

UEM 901 : Propriétés physico-chimiques et implications dans le vivant

2^{ème} partie : les protéines thérapeutiques

Professeur Gilles Ponchel

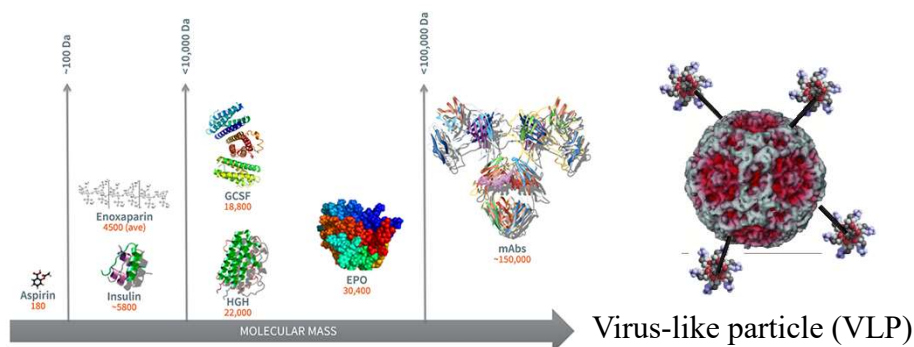
université
PARIS-SACLAY

FACULTÉ DE
PHARMACIE

Laboratoire de Pharmacotechnie et Biopharmacie
UFR de Pharmacie
Institut Galien UMR CNRS 8612

1

Les molécules, les entités actives...



- Nouvelles molécules (New Chemical Entities, **NCE**): tendance à la diminution?
- Molécules connues: améliorations possibles (« drug repositioning ») ?
- Protéines thérapeutiques : en augmentation
- Thérapies géniques, thérapies cellulaires, ...

2

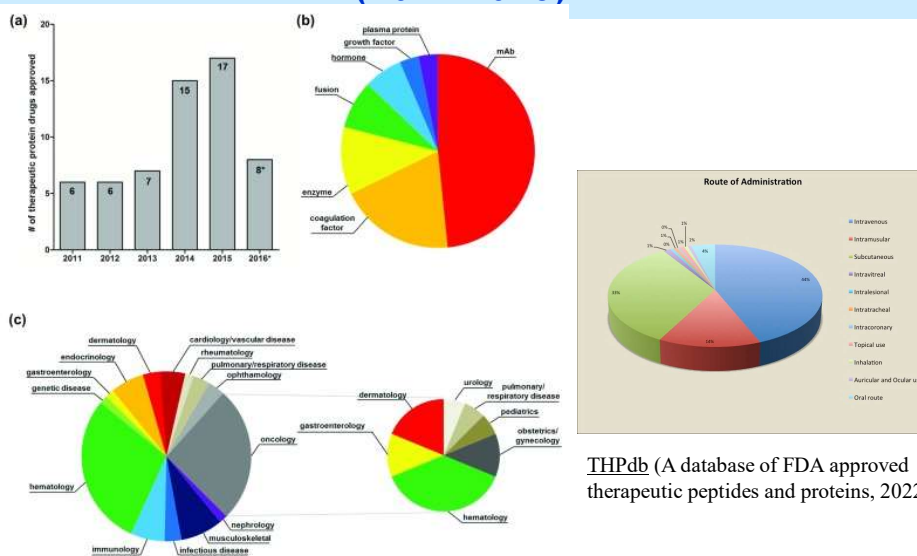
Peptides et protéines

- Les peptides et les protéines sont formés à partir d'une bibliothèque d'environ 20 amino-acides (aa synthétiques) liés entre eux par une liaison amide (covalente) et combinés de façon variée.
- Peptides < 50 amino acides
- Protéines > 50 amino acides
- Les fonctionnalités d'une protéine sont déterminées par sa structure 3D (non covalente). (Structure tertiaire).

