

université
PARIS-SACLAY

FACULTÉ DE
PHARMACIE

Biomédicaments où en est-on?
Spécificités du développement des principes actifs issus des
biotechnologies

**UE M1 919: Initiation à la Découverte de Médicaments :
Les Défis du 21e Siècle**

isabelle.turbica@universite-paris-saclay.fr

PLAN

- Introduction: biotechnologies et santé
- Production des protéines recombinantes
- Procédés de production

Les couleurs des biotechnologies

Biotechnologies blanches:
Industrielle *Systèmes biologiques comme alternative aux procédés chimiques: bio-énergie, matière première renouvelable...*

Biotechnologies bleues:
Biodiversité marine (santé, cosmétique, aquaculture, agroalimentaires)

Biotechnologies jaunes:
Protection de l'environnement, dépollution

Biotechnologies Rouges: Santé
Protéines thérapeutiques, thérapie génique et cellulaire, diagnostic, ingénierie tissulaire...

Biotechnologies vertes
Agro-alimentaire, alimentation, agriculture, OGM

Biotechnologies noires:
Bio-défense et Bio-sécurité

Définition des biotechnologies

• L'OCDE* définit la biotechnologie comme
« **l'application des principes scientifiques et de l'ingénierie à la transformation de matériaux par des agents biologiques pour produire des biens et services** ».



La **biotechnologie pharmaceutique** se définit comme l'ensemble des procédés biotechnologiques, utilisant des micro-organismes, plantes et animaux ou leurs constituants, pour la production de produits pharmaceutiques.

Définition(s) des biomédicaments:

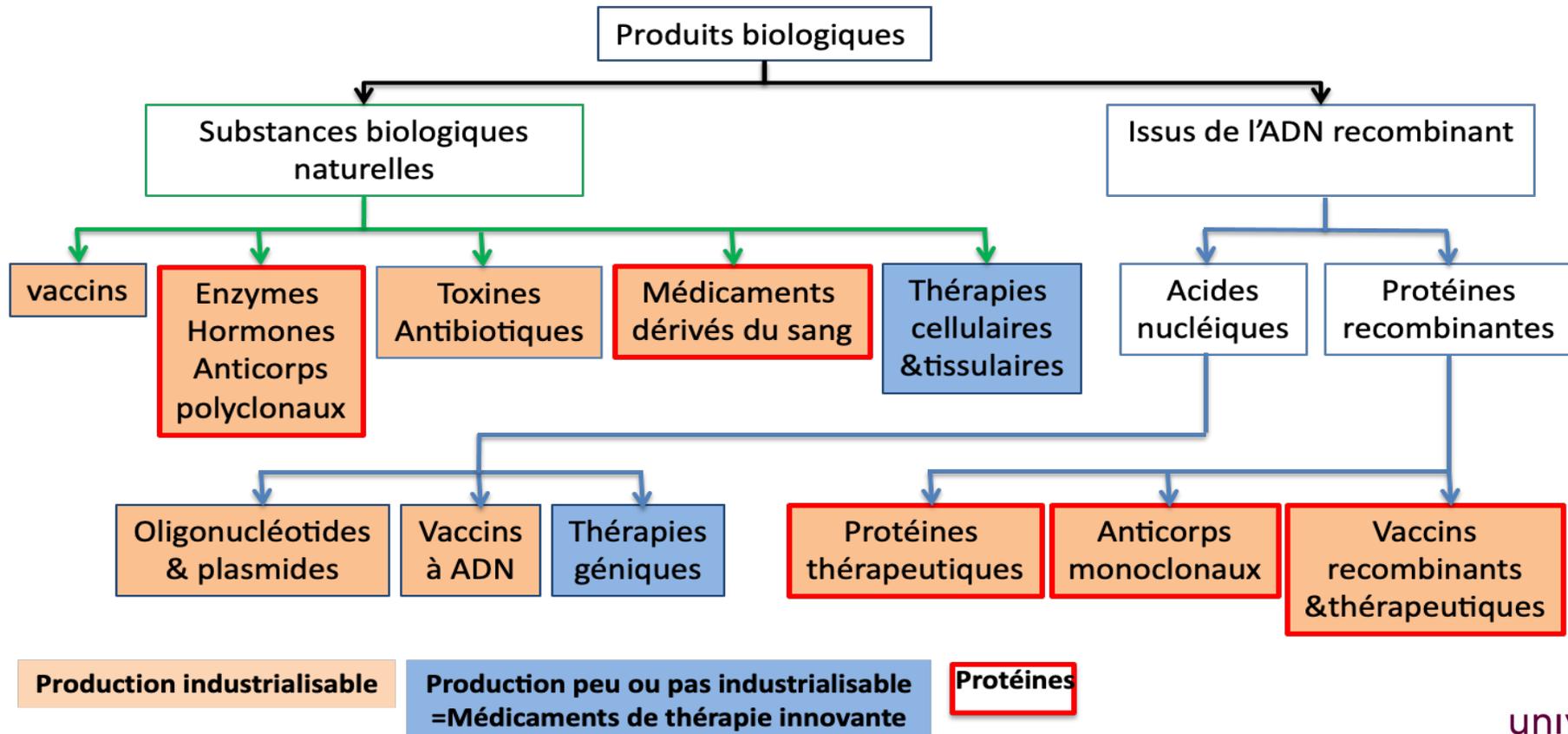
LOI n° 2007-248 du 26 février 2007

Médicament biologique:

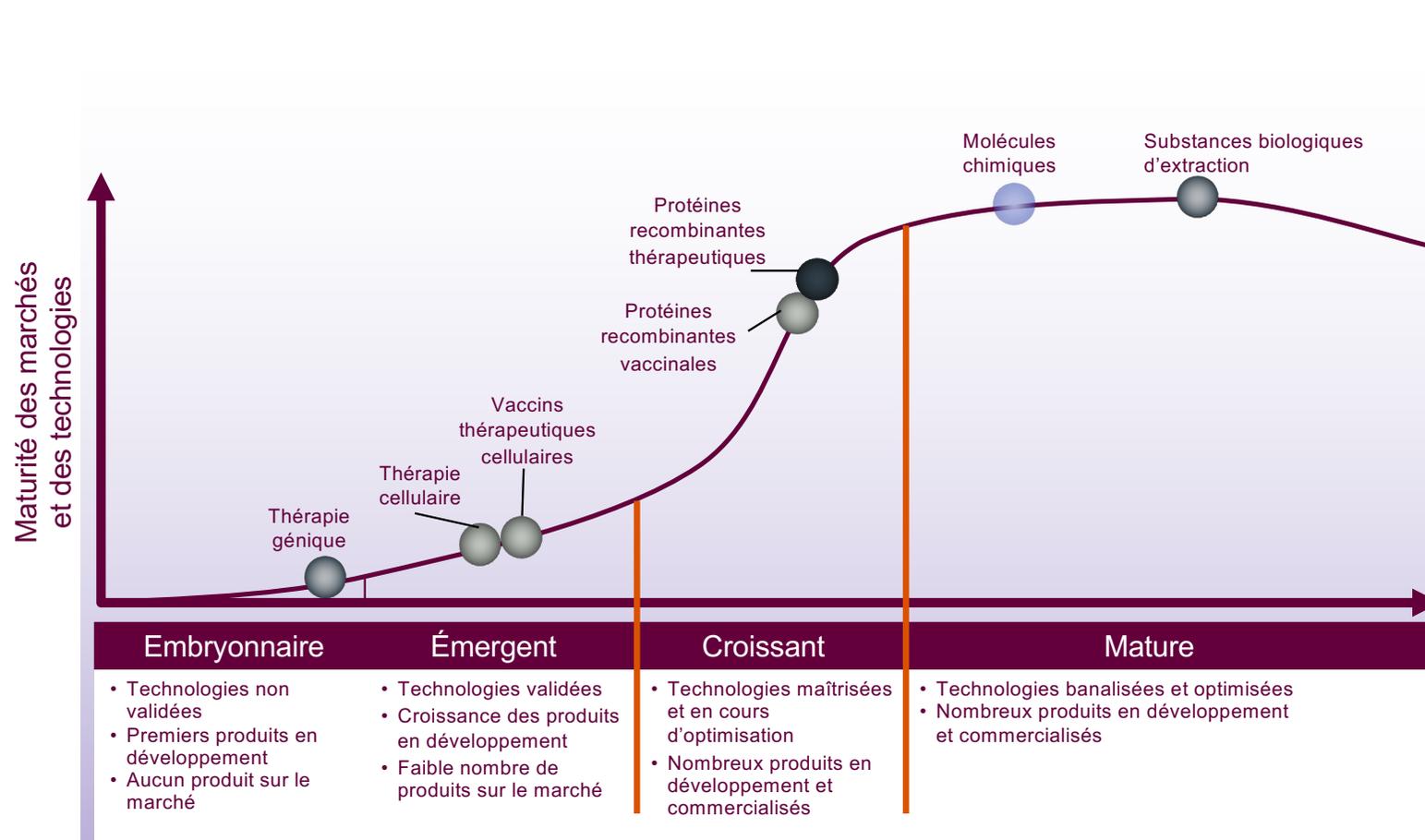
« tout médicament dont la substance active est produite à partir d'une **source biologique** ou en est extraite et dont la caractérisation et la détermination de la qualité nécessitent une combinaison d'essais physiques, chimiques et biologiques ainsi que la connaissance de son **procédé de fabrication** et de son **contrôle** »

Classification des Biomédicaments

Leur CONCEPTION et leur PRODUCTION fait appel aux biotechnologies



Maturité des technologies



Origine possible des substances biologiques:

- **1-Extraction: tissus ou fluides animaux ou humain (sang, urines, lait, cellules...)**
- **2-Substrat cellulaire : cellules procaryotes (bactéries) ou eucaryotes (champignons, insectes, mammifères) → Système de production en culture**
 - **Sécrétion naturelle : toxines ou enzymes bactériennes (Toxine botulique, anatoxine tétanique, streptokinase...)**
 - **Sécrétion après modification génétique permettant l'expression d'un gène étranger**
- **3-A partir d'animaux ou plantes transgéniques**

Biomolécules thérapeutiques et micro-organismes

- **Protéines:**

- Recombinantes: hormones, anticorps et dérivés, cytokines...
 - Bactéries, levures, champignons, cellules d'insecte, cellules de mammifères
- Naturellement produite par la cellule: enzymes, hormones, anticorps, albumine, collagène...
 - Bactéries, levures, champignons, cellules de mammifère

- **Acides nucléiques**

- vaccins ADN, ARN: bactéries
- Plasmides, oligonucléotides: bactéries
- Vecteurs viraux: virus (thérapie génique)

