

SESSION 2013

CAPET
CONCOURS EXTERNE
ET CAFEP

Section : BIOTECHNOLOGIES
Options : BIOCHIMIE – GÉNIE BIOLOGIQUE

ÉTUDE D'UN SYSTÈME, D'UN PROCÉDÉ
OU D'UNE ORGANISATION

Durée : 5 heures

L'usage de tout ouvrage de référence, de tout dictionnaire et de tout matériel électronique (y compris la calculatrice) est rigoureusement interdit.

Dans le cas où un(e) candidat(e) repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il (elle) le signale très lisiblement sur sa copie, propose la correction et poursuit l'épreuve en conséquence.

De même, si cela vous conduit à formuler une ou plusieurs hypothèses, il vous est demandé de la (ou les) mentionner explicitement.

NB : *La copie que vous rendrez ne devra, conformément au principe d'anonymat, comporter aucun signe distinctif, tel que nom, signature, origine, etc. Si le travail qui vous est demandé comporte notamment la rédaction d'un projet ou d'une note, vous devrez impérativement vous abstenir de signer ou de l'identifier.*

Tournez la page S.V.P.

Les anticorps monoclonaux humains comme molécules thérapeutiques

Les qualités des anticorps monoclonaux, spécificité, affinité, facilité d'obtention et de production industrielle en font des outils diagnostiques et thérapeutiques de choix. On se propose d'étudier les avancées technologiques de conception et de caractérisation des anticorps monoclonaux thérapeutiques, ainsi que la production industrielle et la purification permettant leur administration répétée notamment dans les pathologies chroniques.

Vous exposerez la stratégie développée pour permettre l'utilisation thérapeutique d'anticorps monoclonaux comme traitement d'affections chroniques en décrivant les aspects scientifiques et technologiques permettant de générer, de caractériser, de produire, de purifier des anticorps thérapeutiques utilisables dans les pathologies chroniques.

Liste des documents et extraits d'articles scientifiques et techniques fournis :
--

Document 1 : Utilisation thérapeutique des anticorps monoclonaux

Document 2 : Structure et obtention des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique

2A : Structure des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique

2B : Description du mode d'obtention des différents types d'anticorps thérapeutiques

Document 3 : Exemples d'anticorps monoclonaux thérapeutiques autorisés par la FDA (Food and Drugs Administration) en 2010

3A : Quelques anticorps monoclonaux approuvés par la FDA pour le traitement anti-cancer.

3B : Quelques anticorps monoclonaux approuvés par la FDA pour le traitement de pathologies immunitaires.

Document 4 : Modifications génétiques du génome de souris pour la production d'anticorps monoclonaux humains

Document 5 : Un exemple de procédure d'obtention d'hybridomes produisant des anticorps monoclonaux humains, application à la production d'anticorps dirigés contre la protéine membranaire CD69

Document 6 : Caractérisation d'anticorps monoclonaux : identification de l'épitope reconnu par cartographie d'épitopes

Document 7 : Comparaison des systèmes de production d'anticorps en cellules de mammifères

Document 8 : Milieu de culture utilisé pour la production industrielle d'anticorps monoclonaux humains par culture de CHO recombinées

8A : Contraintes réglementaires affectées aux milieux de culture utilisés pour les lignées CHO productrices de protéines thérapeutiques

8B : Optimisation de milieu de culture sans sérum à partir d'un milieu de culture basal commercial pour CHO

8C : Optimisation des conditions de culture de rCHO pour la production d'anticorps monoclonaux

Document 9 : Conditions de culture pour la production industrielle d'anticorps monoclonaux en bioréacteur

9A : Conditions de culture en fed-batch

9B : Résultats

Document 10 : Procédé de purification d'un anticorps monoclonal à partir de surnageant de culture des cellules CHO en bioréacteur

10A : Différentes étapes de purification

10B : Etapes de chromatographie

10C : Contrôle de qualité des anticorps monoclonaux humains purifiés

Document 11 : Exemples d'utilisation à visée thérapeutique d'anticorps monoclonaux.

Document 1 : Utilisation thérapeutique des anticorps monoclonaux

Le potentiel thérapeutique des anticorps comme « magic bullets » avait déjà été décrit par Paul Ehrlich en 1908.

En 1975, Köhler et Milstein ont réussi à fabriquer des anticorps monoclonaux à l'aide de la technique de l'hybridome. Au cours des 25 dernières années, les techniques de biologie cellulaire et moléculaire se sont affinées, si bien qu'il est devenu possible aujourd'hui de fabriquer des quantités pratiquement illimitées d'anticorps monoclonaux murins, chimères et humanisés pour de nombreuses applications cliniques, notamment dans la recherche, le diagnostic et le traitement des maladies. Les premières applications thérapeutiques ont fait appel à des anticorps monoclonaux produits chez la souris (anticorps murins). Les injections d'anticorps murins provoquaient cependant des réactions immunes et entraînaient la formation d'anticorps humains « anti-souris » (Human Anti-Mouse Antibodies – HAMA). La découverte du fondement génétique de la diversité des anticorps et la technologie de l'ADN recombinant ont, par la suite, ouvert la porte aux formes partiellement humanisées d'anticorps murins. Les anticorps monoclonaux chimères, humanisés et entièrement humains sont moins immunogènes, et induisent beaucoup moins fréquemment la formation d'anticorps anti-immunoglobuline dans le cadre de la pratique thérapeutique. Ces anticorps peuvent par conséquent être utilisés de manière répétée durant une période prolongée.

