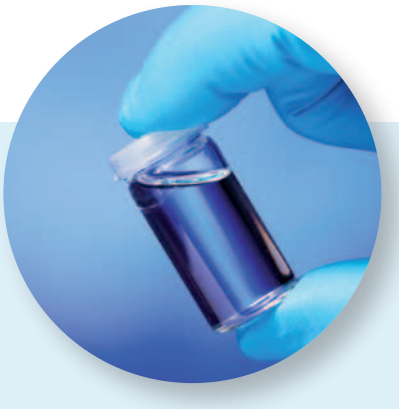
Protéines thérapeutiques : Retour à la nature ?

Gerrit Borchard



Numéro FPH: 1-1017995-12-2012-P12.5

But de l'apprentissage

- Vous savez comment les protéines thérapeutiques sont produites et formulées.
- Vous connaissez les propriétés pharmacocinétiques essentielles des protéines thérapeutiques.
- Vous êtes familiarisés avec la relation entre structure, efficacité et immunogénicité des protéines thérapeutiques.
- Vous êtes familiarisés avec la nomenclature et les mécanismes d'action des anticorps monoclonaux.
- Vous êtes familiarisés avec les bases du stockage et de l'emploi adéquats des protéines thérapeutiques.

Resumé

Grâce au développement de la biologie moléculaire, de la connaissance des bases génétiques (génomique) et de la biochimie des protéines (protéomique) les médicaments protéiniques sont toujours plus utilisés dans le traitement d'affections graves. Les protéines thérapeutiques se distinguent des principes actifs obtenus via une synthèse chimique par leur poids moléculaire beaucoup plus élevé, leur structure qui détermine leur fonctionnalité, leur profil pharmacocinétique et leur immunogénicité potentielle. Afin d'assurer la sécurité et l'efficacité des protéines thérapeutique, le développement de procédures spéciales de fabrication et de formulation est nécessaire. Finalement, la compliance des patients peut être améliorée grâce à leur sensibilisation à des facteurs spécifiques au traitement par des protéines thérapeutiques.

Introduction

Utiliser comme médicament des protéines, qui remplissent des tâches importantes partout dans l'organisme, est une idée fascinante même si elle est aussi évidente. Les protéines endogènes comme l'insuline, les facteurs de croissance ou les cytokines doivent avoir une spécificité plus élevée et déclencher moins d'effets indésirables pharmacologiques que les médicaments de synthèse chimique, dont elles se distinguent très largement. Les protéines se composent d'une chaine d'acides aminés ; chacun de ces acides aminés a lui-même un poids moléculaire proche de celui de l'acide salicylique. La taille de ces molécules est claire si l'on considère qu'une protéine comprend plusieurs centaines d'acides aminés. La titine, la plus grande protéine humaine (système filamentaire dans la musculature cardiaque et squelettique) comprend 30 000 acides aminés et son poids moléculaire est d'env. 3600 kDa.

Grâce à des liaisons hydrogène et à des ponts disulfure, la séquence peptidique (structure primaire) détermine la formation d'éléments structurels (structure secondaire) et le repliement de la chaîne polypeptidique dans l'espace (structure tertiaire). Un repliement correct confère à la protéine sa fonctionnalité optimale. Une modification, par ex. par dépliement, conduit à une perte de fonctionnalité, éventuellement à une agrégation et finalement à une identification de la structure protéinique modifiée comme antigène par le système immunitaire.

Les procédés de production et les méthodes de formulation des protéines thérapeutiques sont donc conçus pour obtenir leur forme native et leur repliement correct.

Le marché des protéines thérapeutiques va poursuivre sa croissance durant les prochaines années [1]. Des produits comme l'interféron-bêta (Avonex®, Rebif®), les facteurs de croissance (Neupogen®, Tevagrastim®) et les anticorps monoclonaux (Humira®, Avastin®) se trouvent toujours plus fréquemment en officine. Afin d'assurer un traitement efficace, il est par conséquent nécessaire de développer les connaissances du personnel de santé, du pharmacien et finalement du patient sur les particularités d'emploi des protéines thérapeutiques.

Petite histoire et récapitulation de biologie moléculaire

Le déchiffrage du code génétique par le biochimiste allemand Heinrich Matthaei en 1961 au *National Institutes of Health* (NIH, Bethesda, USA) fut sûrement un des moments les plus importants de l'histoire des sciences [2]. Le patron de l'époque de Matthaei, Nirenberg, obtint en 1968 le prix Nobel pour leur travail commun. D'autres événements marquants furent notamment l'isolation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) par le chimiste bâlois Friedrich Miescher en 1869 [3], la preuve que l'ADN est porteur de l'information héréditaire par Avery, McLeod et McCarthy (1944) [4], et finalement l'identification de la structure de l'ADN par Watson et Crick en 1953 [5]. Watson et Crick obtinrent pour cela, conjointement à Maurice Wilkins, le prix Nobel en 1962. Rosalind Franklin, biophysicienne britannique au King's College de Londres, dont les données ont indiscutablement été utilisées par Watson et Crick pour le développement de leur théorie, est décédée en 1958 déjà, à l'âge de 37 ans. Cinq ans seulement après Matthaei, en 1966, le décodage complet du code génétique fut présenté lors d'une conférence à Cold Spring Harbor (Long Island, New York).

Il est maintenant bien connu que l'ADN est constitué de deux brins d'acides ribonucléiques complémentaires qui forment la double hélice typique via des interactions intramoléculaires. La conclusion que dans tous les organismes, tous les constituants de chacune de protéines, les acides aminés, sont précisément déterminés (codés) par une simple combinaison d'à chaque fois trois acides nucléiques, était révolutionnaire. Cela signifiait en fin de compte que la connaissance de la séquence des acides aminés d'une protéine permet également de déterminer la séquence d'ADN correspondante.

