

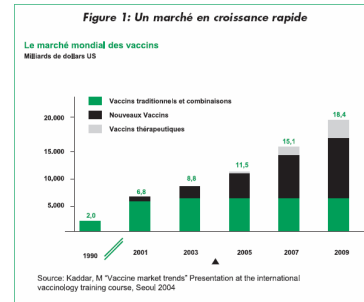


Vaccins issus des Biotechnologies

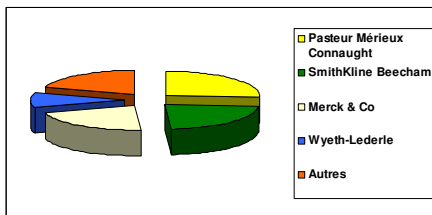
Bernard PAU, Professeur
Laboratoire d'Immunologie et Biotechnologie
Faculté de Pharmacie

2007

Marché mondial des vaccins



Parts de Marché



Recherche et Production Biotechnologique de vaccins

Groupes Pharmaceutiques	Soc Biotech Etrangères	Soc Biotech Françaises
America Home Product Bristol-Myers Squibb GlaxoWellcome-SBK Merck & Co Aventis Astra-Zeneca	Amgen Biogen Chiron Powderject Novavax The Immune Response Corporation	Centre d'Immunologie Pierre Fabre Neovacs IDM Qualitech Biotech Infection Point AP Cells

Vaccins issus des Biotechnologies

1. Vaccins sous-unités recombinants
2. Vaccins vivants atténués par génie génétique
3. Vaccins vivants recombinés
4. Vaccins à ADN nu
5. Vaccination antitumorale
6. Choisir le bon antigène

1. Vaccins sous-unités recombinants

Définition

Ag produit par génie génétique, extrait et purifié puis associé à une molécule porteuse ou un adjuvant pour stimuler le système immunitaire

Ingénierie génétique des protéines recombinantes

1. Identifier et isoler le gène codant pour la protéine
2. Cloner le gène dans un vecteur d'expression approprié
3. Transformer l'hôte cellulaire choisi
4. Produire la protéine
5. Purifier

Cellules hôtes

- **Bactéries :**
 - Temps de génération court
 - Bon rendement (10% des prot totales)
 - Coût faible
 - MAIS... Repléments souvent incorrects (corps d'inclusion)
 - Prot étrangère qqfois toxique pour la bactérie
 - Pas de modifs post-traductionnelle (glycosylat°, phosphorylation,...°)
- **Levures (*Saccharomyces cerevisiae*) :**
 - Cellule eucaryote
 - Temps de génération court
 - Coût faible
 - Modifications post traductionnelles
 - MAIS... protéases actives (modification génétique des souches)

Cellules hôtes

- **Cellules d'insectes :**
 - Haut niveau d'expression
 - Repléments corrects
 - Coût > levures et bactéries
- **Cellules de mammifère (CHO) :**
 - Meilleur système
 - Cher

Culture en masse



Extensification :
Augmenter le volume des cultures

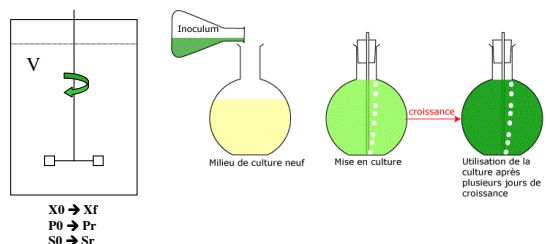
Intensification :
Augmenter le nombre de cellules par volume de culture

Optimisation

- Composition du milieu de culture (glucides, glutamine, ac gras, vitamines, hormones, facteurs de croissance)
- Apport en nutriments
- Élimination des métabolites
- Transferts de chaleur
- Oxygénation
- pH
- T°
- Forces hydrodynamiques
- Agitation
- Homogénéisation du milieu

