

UNIVERSITE MOHAMMED V
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE -RABAT-

ANNEE : 2011

THESE N°:02

LES BIOSIMILAIRES : REGLEMENTATION,
DEVELOPPEMENT, ET METHODES DE CÔNTRÔLE.

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le :.....

PAR

Mr. ADIB Mourad

Né le 18 Septembre 1985 à Casablanca

Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie

MOTS CLES : Biosimilaires – Réglementation– Développement –Contrôle–
Méthodes Analytiques– Érythropoïétine.

JURY

Mr. M. ZOUHDI

Professeur de microbiologie

Mr. Y. CHERRAH

Professeur de pharmacologie

Mr. S. MRANI

Professeur agrégé de Virologie

Mr. A. IBRAHIMI

Professeur habilité de Biotechnologie

Mme. S. MOUSANNIF

Membre associé

PRESIDENT

RAPPORTEUR

JUGES



سبحانك لا علم لنا إلا
ما علمتنا إنك أنت
العليم الحكيم

و

سورة البقرة: الآية: 31

اللهم إنا نسألك علما نافعا
وقلبا خاشعا وشفاءا من كل
داء وسقم



UNIVERSITE MOHAMMED V- SOUISSI
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT

DOYENS HONORAIRES :

1962 – 1969 : Docteur Abdelmalek FARAJ

1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH
1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK
1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI
1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI

ADMINISTRATION :

Doyen : Professeur Najia HAJJAJ
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et estudiantines
Professeur Mohammed JIDDANE
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
Professeur Ali BENOMAR
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
Professeur Yahia CHERRAH
Secrétaire Général : Mr. El Hassane AHALLAT

PROFESSEURS :

Février, Septembre, Décembre 1973

1. Pr. CHKILI Taieb

Neuropsychiatrie

Janvier et Décembre 1976

2. Pr. HASSAR Mohamed

Pharmacologie Clinique

Mars, Avril et Septembre 1980

3. Pr. EL KHAMLICHI Abdeslam

Neurochirurgie

.. Pr. MESBAHI Redouane

Cardiologie

Mai et Octobre 1981

5. Pr. BOUZOUBAA Abdelmajid

Cardiologie

6. Pr. EL MANOUAR Mohamed

Traumatologie-Orthopédie

7. Pr. HAMANI Ahmed*

Cardiologie

8. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih

Chirurgie Cardio-Vasculaire

9. Pr. SBIHI Ahmed

Anesthésie – Réanimation

.. Pr. TAOBANE Hamid*

Chirurgie Thoracique

Mai et Novembre 1982

11. Pr. ABROUQ Ali*

Oto-Rhino-Laryngologie

12. Pr. BENOMAR M'hammed

Chirurgie-Cardio-Vasculaire

13. Pr. BENSOUA Mohamed

Anatomie

14. Pr. BENOSMAN Abdellatif

Chirurgie Thoracique

15. Pr. LAHBABI ép. AMRANI Naïma

Physiologie

Novembre 1983

16. Pr. ALAOUI TAHIRI Kébir*
17. Pr. BALAFREJ Amina
18. Pr. BELLAKHDAR Fouad
19. Pr. HAJAJ ép. HASSOUNI Najia
20. Pr. SRAIRI Jamal-Eddine

Pneumo-ptisiologie
Pédiatrie
Neurochirurgie
Rhumatologie
Cardiologie

Décembre 1984

21. Pr. BOUCETTA Mohamed*
22. Pr. EL GUEDDARI Brahim El Khalil
23. Pr. MAAOUNI Abdelaziz
24. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi
25. Pr. NAJI M'Barek *
26. Pr. SETTAF Abdellatif

Neurochirurgie
Radiothérapie
Médecine Interne
Anesthésie -Réanimation
Immuno-Hématologie
Chirurgie

Novembre et Décembre 1985

27. Pr. BENJELLOUN Halima
28. Pr. BENSALD Younes
29. Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa
30. Pr. IHRAI Hssain *
31. Pr. IRAQI Ghali
- Pr. KZADRI Mohamed

Cardiologie
Pathologie Chirurgicale
Neurologie
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale
Pneumo-ptisiologie
Oto-Rhino-laryngologie

Janvier, Février et Décembre 1987

33. Pr. AJANA Ali
34. Pr. AMMAR Fanid
35. Pr. CHAHED OUZZANI Houria ép.TAOBANE
36. Pr. EL FASSY FIHRI Mohamed Taoufiq
37. Pr. EL HAITEM Naïma
38. Pr. EL MANSOURI Abdellah*
39. Pr. EL YAACOUBI Moradh
40. Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah
41. Pr. LACHKAR Hassan
42. Pr. OHAYON Victor*
- Pr. YAHYAOUY Mohamed

Radiologie
Pathologie Chirurgicale
Gastro-Entérologie
Pneumo-ptisiologie
Cardiologie
Chimie-Toxicologie Expertise
Traumatologie Orthopédie
Gastro-Entérologie
Médecine Interne
Médecine Interne
Neurologie

Décembre 1988

44. Pr. BENHAMAMOUCHE Mohamed Najib
45. Pr. DAFIRI Rachida
46. Pr. FAIK Mohamed
47. Pr. HERMAS Mohamed
- Pr. TOLOUNE Farida*

Chirurgie Pédiatrique
Radiologie
Urologie
Traumatologie Orthopédie
Médecine Interne

Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990

49. Pr. ADNAOUI Mohamed
50. Pr. AOUNI Mohamed
51. Pr. BENAMEUR Mohamed*
52. Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali
53. Pr. CHAD Bouziane
54. Pr. CHKOFF Rachid
55. Pr. FARCHADO Fouzia ép.BENABDELLAH
56. Pr. HACHIM Mohammed*
57. Pr. HACHIMI Mohamed

Médecine Interne
Médecine Interne
Radiologie
Cardiologie
Pathologie Chirurgicale
Pathologie Chirurgicale
Pédiatrique
Médecine-Interne
Urologie

58. Pr. KHARBACH Aïcha
 59. Pr. MANSOURI Fatima
 60. Pr. OUZZANI Taïbi Mohamed Réda
 61. Pr. SEDRATI Omar*
 62. Pr. TAZI Saoud Anas

Gynécologie -Obstétrique
 Anatomie-Pathologique
 Neurologie
 Dermatologie
 Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

63. Pr. AL HAMANY Zaitounia
 64. Pr. ATMANI Mohamed*
 65. Pr. AZZOUZI Abderrahim
 66. Pr. BAYAHIA Rabéa ép. HASSAM
 67. Pr. BELKOUCHI Abdelkader
 68. Pr. BENABDELLAH Chahrazad
 69. Pr. BENCHEKROUN BELABBES Abdellatif
 70. Pr. BENSOUHA Yahia
 71. Pr. BERRAHO Amina
 72. Pr. BEZZAD Rachid
 73. Pr. CHABRAOUI Layachi
 74. Pr. CHANA El Houssaine*
 75. Pr. CHERRAH Yahia
 76. Pr. CHOKAIRI Omar
 77. Pr. FAJRI Ahmed*
 78. Pr. JANATI Idrissi Mohamed*
 79. Pr. KHATTAB Mohamed
 80. Pr. NEJMI Maati
 81. Pr. OUAALINE Mohammed*
 82. Pr. SOULAYMANI Rachida ép. BENCHEIKH
 83. Pr. TAOUFIK Jamal

Anatomie-Pathologique
 Anesthésie Réanimation
 Anesthésie Réanimation
 Néphrologie
 Chirurgie Générale
 Hématologie
 Chirurgie Générale
 Pharmacie galénique
 Ophtalmologie
 Gynécologie Obstétrique
 Biochimie et Chimie
 Ophtalmologie
 Pharmacologie
 Histologie Embryologie
 Psychiatrie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Anesthésie-Réanimation
 Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
 Pharmacologie
 Chimie thérapeutique

Décembre 1992

84. Pr. AHALLAT Mohamed
 85. Pr. BENOUDA Amina
 86. Pr. BENSOUHA Adil
 87. Pr. BOUJIDA Mohamed Najib
 88. Pr. CHAHED OUZZANI Laaziza
 89. Pr. CHRAIBI Chafiq
 90. Pr. DAOUDI Rajae
 91. Pr. DEHAYNI Mohamed*
 92. Pr. EL HADDOURY Mohamed
 93. Pr. EL OUAHABI Abdessamad
 94. Pr. FELLAT Rokaya
 95. Pr. GHAFIR Driss*
 96. Pr. JIDDANE Mohamed
 97. Pr. OUZZANI TAIBI Med Charaf Eddine
 98. Pr. TAGHY Ahmed
 99. Pr. ZOUHDI Mimoun

Chirurgie Générale
 Microbiologie
 Anesthésie Réanimation
 Radiologie
 Gastro-Entérologie
 Gynécologie Obstétrique
 Ophtalmologie
 Gynécologie Obstétrique
 Anesthésie Réanimation
 Neurochirurgie
 Cardiologie
 Médecine Interne
 Anatomie
 Gynécologie Obstétrique
 Chirurgie Générale
 Microbiologie

Mars 1994

100. Pr. AGNAOU Lahcen
 101. Pr. AL BAROUDI Saad
 102. Pr. BENCHERIFA Fatiha

Ophtalmologie
 Chirurgie Générale
 Ophtalmologie

103.	Pr. BENJAAFAR Nouredine	Radiothérapie
104.	Pr. BENJELLOUN Samir	Chirurgie Générale
105.	Pr. BEN RAIS Nozha	Biophysique
106.	Pr. CAOUI Malika	Biophysique
107.	Pr. CHRAIBI Abdelmjid	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
108.	Pr. EL AMRANI Sabah ép. AHALLAT	Gynécologie Obstétrique
109.	Pr. EL AOUDAD Rajae	Immunologie
110.	Pr. EL BARDOUNI Ahmed	Traumato-Orthopédie
111.	Pr. EL HASSANI My Rachid	Radiologie
112.	Pr. EL IDRISSE LAMGHARI Abdennaceur	Médecine Interne
113.	Pr. EL KIRAT Abdelmajid*	Chirurgie Cardio- Vasculaire
114.	Pr. ERROUGANI Abdelkader	Chirurgie Générale
115.	Pr. ESSAKALI Malika	Immunologie
116.	Pr. ETTAYEBI Fouad	Chirurgie Pédiatrique
117.	Pr. HADRI Larbi*	Médecine Interne
118.	Pr. HASSAM Badredine	Dermatologie
119.	Pr. IFRINE Lahssan	Chirurgie Générale
120.	Pr. JELTHI Ahmed	Anatomie Pathologique
121.	Pr. MAHFOUD Mustapha	Traumatologie – Orthopédie
122.	Pr. MOUDENE Ahmed*	Traumatologie- Orthopédie
123.	Pr. OULBACHA Said	Chirurgie Générale
124.	Pr. RHRAB Brahim	Gynécologie –Obstétrique
125.	Pr. SENOUCI Karima ép. BELKHADIR	Dermatologie
126.	Pr. SLAOUI Anas	Chirurgie Cardio-Vasculaire

Mars 1994

127.	Pr. ABBAR Mohamed*	Urologie
128.	Pr. ABDELHAK M'barek	Chirurgie – Pédiatrique
129.	Pr. BELAIDI Halima	Neurologie
130.	Pr. BRAHMI Rida Slimane	Gynécologie Obstétrique
131.	Pr. BENTAHILA Abdelali	Pédiatrie
132.	Pr. BENYAHIA Mohammed Ali	Gynécologie – Obstétrique
133.	Pr. BERRADA Mohamed Saleh	Traumatologie – Orthopédie
134.	Pr. CHAMI Ilham	Radiologie
135.	Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae	Ophtalmologie
136.	Pr. EL ABBADI Najia	Neurochirurgie
137.	Pr. HANINE Ahmed*	Radiologie
138.	Pr. JALIL Abdelouahed	Chirurgie Générale
139.	Pr. LAKHDAR Amina	Gynécologie Obstétrique
140.	Pr. MOUANE Nezha	Pédiatrie

Mars 1995

141.	Pr. ABOUQUAL Redouane	Réanimation Médicale
142.	Pr. AMRAOUI Mohamed	Chirurgie Générale
143.	Pr. BAIDADA Abdelaziz	Gynécologie Obstétrique
144.	Pr. BARGACH Samir	Gynécologie Obstétrique
145.	Pr. BEDDOUCHE Amocrane*	Urologie
146.	Pr. BENZAOUZ Mustapha	Gastro-Entérologie
147.	Pr. CHAARI Jilali*	Médecine Interne
148.	Pr. DIMOU M'barek*	Anesthésie Réanimation
149.	Pr. DRISSI KAMILI Mohammed Nordine*	Anesthésie Réanimation

150. Pr. EL MESNAOUI Abbas
151. Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
152. Pr. FERHATI Driss
153. Pr. HASSOUNI Fadil
154. Pr. HDA Abdelhamid*
155. Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
156. Pr. IBRAHIMY Wafaa
157. Pr. MANSOURI Aziz
158. Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
159. Pr. RZIN Abdelkader*
160. Pr. SEFIANI Abdelaziz
161. Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Chirurgie Générale
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Gynécologie Obstétrique
 Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
 Cardiologie
 Urologie
 Ophtalmologie
 Radiothérapie
 Ophtalmologie
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Génétique
 Réanimation Médicale

Décembre 1996

162. Pr. AMIL Touriya*
163. Pr. BELKACEM Rachid
164. Pr. BELMAHI Amin
165. Pr. BOULANOUAR Abdelkrim
166. Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
167. Pr. EL MELLOUKI Ouafae*
168. Pr. GAOUZI Ahmed
169. Pr. MAHFOUDI M'barek*
170. Pr. MOHAMMADINE EL Hamid
171. Pr. MOHAMMADI Mohamed
172. Pr. MOULINE Soumaya
173. Pr. OUADGHIRI Mohamed
174. Pr. OUZEDDOUN Naima
175. Pr. ZBIR EL Mehdi*

Radiologie
 Chirurgie Pédiatrie
 Chirurgie réparatrice et plastique
 Ophtalmologie
 Chirurgie Générale
 Parasitologie
 Pédiatrie
 Radiologie
 Chirurgie Générale
 Médecine Interne
 Pneumo-phtisiologie
 Traumatologie-Orthopédie
 Néphrologie
 Cardiologie

Novembre 1997

176. Pr. ALAMI Mohamed Hassan
177. Pr. BEN AMAR Abdesselem
178. Pr. BEN SLIMANE Lounis
179. Pr. BIROUK Nazha
180. Pr. BOULAICH Mohamed
181. Pr. CHAOUIR Souad*
182. Pr. DERRAZ Said
183. Pr. ERREIMI Naima
184. Pr. FELLAT Nadia
185. Pr. GUEDDARI Fatima Zohra
186. Pr. HAIMEUR Charki*
187. Pr. KANOUNI NAWAL
188. Pr. KOUTANI Abdellatif
189. Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
190. Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
191. Pr. NAZI M'barek*
192. Pr. OUAHABI Hamid*
193. Pr. SAFI Lahcen*
194. Pr. TAOUFIQ Jallal
195. Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Gynécologie-Obstétrique
 Chirurgie Générale
 Urologie
 Neurologie
 O.RL.
 Radiologie
 Neurochirurgie
 Pédiatrie
 Cardiologie
 Radiologie
 Anesthésie Réanimation
 Physiologie
 Urologie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Cardiologie
 Neurologie
 Anesthésie Réanimation
 Psychiatrie
 Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

196. Pr. AFIFI RAJAA
197. Pr. AIT BENASSER MOULAY Ali*
198. Pr. ALOUANE Mohammed*
199. Pr. BENOMAR ALI
200. Pr. BOUGTAB Abdesslam
201. Pr. ER RIHANI Hassan
202. Pr. EZZAITOUNI Fatima
203. Pr. KABBAJ Najat
204. Pr. LAZRAK Khalid (M)

Novembre 1998

205. Pr. BENKIRANE Majid*
206. Pr. KHATOURI ALI*
207. Pr. LABRAIMI Ahmed*

Janvier 2000

208. Pr. ABID Ahmed*
209. Pr. AIT OUMAR Hassan
210. Pr. BENCHERIF My Zahid
211. Pr. BENJELLOUN DAKHAMA Badr.Sououd
212. Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
213. Pr. CHAOUI Zineb
214. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
215. Pr. ECHARRAB El Mahjoub
216. Pr. EL FTOUH Mustapha
217. Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
218. Pr. EL OTMANYAzzedine
219. Pr. GHANNAM Rachid
220. Pr. HAMMANI Lahcen
221. Pr. ISMAILI Mohamed Hatim
222. Pr. ISMAILI Hassane*
223. Pr. KRAMI Hayat Ennoufouss
224. Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
225. Pr. TACHINANTE Rajae
226. Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Novembre 2000

227. Pr. AIDI Saadia
228. Pr. AIT OURHROUI Mohamed
229. Pr. AJANA Fatima Zohra
230. Pr. BENAMR Said
231. Pr. BENCHEKROUN Nabiha
232. Pr. CHERTI Mohammed
233. Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
234. Pr. EL HASSANI Amine
235. Pr. EL IDGHIRI Hassan
236. Pr. EL KHADER Khalid
237. Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
238. Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
239. Pr. HSSAIDA Rachid*

Gastro-Entérologie
Pneumo-phtisiologie
Oto-Rhino-Laryngologie
Neurologie
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Néphrologie
Radiologie
Traumatologie Orthopédie

Hématologie
Cardiologie
Anatomie Pathologique

Pneumophtisiologie
Pédiatrie
Ophtalmologie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Traumatologie Orthopédie
Gastro-Entérologie
Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne

Neurologie
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Ophtalmologie
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie
Oto-Rhino-Laryngologie
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Anesthésie-Réanimation

240. Pr. LACHKAR Azzouz
 241. Pr. LAHLOU Abdou
 242. Pr. MAFTAH Mohamed*
 243. Pr. MAHASSINI Najat
 244. Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
 245. Pr. NASSIH Mohamed*
 246. Pr. ROUMI Abdelhadi

Urologie
 Traumatologie Orthopédie
 Neurochirurgie
 Anatomie Pathologique
 Pédiatrie
 Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-Faciale
 Neurologie

Décembre 2001

247. Pr. ABABOU Adil
 248. Pr. AOUAD Aicha
 249. Pr. BALKHI Hicham*
 250. Pr. BELMEKKI Mohammed
 251. Pr. BENABDELJLIL Maria
 252. Pr. BENAMAR Loubna
 253. Pr. BENAMOR Jouda
 254. Pr. BENELBARHDADI Imane
 255. Pr. BENNANI Rajae
 256. Pr. BENOUACHANE Thami
 257. Pr. BENYOUSSEF Khalil
 258. Pr. BERRADA Rachid
 259. Pr. BEZZA Ahmed*
 260. Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
 261. Pr. BOUHOUCHE Rachida
 262. Pr. BOUMDIN El Hassane*
 263. Pr. CHAT Latifa
 264. Pr. CHELLAOUI Mounia
 265. Pr. DAALI Mustapha*
 266. Pr. DRISSI Sidi Mourad*
 267. Pr. EL HAJOUI Ghziel Samira
 268. Pr. EL HIJRI Ahmed
 269. Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
 270. Pr. EL MADHI Tarik
 271. Pr. EL MOUSSAIF Hamid
 272. Pr. EL OUNANI Mohamed
 273. Pr. EL QUESSAR Abdeljlil
 274. Pr. ETTAIR Said
 275. Pr. GAZZAZ Miloudi*
 276. Pr. GOURINDA Hassan
 277. Pr. HRORA Abdelmalek
 278. Pr. KABBAJ Saad
 279. Pr. KABIRI EL Hassane*
 280. Pr. LAMRANI Moulay Omar
 281. Pr. LEKEHAL Brahim
 282. Pr. MAHASSIN Fattouma*
 283. Pr. MEDARHRI Jalil
 284. Pr. MIKDAME Mohammed*
 285. Pr. MOHSINE Raouf
 286. Pr. NABIL Samira
 287. Pr. NOUINI Yassine
 288. Pr. OUALIM Zouhir*
 289. Pr. SABBAAH Farid
 290. Pr. SEFIANI Yasser
 291. Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Anesthésie-Réanimation
 Cardiologie
 Anesthésie-Réanimation
 Ophtalmologie
 Neurologie
 Néphrologie
 Pneumo-phtisiologie
 Gastro-Entérologie
 Cardiologie
 Pédiatrie
 Dermatologie
 Gynécologie Obstétrique
 Rhumatologie
 Anatomie
 Cardiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Chirurgie Générale
 Radiologie
 Gynécologie Obstétrique
 Anesthésie-Réanimation
 Neuro-Chirurgie
 Chirurgie-Pédiatrique
 Ophtalmologie
 Chirurgie Générale
 Radiologie
 Pédiatrie
 Neuro-Chirurgie
 Chirurgie-Pédiatrique
 Chirurgie Générale
 Anesthésie-Réanimation
 Chirurgie Thoracique
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Médecine Interne
 Chirurgie Générale
 Hématologie Clinique
 Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Urologie
 Néphrologie
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Pédiatrie

292. Pr. TAZI MOUKHA Karim
Décembre 2002
 293. Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
 294. Pr. AMEUR Ahmed *
 295. Pr. AMRI Rachida
 296. Pr. AOURARH Aziz*
 297. Pr. BAMOU Youssef *
 298. Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
 299. Pr. BENBOUAZZA Karima
 300. Pr. BENZEKRI Laila
 301. Pr. BENZZOUBEIR Nadia*
 302. Pr. BERNOUSSI Zakiya
 303. Pr. BICHRA Mohamed Zakariya
 304. Pr. CHOHO Abdelkrim *
 305. Pr. CHKIRATE Bouchra
 306. Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
 307. Pr. EL ALJ Haj Ahmed
 308. Pr. EL BARNOUSSI Leila
 309. Pr. EL HAOURI Mohamed *
 310. Pr. EL MANSARI Omar*
 311. Pr. ES-SADEL Abdelhamid
 312. Pr. FILALI ADIB Abdelhai
 313. Pr. HADDOUR Leila
 314. Pr. HAJJI Zakia
 315. Pr. IKEN Ali
 316. Pr. ISMAEL Farid
 317. Pr. JAAFAR Abdeloiihab*
 318. Pr. KRIOULE Yamina
 319. Pr. LAGHMARI Mina
 320. Pr. MABROUK Hfid*
 321. Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
 322. Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid*
 323. Pr. MOUSTAINE My Rachid
 324. Pr. NAITLHO Abdelhamid*
 325. Pr. OUJILAL Abdelilah
 326. Pr. RACHID Khalid *
 327. Pr. RAISS Mohamed
 328. Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
 329. Pr. RHOU Hakima
 330. Pr. SIAH Samir *
 331. Pr. THIMOU Amal
 332. Pr. ZENTAR Aziz*
 333. Pr. ZRARA Ibtisam*

PROFESSEURS AGREGES :

Janvier 2004

334. Pr. ABDELLAH El Hassan
 335. Pr. AMRANI Mariam
 336. Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
 337. Pr. BENKIRANE Ahmed*

Urologie

Anatomie Pathologique
 Urologie
 Cardiologie
 Gastro-Entérologie
 Biochimie-Chimie
 Endocrinologie et Maladies Métaboliques
 Rhumatologie
 Dermatologie
 Gastro-Entérologie
 Anatomie Pathologique
 Psychiatrie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Chirurgie Pédiatrique
 Urologie
 Gynécologie Obstétrique
 Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Ophtalmologie
 Urologie
 Traumatologie Orthopédie
 Traumatologie Orthopédie
 Pédiatrie
 Ophtalmologie
 Traumatologie Orthopédie
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Traumatologie Orthopédie
 Médecine Interne
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Générale
 Pneumophtisiologie
 Néphrologie
 Anesthésie Réanimation
 Pédiatrie
 Chirurgie Générale
 Anatomie Pathologique

Ophtalmologie
 Anatomie Pathologique
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Gastro-Entérologie

338. Pr. BENRAMDANE Larbi*
 339. Pr. BOUGHALEM Mohamed*
 340. Pr. BOULAADAS Malik
 341. Pr. BOURAZZA Ahmed*
 342. Pr. CHAGAR Belkacem*
 343. Pr. CHERRADI Nadia
 344. Pr. EL FENNI Jamal*
 345. Pr. EL HANCHI ZAKI
 346. Pr. EL KHORASSANI Mohamed
 347. Pr. EL YOUNASSI Badreddine*
 348. Pr. HACHI Hafid
 349. Pr. JABOUIRIK Fatima
 350. Pr. KARMANE Abdelouahed
 351. Pr. KHABOUZE Samira
 352. Pr. KHARMAZ Mohamed
 353. Pr. LEZREK Mohammed*
 354. Pr. MOUGHIL Said
 355. Pr. NAOUMI Asmae*
 356. Pr. SAADI Nozha
 357. Pr. SASSENOU ISMAIL*
 358. Pr. TARIB Abdelilah*
 359. Pr. TIJAMI Fouad
 360. Pr. ZARZUR Jamila

Chimie Analytique
 Anesthésie Réanimation
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Neurologie
 Traumatologie Orthopédie
 Anatomie Pathologique
 Radiologie
 Gynécologie Obstétrique
 Pédiatrie
 Cardiologie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Ophtalmologie
 Gynécologie Obstétrique
 Traumatologie Orthopédie
 Urologie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire
 Ophtalmologie
 Gynécologie Obstétrique
 Gastro-Entérologie
 Pharmacie Clinique
 Chirurgie Générale
 Cardiologie

Janvier 2005

361. Pr. ABBASSI Abdellah
 362. Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
 363. Pr. ALAOUI Ahmed Essaid
 364. Pr. ALLALI Fadoua
 365. Pr. AMAR Yamama
 366. Pr. AMAZOUZI Abdellah
 367. Pr. AZIZ Nouredine*
 368. Pr. BAHIRI Rachid
 369. Pr. BARKAT Amina
 370. Pr. BENHALIMA Hanane
 371. Pr. BENHARBIT Mohamed
 372. Pr. BENYASS Aatif
 373. Pr. BERNOUSSI Abdelghani
 374. Pr. BOUKLATA Salwa
 375. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed
 376. Pr. DOUDOUH Abderrahim*
 377. Pr. EL HAMZAOUI Sakina
 378. Pr. HAJJI Leila
 379. Pr. HESSISSEN Leila
 380. Pr. JIDAL Mohamed*
 381. Pr. KARIM Abdelouahed
 382. Pr. KENDOUCI Mohamed*
 383. Pr. LAAROUCI Mohamed
 384. Pr. LYAGOUBI Mohammed
 385. Pr. NIAMANE Radouane*

Chirurgie Réparatrice et Plastique
 Chirurgie Générale
 Microbiologie
 Rhumatologie
 Néphrologie
 Ophtalmologie
 Radiologie
 Rhumatologie
 Pédiatrie
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale
 Ophtalmologie
 Cardiologie
 Ophtalmologie
 Radiologie
 Ophtalmologie
 Biophysique
 Microbiologie
 Cardiologie
 Pédiatrie
 Radiologie
 Ophtalmologie
 Cardiologie
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Parasitologie
 Rhumatologie

386. Pr. RAGALA Abdelhak
 387. Pr. SBIHI Souad
 388. Pr. TNACHERI OUAZZANI Btissam
 389. Pr. ZERAIDI Najia

AVRIL 2006

423. Pr. ACHEMLAL Lahsen*
 424. Pr. AFIFI Yasser
 425. Pr. AKJOUJ Said*
 426. Pr. BELGNAOUI Fatima Zahra
 427. Pr. BELMEKKI Abdelkader*
 428. Pr. BENCHEIKH Razika
 429. Pr. BIYI Abdelhamid*
 430. Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
 431. Pr. BOULAHYA Abdellatif*
 432. Pr. CHEIKHAOUI Younes
 433. Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
 434. Pr. DOGHMI Nawal
 435. Pr. ESSAMRI Wafaa
 436. Pr. FELLAT Ibtiham
 437. Pr. FAROUDY Mamoun
 438. Pr. GHADOUANE Mohammed*
 439. Pr. HARMOUCHE Hicham
 440. Pr. HANAFI Sidi Mohamed*
 441. Pr. IDRIS LAHLOU Amine
 442. Pr. JROUNDI Laila
 443. Pr. KARMOUNI Tariq
 444. Pr. KILI Amina
 445. Pr. KISRA Hassan
 446. Pr. KISRA Mounir
 447. Pr. KHARCHAFI Aziz*
 448. Pr. LAATIRIS Abdelkader*
 449. Pr. LMIMOUNI Badreddine*
 450. Pr. MANSOURI Hamid*
 451. Pr. NAZIH Naoual
 452. Pr. OUANASS Abderrazzak
 453. Pr. SAFI Soumaya*
 454. Pr. SEKKAT Fatima Zahra
 455. Pr. SEFIANI Sana
 456. Pr. SOUALHI Mouna
 457. Pr. TELLAL Saida*
 458. Pr. ZAHRAOUI Rachida

Octobre 2007

458. Pr. LARAQUI HOUSSEINI Leila
 459. Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
 460. Pr. MOUSSAOUI Abdelmajid
 461. Pr. LALAOU SALIM Jaafar *
 462. Pr. BAITE Abdelouahed *
 463. Pr. TOUATI Zakia
 464. Pr. OUZZIF Ez zohra *

Gynécologie Obstétrique
 Histo-Embryologie Cytogénétique
 Ophtalmologie
 Gynécologie Obstétrique

Rhumatologie
 Dermatologie
 Radiologie
 Dermatologie
 Hématologie
 O.R.L
 Biophysique
 Chirurgie - Pédiatrique
 Chirurgie Cardio – Vasculaire
 Chirurgie Cardio – Vasculaire
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Gastro-entérologie
 Cardiologie
 Anesthésie Réanimation
 Urologie
 Médecine Interne
 Anesthésie Réanimation
 Microbiologie
 Radiologie
 Urologie
 Pédiatrie
 Psychiatrie
 Chirurgie – Pédiatrique
 Médecine Interne
 Pharmacie Galénique
 Parasitologie
 Radiothérapie
 O.R.L
 Psychiatrie
 Endocrinologie
 Psychiatrie
 Anatomie Pathologique
 Pneumo – Phtisiologie
 Biochimie
 Pneumo – Phtisiologie

Anatomie pathologique
 Anesthésie réanimation
 Anesthésier réanimation
 Anesthésie réanimation
 Anesthésie réanimation
 Cardiologie
 Biochimie

465. Pr. BALOUCH Lhousaine *
 466. Pr. SELKANE Chakir *
 467. Pr. EL BEKKALI Youssef *
 468. Pr. AIT HOUSSA Mahdi *
 469. Pr. EL ABSI Mohamed
 470. Pr. EHIRCHIOU Abdelkader *
 471. Pr. ACHOUR Abdessamad*
 472. Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
 473. Pr. GHARIB Noureddine
 474. Pr. TABERKANET Mustafa *
 475. Pr. ISMAILI Nadia
 476. Pr. MASRAR Azlarab
 477. Pr. RABHI Monsef *
 478. Pr. MRABET Mustapha *
 479. Pr. SEKHSOKH Yessine *
 480. Pr. SEFFAR Myriame
 481. Pr. LOUZI Lhoussain *
 482. Pr. MRANI Saad *
 483. Pr. GANA Rachid
 484. Pr. ICHOU Mohamed *
 485. Pr. TACHFOUTI Samira
 486. Pr. BOUTIMZINE Nourdine
 487. Pr. MELLAL Zakaria
 488. Pr. AMMAR Haddou *
 489. Pr. AOUI Sarra
 490. Pr. TLIGUI Houssain
 491. Pr. MOUTAJ Redouane *
 492. Pr. ACHACHI Leila
 493. Pr. MARC Karima
 494. Pr. BENZIANE Hamid *
 495. Pr. CHERKAOUI Naoual *
 496. Pr. EL OMARI Fatima
 497. Pr. MAHI Mohamed *
 498. Pr. RADOUANE Bouchaib*
 499. Pr. KEBDANI Tayeb
 500. Pr. SIFAT Hassan *
 501. Pr. HADADI Khalid *
 502. Pr. ABIDI Khalid
 503. Pr. MADANI Naoufel
 504. Pr. TANANE Mansour *
 505. Pr. AMHAJJI Larbi *

Mars 2009

Pr. BIIJOU Younes
 Pr. AZENDOUR Hicham *
 Pr. BELYAMANI Lahcen *
 Pr. BOUHSAIN Sanae *
 Pr. OUKERRAJ Latifa
 Pr. LAMSAOURI Jamal *
 Pr. MARMADE Lahcen

Biochimie
 Chirurgie cardio vasculaire
 Chirurgie cardio vasculaire
 Chirurgie cardio vasculaire
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Chirurgie plastique
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Dermatologie
 Hématologie biologique
 Médecine interne
 Médecine préventive santé publique et hygiène
 Microbiologie
 Microbiologie
 Microbiologie
 Virologie
 Neuro chirurgie
 Oncologie médicale
 Ophtalmologie
 Ophtalmologie
 Ophtalmologie
 ORL
 Parasitologie
 Parasitologie
 Parasitologie
 Pneumo phtisiologie
 Pneumo phtisiologie
 Pharmacie clinique
 Pharmacie galénique
 Psychiatrie
 Radiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Radiothérapie
 Radiothérapie
 Radiothérapie
 Réanimation médicale
 Réanimation médicale
 Traumatologie orthopédie
 Traumatologie orthopédie

Anatomie
 Anesthésie Réanimation
 Anesthésie Réanimation
 Biochimie
 Cardiologie
 Chimie Thérapeutique
 Chirurgie Cardio-vasculaire

Pr. LEZREK Mounir
Pr. NAZIH Mouna*
Pr. LAMALMI Najat
Pr. ZOUAIDIA Fouad
Pr. BELAGUID Abdelaziz
Pr. DAMI Abdellah*
Pr. CHADLI Mariama*

Ophthalmologie
Hématologie
Anatomie pathologique
Anatomie pathologique
Physiologie
Biochimie chimie
Microbiologie

ENSEIGNANTS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS

1. Pr. ABOUDRAR Saadia
2. Pr. ALAMI OUHABI Naima
3. Pr. ALAOUI KATIM
4. Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma
5. Pr. ANSAR M'hammed
6. Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz
7. Pr. BOUHOUCHE Ahmed
8. Pr. BOURJOUANE Mohamed
9. Pr. CHAHED OUZZANI Lalla Chadia
10. Pr. DAKKA Taoufiq
11. Pr. DRAOUI Mustapha
12. Pr. EL GUESSABI Lahcen
13. Pr. ETTAIB Abdelkader
14. Pr. FAOUZI Moulay El Abbas
15. Pr. HMAMOUCHE Mohamed
16. Pr. IBRAHIMI Azeddine
17. Pr. KABBAJ Ouafae
18. Pr. KHANFRI Jamal Eddine
19. Pr. REDHA Ahlam
20. Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med
21. Pr. TOUATI Driss
22. Pr. ZAHIDI Ahmed
23. Pr. ZELLOU Amina

Physiologie
Biochimie
Pharmacologie
Histologie-Embryologie
Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Applications Pharmaceutiques
Génétique Humaine
Microbiologie
Biochimie
Physiologie
Chimie Analytique
Pharmacognosie
Zootechnie
Pharmacologie
Chimie Organique

Biochimie
Biologie
Biochimie
Chimie Organique
Pharmacognosie
Pharmacologie
Chimie Organique

* *Enseignants Militaires*



Dédicaces





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 très chères sœurs

Nadia et Zineb

*Je ne peux exprimer à travers ses lignes tous
mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous.
Puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.
Je vous souhaite la réussite dans votre vie, avec tout
Le bonheur qu'il faut pour vous combler.*





A mes meilleurs amis

*N.ABOUNOUH, O.RABICHI, B.WAKHAZAN,
N.LAAZABI, F.LAOUISI, A.MAYDOUNE,
A.M.BENAZOUZ, A.HALAWITE, M. ATTI, Y.NIF,
F.ADCHIRA, S. EL KOURAIBI, A. MORJAN,
B. BENTAHER...*

*En souvenir d'agréables moments passés ensemble,
Et en témoignage de notre amitié.*

*Je vous exprime par ce travail toute mon affection et j'espère
Que notre amitié restera intacte et durera pour toujours.*

A tous mes amis.





Remerciements





*À notre maitre président
de thèse Monsieur le Professeur*

M.ZOUHDI

Professeur de microbiologie

*Vous nous avez accordé un immense honneur et un
grand privilège*

*En acceptant la présidence de notre jury de thèse.
Nous vous remercions aussi pour la gentillesse et la
spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu
diriger ce travail.*

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





*À notre maître et rapporteur
de thèse Monsieur le Professeur
Y.CHERRAH*

Professeur de pharmacologie

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

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

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

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





*À notre maître et juge
de thèse Monsieur le Professeur
S.MRANI
Professeur agrégé de virologie*

*Je vous remercie, Monsieur de m'avoir fait l'honneur
d'accepter de faire partie de mon jury de thèse
Qu'il me soit permis, Monsieur, de vous exprimer ma
profonde gratitude et mes sincères remerciements.
Merci pour votre sympathie, votre gentillesse et votre
disponibilité.*





*À Monsieur le Professeur
A.IBRAHIMI
Professeur habilité de Biotechnologie*

Vous m'avez fait l'honneur de siéger dans ce jury.

*Je vous remercie de la spontanéité
et de l'amabilité avec lesquelles vous
avez accepté de juger ce travail.*

*Veillez trouver ici, Monsieur, l'expression
de notre sincère gratitude.*





À Madame le Docteur

S.MOUSANNIF

*Responsable département médical des
laboratoires Sanofi-Aventis*

*Nous sommes très sensibles à l'honneur que
vous nous faites en acceptant avec spontanéité
de juger ce travail.*

*Veillez trouvez ici, Madame, l'expression de notre
profond respect et de notre sincère reconnaissance.*





*À Monsieur S.AHID
Professeur assistant de pharmacologie*

À qui je dois ma reconnaissance et mon profond respect pour ses conseils constructifs, sa gentillesse et sa disponibilité durant la réalisation de ce travail. Veuillez agréer ma profonde gratitude et ma sincère admiration de votre sympathie et votre sérieux.





Liste des abréviations



AC	: Avis de conformité
ADN	: Acide désoxyribonucléique
AF4	: Asymmetric Flow Field Flow Fractionation
AMM	: Autorisation de mise sur le marché
ARNm	: Acide ribonucléique messager
BCP	: Banque de cellules primaires
BCT	: Banque de cellules de travail
BFU-E	: Burst Forming Unit-Erythroid
BLA	: Biologics License Application
BPF	: Bonnes pratiques de fabrication
CCE	: Conseil des Communication européenne
CERA	: continuous erythropoietin receptor activator
CFU-E	: Colony Forming Unit-Erythroid
CHMP	: (The Committee for Medicinal Products for Human), Comité des spécialités pharmaceutiques à usage humain
CHO	: Cellules ovariennes de l' hamster
CNBr	: Bromure de cyanogène
CO2	: Dioxyde de carbone
COS	: Cellules de rein de singe
CRP	: C-Réactive protéine
EC	: Electrophorèse capillaire
EMA	: (european medicines agency) ou <i>Agence européenne d'évaluation des médicaments</i>
EPO	: Érythroïtine
ESI	: ElectroSpray Ionisation ou ionisation par un source electrospray
EZ	: Électrophorèse de zone
FDA	: (Food and Drug Administration) l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments
G-CSF	: (<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>) ou <i>facteur de croissance granulocytaire</i>
GM-CSF	: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor ou <i>facteur de croissance granulo-macrophagique</i>
GMP	: <i>Good manufacturing practices</i> ou bonnes pratiques de fabrication
GPC	: Chromatographie à perméation de gel
Hb	: Hémoglobine
HCV	: Virus de l'hépatite C
hGH	: Hormone de croissance
HMQC	: <i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i> ,.
HPAEC-PAD	: Chromatographie liquide à haute performance échangeuse d'anions couplée à un système de détection ampérométrique pulsé,
HPLC	: Chromatographie en phase liquide haute performance
HPLC-ES	: Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse par une interface de type electrospray
HSQC	: <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>

HTA	: L'hypertension artérielle
ICH	: International conference of Harmonisation
IEF	: Isoélectrofocalisation
IFN- α 2	: l'interféron alpha-2b
IL-2	: Interleukine 2
IL3	: Interleukine -3
IL5	: Interleukine-5
IRC	: <i>Insuffisance rénale chronique</i>
ISO	: Organisation internationale de la normalisation
ITT	: population en intention de traiter
IV	: Intraveineux
KIRA	: Kinase Receptor Activation Assay
LC /MS	: La chromatographie en phase liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse
LEEM	: Les entreprises du médicament.
M	: Concentration molaire
m/z	: La masse sur la charge
MALDI	: Désorption-ionisation laser assisté par matrice
MRC	: Maladie rénale chronique
MS	: Spectrométrie de masse
MS/MS	: Spectrométrie de Masse en Tandem
N ₂	: Azote
NESP	: Novel erythropoiesis stimulating protein
nOe	: (<i>NOE</i>) <i>Effet nucléaire Overhauser</i> .:
NSO	: Murine plasmocytoma
O ₂	: Oxygène
ODS	: Octadecyl
OECD	: Organistaion for Economic Co-operation and Développement
OMS	: Organisation mondiale de santé
PaO ₂	: Pression artérielle en oxygène
PBS	: (phosphate buffered saline) le tampon phosphate salin
PBU	: Produit biologique Ultérieur
PDA	: Photo Diode Array
PH	: Potentiel d'hydrogène
PHM	: Prix Hospitalier Maroc
PI	: Point isoélectrique
PLRP	: Phases stationnaires polymériques
PP	: Population per protocole
PPM	: Prix Public Maroc
PS-DVB	: Polystyrène-Divinylbenzene
PTH	: Hormone parathyroïdienne
rh-IL-2	: Interleukine-2 humaine recombinante
r-HuEPO	: (recombinant human erythropoietin) ou érythropoïétine humaine recombinante

RMN : Résonance magnétique nucléaire
RP-HPLC : (Reversed phase high performance liquid chromatography) ou chromatographie liquide à haute performance en phase inverse
SC : Sous cutanée
SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEC-HPLC : La chromatographie liquide à haute performance couplée à la chromatographie d'exclusion stérique
SEP : Subsequent Entry Biologic
SOP : Protocoles d'opérations normalisées
SPR : Résonance plasmonique de surface
TOF : (time-of-flight mass spectrometry) analyseur à temps de vol.
UV : Ultra-violet
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

Liste des figures :

A decorative flourish in the top right corner of a horizontal bar, featuring intricate, swirling patterns in shades of brown and red with a white outline.

Liste des figures

&

A decorative flourish in the bottom left corner of a horizontal bar, featuring intricate, swirling patterns in shades of brown and red with a white outline.

