UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

SUIVI EN LIGNE DE LA PRODUCTION DE PROTÉINES RECOMBINANTES EN BIORÉACTEUR PAR RÉSONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE

NATALIE CHAVANE

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES

(GÉNIE BIOMÉDICAL)

NOVEMBRE 2007

©Natalie Chavane, 2007.

Library and Archives Canada

Published Heritage Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et Archives Canada

Direction du Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-36903-6
Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-36903-6

NOTICE:
The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:
L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

SUIVI EN LIGNE DE LA PRODUCTION DE PROTÉINES RECOMBINANTES EN BIORÉACTEUR PAR RÉSONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE

présenté par : CHAVANE Natalie

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. GUENAT Olivier, Ph.D., président

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. JOLICOEUR Mario, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

Mme HOEMANN Caroline, Ph.D., membre et codirectrice de recherche

M. HENRY Olivier, Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord mon directeur de recherche, le professeur Grégory De Crescenzo, ainsi que mes co-directeurs, les professeurs Mario Jolicoeur et Caroline Hoemann, pour leur soutien, leur disponibilité et leurs idées pour aller toujours plus loin tout au long du projet. Grâce à l'opportunité qu'ils m'ont offerte, j'ai pu découvrir la recherche et le monde passionnant des bioprocédés et des biotechnologies.

Je remercie aussi le CRSNG pour avoir aidé au financement de mon projet de maîtrise.

Je remercie également Renaud Jacquemart, étudiant post-doc', qui m'a formée aux pratiques de laboratoire, m'a conseillée et aidée à maintes reprises, avec qui j'ai partagé de nombreuses heures au laboratoire mais qui surtout a été un véritable ami tout au long de cette maîtrise.

Merci aussi à tous les autres étudiants et associés de recherche du labo pour la sympathique ambiance de laboratoire dans laquelle j'ai pu travailler pendant cette dernière année et demie ainsi que pour leurs conseils techniques, leur partage d'idées et leur amitié.

Merci à ma Maman, à Dumè, à Noém' et à Cyril, pour m'avoir encouragée quand j'en avais besoin, et pour avoir été toujours disponibles en cas de baisse de moral que vous soyez proches ou à l'autre bout du monde !

Enfin, Merci à Ronan pour ses encouragements, son soutien, sa présence, sa patience, et surtout pour son amour.

RÉSUMÉ

Dans le secteur biopharmaceutique, l'intérêt n'a cessé de croître pour les protéines recombinantes. Ces dernières sont de première importance dans le domaine de la médecine pour le traitement de maladies incurables jusqu'alors, et représentent un marché de plus de 60 milliards de dollars US. Dans le cadre de l'optimisation ou du contrôle de bioprocédés, les recherches s'orientent vers les méthodes de suivi en ligne de la production en protéines. Les présents travaux décrivent une stratégie innovante et automatisée de quantification de protéines en ligne. Cette dernière consiste à coupler un biocapteur dont le principe de détection est basé sur la résonance plasmonique de surface (SPR) à un bioréacteur pour suivre l'évolution de la concentration en protéine d'intérêt en même temps que la culture se poursuit. Les travaux présentés ici font suite à ceux entrepris par Jacquemart et al. en 2006, où nous avons établi qu'un biocapteur SPR couplé à un bioréacteur permettait de suivre en ligne l'accumulation de protéines produites par transfection transitoire avec des cellules HEK 293. Les travaux ont porté sur le suivi de la production d'anticorps monoclonaux recombinants sécrétés par une lignée cellulaire stable d'hybridome, à titre de modèle, compte tenu du fait que les anticorps monoclonaux et leurs dérivés représentent un cinquième du marché actuel des biomolécules à usage thérapeutique. L'anticorps à l'étude est un anticorps anti-PSMA (Prostate-Specific Membrane Antigen), qui se lie spécifiquement aux résidus 490-500 du domaine extracellulaire de la PSMA. La PSMA étant une protéine qui est surexprimée

par les cellules tumorales de plusieurs types de cancer, notamment celui de la prostate, cet anticorps présente un grand potentiel pour le traitement ou le diagnostic de cancers.

L'objectif principal de ces travaux de maîtrise consiste en la validation du concept mais spécifiquement pour la quantification en ligne de la production d'anticorps bioactifs lors d'une culture en bioréacteur et ce, à l'aide d'un biocapteur dont le principe de détection est basé sur la technologie SPR. En premier lieu, la méthode de détection de l'anticorps d'intérêt a été développée en comparant les performances de deux partenaires biologiques de l'anticorps monoclonal, soit la protéine entière reconnue par l'anticorps et le peptide linéaire dérivé de cette protéine et utilisé lors de l'immunisation. La qualité du signal, la sensibilité et la durée d'utilisation du biocapteur SPR sont les trois critères qui ont été pris en compte. Dans un deuxième temps, une méthode de quantification à l'aide de ce biocapteur a été mise au point. Une méthode basée sur l'utilisation d'une courbe de calibration s'est avérée suffisamment performante. Troisièmement, des tests préliminaires de quantification hors ligne ont été effectués afin de valider notre approche. Une culture en mode cuvée en flacons de 500 mL munis de chicanes, réalisée en triplicata avec échantillonnage périodique, a permis d'établir la preuve de concept pour la quantification d'anticorps bioactifs par SPR. Suite à ces essais, une culture en bioréacteur de 3,5 L avec prélèvement continu et mesure automatisée en ligne de la concentration en anticorps produit a été réalisée. Pour les deux cultures (flacons et bioréacteur), les mesures SPR ont été validées par une méthode hors ligne traditionnelle (quantification après « Western Blotting ») avec un coefficient de détermination R^2 de 0,95 en flacons et 0,97 en bioréacteur entre les deux méthodes.

Nous avons ainsi démontré l'applicabilité et l'efficacité de la technologie SPR pour quantifier en ligne la quantité bioactive de protéine produite en bioréacteur, ouvrant de grandes perspectives dans l'optimisation des bioprocédés. Des futurs travaux consisteraient à quantifier à la fois la quantité bioactive et la quantité totale de la protéine d'intérêt produite afin d'avoir une information encore plus complète sur sa production.

ABSTRACT

In the biopharmaceutical industry, recombinant proteins are becoming increasingly important as indicated by their market share now representing more than 60 billion US dollars. Of interest, 20 % of the biopharmaceutical products in development are currently antibodies or antibody derivatives. For therapeutic purposes, large amounts of specific antibodies are required; this need is exacerbated if the disease to be treated is chronic. Methods that permit on-line monitoring of protein production could have a large and favorable impact upon large scale production of recombinant proteins including antibodies since they would permit to rapidly optimize and control bioreactor conditions. The present work describes an innovative and automated strategy for at-line quantification of soluble proteins secreted during bioreactor culture. Our strategy consisted in harnessing a biosensor whose detection principle is based on surface plasmon resonance (SPR) to a bioreactor in order to follow the accumulation of bioactive proteins of interest throughout the culture. We have already shown in previous work performed by our team that harnessing a SPR biosensor to a bioreactor allowed for at-line detection of protein production by transient transfection of HEK 293 cells. The same experimental setup was applied to monoclonal antibody quantification, when the latter is produced by a stable hybridoma cell line. This biological system is a pertinent case study since monoclonal antibodies and their derivatives represent 20 % of worldwide therapeutic biomolecule production. The monoclonal antibody produced is an anti-PSMA antibody (Prostate-Specific Membrane Antigen) that binds to residues 490-

500 of the extracellular domain of PSMA. Since PSMA is a protein that is overexpressed by tumor cells in various types of cancer, particularly in the case of prostate cancer, the studied antibody is of great interest for the diagnosis and the treatment of these cancers.

The main objective of this project is to quantify at-line the concentration of bioactive antibody secreted during a bioreactor culture, this being performed by means of an SPR biosensor. At first, a methodology was developed to permit specific detection of the antibody of interest while accumulating at the surface of the biosensor. This was performed by comparing antibody binding profiles of two related binding partners immobilized at the biosensor surface (i.e. the integral protein and the linear antigen used for immunization). Robustness of the antibody detection method by SPR was evaluated based on three criteria: signal quality, sensitivity of the SPR-based biosensor and the SPR biosensor chip lifetime. Secondly, a method allowing for the quantification of the antibody using these specifically designed biosensor surfaces was developed. The preferred method was the calibration method, requiring the use of purified antibody samples of known concentrations. Preliminary quantitative tests were performed off-line to validate our SPR methodology for antibody quantification. Batch cultures were performed in 500mL-baffled flasks in triplicate with periodic sampling. Analysis of cell-free supernatant demonstrated that SPR quantification of bioactive antibodies was indeed possible and accurate. Finally, a 3.5L-bioreactor culture was carried out with continuous sampling of the cell culture supernatant in order to perform automated at-line concentration measurements by the SPR-based biosensor. For both off-line and at-line

quantifications, SPR measurements were confirmed by a traditional off-line method for quantification (i.e. band quantification after Western blotting) with a determination coefficient R^2 of 0.95 in flasks and 0.97 in bioreactor.

Thus, we were able to demonstrate the applicability, the efficacy and limitations of our approach for at-line quantification of bioactive protein secreted in bioreactor. This is an important achievement in the development of process analytical technologies (PAT). Future work would consist in at-line quantification of both bioactive and total protein in order to obtain a complete quantification of protein production at-line.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS ..... **IV**
RÉSUMÉ ..... **V**
ABSTRACT ..... **VIII**
TABLE DES MATIÈRES ..... **XI**
LISTE DES TABLEAUX ..... **XIII**
LISTE DES FIGURES ..... **XIV**
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS ..... **XVI**
LISTE DES ANNEXES ..... **XVIII**
CHAPITRE 1. CONTEXTE ET REVUE DE LA LITTÉRATURE **1**
1.1. CONTEXTE 1
1.2. ORGANISATION DU MEMOIRE 2
1.3. REVUE DE LA LITTERATURE 3
1.3.1. Les applications des anticorps monoclonaux *3*
1.3.1.1. Traitement de cancers 3
1.3.1.2. Traitement du cancer de la prostate 5
1.3.1.3. Autres applications 6
1.3.2. Rôle et structure des anticorps *10*
1.3.3. La production d'anticorps monoclonaux *13*
1.3.3.1. La technologie des hybridomes 13
1.3.3.2. Autres modes de production d'anticorps monoclonaux 14
1.3.4. La Résonance Plasmonique de Surface (SPR) *16*
1.3.4.1. Principes physiques de la SPR 16
1.3.4.2. Le BIAcore 3000 18
1.3.4.3. Les applications de la SPR 23
1.3.4.4. Détermination des constantes cinétiques et thermodynamiques des interactions macromoléculaires à partir des données Biacore 24
1.3.4.5. Détermination de concentrations de protéines par SPR *27*
1.3.5. Les méthodes de suivi en ligne de la production de protéines en bioréacteur *30*
CHAPITRE 2. PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS **31**
2.1. PROBLEMATIQUE 31
2.2. HYPOTHESES 34
2.3. OBJECTIFS 34

CHAPITRE 3. AT-LINE QUANTIFICATION OF BIOACTIVE ANTIBODY CONCENTRATION IN BIOREACTOR BY SURFACE PLASMON RESONANCE **36**

3.1. ABSTRACT 36
3.2. KEYWORDS 37
3.3. INTRODUCTION 37
3.4. MATERIAL AND METHODS 42
3.4.1. Cell line and secreted antibody *42*
3.4.2. Cell culture *42*
3.4.3. Bioreactor connection to SPR biosensor for at-line measurements *44*
3.4.4. SPR measurements *46*
3.4.4.1. Sensor surface preparation 46
3.4.4.2. Biacore sample injections 47
3.4.5. Reaction rate correlation with protein concentration *48*
3.4.6. Western blotting and densitometry quantification *50*
3.5. RESULTS AND DISCUSSION 51
3.5.1. Effect of ligand on the performance of SPR measurement *51*
3.5.2. Robustness of the antibody quantification method *56*
3.5.3. Off-line validation of SPR measurements *59*
3.5.4. At-line measurement of bioactive mAb concentration along a bioreactor culture *61*
3.6. CONCLUSIONS 63
3.7. ACKNOWLEDGEMENTS 65
3.8. REFERENCES 65

CHAPITRE 4. DISCUSSION GÉNÉRALE **68**

CHAPITRE 5. CONCLUSION **72**

CHAPITRE 6. RECOMMANDATIONS **73**

RÉFÉRENCES **75**

ANNEXE 1. ..... **82**

LISTE DES TABLEAUX

Table 3.1. Comparison of mAb binding to PSMA and PS0215 surfaces 55

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Représentation schématique de la structure d'un anticorps. 12

Figure 1.2. Technique de production d'anticorps monoclonaux. 14

Figure 1.3. Principe de la technologie BIAcore. 18

Figure 1.4. Sensorgramme type. 20

Figure 3.1. Schematic representation of the experimental setup connecting the bioreactor to the biosensor for SPR at-line measurements. 45

Figure 3.2. Sensorgrams corresponding to ten injections of diluted filtered hybridoma culture medium over PS0215 (a), PSMA (c) and respective mock surfaces (b and d). The reference sample corresponded to filtered conditioned medium collected after 10 days of a 17G1.1 culture in a 500-mL baffled flask that had been inoculated at 400,000 cells/mL. Sample was automatically diluted 1/20 in running buffer prior to injection. 54

Figure 3.3. Design of the quantification method.
(a) Control-corrected sensorgrams corresponding to the injection of purified mAb samples at concentrations ranging from 3 to 200 nM (black solid line) and sensorgrams from Figure 3.2a (grey solid line). (b) Calibration curve obtained by extracting initial reaction rates from the sensorgrams shown in (a). (c) Antibody initial reaction rate variations when injecting spent medium at the same dilution over the PS0215 and control surfaces. Insert : Correlation coefficients related to the linear regression performed for initial reaction rate measurements of the various sensorgrams shown in (a). 57

Figure 3.4. Shake flask and bioreactor hybridoma cell culture monitoring.
(a,b) Cell density (▲) and viability (Δ) evaluated off-line by trypan blue exclusion method in flask cultures and bioreactor culture respectively. (c,d) (■) Off-line and at-line (+) quantification of bioactive antibody by SPR biosensing and off-line quantification by Western blotting followed by densitometry (◊) for flask cultures (c) and bioreactor culture (d). In panel (d), I and III areas correspond to periods of time during which in-line filter was functional, while II corresponds to period of time during which the in-line filter was damaged. 60

Figure 3.5. Western blot and densitometry off-line analysis of centrifuged samples manually taken during the flask cultures. Numbered squares correspond to areas that

were used to perform densitometry analysis. (a) Squares '1' to '7' correspond to samples harvested at 7, 22, 31, 47, 57, 71, 78 h respectively, square '8' is for background correction (b) Squares '1' to '8' correspond to samples harvested at 95, 101, 120, 145, 171, 191, 220, 247 h respectively, square '9' is for background correction. 61

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

CDR	Complementarity-Determining Regions
CHO	Chinese Hamster Ovary
EDC	*N*-ethyl-*N*-(3-diethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
FDA	Food and Drug Administration
GFP	Green Fluorescent Protein
HBS	Hepes Buffered Saline
HEK	Human Embryonic Kidney
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HRP	Horse Radish Peroxidase
Ig	Immunoglobulines
NHS	*N*-hydroxysuccinimide
PAT	Process Analytical Technologies
PDEA	2-(2-pyridinyldithio)ethaneamine hydrochloride
PS0215	Peptide dont la structure primaire est CGKSLYESWTKK (dérivé de PSMA)
PSMA	Prostate-Specific Membrane Antigen
PVDF	PolyVinylidene DiFluoride
RU	Unité de Résonance ou Resonance Units
SPR	Surface Plasmon Resonance ou Résonance Plasmonique de Surface

SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
TBS	Tris-Buffered Saline
θ_{SPR}	Angle SPR

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. At-line monitoring of bioreactor protein production by surface plasmon resonance. 82

CHAPITRE 1. CONTEXTE ET REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1. Contexte

Plus de 670 000 hommes sont diagnostiqués positivement pour le cancer de la prostate chaque année dans le monde, ce qui représente un cancer sur neuf. Le cancer de la prostate est actuellement le deuxième cancer le plus commun chez les hommes après le cancer du poumon (Ferlay et al., 2007). Dans le but de diagnostiquer et de traiter ce cancer, les recherches portent aujourd'hui sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux qui se lient à la PSMA (Prostate-Specific Membrane Antigen), protéine surexprimée à la surface de cellules tumorales du cancer de la prostate (Slovin, 2005).

L'immunothérapie, soit l'utilisation d'anticorps à des fins thérapeutiques, requiert des quantités relativement élevées d'anticorps (de l'ordre de plusieurs mg par kg), d'autant plus si la maladie à traiter est chronique. En conséquence, il n'est pas surprenant que la demande en anticorps monoclonaux soit en constante augmentation. Il est donc devenu nécessaire de produire des anticorps monoclonaux à grande échelle. De plus pour une application thérapeutique, la production doit également être reproductible d'où la nécessité d'avoir des outils de suivi en ligne afin de contrôler et d'améliorer de manière continue les procédés de production d'anticorps monoclonaux. La technologie de résonance plasmonique de surface (SPR) présente l'avantage d'étudier les interactions d'une protéine avec son ligand naturel et est déjà utilisée communément pour la caractérisation d'anticorps. De plus, la possibilité de tester le surnageant de

culture sans traitement préalable ainsi que la possibilité d'automatiser les mesures font de cette technologie un candidat idéal pour le suivi en ligne de la production d'anticorps monoclonaux, et plus généralement de protéines recombinantes.

1.2. Organisation du mémoire

Le chapitre 1 présente la revue de littérature des principaux thèmes abordés dans ce mémoire. Le chapitre 2 aborde le sujet du mémoire, ainsi que la problématique, les hypothèses et les objectifs du projet. Le chapitre 3 correspond à un article intégré dans le corps du texte. Cet article a été soumis au journal *Biosensors and Bioelectronics* le 1er novembre 2007. Ce chapitre constitue donc le corps du mémoire, à savoir l'article soumis englobant tous les travaux de recherche effectués au cours de cette maîtrise, ainsi que la suite de la revue de la littérature présentée au chapitre 1. Toutes les étapes nécessaires pour mener à bien le projet sont abordées au chapitre 3, des expériences préliminaires de design du biocapteur SPR, de la méthode de quantification, aux expériences de couplage SPR-bioréacteur, et les résultats y sont également discutés. Le chapitre 4 revient sur les principaux éléments de ce projet de maîtrise dans une discussion générale. Enfin, le chapitre 5 présente les conclusions relatives à ce projet de recherche et le chapitre 6 les recommandations pour de futurs travaux et améliorations.

1.3. Revue de la littérature

1.3.1. Les applications des anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux, ou leurs dérivés, constituent une part importante du marché des produits biopharmaceutiques. Depuis leur première production en 1975, le marché n'a cessé de croître et aujourd'hui on compte plusieurs centaines d'anticorps monoclonaux ou dérivés, qui sont soit déjà utilisés, soit en études cliniques, principalement à des fins thérapeutiques ou diagnostiques (Roque et al., 2004). Le taux de croissance annuel moyen du marché des anticorps monoclonaux est estimé à 20,9 % ce qui représenterait un marché de plus de 16 milliards de dollars US en 2008 (Pavlou & Belsey, 2005).

1.3.1.1. Traitement de cancers (Berger et al., 2002; Reichert & Valge-Archer, 2007)

Les anticorps monoclonaux présentent un grand potentiel pour le traitement du cancer car ils peuvent être conçus pour cibler de manière sélective les cellules tumorales. Une fois qu'ils se sont liées à ces cellules, différents types de réponses immunitaires sont déclenchées sans pour autant nuire aux cellules saines voisines des cellules tumorales. Cela est possible car l'anticorps sélectionné se lie de manière préférentielle aux cellules cancéreuses, soit parce que les cellules cancéreuses présentent un bien plus grand nombre d'antigènes à leur surface que les cellules saines (surexpression), soit tout simplement parce que l'antigène avec lequel l'anticorps se lie est présent uniquement à la surface des cellules cancéreuses.

Lorsque la cible de l'anticorps est un antigène à la surface des cellules, la réponse devrait ultimement conduire à la destruction de la cellule cible. Plusieurs modes d'action sont possibles pour les anticorps une fois qu'ils se sont liés à leur cible. Tout d'abord, la destruction de la cible peut être directe, en utilisant un anticorps conjugué à une toxine ou à un radio-isotope. Concernant les immunotoxines, c'est-a-dire un anticorps ou un facteur de croissance couplé à une toxine, malgré des résultats prometteurs, en 2006, une seule immunotoxine était approuvée par la Food and Drug Administration (FDA), l'interleukine-2 couplé avec la toxine de la diphtérie, pour les cas de lymphome T cutané (Kreitman, 2006). De récents travaux (Moffett et al., in Press) ont démontré le potentiel de l'anticorps que nous avons utilisé pour cette étude (anticorps anti-PSMA) à être utilisé comme immunotoxine lors d'essais cellulaires. De nombreuses autres immunotoxines sont à l'étude en phase clinique, mais les problèmes d'immunogénicité ou de toxicité compromettent pour le moment leur utilisation (Kreitman, 2006). Deux anticorps monoclonaux conjugués avec un radio-isotope, ^{90}Y-ibritumomab tiuxetan et ^{131}I-tositumomab, dont l'anticorps est dirigé contre CD20, un antigène présent abondamment à la surface d'un grand nombre de lymphocytes B, ont été approuvés par la FDA pour le traitement des cancers de type non Hodgkiniens (Sharkey & Goldenberg, 2005). Le cas échéant, le mode d'action peut être indirect. L'anticorps peut tout d'abord activer d'autres composants du système immunitaire. Par exemple, après s'être liés à leur cible, les anticorps monoclonaux peuvent recruter les cellules effectrices comme les lymphocytes tueurs, les macrophages ou les neutrophiles. Plusieurs anticorps de ce type sont déjà approuvés par la FDA comme le rituximab ou l'alemtuzumab (Trikha et al.,

2002). L'anticorps peut aussi bloquer l'action de récepteurs ou de facteurs de croissance critiques, de façon à empêcher la prolifération des cellules cibles et la propagation de la maladie. Par exemple, l'anticorps monoclonal cetuximab se lie à EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), protéine transmembranaire surexprimée par les cellules épithéliales de plusieurs types de cancers, empêchant son ligand naturel de s'y attacher et d'activer les voies de signalisation qui lui sont propres. Cette inhibition conduit à l'apoptose de la cellule et stoppe donc la croissance de la tumeur (Harris, 2004).

1.3.1.2. Traitement du cancer de la prostate

La PSMA, Prostate-Specific Membrane Antigen, est une protéine présente à la surface des cellules tumorales de la prostate (Booy et al., 2006; Chang, 2004a, 2004b). C'est une protéine membranaire de type II (Chang, 2004a), c'est-à-dire qu'une seule chaîne peptidique traverse la membrane cellulaire et que son extrémité N-terminale est dans le cytoplasme tandis que son extrémité C-terminale est extracellulaire (Cai et al., 2003).

