



**République Algérienne Démocratique et  
Populaire**

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT  
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE**



**UNIVERSITE SAAD DAHLEB - BLIDA 1 –**

**FACULTE DE MEDECINE**

**DEPARTEMENT DE PHARMACIE**

**Mémoire de fin d'études**

**En vue de l'obtention du Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie**

**Thème :**

**QUALITÉ DES MÉDICAMENTS  
BIOTECHNOLOGIQUES : CAS DES BIOSIMILAIRES**

**Réalisé par :**

- Mlle FERRI NADJET
- Mlle ALI AGHA NOUR EL HOUDA
- Mlle HADJ IDRIS SILIA

**Encadré par :**

**DR. AZZOUZ L**

**Jury :**

- Présidente : DR. BELAIDI F maître assistante en chimie analytique
- Examineur : DR ARIES S maître assistant en chimie minérale

**Session : juillet 2023**



## **Remerciements**

En tout premier lieu, on tient à remercier DIEU, le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce travail.

Nos remerciements à notre promotrice DR. L. AZZOUZ pour nous avoir encadré.

On tient à exprimer toute notre reconnaissance à nos membres de jury DR. BELAIDI F et DR ARIES.S d'avoir accepté de juger ce travail.

On tient également à remercier toutes les personnes qui nous ont aidé lors de la rédaction de ce mémoire.



## Dédicaces

Je dédie ce Mémoire :

À mes très chers parents en témoignage de l'amour, du respect et de ma profonde et éternelle gratitude que je leurs porte et ma reconnaissance pour leur soutien et leur encouragement qu'ils m'ont prodigues tout au long de ma vie.

À mon frère : YEKHLEF

À mes sœurs spécialement AMINA et MILOUDA pour leur encouragement et leur aide illimité tout au long de mes études, Que dieu vous préserve longue vie et prospérité.

À mon futur mari FLIZI MOHAMMED pour son support et encouragement

tout au long de mes études.

À ma famille paternelle et maternelle

À ma promotrice : Dr. AZZOUZ.L

À mes collègues : SILIA et NOUR ELHOUDA

A tous mes amis : AMINA, KHADIDJA et IKRAM....

A tous ceux qui pense à moi et que je n'ai pas mentionné.

NADJET FERRI

Je dédie ce modeste travail

À mes très chères parents «OUKACI NORA» et «HADJ IDRIS BRAHIM»

qui ont été toujours à mes côtés et m'ont toujours soutenu . Qu'ils trouvent ici, l'expression de ma profonde gratitude pour tous leurs sacrifices et patience.

À mes frères NASSIM ,KARIM et FAROUK

À ma très chère «NESRINE» pour son encouragement et son soutien tout au long de mes études

À toute ma famille et mes amis

À mes collègues NADJET et HOUDA

HADJ IDRIS SILIA

J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail ;

À ma très chère mère, qui me donne toujours l'espoir de vivre et qui n'a jamais cessé de prier pour moi  
À mon très chère père, pour ses encouragements, son soutien, surtout pour son amour et son sacrifice afin  
que rien n'entrave le déroulement de mes études

À mes chères frère Walid et Abd EL-Malek

À ma chère sœur AYA

À mon grand père et ma tante puisse dieu le tout puissant les avoir en sa sainte miséricorde.

À toute la famille ALI AGHA et La famille Derabla

À ma promotrice DR Azzouz.L

À mes chères Amies

À tout qui m'aide et compulse ce modeste travail

Enfin je remercie beaucoup mes collègue de cette travaille Nadjet et Silia qui a contribué à la réalisation de  
ce modeste travail

NOUR EL-HOUDA ALI AGHA

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**ANSM**: Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé.

**ATNC** : Agents transmissibles Non Conventionnels

**AMM** : Autorisation de Mise sur le Marché

**ACM** : Anticorps Monoclonaux

**AUC** : Aire Sous la Courbe.

**CQ**: Contrôle de la Qualité

**CMB** : Concentration Minimale Bactéricide

**CTD**: Common Thechnical Document.

**CDR**: Complementarity Determining Regions.

**EMA**: Européen Medicines Agency-Agence européenne des Médicaments.

**EST** : Encéphalopathie Spongiforme Transmissible

**EU**: États-Unis.

**EOP**: End of Production.

**EGF**: Epidermal Growth Factor.

**FAO** : Organisation des Nations –Unies pour l’Alimentation et l’Agriculture

**FDA**: Food and Drug Administration- agence americaine des médicaments  
Et des produits alimentaires

**FSH** : Hormone de Stimulation Folliculaire

**HPLC**: Chromatographie Liquide Haute Performance.

**HGPRT** : Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transférase

**ICH** : International Council for Harmonisation of Technical Requirements for  
Pharmaceuticals for Human Use- Conseil international d’harmonisation des exigences  
techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain.

**LH** : Hormone Lutéinisante

**MCB** : Master Cell Bank

**MCID** : Minimally Clinically Important Différence.

**NK** : Natural Killer.

**CMB** : Concentration Minimale Bactéricide

**OCDE**: Organisation de Coopération et de Développement Économiques.

**OGM**: Organismes Génétiquement Modifiés.

**OMS**: Organisation Mondiale de la Santé–**WHO**: World Health Organisation.

**PA**: Principe Actif.

**PD**: Pharmacodynamique.

**PK**: Pharmacocinétique.

**QSE**: Qualité, Sécurité, Efficacité.

**TSH**: Thyroïde Stimulating Hormone – Thyréostimuline Hormone

**TK**: Thymidine Kinase.

**UE**: Union Européenne

**UI**: Unité Internationale.

**USP**: Pharmacopée Américaine ou the United States Pharmacopea

**USFD&C**: United States Food, Drug, and Cosmetic Act.

**WCB**: Working Cell Bank

## LISTE DES FIGURES

Figure 1	Frise chronologique sur le développement des produits biologiques et des biosimilaires .....	3
Figure 2	Les cinq couleurs de biotechnologie .....	5
Figure 3	Poids moléculaires de différentes molécules chimiques et biologiques exprimés en Dalton .	15
Figure 4	Structure moléculaire des protéines .....	16
Figure 5	Place des guidelines ICH dans le procédé de fabrication. ....	19
Figure 6	Étapes de production une protéine thérapeutique (exemple de vaccin) .....	26
Figure 7	Constitution des banques cellulaires .....	31
Figure 8	les étapes de récupération des molécules d'intérêt. ....	32
Figure 9	Hétérogénéité du mélange produit .....	36
Figure 10	Principales étapes de l'exercice de comparabilité .....	48
Figure 11	Procédure de démonstration de la comparabilité/similarité .....	49
Figure 12	Schéma de courbe AUC (AIRE SOUS LA COURBE) .....	53
Figure 13	Résumé des caractéristiques d'un essai d'équivalence .....	54
Figure 14	Résumé des caractéristiques d'un essai de non-infériorité .....	55
Figure 15	Anticorps monoclonaux .....	56
Figure 16	Structure d'une immunoglobuline .....	57
Figure 17	Les fonctions de l'anticorps. ....	59
Figure 18	Différentes types d'anticorps .....	60
Figure 19	Obtention des anticorps monoclonaux murins d'après biochimie humaine, .....	63

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Principaux médicaments biologiques autorisés dans l'UE* .....	8
Tableau 2 Caractéristiques spécifiques des médicaments bio-similaires .....	10
Tableau 3 Liste des médicaments bio-similaires commercialisées en Algérie (1 SEPTEMBRE 2021)12	
Tableau 4 Comparaison du développement et des caractéristiques des médicaments génériques .....	13
Tableau 5 Choix du système hôte pour la production d'une protéine recombinante. ....	28
Tableau 6 Lignées cellulaires les plus utilisées .....	29
Tableau 7 Principaux paramètres à évaluer pour la caractérisation des produits biologiques .....	43
Tableau 8 les principaux contrôles à effectuer pour la libération de la substance active biologique et du produit fini. ....	44
Tableau 9 Approches de similarité selon le guide EMA .....	49
Tableau 10 Résumé des analyses qualitatives nécessaires pour démontrer la similarité d'un biomédicament .....	50
Tableau 11 Résumé des analyses nécessaires pour démontrer la similarité préclinique d'un biomédicament .....	51
Tableau 12 Résumé des analyses nécessaires pour démontrer la similarité clinique d'un biomédicament .....	51
Tableau 13 : Caractéristiques structurales et fonctionnelles principales des différentes classes d'anticorps. ....	58
Tableau 14 Anticorps et protéine de fusion-Fc approuvés par l'EMA (références et biosimilaires, classement alphabétique). ....	61
Tableau 15 Études comparatives de la qualité analytique (propriétés physico-chimiques) et fonctionnelles (activité biologique / pharmacologique): anticorps de références et biosimilaires .	68

## **GLOSSAIRE :**

### **Bioéquivalence**

On parle de bioéquivalence pharmaceutique « lorsque deux médicaments contiennent la même quantité de la même substance active dans la même forme pharmaceutique galénique et un degré de dissolution identique s'il s'agit de comprimés. (1)

### **Bras parallèles**

L'essai en deux groupes parallèles, l'archétype de l'essai thérapeutique. Le traitement étudié est comparé à un traitement contrôle (placebo ou traitement actif) à l'aide de deux groupes de patients constitués par randomisation de façon contemporaine et suivis en parallèle.(2)

### **Complexe immun**

Complexe macromoléculaire formé par la combinaison de molécules d'anticorps et d'antigènes unis de façon spécifique. (Les immuns-complexes peuvent provoquer des réactions inflammatoires sévères. Ils pourraient être à l'origine de nombreuses maladies encore inexplicables [maladie sérique, certaines glomérulonéphrites aiguës, etc.].) (3)

### **Double aveugle**

La technique de l'essai en double aveugle est souvent utilisée pour éviter que la personne malade, le médecin et le personnel soignant ne soient influencés par une opinion a priori qu'ils pourraient avoir vis-à-vis de tel ou tel médicament.(4)

### **Epitope**

En biologie, partie de la molécule d'un antigène qui a la propriété de se combiner avec l'anticorps spécifique correspondant (5)

### **Éssai croisé ou cross over**

Il s'agit du plan expérimental d'un essai clinique comparatif, sont des essais dit intra-individuels. Dans ce type d'essai, les 2 traitements A et B (ou un traitement et un placebo) comparés sont administrés (tous les 2) à tous les sujets dans un ordre tiré au sort (c'est l'ordre d'administration qui est tiré au sort) : (A puis B) ou (B puis A).(6)

### **Études pharmacocinétiques**

Études portant sur la manière dont un médicament est transformé par l'organisme, y compris son absorption, sa diffusion, sa biotransformation et son excrétion.(7)

### **Études pharmacodynamiques**

Études portant sur les effets biochimiques et physiologiques d'un médicament dans l'organisme, y compris son mode d'action.(8)

### **Médicament de référence**

Encore appelé « princeps », le médicament de référence est la version d'origine d'un médicament. Il est protégé par un brevet, généralement pendant 20 ans. Après l'expiration de ce brevet, des médicaments génériques peuvent être mis sur le marché.(9)

### **Paratope**

Partie variable d'un anticorps ou d'un récepteur membranaire des lymphocytes B (BCR) et lymphocytes T (TCR), pour déterminer si elle appartient au domaine du soi ou au domaine du non-soi.(5)

### **Système du complément**

Est un ensemble d'une vingtaine de protéines plasmatiques. Ce système agit par une cascade d'activation pour former, au final le complexe d'attaque membranaire (CAM) qui permettra au complément d'avoir une action cytolytique sur la cellule cible.(10)

# TABLE DES MATIÈRES

Liste des figures .....	III
Liste des tableaux .....	IV
Glossaire : .....	V
Table des matières .....	VII
Introduction .....	1
CHAPITRE I : BIOSIMILAIRES : Produits issus de la biotechnologie .....	2
1. NOTION DE LA BIOTECHNOLOGIE .....	2
1.1. Historique .....	2
1.2. Définition de la biotechnologie .....	4
1.3. Catégories de la biotechnologie .....	5
2. MÉDICAMENTS BIOLOGIQUES .....	6
2.1 Définition .....	6
2.2 Classification des médicaments biologiques .....	7
3. Médicaments Bio-similaires .....	9
3.1 Définition .....	9
3.2 Caractérisation des bio-similaires .....	10
3.3 Aspect économique des bio-similaires en Algérie .....	11
3.4 Pourquoi les médicaments bio-similaires ne sont pas considérés comme des médicaments génériques ? .....	13
4. Complexité des médicaments biotechnologiques .....	15
CHAPITRE II : Exigences réglementaires des biosimilaires .....	18
1. Conseil international sur l'harmonisation (ICH) .....	18
2. Réglementation au sein de l'Union Européenne .....	22
2.1 Guidelines de Agence Européenne du Médicament (EMA) .....	22
2.2 Pharmacopée Européenne (Ph.Eur) .....	22
<b>QUALITÉ DES MÉDICAMENTS BIOTECHNOLOGIQUES : CAS DES BIOSIMILAIRES</b> .....	<b>VII</b>

2.3 Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM)	23
3. Réglementation en dehors de l'Union Européenne	23
3.1 Organisation Mondiale de la Santé «OMS»	23
3.2 United States Food, Drug, and Administration (US FDA)	24
4. Enregistrement des biosimilaires	24
5. Autorisation de mise sur le marché (AMM)	25
5.1 Définition	25
5.2 Autorisation de mise sur le marché (AMM) des médicaments Bio-similaires	25
CHAPITRE III : Procédé de fabrication des biomédicaments	26
1. Développement d'une lignée cellulaire	27
1.1 cellule recombinante	27
1.2 Cellule Hôte :	27
1.3 Sélection de la cellule hôte	30
2. Constitution des banques cellulaires	31
3. Récupération des molécules d'intérêt	32
3.1 Expansion cellulaire (Upstream Processing)	32
3.2 Récolte de la protéine	33
3.3 Purification de la biomolécule (Downstream Processing)	34
3.4 Mise en forme pharmaceutique	35
CHAPITRE IV : Étude de la qualité des médicaments biotechnologiques	36
1. Considérations analytiques	37
1.1 substances de référence	37
1.2 Validation des méthodes analytiques	37
2. Contrôle des matières premières utilisées à la fabrication	38
2.1 Vecteur d'expression	38
2.2 Cellule hôte	38
2.3 Banque cellulaire	38

2.4 Recherche des Impuretés et contaminants .....	40
3. Contrôle du procédé de fabrication .....	40
3.1 Contrôle en ligne (ou in situ).....	40
3.2 Contrôle hors-ligne .....	41
4. Contrôle qualité de la substance active et du produit fini .....	41
4.1 Caractérisation .....	41
4.1.1 Propriétés physico-chimiques .....	41
4.1.2 Activité biologique .....	41
4.1.3 Propriétés immuno-chimiques .....	42
4.1.4 Pureté, impuretés et contaminant .....	42
4.1.5 Quantité .....	43
4.2 Contrôle de routine .....	44
5. Études de Stabilité .....	45
5.1 Planification des études de stabilité .....	46
5.2 Tests de stabilité .....	46
CHAPITRE V : Études de Comparabilité des biosimilaires .....	48
1. Comparabilité au niveau de la qualité .....	50
2. Comparabilité Pré Clinique .....	51
3. Comparabilité Clinique .....	51
3.1 Études cliniques PK/PD .....	52
3.2 Études cliniques d'efficacité .....	53
Chapitre VI : Les Anticorps monoclonaux- biosimilaires .....	56
1. Définition des anticorps monoclonaux .....	56
2. Structure d'une immunoglobuline .....	56
3. Fonctions biologiques des immunoglobulines .....	59
4. Type d'anticorps monoclonaux .....	60
5. Liste des Anticorps monoclonaux princeps et biosimilaires .....	60

6. Production des anticorps monoclonaux .....	63
6.1 Dispositions generales .....	64
6.2 Cellule source .....	64
6.3 Lignee cellulaire productrice de l'anticorps monoclonal .....	65
6.4 Banques de cellules .....	65
6.5 Culture cellulaire et recolte des anticorps .....	66
6.6 Purification des recoltes .....	66
6.7 Substance active .....	67
6.8 Vrac final .....	67
6.9 Lot final .....	67
7. Étude de comparabilité des anticorps monoclonaux biosimilaires .....	68
8. Contrôle de routine .....	70
8.1 Identification .....	71
8.2 Essais .....	71
8.3 Dosage .....	72
Conclusion .....	73
Références bibliographiques .....	74
Annexes .....	79

## INTRODUCTION

La biotechnologie moderne a permis de développer de nombreuses thérapies innovantes utilisées dans le traitement de pathologies lourdes et chroniques comme le cancer, la sclérose en plaques ou la polyarthrite rhumatoïde.

Aujourd'hui, les médicaments issus de la biotechnologie occupent une part importante du marché global des médicaments. Ils sont à l'origine d'un chiffre d'affaires conséquent et attractif.

Avec les chutes de nombreux brevets de bio-médicaments innovants (médicaments biologiques) dans le domaine public, des versions non innovantes appelées bio-similaires ont été développées.

Ces derniers sont définis comme des produits similaires, mais pas identiques, à un médicament biologique de référence déjà approuvé par les autorités, dont le brevet de protection a expiré.

Les bio-similaires, de par leur nature intrinsèque, la complexité de leur production, de leurs contrôles de qualité particulier et de leur évaluation réglementaire, ne peuvent pas être considérés comme des génériques des bio médicaments de référence.

Vue l'importance de ces produits issus de la biotechnologie au niveau sanitaire et économique, notre travail traité dans son côté théorique comprend : dans un premier temps une présentation des médicaments biologiques et bio similaires avec leur contexte réglementaire,

Ensuite, une description de leur procédé de fabrication ainsi leur contrôle qualité seront évoqués afin de comprendre les enjeux auxquels devront faire face les industriels.

Enfin, un exemple d'étude « Anticorps monoclonaux » sera traité. Le choix de cette molécule a été fait en raison de prouver son fort taux de développement et sa qualité car ces AC monoclonaux portent beaucoup d'espoirs dans le traitement de nombreuses pathologies lourdes, pour lesquelles les thérapeutiques conventionnelles ont montré leurs limites, grâce à leur approche originale de «thérapeutiques ciblées».

# CHAPITRE I : BIOSIMILAIRES : PRODUITS ISSUS DE LA BIOTECHNOLOGIE

## 1. NOTION DE LA BIOTECHNOLOGIE

### 1. 1. Historique

La biotechnologie est un effort multidisciplinaire mis en place par l'humanité depuis plus de 5000 ans. Avec les débuts de la culture des plantes, de l'élevage des animaux, de l'élaboration de la bière ou de vin et de la production de fromage, c'était l'application des principes de la biotechnologie au sens large que l'on mettait en place.

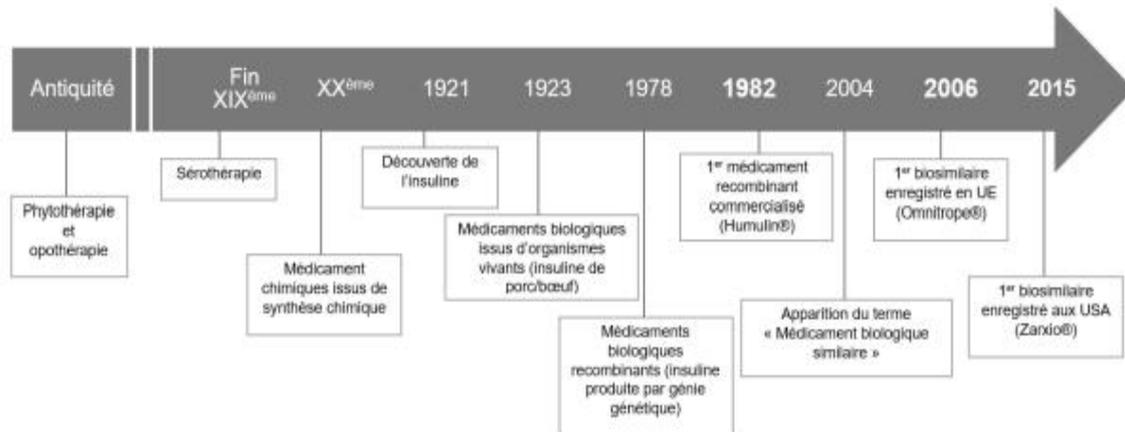
En 1919, Karl Ereky, un ingénieur Hongrois, a inventé le terme biotechnologie pour décrire l'interaction entre la biologie et la technologie humaine(11). Il avait entrevu une nouvelle technologie fondée sur l'utilisation de la biologie pour convertir des matières premières en produits utiles à la société. Certains historiens de la science diront que les origines de la biotechnologie remontent à 4000-8000 ans au sumérien, cultures égyptienne et chinoise. La fermentation est un processus biologique de base ancestral par lequel un organisme vivant, une levure, réagira avec les glucides, comme le blé, dans un récipient pour produire de l'alcool. Ce produit sumérien était la bière. Cette biotechnologie de base (fermentation) était également utilisée aussi pour la préparation du pain et du fromage, des aliments de base, et plus tardivement du vin au cours des millénaires.

La biotechnologie moderne est née dans les années 1970 en Caroline du Nord-Etats Unis et est devenue depuis une industrie à l'échelle mondiale. Amgen, fondée en 1980, a été l'une des Premières sociétés à concrétiser les promesses de cette nouvelle discipline en apportant aux patients des médicaments issus de la biotechnologie.

De nos jours, les secteurs de l'industrie de la biotechnologie sont la santé (ex. biomédicaments, matériel médical, tests diagnostiques), l'agriculture (ex. organismes génétiquement modifiés), l'industrie et l'environnement (ex. biocarburants, biomatériaux).

La biotechnologie dans le domaine médicale sert essentiellement à la fabrication de principes actifs servant à lutter contre des maladies graves.-

La figure 1 ci –dessous présente une frise chronologique regroupant les étapes majeures dans le développement historique des produits biologiques et biosimilaires.



**Figure 1 Frise chronologique sur le développement des produits biologiques et des biosimilaires**

En 1978, les laboratoires Eli Lilly mettent au point la première insuline humaine recombinante, produite par génie génétique grâce à deux chercheurs américains, Stanley Cohen et Herbert Boyer. Ils créent une version recombinante du gène humain de l'insuline et l'introduisent dans le plasmide d'une bactérie Escherichia Coli qui produira ensuite cette protéine. Elle sera disponible en 1982 sous le nom d'Humulin. Il s'agira du premier médicament biologique commercialisé aux États-Unis (EU). (12)

Durant les années suivantes, plusieurs autres médicaments biologiques issus du génie génétique arrivent sur le marché : hormone de croissance, vaccin, interféron alfa, thrombolytique... (13)

En 2004, la notion de « médicament biologique similaire » apparaît en Union Européenne (UE) à travers la directive 2001/83/CE, amendée par les directives 2003/63/CE et 2004/27/CE. Le 12 avril 2006 est enregistré le premier biosimilaire par l'European Medicines Agency (EMA). Il s'agit de la somatropine, une hormone de croissance commercialisée sous le nom d'Omnitrope par le laboratoire Sandoz, qui est un biosimilaire de Genotropin de Pfizer. (12)

Aux EU ,en 2015, Zarxio de Sandoz (filgrastim) biosimilaire de Neupogen du laboratoire Amgen est le premier médicament enregistré aux EU .