Tableaux

Figure 1	schéma générale de production d'un biomédicament	10
Figure 2	Structure moléculaire de l'aspirine et de l'interféron	12
Figure 3	les principales lignes directives	19
Figure 4	structure hiérarchique des guidelines de l'EMA	23
Figure 5	Coût de développement d'un médicament biosimilaire et taux de réduction du prix de vente du médicament.	43
Figure 6	Les étapes de production des biosimilaires (système clos)	50
Figure 7	Les différents systèmes d'expression utilisés pour la production des biosimilaires	52
Figure 8	Schéma d'un bioréacteur [Fries 2005]	42
Figure 9	Les différents modes de culture	57
Figure 10	Evolution dans le temps de la concentration cellulaire (X), des substrats (S) et des produits (P) en fonction du mode d'alimentation du bioréacteur	57
Figure 11	Schéma représentatif des différentes étapes de purification	58
Figure 12	Procédé globale de production	60
Figure 13	Représentation schématique de la construction de gènes recombinants capables de diriger la sécrétion de protéines thérapeutiques dans le lait.	62
Figure 14	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]	70
Figure 15	les éléments d'un spectromètre de masse	70
Figure 16	Analyse par Maldi-Q-ToF en mode MS des peptides tryptiques marqués de l'érythropoïétine bêta séparés par chromatographie en phase inversée	72
Figure 17	Ionisation MALDI – Schéma de principe	73
Figure 18	Une cible MALDI Perkin Elmer-PerSeptive Biosystems La cible est une plaque métallique, en acier inoxydable ou en acier recouvert d'or. Celle présentée sur la photo peut supporter jusqu'à 100 dépôts différents et mesure 5 cm x 5cm.	74
Figure 19	Principe de la désorption /ionisation MALDI	75
Figure 20	Schéma simplifié du fonctionnement d'une source électrospray.	76
Figure 21	Exemple de spectre obtenu par dichroïsme circulaire	78
Figure 22	Schéma du principe de la résonance plasmonique de surface	81

Figure 23	Exemple des courbes de cinétiques de liaisons des ligands aux récepteurs obtenu par résonance plasmonique de surface	82
Figure 24	Positions dans la structure de la déformylase des contraintes de distance déterminées à partir de l'observation des nOe	84
Figure 25	Représentation tridimensionnelle du filgrastim. Les coordonnées des atomes ont été obtenues par diffractométrie de rayons X sur un cristal de la protéine.	87
Figure 26	Résolution de la structure d'une macromolécule biologique par diffraction des rayons X. Vue schématique des différentes étapes	88
Figure 27	structure type d'une colonne échangeuse d'anions (A ⁻)	91
Figure 28	Schéma de principe de l'ampérométrie pulsée	92
Figure 29	Séparation par électrophorèse capillaire de zone des différents isoformes D'un produit princeps contenant l'EPO et ses différents biosimilaires.	94
Figure 30	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.	97
Figure 31	Schéma du principe du SEC-HPLC	99
Figure 32	Représentation Schématique de la répartition des fractions de l'échantillon dans la cellule lors d'analyse par AF4.	101
Figure 33	Biosimilaires en développement et commercialisés dans le monde hors Asie par famille de molécules biologiques (liste non exhaustive)	104
Figure 34	Schéma de la stratégie de production d'insuline recombinante utilisée en 1982 par Eli Lilly	106
Figure 35	Schéma de synthèse de l'hormone de croissance	109
Figure 36	Structure de l'interleukine humaine recombinante	111
Figure 37	Niveau d'action de l'EPO dans la formation des cellules sanguines	125
Figure 38	la fixation de l'EPO à son récepteur et les voies de signalisation intracellulaire	126
Figure 39	Deux isoformes de récepteurs de l'EPO. à gauche un homodimère, à droite hétérodimère	127
Figure 40	Structure de l'érythropoïétine alpha	131
Figure 41	Comparaison des cartes de restriction trypsique pour établir la comparabilité des structures primaires.	132
Figure 42	Comparaison des spectres de dichroïsme circulaire	133

Figure 43	Distribution des isoformes du Binocrit® et son comparateur en électrophorèse capillaire	134
Figure 44	Comparaison des profils de glycosylation par échange anionique à haute performance - Détection par ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD).	135
Figure 45	Etude des liaisons du biosimilaire et son comparateur au récepteur par résonance plasmonique.	136
Figure 46	déroulement de l'étude INJ-9	139
Figure 47	Évolution des concentrations moyennes d'Hb entre 0 et 28 semaines de traitement dans les groupes traités par Binocrit® et le comparateur érythropoïétine alfa	134
Figure 48	Évolution des doses (moyenne ± SD) d'EPO au cours de l'étude INJ-9 dans les groupes Binocrit et comparateur époïétine alfa	144

Liste des tableaux :

Tableau I	Exemple d'épreuves virologiques pouvant être utilisées et limites de ces épreuves.	15
Tableau II	Les lignes directrices de l'EMA classées selon l'ordre chronologique de leur apparition.	27
Tableau III	Comparaison de certaines dispositions clés des projets de loi biosimilaires et la loi HatchWaxman.	37
Tableau IV	Exemple d'essai préclinique in vitro comparent l'activité sur des cellules normocythémiques des souris Retacrit® (biosimilaire) et Eprex® (produit de référence)	45
Tableau V	les différentes techniques utilisées pour le contrôle des biosimilaires	102
Tableau VI	les principaux anticorps monoclonaux commercialisés : principales indications et les dates d'expiration de leurs brevets.	120
Tableau VII	Les principaux médicaments biotechnologiques commercialisés au Maroc et leurs biosimilaires.	121
Tableau VIII	Données pharmacocinétiques de l'érythropoïétine.	129
Tableau IX	Caractéristiques des patients à l'inclusion durant l'étude inj-9	141



Table des matières



INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : GENARLITES	4
I-DEFINITIONS	5
Définition communautaire européenne	5
Définition de la Food and Drug Administration(U.S).....	6
Définition du code de santé public française.....	6
Définition de santé canada	6
Définition de l'Europabio	4
Définition de l'OCDE	4

Définition de LEEM.....	4
II- HISTORIQUE	9
III- LES BIOMEDICAMENTS	10
CHAPITRE II : LEGISLATION	13
I- Législation international sur les biosimilaires	14
1) L'exemple des ICH	14
2) Les lignes directrices de l'ICH relatives aux produits biotechnologiques.....	14
2-1) La ligne directrice Q5A	14
2-2) La ligne directrice Q5B	15
2-3) La ligne directrice Q5C	16
2-4) La ligne directrice Q5D	16
2-5) La ligne directrice Q6B	17
2-6) La ligne directrice S6.....	17
II-la législation de l'union européenne	18
1) Les directives européennes.....	18
La directive 2004/27/CE	18
2) Les principales lignes directrices européennes.....	19
2-1) Lignes directrices générales CHMP/437/04	19
2-2) Les lignes directrices pour la qualité	20
2-2-1) CPMP/BWP/3207/00	20
2-2- 2) CHMP/49348/05	20
2-3) Les lignes directrices pour les essais non cliniques et cliniques.....	21
2-3-1) CPMP/ICH/5721/03	21
2-3-2) CHMP/42832/05	21
2-3-3) CHMP/BMWP/101695/06	22
2-3-4) CHMP/BMWP/14327/06	22
2-4) Les lignes directrices spécifiques aux produits.....	23
2-4-1) CHMP/313229/05	23
2-4-2) CHMP/94528/05	2 3
2-4-3) CHMP/32775/05	24
2-4-4) CHMP/94526/05	24
2-4-5) CHMP/BMWP/102046/06	24
2-4-6) CPMP/BWP/1113/98	24
2-4-7) CHMP/BMWP/7241/2006	24

2-4-8) CHMP/BMWP/496286/06	25
2-4-9) EMEA/CHMP/BMWP/17073408	25
2-4-10) EMEA/CHMP/114720/2009	25
2-4-11) Les lignes directrices publiées en 2010	25
III-LEGISLATION CANADIENNE.....	29
2) Les principales pointes de la législation canadienne.....	30
3) Les lignes directives.....	31
VI) Les Etats-Unis	33
1) Avant la réforme du système de santé	33
2) Après la réforme du système de santé.....	33
3) Les principales caractéristiques de la nouvelle législation américaine en matière de biosimilaires	34
3-1) Définition appropriée du médicament biosimilaire	34
3-2) Interchangeabilité	34
3-3) Les études de comparabilité.....	34
3-4) Le Développement de la liste de brevets	35
3-5) L'exclusivité des données.....	35
V) La législation Marocaine	39
CHAPITRE III : DEVELOPPEMENT D'UN MEDICAMENT BIOSIMILAIRE	41
1) Les essais précliniques	42
1-1) Les essais précliniques in vitro	43
1-1-1) Tests de liaison ligand –récepteur	44
1-1-2) Tests basées sur l'utilisation des lignées cellulaires	45
1-2) Les essais précliniques in vivo	45
2) Procédés de production	49
2-1) procédé production en système clos	49
2-1-1) La sélection de la séquence d'ADN appropriée	51
2-1-2) Préparation de banque de cellules primaires	53
2-1-3) La banque de cellules de travail (BCT).....	53
2-1-4) production.....	54
2-1-5) purification	58
2-1-6) analyse	59
2-1-7) formulation.....	60
2-2) Production en système ouvert.....	61
CHAPITRE IV : LES CONTROLES	63

I-) LES CONTROLES.....	65
1) le contrôle des biosimilaires.....	65
1-1) Contrôle de la comparabilité structurale.....	65
1-2) Propriétés physicochimiques	67
2) - METHODES DE CONTROLES.....	68
2- 1) Méthodes utilisées pour le contrôle de la structure primaire et la composition en acides aminés .	68
2- 1- 1) La spectrophotométrie de masse	69
2- 1- 2) La quantification par LC-MS	71
2- 1- 3) Desorption-ionisation laser assisté par matrice	73
2- 1- 4) Les sources électrospray.....	75
2- 2)- Méthodes employées pour le contrôle des structures secondaires et tertiaires	77
2- 2-1) Dichroïsme circulaire	77
2-2-2) Absorption UV-visible	78
2-2-3) La résonance plasmonique de surface	80
2-2-4) Résonance magnétique nucléaire	83
2- 2-5) La diffraction des rayons X.....	86
2-3)- Méthodes utilisées pour le contrôle des modifications post transrationnels, glycosylation	88
2-3-1) Séquençage par spectrométrie de masse	89
2- 3-2) Analyse par HPAEC-PAD	90
2-4)- Contrôles de l'hydrophobicité, charge, isoformes.....	93
2-4-1) Électrophorèse de zone (EZ)	93
2-4-2) RP-HPLC	95
2- 5)- Méthodes pour la détermination du poids moléculaire, et des agrégats	96
2-5-1) SDS-page.....	96
2-5-2) SEC-HPLC	98
2-5-3) L'ultracentrifugation	99
2-5-4) AF4 (Asymmetric Flow Field Flow Fractionation)	100
CHAPITRE V : PRINCIPALES CLASSES PHARMACOLOGIQUES.....	104
1) HORMONES	105
1-1)- l'insuline	105
1-2)- Hormone de croissance	107
2) LES CYTOKINES.....	110
2-1)- Les interleukines	110
2-2)- Les interférons.....	111

3)-LES FACTEURS DE CROISSANCE.....	114
3-1)- Erythropoïétine	114
3-2)- Facteur de croissance humain	115
4)-Les anticorps monoclonaux	120
CHAPITRE VI : LE CAS DES BIOSIMILAIRES DE L'ERYTHROPOÏÉTINE	123
I- PHARMACOLOGIE DE L'ERYTHROPOÏÉTINE	124
1- L'érythropoïétine	124
2- Isoformes de l'érythropoïétine	126
3- Production de l'érythropoïétine	127
4- Indications thérapeutiques et posologies.....	127
5- Profil pharmacocinétique	128
6- Effets indésirables	129
7- Echappement thérapeutique	129
8- Concentrations plasmatiques attendues pour l'érythropoïétine	130
9-Structure de l'érythropoïétine	131
II- CONTROLE DE COMPARABILITE DES BIOSIMILAIRES DE L'ERYTHROPOÏÉTINE AU PRODUIT DE REFERENCE	132
1) Le contrôle de la comparabilité physicochimique	132
2)-Le contrôle de la comparabilité biologique	137
3)-Le développement clinique.....	137
CONCLUSION.....	147
RESUME	149
BIBLIOGRAPHIE	162



Introduction



C'est en 1982 qu'est apparu le premier médicament biotechnologique : l'insuline humaine, fabriquée à partir de cellules modifiées par génie génétique. Peu après, ont suivi l'hormone de croissance recombinante, les interférons, les facteurs de croissance hématopoïétiques, l'érythropoïétine (EPO) et bien d'autres produits encore. Les produits biotechnologiques comptent parmi les médicaments les plus onéreux, du fait de leurs coûts de développement et de fabrication très élevés. Les brevets arrivant à expiration pour ceux de première génération [1], laissant la possibilité de reproduire ces médicaments un peu particuliers. Et ce n'est qu'en 2006 que l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) a autorisé la mise sur le marché des premiers médicaments « bio-génériques » ou biosimilaires. Il faut savoir que les bio-médicaments sont des molécules complexes difficiles à produire et sensibles au mode de fabrication : un changement, même minime, des protéines synthétisées peut être à l'origine de réactions immunitaires. Aussi, les biosimilaires sont considérés « similaires » aux produits de référence, et non identiques comme pour les génériques, ce qui rend l'approche générique non applicable pour cette classe de médicaments.

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 [2]. Les méthodes d'évaluation d'un biosimilaire se font au cas par cas et reposent sur le contrôle de l'efficacité et de la sécurité à l'aide d'essais pré-cliniques et cliniques d'une part, et de la qualité grâce à un contrôle rigoureux des méthodes de fabrication d'autre part.

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[3].

Le but de ce travail est de mettre le point sur les différents aspects réglementaire régissant le développement des médicaments biosimilaires, leur procédés de production, ainsi que les méthodes de contrôle utilisées pour l'évaluation de leur comparabilité physicochimique, et biologique aux médicaments biologiques de référence.



CHAPITRE I: *GENERALITES*



I DEFINITIONS

✓ Définitions des autorités de santé internationales :

Définition européenne du médicament Biosimilaire :

Un médicament biosimilaire est un médicament biologique qui a prouvé sa « similarité » par rapport à un médicament de référence.

La société pharmaceutique qui choisit de développer un nouveau médicament biologique, « biosimilaire » à un produit de référence, doit démontrer la nature similaire des deux médicaments biologiques. Des études comparatives sont nécessaires pour fournir la preuve de la nature « similaire » en terme de qualité, sécurité et efficacité du nouveau produit biologique par rapport au produit de référence choisi dans la Communauté Européenne. La législation offre un cadre légal pour les biosimilaires, dans lequel il est précisé que moins de données sont nécessaires pour ces produits par rapport à ce qui était nécessaire pour le produit de référence original.

Selon l'Article 10 (4) de la Directive 2001/83/EC, tel que modifié:

« 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 » [4].

Définition de la FDA du médicament biosimilaire ou (*follow on biologic*) :

Un médicament biosimilaire est défini comme étant un médicament dont la biosimilarité a été approuvé telle que la définition dans la sous section (k) :

a) que le produit biologique est fortement semblable à un produit de référence malgré des différences mineures dans les composants médicalement inactifs.

b) l'absence de toute différence médicalement significative entre le produit biologique similaire et le produit de référence en termes d'activité, pureté, et sécurité du produit [5].

Définition Française du Médicament Biologique Similaire :

Transposant la directive 2004, l'article 4 de la loi n° 2007-248 a ajouté un 25^{ème} alinéa à l'article L 5121-1 du code de santé public définit le biologique similaire comme :

« tout médicament biologique de même composition qualitative et quantitative en substance active et de même forme pharmaceutique qu'un médicament biologique de référence mais qui ne remplit pas les conditions prévues au a du 5^o du présent article pour être regardé comme une spécialité générique en raison de différences liées notamment à la variabilité de la matière première ou aux procédés de fabrication et nécessitant que soient produites des données précliniques et cliniques supplémentaires dans des conditions déterminées par voie réglementaire [6].

Définition de l'agence canadienne de santé :

Produit biologique ultérieur (PBU) (Subsequent Entry Biologic (SEB))

Médicament biologique faisant son entrée sur le marché après une version dont la vente est autorisée au Canada, et dont la similarité a été établie avec un médicament biologique de référence. L'autorisation d'un PBU se fonde en partie sur des données d'innocuité et d'efficacité préexistantes que l'on jugerait pertinentes en raison d'une similarité établie avec

un médicament de référence et qui exerceraient une influence sur la quantité et le genre de données originales requises [7].

Nota : Un PBU est également appelé produit biologique similaire en Union européenne et produit suivi de protéine de suite aux États-Unis.

Médicament biologique de référence (*Reference biologic drug*) :

Médicament biologique autorisé après l'examen d'un ensemble complet de données cliniques, non cliniques et sur la qualité auquel un PBU est comparé dans le cadre d'études visant à démontrer sa similarité.

✓ **Autres définitions :**

Définition d'EuropaBio : (the European Association for Bioindustries) :

Médicament dérivé des biotechnologies, qui fait référence à un médicament d'origine biologique ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché et qui est soumis à une autorisation de mise sur le marché par un demandeur indépendant. À cet égard, un médicament biosimilaire désigne toute substance dérivée du tissu biologique ou de la matière première d'une source cellulaire vivante, présentée comme ayant des propriétés qui permettent le traitement ou la prévention de maladies chez les êtres humains, ou qui peut être utilisée chez les êtres humains en vue d'effectuer un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier des fonctions physiologiques, qui possède des propriétés physico-chimiques et biologiques similaires, la même substance pharmaceutique et la même forme pharmaceutique, et dont l'équivalence avec le médicament biotechnologique de référence a été prouvée en termes d'innocuité et d'efficacité [8].

Définition de L'OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) :

Médicament biosimilaire - version générique d'un médicament biologique (produit biopharmaceutique de haut poids moléculaire généré par des cellules d'hybridomes ou des microorganismes, animaux ou plantes recombinants) [9].

Définition du LEEM (Les Entreprises du Médicament) :

Un médicament biosimilaire est une préparation qui succède à un médicament issu de la biotechnologie dont le procédé de fabrication n'est plus protégé. Les biosimilaires sont comparables à leur préparation de référence sans toutefois leur être identiques [10]. Selon LEEM les médicaments biosimilaires sont:

- ✓ des médicaments high-tech issus de la biotechnologie.
- ✓ généralement des principes actifs de grande taille dotés d'une structure complexe (protéines).
- ✓ des préparations dont la fabrication exige un grand savoir-faire.
- ✓ des médicaments dont la fabrication repose sur la «technologie de l'ADN recombinant» (un gène est transféré dans une cellule hôte pour y fabriquer la protéine souhaitée).
- ✓ des médicaments dont la fabrication est exigeante en termes de temps et d'argent, des médicaments qui sont soumis à un important programme d'études précliniques et cliniques, préalablement défini par les autorités.
- ✓ des médicaments comparables pour l'essentiel à une préparation de référence déjà autorisée.
- ✓ des préparations dont l'efficacité thérapeutique a été jugée comparable à celle de la préparation de référence dans des études cliniques.
- ✓ des médicaments dont l'innocuité et la tolérance ont été jugées comparables à celles de la préparation de référence dans des études cliniques [10].

II)- HISTORIQUE :

En avril 2006, soit quelques mois après l'entrée en vigueur du règlement communautaire, la Commission européenne accorde sa première AMM pour l'Omnitrope[®], un biosimilaire du génériqueur Sandoz (filiale du groupe suisse Novartis). La Commission suit ainsi l'avis scientifique positif de l'EMA rendu en janvier 2006. Version similaire de l'hormone de croissance Genotropine[®] de Pfizer, l'Omnitrope[®] est destiné à traiter le déficit d'hormone de croissance chez les enfants et les adultes [11].

En mai 2006, c'est le Valtropin[®], de la société biopharmaceutique suisse BioPartners, qui bénéficie de la deuxième AMM d'un biosimilaire délivrée par la Commission européenne. Le Valtropin[®] (somatotropine), biosimilaire de l'Humatrope[®] de Lilly, est une hormone recombinante indiquée pour le déficit en hormone de croissance [12]. Par contre, en juin 2006, l'EMA rejette le dossier d'Alpheon[®] de Biopartners (interféron alpha-2a) indiqué dans le traitement de l'hépatite C. Son refus est motivé par des questions relatives à la qualité et aux différences identifiées entre ce biosimilaire et son produit de référence, le Ropheron-A[®] de Roche [13].

En août 2007 sont autorisés le Binocrit[®] (Sandoz), l'Epoetin hexal[®] (Hexal), l'Abseamed[®] (Medice) en décembre 2007 le Retacrit[®] (Hospira) et le Silapo[®] (Stada), Puis En octobre 2009 le Biopoin[®] (CT Arzneimittel GmbH) et Eporatio[®] (ratiopharm GmbH) biosimilaires de l'Epex[®] de Janssen-Cilag [14-20].

En septembre 2008 le Ratiograstim[®] (Ratiopharm GmnH), Biograstim[®] (CT Arzneimittel GmbH), Tevagrastim[®] (Teva Generics GmbH), Filgrastim[®] ratiopharm (Ratiopharm GmbH), en février 2009 Zarzio[®] (Sandoz GmbH), Filgrastim Hexal[®] (Hexal AG), puis en juin 2010 Nivestim[®] (Hospira UK Limited) biosimilaires du Neupogen[®] (Amgen) [21-27].

Donc en résumé Depuis 2006, 16 biosimilaires ont été autorisés (7 médicaments à base d'érythropoïétine, 2 de somatotropine et 7 de filgrastim) et il y en aura davantage dans les années à venir (notamment les biosimilaires à base d'insuline, d'interféron-alpha, d'héparine et de facteur stimulant la croissance de granulocytes G-CSF).

III) LES BIOMÉDICAMENTS :

Les médicaments issus de la biotechnologie sont des agents thérapeutiques produits à l'aide d'organismes vivants et de la technologie de recombinaison de l'ADN (couramment appelée la génie génétique). Cette classe de produits, aussi connue sous le nom de médicaments biothérapeutiques, comprend les peptides recombinants et les protéines recombinantes tels que les cytokines et les facteurs de croissance, les vaccins thérapeutiques, les anticorps monoclonaux, les agents de thérapie génique incluant ceux qui emploient des vecteurs viraux, et les virus thérapeutiques génétiquement modifiés. Les produits thérapeutiques de l'ADN sont produits à l'aide d'une variété de systèmes hôte/vecteur tels que : bactérie/plasmide, cellule de levure/plasmide, cellule mammalienne/virus et cellule d'insecte/virus.

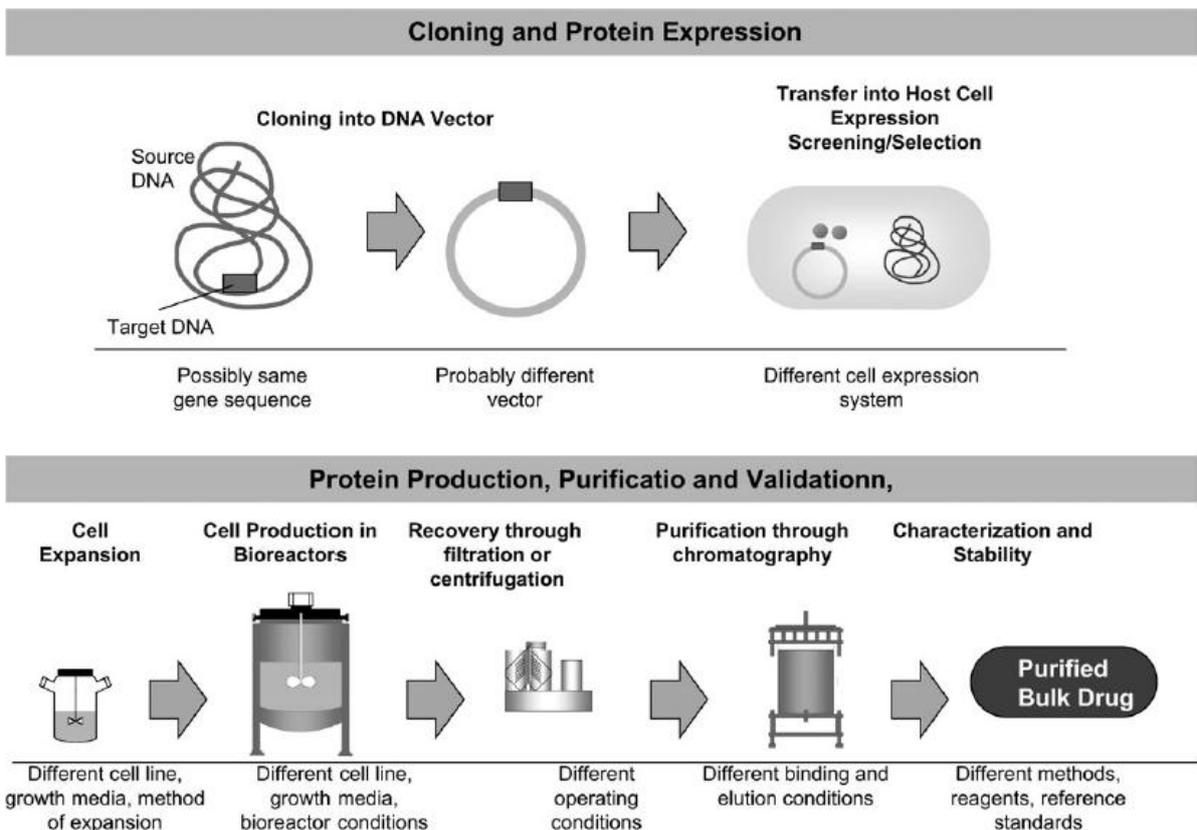


Figure 1: schéma générale de production d'un biomédicament

Au cours de la dernière décennie il s'est produit une croissance phénoménale de l'innovation et de la production des médicaments issus de la biotechnologie. Actuellement, des centaines de programmes de recherche fondamentale et clinique en biotechnologie sont en cours, dans l'espoir de soigner un jour des maladies encore incurables. Ces molécules permettent de soigner là où les thérapies traditionnelles chimiques n'ont pas su trouver de solutions [28].

Ainsi en 2007, plus de 325 millions de patients ont bénéficié de traitements biotechnologiques (dont les traitements géniques) pour empêcher ou soigner des attaques cardiaques et cérébrales, la sclérose en plaque, certaines infections virales, l'insuffisance rénale, l'anémie, le cancer du sein, la fibrose kystique, la leucémie, l'hépatite, des maladies génétiques rares, le diabète et d'autres pathologies. Actuellement les produits biotechnologiques représentent 40% du total des produits brevetés, avec plus de 600 traitements biotechnologiques qui sont en phase d'essai, pour traiter à terme plus de 100 pathologies [29].

- 210 traitements contre le cancer
- 50 traitements contre les maladies infectieuses
- 44 traitements contre les maladies auto-immunes
- 22 traitements contre le VIH et ses maladies opportunistes
- 22 traitements contre les maladies cardiovasculaires.

La spécificité des biomédicaments :

En générale, les médicaments chimiques présentent des composants assez simples, avec une structure moléculaire relativement peu complexe. Les médicaments biologiques sont des entités moléculaires très développées, leurs poids moléculaires peut aller de 5 Kda (Ex : l'insuline) jusqu'à plus de 500 Kda (Ex : les IgM). Une molécule d'un médicament biologique est une protéine composée d'une chaîne de centaines d'acides aminés, au sein d'une structure tridimensionnelle complexe. La nature exacte de cette conformation est cruciale pour l'activité thérapeutique et les effets indésirables du produit [30].

La structure et l'activité des protéines, sont compliquées par une glycosylation et d'autres modifications post translationnelles, entraînant une hétérogénéité. Les modèles de glycosylation dit modèles d'isoformes des protéines, dépendent de la cellule de production et des conditions de culture [31].

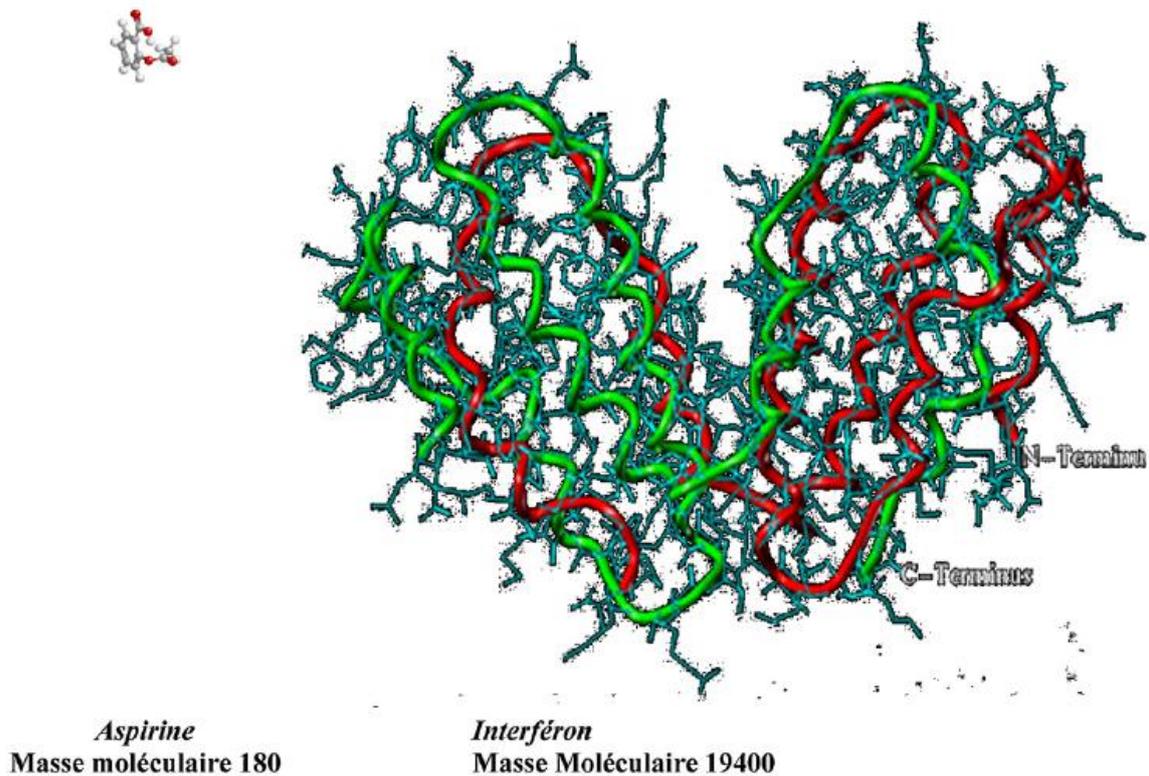


Figure 2 : Structure moléculaire de l'aspirine et de l'interféron

En effet la stabilité conformationnelle est assurée principalement, par des interactions physiques, plutôt faibles, qui font que les produits biologiques ou issus de la biotechnologie soient particulièrement sensibles aux facteurs de l'environnement tels que les changements de température, l'oxydation, la lumière, la teneur en ions et le cisaillement. Des conditions de stockage strictes sont habituellement nécessaires pour préserver leur activité biologique et empêcher leur dégradation [32].



Chapitre II :
Réglementation



I- la réglementation internationale :

Les normes et les lignes directrices relatives aux produits biotechnologiques ont été adoptées par les organismes internationaux et multilatéraux comme l'organisation mondiale de santé (OMS), l'organisation internationale de normalisation (ISO), le Conseil des Communautés européennes (CCE), l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et le Réseau de données relatives aux souches microbiennes (Microbial Strains Data Network(MSDN), ainsi que l'ICH(L'International Conference of Harmonisation) [33].

1) Les lignes directrices de l'ICH relatives aux produits biotechnologiques :

Des lignes directrices ont été élaborées par les membres de l'ICH afin d'harmoniser la documentation devant nécessairement accompagner la mise au point de médicaments et l'évaluation réglementaire des produits contenant de nouvelles molécules ou des nouveaux produits issus de la biotechnologie. L'OMS est admise au Comité directeur de l'ICH en qualité d'observateur mais n'intervient pas directement dans la rédaction ou l'élaboration des directives et n'exerce aucun contrôle sur leur approbation [34].

1-1) La ligne directrice Q5A :« Sécurité virale des produits biotechnologiques » :

La ligne directrice Q5A indique les données qui doivent être présentées dans la demande de commercialisation ou d'homologation des produits issus de la biotechnologie dérivés de lignées de cellules caractérisées d'origine humaine ou animale (mammifères, oiseaux, insectes), et propose des approches pour l'évaluation du risque de contamination virale et pour l'élimination des virus d'un produit qui contribuent à la sécurité d'emploi des produits issus de la biotechnologie dérivés de lignées cellulaires animales ou humaines (voir tableau 1) [35].

Tableau I : Exemple d'épreuves virologiques pouvant être utilisées et limites de ces épreuves.

<i>EPREUVE</i>	<i>PRODUIT D'ESSAI</i>	<i>CAPACITE DE DETECTION</i>	<i>LIMITE DE DETECTION</i>
Production d'anticorps	Lysat de cellules et leur milieu de culture	Antigènes viraux spécifiques	Antigènes non infectieux dans les systèmes d'épreuve animaux
Dépistage des virus <i>in vivo</i>	Lysat de cellules et leur milieu de culture	Large gamme de virus pathogènes pour les humains	Agent incapables de se répliquer ou de provoquer la maladie dans le système d'épreuve
Dépistage des virus <i>in vitro</i> :		Large gamme de virus pathogènes pour les humains	Agent incapables de se répliquer ou de provoquer la maladie dans le système d'épreuve
1. Caractérisation d'un témoin cellulaire	1. Lysat de cellules et leur milieu de culture (pour la culture, des cellules intactes doivent faire partie du produit d'essai)		
2. Dépistage dans le procédé de production	2. Produit récolté du vrac non traité ou lysat de cellules et leur milieu de culture provenant du réacteur de production		
MET sur :		Virus et particules apparentées à des virus	Épreuve qualitative avec identification
1. Substrat cellulaire	1. Cellules viables		
2. Surageant de culture de tissu	2. Surageant de culture acellulaire		
Transcriptase inverse (TI)	Surageant de culture acellulaire	Rétrovirus et expression de la TI virale	Ne détecte que les enzymes dont l'activité est optimale dans des conditions optimales. L'interprétation peut être difficile à cause de la présence d'enzymes cellulaires; bruit de fond avec certains échantillons concentrés
Infectivité par des rétrovirus (RV)	Surageant de culture acellulaire	Rétrovirus infectieux	RV incapables de se répliquer ou de former des plages isolées dans le système d'épreuve choisi
Coculture	Cellules viables	Rétrovirus infectieux	RV incapables de se répliquer
1. Infectivité			1. Voir infectivité par RV ci-dessus
2. Titre de la MET			2. Voir MET ci-dessus ^a
3. Titre de la TI			3. Voir TI ci-dessus
PCR (amplification en chaîne par la polymérase)	Cellules, liquide de culture et autres matières	Séquences virales spécifiques	Des séquences amorces doivent être présentes. N'indique pas si le virus est infectieux

^a En outre, difficulté de distinguer le produit d'essai des cellules indicatrices.

1-2) La ligne directrice Q5B : « analyse des vecteurs d'expression dans les cellules utilisées pour la production protéique dérivée de l'ADNr » :

Cette ligne directrice offre un guide pour la caractérisation des vecteurs d'expression utilisés pour la production de produits protéiques recombinants au moyen de cellules eucaryotes ou

procaryotes. Et décrit les renseignements jugés utiles pour l'évaluation de la structure de ses vecteurs d'expression servant à la fabrication de protéines dérivées de l'ADN recombinant [36].

1-3) La ligne directrice Q5C : « Etude de stabilité des produits biotechnologiques » :

(Q5C) est une directive qui introduit le concept d'identification et de caractérisation du produit ,elle fournit des explications détaillées sur les analyses et les épreuves physico-chimiques, biochimiques, et immunochimiques qui doivent être inclus dans l'évaluation de stabilité à joindre au dossier d'une demande de mise sur le marché d'un produit biologique ou issu de la biotechnologie, et énonce des recommandations relatives à l'évaluation de la stabilité des protéines et les polypeptides bien caractérisés ainsi que les produits qui en dérivent ou dont ils font partie et qui sont isolés de tissus, de liquides biologiques , de cultures cellulaires, ou qui sont fabriqués au moyen de la technologie de l'ADN recombinant. Ainsi cette ligne directrice adresse des méthodes d'évaluation, et de présentation des données de stabilité pour des produits tels que les cytokines (interférons, interleukines, facteurs stimulant les colonies, facteurs de nécrose de tumeurs), les érythropoïétines, les activateurs de plasminogène, les facteurs plasmatiques, les hormones et les facteurs de croissance, les insulines, les anticorps monoclonaux et les vaccins composés de protéines ou de polypeptides bien caractérisés [37].

1-4) La ligne directrice Q5D : « préparation et caractérisation des substrats cellulaires » :

Dans cette ligne directrice, sont décrites les normes générales qu'il convient d'appliquer à la préparation de lignées cellulaires humaines, animales et microbiennes devant servir à la préparation de produits biologiques ou issus de la biotechnologie, ainsi qu'à la constitution et à la caractérisation de banques de cellules utilisées à des fins de production [38].

1-5) La ligne directrice Q6B: « Spécifications : méthodes analytiques et critère d’approbation pour les produits biologiques et issus de la biotechnologie » :

La ligne directrice Q6B souligne les principes généraux pour l’adoption et la justification, dans la mesure du possible, d’un ensemble uniforme de spécifications internationales pour les produits issus de la biotechnologie et pour les produits biologiques, afin d’appuyer de nouvelles demandes de mise en marché.

Ainsi elle détaille l’ensemble des principes à prendre en considération dans l’adoption de ces spécifications telles que les méthodes de caractérisation, les considérations analytiques, le contrôle du procédé, les spécifications des pharmacopées, les limites de mise en circulation par rapport au limites de durée de conservation, ainsi que des concepts statistiques.

Cette ligne directrice fournit aussi des éléments de spécification des substances médicamenteuses, et du produit médicamenteux de point de vue : apparence, identité, pureté, impuretés, puissance, et quantité) [39].

1-6) La ligne directrice S6 : « Évaluation au stade préclinique de la sécurité des produits pharmaceutiques issus de la Biotechnologie » :

La ligne directrice S6 définit les principes généraux adoptés pour l’évaluation de la sécurité des produits biologiques ou issus de la biotechnologie, elle décrit les méthodes d’étude de l’activité biologique, l’activité pharmacodynamique, choix de l’espèce ou du modèle animal, le nombre et le sexe des animaux, le choix du mode d’administration et de la dose, et l’immunogénicité.

Elle précise aussi les considérations particulières à prendre en compte lors de cette évaluation telles que les études de sécurité d’emploi pharmacologique, les études de toxicité à dose unique et à doses répétées, les études d’immunotoxicité, les études de toxicité sur les fonctions de la reproduction et le développement, les études de génotoxicité, les études de carcinogénicité, ainsi que les études d’évaluation de la tolérance locale [40].

I- L'Union Européenne (UE) :

L'Union Européenne a été la première à agir et à rechercher une dénomination capable de répondre au cas particulier de ces médicaments. Plutôt que le terme «biogénérique», jugé inapproprié, c'est le terme «biosimilaire» qui a été retenu pour ces produits définis comme des « nouvelles versions similaires au produit biologique de référence en termes de qualité, d'efficacité et de sécurité ».

Leur autorisation est régie par la nouvelle législation pharmaceutique européenne en vigueur depuis novembre 2005 (directive 2004/27/CE) qui prévoit une période de protection des données jusqu'à 11 ans à partir de l'autorisation de la spécialité de référence. Ce n'est qu'à l'issue de cette période que les biosimilaires peuvent accéder au marché.

1) Les directives européennes :

La directive 2004/27/CE :

La directive 2004/27/CE du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004 modifie la directive 2001/83/CE instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain. Ainsi, après la modification de l'article 10 :

- On entend par « médicament générique » (§2. (b)): Un médicament qui a la même composition qualitative et quantitative en substances actives et la même forme pharmaceutique que le médicament de référence et dont la bioéquivalence avec le médicament de référence a été démontrée par des études appropriées de biodisponibilité.
- (§ 4) Lorsqu'un biomédicament qui est similaire à un biomédicament 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 biomédicament et du biomédicament 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 une annexe de ce document (l'annexe I), et les lignes directrices

détaillées afférentes. Les résultats d'autres essais figurant dans le dossier du médicament de référence ne doivent pas être fournis [10].

2) Les principales lignes directrices européennes (guidelines) :

2-1) Lignes directrices générales CHMP/437/04 :

La non-applicabilité de l'approche « générique » pour le développement des médicaments biosimilaires a conduit l'EMA à réfléchir aux conditions de développement que devraient remplir ces médicaments pour pouvoir être mis sur le marché.

En 2004, l'EMA a édité des recommandations qui décrivent la voie de développement « biosimilaires » pour ces nouvelles molécules, basée sur la comparabilité en termes de qualité, d'efficacité et de tolérance avec le produit de référence [41].

C'est ainsi que la série de lignes directrices CHMP/437/04 adoptée en 2005 marque l'introduction du concept de « produits médicaux biosimilaires » et les principes clés pour le développement des médicaments biosimilaires [42].

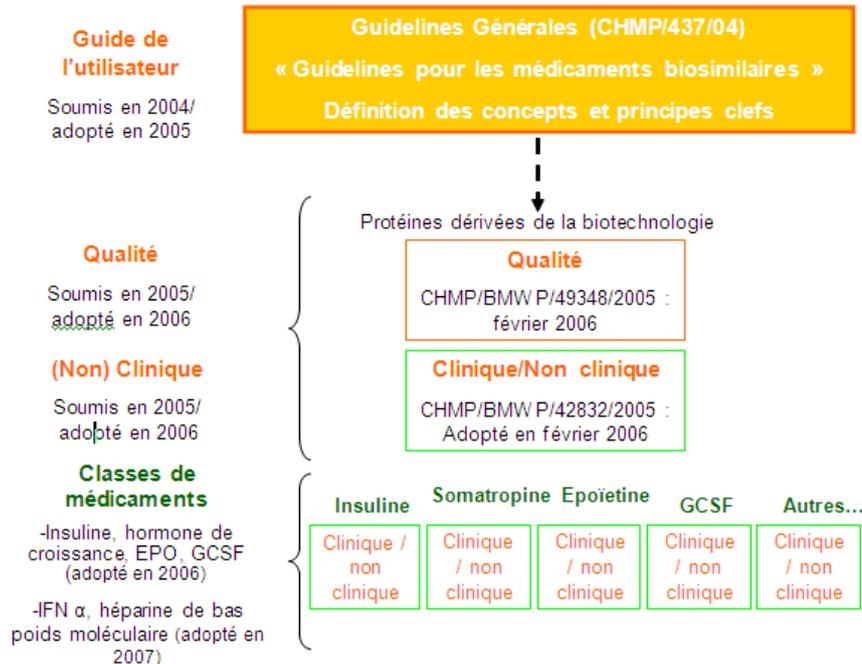


Figure 3 : les principales lignes directrices.

Les guidelines suivantes adoptées en 2006 envisagent les aspects relatifs à la qualité et précisent les démarches cliniques et non cliniques à suivre. Plusieurs points sont abordés dans ces guidelines :

- L'approche générique apparaît non appropriée, par rapport à la complexité des structures et/ou production moléculaires,
- Le concept de biosimilaire est appliqué à tous les produits biologiques approuvés après l'expiration des brevets d'exploitation des médicaments biologiques de référence.
- La biosimilarité entre la nouvelle molécule et le produit de référence doit être établie à différents niveaux : Qualité/Sécurité/Efficacité.
- Chaque produit est clairement identifié pour mettre en place un dispositif de pharmacovigilance.
- Les classes spécifiques des molécules ont été déterminées.
- Quand la voie d'administration, la posologie, ou la forme sont différentes : mise en place d'essais cliniques ou non cliniques [43].