Il a été montré que les cellules tumorales de la prostate surexpriment la PSMA, et que plus la tumeur est agressive, plus la surexpression de la PSMA est importante (Booy et al., 2006). Les anticorps anti-PSMA sont déjà utilisés à des fins de diagnostic du cancer de la prostate et sont en études cliniques pour une utilisation à des fins thérapeutiques (Chang, 2004a). Par exemple, un anticorps monoclonal pour le domaine extracellulaire de PSMA, huJ591, qui est marqué avec divers radionucléides, est en étude préclinique et en essais cliniques phase I (Booy et al., 2006). De plus, de nouveaux

anticorps anti-PSMA ont récemment été générés en procédant à une immunisation avec l'épitope correspondant aux résidus extracellulaires 490 à 500 de la PSMA. Ce site antigénique a été choisi selon plusieurs critères : hydrophilicité, accessibilité, flexibilité structurale et l'absence de sites de glycosylation. Les résultats préliminaires ont démontré qu'en plus de se lier à la surface de cellules tumorales du cancer de la prostate, ces anticorps sont internalisés, tout comme huJ591, ce qui confirme leur potentiel à agir comme immunotoxine (Moffett et al., in Press).

Cependant, l'usage d'un anticorps anti-PSMA pourrait ne pas se limiter au cancer de la prostate. En effet, la PSMA semble aussi être exprimée dans d'autres types de cancers, plus spécifiquement dans la néo-vascularisation associée à ces cancers (Chang, 2004b), c'est-a-dire à la surface des cellules endothéliales vasculaires apparues avec la tumeur (Booy et al., 2006). Les cas pour lesquels la surexpression de PSMA a été observée dans les nouveaux tissus vasculaires sont les cancers du rein, de la vessie, du colon et du sein (Chang, 2004b).

1.3.1.3. Autres applications

Le champ d'application des anticorps monoclonaux est très vaste. Dans les paragraphes suivants, nous nous attarderons principalement à leurs rôles dans le traitement des infections respiratoires virales, des rejets de greffe, et de la septicémie après avoir discuté leurs applications pour le traitement de cancers. Cependant, d'autres maladies, comme l'asthme, l'hépatite ou encore l'arthrite rhumatoïde, sont traitées ou en voie d'être traitées en combinant les anticorps monoclonaux aux traitements existants.

De plus, les anticorps monoclonaux sont aussi un outil de diagnostic très précis, particulièrement dans le cas de certaines tumeurs (Berger et al., 2002).

1.3.1.3.1. Traitement des infections virales

Les anticorps jouent également un rôle important dans le traitement des infections virales dans les cas où un vaccin n'est pas disponible ou n'est pas suffisamment efficace. Les anticorps peuvent agir de plusieurs manières. Ils peuvent reconnaître les cellules infectées en se liant aux protéines virales présentes à la surface de ces cellules, enclenchant ainsi une réponse immunitaire, ou bloquant la libération d'agents infectieux de manière locale (Berger et al., 2002; Dubois et al., 2005). Par exemple, il a été démontré que deux anticorps monoclonaux, 19C2 et 1H831, peuvent se lier à deux protéines situées sur l'enveloppe du virus de la vaccine lorsqu'il est à la surface d'une cellule infectée. Les anticorps sus-cités empêchent ainsi la cellule de relarguer le virus et bloquent ainsi sa transmission (Vanderplasschen et al., 1997). Les anticorps peuvent aussi agir de manière intracellulaire afin d'empêcher la réplication du virus. Dans le cas du virus Sindbis, plusieurs anticorps monoclonaux qui interagissent avec les protéines E1 et E2, deux glycoprotéines transmembranaires à la surface des cellules infectées, ont prouvé leur efficacité. Ces deux protéines interviennent normalement de manière intracellulaire par le biais de leur extrémité cytoplasmique dans le processus de relargage des virions matures dans le milieu extracellulaire ; elles sont donc nécessaires à la propagation du virus (Griffin et al., 1997). Il a été démontré que les

interactions de ces anticorps monoclonaux avec les protéines E1 et E2 bloquent ainsi l'action biologique de ces dernières.

1.3.1.3.2. Prévention des rejets de greffe

L'utilisation d'anticorps monoclonaux dans le cas de greffe représente une alternative intéressante à la thérapie conventionnelle impliquant l'utilisation des corticostéroïdes comme immunosuppresseurs, car des effets secondaires importants reliés à l'emploi de ceux-ci sont observés tels que des infections opportunistes, l'apparition de tumeurs, la prolifération importante de lymphocytes, voire même une toxicité importante (Berger et al., 2002; Luk & Wong, 2006).

Les anticorps monoclonaux peuvent être utilisés à plusieurs niveaux en cas de rejet. Tout d'abord, il est possible d'agir en amont, en empêchant l'activation des lymphocytes T qui ont pour fonction de détruire ce qu'ils reconnaissent comme étranger à l'hôte. L'expression des récepteurs à l'interleukine-2 est une étape cruciale dans l'activation des lymphocytes T. Daclizumab, un anticorps qui cible l'interleukine-2, pourrait inhiber l'activation des lymphocytes T. Une étude clinique a montré une amélioration dans le cas de greffes de rein (Nashan et al., 1999). Ils peuvent aussi agir une fois les lymphocytes activés en éliminant spécifiquement la population de lymphocytes T activés. Pour ce faire, l'utilisation d'un anticorps qui se lie aux récepteurs à l'interleukine-2, présents en grand nombre à la surface des lymphocytes T afin d'empêcher la liaison subséquente de l'interleukine-2 et donc la prolifération cellulaire, est envisageable. À cet effet, plusieurs études cliniques avec l'anticorps basiliximab ont

donné des résultats prometteurs pour prévenir les rejets de greffe (Adu et al., 2003; Marino et al., 2004). Enfin, une autre stratégie est d'agir plus en amont en induisant une tolérance spécifique au donneur et ainsi rendre la réponse de rejet à la greffe plus faible et donc plus facile à éliminer. L'anticorps alemtuzumab, se liant aux lymphocytes T, B et aux monocytes, a été testé comme traitement empêchant la prolifération des lymphocytes. Son administration lors de la greffe a permis de réduire de façon significative la quantité d'immunosuppresseurs administrés aux patients après l'opération tout en améliorant la prise de la greffe (Tzakis et al., 2003).

1.3.1.3.3. Traitement de la septicémie

Les cas d'infections, particulièrement dans les centres de soins, sont de plus en plus difficiles à traiter dû à la nouvelle résistance de certaines souches de bactéries ou de champignons aux antibiotiques. La plupart des stratégies récentes pour lutter contre ces infections met en œuvre des anticorps monoclonaux ou des fragments d'anticorps monoclonaux qui sont dirigés contre les épitopes à la surface des cellules hôtes pour prévenir l'attachement des bactéries (Berger et al., 2002; Patti, 2004). Une étude clinique en phase II a établi que l'anticorps monoclonal tefibazumab, se liant spécifiquement à C1fA, une adhésine qui se trouve à la surface de la majorité des souches de *Staphylococcus aureus*, permet de stopper la progression de septicémies reliées à *S. aureus* (Weems et al., 2006).

1.3.2. Rôle et structure des anticorps

Les anticorps sont des protéines globulaires spécialisées intervenant dans les processus de défense immunitaire, et constituent la classe des immunoglobulines (Ig). Les anticorps ont deux fonctions distinctes : la première est de se lier spécifiquement à des molécules d'origine pathogène qui ont provoqué une réaction immunitaire, par le biais de leurs antigènes, et la deuxième est de recruter d'autres cellules et molécules pour détruire le pathogène une fois que l'anticorps s'y est lié (Janeway et al., 2001; Roque et al., 2004).

Les anticorps sont naturellement synthétisés par les lymphocytes B, cellules du système immunitaire. Les anticorps présentent une diversité phénotypique très importante, ce qui leur confère à la fois une grande spécificité et une grande variété. Ceci est rendu possible d'un point de vue structural, par la présence de petites régions hypervariables dont les gènes codants subissent des recombinaisons aléatoires complexes (Berger et al., 2002).

Il existe cinq groupes d'immunoglobulines (Ig) : les IgG, les IgM, les IgA, les IgE et les IgD, qui diffèrent par la composition en acides aminés de leurs chaînes lourdes (Figure 1.1) et qui ont des fonctions biologiques différentes (Janeway et al., 2001; Spiegelberg, 1989; Whitton et al., 2004). Les IgG constituent la classe la plus abondante et elle se divise en quatre sous-classes, dénommées IgG1 à IgG4. Les principales fonctions de cette classe sont la neutralisation, l'activation du système complémentaire et l'opsonisation, soit le marquage d'un pathogène pour en faciliter la phagocytose

(Spiegelberg, 1989; Whitton et al., 2004). Les IgM ont une structure similaire aux IgG, mais leurs chaînes lourdes sont plus longues et elles sont sécrétées sous forme pentamérique, elles interviennent principalement dans le système complémentaire (Boes, 2000; Spiegelberg, 1989; Whitton et al., 2004). Les IgA ont une structure similaire aux IgG mais se retrouvent sous forme dimérisée, cette classe se divise en deux sous-classes. Elles se trouvent en quantité importante dans les sécrétions et fluides corporels (larmes, salive, lait, fluide gastrique, muqueuses) et constituent une barrière immunitaire importante au niveau des muqueuses (Kerr, 1990; Spiegelberg, 1989; Whitton et al., 2004). Les IgE ont également une structure identique à celles des IgG, mais avec une chaîne lourde plus longue ; on les retrouve en quantité abondante à la surface des mastocytes. Elles sont responsables des réactions allergiques, mais jouent également un rôle important dans la défense contre les parasites (Perlmann et al., 1999; Spiegelberg, 1989; Whitton et al., 2004). Les IgD ont une structure identique aux IgG ; il subsiste encore des doutes quant à leur fonction, cependant elles sont souvent décrites comme jouant le rôle de récepteurs à la surface des lymphocytes B (Leslie & Martin, 1978; Perlmann et al., 1999; Spiegelberg, 1989; Whitton et al., 2004).

Les IgG, apparentés structurellement à un « Y », sont composés de chaînes peptidiques appelées chaînes lourdes et légères, dont les extrémités variables d'un anticorps à un autre, permettent leurs interactions avec un antigène spécifique. Chaque immunoglobuline est constituée de deux chaînes lourdes de 50 kDa et de deux chaînes légères de 25 kDa, liées par des ponts disulfures (Figure 1.1) (Berger et al., 2002). Chacune des quatre chaînes peptidiques d'un anticorps contient une partie

constante (à son extrémité C-terminale) et une partie variable (à son extrémité N-terminale). Au sein de cette dernière se trouvent trois boucles hypervariables, appelées les domaines CDR (Complementarity-Determining Regions). C'est la combinaison des CDR d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère qui confère sa spécificité et son affinité à l'anticorps (Berger et al., 2002; Roque et al., 2004). La partie constante, quant à elle, permet à l'anticorps de se lier aux cellules effectrices du système immunitaire comme les lymphocytes B et T (Berger et al., 2002).

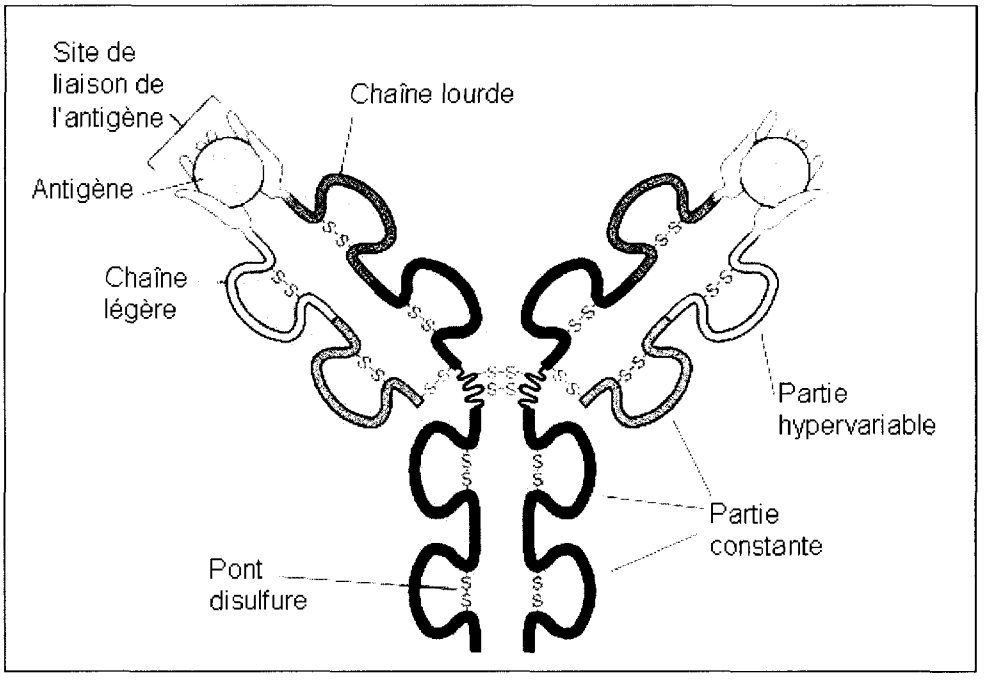


Figure 1.1. Représentation schématique de la structure d'un anticorps. Modifiée à partir de la Figure 4-32 de Essential Cell Biology, Second Edition, publiée par Garland Science en 2004; B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter.

1.3.3. La production d'anticorps monoclonaux

1.3.3.1. La technologie des hybridomes

Pour le bon fonctionnement du système immunitaire, les lymphocytes B sécrètent une multitude d'anticorps différents à la fois, rendant très difficile l'isolement d'un seul type d'anticorps. De ce fait, bien que produits naturellement par le système immunitaire, le besoin d'anticorps avec une spécificité unique a encouragé le développement de nouvelles technologies pour la production à grand échelle d'anticorps à usage biopharmaceutique (Roque et al., 2004).

Une réponse à ce problème est la production d'anticorps monoclonaux par la technologie des hybridomes (Berger et al., 2002). Les anticorps monoclonaux sont des anticorps qui sont produits par un seul clone de lymphocytes B et qui présentent donc tous la même structure primaire (séquence) et donc la même spécificité pour l'antigène lorsque correctement repliés. La technologie des hybridomes, résumée dans la figure 1.2, consiste à fusionner des lymphocytes B, issus de la rate d'un animal préalablement immunisé avec l'antigène d'intérêt, à des myélomes, cellules tumorales qui ne sécrètent normalement aucun anticorps. Les lymphocytes B donnent aux hybridomes la capacité de produire l'anticorps souhaité, tandis que les myélomes leur confèrent la capacité de se diviser indéfiniment.en théorie et de sécréter l'anticorps d'intérêt de manière constitutive. Après la fusion, les cellules hybrides sont sélectionnées, clonées en repartant des cultures à partir d'une cellule unique, et ensuite criblées pour la production de l'anticorps d'intérêt (Berger et al., 2002; Janeway et al., 2001).

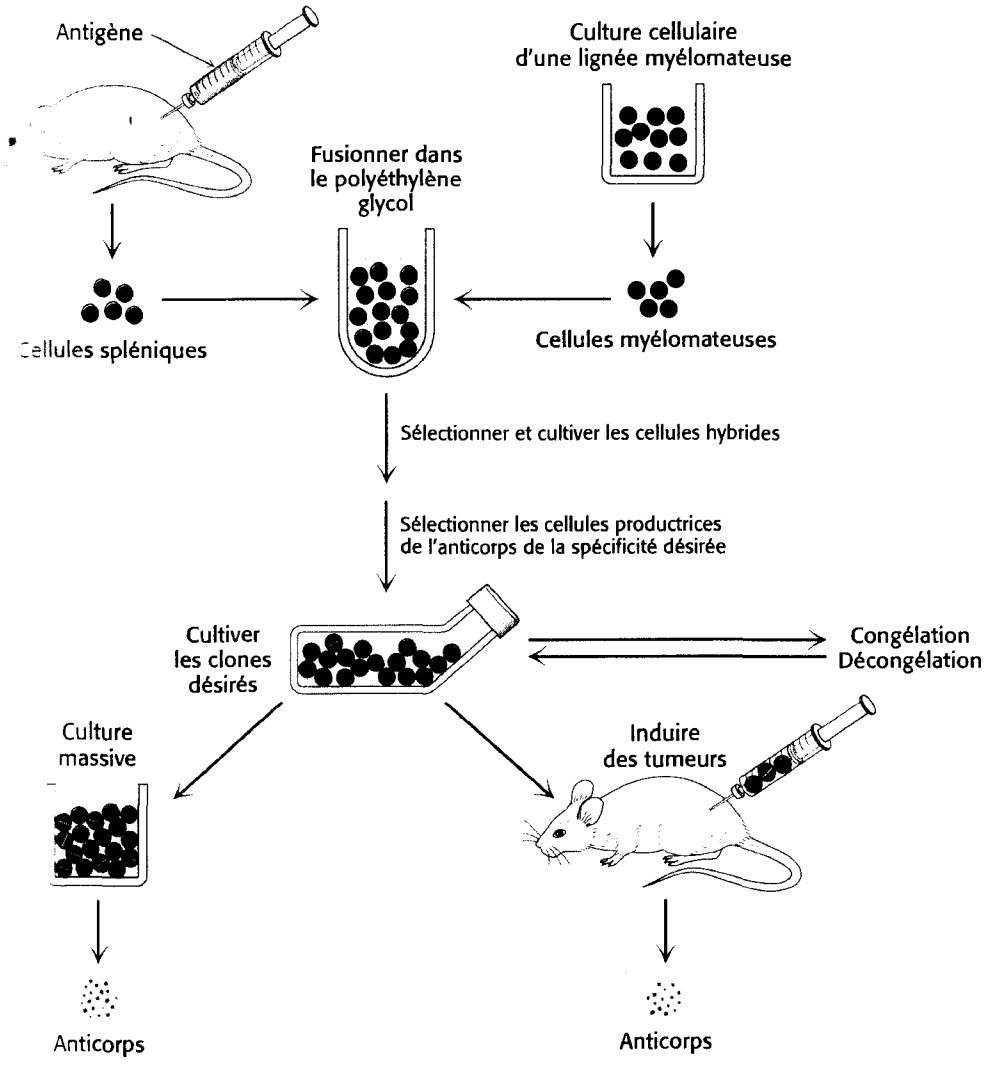


Figure 1.2. Technique de production d'anticorps monoclonaux. Figure 4.33 de Biochimie, Cinquième édition, publié par Médecine-Sciences Flammarion en 2003, L. Stryer, J. Berg, J. Tymoczko.

1.3.3.2. Autres modes de production d'anticorps monoclonaux

En plus de la technologie des hybridomes, les anticorps monoclonaux sont également produits selon des méthodes générales de production de protéines recombinantes. La majorité des anticorps monoclonaux, s'ils ne sont pas produits par

des hybridomes, sont tout de même produits dans des cellules de mammifères pour satisfaire aux caractéristiques souhaitées de qualité de produit, notamment au niveau de la glycosylation (Birch & Racher, 2006). Les principales lignées utilisées sont les cellules 'Chinese Hamster Ovary' (CHO) et les lignées de myélomes murin (NS0 ou Sp2/Ag-14) (Birch & Racher, 2006). Les anticorps sont produits par transfection stable, ou transitoire, car cette dernière méthode est moins coûteuse, plus facile et permet de procéder rapidement à des études précliniques ou cliniques en attendant d'obtenir une lignée stable, ce qui peut parfois être assez long et coûteux (Derouazi et al., 2004).

Une autre alternative est de produire les anticorps monoclonaux dans des cellules de plantes qui ont l'avantage d'être nettement moins coûteuses à produire, plus faciles à cultiver à grande échelle et d'éviter la présence de contaminants pathogènes d'origine animal dans le produit final (Ko & Koprowski, 2005). Les cellules de plantes sont aussi capables de glycosyler les protéines recombinantes, mais les patrons de glycosylations observés diffèrent de ceux des cellules de mammifères (Andersen & Reilly, 2004). Pour remédier à ce problème, Bakker et al. (Bakker et al., 2001) ont co-produit un anticorps avec l'enzyme humaine β1,4-galactosyltransferase et ont pu obtenir un profil de galactosylation similaire à celui des anticorps produits dans des systèmes d'expression de mammifères.

Enfin, les anticorps monoclonaux ont aussi été produits dans des levures ou des bactéries, car les titres atteints sont plus élevés et ces cellules sont plus faciles à cultiver que les cellules de mammifères, mais ce sont plus souvent des fragments que l'anticorps entier auxquels ces stratégies de production sont appliquées (Andersen & Reilly, 2004).

Il a tout de même été possible de produire un anticorps entier mais aglycosylé dans *Escherichia coli* (Simmons et al., 2002). La production d'anticorps dans *Aspergillus niger* a aussi été rapportée mais les anticorps obtenus ont un profil de glycosylation hétérogène et très différent de celui de l'homme (Birch & Racher, 2006).

1.3.4. La Résonance Plasmonique de Surface (SPR)

1.3.4.1. Principes physiques de la SPR

Lorsqu'un rayon de lumière passe d'un matériau de fort indice de réfraction (comme du verre par exemple) à un matériau de faible indice de réfraction (comme de l'eau par exemple), une certaine quantité de lumière est réfléchie à l'interface et l'autre partie est réfractée à travers la surface. Dans le cas où l'angle d'incidence θ, c'est-à-dire l'angle avec lequel la lumière arrive à l'interface, est plus grand que l'angle critique (θ_{crit}), la lumière est alors complètement réfléchie (van der Merwe, 2001). En revanche, si la surface de verre est recouverte d'un fin film d'un métal noble comme l'or, cette réflexion n'est pas totale et une partie de l'onde incidente sert à la propagation d'une onde évanescente perpendiculairement à la surface dans le film de métal (Ben Khelifa, 2000). Il existe alors un angle plus important que l'angle critique pour lequel la perte de lumière est maximale et pour lequel l'intensité de la lumière réfléchie est minimale. Cet angle est appelé l'angle de résonance plasmonique de surface (θ_{SPR}). Il est la conséquence de l'oscillation d'électrons mobiles (soit d'un « plasma »), à la surface du film métallique. Ces vagues de plasma oscillantes sont appelées plasmons de surface. Quand la longueur d'onde de la lumière incidente (polarisée et monochromatique) est

égale à la longueur d'onde des plasmons de surface, les électrons résonnent, d'où le terme de Résonance Plasmonique de Surface (van der Merwe, 2001). L'excitation des plasmons de surface par la lumière incidente induit une perte d'énergie et de ce fait, une diminution de l'intensité de la lumière réfléchie. C'est parce que l'amplitude de l'onde incidente dans le plan du film métallique dépend de l'angle avec lequel elle atteint l'interface que l'angle θ_{SPR} est observé. Le champ électromagnétique évanescent associé aux plasmons de surface peut pénétrer du film métallique dans le milieu sur une courte distance (de quelques centaines de nm). À cause de cela, la fréquence résonante de cette onde de surface plasmonique, et donc θ_{SPR} également, dépendent de l'indice de réfraction du milieu. Ainsi, si la surface est immergée en solution aqueuse et que des protéines s'y lient, l'indice de réfraction au voisinage de la surface varie. Cette variation peut donc être associée à une variation de l'angle θ_{SPR}, que l'on peut mesurer (Ben Khelifa, 2000; Szabo et al., 1995; van der Merwe, 2001). Il est à noter qu'en plus de l'indice de réfraction, un autre paramètre, la température, modifie θ_{SPR}. Aussi les instruments basés sur la SPR doivent-ils être capables de réguler la température de manière très précise afin de corréler une variation de θ_{SPR} à une variation de la quantité de protéines à la surface du biocapteur.

