

Purification d'IgM recombinants produits en cellules CHO-Xpress

H. Ginisty, CSO
GTP Technology

Colloque Adebiotech, Technologies innovantes en séparation industrielle des protéines
28-29 octobre 2013

Fournisseur de service scientifiques et techniques pour accélérer les projets de production de protéines recombinantes.



Protéines pour la recherche

- « **Protéines cibles** » pour HTS, lead optimisation,...
- **Antigènes** pour la génération d'anticorps
- **Protéines** pour des études structurales (Cristallographie et RMN,...)



« Process dev » & « tech transfer »

- **Protéines thérapeutiques**
 - Vaccins protéiques
 - mAb, Fab, ScFv,...
 - Enzymes,.....
- **Protéines industrielles**
 - Tests diagnostiques ou analytiques
 - Additifs alimentaires
 - Nanotechnologies
 - Agrochimie

Identité

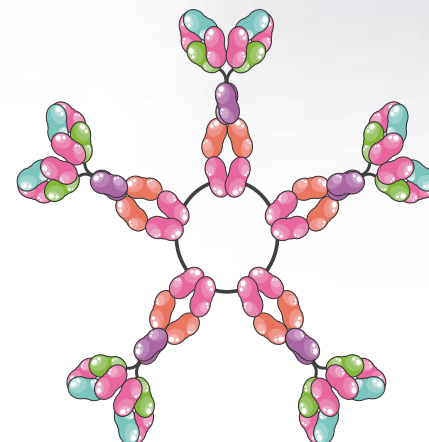
- ✦ **13 ans d'expérience**
- ✦ **22 salariés, 11 ingénieurs ou PhDs**
- ✦ **2 M€ de chiffre d'affaire (2012), 45% à l'export**
- ✦ **Déménagement prévu dans de nouveaux locaux (1000 m2 fin 2013)**

❖ Fort intérêt thérapeutique et pour le diagnostic

- Première classe d'immunoglobulines décelable lors d'une réponse immunitaire primaire.
- Penta ou Hexamerique => Avidité supérieure à celles des autres classes d'anticorps
- Meilleure classe d'anticorps pour activer le complément (CDC)

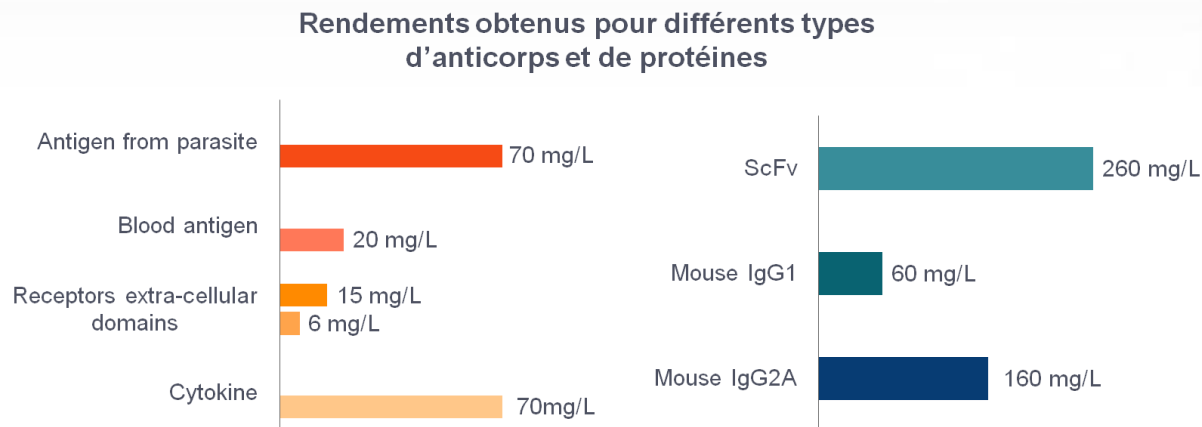
❖ Sources actuelles :

- Purification à partir du sérum de patients infectés, mais :
 - Variabilité du « sourcing »
 - Problèmes éthiques
 - Problème des maladies infectieuses en voie de disparition
- Autres sources
 - Hybridomes (100 à 200 mg/L)
 - CHO (10 mg/L)
 - PerC6 jusqu'à 800 mg/L (20 pg/cell/day)



