

Les biomédicaments dérivés du plasma et de protéines thérapeutiques : enjeux et perspectives

Par **Herbert J. GUEDEGBE**,

Directeur général du LFB Biomanufacturing

Ludovic BURLLOT

Directeur du Développement Biopharmaceutique LFB

Et **Patrick DELAVault**

Vice-Président Exécutif, Affaires Scientifiques, Médicales & Réglementaire LFB

Membre de l'Académie nationale de pharmacie

Les médicaments biologiques dérivés du plasma et des protéines thérapeutiques sont une classe particulière de biomédicaments assez méconnue et ce, malgré des applications pour le traitement de maladies rares et souvent graves telles que les maladies génétiques, les cancers et les maladies inflammatoires. Les processus industriels de fabrication allant du fractionnement à la sécurisation biologique du plasma ainsi que de la production et la purification des protéines recombinantes sont décrits dans ce présent article. Bien que ces deux types de biomédicaments diffèrent principalement au niveau de leur source de production mais aussi des procédés en amont, les enjeux restent comparables et renvoient souvent à des questions de souveraineté sanitaire et de positionnement stratégique de la France dans un contexte de forte compétition autour du marché mondial du médicament biologique, marché en pleine croissance.

Introduction

Les biomédicaments ou médicaments biologiques regroupent les molécules et macromolécules thérapeutiques produites par le vivant, par opposition à celles produites par synthèse chimique. On retrouve des biomédicaments dans différentes classes de produits pharmaceutiques, comme les protéines dérivées du plasma, les vaccins, les protéines recombinantes, les hormones ou encore les anticorps monoclonaux. Les biomédicaments regroupent aussi les thérapies innovantes, comme la thérapie génique, la thérapie cellulaire et la thérapie tissulaire.

Les biomédicaments trouvent leurs applications thérapeutiques dans un vaste champ de pathologies, telles que les cancers, les maladies inflammatoires, les maladies auto-immunes, les maladies infectieuses, les maladies génétiques et hormonales. Ces biomédicaments s'inscrivent pour une bonne part dans le paradigme de la médecine personnalisée et des thérapies ciblées.

Le développement et la production de ces biomédicaments reposent sur un socle de bases scientifiques et de moyen de bioproduction bien spécifiques. Le propos

de notre article adopte délibérément le prisme des spécificités de production industrielle de ces médicaments, sans focalisation particulière sur les aspects, enjeux et perspectives technologiques déjà largement décrits dans la littérature.

La production des protéines dérivées du plasma

Jusque dans les années 1970, les protéines d'intérêt thérapeutique étaient extraites essentiellement de sources biologiques naturelles telles que le sang/plasma, le placenta, de tissus humains ou de tissus d'origine animale. L'émergence du génie génétique et des technologies de l'ADN recombinant vont permettre le développement de nouveaux procédés de production de protéines spécifiques d'intérêt thérapeutique. Ainsi, en 1980, l'insuline devient-elle la première protéine recombinante humaine produite par des bactéries génétiquement modifiées.

En 2023, malgré la recherche, le développement et la maturité industrielle de la production des biomédicaments, le fractionnement du plasma reste un

enjeu de santé publique primordial pour la mise à disposition envers les patients et les professionnels de santé de médicaments d'intérêt thérapeutique majeur (MITM) qui se définissent comme des « médicaments ou classes de médicaments pour lesquels une interruption de traitement est susceptible de mettre en jeu le pronostic vital des patients à court ou moyen terme, ou représente une perte de chance importante pour les patients au regard de la gravité ou du potentiel évolutif de la maladie ». À ce titre, ces biomédicaments figurent dans la liste des 450 médicaments dits « essentiels » éditée par le ministère de la Santé et de la Prévention pour prévenir les situations de ruptures et mieux prévenir/maîtriser les situations de tensions d'approvisionnement (Liste des médicaments essentiels – Juin 2023).

Ces biomédicaments comprennent une gamme large de facteurs de la coagulation⁽¹⁾ tels que le facteur VIII, le facteur IX, le facteur XI, le complexe prothrombique, le facteur Von Willebrand, ou le fibrinogène, les immunoglobulines polyvalentes et hyperimmunes comme l'anti-RhO, anti-hépatite B, antirabiques ou antitétaniques, des protéines inhibitrices de la sérine protéase comme l'alpha-1-antitrypsine ou le C1-inhibiteur, les inhibiteurs de la coagulation comme l'antithrombine, la protéine C et enfin l'albumine.

L'histoire du fractionnement plasmatique est intimement liée à l'histoire de la transfusion du sang qui débute en 1616 quand William Harvey, un médecin anglais jette les fondations de la compréhension de la physiologie de la circulation du sang. En 1667, Jean Baptiste Denis, médecin français de Louis XIV, sera le premier à injecter le sang d'un animal (mouton) à un jeune garçon atteint de fièvre. En 1818, James Blundell sera le premier à réaliser les premières transfusions de sang humain pour contrôler les hémorragies du *post-partum*. En 1901, l'Autrichien Karl Landsteiner met en évidence les différents groupes sanguins A, B et O. À partir de cette découverte, la transfusion sanguine va se développer rapidement. En 1914, Albert Hustin, médecin belge, découvrira les propriétés anticoagulantes du citrate de soude. Cette découverte permettra de dissocier le donneur du receveur pour mieux répondre aux besoins sur les champs de bataille de la première guerre mondiale.

Il faudra attendre 1940 pour parler de « fractionnement » du plasma. Edwin Cohn, biochimiste américain, mettra au point une technique de séparation des différentes protéines du plasma permettant la purification de l'albumine pour être utilisée sur le théâtre des

opérations lors de la deuxième guerre mondiale. Le procédé de séparation proposé par E. Cohn sera à partir de cette date optimisé, industrialisé et enrichi pour extraire de nouvelles protéines plasmatiques essentielles.

Aujourd'hui un nombre restreint d'entreprises pharmaceutiques comme CSL Limited, Grifols S.A., Kedrion S.p.A, LFB S. A., Octapharma AG, Takeda Pharmaceutical Company ont investi dans cette technologie pour produire industriellement ces protéines dérivées du plasma.

Les avancées technologiques et les améliorations dans ce domaine sont permanentes afin de répondre à six grands défis pour assurer la mise à dispositions de ces médicaments :

- la sécurité et la qualité : c'est une préoccupation majeure pour garantir l'absence de contaminants pouvant provenir du plasma ;
- la complexité du plasma : le plasma est une matrice biologique complexe contenant plus de 300 protéines à des concentrations très différentes. Isoler et purifier spécifiquement les protéines d'intérêt, tout en éliminant les autres composants indésirables, est un défi technique notable ;
- la stabilité de ces protéines : la plupart des protéines issues du plasma ont des structures primaire, secondaire et tertiaire extrêmement labiles qui nécessitent le développement de formulation et de forme pharmaceutique adaptées ;
- les coûts : à l'instar des produits biologiques recombinants, les coûts de production des produits dérivés du plasma représentent plus de 50 % du prix de cession de ces médicaments. Ces coûts sont induits par le prix associé à la collecte du plasma et des investissements industriels importants ;
- approvisionnement en plasma : l'approvisionnement en plasma est un défi permanent et la demande mondiale en médicaments dérivés du plasma est en augmentation constante d'environ 8 % par an ;
- évolution des normes réglementaires : les industriels doivent s'adapter aux évolutions réglementaires et mettre à jour leurs processus et leurs installations en conséquence.