De la souris à l'homme: anticorps monoclonaux chimères, humanisés et entièrement humains

Les premiers anticorps monoclonaux ont été fabriqués par la fusion d'une cellule B produisant des anticorps et d'une lignée de cellules myélomateuses. Les cellules myélomateuses sont des lymphocytes B immortalisés. Cette fusion permet de fabriquer des lignées cellulaires à très longue durée de vie, capables de produire des anticorps dont la spécificité peut être choisie.

L'anticorps anti-CD3 (Orthoclone OKT3[®], muromomab-CD3) est un représentant de la première génération. Il est utilisé dans le traitement du rejet aigu après greffe d'organe et a été le premier anticorps monoclonal admis pour l'usage thérapeutique chez l'homme. L'expérience clinique a montré que le muromomab-CD3 doit être utilisé en association avec d'autres médicaments immunosuppresseurs pour prévenir la réponse immunitaire contre l'anticorps murin. Les anticorps HAMA peuvent néanmoins apparaître malgré l'application simultanée d'une immunosuppression intensive. La demi-vie normale du muromomab-CD3 dans la circulation est de 18 heures. Après le développement d'anticorps HAMA, le muromomab-CD3 peut être éliminé de la circulation en quelques heures seulement.

Contrairement au traitement limité dans le temps, propre aux rejets aigus de greffes, celui des maladies cancéreuses ou auto-immunes nécessite des applications sur des périodes relativement prolongées pour obtenir l'effet thérapeutique désiré de façon durable.

La constatation selon laquelle la réaction immunitaire du patient contre les anticorps de souris compromet l'efficacité thérapeutique dans ces affections chroniques a conduit au développement de stratégies visant à diminuer l'immunogénicité des anticorps monoclonaux. Dans un premier temps, on s'est mis à produire des anticorps monoclonaux chimères. La fréquence d'induction d'une réponse anti-anticorps a ainsi considérablement diminué, ce qui a permis d'administrer ces médicaments de manière répétée. [...] Cependant, la formation de HAMA reste par conséquent un problème potentiel significatif, même si les anticorps monoclonaux chimères se sont aujourd'hui solidement implantés dans la pratique clinique. Ils exigent toutefois un suivi attentif et, le cas échéant, l'administration concomitante de corticostéroïdes, voire parfois l'interruption du médicament.

La poursuite systématique des efforts de recherche a par la suite conduit au développement d'anticorps humanisés. On espérait obtenir ainsi une réduction significative de leur immunogénicité. En pratique, on s'est cependant trouvé confronté à l'induction de réactions à anticorps HAMA, dont l'incidence était néanmoins plus faible par rapport à celle constatée avec les anticorps chimères. [...]

Des anticorps entièrement humains ont été développés au cours des dernières années, afin de diminuer encore plus l'immunogénicité des anticorps monoclonaux thérapeutiques. Différentes méthodes ont été utilisées: des souris porteuses d'un défaut immunitaire (severe combined immune deficiency, SCID) peuvent être reconstruites à l'aide de tissu foetal humain. L'immunisation de ces souris génère des anticorps humains.

La plus grande partie des anticorps humains est cependant produite *in vitro* par la méthode *Phage-Display* ou par l'intermédiaire de souris transgéniques produisant des anticorps entièrement humains. Plusieurs de ces anticorps exclusivement humains sont actuellement autorisés et d'autres sont testés dans le cadre d'essais cliniques de phase I à III.

Source : http://www.medicalforum.ch/pdf/pdf_f/2008/2008-08/2008-08-023.PDF

Document 2 : Structure et obtention des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique

2A : Structure des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique

Structure	“Omab”	“Ximab”	“Zumab”	« Umab »	Naming convention
<p>Mouse</p>					
<p>Chimeric</p>	0%	80-90%	90-95%	100%	Percentage of human antibody
<p>Humanized</p>	Low			High	Frequency of administration
<p>Human</p>	Difficult			Possible	Repeated administration (due to high antigenicity)
	Low			High	Effector function (CDC activity, ADCC activity)

ADCC (antibody dependant cytotoxicity) / CDC (complement dependant cytotoxicity)

2B: Description du mode d'obtention des différents types d'anticorps thérapeutiques

Anticorps murins : issus de la technologie de production d'hybridome après immunisation de souris, ou plus rarement de rats.

Anticorps chimériques : obtenus par la fusion du domaine variable de liaison à l'antigène d'un anticorps monoclonal de souris avec les domaines constants humains :

V_L de souris à C_L humain pour les chaînes légères
 et V_H de souris à $C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$ humain pour les chaînes lourdes.

Anticorps humanisés : créés en greffant les régions déterminant la complémentarité (CDRs) d'anticorps monoclonal de souris dans une IgG humaine.

Anticorps humains : sont obtenus par différentes stratégies :

- Par criblage d'une banque de fragments variables d'anticorps [single-chain variable fragments (scFvs)] correspondant au paratope et reconstruction par génie génétique d'une immunoglobuline complète.
- Par la méthode classique de production d'hybridomes, mais par immunisation d'une souris transgénique dont les gènes d'immunoglobuline ont été éliminés et remplacés par le locus des gènes d'immunoglobulines humaines.
- Par l'immortalisation d'une cellule mémoire B humain issue du sang périphérique.

Traduit d'après: *Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies*. Paul Carter. *Nature Reviews Cancer* 1, 118-129 (November 2001)

http://www.kyowa-kirin.co.jp/antibody/english/about_antibody/history.html
Biotechnol. J. 2008, 3, 1157-1171

Document 3 : Exemples d'anticorps monoclonaux thérapeutiques autorisés par la FDA (Food and Drugs Administration) en 2010

3A: Quelques anticorps monoclonaux approuvés par la FDA pour le traitement anti-cancer.

