

# Sang artificiel

Les alternatives synthétiques au sang donné par un donneur sont en attente de développement depuis des décennies. NinaNotman fait état de récents progrès prometteurs



Des substituts du sang humain sont en préparation depuis les années 1980. Mais, pour une combinaison de raisons scientifiques et politiques, il n'en existe aucun actuellement sur le marché, ni en Europe ni aux États-Unis. Quelques substituts sanguins sont encore en cours d'essais cliniques, et la communauté universitaire continue d'améliorer activement les produits.

connus sous le nom d'oxygénothérapies et de transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine.

"Personne n'était intéressé par ce type de travail jusqu'à l'arrivée du VIH dans les années 1980", explique Thomas Chang de l'Université McGill, Montréal, Canada, l'un des premiers pionniers du domaine, "puis tout le monde a commencé à se pencher sur la fabrication de substituts sanguins artificiels."

Il ajoute : « nous devons être prêts à faire face à un nouvel épisode de VIH ou similaire lorsque le sang pourrait être contaminé ». Ce sont les préoccupations liées au VIH qui ont conduit l'Afrique du Sud à devenir jusqu'à présent l'un des rares pays à approuver l'utilisation d'un substitut sanguin.

– un produit appelé Hemopure. Les craintes de contamination des réserves de sang provenant de donneurs ne sont qu'une des raisons de l'intérêt porté à ce domaine. Les inquiétudes persistantes concernant le manque de réserves de sang provenant de donneurs dans les zones reculées font également progresser le domaine, l'armée et la marine américaines finançant une grande partie de la recherche. On ne sait jamais quand il y aura une catastrophe ou une guerre quand nous n'aurons pas assez

réserves de sang, dit Chang. Des besoins plus spécifiques incluent des patients, tels que les Témoins de Jéhovah, qui, pour des raisons religieuses, ne peuvent pas utiliser le sang d'un donneur, et des patients qui ont développé une réponse immunitaire au don de sang.

En plus de ne pas dépendre des réserves de sang des donneurs, le sang artificiel présente d'autres avantages majeurs, notamment le fait qu'il n'est pas nécessaire de vérifier les groupes sanguins avant la transfusion – le sang artificiel est le groupe sanguin universel O négatif. Le sang artificiel évite également les problèmes de durée de conservation : le sang des donneurs peut être conservé pendant un maximum de 42 jours avant utilisation et sa qualité commence à se dégrader peu de temps après son prélèvement.

## Déjouer les obstacles

La nécessité et l'utilité sont peut-être claires, mais le chemin vers l'approbation réglementaire en Europe et aux États-Unis a été tortueux.

– avec de nombreux obstacles apparemment destinés à bloquer le chemin.

Les premiers essais cliniques de ces produits – menés par plusieurs sociétés différentes – ont donné des résultats décevants avec des effets secondaires indésirables, le plus grave étant une augmentation de la tension artérielle. Chang attribue les résultats à la précipitation pour commercialiser un produit à la suite de la crise du VIH : « il n'y avait pas assez de recherche fondamentale avant l'apparition du VIH – et en conséquence, lorsqu'on s'est rendu compte que le sang des donneurs

## En bref

– La crise du VIH dans les années 1980 a déclenché la recherche sur le sang artificiel

– Obtention de la réglementation approbation pour ces les produits ont prouvé difficile jusqu'à présent en Europe et aux États-Unis

– Conception commerciale les approches incluent laissant l'hémoglobine libre dans le plasma et l'enfermant dans des globules rouges artificiels et polymères

– L'universitaire la communauté fonctionne sur l'amélioration de la compréhension de base de la façon dont analyses de sang, pour améliorer encore les produits

pourraient être contaminés, les entreprises ont commencé à fabriquer de nombreux types différents de substituts sanguins, et malheureusement certains ne fonctionnent pas et d'autres ont des effets secondaires indésirables.

Les inquiétudes ont atteint leur paroxysme début 2008, lorsqu'une méta-analyse des résultats de 16 essais cliniques de cinq produits différents qui avaient été utilisés sur plus de 3 500 patients a été publiée dans le *Journal de l'Association médicale américaine*.

L'étude, dirigée par Charles Natanson, un scientifique principal des National Institutes of Health des États-Unis, a révélé un risque trois fois plus élevé de crise cardiaque chez les patients ayant reçu les substituts, par rapport au groupe témoin ayant reçu du sang d'un donneur (voir *Monde de la chimie*, juin 2008, p13).