La collecte du plasma

La première étape du procédé de fractionnement du plasma est la collecte du plasma. Le volume de plasma fractionné dans le monde est estimé à 61,8 millions de litres (MBR – Global Blood & Plasma - Collections and use 2021/2022). La collecte du plasma dans le monde se découpe principalement en trois régions, avec l'Amérique du Nord qui représente 63 % du volume collecté, l'Asie avec 21 % et l'Europe avec 15 % (MBR – Global Blood & Plasma - Collections and use 2021/2022). La proportion de la collecte en Europe diminue depuis 2010, ce qui rend l'Europe de plus en plus dépendante de l'Amérique du Nord.

La collecte du plasma est réalisée par deux processus :

- Le don de sang total, suite au don, pour lequel le plasma est séparé des autres constituants du sang par centrifugation. Ce don représente 13 % en moyenne de

⁽¹⁾ Les facteurs de coagulation sont des protéines du sang indispensables en cas de lésion vasculaire. Ils sont en libre circulation dans le sang et n'interviennent que lors de la réaction de coagulation qui est initiée par les plaquettes sanguines. La réaction de coagulation est complexe et met en œuvre différents facteurs en commençant par le facteur I (fibrinogène) qui initie la réaction. Parmi les plus importants, le facteur VIII qui se combine avec le facteur de Willebrand pour former une molécule complexe qui va activer le facteur X. Les facteurs VIII et IX sont particulièrement connus pour les maladies qu'ils provoquent en cas de déficit : respectivement l'hémophilie A et B.

la collecte du plasma pour le fractionnement mondial, mais notons qu'en Europe cette collecte représente 40 à 50 % des dons.

- Le don par plasmaphérèse, qui permet de ne collecter que le plasma du donneur. C'est un acte de durée plus longue, mais qui permet de collecter un volume de plasma par donneur plus important. Ce don représente 87 % de la collecte du plasma pour fractionnement dans le monde.

Ces dons sont réalisés dans des centres spécialisés et agréés. Ils peuvent être gérés soit par des organismes gouvernementaux et organisations sans but lucratif ou des entreprises privées. En fonction de cette organisation, le don de sang ou de plasma pourra être non rémunéré (dit « éthique »), ou compensé, ou rémunéré. Cette activité de collecte répond à des obligations réglementaires édictées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'agence européenne du médicament (EMA) et l'agence américaine du médicament (FDA).

L'enjeu auquel est confronté chacun des fractionneurs est de disposer d'une organisation de collecte adaptée à ses propres capacités de production et à la demande des patients en constante augmentation.

Afin d'assurer une sécurité maximale pour les patients traités par les médicaments dérivés du plasma, l'ensemble des centres de collecte de plasma appliquent des critères stricts pour sélectionner les donneurs de plasma (référence). Les dons collectés sont individuellement testés par méthodes immunoenzymatiques et d'amplification génomique afin d'écartier le risque d'utilisation d'un don porteur de marqueurs viraux.

Pour renforcer cette sécurité, les fractionneurs instaurent à réception de ces dons une « fenêtre » sérologique permettant le cas échéant la détection d'une infection non observée au moment du don. À la mise en œuvre du plasma à l'échelle industrielle, la recherche de marqueurs viraux sera aussi réalisée sur un prélèvement en amont du procédé (premier pool homogène après décongélation du plasma).

Les procédés de purification et la stratégie de sécurisation biologique – Du plasma au biomédicament

Le plasma est une matière première complexe contenant 90 % d'eau et 10 % de protéines. Plus de 300 protéines sont présentes dans le plasma à des proportions très différentes avec en majorité l'albumine (+ 60 %), les immunoglobulines polyvalentes (+ 20 %), le fibrinogène (+ 5 %) et d'autres protéines présentes en faible quantité comme le facteur von Willebrand (protéine nécessaire à l'hémostase primaire permettant l'adhésion des plaquettes au vaisseau lésé et au transport du facteur VIII) représentant moins de 0,02 % des protéines plasmatiques.

Les procédés de purification doivent être dimensionnés en fonction de la quantité de protéines à purifier : soit plusieurs centaines de kilogrammes par exemple pour l'albumine ou seulement quelques grammes pour le facteur von Willebrand.

Les procédés du fractionnement du plasma reposent toujours sur les principes développés par Edwin Cohn. Cette méthode sépare les différentes protéines en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques, c'est-à-dire de leur solubilité à température négative avec des concentrations en éthanol variables, de leur point isoélectrique, de leur masse, de leur hydrophobicité.

Les dons conservés congelés, soit en poches, soit en bouteilles, sont « poolés » dans un fondoir (taille de lot de 3 000 L à 9 000 L représentant plusieurs dizaines de milliers de dons) puis décongelées à température négative (de l'ordre - 5°C) afin de séparer par centrifugation continue les protéines solubles des protéines cryoprécipitables :

- le cryosurnageant (la partie liquide) contient majoritairement sans être exhaustif l'albumine, les immunoglobulines polyvalentes et spécifiques, le fibrinogène, l'alpha-1 antitrypsine, les facteurs de la coagulation FIX et FXI, l'antithrombine et la protéine C ;
- le cryoprécipité contient le fibrinogène, le Facteur VIII et le facteur von Willebrand. Après remise en solution du cryoprécipité, un procédé spécifique pour chacune de ces protéines sera réalisé.

Comme présenté en Figure 1 (page suivante), après l'étape de cryoprécipitation, chaque industriel va mettre en œuvre un processus de fabrication qui vise, pour chaque décongélation d'un *pool* de plasma, à purifier *a minima* 2 ou 3 protéines différentes pour optimiser la production industrielle, mais aussi valoriser au maximum l'utilisation de ces dons pour des raisons éthiques.

Les technologies mises en œuvre pour ces procédés sont largement utilisées dans la bioproduction :

- Les étapes de précipitation utilisées pour extraire des protéines d'intérêt thérapeutique, ou au contraire indésirables. Ces protéines sont précipitées selon leurs caractéristiques physico-chimiques en présence de conditions particulières avec un solvant, un sel, une modification de pH dans des conditions de températures précises.
- La chromatographie liquide est une technique séparative qui consiste à faire migrer les protéines ou impurétés à séparer sur une phase stationnaire immobile, à l'aide d'une phase mobile. Les phases stationnaires appelées gels/résines de chromatographie peuvent être de natures différentes (échange d'ions, affinité, interaction hydrophobe, échange par la taille).
- Différents modes de filtration et diafiltration afin d'éliminer ou retenir un précipité, de réduire la charge microbienne, de changer l'environnement de la protéine pour les étapes de purification ou leur formulation.