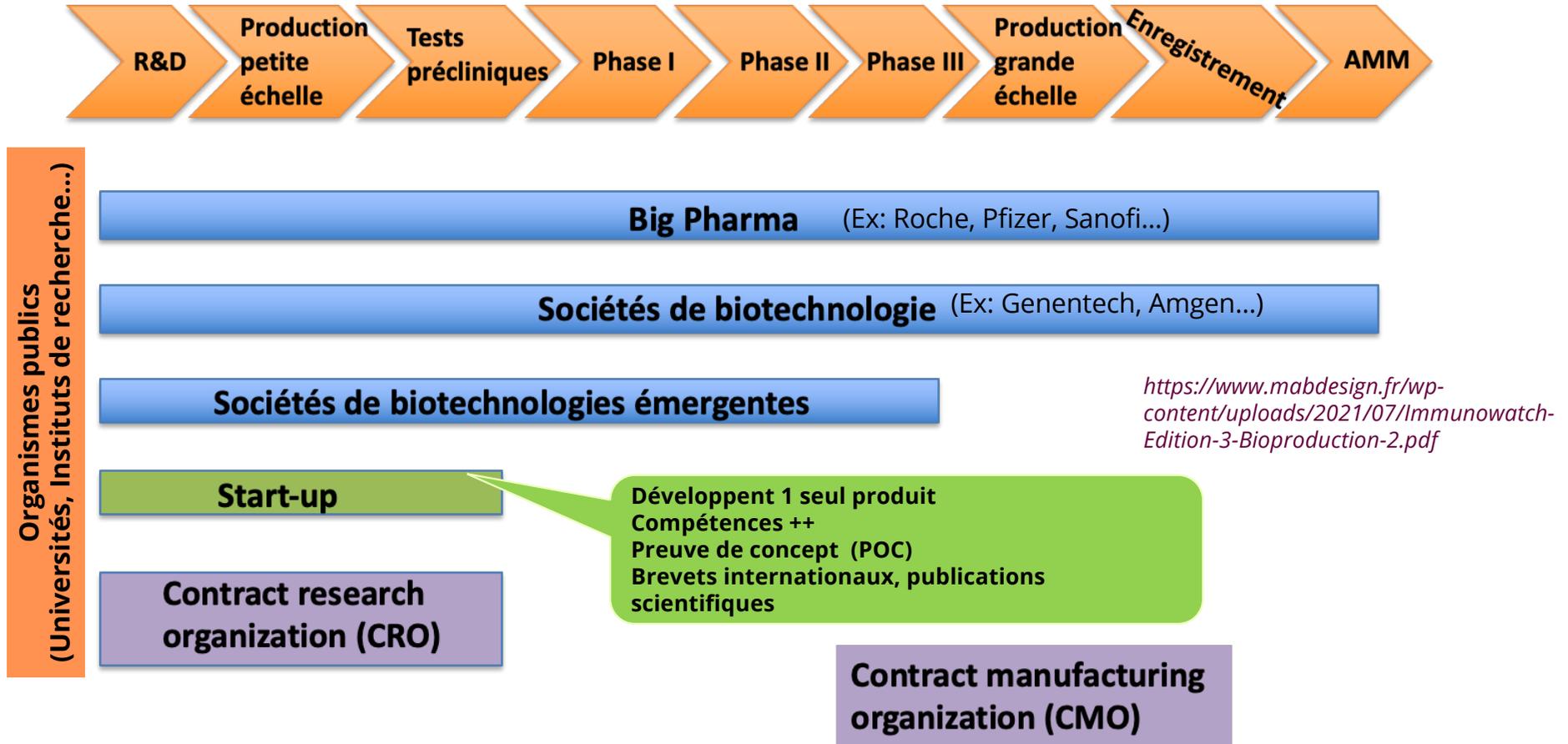
- **Antibiotiques:** champignons, bactéries

- **Lipides, polysaccharides, molécules organiques complexes:** levures, bactéries

- **Vaccins**

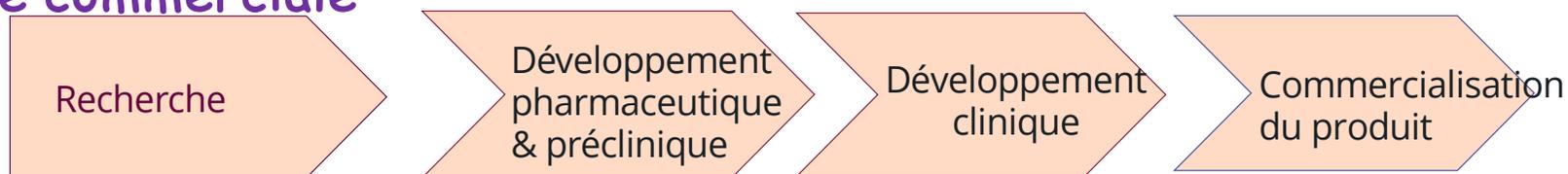
- Micro-organismes: virus, bactéries
- Recombinants: bactéries, levures, cellules mammifères, d'insectes

Les acteurs de la bioproduction



- 530 bioproduits développés par des sociétés françaises (startup → big pharma)
- Dont 169 anticorps monoclonaux, 35 produits de thérapie cellulaire et 78 produits de thérapie génique
- Investissement de 800 millions € dans le développement des biothérapies (Grand Défi biomédicaments, 2020)

But: développer un procédé qui mène un produit caractérisé en recherche vers sa disponibilité commerciale



La cible biologique	*Recherche * Identification *Validation *Tests et modèles d'étude	Identification de biomarqueurs	Utilisation des biomarqueurs	Tests compagnons
Le produit	*Identifier le Lead *Production de lots recherche et caractérisation	* Production GLP * Caractérisation analytique * Sécurisation biologique * Formulation phase I	Production (lots cliniques, lots de validation industrielle) Formulation phase II/III Caractérisation analytique complète	Production GMP (lots commerciaux)
Ses propriétés	*Etudes pharmacologiques <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> = Preuve de concept (POC)	Toxicologie Pharmacologie	Etudes cliniques	Pharmaco-économie Pharmacovigilance et plan de gestion de risques

Quantités requises

mg


Go / No Go

g
Centaines de g

kg
Dizaines de kg

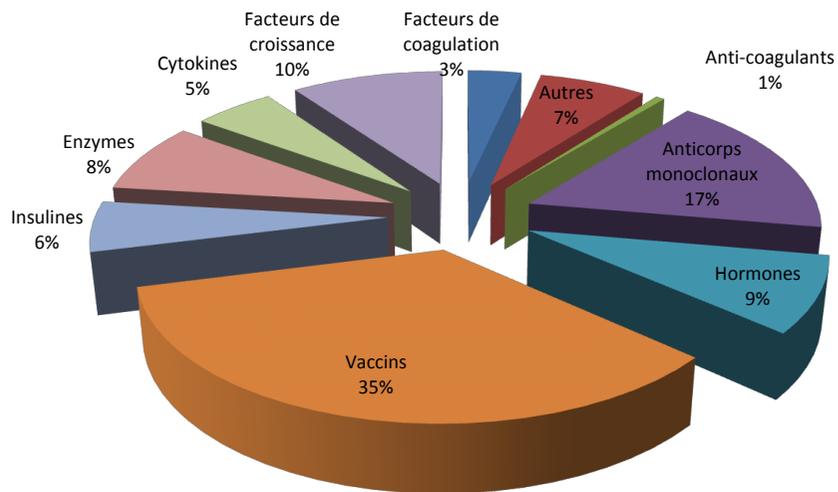

Enregistrement

Centaines de kg

Le procédé de production des biomédicaments est
complexe et variable:

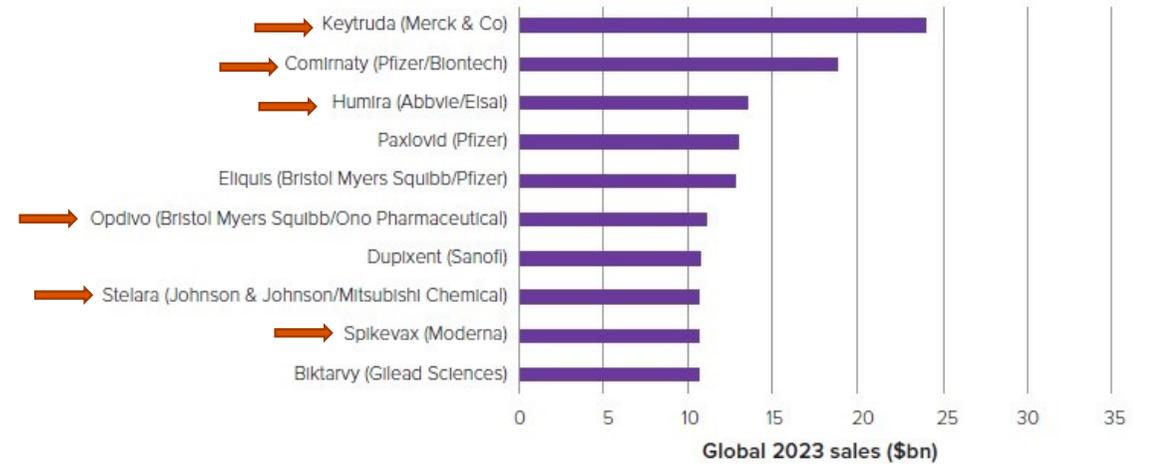
le procédé « fait » le produit

La production de protéines recombinantes

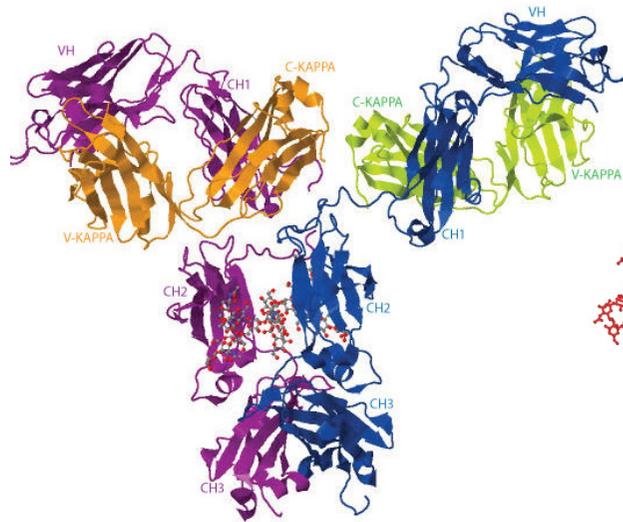


Classification pharmacologique des biomédicaments

Top selling drugs in 2023



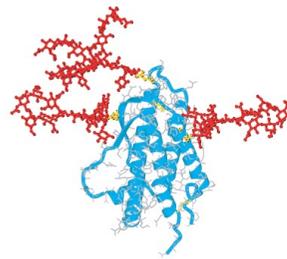
Les protéines à usage thérapeutique: des macromolécules complexes



Anticorps monoclonaux

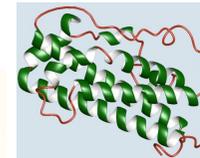
1200 aa; 150kDa

Site de glycosylation sur fragment Fc



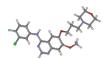
Erythropoïétine (EPO)

