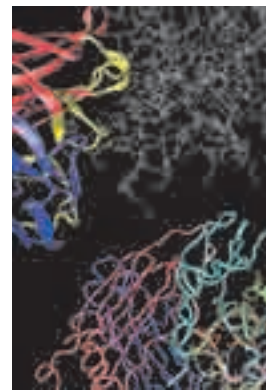


> Les anticorps monoclonaux thérapeutiques commercialisés ou en développement sont produits à partir de cellules de mammifères en culture, dont notamment la cellule de hamster CHO. Ces systèmes cellulaires permettent la production industrielle de protéines complexes possédant des structures, activités biologiques et propriétés pharmacodynamiques proches des protéines naturelles. Mais des coûts de production élevés et un prix du traitement prohibitif pourraient dans l'avenir limiter l'accessibilité de ces thérapies innovantes au plus grand nombre et freiner ce marché pourtant en très fort développement. Parallèlement à l'optimisation de la productivité des systèmes mammaliens, l'industrie pharmaceutique et biotechnologique développe activement des systèmes de production alternatifs espérés moins coûteux, plus efficaces et permettant une amélioration de l'efficacité thérapeutique des anticorps thérapeutiques. <

## Les systèmes alternatifs de production d'anticorps monoclonaux thérapeutiques

### Avantages espérés pour le futur

Stéphane Olivier, Majid Mehtali



Vivalis SA, 6, rue Alain Bombard,  
 44800 Saint-Herblain, France.  
[mehtali@vivalis.com](mailto:mehtali@vivalis.com)

Les anticorps monoclonaux (Acm) constituent la classe thérapeutique présentant la croissance la plus forte du marché pharmaceutique, avec un taux de croissance annuel d'environ 14 %, dans un marché mondial estimé à 42 milliards de dollars en 2010, soit 40 % du marché des biomédicaments. Vingt-deux Acm sont aujourd'hui commercialisés et près de 500 sont en développement [1]. Les besoins mondiaux en Acm dépassent déjà 2 tonnes en 2008, et ce succès commercial impose donc de disposer de fortes capacités industrielles de production. Les plateformes de production sont aujourd'hui basées exclusivement sur des systèmes mammaliens, et notamment sur la cellule CHO issue d'ovaires de hamster chinois [2] (→). Cette (→) voir O. Cochet et M. Chartrain, page 1078 lignée cellulaire, validée par les autorités réglementaires, est utilisée par l'industrie depuis deux décennies. Elle permet la synthèse d'anticorps présentant des caractéristiques biologiques et chimiques relativement similaires à celles des protéines naturelles, et des progrès considérables dans la biologie moléculaire des vecteurs d'expression et dans la

maîtrise des procédés de production industrielle ont permis des gains de productivité spectaculaires, de 10 mg d'anticorps par litre de surnageant de culture à souvent plus de 1 g par litre [2]. Cependant, ces procédés sont onéreux, une unité de bioproduction représentant un investissement d'environ 200 millions d'euros pour une capacité de 200 kg par an. Les traitements sont en conséquence également onéreux, ils s'élèvent en moyenne entre 1 000 et 5 000 euros par mois et par patient. L'apport thérapeutique incontestable de l'immunothérapie et son coût élevé n'ont pas manqué de stimuler un débat animé, notamment auprès des caisses d'assurance maladie. Mais ni ces considérations médicales et sociales, ni l'augmentation des productivités ne se sont traduites par une diminution notable du coût des traitements, en raison en partie des fortes doses thérapeutiques requises et des difficultés associées au traitement et à la purification des Acm à partir de grands volumes [3]. Dans ce contexte, des systèmes de production alternatifs aux systèmes mammaliens sont considérés avec beaucoup d'attention, et pourraient permettre une baisse progressive des coûts de production, voire une amélioration de l'index thérapeutique, tout en maintenant l'exigence sanitaire requise pour

de telles molécules. Cette synthèse fait le point sur l'état d'avancement et les avantages et inconvénients de ces différents systèmes de production alternatifs, en majorité non mammaliens (Tableau I).

