

Biotechnologies et médicaments

André Tartar

Résumé En l'espace d'une trentaine d'années, les biotechnologies sont devenues incontournables dans tous les domaines touchant au médicament. Utilisées initialement pour produire dans de meilleures conditions des protéines à usage thérapeutique, elles ont permis de viser des cibles moléculaires précises avec les générations successives d'anticorps monoclonaux. Elles se sont également imposées dans toutes les phases de découverte et de développement des médicaments « classiques », allant des tests de criblage à l'utilisation des caractéristiques génétiques associées aux pathologies pour stratifier des patients et ouvrir la voie à la médecine personnalisée.

Mots-clés **Biotechnologies, médicaments, anticorps monoclonaux, biotechs, pharmacogénomique.**

Abstract **Biotechnologies and pharmaceuticals**
Within thirty years, biotechnologies have become essential for all areas of pharmaceuticals. Initially, they were used to produce more efficiently therapeutic proteins. A major step was the discovery and progressive humanization of monoclonal antibodies that provided a unique tool to interfere with specific biological targets. Biotechnologies are also involved in every step of the discovery and development of "small molecule" drugs. Initially involved in the early steps of high throughput screening, they now offer the possibility of using genomic analysis for the stratification of patient populations, leading the way to personalized medicine.

Keywords **Biotechnologies, pharmaceuticals, monoclonal antibodies, biotechs, genomic pharmacology.**

Dans le domaine de la santé, les différentes activités regroupées sous le terme générique de « biotechnologies » – qualifiées parfois de biotechnologies rouges – ont considérablement évolué au cours des dernières décennies. Lors d'une première période, que l'on peut situer approximativement dans les années 1980, leur périmètre, bien défini, recouvrait l'utilisation des technologies de l'ADN recombinant pour produire des protéines d'intérêt thérapeutique en insérant les gènes codant pour ces protéines dans des cellules hôtes. Les sociétés qui en sont issues, les premières « biotechs », se sont initialement développées au sein même des campus et des laboratoires académiques dont les travaux avaient permis l'émergence de cette toute nouvelle discipline.

Les biotechs de première génération

Les premières protéines ciblées n'avaient rien d'original : leurs propriétés thérapeutiques étaient bien connues et utilisées depuis longtemps, seules leurs méthodes de production laissaient à désirer. Ainsi l'insuline, produite à partir du porc, différait par un acide aminé de l'insuline humaine (ce qui était corrigé à l'époque par une approche hémisynthétique). Par contre, elle nécessitait trois pancréas de porc pour une dose hebdomadaire. La production d'insuline humaine par des cellules génétiquement modifiées a permis de s'affranchir définitivement de cette limite. Un autre exemple a été celui de l'hormone de croissance : extraite à partir d'hypophyses prélevées sur des cadavres, elle fut à l'origine de la contamination de nombreux jeunes patients par l'agent responsable de la maladie de Creutzfeldt Jakob. La production par génie génétique dans des cellules procaryotes a permis de faire disparaître définitivement ce risque.

Une étape nouvelle fut franchie avec des protéines pour lesquelles les faibles quantités disponibles à partir des sources classiques n'avaient pas permis d'en évaluer le potentiel thérapeutique. Parmi ces protéines, les interférons (dont on savait qu'ils *interféraient* avec la répllication des virus dans les cellules hôtes) et l'érythropoïétine (capable de promouvoir la production de globules rouges) ont pu enfin être produites en quantités suffisantes pour faire l'objet d'essais cliniques puis être utilisées comme médicaments, comblant ainsi des besoins jusque là non satisfaits. Le vaccin contre les papillomavirus, responsables du cancer du col de l'utérus, est un exemple récent de l'apport des technologies de l'ADN recombinant : l'utilisation du virus tué comme atténué n'étant pas envisageable, les protéines de l'enveloppe virale ont été produites dans la levure, puis réassemblées pour créer des particules pseudo virales qui génèrent une immunité protectrice plus efficace que l'immunité naturelle, mais ne contiennent pas le matériel génétique du virus [1].