165 aa; 30,6 kDa ; 40% glycosylation



Hormone de croissance

191 aa; 22kDa,
non glycosylée
4 hélices α antiparallèles



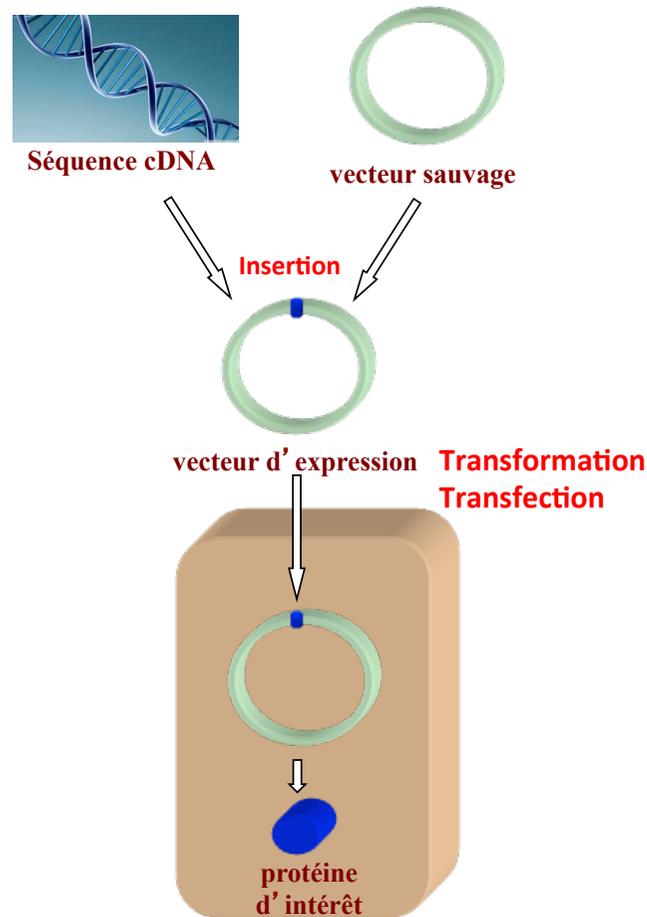
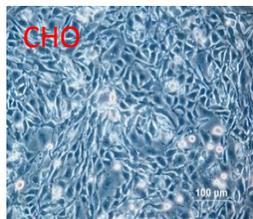
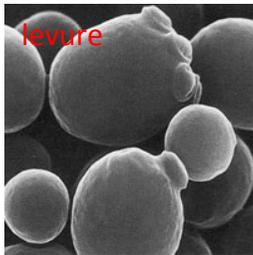
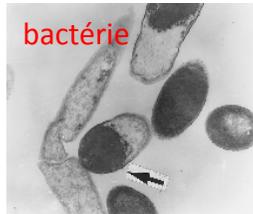
Gefitinib, (0,447kDa)



Insuline

50 aa; 16 kDa,
non glycosylée

Technologie des protéines recombinantes



Organisme génétiquement
modifié exprimant la protéine
d'intérêt

Production par cellule hôte=
générer **LE** clone producteur
(Cell line development)

- ✓ Travail sur **la séquence** à exprimer:
Nucléotidique (→Protéique)
- ✓ Optimisation du vecteur
d'expression
- ✓ Ciblage de l'insertion du transgène

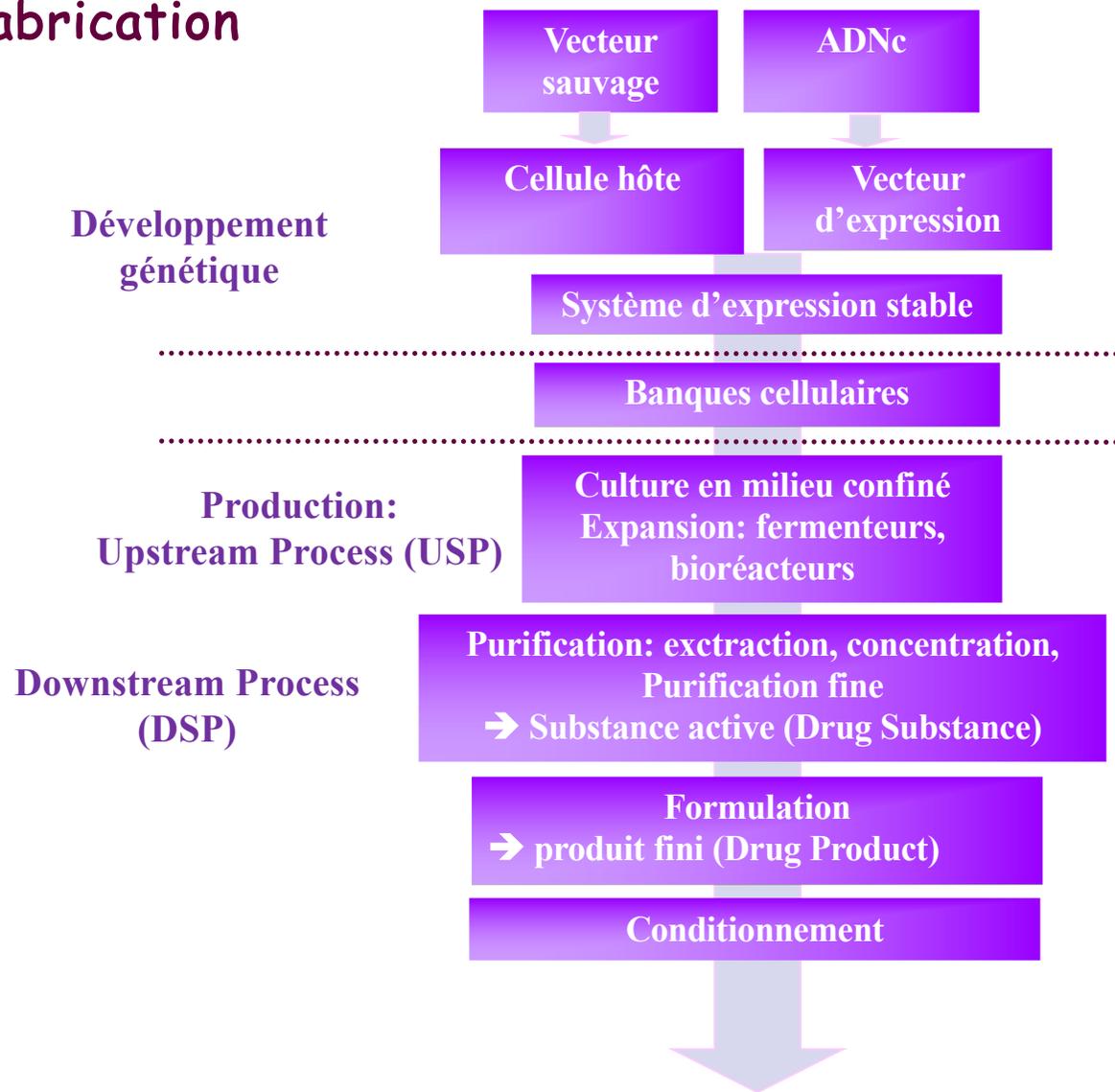
- ✓ Sélection **des cellules** transfectées
- ✓ Sélection des clones hautement
productifs
- ✓ Caractérisation génétique de la
lignée établie
- ✓ Optimisation des conditions de
culture

Les principales contraintes pour la production

But de la production	Quantité requise	Degré de purification
Recherche: analyse fonctionnelle, caractérisation	µg ou g	modéré
Commercialisation / applications en recherche	100mg à 100g	modéré
Enzymes commerciales	g au kg	modéré à haut
Utilisation thérapeutique in vivo		haut
maladies à faible incidence	100g à 10 kg	
maladies à haute incidence	10kg à 100kg	

- ✓ Quantité
- ✓ Taux de production, cinétique, hétérogénéité
- ✓ Complexité moléculaire
- ✓ Procédés de production complexes et variables, contrôles qualité complexes
- ✓ Stabilité, solubilité
- ✓ Considérations économiques: équipements disponibles, coûts de production

Procédé de fabrication



Protein	System	Production level
Hirudin	<i>S. cerevisiae</i> ^(Y)	60 mg/L
	<i>H. polymorpha</i> ^(Y)	–
Interferon α -2b	<i>H. polymorpha</i> ^(Y)	120 mg/L
Hepatitis B vaccine	<i>H. polymorpha</i> ^(Y)	–
Angiostatin	<i>P. pastoris</i> ^(Y)	108 mg/L
Anti-HBs Fab	<i>P. pastoris</i> ^(Y)	50 mg/L
Human serum albumin	<i>K. lactis</i> ^(Y)	3 g/L
	<i>S. cerevisiae</i> ^(Y)	3 g/L
	<i>P. pastoris</i> ^(Y)	10 g/L
Human interleukin 6	<i>A. niger</i> ^(F)	150 mg/L
Human apolipoprotein AI	CHO cells ^(M)	80 mg/mL
Insulin precursor	<i>P. pastoris</i> ^(Y)	3 g/L
	<i>S. cerevisiae</i> ^(Y)	98 mg/L
Human tPA	CHO cells ^(M)	34 mg/L
Human gonadotropin	CHO cells ^(M)	3 g/L
Erythropoietin (epoetin α)	CHO cells ^(M)	–
Monoclonal Ab	NSO cells ^(M)	3 g/L
HPV vaccine (Cervarix TM)	Insect cells	–
Human proapolipoprotein AI	Insect cells	80 mg/L
Clotting factor VIIa	BHK cells ^(M)	–

Exemple de l'insuline:
1980: mg
2010: 3-8 g/L
2015: 10 g/L
2020 > 10 g/L

Examples of recombinant therapeutic proteins successfully expressed using different production systems, including highest production levels reported in each organism.

