



Production d'anticorps monoclonaux par cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO)

Edwige Arnold (M.Sc.A)
edwige.arnold@polymtl.ca
Bureau: JAB-2078

GCH6302 Culture des cellules
2 juin 2014

Objectifs du cours

- Acquérir les bases de culture cellulaire mammifère
- Comprendre les problématiques liées à la production dans les cellules mammifères
- Appréhender les différents paramètres à prendre en compte lors d'une culture
- Aperçu des techniques de laboratoire
- Culture scientifique via la lecture d'articles

Plan

Introduction
Anticorps monoclonaux
Culture cellulaire
Ingénierie cellulaire
Problématiques
Mon projet
Conclusion et travaux à venir
Plan du laboratoire

😊 Discussion 😊

Introduction

Introduction

Besoin de nouveaux traitements: cancers, maladies autoimmunes...



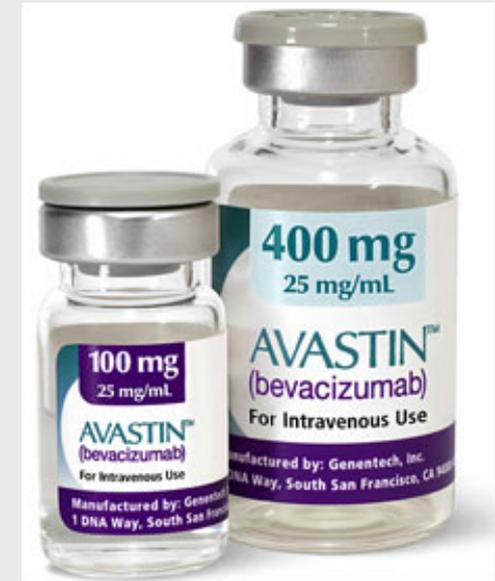
1986

1^{er} anticorps monoclonal thérapeutique approuvé



1997

7 milliards de \$ en 2012



2004

2012: 55 milliards de \$US de ventes globales d'anticorps monoclonaux thérapeutiques

Introduction

Augmentation de la production de thérapeutiques via les cellules animales:

- Efficacité de ces médicaments
- Amélioration des procédés (fed-batch)
- Thérapeutiques nécessitant les modifications post-traduction des eukaryotes
- Molécules larges qui ne peuvent être synthétisées par toutes les plateformes

70% des protéines recombinantes sont produites dans les CHO:

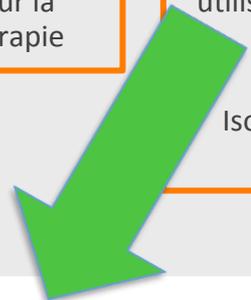
- Bénéficient d'un bon historique/Approbation par la FDA plus facile
 - Amélioration de la production spécifique (initialement basse)
 - Modifications post-traduction
 - Ingénierie génétique des lignées efficace

Introduction

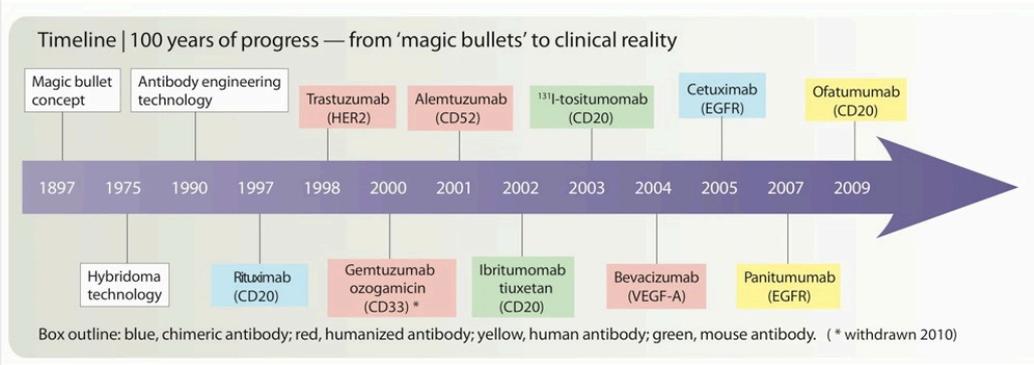
Un peu d'histoire...



<p>1885 Roux cultive des cellules d'embryons de poulet dans une solution saline</p>	<p>1907 Harrison cultive des fibres nerveuses de grenouille</p>	<p>1910 - 1920 Carrel développe des techniques de culture Rous et Jones utilisent la trypsine pour les cellules adhérentes</p>	<p>1950 - 1955 Culture de cellules HeLa par Gey Eagle développe un milieu de culture défini chimiquement</p>	<p>1986 OKT3 utilisé pour la thérapie</p>	<p>1990s Anticorps monoclonaux utilisés pour la thérapie humaine Isolation de cellules souches</p>
--	--	--	--	--	--



Monoclonal antibodies in therapy. I. Cancer.



Weiner LM et al. *Nat Rev Immunol* 10:317 (2010), modified

Introduction

TABLE 1 FDA-approved monoclonal antibody products

Product	Manufacturer	Date	Indication/target ^a	Host cell
Orthoclone OKT3	J & J	1986	Transplant rejection/ <i>T-cell CD3 receptor</i>	Hybridoma
ReoPro	Centocor/Lilly	1994	Cardiovascular disease/ <i>glycoprotein IIb/IIIa</i>	Sp2/0
Rituxan	Genentech	1997	Non-Hodgkin's lymphoma and diffuse large B-cell/ <i>CD20</i>	CHO
Zenapax	Roche	1997	Organ rejection/ <i>IL-2 receptor a</i>	NS0
Simulect	Novartis	1998	Organ rejection/ <i>IL-2 receptor a</i>	Sp2/0
Remicade	Centocor	1998	Rheumatoid arthritis and Crohn's disease/ <i>TNF-α signaling</i>	NS0
Herceptin	Genentech	1998	Breast cancer/ <i>ErbB2</i>	CHO
Synagis	MedImmune	1998	Respiratory syncytial virus/ <i>F protein epitope</i>	NS0
Mylotarg	Wyeth	2000	Acute myelogenous leukemia/ <i>CD33</i>	NS0
Campath-1H	Genzyme	2001	Lymphocytic leukemia/ <i>CD52</i>	CHO
Zevalin	Spectrum Pharmaceuticals	2002	Non-Hodgkin's lymphoma/ <i>CD20</i>	CHO
Humira	Abbott	2002	Rheumatoid arthritis and Crohn's disease/ <i>TNF-α signaling</i>	CHO
Xolair	Genentech	2003	Asthma/ <i>immunoglobulin E</i>	CHO
Bexxar	GlaxoSmithKline	2003	Non-Hodgkin's lymphoma/ <i>CD20</i>	Hybridoma
Raptiva	Genentech	2003	Plaque psoriasis/ <i>CD11a</i>	CHO
Erbix	Imclone/BMS	2004	Cancer (colorectal)/ <i>epidermal GF receptor</i>	Sp2/0
Avastin	Genentech	2004	Cancer (colon or rectum)/ <i>endothelial GF</i>	CHO
Tysabri	Biogen Idec	2004	Multiple sclerosis and Crohn's disease/ <i>T-cell VLA4 receptor</i>	NS0
Vectibix	Amgen	2006	Cancer (colorectal)/ <i>epidermal GF receptor</i>	CHO
Lucentis ^b	Genentech	2006	Macular degeneration/ <i>vascular endothelial GF</i>	<i>E. coli</i>
Soliris	Alexion	2007	PNH (hemolysis)/ <i>complement protein C5</i>	NS0
Cimzia ^c	UCB-Celltech	2008	Rheumatoid arthritis and Crohn's disease/ <i>TNF-α</i>	<i>E. coli</i>
Simponi	Centocor	2009	Rheumatoid and psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis/ <i>TNF-α</i>	CHO
Ilaris	Norvatis	2009	Cryopyrin-associated periodic syndrome/ <i>IL-1</i>	Sp2/0
Stelara	Centocor	2009	Psoriasis/ <i>IL-12 and IL-23</i>	Sp2/0
Arzerra	GSK/Genmab	2009	Chronic lymphocytic leukemia/ <i>CD20</i>	CHO

^aIL, interleukin; TNF- α , tumor necrosis factor alpha; GF, growth factor.

^bHuman antibody Fab fragment.

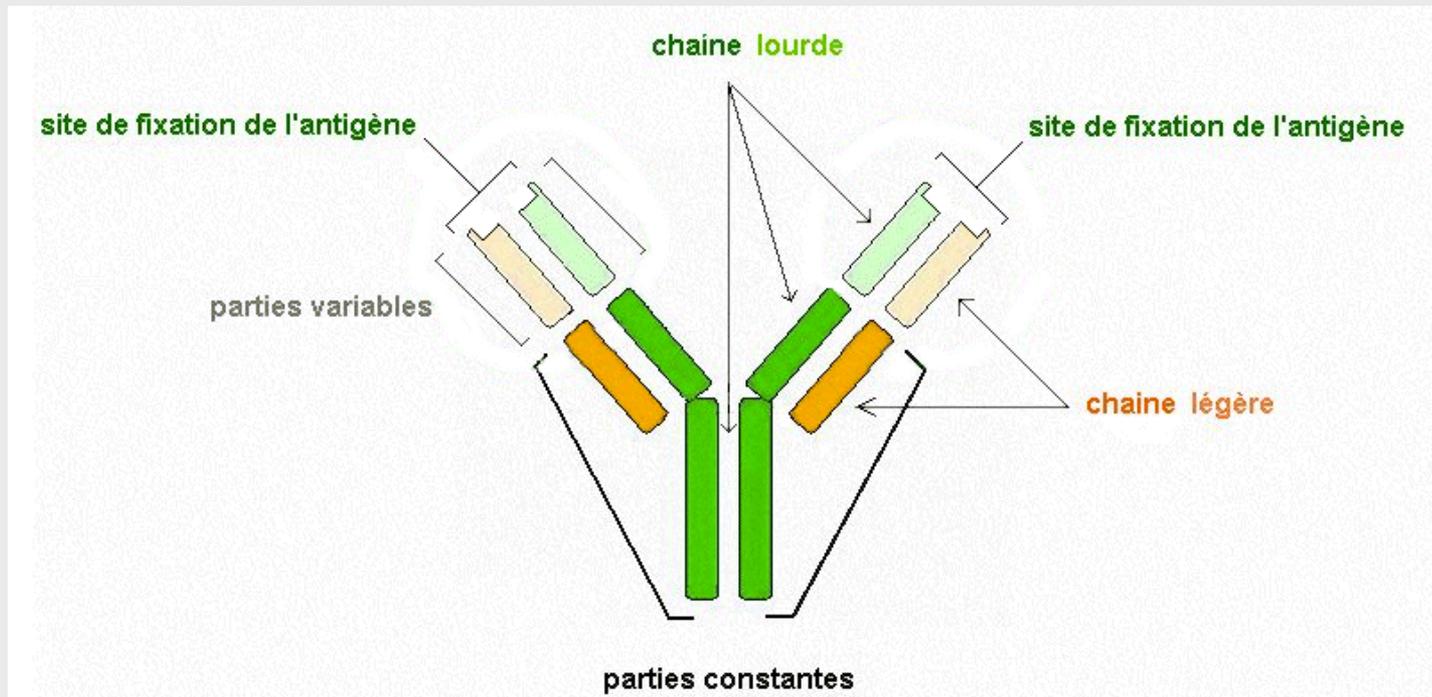
^cPEGylated anti-TNF- α antibody Fab fragment.

Anticorps monoclonaux

Anticorps monoclonaux

Qu'est-ce qu'un anticorps?

Protéine du sérum sanguin sécrétée par les lymphocytes B (globules blancs intervenant dans l'immunité) en réaction à l'introduction d'une substance étrangère (antigène) dans l'organisme (*dictionnaire Larousse*).



Anticorps monoclonaux

Qu'est-ce qu'un anticorps monoclonal?

Les anticorps monoclonaux sont des anticorps qui reconnaissent le même épitope (un site sur un antigène) et provenant d'une seule cellule.

Pourquoi utiliser les anticorps monoclonaux?

Spécificité: reconnaissance d'un seul antigène

Action: cibler des cellules spécifiques, bloquer l'action de molécules ou de récepteurs, signalisation

Qu'est-ce qu'un anticorps recombinant?

Les anticorps recombinants sont des anticorps produits par une cellule dont le matériel génétique a été modifié.

Anticorps monoclonaux

Un anticorps fonctionnel?

Importance de la glycosylation des protéines: les structures carbohydrates peuvent affecter les propriétés de la molécule (bioactivité, pharmacocinétique, solubilité, antigénicité)

Glycosylation influencée par le process, la lignée hôte, l'environnement extracellulaire

Difficulté dans l'industrie, car diversité des structures → problèmes d'approbation par la FDA

