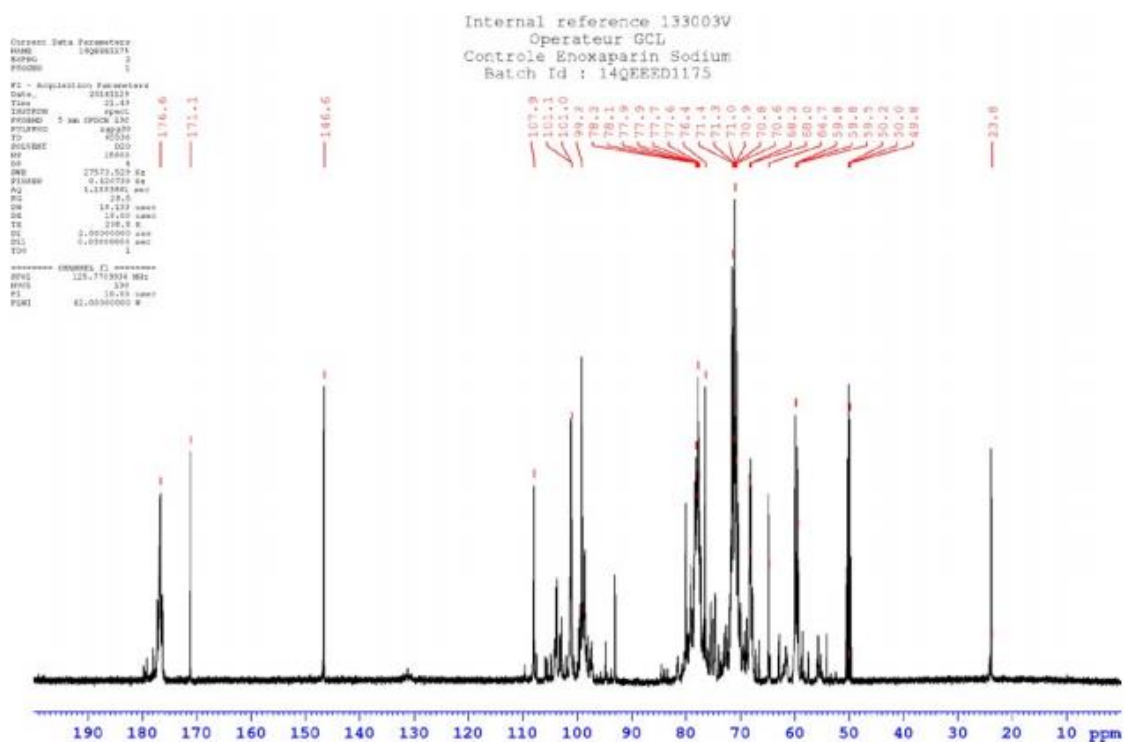


Figure I.1.1.1 : Le spectre RMN ¹³C de l'énoxaparine sodique.

I.1.2. Identification B : cette identification s'effectue par la chromatographie liquide en utilisant le procédé de normalisation. Elle implique aussi l'utilisation d'un mélange d'héparinases qui est utilisée pour dégrader l'énoxaparine sodique en disaccharides. Tous les produits dégradés ont été analysés par chromatographie liquide haute performance échangeuse d'anions (SAX-HPLC) (Annexe 3) équipée d'un détecteur UV.

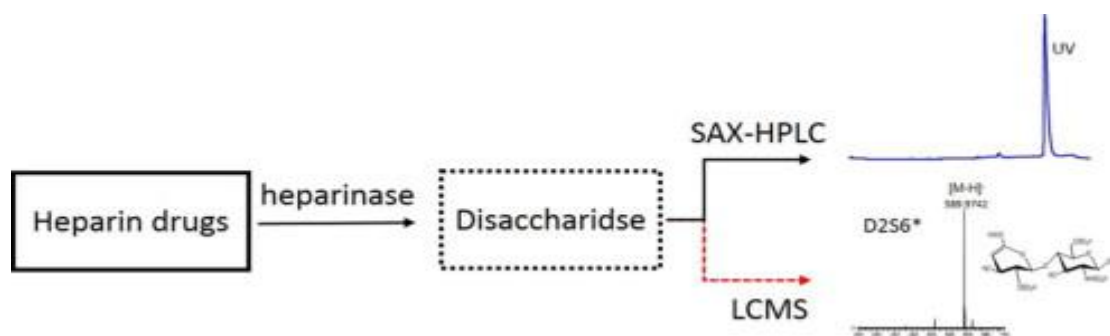


Figure I.1.2.1: Principe de l'identification B basée sur la digestion par l'héparinase de l'énoxaparine sodique. [90]

Procédé de Normalisation

La méthode de normalisation interne est une technique fréquemment utilisée dans les laboratoires d'analyse. Elle permet de déterminer la part d'un constituant présent dans un mélange et ce grâce à l'intégration des pics obtenus sur le chromatogramme.

➤ Matériels et méthodes

Solution A : Faire dissoudre 12 mg de tétrahydroborate de sodium R dans 400 µl d'eau R et mélanger à l'aide d'un mélangeur de type vortex.

Solution d'héparinase (a) : Faire dissoudre de l'héparinase I R dans de la solution tampon phosphate de potassium pH 7,0 R de façon à obtenir une activité de 0,1 UI/mL. Conserver la solution à - 20 °C jusqu'à son emploi.

Solution d'héparinase (b) : Faire dissoudre de l'héparinase II R dans de la solution tampon phosphate de potassium pH 7,0 R de façon à obtenir une activité de 0,4 UI/mL. Conserver la solution à - 20 °C jusqu'à son emploi.

Solution d'héparinase (c) : Faire dissoudre de l'héparinase III R dans de la solution tampon phosphate de potassium pH 7,0 R de façon à obtenir une activité de 0,4 UI/mL. Conserver la solution à 20 °C jusqu'à son emploi.

Solution d'héparinase (d) : Mélanger des volumes égaux de solution d'héparinase (a), solution d'héparinase (b) et de solution d'héparinase (c).

Solution à blanc : Mélanger doucement, en retournant le tube, 20 μL d'eau R, 70 μL de solution tampon acétate de sodium/calcium pH 7,0 R et 100 μL de solution d'héparinase (d). Placer dans un bain-marie à 25 °C pendant 48 h. Mélanger 60 μL de cette solution et 10 μL de solution A récemment préparée. Mélanger et laisser reposer à température ambiante pendant 4 heures.

Solution à examiner (a) : Faire dissoudre 20 mg d'énoxaparine sodique dans 1 mL d'eau R.

Solution à examiner (b) : A 20 μL de solution à examiner (a), ajoutez 70 μL de solution tampon acétate de sodium/calcium pH 7,0 R et 100 μL de solution d'héparinase (d). Mélanger doucement, en retournant le tube, et placer dans un bain-marie à 25 °C pendant 48 h.

Solution à examiner (c) : A 60 μL de solution à examiner (b), ajoutez 10 μL de solution A récemment préparée. Mélanger et laisser reposer à température ambiante pendant 4 h.

Solution témoin (a) : Faire dissoudre 20 mg d'énoxaparine sodique SCR dans 1 mL d'eau R.

Solution témoin (b) : A 20 μL de solution témoin (a), ajoutez 70 μL de solution tampon acétate de sodium/calcium pH 7,0 R et 100 μL de solution d'héparinase (d). Mélanger doucement, en retournant le tube, et placer dans un bain-marie à 25 °C pendant 48 h.

Solution témoin (c) : A 60 μL de solution témoin (b), ajoutez 10 μL de solution A récemment préparée. Mélanger et laisser reposer à température ambiante pendant 4 h.

Les solutions témoins sont analysés par SAX-HPLC équipé d'un détecteur UV (longueur d'onde de détection 234 nm) pour identifier le temps d'élution de chaque disaccharide.

Le mélange de digestion par les héparinases se termine par ébullition dans un bain-marie à 100 °C pendant 2 minutes, puis centrifugés à 10 000 tours pendant 3 minutes pour éliminer les héparinases dénaturées. Le surnageant est ensuite utilisé pour une analyse SAX-HPLC.

➤ **Conditions chromatographiques****Précolonne :**

- Dimensions: $l = 0,01$ m, $\varnothing = 4,6$ mm,
- Phase stationnaire: résine échangeuse d'anions fortement basique pour chromatographie R ($5 \mu\text{m}$).

Colonne :

- Dimensions: $l = 0,25$ m, $\varnothing = 4$ mm,
- Phase stationnaire: résine échangeuse d'anions fortement basique pour chromatographie R ($5 \mu\text{m}$),
- Température: 50°C .

Phase mobile :

- Phase mobile A: dissolvez 0,280 g de phosphate monosodique R dans 950 mL d'eau R, ajustez à pH 3,0 avec de l'acide phosphorique R et complétez à 1000 mL avec de l'eau R.
- Phase mobile B: dissolvez 140 g de perchlorate de sodium R dans 950 ml, de phase mobile A, ajustez à pH 3,0 avec de l'acide phosphorique R et complétez à 1000 ml, avec la phase mobile A.

Tableau I.1.2.1: Le programme d'élution par gradient.
--

Intervalle (min)	Phase mobile B (pour cent V/V)	Phase mobile A (pour cent V/V)
0-20	97 ⇔ 65	3 ⇔ 35
20 – 50	65 ⇔ 0	35 ⇔ 100
50 – 60	0	100

Débit: 0,8 mL/min.

Détection: spectrophotomètre à 234 nm.

Injection : 18 μL de solution à blanc, de solution à examiner (c) et des solutions témoins (b) et (c).

➤ **Résultat**

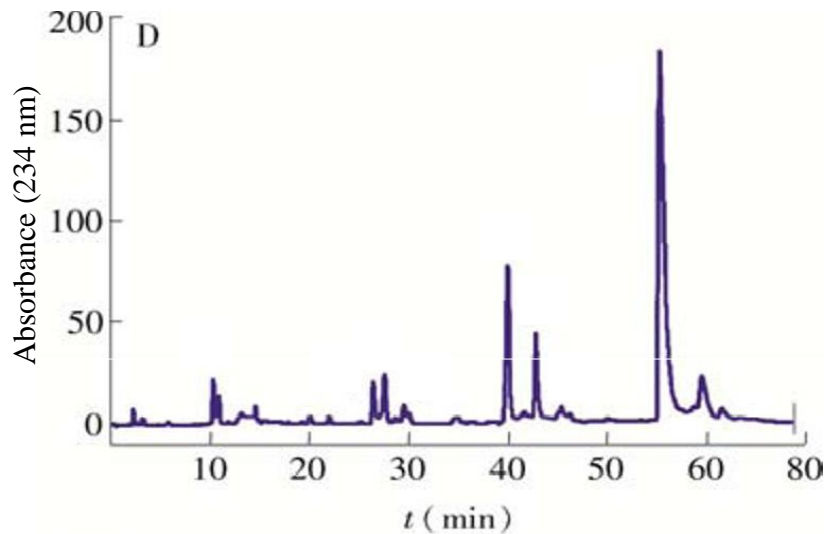


Figure I.1.2.2 : Chromatogramme des disaccharides d'énoxaparine produits par digestion enzymatique par les héparinases. [91]

➤ **Identification des disaccharides et des dérivés 1,6-anhydro**

Par comparaison avec le temps d'éluion de la solution témoin (c), les structures des produits de digestion enzymatique de l'énoxaparine (les disaccharides) sont identifiées, puis la teneur en chaque disaccharide est calculée en intégrant l'aire du pic à 234 nm.

En utilisant le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) pour confirmer l'identité des pics dus aux dérivés 1,6-anhydro.

➤ **Calcul**

Une fois les pics identifiés, utilisez les valeurs du tableau I.1.2.2 pour calculer le pourcentage (p / p) des trois principaux dérivés 1,6-anhydro obtenus après dépolymérisation de l'énoxaparine sodique en utilisant la formule suivante:

$$100 \times \frac{Mw}{\sum Mw_x \cdot A_x} \times (A_1 + A_2 + A_3)$$

M_w = masse moléculaire relative moyenne en masse de l'énoxaparine (déterminée dans l'identification C)

M_{w_x} = masse moléculaire relative attribuée au dérivé x dans le tableau I.1.2.2.

A_x = surface du pic du au dérivé x.

A_1 = surface du pic du au dérivé 1,6-anhydro Δ IS.

A_2 = surface du pic du au dérivé 1,6-anhydro Δ IIS.

A_3 = surface du pic du au dérivé 1,6-anhydro Δ IS-IS.

Ne tenez pas compte des pics obtenus avec la solution à blanc.

Arrondissez la valeur obtenue à l'unité.[⁹²] [⁹³] [⁹⁴][⁹⁵]

Tableau I.1.2.2 : Corrélation entre la rétention relative des pics des chromatogrammes obtenus avec les solutions d'énoxaparine dépolymérisée et réduite, par rapport au dérivé Δ IS réduit (temps de rétention = environ 30 min), et la masse moléculaire de ces dérivés de l'énoxaparine.[⁹⁶]

Dérivés	Rétention relative	Masse moléculaire (Da)
Non identifié	< 0,20	741
Δ IVA réduit	0,20	401
Non identifié	0,20 - 0,46	741
Δ IVS réduit	0,46	461
Non identifié	0,46 - 0,48	483
Δ IIA réduit	0,48	503
Non identifié	0,48 - 0,52	503
1,6-anhydro Δ IIS	0,52	443
Non identifié	0,52 - 0,57	503
Δ IIIA réduit	0,57	503
Non identifié	0,57 - 0,66	533
Δ IIS réduit	0,66	563
Non identifié	0,66 - 0,76	563
Δ IIIS réduit	0,76	563
Non identifié	0,76 - 0,85	583
Δ IA réduit	0,85	605
1,6-anhydro Δ IS	0,88	545
Non identifié	0,88 - 0,97	635
Δ IIA-IVSglu réduit	0,97	1066
Δ IS réduit	1,00	665

Δ IS	1,04	665
Non identifié	1,04 - 1,10	1228
Δ IIA-IVSglu réduit	1,10	1168
Non identifié	1,10 - 1,28	1228
1,6-anhydro Δ IS-IS	1,28	1210
Non identifié	> 1,28	1228

➤ **Limite**

15 pour cent à 25 pour cent de composants dont la chaîne présente une structure 1,6-anhydro à son extrémité réductrice. [97]

I.1.3. Identification C : décrite dans la monographie Héparines de basse masse moléculaire, elle est basée sur l'utilisation de la SEC (Annexe 4).

➤ **Matériels et méthodes**

Solution à examiner : Faire dissoudre 20 mg de l'énoxaparine sodique dans 2 mL de phase mobile.

Solution témoin : Faire dissoudre 20 mg de l'énoxaparine sodique *pour étalonnage SCR* dans 2 mL de phase mobile.

Colonne :

— *dimensions* : $l = 0,30$ m, $\varnothing = 7,5$ mm,

— *phase stationnaire*: gel de silice à particules sphériques appropriées (5 μm) dont l'intervalle de fractionnement des protéines est approximativement de 15 000 à 100 000.

— *nombre de plateaux théoriques* : au minimum 20 000 par mètre.

Phase mobile : solution de *sulfate de sodium anhydre R* à 28,4 g/L ajustée à pH 5,0 à l'aide d'*acide sulfurique dilué R*.

Débit : 0,5 mL / min.

Détection: réfractomètre différentiel.

Injection: 25 μL .

Étalonnage:

Utiliser comme détecteur un réfractomètre différentiel (RI) relié en série à un spectrophotomètre ultraviolet (UV) réglé à 234 nm de façon que le détecteur UV soit relié à la sortie de la colonne et le détecteur RI à la sortie du détecteur UV.

Mesurer précisément le temps qui s'écoule entre les 2 détecteurs, pour aligner correctement les chromatogrammes qui en proviennent. Les temps de rétention utilisés dans l'étalonnage sont ceux qui proviennent du détecteur RI.

Le facteur de normalisation utilisé pour calculer la masse moléculaire relative à partir du rapport RI/UV est obtenu comme suit: calculer la surface totale sous les courbes UV₂₃₄ ($\sum UV_{234}$) et RI ($\sum RI$) par intégration numérique dans un intervalle ne comprenant pas les pics dus au sel ou au solvant en fin de chromatogramme. Calculer le rapport r à l'aide de l'expression suivante:

$$\frac{\sum RI}{\sum UV_{234}}$$

Calculer le facteur f à l'aide de l'expression suivante:

$$\frac{M_{na}}{r}$$

M_{na} = valeur de la masse moléculaire relative moyenne déclarée de l'héparine de basse masse moléculaire pour étalonnage SCR indiquée par la notice délivrée avec la SCR.

A condition que les réponses UV₂₃₄ et RI soient alignées, la masse moléculaire relative M en tout point est calculée à l'aide de l'expression suivante:

$$f \frac{RI}{UV_{234}}$$

Le tableau résultant des temps de rétention et des masses moléculaires relatives peut servir à dériver un étalonnage du système chromatographique en ajustant une relation mathématique appropriée aux données. Un polynôme du 3^e degré est recommandé. *Il convient de souligner que l'extrapolation de cette courbe d'étalonnage ajustée aux masses moléculaires élevées n'est pas valable.*

Injecter 25 μ L de solution à examiner et enregistrer le chromatogramme pendant une durée permettant une élution complète des pics dus aux solvants et à la substance à examiner. La masse moléculaire relative moyenne en masse est définie par l'expression suivante:

$$\frac{\sum (RI_i M_i)}{\sum RI_i}$$

RI_i = masse de substance éluée dans la fraction i ,

M_i = masse moléculaire relative correspondant à la fraction i .

La masse moléculaire relative moyenne en masse de l'énoxaparine sodique est de 3800 à 5000. Le pourcentage en masse des chaînes de masse moléculaire relative inférieure à 2000 est de 12,0 pour cent à 20,0 pour cent. Le pourcentage en masse des chaînes de masse moléculaire relative comprise entre 2000 et 8000 est de 68,0 pour cent à 82,0 pour cent. Le pourcentage en masse des chaînes de masse moléculaire relative supérieure à 8000 est inférieur à 18,0 pour cent. [98] [99]

➤ Résultats

Lovenox® Sanofi Aventis

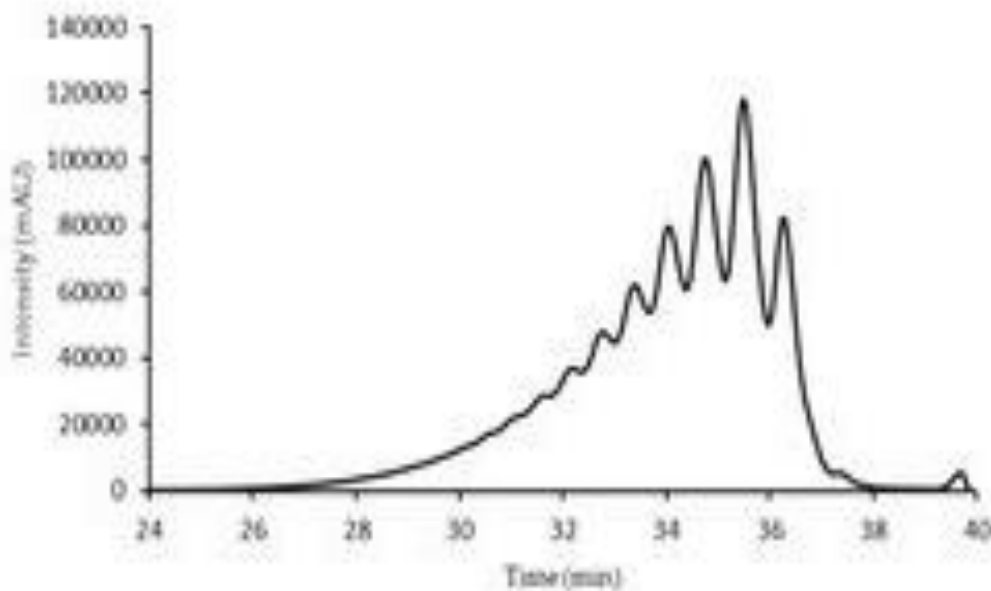


Figure I.1.3.1 : Un chromatogramme représentatif de la CES du Lovenox®. L'hétérogénéité et la complexité de la structure de l'énoxaparine sodique sont mises en évidence. [100].

➤ **Les critères d'acceptation**

Tableau I.1.3.1 : La distribution de la masse moléculaire de l'énoxaparine sodique.

Distribution de masse moléculaire	Critères d'acceptation
- Masse moléculaire moyenne en masse	3800 à 5000 Da
- fractions < 2000 Da	12,0 à 20,0%
- fractions entre 2000 et 8000 Da	68,0 à 82,0%
- fractions > 8000 Da	18,0% au maximum

I.1.4. Identification D : basée sur une réaction de précipitation de l'énoxaparine sodique après l'ajout de son antidote qui est le sulfate de protamine ; c'est une identification supplémentaire non requise par la monographie de la Ph. Eur. mais spécifique de l'énoxaparine sodique et donc effectuée en routine.

➤ **Matériels et méthodes**

Faire dissoudre 50 mg d'énoxaparine sodique dans 2 ml d'eau dans un tube à essai ; ajouter 1 ml de solution de sulfate de prolamine à 2% (m / V) et mélanger.

➤ **Résultat**

Un précipité blanc crémeux se forme.

I.2. Essais

I.2.1. Aspect de la solution

Faire dissoudre 1,0 g d'énoxaparine sodique dans 10 mL d'eau R.

I.2.1.1 La limpidité

A. METHODE VISUELLE

Dans des tubes à essai identiques, de verre neutre, incolore et transparent, d'un diamètre intérieur de 15-25 mm et à fond plat, comparer la solution d'énoxaparine sodique et la suspension témoin, l'épaisseur de la couche étant de 40 mm. 5 min après la préparation de la suspension témoin, examiner les liquides dans l'axe du tube sur fond noir en opérant à la lumière diffuse du jour, la diffusion de la lumière doit être telle qu'elle permette de différencier facilement la suspension témoin I de l'eau R et la suspension témoin II de la suspension témoin I.

