

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR**

**ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1 -**



**FACULTE DE MEDECINE**

**DEPARTEMENT DE PHARMACIE**

Thèse d'exercice de fin d'études

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

*Thème*

**LE CONTRÔLE QUALITÉ  
DES MÉDICAMENTS BIOSIMILAIRES**

**Présenté et Soutenu par : Session Juillet 2022**

- Harrath Mohamed Redha
- Abdeldjebbar Abir

**Directeur de thèse : Dr. IMOUDACHE** Maitre-assistant en Chimie Minérale

**Jury d'évaluation:**

- Président de Jury : **Dr. Benghezal .I** Maitre-assistant en Biophysique
- Examinatrice : **Dr. Boucekchoukh .A** Maitre-assistante en Chimie Minérale

**Année universitaire 2021 – 2022**

## Dédicaces

Tout d'abord je tiens à remercier ALLAH le Tout Puissant de m'avoir donné la santé, la volonté, le courage et la patience pour mener à terme ma formation et pouvoir réaliser ce travail de recherche.

**A Mes Parents :** Vous m'avez appris à balbutier mes premières Paroles, à faire mes premiers pas dans la vie, à sourire, vous avez fait tant de sacrifices pour mon éducation et mes études. Vous m'avez comblé par votre soutien et votre générosité.

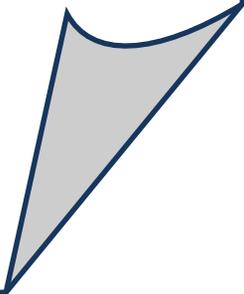
Ces quelques lignes ne sauraient exprimer toute l'affection et l'amour que je vous porte. Aujourd'hui, je dépose entre vos mains le fruit de votre patience et de vos innombrables sacrifices, soit-il l'exhaussement de vos vœux tant formulés et vos prières. Puisse dieu vous prêter longue vie, avec bonne santé, afin que je puisse vous combler.

**A mes Grands-parents :** A vous qui n'avez pas eu la chance de voir ce jour car la mort vous a arraché à notre Affection : j'implore Dieu le tout Puissant de vous pardonner et vous accepter dans Son paradis en exauçant tous ces vœux que vous avez émis pour moi sur cette terre et pour l'au-delà.

**A mes chères sœurs :** Puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais. Soyez fiers de vous-mêmes et continuez sur la voie tracée par nos parents.

**A mes meilleurs amis :** En souvenir d'agréables moments passés ensemble, et en témoignage de notre amitié. Je vous exprime toute mon affection et j'espère Que notre amitié restera intacte et durera pour toujours.

« Med Redha »



Je dédie cet événement marquant de ma vie

A la mémoire de mon **Papa** disparu trop tôt, avant même de partager cette joie avec moi, que dieu te garde en son vaste paradis.

A la lumière de mes jours, qui n'a jamais cessé de formuler des prières à mon égard; ma très chère **Mami**, merci de m'avoir poussée et motivée dans mes études, je te présente mon amour sincère et ma gratitude. Que Dieu te garde toujours pour moi mon ange gardien.

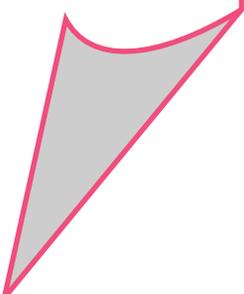
A **Maman** celle qui m'a donnée la vie et qui attend ce jour avec impatience.

A **ma tante maternelle K** qui m'a appris d'être la meilleure de sa classe.

A mes chères **sœurs** et **frère** ; **ma famille**, **mes amies**, **mes proches** et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité.

A tous **mes enseignants**, tout au long de mes études.

« **Abir** »



## Remerciements

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

- Nous voudrions tout d'abord adresser toutes nos reconnaissances à l'encadreur de ce mémoire, **Dr.Imoudache** (Pharmacien MAT en Chimie minérale) pour nous avoir encadrés, aidés, orientés ainsi que pour ses conseils judicieux qui ont contribué à alimenter notre réflexion.
- Aux membres du jury:
  - Président : **Dr. Benghezal .I** Maitre-assistant en Biophysique
  - Examinatrice : **Dr.Bouhekchoukh .A** Maitre-assistante en Chimie Minérale

Messieurs, Mesdames, les jurys, Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail. On vous adresse l'expression de notre ample reconnaissance.

- Nous désirons aussi remercier **les professeurs de l'Université de Blida 1**, qui nous ont fourni les outils nécessaires à la réussite de nos études universitaires.
- Nous tenons à remercier spécialement **Pr.Boudis .A** qui nous a aidés à faire un stage pratique au Laboratoires Frater-Razes.

# Table des matières

Liste des figures.....	1
Liste des Tableaux .....	2
Liste des Abréviations .....	4
➤ La Partie Théorique.....	6
Introduction .....	6
HISTORIQUE .....	7
Chapitre I : Les médicaments biologiques et biosimilaires.....	9
1. Définitions .....	9
1.1. Le Médicament .....	9
1.2. La spécialité pharmaceutique.....	9
1.3. La spécialité générique d'une spécialité de référence.....	9
1.4. Le produit Bio-thérapeutique « le biomédicament » .....	10
1.4.1. Définition.....	10
1.4.2. Les classes thérapeutiques des biomédicaments .....	11
1.4.3. La complexité des médicaments biologiques.....	11
1.5. Le produit bio thérapeutique similaire « le biosimilaire » .....	17
1.5.1. Définition.....	17
1.5.2. Les champs d'application .....	17
1.5.3. Un biosimilaire n'est pas un générique.....	18
1.5.4. Un double intérêt .....	19
1.5.5. L'autorisation de mise sur le marché .....	20
Chapitre II : La production et le développement des Biomédicaments et Biosimilaires.....	23
2.1. Le développement des médicaments biologiques.....	23
2.2. Les étapes de développement des biosimilaires.....	24
2.3. Le plan de développement et les expériences de quelques biosimilaires présentés à l'EMA.....	28
Chapitre III : Le Contrôle qualité des médicaments biologiques et biosimilaires. ....	33
▪ Le Contrôle Qualité des médicaments biologiques. ....	33
▪ Les exigences de comparabilité des biosimilaires au niveau de la qualité.....	36
La comparabilité Préclinique.....	38

La comparabilité Clinique .....	39
2.1. L'étude Clinique PK/PD.....	39
2.2. L'étude Clinique d'efficacité.....	40
3. Le point de vue des opposants aux exigences européennes sur les biosimilaires.....	41
▪ Le contrôle qualité des Biosimilaires.....	41
1. Le Contrôle de la comparabilité structurale .....	43
2. Les Méthodes de contrôles.....	45
➤ <b>La Partie Pratique</b> .....	61
1- Une Présentation du terrain de stage .....	61
1.1-Historique de laboratoires FRATER – RAZES .....	61
1.2- Présentation du groupe .....	62
2- Problématique .....	63
3- Présentation de L'ENOXAPARINE .....	64
3.1- Aspect et présentation du L'ENOXAPARINE SODIQUE (VARENOX).....	64
3.2- Les données pharmacologiques .....	65
3.2.1- Mécanisme d'action.....	65
3.2.2- Indications thérapeutiques.....	65
3.2.3-Contre-indication .....	65
3.2.4-Effets indésirables.....	65
3.2.5- Interactions médicamenteuses .....	66
4- CONTRÔLE QUALITE PHYSICO-CHIMIQUE DUL'ENOXAPARINE Sodique.....	66
4.1- Matériels .....	66
4.2- Méthodes.....	69
4.2.1. Les références des méthodes réalisées .....	69
4.2.2. Le Contrôle physico-chimique de la matière première .....	70
4.2.3. Contrôle Physico-Chimique de Produit Fini .....	79
- Résultats et Discussions .....	86
1. Contrôle physico-chimique de l'ENOXAPARINE SODIQUE (matière première) .....	86
2. Contrôle physico-chimique de l'ENOXAPARINE SODIQUE 40mg / 0.4ml (produit fini).....	88
- Conclusion .....	93
<b>Conclusion Générale</b> .....	94
<b>Résumé</b> .....	95
<b>Références Bibliographiques</b> .....	97

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Une frise chronologique regroupant les étapes majeures dans le développement historique des produits biologiques et biosimilaires.....	7
<b>Figure 1.1 :</b> Un schéma générale de production d'un biomédicament.....	10
<b>Figure 1-2 :</b> Une Classification des médicaments biologiques.....	11
<b>Figure 1.3:</b> Une Comparaison entre la taille moléculaire de quelques médicaments biologiques avec celle de l'aspirine. ....	12
<b>Figure 1.4 :</b> La variabilité des lots dans une bioproduction .....	12
<b>Figure 1.5 :</b> Les principales étapes intervenant dans la fabrication des médicaments biologiques .....	13
<b>Figure 1.6 :</b> L'enregistrement des biosimilaires .....	21
<b>Figure 1.7 :</b> La Structure du CTD4.....	21
<b>Figure 2.1 :</b> Le Coût de développement d'un médicament biosimilaire et taux de réduction du prix de vente du médicament. ....	25
<b>Figure 2.2:</b> La production des biosimilaires (système clos) .....	27
<b>Figure 2.3 :</b> Le procédé globale de production .....	27
<b>Figure 2.4 :</b> Une représentation schématique de la construction de gènes recombinants capables de diriger la sécrétion de protéines thérapeutiques dans le lait. ....	28
<b>Figure 2.5 :</b> Le mécanisme d'action des HBPM .....	30
<b>Figure 3.1 :</b> L'hétérogénéité du mélange produit .....	33
<b>Figure 3.2 :</b> Les bénéfices et risques dans les procédures d'avis. D'après Abraham J .....	43
<b>Figure 3.3 :</b> Un spectre de masse de l'hormone de croissance hGH obtenu grâce à un spectromètre de masse MALDI /TOF. On constate ainsi que l'hGH pèse 22 130 D. [Bonnaire 1998] .....	46
<b>Figure 3.4 :</b> Une Analyse par Maldi-Q-ToF en mode MS des peptides tryptiques marqués de l'érythropoïétine bêta séparés par chromatographie en phase inversée .....	47
<b>Figure 3.5 :</b> Ionisation MALDI – Schéma de principe.....	48
<b>Figure 3.6:</b> Le principe de la désorption/ionisation MALDI .....	48
<b>Figure 3.7 :</b> Un schéma simplifié du fonctionnement d'une source électrospray. ....	49
<b>Figure 3.8 :</b> Un exemple de spectre obtenu par dichroïsme circulaire .....	50
<b>Figure 3.9 :</b> Un schéma du principe de la résonance plasmonique de surface .....	51
<b>Figure 3.10 :</b> Positions dans la structure de la déformylase des contraintes de distance déterminées à partir de l'observation des nOe .....	52
<b>Figure 3.11 :</b> Une représentation tridimensionnelle du filgrastim.....	53

<b>Figure 3.12</b> : Une séparation par électrophorèse capillaire de zone des différents isoformes D'un produit princeps contenant l'EPO et ses différents biosimilaires.....	<b>55</b>
<b>Figure 3.13</b> : Image d'une analyse par SDS-PAGE d'EPO urinaire endogène (uEPO), de préparations de rEPO disponibles dans le commerce, ainsi que des NESP et de la CERA. ....	<b>56</b>
<b>Figure 3.14</b> : Schéma du principe du SEC-HPLC .....	<b>57</b>
<b>Figure 3.15</b> : Représentation Schématique de la répartition des fractions de l'échantillon dans la cellule lors d'analyse par AF4. ....	<b>59</b>
<b>Figure 4.1</b> : les laboratoires FRATER-RAZES .....	<b>62</b>
<b>Figure 4.2</b> : Répartition des essais cliniques par phases dans META en 2017 .....	<b>63</b>
<b>Figure 4.3</b> : «VARENOX (ENOXAPARINE SODIQUE) dosage 6000UI/0.6m.....	<b>64</b>
<b>Figure 4.4</b> : Les différentes formes de dosage De Varenox .....	<b>64</b>
<b>Figure 4.5</b> : Seringue pré-remplie de VARENOX.....	<b>64</b>
<b>Figure 4.6</b> : Verreries de laboratoires.....	<b>66</b>
<b>Figure 4.7</b> : PH-mètre .....	<b>67</b>
<b>Figure 4.8</b> : Tampons standards .....	<b>67</b>
<b>Figure 4.9</b> : équipements du laboratoire utilisés dans le contrôle de VARENOX.....	<b>68</b>
<b>Figure 4.10</b> : bulletin d'analyses de VARENOX injectable 40mg/0.4ml, produit fini.....	<b>92</b>

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1-1</b> Les différences entre un médicament biologique et un médicament chimique.....	<b>14</b>
<b>Tableau 1.2</b> : Les exigences Réglementaires .....	<b>15</b>
<b>Tableau 1.3</b> : Comparaison du développement et des caractéristiques des médicaments génériques et des médicaments biosimilaires .....	<b>16</b>
<b>Tableau 1.4</b> : Comparaison entre les biosimilaires et les médicaments génériques .....	<b>19</b>
<b>Tableau 3.1</b> : Les principaux tests appliqués dans chaque étape de contrôle qualité.....	<b>35</b>
<b>Tableau 3.2</b> : Principaux paramètres à évaluer et exemples de méthodes utilisées pour la caractérisation des produits biologiques .....	<b>35</b>
<b>Tableau 3.3</b> : Les contrôles de routine les plus fréquents des produits biologiques.....	<b>36</b>
<b>Tableau 3.4</b> : Résumé des analyses qualitatives nécessaires pour démontrer la similarité d'un biomédicament .	<b>37</b>
<b>Tableau 3.5</b> : Résumé des analyses nécessaires pour démontrer la similarité préclinique d'un biomédicament	<b>38</b>
<b>Tableau 3.6</b> : Résumé des analyses nécessaires pour démontrer la similarité clinique d'un biomédicament	<b>39</b>
<b>Tableau 3.7</b> : Exemple de contrôle qualité de la production des anticorps monoclonaux .....	<b>59</b>
<b>Tableau 3.8</b> : Les différentes techniques utilisées pour le contrôle des biosimilaires.....	<b>60</b>

<b>Tableau 4.1</b> : Les références des méthodes des tests à réaliser.....	<b>69</b>
<b>Tableau 4.2</b> : les conditions chromatographiques de la détermination de la moyenne du poids moléculaire et la distribution de la masse moléculaire de l'ENOXAPARINE SODIQUE. ....	<b>71</b>
<b>Tableau 4.3</b> : les conditions chromatographiques de la détermination de la moyenne du poids moléculaire et la distribution de la masse moléculaire de l'ENOXAPARINE SODIQUE .....	<b>80</b>
<b>Tableau 4.4</b> : Les résultats de contrôle physico-chimique de la matière première de 3 lots testés .....	<b>86</b>
<b>Tableau 4.5</b> : caractère de la solution d'ENOXAPARINE SODIQUE 40mg/0.4ml.....	<b>88</b>
<b>Tableau 4.6</b> : valeurs d'identification B d'ENOXAPARINE SODIQUE .....	<b>88</b>
<b>Tableau 4.7</b> : Valeurs de la moyenne de la masse moléculaire .....	<b>89</b>
<b>Tableau 4.8</b> : Valeurs de pourcentage en masse de chaînes inférieures à 2000 .....	<b>89</b>
<b>Tableau 4.9</b> : Valeurs de pourcentage en masse des chaînes supérieures à 8000. ....	<b>89</b>
<b>Tableau 4.10</b> : Valeurs de pourcentage en masse des chaînes comprises entre 2000 et 8000 .....	<b>89</b>
<b>Tableau 4.11</b> : Valeurs de volume extractible d'ENOXAPARINE SODIQUE.....	<b>90</b>
<b>Tableau 4.12</b> : Valeurs de la densité d'ENOXAPARINE SODIQUE.....	<b>90</b>
<b>Tableau 4.13</b> : Valeurs de pH d'ENOXAPARINE SODIQUE .....	<b>90</b>
<b>Tableau 4.14</b> : Valeurs d'absorbance spécifique d'ENOXAPARINE SODIQUE.....	<b>90</b>
<b>Tableau 4.15</b> : Valeurs de Teneur en sodium d'ENOXAPARINE SODIQUE.....	<b>91</b>
<b>Tableau 4.16</b> : Valeurs d'activité anti facteur Xa d'ENOXAPARINE SODIQUE .....	<b>91</b>
<b>Tableau 4.17</b> : Valeurs d'activité anti facteur IIa d'ENOXAPARINE SODIQUE.....	<b>91</b>
<b>Tableau 4.18</b> : Valeurs de Ration anti-FXa / anti-FIIa d'ENOXAPARINE SODIQUE .....	<b>91</b>

## Liste des abréviations

**Adm** : Administration.

**MX**: Amoxicilline.

**ATB**: Antibiotique(s)

**AC** : Avis de conformité

**BP** : British Pharmacopea

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AMM** : Autorisation de mise sur le marché

**BPF** : Les Bonnes Pratiques de Fabrication.

**C-à-d** : C'est-à-dire

**CMB** : Concentration minimale bactéricide.

**CNBr** : Bromure de cyanogène

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice.

**CP** : Comprimé(s)

**CHO** : Cellules ovariennes de l'hamster.

**CRP** : C-Réactive protéine

**D.C.I** : Dénomination Chimique Internationale.

**Exp** : Exemple(s)

**EPO** : Érythropoïétine

**EMA**: *Agence européenne d'évaluation des médicaments*

**FXa** : Facteur stuart activé de la coagulation. Transforme la prothrombine en trombine

**FIIa** : Protrombine transforme le fibrinogène en fibrine

**GMP-UE** : Good manufacturing practices-union européenne

**ID** : Intra dermique

**IM** : Intra musculaire

**IV** : Intra veineuse

**Mdt** : Médicament(s)

**MS** : Spectrométrie de masse

**MALDI** : Désorption-ionisation laser assisté par matrice

**MTZ** : Métronidazole

**NC** : Nom Commercial

**Ph.Eur** : Pharmacopée Européenne

**PA**: Principe Actif

**Ppt** : Propriété(s)

**PD** : Pharmacodynamique

**PK** : Pharmacocinétique

**PF**: produit fini

**Ppm** : partie par million

**P/v**: Poids/volume

**R&D**: Research and Development

**RMN** : Résonance magnétique nucléaire

**Réf.** : Référence

**RP-HPLC** : Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse

**SC** : Sous cutanée.

**S/f** : Sous forme

**SPR** : Résonance plasmonique de surface

**TMTS** : Traitement des maladies transmises sexuellement.

**TCA**: Temps de céphaline activé

**UV**: Ultra-violet

## Introduction

Grâce à l'évolution des connaissances en biologie à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle, les médicaments biologiques ont pu connaître des avancées majeures. Les biotechnologies n'ont cessé d'apporter des améliorations et un arsenal thérapeutique de plus en plus important s'est offert aux professionnels de santé et aux patients dans des domaines comme l'oncologie ou les maladies inflammatoires. Cependant, ces médicaments sont très chers et contribuent à l'augmentation des dépenses de santé. La tombée des brevets dans le domaine public permet l'arrivée de médicaments similaires, mais pas identiques, appelés les biosimilaires. Ces médicaments ont un prix moins élevé et offrent l'opportunité aux systèmes de santé d'effectuer d'importantes économies.

Les biosimilaires, de par leur nature intrinsèque, la complexité de leur production, de leurs contrôles de qualité et de leur évaluation réglementaire, ne peuvent pas être considérés comme des génériques de médicaments biologiques. C'est pour cette raison que les règles mises en place par les autorités de santé pour leur évaluation sont des règles rigoureuses surtout sur le plan clinique et physicochimique [1]. Le développement clinique d'un biosimilaire et les méthodes de son évaluation se font au cas par cas et reposent sur la démonstration de son équivalence au médicament biologique de référence en termes de qualité, de sécurité et d'efficacité. Des études chez l'animal et chez l'homme démontrant notamment la bioéquivalence au plan pharmacocinétique et surtout son équivalence en termes d'efficacité clinique et de tolérance au médicament biologique de référence sont nécessaires pour obtenir une AMM.

Pour réaliser ces contrôles physicochimiques et biologiques, les autorités de santé exigent l'utilisation des techniques sensibles, très performantes et innovantes selon « l'état de l'art » afin de pouvoir déceler des variations mineures dans tous les aspects de l'évaluation de la qualité, structure protéique, caractéristiques physicochimiques, activité biologique et profil d'impuretés. [2]

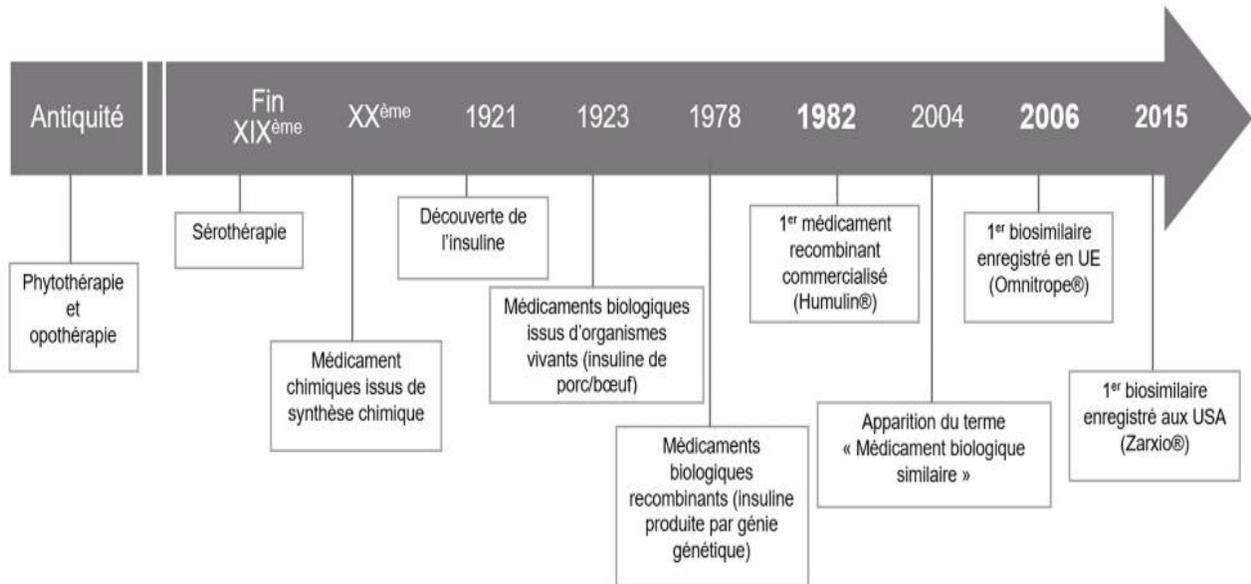
Les exigences européennes pour le développement d'un biosimilaire demandent ainsi la réalisation d'essais de Phase I et de phase III. Ce développement, outre son coût, rallonge la durée de développement d'un biosimilaire (environ 6 ans). [3] De nombreux groupes scientifiques (dont le MIEF (Medecine in Europe Forum))<sup>1</sup> s'opposent à ces exigences qu'ils jugent trop contraignantes et injustifiées, dénonçant même un protectionnisme industriel voulu<sup>2</sup>. C'est dans ce contexte que nous avons initié la présente étude dans le but de mettre le point sur les différentes méthodes de contrôle utilisées pour l'assurance de la comparabilité physicochimique et biologique des biosimilaires aux médicaments biologiques de référence, en démontrant aussi la comparabilité au regard de la sécurité et de l'efficacité, ce qui pourra simplifier les procédures exigées pour obtenir l'AMM des biosimilaires.

---

<sup>1</sup> MIEF & ISDB ; Copies des médicaments issus de biotechnologies (« biosimilaires ») : l'agence européenne Évolue timidement vers plus de pragmatisme ; Réponse conjointe à la consultation de l'EMA ; 31 Octobre 2013 Disponible sur <http://www.prescrire.org/Docu/DOCSEUROPE/20131031EMAbiosimilarsFR.pdf>

<sup>2</sup> Editorial Nature Biotechnology; Building a wall against biosimilars; Nature Biotechnology; Aril 2013; 31

# HISTORIQUE



**Figure 1 :** Une frise chronologique regroupant les étapes majeures dans le développement historique des produits biologiques et biosimilaires. [4]

Depuis très longtemps l'Homme utilise les organismes vivants pour se soigner. Dès l'Antiquité, les plantes, les animaux et les humains étaient utilisées à des fins thérapeutiques. C'est ce que l'on appelle **laphytothérapie** : étymologiquement « thérapie des plantes » et **l'opothérapie** « l'administration à visée thérapeutique d'extraits d'organes d'origine animale ou humaine ». [4]

A la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle apparaît **la sérothérapie** qui consiste en une administration à visée thérapeutique de sérums d'origine animale ou humaine contenant des anticorps spécifiques et capables de neutraliser un antigène microbien, une toxine, une bactérie, un venin ou un virus. [5]

Le XX<sup>ème</sup> siècle a vu l'essor de médicaments issus de synthèse chimique : aspirine, antibiotiques, médicaments neurologiques, analgésiques ; grâce à des avancées majeures en chimie. [6] Toutefois, l'intérêt pour les produits issus du vivant perdure. Les canadiens Frederick Grant Banting et Charles Best découvrent l'insuline en 1921 et son utilisation dans le traitement du diabète. Deux ans après, des laboratoires se lancent dans la production d'insuline extraite de pancréas de bœuf ou de porc. Sa structure chimique ne sera déterminée qu'en 1955 par le biochimiste anglais Frédéric Sanger et permettra de mettre en évidence des différences entre l'insuline humaine et les insulines animales, jusqu'alors utilisées comme traitement du diabète. [7]

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.[8] Durant les années suivantes, plusieurs autres médicaments biologiques issus du génie génétique arrivent sur le marché : hormone de croissance, vaccin, interféron alfa, thrombolytique [9]

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. Les médicaments biologiques tombés dans le domaine public peuvent être copiés. Ainsi, 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. [10]

Aux EU, le laboratoire Sandoz avait déposé une demande pour commercialiser l'Omnitrope en juillet 2003 qui s'était soldée par un avis de la Food and Drug Administration (FDA), en septembre 2004, stipulant qu'elle était dans l'impossibilité de parvenir à une décision faute de réglementation appropriée. Sandoz porta plainte contre la FDA sous motif que, selon la réglementation américaine, la FDA est dans l'obligation d'autoriser ou de refuser une demande d'autorisation de médicament. Cette plainte avait abouti à une décision judiciaire ordonnant à FDA de statuer, qui par la suite octroya l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) pour l'Omnitrope sans réglementation spécifique sur les biosimilaires. [11] Une procédure d'autorisation spécifique pour les biosimilaires sera mise en place plus tard, en 2009, dans le cadre de la loi Biologics Price Competition and Innovation (BPCI). En 2015, Zarxio de Sandoz (filgrastim) biosimilaire de Neupogen du laboratoire Amgen sera le premier médicament enregistré via cette nouvelle procédure. 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. [12]

# Chapitre 1 : Les médicaments biologiques et biosimilaires

## 1. Définitions

Tout d'abord, quelques rappels concernant les définitions des termes sont nécessaires.

### 1.1. Le Médicament

Le médicament au sens de la présente loi de santé algérienne est défini comme étant : « Toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales; et tout produits pouvant être administrés à l'homme ou l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, de corriger et de modifier ses fonctions biologique. » [13]

« Ils sont considérés également comme médicaments, notamment :

- les produits diététiques qui renferment des substances non alimentaires leur conférant des propriétés utiles à la santé humaine.
- les produits stables dérivés du sang.
- les concentrés d'hémodialyse ou solutés de dialyse péritonéale.
- Les gaz médicaux. » [13]

### 1.2. La spécialité pharmaceutique :

On entend par spécialité pharmaceutique tout médicament préparé à l'avance, présenté sous un conditionnement particulier et caractérisé par une dénomination spéciale. [13]

### 1.3. La spécialité générique d'une spécialité de référence :

Pour mieux comprendre la différence entre un médicament générique et un médicament biologique similaire, rappelons la définition d'un médicament générique. Selon la présente loi de santé algérienne « C'est Tout médicament qui a la même composition qualitative et quantitative en principe(s) actif(s), la même forme pharmaceutique, et qui est interchangeable avec la spécialité de référence du fait de sa bioéquivalence démontrée par des études appropriées de biodisponibilité. Une spécialité ne peut être qualifiée de spécialité de référence, que si son enregistrement a été effectué au vu de l'ensemble des données nécessaires et suffisantes à elles seules pour son évaluation ». [13]

## 1.4. Le produit bio thérapeutique ou « biomédicament »

### 1.4.1. Définition

Selon la loi de santé algérienne, on entend par produit bio thérapeutique (médicament biologique) « Tout médicament dont la substance active est produite à partir d'une source biologique ou en extraite ». [13]

Et Selon la directive 2001/83/CE du Parlement Européen et du conseil du 6 novembre 2001, on entend par médicament biologique « un produit dont la substance active est une substance biologique. Une substance biologique est une substance qui est produite à partir d'une source biologique ou en est extraite et dont la caractérisation et la détermination de la qualité nécessitent une combinaison d'essais physico-chimico-biologiques, ainsi que la connaissance de son procédé de fabrication et contrôle ».