3

3

Protéines thérapeutiques approuvées par la FDA (2011-2016)



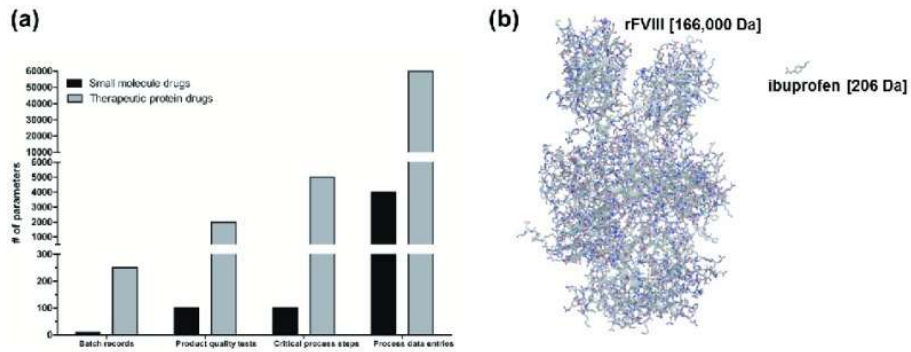
THPdb (A database of FDA approved therapeutic peptides and proteins, 2022)

4

H.A. Daniel Lagassé et al., 2017

4

La production des protéines thérapeutiques est complexe

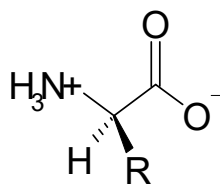


H.A. Daniel Lagassé et al., 2017

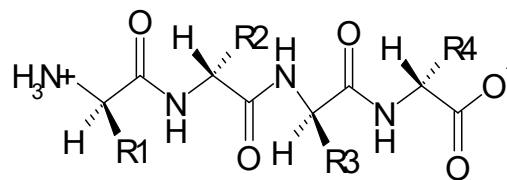
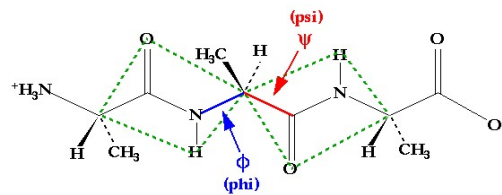
5

5

La liaison amide entre les amino-acides



amino acide

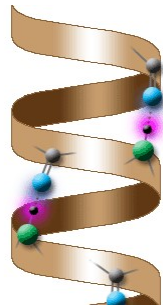


(poly)peptide

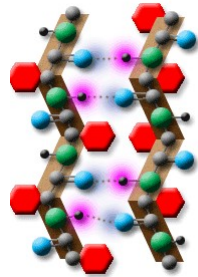
6

6

Les peptides et les polypeptides forment des structures secondaires



(Les poly)peptides peuvent former des helices alpha



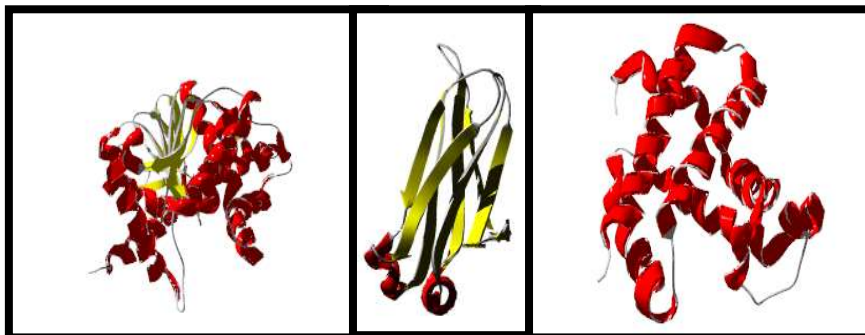
Les (poly)peptides peuvent former des feuillets bêta

7

7

...qui conduisent aux structures tertiaires (3D) des protéines

Weak secondary bonds, disulfide bridges, stabilize the 3D structure:



Lactate Dehydrogenase:
Mixed α / β

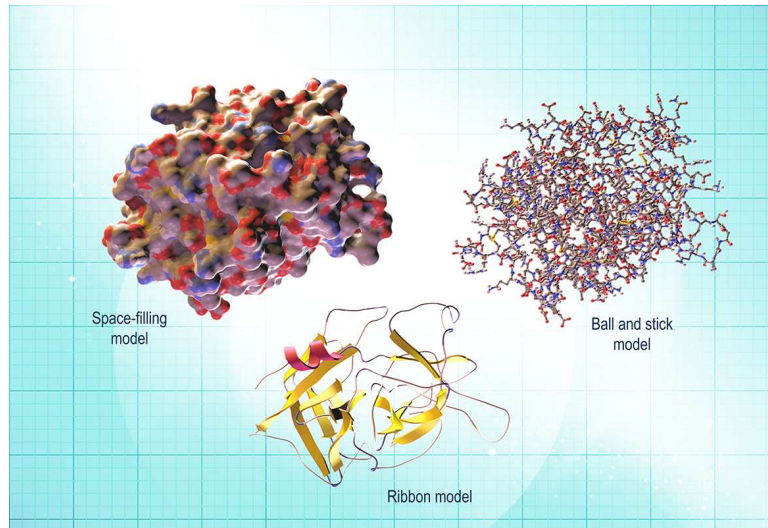
Immunoglobulin
Fold: β

Hemoglobin B
Chain: α

8

8

...formant des proteines très variées



D'après Amgen, 2019

9

9

Instabilités des proteines : conséquences en formulation et après leur administration

- Très grosses molecules (quelques nm)
- La structure tertiaire est maintenue par de faibles forces non covalentes (instabilité in vitro et in vivo)
- Forte tendance à l'auto-assemblage, l'agrégation, l'adsorption sur les surfaces
- Destructions facile durant la conservation même dans des conditions relativement douces
- Facilement détruit/éliminé dans l'organisme

10

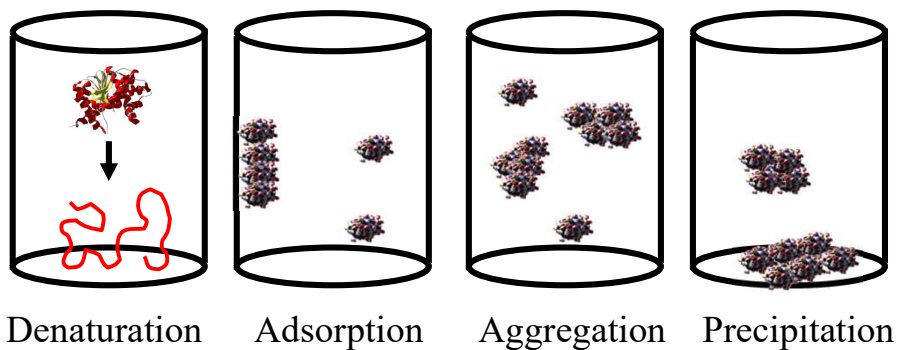
10

Causes d'instabilité des protéines:

- Les liaisons covalentes sont impliquées dans des réactions de:
 - Désamidation
 - Oxydation
 - Échange disulfure
 - Protéolyse
- Les liaisons non covalentes sont impliquées dans les phénomènes de:
 - Dénaturation
 - Agrégation
 - Précipitation
 - Adsorption

11

Processus d'instabilité impliquant des liaisons non covalentes

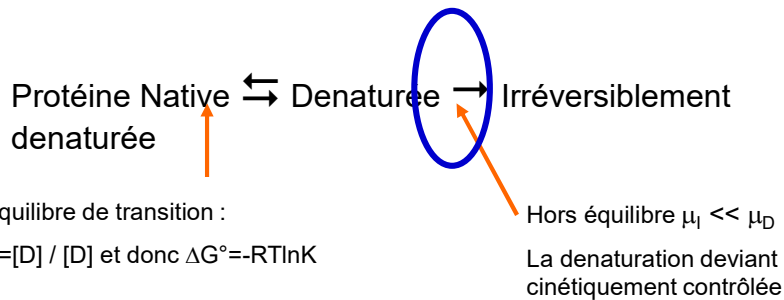


12

12

Dénaturation des protéines thérapeutiques :

