

# De la **biologie** de **synthèse** aux **biomédicaments**

*Autour du Professeur Hervé Watier (MD, PhD), professeur d'Immunologie à la Faculté de Médecine de Tours et chef de service au CHU, coordinateur du LabEx MABImprove et du programme ARD2020 « Biomédicaments » de la région Centre-Val de Loire, ont collaboré à cet article Alexandre Bradier, étudiant en pharmacie, Joan Leclerc (PhD), du groupe IMT, chargé de mission pour la diffusion de la culture scientifique et technique du programme Biomédicaments, Mélusine Larivière (PharmD, PhD), animatrice scientifique du LabEx MABImprove et Guillaume Brachet (PharmD, PhD), assistant hospitalier universitaire en immunologie.*

Se poser la question des liens entre biologie de synthèse et biomédicaments nécessite d'abord de définir ce que sont les biomédicaments. Le plus simple est de les définir par ce qu'ils ne sont pas : ils ne proviennent pas de l'agriculture biologique, ni issus de la synthèse chimique, et ne sont pas de la « médecine douce ». Ce sont au contraire des molécules très actives, fréquemment produites par des OGM (Organismes Génétiquement Modifiés) et comme tout médicament, potentiellement sources d'effets indésirables. Les biomédicaments sont des macromolécules toujours produites par le vivant (on parle de bioproduction). La majorité sont des protéines, c'est-à-dire un enchaînement d'acides aminés tel un collier de perles, adoptant une grande variété de conformations dans

l'espace et pouvant faire l'objet de modifications chimiques par la cellule qui les produit (modifications post-traductionnelles). À la différence des médicaments chimiques classiques, ils possèdent un certain degré d'hétérogénéité, ce qui signifie que le principe actif existe sous plusieurs formes légèrement différentes liées à ces modifications post-traductionnelles, dont la plus fréquente est la réaction de *N*-glycosylation. C'est pourquoi les biomédicaments sont difficiles à caractériser par des méthodes uniquement structurales. La réglementation est donc plus exigeante quand il s'agit de produire une copie légale, appelée biosimilaire, qu'elle ne l'est pour un médicament chimique, dont la copie est un générique.

Les biomédicaments constituent un axe de développement

majeur pour l'industrie pharmaceutique. Ils n'ont pas pour vocation de remplacer les médicaments issus de la chimie mais ils diversifient l'offre médicamenteuse et ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques. De fait, les biomédicaments sont indiqués dans le traitement d'un nombre croissant de maladies (**Tableau**).

### 1 Bioproduction d'un biomédicament et bioproduction d'un médicament chimique

La production d'un médicament chimique peut faire appel à de l'extraction, à de la synthèse, et maintenant

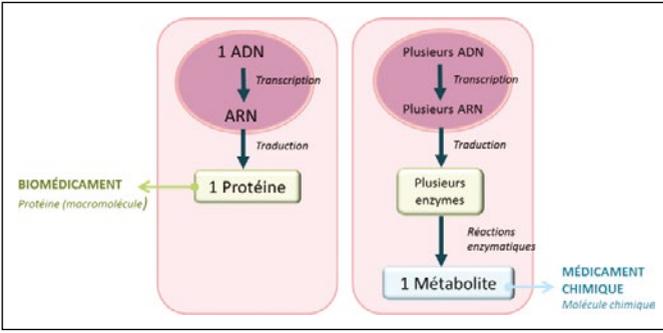
aussi à de la bioproduction. La fabrication d'un médicament chimique par des cellules vivantes est aussi appelé « biologie de synthèse », ce qui a été remarquablement illustré par le **Chapitre de R. Spagnoli** dans cet ouvrage *Chimie et biologie de synthèse, les applications* (EDP Sciences, 2019).

En réalité, la bioproduction d'un biomédicament est plus simple puisque l'on insère seulement les ADN codant la protéine (le biomédicament) dans la cellule-usine. Dans le cas de la biologie de synthèse, il faut intégrer dans la cellule usine tous les ADN codant les enzymes nécessaires à la synthèse de la molécule chimique (**Figure 1**).

#### Tableau

Différences entre médicaments chimiques et biomédicaments.