Le décalage par rapport au marché européen est dû à une réglementation qui a mis plus de temps à se mettre en place aux EU.

En 2019, l'UE comptabilisait 58 approbations de biosimilaires par l'EMA contre 20 biosimilaires par la FDA aux EU. (14)

## 1.2. Définition de la biotechnologie

En 1913, C'est l'ingénieur hongrois Károly EREKY qui inventa le mot « biotechnologie », Il est composé de « bio » du grec *bios*, vie, et de « technologie » qui désigne les études des outils et des techniques (du grec *techno*, art manuel). Les biotechnologies correspondent donc aux techniques qui utilisent le vivant.

Selon la littérature, la biotechnologie est définie comme une " Technique produisant par manipulation génétique des molécules biologiques ou des organismes transgéniques en vue d'application industrielles (agroalimentaire, pharmacie, chimie .....etc.) ". (15)

Plusieurs organismes ont défini la biotechnologie, notamment :

- Organisation (OCDE) : la biotechnologie est "l'application de la science et de la technologie à des organismes vivants , de même qu'à ses composantes , produits et modélisations , pour modifier des matériaux vivants ou non-vivants aux fins de la production de connaissances ,de biens et de services " (16)

-Organisation des Nations-Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) celle-ci a donné deux définitions complémentaires :

« La biotechnologie implique la manipulation, sur des bases scientifiques, d'organismes, vivants, particulièrement à l'échelle génétique, afin de produire des nouveaux produits tels que les hormones, les vaccins, les anticorps monoclonaux, etc. ». (17)

« En termes généraux, la biotechnologie est l'utilisation de procédés biologiques visant l'obtention de produits utiles, qui incluent des organismes modifiés, des substances et des appareils ». (18)

- Selon l'article 2 de la Convention des Nations Unies sur la diversité biologique de Rio 1992, la biotechnologie est définie comme : «toute application technologique utilisant des systèmes biologiques, organismes vivants, ou leurs dérivés, pour fabriquer ou modifier des produits ou des procédés spécifiques »  
Ainsi, " On appelle biotechnologie les procédés biologiques produisant des substances bénéfiques à l'agriculture, à l'industrie, à la médecine et à l'environnement " (19)

### 1.3. Catégories de la biotechnologie

Vue l'importance de la biotechnologie qui est une myriade de domaine de recherche intéressants, des industriels et certains laboratoires ont proposé de catégoriser la biotechnologie selon l'âge d'un part et selon les couleurs de l'arc-en-ciel d'autre part :

#### - Biotechnologie selon l'âge

Les biotechnologies peuvent être subdivisées en deux types :

**Biotechnologie classiques** (non moléculaires) : Ces biotechnologies, apparues dans les années soixante, englobent un grand nombre d'investigations réalisées au laboratoire, c'est le cas de transfert de caractères par des croisements dirigés ou la multiplication de génotypes par culture des tissus.

**Biotechnologies modernes** : Ces biotechnologies, apparues dans les années soixante-dix, sont basées sur la technologie du DNA recombiné, Elles sont derrière la révolution génétique. (20)

#### - Biotechnologies par les couleurs

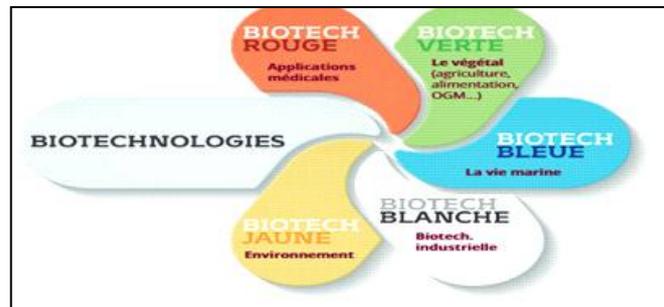


Figure 2 Les cinq couleurs de biotechnologie

**Biotechnologie verte** : elle recouvre tous les procédés biotechnologiques du secteur agricole.

Les Plantes transgéniques et l'OGM, les antioxydants, la culture fruitière, les levures et les bactéries transgéniques, les biréacteurs (systèmes qui maintien un milieu biologiquement vivant) ou les agents insecticides, sont quelques exemples des nombreux domaines englobant la biotechnologie verte. (21)

**Biotechnologie bleue** : est la biotechnologie relative à la mer et aux océans, à l'exploration et à l'exploitation des organismes marins.

Les additifs et les colorants pour l'alimentation, les compléments alimentaires, les cosmétiques et les crèmes rajeunissantes en sont quelques applications.

**Biotechnologie blanche** : est liée au secteur industriel. Les procédés catalysés par des enzymes pour augmenter la rapidité de l'obtention de produits constituent la biotechnologie blanche.

À titre d'exemple : le traitement aux enzymes xylanases pour prévenir la formation de dérivés toxiques dans la lignine pour la fabrication du papier. (21)

**Biotechnologie rouge** : elle rassemble toutes les utilisations de la biotechnologie liées à la médecine.

Elle comprend la production de vaccins et d'antibiotiques, le développement de nouveaux médicaments, les techniques de diagnostic moléculaire, les thérapies de régénération et le développement du génie génétique pour guérir les maladies par la manipulation génétique. (21)

**Biotechnologie jaune** : Il s'agit d'utiliser les avancées biotechnologiques et microbiologiques afin de protéger et assainir l'environnement.

À titre d'exemple l'élaboration d'aliments modifiés par augmentation des apports caloriques et supplément de vitamines dans les pays en voie de développement, pour combattre, de manière rapide et efficace, la malnutrition infantile. (21)

## 2. MÉDICAMENTS BIOLOGIQUES

Les médicaments de provenance biologique proviennent d'organismes vivants ou de leurs cellules, d'où apparaît la notion de "bio-médicament" qui est un produit biotechnologique, pharmaceutiquement actif et synthétisé par une source biologique (cellule vivante) ou extraite d'elle, et non obtenue par la chimie de synthèse. (22)

### 2.1 Définition

Selon la FDA, un bio-médicament est : « un produit biopharmaceutique également connu sous le nom de produits biologique est un produit pharmaceutique fabriqué, extrait ou semi-synthétisé à partir des sources biologiques. Différent des produits pharmaceutiques totalement synthétisés, ils peuvent être composés des sucres, de protéines ou d'acides nucléiques ou d'une combinaison de ces substances. Ils peuvent également être des entités vivantes, telles que des cellules et des tissus» (23)

Le Code de la Santé Publique de la France définit par l'article L.5121-1 les médicaments biologiques ou bio-médicaments comme “tout médicament dont la substance active est produite à partir d’une source biologique ou en est extraite et dont la caractérisation et la détermination de la qualité nécessitent une combinaison d’essais physiques, chimiques et biologiques ainsi que la connaissance de son procédé de fabrication et de son contrôle”(24)

## 2.2 Classification des médicaments biologiques

Les médicaments biologiques peuvent également être :

- **Hormones** : parmi les hormones produites, il y a :
  - ❖ Hormone de croissance : Somatotropine
  - ❖ Hormone de la stérilité féminine : la FSH et la LH recombinante
  - ❖ Hormone thyroïdienne : La TSH (thyroïdienne hormone)
  - ❖ Hormone hypoglycémisante : l’Insuline.
  
- **Anticorps monoclonaux** : cette classe est utilisée dans :
  - ❖ Traitement du cancer, de la polyarthrite rhumatoïde, du psoriasis.
  - ❖ Cas du rejet de transplantation.
  
- **Cytokine biosynthétiques et médicaments agissant sur les Cytokines** :
  - ❖ Interleukine-2 humaine recombinante : est une interleukine, un type de cytokine du système immunitaire ,qui contribue à la réponse naturelle du corps à une infection microbienne (en stimulant la prolifération lymphocytaire ).
  - ❖ Interférons recombinants : utilisés dans le cas de sclérose en plaque, et le traitement des hépatites
  - ❖ Erythropoïétine: utilisés dans le traitement de l’anémie de l’insuffisance rénale chronique
  
- **Enzymes**

.Ciclosporine et Tacrolimus : ce sont des immunosuppresseurs

- ❖ Utilisés principalement dans le domaine de l'hématologie ex : Streptokinase, altérase

- **Bio-médicaments de la coagulation**

- ❖ Facteur de la coagulation obtenu par génie génétique ex : traitement de l'hémophilie

- **Vaccins Recombinants**

- ❖ Ils font partie des premiers bio-médicaments par ex. : NUVAXOVID ; JCOVDEN COVID-19 VACCINE JANSSEN(25)

Le tableau suivant représente les principaux médicaments biologiques autorisés dans l'UE et USA.

Tableau 1 Principaux médicaments biologiques autorisés dans l'UE\* (26)

Nom commercial	Substance active	Ligand(c)	Aire thérapeutique	Date d'expiration des brevets(a)(b)
Aranesp	Darbépoétine alfa	EPO r	OH	2016
Avastin	Bevacizumab	VEGF	OH	2022
Blinicyto	Blinatumoma b	CD3/19	OH	2026
Cam path/Lemtrada	Alemtuzumab	CD 52	OH, N	2021
Darzalex	Daratumumab	CD 38	OH	2026
Enbrel	Etanercept	TNF $\alpha$	R, D	2015
Eprex	Époétine alfa	EPO r	OH	2004
Erbix	Cetuximab	EGFR	OH	2014
Gazyvaro	Obinutuzuma b	CD 20	OH	2024
Herceptin	Trastuzumab	HER2	OH	2014
Humira	Adalimumab	TNF $\alpha$	R, G, D	2018
Keytruda	Pembrolizuma b	PD-1	OH	2028

Lucentis	Ranibizumab	VEGF	O	2022
Mabthera	Rituximab	CD 20	OH, R	2013
Neulasta	Pegfilgrastim	G CSF r	OH	2017
Opdivo	Nivolumab	PD-1	OH	2026
Perjeta	Pertuzumab	HER2	OH	2023
Prolia/Xgeva	Denozumab	RANKL	R, OH	2022
Remicade	Infliximab	TNF $\alpha$	R, G, D	2015
RoActemra	Tocilizumab	IL-6R	R	2017
Simponi	Golimumab	TNF $\alpha$	R	2024
Soliris	Eculizumab	C5	OH	2020
Synagis	Palivizumab	VRS	I	2015
Tecentriq	atezolizumab	PDL-1	O	2027
Tysabri	Natalizumab	4-intégrine	N	2015
Vectibix	Panitumumab	EGFR	OH	2018
Xolair	Omalizumab	IgE	P	2017
Yervoy	Ipilimumab	CTLA 4	OH	2021

R : Rhumatologie

D : Dermatologie

N : Neurologie

I :

Infectiologie

G : Gastroentérologie

O/H : Oncologie /Hématologie

: Pneumologie

O :Ophtalmologie

### 3. médicaments Bio-similaires

#### 3.1 Définition

Selon l'agence ANSM « un médicament bio-similaire 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. Les médicaments biologiques ou bio-médicaments, sont obtenus par un procédé biotechnologique qui implique une source biologique (protéines, cellules...). »(26)

Selon l'article L.5121-115° du code de la santé publique de la France: « Un médicament bio-similaire est un médicament biologique de même composition qualitative et quantitative en substance active et de même forme pharmaceutique qu'un médicament biologique de référence mais qui ne remplit pas les conditions pour être regardé comme une spécialité générique en raison de différences liées notamment à la variabilité de la matière première ou aux procédés de fabrication et nécessitant que soient produites des données précliniques et cliniques supplémentaires dans des conditions déterminées par voie réglementaire». (27)

Donc, Un médicament bio-similaire est mis au point de manière à ce qu'il soit hautement similaire à un médicament biologique de référence déjà commercialisé.

### 3.2 Caractérisation des bio-similaires

Les médicaments bio-similaires étant eux-mêmes des médicaments biologiques, ils en partagent toutes les caractéristiques.

Compte tenu de la variabilité naturelle de la source biologique et du procédé de fabrication propre à chaque fabricant, de légères différences peuvent apparaître entre le médicament bio-similaire et son médicament de référence (tableau 2). Des contrôles stricts sont toujours en place pendant la fabrication pour veiller à ce que ces légères différences n'influencent pas le mode d'action du médicament ou sa sécurité. (28)

Ces différences ne sont donc pas cliniquement significatives en ce qui concerne la sécurité et l'efficacité.

Tableau 2 Caractéristiques spécifiques des médicaments bio-similaires(28)

<b>Forte similarité avec le médicament de référence</b>	Le médicament bio-similaire est. doté de propriétés physiques, chimiques et biologiques très semblables à celles du médicament de référence. Il peut y avoir de légères différences par rapport au médicament de référence qui ne sont pas cliniquement significatives en ce qui concerne la sécurité ou l'efficacité.
<b>Aucune différence significative au niveau clinique par rapport au médicament de</b>	Aucune différence ne doit affecter la performance clinique. Les études cliniques fournies en vue de l'approbation d'un médicament biosimilaire confirment que les éventuelles différences n'auront pas d'effet sur la sécurité ni l'efficacité.

<b>référence</b>	
<b>Variabilité du médicament biosimilaire dans des limites strictes</b>	<p>Une légère variabilité n'est permise que lorsqu'il est établi scientifiquement qu'elle n'influence pas la sécurité ni l'efficacité du médicament biosimilaire.</p> <p>La marge de variabilité autorisée pour un médicament biosimilaire est la même que celle autorisée entre les lots du médicament de référence. Le respect de cette marge est assuré par un procédé de fabrication solide permettant de garantir que tous les lots du médicament présentent la qualité requise.</p>
<b>Mêmes normes strictes de qualité, de sécurité et d'efficacité</b>	<p>Les médicaments biosimilaires sont approuvés selon les mêmes normes strictes de qualité, de sécurité et d'efficacité que celles qui s'appliquent à tous les autres médicaments.</p>

L'augmentation de la commercialisation des bio-similaires s'explique par les pressions exercées par les organismes de santé dans les pays développés pour réaliser des économies et maîtriser les dépenses de santé. En effet, le coût d'un médicament biologique est bien supérieur à celui des médicaments issus de la synthèse chimique et représente des dépenses importantes pour les organismes de santé.

Le prix de vente d'un bio-similaire est en moyenne de 20 à 30% moins cher que le prix du médicament biologique de référence ce qui permettrait donc de réaliser des économies.

Par ailleurs, cette ouverture à la concurrence permet de stimuler la performance, exemple concret le cas de Toujeo® de Sanofi, nouvelle insuline glargine développée pour faire face à la concurrence a montré une réduction significative des épisodes d'hypoglycémie diurne et nocturne, comparativement à Lantus ®(29).

Les bio-similaires représentent également la possibilité d'accéder plus aisément à des thérapies excessivement coûteuses pour les pays en développement où les patients ne bénéficient pas forcément d'une couverture sociale et doivent payer eux-mêmes leurs traitements.

### 3.3 Aspect économique des bio-similaires en Algérie

Le travail réalisé par le comité économique intersectoriel des prix ,placé auprès de l'Agence Nationale des Produits Pharmaceutique, pour prioriser certains médicaments à l'enregistrement va permettre de générer une économie prévisionnelle de 50 millions de dollars sur des molécules biosimilaires et génériques fabriquées localement qui étaient importées auparavant

De plus 27 bio similaires ayant obtenu l'approbation de la FDA et l'EMA , ont été enregistrés par procédure accélérée en 2021. Ces biosimilaires, auparavant importés par un seul opérateur économique, introduits dans l'appel d'offre de la PCH vont permettre de réaliser une baisse prévisionnelle à l'enregistrement de 100 millions de dollars de la facture d'importation.(30)

Tableau 3 Liste des médicaments bio-similaires commercialisées en Algérie (1 SEPTEMBRE 2021)

Substance active	Médicament de référence	Bio-similaire
<b>Erythropoïétine</b>		
Epoétine	Eprex	BINOCRIT
		RETACRIT
<b>Anti-TNF Alfa</b>		
Infiximab	REMICADEE	FLIXABI
		INFLECTRA
		REMSIMA
Etanercept	ENBREL	BENEPALI
		ERELZI
		NEPEXTO
Adalimumab	HUMIRA	AMGEVITA
		HOLIO
		HYRIMOZ
		IDACIO
		IMRALDI
<b>Facteur de croissance leucocytaire</b>		

Filgrastim	NEUPOGEN	ACCOFIL
		NIVESTIM
		TEVAGRASTIM
		ZARZIO
Pegfilgrastim	NEULASTA	CEGFILA
		FULPHILA
		NYVEPRIA
		PELGRAZ
		PELMEG
		ZIEXTENZO
<b>Insuline</b>		
Insuline glargine	LANTUS	ABASAGLAR
Insuline Asparte	NOVORAPID	INSULINE ASPARTE SANOFI

### 3.4 Pourquoi les médicaments bio-similaires ne sont pas considérés comme des médicaments génériques ?

Un médicament bio-Similaire n'est pas considéré comme un générique d'un médicament biologique.

Cette distinction est principalement due au fait que la variabilité naturelle et la fabrication plus complexe des médicaments biologiques ne permettent pas une réplique exacte de la micro-hétérogénéité moléculaire.

Par conséquent, un plus grand nombre d'études sont nécessaires pour l'approbation réglementaire des médicaments bio-similaires que pour les médicaments génériques afin de garantir que les petites différences n'influencent ni la sécurité ni l'efficacité. Le Tableau 4 compare le développement et les caractéristiques des médicaments génériques et des médicaments bio-similaires. **(28)**

Tableau 4 Comparaison du développement et des caractéristiques des médicaments génériques des médicaments bio-similaires

Médicament générique	Médicament biosimilaire
Généralement produit par synthèse chimique	Obtenu à partir d'une source biologique

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
Principalement des petites molécules, plus faciles à caractériser	En général, molécules plus grandes, à la structure plus complexe, qui requièrent des technologies multiples pour leur caractérisation

<b>Médicament générique</b>	<b>Médicament biosimilaire</b>
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

<p>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</p>	<p>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</p>
---	---

#### 4. Complexité des médicaments biotechnologiques

Contrairement aux médicaments classiques qui sont pour la plupart des petites molécules (31), synthétisées chimiquement avec une structure bien définie et caractérisée, la plupart des produits biopharmaceutiques présentent un poids moléculaire élevé avec des formes complexes qui ne sont pas facilement caractérisées (Figure 3).

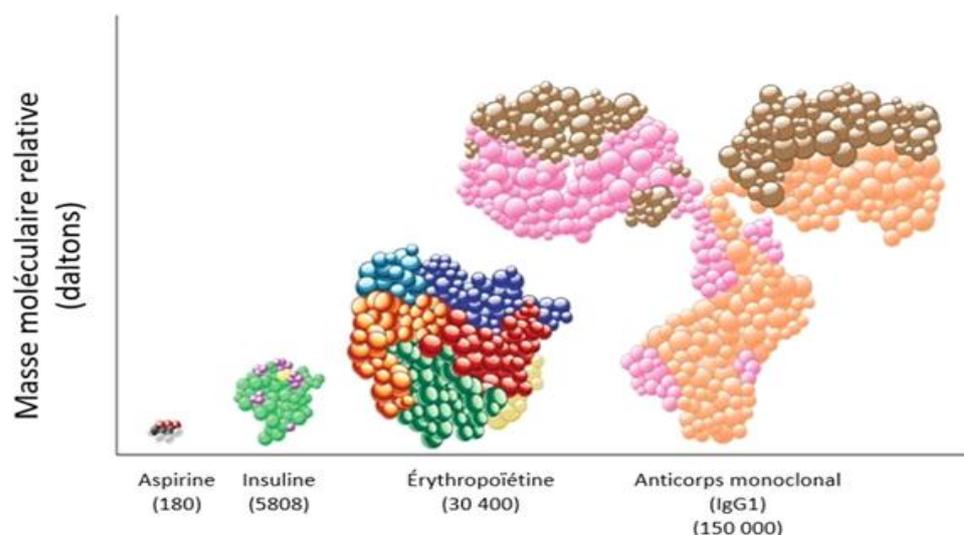


Figure 3 Poids moléculaires de différentes molécules chimiques et biologiques exprimés en Dalton (31)

Les protéines sont constituées d'une séquence primaire (séquence d'acides aminés), secondaire (des motifs structuraux sous la forme d'une hélice alpha et d'un feuillet bêta) et d'une structure tertiaire (la forme globale d'une protéine).

Elles présentent parfois une structure qu'on appelle quaternaire, c'est-à-dire que plusieurs chaînes polypeptidiques (sous-unités) forment un complexe protéique (par exemple, l'hémoglobine).

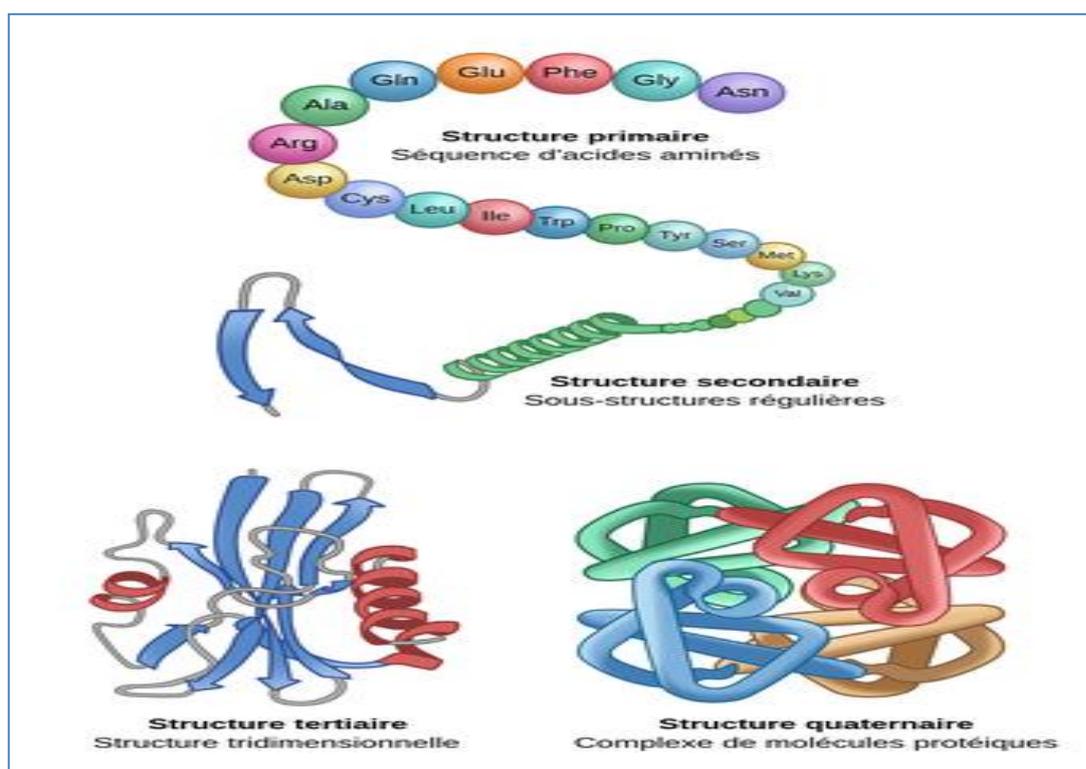


Figure 4 Structure moléculaire des protéines (32)

Les produits biologiques peuvent être modifiés de manière imprévisible par le processus de fabrication, ce qui peut entraîner une modification dans l'activité biologique ou l'induction d'une immunogénicité du fait de leur présence.