- Dépliage réversible ou transitions irréversibles
- Modèle de Lumry-Eyring (*Lumry and Eyring 1954*)



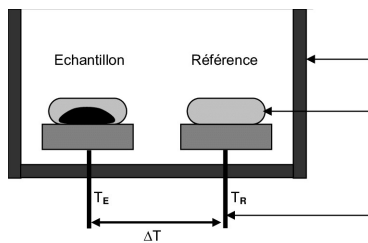
- La transition réversible est expérimentalement et théoriquement accessible et empiriquement liée à la stabilité cinétique
- La transition irréversible concerne directement les protocoles de formulation.

13

Etude et caractérisation de l'équilibre Protéine native \rightleftharpoons Protéine dénaturée

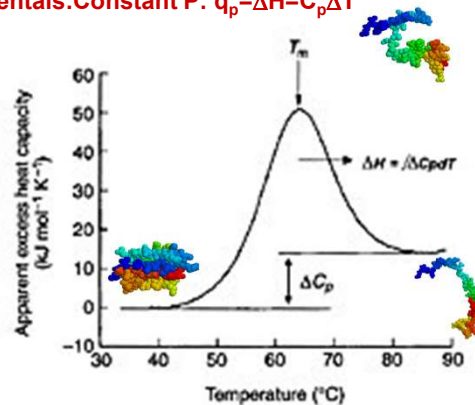
- La thermodynamique de l'équilibre de dénaturation peut être étudiée par des techniques calorimétriques, par ex. DSC
- La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) mesure le flux de chaleur (en Watt=J/sec) nécessaire pour chauffer l'échantillon à une vitesse constante

Fundamentals: Constant P: $q_p = \Delta H = C_p \Delta T$



Principe de la DSC

14



14

Differential Scanning calorimetry (DSC)

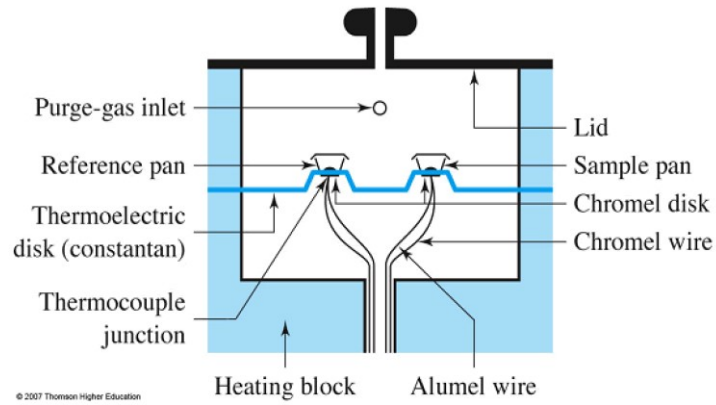
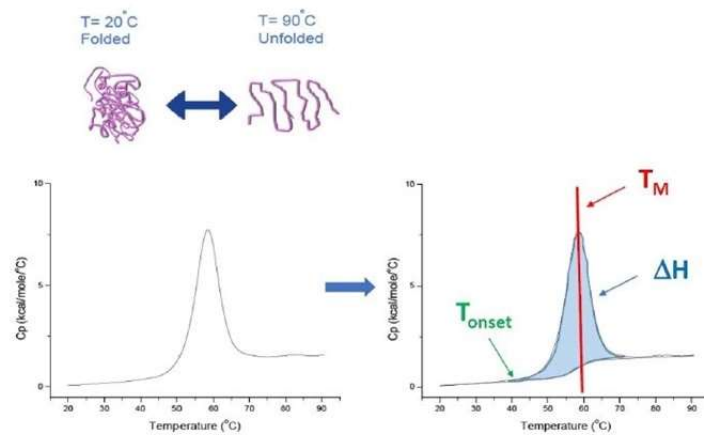