International non-proprietary name	Trade name	Target and type	Indication under review or first approved	FDA approval year
Ofatumumab	Arzerra	CD20; human IgG1	Chronic lymphocytic leukemia	2009
Tositumomab-I131	Bexxar	CD20; murine IgG2a	Non-Hodgkin lymphoma	2003
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	CD20; murine IgG1	Non-Hodgkin lymphoma	2002
Rituximab	Rituxan	CD20; chimeric IgG1	Non-Hodgkin's lymphoma	1997
Alemtuzumab	Campath-1H	CD52; humanized IgG1	Chronic myeloid leukemia	2001
Panitumumab	Vectibix	EGFR; human IgG2	Colorectal cancer	2006
Cetuximab	Erbix	EGFR; chimeric IgG1	Colorectal cancer	2004
Bevacizumab	Avastin	VEGF; humanized IgG1	Colorectal cancer	2004

CD, cluster of differentiation; EGFR, epidermal growth factor receptor; VEGF, vascular endothelial growth factor.
International non-proprietary naming convention: -umab, human; -zumab, humanized; -ximab, chimeric; -momab, murine.

3B: Quelques anticorps monoclonaux approuvés par la FDA pour le traitement de pathologies immunitaires.

International non-proprietary name	Trade name	Target and type	Indication under consideration or first approved	FDA approval year
Muromomab-CD3	Orthoclone Okt3	CD3; murine IgG2a	Reversal of kidney transplant rejection	1986*
Basiliximab	Simulect	IL2R; chimeric IgG1	Prevention of kidney transplant rejection	1998
Tocilizumab	Actemra	IL6R; humanized IgG1	Rheumatoid arthritis	2010
Ustekinumab	Stelara	IL12/23; human IgG1	Plaque psoriasis	2009
Omalizumab	Xolair	IgE; humanized IgG1	Asthma	2003
Natalizumab	Tysabri	$\alpha 4$ integrin; humanized IgG4	Multiple sclerosis	2004
Golimumab	Simponi	TNF; human IgG1	Rheumatoid and psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis	2009
Adalimumab	Humira	TNF; human IgG1	Rheumatoid arthritis	2002
Infliximab	Remicade	TNF; chimeric IgG1	Crohn disease	1998

Information current as of September 1, 2010. *Voluntarily withdrawn from US market.
CD, cluster of differentiation; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor.
International non-proprietary naming convention: -umab, human; -zumab, humanized; -ximab, chimeric; -momab, murine.

D'après: *Antibody-based therapeutics to watch in 2011*. Janice M. Reichert- *mAbs* 3:1, 76-99; January/February 2011; © 2011 Landes Bioscience

Document 4 : Modifications génétiques du génome de souris pour la production d'anticorps monoclonaux humains

L'utilisation de souris transgéniques pour les gènes d'immunoglobulines humaines permet de produire des anticorps humains grâce à la technologie de production d'hybridomes bien documentée. Différentes lignées de souris sont disponibles, leur nom commercial est par exemple XenoMouse®, HuMAb® Mouse....

Ces souris transgéniques présentent des propriétés communes :

1. Le locus endogène de la chaîne lourde des immunoglobulines de souris a été inactivé par la technique de d'inactivation des segments J_H ou C_{μ} (knock-out) ;
2. Le locus endogène de la chaîne légère kappa murine a été inactivé par inactivation des segments J_k et /ou C_k (knock-out) ;
3. Le locus endogène de la chaîne légère lambda reste intact et fonctionnel ;
4. Le transgène de la chaîne lourde humaine contient au minimum : la majorité des segments V_H humains, tous les segments D humains, tous les segments J_H humains, le segment C_{μ} - C_{δ} humain et au moins un segment C_{γ} humain ;
5. Le transgène de la chaîne légère kappa humaine contient la majorité des segments V_k humains et le segment C_k humain.

Traduit d'après: *Antibody Engineering : Methods and Protocols* Editor(s): Benny K. Lo¹ Affiliation(s) Humana Press 2004 Series: *Methods in Molecular Biology* | Volume No.: 248

Document 5: Un exemple de procédure d'obtention d'hybridome produisant des anticorps monoclonaux humains, application à la production d'anticorps dirigés contre la protéine membranaire CD69

Control and antigen producing cell lines

RBL rat basophilic leukemia cells (RBL-WT) and the stable transfectant of a human CD69 protein (RBL-CD69) were both cultured in DMEM supplemented with 5% foetal calf serum (FCS).

Immunization

The HuMAb[®] mice were immunized with RBL-CD69 cells. The animals received a primary injection with 10^7 cells emulsified with Complete Freund's Adjuvant and 2–3 weeks later, a secondary injection was performed using the same dose of cells emulsified with Incomplete Freund's Adjuvant (IFA). Sera from immunized mice were obtained and monitored for the presence of specific antibody using ELISA as described below. Two weeks after the second immunization, an i.v. (intra venous) boost with $2 \cdot 10^6$ RBL-CD69 cells in PBS was administered, and 3 days later animals were sacrificed and their spleens were removed.

Cell fusion

The spleens were teased to isolate splenocytes, which were washed and used for fusion (Köhler and Milstein, 1975) with NSO mouse myeloma cells. Fused cells were suspended in DMEM supplemented with 20% FCS plus hypoxanthine–aminopterin–thymidine (HAT) and plated in 24-well plates at different cell concentrations.

Screening

Supernatants of hybridomas from 24-well plates were first screened for human anti-RBL-CD69 IgM secretion. Clones from positive wells were transferred and plated in 96-well plates. Supernatants from individual hybridomas were tested by ELISA for the secretion of Hu-IgM, and the positive wells were tested further by flow cytometry using RBL-CD69 and RBL-WT cells. Those hybridomas that were positive for RBL-CD69 but negative for RBL-WT cells were then subcloned by limited dilution at least three times.