2-2) Les lignes directrices pour la qualité :

2-2-1) CPMP/BWP/3207/00 :

La ligne directrice sur la comparabilité des produits pharmaceutiques contenant les protéines issues de Biotechnologie en tant que substance active : recommandations concernant la qualité. Cette ligne directrice représente la première ligne directrice qui offre les recommandations générales relatives à la qualité des produits biologiques [44-45].

2-2-1) CHMP/49348/05 :

Produits pharmaceutiques biologiques similaires contenant les protéines issues de biotechnologie en tant que substance active : recommandations concernant la qualité.

Cette directive est constituée essentiellement de deux parties : une partie qui concerne la qualité des médicaments biosimilaires. L'autre partie détaille la démonstration de la comparabilité d'un médicament biosimilaire avec celle d'un produit de référence [43].

L'objectif de cette directive est de traiter les aspects relatifs à la qualité des médicaments biosimilaires et d'établir les conditions de qualité pour qu'un produit biologique soit considéré comme similaire à un produit biologique de référence déjà autorisé sur le marché, Cette directive adresse les exigences de l'EMA concernant le processus de fabrication, les méthodes analytiques d'évaluation de la comparabilité, les critères adoptés pour choisir un produit de référence, ainsi que la caractérisation chimique et biologique du produit biosimilaire.

Elle précise que le dossier de demande d'AMM, doit contenir les mêmes données sur la qualité et la sécurité du produit biosimilaires par rapport au produit biologiques de référence.

Elle indique aussi que l'exercice de comparabilité peut se faire par rapport à des données officielles : monographies de la pharmacopée, guidelines de l'ICH, des publications scientifiques, de telles comparaisons du principe actif et du produit fini sont cependant limités et insuffisantes pour établir tous les aspects de cette évaluation. C'est pour cette raison l'EMA exige la réalisation d'un exercice étendu de comparabilité est pour démontrer que le biosimilaire et le produit biologique de référence possèdent les mêmes profils en termes de qualité, sécurité, et d'efficacité. [43-46]

2-3) Les lignes directrices pour les essais non cliniques et cliniques :

2-3-1) CPMP/ICH/5721/03 :

(Ligne directrice Q5E d'ICH) 4^{ème} édition. Note de recommandations sur les produits biotechnologiques/biologiques suite à un changement de procédé de fabrication [44].

2-3-2) CHMP/42832/05 :

Ligne directrice sur le développement des produits pharmaceutiques biologiques similaires contenant les protéines issues de Biotechnologie en tant que substance active : les recommandations concernant les essais non-cliniques et cliniques.

Avant de lancer le développement clinique d'un médicament biosimilaire, des études non cliniques devraient être réalisées. Ces études devraient être des études comparatives, et en

même temps capables de détecter des différences de réponse entre le biosimilaire et le produit de référence.

pour démontrer la comparabilité clinique entre le biosimilaire et le produit de référence en ce qui concerne les paramètres pharmacocinétiques principaux, des études comparatives pharmacocinétiques devraient être réalisées, la conception de ces études ne devraient pas nécessairement suivre le même plan standard de comparabilité clinique, puisque autre que la similitude en termes d'absorption, et de biodisponibilité, l'étude de comparabilité doit inclure d'autres données supplémentaires telles que les caractéristiques d'élimination et le temps de demi-vie d'élimination [47].

2-3-3) CHMP/BMWP/101695/06 :

Comparabilité des produits pharmaceutiques issus de biotechnologie après un changement du processus de fabrication : essais cliniques et non-cliniques [44].

2-3-4) CHMP/BMWP/14327/06 :

Ligne directrice sur l'évaluation d'immunogénicité des protéines thérapeutiques issus de biotechnologie, cette ligne directrice offre un cadre général de la réglementation de l'EMA en ce qui concerne l'immunogénicité des biosimilaires, ainsi elle énumère l'ensemble des critères dont les développeurs d'un médicament biosimilaire doivent répondre pour leur demandes d'autorisation, ou lors de tout changement au niveau du processus de production capable d'affecté la qualité et l'innocuité du produit biosimilaire, ainsi elle traite les facteurs qui pourraient influencer l'immunogénicité des produits biosimilaires lors des différentes étapes de leurs développement, elle détaille également l'ensemble des méthodes d'évaluation du potentiel immunogénique des biosimilaires lors des essais précliniques et cliniques.

Enfin et dans le cadre de la pharmacovigilance post-marketing la ligne directrice recommande la nécessité d'établir un plan de gestion des risques et la mise en place d'un système de pharmacovigilance qui tient compte des risques potentiels identifiés auparavant. [48]

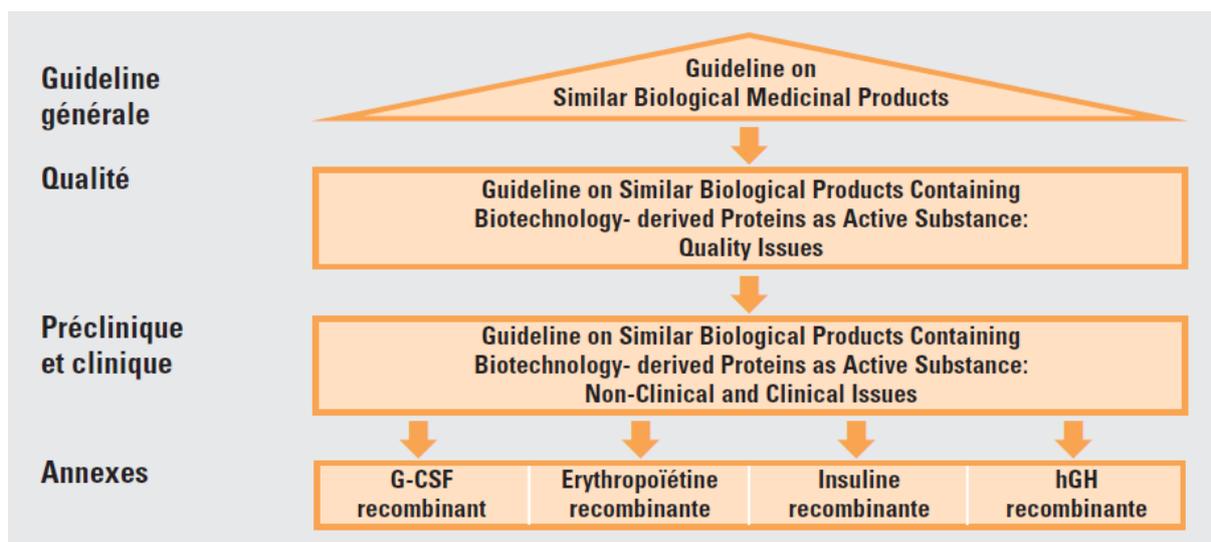


Figure 4 : structure hiérarchique des lignes directrices de l'EMA

2-4) Les lignes directrices spécifiques aux produits :

Comme chaque famille des biosimilaires est unique, des annexes spécifiques, ainsi que des annexes modifiées ont été publiées pour la somatropine, l'insuline, le G-CSF, l'interféron alfa, l'érythropoïétine, les héparines de faible poids moléculaire :

2-4-1) CHMP/313229/05 :

Annexe de la ligne directrice sur le développement des produits pharmaceutiques biologiques similaires contenant les protéines issues de biotechnologie en tant que substance active : issues non-cliniques et cliniques, recommandations sur le développement des produits pharmaceutiques biosimilaires contenant le facteur de croissance stimulant granulocytaire recombinant [49].

2-4-2) CHMP/94528/05 :

Annexe de ligne directrice sur le développement des produits pharmaceutiques biologiques similaires contenant des protéines issues de biotechnologie en tant que substance active : Issues non-cliniques et cliniques, recommandations sur le développement des produits pharmaceutiques similaires contenant la somatropine [50].

2-4-3) CHMP/32775/05 :

Annexe de la directive sur les produits pharmaceutiques biologiques similaires contenant les protéines issues de biotechnologie en tant que substance active : issues non-cliniques et cliniques – recommandations sur le développement des produits pharmaceutiques semblables contenant l'insuline humaine recombinante **[51]**.

2-4-4) CHMP/94526/05 :

Annexe de ligne directrice sur le développement des produits pharmaceutiques biologiques similaires contenant les protéines issues de biotechnologie en tant que substance active : Issues non-cliniques et cliniques, recommandations pour le développement des produits pharmaceutiques similaires contenant les érythropoïétines recombinantes **[52]**.

2-4-5) CHMP/BMWP/102046/06 :

Ligne directrice sur les Produits pharmaceutiques similaires contenant l'interféron recombinant alfa autant que substance active **[53]**.

2-4-6) CPMP/BWP/1113/98 :

Document de concept : Développement d'une directive sur la comparabilité des produits issus de biotechnologie **[54]**.

2-4-7) CHMP/BMWP/7241/2006 :

Annexe de la directive sur les produits pharmaceutiques biologiques similaires contenant des protéines issues de biotechnologie en tant que substance active : recommandations sur le développement non clinique des produits pharmaceutiques biologiques similaires contenant l'Interféron recombinant **[55]**.

2-4-8) CHMP/BMWP/496286/06 :

Produits pharmaceutiques biologiques similaires contenant les héparines de faible poids moléculaire : recommandations de développement non-cliniques (cette ligne directrice détaille les recommandations de la ligne directrice CHMP/BMWP /118264/07) [56].

2-4-9) EMEA/CHMP/BMWP/17073408 :

Révision des conseils sur les produits pharmaceutiques similaires contenant les érythropoïétines recombinantes [57].

2-4-10) EMEA/CHMP/114720/2009 :

Recommandations sur l'évaluation d'immunogénicité des anticorps monoclonaux destinés à l'utilisation clinique in vivo [58].

2-4-11) Les lignes directrices publiées en 2010 :

- EMA/CHMP/BMWP/94999/2010 :

Document de concept pour le développement des médicaments biosimilaires contenant la FSH (*follicle stimulation hormone*) recombinante [59].

- EMEA/CHMP/BMWP/86572/2010 :

Document de concept pour le développement des médicaments biosimilaires contenant l'interféron bêta recombinant [60].

- EMEA/CHMP/BMWP/301636/2018.Corr (ligne directive corrigée et adoptée le 01/10/2010) :

Ligne directrice sur le développement clinique et non clinique des médicaments biosimilaires contenant l'érythropoïétine recombinante [61].

- EMEA/CHMP/BMWP/403543/2010 :

Ebauche de guideline pour le développement des médicaments biosimilaires contenant des anticorps monoclonaux autant que principe actif [62].

Tableau II : Les lignes directrices de l'EMA classées selon l'ordre chronologique de leur apparition.

Numéro de Référence de la directive	Titre de la directive	Date
Directive générale CHMP/437/04	Les médicaments biologiques similaires	DP : Sep 2005 DA : Oct 2005
Directives sur la qualité CHMP/BWP/3207/00	La comparabilité des médicaments contenant des protéines issues de biotechnologie autant que principe actif : recommandations sur la qualité.	DP : Dec 2003 DA : Oct 2003
CHMP49348/05	Les médicaments biologiques similaires contenant des protéines issues de biotechnologie autant que principe actif : recommandations sur la qualité	DP : Fév. 2006 DA : Jun 2006
Recommandations sur les essais non cliniques et cliniques		
CHMP/ICH/5721/03	ICH Q5E étape 4 : guide pour les produits biotechnologiques/biologiques. Au sujet des modifications dans le processus de production.	DP : Déc 2004 DA : Jun 2005
CHMP/42832/05	Les produits biologiques similaires contenant des protéines issues de biotechnologie comme principe actif : recommandations sur les essais cliniques et non cliniques.	DP: Fév. 2006 DA : Jun 2006
CHMP/BMWP/101695/06	Comparabilité des médicaments issus de biotechnologie, après un changement de processus de production : recommandations sur les essais cliniques et non cliniques	DP : Jul 2007 DA : Nov 2005
CHMP/BMWP/101695/06	Immunogénicité des protéines thérapeutiques issues de biotechnologie	DP : Jan 2008 DA : Avr 2008
Directives spécifiques aux produits		
CHMP/31329/05	Annexe de la guideline sur les biosimilaires concernant les recommandations sur les essais cliniques et non cliniques : directive relative aux produits biosimilaires de la G-CSF.	DP : Fév 2006 DA : Jun 2006
CHMP/94528/05	Annexe de la guideline sur les biosimilaires concernant les recommandations sur les essais cliniques et non cliniques : directive relative aux produits biosimilaires de la somatropine.	DP : Fév 2006 DA : Jun 2006
CHMP/32775/05	Annexe de la guideline sur les biosimilaires concernant les recommandations sur les essais cliniques et non cliniques : directive relative aux produits biosimilaires de l'insuline humaine recombinante	DP : Fév 2006 DA : Jun 2006

CHMP/94526/05	Annexe de la guideline sur les biosimilaires concernant les recommandations sur les essais cliniques et non cliniques : directive relative aux produits biosimilaires de l'érythropoïétine recombinantes	DP : Mar 2006 DA : Jul 2006
CHMP/BMWP/1182264/07	Les produits biologiques similaires contenant les héparines à bas poids moléculaire.	DP : Avr 2006 DA : Oct 2006
EMEA/CHMP/BMWP/301636/2008	Ligne directrice révisée sur le développement non clinique et clinique des médicaments biosimilaires contenant l'érythropoïétine recombinante.	DP : Mar 2006 DA : Oct 2006
Projet de ligne directrice CHMP/BMWP/102046/06	Les produits biologiques similaires contenant l'interféron alfa recombinante	DP : Oct 2007
EMEA/CHMP/BMWP/403543/2010	guideline pour le développement des médicaments biosimilaires contenant des anticorps monoclonaux autant que principe actif	DP : Nov 2010
Dossiers de conception		
CPMP/BWP/1113/98	Développement de la guideline du CPMP relative à la comparabilité des produits issus de biotechnologie.	DP : Jun 1998
CPMP/BMWP/7241/2006	Annexe de la guideline sur les biosimilaires concernant les recommandations sur les essais cliniques et non cliniques : directive relative aux produits biosimilaires de l'interféron alfa.	DP : Apr 2006
CPMP/BMWP/7241/2006	Recommandations sur les essais cliniques et non cliniques relatives aux biosimilaires des héparines de bas poids moléculaire	DP : Jan 2007
EMEA/CPMP/BMWP/170734/08	Révision de la directive relative aux biosimilaires de l'érythropoïétine recombinante	DP : Jul 2008
EMA/CHMP/BMWP/86572/2010	Document de concept pour le développement des médicaments biosimilaires contenant l'interféron bêta.	DP : Mar 2010
EMA/CHMP/BMWP/94899/2010	Document de concept pour le développement des médicaments biosimilaires contenant la FSH (<i>follicule stimulation hormone</i>) recombinante.	DP : Mar 2010

EP : date de publication ED : date d'application

II- LA LEGISLATION CANADIENNE :

Concernant les produits biologiques, l'opinion de l'agence canadienne est en tout point semblable à celle de l'EMA. En préambule, cette dernière indique clairement que les produits biologiques fabriqués à partir d'animaux, de micro-organismes ou par l'utilisation d'animaux ou de microorganismes (bactéries, levures), présentent une structure plus complexe avec un contenu qui tend à varier davantage que les médicaments synthétisés par voie chimique. L'agence canadienne rappelle que les médicaments biologiques sont labiles et sensibles aux variations des procédés de fabrication. L'utilisation de matières premières biologiques, de cellules productrices et de milieux de fermentation comporte donc des risques (présence de contaminants, de virus etc...).

Pour cette raison, l'agence précise qu'il doit être accordé une attention particulière au contrôle des matières premières, à l'inactivation des virus et à toutes les étapes de purification et d'analyse des produits. Elle prévient que toute altération ou modification touchant les matières premières, les procédés de fabrication, l'équipement ou les installations peut avoir des répercussions importantes et inattendues sur les produits intermédiaires et/ou finaux [63].

Selon les recommandations canadiennes, les essais cliniques comparatifs sont essentiels pour démontrer la similarité des profils d'efficacité et d'innocuité entre le PBU et un médicament biologique de référence (devant être déjà commercialisé au Canada). Seules quelques exceptions, telles que les hormones de croissance ou les insulines humaines recombinantes, se satisferont d'une étude clinique comparative vérifiant uniquement l'innocuité. Pour les autres, la similarité devra être démontrée par des essais cliniques d'équivalence, toujours préférables à des essais de non-infériorité. Comme en Europe, aucune indication n'est donnée sur le nombre de patients à inclure dans les essais, par contre les études cliniques comparatives devront être conçues de façon à compter un nombre suffisant de patients traités sur une période acceptable pour détecter des différences majeures entre le PBU et le produit biologique de référence.

A noter que l'analyse de l'immunogénicité du PBU devra se faire dans le cadre d'études spécialement conçues.

Autre point important concernant le PBU, l'agence met l'accent sur la nécessité de disposer d'un plan de gestion de risque avec les mêmes exigences que celles liées aux nouveaux médicaments biologiques, avec un suivi particulier de l'immunogénicité. A noter que ce plan devra être mis en place et conservé tout au long de la vie du produit.

L'agence canadienne est plus floue que l'EMA sur la nécessité de réaliser des essais cliniques comparatifs pour chaque indication d'un même produit biologique. Néanmoins, les experts canadiens précisent que lorsque le médicament biologique de référence ne possède pas l'indication clinique recherchée, des données complètes sur les essais cliniques doivent être fournies à l'appui de cette indication [7-64].

Les principales pointes de la législation canadienne:

L'agence de santé canadienne, a publié ses guidelines relatives à la copie de produits biologiques (biosimilaires). Appelés Produits Biologiques Ultérieurs – PBU (ou Subsequent Entry Biologics – SEBs), ceux-ci se trouvent encadrés de manière aussi stricte qu'en Europe quant à la nécessité de réaliser des essais cliniques comparatifs.

Les concepts et principes fondamentaux du cadre réglementaire s'appliquant aux PBU :

- Le demandeur d'AMM doit présenter les preuves nécessaires afin d'appuyer tous les aspects d'une demande d'autorisation, ainsi que les décisions réglementaires concernant les PBU seront fondées sur la loi et le règlement sur les aliments et drogues. Les concepts et les principes scientifiques et réglementaires faisant partie des cadres réglementaires actuels visant les produits biologiques, pharmaceutiques et génériques servent de fondement au cadre réglementaire s'appliquant aux PBU.

- L'autorisation d'un ensemble réduit de données cliniques et non cliniques pour un PBU repose sur la démonstration d'une similarité entre le PBU et le médicament biologique de référence adéquat.

- Les PBU ne sont pas des « drogues biologiques génériques » par conséquent, bon nombre de caractéristiques associées au processus d'autorisation et à l'utilisation commerciale des

médicaments génériques ne s'appliquent pas, c'est pour cette raison que l'autorisation d'un produit à titre de PBU ne constitue pas une déclaration d'équivalence thérapeutique ou pharmaceutique avec le médicament biologique de référence.

- Une présentation de PBU implique une comparaison avec un autre produit. Ainsi, toutes les lois et tous les principes touchant les brevets et la propriété intellectuelle énoncés dans le règlement sur les aliments et drogues (protection des données), le règlement sur les médicaments brevetés (avis de conformité) et la loi sur les brevets s'appliquent aux PBU.

-Une fois qu'un avis de conformité (AC) est émis, le PBU constitue un nouveau médicament biologique et est réglementé comme tout autre nouveau médicament biologique. Un PBU ne peut cependant servir de médicament biologique de référence pour une autre présentation de PBU [7-64].

3) les lignes directrices :

Pour les lignes directrices l'agence canadienne de santé adopte les lignes directrices de l'ICH relatives aux produits biotechnologiques et une ligne directrice spécifique aux produits biologiques ultérieures pour l'approbation des produits biosimilaires.

Les lignes directrices de l'ICH :

Q5A, Q5B, Q5C, Q5D, Q6B, S6 (cf. pages 14-17)

Lignes directrices spécifiques aux produits biologiques ultérieures : « lignes directrices à l'intention des promoteurs : exigences en matière de renseignements et de présentation relatives aux produits biologiques ultérieurs (PBU) »

Ce document adresse des recommandations concernant les PBU, aux demandeurs d'AMM pour leur permettre de satisfaire aux exigences en matière de renseignements et de réglementation relevant de la loi et du règlement sur les aliments et drogues pour ce qui est de l'autorisation des produits biologiques ultérieurs (PBU) au Canada.

Le document est constitué de cinq chapitres :

Le premier chapitre décrit le cadre législatif général applicable à ces produits : les brevets, la propriété intellectuelle et la protection des données, les critères de choix du Médicament biologique de référence. Le deuxième chapitre porte sur les exigences en matière de renseignements relatives aux demandes d'essais cliniques, les exigences en matière de renseignements pour présentations de drogue nouvelle comme les renseignements sur la qualité, les renseignements cliniques et non cliniques, ainsi que le plan de gestion des risques sont détaillées dans le troisième chapitre.

Le quatrième chapitre met en évidence les exigences applicables aux PBU après leurs commercialisation telles que le signalement des réactions indésirables, l'établissement de rapports périodiques de pharmacovigilance, il détaille aussi les cas dans lesquelles l'agence canadienne peut prendre la décision de suspendre d'une manière déterminée ou indéterminée la commercialisation d'un produit biologique ultérieur.

Le dernier chapitre précise les exigences de l'agence en matière d'étiquetage pour ces produits.

Dans ce document l'agence canadienne insiste sur la nécessité d'harmonisation avec d'autres organismes de réglementation compétents et d'organismes internationaux, comme l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [7].

III) Les Etats-Unis :

1) Avant la réforme du système de santé :

Durant cette phase les lois qui existaient n'étaient pas assez suffisant pour encadrer la problématique des biosimilaires aux Etats-Unis. Trois principales lois régissent l'autorisation des médicaments, dont les médicaments biologiques :

- la loi « public health service (PHS Act) » de 1902 relative aux médicaments biologiques traditionnels comme les vaccins [65].
- la loi « Food, Drug, and Cosmetic (FD&C Act » de 1938) relative aux médicaments de petite taille moléculaire [66].
- la loi « Hatch Waxman Act » de 1984, relative aux médicaments génériques, en incluant les médicaments biologiques [67].

2) Après la réforme du système de santé :

Le 21 mars 2010, le congrès américain a promulgué une nouvelle législation concernant une réforme du système de santé aux États-Unis, connu sous le nom de « Patients Protection and Affordable Care Act » [68].

Cette loi comprend une partie relative aux produits biologiques intitulée « Biologics Price Competition and Innovation Act » qui permet à la FDA (Food and Drug Administration) d'instauré des lois relatives à la commercialisation de ces produits [69].

La loi sur les biosimilaires contient de nombreuses similarités avec la loi régissant la procédure de développement des médicaments génériques qui a été adopté en 1984 Hatch-Waxman Act.

3) Les principales caractéristiques de la nouvelle législation américaine en matière de biosimilaires :

3-1) Définition appropriée du médicament biosimilaire ou (*follow on biologic*) :

Un médicament biosimilaire est défini Comme étant un médicament dont la biosimilarité a été approuvé telle que la définition dans la sous section (k) :

- a) que le produit biologique est fortement similaire à un produit de référence malgré des différences mineures dans les composants médicalement inactifs.
- b) l'absence de toute différence médicalement significative entre le produit biologique similaire et le produit de référence en termes d'activité, pureté, et sécurité du produit [66-68].

3-2) Interchangeabilité :

Un produit biologique similaire est considéré interchangeable si les conditions suivantes sont remplies :

- le produit biologique peut être substitué au produit de référence sans l'intervention du praticien qui a prescrit le produit de référence.
- peut produire le même résultat clinique que le produit de référence.
- le produit ne présente aucun risque additionnel de point de vue sécurité lors d'une commutation possible entre le produit de référence et le biosimilaire.
- La voie d'administration, la forme galénique, et l'efficacité doivent être identiques pour le biosimilaire et le produit de référence.
- Les conditions d'utilisation pour le biosimilaire ont été approuvées pour le produit de référence [70-72].

3-3) Les études de comparabilité :

- Le demandeur doit établir la biosimilarité à travers :
- Des études analytiques qui doivent prouver que le biosimilaire est fortement semblable au produit de référence, malgré l'existence de certaines différences mineures en constituants inactifs (excipients).

- Des études établies chez les animaux (comprenant des études de toxicité) ;
- Des études cliniques (d'immunogénicité y compris des études de pharmacocinétique et/ou pharmacodynamique) pour démontrer la sécurité, la pureté et l'efficacité dans une ou plusieurs conditions pour lesquelles le produit de référence est approuvé.

Le demandeur doit montrer également que le produit de référence et le biosimilaire, possèdent tous les deux le même mécanisme d'action, si ce dernier est élucidé [71-72].

Dans certain cas la FDA peut dispenser le demandeur d'AMM de la réalisation d'une ou plusieurs de ces études.

3-4) Le Développement de la liste des brevets :

- le demandeur doit envoyer un avis de sa demande au propriétaire des brevets du produit de référence
- la FDA fixe un intervalle de temps bien défini pour permettre l'échange d'information sur le dossier et en matière de brevets (8 mois après le dépôt de la demande auprès de la FDA) [66-67].

3-5) L'exclusivité des données

- ✓ Produit de référence :

Les médicaments biologiques de référence reçoivent 12 ans d'exclusivité pour la première approbation, aucune exclusivité n'est accordée pour les nouvelles indications, nouveau dosage, nouvelle voie d'administration, ou un nouveau système de livraison, etc..., ou toutes les modifications qui n'affectent pas la sécurité, la pureté ou l'efficacité du produit de référence.

Les demandes de développement d'un produit biosimilaire (essais de caractérisations essais précliniques, cliniques...) ne peuvent pas être acceptées par la FDA pendant au moins 4 années après la date d'approbation du produit de référence la première fois [70-72].

✓ Biosimilaire:

D'une manière identique à la loi « Hatch-Waxman », qui accorde une période de 180 jours d'exclusivité sur le marché aux premiers demandeurs de médicaments génériques», la loi sur les biosimilaires donne également pour le premier produit biosimilaire une période d'exclusivité. Mais pour qu'un biosimilaire bénéficie de cette exclusivité. Il doit être approuvé interchangeable avec le médicament biologique de référence car seuls les produits considérés interchangeables sont habilités à cette exclusivité.

La durée d'exclusivité est généralement de 12 mois pour le premier biosimilaire interchangeable. Toutefois le délai dépend d'un certain nombre de facteurs étudiés par la FDA au cas par cas [71-72].

Tableau IV : Comparaison de certaines dispositions clés des projets de loi biosimilaires et la loi Hatch-Waxman.

Règlement	Waxman bill (HR 1427)	Eshoo bill (HR 1548)	Hatch-waxman act
Durée d'exclusivité	Nouveau produit : 5 ans ¹ Nouvelle indication : 3 ans ² Application pédiatrique : 6 mois additionnels ³	Nouveau produit : 12 ans ¹ Nouvelle indication : 14 ans ² Application pédiatrique : 6 mois additionnels ³	Nouveau produit : 5 ans ¹ Nouvelle indication : 3ans ² Application pédiatrique : 6 mois additionnels ³
essais clinique à nouveau ?	Non	Oui	Non
Interchangeabilité	Oui	Pas d'interchangeabilité, Celle-ci n'est accordée que dans des cas limités	Oui
La notification des brevets	Pas d'exigences en matière de brevets pour le demandeur du biosimilaire. En revanche le titulaire de l'AMM du produit de référence doit établir une liste des brevets de protection du produit, dans les 60 jours qui suit le dépôt de la demande de développement du biosimilaires auprès des autorités		Les brevets de protection du produit ou de son utilisation doivent être enregistrés par le titulaire du produit de référence dans 'l'orange book''

¹Estimée à partir de la date de la première autorisation du nouveau produit contenant la même protéine thérapeutique.

²Estimée à partir de la date d'approbation de la première nouvelle indication.

³ ajoutée à la date d'expiration de la période d'exclusivité accordé pour un nouveau produit, ou une nouvelle indication.

Malgré ce manque de réglementation, des biosimilaires sont déjà commercialisés sur le marché américain. Le premier à avoir obtenu l'AMM de la FDA est l'Omnitrope[®] de Sandoz en 2006, sur la base d'un dossier complet (BLA). Le débat sur les médicaments biosimilaires au États-Unis est loin d'être clos, d'autant que la législation américaine est appelée à évoluer et que d'autres questions d'ordre réglementaire, comme l'interchangeabilité et la durée des essais cliniques, restent en suspens.

IV) La législation Marocaine :

Actuellement au Maroc, il n'existe aucun règlement spécifique aux biosimilaires. Cependant on assiste à une augmentation des dépôts de dossiers des médicaments issus de la biotechnologie en vue de l'octroi de l'AMM.

Tous les produits sont importés et donc ont déjà obtenu l'AMM dans leurs pays d'origine.

Pour les contrôles, ils sont réalisés conformément aux dossiers techniques et aux référentiels internationaux en vigueur. En ce qui concerne l'évaluation, elle est réalisée selon les recommandations des circulaires ministérielles n°48 et 49.

Le dossier d'AMM pour les produits biologiques similaires est composé de :

- La documentation pharmaceutique
- La documentation toxicologique et pharmacologique
- La documentation clinique
- La documentation virologique

Les référentiels :

- Les pharmacopées en vigueur :

Selon l'origine du produit, la pharmacopée européenne, japonaise ou américaine

- Les normes ICH :

- Q5A : Sécurité virale des produits biotechnologiques
- Q5B : analyse des vecteurs d'expression dans les cellules utilisées pour la production protéique dérivée de l'ADNr
- Q5C : Etude de stabilité des produits biotechnologiques
- Q5D : Préparation et caractérisation des substrats cellulaires
- Q6B : Spécifications : méthodes analytiques et critère d'approbation pour les produits biologiques et issus de la biotechnologie

- ✓ Les guidelines et directives Européennes (EMEA) :

La directive 2004 /27 et les lignes directrices spécifiques aux produits.

- ✓ Le guide des bonnes pratiques de fabrication.
- ✓ Les circulaires du Ministère de la Santé : circulaires ministérielles n°48 et 49 **[73]**.



Chapitre III :
Développement d'un
médicament Biosimilaire



I- Les étapes de développement d'un médicament biosimilaire :

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 [74]. 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 [75].

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].

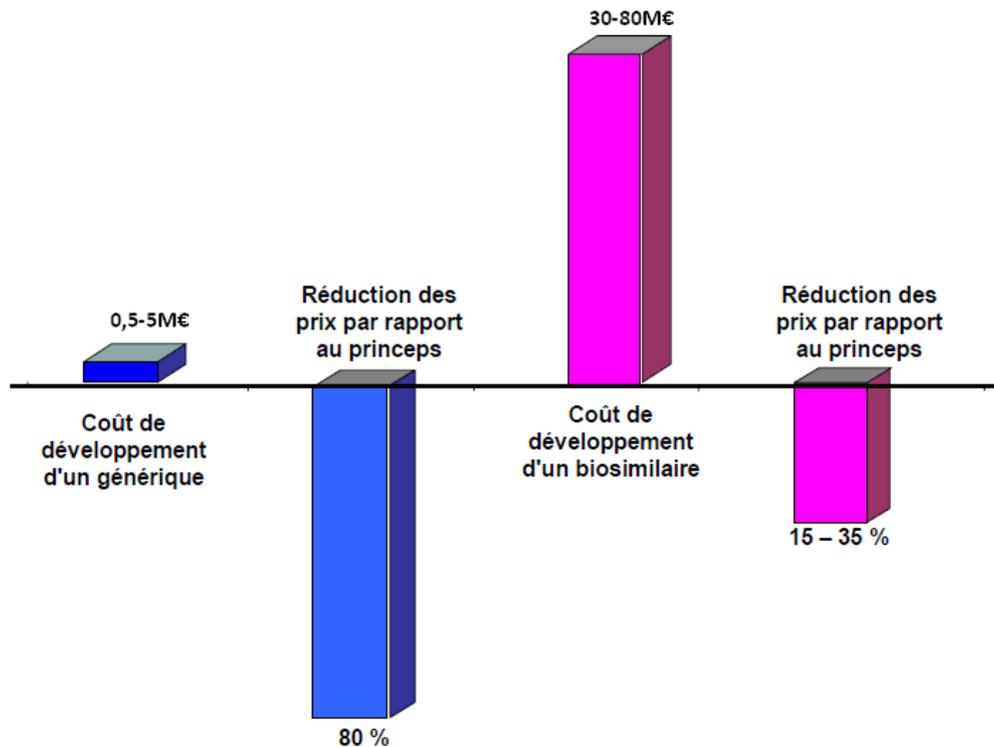


Figure 5: Coût de développement d'un médicament biosimilaire et taux de réduction du prix de vente du médicament.

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 [76]. 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 :

1-1-1) Tests de liaison ligand –récepteur :

Exemples des techniques utilisées pour l'évaluation de la liaison ligand-récepteur :

Une technique basée sur la prolifération d'une lignée cellulaire induite par le médicament à étudier. Cette prolifération est mesurée par l'intermédiaire de thymidine tritiée ou d'un composé non radioactif (méthylthiotétrazole par exemple) introduit dans l'ADN cellulaire. Wei et al. Ont développé cette technique utilisant la thymidine tritiée pour quantifier une érythropoïétine recombinante humaine dans le plasma [77].

Une technique basée sur l'activation d'un gène rapporteur après liaison du médicament à analyser utilisant la β -galactosidase ou la luciférase comme marqueur d'activation du gène. La quantification du médicament est indirecte et fonction de la liaison médicament-récepteur [78]. Vrolijk et al. Ont développé une technique de ce type pour doser l'interféron- α , basée sur l'activation d'un gène du virus de l'hépatite C (HCV) relié à une luciférase.

Une technique basée sur l'activation d'un récepteur aux kinases ou Kinase Receptor Activation Assay (KIRA). Les récepteurs cibles du médicament sont liés à une enzyme qui est activée par la liaison médicament-récepteurs cibles. L'activité de l'enzyme, fonction de la quantité de médicament, est mesurée par immunoassay [79].

Une technique appelée la résonance plasmonique en surface ou (Surface Plasmon Resonance) destinée à améliorer les problèmes d'altération des capacités d'activation des récepteurs dans les cultures de cellules. Le ligand se lie à la molécule d'intérêt thérapeutique emprisonnée dans une maille de dextran et déposée à la surface d'une puce recouverte d'or. L'activité de l'échantillon contenant le médicament est mesuré par la modification de réflexion de la lumière sur la puce [80].

1-1-2) Tests basées sur l'utilisation des lignées cellulaires :

Ces tests sont réalisés grâce aux techniques de génie génétique (ADN recombinant) qui ont permis la synthèse de lignées cellulaires immortelles exprimant de manière sélective des récepteurs spécifiques à un médicament donné.

Tableau V : Exemple d'essai préclinique in vitro comparant l'activité sur des cellules normocythémiques de souris Retacrit[®] (biosimilaire) et Eprex[®] (produit de référence).

Produit	Eprex [®]	Retacrit [®]
La dose (marquée sur l'étiquette du produit)	10000 UI	10000 UI
La quantité en érythropoïétine (ug/ml)	112(±8)	89(±17)
L'activité biologique mesurée (UI/ml)	12884(10860-15285)	11016(8942-13571)

Les tests in vitro offrent l'avantage de présenter une moindre variabilité que les tests in vivo. Malgré ces avantages sur les tests in vivo, les tests in vitro ne sont que des indicateurs d'une activité biologique et ne sont pas le reflet exact de la situation in vivo [79].

1-2) Les essais précliniques in vivo :

Principe : 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 [79].

Ces tests in vivo comprennent les études suivantes :

✓ Etude de la pharmacodynamie :

Ces études sont constituées d'une batterie de tests utilisant des modèles in vivo et in vitro permettant de distinguer :

les effets propres à la molécule (pharmacodynamie spécifique) avec mise en évidence d'une relation effet-dose et effet-temps, la détermination de la DE50 (Dose Efficace 50 ou dose entraînant 50% de l'effet maximum) toujours exprimée en mg/kg et recherche du mécanisme d'action de la molécule, des effets généraux, et les éventuelles interactions [81].

✓ Etude de détermination de la pharmacocinétique :

C'est le devenir de la molécule dans l'organisme dont on distingue en général 4 phases nommées " ADME " pour : Absorption, Distribution, Métabolisme et Elimination. Pour la tolérance locale, elle doit être étudiée chez l'animal en utilisant la voie d'administration la plus pertinente compte tenu de la voie d'administration clinique et doit être réalisée avant les essais de phase I.

✓ Des études toxicocinétiques :

Ces études donnent des indications préliminaires sur le devenir de la molécule dans l'organisme au cours du temps, ces indications doivent être prises en compte pour l'évaluation de la première dose à administrer aux volontaires sains en phase I.

- paramètres étudiés lors des études toxicocinétiques :

L'évolution de la concentration en fonction du temps, la quantité du médicament, la durée de l'exposition, la taille de la molécule, la lipophilie, la vitesse d'absorption, la biodisponibilité, la distribution et la concentration dans chaque site, la demi-vie, le métabolisme, et l'élimination.

Ces études sont complétées par une évaluation de la toxicité aiguë et la toxicité à doses répétées :

- Toxicité aiguë :

L'intérêt de ces tests est d'orienter la préparation des protocoles de toxicité animale en administration répétée et de fournir des données utiles à l'usage clinique en cas d'intoxication aiguë.

La toxicité animale en administration unique devra être faite avant toute administration à l'homme. L'objectif est d'évaluer, si possible, la DL50 ainsi que la dose sans effet létal. Cependant la détermination exacte de la DL50 n'est plus requise. Car la tolérance ne sera pas seulement jugée sur la survie ou la mort des animaux, mais aussi sur des critères cliniques (évolution pondérale, activité motrice, état tégumentaire,...). L'observation des animaux dure habituellement 14 jours. Les animaux survivants devront être sacrifiés à l'issue de cette période pour examen macroscopique des viscères. Au moindre doute à la nécropsie, un examen histopathologique devra être réalisé. Dans certains cas, des examens biologiques pourront être pratiqués. La dose maximale sans effet toxique sera la dose la plus élevée pour laquelle aucun effet toxique significatif clinique, biologique ou anatomopathologique n'aura été relevé par rapport au(x) lot(s) d'animaux témoins [82].

Ces essais doivent être menés chez deux espèces de mammifères (habituellement la souris et le rat), par deux voies d'administration : la voie d'utilisation clinique et la voie offrant la meilleure biodisponibilité connue (intraveineuse, intrapéritonéale,...). Si la voie d'utilisation clinique développée est intraveineuse, les études de toxicologie pourront n'être menées qu'avec cette dernière voie d'administration. De plus, un essai allégé est généralement effectué chez le chien pour rechercher la dose maximale tolérée (dose qui provoque un effet toxique minime mais qui n'affecte pas la survie des animaux) ou la dose maximale sans effet toxique.

- Toxicité par administration répétée :

Les études de toxicologie en administration répétée doivent être menées sur au moins deux espèces animales mammifères dont une non-rongeur. Le rongeur le plus souvent utilisé est le rat. Le choix de la deuxième espèce est de préférence orienté par les données déjà acquises sur la pharmacocinétique du produit en cours d'évaluation. En effet, la deuxième espèce animale choisie devra, dans la mesure du possible, présenter un profil

cinétique proche de l'homme (chien, singe,...). Dans le cas où aucune donnée de pharmacocinétique humaine n'est disponible, il pourra être procédé à une première administration à l'homme en dose unique après des études de toxicologie réitérée chez le rat et le chien. Notons enfin que les différences métaboliques entre les animaux et l'homme sont plus souvent quantitatives que qualitatives.

La voie d'administration doit, en principe, être celle de l'utilisation clinique. Habituellement, trois doses sont utilisées:

- une dose faible, correspondant à 2 à 3 fois la posologie clinique rapportée au poids corporel ou à la surface corporelle des animaux et corrigée si nécessaire en cas de biodisponibilités différentes entre l'animal utilisé et l'homme.
- une dose forte, devant en principe provoquer un ou plusieurs effets toxiques.
- une dose moyenne ou moyenne géométrique des deux doses précédentes.

En plus de ces études toxicologiques et toxicocinétiques d'autres études sont réalisées pour l'évaluation du pouvoir mutagène, de la cancérogénèse, et les effets sur les fonctions de reproduction [83].

- Cas particulier des produits issus des biotechnologies :

La nature particulière de ces produits ainsi que leur potentialité immunogène conduit à adapter les tests de toxicologie dans leur déroulement et l'élaboration de leur protocole [82].

- Pour les produits biosimilaires :

Pour les biosimilaires des études menées chez l'animal doivent être effectuées pour analyser l'activité pharmacodynamique appropriée à l'application clinique et la toxicité non-clinique grâce à au moins une étude de toxicité à doses répétées et des mesures de toxico-cinétique. Ces dernières doivent comporter la détermination du titre en anticorps, de la réactivité croisée et de la capacité de neutralisation. Enfin, s'il existe des problèmes particuliers de tolérance, ils

doivent être évalués dans la même étude de doses répétées. En principe, les autres études habituelles de toxicologie ne sont pas nécessaires pour l'enregistrement des biosimilaire [84].

2) 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) 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 [74].

Le procédé de production en système clos comporte généralement sept phases [85]:

- 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

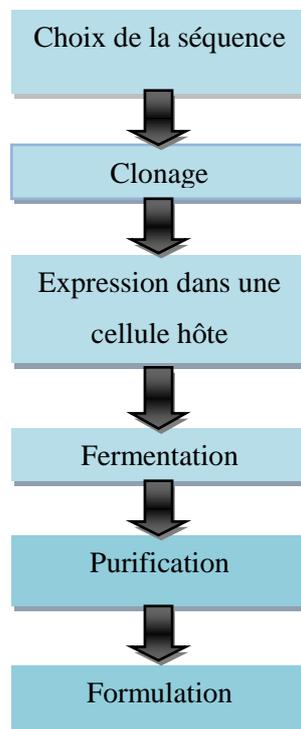


Figure 6: Les étapes de production des biosimilaires (système clos)

2-1-1) La sélection de la séquence d'ADN appropriée :

La première étape du processus de production de la protéine recombinante consiste à l'identification, et la sélection de la séquence d'ADN codant pour la protéine voulue, après cette sélection, la séquence isolée doit être incorporé dans un système d'expression :

Les stratégies d'expression des protéines doivent assurer l'obtention de la protéine la plus proche possible de la protéine naturelle particulièrement en ce qui concerne ses propriétés physicochimiques, catalytiques et immunologiques.

La figure 7 résume les différents possibilités actuelles de production d'une protéine, il est nécessaire d'optimiser le système d'expression à utilisé. C'est ainsi que seront essentiels les choix concernant :

- la cellule hôte (une bactérie, une levure ou une cellule animale).
- le vecteur d'expression dans lequel est introduit le gène ou l'ADN complémentaire correspondant à la protéine à produire.
- le promoteur qui régulera le niveau d'expression de cette protéine.

Ce choix de la cellule hôte est dicté en considèrent deux critères essentiels :

- les possibilités offertes par la cellule de modifier la protéine après sa traduction (glycosilation, carboxylation, clivage protéolytique) sachant que seules les cellules animales et en partie la levure sont capables d'assurer une maturation convenable de la protéine.
- des critères économiques, sachant qu'une culture à grande échelle d'*Escherichia coli* est moins onéreuse que s'il s'agit de cellules animales, lesquelles croissent lentement et nécessitent des milieux complexes et coûteux [86].

