

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 دحلبج البلدة-1



FACULTE DE MEDECINE
كلية الطب

DEPARTEMENT DE PHARMACIE
قسم الصيدلة

Thèse d'exercice présentée en vue de l'obtention du Diplôme de Docteur en Pharmacie

Thème

Aspect Réglementaire de la Comparabilité des
Médicaments Biologiques Après Changement de leurs
Processus de Fabrication

Présenté et soutenu par :

Session Juin 2019

M^{elle} MAIZIA Asma

M^{elle} NABI Hadjer

Jury d'évaluation:

Présidente de Jury : **Dr.BENHAMIDA.S** Maitre-assistante en Pharmacologie

Examineur : **Dr.REGGABI.K** Maitre-assistante en Pharmacologie

Examineur : **Dr. DJELLOULI.S** Maitre-assistant en Pharmacologie

Encadreur: **Dr.BOUZEKRI.F** Maitre-assistant en Chimie Thérapeutique

Année universitaire 2018 – 2019

Je dédie ce travail à mes parents Mohamed & Fatma, à ma sœur Fahima et mon beau-frère Abdelkader, à ma sœur Malika, à mon frère Brahim et ma belle-sœur Marine, à mon frère Zoheir, à ma grand-mère et à la mémoire de mes grands parents

Hadjer

Je dédie ce travail à mes parents Sadek & Fatma, à ma sœur Ikram , à mon frère Mohamed, à ma grande mère Houria et à la mémoire de mes grands parents

Asma

Remerciement

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui nous voudrions témoigner toute notre gratitude.

Nous voudrions tout d'abord adresser toutes nos reconnaissances à l'encadreur de ce mémoire, Dr BOUZEKRI pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion.

Nous désirons aussi remercier les professeurs de l'université de Blida 1, qui nous ont fourni les outils nécessaires à la réussite de nos études universitaires.

Nous tenons à remercier spécialement Martine Nabi, Qui nous a fourni son aide, et ses connaissances sans hésitation.

Enfin, nous tenons à témoigner toute notre gratitude à nos parents respectifs pour leur confiance et leur soutien inestimable et leur présence pendant tout notre cursus scolaire et universitaire.

Nous voudrions exprimer notre reconnaissance envers les amis et collègues qui nous ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de notre démarche.

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
1 CHAPITRE1 - GENERALITES	2
1.1 Biotechnologie.....	2
1.2 Biomédicaments et les biosimilaires.....	2
1.2.1 Définitions du biomédicament	2
1.2.2 Définitions du biosimilaire.....	3
1.3 Classes thérapeutiques des biomédicaments	4
1.4 Développement des médicaments biologiques	6
1.5 Complexité des médicaments biologiques.....	8
1.5.1 Spécificité des molécules biologiques	8
1.5.2 Complexité de la réglementation des médicaments biologiques	14
2 CHAPITRE 2 - PROCEDE DE FABRICATION DES MEDICAMENTS BIOLOGIQUES	16
2.1 Préparation de la banque cellulaire	16
2.1.1 Développement génétique.....	16
2.1.2 La sélection du clone compétent.....	23
2.1.3 Mise en banques cellulaires	25
2.1.4 Stabilité des lignées cellulaires	26
2.2 Fermentation (<i>upstream process</i>).....	26
2.2.1 Culture cellulaire et expression du produit biologique	27
2.2.2 Bioréacteurs : Mode opératoire et Choix de conception	28
2.3 Isolement et purification des substances biopharmaceutiques (<i>Downstream process</i>).....	33
2.3.1 Récupération initiale ou récolte	33
2.3.2 Purification	34
2.4 La formulation des médicaments biologiques.....	37
2.5 Contrôle du procédé de fabrication des médicaments biologiques.....	38
3 CHAPITRE 3 - DEMONSTRATION DE LA COMPARABILITE DES PRODUITS	39
BIOLOGIQUES D'UN POINT DE VUE REGLEMENTAIRE.....	39
3.1 Changement de processus de fabrication des médicaments biologiques.....	39
3.2 But de l'étude de comparabilité	43

3.3	Démonstration de la comparabilité – les différentes approches	45
3.3.1	Approche basée sur les risques	45
3.3.2	Approche séquentielle - Stepwise	47
3.3.3	Approche par phase appropriée.....	48
3.3.4	Approche de totalité des épreuves	49
3.4	Conception de l'étude de comparabilité	50
3.4.1	Evaluation du niveau de risque lié au type de changement de processus de fabrication.....	51
3.4.2	Réduction progressive du risque résiduel - Caractérisation étape par étape	56
CONCLUSION.....		69
BIBLIOGRAPHIE		71

Liste des figures

Figure 1-1 Classification des médicaments biologiques (11)	5
Figure 1-2 Comparaison entre la taille moléculaire de quelques médicaments biologiques avec celle de l'aspirine.	8
Figure 1-3 Variabilité des lots dans une bioproduction (13)	9
Figure 1-4 Principales étapes intervenant dans la fabrication des médicaments biologiques (16)	10
Figure 2-1 Schéma de la construction génétique (24)	16
Figure 2-2 Schéma simplifié d'un vecteur d'expression	18
Figure 2-3 Protéines mal repliées et corps d'inclusions dans le système d'expression : E.coli	20
Figure 2-4 Schéma de synthèse des protéines dans les cellules eucaryotes	20
Figure 2-5 Développement d'une lignée de cellules de mammifères.	24
Figure 2-6 Schéma simplifié de l'OMS d'un exemple de développement d'une lignée cellulaire génétiquement modifiée	25
Figure 2-7 Représentation de la culture cellulaire à petite et à grande échelle.	27
Figure 2-8 Les trois types de protocoles de fermentation.	30
Figure 2-9 Différents types de chromatographies utilisé pour la purification des biopharmaceutiques	34
Figure 3-1: La conception de l'étude de comparabilité.	50
Figure 3-2:Niveau de risque déterminé par la nature du changement de processus de fabrication (109)	51
Figure 3-3: Réduction progressive du risque résiduel.	56
Figure 3-4:Evaluation de risque selon le stade de développement clinique.	60

Liste des Tableaux

<i>Tableau 1-1 Une liste non exhaustive d'exemples de médicaments biologiques commercialisés dans le marché Algérien</i>	5
<i>Tableau 1-2 Différences entre un médicament biologique et un médicament chimique</i>	11
<i>Tableau 1-3 Comparaison d'exemples de molécule chimique et des molécules biologiques sur plusieurs niveaux de différences</i>	12
<i>Tableau 1-4 Comparaison du développement et des caractéristiques des médicaments génériques et des médicaments biosimilaires (26)</i>	15
<i>Tableau 2-1 Comparaison des systèmes d'expression: bactéries, levures, insectes et cellules mammifères (53)</i>	22
<i>Tableau 2-2 Les conditions de croissance utilisées dans la fabrication de produits biologiques selon les systèmes d'expressions les plus utilisés. (77)</i>	27
<i>Tableau 2-3 Modèles de bioréacteurs</i>	29
<i>Tableau 2-4 Exemples de diverses opérations de production de bioréacteurs. (13) (1)</i>	32
<i>Tableau 2-5 Catégories et exemples de quelques excipients pharmaceutiques couramment utilisés dans la formulation des produits biologiques</i>	37
<i>Tableau 3-1 Exemples de changements de procédé de fabrication</i>	40
<i>Tableau 3-2 Liste non exhaustive des modifications de processus de fabrication considérées par l'EMA comme présentant un risque majeur. (113)</i>	52
<i>Tableau 3-3 Liste non exhaustive de modifications de processus de fabrication que la FDA considère comme un risque majeur. (114)</i>	53
<i>Tableau 3-4 Recommandation de l'OMS sur les données à l'appui d'un changement critique du processus de purification des produits biologiques. (115)</i>	54

Liste des abréviations

A

AAM · Anticorps Anti-Médicament
Ac · Anticop
ADN · Acide Désoxyribonucléique
ADNc · Acide Désoxyribonucléique Complémentaire
ANSM · Agence Nationale de Sécurité du Médicament
ARN · Acide Ribonucléique
ARNm · Acide Ribonucléique Messenger

B

BHK · Baby Hamster Kidney
BLA · Biologics License Application
BPF · Bonne Pratique de Fabrication
BPL · Bonnes pratiques de laboratoire
BV · Baclovirus
BY-2 · Bright Yellow 2

C

CHO · Chinese Hamster Ovary
CI · Cellules d'Insectes
CIH · Chromatographie D'Interactions Hydrophobes
CMC · Chemistry, manufacturing, and controls

D

DCI · Dénomination commune internationale
DHFR · dihydrofolate réductase

E

E.coli · Escherichia coli
ELISA · Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMA · European Medicines Agency

EOP2 · End Of Phase2
Epo · Erythropoïétine

F

Fab · Fragment Antigen Binding
FBS · Fetal Bovine Serum
Fc · Fragment Cristallisable
FDA · Food and Drug Administration
FSH · Follicle-stimulating hormone

G

GAA · Alpha-Glucosidase Acide

H

HBs · protéine de surface du virus de l'hépatite B
HEK · Human embryonic kidney
His · Histidine

I

ICH · International Conference on Harmonization
IgG · Les immunoglobulines de type G
IL-2 · Interleukine 2
IMPD · Investigational Medicinal Product Dossier

K

KDa · Kilodalton

M

MCB · Master Cell Bank

N

NT-1 · Nicotiana Tabacum 1

O

OGM · Organismes Génétiquement
Modifiés

P

PBU · Produits Biologiques Ultérieurs
pH · Potentiel Hydrogène
PM · Poids Moléculaire

Q

QSE · Qualité, Sécurité et Efficacité

S

SBP · Similar Biotherapeutic Product

T

TFF · Tangential Flow Filtration

V

V.A · Voie d'Administration

W

WCB · Working Cell Bank

Glossaire

La transfection :

Est une technique de biologie moléculaire qui consiste à introduire un ADN étranger dans une cellule eucaryote cultivée in vitro. Chez les bactéries, on parle plutôt de transformation que de transfection.

Banque d'ADN :

C'est un ensemble de fragments d'ADN provenant d'un génome, cloné dans plusieurs copies d'un vecteur. Après transformation, les différentes colonies obtenues correspondent à des cellules contenant un des vecteurs recombinants constitutifs de la banque.

Promoteur :

C'est une région de régulation en amont de la région codante d'un gène, à proximité de son extrémité 5'. Il comporte en particulier le site de fixation du complexe d'initiation dont fait partie l'ARN polymérase, ainsi que les sites de fixation des protéines régulatrices de la transcription. Ces derniers peuvent être soit des répresseurs soit des activateurs (dans le cas des procaryotes, certains de ces sites sont plus précisément désignés comme constituants de l'opérateur)

Diafiltration :

une nouvelle solution est ajoutée au rétentat au même rythme que le filtrat extrait. En conséquence, le volume de rétentat et la concentration en produit ne changent pas pendant le processus de diafiltration

Introduction

Les protéines sont les servantes de la vie. Elles sont présentes dans tous les éléments constitutifs des organismes vivants et leur variété fonctionnelle est stupéfiante, même l'organisme unicellulaire le plus simple contient un millier de protéines différentes, qui remplissent de nombreuses fonctions vitales. Chez l'homme un déficit ou un mal fonctionnement d'une des protéines entraîne des problèmes fonctionnels dans l'organisme généralement très graves, l'arrivée de la biotechnologie et le génie génétique dans l'industrie pharmaceutique a permis la disponibilité de médicaments très puissants avec des mécanismes d'action plus ciblés pour ces maladies.

Bien que les médicaments biologiques ont résolu beaucoup de problèmes de santé publique, leur réglementation n'est pas une tâche facile pour les autorités réglementaires car ils se caractérisent par une complexité inhérente importante sur le plan structural et fonctionnel, et ont un procédé de fabrication qui diffère totalement d'un procédé de fabrication d'un médicament chimique, de ce fait toute modification dans le processus de fabrication de ces médicaments ne sera pas jugé facilement car elle peut entraîner des modifications dans le profil de qualité, sécurité et efficacité (QSE) du produit biologique.

Les modifications du processus de fabrication sont souvent nécessaires pendant le développement du médicament et même après son approbation pour son amélioration continue, les fabricants ont la liberté d'introduire des changements dans leurs processus à condition de procéder à un exercice de comparabilité adéquatement conçue entre le produit avant et après le changement afin de démontrer qu'un tel changement n'a pas d'impact sur l'innocuité (immunogénicité) et/ou l'efficacité (puissance) du produit biologique.

La plupart des fabricants se limitent aux études de comparabilité analytiques pour prouver l'absence de différences avant et après modification du procédé de fabrication, cependant, les résultats obtenus ne sont pas systématiquement concluants, surtout avec des changements majeurs, ce qui exige de pousser la comparabilité avec un supplément non clinique (études sur animaux) et même cliniques (études sur êtres humains), C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail dans le but de faire une revue des textes réglementaire internationaux et d'en extraire des approches pour la conception de l'étude de comparabilité pour servir de support à l'autorité algérienne pour établir des directives réglementaires pour l'évaluation de l'impact des changements de processus de fabrication sur la qualité des médicaments biologiques.

1 Chapitre1 - Généralités

1.1 Biotechnologie

Il est difficile de regrouper tous les aspects de la biotechnologie dans une seule définition car cette dernière s'est étendue au fil du temps à plusieurs domaines, l'emploi du mot 'biotechnologie' pour la première fois a été attribué à Karl Ereky (économiste agricole hongrois) en 1919 dans le but de couvrir l'interaction de la biologie avec la technologie. Aujourd'hui, selon la bibliographie présente il existe plusieurs définitions en allant de la plus large à la plus étroite :

Définition de la FDA (Food and Drug Administration) :

« L'application des systèmes biologiques et des organismes à des processus techniques et industriels ». (1)

La définition du dictionnaire français Larousse :

« Toute technique utilisant des êtres vivants (micro-organismes, animaux, végétaux), généralement après modification de leurs caractéristiques génétiques, pour la fabrication industrielle de composés biologiques ou chimiques (médicaments, matières premières industrielles) ou pour l'amélioration de la production agricole (plantes et animaux transgéniques ou organismes génétiquement modifiés O.G.M). » (2)

La fédération européenne de la biotechnologie :

« La biotechnologie est l'utilisation intégrée de la biochimie, de la microbiologie et des sciences de l'ingénieur afin de permettre une application technologique (industrielle) des capacités des micro-organismes, des cellules de tissu cultivées et de leurs parties » (3)

Le début de l'utilisation de la biotechnologie dans l'industrie pharmaceutique a été marqué par la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928, par la suite, l'avènement du génie génétique et l'utilisation de l'Acide désoxyribonucléique (ADN) recombinant qui a constitué l'évènement phare dans l'industrie des bio médicaments par la production de la première insuline humaine recombinante à partir des cellules du pancréas de bœuf et de porc et après le développement de nouveaux bio similaires.

1.2 Biomédicaments et les biosimilaires

1.2.1 Définitions du biomédicament

Le biomédicament a été l'objet de discussions de nombreuses autorités sanitaires internationales et chacune a donné sa propre définition.

L'agence européenne des médicaments EMA: (La directive européenne 2001/83 modifiée par la directive 2003/63/C)

« Un médicament biologique est un produit dont la substance active est une substance biologique. Une substance biologique est une substance qui 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 physico-chimiques et biologiques, ainsi que la connaissance de son procédé de fabrication et de son contrôle » (4)

FDA :

«Les produits biologiques sont une catégorie diverse de produits et sont des molécules généralement grandes et complexes. Ces produits peuvent être produits par la biotechnologie dans un système vivant, comme un microorganisme, une cellule végétale ou une cellule animale, et sont souvent plus difficiles à caractériser que les petites molécules médicamenteuses.» (1)

L'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé l'ANSM :

«Un médicament biologique est une substance produite à partir d'une cellule ou d'un organisme vivant ou dérivée de ceux-ci. Les vaccins, les anticorps monoclonaux ou les facteurs de croissance sont des exemples de produits biologiques» (5)

Santé Canada :

«Les médicaments biologiques proviennent d'organismes vivants ou de leurs cellules et sont souvent fabriqués au moyen de la biotechnologie. On les utilise pour traiter des maladies et des états pathologiques, y compris l'anémie, le diabète, les maladies intestinales inflammatoires, le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde, le déficit hormonal et certaines formes de cancer. De façon générale, les médicaments biologiques sont plus vastes et complexes que les médicaments chimiques.» (6)

1.2.2 Définitions du biosimilaire

Dans cette partie sont présentées les différentes définitions des biosimilaires décrites par l'Organisation Mondiale de la Santé, la réglementation américaine et européenne :

L'OMS :

« Un biosimilaire est un produit biologique qui est similaire en termes de qualité, de sécurité et d'efficacité à un produit biologique de référence déjà enregistré» (7)

La biosimilarité est définie par l'OMS aussi comme étant :

«Absence d'une différence pertinente dans le paramètre d'intérêt» (7)

FDA :

«Un biosimilaire est un produit biologique qui est très similaire et n'a pas de différences cliniques significatives par rapport à un produit de référence existant approuvé par la FDA» (1)

L'EMA :

«Un biosimilaire est un médicament biologique contenant une version de la substance active du médicament biologique original déjà autorisé (médicament de référence). La Similarité avec le médicament de référence en termes de caractéristiques de qualité, d'activité biologique, de sécurité et d'efficacité est basée sur un exercice complet de comparabilité qui doit être établie» (8)

Autres définitions :

✓ Définition de l'agence canadienne de santé :

«Un médicament biologique similaire, ou médicament biosimilaire, est un médicament dont on a démontré le caractère très semblable à un médicament biologique déjà autorisé pour la vente (connu sous le nom de *médicament biologique de référence*). Au Canada, on appelait auparavant les médicaments biosimilaires des produits biologiques ultérieurs (PBU). Les médicaments biosimilaires sont approuvés en fonction d'une comparaison approfondie avec un médicament de référence et peuvent faire leur entrée sur le marché une fois que les brevets et les protections des données du médicament biologique de référence sont expirés. » (9)

✓ Définition de l'ANSM:

«Un médicament biosimilaire est similaire à un médicament biologique de référence qui a été autorisé en Europe depuis plus de 8 ans et dont le brevet est tombé dans le domaine public. » (10)

1.3 Classes thérapeutiques des biomédicaments

Les médicaments biologiques sont des produits synthétisés à partir d'organismes vivants comme défini précédemment, cependant ces organismes peuvent ne subir aucun changement génétique à leur échelle et produisent des substances eux même avec leur propre matière génétique, ce sont les médicaments non issus de l'ADN recombinant ; d'autre part il existe des médicaments provenant d'organismes génétiquement modifiés utilisant la technologie de l'ADN recombinant qu'on appelle médicaments biologiques issus de l'ADN recombinant (voir figure 1-1)

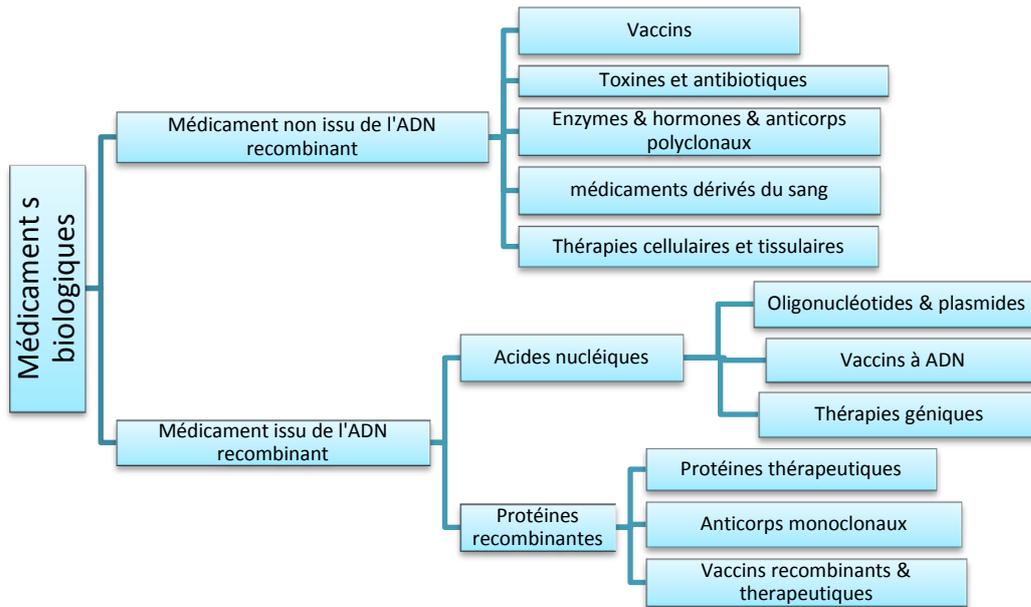


Figure 1-1 Classification des médicaments biologiques (11)

Le tableau 1-1 donne une liste exhaustive d'exemples de médicaments biologiques commercialisés dans le marché mondial :

Tableau 1-1 Une liste non exhaustive d'exemples de médicaments biologiques commercialisés dans le marché Algérien

Classe thérapeutique		Molécule biologique (DCI) ¹	Bio médicament de référence	Les biosimilaires	Indications
Hormones	Insulines	Insuline Glargine	LANTUS	ABASAGLAR BASALOG ONE	diabète insulino-dépendants.
	Hormone parathyroïdienne	Tériparatide	FORSTEO	Movymia Terrosa	la prise en charge d'ostéoporoses.
	Gonadotrophines	Follitropine alfa hormone folliculostimulante humaine recombinante FSH ²	GONAL-f	BEMFOLA OVALEAP	hyperstimulations ovariennes en cas de procréation médicalement assistée, hypofertilités, stimulations folliculaires
	Hormone de croissance	Somatropine	GENOTONOR M	OMNITROPE	déficits en hormone somatotrope, retards de croissance, syndromes de Prader-Willi.
Facteur de croissance hématopoïétique	Filgrastim	NEUPOGEN	ACCOFIL FILGRASTIM HEXAL	mobilisation des cellules souches, neutropénies.	

¹ DCI : Dénomination Commune Internationale.

² FSH : Follicle-stimulating hormone

				GRASTOFIL NIVESTIM RATIOGRASTIM TEVAGRASTIM ZARZIO	
	Erythropoïtines	Epoétine alpha EPO ³ recombinante humaine	EPREX®	Abseamed® Binocrit® Epoetine Alfa Hexal® Retacrit® Silapo®	Anémies (dues à une insuffisance rénale ou à une chimiothérapie), stimulations de l'érythropoïèse.
Cytokines	Interleukines	Aldesleukine (l'IL-2 ⁴ humaine recombinante)	PROLEUKINE	/	la prise en charge de cancers du rein.
	Interférons	Interféron bêta-1a	Avonex	Cinnovex	la prise en charge de scléroses en plaques.
	Enzymes recombinantes	acide α-glucosidase humain recombinant	Lumizyme, Myozyme		la maladie de Pompe (déficit en GAA ⁵)
	Protéines de fusion	Etanercept	ENBREL	Benepali Erelzi Lifmior	la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, l'arthrite polyarticulaire idiopathique, le rhumatisme psoriasique et la spondylarthrite ankylosante.
	Facteurs plasmatiques	Facteur VIII	RECOMBINANTTE	Advate	Hémophilie A
	Anticorps monoclonaux	Infliximab Trastuzumab	REMICADE® HERCEPTIN®	Flixabi®, Inflectra®, Remsima®, Herzuma, Kanjinti, Ontruzant	Maladie de Crohn, colite ulcéreuse, polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite kystique, arthrite psoriasique, psoriasis en plaques

1.4 Développement des médicaments biologiques

Le développement suit les étapes suivantes (12)

³ EPO : Erythropoïétine

⁴ IL-2 : Interleukine-2

⁵ GAA : Alpha-Glucosidase Acide

1. **La recherche exploratoire :** Inclut l'étude des mécanismes de la maladie afin de déterminer la cible que le médicament devra atteindre, puis c'est le criblage : de très nombreuses molécules sont testées afin de ne retenir que celles éventuellement efficaces.
2. **Essais précliniques :** Réalisés sur des systèmes moléculaires inertes, des cellules et des cultures de cellules, ont pour but de s'assurer de l'effet pharmacologique des molécules sélectionnées et de leur sécurité envers les patients. Si ces tests sont concluants, des expériences sont alors menées chez l'animal.

Tests de toxicologie : ces tests évaluent les risques d'effets secondaires des médicaments en développement. Pour se faire, la réglementation impose des études chez l'animal selon des protocoles précis conformes aux Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) qui assureront la reproductibilité des essais. Ils se réalisent en différentes étapes suivant des procédures précises internationalement validées.

3. **Les essais cliniques chez l'homme :** Lorsque les essais sur animaux donnent des résultats concluants, on passe aux essais sur l'homme.

Les essais de phase I : Tolérance

C'est au cours de cet essai que se font les premières administrations sur l'être humain sain. L'objectif est d'établir les doses à administrer et le devenir du PA dans l'organisme : absorption, métabolisme et élimination

On étudie au cours de cette phase la sécurité du médicament et ses interactions.