Current Opinion in Biotechnology 2012, 23:965–971

Principaux systèmes de production industriels

	E. Coli	Levure	Mammifère
Clivage protéolytique	?	?	oui
Glycosylation	non	?	oui
Secretion	?	oui	oui
Folding	?	?	oui
Phosphorylation	non	?	oui
Acétylation	non	oui	oui
Amidation	non	oui	oui
% P intérêt/P totales	>50%	1%	<1%
MM, quantité	60-70 kDa 100g/L	30kDa 1g/L	<300kDa 1-5g/L
Inconvénients	Non adapté aux protéines complexes Agrégation du produit	Pas pour la production d'anticorps	Faibles productivités Couts élevés

Production de protéines recombinantes par *E.coli*

Caractéristiques du plasmide

- Promoteur fort (constitutif ou inducible) → transcription ++
- Site de fixation des ribosomes
- Sites de restriction uniques
- Signal de terminaison de transcription
- Origine de réplication dans les bactéries
- Gène de résistance à un antibiotique (marqueur de sélection)

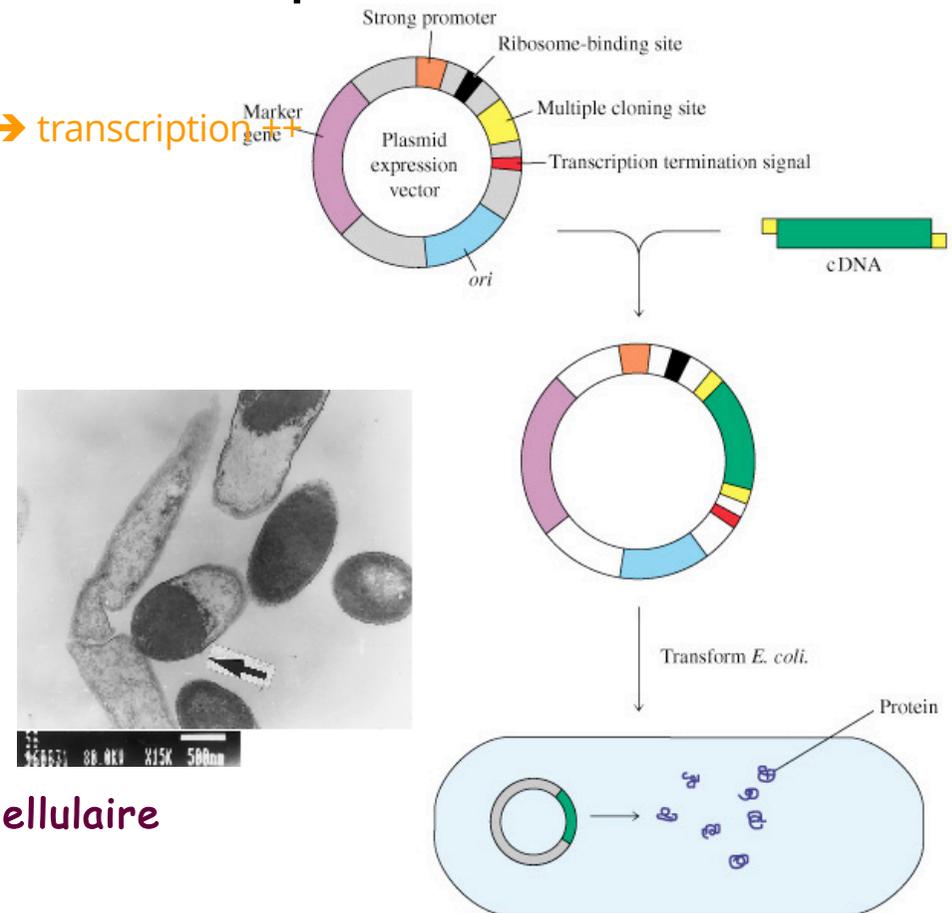
Caractéristiques des bactéries hôtes:

- *recA(-)* : pas de recombinaison possible.
- *dam* ou *dcm(-)* : pas de méthyltransférases
- Pas de plasmides endogènes

Les protéines recombinantes sont produites en intra-cellulaire

- ✓ Peu de protéines chaperon
- ✓ pas de modifications post-traductionnelles
- ✓ Environnement réducteur du cytoplasme

Formation de corps d'inclusion:
précipitation de la protéine exprimée



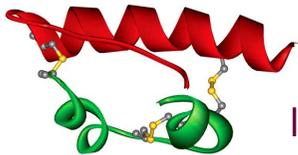
Avantages

- Croissance rapide et peu onéreuse
- Système génétique bien connu, nombreuses souches améliorées
- Nombreux vecteurs d'expression disponibles, facilité de transfection dans les bactéries-hôtes
- Bons rendements de production des protéines (plusieurs dizaines de grammes par litre de culture)
- Corps d'inclusion cytoplasmiques: facilité de purification

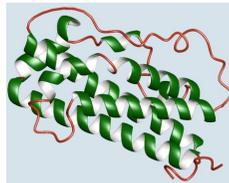
Inconvénients

- Pas de modification post-traductionnelle
Activité biologique différente de la protéine native
- Corps d'inclusion: protéine insoluble, mal repliée
- Présence d'endotoxines bactériennes: le procédé de purification doit prévoir des étapes d'élimination

Quelques protéines thérapeutiques produites par E Coli:



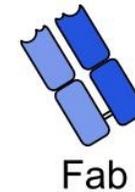
Insulines
16kDa



Hormone
de croissance
22kDa



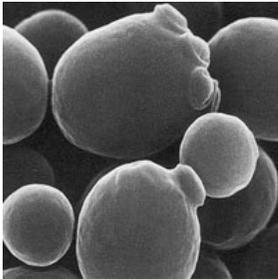
Interférons
20 kDa
20



Fab

Fragment
d'anticorps
25 kDa
Université
PARIS-SACLAY

Production de protéines recombinantes dans la levure



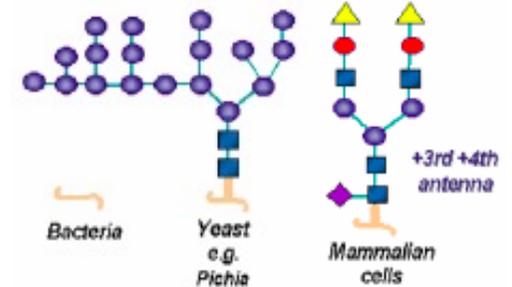
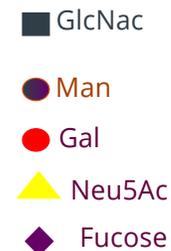
Saccaromyces cerevisiae



Pichia pastoris

INCONVENIENTS

- Glycosylation possible mais hypermannosylations
- Mauvais repliement de la protéine produite



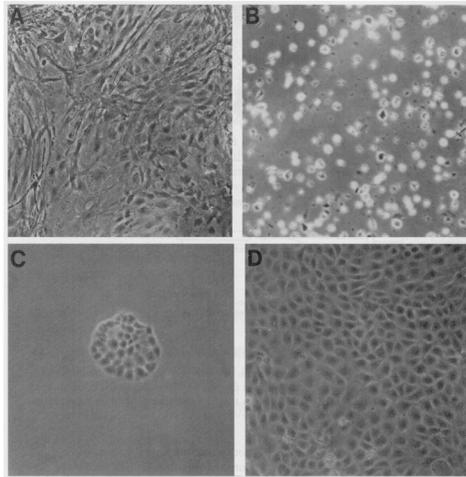
Ingénierie des levures pour « humaniser » la glycosylation

AVANTAGES

- Petit génome eucaryote facilement manipulable et bien caractérisé
- Absence d'endotoxine
- Fermentation peu coûteuse
- Bons rendements (quelques grammes par litre de culture)
- Modifications post traductionnelles simples
- Possibilité de sécrétion de la protéine d'intérêt

Protéines thérapeutiques produites en levure:
Insulines
Vaccin anti virus d'hépatite B (Ag HBs)
Vaccin anti papillomavirus
Glucagon
Facteurs de croissance

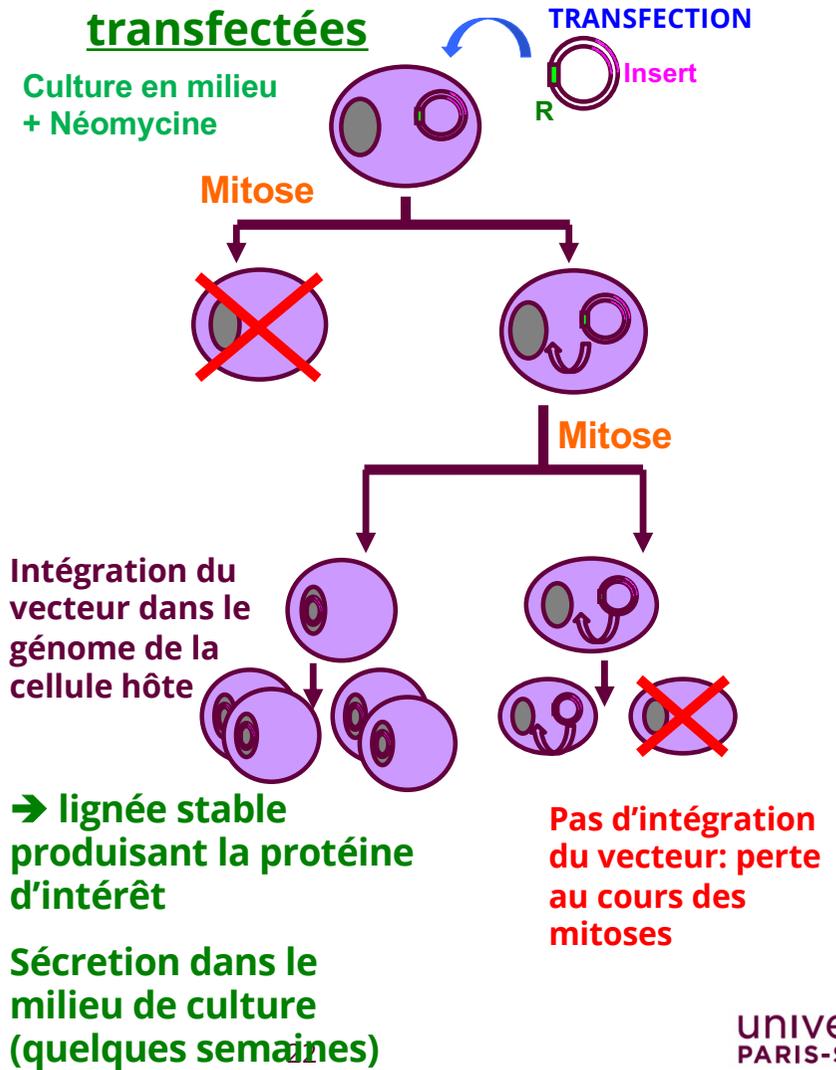
Production de protéines thérapeutiques en cellules mammifères

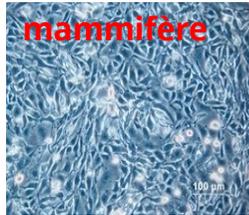


A Non transfectées
B-D Transfectées avec sélection

La lignée cellulaire établie est soumise à un contrôle qualité très poussé

Sélection des cellules transfectées





Jusqu'à 300 kDa
1-10g/L

Approuvées par Haute Autorité de Santé

Lignée	Nature
BHK21	rein de hamster syrien
CHO	Ovaire de hamster chinois
HEK 293	Rein embryonnaire humain
NSO	Myelome murin Ne secretant pas d' Ig

En développement

PER.C6 (Crucell)	cellules humaines de rétine immortalisées
HT (Shire Technology)	cellules dérivées de fibrosarcome épithéliales
Ebx® (Vivalis)	cellules souches embryonnaires de canard

- ✓ Anticorps entiers et autres grosses protéines
 - ✓ Glycosylation optimale
 - ✓ Meilleure activité fonctionnelle de la protéine produite
- Nombreux vecteurs d'expression optimisés