Lors de la biosynthèse des protéines, après séparation de la double hélice l'information génétique d'une partie déterminée du génome est transférée sur une séquence complémentaire d'acide ribonucléique, dit ARN messager (ARNm). Ce processus est dénommé transcription. L'ARNm migre alors jusqu'aux ribosomes dans le cytoplasme où, pendant la traduction durant laquelle est également impliqué l'ARN de transfert (ARNt), les acides aminés sont assemblées dans la séquence correcte pour former la protéine correspondante. Des modifications dites post-traductionnelles, comme la scission enzymatique d'une partie de la molécule (par ex. préproinsuline -> proinsuline -> insuline) ou une glycosylation, peuvent ensuite encore intervenir. Cette suite de processus, transcription de l'information génétique dans le noyau cellulaire et traduction en protéines par les ribosomes, a été désignée par Francis Crick comme le « dogme central de la biologie moléculaire » [6]. Selon ce dogme, seuls des transferts d'ADN à ADN (lors de la réplication du matériau génétique durant la division cellulaire), d'ADN à ARN et d'ARN à protéine sont permis.

L'hypothèse selon laquelle la transmission d'ARN à ADN est possible a déjà été formulée en 1964 par Howard Martin Temin (University of Wisconsin-Madison). Temin avait découvert que certains virus à ARN, dits rétrovirus, avaient la capacité d'intégrer leur ARN dans les génomes des cellules hôtes infectées, et donc d'inverser le sens de la transcription. Les rétrovirus utilisent ainsi leurs cellules hôtes pour leur réplication. L'enzyme nécessaire à cette opération, la transcriptase inverse, a été découverte par Temin et simultanément et indépendamment par David

Protéines thérapeutiques : Retour à la nature ?

Baltimore (*Massachusetts Institute of Technology*, MIT, Boston), découverte pour laquelle ils obtinrent, conjointement à Renato Dulbecco, le prix Nobel en 1975. On sait aujourd'hui que le génome humain comporte environ 8 % d'ADN rétroviral [7], provenant d'infections de nos ancêtres dans la chaine évolutive. Il a plus tard été constaté que la transcriptase inverse provoque une fréquence élevée d'erreurs lors de la transmission de l'information génétique dans le génome hôte, ce qui a pour conséquence un taux élevé de mutations dans les rétrovirus répliqués et qui rend notamment très compliqué le développement d'un vaccin contre le HIV.

Deux autres types d'enzymes, les endonucléases de restriction et les ligases, sont de grande importance dans la production de protéines thérapeutiques. La découverte des enzymes de restriction, pour laquelle le suisse Werner Arber a obtenu le prix Nobel en 1978, conjointement à ses collègues américain Daniel Nathans et Hamilton Smith, est souvent désignée comme étant le début du développement de la biologie moléculaire. Isolée à l'origine à partir de bactéries, cette enzyme permet de « couper » l'ADN bactérien à des emplacements déterminés, ce qui va notamment former des fragments d'ADN dits à « bords collants » (*sticky ends*). Ces bords peuvent alors être réassemblés par le deuxième type d'enzymes, les ligases. L'utilisation des deux types d'enzymes permet de produire, à partir de la molécule circulaire d'ADN, les plasmides contenant l'information génétique, par ex. pour une protéine donnée.

Aspects des protéines thérapeutiques

Production

Les plasmides sont introduits dans les cellules hôtes, dites « système d'expression », et incubées dans des conditions optimisées (nutriments, pH, température) à l'intérieur de bioréacteurs. Les parties codantes des plasmides sont lues et l'information génétique traduite dans la protéine correspondante. En laboratoire comme à l'échelle industrielle, on utilise le plus souvent comme cellules hôtes pour la production de protéines thérapeutiques des cultures bactériennes (*Escherichia coli*), mais aussi toujours plus de cellules de mammifères (*ovaires de hamster chinois*, CHO) ou de levures (*Pichia pastoris*). Les différences entre les systèmes d'expression consistent en des modifications post-traductionnelles : Les protéines humaines produites avec des cellules CHO sont glycosylées, ainsi que celles produites à partir de levures, mais leur glycolysation est en partie très différente. Les protéines produites à partir d'*Escherichia coli* ne sont pas glycolysées du tout, raison pour laquelle les glycoprotéines ne peuvent pas être produites au moyen de ces cellules hôtes. En fonction du système d'expression, la protéine est excrétée dans le milieu de culture ou reste dans les précipités intracellulaires (*inclusion bodies*). Cette partie de la production est dite *upstream processing*.

La deuxième partie de la production, dit aussi *downstream processing*, englobe l'isolation et la purification de la protéine à partir du milieu de culture, évtl. après scission des composants cellulaires, dans une succession de plusieurs étapes. Il faut alors veiller à éliminer tous les constituants étrangers, comme par ex. les protéines cellulaires, celles-ci pouvant être à l'origine de réactions immunitaires indésirables chez le patient. Après son isolation, il faut s'assurer que la protéine acquière son repliement natif, une modification des structures secondaires et tertiaires pouvant signifier une perte d'efficacité et/ou une immunogénicité accrue.

Formulation

La formulation des protéines thérapeutiques a pour but la description d'une forme stable, pouvant être préparée à l'échelle industrielle et d'une forme galénique pouvant être administrée. La formulation stabilise la protéine dans son repliement natif, afin d'éviter une perte d'efficacité. La formulation doit également protéger la protéine contre l'agrégation, l'oxydation des acides aminés et/ou la désamination et la fragmentation. En principe, les protéines thérapeutiques sont administrées par injection (sous-cutanée, intramusculaire ou intraveineuse) et les formulations doivent par conséquent remplir les exigences de la pharmacopée concernant la préparation de solutions injectables.

Encadré 1
Solution ou lyophilisat?