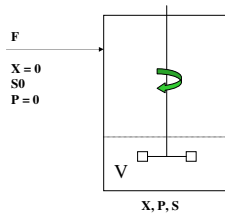
Mode de conduite des réacteurs

- **Culture discontinue = Batch**



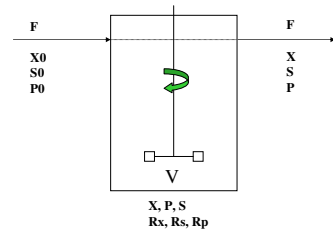
Mode de conduite des réacteurs

• Culture discontinue alimentée = Fed Batch



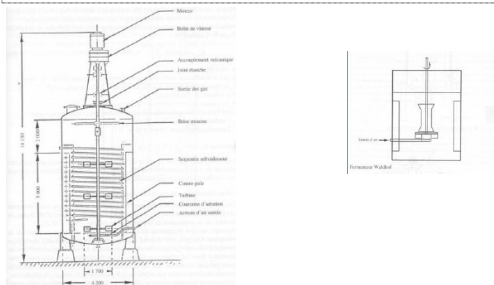
Mode de conduite des réacteurs

• Culture en continu



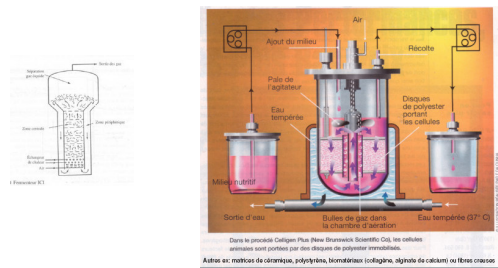
Différents types de bioréacteurs

Agitation mécanique sans circulation interne avec circulation interne



Différents types de bioréacteurs

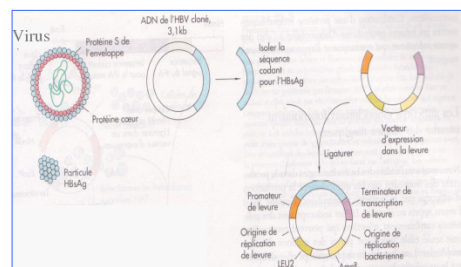
Agitation pneumatique (air-lift)



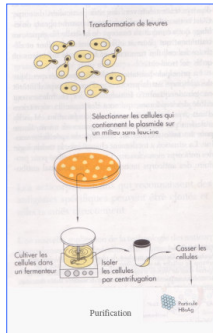
Attention, éviter

- **Le stress hydrodynamique**
 - Adjonction de surfactant (Pluronic F-68)
- **L'apoptose**
 - Tarissement en nutriments spécifiques
 - Accumulation d'Ac lactique et d'ammoniaque
 - → modification des cellules hôtes

Production recombinante d'Ag HBs



Production recombinante d'Ag HBs



Rendement
1 à 2% des prot totales
50 à 100 mg de prot/L

- **Vaccins sous-unités anti HBV commercialisés**
 - * GeneVac B (Pasteur Mérieux)
 - * Engerix B (SmithKline beecham Biological)

- **Vaccins sous-unités à l'étude**
 - * Grippe
 - * Choléra
 - * Anthrax
 - * Paludisme, ...

2. Vaccins vivants atténués par génie génétique

Définition

Inactivation par génie génétique des gènes responsables du pouvoir pathogène du micro-organisme ou des gènes de virulence

Avantages

- Coût moindre
- Sécurité accrue

Ex : Vaccin oral contre la shigellose (essais chez l'homme)
Vaccin contre le virus de la Fièvre de la vallée du Rift

3. Vaccins vivants recombinants

Définition

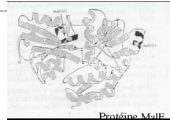
L'Ag vaccinal est apporté par un agent infectieux (virus ou bactérie atténué) modifié et porteur du gène codant pour l'Ag.

Avantages

- **Réaction immunitaire double :**
 - contre l'Ag et l'agent infectieux
 - de type humorale et cellulaire
- **Vaccination polyvalente possible**
- **Agents infectieux utilisés :**
 - Poxvirus, canarypoxvirus, adénovirus,...
 - Etudes en cours : HBV, HIV-1,
 - BCB, Salmonella, Shigella, ...

Souches atténuées de Salmonelles/Protéines MaIE et LamB

- Souches de *Salmonella aro-* ayant des délétions dans un ou plusieurs gènes codant pour la voie de biosynthèse des aa aromatiques
- **Protéines MaIE et LamB** : protéines d'*E. coli* dans lesquelles on peut introduire par génie génétique des épitopes étrangers



Application aux épitopes de

- la toxine cholérique
- la toxine tétanique
- Ag HBs
- la protéine M du Streptocoque
- l'hémagglutinine de la grippe
- la boucle V3 de HIV, ...

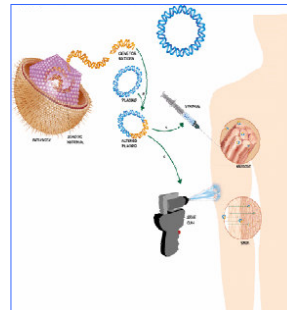
4. Vaccins à ADN nu

Définition

Insertion d'une séquence d'acide nucléique dans un plasmide bactérien.