Figure 1: Heat Flux DSC

15

15

Differential Scanning calorimetry (DSC)

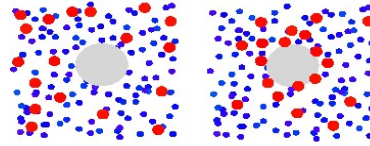


16

16

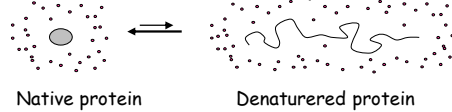
Stabilité en présence d'autres molécules/ions en solution

- Les solutés affectent la stabilité, la solubilité et l'oligomérisation en fonction de leur adsorption ou de leur répulsion à partir de l'interface protéique

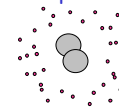


Preferential exclusion : inhibits the formation of interface

Stabilize

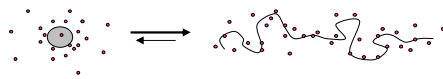


Precipitate

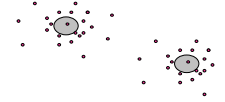


Preferential binding : promotes larger interfaces

Destabilize



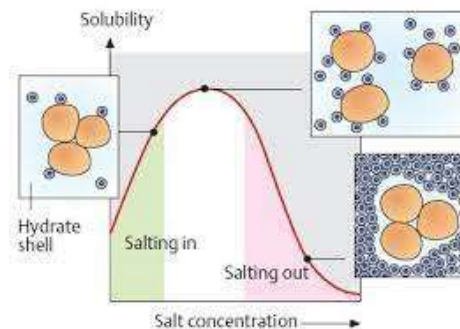
Solvate



17

”salting in” et ”salting out” des protéines

- La solubilité des protéines augmente généralement légèrement en présence de sel, appelé « salting in ».
- Cependant, à des concentrations élevées de sel, la solubilité des protéines chute fortement et les protéines peuvent précipiter, ce que l'on appelle le « salting out ».



18

18

Les séries de Hofmeister ou séries lyotropiques classent l'effet stabilisant des ions dans l'eau

Kosmotropes

most stabilizing
strongly hydrated anions

citrate³⁻ > sulfate²⁻ > phosphate²⁻ > F⁻ > Cl⁻ > Br⁻ > I⁻ > NO₃⁻ > ClO₄⁻

N(CH₃)₄⁺ > NH₄⁺ > Cs⁺ > Rb⁺ > K⁺ > Na⁺ > H⁺ > Ca²⁺ > Mg²⁺ > Al³⁺

weakly hydrated cations

strongly hydrated cations

sucrose
sorbitol
betaine

Glycine

Urea

Michael Chaplin

Les effets reposent sur la densité de charge de surface et la polarisabilité

Les kosmotropes anioniques (par exemple F⁻ et SO₄²⁻) lient fortement 10 à 20 molécules d'eau

Les chaotropes anioniques affectent fortement les propriétés globales

Koga et al. 2004,
Westh et al. 2006

19

19

Excipients exclus ou liés aux protéines

Preferentially excluded compounds Promote	Preferentially bound compounds Promote
<i>Stability, precipitation, inclusion bodies, crystallization, oligomerization etc..</i>	<i>Unfolding, solubility, dissociation</i>
Sugars (sucrose, trehalose, maltose...)	Denaturants (Urea, GuanidineHCl...)
Sugar alcohols (glycerol, sorbitol, inositol..)	Amphiphiles (Ethanol, Acetone, propanol ...)
Many amino acids (proline, glycine, betaine..)	Ionic surfactants (SDS, LAS, CTAC...)
Polymers (PEG, proteins, polysaccharides..)	SCN ⁻ , ClO ₄ ⁻ , I ⁻ ,
SO ₄ ²⁻ , HPO ₄ ²⁻ , F ⁻ , Citrate, Acetate, Tartrate	

20

Timasheff et al.