Les anticorps monoclonaux

Une troisième vague sera celle des anticorps monoclonaux. Dans les deux cas précédents, il s'agissait d'obtenir par l'intermédiaire d'une cellule génétiquement modifiée des protéines identiques aux protéines endogènes connues et de les injecter pour corriger des pathologies associées à leur déficit ou des protéines à visée vaccinale. Cette fois, le but était de produire des anticorps monospécifiques capables de neutraliser, en s'y liant, une protéine particulière, et ainsi d'interférer directement et spécifiquement avec des mécanismes pathologiques. Les premiers anticorps monoclonaux ont été produits au Medical Research Council (MRC) en 1975

par Georges Köhler et César Milstein en fusionnant deux types de cellules : une cellule B produisant les anticorps et une cellule cancéreuse immortelle [2]. L'hybridome qui en résulte possède à la fois la capacité de produire des anticorps et celle de se reproduire indéfiniment. Si cette découverte valut à ses auteurs le prix Nobel de médecine en 1984, le MRC n'envisageant aucune application commerciale, décida de ne pas la breveter.

En 1986, plus de dix ans après cette publication, un premier anticorps monoclonal – le muromomab dirigé contre le CD3 (marqueur de lymphocytes T) – sera utilisé chez l'Homme pour lutter contre les rejets de greffe. Les succès suivants se feront attendre longtemps : d'origine murine, les premiers anticorps monoclonaux déclenchaient des réactions immunitaires graves. De plus, les espoirs de les utiliser pour traiter les cancers furent décevants car il devint rapidement clair que les véritables antigènes spécifiques de tumeurs étaient rares et souvent inaccessibles aux grosses molécules que sont les anticorps. Des efforts considérables furent alors entrepris pour palier à ces problèmes en remplaçant progressivement les séquences issues de la souris par leurs correspondants humains (figure 1), depuis la mise au point de monoclonaux chimériques souris/homme jusqu'à la production de véritables monoclonaux humains par des souris transgéniques dont le système immunitaire avait été « humanisé ». Il faudra cependant attendre près de dix ans pour voir apparaître un second anticorps monoclonal sur le marché : un antiagrégant plaquettaire (l'abciximab), dont la structure est une chimère souris/homme.

Depuis, les succès se sont multipliés avec l'approbation par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) de 29 nouveaux anticorps monoclonaux au cours des quinze dernières années. Simultanément, les domaines thérapeutiques visés se sont considérablement élargis, touchant maintenant aussi bien le cancer que l'inflammation, l'auto-immunité ou les maladies infectieuses... En 2011, les ventes mondiales d'anticorps monoclonaux thérapeutiques atteignaient 56 milliards de dollars. Elles sont concentrées sur un petit nombre de produits puisque les ventes des dix premiers monoclonaux par chiffre d'affaires atteignaient à elles seules 47 milliards de dollars (soit plus de

5 % des ventes totales de médicaments au cours de la même période).

De manière intéressante, si on a très tôt cherché à utiliser des immunotoxines pour cibler des agents cytotoxiques sur des cellules tumorales au moyen de ces anticorps monoclonaux, ce n'est que très récemment que ces produits sont arrivés dans l'arsenal thérapeutique, avec en particulier un premier vrai succès avec la mise sur le marché en 2011 du brentuximab, un anticorps monoclonal anti-CD30 (un marqueur présent à la surface des lymphocytes) conjugué chimiquement à une puissante toxine, la monométhyl auristatine E (figure 2 p. 44). C'est le premier nouveau médicament depuis près de trente ans pour le traitement de patients adultes atteints d'un lymphome non hodgkinien réfractaire [3].

L'aide à la découverte

Même si ces succès sont considérables, s'y arrêter serait oublier un autre volet, tout aussi important : l'apport des biotechnologies au domaine du médicament. Il est en effet apparu très rapidement que les méthodes dérivées de l'ADN recombinant pouvaient contribuer à la découverte et au développement des médicaments classiques, non biotechnologiques. Avec l'apparition des tests de criblage sur récepteurs, la pharmacologie moléculaire s'est considérablement développée. Avant l'arrivée des techniques de l'ADN recombinant, pour des raisons de disponibilité, ces essais étaient réalisés sur des membranes de cellules animales, dont bien souvent les récepteurs mimaient de manière imparfaite leurs homologues humains. La possibilité de transférer dans des cellules modèles ces récepteurs humains a permis de s'affranchir de ce risque et de tester les molécules sur les récepteurs humains, mais aussi sur ceux des espèces animales qui seront utilisées au cours des tests précliniques pharmacologiques comme toxicologiques. Une étape supplémentaire dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques a été franchie avec la production d'animaux transgéniques permettant de modéliser les pathologies humaines.

