

UNIVERSITÉ BORDEAUX SEGALEN
École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé de Bordeaux

2008/2011

Thèse n°

THÈSE

Pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé,

Option : Biochimie

Présentée et soutenue publiquement

Le 19 Decembre 2011

Par Jerome Pezzini

Né le 23/05/1986 à Auch (32)

**La chromatographie en mode mixte pour la purification de
protéines recombinantes à visée santé.**

Caractérisation des interactions impliquées dans les supports de
chromatographie HyperCel[®], modélisation et applications.

Membres du Jury

| | |
|-----------------------------------|--------------------|
| M Bernard Gallois | Président |
| M Frédéric De Lamotte Guery | Rapporteur |
| M Philippe Cardot | Rapporteur |
| Mme M.A. Vijayalakshmi | Examineur |
| M René Gantier | Examineur |
| M Xavier Santarelli | Directeur de Thèse |

Avant-propos

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie Bernard Gallois de présider ce jury dont la composition et la compétence est une satisfaction personnelle et qui, j'en suis convaincu, fait honneur au domaine des bioséparations et de la chromatographie. Je remercie donc tout particulièrement messieurs Philippe Cardot et Frédéric de Lamotte d'avoir accepté l'exercice d'examen minutieux de mon manuscrit en leur fonction de rapporteurs. Je remercie Mme Vijayalakshmi de me faire l'honneur de traverser les continents pour examiner mon travail. L'excellence scientifique et la bienveillance que vous avez apportées à notre précédente rencontre ne pouvait laisser cet évènement sans suite.

Je remercie également René Gantier en sa qualité de représentant de la société PALL sans laquelle tout ceci n'aurait été possible, mais aussi pour les discussions, les débats intenses et les conseils prodigués qui m'ont beaucoup apporté. Je tiens également à remercier Catherine Allieux et Patrick Santambien de s'être battus pour l'existence de ce projet.

Je remercie la Société de BioChromatographie et Nanoséparations (SBCN) qui m'a permis durant ces trois années d'assister à des congrès références dans le domaine de la biochromatographie et d'y présenter un certain nombre de mes travaux. J'ai ainsi pu faire des rencontres extrêmement intéressantes et enrichissantes et dont l'utilité ne manquera pas de se faire sentir. Je remercie particulièrement son illustre président et ses non moins valeureux secrétaires.

Je remercie donc chaleureusement Xavier Santarelli, mon directeur de thèse et néanmoins ami, maître incontesté de la chromatographie, et dont la gentillesse, la sollicitude et les conseils, m'ont permis de me développer et d'aborder sereinement ce projet.

Je remercie l'ensemble du laboratoire EA4135 et de l'ENSTBB, de m'avoir hébergé, supporté, et conseillé au cours de ces trois longues années.

Je remercie tout d'abord Charlotte Cabanne dont l'encadrement et l'apport ont été indispensables à la réussite de ce projet. Les discussions parfois enflammées mais toujours joyeuses, lors de la rédaction des articles, des présentations ou lors des « manips » resteront comme un des éléments majeurs de cette période.

Je remercie Bertrand Garbay (Monsieur le directeur) pour les batailles verbales indispensables et ô combien enrichissantes, Christophe, apprenti « geek », que j'ai plaisir à voir (presque) dépasser le maître, Majid, Agnès, Patricia, Wilfrid, Caroline, Sébastien et toute l'équipe pour leur dévouement et leur gentillesse.

Je tiens à remercier l'équipe R&D Applications de Pall Cergy, et particulièrement Magali pour cette collaboration fructueuse, mais aussi Jérôme, Mélanie, Fabien et Aurélia pour ses travaux précurseurs ainsi que tout le personnel qui m'a chaleureusement accueilli à chacun de mes séjours.

Et les autres qui se reconnaîtront...

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| <u>TABLE DES MATIERES</u> | 4 |
| <u>RESUME</u> | 7 |
| <u>ABSTRACT</u> | 8 |
| <u>INTRODUCTION</u> | 9 |
| <u>1. INTRODUCTION A LA PURIFICATION DE PROTEINES</u> | 10 |
| 1.1. LA PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES A VISEE SANTE : UN MOTEUR INDUSTRIEL | 10 |
| 1.2. LA PURIFICATION : UN CHALLENGE SCIENTIFIQUE ET ECONOMIQUE. | 11 |
| 1.3. LA CHROMATOGRAPHIE: L’OUTIL INDISPENSABLE. | 14 |
| 1.4. LES PROTEINES : DES MOLECULES COMPLEXES A PURIFIER. | 17 |
| <u>2. LA CHROMATOGRAPHIE EN MODE MIXTE : UN NOUVEAU MODE DE PURIFICATION</u> | 18 |
| 2.1. LES RESINES MODE MIXTE HYPERCEL | 21 |
| 2.1.1. Historique du developpement | 21 |
| 2.2. Présentation des resines HEA, PPA et MEP HyperCel | 22 |
| <u>3. CARACTERISATION DES INTERACTIONS PROTEINES-SUPPORTS DE CHROMATOGRAPHIE</u> | 24 |
| 3.1. INTRODUCTION | 24 |
| 3.2. MATERIELS ET METHODES | 26 |
| 3.3. EFFET DU SEL SUR LES INTERACTIONS MODE MIXTE | 33 |
| 3.3.1. Lorsque le pI des proteines est inférieur au pH | 33 |
| 3.3.2. Lorsque le pI des proteines est proche du pH | 37 |
| 3.3.3. Lorsque le pI des proteines est superieur au pH | 44 |
| 3.3.4. Comparaison avec les supports classiques..... | 48 |
| 3.4. EFFET DU pH SUR LES INTERACTIONS MODE MIXTE | 51 |
| 3.5. EFFET D’AGENTS CHAOTROPIQUES SUR LES INTERACTIONS MODE MIXTE | 54 |
| 3.5.1. L’effet hydrophobe | 54 |
| 3.5.2. Effet de l’Uree..... | 55 |
| 3.5.3. Effet de la Guanidine | 58 |
| 3.5.4. Effet de l’Arginine | 60 |
| 3.6. INFLUENCE DES TYPES DE SELS, TAMPONS ET AUTRES COMPOSES SUR LES INTERACTIONS MODE MIXTE | 62 |
| 3.6.1. Effet des Types de sels..... | 62 |
| 3.6.2. Effet de la Glycine | 70 |
| 3.7. SELECTIVITE DES RESINES MODE MIXTE | 72 |

| | | |
|-----------|--|-------------------|
| 3.7.1. | Reduction de la charge du lysozyme modifié | 72 |
| 3.7.2. | Des selectivité originales | 80 |
| 4. | <u>APPLICATIONS</u> | <u>82</u> |
| 4.1. | LA CHROMATOGRAPHIE EN MODE MIXTE POUR LA PURIFICATION DE PROTEINES RECOMBINANTES AVEC ETIQUETTE MALTOSE BINDING PROTEIN (ARTICLE 1) | 83 |
| 4.2. | OPTIMISATION D'UN PROCEDE DE PURIFICATION DE FRAGMENTS D'ANTICORPS A L'AIDE DE RESINES DE CHROMATOGRAPHIE EN MODE MIXTE (ARTICLE 2). | 91 |
| 4.3. | LES RESINES DE CHROMATOGRAPHIE EN MODE MIXTE POUR LA PURIFICATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX : OPTIMISATIONS ET MODELISATION (ARTICLE 3)..... | 100 |
| 5. | <u>CONCLUSION</u> | <u>115</u> |
| | <u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u> | <u>117</u> |
| | <u>Liste des publications</u> | <u>124</u> |
| | <u>COMMUNICATIONS</u> | <u>125</u> |

ABREVIATIONS

Liste non exhaustive des abréviations qui ne sont pas explicitées dans le texte ou qui peuvent générer des confusions.

BSA : Bovine Serum Albumine

Conc : Concentration du tampon exprimée en pourcentage de la pompe utilisé. (%B)

Cond : Conductivité exprimée en milli-Siemens par centimètre (mS/cm)

CV : Volume de colonne

DBC : Capacité dynamique de fixation.

GRAVY : Grand average of hydropathicity : index indiquant la solubilité théorique des protéines et acides aminés, selon l'échelle de Kyte et Doolittle [Kyte and Doolittle, 1982].

HEA : HexylAmine

HIC : Chromatographie d'interaction hydrophobe

IEX : Chromatographie d'échange d'ions

MBP : Maltose Binding Protein

MEP : MercaptoethylPyridine

PG : PhenylGlyoxal

pH : Potentiel Hydrogène

pI : Point isoélectrique

pKa : constante de dissociation de groupements acido-basiques

PPA : PhenylPropylAmine

RPC : Chromatographie de phase inverse

SEC : Chromatographie d'exclusion stérique

Signal UV : Signal d'absorbance à 280 nm des molécules.

Tr, Vr : Temps et volume de rétention

RESUME

La chromatographie en mode mixte représente l'une des plus grandes évolutions de ces dernières années dans le domaine des bioséparations. Cette technique repose sur l'intervention de plusieurs types d'interactions au sein d'un seul et même support. Les résines de chromatographie mode mixte HEA, PPA et MEP HyperCel portent des groupements aliphatiques, aromatiques, thiophiliques ainsi que des groupements aminés protonables en différentes positions. Au moyen d'expériences de chromatographie, à l'aide de protéines standards aux propriétés spécifiques et de mélanges complexes, nous avons isolé ces différentes interactions. Nous avons mis en évidence l'intervention majeure d'au moins deux types d'interactions au sein de ces supports : interactions hydrophobes et électrostatiques. Nous avons pu observer le comportement des résines lors de variations de pH, de force ionique, de types de sels et de tampons ou lors de la présence d'autres composés organiques. Nous avons mis en évidence l'intervention combinée de ces types d'interactions lors des différentes phases de chromatographie. Le comportement des résines mode mixte a révélé des sélectivités particulières et dont le contrôle ciblé à l'aide de l'environnement a permis le développement de méthodes de purification efficaces et originales. Nous avons pu ainsi développer des applications telles que la purification de fragment d'anticorps (*Fab'2*) à partir de culture de cellules d'insectes, la capture de protéine de type MBP à partir d'extrait bactériens et la capture d'anticorps monoclonaux à partir de cellules de mammifères (CHO), et ainsi améliorer les conditions d'utilisation de la chromatographie en mode mixte.

Mots clés : Purification, chromatographie en mode mixte, caractérisation, modélisation, Interactions hydrophobes, Interactions électrostatiques, anticorps.

ABSTRACT

Mixed mode chromatography is the most innovative technique for bioseparation. Mixed mode resins, as the term suggest, involves multiples types of interaction at the same time. HyperCel mixed mode resins, HEA, PPA and MEP, involve aliphatic, aromatic or thiophilic groups as well as protonable amine located in the spacer arm or as a head group. Using classical chromatographic experiments, standards proteins and complex mixtures, we highlighted the two major types of interactions involved: hydrophobic and electrostatic interactions. We specifically influenced these interactions by modifying the environment in terms of ionic strength, pH, salt types, and other compounds. The combination of these interactions during every phase of a chromatographic process has been demonstrated. Mixed mode resins thus offer unique selectivity that can be controlled by the environment. This allowed us to develop several applications from antibodies fragments capture from insect cells, to the purification of MBP-tagged proteins, through monoclonal antibody capture from CHO cells. We thus enhanced mixed mode chromatography.

Keywords: Mixed-mode chromatography, recombinant protein purification, characterization, modeling, antibody, HyperCel.

INTRODUCTION

Cette étude est réalisée dans le cadre d'une Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE) entre la société PALL division Life Sciences (48 av des Genottes, 95800 Cergy St Christophe), et le laboratoire EA4135 Biotechnologie des protéines recombinantes à visée santé (146 rue Léo Saignat, Université Bordeaux Segalen, 33076 Bordeaux).

Dans la première partie du document, nous rappellerons les bases de la chromatographie pour la purification de protéines (Biochromatographie).

Dans la deuxième partie, nous présenterons la chromatographie en mode mixte et l'historique de son développement. Nous présenterons également les résines de chromatographie en mode mixte HyperCel étudiées.

Dans la troisième partie, nous présenterons les expériences réalisées afin d'évaluer, caractériser et comprendre les interactions impliquées dans les supports de chromatographie en mode mixte HyperCel. A cet effet, nous avons évalué différents environnements physicochimiques et leur influence sur les interactions entre les protéines et les supports de chromatographie. Nous avons fait varier les conditions de force ionique, et de pH. Nous avons évalué différents composés, puis nous avons étudié la sélectivité de ces résines de chromatographie en mode mixte.

Enfin dans la quatrième partie, nous présenterons les applications utilisant la chromatographie en mode mixte pour la purification de molécules biologiques d'intérêts majeurs que nous avons développés.

1. INTRODUCTION A LA PURIFICATION DE PROTEINES

Afin de comprendre les mécanismes et les enjeux de la recherche et du développement dans le domaine des supports de chromatographie, il est nécessaire de présenter les bases et termes de la chromatographie et le contexte économique dans lequel s'inscrit ce projet.

1.1.LA PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES A VISEE SANTÉ : UN MOTEUR INDUSTRIEL

L'obtention de protéines grâce aux techniques modernes de biotechnologie est possible en deux phases principales : la phase de production où des cellules sont génétiquement modifiées pour contenir un gène qui va permettre l'expression d'une protéine d'intérêt et donc sa production, et, la phase de purification où il s'agit d'isoler et de purifier la protéine cible.

Aujourd'hui les étapes de production se déroulent généralement dans ce qu'on l'appelle un bioréacteur. Le processus utilisant cet outil débute par l'inoculation du milieu de culture stérile contenu dans le bioréacteur par des cellules génétiquement modifiées. La croissance des cellules est ainsi assurée par le milieu, ou par des apports nutritifs. Cette croissance s'effectue sous contrôle de nombreux paramètres, l'objectif étant la production en masse d'une molécule d'intérêt. Les cellules ou le milieu de culture sont ensuite récupérés en fonction du type d'expression choisi. En effet, la protéine peut être exprimée à l'intérieur des cellules ou sécrétée dans le milieu extracellulaire. Plusieurs types cellulaires peuvent être utilisés, de type procaryotes ou eucaryotes. *Escherichia coli* est l'espèce bactérienne la plus utilisée. Les protéines sont produites dans cet organisme, le plus souvent, à l'intérieur des cellules, il est donc nécessaire de récupérer ces dernières et d'extraire le contenu intracellulaire. Les cellules animales sont de plus en plus utilisées notamment les cellules ovariennes de hamster chinois (CHO). Les protéines produites sont sécrétées dans le milieu de culture. C'est également le cas pour les levures et notamment *Pichia pastoris*. La première étape de purification appelée clarification permet la séparation des cellules, des débris cellulaires du milieu de culture. Elle est généralement effectuée par centrifugation ou filtration.

La molécule d'intérêt est ainsi récupérée dans un milieu complexe contenant un grand nombre de contaminants de natures variées. Afin d'optimiser la pureté du produit final, ces impuretés doivent être éliminées. Les techniques de purification, par la succession d'étapes de séparation vont permettre leur élimination, l'isolement de la molécule cible, ainsi que sa concentration et son conditionnement. Tout ceci afin de respecter les critères liés à une utilisation thérapeutique, à un objectif de recherche et de développement ou encore de caractérisation. La recherche de molécules thérapeutiques protéiques, plus spécifiquement d'anticorps, est en plein développement. Cependant l'utilisation de ces molécules (notamment chez l'homme) implique l'utilisation de doses importantes. Il est donc indispensable d'obtenir une pureté suffisante pour une totale innocuité.

1.2. LA PURIFICATION : UN CHALLENGE SCIENTIFIQUE ET ECONOMIQUE.

Les techniques de production ont fait l'objet de très nombreuses améliorations ces dernières années et représentent aujourd'hui l'une des forces de l'industrie biopharmaceutique alors que la purification devient l'une de ces faiblesses. Les quantités de protéines produites ne cessent d'augmenter. Les titres d'expression sont récemment passés du mg/L au g/L voire plusieurs dizaines de g/L et la grande disparité des milieux de production ainsi que la variation des conditions de production augmentent significativement la complexité des échantillons. Les profils d'impuretés deviennent alors de plus en plus complexes, augmentant les exigences techniques pour les techniques de purification.

Malheureusement, la purification et les techniques de chromatographie n'ont pas suivi la même évolution. Alors que la productivité de la culture cellulaire a été multipliée par 100, pendant la même période, la productivité de la purification a été multipliée par 15 [Langer, 2009]. Bien sûr des avancées considérables ont été faites, notamment avec l'arrivée de nouvelles matrices de chromatographies, avec l'augmentation des débits d'utilisation, des cycles d'utilisations et des capacités dynamiques.

Parallèlement aux améliorations physiques des supports de chromatographie, un travail important a été réalisé sur l'amélioration de la sélectivité des supports.

De toutes les techniques de purification, la chromatographie est de loin la plus largement utilisée pour la séparation des protéines. Elle a été l'objet de nombreuses recherches afin d'en améliorer les performances, la spécificité, la rapidité tout en cherchant la réduction des coûts. Néanmoins, il est encore courant de dire que la chromatographie est le « goulot d'étranglement » d'un procédé de production de molécules biologiques. C'est particulièrement vrai dans l'industrie biopharmaceutique où l'on décrit couramment la chromatographie comme la plus grosse source de dépense dans un procédé de production. Le coût de la purification sur l'ensemble du bioprocédé est estimé à 50% (**Figure 1**), les résines de chromatographies représentant 20% du coût de la purification et les consommables associés (eau, tampons...) près de 50% (**Figure 2**). Le succès des biotechnologies pour la production d'actifs biologiques pour l'industrie biopharmaceutique dépend donc des solutions de l'ingénierie en procédés de traitement post-bioproduction que sont la purification et donc la chromatographie.

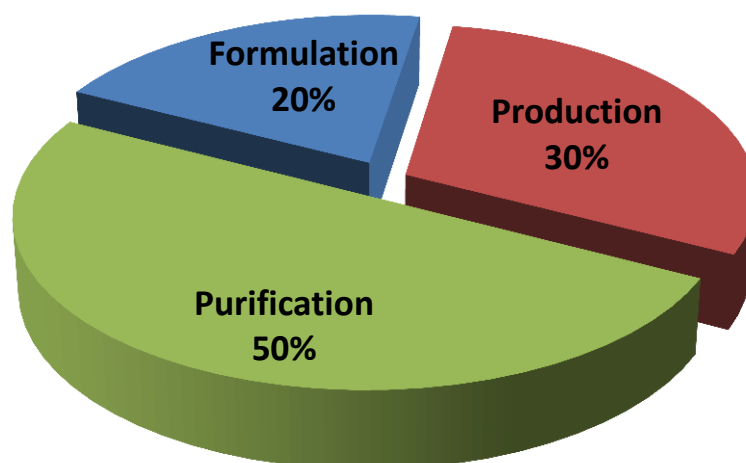


FIGURE 1. DISTRIBUTION DES COÛTS D'UN PROCÉDE DE PRODUCTION BIOPHARMACEUTIQUE

Des alternatives techniquement disponibles (la précipitation, la cristallisation, la filtration...), aucune n'a aujourd'hui le potentiel pour remplacer la chromatographie, que ce soit en termes d'efficacité, de rendement, ou encore de pureté. Elle reste donc le principal « cheval de bataille » des biotechnologies.

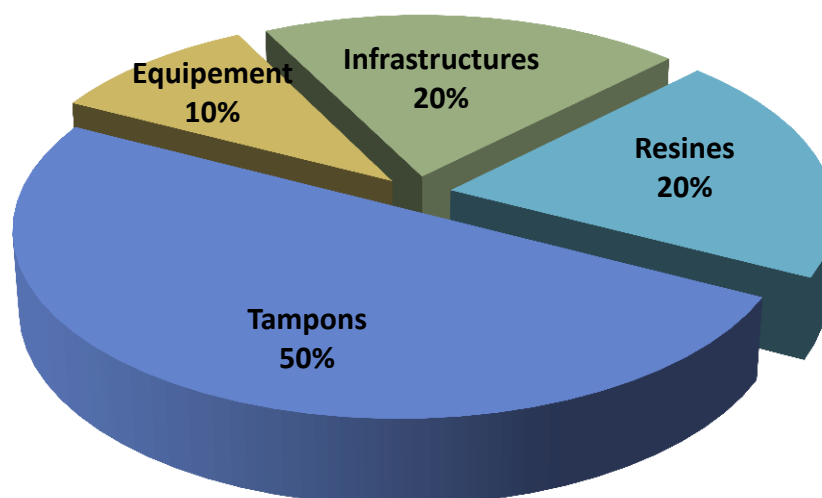


FIGURE 2. DISTRIBUTION DES COUTS D'UN PROCEDE DE PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE

De plus, cette nécessité d'améliorer les étapes de purification et donc de chromatographie se ressent à toutes les échelles de la production par voie biotechnologique. En effet, il est courant de produire des protéines recombinantes, à l'échelle laboratoire, dans un objectif de développement, de recherche biologique et médicale, ou encore, de caractérisation. Ceci nécessite l'obtention efficace d'une molécule c'est-à-dire une pureté et des quantités relativement importantes et, bien sûr, un coût maîtrisé. Il faut pour cela développer et optimiser les étapes de purification et donc bien comprendre le fonctionnement des supports de chromatographie.

Une connaissance approfondie des interactions mises en jeu dans les supports chromatographiques permet l'amélioration de leurs performances. Afin de se positionner sur le marché concurrentiel des supports chromatographiques, les fabricants doivent maintenant innover en intégrant au développement de nouveaux supports la compréhension des mécanismes qui seront mis en jeu. Dans ce contexte économiquement porteur et scientifiquement important, ce travail de thèse a donc été effectué en partenariat avec l'entreprise Pall Life Sciences spécialisée dans le développement de supports de chromatographie. Les résines HEA, PPA et MEP HyperCel fabriquées et commercialisées par cette entreprise ont été étudiées de manière à comprendre les interactions mises en jeu entre les protéines et les supports chromatographiques de type « mode mixte ».

1.3.LA CHROMATOGRAPHIE: L'OUTIL INDISPENSABLE.

La séparation par chromatographie implique de nombreuses interactions non covalentes réversibles entre une molécule, protéique dans notre cas, et un groupe fonctionnel appelé « ligand » attaché sur un support solide appelé « matrice ». ». A la surface des protéines se trouvent des résidus acides et basiques pouvant, par exemple, contribuer à des interactions ioniques. D'autres acides aminés peuvent participer à des interactions de type hydrophobe, thiophiliques, π - π , Van der Waals. On distingue ainsi plusieurs types de chromatographie selon les propriétés physiques, chimiques, ou même, biologiques utilisées pour purifier les divers éléments. On peut en effet séparer les protéines selon leur taille, leur charge, le caractère hydrophobe, l'affinité pour un ligand. La **Figure 3** présente le pourcentage d'utilisation de chaque type de chromatographie, de manière globale.

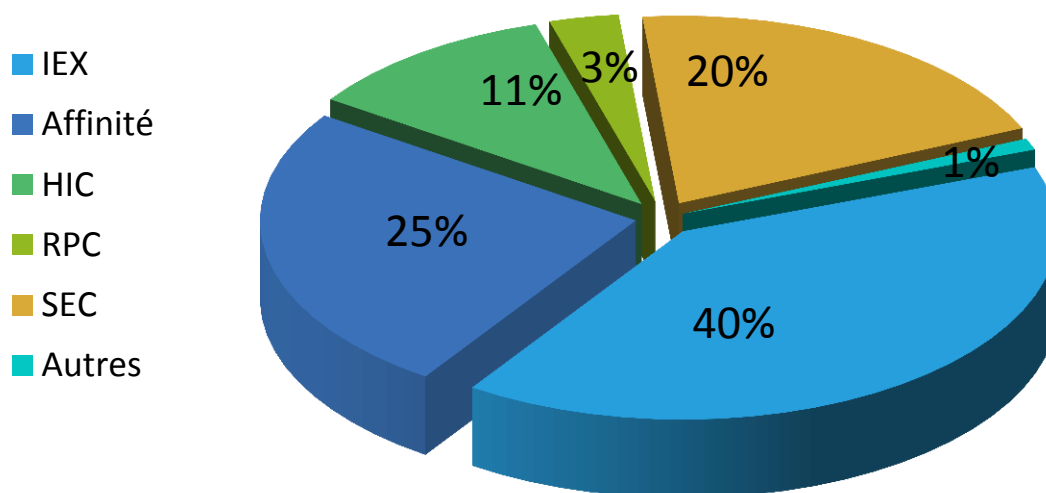


FIGURE 3. MOYENNE D'UTILISATION DES DIFFERENTS TYPES DE CHROMATOGRAPHIE

Un procédé chromatographique est généralement constitué de trois grandes phases. La capture constitue l'extraction de la molécule d'intérêt de l'extrait biologique brut. Il s'agit de fixer la protéine cible sur un support chromatographique le plus rapidement possible, pour la stabiliser et la concentrer. Les étapes dites de purifications intermédiaires permettent l'élimination d'un grand nombre de contaminants, Enfin, les étapes de polissage vont assurer la pureté finale du produit et son conditionnement.

L'étape de capture constitue la première étape du procédé proprement dit et est sans doute l'étape la plus importante en terme de rendement car elle conditionne la quantité de produit cible que l'on va être capable d'immobiliser sur le support chromatographique et donc potentiellement disponible à la fin de la purification. Il est nécessaire de capturer la plus grande quantité possible de la molécule d'intérêt. Par conséquent, les supports utilisés doivent permettre une bonne capacité de fixation pour traiter une grande quantité d'extrait brut en un minimum de temps.

Les étapes intermédiaires doivent permettre une bonne sélectivité, de préférence complémentaire de l'étape précédente. Les supports sont choisis pour éliminer les contaminants restants, tout en limitant le plus possible la perte de la molécule d'intérêt.

Enfin le polissage doit être extrêmement sélectif. En effet, cette étape permet de finaliser la purification. Elle utilise généralement de plus faibles quantités de produits et de plus faibles débits. . Au cours de cette étape, il faut éliminer les protéines très « proches » ainsi que les variants de la protéine ou ses agrégats. Il faut donc se focaliser sur la résolution mais aussi sur le recouvrement. En effet, une perte de la protéine cible à cette étape est très coûteuse. Cette étape peut permettre aussi le conditionnement de la protéine pour le stockage (pH, force ionique, additifs).

Chaque étape de chromatographie peut être elle-même décrite comme se déroulant en trois phases. La fixation consiste en l'adsorption des molécules (et à fortiori la molécule cible) au niveau des ligands greffés sur les billes de chromatographie. Le produit à purifier est passé sur la colonne de chromatographie afin de permettre aux molécules d'interagir avec le support. Des temps de contact (ou temps de résidence) suffisamment longs sont choisis pour favoriser les interactions. Les molécules non adsorbées ou non retenues lors de cette étape sont récupérées afin de vérifier l'absence de la molécule cible.

La seconde étape appelée lavage vise à éliminer le plus possible de molécules contaminantes adsorbées sur le support lors de la fixation. Cette étape est très importante pour la pureté du produit final.

Enfin, la troisième étape ou élution consiste en un décrochage sélectif de la molécule d'intérêt. A cette étape, on va chercher à récupérer la molécule dans le plus petit volume possible (pour augmenter sa concentration), avec le moins de contaminants possible, et dans les conditions les plus favorables à la stabilité de la molécule, à son conditionnement et à son utilisation ultérieure.

Chaque phase est souvent constituée de plusieurs étapes. Ainsi il n'est pas rare d'avoir plusieurs étapes de lavage afin de décrocher spécifiquement tel ou tel type de contaminant.

Ces trois phases constituent le procédé de purification stricto sensu mais il y a d'autres étapes indispensables que sont l'équilibration et le nettoyage.

L'équilibration est la première étape lors de l'utilisation d'une résine chromatographique, pendant laquelle le tampon d'équilibration (généralement identique au tampon de charge) est mis en contact prolongé avec la résine. Elle permet d'éliminer le tampon de stockage dans lequel la résine était éventuellement conservée et de conditionner les billes dans un environnement favorable à la fixation de la molécule cible. Ainsi, tous les interstices et autres pores qui constituent la bille de chromatographie seront déjà en contact avec ce tampon évitant tout problème d'homogénéité de phase et/ou de transition de pH et/ou de conductivité. Cette étape est absolument nécessaire au bon déroulement de la fixation de la molécule d'intérêt.

Le nettoyage est l'étape finale, durant laquelle l'objectif est d'éliminer les éventuelles molécules contaminantes encore adsorbées et ainsi redonner au support de chromatographie son potentiel initial. En effet, des molécules ou débris peuvent rester fixés sur une résine de chromatographie après élution de la molécule cible. Les conditions d'élution utilisés ne sont parfois pas suffisamment stringentes, pour éliminer la totalité des molécules adsorbées. Le nettoyage, ou régénération, permet d'éliminer ces molécules résiduelles et de permettre une réutilisation optimale du support de chromatographie. Ces étapes sont donc très importantes dans un procédé de purification notamment dans l'industrie où la réutilisation des consommables est un enjeu majeur. Il est donc nécessaire de maîtriser les solutions et composés qui vont être efficaces dans l'élimination de la totalité de ces résidus.

1.4. LES PROTEINES : DES MOLECULES COMPLEXES A PURIFIER

Les protéines sont des molécules poly-ioniques possédant en même temps des groupements hydrophobes et hydrophiles. Ce sont en fait des matrices tridimensionnelles avec une grande diversité de distribution des groupes fonctionnels de surface. Il est donc impossible pour tous les résidus aminoacides d'être en contact simultané avec la surface du support de chromatographie. Seuls les résidus proches ou à la surface des protéines peuvent avoir un impact sur le comportement chromatographique et seule une fraction de ces résidus externes va interagir avec un type particulier de matrice chromatographique (d'échanges ioniques, d'affinité...). Les acides aminés enfouis à l'intérieur de la structure protéique ne jouent pas de rôle direct dans les interactions de surface avec les supports de chromatographie. Néanmoins des réorganisations structurales peuvent intervenir au niveau de la protéine sous l'influence d'interactions de force importante (type hydrophobe). Des changements structuraux déplaçant la composition en acides aminés dans les régions de contacts entre le support et les protéines, peuvent influencer sur le comportement chromatographique des protéines.

La substitution d'un acide aminé dans une protéine peut également influencer le comportement chromatographique dans la mesure où il se situe dans la zone de contact direct avec le support de chromatographie, ou lorsqu'il modifie suffisamment la structure de la protéine pour induire un changement morphologique de la zone de contact. L'hétérogénéité dans la distribution des acides aminés à la surface des protéines va donc permettre à certaines zones de surface de dominer le comportement chromatographique. Les régions possédant la plus forte concentration de groupes particuliers impliqués dans le processus de chromatographie, peuvent dominer le comportement de séparation. A contrario, lorsqu'il y a peu de ces groupes fonctionnels à la surface des protéines, on peut penser qu'une large portion de la surface de la protéine guide le phénomène.

De plus, ces bio-polymères, relativement instables, peuvent se dénaturer sous l'effet d'un environnement chimiquement ou thermodynamiquement défavorable. Il est donc important de s'assurer que l'adsorption et l'élution de ces molécules se fassent dans des conditions minimisant les interactions non spécifiques, et en évitant l'utilisation de solvants organiques ou de pH extrêmes.

De par sa complexité et son réarrangement tridimensionnel unique, chaque protéine à purifier représente une situation nouvelle et un challenge pour la recherche et le développement. Ainsi la compréhension des mécanismes complexes impliqués dans les interactions entre protéines et supports de chromatographie est nécessaire à l'optimisation et l'amélioration des conditions de purification.

2. LA CHROMATOGRAPHIE EN MODE MIXTE : UN NOUVEAU MODE DE PURIFICATION

Les interactions protéines-supports de chromatographie sont généralement décrites comme utilisant un seul type d'interaction (ionique, hydrophobe...). Dans la réalité, chaque chromatographie fait intervenir plusieurs types d'interactions en même temps. Certaines sont dites « secondaires » ou « non spécifiques » et ont généralement pour origine le support de chromatographie (le polymère, le constituant, la bille) ou le bras « espaceur » placé entre le ligand et la bille.

La chromatographie en mode mixte (parfois appelé multimodale), a été développée pour utiliser de façon rationnelle de multiples interactions et a pour objectif de les faire intervenir de façon contrôlée, à l'inverse des interactions dites non spécifiques. En effet, comme le terme mode mixte le suggère, ces résines permettent différents types d'interactions avec un seul et même support de chromatographie.

La combinaison de plusieurs types d'interactions a pour objectif l'obtention de nouvelles sélectivités qui sont différentes de la simple combinaison de chaque type. Ainsi le nombre de colonnes nécessaires peut être réduit, et parfois certaines séparations jusqu'alors impossibles peuvent être réalisées. Ces modes peuvent être de l'échange d'ions, de l'interaction hydrophobe, ou encore des interactions hydrogène, π - π ou thiophiliques.

La chromatographie n'est pas une technique nouvelle. On situe son « invention » dans les années 1900 par le botaniste russe Tswett [Tswett, 1906]. Il faudra cependant quelques années pour voir cette technique « démocratisée ». Même si elle est en plein essor, la chromatographie en mode mixte n'est, elle non plus, pas entièrement nouvelle. Elle a, en effet, déjà été utilisée par de nombreux utilisateurs sans le savoir.

Comme nous l'avons dit précédemment, la matrice de base et le bras espaceur influencent les processus de chromatographie par des interactions non spécifiques différentes du type d'interaction recherché. Ces interactions constituent donc une forme discrète de la chromatographie en mode mixte.

En 1956, Tiselius et collaborateurs développent une technique de chromatographie utilisant l'hydroxyapatite, un dérivé calcique, comme ligand pour la purification de macromolécules. [Tiselius *et al.*, 1956]. Cette technique est assez méconnue à l'époque, bien qu'extrêmement performante. Elle est aujourd'hui largement répandue et acceptée comme la première chromatographie mode mixte découverte. La combinaison forte de sites d'interactions ioniques (Phosphate) et d'interactions de type affinité pour le métal (Calcium) apporte le caractère multimodal aux séparations utilisant l'hydroxyapatite.

Néanmoins, ces résines ont longtemps été classées dans la catégorie des résines d'affinité, leur mécanisme étant très complexe. On peut considérer que la plupart des supports d'affinité sont des supports mode mixte, car ils font intervenir de façon importante plusieurs types d'interactions en se fixant sur des sites spécifiques au niveau des protéines. La plus connue des interactions d'affinité, la protéine A, se fixe au fragment Fc des anticorps grâce à la combinaison d'interactions hydrogènes, hydrophobes ou encore ioniques [Gagnon, 1996]. On peut également citer les chromatographies d'affinité pour les histidines [Amourache *et al.*, 1984], d'affinité pour le métal [Porath *et al.*, 1975] et les colorants [Subramanian, 1982]

Les supports mode mixte et d'affinité présentent donc des similitudes. En effet, le réarrangement spatial des éléments constituant un ligand mode mixte va avoir tendance à interagir avec une structure complémentaire au niveau de la protéine. Mais contrairement à la technique classique d'affinité, il n'y a pas a priori de site spécifique connu. Dans le cas de l'utilisation de ligand mode mixte, leur utilisation constitue une recherche de sites potentiels au niveau de la protéine cible qui permettront une affinité au sens large et une sélectivité.

Néanmoins une spécificité tend à distinguer très fortement la chromatographie en mode mixte, et son utilisation, des autres techniques. C'est l'orthogonalité inhérente à l'implication de plusieurs types d'interactions au sein d'un support mode mixte. En effet de par leur conception particulière, faisant intervenir différentes interactions dans un même ligand, plusieurs types de chromatographies interviennent. Or ces multiples chromatographies ne sont pas forcément indépendantes en chaque instant. La fixation et l'élution ainsi que le nettoyage

sont contrôlés sur les supports mode mixte par des paramètres plus ou moins spécifiques à chaque type d'interaction. Par exemple, le pH va contrôler les interactions ioniques, les sels lyotropiques vont contrôler l'interaction hydrophobe et la force ionique. Il est donc possible d'optimiser ces différents paramètres, tels que le type de sels, le type de tampon et sa concentration, le pH ou tout autre composé. Ainsi la modification et la combinaison de ces paramètres vont conférer aux résines mode mixte leur potentiel unique de séparation.

La complexité induite par le grand nombre de paramètres impliqués dans la chromatographie en mode mixte, nécessite d'avoir recours aux techniques de planification d'expériences et de criblage à haut débit. Néanmoins, au-delà de ces techniques globales, l'utilisation raisonnée des résines mode mixte doit être basée sur la compréhension des paramètres et des interactions impliqués.

Parmi la multitude de combinaisons possibles, la chromatographie en mode mixte utilise plus couramment celle d'effets hydrophobes et électrostatiques. Ce type de mode mixte a été en partie étudié lors du développement des supports d'interactions hydrophobes classiques (HIC) [Er-el *et al.*, 1972 ; Hofstee, 1973a ; Hofstee, 1973b]. En effet, les effets de combinaisons de charges présentes sur les résines avec les groupements hydrophobes ont été discutés. Bien que ces mélanges d'interactions ont été généralement décrits comme indésirables, certaines études ont néanmoins mis en évidence certains avantages à leur utilisation [Simmonds *et al.*, 1977 ; Crowther *et al.*, 1982].

2.1.LES RESINES MODE MIXTE HYPERCEL

2.1.1. HISTORIQUE DU DEVELOPPEMENT

En 1999, l'entreprise Pall Life Sciences révèle la résine MEP HyperCel, qui devient le premier support de chromatographie vendu sous l'appellation « mode mixte ». Son développement est directement issu de plusieurs travaux.

Dans les années 1990, Porath et Oscarson développent la technique de chromatographie d'adsorption thiophilique et montrent une affinité toute particulière de supports de chromatographie contenant des atomes de soufre pour les anticorps [Porath *et al.*, 1985 ; Oscarson and Porath, 1990]. Les travaux de Knudsen et de Scholz montrent également que des structures de type pyridine sont efficaces pour la séparation des immunoglobulines [Knudsen, *et al.* 1992 ; Scholz *et al.*, 1998].

Dès lors, en 1995, Schwarz et ses collaborateurs développent un certain nombre de supports de chromatographie, contenant un ou plusieurs atomes de soufre, des cycles aromatiques, ainsi que d'autres hétéroatomes tels que l'azote, et ce en différentes positions sur les ligands. [Schwarz *et al.*, 1995]. Ces derniers sont étudiés dans leur capacité à fixer et purifier des anticorps. De nombreux ligands mode mixte, notamment basés sur des mercaptohétérocycles ont ainsi été créés et évalués. [Schwarz, 1996].

En 1997, Burton et Harding, en se basant sur ces études, ont développés le concept de chromatographie d'induction de charge ou HCIC et l'ont appliqué à la purification de la chymosine [Burton and Harding, 1998]. Ce concept a été la première appellation spécifique à un type de ligand mode mixte et repose notamment sur le ligand Mercapto-ethylpyridine que l'on retrouve dans la résine MEP HyperCel. Ces ligands ont été principalement développés dans le but de proposer une alternative majeure à la chromatographie d'affinité sur protéine A pour la purification d'anticorps [Schwartz *et al.*, 2001].

En 2006, deux autres supports de chromatographie en mode mixte, les HEA et PPA HyperCel sont commercialisés par la société PALL.

2.2. PRESENTATION DES RESINES HEA, PPA ET MEP HYPERCEL

Les résines de chromatographies mode mixte HyperCel possèdent des groupements chimiques potentiellement impliqués dans des interactions de « type » différents. On trouve en effet des groupements de type alkyles (HEA, PPA et MEP) et aryles (PPA et MEP) impliqués dans des interactions de type hydrophobes (**Figure 4**). On trouve également des groupements amino (en tête de groupe pour MEP et dans le bras espaceur pour HEA et PPA) potentiellement ionisables. Ces charges sont potentiellement impliquées dans des interactions de type électrostatiques.

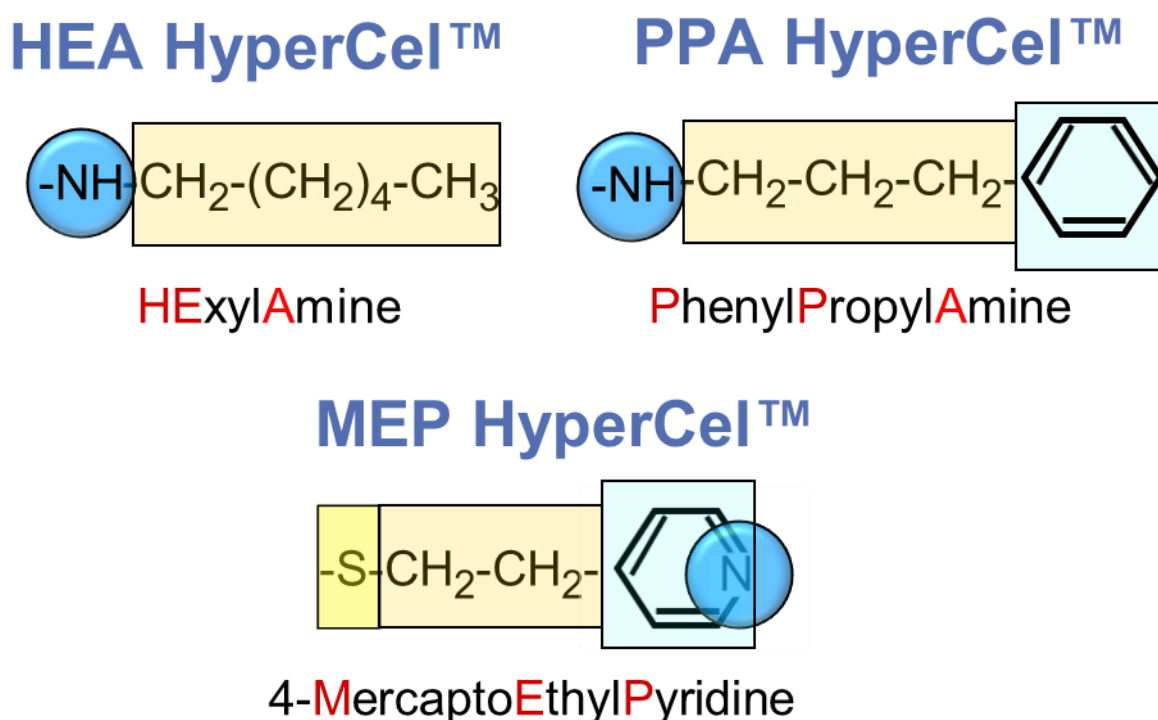


FIGURE 4. STRUCTURE DES SUPPORTS DE CHROMATOGRAPHIE EN MODE MIXTE HYPERCEL

Ces ligands synthétiques mode mixte sont immobilisés sur une matrice HyperCel constituée de cellulose, mécaniquement stable et couramment utilisée dans l'industrie. Les ligands HEA, PPA et MEP HyperCel sont des supports de chromatographie adaptables à l'échelle industrielle, développés pour la capture de protéines et l'élimination d'impuretés dans un environnement biopharmaceutique. Ils sont basés sur la combinaison des propriétés électrostatiques et hydrophobes. Les ligands HEA, PPA et MEP apportent ainsi de nouvelles sélectivités, non accessibles avec des techniques d'échange d'ions (IEC) ou d'interaction hydrophobe (HIC).

La première idée sur laquelle repose les supports mode mixte HEA PPA et MEP HyperCel est que l'utilisation simultanée de deux types d'interactions va permettre une utilisation plus optimale de chacun. En effet, une interaction hydrophobe classique nécessite d'être provoquée pour permettre l'accrochage efficace des protéines. Cela passe en général par l'ajout d'une quantité importante de sels lyotropiques favorisant la réorganisation des molécules d'eau et donc l'effet hydrophobe comme nous le détaillerons par la suite. Or ces quantités de sels importantes nécessitent généralement d'être éliminées dans la suite du procédé. Néanmoins, il est théoriquement possible de créer des supports hydrophobes tellement attractifs qu'il sera possible d'adsorber un grand nombre de protéines dans des conditions de sels modérés. Par contre l'élution peut dans ces conditions être très difficile voire impossible. Or un bon support de chromatographie est un support capable d'accrocher un grand nombre de molécules mais aussi de les décrocher de façon différenciée.

Partant donc du postulat qu'il est intéressant d'accrocher fortement le plus grand nombre de protéines dans une très grande majorité de conditions, ces supports possèdent une hydrophobicité intrinsèque importante. Cela passe par des groupements fortement hydrophobes (hexyl, phenyl, pyridine) et des densités de ligands importantes. Puis dans un objectif de désorption efficace, sont ajoutées des charges permettant une répulsion de charge lors de la baisse du pH. Cette baisse de pH, modifie les charges à la surface des protéines (ajout de charges positives) ainsi qu'au niveau du ligand. Une répulsion de charges est induite et les protéines sont décrochées du support. C'est sur ce premier principe que reposent les résines mode mixte hydrophobe cationique HEA, PPA et MEP HyperCel.

Les groupements ionisables des résines HEA et PPA HyperCel possèdent un pKa autour de 8 ce qui leur confère une charge positive dans la majorité des situations biologiques et cela les assimile à des échangeurs d'ions fort. A contrario, le ligand MEP possède un pKa autour de 5.0, l'ionisation intervient donc au moment de la baisse de pH lors des phases de lavages et/ou d'élution. Le groupement est donc un échangeur faible.

La deuxième idée sur laquelle reposent les supports de chromatographie en mode mixte HyperCel est que la combinaison d'interactions au sein d'un seul et même support va permettre d'apporter une sélectivité supplémentaire, nouvelle et différente de la simple succession de chacune des interactions. C'est ce que nous allons aborder dans la suite du document.

3. CARACTERISATION DES INTERACTIONS PROTEINES-SUPPORTS DE CHROMATOGRAPHIE

3.1. INTRODUCTION

La difficulté d'évaluer directement la force d'une interaction, et donc l'influence de l'environnement physicochimique sur cette interaction lorsqu'une protéine est correctement adsorbée, nous a conduits à évaluer des conditions de non fixation et plus précisément de proche fixation. L'objectif étant d'induire suffisamment d'interactions pour observer le retardement ou la rétention d'une protéine par les supports mode mixte, tout en évitant son adsorption. Ainsi toute modification d'environnement ayant une influence, positive ou négative sur une ou plusieurs interactions peut être directement observée au niveau du temps de rétention.

Les premières études d'utilisation des résines en mode mixte montrent bien leurs utilités pour l'étape de capture des protéines en traitant directement les extraits biologiques sans étapes de conditionnements de l'échantillon [Brenac Brochier *et al.*, 2008 ; Boschetti *et al.*, 2002]. L'objectif de ce chapitre est de traiter de l'utilisation d'expériences chromatographiques pour comprendre et expliquer le fonctionnement des interactions mises en jeu par les résines en mode mixte HEA et PPA HyperCel et des protéines à purifier en fonction de différents environnements physicochimiques.

L'un des premiers moyens d'études mis en place est l'utilisation de sels. En effet, les sels sont décrits comme étant capable de réduire les interactions électrostatiques et favoriser de façon plus ou moins importante les interactions hydrophobes [Melander and Horváth, 1977 ; Porath, 1986].

Lorsque l'on utilise des sels en solutions aqueuses, on peut raisonner selon deux grandes valeurs. La concentration en sels dans la solution, et la conductivité (exprimés en Siemens par centimètre). La loi de Kohlrausch qui décrit la résistance électrique des solutés ioniques qui constituent les sels, démontre qu'un électrolyte en solution possède une résistance électrique définie et constante. Ainsi chaque ion, et donc chaque sel (couple d'ions), possède une résistance et donc une conductivité (son inverse) propre. Cette loi démontre également qu'il

existe une relation de proportionnalité entre la conductivité et la concentration de l'électrolyte. Ainsi l'utilisation de la conductivité permet la comparaison des résultats d'expériences utilisant des solutions contenant des mélanges salins différents.

Dans cette partie, nous avons choisi de travailler sans « apriori » sur les interactions impliquées dans les supports de chromatographie en mode mixte HyperCel et donc d'essayer d'observer s'il était possible de modifier ces interactions en changeant l'environnement physicochimique. Au vu de la structure des ligands HEA et PPA HyperCel, et notamment de leurs différences vis-à-vis du ligand MEP HyperCel, nous avons choisi de nous intéresser tout d'abord à la présence d'une charge positive lors de la phase d'adsorption et de son influence sur les interactions, puis aux effets hydrophobes et enfin à leurs combinaisons.

3.2. MATERIELS ET METHODES

Equipement

Les chromatographies et préparation des colonnes ont été réalisées sur des automates de purification de type AKTA Explorer ou Purifier (10 et 100), (GE Healthcare). Les mesures de pH, de conductivité et d'absorbance à 280 nm sont gérées par l'appareil.

Les mesures spectro-photométriques sont réalisées sur un appareil de type NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) sur des échantillons de 2 μ l.

Les divers tampons ont été préparés en utilisant des produits provenant de Sigma-Aldrich. Chaque solution a été filtrée sur des membranes de cellulose régénérée ou de polyamide 0,45 μ m (Sartorius Stedim Biotech) avant utilisation.

Produits chimiques

Les supports de chromatographie HEA PPA et MEP HyperCel ont été fournis par Pall Life Sciences (Cergy St christophe, France).

Matériels biologiques

Les protéines pures ont été obtenues auprès de Sigma Aldrich.

Préparation des colonnes de chromatographie

Les résines ont été paquées dans des colonnes de type Tricorn 10/50 (GE Healthcare) et LRC 10/120 (Pall) avec une hauteur de lit de 5 cm correspondant à un volume d'environ 4 ml, selon les procédures fournies. Le débit de paquage est de 1000 cm/h. Les hauteurs équivalentes à un plateau théorique (HETP) et asymétrie ont été évaluées par injection d'acétone à 5% (v/v) à raison de 1% du volume de la colonne, afin de valider le paquage des colonnes. Les résines ont été renouvelées à chaque expérience afin de limiter les contaminations.

Caractérisation des interactions

Effet de la conductivité sur les interactions en mode mixte

Les colonnes ont été équilibrées avec le tampon d'équilibration avec le nombre de volumes de colonnes nécessaires et suffisants (>10 CV). Des solutions protéiques à 3 mg/ml ont été préparées dans le tampon d'équilibration. Des volumes de 500 µl d'échantillons ont été injectés sur les colonnes.