- **Les essais de phase II : Efficacité**

Ils portent sur un faible nombre de malades. L'activité de la substance, son efficacité, ses effets secondaires éventuels sont évalués au cours de cette phase. Ceci permet d'établir la dose optimale du produit.

- **Les essais de phase III : Rapport bénéfice/risque**

Ils portent sur un grand groupe de malades et visent à se mettre dans les futures conditions d'emploi. Ils permettent de juger de l'efficacité et de la tolérance du produit.

Ils sont réalisés sous forme comparative entre au moins deux groupes de malades. Un groupe reçoit un produit connu et sert de témoin, l'autre groupe reçoit le produit à évaluer. Ces essais permettent d'apporter une preuve substantielle de l'efficacité de la molécule.

- **Les essais de la phase IV : Essais après commercialisations**

Sont réalisés une fois le médicament commercialisé, sur un nombre de patients souvent très important (jusqu'à plusieurs dizaines de milliers de personnes). Ils permettent d'approfondir la connaissance du médicament dans les conditions réelles d'utilisation et d'évaluer à grande

échelle sa tolérance. La pharmacovigilance permet ainsi de détecter des effets indésirables très rares qui n'ont pu être mis en évidence lors des autres phases d'essais.

1.5 Complexité des médicaments biologiques

1.5.1 Spécificité des molécules biologiques

Contrairement aux petites molécules classiques d'origine chimique qui ont des structures moléculaires simples et dont la formule est relativement moins compliquée à produire et à copier ; les molécules issues de procédé biotechnologique utilisant l'ADN recombinant sont formées de molécules beaucoup plus complexes.

1.5.1.1 Sur le plan structural

Par rapport aux substances chimiques de petites tailles, les médicaments biologiques se composent de grandes structures moléculaires, souvent complexes (13).

A titre d'exemple, les immunoglobulines de type G (IgG) comporte 660 acides aminés et fait un poids moléculaire de 150 000 Da, un interféron est composé de 165 acides aminés et son poids est de 19 625 Da alors qu'un médicament de synthèse chimique comme l'aspirine correspond à un poids de 180 Da (voir figure 1-2 (14))

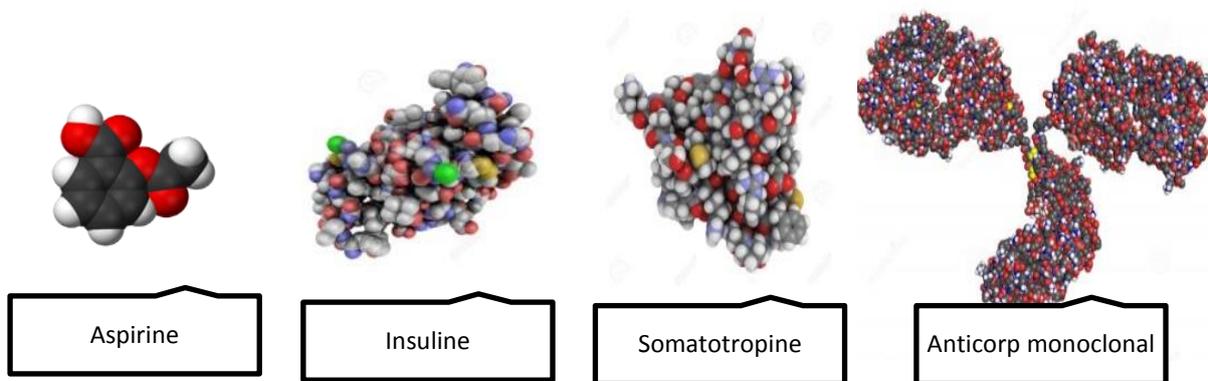


Figure 1-2 Comparaison entre la taille moléculaire de quelques médicaments biologiques avec celle de l'aspirine.

En plus de leur grande taille, les produits biologiques ont une organisation spatiale en trois dimensions qui doit être conservée pour le maintien de l'activité biologique, alors que les molécules d'origine chimique sont de structure plane avec une flexibilité très réduite. (15)

1.5.1.2 Degré de variabilité inhérent aux molécules produites

A partir d'une voie de synthèse chimique, on obtient une population moléculaire homogène et reproductible du même principe actif, alors qu'à partir d'un système de production

biologique, et compte tenu de la complexité des processus biologiques, le produit résultant est une population mixte de la molécule active sous des formes variantes.

Cette diversité/variabilité intrinsèque des molécules produites est décrite sous le terme de « micro hétérogénéité » (5) (15)

Ce faible degré de variabilité peut être observé au sein d'un même lot ou entre divers lots du même médicament biologique (figure 1-3) et cette faible variabilité doit se situer dans la fourchette acceptable pour assurer une sécurité et une efficacité constante. (13)

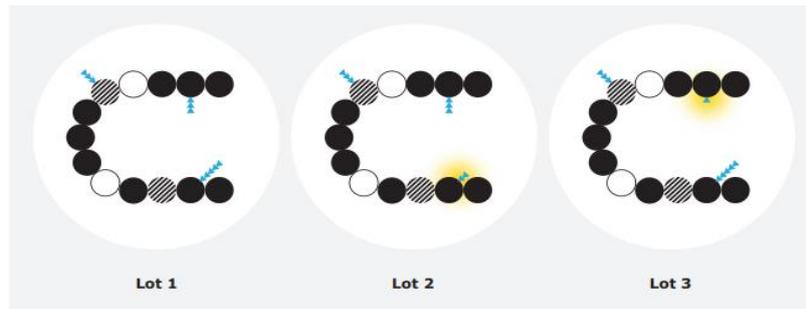


Figure 1-3 Variabilité des lots dans une bioproduction (13)

1.5.1.3 Complexité du procédé de fabrication

La figure 1-4 montre les principales étapes intervenant dans la fabrication des médicaments biologiques. Chacune des étapes de la fabrication est très critique et nécessite une surveillance rigoureuse pour s'assurer de du profil QSE du produit final.

Les microorganismes ou les cellules desquels les protéines sont issues sont très sensibles et peuvent perdre leur stabilité sous l'effet des variations qu'ils subissent. Le moindre changement apporté durant la production, comme une légère modification de l'équipement utilisé ou des conditions environnementales, ou un changement souvent considéré comme négligeable, risque d'altérer le médicament et son effet particulier dans l'organisme et le moindre écart au processus établi peut influencer sur l'efficacité, l'innocuité ou la biodisponibilité du médicament biologique produit. (16)

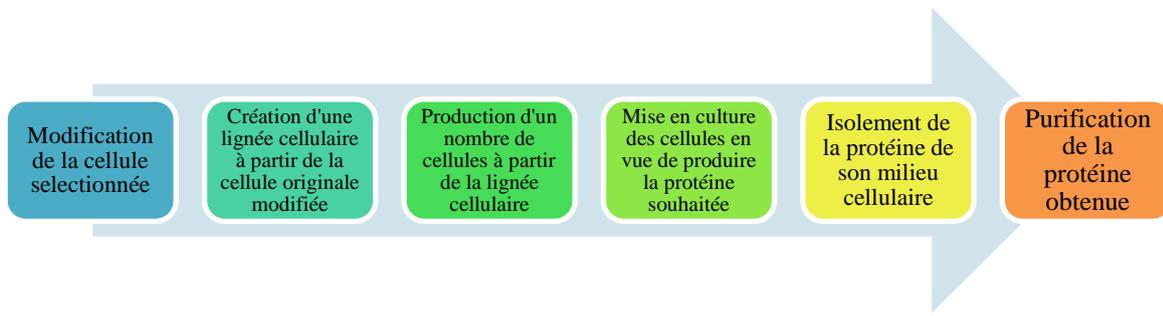


Figure 1-4 Principales étapes intervenant dans la fabrication des médicaments biologiques (16)

1.5.1.4 La stabilité

Les petites molécules ont tendance à suivre le comportement d'Arrhenius (c'est-à-dire un mouvement moléculaire dépendant de la chaleur) et ont donc une stabilité prévisible basée sur des études d'accélération. En revanche, la stabilité des produits biopharmaceutiques est plus difficile à prévoir car les protéines se dégradent par différentes voies. De légères variations dans le processus de fabrication susceptibles d'affecter la stabilité des protéines ne sont pas nécessairement identifiables au moyen d'études de stabilité accélérées. Par exemple, la dégradation de l'érythropoïétine dé-glycosylée à 70° C se produit plus rapidement que pour la molécule native, entièrement glycosylée. (17) (18)

1.5.1.5 Contrôle et caractérisation

Pour étudier ou contrôler telle ou telle caractéristique moléculaire des produits biologiques il faudra envisager, comme le prévoit la définition d'un médicament biologique « une combinaison d'essais physico-chimiques et biologiques » pour pouvoir appréhender de façon globale l'intégrité de la structure tridimensionnelle de la molécule d'intérêt et garantir à la fin, l'activité thérapeutique et un profil de tolérance identique à chaque utilisation chez les patients. (19)

1.5.1.6 Immunogénicité

Le système immunitaire a la capacité de reconnaître les protéines étrangères et de réagir contre elles. Les médicaments biologiques ne déclenchent généralement pas de réponse immunitaire ou uniquement une réponse immunitaire limitée (par ex. apparition passagère d'anticorps). Les effets indésirables de nature immunologique (par ex. réactions liées à la perfusion ou au niveau du site d'injection) sont généralement sans gravité. Toutefois, dans de rares cas, une réaction immunologique à un médicament biologique peut être grave et potentiellement mortelle. Par ailleurs, les anticorps ciblant le médicament biologique

«Anticorps Anti-Médicament» ou (AAM) pourraient neutraliser l'activité du médicament et réduire son efficacité. L'immunogénicité potentielle doit donc toujours être évaluée pour tous les médicaments biologiques. (13)

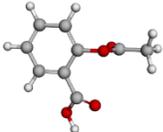
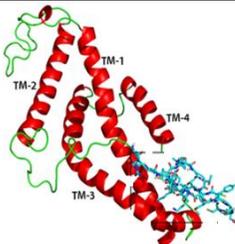
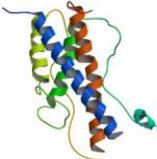
La différence entre un médicament chimique et un médicament biologique est illustrée dans ce tableau 1-2 de la FDA :

Tableau 1-2 Différences entre un médicament biologique et un médicament chimique

Médicament de petites molécules (d'origine chimique)	Produits biologiques
Poids moléculaire généralement faible	Poids moléculaire généralement élevé
Synthèse généralement organique ou chimique	Fabriqué avec / à partir de cellules / organismes vivants → Risque inhérent et risque de contamination
Des étapes critiques moindres dans le procédé de fabrication	De nombreuses étapes critiques dans procédé de fabrication
Caractérisé facilement	Moins facilement caractérisé
Structure connue	La structure peut être ou ne pas être complètement définie ou connue
Population médicamenteuse finale homogène	Population médicamenteuse finale hétérogènes Peut inclure des variantes
Généralement pas immunogène	Souvent immunogène

On a pris des exemples de molécules commercialisées dans le marché mondial pour mettre en évidence la différence entre eux sur divers niveaux, ceci a été récapitulé au tableau 1-3 ci-dessous:

Tableau 1-3 Comparaison d'exemples de molécule chimique et des molécules biologiques sur plusieurs niveaux de différences

	Médicament chimique	Médicaments biologiques		
	ASPIRIN® (20)	REMICADE® (21) Infliximab anticorps monoclonal chimérique IgG1 _k	ENGERIX-B® (22) Vaccin contre l'hépatite B (recombinant)	GENOTROPIN® (23) Somatropine Hormone de croissance
Taille	PM ⁶ : 180.157 g/mol	149KDa	Polypeptide de taille variable	PM : 22.1 kD
Structure				
Matière de départ	Acide salicylique + Anhydride éthanóique	A partir d'une lignée cellulaire recombinante cultivée	Cellules de levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et l'ADN recombinant.	à partir d'une souche d' <i>Escherichia coli</i>
Caractérisation	Utilisation de méthodes analytiques simples	Nécessitent la combinaison entre plusieurs méthodes analytiques très sophistiqués et des méthodes biologiques		
Stabilité	A conserver à une température ne dépassant pas les 30°C	Nécessite une température de conservation: de 2 à 8 °C Une fois reconstituée, il conserve ses propriétés physico-chimiques pendant 24 heures à température ambiante	il doit être conservé entre 2 et 8 °C, Il craint le gel. Un vaccin qui a gelé n'est plus efficace et doit être jeté	Entre(2 °C et 8 °C). Ne pas congeler
V.A ⁷	Voie orale	Injection intraveineuse	Voie intramusculaire	Sous-cutanée
Pharmaco-cinétique	A ⁸ : rapidement et presque totalement absorbé par voie orale	A : Dépourvu de profil d'absorption D : Compartiment vasculaire	Pas de données dans la bibliographie sur la pharmacocinétique	A : la biodisponibilité de la somatropine administré par voie sous-cutanée est environ de 80%

⁶ Poids moléculaire⁷ Voie d'administration⁸ Absorption

	<p>D⁹ : diffusion rapide dans tous les tissus. Ils traversent la barrière placentaire et sont retrouvés dans le lait maternel.</p> <p>M¹⁰ : fortement métabolisé au niveau hépatique.</p> <p>E¹¹ : principalement par voie urinaire</p>	<p>M : Même voie du métabolisme des protéines endogènes.</p> <p>Hydrolyse --a.a -- recyclé ou catabolisé</p> <p>E : un t_{1/2} de 12,3 et 14,7 jours</p>		<p>E : le temps de demi vie est de 2 à 3 h</p>
Immunogénéicité	Faible	Formation d'anticorps dirigés contre l'inflximab chez 10 % des patients traité par ce médicament	Production d'Ac ¹² spécifiques contre AgHBs ¹³ (anticorps anti-HBs), qui correspond à la protection contre l'infection par le virus de l'hépatite B	une faible proportion de patients pourrait produire des anticorps pendant le traitement par l'hormone de croissance Des réactions d'hypersensibilité ont rarement survenues
Toxicité	Les effets d'un surdosage sont les suivants: acouphènes, douleurs abdominales, hypokaliémie, hypoglycémie, pyrexie, hyperventilation, dysrythmie, hypotension, hallucination, insuffisance rénale, confusion, convulsions, coma et mort.	D'après les résultats des essais sur le chimpanzé et les rats il n'as pas d'effets toxiques. Risque de réactions croisées visant les cellules mononuclées et les cellules du stroma de nombreux tissus. Suite à une étude sur la réactivité croisée in vitro avec des tissus humains normaux	l'Engerix B® renferme toujours une infime quantité de thiomersal, et il est notoire que même les quantités infimes gardent toujours une certaine nocivité.	Surdosage prolongé : des signes et des symptômes de gigantisme et d'acromégalie .Un surdosage à court terme : peut entraîner une hypoglycémie initiale, puis une hyperglycémie

⁹ Distribution

¹⁰ Métabolisme

¹¹ Elimination

¹² Anticorps

¹³ Antigène de l'hépatite B

1.5.2 Complexité de la réglementation des médicaments biologiques

Selon Trouvin et al : « La classification comme médicament biologique entraîne au plan réglementaire la mise en place des critères d'évaluation plus exigeants en raison de la complexité de ces produits et de leurs procédés d'obtention qui rendent la qualité finale du produit plus difficile à garantir et à maîtriser» (19)

L'EMA, en accord avec le point de vue de la FDA, affirme que les produits biologiques sont différents des médicaments chimiques en raison de (24) :

- l'utilisation d'organismes vivants pour produire le produit biologique,
- la complexité accrue des processus de fabrication,
- la complexité accrue des produits

A l'issue de l'expiration des brevet des médicaments biologiques qu'on appelle médicament de référence, d'autres développeurs peuvent produire un médicament copie du médicament de référence mais ce dernier ne retiendra pas la dénomination de médicament générique car cette copie n'est pas identique à la référence mais elle lui est semblable, on parle de médicament biosimilaire

Cela a été largement abordé par les autorités de santé compétentes :

«Les produits biologiques consistent généralement en des entités relativement grandes et complexes qui sont difficiles à caractériser. De plus, les produits biologiques similaires (Similar Biotherapeutic Products SBP) sont fabriqués et contrôlés en fonction de leur propre développement, car le fabricant d'un SBP n'a normalement pas accès à toutes les informations de fabrication nécessaires sur le produit d'origine ... En conséquence, il a été convenu que la méthode normale d'octroi de licence aux médicaments génériques au moyen d'études de bioéquivalence n'est pas scientifiquement appropriée pour les SBP.» (25).

En revanche, les fabricants de biosimilaires doivent démontrer que le biosimilaire est très similaire au produit de référence, à l'exception de différences mineures entre les composants cliniquement actifs. Les fabricants de produits biosimilaires doivent également démontrer qu'il n'existe aucune différence cliniquement significative entre le produit biosimilaire et le produit de référence en termes de sécurité et d'efficacité» (1)

-le résumé de la différence entre le concept générique et le concept biosimilaire est illustré dans le tableau 1-4 de l'EMA suivant :

Tableau 1-4 Comparaison du développement et des caractéristiques des médicaments génériques et des médicaments biosimilaires (26)

Médicament générique	Médicament biosimilaire
Généralement possible d'obtenir exactement la même molécule	Possible de reproduire la molécule avec un degré élevé de similarité compte tenu des méthodes propres à la biofabrication et de la variabilité biologique naturelle
Données complètes exigées sur la qualité pharmaceutique	Données complètes exigées sur la qualité pharmaceutique, ainsi qu'études comparant la structure et l'activité biologique du médicament biosimilaire avec celles du médicament de référence
Développement fondé sur la preuve de la bioéquivalence (c'est-à-dire que, administrés dans des conditions similaires, le générique et le médicament de référence libèrent la substance active dans le corps au même rythme et dans les mêmes quantités)	Développement fondé sur la preuve de la biosimilarité au moyen d'études de comparabilité (comparaison exhaustive directe entre le médicament biosimilaire et le médicament de référence pour démontrer une forte similarité au niveau de la structure chimique, de la fonction biologique, de l'efficacité, de la sécurité et de l'immunogénicité)
Les données cliniques requises sont principalement des études de bioéquivalence pharmacocinétique	Outre les études comparatives de pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, des données sur la sécurité et l'efficacité peuvent être exigées, en particulier pour les médicaments biologiques les plus complexes
Toutes les indications approuvées pour le médicament de référence peuvent être autorisées une fois la bioéquivalence démontrée, sans qu'il soit nécessaire de fournir d'autres données cliniques	L'efficacité et la sécurité doivent être démontrées pour chaque indication. Toutefois, des essais cliniques de confirmation avec le médicament biosimilaire ne sont généralement pas nécessaires pour chaque indication approuvée pour le médicament de référence. Une fois la biosimilarité démontrée, l'extrapolation des données à d'autres indications est possible si les éléments de preuve scientifiques disponibles concernent tous les aspects spécifiques de ces indications

2 Chapitre 2 - Procédé de Fabrication des médicaments biologiques

2.1 Préparation de la banque cellulaire

Il existe un processus en trois étapes pour la préparation des banques de cellules utilisées dans la fabrication de protéines recombinantes et d'anticorps monoclonaux: Le développement génétique, la sélection du clone compétent, et La mise en banque de cellules

2.1.1 Développement génétique

Avant la fabrication de protéine à grande échelle dans l'industrie du biomédicament, il faut une étape préliminaire qui est le développement génétique, cette étape est très importante, elle couvre différents systèmes à choisir et beaucoup d'étapes critiques, elle commence tout d'abord par l'introduction d'un gène étranger codant pour la protéine dans une cellule hôte (bactérienne, végétale ou animale). Pour ce faire, le gène est généralement inséré dans un vecteur (un petit morceau d'ADN) afin de former une molécule d'ADN recombinant (construction de l'expression).

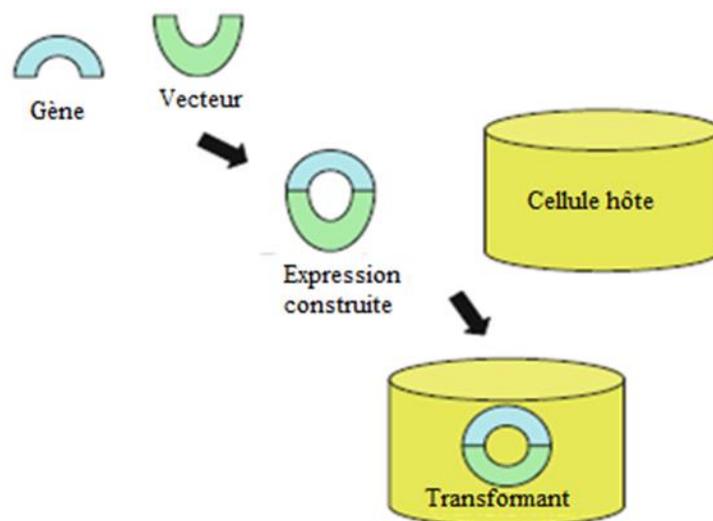


Figure 2-1 Schéma de la construction génétique (24)

Le processus par lequel le vecteur contenant le gène est introduit dans une cellule hôte est appelé 'transformation' ou « transfection ». La cellule hôte qui héberge actuellement le gène étranger est une cellule «transformée» ou un «transformant» (figure 2-1) (27)

Une première étape essentielle dans la construction de l'expression consiste à isoler le gène qui code pour la séquence des acides aminés du produit biopharmaceutique souhaité, séparé de tous les autres ADN de l'organisme. Ceci peut se faire de 3 manières; soit une extraction directe de l'ADN cellulaire, soit la préparation de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'acide ribonucléique messager (ARNm) connue, soit l'utilisation d'un ADN synthétique.

(28). Pour la plupart des organismes, cette perspective est décourageante, car il existe plusieurs milliers de gènes répartis sur plusieurs millions de bases d'ADN. (29), *l'alternative* pour les développeurs de médicaments biologiques est l'utilisation des banques d'ADN (appelé aussi librairie génomique).

Par comparaison aux procaryotes, l'ADN des eucaryotes est constitué d'introns et d'exon. Il n'est pas possible d'utiliser l'ADN génomique pour le clonage de l'ADN eucaryotes. Pour cela l'ARNm qui avait subi une maturation et correspond aux exons uniquement est préféré.

Pour la manipulation de l'ADN tout au long des étapes précédentes et des étapes à suivre, une grande variété d'enzymes est disponibles, elles peuvent être regroupées en quatre catégories principales: (29)

- Les *nucléases* coupent, raccourcissent ou dégradent les molécules d'acide nucléique;
- Les *ligases* joignent des molécules d'ADN;
- Les *polymérases* fabriquent des copies des molécules d'acide nucléique;
- Les *enzymes modifcatrices* suppriment ou ajoutent des groupes chimiques

Le gène codant pour la substance biopharmaceutique est transporté vers la cellule hôte dans un véhicule appelé « vecteur ». Le vecteur à utiliser est déterminé par le type de cellules hôtes et les objectifs de l'expérience de clonage (27).

Il existe deux types de vecteurs utilisés lors de la manipulation de l'ADN recombinant ; Les vecteurs de clonage s'il s'agit simplement de constituer une librairie de gènes par contre, si le but recherché est la production industrielle d'une protéine (ce qui est le but pour la production de médicaments biologiques), il faut obligatoirement qu'il y ait expression du gène et que cette expression soit la plus efficace, un vecteur d'expression doit être stable et en grand nombre de copies dans la cellule hôte. (28)

Pour exprimer une protéine recombinante, un vecteur doit contenir : (30) (figure 2-2)

- ❖ Un promoteur,
- ❖ Une origine de réplication,
- ❖ Un site de clonage,
- ❖ Un marqueur de sélection,
- ❖ Un site de liaison aux ribosomes
- ❖ Et un signal de recombinaison,

- ❖ Certains vecteurs peuvent contenir des gènes qui codent pour des protéines de fusion (tag) qui facilitent la purification de la protéine recombinante par chromatographie d'affinité. Les TAG les plus utilisés sont la Glutathione S-transferase et (His)₆ (6 résidus d'histidine).

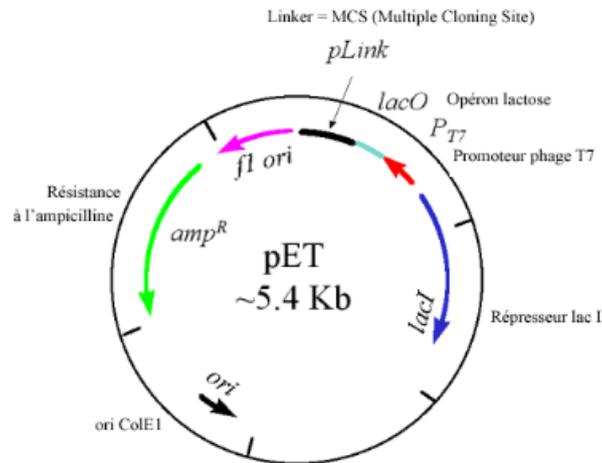


Figure 2-2 Schéma simplifié d'un vecteur d'expression (31)

Le vecteur contient des promoteurs (pour une transcription efficace), des amplificateurs et d'autres fragments d'ADN propriétaires qui contiennent les astuces et les secrets commerciaux d'un fabricant pour autoriser la surproduction du produit biopharmaceutique dans l'hôte. Les fabricants intègrent de nombreuses modifications génétiques, «améliorations», dans leurs constructions d'expression pour garantir que le biopharmaceutique souhaité est produit en abondance (24).