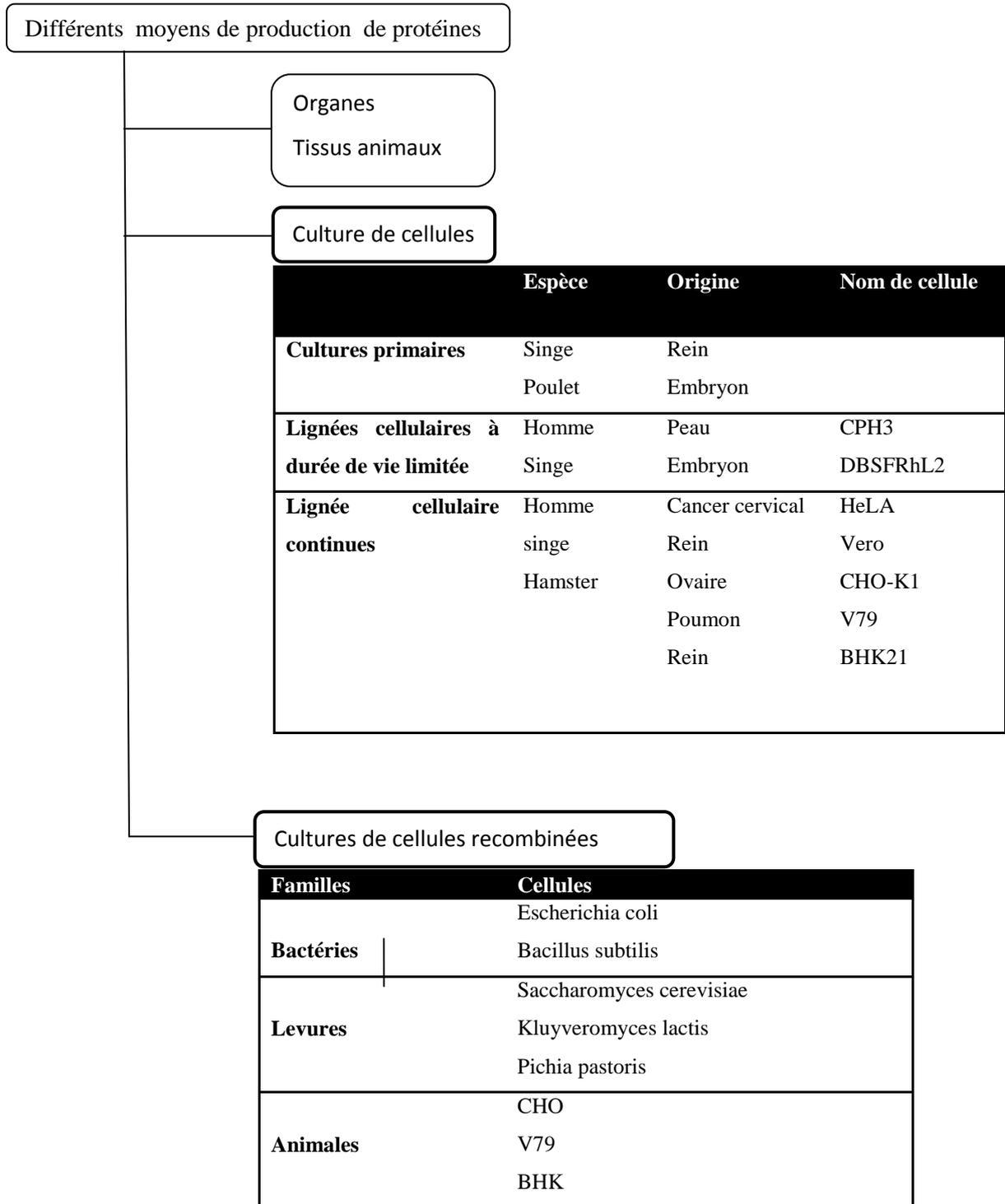


Figure 7 : Les différents systèmes d'expression utilisés pour la production des biosimilaires

2-1-2) Préparation de banque de cellules primaires :

Une banque de cellules est un ensemble d'ampoules de composition uniforme conservées dans des conditions définies et qui contient une fraction aliquote d'un même pool de cellules. La banque de cellules primaire (BCP) est généralement constituée à partir du clone cellulaire sélectionné qui renferme le vecteur d'expression.

Il faut décrire en détail les antécédents de la lignée cellulaire utilisée et le processus par lequel les banques de cellules ont été constituées, en indiquant notamment les méthodes et les réactifs employés durant la culture, l'âge cellulaire in vitro et les conditions de conservation.

Toutes les banques de cellules doivent être caractérisées pour les marqueurs phénotypiques et génotypiques pertinents pouvant inclure l'expression de la protéine recombinante ou la présence du vecteur d'expression.

Le vecteur d'expression présent dans la BCP devrait être analysé après. Si la BCP ne peut être soumise directement aux analyses, il faut analyser chaque BCT. Pour réaliser cette analyse, différentes techniques sont préconisées comme la cartographie de restriction ("restriction endonuclease mapping") ou d'autres techniques appropriées. Le but de ces analyses effectuées sur le vecteur d'expression est de déterminer le nombre de copies, la présence d'insertions ou de délétions et le nombre de sites d'intégration. Dans le cas des systèmes d'expression extrachromosomiques, il faut déterminer le pourcentage des cellules hôtes contenant le vecteur d'expression [7].

2-1-3) La banque de cellules de travail (BCT) :

La banque de cellules de travail est obtenue par la multiplication des cellules d'une ou de plusieurs ampoules de la BCP. Pour cette banque de cellules il faut décrire en détail les antécédents de la lignée cellulaire utilisée et le processus par lequel la banque de cellules a été constituée, en indiquant notamment les méthodes et les réactifs employés durant la culture, l'âge cellulaire in vitro et les conditions de conservation [7].

2-1-4) la production :

La production des médicaments issus de la biotechnologie se fait essentiellement grâce à des procédés de fermentation. Ils sont constamment développés afin de cultiver les microorganismes dans les conditions optimales pour qu'ils puissent produire les produits désirés.

2-1-4-1) Les équipements de bioproduction:

Les bioréacteurs :

Définition : Terme générique dérivé du vocabulaire du génie chimique désignant des récipients dans lesquels se déroulent une réaction (bio)-chimique. Ce terme de bioréacteur regroupe les fermenteurs (terme ancien) et cytotoculteur (terme plus récent) [87].

Les bioréacteurs consistent, le plus souvent, en une cuve en verre, à petite échelle, ou en inox, à grande échelle. Ces cuves sont munies, le plus généralement, d'un dispositif d'agitation, d'un Système d'aération et de balayage en différents gaz (O_2 , N_2 , CO_2 , Air...). Différentes voies d'alimentation en solutions telles que acides/bases sont aussi présentes.

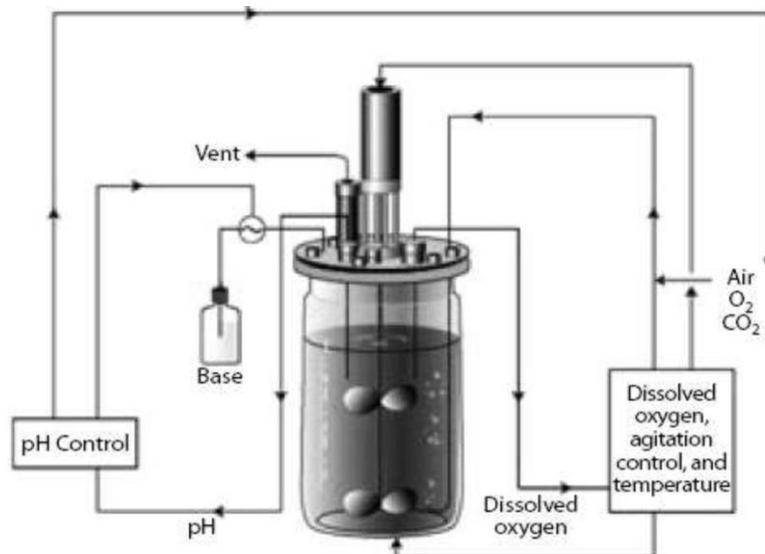


Figure 8 : Schéma d'un bioréacteur.

Il existe 3 grands systèmes de fermentation (bioréacteurs).

✓ **Le premier système de fermentation appelé fermentation « batch » ou discontinue:**

Dans le cas du mode discontinu ("batch"), le système est fermé, le milieu n'est pas renouvelé. La concentration en substrat diminue tandis que celle du produit augmente avec la croissance cellulaire. Le milieu, une fois épuisé et enrichi en sous-produits (métabolites), n'assure plus son rôle nutritif. La croissance cellulaire est stoppée

On peut observer 4 phases de croissance :

- Une phase de latence
- Une phase exponentielle de croissance
- Une phase stationnaire
- Une phase de mortalité.

✓ **Le deuxième système de fermentation semi-continu appelé fermentation « fed-batch » ou batch alimenté:**

En mode semi-continu ("fed-batch"), le substrat est apporté au fur et à mesure de sa consommation par les micro-organismes (Ce système est employé dans la production de la pénicilline. En effet, celle-ci est soumise à une répression catabolique lors de la présence d'une forte concentration de substrat carboné (le glucose)) On procède à l'ajout du substrat au fur et à mesure de sa consommation ce qui permet de maintenir la concentration en substrat et de prolonger la phase de production des cellules.

✓ **Le troisième système de fermentation appelé fermentation continue ou système ouvert (CSTR: *continuous stirred tank reactor*):**

La solution de nutriment est apportée en continue au réacteur mais une quantité équivalente de solution fermentée est prélevée. Le volume est donc constant.

On distingue deux grands types de fermenteurs continus :

Le réacteur à écoulement piston.

Le réacteur infiniment mélangé.

Ces deux types de fermenteurs diffèrent par le mode d'écoulement de la solution de nutriment.

▪ **Le réacteur à écoulement piston :**

Il est caractérisé par un rapport longueur /largeur très élevé. Le réacteur est cylindrique (10 à 15 mètres de long). La solution de nutriment pénètre à une extrémité du réacteur et la biomasse cellulaire ainsi que la production du produit collecté à l'autre extrémité du réacteur. Dans ce type de réacteur la turbulence est nulle. Il n'y a aucun mélange, pas d'agitation, pas d'homogénéité. Un élément qui entre dans le réacteur progresse sans mélange avec la molécule qui la précède ou qui la suit. Ceci génère des gradients de concentration à l'intérieur du réacteur. Plus on se situe loin par rapport à l'entrée du réacteur, plus la concentration de substrat est faible et plus la concentration du produit est élevée. L'inconvénient d'un tel type de réacteur est la difficulté de réguler le pH. Celui-ci étant différent en tout point du réacteur.

▪ **Le réacteur infiniment mélangé :**

L'homogénéité du contenu du réacteur est parfaite tout élément qui pénètre dans le réacteur est homogénéisé au contenu.

La concentration d'un composé donné dans le réacteur est la même en tout point. la concentration d'un composé donné dans l'effluent du réacteur est la même qu'à la concentration de ce composé à l'intérieur du réacteur [88].

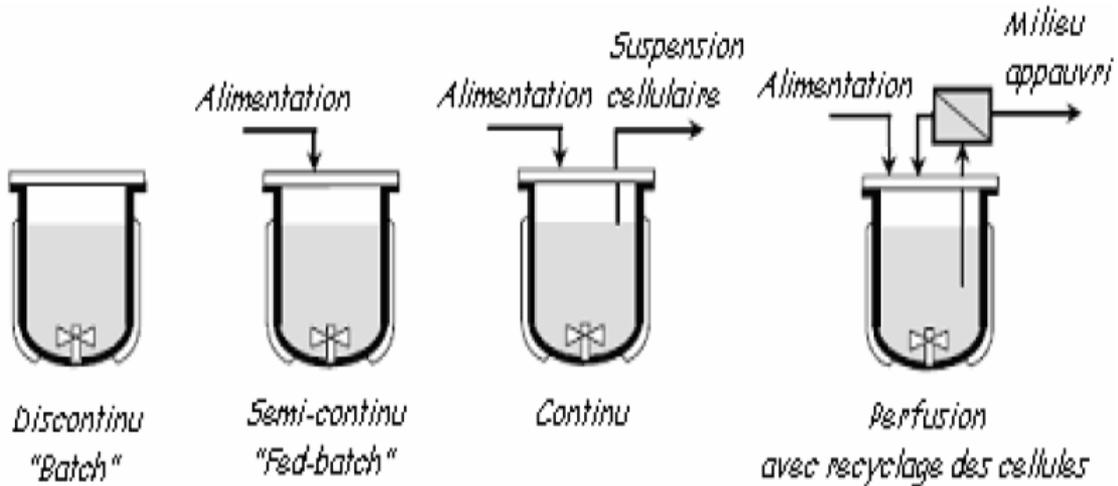


Figure 9: Les différents modes de culture

Des exemples de cinétiques selon le mode d'alimentation sont donnés ci-dessous :

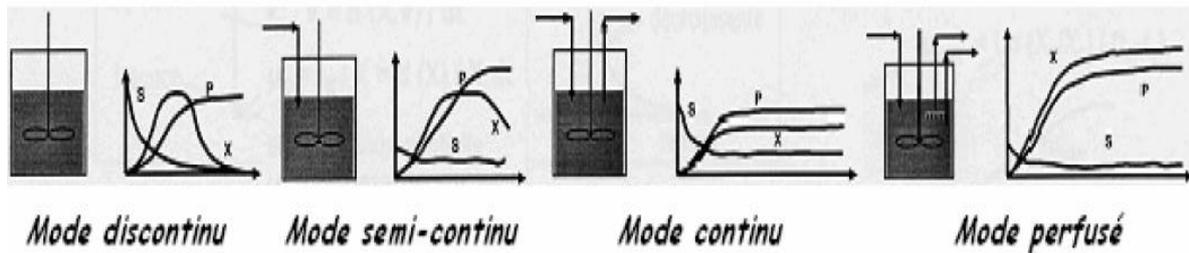


Figure 10 : Evolution dans le temps de la concentration cellulaire (X), des substrats (S) et des produits (P) en fonction du mode d'alimentation du bioréacteur

2-1-4-2) Autres équipements utilisés :

- Cuves, échangeurs de chaleur : pour la préparation des milieux stériles
- Centrale de production : pour le traitement et la stérilisation des gaz d'oxydoréduction (indispensables aux processus aérobies)
- Matériel de régulation et d'automatisation : permet de relier les différents éléments et maîtriser le processus avec une meilleure sécurité [88].

2-1-5) la purification :

La purification d'une protéine est un processus qui consiste à extraire cette substance depuis un mélange initial de tissus biologiques ou cultures cellulaires. Pour séparer la protéine des autres composantes cellulaires, il faut passer par plusieurs étapes de purification nécessitant différents traitements de l'échantillon de départ [89] :

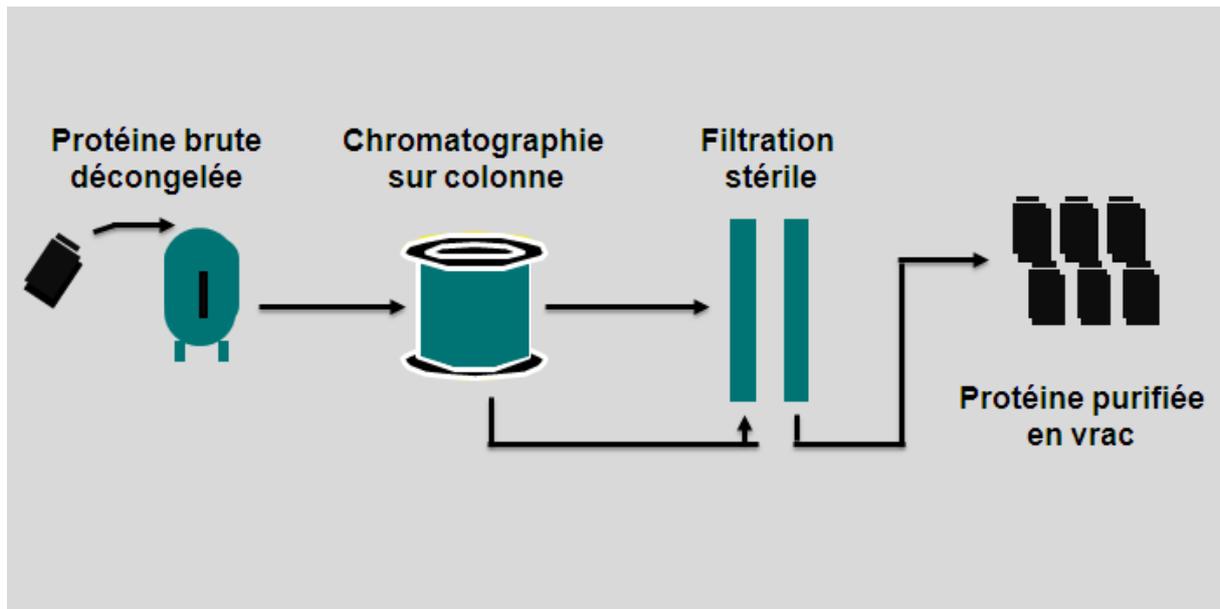


Figure 11 : Schéma représentatif des différentes étapes de purification

a) séparation et clarification :

Le but de cette opération est de séparer les cellules du surnageant et conserver la fraction d'intérêt selon que le produit est intracellulaire ou extracellulaire, les méthodes les plus usuelles sont la centrifugation, et la microfiltration.

b) Homogénéisation du mélange :

L'objectif de cette opération est de briser les cellules pour récupérer le produit si sa production se fait au niveau intracellulaire, les méthodes les plus utilisées pour l'homogénéisation sont : la gélification et la dégélification, les ultrasons, les contraintes hydrodynamiques.

c) la concentration :

Cette opération a pour but de réduire le volume du produit obtenu.

d) Raffinage de la pureté de la protéine extraite :

C'est la purification proprement dite se fait à l'aide des techniques chromatographiques, combinées souvent au tamisage moléculaire ou l'isofocalisation qui permettent de raffiner la pureté [90].

2-1-6) Analyse :

Cette étape a pour objectif de contrôler la qualité du produit final obtenu, fait recours à différentes techniques analytiques, et doit être réalisé conformément aux normes internationales. (Guidelines de l'EMA, GMP, SOP (protocoles d'opérations standardisés))

L'application de ces normes doit se faire d'une manière plus stricte pour les produits biologiques étant donné que les réactions menant à la formation du produit final ne sont pas bien définies [80].

3-1-4-4) La formulation :

La formulation est l'étape terminale de la production, c'est l'étape clé pour obtenir une protéine stable, le choix des excipients est déterminant car il peut affecter la nature de la protéine et donc avoir un impact sur l'efficacité et l'innocuité de la protéine thérapeutique.

Des études de formulation doivent être effectuées au cours du développement d'une forme pharmaceutique adaptée pour le biosimilaire, même si les excipients sont quantitativement et qualitativement les mêmes que ceux du produit de référence. Elles doivent notamment démontrer que la formulation proposée est appropriée à la stabilité et à l'intégrité du principe actif pour son indication thérapeutique, ainsi qu'à sa compatibilité, en particulier avec les excipients ou les diluants et les matériaux de conditionnement [91].

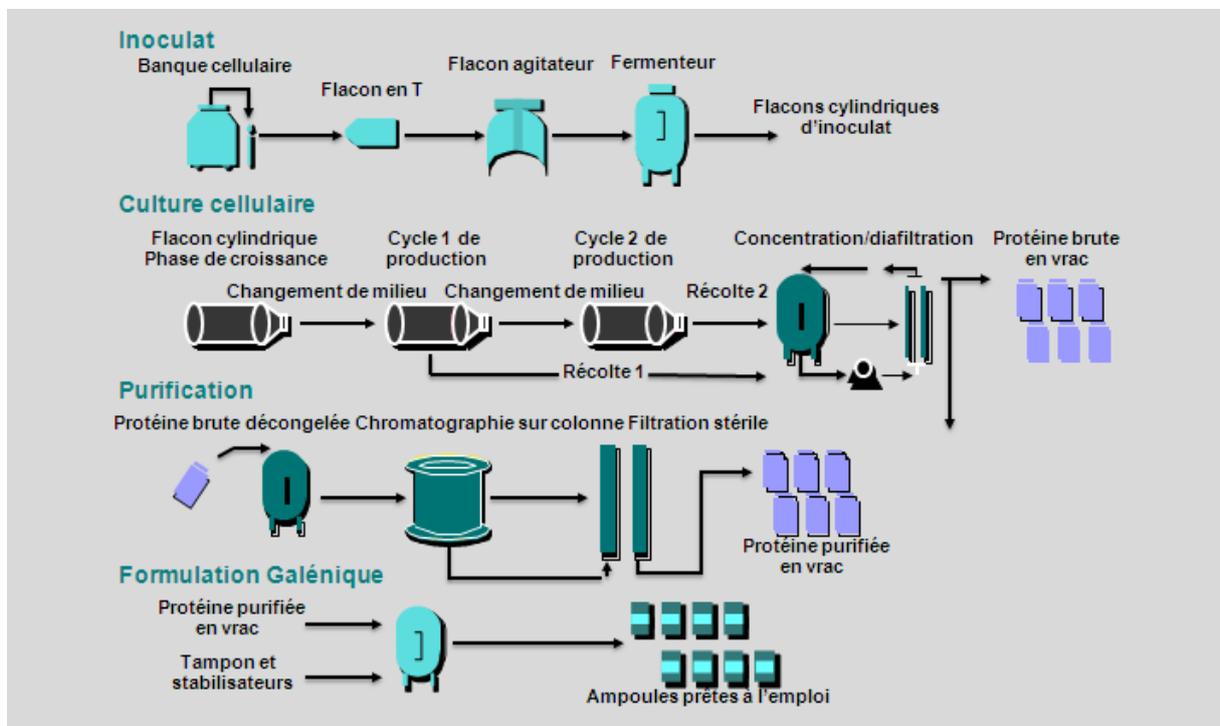


Figure 12 : Procédé globale de production

2-2) 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. L'idée d'exploiter les animaux et les plantes transgéniques s'est donc rapidement imposée.

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 [92].

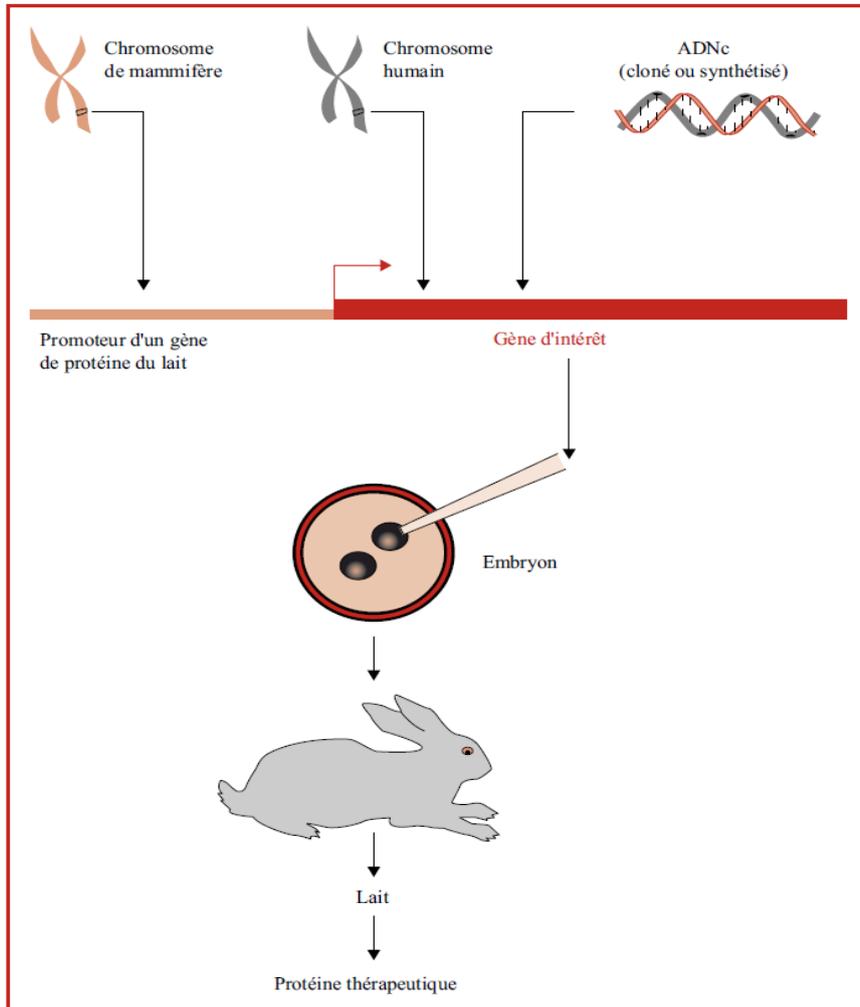


Figure 13 : Représentation schématique de la construction de gènes recombinants capables de diriger la sécrétion de protéines thérapeutiques dans le lait.



Chapitre IV :

Les contrôles



Les protéines thérapeutiques sont souvent produites par la voie de l'ADN recombinant en utilisant un micro-organisme comme outil de synthèse. Les preuves d'une synthèse correcte sont souvent indirectes : composition en acides aminés, séquence, caractéristiques physico-chimiques (hydrophobicité, poids moléculaire, séquence polysaccharidiques, isoformes, microvariants, etc.), activité biologique. Autant d'indices indirectes, individuellement insuffisants, mais qui mis bout à bout forment un faisceau suffisant pour arriver à un haut degré de certitude que le produit final obtenu est bien conforme à ce qui était attendu [93].

Compte tenue de la complexité des molécules recombinantes et de leur micro-hétérogénéité intrinsèque, les techniques analytiques les plus modernes doivent être utilisées pour les études de caractérisation. Les méthodes choisies pour les essais d'équivalence doivent auparavant avoir été qualifiées et validées en utilisant les standards et matériels de référence internationaux, s'ils sont disponibles. Ces méthodes doivent être capables de détecter de légères différences dans tous les aspects pertinents de l'évaluation : structure de la protéine, caractéristiques physicochimiques, activité biologique, impuretés.

Pour la comparaison physicochimique il doit comporter notamment l'évaluation des paramètres physicochimiques et l'identification structurale des substances et impuretés liées au produit, ainsi que la détermination de la stabilité des molécules en réalisant des études de vieillissement accéléré et dans des conditions contraignantes (variation de température, etc.).

La caractérisation physicochimique doit aussi comporter la détermination de la composition, des propriétés physiques, de la structure primaire, bi- et tridimensionnelle de la substance active.

Les protéines possèdent un certain degré d'hétérogénéité inhérent aux modifications post-traductionnelles induites par le système d'expression. Par conséquent, un biosimilaire peut comporter un mélange de formes micro-hétérogènes ou d'isoformes qu'il faut s'efforcer d'identifier.

L'exercice de comparabilité doit aussi inclure une détermination des propriétés biologiques du biosimilaire et du produit de référence, en utilisant différentes approches avec des techniques appropriées pour mesurer l'activité biologique. Seuls Les impuretés et substances liées au produit doivent être définies, toujours en utilisant des techniques de pointe. La comparaison

entre biosimilaire et produit de référence concerne les voies de dégradation spécifiques et les modifications post-traductionnelles potentielles des protéines individuelles. Les études de vieillissement accéléré des deux produits peuvent aussi être utilisées pour comparer les profils de stabilité. Car les impuretés liées au procédé (protéines des cellules hôtes, ADN cellulaire, réactifs, produits de dégradation) sont vraisemblablement différentes entre deux procédés de fabrication.

La comparaison de ces impuretés doit être effectuée par des techniques analytiques de pointe et leur impact doit être confirmé par des études appropriées [41].

I-) Le contrôle des biosimilaires

1-) 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 glycosilation, des différences de glycosilation appelées isoformes, en particulier de sialylation, se traduisent par des pH iso-électriques différents [94].

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 structurales 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.

1-2) Propriétés physicochimiques :

a) Poids moléculaire :

Le poids moléculaire (ou la dimension) est déterminé par la chromatographie d'exclusion sur gel, l'électrophorèse en gel de SDS- polyacrylamide (dans des conditions réductrices et non réductrices)

b) Profil d'isoformes :

Celui-ci est déterminé par la focalisation isoélectrique ou autres techniques appropriées.

c) Coefficient d'extinction (ou absorptivité molaire) :

Les profils chromatographiques et les données sur l'identité, l'homogénéité et la pureté peuvent être obtenus par chromatographie d'exclusion sur gel, la chromatographie en phase liquide inversée, la chromatographie d'échange d'ions en phase liquide, la chromatographie d'affinité et autres méthodes appropriées.

d) Profil chromatographique :

Les profils chromatographiques et les données sur l'identité, l'homogénéité et la pureté peuvent être obtenus par chromatographie d'exclusion sur gel, la chromatographie en phase liquide inversée, la chromatographie d'échange d'ions en phase liquide, la chromatographie d'affinité et autres méthodes appropriées.

e) Profil de chromatographie liquide :

Les spectres d'absorption en ultra-violet et en spectre visible sont déterminés au besoin. La structure supérieure du produit est examinée en se servant de méthodes telles le dichroïsme circulaire, et la résonance magnétique nucléaire [7].

2- Méthodes de contrôles :

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 [93].

2-1) 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. Actuellement, la spectrométrie de masse est utilisée dans des domaines aussi variés que la médecine, la biologie, la pharmacologie, la chimie organique et minérale, l'électronique, la science des matériaux, ...etc.

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 minime d'échantillon (du mg au pg).

À l'heure actuelle, il est possible d'obtenir un spectre de masse de la plupart des substances minérales, organiques ou bio-organiques dont la masse moléculaire peut atteindre quelques centaines de milliers d'unités de masse atomique. 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 ou liquide.

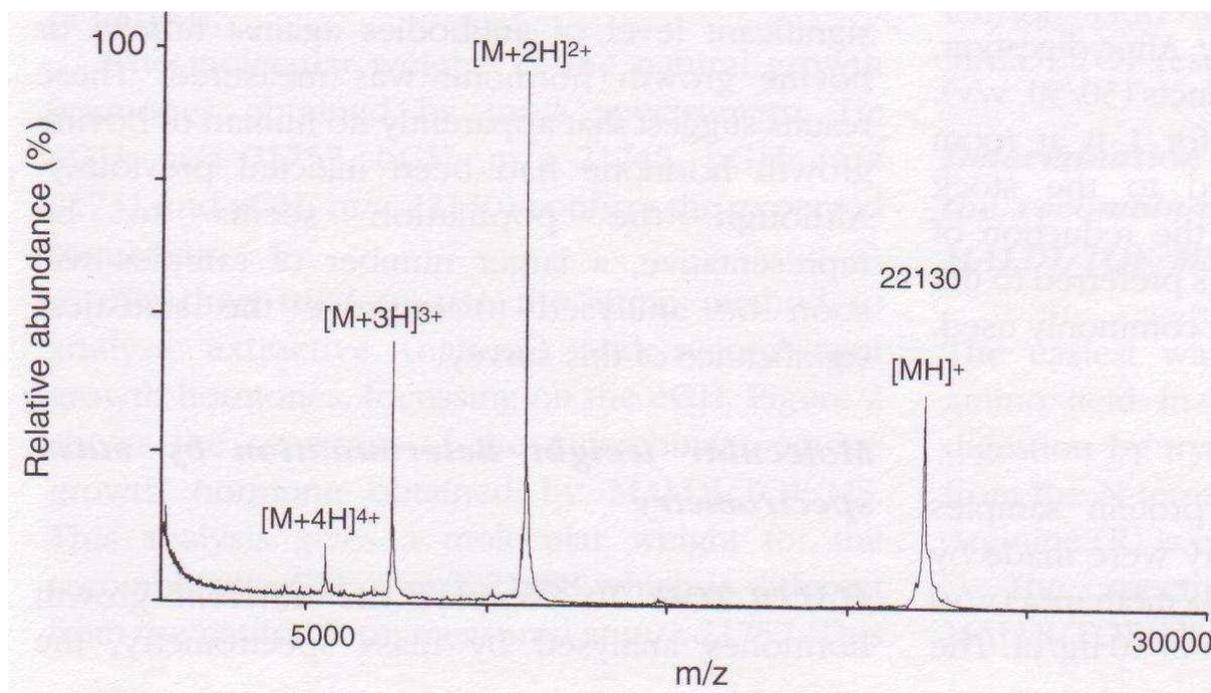


Figure 14 : spectre de masse de l'hormone de croissance hGH obtenu grâce à un spectromètre de masse MALDI /TOF. On constate ainsi que l'hGH pèse 22 130 D. [Bonnaire 1998]

Appareillage :

Un spectromètre de masse est composé d'un système d'introduction, d'une source d'ions (ces deux parties étant parfois indissociables), d'un analyseur et d'un ensemble de détection d'ions. Pratiquement tous les spectromètres commerciaux sont aujourd'hui équipés d'un système informatique de pilotage et de traitement des données [95].

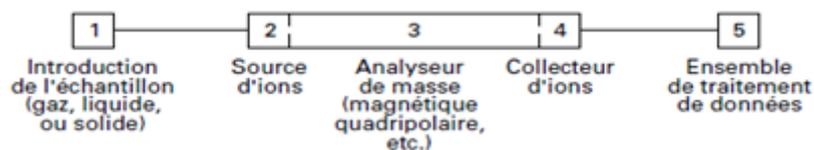


Figure 15: les éléments d'un spectromètre de masse

Intérêt pour le développement des biosimilaires :

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

2-1-2) La quantification 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 palier 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 œuvre 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 [79].

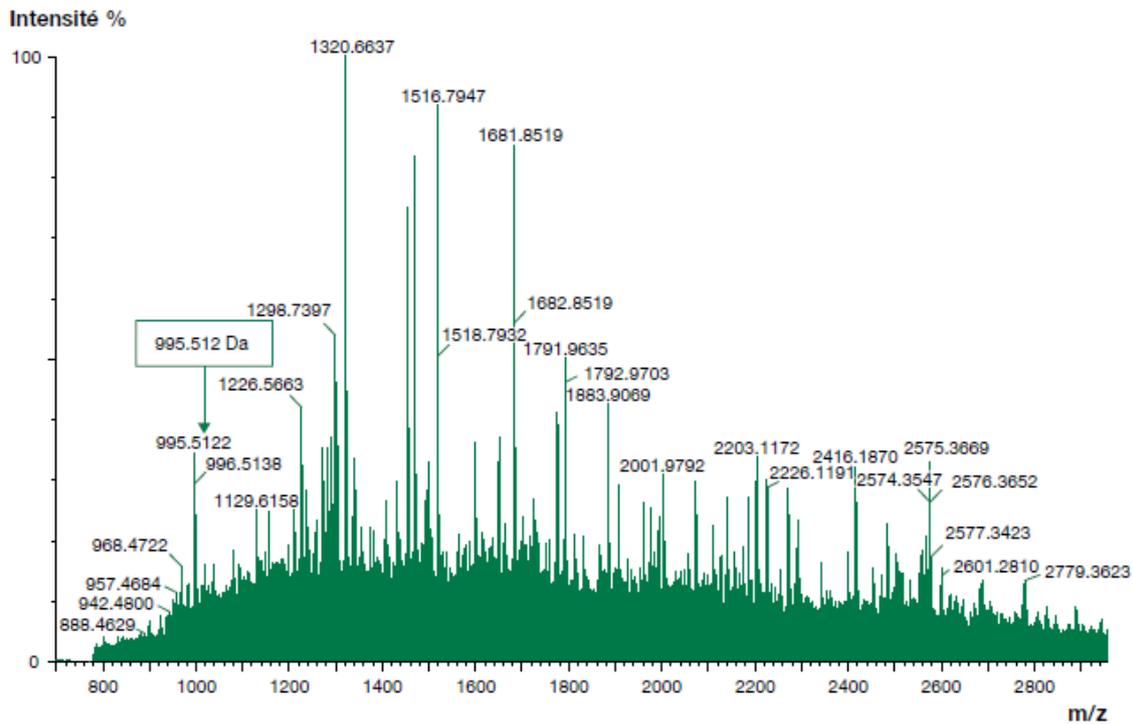


Figure 16 : Analyse par Maldi-Q-ToF en mode MS des peptides tryptiques marqués de l'érythropoïétine bêta séparés par chromatographie en phase inversée

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

2-1-3) Désorption-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.

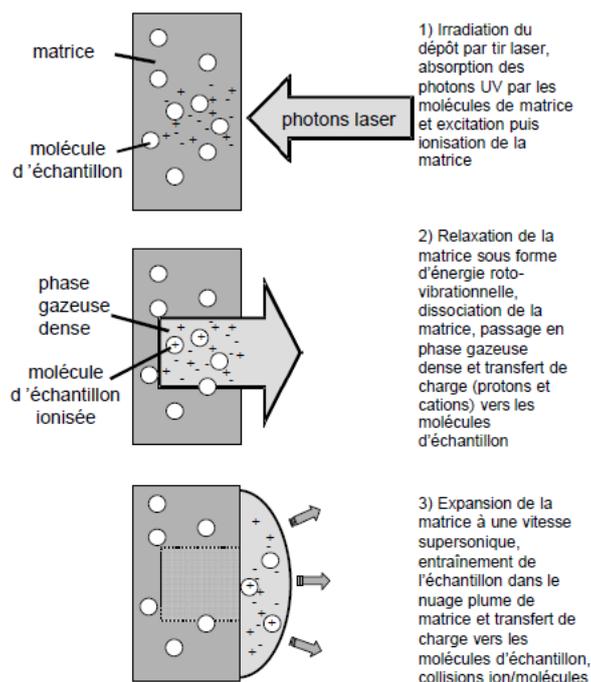


Figure 17 : Ionisation MALDI – Schéma de principe

L'ionisation par technique MALDI se déroule en deux étapes. Dans la première étape, la substance à analyser est mélangée à une solution de petites molécules organiques, appelées matrices, possédant une forte absorption dans l'ultraviolet. Cette solution est déposée sur une surface métallique, appelée la cible MALDI (Figure 18). L'évaporation du solvant avant analyse aboutit à la formation d'un dépôt de matrice/analyte co-cristallisé où les cristaux de matrice sont dopés en molécules d'analyte dispersées (10⁵ à 10⁶ fois plus de molécules de matrice que d'analyte).

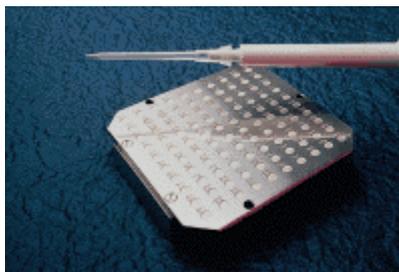


Figure 18 : Une cible MALDI Perkin Elmer-PerSeptive Biosystems
La cible est une plaque métallique, en acier inoxydable ou en acier recouvert d'or. Celle présentée sur la photo peut supporter jusqu'à 100 dépôts différents et mesure 5 cm x 5cm.

La deuxième étape se produit sous vide après transfert de la plaque MALDI dans la chambre d'ionisation du spectromètre. Le dépôt est irradié par des impulsions laser intenses. La majorité des lasers utilisés sont à azote et émettent à une longueur d'onde de 337 nm (laser à azote). La durée des impulsions laser est de l'ordre de quelques nanosecondes. Ces impulsions sont répétées à une fréquence de quelques Hertz. L'acquisition d'un spectre de masse se fera donc par accumulation d'un certain nombre d'impulsions laser, de l'ordre de plusieurs centaines. L'énergie transmise par le laser est absorbée par la matrice, et cette irradiation induit l'accumulation d'énergie dans la phase condensée sous la forme d'excitation des molécules de la matrice. Cet apport d'énergie très localisé cause l'ablation d'une portion de la surface du cristal et/ou la sublimation des cristaux, suivie de l'expansion d'agrégats de la matrice en phase gazeuse (Figure 19), entraînant l'analyte intact dans le panache d'expansion. Le mécanisme le plus largement admis pour la formation des ions implique le transfert de protons soit avant désorption en phase solide, soit dans le panache d'expansion en phase gazeuse. Ce dernier modèle explique l'ionisation de l'analyte par un mécanisme en plusieurs étapes. Une molécule de matrice est ionisée dans l'agrégat, formant ainsi un cluster protoné (dont l'affinité protonique est supérieure à celle de l'analyte). Après désolvatation de l'agrégat, le proton est transféré à l'analyte (par coopérativité des molécules de la matrice). Les ions formés sont alors accélérés à l'aide d'un champ électrostatique vers l'analyseur.

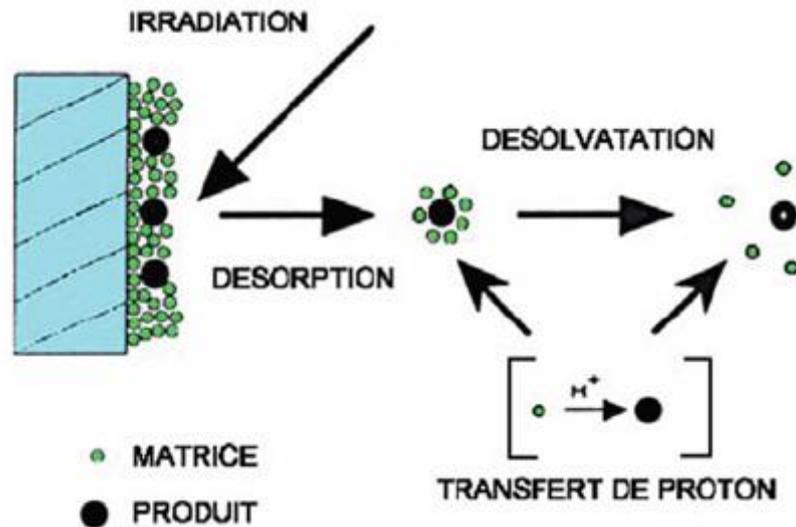


Figure 19 : Principe de la désorption /ionisation MALDI

Le choix de la matrice utilisée pour co-cristalliser les analytes est primordial pour observer une bonne désorption et ionisation des composés, elle permet d'assurer la protection de l'analyte et la transmission des protons à l'échantillon. Son choix est dirigé par le type de molécules à analyser et le laser utilisé [79].

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

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.

Les mécanismes conduisant à la formation d'ions en phase gazeuse par électrospray peuvent être résumés en trois étapes principales [79]:

- (1) la formation de gouttelettes chargées à partir de l'extrémité d'un capillaire métallisé
- (2) l'évaporation du solvant et les explosions coulombiennes,
- (3) formation d'agrégats chargés
- 4) et finalement obtention d'ions désolvatés en phase gazeuse (positifs, négatifs et adduits, en fonction du mode d'ionisation)

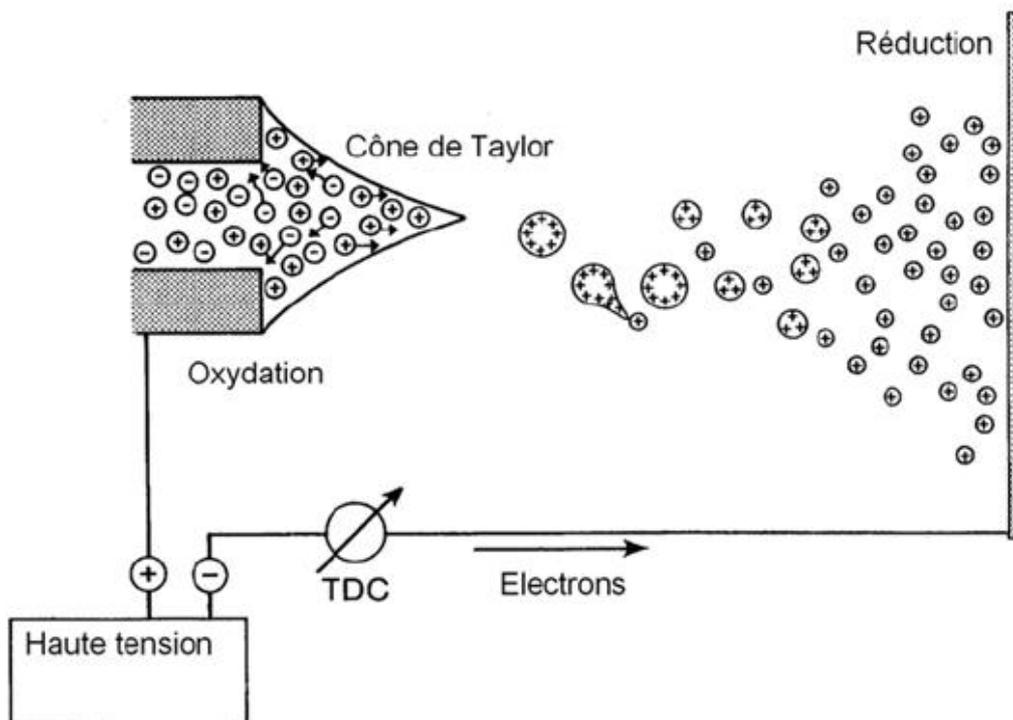


Figure 20 : Schéma simplifié du fonctionnement d'une source électrospray.