Ils ont tendance à être sensibles à des facteurs environnementaux tels que les changements de température, le cisaillement et l'oxydation. Par conséquent, ils sont moins stables et se dégradent plus facilement que les médicaments chimiques(32).

Ils sont également sensibles à tout type de contamination comme les virus, les bactéries, les endotoxines bactériennes, les champignons, les levures et les mycoplasmes dont la présence dépend de la lignée cellulaire et des matières premières utilisées au cours du procédé de fabrication. Par conséquent, il est nécessaire de mettre en place des contrôles et d'utiliser des procédés qui maîtrisent ces contaminations lors des étapes de fabrication.

Un autre point biotechnologique, il doit être prouvé que les cellules utilisées permettent de synthétiser un produit qui est sûr pour le patient. Ceci doit être assuré en générant une banque cellulaire de fin de production (EOP ou End of Production) dans le but de tester la stabilité génétique et la sécurité virale et microbienne.

## CHAPITRE II : EXIGENCES RÉGIMENTAIRES DES BIOSIMILAIRES

La nature, la variabilité ainsi que la complexité de la fabrication et du CQ des médicaments bio-similaires issue de la biotechnologie impliquent une mise en place d'une réglementation spécifique distincte de celle des médicaments classiques et plus poussée, cela afin d'encadrer l'enregistrement et garantir la mise sur le marché de produits de qualité, de sécurité et d'efficacité(QSE) démontrés.

### **1. Conseil international sur l'harmonisation (ICH)**

Le conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain(ICH) a pour objectif d'harmoniser l'interprétation et l'application de directives techniques régissant l'évaluation de médicaments à usage humain comme base de l'autorisation de mise sur le marché des médicaments, afin de minimiser les doublons lors du développement et de l'autorisation. (33)

L'ICH a publié 7 lignes directrices concernant le CQ des produits issus de la biotechnologie (Figure 5) :

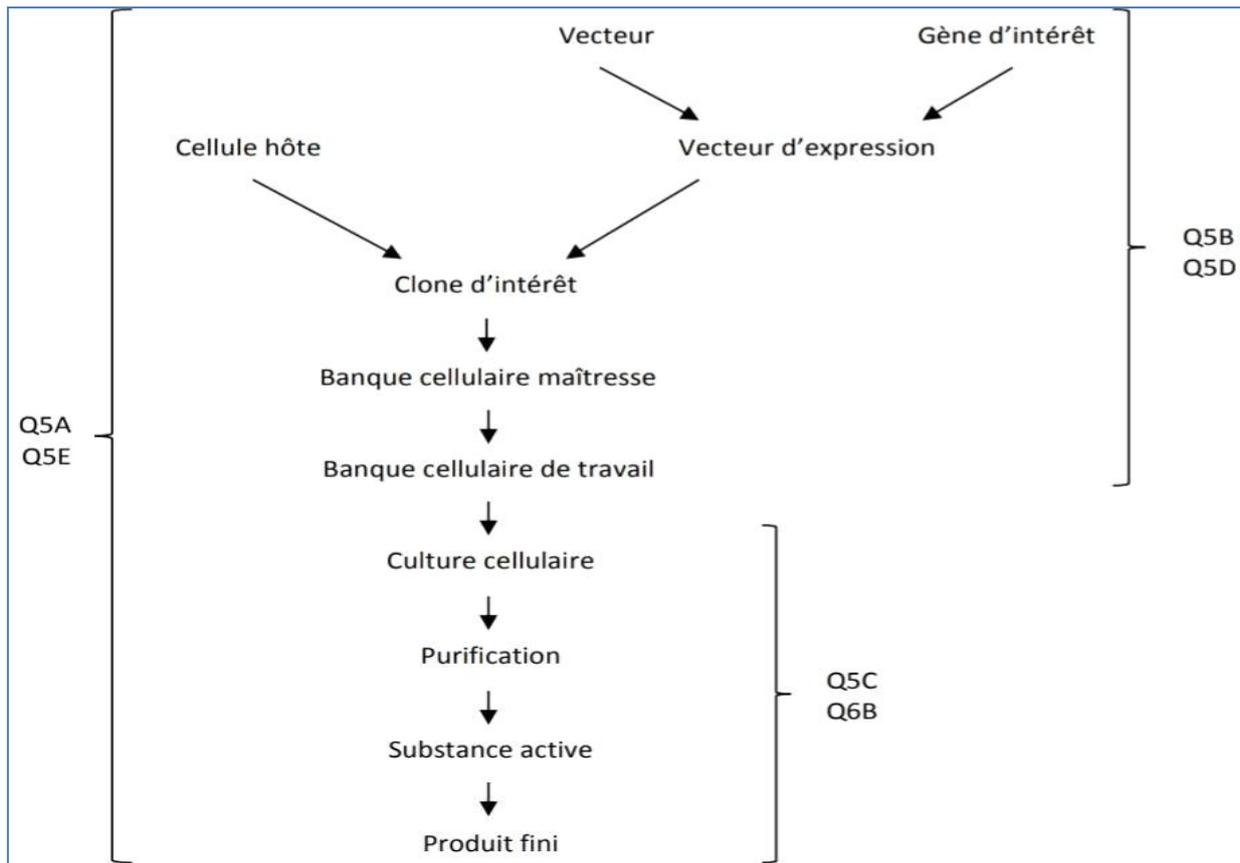


Figure 5 Place des guidelines ICH dans le procédé de fabrication. (34)

- ❖ **Q5A(R1) Évaluation de la sécurité virale des produits biotechnologiques dérivés des lignées cellulaires d'origine humaine ou animale :**
- ❖ Cette guideline fournit des recommandations pour l'évaluation du risque de contamination virale des produits biotechnologiques et pour l'élimination des virus de ces produits. Elle décrit également les données à fournir lors de la demande d'AMM. **(31)**
- ❖ ***Q5B Analyse de la construction d'expression dans les cellules utilisées pour la production de produits protéiques dérivés de l'ADN recombinant***
- ❖ Cette guideline énonce des recommandations concernant la caractérisation de la construction d'expression utilisée pour la production de protéines recombinantes dans des cellules procaryotes et eucaryotes. Le but de l'analyse de la construction d'expression est de vérifier que la séquence codante d'intérêt a été intégrée dans le vecteur d'expression et qu'elle est maintenue dans la cellule hôte tout au long de la production. **(32)**

- ❖ ***Q5C - Études de stabilité des produits biotechnologiques/biologiques***
- ❖ Les produits biologiques contiennent des substances actives comme les protéines dont le maintien de la conformation moléculaire est essentiel à l'activité biologique. Ces produits sont particulièrement sensibles aux facteurs environnementaux tels que la température, l'oxydation, la lumière ou le cisaillement. Afin d'assurer le maintien de l'activité biologique et d'éviter la dégradation du produit, des conditions de stockage rigoureuses sont donc
- ❖ Nécessaires. Le but de la guideline ICH Q5C est de donner des indications sur les études de stabilité à fournir lors du dépôt de la demande d'AMM. (34)
- ❖ ***Q5D– Dérivation et caractérisation des substrats cellulaires utilisés pour la production des produits biotechnologiques/biologiques***
- ❖ Cette guideline fournit des recommandations et des standards, à soumettre lors de la demande d'AMM, concernant la création des lignées cellulaires humaines, animales et bactériennes, ainsi que la préparation et la caractérisation des banques cellulaires utilisées pour la production des bio-médicaments. (35)
- ❖ ***Q5E –Comparabilité des produits biotechnologiques/biologiques sous réserve de modifications dans leur procédé de fabrication***
- ❖ L'objectif de cette guideline est de fournir des principes pour évaluer la comparabilité des bio-médicaments avant et après des changements effectués dans le procédé de fabrication. Elle apporte une aide pour le recueil d'informations pertinentes qui serviront à prouver que le changement n'a pas d'impact négatif en termes de qualité, de sécurité et d'efficacité du bio-médicament. (36)
- ❖ ***Q6B–Méthodes analytiques et critères d'acceptation pour les produits biotechnologiques/biologiques***
- ❖ Cette ligne directrice présente des principes généraux pour l'établissement et la justification d'un ensemble de spécifications internationales pour les produits issus des biotechnologies et les produits biologiques afin d'appuyer les nouvelles demandes d'AMM. (37)

❖ *S6(R1) –Évaluation préclinique de la sécurité des produits pharmaceutiques issus de la biotechnologie*

Cette ligne directrice a établi un cadre de base pour l'évaluation préclinique de l'innocuité des produits pharmaceutiques issus des biotechnologies. Elle aborde des thèmes comme la sélection des espèces, la conception des études, l'immunogénicité, la toxicité pour la reproduction et le développement ainsi que le potentiel carcinogène.

(38)

## 2. Réglementation au sein de l'Union Européenne

### 2.1 Guidelines de Agence Européenne du Médicament (EMA)

C'est en octobre 2005 que prend effet la première guideline concernant les bio-similaires en Europe intitulée "**Similar biological medicinal products**". L'objectif de cette guideline est d'introduire le concept de médicament biologique similaire et de définir les principes généraux à appliquer pour l'enregistrement de ces médicaments.

Elle est suivie ensuite en 2006 par des guidelines portant sur la qualité et les données non cliniques et cliniques des bio-similaires

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

En 2008, entre en application la guideline "**Immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins**" pour fixer des recommandations générales à appliquer pour la réalisation de l'évaluation de l'immunogénicité des bio-similaires en vue de l'obtention de l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). (39)

Concernant L'interchangeabilité est un acte médical qui consiste à remplacer un médicament biologique par un autre qui lui est similaire, dans le même objectif thérapeutique. L'Agence européenne du médicament et les chefs d'agence européens, dans une déclaration récente ont confirmé que tous les médicaments bio-similaires d'un même médicament de référence, autorisés par l'Union européenne, étaient interchangeables. Cette position harmonisée est commune à l'ensemble des pays de l'Union européenne.

### 2.2 Pharmacopée Européenne (Ph.Eur)

De nos jours, les produits biologiques sont également préparés à l'échelle industrielle et soumis à des critères de qualités comparables à ceux qui s'appliquent aux médicaments chimiques, donc ils font l'objet de monographies.

D'important travaux ont également été engagés sur les produits issus de la biotechnologie ; c'est ainsi qu'ont été publiées dès la 4<sup>ème</sup> édition de la PH. EUR ; c'est le cas de Filgrastim, une forme recombinante du facteur de croissance hématopoïétique spécifique de la lignée granulocytaire. (40)

Dernièrement En février 2022, 67 médicaments bio-similaires étaient autorisés dans l'Union européenne.

### **2.3 Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM)**

Le périmètre d'actions de l'ANSM couvre les différentes catégories de médicaments (princeps, génériques, bio-similaires, médicaments à base de plantes, homéopathie, etc.) disponibles sur le marché pour les adultes et pour la population pédiatrique.

Dans le développement d'un médicament, l'ANSM intervient dès la phase des essais cliniques. Elle délivre ensuite, au niveau national, une autorisation de mise sur le marché (AMM) en fonction de l'évaluation des bénéfices et des risques du médicament et poursuit son action en assurant ensuite la surveillance de sa sécurité d'emploi. (41)

ANSM précise que l'interchangeabilité entre un médicament biologique et un autre similaire peut intervenir à tout moment, à l'initiative du prescripteur, et en tenant compte de l'intérêt du patient

L'interchangeabilité doit respecter plusieurs conditions :

- Un patient traité par un médicament biologique doit être informé d'une possible interchangeabilité entre Deux médicaments biologiques (médicament de référence et/ou médicament biosimilaire) et donner son Accord
- Il doit recevoir une surveillance clinique appropriée lors du traitement.
- Une traçabilité sur les produits concernés doit être assurée (le produit prescrit doit être inscrit dans le dossier du patient).

## **3. Réglementation en dehors de l'Union Européenne**

### **3.1 Organisation Mondiale de la Santé «OMS»**

L'OMS a publié en 2009 une guideline sur les bio-similaires intitulée “**WHO Guidelines on Evaluation of Similar Biotherapeutic Products** ” afin de faciliter l'harmonisation mondiale de la réglementation des bio-similaires. L'approche de l'OMS est identique à celle de l'EMA. (42)

### **3.2 United States Food, Drug, and Administration (US FDA)**

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

### **3.3 pharmacopée Américaine ou The United States Pharmacopeia(USP)**

L'USP établit des normes pour les bio-médicaments utilisées par les organismes de réglementation et les fabricants pour aider à garantir que ces produits ont l'identité appropriée, ainsi que l'efficacité, la qualité et la sécurité.

Elle contient tout un chapitre concernant les produits issus de la biotechnologie intitulé "**<1045> Biotechnology-derived articles**", ainsi que des monographies spécifiques aux différents médicaments issus de la biotechnologie. (43)

## **4. Enregistrement des biosimilaires**

Une documentation et des données substantielles sont requises dans les demandes d'autorisation d'importation / de fabrication et de commercialisation de médicaments biosimilaires, ce qui entraîne des applications complexes et de grande envergure. Le CTD a été créé afin de surmonter ces obstacles et est devenu le format obligatoire pour les nouvelles demandes de médicaments au niveau international.

### **4.1 Common Technical Document (format CTD)**

#### **Définition**

Le CTD est un « format commun bien structuré » internationalement convenu pour l'organisation des exigences techniques devant être soumis à l'autorité de régulation en tant que demande d'enregistrement de produits pharmaceutiques à usage humain dans les trois régions de l'ICH (USA, Europe et Japon).

Le CTD est un format d'application et ensemble de spécifications pour un dossier d'enregistrement de médicaments ; il est organisé en cinq modules.

Le module 1 est spécifique à une région et les modules 2, 3, 4 et 5 sont destinés à être communs à toutes les régions. (38)

## **Intérêt de CTD**

-Fournir un format /modèle commun harmonisé pour la soumission des exigences techniques aux autorités de réglementation acceptable dans les trois régions de l'ICH

-Réduire le temps et les ressources utilisés pour compiler les demandes:

- ❖ Faciliter la préparation des soumissions électroniques. □
- ❖ Faciliter la soumission simultanée dans trois régions. □
- ❖ Faciliter l'échange d'informations réglementaires. □
- ❖ Disponibilité plus rapide de nouveaux médicaments. (38)

## **5. Autorisation de mise sur le marché (AMM)**

### **5.1 Définition**

Une AMM, ou autorisation de mise sur le marché, est une autorisation délivrée à

Un titulaire responsable de commercialisation d'une spécialité pharmaceutique après son évaluation.

### **5.2 Autorisation de mise sur le marché (AMM) des médicaments Bio-similaires**

Pour ces médicaments, l'AMM est délivrée sur la base d'une équivalence de résultats thérapeutiques et non

Pas uniquement sur la base de la bioéquivalence comme pour les

Génériques traditionnels.

La démonstration de la similarité nécessite donc de nouveaux essais précliniques et cliniques. (35)

L'organisation du dossier d'enregistrement d'un médicament bio-similaire est se compose de 5 modules :

- ❖ Module 1 : Partie administrative
- ❖ Module 2 : Résumés des modules 3, 4 et 5.
- ❖ Module 3 : Partie Qualité complète
- ❖ Module 4 : Partie Non-clinique
- ❖ Module 5 : Partie Clinique

## CHAPITRE III : PROCÉDÉ DE FABRICATION DES BIOMÉDICAMENTS

Les médicaments biotechnologiques fabriqués exclusivement à partir de cellules vivantes ont une structure complexe.

Une maîtrise parfaite de leur procédé de fabrication est cruciale pour obtenir des macromolécules protéiques stériles, suivant les critères de qualité requis, permettant d'obtenir des résultats thérapeutiques reproductibles et fiables pour les patients (figure6)

(44)

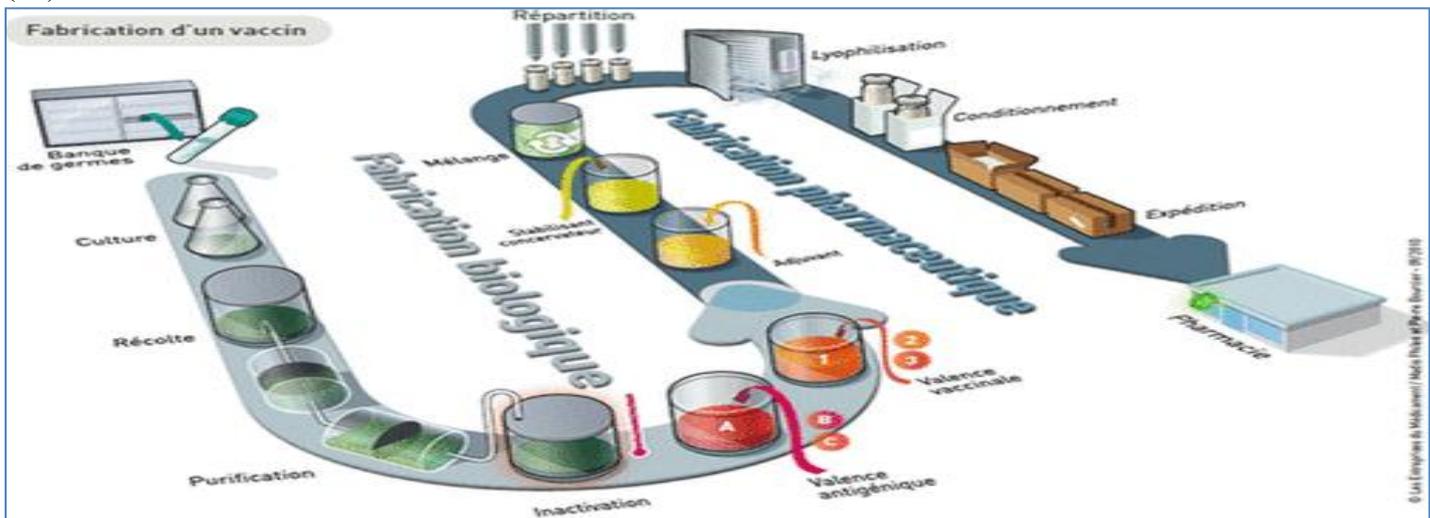


Figure 6 étape de production une protéine thérapeutique (exemple de vaccin)

Le processus de fabrication est résumé comme suit :

La séquence codante (ADN) de la protéine désirée à produire est insérée dans un vecteur d'expression qui sera transféré dans une cellule hôte, issue d'une lignée cellulaire définie.

Cette cellule hôte servira de base pour la production de banques cellulaires. Les cellules seront ensuite mises en culture dans des bioréacteurs de tailles croissantes pour accroître leur quantité avant d'être cultivée dans le bioréacteur final (jusqu'à 20m<sup>3</sup>) qui se finalisera par la récolte de la protéine désirée.

Cette première phase qui correspond à la culture cellulaire est également appelé phase « Upstream ». Elle est suivie de la phase « Downstream » qui consiste à purifier la protéine. Celle-ci est ensuite formulée et conditionnée. (45)

## **1. Développement d'une lignée cellulaire**

### **1.1 cellule recombinante**

Les médicaments biotechnologiques sont principalement fabriqués à partir de cellules animales en raison de leurs propriétés qui sont proches des cellules humaines et de leur machinerie qui permet la fabrication de protéines recombinantes dont la structure et la composition sont les plus proches de celles retrouvées chez les êtres humains.

Cependant, d'autres systèmes hôtes tels que les cellules d'insectes, les cellules végétales, les bactéries ou encore les levures sont utilisées en fonction des besoins requis.

### **1.2 Cellule Hôte :**

Il existe deux grandes familles de cellules hôtes : les procaryotes dont font parties les bactéries et les eucaryotes qui regroupent les levures, les cellules de mammifère, les cellules d'insecte et , les plantes et animaux transgéniques.

Le choix de l'hôte dépend avant tout de la nature de la protéine d'intérêt, de sa complexité puis le système possédant le meilleur rendement et le moindre coût sera retenu.

Si la protéine d'intérêt est complexe et nécessite des modifications post-traductionnelles pour son activité thérapeutique alors le choix se portera principalement sur des cellules de mammifères tandis que si la protéine a une structure simple, les bactéries seront préférentiellement utilisées pour leur simplicité et leur bon rendement.

Le Tableau 5 suivant résume les avantages et inconvénients des principaux organismes hôtes utilisés pour la production d'une protéine recombinante.

Tableau 5 Choix du système hôte pour la production d'une protéine recombinante(45).

<b>Organismes procaryote</b>			
<b>Hôte producteur</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>	<b>Exemples</b>
<b>Bactéries</b> ( <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacilles</i> ,...)	Génétique maîtrisée Possibilité de sécrétion Faible coût de production Haut rendement Simplicité des conditions de culture	Pas de modifications post-traductionnelles Production de protéines simples Production sous forme de corps d'inclusion	Insuline Somatostatine Hormone de Croissance
<b>Organismes eucaryotes</b>			
<b>Hôte producteur</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>	<b>Exemples</b>
<b>Levures/Champignons</b> ( <i>Saccharomyce cerevisiae</i> , <i>Pichiapastoris</i> , <i>Aspergillusniger</i> ...)	Génétique maîtrisée Faible coût de production Haut rendement Simplicité des conditions de culture Pas d'endotoxines Présence de modifications post-traductionnelles Simples	Glycoprotéines simples Glycosylation incorrecte Mauvaise sécrétion	Antigène de surface de l'hépatite Insuline GM-CSF Hirudine
<b>Cellules de mammifère (cellules d'ovaires d'hamster chinois, cellules de myélome murin, cellules humaines,...)</b>	Maturation proche de la protéine native Synthèse de protéines complexes	Culture cellulaire difficile Haut coût de production Cellules modifiées instables Faible rendement	Nombreux anticorps monoclonaux EPO TPA
<b>Cellules d'insecte</b> ( <i>Shootera frugiperda</i> ,...)	Rendement élevé Présence de modifications post-traductionnelles Culture cellulaire plus facile Virus non contaminant	Manque d'information sur certains mécanismes (glycosylation) Non utilisé à l'échelle Industrielle	Vaccins
<b>Animaux transgéniques</b>	Facilité de recueil des protéines (lait, urine,...) Synthèse de protéines complexes	Génération des individus producteur longue Haut coût de production Non utilisé à l'échelle Industrielle	Anticoagulants Hormone de croissance

<b>Plantes transgéniques</b>	Synthèse de protéines complexes Virus non contaminant Culture simple Faible coût de production	Contaminants de type pesticide,herbicide,... Non utilisé à l'échelle Industrielle	Avidine $\beta$ -glucuronidase Anticorpsmonoclonaux
------------------------------	---	--	---

Les lignées cellulaires qui sont actuellement utilisées sont des lignées continues, c'est-à-dire que les cellules ont une capacité illimitée de division. Il s'agit alors d'immortalisation.