En termes de processus potentiels physiques et chimiques de dégradation, le lyophilisat est en général la formulation la plus stable des protéines thérapeutiques. Les inconvénients qu'elle présente par rapport à la solution sont la nécessité de processus supplémentaires dans la production ainsi que dans la reconstitution juste avant l'utilisation. Les deux processus sont non seulement onéreux mais constituent aussi des sources d'erreurs, susceptibles de réduire voire même de supprimer complètement l'efficacité du principe actif. Lors de la reconstitution, la procédure indiquée doit être minutieusement suivie afin d'éviter une agrégation de la protéine [8]. Les formes galéniques liquides sont par contre plus simples à produire et sont immédiatement utilisables, mais présentent toutefois typiquement une stabilité et une durabilité moindres.

Tableau 1
Adjuvants et leur fonction dans la formulation des protéines thérapeutiques

Adjuvants	Fonctions	Exemples
tampons	régulation du pH	tampon histidine, citrate, succinate, acétate ou phosphate
sucres	tonicité, stabilisation, agent de charge	sucrose, tréhalose
polyols	tonicité, stabilisation, agent de charge	mannitol, sorbitol
sels	tonicité, agent de charge	chlorure de sodium
acides aminés	tonicité, stabilisation, agent de charge	glycine, arginine, leucine, proline
tensioactifs	stabilisation	polysorbate 20 et 80
conservateurs	conservation	alcool benzylique
antioxydants	stabilisation	méthionine, alcool benzylique

L'administration via les muqueuses n'est pas une alternative à l'injection, en raison de l'activité enzymatique des muqueuses, de la pénétration réduite des principes actifs protéiniques et de la variabilité du taux plasmatique qui en découle.

Les facteurs qui déterminent la formulation des protéines thérapeutiques sont :

- la forme galénique (solution aqueuse ou poudre lyophilisée pour reconstitution)
- la dose, et la concentration de la protéine dans la formulation qui en découle
- le pH, l'osmolalité et la tonicité
- le type, la qualité et la quantité des adjuvants utilisés
- le type et la qualité du conditionnement primaire (flacons de verre, seringues prêtes à l'emploi, etc.)

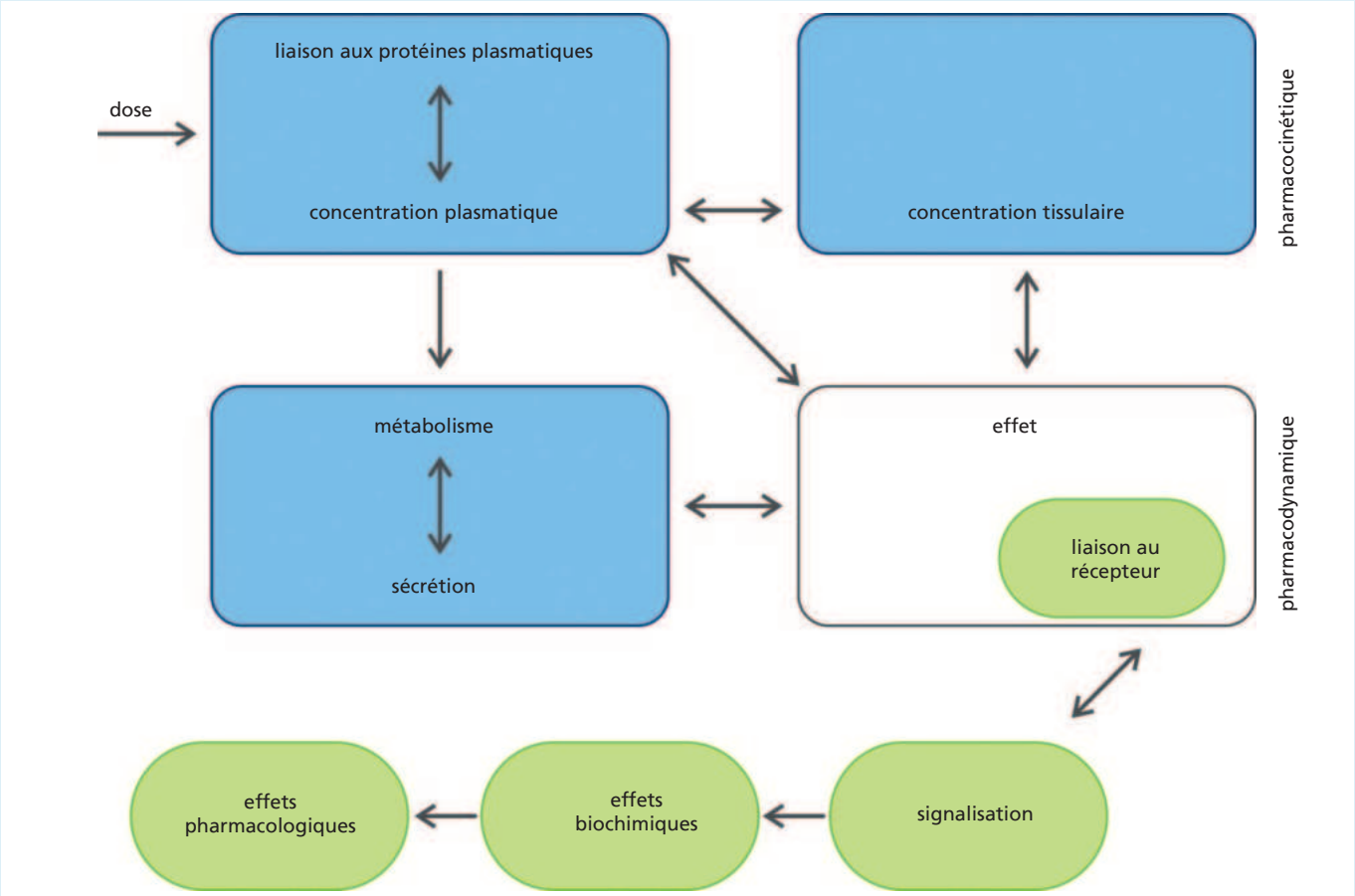


Illustration 1
Pharmacocinétique et pharmacodynamique des protéines thérapeutiques

Protéines thérapeutiques : Retour à la nature ?