Le vecteur est le plus souvent un plasmide mais il y a d'autres types de vecteurs comme les cosmides et les virus comme le baculovirus.

Il est nécessaire de choisir le type de promoteur à utiliser. La protéine doit-elle être exprimée de manière constitutive ou après un signal d'induction approprié? Faut-il utiliser le promoteur le plus puissant possible? De plus, il faut décider s'il peut être avantageux d'exprimer la protéine par fusion avec une protéine complètement différente mais bien exprimée. (28)

Après la construction de l'expression l'expérimentateur se pose une question :

« Production de protéines recombinantes: quel système choisir? » (32)

N'importe quelle protéine peut être produite à l'aide d'organismes modifiés par génie génétique, mais tous les types de protéines ne peuvent pas être produits par tous les types de cellules. (33) Parce que chaque protéine est différente et il ne peut y avoir un système d'expression unique.

Toutefois, il n'existe aucune restriction quant au type de cellule hôte pouvant être utilisée pour la fabrication commerciale à condition que les cellules: 1) prennent en charge

l'expression du produit à niveau élevé pendant plusieurs mois de culture, 2) puissent être adaptées à de grands volumes (100 à 10 000 L), 3) peuvent atteindre et maintenir une densité cellulaire viable élevée dans un processus de fabrication acceptable ($>5 \times 10^6$ cellules/mL en culture discontinue, $>10^8$ cellules/ml en perfusion), 4) offrent des capacités de traitement post-traductionnelles appropriées. (34)

Différents systèmes d'expression existent, la littérature mentionne que 39% des protéines recombinantes sont produites chez *Escherichia coli* (E.coli), 35% par les cellules d'ovaire de hamster chinois(CHO), 15% dans les levures, 10% par d'autres systèmes mammaliens et 1% par d'autres bactéries ou d'autres systèmes (35)

Allant des systèmes microbiens les plus simples aux systèmes cellulaires complexes tels que les lignées cellulaires de mammifères. (36), le choix du système d'expression est principalement guidé par les modifications que la protéine doit subir pour être biologiquement active. De même, il est important de connaître le compartiment cellulaire dans lequel la protéine d'intérêt se replie ou exerce son activité biologique naturelle, selon que cette protéine est cytoplasmique, membranaire ou se replie dans un compartiment extra cytoplasmique. (37)

- **L'expression procaryote : les bactéries**

L'expression de gènes hétérologues dans des bactéries est de loin le moyen le plus simple et le moins coûteux disponible pour obtenir de grandes quantités de polypeptide (38), Leurs avantages intrinsèques, tels que la croissance rapide, les rendements élevés et la facilité de manipulation, en font le premier choix pour l'expression de peptides et de protéines non glycosylés (39).

E. coli est l'une des hôtes les plus anciennes et les plus largement utilisées pour la production de protéines hétérologues (40). Actuellement, 30% des protéines recombinantes utilisées en thérapeutique sont produites dans *E. coli*. (41)

Les dérivés d'*E. Coli* K12 sont les plus largement utilisés, souvent avec des déficiences en protéase et d'autres mutations. Récemment, des souches B, par exemple Le BL21 a gagné en popularité en raison de son efficacité dans l'expression de protéines recombinantes.

Cependant, le système d'expression procaryote présente de nombreuses lacunes: toutes les protéines ne sont pas solubles. Les protéines mal repliées formées dans le cytoplasme peuvent former des agrégats insolubles appelés corps d'inclusion, (figure 2-3), ce qui conduit à une purification difficile. De plus, les systèmes d'expression procaryotes sont généralement incapables d'effectuer des modifications post-traductionnel (42)

Il faut noter aussi que les protéines recombinantes produites à l'aide du système d'expression *E. coli* peuvent être contaminées par des endotoxines. (43)

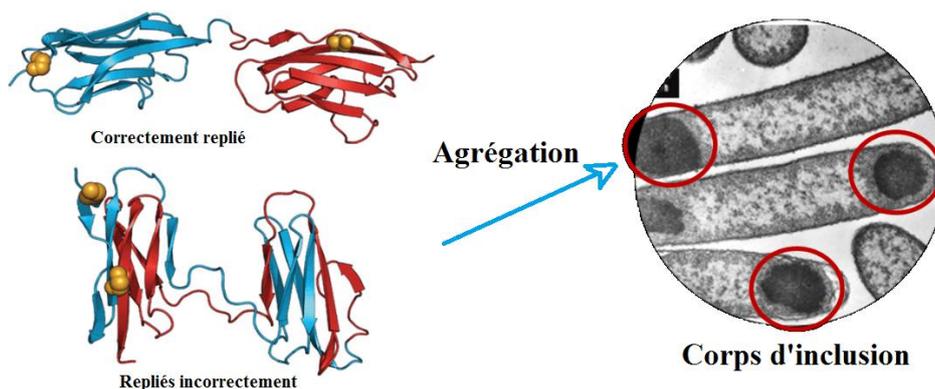


Figure 2-3 Protéines mal repliées et corps d'inclusions dans le système d'expression : E.coli (44)

Ainsi, d'autres systèmes plus sophistiqués sont également en cours de développement; de tels systèmes peuvent permettre l'expression de protéines jusque-là impossibles chez E. coli, par exemple des protéines glycosylées. (42)

- **Expression eucaryote :**

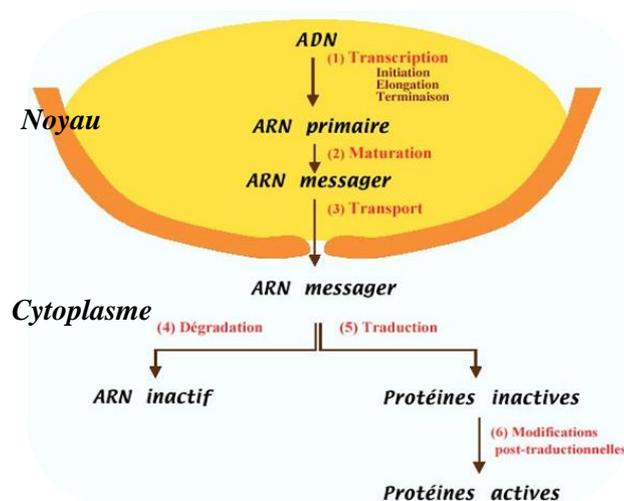


Figure 2-4 Schéma de synthèse des protéines dans les cellules eucaryotes (45)

- **Expression des cellules de levures :**

Les levures sont des organismes unicellulaires compartimentés appartenant au règne des champignons. En comparant le système d'expression de la levure avec les systèmes d'expression bactériens, tels que E. coli, l'expression de la levure permet une modification post-traductionnelle, telle que la glycosylation, la phosphorylation, l'acétylation et l'acylation liées à l'azote . Contrairement à d'autres systèmes d'expression eucaryotes, tels que les cellules d'insectes et de mammifères, l'expression de la levure offre plusieurs avantages, par exemple les levures ont une croissance cellulaire rapide et nécessitent des techniques de culture simples pour la maintenance, en particulier pour les cellules recombinantes (46) (47). En biotechnologie industrielle, de nombreuses levures ont été reconnues comme

Saccharomyces cerevisiae, *Pichiapastoris* et *Hansenulapolymorpha*, *Kluyveromyceslactis*, *Pichiastipitis*, *Schizosaccharomycespombe*, *Schwanniomyces occidental*, *Yarrowialipolytica* et *Arxula adenivorans* pour la production de produits recombinants (48).

Il faut noter que les cellules de levures réalisent les premières étapes de glycosylation de la même manière que les cellules animales. Mais les sucres terminaux des glycoprotéines ne sont cependant pas correctement ajoutés. (49)

Expression des cellules mammifères :

Des modifications post-traductionnelles importantes affectent à la fois l'identité physico-chimique et l'activité biologique de nombreux polypeptides recombinants. Les cellules de mammifères sont essentielles pour effectuer ces modifications correctement et des méthodes efficaces ont été établies pour les transduire ou les transfecter, en se basant soit sur des vecteurs viraux, soit sur des vecteurs synthétiques, ou sur une combinaison des deux (50). Ainsi, la qualité et l'efficacité d'une protéine peuvent être supérieures lorsqu'elles sont exprimées dans des cellules de mammifère par rapport à d'autres hôtes tels que les bactéries, les plantes et les levures. (51)

En outre, les estimations parlent de plusieurs centaines de protéines candidates à des essais cliniques. Un grand nombre de ces protéines est exprimé dans des cellules immortalisées d'ovaires de hamsters chinois (CHO), mais d'autres lignées cellulaires, telles que celles dérivées du myélome de souris, des reins du bébé hamster (BHK), les reins d'embryons humains (HEK-293) et les cellules rétiniennes humaines ont obtenu l'approbation réglementaire pour la production de protéines recombinantes. (51)

Expression des cellules d'insectes :

Les cellules d'insectes (CI) utilisées conjointement avec le système de vecteur d'expression du baculovirus (BV) gagnent rapidement du terrain en tant que plate-forme pour la production de protéines recombinantes. Les cellules d'insectes présentent plusieurs avantages comparatifs par rapport aux cellules de mammifères, tels que la facilité de culture, une plus grande tolérance à l'osmolalité, une concentration en sous-produits et des niveaux d'expression plus élevés en cas d'infection par un baculovirus recombinant (52). En ce qui concerne le repliement des protéines et le traitement post-traductionnel, les cellules d'insectes ne sont devancées que par les lignées cellulaires de mammifères. Il est démontré que de nombreux événements de traitement connus dans les systèmes mammifères se produisent également chez les insectes. (53)

En fait, la plupart des produits sous licence obtenus dans les CI correspondent à des vaccins et non à des produits à forte demande de production tels que des anticorps thérapeutiques. (54)

Cette capacité d'expression relativement faible peut être compensée dans le couple CI-BV. Cela implique que pour la production d'une protéine recombinante dont les besoins du marché ne dépassent pas 5 à 10 kg par an (c'est-à-dire les vaccins sous-unités), le couple CI-BV est actuellement l'une des meilleures alternatives. (55)

Tableau 2-1 Comparaison des systèmes d'expression: bactéries, levures, insectes et cellules mammifères (56)

Caractéristiques	Bactéries	Levures	Insectes	Cellules de mammifères
La croissance cellulaire	Rapide (30 min)	Rapide (90min)	Lente (18-24h)	Lente (24h)
Complexité du milieu de croissance	-	-	+	+
Coût du support de croissance	-	-	+	+
Niveau d'expression	+++	++	++	+
Expression extracellulaire	Sécrétion dans le périplasme	Sécrétion dans le milieu extracellulaire	Sécrétion dans le milieu extracellulaire	Sécrétion dans le milieu extracellulaire
Modifications post-traductionnelles				
Repliement des protéines	repliement habituellement requis	repliement habituellement requis	pliage approprié	pliage approprié
Glycosylation N-liée	-	Haut mannose	simple, sans acide sialique	Complexe
Glycosylation O-liée	-	+	+	+

Expression des cellules de plantes

L'application de la culture de cellules végétales dans la production de protéines recombinantes s'est concentrée sur un petit nombre de lignées de cellules végétales bien caractérisées, dont les plus populaires sont dérivées des cultivars de tabac Bright Yellow 2 (BY-2) et *Nicotiana tabacum* 1 (NT-1). La première protéine recombinante produite dans des cellules végétales a été rapportée il y a près de 44 ans. (57) Depuis cette première démonstration, plus de 20 protéines recombinantes différentes ont été produites dans des cultures de cellules végétales, notamment des anticorps, des enzymes, des hormones, des facteurs de croissance et des cytokines. (58)

Les cellules végétales, comme les microbes, peuvent être conservées dans des milieux synthétiques simples, mais elles peuvent, comme les cellules animales, synthétiser des protéines multimères complexes et des glycoprotéines, telles que les immunoglobulines (59) (60) et les interleukines. (61) Les glycoprotéines humaines recombinantes synthétisées dans les plantes présentent une similitude beaucoup plus grande que leurs équivalents natifs en

termes de structure de N-glycane par rapport aux mêmes protéines produites dans les levures, les bactéries et les champignons filamenteux. (58)

Animaux transgéniques :

Les protéines complexes modifiées post-traductionnelles peuvent être exprimées avec succès sous leur forme biologiquement active native à l'aide d'un système d'expression transgénique animal. Cependant, il faut presque trois ans entre l'introduction du transgène dans l'animal et la production à un niveau utilisable. Les procédures d'élevage sont des technologies connues. La protéine recombinante est habituellement exprimée dans la glande mammaire, souvent à un gramme élevé de protéine par litre de concentration de lait. (24)

- **La transformation :**

La transfection/transformation peut se faire par différentes procédures parmi elles le traitement au sel de calcium, l'électroporation, l'infection par *Agrobacterium*, le processus biolistique, la transfection virale, la microinjection et le transfert nucléaire. (27)

- **La sélection des cellules recombinées**

Divers systèmes de sélection de cellules transformées/transfectées existent, notamment la résistance aux antibiotiques tels que la néomycine, l'hygromycine et la puromycine. Cependant, la sélection de la présence du gène dihydrofolate réductase(DHFR) transfecté dans des cellules CHO déficientes en activité DHFR reste l'approche la plus fréquemment utilisée. En présence de cet agent de sélection, appliqué quelques jours après le transfert de gène, seules les cellules exprimant le gène sélecteur survivent. (51)

2.1.2 La sélection du clone compétent

Du fait de l'intégration aléatoire de gènes étrangers d'intérêt et de la perturbation subséquente du génome par des systèmes d'amplification génique, les clones de cellules obtenus lors du développement de lignées cellulaires sont extrêmement hétérogènes. De plus, les clones à haute production sont généralement rares dans une population de cellules transfectées, car la région active supportant une expression génique élevée dans le chromosome est rare. (62) Et ces clones à cellules productrices élevées ont généralement des taux de croissance plus faibles, car une part importante des ressources est utilisée pour l'expression de la protéine recombinante. (63) Par conséquent, le criblage d'un grand nombre de clones de cellules est généralement nécessaire pour isoler les clones à haute production. (Voir figure 2-5)

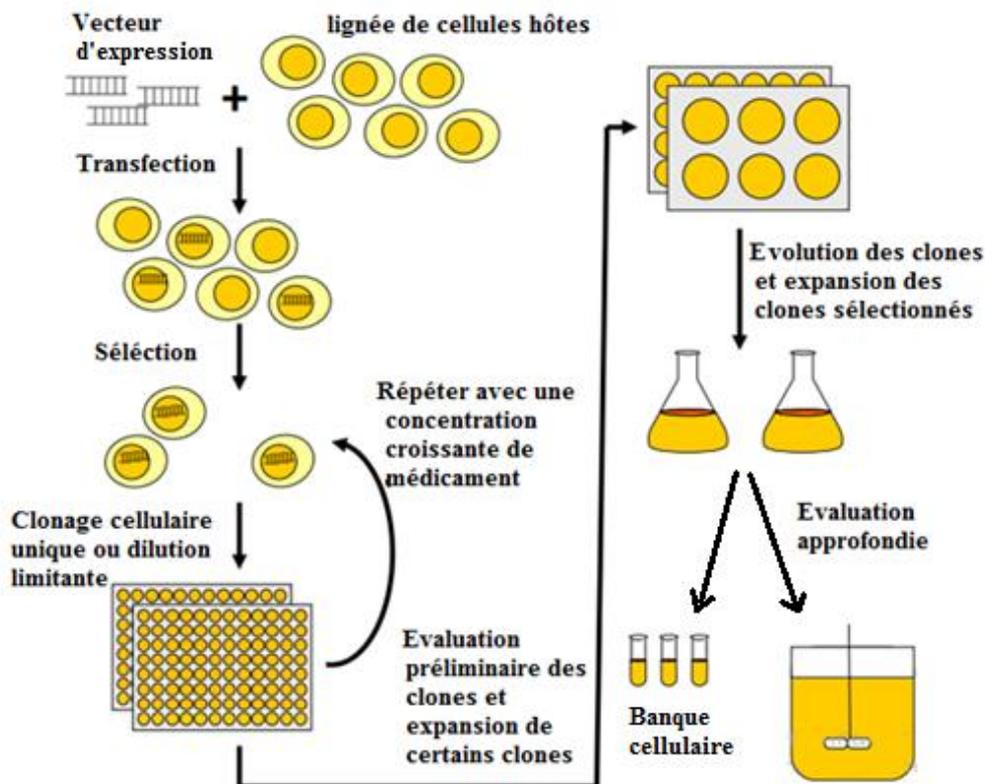


Figure 2-5 Développement d'une lignée de cellules de mammifères. (62)

Pour assurer la monoclonalité, il est nécessaire de procéder à plusieurs séries de sous-clonages en série, (64). Le clonage et le sous-clonage sont des moyens efficaces non seulement pour assurer la clonalité / la stabilité, mais également pour améliorer la productivité dans certains cas. (65).

La ligne directrice de l'OMS recommande les meilleures pratiques pour les critères de sélection de clones : « La combinaison cellule / vecteur la plus prometteuse sera ensuite utilisée pour générer un grand nombre de clones (100 à 1000) après la transfection de la culture avec l'ADNr. En règle générale, ces clones seront sélectionnés en fonction de leur productivité et un nombre présentant la productivité la plus élevée (10 à 50) sera utilisé pour une évaluation ultérieure. Des tests supplémentaires seront ensuite effectués pour sélectionner un petit nombre (1 à 5) à établir en tant que petites banques de cellules pré-maîtresses. Une sélection finale sera effectuée, souvent basée sur les caractéristiques de stabilité et la possibilité de mise à l'échelle, avant de générer finalement une banque cellulaire maîtresse : Master Cell Bank MCB et une banque cellulaire de travail : Working Cell Bank WCB » (voir figure 2 -6) (66)

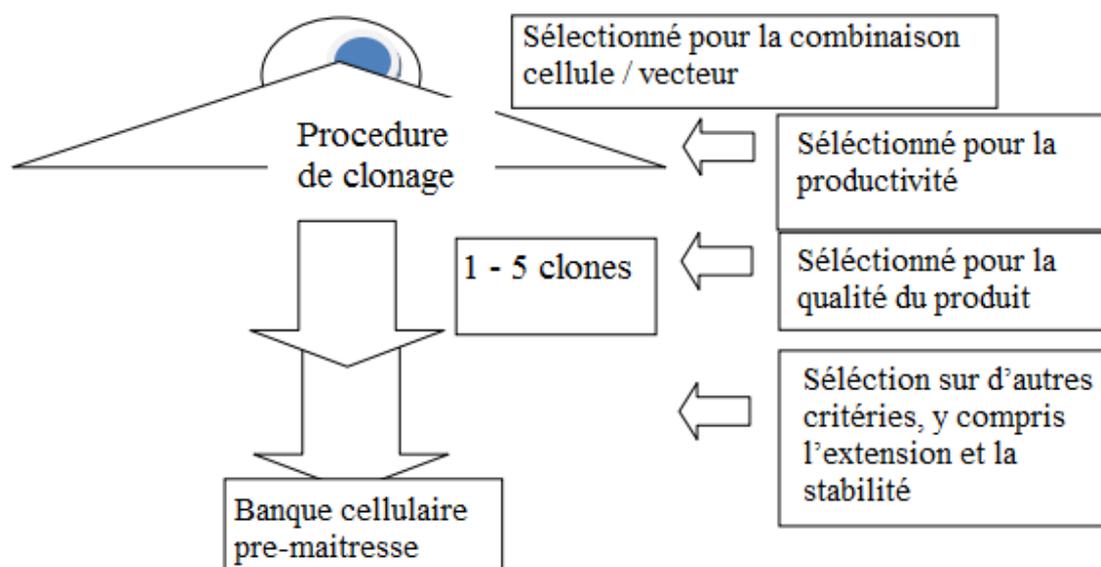


Figure 2-6 Schéma simplifié de l'OMS d'un exemple de développement d'une lignée cellulaire génétiquement modifiée (63)

2.1.3 Mise en banques cellulaires

Le processus de banque de cellules vise à fournir des stocks fiables de cellules pouvant être utilisées et caractérisées pendant toute la durée de vie du produit biopharmaceutique, il est donc nécessaire de procéder à une cryoconservation et à la caractérisation d'un stock de référence de cellules.

Il est habituel de préparer un système de banques de cellules à deux niveaux. Il consiste en une banque de cellules maîtresse (MCB) de 50 à 400 ampoules et des banques de cellules de travail (WCB) du fabricant dérivées de manière identique d'une ampoule de la MCB (67). Il est essentiel d'établir un stock de semences de cellules mères congelées qui doit être préparé avec le passage le plus bas possible (68). En fait, ces lignées cellulaires sont si fondamentales que, par exemple, si un fabricant les perdait en raison d'une contamination, il serait impossible de continuer la production. En outre, le rétablissement de l'offre impliquerait la tâche ardue de recréer la banque de cellules maîtresses ou MCB, exploit qui risque de ne pas être réalisé, quel que soit le niveau de documentation du processus précédent. (69).

Les cellules de la MCB sont développées pour former la WCB, qui est caractérisé pour sa viabilité cellulaire avant son utilisation dans le processus de fabrication. Il est recommandé de stocker les banques de cellules de production dans deux ou plusieurs zones largement séparées d'une installation de production, ainsi que sur un site distant, afin d'éviter toute perte

de la lignée cellulaire. Le stockage sur deux sites de toutes les cellules est réalisé avec un stockage sur site et un stockage hors site. (70)

2.1.4 Stabilité des lignées cellulaires

Au cours d'un processus de fabrication à grande échelle, les cellules d'une banque congelée doivent être étendues plusieurs fois pour atteindre un volume final pouvant aller 20 000 litres. L'intégrité du gène d'intérêt et le flux précis d'informations génétiques tout au long de ce processus sont essentiels à la qualité du produit (71).

Certaines des premières études réalisées dans les années 1980 suggéraient que l'ADN exogène transfecté dans des cellules de mammifère était soumis à une fréquence de mutation élevée allant jusqu'à 1%. (72) (73). Dans le cas de micro-organismes, le taux de mutation spontanée varie généralement de 10^{-6} à 10^{-9} . Il en résulte que dans une culture bactérienne pure comportant 10^9 bactéries/ml, il est probable que tous les gènes ont muté au moins une fois parmi les cellules présentes dans 1 ml de culture. (28)

Dans une étude récente sur le génome complet de la CHO, il a été signalé que des mutations peuvent s'accumuler rapidement lors du développement de lignées cellulaires de production. Un total de plus de 300 000 nouveaux polymorphismes mononucléotidiques dans une lignée cellulaire de production donnée ont été obtenus par comparaison à la lignée parentale. (74)

Plusieurs rapports révèlent que des mutations de l'ADN peuvent être introduites de manière aléatoire à différents stades de développement de la lignée cellulaire (75) (76) Les mutations génétiques pourraient résulter d'erreurs dans la réplication de l'ADN dues à l'épuisement des nucléosides, et à d'autres conditions de stress physico-chimiques (77). En fait les nouvelles conditions de milieu exercent une sélection différente, des caractères sont perdues et d'autres peuvent apparaître (28)

2.2 Fermentation (*upstream process*)

La production d'un lot à l'échelle industrielle commence réellement à cette étape. Dans cette partie nous allons aborder la culture cellulaire et l'expression du biopharmaceutique avec un petit aperçu sur les bioréacteurs ou fermenteurs.

2.2.1 Culture cellulaire et expression du produit biologique



Figure 2-7 Représentation de la culture cellulaire à petite et à grande échelle.

(78)

Le processus commence par la décongélation d'un flacon de banque de cellules cryoconservé (WCB) suivie de l'expansion successive dans des récipients de culture plus grands, dans des bioréacteurs à petite échelle tel que les flacons à secousses, des centrifugeuses et des poches à ondes.

Lorsque le volume de culture et la densité cellulaire répondent à des critères prédéterminés, la culture est transférée dans un bioréacteur de production dans lequel les cellules continuent à se développer et à exprimer le produit c'est Le *scale up* ou mise à l'échelle. (voir figure 2-7) (79).