"L'article de Natanson combinait les résultats de tous les essais cliniques, de tous les produits, de toutes les entreprises, et les regroupait", explique Chang, "et ce fut un désastre pour ce domaine". Certains produits ont eu moins d'effets secondaires que d'autres, mais

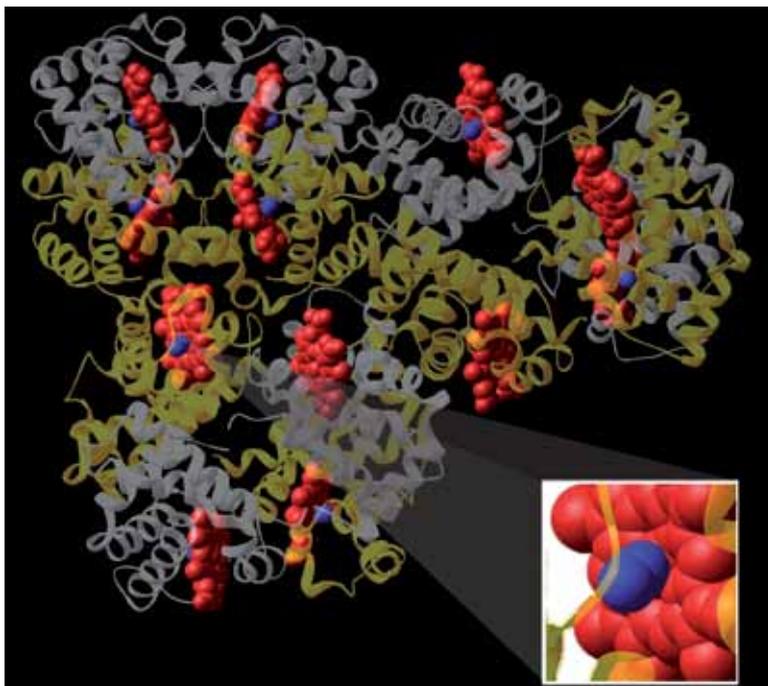
parce qu'ils étaient traités comme un seul, tout le monde a commencé à s'inquiéter et le

La drogue et la Drug Administration sont devenues réticentes à approuver, dit-il.

La frustration de ng est partagée par tous les scientifiques travaillant dans ce domaine, notamment John Olson, basé







## 'Comme tout

Dans la science,  
c'est comme ça que tu  
emballer  
les données pour  
en présentant'

un résultat très cohérent, quel que soit le type de patients que vous étudiez ou quelle que soit la société que vous avez examinée, ajoute-t-il.

## Hémopur

Même si la FDA se méfie actuellement de ces produits, une poignée d'entreprises aux États-Unis tentent encore de surmonter les obstacles lorsqu'elles tentent de commercialiser un substitut sanguin.

Selon Olson, le meilleur du groupe est Hemopure – un substitut sanguin développé par la société d'oxygénothérapie OPK Biotech. Hemopure a été initialement conçu par la petite start-up Biopure, qui a été rachetée par OPK Biotech lors de sa faillite l'année dernière (voir *Monde de la chimie*, 14 mai 2009, bit.ly/4kdkFr).

«Hemopure est, à mon avis, celui dont l'utilisation devrait être la plus proche d'être approuvée lorsqu'aucun don de sang n'est disponible», déclare Olson. "C'est la technologie la plus simple et la moins chère."

Comme l'explique Rick Light, vice-président de la recherche et du développement chez OPK Biotech : « une distinction importante entre Hemopure et tout autre transporteur d'oxygène à base d'hémoglobine est qu'Hemopure est stable à température ambiante sous forme liquide pendant au moins 3 ans. » Il suffit de le retirer du commerce et de l'utiliser immédiatement, dit-il. Cela le distingue des autres substituts sanguins potentiels qui nécessitent une réfrigération ou sont lyophilisés, ce qui signifie qu'ils doivent être reconstitués avec du plasma.