## La glycosylation des anticorps monoclonaux

Le système de production idéal doit permettre la synthèse d'un anticorps possédant une structure et des caractéristiques pharmacologiques et pharmacodynamiques similaires à celles d'un anticorps humain naturel. Ces propriétés biologiques étant en grande partie contrôlées par le profil de glycosylation de l'anticorps [4], les systèmes de production mammaliens ont longtemps été préférés aux systèmes non mammaliens car seuls les mammifères disposent d'une machinerie de glycosylation permettant des modifications post-traductionnelles proches de celles retrouvées chez l'homme (Figure 1). La glycosylation est essentielle aux anticorps car elle conditionne leur demi-vie dans la circulation sanguine (→) ainsi que leurs interactions avec les cellules effectrices (→). Une modification de ces N-glycannes peut donc altérer l'activité biologique, la solubilité et la stabilité des anticorps mais aussi induire une immunogénicité. Les progrès réalisés dans la compréhension des relations structure/fonction des Acm ont en particulier permis de mieux définir le rôle

(→) voir G. Paintaud, page 1057

(→) voir R. Abès et al., page 1011 ; A. Beck et al., page 1024

des N-glycannes dans l'interaction avec les cellules effectrices, et d'établir une relation entre l'absence de fucose sur les structures N-glycanniques des anticorps IgG1 et leur activité cytotoxique à médiation cellulaire (activité *antibody-dependent cell cytotoxicity* ou ADCC) [5] (→). Il découle de cette découverte que la modulation de la glycosylation de certains anticorps monoclonaux pourrait potentialiser leur efficacité thérapeutique, voire éventuellement permettre la réduction des doses thérapeutiques. Un système de production performant devra donc pouvoir produire efficacement et économiquement des Acm ayant un profil de glycosylation et des caractéristiques pharmacodynamiques très similaires à ceux des anticorps humains naturels, et dont l'activité thérapeutique sera renforcée.

## Les systèmes alternatifs de production d'anticorps monoclonaux

### Les systèmes bactériens

Depuis l'avènement de la biologie moléculaire, *Escherichia coli* est le système biologique de choix pour la

	Temps de génération du clone producteur <sup>1</sup>	Capacité de production <sup>2</sup>	Glycosylation <sup>3</sup>	Activité ADCC <sup>4</sup>	Sécurité biologique <sup>5</sup>
Bactéries	++++	+	-	-	++++
Levures	++++	++	+	-	++++
Champignons filamenteux	++	++	+	-	++++
Cellules d'insectes	++	+	++	+	++++
Plantes transgéniques	+	++++	++	++	++++
Animaux transgéniques	+	++++	+++	++++	+++
Cellules aviaires	++	++	++++	++++	++++
Cellules de mammifères	++	+++	++++	++	+++

**Tableau I. Avantages comparatifs des systèmes de production d'anticorps monoclonaux complets.**<sup>1</sup> Le temps nécessaire à la génération d'un clone producteur final, c'est-à-dire le temps requis entre la construction du vecteur d'expression génétique, l'isolement et la validation du candidat cellulaire ou animal destiné à la production industrielle de cet anticorps.

<sup>2</sup> Le critère de « capacité de production » représente pour

les différents systèmes les rendements de production en anticorps monoclonaux complets avant purification. Ainsi, si les bactéries permettent en général de très hauts rendements de purification des protéines non complexes, ce système n'est pas approprié pour la production d'anticorps monoclonaux complets en raison des limitations biologiques inhérentes à cet organisme (ex : mauvaise expression de protéines portant des ponts disulfures, voir texte). Par contre, la production par les plantes ou les animaux transgéniques est élevée, et n'est théoriquement limitée que par la surface mise en culture ou par le nombre élevé d'animaux.

<sup>3</sup> Le critère de « glycosylation » représente ici la similarité du profil de glycosylation de protéines hétérologues exprimées par le système considéré avec le profil de glycosylation obtenu dans les systèmes mammaliens. Cette comparaison ne tient pas compte des modifications apportées par ingénierie génétique afin « d'humaniser » les systèmes de production non mammaliens.

<sup>4</sup> Le critère « activité ADCC » (*antibody-dependent cell cytotoxicity*) représente l'activité cytotoxique cellulaire dépendante des anticorps observée ou attendue pour des anticorps monoclonaux produits par le système de production considéré, sans « humanisation » de la machinerie de glycosylation.