1.3.4.2. Le BIAcore 3000

1.3.4.2.1. Principe de détection

Dans le Biacore 3000, la chambre de mesure est constituée par une cellule micro-fluidique dont l'une des parois correspond à la surface d'interaction du biocapteur. Celle-ci est constituée d'une couche de verre, d'un fin film d'or (environ 50 nm) (Jason-Moller et al., 2006) et d'une couche de dextrane carboxyméthylé (environ 100 nm) (Pharmacia Biosensor AB, 1991). À l'arrière de cette cellule se trouvent une source de lumière polarisée monochromatique ainsi qu'une barrette de diode qui permet de mesurer les variations de l'angle θ_{SPR} (Figure 1.3) (Szabo et al., 1995).

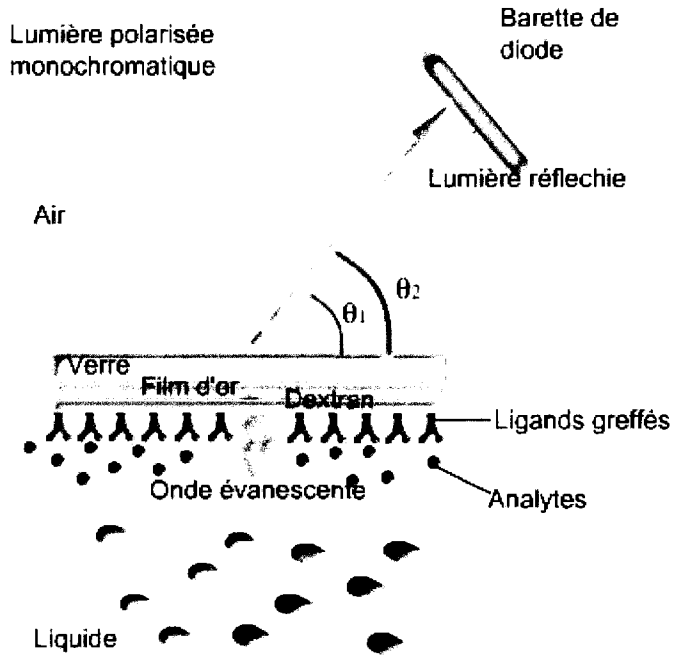


Figure 1.3. Principe de la technologie BIAcore. Tiré de http://www.med.univ-angers.fr/discipline/bio_cel/IUP3/cours%20biacore%20iup3.ppt

1.3.4.2.2. Le sensorgramme

Dans cette cellule micro-fluidique, d'un volume de quelques microlitres, une solution aqueuse, appelée tampon de circulation (ou « running buffer »), assure une circulation continue de liquide. Afin de mesurer une interaction, une molécule, appelée le ligand, doit être immobilisée au préalable à la surface de la couche de dextrane. Le ligand est une molécule à laquelle l'analyte (la molécule d'intérêt injectée sous forme soluble), va se lier de manière spécifique (Ben Khelifa, 2000). Les couples antigène/anticorps en constituent un bon exemple. Traditionnellement, le ligand (par exemple l'antigène) est immobilisé de manière covalente sur la matrice tridimensionnelle de dextrane (Szabo et al., 1995). Dans le cas des protéines et des peptides, plusieurs approches chimiques existent pour ce faire. Les deux principalement utilisées sont le couplage par la fonction amine (utlisant la présence de lysine dans la molécule de ligand ainsi que le groupement amine terminal des peptides ou protéines) et le couplage thiol (qui nécessite la présence de cystéine dans la molécule de ligand) (Ben Khelifa, 2000). Après couplage covalent, l'analyte (ici l'anticorps), également en solution aqueuse, est injecté dans la cellule micro-fluidique de façon continue de manière à maintenir une concentration constante et uniforme en analyte dans le liquide circulant au dessus de la surface du biocapteur (Torreri et al., 2005). Comme l'analyte se lie au ligand, l'accumulation de masse à la surface augmente, entraînant une augmentation de l'indice de réfraction et donc une variation de l'angle θ_{SPR}. Ces variations sont mesurées en temps réel (Ben Khelifa, 2000; Boozer et al., 2006; R. Karlsson, 2004; Muller-Renaud et al., 2005; Szabo et al., 1995), le

résultat étant présenté sous forme de graphiques appelés sensorgrammes, représentant les « unités de résonance » (RU) en fonction du temps. Il existe une relation linéaire entre l'accumulation de masse à la surface du biocapteur et les unités de résonance : 1 RU correspond à 1 pg de protéine /mm^2 (Alfthan, 1998; Besenicar et al., 2006) et à une variation de 0,0001° de l'angle θ_{SPR} (Jason-Moller et al., 2006).

La Figure 1.4 présente l'allure typique d'un sensorgramme lors d'une analyse SPR au BIAcore.

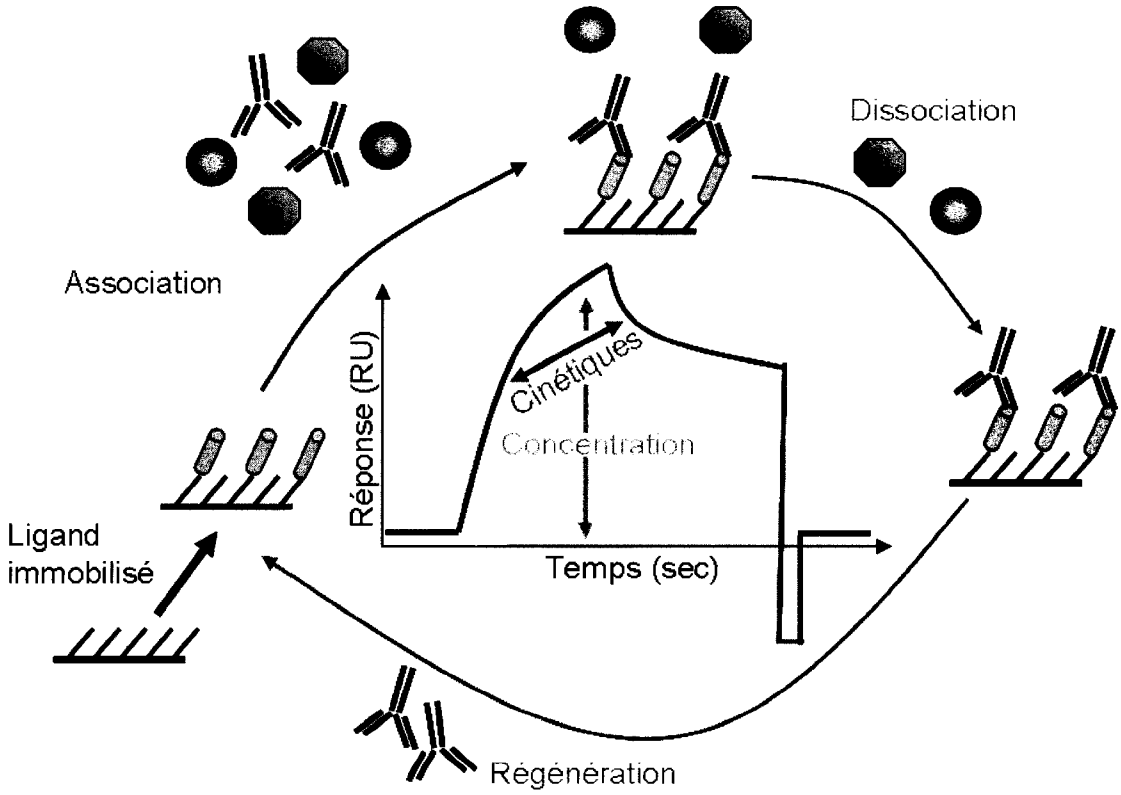


Figure 1.4. Sensorgramme type.

La phase d'association correspond globalement à la formation de complexes analyte/ligand à la surface biocapteur, ce qui a pour résultat un accroissement du signal SPR. Cependant, dans la plupart des cas, ce que l'on appelle la phase d'association est le résultat de la combinaison de plusieurs mécanismes complexes : transfert de masse (ou diffusion), dissociation suivie de ré-association de l'analyte (« rebinding ») ou encore gêne stérique (O'Connor-McCourt et al., 1998). Afin de minimiser, voire d'éliminer, la contribution de ces effets, le design expérimental doit être optimisé (voir 1.3.4.2.3.) (Myszka, 1997). La phase de dissociation correspond à la séparation des complexes analyte/ligand ce qui entraîne une diminution du signal. La phase de régénération, qui correspond à une injection d'une solution dont le pH ou le contenu en sel ou en détergent est différent du tampon, se doit de favoriser la dissociation de tous les complexes analyte/ligand persistant après la phase de dissociation, sans toutefois altérer la bioactivité du ligand afin de réutiliser la cellule pour des mesures ultérieures, en ne conservant que le ligand à sa surface.

1.3.4.2.3. Le double référençage

Un sensorgramme obtenu après l'injection d'un échantillon sur la surface de mesure présente quelques artefacts qu'il est possible de corriger par un double référençage afin d'améliorer la qualité des données (Myszka, 1999). Ces artefacts sont notamment dus aux changements d'indices de réfraction des tampons, aux effets de matrice, aux interactions non-spécifiques, au bruit lié à l'injection ou encore à la dérive de la ligne de base du signal.

Le double référençage se réalise en deux temps. Tout d'abord, cela consiste à utiliser une surface de référence en parallèle à la surface de mesure utilisée. La surface de référence est traitée de la même manière que la surface de mesure lors de l'immobilisation hormis le fait que la solution contenant le ligand ne sera pas injectée. Les groupements carboxyliques de cette surface sont donc activés, puis directement désactivés en utilisant la même approche chimique que sur la surface où le ligand a été couplé de façon covalente. Cela garantit un environnement similaire pour les deux surfaces. Chaque échantillon testé est injecté en série sur les deux surfaces et le sensorgramme obtenu après injection sur la surface de référence est soustrait à celui obtenu après injection sur la surface de mesure. Cela permet d'éliminer la plupart du bruit lié aux différences d'indices de réfraction entre le tampon de circulation et le tampon dans lequel l'analyte a été mélangé ainsi que la plupart du bruit de l'injection. Dans un deuxième temps, un « blanc » est injecté également sur les deux surfaces pour éliminer les déviations systématiques dans la réponse mesurée. En effet, puisque ces déviations sont systématiques, elles apparaîtront également sur le sensorgramme d'un blanc, et en soustrayant ces données à la réponse mesurée, cet artefact sera éliminé. Le blanc est souvent le tampon dans lequel les dilutions des échantillons sont effectuées (Myszka, 1999).

1.3.4.3. Les applications de la SPR

La technologie SPR permet d'étudier les interactions d'un grand nombre de molécules avec leurs partenaires. On peut notamment citer les récepteurs, les anticorps, les antigènes, les enzymes, les glycoprotéines, les acides nucléiques, les substances médicamenteuses, les cellules ainsi que les virus (Boozer et al., 2006; R. Karlsson, 2004; Muller-Renaud et al., 2005).

Le type d'études possibles est également très varié. L'information pouvant aussi bien être qualitative : identification de nouveaux partenaires, spécificité et sélectivité de molécules, criblage de molécules, que quantitative : mécanisme d'interaction, stœchiométrie, détermination de constantes thermodynamiques, cinétiques, d'affinité et analyse de concentration (Karlsson, 2004; van der Merwe, 2001).

Le Biacore 3000 peut détecter des molécules d'un poids moléculaire aussi faible que 180 Da. Il est possible de mesurer des constantes d'affinité entre 10^4 et 2.10^{10} M^{-1} et des constantes cinétiques d'association entre 10^3 et 10^6 $M^{-1}.s^{-1}$ et de dissociation entre 10^{-5} et 10^{-2} s^{-1} (Pharmacia Biosensor AB, 1991).

De ce fait, la SPR possède de nombreux domaines d'applications. Karlsson en recense quatre principaux où la SPR est largement utilisée, à savoir, le contrôle de qualité ou la recherche de toxines et de pathogènes dans les aliments (Muller-Renaud et al., 2005), la découverte de substances médicamenteuses, l'étude du potentiel immunogène de molécules, et la recherche protéomique (Karlsson, 2004).

1.3.4.4. Détermination des constantes cinétiques et thermodynamiques des interactions macromoléculaires à partir des données Biacore

1.3.4.4.1. Équation générale (Karlsson et al., 1991; Pharmacia Biosensor AB, 1991)

Lorsqu'un analyte A se lie avec un ligand B pour former le complexe AB, le taux de formation du complexe AB s'exprime de la manière suivante si l'on assume une cinétique de premier ordre de type Langmuirienne :

(1.1) $d[AB]/dt = k_a.[A].[B] - k_d.[AB]$

où k_a est la constante cinétique d'association et k_d la constante de dissociation en $M^{-1}s^{-1}$ et s^{-1}, respectivement.

Comme le ligand B est immobilisé à la surface du biocapteur, la concentration du complexe AB est reliée à la quantité d'analyte lié à la surface, R_A. De plus, la concentration du ligand B non lié correspond à la différence entre la quantité maximale d'analyte, R_{max}, qui peut s'y lier et celle qui est déjà liée, R_A. Enfin, comme l'analyte est injecté de manière continue à la surface du biocapteur, la concentration d'analyte non lié est constante et notée C. De ce fait, l'équation précédente devient :

(1.2) $dR_A/dt = k_a.C.(R_{max} - R_A) - k_d.R_A$

1.3.4.4.2. Méthode analytique

- <u>Calcul de la constante d'affinité</u> (Karlsson et al., 1991)

Lorsque plusieurs injections du même analyte ont été réalisées sur la même surface à des concentrations C différentes et que dans chacun des cas l'équilibre thermodynamique est atteint, c'est-à-dire qu'un plateau a été atteint dans la phase

d'association, alors $dR_A/dt = 0$. Il est donc possible de calculer la constante d'affinité $K = k_a/k_d$ à partir de l'équation précédente :

(1.3) $R_A/C = K.R_{max} - K.R_A$

En traçant R_A/C en fonction de R_A avec des échantillons de concentration C connue, alors on peut déterminer K et R_{max}.

- Calcul de la constante cinétique de dissociation (Karlsson et al., 1991)

Lors de la phase de dissociation, étant donné que c'est le tampon qui est injecté de façon continue au dessus de la surface, l'équation (1.2) devient :

(1.4) $dR_A/dt = - k_d.R_A$

En résolvant cette équation, on obtient :

(1.5) $\ln(R_{A1}/R_n) = k_d.(t_n - t_1)$

où t_1 correspond au moment où la phase de dissociation débute, R_{A1} est la réponse associée. t_n est tel que $t_n > t_1$ et R_n correspond à la valeur du signal au temps t_n.

- Calcul de la constante cinétique d'association (Karlsson et al., 1991; Pharmacia Biosensor AB, 1991)

L'équation (1.2) peut être réarrangée pour donner :

(1.6) $dR_A/dt = k_a.C.R_{max} - (k_a.C + k_d).R_A$

En traçant dR_A/dt en fonction de R_A, on peut déterminer $k_a.C + k_d$, et sous réserve que la constante de dissociation ait déjà été calculée (voir les équations 1.4 et 1.5.) et que la concentration de l'analyte soit connue, alors on obtient k_a. Une autre méthode consiste à tracer ensuite la pente (dR_A/dt en fonction de R_A) pour plusieurs concentrations C et d'extraire la pente de cette courbe qui correspond à k_a.

1.3.4.4.3. Approche numérique

La méthode analytique pour le calcul de constantes cinétiques n'est applicable que dans le cas d'une interaction Langmiurienne. En réalité, le mode d'interaction entre l'analyte et le ligand est souvent plus complexe. En effet, le ligand peut se présenter sous deux formes différentes à la surface du biocapteur, les cinétiques d'interactions de chacune de ces populations pouvant être différentes (hétérogénéité de surface) (Morton et al., 1995), l'analyte peut aussi être présent sous deux formes et interagir de deux manières avec le ligand (hétérogénéité de l'analyte) (Karlsson & Falt, 1997), un changement conformationnel peut avoir lieu à la suite de la formation du complexe analyte/ligand (Morton et al., 1995) ou encore le transfert de masse peut limiter l'interaction entre l'analyte et le ligand (phénomène de diffusion limitante de l'analyte) (Karlsson & Falt, 1997). Dans ces cas de figure, les équations différentielles régissant ces différents phénomènes complexes étant non linéaires, les équations ne peuvent être résolues de manière analytique. L'approche utilisée consiste alors à intégrer numériquement ces équations, à analyser de façon globale les divers sensorgrammes et à effectuer un ajustement statistique des courbes obtenues (Karlsson & Falt, 1997; Morton et al., 1995). La compagnie Biacore propose le logiciel BIAevaluation qui intègre ces différents modèles et détermine les constantes cinétiques selon les algorithmes d'intégration numérique proposés par Burden et Faires en 1993 (Karlsson & Falt, 1997).

1.3.4.5. Détermination de concentrations de protéines par SPR

Il existe deux méthodes pour mesurer la concentration à l'aide du Biacore. La première est la méthode des flux, permettant une mesure absolue de la concentration. La seconde est la méthode de calibration, permettant une mesure relative de la concentration. L'une ou l'autre de ces techniques est employée dépendamment des conditions de transport de masse (Ben Khelifa, 2000).

1.3.4.5.1. Le transfert de masse

Lorsque l'analyte est injecté au dessus de la surface où le ligand est immobilisé, le taux de liaison observé est le résultat de deux phénomènes : la diffusion, ou le transfert de masse de l'analyte de la solution jusqu'au voisinage de la surface, et l'interaction biologique proprement dite entre le ligand et l'analyte (Jason-Moller et al., 2006). Dans la cellule micro-fluidique du Biacore 3000, de géométrie définie, le flux, J, de l'analyte à la surface s'exprime de la manière suivante (Karlsson et al., 1993) :

$$(1.7)\ J = k.C.D^{2/3}.u^{1/3}$$

où k est une constante dépendant de la géométrie de la cellule, D est le coefficient de diffusion et u le débit. Suivant les conditions dans lesquelles l'expérimentateur veut travailler, c'est-à-dire avec transfert de masse limitant ou non, deux paramètres expérimentaux peuvent être modifiés : la quantité de ligand immobilisé à la surface et le débit d'injection de l'analyte (Karlsson et al., 1991).

1.3.4.5.2. La méthode des flux

Cette méthode, plus délicate et plus laborieuse à réaliser, est en général utilisée lorsque la méthode de calibration (voir la partie 1.3.4.5.3.) n'est pas applicable. Elle présente cependant l'avantage d'être plus générale puisqu'elle est utilisable même dans le cas où le transport de masse n'est pas entièrement limitant, et également, pour des couples analyte/ligand avec des constantes d'association plus faibles (jusqu'à 10^3 $M^{-1}.s^{-1}$). Il est tout de même nécessaire de connaître le poids moléculaire et le coefficient de diffusion de l'analyte pour pouvoir la mettre en pratique (Christensen, 1997; Richalet-Secordel et al., 1997).

La détermination de la concentration, telle que décrite par Christensen (Christensen, 1997), requiert plus de mesures que dans le cas où la limitation par transfert de masse est totale car il faut procéder à des injections de l'analyte à différents débits. Du point de vue plus général de cette théorie, le taux de liaison de l'analyte avec le ligand s'exprime de la façon suivante :

$$(1.8)\ dR_A/dt = L_m.(MW.G.L_r.[A_{bulk}] - k_d.R_A)/(L_r+L_m)$$

où $[A_{bulk}]$ (noté C dans notre cas) est la concentration de l'analyte en solution, MW est la poids moléculaire de l'analyte, G est le facteur de conversion des RU en g/mm^2 (G = 1000 $RU.mm^2/ng$), L_r est le produit de [B] par k_a et L_m est le coefficient de transport de masse caractérisant l'équilibre entre l'analyte en solution et l'analyte lié à la surface, L_r et L_m sont les coefficients de Onsager.

Lorsque l'on considère le début de la phase d'association, à nouveau l'effet de la dissociation peut être négligé et (1.8) se simplifie :

(1.9) $dR_A/dt = L_m.MW.G.L_r.[A_{bulk}]/(L_r+L_m)$

Sachant que l'on obtient dR_A/dt en extrayant la pente correspondant au début de la phase d'association du sensorgramme, que L_m peut être calculé comme décrit dans (Christensen, 1997), il reste seulement deux inconnues : $[A_{bulk}]$ et L_r. Ces dernières sont déterminées en procédant à plusieurs injections à des débits différents afin d'obtenir un système de deux équations à deux inconnues (Ben Khelifa, 2000).

1.3.4.5.3. La méthode de calibration

Dans le cas où la limitation par transfert de masse est totale, c'est-à-dire que le transport de masse est le seul facteur limitant, alors c'est le phénomène de la diffusion qui régit l'interaction entre l'analyte et le ligand. Dans de telles conditions, la vitesse de réaction initiale est indépendante de la cinétique de la liaison entre l'analyte et le ligand et est directement proportionnelle à la concentration de l'analyte (Karlsson et al., 1993; Pol et al., 2007).

L'expression du taux de liaison de l'analyte de l'équation (1.9) devient alors :

(1.10) $dR_A/dt = k_m.G.MW.[A_{bulk}]$

où k_m est le coefficient de transfert de masse qui est défini, dans le cas d'un transfert de masse total, par l'équation suivante (Karlsson et al., 1994) :

(1.11) $k_m = 0,98.(D/h)^{2/3}.[f/(0,3.b.l)]^{1/3}$

où D est la coefficient de diffusion, f est le débit volumétrique, et h, b et l sont respectivement la hauteur, la largeur et la longueur de la cellule micro-fluidique.

Afin de se trouver dans ce cas de figure, plusieurs conditions doivent être satisfaites. Tout d'abord, une grande quantité de ligand doit être immobilisée sur la surface du biocapteur afin que l'interaction analyte/ligand ne soit pas limitée par la quantité de ligand libre disponible (Karlsson et al., 1993; Kikuchi et al., 2005; Richalet-Secordel et al., 1997), le débit ne doit pas être élevé (<30 μL/min) (Jason-Moller et al., 2006; Karlsson et al., 1991) et la constante d'association de l'interaction analyte/ligand doit être suffisamment élevée (Karlsson et al., 1993; Pol et al., 2007; Richalet-Secordel et al., 1997). Enfin puisque c'est une mesure relative de concentration, il est nécessaire de faire une courbe de calibration avec un standard de concentration connue afin d'établir la relation entre la concentration et le taux de liaison entre l'analyte et le ligand (Battaglia et al., 2005; Kikuchi et al., 2005; Muller-Renaud et al., 2004; Richalet-Secordel et al., 1997). La détermination du taux de liaison initial, exprimée en $RU.s^{-1}$, s'effectue simplement en ne prenant en compte que la phase d'association du sensorgramme et en extrayant la pente initiale de cette phase.