La solution d'énoxaparine sodique est considérée comme limpide si sa limpidité correspond à celle de l'eau R ou du solvant utilisé dans les conditions opératoires indiquées ci-dessus, ou si son opalescence n'est pas plus prononcée que celle de la suspension témoin I.

B. METHODES INSTRUMENTALES

Le degré d'opalescence peut également être déterminé par des méthodes instrumentales, qui reposent sur la mesure de l'effet d'absorption ou de diffusion de la lumière résultant de l'existence d'inhomogénéités de densité optique à l'échelle submicroscopique, dans les solutions et suspensions opalescentes, la néphélométrie et la turbidimétrie sont des techniques utilisées à cette fin. Pour les mesures turbidimétriques portant sur des échantillons colorés, la turbidimétrie à ratio et la néphélométrie en mode ratio sont utilisées. L'effet de diffusion de la lumière par les particules en suspension peut être mesuré par observation de la lumière transmise (turbidimétrie) ou de la lumière diffusée (néphélométrie). [101]

I.2.1.2. Le degré de coloration

Dans des tubes à essai identiques, de verre neutre, incolore et transparent, d'un diamètre intérieur de 15 mm à 25 mm et à fond plat, comparer la solution de l'énoxaparine sodique à l'eau R, au solvant ou à la solution témoin (tableau des solutions témoins) prescrite dans la monographie, l'épaisseur de la couche étant de 40 mm. Apprécier les nuances à la lumière diffuse du jour par examen dans l'axe du tube sur fond blanc.^[102]

Tableau I.2.1.2.1 : Les solutions témoins B.

Solution témoin	Volumes en millilitres	
	Solution étalon B	Acide chlorhydrique à 10 g/L de HCl
B ₁	75,0	25,0
B ₂	50,0	50,0
B ₃	37,5	62,5
B ₄	25,0	75,0
B ₅	12,5	87,5
B ₆	5,0	95,0
B ₇	2,5	97,5
B ₈	1,5	98,5
B ₉	1,0	99,0

La solution de l'énoxaparine sodique n'est pas plus fortement colorée que la solution de degré 6 de la gamme des solutions témoins présentant la coloration la plus appropriée. ^[103]

I.2.2. Le pH

➤ Matériels et méthodes

Préparation de la solution à examiner : Faire dissoudre 1,0 g d'énoxaparine sodique dans de l'eau exempte de dioxyde de carbone R et compléter à 10,0 mL avec le même solvant.

La détermination potentiométrique du pH est effectuée comme indiqué dans le chapitre II de la première partie (II.1.2.1).

Conditions d'étalonnage et de mesure : les mesures sont effectuées à une température généralement entre 20 °C et 25 °C. L'étalonnage consiste à déterminer la pente et le zéro du système de mesure. L'appareil est étalonné avec au moins 2 solutions tampons choisies de telle sorte que leurs pH encadrent le pH attendu de la solution de l'énoxaparine sodique et présentent un écart d'au moins 2 unités pH. Le pH d'une autre solution tampon de pH intermédiaire, lu sur l'échelle, ne doit pas différer de plus de 0,05 unité pH de la valeur correspondant à cette solution.

Plonger les électrodes dans la solution de l'énoxaparine sodique et effectuer la lecture dans les mêmes conditions que celles appliquées pour les solutions tampons de référence. [104]

➤ **Limites:** 6,2 à 7,7. [105]

I.2.3. L'absorbance spécifique

L'absorbance (A) d'une solution est le logarithme décimal de l'inverse de la transmittance (T) pour un rayonnement monochromatique. Elle s'exprime par l'équation:

$$A = \log_{10} \left(\frac{1}{T} \right) = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

$$T = I / I_0$$

I = intensité du rayonnement monochromatique incident.

I₀ = intensité du rayonnement monochromatique transmis.

En l'absence d'autres facteurs physicochimiques, l'absorbance (A) est proportionnelle à l'épaisseur (b) de la couche traversée et à la concentration (c) de la substance dissoute, en accord avec l'équation:

$$A = \epsilon cb$$

ε = absorbance molaire, si b est exprimé en centimètres et c en moles par litre.

L'expression $A_{1 \text{ cm}}^{1 \text{ pour cent}}$ représentant l'absorbance spécifique d'une substance dissoute, se rapporte à l'absorbance d'une solution à 10 g/L sous une épaisseur de 1 cm à une longueur d'onde déterminée d'où:

$$A_{1 \text{ cm}}^{1 \text{ pour cent}} = \frac{10\epsilon}{M_r}$$

➤ **Matériels et méthodes**

Préparation de la solution à examiner : Faire dissoudre 50,0 mg d'énoxaparine sodique dans 100 mL d'acide chlorhydrique 0,01 M.

Mesurer l'absorbance à la longueur d'onde prescrite sous une épaisseur de 1 cm. L'absorbance de la solution, mesurée par rapport à l'air et à la longueur d'onde prescrite, ne doit en aucun cas dépasser 0,4 et doit être de préférence inférieure à 0,2. Tracer le spectre d'absorption en portant en ordonnée les valeurs d'absorbance ou toute fonction de celle-ci et en abscisse la longueur d'onde ou toute fonction de celle-ci. [106].

➤ **Limites:** 14,0 à 20,0 déterminées à 231 nm. [107]

I.2.4. L'alcool benzylique

C'est l'excipient associé à l'énoxaparine sodique pour assurer la stabilité (conservateur). Cet essai est fondé sur l'utilisation de l'HPLC (Annexe 3).

➤ **Matériels et méthodes**

Solution d'étalon interne : solution de 3,4-diméthyl phénol R à 1 g/L dans du méthanol R.

Solution à examiner : Faire dissoudre environ 0,500 g d'énoxaparine sodique dans 5,0 mL d'hydroxyde de sodium 1 M. Laisser reposer pendant 1 h. Ajoutez 1,0 mL d'acide acétique glacial R et 1,0 mL de solution d'étalon interne et compléter à 10,0 mL avec de l'eau R.

Solution témoin : Préparer une solution à 0,25 g/L d'alcool benzylique R dans l'eau R. Mélanger 0,50 mL de cette solution et 1,0 mL de solution d'étalon interne puis compléter à 10,0 mL avec de l'eau R.

Précolonne :

- dimensions : $l = 0,02$ m, $\varnothing = 4,6$ mm,
- phase stationnaire : gel de silice octylsilylé pour chromatographie R 5 μ m).

Colonne :

- dimensions : $l = 0,15$ m, $\varnothing = 4,6$ mm,
- phase stationnaire : gel de silice octylsilylé pour chromatographie R (5 μ m).

Phase mobile : méthanol R, acétonitrile R, eau R (5:15:80 V/V/V).

Débit : 1 mL/min.

Détection : spectrophotomètre à 256 nm.

Injection : 20 µL.

➤ **Résultat:**

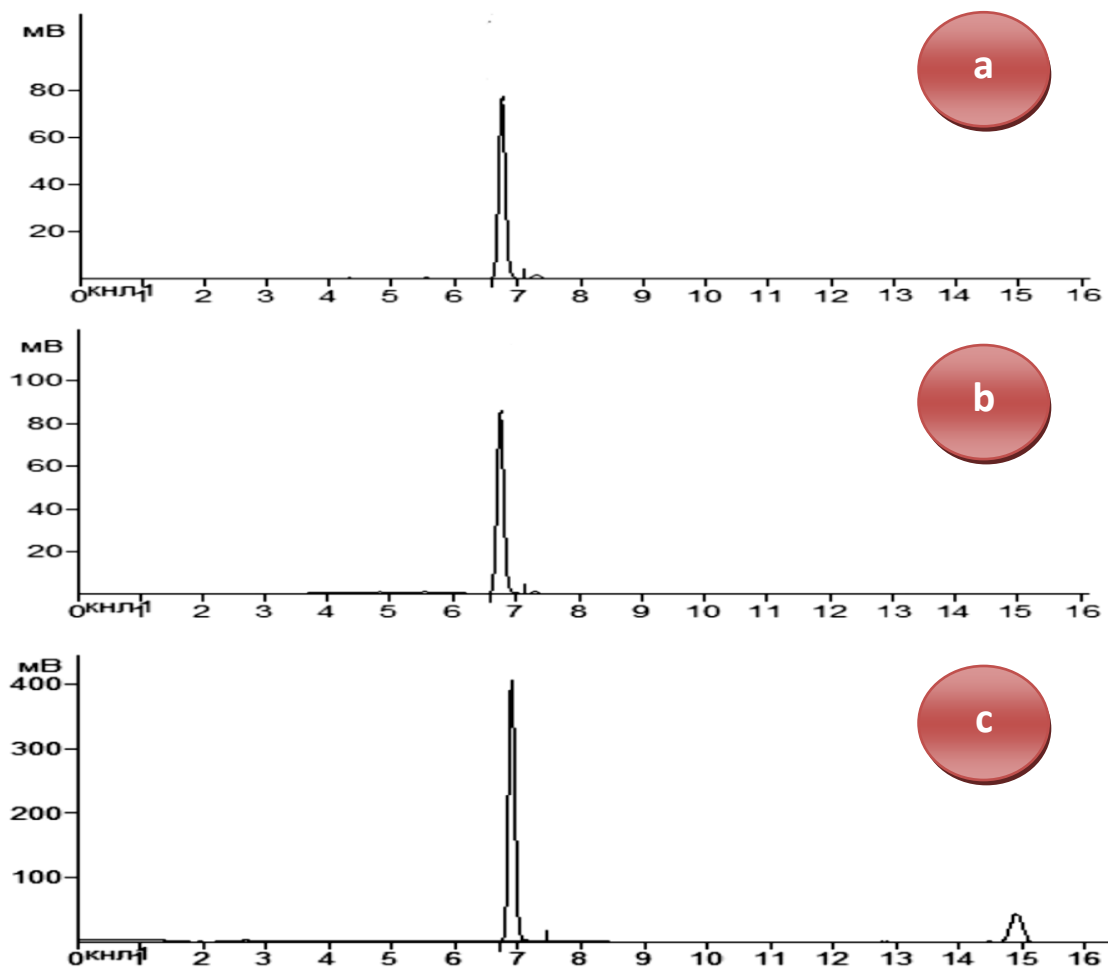


Figure I.2.4.1 : Chromatogrammes HPLC typiques de:

(a) L'étalon d'alcool benzylique

(b) Echantillon de mélange réactionnel provenant de l'hydrolyse de l'héparine benzylate.

(c) Un chromatogramme HPLC d'alcool benzylique avec le benzaldéhyde est donné à titre de comparaison. [108]

A partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, calculer le rapport (R1) entre la hauteur du pic dû à l'alcool benzylique et la hauteur du pic dû à l'étalon interne. A partir du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, calculer le rapport (R2) entre la hauteur du pic dû à l'alcool benzylique et la hauteur du pic dû à l'étalon interne. Calculer la teneur pour cent m/m en alcool benzylique de l'énoxaparine sodique à l'aide de l'expression suivante:

$$\frac{0,0125 \times R_2}{m \times R_1}$$

m: masse de la prise d'essai en grammes

➤ **Limite:** au maximum 0,1 pour cent m/m. [109].

I.2.5. Chlorure de benzéthonium

Lors de la préparation de l'énoxaparine sodique, on transforme la MP d'héparine en un sel d'ammonium quaternaire par réaction avec le chlorure de benzéthonium, pour générer un sel d'ammonium quaternaire d'héparine ; le chlorure de benzéthonium doit être présent à des limites bien précis dans la MP énoxaparine sodique [110]. Pour cela on utilise l'HPLC (Annexe 3) pour confirmer qu'il est ne dépasse pas les limites déterminées par l'USP.

➤ **Limites:** 0,0050 % au maximum.

I.2.6. Solvants résiduels “ méthanol et le chlorure de méthylène ”

La chromatographie en phase gazeuse à espace de tête ou headspace (CPG HS) (Annexe 2) est la méthode de choix pour l'analyse des solvants résiduels dans les substances et produits médicamenteux selon ICH, USP (chapitre 467) et Ph.Eur. (chapitre 5.4).

Les solvants résiduels qui peuvent être présent dans l'énoxaparine sodique sont le méthanol et le chlorure de méthylène qui sont des solvants de classe 2 dont l'utilisation est limitée à cause de leur toxicité vis-à-vis de l'organisme. [111].

➤ **Matériels et méthodes**

L'analyse des solvants résiduels par CPG HS impose des exigences élevées aux solvants utilisés pour la préparation des échantillons. Une analyse précise nécessite l'utilisation de solvants très purs définis par l'ICH.

➤ **Limites**

Tableau I.2.6.1 : Les limites des solvants résiduels.

Solvants résiduels	Limites
Méthanol	0,0100 % au maximum
Le chlorure de méthylène	0,0100 % au maximum

I.2.7. Azote

Cet essai est effectué par la méthode de Kjeldahl qui est une digestion à l'acide sulfurique.

➤ **Matériels et méthodes**

La détermination de l'azote s'effectue en deux étapes. La première étape est une digestion en milieu acide qui transforme tous les composés organiques azotés en azote ammoniacal. Dans la seconde étape, les ions ammonium sont dosés par un système automatisé. Les ions ammonium réagissent avec du salicylate, du nitroferrocyanure et de l'hypochlorite de sodium pour former en milieu alcalin un complexe salicylate ammoniacal, dont l'absorbance à 660 nm est proportionnelle à la concentration d'azote ammoniacal.

➤ **Limite:** 1,8 à 2,5 %.

I.2.8. Sodium

Le sodium n'a pas été ajouté comme excipient, mais fait partie du principe actif, avec lequel il forme un sel soluble dans l'eau, pour que ce dernier puisse être injecté. La charge sodée apportée par l'énoxaparine doit être prise en compte chez certains patients (p. ex. patients souffrant d'hypertension artérielle, d'insuffisance cardiaque ou d'insuffisance rénale). En cas de restriction sodée importante, une alternative thérapeutique moins riche en sodium doit être recherchée.

➤ Matériels et méthodes

Solution à examiner : Faire dissoudre 50 mg de l'énoxaparine sodique dans de l'acide chlorhydrique 0,1 M contenant 1,27 mg de chlorure de césium R par millilitre et compléter à 100,0 mL avec le même solvant.

Solutions de référence : Préparer des solutions de référence (25 ppm, 50 ppm et 75 ppm) à partir de la solution à 200 ppm de sodium (Na) R diluée avec de l'acide chlorhydrique 0,1 M contenant 1,27 mg de chlorure de césium R par millilitre.

Source : lampe à cathode creuse au sodium.

Longueur d'onde : 330,3 nm.

Dispositif d'atomisation : flamme de composition appropriée.^[112]

➤ **Limites :** 11.3 pour cent à 13.5 pour cent. ^[113]

I.2.9. Perte à la dessiccation

Cet essai mesure l'eau et les autres substances volatiles. Il est réalisé à une température de 70°C. La prise d'essai est choisie de telle sorte à ce que la différence des masses avant/après dessiccation soit comprise entre 5 et 50 mg.

➤ **Limite:** 5,5 à 11,0%.

I.2.10. Endotoxines bactériennes

Les endotoxines bactériennes sont des molécules pyrogènes issues des bactéries Gram négatif.

L'essai des endotoxines bactériennes décrit dans le chapitre 2.6.14 de la Ph. Eur. est basé sur le principe que le lysat d'amebocyte de limule (LAL) réagit en présence d'endotoxines bactériennes pour donner soit une coagulation soit un trouble soit une coloration jaune selon la technique employée.

➤ Matériels et méthodes

La réaction se produit dans une plaque de micropuits pour rechercher la présence d'endotoxines bactériennes dans l'échantillon.

100 μL prélevés à l'aide d'une pipette automatique et déposés dans les puits. 100 μL de LAL sont ajoutés dans chaque puits. La réaction n'est possible qu'à 37°C, la plaque de micropuits est donc placée dans une enceinte thermostatée qui maintient également une agitation constante. L'appareil mesure l'absorbance dans chaque micropuits et l'affiche en temps réel. Les résultats finaux sont obtenus au bout de 45 minutes environ.

Le logiciel d'analyse fournit les résultats.

➤ **Limites:** moins de 0.01 unité d'endotoxine / unité d'activité anti-facteur Xa en UI anti-facteur Xa.

I.2.11. La contamination microbienne

Le contrôle microbiologique des matières premières doit permettre de vérifier que celles-ci ne renferment pas de microorganismes risquant de gêner le déroulement de la fabrication ou, de microorganismes qui, ne pouvant être éliminés par les technologies mises en œuvre, pourraient altérer le produit fini. Ce test consiste à rechercher les microorganismes potentiellement dangereux.

➤ **Matériels et méthodes**

On prélève 100 à 500 microlitres de la solution de l'énoxaparine à l'aide d'une pipette graduée ou mieux pipette automatique, ensuite le prélèvement est déposé à la surface de la gélose et immédiatement répartis de façon uniforme à la surface du milieu au moyen d'un enseigneur stérile du type pipette râteau. Après la période d'incubation nécessaire, procéder au comptage des colonies pour chaque boîte de pétri.

➤ **Limites**

Tableau I.2.11.1 : Les limites de la contamination microbienne.

Contamination microbienne	Résultat
• Numération aérobie viable totale	100 CFU /g au maximum
• Dénombrement des levures et des champignons	10 CFU /g au maximum
• Micro-organismes spécifiés:	
Espèces de Salmonella	absence
Staphylococcus aureus	absence
Escherichia coli	absence
Pseudomonas aeruginosa	absence

**Tableau I.1 : Les identifications et les essais effectués sur la MP
énoxaparine sodique.**

Détermination	Méthode	Spécifications
1. Identifications		
A. Spectre RMN ¹³ C	Spectroscopie RMN	Le spectre obtenu est semblable au spectre RMN ¹³ C obtenu avec l'étalon de référence de l'énoxaparine sodique approprié.
B. La teneur en 1,6 anhydro	HPLC	15 à 25%.
C. Distribution de la masse moléculaire • fractions < 2000 Da • fractions [2000 - 8000 Da] • fractions > 8000 Da Masse moléculaire moyenne en masse	CES	12,0 à 20,0 68,0 à 82,0 18,0 au maximum 3800 à 5000
D. Sulfate de protamine	Précipitation	Un précipité blanc crémeux se forme.
2. Essais:		
Apparence Couleur Solution aqueuse • opalescence • coloration		Poudre fine Blanc à presque blanc Standard 1 maximum Degré 6 maximum
pH	Potentiométrie	6,2 à 7,7
L'absorbance spécifique	Spectroscopie UV	14,0 à 20,0
Alcool benzylique	HPLC	0,1000 % au maximum

Benzéthonium résiduel	HPLC	0,0050 % au maximum
Solvants résiduels	CPG-HS	
• méthanol		0,0100 % au maximum
• le chlorure de méthylène		0,0100 % au maximum
Azote	Méthode de Kjeldahl	1,8 à 2,5 %
Sodium	SAA	11,3 à 13,5 %
Perte à la dessiccation		5,5 à 11,0 %
Endotoxines bactériennes		moins de 0,01 UE / anti-Xa UI
Contamination microbienne		
• Numération aérobie viable totale		100 CFU / g au maximum
• Dénombrement des levures et des champignons		10 CFU / g au maximum
• Micro-organismes spécifiés		
Espèces de Salmonella		absence
Staphylococcus aureus		absence
Escherichia coli		absence
Pseudomonas aeruginosa		absence

II. Contrôle de la qualité du Produit Fini « Enoxaparine sodique injectable »

La conformité du médicament aux normes et sa validité sont examinées par plusieurs méthodes analytiques qualitatives et quantitatives, telles que les dosages volumétriques, les dosages par spectrophotométrie et l'analyse par différentes méthodes chromatographiques.

II.1. Identifications

II.1.1. Identification A: basée sur l'utilisation du sulfate de protamine et la mise en évidence d'une réaction de précipitation ; cette identification est exigée par l'USP.

➤ **Matériels et méthodes:**

Transférer le contenu total d'un récipient à dose unique ou 0,4 ml d'un contenant à doses multiples dans un tube à essai en verre, ajouter 2 ml d'eau et 1 mL de solution de sulfate de protamine à 2 % (p / v) , et mélanger.

➤ **Critères d'acceptation:** Il se forme un précipité blanc crème. [114]

II.1.2. Identification B : basée sur la spectroscopie d'absorption dans l'UV-visible (Annexe 9).

➤ **Matériels et méthodes**

Une solution d'essai et une solution étalon sont examinées par spectrophotométrie, dans des cellules de 1 cm, sur la plage spectrale de 200 à 400 nm.

Milieu: acide chlorhydrique 0,01 N

Solution standard: 500 μ g / mL

Solution échantillon: Transférer le contenu total d'un récipient unidose ou 0,4 mL d'un récipient multidose dans une fiole jaugée de 100 mL. Diluer avec un volume moyen.

Enregistrer et comparer les spectres obtenus simultanément pour la solution d'essai et la solution standard. Calculer les absorptivités et / ou les rapports d'absorbance. Les absorbances indiquées pour ces calculs sont celles mesurées à l'absorbance maximale à 231 ± 2 nm. Les

exigences sont satisfaites si les spectres d'absorption UV-visible de la solution d'essai et de la solution étalon présentent des maxima et des minima aux mêmes longueurs d'onde et si les taux d'absorption et / ou les rapports d'absorbance se situent dans les limites spécifiées. [115] [116]

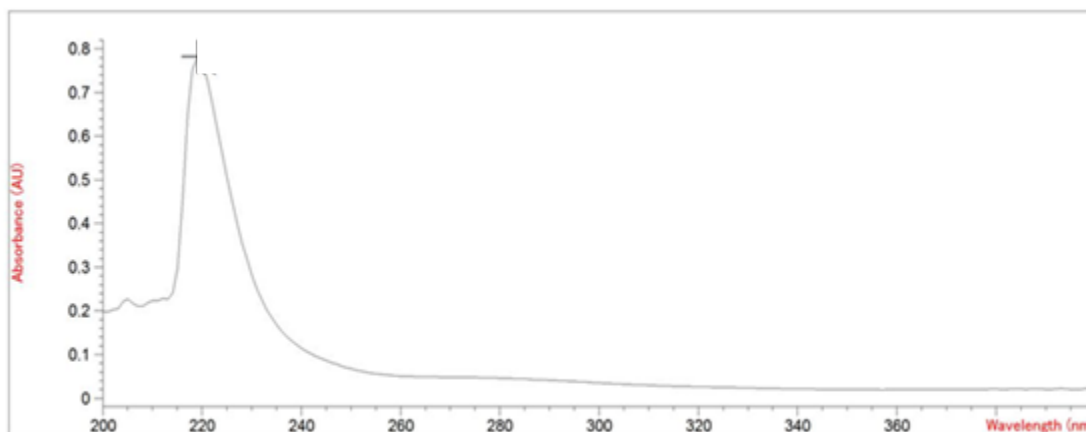


Figure II.1.2.1 : Spectre UV-visible de la solution de l'énoxaparine sodique. [117]

➤ **Critères d'acceptation:** Les spectres présentent des maxima à 231 ± 2 nm. [118]

II.1.3. Tests d'identification – Général

II.1.3.1. Sodium

➤ **Matériels et méthodes**

Préparer une solution contenant 0,1 g de l'énoxaparine sodique dans 2 ml d'eau. Ajouter 2 mL de carbonate de potassium à 15% et porter à ébullition. Aucun précipité ne se forme.

