

Nouvelles approches de prétraitement et clarification pour cultures cellulaires à haute densité

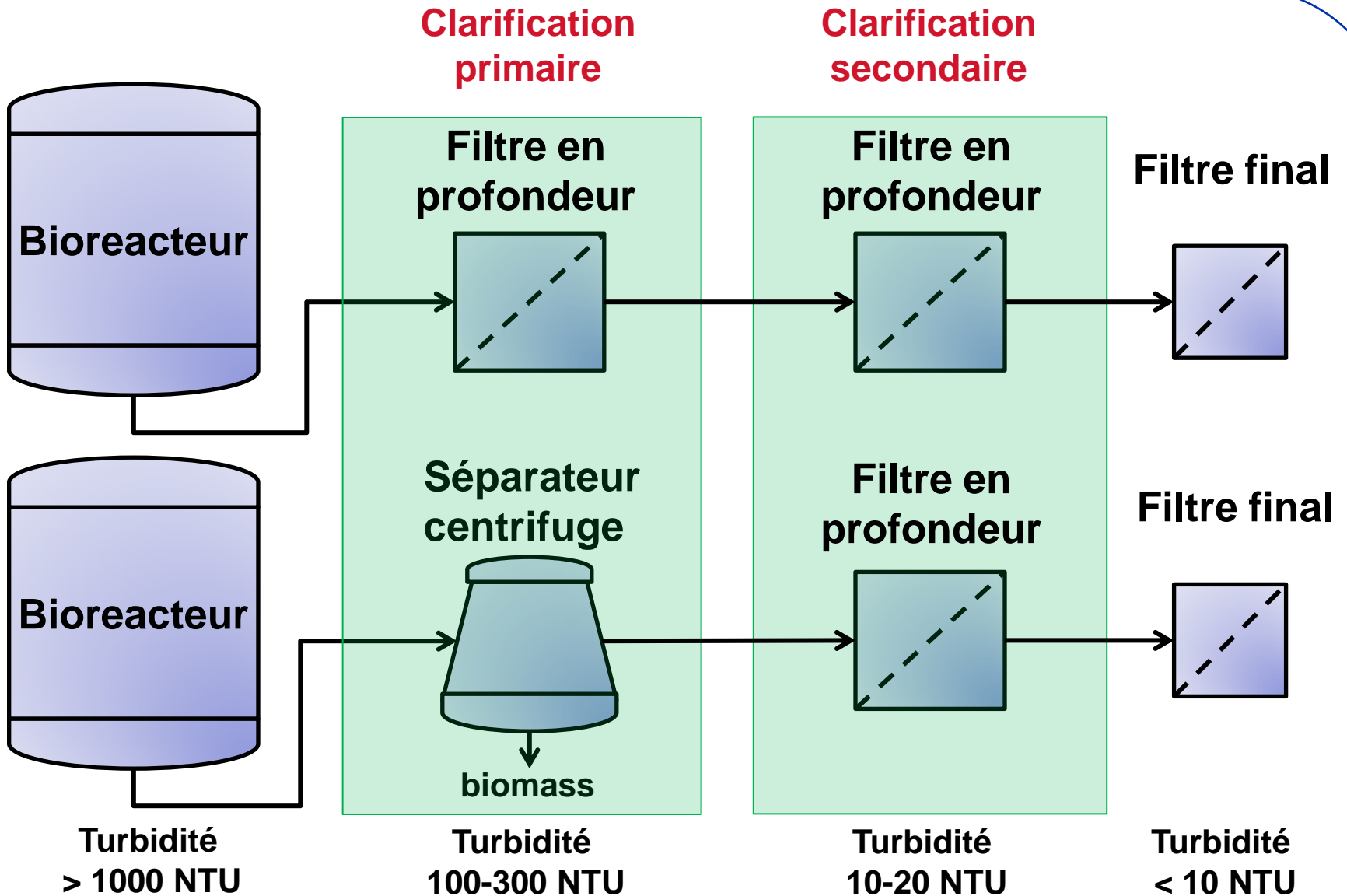
Colloque Innovation Protéine Prod, Adebiotech

Parc Biocitech, Romainville, France

28 Octobre 2013

Pierre Schelling

Plateformes de clarification traditionnelles



La tendance est à l'augmentation constante du titre d'expression de protéine recombinante¹