Les adjuvants typiques utilisés dans la formulation des protéines, ainsi que leur fonction, sont décrits dans le tableau 1. Il faut particulièrement veiller à la qualité des adjuvants lors de leur choix. Ainsi, des impuretés présentes dans les polysorbates, telles que des peroxydes ou des ions métalliques, peuvent entrainer des oxydations des principes actifs protéiniques. Il faut en outre généralement éviter les sucres réducteurs comme le lactose ou le glucose (par ex. aussi dans les solutions pour la reconstitution de protéines lyophilisées), car des modifications de la protéine peuvent se produire au cours de réactions de Maillard. Le tampon acétate ne peut pas être utilisé dans des formulations lyophilisées, car une modification du pH se produit lors de la lyophilisation en raison de l'évaporation de l'acide acétique.

Pharmacocinétique

L'illustration 1 présente le rapport entre la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des protéines thérapeutiques. Les principes actifs protéiniques sont en général administrés sous forme d'injections ou de perfusions ; en cas d'injection sous-cutanée (s.c.) toutefois, une biodisponibilité réduite est souvent mesurée. A titre d'exemple, des biodisponibilités de 50 % pour l'interféron-bêta et d'env. 60 % pour des anticorps thérapeutiques sont mentionnées après application s.c. Cette biodisponibilité incomplète des protéines appliquées par voie s.c. est attribuée à leur agrégation et à l'endocytose consécutive par des cellules immunitaires, et/ou à la dégradation enzymatique à l'endroit de l'injection.

Des réactions inflammatoires au site d'injection sont souvent constatées, en particulier avec l'interféron-bêta-1b (IFN-bêta-1b). L'IFN-bêta-1b est préparé avec *Escherichia coli*, n'est donc pas glycosylé et a par conséquent tendance à former des agrégats après injection sous-cutanée. Ces agrégats sont identifiés comme étrangers (« immunogènes ») par le système immunitaire du patient et éliminés par phagocytose. Cela induit simultanément la formation d'anticorps neutralisants, qui réduisent fortement ou même répriment complètement l'efficacité de la protéine thérapeutique (encadré 3).
Chez certains patients, des anticorps neutralisants contre une protéine thérapeutique peuvent être déjà présents avant le début du traitement. L'utilisation des « *Companion Diagnostics* » [9] pour la détection de ces « *pre-existing neutralising anti-drug antibodies* (ADA) », qui peuvent réduire ou même entièrement supprimer l'efficacité du traitement, est de plus en plus envisagée. Ceux-ci peuvent contribuer à établir un concept de médecine personnalisée, permettant de sélectionner le traitement adapté à un patient déterminé de manière à obtenir une meilleure prise en charge du patient et simultanément une réduction du coût très élevé du traitement avec des principes actifs protéiniques. Deux de tels *Companion Diagnostics* ont récemment été autorisés par la FDA, toutefois pour des principes actifs à petites molécules. Il s'agit de kits de diagnostic pour les préparations Zelboraf® (vemurafenib, traitement du mélanome) et Xalkori® (crizotinib, traitement du carcinome pulmonaire non à petites cellules). Pour les anticorps cetuximab (Erbitux®) et panitumumab (Vectibix®), il existe des *Companion Diagnostics* sur la présence d'un gène KRAS de type sauvage. Pour l'herceptin (Trastuzumab®), une surexpression de HER2 doit être testée au moyen d'un kit de diagnostic. Il faut s'attendre à voir l'offre de tels kits de diagnostic pour les protéines thérapeutiques augmenter à l'avenir.
La concentration disponible pour l'effet est influencée par la liaison aux protéines plasmatiques, la métabolisation et la répartition de la protéine dans les tissus. Les protéines ont en général une faible liaison aux protéines plasmatiques et donc un petit volume de répartition, qui correspond approximativement au volume sanguin (env. 3–8 l). Celui-ci peut toutefois être influencé par l'endocytose à récepteurs, afin d'augmenter le volume intracellulaire cor-

Encadré 2
Indications pratiques se rapportant aux protéines thérapeutiques

L'entreposage, la reconstitution (de produits lyophilisés) et la dilution/le mélange (de solutions) adéquats des protéines permettent de conserver leur activité et d'éviter la formation d'agrégats. Il faut alors toujours respecter très précisément les indications figurant sur la notice d'emballage. Les solutions de protéines doivent être conservées sous réfrigération, entre 4 et 8°C, une congélation ainsi qu'un réchauffement de la solution avant l'injection ayant un effet désastreux sur la stabilité du principe actif. Les solutions doivent être conservées à l'abri de la lumière pour éviter la photo-oxydation des acides aminés histidine, tryptophane et tyrosine et un repliement consécutif de la protéine. Lors de la reconstitution des lyophilisats, le solvant (de l'eau pour les injections) doit être introduit lentement et sur la paroi du contenant afin d'éviter la formation de mousse. Procéder ensuite à une forte agitation entraine la formation d'agrégats et doit par conséquent être évité, la solution doit par contre être lentement remuée durant environ 30 secondes. L'utilisation du produit de reconstitution mentionné dans l'information professionnelle est essentielle pour garantir l'efficacité du principe actif protéinique. Ainsi, l'utilisation par ex. d'une solution de glucose à 5 % avec l'Herceptin® (trastuzumab) provoque l'agrégation de la protéine.

respondant. Le rapport des concentrations tissulaires et plasmatiques se situe typiquement entre 1:10 et 1:2, par ex. pour les anticorps monoclonaux.

La métabolisation des principes actifs protéiniques se déroule suivant les mêmes mécanismes et implique les mêmes systèmes enzymatiques (glycosidases, endo-/exopeptidases) que celle des protéines endogènes ou alimentaires. Les protéines sont alors scindées en di- et tripeptides ainsi qu'en acides aminés, qui sont utilisés dans la synthèse de nouvelles protéines endogènes. Au contraire du métabolisme des principes actifs à petites molécules, produits par synthèse chimique, un grand nombre de métabolites inactifs et non toxiques se forment.

