



HAL
open science

Développement d'une nouvelle stratégie de purification d'anticorps monoclonaux immunoconjugués par une technique de chromatographie d'interactions hydrophobes

Marion Le Cam

► **To cite this version:**

Marion Le Cam. Développement d'une nouvelle stratégie de purification d'anticorps monoclonaux immunoconjugués par une technique de chromatographie d'interactions hydrophobes. Sciences pharmaceutiques. 2012. dumas-00745883

HAL Id: dumas-00745883

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00745883v1>

Submitted on 26 Oct 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UFR DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
DE ROUEN**

Année 2012

N°

**THÈSE
POUR LE DIPLOME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Par

Marion LE CAM

Née le 12 Avril 1988 à Longjumeau

Présentée et soutenue publiquement le 8 Octobre 2012

**Développement d'une nouvelle stratégie
de purification d'anticorps monoclonaux
immunoconjugués par une technique de
chromatographie d'interactions hydrophobes**

Directeur de thèse : **Mr Philippe VÉRITÉ**, Professeur de Chimie Analytique.

Président du Jury : **Mr Gilles GARGALA**, Maître de Conférence
Universitaire et Praticien Hospitalier, Parasitologie.

Membres du jury : **Mr Eric LACOSTE**, Maître de stage. Responsable du
laboratoire de bio-organique à Sanofi, Vitry sur Seine.

Mr Jean CHASTANG, Maître de Conférence
Universitaire, Biomathématiques.

*A Serge,
qui restera à jamais mon modèle.*

ANNEE UNIVERSITAIRE 2011 - 2012
U.F.R. DE MEDECINE-PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : Professeur Pierre FREGER

ASSESSEURS : Professeur Michel GUERBET
Professeur Benoit VEBER
Professeur Pascal JOLY
Professeur Bernard PROUST

DOYENS HONORAIRES : Professeurs J. BORDE - Ph. LAURET - H. PIGUET - C. THUILLEZ

PROFESSEURS HONORAIRES : MM. M-P AUGUSTIN - J. ANDRIEU-GUTTRANCOURT - M. BENOZIO -
J. BORDE - Ph. BRASSEUR - R. COLIN - E. COMOY - J. DALION - . DESHAYES - C.
FESSARD - J.P. FILLASTRE - P. FRIGOT - J. GARNIER - J. HEMET - B. HILLEMAND -
G. HUMBERT - J.M. JOUANY - R. LAUMONIER - Ph. LAURET - M. LE FUR - J.P.
LEMERCIER - J.P. LEMOINE - M^{le} MAGARD - MM. B. MAITROT - M.
MAISONNET - F. MATRAY - P. MITROFANOFF - Mme A. M. ORECCHIONI - P.
PASQUIS - H. PIGUET - M. SAMSON - Mme SAMSON-DOLLFUS - J.C. SCHRUB -
R. SOYER - B. TARDIF - TESTART - J.M. THOMINE - C. THUILLEZ - P. TRON -
C. WINCKLER - L.M. WOLF

I - MEDECINE

PROFESSEURS

M. Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
M. Bruno BACHY	HCN	Chirurgie pédiatrique
M. Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et Biologie Moléculaire
M. Jacques BENICHOU	HCN	Biostatistiques et informatique médicale
M. Eric BERCOFF	HB	Médecine interne (gériatrie)
M. Jean-Paul BESSOU	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise BEURET-BLANQUART	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
M. Guy BONMARCHAND	HCN	Réanimation médicale
M. Olivier BOYER	UFR	Immunologie
M. Jean-François CAILLARD	HCN	Médecine et santé au Travail
M. François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Philippe CHASSAGNE	HB	Médecine interne (Gériatrie)
M. Alain CRIBIER (<i>Surnombre</i>)	HCN	Cardiologie
M. Antoine CUEVELIER	HB	Pneumologie

LISTENSEIMEDPHAR2011-2012

M. Pierre CZERNICHOW	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
M. Jean - Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et Imagerie Médicale
M. Stéfan DARMONI	HCN	Informatique Médicale/Techniques de communication
M. Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mme Danièle DEHESDIN	HCN	Oto-Rhino-Laryngologie
M. Philippe DENIS (Surnombre)	HCN	Physiologie
M. Jean DOUCET	HB	Thérapeutique/Médecine – Interne - Gériatrie.
M. Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
M. Philippe DUCROTTE	HCN	Hépto – Gastro - Entérologie
M. Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie Orthopédique - Traumatologique
M. Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie Orthopédique et Traumatologique
M. Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mlle Héléne ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
M. Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
M. Pierre FREGER	HCN	Anatomie/Neurochirurgie
M. Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et Santé au Travail
M. Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie Médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
M. Michel GODIN	HB	Néphrologie
M. Philippe GRISE	HCN	Urologie
M. Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
M. Fabrice JARDIN	CB	Hématologie
M. Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
M. Pascal JOLY	HCN	Dermato - vénéréologie
M. Jean-Marc KUHN	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie cytologie pathologiques
M. Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
M. Alain LAVOINNE	UFR	Biochimie et biologie moléculaire
M. Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
M. Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
M. Xavier LE LOET	HB	Rhumatologie
M. Eric LEREBOURS	HCN	Nutrition
Mlle Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
M. Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile

M. Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. Eric MALLET (<i>Surnombre</i>)	HCN	Pédiatrie
M. Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mlle Isabelle MARIE	HB	Médecine Interne
M. Jean-Paul MARIE	HCN	ORL
M. Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - obstétrique
M. Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
M. Pierre MICHEL	HCN	Hépat - Gastro - Entérologie
M. Francis MICHOT	HCN	Chirurgie digestive
M. Bruno MIHOUT	HCN	Neurologie
M. Pierre-Yves MILLIEZ	HCN	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique
M. Jean-François MUIR	HB	Pneumologie
M. Marc MURAINÉ	HCN	Ophthalmologie
M. Philippe MUSETTE	HCN	Dermatologie - Vénérologie
M. Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
M. Jean-Marc PERON	HCN	Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale
M. Christian PFISTER	HCN	Urologie
M. Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
M. Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
M. Bernard PROUST	HCN	Médecine légale
M. François PROUST	HCN	Neurochirurgie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie et méd. du dévelop. et de la reprod.
M. Jean-Christophe RICHARD (<i>Mise en dispo</i>)	HCN	Réanimation Médicale, Médecine d'urgence
M. Horace ROMAN	HCN	Gynécologie Obstétrique
M. Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie – Pathologie
M. Guillaume SAVOYE	HCN	Hépat - Gastro
M. Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mlle Florence THIBAUT	HCN	Psychiatrie d'adultes
M. Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
M. Christian THUILLEZ	HB	Pharmacologie
M. Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
M. François TRON (<i>Surnombre</i>)	UFR	Immunologie
M. Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
M. Jean-Pierre VANNIER	HCN	Pédiatrie génétique

M. Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie Réanimation chirurgicale
M. Pierre VERA	C.B	Biophysique et traitement de l'image
M. Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
M. Olivier VITTECOQ	HB	Rhumatologie
M. Jacques WEBER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
M. Jeremy BELLIEN	HCN	Pharmacologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
M. Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Physiologie
Mme Sophie CLAEYSSENS	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
M. Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
M. Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
M. Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mme Catherine HAAS-HUBSCHER	HCN	Anesthésie - Réanimation chirurgicale
M. Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
M. Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
M. Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie Cellulaire
Mme Lucie MARECHAL-GUYANT	HCN	Neurologie
M. Jean-François MENARD	HCN	Biophysique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et Biologie moléculaire
M. Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
M. Francis ROUSSEL	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
M. Eric VERIN	HCN	Physiologie

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

M. Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
M. Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIEMme Dominique **LANIEZ**

UFR Anglais

Mme Michèle **GUIGOT**

UFR Sciences humaines - Techniques d'expression

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

M. Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
M. Jean-Jacques BONNET	Pharmacologie
M. Roland CAPRON (PU-PH)	Biophysique
M. Jean COSTENTIN (PU-PH)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
M. Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
M. Michel GUERBET	Toxicologie
M. Olivier LAFONT	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX	Physiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
M. Marc VASSE (PU-PH)	Hématologie
M Jean-Marie VAUGEOIS (Délégation CNRS)	Pharmacologie
M. Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mle Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mme Dominique BOUCHER	Pharmacologie
M. Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
M. Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
M. Jean CHASTANG	Biomathématiques
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mle Cécile CORBIERE	Biochimie
M. Eric DITTMAR	Biophysique
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mle Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Roseline DUCLOS	Pharmacie Galénique
M. Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
M. François ESTOUR	Chimie Organique

M. Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla GHARBI	Chimie analytique
Mlle Marie-Laure GROULT	Botanique
M. Hervé HUE	Biophysique et Mathématiques
Mme Hong LU	Biologie
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
M. Paul MULDER	Sciences du médicament
M. Mohamed SKIBA	Pharmacie Galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie Galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
M. Rémi VARIN (MCU-PH)	Pharmacie Hospitalière
M. Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEUR ASSOCIE

M. Jean-Pierre GOULLE	Toxicologie
------------------------------	-------------

MAITRE DE CONFERENCE ASSOCIE

Mme Sandrine PANCHOU	Pharmacie Officinale
-----------------------------	----------------------

PROFESSEUR AGREGÉ OU CERTIFIÉ

Mme Anne-Marie ANZELLOTTI	Anglais
----------------------------------	---------

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

M. Bérénice COQUEREL	Chimie Analytique
M. Johann PELTIER	Microbiologie

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre HENRI BECQUEREL

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEURS

M. Jean-Loup HERMIL	UFR	Médecine générale
----------------------------	-----	-------------------

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS :

M. Pierre FAINCILBER	UFR	Médecine générale
-----------------------------	-----	-------------------

M. Alain MERCIER	UFR	Médecine générale
-------------------------	-----	-------------------

M. Philippe NGUYEN THANH	UFR	Médecine générale
---------------------------------	-----	-------------------

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS :

M Emmanuel LEFEBVRE	UFR	Médecine générale
----------------------------	-----	-------------------

Mme Elisabeth MAUVIARD	UFR	Médecine générale
-------------------------------	-----	-------------------

Mme Marie Thérèse THUEUX	UFR	Médecine générale
---------------------------------	-----	-------------------

LISTE DES RESPONSABLES DE DISCIPLINE

Melle Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
M. Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
M. Roland CAPRON	Biophysique
M. Jean CHASTANG	Mathématiques
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation, Economie de la Santé
Mlle Elisabeth CHOSSON	Botanique
M. Jean COSTENTIN	Pharmacodynamie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
M. Loïc FAVENNEC	Parasitologie
M. Michel GUERBET	Toxicologie
M. Olivier LAFONT	Chimie organique
M. Jean-Louis PONS	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
M. Mohamed SKIBA	Pharmacie Galénique
M. Marc VASSE	Hématologie
M. Philippe VERITE	Chimie analytique

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS**MAITRES DE CONFERENCES**

M. Sahil ADRIOUCH	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 614)
M. Antoine OVRARD-PASCAUD	Physiologie (Unité Inserm 644)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

M. Mario TOSI	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 614)
M. Serguei FETISSOV	Physiologie (Groupe ADEN)
Mme Su RUAN	

Par délibération en date du 3 mars 1967, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés au laboratoire de Bio-organique du département de développement chimique et biotechnologique de Sanofi à Vitry-sur-Seine. Au terme de ces travaux, je souhaite adresser mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont apportées leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de cette thèse.

Mes premiers remerciements vont à Eric Lacoste, responsable du laboratoire de Bio-organique, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Merci pour ta disponibilité et ton écoute, pour les publications et les conseils qui ont contribué à alimenter ma réflexion.

Je tiens également à remercier chaleureusement Marc Frédéric, qui a encadré mes manipulations tout au long de ces travaux. Je te remercie pour ta disponibilité, ton dynamisme perpétuel et ta bonne humeur. Enfin merci pour le temps que tu as bien voulu me consacrer concernant les plans d'expériences.

Je voudrais remercier mon directeur de thèse, le Pr Philippe Vérité, ainsi que les membres de mon jury, Mr Gilles Gargala et Mr Jean Chastang, qui ont volontiers accepté de juger mon travail. Merci également pour la qualité de vos enseignements et votre gentillesse durant ces années d'études qui ont alimenté ma curiosité chaque jour un peu plus et qui font que j'en suis aujourd'hui à présenter de tels travaux.

Je souhaiterais remercier toutes les personnes qui ont contribué à mon parcours en me montrant que la volonté est la base de toute réussite. Je remercie particulièrement Lise Ha-Pham pour ce formidable voyage passé en ta compagnie, pour ces longues discussions qui m'ont encouragé et incité à donner le meilleur de moi-même.

Je remercie également mes amis proches, Sandrine, Nathalie, Tiphaine et bien sur Etienne pour votre bonne humeur et les bons moments que je passe toujours en votre compagnie. Je remercie par ailleurs l'ensemble du Taekwondo Elite 76, pour son esprit d'équipe imperturbable et tous ces entraînements passés dans la joie et la transpiration. Enfin je remercie mon camarade Amandine, pour son humour et sa joie de vivre.

Pour finir je souhaiterais remercier ma famille pour m'avoir encouragée et soutenue durant ces 6 années d'études. Merci à Pauline, ma sœur et Cyrille, pour votre retour en France qui nous a tous réjoui. Merci pour votre aide cette dernière année et pour les bons plats que vous m'avez toujours élaboré. Je remercie également mes parents de m'avoir donné l'opportunité de réussir mes études dans les meilleures conditions qui soient. J'espère que vous serez fiers de moi. Enfin je remercie Benjamin d'avoir été en première ligne de soutien cette année. Merci pour ta sérénité, ton optimisme et tes innombrables jeux de mots.

Liste des abréviations

(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfate d'ammonium
ADC	Antibody drug conjugate
ADCC	Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity
C&BD	Chemistry and biotechnology development
CDC	Complement dependent cytotoxicity
CDR	Complementarity determining regions
DAR	Drug Antibody Ratio
DMI	N ² -deacetyl-N ^{2'} -(3mercapto-1-oxopropyl)-maytansine
DM4	N ² -deacetyl-N ^{2'} -(4mercapto-4-methyl-1-oxopropyl)-maytansine
Fab	Fragment having the antigen binding site
Fc	Fragment cristallisable
FDA	Food and drug administration
FNR	Fraction non retenue
FR	Framework
HIC	Hydrophobic Interaction Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS / MS	High Resolution Mass Spectrometry / Mass Spectrometry
IgG	Immunoglobuline G
KCl	Chlorure de potassium
KPi	Phosphate de potassium
Mabs	Monoclonal antibodies
MMAE	Monomethyl auristatine E
MMAF	Monomethyl auristatine F
NK	Natural killer
Q TOF	Q Time of Flight
R&D	Recherche et développement
RFc	Récepteurs à la fraction Fc
RIC	Radio Immunno Conjugate
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique
SPDB	N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)butyrate
SPP	N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)pentanoate
TFF	Filtration à flux tangentiel
UF/DF	Ultra-Filtration / Dia-Filtration
UV	Ultra-Violet

Table des matières

I Introduction	1
1.1 Structure et fonctions des Anticorps monoclonaux	1
1.1.1 Structure protéique des anticorps	1
1.1.2 Fonctions effectrices des IgG	2
1.2 Les anticorps monoclonaux thérapeutiques	3
1.3 Les Immunoconjugués	4
1.3.1 Définition des immunoconjugués	4
1.3.2 Classe des Antibody Drug Conjugates	5
A- Les Anticorps Monoclonaux (Mabs)	5
B- Les Agents Cytotoxiques	6
C- Les Agents de Liaison ou Linkers	7
II Présentation et Objectifs des travaux	9
2.1 Contexte de l'étude	9
2.2 Purification par chromatographie d'interactions hydrophobes	10
2.2.1 Principe de séparation	10
2.2.2 Paramètres influents	11
2.3 Objectifs des travaux	12
III Matériels et méthodes	12
3.1 Préparation de l'immunoconjugué	12
3.1.1 Synthèse	12
3.1.2 Caractérisation du produit	14
A- Analyse Ultra-Violet UV	14
B- Analyse par Chromatographie d'exclusion stérique SEC	14
C- Analyse par Spectrométrie de masse Haute résolution	15
3.2 Matière première utilisée	15
3.3 La méthode des plans d'expériences	15
3.3.1 Premier plan de criblage	16
3.3.2 Second plan de criblage	17
3.3.3 Surface de réponses	18
A- Surface de réponses Anticorps nu	18
B- Surface de réponses ADC	19
3.4 Test sur un Brut de conjugaison	20
3.5 Matériels	20
IV Résultats et discussion	20
4.1 Résultats du premier plan de criblage	20
4.2 Résultats du second plan de criblage	24
4.3 Résultats des surfaces de réponses	27
4.3.1 Anticorps nu	27
4.3.2 ADC	28
4.4 Test sur un brut de conjugaison	29
V Conclusion	36
VI Annexes	37
VII Bibliographie	42

I Introduction

Les anticorps monoclonaux constituent une classe thérapeutique qui connaît le plus fort taux de développement actuel dans le domaine des biotechnologies pharmaceutiques. Plus de 30 immunoglobulines et dérivées ont obtenues une AMM ces 20 dernières années dans des indications variées (oncologie, hématologie, inflammation, transplantation etc). En 2010, ils représentaient un marché estimé à plus de 50 milliards de dollars (La Merie 2010) et leur proportion dans le marché des biomédicaments à atteint 20% en 2011 (Leem 2012).

Le couplage à un agent cytotoxique (ADC antibody drug conjugate) est un concept datant des années 1950 avec les premiers essais chez l'animal. Ils font partis de la classe prometteuse des immunoconjugués avec les radio-immunoconjugués et les immuno-toxines. Ce concept combine donc à la fois la spécificité de l'anticorps et la cytotoxicité de la molécule conjuguée (Goldmacher & Kotvun 2011). Le premier ADC commercialisé n'arrivera que 50 ans plus tard avec le Mylotarg® (Gemtuzumab ozogamycin contre la leucémie aiguë myéloïde), bien qu'il soit retiré du marché par la firme Pfizer en 2010 par manque de bénéfices significatifs (FDA NEWS RELEASE 2010). Cependant, le potentiel thérapeutique de ces molécules est toujours présent et les industries du médicament leur portent un intérêt grandissant. A ce jour, il y a d'ailleurs un produit sur le marché, deux produits en phase III d'essai clinique et plus d'une vingtaine de projets en cours de développement (Teicher & Chari 2011). (Cf annexe I)

Mes travaux ont été réalisés au sein du laboratoire de développement chimique et biotechnologique de Sanofi, qui réalise notamment des études de procédés sur la conjugaison et la purification des immunoconjugués ainsi que des transferts de procédés. La purification des produits est un des enjeux majeurs lors de la mise en place d'un procédé, et évolue en fonction des connaissances acquises et des contraintes réglementaires associées. Cela fait donc appel à une recherche permanente d'optimisation des acquis.

Mes recherches interviennent dans ce contexte général et mon travail se focalise sur la purification des anticorps monoclonaux conjugués à des molécules cytotoxiques.

Après quelques notions sur les anticorps monoclonaux et les immunoconjugués, vous sera présenté le contexte précis de mon étude et le type de purification étudiée ainsi que les objectifs associés, les moyens de leur mise en œuvre puis les résultats obtenus.

I.1 Structure et fonctions des Anticorps monoclonaux

I.1.1 Structure protéique des anticorps

Les anticorps sont des glycoprotéines complexes qui appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Ils sont produits au sein du système immunitaire par les lymphocytes B et constituent une ligne de défense essentielle contre les divers agents pathogènes par le biais d'une reconnaissance spécifique antigène-anticorps.

Les immunoglobulines (Ig) humaines sont réparties en 5 classes (Ig A,D,E,G et M) et sont constituées de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes (H pour *Heavy Chain*) et deux chaînes légères (L pour *Light Chain*), identiques entre elles et reliées par des ponts disulfures. Les anticorps monoclonaux thérapeutiques ayant obtenus une AMM jusqu'à présent appartiennent à la classe des IgG, c'est pourquoi nous détaillerons cette structure plus particulièrement.

Au milieu de la chaîne lourde se trouve une zone charnière, encore appelée région Hinge qui

confère à l'immunoglobuline une grande flexibilité et facilite ainsi son interaction avec l'antigène. Il existe différents types d'immunoglobulines et de sous types dus à la nature des chaînes lourdes. Chez l'Homme, on distingue ainsi les 5 classes d'immunoglobulines avec les chaînes lourdes α , μ , δ , γ ou ϵ . Chaque chaîne lourde comprend 3 ou 4 domaines constants (notés C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} et C_{H4}) et un domaine variable V_H , pour une masse totale d'environ 50 kDa. Il existe deux types de chaînes légères, les types κ et λ . Chaque chaîne légère comprend un domaine constant C_L et un domaine variable V_L aboutissant à une masse de 25 kDa. Un anticorps entier est donc formé de 4 chaînes polypeptidiques, possède une masse d'environ 150 kDa et une forme caractéristique en « Y » (Schroeder and Cavacini 2010) (Cf figure n°1)

Les régions variables des chaînes lourdes et légères se décomposent chacune en 3 domaines hypervariables appelés CDR (complementarity determining regions) en alternance avec des domaines charpentes ou FR (Framework). Les 6 boucles hypervariables peuvent se rapprocher dans l'espace pour former une zone appelée paratope, responsable de la reconnaissance spécifique de l'anticorps pour un épitope (situé sur l'antigène) (Allard 2012).

Les anticorps peuvent être caractérisés par différents fragments obtenus par coupure enzymatique à la papaïne. On obtient alors le fragment Fab (Fragment having the antigen binding site) et le fragment Fc (fragment cristallisable). Le Fab est donc responsable de la liaison spécifique de forte affinité aux antigènes via le CDR et le fragment Fc se lie à des récepteurs RfC impliqués dans les fonctions effectrices des anticorps monoclonaux ainsi qu'à des récepteurs RfC néonataux impliqués dans la demi-vie plasmatique des IgG. (Beck & Al 2009).

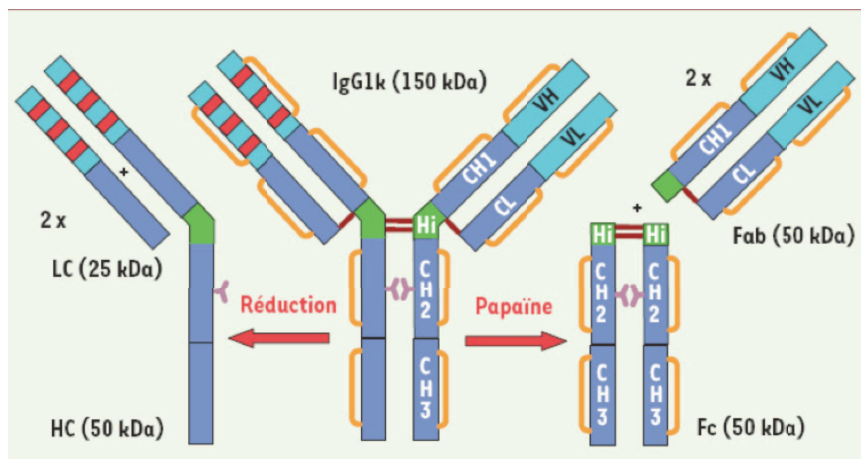


Figure n°1 : structure d'une IgG. Les parties variables sont en bleu clair, les parties constantes en bleu foncé. Les CDR sont en rouge, les ponts disulfures interchaînes en brun et intrachânes en orange. Les glycanes sont en roses. Chaîne Lourde (H), légère (L), variable (V), constante (C). Source : (Beck & Al 2009)

1.1.2 Fonctions effectrices des IgG (Cf figure n°2)

Les IgG sont produites suite à une infection par des éléments étrangers à l'organisme. Une des premières fonctions de l'IgG est de neutraliser cet agent en se liant à l'antigène grâce à la partie Fab de l'anticorps. Ceci bloque l'activité biologique de l'antigène et par la suite permet son élimination grâce aux effecteurs immunitaires. Les propriétés effectrices sont elles assurées par le fragment Fc et son récepteur RfC en activant des voies cytotoxiques dépendantes des cellules immunitaires (cellules NK, granulocytes) ou du complément. Ces phénomènes sont nommés ADCC (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity) ou CDC (complement dependent cytotoxicity) (Oschsenbein 2008).

