

**Exemples de protéines
biopharmaceutiques produites par
bioingénierie**

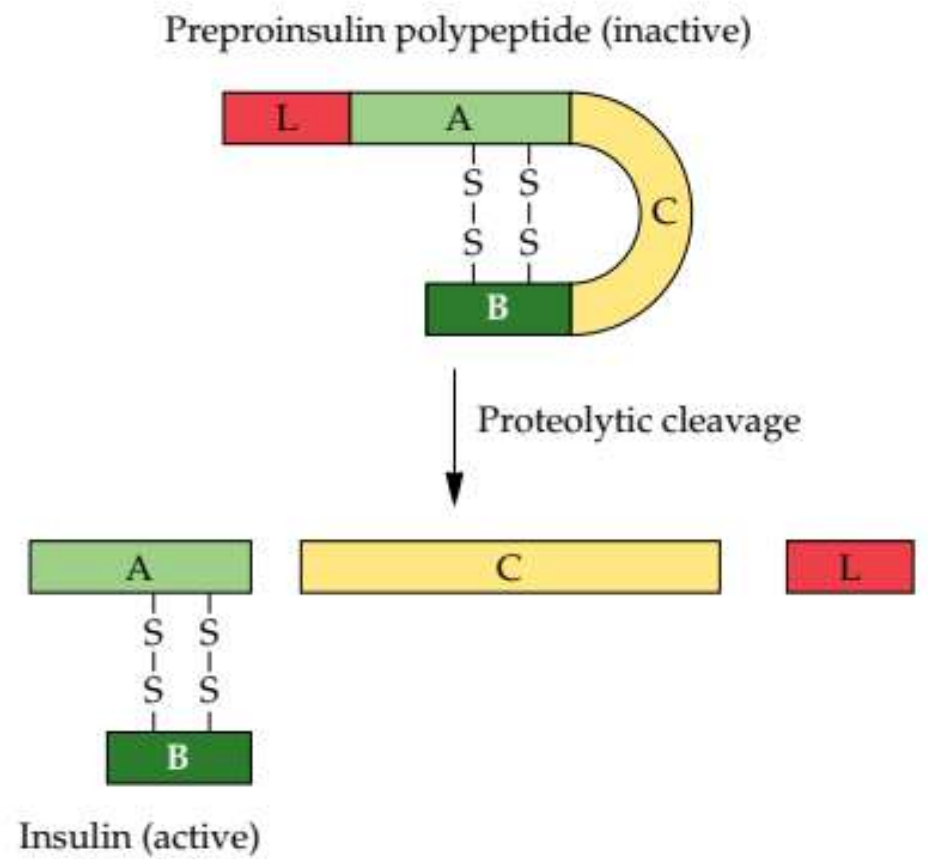
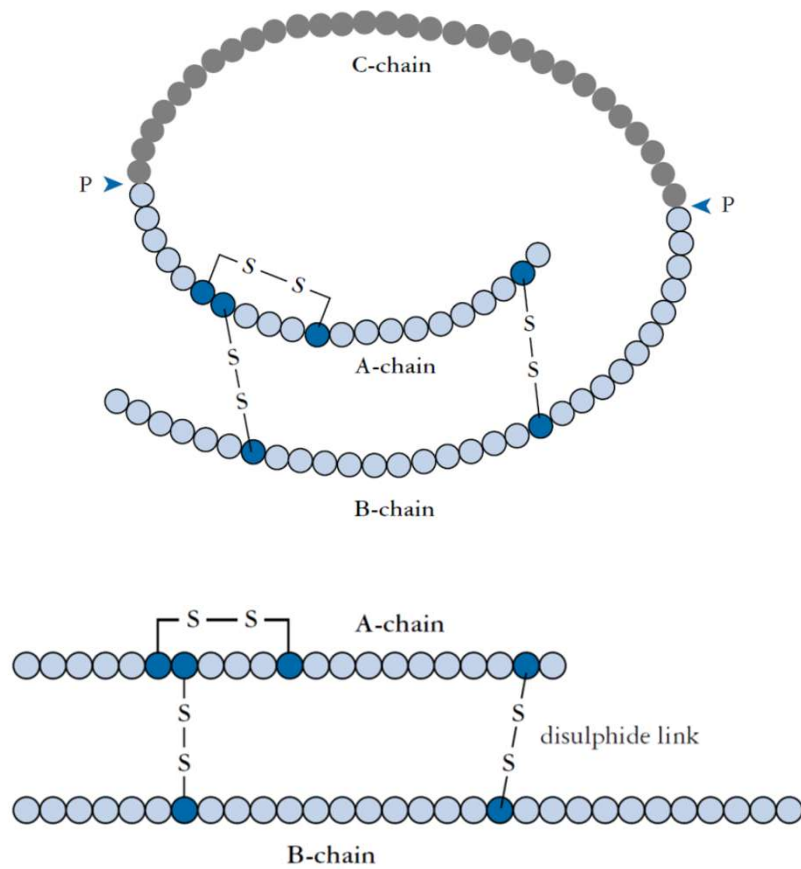
Diabète Vs Insuline

- Le nombre de personnes atteintes de diabète est estimé à plus de 370 millions, et en 2030, il passera à 552 millions.
- Le diabète de type I est un trouble métabolique courant (il touche 40 à 45 millions de personnes dans le monde) dans lequel le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline pour réduire la glycémie. Les diabétiques de type I, qui doivent être traités par insuline, représentent environ un dixième de tous les diabétiques dans le monde, tandis que les diabétiques de type II, qui ne nécessitent généralement pas d'administration externe d'insuline (sauf en cas de diabète de type II avancé), représentent les 90 % restants.

Insuline

- L'insuline humaine est un polypeptide dont la masse moléculaire est de 5808 Da.
- L'insuline est composée de deux chaînes d'acides aminés, la chaîne A (acide, 21 acides aminés) et la chaîne B (basique, 30 acides aminés).
- Lorsqu'elles sont synthétisées naturellement, ces chaînes sont liées par un autre peptide de 30 acides aminés appelé peptide C. Cette molécule précurseur de 81 acides aminés est connue sous le nom de proinsuline.
- Les chaînes A et B sont liées entre elles par des liaisons disulfures entre les résidus de cystéine, et la proinsuline est clivée par une protéase pour produire l'hormone active