La partie I de l'annexe I de la directive 2001/83/CE et la partie A de l'annexe du règlement (CEE) n°2309/93 précise que sont considérés comme des médicaments biologiques les médicaments suivants :

« Les médicaments immunologiques et les médicaments dérivés du sang et du plasma humains » ainsi que « les médicaments issus de l'un des procédés biotechnologiques suivants :

- Technologie de l'acide désoxyribonucléique (ADN) recombinant.
- Expression contrôlée de gènes codant pour des protéines biologiquement actives dans des procaryotes et des eucaryotes, y compris des cellules transformées de mammifères
- Méthodes à base d'hybridomes et d'anticorps monoclonaux. Médicaments vétérinaires, y compris ceux non issus de la biotechnologie, destinés principalement à être utilisés comme améliorateurs de performance pour promouvoir la croissance ou pour augmenter la productivité des animaux traités. »

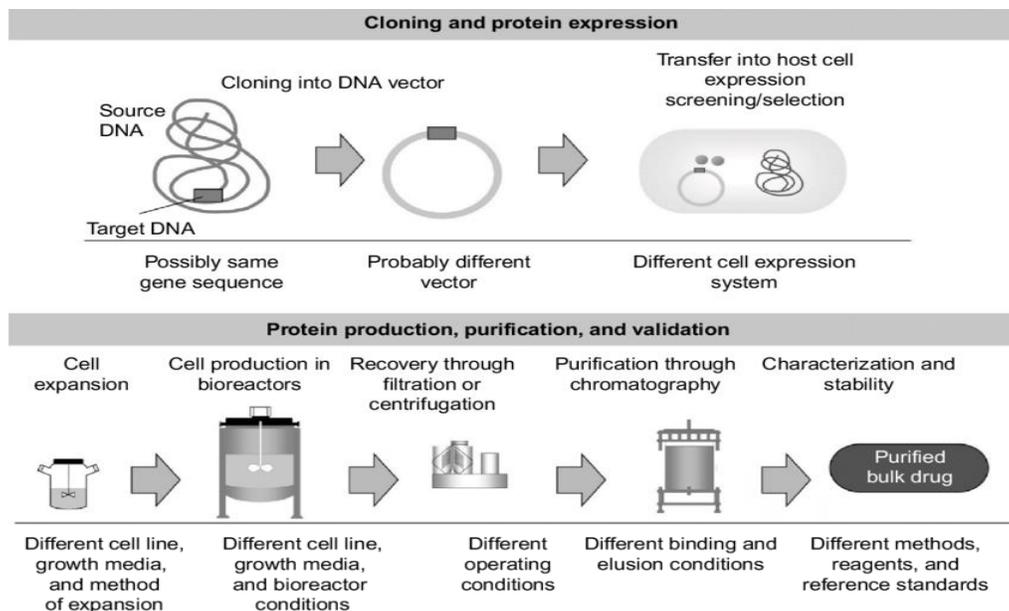
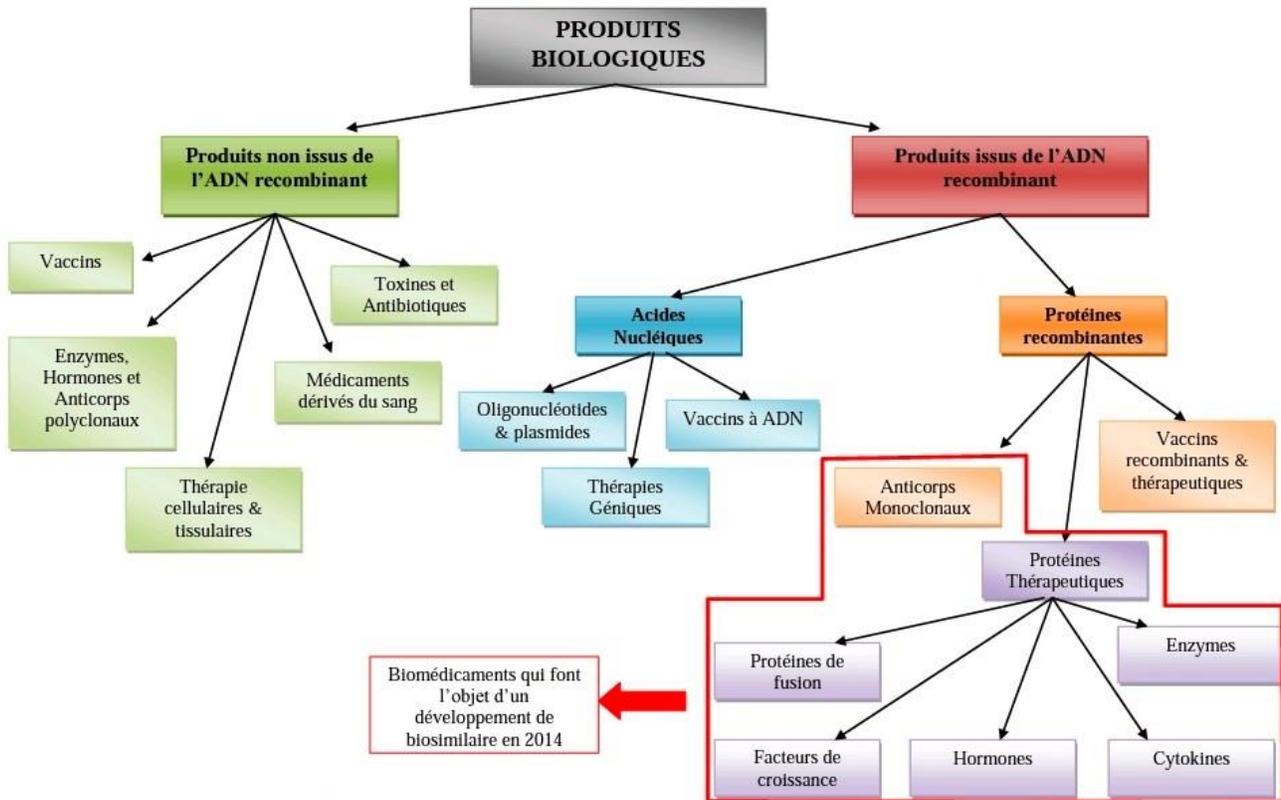


Figure 1.1 : Schéma générale de production d'un biomédicament [13]

## 1.4.2. Les classes thérapeutiques des biomédicaments

Les médicaments biologiques sont des produits synthétisés à partir d'organismes vivants comme défini précédemment, cependant ces organismes peuvent ne subir aucun changement génétique à leur échelle et produisent des substances eux même avec leur propre matière génétique, ce sont les médicaments non issus de l'ADN recombinant ; d'autre part il existe des médicaments provenant d'organismes génétiquement modifiés utilisant la technologie de l'ADN recombinant qu'on appelle médicaments biologiques issus de l'ADN recombinant (voir **figure 1-2**) : Classification des médicaments biologiques[15]



**Figure 1-2:** Classification des médicaments biologiques [15]

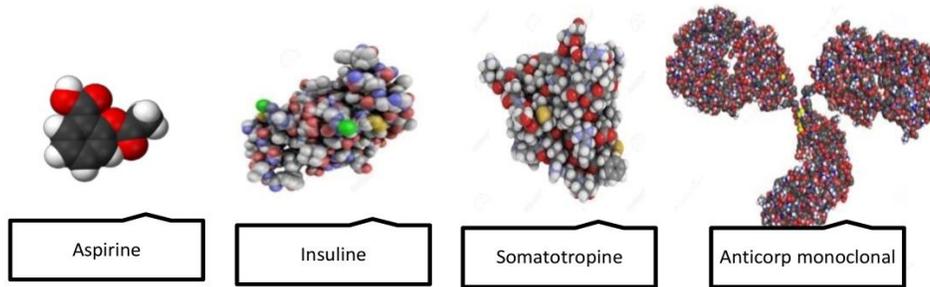
## 1.4.3. La complexité des médicaments biologiques

### 1.4.3.1. La spécificité des molécules biologiques

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

### - Sur le plan structural

Par rapport aux substances chimiques de petites tailles, les médicaments biologiques se composent de grandes structures moléculaires, souvent complexes [16]. A titre d'exemple, les immunoglobulines de type G (IgG) comporte 660 acides aminés et fait un poids moléculaire de 150 000 Da, un interféron est composé de 165 acides aminés et son poids est de 19 625 Da alors qu'un médicament de synthèse chimique comme l'aspirine correspond à un poids de 180 Da

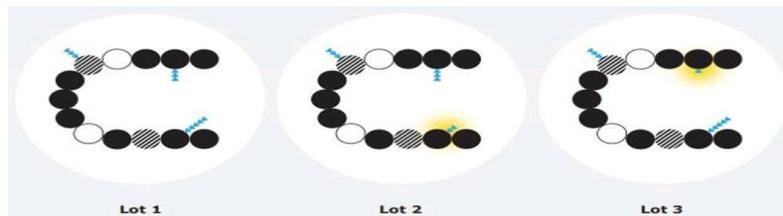


**Figure 1.3** Comparaison entre la taille moléculaire de quelques médicaments biologiques avec celle de l'aspirine. [17]

En plus de leur grande taille, les produits biologiques ont une organisation spatiale en trois dimensions qui doit être conservée pour le maintien de l'activité biologique, alors que les molécules d'origine chimique sont de structure plane avec une flexibilité très réduite. [18]

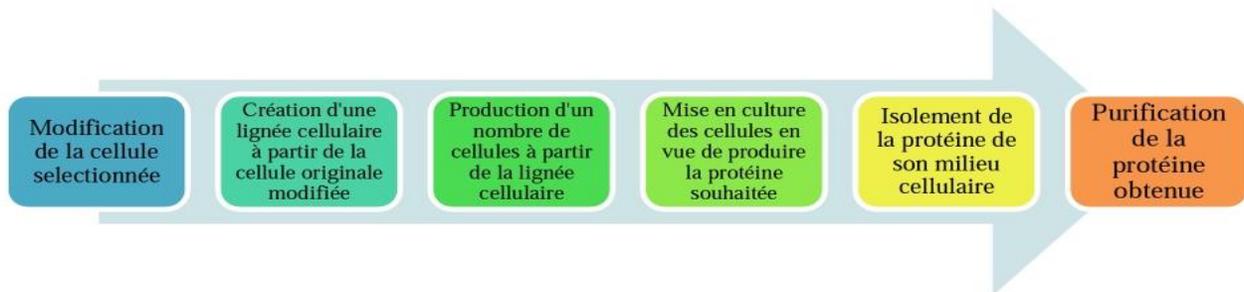
### - Le degré de variabilité inhérent aux molécules produites

A partir d'une voie de synthèse chimique, on obtient une population moléculaire homogène et reproductible du même principe actif, alors qu'à partir d'un système de production biologique, et compte tenu de la complexité des processus biologiques, le produit résultant est une population mixte de la molécule active sous des formes variantes. Cette diversité/variabilité intrinsèque des molécules produites est décrite sous le terme de « micro hétérogénéité » [18] [19] Ce faible degré de variabilité peut être observé au sein d'un même lot ou entre divers lots du même médicament biologique (figure 1-3) et cette faible variabilité doit se situer dans la fourchette acceptable pour assurer une sécurité et une efficacité constante. [16]



**Figure 1.4** La variabilité des lots dans une bioproduction [16]

- **La complexité du procédé de fabrication** : La figure 1-5 montre les principales étapes intervenant dans la fabrication des médicaments biologiques. Chacune des étapes de la fabrication est très critique et nécessite une surveillance rigoureuse pour s'assurer de profil QSE du produit final. Les microorganismes ou les cellules desquels les protéines sont issues sont très sensibles et peuvent perdre leur stabilité sous l'effet des variations qu'ils subissent. Le moindre changement apporté durant la production, comme une légère modification de l'équipement utilisé ou des conditions environnementales, ou un changement souvent considéré comme négligeable, risque d'altérer le médicament et son effet particulier dans l'organisme et le moindre écart au processus établi peut influencer sur l'efficacité, l'innocuité ou la biodisponibilité du médicament biologique produit. [20]



**Figure 1.5** Les principales étapes intervenant dans la fabrication des médicaments biologiques [20]

- **La stabilité** : Les petites molécules ont tendance à suivre le comportement d'Arrhenius (c'est-à-dire un mouvement moléculaire dépendant de la chaleur) et ont donc une stabilité prévisible basée sur des études d'accélération. En revanche, la stabilité des produits biopharmaceutiques est plus difficile à prévoir car les protéines se dégradent par différentes voies. De légères variations dans le processus de fabrication susceptibles d'affecter la stabilité des protéines ne sont pas nécessairement identifiables au moyen d'études de stabilité accélérées. Par exemple, la dégradation de l'érythropoïétine dé-glycosylée à 70° C se produit plus rapidement que pour la molécule native, entièrement glycosylée. [21][22]

- **Contrôle et caractérisation** : Pour étudier ou contrôler telle ou telle caractéristique moléculaire des produits biologiques il faudra envisager comme le prévoit la définition d'un médicament biologique « une combinaison d'essais physico-chimiques et biologiques » pour pouvoir appréhender de façon globale l'intégrité de la structure tridimensionnelle de la molécule d'intérêt et garantir à la fin, l'activité thérapeutique et un profil de tolérance identique à chaque utilisation chez les patients. [23]

- **Immunogénicité** : Le système immunitaire a la capacité de reconnaître les protéines étrangères et de réagir contre elles. Les médicaments biologiques ne déclenchent généralement pas de réponse immunitaire ou uniquement une réponse immunitaire limitée (par ex. apparition passagère d'anticorps). Les effets indésirables de nature immunologique (par ex. réactions liées à la perfusion ou au niveau du site d'injection) sont généralement sans gravité. Toutefois, dans de rares cas,

une réaction immunologique à un médicament biologique peut être grave et potentiellement mortelle. Par ailleurs, les anticorps ciblant le médicament biologique

«Anticorps Anti-Médicament» ou (AAM) pourraient neutraliser l'activité du médicament et réduire son efficacité. L'immunogénicité potentielle doit donc toujours être évaluée pour tous les médicaments biologiques. [16]

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

**Tableau 1-1** Différences entre un médicament biologique et un médicament de synthèse chimique [16]

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

#### 1.4.3.2. La complexité de la réglementation des médicaments biologiques

Selon Trouvin et Al : « La classification comme médicament biologique entraîne au plan réglementaire la mise en place des critères d'évaluation plus exigeants en raison de la complexité de ces produits et de leurs procédés d'obtention qui rendent la qualité finale du produit plus difficile à garantir et à maîtriser» [23] L'EMA, en accord avec le point de vue de la FDA, affirme que les produits biologiques sont différents des médicaments chimiques en raison de [24]:

- L'utilisation d'organismes vivants pour produire le produit biologique,
- La complexité accrue des processus de fabrication,

▪ La complexité accrue des produits à l'issue de l'expiration des brevets des médicaments biologiques qu'on appelle médicament de référence, d'autres développeurs peuvent produire un médicament copie du médicament de référence mais ce dernier ne retiendra pas la dénomination de médicament générique car cette copie n'est pas identique à la référence mais elle lui est semblable, on parle de médicament biosimilaire. Cela a été largement abordé par les autorités de santé compétentes : «Les produits biologiques consistent généralement en des entités relativement grandes et complexes qui sont difficiles à caractériser. De plus, les produits biologiques similaires (Similar Biotherapeutic Products SBP) sont fabriqués et contrôlés en fonction de leur propre développement, car le fabricant d'un SBP n'a normalement pas accès à toutes les informations de fabrication nécessaires sur le produit d'origine. En conséquence, il a été convenu que la méthode normale d'octroi de licence aux médicaments génériques au moyen d'études de bioéquivalence n'est pas scientifiquement appropriée pour les SBP.» [25]

En revanche, les fabricants de biosimilaires doivent démontrer que le biosimilaire est très similaire au produit de référence, à l'exception de différences mineures entre les composants cliniquement actifs. Les fabricants de produits biosimilaires doivent également démontrer qu'il n'existe aucune différence cliniquement significative entre le produit biosimilaire et le produit de référence en termes de sécurité et d'efficacité» [26]

**Tableau 1.2 : Les exigences réglementaires [26]**

## Exigences réglementaires

	Biomédicament d'origine	Médicament biosimilaire
<b>Qualité</b>		
Plusieurs lots	✓	✓
Analyse de comparabilité		✓
<b>Caractéristiques analysées:</b>		
Propriétés physicochimiques	✓	✓
Activité biologique	✓	✓
Propriétés immunochimiques	✓	✓
Pureté / Impuretés	✓	✓
Quantité	✓	✓
<b>Etudes précliniques</b>		
<i>In vitro</i>		
Liaison à l'antigène cible	✓	✓
Liaison à des isoformes représentatives des 3 récepteurs : Fcγ, FcRn et complément	✓	✓
Fonctions associées au fragment Fab	✓	✓
Fonctions associées au fragment Fc	✓	✓
<i>In vivo</i>		
PK	✓	✓
PD	✓	✓
Sécurité d'emploi*	✓	✓
<b>Etudes cliniques</b>		
<b>Phase I</b>		
PK	✓	✓
PD	✓	✓
<b>Phase II</b>		
Etudes de doses	✓	
<b>Phase III</b>		
Efficacité	✓	✓
Sécurité d'emploi	✓	✓

\* La sécurité d'emploi, dans ce contexte, ne se réfère pas à une étude complète de toxicité des doses répétées, mais plutôt à une évaluation de paramètres de sécurité tels que les signes cliniques, le poids et les fonctions vitales.

- le résumé de la différence entre le concept générique et le concept biosimilaire est illustré dans le tableau 1-2 de l'EMA suivant :

**Tableau 1.3** Une Comparaison du développement et des caractéristiques des médicaments génériques et des médicaments biosimilaires [27]

<b>Médicament générique</b>	<b>Médicament biosimilaire</b>
<b>Généralement possible d'obtenir exactement la même molécule</b>	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
<b>Données complètes exigées sur la qualité pharmaceutique</b>	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
<b>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)</b>	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)
<b>Les données cliniques requises sont principalement des études de bioéquivalence pharmacocinétique</b>	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
<b>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</b>	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

## 1.5. Le produit bio thérapeutique similaire ou « biosimilaire »

### 1.5.1 Définition



Au sens de la présente loi de santé algérienne, On entend par produit bio thérapeutique similaire « Tout médicament similaire sur le plan qualité, sécurité et efficacité a un produit bio thérapeutique de référence. Un produit bio thérapeutique ne peut être qualifié de produit bio thérapeutique de référence que si son enregistrement a été effectué au vu de l'ensemble des données nécessaires et suffisantes à elles seules pour son évaluation. » [13]

Il est défini aussi comme un médicament très similaire à un autre médicament (dit « médicament biologique de référence ») déjà autorisé pour la commercialisation et dont les brevets et les droits d'exclusivité ont expiré. Une comparaison approfondie a permis de démontrer qu'il n'y a aucune différence cliniquement significative entre le biosimilaire et le médicament de référence.

**Le biosimilaire a la même composition qualitative et quantitative en substance active, la même forme pharmaceutique et prend en charge les mêmes pathologies dans les mêmes posologies que le médicament biologique de référence.[28]**

La directive 2004/27/CE du Parlement Européen et du Conseil du 31 mars 2004, modifiant la directive 2001/83/CE, donne une définition d'un médicament biologique similaire. Aux termes de la directive, « Lorsqu'un médicament biologique qui est similaire à un médicament biologique de référence ne remplit pas les conditions figurant dans la définition des médicaments génériques, en raison notamment de différences liées à la matière première ou de différences entre les procédés de fabrication du médicament biologique et du médicament biologique de référence, les résultats des essais précliniques ou cliniques appropriés relatifs à ces conditions doivent être fournis. Le type et la quantité des données supplémentaires à fournir doivent satisfaire aux critères pertinents figurant dans l'annexe I et les lignes directrices détaillées y afférentes. Les résultats d'autres essais figurant dans le dossier du médicament de référence ne doivent pas être fournis. »[29]

### 1.5.2. Champs d'application :

Les biomédicaments englobent les protéines recombinantes produites grâce à la technologie de l'acide désoxyribonucléique (ADN) recombinant (Cf. Chapitre II Production des médicaments biologiques et biosimilaires) telles que les hormones, les enzymes ou les anticorps monoclonaux qui peuvent aussi être produits à partir de la technologie des hybridomes. D'autres produits

comme les dérivés du sang ou du plasma humain, les vaccins, les allergènes mais aussi les produits de thérapie génique et cellulaire appartiennent à cette même famille de médicaments. D'après l'Agence Européenne des Médicaments (EMA), en principe, le concept de biosimilaire est applicable à tout médicament biologique. Toutefois, en pratique, le succès du développement d'un biosimilaire dépend de la capacité à produire une copie hautement similaire à la référence et à démontrer sa similarité. Par conséquent, cette approche est plus difficile pour les médicaments biologiques d'extraction qui sont plus difficiles à caractériser et ceux de thérapies innovantes pour lesquels il existe encore peu d'expérience. [30]

### **1.5.3. Un médicament biosimilaire n'est pas un médicament générique**

Les médicaments biosimilaires et les médicaments génériques ne sont pas comparables, Les médicaments dits « biosimilaires » sont aux biothérapies ce que les médicaments dits « génériques » sont aux médicaments classiques.

- les matières premières utilisées, les procédés de production, les modes d'action, les procédures d'autorisation de mise sur le marché sont différents ;
- les réactions biologiques aboutissent à des produits qui doivent être étroitement contrôlés pour garantir une similarité entre le médicament biosimilaire et son biomédicament de référence.
- Dans le cas d'un médicament générique, la substance chimique active est rigoureusement la même que dans le médicament de référence. Les excipients peuvent varier, mais la substance active est la même. De ce fait, la commercialisation d'un médicament générique ne nécessite que des études qui visent à s'assurer que cette substance active est absorbée et éliminée de la même manière qu'avec le médicament de référence.

Dans le cas des biothérapies, les choses sont différentes. En effet, ces médicaments, souvent des protéines, ont une structure chimique beaucoup plus complexe, en particulier au niveau de leur structure tridimensionnelle (3D). En effet, selon les cellules utilisées pour la produire et les conditions de leur culture, une protéine de biothérapie peut se plier de différentes façons (mais rester active). Ainsi, par exemple, un anticorps monoclonal biosimilaire peut avoir une structure 3D légèrement différente de l'anticorps de référence (mais être tout aussi efficace).

Pour cette raison le terme de « générique » n'est pas utilisé et ces différences en terme de structure 3D sont prises en compte dans le terme « biosimilaire ». [3]

**Tableau 1.4** Une comparaison entre les biosimilaires et les médicaments génériques. [3]

	Médicament générique 	Médicament biosimilaire 
Procédé de fabrication	Synthèse chimique	Synthèse biologique
Concept	Bioéquivalence	Similarité en termes de qualité, d'efficacité et de sécurité
Taille et poids moléculaire	Petite taille, poids faible (exemple : aspirine 21 atomes, 180 Da)	Grande taille, poids élevé (exemple : anticorps monoclonal ≈25 000 atomes, 150 000 Da)
Complexité	Structure simple et bien définie	Structure de haute complexité, hétérogène
Durée de développement	Courte (= 1-3 ans)	Longue (= 5-6 ans)
Coût de développement	1 à 3 millions d'euros	100 à 300 millions d'euros
Dossier de demande d'AMM	Dossier bibliographique et étude de bioéquivalence	Dossier pré-clinique comportant des études de pharmacodynamie et de toxicologie Dossier clinique comportant des essais cliniques de phase I et de phase III

#### 1.5.4. Un Double intérêt

La mise à disposition des médicaments biosimilaires a un double intérêt :

**De santé publique en facilitant l'accès aux soins** : augmenter le nombre de médicaments biologiques disponibles permet de limiter les tensions d'approvisionnement et de prévenir les ruptures de stocks et/ou les accidents de production. Ceci permet de garantir aux patients le maintien de l'accès à leurs traitements.

**D'un point de vue économique** : stimuler la concurrence et induire une baisse des prix des médicaments biologiques tout en garantissant la sécurité et la qualité des traitements. [31]

La question de l'intérêt de la mise sur le marché de molécules similaires pour lesquelles le besoin médical est satisfait et qui ne permettent pas une diminution fulgurante des coûts par rapport aux génériques (biosimilaires 10 à 25% moins chers[31] contre 60% pour les génériques) peut se poser.

Cette différence entre les deux secteurs est due au fait de la complexité de la fabrication [32] et du développement des biosimilaires beaucoup plus coûteuse : 10-40 millions pour un biosimilaire contre 1-2 millions pour un générique. [33]

Seulement, le coût des traitements étant très élevé (de 1000€ à 10000€ par ordonnance), même une faible réduction des coûts peut entraîner des avantages certains pour les organismes payeurs. Par

exemple, il a été estimé qu'une réduction de seulement 20% du coût de 5 biomédicaments originaux permettrait de diminuer de plus de 1.6 milliard par an les coûts de santé en Europe [34]. De plus, la concurrence stimule la performance et tend à faire baisser les prix de façon continue, ce qui permet un plus large accès aux soins pour les patients et permettra de réduire les dépenses de santé dans des systèmes déjà surendettés.

Un exemple de l'avantage indirect des biosimilaires est la mise sur le marché indien de REDITUX®, le biosimilaire du MABTHERA® (un anticorps monoclonal utilisé dans le traitement du lymphome non hodgkinien) en 2007 avec un prix environ 50% moins élevé. Le laboratoire Roche produisant le MABTHERA® a diminué le prix de vente en Inde afin de diminuer la différence de coûts entre les deux produits [35]

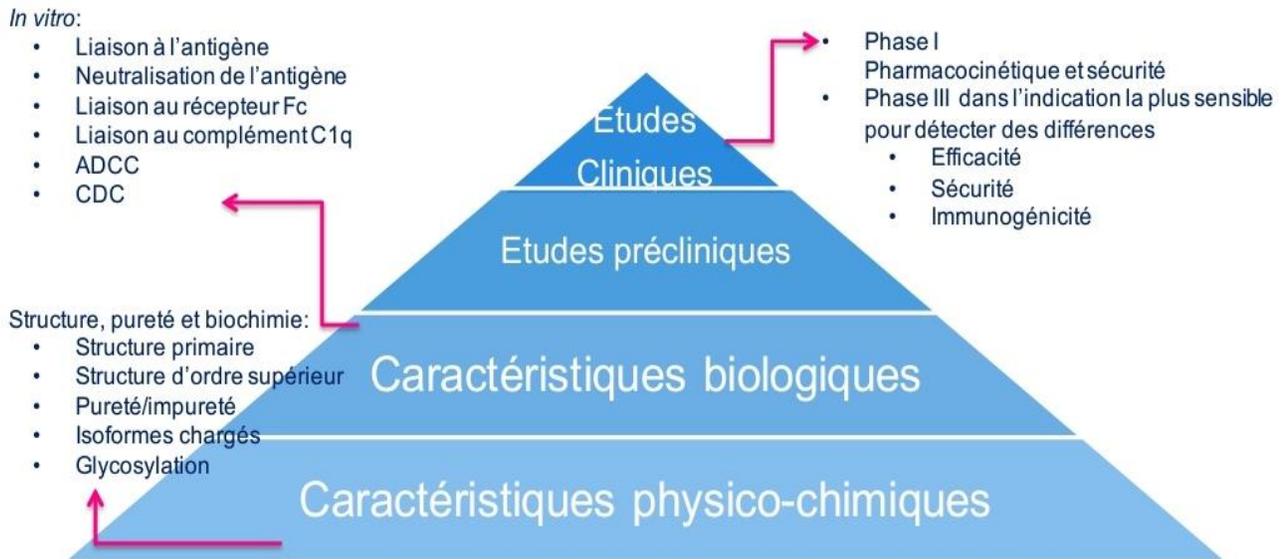
#### **1.5.6. L'autorisation de mise sur le marché : AMM**

La complexité de fabrication de ces biosimilaires et les risques associés ne permettent pas de baser cette autorisation sur un dossier simplifié comme pour les génériques. La mise en place d'un cadre spécifique est nécessaire afin de pouvoir faciliter la mise sur le marché des biosimilaires tout en prenant en compte les spécificités et l'évaluation des risques pour ces produits.

Pour le médicament biosimilaire, en raison des particularités mentionnées précédemment, le dossier de demande d'AMM est plus conséquent et il convient de démontrer la non-infériorité du biosimilaire par rapport au médicament biologique de référence, ainsi que la biosimilarité sur tous les plans du dossier. Quant au prix, il est inférieur d'environ 30 % à celui du médicament de référence. [36]

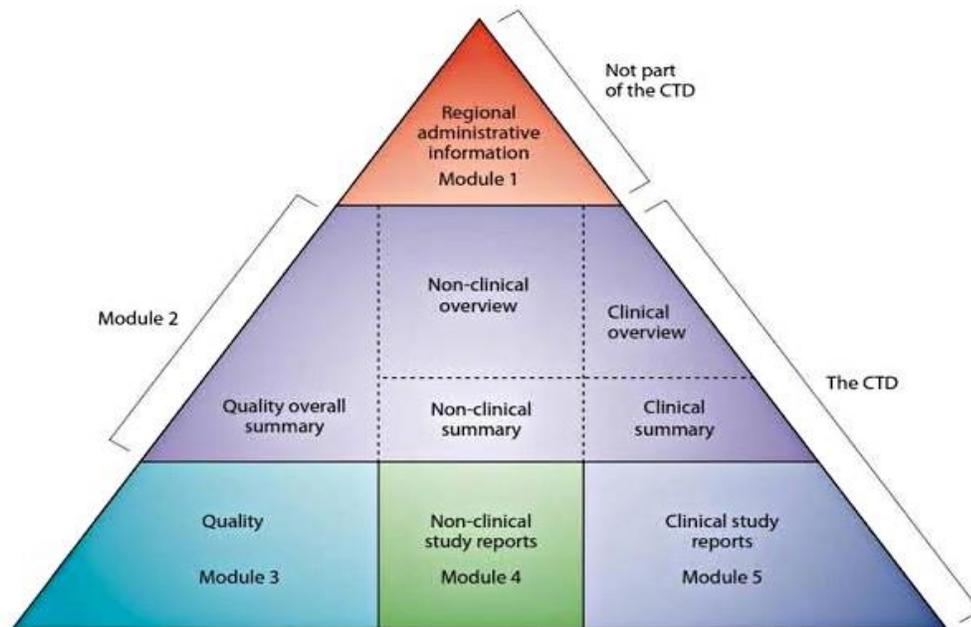
L'approche biosimilaire décrite par les recommandations se base sur la démonstration de la similarité entre le référent et le biosimilaire : le but étant de prouver la comparabilité des produits en termes de qualité, d'homogénéité, de procédé de fabrication, de sécurité et d'efficacité dans des limites de variabilités acceptables.

# Enregistrement des biosimilaires



**Figure 1.6 :** l'enregistrement des biosimilaires [36]

## - Dossier d'enregistrement :



**Figure 1.7** Structure du CTD [36]

Le dossier de demande d'enregistrement doit être en conformité avec le format CTD [37] (Common Technical Document) en vigueur depuis 2001 (**Figure 1.5**). Les différents modules doivent être adaptés pour les biosimilaires :

- **Le module 1**, administratif, est spécifique à chaque région : il n'y a pas de consensus sur les données à présenter dans ce module. Cependant, un résumé des preuves démontrant la similarité entre le biomédicament et le biosimilaire est recommandé.
- **Le module 2**, résumé des autres modules, doit contenir la même quantité d'informations qu'un princeps.
- **Le module 3** est la partie qualité : elle doit être complète (données chimiques, pharmaceutiques et biologiques). Il s'y ajoute pour les biosimilaires la démonstration de la similarité par rapport au produit de référence.
- **Le module 4** présente les données pré cliniques : ce module est réduit pour les biosimilaires mais l'approche adoptée doit être clairement justifiée.
- **Le module 5** présente les données cliniques : ce module est lui aussi réduit par rapport à un biomédicament innovateur mais il doit présenter les résultats des essais cliniques PK/PD et d'efficacité ainsi que le rationnel du développement clinique appliqué.

## Chapitre 2 : La Production et Le Développement des Biomédicaments et Biosimilaires

### 2.1. Le développement des médicaments biologiques [38] [39] [40]

Le développement suit les étapes suivantes :

(EPO=Erythropoïétine, IL-2 = Interleukine-2, GAA = Alpha-Glucosidase Acide)

**1. La recherche exploratoire** : Inclut l'étude des mécanismes de la maladie afin de déterminer la cible que le médicament devra atteindre, puis c'est le criblage : de très nombreuses molécules sont testées afin de ne retenir que celles éventuellement efficaces.

**2. Les essais précliniques** : Réalisés sur des systèmes moléculaires inertes, des cellules et des cultures de cellules, ont pour but de s'assurer de l'effet pharmacologique des molécules sélectionnées et de leur sécurité envers les patients. Si ces tests sont concluants, des expériences sont alors menées chez l'animal. Tests de toxicologie : ces tests évaluent les risques d'effets secondaires des médicaments en développement. Pour se faire, la réglementation impose des études chez l'animal selon des protocoles précis conformes aux Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) qui assureront la reproductibilité des essais. Ils se réalisent en différentes étapes suivant des procédures précises internationalement validées.