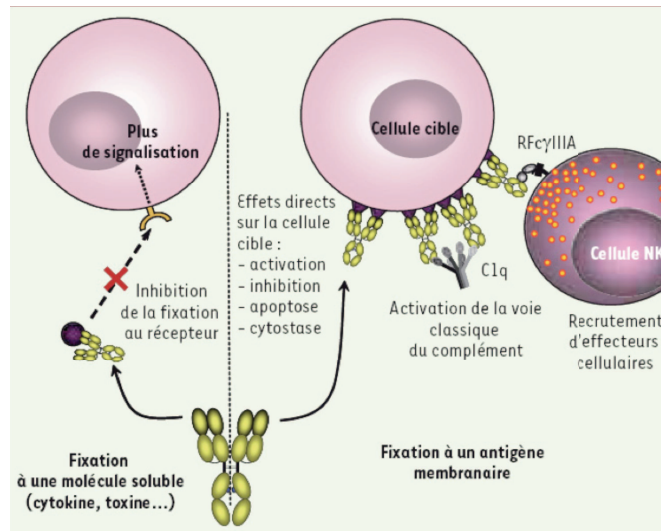


Figure n°2 : Fonctions effectrices d'une IgG. Le mode d'action varie selon que la cible soit soluble ou membranaire. Source : (Abès 2009)

1.2 Les anticorps monoclonaux thérapeutiques

Paul Ehrlich émet dès 1900 l'idée d'utiliser la spécificité des anticorps pour neutraliser un agent pathogène (Schneider 2008). Cette idée sera concrétisée en 1975 grâce aux travaux de Köhler et Milstein avec la mise au point de la production d'anticorps monoclonaux murins par la technique dite des hybridomes (Milstein, G. Kohler and C. 1975). C'est avec cette technologie que sera commercialisé en 1986 le Muromomab, premier anticorps monoclonal entièrement murin dirigé contre le récepteur CD3 des lymphocytes T, utilisé pour éviter les rejets de greffe (Beck & Al 2009). Ces anticorps de première génération en thérapeutique ont vu leur développement se limiter en raison de leur immunogénicité élevée et de leur demi-vie trop courte (Mistretta & Coll 2009). Des progrès considérables ont été apportés en biologie moléculaire pour concevoir d'autres générations d'anticorps moins immunogènes. C'est ainsi que des anticorps chimériques (domaines variables murins, domaines constants humains), humanisés (CDR murins greffés sur les charpentes humaines) et humains (banques combinatoires de phages ou utilisation de souris transgéniques) ont été développés à partir du milieu des années 80 (Siberil & Al 2005). (Cf figure n°3)

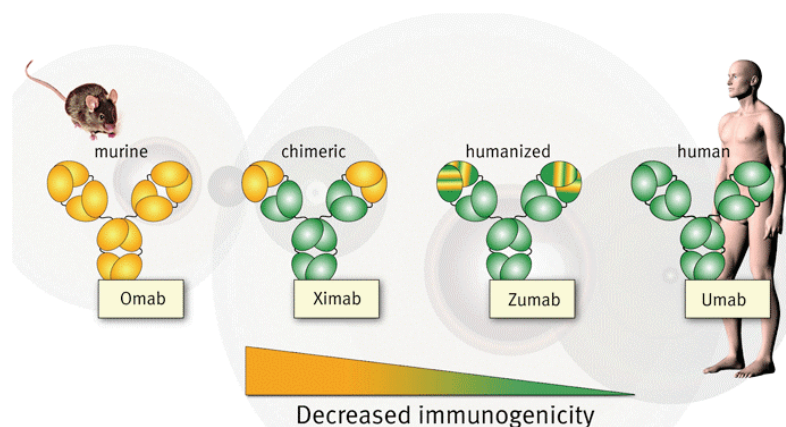


Figure n°3 : Présentation des différentes générations d'anticorps thérapeutiques. Humanisation progressive des anticorps monoclonaux, les suffixes indiquent le type d'anticorps : -omab (murins), -ximab (chimérique), -zumab (humanisé), -umab (humain). Source : Joost Bakker, Genmab

Actuellement on dénombre une trentaine d'anticorps monoclonaux thérapeutiques commercialisés dont la plupart sont humanisés ou humains (Leem 2012).

Parmi ces anticorps, 3 appartiennent à la classe des immunoconjugués : 2 RIC (radio immuno conjugate) et un seul ADC (antibody drug conjugate), l'Adcetris®, qui a obtenu son autorisation en août 2011 (FDA NEWS RELEASE 2011). Il s'agit donc d'une classe de biomédicaments en pleine croissance avec de nombreux projets en développement.

1.3 Les Immunoconjugués

Les anticorps monoclonaux non modifiés utilisés aujourd'hui classiquement en oncologie montrent une certaine efficacité mais sont administrés en complément le plus souvent d'une chimiothérapie (Weiner, Surana & Wang 2010). En effet ils présentent une cytotoxicité et un taux de pénétration dans la tumeur relativement faible comparativement aux molécules chimiques cytotoxiques. Ces dernières, bien que très actives, sont non spécifiques et atteignent autant les cellules saines que tumorales, induisant de nombreux effets indésirables. Ces molécules ont donc une fenêtre thérapeutique assez étroite (caractérisée par un faible delta entre la dose minimale pour avoir un effet thérapeutique et la dose où apparaissent les effets toxiques). En y ajoutant l'émergence des résistances aux médicaments anticancéreux par certaines populations de cellules cancéreuses, on comprend le besoin de développer des thérapies plus sélectives et efficaces, avec une toxicité minimale (Lyer and Kadambi 2011). C'est ainsi que le développement des immunoconjugés a pris toute son importance.

1.3.1 Définition des immunoconjugués

Un immunoconjugué consiste en un anticorps monoclonal couplé à un agent hautement toxique par le biais d'un agent de liaison appelé linker. (Cf figure n°4). Cette ingénierie permet donc de combiner la spécificité du ciblage par les anticorps avec de nouvelles fonctions effectrices puissantes par les agents qui leur sont conjugués. C'est ainsi que plusieurs classes d'agents ont été couplées aux anticorps notamment des radio-isotopes, des agents toxiques (drogues anticancéreuses ou toxines), des cytokines, des enzymes, mais également à des particules incluant des liposomes ou des nanoparticules métalliques.

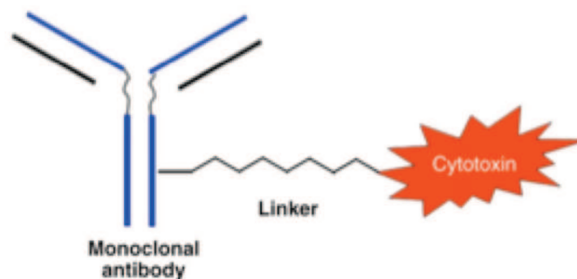


Figure n°4 : Représentation schématique d'un immunoconjugué. Source : (Lyer and Kadambi 2011)

En 2008, le nombre de décès par cancer a été estimé à 7,8 millions soit 13% de la mortalité mondiale. Selon l'INVS, en France, on dénombre en 2011 365 500 nouveaux cas de cancers. Le cancer est donc une cause majeure de décès dans le monde. C'est pourquoi l'oncologie est le domaine majeur de la recherche et du développement des immunoconjugués, mais également car de nombreux antigènes ont été identifiés comme étant surexprimés dans certains types de cancers comparativement aux tissus sains (Wu & Senter 2005).

A l'heure actuelle, nous avons vu que seuls deux RIC (Zevalin® : Ibritumomab-tiuxetan et Bexxar® : Tositumomab-¹³¹I, tous deux indiqués dans les lymphomes non Hodgkinien) et un ADC (Adcetris® : Brentuximab-vedotin indiqué notamment dans les cas d'échec de transplantation de cellules souches autologues pour les lymphomes Hodgkinien) (Casi &

Neri 2012) (Reichert 2011) ont atteint le marché. Ce faible taux d'approbation est principalement dû pour les RIC aux effets secondaires importants, et pour les ADC au manque d'efficacité des cytotoxiques de première génération et à leur instabilité par des agents de liaison non optimisés. C'est ainsi qu'une seconde génération d'ADC a été conçue, utilisant des cytotoxiques plus actifs et des agents de liaison plus stables.

1.3.2 Classe des Antibody Drug Conjugates

Le mécanisme d'action des ADC est décrit comme suit : après fixation sur son antigène cible, l'anticorps sera internalisé dans la cellule par endocytose médiée par des récepteurs. Les vésicules fusionneront avec des lysosomes où la molécule cytotoxique sera libérée de l'anticorps via différents mécanismes. L'agent cytotoxique actif ira agir directement sur la cellule en induisant sa mort et parfois sur les cellules voisines par transport ou diffusion dans l'environnement. (Cf figure n°5)

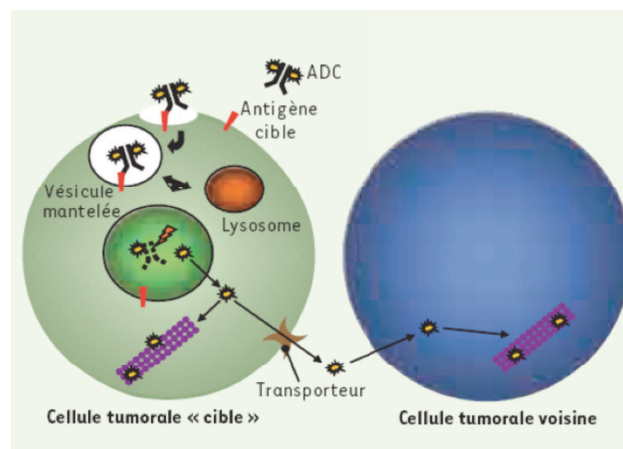


Figure n°5 : Mécanisme d'action des ADC. Source : (Haeuw 2009)

Bien que ce concept apparaisse simple, le développement de ce type de produit représente de nombreux challenges. En effet beaucoup de paramètres sont à optimiser individuellement pour obtenir un produit spécifique et efficace dans son ensemble. La conception d'un ADC fait donc appel à une ingénierie spécifique qui peut se résumer ainsi (Ducry & Stump 2010):

- Disposer d'un agent capable de cibler la tumeur. Rôle joué par l'anticorps (avec un maximum d'efficacité anticancéreuse et peu immunogène).
- Combiner un agent actif à visée antitumorale. Donc utiliser des molécules hautement cytotoxiques.
- Etablir ce lien par un agent de liaison qui permettra de libérer le cytotoxique après internalisation de l'anticorps. Il faut donc concevoir des agents de liaison qui augmentent la stabilité de l'ADC dans la circulation générale sans altérer la fonction de l'anticorps.

Nous verrons donc à présent en détail ces différentes parties et leurs caractéristiques attendues.

A- Les Anticorps Monoclonaux (Mabs)

La première génération d'ADC développée a montré des résultats insatisfaisants. En ce qui concerne les anticorps, un manque d'internalisation et des problèmes d'immunogénicité ont été mis en cause. En effet, les anticorps utilisés étaient murins, connus pour leur forte immunogénicité. Aujourd'hui grâce aux anticorps humanisés et humains, ce problème est considérablement réduit.

L'anticorps est utilisé comme un vecteur qui apporte le cytotoxique dans la cellule. Ses propriétés telles que sa pharmacocinétique et sa distribution doivent rester les mêmes et il

doit être suffisamment internalisé pour que l'agent toxique soit à une concentration intracellulaire suffisante. Pour cela il doit reconnaître des antigènes qui sont de préférence surexprimés dans la cellule cancéreuse et sous exprimés dans les tissus sains (Goldmacher & Kotvun 2011).

Cependant l'anticorps peut contribuer à la mort cellulaire par la mise en jeu des deux mécanismes précédemment cités ADCC et CDC, c'est pourquoi aujourd'hui plus de 70% des IgG utilisées sont des IgG1 qui possèdent ces deux mécanismes (des IgG2 et IgG4 sont également utilisées et sont le reflet de cas spéciaux) (La Merie Business Intelligence 2011).

Enfin l'anticorps doit présenter des sites disponibles pour la conjugaison. Il s'agit des lysines de la chaîne d'acide aminés et des cystéines des ponts interchaines.

B- Les Agents Cytotoxiques

L'agent cytotoxique fixé à l'anticorps est une prodrogue qui devient active dans la cellule tumorale après libération (Jaracz & Al 2005). Un des premiers ADC développé par la firme Bristol Myers Squibb dans les années 1990 combinait un anticorps humanisé BR96 à la doxorubicine (agent intercalant de l'ADN). Huit molécules étaient fixées et la dose requise devait être supérieure à 100mg/Kg pour obtenir une efficacité suffisante, montrant alors la faible efficacité de la doxorubicine (Ducry & Stump 2010).

L'activité de la molécule libre doit être suffisante pour tuer la cellule cancéreuse, même à faible concentration. En effet peu de molécules peuvent être fixées à l'anticorps et peu sont internalisées. (Cf figure n° 6). Parmi les molécules étudiées dans les années 1980 et 1990 pour la chimiothérapie dite classique, certaines présentaient en clinique une trop forte toxicité et leur utilisation seule fut compromise. Ces molécules sont alors devenues les agents idéals pour la conjugaison. Leur mécanisme d'action est connu depuis longtemps ce qui évite également de nouvelles études de développement. Aujourd'hui, les agents utilisés sont 100 à 1000 fois plus toxiques que ceux classiquement utilisés en chimiothérapie (Lyer and Kadambi 2011).

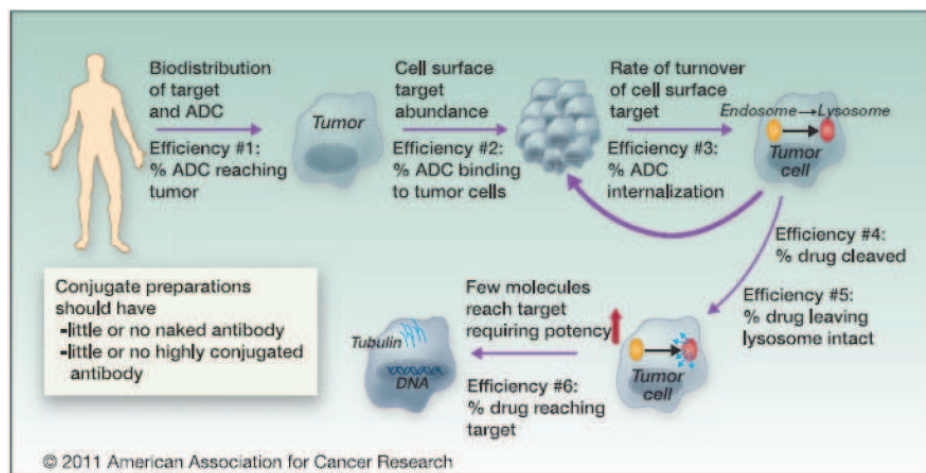


Figure n°6 : Schéma illustrant les étapes critiques de l'administration de l'ADC au patient à la libération de l'agent cytotoxique dans la cellule tumorale. Si l'efficacité de chaque étape est de 50%, seulement 1,56% de la dose administrée atteint la cible intracellulaire. Source : (Teicher & Chari 2011)

Ces produits sont classés en deux grandes catégories (Cf figure n°7):

- Ceux qui ciblent l'ADN (en provoquant des cassures du double brin) représentés par la calichéamycine et la duocarmycine
- Ceux qui ciblent les microtubules (en inhibant la polymérisation de la tubuline) représentés par les dérivés de la maytansine (DMI et DM4) et ceux de l'auristatine (MMAE et MMAF).

Afin de ne pas gêner la reconnaissance antigène/anticorps, les cytotoxiques sont fixés

principalement sur la partie Fc de l'anticorps. Etant très actifs, il n'est pas nécessaire d'en fixer beaucoup. Ce ratio ; nombre de cytotoxique par anticorps encore appelé DAR (Drug Antibody Ratio) ; est un paramètre important qui influence l'activité de l'ADC. En effet si le DAR est trop élevé, l'organisme reconnaît le conjugué comme une protéine endommagée et sera rapidement éliminé. Cela peut aussi induire la précipitation ou l'agrégation de la protéine (Senter 2009). Si le DAR est trop faible, le produit n'aura pas d'efficacité. Ce paramètre est donc majeur et il a été montré que la dose maximale tolérée lui est corrélée (Sun & Al 2005). Les produits actuellement en développement ont un DAR qui oscille entre 3 et 4 (Goldmacher & Kotvun 2011).

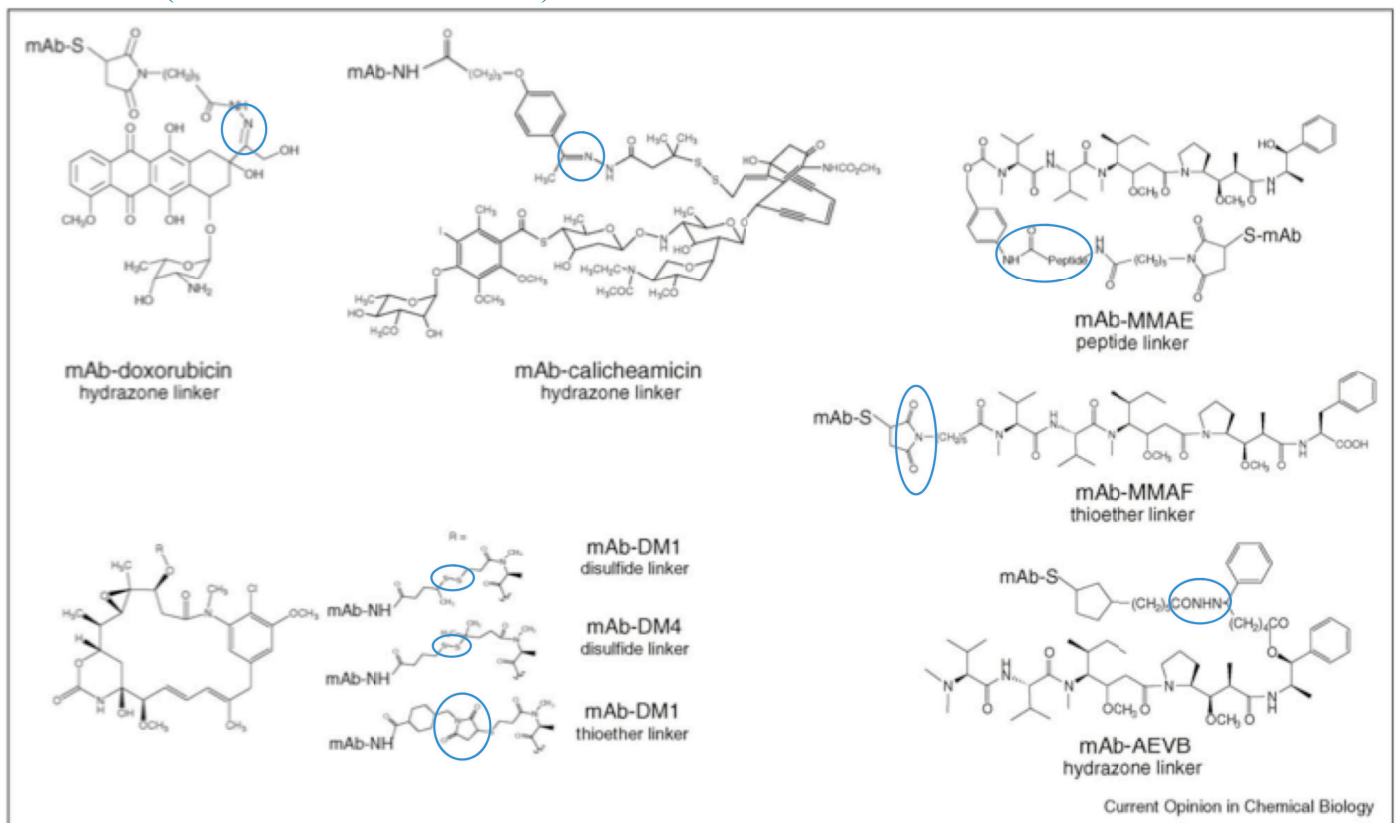


Figure n°7 : Structure des ADC développés actuellement. Les linkers sont de types hydrazones, disulfides, peptidiques ou thioether. Pour le thioether, le cytotoxique est libéré avec le linker et la lysine ou la cystéine de l'anticorps après dégradation protéolytique de l'anticorps. Source : (Senter 2009)

C- Les Agents de Liaison ou Linkers (Cf figure n°7)

Le rôle de l'agent de liaison est primordial, il doit être extrêmement stable dans la circulation générale pour ne pas libérer le cytotoxique de façon prématurée. Cela provoquerait des effets indésirables majeurs avec une atteinte des cellules saines. Ce n'est qu'après internalisation dans les endosomes que le linker doit se rompre pour libérer efficacement et sous forme active le cytotoxique (Lyer and Kadambi 2011). Les linkers sont bifonctionnels afin de faciliter l'accrochage à l'anticorps d'une part et à l'agent cytotoxique d'autre part. La fixation sur l'anticorps se fait principalement par acylation des lysines ou par alkylation des cystéines. Les agents de liaison sont classés en deux catégories : les linkers clivables, qui se « désintègrent » dans la cellule par un processus chimique ou enzymatique, et les linkers non clivables qui libèrent le cytotoxique avec au moins un acide aminé appartenant à l'anticorps.

Parmi les linkers clivables on trouve les hydrazones, qui sont stables à pH neutre et qui subissent une hydrolyse dans l'environnement acide du compartiment lysosomal. C'est ce type de liaison qui a été utilisée dans le Mylotarg® (Gentuzumab ozogamycin) premier ADC

à avoir obtenu une autorisation par la FDA en 2000 (Bross & Al 2001). Cependant ce type de linker est décrit comme associé à une libération prématurée et non spécifique en clinique. Aujourd'hui, après le retrait en 2010 du Mylotarg® par la firme Pfizer (FDA NEWS RELEASE 2010), un seul produit est en phase III avec cette technologie.

Le second linker clivable par un processus chimique est un pont disulfure. La rupture se fait dans le cytosol de la cellule où l'environnement est plus réducteur grâce aux hautes concentrations en glutathion (Casi & Neri 2012). Actuellement 2 constructions utilisent les dérivés de la maytansine (DMI et DM4) et le linker disulfure : le SPP et le SPDB. Le SPDB possède un disulfure optimisé avec un encombrement stérique qui empêche une réduction prématurée. C'est le linker clivable privilégié actuellement grâce à la haute stabilité qu'il apporte.