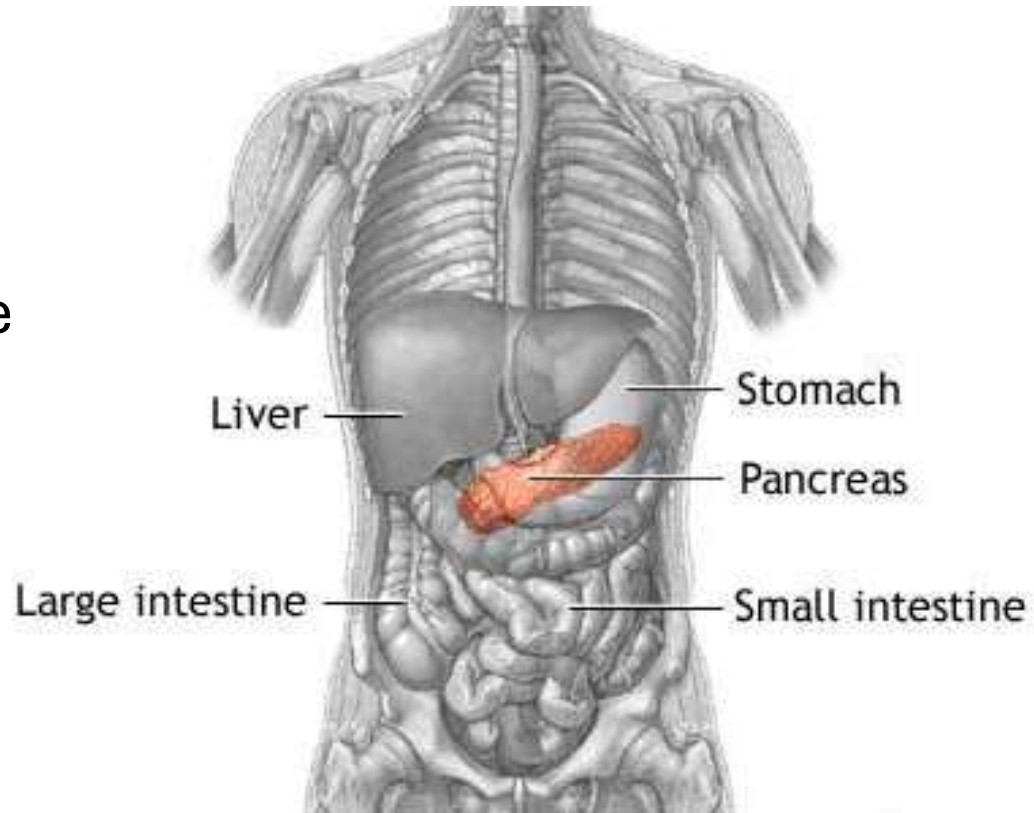
Insuline



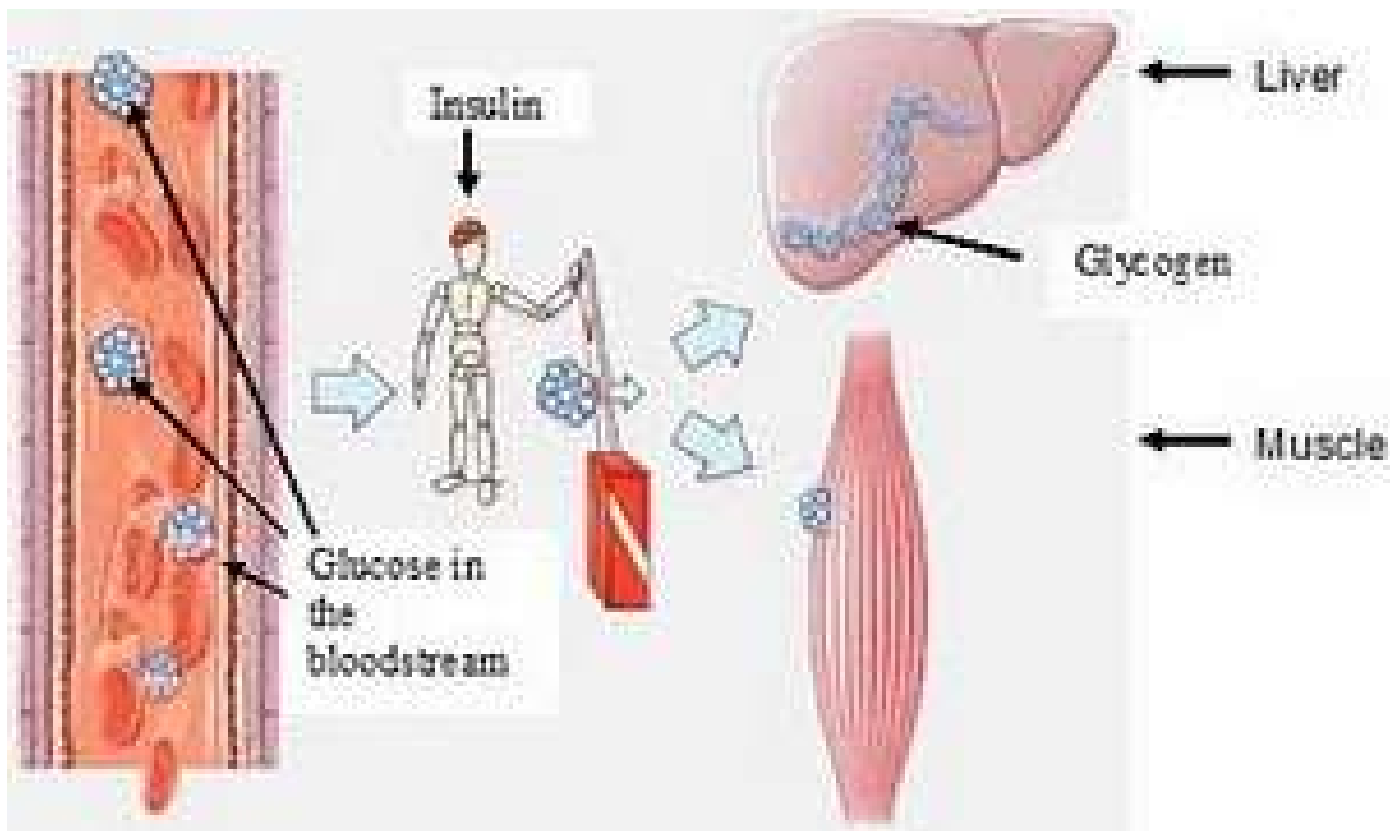
Insulin

– c'est quoi exactement?

- Une hormone (messenger chimique) qui permet au glucose de passer du sang vers vos cellules.