Médicaments chimiques	Biomédicaments
<b>Production</b>	
Le principe actif est issu de la synthèse chimique ou issu du vivant	Les médicaments biologiques sont toujours fabriqués par des cellules vivantes
<b>Taille et structure</b>	
Le principe actif possède une structure relativement simple et une petite taille	Ils peuvent être de taille 1 000 fois supérieure et ont une structure plus complexe
<b>Copies</b>	
Des copies identiques peuvent être fabriquées par des laboratoires concurrents ( <b>génériques</b> )	Ils sont fabriqués à partir d'une lignée cellulaire unique. Un concurrent devra produire dans une autre lignée ( <b>biosimilaires</b> )
<b>Caractérisation</b>	
Structure simple pouvant être entièrement caractérisée	Structure complexe plus ou moins hétérogène souvent difficile à caractériser entièrement
<b>Immunogénicité</b>	
Faible potentiel immunogène : les petites molécules chimiques sont si petites qu'elles échappent souvent au système immunitaire	Fort potentiel immunogène
<b>Voies d'administration</b>	
Variable	Voie injectable uniquement



**Figure 1**

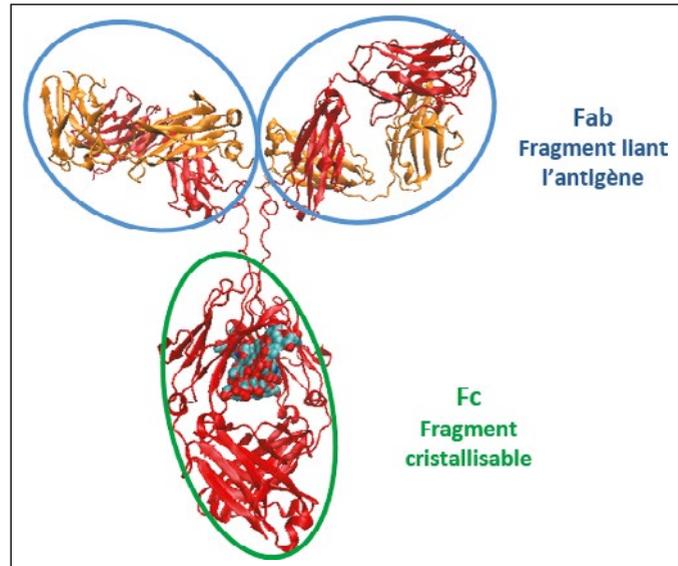
Bioproduction d'un biomédicament (à gauche) et bioproduction d'un médicament chimique (à droite). En rose, sont représentées les cellules-usine eucaryotes, avec leur noyau en violet. Ces cellules-usine sont modifiées génétiquement, avec au moins un gène codant la protéine-médicament pour les biomédicaments, ou plusieurs gènes codant des enzymes chargées d'assurer la biosynthèse du métabolite d'intérêt pour les médicaments chimiques.

Si l'on définit la biologie de synthèse comme étant la modification du patrimoine enzymatique de la cellule-usine, la question que l'on peut se poser est celle de savoir si ce concept a déjà été transposé au domaine du biomédicament et s'il permet d'obtenir des biomédicaments encore plus efficaces. Pour traiter ce sujet, nous allons nous focaliser sur le secteur le plus dynamique des biomédicaments, celui des anticorps thérapeutiques que nous connaissons le mieux, au travers notamment du LabEx MAblmprove.

## 2 Améliorer encore les anticorps

Les anticorps thérapeutiques forment la catégorie de biomédicaments qui, d'ores et déjà, remporte le plus de succès et suscite le plus d'espoir. Ils présentent en effet l'avantage de pouvoir viser une vaste palette de cibles (qui sont pour eux des antigènes), d'où des indications thérapeutiques nombreuses et très diverses. Cette reconnaissance spécifique de cibles multiples est permise grâce aux portions Fab (**Figure 2**). À l'autre extrémité de l'anticorps, la portion Fc permet notamment aux anticorps de persister longtemps dans

l'organisme et ainsi d'être administrés de façon espacée. Cette portion Fc est également responsable du mécanisme de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (« *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* »), dont



**Figure 2**

Modèle tridimensionnel d'un anticorps thérapeutique, en représentation ruban. Les deux chaînes lourdes identiques (en rouge) sont reliées entre elles au niveau de la région charnière par des ponts disulfure et sont étroitement associées entre elles au niveau de la portion Fc. Deux structures glycaniques (une par chaîne lourde), qui sont des polymères de sucres, sont représentées par des sphères bleues et rouges, et occupent l'espace au cœur du Fc. Les deux chaînes légères (en orange), identiques entre elles, sont étroitement associées aux chaînes lourdes au niveau des portions Fab. Les sites de liaison à la cible (à l'antigène) sont situés à l'extrémité des bras Fab.