1.3.5. Les méthodes de suivi en ligne de la production de protéines en bioréacteur

Cette partie est traitée de manière détaillée dans l'introduction de l'article (chapitre 3).

CHAPITRE 2. PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

2.1. Problématique

À l'heure actuelle, une des principales méthodes de production à grande échelle d'anticorps monoclonaux est la culture en bioréacteurs de lignées d'hybridomes, et plus particulièrement en mode cuvée alimentée ou en culture continue (Berger et al., 2002; Bibila & Robinson, 1995). Ces modes de culture permettent d'augmenter le rendement et de maximiser la productivité tout en ayant un produit final de qualité notamment grâce à la capacité des cellules de mammifères à effectuer des modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation (Birch & Racher, 2006). Même si la culture de cellules de mammifères en bioréacteur reste plus délicate et plus coûteuse que celle de cellules de plantes ou de bactéries (Schmidt, 2004), pour une application thérapeutique, il est souvent nécessaire d'avoir une molécule bioactive et ces systèmes d'expression fournissent les protéines recombinantes les plus proches de celles normalement exprimées par des cellules humaines en termes de repliement, de modifications post-traductionnelles et donc de bioactivité.

Dans le but de développer ce type de bioprocédés, mais surtout afin de les contrôler et de les optimiser, il est important de pouvoir suivre en ligne de nombreux paramètres de culture. Afin de maximiser le rendement et la productivité d'une culture, il est nécessaire d'avoir de l'information aussi bien sur les conditions de culture (pH, concentration d'oxygène dissous), sur l'état énergétique des cellules (changement

métaboliques suite à un stress), que sur leur production de protéines d'intérêt (concentration et bioactivité de la protéine produite) (Ozturk et al., 1995). Or, si de nombreuses méthodes, aussi bien invasives que non-invasives, sont disponibles pour le suivi de paramètres extrinsèques comme la température, le pH ou la concentration d'oxygène dissous, il demeure plus difficile de suivre en ligne les changements métaboliques, l'évolution de la biomasse ou la production en protéines au cours d'une culture en bioréacteur (Hisiger & Jolicoeur, 2005; Noll & Biselli, 1998; Ozturk et al., 1995). Concernant ce dernier paramètre notamment, plusieurs techniques ont été mises en œuvre jusqu'à ce jour pour obtenir en ligne la concentration en protéine d'intérêt : suivi par HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) (Larson et al., 2002), utilisation de protéines de fusion fluorescentes (DeLisa et al., 1999; Liu et al., 2001; Lu et al., 2002; Reischer et al., 2004) ou encore utilisation de la spectrométrie de masse (Jones et al., 2005). Cependant, un des défauts majeurs de ces techniques est qu'elles permettent uniquement le suivi de la production totale de protéine d'intérêt (bioactive et inactive). Or, concernant la production en protéines, il faut différencier quantité totale de protéine d'intérêt produite et quantité bioactive de protéine produite car seules les protéines actives sont commercialement d'intérêt. En revanche, dans une perspective d'amélioration du procédé, l'obtention des deux informations, à savoir protéine totale et protéine active, est intéressante.

La technologie de la résonance plasmonique de surface (SPR) présente, entre autres avantages, celui de pouvoir étudier les interactions d'une protéine avec son ligand naturel, c'est-à-dire qu'il est possible d'évaluer non seulement la quantité totale mais également dans certains cas, comme pour les anticorps, la bioactivité de la protéine produite, qui peut se définir comme la capacité de la protéine produite de se lier à son partenaire biologique (Kikuchi et al., 2005; Pol et al., 2007; Wendler et al., 2005). Dès lors, il devient évident que la possibilité de pouvoir coupler un biocapteur SPR avec un bioréacteur présente une importante avancée pour le suivi en ligne de bioprocédés. En effet, le fait de pouvoir caractériser la production, noter les changements suite à un stress ou encore évaluer la bioactivité, et ce en temps réel et de manière automatique, permettrait non seulement de s'affranchir des erreurs de manipulation, mais surtout d'avoir un outil de suivi en ligne pouvant être utilisée dans une stratégie de contrôle de la culture et ainsi de travailler à améliorer la productivité, la reproductibilité et la qualité (Junker & Wang, 2006). Les travaux effectués précédemment au sein de notre équipe (Jacquemart et al., in Press), s'inscrivent parfaitement dans le cadre des PAT (Process Analytical Technologies). Le suivi en ligne et automatisé de la concentration en protéines produites suite à une transfection transitoire sur une lignée HEK 293 a pu être réalisé en couplant un biocapteur SPR à un bioréacteur. Cependant, dans ces précédents travaux, la méthode de détection la protéine produite était indirecte (utilisation d'une étiquette pour sa capture à la surface du biocapteur), de plus la quantification de cette protéine n'était pas absolue et sa bioactivité n'a pu être évaluée.

2.2. Hypothèses

Nous avons posé deux hypothèses dans le cadre de ce projet de maîtrise, à savoir :

1) une quantification **hors-ligne** de l'anticorps anti-PSMA produit par la lignée d'hybridomes 17G1 est possible à l'aide de la SPR en utilisant l'un des deux partenaires dont nous disposions (PSMA ou le peptide utilisé lors de l'immunisation pour la production de la lignée d'hybridomes) comme ligand.

2) la combinaison de cette stratégie de mesure **hors-ligne** avec le dispositif expérimental mis en place précédemment (Jacquemart et al., in Press) peut être utilisé pour mesurer **en ligne** la concentration d'anticorps produit en bioréacteur.

2.3. Objectifs

L'objectif principal de ce projet consistait à suivre en ligne la quantité bioactive d'anticorps monoclonal produite par une lignée cellulaire d'hybridomes, cultivée en bioréacteur, à l'aide de la technologie de résonance plasmonique de surface. Ces travaux font suite à ceux entrepris par Jacquemart et al. en 2007 (annexe 1) qui ont démontré qu'il est possible de détecter et de suivre dans le temps l'évolution relative de la concentration en protéines produites totales par transfection transitoire de cellules HEK 293, en couplant un biocapteur SPR à un bioréacteur.

Pour mener à bien cet objectif, plusieurs étapes sous-jacentes ont été définies :

- Comparer les ligands à notre disposition afin de les immobiliser à la surface du biocapteur SPR.

- Déterminer les performances de ce biocapteur avec le ligand choisi.
- Établir une méthode de quantification hors ligne de l'anticorps à l'aide du biocapteur et du ligand choisi.
- Valider cette méthode de quantification avec des expériences hors ligne.
- Quantifier en ligne les anticorps sécrétés par une culture d'hybridomes en bioréacteur.

CHAPITRE 3. AT-LINE QUANTIFICATION OF BIOACTIVE ANTIBODY CONCENTRATION IN BIOREACTOR BY SURFACE PLASMON RESONANCE

N. Chavane, R. Jacquemart, C. Hoemann, M. Jolicoeur[1], G. De Crescenzo[1,]*

École Polytechnique de Montréal, Department of Chemical Engineering, P.O. Box 6079, Station Centre-ville, H3C 3A7 Montréal, Québec, Canada.

[1] both authors contributed equally
* To whom correspondence should be addressed. Tel: 1-514-340-4711 ext. 7428. Fax: 1-514-340-2990. Email: gregory.decrescenzo@polymtl.ca.

3.1. Abstract

Off-line classical methodologies for the determination of antibody concentration such as ELISA are well documented, their implementation is however long and labour-intensive. Therefore, immunodetection methods cannot satisfy the need for at-line quantification of protein levels in bioreactor. We recently described an innovative at-line method to detect proteins secreted during bioreactor culture by the use of surface plasmon resonance (SPR)-based biosensor technology. This previous analysis did not discriminate between folded and denatured protein. Here we demonstrate that at-line SPR can further be used to monitor bioactive secreted protein concentration, i.e. antibody with conserved antigen-binding activity. In a first series of experiments, conditions for SPR-based measurements were validated off-line by monitoring bioactive antibody concentration over time in conditioned media from 500 mL baffled flask

hybridoma cell cultures. A fully-automated experimental setup in which the SPR-based biosensor was harnessed to a bioreactor was then used at-line to monitor the concentration of bioactive antibody produced in a 3.5-L bioreactor. Quantitative SPR measurements performed both at-line and off-line were in excellent agreement with quantitative Western blotting followed by densitometry analyses at matching time points. Our experimental study thus confirms that SPR biosensors can be applied to at-line quantification of correctly folded proteins that are secreted by cells cultured in bioreactor. Our experimental approach represents a novel and robust analytical strategy to be applied to the control and optimization of the production of bioactive secreted proteins.

3.2. Keywords

At-line monitoring, At-line quantification, Antibody production, Hybridoma cells, Surface Plasmon Resonance, Prostate-Specific Membrane Antigen

3.3. Introduction

In the biopharmaceutical industry, recombinant proteins are becoming increasingly important as indicated by their market share now representing more than 60 billion US dollars (Pavlou and Belsey, 2005). Of interest, 20% of the biopharmaceutical products in development are currently antibodies or antibody derivatives (Roque et al., 2004). For therapeutic purposes, large amounts of specific antibodies are required; this need is compounded if the disease to be treated is chronic (Andersen and Reilly, 2004).

In an effort to satisfy market needs, various expression systems have been evaluated and employed for large-scale antibody production. Those include hybridoma cell lines, other mammalian cell lines such as Chinese Hamster Ovary cells, transgenic plants and plant cells, fungal or bacterial systems (Andersen and Reilly, 2004; Birch and Racher, 2006). In the context of large scale antibody production, the requirement of quantitative tools designed for the on-line monitoring of bioreactor-based cultures has often been mentioned as key to improve cell specific productivity as well as to ensure culture reproducibility and robustness. As underlined by Baker and colleagues (Baker et al., 2002), product concentration may be the most important parameter to routinely measure.

Among the off-line techniques available for antibody characterization, surface plasmon resonance (SPR)-based biosensors, and particularly commercial biosensors from GE Healthcare (formerly BIACORE Inc.) are widely employed (Karlsson, 2004; Rich and Myszka, 2006). The broad use of this state-of-the-art technology could be attributed to the many practical advantages offered by SPR biosensing when compared to other biophysical techniques such as fluorescence-based biosensors, analytical ultracentrifugation or isothermal calorimetry. Those are: *i)* SPR detection is highly sensitive and does not require any labelling of the species under study, *ii)* samples from cell-free culture supernatant can be directly analyzed with very limited sample preparation and consumption by taking advantage of very specific interactions of the macromolecule under study with its related natural ligand and *iii)* measurements can be entirely automated allowing unattended operation, good accuracy, and robustness (Boozer et al., 2006; Canziani et al., 2004; Karlsson, 2004; Kikuchi et al., 2005). This

latter feature offers the potential of high-throughput screening (Leonard et al., 2007; Liu et al., 2004). Furthermore, when compared with other standard off-line methods such as Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) or quantitative Western blotting, SPR is far more attractive since measurements are performed in real time. In essence, real-time monitoring permits a complete thermodynamic and kinetic characterization of the macromolecular interactions (de Mol et al., 2005; Duverger et al., 2003; McDonnell, 2001), the latter being already demonstrated to be appropriate for quality assessment of recombinant proteins used as therapeutics (DiGiacomo et al., 2004; Kikuchi et al., 2005).

Of salient interest, SPR biosensors are now routinely used for measuring bioactive concentrations of proteins within unpurified samples (Kikuchi et al., 2005; Pol et al., 2007; Sigmundsson et al., 2002; Wendler et al., 2005; Zeder-Lutz et al., 1999). In that respect, two major approaches are employed for concentration determination. The most cited method relies on the attainment of total mass transport limitation conditions within the biosensor flow cell and requires the use of a calibration curve in order to correlate protein concentration to the initial reaction rate extracted from SPR data (Karlsson et al., 1993; Pol et al., 2007). An alternative strategy has also been introduced to accommodate both total and partial mass transport limitation situations. The latter method, known as the flux analysis approach, relies on changes in binding rate with varying flow rate and does not require any calibration (Pol et al., 2007; Richalet-Secordel et al., 1997).

Whereas off-line classical methodologies for the determination of antibody concentration such as ELISA or quantitative Western blotting are well documented, their implementation is long and labour-intensive (Canziani et al., 2004; Roque et al., 2004). Therefore, immunodetection methods cannot satisfy the need for at-line quantification of protein levels. It could be noted that several critical cell culture parameters such as pH, oxygen and carbon dioxide partial pressures can be adequately monitored on-line using common probes. However bioprocess development, control and optimization require the use of devices capable of monitoring protein production and bioactivity on-line, or at least at-line. The potential advantages of an at-line biosensor would be numerous: effects of changes in culture parameters would be simultaneously monitored and potentially relayed to a control system aiming at optimizing cell-specific productivity (Hisiger and Jolicoeur, 2005; Jones et al., 2004).

First-generation setups for on-line monitoring of protein production, developed in the late 80's took advantage of flow-injection analysis coupled with capacitance, turbidimetric, or fluorimetric detection (Gebbert et al., 1994). However these systems suffered from low accuracy and loss of sensitivity. More recently, bioprocess at-line monitoring has been successfully used to monitor the production of a chimeric protein of interest fused to fluorescent reporters such as GFP (Green Fluorescent Protein) (DeLisa et al., 1999; Hisiger and Jolicoeur, 2005; Jones et al., 2004; Liu et al., 2001; Lu et al., 2002; Reischer et al., 2004; Su et al., 2004), or, more rarely, to a coloured tag such as Rubredoxin (Kohli and Ostermeier, 2003). The main disadvantages of these strategies reside in the fact that protein levels can be overestimated due to cleavage of the reporter.

Also, the tag must be cleaved from the protein after production and purification. Furthermore in the case of GFP-based strategies, the signal can be biased by intrinsic riboflavin (maximum fluorescence at 450/530 nm compared to 470/510 nm for GFP). Another strategy based on on-line mass spectrometry is available (Jones et al., 2005). Although on-line mass spectrometry provides good qualitative information about protein integrity, sensitivity is lower compared to fluorescence measurements, protein levels are not quantified, and no information about protein bioactivity can be obtained (Jones et al., 2005).

Compared with these techniques, a system based on on-line SPR biosensing would be of great interest to perform rapid measurements that are more accurate, and more specific. In that effort, we recently demonstrated that an SPR biosensor harnessed to a bioreactor can be used for at-line detection of secreted protein in a bioreactor culture of transiently transfected HEK 293 cells (Jacquemart et al., in Press). Pursuing the same goal, discrete culture sampling performed at-line and later analyzed by SPR for the determination of intracellular components of *E.coli* fed-batch cultures has been performed by Vostiar et al. (Vostiar et al., 2005). Recently, Lee et al. (Lee et al., 2007) demonstrated the usefulness of an SPR approach for at-line monitoring cell-free protein synthesis. In this manuscript, we demonstrate that the same SPR-based detection setup as we previously validated for at-line detection (Jacquemart et al., in Press) allows for a strict at-line quantification of bioactive monoclonal antibody produced by a hybridoma cell line cultured in a bioreactor. Prior to at-line quantification of bioactive monoclonal antibody concentration produced in bioreactor, preliminary off-lines experiments were

performed. In these experiments, the type of ligand, the ligand immobilization strategy as well as the quality of the biosensor calibration and the ageing of the sensor surface were assessed. Off-line and at-line quantifications of standard batch cultures were then performed to validate the optimized quantification protocol.

3.4. Material and methods

3.4.1. Cell line and secreted antibody

His-tagged truncated prostate-specific membrane antigen ectodomain (that will be further designated as PSMA), that had been produced in bacculovirus Sf-9 cells and purified by Ni-NTA affinity chromatography as well as hybridoma cell line 17G1.1 corresponding to a derived sub-clone of the hybridoma cell line 17G1 (Patent PCT/CA2004/000127), that secretes monoclonal antibody (thereafter designated as mAb) binding to PSMA were generous gifts from Dr. S. Moffett (ProScan Rx Pharma, Inc., Montreal, Quebec, Canada). mAb standards used for biosensor calibration were purified as described elsewhere (Moffett et al., in Press). Aliquots of purified mAb stock solution at 1.5 g/L were kept at -20°C in 10 % glycerol.

3.4.2. Cell culture

17G1.1 cells were grown in suspension in PFHM-II Protein-Free Hybridoma Medium (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON, Canada) supplemented with 1 ng/mL Interleukine-6 (Cedarlane Laboratories Ltd., Burlington, ON, Canada), 0.1 % Pluronic F-68 (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), PenStrep (100 units/mL penicillin and 0.1

mg/mL streptomycin, Sigma-Aldrich), and Amphotericin B (2.5mg/L, Sigma-Aldrich) at 37°C in batch mode. Cell density at inoculation was 400,000 cells/mL for 500 mL-baffled flasks cultures and 275,000 cells/mL for bioreactor culture.

For off-line experiments, cells were cultured in 500-mL baffled flasks (VWR International Ltd., Mississauga, ON, Canada) in a 37°C humidified incubator (Revco, Thermo Electron Corporation, Asherville, NC, USA) maintaining 5% CO_2 and an agitation speed of 90 RPM. Samples were manually taken from cell cultures, centrifuged 10 minutes at 1050 rpm (Durafuge 300R V1 or Micromax RF, Thermo Electron Corporation, Milford, MA, USA) and kept at -20°C for further analysis.

Bioreactor culture was performed in a 3.5-L bioreactor (ChemapAG, Basel, Switzerland). Agitation speed was maintained at 90 RPM by a double helical ribbon impeller having the same geometrical ratios as those previously published (Jolicoeur et al., 1992). Dissolved oxygen was measured by a polarographic probe (InPro 6800, Mettler Toledo, Mississauga, ON, Canada) connected to a data acquisition and control system (Virgo, Longueil, QC, Canada) and maintained at 45 ± 5 % from air saturation by continuous feed of an air/oxygen/5% CO_2 mixture in the headspace. pH was measured with a glass electrode probe (Mettler Toledo), using the same data acquisition and control system, and maintained between 7.1 and 7.4 by automatic addition of 7.5 % sodium bicarbonate solution.

In addition to automated continuous sampling for at-line SPR monitoring (see below), manual sampling was performed. Samples were centrifuged 10 minutes at 1050 rpm and kept at -20°C for further off-line analysis.

3.4.3. Bioreactor connection to SPR biosensor for at-line measurements

From one hour post-inoculation, the culture medium of the bioreactor was continuously pumped through a decantation column (20-cm height, 0.5-cm diameter, 50 μL/min flow rate) and remaining cells/debris were filtered with an in-line tangential filter (0.22-μm, PALL, Mississauga, ON Canada) positioned at the inlet valve of a peristaltic pump (Ismatec, Cole Palmer Canada Inc., Anjou, QC, Canada). Filtered, cell-free culture medium was then continuously delivered to a modified 7-mm plastic vial placed in a Biacore 3000 rack (Biacore Inc., Piscataway, NJ, USA) (Figure 3.1).

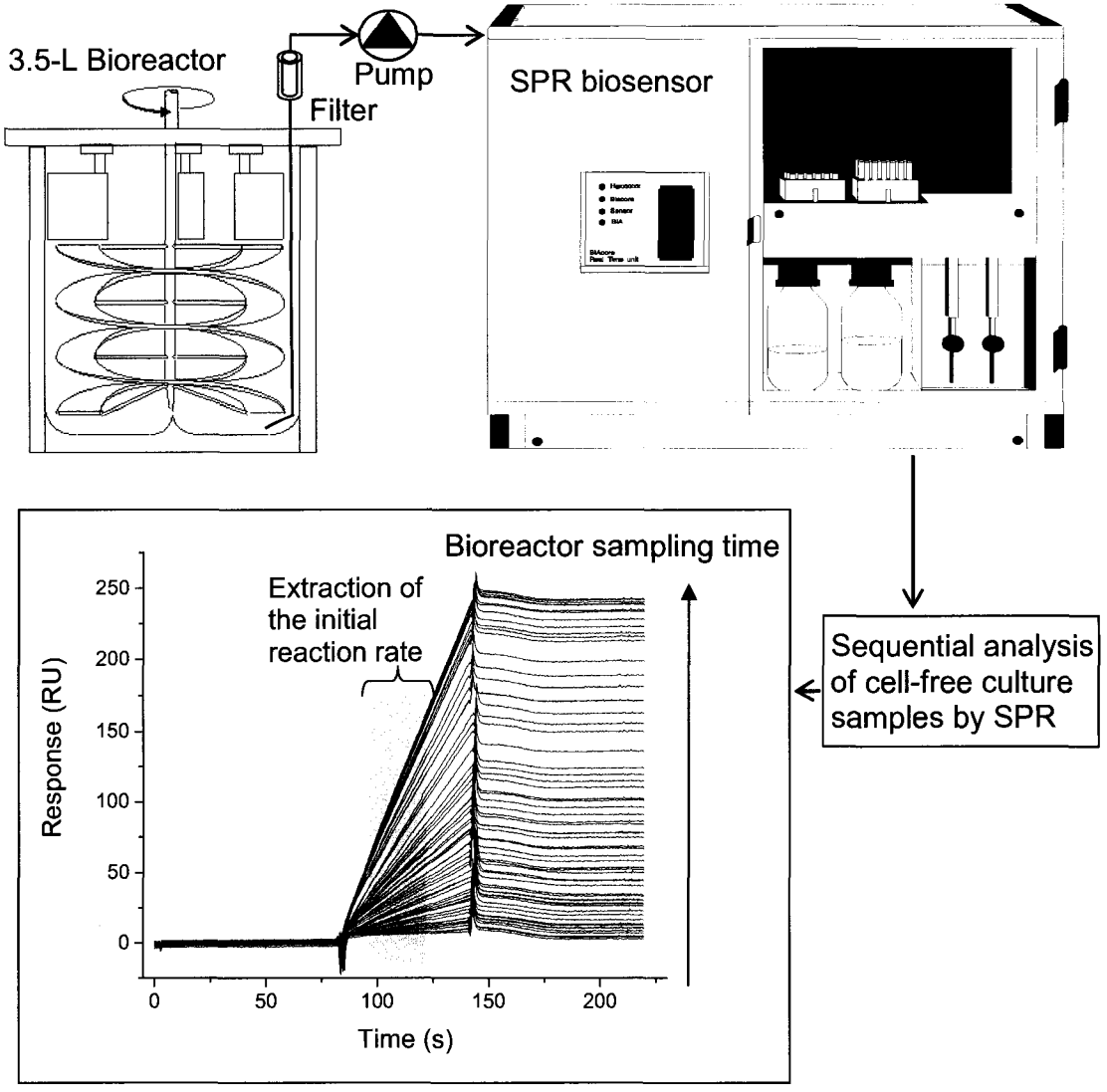


Figure 3.1. Schematic representation of the experimental setup connecting the bioreactor to the biosensor for SPR at-line measurements.