La métabolisation et l'élimination des principes actifs protéiniques se déroulent via le foie et les reins, le poids moléculaire de la protéine jouant un rôle dans la hiérarchisation des deux voies d'élimination. Les petites protéines (< 65 kDa) subissent une filtration glomérulaire et sont hydrolysées dans le lumen des tubules proximaux par un système enzymatique présent dans la membrane. Les produits d'hydrolyse sont absorbés au niveau du lumen par des transporteurs spécifiques des peptides et conduits dans la circulation systémique. Chez l'homme en bonne santé, la concentration en protéines est extrêmement faible en raison de ce mécanisme.

Dans le foie, les protéines sont absorbées dans les hépatocytes, les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales via l'endocytose à récepteurs puis métabolisées. Les récepteurs permettant l'endocytose des protéines sont par ex. le récepteur des asialoglycoprotéines (glycoprotéines, par ex. asialo-érythropoiétine), le récepteur du mannose (glycoprotéines) ou le récepteur LDL (lipoprotéines).

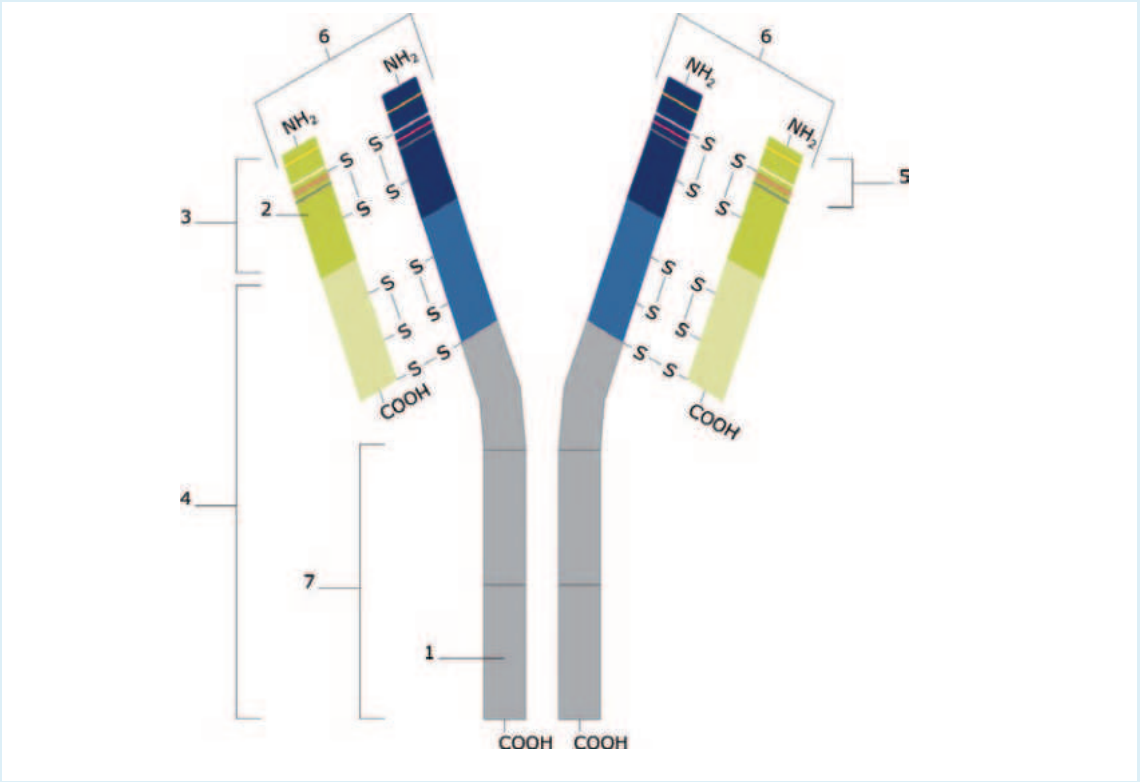


Illustration 2
Structure d'une immunoglobuline G.
Un anticorps est constitué de deux chaînes lourdes (1) et deux chaînes légères (2) identiques, reliées entre elles par des ponts disulfure dans une structure en forme d'Y. Chaque chaîne comprend une région variable (3) et une région constante (4). Les domaines variables renferment la CDR (*Complementary determining region*) (5) et forment ensemble la zone de reconnaissance de l'antigène Fab (6). L'anticorps peut interagir avec le système immunitaire via le fragment Fc (7).

Protéines thérapeutiques : Retour à la nature ?

Mais l'élimination d'une protéine thérapeutique peut aussi être couplée é sa pharmacodynamique. C'est par ex. le cas pour le filgrastim (Granulocyte-Colony Stimulating Factor, G-CSF), un facteur de croissance qui active la différentiation de cellules souches de la moelle osseuse en granulocytes neutrophiles. Le filgrastim est par conséquent utilisé pour reconstituer le système immunitaire de patients immunosupprimés, par ex. à la suite d'une chimiothérapie de tumeurs non myéloïdes. Le traitement avec le filgrastim n'a pas toutefois seulement pour conséquence la multiplication des granulocytes mais aussi une expression accrue des récepteurs spécifiques à ce principe actif par les granulocytes. L'effet pharmacologique déclenche simultanément l'élimination du principe actif, dans une sorte de mécanisme feed-back. Il en résulte un profil pharmacocinétique non linéaire, déterminé par la combinaison d'un processus d'élimination passif, non saturable, (filtration glomérulaire dans les reins) et d'un processus d'élimination actif, saturable (endocytose à récepteurs) par les granulocytes neutrophiles.