En parallèle, le séquençage du génome humain a donné accès à de nouvelles cibles thérapeutiques jusqu'alors inconnues que le génie génétique a permis d'exprimer sous

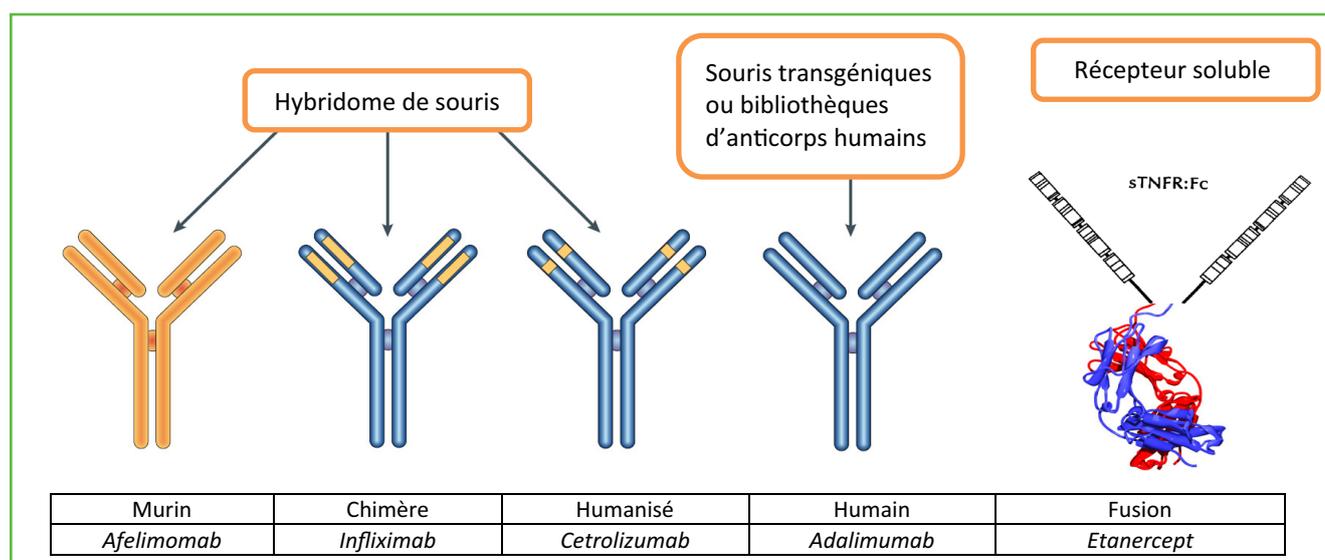


Figure 1 - Différentes génération d'anti « tumor necrosis factor » (TNF).

Les parties issues de la souris sont figurées en jaune. Limitées aux régions en contact avec l'antigène dans les chimères et les humanisés, elles disparaissent totalement dans les anticorps humains de dernière génération. Etanercept utilise le récepteur soluble du TNF greffé sur une partie constante d'immunoglobuline. Ces anticorps ont apporté des progrès considérables dans le traitement de pathologies auto-immunes particulièrement invalidantes, comme la maladie de Crohn ou la polyarthrite rhumatoïde.