Le milieu de culture et les conditions de croissance utilisés dans la fabrication de produits biologiques diffèrent selon les systèmes d'expressions (tableau 2-2)

Tableau 2-2 Les conditions de croissance utilisées dans la fabrication de produits biologiques selon les systèmes d'expressions les plus utilisés. (80)

Les caractéristiques	Cellules microbiennes (bactérie ou levure)	Suspension cellulaire de plantes	Suspension de cellules animales
Taux de croissance	Temps de doublement rapides de 1-2 heures	Temps de doublement lent de 2 à 5 jours	Lent, temps de doublement de 12-20hrs
Exigence d'aération	Haute	Faible	Faible
Sensibilité au cisaillement	Faible sensibilité	Sensible	Sensible
Méthode de contrôle du Potentiel Hydrogène(Addition d'acide et de base	Addition d'acide et de base	Ajout de gaz -CO2 -N2

pH)			
Milieu de culture	eau -sources d'énergie -carbone, azote, - éléments minéraux- vitamines plus oxygène Antibiotiques	mélange de sels : éléments essentiels / ions minéraux Supplément d'azote: vitamines, acides aminés Sources de carbone: généralement du sucre, saccharose -L'agent gélifiant : Régulateurs de croissance végétale	Les sucres Graisse Eau (haute qualité, stérilisée) Acides aminés Électrolytes Vitamines Sérum (sérum de veau foetal, sérum synthétique) Oligo-éléments Les hormones Méthotrexate

Pour obtenir le contrôle requis les scientifiques surveillent attentivement les variables telles que la température, le pH, la concentration en éléments nutritifs, la densité cellulaire et les niveaux d'oxygène. Ils effectuent également des tests fréquents pour se protéger contre la contamination potentielle par des bactéries, des levures et d'autres microorganismes.

Le processus d'expansion et de culture cellulaire peut prendre de quelques jours à quelques semaines, en fonction de la productivité de la lignée cellulaire et d'autres facteurs. (81)

Après avoir défini le procédé de fermentation, il s'agit maintenant d'étudier le dispositif qui doit permettre sa mise en œuvre

2.2.2 Bioréacteurs : Mode opératoire et Choix de conception

La culture à l'échelle industrielle est couramment réalisée dans des bioréacteurs (fermenteurs). Afin de déplacer les nutriments dans les cellules et éliminer les déchets, les bioréacteurs ont plusieurs modèles de circulation (Tableau 2-3)

La performance d'un bioréacteur est régie par la thermodynamique (comme la solubilité de l'oxygène dans le milieu), la cinétique (comme la croissance cellulaire et la formation du produit) et le transport des matériaux (déplacement des nutriments dans les cellules et élimination des déchets).

Aujourd'hui, plusieurs choix de conception de bioréacteur sont disponibles. Pour la fabrication à petite échelle, les cultures cellulaires peuvent être étendues dans des flacons d'agitation, des centrifugeuses, des bouteilles à rouleaux, des sacs à vagues. Pour la fabrication à grande échelle, les cultures cellulaires peuvent être étendues dans des bioréacteurs en acier inoxydable (échelle allant jusqu'à 20 000 L) ou dans des poches à plate-

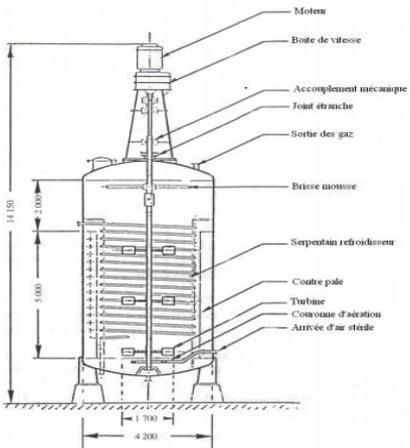
forme à bascule (échelle jusqu'à 500 L) ou même dans des bioréacteurs jetables (jusqu'à 2 000 L).

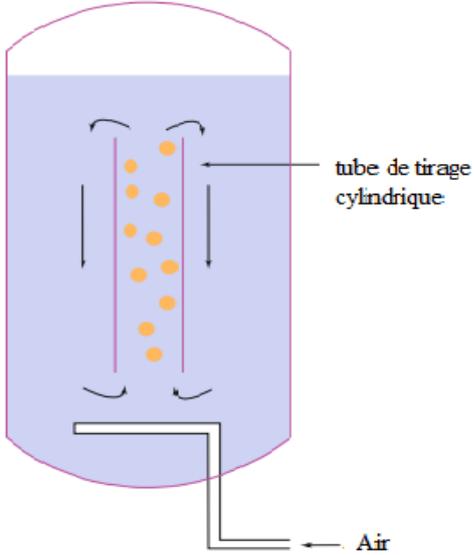
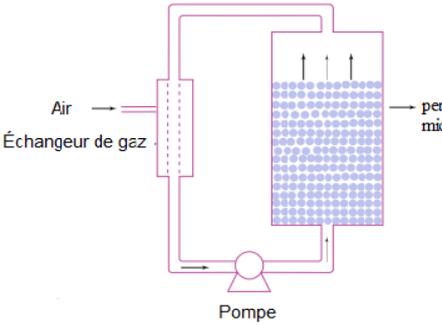
La possibilité de choix entre les bioréacteurs permanents en acier inoxydable et les bioréacteurs jetables à usage unique évolue rapidement. Les bioréacteurs jetables à usage unique ont deux avantages majeurs: 1) l'élimination des coûts associés à la validation du nettoyage et 2) la facilité d'utilisation en tant que «système fermé» dans l'installation de culture cellulaire. Par contre, ils présentent deux inconvénients majeurs: (1) le coût d'achat et d'élimination et (2) la sensibilité potentielle des lignées cellulaires aux matières plastiques. (24)

Les bioréacteurs à usage unique jetables sont particulièrement intéressants pour les produits biologiques en stade clinique où la fabrication est peu fréquente et doit être extrêmement fluide. (24)

Il faut noter aussi que les caractéristiques diffèrent entre les cellules microbiennes et mammifères et la conception d'un bioréacteur sera différente pour chaque type de cellule. Par exemple, une cellule de mammifère nécessite un temps de traitement prolongé par rapport à une cellule microbienne, ce qui oblige le bioréacteur à fonctionner dans des conditions aseptiques plus strictes. Et les cellules de mammifères sont plus facilement endommagées par le cisaillement que les cellules microbiennes donc le bioréacteur doit fournir un système de circulation plus doux. (24)

Tableau 2-3 Modèles de bioréacteurs

<p>Bioréacteur à cuve mécaniquement agitée</p>  <p>(82)</p>	<p>Les fermenteurs à cuve mécaniquement agitée sont constitués d'un récipient cylindrique avec une base centrale entraînée par moteur qui supporte une ou plusieurs roues. (83)</p> <p>De l'air ou de l'oxygène est ajouté par barbotage (pulvérisation à travers une plaque perforée) (24). Ce type de bioréacteur présente comme avantages : un fonctionnement continu, bon contrôle de la température, simplicité de construction et facilité de nettoyage...etc. (84). En raison de sa fiabilité et de son expérience dans la conception et le potentiel d'extension, le réservoir agité reste le bioréacteur le plus couramment utilisé. (33)</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<p>Bioréacteur par Transport aérien</p>  <p>(33)</p>	<p>Contient généralement un tube de tirage de gaz de la boucle interne à l'intérieur de la colonne. L'aspiration de gaz provoque l'écoulement ascendant du liquide avec les particules en suspension dans le tube de tirage interne. Par la suite, le gaz s'échappe du haut du bioréacteur et le liquide contenant les particules en suspension passe par le tuyau de descente libre de gaz. (85)</p> <p>Comparés aux fermenteurs à cuve agitée mécaniquement, les fermenteurs par transport aérien (<i>Airlift</i>) sont plus faciles à faire évoluer, nécessitent moins d'énergie pour fonctionner et sont plus adaptables aux cultures sensibles au cisaillement comme les cultures de cellules mammifères. (86)</p>
<p>Bioréacteur à lit plié</p>  <p>(33)</p>	<p>Dans les réacteurs à lit tassé, les cellules sont immobilisées sur de grosses particules. Ces particules ne bougent pas avec le liquide. Les réacteurs à lit compacté sont simples à construire et à exploiter, mais peuvent être obstrués et avoir un faible transfert d'oxygène. (87)</p>

La cinétique de la croissance cellulaire et de la formation du produit dictera non seulement le type de bioréacteur utilisé, mais également la manière dont le processus de croissance est effectué. Trois types de protocoles de fermentation sont couramment utilisés (Figure 2-8) :

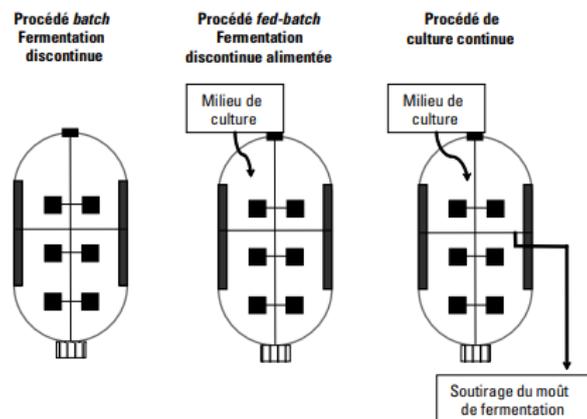


Figure 2-8 Les trois types de protocoles de fermentation. (78)

✓ **Mode discontinue (batch) :**

Dans un procédé discontinu, le bioréacteur est rempli avec tout le volume de milieu nécessaire pendant la phase de production de cellules. Aucun supplément de milieu de culture n'est ajouté pour augmenter la croissance cellulaire ou la production au cours du processus.

Les déchets, tels que le lactate et l'ammonium, et le produit lui-même s'accumulent dans le bioréacteur. Le produit est récolté à la fin du processus. La densité cellulaire maximale et les rendements en produits seront inférieurs à ceux d'un procédé discontinu alimenté. (33)

✓ **Le mode discontinue alimenté (*Fed batch*) :**

La fermentation commence dans un petit volume de milieu de culture, elle démarre donc plus vite. Lorsque la croissance du micro-organisme par exemple est en phase exponentielle. On commence à introduire dans la cuve le milieu de culture stérile. Le débit d'alimentation est réglé de façon à ce que la concentration en substrat soit constante dans la cuve. (28)

La culture en *Fed-batch* est très utilisée dans l'industrie lorsque l'on veut optimiser l'apport d'un nutriment susceptible d'avoir un effet retardateur sur la croissance. (88)

Le mode discontinue alimenté est couramment utilisé pour la production de protéines recombinantes car le processus est bien compris et caractérisé. (33)

✓ **Le mode continue ou mode de perfusion :**

Dans un processus de perfusion, le milieu de culture et les déchets sont continuellement échangés et le produit est récolté pendant toute la période de culture. Un dispositif à membrane est utilisé pour retenir les cellules dans le bioréacteur, et les déchets sont éliminés du bioréacteur par ce dispositif. Pour maintenir le niveau moyen constant dans le bioréacteur, du milieu frais est ajouté au bioréacteur. En fonctionnant en mode de perfusion, le niveau de déchets sera maintenu constant et créera un environnement stable pour la croissance ou la production des cellules. Avec le processus de perfusion, des densités cellulaires beaucoup plus élevées peuvent être atteintes et donc une productivité plus élevée. (89)

Le tableau 2-4 présente des exemples de diverses opérations de production de bioréacteurs.

Tableau 2-4 Exemples de diverses opérations de production de bioréacteurs. (13) (1)

Produit biologique commercialisé	Processus de production de culture cellulaire
Nplate (protéine de fusion recombinante) système bactérien d'expression (E. coli)	«Le romiplostim est une protéine de fusion (peptibody) Fc-peptide 59 KDa non glycosylée recombinante produite dans E. coli. La protéine romiplostim est exprimée de manière intracellulaire dans E. coli sous forme de corps d'inclusion utilisant une fermentation discontinue alimentée à haute densité cellulaire. Le processus de fermentation commence par le dégel et l'agrandissement du flacon de la banque de cellules de travail dans d'autre flacon. Ceci est suivi d'une expansion cellulaire supplémentaire et de l'induction de la synthèse du produit dans un fermenteur de production. Une fois la fermentation en production terminée, le bouillon est refroidi et le traitement des cellules est lancé
Lucentis (anticorps monoclonal Fab fragment) système d'expressionsbacterien (E. coli)	Une ampoule de MCB ou de WCB est décongelée etensemencée dans un flacon d'agitation de 2 litres. Le flacon est incubé (inoculum primaire), après la culture et transférée dans un bioréacteur de 10 L pour générer l'inoculum secondaire. Les étapes d'inoculum primaire et secondaire sont effectuées de manière à fournir une masse cellulaire suffisante pour être transférées dans le bioréacteur de production. La première partie de l'étape de la culture de production consiste en une accumulation de masse cellulaire et une croissance cellulaire rapide, qui épuisent le milieu en phosphate. Cet épuisement déclenche la deuxième partie, qui est la phase d'induction du produit. Les deux sous-unités s'accumulent dans l'espace périplasmique et s'assemblent pour former le fragment Fab. Les étapes suivantes ont pour but de libérer le ranibizumab des cellules, de séparer le ranibizumab des débris cellulaires et de préparer une matière première clarifiée stable pour la première étape de chromatographie
<i>NovoThirteen</i> (Protéine recombinante) exprimé dans des cellules de levure (<i>S. cerevisiae</i>)	Il est produit de manière intracellulaire dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i> par fermentation en mode discontinu, après les cellules sont homogénéisées, capturées et purifiées.
NovoSeven (protéine recombinante) exprimé dans une cellule animale (rein de hamster)	La production a lieu dans un fermenteur. Les cellules d'une ampoule de WCB sont utilisées pour lancer chaque cycle de production. Les cellules sont propagées en quantités suffisantes avant l'inoculation du fermenteur de production. Les fermenteurs sont des réservoirs agités classiques. Toutes les 24 heures, une partie du liquide de culture est récoltée et remplacée par un nouveau milieu. Un milieu contenant du sérum est utilisé pour la phase de production

2.3 Isolement et purification des substances biopharmaceutiques (*Downstream process*)

Le traitement en aval (*Downstream process*) comprend toutes les étapes requises pour purifier un produit biologique du bouillon de culture cellulaire au produit purifié final. Il comporte plusieurs étapes pour capturer la biomolécule cible et éliminer les impuretés liées aux cellules hôtes (protéines de la cellule hôte, ADN, etc.), les impuretés liées au processus (tampons, ligands lessivés, anti-mousse, etc.) et les impuretés liées au produit (agrégats, fragments, espèces coupées, etc.) afin de proposer un produit pur et sûr pour le patient.

Il comprend généralement deux étapes principales:

- Récupération initiale ou récolte
- Purification (élimination de la plupart des contaminants)

2.3.1 Récupération initiale ou récolte

Après la phase d'expansion cellulaires et d'expression de la protéine recombinante d'une manière extracellulaire ou intra cellulaire vient l'étape de la récolte dans le but de séparer les cellules de production du bioréacteur et du milieu de culture

Dans le cas où l'expression du produit biologique est extracellulaires, la séparation primaire du produit des cellules est réalisée par centrifugation ou filtration en profondeur (fonctionne selon les principes du tamisage mécanique et de l'adsorption) ou par filtration à flux tangentiel; principe selon lequel les cellules recirculées en permanence passent le long des surfaces de la membrane tandis que le filtrat liquide, qui contient le produit, est recueilli. (24)

D'autre part, pour la récupération des protéines intracellulaires, la rupture des cellules est réalisée à l'aide de méthodes mécaniques telles que le cisaillement solide (ex: homogénéisation à grande vitesse), le cisaillement liquide (ex: homogénéisation à haute pression, ultrasonication) ou des méthodes non mécaniques qui peuvent être des méthodes chimiques ou enzymatiques, ensuite les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation ou filtration. (90)

Les protéines intracellulaires peuvent être des protéines cytosoliques ou liées à la membrane. les protéines cytosoliques étant en grande partie hydrophiles peuvent être extraites à l'aide d'un tampon aqueux alors que les protéines membranaires intégrales ont des régions de surface comprenant des acides aminés non polaires. Par conséquent, leur tampon d'extraction et de purification doit contenir des solvants organiques. (90)

Dans les cas où les protéines sont exprimées en tant que corps d'inclusion (comme certains recombinants produits par *E. coli*), une étape supplémentaire de repliement des protéines (échange de tampon) est requise. (91)

2.3.2 Purification

La purification consiste à prendre un grand volume de produit brut et le convertir en un plus petit volume de produit plus pur. Le produit de départ brut est généralement la solution de bioréacteur récoltée issue d'un processus de production de culture cellulaire.

Elle est essentiellement constituée d'étapes de chromatographie en association avec des méthodes physique.

- **Les méthodes chromatographiques :**

Pour atteindre la rigueur de pureté requise dans l'industrie biopharmaceutique, dépassant parfois 99%, des étapes de chromatographie sont généralement nécessaires. La chromatographie permet une haute résolution et a toujours été le cheval de bataille pour la purification de protéines. (92)

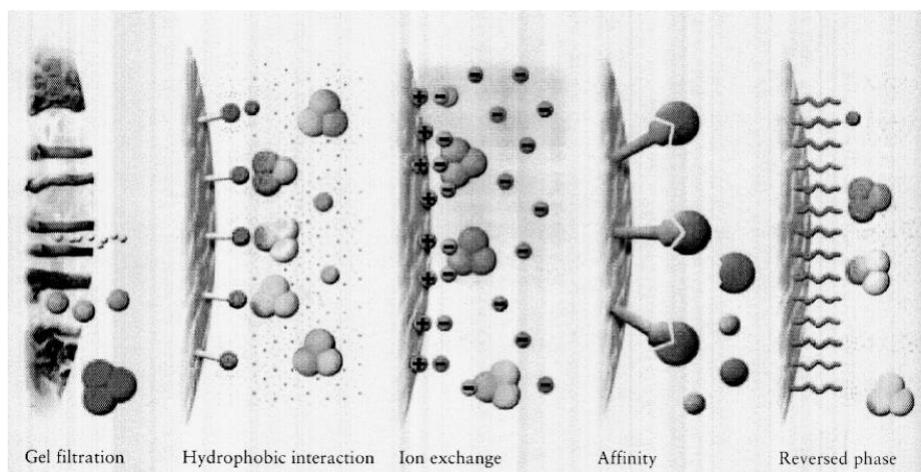


Figure 2-9 Différents types de chromatographies utilisés pour la purification des biopharmaceutiques

Sur la base de l'interaction entre la phase stationnaire solide et les biomolécules, les techniques chromatographiques peuvent être résumées en 4 classes: chromatographie d'affinité, chromatographie d'échange d'ions, chromatographie d'interactions hydrophobes, chromatographie d'exclusion de taille. (93)

- a- Chromatographie d'affinité :

La chromatographie par affinité est une méthode de séparation basée sur une interaction de liaison spécifique entre un ligand immobilisé et son partenaire de liaison. (94)

L'exemple le plus courant de processus d'affinité est la chromatographie sur protéine A, appliquée depuis plus de 10 ans dans les milieux industriels et universitaires pour la capture et la purification d'anticorps. (93)

Une autre stratégie basée sur l'affinité et bien établie pour la purification de protéines recombinantes consiste à utiliser des étiquettes de fusion, qui sont des séquences d'acides aminés attachées à des protéines recombinantes présentant des affinités sélectives et élevées. Pour un ligand chimique ou biologique immobilisé sur une colonne chromatographique. En particulier, le marqueur polyhistidine (xHis) a été fréquemment utilisé pour purifier des protéines recombinantes en raison de sa capacité de liaison aux cations de métaux divalents. (93)

La chromatographie par affinité est considérée comme une méthode chromatographique non dénaturante avec des taux de récupération élevés de la masse protéique et de l'activité biologique spécifique et une excellente élimination des impuretés. Il s'agit généralement de la première étape, et parfois la seule, d'une stratégie de purification. (24)

b- Chromatographie d'échange d'ions :

La chromatographie d'échange d'ions sépare les protéines par leurs résidus chargés¹⁴ Les échangeurs d'anions lient des molécules chargées négativement tel que l'ADN (fractions phosphates chargées négativement) et les endotoxines bactériennes (fractions phosphorylées et carboxylées) tout en permettant aux protéines de s'écouler et les échangeurs de cations lient des molécules chargées positivement c'est-à-dire capturent les protéines tout en laissant passer l'ADN et les endotoxines. (33)

La chromatographie d'échange d'ions est considérée comme une méthode chromatographique non dénaturante avec des taux de récupération élevés de la masse protéique et de l'activité biologique spécifique. (24)

c- Chromatographie d'interactions hydrophobes :

Les protéines sont liées aux colonnes de Chromatographie D'Interactions Hydrophobes(CIH) par des concentrations modérément élevées en sel (ce qui favorise la liaison des protéines hydrophobes à la matrice)

¹⁴ Les résidus chargés sur les surfaces des protéines comprennent les groupes latéraux des acides aminés, les extrémités a-amino et a-carboxy des chaînes et les résidus d'acide sialique sur les glycoprotéines

-l'élution est obtenue par une diminution linéaire ou progressive de la concentration en sel. (95)

La CIH est considéré comme une chromatographie dénaturante avec différentes récupérations de la masse protéique et impact sur l'activité biologique spécifique. (24)

d- Chromatographie d'exclusion de taille

La chromatographie d'exclusion de taille n'implique pas de liaison – élution, mais sépare les protéines en fonction de leur taille à travers des billes poreuses. Les grosses molécules ne peuvent pas pénétrer dans les pores et éluer en premier, alors que les petites molécules éluent plus tard. (96)

Comparée aux autres méthodes chromatographiques, la chromatographie par exclusion de taille fournit une faible résolution, une faible capacité et est lente. (24)

• **Méthodes de séparation physique :**

Les trois principaux types de méthodes de séparation physique comprennent (1) la précipitation (2) l'ultrafiltration / diafiltration et (3) la nano filtration.

- Les méthodes de précipitation : peuvent être divisés en procédés qui réduisent sélectivement la solubilité de la protéine ou réduisent sélectivement la solubilité des impuretés
- Filtration à flux tangentiel (TFF) : dans laquelle une taille de pores de membrane fixe est utilisée pour permettre aux molécules de plus petite taille de circuler à travers la membrane tout en conservant les protéines. Lorsque la filtration à flux tangentiel est utilisé pour la concentration en protéines, le processus est appelé «ultrafiltration» et lorsque elle est utilisé pour éliminer les résidus de faible poids moléculaire ou effectuer un échange de tampon, le processus est appelé «dia filtration» . (24)
- la nano filtration: Les filtres d'élimination de virus (nano filtres) sont spécifiquement conçus pour éliminer les virus et autres biomolécules via un mécanisme d'exclusion de taille. (97) Elle est particulièrement efficace pour éliminer les virus non enveloppés résistants aux méthodes d'inactivation telles que le traitement thermique ou solvant / détergent. (98)

Comme pour toute étape du processus de fabrication, il est important de garder à l'esprit à la fois la récupération de la masse protéique et celle de l'activité spécifique de la protéine biologique lors de l'incorporation de l'une de ces méthodes de séparation physique.

2.4 La formulation des médicaments biologiques

La formulation du produit est un élément crucial pour minimiser la tendance d'un produit à se dégrader et pour maximiser sa durée de vie. Le développement d'une étape de formulation stable implique l'optimisation des conditions du tampon, y compris le pH, la force ionique, et l'inclusion d'excipients et de stabilisants en quantités variables pour avoir une forme galénique appropriée. (99) (les catégories et les exemples de quelques excipients pharmaceutiques couramment utilisés dans les produits biologiques sont représentés dans le tableau 2-5)

La stabilisation pendant le traitement et le stockage représente un défi majeur pour l'industrie pharmaceutique car les produits biologiques sont intrinsèquement instables et sujets à la dégradation par plusieurs mécanismes de dégradation physiques et chimiques tels que l'agrégation, l'oxydation, la désamidation et la perte de structure tertiaire. (100) (24)

Tableau 2-5 Catégories et exemples de quelques excipients pharmaceutiques couramment utilisés dans la formulation des produits biologiques

Catégorie d'excipient	Exemples
Tampons	Acétate, succinate, Citrate, phosphate
Acides aminés	Arginine, acide aspartique, acide glutamique, lysine, proline, glycine, histidine, méthionine
stabilisant / agents de charge	Lactose, tréhalose, dextrose, surose, sorbitol, glycérol, albumine, gélatine, mannitol
Tensioactifs	Tween 20, Tween 80, Pluronic F68
Antimicrobiens / Conservateurs	Alcool benzylique, m-crésol, phénol, 2-phénoxyéthanol
Ions métalliques / Chélateurs	Ca ²⁺ , Zn ²⁺ , EDTA
à base de cyclodextrine	Hydroxypropyl β -cyclodextrine
Autres	Polyanions, sels

Il est en général impossible d'administrer ces protéines par voie orale car elle seront dégradées, la forme galénique utilisée est alors une préparation liquide, liquide congelé ou lyophilisat. Le choix entre les trois dépendra de la stabilité du produit sous la forme prêt à l'emploi, bien qu'une présentation liquide soit généralement préférée, dans certains cas, il peut être nécessaire de congeler le produit pendant son stockage ou de le lyophiliser pour minimiser la dégradation chimique. Les formes lyophilisées présentent l'inconvénient de coûts supplémentaires liés au développement, à la fabrication et aux tests, ainsi qu'à la nécessité de

diluants pour reconstitution, bien qu'elles puissent réduire le nombre de lots de réapprovisionnement pouvant être requis en raison de la stabilité supérieure de la forme lyophilisée. Dans les cas où la congélation est nécessaire, un cryoprotecteur (tel que le saccharose) est généralement ajouté pour minimiser la cryoprécipitation ou l'agrégation résultant de la cryoconcentration. (101) (102)

2.5 Contrôle du procédé de fabrication des médicaments biologiques

Le contrôle du procédé de fabrication d'une protéine recombinante consiste d'une part à surveiller in situ les paramètres liés au pilotage de la culture cellulaire tels que le pH, la température, la concentration en oxygène dissous et CO₂ dissous ou l'agitation. Et d'autre part à réaliser des échantillonnages pour réaliser divers contrôles comme la concentration en produit, substrats et métabolites ou la densité cellulaire. Une perturbation, même légère, de ces paramètres peut avoir des conséquences négatives sur la productivité et la qualité du produit désiré. La croissance cellulaire et la viabilité des cellules sont des éléments clé de la productivité, il est donc primordial d'instaurer des contrôles en ligne (monitoring) et hors-ligne (échantillonnage) pour maintenir des conditions optimales de production et vérifier le bon déroulement du procédé. (103)

Chapitre 3 - Démonstration de la comparabilité des produits biologiques d'un point de vue réglementaire

Les fabricants de médicaments biologiques apportent souvent des modifications à leurs processus biopharmaceutiques, non seulement au cours du développement clinique, mais également pour l'amélioration continue des processus après commercialisation. Cependant, ils doivent prendre la responsabilité d'évaluer soigneusement l'impact potentiel sur le profil QSE du produit biopharmaceutique en raison des modifications mises en œuvre.