Un dernier linker entre dans la catégorie des clivables, il s'agit des peptides notamment le dipeptide valine-citrulline, qui subit une hydrolyse enzymatique par la cathepsine B, présente à des taux élevés dans certaines tumeurs (Ducry & Stump 2010). Ce linker est utilisé notamment dans des constructions avec les dérivés de l'auristatine MMAE et MMAF.

Les linkers non clivables requièrent, pour libérer le cytotoxique, la dégradation de l'anticorps par les enzymes protéolytiques de la cellule. Par conséquent le cytotoxique libéré est toujours attaché au linker. Ce type de liaison est typiquement assuré par un thioether, et se retrouve avec des dérivés de la maytansine ou de l'auristatine. Ce type de linker est plus stable dans la circulation donc mieux toléré mais il est aussi moins internalisé donc moins efficace (Lyer and Kadambi 2011).

Dans tous les cas, il n'y a pas de linker universel, chacun ayant ses avantages et ses inconvénients, et le choix dépend principalement du type de cancer ciblé et de l'agent cytotoxique utilisé.

Finalement chaque partie de l'ADC requiert des caractéristiques spécifiques, qui sont résumées dans le Tableau n° I.

Antigène	Surexprimé dans la tumeur Répartition homogène sur la cellule Non circulant Absent des tissus sains
Anticorps	Humanisé ou humain Non immunogène Longue demi vie Activité ADCC et/ou CDC Forte affinité pour l'antigène
Linker	Stable dans la circulation générale Libération du cytotoxique en intracellulaire Libération du cytotoxique sous forme active
Cytotoxique	Haute activité Faible poids moléculaire Stable et soluble dans les milieux aqueux Fonctions réactives disponibles pour la conjugaison

Tableau n° I : résumé des caractéristiques essentielles et souhaitables pour le développement d'un ADC.

II Présentation et Objectifs des travaux

2.1 Contexte de l'étude

Comme nous l'avons dit précédemment, le DAR est une des spécificités à prendre en compte et il est aujourd'hui pour les produits en développement autour d'une moyenne de 3 à 4. Les cytotoxiques peuvent être fixés sur les lysines ou sur les cystéines des ponts interchaines. Concernant les lysines, la réaction de conjugaison étant statistique (ce ne sont pas toujours les mêmes lysines qui sont conjuguées), plus de 100 espèces différentes peuvent être obtenues dont certaines n'ont pas les caractéristiques physico chimiques requises (Robert P. Lyon & Al 2012). Dans les deux cas, on obtient une population hétérogène avec différents ratios de cytotoxiques fixés.

C'est pourquoi les laboratoires cherchent aussi bien à maîtriser ce DAR qu'à le réduire au minimum. Diminuer le nombre de cytotoxique par anticorps se justifie par plusieurs raisons. En premier lieu, on sait que le DAR est corrélé à la tolérance. Ainsi un ADC avec un DAR de 4 aura une dose maximale tolérée double comparé à un ADC possédant un DAR de 8. Réduire le DAR permet d'accroître l'index thérapeutique et la sécurité du patient (Senter 2009). De plus les molécules utilisées actuellement sont très actives et 2 molécules fixées seraient suffisantes pour observer un effet. Parmi les constructions développées, certaines utilisant des linkers clivables possèdent un effet dit « Bystander ». Il s'agit de la capacité du cytotoxique libéré ou de ses métabolites non chargés à traverser les membranes cellulaires et à diffuser vers les cellules voisines. Par conséquent il n'est pas nécessaire de cibler toutes les cellules tumorales. Maîtriser cet effet pourrait avoir de grandes conséquences notamment pour cibler les tumeurs solides avec une expression antigénique de surface hétérogène (Lyer and Kadambi 2011).

Certains laboratoires comme Genentech, ont développé un concept intéressant appelé THIOMAB, en insérant des résidus cystéines sur la chaîne lourde à des sites spécifiques disponibles pour la conjugaison (Dosio & Al 2011). Une population homogène est obtenue avec seulement 2 molécules fixées par anticorps (Junutula & Al 2008). Cette technologie a été utilisée pour conjuguer la MMAE à un anticorps anti MUI6 (protéine de surface exprimée dans les cancers ovariens) et la DMI à Trastuzumab. Dans les deux cas on obtient une efficacité comparable aux ADC conventionnels mais avec une meilleure tolérance (Ritter 2012). D'autres laboratoires comme Ambrx ou Allozyne's développent également des technologies pour cibler les sites de conjugaison dans le but d'obtenir des populations homogènes de produits.

Bien que ces axes de recherches soient avancés, il est aujourd'hui encore difficile de préparer un ADC avec un DAR de 2, car une fraction non négligeable d'anticorps ne sera pas conjuguée (Dosio & Al 2011). C'est pourquoi Sanofi s'intéresse dès à présent à développer une technique de purification des immunoconjugués afin de séparer une population d'anticorps dits « nus » ou « modifiés » (qui n'a pas réagi avec le cytotoxique) d'une population dite « conjuguée ».

Une technique de chromatographie d'interactions hydrophobes a déjà été développée afin de quantifier la proportion d'anticorps nus vis-à-vis de la population d'anticorps conjugués. Une application de cette technique lors d'une étape de purification pour éliminer la population indésirable a été envisagée.

Ainsi mon étude intervient au sein de ce contexte et consiste à développer la technique de chromatographie d'interactions hydrophobes afin de pouvoir discriminer les deux populations précédemment citées lors d'une étape de purification.

2.2 Purification par chromatographie d'interactions hydrophobes

La technique de chromatographie par interactions hydrophobes fut développée tardivement dans les années 1970. C'est en 1973 que Shaltiel et Er-el décrivent cette méthode et que Hjertén introduit le terme de « chromatographie d'interactions hydrophobes » pour décrire la séparation des protéines par l'utilisation de sels sur des matrices de carbohydrates faiblement hydrophobes.

L'hydrophobicité est définie par la répulsion entre des composants non polaires et un environnement polaire comme l'eau. Ainsi la séparation des protéines en HIC est basée sur les interactions hydrophobes entre les régions non polaires des protéines et les ligands hydrophobes de la colonne. Il s'agit d'une interaction réversible favorisée par de fortes concentrations en sels (Nfor & Al 2011). L'adsorption augmente avec de fortes concentrations en sels dans la phase mobile et l'élution est obtenue en diminuant progressivement cette concentration.

2.2.1 Principe de séparation

La séparation des protéines en HIC se fait en 2 étapes. La première concerne l'adsorption des protéines sur la colonne et la seconde concerne son élution dans la phase mobile. (Cf figure n°8)

Comme nous l'avons dit précédemment, les protéines se fixent sur le support de la colonne en présence de sels. En effet dans un milieu à haute force ionique, les molécules d'eau sont mobilisées pour hydrater les anions et cations issus de la dissociation du sel. On parle d'effet « salting out ». L'environnement autour des protéines est modifié dû à la rareté des molécules d'eau disponibles, et ceci est thermodynamiquement favorable à l'établissement d'interactions hydrophobes entre la protéine et les groupements hydrophobes de la phase stationnaire (Marshak & Al 1996). En effet la présence de sel augmente l'énergie libre des protéines proportionnellement à la surface hydrophobe des protéines. Les associations intermoléculaires de groupes hydrophobes minimisent cette augmentation d'énergie libre en diminuant les interactions entre les surfaces hydrophobes des protéines et le solvant polaire du milieu. C'est pourquoi, lorsqu'on introduit une phase stationnaire hydrophobe dans le milieu, les protéines s'y lient pour diminuer cette énergie libre. A haute concentration en sel, l'interaction des protéines sur la colonne forme donc un état thermodynamiquement plus stable qu'un état sans interactions (Queiroz J.A. & Al 2001).

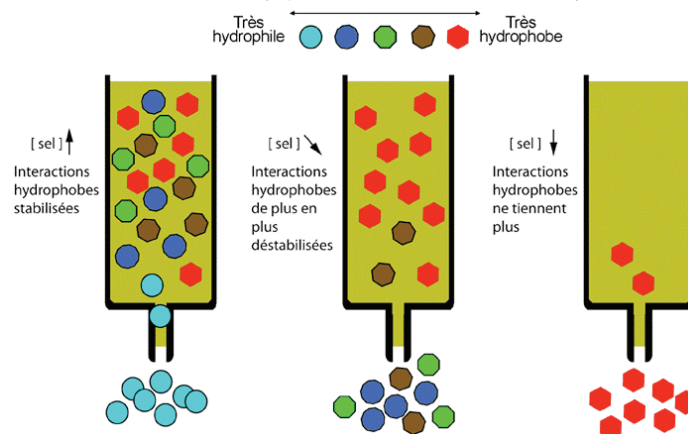


Figure n° 8 : principe de séparation schématique en HIC. Source : (Leblanc 2011). A forte concentration en sel, les régions hydrophobes des protéines interagissent avec les ligands hydrophobes de la colonne. Seules les molécules très hydrophiles sont éliminées. En diminuant progressivement la concentration en sel, on solubilise les protéines hydrophobes qui seront récupérées avec la phase mobile. Peu à peu, on récupère les protéines très hydrophobes.

L'élution se fait après rinçage en faisant passer un tampon de force ionique décroissante. Les ions du sel sont éliminés progressivement, les protéines se solubilisent peu à peu et sont éluées dans la phase mobile. Les protéines sont ainsi éluées par ordre d'hydrophobicité croissante.

2.2.2 Paramètres influents

Le degré d'hydrophobicité d'une protéine est dépendant de la somme des nombreux acides aminés non polaires présents à leur surface (phénylalanine, tryptophane, valine), ainsi que de leur distribution. Chaque protéine possède donc un degré d'hydrophobicité propre. Dans notre cas, les cytotoxiques sont hydrophobes. L'anticorps nu est donc moins hydrophobe qu'un conjugué avec un DAR de 1, lui-même moins hydrophobe qu'un conjugué avec un DAR de 2 etc. En intervenant sur les paramètres influents de la HIC, on peut alors essayer d'établir une séparation de ces différentes espèces.

Deux éléments majeurs sont à considérer pour obtenir une bonne séparation en HIC : la phase stationnaire et la phase mobile.

Les colonnes sont constituées de supports inertes d'agarose, de cellulose ou encore de copolymères synthétiques dont la taille peut varier et moduler la séparation. Sur ces billes sont greffés des ligands dont le type, la densité ou la longueur de la chaîne agit sur la séparation. Les ligands les plus souvent utilisés en HIC sont de type linéaire (Butyl, Hexyl, Octyl...). Le phényl et les ligands aromatiques sont également utilisés et présentent une interaction mixte hydrophobe/aromatique. (Cf figure n°9). Le développement d'une large gamme de phase stationnaire permet alors aujourd'hui d'avoir une grande variété d'applications en HIC dans la purification des biomolécules.

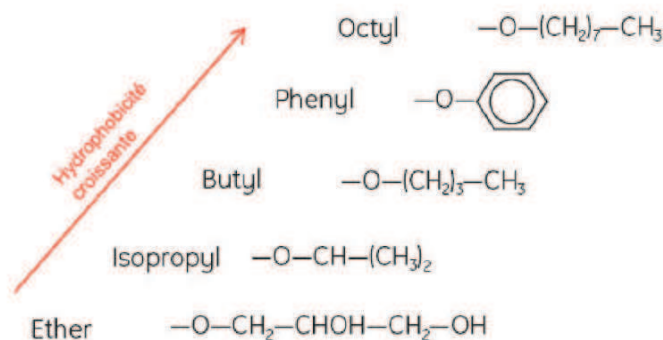


Figure n°9 : exemple de ligands utilisés en HIC. Source : (GE Healthcare Bio-sciences, 2006.)

En ce qui concerne la phase mobile, de nombreux paramètres interviennent dans la qualité de la séparation comme le type de sel et sa molarité, le pH de la solution, la température, la présence ou non d'additifs ainsi que la concentration en anticorps et la quantité injectée (Yuefeng Lu & Al 2009).

L'influence des différents sels dans la rétention des protéines suit l'ordre établi pour leur précipitation, il s'agit de la série de Hofmeister (Cf figure n°10). En effet à trop forte concentration, les sels peuvent causer la dénaturation partielle des protéines et induire leur précipitation (Nfor & Al 2011). En HIC, il faudra veiller à ne pas dépasser la concentration en sel qui induit la précipitation. Cela causerait une perte en produit et donc une baisse de rendement considérable.

Ainsi des sels comme le sulfate d'ammonium, le sulfate de sodium et le sulfate de potassium sont les plus efficaces pour promouvoir les interactions protéines-ligands grâce à leur comportement « salting out » élevé.

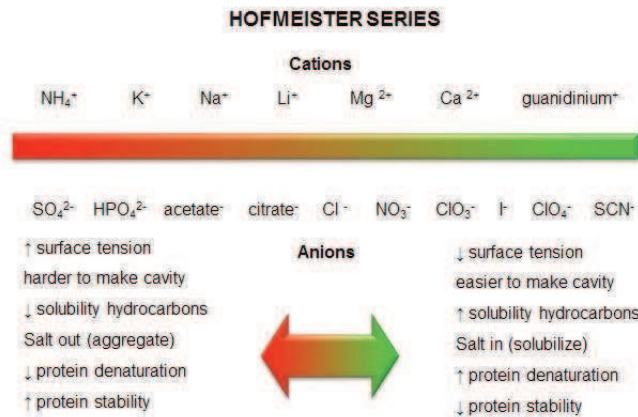


Figure n° 10 : Série de Hofmeister. De droite à gauche on observe l'effet anti chaotrope « salting out » qui favorise les interactions hydrophobes. A l'inverse de gauche à droite on observe l'effet chaotrope « salting in » qui diminue les interactions hydrophobes.

Pour le pH, il a été défini par Hjerten & Al en 1986 que la rétention des protéines s'opérait entre $5 < \text{pH} < 8.5$. En effet au dessus du point isoélectrique (~ 8 en moyenne pour les mabs), les protéines sont chargées négativement (fonctions acides sous forme carboxylates COO^-) ce qui induit une augmentation de leur hydrophilie. A l'inverse à un pH inférieur à 5 les protéines sont chargées positivement (fonctions amines protonées sous formes NH_3^+) et les interactions électrostatiques prédominent sur les interactions hydrophobes. Cette gamme de pH où travailler reste assez large et ce paramètre sera à prendre en considération lors du développement d'une séparation (Queiroz J.A. & Al 2001).

De la même manière la température influe sur la séparation et l'ajout d'aditifs peut permettre de moduler l'élution des protéines. Les plus utilisés sont miscibles à l'eau : alcools, détergents et solution aqueuses de sels chaotropiques.

2.3 Objectifs des travaux

En définitive et à la vue de tous ces paramètres, il paraît bien difficile de développer une technique HIC pour purifier l'ADC de l'anticorps nu. Pourtant, cela est rendu possible grâce à l'utilisation de plans d'expériences qui permettent d'étudier plusieurs de ces facteurs à la fois. L'objectif de ces travaux est donc de définir dans un premier temps les paramètres les plus influents sur la séparation de nos deux populations et de trouver ensuite les conditions optimales pour récupérer un ADC débarrassé des anticorps nus. L'idéal serait de trouver des conditions telles que l'anticorps nu ne soit pas retenu sur la colonne HIC et que seul l'ADC interagissent avec les ligands hydrophobes de la matrice et soit récupéré totalement lors de l'élution.

III Matériels et méthodes

N.B : L'incertitude sur certaines des données de ce chapitre est maintenue pour des raisons de confidentialité. Ceci n'entrave en rien la compréhension du sujet.

3.1 Préparation de l'immunoconjugué

3.1.1 Synthèse

La synthèse de l'immunoconjugué peut être fractionnée en 5 étapes :

- un changement de tampon par ultrafiltration/diafiltration (UF/DF) qui consiste à transférer l'anticorps dans un tampon adéquat pour les réactions chimiques.

- la modification ou activation, qui consiste à fixer les agents de liaison sur les anticorps monoclonaux.
- la conjugaison à proprement parler, soit la liaison du cytotoxique sur les agents de liaisons.
- la purification du produit pour éliminer les résidus de conjugaison.
- le conditionnement de l'immunoconjugué dans un tampon de formulation, qui augmente sa stabilité.

Les étapes 2 et 3 sont communément appelées « conjugaison ».

Ultrafiltration/Diafiltration (Cf annexe 2)

Le changement de tampon est réalisé par une opération de filtration à flux tangentielle (TFF). Le seuil de coupure des membranes utilisées est entre 3 et 5 fois inférieur à la masse moléculaire des anticorps à diafiltrés (~150kDa). La TFF s'effectue en deux étapes, d'abord une concentration afin de réduire le volume de travail, puis une diafiltration entre 6 et 12 DV (diavolumes) dans le tampon de réaction à pH 6-8. La diafiltration est effectuée à volume et à débit constants. Les quantités d'anticorps chargées sur les cassettes sont de l'ordre de 20 à 500 g/m².

Activation/Modification

Les réactions chimiques sont des réactions de « chimie dans l'eau » et peuvent donc être réalisées dans des flacons ou réacteurs en verre. La modification s'effectue à une concentration entre 2 et 20 g/L, dans un tampon phosphate avec 2 à 20% de solvant organique, ce qui nécessite une dilution dans le tampon de réaction après diafiltration. Une quantité fixée de l'agent de liaison par rapport à l'anticorps est introduite dans le contenant. Cet agent est préalablement préparé en solution dans le solvant organique. La réaction a lieu sous agitation à température ambiante durant quelques heures.

Conjugaison

La conjugaison est réalisée dans le milieu réactionnel précédent après une dilution. La quantité de solvant organique nécessaire pour avoir entre 2 à 20% du volume final et le cytotoxique sont ajoutés. L'excès de cytotoxique doit permettre de ne pas laisser d'agent de liaison non-conjugué car ce serait une impureté difficile à éliminer. La réaction a ensuite lieu sans agitation et à température ambiante, durant environ une journée.

Purification

En sortie de conjugaison, le produit est instable, se dégrade rapidement et présente une très forte tendance à l'agrégation car les réactions chimiques se poursuivent. Une étape de purification est donc nécessaire pour éliminer les résidus de la réaction. Dans certains procédés cette étape peut être couplée avec un changement de tampon en utilisant une seconde UF/DF. Le seuil de coupure des membranes permet d'éliminer les petites molécules chimiques et l'excès de solvant organique, afin d'obtenir un échantillon stable sur plusieurs jours. Dans d'autres cas, comme celui des expériences réalisées ici, une étape de purification intermédiaire est nécessaire simplement pour générer un produit pur.

Formulation

L'immunoconjugué purifié est dépourvu des résidus de la réaction mais il reste dans un tampon qui n'est pas favorable à sa stabilité. La présence de sels de phosphate peut induire à long terme sa précipitation. C'est pourquoi on transfère l'ADC dans un tampon de formulation contenant de l'acétate de sodium, du sucrose, du polysorbate et autres composants qui augmentent la stabilité du produit.

3.1.2 Caractérisation du produit (Wakankar A. & Al 2011)

A- Analyse Ultra-Violet UV

Les concentrations de l'anticorps nu et de l'ADC, ainsi que le DAR sont déterminées par la loi de Beer Lambert avec les longueurs d'ondes d'absorption maximales de l'anticorps et du cytotoxique.

Concentration en Anticorps (g/L)

$$[Ac] = \frac{A_{Ac}^{280nm}}{\epsilon_{Ac} \times l} \times M_{Ac}$$

Avec : l, longueur de la cuve en cm

ϵ , coefficient d'absorption molaire en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$

M, masse molaire en $g \cdot mol^{-1}$

Concentration en cytotoxique

On définit les relations suivantes

$$A_{cyto}^{\lambda \max} = A_{totale}^{\lambda \max} - A_{Ac}^{\lambda \max} \quad \text{et} \quad \frac{A_{Ac}^{\lambda \max}}{\epsilon_{Ac}^{\lambda \max}} = \frac{A_{Ac}^{280nm}}{\epsilon_{Ac}^{280nm}}$$

On a donc :

$$A_{Ac}^{\lambda \max} = \epsilon_{Ac}^{\lambda \max} \times \frac{A_{Ac}^{280nm}}{\epsilon_{Ac}^{280nm}}$$

On obtient alors la relation suivante :

$$[Cyto] = \frac{A_{totale}^{\lambda \max} - \left(\epsilon_{Ac}^{\lambda \max} \times \frac{A_{Ac}^{280nm}}{\epsilon_{Ac}^{280nm}} \right)}{\epsilon_{Cyto}^{\lambda \max}} \times M_{cyto}$$

Concentration en ADC (g/L)

$$[ADC] = \frac{A_{totale}^{280nm} - \left([Cyto] \times \frac{A_{Cyto}^{280nm}}{M_{cyto}} \right)}{\epsilon_{Ac}^{280nm}} \times M_{Ac}$$

DAR

$$DAR = \frac{[Cyto]}{[Ac]}$$

B- Analyse par Chromatographie d'exclusion stérique SEC

Cette technique permet la séparation des protéines en fonction de leur taille. Les colonnes sont constituées de billes creuses et poreuses dont la taille des pores permet l'entrée de petites molécules. Les grosses molécules ne pouvant pas entrer dans ces billes passent directement à travers la colonne. On peut ainsi déterminer la présence de dimères et d'agrégats. (Cf annexe 2)

Les analyses sont réalisées à l'aide d'un système HPLC LaChrom Elite® équipée d'une colonne et d'une colonne de garde TSK Gel (TOSOHAAAS), avec un diamètre de particules de 5 μ m. La séparation est effectuée dans un tampon phosphate à pH neutre, sur une durée de 30 minutes.

La mesure de surfaces en normalisation interne (NIS) à 280 nm, donne un pourcentage de l'aire des agrégats, un pourcentage de l'aire des monomères et un pourcentage de l'aire des fragments (lorsqu'ils sont détectables), pour un total de 100%.

A partir des aires mesurées au maximum d'absorption de l'anticorps et du cytotoxique, on peut calculer leur concentration respective et obtenir par la suite la mesure du DAR.

C- Analyse par Spectrométrie de masse Haute résolution

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet d'identifier des molécules d'intérêts par leur rapport masse sur charge après fragmentation dans une source d'ions. Cela permet d'identifier les molécules et d'en faire leur analyse structurale. Les analyses sont réalisées à l'aide d'un système QTOF-2(Waters) Chaîne HPLC HPI100 avec l'utilisation d'une colonne SEC Acquity BEH200 avec un diamètre de 1.7µm. La séparation est effectuée à l'aide de 2 tampons constitués pour le premier d'un mélange eau/formiate d'ammonium/acide formique et pour le second d'un mélange acétonitrile/acide formique.