Anticorps

Les anticorps monoclonaux constituent aujourd'hui le plus important groupe de protéines thérapeutiques. L'expression « anticorps » figure pour la première fois en 1891 dans un texte de Paul Ehrlich [11], après que Behring et Kitasato avaient déjà décrit l'effet des anticorps en 1890 [12]. En 1923, Heidelberger et Avery démontrèrent que les anticorps sont des protéines [13], et la preuve de l'interaction entre ligands et récepteurs selon l'hypothèse clé-serrure formulée par Ehrlich fut apportée par Linus Pauling en 1940 [14]. Ensuite, en 1948, Astrid Fagreaus constata que les cellules B sont responsables de la production des anticorps [15], et Edelman et Porter en déterminèrent finalement la structure en 1960 [16].
Aujourd'hui, les anticorps monoclonaux constituent une partie importante des protéines thérapeutiques. Rien que durant les années 1990 à 2009, plus de 500 études cliniques ont été réalisées avec des anticorps monoclonaux, dont plus de la moitié dans le domaine du traitement du cancer.

La structure d'un anticorps du type immunoglobuline G (IgG) est indiquée dans l'illustration 2. Les anticorps se composent de deux chaines protéiques lourdes (*heavy chain*, HC), reliées entre elles par des ponts disulfure. Chaque chaine lourde est à son tour liée à une chaine légère (*light chain*, LC). Le fragment Fab est responsable de la liaison spécifique à l'antigène, l'anticorps via le fragment Fc se lie au récepteur Fc, exprimé sur les cellules immunitaires. L'anticorps présente en outre une région constante, pour ainsi dire l'ossature (*Scaffold*), et une région avec des séquences variables d'acides aminés, qui déterminent la spécificité de l'anticorps pour l'antigène (CDR, complementary determining regions).

Des anticorps monoclonaux peuvent être produits par ex. par la technologie des hybridomes [17]. Des souris sont vaccinées avec l'antigène, puis les cellules B produisant l'anticorps sont isolées. Celles-ci sont fusionnées avec des cellules cancéreuses (cellules de myélome) et les cellules immortalisées productrices d'anticorps obtenues sont mises en contact avec l'antigène. De cette manière, il est possible d'isoler les cellules clones, dites hybridomes, qui produisent spécifiquement l'anticorps désiré. Dans des conditions optimisées, les hybridomes peuvent aussi être utilisés pour la production industrielle d'anticorps. Les anticorps ainsi obtenus présentent une structure murine et, lors d'une application chez l'homme, peuvent aussi déclencher des réactions immunitaires. Afin d'éviter cela, des anticorps avec des structures de plus en plus humaines

Encadré 3
Immunogénicité des protéines thérapeutiques

L'imunogénicité est un facteur très important dans le traitement par des principes actifs protéiniques. On considère actuellement que pratiquement toutes les protéines recombinantes, d'origine humaine ou non, déclenchent des réactions immunitaires. Les causes exactes de ces réactions sont inconnues, mais l'on estime que différents facteurs sont importants. En font partie des facteurs liés au produit, comme des microhétérogénéités de la structure protéique (voir paragraphe : biosimilaires), des impuretés et la présence d'agrégats. Les facteurs liés au traitement englobent les voies et la fréquence d'administration, la dose administrée, la durée du traitement, la situation immunitaire du patient ainsi que d'éventuelles comédications.
Une méthode permettant pour le moins de réduire l'immunogénicité des principes actifs protéiniques est la « pégylation », c'est-à-dire la liaison covalente d'une ou plusieurs molécules de polyéthylène glycol à la protéine. Cela permet d'une part de masquer d'éventuels épitopes antigéniques, d'autre part d'augmenter la solubilité de la protéine grâce au polymère fortement hydrophile et ainsi de réduire l'agrégation. Cela produit aussi un effet pharmacocinétique: Le poids moléculaire plus élevé réduit la filtration glomérulaire des protéines pégylées dans les reins. Avec l'élévation de la stabilité enzymatique et l'élimination réduite par les phagocytes, les protéines pégylées présentent par conséquent une demi-vie plus longue que les protéines non pégylées. Cela permet une réduction de la fréquence d'administration et de la dose de ces molécules. Plusieurs médicaments à base de protéines pégylées comme Pegintron® ou Pegasys® sont déjà commercialisées [10].

