

## Le Nespresso® de la spectrométrie de masse pour les bioanalyses



# ANAQUANT

SOLUTIONS FOR BIOANALYSIS

**Date de création :** 2014

**Implantation :** société basée à Villeurbanne, avec des clients dans l'ensemble de l'Europe

**Secteur d'activité :** biotechnologie, pharmaceutique et cosmétique

**Technologies :** solutions d'analyses pour la caractérisation et quantification de protéines en matrice complexe. La société propose à la fois des services d'analyse mais également des kits de standards pour faciliter l'utilisation de la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (LC-MS).

**Fondateurs :** Tanguy Fortin et Jérôme Lemoine

**Financement, subventions, crédits :** fonds propres

**Produits :** produits propriétaires, la technologie READY-BEADS™ permettant de faciliter l'utilisation de la LC-MS grâce à la normalisation des standards.

**Une ambition :** répondre aux problématiques des sociétés dans le monde de la santé en offrant des solutions innovantes en analyse de protéines et peptides tout au long du processus de recherche, développement et production.

• [www.anaquant.com](http://www.anaquant.com)

ANAQUANT a aujourd'hui deux activités bien distinctes : la première est basée sur une offre de service en développement analytique pour supporter la découverte de nouveaux biomédicaments et l'ensemble des étapes de bioproduction ; la seconde, fruit de sa recherche interne, est une offre de produits basée sur une technologie brevetée appelée READYBEADS™.

### Les READYBEADS™ : des microbilles calibrées

La technologie READYBEADS™ est née d'un constat : les sociétés biopharmaceutiques, clientes d'ANAQUANT, ont de plus en plus recours à la spectrométrie de masse comme outil analytique et ont besoin de standards calibrés, faciles à utiliser avec une haute reproductibilité. En réponse à ce problème, ANAQUANT a développé une technologie unique qui permet de disposer d'étalons sous forme de microbilles de polymère, prêtes à l'emploi, contenant quelques nanogrammes de chaque molécule. Ces billes sont faciles à utiliser, ne demandent pas d'expertise particulière et sont stables à température ambiante. Elles offrent un gain de temps considérable dans la préparation d'échantillons et une réduction des coûts, tout en présentant une fiabilité et une précision qui permettent une évaluation optimisée des molécules. Notre ambition : fournir le standard universel de façon à ce que chaque étalon soit identique partout dans le monde.

### Un cas concret : l'analyse des impuretés dans un biothérapeutique

L'une des problématiques actuelles du monde des sociétés pharmaceutiques et biotechnologiques est l'analyse des impuretés coproduites lors de la production d'un biothérapeutique tel que les anticorps monoclonaux, les vaccins ou les thérapies géniques et cellulaires [1].

Ces médicaments biothérapeutiques sont généralement produits dans de grands fermenteurs contenant des cultures cellulaires ; ce procédé est appelé « up stream process » (USP). Suite à cette production, un processus de purification de la ou des molécules d'intérêt est alors réalisé afin d'éliminer un maximum de coproduits ; cette étape est appelée le « down stream process » (DSP). Le produit final, appelé « drug substance » (DS), est alors obtenu (figure 1).

Afin d'assurer la qualité des produits et satisfaire les exigences réglementaires, les sociétés biopharmaceutiques doivent analyser les impuretés contenues dans le produit final (DS). Parmi ces impuretés, de nombreuses protéines coproduites lors de l'étape USP peuvent alors se trouver dans la DS à de faibles concentrations (de l'ordre du ppm ou centaine de ppm). Les autorités réglementaires européennes demandent la caractérisation et la quantification de ces « host cell proteins » (HCP). En effet, les HCP peuvent avoir différents impacts : provoquer des activités biologiques, pouvant dégrader le produit final, ou induire une réponse immunitaire du patient non souhaitée lors de l'injection du médicament.