Insulin: Comment ça marche



Production de l'insuline recombinante

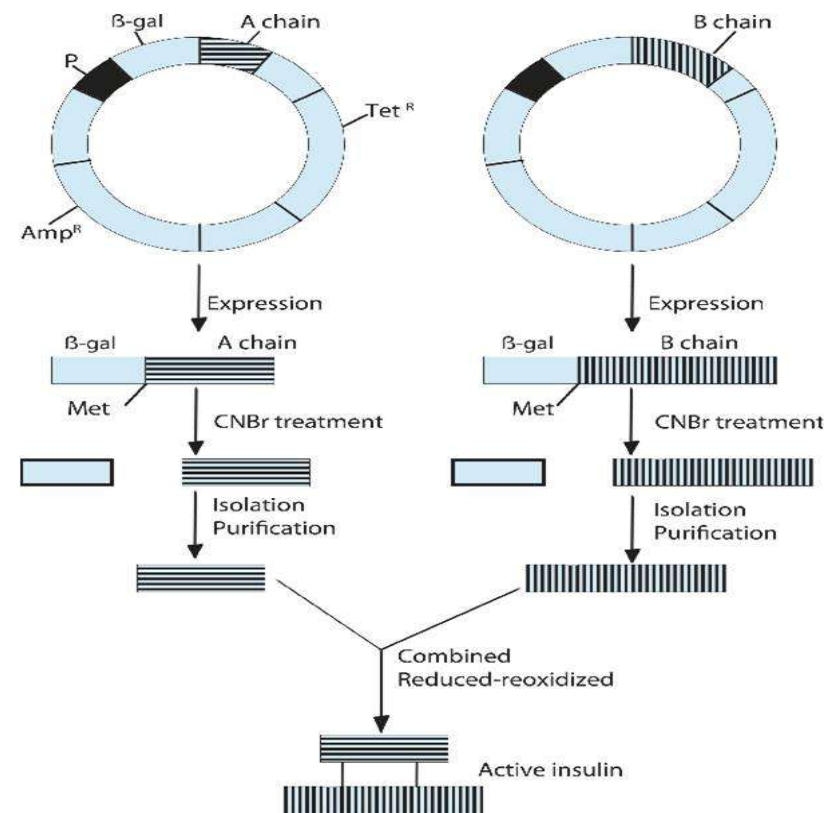
- Le premier produit commercial issu de la technologie de l'ADN recombinant fut l'insuline humaine, utilisée dans le traitement du diabète. La séquence d'ADN codant pour l'insuline humaine fut synthétisée, un exploit remarquable à l'époque, et insérée dans un plasmide capable de se maintenir dans une souche non pathogène de la bactérie *Escherichia coli*.
- Les cellules hôtes bactériennes ont agi comme des usines biologiques pour la production des deux chaînes peptidiques d'insuline humaine, lesquelles pouvaient être purifiées et combinées pour traiter les diabétiques allergiques à l'insuline porcine disponible dans le commerce.

Production de l'insuline recombinante

- Eli Lilly and Company a lancé l'insuline humaine issue de l'ADN recombinant en 1982. Deux approches de production différentes ont été décrites par Eli Lilly and Company.
- Dans la première approche, les chaînes A et B de l'insuline ont été cultivées séparément dans des bactéries sous forme de corps d'inclusion. Ensuite, des purifications séparées des deux chaînes ont été réalisées, puis combinées chimiquement, puis d'autres étapes de purification ont été réalisées.
- Dans la seconde technique, l'expression de la proinsuline chez *Escherichia coli* a pris la forme d'un promoteur tryptophane avec une liaison méthionine à la proinsuline.

Production de l'insuline recombinante

- Des scientifiques ont synthétisé chimiquement les séquences d'ADN des deux chaînes A et B de l'insuline, puis les ont insérées séparément dans deux plasmides pBR322, à côté du gène de la β -galactosidase.
- Les plasmides recombinants ont été transférés séparément dans des cellules *d'E. coli*, qui ont sécrété séparément les chaînes A et B de la β -galactosidase fusionnée.
- Ces chaînes ont été isolées à l'état pur par détachement de la β -galactosidase, avec des rendements d'environ 10 mg/24 g de cellules saines et transformées.



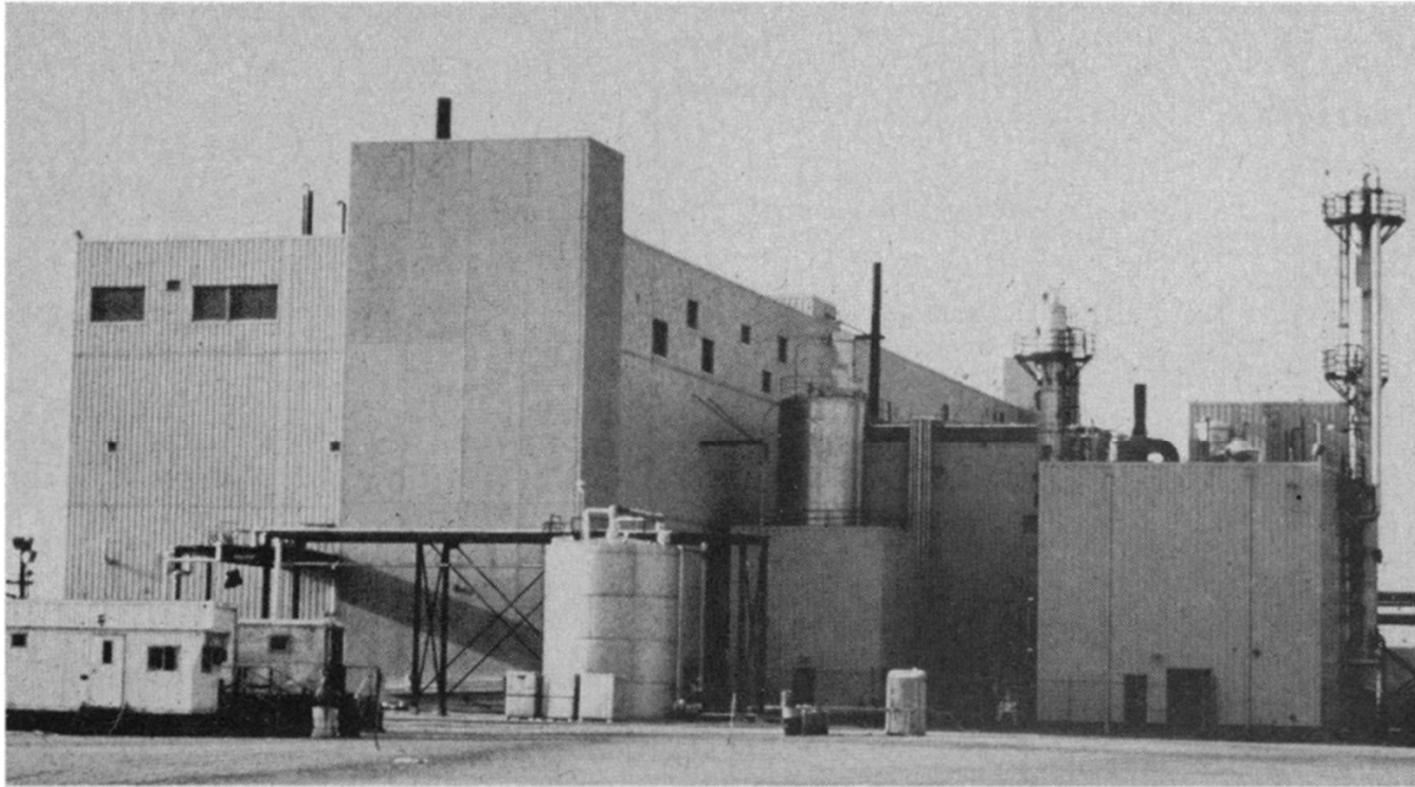


Fig. 4. The new production plant in Indianapolis for human insulin produced by recombinant DNA technology.