20

Techniques de mesure de la taille et de l'agrégation

Table 2. Automated and High-Throughput Methods for Formulation Characterization Used in Various Stages of Biopharmaceutical Formulation Development.

Stage of Development	Method	Characteristics	Reference
Preformulation	NMR	Conformation	20
	Turbidity	Aggregation propensity	18
	SE-UPLC	Aggregation propensity, fragmentation	99
	DLS	Aggregation propensity	38, 50
	Fluorescence	Conformation, aggregation	17
	DSF	Conformational stability	15, 16
	DSC	Conformational stability	12
Preclinical formulation	Precipitation/solubility	Colloidal stability	52
	SLS	Aggregation	19
	IEC	Aggregation, charge variants	77
	RP-UPLC	Fragmentation	76
	DLS	Aggregation, colloidal stability	59, 74, 110
	DLS	Viscosity	93, 94
Clinical and commercial formulation	Mass spectrometry	Chemical modifications	78, 79, 80
	SLS	Aggregation	143, 144, 145
	Light obscuration	Aggregation, large aggregates, particles	54, 55
	Flow cytometry	Particles	57
	Microflow imaging	Large aggregates, aggregate morphology	53, 56
	FT-IR	Aggregate conformation, identity	21
	Raman spectroscopy	Particles, chemical characteristics	22

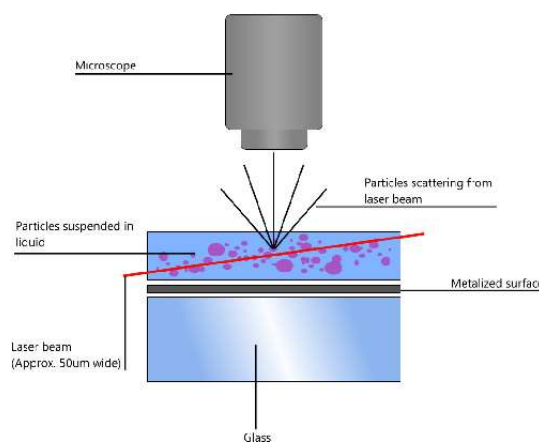
DLS, dynamic light scattering; DSC, differential scanning calorimetry; DSF, differential scanning fluorimetry; FT-IR, Fourier transform infrared spectroscopy; IEC, ion exchange chromatography; NMR, nuclear magnetic resonance; RP-UPLC, reverse-phase ultra-performance liquid chromatography; SE-UPLC, size exclusion ultra-performance liquid chromatography; SLS, static light scattering.

Razinkov VI, et al. J. Biomol. Screen. 2015

21

Diffusion dynamique de la lumière Dynamic Light Scattering (DLS)