**A** NAQUANT est une société de recherche sous contrat, également appelée par l'acronyme anglophone CRO, pour « contract research organization ». Cette startup lyonnaise biotechnologique a été fondée en 2014 par Tanguy Fortin (PhD) et le professeur Jérôme Lemoine (Institut des Sciences Analytiques de Lyon). Elle possède plus de vingt ans d'expertise en analyse de protéines par spectrométrie de masse. C'est un acteur clé en France mais également en Europe, spécialisé dans l'analyse de biomolécules par spectrométrie de masse : médicaments biothérapeutiques, biomarqueurs protéiques et suivis des impuretés liées aux processus de bioproduction des biomédicaments (« host cell proteins », HCP).



Figure 1 - Processus de production et purification d'un médicament biothérapeutique.

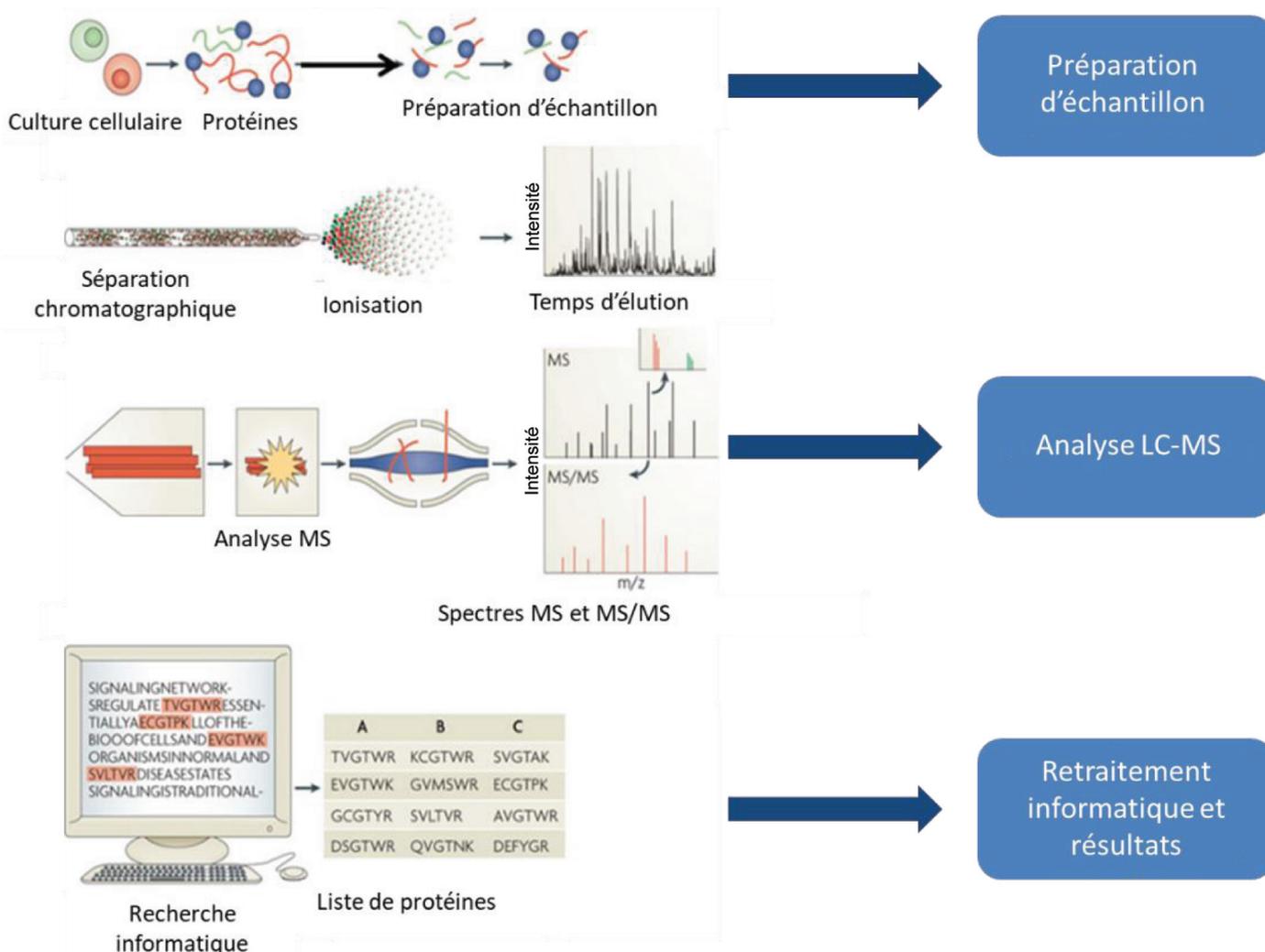


Figure 2 - Principe général de la spectrométrie de masse en mode « peptide mapping » pour l'analyse de protéines.

Afin de répondre à la problématique que posent les HCP, ANAQUANT a développé une stratégie analytique permettant à la fois d'identifier les HCP, mais également de les quantifier pour pouvoir valider les lots de production du produit final, comparer les lots entre eux, et ainsi assurer une qualité de production reproductible et maîtrisée tout en répondant au cahier des charges mis en place par les autorités réglementaires.

### Les READYBEADS™ dans le processus d'analyse des HCP : la solution proposée

Bien que les HCP soient principalement analysées par des tests immunologiques tels que les techniques « western blots » ou ELISA, ces tests ne permettent pas de les identifier et de les quantifier individuellement.

L'approche développée par ANAQUANT est basée à la fois sur les principes de la spectrométrie de masse, et également sur l'utilisation de la technologie READYBEADS™ comme

standards universels, permettant une approche globale et générique de la problématique HCP.