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

The screening of hybridomas secreting specific anti CD69 Abs was performed using recombinant CD69 protein (rCD69). Aliquots (50 μ l) containing 2 μ g of rCD69 were dispensed into each well of 96-well polystyrene plates. The plates were incubated overnight at 4°C, and then wells were blocked by addition of 200 μ l of PBS/1% FCS per well, and incubated for 2 h at room temperature. The wells were washed twice with PBS/ 0.05% Tween 20, the hybridoma supernatants (50 μ l/ well) were added and the plates incubated for 2 h at 4°C. This was followed by washing and incubation with biotinylated goat anti-Hu-IgM (50 μ l/well at 1/5000 dilution) for 2 h at 4°C. After washing, streptavidin–HRP was added (50 μ l/well at 1/4000 dilution), and the plates were incubated at room temperature for 15 min. The colorimetric reaction was developed with the substrate ortho-phenylene-diamine, prepared according to manufacturer's instruction (Sigma) (50 μ l/well) for 15–30 min and stopped by the addition of 50 μ l/well of 4 M sulphuric acid. Absorbance at 450 nm was measured. Each control and test group consisted of three replicate wells. Each experiment was repeated at least three times.

Source : Journal of Immunological Methods 282 (2003) 147– 158

The use of transgenic mice for the production of a human monoclonal antibody specific for human CD69 antigen

Document 6: Caractérisation d'anticorps monoclonaux : identification de l'épitope reconnu par cartographie d'épitopes

Les anticorps monoclonaux sont caractérisés pour préciser trois propriétés majeures.

Tout d'abord la classe et la sous classe de l'anticorps est déterminée; en effet selon la nature du fragment Fc les propriétés effectrices des anticorps sont différentes.

La seconde permet la mesure de l'affinité intrinsèque de l'anticorps pour l'antigène, mesure du K_D .

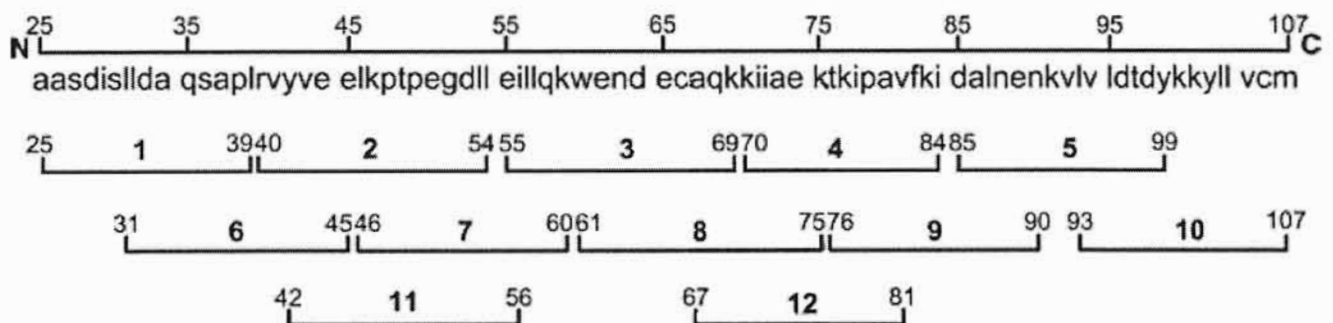
La dernière propriété est l'identification de l'épitope reconnu, en vue de prédire l'effet physiologique agoniste ou antagoniste de l'anticorps thérapeutique.

Le document montre les étapes du protocole et un résultat de cartographie d'épitopes pour identifier l'épitope linéaire reconnu par un anticorps monoclonal.

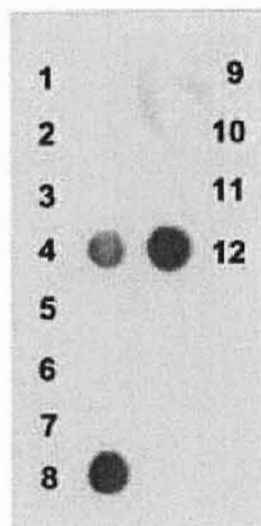
Peptide Array protocol—Twelve synthetic peptides in one nitrocellulose array, each containing 15 amino acid residues, were designed corresponding to residues 25–107 of the antigen. The synthetic peptides were prepared under a contract with Genesis Biotech Inc. (Taipei, Republic of China). Briefly, the peptides were directly synthesized *in situ* on a nitrocellulose paper. The nitrocellulose membrane in 0.01 M Tris-buffered saline containing 0.05% (v/v) Tween 20 (TBST) was blocked with 5% (w/v) gelatin in TBST for 2 h at room temperature followed by washing three times. After incubation with mAb (mouse antibody) for 2 h and three washes, goat anti-mouse IgG conjugated with horseradish peroxidase (HRP) in 0.5% gelatin/TBST was added and incubated. Finally, following the washes, the chemiluminescent substrate (ECL™ Western blotting System, Amersham Biosciences) was added, washed, and immediately developed by exposing onto a film.

Peptide Array results—Twelve peptides corresponding to a 9-kDa fragment of the antigen (residues 25–107) were directly synthesized *in situ* on nitrocellulose membrane. Peptides 11 and 12 were prepared due to the presence of Pro residues thought to be potentially antigenic. The entire peptide array was commercially prepared under a contract for customer designing. Binding of antibody was conducted by using HRP-labeled secondary antibody with chemiluminescent agent as a developer.

6A: Antigen sequence and peptides localization



6B : Peptide array revealed with mAb



Source: THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 280, No. 5, Issue of February 4, pp. 3574–3582, 2005

Tournez la page S.V.P.