3.4.4. SPR measurements

SPR measurements were performed using a Biacore 3000 system (Biacore Inc.). For antibody detection, two ligands corresponding to PSMA and to PS0215, a variant of the linear peptide that had been used for immunization and to which an additional cysteine had been N-terminally added for biosensor immobilization purposes (sequence CGKSLYESWTKK, 95 % purity, Bio-Synthesis Inc., Lewisville, TX, USA) were immobilized on different surfaces of CM4 sensor chips (Biacore Inc.) as described below.

3.4.4.1. Sensor surface preparation

PS0215 peptide was chemically coupled to CM4 sensor chip surfaces using standard thiol coupling procedure (De Crescenzo et al., 2003). Briefly, coupling was performed in Hepes Buffered Saline (HBS) running buffer [20 mM Hepes (pH 7.4), 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, and 0.05% Tween 20] at a flow rate of 5 μL/min. Injections of 0.05 M *N*-hydroxysuccinimide (NHS) and 0.2 M *N*-ethyl-*N*-(3-diethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) equimolar mixture (70 μL) was followed by a 70-μL injection of 4.5 mg of 2-(2-pyridinyldithio)ethaneamine hydrochloride (PDEA) diluted in 250 μL of 10 mM sodium borate pH 8.5 and by two 10-μL injections of PS0215 diluted in 100 μL of 10 mM sodium acetate, pH 4.0, to reach a maximal amount of coupled peptide (between 350 and 450 RU). A 70-μL injection of 1.5 mg cysteine and 14 mg sodium chloride diluted in 250 μL of 10 mM

sodium acetate, pH 4.0 was then used to block the remaining activated groups on the sensor chip surface.

PSMA was coupled to CM4 sensor chips using the standard amine coupling procedure. That is, phosphate buffered saline (PBS, Invitrogen Canada Inc.) with 0.05% Tween 20 was used as running buffer and flow rate was set at 5 μL/min. Sequential injections consisted of NHS/EDC mixture (as above) followed by two 10-μL injections of 17 mg/L PSMA dissolved in 10 mM sodium acetate, pH 5.5, to reach a maximal amount of coupled PSMA (between 2700 and 3300 RU). A 70-μL injection of 1.0 M ethanolamine-HCl, pH 8.5 was then used to block the remaining activated groups.

For referencing purposes (Rich and Myszka, 2000), mock surfaces related to each coupling strategy were generated by applying the same coupling procedure in which ligand injection was replaced by buffer injection.

3.4.4.2. Biacore sample injections

All injections were carried out at a flow rate of 20 μL/min and all samples were diluted in PBS running buffer. Each sample was injected for 1 min over control and PS0215 surfaces (in a serpentine fashion), followed by a 1 min injection of running buffer (dissociation phase) using the KINJECT procedure of the Biacore 3000 biosensor. Regeneration of the sensor chip for subsequent injection cycles was performed by a 20 s pulse (100 μL/min) of 10 mM glycine, pH 2.0. In the case of control and PSMA surfaces, all conditions were similar except that the antibody injection duration was 5 min.

For at-line monitoring of antibody concentration in the bioreactor, the same protocol was applied in an automated fashion. That is, at set intervals during the bioreactor cell culture, the biosensor was programmed to automatically sample culture medium continuously delivered in a modified 7 mm plastic vial. For subsequent off-line analysis, filtered medium was aliquoted (600 μL) in separate 7 mm plastic vials positioned in the right rack. The biosensor automatically prepared sample for injection by diluting filtered culture medium with running buffer (1/20 dilution) in separate empty vials positioned in the left rack. Diluted samples were then automatically injected over the sensor surfaces and subsequent surface regeneration was performed as described above. The modified sample vial was automatically emptied by the biosensor (while continuously re-filled by the pump) between sample injections and prior to the next automated dilution of culture medium. This cycle of events (1 h in between each injection) was automatically repeated throughout the bioreactor cell culture with limited manual intervention (buffer tank and regeneration vial replenishment once a day). Every 12 hours, a freshly prepared antibody standard (0.45 g/L diluted 1/20) was automatically injected to re-adjust the calibration curve used for the determination of bioactive mAb concentration (see following section).

3.4.5. Reaction rate correlation with protein concentration

To ensure mass transport limitation in the case of a high molecular weight analyte, one must immobilize a maximal amount of ligand when preparing the biosensor surface in addition to performing SPR measurement at a low flow rate (Karlsson et al.,

1993; Karlsson et al., 1994; Kikuchi et al., 2005; Pol et al., 2007). Within the Biacore instrument, the accumulation of the analyte (mAb in our case) over the biosensor surface can be represented as a two-step process (Karlsson et al., 1994):

$$mAb_{bulk} \rightleftarrows mAb_{surface} \quad \text{and} \quad mAb_{surface} + L \rightleftarrows mAb\text{-}L$$

where mAb_{bulk} stands for mAb in solution, $mAb_{surface}$ for mAb in the vicinity of the biosensor surface, L for the ligand that had been covalently immobilized at the surface (i.e. PSMA or PS0215) and mAb-L for the complex formed by the mAb and the ligand. The first step, which consists in the migration of the mAb from the bulk to the surface, is referred to as the diffusion step. The second step corresponds to the interactions between the mAb and its binding partner that had been covalently immobilized at the biosensor surface.

If there is total mass transport limitation, i.e. if the diffusion of the analyte from the bulk to vicinity of the surface is the limiting step as compared to the kinetics of antibody/ligand interactions, concentration of bioactive mAb can be determined independently of its binding kinetics, the initial reaction rate being proportional to mAb concentration (Pol et al., 2007; Richalet-Secordel et al., 1997), as depicted by the following equation (Pol et al., 2007):

$$(3.1)\ dR/dt = MW.k_m.G.[A_{bulk}]$$

where R is the response (RU) corresponding to the mAb accumulation at the biosensor surface, dR/dt thus being the initial reaction-rate ($RU.s^{-1}$), MW is the molecular weight of the analyte, k_m is the mass transfer coefficient (Karlsson et al. 1994) and G

corresponds to a conversion factor that takes into account that 1 RU of accumulated protein equals to 1 $pg.mm^{-2}$.

For every sample, the initial reaction rate was calculated by extracting the slope of the sensorgram for the 30 first seconds of the injection.

3.4.6. Western blotting and densitometry quantification

5 μL of filtered samples (manually taken during cell culture or automatically aliquoted) were loaded onto non-reducing 7.5 % SDS-PAGE mini-gel and transferred to PVDF membrane (BioRad, Hercules, CA, USA) using Mini Trans-Blot Cell (BioRad) and according to the manufacturer protocol. The membranes were then blocked with 5 % w/v fat-free milk powder in Tris Buffered Saline-Tween 20 (TBS-Tween, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% v/v Tween 20). After blocking, membranes were rinsed and incubated for 1 hour with an anti-mouse IgG secondary HRP-coupled antibody (1/15,000 dilution, BioRad) in TBS-Tween and 0.5 % w/v fat-free milk powder and rinsed 3 times for 10 minutes with TBS-Tween and once for 10 minutes with TBS only. The membranes were then submitted to chemiluminescent detection according to the manufacturer recommended protocol (Immun-Star HRP substrate, BioRad) on X-ray film (Amersham, Oakville, ON, Canada) followed by image acquisition of with a CCD camera and densitometry evaluation (Alpha Innotech, Mississauga, ON, Canada).

3.5. Results and discussion

3.5.1. Effect of ligand on the performance of SPR measurement

In an effort to determine which ligand would be the most appropriate for measuring concentration of bioactive mAb, off-line preliminary experiments were conducted on the Biacore 3000 biosensor. Two ligands, i.e PSMA and the linear peptide used for immunization (namely PS0215), were compared. The covalent coupling strategy was optimized in each case in order to obtain the best performances for SPR measurement. Four criteria were taken into account in order to determine whether the PS0215 peptide or PSMA would be the most suitable sensor ligand: signal amplitude, signal linearity, detection sensitivity, and sensor chip lifetime. High signal amplitude ensures a good quality signal-to-noise ratio, while a linear response simplifies initial reaction rate determination for concentration determination. Good sensitivity permits detection of a larger concentration range for which concentration determination can be performed with good confidence. Since our ultimate goal was to determine at-line antibody concentration from the beginning to the end of the culture, the interaction between mAb and the ligand has to be of high affinity enough to give reliable signal when mAb concentrations are low (i.e. at the beginning of the culture). Finally, since our objective was to perform SPR measurements for the duration of the entire culture, the last criterion we evaluated was the lifetime of the different sensor chip surfaces, i.e. the maximal number of injections that can be performed prior to total loss of activity of our surface as well as their ageing profile (loss of signal as a function of injection cycles). We estimated that the duration of our batch hybridoma culture would be approximately

ten days according to previous cultures performed in baffled flasks. Since our goal is to obtain at least one measurement of bioactive mAb concentration per hour, the surface has to give correct signal for at least 240 sample injections and regeneration cycles.

In order to maximize the bioactivity of PS0215, a thiol coupling method that took advantage of the N-terminal engineered cysteine of PS0215 was preferred for this specific ligand to an amine coupling approach. We anticipated that the latter would have led to surface heterogeneity (as multiple lysine residues are present within PS0215) that may affect mAb-immobilized PS0215 kinetics of interaction. In the case of PSMA ligand, covalent coupling was achieved by standard amine coupling as no free cysteines are available within the protein. Furthermore, for each ligand, efforts were directed towards immobilizing a maximal amount of each ligand on different surfaces in order to favour mass transport limitation during subsequent mAb injections. This was performed by testing the effect of pH on immobilization levels (data not shown) and by repeating ligand injection until reaching saturation of the activated surfaces with immobilized ligands. We succeeded in immobilizing 400 and 3,000 RU of PS0215 and PSMA, respectively. Considering that the molecular weights of mAb, PSMA and PS0215, are respectively 150 kDa, 50 kDa and 1.5 kDa, the theoretical maximal amount of mAb that could then be captured on the biosensor surface, was 40,000 and 9,000 RU for PS0215 and PSMA, respectively (assuming a 1:1 binding stoichiometry).

In order to test both PSMA and PS0215 surfaces, a standard batch culture of hybridoma cells was performed in baffled flasks (400,000 cells/mL at inoculation). After 10 days of culture, the conditioned medium was harvested, centrifuged, and filtered

(0.22 μm) to generate a reference culture supernatant containing mAbs. The latter was automatically diluted (1/20 dilution) by the biosensor and injected 10 times over PSMA or PS0215 and related mock surfaces after four buffer injections for surface stabilization. In between injection cycles, surface regeneration was performed by injection of glycine buffer (pH 2.0). Raw data collected using the different surfaces are shown in Figure 3.2. mAb binding levels at the end of the injections as well as initial reaction rates that were determined after control-correction of the sensorgrams are given in Table 3.1.

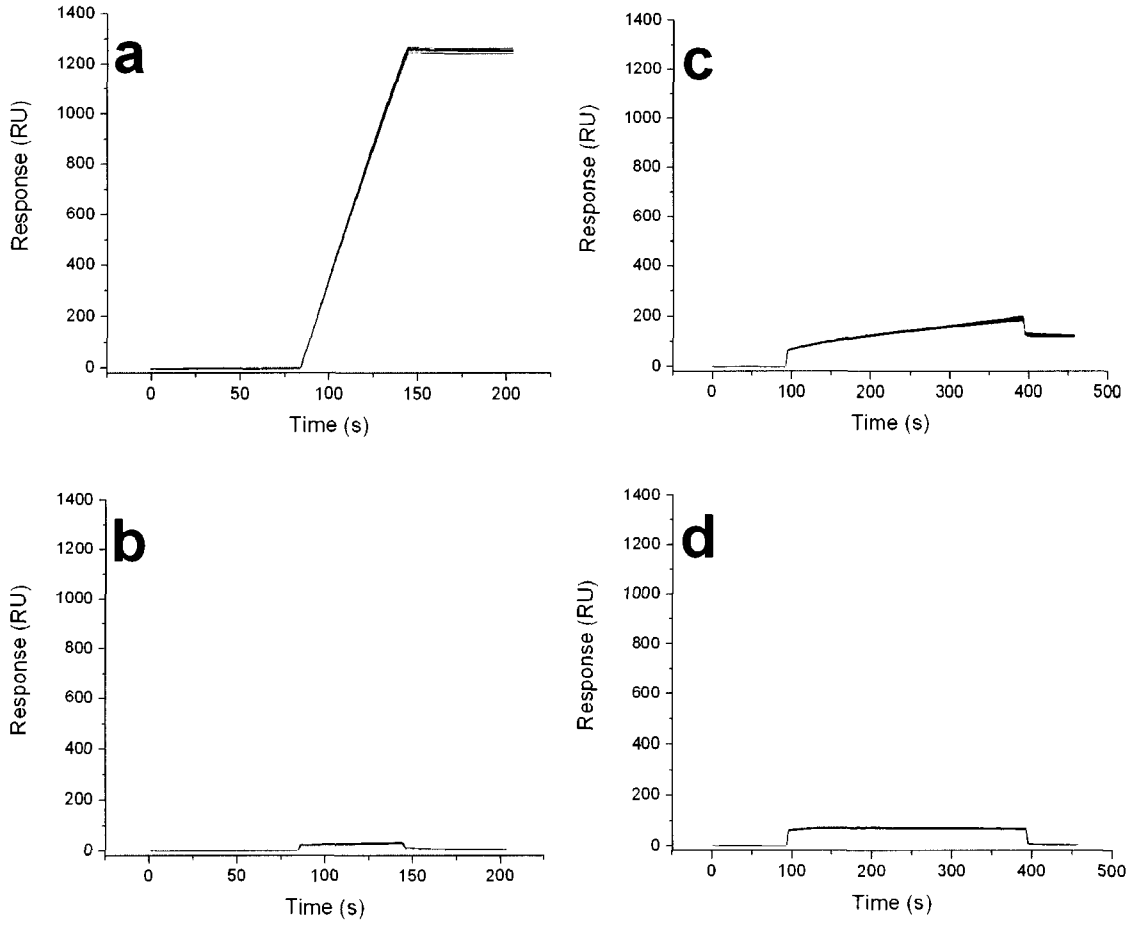


Figure 3.2. Sensorgrams corresponding to ten injections of diluted filtered hybridoma culture medium over PS0215 (a), PSMA (c) and respective mock surfaces (b and d). The reference sample corresponded to filtered conditioned medium collected after 10 days of a 17G1.1 culture in a 500-mL baffled flask that had been inoculated at 400,000 cells/mL. Sample was automatically diluted 1/20 in running buffer prior to injection.

Table 3.1. Comparison of mAb binding to PSMA and PS0215 surfaces

	Antibody reaction rate (RU/s)	Antibody accumulation at the end of the injection (RU)	Surface lifetime (number of cycles)
PS0215	21.4 ± 0.1 (n= 10)	1250 ± 6 (n = 10, 1-min injections)	At least 250
PSMA	0.50 ± 0.016 (n= 10)	109 ± 4 (n = 10, 5-min injections)	At least 100

Note that sensorgrams shown in Figure 3.2 were double referenced prior to antibody reaction rate and antibody accumulation measurements.

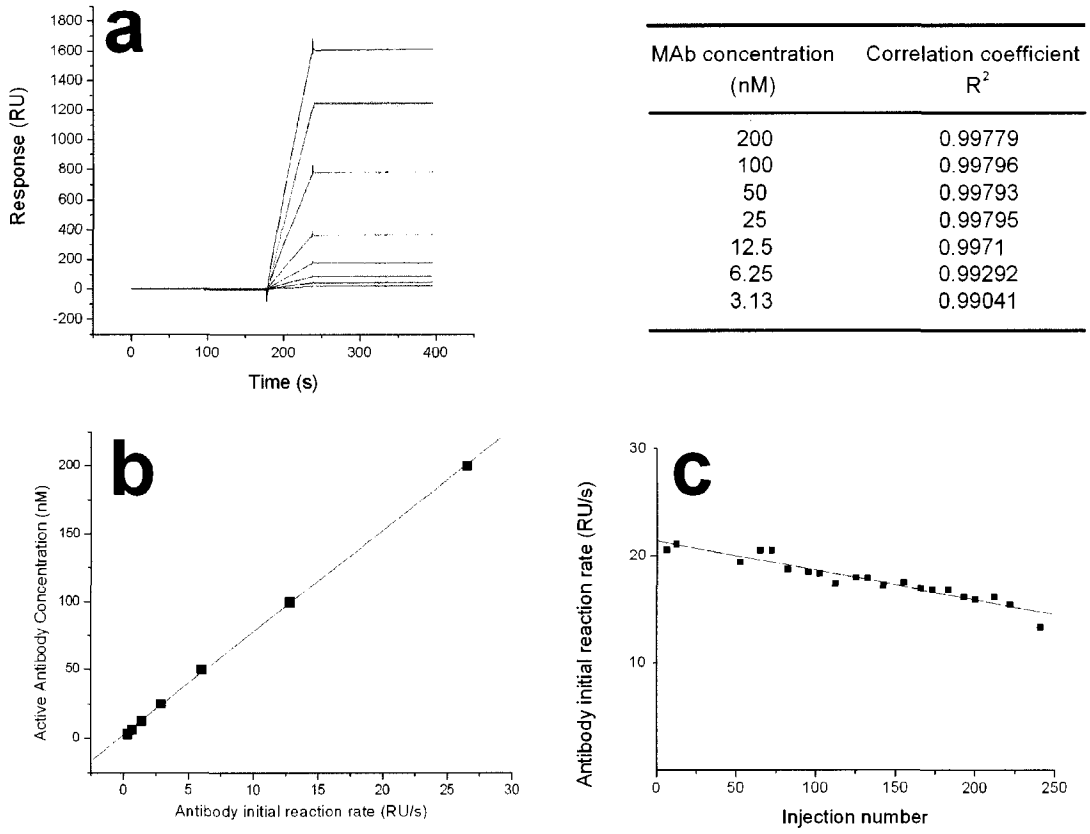
A comparison of the sensorgrams that were recorded when injecting diluted spent medium over PS0215 and PSMA surfaces to those recorded over their respective mock surfaces indicated that, as expected, interactions between the carboxymethylated dextran matrix of our biosensor surfaces and the proteins within the conditioned medium are minimal even when medium contained non-negligible concentrations of intracellular proteins (as we determined that cell viability was less than 20% after 10 days of culture in baffled flasks).

Based on the excellent reproducibility achieved with PS0215-immobilized surfaces (less than 0.5% variation for both initial reaction rate and antibody accumulation, see Table 3.1) in addition to the linearity of the sensorgrams during the injection phase that eased initial reaction rate determination (see Figure 3.2a), PS0215 peptide surfaces were then further investigated for the development of our assay aiming at determining bioactive antibody concentration at-line.

3.5.2. Robustness of the antibody quantification method

In a series of subsequent experiments, injections of purified mAb were then performed at concentration ranging from 3 to 200 nM (0.00135 to 0.03 g/L, manual independent dilutions) over both mock and PS0215 surfaces. Injections were performed at low flow rate (20 μL/min) in order to favour mass transport limitation (Figure 3.3a). For every concentration tested, the initial reaction rate was calculated by extracting the initial slope of the control-corrected sensorgram (30 first seconds of the injection phase, i.e. from t = 180 to 210 s in Figure 3.3a). For every antibody concentration, regression coefficients were found to be excellent ($R^2 > 0.99$, see insert in Figure 3.3).

Furthermore, a plot of these initial reaction rates as a function of the mAb concentrations was found to be linear (Figure 3.3b, $R^2 = 0.9996$). This unambiguously indicated that our approach combining PS0215 surface and mAb initial reaction rate measurement was able to measure bioactive mAb concentrations spanning from 0.00135 to 0.03 g/L.



MAb concentration (nM)	Correlation coefficient R^2
200	0.99779
100	0.99796
50	0.99793
25	0.99795
12.5	0.9971
6.25	0.99292
3.13	0.99041

Figure 3.3. Design of the quantification method.
(a) Control-corrected sensorgrams corresponding to the injection of purified mAb samples at concentrations ranging from 3 to 200 nM (black solid line) and sensorgrams from Figure 3.2a (grey solid line). (b) Calibration curve obtained by extracting initial reaction rates from the sensorgrams shown in (a). (c) Antibody initial reaction rate variations when injecting spent medium at the same dilution over the PS0215 and control surfaces. Insert : Correlation coefficients related to the linear regression performed for initial reaction rate measurements of the various sensorgrams shown in (a).

Of interest, both pure mAb injections (Figure 3.3a) and injections of diluted cell culture medium containing mAb (Figure 3.2a) gave sensorgrams with similar profiles (linear mass accumulation during injection and very slow dissociation rates of the formed macromolecular complexes). This observation strongly suggested that the

interaction between mAb and immobilized PS0215 was highly specific and that culture media components did not interfere significantly with detection. That is, if analytes other than mAb, present in the medium at the end of the culture, had bound to PS0125, one would have expected that the corresponding sensorgram profile would have been different from the ones related to pure mAb injections. These results further supported our decision to use surface-immobilized PS0215 in our quantification assay. Using this sensorchip set of surfaces, a 1/20 dilution of a 10 day-old cell culture medium sample (Figure 3.2) gave an initial reaction rate value (Table 3.1) within the linear range of our calibration curve (Figure 3.3a). These data demonstrated that bioactive mAb concentration at the end of our first baffled flask culture was 0.48 g/L, which is a standard value for batch mAb production (Moffet, personal communication).

Ageing of PS0215 surfaces was then investigated by injecting diluted spent medium over both PS0215 and control surfaces for 250 cycles. As shown in Figure 3.3c, initial reaction rate corresponding to mAb binding to immobilized PS0215 was observed to decrease with injection number. This drift would have to be taken into account for at-line experiments. We anticipated that injections of a standard of known concentration at set intervals (every 12 h) would permit our calibration curve to be reajusted and thus remain precise and accurate throughout the culture period.

3.5.3. Off-line validation of SPR measurements

After having established which experimental strategy would be the most suitable to determine bioactive mAb concentration, we performed 10-day long 500 mL baffled-flask hybridoma cell cultures (in triplicate) for which mAb concentration was followed off-line by SPR. As shown in Figure 3.4a, cells grew exponentially up to 57 h after inoculation at a specific rate of 0.033 h^{-1} ± 0.0012 h^{-1}. Meanwhile bioactive mAb concentration also increased at an exponential rate with a specific rate of 0.035 h^{-1} ± 0.0017 h^{-1} (see Figure 3.4c). These two specific rates are similar, which indicated that antibody production was growth-associated. After the cell growth phase (60 h), the cells started to die and the net bioactive antibody production rate decreased but was still positive and exponential (0.0062 h^{-1} ± 0.0005 h^{-1}).