Malgré toutes les précautions prises lors de la collecte des dons, les industriels ont une obligation d'introduire dans leurs procédés de purification *a minima* deux étapes orthogonales (orthogonale = mode de fonctionnement différent) dédiées à l'élimination ou à l'inactivation des virus.

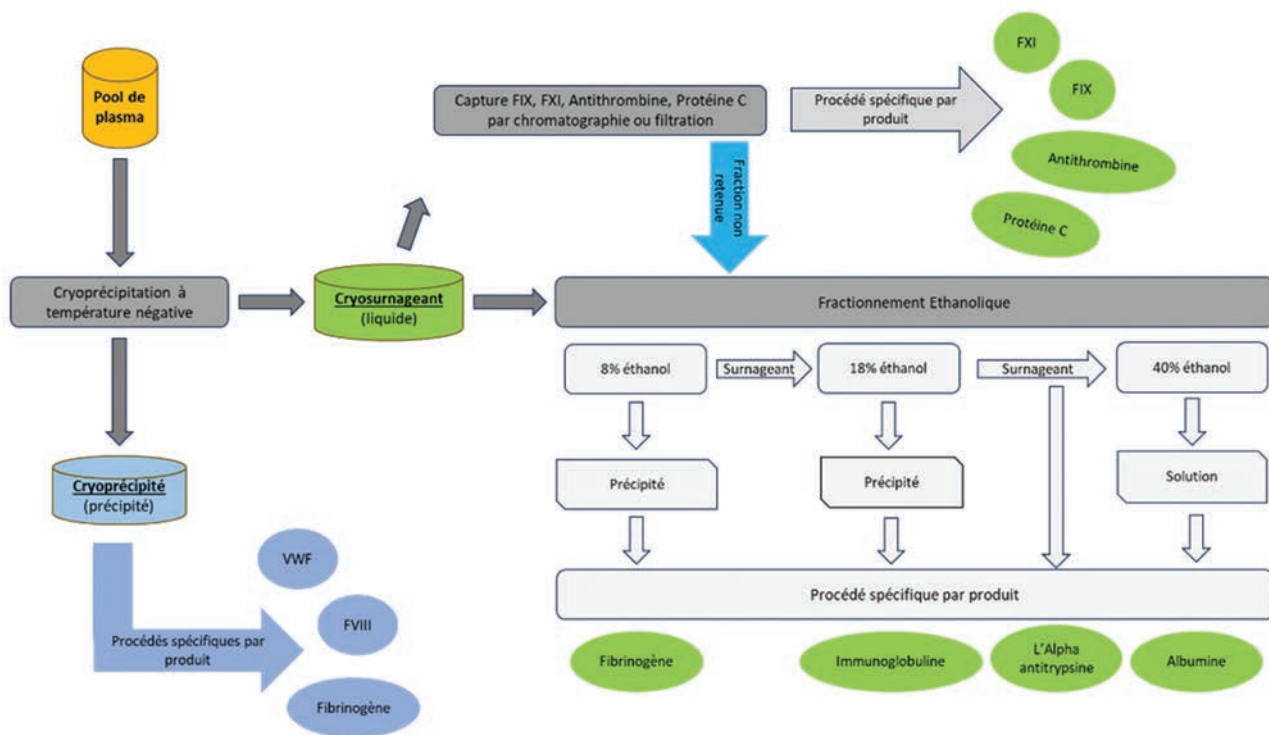


Figure 1 : L'arbre de fractionnement.

Les étapes d'élimination et d'inactivation sont classées en quatre grandes familles :

- le traitement solvant/détergent (inactivation) permettant de détruire l'enveloppe lipidique des virus enveloppés comme le virus HIV ;
- le traitement pH acide (inactivation) est aussi une étape spécifique pour les virus enveloppés ;
- les traitements thermiques (inactivation) sont réalisés, soit en solution (pasteurisation), soit sous forme lyophilisée (chauffage à sec) ;
- la nanofiltration (élimination) est une technique de filtration permettant de retenir les virus spécifiquement par exclusion de taille. Pour les produits plasmatiques, les seuils de coupure de ces filtres utilisés vont de 15 à 35 nm, seuils qui devront être adaptés à la structure tridimensionnelle des protéines cibles.

En complément de ces étapes dédiées et dans la continuité de ce même objectif de maîtriser le risque viral, certaines étapes du procédé comme les étapes de précipitation, les étapes de chromatographie vont contribuer à renforcer la sécurité des médicaments, soit par des phénomènes de partitionnement (lors des étapes de précipitation), soit par des phénomènes d'adsorption.

Une très grande majorité de ces molécules est labile en solution. Afin de pouvoir assurer la mise à disposition de ces produits aux hôpitaux et permettre des périodes de conservation suffisantes (2 ans), ces produits vont être lyophilisés (processus de séchage à basse température permettant de retirer l'eau contenue dans les molécules les rendant ainsi plus stables). L'utilisation de la lyophilisation nécessite pour chacune de ces protéines le développement de formulations spécifiques permettant de conserver leur intégrité physiologique et leur potentiel thérapeutique.

Les perspectives technologiques à venir pour optimiser les procédés

L'utilisation en Europe et en France de ces médicaments dérivés du plasma est en constante augmentation et des tensions importantes d'approvisionnement sont ainsi observées régulièrement dans les hôpitaux. Ces difficultés sont liées à la difficulté d'augmenter le nombre de dons collectés et/ou à des raisons industrielles liées à la complexité de ces procédés. L'un des objectifs majeurs est donc de développer de nouveaux procédés plus robustes, tout en améliorant significativement les rendements de purification de ces protéines.

Une nouvelle stratégie de fractionnement du plasma doit donc être développée, forte des avancées technologiques réalisées ces dernières années par les équipementiers ou fabricants de matières premières. Une des voies principales aujourd'hui envisagée est de remplacer l'étape de cryoprécipitation par une décongélation à température positive du plasma. Une fois le plasma décongelé, de nouveaux systèmes de captures spécifiques pourront être mis en place :

- la chromatographie par le développement de nouveaux gels de chromatographie d'affinité, couplé à de nouveaux systèmes de pilotage comme la technologie multi-colonne ;
- la séparation de protéines par un champs électrique à travers une membrane de porosité définie permettant de capturer par sa charge et sa taille la protéine d'intérêt.

Ces modifications de procédés doivent être accompagnées d'une stratégie d'enregistrement réglementaire bien établie. En effet ces modifications importantes peuvent nécessiter des études cliniques additionnelles pour leur enregistrement ce qui induit des délais

supplémentaires pour leur mise en place et des surcoûts importants. Ces stratégies d'implémentation devront être en amont validées avec les autorités de santé en vue de leur enregistrement réglementaire.