Dans les cellules cibles, l'acide nucléique est traduit en protéine ou en peptide antigénique

Principe



- ADN codant pour les protéines vaccinales
- Insertion dans un plasmide bactérien
- Promoteur eucaryote
- Injection en IM
- Synthèse *in situ* des protéines d'intérêt

Avantages

- Réponse immunitaire humorale et cellulaire durable
- Rôle prépondérant des CPA
- Peu de rappels nécessaires
- Efficace
- Bonne tolérance
- Coût de production faible

Etudes en cours chez la souris

- Virus : HIV, Hépatites, Grippe, Papillomes, Herpès, ...
- Bactéries : Tétanos, Shigella, ...
- Parasites : leishmanies, plasmodium, ...
- Autres : maladies auto-immunes, cancer

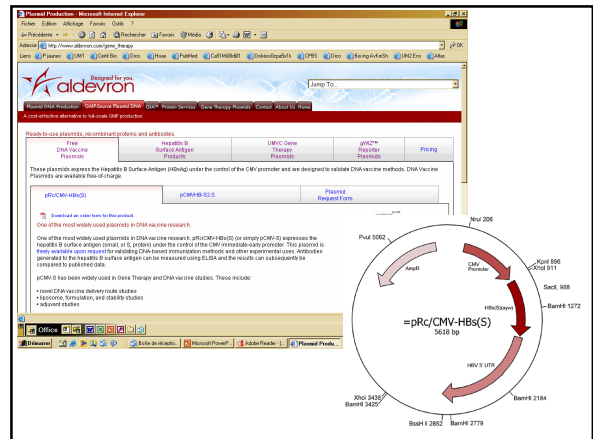
Exemple 1 : Vaccin ADN anti-Hep B

- **1999 : activité démontrée chez la souris**
 - Baisse durable de la virémie
 - Baisse du taux d'ADN viral intra-hépatique
 - Elimination virale complète dans certains cas
- **Essais cliniques chez l'homme, phase I-II**
 - Société Powderjext Vaccines (Madison)
 - Hôpital Necker
 - Institut Pasteur

Exemple 2 : Vaccin ADN anti-paludisme

- **Essai en phase I** (NMRC, Pasteur Mérieux Connaugh)
- **Plasmide** porteur du gène de *P. falciparum* codant pour les protéines du circumsporozoïte, stade hépatique du parasite : **protéine PfCSP**

- **Chez l'animal** : 6/6 Macaques Rhesus → réponse cytotoxique
- **Chez l'homme** : 20 volontaires jamais exposés au palu
 - 3 injections à 4 semaines d'intervalle
 - 11/20 patients → réponse cytotoxique spécifique



Pour augmenter la réponse immunitaire

- **Plasmides exprimant plusieurs Ag** (traitement de co-infections)
- **Plasmides exprimant des molécules immunostimulatrices** (IL2, IFN)
- **Séquences CpG** du plasmide
- **Adjuvant** (lipide A monophosphorylé)

Questions

- **Variabilité des réponses immunitaires**
- **Durée de vie de la protéine antigénique ?**
- **Intégrat° de l'ADN dans le génome des cellules hôtes ?**
- **Dissémination dans l'organisme de l'ADN injecté ?**
- **Application plutôt de type thérapeutique**

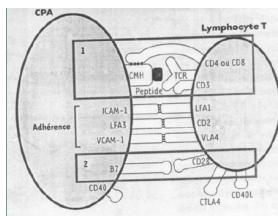
5. Vaccins antitumoraux

Le système immunitaire est capable de reconnaître des cellules tumorales

- 19ème siècle : William Cooley
- Années 80 : Pr Rosenberg
- Années 90 : Pr Boon

Immunothérapie anticancéreuse

Favoriser ou amplifier la reconnaissance de la tumeur par le système immunitaire du malade en vue de sa destruction



antigènes « spécifiques » de tumeurs

Ag Publics :

- **MAGE** : 75% mélanomes
- **BAGE, GAGE, RAGE**
- **α foetoprotéine** : 90% K foie

Ag partagé par plusieurs tumeurs et anormalement glycosylé :

- **MUC1** : 80% K Sein

Ag mutés :

- **p21ras** : 80% K colon, 90% K pancréas
- **p53** : 50% K poumon

Ag provenant de gènes viraux intégrés dans le génome (HBV, EBV, Papilloma,...)