In order to validate SPR off-line measurements, antibody present in filtered conditioned medium obtained from samples taken for cell viability and density measurements was analyzed by Western blot-densitometry (Figure 3.4c and 3.5). At the end of the culture, degradation products appeared (Figure 3.5), they were considered as non bioactive mAb fragments and were not taken into account for densitometry quantification since only bioactive antibody was quantified by SPR. Antibody levels quantified by Western blotting were in excellent agreement with antibody concentration obtained by off-line SPR-based measurements (R^2 = 0.95, Figure 3.4c) as previously observed in our previous study examining myc-tag protein production (Jacquemart et al., in Press).

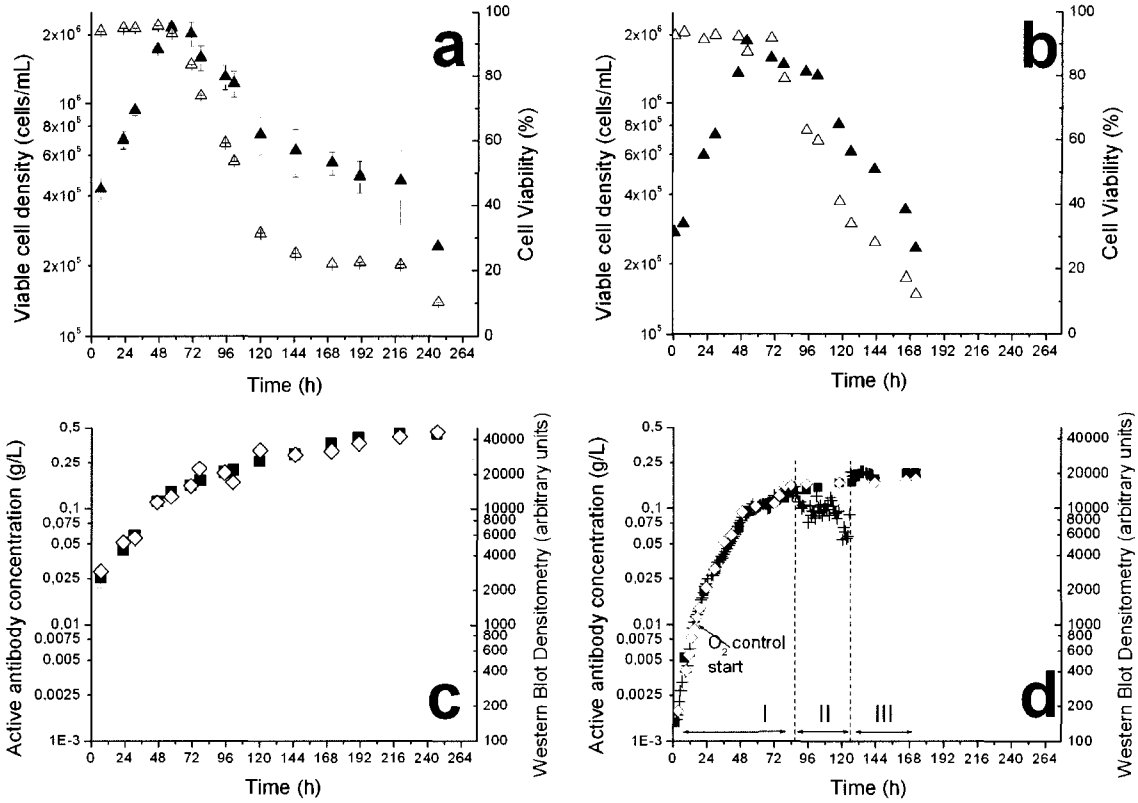


Figure 3.4. Shake flask and bioreactor hybridoma cell culture monitoring. (a,b) Cell density (▲) and viability (Δ) evaluated off-line by trypan blue exclusion method in flask cultures and bioreactor culture respectively. (c,d) (■) Off-line and at-line (+) quantification of bioactive antibody by SPR biosensing and off-line quantification by Western blotting followed by densitometry (◊) for flask cultures (c) and bioreactor culture (d). In panel (d), I and III areas correspond to periods of time during which in-line filter was functional, while II corresponds to period of time during which the in-line filter was damaged.

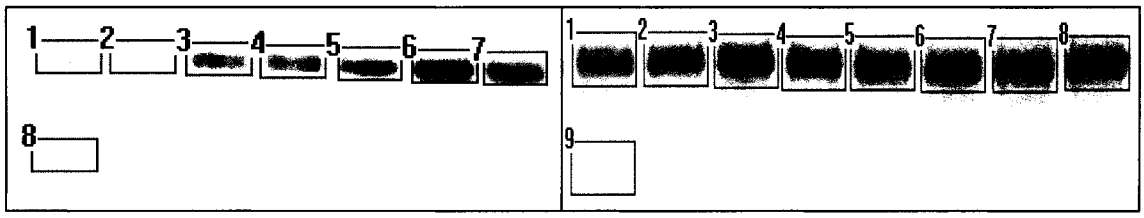


Figure 3.5. Western blot and densitometry off-line analysis of centrifuged samples manually taken during the flask cultures. Numbered squares correspond to areas that were used to perform densitometry analysis. (a) Squares '1' to '7' correspond to samples harvested at 7, 22, 31, 47, 57, 71, 78 h respectively, square '8' is for background correction (b) Squares '1' to '8' correspond to samples harvested at 95, 101, 120, 145, 171, 191, 220, 247 h respectively, square '9' is for background correction.

3.5.4. At-line measurement of bioactive mAb concentration along a bioreactor culture

We then performed hybridoma cell culture in a 3.5-L bioreactor to which our SPR biosensor was harnessed as previously described (Jacquemart et al., in Press). Prior to initiating the culture, two sets of PS0215 and control surfaces were freshly prepared by taking advantage of the four independent flow cells available on each sensorchip. Surface calibrations were performed as described above (data not shown). Continuous delivery of filtered culture medium to one biosensor vial was synchronized with an automated biosensor protocol allowing for measurements of bioactive mAb concentration every hour throughout the duration of the entire culture (172 hours). In addition, cell culture samples were manually taken twice a day, through the bioreactor sampling port, in order to evaluate cell growth and viability as well as to prepare cell-

free samples for subsequent off-line SPR measurements and quantification by Western blotting and densitometry.

In the case of bioreactor batch culture, cells grew exponentially from 7 to 52 h at a specific rate of 0.039 h^{-1} ± 0.0019, which was higher than for flask culture (0.035 h^{-1} ± 0.0017 h^{-1}). We attributed this increase to a better control of culture parameters in bioreactor. The growth phase was thus shorter in bioreactor than in flasks but the maximal cell densities were similar in both cases (2 x 10^6 cells/mL, see Figure 3.4a and b), suggesting that the yield in cell per medium nutrient content was similar in both cultures. After four days, cell viability decreased more rapidly in bioreactor as compared to shake flask cultures (negative specific rates of -0.0094 h^{-1} ± 0.0012 and -0.022 h^{-1} ± 0.0015 in bioreactor and shake flasks, respectively), hence limiting bioreactor culture to 172 h (versus 247 h in shake flasks). This is more likely to be attributed to increased shear stress during agitation.

Figure 3.4d shows results for at-line quantification of bioactive mAb concentration (+ symbols). During the first 86 hours (Phase I of Figure 3.4d) mAb concentration increased as expected. However, after 86 hours (phase II in Figure 3.4d), at-line quantification showed a sudden decrease in bioactive mAb concentration as well as an increased variability in the calculated values. Previous results from shake flask cultures indicated that such a decrease in bioactive mAb concentration could not be attributed to mAb degradation. We then hypothesized that such a variation was due to problem with our experimental setup. This was actually confirmed since a visual inspection of the in-line filter revealed that the latter was clogged and possibly damaged.

We thus postulated that cells and cell debris had been injected over the biosensor surface, which would explain our sporadic phase II results. Therefore, the in-line filter was replaced, the biosensor microfluidic parts were unclogged and at-line monitoring was continued using the remaining fresh PS0215 and control surfaces we had previously prepared and calibrated (Figure 3.4d, phase III). As expected, at-line concentration measurements for the end of the culture were observed to be consistent with those recorded during the early stages of the culture (Figure 3.4d, phase I).

After at-line monitoring and extensive cleanup of the biosensor, a new set of PS0215 and control surfaces was prepared in order to validate at-line SPR results. Centrifuged samples collected for cell viability and density measurements were then manually filtered prior to dilution and injection on both surfaces after calibration. In parallel, mAb concentrations were also evaluated by quantitative Western blotting. As can be see in Figure 3.4d, our hypothesis of in-line filter failure was confirmed by both SPR (closed squares) and Western blot (open diamonds) quantification.

3.6. Conclusions

In the present study, we have demonstrated that an experimental setup harnessing an SPR-based biosensor to a bioreactor is suitable for at-line monitoring of bioactive monoclonal antibody concentration. In order to monitor production from the very beginning to the end of the culture, we optimized our SPR measurements by selecting a high affinity antibody binder as ligand to be immobilized at the surface of our biosensor. Off-line SPR and western blotting experiments were in excellent agreement with at-line

measurements, except for the few hours during which the in-line filter was damaged. Similar problems with in-line filter were already noticed by Ozturk and colleagues in attempts to at-line monitor antibody concentrations by HPLC (Ozturk et al., 1995). In future experiments, this pitfall can be easily solved by aseptically changing the in-line filter daily.

We were thus able to demonstrate the robustness of our novel SPR at-line quantification method that enabled concentration measurement every hour. Our experimental results suggest that higher frequencies for concentration determination could be attained without drastic modifications of the experimental protocol since 30 s long injections of diluted medium are sufficient for accurate determination

A further step in at-line culture characterization would be to quantify both total and bioactive antibody concentrations. We believe that our experimental setup is versatile enough to achieve this goal. On a similar note, Canziani and colleagues (Canziani et al., 2004) developed a multiple injection SPR assay in which an Fc-specific antibody was immobilized at the sensorchip surface to determine total antibody concentration although subsequent injection of antigen over captured mAb would be necessary to permit bioactivity assessment. An alternative strategy would be to perform both total and bioactive mAb quantifications in parallel. That is, two of the four available surfaces on a sensor chip could be dedicated to total mAb concentration measurements via anti-Fc antibody interactions, while bioactive mAb concentration could be measured as described in this manuscript using the two remaining surfaces of the biosensor chip.

Our experimental approach has the great advantage of being adaptable to any protein for which of a specific high-affinity binding partner is available. Therefore, the coupling of an SPR biosensor to a bioreactor constitutes a powerful tool for at-line monitoring, control and optimization of bioreactor protein production.

3.7. Acknowledgements

This work was supported by the Canada Research Chair on Protein-enhanced Biomaterials (G.D.C.), the Canada Research Chair on the Development of Metabolic Engineering Tools (M.J.) and by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

3.8. References

Andersen, D. C., Reilly, D. E. 2004. Current Opinion in Biotechnology 15, 456-62

Baker, K. N., Rendall, M. H., Patel, A., Boyd, P., Hoare, M., Freedman, R. B., James, D. C. 2002. Trends in Biotechnology 20, 149-56

Birch, J. R., Racher, A. J. 2006. Advanced Drug Delivery Reviews 58, 671-85

Boozer, C., Kim, G., Cong, S., Guan, H., Londergan, T. 2006. Current Opinion in Biotechnology 17, 400-5

Canziani, G. A., Klakamp, S., Myszka, D. G. 2004. Analytical Biochemistry 325, 301-7

De Crescenzo, G., Litowski, J. R., Hodges, R. S., O'Connor-McCourt, M. D. 2003. Biochemistry 42, 1754-63

de Mol, N. J., Dekker, F. J., Broutin, I., Fischer, M. J., Liskamp, R. M. 2005. Journal of Medicinal Chemistry 48, 753-63

DeLisa, M. P., Li, J., Rao, G., Weigand, W. A., Bentley, W. E. 1999. Biotechnology and Bioengineering 65, 54-64

DiGiacomo, R. A., Xie, L., Cullen, C., Indelicato, S. R. 2004. Analytical Biochemistry 327, 165-75

Duverger, E., Frison, N., Roche, A. C., Monsigny, M. 2003. Biochimie 85, 167-79

Gebbert, A., Alvarez-Icaza, M., Peters, H., Jager, V., Bilitewski, U., Schmid, R. D. 1994. Journal of Biotechnology 32, 213-20

Hisiger, S., Jolicoeur, M. 2005. Journal of Biotechnology 117, 325-36

Jacquemart, R., Chavane, N., Durocher, Y., Hoemann, C., De Crescenzo, G., Jolicoeur, M. in Press. Biotechnology and Bioengineering

Jolicoeur, M., Chavarie, C., Carreau, P., Archambault, J. 1992. Biotechnology and Bioengineering 39, 511-521

Jones, J. J., Bridges, A. M., Fosberry, A. P., Gardner, S., Lowers, R. R., Newby, R. R., James, P. J., Hall, R. M., Jenkins, O. 2004. Journal of Biotechnology 109, 201-11

Jones, J. J., Wilkins, C. L., Cai, Y., Beitle, R. R., Liyanage, R., Lay, J. O., Jr. 2005. Biotechnology Progress 21, 1754-8

Karlsson, R. 2004. Journal of Molecular Recognition 17, 151-61

Karlsson, R., Fagerstam, L., Nilshans, H., Persson, B. 1993. Journal of Immunological Methods 166, 75-84

Karlsson, R., Roos, H., Fagerstam, L., Persson, B. 1994. Methods: A companion to methods in enzymology 6, 99-110

Kikuchi, Y., Uno, S., Nanami, M., Yoshimura, Y., Iida, S., Fukushima, N., Tsuchiya, M. 2005. Journal of Bioscience and Bioengineering 100, 311-7

Kohli, B. M., Ostermeier, C. 2003. Protein Expression and Purification 28, 362-7

Lee, K. H., Joung, H. A., Ahn, J. H., Kim, K. O., Oh, I. S., Shin, Y. B., Kim, M. G., Kim, D. M. 2007. Analytical Biochemistry 366, 170-4

Leonard, P., Safsten, P., Hearty, S., McDonnell, B., Finlay, W., O'Kennedy, R. 2007. Journal of Immunological Methods 323, 172-9

Liu, B., Li, S., Hu, J. 2004. American journal of pharmacogenomics: genomics-related research in drug development and clinical practice 4, 263-76

Liu, S., Bugos, R. C., Dharmasiri, N., Su, W. W. 2001. Journal of Biotechnology 87, 1-16

Lu, C., Albano, C. R., Bentley, W. E., Rao, G. 2002. Biotechnology and Bioengineering 79, 429-37

McDonnell, J. M. 2001. Current Opinion in Chemical Biology 5, 572-7

Moffett, S., Mélançon, D., De Crescenzo, G., St-Pierre, C., DesChenes, F., Saragovi, H. U., Gold, P., Cuello, A. C. in Press. Hybridoma

Ozturk, S., Thrift, J., Blackie, J., Naveh, D. 1995. Biotechnology and Bioengineering 48, 201-206

Pavlou, A. K., Belsey, M. J. 2005. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik 59, 389-96

Pol, E., Karlsson, R., Roos, H., Jansson, A., Xu, B., Larsson, A., Jarhede, T., Franklin, G., Fuentes, A., Persson, S. 2007. Journal of Molecular Recognition 20, 22-31

Reischer, H., Schotola, I., Striedner, G., Potschacher, F., Bayer, K. 2004. Journal of Biotechnology 108, 115-25

Rich, R. L., Myszka, D. G. 2000. Current Opinion in Biotechnology 11, 54-61

Rich, R. L., Myszka, D. G. 2006. Journal of Molecular Recognition 19, 478-534

Richalet-Secordel, P. M., Rauffer-Bruyere, N., Christensen, L. L., Ofenloch-Haehnle, B., Seidel, C., Van Regenmortel, M. H. 1997. Analytical Biochemistry 249, 165-73

Roque, A. C., Lowe, C. R., Taipa, M. A. 2004. Biotechnology Progress 20, 639-54

Sigmundsson, K., Masson, G., Rice, R., Beauchemin, N., Obrink, B. 2002. Biochemistry 41, 8263-76

Su, W. W., Guan, P., Bugos, R. C. 2004. Biotechnology and Bioengineering 85, 610-9

Vostiar, I., Tkac, J., Mandenius, C. F. 2005. Analytical Biochemistry 342, 152-9

Wendler, J., Vallejo, L. F., Rinas, U., Bilitewski, U. 2005. Analytical and bioanalytical chemistry 381, 1056-64

Zeder-Lutz, G., Benito, A., Van Regenmortel, M. H. 1999. Journal of Molecular Recognition 12, 300-9

CHAPITRE 4. DISCUSSION GÉNÉRALE

Dans le cadre de l'optimisation et du contrôle de bioprocédés, et plus particulièrement dans le cas de la production de protéines recombinantes comme les anticorps monoclonaux, la possibilité de connaître en temps réel la quantité totale de protéine produite mais surtout la quantité bioactive permettrait d'améliorer grandement la compréhension des systèmes d'expression de protéines et donc d'augmenter le rendement et la qualité du produit final. La technologie de la SPR, employée aujourd'hui communément pour la caractérisation de protéines, la détermination de leur concentration ou encore le calcul de constantes cinétiques ou thermodynamiques, se présente comme un outil idéal pour le suivi en ligne de la production de protéines. En effet, la technologie de la SPR, appliquée dans les appareils comme le Biacore 3000, présente de nombreux avantages : les mesures sont automatisées, la préparation de l'échantillon est limitée (filtre 0.22 μm ou centrifugation), et surtout les protéines n'ont pas besoin d'être étiquetées puisque l'on peut étudier l'interaction entre la protéine produite et son ligand naturel. Après avoir montré dans des travaux précédents qu'il était possible de suivre en ligne l'accumulation relative de protéines produites (Jacquemart et al., in Press), en couplant un bioréacteur à un biocapteur SPR, l'objectif ici était de quantifier en ligne la quantité d'anticorps bioactifs produit par une lignée d'hybridome en utilisant le même montage expérimental.

La première étape pour ce faire était de choisir quel ligand utiliser pour les mesures SPR ainsi que décider de la méthode de détermination de la concentration.

Deux ligands qui permettaient l'attachement spécifique de l'anticorps produit étaient disponibles : la protéine PSMA ou uniquement une portion linéaire de cette protéine, le peptide PS0215, dont la séquence correspond à l'épitope reconnu par l'anticorps. Il a été établi que la sensibilité de la mesure ainsi que la précision étaient bien meilleures lorsque le ligand utilisé est le peptide PS0215 plutôt que la protéine PSMA. De plus, la possibilité de procéder aux mesures en condition de limitation par transfert de masse a grandement simplifié la méthode de détermination de la concentration. En effet, une simple courbe de calibration, donnant une relation linéaire entre les données SPR et la concentration en anticorps bioactif, a pu être utilisée. Lors de l'étude de la robustesse du biocapteur, il a été constaté qu'au fur et à mesure des régénérations, le signal obtenu lors de l'injection répétée d'un même échantillon diminuait en intensité. L'injection périodique d'un standard de concentration connue a permis de prendre cela en compte et de corriger la courbe de calibration au cours de l'expérience.

Une fois la méthode de détermination de la concentration établie, une validation hors-ligne avec une culture standard en flacons agités en mode cuvée a été effectuée en triplicata. Les échantillons prélevés manuellement deux fois par jour durant les dix jours de culture ont d'abord été quantifiés avec la méthode SPR puis été analysés par densitométrie après « Western blotting », une méthode plus traditionnelle. L'excellente corrélation entre les deux séries de mesures, $R^2 = 0{,}95$, a démontré la validité ainsi que l'applicabilité de notre méthode pour un suivi en ligne.

La dernière étape du projet consistait à mettre en œuvre cette technique lors d'une culture en bioréacteur des cellules hybridomes. Le couplage, réalisé par le biais

d'un port de prélèvement du bioréacteur, consistait en quatre éléments principaux : une ligne de très petit diamètre (0,2 mm) pour limiter le volume mort, une colonne de décantation, suivie d'un filtre de 0,22 μm et enfin d'une pompe péristaltique opérant à 50 μL/min. En sortie de pompe, le surnageant, débarrassé de débris cellulaires, était échantillonné (pour analyses ultérieures) et injecté de manière automatisée à la surface du biocapteur SPR. Après 86 h de culture, les mesures SPR ont commencé à décroître en intensité, ce qui n'a pas eu lieu lors de la culture en flacons agitées. Une inspection visuelle du filtre en ligne a suggéré que ce dernier était bouché par une quantité trop importante de débris cellulaires. De plus, les échantillons prélevés manuellement pendant la culture, en parallèle des échantillons automatiques, ont été testés en SPR. Or, tout comme les échantillons quantifiés par Western Blotting par la suite, le profil de production restait similaire à celui de la culture en flacons. Enfin, une fois le filtre en ligne et les surfaces du biocapteur changées, les résultats SPR en ligne suivent à nouveau la tendance habituelle de production. Il a donc été vérifié que le biais dans la quantification SPR était dû à un problème du filtre en ligne, bouché par une quantité trop importante de débris cellulaires, et il a été suggéré que pour de futures cultures, ce filtre soit remplacé aseptiquement par un nouveau filtre tous les jours pour éviter cette situation.

Enfin, même si le profil de production en anticorps est similaire dans le cas de la culture en flacons et de la culture en bioréacteur (0,033 h^{-1} ± 0,0012 h^{-1} et 0,039 h^{-1} ± 0,0019 h^{-1} respectivement), la culture a duré seulement 175 h en bioréacteur contre 275 h en flacons, et les taux de production spécifique ne sont pas les mêmes aussi bien en

phase de croissance cellulaire (0,035 h^{-1} ± 0,0017 h^{-1} et 0,071 h^{-1} ± 0,0026 h^{-1} respectivement) qu'en phase de mortalité (0,0062 h^{-1} ± 0,0005 h^{-1} et 0,0011 h^{-1} ± 0,00005 h^{-1} respectivement). Ces différences peuvent s'expliquer partiellement par le fait que l'environnement est différent en flacons et en bioréacteur et que les forces de cisaillement exercées sur les cellules ne sont pas les mêmes. Cependant, de plus amples expériences devraient être effectuées pour vérifier ces hypothèses.

CHAPITRE 5. CONCLUSION

Dans ce projet de maîtrise, nous avons démontré qu'il est possible de quantifier en ligne la production d'anticorps par une lignée d'hybridome en bioréacteur en utilisant un couplage avec un biocapteur SPR. Nous avons optimisé la méthode de détection de l'anticorps afin d'avoir un signal de bonne qualité, et ce, du début à la fin de la culture. De plus, notre méthode de détection nous a permis de procéder à des mesures rapides, d'une durée totale de moins de cinq minutes pour un cycle SPR. Bien que dans la présente étude, une mesure SPR avait lieu par heure, si cela s'avérait nécessaire, la cadence pourrait facilement être augmentée.