<sup>5</sup> Le recours à des systèmes biologiques pour la production de protéines recombinantes thérapeutiques destinées à l'homme doit prendre en considération les risques éventuels de transmission d'agents pathogènes. En raison de leur plus grande susceptibilité aux pathogènes humains, les systèmes de production mammifères (animaux ou cellules de mammifère) peuvent être sources ou vecteurs potentiels de contamination virale possiblement transmissible à l'homme.

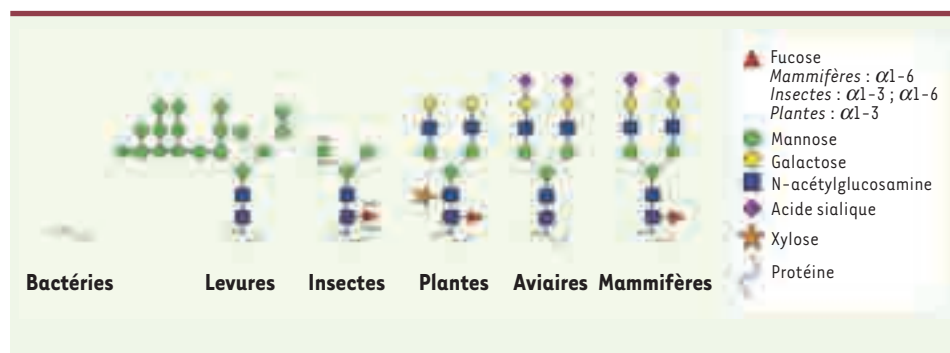
production à grande échelle de protéines recombinantes, en raison notamment de la facilité et de la rapidité de génération de clones producteurs et de coûts de production avantageux (Tableau 1). Mais la limitation majeure de ce système réside dans l'incapacité des bactéries à synthétiser des protéines complexes correctement assemblées et glycosylées. Si des anticorps complets aglycosylés, et donc dépourvus d'activité effectrice, ont déjà été exprimés dans *Escherichia coli*, les bactéries sont surtout utilisées pour la production de fragments artificiels d'anticorps tels que les fragments FV ou scFV, pour lesquels une modification post-traductionnelle n'est pas requise [6] (→). Ces fragments d'anticorps conservent bien tout ou partie de leur capacité de fixation spécifique des antigènes ciblés, mais leur courte demi-vie, leur incapacité à activer les cellules effectrices, et la mauvaise expression par les bactéries des fragments nécessitant la formation de ponts disulfures (ex : Fab et F(ab')<sub>2</sub>) ont restreint leurs applications à la production de réactifs de recherche. Aucun anticorps ou fragment d'anticorps produit dans des bactéries n'est ainsi aujourd'hui commercialisé, et le ReoPro<sup>®</sup>, seul fragment Fab ayant atteint le marché pour la prévention des complications cardiaques ischémiques, est produit dans des cellules murines Sp2/0 [2] (→). La découverte en 1993 que les camélidés produisent naturellement des anticorps de forte affinité mais de petite taille, composés uniquement d'une chaîne lourde, plus résistants aux variations de température et de pH et donc plus aptes à être efficacement produits en bactéries, a relancé l'intérêt de ce système de production [7]. Ainsi, la société Ablynx (Belgique), fondée en 2001 pour exploiter commercialement les anticorps de camélidés, produit ces molécules en bactéries ou en levures (voir ci-dessous) avec des rendements supérieurs à 1 gramme par litre de fermentation. Ces anticorps naturels de camélidés présentent des avantages notables par rapport aux fragments artificiels d'anticorps humains, et attirent un intérêt certain dans l'industrie pharmaceutique. Mais leur faible demi-vie dans la circulation humaine, l'absence d'activité effectrice et leur éventuelle immunogénicité suscitent de nombreuses interrogations quant à la place réelle de cette technologie dans l'arsenal thérapeutique. Les études cliniques en cours devraient prochainement apporter des réponses à ces questions.