Document 7: Comparaison des systèmes de production d'anticorps en cellules de mammifères

Les anticorps thérapeutiques sont principalement produits par 2 types de lignées cellulaires de mammifère, la lignée NS0 (cellules de myélome de souris) et la lignée CHO (cellules d'ovaire de hamster chinois).

Les cellules NS0 sont des cellules de myélome non sécrétrices d'anticorps et produisant un acide sialique non synthétisé par les cellules humaines, l'acide N-glycolylneuraminique. Cet acide sialique, ajouté aux protéines lors de l'étape de glycosylation est supposé augmenter leur immunogénicité pour l'homme. Cette potentielle immunogénicité a conduit à limiter l'utilisation de cette lignée dans le cadre de la production de protéines thérapeutiques.

Les cellules CHO sont préférées pour la production de protéines thérapeutiques dans 70% des cas. Le contrôle de la glycosylation des anticorps lors de la production en CHO a été particulièrement évalué, en effet elle influence la clairance et l'activité biologique des anticorps injectés. De plus les cellules CHO, bien qu'initialement adhérentes, peuvent se multiplier indéfiniment et en suspension dans un milieu sans sérum. Après une vingtaine d'années de travail intense visant à l'optimisation de la lignée, des milieux de culture et des conditions de culture en bioréacteur, une productivité très élevée de 20 pg de protéines produites par jour et par cellule est aisément atteinte en routine, dans un système de fed-batch autorisant des densités cellulaires pouvant atteindre $20 \cdot 10^6$ cellules /mL de milieu de culture.

Source: *mAbs* 2:5, 466-477; September/October 2010; © 2010 Landes Bioscience

Document 8: Milieu de culture utilisé pour la production industrielle d'anticorps monoclonaux humains par culture de CHO recombinées

L'étude menée par Do Yun Kim et al. en 2006 a pour objectif d'optimiser la composition du milieu IMDM (document 8A) pour permettre la culture de lignées CHO recombinées sans addition de sérum de veau fœtal.

Les cellules CHO modifiées génétiquement pour produire des anticorps monoclonaux (rCHO) sont cultivées en suspension, sous agitation à 110 rpm et incubées à 37°C en atmosphère enrichie en CO₂ (5%).

Les auteurs ont testé différents mélanges de composants à ajouter au milieu de base IMDM pour permettre la croissance cellulaire en l'absence d'addition de sérum de veau fœtal. Les résultats de cette optimisation du milieu de culture sont récapitulés dans le tableau du document 8B.

Le milieu ainsi optimisé a été utilisé pour tester différentes conditions de culture en vue de la production d'anticorps monoclonaux, les résultats de cette étude sont fournis dans le document 8C.

8A : Contraintes réglementaires affectées aux milieux de culture utilisés pour les lignées CHO productrices de protéines thérapeutiques

Les milieux optimisés pour CHO dérivent pour la plupart du milieu de Dulbecco modifié par Iscove (IDMM) dont la composition est donnée ci-dessous :

Inorganic Salts (g/liter) CaCl ₂ (anhydrous) 0.16500 MgSO ₄ (anhydrous) 0.09770 KCl 0.33000 KNO ₃ 0.000076 NaHCO ₃ 1.50000 NaCl 4.50500 NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 0.12500 Na ₂ SeO ₃ (anhydrous) 0.0000173	Amino Acids (g/liter) L-Alanine 0.02500 L-Arginine·HCl 0.08400 L-Asparagine·H ₂ O 0.02840 L-Aspartic Acid 0.03000 L-Cystine·2HCl 0.09124 L-Glutamic Acid 0.07500 L-Glutamine 0.58400 Glycine 0.03000 L-Histidine·HCl·H ₂ O 0.04200	L-Isoleucine 0.10500 L-Leucine 0.10500 L-Lysine·HCl 0.14600 L-Methionine 0.03000 L-Phenylalanine 0.06600 L-Proline 0.04000 L-Serine 0.04200 L-Threonine 0.09500 L-Tryptophan 0.01600 L-Tyrosine·2Na·2H ₂ O 0.10379 L-Valine 0.09400
Vitamins (g/liter) D-Biotin 0.000013 Choline Chloride 0.00400 Folic Acid 0.00400 myo-Inositol 0.00720 Nicotinamide 0.00400	D-Pantothenic Acid 0.00400 (hemicalcium) Pyridoxine·HCl 0.00400 Riboflavin 0.00040 Thiamine·HCl 0.00400 Vitamin B-12 0.000013	Other (g/liter) D-Glucose 4.50000 HEPES 5.95800 Phenol Red, Sodium Salt 0.01500 Sodium Pyruvate 0.11000

Lors de la culture de cellules de mammifères, le milieu de culture doit être supplémenté en sérum de veau fœtal riche en protéines, qui contient des facteurs de croissance (stimulateur de la division cellulaire) mais aussi protéines de transport de molécules indispensables à la croissance comme les acides gras ou le fer.

De nombreuses entreprises commercialisant des milieux de culture pour cellules de mammifère ont développé des milieux de culture sans sérum optimisés pour la production industrielle de protéines thérapeutiques. Ces milieux sans sérum, chimiquement définis, doivent permettre la survie et la croissance cellulaire mais aussi une glycosylation correcte des protéines produites et ne contenir aucun produit d'origine animale pour se conformer à la réglementation concernant la mise sur le marché des protéines recombinées.