Production de l'insuline recombinante

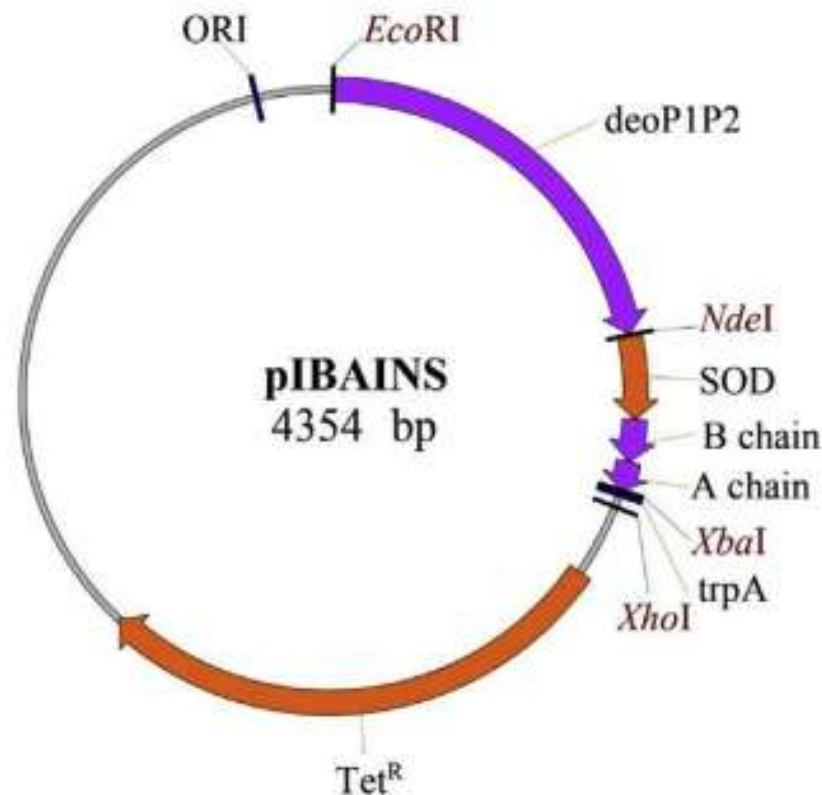
- Il est préférable d'adopter la voie de la proinsuline, car elle ne nécessite qu'une seule fermentation et purification, ce qui rend le processus de production plus efficace que la méthode de combinaison à deux chaînes. Depuis 1986, la voie de la proinsuline est commercialisée.
- Il a donc été décidé de synthétiser une insuline monocaténaire dont les chaînes A et B sont liées de manière covalente par un peptide de liaison de 6 acides aminés.
- À ce jour, il a été démontré que *L. lactis* génétiquement modifiée peut produire et sécréter une insuline monocaténaire possédant une activité biologique insulinique in vitro. Des niveaux élevés de production de protéines recombinantes ont été obtenus grâce à *S. cerevisiae*.

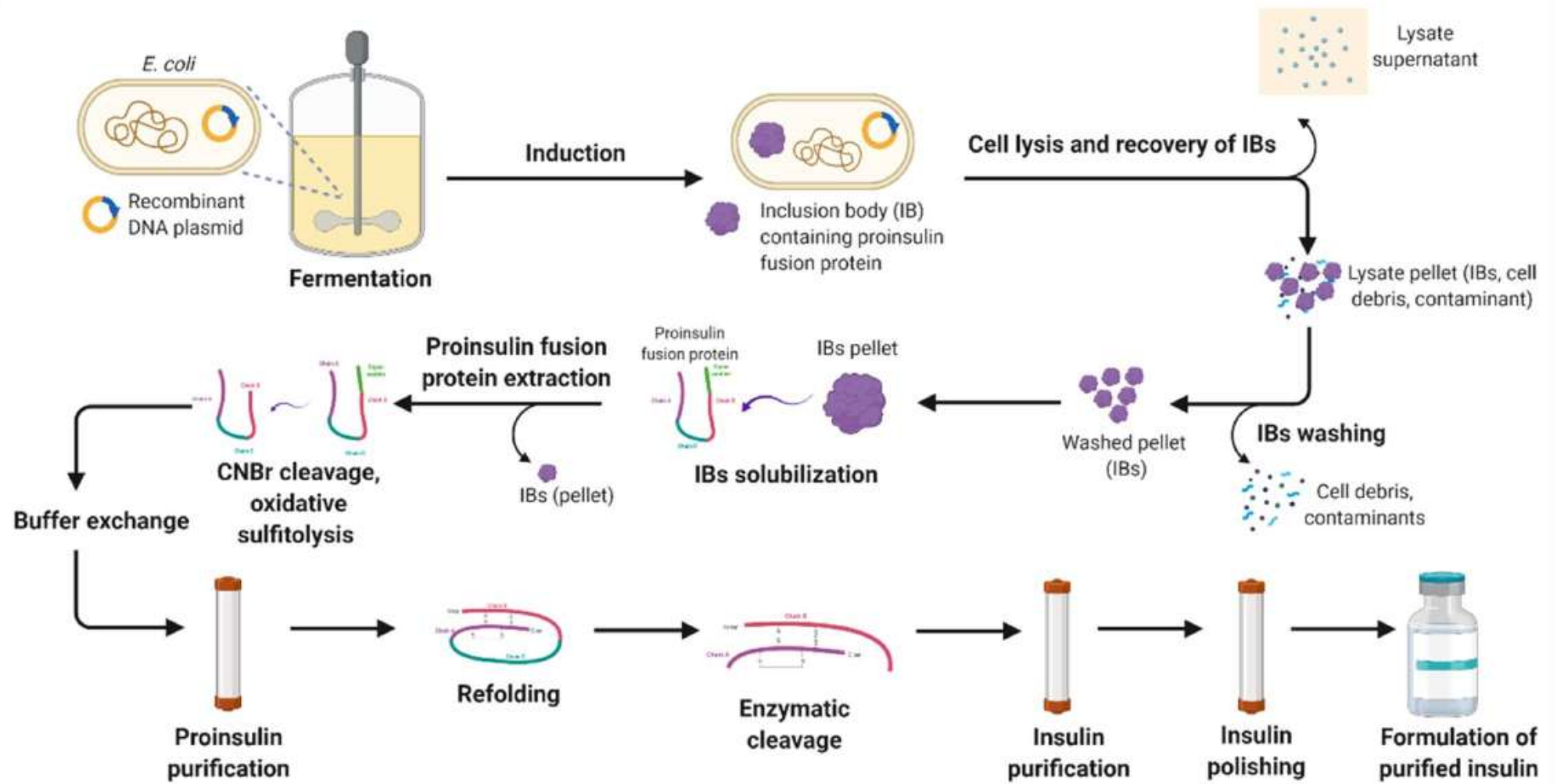
Production de l'insuline recombinante

- Pour garantir que l'insuline monocaténaire soit aussi active que l'insuline native, quatre modifications supplémentaires d'acides aminés ont été apportées à la protéine (au niveau de l'ADN).
- Des dérivés de l'insuline présentant deux de ces modifications étaient déjà utilisés en clinique au moment de ces travaux, ce qui a conforté les chercheurs dans l'idée que les modifications proposées de quatre acides aminés permettraient d'obtenir une forme d'insuline active et stable.
- L'insuline monocaténaire ainsi obtenue est plus stable à haute température et moins susceptible de s'agréger que l'insuline native.