Concernant le couplage du bioréacteur et du biocapteur SPR, la colonne de décantation insérée par un des ports de prélèvement du bioréacteur, suivi par un filtre tangentiel de 0.22 μm, et une pompe fonctionnant continuellement à un faible débit (50 μL/min), a permis de n'envoyer que du surnageant débarrassé de débris cellulaires vers le biocapteur. De plus, l'utilisation d'une tubulure de très faible diamètre a grandement minimisé les volumes morts, permettant ainsi de limiter le décalage entre les concentrations mesurées et celles effectives dans le bioréacteur.

Enfin, les résultats de la quantification par SPR, aussi bien pour un échantillonnage manuel lors de la culture en flacons, que pour un échantillonnage automatisé lors de la culture en bioréacteur, sont en excellente adéquation avec ceux obtenus par la quantification après « Western blotting » hors-ligne.

CHAPITRE 6. RECOMMANDATIONS

Les recommandations suivantes pourraient permettre d'améliorer le montage expérimental afin d'obtenir de meilleures performances.

Tout d'abord, comme cela a été constaté lors de la culture en bioréacteur, le filtre placé en amont du biocapteur SPR a une durée d'utilisation limitée. Dans l'optique de réaliser le couplage sur tout type de bioprocédés, aussi bien des cultures en mode cuvée qu'en perfusion, c'est-à-dire pour plusieurs dizaines de jours, il est conseillé de remplacer le filtre toutes les 24 heures afin d'éviter la rétention de protéines dans le filtre lorsque ce dernier accumule les débris. De plus, afin de limiter la quantité de débris qui se rendent jusqu'au filtre, il pourrait être envisagé de revoir le design de la colonne de décantation.

En ce qui concerne la quantification par SPR, l'idéal serait de quantifier à la fois la quantité totale d'anticorps dans le surnageant et la quantité bioactive. Pour ce faire, deux méthodes pourraient être testées. La première consisterait à mesurer les deux quantités l'une à la suite de l'autre en faisant un essai de type sandwich sur la surface du biocapteur. Un anticorps anti-espèce serait utilisé comme ligand, puis l'anticorps produit serait injecté, donnant l'information sur la quantité totale. Il s'en suivrait une injection de PSMA sur cette même surface afin d'obtenir une estimation de la quantité bioactive à l'aide du profil d'interaction entre PSMA et l'anticorps d'intérêt précédemment capturé. La deuxième méthode, peut-être plus simple même si elle prendrait plus de temps, serait de faire les deux mesures l'une à la suite de l'autre. Sur les deux premières surfaces de la

puce du biocapteur, un anticorps anti-espèce comme ligand pourrait être utilisé sur l'une, et l'autre comme contrôle pour le référençage. La deuxième paire de surfaces pourrait être mise à profit en immobilisant sur l'une d'elles le peptide PS0215 comme ligand (la dernière surface étant utilisée comme contrôle).

Enfin, dans cette étude, il a été montré que la surface est valide pour seulement 250 essais. Pour réaliser un suivi en ligne sur des bioprocédés de longue durée, il serait possible d'avoir plusieurs surfaces de prêtes avant même le début de la culture et d'en changer toutes les 250 injections. La mesure de concentration est relative, et non absolue, et ne nécessite donc pas d'avoir la même surface tout au long de l'expérience du moment qu'une courbe de calibration est établie pour chaque nouvelle surface.

Notre approche expérimentale a le grand avantage de pouvoir être transposable à tout type de molécule, sous réserve d'avoir un partenaire de liaison disponible. En conséquence, le couplage bioréacteur-biocapteur SPR constitue une nouvelle approche expérimentale qui pourrait s'avérer des plus utiles dans le cadre du suivi en ligne de bioprocédés, tant pour le développement que pour l'optimisation de ces derniers.

RÉFÉRENCES

Adu, D., Cockwell, P., Ives, N. J., Shaw, J., & Wheatley, K. (2003). Interleukin-2 receptor monoclonal antibodies in renal transplantation: meta-analysis of randomised trials. *Bmj, 326*(7393), 789.

Alfthan, K. (1998). Surface plasmon resonance biosensors as a tool in antibody engineering. *Biosens Bioelectron, 13*(6), 653-663.

Andersen, D. C., & Reilly, D. E. (2004). Production technologies for monoclonal antibodies and their fragments. *Curr Opin Biotechnol, 15*(5), 456-462.

Bakker, H., Bardor, M., Molthoff, J. W., Gomord, V., Elbers, I., Stevens, L. H., et al. (2001). Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci U S A, 98*(5), 2899-2904.

Battaglia, T. M., Masson, J. F., Sierks, M. R., Beaudoin, S. P., Rogers, J., Foster, K. N., et al. (2005). Quantification of cytokines involved in wound healing using surface plasmon resonance. *Anal Chem, 77*(21), 7016-7023.

Ben Khelifa, M.-L. (2000). *Ingénierie des paramètres cinétiques de l'interaction antigène-anticorps.* Joseph Fourier, Grenoble.

Berger, M., Shankar, V., & Vafai, A. (2002). Therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Am J Med Sci, 324*(1), 14-30.

Besenicar, M., Macek, P., Lakey, J. H., & Anderluh, G. (2006). Surface plasmon resonance in protein-membrane interactions. *Chem Phys Lipids, 141*(1-2), 169-178.

Bibila, T. A., & Robinson, D. K. (1995). In pursuit of the optimal fed-batch process for monoclonal antibody production. *Biotechnol Prog, 11*(1), 1-13.

Birch, J. R., & Racher, A. J. (2006). Antibody production. *Adv Drug Deliv Rev, 58*(5-6), 671-685.

Boes, M. (2000). Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol, 37*(18), 1141-1149.

Booy, E. P., Johar, D., Maddika, S., Pirzada, H., Sahib, M. M., Gehrke, I., et al. (2006). Monoclonal and bispecific antibodies as novel therapeutics. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 54*(2), 85-101.

Boozer, C., Kim, G., Cong, S., Guan, H., & Londergan, T. (2006). Looking towards label-free biomolecular interaction analysis in a high-throughput format: a review of new surface plasmon resonance technologies. *Curr Opin Biotechnol, 17*(4), 400-405.

Cai, Y. D., Zhou, G. P., & Chou, K. C. (2003). Support vector machines for predicting membrane protein types by using functional domain composition. *Biophys J, 84*(5), 3257-3263.

Chang, S. S. (2004a). Monoclonal antibodies and prostate-specific membrane antigen. *Curr Opin Investig Drugs, 5*(6), 611-615.

Chang, S. S. (2004b). Overview of prostate-specific membrane antigen. *Rev Urol, 6 Suppl 10*, S13-18.

Christensen, L. L. (1997). Theoretical analysis of protein concentration determination using biosensor technology under conditions of partial mass transport limitation. *Anal Biochem, 249*(2), 153-164.

DeLisa, M. P., Li, J., Rao, G., Weigand, W. A., & Bentley, W. E. (1999). Monitoring GFP-operon fusion protein expression during high cell density cultivation of Escherichia coli using an on-line optical sensor. *Biotechnology and Bioengineering, 65*(1), 54-64.

Derouazi, M., Girard, P., Van Tilborgh, F., Iglesias, K., Muller, N., Bertschinger, M., et al. (2004). Serum-free large-scale transient transfection of CHO cells. *Biotechnol Bioeng, 87*(4), 537-545.

Dubois, M. E., Yoshihara, P., & Slifka, M. K. (2005). Antibody-mediated protection against respiratory viral infection. *Semin Respir Crit Care Med, 26*(6), 635-642.

Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M., & Boyle, P. (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol, 18*(3), 581-592.

Griffin, D., Levine, B., Tyor, W., Ubol, S., & Despres, P. (1997). The role of antibody in recovery from alphavirus encephalitis. *Immunol Rev, 159*, 155-161.

Harris, M. (2004). Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *Lancet Oncol, 5*(5), 292-302.

Hisiger, S., & Jolicoeur, M. (2005). A multiwavelength fluorescence probe: is one probe capable for on-line monitoring of recombinant protein production and biomass activity? *Journal of Biotechnology, 117*(4), 325-336.

Jacquemart, R., Chavane, N., Durocher, Y., Hoemann, C., De Crescenzo, G., & Jolicoeur, M. (in Press). At-line Monitoring of Bioreactor Protein Production by Surface Plasmon Resonance. *Biotechnology and Bioengineering.*

Janeway, C., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. (2001). *Immunobiology fifth edition The immune system in health and disease.* Garland Science Publishing. Consulté le 10 août 2007, tiré de Medline: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowTOC&rid=imm.TOC&depth=10.

Jason-Moller, L., Murphy, M., & Bruno, J. (2006). UNIT 19.13 Overview of Biacore Systems and Their Applications. In Coligan, Dunn, Speicher & Wingfield (éds.), *Current Protocols in Protein Science*: John Wiley and Sons, Inc.

Jones, J. J., Wilkins, C. L., Cai, Y., Beitle, R. R., Liyanage, R., & Lay, J. O., Jr. (2005). Real-time monitoring of recombinant bacterial proteins by mass spectrometry. *Biotechnology Progress, 21*(6), 1754-1758.

Junker, B. H., & Wang, H. Y. (2006). Bioprocess monitoring and computer control: key roots of the current PAT initiative. *Biotechnol Bioeng, 95*(2), 226-261.

Karlsson, R. (2004). SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas. *J Mol Recognit, 17*(3), 151-161.

Karlsson, R., Fagerstam, L., Nilshans, H., & Persson, B. (1993). Analysis of active antibody concentration. Separation of affinity and concentration parameters. *J Immunol Methods, 166*(1), 75-84.

Karlsson, R., & Falt, A. (1997). Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors. *J Immunol Methods, 200*(1-2), 121-133.

Karlsson, R., Michaelsson, A., & Mattsson, L. (1991). Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J Immunol Methods, 145*(1-2), 229-240.

Karlsson, R., Roos, H., Fagerstam, L., & Persson, B. (1994). Kinetic and Concentration Analysis Using BIA Technology. *Methods, 6*(2), 99-110.

Kerr, M. A. (1990). The structure and function of human IgA. *Biochem J, 271*(2), 285-296.

Kikuchi, Y., Uno, S., Nanami, M., Yoshimura, Y., Iida, S., Fukushima, N., et al. (2005). Determination of concentration and binding affinity of antibody fragments by use of surface plasmon resonance. *J Biosci Bioeng, 100*(3), 311-317.

Ko, K., & Koprowski, H. (2005). Plant biopharming of monoclonal antibodies. *Virus Res, 111*(1), 93-100.

Kreitman, R. J. (2006). Immunotoxins for targeted cancer therapy. *Aaps J, 8*(3), E532-551.

Larson, T. M., Gawlitzek, M., Evans, H., Albers, U., & Cacia, J. (2002). Chemometric evaluation of on-line high-pressure liquid chromatography in mammalian cell cultures: analysis of amino acids and glucose. *Biotechnol Bioeng, 77*(5), 553-563.

Leslie, G. A., & Martin, L. N. (1978). Structure and function of serum and membrane immunoglobulin D (IgD). *Contemp Top Mol Immunol, 7*, 1-49.

Liu, S., Bugos, R. C., Dharmasiri, N., & Su, W. W. (2001). Green fluorescent protein as a secretory reporter and a tool for process optimization in transgenic plant cell cultures. *Journal of Biotechnology, 87*(1), 1-16.

Lu, C., Albano, C. R., Bentley, W. E., & Rao, G. (2002). Differential rates of gene expression monitored by green fluorescent protein. *Biotechnology and Bioengineering, 79*(4), 429-437.

Luk, J. M., & Wong, K. F. (2006). Monoclonal antibodies as targeting and therapeutic agents: prospects for liver transplantation, hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Clin Exp Pharmacol Physiol, 33*(5-6), 482-488.

Marino, I. R., Doria, C., Scott, V. L., Foglieni, C. S., Lauro, A., Piazza, T., et al. (2004). Efficacy and safety of basiliximab with a tacrolimus-based regimen in liver transplant recipients. *Transplantation, 78*(6), 886-891.

Moffett, S., Mélançon, D., De Crescenzo, G., St-Pierre, C., DesChenes, F., Saragovi, H. U., et al. (in Press). Preparation and Characterization of New Anti-PSMA Monoclonal Antibodies With Potential Clinical Uses. *Hybridoma.*

Morton, T. A., Myszka, D. G., & Chaiken, I. M. (1995). Interpreting complex binding kinetics from optical biosensors: a comparison of analysis by linearization, the

integrated rate equation, and numerical integration. *Anal Biochem, 227*(1), 176-185.

Muller-Renaud, S., Dupont, D., & Dulieu, P. (2004). Quantification of beta casein in milk and cheese using an optical immunosensor. *J Agric Food Chem, 52*(4), 659-664.

Muller-Renaud, S., Dupont, D., & Dulieu, P. (2005). Development of a biosensor immunoassay for the quantification of alphas1-casein in milk. *J Dairy Res, 72*(1), 57-64.

Myszka, D. G. (1997). Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Curr Opin Biotechnol, 8*(1), 50-57.

Myszka, D. G. (1999). Improving biosensor analysis. *J Mol Recognit, 12*(5), 279-284.

Nashan, B., Light, S., Hardie, I. R., Lin, A., & Johnson, J. R. (1999). Reduction of acute renal allograft rejection by daclizumab. Daclizumab Double Therapy Study Group. *Transplantation, 67*(1), 110-115.

Noll, T., & Biselli, M. (1998). Dielectric spectroscopy in the cultivation of suspended and immobilized hybridoma cells. *J Biotechnol, 63*(3), 187-198.

O'Connor-McCourt, M., De Crescenzo, G., Lortie, R., Lenferink, A., & Grothe, S. (1998). 11. The analysis of surface plasmon resonance-based biosensor data using numerical integration. In P. Lundhal, A. Lundqvist & E. Greijer (éds.), *Quantitative analysis of biospecific interactions* (pp. 175-190): Harwood academic publishers.

Ozturk, S., Thrift, J., Blackie, J., & Naveh, D. (1995). Real-time monitoring of protein secretion in mammalian cell fermentation: measurement of monoclonal antibodies using a computer-controlled HPLC system (BioCad/RPM). *Biotechnology and Bioengineering, 48*(3), 201-206.

Patti, J. M. (2004). A humanized monoclonal antibody targeting Staphylococcus aureus. *Vaccine, 22 Suppl 1*, S39-43.

Pavlou, A. K., & Belsey, M. J. (2005). The therapeutic antibodies market to 2008. *Eur J Pharm Biopharm, 59*(3), 389-396.

Perlmann, P., Perlmann, H., ElGhazali, G., & Blomberg, M. T. (1999). IgE and tumor necrosis factor in malaria infection. *Immunol Lett, 65*(1-2), 29-33.

Pharmacia Biosensor AB, U., Sweden. (1991). *BIAcore System Manual.*

Pol, E., Karlsson, R., Roos, H., Jansson, A., Xu, B., Larsson, A., et al. (2007). Biosensor-based characterization of serum antibodies during development of an anti-IgE immunotherapeutic against allergy and asthma. *J Mol Recognit, 20*(1), 22-31.

Reichert, J. M., & Valge-Archer, V. E. (2007). Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov, 6*(5), 349-356.

Reischer, H., Schotola, I., Striedner, G., Potschacher, F., & Bayer, K. (2004). Evaluation of the GFP signal and its aptitude for novel on-line monitoring strategies of recombinant fermentation processes. *Journal of Biotechnology, 108*(2), 115-125.

Richalet-Secordel, P. M., Rauffer-Bruyere, N., Christensen, L. L., Ofenloch-Haehnle, B., Seidel, C., & Van Regenmortel, M. H. (1997). Concentration measurement of unpurified proteins using biosensor technology under conditions of partial mass transport limitation. *Anal Biochem, 249*(2), 165-173.

Roque, A. C., Lowe, C. R., & Taipa, M. A. (2004). Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification. *Biotechnol Prog, 20*(3), 639-654.

Schmidt, F. R. (2004). Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol, 65*(4), 363-372.

Sharkey, R. M., & Goldenberg, D. M. (2005). Perspectives on cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies. *J Nucl Med, 46 Suppl 1*, 115S-127S.

Simmons, L. C., Reilly, D., Klimowski, L., Raju, T. S., Meng, G., Sims, P., et al. (2002). Expression of full-length immunoglobulins in Escherichia coli: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies. *J Immunol Methods, 263*(1-2), 133-147.

Slovin, S. F. (2005). Targeting novel antigens for prostate cancer treatment: focus on prostate-specific membrane antigen. *Expert Opin Ther Targets, 9*(3), 561-570.

Spiegelberg, H. L. (1989). Biological role of different antibody classes. *Int Arch Allergy Appl Immunol, 90 Suppl 1*, 22-27.

Szabo, A., Stolz, L., & Granzow, R. (1995). Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA). *Curr Opin Struct Biol, 5*(5), 699-705.

Torreri, P., Ceccarini, M., Macioce, P., & Petrucci, T. C. (2005). Biomolecular interactions by Surface Plasmon Resonance technology. *Ann Ist Super Sanita, 41*(4), 437-441.

Trikha, M., Yan, L., & Nakada, M. T. (2002). Monoclonal antibodies as therapeutics in oncology. *Curr Opin Biotechnol, 13*(6), 609-614.

Tzakis, A. G., Kato, T., Nishida, S., Levi, D. M., Madariaga, J. R., Nery, J. R., et al. (2003). Preliminary experience with campath 1H (C1H) in intestinal and liver transplantation. *Transplantation, 75*(8), 1227-1231.

van der Merwe, P. (2001). Surface Plasmon Resonance. In U. Oxford University Press (éd.), *Protein-Ligand Interactions; A Practical Approach Volume 1: Hydrodynamics and Calorimetry* (1e éd., Vol. pp. 137-170).

Vanderplasschen, A., Hollinshead, M., & Smith, G. L. (1997). Antibodies against vaccinia virus do not neutralize extracellular enveloped virus but prevent virus release from infected cells and comet formation. *J Gen Virol, 78 (Pt 8)*, 2041-2048.

Weems, J. J., Jr., Steinberg, J. P., Filler, S., Baddley, J. W., Corey, G. R., Sampathkumar, P., et al. (2006). Phase II, randomized, double-blind, multicenter study comparing the safety and pharmacokinetics of tefibazumab to placebo for treatment of Staphylococcus aureus bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother, 50*(8), 2751-2755.

Wendler, J., Vallejo, L. F., Rinas, U., & Bilitewski, U. (2005). Application of an SPR-based receptor assay for the determination of biologically active recombinant bone morphogenetic protein-2. *Analytical and bioanalytical chemistry, 381*(5), 1056-1064.

Whitton, J. L., Slifka, M. K., Liu, F., Nussbaum, A. K., & Whitmire, J. K. (2004). The regulation and maturation of antiviral immune responses. *Adv Virus Res, 63*, 181-238.

ANNEXE 1. AT-LINE MONITORING OF BIOREACTOR PROTEIN PRODUCTION BY SURFACE PLASMON RESONANCE

At-line Monitoring of Bioreactor Protein Production by Surface Plasmon Resonance

R .Jacquemart[1], N. Chavane[1], Y. Durocher[2], C. Hoemann[1], G. De Crescenzo[1,3] and M. Jolicoeur[1,3,*]

[1] Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, Centre-ville Station, Montréal, Québec, Canada. [2] Bioprocess Sector, Biotechnology Research Institute (NRC), 6100 Royalmount Ave., H4P 2R2 Montréal, Québec, Canada. [3] These authors contributed equally to this work.

Running Title: At-line Monitoring of Bioreactor Protein Production by Surface Plasmon Resonance

***Corresponding Author**
Mario Jolicoeur, P.Eng., Ph.D.
Professor
Tel: 514-340-4711 ext. 4525
Fax: 514-340-4159
E-mail: mario.jolicoeur@polymtl.ca

ABSTRACT

An innovative and automated method for the at-line monitoring of secreted protein was developed by harnessing a Surface Plasmon Resonance-based biosensor to a bioreactor. The proof of concept was performed by following at-line the relative concentration of a secreted protein produced by transient transfection of mammalian cells in a bioreactor. Our results suggest that our approach can be readily applied to the at-line determination of both protein concentration and bioactivity. Our experimental setup and strategy can thus satisfy the needs related to the development of novel bioprocess control protocols in the context of the new process analytical technology that arises in the biopharmaceutical industry.

KEYWORDS

At-line protein monitoring, Bioreactor protein production, HEK 293 cells, Surface plasmon resonance, Transient transfection.

INTRODUCTION

A method allowing at-line monitoring of both protein concentration and bioactivity level, simultaneously, will significantly enhance academic and industrial research on secreted protein processes. Such monitoring capacity can accelerate cell line screening and optimization of culture parameters since the determination of protein concentration and bioactivity normally requires extended *post hoc* analysis (e.g. ELISA, Western Blot, bioassays). Few approaches have been developed aimed at monitoring protein production at-line. Among them, the fusion of a fluorescent reporter such as GFP to the protein of interest has been investigated (Jones et al., 2004). However, protein cleavage from its reporter or partial proteolysis can both result in a biased quantification of protein levels. Recently, a mass spectrometer (MS) connected to a bioreactor has been used to quantify multiple proteins present in cell culture media (Jones et al., 2005). Although at-line MS analysis can demonstrate protein integrity, there is still an unmet need for instantaneous monitoring of protein activity. We here demonstrate that, for a price comparable to that of mass spectrometry, our experimental setup consisting of a Surface Plasmon Resonance (SPR)-based biosensor harnessed to a bioreactor, allows for the robust at-line follow-up of the relative concentration of secreted protein. We also provide evidence that our experimental strategy can easily be adapted to follow both protein concentration and bioactivity at-line.

MATERIALS AND METHODS

Cell line and culture parameters

Human Embryonic Kidney (HEK) 293 EBNA1 cells were grown in suspension in HSFM medium supplemented with 1% FBS, at 37°C in a batch mode using a 3.5-L bioreactor (ChemapAG, Basel, Switzerland, 2.7-L working volume). Culture parameters were as follow: agitation speed was maintained at 60 RPM by a double helical ribbon impeller having the same geometrical ratios as previously published (Jolicoeur et al., 1992). Dissolved oxygen was measured by a polarographic probe (InPro 6800, Mettler Toledo, Mississauga, ON, Canada) connected to a data acquisition and control system (Virgo, Longueil, QC, Canada) and maintained at 50 ± 5 % from air saturation by continuous feed of an air/oxygen/5% CO_2 mixture in the headspace. pH was maintained at 7.2 ± 0.2.

24 hours after inoculation (2 x 10^5 cells.mL^{-1}), cells were transiently transfected with the pTT2-MP-RIIIED-E vector using polyethylenimine as a transfection vehicle (Durocher et al., 2002). This vector encodes MP-RIIIED-E, a chimeric protein corresponding to the membrane-proximal region of the TGF-β type III receptor ectodomain fused to a myc tag (N-terminus) for detection, to a His tag (C-terminus) for subsequent purification and to an E coil peptide (De Crescenzo et al., 2003a) for biosensor surface capture via interactions of the E coil moiety of the protein with its surface-immobilized binding partner, i.e., the K coil peptide (De Crescenzo et al., 2004; De Crescenzo et al., 2003b) (see *Vector and Secreted Protein* section below).