Ajouter 4 mL de pyroantimonate de potassium TS et porter à ébullition. Laisser refroidir dans de l'eau glacée et, si nécessaire, frotter l'intérieur du tube à essai avec une tige en verre. Un précipité dense se forme.

➤ **Résultat**

La solution de l'énoxaparine sodique confère une couleur jaune intense à une flamme non lumineuse. [119] [120]

II.2. Essais

II.2.1. Activité Anti-Facteur Xa

L'essai de l'activité anti Facteur Xa est un test chromogène destiné à la détermination quantitative de l'énoxaparine dans des solutions purifiées par mesure de l'activité d'inhibition du facteur Xa.

L'effet inhibiteur de l'anti-thrombine III (AT-III) sur la thrombine, le facteur Xa et d'autres sérines protéases de coagulation dans le plasma est multiplié par plusieurs milliers par l'énoxaparine. Cette inhibition explique l'effet anticoagulant de l'énoxaparine.

La présence d'énoxaparine catalyse la réaction entre ATIII et le facteur Xa. Le test d'inhibition du facteur Xa est le test le plus utile couvrant la plus grande variété de préparations d'énoxaparine.

Dans le test, le taux d'inhibition du facteur Xa est directement proportionnel à la concentration d'énoxaparine puisque les facteurs Xa et AT-III sont en excès. L'activité résiduelle du facteur Xa est inversement proportionnelle à la concentration d'énoxaparine.

➤ Matériels et méthodes

Solution d'acide acétique : acide acétique glacial et eau.

Tampon polyéthylène glycol 6000 pH 7,4 : Dissolvez 6,08 g de tris (hydroxyméthyl) aminométhane et 8,77 g de chlorure de sodium dans 500 mL d'eau. Ajouter 1,0 g de polyéthylène glycol 6000, ajuster avec de l'acide chlorhydrique à un pH de 7,4 et diluer avec de l'eau à 1000 ml.

Tampon pH 7,4 : dissoudre 6,08 g de tris (hydroxyméthyl) aminométhane et 8,77 g de chlorure de sodium dans 500 ml d'eau. Ajuster avec de l'acide chlorhydrique à un de 7,4 et diluer avec de l'eau à 1000 mL.

Tampon pH 8,4 : dissoudre 3,03 g de tris (hydroxyméthyl) aminométhane, 5,12 g de chlorure de sodium et 1,40 g d'édentate de sodium dans 250 ml d'eau. Ajuster avec de l'acide chlorhydrique à un pH de 8,4 et diluer avec de l'eau à 500 ml.

Solution d'antithrombine III humaine : Reconstituer un flacon d'antithrombine III dans l'eau pour obtenir une solution contenant 5 unités d'antithrombine III / mL. Diluer cette solution avec un tampon polyéthylène glycol 6000 pH 7,4 pour obtenir une solution ayant une concentration de 1,0 unité anti-thrombine III / mL.

Solution de facteur Xa : Reconstituer une quantité pesée de facteur Xa bovin dans un tampon polyéthylène glycol 6000 pH 7,4 pour obtenir une solution qui donne une augmentation de la valeur d'absorbance à 405 nm de 0,20 unités d'absorbance / min lorsqu'elle est dosée comme décrit ci-dessous mais en utilisant le cas échéant volume, V, le volume en μL de tampon pH 7,4 au lieu de V μL de la solution d'énoxaparine.

Solution de substrat chromogène : préparer une solution d'un substrat chromogène approprié pour le test amidolytique du facteur Xa dans l'eau pour obtenir une concentration d'environ 3 mM. Diluer avec un tampon pH 8,4 pour obtenir une solution ayant une concentration de 0,5 mM.

Solutions standards: Reconstituer le contenu entier d'une ampoule d'énoxaparine sodique USP pour les dosages biologiques RS avec de l'eau et diluer avec un tampon pH 7,4 pour obtenir quatre dilutions dans la plage de concentration entre 0,025 et 0,2 Anti-Factor Xa UI / mL.

Solutions d'échantillon: Procéder comme indiqué pour les solutions standards pour obtenir des concentrations d'injection similaires à celles obtenues pour les solutions standards.

Échantillons: solutions standard, solutions d'échantillons, solution d'antithrombine III humaine, tampon pH 7,4, solution de facteur Xa, solution de substrat chromogène et solution d'acide acétique

Étiqueter 18 tubes appropriés: B1 et B2 pour les blancs; T1, T2, T3 et T4 chacun en double pour les dilutions des solutions d'échantillon; et S1, S2, S3 et S4 chacun en double pour les dilutions des solutions standard. [Remarque - Traiter les tubes dans l'ordre B1, S1, S2, S3, S4, T1, T2, T3, T4, T1, T2, T3, T4, S1, S2, S3, S4, B2.] À chaque tube, ajouter le même volume, V (20–50 μL), de solution d'antithrombine III humaine et un volume égal, V, du blanc (tampon pH 7,4) ou d'une dilution appropriée des solutions d'échantillon ou des solutions standard. . Mélanger, mais ne laisser pas la formation de bulles d'air. Incuber à 37 ° C

pendant 2,0 min. Ajouter à chaque tube 2 V (40 à 100 μ L) de solution de facteur Xa et incuber pendant 2,0 min. Ajouter un volume de 5 V (100–250 μ L) de solution de substrat chromogène. Arrêter la réaction après 4,0 min avec un volume de 5 V (100–250 μ L) de solution d'acide acétique. Mesurer l'absorbance de chaque solution à 405 nm à l'aide d'un spectromètre UV-Visible contre le blanc B1. La lecture du blanc B2 par rapport au blanc B1 est de $\pm 0,05$ unité d'absorbance.

Tableau II.2.1.1 : Les différentes solutions utilisées dans le dosage de l'activité anti-Xa

Échantillon standard	50 μ l
Solution de l'anti-thrombine humaine III	50 μ l
Mélanger mais ne laisser pas la formation de bulles. Incuber à 37 ° C, pendant 2 minutes	
Solution facteur Xa bovin	50 μ l
Mélanger et incuber à 37 ° C, pendant exactement 2 minutes	
Solution du substrat chromogène	50 μ l
Mélanger et incuber à 37 ° C, pendant 2 minutes	
Solution d'acide acétique	50 μ l
Mélanger et mesurer l'absorbance à 405 nm	

La concentration standard de 100 UI / ml (stock principal) doit être diluée conformément au tableau ci-dessous:

Tableau II.2.1.2 : Préparation des solutions standards et des solutions d'essai

Série No.	Concentration (UI/ml)	Stock (µl)	Tampon diluant pH 7.4 (µl)	Volume (µl)	total
S1	10	50 µl du stock principal	450	500	
S2	1	50 µl de S1	450	500	
S3	0.12	60 µl de S2	440	500	
S4	0.09	45 µl de S2	455	500	
Dilution de la solution d'essai - Le stock principal de l'échantillon d'essai a une concentration de 100 UI / ml					
Série No.	Concentration (IU/ml)	Stock (µl)	Tampon diluant pH 7.4 (µl)	Volume (µl)	total
T1	10	50 µl du stock principal	450	500	
T2	1	50 µl du T1	450	1000	
T3	0.12	60 µl du T2	440	500	
T4	0.09	45 µl du T2	455	500	

➤ **Calculs:** Pour chaque série, calculer la régression de l'absorbance par rapport aux logarithmes décimales des concentrations des solutions échantillons et des solutions étalons, et calculer l'activité de l'énoxaparine sodique dans l'injection en UI d'activité anti-facteur Xa / mL, en utilisant des méthodes statistiques pour les dosages en ligne parallèle. Les quatre estimations logarithmiques indépendantes de la puissance relative sont ensuite combinées pour obtenir la moyenne géométrique finale. Ses limites de confiance sont calculées. [121]

➤ **Résultat:**

Tableau II.2.1.3 : Résultats de l'absorbance par rapport aux logarithmes décimaux des concentrations des solutions échantillons et des solutions étalons.

concentration des solutions standards IU/ml	Absorbance a 405nm	
	Set-1	Set-2
0.03	0.7731	0.7731
0.06	0.5363	0.473
0.09	0.2971	0.3303
0.12	0.197	0.1897

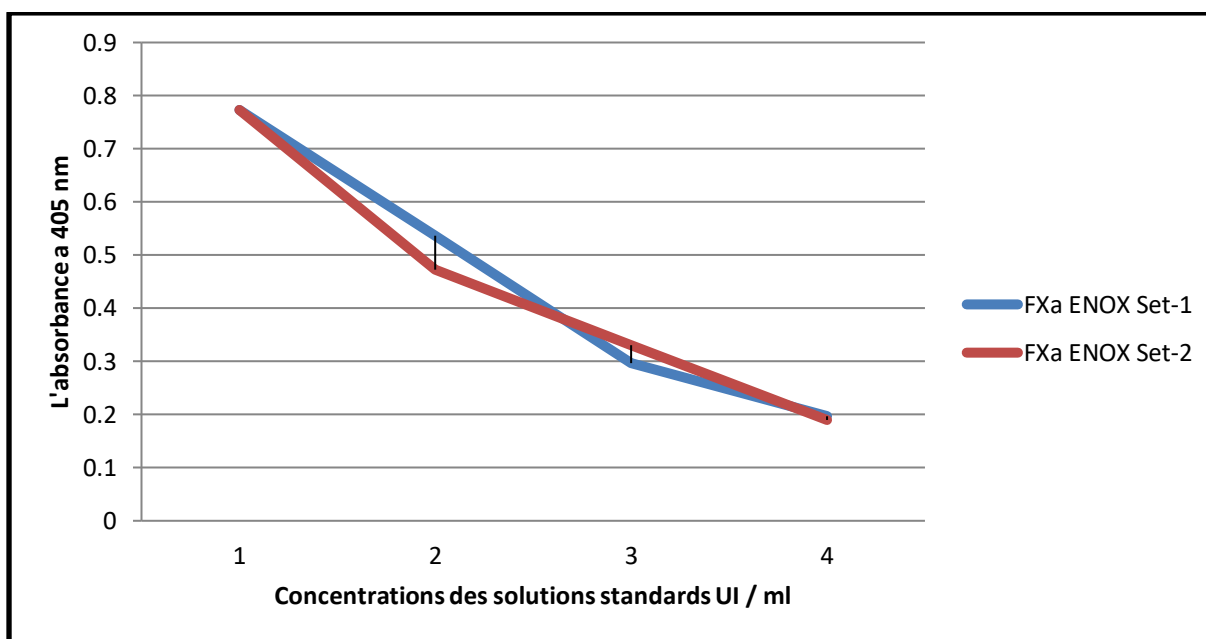


Figure II.2.1.1 : Graphe représentant la régression de l'absorbance par rapport aux logarithmes décimaux des concentrations des solutions échantillons et des solutions étalons. [122]

➤ **Critères d'acceptation:** L'activité est entre 90% et 110% de l'activité indiquée sur l'étiquette en termes d'unités internationales anti-facteur Xa (UI).

II.2.2. Le Rapport anti-facteur Xa / anti-facteur IIa

Le rapport de la valeur numérique de l'activité anti-facteur Xa dans l'anti-Xa UI / mL à la valeur numérique de l'activité anti-facteur IIa dans l'anti-facteur IIa UI / mL, tel que déterminé par l'activité anti-facteur Xa et l'activité anti-facteur IIa, respectivement, est de 3.3 à 5.3. [123]

II.3. Autres Composants

II.3.1. La teneur en alcool benzylique : déterminée par HPLC (Annexe 3).

➤ Matériels et méthodes

Phase mobile : acétonitrile, méthanol et eau.

Solution standard : 1,5 mg / mL d'alcool benzylique USP RS en phase mobile.

Solution échantillon : Transférer exactement 5,0 mL de l'injection dans une fiole jaugée de 50 mL. Diluer avec la phase mobile au volume.

Mode: HPLC.

Détecteur : UV 256 nm

Colonne : acier inoxydable de 4,6 mm × 15 cm; emballage L7¹

Débit : 1,0 mL / min, maintenu constant à ± 10%

Volume d'injection : 20 µL

Échantillons : solution standard et solution d'échantillon

Calculer le pourcentage d'alcool benzylique dans la portion d'injection prise:

$$\text{Résultat} = (r_U / r_S) \times C$$

r_U = aire du pic d'alcool benzylique de la solution échantillon.

r_S = aire du pic d'alcool benzylique de la solution standard.

C = concentration d'alcool benzylique dans la solution standard (mg / mL)

➤ **Critères d'acceptation:** 1,35 % - 1,65 %. [124]

II.4. Les Tests Spécifiques

II.4.1. Le pH

➤ **Limites** : 5,5 à 7,5. [125]

II.4.2. Le Test des endotoxines bactériennes

Le test des endotoxines bactériennes (TEB) est un test permettant de détecter ou de quantifier les endotoxines de bactéries à Gram négatif en utilisant le lysat d'amebocytes du crabe fer à cheval (*Limulus polyphemus* ou *Tachypleus tridentatus*).

Il existe trois techniques pour ce test:

1-La technique du gel-caillot : basée sur la formation de gel.

2- La technique turbidimétrique: basée sur le développement de la turbidité après clivage d'un substrat endogène.

3- La technique chromogène: basée sur le développement de la couleur après clivage d'un complexe synthétique peptide-chromogène.

Procéder par l'une des trois techniques pour le test. En cas de doute ou de litige, la décision finale est prise sur la base de la technique du gel-caillot. Le test est effectué de manière à éviter la contamination par les endotoxines. [126]

➤ **Critères d'acceptation**: la solution d'énoxaparine sodique contient moins de 0,01 unité d'endotoxine USP / unité d'activité anti-facteur Xa en UI anti-facteur Xa.[127]

II.4.3. Activité anti-facteur IIa

C'est un test chromogène destiné au dosage quantitatif de l'énoxaparine dans des solutions purifiées par mesure de l'activité d'inhibition du facteur IIa.

Dans l'essai, le taux d'inhibition du facteur IIa est directement proportionnel à la concentration d'énoxaparine puisque les facteurs IIa et AT-III sont en excès. L'activité résiduelle du facteur IIa est inversement proportionnelle à la concentration d'énoxaparine.

➤ **Matériels et méthodes**

Solution d'acide acétique, tampon polyéthylène glycol 6000 pH 7,4, tampon pH 7,4, tampon pH 8,4 et solution d'antithrombine III humaine: procéder comme indiqué dans le test d'activité anti-facteur Xa, sauf que la concentration de la solution d'antithrombine III humaine est de 0,5 Unité d'antithrombine III / mL.

Solution de thrombine humaine: reconstituer la thrombine humaine (voir Réactifs, indicateurs et solutions - Spécifications des réactifs) dans de l'eau et diluer dans un tampon polyéthylène glycol 6000 pH 7,4 pour obtenir une solution ayant une concentration de 5 unités de thrombine / mL.

Solution de substrat chromogène: préparer une solution d'un substrat chromogène approprié pour un test amidolytique pour la thrombine dans l'eau pour obtenir une concentration d'environ 3 mM. Immédiatement avant utilisation, diluer avec un tampon pH 8,4 à 0,5 mM.

Solutions standard: Reconstituer le contenu entier d'une ampoule d'USP Enoxaparin Sodium pour bioessais RS avec de l'eau et diluer avec un tampon pH 7,4 pour obtenir quatre dilutions ayant des concentrations comprises entre 0,015 et 0,075 UI d'activité anti-facteur IIa / mL.

Solutions standard: Diluer la solution d'énoxaparine sodique USP pour bioessais RS avec un tampon pH 7,4 pour obtenir quatre dilutions ayant des concentrations comprises entre 0,015 et 0,075 UI d'activité anti-facteur IIa / mL.

Solutions d'échantillon: Procéder comme indiqué sous Solutions standard pour obtenir des concentrations d'injection similaires à celles obtenues pour les solutions standards.

Procéder comme indiqué dans le test d'activité anti-facteur Xa, sauf pour utiliser la solution humaine de thrombine au lieu de la solution de facteur Xa et pour utiliser la solution d'antithrombine III humaine comme décrit ci-dessus.^[128]

Tableau II.4.3.1 : Les différentes solutions utilisées dans le dosage de l'activité anti-IIa

Échantillon standard	50µl
Solution de l'antithrombine humaine III	50µl
Mélanger mais ne laisser pas la formation de bulles d'air. Incuber à 37 ° C, pendant 2 minutes	
Solution de thrombine humaine	50µl
Mélanger et incuber à 37 ° C, pendant exactement 2 minutes	
Solution du substrat chromogène	50µl
Mélanger et incuber à 37 ° C, pendant 2 minutes	
Solution d'acide acétique	50µl
Mélanger et mesurer l'absorbance à 405 nm	

La concentration standard de 100 UI / ml (stock principal) doit être diluée conformément au tableau ci-dessous:

Tableau II.4.3.2 : Préparation des solutions standards et des solutions d'essai

Série No.	Concentration (UI/ml)	Stock (µl)	Tampon diluant pH 7.4 (µl)	Volume total (µl)
S1	10	50 µl du stock principal	450	500
S2	1	100 µl de S1	900	1000
S3	0.48	240 µl de S2	260	500
S4	0.36	180 µl de S2	320	500
S5	0.24	120 µl de S2	380	500
S6	0.12	60 µl de S2	440	500

Dilution de la solution d'essai - Le stock principal de l'échantillon d'essai a une concentration de 100 UI / ml

Série No.	Concentration (IU/ml)	Stock (µl)	Tampon diluant pH 7.4 (µl)	Volume total (µl)
T1	10	50 µl du stock principal	450	500
T2	1	100 µl du T1	900	1000
S3	0.48	240 µl du T2	260	500
S4	0.36	180 µl du T2	320	500
S5	0.24	120 µl du T2	380	500
S6	0.12	60 µl du T2	440	500

➤ **Calculs:** Pour chaque série, calculer la régression de l'absorbance par rapport aux concentrations logarithmes décimales des solutions d'échantillon et des solutions étalons, et calculez l'activité de l'énoxaparine sodique dans l'injection en UI d'activité anti-facteur IIa / mL, en utilisant des méthodes statistiques pour les dosages en ligne parallèle. Les quatre estimations de dilution indépendantes sont ensuite combinées pour obtenir la moyenne pondérée finale. Calculer ensuite les limites de confiance.

➤ **Résultats:**

Tableau II.4.3.3 : Résultats de l'absorbance par rapport aux logarithmes décimaux des concentrations des solutions échantillons et des solutions étalons.

concentration des solutions standards IU/ml	Absorbance a 405nm	
	SET-1	SET-2
0.12	0.7827	0.789
0.24	0.7628	0.6948
0.36	0.6047	0.5477
0.48	0.4684	0.463

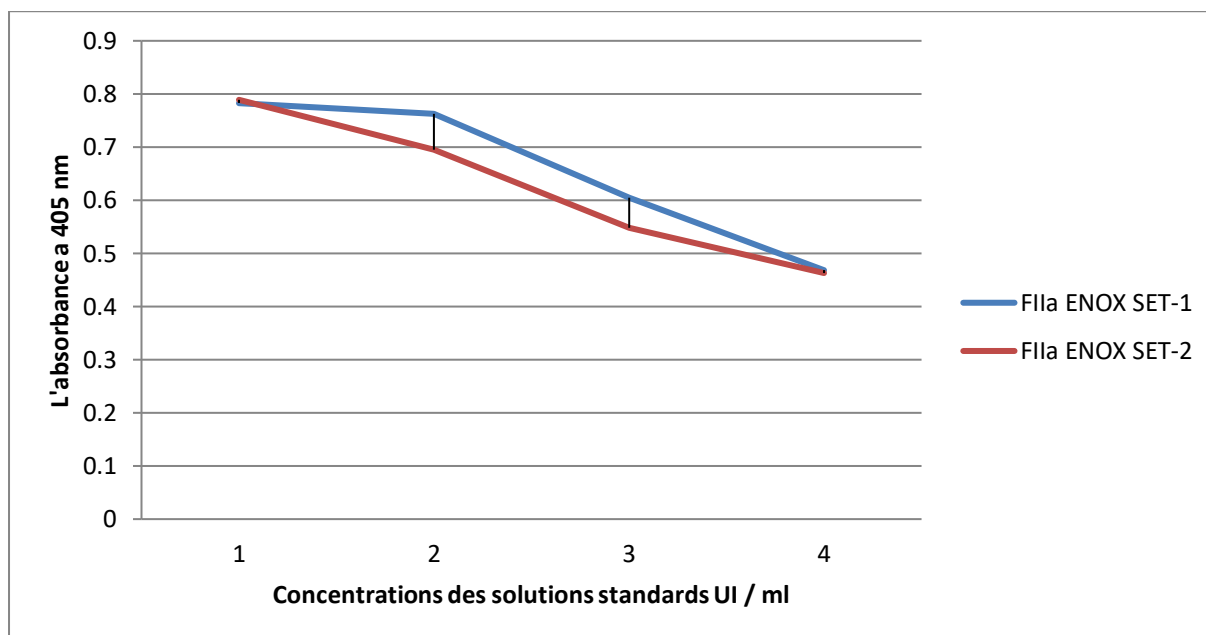


Figure II.4.3.1 : Graphe représentant la régression de l'absorbance par rapport aux logarithmes décimales des concentrations des solutions échantillons et des solutions étalons.[¹²⁹]

➤ **Critères d'acceptation:** L'activité anti-facteur IIa UI (ou UI / ml) est 20,0 - 35,0% de la puissance indiquée sur l'étiquette en termes d'unités internationales anti-facteur Xa (UI ou UI / ml).