Après la consultation des différentes lignes directrices des autorités réglementaires Américaines (FDA) et Européennes (EMA) et la conférence internationale d'harmonisation(ICH) Q5E ; nous allons présenter dans ce dernier chapitre les différents facteurs ou éléments clés à prendre en compte pour éviter tout impact négatif d'un changement de processus de fabrication qui sont la base d'une étude de comparabilité adéquate pour aboutir à un produit après le changement hautement similaire ou comparable au produit avant le changement que ce soit pour un nouveau produit biologique ou un biosimilaire.

2.6 Changement de processus de fabrication des médicaments biologiques

Le développeur de médicament biologique a besoin de la liberté d'apporter des changements dans son processus de fabrication en particulier pendant le développement clinique pour perfectionner sa production afin d'assurer sa robustesse et sa cohérence, mais aussi pour l'amélioration continue des processus une fois le produit est mis sur le marché.

Le changement ne devrait pas être regardé comme menaçant, par contre il doit être géré de manière appropriée. Chaque changement de processus de fabrication comporte un risque potentiel d'impact sur le produit. Par conséquent, chaque changement de processus de fabrication devrait fournir une valeur pour compenser ce risque potentiel, d'un point de vue risque / bénéfice, le bénéfice d'un changement de procédé de fabrication devrait toujours dépasser le risque d'impact négatif sur le biopharmaceutique.

Voici quelques exemples de modifications du processus de fabrication à valeur ajoutée: (24)

↳ Améliorer la robustesse et le contrôle de la fabrication :

- Echange d'une résine de chromatographie pour améliorer l'élimination des impuretés liées au processus.

- Changement de site de fabrication pour améliorer la conformité aux bonnes pratiques de fabrication(BPF)

↳ Améliorer la pureté, la qualité ou la sécurité du produit

-Ajout d'une nouvelle colonne de polissage chromatographique

-Resserrement des spécifications de libération du produit et / ou de stabilité

-Échanger une matière première ou un excipient critique contre un standard de qualité supérieur

↳ Augmentation de la capacité de fabrication

- Echanger une lignée de cellules par une lignée avec une productivité plus élevée.

- Mise à l'échelle (ou montée en puissance) pour augmenter la capacité de production

- Ajout de sites de fabrication supplémentaires pour le produit.

Idéalement, les changements de procédé de fabrication devraient survenir le plus tôt possible dans la mise au point du médicament et de préférence, seulement aux étapes à faible risque. De façon réaliste, les changements de processus de fabrication se produiront tout au long du cycle de vie du processus et du produit et partout où cela est nécessaire.

Le tableau 3-1 présente quelques exemples de changements récemment effectués qui illustrent la diversité du moment et de l'endroit où les changements des procédés de fabrication ont été mis en œuvre avec succès pendant le développement clinique :

Tableau 0-1 Exemples de changements de procédé de fabrication

<p>Anticorps monoclonal ("Soliris, Eculizumab")</p>	<p>-Un changement de lignée cellulaire à un stade précoce de développement : la lignée cellulaire LEX98 a démontré une expression plus élevée que la lignée cellulaire HAL1 originale utilisée dans le procédé A et a donc été sélectionnée. Les principales études cliniques ont été menées avec du matériel dérivé de la lignée cellulaire LEX98 .</p> <p>-Changements dans le milieu de culture cellulaire.</p> <p>-Mise à l'échelle du processus de fermentation de 200L à 2000L et 5000L.</p> <p>-Diverses modifications du processus de purification.</p> <p>-Changement de site de fabrication.</p> <p>L'exercice de comparabilité à l'appui des différents changements est jugé adéquat et les données globales fournies ont été jugées acceptables.</p>
<p>Protéine recombinante</p>	<p>Les lots d'essais précliniques ainsi que les lots d'essais cliniques de phase 1 et 2 ont été fabriqués à l'aide du premier processus de développement.</p>

<p>("Xigris, protéineC activée")</p>	<p>Les études d'optimisation subséquentes ont mené au développement du procédé commercial initial qui a servi à la fabrication des lots pour les essais cliniques de phase 3. Ce dernier procédé a permis d'améliorer la stabilité de la solution de fabrication de la substance médicamenteuse. En passant d'un processus à l'autre, une étape a été ajoutée pour fournir un niveau plus élevé d'assurance de la sécurité virale et certaines matières premières d'origine animale ont été retirées. Enfin, au cours de la phase 3, un processus commercial légèrement modifié a été introduit, avec l'utilisation de nouvelles banques cellulaires maîtresse et de travail (clonées à partir des banques cellulaires existantes), En outre, la concentration de citrate dans l'étape finale d'élution a été réduite de 20mM à 10mM.</p>
<p>Anticorps monoclonal, Ilumetri (Tildrakizumab) (104)</p>	<p>Le processus commercial de fabrication de la substance active a été développé parallèlement au programme de développement clinique. La substance active I a été utilisée pour des études non cliniques. Processus 1 a été mis à l'échelle et transféré sur un autre site. Ce produit a été utilisé pour les essais cliniques de phase 1 et 2. Le processus I a subi un nouveau raffinage qui a abouti au processus II. Les principaux changements ont été l'utilisation d'un WCB au lieu d'un MCB, des changements de colonne et un changement dans la formulation de la substance active, parmi d'autres changements plus mineurs. Le matériau du processus II a été utilisé pour les essais cliniques de phase 3. Enfin, le processus II a été transféré sur le site commercial et mis à l'échelle. Le principal changement à côté des installations et de l'échelle a été l'introduction d'un nouveau WCB, qui a été cultivé et est stocké sans utiliser desérum foetal bovin(FBS).</p>
<p>Anticorps monoclonal, Bavencio (Avelumab) (105)</p>	<p>Les études non cliniques (y compris l'étude pivot de toxicologie) et les études cliniques initiales ont été menées à l'aide de matériel avelumab dérivé du processus de fabrication initial (également dénommé Process A) produit dans l'usine de développement Merck Bio de Martillac, en France. Le processus de fabrication de l'avelumab a subi un changement majeur visant à mettre au point un processus optimisé plus performant afin de répondre principalement aux besoins des programmes de développement clinique et des lancements de produits. Le nouveau processus a été désigné par le processus B... Le produit fini avelumab a été formulé à une</p>

	concentration en protéines de 10 mg / ml en utilisant la substance active avelumab du processus de fabrication initial (processus A) avec un volume de 8 ml. Cette formulation a été utilisée tout au long du programme de développement initial, par exemple, les études non cliniques, les essais cliniques de phase I / II et la partie A de l'étude de phase II. Pour soutenir le développement clinique et l'utilisation commerciale, une formulation optimisée d'avelumab à une concentration plus élevée (20 mg / mL) a été conçue. Cette formulation a été préparée en utilisant la substance active avelumab à partir d'un procédé de fabrication optimisé (procédé B).
--	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Les modifications des processus de fabrication se poursuivent tout au long de la phase de post-commercialisation. Une enquête sur vingt-neuf anticorps monoclonaux commerciaux approuvés par l'EMA jusqu'à l'octobre 2014 a révélé que plus de 400 modifications de processus de fabrication post-commercialisation avaient été approuvées, le nombre de modifications de processus par anticorps monoclonal allant de 0 à 50 (106).

AbbVie, le fabricant d'Humira (adalimumab), a annoncé que, suite à l'autorisation de mise sur le marché initiale accordée par l'EMA en 2003, le processus de fabrication de la substance médicamenteuse avait subi plus de 20 changements, notamment des augmentations d'échelle de fabrication, l'ajout de nouveaux sites de fabrication, l'amélioration des contrôles de processus et sa robustesse et resserrement des spécifications (107).

Il est clair que les procédés de fabrication utilisés aujourd'hui pour les produits biopharmaceutiques commercialisés depuis une ou deux décennies ne seront pas identiques aux procédés de fabrication utilisés dans les études cliniques pivots originales, mais ces procédés continueront de produire un biopharmaceutique hautement similaire.

Par ailleurs, le changement de procédé a certainement des inconvénients, par exemple des effets inattendus sur l'identité du produit (séquence d'acide aminé), son profil de glycosylation, production d'impuretés indésirables (protéines de la cellule hôte, ADN) ou des contaminants (virus)) et la stabilité du produit, tout ça peut avoir des conséquences sur le profil QSE.

L'ANSM : « La production des médicaments biologiques est complexe car elle s'appuie sur des cellules ou des organismes vivants. En raison de la variabilité biologique de ces sources de production, des différences de fabrication sont inévitables et elles peuvent impacter les propriétés cliniques des produits. »

L'apparition d'aplasie pure de la lignée érythrocytaire survenue chez 175 patients insuffisants rénaux chroniques ayant reçu de l'Epex entre 1998 et 2004 constitue un exemple d'une conséquence liée à une modification du procédé de fabrication d'un Produit biopharmaceutique. Cet effet indésirable imprévu a été attribué à la nouvelle formulation d'Epex contenant du polysorbate 80 comme stabilisateur à la place d'albumine. Bien qu'il ait été justifié à ce moment-là, ce changement a entraîné une modification de l'innocuité de l'érythropoïétine. (108)

2.7 But de l'étude de comparabilité

Les études de comparabilité des produits biologiques ont pour objectif d'évaluer l'impact des modifications de fabrication qui interviennent généralement tout au long du processus et du développement du produit ou après l'approbation. Étant donné que chaque produit protéique candidat est unique et que ses attributs de qualité sont souvent étroitement liés à son processus de fabrication, une étude de comparabilité doit être une évaluation complète basée sur l'ensemble des connaissances acquises au cours du développement du médicament.

Les résultats d'une étude de comparabilité permettent de vérifier que les produits fabriqués avant et après les modifications de fabrication ont des attributs de qualité très similaires et sont fonctionnellement équivalents les uns des autres. (109)

↳ **La comparabilité pour un produit chimique : La bioéquivalence**

Les médicaments chimiques sont faciles à reproduire, ce qui facilite la fabrication d'un lot homogène d'une copie exacte du produit d'origine. Des copies de médicaments à petites molécules (appelés «médicaments génériques») peuvent être fabriquées en utilisant des connaissances de fabrication non exclusives et une synthèse chimique standard.

Selon la FDA dans la ligne directrice pour l'industrie (le projet) dénommée : *Protocoles de comparabilité pour les médicaments à usage humain et les produits biologiques : Informations sur la chimie, la fabrication et les contrôles* (110) :

« Pour les substances médicamenteuses chimiques, vous devez inclure la caractérisation structurelle appropriée, les procédures analytiques à utiliser et les critères permettant de démontrer sans équivoque que la structure chimique reste inchangée dans un protocole de comparabilité pour un changement de procédé de fabrication susceptible d'affecter la structure chimique (par exemple, la stéréo-configuration) et la substance médicamenteuse (par exemple, changement de voie de synthèse ou de procédé de fabrication). »

Comparable appliqué à un médicament chimique signifie " équivalent " ou " identique ". En effet, les copies génériques de médicaments à petites molécules ne doivent démontrer que la bioéquivalence vis-à-vis du princeps.

↳ **La comparabilité pour un produit biologique : la notion « Très similaire »**

Dans le cas d'un produit biologique que ce soit pour le développement d'un produit de référence ou un biosimilaire, cette même approche des médicaments génériques à petites molécules ne peut pas leur être directement appliquée car il n'est pas possible de créer une copie exacte d'un médicament biologique et de plus, un degré de micro-hétérogénéité au sein et entre les lots du même produit biologique est systématiquement observé, ce qui n'est généralement pas observé pour les médicaments à petites molécules.

Le but de l'exercice de comparabilité est de 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. D'après les données générées par l'exercice de comparabilité, il faut déterminer s'il est scientifiquement 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* (111): « 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. »

Similaire tel que défini dans le dictionnaire Larousse signifie " qui peuvent, d'une certaine façon, être assimilées les unes aux autres ", c'est-à-dire être semblables mais non identiques. Avec la méthodologie analytique sophistiquée d'aujourd'hui, l'observation des différences (c'est-à-dire les variantes moléculaires) est assez courante.

Bien que le terme " très similaire " soit utilisé dans les lignes directrices réglementaires, la définition de «hautement similaire» est expérimentale au cas par cas. Comme l'indique l'ICH Q5E, (111) «une évaluation minutieuse de toutes les conséquences prévisibles pour le produit doit être réalisée». Cependant, différents fabricants et différents évaluateurs d'autorités de réglementation interprètent subjectivement si une telle évaluation minutieuse a été réalisée, ce qui peut parfois faire peur pour le fabricant. Cependant, étant donné que c'est aux autorités de réglementation de considérer ce qui est très similaire de ce qui ne l'est pas, il est primordial de s'assurer que les examinateurs de la réglementation ont une compréhension claire et complète

de ce qui a été modifié dans le processus de fabrication et que les données disponibles confirment que le changement n'a pas eu d'effet négatif sur le biopharmaceutique.

Il n'y a aucune excuse pour qualifier à tort un changement de procédé de fabrication comme produisant un biopharmaceutique comparable si une évaluation minutieuse de toutes les conséquences prévisibles n'a pas été réalisée ou si les données expérimentales générées ne justifient pas cette conclusion. (112)

2.8 Démonstration de la comparabilité – les différentes approches

2.8.1 Approche basée sur les risques

Si un fabricant de produits biologiques apporte des changements à son procédé de fabrication, il sera certainement confronté à un risque d'impact négatif inattendu sur le profil QSE de son produit biologique. L'idée de cette approche est de déterminer l'étendue des études de comparabilité selon le degré de ce risque.

Le fabricant de produit biologique doit évaluer le risque d'une manière objectif pour décider de s'engager dans des essais de comparabilité poussé ou non, pour cela il doit toujours se référer aux autorités réglementaires :

La ligne directrice de l'ICH, la Q5E présente trois facteurs de risques généraux qui devraient être pris en compte pour déterminer l'étendue des tests de comparabilité (111) :

➤ Constatations sur la qualité :

- Produit pharmaceutique - Le type, la nature et l'envergure des différences existantes entre le produit avant et après les modifications pour ce qui est des attributs de qualité, y compris les substances reliées au produit, le profil d'impuretés, la stabilité et les excipients. Par exemple, de nouvelles impuretés pourraient nécessiter des études toxicologiques à des fins de qualification.
- Les résultats des études d'évaluation et de validation portant sur le nouveau procédé, y compris les résultats pertinents des tests en cours de fabrication.
- La disponibilité, les capacités et les limites des tests utilisés pour toute étude de comparabilité.

➤ La nature et le niveau de connaissance du produit :

- La complexité du produit, y compris l'hétérogénéité et la structure d'ordre supérieur - Il se peut que les épreuves physicochimiques et biologiques in vitro ne puissent pas déceler toutes les différences dans la structure et/ou la fonction.

- Le rapport entre la structure et l'activité et la force de l'association des attributs de qualité avec l'innocuité et l'efficacité.
 - Le rapport existant entre la protéine thérapeutique et les protéines endogènes, et les répercussions en ce qui concerne l'immunogénicité.
 - Le(s) mode(s) d'action .
- **Données pertinentes non cliniques et cliniques disponibles sur le produit, les aspects de l'utilisation ainsi que la classe du produit:**
- Les indications thérapeutiques et les groupes de patients cibles :Les conséquences des différences possibles peuvent varier d'un groupe de patients à un autre, par exemple le risque d'immunogénicité non voulue. Il conviendrait peut-être de prendre en considération les conséquences pour chacune des indications.
 - La posologie, par exemple le régime posologique, la voie d'administration : Le risque de certaines conséquences possibles d'une différence, comme l'immunogénicité, pourrait être plus élevé dans le cas d'une administration chronique, comparativement à une administration de courte durée; l'administration par voie sous-cutanée pourrait provoquer une immunogénicité plus souvent que l'administration par voie intraveineuse.
 - L'intervalle thérapeutique et la courbe dose-réponse : Les conséquences d'une certaine modification pourraient différer dans le cas de produits ayant un large intervalle thérapeutique, comparativement aux produits ayant un intervalle plus restreint. L'innocuité ou l'efficacité d'un produit ayant une courbe dose-réponse prononcée ou en forme de cloche peuvent être touchées par des modifications mineures dans la pharmacocinétique ou les études de fixation aux récepteurs.
 - L'expérience antérieure, par exemple l'immunogénicité, l'innocuité : L'expérience avec le produit original ou avec d'autres produits de la même classe peut être pertinente, particulièrement si l'on tient compte des effets défavorables rares, par exemple. les connaissances sur les conséquences de l'immunogénicité.
 - Rapport, distribution et clairance.

Ces facteurs de risque généraux doivent être évalués au cas par cas lorsqu'un fabricant envisage un changement de procédé. Le fait de ne pas procéder à une telle évaluation peut entraîner des obstacles pour les autorités réglementaires.

-FDA et EMA de leur part ont fait une classification des risques selon qu'il s'agit des changements à faible risque pouvant impliquer l'acquisition de certaines données de processus avant et après le changement, ou peut-être même simplement une justification écrite

expliquant pourquoi aucun test n'est nécessaire, ou des changements de risque plus élevés impliquant généralement des données détaillées sur la caractérisation du produit, des données de stabilité et même éventuellement des données cliniques.

2.8.2 Approche séquentielle - Stepwise

C'est une approche appelée aussi approche étape par étape, elle a été adoptée par différentes autorités principalement la FDA américaine et l'européenne EMA, elle consiste à abréger l'exercice de comparabilité et de mener une étude progressive étape par étape, si les résultats d'une étape sont concluants, on peut ne pas passer aux autres étapes de l'étude.

Selon l'FDA dans la ligne directrice dénommée : *Démonstration de la comparabilité des produits biologiques humains, y compris des produits dérivés de la biotechnologie thérapeutique* « Un promoteur peut être en mesure de démontrer la comparabilité d'un produit biologique fabriqué après un changement de fabrication et d'un produit fabriqué avant la mise en œuvre du changement au moyen de différents types d'essais analytiques et fonctionnels, avec ou sans essais précliniques sur les animaux. La FDA peut déterminer que les deux produits sont comparables si les résultats des tests de comparabilité démontrent que le changement de fabrication n'affecte pas la sécurité, l'identité, la pureté ou l'activité. » (113)

Dans la ligne directrice de l'EMA sur *la comparabilité de médicaments dérivés de biotechnologie après un changement de procédé de fabrication* « La démonstration de la comparabilité des produits avant et après modification est un processus séquentiel, commençant par des études de qualité (limitées ou exhaustives) et étayé, si nécessaire, par des études non cliniques, cliniques et / ou de pharmacovigilance. »

Selon la directive de l'EMA sur *les exigences en matière de documentation de la qualité concernant les médicaments expérimentaux biologiques utilisés dans les essais cliniques (septembre 2018)* (114) « Cet exercice de comparabilité doit normalement suivre une approche progressive, comprenant la comparaison des attributs qualité de la substance active et des intermédiaires pertinents, à l'aide de méthodes analytiques appropriées. Les méthodes analytiques comprennent généralement des tests de routine et peuvent être complétées par des tests de caractérisation supplémentaires (y compris des méthodes orthogonales), selon le cas. Lorsque l'expérience accumulée par les fabricants et d'autres informations pertinentes ne suffisent pas pour évaluer le risque introduit par le changement, ou si un risque potentiel pour les patients est anticipé, un exercice de comparabilité fondé uniquement sur des considérations de qualité pourrait ne pas suffire »

Selon la Q5E de l'ICH : « Si un fabricant peut fournir une assurance de la comparabilité uniquement par le truchement d'études analytiques, des études non cliniques ou cliniques sur le produit après les modifications ne sont pas justifiées. Toutefois, lorsque le rapport entre des attributs qualité bien précis et l'innocuité et l'efficacité n'a pas été établi, et que des différences entre les attributs qualité du produit avant et après les modifications sont observées, il conviendrait peut-être d'inclure un agencement d'études sur la qualité, non cliniques et/ou cliniques dans l'exercice de comparabilité. » (111)

2.8.3 Approche par phase appropriée

Au cours du développement du produit, on s'attend à ce que de multiples changements dans le processus de fabrication se produisent et à ce que les études nécessaires de comparabilité soient effectuées. Le degré d'effort impliqué dans ces études de comparabilité est influencé par l'étape clinique du développement du produit biologique. Comparativement aux stades ultérieurs de développement clinique, les premiers stades présentent moins de risques sur la sécurité des patients, ainsi qu'une disponibilité limitée de procédures analytiques validées et une connaissance limitée des produits et des procédés de fabrication. Par conséquent, les autorités réglementaires s'attendent de plus en plus à ce qu'une étude de comparabilité soit approfondie à mesure que le développement clinique progresse. Les lignes directrices réglementaires décrivent les attentes relatives à l'étude de comparabilité à l'aide de cette approche: (1) les changements de processus apportés avant le développement clinique de phase 1, (2) les changements de processus apportés au cours du développement clinique à un stade précoce, (3) les changements de processus apportés au cours du développement clinique à un stade avancé et (4) les changements de processus apportés après l'achèvement du développement clinique de phase 3 et/ou après la mise sur le marché. (24)

✓ **Changements avant la phase 1**

Les fabricants ont la plus grande liberté de mettre en œuvre les changements de procédé avant la fabrication du lot pour la toxicologie préclinique (animale), sans avoir à évaluer la comparabilité du produit biologique après le changement:

✓ **Changements au cours de la phase initiale du développement clinique**

Les changements apportés au procédé de fabrication au cours des essais cliniques de phase 1 et de phase 2 nécessitent une étude de comparabilité moins poussés.

✓ **Changement au cours du dernier stade de développement clinique**

Une fois que le matériel d'essai clinique de confirmation de phase 3 a été fabriqué, d'autres changements de procédé de fabrication nécessiteront une étude de comparabilité complète car

les autorités réglementaires s'inquiètent à cause du risque accru pour le progrès du développement du produit en incorporant les changements de procédé de fabrication au cours des dernières étapes du développement clinique.

✓ **Changement après l'achèvement de la phase 3 ou après l'approbation de mise en marché**

Le risque le plus élevé d'un changement de procédé de fabrication pour les patients, nécessitant ainsi la plus grande préoccupation des autorités réglementaires, se produit une fois que les données sur l'efficacité ont été recueillies pour démontrer l'avantage médical du produit biologique. À ces stade, les changements de procédé de fabrication exigent des études de comparabilité les plus approfondies.

2.8.4 Approche de totalité des épreuves

C'est une approche qui englobe toute les données des approches citées précédemment appliqué par la FDA pour évaluer la démonstration de la biosimilarité.

