



La technologie "Dip and Read™" sans marquage développée par Fortebio : un procédé innovant dans la caractérisation rapide et en temps réel des anticorps en bioprocess.

Contact en France: Patrice Turi - pturi@fortebio.co.uk

Située au cœur de la Silicon Valley à Menlo Park, la société Fortebio a développé des instruments d'analyses des interactions entre macromolécules, en temps réel et sans marquage. Fortebio propose aujourd'hui des solutions complètes, avec des instruments (Octet) développés autour de la technologie propriétaire BLI (Bio Layer Interferometry), des biosenseurs "Dip and Read™" et des réactifs prêts à l'emploi, utilisant des plaques de microtitration de 96 ou 384 puits comme support pour échantillonner les réactifs, tampons et ligands d'intérêt. Ne nécessitant pas de microfluidique, le principe optique, basé sur l'interférométrie (technologie BLI), permet de mesurer les interactions à la surface d'une fibre optique en temps réel. Grâce à un traitement du signal adapté, il est ainsi possible de déterminer les constantes cinétiques de vitesse d'association et de dissociation (kon, koff) et l'affinité à l'équilibre (KD). Cette technologie est très peu sensible à la composition du milieu et permet de quantifier et de déterminer les paramètres cinétiques d'un échantillon biologique ou d'une molécule pharmaceutique, dans des échantillons bruts non purifiés ou dans des matrices complexes contenant par exemple du DMSO. Cette technologie est particulièrement adaptée à des screening

de molécules à haut débit et se révèle bien souvent plus rapide, plus fiable et plus informative que des techniques plus traditionnelles, tout en conservant des coûts d'analyse par échantillons très compétitifs.

1) Quantification des anticorps

Une application typique dans la sélection d'anticorps est le screening de surnageants d'hybridomes. Les techniques généralement employées sont l'ELISA, le « western blot » ou les techniques immunohistochimiques. Avant l'avènement des systèmes Octet, il n'y avait pas vraiment de techniques capables de combiner vitesse d'analyse, grande reproductibilité, facilité d'utilisation et faibles coûts par échantillon, pour quantifier et analyser des anticorps dans des surnageants de culture contenant du serum.

Il est maintenant possible d'obtenir des résultats en moins de 2 minutes en utilisant les biosenseurs "Dip and Read™" associés à un système Octet, une fois calibré avec une gamme étalon élaborée à partir d'anticorps isotypes appropriés. Il est par exemple possible de doser des anticorps de souris directement à partir d'une simple colonie d'hybridome, et de déterminer ainsi la souche la plus performante. Lorsqu'il

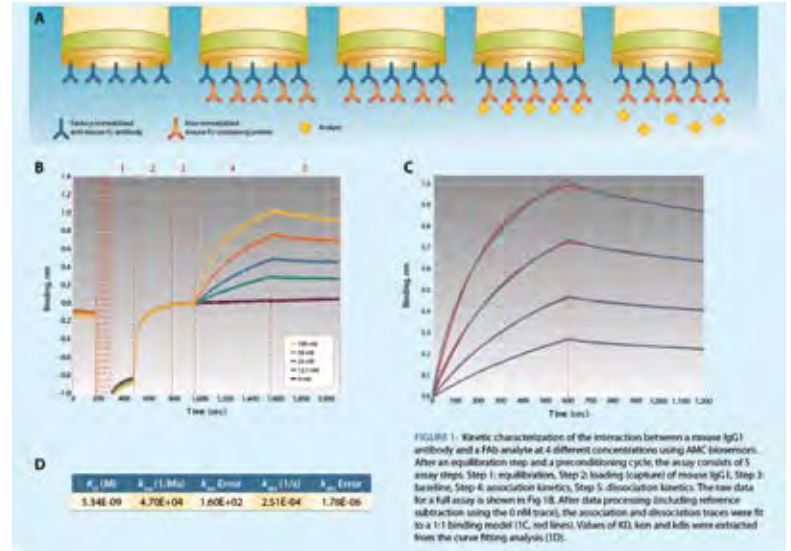


FIGURE 1 - Kinetic characterization of the interaction between a mouse IgG1 antibody and a Fab analyte at 4 different concentrations using AMC biosensors. After an equilibration step and a preconditioning cycle, the assay consists of 5 assay steps: Step 1: equilibration, Step 2: loading (capture) of mouse IgG1, Step 3: baseline, Step 4: association kinetics, Step 5: dissociation kinetics. The raw data for a full assay is shown in Fig 1B. After data processing (including reference subtraction using the 0 nM trace), the association and dissociation traces were fit to a 1:1 binding model (IC₅₀ and lines). Values of k_{on} , k_{off} and K_D were extracted from the curve fitting analysis (D).

s'agit d'optimiser certains paramètres comme les milieux de cultures, additifs ou autres facteurs de croissance, une réponse quasi immédiate sur la quantité d'anticorps produits est une aide à la décision précieuse et permet un gain de temps et d'argent significatif, par rapport à d'autres techniques nécessitant des étapes de purification plus longues et fastidieuses.