II.4.4. Le Contenu en sulfate libre

L'activité anticoagulante des HBPM est fortement influencée par le degré de sulfatation et la distribution des groupes sulfate dans leurs chaînes oligosaccharidiques, donc il est indispensable de déterminer le contenu en sulfate pour démontrer l'activité.

La teneur en sulfate libre est déterminée en utilisant une méthode de chromatographie ionique (IC).

Phase mobile: solution de carbonate de sodium 3,0 mM

Solution d'adéquation du système: 3 µg / mL d'anion sulfate et 5 µg / mL d'anion d'oxalate.

Solution mère standard de sulfate: préparer une solution de sulfate de sodium en phase mobile dans un récipient sans sulfate approprié de telle sorte que la concentration de sulfate soit connue avec précision à environ 1 mg / ml. Transférer 5 g de la solution dans un récipient similaire et ajouter la phase mobile pour obtenir 25 g de solution.

Solution standard A: 0,1 µg / g de sulfate de la solution mère standard de sulfate en phase mobile.

Solution standard B: 0,5 µg / g de sulfate de la solution mère standard de sulfate en phase mobile.

Solution standard C: 1 µg / g de sulfate de la solution mère standard de sulfate en phase mobile.

Solution standard D: 2 µg / g de sulfate de la solution mère standard de sulfate en phase mobile.

Solution standard E: 4 µg / g de sulfate de la solution mère standard de sulfate en phase mobile.

Solution standard F: 5 µg / g de sulfate de la solution mère standard de sulfate en phase mobile

Solution échantillon: Transférer une quantité connue, m , d'énoxaparine sodique injectable, pesée avec précision, dans un flacon sans sulfate préalablement taré. Ajouter la phase mobile pour obtenir une solution ayant une concentration connue d'environ 10 mg/g.

➤ **Système chromatographique**

Mode: chromatographie ionique

Détecteur: conductivité

Colonne:

- Garde: 4 mm x 5 cm; emballage L61
- Analytique: 4 mm x 25 cm; emballage L61.

[REMARQUE — Utiliser un autosuppresseur anionique micromembranaire ou un système de suppression chimique approprié.]

Débit: 2,0 mL / min

Taille d'injection: 25 μ L

➤ **Adéquation du système**

Échantillon: solution d'adéquation du système

Exigences d'adéquation:

- **Résolution:** pas moins de 1 entre les pics sulfate et oxalate

Échantillons: solutions standard A-F et solution échantillon

Tracer la courbe standard de la hauteur du pic de sulfate en fonction de la concentration de sulfate (en μ g / g) dans les solutions standard A-F. À partir de la hauteur du pic de sulfate, déterminer la concentration de sulfate, C , en μ g / g, dans la solution d'échantillon, en utilisant la courbe standard.

Calculer le pourcentage de teneur en sulfate libre (w / w) dans la portion d'injection prise:

$$\text{Résultat} = [(C \times M_s) / 10m]$$

Ms = masse totale de la solution échantillon (g)

m = masse d'injection prise pour préparer la solution échantillon (mg)

- **Critères d'acceptation:** Le pourcentage de sulfate libre est de 0,12% (p / p).[130]

II.4.5. Les Tests de Stérilité

Étant donné que les tests de stérilité sont une procédure très exigeante, où l'asepsie de la procédure doit être assurée pour une interprétation correcte des résultats, il est important que le personnel soit correctement formé et qualifié. Le test de stérilité est effectué dans des conditions aseptiques. Afin d'atteindre ces conditions, l'environnement de test doit être adapté à la manière dont le test de stérilité est effectué. Les précautions prises pour éviter la contamination sont telles qu'elles n'affectent pas les micro-organismes qui doivent être révélés dans le test.

Ces procédures pharmacopées ne sont pas en elles-mêmes conçues pour garantir qu'un lot de produit est stérile ou a été stérilisé. Ceci est accompli principalement par la validation du processus de stérilisation ou des procédures de traitement aseptique.

Lorsque la preuve d'une contamination microbienne dans la solution de l'énoxaparine sodique est obtenue par la méthode pharmacopée appropriée, le résultat ainsi obtenu est une preuve concluante que la solution ne satisfait pas aux exigences du test de stérilité, même si un résultat différent est obtenu par une autre procédure.

Pour les seringues préremplies de l'énoxaparine sodique, expulser le contenu de chaque seringue dans un ou deux entonnoirs à membrane séparés ou dans des récipients de mise en commun séparés avant le transfert. Testez la stérilité de l'aiguille, en utilisant l'inoculation directe sous test de validation. Confirmez la stérilité en incubant une partie du milieu à la température d'incubation spécifiée pendant 14 jours.

- **Critères d'acceptation:** Aucune croissance de micro-organismes ne se produit.[131]

II.4.6. Les Particules dans les injections

Les matières particulaires dans les injections sont constituées de particules mobiles non dissoutes, autres que des bulles de gaz, présentes involontairement dans les solutions.

Pour la détermination de la matière particulaire, on utilise deux procédures:

1) *La méthode 1: le test de comptage de particules d'obscuration de la lumière*

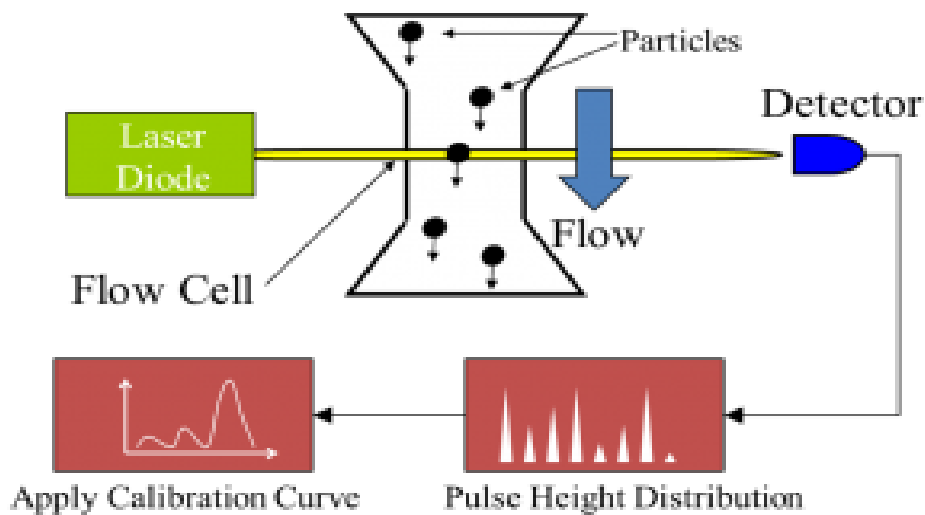


Figure II.4.6.1: Le principe de test de comptage de particules d'obscuration de la lumière.

2) *La méthode 2 : le test de comptage microscopique de particules*

Lors de l'examen des produits injectables pour des particules sous-visibles, la méthode 1 est de préférence appliquée. Cependant, il peut être nécessaire de tester certaines préparations par le test de comptage des particules d'obscuration de la lumière suivi du test de comptage microscopique des particules pour parvenir à une conclusion sur la conformité aux exigences.^[132]

**Tableau II.1 : Les identifications et les essais effectués sur le PF
énoxaparine sodique injection.**

Détermination	Méthode	Spécifications
Identifications		
A. Sulfate de protamine	Précipitation	Formation d'un précipité blanc crème
B. Absorption dans l'UV-visible	Spectroscopie UV-visible	Les spectres présentent des maxima à 231 ± 2 nm
C. Test d'identification général (Sodium)	Précipitation	Coloration jaune intense à une flamme non lumineuse.
Essais		
L'activité Anti-Facteur Xa	Test chromogène (Absorbance dans l'UV)	90% et 110 % de l'activité indiquée sur l'étiquette.
Le Rapport anti-Xa/anti- IIa	-	3.3 - 5.3.
Autres composants		
Alcool benzylique	HPLC	1,35 % - 1,65 %.
Tests spécifiques		
pH	Potentiométrie	5,5 à 7,5.
Endotoxines bactériennes	Technique du gel-caillot	Moins de 0,01 UE / anti-Xa UI
Activité anti-facteur IIa	Test chromogène (Absorbance dans l'UV)	20,0 - 35,0 % de la puissance indiquée sur l'étiquette.
Le Contenu en sulfate libre	IC	0,12 % (p / p)
Tests de Stérilité		Aucune croissance de micro-organismes ne se produit

III. Les impuretés

L'analyse des impuretés est d'un intérêt crucial pour toute substance à usage pharmaceutique. Dans le cas des substances d'origine animale, en plus des impuretés liées au procédé, des efforts particuliers sont faits pour contrôler les impuretés qui pourraient se trouver dans la matière de départ. Par conséquent, le contrôle des impuretés des HBPM est prescrit à la fois dans les monographies de HBPM et d'héparine non fractionnée. Comme pour les autres substances actives et médicaments, les impuretés telles que les solvants résiduels, les métaux lourds et autres doivent être limitées.

III.1. Les acides nucléiques et les protéines

Étant donné que les HBPM proviennent de tissus de mammifères, les impuretés telles que les acides nucléiques et les protéines doivent être contrôlées. Cela se fait en testant l'HNF dont ils sont dérivés.

III.1.1. Les impuretés nucléotidiques

Les impuretés nucléotidiques ont été déterminées en digérant d'abord les acides nucléiques dans l'échantillon d'héparine avec une combinaison d'enzymes pour générer des nucléosides libres. Les nucléosides résultants ont été séparés par HPLC (Annexe 3) et les aires de pic des nucléosides ont été déterminées. Le pourcentage de chaque nucléoside dans l'échantillon d'héparine a été déterminé en comparant sa surface de pic à celle d'un étalon de référence d'adénosine.

➤ **Limites:** Le critère d'acceptation était une teneur en impuretés nucléotidiques dans l'échantillon d'héparine qui ne dépassait pas 0,15.

III.1.2. Les impuretés protéiques

Les impuretés protéiques ont été déterminées en utilisant une méthode de détermination des protéines de Lowry dont sa grande sensibilité est sa principale qualité. Elle peut atteindre 5-10 µg.

Principe de la méthode

C'est une méthode colorimétrique complémentaire à celle du Biuret. En effet, la protéine réagit tout d'abord avec un réactif cuivrique alcalin (réactif de Gornall de la méthode du biuret) puis un second réactif, dit phosphotungstomolybdique (réactif de Folin-Ciocalteu), est ajouté. Ce réactif permet la réduction des acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane) conduisant à la formation d'un complexe coloré bleu foncé dont on mesurera l'absorbance entre 650 et 750 nm.

➤ Matériels et méthodes

Une préparation d'échantillon facultative pour éliminer les substances qui interféraient avec la détermination des protéines est effectuée au besoin. Cette étape facultative a été appelée le traitement des substances interférentes (TSI) décrite dans la monographie de l'USP sur l'héparine sodique

Le protocole à suivre est de mélanger la solution alcaline (solution de carbonate de sodium alcalin à 20g/L dans 0.1M de soude) à la solution de l'énoxaparine sodique, puis d'ajouter une solution de sulfate de cuivre et de tartrate double de sodium et de potassium. Laisser incuber au minimum 10 minutes à température ambiante. Ajouter ensuite le réactif de Folin (dilué au demi) sous agitation rapide. Attendre 30 minutes, et mesurer la DO à 750 nm.

➤ **Limites:** 0.5 au maximum.

III.2. Sulfate de chondroïtine sursulfaté (SCSS)

L'héparine est un médicament vital qui a été utilisé en toute sécurité depuis les années 1940. Cependant, en 2008, Une augmentation marquée a été rapportée des événements indésirables graves associés au traitement à l'héparine, touchant des milliers de patients. Ces événements comprenaient le développement de symptômes tels que des éruptions cutanées, des évanouissements, des battements cardiaques, une pression artérielle extrêmement basse et des réactions allergiques graves.

Cela a entraîné près de 100 décès seulement aux États-Unis. Elle a également touché l'UE et l'Asie. Ces effets secondaires indésirables ont entraîné le retrait d'un certain nombre de lots d'héparine des marchés américain et européen, suivi d'une enquête sur la présence de contaminants dans les lots suspects. Un certain nombre de laboratoires internationaux ont participé à l'enquête. À la suite de cette recherche et de la réaction rapide de la FDA, la présence de l'SCSS a été trouvée comme la cause des effets indésirables.

L'SCSS était un adjuvant synthétique peu coûteux qui avait une certaine activité anticoagulante et était vraisemblablement ajouté à l'héparine pour augmenter le profit lorsque le médicament était en pénurie en raison d'une épidémie de maladie porcine.

Après les problèmes de falsification des produits à base d'héparine avec du l'SCSS, de nouvelles méthodes de contrôle comme ^1H -RMN (Annexe 6) et HPLC (Annexe 3) ont été introduites à la fois par la FDA et dans les recueils de pharmacopée pour être en mesure de détecter ce contaminant et d'autres.

III.2.1. Analyse par la spectroscopie RMN du proton (^1H)

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique à haute résolution, c'est la méthode la plus fiable pour détecter la présence de SCSS en cas de contamination intentionnelle et d'autres contaminants et impuretés.

Principe:

Les signaux du groupe méthyle de l'héparine, sulfate de dermatane SD et SCSS résonnent à certains déplacements chimiques spécifiques et sont facilement quantifiés sur la base de l'intégration des signaux RMN. Aussi, un pourcentage très faible de 0,1% d'impureté SD et de contaminant SCSS est détectable par RMN ^1H .

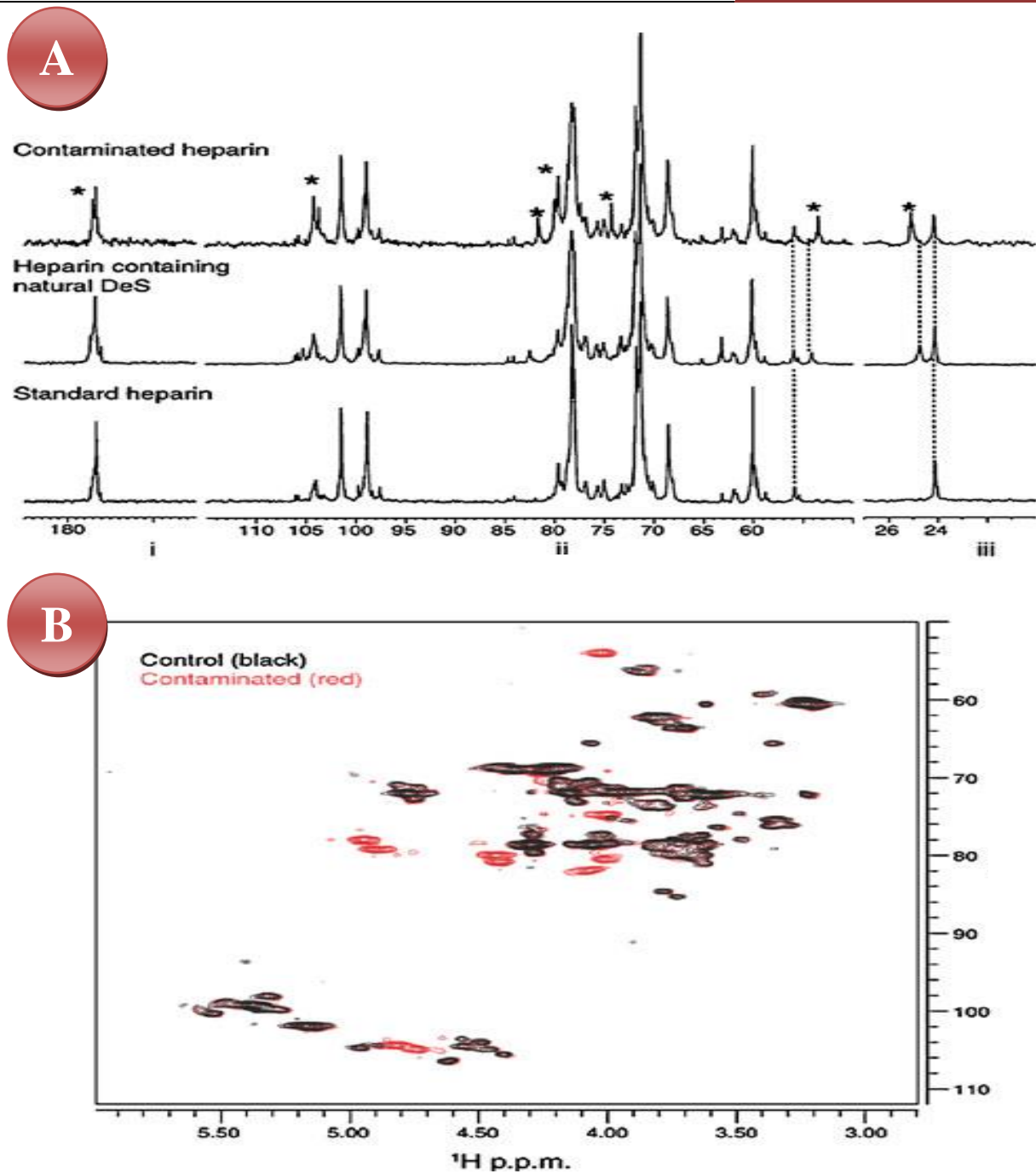


Figure II.2.1.1 : Spectres RMN de l'héparine contaminée.

(A) Comparaison des régions carbonyle (i), sucre (ii) et N-acétyl (iii) des spectres RMN ¹H de l'héparine standard, de l'héparine contenant du dermatane sulfate naturel et de l'héparine contaminée. Les signaux dus au contaminant sont mis en évidence par des astérisques.

(B) Spectre issu de la spectroscopie de cohérence quantique unique hétéronucléaire de l'échantillon contaminé superposé à celui d'un échantillon d'héparine de contrôle.

➤ Critères d'acceptation:

Aucun signal correspondant à l'SCSS ne doit en aucun cas être détecté.

III.2.2. La Chromatographie Liquide Haute Performance

L'HPLC permet la différenciation des contaminants naturels liés au processus de production, tels que sulfate de chondroïtine (SC) et sulfate de dermatane et des contaminants synthétisés chimiquement tels que l'SCSS. Dans la monographie de l'HNF dans la Ph. Eur une limite de 2% a été fixée pour la somme des SD et SC, qui co-éluent dans cette méthode ; mais aucun pic correspondant à l'SCSS ne doit être détecté dans tous les cas.

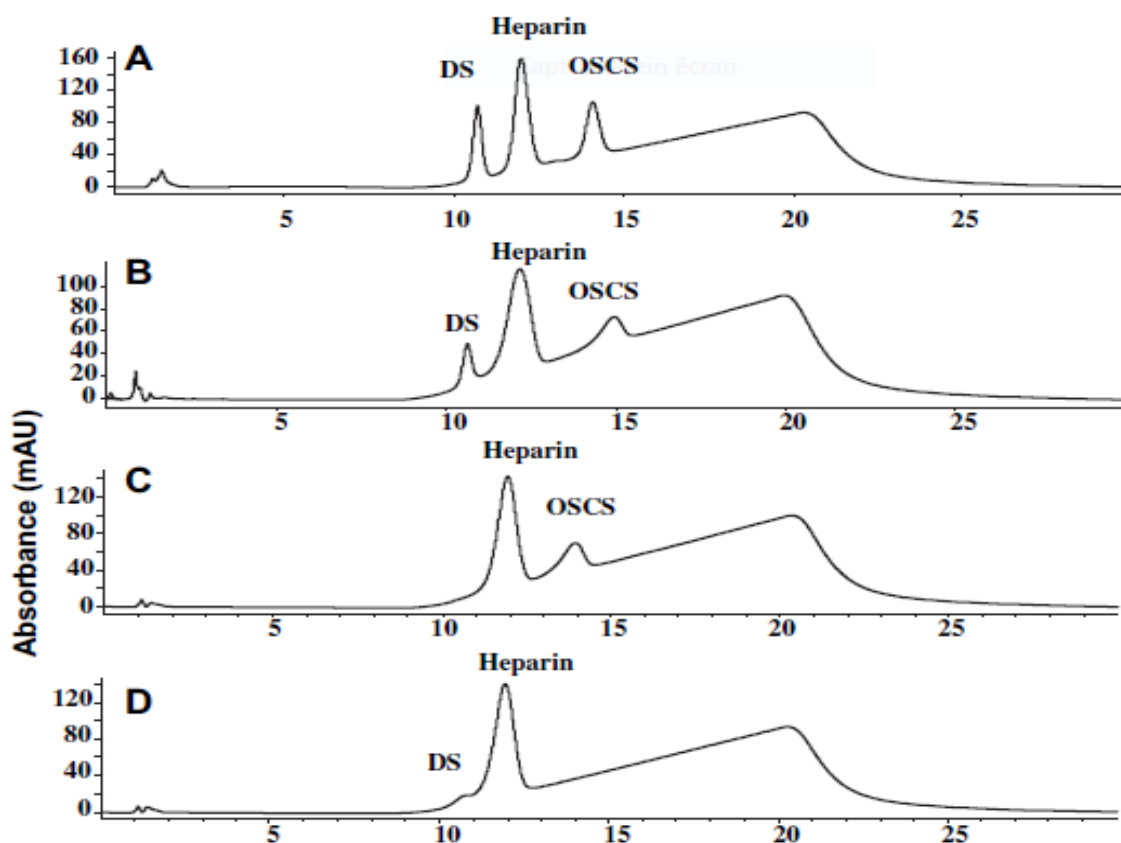


Figure III.2.2.1 : Analyse de quatre échantillons de l'héparine pour révéler les contaminants possibles par chromatographie liquide haute performance:

Échantillons: (A) héparine sodique enrichie avec 10% de SD et 10% d'SCSS.