8B : Optimisation d'un milieu de culture sans sérum pour lignée CHO productrice d'anticorps

Exp. group	IMDM supplemented with	mg L ⁻¹	Cell growth
A	Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O CuCl ₂ ZnSO ₄ ·7H ₂ O Pluronic F-68	2 0.0025 1 1000	-
B	A+ serum	-	+++
C	A+ IGF Na ₂ SeO ₃ Ferric citrate Ethanalamine Phospatidylcholine	0.02 0.0173 2 3 5	+
D	C+ soy protein hydrolysate	5000	++
E	C+ wheat protein hydrolysate	5000	-
F	C+ yeast extract	5000	+++

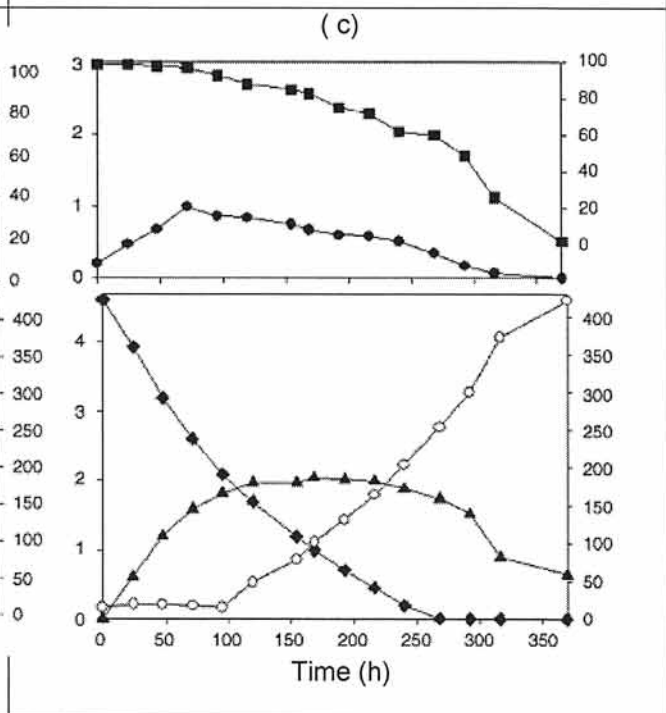
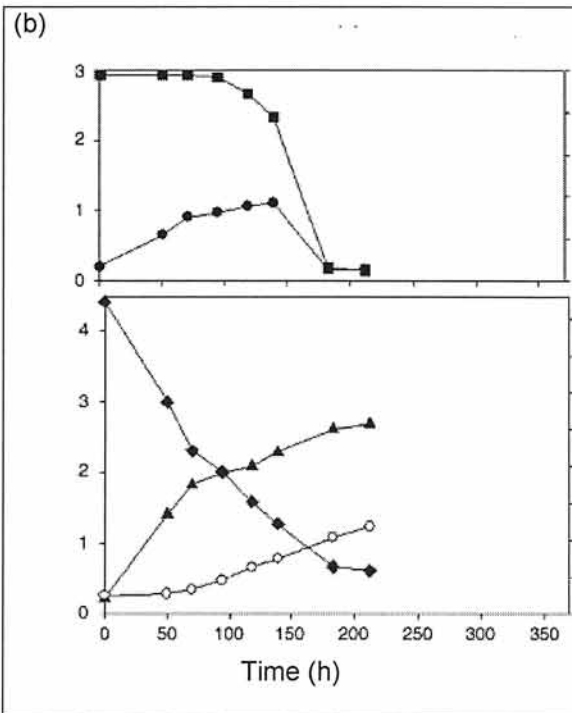
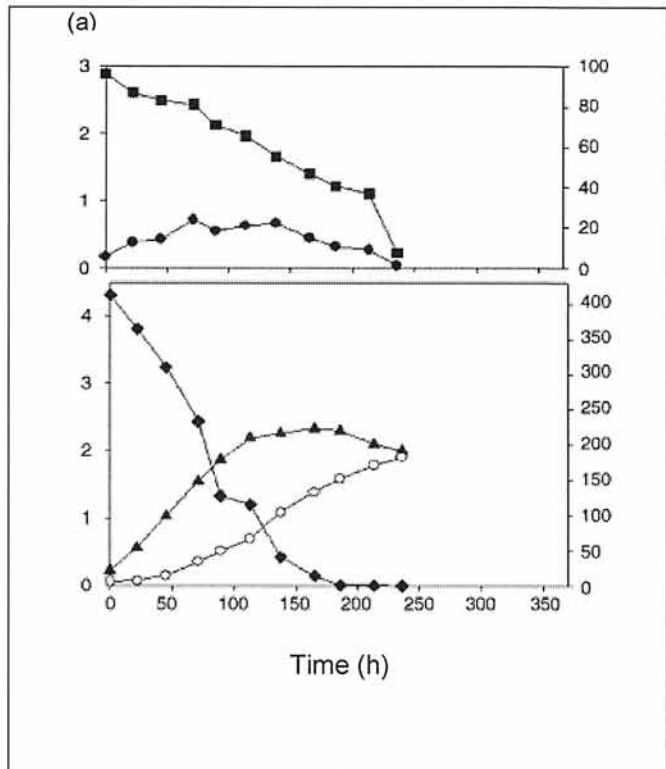
IGF : facteur de survie et de prolifération cellulaire (Growth Factor) / Pluronic F-68 : agent antimoussant et émulsifiant des acides gras
soy (soja) , blé (wheat), levure (yeast).

8C : Optimisation des conditions de culture de rCHO pour la production d'anticorps monoclonaux

Les expériences suivantes montrent les résultats obtenus par culture des cellules rCHO dans le milieu de base correspondant au milieu condition A (doc 8B), (courbes a) ou dans le milieu optimisé choisi d'après les expériences précédentes (8B) et après une période d'adaptation dans ce milieu de 300 heures (courbes b) ou 3600 heures (courbes c).