Les tampons ont été préparés par ajout de différentes concentrations de sels au tampon d'équilibration. La conductivité et le pH ont été mesurés et ajustés si nécessaire. Pour les pH 8, 9 et 10 un tampon Tris-HCl (50 mM) a été réalisé et ajusté à chaque pH.

Pour les expériences d'adsorption des protéines à pH 8 en fonction de la concentration en sels (Table 3), l'équilibration a été réalisée avec un tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8 avec 0 M, 1 M ou 2 M de NaCl.

Pour les expériences d'élution en mode gradient (Figures 6 et 7), du Tris-HCl 50 mM pH 8 a été utilisé comme tampon d'équilibration sans ajout de sels. Un gradient linéaire de 0 à 100% du tampon d'élution a été appliqué pendant 20 volumes de colonnes. Le tampon d'élution correspond au tampon d'équilibration avec 1 M NaCl.

Pour les expériences d'élution en mode isocratique (Figure 8 à 11 et 14 à 15) le tampon d'équilibration a été maintenu durant l'expérience jusqu'à l'élution complète des protéines. Les sels de chlorure de sodium, de chlorure d'ammonium et de sulfate de sodium ont ensuite été ajoutés au tampon d'équilibration à des concentrations de 0.5 et 1 M. Le pH a été contrôlé et ajusté si nécessaire. Les conductivités ont été mesurées. Les colonnes ont ensuite été lavées avec une solution à pH acide (0.2 M acide citrique).

Pour les expériences de mesure de rétention en fonction de la conductivité (Figures 12, 13 et 16), différentes concentrations (de 0.1 à 0.5 M) de chlorure de sodium ont été ajoutées au tampon d'équilibration à pH 8.

Pour les expériences d'adsorption à pH acide à forte force ionique (Figures 17 et 18), du tampon citrate phosphate 0.1 M pH 3 avec 2 M NaCl a été utilisé pour l'équilibration. L'élution a été réalisée avec du tampon citrate phosphate 0.1 M pH 3. Un gradient linéaire de 0 à 100% du tampon d'élution en 20 CV a été appliqué.

Comparaison avec les supports d'interactions hydrophobes et ioniques.

Des résines Hexyl et Phenyl Toyopearl (Tosoh Biosciences) et Q HyperCel (Pall) ont été utilisés et paqués dans des colonnes Tricorn 5/5, avec une hauteur de lit de 5cm (volume d'environ 1ml) selon les procédures fournies. Les asymétries et HETP ont été utilisées pour évaluer le paquage des colonnes.

Pour les expériences de mesure de rétention en fonction de la conductivité (Figures 19 à 22), différentes concentrations (de 0.1 à 0.5 M) de chlorure de sodium ont été ajoutées au tampon d'équilibration Tris-HCl 50 mM pH 8.

Effet du pH

Pour les expériences de mesure de rétention en fonction du pH (Figure 23), le tampon sodium phosphate 0.1 M a été utilisé à pH 6 et le tampon Tris-HCl 50 mM pour les pH 7 à 10. Les tampons d'équilibrations ont été maintenus durant les expériences jusqu'à l'élution complète des protéines. Les colonnes ont ensuite été lavées avec une solution à pH acide (0.2 M acide citrique).

Effets du pH sur les capacités dynamiques de fixation

Les capacités dynamiques de fixations ont été mesurées à l'aide de la protéine BSA (Figure 24). Après équilibration, une solution à 3mg/ml de BSA a été appliquée de façon continue sur les colonnes jusqu'à obtention de la rupture de la fixation. Les colonnes ont ensuite été lavées avec le tampon d'équilibration jusqu'à réduction du signal UV. L'élution a été réalisée par une solution à pH acide (Acide citrique 0.2 M). Les capacités dynamiques ont été mesurées à 10% du signal maximum d'absorption de l'échantillon protéique de départ. Les expériences de capacité dynamique ont été réalisées avec trois tampons différents : un tampon citrate phosphate à pH 5.5, un tampon citrate phosphate à pH 7.3 et un tampon carbonate bicarbonate à pH 10. Pour chaque pH de tampon, trois débits ont été évalués. Les débits linéaires utilisés ont été 75, 150 et 300 cm/h, correspondant à des temps de résidence de 4, 2 et 1 minutes, respectivement.

Effet des additifs sur les interactions en mode mixte

Pour les expériences de rétention en fonction de l'ajout d'urée (Figure 26), du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 a été utilisé avec des concentrations de 1 ou 2 M d'urée.

Pour les expériences de combinaison d'urée et de sels, (Figure 27) le tampon d'équilibration Tris-HCl 50 mM pH 9a été utilisé avec 4 M d'urée. Le tampon d'élution correspond au tampon d'équilibration avec 2 M NaCl. Un gradient linéaire en 10 CV de 0 à 100% du tampon d'élution a été utilisé.

Pour les expériences d'élution par la guanidine (Figure 29), le tampon d'équilibration Tris-HCl 50 mM pH 8 a été utilisé. Le tampon d'élution Tris-HCl 50 mM pH 8 Guanidine 6 M a été utilisé pour décrocher les protéines. Un gradient linéaire en 10 CV de 0 à 100% du tampon d'élution a été utilisé. Les produits d'élutions ont été récupérés et dosés par spectrophotométrie.

Pour les expériences d'élution par l'arginine (Figures 32 et 33), le tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 avec 0 ou 1 M d'arginine a été utilisé pour l'équilibration. Un tampon d'élution Citrate 0.1 M pH 3 a été utilisé pour décrocher les protéines. Les produits élués et non retenus ont été récupérés et dosés par spectrophotométrie.

Pour les expériences de rétention en présence de glycine, le tampon Tris-HCl pH 8 50 mM avec 0 et 2 M de glycine a été utilisé. Les tampons d'équilibrations ont été maintenus durant l'expérience jusqu'à l'élution complète des protéines.

Effet de la nature des sels sur les interactions en mode mixte

Pour les expériences de rétention en fonction de la nature des sels (Figures 37 à 44), des tampons d'équilibration contenant 0.1 M et 0.3 M de chlorure de sodium, d'acétate de sodium, de sulfate de sodium, de chlorure d'ammonium, d'acétate d'ammonium, de sulfate d'ammonium, de chlorure de potassium, d'acétate de potassium et de sulfate de potassium ont été préparés. Les conductivités et pH ont été mesurés. Des solutions de lysozyme à 3 mg/ml ont été préparées avec chaque tampon d'équilibration. Des volumes de 1 ml d'échantillons ont été injectés sur les colonnes. Les tampons d'équilibrations ont été maintenus durant l'expérience jusqu'à l'élution complète des protéines.

Etude de la modification du lysozyme

Instrumentation

Un agitateur de type Blood Tube rotator SB1 de Bibby Stuart Scientific (Nemours, France) a été utilisé pour l'agitation durant la modification chimique de lysozyme à 4°C. Un agitateur orbital Infors HT (Massy, France) a été utilisé pour agitation à 25°C et 37°C.

Un spectromètre de masse LCQ Deca XP de Thermo Fisher Scientific (Villebon sur Yvette, France) a été utilisé couplé en amont d'une nano-chromatographie liquide équipée d'une colonne de dessalage et de pré-concentration C4 (μ -Precolumn™ Cartridge ; Acclaim PepMap 300 ; Øinterne 300 μ m x 5m ; LC Packings Dionex) et d'une colonne analytique C4 (C4 PepMap 300 ; Øinterne 75 μ m x 5 cm ; LC Packings Dionex). Les paramètres sont : voltage de l'aiguille (1.96V), voltage du capillaire (14V), μ scan MS: 1, μ scan MS²:1, MS range m/z: 300-2000. Solution A: 95/05/0.1 H₂O/ACN/HCOOH v/v/v, Solution B: 20/80/0.1 H₂O/CAN/HCOOH v/v/v, Gradient : 5 à 75 % en 35 minutes

Modification du lysozyme par le phenylglyoxal

La modification chimique du lysozyme a été effectuée à 4°C, 25°C et 37°C sous agitation selon différents temps. Le milieu réactionnel utilisé était composé de 120 ml de Tris-HCl 50 mM pH8 dans lequel ont été ajoutés 134 mg de phenylglyoxal et 120 mg de lysozyme. Un ratio phenylglyoxal / nombre d'arginine de 9.527 a donc été utilisé. La modification chimique de la protéine a été arrêté par élimination du réactif sur colonne d'exclusion stérique HiPrep™ 26/10 Desalting (GE Healthcare). L'échantillon a été conditionné en tampon d'équilibration lors de cette étape.

Analyse de la rétention du lysozyme modifié sur colonnes mode mixte (Figure 51)

Les colonnes mode mixte HEA et PPA HyperCel ont été équilibrées avec le tampon d'équilibration Tris-HCl 50 mM pH 8. L'échantillon de lysozyme modifié a été injecté avec un volume de 2 ml. Les colonnes ont été lavées en tampon d'équilibration afin de récupérer les protéines non retenues pendant au moins 10 CV. Puis un gradient linéaire d'élution en 20 CV a été effectué avec le tampon d'élution Phosphate Citrate 50 mM pH 3 afin de récupérer les protéines adsorbées. Les protéines non retenues et/ou éluées (pics) ont été récupérées et analysées en spectrométrie de masse.

Analyse des fractions par spectrométrie de masse

L'analyse de la masse d'une protéine entière connue a d'abord été réalisée sur le spectromètre de masse afin de valider le système LC-MS pour une évaluation des masses de différents échantillons. L'anhydrase carbonique a été utilisée et a permis l'obtention d'un spectre de source qui après déconvolution via le logiciel Bioworks 3.3.1, propose une masse très proche de la masse théorique (29021.40 ± 4 Da). La masse moyenne théorique est de 29024.6 Da, masse comprenant le clivage de l'acide aminé Methionine en position N-term et la modification post-traductionnelle N-acetylation sur la sérine en position 2.

Le système de séparation en chromatographie liquide et l'analyse en spectrométrie de masse ont donc été validées pour l'évaluation des masses des échantillons de lysozyme.

Les échantillons de lysozyme issus de nos expériences en chromatographie mode mixte ont d'abord été acidifiés par acide formique (1% final), puis 10 μ l de chaque échantillon ont été injectés sur la colonne LC. Deux blancs ont été introduits entre chaque échantillon. Les protéines détectées dans chaque échantillon sont donc bien spécifiques de l'échantillon et ne sont pas le résultat d'un phénomène de rémanence de l'injection précédente.

La masse moyenne théorique du lysozyme de poulet est de 14305.14 Da et une molécule de phenylglyoxal donne un adduit de +116 Da à la masse théorique du lysozyme. Ainsi, ont pu être définis les masses majoritaires dans chaque échantillon et le nombre de phenylglyoxal impliqués.

Evaluation de l'effet du phenylglyoxal sur les colonnes HIC et IEX (Figures 52 et 53)

Une colonne d'échange de cations Resource S (1ml) (GE Healthcare) a été utilisée. Le tampon acétate de sodium 50 mM pH 6 a été utilisé pour l'équilibration. L'élution a été induite avec un gradient linéaire en 20 volumes de colonnes avec le tampon d'élution acétate de sodium 50 mM pH 6 avec 1 M NaCl, Un débit volumique de 4 ml/min a été utilisé.

Les échantillons utilisés ont été dessalés sur colonne Hitrap Desalting de 5 ml (GE Healthcare).

Des résines d'interactions hydrophobes Hexyl et Phenyl Toyopearl (Tosoh Biosciences) ont été utilisés. Les colonnes ont été paquées dans des colonnes Tricorn 5/50 de 1ml.

Le tampon sodium phosphate 20 mM pH 7 avec 1.5 M de sulfate d'ammonium a été utilisé pour l'équilibration. L'élution a été obtenue avec un gradient linéaire en 20 volumes de colonnes avec le tampon d'élution sodium phosphate 20 mM pH 7. Un débit de 1 ml/min a été utilisé.

Les échantillons ont été conditionnés dans le tampon d'équilibration par dilution au demi avec du tampon sodium phosphate 20 mM pH 7 avec 3 M de sulfate d'ammonium.

Evaluation de la sélectivité

Elution par le pH

Des mélanges d' α -chymotrypsinogène, de lysozyme, d'ovalbumine, et de BSA ont été réalisés dans le tampon d'équilibration à une concentration finale de 2mg/ml. Le tampon d'équilibration sodium phosphate 0.2 M NaCl 0.2 M pH 7.4 a été utilisé. Le tampon de lavage Sodium Phosphate 0.2 M pH 5 a été utilisé. Le tampon d'élution citrate phosphate 0.2 M à pH 2.8 a été utilisé. Une première étape d'élution a été réalisée avec le tampon de lavage, puis un gradient de 0 à 100% du tampon d'élution a été réalisé en 30 CV.

Elution par la guanidine.

Le même mélange protéique a été réalisé et utilisé à pH 8 avec un tampon d'équilibration Tris-HCl 50 mM pH 8. Un gradient linéaire de 0 à 100% du tampon d'élution a été réalisé en 20 CV. L'élution a été réalisée avec du Tris HCl 50 mM Guanidine 6 M.

3.3.EFFET DU SEL SUR LES INTERACTIONS MODE MIXTE

3.3.1. LORSQUE LE PI DES PROTEINES EST INFERIEUR AU PH

Des expériences de chromatographie en mode mixte avec les résines HEA et PPA HyperCel ont été réalisées avec des protéines standards dans des conditions de pH supérieur à leur point isoélectrique (pI) et des conditions de conductivité de l'ordre de 3 mS/cm correspondant au tampon d'utilisation sans ajout de sels.

Les protéines utilisées sont : la sérum albumine bovine (BSA) avec un pI ~ 5.2, la catalase (pI ~ 6.8), l'ovalbumine (pI ~ 5.0), et l'ovotransferrine (pI ~ 6.8). Les points isoélectriques sont théoriques et calculés à partir de la séquence primaire de ces protéines obtenue sur la base de données Uniprot. Les caractéristiques de ces protéines sont présentées sur la **figure 5**.

Malgré l'incertitude associée au calcul théorique des points isoélectriques, ne tenant pas compte de la localisation tridimensionnelle des acides aminés ainsi que de l'influence de l'environnement sur les constantes de dissociations (pKa), on peut proposer que lorsque le pH du tampon utilisé est supérieur au point isoélectrique d'une protéine, la charge globale nette à la surface de la protéine doit être négative.

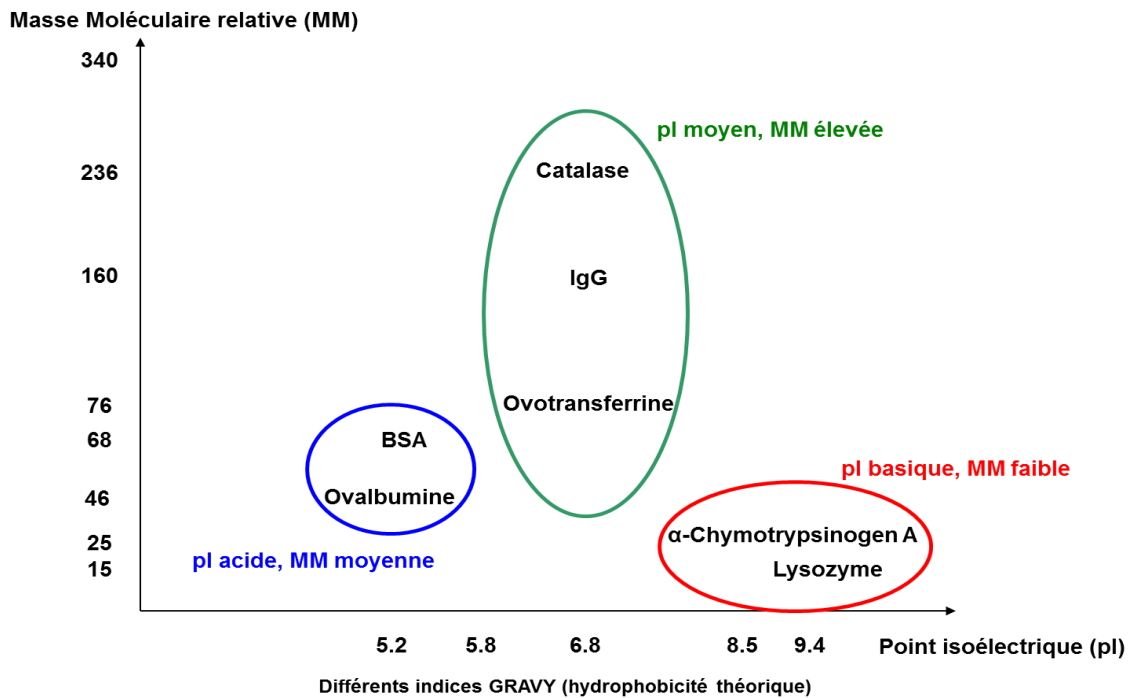


FIGURE 5. REPRESENTATIONS DES PROPRIETES DES PROTEINES STANDARDS UTILISEES

Dans une condition de pH donnée, on peut même estimer par le calcul les charges nettes théoriques en utilisant les constantes de dissociations des groupements acido-basiques des chaînes latérales des acides aminés ionisables et des extrémités protéiques (**Table 1**). En effet, le pKa d'un résidu correspond au pH d'équilibre entre la forme protonée et déprotonée. Ainsi, en utilisant l'équation de Henderson-Hasselbalch [Tanford *et al.*, 1957.], on peut estimer algébriquement la fraction de résidus chargés positivement ou négativement (selon leur état acido-basique) pour un pH donné. Puis, connaissant par la séquence primaire la représentativité de chaque résidu, on peut estimer la charge globale de la protéine. Ces charges sont de -9.6, -4.2, -12, -26.1, -14, à pH 8 pour l'ovotransferrine, la catalase, la BSA et l'ovalbumine, respectivement (**Table 2**).

TABLE 1. PROPRIETES DES GROUPEMENT ACIDO-BASIQUES DES PROTEINES

| | Nom | pK | Charge |
|-----------------------|--------------------|-----|--------|
| H | Histidine | 6.5 | + / N |
| K | Lysine | 10 | + / N |
| R | Arginine | 12 | + / N |
| D | Acide aspartique | 4.4 | N / - |
| E | Acide Glutamique | 4.4 | N / - |
| Y | Tyrosine | 10 | N / - |
| NH₂ | Amine terminale | 8 | + / N |
| COOH | Acide carboxylique | 3.1 | N / - |

(N : Neutre ; + : chargé positivement ; - : chargé négativement)

TABLE 2. CHARGE NETTE (NOMBRE) THEORIQUE DES PROTEINES STANDARDS SELON LE PH

| pH | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-------------------------------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|
| Ovotransferrine | 76.2 | 28.9 | 10.2 | 1.0 | -9.6 | -33.6 | -73.8 |
| Catalase | 66.1 | 32.9 | 16.8 | 2.7 | -4.2 | -11.4 | -32.7 |
| BSA | 70.9 | 19.4 | -1.8 | -13.9 | -26.1 | -51.6 | -91.6 |
| Ovalbumine | 28.7 | 4.2 | -5.6 | -10.5 | -14.0 | -20.2 | -34.0 |
| α -chymotrypsinogène-A | 16.1 | 8.8 | 5.8 | 4.1 | 1.0 | -6.1 | -15.7 |
| Lysozyme | 16.5 | 11.8 | 9.9 | 8.9 | 6.3 | 0.4 | -5.3 |

Lors des expériences de chromatographie utilisant ces protéines standards à pH 8 et les résines en mode mixte HEA et PPA HyperCel, nous observons une adsorption efficace de ces protéines sur les deux supports de chromatographie (Table 3). Ces protéines ayant été adsorbées dans des conditions de très faible force ionique, on peut envisager l'intervention de mécanismes électrostatiques entre les surfaces des protéines putativement négatives et les supports HyperCel chargés positivement à pH 8.

TABLE 3. RECAPITULATIF D'ADSORPTION DE PROTEINES STANDARDS SUR HEA ET PPA HYPERCEL EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SELS A PH 8

| | HEA HyperCel / PPA HyperCel | | |
|-----------------------|-----------------------------|------------|------------|
| | 50 mM Tris pH 8 | + 1 M NaCl | + 2 M NaCl |
| BSA | ✓/✓ | ✓/✓ | ✓/✓ |
| Ovotransferrine | ✓/✓ | ✓/✓ | ✓/✓ |
| Ovalbumine | ✓/✓ | ✓/✓ | ✓/✓ |
| IgG | ✓/✓ | ✓/✓ | ✓/✓ |
| Catalase | ✓/✓ | ✓/✓ | ✓/✓ |
| Lysozyme | x/x | ✓/✓ | ✓/✓ |
| A-chymotrypsinogène A | x/✓ | ✓/✓ | ✓/✓ |

On peut donc proposer le concours de forces d'attractions électrostatiques dans le mécanisme d'interaction des supports mode mixte HEA et PPA HyperCel. Par contre, l'ajout de grandes quantités de sels après fixations des protéines n'entraîne pas l'élution de ces protéines (voir l'exemple **Figure 6**). De même, l'adsorption de ces protéines est obtenue lorsque l'on utilise des solutions contenant déjà ces fortes quantités de sels (**Figure 7**)

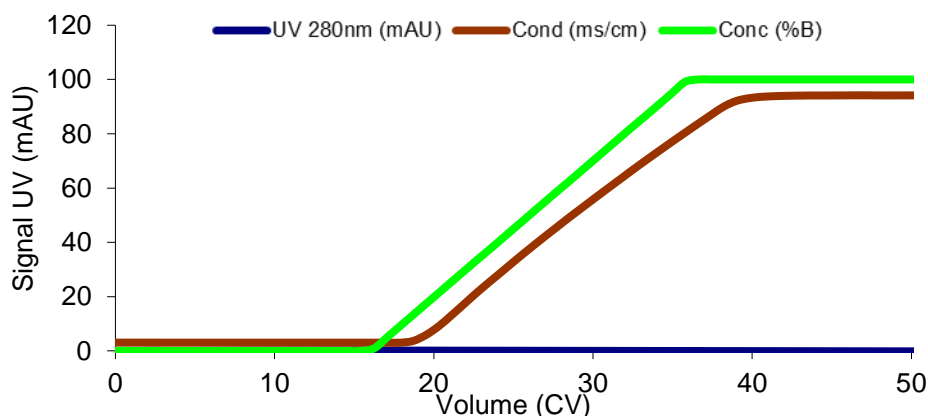


FIGURE 6. CHROMATOGRAMME D'ADSORPTION DE LA CATALASE SUR LA RESINE HEA HYPERCEL EN ABSENCE DE SELS

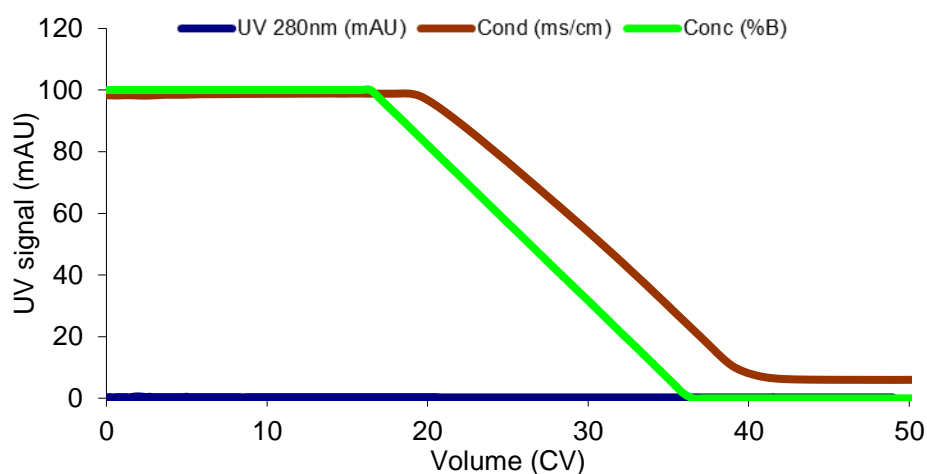


FIGURE 7. CHROMATOGRAMME D'ADSORPTION DE LA BSA SUR PPA HYPERCEL EN PRESENCE DE SELS

Le comportement de fixation des résines en mode mixte avec ces protéines est dits tolérant aux sels. On obtient alors la fixation de ces protéines quelle que soit la concentration saline. C'est ce que nous avons observé pour l'ensemble des protéines (**Table 3**). Connaissant l'effet antagoniste des sels sur les interactions électrostatiques, nous pouvons clairement envisager que ces interactions ne sont pas uniques et que d'autres interactions sont impliquées dans l'adsorption de ces protéines.

3.3.2. LORSQUE LE PI DES PROTEINES EST PROCHE DU PH

Pour évaluer plus efficacement les mécanismes d'interactions des résines mode mixte, nous avons choisi de nous placer dans des conditions où les interactions entre les protéines et les supports sont « limites » et où l'on peut aisément et directement observer l'influence des changements de l'environnement.

Pour cela, nous avons tout d'abord choisi une autre protéine, l' α -chymotrypsinogène-A, qui est une protéine de faible masse moléculaire, contenant un nombre élevée d'acide aminés hydrophobes d'où son indice GRAVY de 0.051 (plus l'indice est positif plus la molécule est apolaire, **Table 4**, [Kyte and Doolittle, 1982]). Cette protéine possède un pI théorique d'environ 8.5. Utilisant toujours un tampon à pH 8, nous nous trouvons dans une condition où le pH est proche du pI de la protéine. Néanmoins, même si la charge nette de la protéine est proche de 0, le nombre de charges positives et négatives présentes à la surface est loin d'être négligeable. Dans ces conditions, les protéines ont également tendance à des modifications structurales qui réduisent la solubilité et exposent certains groupements apolaires ce qui augmentent l'hydrophobicité [Xia et al., 2005].

TABLE 4. INDICE GRAVY DES ACIDES AMINES

| | Nom | Gravy | | Nom | Gravy |
|---|---------------|-------|---|-------------|-------|
| I | Isoleucine | 4.5 | W | Tryptophane | -0.9 |
| V | Valine | 4.2 | Y | Tyrosine | -1.3 |
| L | Leucine | 3.8 | P | Proline | -1.6 |
| F | Phenylalanine | 2.8 | H | Histidine | -3.2 |
| C | Cysteine | 2.5 | E | Ac. Glu. | -3.5 |
| M | Methionine | 1.9 | Q | Glutamate | -3.5 |
| A | Alanine | 1.8 | D | Ac. Asp. | -3.5 |
| G | Glycine | -0.4 | N | Aspartate | -3.5 |
| T | Threonine | -0.7 | R | Lysine | -3.9 |
| S | Serine | -0.8 | | Arginine | -4.5 |

Lorsque l'on met l' α -chymotrypsinogène-A en contact avec la résine HEA HyperCel, on observe qu'elle interagit avec le ligand et est très fortement retardée dans la colonne. Elle n'est cependant pas adsorbée de façon stable (**Figure 8**). On observe des temps de rétention supérieurs à 8 volumes de colonnes (CV).

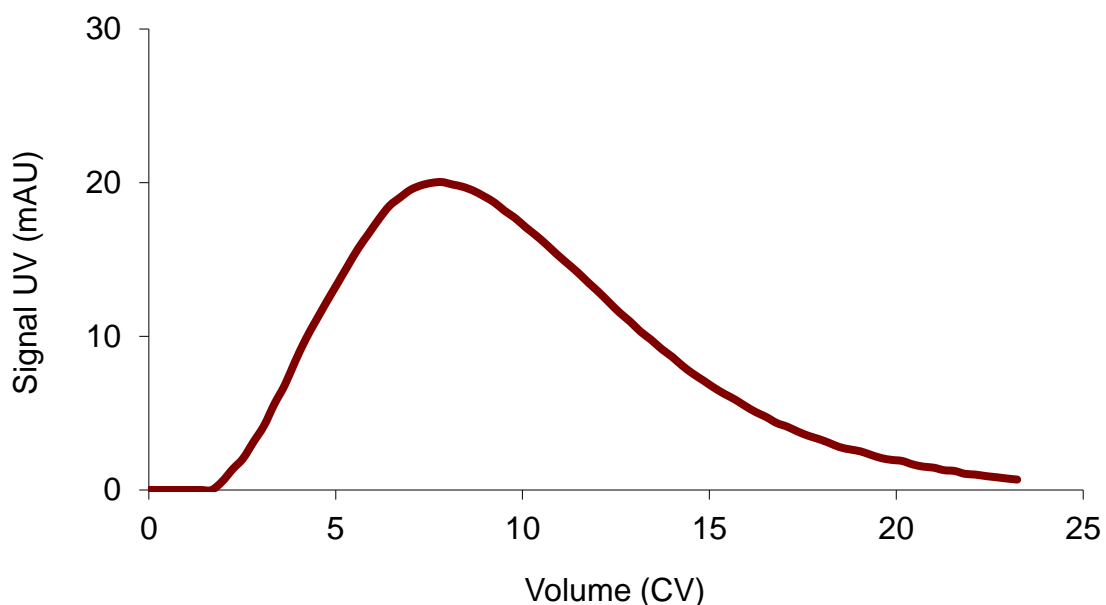


FIGURE 8. CHROMATOGRAMME D'INTERACTION DE RETENTION DE L' α -CHYMOTRYPSINOGENE-A SUR HEA HYPERCEL SANS SELS

Dans un tampon à pH 8 et de très faible force ionique, avec un pI de 8.5, la charge nette de la protéine est faible (+1). Malgré cette charge globale légèrement positive, la protéine présente des charges positives et négatives à sa surface. Il peut donc y avoir attraction électrostatique entre le ligand et les zones négatives à la surface de la protéine. Inversement, il peut y avoir répulsion entre le ligand et des charges positives de la protéine. Ceci pourrait expliquer la rétention partielle de la protéine. Cependant, on peut également proposer la présence d'interactions hydrophobes qui interviendraient même à très faible force ionique.

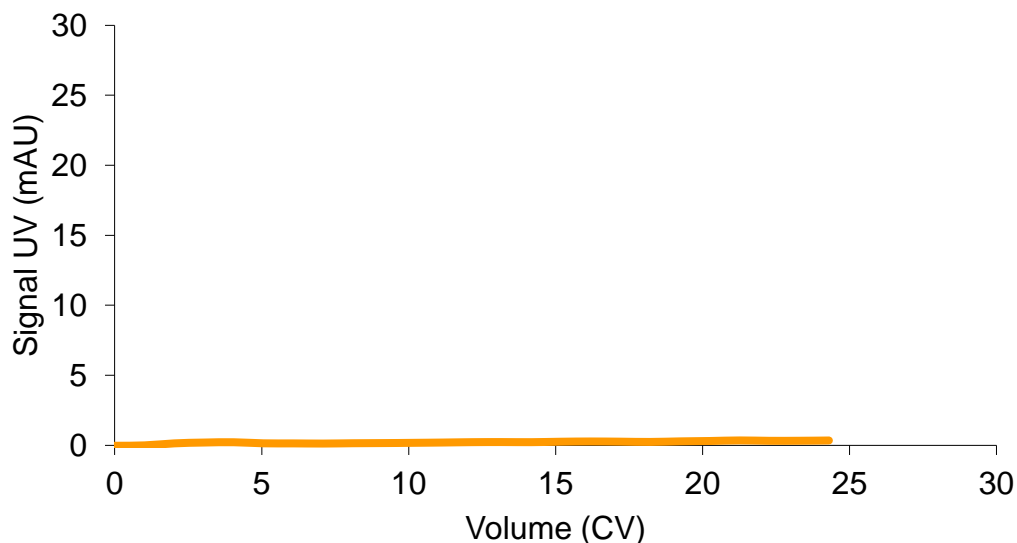


FIGURE 9. CHROMATOGRAMME D'ADSORPTION DE L'A-CHYMOTRYPSINOGENE-A SUR HEA HYPERCEL EN PRESENCE DE 0.5M DE SULFATE D'AMMONIUM

Lorsque l'on ajoute des sels au tampon, on modifie assez sensiblement le comportement de rétention de la protéine. En effet, l'ajout de 0,5 M de sulfate d'ammonium favorise très largement l'interaction de la protéine avec le support de chromatographie et permet son adsorption totale (**figure 9**).

Connaissant l'influence des sels et notamment du sulfate d'ammonium sur les interactions hydrophobes et au vu de la structure du ligand, il est raisonnable de penser que l'ajout de sels a permis l'implication forte de ces interactions dans le mécanisme d'adsorption. Nous avons observé une rétention partielle en absence de sels, il existait donc un mécanisme qui limitait l'adsorption. Les charges positives à la surface de la protéine pourraient être responsables de la répulsion. L'ajout de sels a donc permis de lutter contre cette répulsion et de favoriser les interactions hydrophobes. L'hypothèse précédemment établie faisait état d'un équilibre entre attraction / répulsion qui entraînait la rétention partielle de la protéine. En présence de sels, l'hypothèse n'est plus valable. L'adsorption totale de la protéine est donc principalement due à des interactions hydrophobes, dans cette situation.

Néanmoins l'ajout de la même concentration en sels, de chlorure d'ammonium, nous ramène à la situation « sans sels » avec une rétention partielle (longue) mais pas de réelle adsorption (**Figure 10**). On peut supposer que les interactions hydrophobes ont été favorisées de façon plus importante en présence de sulfate d'ammonium que de chlorure d'ammonium. Le sulfate d'ammonium est couramment décrit comme un sel très efficace dans la promotion des interactions hydrophobes [Jakobi, 1971]. La différence de conductivité entre les deux solutions salines est également à prendre en compte (différence de conductivité de 20 mS/cm). Le même comportement est retrouvé en utilisant du chlorure de Sodium (NaCl).

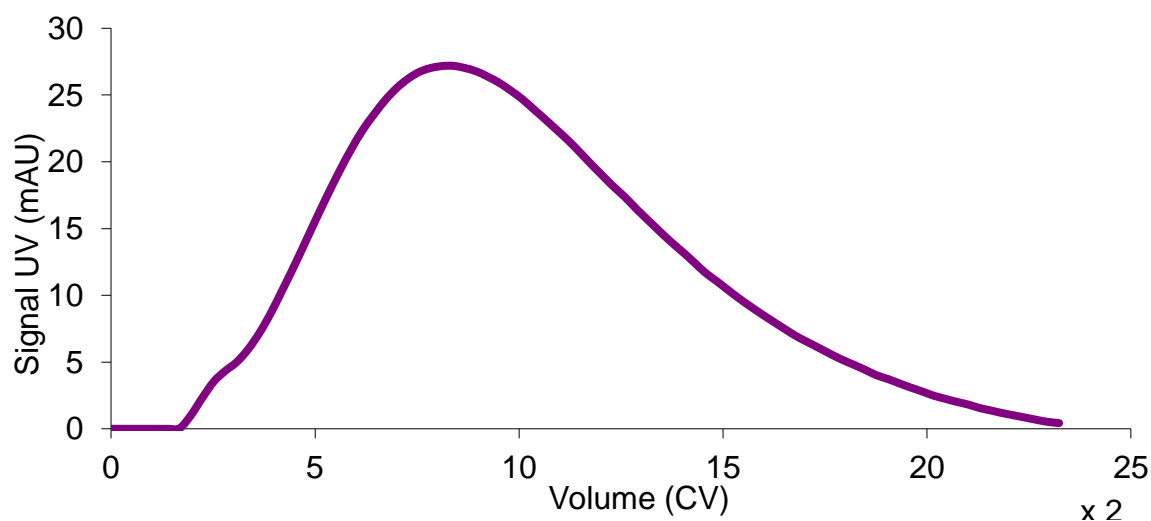


FIGURE 10. CHROMATOGRAMME DE RETENTION DE L'A-CHYMOTRYPSINOGENE-A SUR HEA HYPERCEL EN PRESENCE DE 05 M DE CHLORURE D'AMMONIUM

L'utilisation d'une concentration encore plus importante (1M) de sels de type chlorure de sodium ou d'ammonium permet l'adsorption efficace de la protéine sur les supports (**Figure 11**). Ainsi des concentrations salines plus élevées sont nécessaires pour favoriser l'interaction de la protéine et son adsorption.

Ces observations sont similaires à celles réalisées traditionnellement en chromatographie d'interaction hydrophobe classique. De plus, ces résultats nous permettent d'observer une différence importante au niveau du type de sels utilisé. Nous aborderons ceci en détails dans la suite de cette étude. Néanmoins, ils mettent en évidence l'intervention significative, dans le mécanisme de chromatographie en mode mixte, d'interactions hydrophobes dans des conditions salines modérées (0.5 M).

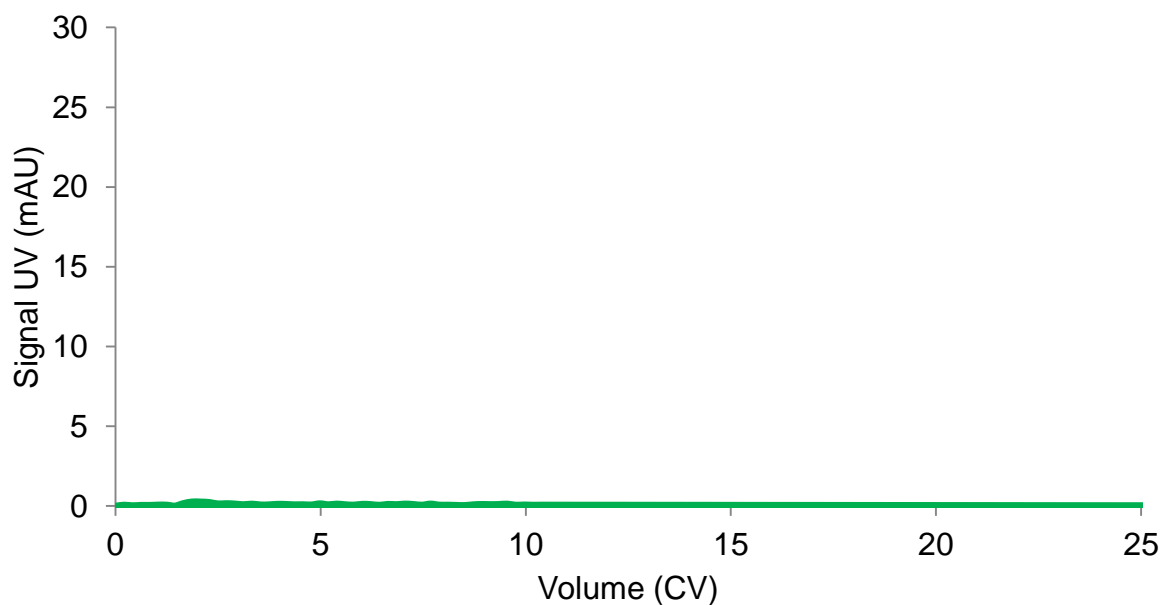


FIGURE 11. CHROMATOGRAMME DE RETENTION DE L'A-CHYMOTRYPSINOGENE-A SUR HEA HYPERCEL EN PRESENCE DE 1 M DE CHLORURE D'AMMONIUM

Connaissant l'influence des sels à la fois sur les interactions électrostatiques et hydrophobes, nous avons cherché à étudier plus finement le comportement de cette protéine en fonction de la concentration en sels. Nous avons ainsi mesuré les temps de rétention en fonction de concentrations croissantes de chlorure de sodium ici exprimées en conductivité (**Figure 12**).

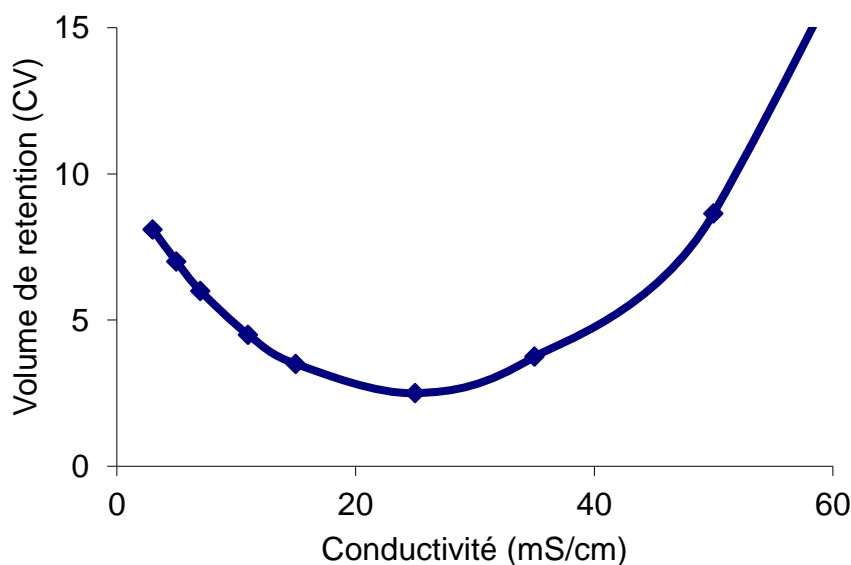


FIGURE 12. INFLUENCE DE LA CONDUCTIVITE SUR LA RETENTION DU CHYMOTRYPSINOGENE-A SUR LA RESINE HEA HYPERCEL

Nous observons tout d'abord comme précédemment une forte rétention en condition de très faible force ionique (plus de 8 CV, à 3 mS/cm). Lorsque la concentration en sels est augmentée, intervient une nette diminution du temps de rétention jusqu'à une valeur minimale (3 CV), puis à mesure que la quantité de sels augmente le temps de rétention augmente également de façon importante. On distingue alors une courbe de rétention en fonction de la concentration en sels en forme de U (**Figure 12**). Ce type de courbe est typique de l'implication d'interactions multimodales. [Kennedy *et al.* 1986 ; Melander *et al.* 1989].

A faible concentration ionique, les interactions électrostatiques entre les zones négatives de la protéine et le support chargé positivement sont possibles et doivent participer à la rétention importante sur la colonne. A mesure que la concentration en sel augmente, ces forces d'attractions sont perturbées, l'interaction entre la protéine et le ligand diminue et le temps de rétention est réduit. Puis dès lors que la concentration en sels devient suffisante, ils participent à favoriser les interactions hydrophobes entre les protéines et le support de chromatographie. Ces interactions deviennent prépondérantes, les temps de rétention deviennent ainsi bien plus importants à mesure que la concentration augmente jusqu'à permettre une adsorption efficace. Donc, lorsque la conductivité augmente, l'interaction hydrophobe supplante l'interaction électrostatique.

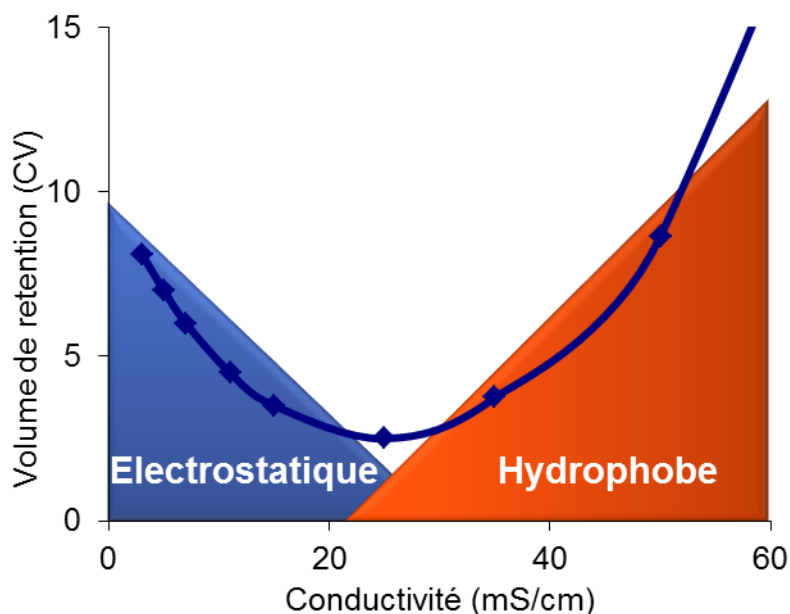


FIGURE 13. PROPOSITION D'EVOLUTION DES INTERACTIONS ENTRE UN SUPPORT MODE MIXTE ET UNE PROTEINE EN FONCTION DE LA CONDUCTIVITE

On peut ainsi décrire le comportement d'interactions entre la protéine et le ligand mode mixte comme une succession d'interactions électrostatiques et hydrophobes guidées par la force ionique. (**Figure 13**). Le minimum d'interaction dépend du type de sels et de la protéine.

La comparaison des résines montre PPA HyperCel ne présente pas le même comportement que HEA HyperCel. En effet la protéine est totalement adsorbée sur la résine à faible force ionique et l'ajout de sels ne modifie pas cette adsorption. Sachant que ces deux résines présentent les mêmes caractéristiques en termes de charge, mais qu'elles diffèrent par leurs groupements « hydrophobes », on peut proposer que ces derniers soient responsables de cette différence. Les interactions hydrophobes sur la résine PPA HyperCel semblent donc possibles et suffisantes même à faible force ionique.

3.3.3. LORSQUE LE pI DES PROTEINES EST SUPERIEUR AU pH

Nous avons ensuite étudié le cas d'une protéine basique avec un pI supérieur au pH d'expérimentation. Cette protéine, le lysozyme possède un pI théorique calculé à partir de la séquence primaire autour de 9.3, le pI expérimental étant généralement décrit comme plus proche de 11 [Kuehner *et al.*, 1999] du fait d'une exposition importante des résidus positifs à la surface [Hernández-Hernández *et al.*, 2008]. Le tampon utilisé est toujours à pH 8. De façon non surprenante, cette protéine n'est pas adsorbée, ni même retenue sur les résines HEA et PPA HyperCel lorsque l'on utilise un tampon sans sels (**Figure 14**). La protéine traverse donc la colonne sans interagir. A pH 8 la charge nette de la protéine est d'environ +6.3 (**Table 2**), ce qui peut donc expliquer une répulsion de charge entre deux surfaces majoritairement positives.

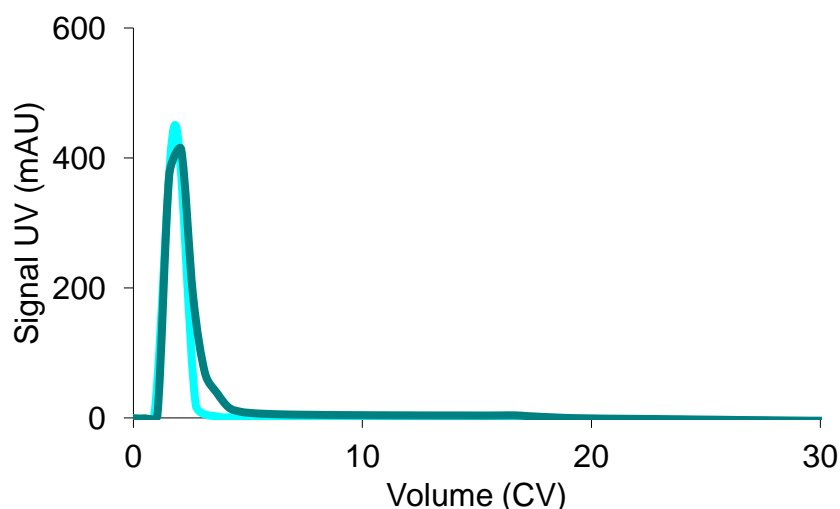


FIGURE 14. CHROMATOGRAMME DE RETENTION DU LYSOZYME SUR HEA HYPERCEL ET PPA HYPERCEL (COURBE BLEU ET VERTE RESPECTIVEMENT)

Cependant, même avec l'augmentation du pH à 9, donnant une charge nette proche de 0 (0.4), la rétention n'est pas modifiée. Un accès limité aux résidus négatifs à la surface, une faible hydrophobicité, ou une forte présence de charges positives peut expliquer ce comportement. En effet le lysozyme possède 11 arginine dont le pKa de la chaîne latérale est supérieur à 12 et 6 lysines dont le pKa est de 10. Ces résidus présentent donc des charges positives quasi permanentes. On peut envisager une répulsion de charge intervenant même à des pH où la charge globale nette est favorable. Nous aborderons plus spécifiquement cette problématique dans la suite du document.

L'ajout des mêmes sels que précédemment, à savoir le sulfate d'ammonium et le chlorure d'ammonium donnent des résultats relativement différents sur la résine HEA HyperCEL (**Figure 15**). En effet l'interaction est largement augmentée entre les résines et le lysozyme, mais la différence entre les sels est nettement plus faible. Le sulfate d'ammonium ne favorise pas beaucoup plus l'interaction que le chlorure d'ammonium. On peut donc penser que dans ce cas l'effet des sels est d'avantage de lutter contre la répulsion de charge, plutôt que de favoriser l'interaction hydrophobe. L'ajout de ces mêmes concentrations de sels, sur la résine PPA HyperCel entraîne l'adsorption efficace de la protéine.

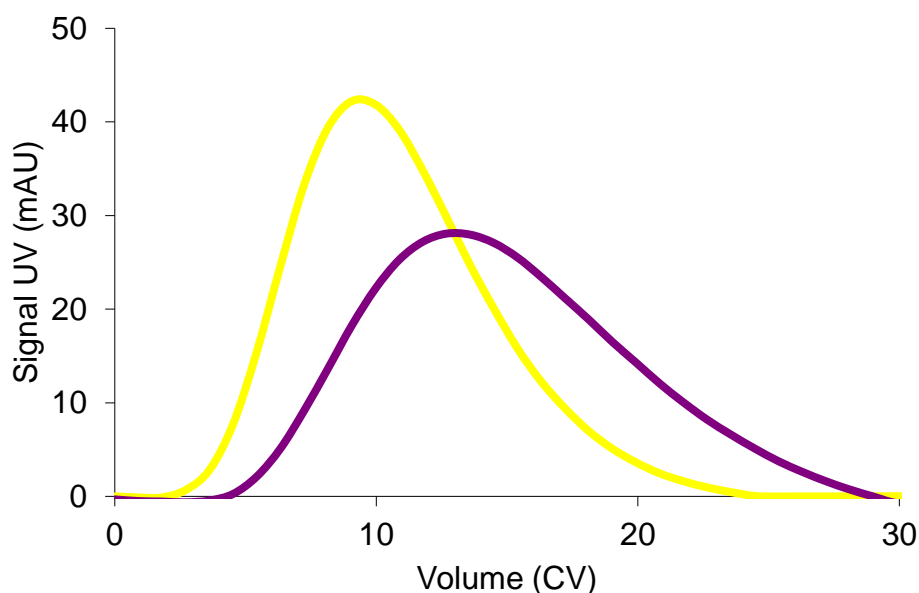


FIGURE 15. CHROMATOGRAMME DE RETENTION DU LYSOZYME SUR HEA HYPERCEL EN PRESENCE DE 0.5 M DE CHLORURE D'AMMONIUM ET DE SULFATE D'AMMONIUM (COURBE JAUNE ET BLEU, RESPECTIVEMENT).