**Cette caractéristique peut s'obtenir de différentes façons :**

- Spontanément à partir de cellules normales ayant échappées à la sénescence
- A partir de tissus tumoraux
- A partir de cellules normales par intervenir agents chimiques, physiques et expression d'oncogènes.

**L'avantage de ces cellules :**

- Elles sont plus productives.
- S'adaptent plus facilement à leur environnement.
- Sont moins fragiles en bioréacteur ce qui facilite leur utilisation lors des étapes de transfert industriel.

Les lignées cellulaires qui sont les plus utilisées sont répertoriées dans le tableau suivant:

Tableau 6 Lignées cellulaires les plus utilisées

<i>Cellule</i>	<i>Origine</i>	<i>Application courante</i>
<i>Vero</i>	Cellule épithélial du rein de singe vert	Vaccines viraux humains et Vétérinaires
<i>ST</i> <i>MDCK</i>	Cellule épithélial de testicules de porc Et de rein de chien	Vaccines viraux vétérinaires
<i>CHO</i>	Cellules d'ovaire d'hamster chinois	Protéines recombinants
<i>BHK</i>	Cellules de rein de bébé Hamster	Facteur VIII, vaccins viraux Et vétérinaires

<i>Sf9</i> <i>High-5</i>	Cellules d'insectes	Protéines recombinants
<i>HEK293</i>	Cellules épithéliales de rein humain Transformées	Adénovirus
<i>PER.C6</i>	Cellules de rétine humaine	Protéines recombinants
<i>NS0</i> <i>Sp 2/0</i>	Cellules de myeloma de souris	Protéines recombinants
<i>Hybridomes</i>	Cellules murines hybridées	Anticorps monoclonaux Utilisez pour le diagnostic

Dans le cadre de la production de protéines recombinantes, ce sont les cellules CHO qui sont les plus utilisées :

- celles-ci sont robustes.
- n'ont pas besoin de support pour proliférer.
- sont facile à transmettre.
- ont une plus grande résistance aux infections virales.
- génèrent des protéines de qualité avec des profils glycolyses quasi-humains
- possèdent des rendements de production pouvant aller jusqu'à 10g/L.

### 1.3 Sélection de la cellule hôte

Une fois la lignée cellulaire choisie, celle-ci sera modifiée génétiquement afin d'obtenir la protéine désirée. C'est la technique de l'ADN recombinant qui sera utilisée.

Dans un premier temps, un gène humain qui code pour la protéine désirée est inséré dans un plasmide ou encore appelé vecteur d'expression. Il est ensuite transféré dans une cellule hôte qui aura la capacité d'exprimer la dite protéine. Une opération de sélection est ensuite menée.

Les cellules ainsi que la protéine qui est synthétisée seront alors testées pour vérifier si celles-ci répondent aux critères de qualité requise pour une production à l'échelle industrielle. En fonction des résultats, un seul clone de ces cellules sera sélectionné afin de constituer des banques cellulaires qui permettront d'assurer la production du médicament biotechnologique durant toute sa durée de vie.

## 2. Constitution des banques cellulaires

Il existe deux types de banques cellulaires : la banque cellulaire primaire ou Master Cell Bank(MCB) et la banque cellulaire de travail ou Working Cell Bank(WCB)

La création des banques cellulaires commence d'abord avec celle de la Master cellbank (MCB). Le clone recombinant sélectionnés tout d'abord mis en culture afin d'accroître la quantité de cellules.

Les nouvelles cellules produites sont ensuite mises en culture dans des contenants différents puis l'ensemble est réuni dans un même et unique pool de cellules pour assurer l'uniformité du contenu de chaque contenant.

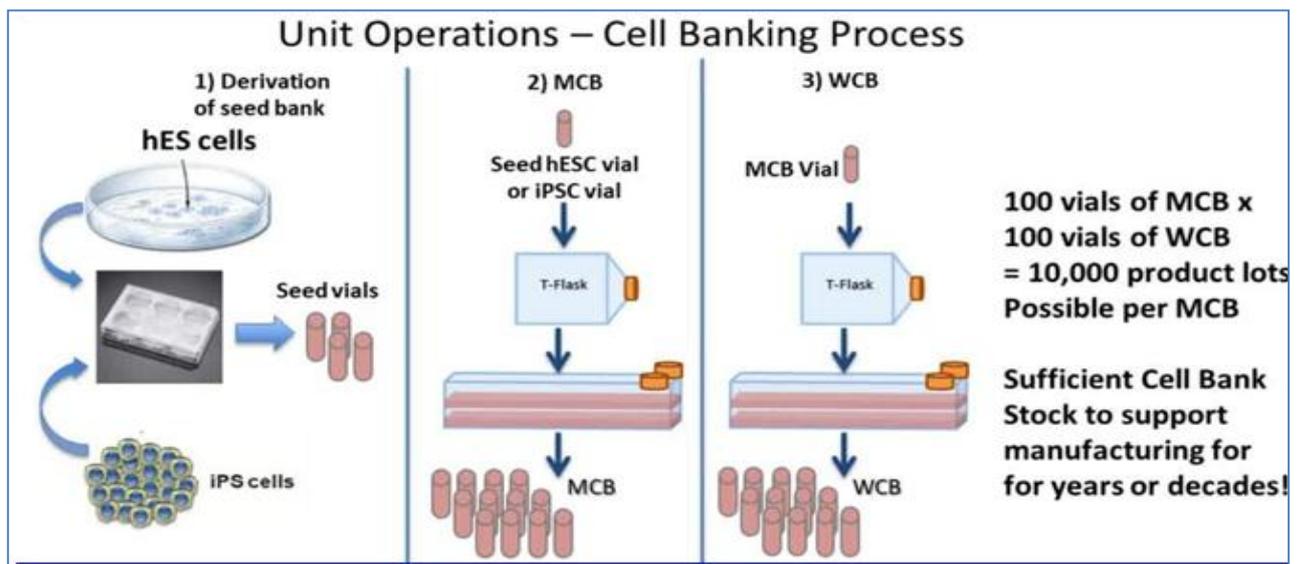


Figure 7 constitution des banques cellulaires (12)

Le pool est alors réparti en plusieurs aliquotes afin d'être cryo-conservés et constitueront la Master Cell Bank. Un contenant de la MCB est ensuite décongelé et permettra de préparer une WCB selon le même principe qu'expliqué précédemment (Figure7)

Un tube de la WCB donnera alors lieu à un lot de production. Lorsque tous les tubes seront utilisés, une nouvelle WCB sera générée à partir de la MCB.

Le but de ces banques cellulaires est de fabriquer des protéines recombinantes qui seront le plus homogène entre elles puisque qu'elles découleront toutes du même clone sélectionné.

Il est donc nécessaire pour le fabricant de mettre en place des dispositions qui vise à protéger sa MCB car si celle-ci est rendue inutilisable alors cela signifierait l'arrêt total de la production et de la commercialisation du médicament.

### 3. Récupération des molécules d'intérêt

Les cellules de WCB, qui fabriquent la protéine thérapeutique, sont conservées à basse Température. Elles sont mises en culture dans des fioles afin de se multiplier en présence de milieux de culture nutritive.

Au fur et à mesure que le nombre des cellules augmente ; celles-ci sont transférées dans des bioréacteurs de plus en plus volumineux (Figure 8)

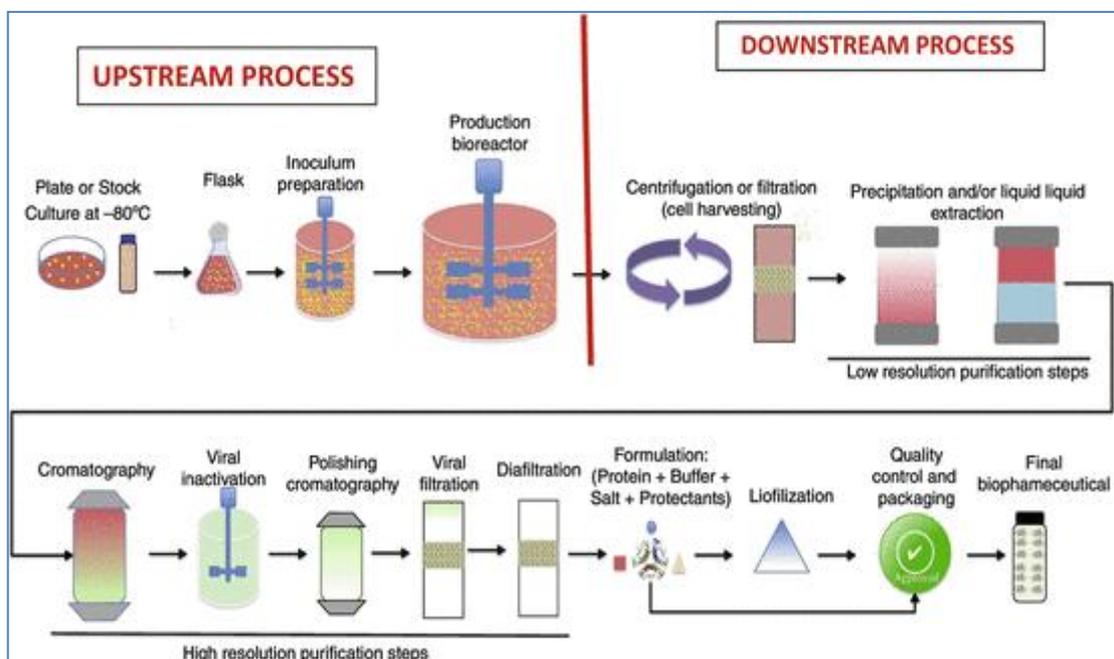


Figure 8 les étapes de récupération des molécules d'intérêt.

En effet, il existe 3 étapes intéressantes récupération des molécules d'intérêt :

#### 3.1 Expansion cellulaire (Upstream Processing)

L'objectif de cette étape est de générer la quantité de cellules nécessaire à l'ensemencement du bioréacteur qui assurera la production industrielle.

Dans un premier temps, un tube de la WCB est décongelé et mis en culture dans un premier bioréacteur. Après un temps déterminé, la culture est ensuite transférée dans

un bioréacteur de taille supérieure. La même opération est réalisée successivement dans des bioréacteurs de taille.

Leur milieu de culture doit être composé d'éléments nutritifs essentiels tels que les sels organiques les acides aminés, les oligo-éléments, les vitamines, les sources de carbone, l'oxygène, les agents tampons et les lipides. Cependant, la formation d'éléments issus du métabolisme cellulaire tels que le lactate, les ions ammoniums ou le butyrate de sodium doivent tous autant être surveillés en raison de leur toxicité cellulaire et de leurs effets négatifs sur la quantité et la qualité des protéines glycosylées.

Croissante jusqu'à atteindre la quantité cellulaire voulue. Puis, le bioréacteur final estensemencé.

Plusieurs paramètres comme la température, le pH, la pression et l'agitation doivent également être contrôlés et pilotés pour assurer la production d'une protéine de qualité.

En effet, des variations mêmes mineures du procédé peuvent avoir un impact sur l'expression des cellules ce qui peut entraîner la formation d'un produit non souhaité.

### **3.2 Récolte de la protéine**

Une fois que le temps de culture dans le bioréacteur final est atteint, il s'ensuit l'étape de récolte ou « clarification primaire » où le produit d'intérêt est principalement séparé des cellules et de diverses impuretés.

Cependant, deux cas peuvent se présenter :

- ❖ soit la protéine d'intérêt reste dans le milieu intracellulaire : il faut d'abord récupérer toute la biomasse contenue dans le bioréacteur et éliminer le milieu de culture. Les cellules sont ensuite lysées et la protéine se retrouve alors dans un mélange constitué de débris cellulaires et du reste du contenu intracellulaire.
- ❖ soit elle est sécrétée dans le milieu extracellulaire : Le milieu de culture qui contient la biomolécule et différentes impuretés doit être séparé, des cellules.

A l'issue de ces deux cas, la protéine devra être isolée à l'aide d'opérations de centrifugation et de filtration en profondeur.

Une filtration tangentielle est souvent ajoutée pour concentrer le filtrat avant de passer à la phase de purification.

### **3.3 Purification de la biomolécule (Downstream Processing)**

La phase « Downstream » est conçue de manière à éliminer le reste des impuretés et donc à obtenir une protéine d'une pureté maximale.

Elle est essentiellement constituée d'étapes de chromatographie et de procédés de séparation membranaire.

La première étape consiste généralement à capturer la protéine d'intérêt et à éliminer les impuretés en ayant recours à une chromatographie d'affinité. Le taux de purification atteint est généralement de l'ordre de 90 %.

Les deux chromatographies qui sont ensuite le plus souvent utilisées sont :

- ❖ La chromatographie par échange d'ions élimine les protéines indésirables, les sels, les résidus et permet d'obtenir un taux de purification pouvant aller jusqu'à 99%.
- ❖ Chromatographie d'interaction hydrophobe sert à éliminer des impuretés à l'état de traces, dont des substances apparentées à la protéine d'intérêt (polymères, fragments et autres formes mal repliées).

En parallèle de ces étapes, la solution contenant le produit doit être soumise à des opérations de clairance virale (ex : inactivation virale, filtration virale). De par leur nature et leurs origines, les produits biotechnologiques sont plus facilement sujets à des contaminations virales. Il faut donc s'assurer que le procédé de fabrication élimine ce risque.

Des étapes de filtration tangentielle peuvent également être mises en place au cours du procédé. Celles-ci sont utilisées soit pour séparer des composés en fonction de leur taille ou de leur poids moléculaires soit pour changer la composition d'un solvant en ajoutant des excipients permettant la formulation du produit purifié (c'est la diafiltration).

La phase downstream se finalise par une filtration virale et une filtration de polissage (0,2 µm de diamètre pour les pores du filtre) qui permettent d'atteindre un taux de pureté de l'ordre de 100 %.

### **3.4 Mise en forme pharmaceutique**

La formulation est une étape complexe qui est réalisée par le fabricant de la substance active.

Les procédés de mise en forme pharmaceutique actuels font surtout intervenir la lyophilisation car elle permet de mieux conserver le médicament et de maintenir sa stabilité.

La protéine peut être directement formulée sous forme injectable (flacon, ampoule ou seringue) par ajout de sels pour ajuster le pH, d'adjuvants pour assurer sa conservation, sachant qu'il reste difficile de maintenir en solution de fortes concentrations de protéines sans risque d'agrégat.

Une fois formulées, les protéines thérapeutiques nécessitent des précautions d'emploi particulières tout au long de la chaîne de distribution où la chaîne du froid doit être respectée. En plus, elles doivent être protégées de la lumière et ne pas être brutalement agitées.

Le remplissage final est ensuite réalisé de manière aseptique afin de ne pas contaminer le produit.

## CHAPITRE IV : ÉTUDE DE LA QUALITÉ DES MÉDICAMENTS BIOTECHNOLOGIQUES

La principale mission du Contrôle Qualité est de vérifier que les médicaments fabriqués correspondent à ce qui est attendu et qu'ils sont conformes aux spécifications définies en termes de qualité, efficacité et sécurité.

La caractérisation et l'évaluation de la qualité de tout médicament dont la substance active est produite à partir d'une source biologique ou en est extraite nécessitent une combinaison de plusieurs méthodes analytiques appropriées ainsi que la connaissance de son procédé de fabrication.

La substance active biologique contient la substance désirée mais aussi des isoformes et des variantes ou produits de structure proche non éliminés lors de la purification, pouvant être dotés également d'une activité biologique équivalente ou proche du produit désiré.

Elle contient également des impuretés de dégradation qui sont liées au produit et des impuretés liées au procédé de fabrication (Figure9).

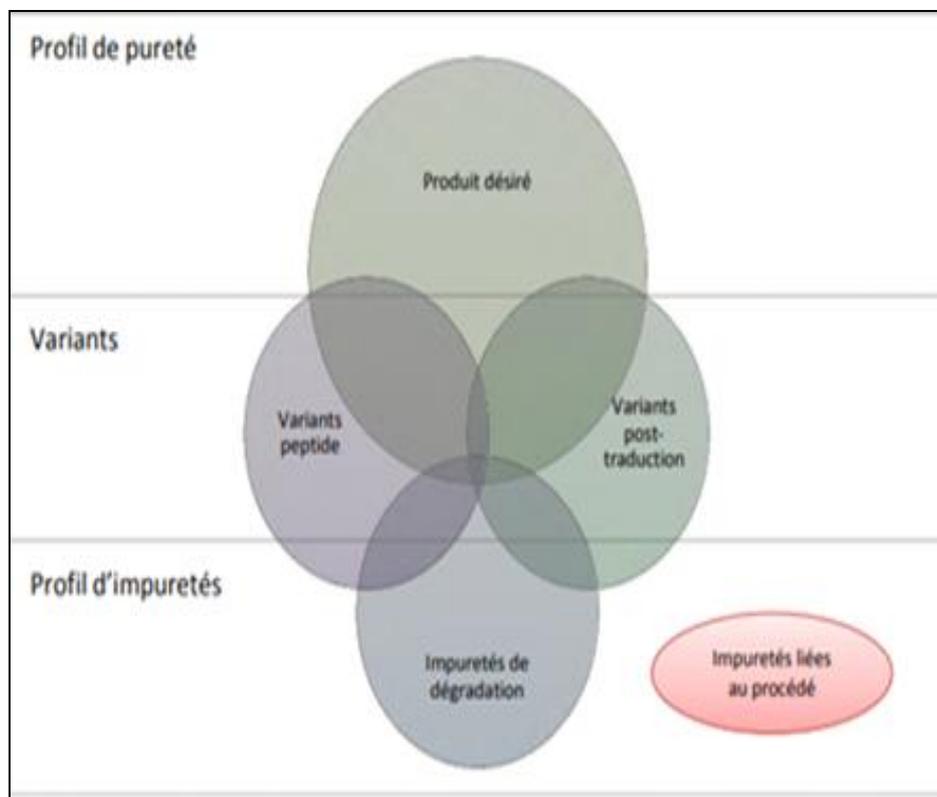


Figure 9 Hétérogénéité du mélange produit

Ainsi, selon la nature de la cellule hôte utilisée, la séquence peptidique de la substance active peut être soumise à des variations suite à diverses réactions comme des oxydations, des substitutions, des déaminations ou des troncations.

De plus, les modifications post-traductionnelles, comme les glycosylations, méthylations, acétylations, acylations, phosphorylations ou sulfatations, contribuent aussi à la variabilité de la substance active biologique.

Le contrôle de la qualité des médicaments biologiques repose, comme pour tout médicament sur le contrôle de la matière première, essentiellement la substance active, ainsi du produit fini.

La qualité des biomédicaments nécessite ainsi une connaissance parfaite de leur procédé de fabrication ce qui implique la surveillance et la validation de chaque étape de fabrication. Et cela à travers la collecte et l'analyse des données en temps réel y compris la culture cellulaire, la purification et la formulation du produit.

Les tests de qualité et les analyses sont effectués sur des échantillons prélevés à chaque étape pour garantir la conformité aux spécifications du produit final.

## **1. Considérations analytiques**

### **1.1 substances de référence**

Dans le cas de demandes d'homologation pour de nouvelles entités moléculaires, il est peu probable qu'un étalon international ou national soit disponible. Au moment de soumettre le dossier, le fabricant devrait avoir adopté une substance de référence interne principale préparée à partir de lot(s) représentatif(s) de substances de production et cliniques.

### **1.2 Validation des méthodes analytiques**

Lorsque la demande d'homologation est transmise aux autorités réglementaires, les demandeurs devraient avoir procédé à la validation des méthodes analytiques incluses dans les spécifications, conformément aux lignes directrices tripartites harmonisées de l'ICH «Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology» et «Validation of Analytical Procedures: Methodology», excepté là où il existe des mesures spécifiques pour des tests spéciaux utilisés dans l'analyse des produits biologiques ou des produits issus de la biotechnologie.

## **2. Contrôle des matières premières utilisées à la fabrication**

Le contrôle de la qualité des matières premières utilisées à la fabrication des médicaments biologiques repose principalement sur les contrôles du vecteur d'expression, de la cellule hôte, des banques cellulaires et des milieux de culture.

### **2.1 Vecteur d'expression**

L'identité du gène d'intérêt codé dans le vecteur d'expression, la structure du vecteur d'expression, la combinaison hôte-vecteur ainsi que la stabilité génétique doivent être analysées. (46)

L'analyse des acides nucléiques peut servir à vérifier la séquence codante ainsi que l'état physique du vecteur d'expression. Afin de s'assurer que la protéine exprimée aura la séquence d'acides aminés exacte. (47) Les méthodes utilisées pour préparer l'ADN codant pour la protéine aussi doivent être décrits.

### **2.2 Cellule hôte**

Le fabricant doit également contrôler le phénotype et le génotype de la cellule hôte afin de s'assurer de l'identité de la cellule utilisée pour la production.

Il importe de décrire la méthode utilisée pour introduire le vecteur d'expression dans la cellule hôte. De plus, les méthodes employées pour amplifier le vecteur d'expression et les critères qui ont motivé le choix du clone cellulaire utilisé pour la production doivent être décrits en détail.

### **2.3 Banque cellulaire**

- **Identification de la banque cellulaire**

La caractérisation et l'identification de la banque cellulaire maîtresse et de la banque cellulaire de travail permet au fabricant d'évaluer cette source en ce qui concerne la présence de cellules provenant d'autres lignées, agents adventices, agents endogènes et contaminants moléculaires (par exemple, toxines ou antibiotiques de l'organisme hôte).

L'objectif de ce test est de confirmer l'identité, la pureté et l'aptitude du substrat cellulaire à la fabrication utilisée. (48)

Ces organismes sont donc à rechercher et à éliminer pour éviter tout problème de sécurité vis-à-vis du patient. (49)

Les fabricants doivent effectuer des tests d'identité et de pureté une fois pour chaque MCB L'identité de ces banques cellulaires est confirmée à partir de l'étude des caractéristiques phénotypiques et/ou génotypiques.

- **Sécurité virale des médicaments biologiques**

Le risque de contamination virale est une caractéristique commune à tous les produits biotechnologiques dérivé de lignées cellulaires.

La contamination virale des produits biotechnologiques peut provenir de la source originale des lignées cellulaires ou de l'introduction fortuite de virus au cours des processus production

Les cellules peuvent présenter une infection virale latente ou persistante (par exemple, le virus de l'herpès) ou endogène (par exemple, le rétrovirus) pouvant être transmis verticalement d'une génération cellulaire à l'autre, puisque le génome viral persiste dans la cellule.