Pour fabriquer Hemopure, « nous prenons du sang bovin et, par filtration et chromatographie, purifions l'hémoglobine pour qu'elle soit constituée de protéines pures à 99,9 pour cent », explique Light. Mais malheureusement, ce n'est pas aussi simple que de simplement dissoudre l'hémoglobine dans un liquide et de la transfuser au patient. L'hémoglobine native est tétramère et se dissocie en dimères dans l'organisme qui sont excrétés par les reins avec une demi-vie d'environ 30 minutes. "Ce qui n'est pas une thérapie très efficace", souligne Light. "Il faut modifier l'hémoglobine pour qu'elle ne se dissocie pas."

Un certain nombre d'approches différentes ont été adoptées pour mettre fin à cette dissociation. « Ce que nous faisons, c'est polymériser avec du glutaraldéhyde [pentane-1,5-dial] pour fabriquer de gros polymères d'hémoglobine qui ont une demi-vie comprise entre 18 et 24 heures dans le corps », explique Light.

L'hémoglobine polymérisée est ensuite mise dans un tampon physiologique,

L'hémoglobine dans Hemopure d'OPK Biotech est stabilisé par polymérisation



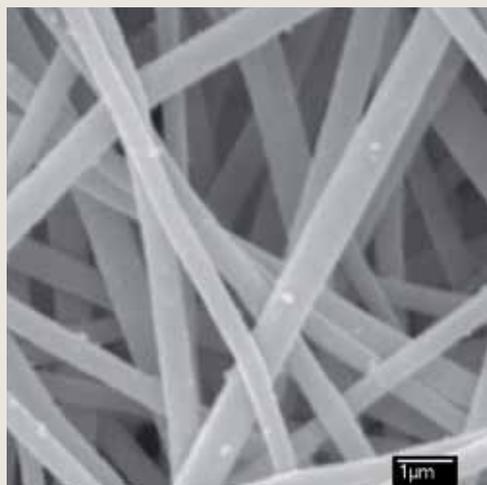
à l'Université Rice, Houston, États-Unis : « L'article de Natanson affirme que tout substitut sanguin est mauvais et provoque des crises cardiaques. Mais comme pour tout ce qui concerne la science, c'est la façon dont vous présentez les données qui sont présentées.

Natanson, cependant, maintient ses conclusions : « la méta-analyse a montré que si l'on mettait toutes les études ensemble, il y avait une toxicité très courante – c'est-à-dire qu'elles semblaient provoquer des crises cardiaques et la mort. » Il semblait que ce soit

## Pharming de sang

Une autre voie potentielle vers des substituts sanguins consiste à cultiver des globules rouges humains à partir de cellules extraites de cordons ombilicaux – une technique appelée blood pharming.

Arteriocyte, basée à Cleveland, aux États-Unis, est une entreprise de biotechnologie qui explore cette approche. « Nous avons démontré que nous pouvons prendre des cellules du cordon ombilical, les développer et les différencier [en globules rouges] en volumes utiles », déclare Adam Sorkin, directeur d'Arteriocyte.



Substrat de nanofibres polymères Nanex d'Arteriocyte pour la culture rapide de cellules souches

directeur de la recherche et du développement.

La première étape consiste à isoler les cellules souches hématopoïétiques d'un cordon ombilical. « Nous les cultivons ensuite sur notre technologie Nanex, qui est un substrat de nanofibres polymères qui multiplie les cellules souches beaucoup plus rapidement que les techniques de culture cellulaire normales », explique Sorkin. « En 10 jours, nous obtenons une multiplication de 300 à 350 fois du nombre de cellules et, en un mois, nous pouvons en obtenir des centaines de milliers, voire un million de fois. »

La deuxième étape consiste à recréer le processus de différenciation qui se produit normalement dans l'organisme, in vitro. « En utilisant un cocktail spécial de facteurs de croissance que nous modifions au cours de plusieurs semaines, nous conduisons progressivement la plupart de ces cellules souches à former des globules rouges qui sont fonctionnellement impossibles à distinguer des globules rouges que vous produiriez de manière native. »

Enfin, les cellules sont filtrées et placées dans du plasma ou un liquide avant de pouvoir être transfusées directement dans l'organisme.

L'objectif final est de réaliser l'ensemble du processus sur place, dans des zones reculées, comme dans les hôpitaux des zones de guerre. « Une fois opérationnel, l'idée est de produire du sang de donneur universel à la demande », explique Sorkin.

« Nous travaillons actuellement sur la mise en œuvre de la technologie du bioréacteur qui générera l'étape de différenciation. » À ce stade, nous passerions aux essais [cliniques]. Sorkin prédit qu'il faudra encore 5 à 10 ans pour que ce produit atteigne le marché.