Lorsque l'on détaille l'influence des sels sur les interactions, nous observons que lorsque la concentration en sels augmente (exprimée ici par l'augmentation de la conductivité), le temps de rétention augmente sensiblement (**Figure 16**). Les sels permettent donc une réduction de la répulsion électrostatique intervenant entre les ligands mode mixte des supports de chromatographie HEA et PPA HyperCel et la protéine chargée positivement.

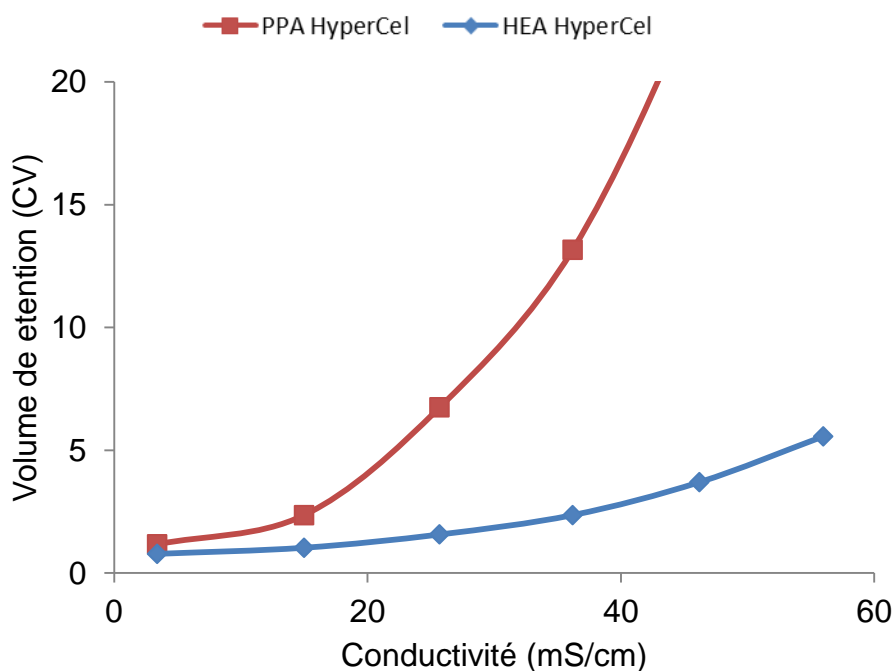


FIGURE 16. INFLUENCE DE LA CONDUCTIVITE SUR RETENTION DU LYSOZYME SUR LES RESINES HEA ET PPA HYPERCEL

Il est à noter que l'influence de la concentration en sels sur la rétention est résine-dépendante. En effet, la résine PPA HyperCel est plus sensible que la résine HEA HyperCel à l'influence du sel. Ces résines ayant le même caractère électrostatique mais différant par leur partie hydrophobe, ces résultats nous montrent l'influence de cette dernière et par conséquent l'évidence d'un effet hydrophobe au sein de l'interaction. Le ligand PPA grâce à la combinaison de groupes aryles et alkyles est plus hydrophobe est plus facilement influencé par l'ajout de sels.

De plus, lorsque l'on utilise des pH acides, le pH devient inférieur au pI de l'ensemble des protéines. Les répulsions de charges interviennent de façon importante et l'on obtient généralement l'éluion. Néanmoins, les interactions en mode mixte par l'intermédiaire des sels peuvent ici aussi être modifiées. Il est ainsi possible grâce à l'ajout de grande quantité de sels (2 M NaCl) d'adsorber une protéine comme la BSA ou l'ovalbumine à pH acide (pH 3). (**Figure 17 et 18**).

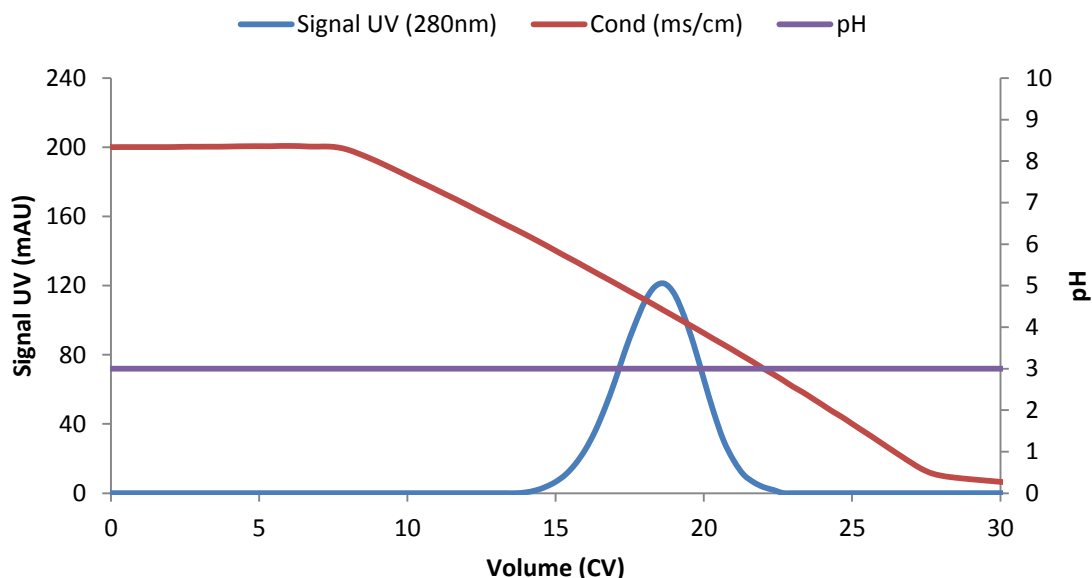


FIGURE 17. CHROMATOGRAMME D'ADSORPTION DE LA BSA A PH 3 SUR HEA HYPERCEL

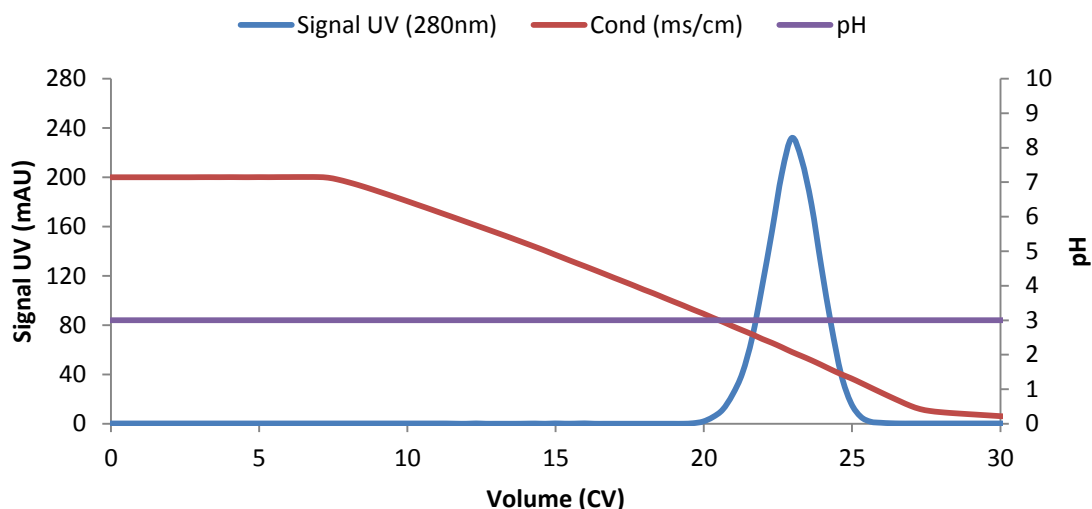


FIGURE 18. CHROMATOGRAMME D'ADSORPTION DE LA BSA A PH 3 SUR PPA HYPERCEL

Il est également possible de passer d'un pH d'adsorption favorable (pH 8) sans sels, à un pH acide (défavorable) avec sels, sans observer de perte de l'interaction et de la protéine. La répulsion de charges électrostatiques induite par le pH acide, est contrebalancée par l'augmentation des interactions hydrophobes favorisées par l'ajout de grande quantité de sels.

La balance entre les différentes interactions est donc directement influencée et contrôlée par l'environnement.

3.3.4 COMPARAISON AVEC LES SUPPORTS CLASSIQUES

On peut ainsi comparer les résines mode mixte HEA, PPA et MEP HyperCel avec les supports de chromatographie classiques d'interactions hydrophobes et d'interactions ioniques.

Les supports choisis ont été :

- un échangeur d'anions composé d'une amine quaternaire chargé positivement et basé sur une matrice HyperCel similaire (Q HyperCel).
- un support de chromatographie HIC de type phenyl (pour comparaison avec le ligand mode mixte PPA).
- un support de chromatographie HIC de type hexyl (pour comparaison avec le ligand mode mixte HEA).

Quelles que soient les protéines étudiées (acide, basique, « grande », « petite ») les supports HIC ne retiennent ni n'adsorbent les protéines lorsque la concentration en sels n'est pas considérablement élevée (**Figure 19 à 22**). En effet des concentrations en chlorure de sodium de l'ordre de 2 M sont nécessaires pour observer une modification de la rétention.

Les supports mode mixte au contraire, que ce soit HEA, PPA et MEP HyperCel, adsorbent parfaitement indépendamment de la concentration en sels, des protéines comme des immunoglobulines G, la BSA, et l' α -chymotrypsinogène-A (**Table 3**). Les supports de chromatographie en mode mixte ne sont donc clairement pas de simples supports hydrophobes.

Lorsque l'on utilise un support échangeur d'anions, on observe que celui-ci n'interagit qu'avec la protéine acide BSA, dans des conditions de pH nettement supérieur au pI (donc avec une protéine majoritairement chargée négativement). Et lorsque l'on ajoute une très faible quantité de sels, l'interaction chute dramatiquement. Les quantités de sels nécessaires pour perturber l'interaction ionique sont faibles. Cette protéine est adsorbée efficacement sur HEA et PPA HyperCel, quelle que soit la conductivité. Les supports mode mixte ne sont pas non plus des échangeurs d'ions simples.

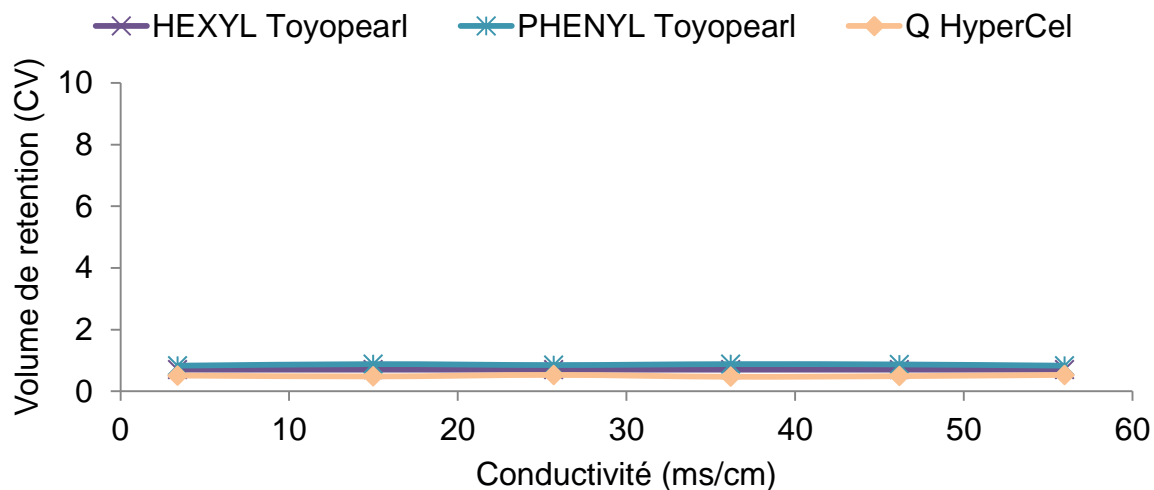


FIGURE 19. INFLUENCE DE LA CONDUCTIVITE SUR LA RETENTION DE L'A-CHYMOTRYPSINOGENE-A SUR DES RESINES HYDROPHOBES ET IONIQUE

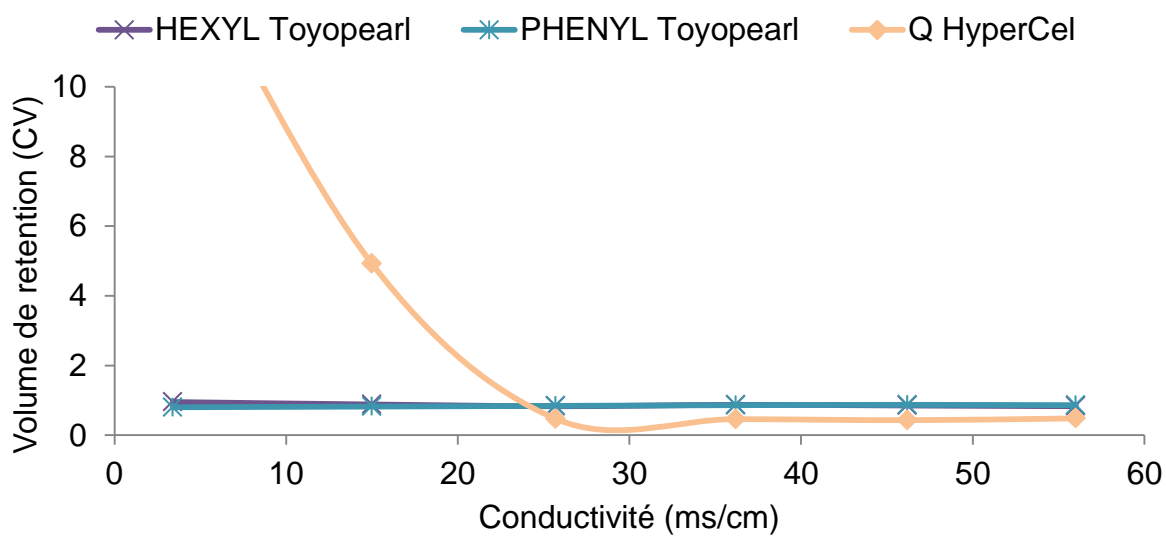


FIGURE 20. INFLUENCE DE LA CONDUCTIVITE SUR LA RETENTION DE LA BSA SUR DES RESINES HYDROPHOBES ET IONIQUE

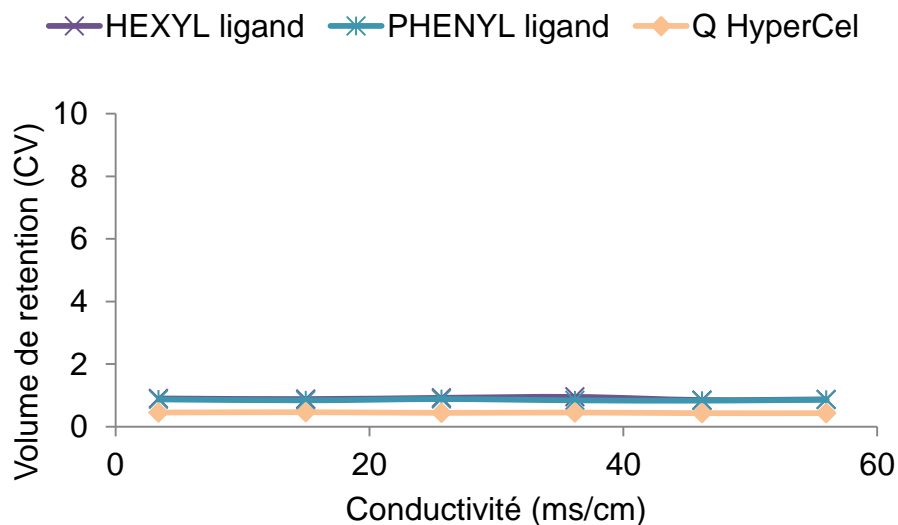


FIGURE 21. INFLUENCE DE LA CONDUCTIVITE SUR LA RETENTION DU LYSOZYME SUR DES RESINES HYDROPHOBES ET IONIQUE

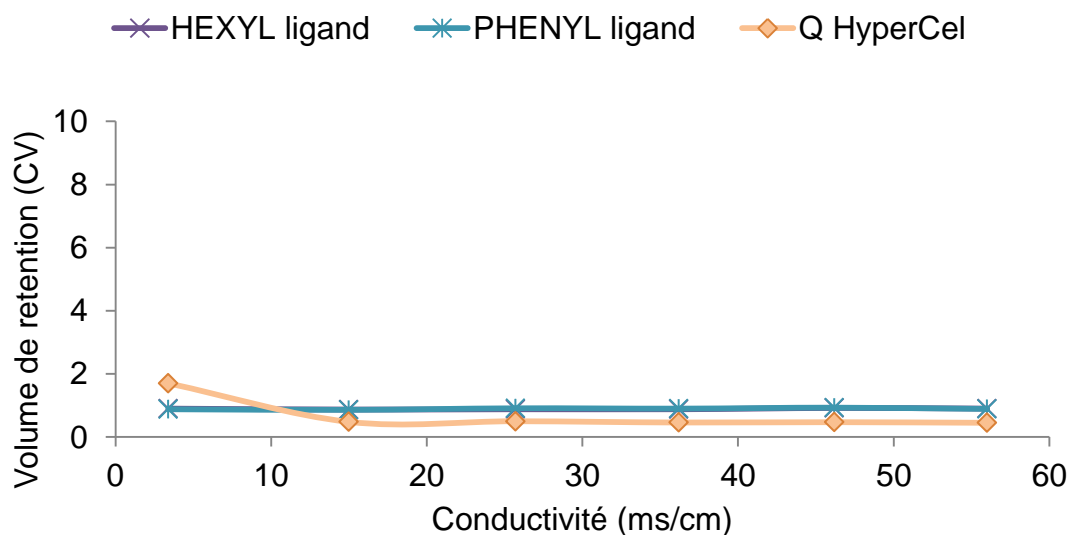


FIGURE 22. INFLUENCE DE LA CONDUCTIVITE SUR LA RETENTION D'IMMUNOGLOBULINE SUR DES RESINES HYDROPHOBES ET IONIQUE

Les résines de chromatographie en mode mixte HEA et PPA HyperCel font donc intervenir une combinaison d'interactions à chaque instant et en chaque situation. C'est la balance entre ces interactions qui doit permettre de contrôler et d'utiliser les résines en mode mixte lors de la purification de protéines.

3.4.EFFET DU PH SUR LES INTERACTIONS MODE MIXTE

Au travers des différentes caractéristiques des protéines standards utilisées nous avons observé que le pH est un paramètre extrêmement important. Il a un effet sur les interactions mises en jeu par les supports en mode mixte et il va guider leurs mécanismes.

Lorsque la concentration en sels est faible, les interactions électrostatiques sont potentiellement visibles et utilisables. C'est pourquoi nous nous sommes placés dans ces conditions. De manière générale, lorsque l'on augmente le pH, on observe l'augmentation des temps de rétentions, jusqu'à obtenir l'adsorption de la protéine α -chymotrypsinogène-A (**Figure 23**). En effet, lorsque le pH est très inférieur au pI, il y a répulsion de charge et non adsorption. La rétention est faible voire quasi nulle. Lorsque le pH se rapproche du pI de la protéine, la charge nette se rapproche de zéro, et des temps de rétention importants sont observés. Lorsque le pH passe au-dessus du pI, la protéine se charge négativement, et l'adsorption est totale.

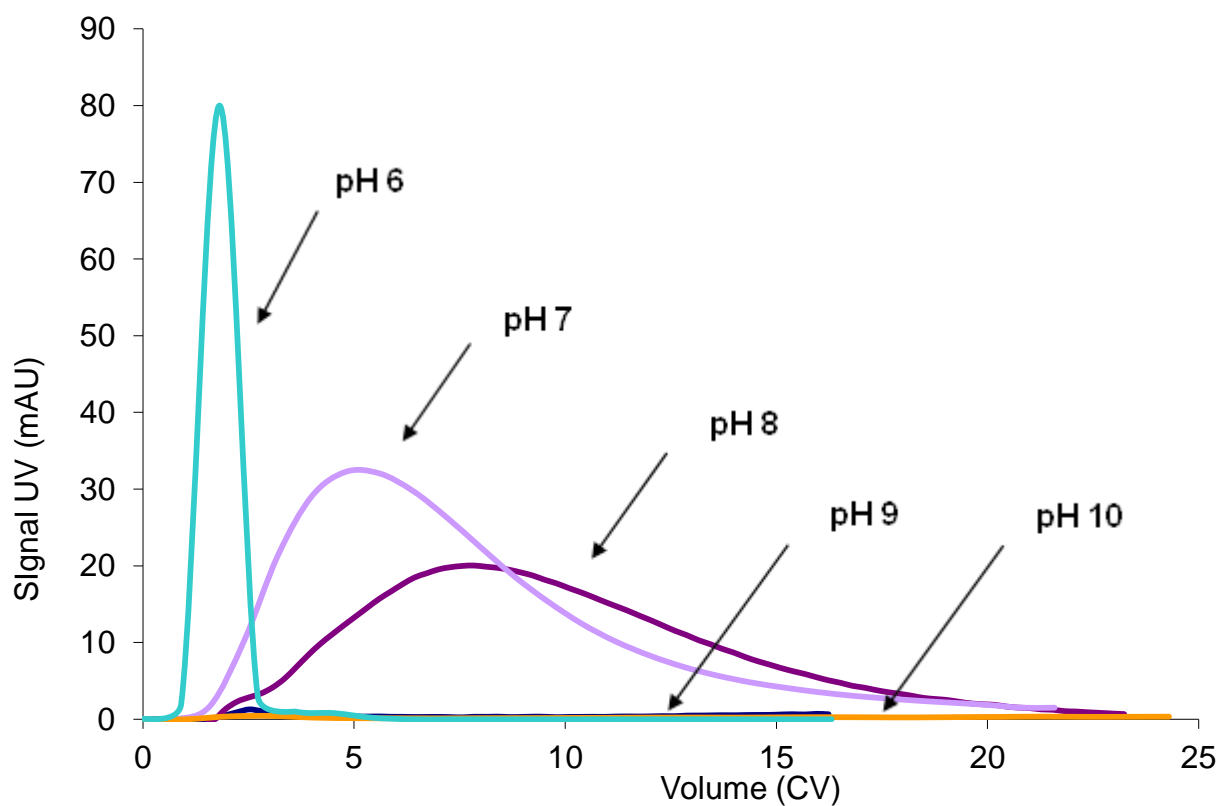


FIGURE 23. INFLUENCE DU PH SUR LA RETENTION DE L' α -CHYMOTRYPSINOGENE-A SUR LA RESINE HEA HYPERCEL

Le pH peut également agir à différents niveaux. Dans un premier temps, le pH va permettre de réguler les charges présentes à la surface des protéines. Mais, dans certains cas particuliers, le pH va agir au niveau des ligands mode mixte eux même en modifiant leurs charges. En effet, en utilisant des pH élevés, dépassant le pKa du ligand, la charge du ligand est modifiée et réduite.

A pH 6, l' α -chymotrypsinogène-A possède une charge nette théorique d'environ +6, elle n'est pas retenue sur la colonne. La répulsion de charge est plus importante que « l'attraction » hydrophobe. A pH 7, la charge nette passe à +4 et la protéine est d'avantage retenue du via les effets hydrophobes avec le ligand mode mixte. A pH 8 la charge est de +1 et la protéine est très fortement retardée sur le support de chromatographie en mode mixte HEA. La combinaison de charges favorables, de charges défavorables et d'interactions hydrophobes induit la rétention. A pH9 et à pH 10, avec une charge nette de -6 et -15, respectivement, la protéine s'adsorbe sur le support. A ces pH les charges à la surface de la protéine sont favorables, et l'intensité des charges au niveau du ligand diminue, la combinaison d'interactions électrostatiques favorables et d'effets hydrophobes permet son adsorption. On peut ainsi envisager l'adsorption de protéines très basiques.

A pH très élevé (10), on peut estimer que les charges au niveau des ligands sont faibles voir absentes, et il est pourtant possible de fixer des protéines. Cela confirme que l'interaction hydrophobe intervient même à très faible force ionique.

Les interactions électrostatiques sont donc très importantes dans les résines de chromatographie en mode mixte HEA et PPA HyperCel, et sont directement influencées par le pH d'utilisation. Néanmoins, l'effet du pH sur les interactions hydrophobes n'est pas négligeable. En effet, la réduction à bas pH de l'hydrophobicité de surface de protéines a été montrée [Alizadeh-Pasdart *et al.*, 2000] et des retentions plus importantes de protéines à haut pH en chromatographie d'interaction hydrophobes ont été décrites [Xia *et al.*, 2005].

Nous avons voulu mesurer cet effet en utilisant les capacités dynamiques de fixation des résines HEA et PPA HyperCel en fonction du pH avec une protéine acide, la BSA. Cette acidité nous a permis de toujours nous placer au-dessus de son point isoélectrique et donc de limiter l'influence des interactions électrostatiques.

Sur la **Figure 24**, on observe que l'interaction diminue lorsque le pH augmente, ce qui est en accord avec la littérature sur les effets hydrophobes. Néanmoins on observe un saut important de capacité entre des pH de 7 et 10. On peut donc penser qu'à des pH trop élevés, jouant sur les charges des ligands, les capacités chutent à cause de la réduction des interactions électrostatiques favorables.

Si l'on regarde l'évolution des capacités en fonction du temps de résidence de la protéine, on observe une forte influence de ce paramètre. Un temps de contact suffisamment long est donc nécessaire pour la mise en place des interactions en mode mixte.

Cette influence du temps de résidence sur les capacités dynamiques de fixation est notamment plus importante que dans le cadre de supports de chromatographie échangeurs d'anions [Pezzini *et al.*, 2008]. Dans le cadre d'interactions ioniques, on sait que la cinétique d'interaction est extrêmement rapide et qu'elle n'influence quasiment pas la fixation [Wesselingh and Bosma, 2001]. La cinétique d'interaction hydrophobe requiert elle d'avantage de temps notamment lors de réarrangements structuraux au niveau des protéines sous l'influence des forces hydrophobes.

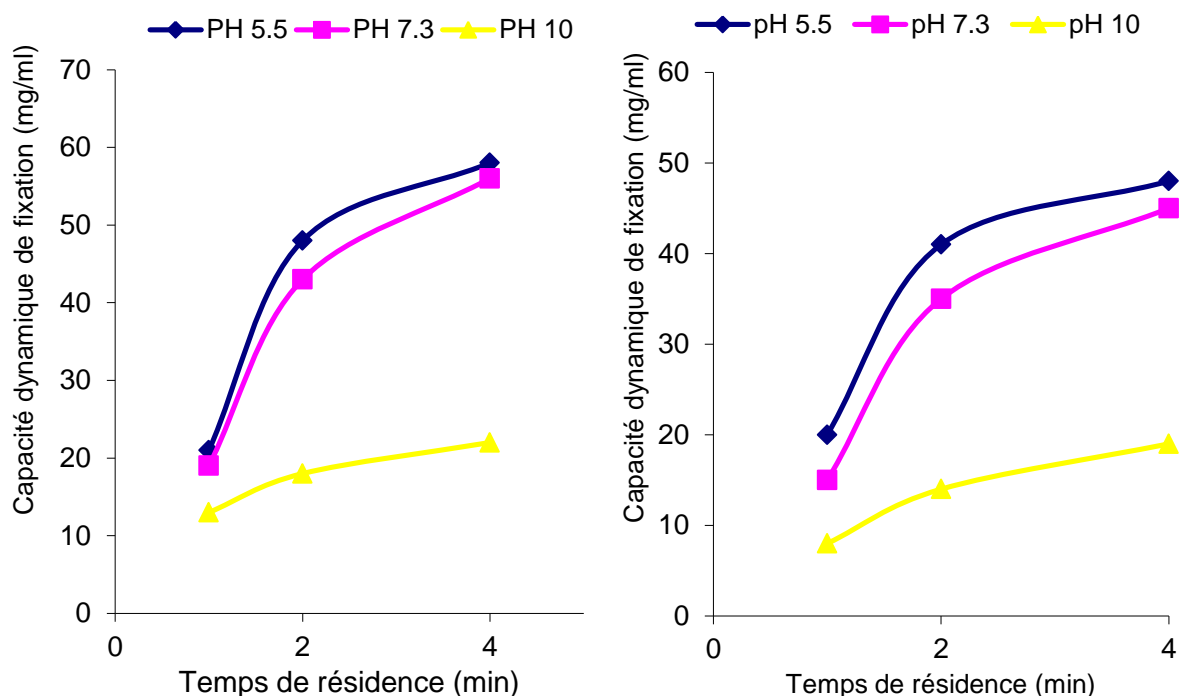


FIGURE 24. CAPACITES DYNAMIQUES DE FIXATION DE LA BSA SUR HEA HYPERCEL (GAUCHE) ET PPA HYPERCEL (DROITE).

3.5.EFFET D'AGENTS CHAOTROPIQUES SUR LES INTERACTIONS MODE MIXTE

3.5.1. L'EFFET HYDROPHOBE

Afin d'approfondir la compréhension des interactions impliquées dans les supports de chromatographie en mode mixte HEA et PPA HyperCel, nous avons cherché à influencer spécifiquement chaque type d'interactions, et à les isoler en utilisant différents composés.

Pour cela, nous avons d'abord cherché à utiliser des molécules de type chaotrope pour perturber efficacement les interactions hydrophobes. En effet de nombreuses études ont mis en évidence l'influence de ces composés sur les effets hydrophobes [Bennion and Daggett, 2003 ; Moelbert *et al.*, 2004 Zangi *et al.*, 2009].

Pour mieux cerner l'effet de ce type de molécules sur les interactions mode mixte, il convient de rappeler le principe des effets hydrophobes en chromatographie.

On appelle interactions hydrophobes, les interactions réversibles qu'il peut y avoir entre les régions hydrophobes à la surface des protéines et les ligands hydrophobes des supports de chromatographie. Elles font partie des plus importantes forces non covalentes à l'origine de nombreux processus tels que la fixation d'enzyme sur un substrat ou le repliement des protéines [Kauzmann, 1959 ; Dill, 1990]. Bien qu'il n'existe pas qu'une seule théorie universellement acceptée concernant les mécanismes impliqués, il est admis que des effets hydrophobes apparaissent quand sont introduits des composés non polaires dans une solution aqueuse. Les molécules d'eau qui entourent une molécule hydrophobe ne peuvent « mouiller » sa surface et former des liaisons hydrogène avec elle, elles vont alors avoir tendance à former à la place une structure ordonnée autour de la substance hydrophobe.

Donc lorsque l'on introduit un soluté apolaire dans l'eau, ou un solvant polaire, il est encapsulé dans une sorte de cage, appelée clathrate, qui consiste en un nombre spécifique de molécules d'eau maintenues ensemble par des liaisons hydrogènes. Afin de minimiser la surface totale des clathrates, et ainsi diminuer le nombre de molécules d'eau ordonnées, les substances hydrophobes ont tendance à se rejoindre, à « fusionner ». Cette propriété des molécules hydrophobes d'induire des forces d'attractions entre molécules qui sont guidées par le solvant est appelé l'effet hydrophobe. Dans ce réarrangement, on observe la dispersion des molécules d'eau ordonné autour de chaque composé apolaire non associées vers un état plus

désordonné. Les interactions ou effets hydrophobes dépendent donc du comportement des molécules de solvants, à comparer avec une attraction directe entre les molécules hydrophobes, et dont la force conductrice serait le gain d'entropie apporté par les changements structuraux des molécules d'eau entourant les substances hydrophobes. Ce raisonnement peut par analogie être adapté aux interactions entre un support de chromatographie portant un ligand hydrophobe et les molécules à séparer [Porath *et al.*, 1973]

Les molécules d'eau sont influencées par un certain nombre de composés classés selon deux catégories. Les cosmotropes ou lyotropes sont décrits comme favorisant la structuration des molécules d'eau, et les chaotropes comme détruisant ces structures ordonnées. Les cosmotropes vont avoir tendance à diminuer la solubilité des macromolécules [Galinski *et al.*, 1997] alors que les chaotropes favorise la solubilisation [De Xammar Oro, 2001].

De manière générale, les agents chaotropiques ont un effet sur la plupart des interactions. En changeant la structure des liaisons hydrogènes entre molécules du solvant, les chaotropes, qui sont en général moins polaires que l'eau, cassent ces liaisons hydrogènes mais aussi diminue la pénalité énergétique due à l'exposition de groupement apolaire. Ils favorisent ainsi la dispersion des molécules hydrophobes et le dépliement des protéines et de leurs cœurs hydrophobes [Herskovits *et al.*, 1970].

Comme la structure des protéines est induite et contrôlée par les liaisons hydrogènes et les interactions hydrophobes, les chaotropes peuvent réduire les interactions protéiques en modifiant à la fois la constante diélectrique du solvant et en dénaturant les protéines.

3.5.2. EFFET DE L'UREE

Parmi les chaotropes, le plus couramment utilisé est l'urée (**figure 25**). Nonobstant un mécanisme d'action sur les protéines extrêmement discuté [Hua *et al.*, 2008], l'urée affecte les liaisons hydrogènes et les interactions hydrophobes en interagissant avec le squelette et les groupements protéiques ainsi qu'en modifiant la solvataion des molécules [Wallqvist *et al.*, 1998]. L'urée possède ainsi un pouvoir de solubilisation important. La particularité intéressante de ce composé est qu'il est non ionique et ne génère pas de conductivité, il est donc raisonnable de proposer que ce composé va agir principalement au

niveau des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes, mais qu'il n'influencera pas ou peu les interactions électrostatiques lors de l'utilisation de concentrations non dénaturantes.

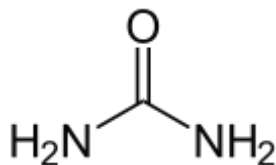


FIGURE 25. FORMULE CHIMIQUE DE L'UREE

Lorsque l'on ajoute de l'urée dans le tampon de fixation de la protéine α -chymotrypsinogène-A à pH 8, dans des conditions de faible force ionique, on observe la réduction des temps de rétention avec l'ajout de 1 et 2 M d'urée (**figure 26**). Ce composé réduit les interactions entre la protéine et le support de chromatographie en mode mixte HEA HyperCel. Ces résultats confirment l'intervention d'interactions hydrophobes et de liaisons hydrogène dans le mécanisme de rétention, en combinaison avec les interactions électrostatiques précédemment mises en valeur.

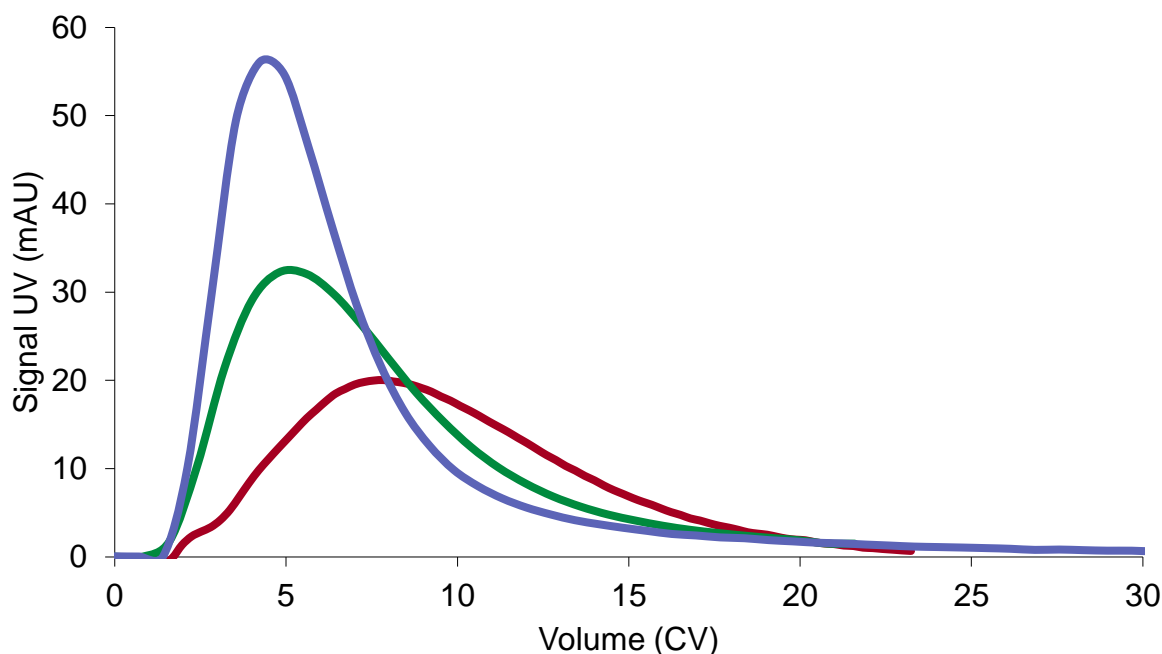


FIGURE 26. INFLUENCE DE L'AJOUT D'UREE SUR LA RETENTION DE L' α -CHYMYOTRYPSINOGENE-A SUR HEA HYPERCEL (EN ROUGE PH8 SANS UREE, EN VERT + 1 M UREE, EN BLEU + 2 M UREE).

Afin d'observer si l'urée pouvait être utilisée pour provoquer et contrôler l'élution d'une protéine correctement adsorbée sur un support de chromatographie en mode mixte, nous avons utilisé la même protéine, l' α -chymotrypsinogène-A, dans des conditions de fixation sur les résines de chromatographie en mode mixte HEA et PPA HyperCel. Pour cela, le pH a été légèrement augmenté jusqu'à pH 9 pour assurer l'adsorption, comme on l'a vu précédemment. Nous avons ensuite ajouté une forte concentration d'urée tout en limitant le risque de dénaturation (4 M). Comme présenté sur la **figure 27**, l'ajout d'une forte concentration d'urée n'a pas permis de modifier complètement les interactions en mode mixte et n'a pas permis l'élution de la protéine.

Lorsque l'on ajoute des sels dans la solution, tout en maintenant l'urée, on observe l'élution et la récupération de la protéine (**figure 27**). Quel que soit l'ordre dans lequel sont ajoutés les sels et l'urée, le décrochage des protéines n'est obtenu qu'avec la combinaison des conditions. Il est donc nécessaire d'agir en même temps sur les multiples interactions majeures que sont les interactions électrostatiques, les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogènes, lorsque l'on travaille avec les résines de chromatographie en mode mixte.

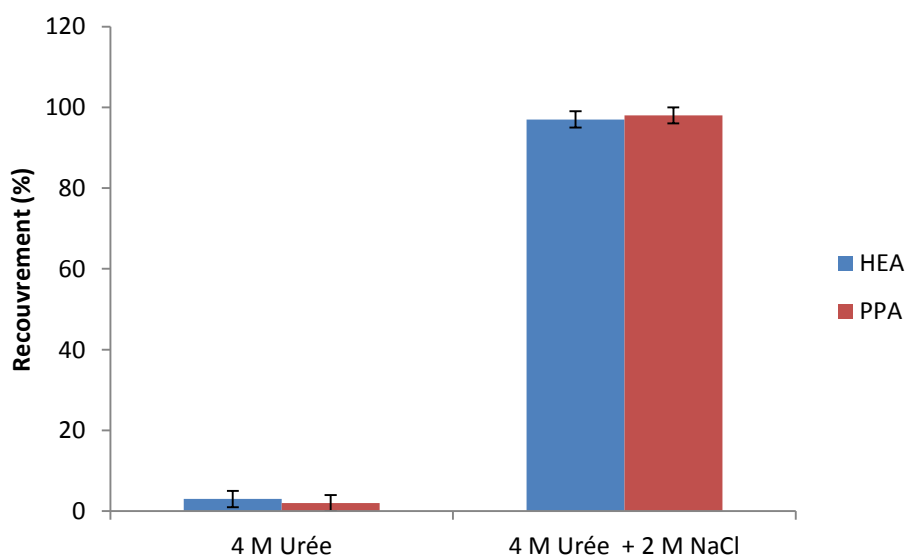


FIGURE 27. INFLUENCE DE LA COMBINAISON D'UREE PLUS SELS SUR LA FIXATION DE L' α -CHYMOTRYPSINOGENE-A A PH 9 SUR LES RESINS MODE MIXTE HEA ET PPA HYPERCEL.

Néanmoins, l'urée en forte concentration et combiné avec des sels, n'a pas permis de lutter efficacement contre les interactions en mode mixte pour un certain nombre de

molécules. En effet, avec des protéines de grandes tailles, hydrophobes, comme la catalase ou la BSA, l'élution par l'urée n'a pas été obtenue. Ainsi l'action de l'urée sur les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogènes n'est pas suffisante pour perturber complètement les interactions fortes entre ces protéines et les supports de chromatographie en mode mixte.

Afin de renforcer le pouvoir de l'urée, sa combinaison avec la thio-urée, décrite dans la littérature [Gordon and Jencks, 1963] comme influençant d'avantage les interactions hydrophobes, a été utilisée sans résultats. Nous avons donc envisagé l'utilisation de chaotropes différents.

3.5.3. EFFET DE LA GUANIDINE

La guanidine est un agent chaotrope ionique très puissant couramment utilisé, qui participe, tout comme l'urée, à dénaturer les protéines [Del Vecchio *et al.*, 2002]. Bien que ces deux molécules soit chimiquement très différentes (**figure 28**), leur mécanisme de d'action est essentiellement identique, impliquant le déplacement d'acides aminés essentiels et l'exposition graduelle d'éléments de la structure secondaire [Heyda *et al.*, 2011]. De plus, la guanidine modifie fortement la force ionique en solution. En effet, une concentration de 6 M de guanidine induit une conductivité d'environ 300 mS/cm. Ainsi cette molécule peut agir à la fois sur les interactions hydrophobes et les interactions électrostatiques.

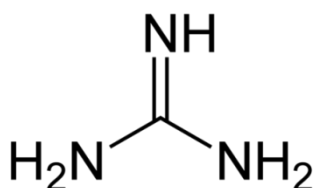


FIGURE 28. FORMULE CHIMIQUE DE LA GUANIDINE.

Pour étudier l'influence de la guanidine, nous avons utilisé des conditions de fixation favorables et observé si l'ajout de guanidine permettait l'élution des protéines. Nous observons que l'élution de protéines est efficacement obtenue lors d'ajouts de concentrations importantes de ce composé, même dans des conditions de fixation favorable (pH, sels) (**Figure 29**). Ainsi, là où des concentrations importantes d'urée, même combinés avec des sels, n'avait pu éluer les protéines, la guanidine est efficace

Des molécules de masses moléculaires élevées comme la BSA, l'ovalbumine, la catalase, l'ovotransferrine ou même des immunoglobulines G sont éluées à pH 8 (pH d'adsorption) lorsque l'on ajoute des concentrations croissantes de guanidine (gradient jusqu'à 6 M).

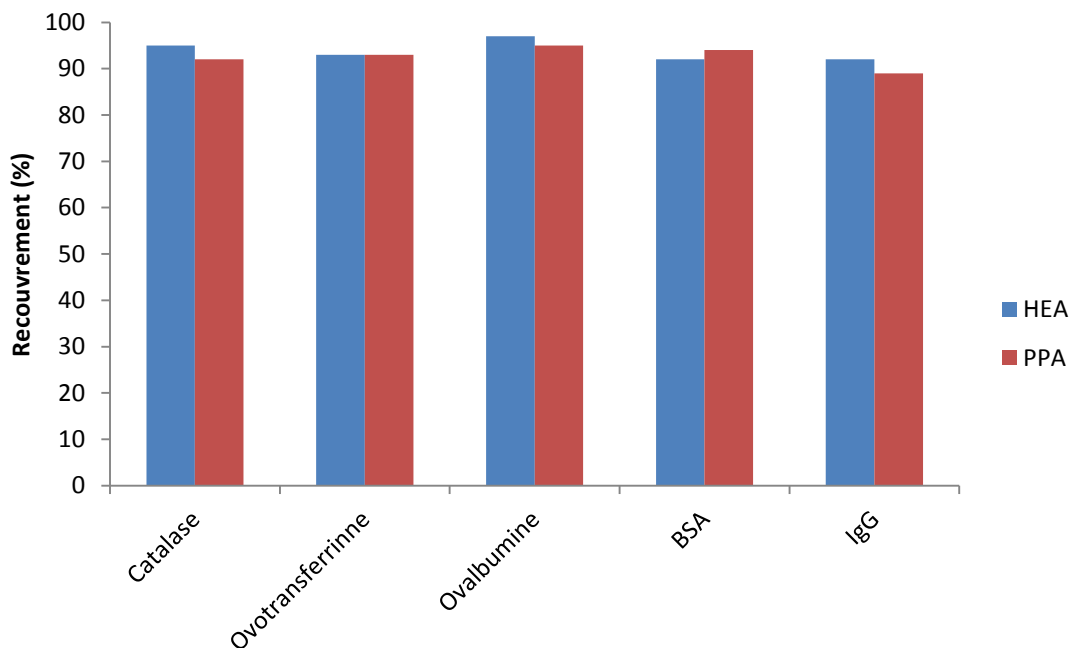


FIGURE 29. UTILISATION DE FORTES CONCENTRATIONS DE GUANIDINE (6 M) POUR L'ÉLUTION DE PROTÉINES À PH 8 SUR HEA ET PPA HYPERCEL.

La guanidine est donc extrêmement efficace pour l'éluion des protéines adsorbées sur les résines de chromatographie en mode mixte, sans modification de pH. Les conditions de guanidine peuvent donc représenter une bonne condition notamment pour nettoyer les colonnes de chromatographie et éliminer les molécules restées sur les colonnes.

La guanidine est donc très performante pour perturber les interactions hydrophobes, les liaisons hydrogènes et les interactions électrostatiques impliquées dans ces supports de chromatographie.

Des différences sont néanmoins observées au niveau de la concentration de guanidine nécessaire à l'éluion des protéines selon les résines mode mixte utilisée. En effet, des concentrations minimales sont nécessaires sur HEA HyperCel, et beaucoup plus importantes sur PPA HyperCel (**Figure 30**). Cela démontre des comportements d'interactions différents entre les résines, et notamment des effets hydrophobes nettement différenciés.

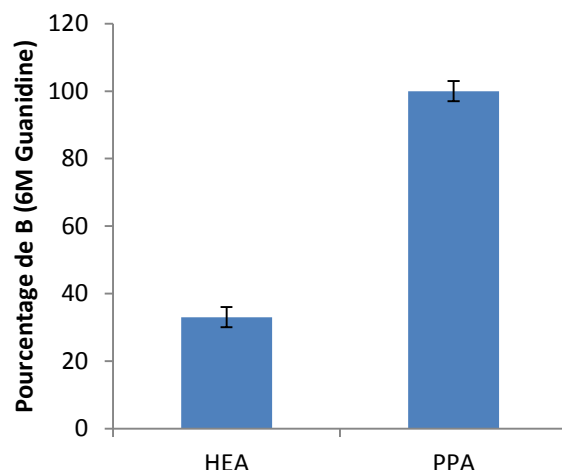


FIGURE 30. COMPARAISON DE LA QUANTITE DE GUANIDINE NECESSAIRE A L'ELUTION D'IGG EN FONCTION DE LA RESINE MODE MIXTE UTILISEE

Néanmoins, les perturbations structurales associées à l'utilisation de concentrations importantes de cette molécule, peuvent être un inconvénient majeur dans le maintien de la fonction d'une protéine lors de sa purification.

3.5.4. EFFET DE L'ARGININE

L'arginine est un acide aminé présentant des propriétés chaotropes et est utilisé pour solubiliser les protéines. L'arginine permet la réduction des interactions inter-protéiques tout en préservant au maximum la stabilité conformationnelle des protéines [Gibson and Murphy, 2005].

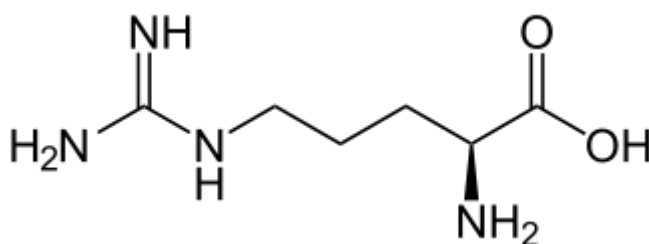


FIGURE 31. FORMULE CHIMIQUE DE L'ARGININE.

L'arginine possède un groupement guanidium et donc présente des propriétés similaires à la guanidine (**figure 25**). Les groupements méthylène et hydroxy ont également été décrit comme intervenant dans le mécanisme de solubilisation au travers d'interactions hydrophobes et de liaisons hydrogènes avec les protéines [Ariki *et al.*, 2011].

L'arginine a déjà montré son potentiel à réduire la force de fixation des protéines avec les supports de chromatographie en mode mixte et notamment la résine MEP HyperCel, [Arakawa *et al.*, 2010].

Lorsque l'on ajoute de l'arginine dans le tampon de fixation de l'ovotransferrine à pH 8, on observe que la fixation est nettement perturbée. En effet, cette protéine correctement adsorbée en absence d'arginine, est partiellement récupérée dans la fraction non retenue (FT) en présence d'arginine (**Figures 32 et 33**).

Ainsi, bien que cette concentration d'arginine ne soit pas suffisante pour perturber complètement l'adsorption d'une protéine interagissant fortement avec les supports en mode mixte, l'arginine peut être utilisée pour renforcer le pouvoir d'un tampon d'élution. On peut alors envisager grâce à l'ajout d'arginine, l'utilisation de pH d'élution moins acides, tout en favorisant la solubilité et en prévenant la formation d'éventuels agrégats.