Les virus peuvent être introduits dans le MCB par plusieurs voies telles que :

- 1) Dérivation de lignées cellulaires d'animaux infectés.
- 2) Utilisation du virus pour établir la lignée cellulaire.
- 3) Utilisation de réactifs biologiques contaminés tels que des composants de sérum animal.
- 4) Contamination lors de la manipulation des cellules.

La sécurité virale des médicaments biologiques repose aujourd'hui sur deux éléments clés :

- La sélection des matières premières pour leur absence de virus.
- Et la capacité du procédé de production à éliminer et/ou inactiver les virus .

Trois approches principales et complémentaires ont évolué pour maîtriser la potentielle contamination virale des produits biotechnologiques :

- Sélection et test de lignées cellulaires et d'autres matières premières, y compris les milieux Composants.
- Évaluer la capacité des procédés de production à éliminer les virus infectieux
- Tester le produit aux étapes appropriées de la production pour l'absence de contamination.

- **Étude de la stabilité des banques cellulaires**

L'étude de la stabilité des banques cellulaires consiste à évaluer la viabilité des cellules et déterminer une limite d'âge in vitro pour la production.

Les tests effectués dépendent de la cellule hôte, du procédé de fabrication et du produit.

Il est possible de vérifier l'intégrité de la séquence codant la protéine d'intérêt ainsi que d'analyser des caractéristiques spécifiques de la cellule telles que la morphologie, la croissance ou la productivité. (50)

## **2.4 Recherche des Impuretés et contaminants**

Étant donné que l'utilisation de matières d'origine animale est inévitable pour la production des biomédicaments, un soin particulier doit être apporté à la prévention et à la surveillance des infections chez les animaux sources/donneurs.

Les mesures doivent inclure les sources d'approvisionnement, les installations, l'élevage, la biosécurité, les procédures, les programmes de tests, le contrôle des litières et des aliments.

L'élimination complète de tout risque à la source est rarement possible, Selon le Chapitre 5.2.8 "Réduction du risque de transmission des agents des encéphalopathies spongiformes animales par les médicaments à usage humain et vétérinaire" de la Pharmacopée Européenne, les mesures mises en place pour réduire le risque de transmission des maladies neurodégénératives du système nerveux central (EST) consistent à réduire le risque au minimum plutôt que de l'éliminer.

Les EST sont des maladies fatales et il n'existe actuellement aucun traitement thérapeutique. Elles sont provoquées par des Agents Transmissibles Non Conventionnels (ATNC) ou prions.

Une attention particulière au risque (EST) doit être accordée pour les produits biologiques et notamment les matières premières d'origine animale utilisées.

Le système d'Assurance Qualité mis en place doit garantir la traçabilité et le contrôle de l'approvisionnement par les fournisseurs.

Les fabricants sont également incités par les autorités à rechercher des méthodes d'inactivation et/ou d'élimination des agents des EST et à développer des procédures de nettoyage spécifiques dans le cas d'utilisation de matières potentiellement contaminées. (51)

## **3. Contrôle du procédé de fabrication**

Une conception adéquate du procédé ainsi que la connaissance de ses capacités, font partie de la stratégie de développement d'un procédé de fabrication bien contrôlé et reproductible, lequel produira une substance médicamenteuse ou un produit médicamenteux conforme aux spécifications.

A cet égard, les limites sont justifiées à partir de renseignements critiques tirés de l'expérience acquise depuis les premiers développements jusqu'à la production à l'échelle commerciale. (52)

Il est 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.

### **3.1 Contrôle en ligne (ou in situ)**

Ce contrôle implique l'utilisation de capteurs directement placés dans la cuve ou les lignes de flux périphériques pour la surveillance du procédé

Exemple : 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 CO<sub>2</sub>dissous ou l'agitation.

### **3.2 Contrôle hors-ligne**

Des échantillonnages sont réalisés quotidiennement pour vérifier le bon déroulement de la production.

## **4. Contrôle qualité de la substance active et du produit fini**

Les paramètres à vérifier sont les suivants :

### **4.1 Caractérisation**

La caractérisation complète est principalement effectuée lors du développement d'un nouveau biomédicament mais aussi lors du développement d'un biosimilaire.

Les propriétés physico-chimiques, l'activité biologique, les propriétés immuno-chimiques et le profil de pureté/impuretés font partis des caractéristiques à étudier de manière approfondie afin de garantir la qualité, la sécurité et l'efficacité du médicament.

La caractérisation permet également de confirmer la qualité du produit lors d'un changement dans le procédé de fabrication et de déterminer les spécifications employées pour la libération des produits en routine. (53)

#### **4.1.1 Propriétés physico-chimiques**

Les principales caractéristiques physico-chimiques analysées sont la séquence peptidique, le poids moléculaire, la conformation spatiale et les éventuelles modifications post-traductionnelles.

D'autres spécificités peuvent être évaluées comme la charge, le point isoélectrique ou l'hydrophobicité de la protéine par exemple.

#### **4.1.2 Activité biologique**

L'activité biologique décrit la capacité d'un produit à réaliser un effet biologique déterminé. Elle est quantifiée au travers de la mesure de la puissance sur la base d'un attribut du produit lié à des propriétés biologiques pertinentes et s'exprime par exemple en Unité Internationale (UI). (53)

Une épreuve biologique valide pour mesurer l'activité biologique doit être fournie par le fabricant. Des exemples de méthodes utilisées pour mesurer l'activité biologique comprennent:

- Les épreuves biologiques sur des animaux, qui mesurent la réponse biologique d'un organisme au produit;

- Les épreuves biologiques en cultures de cellules, qui mesurent la réponse biochimique ou physiologique au niveau cellulaire;
- Les épreuves biochimiques, qui mesurent l'activité biologique telle que les taux de réaction enzymatique ou les réponses biologiques induites par interactions immunologiques.

D'autres méthodes telles que les épreuves de liaison entre ligand et récepteur, peuvent être acceptables(52)

### **4.1.3 Propriétés immuno-chimiques**

Les propriétés immuno-chimiques d'une protéine peuvent servir à établir son identité, son homogénéité ou sa pureté, ou bien servir à la quantifier. (52)

Pour certaines substances médicamenteuses ou produits médicamenteux, la molécule protéique pourra être examinée en se servant de méthodes immuno-chimiques (p.ex.: ELISA, transfert Western) en ayant recours à des anticorps qui reconnaissent différents épitopes de la molécule protéique.

### **4.1.4 Pureté, impuretés et contaminant**

Le profil de pureté et d'impuretés d'un médicament biologique est complexe. En effet, il existe de nombreuses variantes qui sont dépourvus d'activité biologique et donc considérés comme des impuretés, associés à des impuretés de dégradation et à des impuretés liées au procédé de fabrication.

Il est important d'évaluer ces impuretés, en s'aidant de la combinaison de plusieurs méthodes analytiques, pour définir des normes d'acceptation lors des contrôles en vue de la commercialisation du produit.

#### **Impuretés liées au produit**

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

Il est important d'identifier et de caractériser les variantes de la substance active biologique

Si ces variantes sont dotées de propriétés comparables à la substance active en termes de sécurité et d'efficacité, elles peuvent alors être classées dans le profil de pureté et appartiennent au produit désiré.

Dans le cas contraire, il s'agit d'impuretés dont la présence doit alors être limitée.

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

## Impuretés et contaminants liés au procédé de fabrication

Les impuretés liées au procédé de fabrication peuvent provenir des substrats cellulaires ainsi que du procédé de culture cellulaire, d'extraction et de purification.

Les contaminants dans un produit comprennent toutes les matières incorporées de façon accidentelle qui ne font pas intentionnellement partie du procédé de fabrication, telles que des matières chimiques et biochimiques, et des espèces microbiennes.

La présence de contaminants doit être rigoureusement évitée et contrôlée de manière adéquate en cours de fabrication à l'aide de critères d'acceptation ou de limites d'action conformes aux spécifications de la substance médicamenteuse ou du produit médicamenteux.

### 4.1.5 Quantité

La quantité de substance médicamenteuse, habituellement basée sur le contenu protéique (masse) devrait être déterminée à l'aide d'un test approprié.

Tableau 7 Principaux paramètres à évaluer pour la caractérisation des produits biologiques

Caractérisation	Critère	Méthode
<b>Caractéristiques Physico-chimiques</b>	Séquence peptidique Poids moléculaire Conformation spatiale Modifications post traductionnelles Charge Hydrophobicité	MALDI-TOF MS, LC-MS Spectrométrie de masse Dichroïsme circulaire, FT-IR, fluorescence HPLC, HPAEC-PAD, CE CE, IEC, IEF RP-HPLC
<b>Activité biologique</b>	Puissance	Tests <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> et/ou biochimique (liaison agoniste/récepteur)
<b>Propriétés Immuno-chimiques</b>	Affinité, avidité, immuno réactivité, fonctions effectrices des	Test liaison Ag/Ac, Western Blot, immunoprécipitation

	anticorps	
<b>Profil de pureté/ impuretés</b>	Variants de masse Variants de charge Variants conformationnels Variants glycosidiques Variants ponts disulfures Protéines cellule hôte ADN résiduel Autres impuretés liées au procédé de fabrication	SEC-MALS, A4F-MALS, SM CE, IEC, IEF, SM, cartographie peptidique Dichroïsme circulaire, FT- IR, fluorescence HPLC, HPAEC-PAD, CE TPM, fluorescence ELISA Hybridation Chromatographie liquide, ELISA, etc.
<b>Quantité</b>	Concentration	HPLC, l'absorbance UV à 280 nm.

Il convient de reconnaître que certaines formes posologiques uniques peuvent nécessiter des tests supplémentaires autres que ceux mentionnés ci-dessus.

#### 4.2 Contrôle de routine

Le contrôle de routine ne reprend pas toutes les études effectuées lors de la caractérisation, il s'agit en fait d'une sélection de tests appropriés qui permettront de confirmer la qualité de la substance active et du produit fini en vue de la commercialisation. Les tests retenus dépendront de la substance active et de la forme pharmaceutique utilisée.

Tableau 8 les principaux contrôles à effectuer pour la libération de la substance active biologique et du produit fini.

Attributs	Critère	Méthode
<b>Apparence</b>	État physique, couleur, Limpidité Ph	Monographie Pharmacopée
<b>Identité</b>	Structure	Cartographie peptidique

	Taille Charge	SDS-PAGE, HP-SEC IEC, HIC, IEF, CZE
<b>Pureté/ Impuretés</b>	Protéines cellule hôte ADN résiduel Variants	ELISA Q-PCR  R-SDS-PAGE, SEC-UV, CGE, IEF, HPLC, HPAC
<b>Contaminants</b>	Endotoxines Charge microbienne	Monographies Pharmacopée
<b>Puissance</b>	Activité biologique	Liaison au récepteur
<b>Dosage</b>	Concentration	HPLC, Absorbance

## 5. Études de Stabilité

L'étude de stabilité a pour objet d'observer le comportement du produit au cours du temps notamment la dégradation du ou des principes actifs présents dans un médicament dans le temps.

Afin de vérifier que la qualité du médicament reste dans les normes définies ou requises durant toute sa durée de vie.

Donc, la stabilité du principe actif et du produit fini est la capacité du produit à demeurer conforme aux critères d'acceptation assurant son identité, son titre, et sa pureté durant une période de conservation spécifiée,

Pour cela, plusieurs types de protocoles peuvent être mis en œuvre :

- Étude de stabilité accélérée : en soumettant le produit à des conditions climatiques extrêmes pour accélérer sa dégradation.
- Étude de stabilité longue durée : le produit est placé dans des conditions normales de stockage. (54)

Les études de stabilité subissent une évolution continue fondée sur l'amélioration de la connaissance scientifique et technique du médicament et reposent sur la mise en œuvre de moyens de plus en plus performants des méthodes analytiques d'investigation, et plus particulièrement d'analyse des résultats,

Elles sont réalisées sur le PA seul, et les produits finis selon un protocole dont les conditions opératoires dépendent du climat du pays où le médicament sera commercialisé.

Elles permettent de mieux connaître le PA, de guider le choix du formulateur lors du développement pharmaceutique, de justifier la stabilité du produit finis de l'enregistrement et de garantir le maintien de cette qualité après commercialisation pendant toute sa durée d'utilisation par le malade.

Le fabricant établit la date de péremption à partir d'études de stabilité en temps réel ou par extrapolation du résultat d'études de dégradation accélérée.

La date ainsi déterminée doit toujours être confrontée par les données obtenues dans des conditions normales puisque ces prédictions demeurent grevées de certaines limitations. (55)

### **5.1 Planification des études de stabilité**

Les études de stabilité constituent un élément clé lors du développement et de l'approbation de nouvelles substances actives pharmaceutiques et de nouveaux médicaments. Le choix des bons paramètres d'analyse à vérifier pendant les tests ainsi qu'une planification précise et fiable du projet sont essentiels pour l'obtention de données significatives. Il convient de définir les méthodes adaptées ainsi que les conditions de stockage appropriées correspondant à la zone climatique du marché cible et de créer le calendrier des prélèvements d'échantillons. Les directives ICH Q 1A-Q1F servent de guide.

### **5.2 Tests de stabilité**

#### **5.2.1 Tests en conditions de stress sur substances actives**

Ceux-ci permettent de recueillir les premières informations sur le profil de stabilité de la substance active.

Il s'agit de tester les influences de la température, de l'humidité, de la lumière, du pH et des agents oxydants sur la substance active (étude de dégradation forcée).

Les résultats obtenus sont synthétisés dans un profil de stabilité de la substance active puis sont utilisés lors du développement galénique et lors du développement et de la validation des méthodes analytiques.

#### **5.2.2 préformulation**

Lors de cette étape, la stabilité de différentes préformulations est vérifiée en fonction des conditions de stockage.

Il est important d'évaluer l'influence et la stabilité des additifs utilisés, et aussi d'évaluer et de déterminer quels additifs sont compatibles. L'objectif principal est de déterminer une formulation définitive pour le nouveau médicament.

#### **5.2.3 Tests en conditions de stress avec lots de mise à l'échelle (lots scale-up)**

Ce test de stabilité sur la formulation choisie prend entre 3 et 6 mois.

Ses objectifs sont les suivants :

- Évaluation de durée de validité de la forme posologique finale.
- détermination provisoire des spécifications et validation des échantillons pour les études cliniques I à III.
- surveillance de la stabilité pendant les phases cliniques.

#### **5.2.4 Tests en conditions de stress et tests à long terme avec lots d'enregistrement**

Un « test accéléré » et un « test à long terme » sont réalisés sur trois lots de production représentatifs de la substance active et du produit fini pour enregistrement.

La formulation et le conditionnement doivent correspondre aux produits tels qu'ils sont commercialisés.

L'étude de stabilité prend au moins 12 mois et les échantillons de test ainsi que les conditions de stockage sont conformes aux recommandations des directives de l'ICH.

Cette étape permet d'obtenir une évaluation de la « période de contre-essai » de la substance active et de la durée de validité du produit fini.

#### **5.2.5 Tests de stabilité dans le cadre d'un suivi**

Le test de stabilité dans le cadre d'un « suivi » est réalisé conformément aux directives de l'ICH pour trois lots de production représentatifs de la substance active et du produit.

Le test de stabilité peut prendre jusqu'à 60 mois. Souvent, l'étude « à long terme » commence à l'étape précédente.

Les objectifs de cette étape sont les suivants :

- Détermination des spécifications après approbation.
- confirmation et extension de la « période de contre-essai » de la substance active, ainsi que de la durée de validité du produit fini. (56)

## CHAPITRE V : ÉTUDES DE COMPARABILITÉ DES BIOSIMILAIRES

La démonstration de la comparabilité n'a pas pour but de démontrer que les produits sont identiques mais qu'ils sont hautement similaires et qu'il n'y a pas de différences cliniques significatives entre les deux produits.

La comparabilité qualité est établie par rapport à la structure moléculaire et doit être prouvée par une caractérisation analytique complète. Par la suite, les essais pré cliniques et cliniques permettent d'assurer que toutes les différences observées au niveau de la qualité n'auront aucun impact sur le profil de sécurité et d'efficacité du biosimilaire (Figure 10).

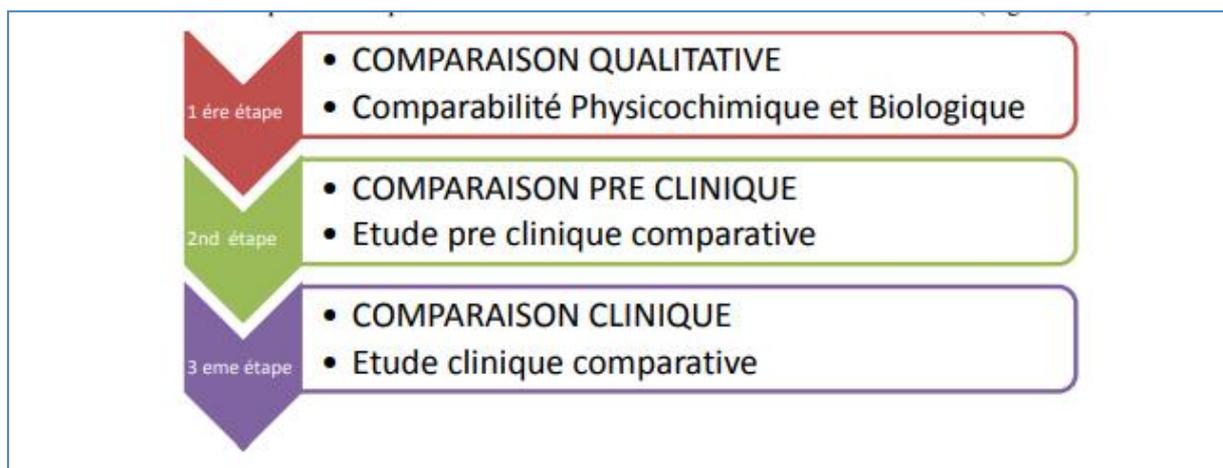


Figure 10 Principales étapes de l'exercice de comparabilité

Le récent guide EMA fait intervenir une double approche de comparabilité pour établir la biosimilarité d'une molécule.

Tableau 9 Approches de similarité selon le guide EMA

Comparabilité (biomédicament de référence)	Biosimilarité (biosimilaire)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Connaissance intime du produit par le fabricant</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas de connaissance interne</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Données sur la Qualité physico-chimique</li> <li>• Faible besoin de données cliniques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Données sur la Qualité physico-chimique</li> <li>• Besoin de données cliniques</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tests de non-infériorité</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• (généralement) Équivalence thérapeutique</li> </ul>

Première approche fait référence à l'ICH Q5E relatif à la démonstration de la comparabilité suite à une modification du procédé de fabrication (les innovateurs doivent prouver la similarité à chaque changement de leurs procédures de fabrication).

Tandis que la-seconde approche fait l'objet d'un supplément spécifique au CTD module 3 et se fonde sur un exercice complet de comparabilité entre le produit biosimilaire et le produit de référence.

La biosimilarité des produits est à démontrer par un exercice de comparaison en plusieurs étapes (Figure 11) en confrontation directe entre le biosimilaire et le biomédicament de référence afin d'analyser et de justifier toute différence entre le biosimilaire et le référent :

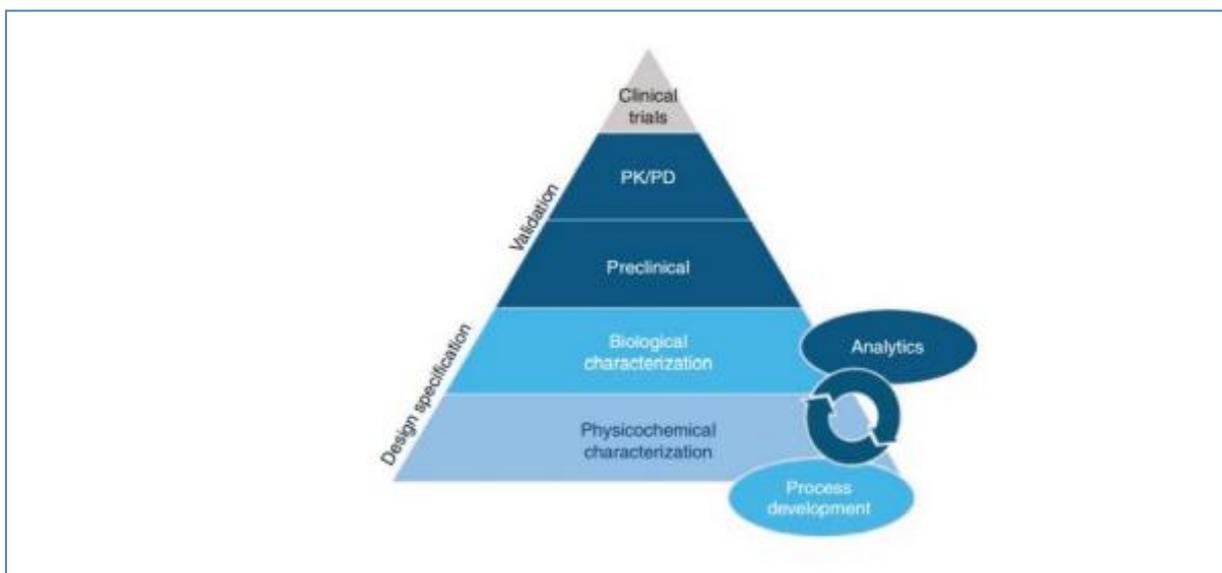


Figure 11 Procédure de démonstration de la comparabilité/similarité

## 1. Comparabilité au niveau de la qualité

Tous les aspects de la qualité et de la micro-hétérogénéité doivent être évalués par des comparaisons directes avec le produit de référence. La comparaison de la qualité est établie sur la comparaison de la structure moléculaire (structure primaire à quaternaire), des propriétés physico-chimiques, de l'activité biologique, des spécifications, des impuretés et de la stabilité des deux produits (Tableau 10)

Tableau 10 Résumé des analyses qualitatives nécessaires pour démontrer la similarité d'un biomédicament

QUALITE	Analyses		Paramètre analysés
Caractérisation physico-chimique	Identité (structure chimique)	Structure primaire	Composition en acides aminés : séquence générale et N/C terminale ponts disulfures
	Propriétés physico-chimiques	Caractérisation de la structure de la protéine : secondaire, tertiaire et quaternaire	Coefficient d'extinction Taille et poids de la molécule Profil en électrophorèse, en chromatographie liquide et en spectroscopie de masse. Modification post-translationnelle (évaluation des isoformes)
Activité biologique	Analyse fonctionnelle		Mécanisme d'action Confirmation de la structure (structure 3D, agrégation) Puissance et échelle d'activité
Propriétés immuno-chimique	Evaluation, estimation et caractérisation des activités des Anticorps liants ou neutralisants, si présents		Spécificité, Affinité, Cinétique de liaison, Activité sur le domaine FC
Impuretés	Identification et quantification des impuretés liées au produit et à la procédure de fabrication		
Stabilité	Évaluer la stabilité du similaire sous des conditions de stress (lumière, agitation.....)		Études de stabilité et de stress

## 2. Comparabilité Pré Clinique

L'évaluation des données précliniques doit permettre de montrer la comparabilité des profils pharmaco-toxicologiques des deux produits (Tableau 11).