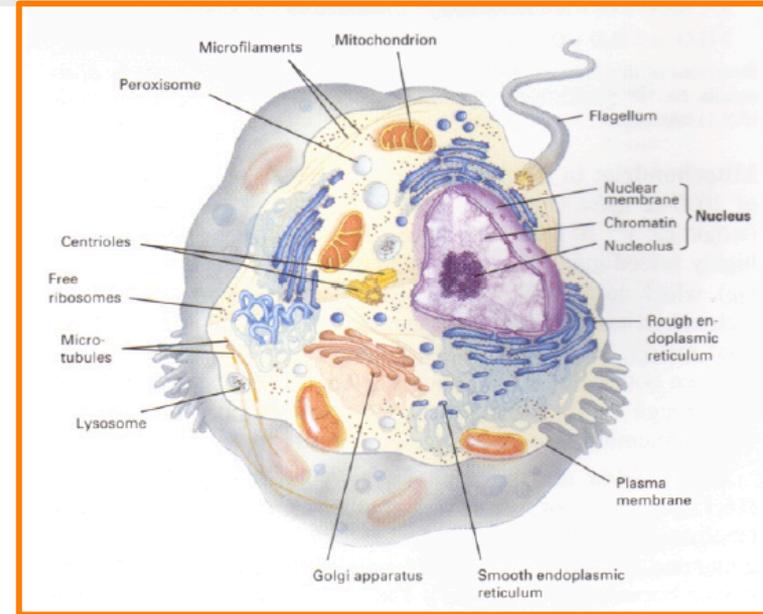
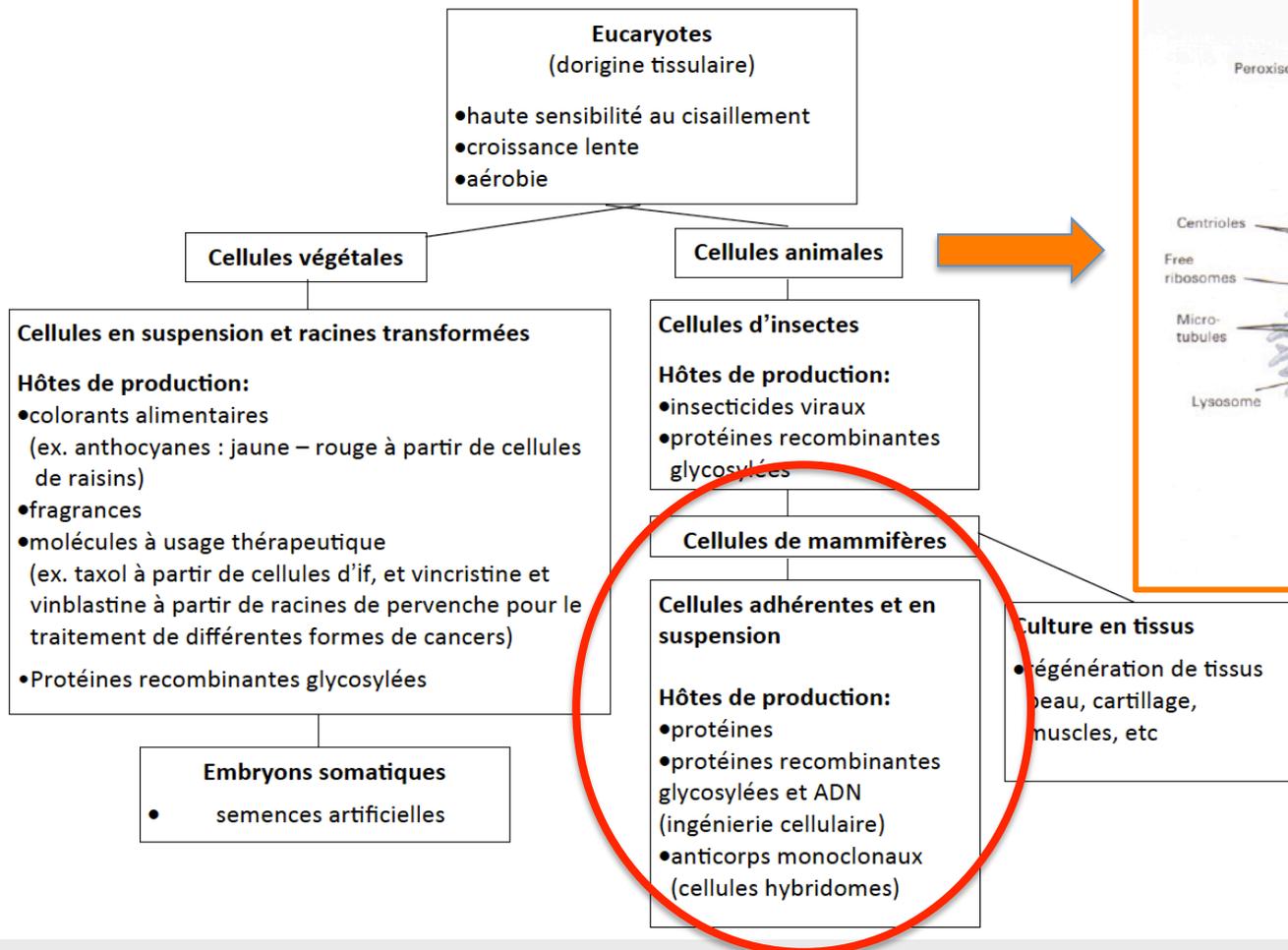
Les cellules mammifères = hôtes de choix car modifications post-traductionnelles proches de celles rencontrées *in vivo*

→ Ingénierie de la glycosylation!

Culture cellulaire

Culture Cellulaire

Rappel: les cellules mammifères



After Campbell, N.A.: *Biology* 4/e. Benjamin/Cummings 1996. The colors are for easy differentiation only.

Culture Cellulaire

Quel type de cellules?

Lignée	Origine	Type	Commentaires
BHK	Rein/Hamster	Fibroblaste	Production Vaccins/ Adhérentes/Suspension possible
CHO	Ovaire/Hamster	Epithélial	Ingénierie génétique/ Protéines recombinantes/ Adhérentes/Suspension
HeLa	Carcinome cervical/ Humain	Epithélial	Croissance rapide/ adhérentes
MDCK	Rein/Chien	Epithélial	Production vaccins vétérinaires/Adhérentes
MRC-5	Poumon embryonnaire/ Humain	Lymphoblaste	Production vaccins humains/Adhérentes
VERO	Rein/Singe vert	Fibroblaste	Production vaccins humains/Adhérentes

Fibroblaste: cellules du tissu conjonctif (cellules séparées par une matrice extracellulaire)

Epithélium: cellules jointives

Lymphoblaste: de la lignée lymphoïde (à l'origine des lymphocytes) ayant les caractéristiques d'une cellule jeune

Culture Cellulaire

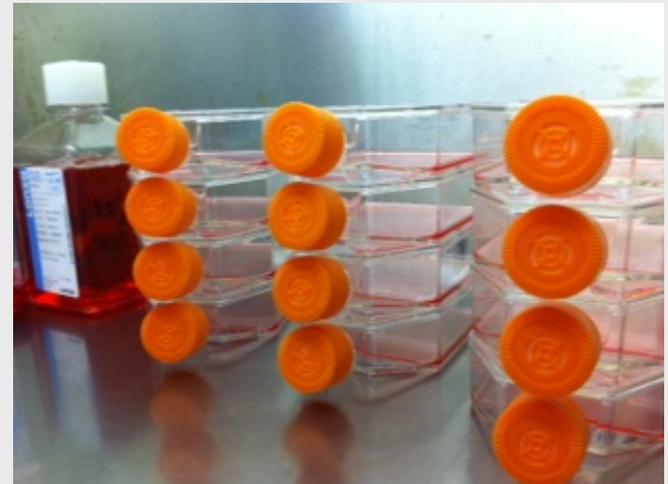
Quel type de cellules?

Cellules adhérentes: s'attachent à la surface du flacon de culture. Inhibition de contact: si la surface est entièrement recouverte, les cellules cessent de pousser ou se différencient.

Cellules en suspension: occupent le volume disponible. Inhibition de la croissance par la disparition des nutriments dans le milieu.



<http://www.bioresearchonline.com/doc/sfr-shake-flask-reader-oxygen-and-ph-0001>



<http://ddar.manchester.ac.uk/blog/?p=636>

Culture Cellulaire

Une introduction à la culture de cellules...

<http://www.youtube.com/watch?v=ZBDSok3SMRY>



<http://www.greiner.at/en/presse/newsroom-details/article/greiner-bio-one-liefert-laborartikel-fuer-stammzellen-burger-430/>



<http://www.knoxnews.com/photos/2011/jan/10/108587/>

Plus de vidéos:

<http://www.youtube.com/watch?v=Qv-Lo2bMjQc>

<http://www.youtube.com/watch?v=gaG15lM1t5A>

http://www.youtube.com/watch?v=ZMCwfQ2_o1A

Culture Cellulaire

Conditions de culture

37°C (des températures plus élevées tuent les cellules)

pH 7,4 (optimum usuel)

pH est assuré par un tampon bicarbonate- CO_2 de pKa 6,3 (le même système que dans le sang *in vivo*)

→ Atmosphère de l'incubateur à 5% CO_2 pour une concentration dans le milieu de 24 mM en bicarbonate

Culture Cellulaire

Milieu de culture

Plusieurs types

Dépend de la lignée

Dépend de l'utilisation (production, transfection...)

Attention! Certains milieux ne permettent pas la transfection (présence d'inhibiteurs)

S'inspirer de la littérature

Composition: glucides (glucose) comme source d'énergie et précurseur de biosynthèse, acides aminés (glutamine) comme précurseurs de synthèse protéique, sels pour avoir un milieu isotonique, bicarbonate (tampon), vitamines et hormones comme cofacteurs métaboliques, phenol red comme indicateur de pH

Industrie: serum-free pour validation FDA (variation de composition, coût, serum peut compromettre l'extraction et la purification des protéines, contamination par agents infectieux
→ virus, prions)

Culture Cellulaire

Milieu de culture

Composé	Bactéries et levures	cellules végétales	cellules animales
Glucides			
glucose	30 000 mg/L	30 000 mg/L	4 500 mg/L
sucrose	x	x	
autres	x	x	
Macronutriments			
KH_2PO_4		1 500	170-275
KCl			330
KNO_3	2 000	0.076	
$\text{MgSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$	600	370	98
$\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$	50	300-400	165
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	6 000		
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \bullet \text{H}_2\text{O}$		150	125
NaCl			4 505
NaHCO_3			3 024
Micronutriments			
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	1.5	2-8.6	
$\text{ZnSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$	0.6	2-8.6	
$\text{CuSO}_4 \bullet 5\text{H}_2\text{O}$	0.6	0.025	
$\text{MnSO}_4 \bullet \text{H}_2\text{O}$	0.6	10	
KI	0.75-0.83		
H_3BO_3	3-6.2		
$\text{CoCl}_2 \bullet 6\text{H}_2\text{O}$		0.025	
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \bullet 5\text{H}_2\text{O}$			0.0173

Culture Cellulaire

Milieu de culture

Composé	cellules		animales
	Bactéries et levures	végétales	
Chelateurs			
EDTA	4 000 mg/L	43 mg/L	
Tampon			
HEPES			5 958 mg/L
Na ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄	20 000/10 000	x	
Indicateur de pH			
Rouge phénol			15
Précurseur			
Pyruvate de sodium			110
Vitamines (total)		4	10
Acides aminés (total)	parfois		20
Facteurs de croissance (total)		3	serum bovin
Extraits de levures	x		
Milieu utilisé ajouté		parfois	parfois

Culture Cellulaire

Contamination

Principaux contaminants d'une culture mammifère: bactéries et champignons

Observations: augmentation ou baisse du pH (voir les indicateurs colorés de pH dans le milieu), milieu opaque, observation microscopique, altération de la croissance et du métabolisme, de la production, agrégation des cellules...



→ Ajout d'antibiotique dans le milieu de culture

Que faire en cas de contamination?

Jeter les flasks, décontaminer l'incubateur et le laboratoire, prévenir les autres utilisateurs

Culture Cellulaire

Croissance des cellules

En phase de croissance:

$$N = N_0 \cdot 2^X$$

$$t_D = \frac{T}{X}$$

$$\mu = \frac{dN}{dt} \cdot \frac{1}{N}$$

$$\ln N = \ln N_0 + \mu \cdot t$$

N: concentration cellulaire finale (c/mL)

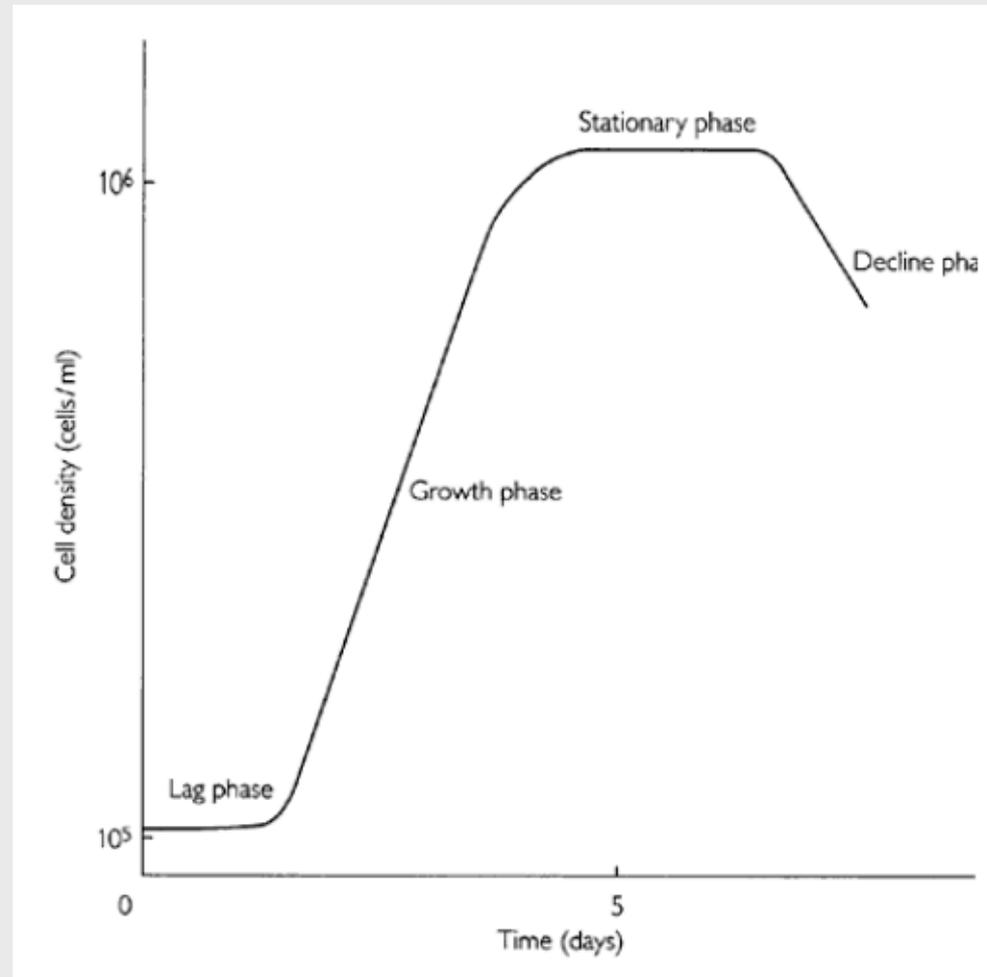
N_0 : concentration cellulaire initiale (c/mL)

X: nombre de générations

t_D : temps de doublement (h)

T: temps total écoulé (h)

μ : taux de croissance spécifique (h^{-1})



Butler, M. (2004). *Animal Cell Culture & Technology*.