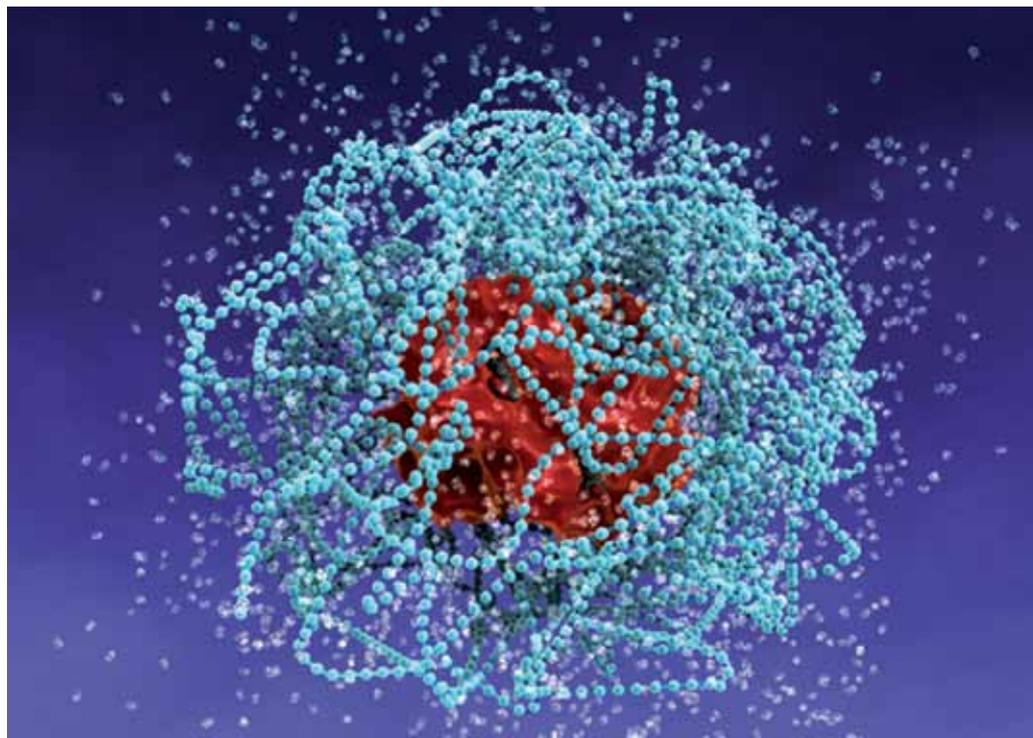
qui contient des sels et des lactates pour maintenir la fonction cardiaque. À ce stade, le produit contient encore environ 30 pour cent de tétramères d'hémoglobine stabilisés – et même s'ils ne peuvent pas se dissocier sous cette forme, ils restent problématiques car ils peuvent pénétrer dans les parois des vaisseaux sanguins et éliminer l'oxyde nitrique. Le NO provoque naturellement la relaxation des parois des vaisseaux sanguins, donc si trop de NO est éliminé, la relaxation est empêchée, ce qui rend la circulation sanguine plus difficile, ce qui entraîne une augmentation de la pression artérielle. Une étape finale de nettoyage élimine la majeure partie de l'hémoglobine tétramère, de manière significative

réduisant l'effet de la pression artérielle, explique Light.

Une fois transfusée dans l'organisme, l'hémoglobine polymérisée fonctionne de la même manière qu'un globule rouge : elle se lie à l'oxygène dans les poumons, l'achemine vers le site approprié de l'organisme puis le libère. Ce qui le différencie des globules rouges, c'est que l'hémoglobine est libre dans le plasma plutôt que liée à l'intérieur de la cellule.

L'avantage de la présence de l'hémoglobine dans le plasma est que l'oxygène qu'elle transporte est plus proche des parois des vaisseaux sanguins. La liaison et la libération de l'oxygène dans le plasma sont plus efficaces que dans les globules rouges, explique Light, donc Hemopure libère l'oxygène plus rapidement que le sang du donneur une fois qu'il atteint le tissu cible. À la fin de sa vie, Hemopure est dégradé par la voie biologique normale de l'hémoglobine.