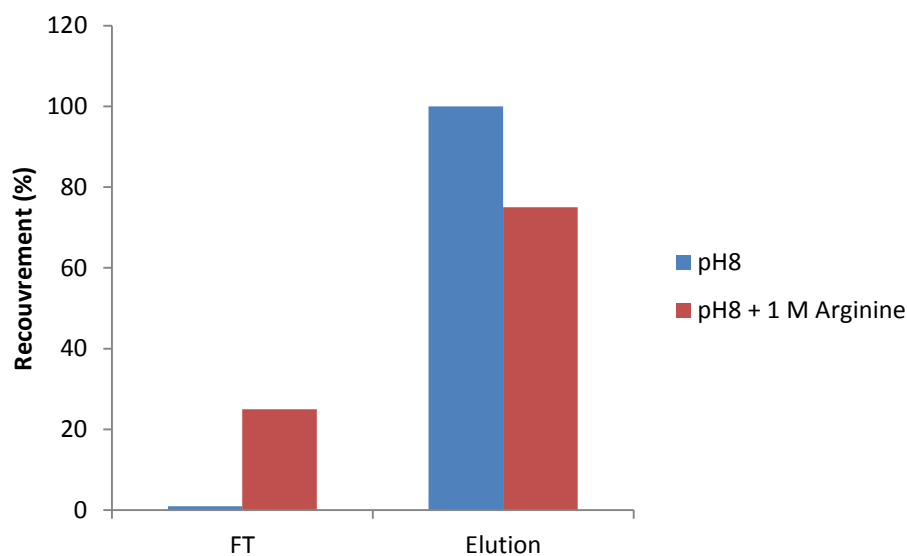


FIGURE 32. INFLUENCE DE L'ARGININE SUR LA FIXATION DE L'OVOTRANSFERRINE A PH8 SUR HEA HYPERCEL

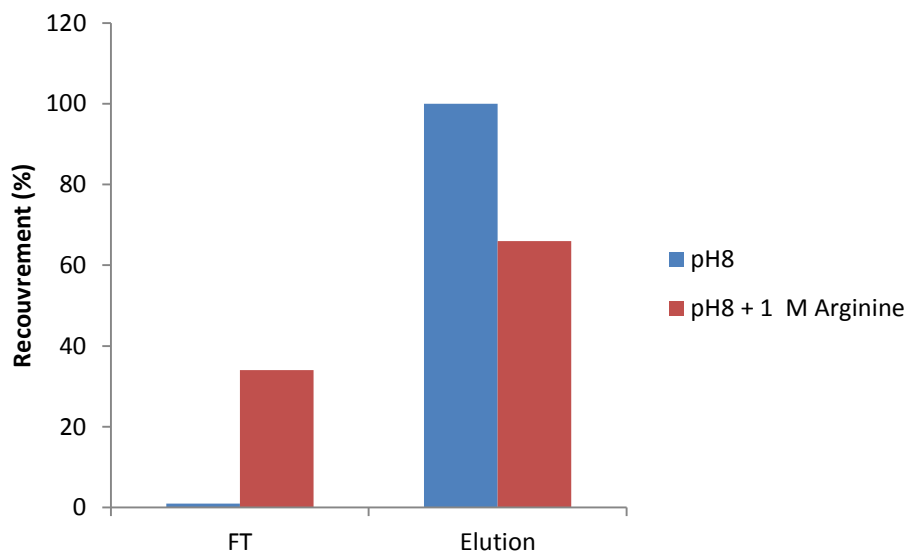


FIGURE 33. INFLUENCE DE L'ARGININE SUR LA FIXATION DE L'OVOTRANSFERRINE A PH8 SUR PPA HYPERCEL

3.6. INFLUENCE DES TYPES DE SELS, TAMPONS ET AUTRES COMPOSES SUR LES INTERACTIONS MODE MIXTE

3.6.1. EFFET DES TYPES DE SELS

Nous avons vu que le pH et les sels sont efficaces pour influencer le comportement des résines de chromatographie en mode mixte. L'influence du pH est majeure et sert de base à leur utilisation. Nous avons cependant observé que les sels influencent grandement la balance entre les interactions ioniques et hydrophobes. Ils sont donc un outil de contrôle important de la séparation en mode mixte. Cette partie propose l'évaluation de l'influence du type de sels sur les supports de chromatographie en mode mixte afin d'approfondir leur mécanismes.

En effet, en 1888, au travers d'expériences de précipitations de protéines de blancs d'œufs, les travaux de Hofmeister ont mis en évidence un effet de la nature des sels et des ions qui les composent sur la stabilité des protéines [Hofmeister, 1888]. Ainsi la solubilité des molécules était influencée par la nature de l'électrolyte utilisé et pas seulement par sa concentration. Dès lors, la nature des sels utilisés est devenue d'une grande importance en chromatographie, pour l'optimisation et la performance d'une étape de purification [Tsumoto *et al.*, 2007].

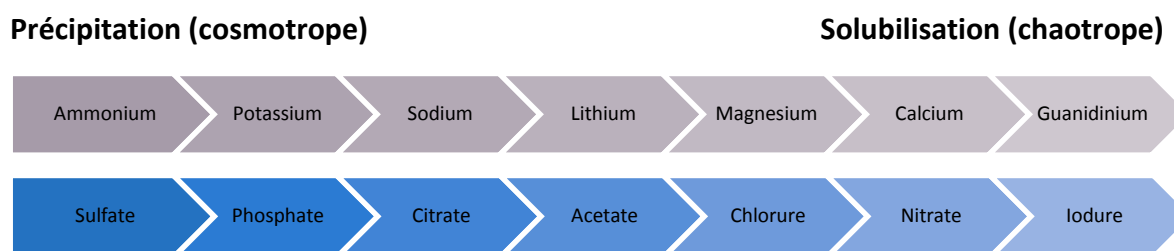


FIGURE 34. SERIE DE HOFMEISTER: CLASSIFICATION DES CATIONS ET ANION SELON LEURS POTENTIELS DE SOLUBILISATION DES PROTEINES EN SOLUTIONS (CROISSANT DE GAUCHE A DROITE).

On distingue ainsi différents effets selon les sels, que l'on classe selon la série de Hofmeister (**figure 34**). A concentration égale, certains sels présentent un effet dit de « salting-out » favorisant la précipitation des protéines, alors que d'autres exercent des effets inverses dit de « salting-in », solubilisant les protéines. Ces phénomènes sont induits par de puissants effets sur la tension de surface des solutions aqueuses dans lesquels ces sels sont introduits et particulièrement sur les molécules d'eau interagissant avec les protéines [Taube, 1910].

La série de Hofmeister décrit donc la propension des différents ions qui constituent les sels à stabiliser ou non les molécules d'eau, les macromolécules, et donc les interactions hydrophobes [Fausnaugh and Regnier, 1986].

Les ions tels que les ions sulfate, citrate, phosphate, à forte densité de charge, ont une tendance à fixer fortement les molécules d'eau (plus fortement que les molécules d'eau entre elles). Ces ions vont attirer, structurer et immobiliser l'eau les entourant et peuvent donc être qualifiés de cosmotropes [Collins, 1997]. A l'opposé, les ions de plus faible densité de charge tel que les ions chlorure, nitrate, iodure fixent plus faiblement les molécules d'eau. Ces ions sont dits chaotropes.

Les chaotropes sont plutôt attirés par les zones de faible densité en eau, alors que les cosmotropes sont attirés par les environnements fortement aqueux. La solubilisation implique donc des ions de faibles densités de charges préférant se fixer au niveau des surfaces hydrophobes. La perte de solubilité est, elle, principalement induite par des ions à fortes densités de charges qui vont former de long complexes fortement hydratés, et ce loin des surfaces hydrophobes. Quand la concentration en sels est assez élevée pour priver les

protéines des molécules d'eau qui les hydratent, les molécules se rapprochent par leurs zones hydrophobes, forment un réseau et précipitent [Thomas and Elcock, 2007].

Les sels sont constitués de paires d'ions. Les ions impliqués dans ces paires sont donc d'une grande importance. Bien que l'effet des anions semblent plus important que celui des cations, notamment grâce à un plus grand rayon d'action, on décrit que l'association de deux ions de charges opposés mais de même types (deux chaotropes ou deux cosmotropes) est de nature à favoriser leur interaction [Collin, 1995]. Par contre, une association mixte d'un chaotrope avec un cosmotrope ne semble pas favorable car elle implique des problèmes de relargage de molécules d'eau. Les ions ont donc tendance à rester séparés en solution aqueuse. Le sulfate de sodium possède deux cosmotropes et a donc tendance à désolubiliser fortement les protéines. De plus, ces ions interagissent directement avec les protéines et modifient leurs interactions avec l'environnement [Zhang and Cremer, 2006]. Il faut donc prendre en compte l'hydratation de l'ion, l'interaction anion-cation, et l'interaction ion-protéine pour expliquer les mécanismes d'action des sels.

Pour étudier l'influence des sels et de leur nature sur les interactions en mode mixte, nous avons utilisés des concentrations fixes de plusieurs sels et comparé les temps de rétentions du lysozyme sur les résines de chromatographie en mode mixte HEA et PPA HyperCel. Afin d'observer directement l'influence des différents sels sur les interactions en mode mixte, nous avons choisi des concentrations salines induisant la rétention partielle de la protéine sur les colonnes, tout en évitant son adsorption. Les concentrations testées ont été de 0.1 M de sels pour PPA HyperCel, et 0.3 M pour HEA HyperCel. Les combinaisons de plusieurs cations et anions ont été testées.

Les cations utilisés ont été : le sodium, l'ammonium et le potassium.

Les anions utilisés ont été : le chlorure, l'acétate et le sulfate.

On observe sur les **figures 35** et **36** récapitulant les différentes rétentions en fonction des sels sur HEA et PPA HyperCel que la nature des sels influence fortement les temps de rétentions. De long temps de rétention sont observés lorsque l'on utilise du chlorure de sodium, du sulfate de sodium, et de l'iodure de potassium. Par contre ces temps sont nettement réduits lorsque l'on utilise des sels tels que le chlorure d'ammonium, l'acétate d'ammonium, ou l'acétate de potassium. Le changement du type de sels influence donc clairement la fixation sur les résines de chromatographie en mode mixte.

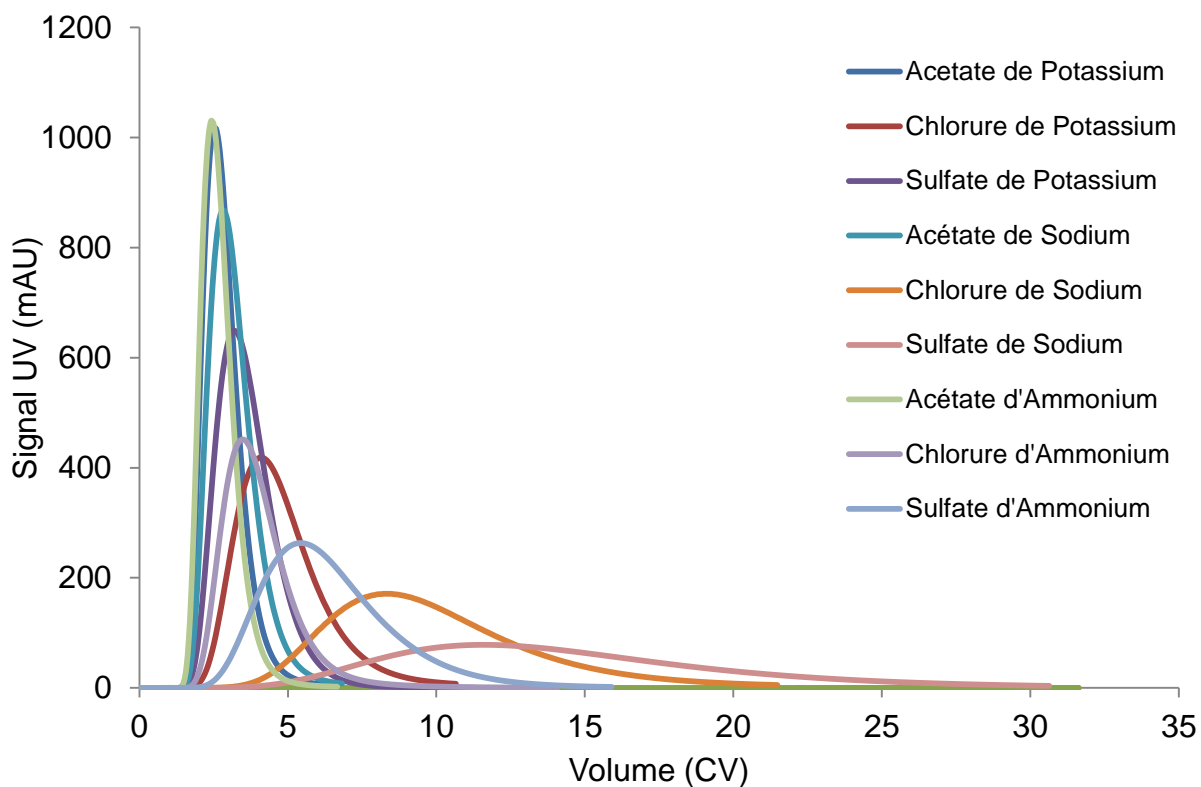


FIGURE 35. INFLUENCE DE LA NATURE DES SELS SUR LA RETENTION DU LYSOZYME A PH 8 SUR HEA HYPERCEL.

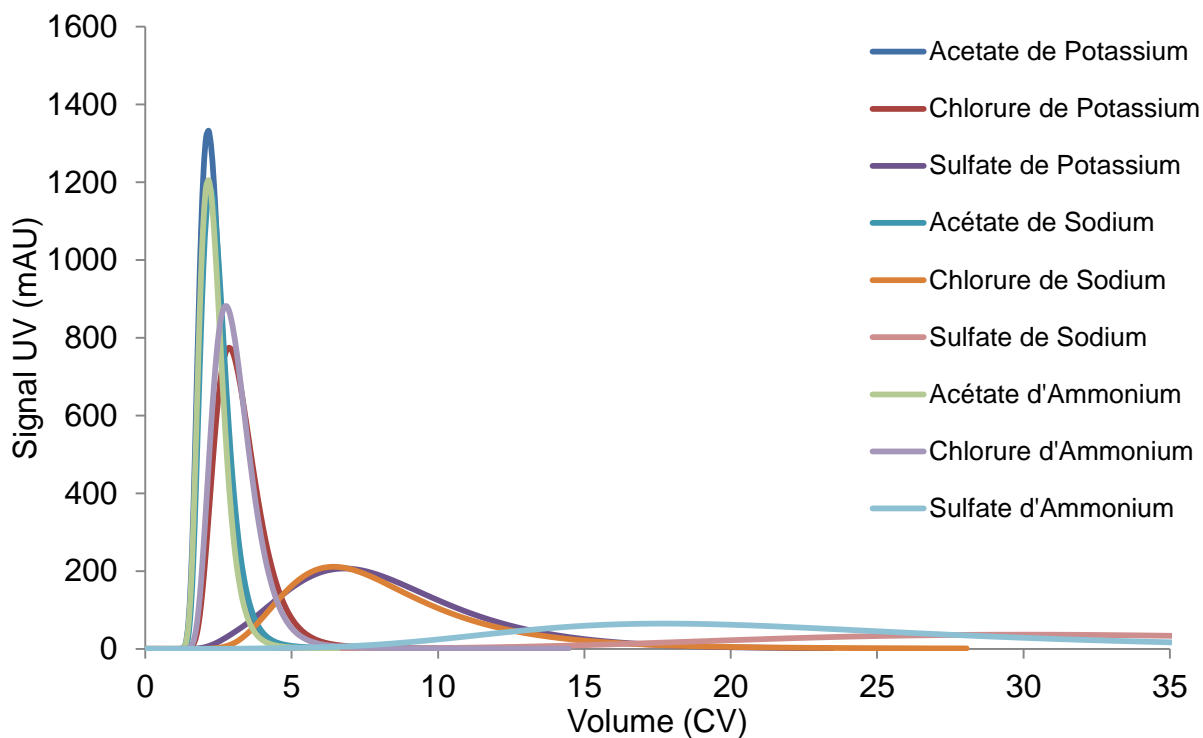


FIGURE 36. INFLUENCE DE LA NATURE DES SELS SUR LA RETENTION DU LYSOZYME A PH 8 SUR PPA HYPERCEL.

Lorsque l'on compare les résultats par sels de cations, on observe que le sodium acétate diminue fortement la rétention des protéines, et perturbe donc l'interaction en mode mixte (**Figures 37 et 38**). Le chlorure de sodium, qui sert de référence permet de longs temps de rétention et favorise les interactions entre la protéine et les supports de chromatographie. Le sulfate de sodium, induit des temps de rétention encore plus importants, allant quasiment jusqu'à l'adsorption sur la résine PPA HyperCel, favorisant ainsi fortement les interactions hydrophobes.

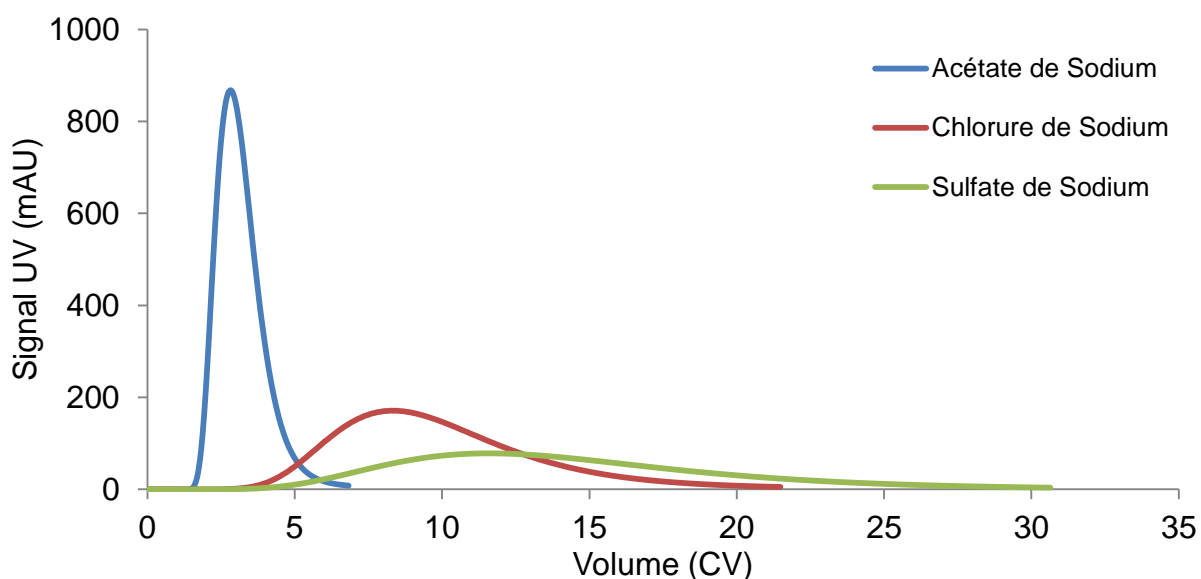


FIGURE 37. EFFET DES SELS DE SODIUM SUR LA RETENTION DU LYSOZYME SUR HEA HYPERCEL

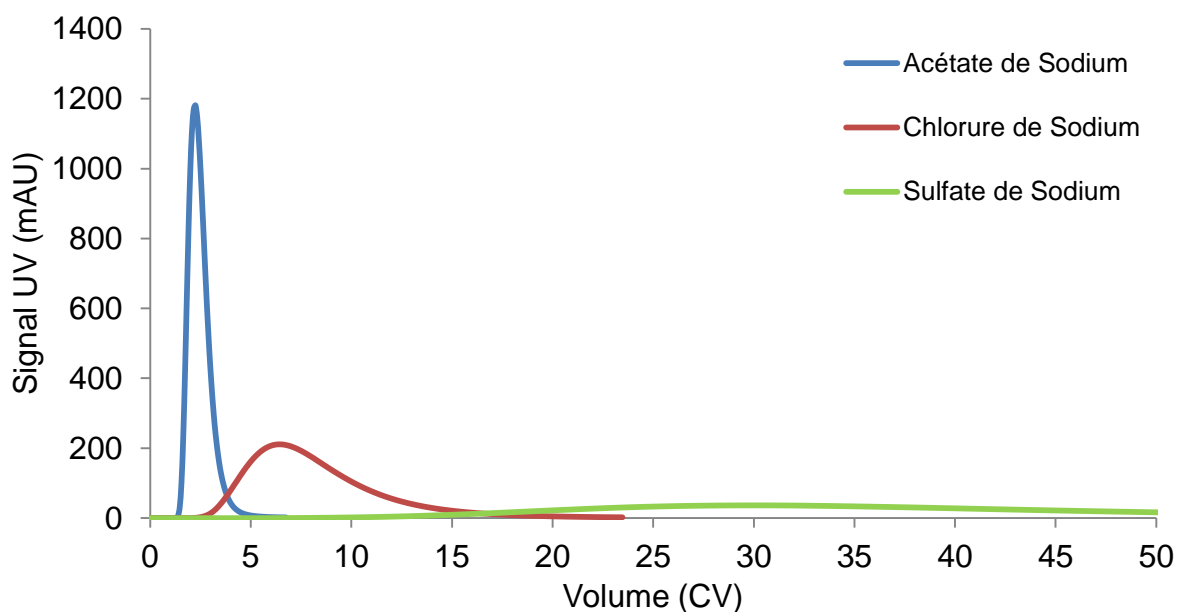


FIGURE 38. EFFET DES SELS DE SODIUM SUR LA RETENTION DU LYSOZYME SUR PPA HYPERCEL

Même combiné au cation ammonium, l'acétate perturbe les interactions en mode mixte, et on observe des temps de rétention faibles (**Figures 39 et 40**). Le chlorure d'ammonium permet d'augmenter ces temps de rétention. Le sulfate d'ammonium, à l'instar du sulfate de sodium, favorise grandement les interactions et induit de long temps de rétention du lysozyme sur les résines de chromatographie en mode mixte.

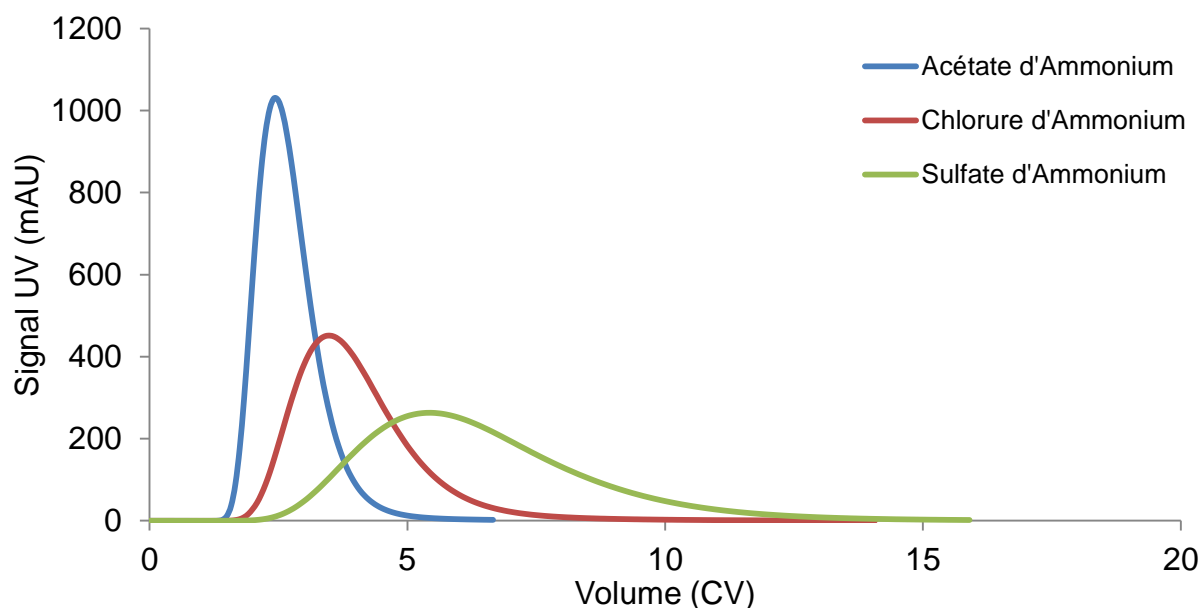


FIGURE 39. EFFET DES SELS D'AMMONIUM SUR LA RETENTION DU LYSOZYME SUR HEA HYPERCEL.

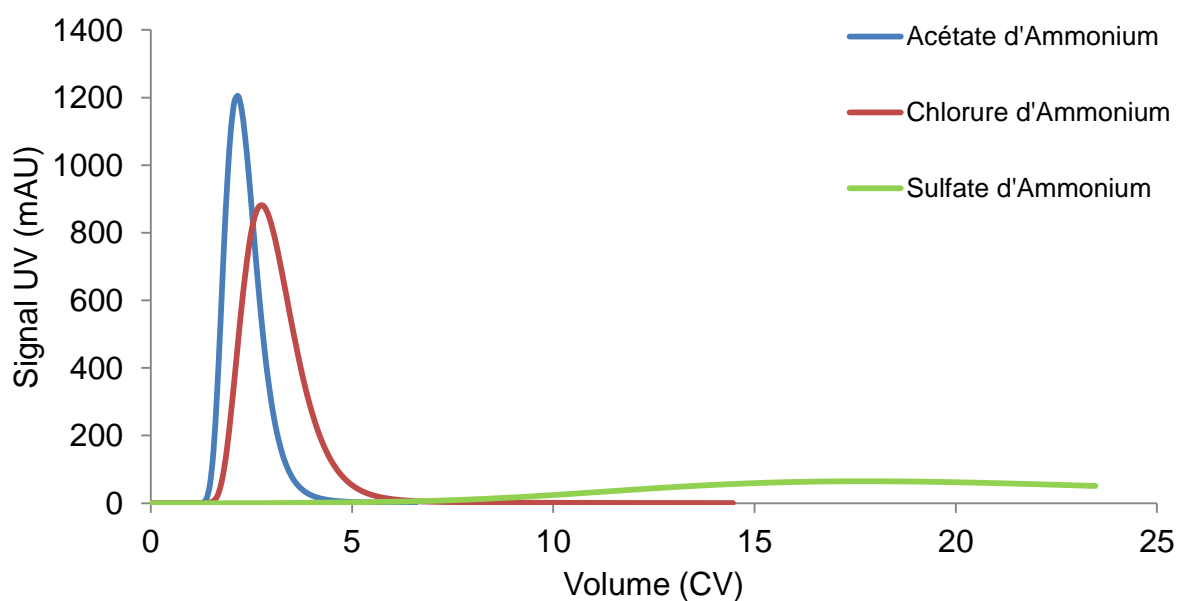


FIGURE 40. EFFET DES SELS D'AMMONIUM SUR LA RETENTION DU LYSOZYME SUR PPA HYPERCEL.

Lorsque l'on utilise le cation potassium, on observe que l'acétate induit encore les plus faibles temps de rétention (**Figures 41 et 42**). L'utilisation de chlorure de potassium permet d'augmenter ces temps. De façon surprenante, le sulfate de potassium induit de long temps de rétention sur PPA (plus long qu'avec le chlorure) alors qu'ils sont plus faibles sur HEA.

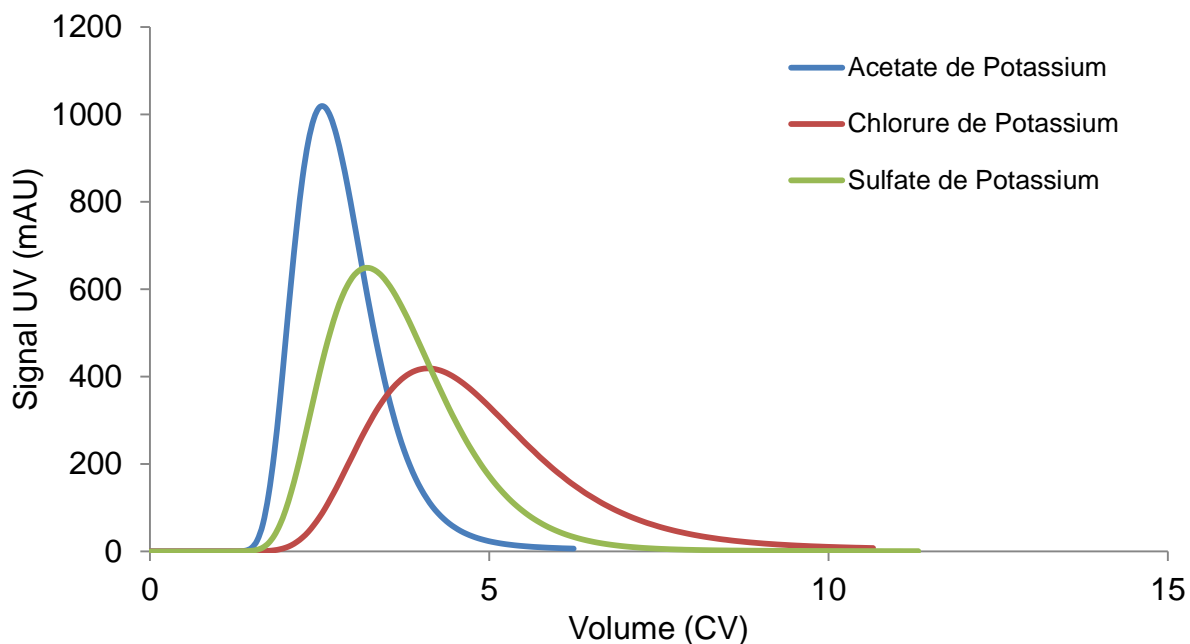


FIGURE 41. EFFET DES SELS DE POTASSIUM SUR LA RETENTION DU LYSOZYME SUR HEA HYPERCEL

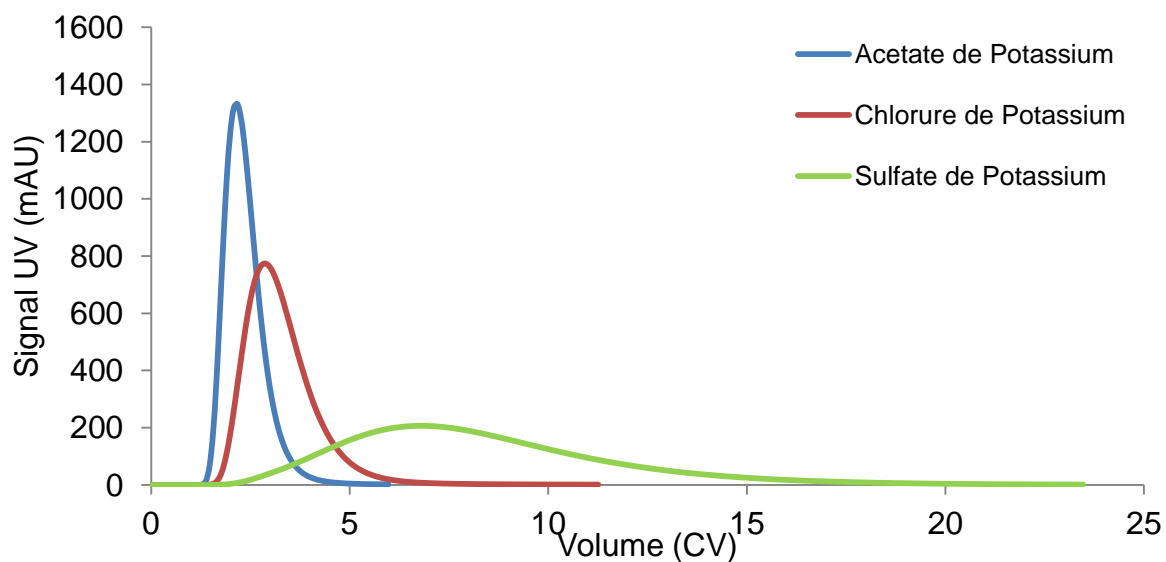


FIGURE 42. EFFET DES SELS DE POTASSIUM SUR LA RETENTION DU LYSOZYME SUR PPA HYPERCEL

On observe ainsi de fortes disparités au niveau des effets des sels sur les interactions en chromatographie en mode mixte. La nature de l'anion semble être prépondérante sur l'influence du type de sels sur les interactions. Ainsi, l'anion acétate semble perturber les interactions entre les ligands mode mixte et la protéine et, on observe dans tous les cas de faible temps de rétention. L'acétate est donc un bon candidat pour la constitution des tampons d'élution. Le chlorure et le sulfate permettent de favoriser les forces d'attractions entre les protéines et les supports de chromatographie en mode mixte, en favorisant notamment fortement les interactions hydrophobes (**Figures 43 et 44**). Ainsi plus l'anion est cosmotrope, plus les temps de rétention sont longs. Les interactions hydrophobes impliquées dans les supports de chromatographie en mode mixte doivent être favorisées par ces sels. Néanmoins, on observe que l'augmentation des interactions n'est pas exclusivement liée à la position des ions sur la série de Hofmeister. En effet, l'effet de chaque sel sur la stabilité et la solubilisation des protéines dépend fortement de sa concentration, ainsi que de la molécule étudiée [Zangi, 2010]. Il est donc difficile de prédire le comportement de chaque sel en fonction de sa nature, et de généraliser leur influence sur les interactions en mode mixte.

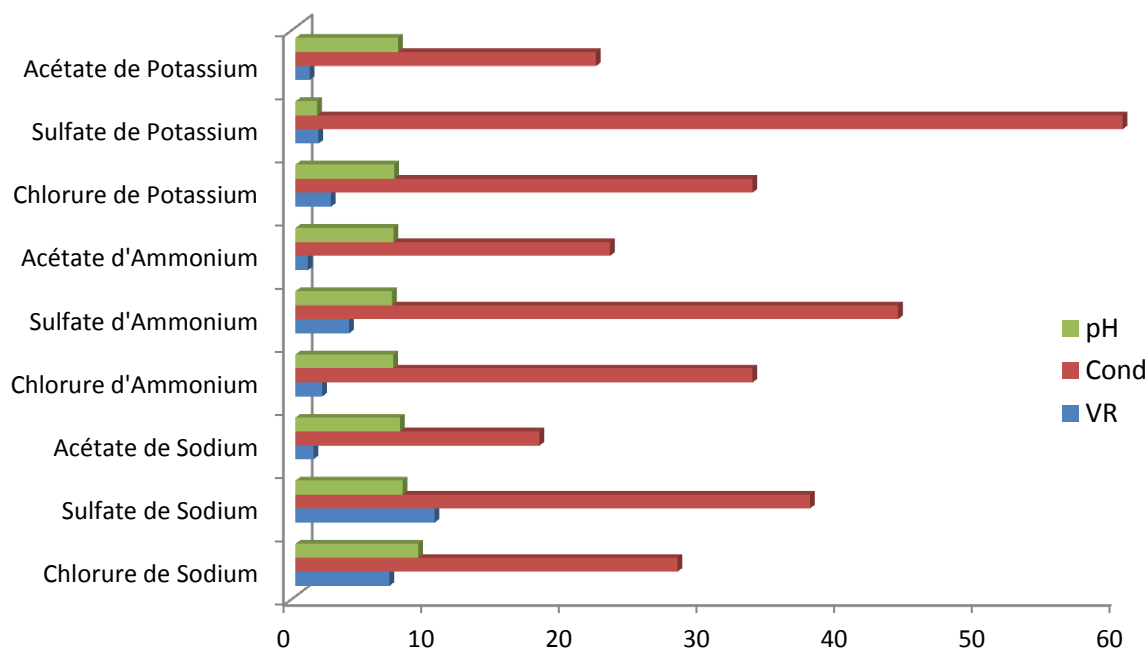


FIGURE 43. INFLUNCE DE LA NATURE DES SELS SUR LA CONDUCTIVITE, LE PH ET LE TEMPS DE RETENTION DU LYSOZYME SUR HEA HYPERCEL (EN VERT : LE PH, EN ROUGE : LA CONDUCTIVITE ET EN BLEU : LE VOLUME DE RETENTION EN CV)

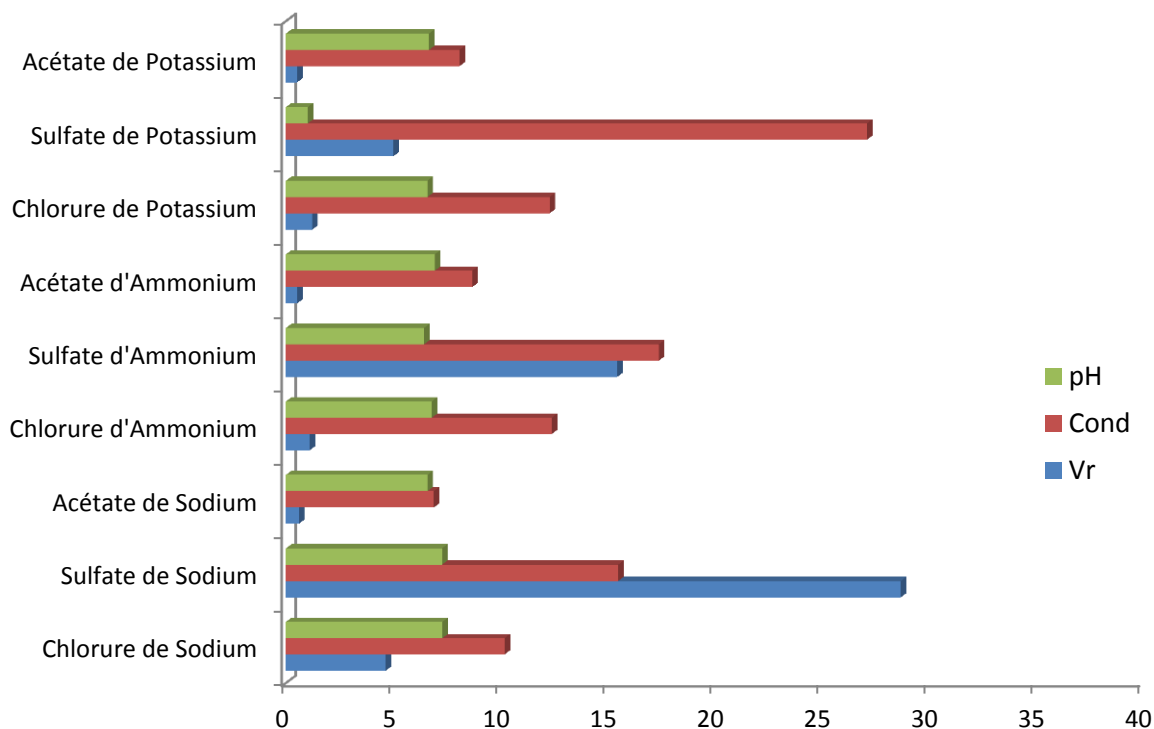


FIGURE 44. INFLUNCE DE LA NATURE DES SELS SUR LA CONDUCTIVITE, LE PH ET LE TEMPS DE RETENTION DU LYSOZYME SUR PPA HYPERCEL (EN VERT : LE PH, EN ROUGE : LA CONDUCTIVITE ET EN BLEU : LE VOLUME DE RETENTION EN CV)

3.6.2. EFFET DE LA GLYCINE

Nous avons étudié l'influence de l'acide aminé zwitterionique glycine sur les interactions en mode mixte. Nous avons pour cela utilisé deux protéines basiques l' α -chymotrypsinogène-A et le lysozyme. Des concentrations de l'ordre de 2 M de glycine sont pour évaluer l'influence de cet acide aminé qui est notamment utilisé dans les tampons d'éluion en chromatographie d'affinité. De par sa structure, la glycine ne modifie pas la conductivité des solutions (**figure 45**).

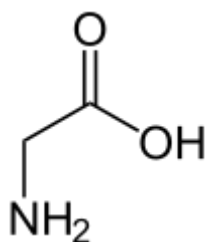


FIGURE 45. FORMULE CHIMIQUE DE LA GLYCINE.

Avec le lysozyme, nous observons que l'interaction n'est pas favorisée avec les résines en mode mixte HEA et PPA HyperCel, dans la mesure où nous retrouvons la protéine dans la fraction non retenue (**Figures 46 et 47**). En utilisant l' α -chymotrypsinogène-A, on observe des temps de rétention nettement supérieurs en présence de glycine dans le tampon. Ce phénomène est observé uniquement sur HEA, dans la mesure où la fixation de l' α -chymotrypsinogène-A sur PPA est effective dans ces conditions. Les conditions de force ionique et de pH sont bien sûr identiques.

Ces résultats nous permettent de proposer que la glycine influence la rétention de certaines molécules sur les supports en mode mixte, et peut être utilisée pour promouvoir la fixation de protéines faiblement adsorbées. La glycine peut ainsi favoriser les interactions hydrophobes entre les protéines et les supports de chromatographie en mode mixte, mais cet acide aminé influence également les interactions électrostatiques [Arakawa and Timasheff, 1984 ; Gagnon and Grund, 1996]. En effet, la glycine joue au niveau de la polarité de la phase mobile et de la tension de surface de la solution. Ainsi la glycine favorise la rétention de l' α -chymotrypsinogène-A dans les conditions testées en augmentant l'attraction hydrophobe ainsi que les interactions électrostatiques favorables entre un ligand chargé positivement et les zones négatives à la surface de la protéine. Dans le cas du lysozyme, la protéine étant majoritairement chargés positivement, la répulsion de charge est augmentée par la glycine et l'interaction non favorisée.

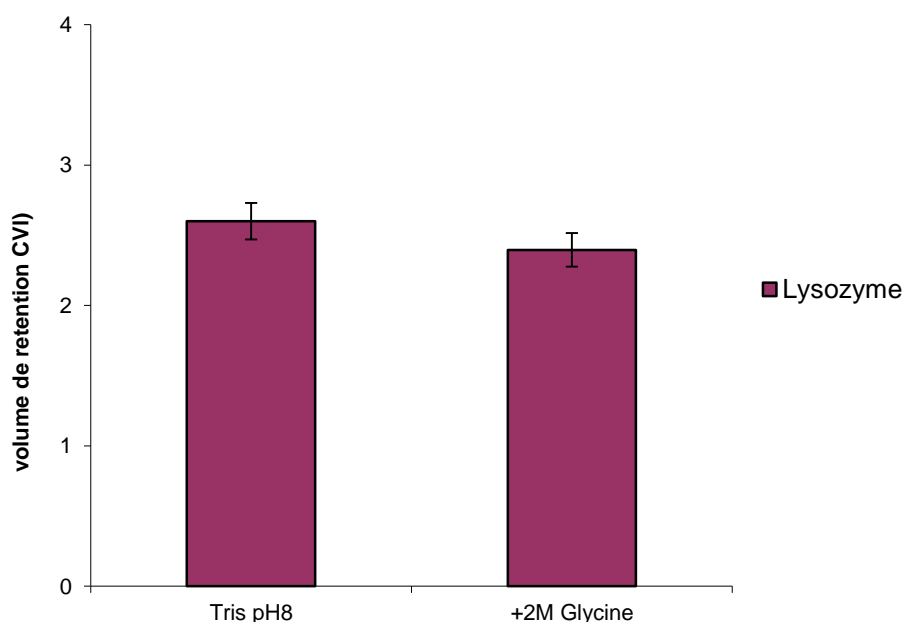


FIGURE 46. INFLUENCE DE LA GLYCINE SUR LA RETENTION DU LYSOZYME SUR PPA HYPERCEL.

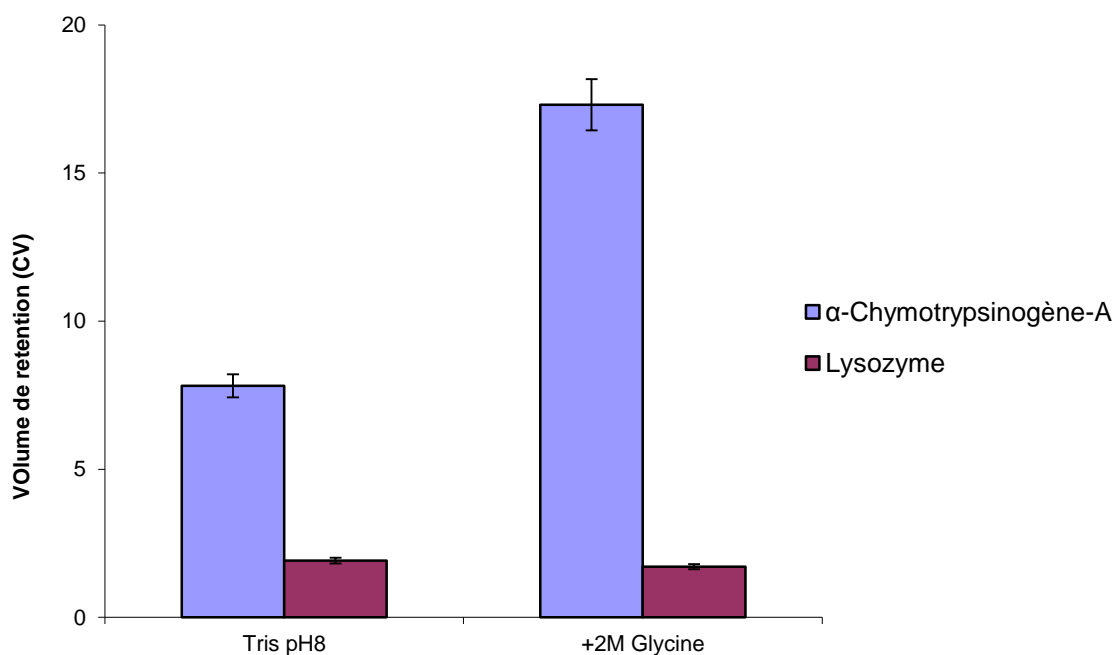


FIGURE 47. INFLUENCE DE LA GLYCINE SUR LA RETENTION DU LYSOZYME ET DE L' α -CHYMOTRYPSINOGENE-A SUR HEA HYPERCEL.

3.7. SELECTIVITE DES RESINES MODE MIXTE

3.7.1. REDUCTION DE LA CHARGE DU LYSOZYME MODIFIE

Nous avons vu lors des expériences précédentes que la charge de la protéine intervient fortement dans le comportement de séparation sur les résines mode mixte. Nous avons également observé que le lysozyme présentait un certain nombre de charges positives dues à la forte proportion d'acides aminés arginine dans sa séquence primaire (11 arginines) (**Figure 48**). En effet le groupe guanidium de l'arginine est protoné sur une large gamme de pH. En fait, la guanidine est la base organique connue la plus forte. Les charges locales de cette protéine étaient donc davantage responsables de son comportement chromatographique que sa charge globale.

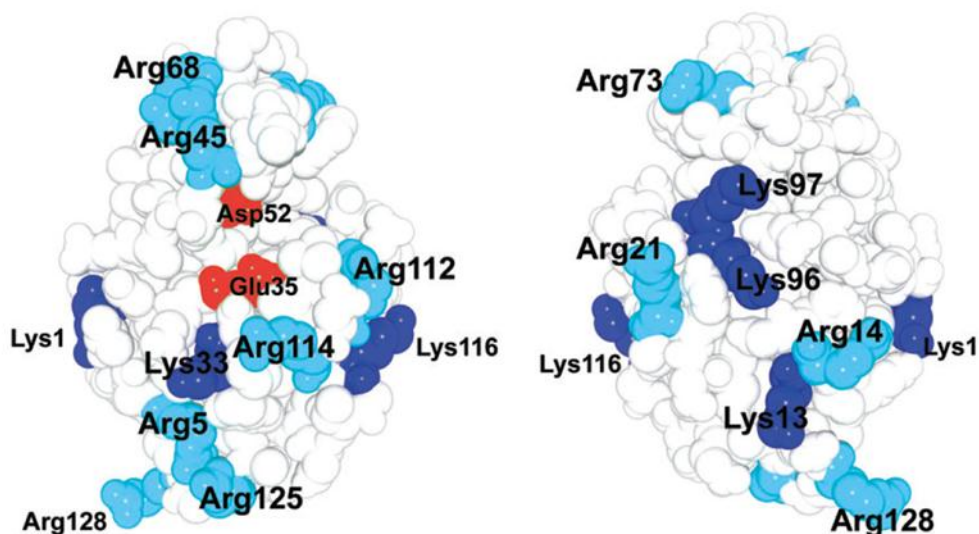


FIGURE 48. STRUCTURE DU LYSOZYME

Afin de vérifier ce comportement et surtout d'observer la sélectivité des résines mode mixte, nous avons cherché à modifier ces charges positives et à les éliminer. Nous voulions ainsi observer la différence de comportement suite à la modification des charges locales et approfondir la compréhension du mécanisme mode mixte.

Nous avons donc cherché à modifier chimiquement les propriétés de surfaces de la protéine. Pour cela nous avons utilisé le phenylglyoxal (PG) qui a été décrit comme réagissant spécifiquement avec les résidus arginine des protéines et éliminant leurs charges positives [Takahashi, 1968 ; 1977]. L'utilisation de cette technique de modification de protéine a notamment été mise en évidence pour l'inactivation d'enzymes telles que l'hydroxylase hydroxybenzoate [Shoun *et al.*, 1980] ou la tryptophanase [Kazarinoff *et al.*, 1977]). Ces résultats suggéraient que la modification de résidus arginine essentiels au sein de sites de fixation perturbe la fonction enzymatique. Dès lors de nombreuses expériences de modification de ces arginines dans le but de modifier la fonction enzymatique ont été effectuées. Elles ont démontré la modification de la réactivité d'enzymes et la perte de la fixation de coenzyme en présence de phenylglyoxal et ont ainsi démontré l'implication des arginines. [Vanoni *et al.*, 1987]. Le rôle des arginines dans les sites de fixation de molécule anioniques a ainsi été montré dans de nombreuses classes d'enzymes. [Patthy and Thesz, 1980]. Le groupement guanidium de l'arginine interagit notamment avec les groupes

phosphates négatifs des substrats. Le phenylglyoxal modifie donc des arginines essentielles à la catalyse.

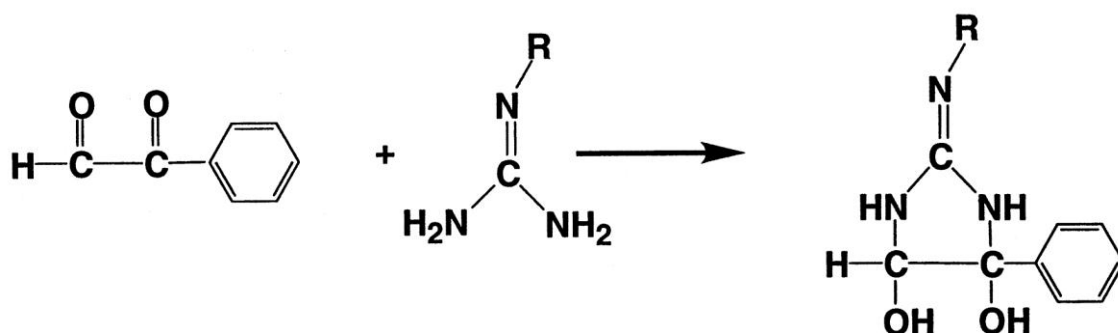


FIGURE 49. PROPOSITION DE MECANISME REACTIONNEL DU PHENYLGLYOXAL SUR L'ARGININE

Le mécanisme d'action du phenylglyoxal sur les résidus arginine est proposé **figure 49** [Wood *et al.*, 1998]. Cette modification est spécifique aux arginines et à leur groupement guanidium, on retrouve néanmoins quelques modifications de lysines hyper-réactives ou d'amines terminales, dans de rares cas et lors de l'utilisation de très fortes concentrations et de temps de réactions prolongés. Le phenylglyoxal réagit uniquement avec l'arginine non protonée et ce même si le pH réactionnel est inférieur au pKa. La réaction est donc favorisée par l'utilisation de pH basique. La stœchiométrie de la réaction a longtemps été décrite comme nécessitant l'ajout de deux molécules de phenylglyoxal par arginine, l'intermédiaire avec une seule molécule de PG étant « instable ». Néanmoins certaines études ont montré l'inhibition d'activités enzymatiques en présence d'une seule molécule de PG par protéine, la stabilité de l'intermédiaire et la stœchiométrie étant fortement dépendantes de la concentration en PG et du pH réactionnel. [Kasher *et al.*, 1986 ; Riordan, 1979].