Production de l'insuline recombinante

- Fig. 2. The construction scheme for the pIBAINS plasmid. The pIBAINS plasmid contains a hybrid protein SOD:INS gene under the deoP1P2 promoter; Tet^R - tetra gene; A chain, B chain





The general workflow for the downstream processing of recombinant human insulin and its analogues (created with BioRender.com)

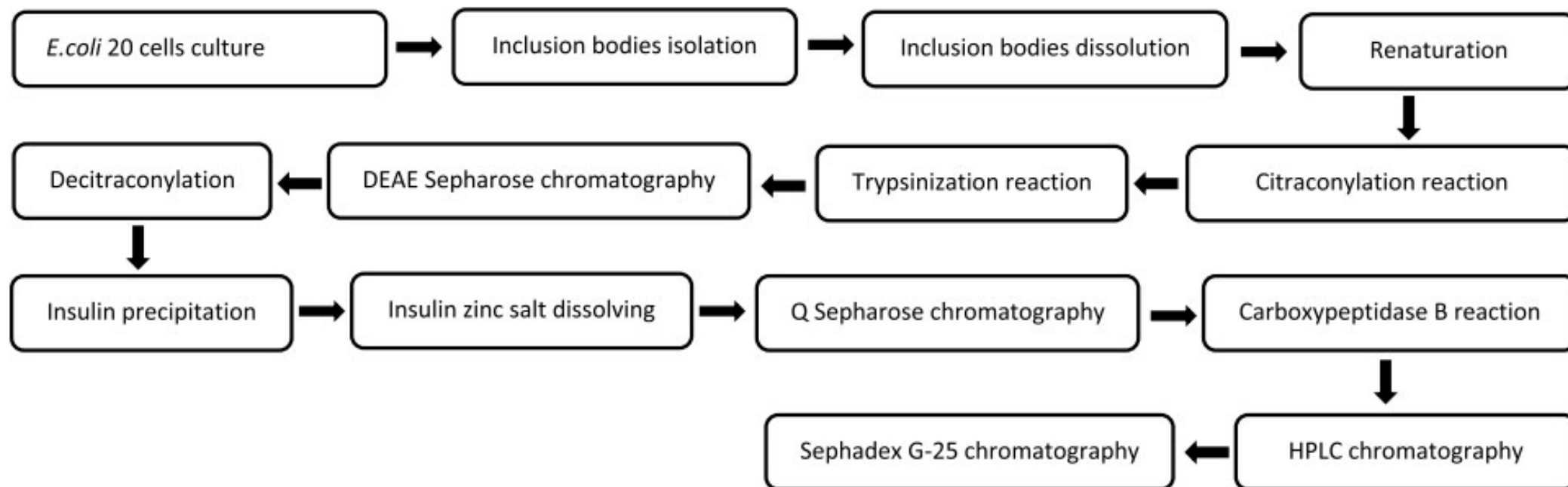


Fig. 1. The block diagram of the process for obtaining recombinant human insulin from *E. coli* 20 cells.

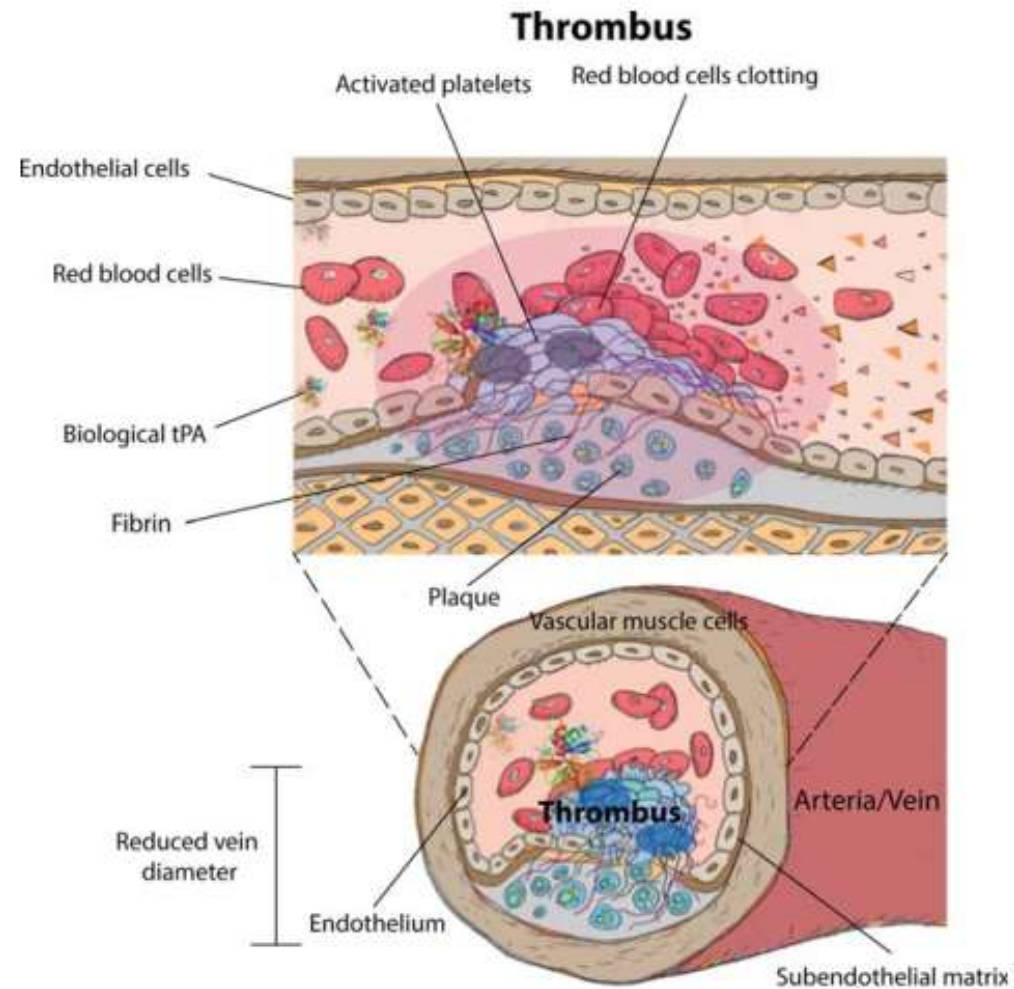
Activateur tissulaire de plasminogène (tPA)

- **Physiologie de l'hémostase:**
- Le système hémostatique est une combinaison d'événements biochimiques et cellulaires se produisant dans le sang des artères et des veines, conçus pour maintenir le sang à l'état fluide (système fibrinolytique) et pour prévenir la perte de sang en cas de lésion de la paroi d'un vaisseau sanguin (système de coagulation).

Activateur tissulaire de plasminogène (tPA)

- **Physiologie de l'hémostase:**
- L'arrêt du saignement, aussi appelé coagulation, se produit suite à la formation d'un caillot qui vient obturer la brèche (ou colmater la blessure) qui s'est formée au niveau d'un vaisseau.
- La formation de ce caillot fait intervenir plusieurs acteurs qui vont entrer en scène à des moments différents.
- On distingue classiquement trois périodes interdépendantes: tout d'abord l'hémostase primaire puis l'étape de la coagulation plasmatique qui permettent l'arrêt du saignement. La troisième étape, la fibrinolyse, permet de dissoudre le caillot une fois qu'il a rempli son rôle et de restaurer l'intégrité du vaisseau.