Culture Cellulaire

Inoculation

A une densité de $>100\ 000$ c/mL pour que la croissance reprenne facilement

Les cellules adhérentes s'attachent dans l'heure (sur une surface disponible)

Passages

Pourquoi? → limitation des nutriments (suspension), manque de surface (adhérentes)

Suspension: dilution des cellules dans du milieu frais

Adhérentes: détachement des cellules (trypsinisation) et reinoculation dans une nouvelle flask avec du milieu frais

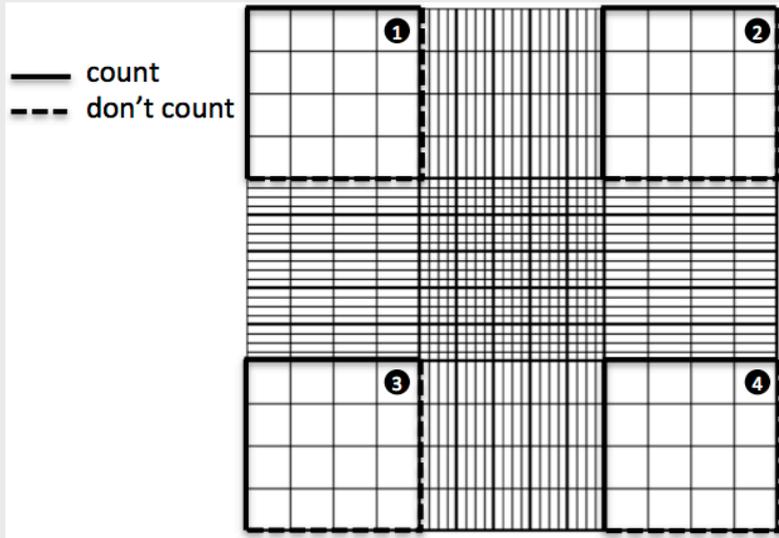
La trypsine casse les protéines qui attachent les cellules à la surface

Au labo: tous les deux jours

Si nombre de passages trop élevé → redécongeler des cellules

Culture Cellulaire

Comptes cellulaires



<http://hemocytometer.wordpress.com/2013/04/04/hemocytometer-protocol/>

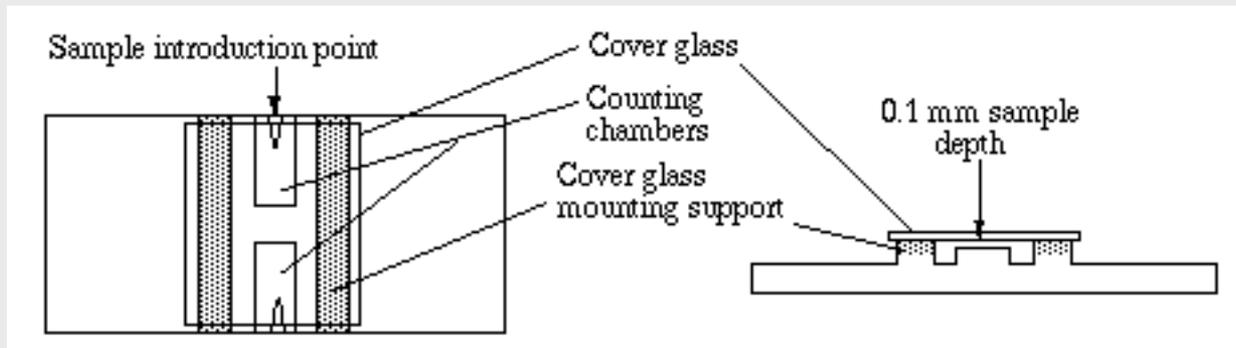
Hémacytomètre

Faire les dilutions appropriées (ne compter ni trop peu, ni trop)

Ajout de bleu trypan pour évaluer la viabilité

Formule de calcul dépend de l'hémacytomètre (volume)

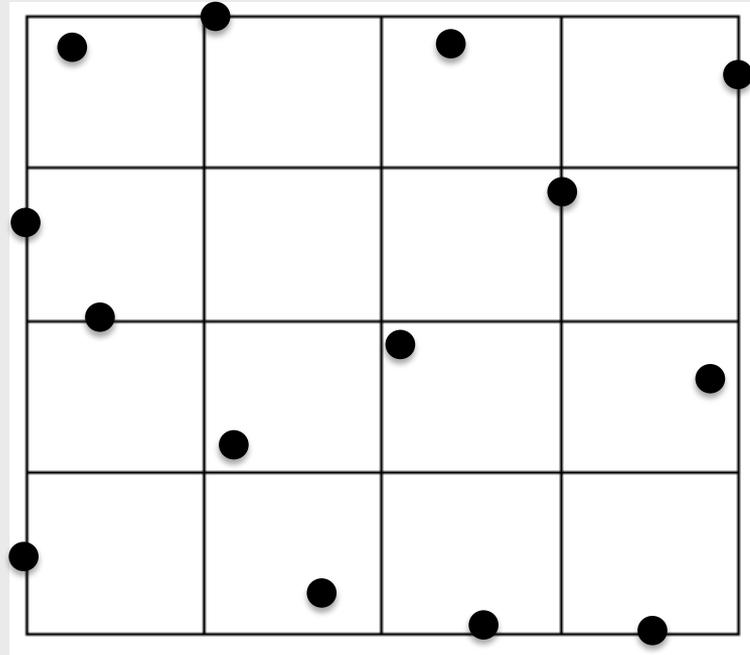
Erreur: 10%



<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/microscopy/cellcounting.html>

Culture Cellulaire

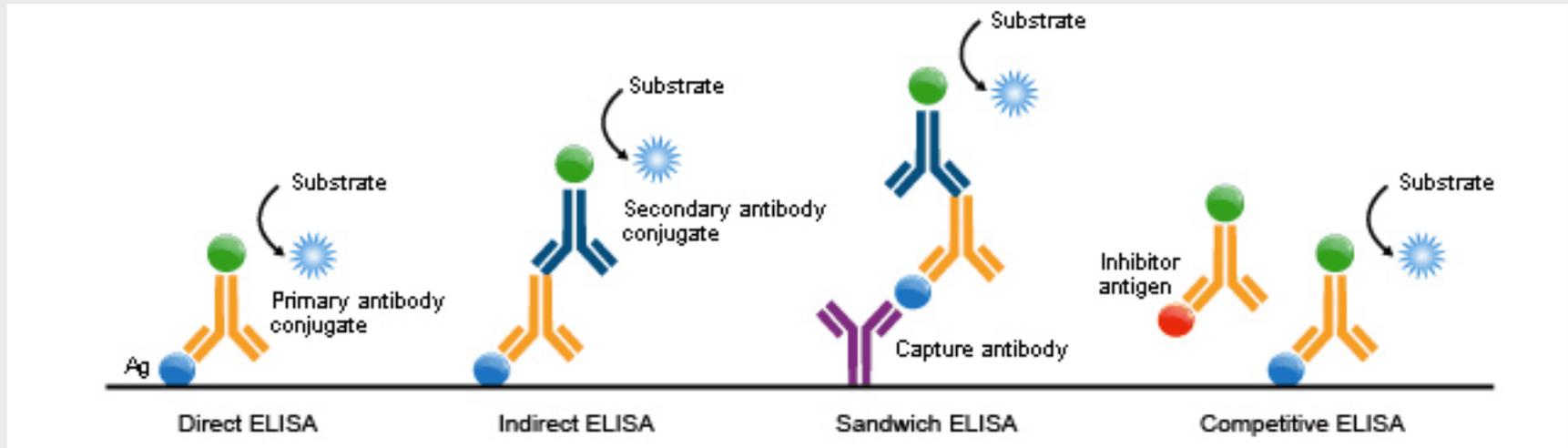
Comptes cellulaires - Exemple



Combien comptez-vous de cellules?

Culture Cellulaire

ELISA



<http://www.abnova.com/support/resources.asp?switchfunctionid=%7B70196CA1-59B1-40D0-8394-19F533EB108F%7D>

Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay

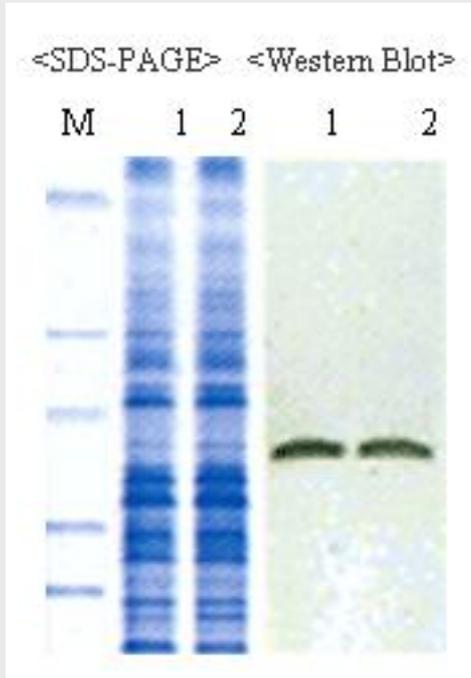
Dosage de protéines variées

Plusieurs types

Basée sur l'affinité spécifique anticorps-antigène

Culture Cellulaire

Western blot



http://www.viswagenbiotech.com/protein_related.jsp

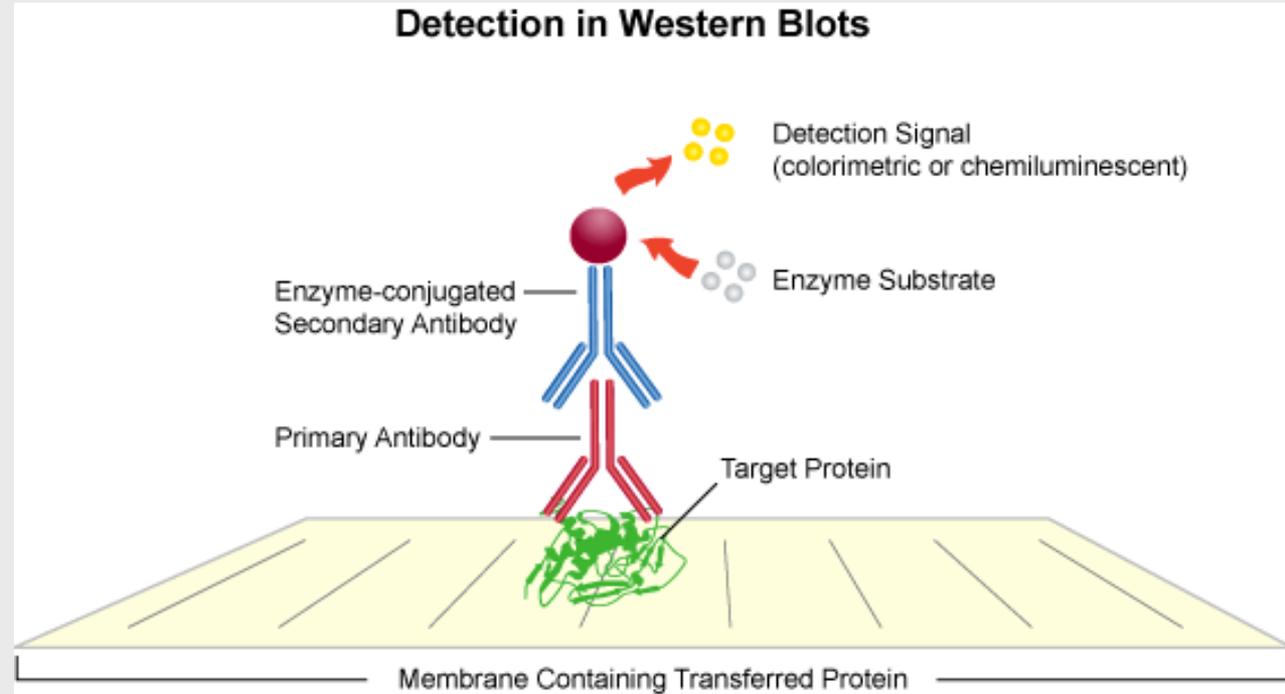


Diagram 2: Illustration of detection in Western Blots.

http://www.leinco.com/general_wb

Détection et identification de protéines spécifiques
Séparation des protéines (électrophorèse) → transfert sur une membrane → exposition à un anticorps

Culture Cellulaire

Analyses des nutriments et sous-produits

Suivi dans les échantillons de :
Consommation de glucose, glutamine
Production lactate, glutamate

Calcul des taux de consommation
spécifiques

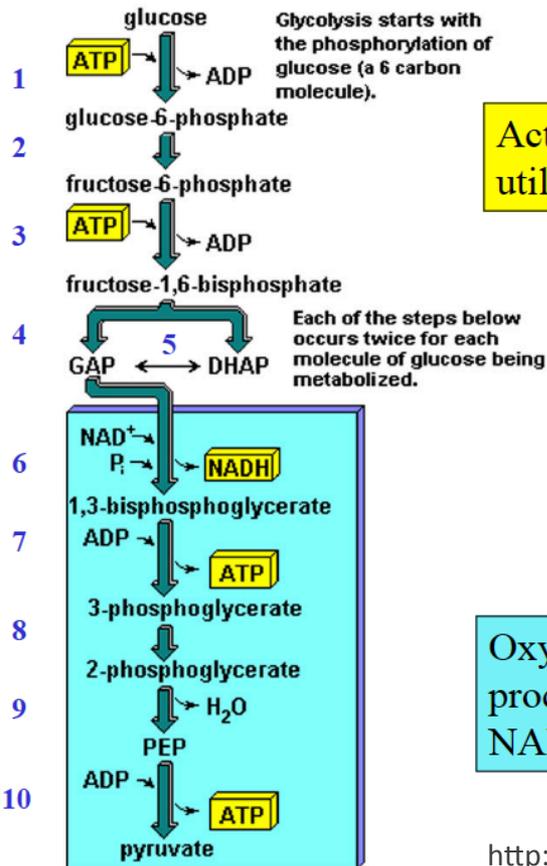


Culture Cellulaire

Métabolisme

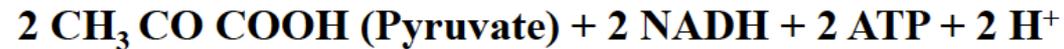
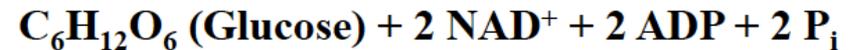
= ensemble des réactions chimiques qui se déroulent dans la cellule pour lui permettre de vivre, se nourrir, se développer, créer de l'énergie, synthétiser des molécules

Glycolyse



Activation avec utilisation d'ATP

Oxydation avec production de NADH et d'ATP

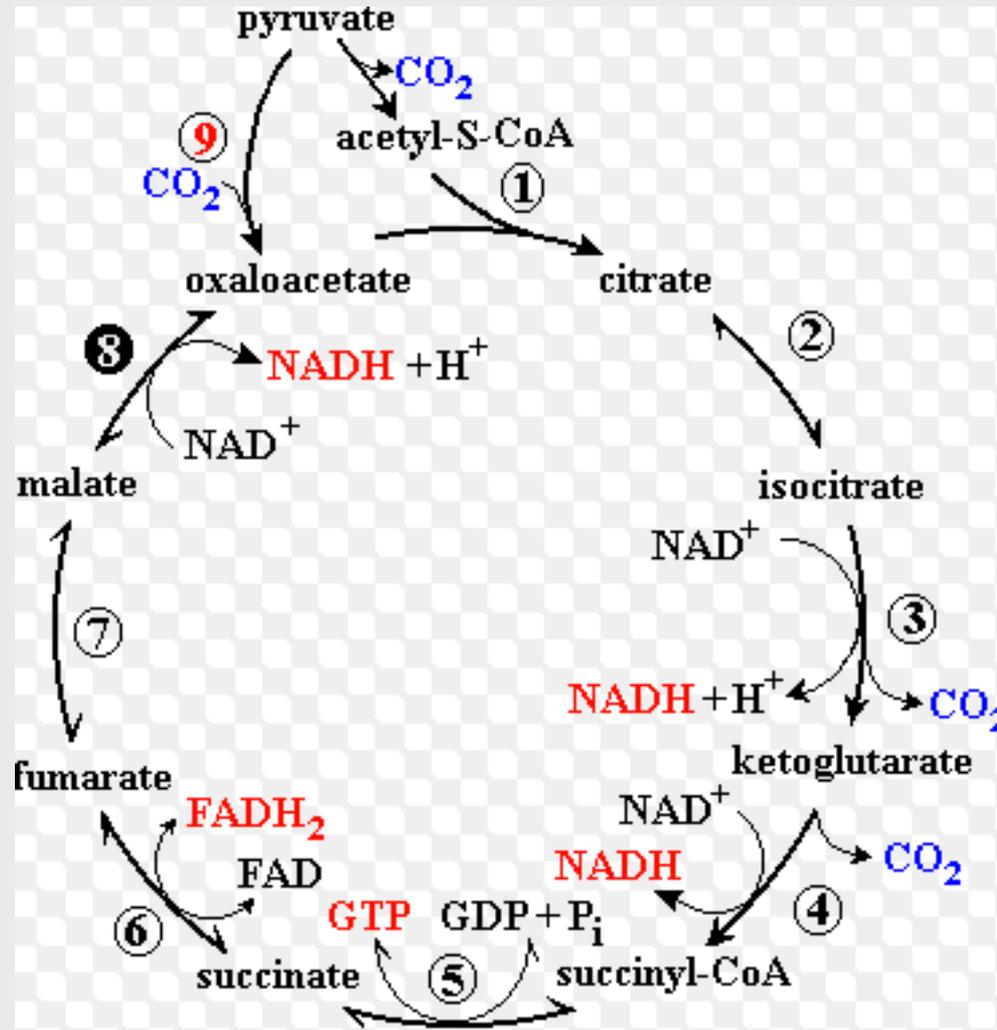


ATP → synthèse de protéines, ADN, acides gras, sucres, mouvement, transport d'ions et métabolites...