La modification des résidus arginine d'une protéine par le PG est donc à l'origine de modifications de charges à la surface des protéines [Gao and Whitesides, 1997]. Des protéines modifiées par le PG ont notamment été analysées sur gels d'isoélectrofocalisation et ont montré un déplacement important de leurs pIs vers des pH acides (**Figure 50**) [Droz *et al.*, 1994]. La modification de la charge des protéines par le phenylglyoxal a également été proposée comme étant à l'origine de changements structuraux induisant alors des modifications d'hydrophobicité de surface. [Chung *et al.*, 1998].

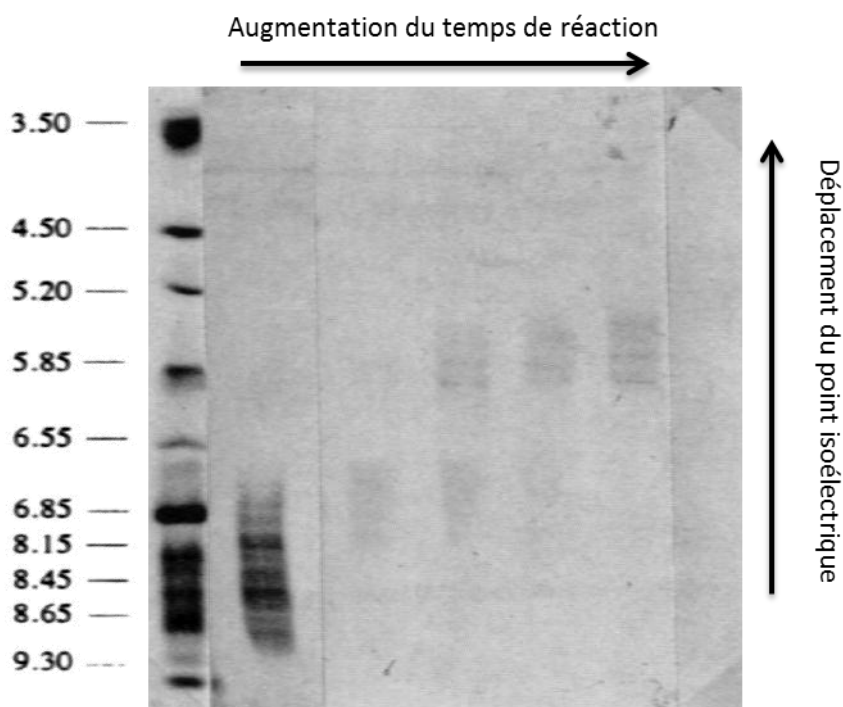


FIGURE 50. ISOELECTROFOCALISATION D'IMMUNOGLOBULINES MODIFIEES PAR LE PHENYLGLYOXAL [DROZ *ET AL.*, 1994]

En utilisant cette propriété spécifique, nous avons alors préparé différentes solutions de lysozymes modifiés avec différentes conditions (temps de réactions, températures) afin de faire varier le nombre d'arginines modifiées. Nous avons alors analysées ces échantillons sur résines mode mixte, et observé leurs comportements d'adsorption, de rétention et d'élution. Les différents pics obtenus ont été analysés en spectrométrie de masse afin de déterminer précisément le nombre de phénylglyoxals fixés et d'estimer le nombre d'arginines modifiées.

Avec ces échantillons modifiés, nous avons pu comparer les comportements de rétentions par rapport à du lysozyme non modifié. Ainsi la protéine native n'est pas retenue sur les colonnes HEA et PPA HyperCel à pH 8 et sans sels (**Figure 16**).

En utilisant un échantillon de lysozyme modifié par le phénylglyoxal nous avons observé un pic non retenu mais retardé sur les colonnes avec un temps de rétention de plus de 5 CV. L'analyse en spectrométrie de masse nous informe de la présence d'une molécule de PG dans cet échantillon. Ainsi la modification d'une charge a déjà permis la modification de la rétention de la protéine sur les résines mode mixte.

Nous avons également observé un certain nombre de protéines correctement adsorbées sur les colonnes mode mixte et nécessitant alors une diminution du pH pour être éluées. Ces protéines ont révélé avoir un nombre plus importants de PG fixés sur les arginines. La modification des arginines a donc permis l'adsorption du lysozyme sur les résines HEA et PPA HyperCel à pH8 en conditions de faible force ionique. Ainsi cette modification influence fortement l'interaction entre les résines mode mixte et cette protéine.

En variant les conditions, nous avons pu faire varier le nombre de molécules de phenylglyoxal fixées par protéine. En fait un échantillon de lysozyme modifié est dans la plupart des cas une population de protéines contenant plus ou moins de phenylglyoxal. Lors de nos expériences nous avons donc observé un certain nombre de pics plus ou moins retardés et/ou élués à différents pH. Ayant appliqué exactement les mêmes méthodes de chromatographie sur chaque échantillon et colonne, nous avons pu déterminer et comparer chaque temps de rétention. Grâce à l'analyse en spectrométrie de masse nous avons pu relier ce temps de rétention au nombre de PG fixé.

Nous observons sur la **Figure 51** l'augmentation de la rétention des protéines à mesure que la quantité de PG fixé augmente. Au bout d'un certain nombre de PG fixés et donc d'arginine modifiée, la rétention se transforme en adsorption, il est alors nécessaire d'utiliser un gradient de pH pour observer les protéines modifiées (limite d'adsorption). Le temps de rétention devient donc dépendant du pH nécessaire à l'éluion de la protéine. Plus il y a de PG, plus il est nécessaire d'utiliser un pH acide pour éluer la protéine et plus la rétention est longue. Nous observons également une différence entre les deux résines mode mixte. La rétention par rapport au nombre de molécule de PG fixées augmente plus rapidement pour la résine PPA HyperCel que pour la résine HEA HyperCel de la rétention. Le nombre de charges à éliminer par protéine pour assurer une bonne interaction avec PPA HyperCel est donc plus faible que pour HEA HyperCel. Ceci est en accord avec les précédents résultats montrant que l'interaction sur PPA HyperCel est plus forte que sur les autres résines mode mixte.

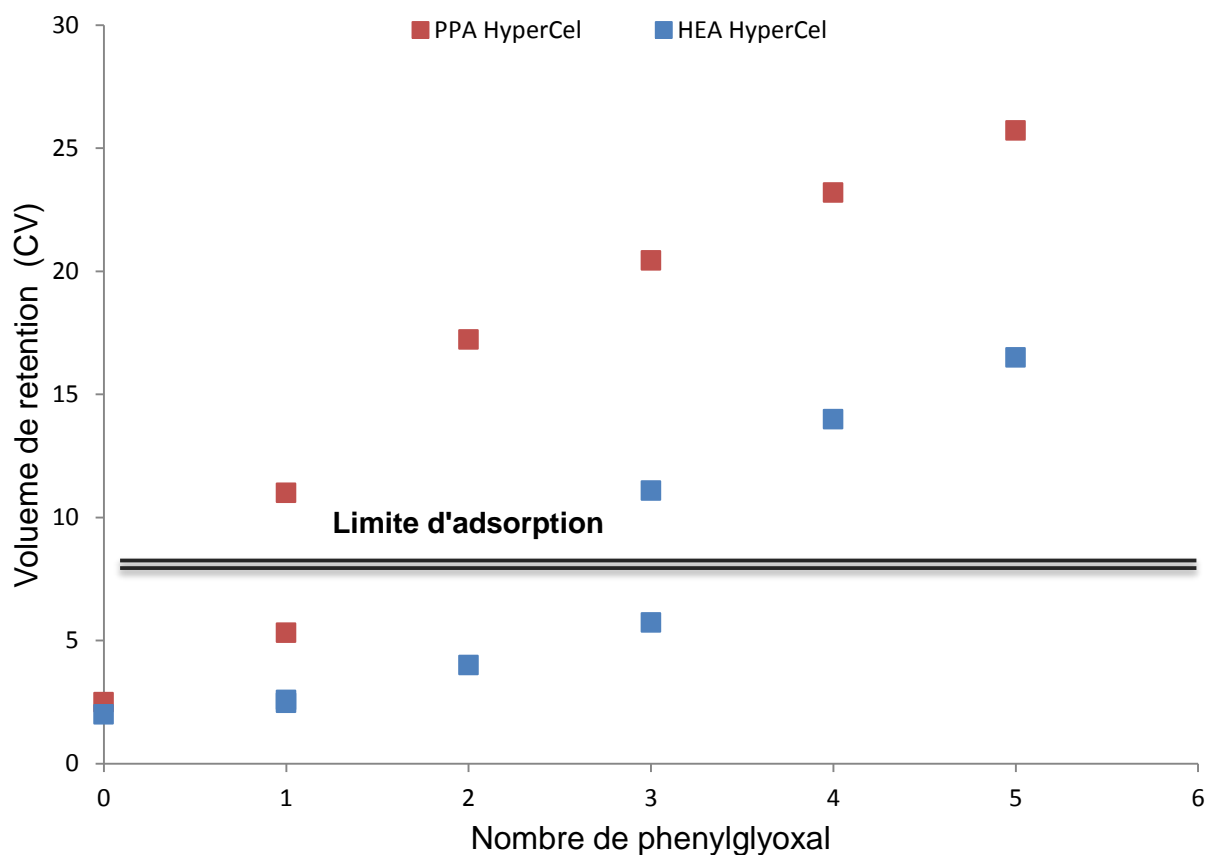


FIGURE 51. INFLUENCE DE LA MODIFICATION DU LYSOZYME PAR LE PHENYLGLYOXAL SUR L'INTERACTION AVEC LES SUPPORTS DE CHROMATOGRAPHIE EN MODE MIXTE.

Nous observons également lors de certaines expériences que les supports mode mixte sont capables de séparer des molécules différant uniquement par une seule modification d'arginine. Ces résines possèdent donc un fort pouvoir de séparation. La charge est extrêmement importante dans le mécanisme de séparation et permet la sélectivité de ces résines en combinaison avec les effets hydrophobes.

Les phénomènes particuliers de rétention observés avec cette protéine à des pH basiques semblent donc bien être confirmés par la présence de charge positive locale proches d'un site de fixation et perturbant l'interaction. La modification de ces charges permet de favoriser l'adsorption de cette protéine.

Nous avons récupéré les pics d'élutions des chromatographies en mode mixte sur HEA et PPA HyperCel, contenant du lysozyme modifié par le phénylglyoxal. Nous avons ensuite passé ces échantillons sur une chromatographie d'échange de cations afin de mettre en évidence la modification de la distribution des charges à la surface du lysozyme.

Sur la **Figure 52**, on observe que plus le nombre de phenylglyoxal augmente, moins il est nécessaire d'ajouter de sels sur la colonne échangeuse d'ions pour éluer les protéines. S'agissant d'une résine de chromatographie d'échange de cations, le ligand est chargé négativement et interagit avec les acides aminés chargés positivement des protéines. Le fait de réduire la quantité de sels nécessaire à l'élution des lysozymes modifiés par le phenylglyoxal montre bien la diminution de la force de l'interaction électrostatique entre le support de chromatographie et les protéines. Le phenylglyoxal perturbe donc efficacement les charges positives des arginines. De plus, ces résultats confirment que les résines de chromatographie en mode mixte permettent de séparer efficacement des molécules présentant une modification chimique au niveau d'un acide aminé. En effet, une seule espèce protéique est retrouvée par échantillons lors de ces expériences utilisant la résine échangeuse de cations.

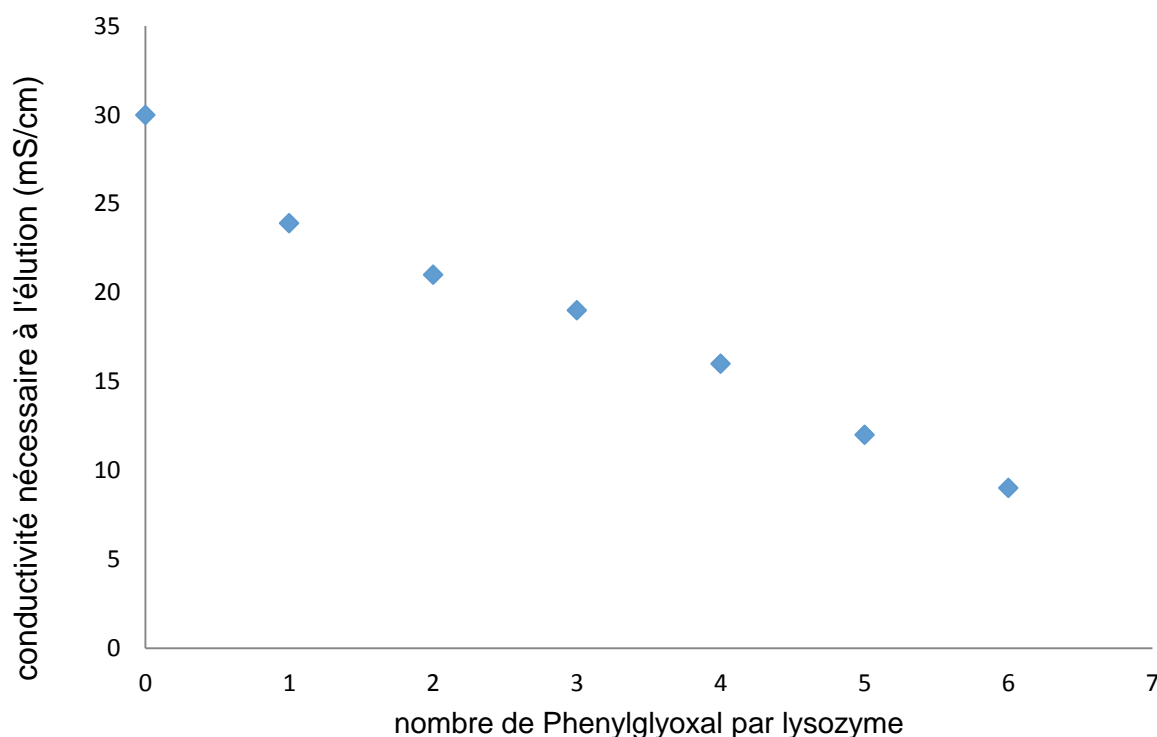


FIGURE 52. INFLUENCE DU PHENYLGLYOXAL SUR LES CHARGES DU LYSOZYME ET SON ADSORPTION SUR RESINES D'ECHANGE DE CATIONS.

La structure du phenylglyoxal et la présence de cycles aromatiques, laisse penser que des modifications au niveau d'interactions hydrophobes ou aromatiques sont possibles. Nous avons alors analysé les échantillons obtenus après séparations sur les résines de chromatographie en mode mixte, sur des résines d'interactions hydrophobes.

Pour cela, nous avons utilisé des résines portant des ligands hexyl et phenyl, comme précédemment. Ainsi nous avons pu mettre en évidence la modification significative du potentiel hydrophobe des lysozymes modifiés par le phenylglyoxal. En effet, le lysozyme, qui est une molécule relativement hydrophile, nécessite des concentrations salines importantes (1.5 M sulfate d'ammonium) pour s'adsorber sur des résines d'interactions hydrophobes. L'éluion de la protéine native est obtenue dès le début d'un gradient linéaire sans sels. Sur la **Figure 53**, on observe que la diminution de la force ionique nécessaire pour obtenir l'éluion des protéines, est d'autant plus importante que le nombre de phenylglyoxals est grand. Ainsi l'hydrophobicité du lysozyme est augmenté par l'ajout de phenylglyoxals.

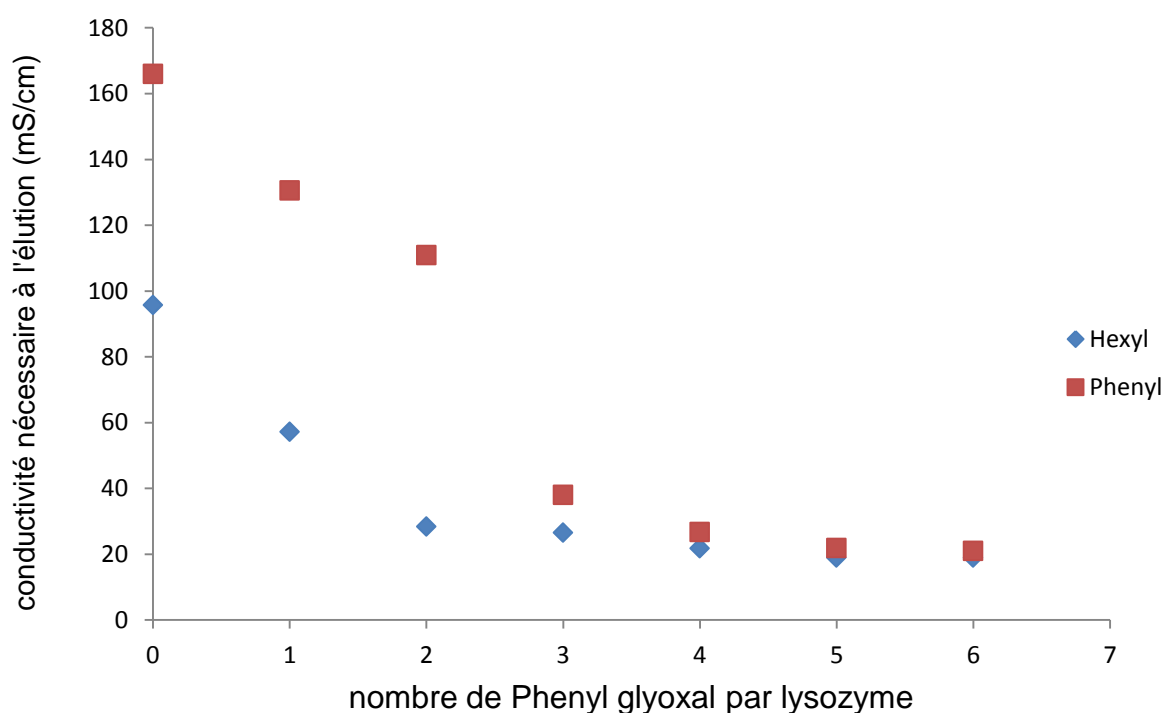


FIGURE 53. INFLUENCE DU PHENYLGLYOXAL SUR L'HYDROPHOBICITE DU LYSOZYME ET SON ADSORPTION SUR RESINE D'INTERACTION HYDROPHOBE.

Les interactions sur les résines de chromatographie en mode mixte HEA et PPA HyperCel, ont donc été favorisées à la fois par la réduction de la répulsion de charges locales au niveau des arginines, et par l'augmentation de l'hydrophobicité de surface des protéines.

3.7.2. DES SELECTIVITE ORIGINALES

Grace aux interactions mises en jeu dans les supports de chromatographie en mode mixte, il est possible d'obtenir des séparations de molécules difficiles à atteindre sur des chromatographies classiques.

On peut en effet utiliser le contrôle du pH pour séparer un ensemble de protéines dont certaines de points isoélectriques similaires (ovalbumine et BSA) (**Figures 54 et 55**).

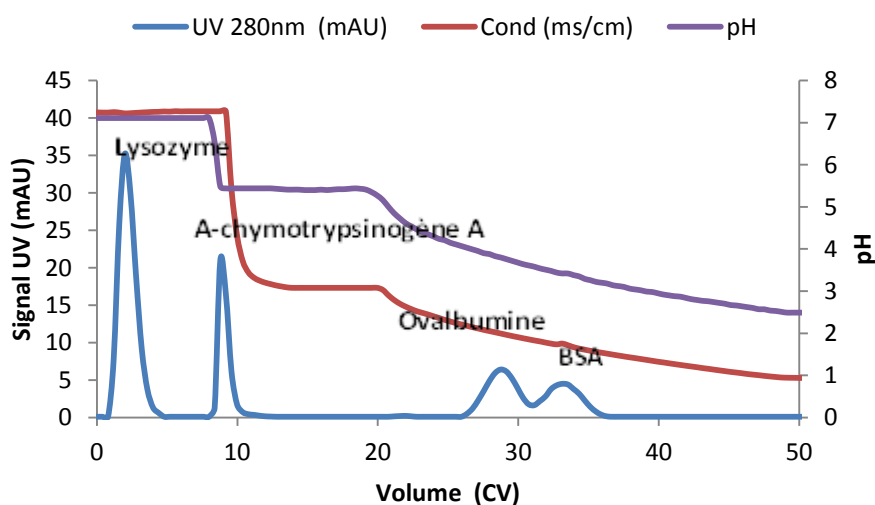


FIGURE 54. SEPARATION D'UN MELANGE PROTEIQUES CONTROLEE PAR LE PH SUR HEA HYPERCEL

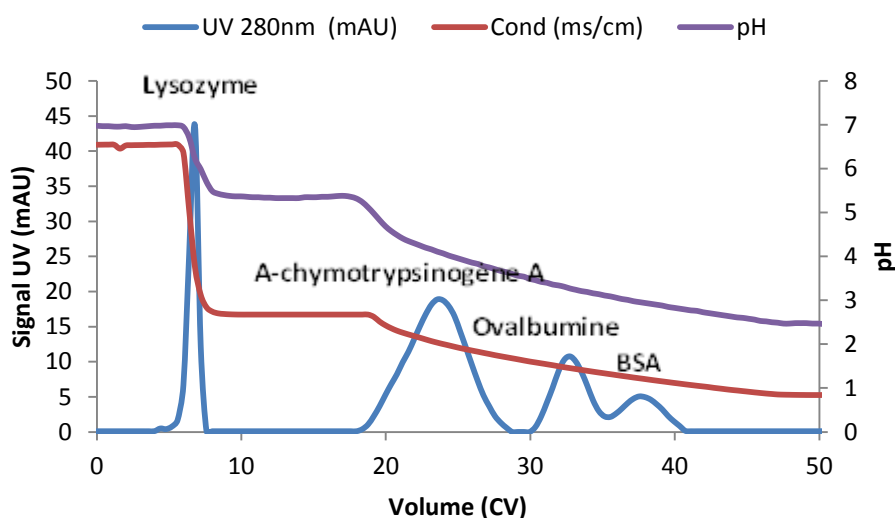


FIGURE 55. SEPARATION D'UN MELANGE PROTEIQUES CONTROLEE PAR LE PH SUR PPA HYPERCEL

On peut également séparer ces mêmes protéines par le contrôle d'un chaotrope ionique fort (guanidine) sans changement de pH (pH 8).

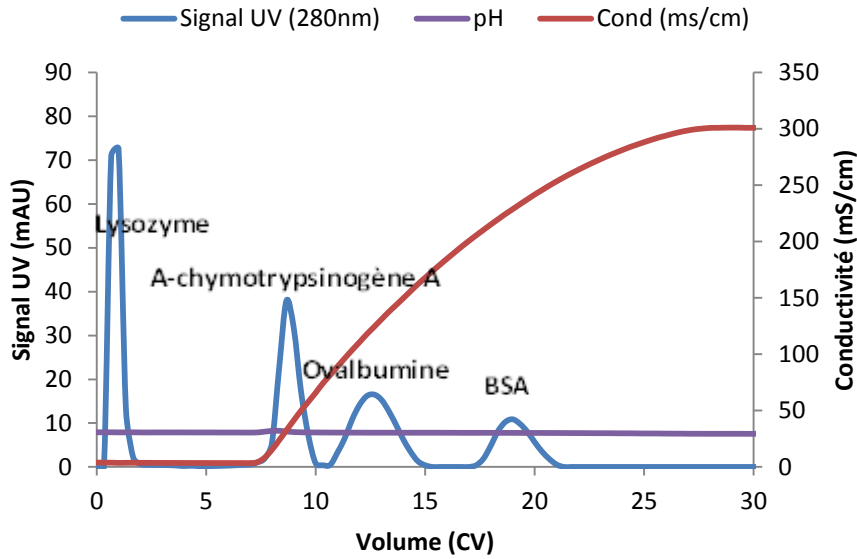


FIGURE 56. SEPARATION D'UN MELANGE PROTEIQUES CONTROLEE PAR LA GUANIDINE SUR HEA HYPERCEL

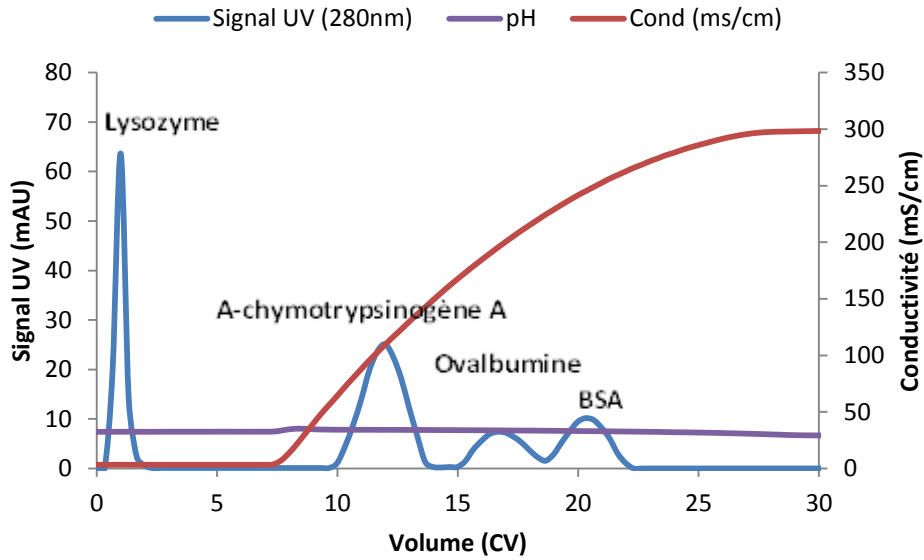


FIGURE 57. SEPARATION D'UN MELANGE PROTEIQUES CONTROLEE PAR LA GUANIDINE SUR PPA HYPERCEL

4. APPLICATIONS

Dans les chapitres suivants, nous présenterons les applications de la chromatographie en mode mixte que nous avons développé pour la purification de molécules d'intérêt biologique.

Les connaissances obtenues par la caractérisation des mécanismes impliqués dans les supports de chromatographie en mode mixte HyperCel, nous ont permis d'affiner et d'améliorer les performances de séparation et de proposer des applications originales.

Ces travaux ont fait l'objet de publications dont nous rappellerons les principaux contextes et objectifs ainsi que les avancées obtenues. Ils sont présentés dans les articles suivants :

Article 1 :

Cabanne C., Pezzini J., Joucla Gilles, Hocquellet A., Barbot C., Garbay B. and Santarelli X. (2009). Efficient purification of recombinant proteins fused to maltose-binding protein by mixed-mode chromatography, *J. Chromatog. A*, 1216, 4451-4456,

Article 2 :

Pezzini J., Brenac Brochier V., Barrouillet M.P., Cerruti M., Clofent-Sanchez G., Schapman A., Topol A., Robert R., Cabanne C., Cerruti P. and Santarelli X. (2009). Rapid screening of purification strategies for the capture of a human recombinant F(ab')₂ expressed in baculovirus-infected cells using a micro-plate approach and SELDI-MS, *J. Chromatog. B*, 877, 2428-2434

Article 3 :

Pezzini J., Joucla G., Gantier R., Toueille M., Lomenech A.M., Le Sénéchal C., Garbay B., Santarelli X. and Cabanne C. (2011). Antibody capture by mixed-mode chromatography: A comprehensive study from determination of optimal purification conditions to identification of contaminating host cell proteins, *J. Chromatog A*, 1218, 8197-8208.

4.1.LA CHROMATOGRAPHIE EN MODE MIXTE POUR LA PURIFICATION DE PROTEINES RECOMBINANTES AVEC ETIQUETTE MALTOSE BINDING PROTEIN (ARTICLE 1)

La protéine Maltose Binding Protein (MBP) est couramment utilisée comme étiquette lors de la production de protéines recombinantes. Elle permet d'augmenter la solubilité, de faciliter la détection, mais aussi de faciliter la purification via la chromatographie d'affinité. Néanmoins les techniques de purification (utilisant les résines greffées avec de l'amylose ou de la dextrine) présentent certains inconvénients en termes d'efficacité ou de capacité de fixation. Connaissant les propriétés physico-chimiques de la MBP : acide, de masse moléculaire moyenne et avec une forte proportion d'acides aminés hydrophobes à sa surface [Fox *et al.*, 2001], nous avons envisagé d'utiliser la chromatographie en mode mixte comme candidat pour la purification de la MBP ou de protéines étiquetées avec la MBP.

Nous avons alors cherché à comparer la chromatographie en mode mixte et notamment les résines HEA et PPA HyperCel avec des résines d'amylose et de dextrine pour la capture de protéines de fusion étiquetées avec la MBP et exprimées de façon recombinante. Nous avons comparé ces résines en termes d'efficacité de purification, de rendement, de capacité dynamique de fixation et de sélectivité.

Ces expériences nous ont permis d'obtenir une des premières approches de purification en mode mixte à partir d'un milieu complexe biologique. Nous avons pu observer des interactions fortes entre les résines de chromatographie en mode mixte HEA et PPA HyperCel et les protéines MBP (sous formes chimériques ou non). En effet, nous avons observé une meilleure adsorption sur les résines mode mixte que sur les résines « amylose ». Ceci est notamment dû à une perte moins importante de MBP au cours des étapes de lavages (**Fig. 2 et 3**). Ceci conforte l'observation précédente qui indiquait la forte capacité des résines de chromatographie en mode mixte à adsorber des protéines acides et contenant un certain nombre de résidus hydrophobes. Nous avons pu également montrer que ces interactions étaient efficaces dans des milieux complexes et non seulement en tampons aqueux standards.

Nous avons confirmé la sélectivité forte des résines mode mixte pour la protéine cible dans cet extrait protéique brut bactérien. Cette sélectivité peut notamment être expliquée par de faibles interactions de la majorité des contaminants protéiques, qui sont soit très fortement

solubles et donc hydrophiles, soit basiques. La molécule éluée est généralement l'espèce majoritaire et est souvent la seule observée lors de l'étape de purification. En effet, la plupart du temps des analyses fines en spectrométrie de masse montrent une grande variété de protéines contaminantes, mais celles-ci ne sont, chacune, que très faiblement concentrées. Il est donc très difficile de les observer en électrophorèse. De plus, du fait des mécanismes mode mixte combinant plusieurs types d'interactions, seul un faible nombre de protéines vont présenter la bonne combinaison de propriétés physico-chimiques pour exposer le même comportement d'interaction en mode mixte que la molécule cible, dans les conditions choisies.

Etant donné la force d'interaction des résines mode mixte, un certain nombre de molécules contaminantes restent également adsorbées sur les résines, et ne sont pas éluées au cours des différentes étapes de lavage et d'élution. Ces molécules ne présentent pas suffisamment de charges à leur surface par rapport à leur hydrophobicité, soit présentent un caractère trop acide. Ces molécules sont donc éliminées lors des phases de nettoyages et de régénérations des résines, mais ne contaminent pas la protéine cible.

Nous avons ensuite montré que les résines mode mixte présentaient des capacités de fixation dynamique plus importantes que les résines amylose tout en conservant une efficacité équivalente (**Table 4**). La force de l'interaction en mode mixte combinée à l'hétérogénéité de la distribution des charges et des zones hydrophobes à la surface des protéines permet d'envisager des adsorptions efficaces des « protéines MBP » au travers de multiples sites d'interactions.

Nous avons enfin observé que les rendements d'élution étaient plus importants sur les résines de chromatographie en mode mixte (**Table 5**). En effet, malgré une grande force d'adsorption guidant le mécanisme, la dualité de fonctionnement inhérente à la chromatographie en mode mixte permet de modifier la balance entre les différents types d'interactions en changeant l'environnement. L'élution des molécules est induite par des répulsions électrostatiques. On obtient alors une élution « active » et non simplement basée sur la perturbation d'une interaction ou la compétition, permettant l'obtention de rendements importants.



Efficient purification of recombinant proteins fused to maltose-binding protein by mixed-mode chromatography

Charlotte Cabanne*, Jérôme Pezzini, Gilles Joucla, Agnès Hocquellet, Caroline Barbot, Bertrand Garbay, Xavier Santarelli

EA 4135, ESTBB, Université V. Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 January 2009
Received in revised form 10 March 2009
Accepted 16 March 2009
Available online 20 March 2009

Keywords:

Mixed-mode chromatography
Maltose-binding protein
Recombinant protein purification

ABSTRACT

Two mixed-mode resins were evaluated as an alternative to conventional affinity resins for the purification of recombinant proteins fused to maltose-binding protein (MBP). We purified recombinant MBP, MBP-LacZ and MBP-Leap2 from crude *Escherichia coli* extracts. Mixed-mode resins allowed the efficient purification of MBP-fused proteins. Indeed, the quantity of purified proteins was significantly higher with mixed-mode resins, and their purity was equivalent to that obtained with affinity resins. By using purified MBP, MBP-LacZ and MBP-Leap2, the dynamic binding capacity of mixed-mode resins was 5-fold higher than that of affinity resins. Moreover, the recovery for the three proteins studied was in the 50–60% range for affinity resins, and in the 80–85% range for mixed-mode resins. Mixed-mode resins thus represent a powerful alternative to the classical amylose or dextrin resins for the purification of recombinant proteins fused to maltose-binding protein.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Expression of recombinant proteins in heterologous organisms usually requires fusion of the said protein with a polypeptide partner. This fusion partner, or tag, facilitates the purification process and in several cases the detection of the recombinant protein. Moreover, it may improve the solubility of the recombinant protein, thereby preventing the formation of biologically inactive aggregates. Maltose-binding protein (MBP) has been widely used as a fusion partner for the production of recombinant protein in *Escherichia coli* [1]. It allows a high level of expression, increases the solubility of the fused protein, and binds specifically to an immobilized ligand composed of amylose or dextrin, thus facilitating the purification process [2–5]. Nevertheless, purification of MBP-fusion proteins by affinity chromatography may be less straightforward than usually expected. Hence, it is thought that the affinity of MBP for amylose or dextrin resins depends on multiple factors. The nature of the protein fused to the MBP can influence the binding capacity of MBP, which may lead to lower purification yields [6]. In one case, it was demonstrated that the fusion partner interacted with the maltodextrin-binding site of MBP, thus preventing the correct binding of the fusion protein during the amylose chromatography step [7]. Moreover, endogenous α -amylases produced by *E. coli* can degrade the Amylose resin, and thus decrease

the purification yield [8]. To circumvent these problems, several authors added a hexahistidine tag (His6) to their MBP-fusion constructs [6,9]. Their goal was to keep the solubility effect mediated by MBP, and to use immobilized metal affinity chromatography (IMAC) to purify the recombinant protein throughout its His-tag. Furthermore, a one-step chromatography process on IMAC was successfully used to purify a recombinant protein fused to MBP, suggesting that MBP itself can interact with copper-chelating columns [10].

MBP has an unusually large number of exposed hydrophobic zones on its surface [3]. Based on this observation, we tested an alternative mixed-mode chromatography method to purify MBP-fused proteins. We used two recently developed mixed-mode resins: HEA and PPA HyperCel [11]. Using these resins, protein purification is based on hydrophobic, ionic or electrostatic and/or pseudo-affinity interactions during the binding step and essentially ionic interactions (charge repulsion) during the elution step. This dual mode technique based on ionisable ligands was first termed hydrophobic charge induction chromatography [12]. It is aimed at the purification of proteins in low-to-moderate salt concentrations when compared to the traditional hydrophobic interaction chromatography (HIC). The possibility to bind proteins under neutral “physiological-like” conditions minimizes their precipitation and/or aggregation, and may contribute to a better recovery. Mixed-mode chromatography has been used as an alternative to Protein A or HIC chromatography to purify monoclonal antibodies [12–18], and to purify other proteins such as serum albumin or penicillin acylase [19–23]. In this study, we investigated the potential of HEA and PPA HyperCel resins to purify MBP and two recombinant MBP-

* Corresponding author.

E-mail address: charlotte.cabanne@estbb.u-bordeaux2.fr (C. Cabanne).

containing polypeptides, MBP-Leap2 and MBP-LacZ. The results were compared to those obtained with conventional affinity resins.

2. Experimental

2.1. Materials

2.1.1. Columns, media and chemicals

C10/10 columns (10 mm × 100 mm) were used for all resins (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Dextrin Sepharose High Performance (rigid highly cross-linked 6% agarose) was provided by GE Healthcare. Amylose resin (highly cross-linked 4% agarose) and Amylose resin HF (highly cross-linked 6% agarose) were purchased from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA). Phenylpropylamine (PPA) and hexylamine (HEA) HyperCel chromatography resins (high porosity cross-linked cellulose) were provided by Pall BioSeptra (Cergy, France).

Buffers were prepared using chemicals of analytical grade from Sigma–Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

2.1.2. Instrumentation

An Akta Explorer 100 workstation from GE Healthcare was used for chromatographic experiments monitored with Unicorn 5.0. Protein detection was operated at 280 nm.

Analysis of the different fractions was performed by reversed-phase HPLC (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) on a reversed-phase divinylbenzene Amberchrom XT20 column (Rohm and Haas, Philadelphia, PA, USA).

The NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) was used to measure protein concentration at 280 nm.

2.1.3. Biological material

MBP, MBP-Leap2 and MBP-LacZ were produced in *E. coli* and purified in our laboratory. Briefly, molecular constructions were made for each protein with the pMALc2E vector (New England Biolabs). The vector express the *malE* gene which encodes MBP fused to the *lacZα* gene. Restriction sites between *malE* and *lacZα* are available for inserting the coding sequence of interest. The vectors also include a sequence coding for the recognition site of a specific protease (enterokinase). The three constructs were then introduced into competent *E. coli* cells. After selection, positive clones were grown in 20 ml of rich LB medium (1% bacto tryptone, 0.5% NaCl, 1% yeast extract). This pre-culture was then added to 2 l rich LB medium supplemented with glucose (3 g/l) and ampicillin (100 μg/ml), and cells were cultivated at 37 °C in a bioreactor (Biostat B plus, Sartorius). When the absorbance at 600 nm reached a value of 0.6, isopropyl β-d-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to a final concentration of 0.3 mM, and the temperature of the bioreactor was decreased to 25 °C. After 5 h of induction, the cells were harvested by centrifugation (7400 × g, 4 °C, 10 min). A 1-g amount (fresh weight) of cell pellet was re-suspended in 5 ml lysis buffer (20 mM Tris–HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) containing protease inhibitors (Complete Mini EDTA-free, Roche, Meylan, France). Cells were disrupted by sonication at 40 W with a 13 mm probe (six cycles of 1 min pulse/1 min incubation on ice). After

Table 1
Properties of tested proteins.

| Protein | Isoelectric point (pI) | Molecular mass (kDa) |
|-----------|------------------------|----------------------|
| MBP | 5.0 | 42.615 |
| MBP-LacZ | 5.3 | 53.521 |
| MBP-Leap2 | 5.3 | 47.182 |

Maltose-binding protein (MBP) is a part of the maltose/maltodextrin system of *E. coli* bacteria, which is responsible for the uptake and efficient catabolism of maltodextrins. MBP is usually used as a tag for recombinant protein purification. LacZ is the 75-residue amino-terminal fragment of the β-galactosidase protein used in α-complementation assays. This is a neutral peptide. Liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) is a 40-residue cationic peptide originally purified from human blood ultrafiltrate. The native peptide contains two disulfide bonds and is unique regarding its primary structure. Its biological role is not known but chemically synthesized LEAP-2 exhibits antimicrobial activities against several Gram-positive bacteria.

sonication, the extract was centrifuged at 12,000 × g for 20 min to remove the insoluble fraction. The supernatant was recovered and corresponded to the crude protein extract containing, as appropriate, one of three proteins whose properties are presented in Table 1.

2.2. Methods

2.2.1. Packing of columns

Packing of columns was performed according to the manufacturer's specifications (% slurry, flow rate and buffer). We compared three affinity and two mixed-mode resins, whose properties are presented in Table 2. Bed height and column diameter were identical for each resin.

2.2.2. Evaluation of resin performances

Each column was equilibrated with a minimum of 10 column volumes (CVs). Buffer used was 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 for mixed-mode resins, and 20 mM Tris–HCl, pH 7.4 for affinity resins. A solution of 5% (v/v) acetone in buffer was loaded on the column with a flow rate of 75 cm/h at a volume equivalent to approximately 1% (v/v) of the bed volume. Absorbance at 280 nm was recorded throughout the experiment. The number of theoretical plates per meter (*N/m*) and asymmetry factor (*AF*) were calculated as follows (Eqs. (1) and (2)):

$$N/m \text{ (m}^{-1}\text{)} = \frac{5.54 \times (\text{elution volume})^2 / (\text{peak width at half-height})^2}{\text{height of the column}} \quad (1)$$

$$AF = \frac{\text{right half-width at 10\% height}}{\text{left half-width at 10\% height}} \quad (2)$$

2.2.3. Purification of recombinant proteins from crude extract

Each column was equilibrated with a minimum of 10 CVs. For mixed-mode resins, 50 mM sodium phosphate buffer, 150 mM NaCl, pH 7.4 were used. For affinity resins 20 mM Tris–HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4 were used. Crude protein extracts (1 ml) containing one of three recombinant proteins was loaded onto each column. Columns were then washed during 10 CVs. For mixed-mode resins, 50 mM sodium phosphate buffer, 150 mM NaCl, pH 6.0, and then 50 mM sodium phosphate citrate buffer, pH 4 were used

Table 2
Properties of resins and applied flow rates.

| Resin | Ligand | Particle size (μm) | Maximum pressure (MPa) | Recommended flow rate (cm/h) |
|----------------------|-------------------|--------------------|------------------------|------------------------------|
| Dextrin Sepharose HP | Dextrin | 34 | 0.3 | 150 |
| Amylose resin | Amylose | 45–165 | 0.5 | 24 |
| Amylose resin HF | Amylose | 45–165 | 0.5 | 100 |
| HEA HyperCel | Hexylamine | 80–100 | 0.3 | 100 |
| PPA HyperCel | Phenylpropylamine | 80–100 | 0.3 | 100 |

for elution. For affinity resins, 20 mM Tris–HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM maltose, pH 7.4 were used for elution. Experiments were made in triplicate. To compare all resins, three flow rates (30, 100 and 150 cm/h) were tested. All fractions were collected for protein concentration measurement and analyses by SDS-PAGE and RP-HPLC.

2.2.4. Measurement of dynamic binding capacity (DBC)

Prior to DBC measurements, we had to purify MBP, MBP-LacZ and MBP-Leap2 from the corresponding crude extracts with Amylose resin, according to the manufacturer's instructions. Complete removal of maltose from each recombinant protein was achieved by two desalting steps on Sephadex G-25 [24].

Each column was equilibrated with a minimum of 10 CVs. For mixed-mode resins, 50 mM sodium phosphate buffer, 150 mM NaCl, pH 7.4 were used. For affinity resins 20 mM Tris–HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4 were used. DBC of each protein was determined by continuous loading of a 1 mg/ml solution until saturation occurred. Columns were then washed with 10 CVs of the appropriate buffer. For mixed-mode resins, 50 mM sodium phosphate buffer, 150 mM NaCl, pH 6.0, and then 50 mM sodium phosphate citrate buffer, pH 4 (HEA HyperCel) or pH 3 (PPA HyperCel) were used for elution. For affinity resins, 20 mM Tris–HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM maltose, pH 7.4 were used for elution. Each column was regenerated according to the manufacturer's specifications. All resins were stored in ethanol 20%. Experiments were done in triplicate. To compare all resins, three flow rates (30, 100 and 150 cm/h) were tested. Breakthrough points were determined at 10% leakage relative to the initial sample adsorption at 280 nm. Dynamic binding capacities were calculated by Eq. (3):

$$DBC = \frac{(V_p - V_o)c_p}{V_R} \quad (3)$$

where V_p is the volume of protein loaded at 10% breakthrough point, V_o the void volume of the system, c_p the protein concentration and V_R is the volume of packed resin.

2.3. Analysis

2.3.1. Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Fractions showing absorbance peaks at 280 nm were analysed by SDS-PAGE using 12% polyacrylamide gels [25]. Molecular masses were estimated using standard markers (Bio-Rad Precision Plus Protein Standard). SDS-PAGE gels were stained with Biosafe Coomassie according to the supplier's instructions (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

2.3.2. Evaluation of purity by RP-HPLC

Fractions of interest were analysed by RP-HPLC. Each fraction (100 μ l) were loaded on the column which was previously equilibrated in the mobile phase. Runs were performed with the mobile phase containing 90% solution A (0.1%, v/v, trifluoroacetic acid in water) and 10% solution B (0.085%, v/v, trifluoroacetic acid, in acetonitrile), and bound proteins were eluted with a 2%/min acetonitrile gradient. Flow rate was 1 ml/min and the absorbance of the eluent was monitored at 214 nm.

3. Results and discussion

3.1. Resin performances

N/m and AF were measured to establish the overall column efficiency (Table 3). The manufacturers of the affinity resins did not give the range of acceptable efficiency values. We therefore used usual values to estimate the packing of these columns. Typical values

Table 3
Number of plates per meter and asymmetry for each resin.

| Resin | N/m (m^{-1}) | AF |
|----------------------|--------------------|------|
| Dextrin Sepharose HP | 5700 | 1.50 |
| Amylose resin | 5300 | 1.21 |
| Amylose resin HF | 5500 | 1.71 |
| PPA HyperCel | 2870 | 0.93 |
| HEA HyperCel | 2630 | 0.99 |

Columns were equilibrated with 10 CVs of appropriate buffer and a solution of 5% (v/v) acetone in buffer was loaded on the column at a volume equivalent to approximately 1% (v/v) of the bed volume with a flow rate of 75 cm/h.

given by the manufacturers of mixed-mode resins were comprised between 1600 and 2900 plates/m for N/m , and between 0.9 and 1.39 for AF . For all columns, we measured N/m and AF values that were in the expected range, strongly suggesting that these columns were correctly packed (Table 3). The AF s measured with the affinity resins were slightly elevated. This was due to peak tailing, a phenomenon frequently encountered in small-diameter columns when the mobile phase is heterogeneous [26]. The number of plates per meter was higher with affinity resins than with mixed-mode resins. This could be due to difference in bead size, since smaller beads are more efficient.

3.2. Purification of recombinant proteins from crude extracts

Each crude protein extract containing one of the three recombinant proteins was loaded onto one of the five resins tested. Fractions were collected and pooled as flowthrough fraction (FT), wash fraction (W) and eluted fraction (E). Similar chromatographic profiles were obtained for the three affinity resins with the three recombinant proteins. As an illustration, the chromatogram obtained with Amylose resin HF for MBP-Leap2 is shown in Fig. 1. This chromatogram should be compared to the one obtained for the purification of the same MBP-Leap2 extract by mixed-mode chromatography with HEA HyperCel (Fig. 2). In the latter case, the eluted peak was higher than that obtained with affinity resins, and no visible peak was observed during the washing step. Similar results were obtained with the PPA HyperCel gel, except that elution of the bound MBP-containing protein was achieved at a lower pH value.

For each experiment, the protein concentration of the FT, W, and E fractions was measured, and the protein content analysed by SDS-PAGE and RP-HPLC. For each recombinant protein studied, we obtained similar results with the three affinity resins. Fig. 3 shows a typical gel pattern obtained with the fractions from MBP-Leap2 purification on Amylose HF resin. Protein concentration and RP-HPLC profiles confirmed the observations made by SDS-PAGE. As

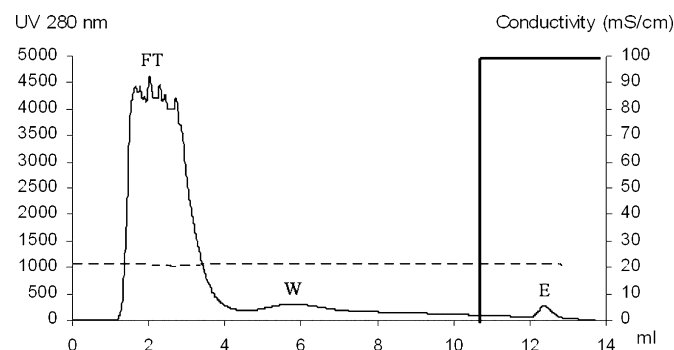


Fig. 1. Purification of MBP-Leap2 on Amylose resin HF. Crude protein extract (1 ml) was loaded on the column at 100 cm/h. The column was then washed with 20 mM Tris–HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4. 20 mM Tris–HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM maltose, pH 7.4 was used for elution. FT: flowthrough; W: wash fraction; E: eluted fraction (absorbance at 280 nm, conductivity in mS/cm, % of buffer B).