L'ionisation se fait par électro spray en mode positif et la durée d'analyse est de 15 minutes. Grâce a cette méthode, on peut déterminer la proportion de chaque population de notre immunoconjugué. (Cf figure n° 11)

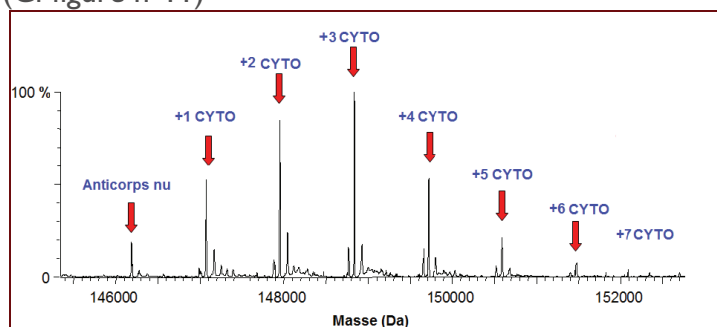


Figure n° 11 : Exemple d'un spectre SE-HPLC/MS d'un ADC. L'analyse en spectrométrie de masse permet d'observer la répartition en cytotoxiques (cyto) sur la population d'immunoconjugués. Légende : SE-HPLC = Chromatographie Liquide d'Exclusion Stérique Haute Performance, MS = Spectrométrie de Masse.

3.2 Matière première utilisée

L'immunoconjugué obtenu à la fin du procédé de conjugaison décrit précédemment se trouve dans un tampon qui n'est pas optimal pour la réalisation des essais. Il contient des espèces telles que du solvant organique, de l'agent cytotoxique en excès ainsi que les résidus de la réaction. Une chromatographie constituée d'hydroxyapatite est donc réalisée (BioRad). (Cf annexe 2) L'interaction se fait par le calcium qui réagit avec les groupements acides des protéines et par le phosphate qui interagit avec les groupements aminés. L'élution se fait par un gradient de phosphate. Cela permet à la fois concentrer notre immunoconjugué et de l'obtenir dans un tampon phosphate 200mM à pH6.6 qui servira de base pour la réalisation des essais futurs.

De plus, pour la réalisation des premiers plans de criblage, la proportion d'anticorps nus dans notre ADC était très faible (<5%), c'est pourquoi 50% d'anticorps nus ont été ajoutés volontairement à notre ADC, afin de discriminer correctement nos résultats.

3.3 La méthode des plans d'expériences

La réalisation des plans d'expériences permet d'obtenir le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences (Goupy 2001). Leur utilisation, quand cela est possible, permet de réduire le temps de développement et ainsi de réduire les coûts. C'est donc naturellement devenu un outil incontournable dans l'industrie pharmaceutique depuis quelques années, permettant de développer et d'optimiser plus rapidement les

procédés. En effet ils permettent de répondre à deux grandes familles de questions : comment estimer et comparer les effets des paramètres de réglages d'un processus ? Et comment régler les paramètres de réglage d'un processus pour atteindre un optimum ?

De plus comprendre le processus et son comportement permet d'avoir une plus grande marge de manœuvre en cas de changement mineur de ce dernier. La compréhension de la méthode des plans d'expériences s'appuie sur 2 notions essentielles : celles de l'espace expérimental et celle de la modélisation mathématique des grandeurs étudiées. L'intérêt de modéliser la réponse par un polynôme est de pouvoir calculer ensuite toutes les réponses du domaine de l'étude sans être obligé de faire les expériences.

Dans le vocabulaire des plans d'expériences, la grandeur que l'on étudie est appelée réponse. Celle-ci dépend de plusieurs variables qui sont appelées des facteurs. Ces facteurs peuvent prendre plusieurs valeurs et on parlera de niveaux ou de modalités. (Cela permet notamment de prendre en compte des variables qualitatives.) (Louvet F. & Delplanque L. 2005).

En reprenant les différents facteurs cités comme étant influent en HIC, l'utilisation des plans d'expériences paraît évidente. Cela nous permettra d'évaluer les facteurs les plus influents et de savoir dans quelles conditions les mettre en œuvre pour atteindre notre objectif ou notre optimum. C'est ainsi que deux plans de criblages ont été réalisés ainsi que deux surfaces de réponse dont les caractéristiques vont être présentées.

NB : Pour les plans de criblages, un mélange de produit constitué à 50% d'ADC et à 50% d'anticorps nus a été utilisé, de façon à bien différencier ces deux populations lors de la séparation.

3.3.1 Premier plan de criblage.

Notre premier plan de criblage a consisté à étudier 9 colonnes, 3 sels, 2 pH et 2 molarités différentes. (Cf tableau n°2). Les colonnes sont issues de 2 fabricants : GE Healthcare® et Tosoh®. Le choix des deux pH est dans un premier temps arbitraire, tout en restant dans l'intervalle $5 < \text{pH} < 8,5$. Les sels ont été choisis avec la série de Hofmeister. Pour ce plan de criblage un modèle additif sans interaction, appelé modèle de « pesée » a été adopté afin de pouvoir estimer et comparer uniquement les effets moyens des facteurs.

Le domaine expérimental contient donc 2 facteurs à 2 modalités, 1 facteur à 3 modalités et 1 facteur à 9 modalités (Cf tableau n°2) soit $2^2 \times 3^1 \times 9^1 = 108$ essais si toutes les combinaisons sont testées.

	Facteur	Nbre Niveaux	Niveaux
U1	pH	2	6.5 7.5
U2	molarité	2	200 500
U3	sels	3	KPi KCl (NH ₄) ₂ SO ₄ Butyl HP Butyl FF Octyl FF
U4	colonnes	9	Phenyl 6 FF low sub PPG 600M Butyl 650M Phenyl 650M Hexyl 650C Ether 650M

Tableau n°2 : Domaine expérimental du premier plan de criblage.

Le modèle mathématique utilisé prend la forme de l'équation suivante :

$$Y = b_0 + b_{1A} \times (X_{1A}) + b_{2A} \times (X_{2A}) + b_{3A} \times (X_{3A}) + b_{3B} \times (X_{3B}) + b_{4A} \times (X_{4A}) + b_{4B} \times (X_{4B}) + b_{4C} \times (X_{4C}) + b_{4D} \times (X_{4D}) + b_{4E} \times (X_{4E}) + b_{4F} \times (X_{4F}) + b_{4G} \times (X_{4G}) + b_{4H} \times (X_{4H})$$

Avec « b0 », la réponse moyenne, les coefficients « bi » qui représentent le « poids » des facteurs mis en œuvre et « Xi » qui représentent les facteurs codés, sans dimension. Le plan d'expérimentation est défini grâce au logiciel NemrodW® (D. Mathieu, R. Phan-Tu-Luu, J. Noni 2000) et comporte 16 expériences. (Cf tableau n°3)

N°Exp	pH	Molarité (mM)	Sels	Colonnes
1	6.5	500	KPi	Butyl HP
2	7.5	200	(NH ₄) ₂ SO ₄	Butyl HP
3	6.5	200	KPi	Butyl FF
4	7.5	500	(NH ₄) ₂ SO ₄	Butyl FF
5	7.5	500	KCl	Octyl FF
6	6.5	200	(NH ₄) ₂ SO ₄	Octyl FF
7	6.5	200	KCl	Phenyl 6 FF low sub
8	7.5	500	(NH ₄) ₂ SO ₄	Phenyl 6 FF low sub
9	6.5	200	KCl	PPG 600M
10	7.5	200	KCl	Butyl 650M
11	6.5	500	(NH ₄) ₂ SO ₄	Butyl 650M
12	7.5	500	KPi	Phenyl 650M
13	6.5	200	(NH ₄) ₂ SO ₄	Phenyl 650M
14	7.5	200	KPi	Hexyl 650C
15	7.5	200	KPi	Ether 650M
16	6.5	500	KCl	Ether 650M

Tableau n°3 : Plan d'expérimentation du premier plan de criblage. Il comporte 16 expériences, les colonnes sont testées 2 fois en tout excepté la colonne PPG600M et la colonne Hexyl 650C, testées une seule fois.

Certains facteurs potentiellement influents ont été fixés volontairement car nous ne pouvons pas tous les étudier en même temps. Ainsi la concentration de la solution d'anticorps a été fixée à 5g/L et la quantité injectée sur la colonne de 10mg/mL de colonne. De la même façon, le tampon d'élution est constitué de phosphate de potassium à une concentration de 20mM.

Les réponses suivantes ont été mesurées pour ce plan : Le rendement dans la fraction non retenue (c'est à dire les composés non retenus par la colonne lors de la charge) ainsi que le DAR de cette fraction, et le rendement de la fraction d'élution et son DAR. L'objectif de nos essais est d'obtenir des conditions assez hydrophobes pour que l'ADC interagisse avec la matrice et soit récupéré lors de l'élution sans retenir l'anticorps nu qui serait éliminé dès la charge dans la fraction non retenue.

3.3.2 Second plan de criblage

Un second plan de criblage a été réalisé afin d'affiner le choix des facteurs. 2 colonnes ont été gardées (Butyl FF et HP de GE Healthcare®) ainsi que 2 sels (phosphate de potassium et chlorure de potassium) que nous testerons à 2 molarités différentes : une molarité basse, et une molarité haute (les valeurs étant différentes pour les deux sels : 1M et 2M pour le KCl et 500mM et 1M pour le KPi)

Le modèle adopté pour ce plan est un plan factoriel complet 2³. Le domaine expérimental contient donc 3 facteurs à 2 modalités. (Cf tableau n°4)

Facteur	Nbre Niveaux	Niveaux
Colonne	2	Butyl HP
		Butyl FF
Sels	2	Kpi
		KCl
Molarité	2	bas
		Haut

Tableau n°4 : domaine expérimental du second plan de criblage.

Le modèle mathématique prend la forme de l'équation suivante :

$$Y = b_0 + b_1 \times (X_1) + b_2 \times (X_2) + b_3 \times (X_3)$$

Le plan d'expérimentation est détaillé dans le tableau n°5

N°Exp	Colonne	Sels	Molarité
1	Butyl FF	KCl	Haut
2	Butyl HP	KCl	Haut
3	Butyl HP	Kpi	Haut
4	Butyl FF	Kpi	bas
5	Butyl HP	KCl	bas
6	Butyl FF	Kpi	Haut
7	Butyl FF	KCl	bas
8	Butyl HP	Kpi	bas

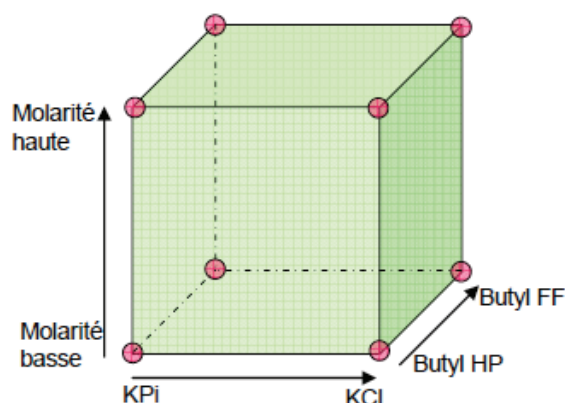


Tableau n°5 : Plan d'expérimentation réalisé et modélisation 3D des expériences. La molarité haute correspond à 2M pour le chlorure de potassium et 1M pour le phosphate de potassium. La molarité basse correspond à 1M pour le chlorure de potassium et 500mM pour le phosphate de potassium.

La concentration de la solution, la quantité chargée sur la colonne, le tampon d'élution ainsi que le pH ont été fixés. Les réponses mesurées pour ce plan sont les mêmes que pour le plan précédent : rendement et DAR dans la fraction non retenue et dans la fraction d'élution.

3.3.3 Surface de réponses

Afin de connaître la valeur d'une ou plusieurs réponses expérimentales en n'importe quel point du domaine, des plans de surface de réponses ont été réalisés. Un plan est accompli pour chacune de nos deux populations c'est-à-dire une surface de réponse pour l'anticorps nu et une surface de réponse pour l'ADC (qui contient une faible proportion d'anticorps nu).

Jusqu'à présent, la quantité de produit chargé sur la colonne était fixée à 10mg/mL. Pour savoir si la charge a une influence sur la séparation, nous avons fait varier cette quantité avec la composition du tampon.

A- Surface de réponses Anticorps nu

D'après les données actuelles de la littérature, la quantité chargée sur une colonne est de l'ordre de 20mg/mL de colonne. Or, nous savons que la population d'anticorps nus n'est pas majoritaire dans notre produit que l'on souhaite purifier. Il n'est donc pas utile de tester des charges en anticorps nus trop importante. C'est pourquoi on a décidé de tester des charges en anticorps nus de 1mg/mL, 3mg/mL et 5mg/mL de colonne (soit l'équivalent d'une proportion de 5%, 15% ou 25% d'anticorps nus dans notre produit). La concentration en phosphate de potassium, sel sélectionné par les plans de criblages, sera testée à 500mM, 750mM et 1M. 9 expériences sont donc réalisées.

Le modèle établi est un plan factoriel complet à 2 facteurs et 3 modalités et prend la forme de l'équation suivante :

$$Y = b_0 + b_1 \times X_1 + b_2 \times X_2 + b_{1-1} \times (X_1.X_1) + b_{2-2} \times (X_2.X_2) + b_{1-2} \times (X_1.X_2)$$

Avec « b_0 » la réponse au centre du domaine, « b_i », « b_j » et « b_{ij} » qui représentent les coefficients du modèle et « X_i » qui sont les facteurs codés corrélés aux paramètres étudiés. Les X_i sont sans dimension et varient entre +1 et -1. Il est normalement nécessaire de réaliser des points tests à posteriori pour valider le modèle, mais ils n'ont pas été réalisés dans notre cas par manque de produit disponible issu d'un même lot.

Ce plan est en fait réalisé 2 fois pour chaque colonne sélectionnée. Le plan

d'expérimentation est détaillé dans le tableau n°6 pour la colonne butyl FF.

N°Exp	Colonne	charge	Molarité
1	Butyl FF	1	500
2	Butyl FF	1	750
3	Butyl FF	1	1000
4	Butyl FF	3	500
5	Butyl FF	3	750
6	Butyl FF	3	1000
7	Butyl FF	5	500
8	Butyl FF	5	750
9	Butyl FF	5	1000

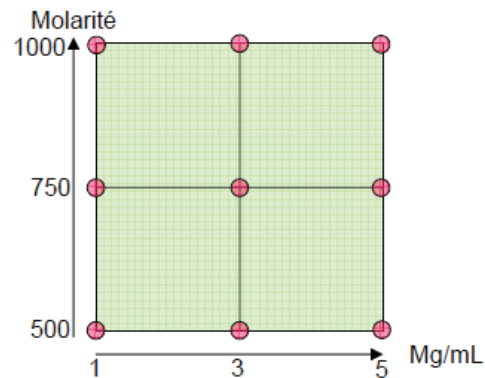


Tableau n°6 : plan d'expérimentation et modélisation 2D pour obtenir la surface de réponse de l'anticorps nu. Ce même plan a été réalisé avec la colonne Butyl HP.

Le rendement dans la fraction non retenue est la réponse mesurée pour ce plan d'expérience. En effet on souhaite que l'anticorps nu n'interagisse pas avec la matrice et soit éliminé dès le lavage post charge.

B- Surface de réponses ADC

Grâce aux résultats de premier plan de surface, une seule colonne est utilisée pour réaliser ce second plan. De la même façon la charge de produit sur la colonne ainsi que la molarité du tampon ont été testées. L'ADC étant la population majoritaire par rapport à l'anticorps nu, des charges plus élevées que pour le dernier plan ont été utilisées. Ainsi les charges à 5mg/mL, 10mg/ml et 15mg/mL ont été retenues. Concernant la molarité des tampons, les résultats du plan précédent nous ont permis de ne plus prendre en compte la concentration à 1M et de se focaliser en dessous de 750mM. Les molarités retenues sont donc 250mM, 500mM et 750mM de KPi.

Le modèle établi est un plan factoriel complet à 2 facteurs et 3 modalités et prend la forme de l'équation suivante :

$$Y = b_0 + b_1 \times X_1 + b_2 \times X_2 + b_{1-1} \times (X_1.X_1) + b_{2-2} \times (X_2.X_2) + b_{1-2} \times (X_1.X_2)$$

Le plan d'expérimentation est détaillé dans le tableau n°7.

N°Exp	Charge	Kpi
	mg/ml	mM
1	5.0	250
2	15.0	250
3	5.0	750
4	15.0	750
5	5.0	500
6	15.0	500
7	10.0	250
8	10.0	750
9	10.0	500
10	10.0	500
11	10.0	500
12	7.8	438
13	12.2	438
14	10.0	625

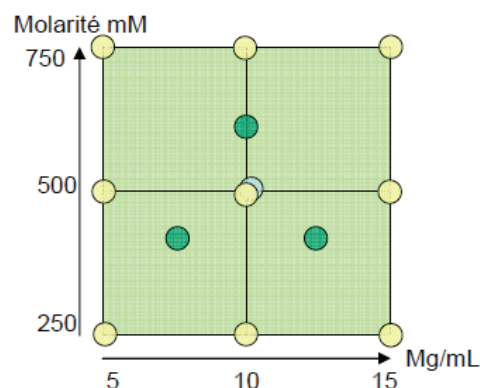


Tableau n°7 : plan d'expérimentation et modélisation 2D des expériences pour obtenir la surface de réponse de l'immunoconjugué. En jaune les points de la matrice, en bleu les points au centre (servant à connaître le bruit et la courbure) et en vert les points tests servant à vérifier le modèle postulé dans tout le domaine d'intérêt. Le point test 625mM KPi et 10mg/mL n'a en réalité pas été réalisé par manque de produit issu du même lot de fabrication.

Les réponses mesurées sont donc essentiellement le rendement et le DAR de la fraction d'élution mais également le rendement et le DAR de la fraction non retenue. En effet notre produit contient initialement une faible proportion d'anticorps nus (<10%).

3.4 Test sur un Brut de conjugaison

Suite à la réalisation des différents plans de criblages et de surface de réponses, nous avons déterminé des conditions dites « optimales » pour satisfaire notre objectif. Ce point optimal a donc été vérifié sur un ADC purifié (uniquement dans un tampon phosphate) puis sur un brut réactionnel (contenant du solvant organique et du cytotoxique libre), afin d'étudier le comportement de ces espèces libres dans notre séparation.

3.5 Matériels

L'ensemble des essais a été réalisé sur une chromatographie Äkta Explorer de GE Healthcare®. Le logiciel UNICORN™ est utilisé pour piloter les essais. Un programme est édité pour chaque manipulation et comprend les parties suivantes (Cf Annexe 4) :

- Equilibration de la colonne avec le tampon de départ.
- Charge sur la colonne, où l'on définit le volume à injecter.
- Rinçage de la colonne et fractionnement du pic, si détection de matière non retenue sur la colonne.
- Elution avec un second tampon (20mM KPi) en gradient ou en palier. Un fractionnement de l'élution est effectué pour récupérer dans un tube l'équivalent de un volume colonne à chaque fois.
- Rinçage après élution
- Sanitization de la colonne à la soude IN pour détruire les éventuelles protéines non éluées.

Pour les plans de criblages, les colonnes « HiTrap HIC selection kit » de GE Healthcare® et les colonnes « ToyoScreen HIC » de Tosoh® sont utilisées. Elles ont un volume de 1mL et le débit utilisé est de 1mL/min. (Cf Annexe 3)

Pour les surfaces de réponses, les colonnes « HiScreen HIC » de GE Healthcare® ont été utilisées. Elles ont un volume de 4,7mL. Le débit imposé est de 150cm/h (1.1mL/min) pour la colonne HiScreen Butyl HP et de 240cm/h (1.8 mL/min) pour la colonne HiScreen Butyl FF.

Le logiciel NemrodW® a été utilisé pour la création des plans d'expériences et le logiciel Modde® a été utilisé pour obtenir certaines figures notamment la modélisation des résultats des plans de surface.

IV Résultats et discussion

4.1 Résultats du premier plan de criblage

Selon Jakobsson, quand on veut développer une technique HIC pour la purification des protéines, il faut dans un premier temps définir le choix : de sa phase stationnaire, de son sel et de son pH (Jakobsson & Al 2005). C'est pourquoi notre premier plan a consisté à étudier ces paramètres. Le choix d'étudier 9 colonnes se justifie par le fait qu'en plus de la différence d'hydrophobicité apportée par les différents ligands, cela permet d'étudier l'influence du média. En effet les résines GE Healthcare® sont constituées de billes en agarose alors que les résines Tosoh® sont en polyacrylamide. (Cf Annexe 3).

Beaucoup d'études utilisent comme sel le sulfate d'ammonium car il fait parti des sels les plus insolubilisant. Cependant, notre immunoconjugué ayant déjà un potentiel hydrophobe supérieur à une protéine classique, nous avons souhaité étudier des sels moins insolubilisant,

ce qui éviterait la précipitation de l'immunoconugué. De plus le phosphate de potassium est un sel déjà présent dans le procédé de purification de l'immunoconugué. L'utiliser éviterait d'apporter une nouvelle espèce dans le milieu. Concernant les molarités, des tests préliminaires nous ont montrés qu'à une concentration de 1M en sulfate d'ammonium, nos protéines précipitent. Nous avons donc décidé de travailler à des concentrations plus basses (200mM et 500mM)

Pour chaque expérience, le calcul des rendements et du DAR a été calculé par dosage UV. Les résultats sont compilés dans le tableau n° 8.

N°Exp	Rdt NR	Rdt Elution	Dar NR	Dar Elution
	%	%		
1	61.7	55.4	0.1	4.2
2	76.6	48.4	0.4	5.2
3	93.0	0	1.6	0
4	57.3	78.9	0	4.3
5	99.0	0	1.4	0
6	97.1	0	1.2	0
7	82.8	0	1.2	0
8	56.4	59.2	0	4.1
9	83.9	0	1.4	0
10	67.0	0	0	0
11	65.5	0	0	0
12	61.7	0	0	0
13	68.9	0	0	0
14	42.5	14.8	0	0.2
15	102.4	0	2.0	0
16	102.8	0	2.1	0

Tableau n°8 : Résultats du premier plan de criblage étudiant 9 colonnes, 3 sels à 2 concentrations différentes et à 2 pH différents. Le rendement dans la fraction non retenue correspond à un rendement global (ADC + Ac nu) tandis que le rendement d'éluion ne fait référence qu'à la quantité d'ADC mise en jeu (50% de la quantité totale).

Nous obtenons 3 profils :

Le premier cas de figure montre un rendement dans la fraction non retenue proche de 100% avec un DAR d'environ 2 et 0% de rendement dans l'éluion, et donc un DAR de 0. (Exemple expérience n°3, tableau n°8). Notre anticorps conjugué n'a donc pas interagité avec la colonne et a été éliminé dès le départ.

Dans le second cas de figure, nous obtenons un rendement de l'ordre de 60% dans la fraction non retenue avec un DAR de 0 : il s'agit de notre anticorps nu. Cependant, l'ADC n'est pas élué et se décroche sous l'effet de la soude en fin de programme. (Exemple expérience n° 11, tableau n°8). Nous sommes dans des conditions qui peuvent discriminer les deux populations, mais nous ne pouvons pas récupérer notre produit, détruit par la soude.

Enfin dans le dernier cas de figure nous obtenons un rendement dans la fraction non retenue proche de 60% avec un DAR de 0 et un rendement d'éluion concernant uniquement l'ADC supérieur à 50 % avec un DAR de 4 (le DAR initial de l'ADC seul est de 5). (Exemple n°8, tableau n°8). C'est ce cas de figure qui nous intéresse et que nous voulons exploiter.