La production des protéines recombinantes

Les biotechnologies permettent d'utiliser le vivant, afin de produire des biomédicaments capables de traiter

un vaste registre de pathologies. Les anticorps monoclonaux et les protéines thérapeutiques constituent l'une des catégories de principes actifs produites par cette voie :

- les anticorps monoclonaux (Acm) sont des immunoglobulines (Ig) ayant une séquence spécifique d'acides aminés qui leur permet d'interagir spécifiquement avec un motif (épitope) donné, présent sur un ou une famille d'antigènes (Ag) ;
- les protéines thérapeutiques incluent : les anticorps thérapeutiques, les facteurs de croissance, les hormones, les cytokines, les protéines de fusion, les facteurs plasmatiques et les enzymes.

Une analyse récente faite par Walsh et Walsh (2022), montre que les biomédicaments ont connu un essor spectaculaire avec 197 biomédicaments approuvés aux États-Unis et en Europe au cours de la période allant de janvier 2018 à juin 2022, augmentant le nombre cumulé de biomédicaments enregistrés dans ces deux régions du monde à plus de 540. Cette augmentation des approbations réglementaires, tendance observée depuis 2015, reflète la confiance croissante des autorités de santé envers les plateformes de production de ces biomédicaments, couplée à la maîtrise des processus de fabrication par les industriels. Les anticorps monoclonaux représentent environ 20 % du marché global de l'industrie pharmaceutique et déjà en 2019, 7 des 10 biomédicaments les

plus vendus dans le monde étaient à base d'anticorps monoclonaux (voir la Figure 2). Ces derniers restent toujours largement dominants dans les approbations réglementaires de produits biopharmaceutiques (Walsh et Walsh, 2022).

L'aire thérapeutique majeure ciblée par les Acm reste largement l'oncologie suivie par les maladies inflammatoires. L'intérêt pour l'oncologie reflète la transformation médicale et thérapeutique qui s'opère avec l'émergence de la médecine dite 'personnalisée', plus ciblée et de la démarche théranostique qui s'appuie sur les progrès réalisés dans l'identification des mécanismes moléculaires impliqués dans les différents types de tumeurs.

Les systèmes d'expression et de production

Bien que différents systèmes d'expression et de production soient utilisés pour produire ces protéines thérapeutiques, nous nous focaliserons davantage sur les systèmes d'expression bactériens, cellules de mammifères et des animaux transgéniques.

Chaque système hôte possédant ses avantages et ses limitations, l'un des éléments importants de la sélection d'un système d'expression tient principalement aux propriétés intrinsèques de la protéine thérapeutique à exprimer et à la capacité qu'a le système d'expression de permettre des modifications post-traductionnelles (MPT - modification biochimique qui intervient sur un ou plusieurs acides aminés de la protéine après que la protéine a été traduite par un ribosome), telles que la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation, la glycosylation ou la formation de ponts disulfures. Ces MPTs pouvant être structurales, chimiques ou fonctionnelles, ont notamment pour propriétés de conférer l'activité biologique des protéines, d'augmenter leur stabilité, de faciliter leur ancrage sur une membrane ou favoriser leur reconnaissance par d'autres molécules cibles.

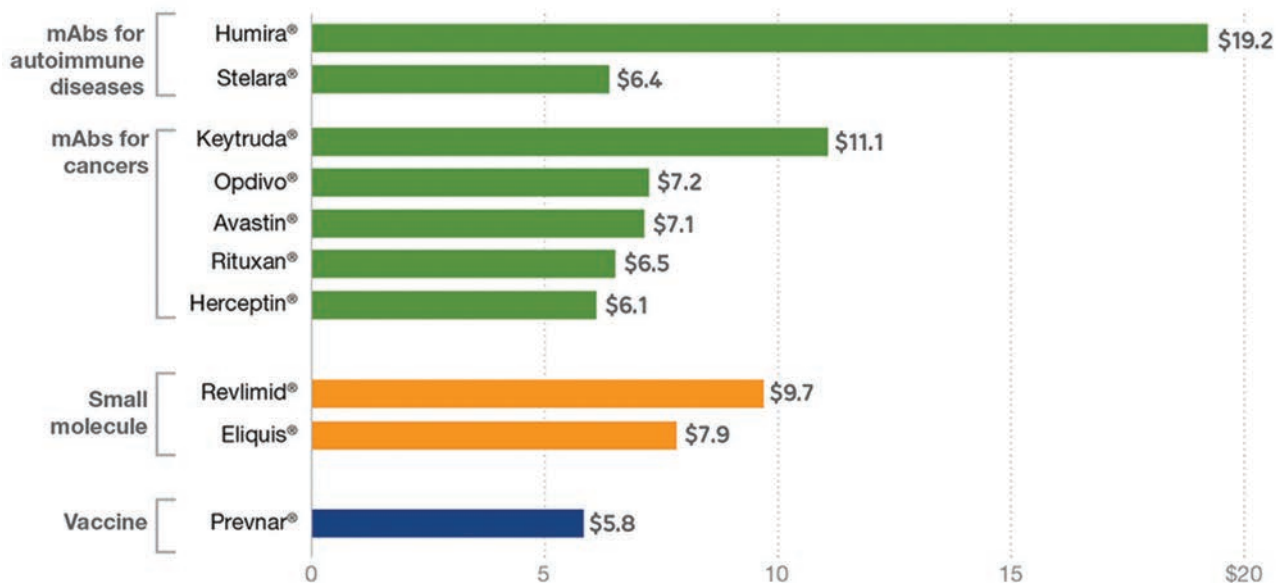


Figure 2 : 10 biomédicaments les plus vendus en 2019 (en milliards de dollars US), tiré de Urquhart (2021).

Les bactéries

Les bactéries sont des systèmes d'expression très utilisés pour la production de protéines thérapeutiques. L'insuline, la première protéine recombinante a d'ailleurs été produite à partir de la bactérie *E. coli*. Les bactéries les plus utilisées dans la bioproduction de protéines recombinantes sont *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas fluorescens*.

Les systèmes d'expression bactériens et plus globalement les cellules procaryotes, lorsqu'elles sont utilisées comme cellules hôtes, permettent une production simple et rapide avec de très bons rendements ainsi qu'un faible coût de production. En revanche, la protéine ne subit pas de modifications post-traductionnelles car les bactéries ne possèdent classiquement pas cette fonction. Cela constitue la principale limitation des bactéries comme cellule-hôte et la raison pour laquelle seule de petites protéines sans modifications post-traductionnelles sont produites *via* les systèmes d'expression bactériens, nécessitant parfois l'ajout d'étape de réaction chimique pour par exemple créer les ponts disulfure (exemple de l'insuline).