Intérêt : détermination de la structure des protéines.

2-2) 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 [96]. 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 α et feuillet β 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 α , feuillet β , 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 α et feuillets β . 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 π et π^* 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) [96-97].

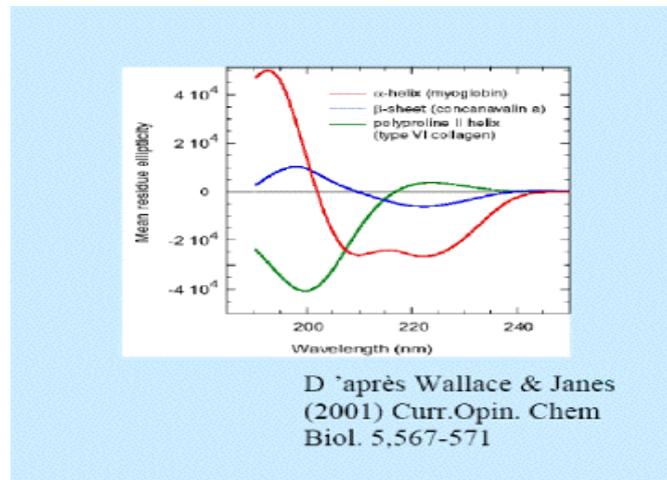


Figure 21 : Exemple de spectre obtenu par dichroïsme circulaire

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 Beer-Lambert. 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.

Principe : Lorsqu'une lumière d'intensité I_0 passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le(s) soluté(s). L'intensité I de la lumière transmise est donc inférieure à I_0 . On définit l'absorbance de la solution comme :

$$A = \log_{10} (I_0/I)$$

On parle aussi de transmittance définie par la relation :

$$T = I/I_0 \text{ C'est-à-dire que } A = -\log T$$

L'absorbance est une valeur positive, sans unité. Elle est d'autant plus grande que l'intensité transmise est faible.

La relation de Beer-Lambert décrit que, à une longueur d'onde λ donnée, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des espèces de la solution, et à la longueur du trajet optique (distance sur laquelle la lumière traverse la solution).

Alors, pour une solution limpide contenant une seule espèce absorbante :

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda l c$$

Avec :

- A_λ est l'absorbance ou la densité optique (sans unité) de la solution pour une longueur d'onde λ .
- c (en $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$) est la concentration de l'espèce absorbante.
- l (en m) est la longueur du trajet optique.
- ε_λ (en $\text{mol}^{-1}\cdot\text{m}^2$) est le coefficient d'extinction molaire de l'espèce absorbante en solution. Il rend compte de la capacité de cette espèce à absorber la lumière, à la longueur d'onde λ .

Selon la loi de Beer-Lambert, l'absorbance est additive (mais non la transmittance). Ainsi, pour une solution contenant plusieurs espèces absorbantes, l'absorbance de la solution est la somme de leurs absorbances. Pour n espèces absorbantes [98] :

$$A = \sum_{i=1}^n A_i(\varepsilon_{\lambda,i}, l = 1\text{cm}, c_i) = \varepsilon_{\lambda,1} c_1 + \varepsilon_{\lambda,2} c_2 + \dots + \varepsilon_{\lambda,n} c_n$$

Intérêt pour le contrôle des biosimilaires :

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

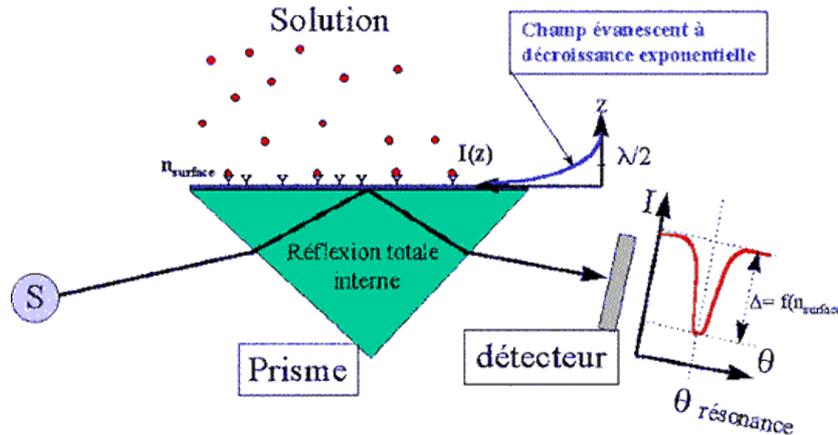
2-2-3) La résonance plasmonique de surface

(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 [99].

✓ La technique :

Le plasmon de surface est une onde à décroissance exponentielle des deux côtés de l'interface séparant un métal (or, argent...) d'un milieu diélectrique sans pertes (milieu biologique par exemple), parallèlement à laquelle elle se propage. Le champ électromagnétique dans le milieu biologique présentant un caractère d'onde évanescente, c'est-à-dire l'amplitude

décroissant exponentiellement avec la distance à l'interface, la fixation de molécules sur l'interface va modifier l'information contenue dans l'onde tant au niveau de sa phase que de son amplitude.



cf P.Schuck, Ann.Rev.Biomol.Str. 1997, 26: 541-566

Figure 22 : Schéma du principe de la résonance plasmonique de surface

On utilise un prisme recouvert d'une très mince surface métallique (argent ou or). Il existe des plasmons de surface qui sont des ondes oscillantes de densité surfacique de charge qui se déplacent à la surface du métal. Ces plasmons (non radiatif) sont excités par la lumière atteignant la surface du métal. L'amplitude du champ électromagnétique $I(z)$ décroît exponentiellement quand on s'éloigne de la surface (en fonction de la longueur d'onde de la lumière incidente). Ils ne peuvent en fait être excités que sous certains angles d'illumination (quand le vecteur d'onde de la lumière à la surface coïncide avec celui des plasmons de surface). Cela conduit à ce que la lumière réfléchi voit son intensité décroître (ayant transféré de l'énergie aux plasmons). Il se forme donc un minimum profond dans l'intensité réfléchi en fonction de l'angle d'incidence. Cet angle dépend très fortement du profil de l'indice de réfraction de la surface (n_{surface}), dans l'épaisseur du champ évanescent proche de la surface. Le changement de la composition (adsorption ou désorption, fixation ou relargage) de

l'interface change cet indice, ce qui conduit à un changement de l'angle de résonance. Des considérations théoriques montrent que l'angle d'incidence est proportionnel à la concentration de macromolécules en surface jusqu'à une concentration surfacique élevée de 50 ng.mm^{-2} . Dans les appareils commerciaux, la surface est l'une des faces d'une cellule ou l'on peut faire circuler les liquides contenant le ligand (fixation) ou le solvant (relargage). On peut alors déterminer la cinétique de ces deux phénomènes [99-100].

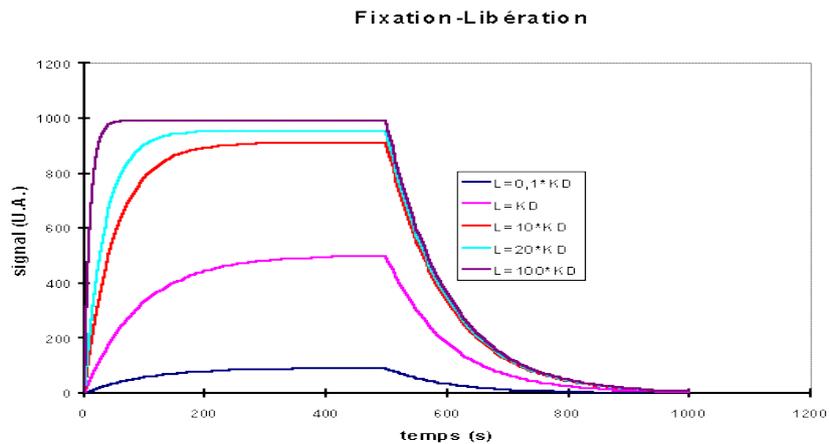


Figure 23 : Exemple des courbes de cinétiques de liaisons des ligands aux récepteurs obtenu par résonance plasmonique de surface

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) 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 α), et une forme où le squelette est replié de manière à former une surface plus ou moins plane (plissée) feuillet β . 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. Les différentes étapes de la détermination de structure de protéine par RMN sont : la préparation de l'échantillon, l'acquisition et le traitement du signal RMN produit par les noyaux observés, l'analyse et l'attribution des spectres, le calcul des coordonnées des atomes à partir des paramètres mesurés sur les spectres RMN [101]. 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.

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.

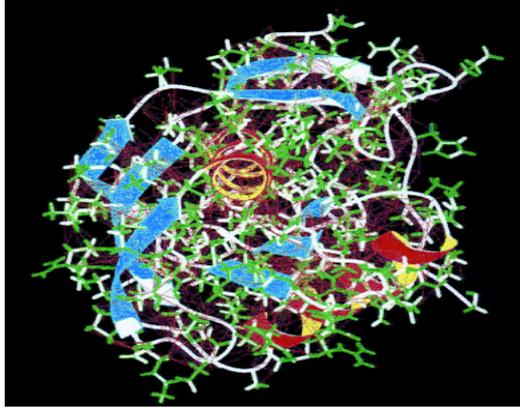


Figure 24 : Positions dans la structure de la déformylase des contraintes de distance déterminées à partir de l'observation des nOe

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.

L'attribution par RMN hétéronucléaire peut s'effectuer à l'aide d'échantillons simplement marqués ^{15}N ou d'échantillons doublement marqués (^{15}N , ^{13}C). Sur une protéine marquée ^{15}N , la stratégie est basée sur les expériences 2D HSQC ou HMQC (« heteronuclear single/multiple quantum correlation ») qui permettent d'observer les pics de corrélation dus au couplage scalaire entre l'hydrogène amide et l'azote de chaque résidu. La stratégie d'attribution basée sur le double marquage utilise, elle, exclusivement les couplages scalaires homo- et hétéronucléaires. Pour tenter d'augmenter la limite de taille des protéines étudiées, en sus du marquage ^{15}N et ^{13}C , 70 à 100 % des protons sont remplacés par des deutériums, pour diminuer la fuite de l'aimantation due aux interactions dipolaires entre protons. La diminution de la relaxation transverse à l'aide de l'expérience TROSY (« transverse relaxation-optimized spectroscopy ») permet également de repousser cette limite.

L'interaction entre deux molécules peut être étudiée par titrage à l'aide d'expériences 2D HSQC, enregistrées pour différents rapports de concentration des deux molécules, et en

suivant les variations de déplacements chimiques. Il est aussi possible d'observer l'échange d'un ligand entre sa forme libre et sa forme liée à un récepteur ou de mesurer les coefficients de diffusion translationnelle à l'aide de gradients de champ B_0 . La variation de déplacements chimiques en fonction de la variation de pH, ou de paramètres thermodynamiques comme la température ou la pression, permet de sonder les différents aspects de la stabilité d'une structure de protéine. Les intermédiaires du repliement d'une protéine peuvent aussi être caractérisés par l'échange des hydrogènes amides avec le deutérium de l'eau lourde. Enfin, une interprétation qualitative des déplacements chimiques en fonction de la structure primaire de la molécule permet la détection des structures secondaires hélice α ou feuillet β .

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 [101].

- ✓ 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 [102].

✓ Le principe de la technique :

La technique de diffraction des rayons X se base sur l'interaction élastique des rayons X avec les électrons des atomes (phénomène de diffusion élastique). Un échantillon quelconque (de volume V) est caractérisé en chaque point de l'espace (repéré par le vecteur \vec{r}) par une densité électronique $\rho(\vec{r})$. Lorsqu'une onde plane monochromatique, de vecteur d'onde \vec{s}_0 , interagit avec un échantillon, il y a diffusion dans toutes les directions de l'espace. Pour une direction de diffusion caractérisée par un vecteur d'onde \vec{s} (qui fait un angle 2θ avec l'onde incidente), l'amplitude et la phase de l'onde diffusée peuvent être représentées par un nombre complexe,

appelé facteur de structure. Pour une direction de diffusion donnée, le facteur de structure s'exprime de manière simple en fonction du vecteur de diffusion : $\vec{S} = \vec{s} - \vec{s}_0$ [102].

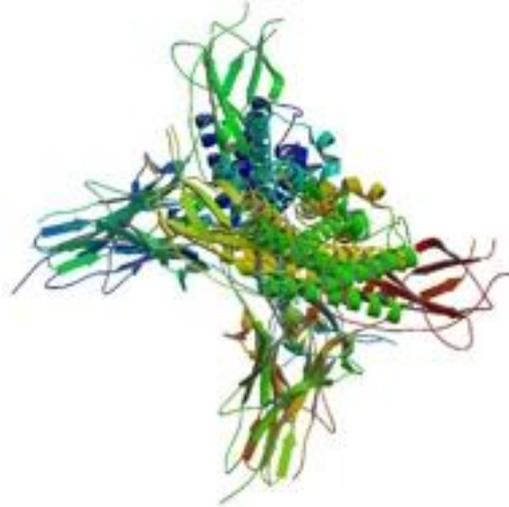


Figure 25 : Représentation tridimensionnelle du filgrastim. Les coordonnées des atomes ont été obtenues par diffractométrie de rayons X sur un cristal de la protéine.

Le processus de détermination de la structure tridimensionnelle d'une macromolécule biologique comprend les cinq étapes suivantes (figure 26) :

- 1- obtention de la macromolécule à l'état pur (ou des macromolécules dans le cas d'assemblages), et sa purification dans certains cas.
- 2- la cristallisation
- 3- collecte de données de diffraction
- 4- construction du modèle par interprétation des cartes de densité électronique
- 5- affinement et validation de la structure

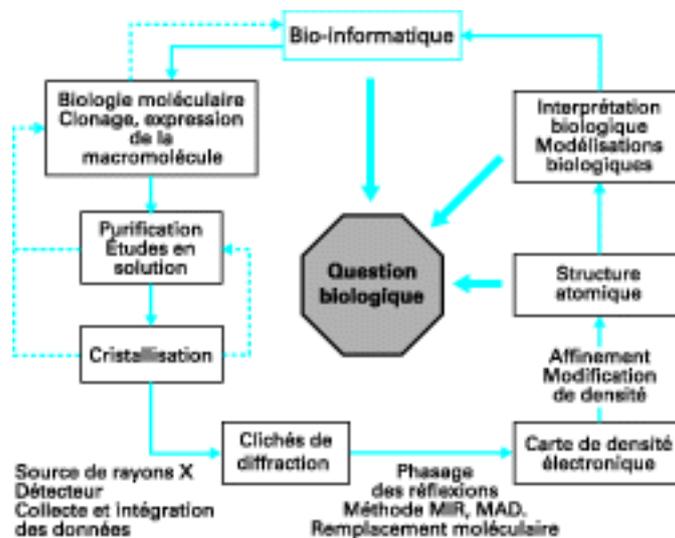


Figure 26 : Résolution de la structure d'une macromolécule biologique par diffraction des rayons X. Vue schématique des différentes étapes

✓ Intérêt de la technique pour le contrôle des biosimilaires :

La détermination des structures secondaires et tertiaires.

2-3)-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 :

- Exemples des techniques utilisées pour la digestion des protéines

- Techniques chimiques :

- ✓ Le marquage chimique de l'extrémité N-terminal (NH_2) :

La première méthode utilise la réaction de Sanger. Les fonctions 2-amino des acides aminés et peptides réagissent avec le 2, 4-dinitrofluorobenzène pour former des dérivés jaunes, les 2, 4-dinitrophényl-peptides. Quand ces derniers composés sont soumis à une hydrolyse acide, l'ensemble des liaisons peptidiques sont hydrolysées, mais la liaison entre la fonction 2, 4-dinitrophényl et la fonction amine de l'acide aminé N-terminal restent stables, d'où l'identification de ce dernier.

D'autres méthodes de marquage de l'extrémité N-terminal sont aussi utilisées telles que la méthode d'Edman, et la méthode du chlorure de dansyle.

- ✓ Identification des acides aminés C-terminaux

On utilise l'hydrazinolise, qui coupe les liaisons à 100°C et donne un acide aminé libre. On peut aussi utiliser des carboxypeptidases qui coupent l'extrémité C-terminale, il en existe plusieurs types :

- la carboxypeptidase A, qui coupe tout sauf les acides aminés basiques (elle est bloquée par la proline)

- la carboxypeptidase B, qui est spécifique des acides aminés basiques (Lys, Arg).

▪ Techniques enzymatique :

Il existe aussi des méthodes biochimiques utilisant des enzymes capables de couper le premier ou le dernier acide aminé de la chaîne polypeptidique, on les nomme des exopeptidases. Les aminopeptidases clivent la liaison peptidique localisée juste après le premier acide aminé et libèrent ce dernier. De manière symétrique, les carboxypeptidases clivent la liaison peptidique localisée juste avant le dernier acide aminé.

En analysant les acides aminés libérés par ces enzymes, il est envisageable d'analyser la séquence N ou C-terminale de la protéine **[103]**.

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 **[104]**.

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 pK_a 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 27).

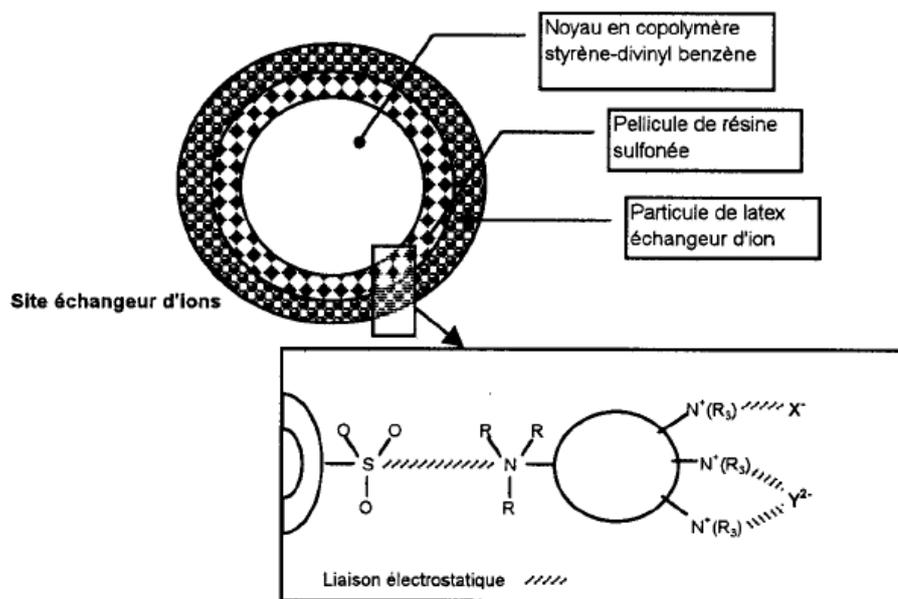


Figure 27 : structure type d'une colonne échangeuse d'anions (A^-)

La détection :

A la sortie de la colonne chromatographique, le système de la détection ampérométrique pulsée (PAD) oxyde les analytes à la surface de l'électrode en or par l'application d'un potentiel positif. Le courant généré par la molécule est proportionnel à sa concentration, ce qui rend l'analyse quantitative. Si un simple potentiel était appliqué à l'électrode, les produits d'oxydation empoisonneraient au cours du temps sa surface [105]. Afin de prévenir la diminution du signal, la surface de l'électrode est nettoyée par l'application d'une série de potentiels appliqués pendant des périodes fixées, après le potentiel de détection. Les potentiels d'applications sont désignés E_1, E_2, E_3, \dots , avec E_1 le potentiel de détection. Les autres potentiels permettent de nettoyer et de restaurer l'électrode pour la détermination suivante.

Les potentiels sont maintenus pendant une durée t_1 , t_2 , t_3 ... La première période est subdivisée en une période d'attente et une de détection. La période d'attente est la durée nécessaire pour que seul le courant, lié à l'oxydation de l'analyte, soit mesuré pendant la période de détection.

[106-107]

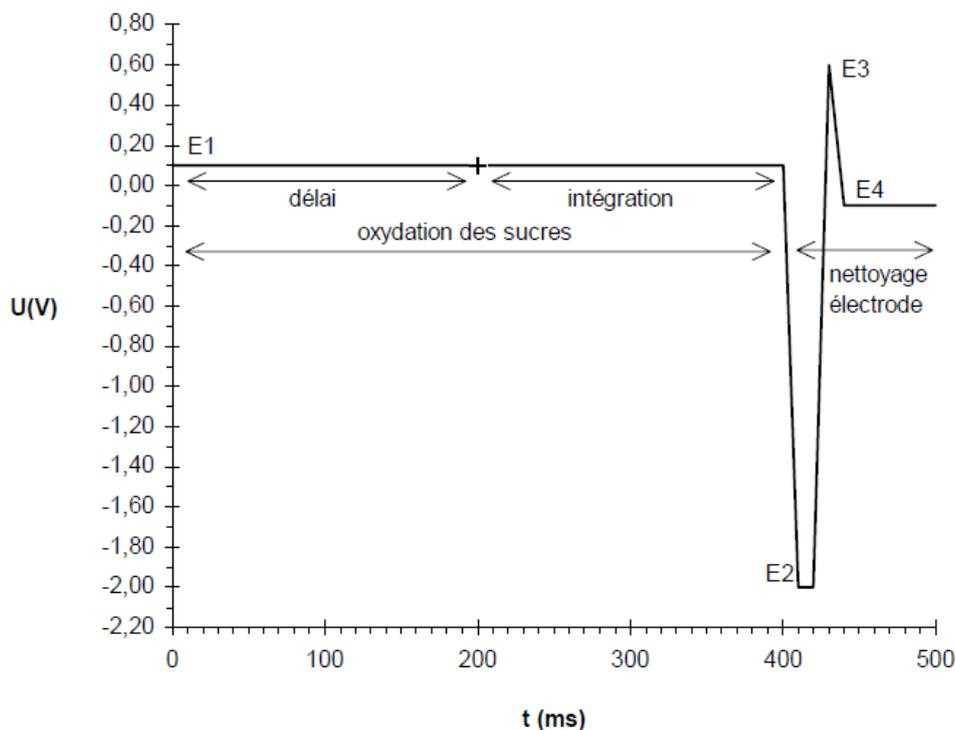


Figure 28 : Schéma de principe de l'ampérométrie pulsée

Intérêt de la technique pour le développement des biosimilaires :

Détermination des modifications post-traductionnels, et la détermination du degré de glycosylation.

2-4) -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.

L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique complémentaire des méthodes chromatographiques qui permet la séparation d'un grand nombre de molécules. Tout comme la chromatographie liquide haute performance qui regroupe de nombreux modes de séparation selon la nature des phases stationnaire et mobile utilisées (échange d'ions, partage en phases normale et inverse, adsorption, exclusion...), l'EC regroupe un grand nombre de modes selon la nature de l'électrolyte de séparation et du capillaire utilisé (électrophorèse de zone, électrophorèse micellaire, électrophorèse sur gel, isoélectrofocalisation, électrochromatographie).

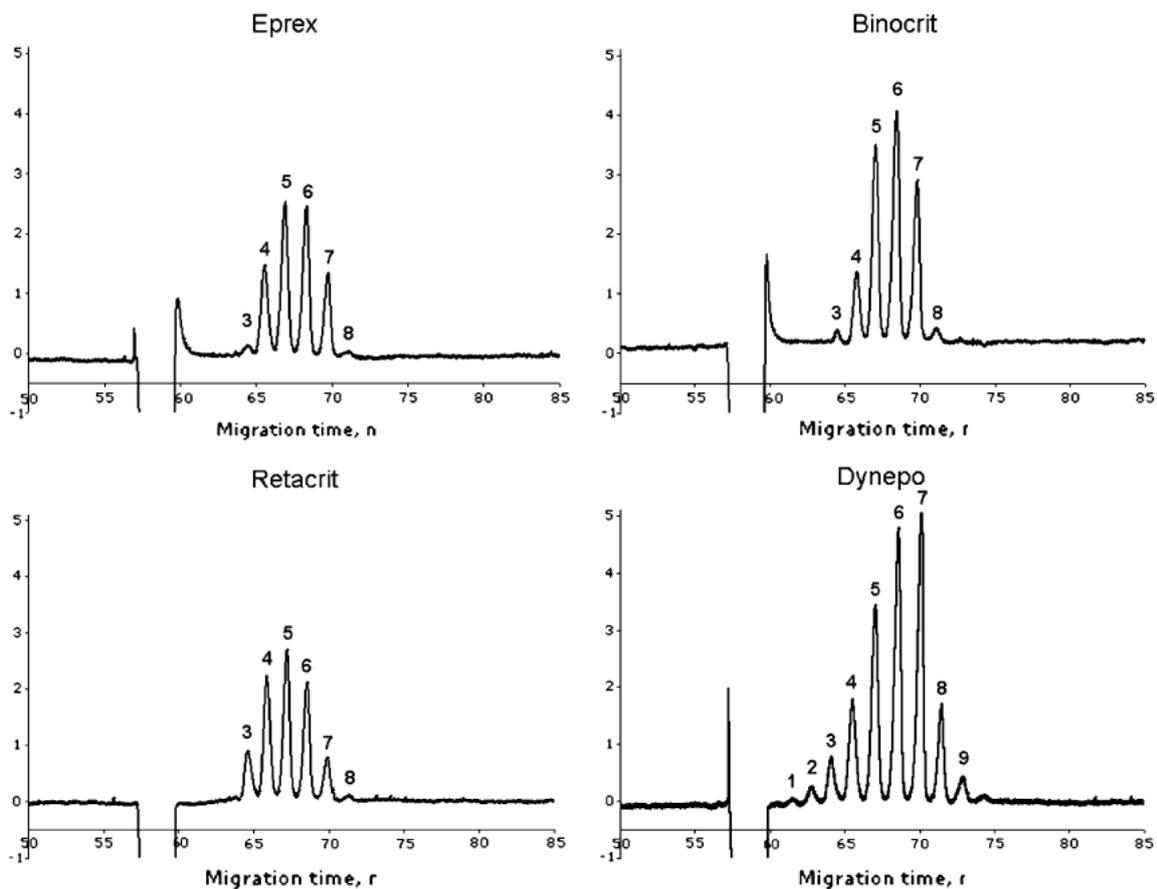


Figure 29: Séparation par électrophorèse capillaire de zone des différents isoformes D'un produit princeps contenant l'EPO et ses différents biosimilaires.

L'EC est une méthode d'analyse désormais reconnue en raison de ces qualités intrinsèques : efficacité et résolution élevées, rapidité et automatisation des séparations, conditionnement aisé du capillaire de séparation, faible consommation d'échantillons et de tampons de séparation (en général dénués de solvants organiques), compatibilité avec de nombreux détecteurs [107-108].

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

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.

L'instrumentation de l'HPLC se compose de plusieurs éléments : une pompe, un injecteur, une colonne et un détecteur. La colonne peut être une colonne en métal ou en Téflon (voir d'autres plastiques) qui est remplie d'une phase (directe ou inverse). Les compagnies qui fabriquent les appareils d'HPLC vendent aussi différents types de colonnes, ce qui facilite la mise en œuvre des méthodes d'analyse.

- 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 allongé et des molécules polaires s'éluent plus rapidement. Pour la phase stationnaire on utilise plutôt la silice sur lequel 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.

✓ Les détecteurs utilisés :

Il en existe notamment deux: le PDA (Photo Diode Array) et la spectrométrie de masse. Le détecteur PDA est celui le plus utilisé. Il permet de mesurer différentes longueurs d'onde dans le spectre du visible et dans le spectre UV. Quand à la détection par spectrométrie de masse son principe est basé sur la mesure du rapport m/z [109].

Intérêt :

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

2-5)- 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 M_r . 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.

D'abord effectuée sur une mince couche cylindrique de polyacrylamide pour l'IEF en première dimension, puis en un gel vertical de SDS-PAGE pour la seconde dimension, cette technique 2D est à présent aussi réalisée entièrement horizontalement selon Görg. L'IEF de haute résolution et de grande reproductibilité est faite en gel plat et mince de polyacrylamide en gradient de pH immobilisé. Ce gel étroit est ensuite déposé sur un gel mince de SDS-PAGE également horizontal dans une cuve thermostatée permettant une bonne rapidité de migration et une réelle reproductibilité. Ces gels sur un support de film polyester sont aisément manipulables soit pour leur coloration, soit pour toutes immunodétection après transfert sur membrane.

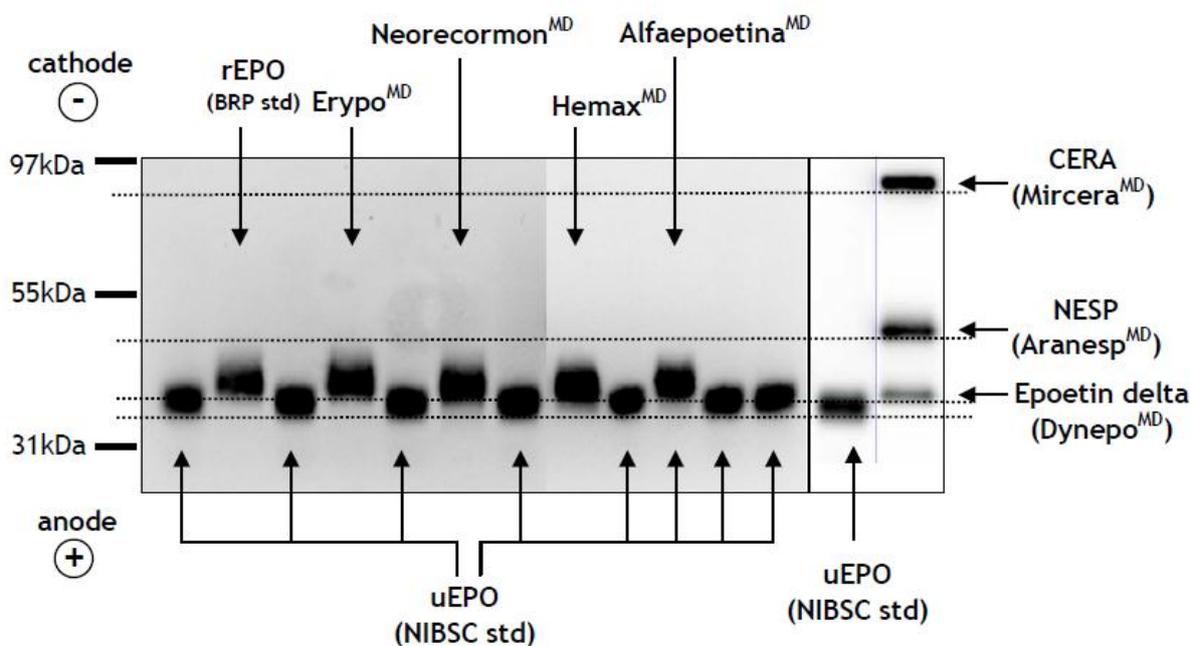


Figure 30: Image d'une analyse par SDS-PAGE d'EPO urinaire endogène (uEPO), de préparations de rEPO disponibles dans le commerce, ainsi que des NESP et de la CERA.

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 M_r , éventuellement la séquence peptidique, la fonction et les informations bibliographiques connues [107-110].

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.

✓ Principe de la SEC-HPLC :

Les colonnes SEC-HPLC sont remplies de billes uniformes de diamètre compris entre 3 et 20 μm . Le remplissage est un matériau nanoporeux qui peut être organique (polymère réticulé, généralement PS-DVB) ou minéral (verre ou silice poreux).

La séparation est optimale lorsque la distribution en taille des pores coïncide avec celle des macromolécules à analyser. Comme la synthèse ne permet d'obtenir qu'une distribution étroite des pores, il est souvent nécessaire de mettre plusieurs colonnes de différente porosité en série, ou d'utiliser un remplissage formé par un mélange de plusieurs gels, pour couvrir la totalité de la gamme des poids moléculaires à séparer [107-111].

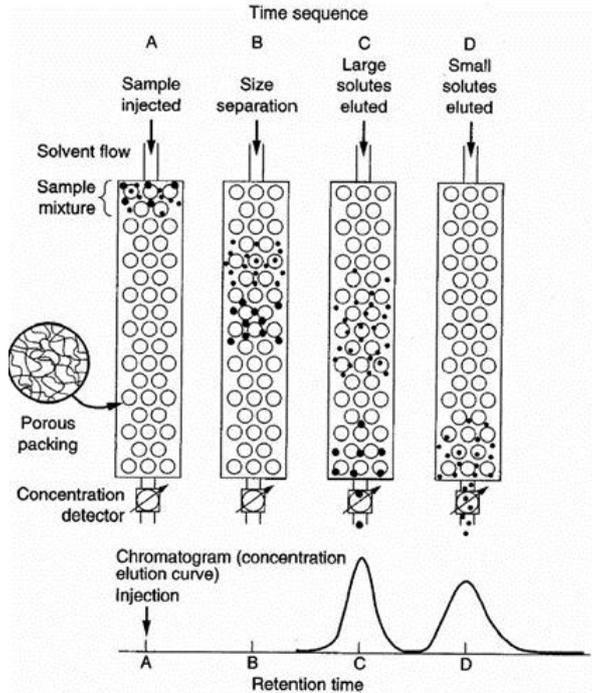


Figure 31 : Schéma du principe du SEC-HPLC

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 [112].

Intérêt de la technique :

Cette technique fournit des informations sur la masse moléculaire, la forme des protéines.

2-5-4) AF4 (Asymmetric Flow Field 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 minime 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).

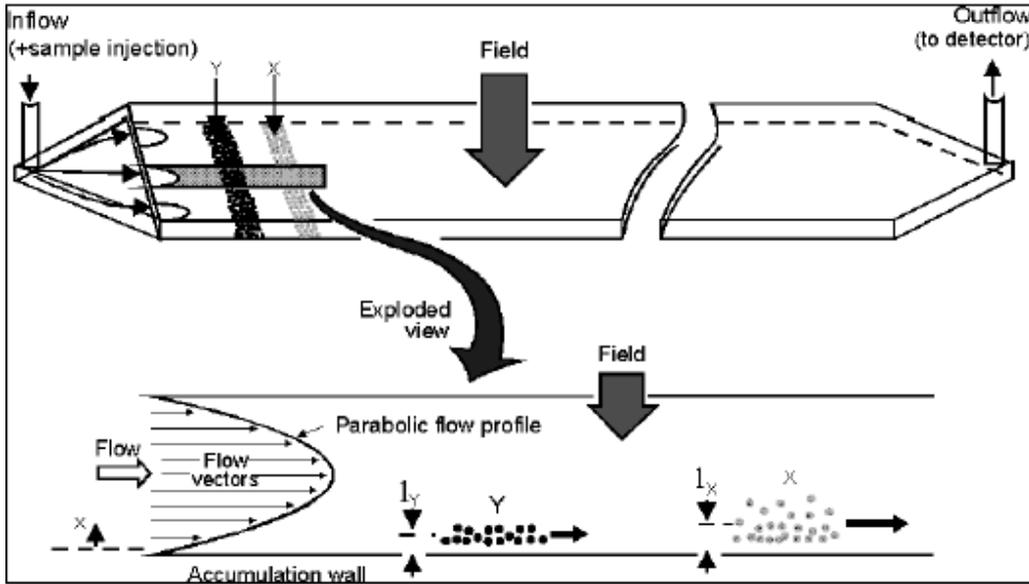


Figure 32 : Représentation Schématique de la répartition des fractions de l'échantillon dans la cellule lors d'analyse par AF4.

Intérêt :

Cette technique 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 [113].

Tableau VI : les différentes techniques utilisées pour le contrôle des biosimilaires.

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

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

AF4 : Assymetrical Flow Field –Flow Fractionnation

AUC : Ultra centrifugation analytique



Chapitre V : *Classification*



LES PRINCIPALES CLASSES PHARMACOLOGIQUE DES BIOSIMILAIRES :

Les biosimilaires développés sont principalement des facteurs de croissance et des hormones dont le brevet est tombé dans le domaine public, comme l'érythropoïétine, le facteur de croissance des granulocytes G-CSF, l'hormone de croissance (somatropine), l'insuline et certaines cytokines.

Cependant, des sociétés asiatiques copient aussi des anticorps dont le brevet n'est pas encore expiré, mais ne les commercialisent que dans les pays asiatiques [114].

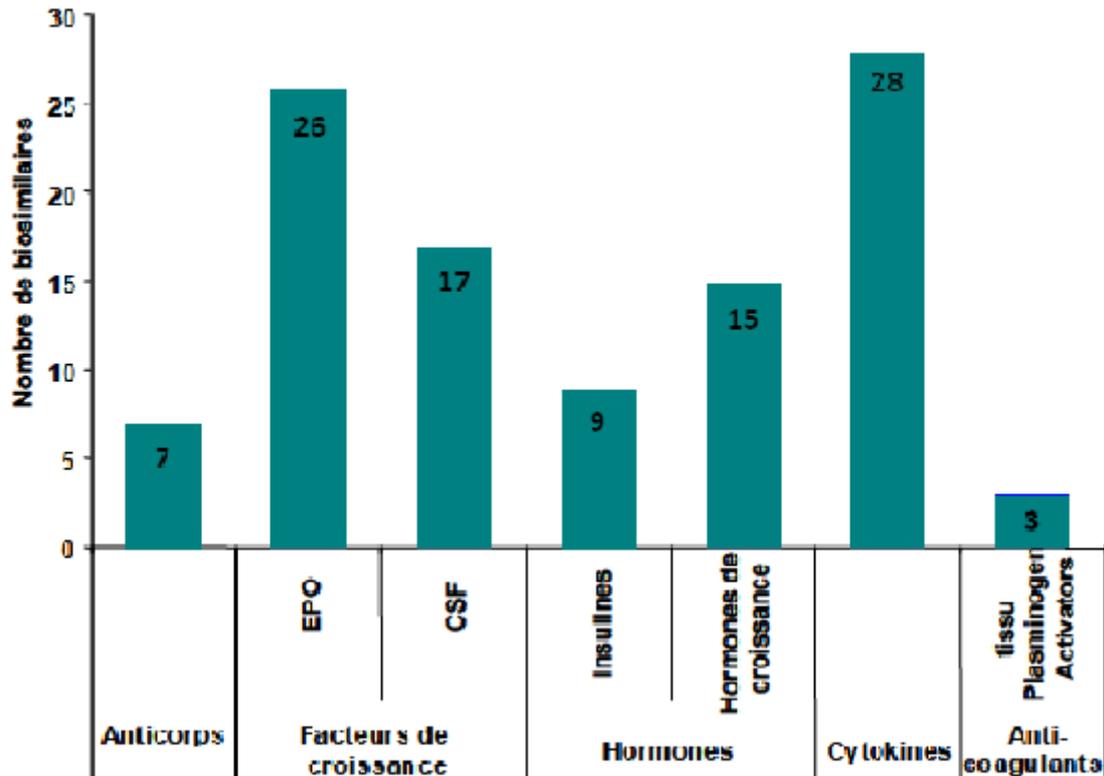


Figure 33 : Biosimilaires en développement et commercialisés dans le monde hors Asie par famille de molécules biologiques (liste non exhaustive)

1) HORMONES:

1-1) l'insuline :

L'insuline est une hormone recombinante constituée de 2 chaînes polypeptidiques reliées entre elles par deux chaînes disulfures et un pont disulfure intra-chaîne dans la chaîne A.

La chaîne A est constituée de 21 acides aminés et la chaîne B est constituée de 30 acides aminés, L'insuline est une hormone hypoglycémisante [115].

✓ Les étapes de production de l'insuline :

Dans un premier temps, la stratégie adoptée pour la production recombinante d'insuline a été de transformer deux souches bactériennes d'*Escherichia coli* : une produisant la chaîne A fusionnée à l'enzyme bêta -galactosidase et l'autre produisant la chaîne B fusionnée à l'enzyme bêta-galactosidase [116]. Pour l'insuline commercialisée aujourd'hui, la souche bactérienne utilisée est *E. coli* K12 [117].

✓ Le système d'expression :

Le système d'expression utilisé est donc celui du lactose, Pour améliorer la productivité, le système d'expression du tryptophane est utilisé par la suite. Un inconvénient de l'utilisation de bactéries pour produire une protéine humaine est que les modifications post-traductionnelles ne sont pas effectuées comme dans une cellule humaine. De nombreuses étapes étaient donc nécessaires pour créer les ponts disulfures inter et intra-chaînes assurant sa structure particulière et donc sa fonction à l'insuline. De plus, les protéines ne sont pas sécrétées dans le milieu de culture mais dans l'espace péri-plasmique ou sous forme de corps d'inclusion dans le cytoplasme. Un choc osmotique ou une lyse bactérienne (dans le cas où la protéine reste dans le cytoplasme) sont donc nécessaires pour l'extraire. L'ajout d'agent dénaturant comme l'urée à 8M permet de solubiliser les corps d'inclusion [118]. Les protéines de fusion synthétisées sont purifiées par différentes techniques de filtration et de chromatographies. Elles sont ensuite traitées par une solution de CNBr qui clive les chaînes peptidiques après la méthionine. La chaîne peptidique de la bêta-galactosidase et la méthionine située juste après sont donc éliminés. Les chaînes A et B sont ainsi purifiées puis mélangées. Pour établir des ponts disulfures entre ces deux chaînes, une oxydation est

nécessaire en utilisant le disulfite de sodium qui active les cystéines. L'ajout d'un agent réducteur permet la création des ponts disulfures finaux.

Cette méthode de synthèse demande ensuite un lourd traitement pour effectuer les modifications post-traductionnelles nécessaires à l'activité hormonale de l'insuline. C'est pourquoi la société Novo Nordisk a décidé de faire synthétiser de l'insuline par des levures [119].