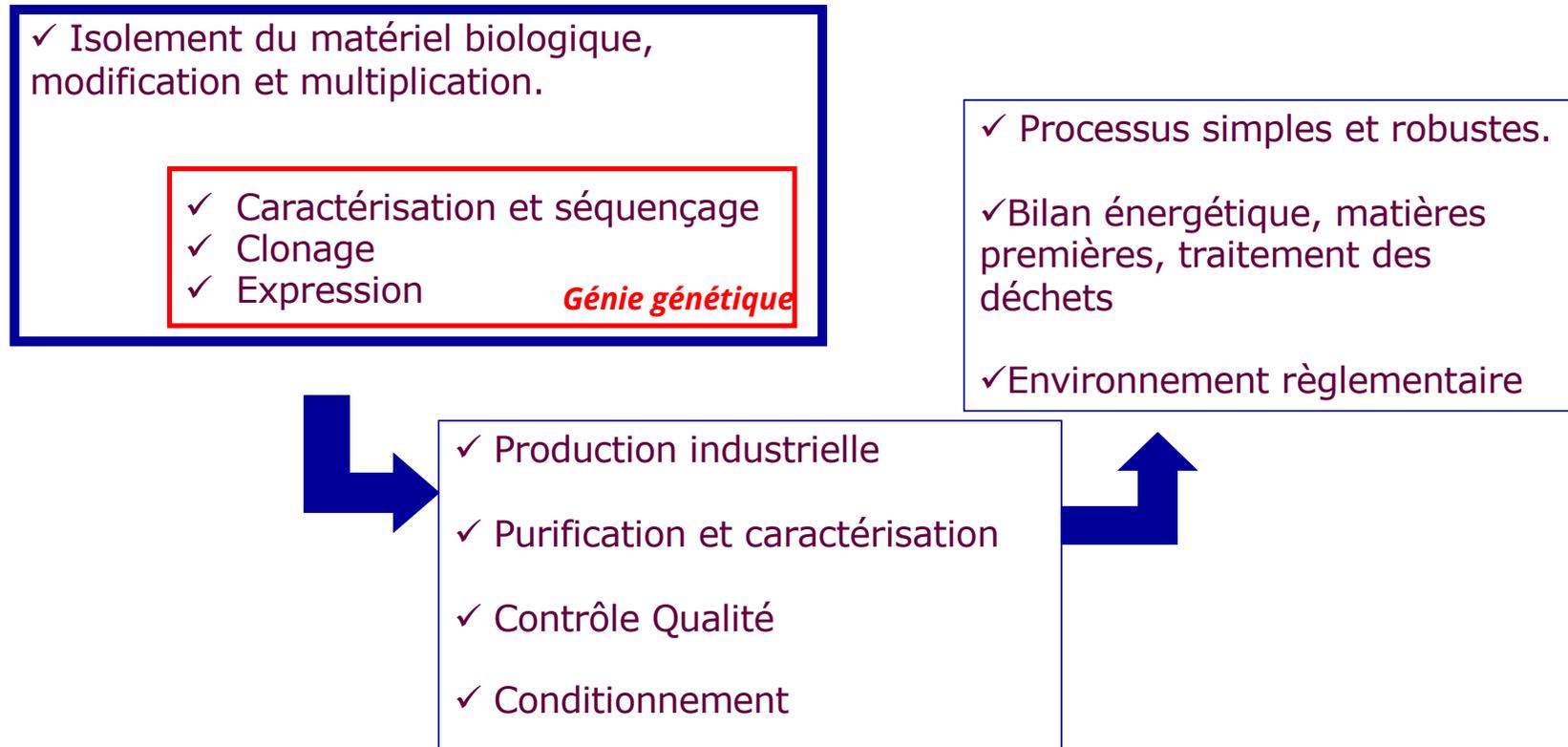
- ✗ Coûts des milieux de culture
- ✗ Construction de la lignée productrice et établissement des banques cellulaires lente
- ✗ Faibles rendements de production,
- ✗ Sécurité virale (cellules humaines)

Quelles protéines produites ?

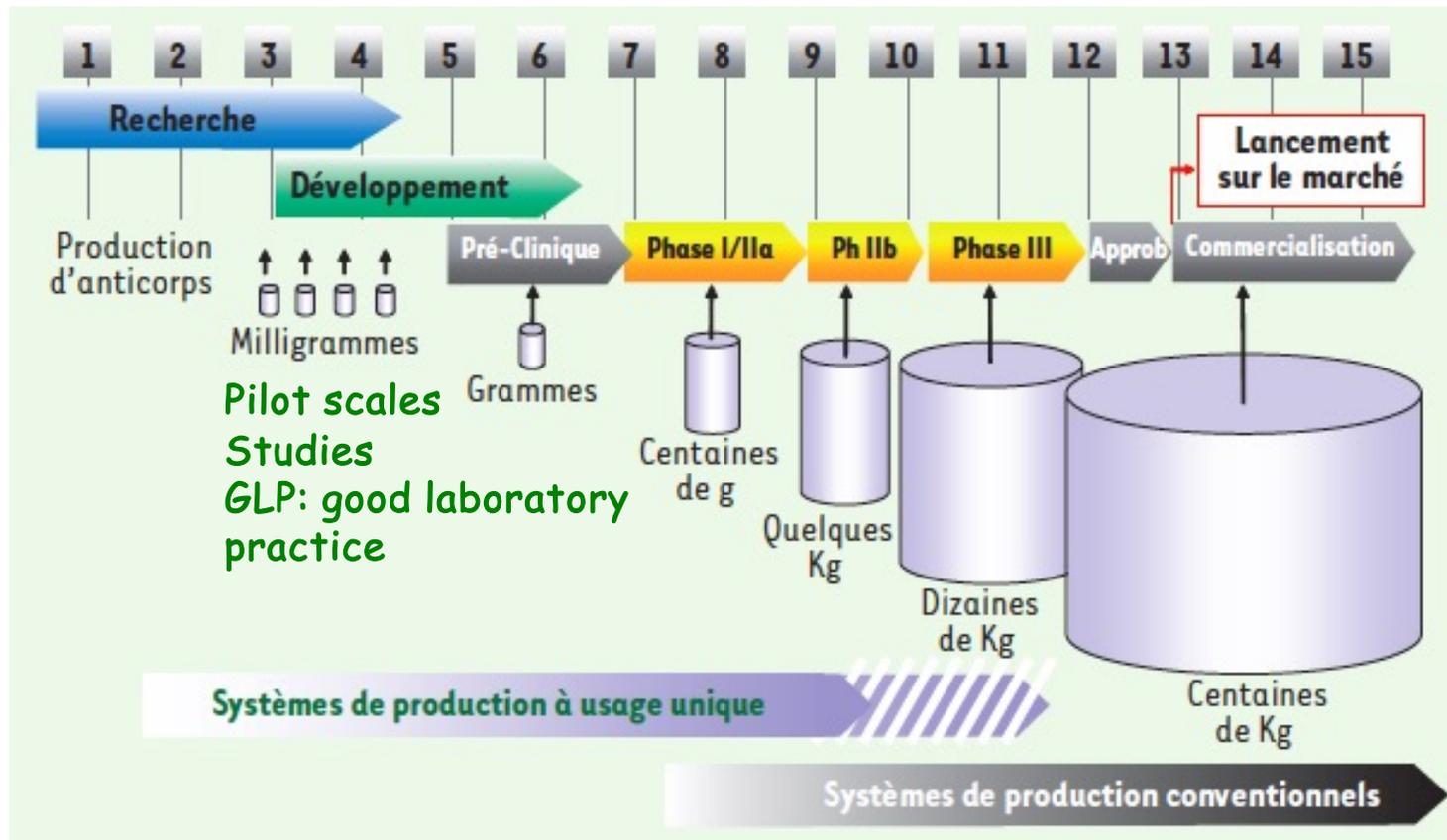
Anticorps entiers
facteurs de croissance,
cytokines,
hormones gonado-thyréotropes,
facteurs de coagulation.....

Les procédés de production

Les produits de santé issus de la biotechnologie nécessitent des procédés industriels complexes, liés à la maîtrise du vivant.



De la recherche vers la commercialisation



Process scale
GMP: good manufacturing practice

Pilot scales
Studies
GLP: good laboratory practice

Méthodes spécifiques en amont,
mais les procédés et les activités R&D sont comparables