Hemopure est actuellement approuvé pour une utilisation en Afrique du Sud et a fait l'objet de premiers essais cliniques aux États-Unis. La production s'est toutefois arrêtée lorsque Biopure a été



SANGART

en faillite – et OPK Biotech se concentre actuellement sur la remise en ligne de la production. Faisant référence aux préoccupations de la FDA concernant ces produits, Light prédit qu'ils seront approuvés à l'étranger avant leur approbation aux États-Unis. La société mère de l'entreprise, OPK, est russe et, selon Light, « OPK a un grand intérêt à introduire ce produit en Russie ».

## MP4

Un autre produit, légèrement différent, qui fait l'objet d'essais cliniques en Europe est le MP4 de Sangart.

Le MP4 de Sangart se compose d'hémoglobine enrobée avec polyéthylène glycol

"Notre agent est administré avec du sang pour améliorer le transfert d'oxygène vers les tissus à partir des globules rouges", explique Howard Levy, directeur scientifique de la société basée à San Diego.

Le MP4 est transfusé aux patients dans un rapport MP4: sang du donneur d'environ 1:19. Expliquant la nécessité de son produit, Levy déclare : « le problème est [quand] le sang est stocké pendant de longues périodes ; au-delà de 3 jours, il subit des changements qui le rendent moins efficace pour fournir de l'oxygène.

«Le MP4 libère d'abord son propre oxygène, puis est capable de prélever l'oxygène des globules rouges et de le distribuer aux tissus», ajoute-t-il.

Les essais cliniques de ce produit en Europe progressent bien. «Nous venons de terminer une étude de phase II sur les traumatismes», explique Levy. "Nous sommes donc en train de nettoyer la base de données et procéderons ensuite à l'analyse des données." Il ajoute : « nous envisageons une mise sur le marché fin 2013 ou début 2014 ».

L'hémoglobine du MP4 provient de sang humain périmé, plutôt que du sang bovin utilisé pour Hemopure. Et pour éviter la toxicité et la dissociation des tétramères, Sangart adopte l'approche alternative consistant à enrober l'hémoglobine de polyéthylène glycol (PEG).

Le 2-iminothiolane est ajouté à l'hémoglobine pour augmenter le nombre de sites thiol sur la molécule. Et puis le PEG est capable de s'attacher à ces sites thiols», explique Levy.

## Globule rouge artificiel

On pense que les problèmes de toxicité qui affectent les substituts sanguins proviennent de l'hémoglobine tétramère libre présente dans les produits, et une approche alternative envisagée consiste à enfermer les tétramères dans un récipient artificiel – imitant essentiellement les globules rouges.

Un chercheur travaillant dans ce domaine est Thomas Chang de l'Université McGill, Montréal, Canada. «Le globule rouge artificiel contient une membrane ou un polymère [enveloppe] autour de l'hémoglobine», explique-t-il. Le boîtier est fabriqué à partir de polymères biodégradables, tels que l'acide poly(lactique), qui se dégradent en acide lactique



Chang a été le pionnier du sang artificiel

puis de l'eau et du dioxyde de carbone dans le corps. Dans sa « cellule », Chang a également inclus

deux enzymes – la catalase et la superoxyde dismutase – qui éliminent les radicaux toxiques dans une nouvelle tentative de recréer des conditions similaires à celles de la cellule naturelle.

«La cellule artificielle mesure environ 80 nm de diamètre, soit 100 fois plus petite que les globules rouges naturels», explique Chang. Les premiers tests sur les animaux ont été encourageants, ne montrant aucun effet indésirable sur la fonction du foie ou de la rate. Les cellules artificielles restent également en circulation dans le sang du corps deux fois plus longtemps que les produits d'hémoglobine polymérisés. "Cela semble prometteur et nous continuons

faire des recherches à ce sujet », déclare Chang.



En plus de recouvrir la molécule, le PEG se lie à côté du site de liaison de l'oxygène de l'hémoglobine, modifiant ainsi la façon dont l'oxygène s'attache et se détache de la molécule. «Cela augmente considérablement l'affinité de l'oxygène, de sorte que l'oxygène est retenu très, très étroitement et n'est libéré que s'il atteint le niveau dans les tissus où il y a un manque d'oxygène», explique Levy. Et c'est l'un des principaux arguments de vente du MP4, selon Levy : il fournit de l'oxygène exactement là où il est nécessaire dans le corps.