(→) voir P. Chames et D. Baty, page 1159

(→) voir O. Cochet et M. Chartrain, page 1078

## Les levures et champignons filamenteux

Comme les systèmes bactériens, les levures et champignons filamenteux offrent une forte productivité (> 1 g/l), une robustesse des procédés industriels, un faible coût des milieux de culture et une présence sur le marché de produits approuvés par les autorités réglementaires. Mais contrairement à *Escherichia coli*, ces organismes peuvent également produire des protéines complexes possédant des ponts disulfures, et certaines de ces souches disposent d'une machinerie de glycosylation permettant la synthèse de N-glycanes sur les protéines recombinantes (Tableau 1). Les industries agroalimentaires et textiles exploitent déjà commercialement ces organismes, *Aspergillus niger* et *Trichoderma reesi* étant utilisés notamment pour la production de nombreuses enzymes recombinantes par des sociétés telles que Genencor (États-Unis) ou NovoNordisk (Danemark). *Saccharomyces cerevisiae* est utilisée commercialement pour la production de nombreuses protéines thérapeutiques simples comme l'insuline, l'hirudine ou des protéines vaccinales contre l'hépatite B [8]. La production d'Acm fonctionnels a été démontrée plus récemment pour la levure *Pichia Pastoris* [9] et pour *Aspergillus niger* [10], ces deux souches ayant la capacité de réaliser une N-glycosylation complexe mais caractérisée par la présence de structures riches en mannoses [11]. Cette glycosylation particulière pouvant altérer les propriétés des anticorps, plusieurs équipes ont entrepris d'humaniser les voies de glycosylation de ces organismes en éliminant les gènes contrôlant l'hypermannosylation, et en introduisant des gènes catalysant la synthèse et l'addition de glycanes humains [12, 13]. Les avancées en ingénierie de la glycosylation dans *Pichia pastoris* ont ainsi permis la production d'anticorps biologiquement actifs avec un profil de glycosylation homogène proche de celui



**Figure 1. Exemples de structures N-glycanniques portées par les anticorps monoclonaux produits dans différents systèmes d'expression.** Les liaisons des résidus fucose au résidu N-acétylglucosamine sont différentes en fonction des espèces : les mammifères présentent des liaisons  $\alpha 1-6$  alors que les plantes portent des liaisons  $\alpha 1-3$ , potentiellement

immunogènes chez l'homme et les insectes présentent les deux types de liaisons, avec une proportion plus importante pour la liaison  $\alpha 1-6$ . Contrairement aux cellules de mammifères, les lignées cellulaires issues d'espèces aviaires (de poule et de canard) ne produisent des anticorps monoclonaux qu'avec un taux très faible de résidus fucose.

d'anticorps humains naturels. L'humanisation des voies de biosynthèse des glycanes chez la levure et les champignons filamenteux constitue donc une approche encore en développement mais très prometteuse ; une illustration est donnée par le rachat pour 400 millions de dollars de la société américaine GlycoFi (New Hampshire) par le géant pharmaceutique Merck.

### Les cellules d'insectes

La production de protéines recombinantes en cellules d'insectes infectées par un vecteur dérivé du baculovirus est très populaire dans les laboratoires de recherche. Les baculovirus sont non pathogènes pour l'homme et les cellules d'insectes présentent l'avantage de pouvoir produire naturellement des protéines complexes glycosylées. De nombreuses glycoprotéines recombinantes, dont des anticorps biologiquement actifs, ont ainsi été produites dans ce système [14]. Cependant, le profil de glycosylation naturellement retrouvé chez les cellules d'insectes se caractérise par la présence de structures glycaniques simples de type oligomannose ou pauci-mannose, pouvant également porter des résidus  $\alpha$ 1,3-fucose immunogènes pour l'homme [15]. Bien que certaines cellules d'insectes comme les cellules High Five™ de la société américaine Invitrogen aient permis de produire des IgG présentant des résidus terminaux galactosylés [16], des approches d'humanisation génétique des voies de glycosylation sont ici encore nécessaires [17]. Par ailleurs, l'étape d'infection lytique par le baculovirus recombinant constitue une limitation contraignante pour tout développement industriel, car celle-ci impose de disposer de larges stocks de virus et d'effectuer de nombreuses campagnes d'infection et de production. Enfin, les cellules d'insectes sont caractérisées par une forte activité protéasique pouvant altérer la protéine exprimée. D'autres systèmes alternatifs ont été envisagés, tels que celui de la société américaine Chesapeake PERL (Maryland) qui infecte directement des larves d'insectes par voie orale par des vecteurs baculovirus et extrait la protéine recombinante des larves infectées. Ce système d'expression original a permis l'expression de fragments d'anticorps (Fab) fonctionnels dans les larves *Trichoplusia ni*, avec un rendement supérieur à 1 gramme par kg de larves [18], mais l'application de cette technologie se restreint encore aux réactifs de recherche, une mise à l'échelle industrielle étant difficilement envisageable, et à notre connaissance aucun Acm complet n'a été produit dans ces larves.