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

#### ▪ Les essais de phase I : Tolérance

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

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

#### ▪ Les essais de phase II : Efficacité

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

#### ▪ Les essais de phase III : Rapport bénéfice/risque

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

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

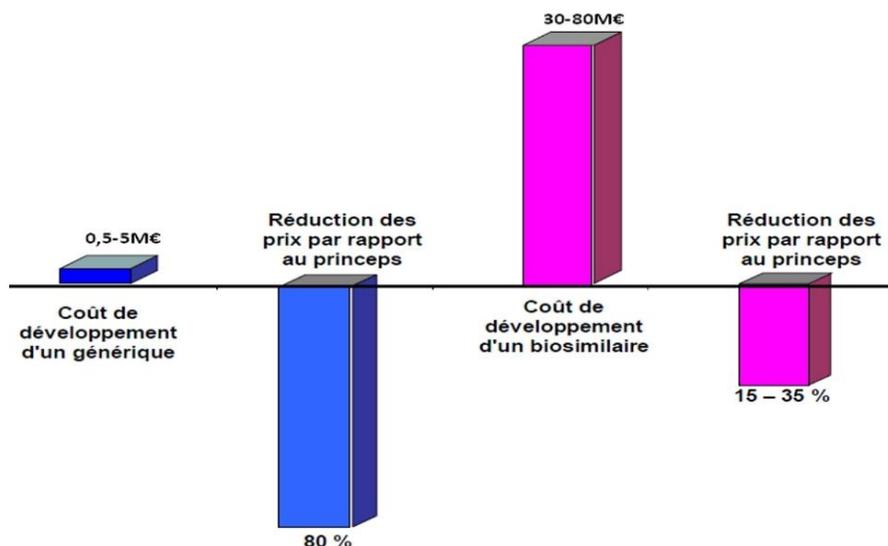
#### ▪ Les essais de la phase IV: Essais après commercialisations

Sont réalisés une fois le médicament commercialisé, sur un nombre de patients souvent très important (jusqu'à plusieurs dizaines de milliers de personnes). Ils permettent d'approfondir la connaissance du médicament dans les conditions réelles d'utilisation et d'évaluer à grande échelle sa tolérance. La pharmacovigilance permet ainsi de détecter des effets indésirables très rares qui n'ont pu être mis en évidence lors des autres phases d'essais.

### 2.2. Les étapes de développement des biosimilaires

De part leur nature protéique, la structure chimique des biomédicaments est **plus complexe** que celle des médicaments classiques. Le développement et le processus de production des biomédicaments impliquent des compétences spécifiques en biotechnologie, que ce soit pour la production du princeps ou la mise au point d'un biosimilaire [41] Mais à cette difficulté s'ajoute celle liée au fait que les modalités de fabrication de la molécule princeps ne sont pas rendues publiques lors de levée du brevet, ce qui obligeant les fabricants de biosimilaires à identifier par eux-mêmes le procédé de fabrication permettant la production des biosimilaires. Ainsi, le temps de développement des biosimilaires est estimé à **cinq à huit ans** en moyenne, alors qu'il n'est que **d'un à deux ans** pour les génériques classiques. Si le coût de développement d'un générique classique s'élève à 5 M€ en moyenne, il est estimé entre 30 à 80 M€ pour les biosimilaires, Cette augmentation importante des coûts de développement s'explique aussi par la nécessité de s'équiper d'une unité de bioproduction (d'un coût de 200 à 400 millions d'euros) et l'utilisation de matériaux de base 20 à 100 fois plus chers que pour les médicaments classiques. [42]

C'est pour ces raisons que l'EMA a instauré un cadre légal au développement de cette nouvelle génération de molécules qui ne pouvaient s'assimiler aux médicaments génériques compte tenu de la complexité de leur fabrication, Outre les exigences classiques demandées pour l'enregistrement d'un biomédicament (démonstration de la qualité, de l'efficacité, et de l'innocuité du produit), la réglementation de l'EMA exige de prouver que le biosimilaire est comparable au produit de référence en terme de qualité, d'efficacité et de sécurité. Concernant la qualité, l'exercice de comparabilité entre le biosimilaire et le biomédicament de référence doit être effectué avec des techniques sensibles de pointe permettant la détection de variations mineures entre les deux produits. Concernant l'efficacité et la sécurité, le même type d'exercice de comparabilité du biosimilaire par rapport au produit de référence est demandé dans la directive CHMP/42832/05. [43]



**Figure 2.1 :** Coût de développement d'un médicament biosimilaire et taux de réduction du prix de vente du médicament. [43]

**1) les essais précliniques :** Des études non cliniques comparent le biosimilaire au produit de référence pouvant détecter des différences mineures de réponse entre les deux doivent être effectuées. La réalisation de ces essais doit être effectuée avec des technologies de pointe. Les essais précliniques comprennent deux types d'essais : des essais in vitro et des essais in vivo.

**1-1) Les essais précliniques in vitro :** Des études précliniques in vitro sont exigées, comme des tests de liaison ligand-récepteur ou des tests basés sur l'utilisation de lignées cellulaires. Les tests in vitro sont basés sur une réponse cellulaire quantifiable après stimulation par un agent. [44]

Ces tests sont réalisés pour établir la comparabilité de la réactivité du biosimilaire par rapport au produit de référence.

Plusieurs variantes de tests in vitro sont utilisées :

**1- Tests de liaison ligand –récepteur**

**2- Tests basées sur l'utilisation des lignées cellulaires**

**1-2) Les essais précliniques in vivo :** Le principe des tests in vivo consiste à administrer les agents à analyser à des animaux et à en mesurer la réponse. Cependant, ces tests présentent plusieurs inconvénients : un coût élevé, un manque de spécificité, une grande variabilité inter-animale et un temps de mise en œuvre important. [45]

Ces tests in vivo comprennent les études suivantes :

- **Etude de la pharmacodynamie**
- **Etude de détermination de la pharmacocinétique**
- **Des études toxicocinétiques** : Ces études sont complétées par une évaluation de la toxicité aiguë et la toxicité à doses répétées.

## **2) Les procédés de production:**

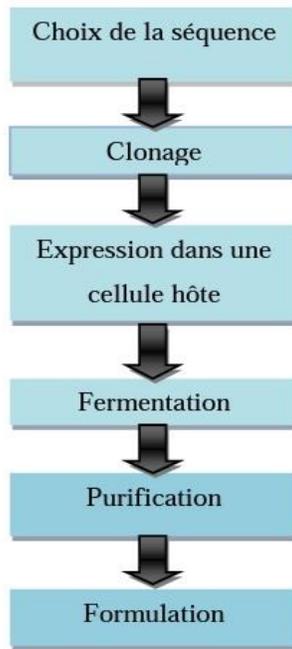
Comme tout médicament biologique, le médicament biosimilaire est défini à la fois par sa source de production, sa caractérisation, ses tests physicochimiques et biologiques et par son procédé de fabrication. Ce procédé doit être développé et optimisé à l'aide des méthodes de pointe les plus performants, notamment en termes de systèmes d'expression, cultures cellulaires, purification, formulation. 2-1)

### **2.1. La production en système clos :**

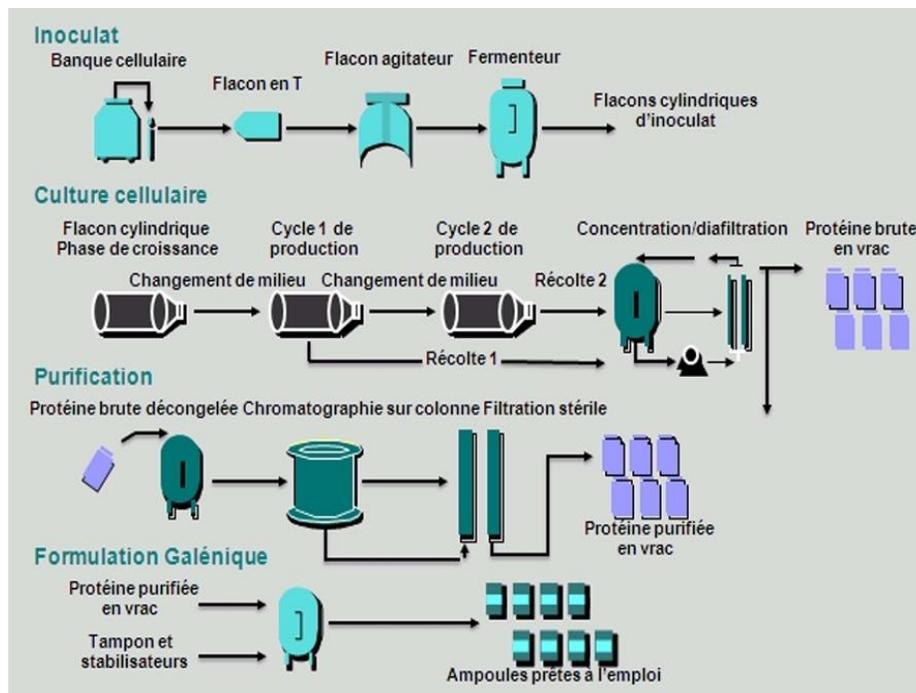
La production industrielle des médicaments issus des bio- technologies comporte de multiples étapes auxquelles sont associées des possibilités de variations. Avant de pouvoir transformer et amplifier l'ADN au sein de systèmes cellulaires procaryotes ou eucaryotes, il est nécessaire de préparer ces systèmes cellulaires eux-mêmes. Classiquement, la lignée cellulaire sélectionnée (encore nommée inoculum ou banque cellulaire) est placée dans un milieu de culture stérile, puis soumise à une fermentation afin d'obtenir une biomasse suffisante. En pratique, on utilise des clones d'une banque cellulaire maîtresse. Viennent ensuite les cycles de production de la protéine d'intérêt au sein de cuves spéciales (les bioréacteurs), puis la protéine brute est extraite par concentration et diafiltration. Plusieurs étapes supplémentaires (élution, filtration stérile) permettent de produire la protéine brute qui sera purifiée par des étapes de chromatographie hydrophobes, d'échanges d'anions et de cations, puis ensuite conditionnée pour être délivrée comme médicament. [41]

Le procédé de production en système clos comporte généralement sept phases [46]:

- 1) La sélection de la séquence d'ADN appropriée
- 2) Préparation de banque de cellules primaires
- 3) Préparation de banque de cellules de travail
- 4) Production
- 5) Purification
- 6) Analyses 7) Formulation



**Figure 2.2** La production des biosimilaires (système clos) [46]

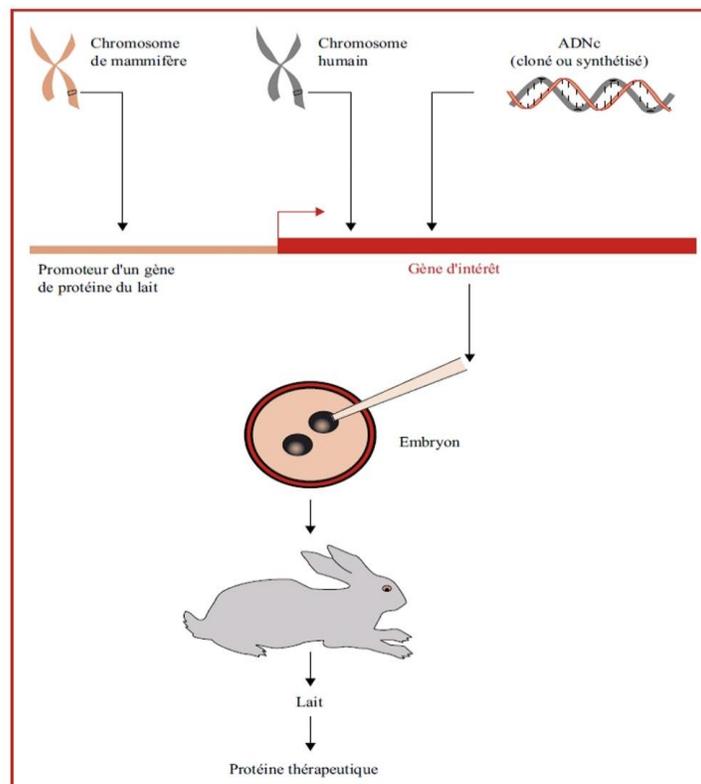


**Figure 2.3:** Le procédé globale de production [46]

**2.2. La Production en système ouvert :** Certaines protéines ont une composition trop complexe pour être synthétisées sous une forme active par les bactéries. C'est le cas de l'érythropoïétine par exemple qui doit être synthétisée par des cellules animales génétiquement modifiées. Le problème avec ces cellules animales en culture est qu'elles ne peuvent pas synthétiser des quantités importantes de cette protéine à un coût acceptable.

Le procédé de production en système ouvert consiste à isoler le gène codant pour la protéine d'intérêt, à l'associer à des éléments régulateurs capables de diriger la synthèse et la sécrétion de la protéine et d'introduire le gène dans un embryon au stade une cellule. Les organismes transgéniques ainsi obtenus sécréteront la protéine, dans divers tissus biologique facile d'accès, tels que :

- Le lait, le sang, le plasma germinal du sperme de porc, le blanc d'œufs ce sont les tissus les plus explorées pour les animaux.
- Pour les plantes, les protéines d'intérêt thérapeutique se trouvant dans les feuilles ou les graines selon les cas. [47]



**Figure 2.4 :** Une représentation schématique de la construction de gènes recombinants capables de diriger la sécrétion de protéines thérapeutiques dans le lait. [47]

- **Le Plan de développement et les expériences de quelques biosimilaires présentés à l'EMA :**

A ce jour, une vingtaine de biosimilaires ont été développés en s'appuyant sur les recommandations européennes ou internationales. Dans cette partie, quelques exemples de développements cliniques soumis aux autorités seront présentés (principalement en France et en Europe) par classes de molécules en mettant en perspective les recommandations européennes ou internationales.

### - L'Insuline :

Historiquement, les insulines étaient extraites de sources animales puis purifiées pour l'administration à l'homme. Aujourd'hui grâce à la technique de l'ADN recombinant l'insuline humaine peut être entièrement synthétisée. Elle est utilisée dans le cadre de diabète insulino dépendant en administration IV ou SC.

L'insuline recombinante humaine est immunogène et provoque des réactions croisées avec l'insuline naturelle.

Contrairement aux autres recommandations, pour l'insuline il est précisé que l'étude PK (en SC, dose unique et croisée) doit être réalisée indépendamment de l'étude PD et au moins une étude PD randomisée en double aveugle : l'étude la plus adaptée étant la mesure de la résistance à l'insuline.[48] La réalisation des ces études peut être suffisante à la conclusion de la comparabilité : il n'y a pas de nécessité d'effectuer une étude de phase III pour prouver l'efficacité.

L'insuline fut une des premières molécules biotechnologiques à être mise sur le marché pour autant, la première insuline biosimilaire ABASRIA®, biosimilaire de la LANTUS® vient juste d'obtenir son autorisation en juin 2014 [49].

Le rapport de l'EMA présentant les données ayant servi à l'obtention de l'avis n'est pas encore disponible ne permettant pas de connaître le détail des données présentées D'après le site « [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) », 4 études de phase I ont été réalisées avec cette molécule ainsi qu'une étude de phase III comparative chez des patients diabétiques de type 1.

### - l'Hormone folliculo-stimulante :

L'hormone folliculo-stimulante (FSH) est une glycoprotéine ; sa production au niveau de l'hypophyse est stimulée par la GnRH (Gonado Tropin-Releasing Hormone) libérée par l'hypothalamus. Cette hormone a pour cible les gonades.

Chez la femme, elle permet de stimuler la production d'œstrogène, entraînant la croissance des follicules et l'ovulation. Chez l'homme, elle favorise la spermatogénèse. L'hormone recombinante produite par génie génétique (r-FSH) est donc utilisée dans le cadre d'assistance médicale à la procréation : des injections SC ou IM (Intramusculaire) sont généralement réalisées. Trois spécialités sont commercialisées : GONAL-F®, PUREGON® et ELONVAL®.

Les études pharmacocinétiques doivent être réalisées en dose unique croisée en SC chez des femmes volontaires saines qui sont sous contraception ou sous agoniste de GnRH (suppression de la production de FSH endogène). A ce jour, seul deux biosimilaires ont été autorisés : OVALEAP® en Septembre 2013 et BEMFOLA® en Mars 2014. Pour la démonstration de la comparabilité, le Gonal® a été utilisé comme référence.

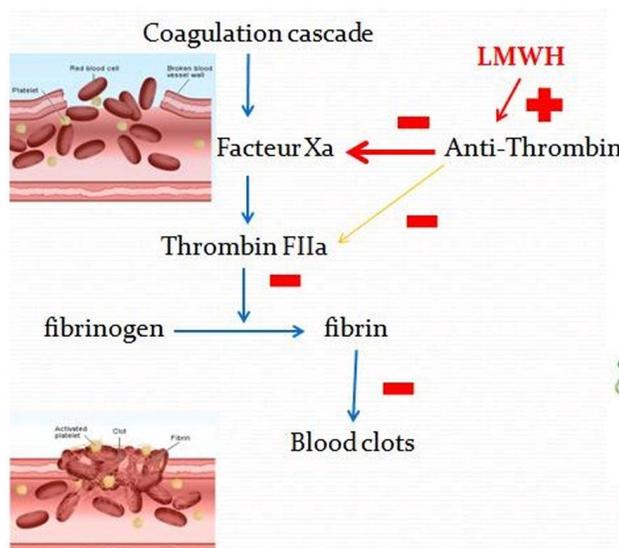
Le BEMFOLA® a été approuvé en Janvier 2014, le rapport de l'EMA n'a pas été diffusé à ce jour. Le biosimilaire a fait l'objet de deux études de Phase I et d'une étude de Phase III.

Deux phases I ont été réalisées pour l'OVALEAP®[50]: une première étude en dose unique, fixe et en montée de dose (37.5 UI, dose recommandée lors des augmentations de doses jusqu'à 300 UI, dose utilisée pour les injections de Gonal-f®) puis une étude comparative avec le produit de référence chez 36 femmes saines utilisant un contraceptif oral (suppression de la production endogène de FSH).

Les études PD (le marqueur principal étant le taux de FSH) ont été réalisées avec l'étude d'efficacité réalisées chez 300 femmes rencontrant des problèmes de fertilité.

### - Les Héparines de bas poids moléculaires

Les héparines sont des molécules appartenant à la famille des glycosaminoglycanes : elles sont produites par les mastocytes de la cavité péritonéale. C'est un mélange hétérogène de polysaccharides sulfatés. Les héparines régulent la cascade de la coagulation en de multiples sites (**Figure 2.7**): elles sont ainsi utilisées comme anticoagulant [51] et les biomédicaments sont obtenus par extraction à partir de la muqueuse d'intestin de porc.



**Figure 2.5** : Mécanisme d'action des HBPM [51]

Les héparines de bas poids moléculaire (Enoxaparine (LOVENOX®) et Tinzaparine (INNOHEP®)) sont obtenues après dépolymérisation chimique ou enzymatique de l'héparine extraite. Les principales difficultés posées dans le développement de biosimilaires de ces molécules sont leur grande hétérogénéité, une relation structure-activité non totalement élucidée et des marqueurs pharmacodynamiques peu représentatifs de l'efficacité.

Les effets indésirables sont des hémorragies ainsi que la survenue d'une thrombocytopenie (plus rare) liée à une réaction immunitaire croisée.

En injection IV, la demi-vie de l'héparine est de  $90 \pm 30$  minutes, d'autant plus courte que la dose administrée est faible. Cette caractéristique explique l'absence de proportionnalité entre la dose et l'effet biologique et pourquoi après injection sous cutanée de faibles doses, la biodisponibilité est faible, alors qu'elle est de 100% pour des doses plus importantes. Il existe une grande variabilité individuelle dans la réponse dose effet, résultant de plusieurs facteurs :

- Variation de la demi-vie d'élimination.
- Variation de l'effet anticoagulant pour une même concentration d'héparine en raison d'une liaison à d'autres protéines que l'antithrombine.

D'après les recommandations européennes, les études pharmacocinétiques conventionnelles ne peuvent être réalisées du fait de cette variabilité et de l'hétérogénéité des HBPM. Une seule étude d'efficacité combinée à une étude PD est recommandée lors d'un traitement préventif ou curatif des événements thromboemboliques après une chirurgie dans le cadre d'un essai comparatif.

Ces recommandations ne font pas l'unanimité et comme le paragraphe suivant l'expose, les HBPMs ne sont pas soumis à ces contraintes dans d'autres pays car celles-ci peuvent être soumises à la réglementation des génériques.

### ⇒ La polémique du LOVENOX®

Le LOVENOX® a été mis sur le marché par le laboratoire Sanofi en 1987 et a permis un important progrès dans la prise en charge des événements thrombotiques. Il est devenu un des produits phares de la compagnie. Le LOVENOX®, de part sa procédure de fabrication et sa structure particulière, est la seule HBPM à disposer de toutes les indications dans la prise en charge des événements thrombotiques : elle est donc non interchangeable avec les autres HBPM et monopolise une partie du marché.

Le développement de biosimilaires/copies utilisant le LOVENOX® a entraîné des discordances majeures entre l'Europe et les Etats-Unis. :

- L'Europe, comme décrit ci-dessus, considère ces HBPM comme biosimilaires et les soumet donc à un développement clinique strict.

- Aux Etats-Unis, les HBPM sont soumises au régime des génériques. [52]

La FDA se base sur une démonstration de la copie exacte de la molécule princeps et non sur la démonstration de la similarité. La FDA s'est basée sur les critères d'équivalence:

- Des propriétés et caractéristiques physiques et chimiques.
- De la nature de la source utilisée et de la procédure de fabrication (méthodes de dépolymérisation).
- De l'arrangement des composants (séquence oligosaccharidique).
- Des essais biochimiques et biologiques.
- Des profils pharmacodynamiques.

Ainsi aucun exercice de comparabilité n'est demandé, ni démonstration de l'efficacité dans un essai de phase III. La FDA certifie que ces essais sont plus sensibles pour relever des différences qu'un essai clinique dans le cadre des HBPM, et que l'approche biosimilaires adoptée par l'EMA n'est pas nécessaire dans ce cas.

Une polémique est née de ces différences d'évaluation entre les deux autorités : Protectionnisme du monopole du laboratoire européen ? Prise de risque de la FDA ?

D'après Glauser et Al [53], qui ont effectué l'analyse de 5 copies du LOVENOX® : les copies sont identiques en termes de structure, de poids moléculaire, d'activité anticoagulante et d'activité pharmacocinétique et pharmacologique chez l'animal pouvant ainsi confirmer la similarité des copies.

Pourtant, d'après Jeske et Al [54]. Le profil pharmacocinétique et pharmacodynamique étant très étroitement liés à la structure des héparines, le moindre changement (sulfatation, acétylation...) peut

avoir un impact sur l'effet pharmacologique. La constitution type « empreinte digitale » (enchaînement d'oligosaccharides non totalement élucidé : du LOVENOX® est très dépendante du processus de fabrication le rendant techniquement inaccessible à la copie. Egalement, une étude des copies montre que la distribution des chaînes selon leurs poids moléculaires n'est pas calquée sur celle du LOVENOX® [55].

Ainsi, des essais d'équivalence ne sont pas suffisants car une trop grande complexité analytique serait à mettre en œuvre pour définir précisément la similarité des deux chaînes oligosaccharides. D'autres arguments sont avancés par ces auteurs ou d'autres partisans des biosimilaires :

- La multiplicité des cibles des héparines rendent impossible une caractérisation précise de l'effet par des essais pré cliniques.
- L'immunogénicité ne peut être évaluée que par des essais cliniques [56].
- La corrélation entre les paramètres pharmacodynamiques et l'effet clinique non clairement établi rend difficile les conclusions quand à l'équivalence des molécules basées uniquement sur le profil pharmacodynamique.
- Un cas de patient traité depuis 4 ans par LOVENOX® a présenté des hémorragies conduisant à son décès quatre mois après la substitution par une copie [57].

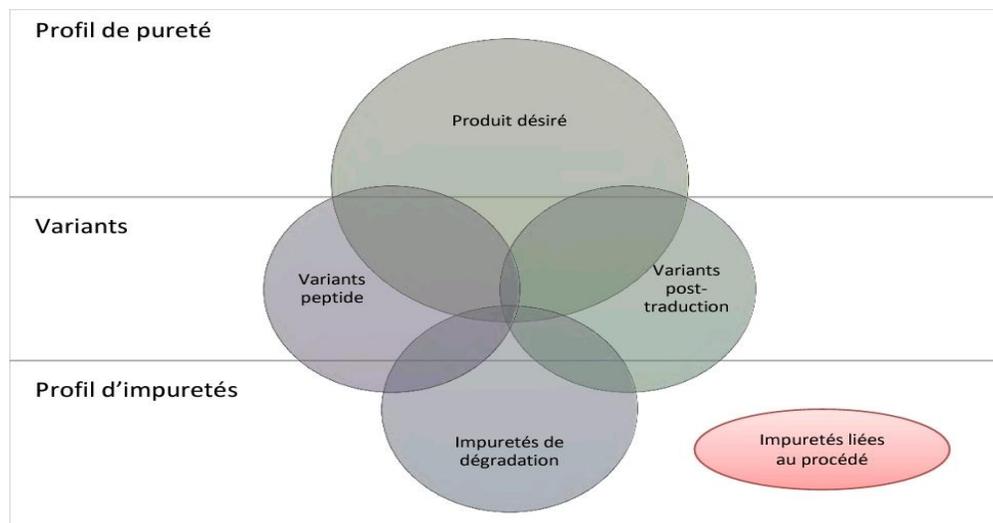
L'ensemble de ces arguments semblent justifiables et justifiés, cependant, les conclusions de certaines publications doivent être mesurées car leur financement peut provenir du laboratoire Sanofi. Egalement, depuis la mise sur le marché de ces copies aux Etats-Unis en 2010, seuls quelques cas ont été rapportés sur des problèmes de tolérance, d'inefficacité ou de sécurité. Au vu du nombre de patients traités par ces « génériques », cela semble faible mais tous les cas réellement observés ne sont peut être pas reportés.

Les défenseurs et détracteurs des biosimilaires s'opposent mais la littérature actuellement disponible ne permet pas à ce jour d'avoir un positionnement clair sur la question. Sandoz (une firme commercialisant un générique de LOVENOX® aux Etats-Unis) rassemble actuellement des données cliniques de phase IV afin de soumettre sa molécule en Europe. Il sera alors intéressant de voir le positionnement de l'EMA par rapport à ces données et leurs décisions sur ce type de molécule : générique ou biosimilaire ?

## Chapitre 3 : Le Contrôle qualité des médicaments biologiques et biosimilaires

- **Le contrôle qualité des médicaments biologiques.**

Le contrôle de la qualité des produits biologiques est un exercice difficile. En effet, la substance active biologique n'est pas une simple entité chimique bien définie mais plutôt un ensemble hétérogène de molécules complexes [58]. Cette complexité moléculaire est appelée micro-hétérogénéité intrinsèque. La substance active biologique contient la substance désirée mais aussi des isoformes et des variants ou produits de structure proche non éliminés lors de la purification, pouvant être dotés également d'une activité biologique équivalente ou proche du produit désiré. Elle contient également des impuretés de dégradation qui sont liées au produit et des impuretés liées au procédé de fabrication.



**Figure3.1:** L'Hétérogénéité du mélange produit [58].

La substance active biologique est soumise à des variabilités suivant le mode de production utilisé qui apporte des différences en termes de profil de pureté et d'impuretés d'un médicament biologique ou biosimilaire. Du fait de la production dans des systèmes vivants et selon la nature de la cellule hôte utilisée, la substance active subit des réactions biochimiques différentes. Ainsi, la séquence peptidique peut être soumise à des variations suite à diverses réactions comme des oxydations, des substitutions, des déamidations ou des troncations. La structure spatiale peut également faire l'objet de modifications de conformation ou bien les molécules peuvent s'agréger/se dissocier. De plus, les modifications post-traductionnelles apportées ne sont par exemple pas les mêmes entre les bactéries et les cellules de mammifères. Il existe différents type de modifications post-traductionnelles, comme les glycosylations, méthylations, acétylations, acylations, phosphorylations ou sulfatations, contribuant aussi à la variabilité de la substance

active biologique. La caractérisation et le contrôle de la qualité de ce type de mélange moléculaire est donc particulièrement difficile et requiert la combinaison de plusieurs méthodes analytiques appropriées. L'EMA dans ses guidelines évoque l'utilisation de "l'état de l'art" des méthodes analytiques pour garantir la qualité, l'efficacité et la sécurité du médicament qui sera administré au patient. Ainsi, 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. Le contrôle de la qualité des médicaments biologiques et biosimilaires repose, comme pour tout médicament, sur :

**- Les contrôles des matières premières (matériel génétique et banques cellulaires).**

Le contrôle de la qualité des matières premières utilisées pour 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[59] [60]

**- Contrôle du procédé de fabrication (en ligne/hors ligne)**

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. Et d'autre part à réaliser des échantillonnages pour réaliser divers contrôles comme la concentration en produit, substrats et métabolites ou la densité cellulaire. Une perturbation, même légère, de ces paramètres peut avoir des conséquences négatives sur la productivité et la qualité du produit désiré. La croissance cellulaire et la viabilité des cellules sont des éléments clé de la productivité, il est donc primordial d'instaurer des contrôles en ligne (monitoring) et hors-ligne (échantillonnage) pour maintenir des conditions optimales de production et vérifier le bon déroulement du procédé.[61]

**- Contrôle de la substance active et du Produit fini.**

- **Caractérisation** (Physicochimiques, Activité biologique, Propriétés immunochimiques, Pureté, impuretés et contaminant)[62] [60]
- **Contrôle de routine** (Identité, Pureté et impuretés, Puissance, Tests généraux, Dosage) [63]

**Le tableau 3.1** Suivant représente les principaux tests appliqués dans chaque étape de contrôle qualité (dans la technologie ADN-r). [63]

Etapes de fabrication	Nombre de tests	Exemple de tests appliqués
Matériel génétique	5-10	Analyse du caryotype, dépistage des oncogène, stabilité des gènes.
Produits protéique en vrac	20	Séquençage des acide aminés, carte peptidique, HPLC, Radioimmunoassay, western blot
Processus de fabrication	10	Rendement protéique, déficit protéique, suppression des endotoxines
Produit final	30	Analyse protéique, tests de stabilité, contamination par l'ADN, test de congeler-décongeler

Encyclopedia of Pharmaceutical Technology DOI: 10.1081/E-EPT-120041180 Copyright # 2007 by Informa Healthcare USA, Inc. All rights reserved.

**Tableau 3.2** Ci-dessous résume les principaux contrôles à effectuer pour la libération de la substance active biologique et du produit [63]

Caractérisation	Critère	Méthode
<b>Caractéristiques physicochimiques</b>	Séquence peptidique	MALDI-TOF MS, LC-MS
	Poids moléculaire	Spectrométrie de masse
	Conformation spatiale	Dichroïsme circulaire, FT-IR, fluorescence
	Modifications post-traductionnelles	HPLC, HPAEC-PAD, CE
	Charge	CE, IEC, IEF
	Hydrophobicité	RP-HPLC
<b>Activité biologique</b>	Puissance	Tests <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> et/ou biochimique (liaison agoniste/récepteur)
<b>Propriétés immunochimiques</b>	Affinité, avidité, immunoréactivité, fonctions effectrices des anticorps	Test liaison Ag/Ac, Western Blot, immunoprécipitation
<b>Profil de pureté/ impuretés</b>	Variants de masse	SEC-MALS, A4F-MALS, SM
	Variants de charge	CE, IEC, IEF, SM, cartographie peptidique
	Variants conformationnels	Dichroïsme circulaire, FT-IR, fluorescence
	Variants glycosidiques	HPLC, HPAEC-PAD, CE
	Variants ponts disulfures	TPM, fluorescence
	Protéines cellule hôte	ELISA
	ADN résiduel	Hybridation
Autres impuretés liées au procédé de fabrication	Chromatographie liquide, ELISA, etc.	