(B) héparine sodique contaminée par SCSS enrichie avec 2,5% de DS.

(C) Héparine sodique contaminée par SCSS.

(D) L'héparine sodique disponible dans le marché.

III.3. La galactosamine dans l'héxosamine totale

Dans le cas de la monographie USP-NF, il existe également des limites pour la galactosamine dans l'hexosamine totale. L'échantillon est hydrolysé en hexosamines, qui sont ensuite séparées par chromatographie ionique haute performance (HPIC) (Annexe 5) couplée à un détecteur ampérométrique pulsé.

➤ **Critères d'acceptation:**

La limite de galactosamine dans l'hexosamine totale est de 1 %.

Résultat finale:

L'héparine est extraite des tissus des animaux à l'aide de protéase. Cette étape d'extraction peut entraîner la présence des impuretés dans l'héparine qui sont éliminées par les étapes de purification associées à la production de l'héparine. De faibles niveaux d'impureté protéique (c'est-à-dire pas plus que les critères d'acceptation) démontrent l'efficacité du processus de purification.

IV. Les études de stabilité de l'énoxaparine sodique

La stabilité des médicaments biologiques est un élément crucial de leur bon usage. Il s'agit de l'un des aspects importants de la qualité. Ainsi, avant d'être commercialisés, les médicaments biologiques sont soumis à des essais et des études de stabilité dans des conditions standardisées et internationalement reconnues. La durée et les conditions de conservation sont fixées en fonction des résultats de ces essais.

IV.1. Etudes de stabilité de la MP Enoxaparine sodique

Des lots de la substance médicamenteuse énoxaparine sodique ont été soumis à des études de stabilité à long terme et intermédiaires dans des conditions de stockage selon l'ICH de 25 ° C / 60% RH (Le critère de stabilité de Routh Hurwitz) et 30 ° C / 65% RH respectivement.

Les résultats de stabilité obtenus pour les substances médicamenteuses énoxaparine sodique conservées jusqu'à 12 et 36 mois ont été complétés et répondaient aux spécifications approuvées.

Tableau IV.1.1 : Les données de stabilité pour trois lots de validation d'énoxaparine sodique.

	Storage Condition and Time Point	Status
Lot 1	25°C/60%RH – 36 months	Completed
	30°C/65%RH – 12 months	Completed
Lot 2	25°C/60%RH – 36 months	Completed
	30°C/65%RH – 12 months	Completed
Lot 3	25°C/60%RH – 36 months	Completed
	30°C/65%RH – 12 months	Completed

Les lots de routine de la substance médicamenteuse énoxaparine sodique ont été soumis sur des études de stabilité à long terme dans des conditions de stockage ICH de 25 ° C / 60% RH. Les résultats de stabilité obtenus pour les substances médicamenteuses énoxaparine sodique conservées jusqu'à 36 mois ont été complétés et répondaient aux spécifications approuvées.

Tableau IV.1.2: Les données de stabilité pour les lots de routine d'énoxaparine sodique.

Batch number	Storage Condition and Time Point	Status
4	25°C/60%RH – 36 months	Completed
5	25°C/60%RH – 36 months	Completed
6	25°C/60%RH – 36 months	Completed
7	25°C/60%RH – 36 months	Completed
8	25°C/60%RH – 24 months	On-going
9	25°C/60%RH – 12 months	On-going

Les spécifications dont les lots doivent répondre à la fin des études sont citées dans le tableau IV.1.3 ci dessous:

Tableau IV.1.3 : Les spécifications et les critères d'acceptation des études de stabilité.

Détermination	Critères d'acceptation
Aspect	Poudre fine blanche à presque blanche
L'absorbance spécifique	14,0 à 20,0
Essais physico-chimiques:	
- Solution aqueuse	
- Opalescence	Standard 1 au maximum
- Coloration	Degré de coloration 6 maximum
- pH d'une solution aqueuse à 10% p / v	6,2 à 7,7
- Perte à la dessiccation	5,5 à 10,0%
Distribution de masse moléculaire:	
- Masse moléculaire moyenne en masse	3800 à 5000 Da
- fractions < 2000 Da	12,0 à 20,0%
- fractions entre 2000 et 8000 Da	68,0 à 82,0%
- fractions > 8000 Da	18,0% maximum
Analyses biologiques (sur base sèche)	
- Activité anti-Xa	90 - 110% de l'activité indiquée sur l'étiquette en termes d'unités internationales anti-facteur Xa
- Activité anti-IIa	20,0 - 35,0% de l'activité indiquée sur l'étiquette en termes d'unités internationales anti-facteur Xa
- Rapport activité anti-Xa / activité anti-IIa	3,3 à 5,3

Les données de stabilité pour le lot 1 ° C / 60% RH sont citées dans le tableau IV.1.4 ci dessous:

tableau IV.1.4: Les données de stabilité pour le lot 1.

TESTS	SPECIFICATION	0 months	3 months	6 months	9 months	12 months	18 months	24 months	36 months
Physical and chemical tests									
- Appearance	White to almost white fine powder	Complies	Complies	Complies	Complies	Complies	Complies	Complies	Complies
- Identification									
UV specific absorbance at 231 nm ^(a)	14.0 to 20.0	16.3	16.3	16.5	16.2	16.2	16.3	16.3	16.4
- Aqueous solution (1g in 10ml)									
Clarity ^(b)	Not more opalescent than Std. 1	< Std. 1	< Std. 1	< Std. 1	< Std. 1	< Std. 1	< Std. 1	< Std. 1	< Std. 1
Colour ^(c)	Not more intense than Degree 6	< Degree 7	< Degree 7	< Degree 7	< Degree 7	< Degree 7	Degree 7	< Degree 6	< Degree 6
- pH of 10 %w/v aqueous solution	6.2 to 7.7	7.1	6.9	6.9	6.7	6.8	6.6	6.6	6.7
- Loss on drying, %w/w	5.5 to 10.0	6.9	6.4	6.6	6.4	6.3	6.4	6.6	6.6
- Free sulphates, %w/w	read and record	0.35	0.39	0.38	0.35	0.37	0.25	0.37	0.40
Molecular mass distribution									
- Fractions < 2000 Da, %	12.0 to 20.0	14.0				14.5		14.5	14.5
- Fractions between 2000 and 8000 Da, %	68.0 to 82.0	75.0	Not required	Not required	Not required	74.5	Not required	74.0	74.0
- Fractions > 8000 Da, %	maximum 18.0	11.0				11.0		11.5	11.5
- Average molecular mass Da	3800 to 5000	4450				4400		4450	4450

VI.2. Etudes de stabilité du PF Enoxaparine sodique injectable

IV.2.1. Etude de stabilité anti-Xa de l'énoxaparine diluée pour usage pédiatrique

L'utilisation de l'énoxaparine chez les patients pédiatriques de faible poids (enfants et nourrissons) devient une pratique courante qui nécessite une dilution pour être administrée. La stabilité anti-Xa des seringues à dose unitaire préparées après dilution au-delà d'un jour est actuellement inconnue.

IV.2.1.1 L'objectif de l'étude

Évaluer la stabilité anti-Xa de l'énoxaparine diluée conservée dans des flacons en verre et des seringues à tuberculine.

IV.2.1.2. Mode opératoire

Quatre lots séparés d'énoxaparine ont été dilués avec de l'eau stérile pour obtenir une concentration finale de 2000 UI / mL et aliquotés dans des seringues en plastique de 1 mL contenant 0,3 mL ou maintenus dans le flacon en verre. Les seringues ont été conservées à température ambiante ou sous réfrigération. Le flacon en verre utilisé pour la dilution a été conservé à température ambiante.

L'activité anti-Xa a été mesurée après 4 semaines. Des comparaisons statistiques ont déterminé si les différences d'activité anti-Xa de l'énoxaparine diluée sont affectées par le milieu de stockage ou la température. Un test apparié a été utilisé pour déterminer toute différence significative entre l'activité anti-Xa à la date de préparation (référence) et les périodes suivantes, avec $p < 0,05$ considéré comme statistiquement significatif.

IV.2.1.3. Les résultats

L'activité anti-Xa de base moyenne était de 2607 UI / mL. Aucune diminution mesurable n'est survenue de l'activité anti-Xa de l'énoxaparine diluée dans le flacon en verre maintenu pendant la période de 4 semaines.

Par rapport au flacon en verre, les échantillons à température ambiante et de seringues réfrigérées présentaient une tendance à la baisse de l'activité anti-Xa aux semaines 3 et 4, mais n'atteignaient pas une signification statistique.

IV.2.1.4. Conclusion

Une diminution non significative de l'activité anti-Xa s'est produite à partir du jour 22 pour l'énoxaparine diluée dans des seringues à tuberculine, quelle que soit la température de stockage. Le stockage jusqu'à 4 semaines d'énoxaparine diluée dans des seringues en verre ou préremplies n'entraîne pas de perte statistiquement significative du potentiel anticoagulant. [133]

IV.2.2. Compatibilité et activité de l'énoxaparine sodique en solution injectable de chlorure de sodium à 0,9% pendant 48 heures

IV.2.2.1 L'objectif de l'étude

La stabilité de l'énoxaparine sodique dans une injection de chlorure de sodium à 0,9% dans des récipients en polychlorure de vinyle (PVC) a été étudiée.

IV.2.2.2. Mode opératoire

Des solutions en triple de 1,2 ml d'énoxaparine sodique et 98,8 ml de chlorure de sodium à 0,9% ont été préparées dans des récipients en PVC de 250 ml et conservées à température ambiante (20-22 ° C). Des échantillons ont été prélevés immédiatement après la préparation et à 0,25, 0,3, 0,75, 1, 4, 12, 16, 24 et 48 heures. Des inspections pour le changement de couleur et la précipitation ont été effectuées avec une station d'inspection de clarté et une loupe. Des échantillons des trois mélanges ont été évalués en double pour l'activité pharmacologique par un test d'héparine de coagulation automatisé.

IV.2.2.3. Les résultats

Tout au long de la période d'étude de 48 heures, les mélanges d'énoxaparine étaient exempts de changement de couleur, de dégagement de gaz. et précipite. L'activité pharmacologique de l'énoxaparine dans les récipients en PVC est restée > 94% de l'activité initiale mesurée pendant 48 heures.

IV.2.2.4. Conclusion

L'énoxaparine sodique 1,2 mg / ml dans une injection de chlorure de sodium à 0,9% dans des récipients en PVC était stable pendant jusqu'à 48 heures à 20-22 ° C.^[134]

IV.2.3. L'étude de stabilité et de stérilité de la solution injectable d'énoxaparine 8 mg / mL

L'énoxaparine est souvent diluée pour administrer avec précision des doses aux patients néonataux et nourrissons. Les recommandations actuelles pour les dilutions peuvent ne pas convenir aux plus petits patients.

IV.2.3.1 L'objectif de l'étude

Évaluer la stabilité et la stérilité de la solution de l'énoxaparine diluée.

IV.2.3.2. Mode opératoire

Un examen de la posologie a eu lieu et une concentration de 8 mg / mL d'énoxaparine a été choisie. Une concentration de 8 mg / mL a été combinée en diluant 0,4 mL d'énoxaparine dans 4,6 mL d'eau stérile pour injection dans un flacon stérile vide. Quatre seringues d'une concentration de 8 mg / mL ont été préparées par 5 techniciens (20 seringues au total).

Les tests de stabilité et de stérilité ont eu lieu à 0, 7, 14 et 30 jours. Une analyse de variance par mesures répétées unidirectionnelle a été utilisée pour détecter des différences significatives dans les concentrations d'anti – facteur Xa aux moments de test.

IV.2.3.3. Les résultats

La dilution de l'énoxaparine était stérile à 30 jours, mais présentait une dégradation significative au point de 30 jours ($p < 0,05$).

IV.2.3.4. Conclusion

Une dilution d'énoxaparine à 8 mg / mL est stable et stérile pendant 14 jours au réfrigérateur mais n'est pas stable à 30 jours.^[135]

V. Défis

Certains défis subsistent pour le futur dans l'analyse et le contrôle des HBPM. L'un d'eux est de satisfaire le besoin de formes pharmaceutiques en SCR qui sont essentielles pour normaliser les résultats dans la plupart des techniques mentionnées pour contrôler les HBPM.

Sans aucun doute, l'un des principaux défis dans le domaine des médicaments est la difficulté à détecter et à lutter contre la contrefaçon et l'adultération. Cela a été démontré pour les héparines contaminées par l'SCSS et c'est une préoccupation pour le moment, non seulement pour les autorités réglementaires, mais aussi pour l'industrie, qui n'est pas toujours en mesure de contrôler ses fournisseurs de matières premières. Plus les contrôles sont imposés, plus il sera difficile pour les trompeurs de ne pas être détectés. Cependant, à moins que le test ne soit effectué au stade final du processus de fabrication, il sera très difficile de trouver des méthodes infaillibles pour détecter la contamination prévue.

VI. Etudes de comparabilité et de similitude

Un défi important pour un avenir très proche est de définir quand une substance active est considérée comme «similaire» ou «identique» à un autre innovateur existant. Pour démontrer la similitude, un vaste programme de caractérisation analytique appliquant des techniques de pointe sera nécessaire, en plus des tests définis dans les monographies de pharmacopées respectives.

La FDA a développé une approche pour déterminer la similitude des produits biosimilaires et innovateurs d'HBPM lors de l'évaluation du dossier d'un biosimilaire de l'énoxaparine. Plusieurs critères sont utilisés pour évaluer les caractéristiques chimiques et biologiques des substances actives, en plus des dosages pour déterminer qu'il n'y a pas d'augmentation du risque d'immunogénicité.

L'approche consiste en la démonstration de l'équivalence sur la base de ce que la FDA appelle les «technologies analytiques intégrées», ce qui signifie la démonstration de l'équivalence sur la base d'un éventail de méthodes analytiques appropriées. Ces critères comprennent la démonstration de :

- L'équivalence des propriétés physico-chimiques.
- L'équivalence de la MP d'héparine (muqueuse intestinale porcine) et le mode de dépolymérisation.
- L'équivalence dans les blocs de construction disaccharidiques.
- La cartographie des fragments et la séquence des espèces d'oligosaccharides.
- L'équivalence dans les dosages biologiques et biochimiques.
- L'équivalence du profil pharmacodynamique in vivo.

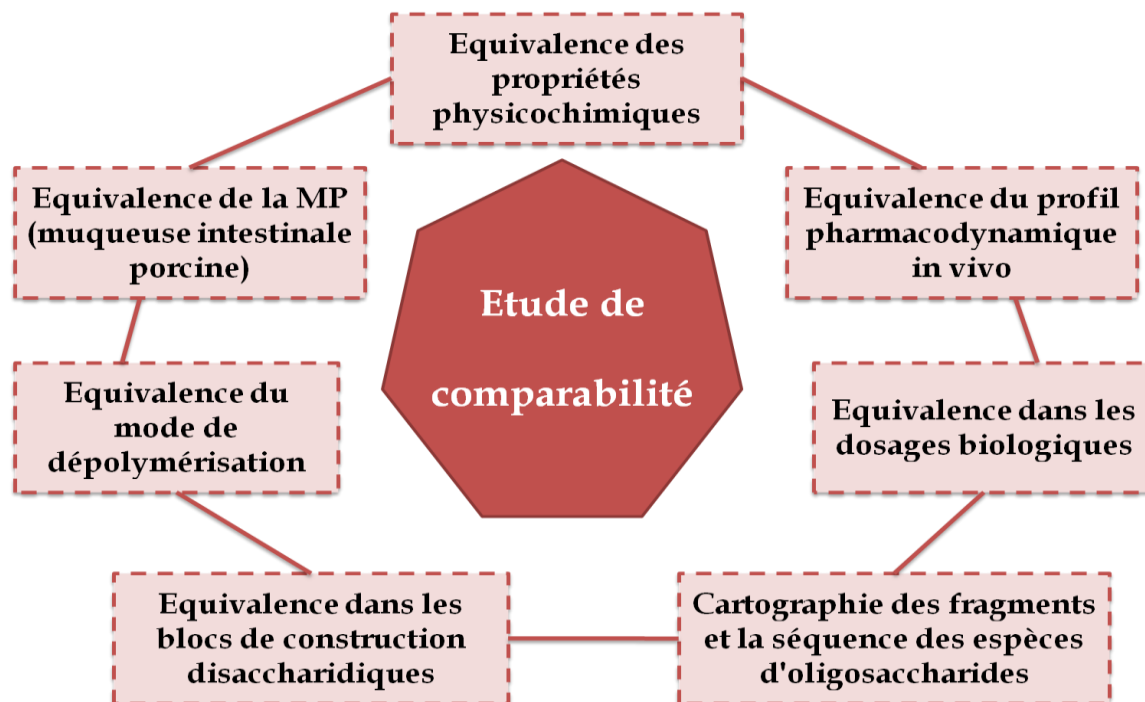


Figure VI.1 : Schéma représentant les études de comparabilités exigées lors du développement d'un biosimilaire de l'énoxaparine sodique.

Par conséquent, en plus des tests des monographies, d'autres techniques analytiques sensibles sont nécessaires pour comparer le produit innovateur et le produit de copie, y compris les méthodes de cartographie de la chaîne, l'analyse des oligosaccharides ou des disaccharides après digestion partielle ou totale, la détermination de la séquence des oligosaccharides et / ou l'analyse RMN.

Indépendamment du statut différent qu'auraient les copies du produit innovateur aux États-Unis ou dans l'UE, en tant que générique ou biosimilaire, respectivement, et de la nécessité ou non d'études cliniques comparatives, un exercice de comparabilité de la qualité est essentiel, basé sur des caractérisation à l'aide de techniques de pointe.

De plus, pour mieux comprendre le mécanisme par lequel l'héparine et les HBPM interviennent dans leur fonction, des méthodes analytiques fournissant une caractérisation structurale au niveau moléculaire sont essentielles pour assurer leur qualité et leur sécurité.

Avec l'avancée des nouvelles technologies et l'augmentation de la sensibilité des techniques existantes, cela devrait être plus faisable à l'avenir. [136]



Conclusion

Conclusion

Dans le domaine médical, le règne des molécules chimiques touche à sa fin car ces dernières années, il y'avait une croissance exponentielle de l'industrie biotechnologique qui a été traduit par la disponibilité de plus d'une centaine de molécules biothérapeutiques.

Les médicaments issus de la biotechnologie sont des biomolécules complexes qui ne peuvent être contrôlés comme les médicaments conventionnels à cause de leur complexité structurelle et leur microhétérogénéité intrinsèque, ainsi que la sensibilité aux différences de processus de fabrication. Tout petit changement dans le processus ou tout type de contamination peuvent engendrer des différences dans les propriétés physicochimiques et l'activité biologique ainsi que le degré d'immunogénicité.

De ce fait le contrôle physicochimique des médicaments issus de la biotechnologie est un groupe de tests de la plus haute importance pour prouver la qualité qui repose donc sur des caractéristiques propres à la nature de ces produits et aux risques spécifiques inhérents aux procédés de fabrication mis en œuvre, cependant ce contrôle doit impérativement être complété par d'autres contrôles biologiques et immunochimiques.

Les biosimilaires peuvent avoir un impact majeur sur l'accessibilité et la disponibilité des médicaments biologiques sur le marché, leur commercialisation augmentera l'accès des patients à des médicaments efficaces et moins coûteux. Compte tenu de la complexité des produits biologiques et les difficultés dans la caractérisation analytique et dans les essais cliniques, il est nécessaire que le concept de biosimilaires repose sur la démonstration de la similarité sur les trois niveaux (qualité, efficacité et sécurité) afin de définir un profil le plus complet possible de ces produits.

A decorative frame with ornate, swirling black flourishes at the corners and midpoints of the sides. The word "Résumés" is written in a large, elegant, black cursive font in the center of the frame.

Résumés

Résumé :

Les médicaments issus de la biotechnologie présentent une grande complexité structurale et fonctionnelle, ils sont produits par des cellules vivantes au moyen d'un processus de fabrication mutli-étapes extrêmement complexe, la qualité de ces médicaments dépend donc des caractéristiques propres à la nature de ces produits (Protéines, glycanes ... etc) et des risques spécifiques inhérents aux procédés de fabrication mis en œuvre. Pour remédier aux inquiétudes concernant ces médicaments, des exigences réglementaires sont prises pour garantir la sécurité et l'efficacité du produit fini. De ce fait, un contrôle physicochimique précis et rigoureux s'impose impliquant l'élaboration d'une stratégie de contrôles adaptée et l'utilisation de méthodes d'analyse appropriées les plus récentes et les plus performantes: spectrales (UV-vis, MS, dichroïsme circulaire, RMN ...) chromatographique (exclusion, échange d'ions, HPLC ...), électrophorétiques (CE, SDS PAGE, IEF...), ce contrôle doit être complété par d'autres contrôles biologiques et immunochimiques.

Abstract :

A biotechnological drug is a large complex biomolecule with a heterogeneous structure prepared by the use of living systems through an extremely complex multistep manufacturing process. Therefore the quality of these drugs depends on the characteristics specific to their nature (proteins, glycanes ... etc) as well as the specific risks inherent in the manufacturing process used. In order to fix concerns about these drugs, regulatory requirements are taken to ensure the safety and efficacy of the finished product. As a result, precise and rigorous physicochemical control is required in order to develop an appropriate control strategy and to use the most recent and most efficient appropriate analysis methods: spectroscopic methods (UV-vis, MS, circular dichroism , NMR...) chromatographic (SEC, IEC, HPLC...), electrophoretic (CE, SDS-PAGE, IEF...), this control must be supplemented by other biological and immunochemical controls.