Le logiciel NemrodW® réalise ensuite pour chaque réponse des tests statistiques (tests de Student, analyse de la variance par un test de Fischer, calculs des résidus et test de normalité.) pour estimer la valeur des coefficients et déterminer si le modèle étudié est explicatif. Cependant dans un plan de criblage, on cherche uniquement à savoir quels coefficients sont les plus actifs et non d'utiliser le modèle dans un but de prévision dans le domaine expérimental. En effet, une étude de criblage met en œuvre un modèle trop simpliste, un écart par rapport au modèle peut être dû non seulement à l'erreur expérimentale mais surtout à l'erreur du modèle lui-même.

Pour chaque réponse étudiée, le logiciel NemrodW® réalise des graphiques qui permettent de visualiser les effets des facteurs. Le delta de poids entre les niveaux nous permet de voir

si cet effet est actif ou non et les effets totaux nous permettent de voir dans quel sens l'effet a lieu (augmentation ou diminution de la réponse mesurée)

La figure n° 12 correspond à la réponse mesurée « Rendement Elution » et la figure n° 13 à la réponse « DAR de la fraction d'élution ».

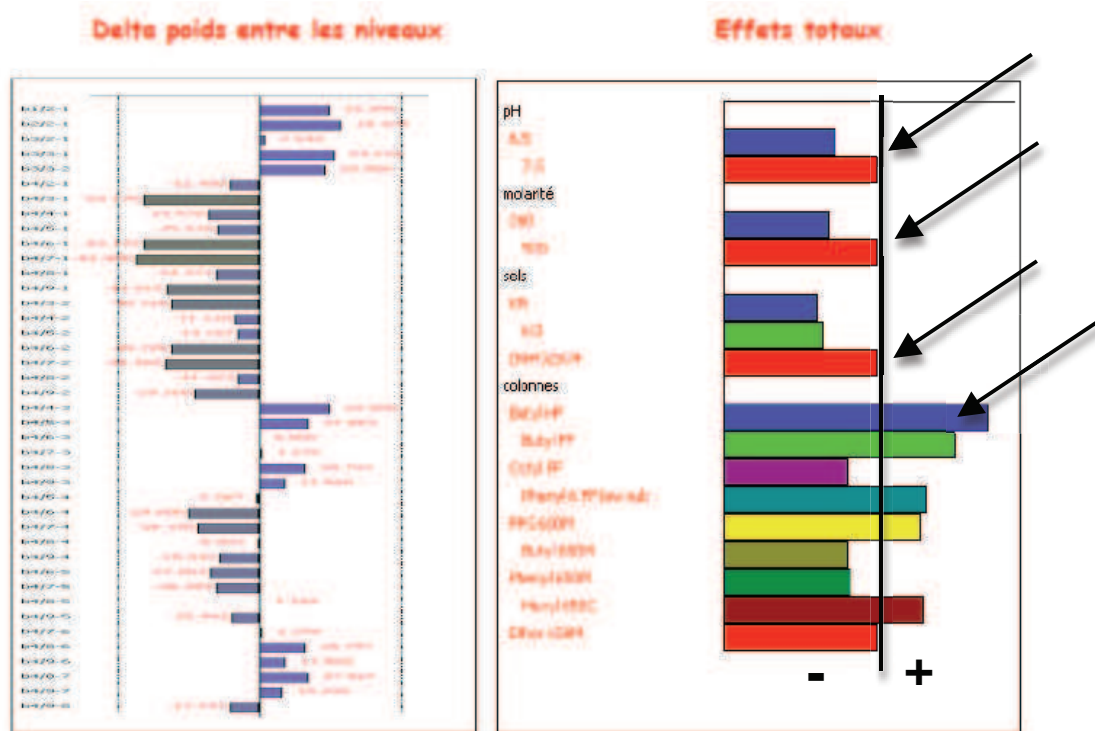


Figure n° 12 : Etude graphique de la réponse « Rendement d'élution » pour le 1^{er} plan de criblage. A gauche, le delta des poids entre les niveaux, ici aucun n'est significatif (Ils ne sortent pas des bornes). A droite, les effets totaux des facteurs.

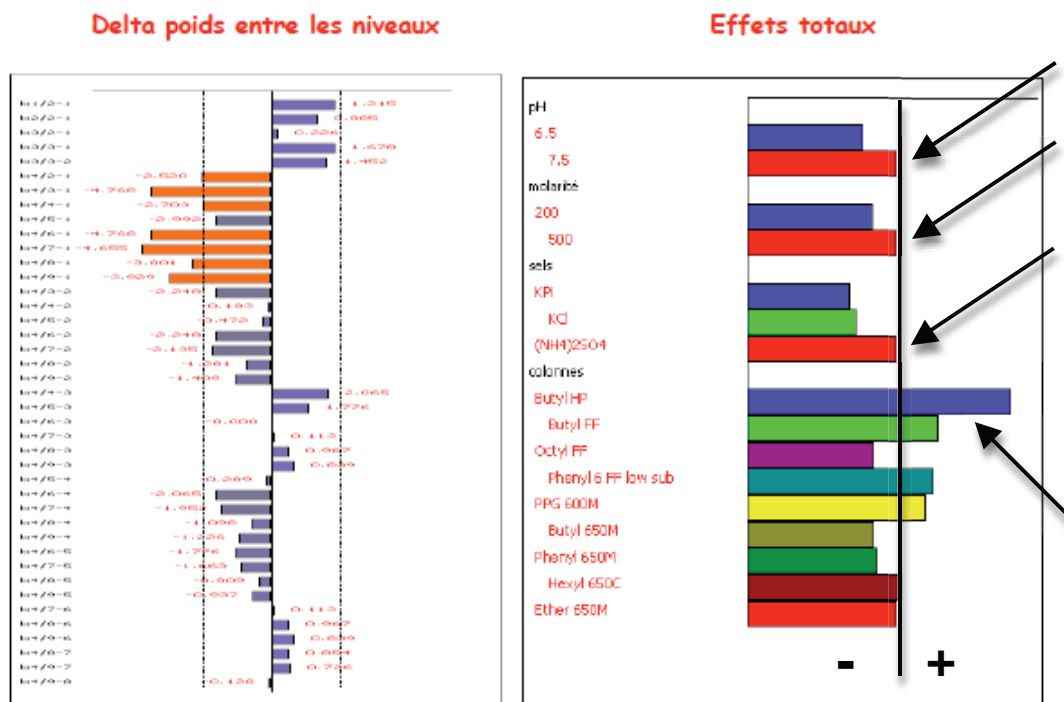


Figure n° 13 : Etude graphique de la réponse « DAR élution » pour le 1^{er} plan de criblage. A gauche, le delta des poids entre les niveaux, ici les coefficients liés à la nature de la colonne sont actifs (ils dépassent les bornes établies et sont en orange sur le diagramme). A droite, les effets totaux des facteurs.

En compilant les résultats obtenus, on se rend compte que tous les facteurs ne sont pas significativement actifs. Cependant, avec pragmatisme, on constate que certaines modalités sont préférables à d'autres. (Cf tableau n°9)

	Tendance	pH	Niveau	Molarité	Niveau	Sels	Modalité	Colonnes	Modalité
En passant de		6.5 à 7.5		200 à 500 (mM)		Kpi KCl (NH ₄) ₂ SO ₄		Butyl HP Butyl FF Octyl FF Phenyl 6 FF PPG 600M Butyl 650M Phenyl 650M Hexyl 650C Ether 650M	
Rdt NR	↓	-6 %	-	↓ -11 %	-	↑ 1) Kpi 2) KCl 3) (NH ₄) ₂ SO ₄	KCl	↑ 1) Ether 650M 2) Octyl FF 3) Butyl FF 4) Butyl HP 5) PPG 600M 6) Phenyl FF 7) Phenyl 650M 8) Butyl 650M 9) Hexyl 650C	Ether 650M
Rdt Elution	↑	16 %	+	↑ 18 %	+	↑ 1) (NH ₄) ₂ SO ₄ 2) Kpi 3) KCl	(NH ₄) ₂ SO ₄	↑ 1) Butyl HP 2) Butyl FF 3) Phenyl FF 4) PPG 600M 5) Hexyl 650C 6) Ether 650M 7) Phenyl 650M 8) Butyl 650M 9) Octyl FF	Butyl HP
Dar NR	↓	-0.3	+	↓ -0.4	+	↓ 3) KCl 2) Kpi 1) (NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	↓ 9) Ether 650M 8) Octyl FF 7) PPG 600M 6) Butyl FF 5) Phenyl FF 4) Butyl HP 3) Butyl 650M 2) Phenyl 650M 1) Hexyl 650C	Hexyl 650C
Dar Elution	↑	1.2	+	↑ 0.9	+	↑ 1) (NH ₄) ₂ SO ₄ 2) KCl 3) Kpi	(NH ₄) ₂ SO ₄	↑ 1) Butyl HP 2) Butyl FF 3) Phenyl FF 4) PPG 600M 5) Hexyl 650C 6) Ether 650M 7) Phenyl 650M 8) Octyl FF 9) Butyl 650M	Butyl HP
Conclusions		7.5		500		(NH ₄) ₂ SO ₄		Butyl HP ou Butyl FF	

Tableau n°9 : Compilation des résultats et des estimations statistiques des coefficients pour le 1^{er} plan de criblage.

Finalement le pH 7.5 semble plus favorable pour obtenir un rendement d'éluion et un DAR élevé ainsi que l'utilisation d'une forte molarité en sels (500mM). L'utilisation de ce pH est en outre un réel avantage car le produit se retrouve à pH 7,5 en sortie de conjugaison. Le sulfate d'ammonium est conseillé pour augmenter ces mêmes réponses et les colonnes Butyl HP et Butyl FF semblent les plus appropriées. Cela permet de ne pas retenir l'anticorps nu pendant la charge et d'éluier ensuite l'ADC.

Il faut cependant noter que les colonnes Butyl 650M, Phenyl 650M et Hexyl 650C ont du potentiel. En effet l'anticorps nu n'est pas retenu durant la charge, l'ADC est fixé sur la

résine, malheureusement, il n'est pas élué par du tampon 20 mM Kpi. L'étude de l'ajout d'un co-solvant qui réduirait les interactions hydrophobes entre la protéine et la résine pourrait alors se justifier dans de tels cas. Mais ce n'est pas la stratégie que nous avons voulu suivre, préférant trouver des conditions simples qui éviteraient l'ajout de nouvelles espèces dans le milieu.

4.2 Résultats du second plan de criblage

Les résultats du premier plan de criblage nous ont donné des indications sur l'influence de certains facteurs et le sulfate d'ammonium semble être le sel le plus approprié. Cependant c'est un sel très insolubilisant qui fait facilement précipiter les protéines. Son utilisation doit donc être minutieuse et laisse peu de marge de manœuvre concernant sa concentration. De plus dans un milieu réactionnel sont présent divers solvants qui peuvent augmenter les interactions hydrophobes et donc ne ferait qu'accroître le risque de précipitation si on utilisait le sulfate d'ammonium. C'est donc la volonté d'éviter l'utilisation du sulfate d'ammonium, un sel très insolubilisant pour nos protéines, qui nous a incité à étudier plus précisément les 2 autres sels : phosphate de potassium et chlorure de potassium.

Ce plan a été réalisé sur les 2 colonnes sélectionnées précédemment : Butyl FF et Butyl HP. Le pH est fixé à 7.5. Les sels sont testés à deux molarités 1M et 2M pour le chlorure de potassium, 500mM et 1M pour le phosphate de potassium. En effet à 2M de phosphate de potassium, la solution devient légèrement trouble, c'est-à-dire que la précipitation est initiée.

Les résultats de ce plan de criblage sont présentés dans le tableau n° 10

Rdt NR	Rdt élué	Dar NR	Dar élué
22	52	0.48	3.45
12	64	0.31	3.15
0	52	0	1.60
8	50	0.42	3.20
32	22	0.78	4.01
0	48	0	2.08
26	20	1.11	3.90
2	64	0.40	2.86

Tableau n° 10 : Résultats du second plan de criblage étudiant 2 colonnes, 2 sels à 2 concentrations différentes.

Les résultats et les études graphiques données par le logiciel NemrodW® concernant la réponse « Rendement d'éluion » et « DAR de la fraction d'éluion sont présentées respectivement par les figures n° 14 et 15.

Delta poids entre les niveaux

Effets totaux

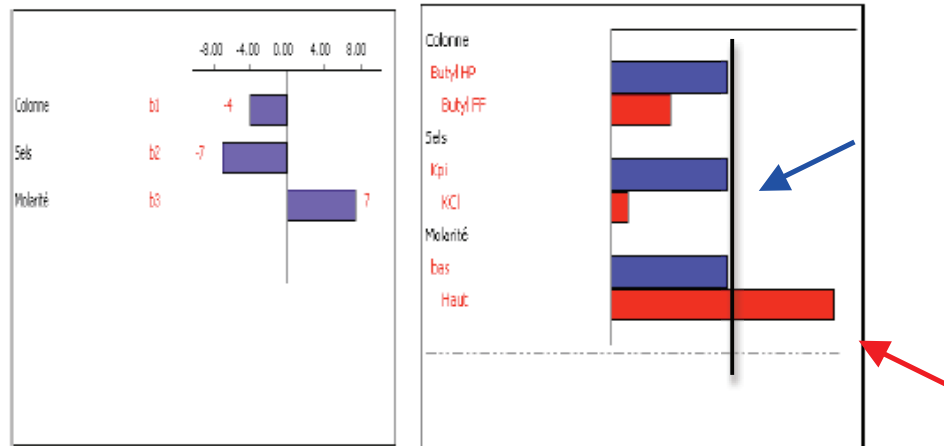


Figure n° 14 : Etude graphique du rendement d'éluion pour le second plan de criblage. Les coefficients liés aux facteurs ne sont pas actifs. Cependant des tendances sont données. L'objectif est d'obtenir le meilleur rendement en ADC possible dans la fraction d'éluion. L'utilisation du KPi à haute molarité semble la meilleure condition.

Delta poids entre les niveaux

Effets totaux

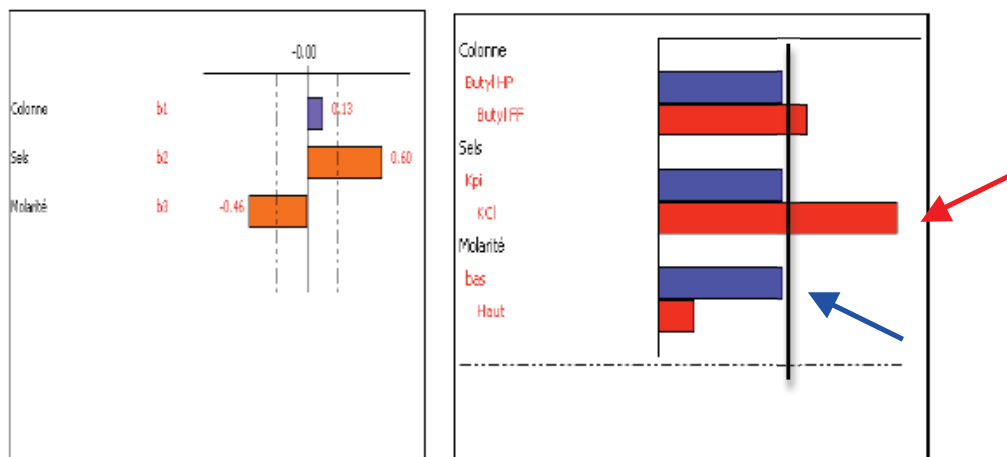


Figure n° 15 : Etude graphique du DAR de la fraction d'éluion pour le second plan de criblage. Les coefficients liés au type de sel et à la molarité sont actifs. Pour obtenir un DAR élevé (correspondant à l'ADC) dans la fraction d'éluion, il semblerait qu'il soit préférable d'utiliser le KCl à basse molarité.

En comparant ces données, on remarque que ces graphiques ne nous donnent pas les mêmes informations. Si on se focalise sur le rendement d'éluion, l'utilisation du phosphate de potassium à haute molarité semble donner un haut rendement.

Mais n'oublions pas que nous travaillons avec un mélange constitué d'anticorps nu et d'ADC. Donc mieux qu'un rendement élevé, nous voulons un rendement qui corresponde à notre ADC, c'est-à-dire à une fraction ayant un DAR proche de 4.

En regardant le graphique concernant cette réponse, les choix à faire sont inverses. L'utilisation du KCl à basse molarité semble la meilleure solution.

On se rend bien compte ici des limites de l'analyse statistique du logiciel, qui ne fait qu'attribuer des valeurs à des coefficients selon un modèle mathématique donné. C'est pourquoi l'étude des chromatogrammes (Cf figure n°16) est ici importante ainsi que la connaissance de l'expérimentateur.

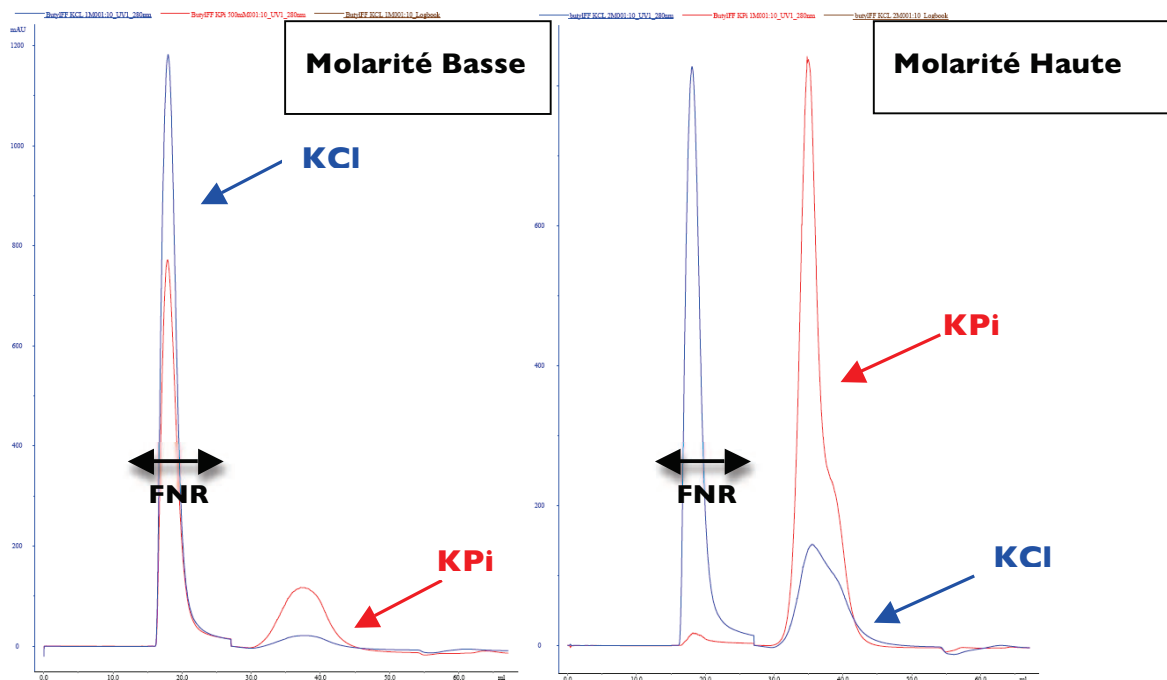


Figure n°16 : Chromatogrammes obtenus pour le second plan de criblage. A gauche les graphiques concernant les molarités basses, à droite les molarités hautes. En bleu sont représentées les courbes obtenues avec le Chlorure de potassium et en rouge les courbes obtenues avec le phosphate de potassium. FNR : Fraction non retenue.

Avec ces chromatogrammes, nous constatons qu'à faible molarité, nous obtenons de l'ADC dans la fraction d'éluion avec le KPi alors qu'avec le KCl, la presque totalité du mélange n'est pas retenue sur la colonne.

A haute molarité par contre, nous obtenons de l'ADC dans la fraction d'éluion avec le KCl tandis qu'avec le KPi la totalité du mélange est retenu sur la colonne. Nous ne séparons plus nos deux populations.

Finalement les choix sont les suivants : nous pouvons choisir d'utiliser le chlorure de potassium et de l'étudier à des concentrations encore plus hautes pour augmenter le rendement dans la fraction d'éluion ou nous pouvons choisir le phosphate de potassium qui montre un bon début d'éluion à une concentration de 500mM et une rétention totale sur la colonne du mélange à haute concentration. Avec ces résultats, nous avons donc notre borne supérieure : IM de phosphate de potassium induit des interactions hydrophobes assez fortes pour que l'anticorps nu soit retenu sur la colonne. Nous avons également notre borne inférieure : 200mM (Cf expérience n°3, plan de criblage n°1) de phosphate de potassium, les interactions hydrophobes sont trop faibles pour retenir notre ADC sur la colonne.

De plus le milieu réactionnel de notre produit contient du phosphate de potassium et beaucoup de réactions se font dans le phosphate. Faire une purification dans un tel tampon évite alors d'ajouter de nouvelles espèces au milieu et permet d'ajuster le pH. En effet l'utilisation du Chlorure de potassium seul ne permet pas d'ajuster un pH et nous sommes obligés d'y ajouter une faible quantité de phosphate de potassium pour y parvenir, ce qui complique la fabrication des tampons.

En conclusion, au terme de ce second plan de criblage, il n'y a pas de différences significatives entre les deux colonnes et nous les gardons pour la suite. Le choix du sel s'est porté sur le phosphate de potassium, déjà présent dans le milieu réactionnel de notre produit et dont nous avons déterminés les bornes de travail : 200 à 1000 mM. Nous pouvons donc passer à l'étude de notre optimum dans cet espace par la réalisation des plans de surface. Cela nous permettra de connaître la concentration optimale pour obtenir la séparation de nos deux populations avec le meilleur rendement.

4.3 Résultats des surfaces de réponses

La réalisation des 2 plans de criblages nous ont permis de sélectionner 2 colonnes, un sel, un pH et une estimation de la gamme de molarité où travailler. Désormais nous souhaitons connaître en n'importe quel point du domaine expérimental, la valeur d'une ou plusieurs réponses expérimentales afin de rechercher un optimum dans une zone de compromis acceptable. Il faut donc trouver les relations existantes entre les facteurs et les réponses. Ceci peut se faire grâce à un modèle mathématique.

Si pour les plans de criblages, nous avons travaillé avec un mélange constitué à 50% d'anticorps nu et à 50% d'ADC, nous souhaitons traiter les deux populations séparément pour la surface de réponse.

4.3.1 Anticorps nu

Pour les deux colonnes, HiScreen Butyl HP et FF, seuls les rendements dans la fraction non retenue ont été mesurées et sont présentés dans le tableau n° 11 concernant la colonne Butyl FF. Le même tableau a été réalisé pour la colonne Butyl HP.

N°Exp	Charge	Kpi	Rdt NR
	mg/ml	mM	%
1	1.0	500.0000	84.00
2	5.0	500.0000	104.80
3	1.0	1000.0000	0
4	5.0	1000.0000	0
5	1.0	750.0000	74.00
6	5.0	750.0000	94.40
7	3.0	500.0000	97.30
8	3.0	1000.0000	0
9	3.0	750.0000	88.70

Tableau n° 11 : résultat des rendements d'anticorps nus dans la fraction non retenue pour le premier plan de surface pour la colonne Butyl FF.

A partir de ces résultats, le logiciel NemrodW® réalise les courbes de surface de réponses. Puis, en fixant notre désirabilité, c'est-à-dire d'avoir un rendement uniquement supérieur à 90%, nous obtenons notre domaine expérimental exploitable. Ces domaines sont présentés sur la figure n° 17.