**Tableau 3.3** Les Contrôles de routine les plus fréquents des produits biologiques [65] [66]

Attributs	Critère	Méthode	Substance active	Produit fini
<b>Général</b>	Apparence		Oui	Oui
	Volume	Monographie	Non	Oui
	pH		Oui	Oui
	Osmolalité	Pharmacopée	Non	Oui
	Particules visibles		Non	Oui
<b>Identité</b>	Structure	Cartographie peptidique	Oui	Non
	Taille	SDS-PAGE, HP-SEC	Oui	Oui
	Charge	IEC, HIC, IEF, CZE	Oui	Oui
<b>Pureté/ Impuretés</b>	Protéines cellule hôte	ELISA	Oui	Non
	ADN résiduel	Q-PCR	Oui	Non
	Variants	SDS-PAGE, SEC-UV, CGE, IEF, HPLC, HPAC	Oui	Non
<b>Contaminants</b>	Endotoxines	Monographies	Oui	Oui
	Charge microbienne	Pharmacopée	Oui	Non
	Stérilité		Non	Oui
<b>Puissance</b>	Activité biologique	Liaison au récepteur	Oui	Oui
<b>Dosage</b>	Concentration	HPLC, Absorbance A <sub>280</sub>	Oui	Oui

Comme nous avons pu le voir précédemment, la fabrication des médicaments biologiques et biosimilaires est une étape difficile de par l'utilisation du système du vivant et la complexité de ce mélange hétérogène qu'est 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 fabricant devra maîtriser son procès pour assurer la reproductibilité et utiliser "l'état de l'art" 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.

- **Les exigences de comparabilité des biosimilaires 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 biosimilarité des produits est à démontrer par un exercice de comparaison en plusieurs étapes, 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.

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.

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. [67]

Le récent guide EMA [68] [69] fait intervenir une double approche de comparabilité pour établir la biosimilarité d'une molécule. Une première 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 seconde fait référence à l'ICH Q5E[70] 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).

**Tableau 3.4 : Résumé des analyses qualitatives nécessaires pour démontrer la similarité d'un biomédicament [68]**

QUALITE	Analyses		Paramètres 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 Acs liants ou neutralisants, si présents		Spécificité, Affinité, Cinétique de liaison, Activité sur le domaine Fc
Impureté	Identification et quantification des impuretés liées au produit et à la procédure de fabrication		
Stabilité	Evaluer la stabilité du similaire sous des conditions de stress (lumière, agitation...)		Etude de stabilité et de stress

La similarité peut être démontrée par des caractérisations analytiques [71], des essais de liaisons aux récepteurs et des essais biologiques (sur des cellules in vivo). De nombreuses techniques et outils existent à ce jour, cependant ces techniques ne sont pas suffisantes pour confirmer l'équivalence des biosimilaires [72]: des essais pré cliniques et cliniques sont donc nécessaires.

**Un dossier qualité complet (CMC : Chemistry Manufacturing Control) combiné à l'exercice de comparabilité structurale peut permettre de diminuer le nombre d'études non cliniques et cliniques.** Les produits étant similaires et non identiques, des différences sont acceptées dans la comparaison de leurs qualités.

### 1) La Comparabilité Pré-Clinique

**Tableau 3.5 :** Résumé des analyses nécessaires pour démontrer la similarité préclinique d'un biomédicament [72]

PRE CLINIQUE	Analyses	Paramètres analysés
In vitro	Evaluation 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

L'évaluation des données précliniques doit permettre de montrer la comparabilité des profils pharmacotoxicologiques des deux produits (Tableau 3.6): si la similarité au niveau de la qualité moléculaire est démontrée préalablement, alors les études pré cliniques nécessaires sont réduites. 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.

Les études in vitro doivent permettre de comparer l'activité PD des deux molécules. les études in vivo sur l'espèce animale la plus adaptée doivent être conduites pour compléter ces données et pour évaluer la toxicité. Une étude de toxicité à dose unique et à dose répétée est donc obligatoire pour établir le profil toxico cinétique (titre en anticorps, réactivité croisée et capacité neutralisante). De tels tests sont particulièrement utiles pour détecter la présence de protéine de la cellule hôte ou des impuretés.

Les autres études toxicologiques de routine ne sont pas nécessaires (mutagénicité, carcinogénicité, toxicologie de la reproduction).

## 2) La Comparabilité Clinique:

**Tableau 3.6 :** Résumé des analyses nécessaires pour démontrer la similarité clinique d'un biomédicament [72]

CLINIQUE	Analyses	Paramètres analysés
PK/PD	Evaluation du profil pharmacocinétique et pharmacodynamique	Absorption/Biodisponibilité Clairance, demi-vie
Essais cliniques	Evaluation de l'efficacité et de la sécurité	Efficacité Sécurité Immunogénicité

L'application d'un plan de développement clinique complet aux biosimilaires pourrait être considérée comme non-éthique, le biosimilaire étant utilisé dans le but de traiter la même maladie, aux mêmes doses et conditions d'utilisation. L'efficacité de cette classe de molécule ayant également été démontrée pour le produit de référence, des essais cliniques ne seraient ainsi éthiquement pas justifiés[73]. 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.

L'approche pour établir la comparabilité clinique des deux molécules se divise donc elle aussi en une approche par étapes : étude PK, étude PD, et essais cliniques comparatif. Pendant toute l'évaluation clinique, une importance particulière doit être apportée à l'évaluation de l'immunogénicité.

### 2.1. L'étude clinique PK/PD

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 (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 : il doit être si possible, le critère primaire de l'étude PK.

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 [74]. Généralement, les essais cliniques pour des biosimilaires doivent démontrer la similarité de l'efficacité du médicament : les études PK/PD permettent cependant d'assurer que les propriétés du biosimilaire sont bien établies, que le marqueur PD qui sera utilisé pour la démonstration de l'efficacité est le plus pertinent et la relation entre la dose et l'exposition correspond à ce qui est attendu.

## 2.2. L'étude clinique 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.

### ⇒ Equivalence ou non-infériorité ?

**Les essais d'équivalence** 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 ») [75]. 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 limitants 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...) [76]

**Les essais de non-infériorité** permettent de démontrer que le biosimilaire n'est pas moins efficace que le biomédicament. 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 [77]. Cependant, ces essais de non-infériorité peuvent montrer que le biosimilaire n'est pas inférieur mais ne statuent donc pas sur une possible supériorité : cela peut être associé à plus d'effets indésirables et donc amener les autorités à demander un développement indépendant de la molécule. Pour cette raison également, les essais d'infériorité ne permettant pas d'appliquer l'extrapolation d'indication.

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.

Pour ces deux types d'essais l'analyse doit se baser sur la population PP (perprotocol) [78] et sur la population ITT (Intend-to-treat) [79]. L'analyse en ITT suppose des déviations au protocole semblables dans les 2 groupes, et diminue l'efficacité estimée pouvant entraîner des biais pour ce type d'essai. L'analyse en PP permet d'augmenter le contraste entre les deux groupes mais peut être biaisée si une importante proportion de sujets sort d'étude (surestimation de l'efficacité si tous les non-répondeurs sortent d'étude). La combinaison des analyses sur les deux populations permet de supporter la conclusion de noninfériorité ou d'équivalence [80].

## ⇒ **Cross-over ou bras parallèles ?**

Une autre question qui se pose pour le design de l'étude d'efficacité est le choix d'une étude croisée (cross over) ou une étude en parallèle.

**Le cross-over** est généralement utilisé pour les équivalences des molécules chimiques ou/et des molécules ayant une demi-vie courte. Le cross-over permet de réduire la variabilité (pas de variabilité interindividuelle chez un même sujet) et le nombre de sujets nécessaires (chaque sujet est son propre contrôle). L'inconvénient du cross over est le « carry over effect » qui peut être causé par l'interaction entre les traitements et les périodes. Ceci peut être limité par une période de « wash out » (période sans traitement) suffisante : au minimum équivalente à 5 demi-vies de la molécule. L'utilisation de ce modèle pour une molécule ayant une demi-vie longue (comme les anticorps) ou induisant la production d'anticorps n'est donc pas adaptée.

**Le modèle en groupes parallèles** est une alternative au cross over mais augmente l'impact de la variabilité interindividuelle sur le résultat, ce qui résulte en une augmentation du nombre de sujets nécessaire.

Les lignes directrices recommandent également que le critère d'évaluation reflète l'action pharmacologique des médicaments et non le bénéfice potentiel pour le patient, les critères mesurant l'activité étant plus sensibles. Le but est de pouvoir détecter des différences potentielles d'efficacité et de sécurité entre le biosimilaire et le biomédicament en minimisant la variabilité interindividuelle. Enfin, l'effet mesuré pour le comparateur versus placebo (essais d'efficacité du comparateur) ne doit pas être modifié. Pour cela, l'essai doit être conduit de la même manière que l'essai qui a établi l'efficacité du comparateur : population, traitements concomitants, durée de l'étude doivent donc être similaires ou identiques.

Ces recommandations européennes pour le développement de la molécule et l'exercice de comparabilité à plusieurs étapes ont également des conséquences sur le dossier d'enregistrement final présenté aux autorités. **(1.4.7- Chapitre 1)**

### **3) Le point de vue des opposants aux exigences européennes sur les biosimilaires :**

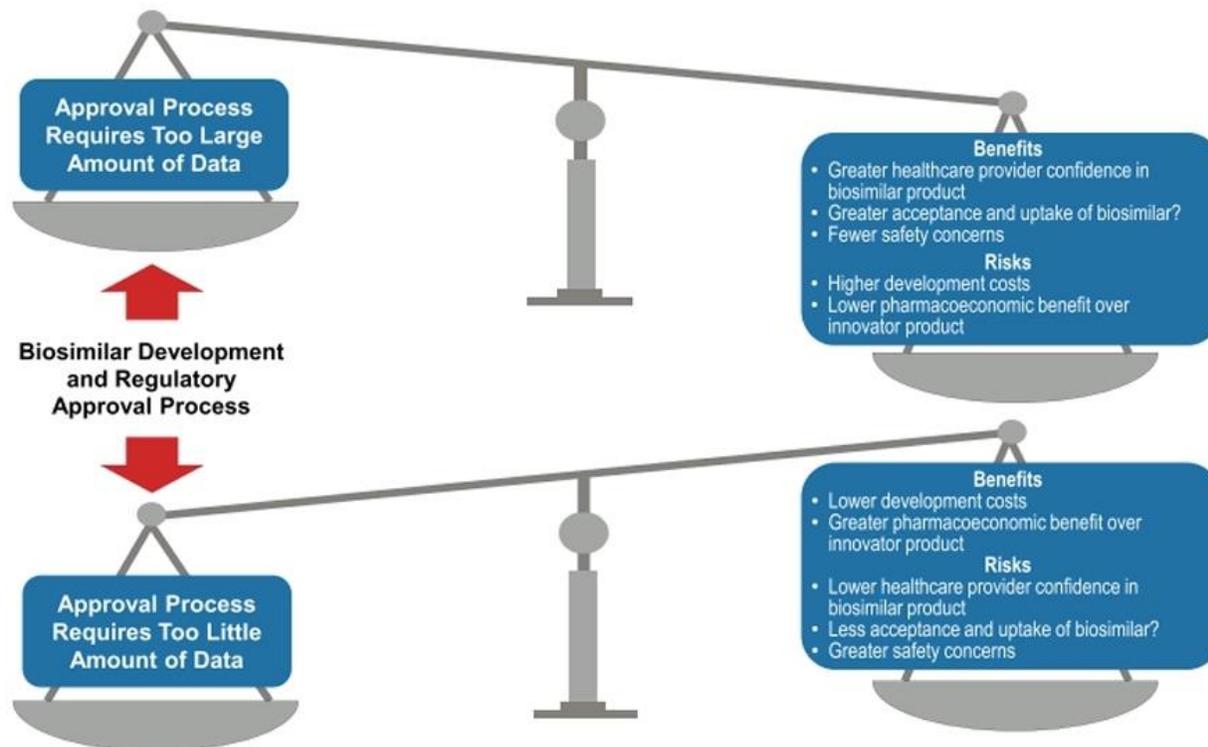
Les exigences pour le développement d'un biosimilaire demandent ainsi la réalisation d'essais de Phase I et de phase III. Ce développement, outre son coût, rallonge la durée de développement d'un biosimilaire (environ 6 ans).

De nombreux groupes scientifiques (dont le MiEF (Medecine in Europe Forum))[81] s'opposent à ces exigences qu'ils jugent trop contraignantes et injustifiées, dénonçant même un protectionnisme industriel voulu[82].

Les principaux arguments avancés sont :

- **Les caractérisations physicochimiques et biologiques accompagnées d'études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques sont suffisantes** : Depuis de nombreuses années des modes de fabrication d'une même substance peuvent poser des problèmes de reproductibilité (exemple la fermentation pour les antibiotiques) induisant des différences d'un lot à l'autre : tous les biomédicaments présentent des variabilités liées à leurs modalités de fabrication. Or, des essais cliniques permettant d'évaluer l'efficacité et le profil d'effets indésirables ne sont pas exigés pour chaque lot.
- **Les essais cliniques demandés sont une exigence disproportionnée [83]** : Pour démontrer l'absence de surcroît d'un événement indésirable rare (comme un événement rare lié à l'immunogénicité) il faut un très grand nombre de patients. Les essais cliniques réalisés ne permettent que de conclure que les deux médicaments ont un effet bénéfique/risque du même ordre, qu'on peut les utiliser aux mêmes fins, en restant attentifs aux signaux de pharmacovigilance, comme pour tous les médicaments.
- **L'interdiction de substitution n'est pas justifiée** : Puisque la même variabilité peut être observée entre deux lots d'une même spécialité. A cela s'ajoute le fait que les Etats membres n'appliquent pas tous les mêmes règles (le Danemark et la Bulgarie autorisent la substitution) remettant en question la pertinence de l'interdiction.
- **Le statut de biosimilaire est peu attractif** (développement long, retour sur investissement faible dû à la non substitution automatique et pas de protection des données) qui pousse les firmes à essayer de positionner leurs molécules comme des « nouvelles substances ».

La revue médicale Prescrire dans l'un de ses articles sur les biosimilaires écrit qu'il est « en tout cas prématuré de légiférer sans connaissance scientifique solide » : il a semblé, au contraire, primordial de légiférer lors de la naissance du concept au début des années 2000 alors que les connaissances et les techniques sur les biomédicaments n'étaient pas optimales. En effet, n'est-il pas ainsi préférable de recueillir le maximum d'informations sur un produit avant sa commercialisation (quitte à développer des recommandations trop strictes) puis rediscuter de ces recommandations avec l'évolution des techniques et des connaissances plutôt que l'inverse ?(Figure 3.2) [84]



**Figure 3.2:** Bénéfices et risques dans les procédures d’avis. D’après Abraham J. [84]

C’est dans cette optique que l’EMA inscrit sa volonté de développer et améliorer ses guidelines en ouvrant en 2013 à la consultation son projet d’évolution des recommandations sur les biosimilaires. Ainsi, l’ensemble des arguments cités plus haut sont recevables par l’EMA.

Mais il semble peu probable de prétendre une refonte complète et une remise en question totale de ces recommandations : en effet, elles ont inspiré de nombreuses autres réglementations internationales supposant ainsi le bien-fondé des demandes européennes.

- **Le Contrôle Qualité des Biosimilaires**

**1) Le Contrôle de la comparabilité structurale:**

La comparabilité est établie à partir d’une étude de caractérisation comparative très poussée, il faut démontrer que le biosimilaire et le produit de référence possèdent :

- La même structure primaire c’est-à-dire : la même séquence d’acides aminés, le même appariement des ponts di-sulfure entre les cystéines.

- Les mêmes structures secondaires et tertiaires (hélices alpha et feuillets bêta)

- La même glycosylation, des différences de glycosylation appelées isoformes, en particulier de sialylation, se traduisent par des pH iso-électriques différents [85].

**a) Séquence en acides aminés :**La séquence d'acides aminés du produit souhaité devrait être déterminée autant que possible en se servant de méthodes semblables à celles décrites aux points b) à e) et ensuite être comparée à la séquence des acides aminés déduite de la séquence du gène pour le produit souhaité.

**b) Composition en acides aminés :**La composition globale des acides aminés est déterminée en recourant à diverses méthodes analytiques et hydrolytiques, et comparée à la composition en acides aminés déduite de la séquence du gène pour le produit souhaité ou son équivalent naturel, si jugé nécessaire. Fréquemment, l'analyse de la composition en acides aminés fournit des informations structurelles utiles pour les peptides et les petites protéines, mais de telles informations sont généralement moins précises pour les grandes protéines. Les données fournies par l'analyse quantitative des acides aminés peuvent souvent aussi être utilisées pour déterminer le contenu protéique.

**c) Séquençage des acides aminés terminaux :**L'analyse des acides aminés terminaux est exécutée pour identifier la nature et l'homogénéité des acides aminés amino- et carboxy-terminaux. Si le produit souhaité est hétérogène en ce qui concerne les acides aminés terminaux, la quantité relative des formes variantes devrait être déterminée en utilisant une méthode analytique appropriée. La séquence de ces acides aminés terminaux devrait être comparée avec la séquence d'acides aminés terminaux déduite de la séquence du gène pour le produit souhaité.

**d) Carte des peptides :**La fragmentation sélective du produit en des peptides discrets est effectuée à l'aide d'enzymes appropriées ou des substances chimiques, et les fragments de peptides qui en résultent sont analysés par HPLC ou autre méthode analytique appropriée. Les fragments de peptides devraient être identifiés autant que possible avec des techniques telles que l'analyse de la composition des acides aminés, le séquençage N-terminal ou la spectrométrie de masse. On a souvent recours à la cartographie des peptides de la substance médicamenteuse ou du produit médicamenteux par une méthode validée appropriée pour confirmer la structure du produit souhaité.

**e) Groupe sulfhydrate et ponts disulfures :**Dans les cas où, basé sur la séquence génétique du gène pour le produit souhaité, la présence de résidus de cystéine est anticipée, le nombre et les positions de tout groupe sulfhydryle libre et/ou de ponts disulfures devraient être identifiés autant que possible. La cartographie des peptides (dans des conditions réductrices et non-réductrices), la spectrométrie de masse ou d'autres techniques appropriées peuvent être utiles à cette évaluation.

**f) Structure des hydrates de carbone :**Pour les glycoprotéines, le contenu en hydrates de carbone (sucres neutres, sucres aminés et les acides sialiques) doit être établi. De plus, la structure des chaînes d'hydrates de carbone, la composition des oligosaccharides (profil antennulaire) et le ou les sites de glycosylation des chaînes de polypeptides doivent être analysés autant que possible.

## **2) Les Méthodes de contrôle :**

En fonction de données analytiques, la démonstration de la comparabilité sur le plan qualité peut conduire ou non à des essais cliniques de comparabilité avec le produit de référence. Il faut se procurer la substance active du produit de référence et entreprendre des études analytiques approfondies pour démontrer la biosimilarité. Les études physico-chimiques doivent inclure des identifications de structure (primaire, secondaire...) et déterminer les voies de dégradations en conditions accélérées.

La comparabilité doit être démontrée au regard de la sécurité et de l'efficacité notamment en justifiant les différences éventuelles : exemple dans la structure comme des modifications dans le profil d'impuretés ce qui peut avoir des conséquences très importantes dans le profil d'efficacité et de sécurité. La comparaison avec un standard disponible (Ph Eu, WHO...) n'est pas suffisante. Le profil d'impureté doit être défini qualitativement et quantitativement, analysé en conditions accélérées pour connaître certaines réactions spécifiques (oxydation, dimérisation) et comparé au produit de référence.

Les méthodes de contrôle peuvent ne pas discriminer les variants, elles doivent être multiples et sophistiquées: absorption UV, dichroïsme circulaire, infrarouge à transformé de Fourier, spectroscopie de fluorescence, RMN, calorimétrie, chromatographie (exclusion, échange d'ions, carte peptidique...), électrophorèse (SDS PAGE, IEF,..), microscopie électronique, Rayons X,.....et bien sur des essais biologiques [86].

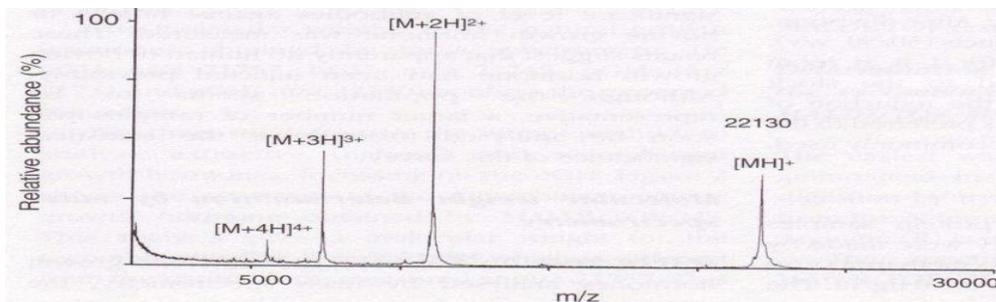
### **2-1) Les Méthodes utilisées pour le contrôle de la structure primaire et la composition en acides aminés :**

#### **2-1-1) La spectrophotométrie de masse :**

Le principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse repose sur l'action d'un champ électromagnétique sur une particule chargée afin, en particulier, d'en déterminer le rapport masse/charge ( $m/z$ ). La mise au point des premiers spectromètres de masse date du début de ce siècle. À partir de 1980, le domaine d'utilisation de la spectrométrie de masse s'est élargi aux composés biologiques grâce à la découverte de nouvelles techniques permettant de produire des ions à partir de molécules de plusieurs centaines de milliers d'unités de masse atomique. La spectrométrie de masse permet d'identifier et de doser une substance ou un élément à l'aide de la mesure du rapport masse/charge d'ions issus de l'échantillon. L'un des principaux avantages de cette technique est d'apporter des informations à partir d'une quantité minimale d'échantillon (du mg au pg).

Le premier renseignement apporté par un spectre de masse est la masse moléculaire et, éventuellement, la composition élémentaire de la molécule échantillon. La structure moléculaire peut

également être déduite du spectre de masse après analyse des dissociations ioniques spontanées ou induites par collision. Enfin, un spectromètre de masse peut être utilisé comme détecteur à haute sélectivité en couplage avec un chromatographe en phase vapeur/liquide.



**Figure 3.3** : Spectre de masse de l'hormone de croissance hGH obtenu grâce à un spectromètre de masse MALDI /TOF. On constate ainsi que l'hGH pèse 22 130 D. [Bonnaire 1998]

### Intérêt pour le développement des biosimilaires :

La détermination de la composition en acides aminés, la masse moléculaire, ainsi que de la structure primaire[87].

#### 2-1-2) La qualification par LC-MS:

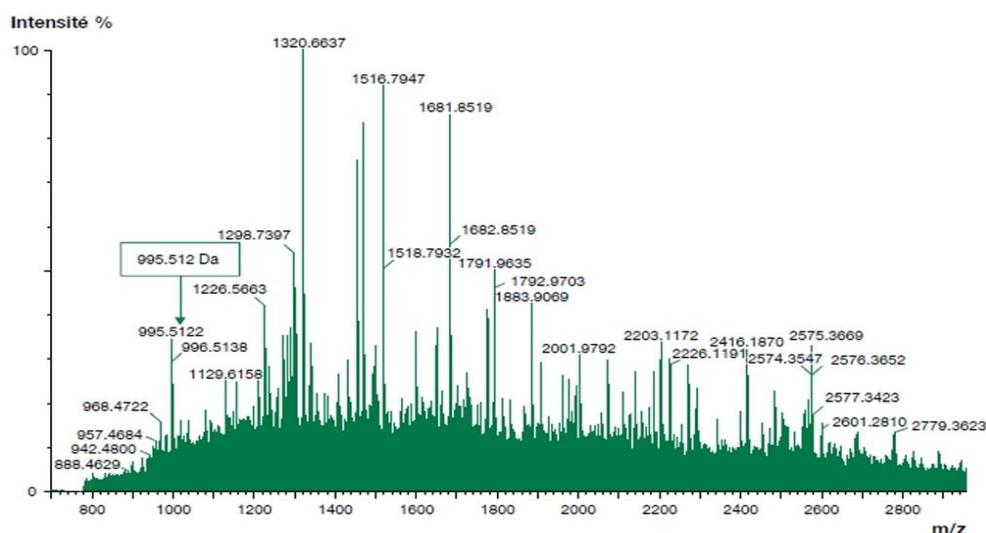
Cette technique a été développée grâce à l'avènement de méthodes de désorption-ionisation à pression atmosphérique comme l'électrospray, les analyses par spectrométrie de masse ont pu être appliquées aux macromolécules telles que les protéines. Cependant cette technique reste délicate à mettre en œuvre en bioanalyse, en raison de la complexité des échantillons étudiés. En effet, le phénomène d'ionisation des macromolécules est un processus au rendement faible et variable. Si, de plus, d'autres molécules sont présentes en solution, celles-ci vont également s'ioniser, ce qui a pour effet non seulement de complexifier le spectre de masse mais en plus de diminuer le rendement d'ionisation du composé à analyser (on parle dans ce dernier cas de suppression d'ionisation).

Pour pallier ces problèmes, il est ainsi nécessaire de séparer les analytes des autres composants de la matrice (excipients) avant leur introduction dans le spectromètre de masse. Pour cela, la chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC, high performance liquid chromatography) apparaît comme un outil de choix, en raison de son fort pouvoir séparatif et de sa simplicité de couplage avec les sources électrospray. La LC-MS (liquid chromatography-mass spectrometry) est d'ailleurs devenue une des techniques les plus employées pour la bioanalyse des composés de faible masse moléculaire, et elle est en fort développement pour le dosage des molécules de taille plus importantes telles que les peptides ou les protéines.

Dans le cas de l'analyse de peptides ou de protéines, il faudra bien évidemment tenir compte de leurs propriétés physico-chimiques spécifiques, tels que leur taille importante ou leur caractère

amphotère. En fonction de la phase stationnaire utilisée, plusieurs types d'interactions peuvent être mises en oeuvre lors de la séparation chromatographique.

Cependant, la chromatographie de partage à polarité de phases inversées est le plus souvent employée. Elle est en effet particulièrement bien adaptée au couplage à la spectrométrie de masse car elle ne nécessite pas l'utilisation de sels à forte concentration et permet de travailler avec des pourcentages importants de solvants organiques, paramètres favorables à la bonne ionisation des composés dans une source électrospray. Alors que ce type de chromatographie met en jeu pour de petites molécules un partage de la molécule entre la phase stationnaire et la phase mobile, pour les peptides et les protéines elle est principalement basée sur leur adsorption sur la phase hydrophobe. Leur élution a alors lieu pour une concentration critique en solvant organique, et c'est pourquoi les applications HPLC utilisent de faibles pentes de gradients en solvants organiques (méthanol ou acétonitrile) pour la désorption consécutive des peptides puis des protéines [88].



**Figure 3.4** Une analyse par Maldi-Q-ToF en mode MS des peptides tryptiques marqués de l'érythropoïétine bêta séparés par chromatographie en phase inversée [88].

**Intérêt :** détermination de la composition en acides aminés, et la caractérisation de la structure primaire.

### 2-1-3) Desorption-ionisation laser assisté par matrice (MALDI) :

Introduite en 1988 par Karas et Hillenkamp, la méthode (MALDI) a été développée afin d'analyser les molécules de haute masse moléculaire. Le MALDI est une source d'ions sous vide. L'échantillon est déposé sur une plaque, puis séché. Il se présente donc sous forme solide. Un processus de désorption de l'échantillon va permettre son analyse.

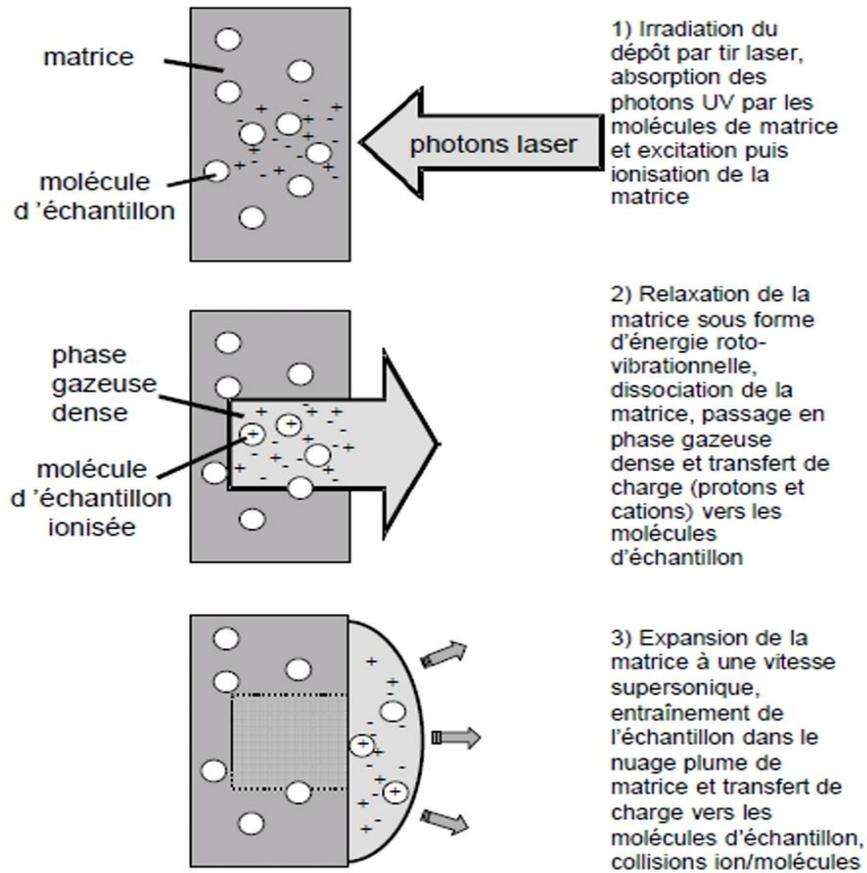


Figure 3.5: Ionisation MALDI – Schéma de principe [88].

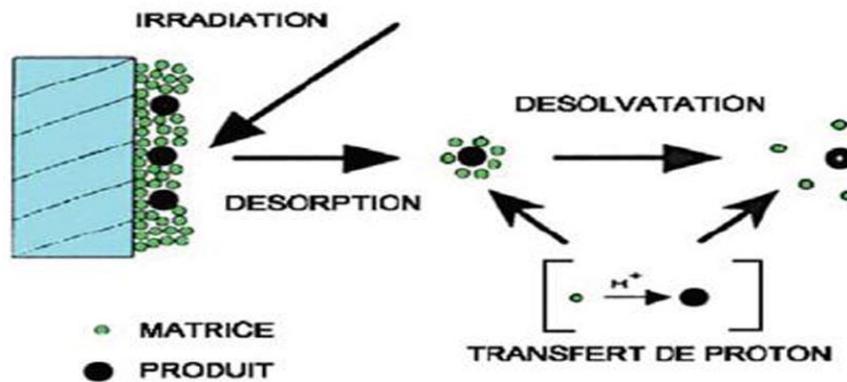
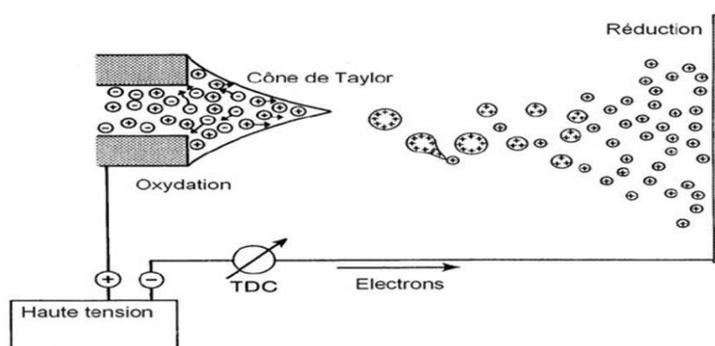


Figure 3.6 Principe de la désorption/ionisation MALDI [88].