NADH → transformé en ATP par respiration mitochondriale

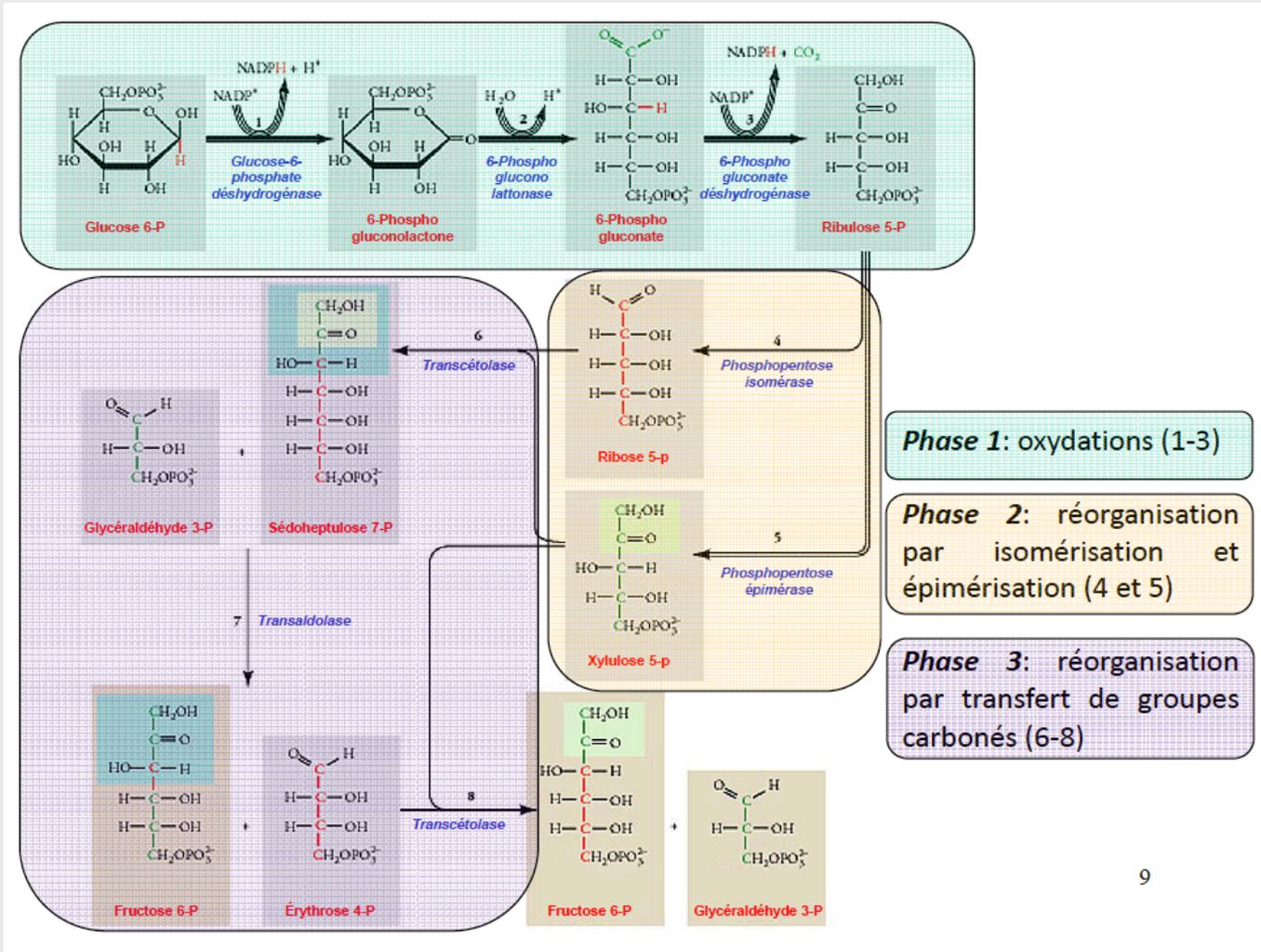
Culture Cellulaire

TCA (cycle de l'acide citrique, cycle de Krebs)



Culture Cellulaire

Pentose-Phosphate Pathway



9

Culture Cellulaire

Bioréacteurs

Batch: système fermé, régime transitoire, volume fixe

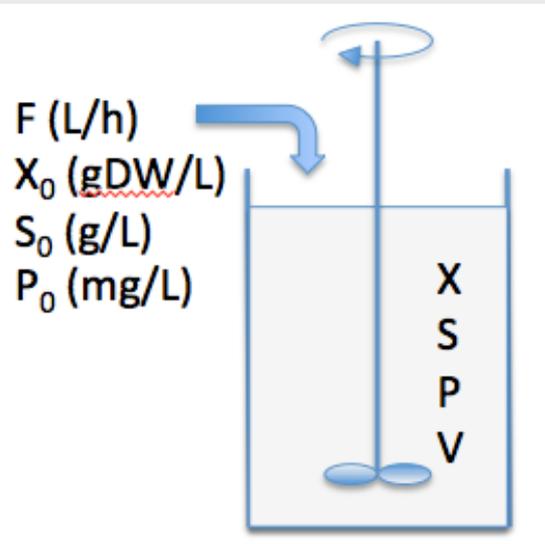
Avantages: fort taux de conversion par unité de volume, flexibilité d'utilisation (produire un autre produit pour le batch suivant, utiliser une autre plateforme), nettoyage facile, risque de contamination moindre, risque de mutation moindre, méthode bien établie dans l'industrie

Désavantages: Coût d'opération élevé (car nettoyage, stérilisation, chauffage refroidissement, durée de production plus courte) , qualité du produit variable

Culture Cellulaire

Bioréacteurs

Fed-batch: alimentation en substrat, régime transitoire, volume augmente au cours du temps



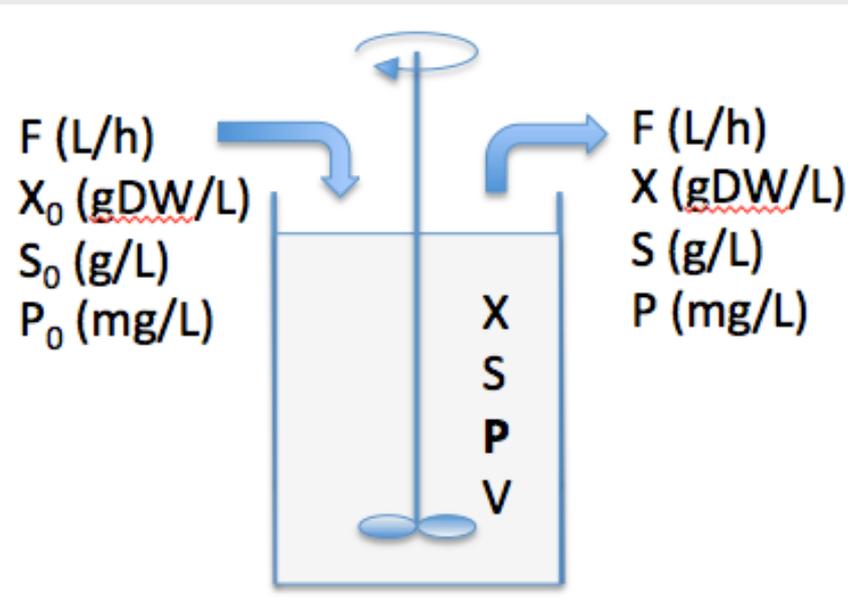
Avantages: accumulation du produit P, Temps de production augmenté, permet ajout d'inducteurs, permet de maintenir le substrat bas (inhibition ou répression catabolique), permet de maintenir un μ en croissance ou quasi-stationnaire, généralement S_0 est concentré pour limiter l'augmentation du volume

Désavantages: accumulation des toxines, dégradation du produit?, plus de risques de contamination et de rupture de la stérilité, stabilité de la plateforme génétique?

Culture Cellulaire

Bioréacteurs

Chemostat (CSTR): une entrée une sortie, après une adaptation → régime permanent



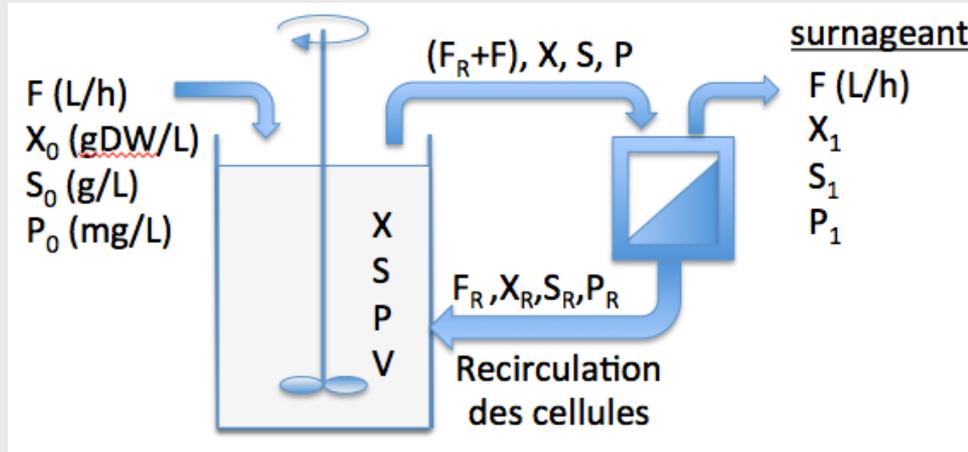
Avantages: enlèvement du produit (bien si P est fragile), enlèvement des toxines, augmentation du temps de production

Désavantages: concentration faible en produit P, plus de risques de contamination et de rupture de la stérilité, stabilité de la plateforme génétique?

Culture Cellulaire

Bioréacteurs

Chemostat en mode perfusion (avec recirculation):



Avantages: augmente la productivité, augmente la concentration en produit (facilite étapes de purifications), augmente la robustesse face aux variations d'opération, alimenter séquentiellement différents substrats,

Désavantages: plus de risques de contamination et de rupture de la stérilité, stabilité de la plateforme génétique?, module de séparation complexe

Culture Cellulaire

Bioréacteurs

Cellules animales = très sensibles au cisaillement

→ Rester en dessous du seuil critique!

Cisaillement excessif → détachement des cellules (adhérentes), lyse, apoptose, relargage de toxines (suspension)

Approche de **Kolmogorov**:

$$\lambda = \frac{2}{3} \phi_{cellule}$$

$$\varepsilon = \frac{v^3}{\lambda^4}$$

$$v = \frac{\mu}{\rho}$$

→ Augmenter la viscosité permet de diminuer le cisaillement!

Autres moyens: ajout de tensioactif (Pluronic-F68), ajout de PEG (polyéthylène glycol)

Culture Cellulaire

Bioréacteurs

L'offre en oxygène doit égaler la demande en oxygène!

L' O_2 est très peu soluble dans l'eau

Régi par la loi de Henry à l'interface gaz-liquide

Plus on augmente le transfert d' O_2 plus on augmente le cisaillement!

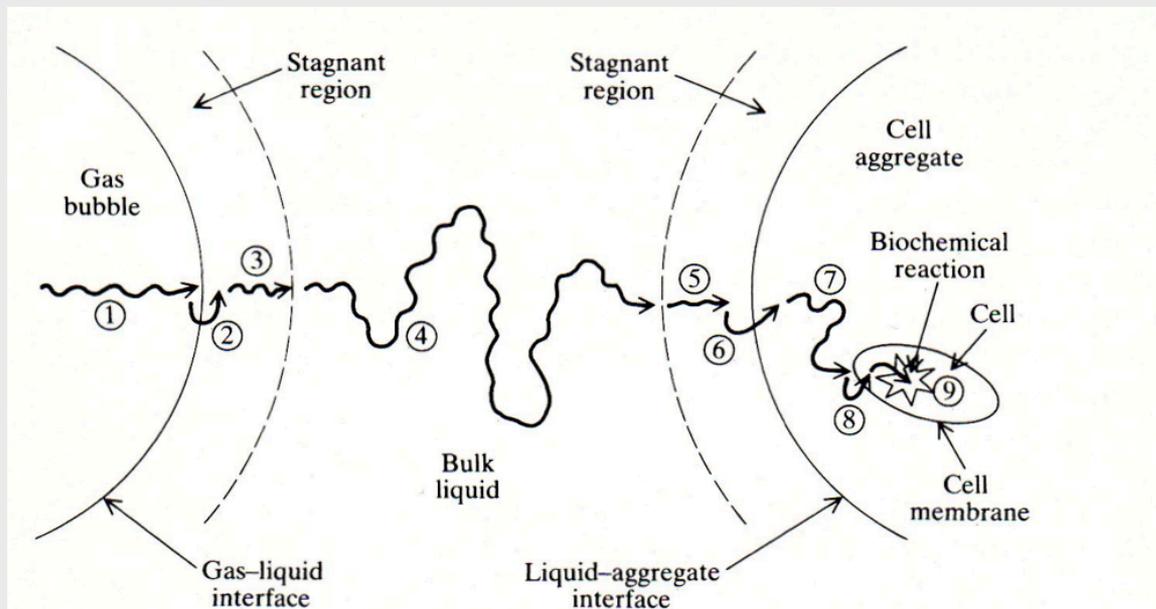


Figure 8.1 Schematic diagram of steps involved in transport of oxygen from a gas bubble to inside a cell. (Bailey, Ollis. 1986. Biochemical engineering fundamentals. 2nd Ed.)