Toutefois, la quantité de données pré cliniques nécessaires pour établir les profils de sécurité et d'efficacité est très dépendante de la molécule et de la classe : chaque molécule doit être étudiée au cas par cas pour établir le nombre d'études nécessaires.

Tableau 11 Résumé des analyses nécessaires pour démontrer la similarité préclinique d'un biomédicament

PRE CLINIQUE	Analyses	Paramètres analysés
In vitro	Évaluation du profil pharmacologique et toxicologique	Activité PD Liaison au récepteur
In vivo		Activité biologique et PD Toxicité non-clinique : dose unique et dose répétée et étude toxicocinétique

### Études in vitro

Elles doivent permettre de comparer l'activité PD des deux molécules.

### Études in vivo

Ces études réalisées sur l'espèce animale la plus adaptée doivent être conduites pour compléter les données in vitro et pour évaluer la toxicité des produits étudiés.

Une étude de toxicité à dose unique et à dose répétée est ~~de~~ obligatoire pour établir le profil toxico cinétique (titre en anticorps, réactivité croisée et capacité neutralisante) du produit. De tels tests sont particulièrement utiles pour détecter la présence de protéine de la cellule hôte ou des impuretés.

## 3. Comparabilité Clinique

Les essais cliniques pour des biosimilaires doivent démontrer la similarité de l'efficacité du médicament.

Tableau 12 Résumé des analyses nécessaires pour démontrer la similarité clinique d'un biomédicament

CLINIQUE	Analyses	Paramètres analysés
PK/PD	Evaluation du profil pharmacocinétique et	Absorption /Biodisponibilité Clairance, demi-vie

	pharmacodynamique	
Essais cliniques	Evaluation de l'efficacité de la sécurité	Efficacité Sécurité Immunogénicité

L'application d'un plan de développement clinique complet aux biosimilaires pourrait être considérée comme non-éthique, étant donné que le biosimilaire est utilisé dans le but de traiter la même maladie, aux mêmes doses et conditions d'utilisation. C'est pourquoi les essais cliniques pour un biosimilaire sont réduits à des études PK/PD comparatives et comparaison d'efficacité pour limiter le nombre de sujets inclus.

Pendant toute l'évaluation clinique, une importance particulière doit être apportée à l'évaluation de l'immunogénicité.

### 3.1 Études cliniques PK/PD

Les études PK/PD permettent d'assurer que les propriétés du biosimilaire sont bien établies et que la relation entre la dose administrée et l'exposition correspond à ce qui est attendu.

#### Études PK

Les études PK doivent de préférence être des études comparatives de dose unique en cross-over, dans une population homogène, utilisant une dose permettant une sensibilité suffisante pour détecter une différence.

Cette étude peut être réalisée (si considérée comme éthique et justifiée) sur des volontaires sains pour réduire la variabilité interindividuelle.

Les études PK/PD doivent être conduites en cross-over pour les produits ayant une demi-vie courte et un potentiel immunogène faible.

Pour les produits ayant une longue demi-vie d'élimination et fortement immunogène, une étude en bras parallèles est recommandée pour l'évaluation de l'immunogénicité (cas des anticorps monoclonaux).

Comme pour les molécules chimiques, l'Aire Sous la Courbe (AUC) est généralement le paramètre le plus fiable pour déterminer le profil pharmacocinétique de la molécule :

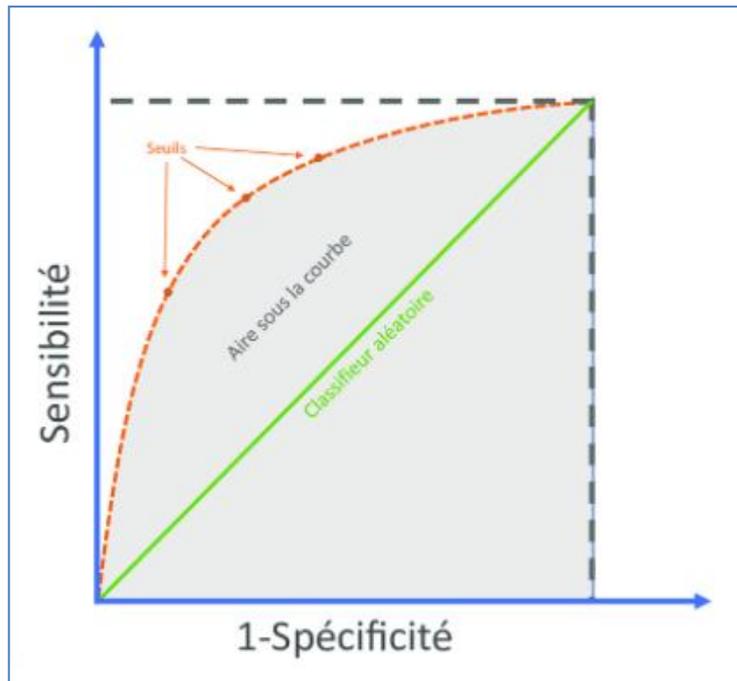


Figure 12 schéma de courbe AUC (AIRE SOUS LA COURBE)

## Études PD

Les études PD doivent permettre de confirmer que les deux molécules ont des profils identiques avant la réalisation d'essais cliniques, spécifiquement si des différences dans les profils PK ont été observées

### 3.2 Études cliniques d'efficacité

L'efficacité similaire doit être démontrée dans un essai avec une puissance adéquate, un dosage et une voie d'administration identique, randomisé et en double aveugle. Des essais d'équivalence ou/et de non-infériorité sont recommandés, dans une population homogène et sensible aux effets du biosimilaires (pas de sujets sains en conséquence).

Les essais de supériorité ne sont pas adaptés pour des biosimilaires, le but étant de démontrer la comparabilité et non la supériorité.

Ainsi, les essais d'équivalence sont recommandés par les autorités pour démontrer la biosimilarité. Néanmoins, les essais de non-infériorité sont justifiés et acceptés lorsque le biomédicament de référence a déjà une marge de sécurité large.

#### Essais d'équivalence

Les essais d'équivalence (Figure13) permettent de démontrer que le biosimilaire et le biomédicament sont thérapeutiquement équivalents. L'essai d'équivalence demande de définir une marge d'équivalence à partir d'une grandeur  $\Delta_{eq}$  qui correspond à la plus large différence

en efficacité qui n'aura pas d'impact en clinique (on parle de MCID « minimally clinically important difference »).

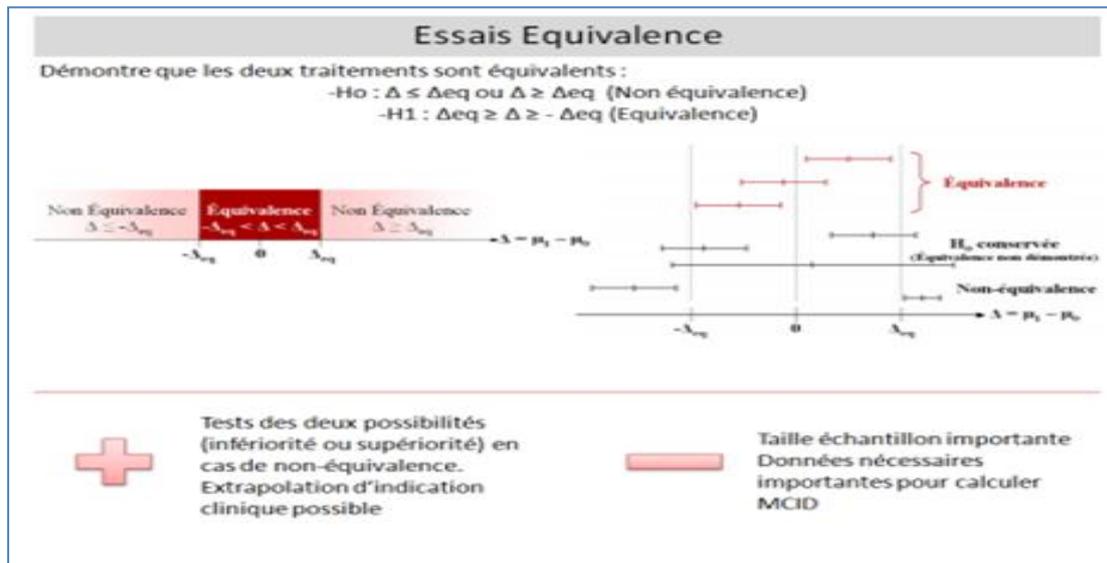


Figure 13 Résumé des caractéristiques d'un essai d'équivalence

On part de l'hypothèse nulle que les deux produits sont non équivalents (soit mieux soit moins bien que le biomédicament de référence). En conséquence, le but est de démontrer que l'efficacité du biosimilaire n'est pas plus importante ou moins importante (efficacité bornée).

Pour ce type d'essai les points limitant sont le fait que plus la MCID est petite (donc intéressante pour montrer la similarité) plus la taille de l'échantillon nécessaire sera importante et que pour déterminer la MCID de nombreuses données provenant du comparateur sont nécessaires (méta analyse des études du comparateur versus placebo...).

### Essais non infériorité

Les essais de non-infériorité (Figure 14) permettent de démontrer que le biosimilaire n'est pas moins efficace que le biomédicament.

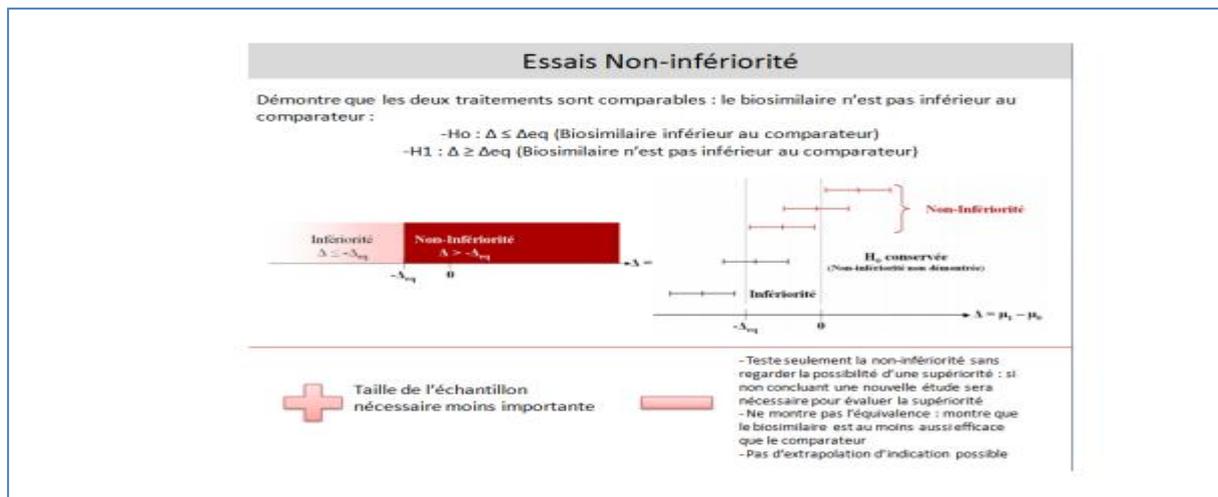


Figure 14 Résumé des caractéristiques d'un essai de non-infériorité

On part de l'hypothèse nulle que le produit A est moins efficace que le produit B. En conséquence, le but est de démontrer que la différence d'efficacité entre le biosimilaire et le biomédicament n'est pas inférieure à la MCID ( $\Delta_{eq}$ ).

L'avantage des essais cherchant à démontrer la non-infériorité est une taille d'échantillon nécessaire moins importante. Cependant, ces essais de non-infériorité peuvent montrer que le biosimilaire n'est pas d'efficacité inférieure mais ne statuent donc pas sur une possible supériorité.

## CHAPITRE VI : LES ANTICORPS MONOCLONAUX- BIOSIMILAIRES

Actuellement, Les anticorps monoclonaux font partie de la nouvelle innovation thérapeutique : Thérapie ciblée qui cible des molécules sur des organes ou des états pathologiques spécifiques.

En 1986 le muromonab est le premier anticorps monoclonal thérapeutique autorisé par la FDA (Food and Drug Administration) dans la prévention du rejet aigu d'allogreffes rénales, hépatiques et cardiaques. (57)

### 1. Définition des anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux pour usage humain sont des préparations d'une immunoglobuline ou d'un fragment d'immunoglobuline, par exemple le F (ab')<sub>2</sub>, de spécificité définie, produite par un clone cellulaire unique.

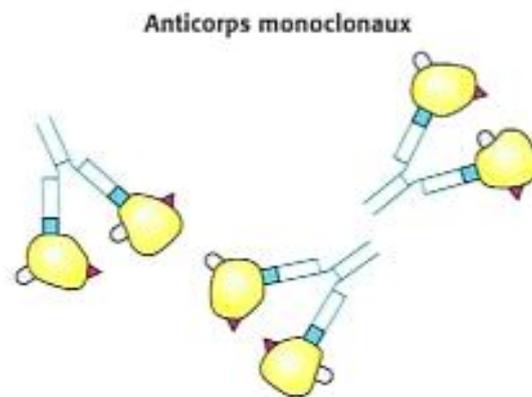


Figure 15 Anticorps monoclonaux

Ils peuvent être obtenus à partir de lymphocytes B immortalisés, qui sont clonés et multipliés sous forme de lignée cellulaires continues, ou à partir de lignées cellulaires ayant fait l'objet d'une recombinaison génétique. (58)

### 2. Structure d'une immunoglobuline

Une immunoglobuline (150 kDa) est composée de 2 chaînes peptidiques légères (L) et de 2 chaînes lourdes (H).

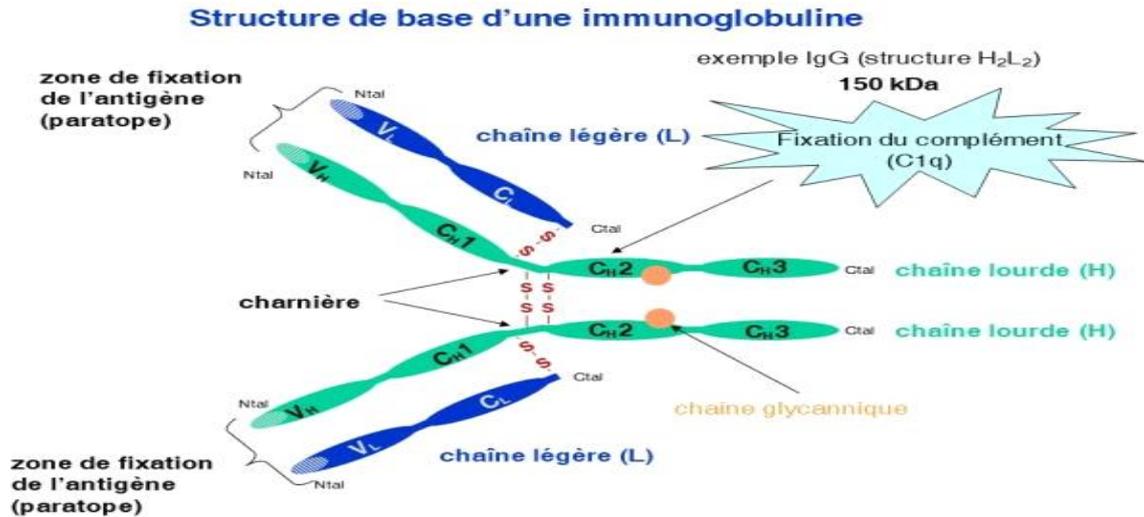


Figure 16 Structure d'une immunoglobuline

Les chaînes L sont de type kappa ou  $\lambda$ . Les chaînes H existent sous forme de 5 sous types  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ , et  $\delta$ .

La nature du sous type de la chaînes lourde déterminent le type d'immunoglobuline (IgG :  $\gamma$ , IgA :  $\alpha$ , IgM :  $\mu$ , IgD :  $\delta$ , IgE :  $\epsilon$ ).

Chaque chaîne légère est reliée à une chaîne lourde par des ponts disulfures (S-S) inter chaînes. Ces ponts peuvent être présents au sein d'une même chaîne et on parlera de ponts intra-chaînes.

Les chaînes des immunoglobulines sont composées de domaines structuraux de 110 acides aminés ; Chaque chaîne est composée d'un domaine constant (C) et d'un domaine variable (V). La partie variable est constituée de régions hypervariables (CDR = *complementarity determining regions*) qui participent à la structure du paratope, qui interagit avec.

Cette partie constante n'interagit pas avec l'antigène mais permet d'activer le complément et d'être reconnu par les récepteurs des immunoglobulines (FcR) des cellules immunitaires telles que les macrophages, les cellules natural killer (NK). (59)

Tableau 13 : Caractéristiques structurales et fonctionnelles principales des différentes classes d'anticorps.

	<b>IGM</b>	<b>IGG</b>	<b>IGA</b>	<b>IGD</b>	<b>IGE</b>
Sous-unités	5	1	1, 2, +	1	1
Domaines chaînes lourdes	5	4	4	4	5
Masse (KDa)	950	150	180 à 500	175	200
T1/2 sérum (j)	5.1	23	5.8	2.8	2.3
Fixation du complément	++	+	-	-	-
Stimulation des basophiles et mastocytes	-	-	-	-	++
Passage transplacentaire	-	+	-	-	-
Passage transépithélial	(+)	(+)	++	-	-
Oponisation pour macrophages, neutrophiles et éosinophiles	-	+	-	-	-
Sous classe	$\mu$	$\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3, \gamma 4$	$\alpha 1, \alpha 2$	$\delta$	E
Taux sériques	1	9 3 1 0.5	3 0.5	0.1	0.001

(mg/ml)					
---------	--	--	--	--	--

### 3. Fonctions biologiques des immunoglobulines

Les anticorps interviennent dans 5 fonctions différentes

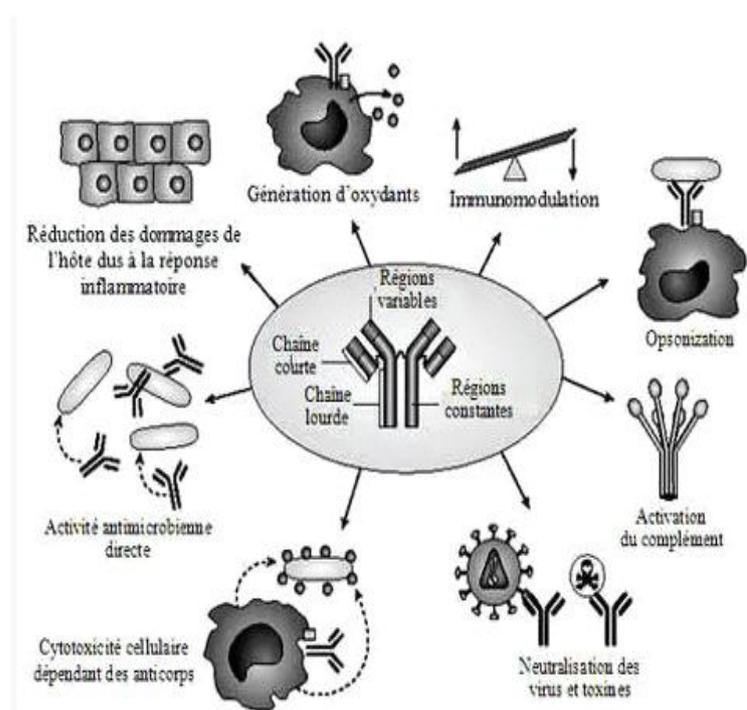


Figure 17 Les fonctions de l'anticorps.

- **Neutralisation** : les anticorps permettent de neutraliser les agents du « non soi » tels que les bactéries, les virus, les toxiques. Cette neutralisation permet de bloquer les fonctions biologiques de l'antigène puis de faciliter son élimination par des mécanismes effecteurs.
- **Opsonisation** : Suite à la formation du complexe immunitaire, le fragment Fc des anticorps est reconnu par des récepteurs spécifiques de la région Fc et présents sur les cellules phagocytaires.
- **Activation du complément** : l'anticorps doit d'abord se fixer sur l'antigène pour découvrir une partie de son fragment Fc, afin de permettre la fixation de la molécule C1q du complément qui activera la voie classique pour détruire les agents du « non soi ».
- **Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)**
- **Activation des mastocytes, éosinophiles, basophiles (60)**

## 4. Type d'anticorps monoclonaux

Seules les IgG seront utilisées en thérapeutique. On distingue :

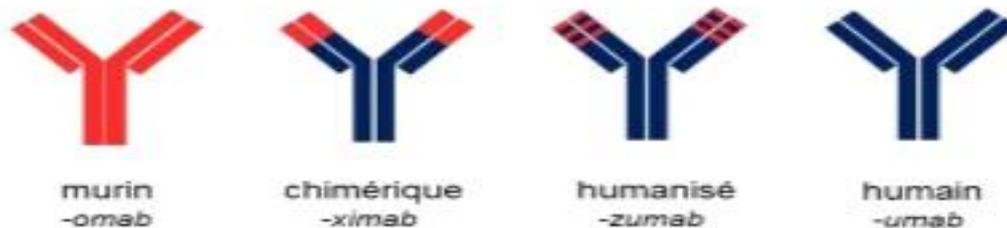


Figure 18 Différentes types d'anticorps

- **Anticorps murins (suffixe -omab) :** ce sont des anticorps produits chez la souris. Le principal défaut de ces anticorps est la production d'anticorps humains anti-souris (HAMA) lorsqu'ils sont utilisés comme agent thérapeutique chez l'homme. Aujourd'hui leur utilisation est limitée.
- **Anticorps chimériques :** les domaines variables de la chaîne lourde et de la chaîne légère d'un anticorps humain sont remplacés par ceux d'une espèce non humaine, qui possèdent la spécificité antigénique voulue.
- **Anticorps humanisés :** les 3 séquences courtes hypervariables (« complementarity determining regions ») des domaines variables non humains de chaque chaîne sont insérées dans le domaine variable d'un anticorps humain. D'autres modifications peuvent être apportées à certaines séquences pour améliorer la liaison à l'antigène.
- **Anticorps humains recombinants :** les domaines variables respectifs de la chaîne lourde et de la chaîne légère d'un anticorps humain sont combinés avec la région constante d'un anticorps humain. (61)

## 5. Liste des Anticorps monoclonaux princeps et biosimilaires

Aujourd'hui, ces médicaments font partie intégrante de l'offre de traitements biologiques efficaces dans l'UE tout en présentant des garanties adéquates concernant la sécurité des patients.