❖ CHO-Xpress une plateforme de production en CHO

- Génération **RAPIDE** de lignées stables
- Sans insertion dans le génome :
 - Aucun effet du locus d'insertion.
 - Lignée polyclonale maintenant un plasmide épisomique à 50 à 500 copies par cellules (dépendant du plasmide et des conditions de culture.)
- Alternative intéressante à la transfection transitoire en HEK
- Productivité spécifique comparable à celle de clone stables :
 - Qp de 30 pg/cellule/jours pour des IgG

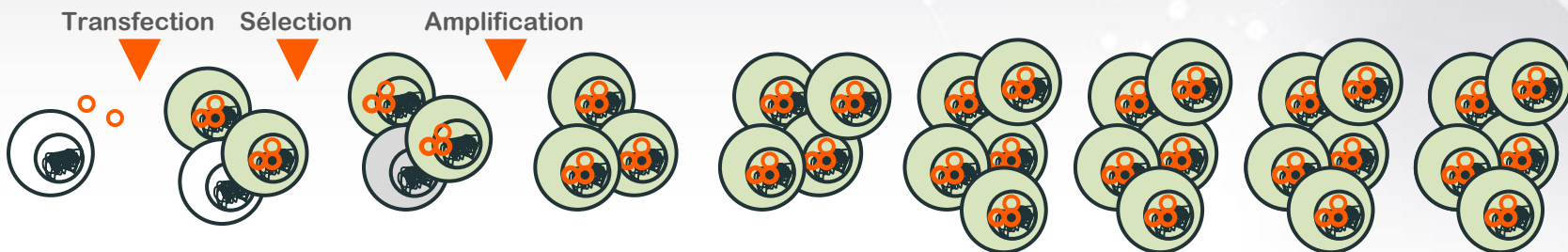


Réplication épisomique du plasmide

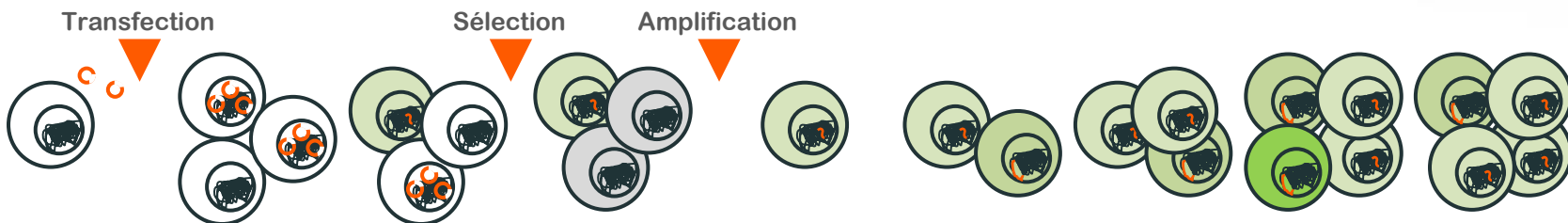
Transitoire



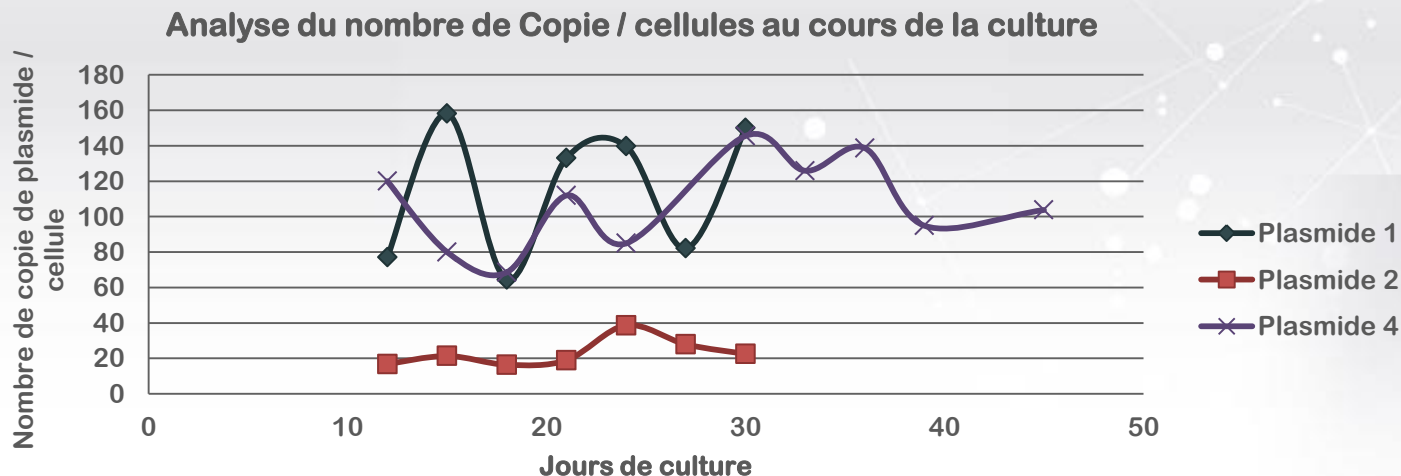
CHO Xpress



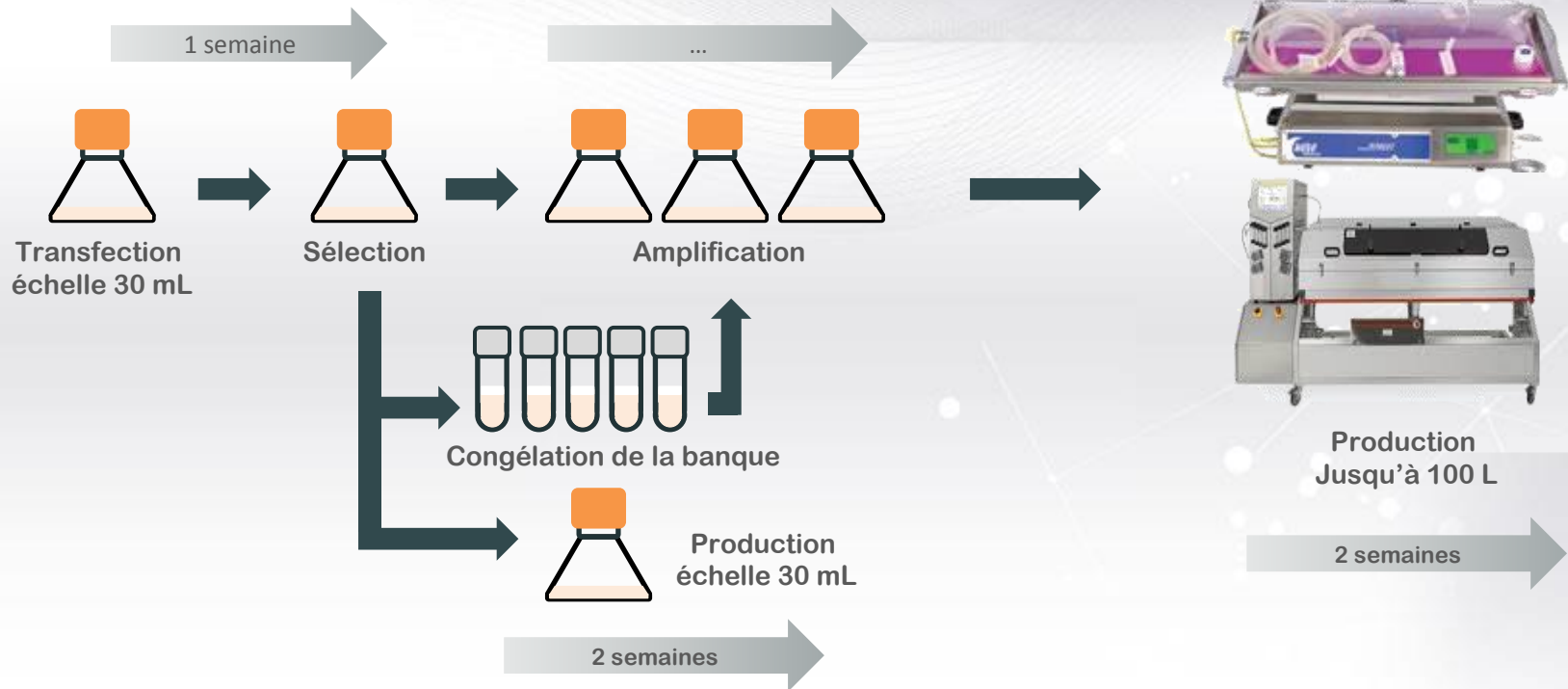
Stable



- ❖ Analyse du nombre de copies par PCR en temps réel sur différentes lignées CHO-Xpress.