l'importance dans l'activité des anticorps anticancéreux a été démontrée par des travaux de notre équipe<sup>1</sup> (**Figure 3**). Ces travaux ont poussé les chercheurs et les entreprises biopharmaceutiques à s'intéresser à la portion Fc, en cherchant à la modifier par ingénierie pour « doper » l'activité ADCC, c'est-à-dire permettre aux cellules de l'immunité de mieux reconnaître l'anticorps et que soit ainsi accrue la destruction de la cible (**Figure 3**). L'une des approches employées pour doper l'anticorps consiste à modifier la glycosylation du Fc pour augmenter sa liaison au FcγRIIIA, le récepteur Fc important pour l'ADCC. La *N*-glycosylation des protéines est un processus enzymatique consistant à lier de façon covalente un glucide à une chaîne peptidique et qui se déroule en plusieurs étapes (**Figure 4**).

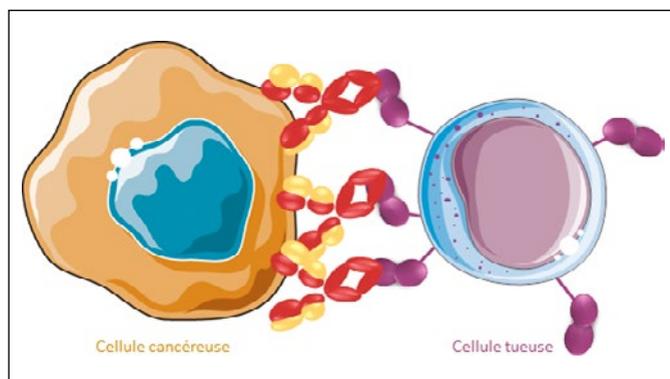
1. Cartron G., Dacheux L., Salles G., Solal-Celigny P., Bardos P., Colombat P., Watier H. (2002). Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene, *Blood*, 99 : 754-8.

Cette glycoingénierie a déjà porté ses fruits, car l'obinutuzumab a maintenant reçu une autorisation de mise sur le marché dans le traitement de la leucémie lymphoïde chronique et des lymphomes non hodgkiniens. La structure glycanique qui se trouve dans les portions Fc de cet anticorps est différente de celle d'autres anticorps thérapeutiques<sup>2</sup>. Pour obtenir cette modification, il a fallu exprimer une *N*-acétylglucosaminyltransférase III dans la cellule produisant l'anticorps (**Encart : « Synthèse protéique et *N*-glycosylation**»). La *N*-acétylglucosaminyltransférase III est l'une des enzymes intervenant dans la *N*-glycosylation. Elle va non seulement ajouter un nouveau résidu *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) sur le glycanne, mais aussi entrer en compétition avec la fucosyltransférase VIII, provoquant une diminution de la quantité de fucose greffé (comme s'il y avait deux ouvrières pour un seul siège

2. Cartron G., Watier H. (2017) Obinutuzumab: what is there to learn from clinical trials?. *Blood*, 130 : 581-589.

**Figure 3**

Le mécanisme d'ADCC (« Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity »). Une fois les anticorps fixés à leur cible, leur portion Fc va permettre de recruter des cellules de l'immunité comme les cellules « Natural Killer » ou macrophages, qui portent des récepteurs pour la portion Fc des IgG. Ces cellules effectrices vont alors libérer leur arsenal cytotoxique en direction de la cellule-cible et l'éliminer.



## SYNTHÈSE PROTÉIQUE ET N-GLYCOSYLATION

Pour fabriquer un anticorps, il faut transférer dans la cellule-usine deux ADN, l'un codant la chaîne lourde et l'autre la chaîne légère de l'anticorps. Ces ADN sont transcrits en ARN messagers (ARNm), qui migrent dans le cytosol, où ils sont pris en charge par les ribosomes au contact du réticulum endoplasmique rugueux (ou granuleux). Au fur et à mesure que le ribosome lit l'ARNm, il recrute l'ARN de transfert (ARNt) propre à chaque codon, qui amène avec lui l'acide aminé correspondant, qui sera ajouté à la protéine en cours de formation.

Le peptide signal permet le passage de la protéine à l'intérieur du réticulum. Dès qu'apparaît dans le réticulum un acide aminé asparagine suivi, deux acides aminés plus loin, d'un acide aminé hydroxylé (sérine ou thréonine), est greffé sur le  $-NH_2$  de l'asparagine (d'où le nom de *N*-glycosylation) un glycanne (ou oligoside, polymère de sucres) qui est préfabriqué.