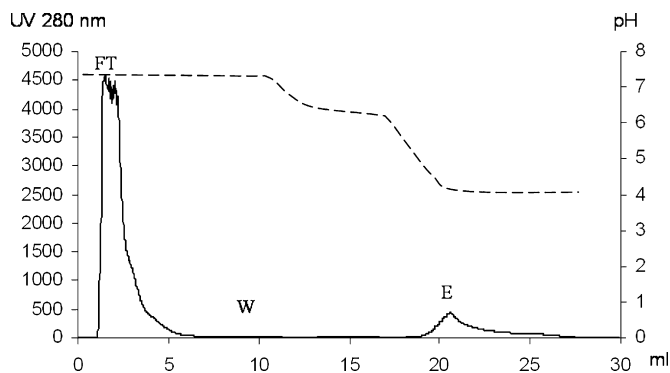


Fig. 2. Purification of MBP-Leap2 on HEA HyperCel (mixed-mode chromatography). Crude protein extract (1 ml) was loaded on the column at 100 cm/h. The column was then washed with 50 mM sodium phosphate buffer, 150 mM NaCl, pH 7.4 with 10 CVs. 50 mM sodium phosphate buffer, 150 mM NaCl, pH 6.0, and then 50 mM sodium phosphate citrate buffer, pH 4 were used for elution. FT: flowthrough; W: wash fraction; E: eluted fraction (absorbance at 280 nm, pH).

expected, the elution fraction contained one major protein whose molecular mass (47 kDa) corresponded to MBP-Leap2. Protein identity was further confirmed by MS analysis. Two minor species of 45 and 42 kDa were also detected. MS analysis showed that the larger one was a degradation product of MBP-Leap2, and the smaller one was endogenous MBP from *E. coli*. In the eluted fraction, these two species represent less than 5% of the protein content. The amount of MBP-fused proteins in the eluted fraction was around 0.5 mg. However, it should be noted that substantial amounts of MBP-Leap2 were present in the wash fractions. This corresponds to the peak centred on the fraction 5.5–6 ml in Fig. 2. The presence of relatively pure MBP-Leap2 in the wash fraction suggested that the protein was specifically bound to the resin during the passage of the crude protein fraction, but that the interaction with the matrix was not strong enough. The same problem was encountered with the other affinity resins tested, but this was not protein-dependent because similar results were obtained with MBP and MBP-LacZ samples.

Significantly different results were obtained with the two mixed-mode resins tested. Fig. 3 shows a typical result obtained for the purification of MBP-Leap2 with HEA HyperCel. MBP-Leap2 was the major protein species found in the eluted fraction, representing 93% of the total proteins. The two molecular species of 45 and 42 kDa were also present, but at a lower concentration than that observed with Amylose resin HF. A small amount of a ~35 kDa

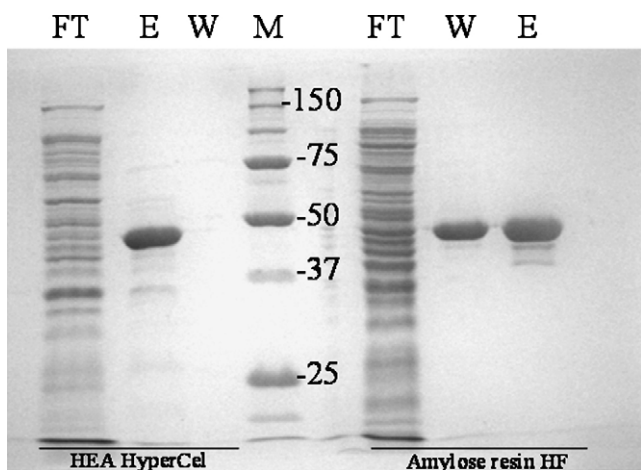


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of fractions recovered from crude extract containing MBP-Leap2 on HEA HyperCel (mixed-mode chromatography) and Amylose resin HF (affinity chromatography). FT: flowthrough; W: wash fraction; E: eluted fraction; M: molecular mass marker.

Table 4
Dynamic binding capacity (mg/ml) at 10% breakthrough.

| Resin | MBP-LacZ | MBP-Leap2 | MBP |
|----------------------|------------|------------|------------|
| Dextrin Sepharose HP | 3.6 ± 0.2 | 3.9 ± 0.2 | 4.5 ± 0.3 |
| Amylose resin | 4.2 ± 0.1 | 4.0 ± 0.2 | 3.3 ± 0.2 |
| Amylose resin HF | 4.4 ± 0.2 | 4.1 ± 0.2 | 3.4 ± 0.1 |
| PPA HyperCel | 24.7 ± 0.3 | 25.2 ± 0.2 | 26.1 ± 0.3 |
| HEA HyperCel | 22.5 ± 0.4 | 23.2 ± 0.4 | 24.2 ± 0.4 |

protein was also detected in the eluted fraction of HEA HyperCel. The amount of purified protein was 2.3 mg. Moreover, we never observed detectable amounts of MBP protein in the wash fractions when HEA and PPA HyperCel gels were used. These results suggested that the binding of the MBP, MBP-Leap2 and MBP-LacZ was stronger on mixed-mode resins than on affinity resins.

In additional experiments, we tried to improve the binding of MBP fused proteins to the affinity resins by modifying the adsorption conditions. We changed the pH value of the binding buffer from 7.4, which is the standard value, to pH 6.0; 8.0 and 9.0. No significant difference was noted except a weaker binding at pH 6.0. In other experiments, we changed the salt concentrations from 0.2 to 1 M without success (data not shown). Finally, we modified the flow rate values in experiments with Amylose HF and Dextrin Sepharose HP resins. A flow rate of 100 cm/h gave the best results. Increasing the flow rate to 150 cm/h led to less efficient binding of the proteins to the column. This may be due to slow mass-transfer kinetic within the column. On the other hand, decreasing to 50 cm/h led to higher desorption of the bound protein during the washing step. When the affinity is weak, the target molecule may “leak” as a diluted broad zone during washing steps. Indeed, the binding equilibrium is shifted since the protein is diluted.

We also tried to improve the purification on mixed-mode resins. In this case where desorption is based on charge repulsion between protein and ligand, it is important to choose an adequate buffer system to obtain a good pH gradient. Our goal was to lower the pH value from 7.4, which corresponded to the initial sample pH, to a smaller value allowing the appearance of positive charges on the recombinant protein and the ligand. On the other hand, the value should not be too low to avoid any protein denaturation. Indeed, desorption of the recombinant protein is induced by a charge repulsion mechanism, and the eluted protein is recovered in a buffer with a pH value compatible with protein integrity. Preliminary experiments showed that the optimal pH gradient which allowed efficient desorption of the recombinant proteins for HEA HyperCel and PPA HyperCel was between pH 7.4 and 4.0 or 3.0, respectively. However, when we used a single-step gradient between pH 7.4 and 4.0 or 3.0, the peak obtained for the eluted protein was not very sharp, suggesting that not all the bound proteins eluted at the same time. This could be due to the fact that the decrease in the pH values was slow owing to a buffering effect. To circumvent this problem, we performed two successive steps as follows: we first decreased the pH from 7.4 to 6.0, and then decreased from 6.0 to 4.0 (HEA HyperCel) or 3.0 (PPA HyperCel). Using this two-step strategy, the eluted peaks were sharper, and this was not detrimental to the protein yield. Measurement of the pH of the eluted fractions gave values around 5.0 for HEA HyperCel resin, and around 4.0 for PPA HyperCel resin.

3.3. Measurement of dynamic binding capacity

The DBC was measured at 10% breakthrough (BT). The flow rate used was 100 cm/h for the different columns tested, excepted for Amylose resin which was measured at a flow rate of 30 cm/h. Results are presented in Table 4.

Columns were equilibrated with 10 CVs of appropriate buffer and each protein was loaded until saturation of the resin with a

Table 5
Recovery of the three recombinant proteins on each resin.

| Resin | MBP-LacZ | MBP-Leap2 | MBP |
|----------------------|----------|-----------|-----|
| Dextrin Sepharose HP | 60% | 61% | 62% |
| Amylose resin | 49% | 51% | 51% |
| Amylose resin HF | 50% | 52% | 53% |
| PPA HyperCel | 82% | 83% | 85% |
| HEA HyperCel | 81% | 81% | 83% |

flow rate of 100 or 30 cm/h (for the Amylose resin). Experiments were done in triplicate and data are mean \pm standard deviation.

The DBC measured for the three types of affinity resins were similar, with values ranging from 3.3 to 4.5 mg/ml. These values were close to those given by the Amylose resin manufacturer (DBC of 3 mg/ml). DBC of the three resins were very close (between 3.3 and 4.5 mg/ml) suggesting that their behaviour was similar. Moreover, we found similar DBC values with the three recombinant proteins tested.

When we compared the values obtained between the two mixed-mode resins for a given protein, we found that DBC values were slightly higher, around +8%, with PPA gel. This might be due to the higher hydrophobicity of the PPA resin [11], a feature that may allow better adsorption of MBP. The DBC values measured for PPA and HEA resins showed that the nature of the protein fused to the MBP had no significant influence. However, the main result was that the DBC measured for both HyperCel resins were 5–7 times higher than those of the affinity resins. Since bead structures are similar for the five resins (cross-linked agarose or cellulose), other factors could explain the higher DBC of these two mixed-mode resins, such as the nature and the force of the interactions that took place. The mixed-mode resins used are based on hydrophobic, electrostatic and/or pseudo-affinity interactions during the binding step. According to the charge distribution on the surface and to the distribution of the hydrophobic zones, interactions might occur on multiple sites of the proteins. On the contrary, with the affinity resins used in this study, there is a single site of binding which can be more or less accessible depending on the fusion partner.

3.4. Recovery

We determined a standard condition regarding flow rate, volume of sample injected and protein concentration, which was optimal for the five resins to be compared. We found that this standard condition corresponded to a flow rate of 100 cm/h (30 cm/h for Amylose resin), an injected volume of 1 ml and a protein concentration of 1 mg/ml. An increase in the protein concentration from 1 to 8 mg/ml led to a 6-fold decrease in recovery for the three affinity resins, whereas the recovery value remained identical for the mixed-mode resins.

Each of three purified proteins was then loaded onto each resin with the appropriate equilibration buffer. After the washing step, proteins were eluted until the absorbance of the outlet stream approached zero. All fractions were then collected and we measured their protein concentration. The amount of proteins eluted from the column was compared to the amount loaded. Three experiments were performed for each protein. Results are presented in Table 5.

The recovery values obtained for the three proteins with the Dextrin Sepharose HP column were consistent with those of the manufacturer's documentation (60%). These yields were slightly higher than those obtained with the two Amylose resins (around 50%). Overall, they indicated that when using these affinity resins, a substantial amount of the protein of interest was lost during the purification process, although these experiments were performed with protein inputs that were below the saturation value. This could

be explained by low adsorption of proteins on the resins or by substantial desorption due to weak interactions. Significantly better results were obtained with the two mixed-mode resins with the three proteins tested. We obtained recovery values of 81–85%, which represents a 30% increase when compared to affinity resins.

4. Conclusion

Our laboratory is involved in the production and purification of recombinant proteins. We usually used MBP as a tag because it has been shown to enhance the solubility of its fused partner, and because it allows purification of the recombinant protein by affinity chromatography. However, purification of MBP-containing proteins by affinity chromatography was not always efficient. In the recent report of an alternative procedure for the purification of MBP proteins, the authors successfully purified a recombinant protein fused to MBP by a one-step chromatography process on IMAC, suggesting that MBP itself can interact with copper-chelating columns [10]. We tested this technique to purify our three MBP forms. Good results were obtained with MBP and MBP-Lac Z, with a yield of 85% for both proteins when standard salt and imidazole concentrations were used. However, MBP-Leap2 did not correctly bind on IMAC resin where the yield was only 20%. Furthermore, modification of the binding conditions did not improve the yield. Therefore, while IMAC can be a good candidate to purify proteins fused to MBP, the binding efficiency was dependent on the nature of the fused partner, at least in our hands. For this reason we evaluated the purification of MBP-containing proteins by mixed-mode chromatography. The mixed-mode resins PPA and HEA HyperCel were very efficient for purifying MBP-tagged proteins from crude extracts. Recovery was around 85%, which was better than the 50–60% obtained with affinity resins. Nonetheless, high protein purity of about 95% was also achieved with mixed-mode resins. The advantage over IMAC purification is that the MBP-tagged proteins are eluted in a lower ionic-strength and imidazole-free buffer, thereby facilitating their use in subsequent experiments. Indeed, removal of the MBP-tag from its partner frequently requires the use of specific endoprotease, whose activity may be impaired in high salt concentrations. In the case of our mixed-mode protocol, the recombinant proteins were eluted in slightly acidic buffers, the pH of the eluted fractions being around 5.0 and 4.0 for HEA and PPA HyperCel, respectively. Although care should be taken for the purification of proteins highly sensitive to acidic pH, this technique represents a powerful alternative for purification of MBP-tagged proteins.

References

- [1] P.D. Riggs, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Assoc./Wiley-Interscience, New York, 1992, p. 1.
- [2] H.-J. Cho, Y. Lee, R.S. Chang, M.-S. Hahm, M.-K. Kim, Y.B. Kim, Y.-K. Oh, *Protein Expr. Purif.* 60 (2008) 37.
- [3] J.D. Fox, R.B. Kapust, D.S. Waugh, *Protein Sci.* 10 (2001) 622.
- [4] M. Hammarström, N. Hellgren, S. Van den Berg, H. Berglund, T. Härd, *Protein Sci.* 11 (2002) 313.
- [5] S. Nallamsetty, D.S. Waugh, *Protein Expr. Purif.* 45 (2006) 175.
- [6] K.D. Pryor, B. Leiting, *Protein Expr. Purif.* 309 (1997) 319.
- [7] J.C. Spurlino, G.-Y. Lu, F.A. Quijcho, *J. Biol. Chem.* 566 (1991) 5202.
- [8] M. Raha, I. Kawagishi, V. Muller, M. Kihara, R.M. Macnab, *J. Bacteriol.* 174 (1992) 6644.
- [9] S. Nallamsetty, D.S. Waugh, *Nat. Protocol* (2007) 383.
- [10] K.-M. Lee, K.-W. Ma, P.-C. Shaw, K.-B. Wong, *Anal. Biochem.* 358 (2006) 152.
- [11] V. Brenac Brochier, A. Schapman, P. Santambien, L. Britsch, *J. Chromatogr. A* 1177 (2008) 226.
- [12] C. Burton, D.R.K. Harding, *J. Chromatogr. A* 814 (1998) 71.
- [13] L. Guerrier, I. Flayeux, E. Boschetti, *J. Chromatogr. B* 755 (2001) 37.
- [14] E. Boschetti, *Trends Biotechnol.* 20 (2002) 333.
- [15] S. Ghose, B. Hubbard, S.M. Cramer, *J. Chromatogr. A* 1122 (2006) 144.
- [16] M.C. Mowry, M. Meagher, L. Smith, J. Marks, A. Subramanian, *Protein Expr. Purif.* 37 (2004) 399.
- [17] H. Bak, O.R.T. Thomas, *J. Chromatogr. B* 848 (2007) 116.
- [18] J. Chen, J. Tetrault, A. Ley, *J. Chromatogr. A* 1177 (2008) 272.

- [19] G.T. Weatherly, A. Bouvier, D.D. Lydiard, J. Chapline, I. Henderson, J.L. Schrimsher, S.R. Shepard, J. Chromatogr. A 952 (2002) 99.
- [20] D. Coulon, C. Cabanne, V. Fitton, A.M. Noubhani, E. Saint-Christophe, X. Santarelli, J. Chromatogr. B 808 (2004) 111.
- [21] M.P. Dux, R. Barent, J. Sinha, M. Gouthro, T. Swanson, A. Barthuli, M. Inan, J.T. Ross, L.A. Smith, T.J. Smith, R. Webb, B. Loveless, I. Henderson, M.M. Meagher, Protein Expr. Purif. 45 (2006) 359.
- [22] K. Rege, M. Pepsin, B. Falcon, L. Steele, M. Heng, Biotechnol. Bioeng. 93 (2006) 618.
- [23] G. Zhao, G. Peng, F. Li, Q. Shi, Y. Sun, J. Chromatogr. A 1211 (2008) 90.
- [24] K. Beena, J.B. Udgaonkar, R. Varadarajan, Biochemistry 43 (2004) 3608.
- [25] U.K. Laemmli, Nature 227 (1970) 680.
- [26] G. Guiochon, S. Golshan, A.M. Katti, Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography, Academic Press, Boston, MA, 1994.

4.2.OPTIMISATION D'UN PROCEDE DE PURIFICATION DE FRAGMENTS D'ANTICORPS A L'AIDE DE RESINES DE CHROMATOGRAPHIE EN MODE MIXTE (ARTICLE 2).

Le développement de procédés de purification utilisant les résines de chromatographie en mode mixte HyperCel peut nécessiter de nombreuses optimisations. En effet nous avons mis en évidence dans les premières parties de ce document, les interactions multiples impliquées dans le mécanisme de séparation en mode mixte et l'influence importante de l'environnement sur la combinaison et le contrôle de ces interactions.

L'optimisation d'un procédé de purification implique l'investigation d'un grand nombre de conditions expérimentales, notamment dans le cadre de la chromatographie en mode mixte. Pour limiter les coûts inhérents à l'optimisation de procédés, une méthode de criblage et d'identification à haut-débit efficace et adaptée à la chromatographie a été développée au sein de la société PALL. Cette technique a été évaluée pour le développement d'un procédé de purification visant la capture de fragments d'anticorps F(ab')₂ à partir de culture de cellules d'insectes. Les résines de chromatographie en mode mixte HEA, PPA et MEP HyperCel ont ainsi pu être évaluées dans des temps réduits, et un certain nombre de conditions optimales de purification ont pu être déterminées grâce à cette technique (**Fig. 2**).

Nous avons ainsi observé la fixation sur les résines de chromatographie en mode mixte de la protéine cible à partir d'un échantillon complexe sans modification préalable que ce soit de pH ou de force ionique.

Nous avons confirmé le comportement d'interactions plus fortes sur la résine PPA HyperCel que sur HEA et MEP HyperCel, impliquant alors des conditions d'élution plus stringentes. La protéine cible est en effet éluée à un pH inférieur sur PPA HyperCel que sur les autres résines (**Fig. 2b**). Nous avons également observé une sélectivité plus faible de la résine MEP HyperCel pouvant être expliqué par l'absence de charges lors de l'étape de fixation. En effet, on observe d'avantage de contaminants dans les fractions d'élution sur MEP HyperCel, que sur HEA et PPA HyperCel (**Fig. 2c**).

Nous avons finalement montré l'adsorption efficace sur les résines de chromatographie en mode mixte d'une molécule dont la charge global est positive (non retenue sur une résine échangeuse d'anions) (**Fig. 2.d**).

La résine HEA HyperCel présentait une adsorption efficace de la protéine cible et des conditions d'élution modérées, permettant de limiter les risques de perturbation de la stabilité de la protéine cible (**Fig. 2a**). Nous avons alors transposé les conditions de purification obtenues par criblage haut débit en microplaques, à l'échelle laboratoire sur colonne HEA HyperCel, pour réaliser une séparation semi-préparative.

Les conditions de pH et de conductivité ont été adaptées à la purification en colonne, en prenant en compte les effets des chutes de pH en conditions dynamiques et les effets tampons des colonnes, afin d'améliorer les rendements et concentrations (**Fig. 3**). Nous avons ainsi obtenu la capture efficace de fragments d'anticorps par chromatographie en mode mixte, sans prétraitement de l'échantillon, avec des rendements importants (supérieur à 80%), tout en conservant la fonction biologique de la molécule (**Table 3**).

L'utilisation de technique de criblage a donc permis de réduire la complexité et le temps d'optimisation. Le criblage à haut débit a permis la sélection de la résine de chromatographie la plus performante et la détermination de conditions d'utilisation optimales. Celles-ci peuvent être rapidement adaptées à la chromatographie en colonne. La chromatographie en mode mixte peut ainsi être rapidement optimisée et délivrer son potentiel de sélectivité.



Rapid screening of purification strategies for the capture of a human recombinant F(ab')₂ expressed in baculovirus-infected cells using a micro-plate approach and SELDI-MS[☆]

J. Pezzini^{a,1}, V. Brenac Brochier^{b,1}, M.P. Barrouillet^{c,1}, M. Cerruti^d, G. Clofent-Sanchez^c, A. Schapman^b, A. Topol^b, R. Robert^c, C. Cabanne^a, P. Cerruti^d, X. Santarelli^{a,*}

^a EA4135, ESTBB, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

^b Pall Life Sciences, 48, avenue des Genottes, 95800 Cergy St Christophe, France

^c RMSB, UMR 5536, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

^d UPS 3044, Station Baculovirus et Thérapie, Saint Christol Lèz Alès, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 November 2008

Accepted 22 April 2009

Available online 3 May 2009

Keywords:

F(ab')₂

Screening

Mixed-mode

Ion exchanger

Chromatography sorbents

HEA HyperCel

PPA HyperCel

MEP HyperCel

Q Ceramic HyperD F

S Ceramic HyperD F

ABSTRACT

The development of a capture step of a human recombinant F(ab')₂ produced and expressed in baculovirus-infected cells was investigated by screening three mixed-mode chromatography sorbents (HEA HyperCelTM, PPA HyperCel and MEP HyperCel) and two ion exchangers (Q Ceramic HyperD[®] F, S Ceramic HyperD F) sorbents using a 96-well plate format and SELDI-MS. HEA HyperCel gave the best separation performance therefore the conditions tested in micro-plate were transferred to laboratory scale chromatographic experiments, confirming that the recombinant F(ab')₂ was effectively captured on the mixed-mode sorbent without any pre-treatment of the crude extract with a 82% recovery and a 39-fold purification.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Development and optimization phases are very important to shorten industrial purification processes of therapeutic proteins and reduce cost. Because of the variety of chromatographic sorbents (nature and density of ligand, spacer chemistry, pore structure, mass transport properties, and nature of the sorbents) optimization experiments can be time and resource consuming. In the past decade, fast approaches have been developed for sorbent performance evaluation and screening [1–8]. Recently, high-throughput (HT) screening platforms were investigated using ProteinChip arrays carrying functionalities equivalent to those of chromatographic sorbents [9–11] or using micro-volumes of chro-

matographic sorbents deposited in 96-well plates [12–27]. This micro-volume technique was improved by using 96-well filter plates. Combination of 96-well format and Surface Enhanced Laser Desorption Ionization-Mass Spectrometry (SELDI-MS) [28,29] or pre-packed mini-columns and SELDI-MS [30] could also be found.

In this paper we describe the rapid screening and optimization of a purification strategy using a 96-well filter plate and SELDI-MS for the capture of a human recombinant F(ab')₂ produced and expressed in baculovirus-infected cells. The F(ab')₂, in the process of being patented, was issued from a human monoclonal IgM. Plasmid cassette-transfer vectors have been designed which enable the construction of recombinant baculoviruses directing the coexpression of complete immunoglobulin with insect cell. The single-chain scFv of the antibody was cloned into *ad hoc* cassette baculovirus vectors. Large scale production of recombinant human F(ab')₂ was made by secreting into the culture medium of infected *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells.

The purification strategy developed here must involve the least number of conditioning steps as possible to preserve the stability of the protein along the process. Shortening the purification time

[☆] This paper was presented at the 11th International Symposium on Biochromatography and Nanoseparations, Montpellier, France, 14–16 October 2008.

* Corresponding author. Tel.: +33 05 57 57 17 13; fax: +33 05 57 57 17 11.

E-mail address: Xavier.Santarelli@estbb.u-bordeaux2.fr (X. Santarelli).

¹ These authors contributed equally to this work.

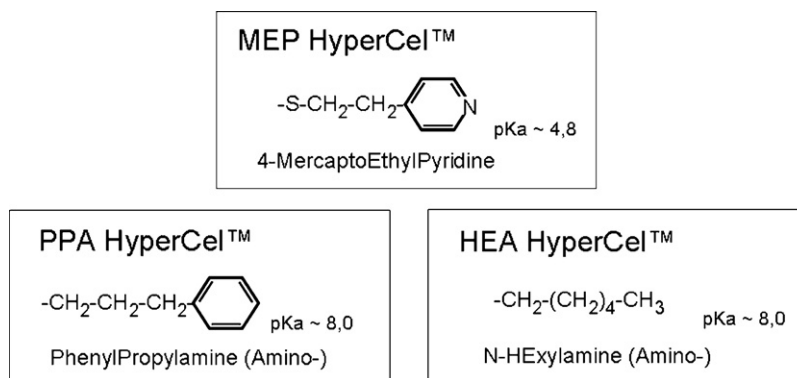


Fig. 1. Mixed-mode ligands of HEA HyperCel™, PPA HyperCel and MEP HyperCel sorbents.

was also essential because of the antibody fragment sensitivity to pH and temperature variation.

Two ion exchange sorbents (Q and S Ceramic HyperD F) and three mixed-mode sorbents (HEA HyperCel, PPA HyperCel and MEP HyperCel) have been studied. The mixed-mode sorbents (Fig. 1) involve mainly hydrophobic and/or, for MEP HyperCel, pseudo-affinity interactions for the binding and essentially ionic interactions (charge repulsion) for the elution. Mixed-Mode or Multi-Modal Chromatography (MCC) offers interesting capture strategy to avoid conditioning steps of the crude extract since they are tailored for binding under low to moderate salt concentrations [31–40]. The ability to bind proteins under “physiological-like” conditions can minimize the risk of precipitation and/or aggregation of the target protein.

The screening of mixed-mode and ion exchange sorbents was performed using a 96-well filter plate approach combined with SELDI-MS to determine the best equilibration and elution conditions. The best conditions obtained for the capture were then transferred to a lab-scale column by direct loading of the crude extract issued from the baculovirus-insect cell culture without pre-treatment (pH or conductivity adjustment) for confirmation of the data obtained from the small-scale screening.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

HEA HyperCel™, PPA HyperCel, MEP HyperCel, Q Ceramic HyperD® F and S Ceramic HyperD F were supplied by Pall Life Sciences (Pall BioSeptra, Cergy, France).

Chemicals were from Sigma–Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

NP20 ProteinChip® Arrays and sinapinic acid (SPA) were from Bio-Rad (Marne La Coquette, France).

The AcroWell™ 96-well filter plates with a 0.45 μm hydrophilic polypropylene (GHP) pore-membrane and 350 μL wells used for sorbent screening were provided by Pall Life Sciences (Saint Germain en Laye, France).

The 96-well plates Maxisorb for the Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) were from Nunc (Dominique Dutscher, Brumath, France).

Sheep Anti-Human IgG (Fd) fraction was from The Binding Site Limited (Birmingham, United Kingdom).

ChromPure human IgG, F(ab')₂ Fragment was from Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, PA, USA).

HRP conjugate F(ab')₂ fragment of goat anti-human was from Beckman Coulter, Inc. (Fullerton, CA, USA).

2.2. Equipment

Automation of micro-plate preparation was done using a liquid handling Biomek® 2000 Robot (Beckman Coulter, Villepinte, France) including a DPC Micromix® 5 Titer Plate Shaker. The PCS4000 ProteinChip Reader used for SELDI-MS analyses and the Mini-Protean® apparatus for SDS-PAGE analyses were from Bio-Rad (Marne La Coquette, France). Liquid chromatography experiments were run using an ÄKTA™ Explorer 100 system and a XK 26/20 column from GE Healthcare (Saclay, France).

2.3. Biological materials

S. frugiperda Sf9 insect cells (ATCC CRL 1711) were transfected for the production of the F(ab')₂ [41]. Briefly, 500 ng of baculovirus DNA and 10 μg of cassette-transfer vector were added to 4 × 10⁶ Sf9 cells. The recombinant baculoviruses were selected from the supernatant of transfected cells after 5 days of incubation at 28 °C either by plaque assays [42] or limiting assessed by ELISA. The F(ab')₂ was expressed in a soluble form with Sf9 cells infected with the recombinant viruses expressing the recombinant antibody and grown in serum-free medium.

2.4. Mini-batch screening of chromatographic conditions using a 96-well format

Pre-equilibrated chromatographic sorbents were deposited in a 96-well plate (50 μl per well) and 200 μl of equilibration buffer were added twice for 10 min. The sample (50 μl per well) was incubated for 60 min and two washing steps were performed using 200 μl of equilibration buffer for 5 min. A stepwise elution was then carried out with 2 × 200 μl of elution buffer 1 for 5 min, followed by 2 × 200 μl of elution buffer 2 and elution buffer 3 for 5 min. Each step was carried out under shaking at room temperature. Fractions were collected under vacuum aspiration using standard 96-well plates.

2.4.1. Mixed-mode chromatographic conditions

Equilibration: Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4.

Elution: 50 mM sodium citrate pH 5 (elution buffer 1); pH 4 (elution buffer 2) and pH 3 (elution buffer 3).

2.4.2. Ion exchange chromatographic conditions

Equilibration:

For Q Ceramic HyperD: 50 mM Tris–HCl pH 8.6.

For S Ceramic HyperD: 50 mM sodium acetate pH 4.5.

Elution:

For Q Ceramic HyperD: 50 mM Tris–HCl pH 8.6 with 0.2 M NaCl (elution buffer 1); 0.5 M NaCl (elution buffer 2); 1 M NaCl (elution buffer 3).

For S Ceramic HyperD: 50 mM sodium acetate pH 4.5 with 0.2 M NaCl (elution buffer 1); 0.5 M NaCl (elution buffer 2); 1 M NaCl (elution buffer 3).

2.5. Liquid chromatographic experiment using a lab-scale column

The capture conditions issued from the screening were transferred to a liquid chromatographic column packed with 70 ml of HEA HyperCel sorbent according to the manufacturer's recommendation. The column was equilibrated in 5 column volumes (CV) of equilibration buffer (PBS pH 7.4) and 2 CV of crude extract were loaded. The column was washed with 2 CV of PBS pH 7.4 and a stepwise elution buffers was carried out with 2 CV of 50 mM sodium citrate pH 6, 4, 2. The flow rate was 6 ml/min (68 cm/h). The absorbance of effluents was detected at 280 nm.

2.6. Analytical procedures

2.6.1. SELDI-MS analysis

Fractions showing absorbance peaks at 280 nm were analyzed using SELDI-MS. Five microliters of fractions were applied directly per array spot on Normal Phase array (NP20). Each spot was washed with $3 \times 5 \mu\text{l}$ of ultrapure water and air-dried. A saturated solution of SPA was prepared by mixing one volume of acetonitrile with one volume of 1% trifluoro acetic acid (TFA) in an aliquot of dried SPA. The aliquot was mixed for 5 min at room temperature and centrifuged at 14,000 rpm for 5 min. An aliquot (0.8 μl) of saturated SPA solution was applied twice to each spot of the array and allowed to dry. The array was introduced in the sample chamber of the PCS4000 Reader and read following an automatic protocol. The PCS4000 Reader was calibrated daily using protein standards of known molecular weight (equine myoglobin, 16,951.5 Da, bovine serum albumin, 66,433.0 Da and *E. coli* β -galactosidase, 116,351.0 Da).

2.6.2. Protein concentration

Protein concentration was determined by using the bicinchoninic acid (BCA) assay [43]. bovine serum albumin (BSA) was used as standard.

2.6.3. Electrophoresis

Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [44] was used to monitor the purification during the chromatographic procedures. Electrophoresis was performed in a Tris–glycine–SDS buffer for 30 min at 200 V using 12% polyacrylamide gels. Detection was performed with Coomassie brilliant blue R 250.

2.6.4. Biological recognition activity

The biological recognition activity was used to characterize the target molecule F(ab')₂. Two type of ELISA were used: Qualitative and Quantitative ELISA.

2.6.4.1. Quantitative ELISA for human F(ab')₂ in the eluates. Microtitration plates were coated with sheep Anti-Human IgG (Fd) fraction at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ overnight at 4 °C in 100 mM sodium carbonate pH 9.6. After the remaining binding sites were washed and blocked with PBS, pH 7.2 containing 5% (w/v) non-fat milk powder. The plates were incubated with human F(ab')₂ at serial dilutions ranging from 100 to 6 ng/ml or with the eluates obtained from mixed-mode chromatography in PBS pH 7.2. After washing, dilutions 1/1000 of

peroxidase conjugate F(ab')₂ fragment of goat anti-human were then added for 60 min to each well at 20 °C and the colorimetric reaction was performed with OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride). OPD have been developed for use as a soluble substrate for the detection of peroxidase activity in ELISA. Optical densities were read within 30 min according to the manufacturer's procedure.

2.6.4.2. Qualitative ELISA. ELISA was performed to determine the ability of the F(ab')₂ to bind the antigen. Microtitration plates were coated with the antigen at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Supernatant from a polyspecific cell line obtained by Epstein–Barr virus (EBV) transformation secreting an IgM antibody was included in the test at 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ as a positive control for all purification fractions.

3. Results and discussion

Based on the structure of the F(ab')₂, the entire form of the target protein was expected to be detected at 100 kDa while the form divided in two F(ab') fragments was expected at 50 kDa using SELDI-MS. Analyses of the different fractions obtained from the mini-batch screening showed that the main form observed in the crude extract and partially purified fractions was the form at 50 kDa. A form at 100 kDa could be observed in partially purified fractions, however it could not be determined whether this species was the entire F(ab')₂ or if it was a contaminant. Although the species corresponding to the 50 kDa peak was not strictly identified as fragments of the F(ab')₂ forms, the orientation of the screening was based on this peak.

The scouting on micro-volumes of mixed-mode and ion exchange sorbents followed by SELDI-MS analysis of the different fractions showed that the F(ab')₂ was captured on HEA HyperCel sorbent equilibrated in "physiological-like" conditions after direct loading of the crude extract without any pH or conductivity adjustment and was recovered at pH 5.0 and 4.0 (Fig. 2a). The F(ab')₂ was also retained on PPA HyperCel sorbent without pre-treatment of the crude extract and was recovered at lower pH than on HEA HyperCel sorbent (pH 4.0 and 3.0) (Fig. 2b). The F(ab')₂ was also retained on MEP HyperCel sorbent and recovered at pH 4.0 but the separation of the target protein from major impurities seemed lower than for HEA or PPA HyperCel sorbents (Fig. 2c). The F(ab')₂ was not retained on Q Ceramic HyperD sorbent equilibrated at pH 8.6 (it was mainly found in the flow through and wash fractions) (Fig. 2d). On the contrary, the F(ab')₂ was retained on S Ceramic HyperD sorbent at pH 4.5 and recovered at the same pH between 0.2 and 0.5 M NaCl (Fig. 2e).

HEA HyperCel appeared as the most interesting chromatography sorbent tested for the capture step of the F(ab')₂ since no treatment of the crude feedstock was needed (no pH adjustment) and mild elution conditions (pH 5 and 4) were used to recover the target protein.

The scale-up of the capture was therefore attempted on a lab-scale column packed with HEA HyperCel sorbent. Based on the data obtained from the screening, a stepwise elution was carried out using a series of three buffers of decreasing pH values: pH 6, 4 and 2 (Fig. 3).

The first step at pH 6 was intended for the elimination of impurities. However, it did not seem to be a necessary step since no absorbance peak was recovered at 280 nm (Fig. 3) and the total protein content in the fraction collected was estimated to be equal to 0 (Table 1).

Since the target protein was recovered in the pH 5 and pH 4 fractions during the 96-well plate screening and in order to avoid the dilution of the target molecule in 2 fractions, the second step was directly carried out at pH 4 and the pH 4 fraction

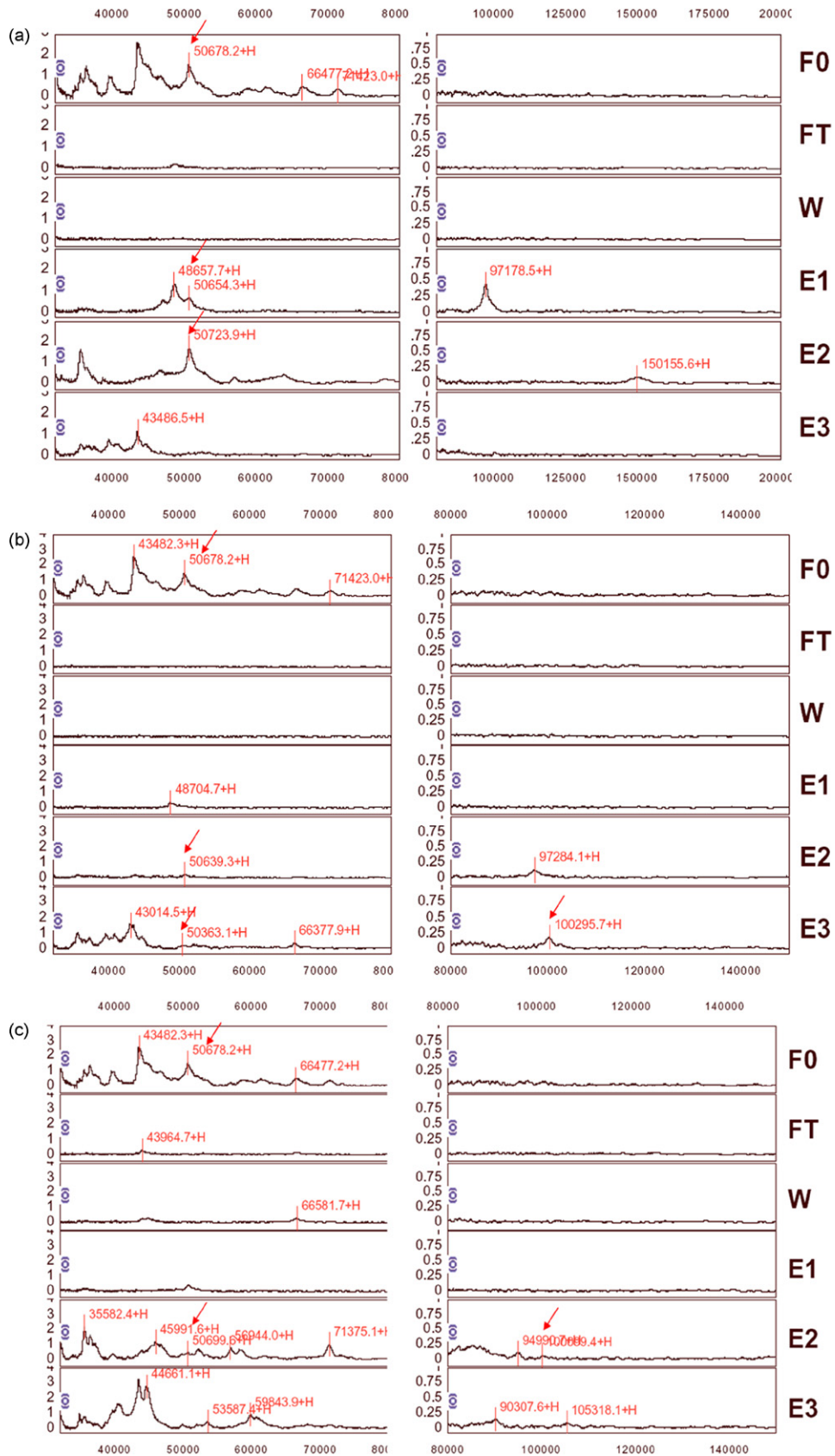


Fig. 2. SELDI-MS profiles after depositing 5 μ l of fraction on NP20 array after micro-plate scouting of each sorbent (a)–(e). F0: crude extract; FT: flow through; W: wash with equilibration buffer; E1: elution buffer 1; E2: elution buffer 2; E3: elution buffer 3. (a) Scouting on HEA HyperCel sorbent equilibrated in PBS pH 7.4. E1: pH 5; E2: pH 4; E3: pH 3. (b) Scouting on PPA HyperCel sorbent equilibrated in PBS pH 7.4. E1: pH 5; E2: pH 4; E3: pH 3. (c) Scouting on MEP HyperCel sorbent equilibrated in PBS pH 7.4. E1: pH 5; E2: pH 4; E3: pH 3. (d) Scouting on Q Ceramic HyperD F sorbent equilibrated in 50 mM Tris–HCl pH 8.6. E1: 0.2 M NaCl; E2: 0.5 M NaCl; E3: 1 M NaCl. (e) Scouting on S Ceramic HyperD F sorbent equilibrated in 50 mM sodium acetate pH 4.5. E1: 0.2 M NaCl; E2: 0.5 M NaCl; E3: 1 M NaCl.

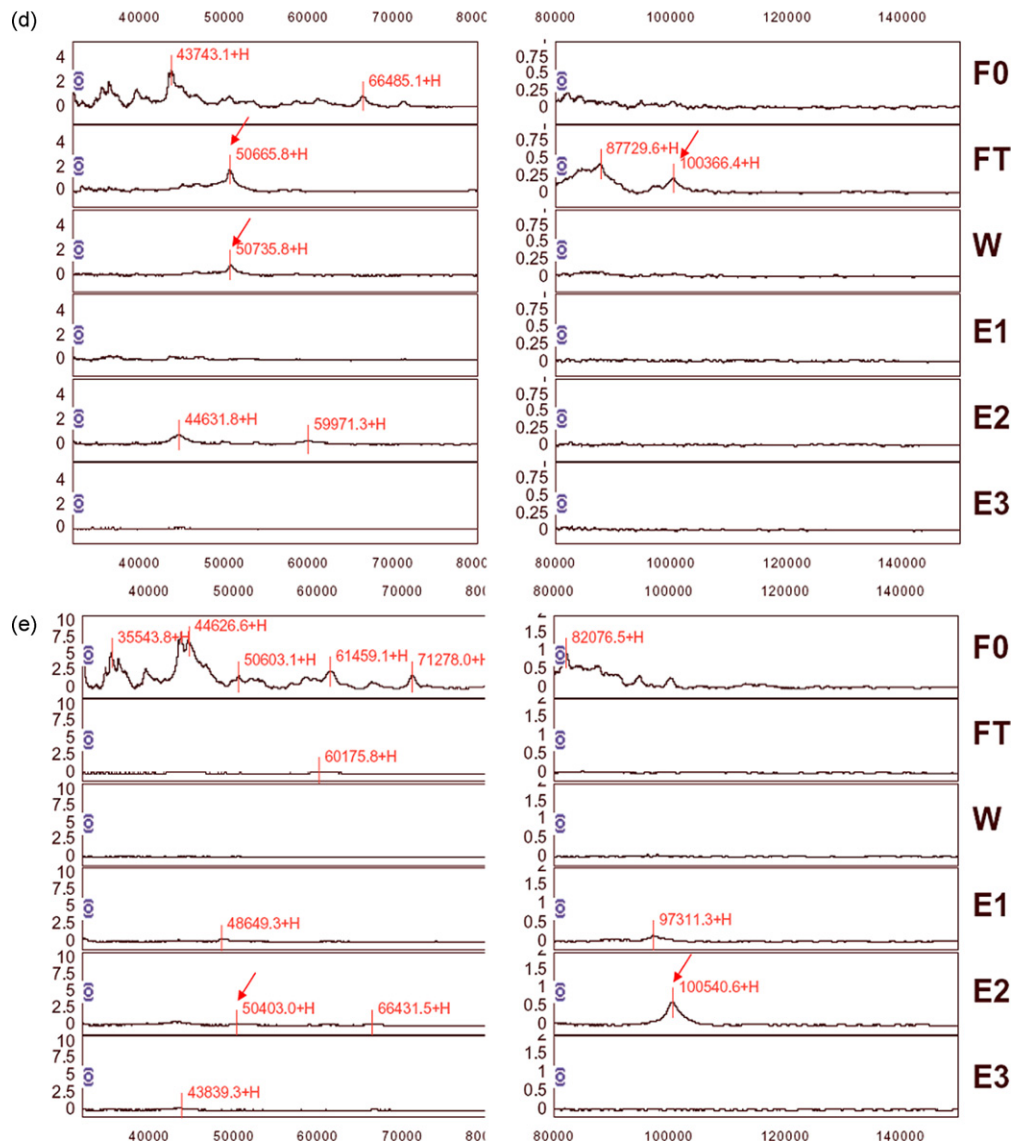


Fig. 2. (Continued)

was immediately neutralized at pH 7 to stabilise the target protein. The SDS-PAGE analysis of the corresponding fraction evidenced the presence of the $F(ab')_2$ with an apparent molecular weight of 27 kDa in reducing conditions in the pH 4 fraction (Fig. 3), confirming the data obtained from the 96-well plate screening. As observed using SELDI-MS, faint bands around 100 and 150 kDa were also observed in the pH 4 lane of the SDS-PAGE gel that could correspond either to the non-reduced form of the $F(ab')_2$ or to a high molecular weight contaminant. If the species observed was a contaminant then size exclusion chromatography or cation exchange chromatography could be envisaged as a polishing step using mild conditions. Indeed, results from the 96-well screening showed that

the $F(ab')_2$ was binding on S Ceramic HyperD and was recovered between 0.2 and 0.5 M NaCl.

Finally, a third step at a very low pH value (pH 2) was aimed at desorbing all the protein contaminants of the cell culture supernatant that were retained on the column. The purification table (Table 1) shows that only the elution fraction at pH 4 gave a biological recognition activity and that recovery of the $F(ab')_2$ was around 82% with a 39-fold purification. These results were encouraging. Thus the capture needs to be improved, especially in terms of recovery.

A loss of 7% of $F(ab')_2$ in the flow through suggests that an increase of the conductivity (up to 10 mS) at binding may

Table 1

Purification of $F(ab')_2$ from baculovirus-insect cell culture supernatant on HEA HyperCel sorbent. F0: crude extract; FT: flow through; pH 6: fraction eluted at pH 6; pH 4: fraction eluted at pH 4; pH 2: fraction eluted at pH 2.

| | Volume (ml) | Total protein (mg) | [$F(ab')_2$] (mg) | Recovery (%) | Purification fold | In vitro specific recognition |
|------|-------------|--------------------|---------------------|--------------|-------------------|-------------------------------|
| F0 | 135 | 127.0 | 1.76 | – | – | + |
| FT | 250 | 3.7 | 0.12 | 7 | 2 | – |
| pH 6 | 36 | 0.0 | 0.00 | 0 | 0 | – |
| pH 4 | 54 | 2.7 | 1.45 | 82 | 39 | +++ |
| pH 2 | 80 | 56.0 | 0.10 | 5.6 | 7 | – |

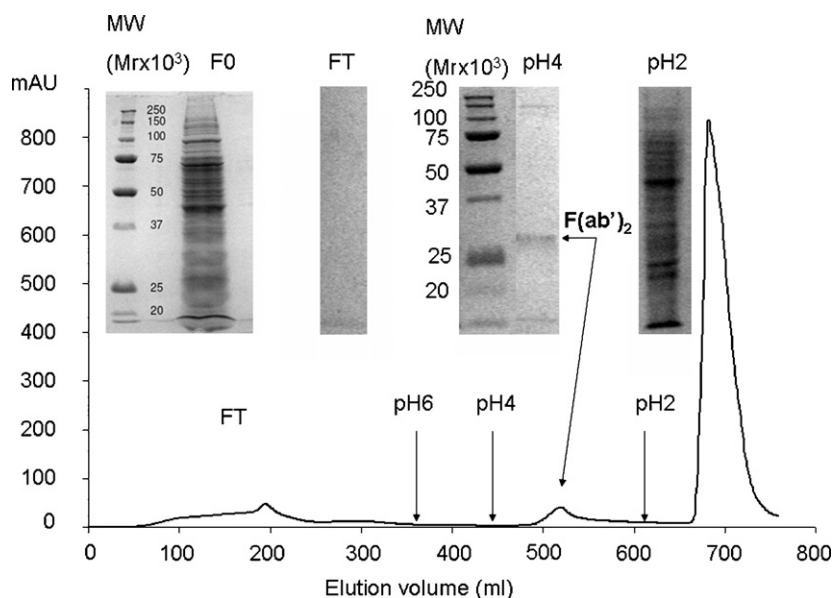


Fig. 3. Purification of a recombinant Human $F(ab')_2$ from crude extract using mixed-mode chromatography. Column: 70 ml of HEA HyperCel sorbent packed in XK 26/20; sample volume: 135 ml; equilibration buffer: 2 CV of PBS pH 7.4; elution buffer: 2 CV of 50 mM of sodium citrate pH 6, 4, 2. Flow rate: 6 ml/min (68 cm/h); measurement of absorbance at 280 nm.

favour the interaction between the target and the sorbent. This slight difference between the 96-well format screening and the purification on a laboratory scale column is likely due to a variation in the interactions between a protein and the ligand in a batch-mode and a dynamic flow mode. It also suggests that an optimization of the chromatographic conditions (equilibration buffer, ionic strength) at lab-scale is essential before larger scale-up.

The mass balance of the total protein content recovered compared to the protein loaded was around 50% (Table 1), likely because the pH 2 fraction presented a precipitation form even after pH adjustment. The estimated $F(ab')_2$ quantities lost in the pH 2 fraction was around 5% of the total $F(ab')_2$ injected.

4. Conclusion

Development of the capture step of a human recombinant $F(ab')_2$ expressed in baculovirus-infected cells was evaluated using mixed-mode and ion exchange chromatography. Mild conditions of binding and recovery were needed to avoid aggregation and/or precipitation of the target protein. A rapid screening of three mixed-mode sorbents and two ion exchangers were carried out using a 96-well filter-plate approach combined with SELDI-MS. It showed that the $F(ab')_2$ could be captured on HEA HyperCel mixed-mode sorbent equilibrated in “physiological-like” conditions and without pre-treatment of the crude extract and was recovered between pH 5 and 4. The $F(ab')_2$ could also be captured using PPA and MEP HyperCel mixed-mode sorbents, however the conditions of elution were too acidic for PPA HyperCel (pH 4 or below) and the separation of the $F(ab')_2$ from impurities was lower for MEP HyperCel. The $F(ab')_2$ was captured on S Ceramic HyperD F sorbent at pH 4.5 but not on Q Ceramic HyperD F sorbent at pH 8.6. Subsequently, the transfer of the capture step on a lab-scale column confirmed that the recombinant $F(ab')_2$ could be captured on HEA HyperCel sorbent with a 82% recovery and a 39-fold purification. Perspective of this work is to optimize the recovery of the $F(ab')_2$ on HEA HyperCel sorbent and to develop one or several additional purification steps including cation exchange chromatography.

Acknowledgements

This work was supported by the University of Bordeaux, the Conseil Régional d'Aquitaine and the CNRS Institute.