Culture Cellulaire

Bioréacteurs

Taux de transfert en O₂:

$$\mathbf{OTR = k_L \times a \times (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \text{ [mmol O}_2\text{/L/s]}}$$

kLa = fct (vitesse d'agitation, géométrie, type agitateur, fluide)

Oxygène uptake rate:

$$OUR = q_{O_2} \cdot X$$

Bilan sur l'O₂:

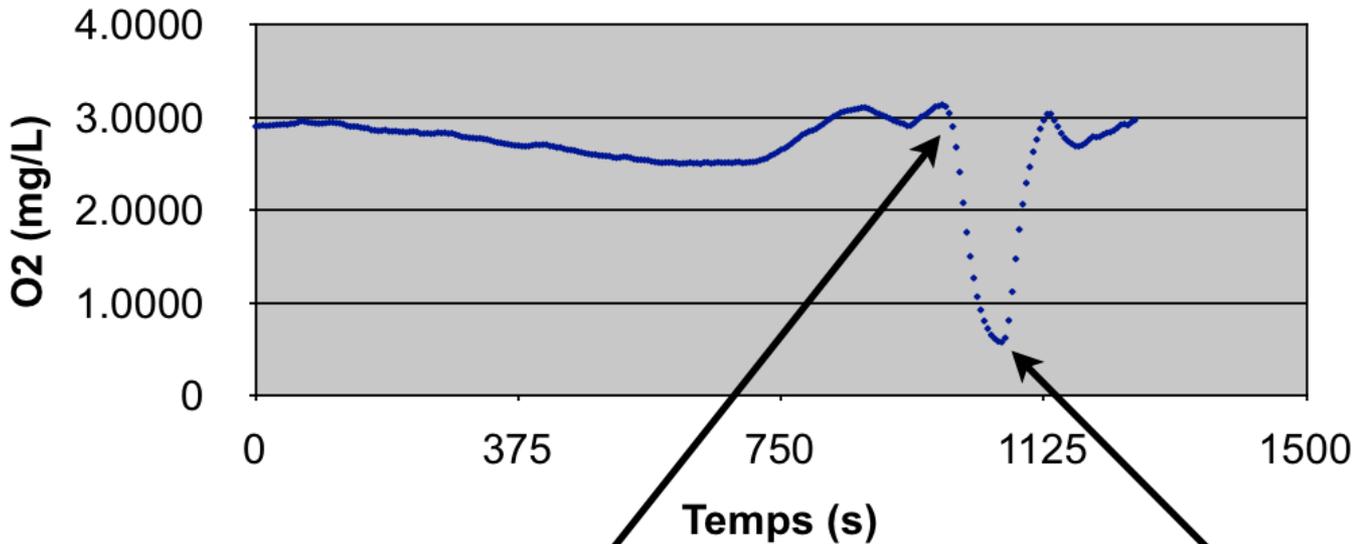
<u>sans cellules</u>	ou	<u>avec cellules</u>
$\frac{\partial C_{O_2,L}}{\partial t} = k_L a \cdot (C_{O_2,L}^* - C_{O_2,L})$		$\frac{\partial C_{O_2,L}}{\partial t} = k_L a \cdot (C_{O_2,L}^* - C_{O_2,L}) - q_{O_2} \cdot X$

Culture Cellulaire

Bioréacteurs

Estimation du $k_L a$ expérimentalement

Oxygène dissous durant une culture typique



Alimentation en air coupée $\rightarrow k_L a \sim$

$$\frac{\partial C_{O_2,L}}{\partial t} = \cancel{k_L a} \cdot (C_{O_2,L}^* - C_{O_2,L}) - q_{O_2} \cdot \chi$$

Débit gazeux remis

$$\frac{\partial C_{O_2,L}}{\partial t} = k_L a \cdot (C_{O_2,L}^* - C_{O_2,L}) - q_{O_2} \cdot \chi$$

Ingénierie cellulaire

Ingénierie cellulaire

Pourquoi?

Amélioration des lignées: croissance, consommation de substrats, production de sous-produits néfastes (ammonium, lactate)

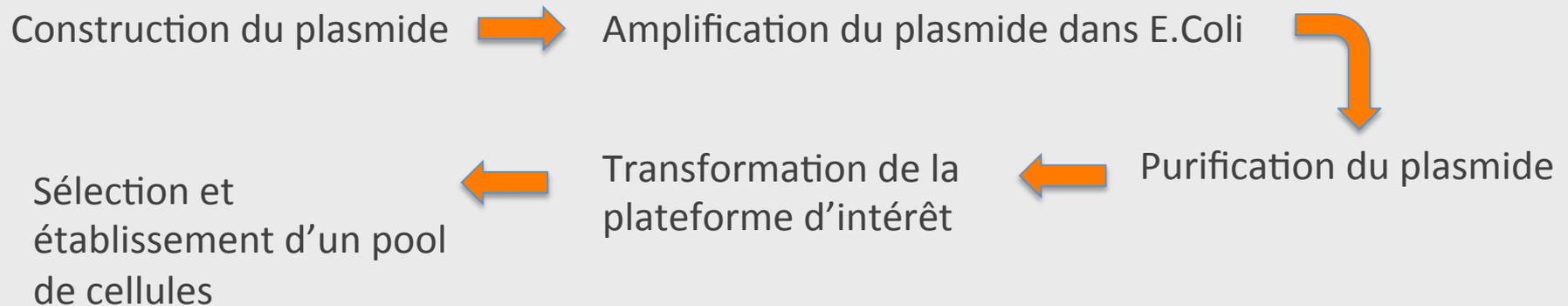
Production: protéines recombinantes, augmenter la production, switch on/off

Métabolisme: diriger les flux, bypass

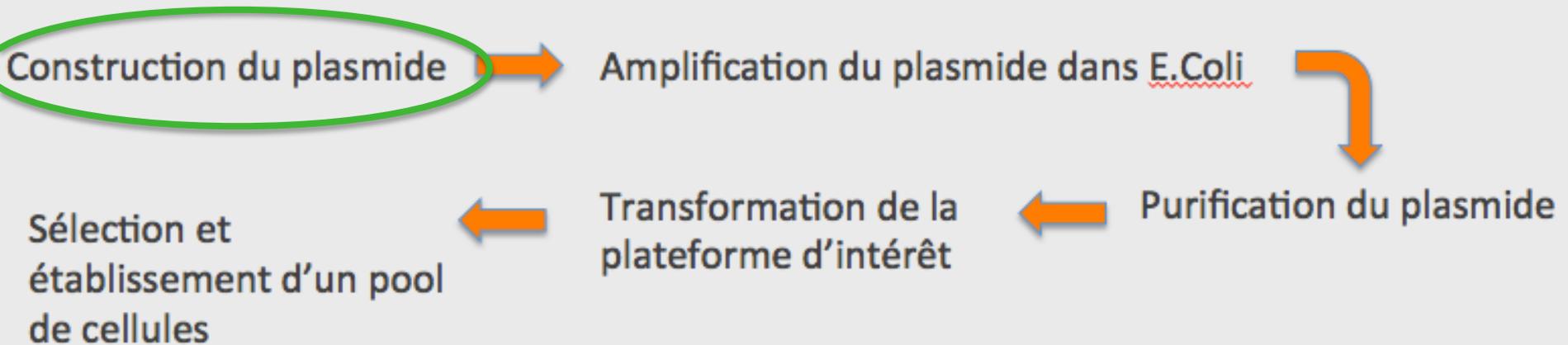
Produit fini: glycosylation

Ajout d'une propriété: résistance à un antibiotique

Développement d'une lignée



Ingénierie cellulaire



Ingénierie cellulaire

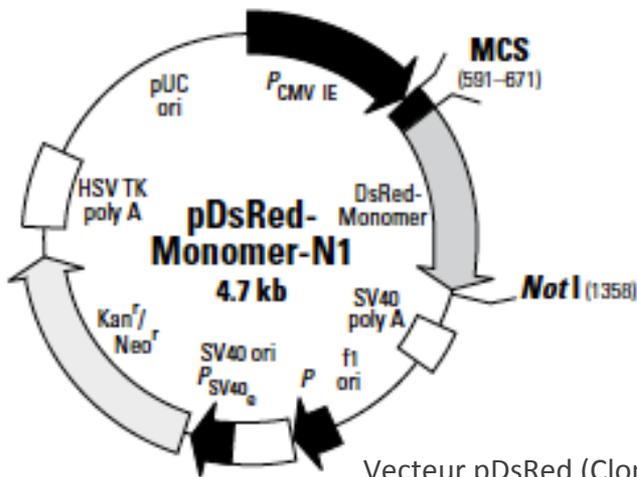
Matériel génétique

Virus: Particule avec ADN/ARN entourée d'une enveloppe protéique, qui utilise la cellule hôte pour se répliquer et se propager aux autres cellules

Transposon: séquence d'ADN qui peut se déplacer de manière autonome dans le génome, ne peut pas se multiplier de manière autonome

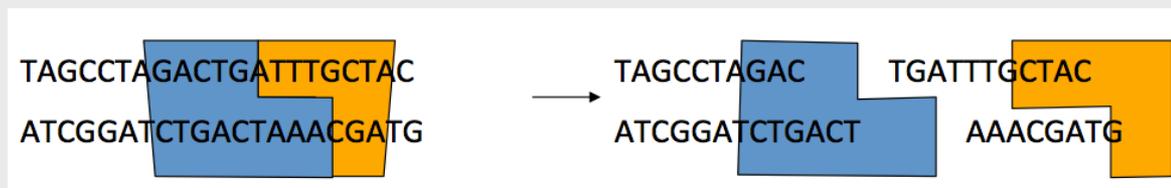
Plasmide : molécule d'ADN circulaire qui se réplique indépendamment du reste du génôme

Le plasmide doit contenir: de sites de restrictions, une origine de réplication bactérienne, un promoteur eukaryotes, un facteur de sélection (un pour les bactéries et un pour les eukaryotes)

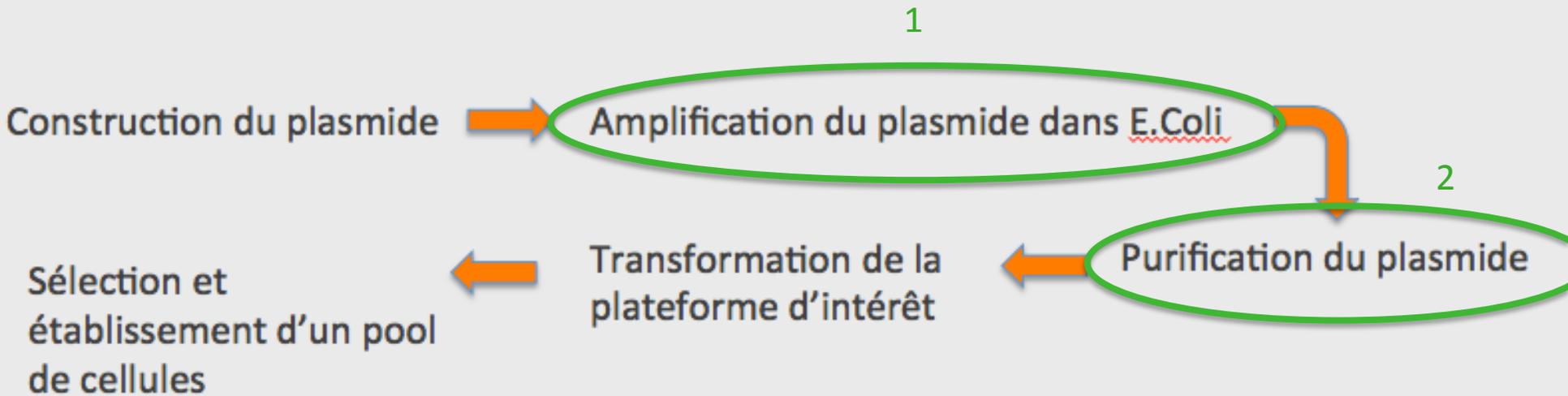


Vecteur pDsRed (Clontech Laboratories Inc.)

Utilisation d'enzymes de restriction pour cliver l'ADN à des sites spécifiques et ligase pour unir des bouts d'ADN

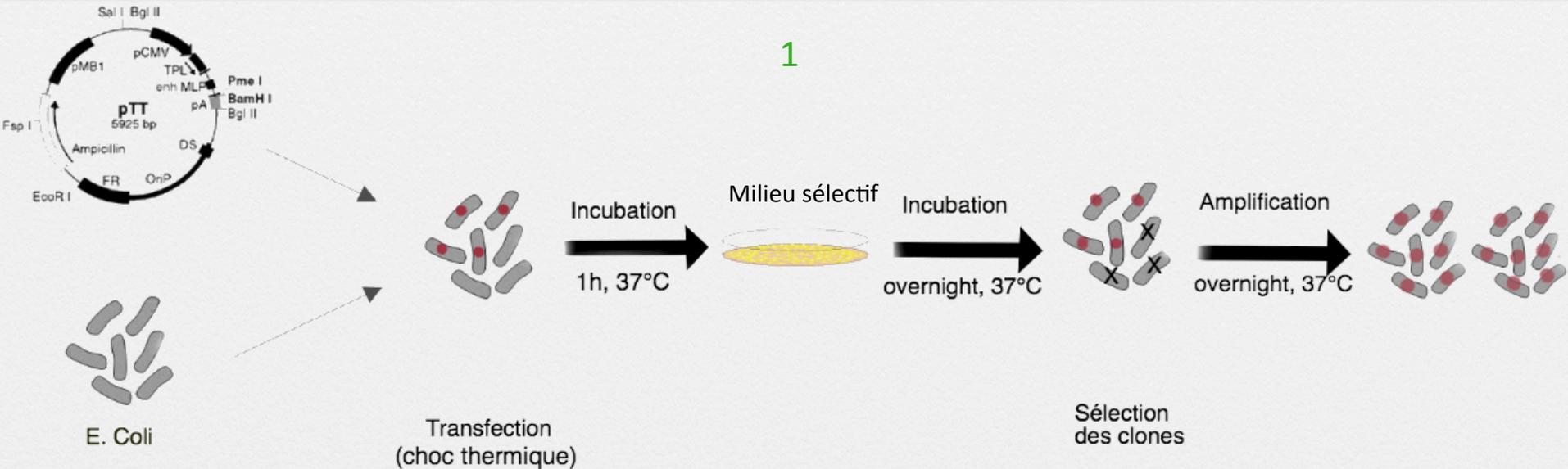


Ingénierie cellulaire



Ingénierie cellulaire

Amplification d'un plasmide

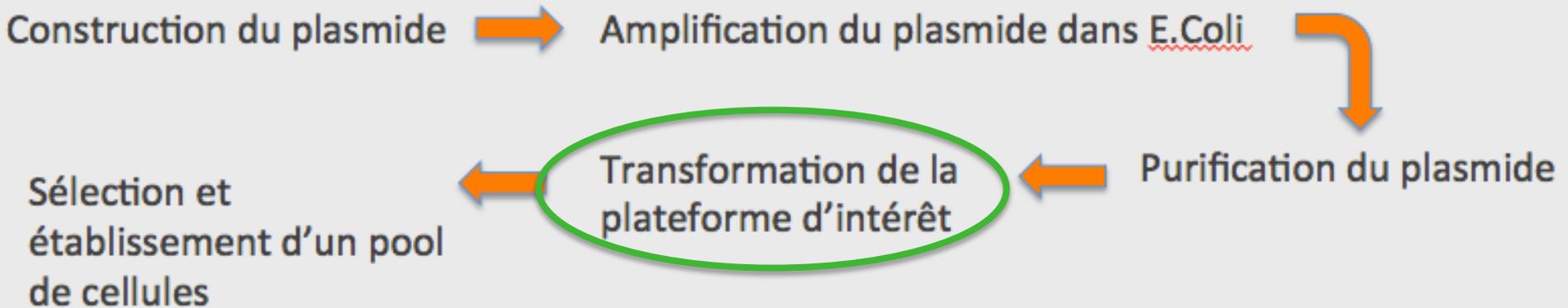


2 Miniprep ou megaprep pour purifier l'ADN

http://www.biomiga.com/index.php?cPath=35_64



Ingénierie cellulaire



Ingénierie cellulaire

Transfection

Transitoire: l'ADN n'est pas intégré au génome, il est perdu lors de la mitose (cas le plus courant)