Les paramètres suivants sont quantifiés au cours de la culture :

- la densité cellulaire (●), (x 10⁶ cells .mL⁻¹)
- la viabilité (■),
- la concentration en glucose (◆) (g.L⁻¹) dans le milieu de culture,
- la concentration en lactate (▲) (g.L⁻¹) dans le milieu de culture,
- la concentration en anticorps recombiné (○)(mg .L⁻¹) dans le milieu de culture,



Source: *Enzyme and Microbial Technology* 39 (2006) 426-433

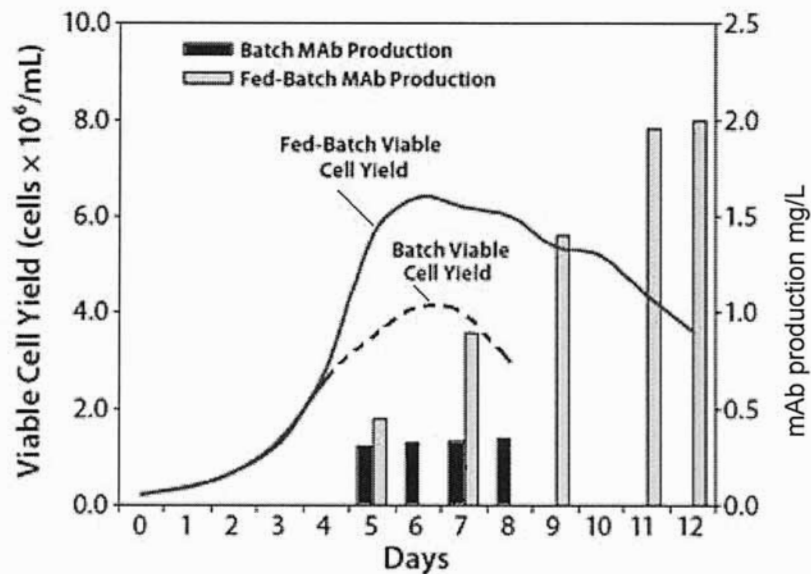
Document 9: Conditions de culture pour la production industrielle d'anticorps monoclonaux en bioréacteur

On se propose de comparer les conditions de culture de CHO recombinées en milieu sans sérum en batch et en fed batch vis-à-vis de la croissance cellulaire et de la production d'anticorps.

9A: Conditions de culture en fed-batch

Fed-batch cultures were carried out in a 5-litre-working-volume bioreactor (B. Braun Biotech, Mesungen, Germany). The concentrations of concentrated glucose and glutamine feeding solution were 200 mM and 90 mM respectively. Amino acids were fed according to their stoichiometric consumption ratio to glutamine in a 'cocktail' that included seven quickly consumed amino acids (lysine, threonine, valine, leucine, isoleucine, phenylalanine and methionine). Sparger aeration was employed using air or pure oxygen, depending on the oxygen demand of the cultures. The dissolved oxygen concentration was set at 60% of air saturation. The agitation rate was 40 rev./min, and the temperature was controlled at 37 °C. The pH was set at 7.2 and controlled through the addition of CO₂. The osmolarity was set at 295–320 mOsmol·kg⁻¹ at the beginning of culture.

9B: Résultats

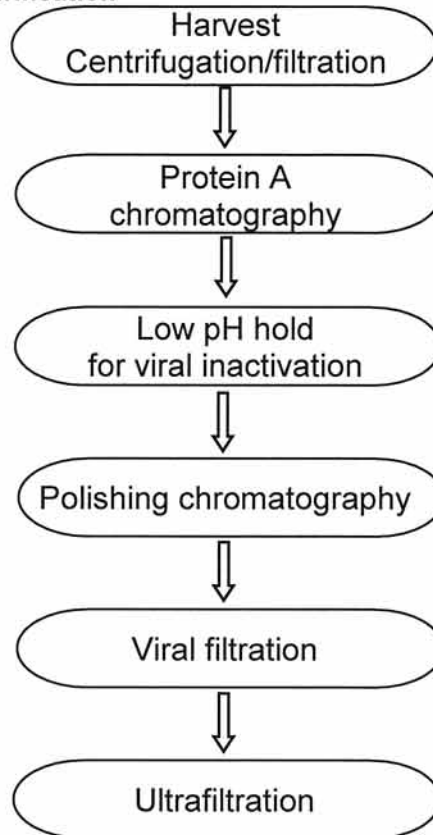


Source: *Process Supplements for Optimized Fed-Batch Culture Systems*; Brandon Pence; *BioProcess International*, Vol. 6, No. 7, July–August 2008, p. 26

Document 10: Procédé de purification d'un anticorps monoclonal à partir de surnageant de culture des cellules CHO en bioréacteur

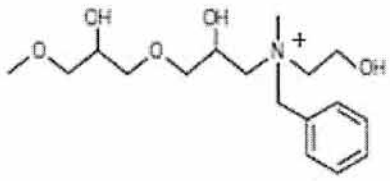
La purification des anticorps monoclonaux dans le surnageant de culture repose sur une succession d'étapes (document 10A) impliquant deux chromatographies détaillées dans le document 10B ; les résultats des contrôles qualité sont donnés dans le document 10C.