Activateur tissulaire de plasminogène (tPA)



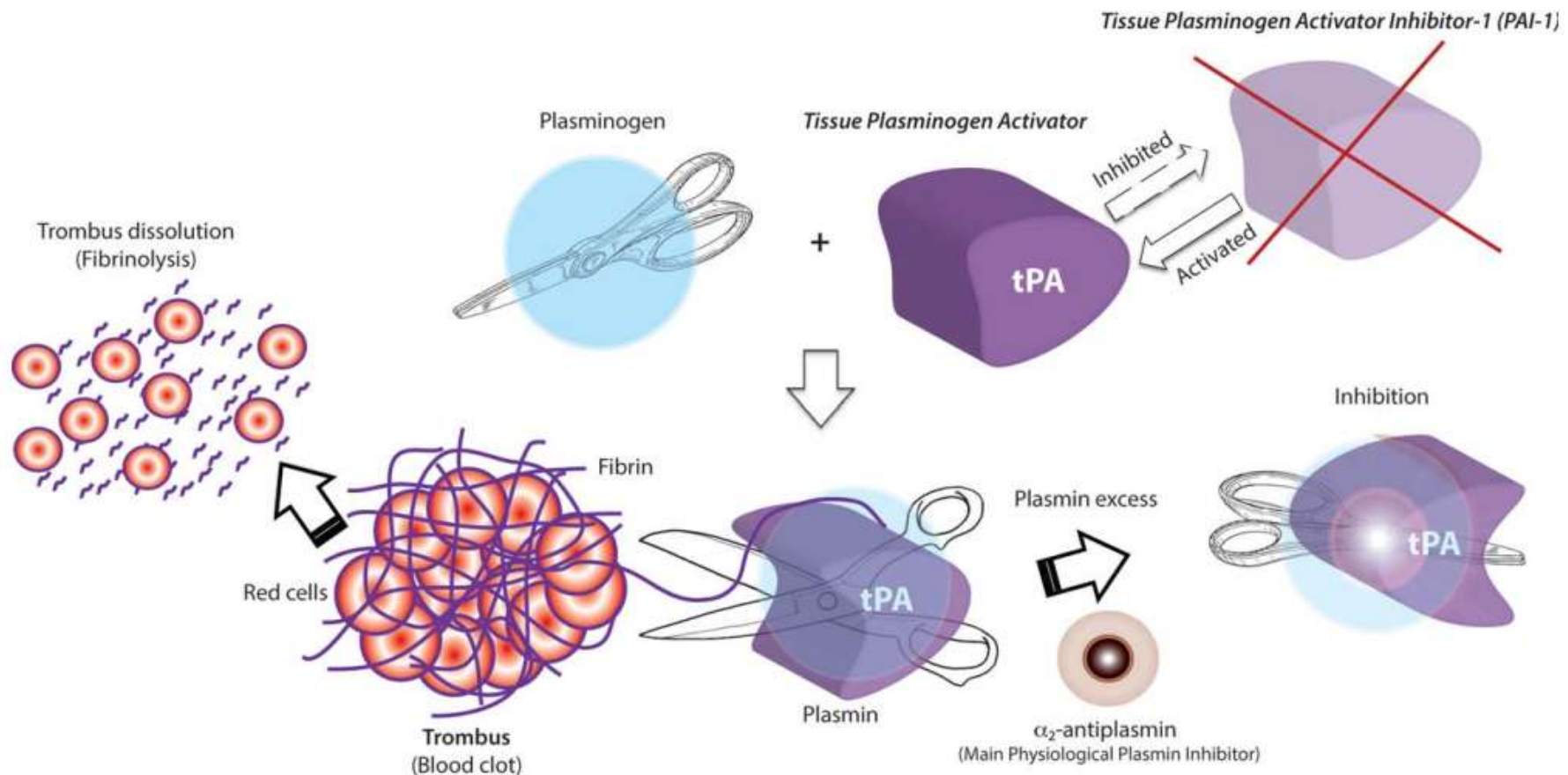
Activateur tissulaire de plasminogène (tPA)

- **Physiologie de l'hémostase:**
- Lorsque de la fibrine s'est formée dans l'organisme celle-ci devra être dissoute lorsque le saignement s'est arrêté. Cette phase est appelée fibrinolyse.
- De nouvelles enzymes interviennent comme la plasmine qui va couper la molécule de fibrine et la rendre soluble.
- Cette étape contribue également à la réparation du vaisseau blessé.

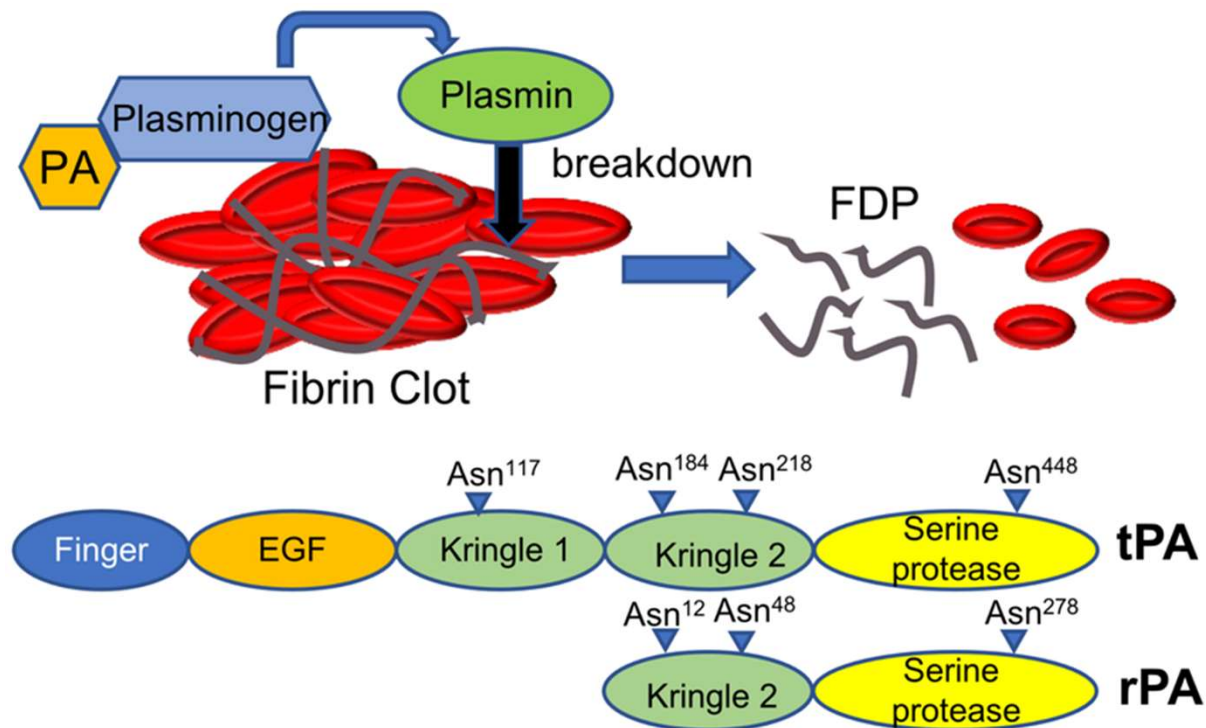
Activateur tissulaire de plasminogène (tPA)

- Le système fibrinolytique est un processus enzymatique protéolytique composé d'une proenzyme inactive, le plasminogène, capable d'être convertie en enzyme active, la plasmine, par l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA).
- Structurellement, le tPA est une protéine globulaire de 70 kDa dotée d'une activité sérine protéinase et composée de cinq domaines : le domaine F (doigt), le domaine E (facteur de croissance épidermique), deux domaines Kringle (K1 et K2) et la région protéase (domaine P).