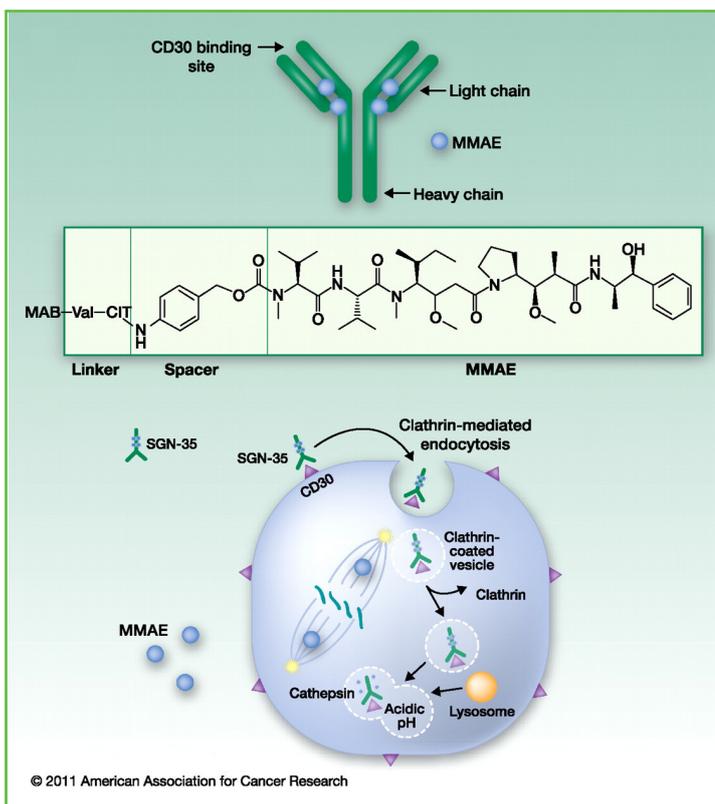


Figure 2 - Le brentuximab (SGN-35), un anticorps monoclonal dirigé contre un marqueur lymphocytaire, le CD30, a été conjugué chimiquement à un poison cytotoxique, la monométhyl auristatine E [3].

forme de protéines (enzymes, récepteurs, canaux ioniques...). Dès lors, le criblage à haut débit qui va permettre de tester des centaines de milliers, voire des millions de petites molécules sur ces cibles, s'est imposé comme une méthode incontournable dans les toutes premières étapes de la recherche. Ici, un apport des biotechnologies a été de s'affranchir de l'utilisation de traceurs radioactifs grâce à la mise en place de criblages fonctionnels faisant souvent appel à des protéines fluorescentes comme la GFP, la « green fluorescent protein »⁽¹⁾. Issue d'une méduse, cette protéine est intrinsèquement fluorescente grâce à une

réaction non enzymo-catalysée (figure 3). Le gène codant pour la GFP est fusionné à celui de la protéine que l'on souhaite étudier. Le fonctionnement de cette dernière sera ainsi associé à l'apparition d'un signal de fluorescence facilement détectable. Les « leads » issus de ce criblage font alors l'objet d'un processus long et complexe d'optimisation au cours duquel on cherchera à améliorer l'activité vis-à-vis de la cible thérapeutique. Cette étape sera grandement facilitée si celle-ci peut être exprimée en quantité suffisante pour permettre des études structurales (RMN ou rayons X). Mais cette optimisation va beaucoup plus loin que la recherche d'une molécule plus active : elle concerne toutes les propriétés qui seront nécessaires pour en faire un médicament. Parmi celles-ci, on citera la sélectivité, l'absence de toxicité, la stabilité métabolique, la perméabilité membranaire, la biodisponibilité orale etc. Par le passé, ces paramètres étaient optimisés au moyen de tests sur des animaux. Ici encore, l'apport des biotechnologies a été capital. La perméabilité au travers de la barrière intestinale, par exemple, est désormais évaluée au moyen de cellules Caco-2⁽²⁾ qui reproduisent cette membrane et permettent de mesurer le passage des molécules.

Un autre exemple est celui du métabolisme : après leur absorption, les médicaments passent au travers du foie où se trouvent de nombreuses enzymes qui vont le modifier et souvent lui faire perdre son activité. Certaines molécules sont ainsi entièrement métabolisées dès leur premier passage hépatique. Il est important de prédire ce métabolisme de manière à atteindre la demi-vie souhaitée pour le médicament. Le clonage des différentes enzymes impliquées de même que l'utilisation de microsomes hépatiques de différentes espèces (dont l'Homme) permettent actuellement d'optimiser la stabilité métabolique à partir de données *in vitro*, évitant ainsi les échecs, fréquents par le passé, lors des premiers essais chez l'Homme.