ملخص:

تتميز العقاقير البيولوجية بتعقيد هيكلي ووظيفي كبيرين ، حيث يتم إنتاجها بواسطة الخلايا الحية عن طريق عملية تصنيع معقدة للغاية ، وبالتالي فإن جودة هذه الأدوية تعتمد على الخصائص المحددة لطبيعة هذه المنتجات (البروتينات ، متعدد السكريد ... إلخ) بالإضافة إلى المخاطر المحددة الكامنة في عمليات التصنيع المستخدمة. لمعالجة المخاوف بشأن هذه الأدوية ، يتم اتخاذ المتطلبات التنظيمية لضمان سلامة وفعالية المنتج النهائي. نتيجة لذلك ، يجب القيام بمراقبة الجودة فيزيائيا وكيميائيا بشكل دقيق وصارم عن طريق استخدام أحدث طرق التحليل وأكثرها فعالية كالطرق المطيافية (مطيافية الضوء المرئي/فوق البنفسجي، مطيافية الكتلة ومطيافية الرنين المغناطيسي النووي)، الكروماتوغرافيا (كروماتوغرافيا التبادل الأيوني و الكروماتوغرافيا السائلة رقيقة الانجاز) بالإضافة الى مختلف تقنيات الرحلان الكهربائي، يجب استكمال المراقبة الفيزيوكيميائية بأخرى بيولوجية ومناعية.



Annexes

Annexes

Annexe 1 : La chromatographie échangeuse d'ions (IEC):

Dans l'IEC, le paramètre qui va permettre la séparation des différents constituants est la charge nette. Pour cela, on utilise des résines chargées positivement (chromatographie échangeuse d'anions) ou négativement (chromatographie échangeuse de cations). [137]

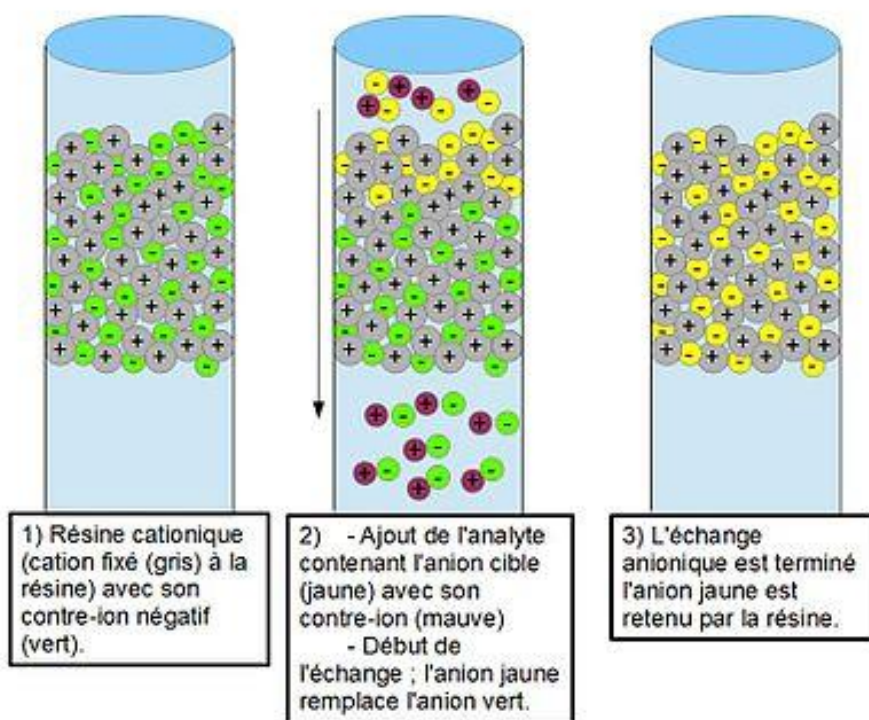


Figure 1: Le principe de l'IEC.

Annexe 2 : La Chromatographie en Phase gazeuse (CPG) :

C'est une méthode de séparation des composés volatils basée sur l'interaction entre ceux-ci et la phase stationnaire. L'agitation brownienne apportée par la montée en température du four libérant les composés de cette interaction. Le balayage de la colonne par le gaz vecteur entraîne les composés vers le détecteur. [138]

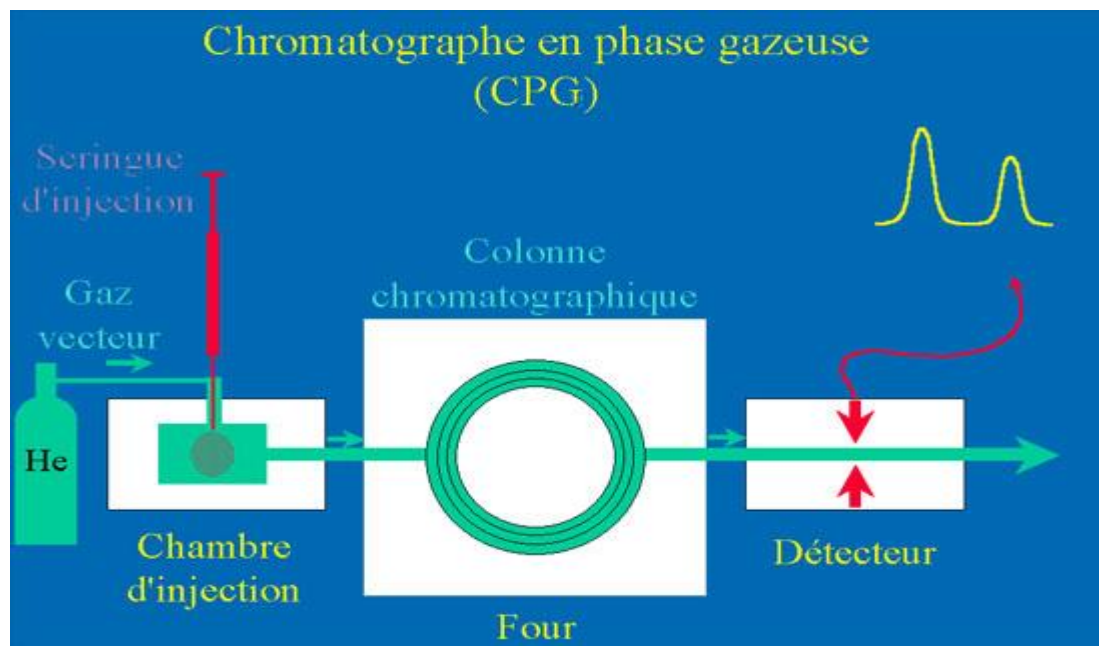


Figure 2: Le principe de la CPG.

Annexe 3 : La Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) :

C'est une technique de séparation chromatographique fondée sur la distribution différentielle des espèces entre deux phases non miscibles, une phase stationnaire (silice vierge ou greffée, polymère moléculaire, échangeurs d'ions) contenue dans une colonne et une phase mobile (solvant pur, mélange de solvants) liquide qui traverse, par percolation, cette phase stationnaire ; chaque soluté se répartit entre les deux phases précédemment mentionnées selon un coefficient de « Nernst »: $K = C_s / C_m$.^[139]

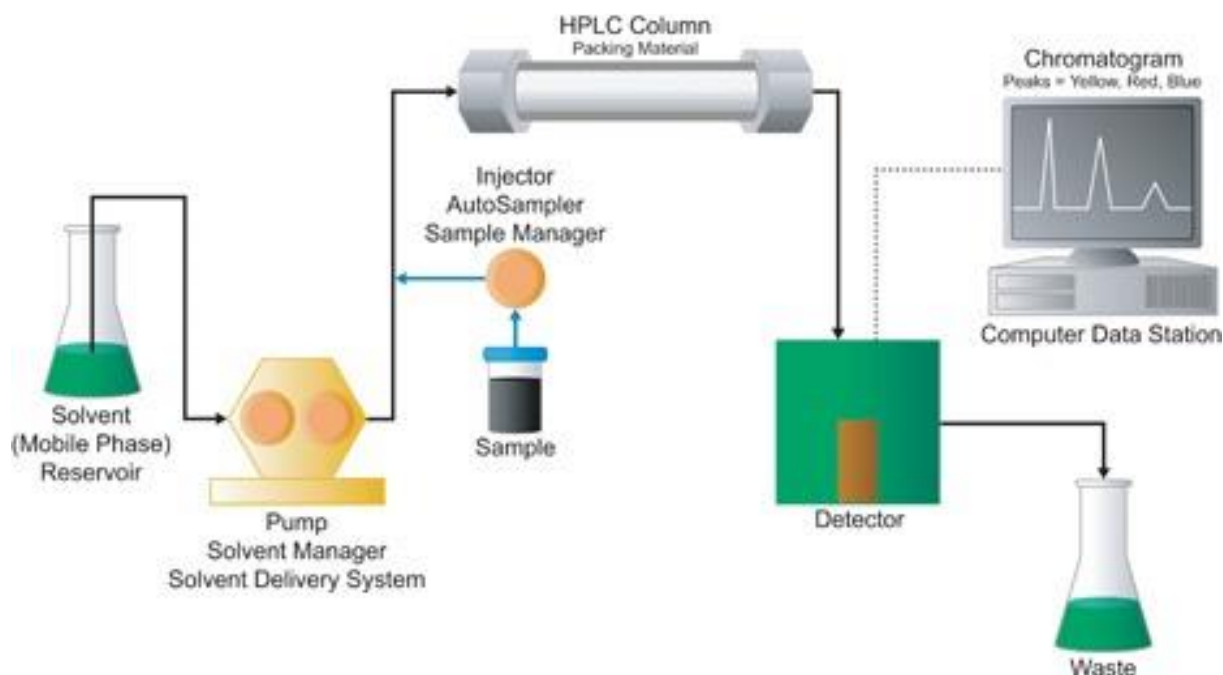


Figure 3: Le principe de l'HPLC

Annexe 4 : La chromatographie d'exclusion stérique (SEC):

C'est un procédé de séparation des molécules en solution en fonction de leur taille au cours de leur pénétration dans les pores de la phase stationnaire remplie de solvant. Contrairement aux autres chromatographies elle n'est pas fondée sur des interactions directes entre le soluté et la phase stationnaire. C'est la plus récente des méthodes chromatographiques complémentaire à la HPLC. Elle est surtout utilisée pour les espèces de masse molaire élevée (100 à 10000000 daltons). [140]

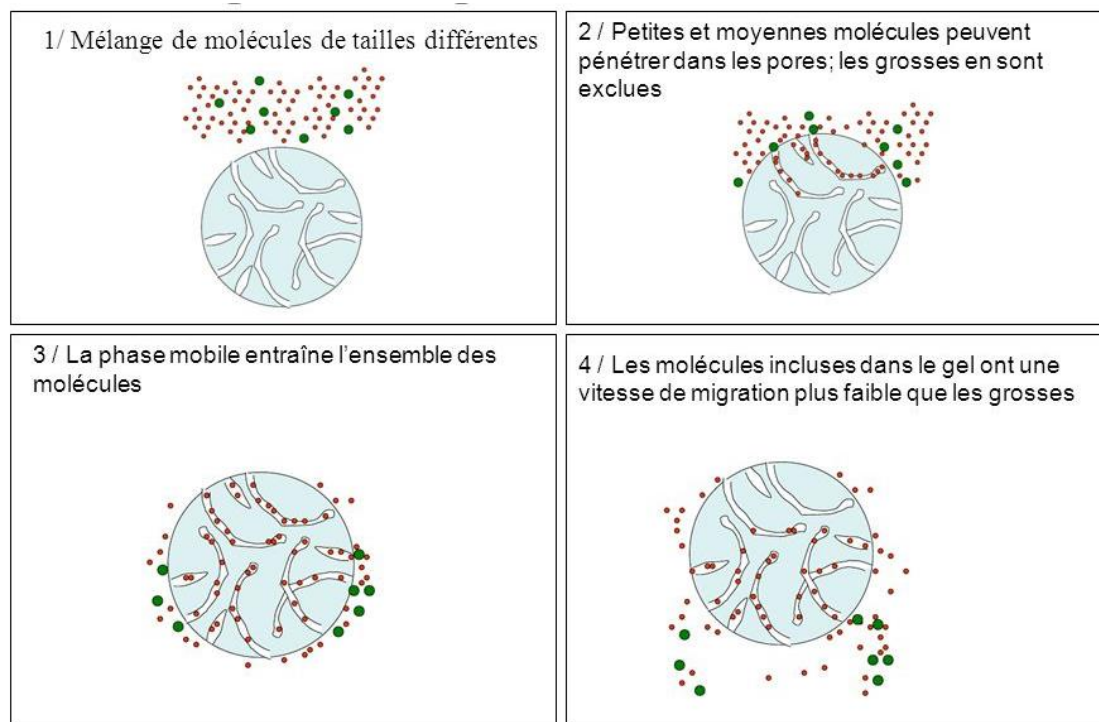


Figure 4: Le principe de la SEC.

Annexe 5 : La chromatographie ionique haute performance (HPIC)

La chromatographie ionique (IC) est une technique qui s'apparente à l'HPLC mais qui présente cependant suffisamment de particularités, tant au niveau du principe de la séparation que de certaines méthodes de détection, pour en faire l'objet d'une étude à part.

Cette technique de chromatographie est orientée vers la séparation des ions et des composés polaires. Pour cela on utilise des colonnes contenant des phases stationnaires comportant des sites ioniques pour qu'il se crée des interactions dipolaires avec les analytes à séparer. Plus grande est la charge portée par un soluté, plus ce dernier est retenu par la phase stationnaire. Ce processus d'échange est lent, comparé à ceux qui régissent les autres types de chromatographie. Pour les composés organiques, il se superpose au mécanisme précédant les effets déjà décrits en HPLC avec les colonnes à polarité inversée.^[141]

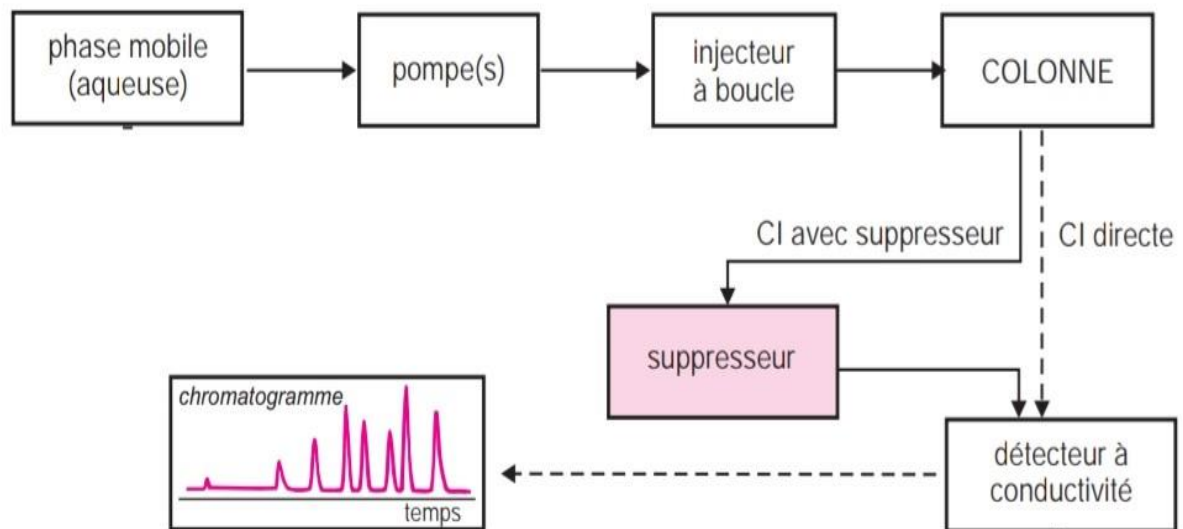


Figure 5: Le principe de l'HPIC.

Annexe 6 : La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

C'est une méthode de spectroscopie fondée sur les propriétés de certains noyaux atomiques à absorber de l'énergie (transition de niveaux) sous l'effet d'un champ magnétique et électromagnétique. On obtient un spectre caractéristique avec des raies de résonance. [142]

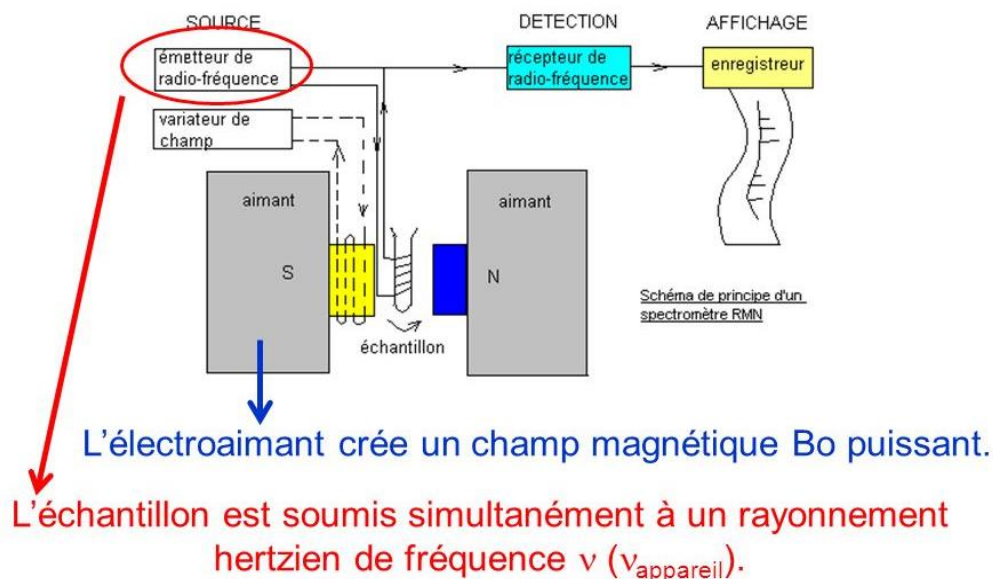


Figure 6: Schéma de principe d'un spectromètre RMN.

Annexe 7 : Le dichroïsme circulaire (CD):

C'est une spectroscopie d'absorption dans l'UV proche et lointain basée sur la capacité d'un échantillon à absorber différemment la lumière polarisée circulaire droite et circulaire gauche. [143]

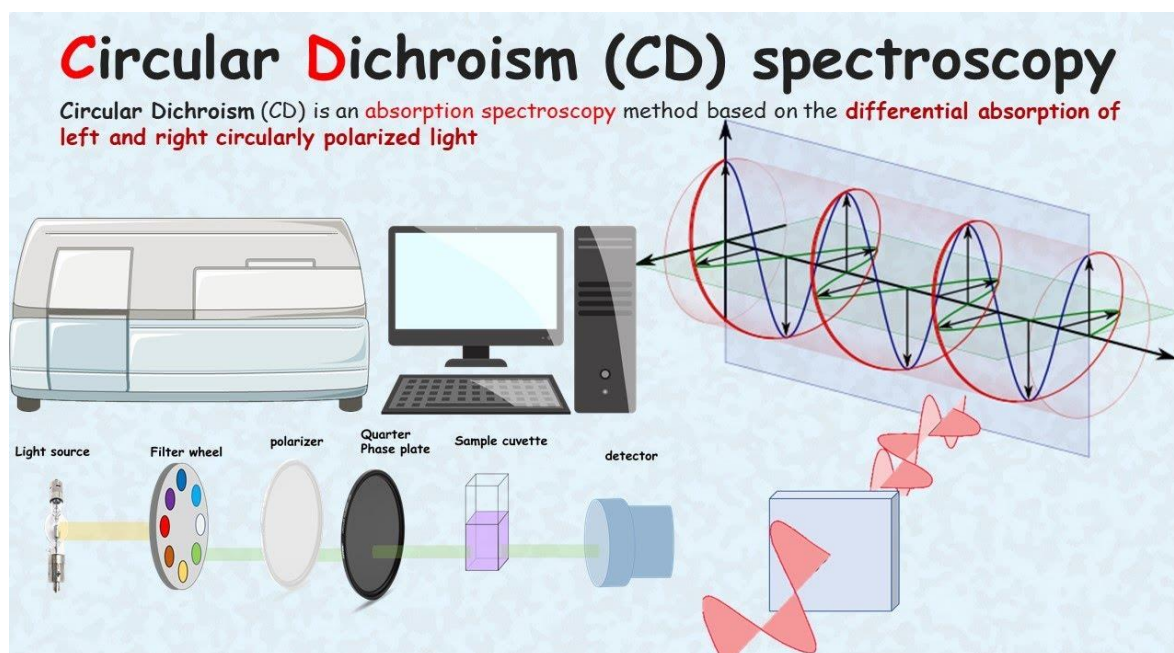


Figure 7: Schéma de principe du CD.

Annexe 8 : La spectrométrie de masse (MS) :

C'est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier les molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). [144]

LA SPECTROMETRIE DE MASSE

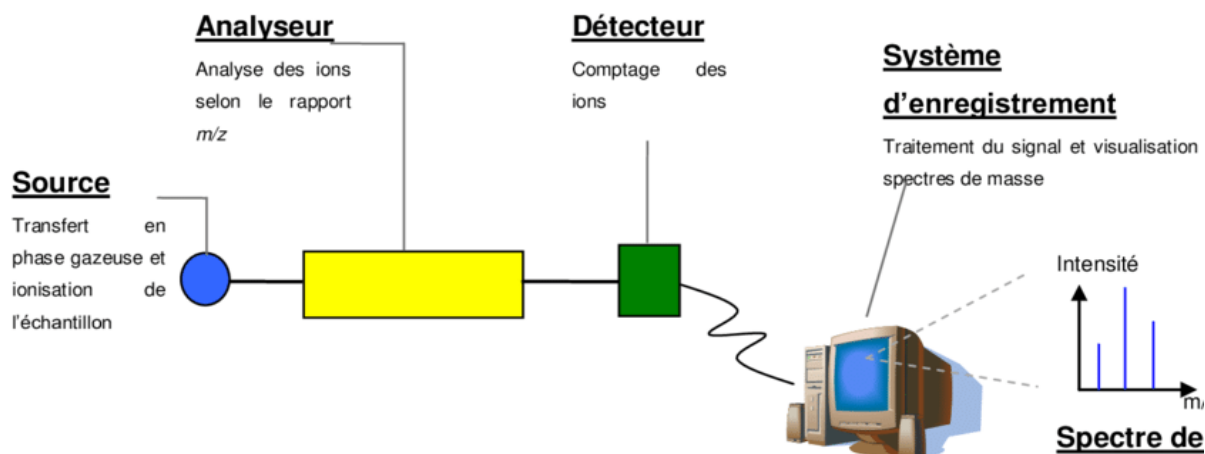


Figure 8: Le principe de la MS.