**Intérêt :** la caractérisation de la structure primaire, et la détermination de la composition en acides aminés [88].

#### 2-1-4) Les sources électrospray (ESI : ElectroSpray Ionisation) :

L'électrospray (ou électronébulisation) est une source d'ions à pression atmosphérique (Figure 20) qui peut facilement être couplée à la chromatographie liquide. Cette technique, proposée par M. Dole en 1968, a été développée par J.B. Fenn au milieu des années 80 et est utilisée en spectrométrie de masse pour produire des ions à partir de composés en solution. Considérée au début comme une source de désorption-ionisation dédiée à l'analyse de polymères, et appliquée ensuite aux protéines, son utilisation s'est rapidement élargie non seulement à d'autres biopolymères, mais également à l'analyse de petites molécules. Cette technique d'ionisation-désorption, n'induit quasiment pas de fragmentation. C'est la raison pour laquelle la méthode électrospray est considérée comme une technique d'ionisation désorption douce.



**Figure 3.7** : Schéma simplifié du fonctionnement d'une source électrospray. [88]

**Intérêt** : détermination de la structure des protéines [88].

### 2-2) Les Méthodes utilisées pour le contrôle des structures secondaires et tertiaires :

#### 2-2-1) Dichroïsme circulaire (Circular dichroism spectroscopy) :

Le dichroïsme circulaire est une technique spectroscopique qui repose sur la capacité qu'ont les structures optiquement actives d'absorber de façon inégale la lumière polarisée circulairement à droite et la lumière polarisée circulairement à gauche. Cette propriété se rencontre plutôt dans les liquides et les solutions du fait de la structure des molécules [89]. L'absence d'organisation structurale dans la molécule étudiée engendre un spectre de dichroïsme circulaire dont l'intensité est nulle, alors qu'une structuration compacte résulte en un spectre qui peut contenir à la fois des signaux positifs et négatifs.

C'est une méthode très utilisée pour l'analyse conformationnelle des peptides et des protéines. Les éléments de structure secondaire jouent un rôle sur leur signal dichroïque, en particulier les structures en hélice. Ainsi, les structures en hélice  $\alpha$  et feuillet  $\beta$  des protéines ou en double hélice des acides nucléiques présentent des signaux dichroïques caractéristiques. La répartition

spectrale du dichroïsme circulaire donne, dans les domaines des ultraviolets, des informations importantes sur la structure secondaire des protéines. Par exemple, elle indique la proportion relative des fragments de la protéine en hélice  $\alpha$ , feuillet  $\beta$ , coudes ou en structure aléatoire. Il est aussi possible d'observer la dénaturation d'une protéine par l'augmentation du signal correspondant à la structure et la diminution des signaux correspondants aux hélices  $\alpha$  et feuillets  $\beta$ . On peut également suivre le repliement de la protéine et déterminer quelle structure secondaire se forme en premier.

Le dichroïsme circulaire donne moins d'informations sur la structure des protéines que la diffraction des rayons X ou la RMN mais il permet de faire des mesures rapides, sans nécessiter une grande quantité de produits et sans analyses longues des données. De même, il permet d'étudier rapidement les protéines et les peptides en faisant varier les conditions de solvants, la température, le pH, la salinité, etc...

Cette technique possède, néanmoins quelques limitations expérimentales. Les spectres de dichroïsme circulaire utilisés dans la détection de la structure secondaire sont liés à l'absorption entre les orbitales  $\pi$  et  $\pi^*$  des liaisons peptidiques. Ces bandes d'absorption résident en partie dans la zone difficile d'accès des ultraviolets, cette partie est inaccessible à l'air à cause de la forte absorption de l'oxygène dans cette gamme de longueurs d'ondes. Dans la pratique, on réalise les mesures à l'aide d'instruments remplis d'azote.

#### - Intérêt pour le contrôle des biosimilaires :

Le dichroïsme circulaire est une technique qui permet d'analyser le contenu en structures secondaires des protéines ou des acides nucléiques. Pour déterminer la proportion de chaque type de structure secondaire, il faut analyser le spectre expérimental en ses composantes élémentaires avec des logiciels appropriés. C'est une technique non destructive qui permet d'étudier les changements de conformation des protéines dans différents environnements (PH, dénaturation par les détergents, les agents chaotropes et la température) [89][90]

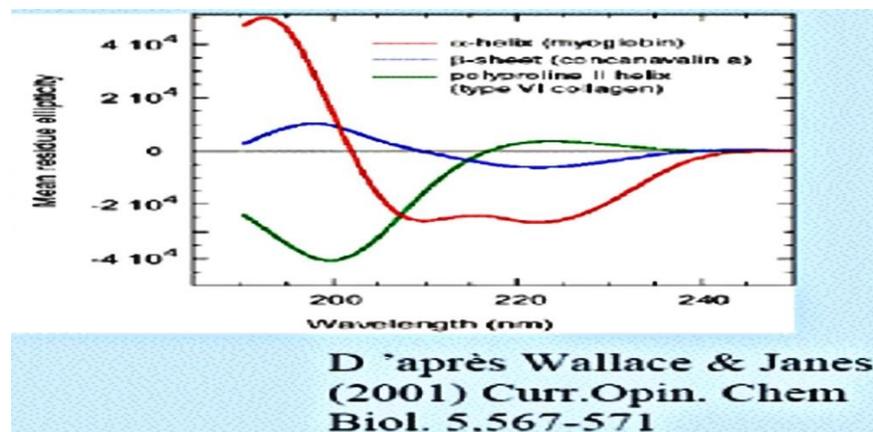


Figure 3.8 : Un exemple de spectre obtenu par dichroïsme circulaire [90]

### 2-2-2) Absorption UV-visible :

La spectroscopie ultraviolet-visible ou spectrométrie ultraviolet-visible est une technique de spectroscopie mettant en jeu les photons dont les longueurs d'onde sont dans le domaine des ultraviolet (200 nm – 400 nm), du visible, et jusqu'au proche infrarouge (750 nm -1 400 nm).

Soumises à un rayonnement dans cette gamme de longueurs d'onde, les molécules subissent une transition électronique. Cette technique est complémentaire de la spectroscopie de fluorescence en ce sens que la fluorescence met en jeu des transitions depuis l'état excité jusqu'à l'état fondamental alors que la spectroscopie d'absorption traite des transitions entre état fondamental et état excité.

UV et le visible est exploitée en analyse quantitative par application de la loi de BeerLambert. La méthode s'applique non seulement aux composés qui présentent une absorption dans le visible mais également aux composés dont un dérivé obtenu par une réaction chimique présente une telle absorption.

### Intérêt pour le contrôle des biosimilaires :

L'absorption en UV / visible permet la détermination des structures primaires et secondaires des protéines thérapeutiques.[91]

### 2-2-3) La résonance plasmonique de surface

(Ou surface plasmon resonance en anglais) est un phénomène physique principalement connu pour son utilisation comme méthode de mesure de la liaison d'un « ligand » sur un « récepteur » adsorbé à la surface d'une couche métallique. Un système de détection SPR mesure la variation de l'indice de réfraction au voisinage de l'interface quand le ligand se fixe aux récepteurs [92].

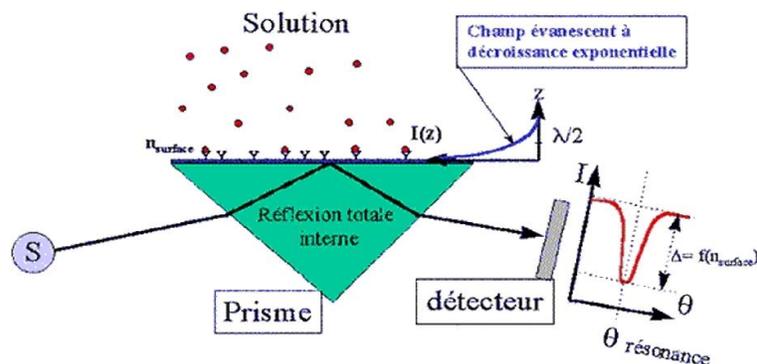


Figure 3.9: Schéma du principe de la résonance plasmonique de surface [92].

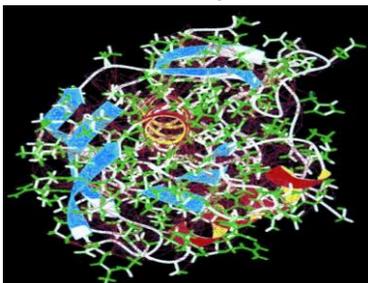
**Intérêt :** C'est une méthode analytiques qui renseigne sur la cinétique de liaison du protéine-récepteur, elle fournit aussi des informations sur l'affinité du ligand pour son récepteur. Donc d'une manière indirecte la possibilité d'exploitation de ces résultats pour la détermination de la conformation secondaire et tertiaire.

### 2-3-4) La détermination de la structure des protéines par Résonance magnétique nucléaire: (RMN)

Les protéines sont des polypeptides, formés à partir des vingt acides aminés naturels. Il existe deux types de conformation locale de la chaîne polypeptidique : une forme où le squelette est replié en hélice (hélice  $\alpha$ ), et une forme où le squelette est replié de manière à former une surface plus ou moins plane (plissée) feuillet  $\beta$ . La résonance magnétique nucléaire (RMN) des protéines étudie principalement le repliement de la chaîne polypeptidique dans l'espace. En cela, elle diffère essentiellement de la RMN pratiquée sur des molécules organiques, qui doit déterminer le graphe des liaisons covalentes. Une caractéristique importante des spectres RMN de protéines est leur extrême complexité, due au grand nombre de noyaux observables dans l'échantillon. L'étude d'une protéine peut se faire par RMN homonucléaire ou hétéronucléaire, suivant que l'on observe les noyaux protons seuls ou avec les noyaux carbones et /ou azotes. Les expériences RMN permettent l'observation des couplages scalaires et dipolaires entre spins. L'observation du transfert d'aimantation, par couplage dipolaire, produit des effets Overhauser nucléaires (nOe) entre noyaux situés à moins de 5 Å l'un de l'autre, et permet l'estimation des distances entre les noyaux observés. [93]

Mais la RMN homonucléaire présente certaines limitations pour l'étude des protéines en solution, à cause du taux de superposition des pics sur les spectres et du mauvais transfert d'aimantation entre protons par couplage scalaire. Ces problèmes, qui rendaient difficile l'utilisation de la RMN pour l'étude de protéines de taille supérieure à cent résidus, ont été réduits par l'utilisation des propriétés RMN de noyaux autres que le proton.

**Figure 3.10 :** Positions dans la structure de la déformylase des contraintes de distance déterminées à



partir de l'observation des nOe [93]

En effet, des noyaux différents résonnent dans des gammes de fréquences différentes, ce qui permet de résoudre les superpositions de déplacements chimiques. De plus, les constantes de couplage hétéronucléaires améliorent la sensibilité du couplage scalaire.

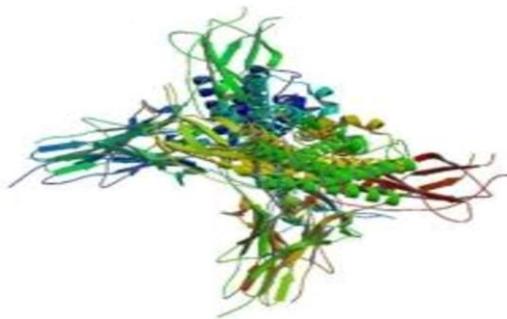
La RMN est une méthode de choix pour l'étude systématique, et au niveau atomique, de la dynamique interne moléculaire, pour des échelles de temps allant de la nanoseconde à la milliseconde suivant les expériences utilisées [93].

**Intérêt pour le contrôle des biosimilaires :** La détermination des structures secondaires et tertiaires.

#### 2-2-5) La diffraction des rayons X :

Deux méthodes sont actuellement utilisées pour déterminer les structures tridimensionnelles des macromolécules biologiques à l'échelle atomique : la diffraction des rayons X et la résonance magnétique nucléaire (RMN). Près de 85 % des structures connues à ce jour ont été déterminées par diffraction des rayons X. Contrairement à la RMN, la cristallographie ne souffre pas de limitations en taille de la macromolécule étudiée et ne présente qu'une seule barrière : être capable d'obtenir des cristaux de la macromolécule étudiée.

La diffraction des rayons X par des monocristaux est la méthode par excellence pour l'étude des macromolécules biologiques à l'échelle atomique. La cristallographie a permis la détermination des structures tridimensionnelles de plusieurs dizaines de milliers de macromolécules biologiques dans des gammes de taille et de complexité très variées : petites protéines, oligonucléotides, acides ribonucléiques de transfert, immunoglobulines, complexes multienzymatiques, complexes nucléoprotéiques, virus d'insectes, de plantes ou de mammifères. Les propriétés physico-chimiques intrinsèques des macromolécules biologiques donnent naissance à des cristaux avec de grands paramètres de maille cristalline et un pouvoir de diffraction en général limité en comparaison du standard actuel des petites molécules organiques. Cela impose des méthodes et des techniques adaptées tout au long du processus cristallographique [94].



**Figure 3.11 :** Représentation tridimensionnelle du filgrastim. Les coordonnées des atomes ont été obtenues par diffractométrie de rayons X sur un cristal de la protéine. [94].

▪ **Intérêt de la technique pour le contrôle des biosimilaires :** La détermination des structures secondaires et tertiaires.

## **2-3) Les méthodes de contrôle des modifications post-traductionnels, glycosylation :**

### **2-3-1) Séquençage par spectrométrie de masse :**

La fragmentation par spectrométrie de masse MS/MS sert à séquencer des courtes séquences d'acides aminés (10 à 20). Couplée avec les techniques de digestion des protéines qui vont être décrites, il est ainsi envisageable de connaître la séquence d'une protéine. Cependant, cette approche nécessite d'utiliser différents protocoles de digestion différents pour espérer obtenir la totalité de la séquence de la protéine.[95]

### **2-3-2) Analyse par HPAEC-PAD**

La chromatographie liquide à haute performance échangeuse d'anions couplée à un système de détection ampérométrique pulsé, est une technique qualitative et quantitative très performante pour l'analyse directe des mono-, di-, oligo- et polysaccharides (technique qui ne nécessite pas de traitement particulier des échantillons en dehors d'une dilution et d'une filtration sans étape de dérivation).

Cette technique donne des bons résultats avec une grande sensibilité (de l'ordre de 300 fmol), ceci dans un intervalle de temps très court par rapport aux autres techniques [96]. Des techniques basées sur la spectrométrie de masse telles que la MALDI-TOF/MS, LC-MS sont aussi utilisées pour l'analyse qualitative.

Pour l'analyse quantitative c'est-à-dire la détermination structurale des sucres, des techniques basées sur la MS/MS sont parmi les techniques les plus utilisées.

L'HPAEC-PAD est intéressante car elle permet une analyse qualitative et quantitative rapide dans des domaines de concentrations assez divers dans le cas des sucres l'utilisation de cette technique prend son avantage de leurs propriétés acides faibles, car ces composés sont des acides faibles dont le pka est compris entre 12 et 13. En milieu basique une légère ionisation se produit et la séparation est possible sur une colonne constituée par une résine échangeuse d'ions de type anionique(figures 3.12). [97]

**Intérêt de la technique pour le développement des biosimilaires :** Détermination des modifications post-traductionnels, et la détermination du degré de glycosylation.

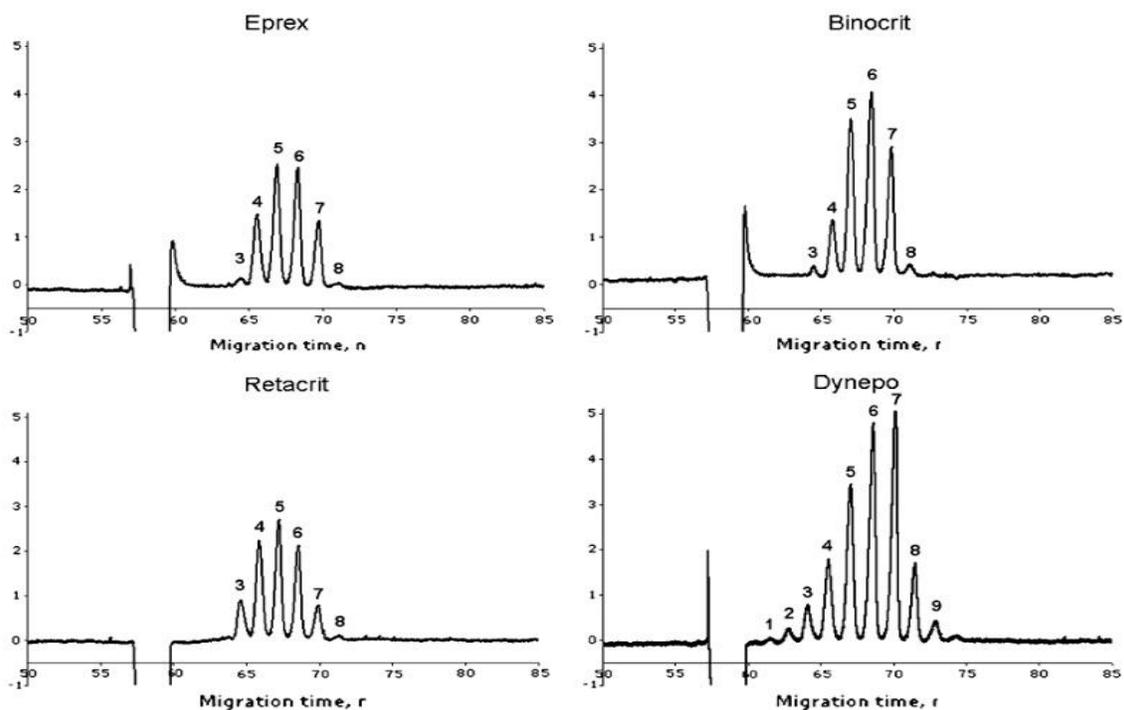
## **2-4) –Les contrôles de l'hydrophobicité, charge, isoformes**

### **2-4-1) Électrophorèse de zone (EZ) :**

C'est la méthode la plus simple. L'échantillon à séparer est placé dans un tampon unique assurant un pH constant et prend donc une charge par rapport à ce tampon. S'il est plus acide que celui-ci, il est chargé négativement, attiré par l'anode et repoussé par la cathode. Si son point isoélectrique pI (pH de la solution dans laquelle il se trouve neutre) est supérieur au pH du

tampon, il est chargé positivement et migre vers la cathode comme un cation. Si l'échantillon est neutre, donc placé à son pI, il n'est pas soumis au champ électrique mais il a la totale liberté de diffuser dans toutes les directions autour de son point d'application. C'est là la principale faiblesse de l'électrophorèse de zone : aucune force électromotrice ne lutte contre la diffusion des échantillons lors de leur migration. Ainsi donc, pour une meilleure résolution des séparations selon ce principe, il faut veiller à les réaliser rapidement ou à se servir d'un autre critère de séparation tel que le tamisage moléculaire au cours d'une électromigration dans un gel de porosité sélective, d'où le très grand succès pratique de la technique dite de SDS-PAGE.[98-99]

**Intérêt :** l'électrophorèse de zone fournit des informations sur le profil en isoformes des protéines thérapeutiques.



**Figure 3.12:** Une séparation par électrophorèse capillaire de zone des différents isoformes D'un produit princeps contenant l'EPO et ses différents biosimilaires. [98-99]

#### 2-4-2) RP-HPLC :

L'HPLC est l'une des méthodes analytiques les plus utilisées. Le principe de base de la séparation est le passage d'un liquide (phase mobile) au travers d'une colonne (support solide = phase stationnaire). L'HPLC existe sous quatre types différents : HPLC en phase inverse, HPLC d'adsorption, HPLC échangeuse d'ions et HPLC d'exclusion. La polarité de la colonne ainsi que le type de solvant ont un impact sur la séparation des molécules dû à l'environnement chimique de l'ensemble.

## - La Spécificité du RP-HPLC :

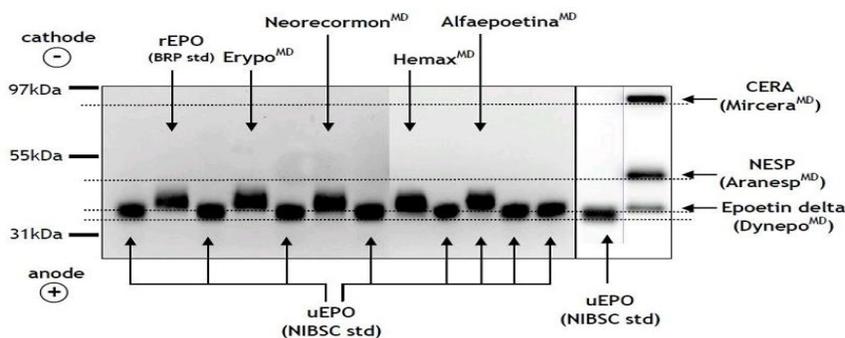
Contrairement à la chromatographie à phase normale, en chromatographie à phase inverse la phase stationnaire est non polaire et la phase mobile modérément polaire. Les molécules qui sont plutôt non polaires en nature ont une rétention allongée et des molécules polaires s'éluent plus rapidement. Pour la phase stationnaire on utilise plutôt la silice sur laquelle on a greffé des fonctions chimiques, le plus souvent de chaînes alkyles à 18 atomes de carbones ou ODS (Octadecyl). Mais également les phases C8 (Octyl) et C4 (butyliques) sont employées souvent quand la phase C18 est trop hydrophobe. Selon le taux de greffage, on obtient une plus ou moins grande résolution. [100]

**Intérêt :** Cette technique permet le contrôle, de l'hydrophobicité, la détermination du profil en isoformes, ainsi que la charge globale.

## 2-5)- Les méthodes de détermination du poids moléculaire, et des agrégats :

### 2-5-1) SDS-page :

La plus utilisée de ces techniques est celle qui consiste à effectuer successivement et en directions orthogonales une IEF et un SDS-PAGE afin de séparer un échantillon complexe suivant la charge ou le pI de chacun de ses constituants, puis suivant leur taille ou masse moléculaire relative Mr. Introduite dans le début des années 70, cette technique ne prit vraiment son essor qu'après la superbe démonstration de O'Farrell en 1975 de la séparation d'un extrait bactérien en plus d'un millier de molécules sur un seul gel d'environ 20 × 20 cm.

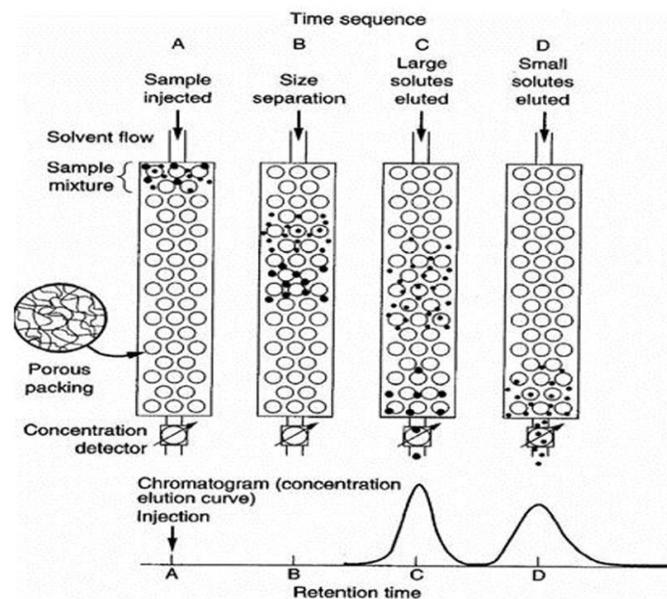


**Figure 3.13 :** Image d'une analyse par SDS-PAGE d'EPO urinaire endogène (uEPO), de préparations de rEPO disponibles dans le commerce, ainsi que des NESP et de la CERA. [100]

Cette technique 2D conduit à des images de taches souvent très complexes. Une aide précieuse pour leur évaluation est donnée par des systèmes automatiques d'analyse d'image. Des banques de données se développent pour associer, à chaque tache étudiée, les valeurs de pI et Mr, éventuellement la séquence peptidique, la fonction et les informations bibliographiques connues [98-101].

▪ **Intérêt de la technique :** Cette technique donne des informations sur le profil en isoformes, permet la détermination du poids moléculaire, et fournit des informations sur la présence des agrégats.

**2-5-2) SEC-HPLC :** La chromatographie d'exclusion stérique (SEC), encore connue sous le nom de chromatographie à perméation de gel (GPC), est de loin la technique de séparation la plus utilisée pour analyser les protéines. Décrite en 1959 par Porath et Flodin pour des biomacromolécules, puis en 1963 par Moore pour des polymères synthétiques, la SEC a connu un développement constant depuis sa découverte pour devenir à l'heure actuelle une méthode de caractérisation de poids moléculaire hautement sophistiquée, tant dans l'instrumentation et la manière d'analyser que dans le traitement des résultats. Il est cependant reconnu qu'avec la complexité croissante des formulations, l'analyse par SEC ne peut fournir qu'une information partielle sur l'hétérogénéité moléculaire dont dépendent de nombreuses propriétés physiques, et physicochimiques de la macromolécule biologique. La caractérisation des protéines par HPLC, technique apparentée à la SEC mais différente en mécanisme de rétention, permet de séparer les macromolécules selon leur composition chimique. La HPLC est peu sensible aux variations du poids moléculaire par contre, elle fournit des renseignements uniques sur l'hétérogénéité chimique ce qui en fait un complément idéal à la SEC dans la caractérisation des protéines complexes tels que les mélanges.[98-102]



**Figure 3.14 :** Schéma du principe du SEC-HPLC [102]

**Intérêt:** cette technique permet la détermination du poids moléculaire des protéines thérapeutiques.

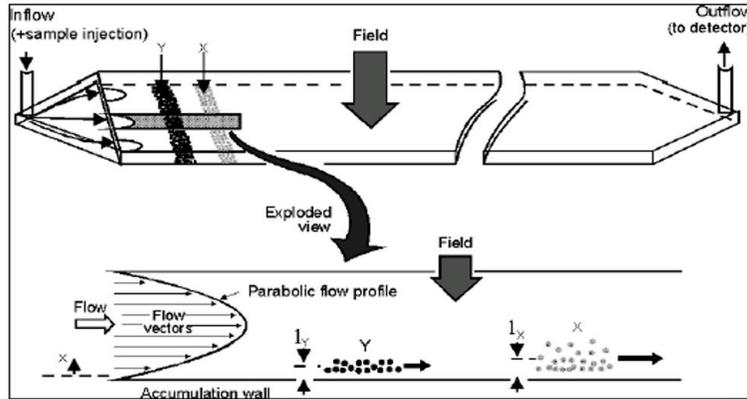
### 2-5-3) L'ultracentrifugation

Développée par T. Svedberg, cette technique a trouvé de larges applications dans le domaine de la chimie-physique des macromolécules, qu'elles soient biologiques ou de synthèse. En effet, dans un champ centrifuge suffisamment intense pour rendre les phénomènes de diffusion négligeables, les macromolécules, généralement plus denses que le solvant dans lequel elles sont dispersées, tendent à s'éloigner de l'axe de rotation pour aller se déposer insensiblement sur le fond du tube qui renferme la solution, on donne à ce déplacement de toute molécule dans le sens de la direction de la force centrifuge le nom de sédimentation même si aucun dépôt n'est visible au fond du tube. Par contre, lorsque les particules dispersées dans le milieu au cours de l'ultracentrifugation remontent vers la surface, on dit que l'on a flottation. Qu'il y ait sédimentation ou flottation, on peut exploiter le phénomène d'enrichissement des zones inférieure ou supérieure du tube pour séparer différents constituants, on dit alors que l'on a réalisé une ultracentrifugation préparative. Par contre, si on se limite à observer le déplacement des molécules, il devient possible d'obtenir des informations sur leur constante de sédimentation, leur forme et leur masse ; on dit alors que l'on a réalisé une ultracentrifugation analytique [103].

▪ **Intérêt de la technique :** Cette technique fournit des informations sur la masse moléculaire, la forme des protéines.

### 2-5-4) AF4 (Asymmetric FlowField Flow Fractionation):

Technique qui permet de séparer des molécules ou particules de grandes tailles (de 1nm à 50µm). Contrairement au cas d'une HPLC, où l'échantillon élué passe dans une colonne remplie d'une phase stationnaire compacte, il est injecté dans une cellule de volume déterminé et dont la base est composée d'un fritté sur lequel est déposé une membrane d'ultrafiltration. Le seuil de coupure de cette membrane, à travers laquelle l'éluant est soutiré, est généralement de 5 ou 10kDa, et il détermine la limite inférieure de taille des échantillons détectés. Par rapport à la HPLC-ES, ce système présente les avantages de l'absence de limite supérieure de taille de molécule, d'une adsorption minimale des molécules due à la surface de contact limitée, et d'un cisaillement négligeable des molécules du fait de l'absence de phase stationnaire. Les constituants de l'échantillon sont séparés par l'application d'un champ de force perpendiculaire à la direction d'éluion, dit flux croisé d'éluant (**Figure 32**).



**Figure 3.15 :** Représentation Schématique de la répartition des fractions de l'échantillon dans la cellule lors d'analyse par AF4. [103].

**Intérêt :** Elle permet de séparer les constituants d'un échantillon par taille. Le couplage de cette technique avec une détection multiangulaire laser (MALLS) permet de déterminer de manière absolue les masses moléculaires des molécules. Nous pouvons alors être en mesure de déterminer un degré de compaction des molécules étudiées [104].