### Les plantes transgéniques

L'utilisation de plantes transgéniques pour la production de protéines thérapeutiques complexes a longtemps été considérée comme une voie de fort potentiel technologique et économique (Tableau 1). La quantité de protéines recombinantes pouvant être produite dans les plantes est virtuellement infinie car elle ne dépend en principe que des surfaces mises en culture. De plus, les techniques de l'agriculture industrielle offrent une grande flexibilité pour l'augmentation en échelle (*scale up*) et les coûts associés y sont comparativement faibles. Les plantes sont aujourd'hui aisément modifiables génétiquement et la conservation de clones producteurs est peu contraignante. Un Acm a été produit dès 1989 dans les feuilles de *Nicotiana tabacum*, des productions transitoires ou

stables ayant été également réalisées avec succès dans les graines de soja, de riz, de blé ou dans la laitue [19, 20]. Ces travaux ont cependant également révélé la présence dans les protéines recombinantes de structures glycaniques non humaines potentiellement immunogènes chez l'homme (xylose et  $\alpha$ 1-3 fucose) et l'absence de galactose et d'acide sialique [19, 20]. Comme pour les levures ou les champignons filamenteux, des travaux génétiques d'humanisation de la machinerie de glycosylation sont entrepris [21, 22]. Mais malgré ces investissements scientifiques et financiers conséquents, le développement commercial de ces plateformes transgéniques est sérieusement compromis en raison d'une vive opposition publique, notamment en Europe, suscitée par les risques de dissémination incontrôlée des plantes transgéniques cultivées en plein champ. Une culture en serre fermée est possible, mais affecterait les coûts de production et donc l'attractivité du système. Une alternative combinant les avantages des plantes et des cellules en culture est considérée avec attention depuis peu, consistant en une culture en bioréacteur de cellules de plantes, de mousses ou de microalgues [23-25]. La société américaine Biolex Therapeutics a ainsi développé un système d'expression basé sur la culture des lentilles d'eau *Lemna minor*. Ces plantes possèdent un temps de génération court d'environ 36 heures, peuvent être modifiées génétiquement et sont capables de produire des Acm à des taux pouvant atteindre 1 gramme d'anticorps solubles par kilogramme de biomasse. Cette société a par ailleurs réussi à humaniser sa plateforme *Lemna minor* par expression d'ARN interférents bloquant la synthèse des enzymes  $\beta$ 1.2-xylosyltransférase et  $\alpha$ 1.3-fucosyltransférase endogènes [25]. Ces plantes génétiquement modifiées ont permis de produire des anticorps anti-CD30 dépourvus de xylose et d' $\alpha$ 1-3 fucose, et dont l'activité ADCC est améliorée vis-à-vis du même anticorps produit en cellules CHO. De manière similaire, la société allemande Greenovation Biotech a quant à elle réussi à développer une plate-forme de production basée sur la mousse *Physcomitrella patens*, et à démontrer sa capacité à modifier génétiquement cet organisme et à produire un Acm en photo-bioréacteur avec un profil de glycosylation proche de celui de l'anticorps naturel ainsi qu'une activité ADCC améliorée en raison de l'absence de résidus fucose [26]. L'avantage principal de cette technologie réside dans des conditions de culture simples et peu coûteuses, la mousse ne nécessitant que de la lumière, du gaz carbonique, de l'eau et des sels minéraux. En revanche, le développement de la plate-forme est encore peu avancé et la capacité de la société à produire efficacement à grande échelle des anticorps fonctionnels n'est pas établie.