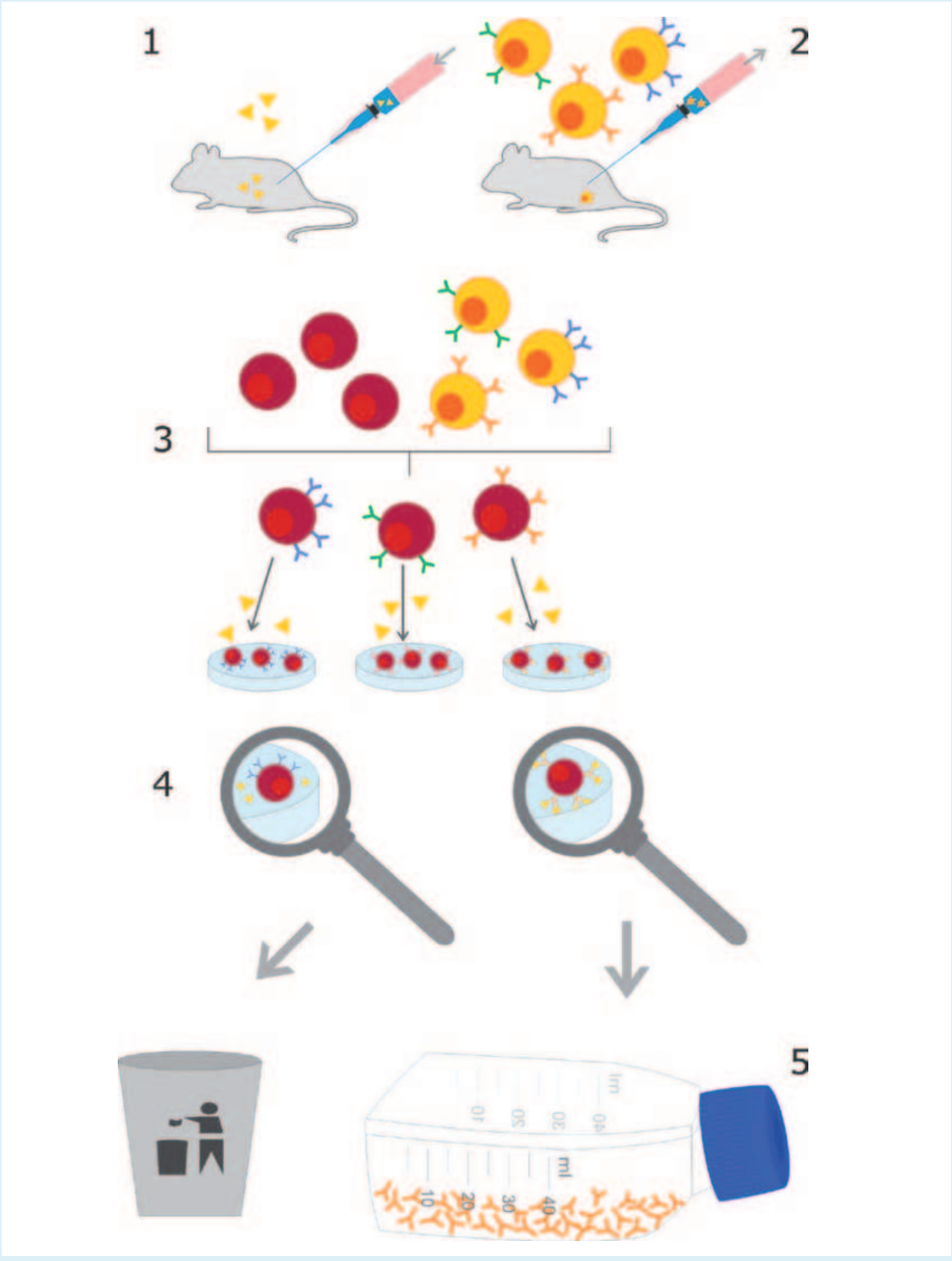


Illustration 3
Représentation schématique de la production d'anticorps au moyen de la technologie des hybridomes.
(1) Infection de la souris avec un antigène et (2) prélèvement des cellules B productrices d'anticorps. (3) Fusion avec des cellules cancéreuses. (4) Isolation des bons clones par un nouveau contact avec l'antigène. (5) Production d'anticorps.

Protéines thérapeutiques : Retour à la nature ?

ont été développés au cours du temps. Ce fait est reflété par la nomenclature, ainsi que le lieu d'attaque de l'anticorps (encadré 4).

Selon leur structure, les anticorps présentent deux mécanismes d'action. L'Herceptin® (Trastuzumab), utilisé contre le cancer du sein, se fixe aux récepteurs du facteur de croissance épidermique humain (HER *human epidermal growth factor* 2) exprimé par les cellules du cancer du sein via son fragment Fab. L'interaction de HER2 avec son récepteur est ainsi compétitivement inhibée et la croissance de la tumeur ralentie. D'autre part, l'Herceptin ® se lie, via le fragment Fc, aux récepteurs HER2 des cellules NK (*natural killer cells*). Les cellules NK sont des constituants du système immunitaire inné et peuvent reconnaitre les cellules cancéreuses « marquées » par les anticorps. L'interaction dite *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity* (ADCC), médiée par les récepteurs Fc, déclenche l'apoptose et la cytolyse des cellules cancéreuses concernées.

Les effets secondaires causés par les anticorps sont en partie dus à leur mode d'action. Ainsi, une exacerbation d'une infection tuberculeuse latente a été décrite au début du siècle chez des patients ayant été traités avec des préparations d'anticorps à action anti-inflammatoire (Remicade ®, Enbrel ®, Humira ®). Les trois préparations sont autorisées dans le traitement d'affections inflammatoires comme par ex. la polyarthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn. Elles agissent en se liant au TNF-alpha, une cytokine inflammatoire, dont l'élimination est ainsi accélérée. Le TNF-alpha est toutefois aussi impliqué dans la répression d'une tuberculose latente, une exacerbation de l'infection découle par conséquent du blocage et de l'élimination accrus de la cytokine.

Les anticorps se trouvant sur le marché ne sont en fin de compte pas les « boules magiques » rêvées par Paul Ehrlich [18], qui trouvent automatiquement leur cible, et uniquement celle-ci. Cela provient du fait que les structures antigéniques (par ex. des récepteurs) reconnues dans la thérapie des cancers ne sont pas uniquement présentes dans la tumeur mais également dans les tissus sains. Des efforts sont donc actuellement déployés pour augmenter la spécificité des anticorps et améliorer leur interaction avec le système immunitaire. Les nouveaux développements dans ce domaine comprennent des anticorps bispécifiques, qui reconnaissent et peuvent se lier simultanément à deux cibles différentes, ou des conjugués anticorps-toxine, qui doivent permettre de tuer directement la cellule cible.

Biosimilaires

Le développement de nouveaux médicaments est un processus long et coûteux, et seul un pourcentage réduit des candidats se trouvant en développement clinique seront autorisés. Dans ce contexte, la fabrication de versions génériques de médicaments déjà approuvés parait attractive, notamment financièrement. Dans le domaine des protéines thérapeutiques comme pour les médicaments issus de synthèses chimique, l'autorisation de mise sur le marché intervient après l'échéance du brevet de la préparation originale. Durant les dernières années, certaines protéines thérapeutiques ont vu leur protection par brevet expirer, de sorte que dans ce domaine aussi, la production de « *Follow-up Biologics* » a été entreprise. Il a toutefois très rapidement fallu constater que les protéines thérapeutiques diffèrent fondamentalement des principes actifs de bas poids moléculaire.