One hour post-transfection, the culture medium was continuously pumped in a decantation column (20-cm height, 0.5-cm diameter, flow rate 50 μL.min^{-1}) and the remaining cells/debris were continuously filtered with a tangential flow 0.22-μm filter (PALL, Canada) positioned at the inlet valve of an HPLC pump (Figure 1A). The total volume of the line from the bioreactor to the biosensor vial was approximately of 5 mL. Filtered cell-free culture medium was then continuously delivered to a modified 7-mm plastic vial placed in the BIACORE 3000 biosensor rack (BIACORE Inc., Piscataway, NJ, USA). At set intervals during the bioreactor cell culture, the biosensor was programmed to automatically sample, aliquot and prepare three filtered medium samples (undiluted, 1/3 and 1/6 dilutions in HBS/Tween biosensor running buffer (De Crescenzo et al., 2004)). Each sample was automatically injected for 240 s over a biosensor surface (25 °C, 50 μL.min^{-1} flow rate) on which the K coil peptide had been covalently immobilized using standard thiol chemistry (660 arbitrary Resonance Units, RUs) and over a mock surface (De Crescenzo et al., 2003b). Running buffer was then continuously injected (1000 s at 50 μL.min^{-1} flow rate) prior to anti-myc antibody injection (9E10 monoclonal antibody, SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, 1/200 dilution, 240 s at 10 μL.min^{-1}). Surface regeneration was performed by injecting two 5M guanidium hydrochloride pulses (20 μL each, 100 μL.min^{-1}). The modified sample vial was automatically emptied and rinsed between sample injections and prior to the next culture medium sampling. This cycle of events (3 h for each time point) was automatically repeated throughout the bioreactor cell culture with limited manual intervention (buffer tank and antibody vial

replenishment once a day). Biosensor curves were double-referenced (Rich and Myszka, 2000). Only data corresponding to injections of the undiluted sample are presented since similar trends were observed in diluted sample injection series.

Vector and secreted protein

Construction of the expression vector used in this study was performed using two vectors, i.e. pTT2 E5coil (De Crescenzo et al., 2003b) and pTT2 MP-RIIIED-K5 (De Crescenzo et al., 2004) in combination with a PCR-based strategy. That is, the vector used in this study presents the same features as pTT2 MP-RIIIED-K5 in which the cDNA encoding the K coil was replaced by the cDNA coding for the E coil using the following strategy. The cDNA encoding the E coil was PCR amplified using the pTT2 E5coil vector as template (kindly provided by Dr. M. O'Connor-McCourt, BRI, NRC) and the following primers, E_{sense} : 5'-TAGAGCGGCCGCGGTGGCGAGGTATCC-3' (*Not*I restriction site underlined) and $E_{antisense}$: 5'-TAGGATCCCTAATGGTGATGATGGTGATGACCGCCCTTCTCAAGTG-3' (*BamH*I restriction site underlined). The resulting fragment was digested with *Not*I/*BamH*I and ligated to pTT2 MP-TβRIIIED-K5 digested with the same enzymes. The construct was verified by sequencing. The amino acid sequence of the encoded protein (MP-RIIIED-E) is given in Figure 2.

Western blotting analysis and quantification by densitometry

10 μL of cell-free culture medium sample were loaded onto 15% polyacrylamide SDS-PAGE minigel and transferred to PVDF membrane. The membranes were blocked with 5 % w/v fat-free milk powder in TBS-Tween (50 mM Tris/150 mM NaCl/0.1% v/v Tween 20), then rinsed and incubated overnight with 1/5000-diluted anti-myc mouse monoclonal antibody in TBS-Tween with 0.5% milk powder, rinsed, incubated for 1 hour with 1/5000-diluted anti-mouse IgG secondary antibody (BioRad, Hercules, CA, USA) in TBS-Tween/0.5% w/v milk powder, then submitted to chemiluminescent detection according to the instructions of the manufacturer (Immun-Star HRP substrate, BioRad, Hercules, CA, USA) and densitometry (Alpha Innotech, Mississauga, ON, Canada).

Initial reaction rate correlation with protein concentration

Within the BIACORE instrument, the accumulation of MP-RIIIED-E over the biosensor surface can be depicted as a two-step process. In the first step, MP-RIIIED-E has to migrate from the bulk to the sensor surface while the interactions between MP-RIIIED-E and its K coil partner that had been covalently immobilized at the biosensor surface occurs in the second step. If the rate of diffusion (first step) is slower than the rate of MP-RIIIED-E/K complex formation, the system is then mass transport limited and the initial reaction rate (dR/dt) is then proportional to MP-RIIIED-E concentration (Pol et al., 2007). Mass transport limitation is known to occur when the binding of a high molecular weight protein

to its partner that has been immobilized at high density at the sensor surface is characterized by an on-rate (k_{on}) being higher than 10^5 $M^{-1}.s^{-1}$ (Pol et al., 2007). Based on the characteristics of our biological system (molecular weight of MP-RIIIED-E higher than 30 kDa and k_{on} for the E/K interaction ≈ 3 x 10^6 $M^{-1}s^{-1}$; De Crescenzo et al., 2003a) and on our experimental setup (660 RUs of immobilized K coil whose molecular weight ≈ 5 kDa), we assumed that MP-RIIIED-E binding was mass transport limited, and thus, that the initial reaction rates were proportional to MP-RIIIED-E concentration.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1B shows the set of control-corrected experimental data obtained at-line along the bioreactor culture and corresponding to the successive injections of samples (phase II) and antibody solution (phase IV). The initial reaction rates (dR/dt in $RU.s^{-1}$) corresponding to mass accumulation resulting from *i)* filtered medium injection over a K coil derivatized biosensor surface and *ii)* anti-myc antibody injection over proteins captured at the biosensor surface were corrected from signal drift (determined from data acquired prior to each automated injection).

Our experimental approach relies on the high affinity and high specificity of the interaction between *de novo* designed E and K coils that have already been demonstrated for coils alone (De Crescenzo et al., 2003a) or when one of the coils is fused to various proteins (De Crescenzo et al., 2004; De Crescenzo et al., 2003b). Hence, injection of filtered medium will result in the specific accumulation of the protein of interest (i.e. MP-RIIIED-E) at the surface of the biosensor via coiled-coil interactions, whereas other species are eluted. Since our system is considered to be mass transport limited, the initial reaction rate at which MP-RIIIED-E accumulates (in $RU.s^{-1}$) will then vary with MP-RIIIED-E concentration in the culture medium. The evolution of MP-RIIIED-E concentration in the culture medium was followed by calculating the initial reaction rate for each curve acquired at-line (Figure 1D). MP-RIIIED-E concentration increased rapidly at an exponential rate (1/C dC/dt in h^{-1}, specific rate of 0.097±0.013 h^{-1} from 24 h to 48 h; n=5, r^2=0.95) while the cells were exponentially growing (Figure 1C,D; specific rate of 0.031±0.0023 h^{-1}; n=5, r^2=0.98). From 48 h to 96 h, MP-RIIIED-E reaction rate was determined to be lower but still increased exponentially (0.013±0.00070 h^{-1}; n=8, r^2=0.98), while the cells were at mid-exponential (48 h) growth phase (Figure 1C,D).
Our at-line measurements were in agreements with those performed off-line when analyzing filtered medium samples by Western blotting with anti-myc antibody (Figure 3 and data not shown) followed by densitometry relative quantification (as pure standard was not available) (Figure 1D) for the complete culture period (24-48 h: specific rate (1/C dC/dt in h^{-1}) of 0.096±0.029 h^{-1}, n=5 and r^2=0.74; 48-96 h: specific rate of 0.014±0.0067 h^{-1}, n=5 and r^2=0.59). This further validated our hypothesis that mass transport limitation occurred at the biosensor surface. Of interest, a third increase for MP-RIIIED-E concentration was also noticed after 96 h of culture and was attributed to cell lysis, causing the release of intracellular MP-RIIIED-E (Figure 1C,D; vertical dashed line).

Following culture medium sample injections, and thus accumulation of myc-tagged secreted protein at the biosensor surface, anti-myc antibody injections were performed at a fixed concentration. As shown in Figure 1E, the initial reaction rate of antibody binding to surface-bound MP-RIIIED-E followed the same profile as MP-RIIIED-E reaction rate (compare Figure 1D and E). Finally, anti-myc initial reaction rate was also reported per amount of surface-bound MP-RIIIED-E, a value that is obtained from SPR measurement prior to anti-myc injection (t = 1640 s, Figure 1B). As shown in Figure 1E, this ratio is constant throughout the bioreactor culture time, thus indicating that, anti-myc antibody binding was proportional to the amount of captured protein, and thus by extension, that MP-RIIIED-E, had been specifically captured via coiled-coil interactions throughout the entire process.

CONCLUSION

A comparison of the data that had been acquired at-line with those derived from a standard off-line technique (Figure 1D) demonstrated that our experimental setup, in combination with the use of a *de novo* designed coiled-coil system, allowed for an efficient monitoring of the evolution of relative protein concentration throughout the entire process in the bioreactor.

Based on the high sensitivity of the BIACORE 3000 SPR biosensor (Rich and Myszka, 2000), our approach is applicable to any secreted proteins. This is also true for untagged proteins, assuming that a specific interacting partner displaying a high-enough affinity for the product to be monitored is available. For example, an antibody specific to the protein could advantageously replace K coil immobilized at the biosensor surface. Furthermore, this study paves the way for at-line quantification of concentration of extracellular proteins when standard of the purified product is available (i.e., injection of protein standards prior to at-line monitoring would allow to build up a calibration curve). Furthermore, secreted protein bioactivity may also be assessed at-line. That is, one would have to inject a biological partner of the protein after its capture; this injection, performed at a fixed concentration, would replace the antibody injections of our experiment. These responses would then have to be normalized by taking into account the amount of captured protein for each cycle. A comparison of the resulting kinetic profiles to each other and to those corresponding to the injection of the same biological partner at the same concentration over a bioactive protein standard would thus allow for the evaluation of protein bioactivity.

In the new context of process analytical technology (PAT) development in the biopharmaceutical industry, the field is open to novel control protocols based on real-time monitoring of critical quality parameters and performance attributes of bioprocesses. The experimental setup and strategy presented here can be easily adapted to satisfy these needs in order to monitor at-line bioprocesses dedicated to the production of bioactive secreted protein in bioreactor. It is also clear that the time required for each measurement may be significantly reduced when well described bioprocesses are involved since a unique sample dilution combined to a shorter cycle may then be

sufficient instead of the three performed in this work. Nevertheless, the current use of a SPR analytical equipment can be extended to the monitoring of multiple bioreactor cultures run in parallel by taking advantage of the availability of four different surfaces on the same biosensor chip.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Canada Research Chair on the Development of Metabolic Tools (M.J.), the Canada Research Chair on Protein-Enhanced Biomaterials (G.D.C.) and by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

REFERENCES

De Crescenzo G, Litowski JR, Hodges RS, O'Connor-McCourt MD. 2003a. Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding. Biochemistry 42:1754-1763

De Crescenzo G, Pham PL, Durocher Y, O'Connor-McCourt MD. 2003b. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding to the extracellular domain of the type II TGF-beta receptor: receptor capture on a biosensor surface using a new coiled-coil capture system demonstrates that avidity contributes significantly to high affinity binding. J Mol Biol 328:1173-1183

De Crescenzo G, Pham PL, Durocher Y, Chao H, O'Connor-McCourt MD. 2004. Enhancement of the antagonistic potency of TGF-beta receptor extracellular domains by coiled-coil induced homo- and hetero-dimerization. J Biol Chem 279:26013-26018

Durocher Y, Perret S, Kamen A. 2002. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. Nucl Acids Res 30:E9

Jolicoeur M, Chavarie C, Carreau, PJ, Archambault J. 1992. Development of a helical-ribbon impeller bioreactor for high-density plant cell suspension culture. Biotechnol Bioeng 39:511-521

Jones JJ, Bridges AM, Fosberry AP, Gardner S, Lowers RR, Newby RR, James PJ, Hall RM, Jenkins O. 2004. Potential of real-time measurement of GFP-fusion proteins. J Biotechnol 109:201-211

Jones JJ, Wilkins CL, Cai Y. 2005. Real-Time Monitoring of Recombinant Bacterial Proteins by Mass Spectrometry. Biotechnol Prog 21:1754-1758

Pol E, Karlsson R, Roos H, Jansson A, Xu B, Larsson A, Jarhede T, Franklin G, Fuentes A, Persson S. 2007 Biosensor-based characterization of serum antibodies during

development of an IgE immunotherapeutic against allergy and asthma. J Mol Recognit 20: 22-31

Rich RL, Myszka DG. 2000. Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. Curr Opin Biotechnol 11:54-61

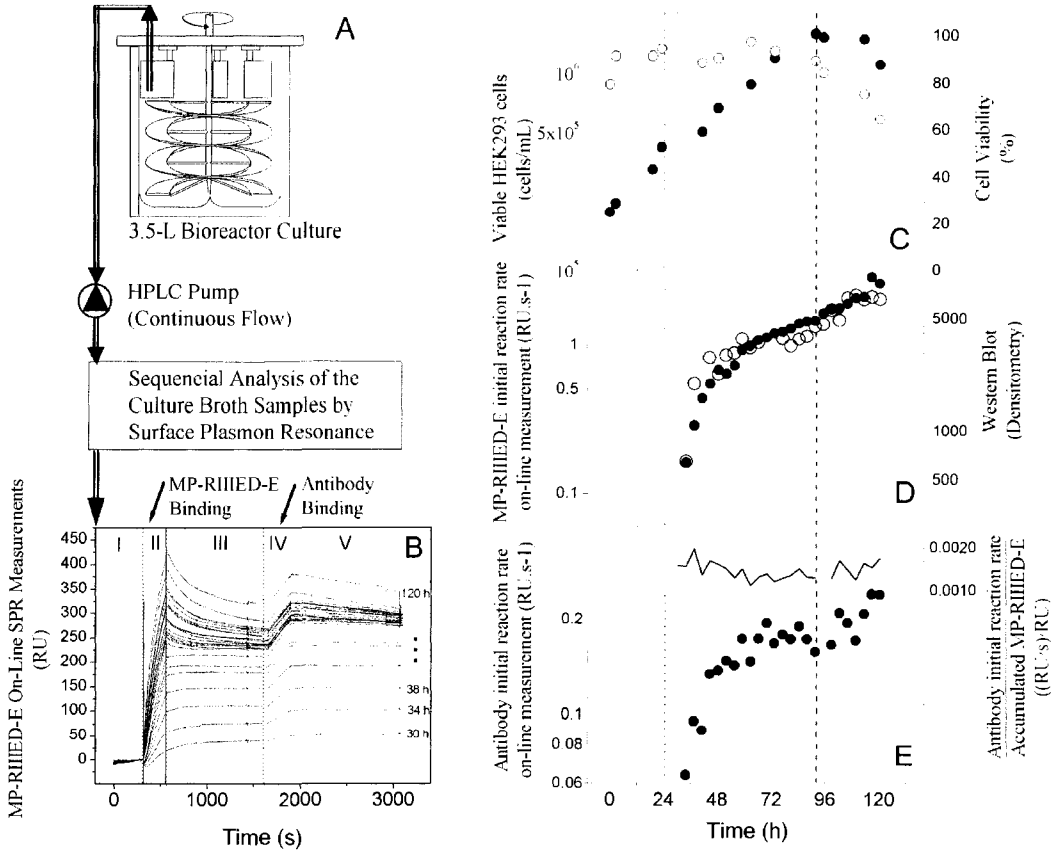


Figure 1 Experimental setup and results for Surface Plasmon Resonance-based at-line monitoring of MP-RIIIED-E production. (A) Schematic representation of the experimental setup corresponding to a 3.5-L bioreactor from which cell-free culture medium is continuously pumped to the BIACORE 3000 biosensor modified vial, via a decantation column and an inline filter with an HPLC pump enabling a regular flow rate. From this continuous flow, samples are automatically prepared at set intervals by the biosensor and injected over sensor chip surfaces. (B) Double-referenced biosensor sensorgrams corresponding to injection of undiluted cell-free culture medium that had been acquired throughout the bioreactor culture operation. Each sensorgram comprises 5 sequential phases (separated by vertical dashed lines) corresponding to the injection of running buffer (phases I, III and V), undiluted sample (phase II), and anti-myc antibody (phase IV), and followed by injection of guanidium hydrochloride for regeneration (not shown). (C) Cell density (●) and viability (○) were evaluated off-line by trypan blue exclusion method. (D) Initial reaction rates corresponding to MP-RIIIED-E binding to biosensor surface-immobilized K coil (●) were determined by linear regression (from 340 to 360 s) and corrected from baseline drift (linear regression from 200 to 220 s). MP-RIIIED-E concentration was also evaluated off-line in matching filtered medium samples by Western blotting followed by densitometry (○). (E) Initial reaction rates corresponding to anti-myc antibody binding to coiled-coil captured MP-RIIIED-E (●) were determined by linear regression (from 1700 to 1800 s) and corrected from baseline

drift (linear regression from 1500 to 1600 s). Antibody/MP-RIIIED-E initial reaction rates were also reported
per unit of accumulated protein (in RU, value at 1640 s) in order to evaluate if captured material corresponded to MP-RIIIED-E (solid line). The vertical dotted line in panels C to D corresponds to the time at which transient transfection was performed, while the vertical dashed line corresponds to the time at which cell viability was observed to decrease.

```
1                   20                  40                  60
|                   |                   |                   |
MAVTSHHMIPVMVVLMSADLATAGPEQKLISEEDLRQLRNPSGFQGQLDGNATFNMELYN
 TβRIIIED                   myc tag
TDLFLVPSPGVFSVAENEHVYVEVSVTKADQDLGFAIQTCFLSPYSNPDRMSDYTIIENI
                            TβRIIIED
CPKDDSVKFYSSKRVHPPIPHAEVDKKRFSPLFKSVFNTSLLFLHCELTLCSRKKGSLKL

PRCVTPDDACTSLDATMIWTMMQNKKTFTKPLAVVLQVDYKENVPSTKDSSPIPPPPPQI

PHGGRGGGGSGGGEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEKGGHHHHHHStop
    Linker                  E5 Coil                     His tag
```

Figure 2 Amino-acid sequence of the MP-RIIIED-E fusion protein. Residues 1 to 25 correspond to residues 1 to 25 of the rat TβRIII sequence according to the numbering used in the Swiss-Protein database (accession number : P26342); MP-RIIIED-E residues 26 to 35 (underlined) correspond to myc tag; MP-RIIIED-E residues 36 to 242 correspond to residues 576 to 782 of the rat TβRIII sequence in the Swiss-Protein database; residues 243 to 253 correspond to an 11 amino-acid linker; residues 254 to 288 correspond to the E coil and residues 291 to 296 correspond to the His tag separated from the E coil sequence by two glycines.

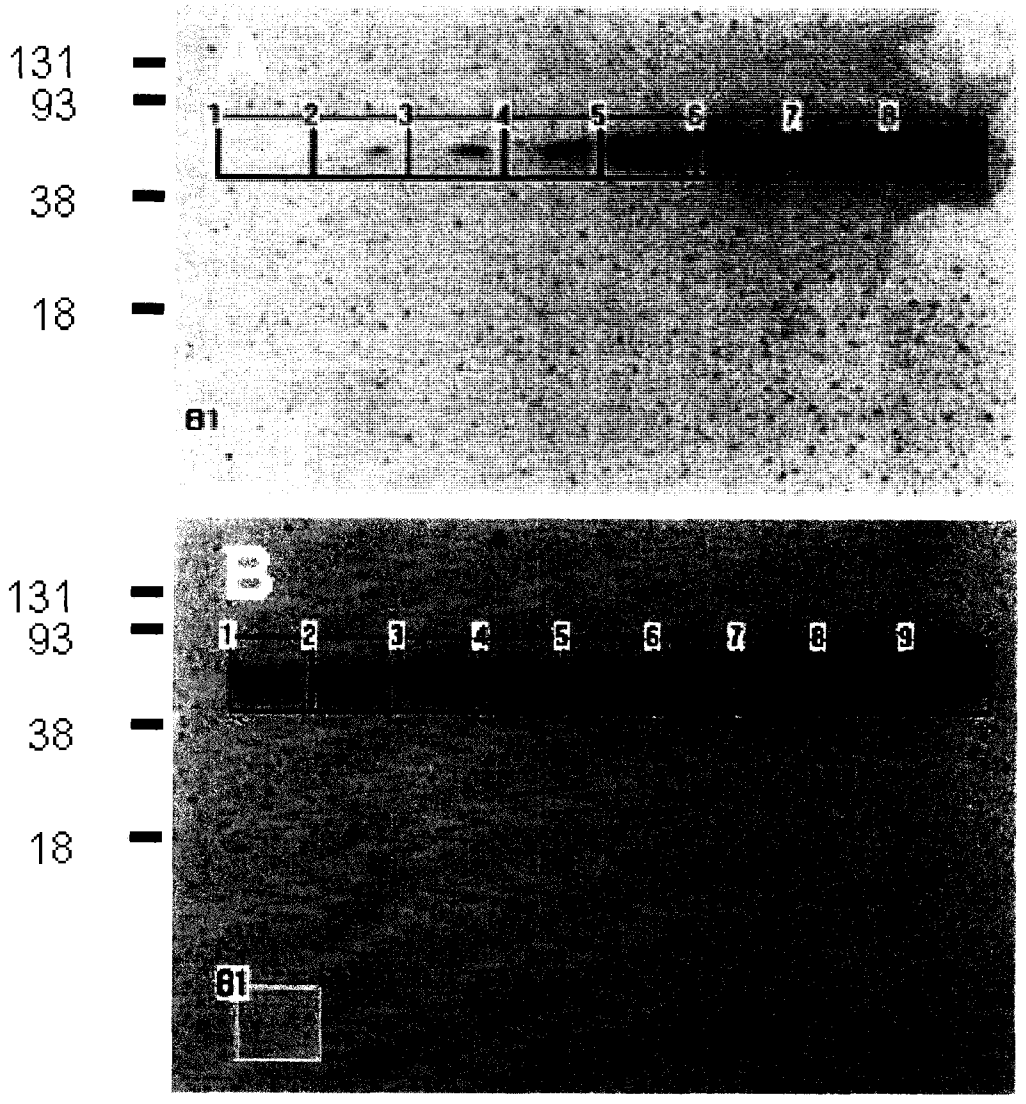


Figure 3 Example of Western blot and densitometry performed for off-line analysis of various cell-free culture medium samples. Blots were probed with anti-myc primary antibody. Numbered squares correspond to areas that were used to perform densitometry analysis. (A) Squares '1' to '8' are related to culture medium samples harvested at 24 h (prior transfection, same time referencing as in Figure1) and 29, 36, 43, 50, 57, 70, 77 h, respectively. (B) Squares '1' to '9' are related to culture medium samples harvested at 77 h (for matching strips from both Western blots), 84, 91, 98, 105, 109, 112, 116, 121 h, respectively. In both (A) and (B), Square 'B1' corresponds to the area used for background correction.