Exemple : Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

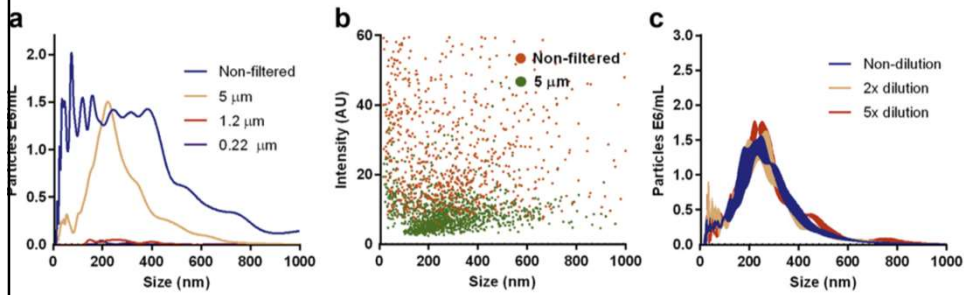


22

22

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

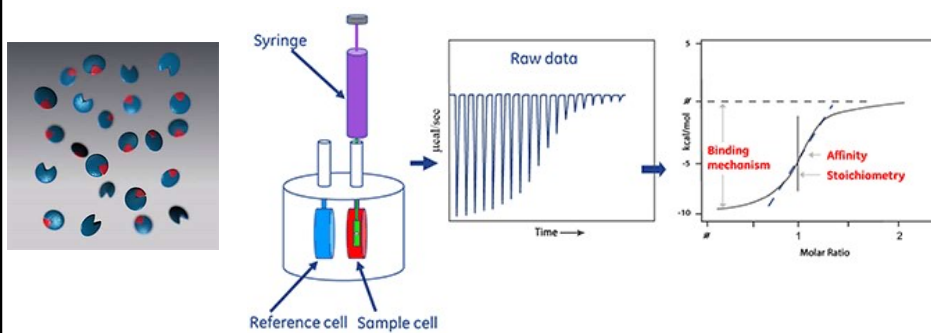
Exemple d'application à l'agrégation d'une solution d'un anti-corps monoclonal IgG4.



23

23

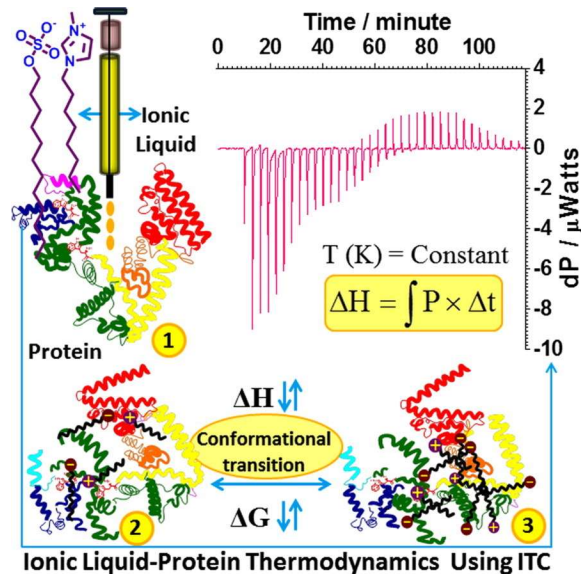
Interaction Titration Calorimetry (ITC)



24

24

Interaction Titration Calorimetry (ITC)

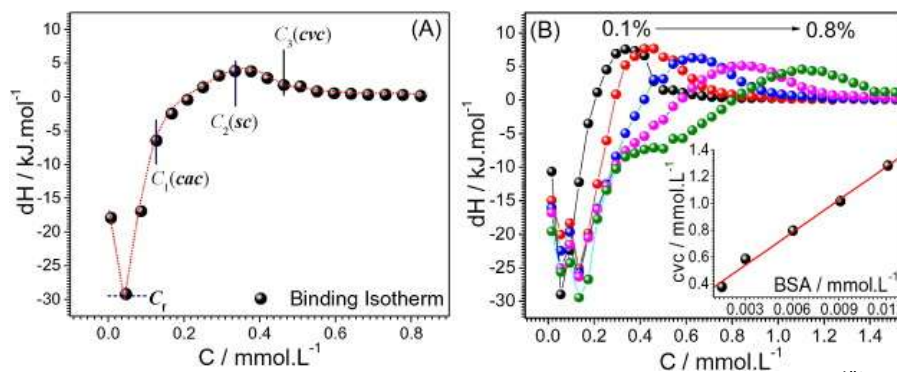


25

25

Exemple de mesure de l'interaction d'un agent tensioactif avec la sérum albumine bovine par calorimétrie de titration (ITC)

Exemple : ITC thermograms of an anionic tensioactive $[\text{C}_8\text{mim}][\text{C}_{12}\text{OSO}_3]$ binding to (A) 0.1% BSA (B) different concentrations of BSA (0.1% to 0.8%).