La figure 2 décrit le principe de la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (LC-MS) pour l'analyse des protéines [2]. Les premières étapes montrent que les protéines ne sont pas analysées sous leurs formes intactes, mais qu'elles sont dans un premier temps digérées sous forme de peptides, chaînes plus courtes d'acides aminés, afin d'obtenir des composés qui auront une meilleure sensibilité lors de la détection. Grâce aux séquences uniques de certains peptides, aussi appelés peptides signatures ou protéotypiques, il est possible, à l'aide d'une corrélation avec des bases de données protéomiques, d'identifier spécifiquement les protéines présentes dans l'échantillon.

La stratégie développée par ANAQUANT va plus loin en proposant de quantifier chacune des protéines identifiées par un standard universel en utilisant un principe publié en 2006 qui permet d'utiliser les signaux observés pour chaque

protéine et d'obtenir une notion quantitative [3]. Dans le cas des HCP, afin de pouvoir quantifier des protéines ayant différentes concentrations au sein même d'un seul échantillon, ANAQUANT a développé un standard universel basé sur une gamme de protéines représentatives d'un ensemble de protéines [4]. Pour simplifier l'utilisation d'un tel standard et assurer la reproductibilité et la certification des résultats, la technologie READYBEADS™ est utilisée.

Ainsi, pour quantifier l'ensemble des protéines identifiées par spectrométrie de masse, une bille READYBEADS™ est ajoutée à l'échantillon lors de sa préparation et les signaux de chaque protéine identifiée sont rapportés sur la gamme pour être convertis en dose. La *figure 3* présente l'ensemble du processus d'analyse des HCP par ANAQUANT (voir aussi l'encadré).



## Qualité et cohérence des analyses

Grâce à la stratégie analytique développée par ANAQUANT, l'identification et la quantification individuelles des HCP

permettent de compléter et d'étoffer les dossiers réglementaires des sociétés biopharmaceutiques.