### Intérêt académique

Même s'il semble bon que ces substituts sanguins puissent éventuellement être commercialisés en Europe et aux États-Unis, de nombreux autres ont échoué au cours des phases de développement ou d'essais cliniques – notamment Polyheme et Rhb2.0 de Baxter.

«Nous devons absolument étudier sérieusement les nouvelles générations de substituts aux cellules sanguines pour résoudre certains problèmes et garantir que

Les banques de sang ne peuvent conserver les dons de sang que pendant 42 jours maximum.

**'Nous devons regarder sérieusement nouvelles générations de cellule sanguine substituts**

les futurs substituts sanguins ne provoqueront aucun effet secondaire», déclare Chang de l'Université McGill. Chris Cooper, expert en hémoglobine à l'Université d'Essex, au Royaume-Uni, partage cet avis : « Pour le moment, le domaine des substituts sanguins est, en un sens, revenu aux universitaires. »

Dans leur quête de ce substitut sanguin de nouvelle génération, Cooper et Olson, de l'Université Rice, étudient, entre autres, les principes fondamentaux du fonctionnement de l'hémoglobine pour déterminer les causes de l'augmentation de la pression artérielle.

L'observation selon laquelle les tétramères éliminent le NO est une cause bien connue de la toxicité de l'hémoglobine en dehors des globules rouges, initialement découverte par Olson, mais plus récemment, Cooper a suspecté une cause multifactorielle. En 2008, Cooper et son équipe ont publié un article dans *le Journal de chimie biologique* démontrant qu'une voie de transfert d'électrons jusqu'alors inconnue dans l'hémoglobine est en partie la clé du problème de toxicité. "L'hémoglobine réagit avec les peroxydes

[naturellement présent dans le corps] et crée des radicaux libres toxiques », explique Cooper. "Nous avons donc étudié ces voies de transfert d'électrons et conçu des ingénieries autour d'elles."

L'équipe a découvert qu'il existe des résidus de l'acide aminé tyrosine dans la structure de l'hémoglobine et qu'en ajouter davantage – grâce à l'ingénierie protéique – permet à l'organisme de mieux se défendre contre les attaques des radicaux libres.

Olson, dont l'équipe basée à Rice étudie également l'hémoglobine issue de la bio-ingénierie, explique : « Nous pouvons regarder la molécule comme un ingénieur regarde une machine à combustion interne et dire « comment puis-je concevoir cela pour qu'il fonctionne mieux ?

Olson et Cooper cultivent leur hémoglobine humaine modifiée dans *Escherichia coli*. « C'est une excellente idée en principe ; tout ce dont vous avez besoin est du sirop de maïs, des minéraux et des bactéries pour avoir une production continue d'hémoglobine selon les normes de fabrication conventionnelles », explique Olson.

«Nous pouvons modifier le programme de production de l'hémoglobine en modifiant sélectivement les acides aminés, pour tenter de supprimer tout effet secondaire ou de l'optimiser pour un meilleur transport», ajoute-t-il. Son équipe procède actuellement à des adaptations pour améliorer la durée de conservation et l'efficacité.

### Peser les coûts

*Le E. coli* Cette approche est séduisante car elle évite d'avoir à s'approvisionner en sang humain ou bovin – mais il existe un problème majeur : le prix. "Personne n'a jamais fait *E. coli* technologie au moindre coût que nous aurions dû pour fabriquer cela», explique Olson. Une unité de sang de donneur (60 g) coûte à un hôpital 300 \$ (194 £), ce qui signifie que pour correspondre au prix, le produit devrait être fabriqué à 6 \$ le gramme. "Pour une technologie recombinante qui n'est pas facile à mettre en œuvre, nous nous situons actuellement entre 200 et 1 000 dollars le gramme."

La question des coûts n'est pas propre à *E. coli* Cependant, Sangart et OPK Biotech admettent que leur technologie n'est pas bon marché et Adam Sorkin d'Arterioocyte (voir encadré p42) admet que « le coût est l'un des défis auxquels nous sommes confrontés à mesure que nous intensifions notre processus ».

Ainsi, avec les problèmes de coûts qui s'ajoutent à la liste toujours croissante d'obstacles que les substituts sanguins doivent franchir avant d'être commercialisés – le concept est-il voué à l'échec ? Non, c'est la réponse catégorique des experts. "Il suffit qu'un seul produit soit mis sur le marché, puis il y aura un marché évident et d'autres prendront leur envol", déclare Cooper à l'assurance.