La pharmacogénomique

L'un des derniers développements a été celui de la pharmacogénomique [4]. La compréhension des mécanismes cellulaires qui sous-tendent les processus de cancérisation avait permis le développement d'inhibiteurs sélectifs des voies de signalisation impliquées, souvent des kinases qui

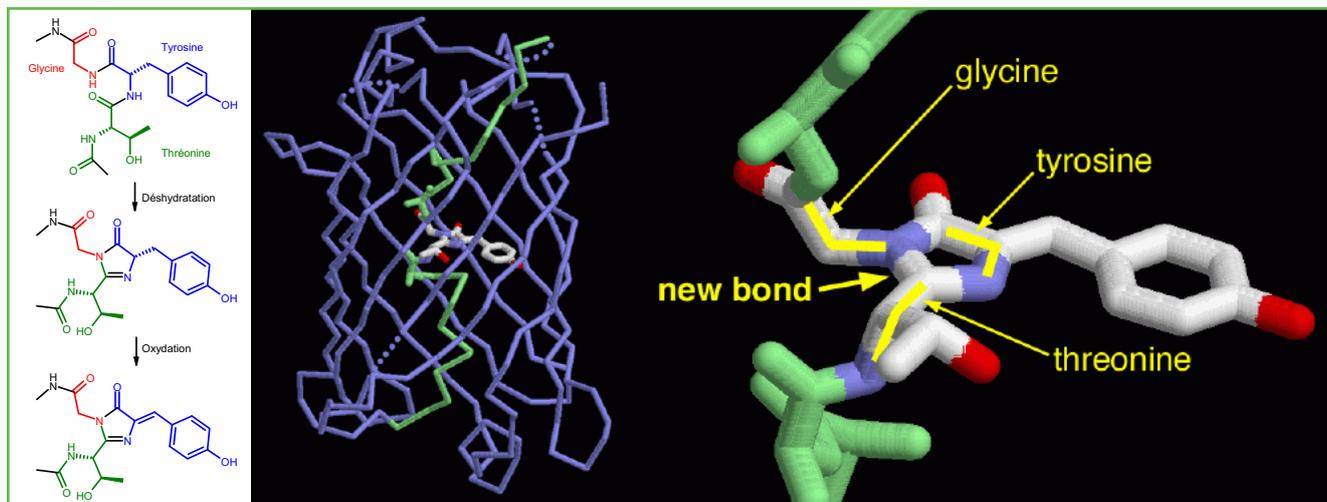


Figure 3 - Le fluorophore de la « green fluorescent protein » (GFP) est formé lors d'une réaction de cyclisation intramoléculaire spontanée mettant en jeu trois acides-aminés contigus (sérine, tyrosine, glycine). À gauche : formation du site fluorescent de la GFP (la conformation imposée par le reste de la protéine favorise les réactions qui ne nécessitent aucune catalyse). À droite : Structure tridimensionnelle de la GFP (source : Protein Data Bank).

phosphorylent les protéines. Ces nouvelles thérapies ciblées constituent un progrès majeur par rapport aux agents cytotoxiques. Par contre, elles ne sont efficaces que dans la sous-population des patients qui portent la mutation responsable du processus de cancérisation. C'est ainsi que s'est développé le concept de théranostique⁽³⁾, qui associe une thérapie ciblée et un test de diagnostic pour identifier, par analyse de leur génome, les patients répondeurs. Mis en place dès le début des essais cliniques, ces tests permettent de réduire le nombre de patients enrôlés et d'éviter de traiter des non-répondeurs. Ces tests seront par la suite utilisés durant toute la durée de vie du médicament. Un exemple récent en est le vemurafenib qui a révolutionné la prise en charge du mélanome métastatique. Sa cible est la kinase BRAF, sous réserve qu'elle soit porteuse de la mutation V600E (la valine en position 600 est remplacée par un acide glutamique). Cette mutation, qui concerne environ 50 % des patients, est responsable de l'activation non contrôlée de la voie des MAPK (protéine kinase activée par mitogène). Les résultats sur les patients porteurs de la mutation sont spectaculaires pour une pathologie gravissime qui, jusqu'à présent, résistait aux traitements classiques [5].

La « chemical biology » : la convergence...

Si on a souvent par le passé opposé chimie et biotechnologie, il est intéressant de constater que ces disciplines convergent de plus en plus au point de se recouvrir dans de nombreux domaines. La « chemical biology » est ainsi une discipline en plein essor possédant désormais ses propres revues scientifiques (figure 4). Les « facteurs », entités biologiques mal définies, sont tous devenus des macromolécules parfaitement connues à l'échelle atomique et accessibles à un large éventail de méthodes analytiques. La synthèse de véritables protéines contenant des acides aminés non naturels est devenue classique. Un « évènement » récent et passé inaperçu : dans le cadre de la mise en place de la législation sur les biosimilaires [6], la FDA a défini ce qu'elle considérait comme un peptide synthétique : tout peptide de moins de 40 acides aminés, qu'il soit produit par synthèse ou recombinant, tombe dans la catégorie « synthétique ». Par contre, au-dessus de 99 acides aminés, un peptide produit par synthèse totale sera considéré comme un recombinant ! Par cette démarche, le législateur prévoit clairement la possibilité que de véritables protéines puissent être produites par synthèse totale à une échelle industrielle et économiquement viable.