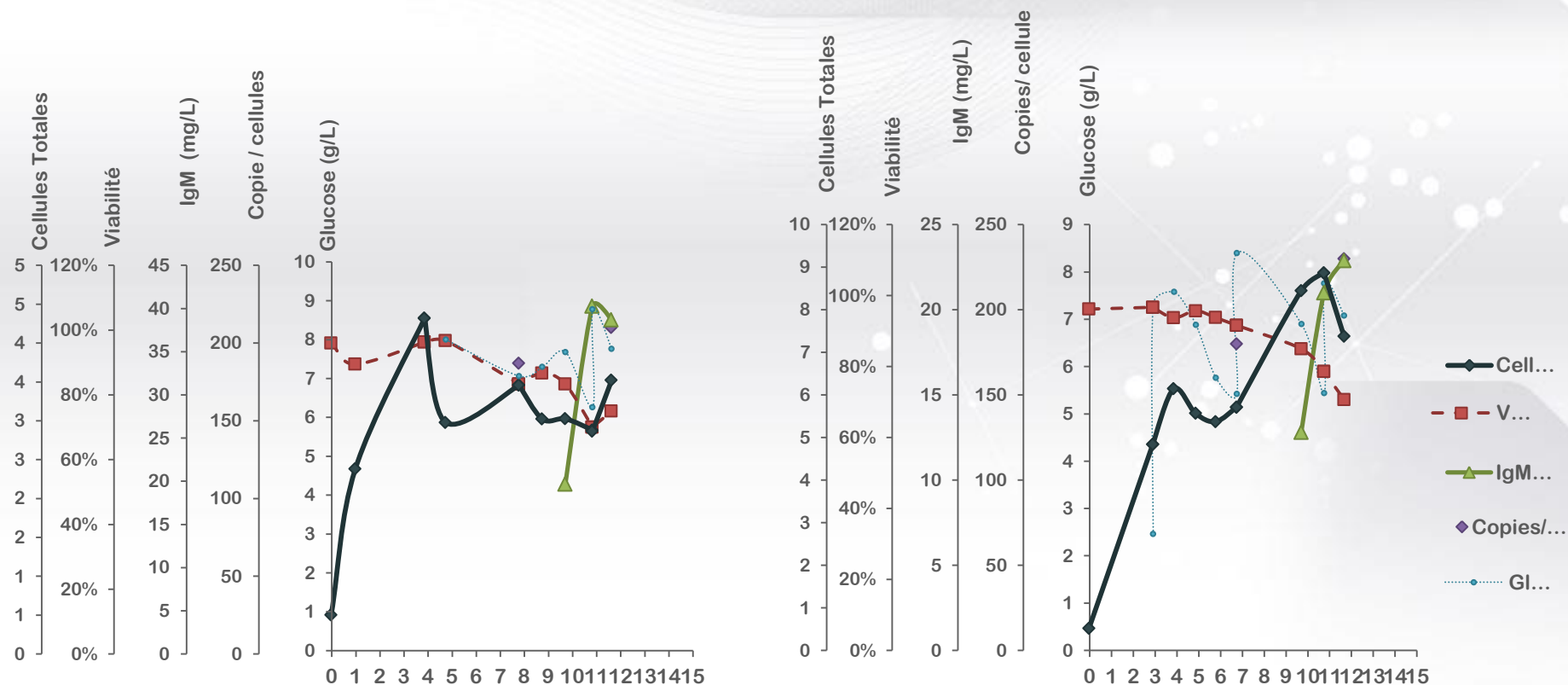


- ❖ Une fois transfecté le plasmide est stable dans la cellule.
- ❖ Quelle que soit l'échelle de production la transfection est réalisée à petite échelle (30 mL)
 - Petite quantité d'ADN nécessaire
 - Faibles couts d'agent transfectant



