

Cahier des Charges :

Production d'anticorps monoclonaux à partir d'hybridomes ou par voie recombinate

Référence : DRF/JOLIOT/DMTS/SPI/LERI

Le 07/07/2020

Table des matières

1.	Objectif :	2
2.	Contexte :	2
3.	Production des anticorps :	2
i.	Par voie recombinate	2
ii.	A partir des hybridomes	3
4.	Livrables :	3
i.	Production des anticorps par voie recombinate	3
ii.	Production des anticorps à partir d'hybridomes	4
5.	Confidentialité :	4

1. Objectif :

Ce cahier des charges a pour objectif de définir les conditions, les critères et les livrables associés à la production d'anticorps monoclonaux et de protéines recombinantes.

2. Contexte :

Le Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse (CEA/DRF/JOLIOT/DMTS/SPI) a produit et sélectionné des hybridomes (au nombre maximum de 7) destinés à produire des anticorps monoclonaux dirigés contre différentes cibles.

Il souhaite faire produire ses anticorps : soit purifiés à partir de ses hybridomes, soit par voie recombinante après clonage des gènes codant les chaînes lourdes et légères et expression en système eucaryote, par le sous-traitant.

3. Production des anticorps :

Pour effectuer cette production le CEA fournira au Titulaire les hybridomes congelés (2-3 tubes), les anticorps purifiés par ses soins (comme contrôles) et les protéines permettant d'évaluer la spécificité et l'affinité des anticorps produits. Le Titulaire aura le choix du système de production.

La production des anticorps devra être effectuée dans un milieu de culture dépourvu de sérum. La purification des anticorps devra être effectuée par chromatographie d'affinité (protéine G ou A). La concentration des anticorps purifiés devra être *a minima* de 3 mg/ml. Si cette concentration est évaluée par la mesure d'absorbance à 280 nm, le coefficient d'extinction utilisé devra être d'un minimum de 1,33 pour 1 mg/ml d'anticorps pour un trajet optique de 1 cm.

Le CEA effectuera le même type de mesure et dans les mêmes conditions, à la réception des anticorps afin de contrôler la justesse de la détermination de la concentration.

Les anticorps devront être livrés en tampon phosphate, dont la composition indiquée sur le certificat d'analyse (joint aux anticorps) sera communiquée au CEA et dont le pH est d'environ 7.4. La pureté des anticorps devra être à minima de 90%. Les résultats de cette analyse, indiqués sur le certificat d'analyse, seront communiqués systématiquement au CEA.

i. **Par voie recombinante**

Le CEA testera préalablement, en interne, les performances (spécificité (reconnaissance de la cible et elle seule) et affinité) des anticorps produits par les cellules avant leur congélation, cependant aucun rapport ne pourra être exigé de la part du Titulaire.

Le Titulaire devra cloner *a minima* les parties variables des chaînes lourdes et légères de chacun des anticorps. Il devra ensuite choisir un système d'expression permettant l'expression de l'anticorps complet (anticorps entier, avec ses deux chaînes lourdes et ses deux chaînes légères), possédant la classe (IgG) et la sous-classe initiale. L'anticorps produit devra avoir les mêmes performances (spécificité et affinité) pour son antigène et la même stabilité que l'anticorps parent murin.

ii. **A partir des hybridomes**

Le SPI testera préalablement, en interne, les performances (spécificité (reconnaissance de la cible et elle seule) et affinité) des anticorps produits par les cellules avant leur congélation, cependant aucun rapport ne pourra être exigé de la part du Titulaire.

Le Titulaire devra, dans ses locaux, remettre en culture les hybridomes envoyés, adapter la culture en milieu ne contenant pas ou pauvre en immunoglobulines autres que celles produites par les hybridomes. Le Titulaire devra évaluer la quantité et la qualité des anticorps sécrétés (reconnaissance de la cible et elle seule, fournie si nécessaire par le SPI). Après ces vérifications, et remise d'un certificat d'analyse, en accord avec le SPI, la production à plus grande échelle sera décidée. Le Titulaire mettra en expansion les cellules, purifiera l'anticorps produit, et évaluera la qualité de l'anticorps produit (affinité et spécificité).

4. Livrables :

i. **Production des anticorps par voie recombinante**

- Séquences des chaînes lourdes et légères des anticorps

Les séquences nucléotidiques codant les parties variables des chaînes lourdes et légères de chaque anticorps cloné et les séquences protéiques seront envoyées au CEA dans un délai d'un mois à réception des cellules.

- Evaluation de la production en système cellulaire avant « scale-up »

Une transfection sera réalisée par le Titulaire, et les anticorps dans le surnageant de culture seront purifiés. Les anticorps seront testés par le Titulaire pour leur spécificité de reconnaissance de la cible et leur affinité pour la cible (test de liaison sur la cible et une protéine apparentée, test d'affinité pour la cible) en comparaison à l'anticorps parental murin (fourni par le CEA), dans un délai de deux semaines après l'envoi des séquences par le Titulaire.

Le CEA fournira à la demande du Titulaire les protéines cibles (et éventuellement apparentées). Le Titulaire enverra au CEA un certificat d'analyse résumant les paramètres analysés et les résultats obtenus. Sur la base de ce certificat d'analyse, la décision sera prise par le CEA pour la production à plus grande échelle.