Actuellement, près de 30 biosimilaires d'AcM et de protéines de fusion ont été approuvés en Europe [adalimumab (8), bévacizumab (2), étanercept (2), infliximab (4), rituximab (6) et trastuzumab (5)]

Seul le cétuximab, qui cible le récepteur de l'EGF (*epidermal growth factor*) manque pour l'instant à cette liste, probablement en raison de la présence d'un second site de N-glycosylation dans la partie Fab de l'immunoglobuline qui rend la démonstration de biosimilarité plus difficile.

Tableau 14 Anticorps et protéine de fusion-Fc approuvés par l'EMA (références et biosimilaires, classement alphabétique).

Dénomination commune internationale (cible antigénique)	Médicament de référence		Noms	Dates AMM Européenne++
	Noms	Dates AMM États-Unis/Européenne		
Adalimumab (TNF- $\alpha$ )	Humira	2003/2002	8 biosimilaires : Amgevita ,Cyltezo, Halimatoz, Hefiya Hulio, Hyrimoz, Imraldi, Solymbic	20172017 20182018 20182017 20172017
Bévacizumab (VEGF.A)	Avastin	2005/2004	2 biosimilaires : Mvasi Zirabev	20182019
Etanercept (TNF- $\alpha$ )	Enbrel	1998/2000	2 biosimilaires : Benepali Erelzi	20162017
Infliximab (TNF- $\alpha$ )	Remicade	1999/1998	4 biosimilaires : Flixabi Inflectra Remsima Zessly	20162013 20132018
Rituximab (CD20)	Rituxan/Mabthera	1997/1998	6 biosimilaires : Blitzima ,Ritemvia, Rituzena, Tuxella,	20172017 20172017 2017

			Rixathon, Riximyo, Truxima	2
Trastuzumab (HER2/neu)	Herceptine/Herceptin	2000/1998	5 biosimilaires : Herzuma Kanjinti Ogivri Ontruzant Trazimera	20182018 20192017 2018

## 6. Production des anticorps monoclonaux

Les premiers anticorps monoclonaux développés étaient entièrement murins. Ils ont été produits par la technique des hybridomes, qui consiste à immortaliser un lymphocyte B en le fusionnant avec une cellule de myélome murin. Cette technique a été mise au point par Georges Köhler et César Milstein et leur a valu le prix Nobel en 1984

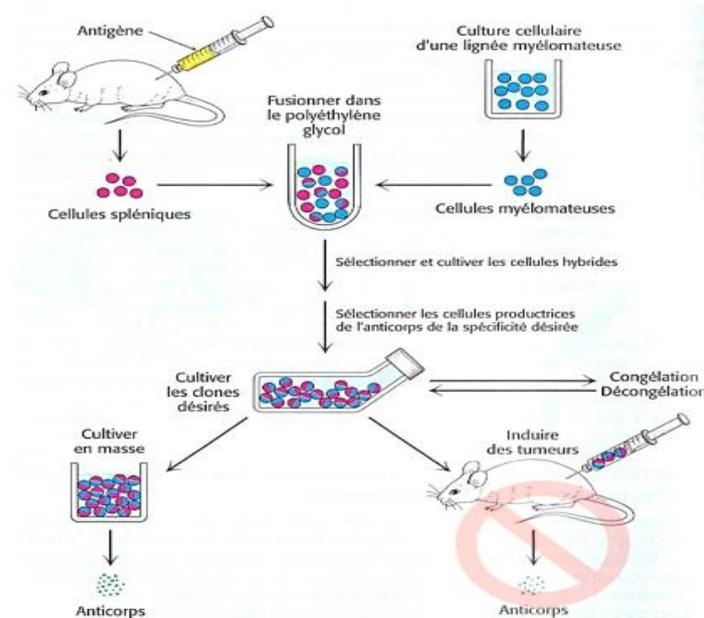


Figure 19 Obtention des anticorps monoclonaux murins d'après biochimie humaine,

Introduction à la médecine interne de G. HENNEN (62)

Dans un premier temps, il faut isoler le lymphocyte B capable de synthétiser un anticorps. Pour cela l'antigène d'intérêt est injecté dans une souris. Les lymphocytes B isolés de l'animal sont ensuite fusionnés avec des cellules de myélomes déficientes en thymidine kinase (TK) et hypoxanthine guanine phosphoribosyl-transférase (HGPRT), deux enzymes nécessaires à la voie de récupération des nucléotides.

Les hybridomes qui correspondent donc à une cellule B fusionnée à une cellule de myélome, sont sélectionnés avec un milieu de culture HAT contenant de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine et de la thymidine. Les hybridomes sont ensuite cultivés en effectuant des dilutions limites de manière à avoir un seul hybridome par puits.

Le surnageant de culture de chaque puit est testé par ELISA pour rechercher la présence d'anticorps ayant la spécificité recherchée.

Cette technique a été très utilisée pour produire des anticorps monoclonaux thérapeutiques et de diagnostic.

La production de ces anticorps passe par les étapes suivantes :

## 6.1 DISPOSITIONS GENERALES

La production est basée sur un système de lot de semence comprenant une banque de cellules primaire et dans les cas appropriés une banque de cellules de travail dérivées des cellules clonées.

La méthode de production est validée au cours des études de développement de façon à prévenir la transmission d'agents infectieux par le produit final.

**Validation du procédé :** Au cours des études de développement, le procédé de production est validé pour les aspects suivants :

- Régularité du procédé de production, notamment des méthodes de culture cellulaire/fermentation, de purification et dans les cas appropriés de fragmentation.
- Élimination ou inactivation des agents infectieux.
- Élimination adéquate des impuretés associées au produit et au procédé (par exemple protéines et ADN de la cellule hôte, protéine A, antibiotique, composants des cultures cellulaires)
- Spécificité et activité biologique de l'anticorps monoclonal.
- Dans les cas appropriés, absence de pyrogènes autres que des endotoxines
- Réutilisabilité des composants intervenant dans la purification (par exemple colonnes), avec limites ou critères d'acceptation établis en fonction de la validation.
- Méthodes utilisées pour la conjugaison dans les cas appropriés.

**Préparation de référence :** Un lot dont la stabilité a été établi et l'adéquation démontrée par des essais cliniques, ou un lot représentatif du précédent, est utilisé comme préparation de référence pour l'identification, les essais et le dosage. La préparation de référence est convenablement caractérisée comme défini sous Caractérisation du produit, à cela près qu'il n'est pas nécessaire de vérifier la réactivité croisée pour chaque lot de préparation de référence.

## 6.2 CELLULE SOURCE

Les cellules source comprennent les partenaires de fusion, les lymphocytes, les cellules myélomatoses, les cellules nourricières et les cellules hôtes (pour l'expression des anticorps monoclonaux recombinants).

L'origine et les caractéristiques de la cellule parentale sont documentées, notamment concernant l'état de santé des donneurs, ainsi que les partenaires de fusion utilisés (par exemple cellule myélomateuse, lignée lymphoblastoïde Bhumaine).

Lorsque cela est possible, les cellules source font l'objet d'un dépistage approprié des agents étrangers et des agents endogènes. Le choix des virus à rechercher dépend de l'espèce et du tissu d'origine.

### **6.3 LIGNEE CELLULAIRE PRODUCTRICE DE L'ANTICORPS MONOCLONAL**

L'adéquation de la lignée cellulaire productrice de l'anticorps monoclonal est démontrée par :

- Une documentation sur l'historique de la lignée cellulaire, comprenant notamment une description des procédures de fusion cellulaire, d'immortalisation ou de transfection et de clonage
- La caractérisation de la lignée cellulaire (par exemple phénotype, analyse isoenzymatique, marqueurs cytogénétiques)
- La caractérisation des propriétés pertinentes de l'anticorps
- L'uniformité des attributs essentiels de la qualité de l'anticorps, jusqu'au niveau de doublements de population ou au nombre de générations utilisées en production de routine, ou au-delà
- Pour les produits recombinants, la reproductibilité de la séquence codante du vecteur d'expression dans des cellules cultivées à la limite d'âge des cellules in vitro pour une utilisation en production, ou au-delà, par des méthodes portant sur les acides nucléiques ou par analyse du produit.

### **6.4 BANQUES DE CELLULES**

- La banque de cellules primaire est une suspension homogène de la lignée cellulaire productrice de l'anticorps monoclonal, répartie en volumes égaux dans des récipients individuels en une seule opération, pour conservation.
- Une banque de cellules de travail est une suspension homogène du matériel cellulaire issu de la banque de cellules primaire à un niveau de passage fini, répartie en volumes égaux dans des récipients individuels en une seule opération, pour conservation.

Les essais suivants sont effectués sur la banque de cellules primaire : viabilité, identité, absence de contamination bactérienne, fongique et mycoplasmique, caractérisation de l'anticorps monoclonal produit. La contamination virale étrangère est évaluée au moyen d'une gamme appropriée d'essais in vivo et in vitro. La contamination par des rétrovirus et autres virus endogènes est évaluée au moyen d'une gamme appropriée d'essais in vitro.

- Les cellules postproduction sont des cellules cultivées jusqu'au niveau de doublements de population ou au nombre de générations utilisées en production de routine, ou au-delà.

Les essais suivants sont effectués sur les cellules postproduction : absence de contamination bactérienne, fongique et mycoplasmique. La contamination virale étrangère est évaluée au moyen d'une gamme appropriée d'essais in vivo et in vitro.

La contamination par des rétrovirus et autres virus endogènes est évaluée au moyen d'une gamme appropriée d'essais in vitro.

## **6.5 CULTURE CELLULAIRE ET RECOLTE DES ANTICORPS**

On distingue

### **Production à un niveau de passage fini (récolte unique)**

Les cellules sont cultivées jusqu'à un nombre maximal défini de passages ou de doublings de population, ou jusqu'à un moment de récolte fixé (en fonction de la stabilité de la lignée cellulaire).

La récolte du produit s'effectue en une seule opération.

### **Production en culture continue (récolte multiple)**

Les cellules sont cultivées en continu pendant une durée définie (qui est en fonction de la stabilité du système et de la régularité de la production). Un contrôle est nécessaire pendant toute la durée de vie de la culture, la fréquence et le type des contrôles dépendent de la nature du système de production.

Chaque récolte fait l'objet d'essais portant sur la teneur en anticorps, la bio charge, la présence d'endotoxines et de mycoplasmes.

Des essais généraux ou spécifiques de recherche de virus étrangers sont effectués à un stade approprié, selon la nature des procédés de production à un niveau de passage fini (récolte unique), au moins 3 récoltes font l'objet d'une recherche de virus étrangers par une gamme appropriée de méthodes in vitro.

Si la présence de virus étrangers est détectée, le procédé fait l'objet d'un examen approfondi visant à déterminer la cause de la contamination, et la récolte n'est pas soumise aux traitements ultérieurs.

Les récoltes dans lesquelles a été détecté un virus endogène ne sont pas utilisées pour la purification, à moins qu'une stratégie appropriée n'ait été définie pour prévenir la transmission d'agents infectieux.

## **6.6 PURIFICATION DES RECOLTES**

Plusieurs récoltes ou mélanges intermédiaires peuvent être regroupés avant de procéder aux traitements ultérieurs.

Le procédé de purification comprend des étapes permettant d'éliminer et/ou inactiver les virus enveloppés et les virus non enveloppés.

Des étapes définies de ce procédé permettent d'obtenir un anticorps monoclonal purifié (substance active) de qualité et d'activité biologique reproductibles.

## **6.7 SUBSTANCE ACTIVE**

Les essais à effectuer sur la substance active dépendent de la validation du procédé, de la démonstration de sa régularité et de la teneur attendue en impuretés associées au produit et au procédé.

La substance active fait l'objet d'essais portant sur son aspect, son identité, sa bio charge, sur la recherche d'endotoxines bactériennes, de substances associées au produit et d'impuretés associées au produit ou au procédé, comprenant des recherches des protéines issues de la cellule hôte, ainsi que sur son intégrité structurelle, sa teneur en protéines et son activité biologique.

Ces essais sont effectués par des méthodes analytiques appropriées, si nécessaire avec comparaison à la préparation de référence. Lorsque la substance active est un anticorps conjugué ou transformé, des essais appropriés doivent être effectués avant et après la conjugaison/modification.

## **6.8 VRAC FINAL**

Un ou plusieurs lots de substance active peuvent être combinés pour produire le vrac final. Des stabilisants appropriés ou d'autres excipients peuvent être ajoutés lors de la préparation du vrac final.

Il doit être conservé dans des conditions validées en termes de bio charge et de stabilité.

## **6.9 LOT FINAL**

Le vrac final est filtré sur un filtre stérilisant et réparti en récipients stériles dans des conditions aseptiques. Il peut ultérieurement être cryodesséché.

Dans le cadre des contrôles en cours de production, un examen de chaque récipient (flacon, seringue ou ampoule) doit être effectué après le remplissage afin d'éliminer les récipients contenant des particules visibles.

Lors du développement du produit, il doit être démontré soit que le procédé ne générera pas de particules protéiques visibles dans le lot final, soit que la teneur de ces particules est réduite à un niveau justifié et autorisé. (63)

## 7. Étude de comparabilité des anticorps monoclonaux biosimilaires

La démonstration de la comparabilité n'a pas pour but de démontrer que les produits sont identiques mais qu'ils sont hautement similaires et qu'il n'y a pas de différences cliniques significatives entre les deux produits.

La comparabilité qualité est établie par rapport à la structure moléculaire et doit être prouvée par une caractérisation analytique complète.

Les essais pré cliniques et cliniques permettent d'assurer que toutes les différences observées au niveau de la qualité n'auront aucun impact sur le profil de sécurité et d'efficacité du biosimilaire.

Tableau 15 Études comparatives de la qualité analytique (propriétés physico-chimiques) et fonctionnelles (activité biologique / pharmacologique): anticorps de références et biosimilaires (64)

Caractéristiques	Techniques analytiques	Paramètres analysés
	<b>Caractérisation physico-chimique</b>	
Propriétés générales	Ultra-violets à 280 nm	Teneur en protéines  pH, osmolalité, concentration en surfactant  Apparence, couleur, clarté
Structure primaire	Analyse de la protéine intacte par chromatographie en phase liquide – spectrométrie de masse (LC-MS)  Analyse des sous-unités protéiques par LC-MS  Carte peptidique par LC-MS/MS  Focalisation isoélectrique capillaire	Masse moléculaire de la protéine intacte  Masse moléculaire des LC et HC réduites, déglycosylées/glycosylées  Séquence protéique (carte peptidique après réduction) Structure des ponts disulfures (carte peptidique sans réduction) Masse moléculaire de la protéine intacte Masse moléculaire des LC et HC réduites, déglycosylées/glycosylées Niveau de glycation  Point isoélectrique

	par image (icIEF)  Chromatographie + réaction ninhydrine	Composition en acides aminés
Modifications post-traductionnelles enzymatiques (glycosylation)	Carte peptique/glycopeptidique par LC-MS/MS  Chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC)-MS/MS  HILIC-FD (2-AB)  Électrophorèse capillaire de zone (CZE) - fluorescence induite par laser (LIF) (APTS)	Site d'occupation des N-glycanes  Identification des N-glycanes  Profilage des N-glycanes  Profilage des N-glycanes
Structures d'ordres supérieurs	Dichroïsme circulaire  Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)  Fluorescence (intrinsèque)  Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)	Structures secondaire et tertiaire  Structure secondaire  Structure tertiaire  Propriétés thermodynamiques, stabilité thermique, identification des transitions thermiques
Particules et agrégats	Chromatographie d'exclusion stérique (SXC)  Diffusion dynamique de la lumière (DLS)  Fractionnement par couplage flux-force asymétrique (A4F)-LS  Ultracentrifugation analytique (AUC)  Obscurcissement de la lumière (LO)	Variants de taille de haut poids moléculaire (HMWS) et de bas poids moléculaire (LMWS)  Particules submicroniques  Particules submicroniques  Profil des agrégats  Particules sub-visibles
Substances apparentées et impuretés	SEC - conditions natives  Électrophorèse capillaire sur gel en milieu dénaturant (CGE-SDS)  Chromatographie d'échange de	Variants de taille  Variants de taille  Variants de charge, distribution des isoformes

	cations (CEX) Focalisation isoélectrique capillaire par image (icIEF)	(déamidation, isomérisation, parties terminales N/C)
Substances apparentées et impuretés	Carte peptidique par LC-MS/MS	Variants de charge, distribution des isoformes (déamidation, isomérisation, parties terminales N/C)  Oxydation
Impuretés des cellules-hôtes	ELISA 2D-LC-MS (avec chromatographie d'affinité)  Qpcr	Protéines de cellules-hôtes  ADN résiduel
	Caractérisation biologique	
Liaison du Fab et activité	ELISA, Résonance plasmonique de surface (SPR)  Tests cellulaires	Affinité antigène-anticorps  Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), cytotoxicité dépendante du complément (CDC), phagocytose dépendante des anticorps (ADCP)
Liaison de la région du Fc	SPR Tests cellulaires	Interactions avec C1q, RFcγIIIa-V/F, RFcγIIIb, RFcγIIa, RFcγIIb, FcRn

Des études de comparabilité de la qualité analytique et fonctionnelle (65), non cliniques (pharmacodynamique et toxicologique) (66) et cliniques sont la pierre angulaire du développement d'anticorps biosimilaires (67).

## 8. Contrôle de routine

Les préparations liquides sont limpides ou légèrement opalescentes, incolores, ou légèrement colorées.

Les préparations cryo-desséchées sont des poudres ou masses solides friables blanches ou légèrement colorées. Après reconstitution, elles présentent les mêmes caractéristiques que les préparations liquides.

## 8.1 Identification

Dans les appropriés, l'identité est établie par des méthodes validées appropriées avec comparaison à la préparation de référence. Le dosage peut également contribuer à l'identification.

## 8.2 Essais

- **Solubilité** : Les préparations cryodesséchées se dissolvent complètement dans le volume prescrit de liquide de reconstitution, en un temps défini, approuvé pour le produit considéré.

-**PH** : La préparation satisfait aux limites approuvées pour le produit considéré.

-**Osmolalité** : au minimum 240 mos mol/kg, sauf exception justifiées et autorisée.

-**Volume extractible** : La préparation satisfait à l'essai du volume extractible.

-**Protéines totales** : La préparation satisfait aux limites approuvées pour le produit considéré.

-**Distribution de taille moléculaire** : Est déterminée par une méthode appropriée, par exemple la chromatographie d'exclusion .La préparation satisfait aux limites approuvées pour le produit considéré.

-**Identité moléculaire et intégrité structurelle** : Selon la nature de l'anticorps monoclonal considéré, sa microhétérogénéité et ses isoformes, divers essais peuvent être utilisés pour établir l'identité moléculaire et l'intégrité structurelle. Ces essais peuvent comprendre la cartographie peptidique, la focalisation isoélectrique, la chromatographie à échange d'ions, la chromatographie à interaction hydrophobe, la cartographie oligosaccharidique, la détermination de la teneur en monosaccharides et la spectrométrie de masse.

-**Pureté** : Des essais sont effectués pour le contrôle des impuretés associées au produit et au procédé, selon des méthodes validées appropriées.

Si des essais de contrôle des impuretés associées au procédé ont été effectués avec des résultats satisfaisants sur la substance active ou le vrac final, ils peuvent être omis sur le lot final.

-**Stabilisant** : Dans les cas appropriés, la préparation satisfait aux limites approuvées pour le produit considéré.

**Eau** : Les produits cryo-desséchés satisfont aux limites approuvées pour le produit considéré.

**Stérilité** : La préparation satisfait à l'essai de stérilité.

**Endotoxines bactériennes** : La préparation satisfait aux limites approuvées pour le produit considéré.

### **8.3 Dosage**

Procédez à un titrage biologique approprié par comparaison à la préparation de référence. Utilisez les méthodes statistiques habituelles pour établir le plan d'essai et calculer les résultats.

### **8.4 Conservation du produit**

Date de péremption : est calculée à partir de la date de filtration stérile, de la date de remplissage (pour les préparations liquides) ou de la date de cryodessiccation (dans les cas appropriés).

## CONCLUSION

L'industrie de la biotechnologie a connu une croissance rapide ces dernières années. Aujourd'hui, les biotechnologies sont utilisées dans de larges domaines, notamment celui de la santé où elles ont révolutionné l'approche de la recherche et la production de nouveaux médicaments utilisés dans le traitement de pathologies lourdes et chroniques comme le cancer, la sclérose en plaques ou la polyarthrite rhumatoïde.

Actuellement, les médicaments biologiques occupent une part importante du marché pharmaceutique dont ils représentent plus de 50 % des médicaments développés par les grandes entreprises malgré leurs coûts du développement importants. Cet essor est principalement dû au développement de nombreux anticorps monoclonaux thérapeutiques.

Ces produits sont des molécules plus grandes et plus complexes que les médicaments traditionnels, ce qui peut entraîner des défis supplémentaires dans leur production et leur contrôle.

la fabrication des médicaments biologiques et biosimilaires est une étape difficile de par l'utilisation du système du vivant et la complexité de la substance active. Compte tenu de cette complexité et de l'importance des caractéristiques évoquées pour l'activité thérapeutique, l'établissement

De la stratégie de contrôle n'en est que plus difficile. Pour répondre à ce challenge, le

Fabriquant devra maîtriser son processus pour assurer la reproductibilité et utiliser des méthodes analytiques pour démontrer la biosimilarité et commercialiser un

Produit sûr et efficace. Il est alors compréhensible que les médicaments biosimilaires ne puissent être assimilés à de simples génériques et qu'un cadre réglementaire particulier doive être mis en place pour évaluer la biosimilarité et contrôler la mise sur le marché de tels produits.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) :[https://www.doctissimo.fr/medicaments/tout-sur-les-medicaments/medicaments-generiques/medicaments-generiques-que-signifie-leur-bioequivalence/7fcfa\\_ar.html](https://www.doctissimo.fr/medicaments/tout-sur-les-medicaments/medicaments-generiques/medicaments-generiques-que-signifie-leur-bioequivalence/7fcfa_ar.html) consulté le 15 mai 2023
- (2): <http://www.txrating.org/spc/polycop/autres%20plan%20experience.htm> consulté le 15 mai 2023
- (3): <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/immun-complexe/41747> consulté le 20 mai 2023
- (4): <https://www.chu-nantes.fr/qu-est-ce-qu-un-essai-en-double-aveugle-1> consulté le 18 mai 2023
- (5): <https://www.universalis.fr/dictionnaire/%25C3%25A9pitope/> consulté le 18 mai 2023
- (6): [https://fad.univ-lorraine.fr/pluginfile.php/23863/mod\\_resource/content/2/co/Definition\\_Essais\\_Croises.html](https://fad.univ-lorraine.fr/pluginfile.php/23863/mod_resource/content/2/co/Definition_Essais_Croises.html) consulté le 8 mai 2023
- (7) :<https://pharmacomedicale.org/pharmacologie/pharmacocinetique/36-etapes-du-devenir-du-medicament> consulté le 20 mai 2023
- (8) [https://www.chu-nantes.fr/medias/fichier/pharmacodynamie\\_1475506984792-pdf](https://www.chu-nantes.fr/medias/fichier/pharmacodynamie_1475506984792-pdf)
- (9) : <https://sante.gouv.fr/soins-et-maladies/medicaments/glossaire/article/medicament-de-reference> consulté le 20 mai 2023
- (10): [https://acthera.univ-lille.fr/co/02\\_fonction.html](https://acthera.univ-lille.fr/co/02_fonction.html) consulté le 20 mai 2023
- (11): Ashish Swarup Verma, Shishir Agrahari, Shruti Rastogi, and Anchal Singh. Biotechnology in the Realm of History. 2011 Jul-Sep. Disponible sur <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3178936/>
- (12): Pfizer. " Les biosimilaires en 10 questions " [Internet]. [cité 23 nov 2018]. Disponible sur: [https://www.pfizer.fr/sites/default/files/content\\_types/les\\_biosimilaires\\_en\\_10\\_questions.pdf](https://www.pfizer.fr/sites/default/files/content_types/les_biosimilaires_en_10_questions.pdf)
- (13): Le Pen C. Les biosimilaires en 15 questions. <https://www.apmnews.com/Documents/lesbiosimilairesen15questionsemail.pdf> consulté le 15 avril 2023
- (14): Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. Nat Biotechnol. Le 15 avril 2023

(15) :Le petit Larousse ILLUSTRÉ 2000

(16) : "Définition statistique de la biotechnologie (mise à jour en 2005) - OCDE «, (consulté le 02 Mai 2023)

(17):Organisation des Nations-Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) : <http://www.fao.org> consulté le 30 Avril 2023

(18):Bio industry Association: <http://www.bioindustry.org> consulté le 30 Avril 2023

(19)-Canadian Food Inspection Agency ([www.cfia.agr.ca](http://www.cfia.agr.ca)). Consulté le 02 Mai 2023

(20): Biotech-ecolo.net (consulté le 27 Avril 2023)

(21): Maris cal&AbogadosAsociados,articleintitulé:« LesonzeCouleursdeLabiotecnologie»,RebecaGarcía-EscuderoBernat (consulté le 02 Mai 2023 )

(22) : Les bio-médicaments 1re partie: cadre général. Manon Broutin et Herve Watier.