- ❖ Expansion de la lignée polyclonale jusqu'à des échelles de 100L.
- ❖ Sécurité du système : banques
 - Une banque de la lignée polyclonale
 - Refaire une transfection ne « coûte » qu'une semaine :
 - Une banque d'ADN plasmidique purifié.
 - Une banque cellulaire de CHO-Xpress.
- ❖ Système opportun pour:
 - Les phases de screening de variants et de validation de candidats thérapeutiques. (mAB, protéines de fusion, cytokines,...)
 - Les productions d'IgG ou d'IgM recombinants pour le diagnostic *in vitro*

rlgM en CHO express



❖ rlgM humain : 20 à 40 mg/L avec des productivités de 13 à 15 pcd (pg/cell/day)

- Suivi de la quantité IgM en cours de culture par BLI Blitz : Pall forte bio)

Essais de récolte par filtration en profondeur

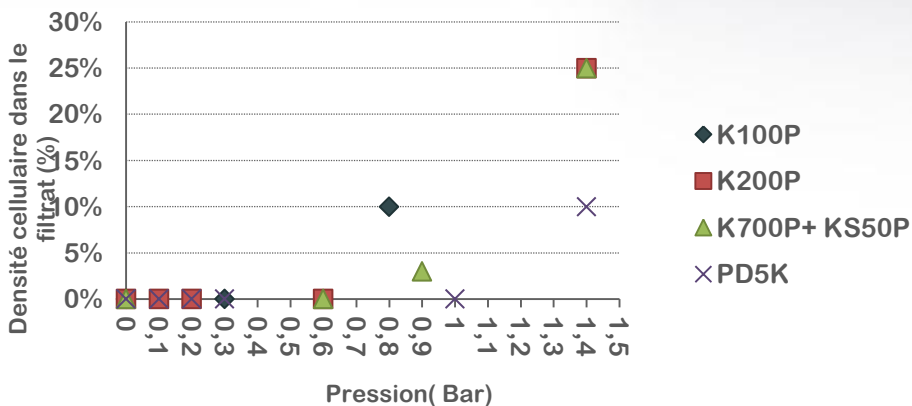
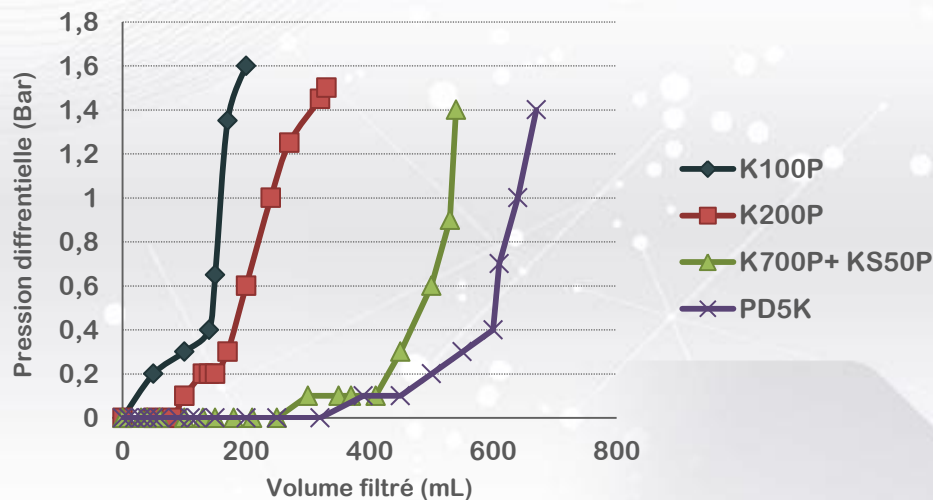
Matériel de départ :

- Culture CHO-Xpress exprimant un IgG recombinant
- Densité cellulaire : $8 \cdot 10^6$ cellules/mL
- Débit de filtration : $0.15 \text{ mL} / \text{cm}^2$