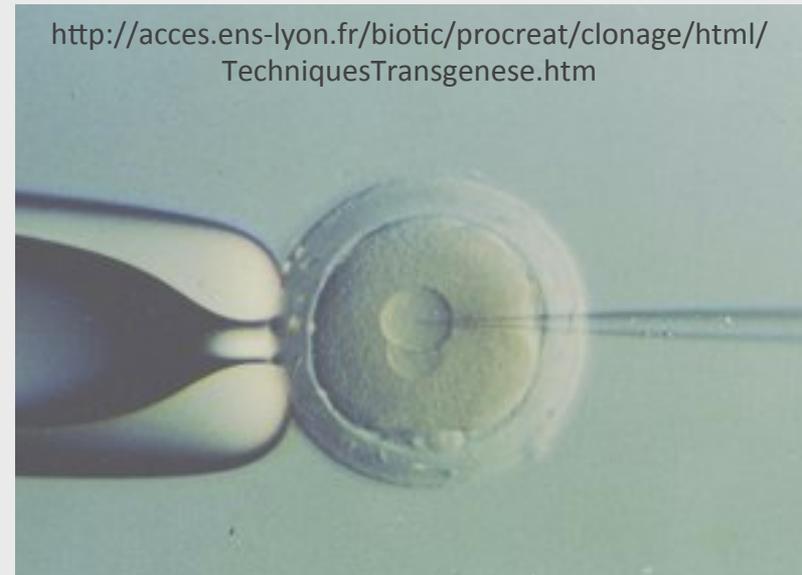
Stable: L'ADN est intégré au génome

Quelques cellules auront intégré l'ADN à leur génome (pourcentage très faible), on applique une sélection pour que seules les cellules qui ont intégré l'ADN survivent

Régulation de l'expression: switch on/off

Plusieurs moyens:

- Phosphate de calcium
- Lipofection (lipofectamine)
- Polycations/Polyplexes (PEI)
- Choc thermique (*E. coli*)
- Microinjection (laboratoires spécialisés)
- Electroporation (choc électrique, formation de pores dans la membrane)
- Virus

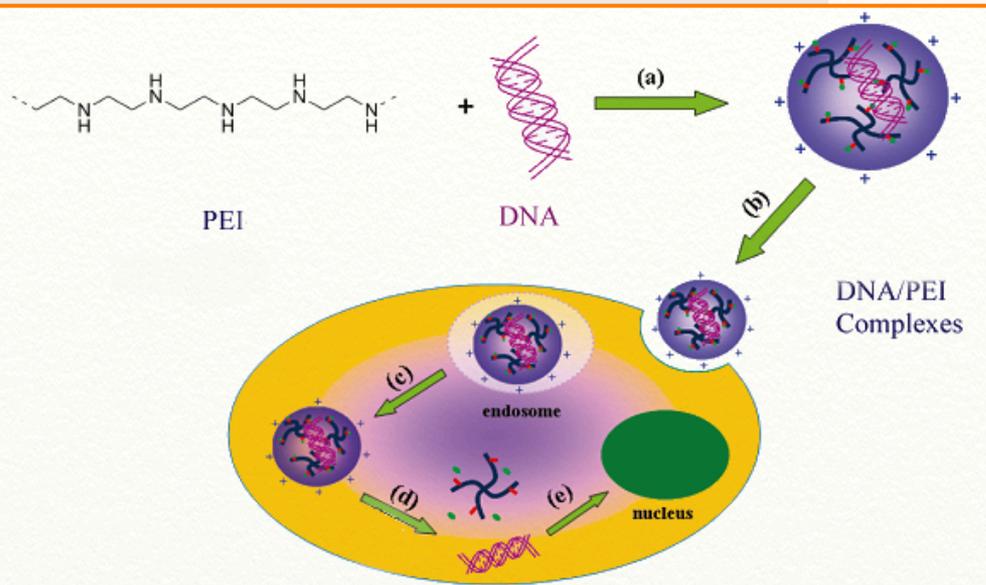
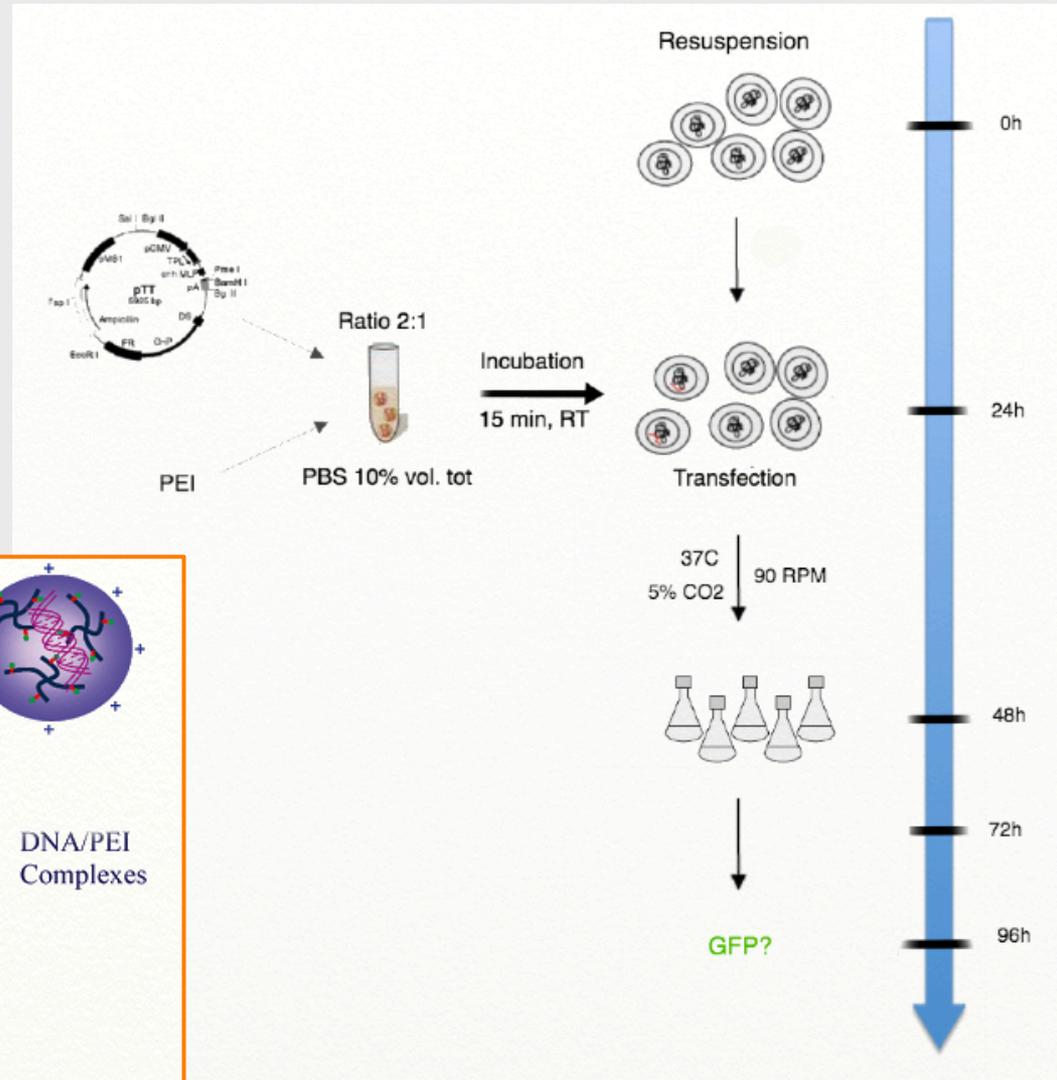


Ingénierie cellulaire

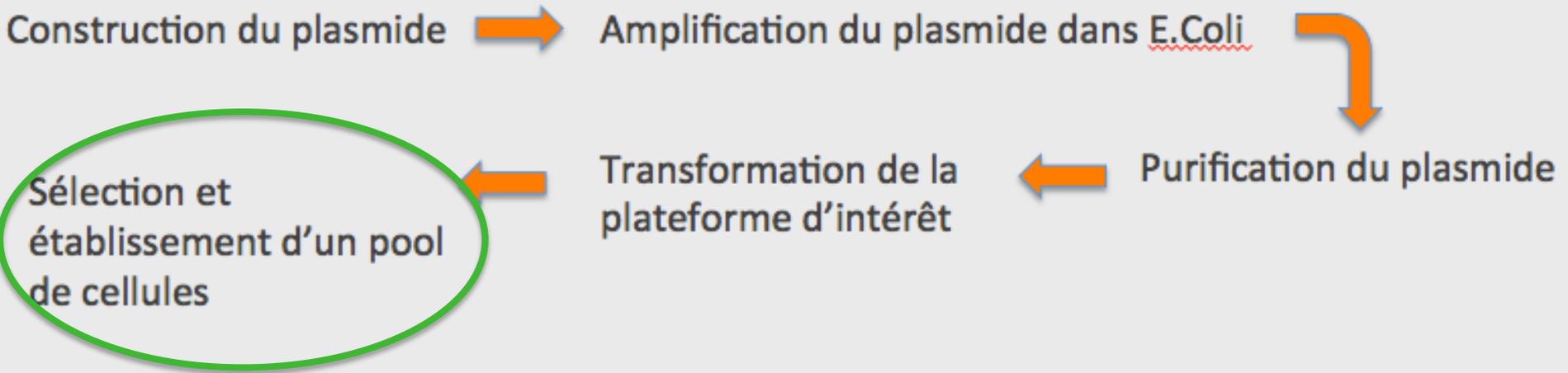
Transfection au PEI

Tests préliminaires pour les ratios PEI/
ADN à utiliser

Polyplexe=globalement positif, se fixe
à la membrane négative, puis
endocytose



Ingénierie cellulaire

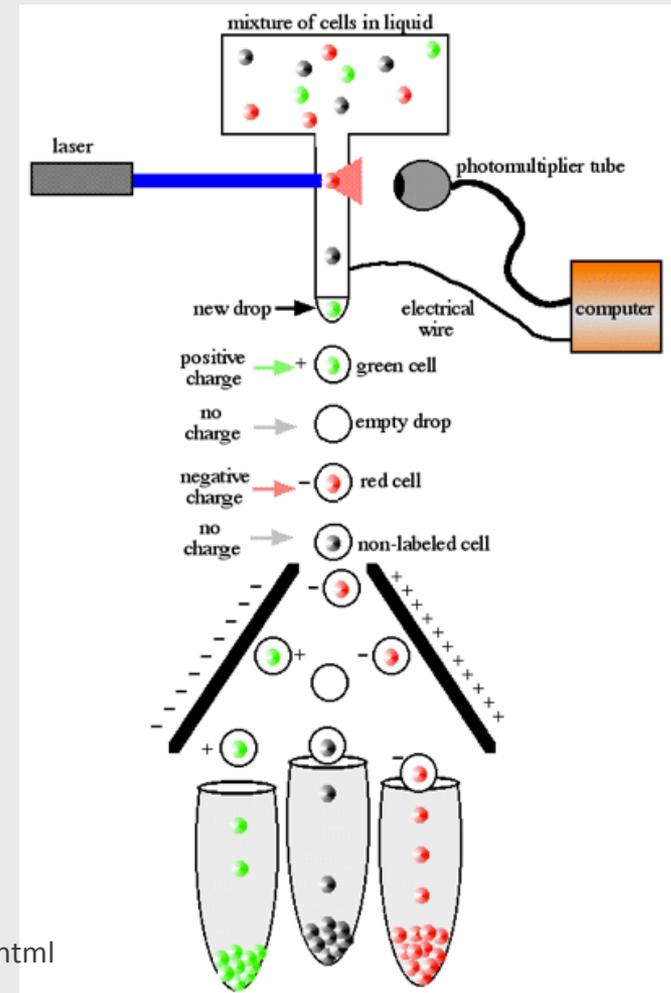


Ingénierie cellulaire

Sélection

- Résistance à un antibiotique (Kanamycine pour *E.coli*, G418 pour les eukaryotes)
- Synthèse d'un nutriment essentiel
- Synthèse d'une enzyme essentielle
- Synthèse de molécules fluorescentes

FACS: tri des cellules par fluorescence



Problématiques actuelles

A votre avis?