D'autre part, les bactéries produisant essentiellement les protéines recombinantes dans leur cytoplasme, une lyse cellulaire est de ce fait nécessaire afin d'extraire la protéine d'intérêt.

Les cellules de mammifères

À la différence des systèmes bactériens, les cellules de mammifères sont davantage utilisées comme cellules hôtes pour exprimer des protéines (plus) complexes. Les cellules de mammifères ont l'avantage de produire des protéines de grande taille avec des MPTs représentatives de celles associées aux protéines humaines tout en s'affranchissant de l'étape de lyse cellulaire. Les coûts de production à partir de cellules de mammifères

sont très élevés, mais néanmoins restent acceptables au regard de la valeur ajoutée des biomédicaments qui en découlent.

Les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary), BHK (Baby Hamster Kidney), NS0 (mouse myeloma cells) et HEK (human embryonal kidney) sont les plus utilisées dans la bioproduction de protéines recombinantes avec une large prédominance pour les cellules CHO du fait de leur capacité à produire des protéines ayant un profil de glycosylation complexe ainsi que les hauts rendements de production obtenus en comparaison avec les autres systèmes d'expression. Le choix et la sélection du/des clones sont primordiaux ici, afin d'obtenir les meilleurs rendements, la meilleure stabilité structurale garantissant une meilleure fonctionnalité de la protéine d'intérêt.

Toutefois, les cellules CHO ne sont pas capables de produire tous les types de glycosylation humaine. Ainsi, les lignées CHO ayant par exemple une capacité limitée de γ -carboxylation, les cellules BHK leur sont préférées pour la production de facteurs de coagulation dont la γ -carboxylation est essentielle pour leur activité biologique – cas du Facteur VIIa recombinant (eptacog alpha).

Les animaux transgéniques

Les animaux transgéniques permettent la production de protéines difficiles à exprimer sur un modèle cellulaire avec des modifications post-traductionnelles similaires à celles des protéines humaines, et ce, avec un coût de production moins élevé que celui lié à l'utilisation des lignées cellulaires.

La difficulté principale liée à l'utilisation d'animaux transgéniques est la transmission possible de pathogènes couplée à des procédés de production plus complexes. Les glandes mammaires sont le système

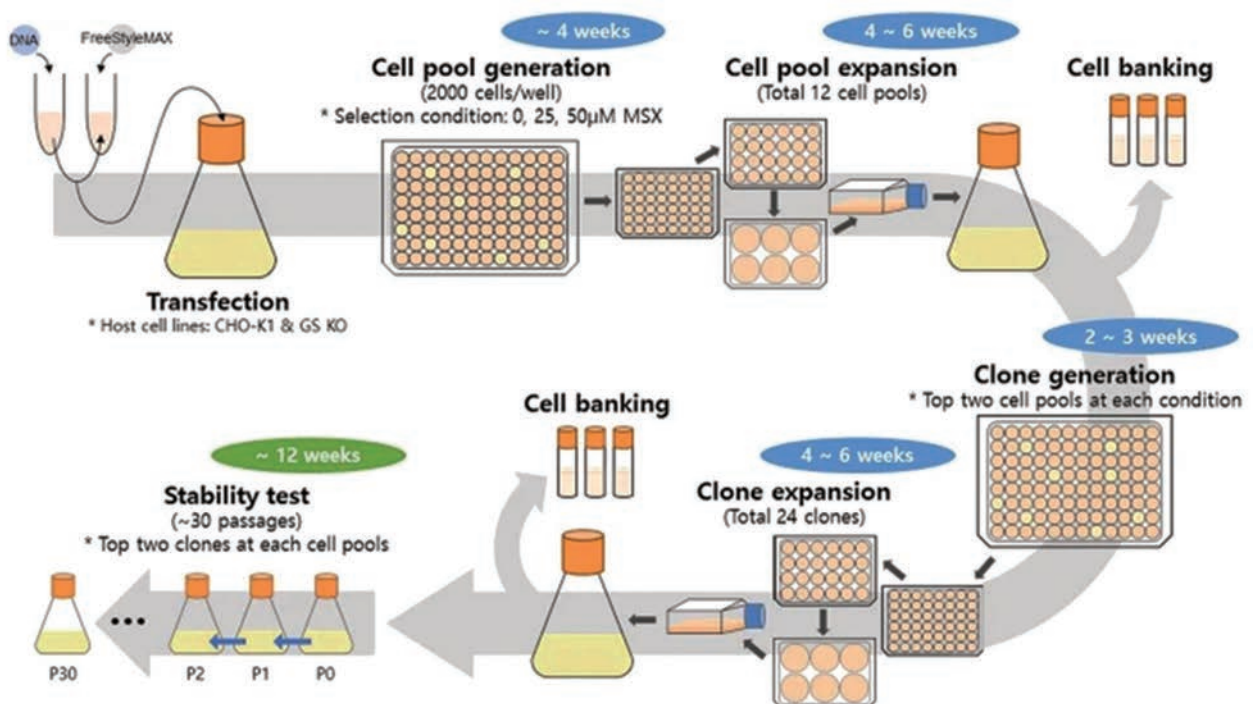


Figure 3 : Flux standard du gène à la quantification du système de banques cellulaires (d'après Noh *et al.*, 2018).

d'expression privilégié compte tenu à la fois de l'aspect pratique (collecte de lait plus facile et plus fréquente) et des effets potentiels moindres de la protéine exprimée sur l'animal en comparaison du sang par exemple.

De ce fait, les glandes mammaires de lapines et/ou chèvres sont le système d'expression transgénique privilégié dans le cadre de la production de produits thérapeutiques humains et trois médicaments utilisant ce système d'expression ont été approuvés à date incluant le nouveau Facteur VIIa (Eptacog beta activé) produit par le LFB dans les glandes mammaires de lapines transgéniques. Le principe actif de Cevenfacta®, l'eptacog beta, est produit à partir de lait de lapines par la technologie de l'ADN recombinant, puis après récolte, le "bulk harvest" subit une étape de clarification (séparation des cellules et des déchets). L'intermédiaire de production ainsi formé est ensuite inactivé et purifié par nanofiltration et différentes étapes de chromatographie afin d'avoir le moins d'impuretés possible avant que la "drug substance" résultante ne soit filtrée puis lyophilisée. L'eptacog beta est presque identique à la protéine humaine facteur VII de la coagulation et fonctionne de la même manière. Le facteur VII est impliqué dans la coagulation du sang en activant un autre facteur de coagulation (facteur X), qui déclenche alors une série d'étapes pour former un caillot sanguin au site du saignement.

Les deux autres biomédicaments approuvés et produits à partir du lait d'animaux transgéniques sont l'antithrombine III humaine recombinante (Atryn®) produite à partir du lait de chèvres transgéniques et un inhibiteur de la C1 estérase humaine recombinante (Ruconest®) obtenu à partir de lait de lapines transgéniques (Shepelev *et al.*, 2018).