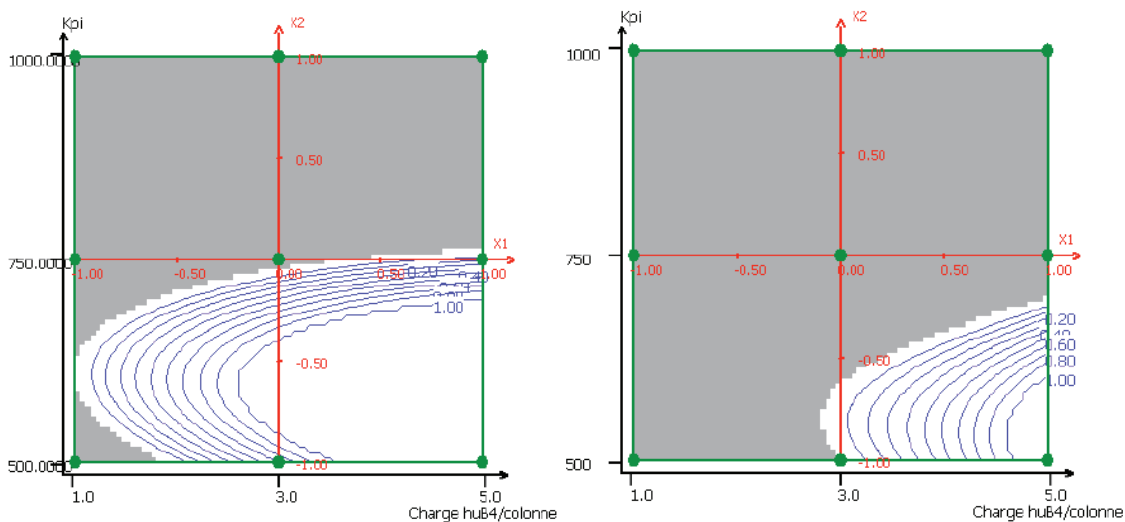


Figure n° 17 : Zone de désirabilité pour obtenir un rendement d'anticorps nus dans la fraction non retenue supérieur à 90%. A gauche pour la colonne Butyl FF et à droite pour la colonne Butyl HP. Le process est peu sensible à la charge pour la colonne Butyl FF.

En comparant ces deux domaines, nous observons que la zone de désirabilité pour la

colonne Butyl FF est plus large que pour la colonne Butyl HP. De plus avec la colonne Butyl FF, la charge à moins d'influence sur le rendement récupéré ce qui est favorable. Nous choisissons donc cette colonne pour la suite de nos expériences.

Finalement pour obtenir un rendement d'anticorps nus supérieur à 90% dans la fraction non retenue, nous voyons qu'il est inutile de travailler avec une molarité de tampon supérieure à 750mM. Nous ne testerons pas ces molarités hautes pour la surface de réponse concernant l'ADC.

4.3.2 ADC

Parmi les 4 réponses mesurées, nous nous sommes focalisé ici essentiellement sur le rendement d'éluion et le DAR de cette fraction puisque nous travaillons avec l'ADC. Les résultats des réponses mesurées concernant l'ADC sont présentés dans le tableau n° 12. La réalisation des points tests nous a permis de mieux interpréter le modèle. Les résultats des tests statistiques tels que la mesure de la variance par un test Anova 1 et 2 nous a confirmé que le modèle polynomial est validé et ajusté. De la même façon, la mesure des résidus (différence entre la mesure observée et la valeur prédite par le modèle) a permis de donner une estimation semi quantitative de l'ordre de grandeur de l'erreur expérimentale. Dans notre cas, le modèle est explicatif et ajusté, il est donc validé aux points expérimentaux.

N°Exp	Charge	Kpi	Rdt NR	Dar NR	Rdt Elution	Dar Elution
	mg/ml	mM	%		%	
1	5.32	250	50.8	3.01	26.8	6.06
2	15.96	250	59.73	3.32	19.47	6.22
3	4.50	750	2	1	84.63	3.72
4	13.50	750	2.52	1.01	86.52	3.81
5	4.86	500	12.69	1	75.27	4.73
6	13.95	500	25.67	2.1	67.54	4.93
7	10.64	250	58.6	3.21	23.2	6.13
8	9.00	750	2	1	84.63	3.76
9	9.72	500	20.79	1.94	73.52	4.82
10	9.72	500	20.35	1.81	72.87	4.8
11	8.30	438	22.3	2.14	57.95	5.11
12	12.98	438	30.16	2.34	54.92	5.10

Tableau n° 12 : Résultats obtenus pour le plan de surface réalisé sur l'ADC. 4 réponses ont été mesurées : Rendement et DAR dans la fraction non retenue et dans la fraction d'éluion. En jaune sont présentés les points de la matrice, en bleu la répétition du point central et en vert les points tests pour la validation du modèle.

Les graphiques obtenus pour ces réponses sont présentés par les figures n° 18 et 19.

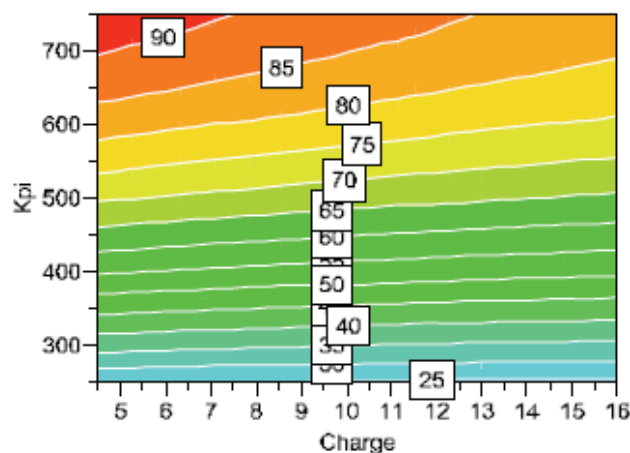


Figure n° 18 : Etude du rendement dans la fraction d'éluion concernant l'ADC en fonction de la molarité du tampon (en millimolaire) et de la quantité de produit chargée (en mg/mL de colonne) sur la colonne Butyl FF. Figure obtenue grâce au logiciel Modde®.

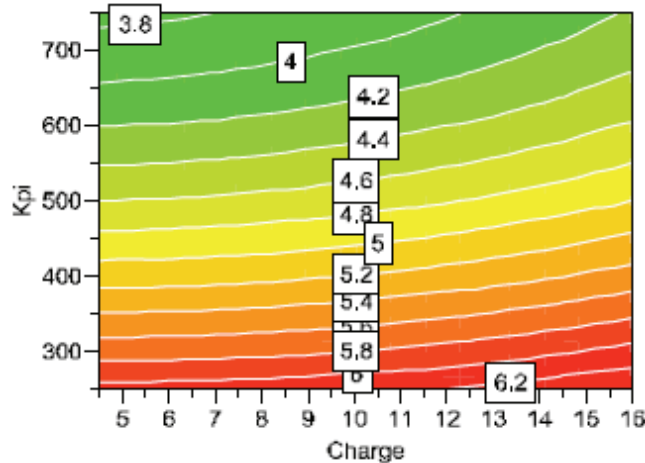


Figure n°19: Etude du DAR dans la fraction d'éluion concernant l'ADC en fonction de la molarité du tampon (en millimolaire) et de la quantité de produit chargée (en mg/mL de colonne) sur la colonne Butyl FF. Figure obtenue grâce au logiciel Modde®.

Avec ces résultats, on remarque que le process est très peu sensible à la charge puisque les réponses obtenues sont quasiment linéaires. Pour obtenir plus de 80% de notre ADC, on voit d'après la figure n°18 qu'il faut se placer à une molarité de tampon supérieure à 600mM. Pour obtenir un DAR dans cette même fraction qui correspond uniquement à notre ADC de départ, c'est-à-dire compris entre 3,5 et 4,5, il faut se placer entre 550 et 750mM de phosphate de potassium.

En réalisant notre profil de désirabilité, on obtient la zone de travail présentée par la figure n°20.

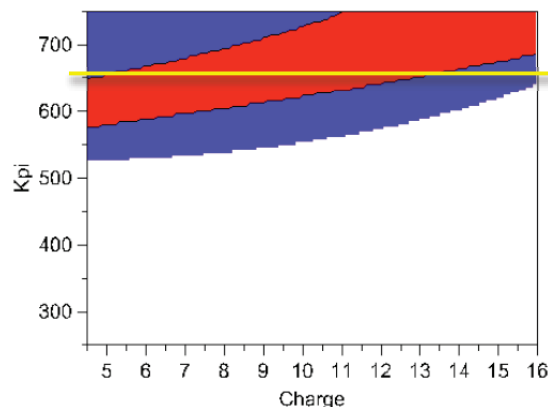


Figure n°20 : Zone de désirabilité obtenue pour l'ADC pour obtenir un rendement supérieur à 80% dans la fraction d'éluion avec un DAR compris entre 3,5 et 4,5. Figure obtenue grâce au logiciel Modde®.

Nous observons qu'à 650mM de phosphate de potassium, nous sommes majoritairement dans la zone de travail qui permet d'avoir un rendement situé entre 80 et 85% de rendement avec un DAR de 4. Ceci est donc retenu comme étant notre condition optimale. De plus, en se référant au plan de surface concernant l'anticorps nu, on sait qu'à 650mM de KPi, l'anticorps nu n'est pas retenu sur la colonne et est éliminé dans la fraction non retenue.

4.4 Test sur un brut de conjugaison

Suite à la réalisation des différents plans de criblages et de surface de réponses, des conditions dites « optimales » ont pu être déterminées pour satisfaire notre objectif. C'est-à-dire disposer d'un domaine où l'on sait que la proportion d'anticorps nus sera séparée de notre population d'ADC, que l'on récupère avec un rendement supérieur à 80%. Avant de réaliser un essai sur un brut de conjugaison, nous voulions réaliser un essai pour prouver que nos résultats précédents se vérifiaient. Afin de garantir l'élimination de la population

d'anticorps nus, nous en avons ajouté 10% à notre produit que nous avons ensuite testé dans nos conditions de séparation optimales. Nous obtenons un rendement d'ADC dans la fraction d'élution à 89% et un DAR de 3,7. Une analyse HRMS a été réalisée sur la fraction non retenue et sur la fraction d'élution, montrant que la population de nu est bien éliminée dans la fraction non retenue. (Cf annexe n°5).

Afin d'étudier le comportement des espèces telles que le solvant organique ou le cytotoxique libre, nous avons réalisé un essai sur un brut de conjugaison en gardant les mêmes conditions. Le tampon KPi est à 650mM, le tampon d'élution à 20mM et la charge de produit à 10mg/mL de colonne (il s'agit ici de la charge médiane testée précédemment.)

Nous obtenons le chromatogramme présenté sur la figure n°21.

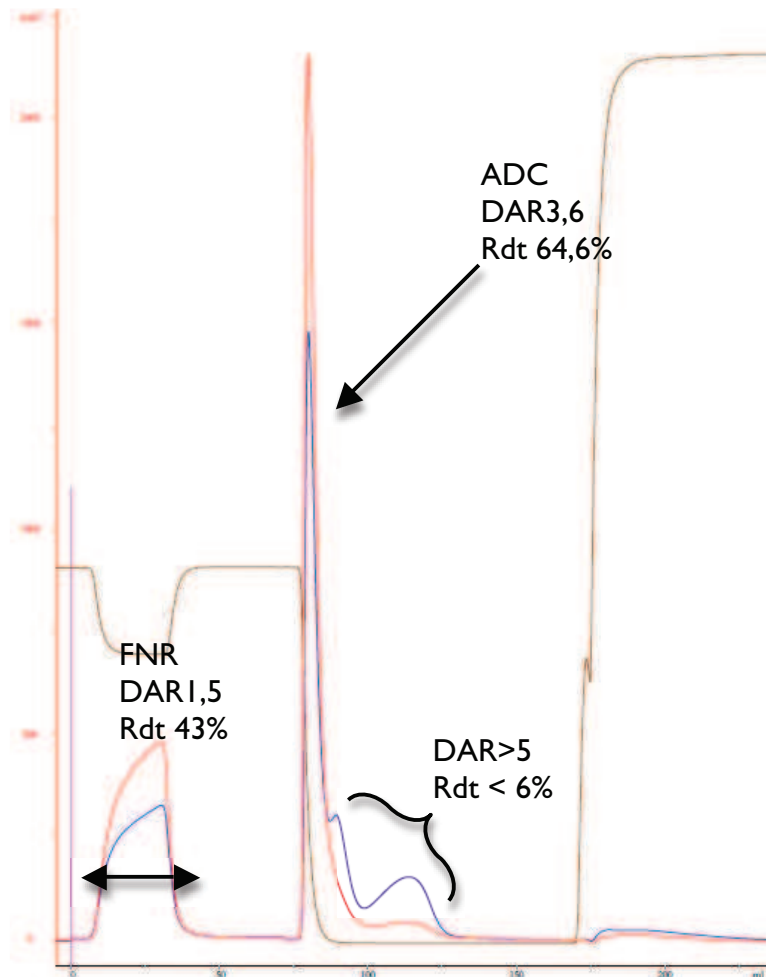


Figure n°21 : Chromatogramme de l'essai réalisé dans les conditions optimales sur un brut de conjugaison contenant de l'agent cytotoxique libre et du solvant organique. La courbe rouge correspond à 280nm, maximum d'absorption de l'anticorps et la courbe bleue au maximum d'absorption du cytotoxique. La courbe marron représente la conductivité au cours de l'analyse. Les DAR ont été mesurés par SEC.

En regardant le chromatogramme au maximum d'absorption du cytotoxique, on remarque qu'il y a un signal après le pic d'ADC. Le cytotoxique est très hydrophobe et est sûrement élué après l'ADC. Mais nous obtenons 2 décochements. Le premier contient encore de l'ADC mais pas le second. Nous remarquons également une baisse de rendement par rapport aux résultats précédents où le rendement dans la fraction d'élution dépassait les 80%. Ceci peut s'expliquer de deux façons.

La première par une influence probable du cytotoxique, qui est très hydrophobe et pourrait chasser de la colonne les anticorps faiblement conjugués par un mécanisme de compétition pour les sites hydrophobes. Mais ceci reste cependant à étudier. L'influence du solvant

organique à hauteur de 5% a été étudiée de façon concomitante. Il est éliminé dans la fraction non retenue et n'influence pas la séparation lors de l'élution. (Cf Annexe 6)

La seconde raison serait que l'ADC préparé ici a un DAR moyen plus faible que le produit utilisé pour les plans d'expériences. En effet le premier produit avait un DAR moyen de 3,4 et contenait 8,2% d'anticorps conjugués à une seule molécule de cytotoxique. Ici pour le brut de conjugaison, le DAR moyen est à 2,3 et le produit contient 20% d'anticorps conjugués à une seule molécule de cytotoxique. C'est pourquoi nous pensons qu'une plus grande partie des ADC à DAR 1 sont éliminés avec l'anticorps nu dans la fraction non retenue et cause notre perte de rendement global.

A partir de l'observation de la courbe de conductivité, nous en avons déduit qu'il était possible d'améliorer cette séparation et d'isoler le pic d'ADC en réalisant un pallier intermédiaire lors de l'élution. A partir de la valeur de la conductivité au niveau du pic d'élution, on calcule la molarité du tampon qui lui est associée. Cette molarité correspond à 200mM de KPi. On décide alors de refaire le même essai en modifiant notre élution. On passe d'un tampon de 650mM à un tampon de 200mM que l'on maintient pendant l'équivalent de 10 volumes de colonne puis on passe à un tampon de 20mM maintenu également 10 volumes de colonne. Ce passage intermédiaire à 200mM correspond en réalité à 71,4% du tampon 20mM et 28,6% du tampon 650mM. On obtient le chromatogramme présenté à la figure n°22.

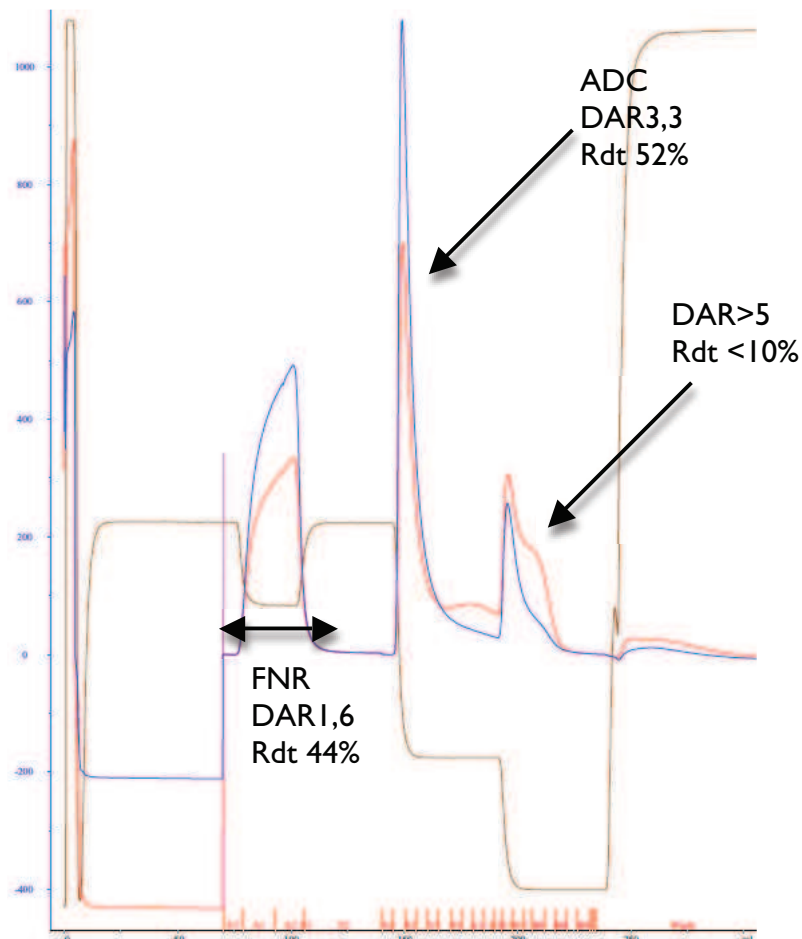


Figure n°22 : Chromatogramme de l'essai réalisé dans les conditions optimales sur un brut de conjugaison contenant de l'agent cytotoxique libre et du solvant organique en optimisant l'élution par un pallier à 200mM. La courbe bleue correspond à 280nm, maximum d'absorption de l'anticorps et la courbe rouge au maximum d'absorption du cytotoxique. La courbe marron représente la conductivité au cours de l'analyse. Les DAR ont été mesurés par SEC.

La fraction non retenue, la fraction d'éluion majoritaire contenant l'ADC et la troisième fraction contenant encore de l'anticorps ont été analysées par HRMS et les résultats sont présentés respectivement à la figure n°23, 24 et 25.

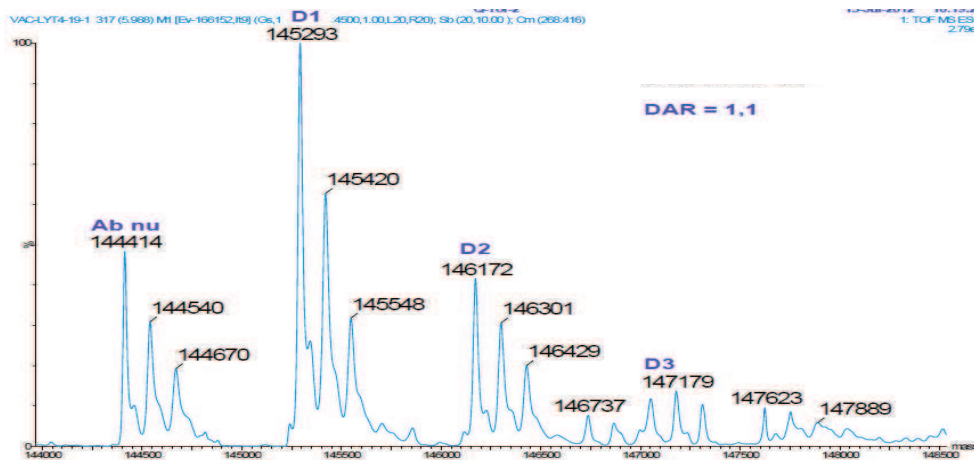


Figure n°23 : Résultats HRMS de la fraction non retenue. Celle ci contient 100% de des anticorps nu et essentiellement de l'ADC à DAR 1.

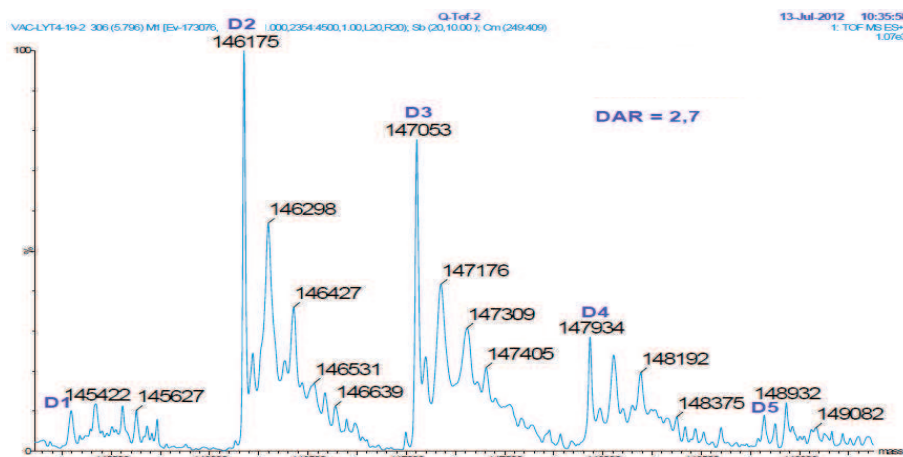


Figure n°24 : Résultats HRMS de la fraction d'éluion contenant l'ADC. Il est exempt d'anticorps nus et ne contient que très peu d'ADC fortement conjugués.

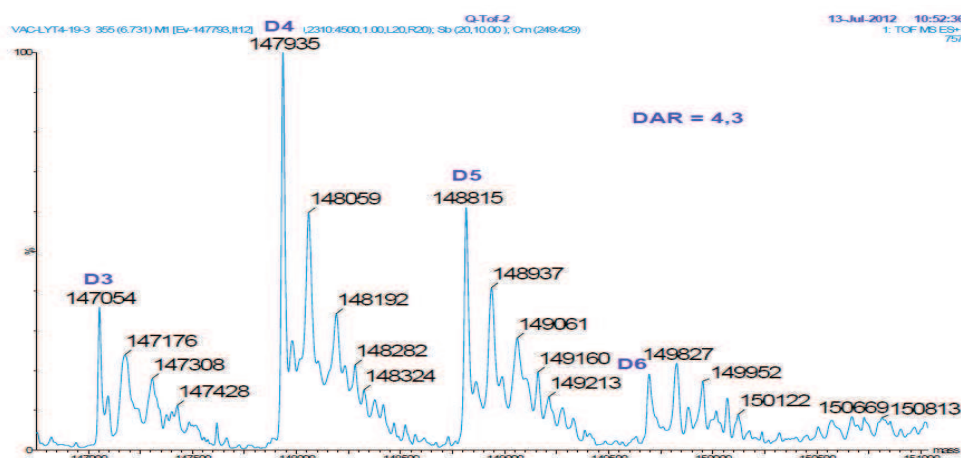


Figure n°25 : Résultats HRMS de la seconde fraction d'éluion contenant de l'ADC. Elle contient les ADC fortement conjugué.