References

- [1] P.R. Levison, C. Mumford, M. Steater, A. Brandt-Nielsen, N.D. Pathirana, S.E. Badger, *J. Chromatogr. A* 760 (1997) 151.
- [2] M. Bensch, P. Schulze Wierling, E. Von Lieres, J. Hubbuch, *Chem. Eng. Technol.* 28 (2005) 1274.
- [3] A. Staby, I.H. Jensen, I. Møllerup, *J. Chromatogr. A* 897 (2000) 99.
- [4] A. Staby, I.H. Jensen, *J. Chromatogr. A* 908 (2001) 149.
- [5] A. Staby, M.B. Sand, R.G. Hansen, J.H. Jacobsen, L.A. Anderson, M. Gerstenberg, U.K. Bruus, I.H. Jensen, *J. Chromatogr. A* 1034 (2004) 85.
- [6] A. Staby, M.B. Sand, R.G. Hansen, J.H. Jacobsen, L.A. Anderson, M. Gerstenberg, U.K. Bruus, I.H. Jensen, *J. Chromatogr. A* 1069 (2005) 65.
- [7] A. Staby, R.H. Jensen, M. Bensch, J. Hubbuch, D.L. Dünweber, J. Krarup, J. Nielsen, M. Lund, S. Kidal, T. Budde Hansen, I.H. Jensen, *J. Chromatogr. A* 1164 (2007) 82.
- [8] A.S. Rathore, *LC-GC* 19 (2001) 616.
- [9] S. Weinberger, E. Boschetti, P. Santambien, V. Brenac, *J. Chromatogr. B* 782 (2002) 307.
- [10] J. Shiloach, P. Santambien, L. Trinh, A. Schapman, E. Boschetti, *J. Chromatogr. B* 790 (2003) 327.
- [11] V. Brenac, V. Ravault, P. Santambien, E. Boschetti, *J. Chromatogr. B* 818 (2005) 61.
- [12] S.M. Cramer, K. Rege, J.S. Dordick, US Patent application 09/791, 317 (2001).
- [13] C.B. Mazza, K. Rege, C.M. Breneman, N. Sukumar, J.S. Dordick, S.M. Cramer, *Biotechnol. Bioeng.* 80 (2002) 60.
- [14] K. Rege, N. Tugcu, S.M. Cramer, *Sep. Sci. Technol.* 38 (2003) 1499.
- [15] J. Thiemann, J. Jankowski, J. Rykl, S. Kurzawski, T. Pohl, B. Wittman-Liebold, H. Schlüter, *J. Chromatogr. A* 1043 (2004) 73.
- [16] K. Rege, A. Ladiwala, S.M. Cramer, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6818.
- [17] K.M. Sunasara, F. Xia, R.S. Gronke, S.M. Cramer, *Biotechnol. Bioeng.* 82 (2003) 330.
- [18] J. Liu, T. Yang, A. Ladiwala, S.M. Cramer, C.M. Breneman, *Sep. Sci. Technol.* 41 (2006) 3079.
- [19] K. Rege, A. Ladiwala, N. Tugcu, C.M. Breneman, S.M. Cramer, *J. Chromatogr. A* 1003 (2004) 19.
- [20] H. Charlton, B. Galarza, K. Leriche, R. Jones, *Biopharm. Int.* 16 (2006) 20.
- [21] J.F. Kramarczyk, Masters of Sciences Thesis, Tufts University, Medford, MA, USA, 2003.
- [22] T. Rodrigues, A. Carvalho, A. Roldao, M.T.J. Carrondo, P.M. Alves, P.E. Cruz, *J. Chromatogr. B* 837 (2006) 59.
- [23] K. Rege, M. Pepsin, B. Falcon, L. Steele, M. Heng, *Biotechnol. Bioeng.* 93 (2006) 618.
- [24] J.L. Coffman, J.F. Kramarczyk, B.D. Kelley, *Biotechnol. Bioeng.* 100 (2008) 605.
- [25] J.F. Kramarczyk, B.D. Kelley, J.L. Coffman, *Biotechnol. Bioeng.* 100 (2008) 707.
- [26] D.L. Wensel, B.D. Kelley, J.L. Coffman, *Biotechnol. Bioeng.* 100 (2008) 839.

- [27] B.D. Kelley, M. Switzer, P. Bastek, J.F. Kramarczyk, K. Molnar, T. Yu, J.L. Coffman, *Biotechnol. Bioeng.* 100 (2008) 950.
- [28] V. Brenac, A. Schapman, V. Ravault, N. Mouz, *Protein Expr. Purif.* 47 (2006) 533.
- [29] M.H.M. Eppink, R. Schreurs, A. Gijzen, K. Verhoeven, *Biopharm. Int.* 20 (2007) 44.
- [30] V. Brenac Brochier, A. Schapman, P. Santambien, L. Britsch, *J. Chromatogr. A* 1177 (2008) 226.
- [31] B.H.J. Hoftsee, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50 (1973) 751.
- [32] R.J. Yon, R.J. Simmonds, *Biochem. J.* 151 (1975) 281.
- [33] I. Sasaki, H. Gotoh, R. Yamamoto, H. Hasegawa, J. Yamashita, T. Horio, *J. Biochem.* 86 (1979) 1537.
- [34] I. Sasaki, H. Gotoh, R. Yamamoto, H. Tanaka, K. Takami, K. Yamashita, J. Yamashita, T. Horio, *J. Biochem.* 91 (1982) 1555.
- [35] W. Kopaciewicz, F.E. Regnier, *Anal. Biochem.* 133 (1983) 133.
- [36] R. Bischoff, L.W. McLaughlin, *J. Chromatogr.* 296 (1984) 329.
- [37] B.Y. Zhu, C.T. Mat, R.S. Hodges, *J. Chromatogr.* 548 (1991) 13.
- [38] B.Y. Zhu, C.T. Mat, R.S. Hodges, *J. Chromatogr.* 594 (1992) 75.
- [39] S.C. Burton, N.W. Haggarty, D.R.K. Harding, *Biotechnol. Bioeng.* 56 (1997) 45.
- [40] S.C. Burton, D.R.K. Harding, *J. Chromatogr. A* 814 (1998) 71.
- [41] M.A. Poul, PhD thesis, Université Montpellier II, Montpellier, France, 1994.
- [42] M.D. Summers, G.E. Smith, *A Manual of Methods for Baculoviruses Vectors and Insect Cells Procedures*, Texas Agricultural A M University, Texas, USA, 1987.
- [43] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76.
- [44] U.K. Laemmli, *Nature* 227 (1970) 680.

4.3. LES RESINES DE CHROMATOGRAPHIE EN MODE MIXTE POUR LA PURIFICATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX : OPTIMISATIONS ET MODELISATION (ARTICLE 3).

L'importance de la biopharmacie croît régulièrement grâce à la production de molécules d'intérêt biologique notamment d'anticorps monoclonaux. Ces molécules d'importances cruciales (et à forte valeurs ajoutées) représentent la majorité des recherches en amélioration des procédés. Les systèmes d'expressions préférentiellement utilisés pour la production d'anticorps monoclonaux sont les cellules ovariennes de hamster chinois (CHO), notamment en raison d'intérêts médicaux/structurels/fonctionnels.

Comme dans tout système d'expression, la protéine produite de façon recombinante fait partie d'un ensemble de molécules naturellement exprimées par l'hôte. Ces molécules endogènes sont appelés HCPs (Host Cell Proteins) et doivent être éliminés au cours des étapes de purification.

Dans ce travail nous avons évalué la chromatographie en mode mixte pour la capture d'anticorps monoclonaux à partir de surnageant de culture de cellules CHO, sans prétraitement, et en proposant la meilleure sélectivité possible. Connaissant à ce stade, l'efficacité de la chromatographie en mode mixte, et notamment son potentiel de séparation singulier, nous avons mis en place un procédé d'optimisation original. En effet, nous avons exploré un grand nombre de conditions expérimentales impliquant des conditions de pH et de conductivités différentes, pour chaque phase de la chromatographie.

Nous avons ainsi influencé la balance entre les différents types d'interactions impliquées dans les supports de chromatographie en mode mixte, lors du lavage mais aussi lors de l'élution. L'utilisation de techniques de criblage en microplaques, de plans d'expériences et de modélisation mathématique, nous a permis d'étendre le champ de conditions d'environnement explorées. Ce champ s'étendant sur des pH allant de 3 à 7.3 et des conductivités de 3 à 25 mS/cm.

Nous avons ainsi évalué les résines HEA, PPA et MEP HyperCel ainsi que la résine Capto Adhere (GE Healthcare). Ces quatre résines portent des ligands en mode mixte de type

hydrophobes et chargés positivement mais présentent des sélectivités propres. Cette étude nous a ainsi permis d'améliorer la compréhension des mécanismes de séparations.

Nous avons tout d'abord analysé les performances des résines de chromatographie pour la capture et l'éluion de la molécule cible, et dans leurs capacités à éliminer les HCPs contaminantes (**Fig. 2**).

Nous avons observé la forte dépendance envers le pH des résines HEA et PPA HyperCel, lors de l'étape de lavage, pour l'élimination des HCPs (plus le pH est bas, plus les HCPs sont éliminées). Les charges présentes sur ces ligands aux pH de lavage, permettent alors la ségrégation des protéines contaminantes en fonction de leurs états de charge (et donc de leurs points isoélectriques). De plus, les minimums d'interactions des protéines contaminantes avec les supports mode mixte (correspondant aux conditions optimales de lavage) se situent dans une zone de conductivité entre 15 et 25 mS/cm (**Fig. 2A**). Ceci est en accord avec les résultats obtenus dans le chapitre 2. En effet, l'utilisation de quantités de sels modérées, permet la réduction d'interactions électrostatiques favorables, tout en limitant l'effet positif sur les interactions hydrophobes. De la même manière, ces conductivités ne perturbent pas significativement les fortes répulsions de charges.

Nous avons observé sur la résine chromatographique MEP HyperCel un effet contraire, symbolisé par une forte dépendance à la conductivité. Ainsi l'absence, de charge aux pH de lavage, caractéristique de ce ligand, élimine l'impact des potentiels électrostatiques des protéines. Seul l'effet hydrophobe, contrôlé par la conductivité, a ainsi été observé.

Nous avons également observé que les interactions entre l'anticorps cible et les résines HEA et PPA HyperCel suivent les règles décrites dans ce document, à savoir un déplacement de la balance entre les interactions hydrophobes et ioniques lorsque l'on modifie les conductivités et pH (**Fig. 2B**). Lorsque l'on augmente la conductivité, on observe le renforcement des interactions hydrophobes et la réduction de la répulsion de charge, permettant de renforcer l'adsorption de l'anticorps. Lorsque l'on diminue le pH, et ce d'autant plus que la conductivité est basse, on décroche fortement la molécule des supports.

Nous avons également confirmé les différences entre les résines HyperCel, et observé un effet globalement plus « fort » des interactions en mode mixte sur PPA HyperCel.

A partir de ces résultats nous avons déterminé des conditions optimales de purification pour chacune des résines de chromatographie en mode mixte (**Table 1**). Nous avons ensuite transposé directement ces conditions en colonnes, à l'échelle laboratoire. Ceci nous a permis de vérifier l'efficacité de la méthode d'optimisation à haut débit (**Table 2**).

Enfin, par l'intermédiaire d'analyse en spectrométrie de masse, nous avons étudié spécifiquement les comportements des molécules contaminantes présentes dans les conditions optimales d'élution de chaque résine de chromatographie en mode mixte (**Table 4**). Nous avons comparé les populations de protéines présentes dans les éluions par rapport à l'extrait de départ (**Fig. 3 et 4**). Nous avons pu ainsi explorer finement les différences de sélectivité des résines, les expliquer au travers de certaines caractéristiques physicochimiques des protéines (**Fig. 5 et 6**) et proposer les méthodes d'améliorations du procédé de purification.



Antibody capture by mixed-mode chromatography: A comprehensive study from determination of optimal purification conditions to identification of contaminating host cell proteins

Jerome Pezzini^{a,b}, Gilles Joucla^a, René Gantier^b, Magali Toueille^b, Anne-Marie Lomenech^c, Caroline Le Sénéchal^a, Bertrand Garbay^a, Xavier Santarelli^a, Charlotte Cabanne^{a,*}

^a Université de Bordeaux, EA 4135, Bordeaux F-33000, France

^b Pall Life Sciences, 48, avenue des Genottes, Cergy St Christophe F-95800, France

^c Université de Bordeaux, Pôle Protéomique, Génomique Fonctionnelle Bordeaux, Bordeaux F-33000, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 June 2011

Received in revised form 8 September 2011

Accepted 14 September 2011

Available online 17 September 2011

Keywords:

Mixed-mode chromatography

Design of experiment

Screening

Mass spectrometry

Host cell proteins

Antibody

ABSTRACT

We evaluated mixed mode chromatography for the capture of recombinant antibodies from CHO cell culture supernatants. We studied PPA HyperCel, HEA HyperCel, MEP HyperCel and Capto adhere resins, which all contain hydrophobic and cationic groups. A microplate approach combined with DoE modeling allowed the exploration of the complex behaviors of these mixed mode resins. Optimal conditions for antibody purification and host cell proteins (HCPs) elimination were determined and then directly up-scaled to laboratory columns. Then we used mass spectrometry to identify the major HCPs potentially coeluted with the antibody. Differences between the four resins in terms of amount, complexity and identity of the HCPs present in the elution fractions were investigated.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, recombinant monoclonal antibodies (mAbs) have become the tool of choice to treat many diseases such as cancers [1]. These therapies require the use of high doses of mAbs over a long period of time. Considerable improvements in the production of recombinant therapeutic proteins by mammalian cells have been made. On the other hand, techniques for purifying mAbs have not evolved at the same pace and represent the bottleneck in the production of therapeutic proteins. Mammalian cells, particularly CHO cells, are widely used for the production of recombinant mAbs. These cells possess the complex cellular machinery required for post-translational protein modifications that are essential for the biological activity of therapeutic proteins. Another advantage of CHO cells is that the protein of interest can be secreted in culture media, thereby greatly simplifying the purification process. However, additional proteins released by the producing cells, called host cell proteins (HCPs), are also found in culture media. Thus the purification process should be efficient in removing these HCPs to

meet the purity specifications required by the regulatory authorities [2].

Purification of mAbs usually relies on three chromatographic steps. First, the mAb is captured using protein-A affinity, typically leading to a highly pure product. Then, the product is further polished by one or two additional chromatography steps. There is a growing interest in developing alternative procedures to capture the antibody of interest. Ideally, this step will effectively capture monoclonal antibodies while removing contaminating proteins.

For the purification of mAbs, Chen et al. [3] compared the classical purification process with an alternative method based on a new generation of chromatography resins that uses hydrophobic interactions. They demonstrated that these new resins can not only capture mAb directly from CHO supernatant obtained after cell culture, but also significantly improve the efficiency of the purification process as a whole. In another study, Follmann and Farner evaluated the performance of different kinds of resins in each step of a three-step purification process for a mAb produced in CHO. They showed that the combination of different resins could be as efficient as the classical process in terms of antibody recovery and final product purity [4]. This suggested that combining different kinds of interactions might be a good solution.

* Corresponding author at: Université de Bordeaux, EA 4135, Bordeaux F-33000, France. Tel.: +33 0557 571 297.

E-mail address: charlotte.cabanne@ipb.fr (C. Cabanne).

Such a combination of different kinds of interactions in one resin is called mixed mode chromatography. Burton and Harding [5] described mixed mode mechanisms as a protein binding onto the resin that relies on a combination of multiple type of interactions including hydrophobic, ionic and electrostatic interactions, whereas elution occurs essentially through ionic interactions (charge repulsion). These mixed mode resins are used to purify proteins in low-to-moderate salt concentrations compared to traditional hydrophobic interaction chromatography (HIC). Being able to bind proteins under neutral “physiological-like” conditions minimizes the risk of their precipitation and/or aggregation, and may contribute to a better recovery of the protein of interest. Mixed-mode chromatography has been used as an alternative to classical sorbents (affinity, HIC) to purify monoclonal antibodies [6–11], and to purify other proteins such as serum albumin, penicillin acylase or MBP-tagged proteins [12–16]. Mixed mode chromatography resins usually involve complex mechanisms and optimization, and need to be thoroughly investigated to facilitate their utilisation.

In the present study, we investigated four mixed-mode chromatography resins (Capto adhere, PPA HyperCel, HEA HyperCel and MEP HyperCel) for the capture of an antibody from a CHO cell culture supernatant. We intended to provide useful information on their mechanisms during a capture step and to characterize the contaminating CHO proteins.

To understand the behavior of mixed mode resins and to describe their use for the purification of mAbs, we first optimized the separation using high throughput screening, design of experiment (DoE) and modeling. We then determined the HCPs profiles of the optimized elution fractions using mass spectrometry. Finally we characterized the HCPs to assess how physicochemical properties of CHO proteins could influence a purification process using mixed mode resins.

2. Materials and methods

2.1. Equipment

An Akta Explorer 100 workstation from GE Healthcare (Uppsala, Sweden) was used for chromatographic experiments monitored with Unicorn 5.0. Protein detection was performed at 280 nm. HPLC analyses were carried out on a Spectra system (Thermo Scientific, MA, USA).

Conductivity and pH were measured and adjusted with the S47 SevenMulti™ dual meter pH/conductivity (Mettler Toledo, Viroflay, France). Concentration and diafiltration of the CHO cell supernatant was done with a 10 kDa Kwick lab cassette (GE Healthcare) on the LabScale TFF system (Millipore, Molsheim, France).

2.2. Biological material

Two types of biological material were used: crude cell culture supernatants from an antibody-producing CHO cell line (ATCC CRL-12445), crude cell culture supernatants from a CHO K1 cell line which does not produce an antibody (Eurobio, Les Ulis, France). Cells were cultivated in a serum-free medium CD CHO (GIBCO Invitrogen SARL, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 8 mM L-glutamine. The number of cells was determined using a hemocytometer. Cell density and viability were determined by the Trypan blue exclusion method at 0.2% final concentration.

2.3. Chemicals

Buffers and solutions were prepared using chemicals of analytical grade from Sigma (St Louis, MO, USA). Sodium phosphate,

sodium acetate and acetic acid were prepared at desired pH and conductivity.

2.4. Screening of chromatographic conditions using a 96-well format

AcroWell™ 96-well filter plates with a 0.45 μm hydrophilic polypropylene (GHP) pore-membrane and 350 μl wells used for sorbent screening were provided by Pall Life Sciences (Saint Germain en Laye, France).

Pre-equilibrated chromatographic sorbents were deposited in a 96-well plate (90 μl per well) and 200 μl of equilibration buffer (sodium phosphate, pH 7.3, 13 mS/cm) were added for 10 min twice. The biological material (150 μl per well) was incubated for 60 min and two washing steps were performed using 200 μl of equilibration buffer for 5 min to remove unbound proteins. A wash step was then carried out with 4 × 150 μl of wash buffer for 5 min. Elution step was then performed with 3 × 160 μl of elution buffer for 10 min. Finally a cleaning step was performed with 2 × 200 μl of cleaning solution (0.1 M citric acid) for 5 min. Each step was carried out under shaking at room temperature. Fractions were collected under vacuum aspiration using standard 96-well plates. Wash and elution buffers were tested in a pH range from 5 to 7.3 for wash step, and 3 to 5 for elution step. Conductivity ranged from 2 to 25 mS/cm for both steps.

2.5. DoE and modeling

DoE conditions were determined using MODDE 8 software (Umetrics, Umeå, Sweden). The analyses and modeling of results were performed using Minitab 16. A two-step optimization process was evaluated in one experiment using a four quantitative multi-level factor design. A D-Optimal design using 2, 8, 14 and 20 mS/cm and pH values of 5.5, 6.2, 6.7 and 7.3 with 3 replicate centre point at 11 mS/cm in 0.1 M sodium phosphate, pH 6.4, for the wash step, and the same range of conductivity with pH values of 3, 3.6, 4.3 and 5 for the elution step with 3 replicate centre points at 11 mS/cm in 0.1 M sodium acetate, pH 4, was completed.

2.6. Liquid chromatographic resins and columns

Capto adhere resin with high flow agarose matrix was purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). PhenylPropylAmine HyperCel (PPA), 4-Mercapto-Ethyl-Pyridine HyperCel (MEP) and HExylAmine (HEA) HyperCel with high porosity cross-linked cellulose were provided by Pall Life Sciences (Cergy, France).

A HiScreen Capto adhere column (4.7 ml, 0.77 cm × 10 cm) was purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). RPC prepacked (5 ml, 0.8 cm × 10 cm) columns of PPA, MEP and HEA HyperCel were provided by Pall BioSeptra (Cergy, France). A residence time of 2.5 min was used for each resin.

2.7. Analysis

2.7.1. HCPs determination by ELISA

HCPs were quantified by ELISA using the CHO protein free media HCPs ELISA kit (#CM015) from Cygnus Technologies (Southport, NC, USA) with the high sensitivity protocol specified in the kit.

2.7.2. Antibody determination by SEC-HPLC

Antibody concentration in the collected fractions was determined by a Size Exclusion High Performance Liquid Chromatography (SEC-HPLC). The SEC column TSKgel G3000SWxl was used (Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, Germany). Samples from microplates and fraction tubes were injected into the SEC column (injection volume 30 μl). The mobile phase consisted in 0.1 M

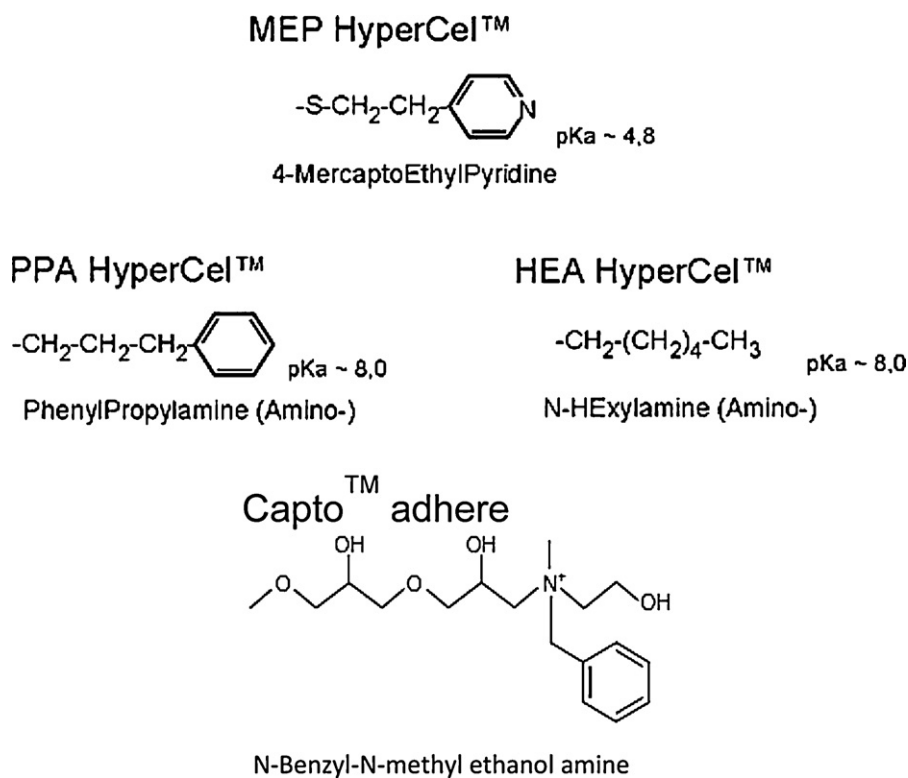


Fig. 1. Basic structure of the four mixed mode resins studied.

sodium sulfate in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.8. Elution was performed isocratically at 0.7 ml/min with a run time of 30 min. Antibody peak areas were determined by integration of the 215 nm signal and compared to a calibration curve generated with diluted samples of known concentration.

2.7.3. HCPs identification

The peptide mixture generated from trypsin digestion of each sample was analyzed by online capillary high-performance liquid chromatography (Dionex, Amsterdam, Netherlands) coupled to a nanospray LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Scientific, Illkirch, France). Data were acquired in a data-dependent mode alternating a high-resolution mass spectrometry (MS) scan survey over the range m/z 300–1700 and ten MS/MS scans in an exclusion dynamic mode. Identification was carried out by database research against the 2010.10 version of the Swissprot database restricted to *Mus musculus* in addition with the 2010.12 version of the Uniprot entries from *Cricetulus griseus*.

3. Results and discussion

3.1. Resin properties

The resin structures are presented in Fig. 1. Capto adhere, MEP HyperCel, PPA HyperCel and HEA HyperCel mixed mode resins are capable of interacting with a range of proteins under physiological conditions (pH and ionic strength) in the absence of lyotropic salts, which are required for capture in traditional HIC chromatography. HEA, PPA and MEP HyperCel sorbents contain alkyl groups (hexyl, propyl and ethyl, respectively) that could be involved in hydrophobic interactions [17]. In addition, PPA and MEP HyperCel possess aromatic groups (phenyl and pyridine) that may be involved in π - π interactions and which are very hydrophobic. MEP HyperCel also presents a thio-ether group that may act in thio-philic associations. They all contain protonable amines located in

the spacer arm for HEA and PPA HyperCel and as a head group for MEP HyperCel. Both PPA and HEA HyperCel are positively charged at physiological pH due to their pK_a (around 8). They could thus be described as strongly charged during the purification process described in this paper. MEP HyperCel has a lower pK_a (~5.0) and is therefore uncharged at neutral pH. The capture is thus achieved, in our process, without charge on the ligand, and its protonation occurs during elution and or wash. Capto adhere is described by the manufacturer as a strong anion exchanger with a multimodal functionality. Based on a quaternary ammonium group, it is always positively charged. It contains a benzyl cycle and a small alkyl chain that may act in hydrophobic interactions. Thus each mixed mode resin has a specific design but all share cationic and hydrophobic groups.

3.2. High throughput screening and modeling

Design of Experiment (DoE) was used to explore a wide range of pH and conductivity conditions for wash and elution with a limited number of experiments. DoE is a systematic approach to investigate a system or process. These structured tests are designed to allow assessment of the effect of factors on specific outputs. In our case, the responses analyzed were antibody recovery (mAb yield) and global HCP content measured with an ELISA assay. HCP content was expressed as a concentration in ng/ml in order not to be linked to the antibody content. HCP content is usually expressed as ppm, which is an HCP concentration compared to the target protein concentration. However, as we chose to combine HCP content and antibody yield within modeling, we assumed that independent responses should be computed together to provide the most realistic model to understand the mixed mode mechanism. The amount of mAb aggregates in the different fractions obtained during the purification step was evaluated by SEC-HPLC. No differences were observed between the four resins for all the conditions studied. Experiments were done in microplates because they allowed the

exploration of a large number of conditions in a limited time, and only small amounts of biological sample were required. pH ranges from 7.3 to 5.5 and from 5.0 to 3.0 were used for wash and elution steps, respectively. The conductivity range was between 2 and 25 mS/cm in both cases. These ranges were chosen based on our previous knowledge of mixed-mode chromatography [16,18].

As the mixed mode resins were evaluated for the capture of antibodies, we directly loaded the CHO cell culture supernatant on the four mixed mode resins. Without any pre-treatment the pH and conductivity values of the crude sample were 7.3 and 13 mS/cm, respectively.

Screening was performed and statistical software was used to analyze the data. Modeling allowed us to predict the behavior of the resins at any conditions inside the tested range, with a significantly lower number of experiments than would have been required with a classical approach. Then the best working zones of each resin were determined based on the highest mAb yield and lowest HCP content. Results are presented as contour plots in Fig. 2 and are discussed below.

3.2.1. Wash step: influence of conductivity and pH

The wash step contributes to purification by specifically removing HCP bound during loading, before the elution of the protein of interest. As previously described [16], it also contributes to the quality of the pH transition and largely influences elution performance.

PPA HyperCel contour plots presented in Fig. 2A (1) show that lowering the pH from 7.3 to 5.5 during the wash step progressively reduced the HCP content whereas the change in conductivity had a very limited impact. A wash step at pH 5.5 was therefore optimum to remove the majority of HCPs. We hypothesize that HCPs removed during this wash step are probably highly basic and slightly hydrophobic proteins, as their elimination is driven by charge repulsion at moderate acidic pH, and even high conductivity was not sufficient to completely overcome the repulsion. In contrast, the conductivity of the wash step strongly impacted the antibody yield at low pH, especially around a value of 5.5. Indeed, our model showed that an increase in the mAb yield was linked to an increase in the conductivity of the washing buffer. The hydrophobicity of both the antibody and the PPA HyperCel ligand was apparently high enough to promote hydrophobic interactions between the protein and the ligand at high-salt concentrations, and counterbalance the charge repulsion, which is favored under low pH conditions. A combination of low pH and high conductivity made it possible to obtain a high yield of mAbs with efficient HCP removal. Hence, optimal conditions retained for the wash step on PPA HyperCel were pH 5.5 and a conductivity of 23 mS/cm.

The conclusions about the impact of conductivity and pH on HCP removal on PPA HyperCel were similar for HEA HyperCel resin (Fig. 2A (2)). Variations in conductivity also had a limited effect, whereas using low pH during the wash step allowed the elimination of HCPs. On the other hand, the effect of conductivity and pH on the mAb yield was quite different for HEA and PPA resins. When the wash step was performed at a pH lower than 6.5, the mAb quantities eluted during the following step decreased. This suggested that a fraction of the antibody was eluted by charge repulsion during the wash step and that the hydrophobic interactions of the antibody with HEA HyperCel were weaker than with PPA HyperCel. When the pH of the wash buffer was increased, more antibodies stayed adsorbed on the resin. Thus, the elution yield with HEA HyperCel was maximal when the pH and conductivity of the wash step were, respectively, in the range of 6.2–7.0 and 10–20 mS/cm. Consequently, the optimal conditions retained for the wash step on HEA HyperCel were pH 6.5 and 15 mS/cm.

The behavior of the MEP HyperCel resin (Fig. 2A (3)) was clearly different from that of the previous HEA and PPA HyperCel. The

HCP content was heavily impacted by conductivity. Decreasing the salt concentration decreased the HCP concentration in the elution fraction. Thus the reduction of hydrophobic interactions by the decrease in salt concentration led to the elimination of weakly bound HCPs. On the contrary, pH variations between 7.3 and 5.5 did not significantly affect the HCP content. As the ligand of MEP HyperCel is not charged in this pH range, the charge of the proteins did not influence their binding onto the resin. Therefore, the main factor that governed the binding of the HCPs was a hydrophobic interaction with the ligand, a factor highly dependent on salt concentration. The conductivity and pH used for the wash step seemed to have a limited effect on mAb yield, the latter being similar over the range of conditions tested. There was no charge repulsion between antibody and ligand over the range of pH tested because the ligand was not charged. The antibody remained adsorbed on the resin by hydrophobic interactions even at low conductivity. Hence, as pH was not primordial, we decided to use a low pH for the wash step in order to limit pH variations between the wash and elution steps. We used a pH that was equally distributed between loading and elution, thus ensuring good efficiency (especially in the column) of both pH transitions. In conclusion, the optimal wash conditions for MEP HyperCel were pH 5.5 and 7 mS/cm.

The results obtained with Capto adhere (Fig. 2A (4)) were significantly different. Both conductivity and pH had an impact on the HCP content. An increase in conductivity was correlated with a better elimination of HCPs during the wash step. Thus, salts allowed HCP removal. A similar trend was observed when the pH was lowered. We hypothesize that electrostatic interactions are largely involved in the binding of HCPs on this resin. Capto adhere principally acted as a strong anion exchanger in our experiments. Increasing the conductivity led to a decrease in mAb yield and adding salts removed the antibody during the wash step. This is in agreement with previous observations about the predominance of electrostatic interactions. On the other hand, variations in pH had no influence. We thus postulate that in the range of pH used, the modification in the charge of the antibody was not sufficient to trigger charge repulsion with the ligand. Low pH and high conductivity allowed HCP removal, but conductivity also lowered mAb yield. It was thus chosen to be as high as possible within a high mAb yield area. In conclusion, the optimal conditions were pH 5.5 and 8 mS/cm for Capto adhere.

3.2.2. Elution step: influence of conductivity and pH

Considering the optimal conditions determined for the wash step, we then explored the model to determine the optimal conditions for elution (Fig. 2B).

For PPA HyperCel (Fig. 2B (1)) we observed that above a specific combination of pH and conductivity, almost no HCPs were found in the elution fraction. This indicated that some HCPs remained adsorbed on the resin. These proteins should be very acidic and hydrophobic, and thus tightly bound on PPA HyperCel. The mAb yield was highly influenced by pH and conductivity. A combination of low pH (<4.0) and conductivity (<10 mS/cm), which results in strong charge repulsion and reduced hydrophobic interaction, was required for optimal elution of the antibody. Interactions between antibody and ligand were thus very strong on this resin. As the adsorption of most HCPs with the sorbents was even stronger than the interaction of the antibody, quantities of HCPs that were co-eluted with the antibody were low. Indeed, performances were very good, but the working zone was quite small (around 0.5 pH unit, and 5 mS/cm of conductivity). These values are a minimum requisite for a robust process. The optimal conditions for elution on PPA HyperCel were pH 3.8 and 3 mS/cm.

The results obtained for HEA HyperCel (Fig. 2B (2)) were similar to those obtained with PPA HyperCel, which was logical because

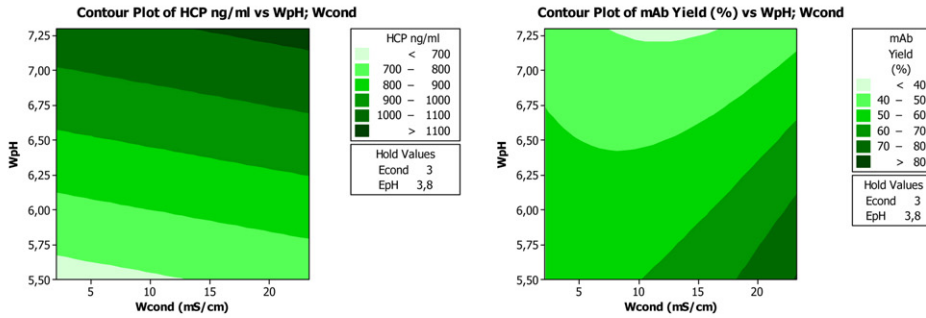
these ligands are similarly charged hydrophobic groups. Nevertheless, the pH value needed to obtain a high antibody yield was not as acidic as with PPA, which may be advantageous for the stability of proteins. However, higher amounts of HCPs were co-eluted with the antibody owing to weaker interactions involved

in HEA. The optimal conditions for HEA HyperCel were pH 4 and 3 mS/cm.

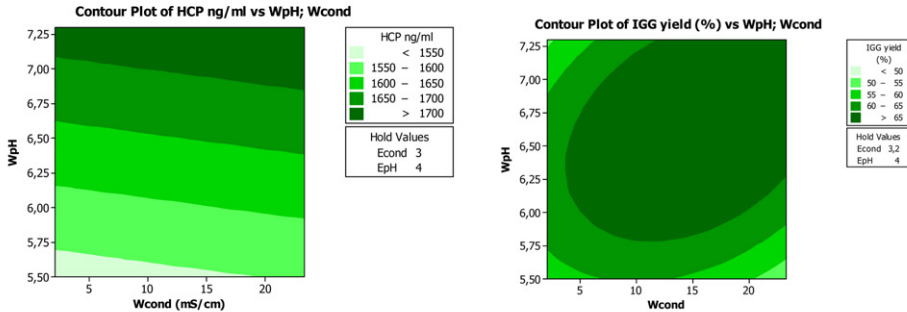
With MEP HyperCel (Fig. 2B (3)) we observed that conductivity and pH greatly influenced mAb yield and HCP removal. Lowering pH increased mAb yield and HCP content. Indeed when the

A. Contour plots of wash conditions.

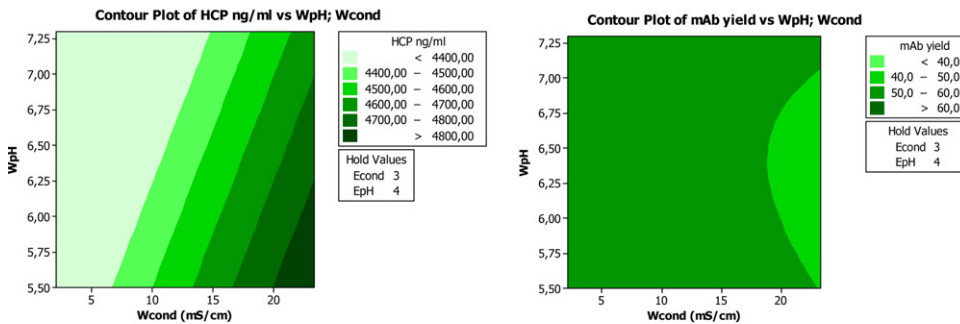
1. PPA HyperCel



2. HEA HyperCel



3. MEP HyperCel



4. CaptoAdhere

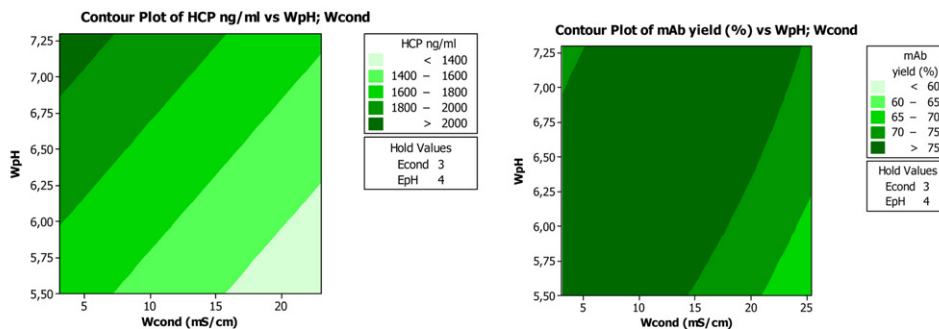
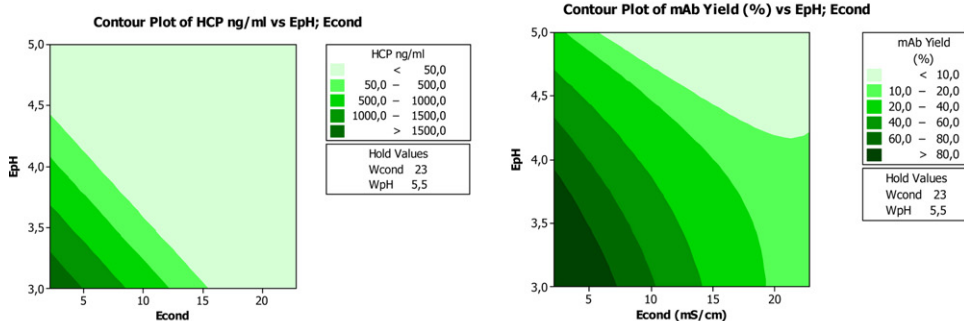


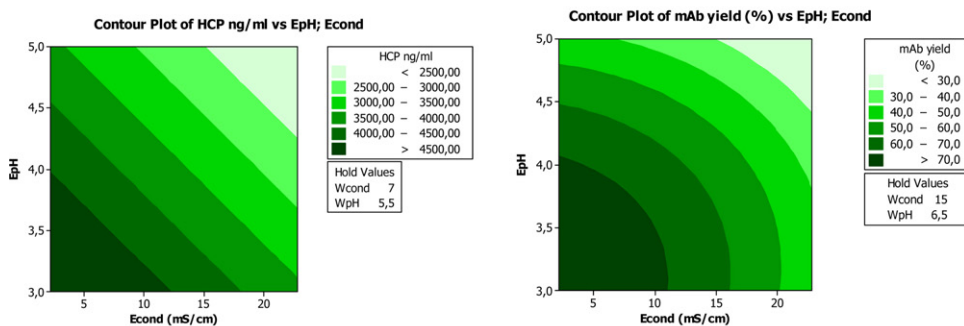
Fig. 2. Contour plots obtained after the screening of wash (A) and elution (B) conditions for PPA HyperCel, HEA HyperCel, MEP HyperCel and Capto adhere. On the left, contour plots showing HCP content. On the right, contour plots showing antibody yield. Values corresponding to the contour plot colors are indicated on the scale on the right of each panel. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

B. Contour plots of elution conditions.

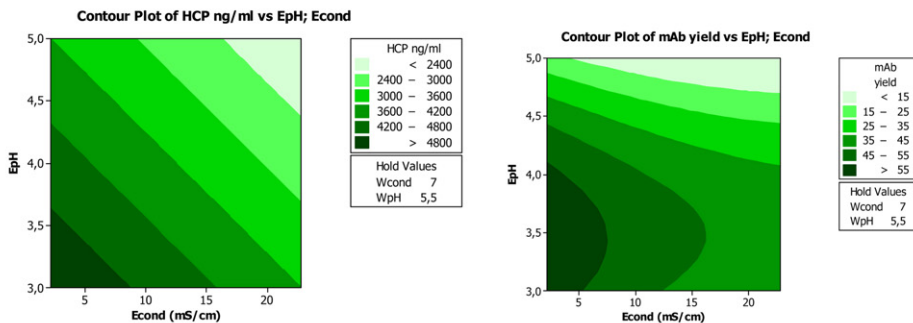
1. PPA HyperCel



2. HEA HyperCel



3. MEP HyperCel



4. CaptoAdhere

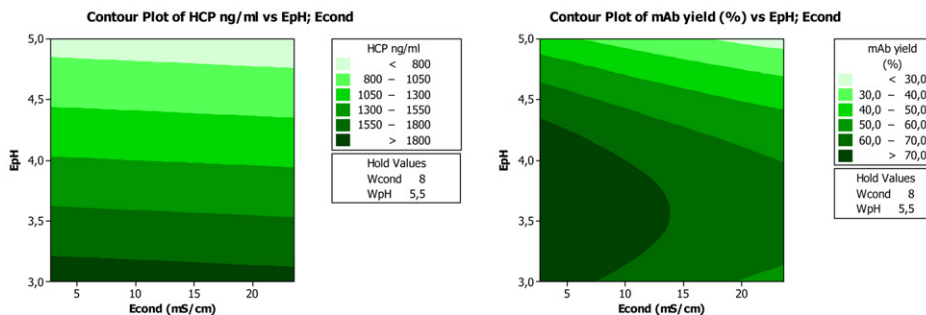


Fig. 2. (Continued).

pH used was below the pK_a value (around pH 5.0) of the ligand, it became protonated. This led to electrostatic repulsion with the bound proteins that were positively charged, and triggered their elution. The increase in conductivity had the exact opposite effect. We observed a decrease in the amount of mAb and HCPs eluted. Indeed conductivity promoted hydrophobic interactions and reduced charge repulsion. In the elution step, this

resin behaves like the other HyperCel mixed mode sorbents. However, we obtained lower antibody yield with MEP HyperCel when compared to the other resins. This could be due to a lower compatibility of this resin with our microplate approach. Nevertheless, we were able to determine the optimal conditions for the elution of the antibody, which were pH 4 and 3 mS/cm for conductivity.

Table 1
Optimal conditions obtained with the model.

| | Binding | Wash | Elution |
|--------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| MEP HyperCel | pH 7.3 13 mS/cm | pH 5.5 7 mS/cm | pH 4 3 mS/cm |
| PPA HyperCel | pH 7.3 13 mS/cm | pH 5.5 23 mS/cm | pH 3.8 3 mS/cm |
| HEA HyperCel | pH 7.3 13 mS/cm | pH 6.5 15 mS/cm | pH 4 3 mS/cm |
| Capto adhere | pH 7.3 13 mS/cm | pH 5.5 8 mS/cm | pH 4 3 mS/cm |

The influence of pH on the elution of HCPs on Capto adhere was obvious (Fig. 2B (4)). A reduction in pH increased the HCP content, whatever the conductivity. Lowering the pH was necessary to modify the charges at the surface of proteins and trigger their elution. Furthermore the increase in conductivity in our range (3–25 mS/cm) was not sufficient to modify the interactions between these HCPs and ligand. Very strong ionic interactions were thus involved. The antibody yield was influenced not only by pH but also somewhat by conductivity. Increasing salts led to a decrease in mAb yield during elution especially below a pH of 4.5. Salts might favor hydrophobic interactions between antibody and ligands. This suggests that the antibody is globally more hydrophobic than the residual HCPs. This resin acts predominantly as an anion exchanger but can present some hydrophobic interactions. The behavior of HCPs versus antibody was significantly different with this resin. The optimal conditions selected for Capto adhere were pH 4 and 3 mS/cm.

The optimal conditions for the four resins are summarized in Table 1.

3.2.3. Influence of ligand structure on chromatographic behavior

By examining the general trends, we observed that on all mixed mode resins, elution yield increased as pH and conductivity decreased. Since the aim of capture was to recover the highest amount of mAb, very similar elution conditions were chosen for the four resins (Table 1). Indeed, low pH during elution allowed charge repulsions between positively charged ligands and mainly positively charged protein surface. Furthermore, conductivity was low in order to reduce the hydrophobic attraction, and not to counteract charge repulsion. Low pH and low conductivity thus favored good elution yield. However, very low pH is known to reduce protein solubility and stability. As the amount of HCPs eluted increased in the same proportion, the highest possible pH was chosen within a high mAb yield area.

Optimal wash conditions were quite variable in terms of conductivity whereas they were closer in terms of pH. During the process, pH had a clear effect on the charge distribution at the surface of the proteins, whereas the effect on the charge of the ligands was limited. As they share similar ionic groups, few differences were observed between the four resins in terms of optimal pH. On the other hand, conductivity acted strongly on both hydrophobic and electrostatic interactions between ligands and proteins. Hence, as the studied mixed mode resins are tailored to have high differences in their hydrophobicity, conductivity really highlighted their specificities. The effect of pH on hydrophobic interactions was not underestimated. Indeed, clear reduction of the surface hydrophobicity of proteins at low pH has already been described [19] and higher retentions of proteins on hydrophobic sorbents have been observed at high pH [20]. However, the effect of pH on hydrophobic interactions between proteins and chromatographic ligands can be complex. In our case, we assumed that changes in hydrophobic interactions due to pH would have a limited effect compared to changes due to conductivity.

The PPA HyperCel ligand features a propyl chain and a phenyl group and is composed of hydrocarbons with a highly hydrophobic aromatic ring. The alkyl-aryl group therefore combines hydrophobic and aromatic interactions. Interactions on PPA are thus very strong, and this was confirmed by our experiments. The high electron density of the aromatic electron cloud may also strengthen van der Waals interactions with proteins. The hexylamine of HEA HyperCel is only composed of an aliphatic chain that gives strong hydrophobicity owing to the number of hydrocarbons. Indeed, the chain length of binding ligands has been shown to directly influence the affinity of proteins for hydrophobic matrices. Increasing the chain length increases the hydrophobicity of resins [21,22]. The hydrophobicity of aliphatic moieties compared to aromatic ones has received much attention, and discrepancies in terms of energetics have been reported [23]. Aromatic moieties often provide “stronger” interactions especially when combined with an alkyl, likely due to different mechanisms of action [24]. Furthermore, on both ligands, the nitrogen is not directly situated in the environment of the hydrophobic group, which is favorable for strong hydrophobic interactions. Hydrophobic interactions on PPA and HEA HyperCel were obviously strong and easily favored when compared with the other resins.

MEP HyperCel contains a nitrogen atom inside the aromatic ring and a sulfur atom in close proximity. Having these groups in the vicinity of the aromatic ring may slightly diminish hydrophobic interactions with proteins. Indeed, thioethers that are structurally similar to ether groups are nucleophilic, and nitrogens are hydrophilic. This organo-sulfur pyridine structure may reduce the high hydrophobicity of the alky-aryl moiety.

Capto adhere contains several hydrophilic hydroxyls close to the methyl benzyl group. Such an environment should reduce the hydrophobicity of the aromatic ring.

In fact, PPA HyperCel, MEP HyperCel and Capto adhere initially appear very similar in the design of their functional groups as they share an aromatic ring connected to alkyl groups of different length. However, PPA HyperCel mainly has hydrocarbons whereas MEP HyperCel has sulfur and nitrogen and Capto adhere has several hydroxyl groups. Their presence in the environment is not favorable for strong hydrophobic interactions, although hydrogen bonding is enhanced by these nucleophiles [25].

Furthermore, electrostatic interactions may also be influenced by steric hindrance of the aromatic rings involved in all resins except HEA HyperCel. Consequently, the effect of charges appeared to be more involved in HEA HyperCel than with PPA HyperCel. Since the hydrophobicity of the ligand is limited on Capto adhere, the electrostatic interaction is predominant. The position of the protonated amine may also influence the retention mechanism. In the case of MEP HyperCel, this protonated amine is situated in the head group, and is thus in contact with the hydrophobic side chains. This raises the hypothesis that the positive charge is buried in a hydrophobic uncharged area. On the contrary, charges on the spacer arm are distant and can thus interact with charged amino acids in close proximity.

3.3. Validation of the model

The optimum conditions defined by the model gave predicted values for mAb elution yield and HCP content. These conditions were directly applied on a lab scale column in order to compare predicted and measured values (Table 2). The experimental values were comparable with the predicted ones. As expected, all resins performed better in the column than in the microplate. A major improvement was observed for the mAb yield obtained on MEP HyperCel in dynamic conditions, thus confirming the low compatibility of this resin with our microplate approach. Correlation

Table 2
Comparison between model predictions and on-column experiments for the antibody yield and HCP content.

| | Model predictions | | Measurements on columns | | |
|--------------|-------------------|--------------|-------------------------|--------------|------------|
| | mAb yield | HCPs (ng/ml) | mAb yield | HCPs (ng/ml) | HCPs (ppm) |
| MEP HyperCel | 55% | ≤4500 | 86% | 1500 | 1120 |
| PPA HyperCel | 80% | ≤800 | 93% | 460 | 430 |
| HEA HyperCel | 70% | ≤1700 | 90% | 730 | 530 |
| Capto adhere | 75% | ≤2000 | 72% | 2400 | 2400 |

between experimental and predicted values was good enough to validate our model.

In conclusion, these four resins could offer good yield for antibody purification and PPA HyperCel would seem to be the most efficient under raw conditions. Large differences were observed for elimination of HCPs, low amounts being obtained with HCPs for HEA and PPA HyperCel, and higher amounts with MEP HyperCel and Capto adhere. This showed that screening with this method was very efficient for designing a purification step using mixed mode resins. It allows the exploration of a wide range of conditions in limited time and with limited sample consumption, so it can benefit from these mixed mode capabilities.

3.4. Identification of HCPs

In the first part of this study, we obtained data concerning the total amount of HCPs, but no information regarding the identity of these proteins. Furthermore, we were not able to establish whether the HCPs that contaminate the elution fraction were the same in all the experiments performed with the four resins. We wanted to know whether there was any selectivity for the elimination or the retention of specific HCPs. This kind of information should be useful to better understand the interactions that take place during mixed-mode chromatography. To get further insight into the behaviors of the HCPs in the purification processes used, we decided to focus on these components. To obtain a source of HCPs from CHO cells, we used a supernatant from CHO K1 which did not produce antibodies. This allowed us to easily observe HCPs without them being overshadowed by the highly concentrated antibody.

We assumed that the HCP composition of our culture was similar to the composition of the antibody-producing cell line. Indeed, this has already been demonstrated by Jin et al. [26]. The supernatant from CHO K1 cultures was concentrated prior to our purification experiments. Then the previously determined optimal conditions for purification were applied on mixed mode resins using this antibody-free supernatant as feedstock. The composition in HCPs of each fraction was investigated *i.e.* flowthrough, wash, elution and “cleaning” fractions. We quantified and identified HCPs by mass spectrometry as described in Section 2.