C'est ce qui survient lorsque la portion Fc de la chaîne lourde est traduite. Cet oligoside est ensuite profondément remanié, d'abord par des glycosidases (enzymes qui éliminent des sucres), puis par des glycosyltransférases (enzymes qui ajoutent des sucres), étagées dans un ordre précis sur le réticulum endoplasmique puis le *cis*-Golgi, le Golgi médian, le *trans*-Golgi et les vésicules de sécrétion. Alors que l'anticorps progresse dans ces différents compartiments pour être sécrété, les glycosyltransférases ajoutent tour à tour de nouveaux sucres sur les glycannes des chaînes lourdes, à la manière d'ouvrières sur une chaîne de montage industrielle. Sur le schéma simplifié de la **Figure 4**, les différents sucres représentés témoignent de l'action des *N*-acétyl-glucosaminyltransférases I puis II (ajout de GlcNAc), d'une fucosyltransférase (ajout de fucose) et d'une galactosyltransférase (ajout de galactoses).

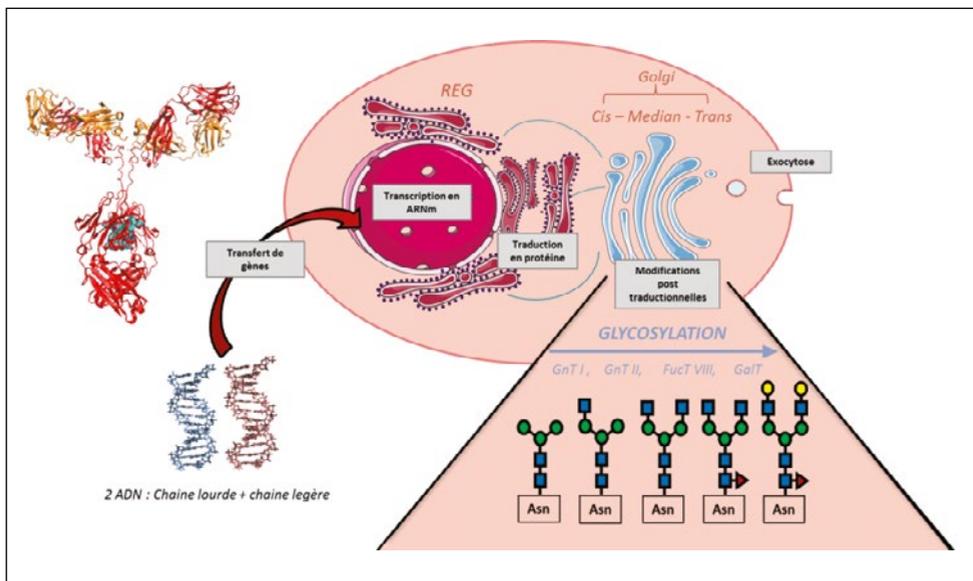


Figure 4

Synthèse protéique et N-glycosylation.

sur la chaîne de montage). C'est en fait l'absence de ce fucose qui va améliorer la liaison au récepteur FcγRIIIA des cellules de l'immunité et donc la réponse ADCC<sup>2</sup>.

Cet exemple illustre donc bien l'intérêt de la biologie de synthèse (modification du patrimoine enzymatique de la cellule-usine) au service des biomédicaments. Dans le cas présent, celui d'un anticorps dopé par biologie de synthèse, il aura donc fallu insérer trois ADN dans la cellule-usine, deux pour l'anticorps (chaîne légère et chaîne lourde) et un pour l'enzyme (*N*-acétylglucosamyltransférase III).

### 3 Doper des anticorps par la chimie

Une autre façon d'obtenir des anticorps dopés pour le traitement des cancers est de recourir à la chimie. En effet, les progrès de l'ingénierie chimique et biologique permettent de conjuguer des anticorps avec des agents cytotoxiques très puissants, autrement dit des poisons, grâce à des liens chimiques (ou « *linkers* ») (*Figure 5*). Cela permet de combiner la

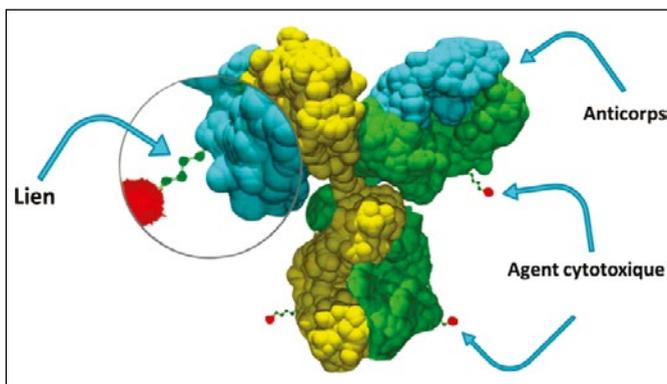
spécificité de ciblage des anticorps avec la forte cytotoxicité de certains médicaments chimiques, pour mieux cibler la tumeur et éviter de léser les tissus sains.