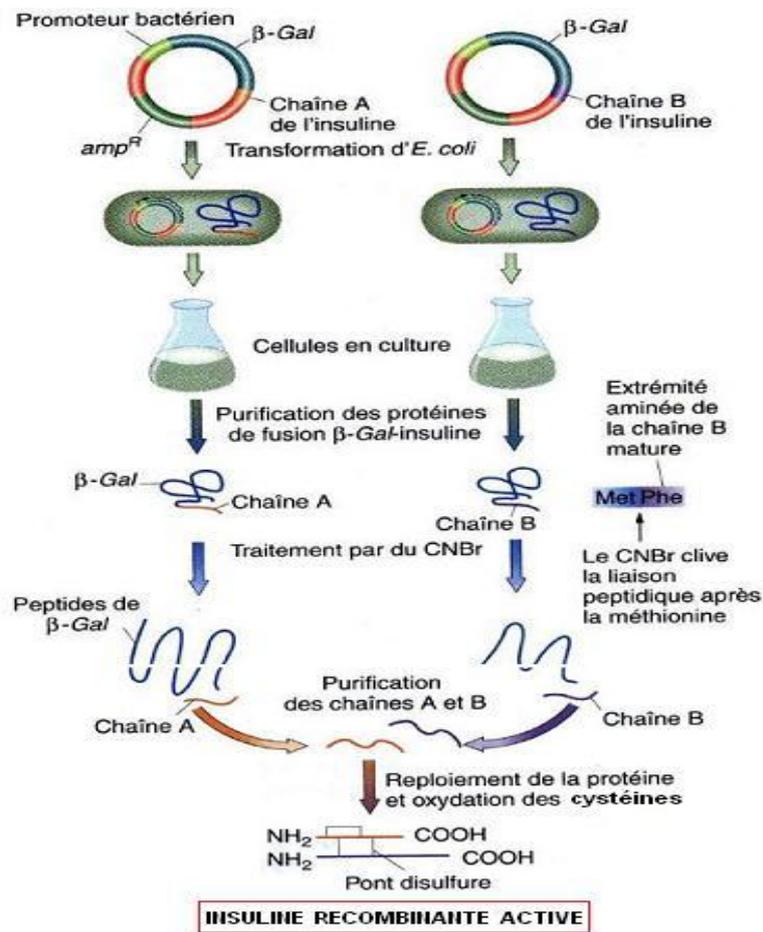


Figure 34: Schéma de la stratégie de production d'insuline recombinante utilisée en 1982 par Eli Lilly

✓ Les produits disponibles :

Les insulines Aventis, Insuman[®], 16 spécialités auxquelles il faut ajouter les insulines Aventis Lantus[®], insuline glargine, à très longue durée d'action.

Les insulines Novo Nordisk, Actrapid[®], Insulatard[®], Mixtard[®] et Ultratard[®], 21 présentations.

Les insulines Lilly, Umuline[®]

Les insulines qui sont commercialisées au Maroc sont les produits de quatre laboratoires pharmaceutiques (Aventis, Lilly, Novo Nordisk, Polymédic) [120].

✓ Les produits biosimilaires :

Les brevets de protection des analogues de l'insuline devaient expirer en 2013 pour l'insuline recombinante humaine son brevet va expirer prochainement c'est pour cette raison que beaucoup de demandes de développement de biosimilaires sont déposées (un exemple des biosimilaires de l'insuline est le dossier de Insulin Human Rapid Marvel, Insulin Human Long Marvel et Insulin Human 30/70 Mix Marvel ce dossier a été refusé par l'EMA, les motifs de ce refus sont l'insuffisance des données sur le procédé de fabrication ainsi que la non représentativité des données cliniques[118].

1-2)- HORMONE DE CROISSANCE: SOMATROPINE

L'hormone de croissance humaine est une hormone polypeptidique (protéine non glycosylée), constituée de 191 acides aminés et comportant deux ponts disulfures elle est synthétisée sous forme d'un précurseur ou pré-hormone dont le clivage protéolytique donne naissance à l'hormone active [121-122].

Les étapes de production de l'hormone de croissance :

1- la construction d'un vecteur d'expression à partir d'une séquence codante (fragment d'ADN contenant les acides aminés de 24 à 191) à partir d'un ADNc.

2- ligature de ce fragment à un oligonucléotide synthétique codant pour les 24 premiers acides aminés

3- l'introduction de ce vecteur dans un système d'expression dans le cas de l'hormone de croissance le système le plus utilisé est celle de l'E.coli.

4- production d'hGH recombinant à l'intérieur de la bactérie

5-récupération de l'hormone après destruction des bactéries par différents méthodes de destruction (choc osmotique, ondes ultrason, contraintes hydrodynamiques, gélification/dégélification)

Par ce procédé de production l'hormone n'est pas sécrétée par E. coli à l'extérieur c'est la méthionine initiatrice à l'extrémité amino-terminale qui empêche la sécrétion.

La protéine peut être aussi produite sans cette méthionine additionnelle si la protéine est fabriquée de manière à être sécrétée. Pour y parvenir, un fragment d'ADN codant pour une séquence signal bactérienne a été clonée devant la séquence codant pour l'hGH. Cette construction est introduite dans les bactéries, y dirige la production d'hGH et la séquence signal impose que la protéine soit sécrétée. La protéine s'accumule dans l'espace péri-plasmique entre les membranes interne et externe, cette protéine peut alors être libérée par un choc hypotonique qui détruit la membrane externe de la bactérie au contraire de ce qui passe dans le cas de la forme intracellulaire de l'hGH[116].

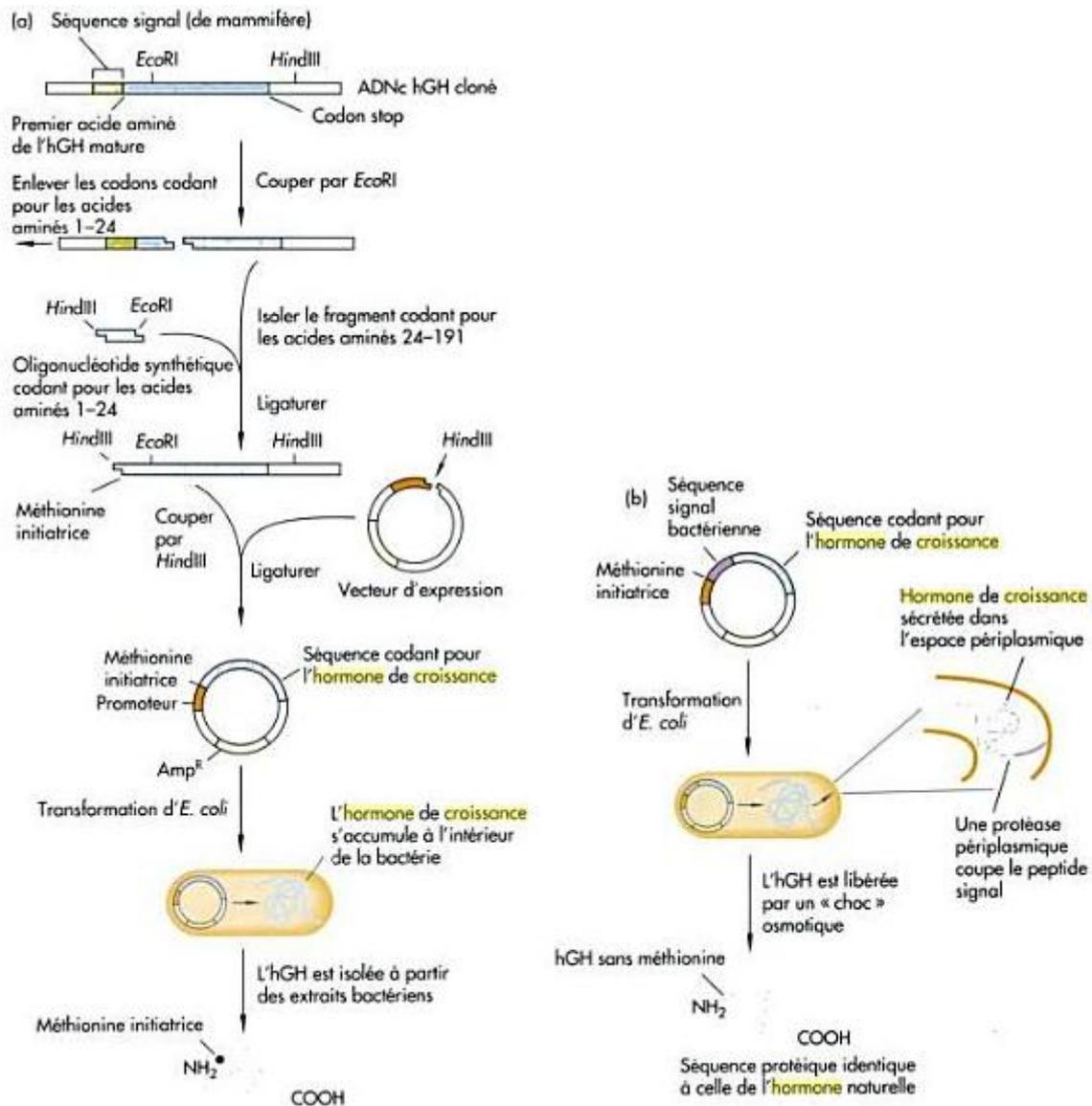


Figure 35: Schéma de synthèse de l'hormone de croissance

(a) procédé par lequel l'hormone est sécrétée à l'intérieur de E.coli

(b) procédé qui permet la sécrétion de l'hormone recombinante dans l'espace péri-plasmique de la bactérie.

Les produits disponibles :

Principes : Genotropine® de Pfizer.

Biosimilaires : Omnitrope® Sandoz.

Valtropin® BioPartners.

2) LES CYTOKINES :

Cette classe comprend les cytokines biosynthétiques et médicaments agissant sur les cytokines.

2-1) L'interleukine -2 humaine recombinante :

L'interleukine 2 (IL2) est un polypeptide de 133 acides aminés sécrété par les lymphocytes T. Cette lymphokine est capable de stimuler l'activité de toutes les cellules qui participent à la réponse immunitaire. C'est une protéine glycosylée avec une masse moléculaire de 15 Da [123]. L'interleukine recombinante diffère de l'interleukine endogène en ce qui concerne les points suivants :

-C'est une protéine non glycosylée.

-La rh IL-2 ne possède pas d'Alanine dans l'extrémité N-terminale, et la sérine en position 125 est substituée par un autre acide aminé qui est la cystéine.

Ces modifications n'ont aucun impact sur l'activité biologique de la rh-IL-2 car des études ont démontré que les deux hormones possèdent la même activité [124].

- Les étapes de production de l'interleukine 2 [125]:

a- la culture des micro-organismes transformé avec une séquence d'ADN qui code pour l'IL-2 humaine mature (séquence de peptide signale + séquence codant pour l'interleukine 2 humaine).

b- l'incitation des micro-organismes transformés. À exprimer et à accumuler l'IL-2 humaine mure.

c- la lyse des micro-organismes, et l'obtention d'un lysat cellulaire.

d- la séparation des composants de membrane cellulaire contenus dans le lysat cellulaire.

e- l'extraction l'IL-2 à partir des composants de membrane cellulaire isolés au moyen d'une solution de lavage qui contient du chlorhydrate de guanidine environ 4 à 7 M.

f- la purification de l'IL-2 par chromatographie.

Un autre procédé de production permet d'obtenir l'interleukine 2, mais cette fois c'est la lignée cellulaire HEK293 qui est utilisée comme système d'expression, la particularité de

cette lignée qu'elle possède la capacité de proliférer en suspension en absence de sérum (293SF-3F6) [126].



Figure 36 : Structure de l'interleukine humaine recombinante

Les produits disponibles :

Macrolin[®], Chiron France

Proleukine[®], Chiron France

2-2) les interférons :

En raison de leur activité antivirale, antiproliférative et immuno-modulatoire, les interférons sont utilisés en tant qu'agents thérapeutiques. Dans la famille des interférons, l'interféron alpha-2b (IFN- α 2b) est le sous-type prédominant. L'INF alpha-2a est prescrit contre l'hépatite, la sclérose en plaques et certains cancers en raison de son pouvoir antiprolifératif et immunomodulateur. L'interféron endogène est une protéine de 166 acides aminés avec une cystéine, en position 17, et une méthionine sur l'extrémité N-terminale, c'est est une protéine O-glycosylée [127].

- La production de l'interféron alfa-2b recombinante [128]:

La première étape de production consiste à isoler le gène codant pour l'interféron humaine natif qui doit être inséré dans un vecteur, qui est dans le cas de l'interféron α -2b le plasmide pPICZ α A/rHuIFN α 2b.

Ce plasmide est construit par le clonage du gène codant pour l'interféron humaine recombinante avec le plasmide pPICZ α A, un codon stop TGA est inséré à l'extrémité 3' pour permettre l'expression de la protéine sans myc épitope tag ou poly histidine tag sur l'extrémité c- terminal, ceci dans le but de faciliter l'excrétion de la protéine par le système d'expression par la suite.

Pour l'interféron alfa-2b plusieurs systèmes d'expression sont utilisés : E. coli, la levure, les cellules d'insectes infectées par le baculovirus, et la levure méthylotrophique *Pichia pastoris* (la souche Mut^SKM71H).

Par exemple la production de l'interféron α -2b par l'utilisation de *Pichia pastoris* comme système d'expression permet la glycosylation des protéines issues de la fermentation, même si cette glycosylation ne possède aucun effet sur l'activité de l'interféron, mais elle représente un facteur déterminant pour les caractéristiques pharmacocinétiques de cette protéine.

Après l'intégration du plasmide pPICZ α A/rHuIFN α 2b dans le génome de *Pichia pastoris* par électroporation, une étape de sélection des levures qui ont intégrés le plasmide est nécessaire à la fin de cette étape seule, les colonies pPICZ α /rHuIFN α 2b Mut^S KM71H qui sont isolées pour être mis en culture par la suite.

- La purification :

La première étape de purification est l'élimination de la biomasse par centrifugation, le surnageant obtenu est filtré et concentré.

Le produit concentré est soumis à une dia-filtration pour être purifié par chromatographie échangeuse de cations par la suite.

- Les contrôles :

Le produit fini est contrôlé par différentes méthodes de contrôle telles que la Western blot, l'ELISA par l'utilisation des anticorps monoclonaux spécifiques de l'interféron alfa-2b, et la SDS-page en condition réductrices par l'utilisation du bleu de coomassie comme colorant de visualisation.

Les produits disponibles :

Interféron alfa-2b :

Princeps : Intron-A[®] Schering-plough.

Biosimilaire : Viraferon peg[®] Schering-plough.

Autres Interférons :

Interféron bêta-1a :

Princeps : Avonex[®] Biogen Idec Limited. (Forme lyophilisé)

: Rebif[®] Merck Serono Europe Limited. (Forme liquide).

Interféron bêta -1b :

Princeps : Bêtaferon[®] Bayer schering pharma

Biosimilaire : Extavia[®] Novartis Europharm Limited

3)-LES FACTEURS DE CROISSANCE :

3-1) l'érythropoïétine :

L'érythropoïétine une hormone glycoprotéique, formée d'une seule chaîne polypeptidique de 165 acides aminés et glycosylée au niveau de trois arginines (liaison de type N) et d'une sérine (liaison de type O) [129].

La glycosylation, essentielle à l'activité biologique *in vivo*, s'obtient grâce à la production par des cellules de mammifère CHO (cellules ovariennes de l'hamster), ou COS (cellules de rein de singe), dans lesquelles on a introduit le gène de l'érythropoïétine humaine à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène de l'érythropoïétine couplé au promoteur du virus SV 40. Ces cellules transfectées produisent dans leur surnageant une érythropoïétine active biologiquement *in vivo* et *in vitro*, les propriétés physiques, structurales, immunologiques et biologiques de l'érythropoïétine recombinante humaine ainsi obtenue sont parfaitement semblables à celles de la protéine extraite de l'urine humaine.

✓ Résumé des étapes de production de l'érythropoïétine humaine :

- Clonage du gène codant pour l'érythropoïétine :

Détermination de la séquence d'acides aminés de l'érythropoïétine humaine et l'insertion de cette séquence dans le génome des cellules ovariennes de l'hamster CHO K1 pour obtenir le plasmide (BII.3.1). Après l'isolement de clone rHuEPO CHO (BII.3.1) une étape de clonage qui comprend deux cycles successives est nécessaire pour la création de la principale banque de cellules de travail, les cellules provenant de cette banque sont mises en culture.

- L'expansion cellulaire :

Cette étape est divisée en deux phases :

- La phase de la croissance en monocouche en présence de milieu enrichi en sérum ce processus est répété durant 3 cycles.
- La phase de production en milieu dépourvu de sérum : après le 3^{ème} cycle de culture en mode monocouche les cellules sont récupérées, et lavées par une solution tamponnée de phosphate (PBS), ensuite les cellules sont incubées dans un milieu sans sérum pour réaliser le milieu de culture conditionné contenant la rHuEPO produite [130-131].

- Concentration et diafiltration :

Le milieu de culture cellulaire conditionné est récolté concentré 20 à 40 fois par ultrafiltration (seuil de 10000 daltons) et diafiltré (seuil de 10000 daltons).

Les produits disponibles [14-29] :

Médicament de référence : Eprex[®] (Janssen Cilag)

Biosimilaires : Binocrit[®] (Sandoz),
Recermon[®] (Roche)
Epoetin alfa hexal[®] (Hexal AG)
Eporatio[®] (Ratiopharm gmbh)
Abseamed[®] (Medice)
Retacrit[®] (Hospira)
Biopoin[®] (ct arzneimittel gmbh)
Silapo[®] (Stada)

3-2) le facteur de croissance humain : G-CSF :

Le G-CSF (abréviation de "Granulocyte Colony-Stimulating Factor", ou "Facteur de Stimulation des Colonies de Granulocytes") est un facteur de croissance. Il correspond à une des classes de cytokines appelées facteurs de croissance hématopoïétique ou CSF (Colony-Stimulating Factors). Les CSF forment une famille de glycoprotéines ayant des fonctions capitales dans la formation des cellules sanguines. Le G-CSF stimule la production des cellules hématopoïétiques et de manière prédominante la production de polynucléaires. Le G-CSF endogène est une glycoprotéine c'est le produit de l'expression d'un gène situé sur le chromosome 17. Il est produit par différentes cellules, telles que les fibroblastes, macrophages, cellules endothéliales, cellules épithéliales.

Le G-CSF est détectable dans le sang, il peut être purifié à partir de surnageants des cultures de cellules tumorales humaines [132-133].

La biotechnologie permet aussi de produire trois allotype humain de G-CSF, le filgrastim (r-metHuG-CSF), le pegfilgrastim (3-Hydroxypropyl-N-méthionylcolony-stimulating factor (clone human 1034) 1-éther avec α -methyl- ω -hydroxypoly(oxy-1,2-ethanediyl), le lenograstim, Nartograstim (-(N-L-Méthionyl-L-alanine)-3-L-threonine-4-L-tyrosine-5-L-arginine-17-L-serinecolony-stimulating factor (clone humain1034) :

✓ Filgrastim :

C'est un peptide de 175 acides aminés, produit par la technologie de l'ADN recombinante, par l'utilisation de la bactérie E.coli comme système d'expression. La -metHuG-CSF diffère du peptide humain endogène par l'addition d'une méthionine sur l'extrémité N-terminale et l'absence de glycosylation [134-135].

✓ Pegfilgrastim :

C'est la forme pégylée du filgrastim, modifié par l'addition d'une chaîne linéaire de 20 Kda de polyéthylène glycol, le pegfilgrastim est produit par le même procédé de production du filgrastim par l'utilisation de l'E.coli comme système d'expression.

✓ Lénograstim :

Glycoprotéine de 174 acides aminés, la chaîne glucidique représente 4% de son poids moléculaire totale, produite par la technique de l'ADN recombinant avec un système d'expression utilisant les cellules de l'ovaire du hamster chinois (CHO). Avec ces caractéristiques la lénograstime est considéré comme la glycoprotéine la plus proche structurellement de la G-CSF endogène.

✓ Nartograstim (marograstim):

Protéine recombinante non glycosylée qui présente la même structure que la rHG-CSF non glycosylée avec la substitution de cinq acides aminés dans la région N-terminale, le système d'expression utilisé pour la production de la Nartograstim est celle de l'E.Coli [136-137].

Les produits disponibles :

- Filgrastim :

Médicament de référence : Neupogen[®] (Amgen)

Les biosimilaires :

- Ratiograstim[®] (Ratiopharm)
- Tevagrastim[®] (Teva generics,gmbh)
- Zarzio[®] (Sandoz)

- Pegfilgrastim : Neulasta[®] (Amgen)

- Lenograstim : Granocyte[®] (Chugai); Neutrogin[®](Chugai)

- Nartograstim : Neu-up[®] (Kyowa)

4) LES ANTICORPS MONOCLONAUX :

Les anticorps constituent une classe typique des bio médicaments temps par le mode de leurs production faisant appelle à de véritable méthodes biologique (Basé sur la stimulation de production par administration d'un antigène ou sur des manipulations complexes faisant intervenir des cultures cellulaires et des transfères de gènes) que par leur mode d'action les anticorps dits chimérique comportent, par exemple, une partie de type humain (anticorps humanisé) et une partie de type murai. Il est possible d'obtenir ainsi des anticorps dirigé spécifiquement contre une cible déterminé, antigène de surface, récepteur, cytokine médicaments, toxine. Les anticorps polyvalent d'origine humain correspondant à la présence d'une grande variété d'anticorps dirigé contre divers agents infectieux en particulier. Ils sont employés en thérapeutique pour corriger une déficience ou pour modifier l'immunité au cours de pathologie à composante immunitaire. En dehors des anticorps polyvalent, des anticorps spécifiques dirigé contre une cible particulière sont disponible en thérapeutique [138].

- Mode de production :

Plusieurs technologies peuvent théoriquement s'utiliser pour la production des anticorps en fonctions des caractéristiques désirées du produit final et des quantités nécessaires à sa commercialisation à une échelle régionale ou mondiale.

Procédés de production :

- La fermentation

Il existe deux grands types possibles de procédés pour produire les quantités nécessaires d'AcM, des procédés faisant appel à la transgénèse. En fait, les AcM actuellement sur le marché ou évalués dans des essais cliniques sont produits in vitro dans des cellules eucaryotes de mammifères (principalement CHO et NSO) les différents lignées cellulaires utilisées (qui incluent également YB2/0 et PERC-6) sont cultivées en suspension dans des milieux de culture sans protéine, en particulier sans protéine d'origine animale. Les procédés de

fabrication pilotes, puis transférés dans des unités de fabrications aux normes des « bonnes pratiques de fabrication » (BPF) pour satisfaire les besoins thérapeutiques.

- la purification :

La purification d'AcM à partir de surnageants de cultures est relativement facile. D'autant que les milieux de culture utilisés sont dépourvus de protéines exogènes. La première étape consiste à clarifier et à concentrer les surnageants de culture. une chromatographie d'affinité utilisant de la protéine A est ensuite utilisée. Les anticorps étant des IgG dans leur immense majorité. Au moins une étape de chromatographie échangeuse d'ions est alors ajoutée au procédé, ce qui permet d'éliminer l'ADN résiduel et les protéines de la lignée productrice contaminant. Un traitement solvant-détergent permettent une inactivation de virus enveloppés potentiellement présents ainsi qu'une étape de nanofiltration (15nm), permettent d'éliminer les particules virales, sont ajoutés au procédé de purification pour assurer une sécurité biologiques maximale. Une fois purifiés les AcM sont généralement conditionnés sous forme liquide. Prêts à l'emploi, à des concentrations de l'ordre de mg/ml, voire à des concentrations plus élevées.

- Les produits disponibles [139]:

Actuellement, une dizaine d'anticorps monoclonaux sont commercialisés et au moins 400 en cours d'évaluation, ces médicaments couvrent les domaines thérapeutiques de l'oncologie, de la transplantation, des maladies auto-immunes, de la cardiologie, de l'infectiologie et de l'allergologie (voir tableau VII).

Les biosimilaires :

Pour le développement des versions biosimilaires de cette classe thérapeutique, l'agence européenne de l'évaluation des médicaments a annoncé récemment la publication des lignes directrices pour le développement des versions biosimilaires d'anticorps monoclonaux.

Un exemple des premiers biosimilaires d'anticorps monoclonaux en développement est le biosimilaire de Rituximab, dont le groupe Teva a annoncé le lancement des études cliniques comparant ce biosimilaire et le biomédicament de référence (MabThéra®) [140].

Tableau VII: les principaux anticorps monoclonaux commercialisés : principales indications et les dates d'expiration des leurs brevets.

DCI	Nom de spécialité	Laboratoire	Date d'expiration du brevet (US/EU)	Indication
Rituximab	MabThera®/Rituxan®	Roche	2014/2013	Lymphomes non hodgkiniens
Infliximab	Remicade®	Schering Plough et J&J	2014	Maladie de Crohn/ polyarthrite rhumatoïde
Trastuzumab	Herceptin®	Genentech	2013	Cancer du sein
Bevacizumab	Avastin®	Genentech	2019	Cancers colorectaux
Adalimumab	Humira®	Abbott	2010	Polyarthrite rhumatoïde
Ranibizumab	Lucentis®	Genentech	2018	
Cetuximab	Erbitux	Imclone System	2017 / 2019	Cancers colorectaux

Tableau VIII : Les principaux médicaments biotechnologiques commercialisés au Maroc et leurs biosimilaires

Famille	biomédicament de référence		Biosimilaires	
	Nom de spécialité	PPM	Nom de spécialité	PPM
Erythropoïé tines	Eprex [®] (solution injectable à 3000 UI 6 kit 0,3 ml)	4313,20 DH	- Potex [®] poudre pour solution injectable à 10000 UI	1266,00 DH
			-Recormone [®] (érythropoïétine β) préparation injectable à 30000 UI 1 boîte de 4 seringues - Epotin [®] solution injectable à 4000 UI 10 flacons de 1 ml	12 900,00 (PPH) 6200,00 DH
Hormone de croissance	Genotropin [®] (solution injectable à 5 mg 1 boîte de 1 cartouche)	920,00 DH (PPH)	- Norditropine nordilet [®] (somatropine solution injectable à 5 mg 1 boîte 1 kit)	1700,00 DH
	Genotropin Kabiquik [®] 10 seringues de 4UI	4913,10 DH	- Umatrope [®] somatropine préparation injectable à 4 UI 1 boîte 1 seringue	580,00 DH
G-CSF	Neupogen [®] filgrastim préparation injectable à 30 mUI 1 boîte de 1 seringue	671,30 DH	Filgrastim Cooper [®] 300 ug 1 seringue	Médicament en développement
	Granocyte [®] 34 lenograstim poudre pour solution 5 seringues injectables à 33.6 mUI	6614,00 DH	Gran [®] lenograstim solution injectable à 34 mUI un flacon à 1 ml	850,00 DH
Famille	Biomédicament de référence		Biosimilaires	

	Nom de spécialité	PPM	Nom de spécialité	PPM
Interférons	Roferon-A [®] interféron alfa-2a préparation injectable à 9 mUI	629,20 (PHM)	Inferon [®] interféron alfa-2a solution injectable à 4.5 mUI.	397,00 DH
	Pegasys [®] interféron alfa-2a pégylé préparation injectable à 180 µg, boîte d'une seringue	2823,40(PH M)		
	Introna [®] interferon alfa-2b solution injectable à 30 mUI 1 stylo 1,5 ml	2020,00 (PHM)		
	Viraferon PEG [®] interféron alfa-2b pégylé solution injectable à 80 µg	1592,70 (PHM)		
	Avonex [®] interferon bêta- 1a préparation injectable à 30µg , boîte de 4 seringues	12000,00 (PHM)	Rebif [®] 44 µg interféron bêta-1a préparation injectable à 44 µg, boîte de 12 seringues	11976,00 (PHM)
	Anticorps monoclonaux	Mabthera [®] rituximab solution pour perfusion à500 mg, une boîte d'un flacon	15444,00 (PHM)	Biosimilaire en développement par les laboratoires Teva



Chapitre VI : le cas des Biosimilaires de l'érythropoïétine

I-Pharmacologie de l'érythropoïétine

1)- l'érythropoïétine :

L'érythropoïétine (EPO) est une hormone glycoprotéique qui fait partie des facteurs de croissance hématopoïétiques. Le rôle physiologique de l'EPO est de réguler la production des globules rouges en fonction des besoins en oxygène de l'organisme. En cas d'hypoxie, la synthèse d'EPO augmente et stimule la production d'érythrocytes, et inversement, la production d'EPO diminue ainsi que le nombre de globules rouges en cas d'hyperoxygénation tissulaire. Le taux d'érythropoïétine endogène chez un sujet adulte sain est d'environ 10 mUI/mL (soit 0,0024 fmoles/ μ L) avec des variations importantes.

Le rein, sensible à un manque d'oxygène, répond par une augmentation de la sécrétion d'EPO. Pour cela, la transcription du gène de l'EPO est induite dans un délai de deux heures, puis la protéine nouvellement synthétisée est sécrétée immédiatement, puisqu'il n'y a pas de réserve intracellulaire d'EPO préexistante. Cette sécrétion est suivie, après un certain temps, par la formation de globules rouges à partir des précurseurs érythrocytaires de la moelle hématopoïétique. L'EPO induit de façon spécifique la prolifération et la maturation des cellules érythrocytaires. La formation des érythrocytes comporte différentes étapes de maturation présentées sur la figure 37 :

L'action de l'EPO débute au niveau des BFU-E (*Burst Forming Unit-Erythroid*), précurseurs des érythroblastes : elle induit leur prolifération.

L'action de l'EPO s'exerce ensuite et de manière plus importante au niveau des CFU-E (*Colony Forming Unit-Erythroid*) autres précurseurs des érythroblastes. Les CFU-E sont considérés comme la cible primaire de l'EPO.

l'EPO est indispensable à la différenciation des BFU-E en CFU-E puis en érythroblastes, et son effet diminue au fur et à mesure de la maturation des cellules érythrocytaires de la moelle osseuse.

L'EPO induit en bout de chaîne la synthèse de l'hémoglobine et la maturation des érythrocytes.

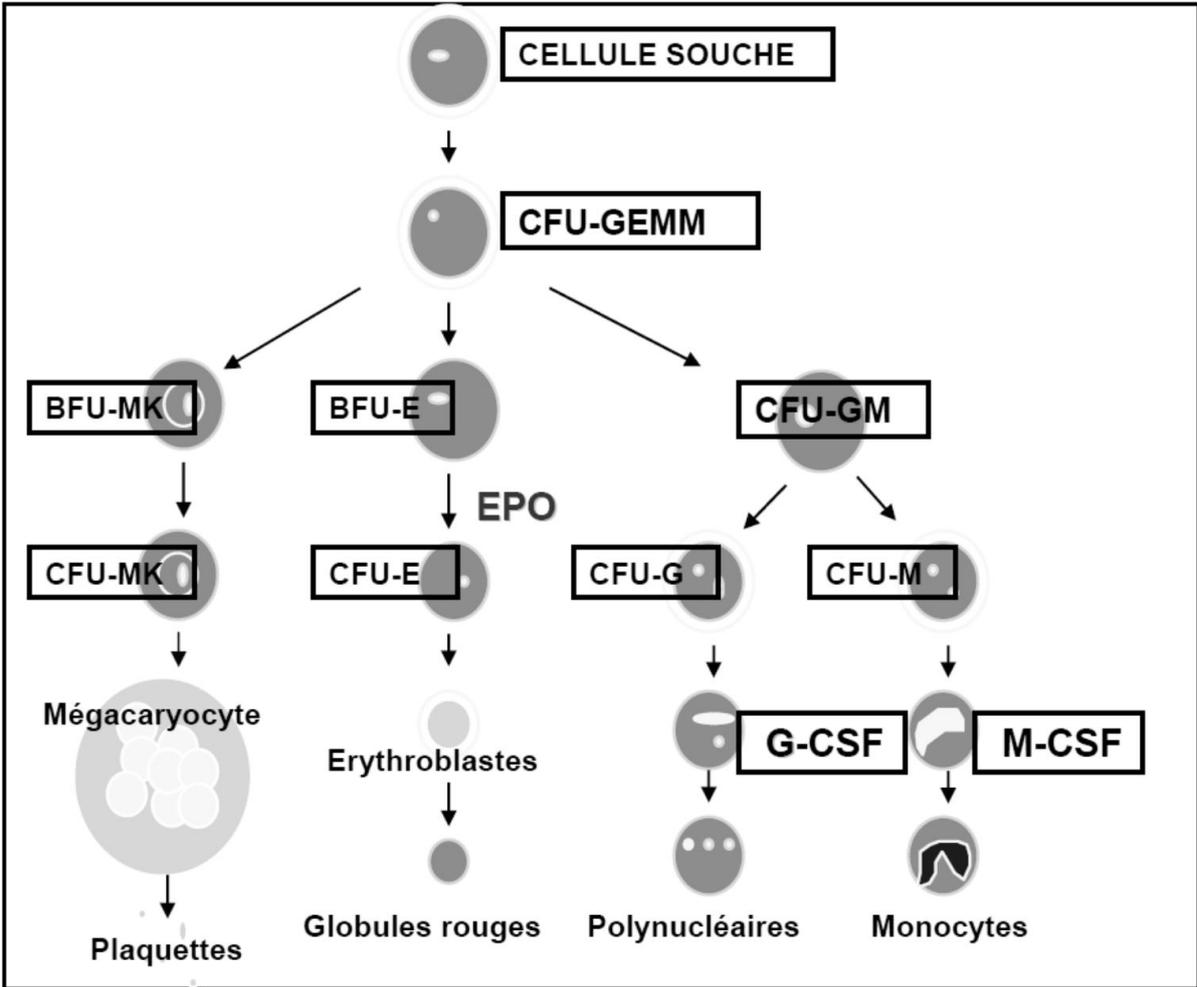


Figure 37 : Niveau d'action de l'EPO dans la formation des cellules sanguines

(E : Erythrocyte/GM : Granulocyte-Macrophage/G : Granulocyte/M : Monocyte-Macrophage/MK : Mega-cayocyte/GEMM : Granulocyte-Erythrocyte-Macrophage-Mégacaryocyte/CSF : Colony Stimulating Factor)

A l'échelon cellulaire, l'EPO se fixe aux récepteurs des cellules précurseurs érythrocytaires. Les récepteurs de l'EPO appartiennent à la famille des récepteurs de l'hormone de croissance. Le signal de transduction induit par l'EPO ne nécessite une liaison qu'avec un petit nombre de récepteurs. La figure 38 présente les voies de signalisation de l'EPO après sa fixation aux

récepteurs des cellules érythrocytaires. L'hématopoïèse s'accompagne d'une perte des récepteurs durant la différenciation cellulaire [141].

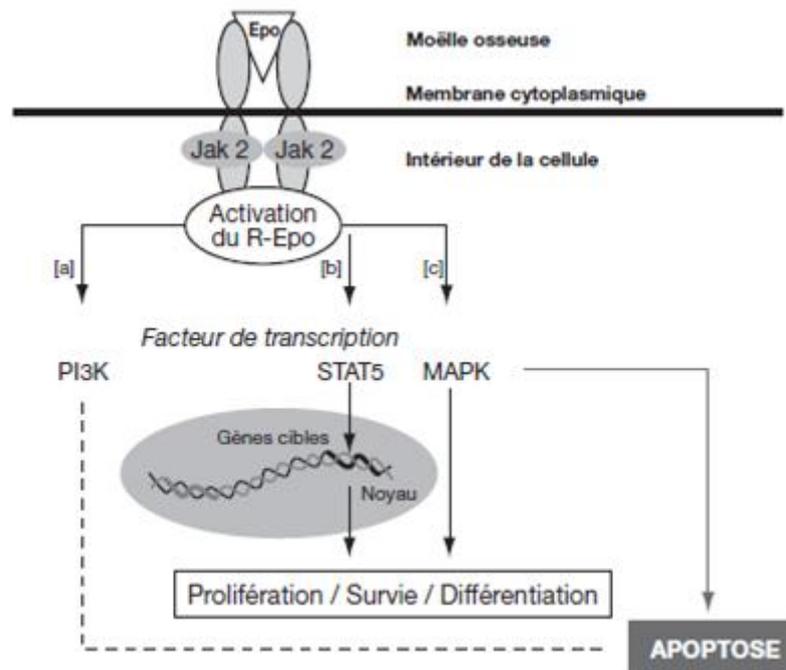


Figure 38: La fixation de l'érythropoïétine à son récepteur et les voies de signalisation intracellulaire

2)- Isoformes du récepteur de l'érythropoïétine :

Il existe différentes isoformes de récepteurs à l'EPO. Ces isoformes diffèrent considérablement dans leur affinité pour l'EPO. Le récepteur hématopoïétique est un homodimère composé de deux unités identiques avec une grande affinité pour l'EPO circulante. L'isoforme impliquée dans la protection tissulaire est un hétérodimère formé par le récepteur à l'EPO associé à un récepteur commun bêta qui est également utilisée par le GM-CSF, l'IL-3, l'IL-5 et d'autres cytokines de type I . Ce dernier, largement exprimé dans différents tissus (rein, cerveau, cœur), présente une faible affinité pour l'EPO et n'est pas stimulé par des concentrations usuelles d'EPO circulante, il nécessite de hautes concentrations d'EPO pour être activé [130].

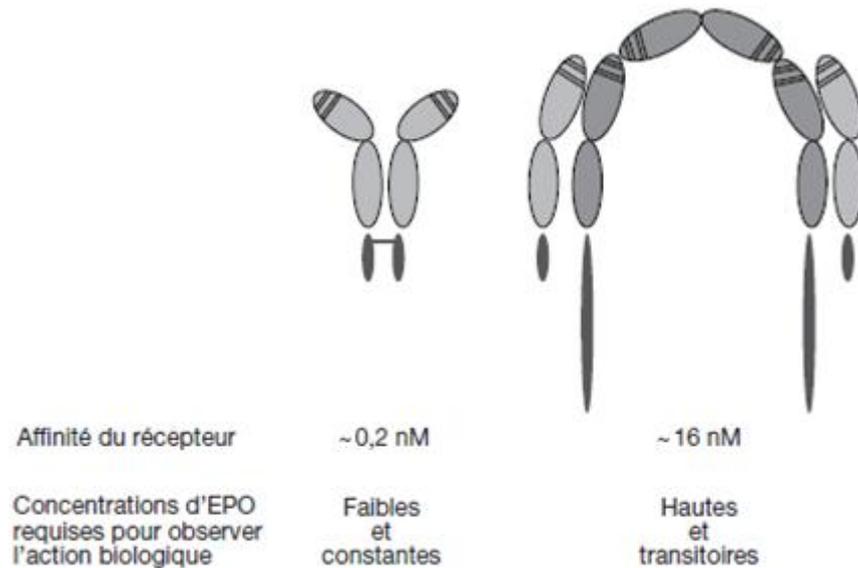


Figure 39 : Deux isoformes de récepteurs de l'EPO à gauche un homodimère, à droite hétérodimère

3)- Production de l'érythropoïétine :

Les protéines de régulation comme l'érythropoïétine ne sont présentes chez l'homme qu'en très faible quantité, expliquant le fait que cette hormone ne peut être obtenue en quantité suffisante à partir de sources naturelles.

Miyake et al ont purifié l'EPO en 1977 à partir d'urine de patients anémiques, ce qui a permis de déterminer sa structure primaire et la séquence du gène codant pour l'EPO. Les techniques de biologie moléculaire et de génie génétique ont ensuite permis la production de masse de l'EPO avec un degré de pureté très important [142].

4)- Indications thérapeutiques et posologies :

La structure de l'EPO étant identique à celle de l'érythropoïétine endogène, son activité thérapeutique est identique à celle de l'EPO endogène. L'EPO est essentiellement employée pour le traitement de l'anémie selon quatre principales indications :

- Le traitement de l'anémie des insuffisants rénaux chroniques dialysés ou des insuffisants rénaux non encore dialysés :

Par voie SC : 20 UI/kg 3 fois par semaine en phase de correction (augmentation possible) puis diminution de moitié en phase d'entretien

Par voie IV : 40 UI/kg 3 fois par semaine en phase de correction (augmentation possible) puis diminution de moitié en phase d'entretien

– Le traitement de l'anémie symptomatique des patients adultes atteints de tumeurs malignes non myéloïdes et traités par chimiothérapie :

Dose initiale par voie SC : 30 000 UI (450 UI/kg) 1 fois par semaine

Dose maximale par voie SC : 60 000 UI (900 UI/kg) 1 fois par semaine

– L'augmentation du volume des dons de sang autologues chez les malades participant à un programme de transfusions autologues différées (administration 2 fois par semaine pendant 4 semaines, dose fonction du résultat souhaité).

– La prévention de l'anémie du nouveau-né prématuré (poids compris entre 750 et 1000 g) : administration SC de 250 UI/kg 3 fois par semaine [144].

5)- Profil pharmacocinétique :

Peu de données sur le métabolisme de l'EPO sont disponibles. Il est probable que la dégradation de l'EPO survienne après clivage enzymatique dans le foie des acides sialiques terminaux des glycanes l'élimination urinaire joue seulement un rôle mineur.

La pharmacocinétique de l'EPO a été étudiée chez des volontaires sains, des patients hémodialysés et des patients en dialyse péritonéale, ainsi que chez des patients ayant des degrés d'insuffisance rénale différents. Aucune relation n'a été établie entre la pharmacocinétique et le degré d'insuffisance rénale. L'élimination de l'EPO après une administration intraveineuse est biphasique avec une $\frac{1}{2}$ vie de 4 à 12 heures. Le volume de distribution est égal à une ou deux fois le volume plasmatique. Les taux sériques reviennent aux valeurs initiales après 48 heures. La demi-vie de l'EPO se trouve diminuée dans certains cas chez les patients en dialyse péritonéale et lors d'administrations répétées.

Les données de pharmacocinétique présentées dans le tableau IX, révèlent des différences notables entre l'administration sous-cutanée (SC) et l'administration intraveineuse (IV).

Tableau IX : Données pharmacocinétiques de l'érythropoïétine.

Paramètre	Voie d'administration SC	Voie d'administration IV
Demi-vie	13 à 28 h	4 à 12 h
Pic de concentration maximale	12 à 28 h	-
Biodisponibilité relative (voie IV : référence)	23 à 42 %	100 %

L'administration intraveineuse se caractérise par des pics sériques élevés alors que l'administration sous-cutanée se caractérise par une résorption et une élimination prolongées conduisant à des concentrations maintenues en plateau (les taux sériques sont maximaux après 12 à 28 heures. Après administration sous-cutanée, la $\frac{1}{2}$ vie moyenne d'élimination est de 13 à 28 heures. Après 72 heures, le taux sérique d'EPO est encore supérieur à la valeur initiale. La pente de la courbe d'élimination et le taux sérique maximum présentent de grandes variations individuelles.

La résorption lente de l'érythropoïétine à partir des tissus sous-cutanés, et les taux sériques élevés de façon prolongée, semblent mieux correspondre aux besoins physiologiques [142].

6)- Effets indésirables :

Les effets indésirables, surtout observés au cours du traitement chez les patients présentant une insuffisance rénale chronique ou une tumeur maligne sous-jacente, sont le plus fréquemment une augmentation de la pression artérielle ou une aggravation d'une hypertension préexistante et des céphalées surtout en cas d'élévation rapide de l'hématocrite. Moins de 10 % des patients recevant de l'érythropoïétine présentent des effets indésirables [144].

7)- Echappement thérapeutique

L'érythropoïétine communément utilisée pour le traitement de l'anémie des patients insuffisants rénaux et des patients atteints de tumeurs malignes non myéloïdes sous

chimiothérapie, est une thérapie coûteuse et tous les patients ne répondent pas au traitement. Actuellement, la dose d'érythropoïétine recombinante humaine est ajustée suivant l'évolution de l'hémoglobinémie sous traitement.