Malgré la diversité des systèmes d'expression, l'utilisation des cellules de mammifères continue d'être dominante avec près de 67 % des produits

recombinants approuvés (incluant à la fois les approbations de nouveaux principes actifs et de nouvelles indications pour des principes actifs déjà existants), représentant ainsi 85 % des nouveaux principes actifs approuvés au cours de ces dernières années (Walsh et Walsh, 2022). Plus spécifiquement, les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO) restent le système mammifère le plus fréquemment utilisé (89 % du total des produits issus des cellules de mammifères) pour les raisons mentionnées précédemment.

Au niveau des systèmes d'expression non-mammifères incluant eucaryotes et procaryotes, la bactérie *Escherichia coli* continue de dominer avec 36 produits approuvés depuis 2018 suivie dans une moindre mesure des levures *Pichia pastoris* et *Saccharomyces cerevisiae* avec respectivement 5 et 4 produits mis sur le marché pendant la même période.

Concernant les plateformes de production transgéniques, un unique nouveau produit approuvé au cours des quatre dernières années en Europe et aux États-Unis, le facteur VII activé recombinant (Eptacog beta) produit par le LFB dans le lait de lapines transgéniques.

La fabrication des protéines thérapeutiques

Une fois que le système d'expression est choisi et les banques cellulaires obtenues, le procédé de fabrication des protéines thérapeutiques est développé en conséquence.

Le procédé de fabrication d'un anticorps monoclonal est développé en fonction de paramètres clés notamment les caractéristiques structurales de la molécule (taille, complexité, importance des MPTs) et les volumes à produire en vue des applications thérapeutiques ciblées (Bourel et Teillaud, 2006).

La banque cellulaire de travail (*working cell bank*),

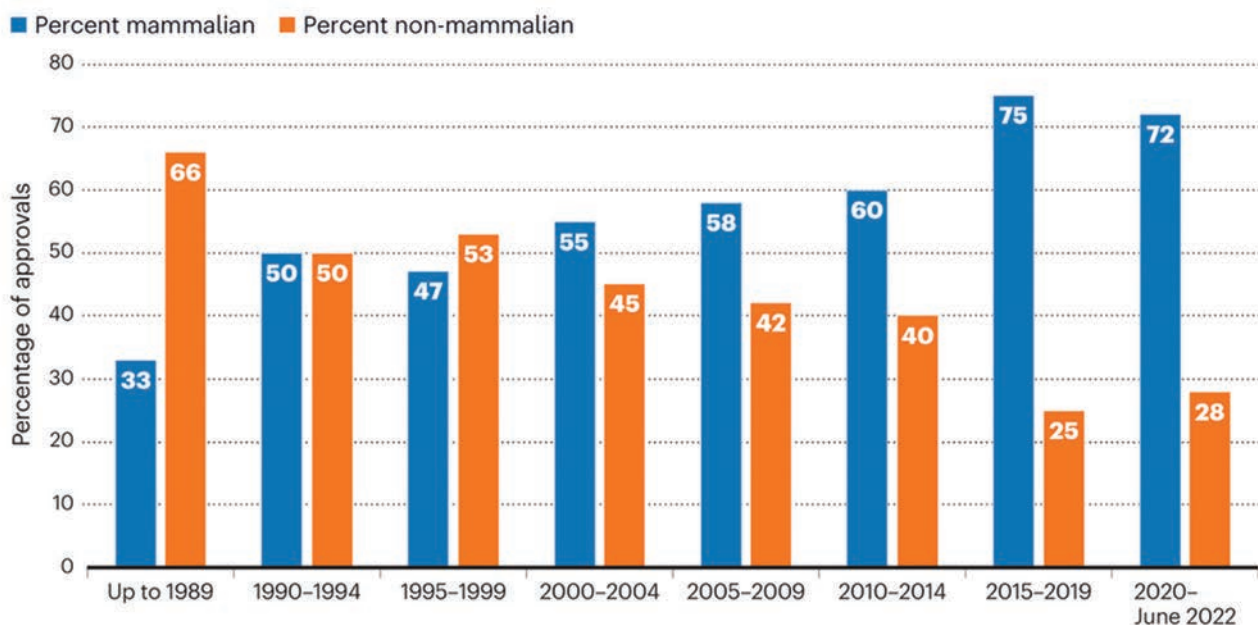


Figure 4 : Utilisation relative des systèmes d'expression de cellules de mammifères par rapport à des plateformes non-mammifères dans la fabrication de produits biopharmaceutiques, d'après Walsh & Walsh (2022).

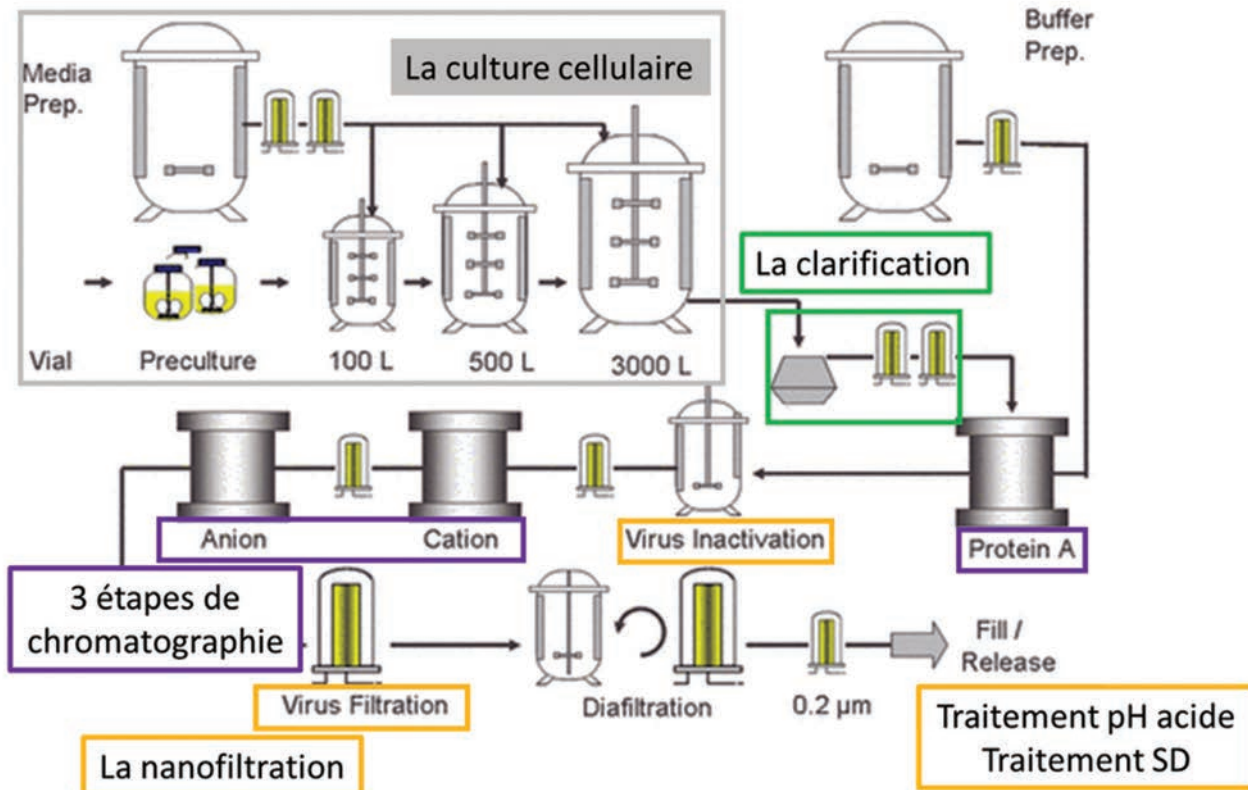


Figure 5 : Procédé standard de fabrication d'un anticorps monoclonal.