L'ensemble du processus analytique mis en place au travers de l'analyse LC-MS et des standards qualifiés grâce à la

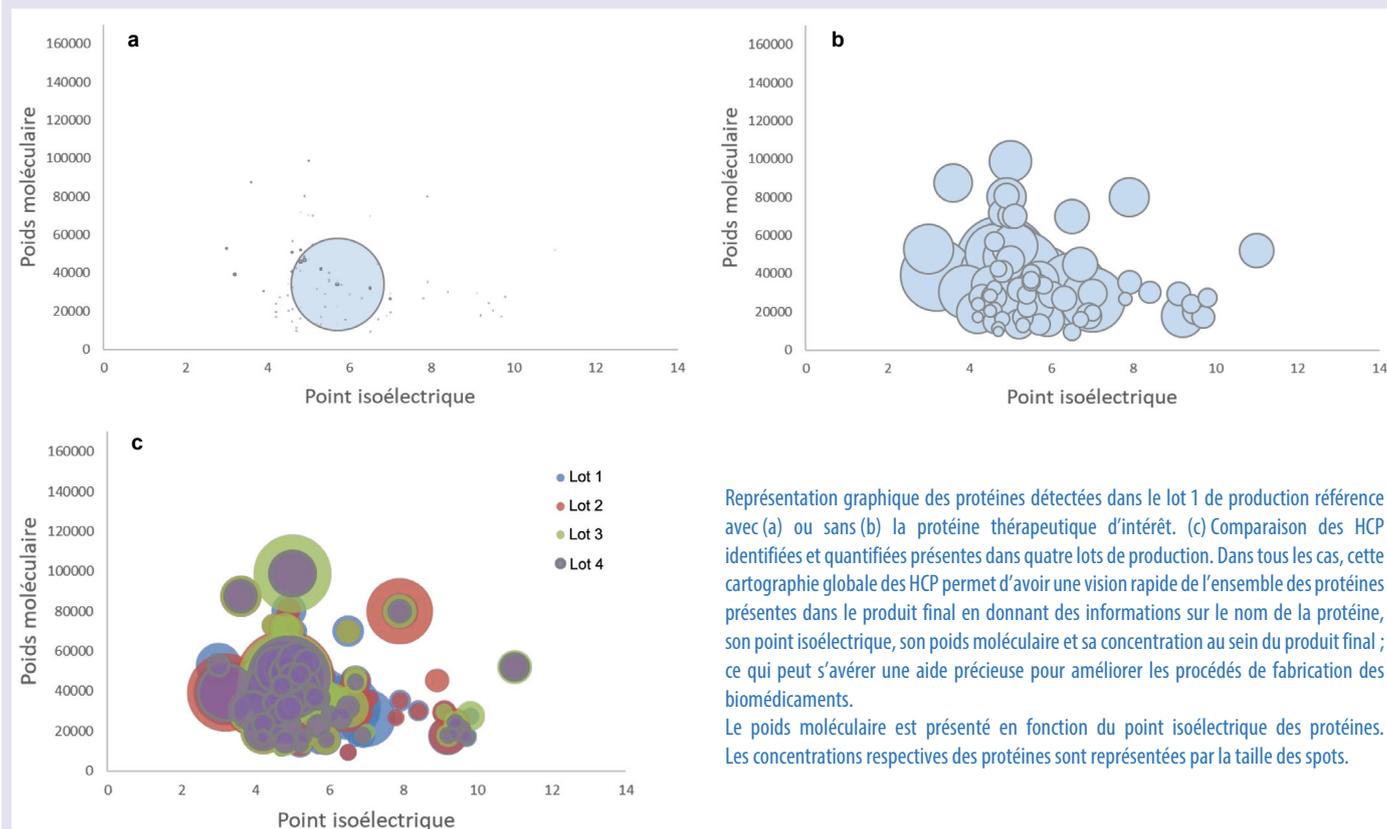
## Analyse d'une production

Afin de s'assurer de la reproductibilité de production d'un médicament biothérapeutique, la cartographie complète des HCP provenant de cette production a été réalisée sur quatre lots de production.

Dans un premier temps, le lot de référence a été analysé afin d'identifier et de quantifier les HCP présentes (*figure a*). La représentation graphique est une reconstitution réalisée à partir de l'identification des protéines grâce à la détection des peptides spécifiques. Plus d'une centaine de protéines ont été identifiées et quantifiées. Pour chaque protéine identifiée, y compris la protéine thérapeutique, le poids moléculaire et le point isoélectrique ont été reportés sur ce graphique, qui permet donc de corréler les analyses de référence en HCP avec la spectrométrie de masse.