Annexe 9 : La spectrophotométrie UV-Vis :

L'échantillon à analyser est traversé par un rayonnement lumineux de longueur d'onde allant de 200-400 nm. Les photons issus du rayonnement transfèrent aux composés analysés une énergie qui excite les molécules traversés. Ainsi une partie du rayonnement incident est absorbé.

L'étude du rayonnement après passage à travers la substance analysée permet d'obtenir des informations sur sa nature. [145]

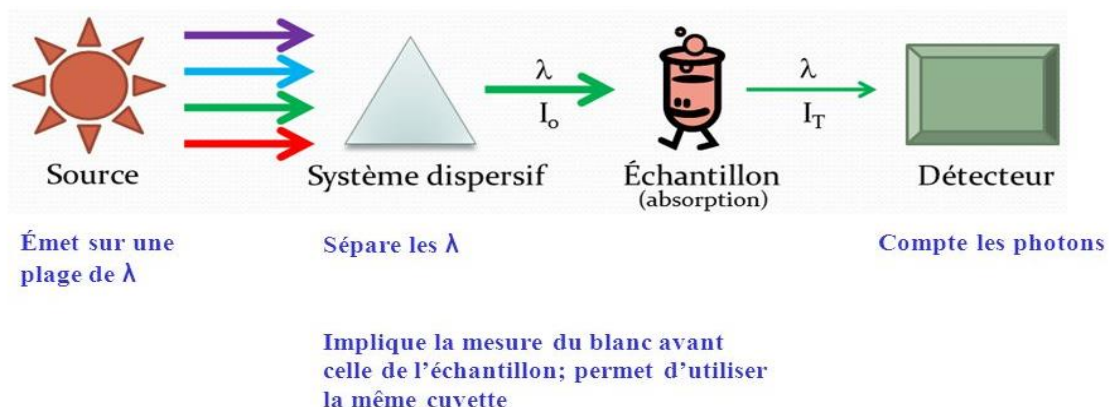


Figure 9: Le principe de la Spectroscopie UV-Vis

Annexe 10 : La spectrométrie d'absorption atomique (SAA):

Lors de ce procédé l'énergie fournie à l'atome provient d'une source lumineuse appelée lampe à cathode creuse. L'atome dans son état de base absorbe l'énergie lumineuse à une longueur d'onde spécifique et passe à un état d'excitation. Un détecteur mesure la quantité de lumière absorbée et un signal électronique est produit en fonction de l'intensité lumineuse. Ce signal est traité et la quantité d'analyte dans l'échantillon est déterminée en fonction de l'absorbance mesurée. [146]

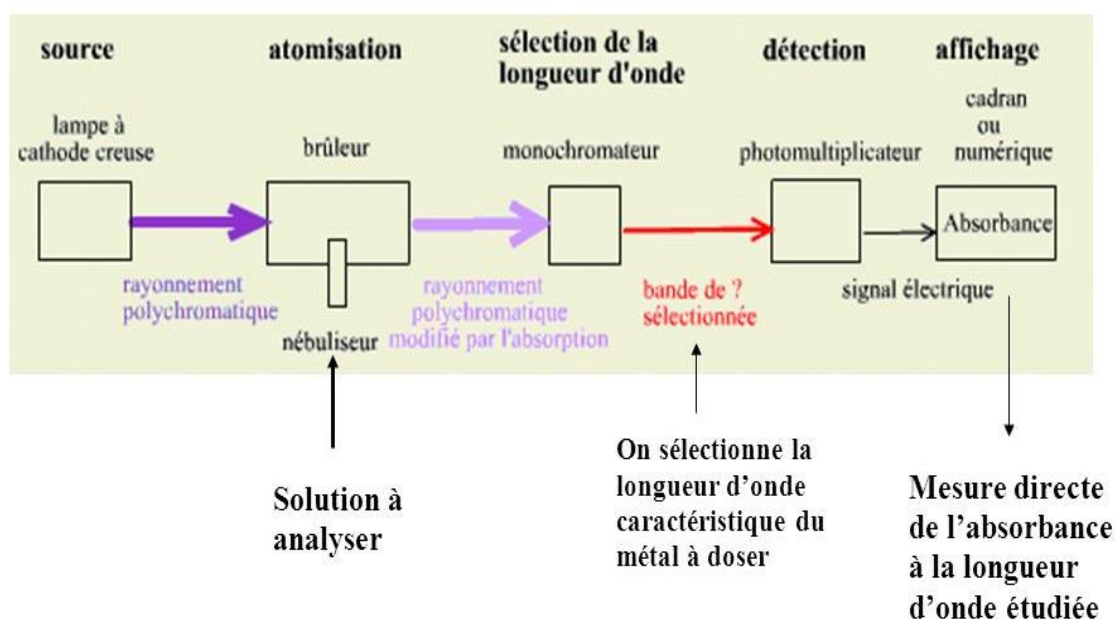


Figure 10: Le principe de la SAA.

Annexe 11 : L'électrophorèse capillaire (CE)

C'est une technique séparative basée sur la migration des protéines sous l'effet d'un champ électrique selon leur taille et leur charge. [147]

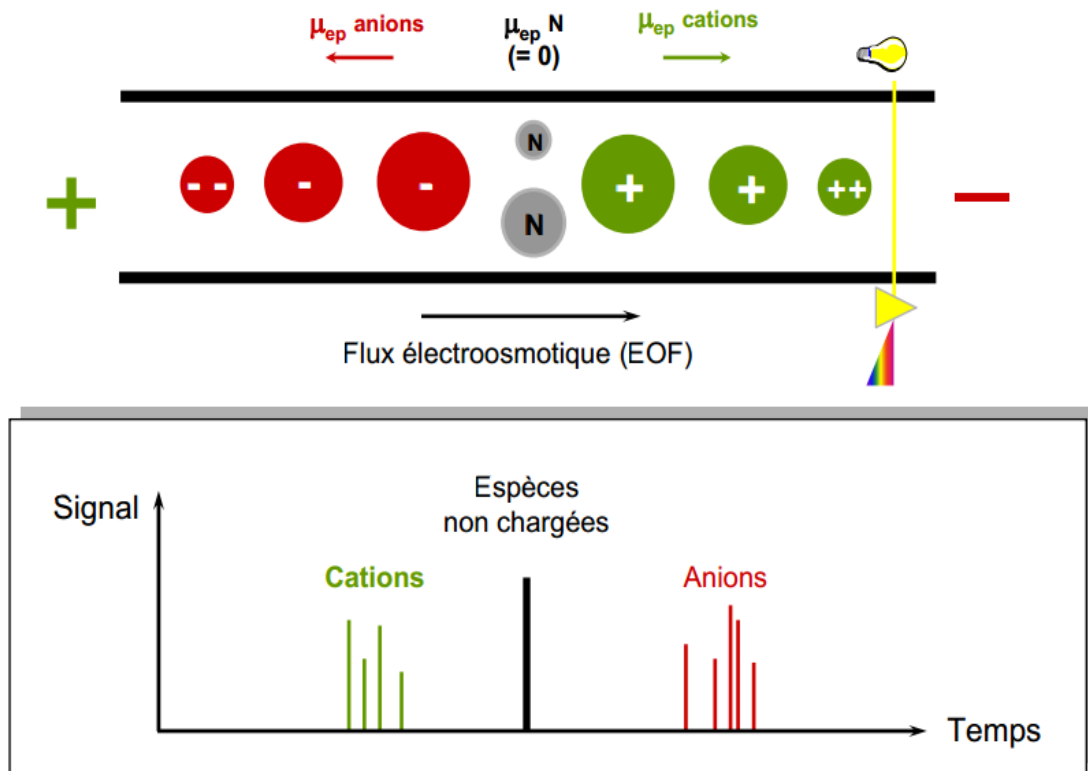


Figure 11: Le principe du CE.

Annexe 12 : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

La particularité de cette électrophorèse est que les échantillons ont été soumis à un prétraitement dénaturant. Les protéines sont ainsi toutes chargées négativement et la migration se fera seulement sous l'influence de la masse moléculaire. [148]

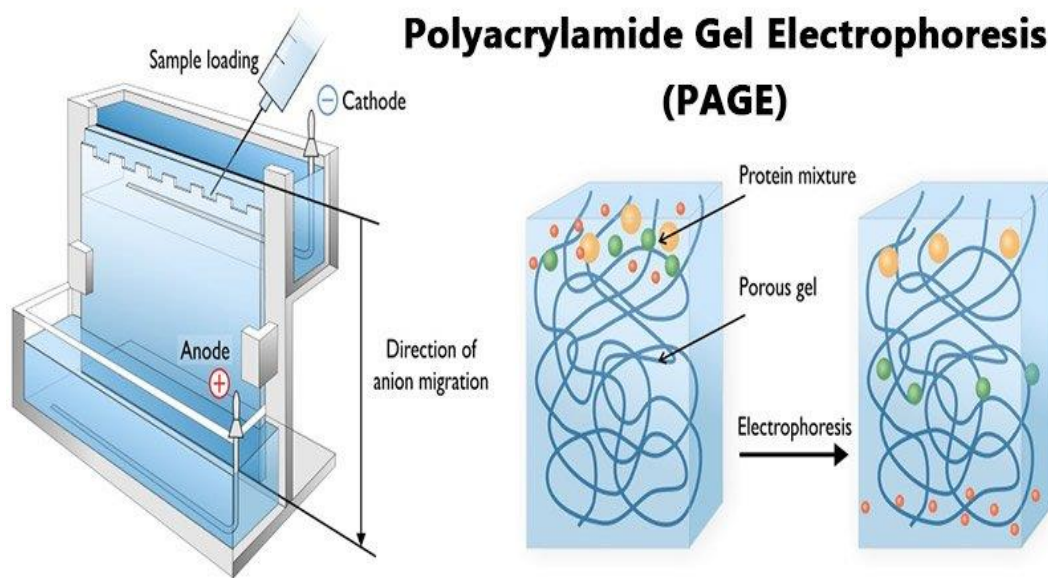


Figure 12: Le principe de la SDS-PAGE.

Annexe 13 : Le peptide mapping ou cartographie peptidique :

C'est un test d'identité des protéines. Il implique la formation de fragments peptidiques, obtenus par un traitement chimique ou enzymatique, suivie de la séparation et de l'identification de ces fragments. Les données obtenues sont ensuite comparées à une substance de référence traitée de la même manière. Cette technique permet de détecter notamment des changements d'acides aminés dans la séquence primaire des protéines. [149]

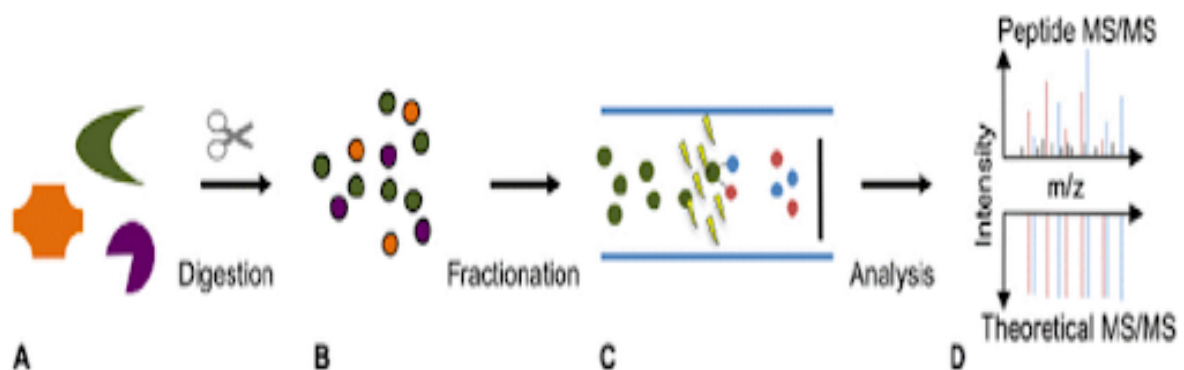


Figure 13: Le principe de la cartographie peptidique.

Annexe 14 : La focalisation isoélectrique ou Iso-Electric Focussing (IEF) :

Les molécules migrent selon un gradient de pH et s'arrêtent lorsque leur point isoélectrique est égal au pH. [150]

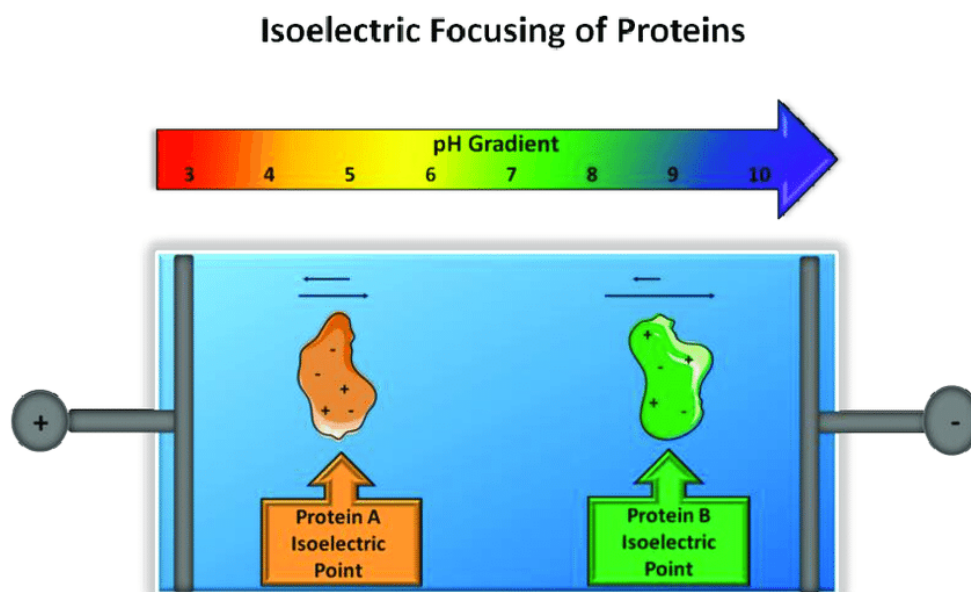


Figure 14: Le principe de l'IEF.

Annexe 15 : Analyse thermogravimétrique :

L'analyse thermogravimétrique (ATG) est une technique d'analyse thermique qui consiste en la mesure de la variation de masse d'un échantillon en fonction du temps, pour une température ou un profil de température donné.

L'ATG est souvent employée dans la recherche et les essais pour déterminer les caractéristiques de matériaux tels que les polymères, pour déterminer les températures de dégradation, l'humidité absorbée par le matériau, la quantité en composés organiques et inorganiques d'un matériau ... etc [151].

¹³⁷ Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications. Jan-Christer Janson. Chapter 4 Ion Exchange Chromatography. PAGES 94-96.

¹³⁸ ANALYSE CHIMIQUE Méthodes et techniques instrumentales modernes 6e édition. Francis Rouessac et Annick Rouessac avec la collaboration de Daniel Cruché. Chapitre 3 Chromatographie en phase gazeuse. PAGE 61.

¹³⁹ Pharmacopée européenne 9.0, CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE 01/2015: 20229 PAGES 50 – 51.

¹⁴⁰ Size Exclusion Chromatography. Sadao Mori, Howard G. Barth. PAGE 11

¹⁴¹ ANALYSE CHIMIQUE Méthodes et techniques instrumentales modernes 6e édition. Francis Rouessac et Annick Rouessac avec la collaboration de Daniel Cruché. Chapitre 4 Chromatographie ionique. PAGE 88-89.

¹⁴² NMR with Proteins and Nucleic Acids Kurt Wüthrich, Zurich (Institute for Molecular Biology and Biophysics, ETH

¹⁴³ USP 40 NF 35 année 2017. (782) Vibrational Circular Dichroism Spectroscopy

¹⁴⁴ ANALYSE CHIMIQUE Méthodes et techniques instrumentales modernes 6e édition. Francis Rouessac et Annick Rouessac avec la collaboration de Daniel Cruché. Chapitre 16 Spectrométrie de masse. PAGE 315

¹⁴⁵ British Pharmacopea 2009. Ultraviolet and visible absorption spectrophotometry (2.2.25).

¹⁴⁶ Pharmacopée européenne 9.0, 2.2.23. SPECTROMÉTRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE PAGES 40 – 42.

¹⁴⁷ Capillary Electrochromatography A Look at Its Features and Potential in Separation Science.

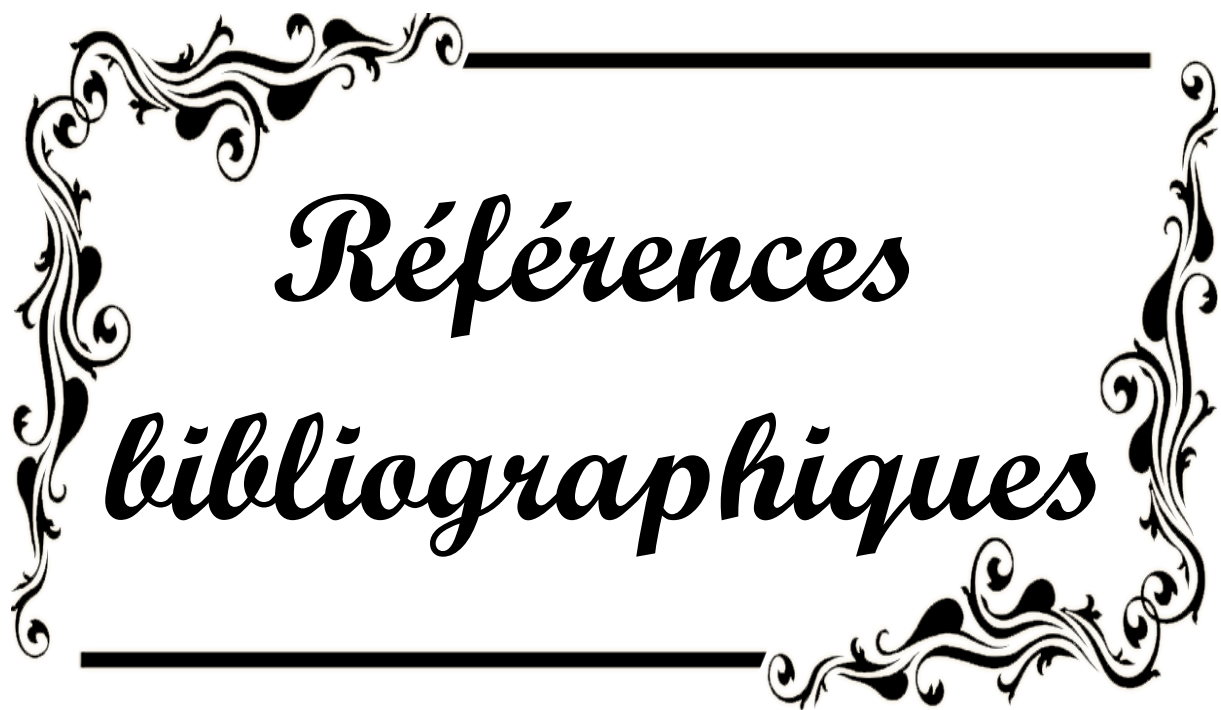
A. Rocco, G. D'Orazio, Z. Aturki, S. Fanali Institute of Chemical Methodologies, Italian National Council of Research (IMC-CNR), Area della Ricerca di Roma I, Rome, Italy

¹⁴⁸ Electrophorèse SDS PAGE : principe et exemple d'application en STL Biotechnologies. Extrait du Biotechnologie & Biologie et Physiopathologie humaine - Académie de Rouen

¹⁴⁹ Protein Identification by Peptide Mass Fingerprinting (PMF). PAGES 186-192

¹⁵⁰ IEF Electrophoresis 2016 SCST Genetic Testing Super Workshop

¹⁵¹ Experimental Techniques in Thermal Analysis Thermogravimetry (TG) & Differential Scanning Calorimetry (DSC). Debjani Banerjee Department of Chemical Engineering IIT Kanpur.



*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- 1.** Définition statistique de la biotechnologie (mise à jour en 2005) - OCDE », consulté le 19 juillet 2017.
- 2.** Ashutosh Kar Pharmacognosy and Pharmabiotechnology (revised expanded edition) PAGE 41-82.
- 3.** ROBERT BUD, History of 'biotechnology'; *Nature* 337.
- 4.** Université de Bordeaux, U.F.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES, Thèse N14 Par Monsieur BENEDETTO Julien, PAGE 22.
- 5.** « Le développement des biotechnologies: quelques repères historiques » PAGE 10.
- 6.** Biotechnology timeline.
- 7.** Université de Bordeaux, U.F.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES, Thèse N14 Par Monsieur BENEDETTO Julien, PAGES 24; 26.
- 8.** Biotechnology timeline.
- 9.** Université Mouloud Mammeri, FACULTE DE MEDECINE, TIZI OUZOU, Thèse: PRODUITS ISSUS DE LA BIOTECHNOLOGIE APPLICATION AUX INSULINES. PAGE 3.
- 10.** Les biomédicaments 1^{re} partie: cadre général. Manon Broutin et Herve Watier. PAGE 109.
- 11.** ROYAUME DU MAROC UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE RABAT ANNEE : 2018 THESE N° :157 MÉDICAMENTS BIOLOGIQUES : SPÉCIFICITÉS ET APPLICATIONS EN ONCOLOGIE.
- 12.** U.S. Food and Drug Administration (FDA 101: Regulating Biological Products).
- 13.** Article L5121-1 du Code de la santé publique. Texte extrait du site Légifrance en date du 04 janvier 2016.
- 14.** Article L5121-1 du Code de la santé publique. Texte extrait du site Légifrance en date du 04 janvier 2016.
- 15.** World Health Organization (WHO), Expert Committee on Biological Standardization. Guidelines On Evaluation Of Similar Biotherapeutic Products (SBPs). 60^{ème} réunion de WHO Expert Committee on Biological Standardization, 19-23 Octobre 2009.
- 16.** Mariscal & Abogados Asociados, article intitulé: « Les onze couleurs de la biotechnologie », Rebeca García-Escudero Bernat Consulté le 5 juin 2017.