Fortebio propose une large variété de « biosenseurs » "Dip and Read™" pour la quantification rapide d'anticorps tels que les biosenseurs protein A, L ou G ainsi que des surfaces plus spécifiques pré-immobilisées avec des anticorps anti-humains ou anti-souris. Des Kits et méthodes ont également été développés pour la quantification des ADA (Anti-Drug-Antibody), protéines A résiduelles ou HCP. Pour des applications très spécifiques, chaque utilisateur a la possibilité de construire à façon son propre « biosenseur » dédié, à partir des « biosenseurs » Streptavidine ou amino réactifs en immobilisant lui-même le ligand d'intérêt, ceci permettant la conversion d'un test ELISA en une méthode rapide de dosage. En s'affranchissant d'étapes de lavages multiples nécessaires en ELISA et avec la possibilité de travailler directement sur des échantillons bruts sans étape de purification au préalable, les systèmes Octet permettent un gain de temps considérable avec des performances supérieures.

2) Affinité et paramètres cinétiques

Une demande croissante en anticorps de meilleure qualité et plus spécifique a conduit à une amélioration permanente des techniques de production d'hybridomes. Les techniques de screening primaire étant de plus en plus rapides, la caractérisation des anticorps plus en amont dans leur processus de sélection est rapidement devenu indispensable, surtout avec des éléments de décision plus complets. Les techniques ELISA déterminent l'affinité à l'équilibre et, bien que cette information soit pertinente, elle s'est rapidement avérée incomplète pour évaluer l'efficacité d'un anticorps, avec des résultats parfois même biaisés par certaines étapes de marquage. Avec le développement des mesures d'interaction sans marquage, les chercheurs ont maintenant accès au profil dynamique de l'interaction, en visualisant et calculant les paramètres cinétiques pendant la phase d'association et de dissociation, ce qui permet de sélectionner les candidats par leur vitesse d'association et surtout par leur stabilité.

En poussant ce concept, Fortebio a permis de lancer sur le marché des instruments qui permettent de réaliser ces analyses en quelques minutes seulement et offrent des débits d'analyses compatibles à ceux exigés par les plateformes de screening

(certains appareils sont même conçus pour s'intégrer complètement dans une chaîne d'analyse entièrement robotisée avec des préparateurs d'échantillons). Par exemple les « biosenseurs » "Dip and Read™" AMC (Anti Mouse IgG Fc capture) permettent de capturer directement des anticorps de souris ou des protéines portant la région Fc d'un anticorps de souris et, par la suite, de mesurer très facilement des interactions entre ces protéines ou anticorps et leur partenaire d'interaction. Ces « biosenseurs » sont parfaitement régénérables et peuvent être réutilisés plusieurs fois, combinant ainsi souplesse d'utilisation et réduction des coûts. Les mêmes « biosenseurs » existent avec des anticorps dirigés contre la partie Fc humaine d'un anticorps (AHC ou Anti-human IgG Fc Capture).

Les applications les plus fréquemment rencontrées sont :

- Détermination des paramètres cinétiques (kon, koff, KD)
- Sélection de cultures d'hybridomes
- Cartographie épitopique
- Contrôle de l'intégrité des produits finis ou à certaines étapes clés de leur production à travers leurs caractéristiques cinétiques, qui doivent rester conformes à un standard de référence (fermentation, étapes de purification, développement de formulation...)

Durant les 7 dernières années, Fortebio s'est attaché à toujours proposer le meilleur de la technologie et s'est considérablement développé sur le marché, avec plus de 400 instruments Octet installés à travers le monde. Présent directement sur les marchés européens et asiatiques avec des filiales à Londres et Shanghai, Fortebio est aujourd'hui classé par des études de marché indépendantes comme le 2ème principal fournisseur de systèmes d'analyse sans marquage dans l'industrie pharmaceutique et biotechnologique. Plus de 4 millions de « biosenseurs » ont déjà été commercialisés, soulignant l'intérêt croissant pour cette technologie.

References:

Green, L., Use of Octet QK to Enhance Service in a Core Hybridoma Laboratory, *Application Note 1*, www.fortebio.com/literature

Ma, W., Dip and Read™ Anti-Mouse IgG (Fc) Capture (AMC) Biosensors, *Technical Note*, www.fortebio.com/literature

Texte original en anglais rédigé par Christopher Silva.

About the Author:
Christopher Silva is the Vice President of Worldwide Marketing at ForteBio. Prior to ForteBio Chris was Director of Marketing at Molecular Devices managing the company's largest product line. Chris holds a BSc in Molecular Biology and a MBA and lives in California USA.



La sécurité grâce au confinement.



SKAN AG
 Binningerstrasse 116
 CH-4123 Allschwil
 T +41 61 485 44 44
 F +41 61 485 44 45
 info@skan.ch
 www.skan.ch

Une symbiose réussie

Hotte de sécurité Skanair® HFC-SH-MT: pesée de haute précision et protection des opérateurs au contact de substances actives et toxiques



Ensemble, avec toujours une longueur d'avance