La concentration de chaque protéine est représentée par la taille du cercle. Le cercle principal ayant un poids moléculaire d'environ 40 000 daltons et un point isoélectrique de 5,5 représente la protéine thérapeutique. Sur la *figure b*, la protéine d'intérêt a été enlevée afin d'avoir une meilleure visibilité des HCP.

Une fois la cartographie complète d'un produit final provenant du lot de référence réalisée, elle a été comparée à trois autres lots de production permettant un contrôle qualité (*figure c*). Sur cette représentation graphique, la protéine thérapeutique n'a pas été incluse pour pouvoir visualiser les différences potentielles entre les HCP analysées dans les différents lots. Globalement, les mêmes protéines sont identifiées dans les lots de production avec des concentrations similaires.



Représentation graphique des protéines détectées dans le lot 1 de production référence avec (a) ou sans (b) la protéine thérapeutique d'intérêt. (c) Comparaison des HCP identifiées et quantifiées présentes dans quatre lots de production. Dans tous les cas, cette cartographie globale des HCP permet d'avoir une vision rapide de l'ensemble des protéines présentes dans le produit final en donnant des informations sur le nom de la protéine, son point isoélectrique, son poids moléculaire et sa concentration au sein du produit final ; ce qui peut s'avérer une aide précieuse pour améliorer les procédés de fabrication des biomédicaments.

Le poids moléculaire est présenté en fonction du point isoélectrique des protéines. Les concentrations respectives des protéines sont représentées par la taille des spots.

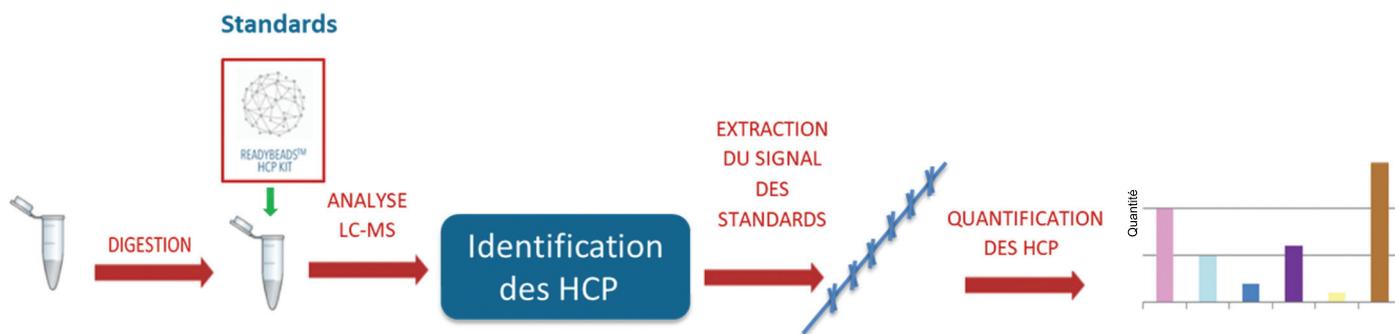


Figure 3 - Processus d'analyse des HCP par ANAQUANT.

technologie READYBEADS™ permet de garantir une grande qualité de données pour la cohérence et l'uniformité des résultats analytiques dans les thématiques de production de médicaments biothérapeutiques.

Cette stratégie analytique peut donc être implémentée dans la production de protéines recombinantes telles que les anticorps monoclonaux ou les vaccins. Il existe sur le marché quelques anticorps tels que le trastuzumab, le pembrolizumab, ou encore le natalizumab.

[1] Li F. *et al.*, Cell culture processes for monoclonal antibody production, *MABs*, **2010**, 2, p. 466.

[2] Aebersold R., Mann M., Mass spectrometry-based proteomics, *Nature*, **2003**, 422, p. 198.