Elle consiste à prendre en considération l'ensemble des données et des informations présentées, y compris la caractérisation structurale et fonctionnelle, l'évaluation non clinique, les données cliniques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, les données cliniques d'immunogénicité, les données cliniques de la sécurité et de l'efficacité. La FDA prévoit d'utiliser l'approche « Totalité des preuves » fondée sur l'évaluation du risque, pour examiner toutes les données et les informations présentées à l'appui de la démonstration de la biosimilarité du produit proposé. Un fabricant peut être en mesure de démontrer la biosimilarité même si il ya des différences mineures dans la formulation et la structure, à condition qu'il fournit des données suffisantes démontrant que les différences ne sont pas cliniquement significatives et que le produit proposé répond par ailleurs aux critères réglementaires de la biosimilarité. Par exemple, les différences dans certaines modifications post-traductionnelles, ou des différences dans certains excipients (par exemple, l'albumine sérique humaine) peuvent ne pas empêcher la conclusion de la biosimilarité si les données et les informations fournies suggèrent que le produit proposé est très similaire au produit de référence malgré des différences mineures dans les composants cliniquement inactifs. Les différences cliniques significatives pourraient inclure une différence dans la fourchette prévue de la sécurité, de la pureté et de l'activité du produit proposé et le produit de référence. En revanche, de légères différences dans les taux de survenue des effets indésirables entre les deux produits ne seraient pas considérées comme des différences cliniquement significatives.

La FDA recommande aux fabricants d'utiliser une approche progressive pour développer les preuves nécessaires à la confirmation de la biosimilarité . La FDA a l'intention de prendre en compte la totalité des preuves fournies par un fabricant au cours de l'évaluation de sa démonstration de la biosimilarité, conformément à une approche de longue date de la FDA en matière d'évaluation des preuves scientifiques. (115)

2.9 Conception de l'étude de comparabilité

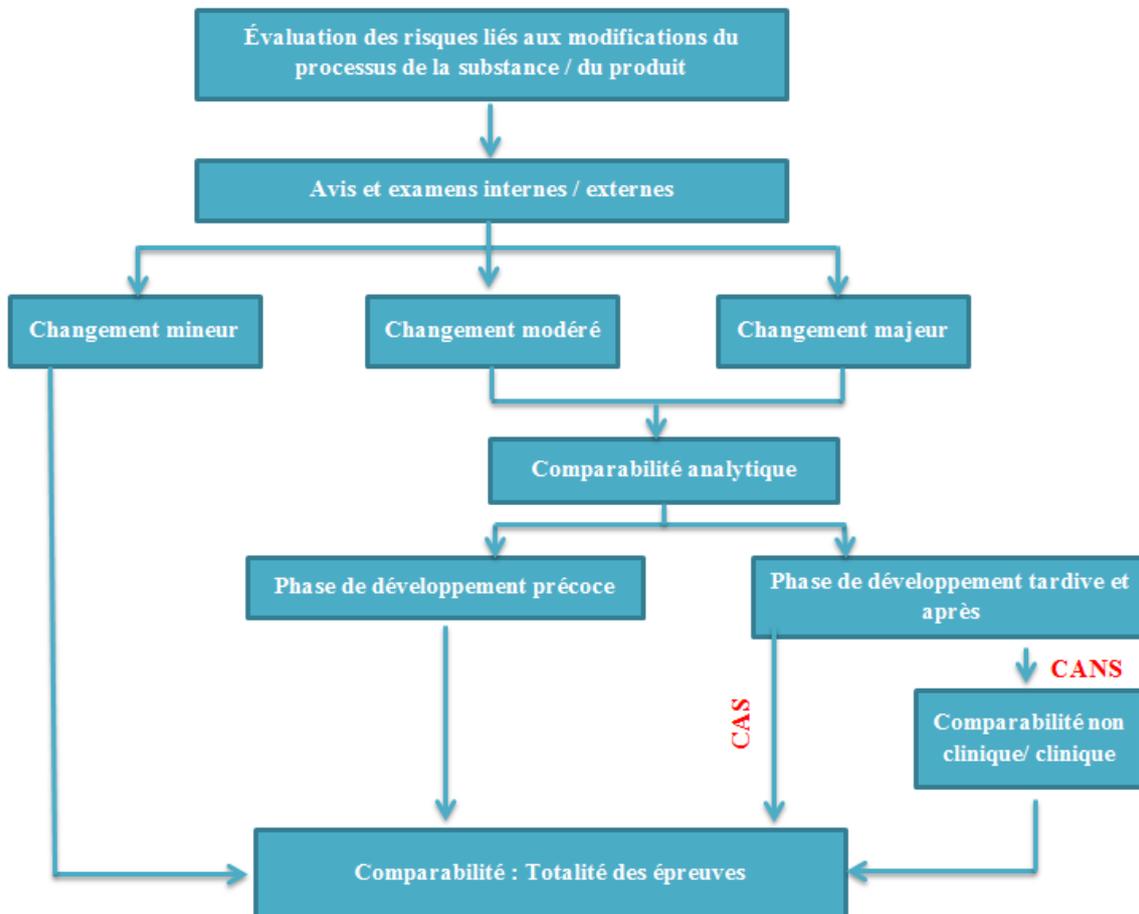


Figure 0-1: La conception de l'étude de comparabilité.¹⁵

La conception de l'étude de comparabilité peut suivre une démarche hiérarchique englobant les quatre approches citées précédemment, à l'issue d'un changement; le développeur de médicament biologique doit commencer d'abord par évaluer le degré des risques par type de changement de processus sur le profil QSE, et en tenant compte de l'étape de développement dans laquelle le changement est effectué, il va procéder à un exercice de comparabilité étape par étape afin de réduire progressivement le risque résiduel. Tout au long de cette démarche il

¹⁵ CAS : Comparabilité Analytique Suffisante
CANS : Comparabilité Analytique Non Suffisante

doit recueillir les preuves nécessaires pour démontrer que son produit de post-changement est « comparable » selon l'EMA et « hautement similaire » selon la FDA au produit de pré-changement en suivant les exigences des autorités réglementaires.

2.9.1 Evaluation du niveau de risque lié au type de changement de processus de fabrication

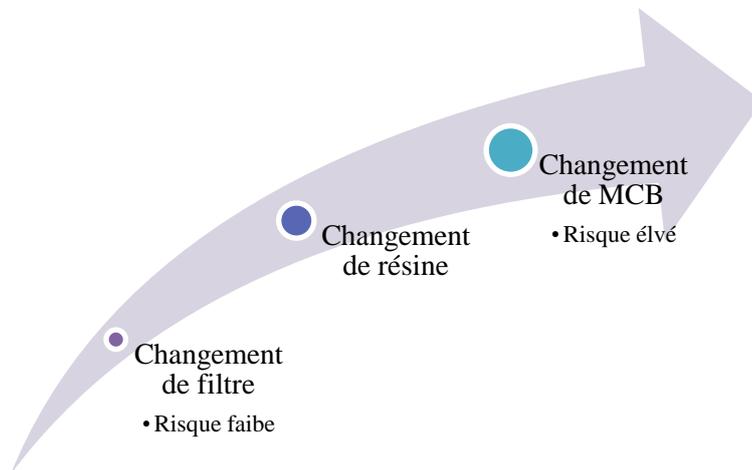


Figure 0-2: Niveau de risque déterminé par la nature du changement de processus de fabrication (112)

Les modifications de processus de fabrication de médicament biologique ne comportent pas le même niveau de risque d'impact potentiel sur le produit (voir figure 3-2).

Le niveau de risque lié à un changement de processus de fabrication est évalué par les fabricants d'une manière subjective. Il s'appuie sur l'expérience acquise dans l'industrie biopharmaceutique (c'est-à-dire les renseignements tirés de ce qui peut éventuellement se produire avec un changement). Il est également basé sur la culture de tolérance au risque du fabricant (c'est-à-dire que différents fabricants veulent des niveaux de garantie différents que le changement n'a pas eu d'impact sur le produit). Le fabricant peut mieux comprendre l'étendue des études de comparabilité qu'il est peut être tenu de réaliser s'il comprend bien le point de vue d'un organisme de réglementation sur le risque lié au procédé de fabrication. Par exemple, au cours de la période de développement clinique d'un médicament, le niveau d'examen par une autorité de réglementation pour un changement de processus de fabrication sert d'indicateur du niveau de risque perçu. Si le changement de processus doit être signalé et / ou approuvé par l'autorité de réglementation avant sa mise en œuvre, il sera considéré comme un changement de risque plus élevé (c'est-à-dire un risque important ou significatif). Si le changement de processus ne doit pas nécessairement être signalé et / ou approuvé avant sa

mise en œuvre, il sera considéré comme un changement de risque plus faible (c'est-à-dire, un non-substantiel ou non significatif). Le tableau 3-2 présente une liste non exhaustive des modifications de processus de fabrication considérées par l'EMA comme présentant un risque majeur ou substantiel (116).

Tableau 0-2 Liste non exhaustive des modifications de processus de fabrication considérées par l'EMA comme présentant un risque majeur. **(116)**

- Changement du fabricant de la substance active.
- Modifications substantielles du processus de fabrication (telles qu'une nouvelle lignée cellulaire d'expression, l'ajout ou la suppression d'une étape de purification, la modification d'étapes affectant la clairance virale, tout retraitement non décrit dans le dossier d'investigation des produits médicaux (l'IMPD)
- Changements entraînant l'apparition de nouvelles impuretés et substances liées au produit.
- Modification de la spécification si les critères d'acceptation sont élargis ou si les procédures d'essai sont supprimées ou remplacées
- Modification de la formulation, y compris modification de la concentration en substance active et de la composition de l'excipient
- Modification du matériel d'emballage immédiat, si la nature du matériau est modifiée
- Modifications des recommandations de stabilité approuvées en cours d'utilisation
- Toute prolongation de la durée de conservation en dehors du protocole de stabilité convenu ou sans engagement préalable

Cette même approche pour déterminer le niveau de risque peut être envisagée à l'aide des affectations de risque des autorités de réglementation face aux modifications du processus de fabrication des produits biopharmaceutiques commerciaux. Si le changement de processus doit être approuvé par l'autorité de réglementation avant sa mise en œuvre, il sera considéré comme un changement de risque majeur (c'est-à-dire. Supplément d'autorisation préalable avec FDA ou modification de type II avec EMA). Si le changement de processus doit être signalé à l'autorité de réglementation avec une attente de 30 jours avant la mise en œuvre, il sera considéré comme un changement de risque modéré (c'est-à-dire, les changements en cours dans les 30 jours avec FDA ou de type IB avec EMA). Si le changement de processus doit être signalé dans un rapport annuel, il sera considéré comme un changement de risque mineur (c'est-à-dire, Rapport annuel avec FDA ou Type IA avec EMA). Le tableau 3-3 présente une liste non exhaustive de modifications de processus de fabrication que la FDA considère comme un risque majeur. (117)

Tableau 0-3 Liste non exhaustive de modifications de processus de fabrication considérées par la FDA comme présentant un risque majeur. (117)

Liste des Modifications majeures publiées par la FDA aux procédés de fabrication des anticorps recombinants et monoclonaux susceptibles de se produire après l'approbation du marché
<p>1. Modifications de processus y compris, sans toutefois s'y limiter :</p> <ul style="list-style-type: none"> - extension du temps de croissance de la culture conduisant à une augmentation significative du nombre de doublages de cellules au-delà des paramètres validés. - procédures de récupération nouvelles ou révisées, processus de purification, y compris le changement de colonne. - une modification de la composition chimique ou de la formulation des solutions utilisées dans le traitement. - une modification de la séquence des étapes de traitement ou une addition, une suppression ou une substitution d'une étape de processus. - retraitement d'un produit sans protocole de retraitement préalablement approuvé
<p>2. Tout changement dans les procédés de fabrication ou les méthodes analytiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - résultats de modification (s) des limites de spécification ou modification (s) de la puissance, de la sensibilité, de la spécificité ou de la pureté - établissement d'une nouvelle méthode d'analyse - suppression d'une spécification ou une méthode analytique - élimination des tests du protocole de stabilité - modification des critères d'acceptation du protocole de stabilité
<p>3. Mise à l'échelle nécessitant un fermenteur, un bioréacteur et / ou un équipement d'épuration plus importants (s'applique à la production jusqu'au volume en vrac purifié final)</p>
<p>4. Modifier la composition ou la forme posologique du produit ou des composants auxiliaires (par exemple, des excipients nouveaux ou différents, des supports ou des tampons).</p>
<p>5. Nouveau lot, nouvelle source, ou version différente, d'une norme de référence ou d'un groupe de référence interne entraînant la modification des spécifications de référence ou une méthode de test alternative</p>
<p>6. Extension de la date de péremption et / ou modification de la température de stockage, de la composition du récipient / de la fermeture ou d'autres conditions, autres que les modifications fondées sur des données en temps réel conformément à un protocole de</p>

stabilité de l'application approuvée
7. Changement de site (s) où la fabrication, autre que les tests, est effectuée, ajout d'un nouvel emplacement ou passation de marché d'une étape de fabrication dans la demande approuvée, à effectuer dans une installation séparée
8. Modifications de l'emplacement (pièce, bâtiment, etc.) des étapes du processus de production susceptibles d'affecter les précautions de contamination ou de contamination croisée

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a également établi une liste non exhaustive des modifications à apporter aux processus de fabrication des produits biopharmaceutiques commerciaux après l'approbation de mise sur le marché. L'OMS utilise une échelle de niveau de risque des changements entrepris : modifications majeures et modérées à déclarer à l'autorité compétente nationale et modifications mineurs non déclarables (pas d'impact sur la qualité) (118). Le tableau 3-4 présente les travaux recommandés pour mettre en œuvre un changement critique du processus de purification.

Tableau 0-4 Recommandation de l'OMS sur les données à l'appui d'un changement critique du processus de purification des produits biologiques. **(118)**

1. Justification de la classification du ou des changements comme majeurs, modérés ou non critique quant à son impact sur la qualité de la substance médicamenteuse
2. Organigramme (y compris les contrôles de processus et de processus en cours) du ou des processus de fabrication proposés et description succincte du processus de fabrication proposé)
3. Résultats de validation du processus
4. Comparabilité de la substance médicamenteuse avant et après le changement en ce qui concerne les propriétés physicochimiques, l'activité biologique, la pureté, les impuretés et les contaminants, selon le cas. Des études de rapprochement non cliniques et / ou cliniques peuvent parfois être nécessaires lorsque les données de qualité sont insuffisantes pour établir la comparabilité. L'étendue et la nature des études cliniques et non cliniques doivent être déterminées au cas par cas, en tenant compte des résultats de la comparabilité sur le plan qualité, nature et du niveau de connaissance du produit, données cliniques et non cliniques pertinentes existantes et l' aspects de son utilisation.
5. Description des lots et résumé des résultats des tests en cours de fabrication et de validation sous forme de données quantitatives, sous forme de tableau comparatif, pour au moins trois

lots consécutifs à l'échelle commerciale de la substance médicamenteuse antérieure et ultérieure. Les résultats des tests de pré-changement comparatifs ne doivent pas être générés simultanément; les résultats des tests historiques pertinents sont acceptables. La mise en matrice, le bracketing, l'utilisation de lots de plus petite taille, l'utilisation de moins de trois lots et / ou l'utilisation de données provenant de lots représentatifs scientifiquement justifiés, ou de lots non nécessairement fabriqués consécutivement, peuvent être acceptables lorsque justifiées.

6. Les résultats des tests comparatifs avant et après modification pour les fabricants ont caractérisé les principaux attributs indicateurs de stabilité pour au moins trois lots de substance médicamenteuse à l'échelle commerciale produits avec les modifications proposées et stockés dans des conditions accélérées et / ou de stress pendant un minimum de 3 mois. Les résultats des tests couvrant une période minimale de 6 mois dans des conditions temps réel / température réelle doivent également être fournis. Une possibilité de 3 mois et un lot de données en temps réel pourraient être acceptables si elles sont correctement justifiées (par exemple, il peut être prouvé que l'effet pertinent, s'il est présent, peut déjà être observé dans un délai de 3 mois). Il n'est pas nécessaire de générer les résultats des tests comparatifs avant modification: les résultats historiques pertinents pour les lots du programme de stabilité sont acceptables. De plus, le fabricant devrait s'engager à entreprendre des études de stabilité en temps réel pour confirmer la durée de conservation / conservation complète de la substance médicamenteuse dans ses conditions de stockage normales et à signaler à l'ANR toute défaillance de ces études de stabilité à long terme en cours. La mise en matrice, la mise entre parenthèses, l'utilisation de lots à plus petite échelle et / ou l'utilisation de moins de trois lots de substance médicamenteuse pour les tests de stabilité peuvent être acceptables si cela est justifié

7. Protocole de stabilité post-approbation et engagement de stabilité mis à jour pour inclure le premier lot à l'échelle commerciale du produit pharmaceutique fabriqué à l'aide de la substance médicamenteuse de post-modification dans le programme de stabilité.

8. Informations évaluant le risque de contamination potentielle par des agents fortuits (par exemple, impact sur les études de clairance virale)

2.9.2 Réduction progressive du risque résiduel - Caractérisation étape par étape

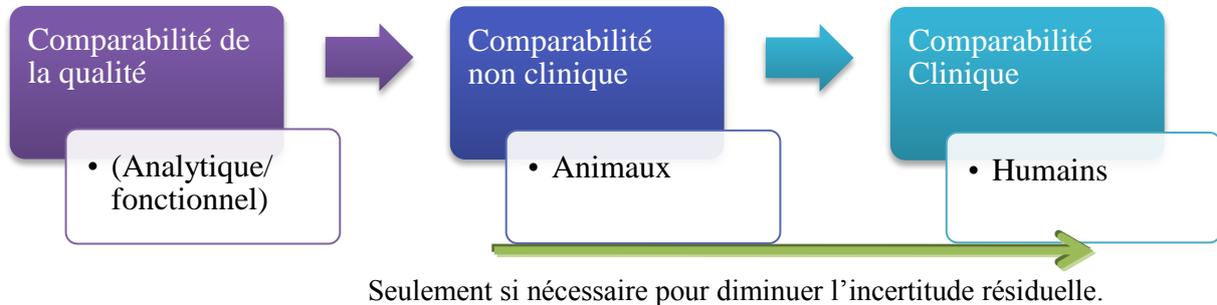


Figure 0-3: Réduction progressive du risque résiduel.

L'objectif général de l'étude de comparabilité est de minimiser le «risque résiduel» du changement de procédé de fabrication ayant une incidence sur l'efficacité ou la sécurité du biopharmaceutique. Plus le niveau de risque associé à un changement de processus est élevé, plus des données expérimentales approfondies seront nécessaires pour répondre de manière adéquate et appropriée aux préoccupations relatives à l'impact potentiel du changement de procédé de fabrication. Plus le niveau de risque associé à un changement de processus est faible, moins de données expérimentales seront nécessaires pour répondre de manière adéquate et appropriée aux préoccupations relatives à l'impact potentiel du changement de procédé de fabrication.

Selon l'EMA : «Cet exercice de comparabilité doit normalement suivre une approche progressive, comprenant la comparaison des attributs de qualité de la substance active et des intermédiaires pertinents, à l'aide de méthodes analytiques appropriées. Les méthodes analytiques comprennent généralement des tests de routine et peuvent être complétées par des tests de caractérisation supplémentaires (y compris des méthodes orthogonales), selon le cas. Lorsque l'expérience accumulée par les fabricants et d'autres informations pertinentes ne suffisent pas pour évaluer le risque introduit par le changement, ou si un risque potentiel pour les patients est anticipé, un exercice de comparabilité fondé uniquement sur des considérations de qualité pourrait ne pas suffire » (116).

2.9.2.1 Comparabilité analytique

A l'issue d'un changement de procédé de fabrication, la première étape pour initier une étude de comparabilité est de procéder à une évaluation analytique en allant de la méthode la plus

simple comme les tests de routines aux méthodes les plus sophistiquées (des méthodes qui évaluent les structures d'ordres supérieurs, les substances apparentées, les impuretés...etc.) : Selon Geigert : « il est important de souligner que les " tests analytiques " sont beaucoup plus qu'une simple " conforme aux spécifications." Il s'agit d'étudier en profondeur le produit avant et après le changement (caractérisation approfondie, spécifications de libération et stabilité) et le procédé (contrôles en cours de fabrication, des gammes historiques) » (24)

Selon l'ICH Q5E: Lorsqu'on examine la comparabilité des produits, le fabricant doit évaluer, par exemple (111) :

- Les données pertinentes de caractérisation physico-chimique et biologique concernant les attributs de la qualité.
- Résultats d'analyse d'échantillons significatifs provenant des étapes appropriées du processus de fabrication (par exemple, matière première, intermédiaire, produit fini).
- Le besoin de données sur la stabilité, y compris celles générées par des conditions de stress ou des conditions accélérées, afin de fournir un aperçu des différences potentielles dans les voies de dégradation du produit et, par conséquent, des différences potentielles dans les substances et les impuretés liées au produit.
- Lots utilisés pour la démonstration de la constance de fabrication.
- L'historique des données qui donnent un aperçu de la " dérive " potentielle des attributs qualité en ce qui concerne l'innocuité et l'efficacité, à la suite d'un seul changement ou d'une série de changements de procédés de fabrication. En d'autres termes, le fabricant doit tenir compte de l'impact des changements au fil du temps pour confirmer qu'il n'y a pas eu d'impact inacceptable sur le profil QSE.

En plus de l'évaluation des données, les fabricants devraient également tenir compte des éléments suivants :

- Les points de contrôle critiques dans le processus de fabrication qui affectent les caractéristiques du produit, par exemple, l'impact de changement de procédé sur la qualité des matières en cours de fabrication, ainsi que la capacité des étapes en aval (down stream) de s'adapter aux matières issues d'un procédé de culture cellulaire modifié.
- Adéquation des contrôles en cours de fabrication, y compris les points de contrôle critiques: pour maintenir la qualité du produit, les contrôles en cours de fabrication pour le processus après le changement devraient, selon le cas, être confirmés, modifiés ou créés.

Il n'est pas approprié de tenir compte que de l'ampleur des essais analytiques nécessaires à la mise en œuvre d'un changement de procédé de fabrication qui peut causer des problèmes. Par exemple, dans le cas de la protéine recombinante Gemesis (becaplermin), le fabricant avait fait valoir que la comparabilité était démontrée parce que les spécifications de libération n'avaient pas changé après le changement de procédé, les modifications du procédé de fabrication (transfert du site de fabrication et mise à l'échelle) ont été introduites au cours du développement du produit et les données de comparabilité pour démontrer que les changements n'ont pas affecté la qualité du produit ont été évaluées et jugées insuffisantes. Bien que l'exercice de comparabilité ait confirmé la conformité aux spécifications des lots avant et après les changements de fabrication, une enquête plus poussée sur la présence de formes à activité réduite pour lesquelles les spécifications sont manquantes et l'impact sur les ponts disulfure est jugée nécessaire pour confirmer que les changements n'ont pas eu d'incidence négative sur la qualité du produit commercial.

2.9.2.1.1 Résultats de la comparabilité analytique de l'ICH Q5E

Après l'évaluation des données de la qualité il y a cinq résultats possibles résultant de l'évaluation initiale de la comparabilité analytique (111) :

- 1- Selon une comparaison appropriée des attributs qualité pertinents, le produit avant les modifications et le produit après les modifications sont fortement similaires et considérés comme étant comparables, c'est-à-dire aucun effet défavorable sur les profils d'innocuité ou d'efficacité n'est prévu;
- 2- Même si le produit avant les modifications et le produit après les modifications semblent fortement similaires, les techniques d'analyse utilisées ne suffisent pas pour discerner les différences pertinentes qui peuvent influencer sur l'innocuité et l'efficacité du produit. Le fabricant devrait songer à la possibilité d'avoir recours à d'autres tests (p. ex. une caractérisation plus poussée) ou à des études non cliniques et/ou cliniques pour en arriver à une conclusion définitive;
- 3- Même si le produit avant les modifications et le produit après les modifications semblent fortement similaires, certaines différences ont été observées dans les attributs de qualité du produit avant les modifications et du produit après les modifications, mais on peut démontrer qu'aucun effet défavorable sur les profils d'innocuité ou d'efficacité est anticipé, et ce, selon le cumul de l'expérience, des renseignements pertinents et des données du fabricant. En pareilles circonstances, le produit avant les modifications et le produit après les modifications peuvent être considérés comparables;

- 4- Même si le produit avant les modifications et le produit après les modifications semblent fortement similaires, certaines différences ont été relevées dans la comparaison des attributs de qualité et un effet défavorable possible sur les profils d'innocuité et d'efficacité ne peut être exclu. En pareilles situations, la production et l'analyse de données additionnelles sur les attributs qualité ne risquent guère d'aider à déterminer si le produit avant les modifications et le produit après les modifications sont comparables. Le fabricant doit songer à la possibilité d'effectuer des études non cliniques et/ou cliniques;
- 5- Les différences dans les attributs de qualité sont si importantes qu'il est établi que les produits ne sont pas fortement similaires et, par conséquent, qu'ils ne sont pas comparables.

2.9.2.1.2 Discussion des résultats :

Bien que le désir soit d'avoir le résultat n°1 (c'est-à-dire. aucune différence observée) dans la plupart des cas, le troisième résultat est plus réaliste (c'est-à-dire des différences observées, mais justifiées pour ne pas avoir d'impact clinique).