(23):U.S. Food and Drug Administration (FDA101: Regulating Biological Products).

(24) : Royaume Du Maroc Université Mohammed V De Rabat Faculté de médecine et de pharmacie rabat année : 2018 thèses en ° : 157 médicaments biologiques : Spécificités et applications en oncologie.

(25):S. Rick wood, S. Di Biase, Searching for Terra Firma in the Bio-similar and Non-Original Biologics Market, IMS Health, 2013.

(26) :<https://ansm.sante.fr/qui-sommes-nous/notre-perimetre/les-medicaments/p/medicaments-biosimilaires#:~:text=Qu%27est%20ce%20qu%27est%20dans%20le%20domaine%20public>. Consulté le 5 mai 2023

(27) : Article L5121-1 du Code de la santé publique. Texte extrait du site Légi France en date du04janvier2016.

(28) .<https://www.anses.fr/fr/portails/1808/content/152882#:~:text=L%27Agence%20europ%27enne%20des%20m%27dicaments,du%20c%27B4t%27humain%20que%20v%27rinaire>. Consulté le 5 mai 2023

(29) : Communiqué de presse de Sanofi, "Sanofi annonce des résultats positifs de phase 3 pour Toujeo," 14 Juin 2014.

[Enligne].[http://www.sanofi.com/Images/36703\\_20140614\\_ADA-Toujeo\\_fr.pdf](http://www.sanofi.com/Images/36703_20140614_ADA-Toujeo_fr.pdf).

[Accès le 27 Octobre 2014].

(30) <https://www.miph.gov.dz/fr/economie-previsionnelle-de-150-millions-de-dollars-grace-au-passage-a-la-production-locale-de-38-generique-et-biosimilaires-auparavant-importes-et-lenregistrement-de-27-nouveaux-biosimilaires/> consulté le 28 avril 2023

(31) ICH, ICH Topic Q5A (R1) Quality of Biotechnological Products: Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin, 1997.

(32): ICH, ICH Topic Q5B Quality of Biotechnological Products: Analysis of the Expression Construct in Cell Lines Used for Production of r-DNA Derived Protein Products, 1996.

(33): Université toulouse iii paul sabatier. thèse intitulée: production, contrôle de la qualité et réglementation des médicaments biosimilaires : un challenge pour l'industrie pharmaceutique par Aurélie Laura Argentin pages 50-54

(34): ICH, ICH Topic Q5C Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological / Biological Products, 1996.

(35): ICH, ICH Topic Q5C Quality of Biotechnological Products: stability Testing of Biotechnological / Biological Products, 1996.

(36): ICH, ICH Topic Q5E Comparability of Biotechnological / Biological Products, 2005.

(37) : ICH, ICH Topic Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological / Biological Products, 1999.

(38): ICH, Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals , 2011.

(39): Université de Bordeaux, U.F.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES, Thèse N14 Par Monsieur BENEDETTO Julien, PAGES 26-28.

(40): Pharmacopée européenne 9<sup>ème</sup> édition Tome 7.1

(41) : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), Les médicaments bio-similaires- Etat des lieux, Septembre 2013.

(42): Université de Lille 2. Thèse intitulée « La réglementation européenne et américaine des médicaments bio-similaires» par Koussayla BOUKHALFA

(43): Université de Picardie Jules Verne. Thèse intitulée « Les médicaments génériques et Bio-similaires» par Cécile PROUCHANDY

(44): la production des bio-médicaments (les médicaments biosimilaires ) (article des médicaments issue de la biotechnologie

(45): LATIEULE,Sylvie. « Culture cellulaire :Trois étapes clés pour produire des protéines thérapeutiques », 4Janvier2011. <http://www.industrie.com/pharma/culture-cellulaire-trois-etapes-cles-pour-produire-des-proteines-therapeutiques>, 39248.

(46): Pharmacopée Européenne, Produits obtenus par la méthode dite de l'ADN recombinant, 2008

(47):LIGNE DIRECTRICE À L'INTENTION DE L' INDUSTRIE Qualité des produits issus de la biotechnologie: Analyse des vecteurs d'expression dans les cellules utilisées pour la production de produits protéiques dérivés de l'ADN-r ICH thème Q5b

(48):ICH harmonised tripartite guideline derivation and characterisation of cellsubstrates used for production of biotechnological/biological products q5d

(49):Aurélie lara argentin. production, controle de la qualite et reglementation des medicaments biosimilaires : un challenge pour l'industrie pharmaceutiqueuniverte toulouse iii paul sabatier faculte des sciences pharmaceutiques2014

(50) : ICH harmonised tripartite guideline viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin q5a

(51):. Pharmacopée Européenne, 5.2.8 Réduction du risque de transmission des agents des encéphalopathies spongiformes animales par les médicaments à usage humain et vétérinaire, 2011.

(52): LIGNE DIRECTRICE À L'INTENTION DE L'INDUSTRIE : SPÉCIFICATIONS : MÉTHODES ANALYTIQUES ET CRITÈRES D'APPROBATION POUR LES PRODUITS BIOLOGIQUES ET ISSUS DE LA BIOTECHNOLOGIE : ICH THÈME Q6B

---

(53): World Health Organization, Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology, 2013.

(54): <https://www.lavoisier.com/fr/etude-stabilite/>consulté le 12/05/2023

(55): <http://localhost:8080/xmlui/handle/123456789/2866> consulté le 13/05/2023

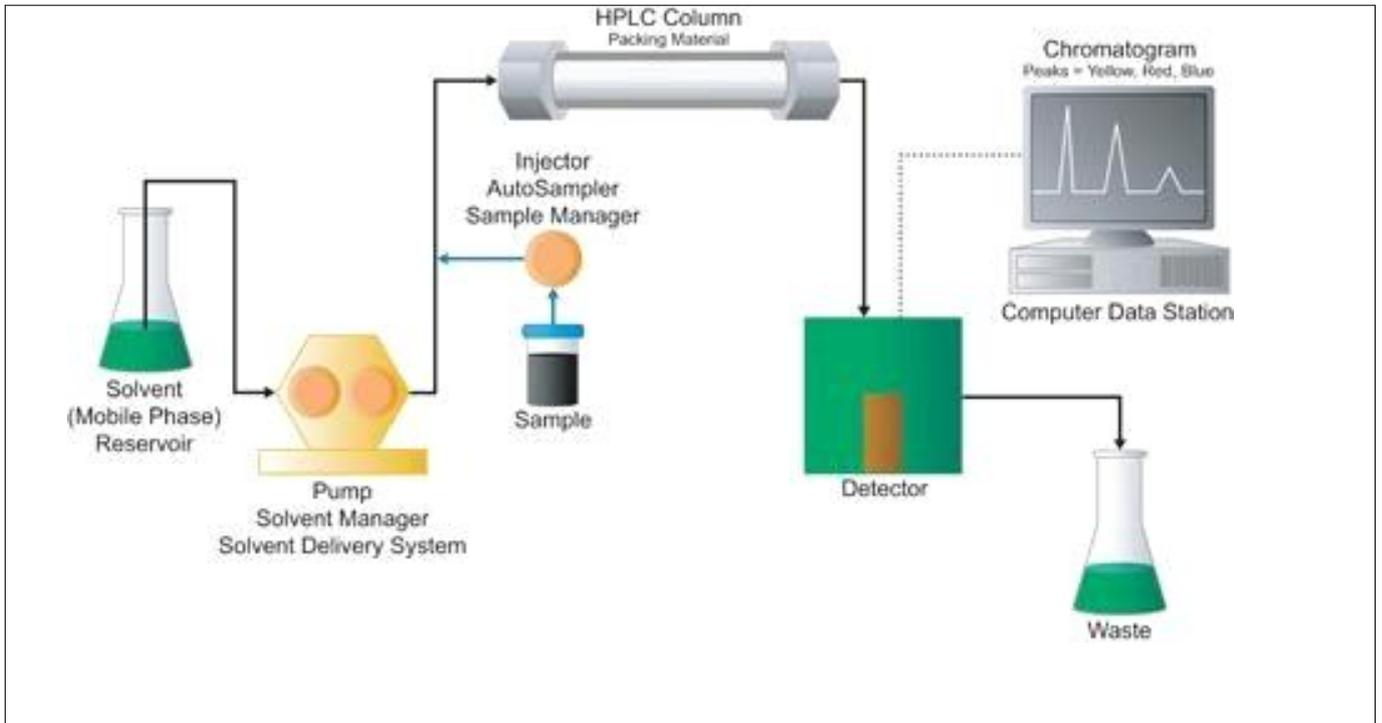
(56): [https://www.ufag-laboratorien.ch/fileadmin/Content/Downloads/fachthemen/UFAG\\_Stabilitaetstests\\_Chemie\\_Plus\\_02-2015.pdf](https://www.ufag-laboratorien.ch/fileadmin/Content/Downloads/fachthemen/UFAG_Stabilitaetstests_Chemie_Plus_02-2015.pdf) consulté le 13/05/2023

(57): [https://acthera.univ-lille.fr/co/03\\_Fabrication.html](https://acthera.univ-lille.fr/co/03_Fabrication.html) consulté le 15 Mai 2023

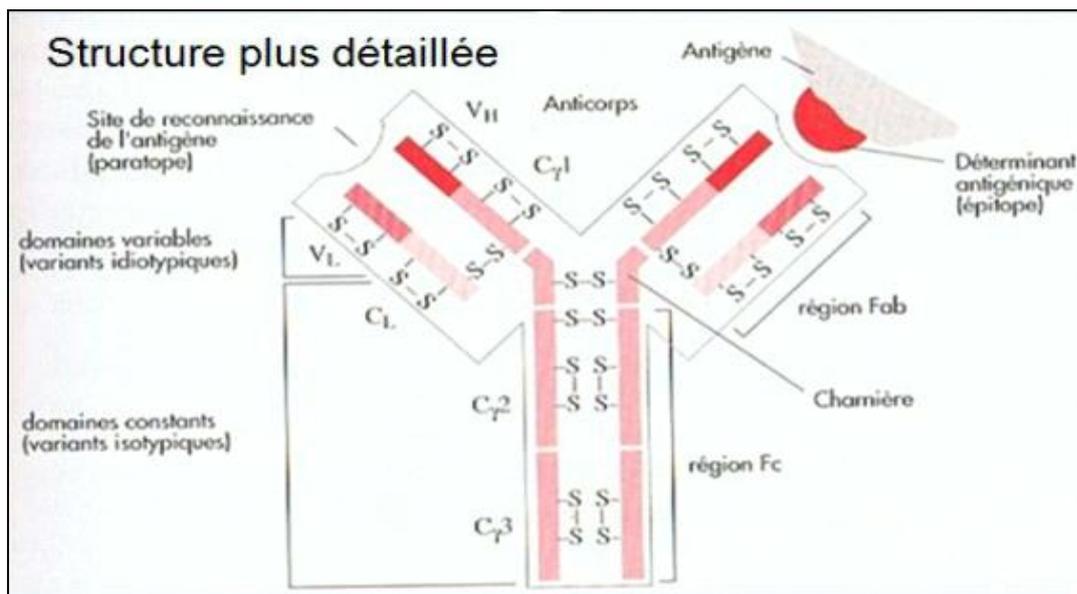
- (58): Pharmacopée européenne 9<sup>ème</sup> édition Tome 7.1
- (49): [https://acthera.univ-lille.fr/co/01\\_structure.html](https://acthera.univ-lille.fr/co/01_structure.html) consulté le 17 Mai 2023
- (60)-[https://acthera.univ-lille.fr/co/02\\_fonction.html](https://acthera.univ-lille.fr/co/02_fonction.html) consulté le 17/05/2023
- (61): [https://acthera.univ-lille.fr/co/04\\_type.html](https://acthera.univ-lille.fr/co/04_type.html) consulté le 15/05/2023
- (62): HENNEN, Georges. Biochimie humaine, introduction biochimique à la médecine interne, Première édition, Paris/Bruxelles, Edition De Boeck et Larcier SA, 1996, 792 p.
- (63) : LATIEULE, Sylvie. « Culture cellulaire :Trois étapes clés pour produire des protéines thérapeutiques», 4Janvier2011. <http://www.industrie.com/pharma/culture-cellulaire-trois-etapes-cles-pour-produire-des-proteines-therapeutiques>, 39248.
- (64): [https://www.medecinesciences.org/en/articles/medsci/full\\_html/2019/12/msc190048/T2.html](https://www.medecinesciences.org/en/articles/medsci/full_html/2019/12/msc190048/T2.html) consulté le 28 avril 2023
- (65):Ambrogelly A, Gozo S, Katiyar A, *et al.* Analytical comparability study of recombinant monoclonal antibody therapeutics. *MAbs* 2018; 10: 513–538.
- (66):van Aerts L, De Smet K, Reichmann G, *et al.* Biosimilars entering the clinic without animal studies. A paradigm shift in the European Union. *MAbs* 2014; 6: 1155–
- (67):Rahalkar H, Cetintas HC, Salek S. Quality, non-clinical and clinical considerations for biosimilar monoclonal antibody development: EU, WHO, USA, Canada, and BRICS-TM regulatory guidelines. *Front Pharmacol* 2018; 9.
- (68) : Pharmacopée européenne 9.0, CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE 01/2015: 20229 PAGES 50 – 51.
- (69) : Scheen AJ.— Nomenclature internationale des différents types d'anticorps monoclonaux. *Rev Med Liège*, 2009, 64, 244-247.
- (70): Scheen AJ.— Nouvelles avancées dans l'utilisation des anticorps monoclonaux en thérapeutique. *Rev Med Liège*, 2009, 64, 253-256
- (71) : "Biosimilars approved in Europe," 17 Octobre 2014. [En ligne]. <http://www.gabionline.net/Biosimilars/General/Biosimilars-approved-in-Europe>. consulté le 25 mai 023

## ANNEXES

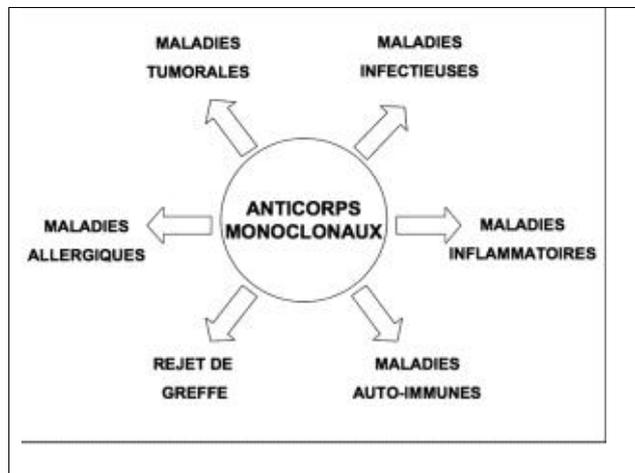
### Annexe1: Le principe de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) (68)



### Annexe2: Structure des anticorps (69)



**Annexe 3: Illustration des différentes pathologies dans lesquelles les anticorps Monoclonaux se sont révélés efficaces en thérapeutique.(70)**



**Annexe 4: Biosimilaires approuvés par l'EMA (71)**

Biosimilaire	DCI	Référence	Classe pharmaco-thérapeutique	Aire thérapeutique	Souche	Laboratoire	Date d'obtention de l'AMM	Forme pharmaceutique			
Omnitrope®	somatropine	Genotropin®	Hormones hypophysaires, hypothalamiques et analogues, hormones de l'antéhypophyse et analogues (hormone de croissance)	Endocrinologie	Escherichia coli	Sandoz	12/04/2006	Poudre et solvant pour préparation injectable			
Somatropin Biopartners®									Saccharomyces cerevisiae / E. coli pour la référence	Biopartners	05/08/2013
Valtropin®		Humatrope®					Biopartners		24/04/2006 Retiré le 10/05/2012		
Abseamed®	époétine alfa	Eprex®	Antianémiques (facteur de croissance hématopoïétique : érythropoïétine)	Oncologie/ Hématologie	Cellules d'ovaires de hamster chinois	Pütter Medice Arzneimittel	28/08/2007	Solution injectable en seringue préremplie			
Binocrit®										Sandoz	28/08/2007
Epoetin alfa Hexal®										Hexal	28/08/2007
Retacrit®	époétine zeta					Hospira	18/12/2007				
Silapo®										Stada	18/12/2007

## Biosimilaires approuvés par l'EMA (suite) (71)

Biosimilaire	DCI	Référence	Classe pharmaco-thérapeutique	Aire thérapeutique	Souche	Laboratoire	Date d'obtention de l'AMM	Forme pharmaceutique
Accofil <sup>®</sup>						Accord Healthcare	Avis positif du CHMP 25/07/2014	
Biograstim <sup>®</sup>						CT Arzneimittel	15/09/2008	
Filgrastim Hexal <sup>®</sup>						Hexal	06/02/2009	Solution injectable ou pour perfusion en seringue préremplie ou non
Filgrastim Ratiopharm <sup>®</sup>	filgrastim	Neupogen <sup>®</sup>	Immunostimulants, facteur de croissance leucocytaire (G-CSF)	Oncologie/ Hématologie	Escherichia coli	Ratiopharm	15/09/2008 Retiré le 20/04/2011	
Grastofil <sup>®</sup>						Apotex	10/10/2013	
Nivestim <sup>®</sup>						Hospira	08/06/2010	
Ratiograstim <sup>®</sup>						Ratiopharm	15/09/2008	
Tevagrastim <sup>®</sup>						Teva Generics	15/09/2008	
Zarzio <sup>®</sup>						Sandoz	06/02/2009	
Inflectra <sup>®</sup>						Hospira	10/09/2013	Poudre pour solution à diluer pour perfusion
Remsima <sup>®</sup>	infliximab	Remicade <sup>®</sup>	Immunosuppresseurs, inhibiteurs du Facteur Nécrosant des Tumeurs alpha (TNFα)	Rhumatologie, Gastro-Entérologie, Dermatologie	Cellules hybridomes murines	Celltrion	10/09/2013	
Bemfola <sup>®</sup>						Finox Biotech	24/03/2014	Solution injectable en stylo prérempli
Ovaleap <sup>®</sup>	folitropin alfa	Gonal-F <sup>®</sup>	Hormones sexuelles et modulateurs de la fonction génitale, gonadotrophines (FSH)	Gynécologie	Cellules d'ovaires de hamster chinois	Teva Pharma	27/09/2013	
Abasria <sup>®</sup>	insuline glargine	Lantus <sup>®</sup>	Médicaments du diabète, insulines et analogues injectables à longue durée d'action	Diabétologie	Escherichia coli	Eli Lilly	09/09/14	Solution injectable en cartouche et stylo prérempli jetable





## **Résumé**

Les biotechnologies ont permis un progrès incroyable dans le domaine de la santé ces deux derniers siècles. Ces progrès ont surtout permis d'améliorer la prise en charge des malades grâce à la création de nouveaux traitements plus sophistiqués et ciblés.

Les médicaments biotechnologiques sont des molécules complexes produites à partir de sources biologiques selon un processus complexe.

Sur le plan réglementaire, les biomédicaments présentent une plus grande exigence en terme de sécurité, de qualité et d'efficacité par rapport aux médicaments d'origine chimique.

De nombreux brevets de biomédicaments ont ou vont expirer prochainement et ouvrent ainsi la voie au marché des médicaments non innovants ou "copies" appelés biosimilaires.

Contrairement aux médicaments génériques, les biosimilaires sont des médicaments hétérogènes de haut poids moléculaire fabriqués dans des organismes vivants et soumis à une certaine variabilité. La caractérisation de tels produits est très complexe et insuffisante pour prouver la biosimilarité entre un biosimilaire et le médicament innovateur de référence. Par conséquent, pour évaluer la biosimilarité et octroyer une autorisation de mise sur le marché, les agences réglementaires demandent la soumission de données supplémentaires en termes de qualité, de sécurité et d'efficacité clinique.

### **Mots clés:**

Les Biotechnologies; Biomédicaments; Biosimilaires ; évaluer; Qualité .

## **Summary**

Biotechnologies have allowed incredible progress in the field of health. last two centuries.

These advances have mainly made it possible to improve the care patients through the creation of new, more sophisticated and targeted treatments. Biotechnological drugs are complex molecules produced from biological sources according to a complex process. From the regulatory point of view, biomedicines present a greater requirement in terms of safety, quality and effectiveness compared to drugs of chemical origin. Many biomedical patents have or will expire soon and thus open the way to the market for non-innovative drugs or "copies" called biosimilars. Unlike generic drugs, biosimilars are heterogeneous high molecular weight drugs made in living organisms and subject to some variability. The characterization of such products is very complex and insufficient to prove the biosimilarity between a biosimilar and the innovative reference drug. Therefore, to assess biosimilarity and grant marketing authorization, regulatory agencies request the submission of data additional in terms of quality, safety and clinical effectiveness.

### **Keywords:**

Biotechnologies; Biomedicines; Biosimilars; Evaluate; Quality .