## Les animaux transgéniques

De nombreuses sociétés de biotechnologies telles GTC Biotherapeutics aux États-Unis ou Pharming aux Pays-Bas investissent activement depuis des années dans la technologie des animaux transgéniques pour la production de protéines thérapeutiques [27]. Ces animaux peuvent permettre en théorie une production industrielle économiquement compétitive dans des organes synthétisant naturellement des glycoprotéines complexes, comme les glandes mammaires (Tableau 1). L'intérêt de ce système pour la production d'Acm fonctionnels a été démontré dans le lait de souris transgéniques [28] et de chèvres. Plus spécifiquement, la société GTC Biotherapeutics a démontré pour plusieurs Acm chimériques, humanisés ou humains sa capacité à produire des quantités supérieures à 1 gramme par litre de lait de chèvre. L'activité ADCC de certains anticorps était renforcée en raison d'un faible taux de fucose. En revanche les taux de mannose fortement élevés pourraient altérer les propriétés de ces Acm (→), bien que des études de pharmacologie *in vivo* n'aient pas révélé de différences notables avec les anticorps produits en cellules CHO. Par ailleurs, la présence chez la chèvre d'acides sialiques non humains N-glycosyl neuraminiques [29] pourrait également conférer une immunogénicité à ces anticorps. Les conséquences de ces différences de structure glycaniques par rapport aux anticorps humains devront donc être attentivement étudiées et caractérisées avant toute application clinique (→). Si le développement commercial de produits thérapeutiques issus d'animaux transgéniques s'est longtemps heurté à une réticence des autorités réglementaires vis-à-vis des produits d'origine transgénique, l'approbation donnée en 2006 par l'Agence européenne du médicament (EMEA) et en février 2009 par la *Food and drug administration* (FDA) américaine, à GTC Biotherapeutics pour la mise sur le marché de l'ATryn®, une antithrombine recombinante produite dans le lait de chèvres transgéniques, constitue une étape majeure validant l'acceptation réglementaire de la technologie, et elle en renforce l'intérêt.

La production d'Acm dans le blanc d'œuf de poules transgéniques a été également longtemps considérée comme une stratégie à fort potentiel en raison de techniques d'élevage industriel bien établies, de la familiarité des autorités réglementaires avec les produits de santé issus d'œufs de poules - de nombreux vaccins sont produits depuis des décennies sur les œufs embryonnés - et du développement de techniques de modification génétique de cellules souches embryonnaires ou d'embryons de poules. Ainsi, en 2005, la société américaine Origen Therapeutics a réussi à générer des poules transgéniques exprimant un Acm anti-CD20 avec un rendement de production de 3 mg par œuf [30]. Le profil de glycosylation de cet anticorps s'est révélé similaire à celui de l'anticorps produit en cellules CHO mais son activité ADCC s'est avérée bien supérieure en raison du taux en résidus fucose remarquablement bas, propriété caractéristique des systèmes aviaires [29, 30]. Malgré ces résultats encourageants, et contrairement aux mammifères transgéniques, cette plateforme reste peu développée en raison de difficultés techniques majeures dans l'obtention d'un taux d'animaux transgéniques satisfaisant. Bien que des progrès importants aient été réalisés dans l'isolement et la culture de cellules souches embryonnaires aviaires, leur exploitation pour la production d'animaux transgéniques reste donc encore un objectif lointain.