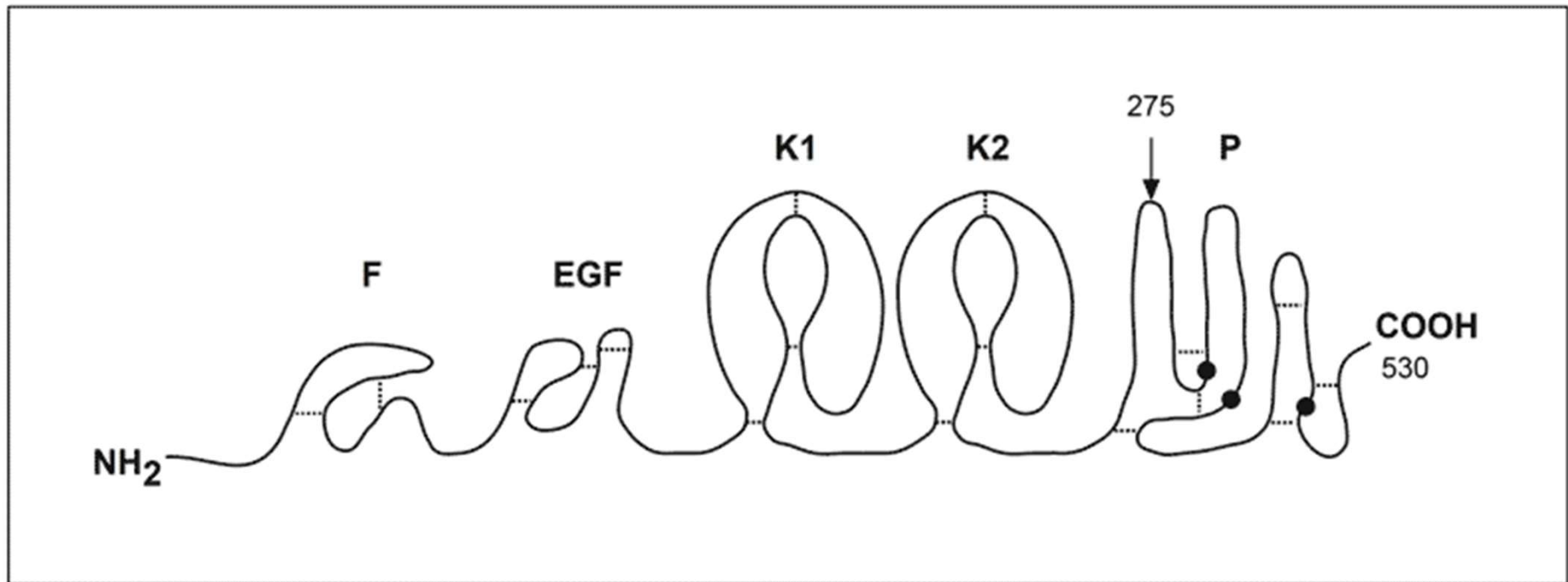
Activateur tissulaire de plasminogène (tPA)



Activateur tissulaire de plasminogène (tPA)



Activateur tissulaire de plasminogène (tPA)



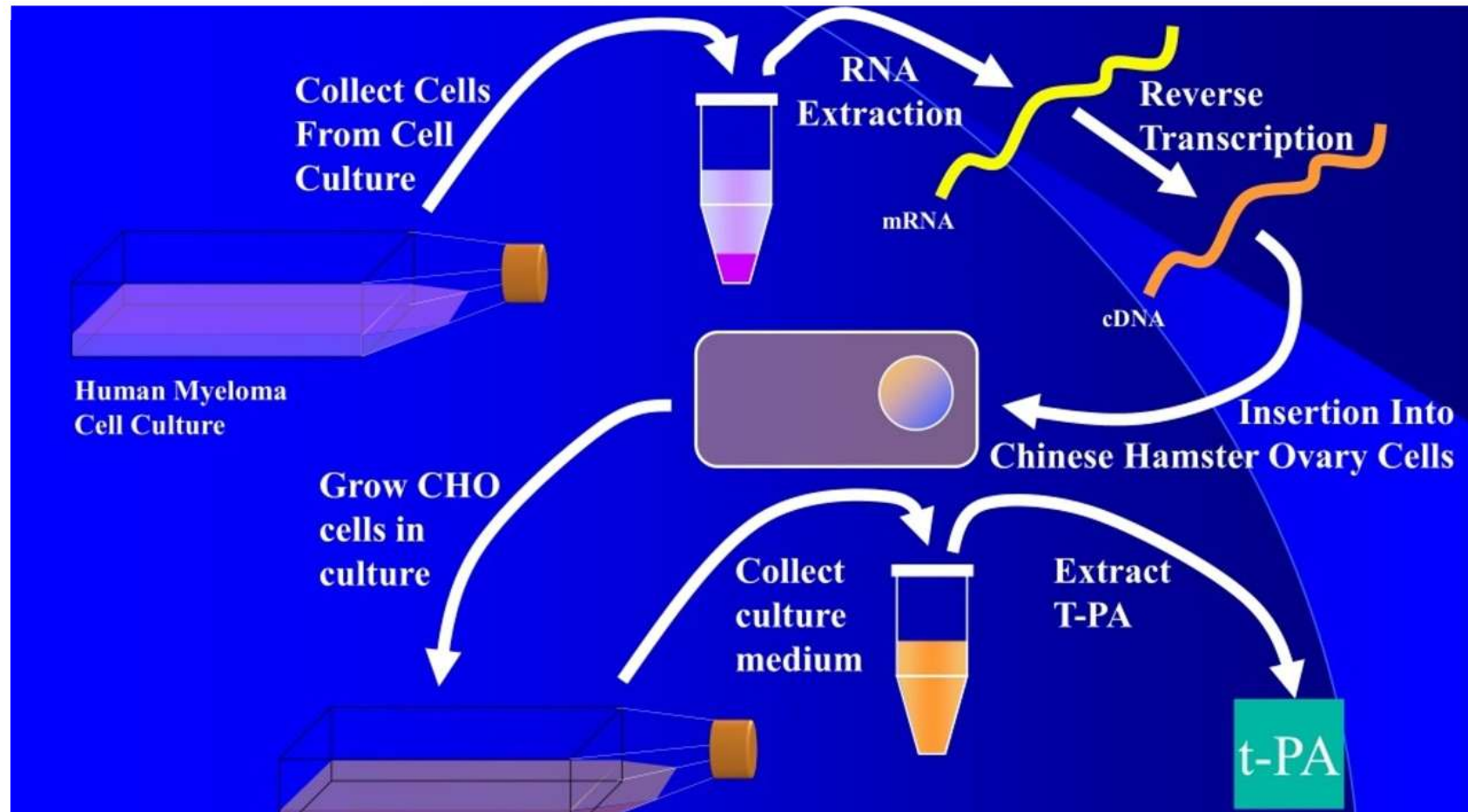
Activateur tissulaire de plasminogène (tPA)