Problématiques

On atteint des concentrations très élevées en biomasse (100-150 millions de cellules) → problème de la demande en oxygène

Modélisation → obtenir des outils de prédiction, obtenir des réseaux métaboliques plus précis

Cisaillement: combiner un mélange homogène et un bon transfert d'oxygène avec un cisaillement acceptable

Stratégies fed-batch et perfusion: d'autant plus qu'on connaît de mieux en mieux le métabolisme

Problématiques

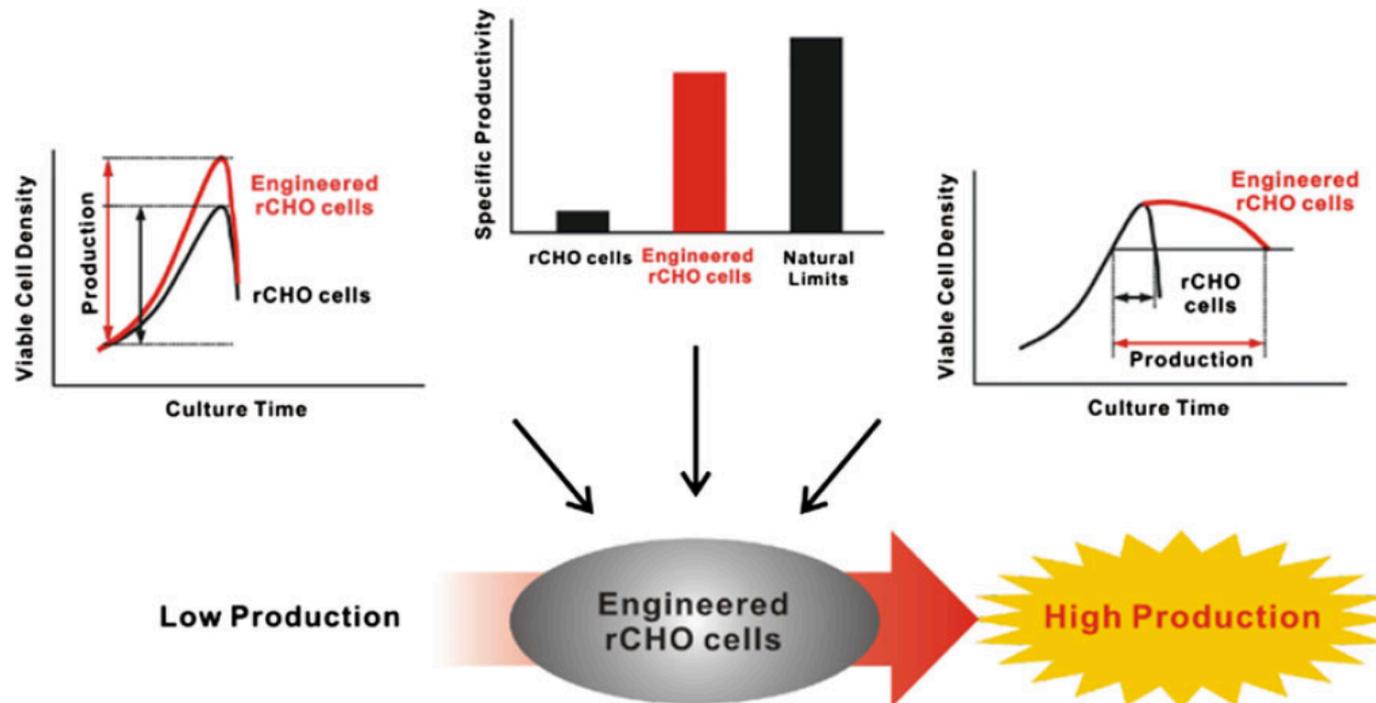


Fig. 2 Schematic depiction of the effect of cell engineering on improved culture characteristics. Cell engineering leads to enhancement of cell growth and q , which reflects on the product titer

Kim, J.Y., Kim, Y-G., Lee, G.M., (2012). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. Applied Microbiology & Biotechnology, 93.

Problématiques

Les produits lactate et ammonium sont néfastes à la fois pour la croissance et la qualité du produit

→ Changement de substrat pour changer les sous-produits

→ Switch vers une consommation de lactate

Forcer les flux dans certaines voies métaboliques

Séquençage du génome: ouvre la voie un meilleur design de vecteurs, plus de copies lors de la traduction

Mon projet

Mon projet

Pourquoi?

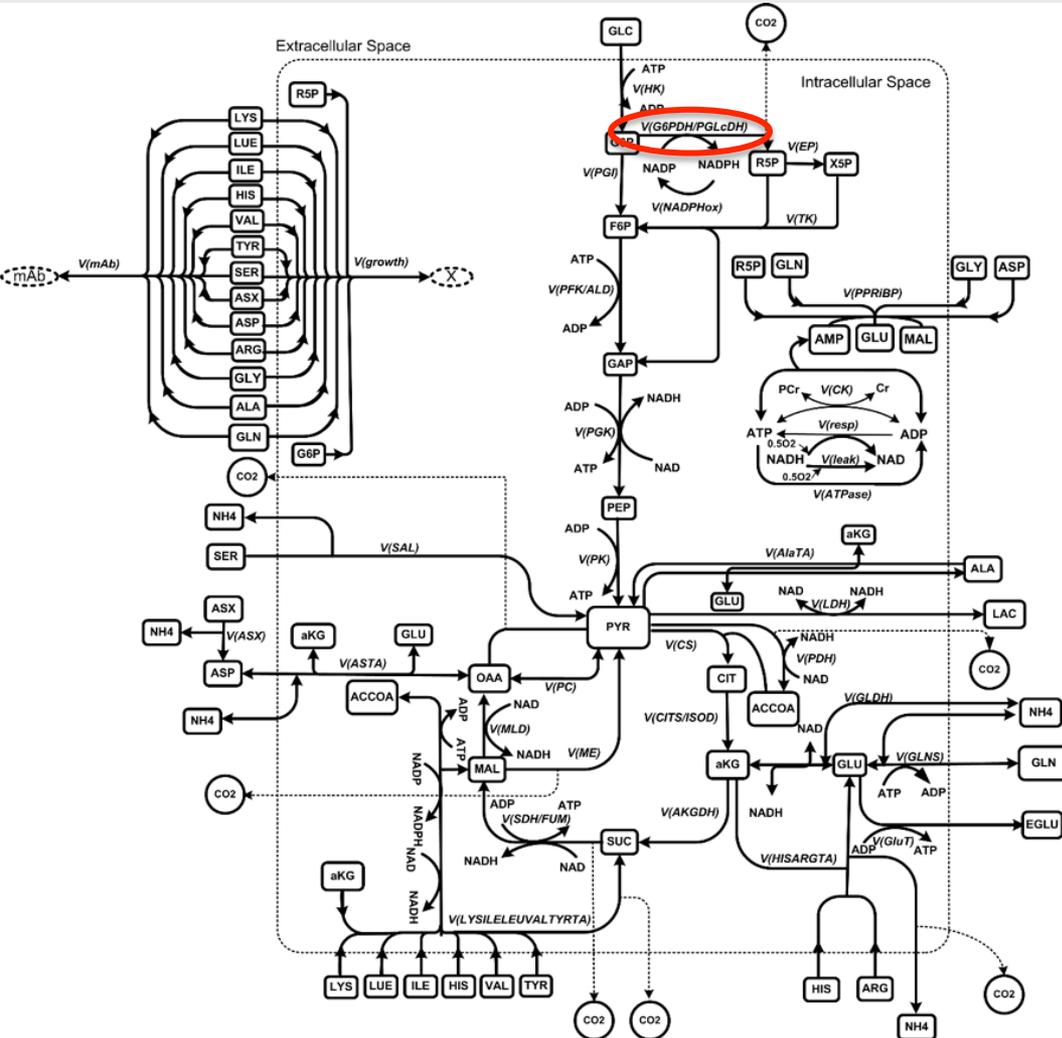
- Marché des anticorps monoclonaux en expansion
- Toujours faibles titres d'anticorps dans les cellules mammifères
 - S'inscrit dans les études récentes sur le métabolisme
- Continuité avec des projets de modélisation déjà existants au sein du laboratoire

Objectifs

- Augmenter la production spécifique d'anticorps dans des plateformes CHO
- Valider le modèle métabolique disponible au laboratoire et ainsi disposer d'un outil de prédiction

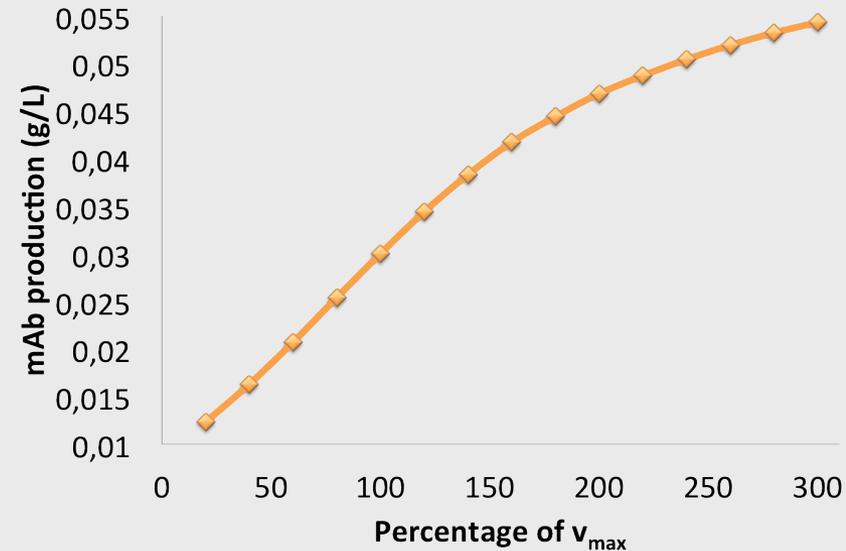
Mon projet

L'origine



Etudes métaboliques récentes:

Lien entre le pic de production et un switch de métabolisme vers les voies oxydatives (Pentose Phosphate Pathway, cycle TCA)



Mon projet

Lignées cellulaires

CHO-HP

Produit: anti-CD20

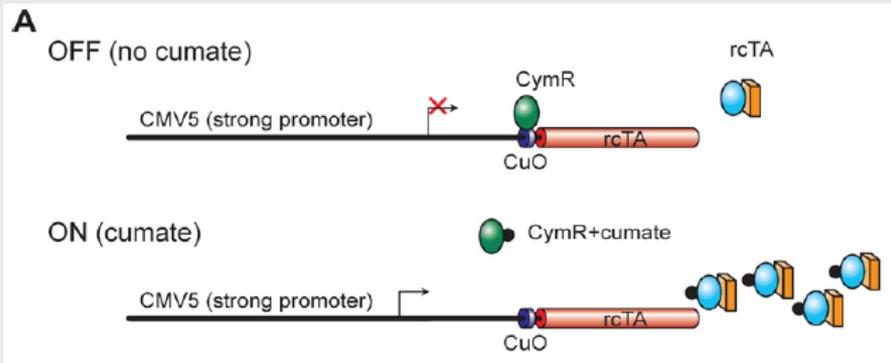
Milieu: HyCell TransFx-C (GE Healthcare)

Système d'induction au cumate

CHO-EG2

Produit: Eg2

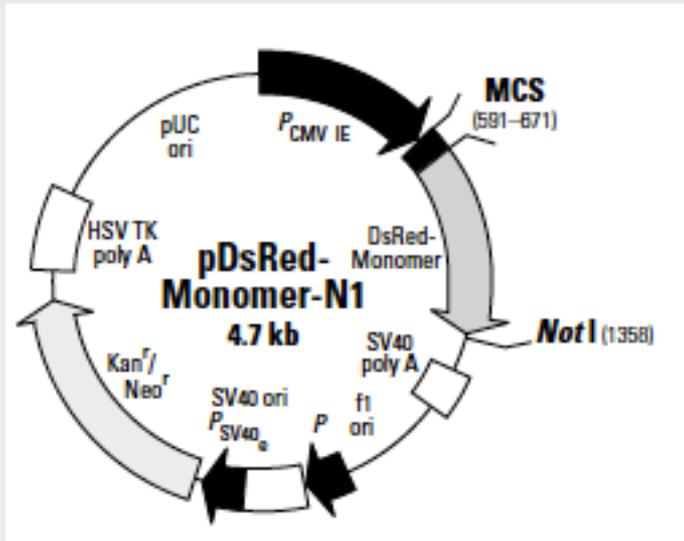
Milieu: HyCell TransFx-C (GE Healthcare)



Mullick et al. (2006). The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells. *BMC Biotechnology*, 6(43).

Mon projet

Méthode



Vecteur pDsRed (Clontech Laboratories Inc.)

Clonage du gène codant pour la G6PD a été réalisé par un collègue (Gupte)

Transfection transitoire

PEI linéaire 25 kDa

Ratio de transfection PEI/ADN: 1/1 et 2/1

Transfection avec le plasmide vide (sans l'enzyme) pour rejeter l'effet de la transfection en elle-même

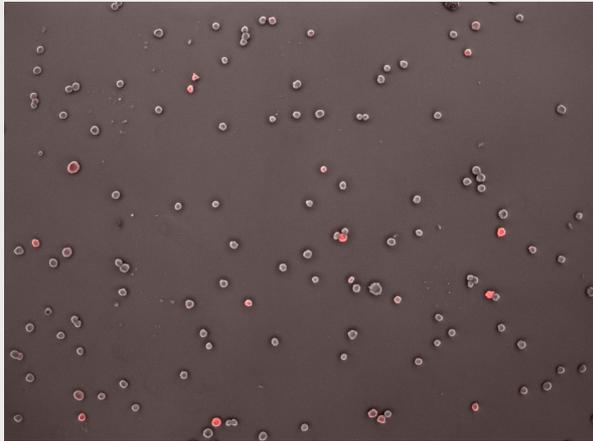
t=0 : inoculation

t=24h: transfection

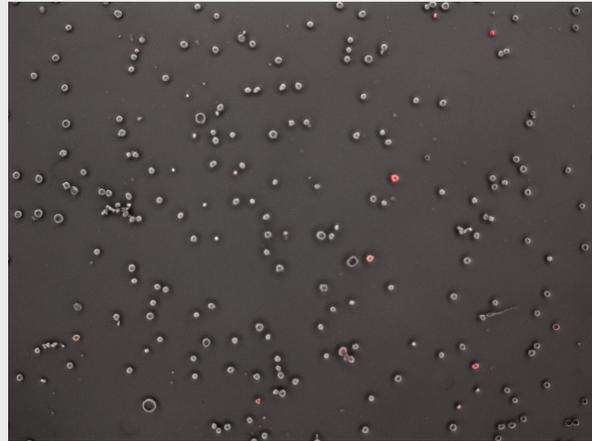
t=48h induction au cumate (CHO-HP)