**Tableau 3.7 :** Un exemple de contrôle qualité de la production des anticorps monoclonaux [104].

Caractéristiques	Propriétés de l'analyse	Méthodes d'analyse
<i>Caractéristiques physiques et chimiques</i>	Pureté	Electrophorèse ou CE
		HPLC phase inverse
		HPLC exclusion de taille
	Intégrité/poids moléculaire	Electrophorèse ou CE
		Spectrométrie de masse
		HPLC exclusion de taille
	Identification	Diffusion de lumière
cIEF		
<i>Activités</i>	Liaison antigène	Immunoassay
	Méthodes biologiques	Prolifération des cellules Cytotoxicité
<i>Produits liés aux impuretés</i>	Aggrégations / fragments	Electrophorèse ou CE HPLC exclusion de taille
<i>Produits liés aux impuretés et aux contaminations</i>	Cellule hôte protéine	Immunoassay
	Cellule hôte DNA	Hybridation DNA
		Fluorescence
	Protéine A	Immunoassay
	Cellule de culture	Immunoassay
Virus		Microscopie électronique Analyses in vivo / in vitro

**Tableau 3.8:** Les différentes techniques utilisées pour le contrôle des biosimilaires [104].

<b>Critères</b>	<b>Méthodes</b>
<b>Compositions, structure primaire</b>	Carte peptidique (LC-MS) Séquençage peptidique par Spectrométrie de masse (ESI-MS, MALDI-TOF)
<b>Structures secondaires et tertiaires</b>	Dichroïsme circulaire UV proche et lointain, RMN, Résonance plasmonique, Stabilité thermique
<b>Modifications post-translationnelles, glycosylation</b>	Spectrométrie de masse HPAEC-PAD
<b>Hydrophobicité, charge, isoformes</b>	RP-HPLC CZE
<b>Poids moléculaire, agrégats</b>	SDS-PAGE, SEC-HPLC, AF4, AUC
<b>Liaison au récepteur</b>	Résonance plasmonique, ELISA, bioassay in vitro
<b>Activité biologique</b>	Bioassay in vitro et in vivo

LC-MS : Chromatographie liquide-spectrométrie de masse

ESI-MS : ionisation par électro-pulvérisation-spectrométrie de masse

MALDI-TOF : ionisation par désorption de la matrice assistée par laser- temps de vol

RMN : Résonance magnétique nucléaire

HPAEC-PAD : Echange d'anion par chromatographie haute performance, détection par ampérométrie pulsée

RP-HPLC : chromatographie liquide par réversion de phase à haute performance

CZE : Electrophorèse de zone capillaire

SDS-PAGE : Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de sulfate de Duodécyl sodium

SEC-HPLC : chromatographie liquide d'exclusion à haute performance

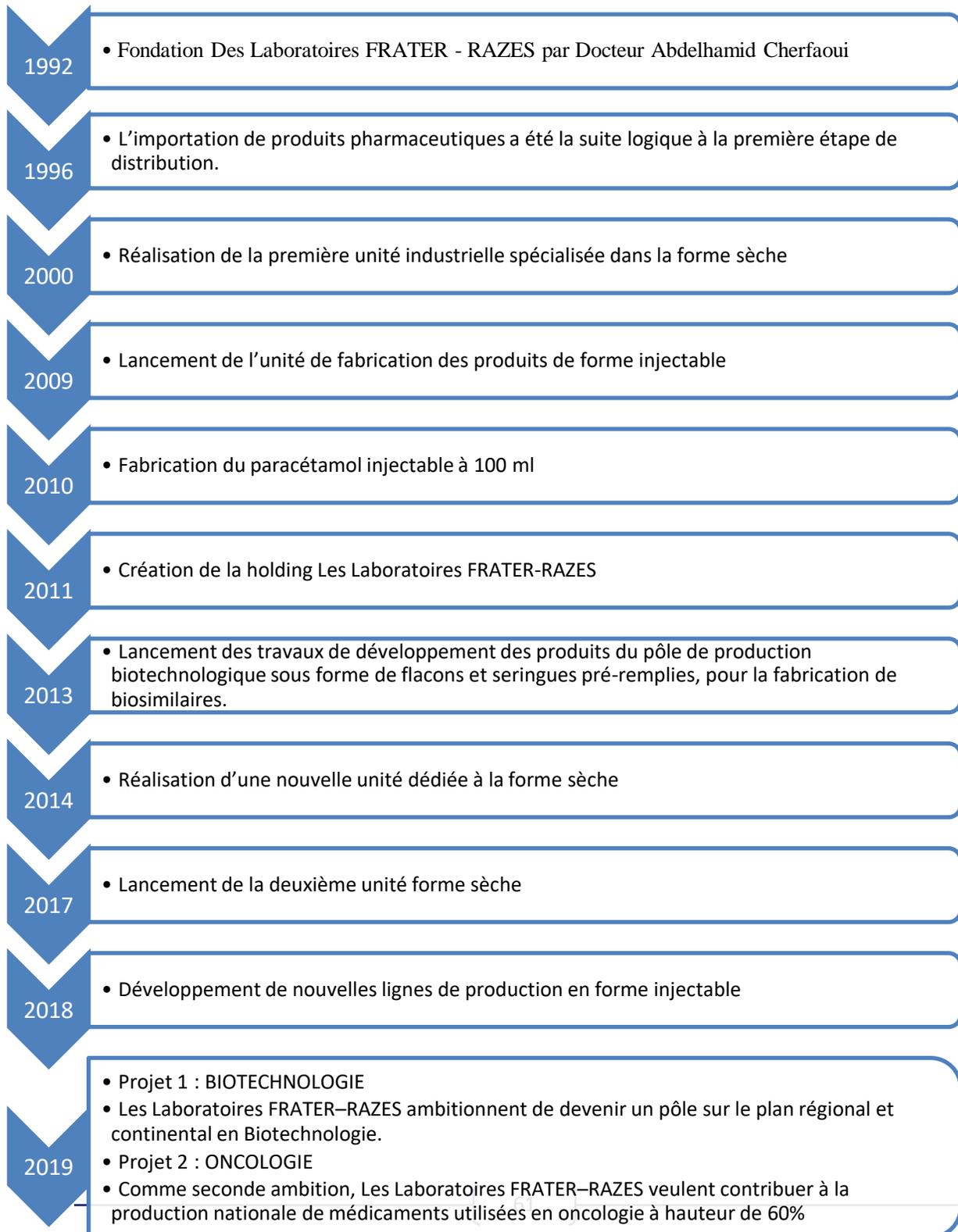
AF4 : **Assymetrical Flow Field –Flow Fractionation**

AUC : Ultra centrifugation analytique

## ❖ La Partie Pratiques

### 1- Une Présentation du terrain de stage :

#### 1.1- Historique de laboratoires FRATER – RAZES :



## 1.2- Présentation du groupe :

Le groupe des Laboratoires FRATER –RAZES est l'un des leaders dans l'industrie pharmaceutique en Algérie, et ce, grâce à son autonomie et à la qualité de ses solutions.

Il contient 4 poles:

- **Pole forme sèche**
  - Unité Hippocrate :Forme sèche
  - Unité Ibn Al Baitar :des Tinibs
- **Pole forme injectable**
  - Unité Al Razi :Flacons Injectable
  - Unité Avicenne :Flacons Injectables
  - Unités Ibn Hunayn :Ampoules Injectables
  - Unité Al Farabi : Ampules Injectables
- **Pole biotechnologie**
  - Unité Fleming :Biosimilaire en Seringue
- **Pole marie curie**
  - Unité Pasteur :Extraits allergénique



Figure 4.1 : les laboratoires FRATER-RAZES

Dans le cadre des activités accompagnées de laboratoires FRATER –RAZES :

- Assurent la formation continue des futures élites dans le secteur de l'industrie pharmaceutique
- Accompagnent et forment les étudiants en pharmacie, génie de procédés, biologie... au cours de leur cursus universitaire
- Partenaire des universités algériennes dans le cadre de développement (CRD)
- Pionnier national dans la production des biosimilaires injectables mettent leur savoir-faire dans le processus de fabrication à la portée des étudiants
- Pourvoient régulièrement des postes pour les jeunes fraîchement diplômés des universités algérienne en assurant un plan de carrière

Les laboratoires FRATER –RAZES à la pointe de la technologie et du respect des normes :

- Outils industriels de dernière génération (origine Nord Européenne) ; Standards Européens, normes GMP (good Manufacturine Practice).
- Les normes ICH.Pharmmacopées européennes, anglaise et américaines.
- Controle de la production tout au long de la chaine.
- Plus de 800 procédures de contrôle interne.
- Audit annuel du laboratoire de contrôle par le LNCPP
- Fournisseurs de matière première aux normes GMP-UE(vérification systématique des certifications GMP des fournisseurs)
- Contrôle régulier Qualitatif et quantitatif de la matière première des fournisseurs. [105]

## 2- Problématique

Les biomédicaments sont des médicaments fabriqués à partir d'organismes vivants, par exemple des bactéries ou des cellules. Ce sont des vaccins, des produits dérivés du sang, des extraits allergéniques, des thérapies géniques et des hormones. Lorsque le brevet d'un médicament « référence » tombe dans le domaine public, d'autres industriels peuvent le produire, ces médicaments sont appelés biosimilaires. **Ce dernier est mis au point pour être similaire au médicament de référence en tout point en terme de qualité, de sécurité et d'efficacité.** L'utilisation des biosimilaires facilite l'accès aux soins suite à l'augmentation du nombre de patients mis sous biothérapie. Sur le plan économique les biosimilaires permettent la réduction des coûts des traitements et la baisse des prix des médicaments biologiques. La fabrication nationale limite les tensions d'approvisionnement et prévient les ruptures de stocks. En revanche La mise sur le marché d'une spécialité innovante est ainsi un exercice long, difficile et coûteux. Un grand nombre de « nouvelles substances actives » sont découvertes, mais au terme des différentes phases des essais demandés pour la constitution de ce dossier, peu d'entre elles seront retenues. Comme pour les médicaments chimiques, parmi les essais, les plus délicats sont les études précliniques et cliniques qui doivent démontrer l'innocuité des biomédicaments et leur efficacité [106]. Selon le ministère de l'industrie pharmaceutique la contribution de l'Algérie dans l'activité de recherche clinique à l'échelle mondiale et continentale reste très limitée, on dénombre seulement 55 essais cliniques (1/1 million d'habitants) malgré tout le potentiel et les atouts disponibles pour en faire un pays attractif aux essais cliniques. Cette difficulté nécessite l'introduction des méthodes d'analyse physicochimiques plus sophistiquées qui ont la capacité de remplacer les études cliniques de la phase III afin d'assurer l'efficacité des biosimilaires.

Au niveau de laboratoire de FRATER-RAZES il nous a été proposé de travailler sur la molécule de L'ENOXAPARINE étant donné que son poids moléculaire d'environ 4500daltons **elle est considéré comme un biosimilaire sur le plan analytique mais pas sur le plan réglementaire en raison de la stabilité de sa matière première d'origine animale ( muqueuse intestinale du porc extraite et**

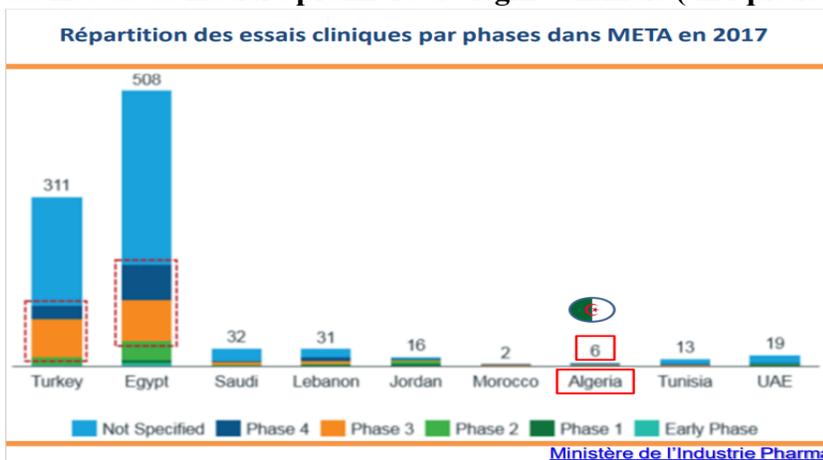


Figure 4.2 : Répartition des essais cliniques par phases dans META en 2017

**purifiée)** contrairement au biomédicament reconnu par sa variabilité qui peut se retrouver pour un même produit ,entre différents lots.

Au cours de ce travail, nous détaillerons l'ensemble des tests à effectuer pour statuer sur la qualité et la conformité de ce biosimilaire.

### 3- Présentation de L'ENOXAPARINE

Le médicament étudié est un produit à base de L'ENOXAPARINE dérivé de l'héparine. C'est un anticoagulant issu du mucus d'intestin de cochon, molécule naturelle et est actuellement un des antithrombotiques les plus utilisés. Cette molécule est une héparine de bas poids moléculaire avec très peu d'effet secondaires mais qui est tout de même très puissante. L'ENOXAPARINE est également utilisé contre la phlébite pour les personnes atteintes de la COVID-19.



**Figure 4.3 :** « VARENOX (ENOXAPARINE SODIQUE) dosage 6000UI/0.6ml

#### 3.1. Aspect et présentation du L'ENOXAPARINE SODIQUE (VARENOX) :

**DCI :** Enoxaparine sodique

**Excipients :** Eau ppi

**Forme :** Solution claire injectable en seringue pré remplie par voie sous-cutanée ou voie intraveineuse (initiation de traitement de l'infarctus du myocarde)

**Conditionnement :** 02 seringues pré remplies

**Dosage:** 2000 UI anti-Xa/0,2 ml ,4000 UI anti-Xa/0,4 ml, 6000 UI anti-Xa/0,6 ml, 8000 UI anti-Xa /0.8

**Classification pharmaco-thérapeutique VIDAL :**

Cardiologie - Angéologie - Insuffisance coronarienne : Insuffisance coronarienne aiguë (Héparine). Hémostase - Hématopoïèse - Hémoglobinopathies - Anti thrombotiques : Héparines et groupe de l'héparine (voie injectable) (Héparines de bas poids moléculaire)



**Figure 4. 4:** Les différentes formes de dosage De Varenox



**Figure 4.5 :** seringue pré-remplie de VARENOX

## 3.2- Les données pharmacologiques :

### 1- Mécanisme d'action :

L'ENOXAPARINE est une héparine de bas poids moléculaire dans laquelle les activités antithrombotiques et anticoagulantes de l'héparine standard ont été dissociées.

Elle est caractérisée par une activité anti-Xa plus élevée que l'activité anti-IIa ou antithrombinique. Pour l'ENOXAPARINE, le rapport entre ces deux activités est de 3,6.

Aux doses prophylactiques, l'ENOXAPARINE n'entraîne pas de modification notable du TCA.

Aux doses curatives, au pic maximum d'activité, le TCA peut être allongé de 1,5 à 2,2 fois le temps du témoin. Cet allongement est le reflet de l'activité antithrombinique résiduelle. [107]

### 2- Indications thérapeutiques :

Ce médicament est un anticoagulant de la famille des héparines de bas poids moléculaire. Il empêche la formation ou l'extension des caillots dans les vaisseaux sanguins.

Il est utilisé chez l'adulte :

- à faible dose, dans le traitement préventif des accidents thromboemboliques, notamment chez les opérés récents ou chez les malades alités ou immobilisés pour une maladie aiguë ;
- à forte dose, dans le traitement des thromboses veineuses (phlébite, embolie pulmonaire...) et, en association avec l'aspirine, dans le traitement initial du syndrome coronarien aigu et de l'infarctus du myocarde. [107]

### 3- Contre-indications :

Ce médicament ne doit pas être utilisé dans les cas suivants :

- baisse des plaquettes sanguines lors d'une précédente utilisation de ce médicament ou d'un autre médicament de la famille des héparines,
- hémorragie ou risque de saignement d'un organe (ulcère de l'estomac ou du duodénum, chirurgie récente de l'œil ou du cerveau...). [107]

### 4- Effets indésirables :

- Très fréquents (plus de 10 % des cas) : hémorragies de gravité variable, élévation transitoire des transaminases.
- Fréquents (1 à 10 % des cas) : hématomes (bleus) au point d'injection, maux de tête, urticaire, démangeaisons, rougeur cutanée.

-Peu fréquents : éruption bulleuse, douleur durable au point d'injection pouvant traduire une lésion de la peau.

-Rares : hyperkaliémie, baisse des plaquettes sanguines justifiant des analyses de sang avant et pendant le traitement, réaction allergique sévère. [107]

**5- Interactions médicamenteuses :** Ce médicament peut interagir avec les médicaments contenant de l'aspirine, des anti-inflammatoires non stéroïdiens : augmentation du risque d'hémorragie. [107]

## 4- CONTRÔLE QUALITE PHYSICO-CHIMIQUE DUL'ENOXAPARINE Sodique

Afin d'assurer le contrôle de la qualité physico-chimique de la matière première du principe actif et du produit fini (ENOXAPARINE SODIQUE), plusieurs essais sont exigés par la pharmacopée européenne 10 ème édition, à savoir : les essais liés à la nature et dosage du principe actif (caractères), les essais d'identification, le dosage de diverses impuretés et les essais pharmaco techniques (pH, métaux lourds, la teneur en sodium...etc).

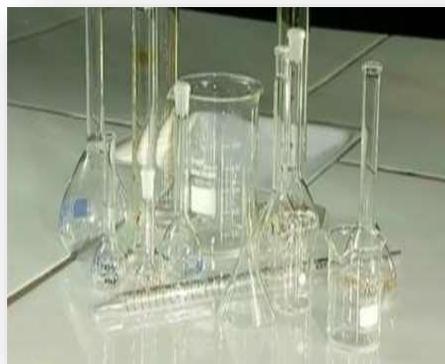
### 4.1- Matériels

#### 1.1. Equipements :

- Chromatographie phase gazeuse CPG
- Chromatographie liquide haute performance HPLC WATERS 2695
- Spectrophotomètre UV/Visible
- Spectroscopie Atomique(SAA)
- Spectroscopie Résonance magnétique nucléaire RMN
- Microplate Rider avec incubateur

#### 1.2. Petit matériels:

- Microbalance
- Réfrigérateur
- Micropipette
- Micropipettes multi-channel
- Éprouvettes
- Flacons
- Vial d'injection
- Spatules
- Erlenmeyers
- Seringues
- Vortex
- Microplaques



**Figure 4.6 :** Verreries de laboratoires

- Fioles( 10ml,20ml, 50ml,100ml,1L )
- Tubes de centrifugation 1.5ml
- Embouts
- Détecteur Réfractomère RI WATERS 2414
- Colonne TSKgelG2000SWXL
- Filtres membranes
- PH-mètre
- Pycnomètre
- Etuve
- Boîtes de peser
- Dessiccateur
- Bêchers
- Baguette de verre
- Creusetde silice



**Figure 4.7 : PH-mètre**

### 1.3. Réactifs et Standards:

- Standards chimiques de références pour Héparine bas poids moléculaire
- Solution de Tris-NaCl tampon (pH7.4)
- Solution de Tris-EDTA tampon (pH8.4)
- Solution d'Antithrombine III (0.5 , 1.0 ) UI ml
- Solution mère S-2238 0.003 mol /l
- Solution mère S-2765 0.003 mol/l
- Solution mère de FXa 71 nkat/ml
- Solution mère de humanthrombin 25 UI/ml
- Acide acétique 300 g/l
- Acétate d'ammonium
- Sodium azide
- Sulfate de Sodium
- Oxyde de deutérium
- Hydroxyde de sodium
- Hydroxyde de potassium
- Pyroantimoniate de potassium
- Acide chlorhydrique
- Carbonate de potassium
- Sulfate de deprotamine
- Solutions étalons(brun , rouge , jaune)
- Tampons standards :pH=3.5, pH=4.00 , pH=7.00 , pH =9.21
- Chlorure de cesium
- Chlorure de sodium
- Sulfate de sodium 20%
- Méthanol
- Ethanol



**Figure 4.8 : Tampons standards**

- Sulfate de magnésium
- Acide sulfurique
- Solution de phénolphtaléine
- Ammoniaque
- Solution de plomb
- Théoacétamide
- Eau purifiée

		
HPLC	Microplate Reader	CPG
		
Spectrophotometrie	Spectroscopie atomique	

**Figure 4.9 :** équipements du laboratoire utilisés dans le contrôle de VARENOX

## 4.2- Méthodes

### 1. Les références des méthodes réalisées :

**Tableau 4.1** : Les références des méthodes des tests à réaliser.

Test	Référence de la méthode
Aspect	Pharmacopée européenne 10 <sup>eme</sup> édition Méthode interne
Identification	Pharmacopée européenne 10 <sup>eme</sup> édition Pharmacopée américaine USP41 Méthode interne
Absorbance spécifique	Pharmacopée européenne 9 <sup>eme</sup> édition Pharmacopée américaine USP39 Méthode interne
Densité et volume extractible	Pharmacopée européenne 9 <sup>eme</sup> édition Méthode interne
Perte de la dessiccation	Pharmacopée européenne 9 <sup>eme</sup> édition
Ph	Pharmacopée européenne 10 <sup>eme</sup> édition
Métaux lourds	Pharmacopée européenne 8 <sup>eme</sup> édition Méthode interne
Teneur en Sodium	Pharmacopée européenne 10 <sup>eme</sup> édition Méthode interne
Solvants Résiduels	Méthode interne
Activité anti-FXa	Pharmacopée européenne 10 <sup>eme</sup> édition Méthode interne
Activité anti-FIIa	Pharmacopée européenne 10 <sup>eme</sup> édition Méthode interne

## 2. Le Contrôle physico-chimique de la matière première :

### 1. Caractères :

**Aspect :** la poudre de l'ENOXAPARINE SODIQUE doit être blanche ou sensiblement blanche, et hygroscopique.

**Solubilité :** la poudre de l'ENOXAPARINE SODIQUE doit être facilement soluble dans l'eau

**Aspect de la solution :** la solution de l'ENOXAPARINE SODIQUE doit être limpide et n'est pas plus fortement colorée que la solution de degré 6 de la gamme des solutions témoins présentant la coloration la plus appropriée.

### 2. Identification

#### a. Identification A : « Résonance magnétique nucléaire RMN »

- **Conditions opératoires :**

- Intensité du champ : 75MHZ

- Température : 40 °C

- Diamètre de la cellule: 5 mm

- **Résultat attendu :**

Le spectre RMN13C obtenu doit être semblable au spectre RMN 13C obtenu avec l'étalon de référence d'héparine de basse masse moléculaire appropriée.

#### b. Identification B :

La ration de l'activité anti-facteur Xa par rapport à l'activité anti-facteur Iia doit être compris entre 3.3 et 5.3.

#### c. Identification C :

Cette identification correspond à la détermination de la moyenne du poids moléculaire et la distribution de la masse moléculaire de l'ENOXAPARINE SODIQUE MP.

- **Procédure opérationnelle :**

**1. Phase mobile:**

7.7 g d'acétate d'ammonium a été dissous dans 1000 ml d'eau purifiée, filtré à travers un filtre de 0.22 µm.

**2. Préparation de la solution essai :**

Une quantité appropriée de l'échantillon a été dissous avec la phase mobile afin d'obtenir une solution d'une concentration de 10 mg/ml, filtrée à travers un filtre de 0.22 µm.

**3. préparation de la solution Working Standard :**

Une quantité appropriée du working standard a été dissous dans la phase mobile pour obtenir une solution d'une concentration de 10 mg/ml , filtrée au travers un filtre de 0.22 µm.

**4. Préparation de la solution standard de calibration SCR :**

Le contenu d'une ampoule d'Héparine de bas poids moléculaire SCR standard de calibration a été dissous avec la phase mobile afin d'obtenir une solution de 10 mg/ml. Cette dernière doit être aliquotée dans des tubes avec un volume de stockage de 100 UI et conservée jusqu'à 03 mois à -20°C.

- **Conditions chromatographiques:**

**Tableau 4.2:** les conditions chromatographiques de la détermination de la moyenne du poids moléculaire et la distribution de la masse moléculaire de l'ENOXAPARINE SODIQUE.

Condition	Nom/ parameter
HPLC	WATERS 2695
Détecteur	UV et RI
Longueur d'onde de détection UV	234 nm
Réfractomètre index de réfraction	Inner température :37°C,sensitivité :4
Colonne	TSK gel G2000SWXL ,7.8 mm x 5µm.
Débit	0.5ml/min
Volume	25µl.
Temps	30 min
Logiciel GPC	EMPOWER

### Système de Suitabilité :

- Le coefficient de corrélation linéaire de la courbe de calibration a été vérifié, cette dernière peut être utilisé pour analyser les chromatographe de l'essai uniquement lorsque le coefficient de corrélation  $R \geq 0.99$ .
- Le RSD du pourcentage de la masse des chaines inférieures à 2000 des 6 injections du WS doit être  $\leq 5\%$ .
- Le RSD du pourcentage de la masse des chaines supérieur à 8000 des 6 injections du WS doit être  $\leq 5\%$ .
- Le RSD du pourcentage de la masse des chaines entre 2000 et 8000 des 6 injections du WS doit être  $\leq 5\%$ .
- Le nombre des plateaux théoriques du dernier pic chromatogramme UV des deux injections de la solution de calibration standard Héparine de bas poids moléculaire doit être  $\geq 6000$  (équivalent à 20000 mètre).
- Le rapport entre la valeur r des deux injections de la solution de calibration standard Héparine de bas poids moléculaire(début et fin) doit être  $\leq 5\%$  , C.à.d  $r(\text{min})/r(\text{max}) \geq 0.95$ .  
 $r \text{ min ou max} = \text{surface IR} / \text{surface UV}$ .
- A partir des résultats du tableau obtenus pour le standard de calibration Héparine bas poids moléculaire la déviation entre M(n) et M(na) a été calculé selon la formule suivante :

$$\frac{M(n) - M(na)}{M(na)} \times 100\%$$

M(n) =moyenne nombre poids moléculaire trouvé.

M(na) =moyenne nombre poids moléculaire du SCR.

- **Résultats de l'analyse et critères d'acceptation :**

- La moyenne de la masse moléculaire Mw de l'essai doit comprise entre **3800 et 5000**.
- Le pourcentage de la masse des chaines inférieures à 2000 X1 doit être comprise entre **12.0 et 20.0%**.
- Le pourcentage de la masse des chaines supérieures à 8000 X2 doit être **inférieur ou égale à 18.0 %**
- Le pourcentage de la masse des chaines entre 2000 et 8000 a été calculé par la formule suivante :  $100\% - X1 - X2$  , doit être comprise entre **68.0-82.0%** .

### d. Identification D: « test de Sodium »

- Dans un tube à essai 2ml de la solution injectable a été transférée et ajoutée 2ml d'une solution de carbonate de potassium à 150g /l puis chauffée à l'ébullition. **Aucun précipité ne doit être formé.**
- 4ml de la solution de pyroantimoniote de potassium a été ajoutée à la solution précédente puis chauffée à l'ébullition et laissée refroidir dans l'eau glacée, la paroi du tube a été frottée avec une baguette de verres c'était nécessaire. **(un précipité blanc doit être formé.)**

## 2. Essai

- **PH:**

le pH a été mesuré à l'aide d'un pH mètre, doit être compris entre **6.2 et 7.7**.

- **Absorbance spécifique:**

50.0mg d'ENOXAPARINE SODIQUE a été dissous dans 100 ml d'HCL 0.01M puis bien mélangée .En utilisant un spectrophotomètre a déterminé l'absorbance spécifique .

L'absorbance spécifique a été calculée avec cette formule :

$$E = A / C L (1-G)$$

Avec :

A : l'absorbance maximale de l'échantillon à 231 ±nm

C : concentration de l'échantillon g/100ml

L : épaisseur de la cuve en cm

G : la perte de dessiccation de l'échantillon en %

L'absorbance spécifique doit être comprise entre **14.0 et 20.0**.

- **Perte de la dessiccation :**

La perte à la dessiccation est déterminée conformément à la technique décrite par la pharmacopée européenne 9<sup>eme</sup> édition selon les étapes suivantes :

- Une boîte de pesée est mis à l'intérieur de l'étuve sous vide .
- La boîte a été séchée à une température de 60°C ±2°C et sous une pression de 670 Pa pour environ 03 heures.
- La boîte a été Transférée dans un dessiccateur.
- 1.000g de l'échantillon est pesée puis transférée dans une boîte de pesée, cette valeur de pesée a été nommée comme P1.
- La boîte de pesée contenant l'échantillon est mis dans l'étuve sous vide, à une température de 60°C ±2 °C et sous pression de 670 Pa pour environ 3 heures.
- La boîte de pesée contenant l'échantillon a été transféré dans le dessiccateur.
- La valeur de la pesée est pesée et nommée comme P2.

- ❖ **Calcul :**

- **Le pourcentage de la perte à la dessiccation (%) =  $\frac{(p0+p1)-p2}{p1} \times 100$**
- **Normes :** Le pourcentage de la perte à la dessiccation doit être ≤10.0 %.

- **Métaux lourds :**

Ce teste nécessite les préparations quatre solutions différents : solution à examiner, solution témoin, solution de contrôle, solution à blanc.

- **Conformité du système :**

Comparée à la solution à blanc, la solution témoin présentait une légère coloration brun , la coloration de la solution de contrôle est au moins aussi intense que celle de la solution témoin.

- **Résultat :**

- La coloration brune éventuelle de la solution à examiner plus intense que celle de la solution témoin.
- Si le résultat de l'essai était difficile à évaluer, les solutions est filtrée sur une membrane filtrante appropriée (diamètre nominale des pores 0.45  $\mu\text{m}$  ). La filtration a été effectuée lentement et régulièrement par pression modérée et constante sur le piston. les taches obtenues ont été comparées sur les filtres avec les différentes solutions.

- **Solvants résiduels :** éthanol, méthanol :

Le taux des solvants résiduels sont déterminés en utilisant le CPG (chromatographie à phase gazeuse), préparations des solutions :sulfate de sodium 20% ,solution témoin méthanol à 3000 ppm et éthanol à 5000 ppm , solution à examiner à 10% (m/v) .

- **Conditions chromatographiques :**

- Colonne : colonne capillaire DB624,30 mx 250 umx 1.4  $\mu\text{m}$
- Détecteur : FID
- Gaz vecteur : Hélium ( $\geq 99.9\%$ )
- Débit du gaz vecteur : 1.0 ml/min
- Débit de l'hydrogène :40ml/min
- Débit du make-up :30ml/min
- Split ration :16.1
- Température de l'injection :150°C
- Température de la colonne :80°C
- Température du détecteur : 200°C

- **Conditions de l'injecteur head-space :**

- ✓ Volume de l'échantillon : 2ml
- ✓ Température de la Viale : 70°C
- ✓ Température de la chambre d'injection : 150 °C
- ✓ Transmission line température : 115°C
- ✓ Temps d'incubation (vial balance time): 30.0 min
- ✓ Vial pressurize time : 0.2 min
- ✓ Quantitative loop filling time : 0.5 min

- **Test de conformité du système :**
- Le nombre de plateaux théoriques des pics du méthanol ne doit pas être inférieur à 5000.
- Le nombre de plateaux théoriques des pics de l'éthanol ne doit pas être inférieur à 5000.
- La résolution entre le pic du méthanol et celui de l'éthanol ne doit pas être inférieur à 1.5.
- Le RSD des surfaces des pics de l'éthanol ne doit pas être supérieur à 10%.
- Le RSD des surfaces des pics de méthanol ne doit pas être supérieur à 10%.

### Calcul

Le contenu des résidus du méthanol ou de l'éthanol de l'échantillon a été calculé en se basant sur les données obtenues pour chaque injection en utilisant la formule suivante :

$$C_n \text{ (ppm)} = \frac{Sech \times Pstd}{(Sstd \times Pech)} \times 10^5$$

C<sub>n</sub> : le contenu des résidus (méthanol ou éthanol) provenant d'une seule injection de la solution à examiner en ppm.

Sech : la surface des pics de méthanol ou l'éthanol de la solution à examiner.

Pstd : la pesée du méthanol ou de l'éthanol (témoin) en gramme.

Sstd : la moyenne de la surface des pics de l'éthanol ou méthanol obtenues des six injections de la solution témoins.

Pech : la pesée de l'échantillon en gramme.

10<sup>5</sup> : Coefficient de calcul.

- **Normes :** Ethanol : au maximum 5000 ppm.

Méthanol : au maximum 3000 ppm.