elle-même obtenue à partir d'une banque cellulaire mère (*master cell bank*), est utilisée pour initier la phase de culture cellulaire encore appelée *upstream* (procédé amont). Celle-ci consiste en une phase initiale de pré-culture permettant d'amplifier les cellules avant de les inoculer dans des bioréacteurs de taille croissante où la protéine d'intérêt sera produite. Pendant la culture cellulaire, un ou plusieurs nutriments sont fournis au bioréacteur et ceux-ci constituent le milieu de culture dans lequel le produit cellulaire restera jusqu'au moment de sa récolte – on parle de culture cellulaire en « mode *fed-batch* » par opposition à la culture cellulaire en « mode continu » où une quantité de substrat est fréquemment ajoutée aux bioréacteurs et un volume cellulaire équivalent est récolté.

Une fois le produit cellulaire récolté (appelé "bulk harvest"), la première étape de la purification (phase "downstream" ou procédé aval) consiste à « clarifier » ce produit cellulaire par centrifugation afin de séparer la protéine d'intérêt des cellules et des débris cellulaires. Ensuite, le surnageant de culture est concentré et cette étape est généralement suivie d'une chromatographie d'affinité utilisant de la protéine A, afin de capturer les anticorps d'intérêt (en majorité des IgG). Plusieurs autres étapes de chromatographie (*a minima* 3 étapes dans l'ensemble du process) et une diafiltration sont ajoutées au procédé, permettant d'éliminer l'ADN résiduel et les HCP (Host Cell Proteins) qui sont les protéines de la lignée productrice contaminantes – l'objectif étant d'obtenir des anticorps avec un taux de pureté élevé.

Tout comme pour les procédés de fabrication des médicaments dérivés du plasma, un traitement solvant-détergent/pH acide et une étape de nanofiltration assurent une sécurité biologique maximale en permettant respectivement une inactivation de virus enveloppés potentiellement présents, ainsi qu'une élimination des particules virales. L'étape de purification se termine classiquement par une filtration 0,2 µm et les anticorps thérapeutiques sont conditionnés généralement sous forme liquide.

Pour la production de biomolécules issues de la transgénèse animale seul un procédé de purification sera établi afin d'assurer une sécurisation biologique acceptable du biomédicament et d'atteindre un très haut niveau de pureté pour limiter au maximum le risque d'immunogénicité (allergies) lié aux protéines du lait de l'animal hôte.

Enjeux et perspectives

Les biomédicaments représentent une catégorie très vaste de médicaments qui tiennent une place majeure dans l'arsenal thérapeutique sur un large spectre de pathologies et leur proportion ne cesse d'augmenter. On estime ainsi qu'environ 8 000 biomédicaments sont actuellement en développement clinique avec près de 30 % d'anticorps monoclonaux et 10 % de ces biomédicaments déjà en phase 3 d'évaluation clinique. D'ici 2024, la majorité des nouveaux médicaments approuvés et mis sur le marché devraient être des biomédicaments. Toutefois, la France continue d'accuser un net

retard en production et développement de biomédicaments et importe de ce fait 95 % des biomédicaments utilisés en France. À titre d'exemple, en 2020, seulement 5 biomédicaments ont été produits en France contre 21 en Allemagne et 12 en Italie, sur les 76 autorisés et commercialisés en Europe. À ceci, s'ajoutent les coûts de productions des biomédicaments qui restent très élevés en France ainsi que les capacités de production disponibles qui sont insuffisantes. Ces différents facteurs posent bien évidemment des défis à la fois pour notre système de soin, notre économie compte tenu du marché mondial (320 milliards d'euros d'ici à 2025) et plus globalement de notre souveraineté sanitaire, car nous restons de ce fait fortement dépendants des importations.

Pour ce qui concerne les biomédicaments issus du plasma, nous insisterons sur deux enjeux majeurs. Le premier est notre capacité à collecter le plasma. Comme nous l'avons vu en 2021, 62 millions de litres de plasma ont été collectés à l'échelle mondiale pour le fractionnement plasmatique. La collecte en Amérique du Nord a représenté 63 % de la collecte globale, totalisant 39 millions de litres de plasma. En Europe, seulement 9 millions de litres ont été collectés, représentant 14 % de la collecte globale. Il est important de noter que ces chiffres pour l'Europe sont sur le déclin depuis 2010, avec 23 % de la collecte globale en 2010 et seulement 14 % en 2021. **Dans ce contexte, la France dépend à 65 % du plasma collecté aux États-Unis ce qui crée une situation de grande vulnérabilité en matière de source de plasma pour fractionnement et pose un enjeu majeur de santé publique et de souveraineté sanitaire.**

À l'échelle européenne, des initiatives nationales ont été mises en place dans certains pays visant à renforcer la collecte de plasma. Une nouvelle législation pour améliorer la sécurité et la qualité du sang, des tissus et des cellules (substances d'origine humaine, règlement « SoHo ») devrait prochainement entrer en vigueur. La France a la chance extraordinaire de disposer, avec l'EFS et le LFB, d'une filière qu'il faut défendre et développer. C'est un véritable atout, en termes de sécurité et de souveraineté sanitaire. Ces deux structures doivent développer des solutions organisationnelles et technologiques pour couvrir au moins 50 % des besoins en produits plasmatiques en France. Au-delà des questions de souveraineté nationale, la France doit aussi développer son *leadership* global en matière de produits plasmatiques au regard du marché mondial en pleine croissance en lien avec les améliorations croissantes de diagnostic et traitement de maladies rares. Dans ce cadre, le LFB construit actuellement une cinquième usine de bioproduction à Arras (Pas-de-Calais) lui permettant de tripler sa capacité de fractionnement du plasma. Ce projet d'une ampleur inédite en France (projet industriel pharmaceutique le plus important de ces dernières années) a permis au LFB, *via* l'État actionnaire, d'investir à ce jour plus de 700 millions d'euros, témoignant de l'importance cruciale que représente la collecte du sang dans le contexte actuel où plusieurs industriels européens annoncent des investissements d'envergure calqués sur le modèle français – exemple de CSL qui en mars

2023 a annoncé un investissement de 470 millions de dollars américains pour quadrupler ses capacités de fractionnement à Marburg en Allemagne quelques mois après une annonce similaire faite en Australie. En Asie, c'est aussi le cas de Takeda qui toujours en mars 2023, a annoncé le plus gros investissement de son histoire dans une usine de production de l'archipel japonais, avec un investissement de 100 milliards de yens (700 millions d'euros) dans une usine de production de thérapies dérivés du plasma à Osaka, au Japon.