La résistance à l'érythropoïétine des patients insuffisants rénaux chroniques est suspectée quand le patient n'atteint pas la cible alors qu'il reçoit plus de 300 UI/kg/semaine d'érythropoïétine ou a un besoin continu de telles doses pour maintenir la cible. Les causes les plus fréquentes de réponse incomplète sont la carence en fer et les maladies infectieuses ou inflammatoires. L'observance doit être vérifiée.

En ce qui concerne le traitement de l'anémie des patients atteints de tumeurs malignes non myéloïdes, la dose initiale recommandée est de 30 000 UI (450 UI/kg) par semaine administrée en une fois ou répartie en 3 à 7 injections, les deux modalités d'administration ayant la même efficacité [142]. Cette dose initiale peut être doublée après 4 semaines de traitement chez les patients non répondeurs. Parmi les patients non répondeurs (40 % en moyenne) après un mois de traitement, 28 % obtiennent une réponse complète avec une double dose d'érythropoïétine recombinante humaine. Cependant les risques d'accidents thromboemboliques et d'hypertension artérielle sont importants aux doses élevées d'EPO employées chez les patients cancéreux.

L'individualisation et l'optimisation des traitements chez les patients non répondeurs, mais aussi chez les répondeurs s'avèrent ainsi nécessaires pour déterminer les doses d'entretien efficaces. L'optimisation des traitements, surtout intéressante pour les fortes doses administrées chez les patients cancéreux, permettrait de déterminer la dose minimum efficace et d'éviter les effets secondaires. Malgré l'utilisation croissante en cancérologie de l'EPO à forte dose administrée une fois par semaine sans effets secondaires graves, peu de données pharmacocinétiques sont disponibles [141-143].

8)- Concentrations plasmatiques attendues pour l'érythropoïétine :

La concentration plasmatique maximale (C_{max}) en EPO attendue dans le plasma après une injection sous-cutanée de 36 000 UI est de l'ordre de 2 000 UI/ml soit environ 0,5 fmole/ μ L de plasma. Pour des doses de 9000 à 36 000 UI administrées, la pharmacocinétique de l'EPO

est linéaire (Fugisaka et al. 2006). Ainsi, les Cmax attendues pour des injections SC de 30 000 à 60 000 UI d'érythropoïétine en cancérologie seront de l'ordre de 0,5 à 1 fmoles d'EPO/ μ L de plasma [141].

8-Structure de l'érythropoïétine :

L'érythropoïétine recombinante (rh EPO) est une glycoprotéine d'environ 30 000 Daltons, fortement glycosylée (environ 40 %)

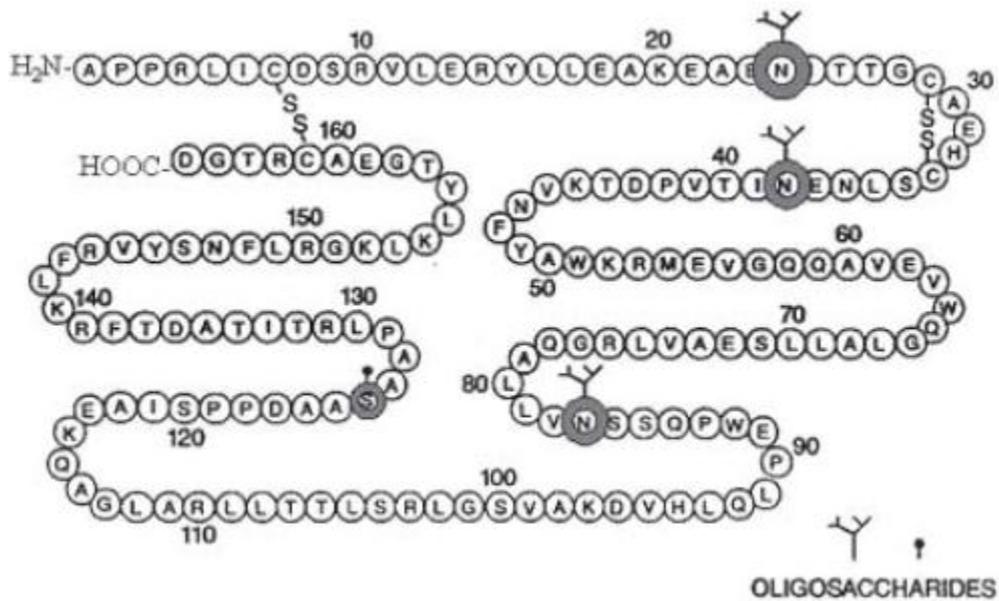


Figure 40 : structure de l'érythropoïétine

II- CONTROLE DE LA COMPARABILITE DES BIOSIMILAIRES DE L'ERYTHROPOÏËTINE AU PRODUIT DE REFERENCE :

1) Le contrôle de la comparabilité physicochimique :

Ce contrôle est établi à partir d'une étude de caractérisation comparative très poussée, pour démontrer que le biosimilaire et le comparateur ont la même :

- ✓ Structure primaire.
- ✓ Structure secondaire et tertiaire.
- ✓ Appariement des ponts disulfures.
- ✓ Profil de glycosylation.

a) structure primaire :

Le biosimilaire et le médicament princeps devraient avoir la même séquence d'acides aminés.

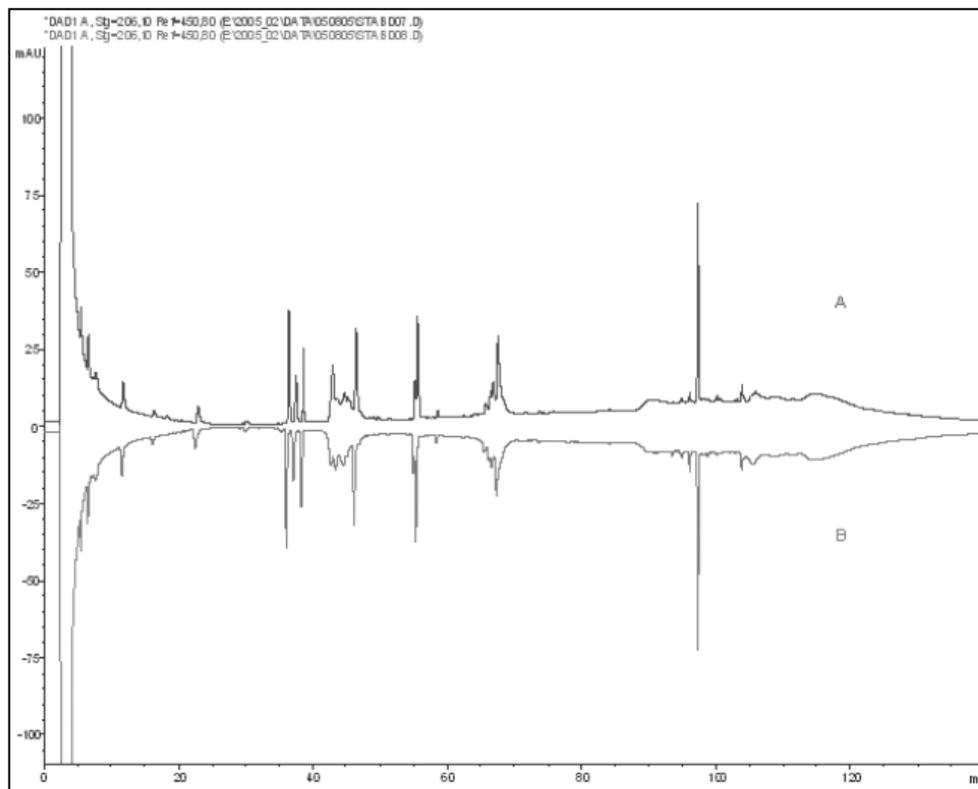


Figure 41: Comparaison des cartes de restriction trypsique pour établir la comparabilité des structures primaires.

A : Binocrit lot 410204 B : le comparateur lot 04BS92R

L'étude des cartes de restriction trypsique du biosimilaire et son comparateur, montre que les deux médicaments présentent une structure primaire rigoureusement identique et possèdent les mêmes sites de clivage enzymatiques.

Et le profil HPLC des peptides générés par l'action d'une protéase présentés en miroir pour ces 2 lots conservés dans des conditions identiques (18 mois à 2-8°C).D'après l'étude les profils sont tout à fait identiques.

b) structure secondaire et tertiaire :

L'étude de la structure secondaire et tertiaire est réalisée par différentes techniques spectroscopiques parmi ces techniques on peut citer la diffraction par les rayons X, et le dichroïsme circulaire.

L'étude de la structure du biosimilaire et le produit de référence dans notre exemple (l'érythropoïétine) par la technique du dichroïsme circulaire montre que les deux produits possèdent les mêmes structures secondaires et tertiaires (hélices alpha et feuillets bêta), ceci se traduit par la superposition parfaite des spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV proche et l'UV lointain [94].

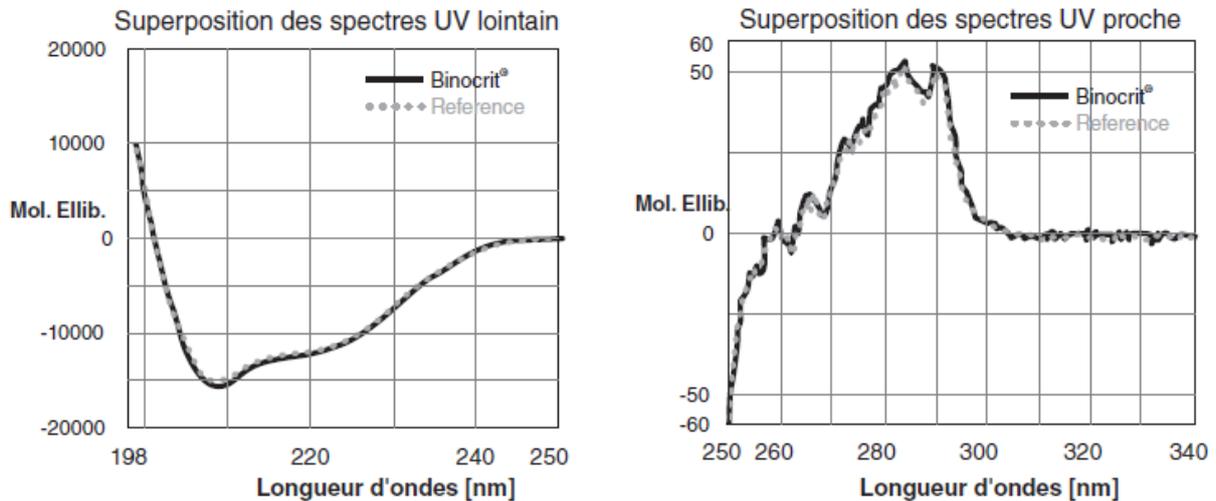


Figure 42 : Comparaison des spectres de dichroïsme circulaire

c) l'appariement des ponts disulfures :

Dans le cas de l'érythropoïétine alfa les ponts disulfure sont présentent seulement entre les cystéines 7 et 157.

c) profil de glycosylation :

Pour l'érythropoïétine alfa c'est surtout l'étude de la similarité des séquences polysaccharidiques au niveau des asparagines 24,38 et 83 et la sérine 126.

Des différences de la glycosylation en particulier de sialylation, se traduisent par l'apparition des isoformes caractérisés des pH isoélectriques différents, l'étude des profils de glycosilation est réalisée par HPAEC-PAD [94].

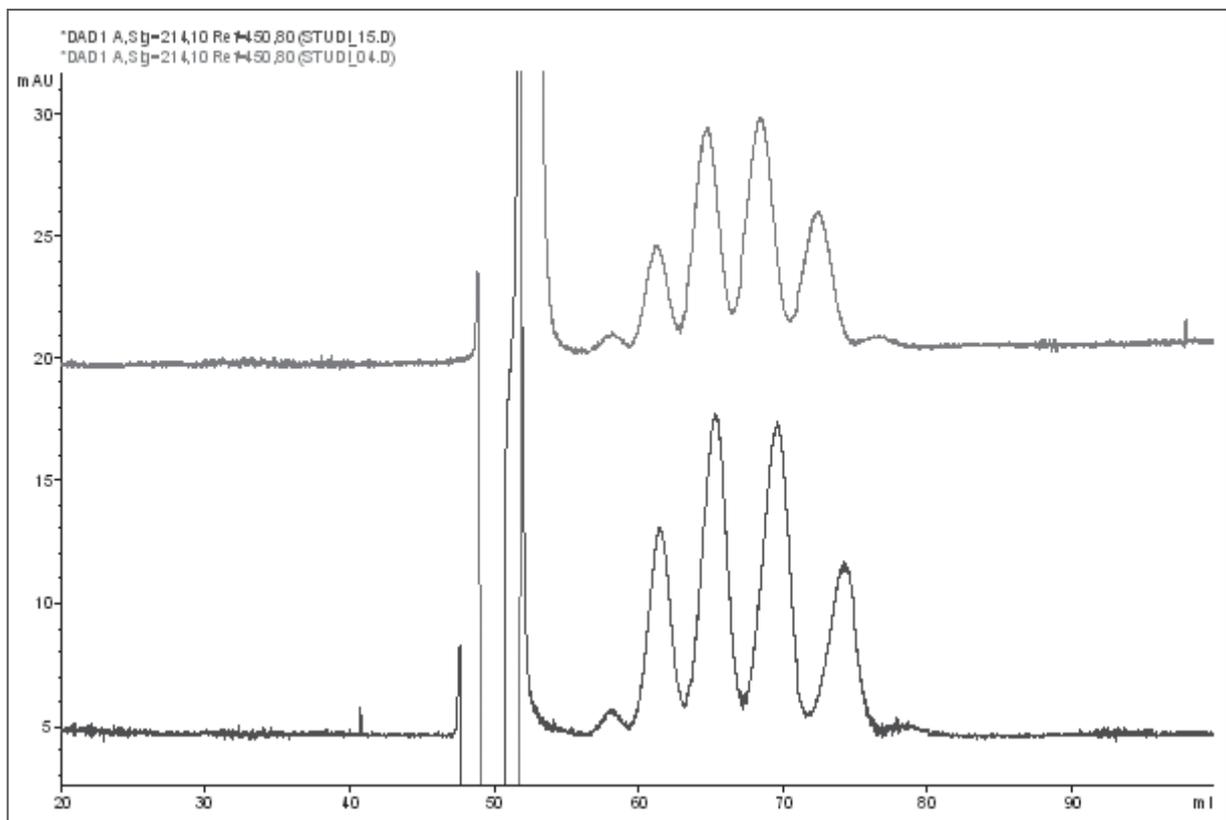


Figure 43 : Distribution des isoformes du Binocrit® et son comparateur en électrophorèse capillaire

L'étude des profils des isoformes, obtenu par l'électrophorèse capillaire montre que le biosimilaire et le comparateur possèdent le même profil des isoformes caractéristiques de

l'érythropoïétine alfa. Cette étude est complétée par la réalisation d'une étude des profils de glycosylation par HPAEC-PAD.

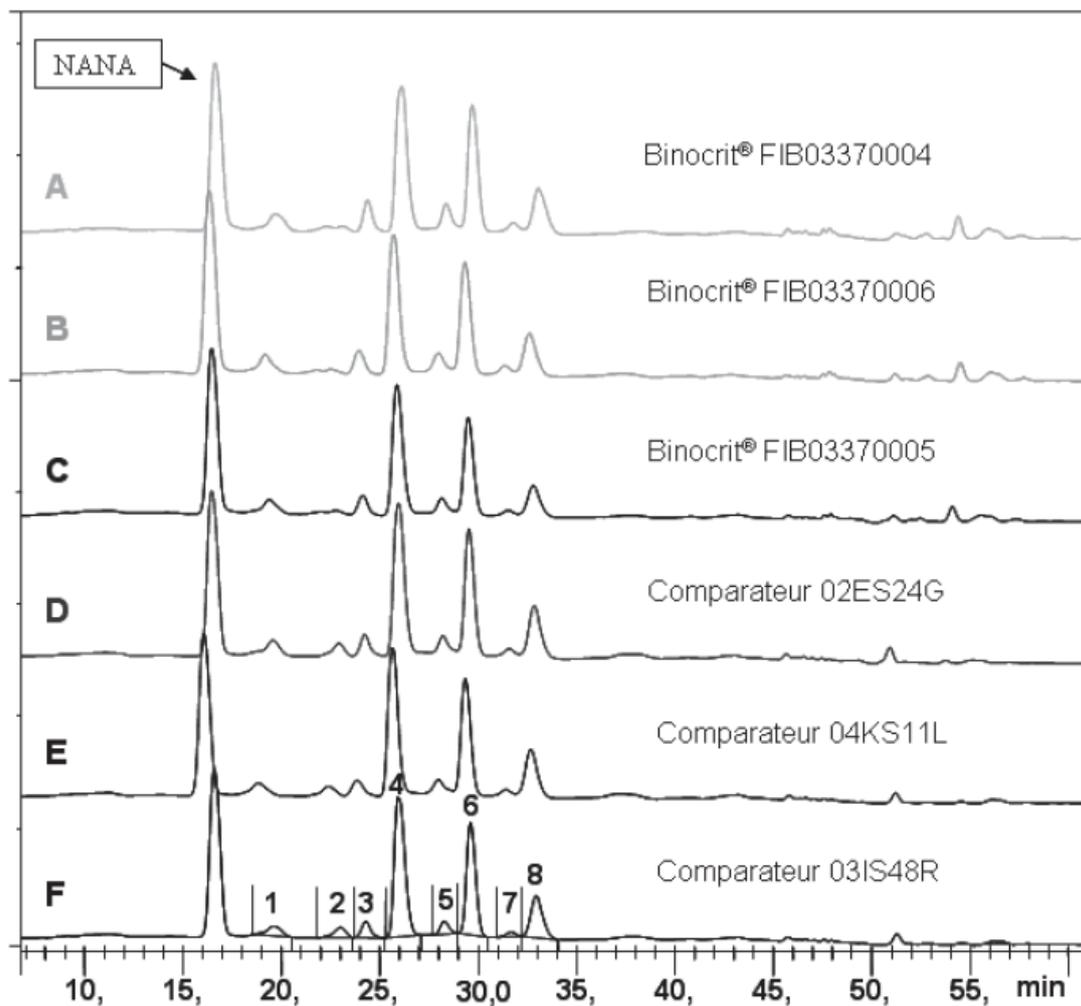


Figure 44 : Comparaison des profils de glycosylation par échange anionique à haute performance - Détection par ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD).

Les pics 1 à 8 correspondent à des glycans fucosylés identifiés comme étant :

- | | |
|---------------|-----------|
| 1: 2A1F | 5: 3A1F1R |
| 2: 3A1F (1-4) | 6: 4A1F1R |
| 3: 3A1F (1-6) | 7: 3A1F2R |
| 4: 4A1F | 8: 4A1F2R |

Cette étude montre la similitude des motifs glucidiques liés aux 3 Asparagines 24, 38, 83 et la sérine 126. Donc le biosimilaire et le comparateur ont le même profil de glycosylation.

2) l'étude de la comparabilité biologique :

Etude de la comparabilité biologique in vitro :

La comparabilité biologique in vitro est démontrée par la comparaison des cinétiques de liaisons du médicament au récepteur.

La cinétique de la liaison du ligand au récepteur est étudiée par différentes méthodes parmi ces méthodes on peut citer la résonance plasmonique de surface (SPR) [112].

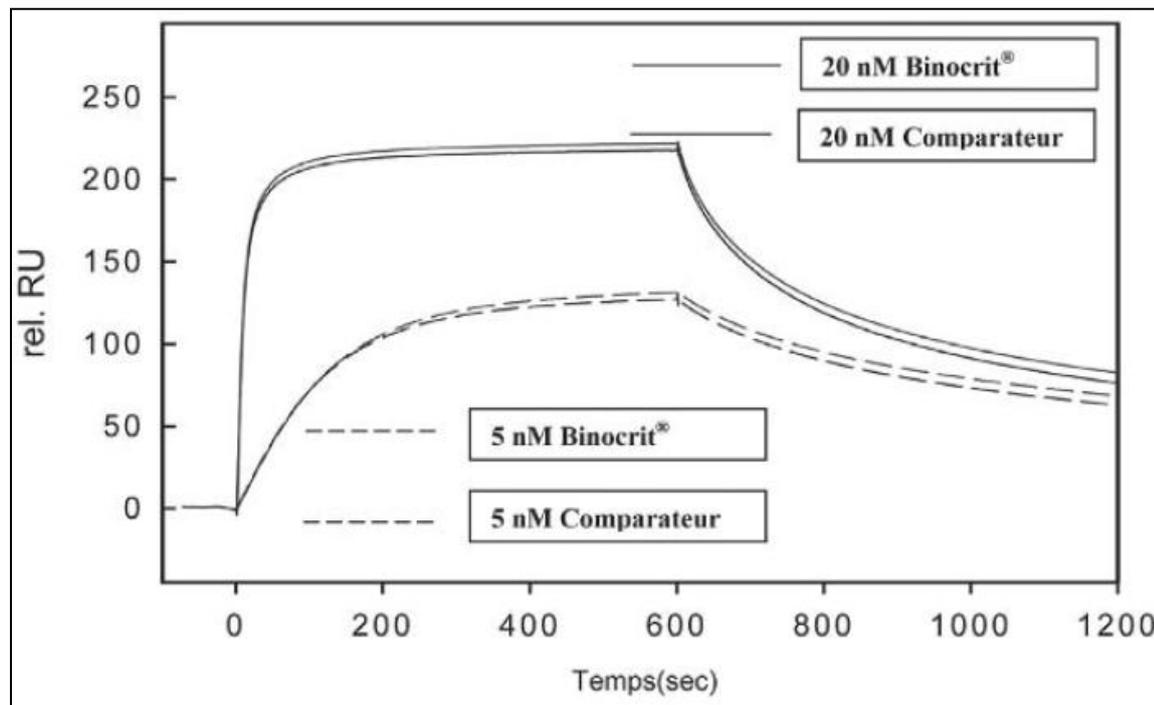


Figure 45 : Etude des liaisons du biosimilaire et son comparateur au récepteur par résonance plasmonique.

Dans cette étude le récepteur de l'érythropoïétine a été fixé sur la surface « sensor chips » et la liaison de l'érythropoïétine (le biosimilaire et le produit de référence) sur son récepteur a été étudiée par résonance plasmonique de surface.

D'après cette étude les cinétiques de liaisons des deux produits sont hautement comparables, même si ils ne présentent pas les mêmes valeurs mais le profil cinétique est identique ce qui est conforme aux recommandations en vigueur [94].

3)-Le développement clinique :

3-1) Les recommandations de l'EMA pour le développement clinique des biosimilaires de l'érythropoïétine :

Selon les recommandations de l'EMA, les érythropoïétines biosimilaires devront être testées dans au moins deux études cliniques d'efficacité randomisées en double insu avec un produit de référence et effectuées de préférence chez des sujets insuffisants rénaux (le nombre de patients n'est pas précisé). Cependant, il est suggéré qu'au moins 300 patients soient observés pendant 12 mois dans le cadre de l'étude de tolérance en termes de l'immunogénicité éventuelle du produit biosimilaire concerné. Une étude effectuée chez des patients ne recevant pas de traitement par un agent stimulant l'érythropoïèse (étude dite de titration) et une étude effectuée chez des patients déjà traités par un agent stimulant l'érythropoïèse (étude dite d'entretien). Ces études auront pour but de démontrer « l'équivalence » des deux produits, à la fois en termes d'efficacité sur la concentration d'hémoglobine, le pourcentage de répondeurs (Hb cible entre 11 et 12 g/l) et en termes de posologie. Il est probable que la première étude sera effectuée chez des patients insuffisants rénaux chroniques non dialysés qui recevront le produit par voie sous-cutanée, alors que la seconde sera effectuée chez des patients hémodialysés qui recevront le produit par voie intraveineuse. L'EMA demande que ces études soient des études d'équivalence (et non pas des études de non-infériorité). Se pose donc la question de la marge acceptable pour considérer que deux produits sont équivalents. Certains sociétés savants comme la société de néphrologie, la société francophone de dialyse, et la société de néphrologie pédiatrique proposent que les marges d'équivalence ne dépassent pas 1 g/dl pour la concentration d'hémoglobine et 10 % pour la dose d'érythropoïétine. Dans ces conditions, le produit biosimilaire sera considéré comme équivalent au produit de

référence si, à la fin de l'étude, les concentrations d'hémoglobine diffèrent de moins de 1 g/dl et les doses utilisées diffèrent de moins de 10 %, entre les deux groupes [145].

3-2) L'exemple de développement clinique d'un biosimilaire de l'érythropoïétine (Binocrit®)

Le développement clinique de ce médicament biosimilaire comprend les étapes suivantes :

- Des essais de phase I réalisés chez des volontaires sains ont d'abord permis d'affirmer que Binocrit® administré par voie intraveineuse (IV) et sous-cutanée (SC), possédait les mêmes propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques que le comparateur époétine alfa.
- Des essais de phase III qui ont pour but de démontrer l'efficacité et la tolérance du biosimilaire par rapport au médicament biologique de référence.

3-1-1) Les études de phase III :

Cette partie développe la méthodologie de la réalisation d'une étude de phase III pour démontrer l'efficacité et la tolérance d'un biosimilaire par rapport à un médicament de référence, pour bien illustrer cette méthodologie deux exemples d'études de phase III sont présentés :

- l'étude INJ-9 réalisée pour évaluer la comparabilité pour un biosimilaire de l'érythropoïétine Binocrit® par rapport à un médicament de référence (Eprex®)
- l'étude INJ-11 réalisée pour confirmer l'efficacité, c'est une étude non comparative.

3-1-1-1) l'étude INJ-9:

Cette étude multicentrique d'équivalence a été conduite sur 56 semaines et a inclus 478 patients IRC, hémodialysés depuis au moins 6 mois et cliniquement stables. Leur concentration en hémoglobine (Hb) était comprise entre 10 et 13 g/dl au cours des 12 semaines précédant l'inclusion et ils étaient traités par une dose stable d'érythropoïétine alfa

en IV correspondant à un maximum de 300UI/kg/ semaine, depuis au moins 8 semaines au moment de l'inclusion. L'étude s'est déroulée en 2 phases de 28 semaines. Une première phase contrôlée, menée en double-aveugle, sur 2 groupes parallèles, était destinée à comparer l'efficacité de Binocrit® versus le comparateur érythropoïétine alfa [146].

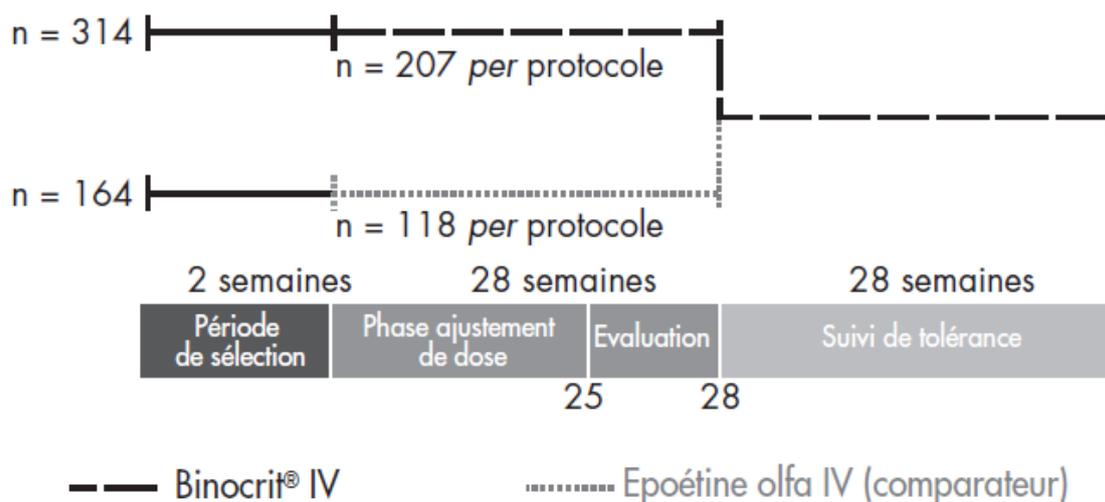


Figure 46 : déroulement de l'étude INJ-9

Les patients ont été randomisés (rapport 2 : 1) pour recevoir par voie IV à la fin de la période de dialyse, soit Binocrit® (n = 314), soit le comparateur (n = 164), à raison de 3 injections par semaine. Pendant les 24 premières semaines, les doses ont été ajustées pour maintenir la concentration d'Hb entre 10 et 13 g/dl. Cette période d'ajustement posologique a été suivie d'une période d'évaluation de 4 semaines, qui avait pour critère principal d'efficacité, la différence absolue des concentrations moyennes d'Hb entre la période d'évaluation (semaines 25 à 28) et l'inclusion, sur la population per protocole (PP). Binocrit® était considéré équivalent au comparateur si l'intervalle de confiance à 95 % de la différence intergroupe sur le critère principal d'efficacité était compris entre -0,5 et +0,5 g/dl. La même mesure réalisée sur la population en intention de traiter (ITT) a été prise comme critère secondaire d'évaluation [146].

3-1-1-2)- évaluation de l'efficacité du biosimilaire par rapport au produit de référence :

Pour l'évaluation de l'efficacité les paramètres qui ont été adoptés pour suivre l'évolution de l'étude sont les suivants :

- a) La variation moyenne des concentrations de l' Hb.
- b) L'ajustement posologique.
- c) La dose moyenne administrée de l'érythropoïétine.
- d) La fréquence des transfusions sanguines.

✓ La population étudiée :

L'analyse en intention de traiter (ITT) a inclus 304 (96,5 %) des 314 patients traités par Binocrit[®] et 161 des 164 patients traités par le comparateur. En éliminant les sorties prématurées de l'étude (17,1 % et 12,2 % respectivement dans les 2 groupes) et les patients n'ayant pas reçu une dose stable d'érythropoïétine alfa avant l'inclusion ou en cours de traitement, la population per protocole était constituée de 207 patients dans le groupe Binocrit[®] et 118 patients dans le groupe comparateur. Les caractéristiques des patients à l'inclusion sont décrites dans le tableau X.

✓ Observations :

Les deux groupes sont comparables pour l'ensemble des caractéristiques classiques (âge, sexe, CRP, PTH, statut martial...). Cependant malgré la randomisation, on constate un pourcentage plus important de diabétiques supérieur dans le groupe Binocrit[®] par rapport au groupe comparateur (30% versus 17,8%) ainsi qu'une ancienneté moyenne du diagnostic de la maladie rénale chronique (MRC) supérieure dans le groupe Binocrit[®] par rapport au groupe comparateur ($98,2 \pm 89,1$ mois versus $82,0 \pm 71,5$ mois respectivement).

Ces éléments pourraient expliquer les différences non significatives observées entre les deux groupes en termes de dose d'érythropoïétine alfa ($7053,9 \pm 3666,8$ versus $6622,9 \pm 3629,2$ UI respectivement) et de concentration en hémoglobine, à l'inclusion, lorsque l'ensemble des patients était encore sous le comparateur érythropoïétine alfa. Ces différences traduiraient ainsi un stade plus avancé de la MRC et de l'anémie **[146-147]**.

Tableau X : Caractéristiques des patients à l'inclusion durant l'étude inj-9

Caractéristique	Binocrit® n = 207	Comparateur n = 118
Sexe n (%)		
Hommes	116 (56)	72 (61)
Femmes	91 (44)	46 (39)
Âge années		
Min-max, médiane	61,9±14,7	62,1±13,3
Race, n (%)		
Caucasienne	206 (99,5)	118 (100)
autres	1 (0,5)	0
Étiologie de l'IRC, N (%)		
Diabète	42 (30)	21 (17,8)
Hypertension	26 (12,6)	13 (11)
Néphrite interstitielle chronique	14 (6,8)	8 (6,8)
Glomérulonéphrite chronique	49 (23,7)	35 (29,7)
Polykystose rénale	17 (8,2)	7 (5,9)
Uropathie	9 (4,3)	5 (4,2)
Autres	31 (15)	18 (15,3)
Inconnu	19 (9,2)	11 (9,3)
Ancienneté du diagnostic, (Mois)		
Moyenne±ET (min-max, médiane)	98,2±89,1 (7-466, 68)	82,0±71,5 (8-299, 53)
Ancienneté de la dialyse, (mois)		
Moyenne±ET (min-max, médiane)	53,1±56,3 (5-339 ; 34)	56,0±64,6 (6-295 ; 34)
Dose d'époétine alfa, (UI/sem)		
Moyenne*±ET (min-max, médiane)	7053,9±3666,8 (3000-24000 ; 6000)	6622,9±3629,2 (3000-20000, 6000)
Concentration Hb, (g/dl)		
Moyenne*±ET (min-max, médiane)	11,7±0,8 (9,9-13,6 ; 11,7)	11,9±0,7 (10,0-13,3 ; 11,9)
Ferritinémie, (ng/ml)		
Moyenne\$±ET (min-max, médiane)	655,1±397,7 (41-1832 ; 582)	685,5±511,7 (39-3250 ; 559)
Coeff. Sat. Transferrine, (%)		
Moyenne\$±ET (min-max, médiane)	24,9±9,2 (9,2-72,8 ; 23,2)	26,3±10,5 (10,1-85,4 ; 25,7)

* Pendant la phase de sélection

\$ A visite-1

✓ Les résultats obtenus :

a) La variation moyenne des concentrations de l' Hb

▪ La population PP

En analyse sur la population PP, la variation moyenne des concentrations d'Hb entre l'inclusion et la période d'évaluation était de $0,147 \pm 0,092$ g/dl dans le groupe Binocrit® et de $0,063 \pm 0,117$ g/dl dans le groupe comparateur. La différence absolue entre ces 2 valeurs était de 0,084 g/dl (IC95 % : [-0,170 ; +0,338])

▪ La population ITT :

Pour cette population des résultats similaires ont été observés sur la population en ITT, avec une différence des concentrations moyennes d'Hb entre l'inclusion et la période d'évaluation de 0,003 g/ dl dans le groupe Binocrit® et -0,187 g/dl dans le groupe comparateur, et une différence absolue entre les deux traitements de 0,189 g/dl (IC95 % : [-0,039 ; +0,418]).

Dans les 2 analyses sur les populations PP et ITT, l'intervalle était compris entre les bornes de $\pm 0,5$ g/dl préalablement retenues pour démontrer l'équivalence avec le comparateur. L'efficacité de Binocrit® pour maintenir la concentration d'Hb a donc été jugée statistiquement équivalente à celle du comparateur. Pendant toute l'étude, les concentrations d'Hb sont restées stables dans les groupes Binocrit® et comparateur, la différence non significative constatée à l'inclusion entre les 2 groupes de traitement s'étant maintenue tout au long de l'étude (Figure. 47). En analyse PP, elles ont varié entre 11,6 et 11,9 g/dl dans le groupe Binocrit® et entre 11,7 et 12,1 g/dl dans le groupe comparateur.

Le pourcentage de patients ayant présenté des concentrations moyennes d'Hb comprises entre 10 et 13 g/dl pendant les périodes de sélection et d'évaluation, en analyse PP, était de 80,7 % dans le groupe Binocrit® et 81,4 % dans le groupe comparateur, sans différence inter-groupe significative.

De plus, le pourcentage de patient ayant présenté des concentrations moyennes d'Hb comprises entre 10 et 13 g/dl et dont les modifications de doses hebdomadaires sont restées < 25 % entre la phase d'inclusion et la période d'évaluation a été de 69,6 % [IC 95 % : 62,8-75,8] et 64,4 % [IC 95 % : 55,1-73,0] dans les groupes Binocrit® et comparateur respectivement, sans différence inter-groupe significative[146-147].

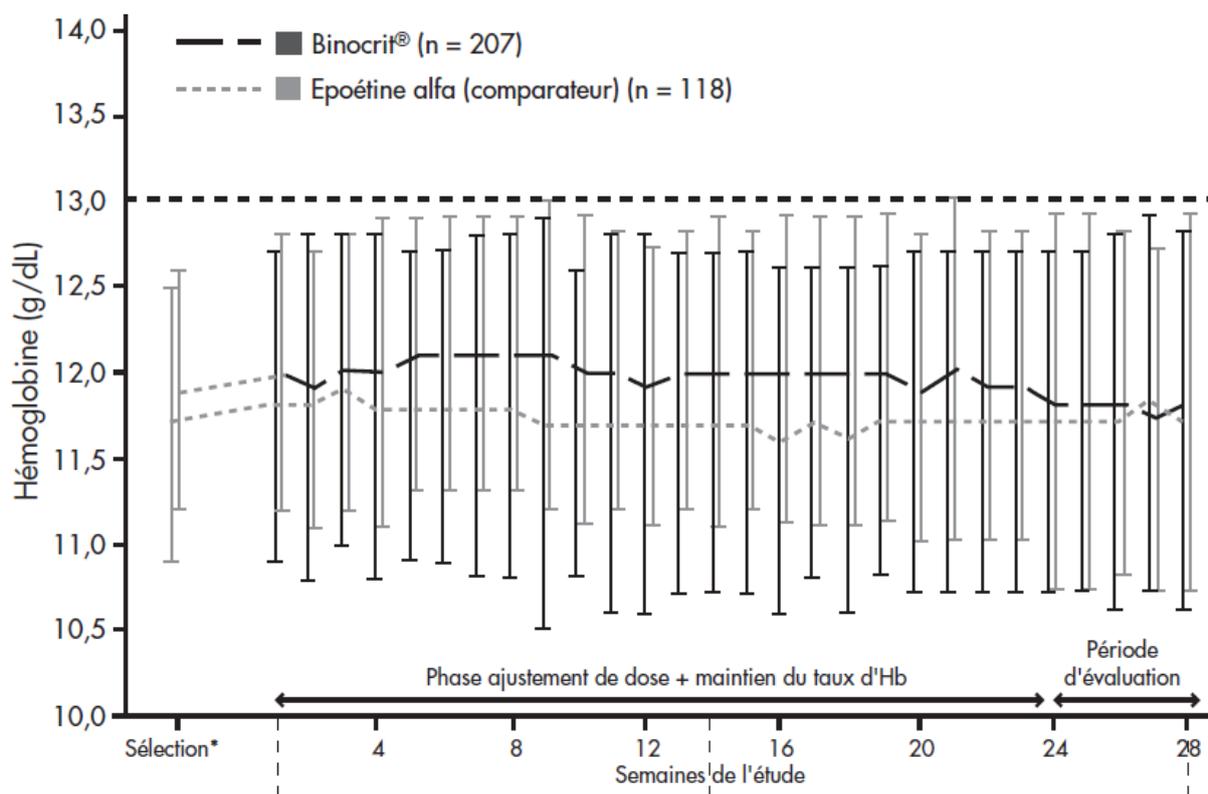


Figure 47: Évolution des concentrations moyennes d'Hb entre 0 et 28 semaines de traitement dans les groupes traités par Binocrit® et le comparateur époétine alfa

b) L'ajustement posologique :

En termes d'ajustements posologiques, des résultats similaires ont été obtenus dans les 2 groupes.

- Population PP

En population PP, 16,9 % des patients sous Binocrit® et 19,5 % des patients du groupe comparateur ont subi au moins un ajustement de dose > 25 % au cours de l'étude.

- Population ITT

Dans l'analyse en ITT, le pourcentage des patients qui ont subi au moins un ajustement posologique a été de 25 % des patients sous Binocrit® et 26,7 % des patients sous médicament de référence.

c) La dose de l'érythropoïétine :

Concernant la dose d'érythropoïétine, comme cela a été constaté, la dose moyenne de Binocrit® administrée par semaine pendant la période d'inclusion a été légèrement plus élevée que celle du comparateur. Cependant, exprimées par unité de poids corporel, les doses de Binocrit® et de comparateur (93,7 et 92,8 UI/kg) n'étaient pas significativement différentes. Cette différence de doses entre les 2 groupes a persisté pendant toute la durée de l'étude et s'est traduite par une variation d'Hb plus forte dans le groupe Binocrit® par rapport au comparateur ($0,147 \pm 0,092$ g/dl versus $0,063 \pm 0,117$ g/dl).

[141] (Figure47 et 48)

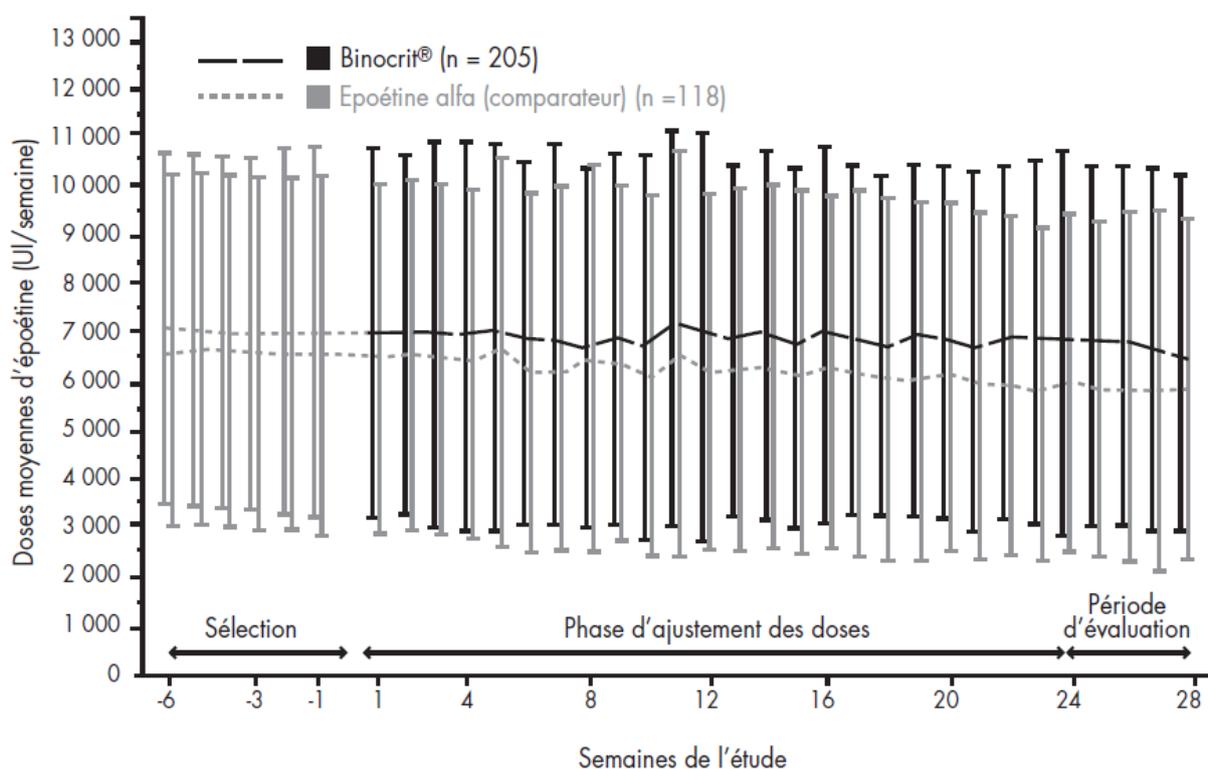


Figure 48 : Évolution des doses (moyenne ± SD) d'EPO au cours de l'étude INJ-9 dans les groupes Binocrit et comparateur érythropoïétine alfa

En termes d'évolution entre l'inclusion et la période d'évaluation dans la population PP, la dose d'érythropoïétine alfa a diminué de 314 UI par semaine dans le groupe Binocrit® versus 739 UI/semaine dans le groupe comparateur, soit une baisse exprimée par unité de poids

corporel de 90,0 versus 82,3 UI/kg/semaine, sans différence significative entre les 2 groupes [146-147].

d) Les transfusions sanguines :

- Population PP :

Concernant les transfusions sanguines pendant la période de traitement, 2 patients du groupe Binocrit® ont été transfusés, versus aucun dans le groupe comparateur.