- 17.** Les biomédicaments (2011), Chapitre V (Biomédicament, économie et innovation), par Marina Cavazzana-Calvo, Dominique Debiais. PAGES 99 à 120.
- 18.** Evaluate Pharma, mai 2018.
- 19.** Etat des lieux sur les médicaments biosimilaires par Dr. Maurice Sofeir 2019.
- 20.** James Swarbrick. Encyclopedia of pharmaceutical technology Third Edition. volume1. PAGES 258-278.
- 21.** Fédération européenne des associations de l'industrie pharmaceutique – EFPIA.
- 22.** ASHP Advantage, A Health-System Pharmacist's Guide to Biosimilars: Regulatory, Scientific, and Practical Considerations.
- 23.** Université TOULOUSE III PAUL SABATIER, Faculté des sciences pharmaceutiques, THESE intitulée « PRODUCTION, CONTROLE DE LA QUALITE ET REGLEMENTATION DES MEDICAMENTS BIOSIMILAIRES : UN CHALLENGE POUR L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE » pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie Présentée et soutenue le 10 décembre 2014 par Aurélie Laura ARGENTIN, PAGES 21-23.
- 24.** EMA . human regulatory . biosimilar medicines overview.
- 25.** Vulto AG, Jaquez OA. The process defines the product: what really matters in biosimilar design and production. Rheumatology 2017; 56: iv14-iv29.
- 26.** EMA . human regulatory . biosimilar medicines overview.
- 27.** Agbogbo FK, Ecker DM, et al. Current perspectives on biosimilars. J Ind Microbiol Biotech 2019; 46(9-10): 1297-1311.
- 28.** La Pharmacopée européenne 9.0.
- 29.** UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER. Thèse intitulée: PRODUCTION, CONTROLE DE LA QUALITE ET REGLEMENTATION DES MEDICAMENTS BIOSIMILAIRES : UN CHALLENGE POUR L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE par Aurélie Laura ARGENTIN PAGES 50-54.
- 30.** 1^{er} congrès national de la Fédération Algérienne de Pharmacie novembre 2016 par F. Belaidi; S. Khammoume.
- 31.** European Commission, What you Need to Know about Biosimilar Medicinal Products, 2013.
- 32.** Université de Bordeaux, U.F.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES, Thèse N14 Par Monsieur BENEDETTO Julien, PAGES 26-28.

- 33.** Pharmacopée européenne 9^{ème} édition Tome 7.1
- 34.** Université de Lille 2. Thèse intitulée « La réglementation européenne et américaine des médicaments biosimilaires» par Koussayla BOUKHALFA
- 35.** Université de Picardie Jules Verne. Thèse intitulée « Les médicaments génériques et biosimilaires» par Cécile PROUCHANDY.
- 36.** 1^{er} congrès national de la Fédération Algérienne de Pharmacie les 26 et 27 novembre 2016 sur le Contrôle physicochimique des médicaments issus de la biotechnologie. F. Belaidi ; S. Khammoume
- 37.** World Health Organization, Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology, 2013.
- 38.** 1^{er} congrès national de la Fédération Algérienne de Pharmacie les 26 et 27 novembre 2016 sur le Contrôle physicochimique des médicaments issus de la biotechnologie. F. Belaidi ; S. Khammoume
- 39.** J-L. Prugnaud, J-H. Trouvin, Les biosimilaires, Springer, 2011.
- 40.** J-F. Boe, A. Beck, A. Carrie et al, "L'analyse des impuretés dans les substances actives d'origine biologique: le cas des anticorps monoclonaux = Analysis of impurities in biological active substances: a case study of monoclonal antibodies," STP pharma pratiques, vol. 24, no. 3, 2014.
- 41.** 1^{er} congrès national de la Fédération Algérienne de Pharmacie les 26 et 27 novembre 2016 sur le Contrôle physicochimique des médicaments issus de la biotechnologie. F. Belaidi ; S. Khammoume.
- 42.** Biosimilar Development, Review, and Approval. FDA.
- 43.** 1^{er} congrès national de la Fédération Algérienne de Pharmacie les 26 et 27 novembre 2016 sur le Contrôle physicochimique des médicaments issus de la biotechnologie. F. Belaidi ; S. Khammoume .
- 44.** Quality Evaluation of Biosimilar Medicines. Article in Universal Journal of Pharmaceutical Research Volume 5, Issue 2 · May 2020 by Evren ALGIN YAPAR. Department of Analysis and Control Laboratories, Turkish Medicines and Medical Devices Agency, 06430 Çankaya, Ankara, Turkey.
- 45.** ICH Q5C guidelines.

- 46.** 1^{er} congrès national de la Fédération Algérienne de Pharmacie les 26 et 27 novembre 2016 sur le Contrôle physicochimique des médicaments issus de la biotechnologie. F. Belaidi ; S. Khammoume
- 47.** Les médicaments biosimilaires dans l'UE Élaboré conjointement par l'Agence européenne du médicament et la Commission européenne
- 48.** Dörner T, Isaacs, J, Gonçalves J, Azevedo V, Castañeda-Hernández, G, Strohal R, Mc Innes I. Biosimilars already approved and in development. Considerations in Medicine 2017. PAGES 7-12.
- 49.** ICH. Ligne directrice ICH Q5E: Comparabilité des produits biotechnologiques et biologiques dont les procédés de fabrication sont sujets à des modifications. s.l. : Santé canada , 15 juin 2015.
- 50.** Le développement des biosimilaires. SANDOZ A Novartis Division.
- 51.** À la recherche de la molécule idéale. Une brève histoire des anticoagulants. G. Meyer. Service de pneumologie et soins intensifs, université Paris-Descartes, sorbonne Paris, hôpital européen Georges-Pompidou
- 52.** Dictionnaire vidal (95° Edition, 2019) PAGE 1681-LOVE
- 53.** Sanofi-aventis Canada Inc. 2905, place Louis-R.-Renaud Laval (Québec) H7V 0A3 Version s-a 14.0 datée du 19 décembre 2019. PAGE 30 de 89
- 54.** Lovenox Article 30 referral – Annex III. EMEA/H/A-30/1429. 22-03-2017 PAGE 44
- 55.** Sanofi-aventis Canada Inc. 2905, place Louis-R.-Renaud Laval (Québec) H7V 0A3 Version s-a 14.0 datée du 19 décembre 2019. PAGE 3 de 89
- 56.** Dictionnaire vidal (95° Edition, 2019) PAGE 1681-LOVE
- 57.** Pharmacopée Européenne 7.0 Tome 2 PAGE 2077
- 58.** Sanofi-aventis Canada Inc. 2905, place Louis-R.-Renaud Laval (Québec) H7V 0A3 Version s-a 14.0 datée du 19 décembre 2019. PAGE 32 de 89
- 59.** Pharmacopée européenne 9.0, ENOXAPARINE SODIQUE 04/2014: 1097 PAGE 2530.
- 60.** Guide Pharmaco-clinique Wolters Kluwer France, Auteurs: Talbert – Willoquet – Gervai. PAGES: 729 - 732
- 61.** ABREGES connaissances et pratique Pharmacologie 2° édition par M. Moulin et A. Coquerel PAGES 529-531

- 62.** iKB cardiologie vasculaire 8° édition-2018 DR. David ATTIAS-Pr. Nicolas LELLOUCHE en collaboration scientifique avec le collège national des cardiologues français
PAGE 196
- 63.** Pharmacie clinique et thérapeutique 5° édition de 2018. PAGES 100-112.
- 64.** Série hématologie. Héparines de bas poids Moléculaire. Sébastien FAURE n° 523 •
février 2013 PAGE 56
- 65.** La revue prescrire – Juin 2018 PAGES 487 - 489
- 66.** Guide Pharmaco-clinique Wolters Kluwer France, Auteurs: Talbert – Willoquet – Gervai.
PAGE 749
- 67.** Dictionnaire vidal (95° Edition, 2019) PAGE 1683-LOVE
- 68.** Sanofi-aventis U.S. LLC Bridgewater, NJ 08807 A SANOFI COMPANY. 05/2020.
PAGE 12
- 69.** Les copies du Lovenox sont-elles à considérer comme des génériques ou des biosimilaires ? Pr. BENHALIMA M. et al. PAGE 4.
- 70.** Dictionnaire vidal (95° Edition, 2019) PAGES 1682-1683-LOVE
- 71.** Lovenox Article 30 referral – Annex III. EMEA/H/A-30/1429. 22-03-2017 PAGES 52 -
55
- 72.** EMC - Biologie médicale Volume 7 > n°2 > juin 2012. Surveillance des traitements anticoagulants: dérivés hépariniques et antivitamine K. V. Siguret, I. Gouin-Thibault PAGES
3 – 8
- 73.** REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES - JUIN 2014 - N°463 Surveillance
biologique des malades sous héparine ou sous fondaparinux PAGES 29 - 34
- 74.** Bianchini, P.; Liverani, L.; Mascellani, G.; Parma, B. Heterogeneity of unfractionated heparins studied in connection with species, source, and production processes. Semin. Thromb. Hemost. 1997, 23, 3–10. [PubMed]
- 75.** Low Molecular Weight Heparins, Biological Drugs close to Non-Biological Complex Drugs. Isabel Rodrigo and al. Spanish Agency for Medicines and Medical Devices (AEMPS), C/Campezo 1, Edificio 8, 28022 Madrid, Spain. 2015 PAGES 294-298
- 76.** Journal of Biosciences and Medicines. C.P. Food (Xiangyang) Co. LTD., Xiangyang, China. October 10, 2018 pAGES 5-6

- 77.** Agence national de sécurité du médicament et des produits de santé. DIRECTION DE L'INSPECTION. Pôle inspection des matières premières. ETAT DES LIEUX SUR LES HEPARINES. 15/07/2014 PAGE 6
- 78.** From Farm to Pharma: An Overview of Industrial Heparin Manufacturing Methods. Jan-Ytzen van der Meer *, Edwin Kellenbach and Leendert J. van den Bos. 21 June 2017. PAGE 3
- 79.** EudraLex. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, Volume 4: EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human Van Veterinary Use, Annex 2 Manufacture of Biological Active Substances and Medicinal Products for Human Use. Ref. Ares (2012)118531-28/06/2012.
- 80.** St. Ange et al. Analysis of heparins derived from bovine tissues and comparison to porcine intestinal heparins. Clin. Appl. Thromb. Hemost. 2016, 22, 520–527. [PubMed]
- 81.** Bovine Mucosal Heparins Are Comparable to Porcine Mucosal Heparin at USP Potency Adjusted Levels. Frontiers in Medicine 5. January 2019. PAGES 1-8
- 82.** Diversifying the Global Heparin Supply Chain: Reintroduction of Bovine Heparin in the United States? Pharm. Technol. **2015**,
- 83.** Structural Characterization of Pharmaceutical Heparins Prepared from Different Animal Tissues. J. Pharm. Sci. **2013**, 102, 1447–1457. [PubMed]
- 84.** Low Molecular Weight Heparins, Biological Drugs close to Non-Biological Complex Drugs. Isabel Rodrigo and al. Spanish Agency for Medicines and Medical Devices (AEMPS), C/Campezo 1, Edificio 8, 28022 Madrid, Spain. 2015 PAGE 302
- 85.** Journal of Biosciences and Medicines. C.P. Food (Xiangyang) Co. LTD., Xiangyang, China. October 10, 2018. PAGE 7
- 86.** Chaîne industrielle mondiale de l'héparine entièrement intégrée. Groupe Haipurui Copyright © 2020 GuangDong ICP No.11096806-1
- 87.** Programme de Formation : Contrôle qualité des Biosimilaires: Méthodes analytiques & Aspects règlementaires. J1 Généralités sur les protéines thérapeutiques et les Biosimilaires
- 88.** Programme de Formation : Contrôle qualité des Biosimilaires: Méthodes analytiques & Aspects règlementaires. J1 Généralités sur les protéines thérapeutiques et les Biosimilaires
- 89.** Pharmacopée européenne 9.0, HEPARINES DE BASSE MASSE MOLECULAIRE 01/2017: 0828 PAGE 2872

- 90.** Heparinase Digestion-Based Disaccharide Composition Analysis of Heparin and Heparinoid Drugs. CHINESE JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY. Volume 43, Issue 7, July 2015.
- 91.** Heparinase Digestion-Based Disaccharide Composition Analysis of Heparin and Heparinoid Drugs. CHINESE JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY. Volume 43, Issue 7, July 2015
- 92.** Pierre André Jean Mourier, Christophe Agut, Hajer Souaifi-Amara, Frédéric Herman, Christian Viskov, Analytical and statistical comparability of generic enoxaparins from the US market with the originator product, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 26-7-2015. PAGE 7-15.
- 93.** Systematic analysis of enoxaparins from different sources with online one and two dimensional chromatography. Analyst accepted manuscript. PAGES 13-28
- 94.** Quantitative compositional analysis of heparin using exhaustive heparinase digestion and strong anion exchange chromatography Pierre Mourier ↑, Pascal Anger, Céline Martinez, Frédéric Herman, Christian Viskov Sanofi, 13, Quai Jules Guesdes, 94403 Vitry-sur-Seine, France. Analytical Chemistry Research 3 (2015). PAGES 46–53.
- 95.** Heparinase Digestion-Based Disaccharide Composition Analysis of Heparin and Heparinoid Drugs. CHINESE JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY. Volume 43, Issue 7, July 2015.
- 96.** Pharmacopée européenne 9.0, ENOXAPARINE SODIQUE 04/2014: 1097 PAGES 2531 – 2532.
- 97.** Pharmacopée européenne 9.0, ENOXAPARINE SODIQUE 04/2014: 1097 PAGES 2530 – 2532.
- 98.** Modernization of Enoxaparin Molecular Weight Determination Using Homogeneous Standards. 22 July 2017.
- 99.** Pharmacopée européenne 9.0, HEPARINES DE BASSE MASSE MOLECULAIRE 01/2017: 0828 PAGE 2872-2873.
- 100.** Modernization of Enoxaparin Molecular Weight Determination Using Homogeneous Standards. 22 July 2017.
- 101.** Pharmacopée européenne 9.0, LIMPIDITE ET DEGRÉ D'OPAESCENCE DES LIQUIDES. PAGES 23-24.

- 102.** Pharmacopée européenne 9.0, DEGRÉ DE COLORATION DES LIQUIDES. PAGES 25-26. LIMPIDITE ET DEGRÉ D'OPAESCENCE DES LIQUIDES. PAGES 23-24.
- 103.** Pharmacopée européenne 9.0, ENOXAPARINE SODIQUE 04/2014: 1097 PAGES 2532.
- 104.** Pharmacopée européenne 9.0, DÉTERMINATION POTENTIOMÉTRIQUE DU pH PAGES 26-27.
- 105.** Pharmacopée européenne 9.0, ENOXAPARINE SODIQUE 04/2014: 1097 PAGES 2532.
- 106.** Pharmacopée européenne 9.0, SPECTROPHOTOMÉTRIE D'ABSORPTION DANS L'ULTRAVIOLET ET LE VISIBLE. Pages 44 – 46.
- 107.** Pharmacopée européenne 9.0, ENOXAPARINE SODIQUE 04/2014: 1097 PAGES 2532.
- 108.** Pharmaceutical Chemistry Journal, Vol. 53, No. 9, December, 2019 (Russian Original Vol. 53, No. 9, October, 2019). DETERMINATION OF THE DEGREE OF ESTERIFICATION IN HEPARIN BENZYLATES DURING SYNTHESIS OF ENOXAPARIN, A DOMESTIC ANALOG OF LOW-MOLECULAR-MASS HEPARIN
- 109.** Pharmacopée européenne 9.0, ENOXAPARINE SODIQUE 04/2014: 1097 PAGES 2532.
- 110.** Synthesis of Best-Seller Drugs 1st Edition, by Ruben Vardanyan and Victor Hruby. Chapter 24 Antithrombotic Drugs (Anticoagulants, Antiplatelets, and Thrombolytics). PAGES 387-388.
- 111.** Analyse de solvants résiduels dans les matières premières et les produits finis, René Wicki
- 112.** Pharmacopée européenne 9.0, SPECTROMÉTRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE. Page 42.
- 113.** Pharmacopée européenne 9.0, ENOXAPARINE SODIQUE 04/2014: 1097 PAGES 2532.
- 114.** USP 40 NF 35 année 2017. Enoxaparin / Official monographs PAGE 3982.
- 115.** DEVELOPMENT AND VALIDATION OF UV SPECTROMETRIC METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF ENOXAPARIN SODIUM IN BULK AND INJECTABLE. Article *in* World Journal of Pharmaceutical Research · Vol 6, Issue 16, 2017.. Prasanthi *et al.* PAGE 15-19.

- 116.** USP 40 NF 35 année 2017. Spectrophotometric identification / Ultraviolet. PAGE 255.
- 117.** DEVELOPMENT AND VALIDATION OF UV SPECTROMETRIC METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF ENOXAPARIN SODIUM IN BULK AND INJECTABLE. Article in World Journal of Pharmaceutical Research · Vol 6, Issue 16, 2017.. Prasanthi *et al.* PAGE 15-19.
- 118.** USP 40 NF 35 année 2017. Enoxaparin / Official monographs PAGE 3982.
- 119.** USP 40 NF 35 année 2017. Enoxaparin / Official monographs PAGE 3982.
- 120.** USP 40 NF 35 année 2017. identification test / General. PAGE 253.
- 121.** USP 40 NF 35 année 2017. Enoxaparin / Official monographs PAGE 3982 – 3983.
- 122.** Validation of a chromogenic Factor Xa assay for testing enoxaparin sodium or enoxaparin injection.
- 123.** USP 40 NF 35 année 2017. Enoxaparin / Official monographs PAGE 3983.
- 124.** USP 40 NF 35 année 2017. Enoxaparin / Official monographs PAGE 3983.
- 125.** USP 40 NF 35 année 2017. Enoxaparin / Official monographs PAGE 3983.
- 126.** USP 40 NF 35 année 2017. Bacterial endotoxins test / Biological tests. PAGE 164.
- 127.** USP 40 NF 35 année 2017. Enoxaparin / Official monographs PAGE 3983.
- 128.** USP 40 NF 35 année 2017. Enoxaparin / Official monographs PAGE 3983.
- 129.** Validation of a chromogenic Factor IIa assay for testing enoxaparin sodium or enoxaparin injection.
- 130.** USP 40 NF 35 année 2017. Enoxaparin / Official monographs PAGE 3984.
- 131.** USP 40 NF 35 année 2017. Microbiological tests / Sterility tests PAGES 136 – 143.
- 132.** USP 40 NF 35 année 2017. Physical tests / Particulate matter in injections PAGES 665 – 669.
- 133.** Sacramento - University of California Davis medical center, Department of Pharmacy Services. Dager WE, Gosselin RC, King JF, Christensen CL, Owings JT, Larkin EC. le 1er avril 2004. PubMed.
- 134.** American Journal of Health-System Pharmacy, Volume 53, Numéro 2, 15 janvier 1996, Pages 167-169.
- 135.** Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics Volume 21, numéro 4 Juillet-août 2016 PAGES 322–326..
- 136.** Non-Biological Complex Drugs. Isabel Rodrigo *et al.* PAGE 313.

- 137.** Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications. Jan-Christer Janson. Chapter 4 Ion Exchange Chromatography. PAGES 94-96.
- 138.** ANALYSE CHIMIQUE Méthodes et techniques instrumentales modernes 6e édition. Francis Rouessac et Annick Rouessac avec la collaboration de Daniel Cruché. Chapitre 3 Chromatographie en phase gazeuse. PAGE 61.
- 139.** Pharmacopée européenne 9.0, CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE 01/2015: 20229 PAGES 50 – 51.
- 140.** Size Exclusion Chromatography. Sadao Mori· Howard G. Barth. PAGE 11
- 141.** ANALYSE CHIMIQUE Méthodes et techniques instrumentales modernes 6e édition. Francis Rouessac et Annick Rouessac avec la collaboration de Daniel Cruché. Chapitre 4 Chromatographie ionique. PAGE 88-89.
- 142.** NMR with Proteins and Nucleic Acids Kurt Wüthrich, Zurich (Institute for Molecular Biology and Biophysics, ETH
- 143.** USP 40 NF 35 année 2017. (782) Vibrational Circular Dichroism Spectroscopy
- 144.** ANALYSE CHIMIQUE Méthodes et techniques instrumentales modernes 6e édition. Francis Rouessac et Annick Rouessac avec la collaboration de Daniel Cruché. Chapitre 16 Spectrométrie de masse. PAGE 315
- 145.** British Pharmacopea 2009. Ultraviolet and visible absorption spectrophotometry (2.2.25).
- 146.** Pharmacopée européenne 9.0, 2.2.23. SPECTROMÉTRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE PAGES 40 – 42.
- 147.** Capillary Electrochromatography A Look at Its Features and Potential in Separation Science. A. Rocco, G. D'Orazio, Z. Aturki, S. Fanali Institute of Chemical Methodologies, Italian National Council of Research (IMC-CNR), Area della Ricerca di Roma I, Rome, Italy
- 148.** Electrophorèse SDS PAGE : principe et exemple d'application en STL Biotechnologies. Extrait du Biotechnologie & Biologie et Physiopathologie humaine - Académie de Rouen
- 149.** Protein Identification by Peptide Mass Fingerprinting (PMF). PAGES 186-192
- 150.** IEF Electrophoresis 2016 SCST Genetic Testing Super Workshop
- 151.** Experimental Techniques in Thermal Analysis Thermogravimetry (TG) & Differential Scanning Calorimetry (DSC). Debjani Banerjee Department of Chemical Engineering IIT Kanpur.