Disposer de volumes de plasma suffisants ainsi que des capacités de fractionnement adéquates apparaissent donc comme des enjeux internationaux hautement stratégiques. En France, la mission d'inspection conjointe de l'Inspection Générale des Affaires Sociales (IGAS) et de l'Inspection Générale des Finances (IGF) récemment terminée et portant sur le modèle économique de l'EFS et de la filière sang et plasma, a fait des recommandations aux pouvoirs publics sur l'évolution de la filière française.

Au niveau du développement et la production de protéines thérapeutiques, les pouvoirs publics au plus haut niveau de l'État ont défini avec France 2030, et spécifiquement avec le plan Innovation Santé, une trajectoire ambitieuse dotée de moyens significatifs (mobilisation de 800 M€ de financement public sur la seule thématique bioproduction de thérapies innovantes) visant à faire produire en France 20 biomédicaments à l'horizon 2030. L' AIS (Agence pour l'innovation en Santé) nouvellement créée et chargée d'orchestrer le plan innovation santé 2030 ainsi que France Biolead qui vise à structurer les divers acteurs de la filière du biomédicament, seront de précieux atouts dans la réalisation de cette ambition et dans l'atteinte de cet objectif.

Post pandémie, le paysage français de la bioproduction est en pleine mutation et avec lui, les attentes des principaux acteurs de la *healthtech* française (biotech, *start-up*, PME, mid-size CDMO et big pharma) se font plus précises (Medicen, remontées terrain avril 2023). Les principaux besoins concernent la lisibilité du paysage français, des besoins de financement (levées de fonds, subventions, investissements publics, fonds d'amorçage et fonds dédiés santé), la réduction des démarches administratives et réglementaires, le maintien de procédures simplifiées mises en place pendant la pandémie, la création de conditions favorables pour l'implémentation de CDMO sur le territoire français, l'adéquation des parcours de formation en lien avec l'expertise scientifique et académique disponible, une plus grande implication des pôles de compétitivité et également la sélection d'axes prioritaires pour supporter cette ambition gouvernementale.

L'accent sera mis dans les prochaines années sur les biotechnologies en oncologie, la thérapie génique et cellulaire, les nouveaux systèmes d'expression mais aussi le développement d'unités de production plus performantes. **Il est crucial dans ce contexte d'intégrer la tendance actuelle au niveau des conjugués anticorps-médicaments (*Antibody Drug Conjugate* ou ADC en anglais) qui représentent le futur des médicaments à base d'anticorps thérapeutiques et dont le**

marché ne cesse de croître, passant de 3,5 milliards de dollars en 2020 à environ 13,1 milliards de dollars en 2030. Les ADC sont des molécules complexes combinant les capacités de ciblage des anticorps monoclonaux et la capacité de destruction des cellules cancéreuses des médicaments cytotoxiques. Toutefois, aucune entreprise française n'est aujourd'hui considérée à la pointe de cette technologie de production de bioconjugués et les capacités de production en propre ou par tiers d'un ou de plusieurs des composants des ADC sont limitées sur le territoire. Sur ces différents aspects, la France pourra néanmoins compter sur le LFB qui *via* le LFB Biomanufacturing, sa filiale CDMO (*Contract Development and Manufacturing organization*) et récente lauréate de l'Appel à projet Industrialisation et Capacités Santé 2030, qui doublera ses capacités industrielles de production de protéines thérapeutiques à l'horizon 2025, afin d'éviter que les acteurs nationaux continuent de produire à l'étranger leurs biomédicaments innovants dû au faible nombre de CDMO et de producteurs de lots commerciaux en France.

Références

- BERTOLINI J., GOSS N. & CURLIN J. (2012), *Production of plasma proteins for therapeutic use*, Editor John Wiley & Sons, Hoboken, N.J., 512 pages.
- BOUREL D. & TEILLAUD J.-L. (2006), « Anticorps monoclonaux : tours et détours technologiques pour de nouveaux espoirs thérapeutiques [Monoclonal antibodies: technology around the clock for new therapeutic hopes] », *C R Biol.*, 329(4), pp. 217-227, French doi:10.1016/j.crv.2006.02.006, Epub 2006 Mar 29, PMID: 16644492; PMCID: PMC7105179.
- BOURGOIN-VOILLARD S., RACHIDI W. & SEVE M. (2015), *Les biotechnologies en santé, tome I : Introduction aux biotechnologies en santé*, Lavoisier.
- CODE DE LA SANTÉ PUBLIQUE, Article L5121-1, vol. L5121-1.
- EUROPEAN MEDECINES AGENCY (2010), "Guideline on plasma-derived medicinal products", EMA/CHMP/BWP/706271/2010.
- MARKETING RESEARCH BUREAU (2021), "Global blood & plasma - Collections and use", MRB 2021/2022.
- MEDICEN PARIS REGION (2023), « Le plan France Innovation Santé 2030 ne suffira pas, seul, à faire décoller la healthtech française », Remontées terrain – avril 2023 – DGE.
- MINISTÈRE DE LA SANTÉ ET DE LA PRÉVENTION (2023), « Liste des médicaments essentiels – Juin 2023 », https://sante.gouv.fr/IMG/pdf/liste-medicaments-essentiels_acc.pdf
- NOH S. M., SHIN S. & LEE G. M. (2018), "Comprehensive characterization of glutamine synthetase-mediated selection for the establishment of recombinant CHO cells producing monoclonal antibodies", *Sci. Rep.*, vol. 8, n°1, p. e5361.
- SHEPELEV M. V., KALINICHENKO S. V., DEYKIN A.V. & KOROBUKO I. V. (2018), "Production of recombinant proteins in the milk of transgenic animals: current state and prospects", *Acta Naturae*, 10(3), pp. 40-47, PMID: 30397525, PMCID: PMC6209402.
- URQUHART L. (2021), "Top companies and drugs by sales in 2020", *Nat Rev Drug Discov.*, 20(4), p. 253, doi:10.1038/d41573-021-00050-6, PMID: 33727694.
- WALSH G. & WALSH E. (2022), «Biopharmaceutical benchmarks 2022», *Nat Biotechnol*, 40, pp. 1722-1760, <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01582-x>