Mon projet

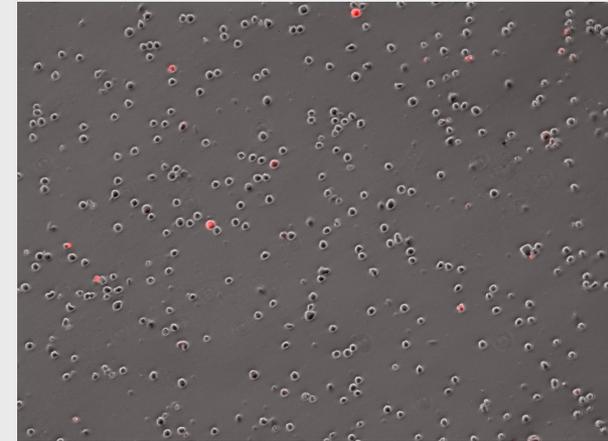
Résultats



24h après transfection



72h après transfection

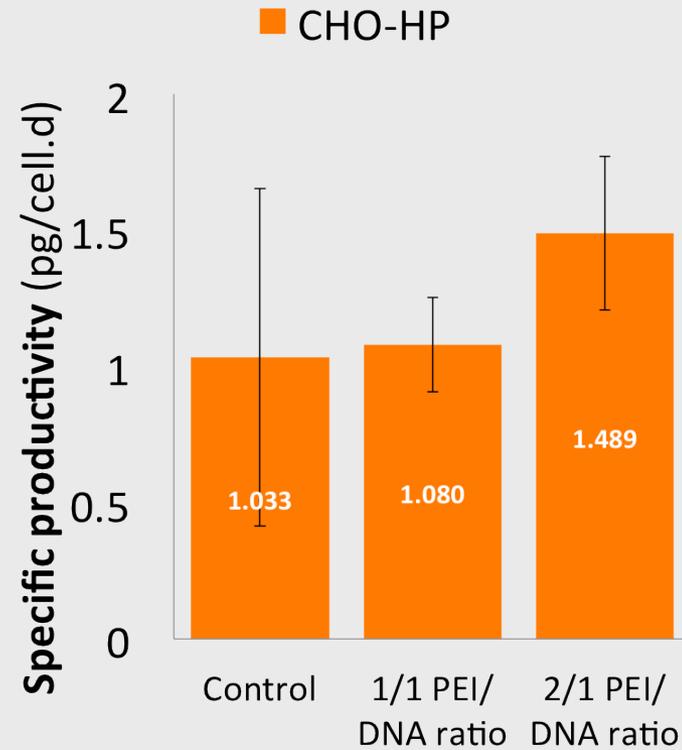
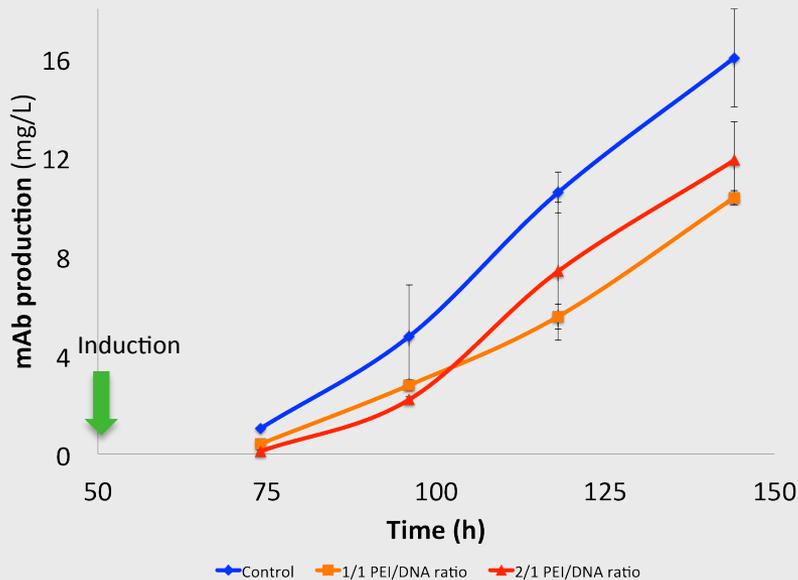
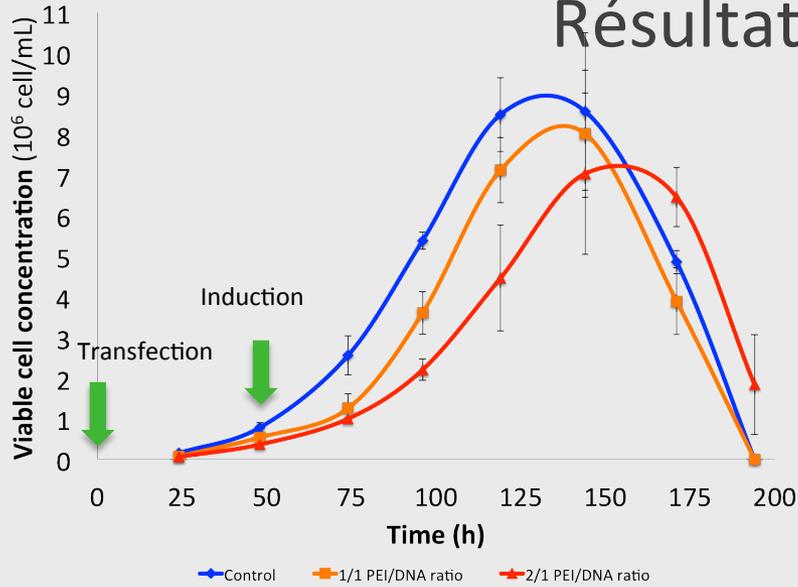


96h après transfection

Image en fluorescence des CHO-EG2 après transfection

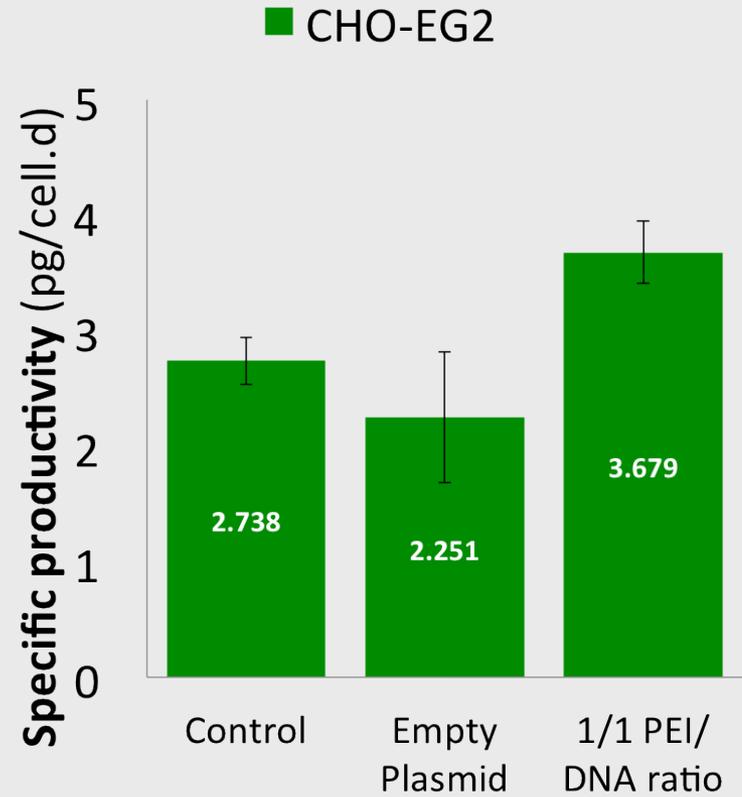
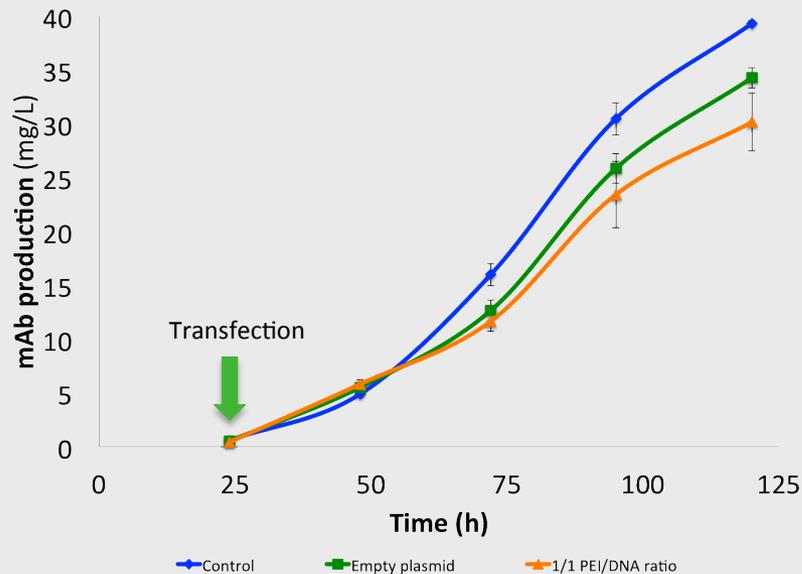
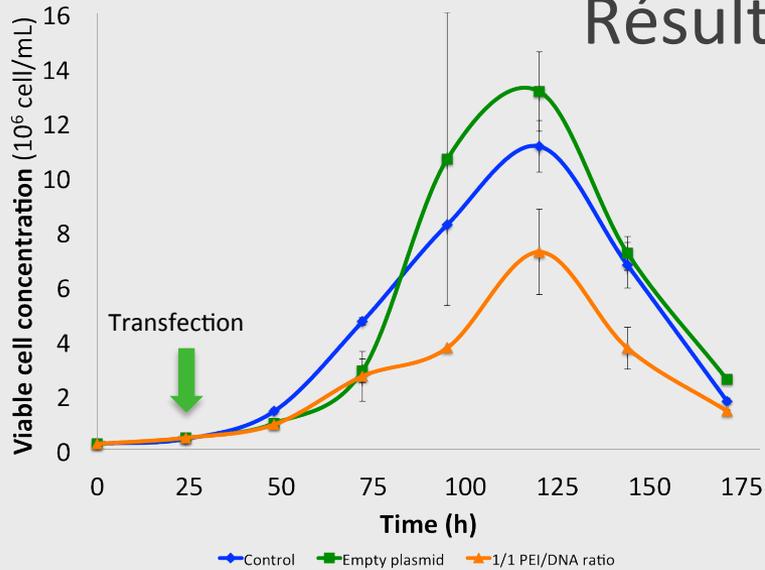
Mon projet

Résultats préliminaires



Mon projet

Résultats préliminaires



Mon projet

Conclusion et travaux à venir

Les simulations du modèle sont en accord avec la littérature

Les premiers résultats confirment l'hypothèse de départ

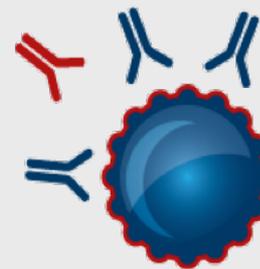
- Confirmation de surexpression de l'enzyme par Western Blot et RT-PCR
 - FACS (cell sorting) pour évaluer précisément le pourcentage de cellules transfectées et faire une batch de cellules 100% transfectées
 - Test d'autres enzymes repérées avec le modèle
 - Utilisation d'autres plateformes cellulaires
 - Développement de lignées stables

Remerciements

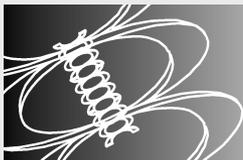
- Prof. Mario Jolicoeur
- Jingkui Chen
- Patrick benoist & Patrick Daoust de Viropro International Inc.
- NSERC Mabnet



**POLYTECHNIQUE
MONTRÉAL**



Canada Research Chair on the
Development of Metabolic
Engineering Tools



Références

Bailey, J.E. & Ollis, D.F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals. Second Edition.*

Butler, M. (2004). *Animal Cell Culture & Technology.*

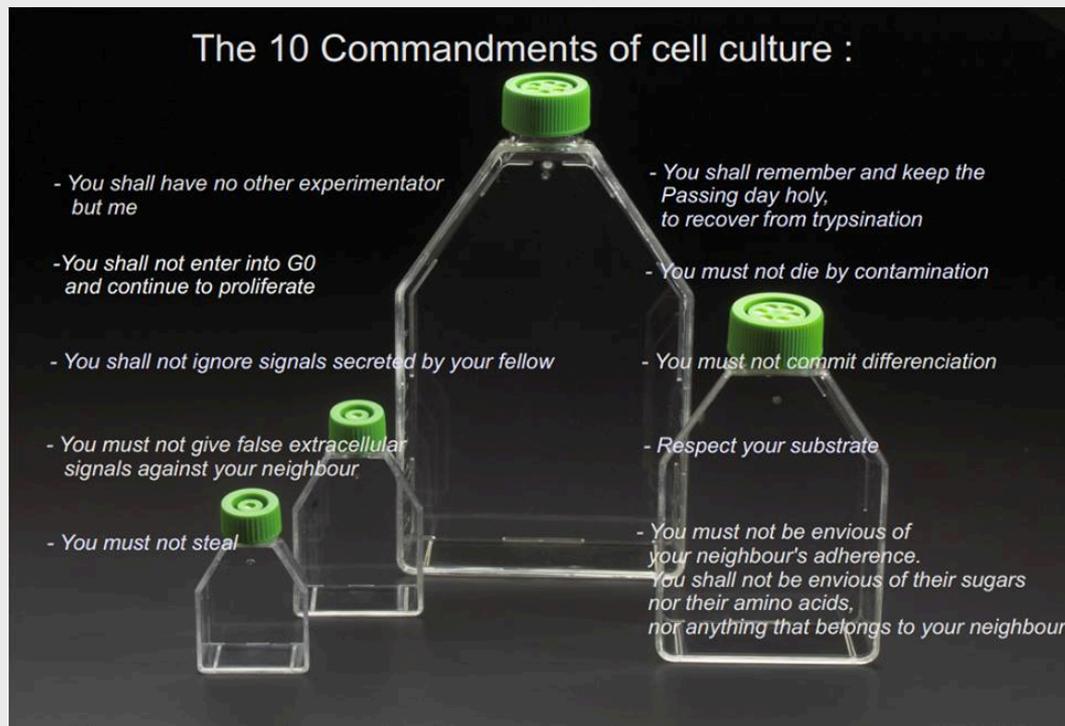
Shuler, M.J. & Kargi, F. (1992). *Bioprocess Engineering, Basic Concept*

Mario Jolicoeur, *Cours de génie biochimique*, Ecole Polytechnique de Montréal

Kim, J.Y., Kim, Y-G., Lee, G.M., (2012). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 93.

Plan du laboratoire

- Manipuler sous hotte stérile
- Compte des cellules
- Passage des cellules
- Echantillonnage
- Transfection des cellules au PEI
- Suivi de transfection au microscope à fluorescence



Articles (présentation orale)

1. Ghorbaniaghdam, A., Chen, J., Henry, O., & Jolicoeur, M. (2014). Analyzing Clonal Variation of Monoclonal Antibody-Producing CHO Cell Lines Using an In Silico Metabolomic Platform. PLoS ONE, 9(3). → Adrien ;)
2. Godoy-Silva, R., Chalmers, J.J., Casnocha, S., Bass, L.A. & Ma, N. (2009). Physiological Responses of CHO Cells to Repetitive Hydrodynamic Stress. Biotechnology and Bioengineering, 103(6).
3. Zhou, M., Crawford, Y., Ng, D., Tung, J., Pynn, A.F.J., Meier, A., Yuk, I.H., Vijayasankaran, N., Leach, K., Joly, J., Snedecor, B. & Shen, A. (2011). Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases. Journal of Biotechnology, 153.
4. Clincke, M-F., Mölleryd, C., Zhang, Y., Lindskog, E., Walsh, K. & Chotteau, V. (2013). Very High Density of Cho Cells in Perfusion by ATF or TFF in WAVE Bioreactor™. Part I. Effect of the Cell Density on the Process. Biotechnology Progress, 29(3).

Merci de votre attention!

Des questions?