Les procédés d'upstream et downstream sont très complexes, spécifiques à chaque protéine et optimisés par le fabricant. Une modification des conditions de production, par ex. par un changement du milieu de culture ou du clone cellulaire, ou même seulement du lieu de production, peut conduire à des modifications structurelles de la

Encadré 4
Nomenclature des anticorps monoclonaux

La désignation des anticorps monoclonaux se compose de plusieurs parties:

1) Préfixe (variable)
2) Cible
   -t(u)- : tumeurs diverses
   -l(i)- : système immunitaire
   -s(o)- : os
   -c(i)- : système cardiovasculaire
   -k(i)- : interleukine
3) Structure
   -om- : murin
   -xi- : chimérique
   -zu- : humanisé
   -um- : humain
4) Suffixe
   -mab : monoclonal antibody

Les noms terminés par -omab désignent des anticorps entièrement murins (par ex. ibritumomab, Zevalin®), la terminaison -ximab désigne des anticorps chimériques (par ex. cetuximab, Erbitux®), dans lesquels seule la région variable présente encore une structure murine. Les noms des anticorps humanisés, qui ne présentent plus que des régions CDR murines, se terminent en -zumab (par ex. trastuzumab, Herceptin®), et les anticorps entièrement humains ont un nom se terminant en -umab (par ex. adalimumab, Humira®).

protéine, susceptibles d'influencer négativement son efficacité et sa sécurité : *Le procédé est le produit*. En raison de la structure compliquée des protéines, un produit ne peut jamais être identique lorsqu'il est préparé suivant deux processus différents, même s'ils sont très similaires. Les particularités du procédé de production n'étant dans une très large mesure connue que du fabricant, il n'est pas non plus possible de « copier » une protéine thérapeutique, et donc d'en produire un générique. De plus, les variations possibles des protéines liées au processus de production (micro-hétérogénéité) s'avèrent très diverses. Il peut en résulter, p. ex. pour le t-PA (*tissue plasminogen factor*) 10^9 variantes différentes (Georg-Burkhard Kresse, Roche).

Dans le domaine des produits génériques de protéines thérapeutiques, on parle donc de « biosimilaires », et non de « biogénériques ». Aussi bien l'agence européenne du médicament (EMA) que la FDA ont fait leur cette définition. En Europe, l'approbation de biosimilaires est soumise à des règles strictes. Bien qu'il s'agisse d'une procédure simplifiée par rapport au produit original, le dossier doit toutefois inclure la documentation des phases I et III ainsi qu'un plan sur 5 ans de gestion du risque pour la phase IV (pharmacovigilance). Les études cliniques doivent être accomplies avec un produit original contenant la même substance à titre de produit de comparaison. En outre, le biosimilaire doit présenter les mêmes forme galénique, dose, mode d'application et indication que le produit original utilisé à titre de comparaison. En Suisse, Swissmedic s'est rallié à la règlementation de l'EMA. Une douzaine environ de biosimilaires sont actuellement autorisés sur le marché européen (tableau 2).

Compte tenu de l'intérêt susmentionné pour les anticorps monoclonaux, il n'est pas surprenant que des biosimilaires de cette classe de substances soient aussi à l'heure actuelle en phase de développement.

Tableau 2
Biosimilaires commercialisés en Europe (situation 2011)

Biosimilaire	**Fabricant**	**Date d'autorisation**	**Autorisé en**	
			Suisse	**Allemagne**
Principe actif : époétine alpha				
Abseamed®	Medice Arzneimittel	08/2007	X	X
Binocrit®	Sandoz	08/2007	X	
Epoetin alfa Hexal®	Hexal Biotech	08/2007		X
Principe actif: époétine zeta				
Retacrit®	Hospira	12/2007		X
Silapo®	STADA	12/2007		X
Principe actif : G-CSF (facteur stimulant les colonies de granulocytes)				
Biograstim®	CT Arzneimittel	09/2008		X
Filgrastim Hexal®	Hexal Biotech	02/2009		X
Nivestim™	Hospira Enterprises	06/2010		X
Ratiograstim	Ratiopharm	09/2008		X
Tevagrastim®	Teva	09/2008		X
Zarzio®	Sandoz	02/2009	X	
Principe actif : somatotropine				
Omnitrope®	Sandoz	04/2006	X	X

Protéines thérapeutiques : Retour à la nature ?

Conclusion

L'utilisation de protéines thérapeutiques peut être vue comme la mise à profit de mécanismes que nous a donné la nature. Mais il nous a aussi fallu apprendre que les processus pilotés par les protéines sont très complexes et en grande partie redondants. Pour parvenir à une utilisation rationnelle et efficace des principes actifs protéiniques dans le traitement de maladies graves, une profonde compréhension de la structure des protéines et de leurs interactions avec les systèmes biologiques est nécessaire. Nous sommes toutefois encore très éloignés d'une description suffisante de ces éléments et de leur mise en œuvre dans le cadre de concepts thérapeutiques. Ou comme Paracelse l'a exprimé [19] : « La nature est la meilleure chimiste et nous devons nous en inspirer, sans quoi nous ne sommes que de mauvais cuisiniers. ».

Littérature

Vous trouvez la bibliographie complète sous www.online-academy.ch

Gerrit Borchard

Prof. Gerrit Borchard (né en 1963) ; 1985-1989 études de pharmacie à l'Université de Francfort sur le Main ; 1990-1993 Thèse de doctorat à l'université de Francfort et à l'Université du Kansas (Lawrence, KS, USA) ; 1994-1995 Post-doc à l'Université de Leiden (Pays-Bas) ; 1995-1997 Adjoint scientifique à l'Université de la Saare ; 1998-2002 Professeur assistant au Leiden/Amsterdam Center for Drug Research (LACDR) de l'Université de Leiden ; 2002-2003 Professeur associé au LACDR ; 2003-2005 Vice President Research, Enzon Pharmaceuticals, Inc. (Piscataway, NJ, USA) ; depuis 2005 Professeur de sciences biopharmaceutiques à l'Université de Genève et directeur scientifique du centre des pharmapeptides à Archamps (France).

Prof. Dr. Gerrit Borchard
Ecole de Pharmacie Genève-Lausanne (EPGL)
Université de Genève
30, quai Ernest Ansermet
1211 Genève
gerrit.borchard@unige.ch