26

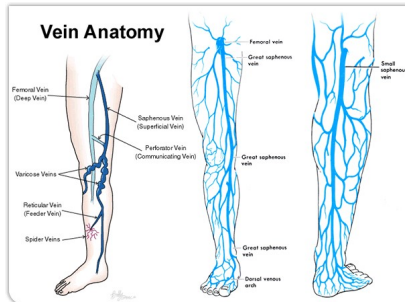
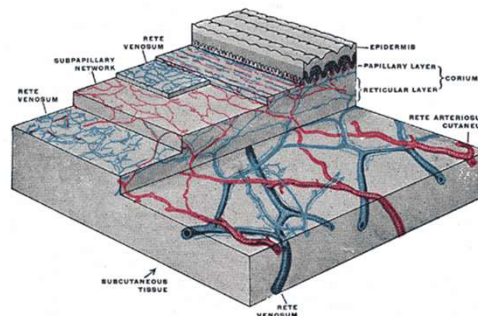
26

Administration parentérale des protéines : voie sous-cutanée



- **Vascularisation sous-cutanée**

- Variable selon les zones
- Débit sanguin variable



27

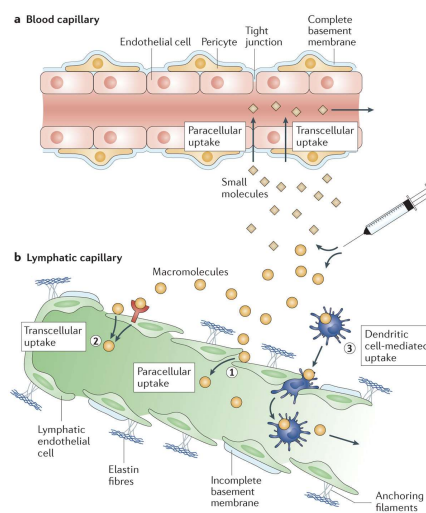
27

Administration parentérale des protéines : voie sous-cutanée



- **Transports :**

- Paracellulaire
- Transcellulaire
 - Actif (y compris efflux)
 - Passif (svt limité par l'hydrophilie)
- Passage vers la circulation sanguine et/ou vers le système lymphatique
- L'endothélium vasculaire est relativement continu
- Les capillaires lymphatiques sont plus lâches (porosité)
- L'absorption lymphatique semble prédominante au-delà de 16kDa
- L'étude expérimentale de l'absorption lymphatique est très délicate



Nature Reviews | Drug Discovery
28

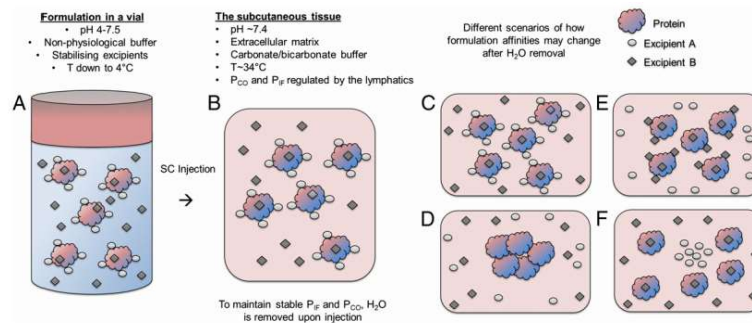
Nature, 2013

28

Administration parentérale des protéines : voie sous-cutanée



- La formulation est instable au site d'injection. Le peptide ET les excipients peuvent interagir avec l'environnement sous-cutané:



H.M. Kinnunen et al. JCR 214 (2015) 94-102

29

29

A retenir

Les caractéristiques chimiques et physico-chimiques des protéines impactent leur devenir in vivo

Elles impactent également le choix de la voie d'administration, la manière de formuler, le choix des procédés technologiques de production, etc

Ces propriétés doivent donc être connues le mieux possibles dès les premières phases précliniques du développement du médicament

30