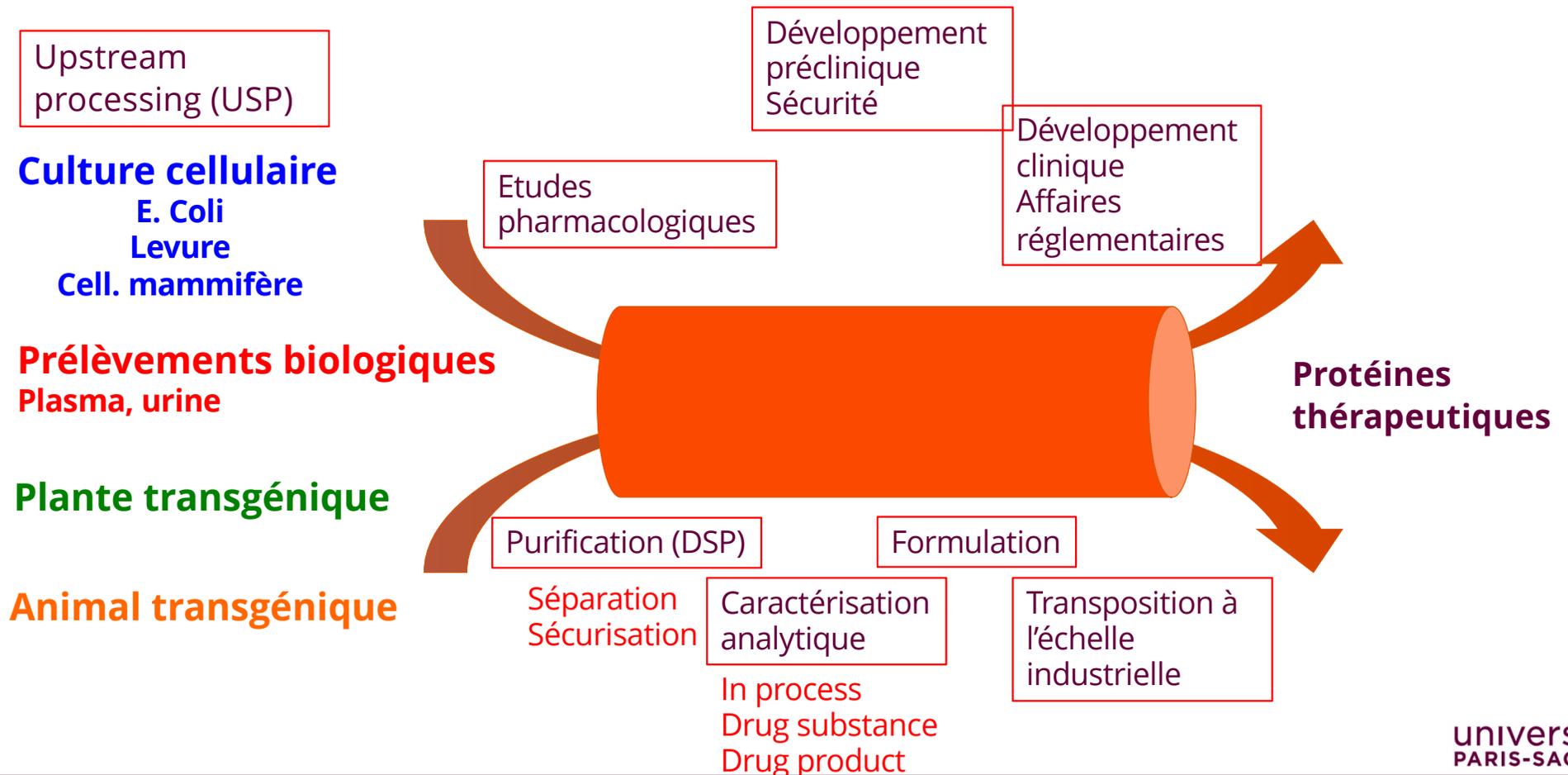
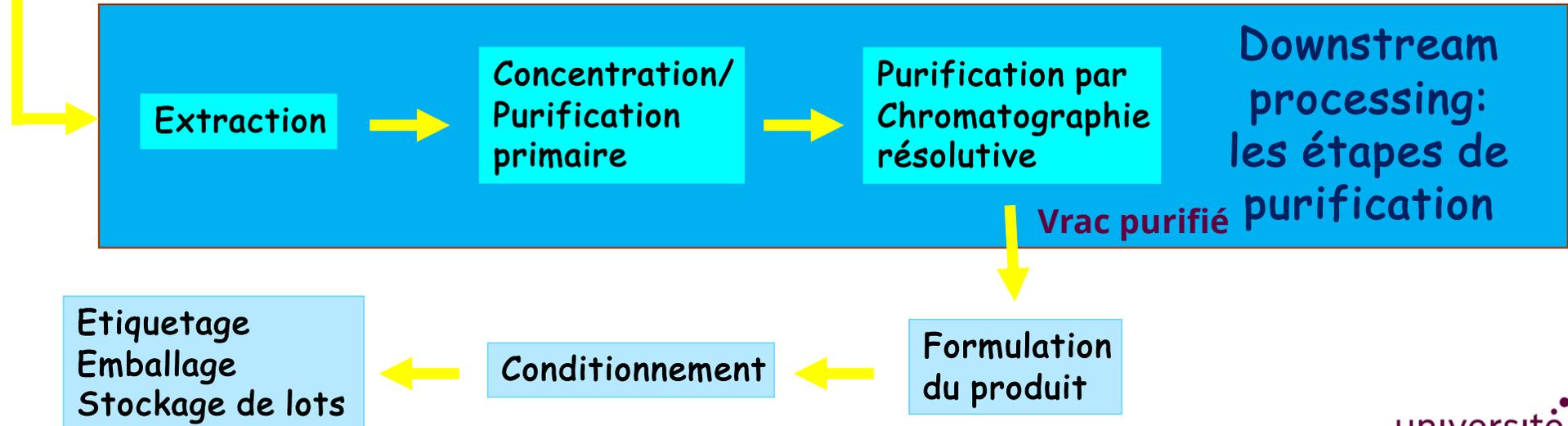


Schéma général d'un procédé de production



Upstream processing: production de la biomasse

Décongélation d'une ampoule de micro-organismes
Culture initiale
Expansion: fermentation (bactéries, champignons, levures),
Bioréacteurs (cellules mammifères)
Production



Upstream processing (USP)

Choix de la souche ou lignée productrice

Rusticité: adaptation au milieu industriel

Performances: vitesse de croissance, de production, rendement

Stabilité génétique

Obtention: collections de souches:

Banques nationales, commerciales: ATCC, Institut Pasteur...

Amélioration par génie génétique

Le bioréacteur : Fonctions requises

- Confinement : étanchéité
- Stérilité : résistance thermique
- Agitation - mélange
- Aération + filtration de l'air
- Apport de nutriments et fluides de régulation
- Procédures de nettoyage

Les paramètres de culture des micro-organismes

Physico chimiques:
pH, pO₂, T°, Pression osmotique

Cinétiques:
Dilution, apport en milieu nutritif, durée de la culture

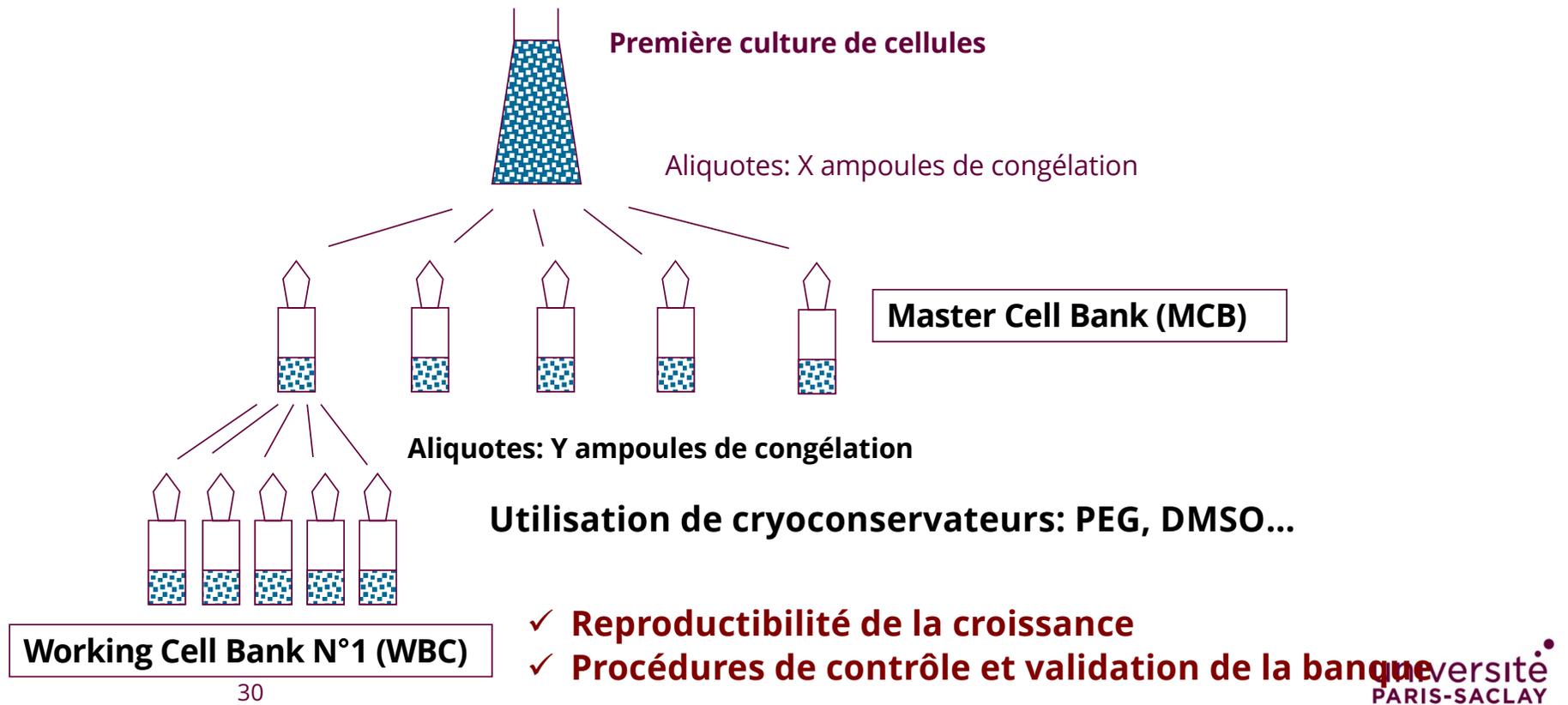
Composition du milieu:
Source d'azote, carbone, facteurs de croissance, acides gras, oligoéléments (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo)...

Accumulation de métabolites

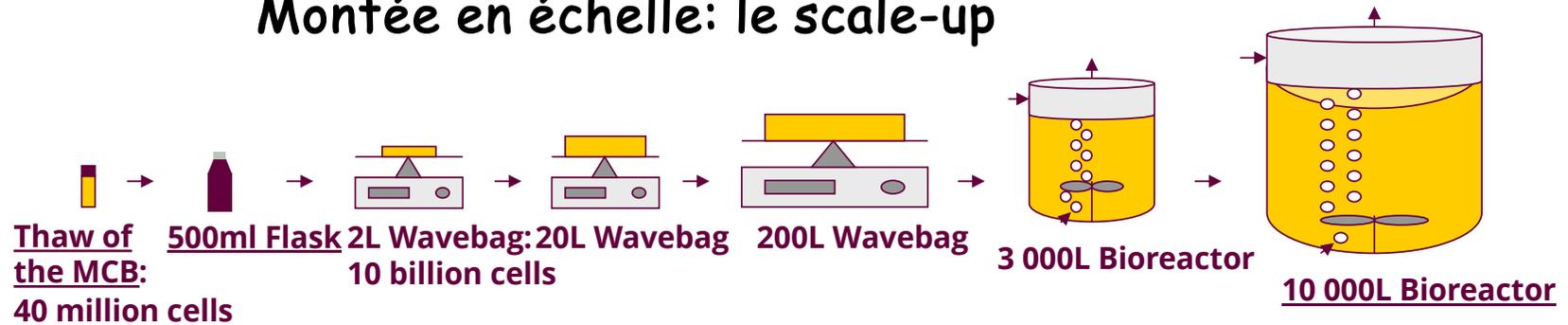
Modélisation du procédé et automatisation

Etablissement de banques cellulaires

But: constitution de stocks d'ampoules de congélation permettant d'avoir des lots de cellules identiques et caractérisés



Montée en échelle: le scale-up

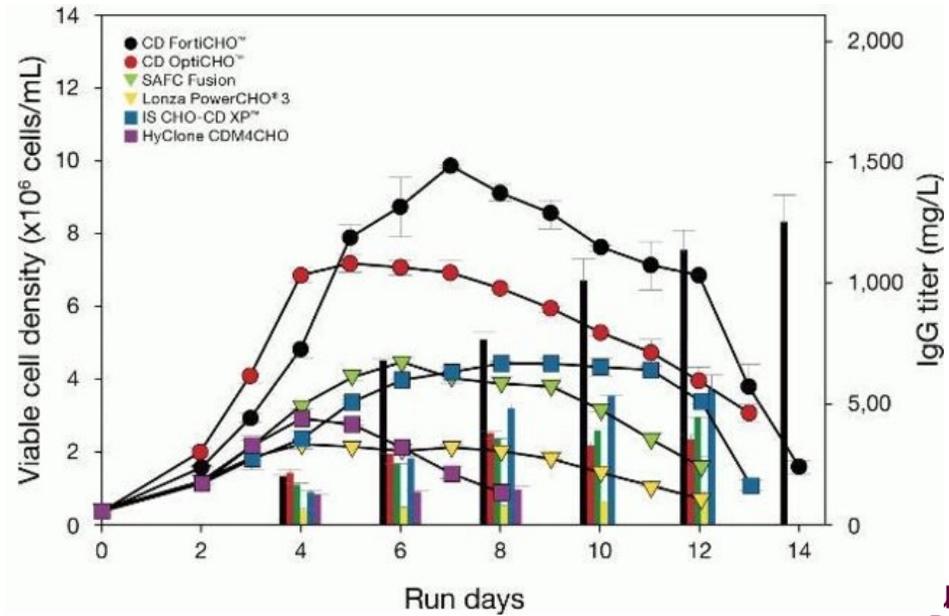


La technologie « Wave »