[3] Silva J.C. *et al.*, Simultaneous qualitative and quantitative analysis of the *Escherichia coli* proteome: a sweet tale, *Mol. Cell Proteomics*, **2006**, 5, p. 589.

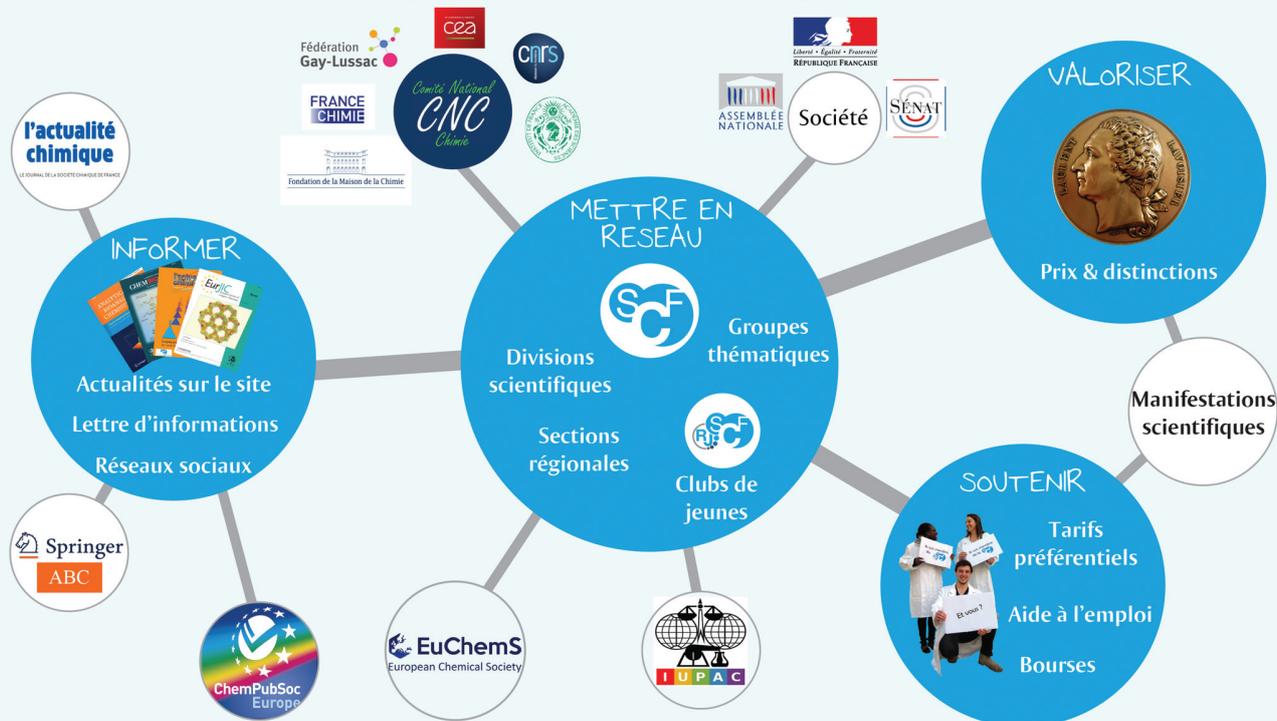
[4] Trauchessec M. *et al.*, Mass spectrometry-based workflow for accurate quantification of *Escherichia coli* enzymes: how proteomics can play a key role in metabolic engineering, *Mol. Cell Proteomics*, **2014**, 13, p. 954.

**Quentin ENJALBERT\*** est directeur commercial, **Mathieu TRAUCHESSEC** et **Chloé BARDET**, chefs de projet, et **Tanguy FORTIN**, PDG, ANAQUANT.

\*ANAQUANT, 5 rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne.  
Courriel : quentin.enjalbert@anaquant.com

## La SCF au coeur du monde de la chimie

La SCF représente les chimistes français auprès des différentes instances avec une triple mission institutionnelle, d'expertise et de réseau



Etudiants, chercheurs, enseignants, industriels,  
la SCF est votre association !