La conjugaison a lieu après la synthèse et la purification de l'anticorps. À la manière d'une modification post-traductionnelle, il s'agit de fixer la molécule chimique, *via* le linker, sur un acide aminé défini, les plus courants étant la lysine et la cystéine (*Figure 5*). Compte tenu du nombre important d'acides aminés dans un anticorps (environ 1 200), il existe de nombreuses possibilités d'attache (notamment pour les lysines puisqu'il en existe plusieurs dizaines à la surface d'un anticorps), ce qui peut induire un problème d'hétérogénéité : le nombre de molécules chimiques attachées à l'anticorps est mal maîtrisé et varie d'une molécule d'anticorps à l'autre.

Pour pallier ce problème, les scientifiques de la société Ambrx Inc. ont proposé de modifier l'anticorps par biologie de synthèse, en y insérant un acide aminé non naturel qui puisse faciliter et guider l'attache du médicament

**Figure 5**

Schéma général d'un immunoconjugué (« antibody-drug conjugate »). L'anticorps est représenté avec ses chaînes lourdes en jaune et vert, et ses chaînes légères en bleu clair. La bioconjugaison se fait par couplage covalent d'agents cytotoxiques (symbolisés par des billes rouges, comme des bombes), par le biais d'un lien chimique (ou linker), sur certains résidus de l'anticorps, souvent des lysines (comme ici) ou des cystéines.



chimique sur l'anticorps<sup>3</sup>. Il serait ainsi possible de mieux contrôler l'homogénéité du médicament, ce qui serait souhaitable dans la perspective d'une utilisation en clinique.

La technologie développée par Ambrx Inc. exploite un codon STOP redondant, le codon « ambre », pour introduire dans

l'anticorps un acide aminé non naturel, créé par synthèse en dérivant chimiquement un acide aminé existant (Figure 6). Celui-ci ne possède pas de codon correspondant dans le code génétique, ni d'ARNt, ni d'aminocyl-ARNt synthétase. L'intérêt d'utiliser un tel acide aminé réside dans les caractéristiques chimiques personnalisables de sa chaîne latérale qui permettent une liaison plus facile et plus spécifique du linker à l'anticorps et un meilleur contrôle de la conjugaison. L'idée de la technique du codon Ambre est en pratique de détourner le codon STOP du même nom (Figure 7) et de l'attribuer à un dérivé d'acide

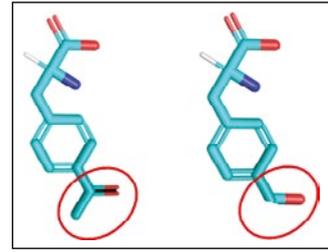


Figure 6

Acide aminé non naturel. Dans cet exemple, la para-acétylphénylalanine (à gauche) est un acide aminé artificiel dérivé du tryptophane (à droite), capable chimiquement de s'insérer dans une protéine, pour peu qu'un ARN de transfert (ARNt) et une aminocyl-ARNt synthétase, eux aussi non naturels, assurent son insertion dans la chaîne polypeptidique.

3. Tian F., Lu Y., Manibusan A., Sellers A., Tran H., Sun Y., Phuong T., Barnett R., Hehli B., Song F., DeGuzman M.J., Ensari S., Pinkstaff J.K., Sullivan L.M., Biroc S.L., Cho H., Schultz P.G., DiJoseph J., Dougher M., Ma D., Dushin R., Leal M., Tchistiakova L., Feyfant E., Gerber H.P., Sapra P. (2014). A general approach to site-specific antibody drug conjugates, *Proc Natl Acad Sci USA*, 111 : 1766-71.

le code génétique									
	Deuxième lettre								Troisième lettre (côté 3')
	U		C		A		G		
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop	A
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C
	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G
	codon d'initiation				codon de terminaison				