Antigènes associés aux tumeurs

Ag de différenciation surexprimé

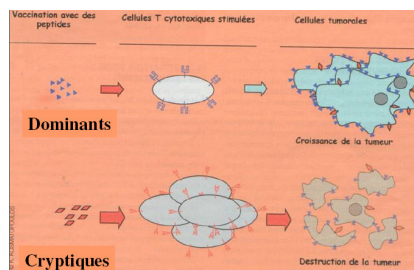
- tyrosinase, gp100, Melan-A, gp75 (*mélanome*)
- Ag prostatique (PSMA),
- Ag carcinoembryonnaire (ACE)
- hTERT (télomérase)
- Her-2/neu (*sein*)

Stratégie 1 : Vaccin avec des Ag tumoraux

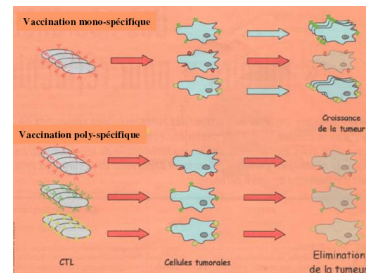
- Protéines semi- ou hautement purifiés
- Ag produit par génie génétique
- Vecteurs viraux ou vaccins à ADN nu codant pour l'Ag
- Peptides Ag de tumeurs
(ex : Ag MAGE et régression tumorale dans le mélanome)
- Adjuvant, molécules stimulatrices
- Poly-vaccination utilisant des peptides cryptiques optimisés

Poly-vaccination utilisant des peptides cryptiques optimisés

Société T-Epivaccines



Vaccination mono-spécifique vs polyspécifique

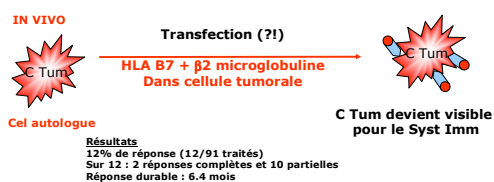


En cours : polypeptides en essai pré-clinique pour le traitement des cancers du poumon et de la prostate

Stratégie 2 : Ré-injection de cellules tumorales génétiquement modifiées

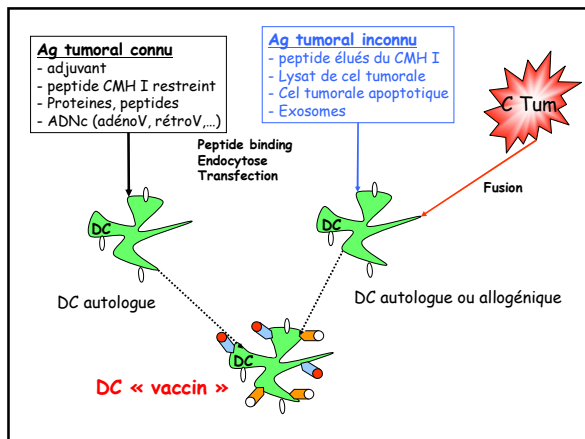
- Cellules autologues transfectées par différents molécules : IL4, IL2, IL12, CMH I, CD80

Ex : ALLOVECTIN-7 (plasmide de CMH I) → Mélanome



Stratégie 3 : Cellules dendritiques

- CD = Cellules présentatrices d'Ag
- Stimulation des T CD4 et T CD8
- Production de lymphocytes cytotoxiques
- Divers produits de stimulation des CD → « CD vaccin »



Exemple d'essai clinique

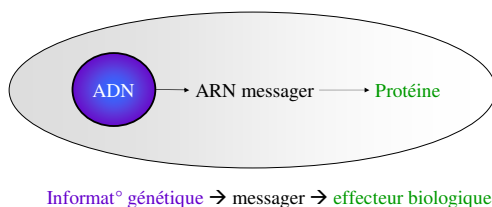
- 17 cancers du rein métastatique
- Injection de **CD fusionnées avec les cellules tumorales autologues**
 - 4 rejets complets des métastases
 - 3 réductions de 50% des métastases pendant 3 mois
 - Mise en évidence du rôle de lymphocytes cytotoxiques

6. Choisir le bon Ag

- **Difficulté** : identifier l'Ag d'intérêt
- **Avant** : corrélation entre études cliniques et modèles animaux
- **Maintenant** : utilisation des données issues de la génomique et de la post-génomique

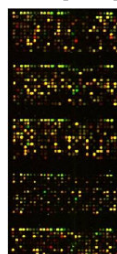


Vision « traditionnelle » du codage



Criblage à haut débit et recherche de nouvelles molécules antigéniques

Transcriptomique



Protéomique



Prédiction *in silico* de nouveaux Ag

Peptides susceptibles de s'associer aux molécules de CMH
et de stimuler la réponse immunitaire

Ex : épitopes HIV-1

Vaccino-génomique

- Développement de vaccins optimisés pour des **sous populations humaines génétiquement caractérisées** et relativement homogènes quant à la nature de leur réponse immunitaire
- Vaccination plus efficace, mieux ciblée, sans effets secondaires