La capacité de la méthodologie analytique sophistiquée d'aujourd'hui permet d'observer un nombre croissant sans cesse de variantes moléculaires. Ainsi, avec les différences analytiques observées, l'objectif est de déterminer s'il est possible de conclure que les différences observées n'ont " aucune signification pratique ". Même s'il peut y avoir des différences à la fois qualitatives et même statistiquement significatives, le fabricant doit déterminer s'il y a un impact réaliste sur le profil QSE du produit biologique. (24)

Un exemple pour le résultat n°3 confirmant l'absence de différence pratique est celui de la protéine recombinante biosimilaire Abseamed (érythropoïétine), dans lequel le fabricant a comparé son produit biologique avec l'érythropoïétine recombinante (Eprex). Bien que des différences analytiques dans la glycosylation aient été observées, l'EMA a conclu qu'il n'y avait pas de signification pratique en raison des différences et a accordé l'autorisation de mise sur le marché (119)

Le résultat n°3 a été aussi confirmé par l'EMA dans sa ligne directrice sur *la comparabilité de médicaments dérivés de biotechnologie après un changement de procédé de fabrication* : « La démonstration de la comparabilité est un processus séquentiel. Ainsi, l'étendue de l'exercice de comparabilité variera. Si un fabricant peut fournir des preuves de comparabilité par le biais d'études physico-chimiques et biologiques, des études non cliniques ou cliniques avec le produit après modification ne sont pas justifiées. » (120)

Avec le résultat n°2 (c'est-à-dire les limitations dues aux méthodes d'analyse) et le résultat n°4 (c'est-à-dire la justification de l'absence d'impact clinique ne peut être atteinte), des études de comparabilité supplémentaires sont nécessaires.

Le résultat n°5 non désiré en aucune circonstance (les différences dans les attributs qualité sont si importantes qu'il est déterminé que les produits ne sont pas très semblables et ne sont donc pas comparables). Lorsque cela se produit, le changement de procédé de fabrication n'est pas mis en œuvre.

Il y a aussi un résultat n°6 possible, c'est le cas où le produit biologique n'est pas comparable parce qu'il a été considérablement amélioré :

Selon l'ICH Q5E « L'amélioration de la qualité du produit est toujours souhaitable et encouragée. Si les résultats de la comparabilité indiquent une amélioration significative de l'efficacité et/ou de l'innocuité, le produit avant et après modification peut ne pas être comparable. Toutefois, ce résultat pourrait être considéré comme acceptable et il est conseillé au fabricant de consulter l'autorité réglementaire régionale appropriée. » (111)

2.9.2.2 Evaluation des risques selon le stade de développement clinique

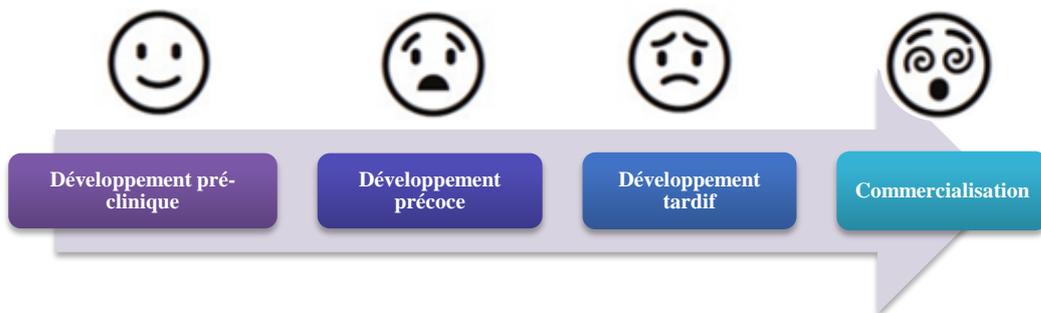


Figure 0-4:Évaluation de risque selon le stade de développement clinique.

Dans le cas d'un changement apporté à un médicament de référence, si le changement est introduit avant de commencer le développement clinique, la question de la comparabilité n'est pas soulevée, Peu de fabricants veulent rester longtemps à ce stade de développement, car l'objectif de l'entreprise est de lancer l'essai clinique de phase 1 pour déterminer si le produit biologique offre un avantage médical. l'ICH Q5E a mentionné ceci comme suit: « Lorsque des changements sont introduits dans le développement avant les études non cliniques, la question de la comparabilité n'est généralement pas soulevée parce que le fabricant effectue

ensuite des études non cliniques et cliniques en utilisant le produit après le changement dans le cadre du processus de développement ». (ICH Q5E: Comparabilité des produits biotechnologiques et biologiques. 2015)

Si le changement est introduit durant les phases de développement précoces, les produits de poste changement seront l'objet d'une étude de comparabilité mais pas nécessairement poussée car le produit de post changement sera aussi mis à des études non cliniques et cliniques durant les phases de développement ultérieurs, selon la ligne directrice de l' ICH Q5E que : « durant les premières phases des études non cliniques et cliniques, les essais de comparabilité ne sont généralement pas aussi poussés que pour un produit approuvé, à mesure que les connaissances et l'information s'accroissent et que les outils d'analyse se développent, l'exercice de comparabilité devrait utiliser l'information disponible et deviendra généralement plus complet. » (111)

L'EMA a aussi abordé ce point : « Dans la situation où les changements ont été apportés avant l'initiation des essais de confirmation; des données adéquates provenant d'études physicochimiques, biologiques et parfois aussi d'études de comparabilité non cliniques ou cliniques, telles qu'une étude pharmacocinétique à dose unique, sont généralement suffisantes pour démontrer que les données non cliniques et cliniques obtenues avant l'introduction du changement sont toujours valables et peuvent être extrapolées au produit après le changement. » (121)

Par contre face un changement réalisé à un stade tardif le recours aux études cliniques et non cliniques est généralement nécessaire.

Selon l'ICH Q5E« Lorsque des changements au procédé sont introduits à des stades avancés de développement et qu'aucune étude clinique supplémentaire n'est prévue pour appuyer l'autorisation de mise en marché, l'exercice de comparabilité devrait être aussi complet et approfondi qu'un exercice effectué pour un produit approuvé. » (111)

Personne ne gagne si l'approbation de mise en marché d'un produit biologique est retardée en raison d'un changement de procédé de fabrication mal évalué. Pour cette raison et pour discuter avec le fabricant des futures changements de processus, la FDA a établi deux points de contrôle des CMCs (Chemistry, manufacturing, and controls) - l'un lors de la transition de la phase 2 à la phase 3 (appelée réunion de fin de phase 2 (EOP2)) et l'autre avant la soumission du dossier d'autorisation de mise sur le marché (122)

Un exemple de l'impossibilité de confirmer l'absence de signification pratique s'est produit avec la protéine recombinante Myozyme (alglucosidase alfa), dans laquelle Genzyme a

comparé ses produits biologiques produits à partir de deux échelles différentes de procédé de fabrication, soit 160 et 2 000 L de taille de bioréacteur.

L'alfa alglucosidase est une glycoprotéine complexe avec une masse calculée de 99 377 daltons en chaîne polypeptidique et une masse totale (incluant les glucides) d'environ 109 000 daltons. Genzyme a utilisé 38 outils analytiques distincts pour évaluer de façon exhaustive les caractéristiques biochimiques d'un grand nombre de lots fabriqués à l'échelle de 160 L (22 lots de substance médicamenteuse) et à l'échelle de 2000 L (24 lots de substance médicamenteuse). La comparabilité biochimique a été confirmée pour la grande majorité des attributs qualité testés. Cependant, il y avait des différences mesurables dans certains attributs, y compris les quantités relatives (mais pas le type prédominant) de glycanes spécifiques. Les préoccupations en matière de comparabilité portaient sur les différences entre les glycanes phosphorylés et les glycanes sialylés. Bien que la gamme des niveaux de sialylation en 2000 Lait été en grande partie contrôlée par la mise en œuvre de contrôles rigoureux du processus, des préoccupations subsistent quant aux différences dans les niveaux de bis mannose-6-phosphate (bisM6P). Il a été montré que les Glycanes phosphorylés jouent un rôle dans le ciblage cellulaire médié par les récepteurs M6P. Ciblage cellulaire basé sur des travaux publiés par Genzyme (McVie-Wylie, 2008, Molecular Genetics and Metabolism).

Les données de comparabilité biochimique ont indiqué que ces glycanes phosphorylés sont présents dans une gamme étroite de valeurs dans l'alfa alglucosidase produite à chaque échelle de fabrication, bien qu'il y ait un certain chevauchement des gammes pour chaque espèce de glycane entre 160 L et 2000 L de produit. Étant donné la difficulté d'évaluer l'impact clinique potentiel des différences observées dans les niveaux de glycanes phosphorylés sur la base de la seule caractérisation biochimique, Genzyme s'est engagé de façon proactive dans des analyses cliniques rétrospectives et non cliniques de l'alfa alglucosidase produite aux échelles 160 L et 2000L .Fait intéressant, même avec les données cliniques et non cliniques supplémentaires à l'appui de la comparabilité des deux échelles de procédé de fabrication, la FDA a considéré que les différences de glycosylation étaient importantes et a exigé que l'entreprise identifie le produit de chaque échelle de fabrication comme étant différent (le produit de 160 L a été approuvé sur le marché sous le nom de Myozyme, et le produit de 2 000 L, puis plus tard le produit de 4 000 L a été approuvé sur le marché sous le nom de Lumizyme). L'EMA, en revanche, a rejeté le produit de la balance de 160 L et n'a approuvé sur le marché que la balance de 2 000 L, puis, plus tard, le produit de 4 000 L, sous le nom de Myozyme. (123)

Une fois l'autorisation de mise sur le marché a été approuvé pour le fabricant; tout changement après commercialisation a un probable impact grave sur le profil QSE du produit :

Selon le projet de directive de l'EMA sur : *La comparabilité des médicaments issus de la biotechnologie après un changement de procédé de fabrication*: « Si un changement de fabrication a lieu après la réalisation de l'essai de confirmation ou après l'approbation, un exercice de comparabilité plus approfondi est requis, y compris des études physico-chimiques et biologiques in vitro, et des études pharmacocinétiques et/ou pharmacodynamiques de comparabilité. Si cet exercice de comparabilité ne permet pas d'exclure l'existence d'un impact sur l'efficacité et le profil d'innocuité du médicament, des études cliniques supplémentaires pourraient devoir être effectuées. Les écarts par rapport à ce niveau conceptuel doivent être justifiés. » (121)

Pour appuyer les changements de procédé pour les produits approuvés, les données provenant des lots à l'échelle commerciale sont généralement indiquées.

Bien qu'il soit souhaitable d'améliorer les processus à ce stade, les fabricants doivent faire preuve de prudence et ne pas modifier le processus au point de recevoir un rejet d'une autorité réglementaire.

L'exemple de la protéine recombinante Krystexxa (pegloticase) illustre les risques sérieux qu'un fabricant peut encourir à ce stade tardif, qui a connu un retard de 14 mois dans l'approbation de mise en marché de la FDA. Avant de déposer le BLA pour ce produit biologique, le fabricant a tenu une réunion pré-BLA axée sur le CMC avec la FDA pour discuter de certains changements " mineurs " apportés au procédé depuis la fabrication des produits de la phase 3. La FDA a rappelé au fabricant que les changements de procédé à ce stade présentent un risque élevé et que l'étude de comparabilité proposée n'était pas suffisante: " Des études de caractérisation supplémentaires doivent être effectuées sur l'ingrédient pharmaceutique actif, y compris des études complètes de dégradation forcée " (124)

Savient est allé de l'avant et a apporté des changements au processus de fabrication. Malheureusement, ce que le fabricant considérait comme mineur, la FDA considérait comme majeur. La FDA a clairement indiqué dans une lettre de réponse complète au fabricant que le processus commercial n'était pas acceptable... Non seulement les produits biologiques entre le processus de la phase 3 et le processus commercial n'étaient pas comparables, mais l'information fournie ne permettait pas à la FDA d'évaluer l'impact des différences physico-chimiques sur l'innocuité et l'efficacité cliniques. La FDA a donné au fabricant deux choix

pour aller de l'avant : soit (1) effectuer des études cliniques supplémentaires en utilisant le procédé commercial, soit (2) valider le procédé de fabrication initial de la phase 3 et soumettre ces données au BLA (125).

Savient a choisi cette dernière option, mais pas sans un retard de 14 mois pour obtenir l'approbation de la mise en marché.

2.9.2.3 Etudes non cliniques/cliniques

Dans un stade avancé de développement ou après l'approbation de mise sur le marché du médicament biologique et devant les différents types de résultats possibles de l'ICH dans la Q5E cité précédemment : #2 Procédures analytiques insuffisantes pour confirmer la comparabilité des produits biologiques avant et après le changement ou #4 Procédures analytiques qui confirment des différences dans les attributs qualité mais l'impact de ces différences en matière de sécurité et d'efficacité ne peut être exclu, des études non cliniques et/ou cliniques sont généralement attendues, dans les cas suivants selon la ligne directrice de la FDA : *Les points à prendre en compte dans la fabrication et les essais de produits à base d'anticorps monoclonaux à usage humain, 1997* (126):

- ❖ le dosage de l'activité n'est pas fiable.
- ❖ Un produit a une gamme thérapeutique étroite : « Les situations dans lesquelles des études supplémentaires peuvent être nécessaires incluent celles dans lesquelles le produit a une plage thérapeutique étroite... » (127)
- ❖ Lorsque de nouvelles impuretés apparaissent après le changement de procédé de fabrication cela est aussi abordé par l'ICH Q5E : « Lorsque le changement entraîne l'apparition de nouvelles impuretés, celles-ci doivent être identifiées et caractérisées lorsque cela est possible. Selon le type et la quantité d'impureté, il pourrait être approprié de mener des études non cliniques ou cliniques pour confirmer qu'il n'y a aucun impact négatif sur l'innocuité ou l'efficacité du produit pharmaceutique ». (111).
- ❖ Lorsqu'une nouvelle formulation est introduite dans le produit biologique final : « Les modifications apportées au produit médicamenteux finaux, comme les changements apportés aux contenants d'entreposage, aux formes posologiques (par exemple : d'une solution à une poudre lyophilisée pour reconstitution) ou aux sites de remplissage, peuvent n'avoir besoin que de données comparatives sur les spécifications de libération et les données sur la stabilité du produit. Toutefois, les changements apportés à la formulation finale du produit peuvent nécessiter des études pharmacocinétiques comparatives ou d'autres types d'études » (127)

L'EMA a aussi souligné l'importance des essais cliniques dans certaines situations : «on peut parfois s'attendre à un effet sur l'efficacité et / ou la sécurité sur la base des différences observées ou ne peut être exclu en dépit des tests physico-chimiques et biologiques les plus récents. Dans de tels cas, des études supplémentaires non cliniques et / ou cliniques seront nécessaires. » (121)

2.9.2.3.1 Etudes pré-cliniques (non-clinique) :

Les études précliniques de sécurité sont à réaliser avant toute comparabilité clinique, l'étendue du programme des études précliniques et notamment le type des études retenues (in vitro et in vivo) est en relation avec les différences identifiées au cours des études de caractérisation physicochimiques et biologiques mises en œuvre et de leurs impacts potentiel sur la sécurité et l'efficacité du médicament. Selon la ligne directrice de l'EMA sur *la comparabilité de médicaments dérivés de biotechnologie après un changement de procédé de fabrication*: « Si les preuves issues d'études physico-chimiques et d'études biologiques liées à la qualité ne suffisent pas à elles seules pour établir la comparabilité des produits avant et après modification, soit parce que ces données révèlent une différence entre les deux produits, soit parce que la nature du changement de fabrication a été modifiée est telle qu'une différence ne peut pas être exclue sur la base des données de qualité disponibles uniquement, les données provenant d'études non cliniques peuvent alors fournir des signaux utiles de différences thérapeutiques et de sécurité potentielles. » (128)

Les évaluations s'appuient sur des études in vitro de liaisons aux récepteurs, de réponses cellulaires montrant s'il existe des différences de réactivité et si les causes en sont connues. Les études in vivo chez l'animal doivent être conçues de façon à obtenir une information plus complète de comparaison entre le produit de pré et de post changement Ces études devront être effectuées sur une espèce connue comme pertinente. Elles ont pour objectif, d'une part, d'évaluer les effets pharmacodynamiques et les activités en relation avec l'application clinique, d'autre part, de s'assurer de la toxicité non-clinique à doses répétées incluant notamment des mesures toxicocinétiques.

Les études in vitro:

Des analyses telles que des études de liaison aux récepteurs ou des analyses cellulaires, dont beaucoup peuvent déjà être obtenues à partir de bioessais liés à la qualité, devraient normalement être effectuées avec les produits antérieurs et postérieurs au changement testés simultanément à l'aide d'un protocole d'étude comparative afin de: évaluer si la réactivité a été

altérée et déterminer le ou les facteurs de causalité probables si la comparabilité ne peut pas être établie. (128)

Les études *in vivo*:

S'il existe des incertitudes ou des préoccupations spécifiques concernant les paramètres pharmacocinétiques ou les effets pharmacodynamiques pertinents pour l'application clinique et / ou la sécurité, des études *in vivo* sur une ou plusieurs espèces pertinentes et sur un modèle animal correctement validé peuvent être envisagées. On se fierait davantage aux résultats d'études menées sur une espèce pour laquelle le produit avant modification serait un modèle pertinent pour l'homme. La formulation finale du produit après modification doit être utilisée de préférence plutôt que la substance médicamenteuse seule. Idéalement, la formulation utilisée dans les études de comparabilité non cliniques devrait être la même que celle utilisée dans les essais cliniques pour faciliter l'interprétation des données. Des méthodes de pointe devraient être utilisées. (128)

2.9.2.3.2 Etudes cliniques :

Les études comparatives PK et pharmacodynamiques effectuées chez l'animal ont un intérêt parfois limité en raison des spécificités d'espèce (affinité pour les récepteurs, clairance). Il est donc parfois nécessaire d'effectuer des essais cliniques pour vérifier que l'efficacité du produit de pré et de post changement est comparable.

Les études cliniques sont aussi un exercice de comparabilité procédant par étapes, commençant par la PC et la PD, suivi des études cliniques d'efficacité.

2.9.2.3.2.1 Etude de pharmacocinétique/pharmacodynamie :

Les études de PC doivent montrer l'équivalence entre le produit de pré et de post changement pour les paramètres clés en évaluant s'il existe des différences dans les caractéristiques de distribution et d'élimination comme la clairance et la demi-vie d'élimination. Les marqueurs pharmacodynamiques doivent être choisis en fonction de leur pertinence pour montrer l'efficacité thérapeutique. Les études sont à réaliser sur une population permettant de mettre en évidence des différences possibles.

Selon l'EMA : « Les études pharmacocinétiques sont une partie essentielle de l'exercice de comparabilité clinique. Le but étant de démontrer la comparabilité et non la caractérisation de la pharmacologie clinique du produit en soi, de telles études devraient être comparatives.

Une étude croisée à dose unique est en principe acceptable en raison de la variabilité généralement inférieure à celle des comparaisons entre têtes. Cependant, des facteurs tels que l'immunogénicité et ses conséquences possibles liées aux modifications de la pharmacocinétique et / ou de la pharmacodynamique doivent être pris en compte.

La pharmacodynamique devrait de préférence être évaluée dans le cadre de l'étude pharmacocinétique comparative, car les modifications de la pharmacodynamique peuvent parfois s'expliquer par une cinétique altérée. Là encore, les études doivent être de nature comparative et ne pas simplement montrer la pharmacodynamique du produit en soi. » (128)

Selon la ligne directrice de l'ICH : *Choix du groupe de contrôle et questions connexes lors des essais cliniques E10* : les études PC et PD sont envisagé à condition que (129) :

- a. Les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du produit avant le changement sont bien caractérisés
- b. Au moins un marqueur pharmacodynamique est un marqueur lié à l'efficacité (par exemple, un marqueur de substitution de l'efficacité),
- c. La relation entre la dose/exposition, le marqueur pharmacodynamique pertinent et la réponse/efficacité du produit avant le changement est bien établi. Le nombre absolu de neutrophiles et le nombre de cellules CD34+ sont des marqueurs PD pertinents pour l'activité du facteur de croissance granulocytaire (G-CSF) et pourrait être utilisé dans des études PC/PD chez des volontaires sains afin de démontrer une efficacité similaire des deux médicaments contenant le G-CSF. La population de l'étude et les tests devraient être sensibles pour détecter les différences potentielles entre le produit de pré et de post changement. Par exemple, dans le cas de l'insuline, la population de l'étude devrait être composée de volontaires sains non-obèses ou des patients atteints de diabète de type 1 insulino-résistants plutôt que des patients obèses avec un diabète de type 2. Dans le cas contraire, il sera nécessaire d'étudier une gamme de doses pertinentes pour démontrer que les tests sont discriminants. En outre, l'intervalle d'acceptation pour la démonstration de similarité des paramètres pharmacodynamiques et pharmacocinétiques doit être prédéfini et justifié de manière appropriée. Si les études PC/PD sont bien conçues, elles sont souvent plus sensibles pour détecter des différences potentielles en termes d'efficacité que les essais utilisant des critères d'évaluation cliniques.

2.9.2.3.2.2 Etudes cliniques proprement dites :

Selon l'EMA : « S'il n'existe aucun marqueur approprié ou si les études pharmacodynamiques ne permettent pas d'établir clairement la comparabilité, un essai clinique comparatif d'équivalence utilisant des critères d'effet cliniques sera nécessaire. Encore une fois, les études doivent être de nature comparative, comparant le produit post-changement avec le produit antérieur au changement. Une efficacité thérapeutique équivalente doit être démontrée. Habituellement, les études cliniques doivent être randomisées, en double aveugle, pour éviter les biais. Les différences d'efficacité possibles doivent normalement être étudiées dans les études présentant la probabilité la plus élevée de montrer une différence » (128)

En fait, les essais d'efficacité et d'innocuité cliniques ne constituent souvent pas l'approche privilégiée pour établir la comparabilité des produits, car ces essais sont coûteux, prennent du temps et sont souvent inutiles. Le recours aux essais d'efficacité et d'innocuité cliniques est généralement réservé en dernier recours lorsque d'autres types d'études ne peuvent traiter de manière satisfaisante les problèmes de comparabilité.

2.9.2.4 Discussion finale : Totalité des épreuves

Un rapport d'étude de comparabilité est soumis à l'autorité de réglementation pour examen (130). Ce rapport sert de «voix» pour le fabricant lorsqu'il est examiné par le ou les examinateurs de l'autorité de réglementation. Le rapport de comparabilité doit donc être facile à comprendre, indiquer clairement les études réalisées et les résultats réels des tests, et contenir une discussion honnête de l'évaluation des différences observées dans le produit biologique après le changement de processus. Trop souvent, la conclusion du rapport de comparabilité est «comparable», lorsque les données parlent autrement. Et parfois, même la conclusion de «comparable» est parfois écrite dans le projet de rapport avant même que les études de comparabilité ne soient réalisées ce qui contredit la loi.

Conclusion

Les changements du processus de fabrication d'un médicament sont inévitables que ce soit au cours de développement clinique ou même après commercialisation, cependant, ces changements doivent être mis en œuvre d'une manière adéquate permettant de préserver la qualité du produit fabriqué surtout dans le cas des médicaments biologiques qui, vu leur nature très complexe, se trouvent très sensibles aux modifications de leurs procédés de fabrication.

Les fabricants des médicaments biologiques ont le défi de convaincre les autorités réglementaires, avec une étude de comparabilité bien conçue, de l'absence de tout impact négatif sur le profil QSE du produit biologique. Cette tâche n'est pas facile car le fabricant doit obéir d'une part aux recommandations des autorités réglementaires pour obtenir l'approbation de mise sur le marché et d'autre part il vise à utiliser le minimum de tests possibles.

Durant notre travail nous avons consulté les différentes lignes directrices (EMA, FDA, ICH, OMS) et la littérature disponible afin de faire une synthèse des différentes approches disponibles pour la conception de l'étude de comparabilité, ce qui aide l'autorité réglementaire algérienne à mettre en œuvre des textes réglementaires pour faire face aux changements de processus de fabrication des médicaments biologiques entrepris par les fabricants que ce soit au cours des phases de développement ou après commercialisation, l'étude de la comparabilité des médicaments biologiques suivra une démarche hiérarchique commençant par évaluer le risque selon le type de changement, par la suite diminuer progressivement le risque résiduel en allant des études analytiques jusqu'aux études non cliniques et cliniques, tous cela en tenant compte de stade du développement, un médicament au stade de commercialisation subira automatiquement une comparabilité plus poussée qu'un médicament encore dans les stades de développement précoce.

En fin, Les fabricants ont la responsabilité et l'obligation de continuer à informer les autorités réglementaires de tout changement apporté dans les procédés de fabrication de leur gamme de médicaments biologiques, les autorités réglementaires, de leur part, doivent établir des directives pour l'évaluation au cas par cas de ces changements, ce qui permet de maintenir un niveau de qualité constant tout en préservant la santé des patients des effets néfastes probables liés à l'utilisation des médicaments biologiques de post-modification.