Figure 7

Le code génétique et les codons STOP. L'ARN messenger est un enchaînement de triplets de bases nucléotidiques U, C, A ou G, chacun correspondant à un ARNt et à une aminocyl-ARNt synthétase, donc à un acide aminé de la chaîne protéique. Les 20 acides aminés naturels sont codés par 45 triplets, dont le codon d'initiation (AUG) en vert, codant une méthionine. À ces 45 triplets s'ajoutent 3 triplets de terminaison en rouge, appelés codons STOP. Ces sont les codons Ocre (UAA), Opale (UGA) et Ambre (UAG). Ces codons ne sont associés à aucun ARNt, mais permettent le recrutement d'un facteur de terminaison (Release Factor) qui va terminer la synthèse protéique et détacher la protéine du ribosome.

aminé, la para-acétylphénylalanine par exemple. Pour cela la cellule-usine doit être modifiée afin qu'elle puisse intégrer ce nouvel acide aminé. Cela nécessite (Figure 8) : l'inactivation du gène *RF1*, le remplacement des codons ambre dans l'ensemble de l'ADN de la cellule usine, l'introduction d'un gène muté pour l'ARNt de la para-acétylphénylalanine, l'introduction d'un gène muté pour la para-acétylphénylalanine-ARNt synthétase.

Il s'agit donc d'une modification de grande ampleur de la cellule usine, qui a déjà été

réalisée avec succès<sup>3</sup>. Une fois cette cellule-usine modifiée, il ne reste plus qu'à y introduire l'ADN de l'anticorps à produire, comme classiquement. Lors de la production il faudra évidemment apporter l'acide aminé non naturel choisi, la para-acétylphénylalanine, dans le milieu de culture, puisque la cellule ne peut en fabriquer. L'anticorps obtenu comportera donc la para-acétylphénylalanine aux endroits déterminés, permettant de diriger la bioconjugaison du linker et du composé cytotoxique.

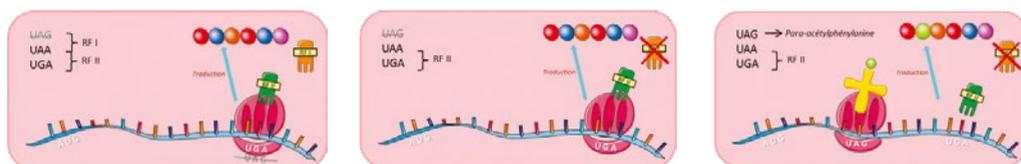


Figure 8

Ingénierie du codon Ambre pour permettre l'insertion d'un acide aminé non naturel. Dans un premier temps (en haut), il faut modifier tous les codons STOP (UAG) dans le génome de la cellule-usine et les remplacer un codon STOP UGA afin d'obtenir des protéines fonctionnelles et une cellule-usine viable. En effet, une fois un acide aminé non naturel attribué au codon Ambre, celui-ci sera systématiquement intégré aux protéines au lieu d'entraîner la fin de la traduction, ce qui pourrait être délétère. Dans un second temps (au milieu), il faut éliminer le facteur de terminaison RF1 pour éviter une compétition avec le nouvel ARNt correspondant au codon Ambre. La terminaison des chaînes protéiques restera possible grâce au facteur RF2 correspondant aux autres codons STOP. Une fois l'ADN de la cellule-usine « nettoyé », il est nécessaire d'y intégrer le nouvel ARNt et l'aminocyl-ARNt synthétase qui ont fait l'objet d'une ingénierie pour connecter le codon Ambre à l'acide aminé non naturel sélectionné, ici la para-acétylphénylalanine, qui sera apportée dans le milieu de culture.

## De nouveaux horizons pour la biologie de synthèse

La biologie de synthèse ouvre des horizons nouveaux, non seulement dans le domaine du médicament chimique, mais aussi dans celui des biomédicaments. Si la technologie du codon Ambre en est encore au stade de la recherche, elle porte en elle la perspective d'anticorps armés plus homogènes et possiblement plus

efficaces. Quant à la glycoingénierie, c'est une approche qui a déjà fait ses preuves, qui est une réalité en clinique et qui continue de susciter l'intérêt des chercheurs pour moduler les activités pharmacologiques des anticorps.

Plus généralement, les exemples exposés ici ne sont qu'un aperçu des nombreuses applications de la biologie de synthèse qui, en modulant le patrimoine enzymatique des cellules-usine, permettent d'améliorer les biomédicaments et leur production.