Le bioréacteur inox

Viabilité cellulaire et productivité en fonction du milieu de culture

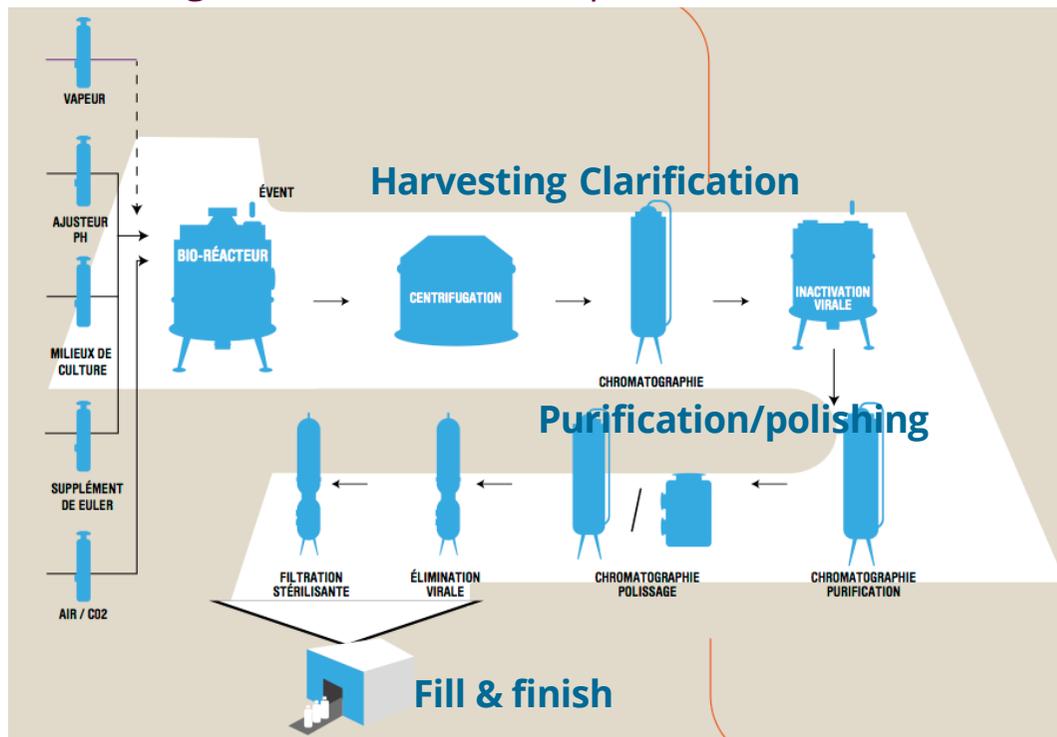


La production en aval: downstream processing

Purification

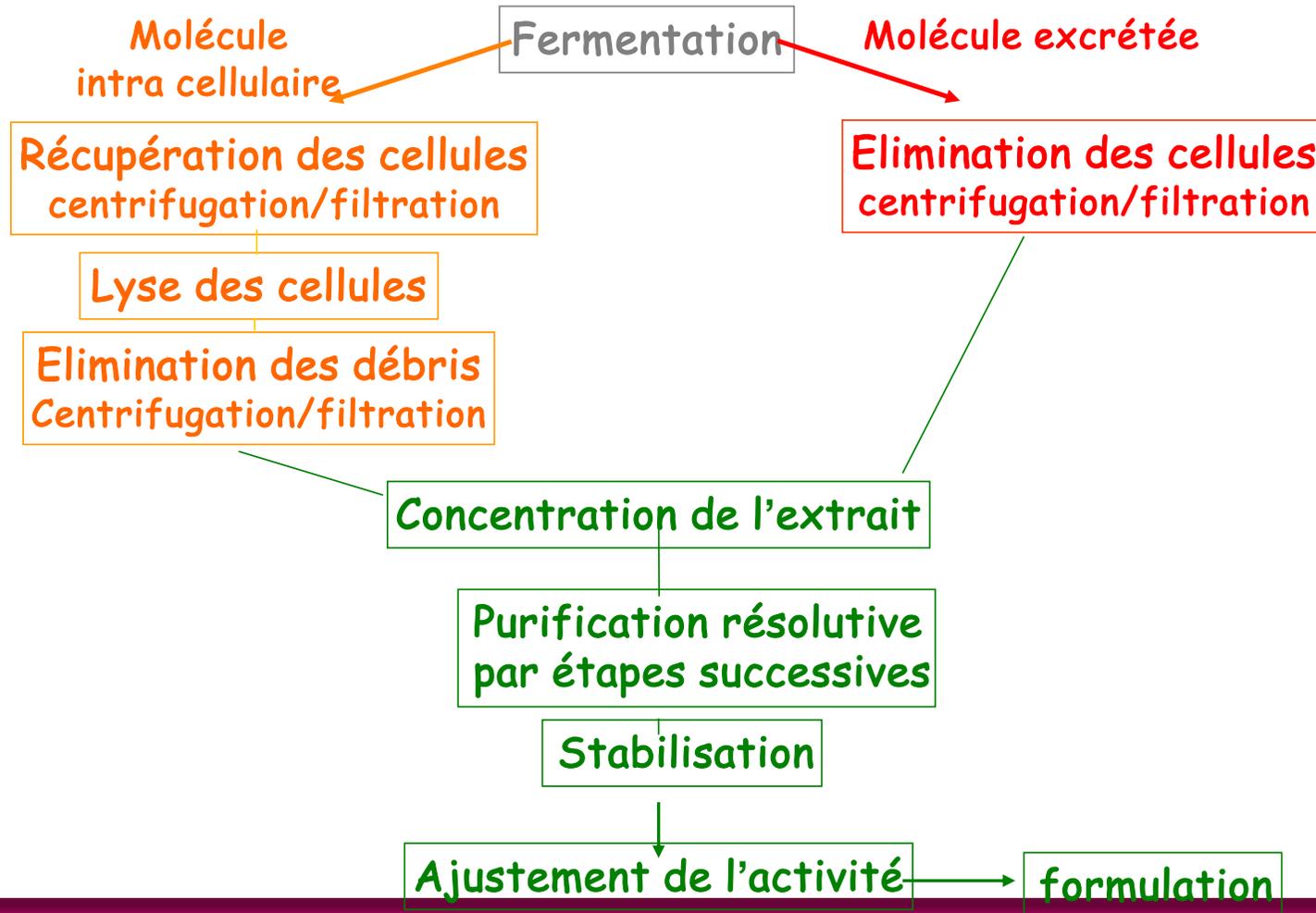
Objectif: extraire le produit d'un milieu complexe avec un degré de pureté proche de 100%, sans altérer le produit et son activité

Schéma global d'une unité de purification



- ✓ **Etapes de séparation, spécifiques ou non, de la protéine d'intérêt**
 - Précipitation
 - Chromatographies
 - Filtration
- ✓ **Etapes de sécurisation biologique : élimination des impuretés, élimination/inactivation des agents infectieux**
- ✓ **Contrôles Qualité : in-process ou de la Drug Substance**
- ✓ **Sécurisation finale (filtration stérilisante)**
- ✓ **Contrôles qualité finaux**
- ✓ **Remplissage/conditionnement**

Le DSP: Schéma général de purification



Centrifugeuse



Installation de filtration



Chromatographie

Exemple: la production industrielle des anticorps thérapeutiques

**Croissance cellulaire
(28 jours)**

10 000 Litres

Upstream process

**Prélèvement du surnageant
de culture
(1 jour)**

Downstream process

**Purification des anticorps
(10 jours)**

15 Litres de concentré(10g/L)

**Caractérisation du produit
(10 semaines)**

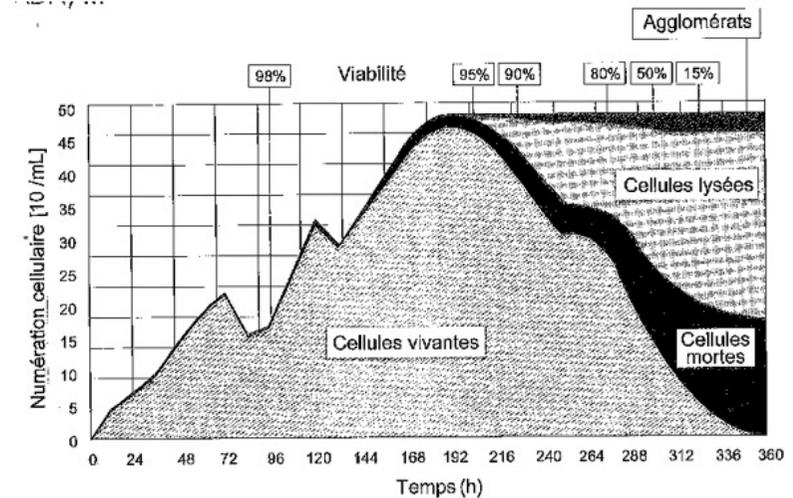
**Formulation
Conditionnement**



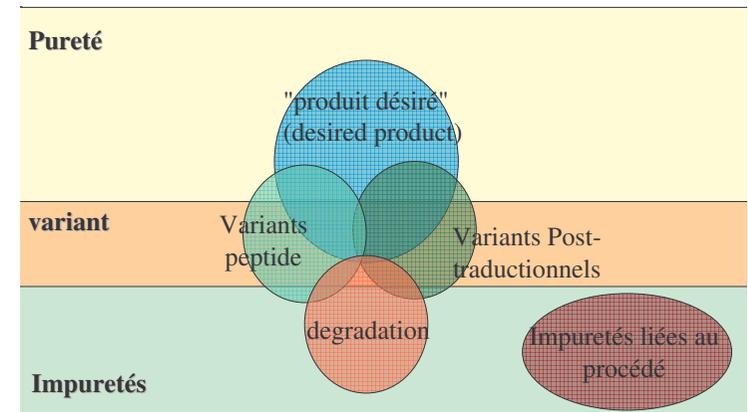
35

Substances à éliminer au cours du procédé de purification

- ✓ Impuretés liées à l'hôte:
Débris cellulaires, Acides nucléiques, Lipides, Protéines de la cellule-hôte (HCP)
- ✓ Microorganismes:
Particules virales, Bactéries, Substances pyrogènes
- ✓ Impuretés liées au procédé:
Traces de tampon, solvants, résines, Métaux, polymères, « extractibles et relargables »...
- ✓ Impuretés liées au produit:
Formes précipitées, tronquées, ou agrégées (pour les protéines)