Avec la réalisation de ce pallier intermédiaire, on obtient alors notre ADC séparé des autres composants du milieu (DM4 très hydrophobe élué à la fin) et exempt de la population d'anticorps nus. On perd cependant du produit faiblement conjugué (DAR 1) dans la fraction non retenue. On observe également que les espèces fortement conjuguées, c'est à dire avec un DAR supérieur ou égal à 4 sont éluées lors du second pallier. Finalement la fraction d'ADC qui nous intéresse se retrouve non seulement débarrassée des anticorps nus, mais présente également une population plus homogène d'anticorps conjugués.

Afin de vérifier si le cytotoxique est bien la cause de notre fuite importante d'ADC dans la fraction non retenue, nous avons décidé de purifier le reste du brut de conjugaison par une chromatographie de type gel filtration. Il s'agit d'une HiPrep 26/10 desalting de GE Healthcare qui permet facilement de séparer les molécules de haut poids moléculaire (Anticorps) des petites molécules (ici, solvant organique et cytotoxique libre). Le produit obtenu est donc dépourvu des molécules de solvants organique et de cytotoxique libre. Nous retrouvons un produit pur que nous injectons sur la colonne HIC HiScreen Butyl FF. L'injection s'effectue dans les mêmes conditions que précédemment, c'est-à-dire 25mL d'une solution à 2g/L soit 10mg/mL de colonne injecté. Nous obtenons le chromatogramme présenté à la figure n°26.

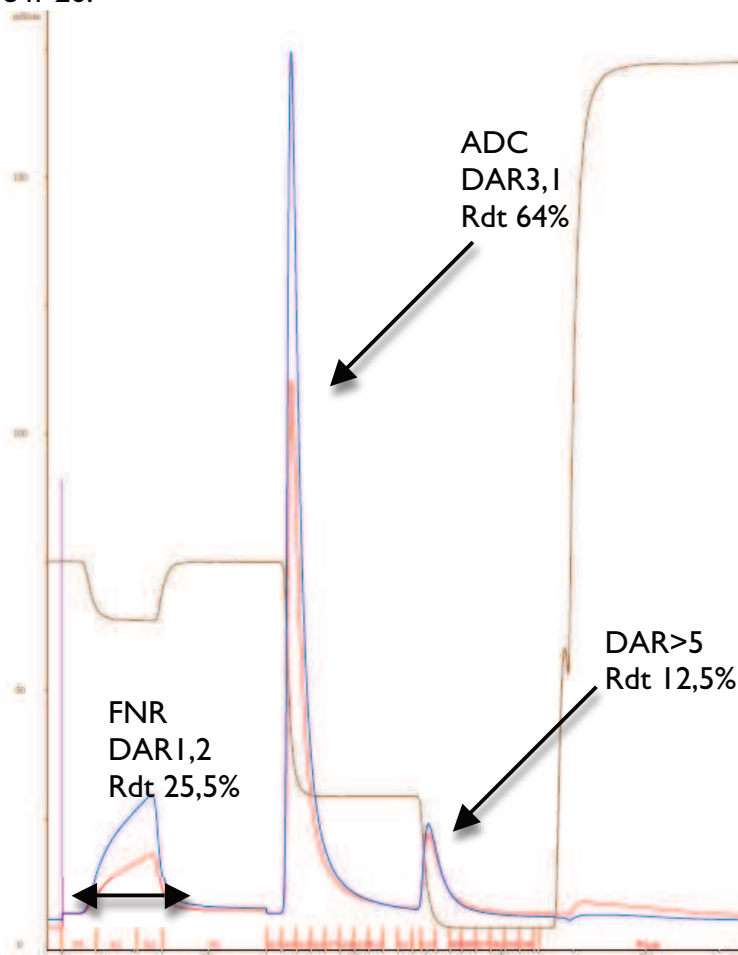


Figure n°26 : Chromatogramme du brut réactionnel purifié par chromatographie de gel filtration. La courbe bleue correspond à 280nm, maximum d'absorption de l'anticorps et la courbe rouge au maximum d'absorption du cytotoxique. La courbe marron représente la conductivité au cours de l'analyse. Les DAR ont été mesurés par SEC.

En comparant les figures n°22 et 26, on s'aperçoit que le profil de la courbe au maximum d'absorption du cytotoxique a changé. Le second pic d'ADC élué n'est plus perturbé par un autre signal. Le cytotoxique libre est donc bien l'espèce éluée en dernier lors du second

pallier d'éluion avec les ADC à DAR élevés.

Les 3 fractions obtenues sont également analysées par HRMS afin de voir si la distribution des ADC est la même que celle obtenue avec le brut de conjugaison non purifié. Les figures n° 27, 28 et 29 présentent respectivement la FNR, la fraction d'éluion I et la fraction d'éluion 2.

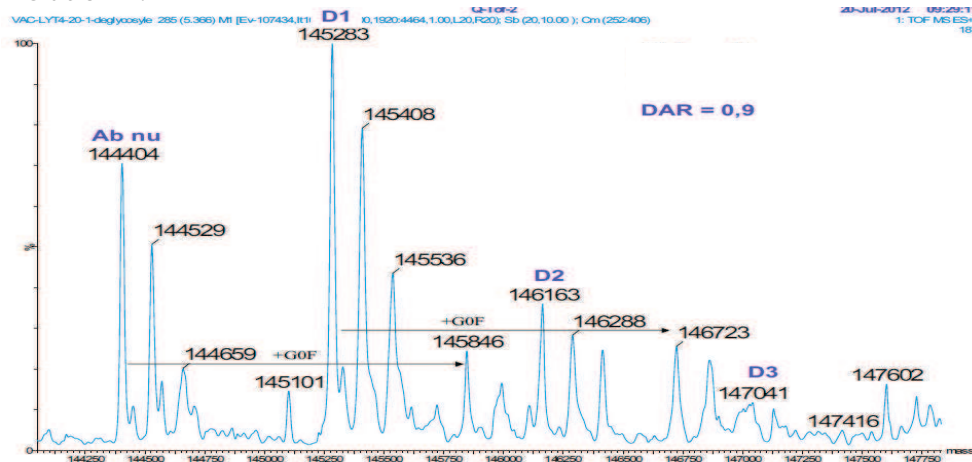


Figure n° 27 : Résultats HRMS de la fraction non retenue du brut réactionnel purifié. Celle ci contient 100% de des anticorps nu et essentiellement de l'ADC à DAR 1

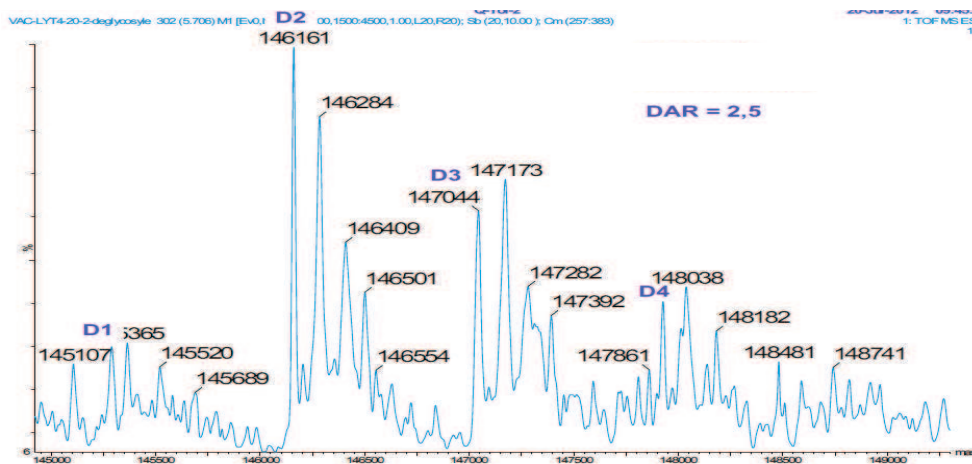


Figure n° 28 : Résultats HRMS de la fraction d'éluion du brut réactionnel purifié contenant l'ADC. Il est exempt d'anticorps nus et ne contient que très peu d'ADC fortement conjugués.

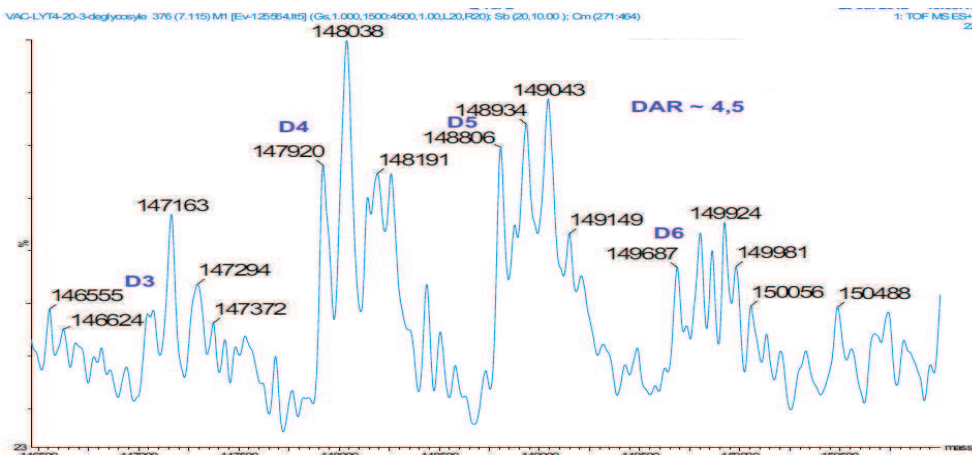


Figure n° 29 : Résultats HRMS de la seconde fraction d'éluion du brut réactionnel purifié contenant de l'ADC. Elle contient les ADC fortement conjugués.

Concernant le profil des distributions des espèces, les résultats sont similaires. La population d'anticorps nus est éliminée en totalité dans la fraction non retenue avec une proportion d'ADC faiblement conjugués (DAR=1). La première fraction d'éluion contient notre ADC et sa distribution est resserrée. Il ne contient plus les espèces fortement conjuguées (DAR=5 et DAR=6). Ces espèces fortement conjuguées sont récupérées dans la seconde fraction d'éluion. Le fait d'avoir éliminé le cytotoxique libre ne modifie pas, à priori, la récupération de notre ADC dans la première fraction d'éluion. Cependant si on se focalise sur les rendements d'ADC récupérés (Cf tableau n° 13) cette influence ne peut être ignorée.

En effet 44% d'ADC passe dans la fraction non retenue lorsque le cytotoxique libre est présent dans le produit contre 25% lorsqu'il est absent. L'hypothèse avancée précédemment sur le fait que le cytotoxique agissait par compétition sur la colonne en éliminant les immunoconjugués à DAR faible se vérifie. Ainsi il est logique que le rendement dans la fraction d'éluion soit plus important, car les immunoconjugués ne sont plus éliminés dans la FNR. Sans cytotoxique libre, les rendements sont plus favorables, et en combinant les deux fractions d'éluions nous retrouvons un rendement proche de 80%.

Brut de conjugaison	<i>FNR</i>	<i>Elution 1</i>	<i>Elution 2</i>
	44%	52%	9%
Brut de conjugaison purifié	<i>FNR</i>	<i>Elution 1</i>	<i>Elution 2</i>
	25%	64%	12%

Tableau n° 13 : Récapitulatif des rendements d'ADC obtenus dans les différentes fractions par chromatographie HIC pour un brut réactionnel (contenant du cytotoxique libre) et un brut réactionnel purifié (sans cytotoxique libre). La présence de cytotoxique libre influe sur la séparation et modifie les rendements.

V Conclusion

L'objectif du projet était d'étudier la faisabilité de la chromatographie d'interactions hydrophobes et de définir des conditions permettant de discriminer les populations d'anticorps nus et d'anticorps conjugués d'un produit.

Le manque de données concernant l'application de cette technique de séparation aux immunoconjugués nous a conduit à utiliser la méthodologie des plans d'expériences afin de définir les facteurs majeurs qui influencent ce type de séparation sur nos produits. Cela nous a permis de sélectionner une colonne de chromatographie (Butyl FF), un sel (phosphate de potassium), ainsi que son pH et sa molarité (pH 7,5 et 650mM). La réalisation de plans de surface de réponses nous a permis de définir un domaine d'étude dans lequel nos résultats peuvent être prédits. Nous avons alors affiné nos conditions pour que la population d'anticorps nus n'interagisse pas avec la colonne et soit éliminée dès la charge du produit sur la colonne. L'élution du produit par un pallier intermédiaire à 200mM permet de récupérer une population d'immunoconjugués ayant une répartition en DAR moins étendue qu'à l'origine. En effet les anticorps fortement conjugués ayant un DAR supérieur à 4 ne sont élués qu'avec le second pallier à 20mM.

La réalisation de cette méthode a été faite sur un brut de conjugaison afin de connaître l'influence potentielle sur la séparation du solvant organique et du cytotoxique libre et de voir ainsi si une application directe serait possible sur le procédé. On s'aperçoit que le cytotoxique, très hydrophobe est l'espèce éluee en dernier. Par conséquent on observe une fuite des anticorps faiblement conjugués, moins hydrophobes que le cytotoxique libre. Ceci nous cause une perte de rendement, car les anticorps faiblement conjugués sont éliminés avec la population non conjuguée.

A l'heure actuelle, l'utilisation de cette technique de purification pourrait être envisagée mais cela dépendra fortement des objectifs souhaités, car le cytotoxique libre interagît avec la colonne et cause une perte de rendement de récupération. Une alternative serait également possible en éliminant ces composants parasites avant ou après la purification par une étape supplémentaire de type chromatographie ou d'ultrafiltration / dia-filtration. Il serait également utile de réaliser une étude détaillée du comportement du cytotoxique sur une colonne HIC. Cela permettrait de réétudier certains facteurs et d'exposer peut être des conditions favorables à l'élution de l'anticorps conjugué sans perte de rendement. Réunir de telles conditions serait un réel avantage car cela permettrait de s'affranchir d'une étape supplémentaire de purification. Une application sur un procédé serait alors envisageable.

VI Annexes

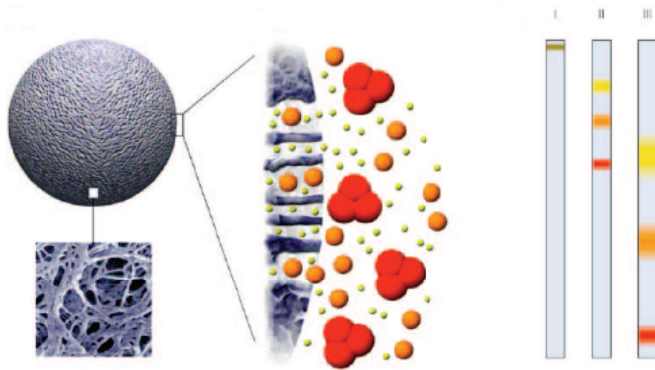
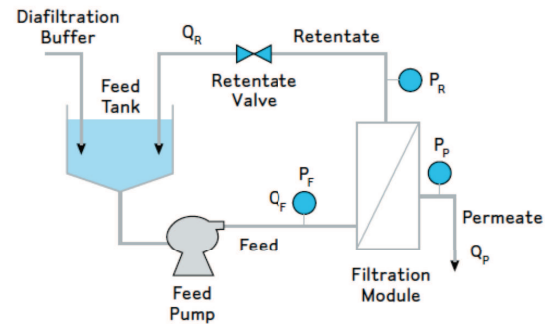
Annexe I : Liste des ADC en développement clinique. Décembre 2011

Source : (La Merie Business Intelligence 2011)

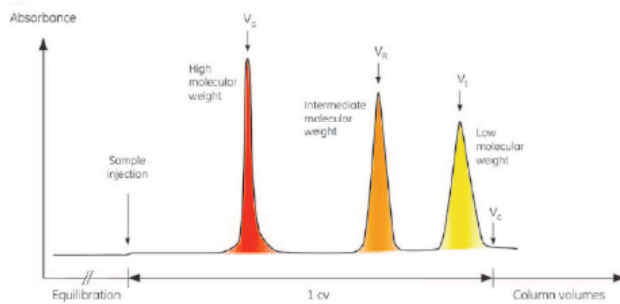
Product Name	Target	Antibody	Linker	Drug	Company	Indication	R&D Stage
Brentuximab vedotin;	CD30	Chimeric	vc	MMAE	Seattle Genetics & Takeda (Millennium)	Hodgkin lymphoma; ALCL	Market
Trastuzumab emtansine	HER2	Humanized	(S)MCC	DM1	Roche (Genentech)	HER2+ metastatic breast cancer	III
Inotuzumab ozogamicin	CD22	Humanized	AcBut	Calicheamicin	Pfizer (Wyeth) & UCB	NHL; DLBCL; ALL	III
Glembatumumab vedotin	GPVMB	Human	vc	MMAE	Celldex Therapeutics	Breast cancer; Melanoma	IIIb
Lorvotuzumab mertansine	CD56	Humanized	SPP	DM1	ImmunoGen	SCLC, MM, Merkel cell carcinoma	I/II
Milatuzumab-Doxorubicin	CD74	Humanized	(S)MCC	Doxorubicin	Immunomedics	Multiple myeloma	I/II
BT-062	CD138	Chimeric	-	DM4	Biotest	Multiple myeloma	I/II
DCDS4501A	CD79b	Humanized	MC-vc-PAB	MMAE	Roche (Genentech)	NHL; CLL	I
DCDT2980S	CD22	Humanized	-	MMAE	Roche (Genentech)	NHL; CLL	I
BAY 94-9343	Mesothelin	Human	-	DM4	Bayer Healthcare Pharmaceuticals	Solid tumors	I
BAY 79-4620;	Carbonic Anhydrase (HuCAL)	Human	-	MMAE	Bayer Healthcare Pharmaceuticals	Solid tumors, esp. NSCLC, gastric	I
ASG-5ME	SLC44A4	Human	vc	MMAE	Astellas & Seattle Genetics	Prostate cancer; Pancreatic cancer	I
ASG-22ME;	Nectin-4	Human	vc	MMAE	Astellas (AgenSys) & Seattle Genetics	Solid tumors	I
AGS-22M6E							
AGS-16M8F	ENPP3	Human	vc	MMAF	Astellas (AgenSys) & Seattle Genetics	Cancer. Renal cancer	I
SAR3419	CD19	Humanized	SPDB	DM4	Sanofi	B-cell lymphoma. NHL	I
SAR566658	CA6 (Muc1)	Humanized		DM4	Sanofi	Solid tumors	I
SGN-75	CD70	Humanized	vc	MMAF	Seattle Genetics	NHL; renal cell carcinoma	I
MDX-1203	CD70	Human	Mb-vc	MGBA	Bristol-Myers Squibb (Medarex)	Clear cell renal cell carcinoma; NHL	I
PSMA ADC (Progenics)	PSMA	Human	vc	MMAE	Progenics	Prostate cancer	I
IMGN388	alphaV integrin	Human	SPDB	DM4	Immunogen (Centocor)	Solid tumors	I

Annexe 2 : Présentation des techniques d'ultrafiltration-diafiltration, de chromatographie d'exclusion stérique et de chromatographie CHT ceramic hydroxyapatite.

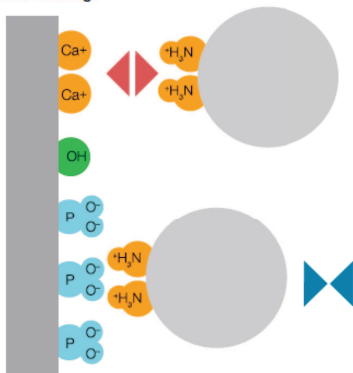
Schéma d'un système de TFF (filtration à flux tangentiel). Source : (Millipore, 2008)



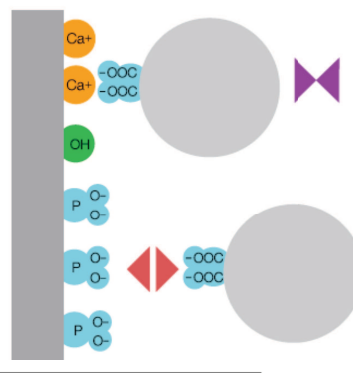
Principe de séparation de la chromatographie d'exclusion stérique. Les grosses molécules en rouges sont éluées en premier. Les petites molécules en jaunes entrent dans les pores de la matrice et sont éluées en dernier. Source : (GE Healthcare Bio-sciences, 2010)



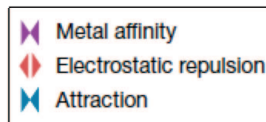
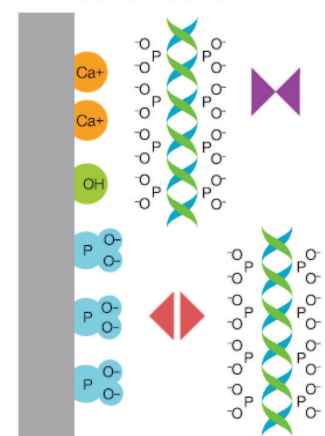
Cation exchange



Metal-affinity carboxyl clusters



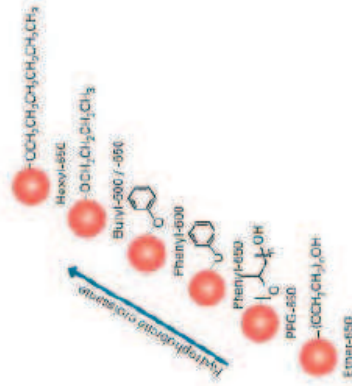
Metal-affinity phosphoryl groups on nucleic acids



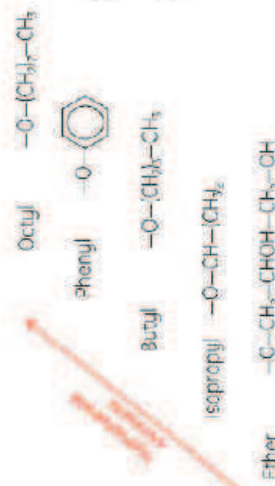
Principe de séparation de la chromatographie CHT Ceramic Hydroxyapatite. 3 mécanismes sont mis en jeu. Les interactions avec les ions phosphates sont majoritaires avec les protéines. Source : (BioRad, Bulletin 6086)



Nom colonne	Ligand	Billes	Taille billes μm
PPG 600M	Polypropylene glycol	Polymetacrylate	65
Butyl 650M	Butyl	Polymetacrylate	65
Phenyl 450M	Phenyl	Polymetacrylate	65
Hexyl 450C	Hexyl	Polymetacrylate	100
Ether 650M	Ether	Polymetacrylate	65



Nom colonne	Ligand	Billes	Taille billes μm
Butyl HP	Butyl	Agarose	34
Butyl FF	Butyl	Agarose	90
Octyl FF	Octyl	Agarose	90
Phenyl 6 FF low sub	Phenyl	Agarose	90