(→) voir P. Stas et I. Lasters, page 1070

(→) voir L. Manache et al., page 1063

## Les cellules aviaires

L'investissement constant dans les systèmes mammaliens a abouti au développement de matériels et technologies de culture adaptés à des cellules capables de croître en suspension dans un milieu dépourvu de sérum animal [2]. Un système de production non mammalien adapté à ces matériels et technologies, et qui aurait la capacité de produire des anticorps normalement glycosylés mais ayant une meilleure activité biologique, présenterait des avantages certains. L'observation que les espèces aviaires produisent naturellement des anticorps pauvres en résidus fucose, et que les poules transgéniques expriment des Acm avec un profil de glycosylation normal mais un taux faible de fucose [29, 30], suggère qu'une lignée cellulaire aviaire continue capable de croître en suspension pourrait constituer une plateforme précieuse pour la production d'Acm à activité ADCC renforcée. La société Vivalis (Saint-Herblain, France) a ainsi exploité avec succès les propriétés biologiques uniques des cellules souches embryonnaires de canard pour dériver une lignée cellulaire propriétaire appelée EB66, combinant les caractéristiques des cellules souches (immortalité et stabilité génétique) et des cellules CHO (croissance en suspension à de hautes densités cellulaires, croissance en milieu sans sérum, modification génétique aisée). Cette lignée cellulaire a été établie selon un procédé n'incluant aucune modification génétique, chimique ou virale, et un dossier réglementaire détaillé (*biological master file*) décrivant son origine et son statut sanitaire a été constitué, permettant, s'il existe une licence d'exploitation de cette cellule, de déposer un dossier d'autorisation d'essais cliniques pour tout produit biologique manufacturé sur la cellule. Cette technologie est déjà exploitée sous licence par la majorité des industriels du vaccin dans le monde pour la production en bioréacteurs de vaccins traditionnellement produits sur des œufs embryonnés de poule, ce qui est le cas de nombreux vaccins humains et vétérinaires, notamment le vaccin contre la grippe. La cellule EB66 peut également être efficacement modifiée génétiquement et l'activité ADCC de plusieurs Acm produits dans cette lignée cellulaire était supérieure d'un facteur 20 à l'activité des mêmes anticorps produits en cellules CHO. La production d'Acm dans ces cellules aviaires EB66 permet en conséquence de combiner plusieurs avantages : (1) l'utilisation d'infrastructures et de procédés de production existants et bien maîtrisés, identiques à ceux mis en œuvre pour les systèmes mammaliens ; (2) une reconnaissance réglementaire conférée par les développements industriels en cours dans le domaine du vaccin ; (3) une production d'Acm recombinants présentant un profil de glycosylation normal mais avec la caractéristique remarquable - issue du règne aviaire - d'un taux très réduit de résidus fucose, et en conséquence d'une activité biologique ADCC fortement accrue. La technologie EB66 étant cependant récente, une optimisation des rendements de production est encore en cours afin d'atteindre des productivités proches de celles obtenues avec les cellules CHO.

## Conclusion

Le succès médical et commercial spectaculaire des anticorps monoclonaux, associé à des coûts de production et de traitements très onéreux, incitent l'industrie, sous la pression des autorités de santé, à produire plus, mieux et moins cher. Bien que les investissements visant l'amélioration des performances des systèmes de production mammaliens actuels soient permanents, l'industrie pharmaceutique et biotechnologique étudie également attentivement des plateformes de production alternatives plus originales, espérées moins coûteuses, plus performantes et permettant la production de protéines présentant un meilleur index thérapeutique. La plupart de ces nouvelles technologies sont encore à des stades très précoces de développement, et beaucoup ne survivront pas, mais certaines de ces plateformes alternatives trouveront sans nul doute dans un futur relativement proche une place stratégique dans l'arsenal technologique de production industrielle des protéines thérapeutiques, dont les anticorps monoclonaux. ♦

## SUMMARY

### Alternative production systems for therapeutic monoclonal antibodies

Monoclonal antibodies constitute a highly successful class of therapeutic proteins, with applications in various fields such as inflammatory diseases, oncology or infectious diseases. Monoclonal antibodies are currently produced on mammalian cell culture systems, such as the well established CHO cell line. Such mammalian cell systems allow the industrial production of therapeutic proteins with biological and pharmacological properties grossly similar to the natural proteins. However, expensive production costs and prohibitive therapeutic costs may limit the access of such innovative therapies to the general population and slow-down the development of this industry. Besides enduring investments to improve the production yields of mammalian systems, the pharmaceutical and biotech industries also closely monitor and invest in the development of alternative production systems with the potential for lower production costs and with the ability to produce proteins with enhanced therapeutic indexes. ♦

### CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

## RÉFÉRENCES

1. LEEM Biotech et Genopole. *Bioproduction 2008, état des lieux et recommandations pour l'attractivité de la France*. Rapport de synthèse, 2008.
2. Cochet O, Chartrain M. Les systèmes mammaliens de production actuels qui sont agréés. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 1078-83.
3. Kelley B. Very large scale monoclonal antibody purification : the case for conventional unit operations. *Biotechnol Prog* 2007 ; 23 : 995-1008.
4. Beck A, Wagner-Rousset E, Bussat MC, et al. Trends in glycosylation, glycoanalysis and glycoengineering of therapeutic antibodies and fc-fusion proteins. *Curr Pharm Biotechnol* 2008 ; 9 : 482-501.
5. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 3466-73.
6. Arabi-Ghahroudi M, Tanha J, MacKenzie R. Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer Metast Rev* 2005 ; 24 : 501-19.
7. Harmsen MM, de Haard HJ. Properties, production and applications of camelid single chain antibodies fragments. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007 ; 77 : 13-22.
8. Gerngross TU. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nat Biotechnol* 2004 ; 22 : 1409-14.
9. Ogunjimi AA, Chandler JM, Gooding CM, et al. High-level secretory expression of immunologically active intact antibody from the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* 1999 ; 21 : 561-7.
10. Ward M, Lin C, Victoria DC, et al. Characterization of humanized antibodies secreted by *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol* 2004 ; 70 : 2567-76.
11. Jigami Y. Yeast glycobiochemistry and its application. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008 ; 72 : 637-48.
12. Hamilton SR, Gerngross TU. Glycosylation engineering in yeast : the advent of fully humanized yeast. *Curr Opin Biotechnol* 2007 ; 18 : 387-92.
13. Maras M, De Bruyn A, Verweken W, et al. *In vivo* synthesis of complex N-glycans by expression of human N-acetylglucosaminyltransferase I in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *FEBS Lett* 1999 ; 452 : 365-70.
14. Edelman L, Marguerite C, Chaabih H, et al. Obtaining a functional recombinant anti-rhesus (D) antibody using the baculovirus-insect cell expression system. *Immunology* 1997 ; 9 : 13-9.
15. Altmann F, Staudacher E, Wilson IB, März L. Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconj J* 1999 ; 16 : 109-23.
16. Hsu TA, Takahashi N, Tsukamoto Y, et al. Differential N-glycan patterns of secreted and intracellular IgG produced in *Trichoplusia ni* cells. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 9062-70.
17. Harrison RL, Jarvis DL. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to produce "mammalianized" recombinant glycoproteins. *Adv Virus Res* 2006 ; 68 : 159-91.
18. O'Connell KP, Kovaleva E, Campbell JH, et al. Production of a recombinant antibody fragment in whole insect larvae. *Mol Biotechnol* 2007 ; 36 : 44-51.
19. Floss DM, Falkenburg D, Conrad U. Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants : an overview. *Transgenic Res* 2007 ; 16 : 315-32.
20. Gomord V, Chamberlain P, Jefferis R, et al. Biopharmaceutical production in plants : problems, solutions and opportunities. *Trends Biotechnol* 2005 ; 23 : 559-65.
21. Frey AD, Karg SR, Kallio PT. Expression of rat beta(1,4)-N-acetylglucosaminyltransferase III in *Nicotiana tabacum* remodels the plant-specific N-glycosylation. *Plant Biotechnol J* 2009 ; 7 : 33-48.
22. Vézina LP, Faye L, Lerouge P, et al. Transient co-expression for fast and high-yield production of antibodies with human-like N-glycans in plants. *Plant Biotechnol J* 2009 ; 7 : 442-55.
23. Hellwig S, Drossard J, Twyman RM, et al. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat Biotechnol* 2004 ; 22 : 1415-22.
24. Cadoret JP, Bardor M, Lerouge P, et al. Microalgae as cell factories producing recombinant commercial proteins. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 375-82.
25. Cox KM, Sterling JD, Regan JT, et al. Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemma minor*. *Nat Biotechnol* 2006 ; 24 : 1591-7.
26. Schuster M, Jost W, Mudde GC, et al. *In vivo* glyco-engineered antibody with improved lytic potential produced by an innovative non-mammalian expression system. *Biotechnol J* 2007 ; 2 : 700-8.
27. Houdebine LM. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2008. Epub Feb 1.
28. Tang B, Yu S, Zheng M, et al. High level expression of a functional human/mouse chimeric anti-CD20 monoclonal antibody in milk of transgenic mice. *Transgenic Res* 2008 ; 17 : 727-32.
29. Raju TS, Briggs JB, Borge SM, et al. Species-specific variation in glycosylation of IgG : evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology* 2000 ; 10 : 477-86.
30. Zhu L, van de Lavoie MC, Albanese J, et al. Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nat Biotechnol* 2005 ; 23 : 1159-69.

TIRÉS À PART

M. Mehtali