- Pureté, spécificité et affinité des anticorps purifiés

Après la production à grande échelle, les anticorps purifiés seront accompagnés d'un certificat d'analyse indiquant le nom de l'anticorps, son numéro de lot, sa concentration (en mg/ml), le coefficient d'extinction utilisé, la valeur d'absorbance obtenue, la dilution de l'anticorps utilisée pour la mesure de concentration, sa pureté, la technique d'analyse de pureté utilisée, les résultats de l'analyse de pureté, la composition du tampon, la technique de purification utilisée. Les anticorps seront testés par le Titulaire pour leur spécificité de reconnaissance de la cible et leur affinité pour la cible (test de liaison sur la cible et une protéine apparentée, test d'affinité pour la cible) en comparaison à l'anticorps parental murin (fourni par le CEA).

- Stabilité des anticorps purifiés

La stabilité des anticorps sera évaluée par le Titulaire par un spectre d'absorbance UV, par la mesure de la concentration, et par un test d'affinité pour la cible, après congélation et décongélation, en comparaison à ceux obtenus avant congélation et à ceux de l'anticorps parental murin (fourni par le CEA).

Le délai de livraison des anticorps purifiés devra être au maximum de 12 semaines après fourniture des cellules par le CEA.

ii. Production des anticorps à partir d'hybridomes

- Évaluation de la viabilité des cellules

Un test de viabilité des cellules sera réalisé par le Titulaire dans un délai d'une semaine après réception des cellules, et si les cellules ne sont pas viables, le Titulaire remettra au CEA un rapport d'analyse indiquant le procédé utilisé pour décongeler les cellules et pour tester la viabilité des cellules ainsi que les résultats obtenus, dans un délai de deux semaines après réception des cellules. Le Titulaire procèdera de la même façon pour la deuxième ampoule. Si aucune des deux ampoules envoyées ne permet la remise en culture des cellules, le CEA procèdera à l'envoi des cellules directement en milieu de culture.

- Évaluation de la sécrétion des anticorps

Une fois le test de sécrétion des anticorps réalisé et si les anticorps ne sécrètent pas correctement, c'est-à-dire s'ils sécrètent à des concentrations inférieures à 10 mg/L, le Titulaire remettra au CEA un rapport d'analyse indiquant le mode de procédé pour tester la sécrétion des anticorps ainsi que les résultats obtenus.

- Pureté, spécificité et affinité des anticorps purifiés

Les anticorps purifiés seront accompagnés d'un certificat d'analyse indiquant le nom de l'anticorps, son numéro de lot, sa concentration (en mg/mL), le coefficient d'extinction utilisé, la valeur d'absorbance obtenue, la dilution de l'anticorps utilisée pour la mesure de concentration, sa pureté, la technique d'analyse de pureté utilisée, les résultats de l'analyse de pureté, la composition du tampon, la technique de purification utilisée. Les anticorps seront testés par le Titulaire pour leur spécificité de reconnaissance de la cible et leur affinité pour la cible (test de liaison sur la cible et éventuellement sur une protéine apparentée, test d'affinité pour la cible). Le CEA fournira, à la demande du Titulaire, au début du projet, les protéines cibles et apparentées.

- Stabilité des anticorps purifiés

La stabilité des anticorps sera évaluée par le Titulaire par un spectre d'absorbance UV, par la mesure de la concentration, et par un test d'affinité pour la cible, après congélation et décongélation, en comparaison à ceux obtenus avant congélation et à ceux de l'anticorps parental murin (fourni par le CEA).

Le délai de livraison des anticorps purifiés devra être au maximum de 12 semaines après fourniture des cellules par le CEA.

5. Confidentialité :

L'ensemble des informations communiquées par le CEA sont confidentielles et doivent être traitées comme telles. Les cellules fournies par le CEA devront être détruites à la fin de la prestation sauf si à la demande du CEA une banque de cellules est réalisée et conservée dans les locaux du Titulaire. En aucun cas ces cellules ne devront être transférées à un tiers, ni pour leur conservation ni pour la production des anticorps. Les séquences des anticorps fournies par le Titulaire sont la propriété du CEA et ne pourront être utilisées ou communiquées à des tiers.

6. Traçabilité :

Le déroulement de la prestation devra faire l'objet d'une traçabilité conforme à un système qualité certifié ISO 9001. Le CEA se réserve le droit d'effectuer des visites dans les locaux du Titulaire afin de vérifier le respect des procédures du système qualité.

7. Conditions financières et livrables :

i. Production des anticorps par voie recombinante

Deux jalons intermédiaires pour chacun des 7 anticorps produits par voie recombinante :

- Evaluation de l'affinité et de la spécificité de l'anticorps recombinant, en comparaison à l'anticorps parental murin avant production à grande échelle,
- Evaluation de la stabilité de l'anticorps à la congélation et décongélation.

ii. Production des anticorps à partir d'hybridomes

Trois jalons intermédiaires pour chacun des anticorps produits par hybridome :

- Evaluation de la viabilité des cellules si arrêt à cette étape,
- Evaluation de la sécrétion des anticorps si arrêt à cette étape,
- Evaluation de la stabilité de l'anticorps à la congélation et décongélation.

iii. Dispositions communes quelle que soit la voie de production

Livrables finaux : livraison des anticorps purifiés et un rapport final pour chacune de ces livraisons.

Au cas où le Titulaire constate qu'un des jalons intermédiaires n'est pas atteint, seules les étapes précédant ce jalon seront facturées à 100% au CEA. Le montant de cette évaluation devra être indiqué dans le devis transmis au CEA.