- **Teneur en Sodium :**

Ce paramètre est déterminé par l'utilisation de SPECTROSCOPIE ATOMIQUE (SAA)

Ce teste nécessite la préparation des solutions standards, solution essai .

- **Les étapes :**

1. Introduction de la solution HCL 0.1N-Césium comme blanc dans le générateur atomique puis ajustement de l'instrument et lire à zéro.

2. Introduction des solutions standards de sodium 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, dans le générateur atomique puis enregistrement des lectures afin de tracer une courbe d'étalonnage ( $r \geq 0.990$ )

3. Introduction des solutions essais dans le générateur atomique puis enregistrement des lectures.

▪ **Conditions :**

Source : lampe à cathode creuse au sodium.

Longueur d'onde : 330.3 nm.

Vitesse de l'air : 10.0 L/min.

Débit d'acétylène : 1.8 L /min.

▪ **Calcul :**

$$\text{Teneur en sodium dans la matière première} = \frac{\text{Cessai} \times 10^{-4}}{\text{M} \times (1 - \text{G})} \times 100\%$$

C essai : la concentration de sodium dans la solution essai (MP) en ppm.

M : Pesée de l'essai (MP) en g.

G : perte à la dessiccation de l'échantillon %.

$10^{-4}$ : Coefficient de calculs.

Normes : la teneur en sodium doit être comprise entre **11.3 % et 13.5 %**.

### 3. Dosage Enzymatique:

❖ **Activité anti facteur Xa :**

1. Préparation du BRP (biological reference pharmacopia) pour le test d'activité biologique de l'héparine bas poids moléculaire

- Solutions tampons : Tris-NaCl pH 7.4, Tris-EDTA pH 8.4 .
- Solution de la substance de référence relative pharmacopée européenne pour le teste d'activité biologique de l'Héparine bas poids moléculaire :

Elle a présenté une activité pas moins de 90.0 % et pas supérieur de 110 % d'anti-FXa UI /ml.

- **Solutions standards** à 0.5 UI/ ml.
- **Solution d'essai** à 0.5 UI/ ml.

2. Solutions utilisées pour le teste d'activité biologique de l'héparine de bas poids moléculaire :

- **Solution S-2765** à : 0.003 mol / l , 0.0005 mol/l .
- **Solution FXa.**
- **Solution Antithrombine III** à : 1UI/ml.

❖ **Procédure opérationnelle de l'activité Anti-FXa :**

1. Préparation de la solution de travail FXa
2. Préparation de la courbe solution standard
3. Préparation de la courbe solution d'essai
4. Détection par absorbance et lecteur de microplaque.

- **Le calcul :** l'activité de la substance à examiner a été calculé en Unités Internationales d'activité anti-facteur Xa par millilitre en utilisant les conditions habituelles d'analyse statistique pour le titrage fondé sur le modèle en ligne parallèles (PLA).

Les valeurs obtenues sur le système microplate Reader sont saisies sur le système PLA à fin de déterminer les calculs de l'activité.

- **Critère d'acceptation des résultats du système suitability:**

1. Signification de non parallélisme = passed
2. Signification de régression = passed
3. Signification non linéaire = passed
4. Confidence level (%) :99.5 %

- **Critère d'acceptation ANTI FXa :**

90.0 à 125.0UI/mg.

❖ **Activité anti facteur IIa :**

1. Préparation du BRP (biological reference pharmacopia) pour le test d'activité biologique de l'héparine bas poids moléculaire

- **Solutions tampons :** Tris-NaCl pH 7.4, Tris-EDTA pH 8.4.
- **Solution de la substance de référence relative pharmacopée européenne pour le teste d'activité biologique de l'Héparine bas poids moléculaire :**

Elle a présenté une activité pas moins de 20.0 % et pas supérieur de 35 % d'anti-FIIa UI /ml.

- **Solutions standards** à : 3.3 UI/ ml, 0.2 UI/ml.
- **Solution d'essai** à : 0.2 UI/ ml.

## 2. Solutions utilisées pour le teste d'activité biologique de l'héparine de bas poids moléculaire :

- **Solution S-2238** à : 0.003 mol / l, 0.0005 mol/l.
- **Solution FIIa** : 25 UI/ml, 5 UI/ml.
- **Solution Antithrombine III** à : 0.5 UI/ml.

### ❖ Procédure opérationnelle de l'activité Anti-FIIa :

1. Préparation de la courbe solution standard

2. Préparation de la courbe solution d'essai

3. Détection par absorbance et lecteur de microplaque.

- **Le calcul** : l'activité de la substance à examiner a été calculée en Unités Internationales d'activité anti-facteur IIa par millilitre en utilisant les conditions habituelles d'analyse statistique pour le titrage fondé sur le modèle en ligne parallèles (PLA)

Les valeurs obtenues sur le système microplate Reader sont saisies sur le système PLA à fin de déterminer les calculs de l'activité.

### • Critère d'acceptation des résultats du système suitability :

1. signification de non parallelisme = passed

2. signification de régression = passed

3. Signification non linéaire = passed

4. Confidencelevel (%):99.5 %

### • Critère d'acceptation ANTI FIIa :

20.0à 35.0 UI/mg.

### 3. Contrôle physicochimique de Produit Fini :

#### 1. Caractère:

##### ❖ Aspect :

La solution injectable doit être claire, inodore, avec un degré de coloration moins intense que la solution de référence J4 ou JB4 dans des seringues pré-remplies de verre type I en solution de l'ENOXAPARINE SODIQUE injectable.

#### 2. Identifications :

##### a. Identification A

Le contenu total d'un récipient à dose unique a été transféré dans un tube à essai en verre, 2 ml d'EPPI et 1 ml de solution de sulfate de protamine à 2 % (p/v) a été ajouté, puis mélangé.

- Résultat attendu : **formation d'un précipité blanc crème.**

##### b. Identification B

Le contenu total de la solution injectable a été transféré dans une fiole de 100 ml diluée avec de l'acide chlorhydrique 0.01 N au trait de jauge. Une lecture au spectrophotomètre réalisée à une longueur d'onde comprise entre **220 nm à 300 nm**. Utilisation de l'acide chlorhydrique 0.01 N comme blanc.

- ❖ **Maximum d'absorption** :  $231 \pm 2$  nm.

##### c. Identification C: Test de sodium

- Dans un tube à essai 2 ml de la solution injectable a été transférée et ajoutée 2 ml d'une solution de carbonate de potassium à 150 g/l puis chauffée à l'ébullition. **Aucun précipité ne doit être formé.**
- 4 ml de la solution de pyroantimoniate de potassium a été ajoutée à la solution précédente puis chauffée à l'ébullition et laissée refroidir dans l'eau glacée, la paroi du tube a été frottée avec une baguette de verre si c'était nécessaire. **un précipité blanc doit se former.**

##### d. Identification D :

Cette identification correspond à la détermination de la moyenne moléculaire et la distribution de la masse moléculaire de l'ENOXAPARINE SODIQUE Produit Fini.

- ❖ **Procédure opérationnelle :**

##### 1. Phase mobile:

7.7 g d'acétate d'ammonium a été dissous dans 1000 ml d'eau purifiée, filtré à travers un filtre de 0.22 µm.

## 2. Préparation de la solution essai :

Une quantité appropriée de l'échantillon a été dissous avec la phase mobile afin d'obtenir une solution d'une concentration de 10 mg/ml, filtrée à travers un filtre de 0.22 µm.

## 3. Préparation de la solution working standard :

Une quantité appropriée du working standard a été dissous dans la phase mobile pour obtenir une solution d'une concentration de 10 mg/ml, filtrée au travers un filtre de 0.22 µm.

## 4. Préparation de la solution standard de calibration SCR :

Le contenu d'une ampoule d'Héparine de bas poids moléculaire SCR standard de calibration a été dissous avec la phase mobile afin d'obtenir une solution de 10 mg/ml. Cette dernière doit être aliquotée dans des tubes avec un volume de stockage de 100 µl et conservée jusqu'à 03 mois à -20°C.

### ❖ Conditions chromatographiques :

**Tableau 4.3** : les conditions chromatographiques de la détermination de la moyenne du poids moléculaire et la distribution de la masse moléculaire de l'ENOXAPARINE SODIQUE.

Condition	Nom/ parameter
HPLC	WATERS 2695
Détecteur	UV et RI
Longueur d'onde de détection UV	234 nm
Réfractomètre index de réfraction	Inner température :37°C,sensitivité :4
Colonne	TSK gel G2000SWXL ,7.8 mm x 5µm
Débit	0.5ml/min
Volume	25 µl
Temps	30 min
Logiciel GPC	EMPOWER

❖ **Système Suitability :**

- Le coefficient de corrélation linéaire de la courbe de calibration a été vérifiée, cette dernière peut être utilisé pour analyser les chromatographe de l'essai uniquement lorsque le coefficient de corrélation  $R \geq 0.99$ .
- Le RSD du pourcentage de la masse des chaînes inférieures à 2000 des 6 injections du WS doit être  $\leq 5\%$ .
- Le RSD du pourcentage de la masse des chaînes supérieur à 8000 des 6 injections du WS doit être  $\leq 5\%$ .
- Le RSD du pourcentage de la masse des chaînes entre 2000 et 8000 des 6 injections du WS doit être  $\leq 5\%$ .
- Le nombre des plateaux théoriques du dernier pic chromatogramme UV des deux injections de la solution de calibration standard Héparine de bas poids moléculaire doit être  $\geq 6000$  (équivalent à 20000 mètre).
- Le rapport entre la valeur r des deux injections de la solution de calibration standard Héparine de bas poids moléculaire (début et fin) doit être  $\leq 5\%$ , C.à.d.  $r(\min)/r(\max) > 0.95$ .

$r \text{ min ou max} = \text{surface IR} / \text{surface UV}$ .

- A partir des résultats du tableau obtenus pour le standard de calibration Héparine bas poids moléculaire la déviation entre  $M(n)$  et  $M(na)$  a été calculé selon la formule suivante :

$$M(n) - M(na) / M(na) \times 100\%$$

$M(n)$  = moyenne nombre poids moléculaire trouvé.

$M(na)$  = moyenne nombre poids moléculaire du SCR.

❖ **Résultats de l'analyse et critères d'acceptation :**

- la moyenne de la masse moléculaire  $M_w$  de l'essai doit comprise entre **3800 et 5000**.
  - le pourcentage de la masse des chaînes inférieures à 2000 X1 doit être comprise entre **12.0 et 20.0 %**.
  - le pourcentage de la masse des chaînes supérieures à 8000 X2 doit être **inférieur ou égale à 18.0 %**.
- le pourcentage de la masse des chaînes entre 2000 et 8000 a été calculé par la formule suivante :  $100\% - X1 - X2$ , doit être comprise entre **68.0-82.0%**.

### 3. Essai

#### ○ **Volume extractible:**

La détermination du volume extractible de la solution injectable de l'ENOXAPARINE est réalisée en suivant les étapes suivantes :

- le contenu de 5 seringues d'ENOXAPARINE SODIQUE a été pesé en utilisant une balance de précision (mode statistique)

- la moyenne de la masse du contenu des 5 seringues a été calculées.

-le volume de la solution injectable a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$D(\text{densité}) = m(\text{masse}) / v (\text{volume}) \rightarrow v = m(\text{masse}) / d (\text{densité}).$$

#### ○ **Normes :**

**20mg /0.2ml** : doit être 0.20 ml -0.22ml.

**40mg /0.4ml** : doit être 0.40ml-0.44ml.

**60mg /0.6 ml** : doit être 0.60ml-0.65 ml.

**80 mg /0.8 ml** : doit être 0.80ml-0.85 ml.

#### ○ **Densité :**

La détermination de la densité de la solution injectable de l'ENOXAPARINE SODIQUE est réalisée en suivant les étapes suivantes :

- le pycnomètre a été pesé vide = P0.

- le pycnomètre a été pesé et rempli avec la solution injectable = P1.

- le pycnomètre a été pesé et rempli avec l'eau = P2.

$$\text{Densité} = (P1-P0) / (P2-P0)$$

○ **Normes** : la densité relative doit être comprise entre **1.04 et 1.08** à 20 °C.

#### ❖ **PH :**

Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH mètre, doit être compris entre **5.5 et 7.5**

#### ❖ **Absorbance spécifique :**

50.0mg d'ENOXAPARINE SODIQUE a été dissous dans 100 ml d'HCL 0.01M, puis bien mélangée. En utilisant un spectrophotomètre a déterminé l'absorbance spécifique.

❖ **Calcule :**

$$E = A / C L$$

Avec:

E: Absorbance spécifique

A : Absorbance maximale de la solution essai, g/100ml

L ; épaisseur (épaisseur de la cellule), cm

L'absorbance spécifique du PF doit être comprise **14.0 et 20.0**.

❖ **Teneur en sodium :**

Ce paramètre est déterminé par l'utilisation de SPECTROSCOPIE ATOMIQUE (SAA)

Ce teste nécessite les préparations des solutions standards, solution essai .

❖ **Les étapes de préparation :**

1. Introduction de la solution HCL 0.1N-Césium comme blanc dans le générateur atomique puis ajustement de l'instrument et lire à zéro.
2. Introduction des solutions standards de sodium 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, dans le générateur atomique puis enregistrement des lectures afin de tracer une courbe d'étalonnage ( $r \geq 0.990$ ).
3. Introduction des solutions essais dans le générateur atomique puis enregistrement des lectures.

❖ **Conditions :**

Source : lampe à cathode creuse au sodium.

Longueur d'onde : 330.3nm.

Vitesse de l'air : 10.0 L/min.

Débit d'acétylène : 1.8 L /min.

❖ **Calcul**

$$\text{Teneur en sodium dans le produit fini} = \frac{C_{\text{essai}} \times \text{poid total du produit fini} \times 10^{-4}}{M \times \text{la quantité de charge d'API de celot}} \times 100\%$$

C essai : la concentration de sodium dans la solution essai (PF) en ppm.

M : pesée de l'essai (PF) en g.  $10^{-4}$ : Coefficient de calculs.

**Normes** : la teneur en sodium doit être comprise entre **11.3 % et 13.5 %**

#### 4. Dosage Enzymatique

##### ❖ Activité anti facteur Xa

#### 1. Préparation du BRP (biological reference pharmacopia) pour le test d'activité biologique de l'héparine bas poids moléculaire.

- Solutions tampons : Tris-NaCl pH 7.4, Tris-EDTA pH 8.4
- Solution de la substance de référence relative pharmacopée européenne pour le teste d'activité biologique de l'Héparine bas poids moléculaire :

Elle a présenté une activité pas moins de 90.0 % et pas supérieur de 110 % d'anti-FXa UI /ml

- Solutions standards à : 0.5, 10UI/ ml
- Solution d'essai à 0.5 UI/ ml.

#### 2. Solutions utilisées pour le teste d'activité biologique de l'héparine de bas poids moléculaire :

- Solution S-2765 à : 0.003 mol / l, 0.0005 mol/l
- Solution FXa
- Solution Antithrombine III à 1UI/ml

##### ❖ Procédure opérationnelle de l'activité Anti-FXa :

1. Préparation de la solution de travail FXa.
2. Préparation de la courbe solution standard.
3. Préparation de la courbe solution d'essai.
4. Détection par absorbance et lecteur de microplaque.

- ❖ **Le calcul** : l'activité de la substance à examiner a été calculée en Unités Internationales d'activité anti-facteur IIa par millilitre en utilisant les conditions habituelles d'analyse statistique pour le titrage fondé sur le modèle en ligne parallèles (PLA)

Les valeurs obtenues sur le système microplate Reader sont saisies sur le système PLA afin de déterminer les calculs de l'activité.

##### ❖ Critère d'acceptation des résultats du système suitability :

1. Signification de non parallelisme = passed
2. Signification de régression = passed
3. Signification non linéaire = passed
4. Confidence level(%) :99.5 %

❖ **Critère d'acceptation ANTI FXa :**

9000 à 11000 anti-FXa UI/ml (90% à 110.0 % de puissance en terme de l'anti- FXa UI/ ml).

❖ **Activité anti facteur IIa :**

**1. Préparation du BRP (biological reference pharmacopia) pour les tests d'activité biologique de l'héparine bas poids moléculaire**

- **Solutions tampons :** Tris-NaCl pH 7.4, Tris-EDTA pH 8.4
- **Solution de la substance de référence relative pharmacopée européenne pour le teste d'activité biologique de l'Héparine bas poids moléculaire :**

Elle a présenté une activité pas moins de 20.0 % et pas supérieur de 35 % d'anti-FIIa UI /ml.

- **Solutions standards** à : 3.3 UI/ ml, 0.2 UI/ml
- **Solution d'essai** à 0.2 UI/ ml

**2. Solutions utilisées pour le teste d'activité biologique de l'héparine de bas poids moléculaire :**

- **Solution S-2238** à : 0.003 mol / l, 0.0005 mol/l
- **Solution FIIa** : 25 UI/ml, 5 UI/ml
- **Solution Antithrombine III** à 0.5 UI/ml

➤ **Procédure opérationnelle de l'activité Anti-FIIa :**

1. Préparation de la courbe solution standard.
2. Préparation de la courbe solution d'essai.
3. Détection par absorbance et lecteur de microplaque.

- ❖ **Le calcul :** l'activité de la substance à examiner a été calculée en Unités Internationales d'activité anti-facteur IIa par millilitre en utilisant les conditions habituelles d'analyse statistique pour le titrage fondé sur le modèle en ligne parallèles (PLA)

Les valeurs obtenues sur le système microplate Reader sont saisies sur le système PLA à fin de déterminer les calculs de l'activité.

❖ **Critère d'acceptation des résultats du système suitability :**

1. Signification de non parallelisme = passed
2. Signification de régression = passed
3. Signification non linéaire = passed

#### 4. Confidence level (%) : 99.5 %

Critère d'acceptation ANTI FIIa :2000 à 3500anti FIIa UI/ml.

Ratio anti facteur Xa / anti facteur IIa : entre 3.3 et 5.3.

#### ○ Résultats et Discussions

Le présent travail porte sur le contrôle physico-chimique de l'ENOXAPARINE SODIQUE 40mg/0.4ml afin de déterminer sa conformité par rapport aux normes de la pharmacopée européenne et comparer la variabilité des résultats obtenus entre les 3 lots testés.

### 1. Contrôle physico-chimique de l'ENOXAPARINE SODIQUE (matière première) :

**Tableau 4.4:** Les résultats de contrôle physico-chimique de la matière première de 3 lots testés (0243,0244,0245)

paramètre	Normes	Résultat
caractères		
Aspect	Poudre blanche ou sensiblement blanche,hygroscopique.	<b>Conforme</b>
solubilité	Facilement soluble dans l'eau.	<b>Conforme</b>
Aspect de la solution	La solution est limpide n'est plus fortement colorée que la solution de degré 6 de la gamme des solutions témoins présentant la coloration la plus appropriée	<b>Conforme</b>
identification		
A.	Le spectre RMN 13C obtenue est semblable au spectre RMN 13C obtenue avec l'étalon de référence d'héparine de basse masse moléculaire appropriée.	<b>Conforme</b>
B.	Le ratio de l'activité anti-FXa par rapport à l'activité anti-FIIa est entre 3.3 à 5.3	<b>Conforme</b>

C.	La masse moléculaire relative moyenne en masse de l'ENOXAPARNE est de 3800 et 5000.	<b>Conforme</b>
	Le pourcentage de la masse des chaînes inférieures à 2000 est de 12.0 et 20.0%.	<b>Conforme</b>
	le pourcentage de la masse des chaînes supérieures à 8000 est $\leq 18.0$ %	<b>Conforme</b>
	le pourcentage de la masse des chaînes entre 2000 et 8000 est de 68.0-82.0% .	<b>Conforme</b>
D.Réaction chimique	La substance à examiner a donné la réaction de sodium.	<b>Conforme</b>
Essai		
pH	6.2 à 7.7	<b>Conforme</b>
Absorbance spécifique	14.0 à 20.0	<b>Conforme</b>
Perte de la dessiccation	$\leq 10.0$ %	<b>Conforme</b>
Métaux lourds	$\leq 30$ ppm	<b>Conforme</b>
Test de sodium	11.3% à 13.5 %	<b>Conforme</b>
Solvant résiduels		
Ethanol	Au maximum :5000 ppm	<b>Conforme</b>
Méthanol	Au maximum :3000 ppm	<b>Conforme</b>
dosage		
Activité anti facteurXa	90.0 à 125.0 UI/mg	<b>Conforme</b>
Activité anti facteurIIa	20. à 35.0UI /mg	<b>Conforme</b>

Les résultats obtenus de 3 lots testés répondent aux spécifications de la pharmacopée européenne ce qui confirme que le principe actif testé est conforme.

## 2. Contrôle physico-chimique de l'ENOXAPARINE SODIQUE 40mg / 0.4ml (produit fini) :

### 1.1. Caractère

**Tableau 4.5** : caractère de la solution d'ENOXAPARINE SODIQUE 40mg/0.4ml.

lots	Aspect	conformité
0243	Solution claire, inodore, avec un degré de coloration moins intense que J4 ou	Conforme aux spécifications décrites dans la pharmacopée européenne 10 <sup>ème</sup> éditions.
0244	JB4 dans des seringues pré-remplies de verre type I en solution de varenox	
0245	injectable 40mg/0.4ml	

De ce fait, l'aspect de 3 lots (0243, 0244,0245) est conforme.

### 1.2. Identification

#### ➤ Identification A :

D'après la réaction chimique de 3 lots testés ( 0234 , 0244 , 0245) : formation d'un précipité blanc crème .

**Donc c'est conforme aux spécifications de la pharmacopée européenne 10<sup>eme</sup> édition.**

#### ➤ Identification B :

**Tableau 4.6** : valeurs d'identification B d'ENOXAPARINE SODIQUE.

Lot	0243	0244	0245
Par « UV »	232nm	231.8nm	231.4nm

**Les valeurs sont conformes aux exigences données** (maximum d'absorption 231 nm  $\pm$ 2 nm).

➤ **Identification C :**

Les solutions examinées de 3 lots (0243, 0244,0245) A donné la réaction de sodium.

**Donc c'est conforme aux spécifications de la pharmacopée européenne 10 eme édition.**

➤ **Identification D :**

L'identification par HPLC a donné les résultats suivants :

➤ La moyenne de la masse moléculaire :

**Tableau 4.7 :** Valeurs de la moyenne de la masse moléculaire.

0243	0244	0245
4542 %	4577%	4581%

Les valeurs sont comprise dans l'intervalle  $3800 < M_m < 5000$  **donc c'est conforme.**

➤ Le pourcentage en masse des chaines inférieures à 2000 :

**Tableau 4.8 :** Valeurs de pourcentage en masse de chaines inférieures à 2000.

0243	0244	0245
19.1%	18.9 %	19.5 %

Les valeurs sont comprise dans l'intervalle  $12.0 < \% < 20.0$  **donc c'est conforme.**

➤ Le pourcentage en masse des chaines supérieures à 8000 :

**Tableau 4.9 :** valeurs de pourcentage en masse des chaines supérieures à 8000.

0243	0244	0245
12.2%	12.4%	12.9%

Les valeurs sont inférieurs à 18 % **donc c'est conforme.**

➤ Le pourcentage en masse des chaines comprises entre 2000 et 8000 :

**Tableau 4.10 :** Valeurs de pourcentage en masse des chaines comprises entre 2000 et 8000.

0243	0244	0245
68.7%	68.7 %	68.7%

Les valeurs sont comprises dans l'intervalle  $68.0 < \% < 82.0$  **donc c'est conforme.**

### 1.3. Essai

- **Volume extractible**

**Tableau 4.11** : Valeurs de volume extractible d'ENOXAPARINE SODIQUE.

LOT	0243	0244	0245
V « ml »	0.41	0.41	0.42

Les valeurs sont comprises entre l'intervalle 0.40ml-0.44 ml **donc c'est conforme.**

- **Densité**

**Tableau 4.12** : Valeurs de la densité d'ENOXAPARINE SODIQUE.

LOT	0243	0244	0245
D	1.05	1.05	1.05

Les valeurs sont comprises dans l'intervalle 1.04 à 1.08ml (20°C) **donc c'est conforme.**

- **PH**

**Tableau 4.13** : Valeurs de pH d'ENOXAPARINE SODIQUE.

LOT	0243	0244	0245
pH	6.6	6.7	6.7

Les valeurs sont comprises dans l'intervalle 5.5 à 7.5 **donc c'est conforme.**

- **Absorbance spécifique**

**Tableau 4.14**: Valeurs d'absorbance spécifique d'ENOXAPARINE SODIQUE.

LOT	0243	0244	0245
A	16.4	16.8	15.8

Les valeurs sont comprises dans l'intervalle 14.0 à 20.0**donc c'est conforme.**

- **Teneur en sodium**

**Tableau 4.15 :** Valeurs de Teneur en sodium d'ENOXAPARINE SODIQUE.

LOT	0243	0244	0245
T « % »	13.1	13.2	12.9

Les valeurs sont comprises dans l'intervalle 11.3 % à 13.5 % **donc c'est conforme.**

#### 1.4.Dosage Eczématique :

- ❖ **Activité anti facteur Xa**

**Tableau 4.16:** Valeurs d'activité anti facteur Xa d'ENOXAPARINE SODIQUE.

LOT	0243	0244	0245
Anti FXa « % »	96.3	101.8	99.9

Les valeurs sont comprise dans l'intervalle 90.0% à 110.0% **donc c'est conforme .**

- ❖ **Activité anti facteur IIa**

**Tableau 4.17:** Valeurs d'activité anti facteur IIa d'ENOXAPARINE SODIQUE.

LOT	0243	0244	0245
Anti FIIa	21.7 %	2375UI/ml	2829 UI/ml

Les valeurs sont comprises dans l'intervalle :

2000 à 3500 UI/ml (lot 0244 et lot 0245)

20.0% à 35.0 % (lot 0243)

**Ce qui fait le dosage est conforme.**

- ❖ **Ratio anti-FXa / anti-FIIa**

**Tableau 4.18:** Valeurs de Ration anti-FXa / anti-FIIa d'ENOXAPARINE SODIQUE.

LOT	0243	0244	0245
Anti-FXa/Anti-FIIa	4.4	4.3	3.5

Les valeurs sont comprises dans l'intervalle 3.3 à 5.3 **donc c'est conforme.**

## 2. Analyse comparative

CLIENT : NA	CERTIFICAT N°	USAGE	CERTIFICAT N°	USAGE																																																																																																																			
<table border="1"> <thead> <tr> <th>DESCRIPTION</th> <th>RESULTAT</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>ASPECT</td> <td>Conforme</td> </tr> <tr> <td colspan="2"><b>IDENTIFICATION</b></td> </tr> <tr> <td>A. Réaction chimique 1</td> <td>Conforme</td> </tr> <tr> <td>B. Par « UV »</td> <td>232 nm</td> </tr> <tr> <td>C. Réaction chimique 2</td> <td>Conforme</td> </tr> <tr> <td></td> <td>4542 %</td> </tr> <tr> <td>D. Par « HPLC »</td> <td>19,1 %</td> </tr> <tr> <td></td> <td>68,7 %</td> </tr> <tr> <td></td> <td>12,2 %</td> </tr> <tr> <td colspan="2"><b>ESSAI</b></td> </tr> <tr> <td>Volume extractible</td> <td>0,41 ml</td> </tr> <tr> <td>Densité</td> <td>1,05</td> </tr> <tr> <td>pH</td> <td>6,6</td> </tr> <tr> <td>Absorbance spécifique</td> <td>16,4</td> </tr> <tr> <td>Activité Anti-facteur Xa</td> <td>96,3 %</td> </tr> <tr> <td>Activité Anti -facteur IIa</td> <td>21,7 %</td> </tr> <tr> <td>Ratio Anti-FXa/ Anti-facteur IIa</td> <td>4,4</td> </tr> <tr> <td>Teneur en sodium</td> <td>13,1 %</td> </tr> </tbody> </table>		DESCRIPTION	RESULTAT	ASPECT	Conforme	<b>IDENTIFICATION</b>		A. Réaction chimique 1	Conforme	B. Par « UV »	232 nm	C. Réaction chimique 2	Conforme		4542 %	D. Par « HPLC »	19,1 %		68,7 %		12,2 %	<b>ESSAI</b>		Volume extractible	0,41 ml	Densité	1,05	pH	6,6	Absorbance spécifique	16,4	Activité Anti-facteur Xa	96,3 %	Activité Anti -facteur IIa	21,7 %	Ratio Anti-FXa/ Anti-facteur IIa	4,4	Teneur en sodium	13,1 %	<table border="1"> <thead> <tr> <th>DESCRIPTION</th> <th>RESULTAT</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>ASPECT</td> <td>Conforme</td> </tr> <tr> <td colspan="2"><b>IDENTIFICATION</b></td> </tr> <tr> <td>A. Réaction chimique 1</td> <td>Conforme</td> </tr> <tr> <td>B. Par « UV »</td> <td>231,8 nm</td> </tr> <tr> <td>C. Réaction chimique 2</td> <td>Conforme</td> </tr> <tr> <td></td> <td>4577 %</td> </tr> <tr> <td>D. Par « HPLC »</td> <td>18,9 %</td> </tr> <tr> <td></td> <td>68,7 %</td> </tr> <tr> <td></td> <td>12,4 %</td> </tr> <tr> <td colspan="2"><b>ESSAI</b></td> </tr> <tr> <td>Volume extractible</td> <td>0,41 ml</td> </tr> <tr> <td>Densité</td> <td>1,05</td> </tr> <tr> <td>pH</td> <td>6,7</td> </tr> <tr> <td>Absorbance spécifique</td> <td>16,8</td> </tr> <tr> <td>Activité Anti-facteur Xa</td> <td>10179 UI/ml</td> </tr> <tr> <td>Activité Anti -facteur IIa</td> <td>2375 UI/ml</td> </tr> <tr> <td>Ratio Anti-FXa/ Anti-facteur IIa</td> <td>4,3</td> </tr> <tr> <td>Teneur en sodium</td> <td>13,2 %</td> </tr> </tbody> </table>		DESCRIPTION	RESULTAT	ASPECT	Conforme	<b>IDENTIFICATION</b>		A. Réaction chimique 1	Conforme	B. Par « UV »	231,8 nm	C. Réaction chimique 2	Conforme		4577 %	D. Par « HPLC »	18,9 %		68,7 %		12,4 %	<b>ESSAI</b>		Volume extractible	0,41 ml	Densité	1,05	pH	6,7	Absorbance spécifique	16,8	Activité Anti-facteur Xa	10179 UI/ml	Activité Anti -facteur IIa	2375 UI/ml	Ratio Anti-FXa/ Anti-facteur IIa	4,3	Teneur en sodium	13,2 %	<table border="1"> <thead> <tr> <th>DESCRIPTION</th> <th>RESULTAT</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>ASPECT</td> <td>Conforme</td> </tr> <tr> <td colspan="2"><b>IDENTIFICATION</b></td> </tr> <tr> <td>A. Réaction chimique 1</td> <td>Conforme</td> </tr> <tr> <td>B. Par « UV »</td> <td>231,4 nm</td> </tr> <tr> <td>C. Réaction chimique 2</td> <td>Conforme</td> </tr> <tr> <td></td> <td>4581 %</td> </tr> <tr> <td>D. Par « HPLC »</td> <td>19,5 %</td> </tr> <tr> <td></td> <td>68,7 %</td> </tr> <tr> <td></td> <td>12,9 %</td> </tr> <tr> <td colspan="2"><b>ESSAI</b></td> </tr> <tr> <td>Volume extractible</td> <td>0,42 ml</td> </tr> <tr> <td>Densité</td> <td>1,05</td> </tr> <tr> <td>pH</td> <td>6,7</td> </tr> <tr> <td>Absorbance spécifique</td> <td>15,8</td> </tr> <tr> <td>Activité Anti-facteur Xa</td> <td>9990 UI/ml</td> </tr> <tr> <td>Activité Anti -facteur IIa</td> <td>2829 UI/ml</td> </tr> <tr> <td>Ratio Anti-FXa/ Anti-facteur IIa</td> <td>3,5</td> </tr> <tr> <td>Teneur en sodium</td> <td>12,9 %</td> </tr> </tbody> </table>		DESCRIPTION	RESULTAT	ASPECT	Conforme	<b>IDENTIFICATION</b>		A. Réaction chimique 1	Conforme	B. Par « UV »	231,4 nm	C. Réaction chimique 2	Conforme		4581 %	D. Par « HPLC »	19,5 %		68,7 %		12,9 %	<b>ESSAI</b>		Volume extractible	0,42 ml	Densité	1,05	pH	6,7	Absorbance spécifique	15,8	Activité Anti-facteur Xa	9990 UI/ml	Activité Anti -facteur IIa	2829 UI/ml	Ratio Anti-FXa/ Anti-facteur IIa	3,5	Teneur en sodium	12,9 %
DESCRIPTION	RESULTAT																																																																																																																						
ASPECT	Conforme																																																																																																																						
<b>IDENTIFICATION</b>																																																																																																																							
A. Réaction chimique 1	Conforme																																																																																																																						
B. Par « UV »	232 nm																																																																																																																						
C. Réaction chimique 2	Conforme																																																																																																																						
	4542 %																																																																																																																						
D. Par « HPLC »	19,1 %																																																																																																																						
	68,7 %																																																																																																																						
	12,2 %																																																																																																																						
<b>ESSAI</b>																																																																																																																							
Volume extractible	0,41 ml																																																																																																																						
Densité	1,05																																																																																																																						
pH	6,6																																																																																																																						
Absorbance spécifique	16,4																																																																																																																						
Activité Anti-facteur Xa	96,3 %																																																																																																																						
Activité Anti -facteur IIa	21,7 %																																																																																																																						
Ratio Anti-FXa/ Anti-facteur IIa	4,4																																																																																																																						
Teneur en sodium	13,1 %																																																																																																																						
DESCRIPTION	RESULTAT																																																																																																																						
ASPECT	Conforme																																																																																																																						
<b>IDENTIFICATION</b>																																																																																																																							
A. Réaction chimique 1	Conforme																																																																																																																						
B. Par « UV »	231,8 nm																																																																																																																						
C. Réaction chimique 2	Conforme																																																																																																																						
	4577 %																																																																																																																						
D. Par « HPLC »	18,9 %																																																																																																																						
	68,7 %																																																																																																																						
	12,4 %																																																																																																																						
<b>ESSAI</b>																																																																																																																							
Volume extractible	0,41 ml																																																																																																																						
Densité	1,05																																																																																																																						
pH	6,7																																																																																																																						
Absorbance spécifique	16,8																																																																																																																						
Activité Anti-facteur Xa	10179 UI/ml																																																																																																																						
Activité Anti -facteur IIa	2375 UI/ml																																																																																																																						
Ratio Anti-FXa/ Anti-facteur IIa	4,3																																																																																																																						
Teneur en sodium	13,2 %																																																																																																																						
DESCRIPTION	RESULTAT																																																																																																																						
ASPECT	Conforme																																																																																																																						
<b>IDENTIFICATION</b>																																																																																																																							
A. Réaction chimique 1	Conforme																																																																																																																						
B. Par « UV »	231,4 nm																																																																																																																						
C. Réaction chimique 2	Conforme																																																																																																																						
	4581 %																																																																																																																						
D. Par « HPLC »	19,5 %																																																																																																																						
	68,7 %																																																																																																																						
	12,9 %																																																																																																																						
<b>ESSAI</b>																																																																																																																							
Volume extractible	0,42 ml																																																																																																																						
Densité	1,05																																																																																																																						
pH	6,7																																																																																																																						
Absorbance spécifique	15,8																																																																																																																						
Activité Anti-facteur Xa	9990 UI/ml																																																																																																																						
Activité Anti -facteur IIa	2829 UI/ml																																																																																																																						
Ratio Anti-FXa/ Anti-facteur IIa	3,5																																																																																																																						
Teneur en sodium	12,9 %																																																																																																																						
Lot 0243		Lot 0244		Lot 0245																																																																																																																			