- La société de biotechnologie Genentech a cloné le t-PA humain pour l'utiliser dans le traitement des caillots sanguins indésirables ou potentiellement mortels.
- Activase (Alterplase recombinante) est le nom commercial du t-PA de Genentech.
- Activase est utile dans le traitement des crises cardiaques et des accidents vasculaires cérébraux lorsqu'elle est administrée dans les 5 heures suivant la formation d'une thrombose ou l'embolie se logeant dans le cœur ou le cerveau.
- L'approbation de la FDA en 1987 et l'utilisation médicale d'Activase ont une histoire très intéressante.

Activateur tissulaire de plasminogène (tPA)

- Les scientifiques de Genentech ont prélevé l'ARNm humain codant pour le t-PA à partir d'une lignée cellulaire de myélome humain
- L'ARNm a été converti en ADNc
- L'ADNc codant pour le t-PA humain a été inséré dans des lignées cellulaires d'ovaire de hamster chinois
- Lorsqu'elles sont cultivées, les cellules CHO excrètent le t-PA humain dans leur milieu de croissance
- L'activase est produite en isolant le t-PA du milieu de croissance, Il s'agit d'un processus coûteux et difficile

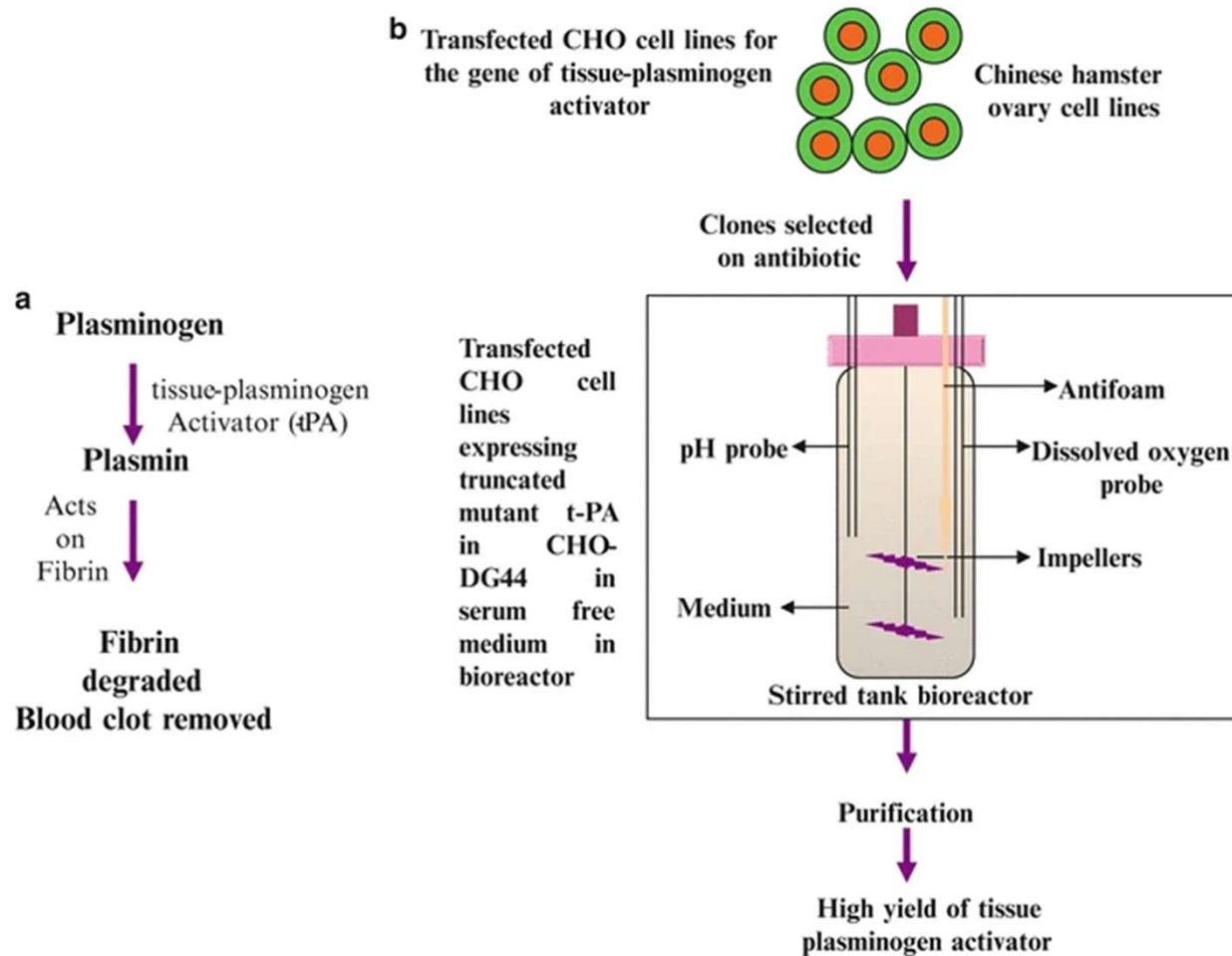
Activateur tissulaire de plasminogène (tPA)



Chinois hamster Ovaire

Cellule Culture

Activateur tissulaire de plasminogène (tPA)



Activateur tissulaire de plasminogène (tPA)

- L'activateur du plasminogène présente un intérêt clinique majeur pour la prise en charge des accidents vasculaires cérébraux (AVC) et des infarctus du myocarde.
- Pour la production de t-PA, *E. coli* et le système de levure n'ont pas fonctionné correctement, respectivement en raison d'un manque de modifications post-traductionnelles et d'une glycosylation excessive.

Activateur tissulaire de plasminogène (tPA)

- Une nouvelle forme tronquée de t-PA, présentant une affinité accrue pour la fibrine et une résistance accrue à PAI-1, a été exprimée dans un système d'expression CHO DG44.
- La protéine thérapeutique a été produite dans des lignées cellulaires CHO DG44 transfectées de manière stable.
- Ces lignées cellulaires ont été maintenues dans un milieu sans sérum, avec de la glutamine, de l'hypoxanthine et de la thymine, dans un bioréacteur à cuve agitée.
- Les cellules ont été cultivées à 37 °C, 140 tr/min, avec 5 % de CO₂ et 85 % d'humidité. La protéine a ensuite été purifiée, avec un rendement plus élevé.

Production de l'hormone de croissance humaine