Source: Bio³, IMT Editions



Courtoisie: Pr. JH Trouvin

université
PARIS-SACLAY

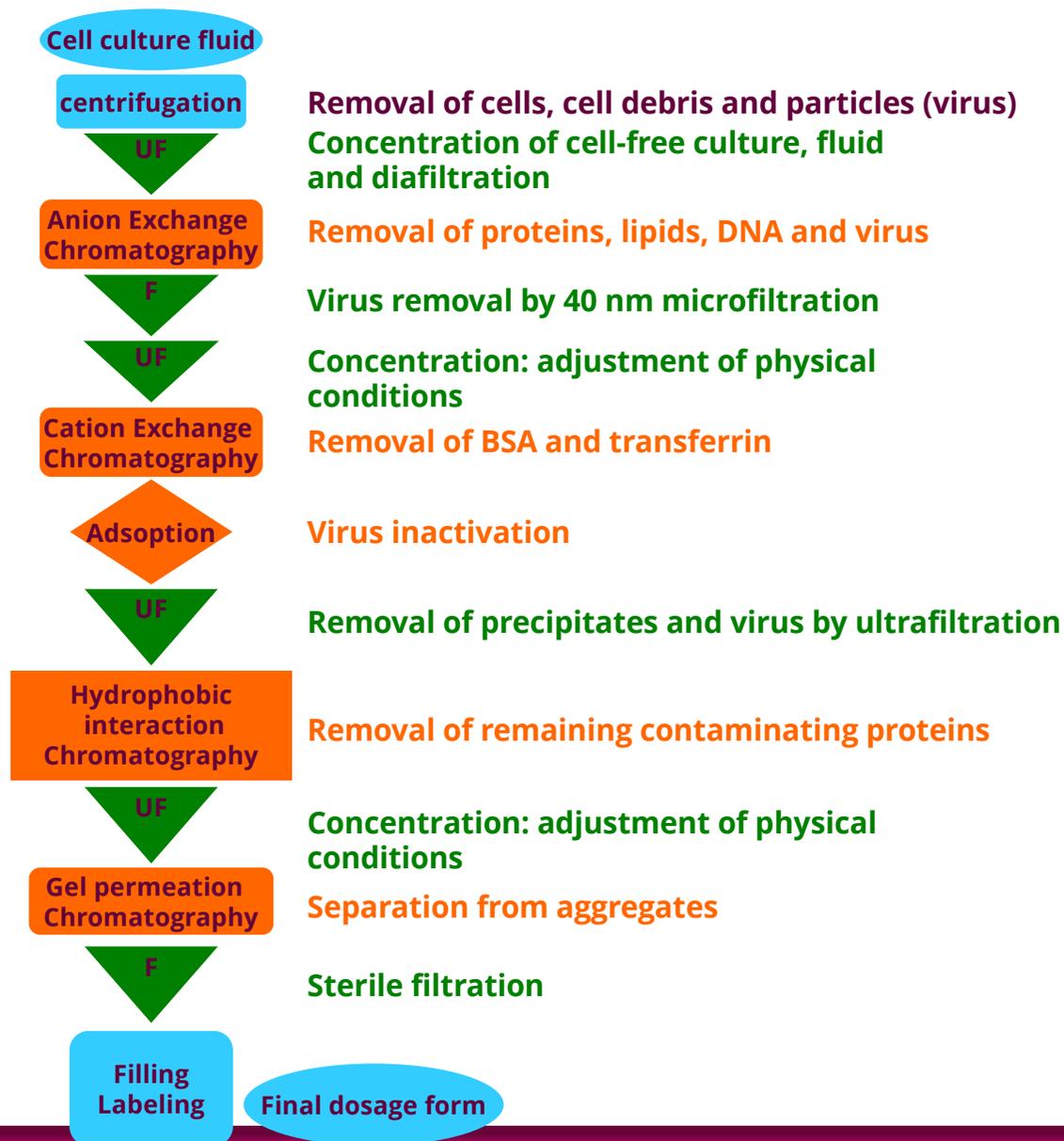


Schéma de purification de l'interferon recombinant

28 kDa, glycosylé

Le procédé de purification contribue à la sécurisation virale

Élimination des microorganismes et agents pyrogènes:

- ✓ Ultra filtration
- ✓ Filtration stérilisante,
- ✓ Etapes de chromatographie (échange anionique)

Le contrôle des protéines thérapeutiques: une batterie de tests pour valider le procédé de purification

Que contrôler?

▪ Identity / structure

- ✓ Primary structure (AA composition)
- ✓ Secondary structure
- ✓ Glycosylation analysis
- ✓ Physical parameters: Mol weight, isoelectric point...

▪ Purity:

- ✓ Host cell impurities (DNA, proteins, lipids...)
- ✓ Fabrication process impurities: leachates and extractables
- ✓ Product-related impurities: unfolded, truncated, aggregated, chemically degraded

▪ Potency(efficacy, activity):

- ✓ Target binding (affinity measurement)
- ✓ *In vitro* assays
- ✓ *In vivo* assays

▪ Security: Virus particles or genome

Endotoxin detection

Quand contrôler?



➤ Identité, pureté, activité: combinaison de plusieurs méthodes

Méthode	Taille	Charge	St I	St II/III	Pureté	Activité (Potency)
Spectrométrie de masse	+++	+	+++	-	+++	-
Dichroïsme circulaire	-	-	-	+++	+	-
RMN	+	-	+	+++	+	-
HPLC						
Exclusion	+++	-	-	+	++	-
Phase inverse	+	+	+++	+	+++	-
Echange d'ions	-	+++	++	-	++	-
SDS-PAGE	+++	-	++	+	++	-
Western-Blot	+++	-	+++	+++	+++	-
Isoélectro focalisation	-	+++	+	+++	+++	-
Receptor binding	-	-	++	+++	-	++
Bioassay	-	-	+++	+++	-	+++

Contrôle de l'Activité biologique

Les tests d'activité biologique doivent être **relevants de l'effet clinique de la molécule**

Spécificité

Dose-réponse

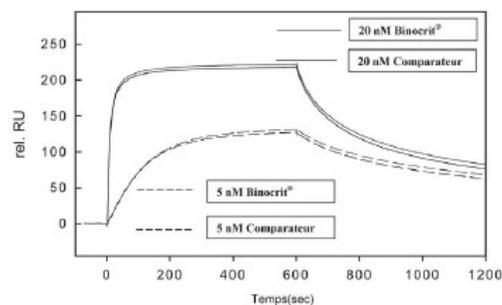
Comparaison à une référence (standardisation)

Les tests doivent être qualitatifs & quantitatifs, et se faire à des étapes-clé du procédé de production

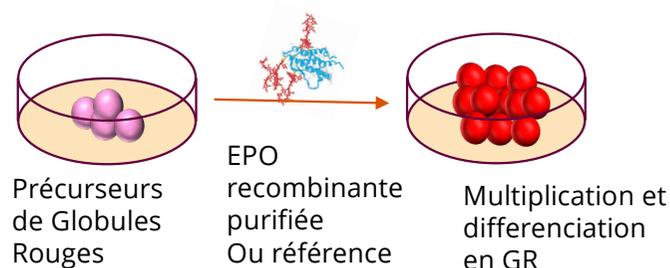
Exemple: activité biologique de l'EPO sur 3 niveaux de tests

✓ **Activité *in vitro*:**

Liaison au récepteur,
calcul d'affinité



✓ **Activité sur des cellules en culture**

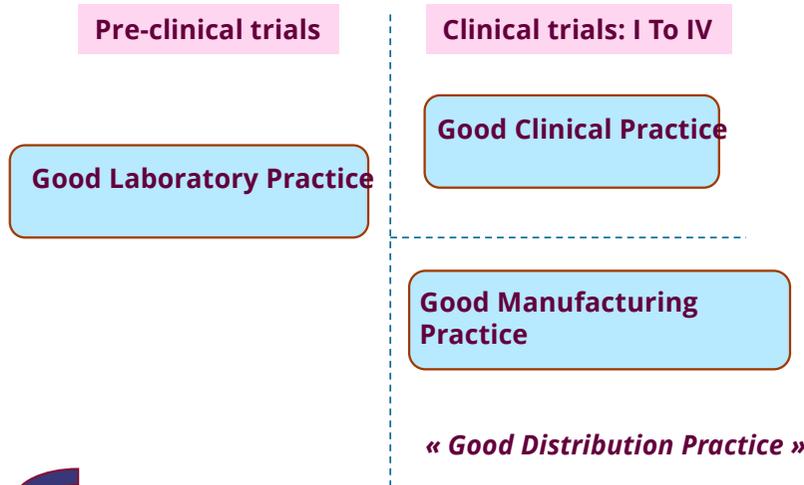


✓ **Activité *in vivo* sur modèle animal**



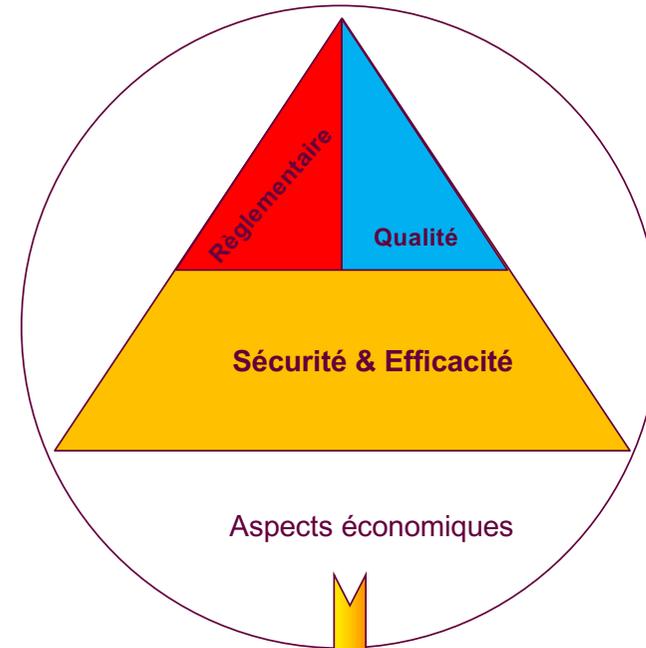
Conclusion

Les GxP



Garantie de fabrication et contrôle cohérents du produit selon des normes de qualité adaptée à son emploi

La production des biomédicaments est contrôlée par une réglementation adaptée au produits issus du vivant



Points critiques
Complexité du procédé
Contrôles qualité
Coûts
Temps

« DEVELOPING A PROCESS WITH THE END IN MIND »