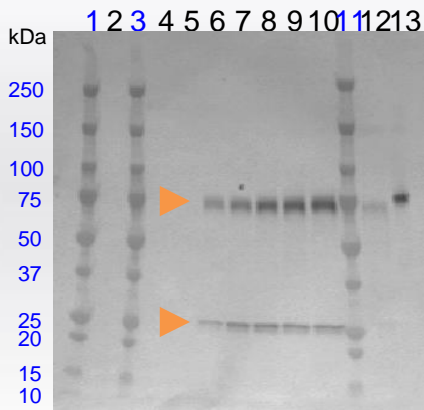
Conclusions

- Aucune densité cellulaire mesurable n'est détectée dans le filtrat avant l'atteinte d'une pression différentielle > 0.6 bars
- « Recovery » de la protéine d'intérêt $> 95\%$
- Le supracap PD5K est le plus adapté et permet une récolte efficace avec un dimensionnement de l'ordre de 23 mL/cm^2 et un débit de 0.15 mL/cm^2
- Scale-Up réalisé à l'échelle 10 L sur supracap 100 (récolte en 2 heures)

PALL Supracap 60

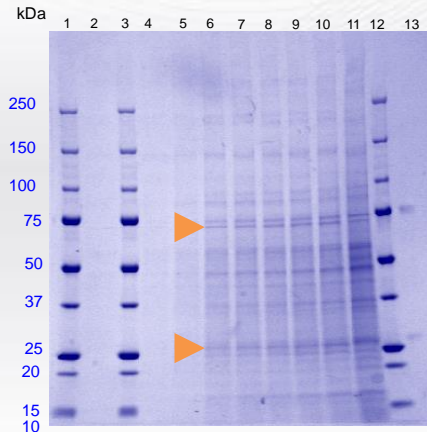


CHO-Xpress permet la production d'IgM humains recombinants fonctionnels

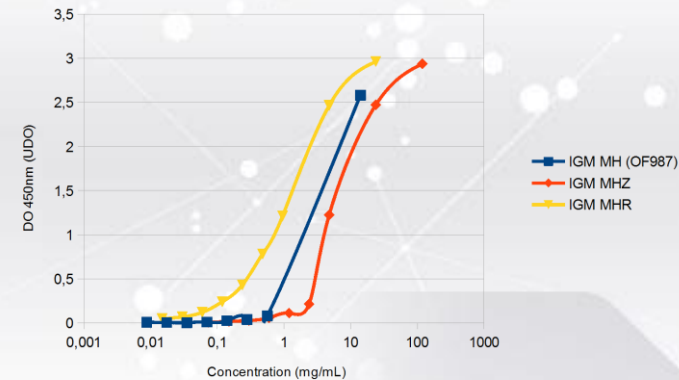


Western blot anti hIgM

1 MPM
2
3 MPM
4 EP-rIGM-MH289h
5 EP-rIGM-MH200h
6 EP-rIGM-MH263h
7 EP-rIGM-MH289h
8 EP-rIGM-MH209h
9 EP-rIGM-MH236h
10 EP-rIGM-MH255h
11 MPM
12 Production 23c
13 Témoin + (IGM 100ng)



SDS-PAGE



Test ELISA fonctionnalité de l'IgM

- ❖ Suivi de la quantité IgM par
 - BLI (Blitz : Pall forte bio)
 - ELISA (Cygnus)
 - 10 à 40 mg/L selon les IgMs

❖ Le challenge

- Grosse molécule (>960 kDa) : Difficile à purifier sur des supports de chromatographie standards
- Moins thermostables que les IgG : Tm 70°C
- Forte tendance à la dénaturation aux pH extrêmes
- Tendance à la précipitation à forte ou faible concentration ionique.

❖ Schéma standard de purification des IgM :

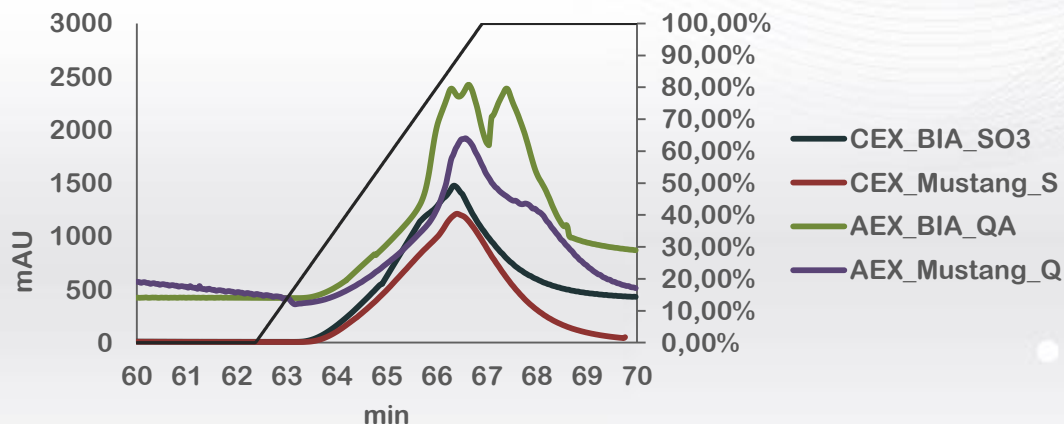
- Une capture sur colonne d'hydroxyapatite
- Suivie d'une combinaison de HIC et IEX.