Annexe 4 : Exemple d'un programme UNICORN rédigé pour un essai.

```

UNICORN 5.20 (Build 500)
User: Le Cam 13/06/2012 16:23:19 Romance Daylight Time
Method file: c:\...marion\DoE S [redacted] 6 2012
1

Method Information

Information:
Method name: c:\...marion\DoE S [redacted] 06 2012.m01
Method created by: Le Cam
Date of creation: 12/06/2012 12:06:51 (Romance Daylight Time)
Created for system: System 1
Method last modified by: Le Cam
Date of last modification: 13/06/2012 16:10:10 (Romance Daylight Time)

Strategy name: E100F400B
Strategy date: 02/06/2003 10:31:02 (Romance Daylight Time)
Strategy size: 2754752 bytes

Variables
volume_inject 5.00 (ml)

Main method:
----- Block : Main -----
0.00 Base CV, 4.657 (ml), HiScreen_Butyl_FF
0.00 InjectionValve Load
0.00 Flow 240 (cm/h)
0.00 ColumnPosition Position1Bypass
0.00 OutletValve WasteFl
0.00 Wavelength 280 (nm), [redacted] OFF (nm)
0.00 Block equilibration
0.00 Block charge
0.00 Block elution
0.00 Block sanitization
0.00 End_Method

Blocks:
----- Block : equilibration -----
0.00 Base SameAsMain
0.00 BufferValveA1 All
0.00 ColumnPosition Position4
1.00 AutoZeroUV
15.00 End_Block

```

```

----- Block : charge -----
0.00 Base Volume, 4.657 (ml), HiScreen_Butyl_FF
0.00 AutoZeroUV
0.00 InjectionValve Inject
0.00 InjectionMark
0.00 OutletValve F2
0.00 Watch UV1 Greater Than, 75 (mAU), CollectNR
(5.00)#volume_inject InjectionValve Load
75.00 End_Block

----- Block : CollectNR -----
0.00 Base Volume, 4.657 (ml), HiScreen_Butyl_FF
0.00 Fractionation 18mm, 14.000 (ml), NextTube, Volume
0.00 Watch UV1 Less Than, 75.0000 (mAU), fincollectNR
0.00 End_Block

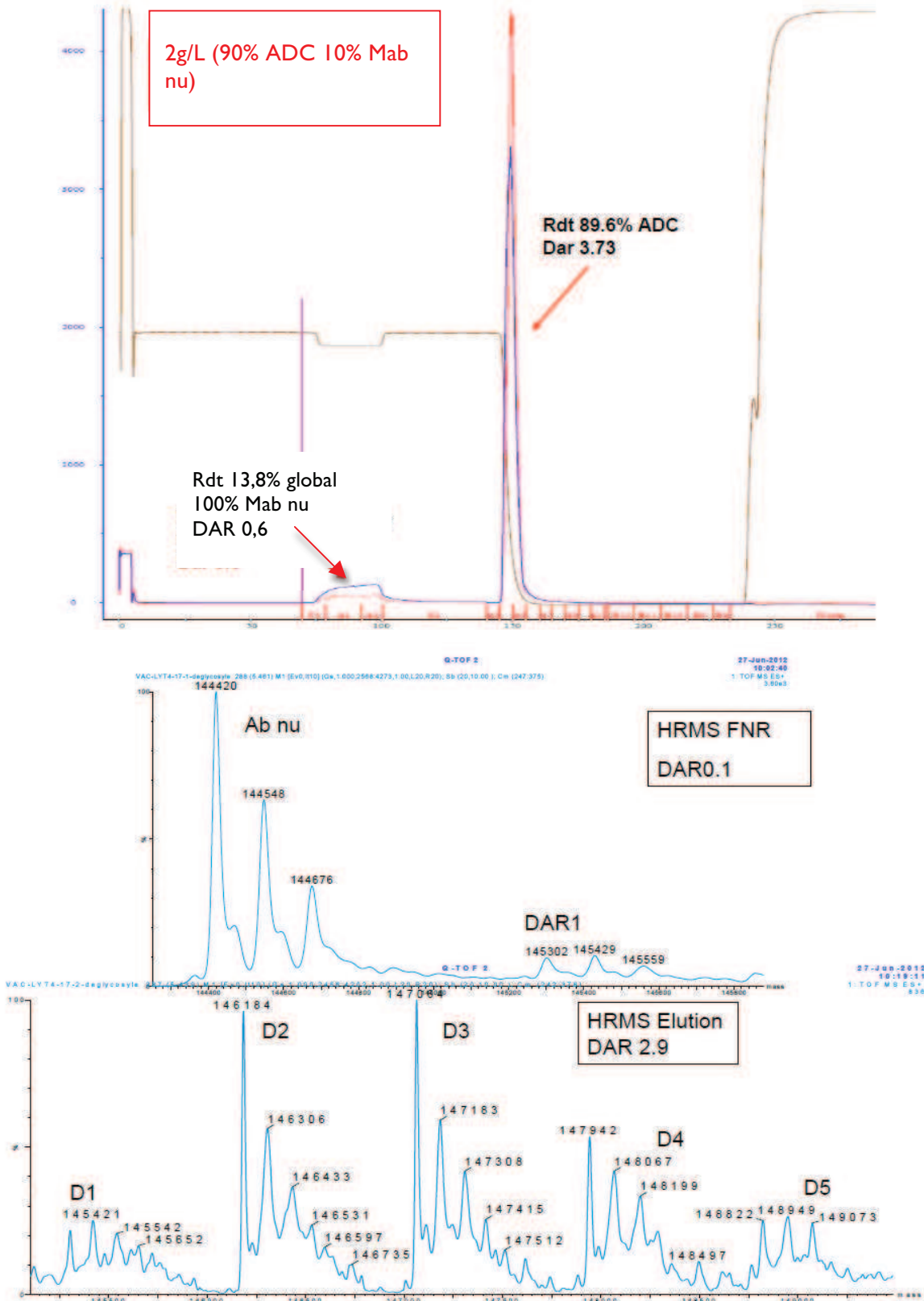
----- Block : fincollectNR -----
0.00 Base Volume, 4.657 (ml), HiScreen_Butyl_FF
0.00 Fractionation 30mm, 45.000 (ml), NextTube, Volume
0.00 End_Block

----- Block : elution -----
0.00 Base SameAsMain
0.00 Watch Off UV1
0.00 AutoZeroUV
0.00 InjectionValve Load
0.00 Gradient 100.0 (%B), 0.00 (base)
0.00 PumpBInlet B2
0.00 OutletValve F2
0.00 Fractionation 18mm, 5.000 (ml), NextTube, Volume
10.00 Fractionation 18mm, 10.000 (ml), NextTube, Volume
20.00 End_Block

----- Block : sanitization -----
0.00 Base SameAsMain
0.00 FractionationStop
0.00 Gradient 0.0 (%B), 0.00 (base)
0.00 OutletValve WasteFl
0.00 BufferValveA1 A18
15.00 End_Block

```

Annexe 5 : Résultats de l'essai réalisé avec les conditions optimales déterminées sur un mélange d'ADC et d'anticorps nus à 10%. Tampon d'équilibration 650mM de phosphate de potassium. Tampon d'éluion 20mM de phosphate de potassium. Le chromatogramme est présenté avec les rendements et les DAR puis les résultats HRMS de chaque fraction. On prouve bien que l'ensemble de la population d'anticorps nu est éliminé dans la fraction non retenue.



Annexe 6 : Plan d'expérience réalisé pour connaître l'influence du solvant organique présent dans le brut réactionnel à hauteur de 5 ou 10%. L'effet de la charge en mg/mL de colonne a également été étudié. Le solvant organique a une influence sur la séparation lorsqu'il est présent à 10% dans le milieu en diminuant le rendement d'élution. A 5% il n'y a pas d'influence sur la séparation.

Modèle expérimental

$$Y = b_0 + b_1.(X_1) + b_2.(X_2)$$

« b0 » représente la réponse moyenne

Les coefficients « bi » représentent, sous l'aspect de valeurs numériques, les « poids » (ou les effets) des facteurs mis en œuvre. « Xi » représente les facteurs codés, sans dimension.

Domaine expérimental

Facteur	Nbre Niveaux	Niveaux
Charge	2	5
		10
DMAC	2	5
		10

Plan d'expérimentation

N°Exp	Charge mg/ml colonne	DMAC %
1	5	5
2	5	10
3	10	5
4	10	10

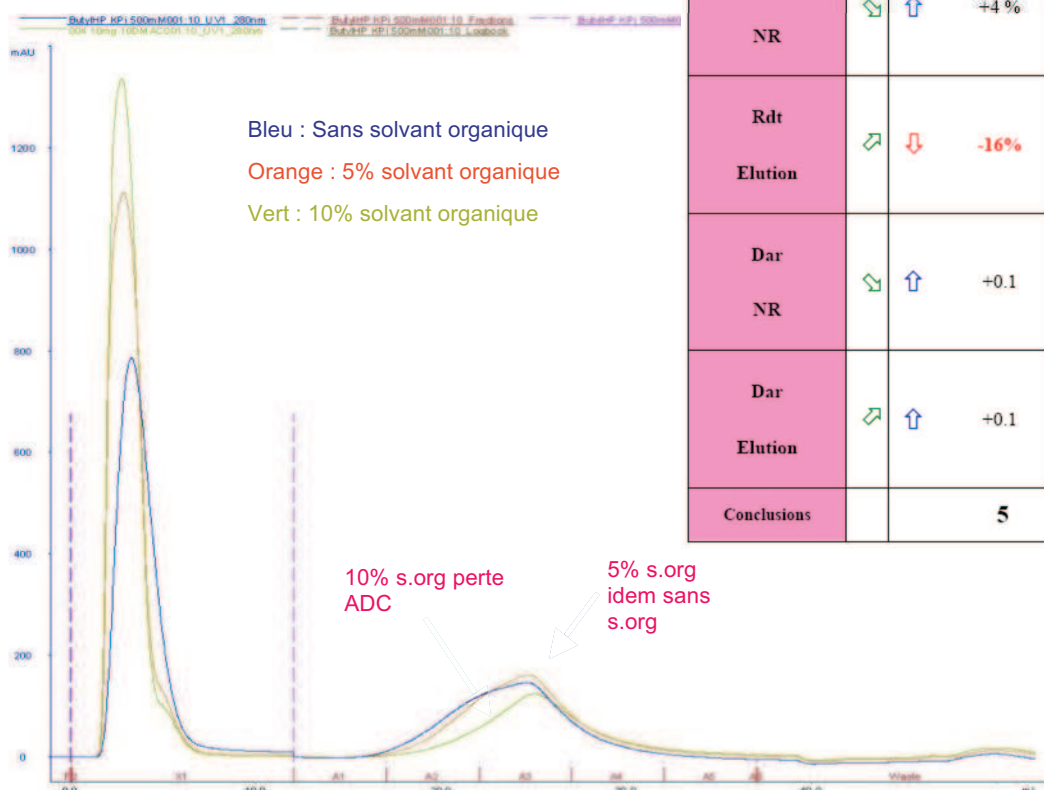
Résultats

Rdt NR	Rdt Elué	Dar NR	Dar Elué
32	84	0.36	3.09
52	52	0.55	3.56
38	68	0.43	3.19
52	38	0.68	3.60

Tableau regroupant les estimations statistiques des coefficients

En rouge les réponses validées	Tendance	Charge mg mab/mL colonne	Modalité	S.org	Modalité
		5		5 à 10 %	
En passant de		5 à 10 %		5 à 10 %	
Rdt NR	↗	↑ +4 %	5	↑ +20 %	5
Rdt Elution	↘	↓ -16 %	5	↓ -32 %	5
Dar NR	↗	↑ +0.1	5	↑ +0.2	5
Dar Elution	↗	↑ +0.1	10	↑ +0.4	10
Conclusions		5		5	

Chromatogrammes



VII Bibliographie

Abès, Dutertre & Teillard. «Les anticorps: mieux connaître pour mieux s'en servir.» *Medecine Sciences*. 2009, 25, 1011-1019.

Allard, B. «Production et caractérisation d'anticorps polyclonaux et monoclonaux ciblant les récepteurs des endothélines en vue d'une immunothérapie des cancers.» Thèse de doctorat, Immunologie, Univ Paris Sud 11, 2012, 257 pages.

Beck & Al. «Anticorps thérapeutiques et dérivés: une palette de structures pour une pléthore d'indications.» *Medecine Sciences*. 2009, 25, 1024-1032.

BioRad. « Ceramic Hydroxyapatite Application guides for process development and scale-up. », *Bulletin 6086*, Rev A.

Bross & Al. «Approval summary: Gemtuzumab ozogamycin in relapsed acute myeloid leukemia.» *Clin. Cancer Res*. 2001, 7, 1490-1496.

Casi & Neri. «Antibody–drug conjugates: Basic concepts, examples and future perspectives.» *J. Control. Release*. 2012, 161, 422-428.

Dosio & Al. «Immunotoxins and anticancer drug conjugate assemblies: the role of the linkage between components.» *Toxins* 3. 2011, 848-883.

Ducry & Stump. «Antibody drug conjugates: linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies.» *Bioconjugate Chem*. 2010, 21, 5-13.

FDA NEWS RELEASE. August 2011. « FDA approves Adcetris to treat two types of lymphoma » <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm268781.htm>.

FDA NEWS RELEASE. 21 06 2010. « FDA: Pfizer Voluntarily Withdraws Cancer Treatment Mylotarg from U.S. Market » <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2010/ucm216448>.

GE Healthcare Bio-sciences AB. «Hydrophobic interaction and reverse phase chromatography. Principles and methods» *Handbook 11-0012-69*, Sweden, 2006.

GE Healthcare Bio-sciences AB. «Gel filtration. Principles and methods.» *Handbook 18-1022-18*, Sweden, 2008.

Goldmacher & Kotvun. «Antibody-drug conjugates: using monoclonal antibodies for delivery of cytotoxic payloads to cancer cells.» *Therapeutic delivery*. 2011, 2, 397-416.

Goupy, Jacques. « Introduction aux plans d'expériences. » Dunod, Paris, 2001.

Haeuw, Caussanel & Beck. «Les immunoconjugués, anticorps "armés" pour combattre le cancer.» *Medecine Sciences*. 2009, 25, 046-1052.

Jakobsson & Al. «Optimisation and robustness analysis of a hydrophobic interaction chromatography step.» *Journal of chromatography A*. 2005, 1099, 157-166.

Jaracz & Al. «Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates.» *Bioorg. Med. Chem*. 2005, 13, 5043–5054.

Junutula & Al. «Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index.» *Nature Biotechnology*. 2008, 26, 925-932.

La Merie Business Intelligence. « Antibody-Drug Conjugates 2011 - real breakthrough still to

come A Technology, Stakeholder and R&D Pipeline Analysis. » Rapport , La Merie Business Intelligence, 2011.

La Merie, Business Intelligence. « Top 30 Biologics 2010. » 04 03 2010.
<http://www.pipelinereview.com/>.

Leblanc, Benoît. « Biochimie des protéines. » 07 2011. <http://pages.usherbrooke.ca/bcm-514-bl/index.php>.

Leem. « Biomédicaments en France : Etat des lieux 2011. » Leem, 2012.

Louvet F. & Delplanque L. « Les plans d'expériences : une approche pragmatique et illustrée - Design of Experiment : The French Touch. » Experimentique, Olivet, 2005.

Lyer and Kadambi. «Antibody drug conjugates: Trojan horses in the war on cancer.» *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2011, 64, 207-212.

Marshak & Al. «Strategies for protein purification and characterization.» *Cold spring harbour laboratory press*, 1996.

Mathieu D, Phan-Tu-Luu R & Nony J. « NEMRODW (new efficient Methodology for Research using Optimal Design) », LPRAI SARL, Marseille, France, 2000.

Millipore. « A hands-on guide to ultrafiltration/diafiltration optimization using Pellicon® cassettes. », Application Note, USA, 2008.

Milstein, G. Kohler and C. «Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.» *Nature*, 1975, 495-497.

Mistretta & Coll. «Production des anticorps monoclonaux.» *Revue médicale de Liège*, 2009, 248-252.

Nfor & Al. «High-throughput protein precipitation and hydrophobic interaction chromatography: Salt effects and thermodynamic interrelation.» *Journal of Chromatography A*. 2011, 1218, 8958-8973.

Oschsenbein, Adrian. «Anticorps monoclonaux comme substances thérapeutiques.» *Med Suisse*. 2008, 140-143.

Queiroz J.A. & Al. «Hydrophobic interaction chromatography of proteins.» *Journal of Biotechnology*. 2001, 87, 143-159.

Reichert, Janice. M. «Antibody-based therapeutics to watch in 2011.» *mAbs (Landes Biosciences)*. 2011, 3, 76-99.

Ritter, A. «Antibody-Drug conjugates: Looking Ahead to an Emerging Class of Biotherapeutic.» *PharmTech*. 2012, 36, 42-47.

Robert P. Lyon & Al. «Conjugation of anticancer drugs through endogenous monoclonal antibody cysteine residues.» *Methods in Enzymology*. 2012, 502, 124-138.

Rosenberg, Amy S. «Effects of protein aggregates: an immunologic perspective.» *The AAPS journal*. 2006, 8, E501-E507.

Ross, Gray, Schenkein & Al. «Antibody-based therapeutics in oncology.» *Expert review of Anticancer Therapy*. 2003, 07-121 .

Schneider, C.K. «Monoclonal antibodies - Regulatory Challenges.» *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2008, 431-438.

Schroeder and Cavacini. «Structure and function of immunoglobulins.» *J. of Allergy and Clin. Immunol.* 2010, 41-52.

Senter, Peter D. «Potent antibody drug conjugates for cancer therapy.» *Current Opinion in Chemical Biology*. 2009, 13, 235–244 .

Siberil & Al. «Therapeutic monoclonal antibodies: a short historical perspective, a lot of engineering, and...some clinical successes.» *Transfusion Clinique et biologique*. 2005, 114-122.

Sun & Al. «Reduction-Alkylation Strategies for the Modification of Specific Monoclonal Antibody Disulfides .» *Bioconjugate Chem*. 2005, 16, 1282-1290.

Teicher & Chari. «Antibody drug conjugate therapeutics : Challenges and potential.» *Clin Cancer Res*. 2011, 17, 6383-6397.

Wakankar A. & Al. «Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates.» *mAbs (Landes Biosciences)*. 2011, 3, 161-172.

Wei Wang & Al. «Antibody structure, instability, and formulation.» *Journal of pharmaceutical sciences*. 2007, 96, 1-26.

Weiner, Surana & Wang. «Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy.» *Nature Reviews Immunology*. 2010, 10, 317-327.

Wu & Senter. «Arming antibodies: Prospects and challenger for immunoconjugates,» *Nature biotechnology*. 2005, 23, 1137-1146.

GE Healthcare Life Sciences. www.gelifesciences.com.

Tosoh Bioscience GmbH. www.separations.eu.tosohbioscience.com.

Yuefeng Lu & Al. «Recent advancement in application of hydrophobic interaction chromatography for aggregate removal in industrial purification process.» *Current Pharmaceutical biotechnology*. 2009, 247-433.

Abstract

Antibody Drug Conjugates (ADC) are cytotoxic agent linked covalently to an antibody directed toward a specific cell surface target expressed by tumor cells. They are becoming an increasingly important class of therapeutic agents for treatment of cancer with one ADC approved in 2011 and more than 20 products currently in clinical trials.

Conjugation reaction leads to a statistical distribution (until 8 cytotoxic per antibody). For most ADCs, average number of cytotoxic per antibody is 3 or 4. Therefore 2 drugs per antibody will be sufficient to have efficacy but the percentage of unconjugated antibody will increase. Nowadays, there is no purification step to eliminate this population of naked antibody.

My thesis project was to study and develop a purification method to eliminate the unconjugated population. Because cytotoxic is hydrophobic agent, ADC is more hydrophobic than unconjugated antibodies. So HIC has been studied.

Design of experiment methodology was used to achieve two screening factors plans and two optimization plans. Screening plans have allowed us to choose one chromatography column, one salt and pH where to work. Optimization plans, for both naked antibody and ADC, have allowed us to define a prediction space to recover our fractions with a satisfactory yield.

Optimal conditions were given and tested on a purified ADC and on a crude reaction (with organic solvent and free cytotoxic.) This study have given us some information about free cytotoxic interactions and allowed to improve separation method.

The method chosen eliminates totally unconjugated population, that is naked antibody doesn't interact with column with conditions chosen. Moreover the method recovers the high conjugated antibody in a second fraction. Finally product recovered is naked antibody free and have no ADC with more than 4 cytotoxic per antibody.

Key words:

Monoclonal Antibody, Antibody drug conjugate (ADC), Hydrophobic interaction chromatography (HIC), Design of Experiment (DoE)

Résumé

Les anticorps monoclonaux conjugués à des molécules cytotoxiques, appartenant à la famille dite des immunoconjugués, font progressivement leur apparition dans l'arsenal thérapeutique contre le cancer avec un produit sur le marché depuis 2011 et plus de 20 projets en phase de développement clinique.

La réaction de conjugaison étant une étape statistique, on obtient une population hétérogène d'anticorps conjugués par 1 à 8 molécules de cytotoxiques. Il persiste également une proportion minoritaire d'anticorps n'ayant pas fixé de cytotoxiques. Cette population n'est actuellement pas éliminée lors des étapes de purification, alors qu'elle n'est pas utile pour l'activité thérapeutique envisagée par ce type de produit.

L'objectif de mon projet de thèse a été d'étudier et de développer une méthode de purification des immunoconjugués permettant d'éliminer la population d'anticorps nus qui n'a pas fixé de cytotoxiques lors de la réaction. La méthode de chromatographie d'interactions hydrophobes a été retenue pour cette étude. Elle permet de séparer les composés par ordre d'hydrophobicité croissante. Le cytotoxique étant un composé hydrophobe, il est donc logique que l'immunoconjugué soit plus hydrophobe que l'anticorps nu. Sur cette base, une séparation est donc envisageable.

La méthodologie des plans d'expériences a été utilisée pour réaliser deux plans de criblages ainsi que deux plans de surface de réponses. Les plans de criblages réalisés nous ont permis de sélectionner une colonne de chromatographie, un sel pour le tampon, un pH de travail ainsi qu'une gamme de concentration pour le tampon. La réalisation de plans de surface sur l'anticorps seul d'une part et le conjugué d'autre part nous ont permis d'établir un domaine de prédiction pour obtenir nos populations dans les fractions voulues, avec un rendement supérieur à 80% pour chacune d'elles. Des conditions optimales ont été déterminées puis testées sur un produit conjugué pur et sur un brut réactionnel contenant du solvant organique et du cytotoxique libre en excès. Le comportement de ce brut de conjugaison a permis d'initier l'étude de l'influence des composants du milieu et d'améliorer la méthode de séparation.

La méthode retenue permet alors d'éliminer en totalité la population d'anticorps nus lors de la charge, c'est-à-dire que les conditions mises en jeu préviennent l'interaction avec la matrice. En plus de cet objectif atteint, la méthode permet de récupérer dans une fraction indépendante les anticorps fortement conjugués (5 à 8 cytotoxiques fixés). Finalement le produit récupéré est non seulement dépourvu d'anticorps nus mais contient un mélange plus homogène d'anticorps conjugués avec seulement 1 à 4 molécules de cytotoxiques.

Mots clés :

Anticorps monoclonaux, Anticorps immunoconjugués, Chromatographie d'interactions hydrophobes (HIC), Plans d'expériences.