- Population ITT :

En analyse en ITT, ils étaient 6,3 % (19 patients) et 3,1 % (5 patients) respectivement dans les groupes Binocrit® et comparateur érythropoïétine alfa. La différence d'ancienneté du diagnostic de la MRC pourrait aussi expliquer le plus grand nombre de patients transfusés dans le groupe Binocrit® versus le comparateur en analyse en ITT et en PP [146].

3-1-1-2) l'étude INJ-11 :

Dans cette étude de phase III réalisée pour confirmer l'efficacité du biosimilaire les patients inclus étaient des adultes ayant une tumeur solide traités par chimiothérapie palliative d'un cycle compris entre 1 à 4 semaines (pour au moins 12 semaines) et ayant une anémie associée (hémoglobine ≤ 10 g/dL) avec un taux de ferritine ≥ 100 μ g/L et/ou une saturation de la transferrine $\geq 20\%$.

Les patients ont reçu pendant 12 semaines (phase correctrice) un traitement par l'érythropoïétine alpha, soit Binocrit®, soit Eprex®, en injection SC sur la base de 3 doses de 150 UI/kg par semaine avec une randomisation [2 : 1]

Le critère de jugement principal était le pourcentage de patients répondeurs, c'est-à-dire ceux avec une augmentation absolue d'au moins 2,0 g/dl des taux d'hémoglobine entre la période d'inclusion et la période d'évaluation (semaines 5 à 12), en l'absence de transfusion au cours des 4 semaines précédentes. Binocrit® pouvait être considéré comme efficace si la borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95% était supérieure à 30%, correspondant au taux présumé de réponse sous placebo (10%) plus la moitié de la différence entre un traitement actif et le placebo (20%) [147].

Résultats :

Les patients randomisés étaient au nombre de 74 dans le groupe Binocrit[®] et de 40 dans le groupe Eprex[®]. La population en intention de traiter comportait 60 patients dans le groupe Binocrit[®] et 34 patients dans le groupe Eprex[®]. Une amélioration des taux d'hémoglobine d'au moins 2 g/dl a été obtenue chez 61% des patients traités par Binocrit[®] avec un IC95% de [48,2% ; 73,9%]. La borne inférieure de cet intervalle de confiance étant supérieure à la borne seuil de signification clinique de 30% prédéterminée, cette amélioration est statistiquement significative. Dans le groupe Eprex[®], le pourcentage de patients répondeurs étaient de 44,1% avec un IC95% de [27,2% ; 62,1%].

Résultat globale :

Dans l'étude (inj-9) de phase III (étude comparative, randomisée, en double-aveugle d'une durée de 28 semaines, chez 478 patients adultes ayant une anémie secondaire à une insuffisance rénale chronique) Binocrit[®] administré par voie IV a montré son équivalence vis-à-vis d'Eprex[®] (époétine alpha) sur la variation du taux d'hémoglobine entre la phase d'évaluation (phase de traitement d'entretien) et l'inclusion.

Dans la 2^{ème} étude de confirmation de l'efficacité de Binocrit[®] (étude randomisée, en double aveugle, d'une durée de 12 semaines, chez 114 patients adultes anémiés traités par chimiothérapie pour une tumeur solide) Binocrit[®] administré par voie sous-cutanée a été efficace en termes de pourcentage de patients ayant amélioré d'au moins 2 g/dl le taux d'hémoglobine (61%). Dans cette étude, l'Eprex[®] a été utilisé comme témoin de validité interne (pas d'analyse comparative). Le pourcentage de patients ayant amélioré d'au moins 2 g/dl le taux d'hémoglobine a été de 41%.

Les données de tolérance issues de ces 2 études ont montré que les profils de tolérance de Binocrit[®] et Eprex[®] ont été globalement comparables et conformes à ce qui était attendu dans les populations traitées. Bien qu'aucune réaction immunogène ne soit apparue, ce risque n'est pas exclu et des données complémentaires ont été demandées dans le plan de gestion des risques, en particulier pour la voie sous-cutanée qui n'a pas été étudiée chez les patients insuffisants rénaux chroniques. [146-147]



Conclusion



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.

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



Titre : Les biosimilaires : réglementation, développement, et contrôle.

Rapporteur : Pr. CHERRAH Yahia

Auteur : ADIB Mourad

Mots clés : biosimilaires-réglementation-production-méthodes analytiques-contrôle-érythropoïétine

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.

La législation européenne a offert depuis 2006 un cadre légal pour les biosimilaires, avec plus de 20 lignes directrices qui encadrent le développement et l'autorisation des produits biologiques similaires au niveau de l'union européen. Concernant ces produits, l'opinion de l'agence canadienne est en tout point semblable à celle de l'EMA, les autorités canadiennes s'inspirent de la réglementation internationale (ICH), et européenne pour l'élaboration de leur propre réglementation. Quand aux Etats-Unis, le Congrès américain a promulgué récemment une nouvelle législation concernant une réforme du système de santé, connu sous le nom de « Patients Protection and Affordable Care Act » qui comprend une partie relative aux produits biologiques intitulée « Biologics Price Competition and Innovation Act » qui permet à la FDA (Food and Drug Administration) d'instaurer des lois relatives à la commercialisation de ces produits.

Par définition un biosimilaire est un médicament biologique issu de biotechnologie. 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 (préparation, purification, formulation, etc.). Deux processus de production développés indépendamment pour un même médicament biologique peuvent donc conduire à des médicaments équivalents, mais jamais à des médicaments identiques. Ainsi, un biosimilaire présentera toujours des différences par rapport à un médicament de référence.

C'est pourquoi il faut effectuer des études détaillées au cours desquelles les deux médicaments sont comparés pour établir leur biosimilarité de point de vue qualité, sécurité, et d'efficacité. 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.

Title : Biosimilars : Regulatory, development, and control.

Reporter : Pr. CHERRAH Yahia.

Author : ADIB Mourad.

Keywords : Biosimilars-regulation-production-control-analytical methods-erythropoietin.

Abstract

A biosimilaire is a biological drug which is equivalent to a drug of reference already authorized. A comparative study is necessary to show that the product is equivalent in terms of quality, safety and effectiveness to a selected reference product.

The EU law offered since 2006 a legal framework for the biosimilaires, with more than 20 guidelines lines which frame the development and the authorization of the similar biological products on the European union. Concerning these products, L`opinion of the Canadian agency is in any point similar to that of EMEA, the Canadian authorities take as a starting point the regulation international, and European for the development of their own regulation.in the United States, the American Congress recently promulgated a new legislation concerning a reform of the health system, known under the name of “Patients Protection and Affordable Care Act” who includes a part relating to the biological products entitled “Biologics Price Competition and Innovation Act” which allows the FDA (Food and Drug Administration) to found relative laws with the marketing of these products.

By definition a biosimilaire is a biological drug resulting from biotechnology. Knowing that the biotechnological drugs are prepared by the use of the alive biological systems whose heterogeneity is inherent in their nature, and their production process. The process (the process is the finished product) are moreover very sensitive to the modifications in the production process (preparation, purification, formulation, etc). Two production processs developed independently for the same biological drug can thus lead to equivalent drugs, but never to identical drugs. Thus, a biosimilaire will always present differences compared to a reference product.

This is why it is necessary to carry out studies detailed during which the two drugs are compared to establish their biosimilarity from quality , safety, and of efficiency. This control of comparability must be carried out and developed with assistance of the most recent methods and most powerful: absorption UV, circular dichroism, plasmonic resonance of surface, RMN, chromatography (exclusion, exchange of ions, SEC-HPLC...), electrophoresis (SDS PAGE, IEF.), X-rays, AF4..., and of course of the biological tests in order to ensure, in the long run, of the properties asserted in terms of quality, safety and efficiency of these unconventional drugs.

العنوان : الأدوية البيومتثالة : التشريع، الإنتاج، والمراقبة.

المشرف : ذ.شراح يحيى.

المؤلف : ادبيب مراد.

الكلمات الأساسية: بيومتثال - تشريع - إنتاج - طرق تحليلية - مراقبة- العامل المحفز لإنتاج الكريات الحمراء.

ملخص

الدواء الحيوي المشابه "البيومتشابه"، دواء بيولوجي معادل لدواء بيولوجي مرجعي حاصل على ترخيص التسويق لإثبات هاته المعادلة يجب القيام بدراسة مقارنة بين الدوائين حتى يتسنى إثبات تكافؤهما من ناحية السلامة، الجودة، وكذا الفعالية. من الناحية التشريعية تعتبر الأنظمة الأوروبية أنظمة رائدة في هذا المجال، حيث استطاعت الوكالة الأوروبية لتقييم الأدوية إصدار أكثر من 20 مبدأ توجيهي، واضعة بذلك إطارا مرجعيا مشجعا لتصنيع هذا النوع من الأدوية. إلى جانب التشريعات الأوروبية تعتبر منظومة القوانين الموضوعية من طرف وكالة الصحة الكندية متقدمة أيضا في هذا المجال، وذلك من خلال وضعها لقوانين مطابقة و متوافقة إلى حد كبير مع نضيرتها الأوروبية، هذا راجع بالأساس إلى اعتبار هاته الأخيرة كمرجع والإعتماد عليها لاستصدار التشريعات الكندية. أما فيما يخص الولايات المتحدة الأمريكية، فقد قام مؤخرا الكونغرس الأمريكي بالمصادقة على تشريعات جديدة في إطار ما يسمى بإعادة إصلاح النظام الصحي المعروف بقانون "حماية المريض، والرعاية المتاحة للجميع" هذا القانون يتضمن شقا خاصا بالأدوية البيولوجية يسمى "تنافسية أسعار الأدوية البيولوجية، والإبتكار"، مما سيسمح لهيأة الدواء والغذاء الأمريكية باستصدار قوانين متعلقة بهاته الأدوية.

تعريفيا يعتبر الدواء البيولوجي الشبيه "البيومتشابه"، دواء بيولوجيا منتجا باستخدام تقنيات التكنولوجيا الحيوية، علما أن أدوية التكنولوجيا الحيوية تصنع باستخدام نظم بيولوجية حية المعروفة بالتباين والاختلاف في طبيعتها، وكذا عملية إنتاجها مما يجعل خصائص المنتج "الدواء" مرتبطة بالأساس بطريقة التصنيع (طريقة التصنيع=المنتج النهائي). علاوة على ذلك فهذا النوع من الأدوية يتأثر بشكل كبير بالتعدلات الممكن حدوثها في عملية التصنيع (الإعداد، التنقية،... الصياغة)، وبالنظر إلى أن استعمال عمليتي إنتاج مختلفتين لتصنيع نفس العقار البيولوجي يعطي كنتيجة دوائين متكافئين، لكن خصائصهما غير متطابقة تطابقا مطلقا وبالتالي فإن البيومتشابه يقدم اختلافات عدة بالمقارنة مع العقار البيولوجي المرجعي.

لهاته الأسباب يجب إجراء دراسات مفصلة يتم من خلالها مقارنة العقارين وذلك بهدف إثبات التشابه البيولوجي بينهما من ناحية الجودة، السلامة، والفعالية. من أجل تقييم جيد لهاته المقارنة يجب الإستعانة بأحدث وأدق التقنيات: كتقنية إمتصاص الأشعة فوق بنفسجية، تقنية ازدواج اللون الدائري، الصدى البلاسموني السطحي، الرنين المغناطيسي النووي، التقنيات الكروماتوغرافية بمتغيراتها (الإستبعاد، التبادل الأيوني، الإستبدال)، وكذا تقنيات الهجرة الكهربائية، الأشعة السينية، هذا دون نسيان الإختبارات البيولوجية. من أجل ضمان توفر خصائص الجودة، السلامة، والفعالية المرغوب تواجودها في هاته الأدوية الغير إعتيادية .



Bibliographie



- [1] **(CDIP)** Centre de Documentation et d'Information pharmaceutique de la Pharmacie Centrale des Auspices Civiles de Lyon, N°6,1, juin 2010.
- [2] **M-L.Laroche, L.Merle**, Bulletin d'information du Centre Régional de Pharmacovigilance de Limoges, N° 39, juin 2007.
- [3] **Prugnaud J.-L.** Législation européenne sur les biosimilaires : les recommandations de l'EMA concernant la qualité, Néphrologie & Thérapeutiques, 2009, vol.5, 3-5
- [4] **Parlement européen**, Directive 2004/27/ce du 31 mars 2004 modifiant la Directive 2001/83/ce instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain, Journal officiel de l'Union européenne, L 136/34 ,30/4/2004.
- [5] **Congrès américain**, section : 7002. Approuval pathan for biosimilar biological products, Biologics Price Competition and Innovation, mars 2010, p. 686-687.
- [6] **A.-C. Perroy-Maillols, E. Sergheraert, D. Vion.** La loi d'adaptation au droit communautaire dans le domaine du médicament, 2007, Bulletin de l'ordre n° 394, p. 133-142.
- [7] **Agence canadienne de santé**, LIGNES DIRECTRICES À L'INTENTION DES PROMOTEURS : Exigences en matière de renseignements et de présentation relatives aux produits biologiques ultérieurs (PBU), 2010, p 1-20.
- [8] **Europabio**, position sur les médicaments biosimilaires réglementés par la position commune sur la révision de la directive 2001/83/EC www.europabio.org, dernière consultation 09/2010, p1-3.
- [9] **OCDE**, La bioéconomie à l'horizon 2030: Quel programme d'action ?, édition OCDE, 2009, page 360.
- [10] **LEEM.les entreprises du médicament**, définition des médicaments biosimilaires, 14/01/2009 <http://www.leem.org>.
- [11] **EMA**, rapport européen public d'évaluation de Omnitrope[®], EMA/H/C/607, avril 2006, <http://www.ema.europa.eu>.
- [12] **EMA**, rapport européen public d'évaluation de Valtropin[®], EMA/H/C/602, avril 2006.
- [13] **EMA**, rapport européen public d'évaluation de Alpheon[®], Réf. Doc. EMA/462560/200628 Juin 2006.
- [14] **EMA**, rapport européen public d'évaluation de BINOCRIT[®] Réf. Doc : EMA/492630/2009 EMA/H/C/725 ,07-2009.

[15]EMEA, rapport européen public d'évaluation de Epoetin[®] Alfa Hexal Réf. Doc : EMEA/492653/2009 EMEA/H/C/726, 07-2009.

[16]EMEA, rapport européen public d'évaluation de Abseamed[®], Doc :Ref : EMEA/706669/2009 EMEA/H/C/72, 10-2009.

[17]EMEA, rapport européen public d'évaluation de Retacrit[®], EMA/365439/2008 EMEA/H/C/872, 04-2010.

[18]EMEA, rapport européen public d'évaluation de Silapo[®], EMA/364417/2008, EMEA/H/C/760, 04-2010.

[19]EMEA, rapport européen public d'évaluation de Biopin[®], Réf. Doc : EMEA/540887/2009, EMEA/H/C/1036, 10-2009.

[20]EMEA, rapport européen public d'évaluation de Eporatio[®], Réf. Doc : EMEA/540882/2009, EMEA/H/C/1033, 10-2009.

[21]EMEA, rapport européen public d'évaluation de Zarzio[®], EMEA, /H/C/91, février 2009.

[22]EMEA, rapport européen public d'évaluation de Ratiograstim[®], EMEA/H/C/825, 09-2008.

[23]EMEA, rapport européen public d'évaluation de Biograstim[®], EMEA/H/C/826, 09-2008.

[24]EMEA, rapport européen public d'évaluation de Tevagrastim[®], EMEA/H/C/82, 09-2008.

[25]EMEA, rapport européen public d'évaluation de Filgrastim ratiopharm[®], EMEA/H/C/824,09-2008.

[26]EMEA, rapport européen public d'évaluation de Filgrastim hexal, EMEA/H/C/918, 12-2008.

[27]EMEA, rapport européen public d'évaluation de Nivestim, EMA/201987/2010, EMEA/H/C/1142, 06-2010.

[28]M.Akioud, A.Elalami, Médicaments issus de la bioechnologie.Approche qualitatif, *Biotechnologie et santé*, mai 2005, p1-2.

[29]A.MOUJANI, Médicaments issus de la Biotechnologie : mise au point sur les biosimilaires. Thèse de doctorat en pharmacie, Rabat : université Mohammed V, 2010 ,76p.

[30] **H.schellkens**.How similar do biosimilars need to be ?.*Nature Biotechnology*, 2004, 22,p 1357-1359.

[31] **A.DALIL**, les copies des produits pharmaceutiques issus de biotechnologie : génériques ou biosimilaires. Thèse de doctorat en pharmacie, Rabat : université Mohammed V, 2006, p 66.

[32] **EMA/CPMP/BWP/3207/00/Rev**. Guideline on compatibility of medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance : quality issues.2003, p1-11.

[33] **J. Mager Stellman**, Encyclopédie de sécurité et de santé au travail, Volume 3, chapitre, 2000, p77-34 77-34.

[34] **WHO**.organisatione mondiale de santé.Médicaments essentiels.le point N° 30,2001, 56p <http://apps.who.int/medicinedocs/fr/d/Jh3008f/4.1.html>.

[35] **ICH**, international conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin Q5a(r1), version dated 23 September 1999.

[36] **ICH**, international conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, quality of biotechnological products: analysis of the expression construct in cells used for production of r-dna derived protein products Q5b, dated 30 November 1995.

[37] **ICH**, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, stability testing of biotechnological/biological products Q5c, dated 30 november 1995.

[38] **ICH**, international conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, derivation and characterisation of cell substrates used for production of biotechnological/biological products Q5d, dated 16 july 1997.

[39] **ICH**, international conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products Q6b, dated 10 march 1999.

[40] **ICH**, international conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, S6.

[41] **J-L.Prugnaud** , Législation européenne sur les biosimilaires : les recommandations de l'EMA concernant la qualité, *Néphrologie & Thérapeutiques*, 2009 ,vol.5,3-5.

[42] **LONDON.G**, Législation européenne sur le développement des biosimilaires : les recommandations de l'EMA concernant l'efficacité et la sécurité, *Néphrologie & Thérapeutiques*, 2009, vol.5, 6-9.

[43] **H.SCHELLEKENS**, Assessing the bioequivalence of biosimilars, the Retacrit[®] case, p 495-499, 2009.

[44] **L.ZUNIGA,B.CALVO**, Regulatory aspects of biosimilars in Europe, *2009 Trends in Biotechnology*, Vol.27, No.7,p385-387.

[45] **EMA/CPMP/BWP/3207/00**, 2003. Committee for medicinal products for human use. Guideline on comparability of medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues. Available at: <<http://www.emea.europa.eu/>>.

[46] **EMA/CHMP/BWP/49348/05**, 2006. Committee for medicinal products for human use. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues. Available at: <<http://www.emea.europa.eu/>>.

[47] **EMA/CHMP/BWP/42832/05**, 2006. Committee for medicinal products for human use. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues. Available at: <<http://www.emea.europa.eu/>>.

[48] **EMA/CHMP/BWP/14327/06**, 2008. Committee for medicinal products for human use. Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic protein. Available at: <<http://www.emea.europa.eu/>>.

[49] **EMA/CHMP/31329/05**, 2006. Annex to guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: nonclinical and clinical issues. Guidance on biosimilar medicinal products containing recombinant granulocyte-colony stimulating factor. Available at: <<http://www.emea.europa.eu/>>.

[50] **EMA/CHMP/945228/05** Annex Guideline on Similar Biological Medicinal Products containing Biotechnology Derived Proteins as Active Substance: Non-Clinical and Clinical Issues Guidance on Similar Medicinal Products containing Somatropin <<http://www.emea.europa.eu/>>.

[51] **EMA**, annex to guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues guidance on similar medicinal products containing recombinant human soluble insulin <<http://www.emea.europa.eu/>>.

[52] EMEA/CHMP/BMWP/94526/2005 annex to guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues guidance on similar medicinal products containing recombinant erythropoietins. <<http://www.emea.europa.eu/>>.

[53] EMEA/CHMP/BMWP/102046/2006, European Medicines Agency Guideline on Similar Biological Medicinal Products, guideline on similar medicinal products containing recombinant interferon alpha Available at: <<http://www.emea.europa.eu/>>.

[54] EMEA/CPMP/BWP/ 1113/98, European Medicines Agency concept paper on the development of a committee for proprietary medicinal products guideline on comparability of biotechnology-derived products Available at: <<http://www.emea.europa.eu/>>.

[55] EMEA/CHMP/BMWP/7241/2006, concept paper on similar biological medicinal products containing recombinant alpha-interferon annex to the guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology derived proteins as active substance – (non) clinical issues Available at: <<http://www.emea.europa.eu/>>.

[56] EMEA/CHMP/BMWP/496286/2006, concept paper on similar biological medicinal products containing low molecular weight heparins - (non) clinical issues Available at: <<http://www.emea.europa.eu/>>.

[57] EMEA/CHMP/BMWP/170734/08, Revision of the Guidance on Similar Medicinal Products Containing Recombinant Erythropoietins Available at: <<http://www.emea.europa.eu/>>.

[58] EMEA/CHMP/114720/2009, Immunogenicity Assessment of Monoclonal Antibodies Intended for In Vivo Clinical Use Available at: <<http://www.emea.europa.eu/>>.

[59] EMEA/CHMP/BMWP/94899/2010. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Concept paper on similar biological medicinal products containing recombinant follicle stimulation hormone. 18 March 2010.

[60] EMEA/CHMP/BMWP/86572/2010. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Concept paper on similar biological product containing recombinant interferon beta. 18 March 2010.

[61] EMEA/CHMP/BMWP/301636/2008 Corr. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant erythropoietins (Revision). 18 March 2010.

[62] **EMEA/CHMP/BMWP/403543/2010**.Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies.(Draft),18 Novembre 2010.

[63] **Raymond James**, SECTEUR PHARMACEUTIQUE – CANADA, Biosimilaires : des guidelines aussi restrictives qu'en Europe.*Euro Equities*, 2010, p 1-2.

[64] **santé canada**, Questions et réponses accompagnant la ligne directrice finale à l'intention des promoteurs : Exigences en matière de renseignements et de présentation relative aux produits biologiques ultérieurs, 2010-05-27.

[65] **S. White Junod**, Biologics Centennial: 100 Years of Biologics Regulation ,FDA, 2002 Dernier consultation, 15/09/2010. <http://www.fda.gov>.

[66] **FDA**, FD&C Act (1938) relative aux médicaments de petite taille moléculaire disponible sur www.fda.gov.

[67] **Alexis Dussol**, Le médicament générique, P.U.F. « Que sais-je ? », 2009, p. 3-14.www.cairn.info.

[68] **John K. Jenkins**, new acting associate director for biosimilars in office of new drugs - may 17, 2010.p1-2

[69] **Congrès américain**, H. R. 1548 To amend the Public Health Service Act to establish a pathway for the licensure of biosimilar biological products, and for other purposes.

[70]**M.LEWIS**, Healthcare Reform--New Path for Biosimilar,washington legal fondation, May 20,2010.

[71] **Congrès américain**, TITLE VII—IMPROVING ACCESS TO INNOVATIVE MEDICAL THERAPIES Subtitle A—Biologics Price Competition and Innovation H. R. 3590— (687-703).

[72] **M.LEWIS**, May 2010 Health Care Reform Update,washington legal fondation, May 19,2010.

[73] **Y.KHAYATI**, MÉDICAMENTS BIOSIMILAIRES, 04/2009.pharmacies.ma/pharmacie/upload/Sections/.../jpm_khayati.pdf.

[74]**JL.PRUGNAUD**, Similarité des médicaments issus des biotechnologies : cadre réglementaire et spécificités. *Annales Pharmaceutique Françaises*, 2008, vol : 42, p.1-6.

[75] **LBORGET, T.GRIVEL**, Biosimilaires et facteurs médico-économiques, *Bulletin du cancerologie* , 2010, Vol 97, N°5, p 1-7 .

[76] **Rose MP, Gaines Das RE, Balen AH**. Definition and Measurement of Follicle Stimulating Hormone. *Endocrine reviews* **2000**, 21, (1), p.5-22.

[77]**Wei X, Grill DS, Heatherington AC, Swanson SJ, Gupta S**. Development and validation of a quantitative cell-based bioassay for comparing the pharmacokinetic profiles of two recombinant erythropoietic proteins in serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2007**, 43, (2), p 666-76.

[78]**Meager A**. Biological assays for interferons. *Journal of Immunological Methods* 2002, 261, (1-2), p21-36.

[79] **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.

[80]**Cooper MA**. Optical biosensors in drug discovery. *Nature reviews Drug discovery* 2002, 1, (7), p 515-528.

[81] **PHARMACO médicale**. Développement des médicaments : Essais précliniques des futurs médicaments, disponible sur www.pharmacomedicale.org.

[82] **ICH**. Note for Guidance on toxicokinetics: The assesement of systemic exposure in toxicity studies. S3A, 1994, p 1-15.

[83] **M. Alexandre**. AFSSAPS, Pré-requis toxicologiques avant essais cliniques. 1999, p 1-12.

[84] **G.London**. Recommandations européenne sur le développement des biosimilaires : les recommandations de l'EMEA concernant l'efficacité et la sécurité. *Néphrologie et Thérapeutique*, Vol 5, 2009, p 7.

[85] **A. Covic Æ M. K. Kuhlmann**. Biosimilars: recent developments. *Int Urol Nephrol*, 2007, 39:p261–266.

[86] **G.SIEST, et al**, apport de la biologie moleculaire a la production de proteines d'interet pharmacologique et la conception de modeles cellulaires, 1993, n°2, p 65-66.

[87] **P.BACCHIN**, Biotechnologies et bioprocédés, université Toulouse III, 2007 www.ppc.ups-tlse.fr/bioprocédé.pdf.

[88] **G.Coutouly**. Les biotechnologies : la part industrielle une approche .centre régional de documentation pédagogique d'alsace .2009, p1-3.

[89] **Sartorius France**, Purification protéine, e, dernière consultation 09/2010 www.sartorius-stedim.fr/

[90] **A.Garnier**, biotechnologie pharmaceutique, De l'éprouvette au produit final 2008, <http://www.gch.ulaval.ca>.

[91] **J-L.PRUGNAUD**, Législation européenne sur les biosimilaires : les recommandations de l'EMA concernant la qualité, *Néphrologie & Thérapeutiques*, 2009 ,vol.5,page 5.

[92]**J-H.TROUVIN**, association de pharmacie hospitalière de l'île de France. Les produits issus des biotechnologies : principes, qualité, risques, conséquences réglementaires, avril 2008.

[93] **PH. ARNAUD**, Les médicaments biosimilaires, *officiel santé*, juin/juillet 2008, page 33

[94] **Le Cotonnec.J.-Y, Lawny.F**, L'importance de la qualité en Biotechnologie : le cas du 1^{er} biosimilaire de l'EPO, *Néphrologie & Thérapeutiques*, 2009, vol.5, p.10-15.

[95] **R. BOTTER et G. BOUCHOUX**, spectrométrie de masse, Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation, 1996, p. 3-5

[96] **CONSEIL EUROPE**, Dichroïsme circulaire. Pharmacopée 6^e Edition supplement S 2010(supp,6,6.7 . p70

[97] **C.ABBAS.QUINTERNET**. Synthèse et études structurales de nouveaux 2 : [α/α]-oligomères, vers de nouveaux foldamères. Thèse de doctorat polytechnique, Nancy : Université Nancy, 2009, p 94.

[98] **J.HENKEL et al**, Essentials of drug product quality . 1981, *Journal of Pharmaceutical Sciences* .Vol 70, Issue 3, p348,

[99] **S.MAIER**. *Plasmonics: Fundamentals and Applications*. Springer.2007,p 223 ISBN978-0387331508.

[100]**P.SCHUK** .surface plasmon resonance .*Ann.Rev.Biomol .Str.*1997,26 :541-566 <http://mon.univmontp2.fr>.

- [101] **T.MALLIAVIN, F.DAREL**, structure des protéines par RMN, Base documentaire techniques de l'ingénieur, Réf : AF6608, 10 jan, 2002.
- [102] **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.
- [103] **GREGORY A , et al** .Structure et fonction des protéineschapitre II de la structure) la fonction. De Boeck Université, 2008, p.77-81
- [104] **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.
- [105] **DIONIX corporation**. Optimal Settings for Pulsed Amperometric Detection of Carbohydrates Using the Dionex ED40 Electrochemical Detector, 2010,Technical Note 21, p.1-4
- [106] **DIONIX corporation**, Determination of Plant-Derived Neutral Oligo- and Polysaccharides Using the CarboPac™ PA200, 2010, Application Update 150, p1-5.
- [107]**V.BRINKS**, Quality of Original and biosimilar Epoetin Products , Pharma research , pages 1-7,octobre 2010.
- [108] **I.LE POTIER, M.TAVERNA, Ph. MORIN**.Electrophorèse capillaire-Principe,Base Documentaire :Techniques de l'ingénieur, 2003, Référence P3365.
- [109] **Infochroma** , dossier technique sur la RP-HPLC <http://www.infochroma.ch>.
- [110] **P.GAREIL, G. PELTRE**, ELECTROPHORESE, base documentaire : techniques de l'ingénieur, 1995, Référence P1815.
- [111] **T.Q. Nguyen**, Chromatographie en phase liquide des polymères synthétiques : principes et applications, ANALYSIS MAGAZINE, 1998, 26, N° 2.p35-41.
- [112] **L.BARDET**, Base documentaire Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation. n°P1405, 2000, vol. P2, 2000. p1405.1430.
- [113] **C.GENEAU**. procede d'elaboration d'agromateriau composite naturel par extrusion bivis et injection moulage de tourteau de tournesol.Toulouse. doctorat en polytechniques 2006.p 31-32.

- [114] **LEEM biotech & genopole**, developement & conseil. Bioproduction, 2008, etat des lieux et recommandations pour l'attractivité de la FRANCE. 2008. www.genopole.fr.
- [115] **A. AGIN, R. SAPIN**, Analogues et dosages d'insuline : le cas général et le cas particulier de la glargine. *Médecine Nucléaire*, 2010,34, p 571–582.
- [116] **D. JAMES, O. WATSON, O. REVELANT**, l'ADN recombinant dans la médecine et l'industrie, *ADN recombinant*, 1994, p. 454-455,
- [117] **V. KOMAROFF et al.** A bacterial clone synthesizing proinsulin. *Biochemistry*, 1994 Vol. 75, No. 8, pp. 3727-3731.
- [118] **M. KUHLMANN, M. MARRE**. Lessons learned from biosimilar epoetins and insulins. *British Journal of Diabetes & Vascular Disease*, 2010, 10p 90-93
- [119] **J. BOUSTIE**. Thérapeutique des diabètes, pathologie diabetique : les insulines + (le glucagon - acarbose et miglitol), 2008, p14-16.
- [120] **A. ELJABRI**, insulines commercialisées au MAROC, 2006 disponible sur pharmacies.ma/.../insulines_commercialisees_au_maroc.pdf.
- [121] **O. GAILLARD**, Hormone de croissance. Profils immuno-analytiques en biologie clinique. *immuno-analyse biologique Spéc2000*, V 15, 2000, p.409-413.
- [122] **Pharmacopée européenne**, monographie n° 951 : somatropin, biological substances. PA/PH/Exp. 6/T (03) 43 ANP, 2003.
- [123] **FJ. DOMONIQUE, D. THOMAS**, Isolement et caractérisation des protéines apparentées à l'interleukine 2 = Purification and characterization of interleukin 2 homologous proteins, Thèse de doctorat en médecine , bibl.ref: 147,1995, 189p.
- [124] **D. BARNGROVER**. Recombinant Interleukin-2 (aldesleukin) for oncology and HIV disease and recombinant protein treatment (Fabrazyme) for Fabry's disease. *Journal of Biotechnology* 95, 2002, p277–283.
- [125] **LEDERER, FRANZN et al**, production de l'interleukine 2 recombinant. office européen des brevets. Brevet EP 0147819B1 .03/06/1992.
- [126] **CHIRON CORPORATION .US**, procédé de récupération, à partir de microorganismes, d'interleukine-2 recombinante, purifiée, oxydée et renaturée. Brevet n°0368857,1997.

[127] **Y. Durocher**. Une méthode de production simple, adaptable et à rendement élevé de l'interféron humain recombinant, institue de recherche en biotechnologie. avril 1999.

[128] **F. Med .DAHMANI and al**, Recombinant *Pichia pastoris* strains and process for the production of recombinant human interferon alpha .office européen des brevets .Brevet EP1905386A1, 2008.

[129] **S.ANIA**. l'érythropoïétine dans le traitement de l'anémie chimio-induite.Thèse de doctorat en pharmacie. Rabat. Université mohammed V.2003.100 p.

[130] **Janssen cilag** .dossier scientifique .Eprex[®] .1999.p.22-51.

[131] [118] **M. KUHLMANN, M. MARRE**. Lessons learned from biosimilar epoetins and insulins. *British Journal of Diabetes & Vascular Disease*, 2010, 10p 94-97.

[132] **POURQUIER, DIDIER**, utilisation du G-CSF comme traitement adjuvant dans la reconstruction de tissus conjonctifs.office européen des brevets, Brevet EP 1365795B, 2010,p1-2.

[133] **B. ROYER, M. AROCK** .Utilisations thérapeutiques des facteurs de croissance hématopoïétiques II.GM-CSF et G-CSF,*Annales de biologie clinique*, 1998 ,Vol 56, N° 3, p 255-266.

[134] **C. S. Bae á D. S. Yang á J. Lee á Y.-H. Park** Improved process for production of recombinant yeast-derived monomeric human G-CSF.*Appl Microbiol Biotechnol*,1999, 52,p338-344.

[135] **R.C.SCHWANKE and al**.molecular cloning, expression in *escherichia coli* and production of bioactive homogeneous recombinant human granulocyte and macrophage colony stimulating factor, *International Journal of Biological Macromolecules*,45,2009, p 97–102.

[136] **FDA and EMEA**, monographies, Granulocyte-Colony-Stimulating-Factor,filgrastim pegfilgrastim ,lenograstim, Nartograstim ,2009 <http://www.druglead.com>.

[137] **HIDEJI TANAKA and al** .Comparison of three types of rhG-CSF.*Acedmic Press cytokine*, vol 8, no°4, p 360-369.

[138] **BENMOUSSA. A, KHAYATI. Y, ELJAOUDI. R, TAOUFIK. J**. biomedicaments : les nouveaux et les anciens, 2006, p 3-6. Disponible sur [www. Pharmacies.ma](http://www.Pharmacies.ma).

[139] **D.BOUREL, J-L.TEILLAUD**. Anticorps monoclonaux : tours et détours technologiques pour de nouveaux espoirs thérapeutiques. *Comptes Rendus Biologies*, 2006, Vol 329, Issue 4, p.217-227.

[140] **T.LONNGRENN**, l'Europe établit les lignes directrices pour le développement des génériques d'anticorps monoclonaux, communiqué de l'EMA, novembre 2010. <http://www.informationhospitaliere.com/pharma-7956-macrolin.html>.

[141] **F.XUEREB et al.** la spectrométrie de masse appliquée à la quantification des protéines médicaments dans le plasma, *J Pharm Clin*, 2008, 27 (3), p181-188.

[142] **VERHELST.D**, Actualités dans la prise en charge de l'anémie. *Néphrologie & Thérapeutiques*, 2010, vol.6, 1-9.

[143] **FUJISAKA Y, TAMURA T, Ohe Y, KUNITOH H, SEKINE I, YAMAMOTO N, et al.** Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Weekly Epoetin Bêta in Lung Cancer Patients. *Japanese journal of clinical oncology*, 200, 36, (8), p 477-482.

[144] **Vidal** (Collectif), Le Dictionnaire Vidal 2010. 86ème Ed. Vidal, 2010.

[145] **J-L BOUCHET et al**, Recommandations d'utilisation des biosimilaires de l'érythropoïétine (EPO). Propositions de la Société de néphrologie, de la Société francophone de dialyse et de la Société de néphrologie pédiatrique, *Néphrologie et Thérapeutique*, 2009, vol : 5 p.61-66.

[146] **B.CANAUD**, Développement clinique du premier ASE enregistré selon la voie de développement européenne des biosimilaires, *Néphrologie & Thérapeutiques*, 2009, vol.5, p 16-20.

[147] **HAS**, Haute Autorité de Santé avis de la commission de la transparence relatif a la spécialité Binocrit[®], pages 6-7, 20 février 2009.

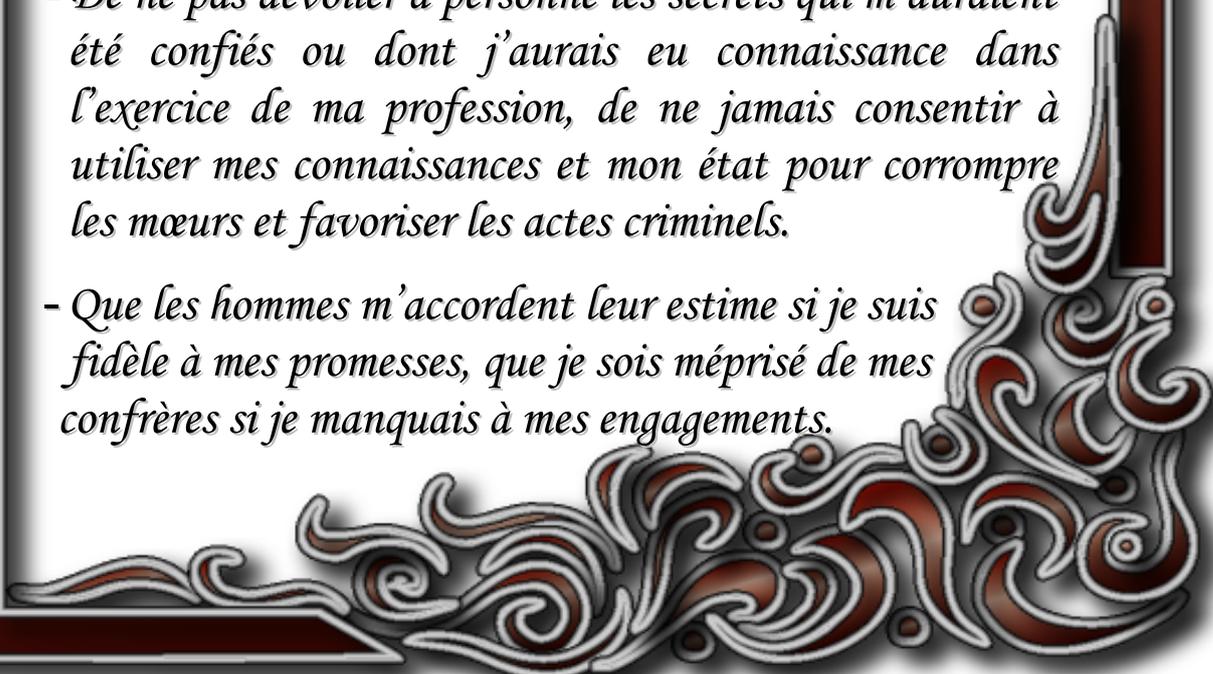


Serment



Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
 - *D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé public, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humain.*
 - *D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à législation en vigueur aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
 - *De ne pas dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
 - *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisé de mes confrères si je manquais à mes engagements.*
- 

جامعة محمد الخامس
كلية الطب والصيدلة
- الرباط -

قسم الصيدلي

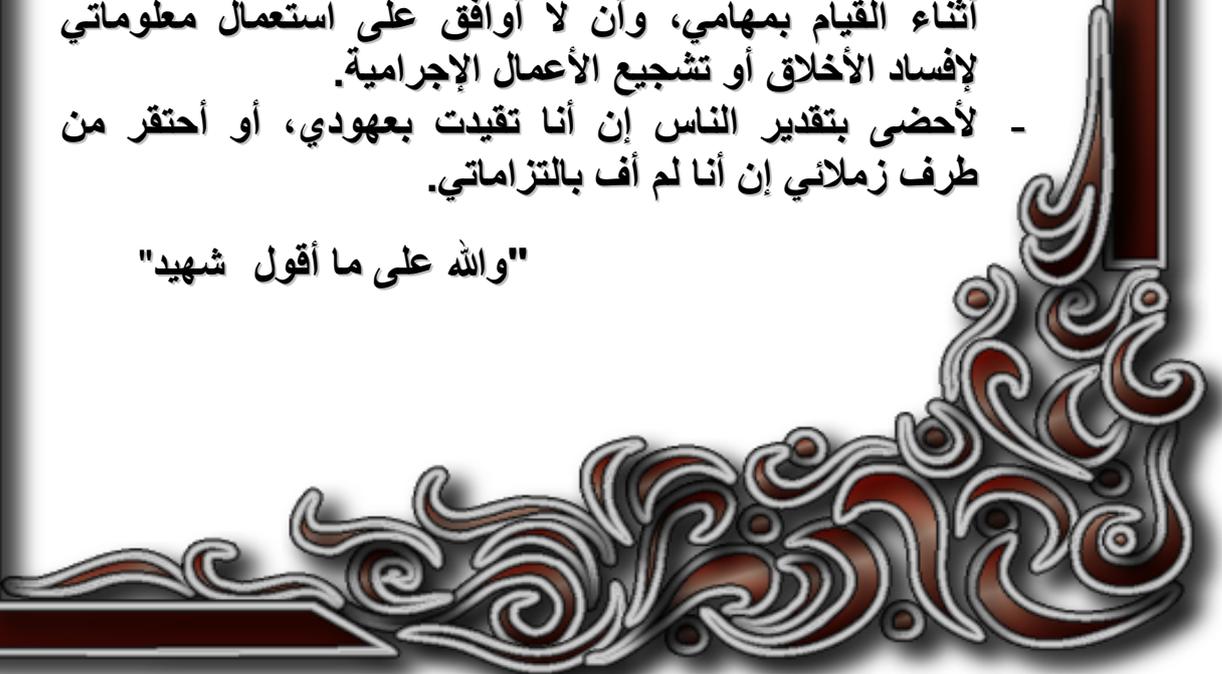
بسم الله الرحمن الرحيم

وأحضر بالثناء العظيم

أن أراقب الله في مهنتي

- أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيا لتعاليمهم.
- أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
- أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
- أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلى أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- لأحضى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

"والله على ما أقول شهيد"



جامعة محمد الخامس
كلية الطب والصيدلة بالرباط

أطروحة رقم : 02

سنة : 2011

الأدوية البيومتماثلة : التشريع، الإنتاج، والمراقبة.
أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم :

من طرف

السيد : اديب مراد

شتنبر 1985 بالدار البيضاء 18المزداد في :

لنيل شهادة الدكتوراة في الصيدلة

الكلمات الأساسية : بيومتماثل - تشريع - إنتاج - طرق تحليلية - مراقبة - العامل المحفز لإنتاج الكريات الحمراء.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس

السيد: ميمون زهدي

أستاذ في علم الأحياء الدقيقة

مشرف

السيد: يحيى الشراح

أستاذ في علم الصيدلة

السيد: سعد لمراني

أستاذة مبرز في علم الفيروسات

أعضاء

السيد: عز الدين إبراهيمي

أستاذ مؤهل في البيوتكنولوجيا

السيدة: سناء مصنيف

عضوة شرفية