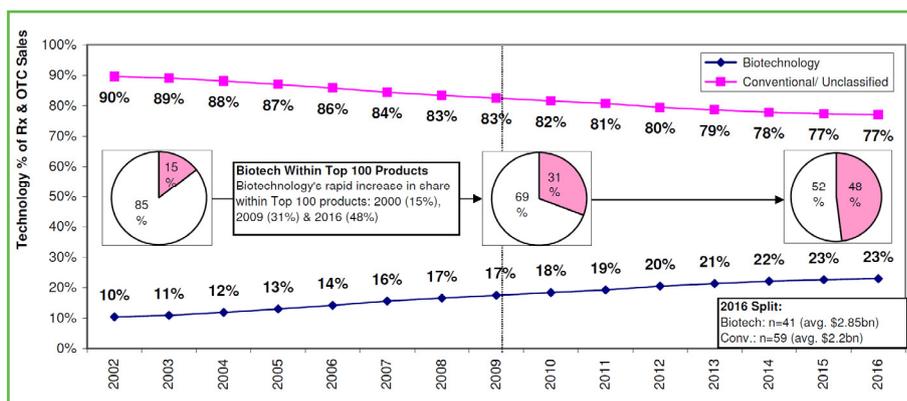


Figure 4 - Évolution des ventes mondiales de médicaments issus d'origine biotechnologique comparées à celle des ventes de médicaments d'origine chimique. À l'horizon 2016, parmi les 100 médicaments réalisant le plus gros chiffre d'affaires, on devrait en compter 48 d'origine biotechnologique.

Source : EvaluatePharma®, 2010.

Notes et références

- (1) Isolée à partir d'une méduse, la « green fluorescent proteïne » (GFP, protéine fluorescente verte) comporte 238 acides aminés. Cette protéine présente la particularité de développer une fluorescence verte par cyclisation d'un tripeptide Ser-Tyr-Gly selon un mécanisme spontané indépendant de tout cofacteur. Elle est très utilisée comme gène rapporteur lors des tests de criblage.
- (2) *Cellules Caco-2* : lignée cellulaire humaine issue d'un carcinome du côlon qui présente la particularité de former des monocouches confluentes sur les membranes de culture cellulaire. Elle est utilisée comme modèle de perméabilité pour évaluer l'absorption intestinale des médicaments.
- (3) *Théranostique* : association d'un diagnostic et d'une thérapie. C'est la base de la médecine personnalisée : elle permet de sélectionner les patients répondeurs à un médicament ou d'éviter de l'administrer s'ils risquent de développer des effets secondaires.
- [1] Shi L. *et al.*, Gardasil: prophylactic human papillomavirus vaccine development. From bench top to bed-side, *Clin. Pharmacol Ther.*, **2007**, *81*, p. 259.
- [2] Köhler G., Milstein C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, **1975**, *258*, p. 495.
- [3] Katz J., Janik J.E., Younes A., Brentuximab Vedotin (SGN-35), *Clin. Cancer Res.*, **2011**, *17*, p. 6428.
- [4] Feero G., Guttmacher A.E., Collins F.S., Genomic medicine - An updated primer, *New Engl. J. of Med.*, **2010**, *362*(21), p. 2011.
- [5] Chapman P.B. *et al.*, Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation, *New Engl. J. of Med.*, **2011**, *364*, p. 2507.
- [6] www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm271790.htm



André Tartar

est professeur à la Faculté des Sciences pharmaceutiques et biologiques de Lille*

* Faculté des Sciences pharmaceutiques et biologiques, 3 rue du professeur Laguesse, F-59006 Lille.
Courriel : andre.tartar@univ-lille2.fr

Connaissez-vous le site de l'AC ?

lactualitechimique.org



Alors, vite à votre souris !