Figure 4.10 : bulletin d'analyses de VARENOX injectable 40mg/0.4ml, produit fini

Les résultats des paramètres de 3 lots différents sont relativement proches ce qui confirme l'absence d'une grande variabilité déterminée pour un produit biosimilaire.

Ce qui fait que la molécule de l'ENOXAPARINE SODIQUE est stable.

## CONCLUSION

Dans cette étude ; un contrôle physico-chimique a été effectué au niveau de service physico-chimie de laboratoire de FRATER-RAZES sur un médicament issu de la biotechnologie (ENOXAPARINE SODIQUE 40mg /0.4ml).Ce contrôle a été réalisé en se référant aux spécifications de la pharmacopée Européenne 8 eme, 9 eme, 10eme édition ; la pharmacopée américaine USP41-USP39 et des méthodes internes.Les résultats obtenus ont montré que sur le plan physicochimique il est conforme aux normes fixés dans le dossier technique. Une comparaison entre 3 lots différents a montré que **la molécule « ENOXAPARINE » est stable et qu'il n'y a pas une variabilité lors de la fabrication ce qui n'est pas dans le cas des biosimilaires.**

Ce travail nous a permis d'améliorer nos connaissances acquises tout au long de notre cursus.

En outre ; il nous a permis de maîtriser quelques techniques analytiques par lesquelles passe le médicament au sein du Laboratoire de FRATER-RAZES.

Bien que les médicaments biosimilaires ont résolu beaucoup de problèmes de santé publique, L'amélioration de la qualité du produit est toujours souhaitable et encouragée. Aujourd'hui La capacité de la méthodologie analytique sophistiquée permet d'observer un nombre croissant sans cesse de variantes moléculaires.

## Conclusion Générale

**Les biosimilaires présentent autant de nouvelles solutions thérapeutiques que de challenges et d'inconnues. Leur évaluation clinique est délicate et sort de l'approche générique, maintenant maîtrisée et connue. Un fabricant souhaitant réaliser le développement clinique d'un biosimilaire doit comprendre la nécessité d'une approche en plusieurs étapes, telle que recommandée par l'EMA, et les enjeux de chacune d'elles afin de caractériser au mieux le biomédicament.**

**Les médicaments biosimilaires sont des médicaments très complexes, et qui ne peuvent être traités comme les médicaments conventionnels. Ils sont donc fondamentalement différents des produits innovateurs en ce qui concerne la complexité de structure et l'hétérogénéité, ainsi que la sensibilité aux différences de processus de fabrication.**

**Le processus de fabrication de chaque médicament biologique définit, dans une mesure certaine, le produit fabriqué. En effet, ces processus sont basés sur des cellules ou des organismes vivants. En raison de la variabilité biologique de ces sources et de la haute complexité structurelle et de la micro-hétérogénéité des macromolécules qui en résultent, de petites différences entre les processus de fabrication peuvent engendrer d'importantes différences dans les propriétés cliniques des produits de ces processus,**

**Compte tenu de leur procédé de fabrication, de l'incidence de nombreux facteurs sur de leur profil physico-chimique ainsi que sur leur activité biologique, les biosimilaires devront faire l'objet d'un contrôle fiable, stricte et rigoureux. Ce contrôle doit être réalisé et développé à l'aide des méthodes de pointe les plus récentes et les plus performantes pour s'assurer, à long terme, des propriétés revendiquées en termes de qualité, de sécurité et d'efficacité de ces médicaments, qui va permettre la simplification de leurs procédures de mise sur le marché.**

**Si seuls les industries pharmaceutiques ou les génériqueurs de taille suffisamment importante peuvent supporter aujourd'hui les coûts de développement et de production des biosimilaires, les sociétés de biotechnologies ont leur place en proposant des innovations concernant la caractérisation (physique, chimique, biologique). L'évaluation et l'optimisation des procédés de fabrication de ces molécules, La détermination des profils patients et l'adaptation personnalisée des traitements thérapeutiques constituent un axe de recherche et développement prometteur.**

## Résumé

Un biosimilaire est un médicament biologique qui est équivalent à un médicament de référence déjà autorisé. Une étude comparative est nécessaire pour démontrer que le produit est équivalent en termes de qualité, de sécurité et d'efficacité à un produit de référence choisi. Et par définition un biosimilaire est un médicament biologique issu de biotechnologie. Et sachant que les médicaments biotechnologiques sont préparés par l'utilisation des systèmes biologiques vivants dont l'hétérogénéité est inhérente à leur nature, et à leur processus de production. Le processus (et donc le produit final) est en outre très sensible aux modifications dans le processus de production. Deux processus de production développés indépendamment pour un même médicament biologique peuvent donc conduire à des médicaments équivalents, mais jamais à des médicaments identiques.

C'est pourquoi il faut effectuer des études détaillées au cours desquelles les deux médicaments sont comparés pour établir leur biosimilarité. Ce contrôle de comparabilité doit être réalisé et développé à l'aide des méthodes de pointe les plus récentes et les plus performantes : absorption UV, dichroïsme circulaire, résonance plasmonique de surface, RMN, chromatographie (exclusion, échange d'ions, SEC-HPLC ...), électrophorèse (SDS PAGE, IEF,...), Rayons X, AF4..., et bien sûr des essais biologiques afin de s'assurer, à long terme, des propriétés revendiquées en termes de qualité, de sécurité et d'efficacité de ces médicaments non conventionnels.

Afin d'obtenir une action thérapeutique toujours identique avec un même produit pharmaceutique, un médicament biosimilaire, doit faire l'objet d'un contrôle qualité, comme l'exemple qu'on a pu voir lors de notre stage pratique, qu'il s'agit d'ENOXAPARINE SODIQUE comme principe actif et dans le but d'étudier des différentes méthodes de contrôle qualité, des différentes analyses de contrôle physicochimique ont été réalisées au niveau de laboratoire FRATER-RAZES.

Pour conclure, malgré les complexités et les freins cités dans cette étude, les biosimilaires ont le vent en poupe et représentent un enjeu important pour l'industrie pharmaceutique. Challenge qu'elle a choisi de relever et qui permettra d'accroître la compétitivité, l'innovation et l'accès aux soins.

**Mots clés :** Biosimilaires, Médicaments biologiques de référence, Production, Contrôle qualité, Réglementation, Méthodes analytique.

## Abstract

A biosimilar product is a biologic product that is approved based on demonstrating that it is highly similar to an FD-approved biologic product, known as a reference product. A comparative study is required to demonstrate that the product is equivalent in terms of quality, safety and efficacy to a chosen reference product. And by definition, a biosimilar is a biologic drug derived from biotechnology. And knowing that biotechnology drugs are prepared by using living biological systems whose heterogeneity is inherent to their nature, and to their production process. The process (and therefore the final product) is also very sensitive to changes in the production. Two production processes developed independently for the same biological drug can therefore lead to equivalent drugs, but never to identical drugs.

This is why detailed studies must be carried out in which the two medicines are compared to establish their biosimilarity from the point of view of quality, safety and efficacy. This comparability control must be performed and developed using the latest and most efficient methods: UV absorption, circular dichroism, surface plasmon resonance, NMR, chromatography, electrophoresis, X-rays, AF4..., and of course biological tests in order to ensure, in the long term, the claimed properties in terms of quality, safety and efficacy of these non conventional drugs.

In order to obtain a therapeutic action always identical with the same pharmaceutical product, a biosimilar drug, must be the object of a quality control, as the example that we could see during our practical training, that it has the SODIQUE ENOXAPARINE as active principle and in order to study the different methods of quality control, different analyses of physicochemical control were realized at the level of laboratory FRATER-RAZES.

In conclusion, despite these obstacles, biosimilars have the wind in their sails and represent a major challenge for the pharmaceutical industry. It is a challenge that the industry has chosen to take up and which will increase the competitiveness, innovation and the access to healthcare.

**Keywords :** Biosimilars, Reference biological drugs, Quality control, Analytical methods, Production, Regulations.

## Références Bibliographiques

- (1). **M-L.Laroche, L.Merle**, Bulletin d'information du Centre Régional de Pharmacovigilance de Limoges, N° 39, juin 2007.
- (2). **Prugnaud J.-L.** Législation européenne sur les biosimilaires : les recommandations de l'EMA concernant la qualité, Néphrologie & Thérapeutiques, 2009, vol.5, 3-5
- (3). Ce qu'il faut savoir sur les médicaments biosimilaires. Document consensuel d'information. Commission européenne. Ref : (2014) 4263293-18/12/2014.
- (4). Marchand A. Opthérapie : émergence et développement d'une technique thérapeutique (France, 1889-1940) [Thèse de doctorat]. Paris, France : Ecole doctorale Abbé Grégoire; 2014.
- (5). Bazin H. Histoire des vaccinations. John Libbey Eurotext, 2008. 474 p.
- (6). Médicament et santé publique. ADSP. 1999; (27):22, 23, 24.
- (7). Fédération Française des diabétiques. Les 90 ans de la découverte de l'insuline. [Internet]. [cité 11 févr 2019]. Disponible sur <https://www.federationdesdiabetiques.org/information/rechercheinnovations-diabete/decouverte-insuline>
- (8). Médicament et santé publique. ADSP. 1999; (27):22, 23, 24.
- (9). Le Pen C. Les biosimilaires en 15 questions. [Internet]. 2014 [cité 23 nov 2018]. Disponible sur: <https://www.apmnews.com/Documents/lesbiosimilairesen15questionsemail.pdf>
- (10). 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)
- (11). Berthier AL. La FDA autorise le biosimilaire Omnitrope® de Sandoz [Internet]. 2006 [cité 30 mai 2019]. Disponible sur: [http://www.pharmaceutiques.com/archive/une/art\\_949.html](http://www.pharmaceutiques.com/archive/une/art_949.html)
- (12). Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. Nat Biotechnol. 2018;36(12):1136 à 1145.
- (13). Article 208.209.210 du Journal officiel de la République Algérienne N46, publié le 29 juillet 2018.
- (14). Règlement n°2309/1993 du Conseil du 22 juillet 1993 établissant des procédures communautaires pour l'autorisation et la surveillance des médicaments à usage humain et à usage vétérinaire et instituant une agence européenne pour l'évaluation des médicaments. JO L 214 du 24 août 1993. Disponible sur : <https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:31993R2309&from=FR>
- (15). **LEEM BIOTECH & GENOPOLE®**. Bioproduction 2008, Etat des lieux et recommandations pour l'attractivité de la France. 2008.
- (16). **EMA**. European Medicines Agency. [En ligne] <https://www.ema.europa.eu/>.
- (17). Biosimilaires des agents biologiques. Que faut-il en penser ? **Toussirot, Bereau M.** 2013.
- (18). Biosimilaires: de la technique au médicoéconomiques. **Girault, et al., et al.** 2015.
- (19). **ANSM**. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé . [En ligne] <https://www.ansm.sante.fr/>.
- (20). **BIOTECanda**. Démystifier les médicaments biosimilaires. Guide à l'intention des rédacteurs scientifiques.

- (21). **Akers, MJ, Vasudevan, V et Stickelmeyer , M.** Formulation development of protein dosage forms. s.l.: Academic/Plenum Publishers, 2002.
- (22). The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. **Kawanishi , G, et al., et al.** 1990, Biochem.
- (23). **Trouvin, Jean-Hugues et Prugnaud, Jean-Louis.** Les biosimilaires. Verlag - France : Springer, 2011.
- (24). **Geigert, John.** The Challenge of CMC Regulatory Compliance for Biopharmaceuticals and other Biologics Second Edition. s.l.: Springer, 2013.
- (25). **OMS.** GUIDELINES ON EVALUATION OF SIMILARBIOTHERAPEUTIC PRODUCTS (SBPs). Organisation Mondiale de Santé. [En ligne] <https://www.who.int/fr>.
- (26). **FDA.** U.S Food & drug Administration. [En ligne] <https://www.fda.gov>.
- (27). **l'agence européenne du médicament et Commission européenne .**Les médicaments biosimilaires dans l'UE.
- (28). EMA, CHMP. Guideline on similar biological medicinal products. [Internet]. 23 octobre 2014 [Cité 5 mars 2019]. Disponible sur : [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientificguideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-rev1\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientificguideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-rev1_en.pdf)
- (29). Directive 2004/27/CE du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004 modifiant la Directive 2001/83/CE instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain. JO L 136 du 30 avril 2004. Disponible sur: <https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:136:0034:0057:FR:PDF>
- (30). Committee for Medicinal Products for Human Use, Draft Guideline on Similar Biological Medicinal Products, European Medicines Agency, 2013.
- (31). Rovira J, Espin J., Garcia L., Olry de Labry A. : The impact of biosimilars's entry in the EU market ; Eminent ; Janvier 2011 ; [http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/healthcare/files/docs/biosimilars\\_market\\_012011\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/healthcare/files/docs/biosimilars_market_012011_en.pdf)
- (32). Mellstedt H., Niederwieser D., Ludwig H. ; The challenge of biosimilars ; Annals of Oncology ; 2008 ; 19 : 411-419
- (33). Grasbowski, H. Ridley, DB., Shulman KA., entry and competition in Generics Biologics ; Manages DecisEconom ; 2007 ; 28 : 439-451
- (34). Weise M. et al. ; Biosimilars : what clinicians should know ; Blood Journal ; Deceber 2012 ; 120 (26) ;5111-5116 ; 1528-0020
- (35). <http://www.biosimilarnews.com/mabthera-prices-get-lower-in-south-africa>
- (36). EMA, CE. Les médicaments biosimilaires dans l'UE Guide d'information destinée aux professionnels de la santé. [Internet]. 2017 [cité 24 jan 2019]. Disponible sur : [https://www.ema.europa.eu/en/documents/leaflet/biosimilars-eu-information-guide-healthcareprofessionals\\_fr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/leaflet/biosimilars-eu-information-guide-healthcareprofessionals_fr.pdf)

- (37). EMA ; Notice Volume 2B Notice to Applicants Medicinal products for human use ; Presentation and format of the dossier : Common Technical Document (CTD) disponible sur [http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-2/b/update\\_200805/ctd\\_05-2008\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-2/b/update_200805/ctd_05-2008_en.pdf)
- (38). S. Latieule, "Culture cellulaire : Trois étapes clés pour produire des protéines thérapeutiques," 2011. [En ligne]. [www.industrie.com/pharma/culture-cellulaire-trois-etapes-cles-pour-produire-des-proteines-therapeutiques,39248](http://www.industrie.com/pharma/culture-cellulaire-trois-etapes-cles-pour-produire-des-proteines-therapeutiques,39248).
- (39). J. Zhang, "Mammalian Cell Culture for Biopharmaceutical Production," in Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, ASM Press, 2010
- (40). F. Li, J. X. Zhou, X. Yang et al, "Current Therapeutic Antibody Production and Process Optimization," BioProcessing Journal, vol. 4, no. 5, 2005.
- (41). **JL.PRUGNAUD**, Similarité des médicaments issus des biotechnologies : cadre réglementaire et spécificités. *Annales Pharmaceutique Françaises*, 2008, vol : 42, p.1-6.
- (42). **I.BORGET, T.GRIVEL**, Biosimilaires et facteurs médico-économiques, *Bulletin du cancerologie* , 2010, Vol 97, N°5, p 1-7 .
- (43). **H.SCHELLEKENS**, Assessing the bioequivalence of biosimilars, the Retacrit® case, p 495-499, 2009.
- (44). **Rose MP, Gaines Das RE, Balen AH**. Definition and Measurement of Follicle Stimulating Hormone. *Endocrine reviews* **2000**, 21, (1), p.5-22.
- (45). **M.DUBOIS**. Développement de techniques analytiques pour l'évaluation des protéines thérapeutiques et des biomarqueurs par spectrométrie de masse. Thèse de doctorat en chimie analytique. Paris : université Pierre et Marie curie, 2008,p 275.
- (46). **A. Covic Æ M. K. Kuhlmann**. Biosimilars: recent developments. *Int Urol Nephrol*, 2007, 39:p261–266.
- (47). **J-H.TROUVIN**, association de pharmacie hospitalière de l'île de France. Les produits issus des biotechnologies : principes, qualité, risques, conséquences réglementaires, avril 2008.
- (48). De Fronzo RA, et al: Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance ; *Am J Physiol* 237: E214-E223, 1979
- (49). CHMP, Avis rendu lors de la réunion du 26 Juin 2014 ; disponible sur <http://ansm.sante.fr/Sinformer/Actualite/Abasria-insuline-glargine-Clopidogrel-ASATeva-Daklinza-daclastavir-Velphoro-Vizamylflutemetamol-f-18-Triumeq-abacavir-dolutegravir-lamivudine-retour-sur-la-reunion-de-juin-2014-du-CHMPPoint-d-information>
- (50). EMA ; Scientific Discussions about ovaleap ; disponible sur [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Scientific\\_Discussion/human/002608/WC500152908.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/002608/WC500152908.pdf)
- (51). Elalamy I. ; Heparines : structure, propriétés pharmacologiques et activités ; 2012 disponible sur <http://fmc.med.univ-tours.fr/Pages/Hemato/DES/A23-Heparine.pdf>
- (52). FDA ; Generics Exonaparine : Questions and Answers ; disponible sur <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm220037.htm>

- (53). B.Glauser; B.Vairo; S.Oliveira; L. Cinelli; M. Pereira, P.Mourão ; Structure and haemostatic effects of generic versions of enoxaparin available for clinical use in Brazil: Similarity to the original drug ; *ThrombHaemost* ; 2012; 107: 302–314
- (54). Jeske W., Walenga J ; Hoppensteadt D., Fareed J. ; Update on the safety and bioequivalence of biosimilars focus on enoxaparin ; *Drug, Healthcare and Patient Safety* ; 2013 ; 5 ; 133-141
- (55). Jeske Wp et Al. ; Assays Depend on Variations in the Anticoagulant and Protamine Sulfate Neutralization profiles of Generic Copies of Enoxaparin ; *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2006 108 Poster Board #-Session: 36-I
- (56). Benhalima M. et Al. ; Les copies du Lovenox sont-elles à considérer comme des génériques ou des biosimilaires ? ; *Société Algérienne de Médecine Vasculaire* 2009 disponible sur <http://www.samevdz.com/site/news.php>
- (57). Kaffenberger BH1, Bekaii-Saab T. ; Recurrent life-threatening deep tissue hematomas after switching to generic enoxaparin: a report and perspective on the approval process for biological compounds ; *Clin Appl Thromb Hemost*. 2012 Jan-Feb; 18 (1):104-6.
- (58). J-L. Prugnaud, J-H. Trouvin, *Les biosimilaires*, Springer, 2011.
- (59). Pharmacopée Européenne, Produits obtenus par la méthode dite de l'ADN recombinant, 2008.
- (60). World Health Organization, Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology, 2013.
- (61). J. Zhang, "Mammalian Cell Culture for Biopharmaceutical Production," in *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, ASM Press, 2010.
- (62). C. Fusi, "Les biosimilaires dans les moindres détails," *Le Moniteur des pharmacies*, n° 2974, Mars 2013.
- (63). ICH, ICH Topic Q 5 D Quality of Biotechnological Products: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products, 1998.
- (64). M. Pohlscheidt, S. Charaniya, C. Bork et al, Part V Process Analytical Technologies (PAT) - Bioprocess and fermentation monitoring, 2013.
- (65). M. A. Schenerman, B. R. Sunday, S. Kozlowski et al, "CMC Strategy Forum Report: Analysis and Structure Characterization of Monoclonal Antibodies," *BioProcess Technical*, 2004.
- (66). P. Seymour, S. Dana Jones, H. L. Levine, "Technology Transfer of CMC Activities for MAb Manufacturing," *BioProcess International*, 2010.
- (67). Seymour P. ; The Challenges of Demonstrating Comparability of Biosimilar Products ; *Bio Process Technology Consultants, Bioprocess Theater* ; May 5, 2010 disponible sur [http://www.bptc.com/sites/default/files/presentations/seymour\\_biosimilar\\_products\\_bio2010.pdf](http://www.bptc.com/sites/default/files/presentations/seymour_biosimilar_products_bio2010.pdf)
- (68). EMA; Guideline on comparability of medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues; 2003.
- (69). EMA; Guideline on comparability of biotechnology-derived medicinal products after a change in the manufacturing process; 2007.

- (70). ICH Guideline E5; Comparability of biotechnological/biological products subject to change in their manufacturing process.
- (71). Kaiser R. ; Comparability Studies : The Keys to a Biosimilar's Success ; Biopharmaceutical Solution ; Covance Webinar ; [http://www.business-review-webinars.com/webinar-slides/Covance Webinar 27-11-2012.pdf](http://www.business-review-webinars.com/webinar-slides/Covance_Webinar_27-11-2012.pdf)
- (72). Schellekens H. ;Biosimilarstherapeutics : what do we need to consider ? ; Nephrology Dialysis Transplantation ; 2009 ; 2 (supp 1) ; 27-36
- (73). Weise M. et al. ; Biosimilars : what clinicians should know ; *Blood Journal* ; December 2012 ; 120 (26) ;5111-5116 ; 1528-0020
- (74). Nick C ; Considerations in the clinical development of biotech medicines ; Regulatory Rapporteur ; January 2013 ; 10(1) ; 5-7
- (75). Bui L., Taylor C. ; Developing Clinical Trials for Biosimilars ; Seminars in Oncology ; Février 2014 ; 41 (S1) ; S15-S25
- (76). Dranitsaris G. et Al ; ; Clinical Trial Design in biosimilar drug development ; Invest New Drug ; 2013 ; 31 ; 479-487
- (77). Fletcher M. ; Biosimilars clinical development program: Confirmatory clinical trials: A virtual/simulated case study comparing equivalence and non-inferiority approaches ;Biologicals ; 2011 ; 39; 270-277
- (78). Population n'incluant que les patients n'ayant pas eu de changement/arrêt de traitement, ni violation de protocole.
- (79). Population incluant tous les patients randomisés, dans leur groupe de randomisation.
- (80). Njue C. ; Statistical consideration for confirmatory clinical trials for similar biotherapeutic products ; Biologicals ; 2011 ; 39 ; 266-269
- (81). MiEF& ISDB ; Copies des médicaments issus de biotechnologies (« biosimilaires ») : l'agence européenne évolue timidement vers plus de pragmatisme ; Réponse conjointe à la consultation de l'EMA ; 31 Octobre 2013 disponible sur <http://www.prescrire.org/Docu/DOCSEUROPE/20131031EMAbiosimilarsFR>.
- (82). Editorial Nature Biotechnology ; Building a wall against biosimilars ; Nature Biotechnology ; Avril 2013 ; 31 (4) : 264
- (83). Prescrire Redaction ; « L'invention du « biogénérique » : une autre arme au service du protectionnisme industriel » : *Revue Prescrire* ; 2003 ; 23 (244) ; 742
- (84). Abraham J. ; Developing Oncology Biosimilars : An Essential Approach for the future ; seminars in Oncology ; Decembre 2013 ; 40 (6) Supp 1 ; S5-S24
- (85). **Le Cottonec.J.-Y, Lawny.F**, L'importance de la qualité en Biotechnologie : le cas du 1er biosimilaire de l'EPO, *Néphrologie & Thérapeutiques*, 2009, vol.5, p.10-15.
- (86). **PH. ARNAUD**, Les médicaments biosimilaires, *officiel santé*, juin/juillet 2008, page 33
- (87). **R. BOTTER et G. BOUCHOUX**, spectrométrie de masse, Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation, 1996, p. 3-5
- (88). **M.DUBOIS**. Développement de techniques analytiques pour l'évaluation des protéines thérapeutiques et des biomarqueurs par spectrométrie de masse. Thèse de doctorat en chimie analytique. Paris : université Pierre et Marie curie, 2008,p 275.

- (89). **CONSEILE EUROPE**, Dichroïsme circulaire. Pharmacopée 6T Edition supplement S 2010, supp,6,6.7 . p70
- (90). **C.ABBAS.QUINTERNET**. Synthèse et études structurales de nouveaux 2 : [ $\alpha/aza$ ]-oligomères, vers de nouveaux foldamères. Thèse de doctorat polytechnique, Nancy : Université Nancy, 2009, p 94.
- (91). **J.HENKEL et al**, Essentials of drug product quality. 1981, *Journal of Pharmaceutical Sciences* .Vol 70, Issue 3, p348,
- (92). **S.MAIER**. *Plasmonics: Fundamentals and Applications*. Springer.2007,p 223 ISBN978-0387331508.
- (93). **T.MALLIAVIN, F.DAREL**, structure des protéines par RMN, Base documentaire techniques de l'ingénieur, Réf : AF6608, 10 jan, 2002.
- (94). **J. CAVARELLI**, Détermination des structures 3D des macromolécules biologiques par diffraction X .Partie 1, Base documentaire technique de l'ingénieur, Référence P1110, 2009, p 30.
- (95). **GREGORY A, et al** .Structure et fonction des protéines chapitre II de la structure) la fonction. De Boeck Université, 2008, p.77-81
- (96). **C.GREY, P.Edebrink, M.KROOK, S. P. JACOBSSON** ,Development of a high performance anion exchange chromatography analysis for mapping of oligosaccharides, *Journal of Chromatography B*, 2009, 877, p.1827–1832.
- (97). **DIONIX Corporation**. Optimal Settings for Pulsed Amperometric Detection of Carbohydrates Using the Dionex ED40 Electrochemical Detector, 2010,Technical Note 21, p.1-4
- (98). **V.BRINKS**, Quality of Original and biosimilar Epoetin Products, *Pharma research*, pages 1-7,octobre 2010.
- (99). **I.LE POTIER, M.TAVERNA, Ph. MORIN**.Electrophorèse capillaire-Principe,Base Documentaire :Techniques de l'ingénieur, 2003, Référence P3365.
- (100). **Infochroma**, dossier technique sur la RP-HPLC <http://www.infochroma.ch>.
- (101). **P.GAREIL, G. PELTRE**, ELECTROPHORESE, base documentaire : techniques de l'ingénieur, 1995, Référence P1815.
- (102). **T.Q. Nguyen**, Chromatographie en phase liquide des polymères synthétiques : principes et applications, *ANALYSIS MAGAZINE*, 1998, 26, N° 2.p35-41.
- (103). **L.BARDET**, Base documentaire Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation. noP1405, 2000, vol. P2, 2000. p1405.1430.
- (104). **C.GENEAU**. procede d'elaboration d'agromateriau composite naturel par extrusion bavis et injection moulage de tourteau de tournesol.Toulouse. doctorat en polytechniques 2006.p 31-32.
- (105). site officiel de FRATER-RAZES\*
- (106). Thème de mémoire : Bilan 2012sur l'utilisation des biosimilaires ; un équivalent du biomédicament de référence ou g énérique biologique .page 52 (recommandation réglementaires). Faculté de la pharmacie,université de lorraine.
- (107). VIDAL, basedes données en ligne.



# Serment de Galien



**« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :**



**D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.**



**D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.**



**De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**



**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».**

