

Optimisation de la stabilité de matériaux biologiques pour de nouvelles stratégies thérapeutiques



BIOSTAB, Programme Physique Chimie du Vivant (2007 – 2011)

A. Hédoux¹, M-C. Bellissent-Funel², J. Siepmann³, M-L. Saboungi⁴

¹UMET, UMR CNRS 8207, Université Lille 1

²Laboratoire Léon Brillouin (UMR CNRS 12) CEA Saclay

³INSERM U1008, Université Lille 2

⁴CRMD UMR CNRS 6619, Université d'Orléans

Contexte et Objectifs Scientifiques

Les avancées de la technologie recombinante sont porteuses de nouvelles approches thérapeutiques, dont les développements sont freinés par la stabilité très marginale des biomolécules. D'où la nécessité de les stocker à l'état sec par lyophilisation, procédure durant laquelle la protéine est soumise à de nombreuses sources de stress. Les principaux objectifs du projet BIOSTAB visaient à :

1. mieux comprendre les processus de dénaturation des protéines soumises aux basses températures (BT) lors d'une procédure de lyophilisation
2. déterminer les agents bioprotecteurs les plus efficaces pour stabiliser les protéines lors d'une procédure de lyophilisation et comprendre leur mécanisme d'action
3. utiliser les formulations optimisées de protéines lyophilisées pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques

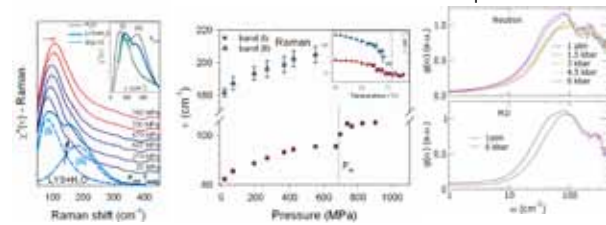
Résultats

1. La dénaturation froide des protéines a été analysée par a) **spectroscopie Raman**

étude du processus de dénaturation du lysozyme sous pression (HP) et de la β -lactoglobuline en présence d'urée à BT, afin d'éviter la formation de glace. Il a été montré que l'état dénaturé n'était atteint que via l'état « Molten Globule » (MG: structure tertiaire plus flexible imbibée de solvant avec une structure secondaire intacte) comme à haute température. Le degré de pénétration du solvant dans la protéine a été relié au degré de dénaturation de la protéine, moins élevé sous HP. Contrairement à la dénaturation chaude, la dénaturation BT ou HP est associée au durcissement de la dynamique de la protéine imposée par celle du solvant. L'ordre local basse densité a été mis en évidence dans l'eau d'hydratation de la protéine lors du processus de dénaturation HP.

b) **diffusion inélastique des neutrons** du Lysozyme HP: le renforcement des modes de vibration internes du lysozyme observé sous pression

confirme les résultats de diffusion Raman et est en bon accord avec les simulations numériques menées, qui montrent un renforcement des interactions protéine-eau.



Dynamique du lysozyme et du solvant sous pression

2. Une phase de screening a permis de faire ressortir que l'association de 2 agents bioprotectants permettait de combiner une stabilisation efficace durant la lyophilisation et durant le stockage. Des analyses Raman in-situ durant une procédure de lyophilisation, ont révélé des changements structuraux associés à des modes de stress identifiés. Les travaux de simulation de dynamique moléculaire ont permis d'obtenir une caractérisation précise des interactions entre biomolécule, bioprotectant et eau et de comprendre les mécanismes d'action des agents bioprotecteurs à l'échelle microscopique.

3. Plusieurs lyophilisats de protéines ont été incorporés dans des implants lipidiques, utilisant différentes techniques. Les propriétés clés de ces implants, dont les cinétiques de libération ainsi que l'activité de la protéine libérée, ont été déterminées. Des modèles mathématiques ont été développés pour mieux comprendre les phénomènes sous-jacents et pour faciliter l'optimisation de ce type de médicament.

Conclusion – Perspectives

Obtention de nombreuses informations sur les mécanismes de bioprotection. Emergence de nouveaux systèmes bioprotectants qui devraient conduire à l'élaboration de nouvelles formulations pour la lyophilisation (impact important pour les industries pharmaceutique et agroalimentaire)

Production scient.: 13 articles publiés + 4 sous presse

CONTACTS :

alain.hedoux@univ-lille1.fr
marie-claire.bellissent-funel@cea.fr
juergen.siepmann@univ-lille2.fr
saboungi@cnrs-orleans.fr



Université Lille 2
Droit et Santé



Inserm