First we had to check whether the optimal conditions previously defined could be transposed to this feedstock. We determined the total HCP quantities in the different fractions by using a dedicated ELISA test. The level of HCPs in the elution peak expressed in mass is presented in Table 3. The ranking of the four resins based on

Table 3
Comparison of the HCP content in the elution fractions of the four resins between producing and non producing cell line.

| | Producing | Non producing | |
|--------------|--------------|---------------|-----------|
| | HCPs (ng/ml) | HCPs (ng/ml) | HCPs (ng) |
| MEP HyperCel | 1500 | 5200 | 31 270 |
| PPA HyperCel | 460 | 1060 | 8500 |
| HEA HyperCel | 730 | 2000 | 11 900 |
| Capto adhere | 2400 | 8240 | 49 470 |

the HCP content in the elution peak was consistent between the producing and non-producing feedstocks.

3.4.1. HCPs composition of the culture supernatant

More than 300 proteins were identified in the supernatant from the culture of CHO K1 cells after four days of growth (Supplementary figure). The major proteins representing at least 0.5% of the total mass of protein are shown in Fig. 3. As expected, several proteins were known to be secreted. This was the case for lipoprotein lipase, procollagen C-endopeptidase enhancer 1, beta-2-microglobulin, glypican-1 and cofilin-1. However, several proteins were detected in the supernatant whereas they did not contain any classical secretion signal. Many of these proteins have already been described in the secretome of several cancer cells [27]. Furthermore we measured cell viability and after 5 days of culture the number of viable cells exceeded 95%. It remained comparable to what is usually observed in CHO cell cultures [28]. Anyway all these proteins would go through the purification process and needed to be taken into account. The characteristics (*pI*, *MM*) of the proteins identified were investigated using the Uniprot database and bibliography.

We analyzed the molecular masses of the CHO proteins present in the supernatant (Fig. 4) and found that most of them had a relatively low molecular mass compared to the antibody. This suggests that the distribution of the hydrophobic and charge patches at the surface is different between HCPs and antibody [22]. Thus the behavior on mixed mode resins could be different.

When examining the distribution of the theoretical isoelectric points of CHO proteins present in the supernatant (Fig. 5), we observed that around 15% of proteins were highly acidic (*pI* < 5). The *pI* of most proteins (60%) was in the pH range of 5–7, and fewer than 25% of proteins were more basic (*pI* > 7). These results are consistent with data from a previous study of proteins secreted from CHO [26].

3.4.2. HCP composition in the elution fractions of the four resins

The supernatant from CHO K1 cells was then applied to each resin using the optimal conditions determined in our study. We thus established in the elution fraction the HCPs that could potentially be co-eluted with an antibody. We examined the physicochemical properties of these proteins in order to identify trends that would facilitate further purification steps and to explain their chromatographic behavior.

In PPA HyperCel and HEA HyperCel, we identified around 20 different HCPs and more than 100 CHO proteins in the elution fraction of MEP HyperCel and Capto adhere.

With regard to the distribution of the isoelectric points and molecular masses of the potentially co-eluted proteins, we observed that the majority of the eluted proteins had a *pI* between 5 and 7 for all four resins (Fig. 5). The HCPs contaminating the elution fraction thus have a *pI* close to that of the antibody, which is not surprising. Interestingly, proteins with an isoelectric point under 5 were completely removed and were not eluted on the four mixed mode resins in these conditions. We conclude that with these acidic proteins, charge repulsion was not sufficient to trigger their elution. However, there were clear differences between the four resins. Less

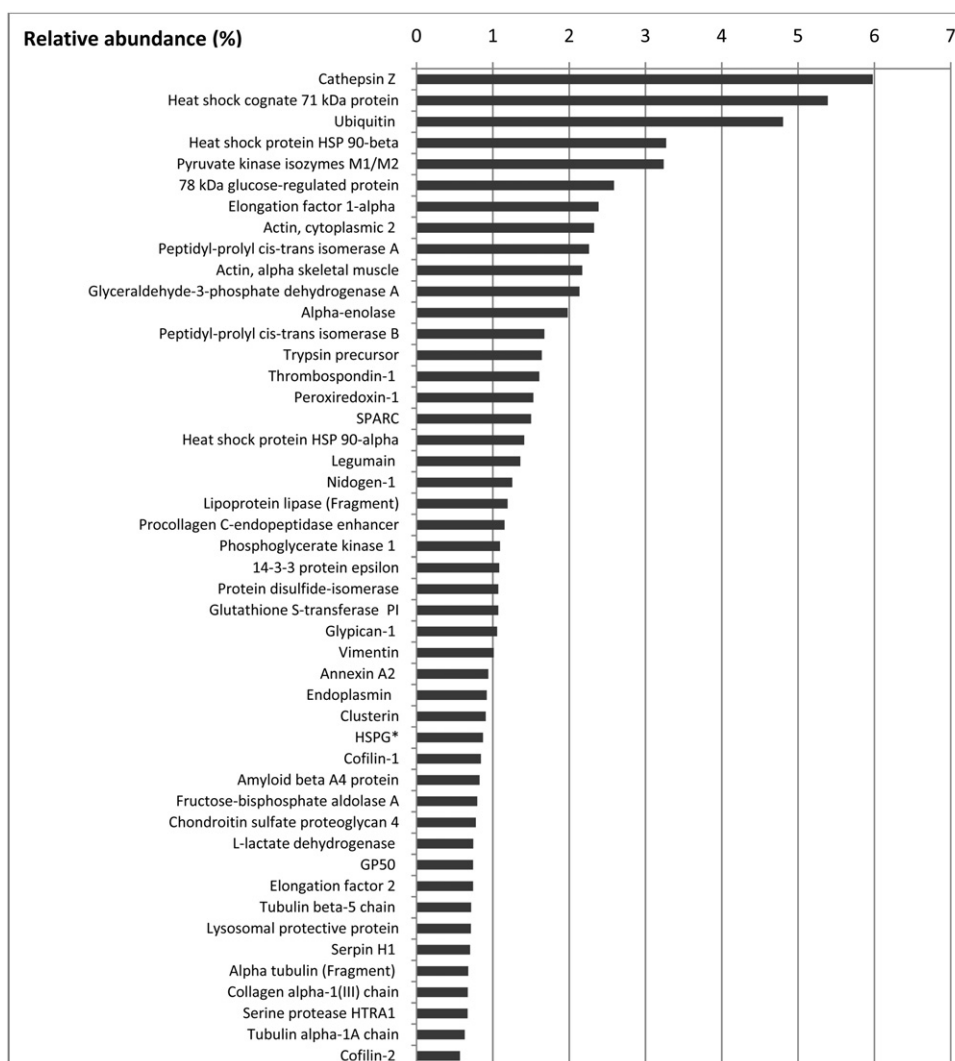


Fig. 3. Relative abundance of the major proteins of the culture supernatant identified by mass spectrometry. *HSPG: basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein.

basic proteins ($pI > 8$) were detected in the elution fraction of HEA and PPA HyperCel than in MEP HyperCel and Capto adhere.

The molecular masses of the HCPs eluted from the four resins were similar and close to those observed in the supernatant (data not shown).

To evaluate the contribution of each HCP in the elution fractions, we estimated the relative mass of each protein based on the relative abundance obtained by mass spectrometry and the total HCP quantitation shown by ELISA. Table 4 lists the proteins that represent at

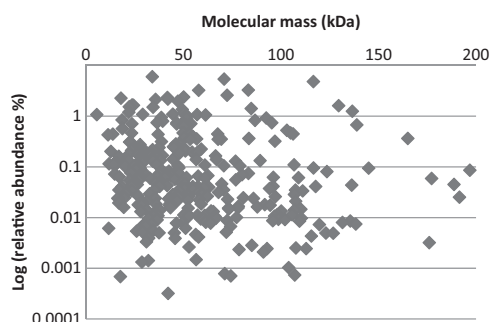


Fig. 4. Distribution of molecular mass of proteins in the supernatant.

least 1% of the total mass of HCPs in the elution fraction for each resin. We considered that a protein representing less than 1% of the HCPs detected in the fractions would not be a major contaminant. Moreover, proteins that accounted for less than 0.1% of the total signal were labeled as undetected. We obtained 36 different HCPs

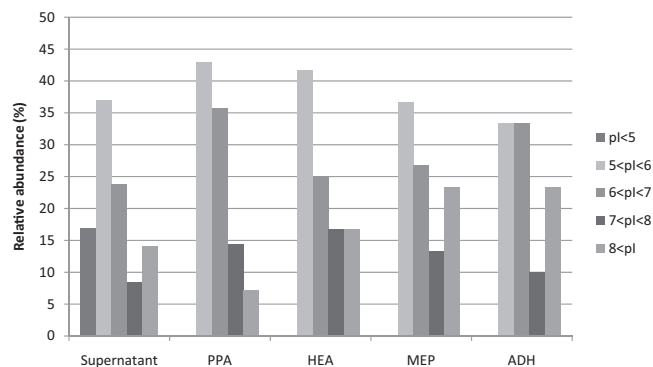


Fig. 5. Distribution of pI of HCPs found in the elution fraction of each resin in comparison with the supernatant (HEA: HEA HyperCel, PPA: PPA HyperCel, MEP: MEP HyperCel, ADH: Capto adhere).

Table 4
HCP Mass (ng) detected in the elution fractions of the four resins (ND: not detected).

| Protein name | pI | MM | Adhere | HEA | PPA | MEP |
|--|------|---------|--------|------|------|------|
| 78 kDa glucose-regulated protein | 5.01 | 70 464 | ND | 176 | 86 | 486 |
| Actin, cytoplasmic 2 | 5.31 | 41 792 | 453 | ND | ND | 408 |
| Alpha-enolase | 6.36 | 47 009 | 936 | ND | ND | 468 |
| Annexin A1 | 7.15 | 38 603 | 266 | 185 | 310 | 408 |
| Annexin A2 | 7.53 | 38 545 | 99 | 998 | 284 | 353 |
| Beta-2-microglobulin | 6.89 | 13 787 | 1605 | ND | ND | 2589 |
| Cathepsin L1 | 5.23 | 24 080 | 929 | 350 | ND | 654 |
| Cathepsin Z | 5.87 | 27 019 | 7460 | 5531 | 1007 | 5626 |
| Cofilin-1 | 8.26 | 18 428 | 2406 | ND | ND | 1265 |
| Collagen alpha-1(III) chain | 9.37 | 95 517 | 2057 | 363 | ND | 1028 |
| Dystroglycan | 9.41 | 67 629 | 664 | ND | ND | ND |
| Elongation factor 1-alpha-1(III) chain | 9.10 | 50 114 | 1587 | ND | 43 | 1510 |
| Elongation factor 2 | 6.23 | 95 166 | 345 | 212 | ND | 60 |
| Fructose-bisphosphate aldolase a | 8.40 | 39 224 | 534 | 50 | ND | 130 |
| Galectin-1 | 5.53 | 14 671 | 939 | ND | ND | 202 |
| Glutathione S-transferase PI | 6.89 | 23 439 | 420 | ND | 50 | 462 |
| Heat shock cognate 71 kDa protein | 5.37 | 70 739 | 1297 | 99 | ND | 841 |
| HnRNP A2/B1 | 8.97 | 37 402 | 689 | ND | ND | 636 |
| HSPG | 5.85 | 396 109 | 615 | ND | 1039 | 244 |
| Lysosomal protective protein | 5.55 | 51 395 | 556 | 191 | 76 | 572 |
| Macrophage-capping protein | 6.73 | 39 240 | 106 | 59 | 191 | 121 |
| Metalloproteinase inhibitor 2 | 6.47 | 21 726 | 411 | 264 | 240 | 607 |
| Nuclear migration protein nudC | 5.17 | 38 358 | 206 | ND | 185 | 225 |
| Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A | 7.88 | 17 840 | 308 | ND | ND | 428 |
| Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B | 9.42 | 20 218 | 168 | ND | ND | 330 |
| Peroxiredoxin-1 | 6.50 | 22 262 | 6798 | 2421 | 1739 | 3630 |
| Prelamin-A/C | 6.54 | 74 237 | 262 | ND | 126 | 131 |
| Procollagen C-endopeptidase enhancer 1 | 8.63 | 47 631 | 709 | 567 | 390 | 673 |
| Pyruvate kinase isozyme M1/M2 | 7.42 | 57 713 | 2129 | ND | ND | 613 |
| Serine protease HTRA1 | 6.73 | 48 925 | 889 | ND | ND | 446 |
| SH3 BGRL | 4.87 | 12 811 | 65 | ND | 448 | ND |
| Stathmin | 5.76 | 17 143 | ND | ND | 150 | ND |
| Thioredoxin | 6.94 | 17 983 | 632 | ND | ND | 56 |
| Transketolase | 7.23 | 67 630 | 655 | ND | ND | 71 |
| Ubiquitin | 6.50 | 8565 | ND | ND | 1909 | ND |
| Vinculin | 5.77 | 116 586 | 501 | 234 | 112 | 332 |

that had already been identified in the supernatant and decided to investigate their behavior.

The relative abundance of the HCPs present in the elution fractions was rather different from that of the supernatant. This strongly suggested that the population of HCPs that might contaminate the antibody fraction was not merely the same population, in terms of relative abundance, as that initially present in the biological sample.

The SH3BGRL (SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein) and HnrPA2B1 (Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1) were major contaminants of the elution fractions whereas they were detected in low amounts in the supernatant. Besides, some highly abundant proteins in the supernatant did not contaminate the elution fractions: HSP90 kDa (Heat Shock Protein), G3PDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), thrombospondin, SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine). These proteins were efficiently removed from the elution fractions of the four mixed mode resins. However, Cathepsin Z, which was the main HCP present in the supernatant, was also the main contaminant in the elution fractions from all mixed mode resins. Finally, differences were observed between resins, some abundant proteins in the supernatant being present in the elution fraction of certain resins but not in others. Such was the case for Peroxiredoxin-1, Ubiquitin and HSP 71 kDa.

We thus conclude that the yields of HCPs in the elution fractions were not merely due to their abundance in the culture supernatant but also to their physico-chemical characteristics. With HEA and PPA HyperCel, fewer than ten proteins were found in large quantities, *i.e.* >300 ng (Table 4).

HEA HyperCel was able to eliminate a large number of HCPs. The only exceptions were the Cathepsin Z and Peroxiredoxin-1

(5500 and 2400 ng, respectively). Lower amounts of Procollagen C-endopeptidase enhancer 1 and Annexin A2 were also recovered in the elution fraction (570 and 1000 ng, respectively). With this resin, the number of contaminating proteins was low. Consequently, by using an additional purification step to eliminate specifically Cathepsin Z and Peroxiredoxin-1, it would be possible to obtain an antibody fraction containing a very low amount of HCPs by using HEA HyperCel.

PPA HyperCel was extremely efficient at removing a large amount of HCPs. As previously shown, the total quantity of HCPs recovered was the lowest of the four resins tested. Interestingly, it was the most efficient for eliminating the Cathepsin Z protein, the amount being more than five times lower than in the other resins. This could be due to the fact that Cathepsin Z interacted strongly with the PPA ligand, and was less eluted under the conditions used to recover the antibody. Indeed, Cathepsin Z was highly recovered in the cleaning fraction (data not shown). Ubiquitin and the SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein were observed specifically in the elution fraction of PPA HyperCel. They were eliminated earlier in the purification with the other resins. Once again, this suggested that PPA HyperCel provides stronger interactions than the other resins tested.

For Capto adhere and MEP HyperCel, Cathepsin Z and Peroxiredoxin-1 were the main contaminants recovered. In addition, more than twenty proteins were also detected in high amounts in the elution fractions (>300 ng). Thus, these two resins were less efficient in removing HCPs. Among these proteins, six had a theoretical basic *pI*. These were cofilin-1, collagen alpha-1(III) chain, elongation factor 1-alpha-1(III) chain, dystroglycan, fructose-bisphosphate aldolase a, heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1, and procollagen C-endopeptidase enhancer 1.

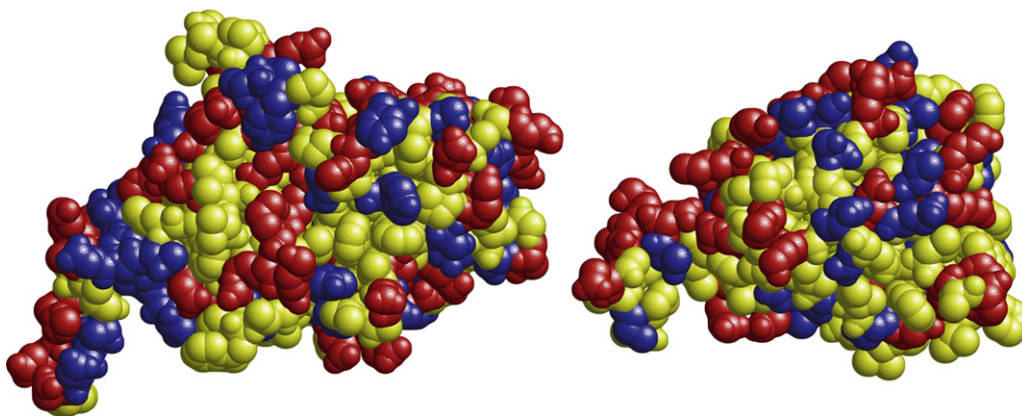


Fig. 6. Cathepsin Z (left) and Peroxiredoxin-1 (right) (hydrophobic residues in yellow, polar in blue, and charged in red, obtained from PDB database and analyses with Rasmol software). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

Basic *pI* should have induced a positively charged surface and thus charge repulsion with the positively charged Capto adhere ligand during loading. However, they were not eliminated in the flowthrough and were recovered in the elution fraction. These basic proteins were also found in the elution fraction of MEP HyperCel. As this resin was uncharged during the loading step, adsorption of these basic HCPs may be due to strong hydrophobic interactions (overcoming charge repulsion with Capto adhere). These proteins have already been described as having several hydrophobic patches or pockets [29–38]. They were not or only slightly recovered in the elution fractions of HEA and PPA HyperCel. Furthermore, they were found at lower pH during the cleaning step. As previously discussed, the hydrophobic interactions involved in these resins are stronger than in MEP HyperCel and Capto adhere. This confirms that these proteins are strongly bound by hydrophobic interactions irrespective of their isoelectric points.

To better understand the presence of several HCPs in the elution fractions, we investigated their structural properties. Peroxiredoxin-1 and Cathepsin Z are low molecular mass proteins (<25 000 Da) with a *pI* close to that of the antibody (around 6). Their chromatographic behavior was similar to that of the antibody, probably due to the distribution of hydrophobic and charge residues at their surface (Fig. 6). They present a high number of hydrophobic residues exposed at the surface, which allows good adsorption on the resins. However, charges are also widely distributed on the surface, thereby allowing charge repulsion during elution. Thus, owing to their low molecular mass, multisite binding is limited and hydrophobic binding cannot occur when the surface is charged.

Interestingly, we noticed that some contaminating HCPs contain immunoglobulin-like (Ig-like) domains. These domains are characterized by a specific fold in which two beta sheets form a “sandwich” that is stabilized by interactions between conserved cysteines and other charged amino acids. Such is the case for HSPG (basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein) and for beta-2-microglobulin, which contain 22 and 1 Ig-like domains, respectively. Thus, we postulate that their presence in the elution fractions may be favored by their structural homology with the antibody.

Moreover mAbs structural stability was monitored by SEC-HPLC and we did not observe any degradation resulting from the presence of contaminating proteases such as Cathepsin Z. Nevertheless, subsequent purification steps need to be performed to specifically eliminate these proteins. As an example, SEC chromatography will benefit from the high molecular mass of the antibody compared to that of the contaminating proteins.

4. Conclusion

Our results show that mixed mode resins can be used as a capture step for antibody purification from a crude culture supernatant of CHO cells. For each of the resins studied, we were able to define the optimal conditions for antibody purification. In all cases, yields and purities were compliant with a capture step. These mixed mode resins could thus be used in several existing purification processes. In spite of their variety, antibodies share similar structural patterns, hydrophobic patches, and charged areas. This allowed us to recommend the use of mixed mode chromatography for the purification of monoclonal antibodies no matter their specificities. Indeed, due to the general mechanisms involved in mixed mode resins (ion exchange and hydrophobic interactions), they will benefit from the large applicability of the respective chromatography. However, the selectivity that is obtained by the simultaneous combination of several types of interactions, and controlled by the optimization of pH and conductivity, will remain constant. Of course, optimal conditions will be adjusted according to the properties of the antibody (*pI*, hydrophobicity).

Our findings provide a better understanding of mixed mode chromatography mechanisms. For PPA and HEA HyperCel, both hydrophobic and electrostatic interactions were highly involved in the binding/elution mechanisms. However, PPA HyperCel could be described as the “stronger” mixed mode. Owing to the low *pK_a* of MEP HyperCel, electrostatic interactions were not present at all times and hydrophobic interactions appeared to be more important for the binding mechanism. On the other hand, electrostatic interactions prevailed in Capto adhere. The latter two resins are “weaker” mixed-mode. Furthermore, we demonstrate that the population of the HCPs that contaminated the antibody fraction was different according to the resin used. Proteins that are potentially coeluted with the antibody did not necessarily present the same physico-chemical properties. The combination of specific hydrophobic zones and charge distribution at the surface of proteins was the key to their chromatographic behavior. In the following purification steps, the use of chromatographic resins based on either hydrophobic or electrostatic interactions would offer different selectivity. By identifying the HCPs, we obtained clues concerning their physicochemical characteristics and chromatographic behavior. This should lead to a strategy to eliminate most HCPs in a rational manner.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.chroma.2011.09.036](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.09.036).

References

- [1] A.A. Shukla, J. Thommes, *Trends Biotechnol.* 28 (2010) 253.
- [2] Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use: CBER, FDA, 94D-0259, 1997.
- [3] J. Chen, J. Tetrault, A. Ley, *J. Chromatogr. A* 1177 (2008) 272.
- [4] D.K. Follman, R.L. Farner, *J. Chromatogr. A* 1024 (1–2) (2004) 79.
- [5] S.C. Burton, D.R.K. Harding, *J. Chromatogr. A* 814 (1998) 71.
- [6] L. Guerrier, I. Flayeux, E. Boschetti, *J. Chromatogr. B* 755 (2001) 37.
- [7] E. Boschetti, *Trends Biotechnol.* 20 (2002) 333.
- [8] S. Ghose, B. Hubbard, S.M. Cramer, *J. Chromatogr. A* 1122 (2006) 144.
- [9] M.C. Mowry, M. Meagher, L. Smith, J. Marks, A. Subramanian, *Protein Expr. Purif.* 37 (2004) 399.
- [10] H. Bak, O.R.T. Thomas, *J. Chromatogr. B* 848 (2007) 116.
- [11] J. Chen, J. Tetrault, Y. Zhang, A. Wasserman, G. Conley, M. DiLeo, E. Haimes, A.E. Nixon, A. Ley, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 216.
- [12] G.T. Weatherly, A. Bouvier, D.D. Lydiard, J. Chapline, I. Henderson, J.L. Schrimsher, S.R. Shepard, *J. Chromatogr. A* 952 (2002) 99.
- [13] D. Coulon, C. Cabanne, V. Fitton, A.M. Noubhani, E. Saint-Christophe, X. Santarelli, *J. Chromatogr. B* 808 (2004) 111.
- [14] M.P. Dux, R. Barent, J. Sinha, M. Gouthro, T. Swanson, A. Barthuli, M. Inan, J.T. Ross, L.A. Smith, T.J. Smith, R. Webb, B. Loveless, I. Henderson, M.M. Meagher, *Protein Expr. Purif.* 45 (2006) 359.
- [15] K. Rege, M. Pepsin, B. Falcon, L. Steele, M. Heng, *Biotechnol. Bioeng.* 93 (2006) 618.
- [16] C. Cabanne, J. Pezzini, G. Joucla, A. Hocquellet, C. Barbot, B. Garbay, X. Santarelli, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4451.
- [17] J.A. Queiroz, C.T. Tomaz, J.M. Cabral, *J. Biotechnol.* 87 (2) (2001) 143.
- [18] M. Touelle, A. Uzel, J.-F. Depoisier, R. Gantier, *J. Chromatogr. B* (2011) 836.
- [19] N. Alizadeh-Pasdar, E.C.Y. Li-Chan, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 328.
- [20] F. Xia, D. Nagrath, S.M. Cramer, *J. Chromatogr. A* 1079 (2005) 229.
- [21] H.P. Jennissen, *Hydrophobic Interaction Chromatography*, vol. 9, *Nature Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*, 2002, p. 353.
- [22] B.H.J. Hofstee, N.F. Otilio, *J. Chromatogr.* 159 (1978) 57.
- [23] G.I. Makhatadze, P.L. Privalov, *Biophys. Chem.* 50 (1994) 285.
- [24] R.P. Bywater, N.V.B. Marsden, in: E. Heftmann (Ed.), *J. Chromatogr. Libr.* 22A (1983) 309.
- [25] G. Zhao, X.-Y. Dong, Y. Sun, *J. Biotechnol.* 144 (2009) 3.
- [26] M. Jin, N. Szapiel, J. Zhang, J. Hickey, S. Ghose, *Biotechnol. Bioeng.* 105 (2) (2010) 306.
- [27] Y.-K. Shin, B.C. Yoo, Y.S. Hong, H.J. Chang, K.H. Jung, S.-Y. Jeong, J.-G. Park, *Electrophoresis* 30 (2009) 2182.
- [28] F.M. Wurm, *Nat. Biotechnol.* 22 (11) (2004) 1393.
- [29] J.R. Alban, M. Carpentier, C. Lansiaux, *J. Fluoresc.* 18 (2008) 75.
- [30] K.A. Piez, B.L. Trus, *J. Mol. Biol.* 110 (4) (1977) 701.
- [31] E.A. Gaucher, U.K. Das, M.M. Miyamoto, S.A. Benner, *Mol. Biol. Evol.* 19 (4) (2002) 569.
- [32] A.L. Sieron, A. Tretiakova, B.A. Jameson, M.L. Segall, S. Lund-Katz, M. Tariq Khan, S.-W. Li, W. Stocker, *Biochemistry* 39 (2000) 3231.
- [33] M. Saint-Jean, T. Izard, J. Sygusch, *J. Biol. Chem.* 282 (19) (2007) 14309.
- [34] G.D. Bowman, I.M. Nodelman, Y. Hong, N.-H. Chua, U. Lindberg, C.E. Schutt, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 41 (2000) 374.
- [35] P. Mark, L. Nilsson, *Eur. Biophys. J.* 36 (2007) 213.
- [36] W.S. Gilmore, S. Olwill, H. Mc Glynn, H.D. Alexander, *Biochem. Soc. Trans.* 32 (2004) 1122.
- [37] Y. Ikeda, T. Noguchi, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 12227.
- [38] M. Bozzi, E. Di Stasio, D. O Cicero, B. Giardina, M. Paci, A. Brancaccio, *Protein Sci.* 13 (2004) 2437.

5. CONCLUSION

Les supports de chromatographie en mode mixte étudiés HEA, PPA et MEP HyperCel de la société PALL Life Sciences, représentent une évolution majeure dans le paysage technologique de la biochromatographie. Grace à leurs ligands portant des groupements aliphatiques (HEA), ou aromatiques (PPA et MEP), ainsi que des groupements aminés protonables en différentes positions. Ces supports chromatographiques reposent donc sur la combinaison de plusieurs types d'interactions au sein d'un seul et même ligand.

En effet, nous avons montré que des interactions ioniques, hydrophobes et des liaisons hydrogènes interviennent dans le mécanisme d'interactions des supports de chromatographie en mode mixte HyperCel.

Chacune de ces interactions impacte fortement et guide la séparation en chromatographie en mode mixte. La balance entre les différentes interactions est la clé de voute de l'originalité de la séparation en mode mixte et de son utilisation. De plus, nous avons mis en évidence que la répartition entre ces interactions, et notamment entre les effets hydrophobes et ioniques (d'attraction et/ou de répulsion), est directement dépendante de l'environnement physicochimique dans lesquels sont utilisés les supports chromatographiques. Les conditions de pH et de sels, constituent les premiers éléments du contrôle de la chromatographie en mode mixte. Le pH agit sur l'interaction en modifiant la distribution des charges à la surface des protéines. La conductivité modifie la balance entre les interactions électrostatiques et hydrophobes. De nombreux autres composés dont nous avons détaillé les effets permettent également de modifier cette balance.

L'adsorption et l'élution en chromatographie en mode mixte, peuvent finalement être obtenues dans de très nombreux environnements/conditions (de pH, de conductivité, d'additifs). On peut ainsi envisager l'utilisation de ces supports de chromatographie en mode mixte dans une majorité de procédés de purification existants.

Différents modes d'utilisation ont également été observés : utilisant des propriétés de charge de la protéine et des supports chromatographiques en modifiant le pH ou la conductivité ; utilisant les propriétés d'hydrophobicité de la protéine et des supports en

modifiant la force ionique et/ou la constante diélectrique de la phase mobile ; combinant les différentes propriétés en utilisant des combinaisons d'environnements spécifiques.

Ces caractéristiques ont été observées grâce à des protéines standards et des mélanges complexes. La compréhension des mécanismes d'interactions, des effets d'environnement et des problématiques associées, nous a également permis de développer un certain nombre d'applications originales intégrant la chromatographie en mode mixte. Nous avons ainsi mis en place la purification de fragment d'anticorps (Fab'2) à partir de culture de cellules d'insectes, la capture de protéine de type MBP (Maltose Binding Protein) avec des performances supérieures à celles des résines d'affinité, et la capture efficace d'anticorps monoclonaux à partir de cellules de mammifères (CHO).

De nouveaux développements sont néanmoins envisageables quant à l'utilisation d'environnements spécifiques pour l'amélioration des séparations. En effet, seul certains outils permettant d'influencer la balance d'interactions ont été évalués en conditions réelles.

La caractérisation de l'importance de chaque type d'interactions en chaque instant d'un procédé de purification est également à approfondir. L'avènement de techniques performantes et sensibles telles que le microcalorimétrie, devraient permettre d'appréhender les nombreuses autres interactions impliquées mais que nous n'avons pu mettre en évidence (π - π , et Van der Waals notamment).

Le développement des modélisations informatiques permettant la simulation des interactions spatiales et énergétiques entre les protéines et les surfaces chromatographiques doit également permettre la compréhension des multiples sites d'interactions et les réorganisations structurelles au niveau des protéines. L'amélioration constante des techniques de résolutions des structures tridimensionnelles des protéines (cristallographie, résonance magnétique) apporte déjà une contribution inestimable.

Enfin, la compréhension poussée des enjeux énergétiques et moléculaires des interactions mode mixte permettra de valoriser de nouvelles potentialités encore inexploitées de la chromatographie en mode mixte.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alizadeh-Pasdar N., Li-Chan E.C.Y. (2000). Comparison of Protein Surface Hydrophobicity Measured at Various pH Values Using Three Different Fluorescent Probes. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 328-334.

Amourache L. and Vijayalakshmi M.A. (1984). Affinity chromatography of kid chymosin on histidyl-sepharose. *J. Chromatogr.* 303 (1), 285-290.

Arakawa T. and Timasheff S. N. (1984). Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding. *Biochemistry* 23, 5912-5923.

Arakawa T., Futatsumori-Sugai M., Tsumoto K., Kita Y., Sato H., and Ejima D. (2010). MEP HyperCel chromatography II: binding, washing and elution. *Protein Expr. Purif.* 71, 168-173.

Ariki R., Hirano A., Arakawa T. and Shirako K. (2011) Arginine increases the solubility of alkyl gallates through interaction with the aromatic ring. *J. Biochem.* 149 (4): 389-394.

Bennion B.J. and Daggett V. (2003). The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 5142-7

Boschetti E. (2002). Antibody separation by hydrophobic charge induction chromatography. *Trends Biotechnol.*, 20, 333-7.

Brenac Brochier V., Schapman A., Santambien P. and Britsch L. (2008). Fast purification process optimization using mixed-mode chromatography sorbents in pre-packed mini-columns. *J. Chromatogr. A*, 1177.

Burton S.C. and Harding D.R.K. (1998). Hydrophobic charge induction chromatography: salt independent protein adsorption and facile elution with aqueous buffers. *J. Chromatogr.*, 814, 71-81.

Chung S. Y., Vercellotti J. R. and Sanders T. H. (1998). Effect of Maturity and Curing on Peanut Proteins: Changes in Protein Surface Hydrophobicity. In Shahidi F., Ho C.-T. and van Chuyen N. (Eds.), *Process-induced chemical changes in food*. New York: Plenum Press.

Collin K.D. (1995). Sticky ions in biological systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5553-5557

Collins K.D. (1997). Charge density-dependent strength of hydration and biological structure. *Biophys J.* January, 72, 65–76.

Crowther J.B. and Hartwick R.A. (1982). Chemically bonded multifunctional stationary phases for high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* 16, 349–353.

De Xammar Oro J.R. (2001). Role of co-solute in biomolecular stability: glucose, urea and the water structure. *J. Biol. Phys.*, 27, 73– 79.

Del Vecchio P., Graziano G., Granata V., Barone G., Mandrich L., Rossi M. and Manco G. (2002). Denaturing action of urea and guanidine hydrochloride towards two thermophilic esterases. *Biochem. J.* 367, 857±863

Dill K. A. (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, 29, 7133–7155.

Droz E., Tadorelli M., Descouts P. and Wells T.N. (1994). Influence of surface and protein modification on immunoglobulin G adsorption observed by scanning force microscopy. *Biophys J.*, 67, 1316–1323

Er-el Z., Zaidenzaig Y. and Shaltiel S. (1972). Hydrocarbon-coated Sepharoses. Use in the purification of glycogen phosphorylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49 (2), 383–390.

Etter E.F. (1990). The effect of phenylglyoxal on contraction and intramembrane charge movement in frog skeletal muscle. *J. Physiol.*, 421, 441–462.

Fausnaugh J.L. and Regnier F.E. (1986), Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J. Chromatogr. A*, 359,131-146

Fox J.D., Kapust R.B., and Waugh D.S. (2001). Single amino acid substitutions on the surface of Escherichia coli maltose-binding protein can have a profound impact on the solubility of fusion proteins. *Protein Sci.* March, 10, 622–630.

Gagnon P. and Grund E. (1996). Large scale process development for hydrophobic interaction chromatography, Part 4: Controlling selectivity. *BioPharm.*, 9, 54–64.

Gagnon P.S. (1996). Purification Tools for Monoclonal Antibodies, Validated Biosystems, Inc., Tucson, Arizona, 155–190.

Galinski E.A., Stein M., Amendt B. and Kinder M. (1997). The kosmotropic (structure-forming) effect of compensatory solutes, *Comp. Biochem. Physiol.*, 117A, 357–365.

Gao J. and Whitesides G.M. (1997). Using Protein Charge Ladders to Determine the Values of Effective Charge and Molecular Weight of Proteins. *Anal. Chem.*, 69, 575–580.

Gibson T.J. and Murphy R.M. (2005). Design of peptidyl compounds that affect β -amyloid aggregation: importance of surface tension and context. *Biochemistry*, 44, 8898–8907.

Gordon J. A. and Jencks W.O. (1963). The relationship of structure to the effectiveness of denaturing agents for proteins. *Biochemistry*, 2, 47–57.

Hernández-Hernández A., Rodríguez-Navarro A. B., Gómez-Morales J., Jiménez-Lopez C., Nys Y. and García-Ruiz J. M. (2008). Influence of Model Globular Proteins with Different Isoelectric Points on the Precipitation of Calcium Carbonate. *Cryst. Growth Des.*, 8 (5), 1495–1502

Herskovits T.T., Jailer H., and Gadgebeku B. (1970). On the structural stability and solvent denaturation of proteins. II. Denaturation by the urea. *J. Biol. Chem.* 245, 4544–4550.

Heyda J., Kozišek M., Bednarova L., Thompson G., Konvalinka J., Vondrašek J., and Jungwirth P. (2011). Urea and guanidinium induced denaturation of a trp-cage miniprotein. *J. Phys. Chem. B*, 115, 8910–8924.

Hofmeister F. (1888). Zur lehre von der wirkung der salze. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 24:247–260.

Hofstee B.H.J. (1973a). Hydrophobic affinity chromatography of proteins. *Anal. Biochem.* 52 (2), 430–448.

Hofstee B.H.J. (1973b). Protein binding by agarose carrying hydrophobic groups in conjunction with charges. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50 (3), 751–757.

Hua L., Zhou R., Thirumalai D. and Berne B.J. (2008). Urea denaturation by stronger dispersion interactions with proteins than water implies a 2-stage unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105, 16928-16933.

Jakoby W.B. (1971). Crystallization as a purification technique, *Enzyme Purification and Related Techniques*, in *Methods in Enzymology*. 22, Jakoby, W.B., Ed., Academic Press.

Kasher J.S., Allen K.E., Kasamo K. and Slayman C.W. (1986). Characterization of an essential arginine residue in the plasma membrane H⁺-ATPase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.*, 261, 10808- 1081.

Kauzmann W. (1959) Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.*, 14, 1–63.

Kazarinoff M.N. and Snell E.E. (1977). Essential arginine residues in tryptophanase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 252, 7598-602.

Kennedy L.A., Kopaciewicz W. and Regnier F.E. (1986). Multimodal liquid chromatography columns for the separation of proteins in either the anion-exchange or hydrophobic-interaction mode. *J. Chromatogr.*, 359, 73–84.

Knudsen K. L., Hansen M. B., Henriksen L. R., Andersen B. K. and Lihme A. (1992). Sulfone-aromatic ligands for thiophilic adsorption chromatography: purification of human and mouse immunoglobulins. *Anal. Biochem.*, 201,170–177.

Kuehner D.E., Engmann J., Fergg F., Wernick M., Blanch H.W. and Prausnitz J. M. (1999). Lysozyme Net Charge and Ion Binding in Concentrated Aqueous Electrolyte Solutions. *J. Phys. Chem. B*, 103 (8), 1368–1374

Kyte J. and Doolittle R.F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 157,105-32.

Langer E.S. (2009). Bioplan Associates, INC. *Pharma Manufacturing*.

Melander W.R and Horvath Cs. (1977). Salt effects on hydrophobic interaction in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of lyotropic series. *Arch. Biochem. Biophys.*, 183, 200–215.

Melander W.R., Rassi Z.E. and Horvath Cs. (1989). Interplay of hydrophobic and electrostatic interactions in biopolymer chromatography: effect of salts on the retention of proteins. *J. Chromatogr.*, 469, 3–27.

Moelbert S., Normand B. and De Los Rios P. (2004). Kosmotropes and chaotropes: modelling preferential exclusion, binding and aggregate stability. *Biophys Chem.*, 112, 45-57.

Oscarson S. and Porath J. (1990). Protein chromatography with pyridine- and alkyl-thioether-based agarose adsorbents. *J. Chromatogr.*, 499, 235–247.

Patthy L. and Thesz J. (1980). Origin of the selectivity of α -dicarbonyl reagents for arginyl residues of anion-binding sites. *Eur. J. Biochem.*, 105, 387-393

Porath J., Sundberg L., Fornstedt N. and Olson I. (1973). Salting-out in amphiphilic gels as a new approach to hydrophobic adsorption. *Nature*, 245, 465–466.

Porath J., Carlsson J., Olsson I., and Belfrage G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258, 598-599

Porath J., Maisano F. and Belew M. (1985). Thiophilic adsorption – a new method for protein fractionation. *FEBS Lett.* 185, 306–310

Porath J. (1986). Salt-promoted adsorption: recent developments. *J. Chromatogr.*, 376 331–341.

Riordan J.F. (1979) Arginyl residues and anion binding sites in proteins. *Mol. Cell. Biochem.* 26, 71-92.

Scholz G. H., Vieweg S., Leistner S., Seissler J., Scherbaum W. A. and Huse K. (1998) A simplified procedure for the isolation of immunoglobulins from human serum using a novel type of thiophilic gel at low salt concentration. *J. Immunol. Methods*, 219 , pp. 109–118.

Schwartz W., Judd D., Wysocki M., Guerrier L., Birck-Wilson E. and Boschetti E. (2001). Comparison of Hydrophobic Charge Induction Chromatography with Affinity Chromatography on Protein A for Harvest and Purification of Antibodies. *J. Chromatogr. A*, 908, 251-263.

Schwarz A. (1996). Five-membered Mercaptoheterocyclic Ligands for Thiophilic Adsorption Chromatography, *J. Molecular Recognition*, 9, 672-674.

Schwarz A., Kohen F., and Wilchek M. (1995) Novel heterocyclic ligands for the thiophilic purification of antibodies. *J. Chromatogr.*, 664, 83–88.

Shoun H., Beppu T. and Arima K. (1980). An essential arginine residue at the substrate-binding site of p-hydroxybenzoate hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, 255, 9319–9324.

Simmonds R.J. and Yon R.J. (1977). Protein chromatography on adsorbents with hydrophobic and ionic groups Purification of human erythrocyte glycophorin. *Biochem. J.* 163 (2), 397–400.

Subramanian S. (1982). Spectral changes induced in Cibacron Blue F3GA by salts, organic solvents, and polypeptides: implications for Blue dye interaction with proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 216 (1), 116–125.

Takahashi K. (1968). The reaction of phenylglyoxal with arginine residues in proteins. *J. Biol. Chem.*, 243, 6171-6179.

Takahashi K. (1977). Further studies on the reactions of phenylglyoxal and related reagents with proteins. *J. Biochem. (Tokyo)*, 81, 403-414.

Tanford C. and Kirkwood J.G. (1957). Theory of protein titration curves. I. General equations for impenetrable spheres. *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 5333–5347.

Thomas A.S. and Elcock A.H. (2007). Molecular Dynamics Simulations of Hydrophobic Associations in Aqueous Salt Solutions Indicate a Connection between Water Hydrogen Bonding and the Hofmeister Effect. *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 14887–14898

Tiselius A., Hjertén S. and Levin Ö. (1956). Protein chromatography on calcium phosphate columns, *Arch. Biochem. Biophys.* 65, 132.

Traube J. (1910). Theory of attraction pressure. *J. Phys. Chem.*, 14,453–475.

Tsumoto K., Ejima D., Senczuk A. M., Kita Y., and Arakawa T. (2007). Effects of salts on protein-surface interactions: applications for column chromatography. *J. Pharm Sci.* 96, 1677-1690.

Tswett M. (1906). Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen. *Ber. Dtsch. Botan. Ges.*, 24: 316-323

Vanoni M.A., Pilone Simonetta M., Curti B., Negri A. and Ronchi S. (1987). Phenylglyoxal modification of arginines in mammalian D-amino-acid oxidase. *Eur. J. Biochem.*, 167, 261-267.

Wallqvist A., Covell D. G., Thirumalai D. (1998). Hydrophobic Interactions in Aqueous Urea Solutions with Implications for Mechanisms of Protein Denaturation, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 427-428.

Wesselingh J.A. and Bosma J.C. (2001) Protein ion-exchange adsorption kinetics, *AIChE J.*, 47, 1571- 1580

Wood T.D., Guan Z., Borders Jr. C.L., Chen L.H., Kenyon G.L. and McLafferty F.W. (1998). Creatine kinase: Essential arginine residues at the nucleotide binding site identified by chemical modification and high-resolution tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 3362–3365.

Xia F., Nagrath D., Cramer S.M., (2005). Effect of pH changes on water release values in hydrophobic interaction chromatographic systems. *J. Chromatogr. A*, 1079, 229-235.

Zangi R. (2010). Can Salting-In/Salting-Out Ions be Classified as Chaotropes/Kosmotropes? *J. Phys. Chem. B*, 114, 643–650.

Zangi R., Zhou R. and Berne B.J. (2009) Urea's action on hydrophobic interactions. *Am Chem Soc.*, 131, 1535-41.

Zhang Y.J. and Cremer P.S. (2006). Interactions between Macromolecules and Ions: the Hofmeister Series. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 10, 658-663.

LISTE DES PUBLICATIONS

1. Charlotte Cabanne, Jerome Pezzini, Gilles Joucla, Agnès Hocquellet, Caroline Barbot, Bertrand Garbay, Xavier Santarelli, Efficient purification of recombinant proteins fused to maltose-binding protein by mixed-mode chromatography, *Journal of Chromatography A*, Volume 1216, Issue 20, 15 May 2009, Pages 4451-4456, ISSN 0021-9673, 10.1016/j.chroma.2009.03.048.
2. J. Pezzini, V. Brenac Brochier, M.P. Barrouillet, M. Cerruti, G. Clofent-Sanchez, A. Schapman, A. Topol, R. Robert, C. Cabanne, P. Cerruti, X. Santarelli, Rapid screening of purification strategies for the capture of a human recombinant F(ab')₂ expressed in baculovirus-infected cells using a micro-plate approach and SELDI-MS, *Journal of Chromatography B*, Volume 877, Issue 24, 15 August 2009, Pages 2428-2434, ISSN 1570-0232, 10.1016/j.jchromb.2009.04.034.
3. Jerome Pezzini, Gilles Joucla, René Gantier, Magali Toueille, Anne-Marie Lomenech, Caroline Le Sénéchal, Bertrand Garbay, Xavier Santarelli, Charlotte Cabanne, Antibody capture by mixed-mode chromatography: A comprehensive study from determination of optimal purification conditions to identification of contaminating host cell proteins, *Journal of Chromatography A*, Volume 1218, Issue 45, 11 November 2011, Pages 8197-8208, ISSN 0021-9673, 10.1016/j.chroma.2011.09.036.

COMMUNICATIONS

Poster

- New challenging chromatographic method for purification of recombinant proteins fused with maltose-binding protein in *Escherichia coli*. Cabanne C., Pezzini J., Joucla G., Hocquellet A., Barbot C., Noubhani AM., Dieryck W., Costaglioli P., Garbay B. and Santarelli X. 11th international meeting SBCN, Montpellier, 14-16 October (2008)

- Two –Step purification of human recombinant F(ab)₂' expressed in Baculovirus-infected cells. Pezzini J., Barrouillet M.-P., Cabanne C., Brochier V., Cerruti M., Clofent-Sanchez G., Cerruti C., Schapman A., Topol A. and Santarelli X. 11th international meeting SBCN, Montpellier, 14-16 October. (2008)

- Rapid screening of purification strategies of a human recombinant F(ab)₂' expressed in Baculovirus-infected cells using a micro-plate approach and SELDI-MS to develop an capture purification step. Brenac Borochier V., Pezzini J., Barrouillet M.P., Cerruti M., Clofent-Sanchez G., Schapman A., Topol A., Robert R., Cabanne C., Cerruti P. and Santarelli X. Journée Scientifique de l'UFR66. Talence, France. (2008)

- Characterizing the Separation Properties of two New Mixed Mode Sorbents. Topol A., Pezzini J., Santarelli X., Cloffent-Sanchez G., Cerruti M., Magistrelli G., Jenco J., Brenac V. and Gantier R. 6th HIC/IPC Bioseparation Conference, Silverado Resort Napa, CA, USA, March 15-19. (2009)

- Designing Alternative Monoclonal Antibody Purification platforms without Protein A Affinity by using Mixed-Mode Chromatography. M. Toueille, J. Pezzini ; X. Santarelli, J.F. Depoisier, G. Elson, R. Gantier, R. Kuriyel. Recovery of Biological Products XIV, Lake Tahoe, CA, USA, 1-6 August 2010.

Présentation:

- Characterization of interactions involved in Mixed Mode chromatography. J. Pezzini, C. Cabanne, R. Gantier, X. Santarelli. 12th International meeting of the Society for Biochromatography and Nanoseparations (SBCN) Lyon, France, 19-22 October 2010

RESUME

La chromatographie mode mixte représente l'une des plus grandes évolutions de ces dernières années dans le domaine des bioséparations. Cette technique repose sur l'intervention de plusieurs types d'interactions au sein d'un seul et même support. Les résines de chromatographie mode mixte HEA, PPA et MEP HyperCel portent des groupements aliphatiques, aromatiques, thiophiliques ainsi que des groupements aminés protonables en différentes positions. Au moyen d'expériences de chromatographie, à l'aide de protéines standards aux propriétés spécifiques et de mélanges complexes, nous avons isolé ces différentes interactions. Nous avons mis en évidence l'intervention majeure d'au moins deux types d'interactions au sein de ces supports : interactions hydrophobes et électrostatiques. Nous avons pu observer le comportement des résines lors de variations de pH, de force ionique, de types de sels et de tampons ou lors de la présence d'autres composés organiques. Nous avons mis en évidence l'intervention combinée de ces types d'interactions lors des différentes phases de chromatographie. Le comportement des résines mode mixte a révélé des sélectivités particulières et dont le contrôle ciblé à l'aide de l'environnement a permis le développement de méthodes de purification efficaces et originales. Nous avons pu ainsi développer des applications telles que la purification de fragment d'anticorps (*Fab'*2) à partir de culture de cellules d'insectes, la capture de protéine de type MBP à partir d'extrait bactériens et la capture d'anticorps monoclonaux à partir de cellules de mammifères (CHO), et ainsi améliorer les conditions d'utilisation de la chromatographie en mode mixte.

Mots clés : Purification, chromatographie en mode mixte, caractérisation, modélisation, Interactions hydrophobes, Interactions électrostatiques, anticorps.

ABSTRACT

Mixed mode chromatography is the most innovative technique for bioseparation. Mixed mode resins, as the term suggest, involves multiples types of interaction at the same time. HyperCel mixed mode resins, HEA, PPA and MEP, involve aliphatic, aromatic or thiophilic groups as well as protonable amine located in the spacer arm or as a head group. Using classical chromatographic experiments, standards proteins and complex mixtures, we highlighted the two major types of interactions involved: hydrophobic and electrostatic interactions. We specifically influenced these interactions by modifying the environment in terms of ionic strength, pH, salt types, and other compounds. The combination of these interactions during every phase of a chromatographic process has been demonstrated. Mixed mode resins thus offer unique selectivity that can be controlled by the environment. This allowed us to develop several applications from antibodies fragments capture from insect cells, to the purification of MBP-tagged proteins, through monoclonal antibody capture from CHO cells. We thus enhanced mixed mode chromatography.

Keywords: Mixed-mode chromatography, recombinant protein purification, characterization, modeling, antibody, HyperCel.