10A : Différentes étapes de purification



10B : Etapes de chromatographie

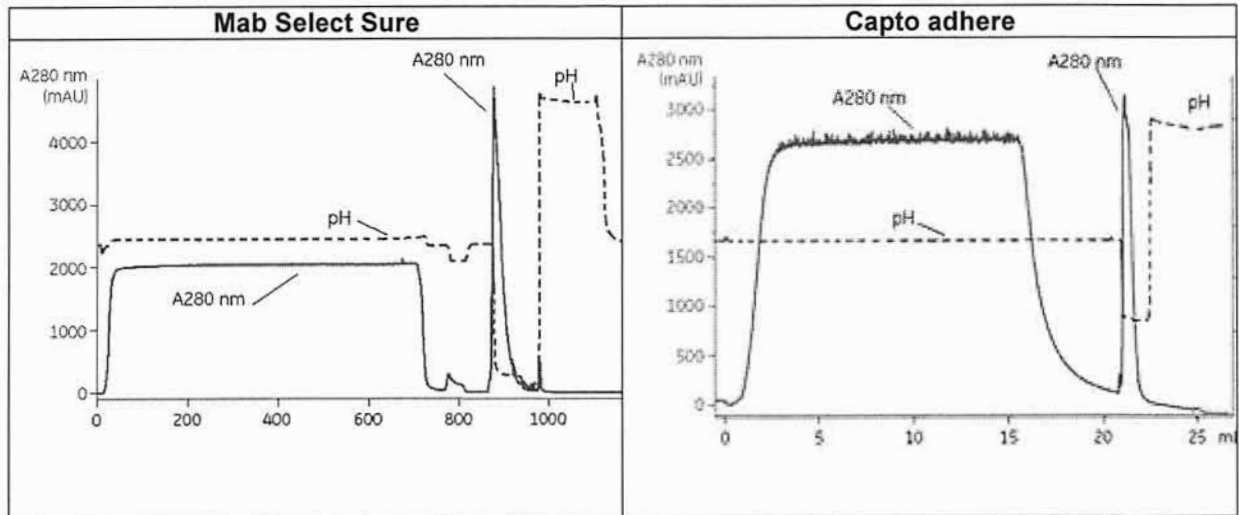
* Caractéristiques des supports chromatographiques utilisés.

step	Protein A chromatography	Polishing chromatography
	Mab Select Sure	Capto adhere
Matrix	Highly cross-linked agarose	Highly cross-linked agarose with dextran surface extended
Average particle size	85 µm	90µm
Ligand (Groupement greffé)	Recombinant protein A	

*Conduite de chromatographie:

	Mab Select Sure	Capto adhere
Sample	Clarified CHO supernatant	Mab Select Sure eluate after virus inactivation and filtration
Loading buffer	0,02 M sodium phosphate 0,15 M sodium chloride pH 7,4	0,025 M TRIS sodium chloride pH 7,5
Elution buffer	0,06 M sodium citrate pH 3,4	0,01 M acetic acid pH 3,0

* Profils d'élution:



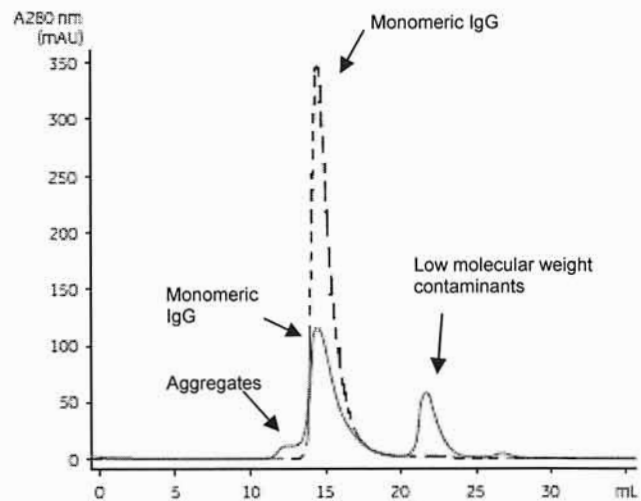
10C: Contrôle de qualité des anticorps monoclonaux humains purifiés

* Contaminants protéiques

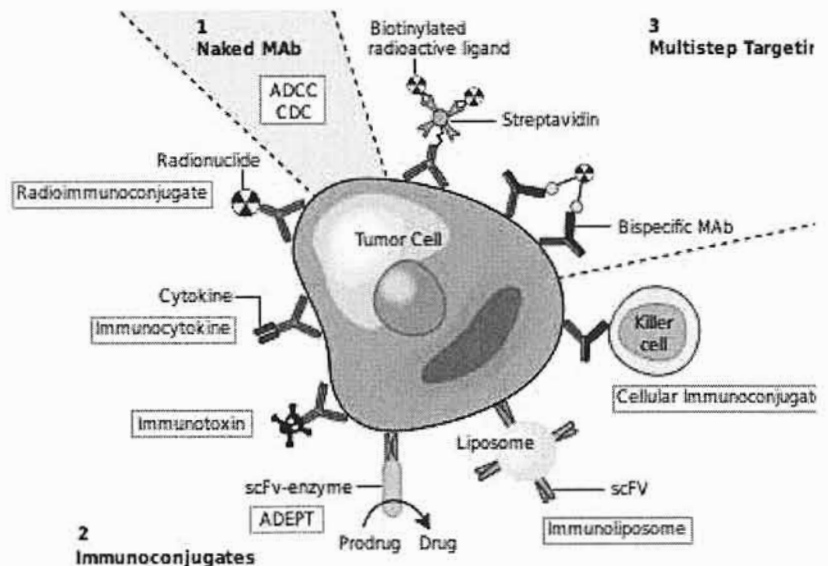
	Accumulated yield (%)	Dimers and aggregates (%)	Protein A (ng/mL)	Host Cell Protein (ng/mL)
Supernatant	100			95 000
MabSelect Sure	95	<0,7	<5	250
Capto adhere	90	<0,1	<5	20

* Contrôle par chromatographie d'exclusion diffusion des fractions non-retenues (—) et éluées (- - -) après étape captoadhere

Source: application note GE Healthcare Life Sciences Two-step purification of monoclonal IgG1 from CHO cell culture supernatant



Document 11 : Exemples d'utilisation à visée thérapeutique d'anticorps monoclonaux



source : <http://www.answers.com/topic/monoclonal-antibody>