Bibliographie

1. **FDA.** U.S Food & drug Administration. [En ligne] <https://www.fda.gov>.
2. *Dictionnaire français Larousse* .
3. *European federation of biotechnology*. [En ligne] <http://www.efbiotechnology.org/> .
4. la directive européenne 2001/83 modifiée par la directive 2003/63/CE (Annexe I, Partie I, 3.2.1.1.b.)). *l'agence européenne des médicaments EMA*. [En ligne]
5. **ANSM.** *Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé* . [En ligne] <https://www.ansm.sante.fr/>.
6. Santé Canada. [En ligne] <https://www.canada.ca/fr/sante-canada.html>.
7. **OMS.** *Organisation mondiale de la santé*. [En ligne] <https://www.who.int/fr>.
8. Biosimilar medicines: Overview. *European medicines agency*. [En ligne] <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/biosimilar-medicines-overview>.
9. Fiche de renseignements : Médicaments Biosimilaires . *Santé Canada*. [En ligne] 07 12 2016. <https://www.canada.ca/fr/sante-canada.html>.
10. **ANSM.** Les médicaments biosimilaires. *Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé* . [En ligne] [Citation : 24 décembre 2018.] [https://www.ansm.sante.fr/Activites/Medicaments-biosimilaires/Les-medicaments-biosimilaires/\(offset\)/0](https://www.ansm.sante.fr/Activites/Medicaments-biosimilaires/Les-medicaments-biosimilaires/(offset)/0).
11. **LEEM BIOTECH & GENOPOLE®** . *Bioproduction 2008, Etat des lieux et recommandations pour l'attractivité de la France*. 2008.
12. **BENAZIZ, Dr W.** Cours développement de médicaments génériques. 2017/2018.
13. **EMA.** *European Medicines Agency*. [En ligne] <https://www.ema.europa.eu/>.
14. *Biosimilaires des agents biologiques. Que faut-il en penser ?* **Toussirot, Bureau M.** 2013 .
15. *Biosimilaires: de la technique au médicoéconomiques*. **Girault, et al., et al.** 2015.
16. **BIOTECanda.** Démystifier les médicaments biosimilaires. *Guide à l'intention des rédacteurs scientifiques*.
17. **Akers, MJ, Vasudevan, V et Stickelmeyer , M.** *Formulation development of protein dosage forms*. s.l. : Academic/Plenum Publishers, 2002.
18. *The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin* . **Kawanishi , G, et al., et al.** 1990, Biochem.
19. **Trouvin, Jean-Hugues et Prugnaud, Jean-Louis.** *Les biosimilaires*. Verlag - France : Springer, 2011.

20. Monographie de l'aspirine . *BAYER CANADA*. [En ligne] 2017.
<https://www.bayer.ca/omr/online/aspirin-pm-fr.pdf>.
21. monographie de REMICADE®. *Janssen Global*. [En ligne] 2018.
https://www.janssen.com/canada/sites/www_janssen_com_canada/files/prod_files/live/remicade_cpmf.pdf.
22. Monographie de ENGERIX-B. *Gsk.canada*. [En ligne] 2019.
<https://ca.gsk.com/media/673227/engerix-b.pdf>.
23. Monographie de GENOTROPIN. [En ligne] 2018.
https://www.pfizer.ca/sites/g/files/g10050796/f/201812/Genotropin_PM_219581_3Dec2018_F.pdf.
24. **Geigert, John**. *The Challenge of CMC Regulatory Compliance for Biopharmaceuticals and other Biologics Second Edition*. s.l. : Springer, 2013.
25. **OMS**. GUIDELINES ON EVALUATION OF SIMILARBIOTHERAPEUTIC PRODUCTS (SBPs). *Organisation Mondiale de Santé*. [En ligne] <https://www.who.int/fr>.
26. **l'agence européenne du médicament et Commission européenne** . Les médicaments biosimilaires dans l'UE.
27. **Wong, Dominic W. S**. *The ABCs of Gene Cloning Third Edition*. Albany, CA, USA : Springer, 2018.
28. **Scriban, René**. *Biotechnologie 5eme édition*. Paris : TEC & DOC, 1999.
29. **Franks, Felix**. *Protein Biotechnology*. England : Humana Press, 1993.
30. Production de protéines recombinantes. [En ligne]
<http://www.takween.com/biotechnologies/proteines-recombinantes.html>.
31. **Blaber, Michael**. Prokaryotic Expression Vectors. [En ligne]
[https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Supplemental_Modules_\(Biochemistry\)/3._Biotechnology_1/3.4%3A_Prokaryotic_Expression_Vectors](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Supplemental_Modules_(Biochemistry)/3._Biotechnology_1/3.4%3A_Prokaryotic_Expression_Vectors).
32. **Dodet, B**. *Biofutur*. s.l. : Lavoisier, 1990.
33. **Crommelin, Daan J. A, Sindelar, Robert D. et Meibohm, Bernd**. *Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications*. 4e édition. New York : springer, 2013.
34. **Ozturk, Sadettin et Hu, Wei-Shou**. *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies*. Boca Raton : CRC Press, 2005.
35. **Demain, Arnold et Vaishnav, Preeti**. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*. 2009, p. 65.
36. **Gutka, Hiten, Yang, Harry et Kakar, Shefali**. *Biosimilars: Regulatory, Clinical, and Biopharmaceutical Development*. s.l. : Springer, 2018.
37. **Betton, Jean Michel et Chaffotte, Alain**. Repliement et production de protéines recombinantes. *M/S : médecine sciences*. 2005.

38. *Expression of correctly folded proteins in Escherichia coli*. **Georgiou, George et Valax, Pascal** . 1996, *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 7, pp. :190-19?
39. *Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems*. **Klaus, Graumann et Andreas, Premstaller**. 2, 2006, *Biotechnology Journal*, Vol. 1, pp. 164-186.
40. **Terpe, K.** Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006.
41. *Industrial production of recombinant therapeutics*. **Chung-Jr Huang, Henry Lin et Xiaoming Yang**. s.l. : Springer, 2012, *Industrial Microbiology and Biotechnology*, pp. 39:383–399.
42. Recombinant Protein and Its Expression Systems. *Creative Biomart*. [En ligne] <https://www.creativebiomart.net/resource/article-recombinant-protein-and-its-expression-systems-365.htm>.
43. **Nidhi, U.** Recombinant Protein Expression System. *Biotechnology products*. 28 08 2010.
44. Recombinant Protein and Its Expression Systems. *Creative BioMart*. [En ligne] <https://www.creativebiomart.net/resource/articles-recombinant-protein-and-its-expression-systems-365.htm>.
45. Les papillomavirus et la régulation de la transcription . *123Bio Biologie et recherche*. [En ligne] <http://www.123bio.net/revues/ibouallaga/22.html>.
46. *Yeast Systems for the Commercial Production of Heterologous Proteins*. **Buckholz, Richard G. et Gleeson, Martin A. G.** 1991, *Bio/Technology*, pp. 1067-1072.
47. *New yeast expression platforms based on methylotrophic Hansenula polymorpha and Pichia pastoris and on dimorphic Arxula adenivorans and Yarrowia lipolytica - a comparison*. **Gellissen, Gerd, et al., et al.** 2005, *FEMS yeast research*, pp. 1079-1096.
48. *Yeast Expression Systems for Industrial Biotechnology*. **Chumnanpuen, Pramote, Kocharin, Kanokarn et Vongsangnak, Wanwipa**. 2016, *Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications*, *Fungal Biology*, pp. 227-237.
49. **Maftah, Abderrahman et Raymond, Julien**. *Biologie moléculaire*. 2éme. Liège : DUNOD, 2000.
50. **Pörtner, Ralf**. *Animal Cell Biotechnology Methods and Protocols*. London : Springer, 2014.
51. *Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells*. **Wurm, Florian M.** 2004, *Nature Biotechnology*, pp. 1393–1398.
52. *Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins*. **Ikonomou, L, Schneider, Y J et Aghathos, S N**. 1, 2003, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 62, pp. 1-20.
53. **E. G. Berger, H. Clausen et R. D. Cummings**. *Glycotechnology*. Boston, MA : Springer US, 1999. pp. 29-43.

54. **Kaba, Stephen A., et al., et al.** Baculovirus surface display of Theileria parva p67 antigen preserves the conformation of sporozoite-neutralizing epitopes. *Protein Engineering*. 2003, pp. 73-78.
55. **Tami, C, et al., et al.** Presentation of antigenic sites from. 2000.
56. **Fernandez, Joseph et Hoeffler, James.** *Gene Expression Systems* . s.l. : ELSEVIER, 1998.
57. **Sijmons, P.C et al.** Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Bio/Technology*. 1990, pp. 217–221.
58. **Gomord, V et Faye, L.** Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. 2004, pp. 171–181.
59. **Drossard, J, et al., et al.** Production of engineered antibodies in tobacco plants and cell suspension cultures. In *Antibody Engineering, New Technology, Application and Commercialization. IBC's 8th annual international conference on antibody engineering*. 1997. Vol. 2.
60. **Fischer, R, Liao, Y.C et Drossard, J.** Affinity-purification of a TMV-specific recombinant full-size antibody from a transgenic tobacco suspension culture. *Immunol Methods*. 1999, pp. 1–10.
61. **Kwon, T H et al.** Expression and secretion of the heterodimeric protein interleukin-12 in plant cell suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.* 2003, pp. 870–875.
62. **Browne, S M et Al-Rubeai, M.** Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *Trends Biotechnol.* 2007, Vol. 25, pp. 425–432 .
63. **Hammill, L, Welles, J et Carson, G R.** The gel microdrop secretion assay: Identification of a low productivity subpopulation arising during the production of human antibody in CHO cells. *Cytotechnology*. 2000, Vol. 34, pp. 27-37.
64. **Underwood, P A et Bean, P.** dilution method of cloning hybridomas. *Immunol. Methods*. 1988, Vol. 107, pp. 119–128.
65. *Stability of Protein Production From Recombinant Mammalian Cells.* **Barnes, Louise M, Bentley, Catherine et Dickson, Alan J.** 6, s.l. : Wiley Periodicals, 20 Mars 2003, BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, Vol. 81, pp. 631-639.
66. **OMS.** Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the. *Organisation mondiale de santé*. [En ligne]
https://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf.
67. **Jenkins, Nigel.** *Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols*. Totowa, NJ : Humana Press Inc, 1999. pp. 99-115.
68. **García-Fruitós, Elena.** *Insoluble Proteins: Methods and Protocols*. New York, NY : Springer New York, 2015. pp. 1-24.
69. **Dougan, Stewart.** The Product is the Process – The Master Cell Bank 2. [En ligne] [Citation : 20 02 2019.] <https://caribbeanbiopharma.com/the-process-is-the-product-the-master-cell-bank-2>.

70. **Molecular Diagnostic Services, Inc.** Master and Working Cell Banks. [En ligne] [Citation : 20 02 2019.] <http://www.mds-usa.com/cellbanking.html>.
71. *Mutation Detection in an Antibody-Producing Chinese Hamster Ovary Cell Line by Targeted RNA Sequencing.* **Siyan, Zhang, et al., et al.** 2016, BioMed Research International, pp. 1-8.
72. **Lebkowski, JS et DuBridg RB, Antell EA, Greisen KS.** Transfected DNA is mutated in monkey, mouse, and human cells. *Mol Cell Biol.* 1984, Vol. 4, pp. 1951–1960.
73. **Miller, JH, et al., et al.** Specificity of mutations induced in transfected DNA by mammalian cells. 1984, Vol. 3, pp. 3117–3121.
74. **Lewis, N E, et al., et al.** Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetus griseus* draft genome. *Nat Biotechnol.* 2013, Vol. 31, pp. 759–765.
75. **Harris, R J, et al., et al.** Assessing genetic heterogeneity in production cell lines: detection by peptide mapping of a low level Tyr to Gln sequence variant in a recombinant antibody. *Biotechnology.* 1993, Vol. 11, pp. 1293–1297.
76. **Dorai, H, et al., et al.** Investigation of product microheterogeneity: a case study in rapid detection of mutation in mammalian production cell lines. *Bioprocess Int.* 2007, Vol. 5, p. 66.
77. *Identifying Low-Level Sequence Variants via Next Generation Sequencing to Aid Stable CHO Cell Line Screening.* **Zhang, Sheng, et al., et al.** 4, s.l. : Wiley Online Library , 2015, Biotechnology Progress, Vol. 31, pp. 1077-1085.
78. **Frank, Delvigne.** Cycle de cours donnés à l'université de Constantine (Algérie). Constantine, université de Constantine, Algérie : s.n., 2010-2011.
79. **Wright, Benjamin, et al., et al.** A Novel Seed-Train Process: Using High-Density Cell Banking, a Disposable Bioreactor, and Perfusion Technologies. *Bioprocess international.* [En ligne] [Citation : 05 février 2019.] <http://www.bioprocessintl.com/upstream-processing/upstream-single-use-technologies/novel-seed-train-process-using-high-density-cell-banking-disposable-bioreactor-perfusion-technologies>.
80. DIFFERENTIATE BETWEEN PLANT, ANIMAL AND MICROBIAL BIOREACTOR. *dokumen.tips.* [En ligne] [Citation : 06 03 2019.] <https://dokumen.tips/documents/differentiate-between-plant-animal-and-microbial-bioreactor.html>.
81. **Jared, J, et al., et al.** *Biologic and Systemic Agents in Dermatology.* [éd.] Paul S. Yamauchi. 1. s.l. : Springer, 2018. p. 104.
82. **Hermans, L, Gosselle, F et Biot, A.** *Biotechnologie des antibiotiques.* Paris : Masson, 1989. pp. 339-381.
83. **garg, Manisha.** Fermentor (Bioreactor): History, Design and Its Construction. *biology discussion.* [En ligne] [Citation : 06 03 2019.] <http://www.biologydiscussion.com/industrial-microbiology-2/fermentor-bioreactor-history-design-and-its-construction/55756>.

84. **Ajith, Kumar.** Different Types of Fermentors / Bioreactors . *Bio-resource* . [En ligne] 2012. [Citation : 06 03 2019.] <http://technologyinscience.blogspot.com/2012/08/different-types-of-fermentors.html>.
85. Airlift Bioreactors - an overview . *ScienceDirect Topics*. [En ligne] 2016. [Citation : 06 03 2019.] <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/airlift-bioreactors>.
86. **SITTIG, W et FAUST, U.** *Chemical Engineering*. s.l. : Google Books, 1982. pp. 230-232.
87. **Bohmann, A, Pörtner, R et Märkl, H.** *Applied-Microbiology and biotechnology*. 1995. pp. 772-780.
88. Fermentation en continu-discontinu, dite de type fed-batch. *Techniques de l'Ingénieur*. [En ligne] [Citation : 07 Mars 2019.] <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/archives-th12/archives-bioprocédés-tiabi/archive-1/fermentations-j6002/fermentation-en-continu-discontinu-dite-de-type-fed-batch-j6002niv10004.html>.
89. **Compton, B et Jensen, J.** Use of perfusion technology on the rise- New modes are beginning to gain ground on Fed-Batch strategy. *Genetic Engineering & Biotechnology News* . 2007, p. 48.
90. collection and purification process of Recombinant proteins. *cours de biotechnologie*. 18 mai 2018.
91. **Roque, Lowe, C R et Taipa, M A.** . Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification. *Biotechnol Prog*. 2004;20(3):639–654. 2004, pp. 639–654.
92. **Rosa, et al., et al.** Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing. *Trends in Biotechnology*. 2009, pp. 240-247.
93. **Saraswat, M, Musante, L et Shortt, B.** Preparative purification of recombinant proteins. *current status and future trends*. 2013, 1-18.
94. Introduction to Affinity Chromatography | LSR | Bio-Rad. *Bio-Rad*. [En ligne] [Citation : 26 Février 2019.] <http://www.bio-rad.com/en-us/applications-technologies/introduction-affinity-chromatography?ID=MWHAVG4VY>.
95. **Pekka, I.** Purification of recombinant proteins.
96. **Walker, John M et Gingold.** *Molecular biology and biotechnology*. [éd.] Royal Society of Chemistry. 5 e édition . s.l. : RSC publishing, 1993.
97. **Korneyeva, Marina et Rosenthal, Scott.** *Virus Removal by Nanofiltration*. 2005.
98. **Shokri i, M et Zerfat, M.** A Review on the Applications of Nanofiltration in Virus Removal and Pharmaceutical Industries. 2018, p. 02.
99. **Lowe, D., et al., et al.** Aggregation, stability, and formulation of human antibody therapeutics. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. 2011, pp. 41-61.
100. **says, Nan Hsuan.** Excipient selection in biologics and vaccines formulation development. *European Pharmaceutical Review*. 14 F2VRIER 2014.

101. **Warne, Nicholas W.** Development of high concentration protein biopharmaceuticals: the use of platform approaches in formulation development. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* Jun 2011, pp. 208-212.
102. **Boe, J F, Carrie, A et al.** Analysis of impurities in biological active substances: a case study of monoclonal antibodies. *STP pharma pratiques.* 2014.
103. **Aurélie, Laura.** Production, controle qualité et réglementation des médicaments biosimilaires. *mémoire de fin d'étude.* 2014.
104. **EMA.** European Public Assessment Report (EPAR): Ilumetri (Tildrakizumab). [En ligne] July 2018. www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/ilumetri-epar-public-assessment-report_en.pdf.
105. —. European Public Assessment Report (EPAR): Bavencio (Avelumab). [En ligne] Juillet 2017. www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/bavencio-epar-public-assessment-report_en.pdf.
106. *Authorized manufacturing changes for therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) in European Public Assessment Report (EPAR) documents.* **Vezér B, et al., et al.** 5, s.l. : T&F Senior Editor, 2016, Current Medical Research and Opinion, Vol. 32, pp. 829-834. 0300-7995.
107. *Consistency of quality attributes for the glycosylated monoclonal antibody Humira® (adalimumab).* **PW, Tebbey, et al., et al.** 5, s.l. : mABs, 2015, Vol. 7, pp. 805-811.
108. **Lee, J F, Litten, J B et Grampp, G.** Comparability and biosimilarity: considerations for the healthcare provider. juin 2012, p. 28(6).
109. *Comparability is not just analytical equivalence.* **Lubiniecki, Anthony S. et Federici, M. Marcia.** 2006, Biologicals, pp. 45-47.
110. **FDA.** Comparability Protocols for Human Drugs and Biologics: Chemistry, Manufacturing, and Controls Information. *Food & Drugs Administration.* [En ligne] DRAFT GUIDANCE, Avril 2016. [Citation : 21 05 2019.] www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM496611.pdf.
111. **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.
112. *The Challenge of CMC Regulatory Compliance for biopharmaceuticals.* 3. Switzerland : Springer, 2019. pp. 381-412.
113. **FDA.** Demonstration of Comparability of Human Biological Products, Including Therapeutic Biotechnology-derived Products. *Food & Drugs Administration.* [En ligne] Avril 1996. [Citation : 21 05 2019.] <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/demonstration-comparability-human-biological-products-including-therapeutic-biotechnology-derived>.

114. **EMA.** Guideline on the Requirements for Quality Documentation Concerning Biological Investigational Medicinal Products in Clinical. *European Medicinal Agency*. [En ligne] Septembre 2018. [Citation : 21 05 2019.] www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-requirements-quality-documentation-concerning-biological-investigational-medicinal_en-0.pdf.
115. FDA Guidance For Industry, Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a reference Product. Février 2012.
116. **EMA.** EMA Guideline on the Requirements for Quality Documentation Concerning Biological Investigational Medicinal Products in Clinical Trials. *European Medicinal Agency*. [En ligne] September 2018. www.ema.europa.eu/.
117. **FDA.** Changes to an Approved Application for Specified Biotechnology and Specified Synthetic Biological Products. *Food & Drug Administration*. [En ligne] July 1997.
118. **OMS.** Directives de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) sur les procédures et les exigences en matière de données pour les modifications de produits biothérapeutiques approuvés. [En ligne] Octobre 2017.
119. EMA Human Medicines European Public Assessment Report (EPAR): Abseamed (Epoetin Alfa). septembre 2007.
120. European Medicines Agency, GUIDELINE ON COMPARABILITY OF BIOTECHNOLOGY-DERIVED MEDICINAL . 19 juillet 2007.
121. EMA Draft Guideline on Comparability of Biotechnology-Derived Medicinal Products After a Change in the Manufacturing Process – Non-Clinical. Janvier 2007.
122. FDA Guidance For Industry: IND Meetings For Human Drugs and Biologics – Chemistry, Manufacturing, and Controls Information . Mai 2001.
123. FDA Endocrinologic and Metabolic Drugs Advisory Committee Briefing Package: Genzyme Corporation-Alglucosidase Alfa . Septembre 2008.
124. FDA BLA Market Approval of Krystexxa (Pegloticase): Approval History, Letters, Reviews and Related Documents . 21 Novembre 2006.
125. FDA BLA Market Approval of Krystexxa (Pegloticase): Approval History. 31 juillet 2009.
126. FDA Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products For Human Use . Février 1997.
127. FDA Demonstration of Comparability of Human Biological Products, Including Therapeutic Biotechnology-Derived Products. Avril 1996.
128. **EMA.** Ligne directrice sur la comparabilité de médicaments dérivés de biotechnologie après un changement de procédé de fabrication . 2007.
129. International Conference On Harmonisation (ICH). *ICH Harmonised Tripartite Guideline. Choice Of Control Group And Related Issues In Clinical Trials E10* . [En ligne] 20 juillet 2000.

130. **FDA.** FDA (Draft) Guidance for Industry: Formal Meeting Between the FDA and Sponsors or Applicants of PDUFA Products. [En ligne] December 2017.

Résumé

Les médicaments biologiques présentent une grande complexité structurale et fonctionnelle, ils sont produits par des cellules vivantes (bactéries, levures, cellules mammifère...) au moyen d'un processus de fabrication mutli-étapes extrêmement complexe, commençant par une culture cellulaire dans des conditions strictement contrôlées pour aboutir à l'expression de la protéine thérapeutique désirée, cette dernière est par la suite hautement purifiée puis conserver dans la forme galénique la plus appropriée. Dans le monde des médicaments biologiques c'est le processus de fabrication qui définit le médicament, les autorités réglementaires internationales recommandent de tenir compte du rapport risque-bénéfice lors de la mise en œuvre d'un changement dans le processus de fabrication et de procéder à un exercice de comparabilité produit biologique avant et après le changement pour confirmer que les deux sont hautement similaires ou comparables. D'abord le fabricant doit évaluer le risque selon le type de changement de processus, en suite éliminer progressivement le risque résiduel en allant de la comparabilité analytique aux études non cliniques et cliniques tous cela en tenant compte de la phase de développement clinique.

Abstract

Biological drugs have a great structural and functional complexity, they are produced by living cells (bacteria, yeasts, mammalian cells ...) by means of an extremely complex mutli-step manufacturing process, starting with a cell culture under strict conditions. controlled to achieve the expression of the desired therapeutic protein, the latter is subsequently highly purified and then keep in the most appropriate galenic form. In the world of biologics it is the manufacturing process that defines the drug, international regulatory authorities recommend taking into account the risk-benefit ratio when implementing a change in the manufacturing process and proceeding to a biologic product comparability exercise before and after the change to confirm that both are highly similar or comparable. First, the manufacturer must evaluate the risk according to the type of process change, and then gradually eliminate the residual risk by going from analytical comparability to non-clinical and clinical studies all this taking into account the clinical development phase.

ملخص

تتميز العقاقير البيولوجية بتعقيد هيكلي ووظيفي كبير ، حيث يتم إنتاجها بواسطة الخلايا الحية (البكتيريا والخمائر وخلايا الثدييات ...) عن طريق عملية تصنيع متبادلة معقدة للغاية ، بدءًا من تضاعف الخلية في ظل ظروف صارمة. يتم التحكم

بها لتحقيق التعبير عن البروتين العلاجي المرغوب فيه ، ويتم تنقيته بشكل كبير لاحقاً ثم الاحتفاظ به في الشكل الأنسب. في عالم البيولوجيا ، فإن عملية التصنيع هي التي تحدد الدواء ، وتوصي السلطات التنظيمية الدولية بتقييم نسبة لمخاطرة/فائدة عند تنفيذ تغيير في عملية التصنيع والانتقال إلى ممارسة مقارنة المنتجات البيولوجية قبل وبعد التغيير للتأكد من أن كليهما متشابهان للغاية أو قابلان للمقارنة. أولاً ، يجب على الشركة المصنعة تقييم المخاطر وفقاً لنوع التغيير، ثم التلخص تدريجياً من الخطر المتبقي من خلال الانتقال من المقارنة التحليلية إلى الدراسات غير السريرية والسريرية ، كل هذا مع مراعاة مرحلة التطوير السريري للدواء البيولوجي.