❖ Les gels et supports « classiques » sont souvent limités en capacité de par la taille des IgM

- Les supports à « larges pores » comme les membranes de chromatographie, les monolithes semblent plus adaptés à la purification d'IgM

- ❖ 6 Supports chromatographiques testés en parallèle pour une phase de capture d'IgM :
 - La référence Hydroxyapatite
 - Une Résine d'affinité : Poros CaptureSelect IgM
 - 2 échangeurs d'ions sur membrane : Mustang S et Q
 - 2 échangeurs d'ions monolithiques BIA SO3 et QA

Colonne	Injecté	Pretraitement	Tampon A	Tampon B	Vol de colonne (mL)	Debit (CV/min)
Hydroxyapatite CHT type II	40 mL de surnageant de production (20mg/L)	+ 10 mM PO ₄	10 mM PO ₄ pH 7,2	500 mM PO ₄ pH 7,2	1	1
Poros Capture Select IgM		Aucun	PBS	0,1 M glycine pH 3	1	1
CEX Mustang S		Dilution en ligne 1/4 Tampon A	50 mM MES pH6	50 mM MES pH6, 1 M NaCl	0,34	10
CEX BIA SO3			50 mM MES pH6	50 mM MES pH6, 1 M NaCl	0,34	10
AEX Mustang Q			50 mM BisTris pH7	50 mM BisTris pH7, 1M NaCl	0,34	10
AEX BIA QA			50 mM BisTris pH7	50 mM BisTris pH7, 1M NaCl	0,34	10



Colonne	FT %	Elué %
Hydroxyapatite CHT type II	21%	75%
Poros Capture Select IgM	0%	40%
CEX Mustang S	11%	74%
CEX BIA SO3	4%	82%
AEX Mustang Q	18%	52%
AEX BIA QA	15%	62%

❖ Optimisations nécessaires :

- Les supports monolithique et membranaire d'échange de cations semblent prometteurs :
 - Les supports BIA apparaissent au premier abord plus résolutifs que les membranes.
 - Optimisation des gradients et des tampons (pH, conductimétrie)
- Optimisation des conditions d'élution de chromatographie d'affinité :
 - Améliorer le rendement d'élution tout en évitant la précipitation
- Optimisation des conditions de charge et d'élution de la chromatographie sur hydroxyapatite (Dilution en ligne ?).

- ❖ Le système CHO Xpress permet la production de rIgM en cellules CHO avec des rendements de 10 à 40 mg/L
- ❖ Les supports de capture de type monolithe et membrane semblent parfaitement adaptés à la capture d'IgM à partir de surnageant de production de CHO Xpress
- ❖ Perspectives
 - Caractérisation de la glycosylation et des isoformes des IgM exprimés
 - Optimisation des conditions de chromatographies sur membrane et sur monolithes.
 - Pour les phases de capture
 - Mais aussi en aval de l'hydroxyapatite.
 - Définition d'un schéma de purification générique pour les IgMs produits en CHO Xpress.

❖ Ingénierie de l'IgM

- « Reformatage » d'IgG en IgM ou la création de nouveaux IgM à partir de chaînes variables identifiées par ailleurs.
- Screening de variants de régions constantes

❖ Compte tenu des rendements de production obtenus à ce jour :



Production de molécules thérapeutiques pour des phases cliniques



Phases recherche précliniques

- Ingénierie d'IgM
- Screening de candidats
- Etudes précliniques chez l'animal.



Sourcing alternatif d'IgM humain

- S'affranchir des lots de sérum humain de patient infectés
- Standard des test IVD