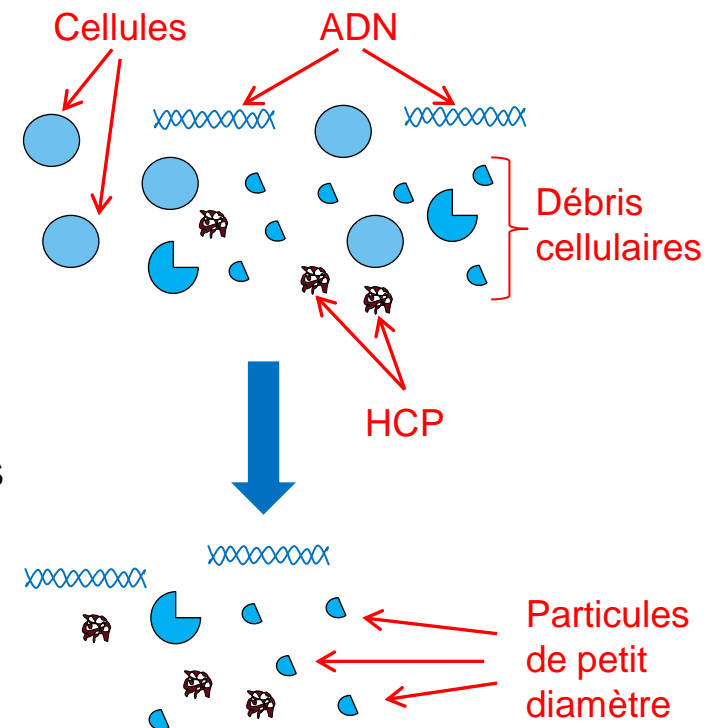
- proche de 240 mg/L pour un processus commercialisé en 1990
- entre 2 – 4 g/L en production commerciale, actuellement
- des productivités en développement de procédé de l'ordre de 10-13 g/L ont été rapportées. Certains systèmes d'expression atteignent même 27 g/L (cellules PER.C6²)
- certaines technologies ont permis d'augmenter la productivité propre de la cellule (Qp)
- avant tout, une plus grande densité cellulaire explique ces très hauts titres (supérieure à $20 \cdot 10^6$ cellules/ml)

¹Second International Conference on Accelerating Biopharmaceutical Development, mAbs 1:3, 190-209; May/June 2009

²Schirmer et. al. Bioprocess International, 2010, 32-39

Défis de l'augmentation de la densité cellulaire

1. plus de cellules et de débris cellulaires à éliminer, plus de contaminants cellulaires (*ADN* et protéines de l'hôte "*HCP*")
2. les limitations des séparateurs centrifuges et des techniques de filtration (profondeur et tangentielle) apparaissent^{1,2}
3. le passage de particules solubles microscopiques réduit la capacité des filtres de clarification secondaire et du filtre final
4. la clarification devient difficile à adapter à l'usage unique



¹ Schirmer et. al. *Bioprocess Intl*, 2010, 32-39.

² M. Rios *Bioprocess Intl*, 10(6)s, 2012, 28-32.

Option de clarification pour cultures cellulaires

1 Séparateurs centrifuges

- Investissement initial important, pas d'option à usage unique
- Le filtrat produit doit souvent être encore filtré sur filtre en profondeur
- Restent cependant souvent utilisés pour les très gros volumes

Limitations pour les récoltes à haute densité cellulaire:

- Proportion de matières solides peut devenir trop élevée pour une bonne séparation
- Force de cisaillement peuvent augmenter la dégradation cellulaire



Option de clarification pour cultures cellulaires

2 Filtres en profondeur

- Filtres en profondeur adsorbants à gradient de densité chargés positivement (p.ex. Millistak+ HC)
- Formats à usage unique: lenticulaire ou format POD

Limitations pour les récoltes à haute densité cellulaire:

- Capacités faibles ($< 100 \text{ L/m}^2$), les volumes morts des filtres deviennent conséquents
- Volume de rinçage important pour réduire les extractibles et conditionner les filtres



Options de prétraitement

p.ex. floculation et précipitation

→ réduction de la proportion des petites particules en agglomérats plus grands, plus faciles à séparer par les techniques de clarification traditionnelles

Précipitation acide

- Connue des autorités réglementaires (conditions acides déjà validées pour certaines étapes, p.ex. inactivation virale)
- Peut conduire à une perte de rendement
- Certaines molécules ne sont pas stables à pH acide

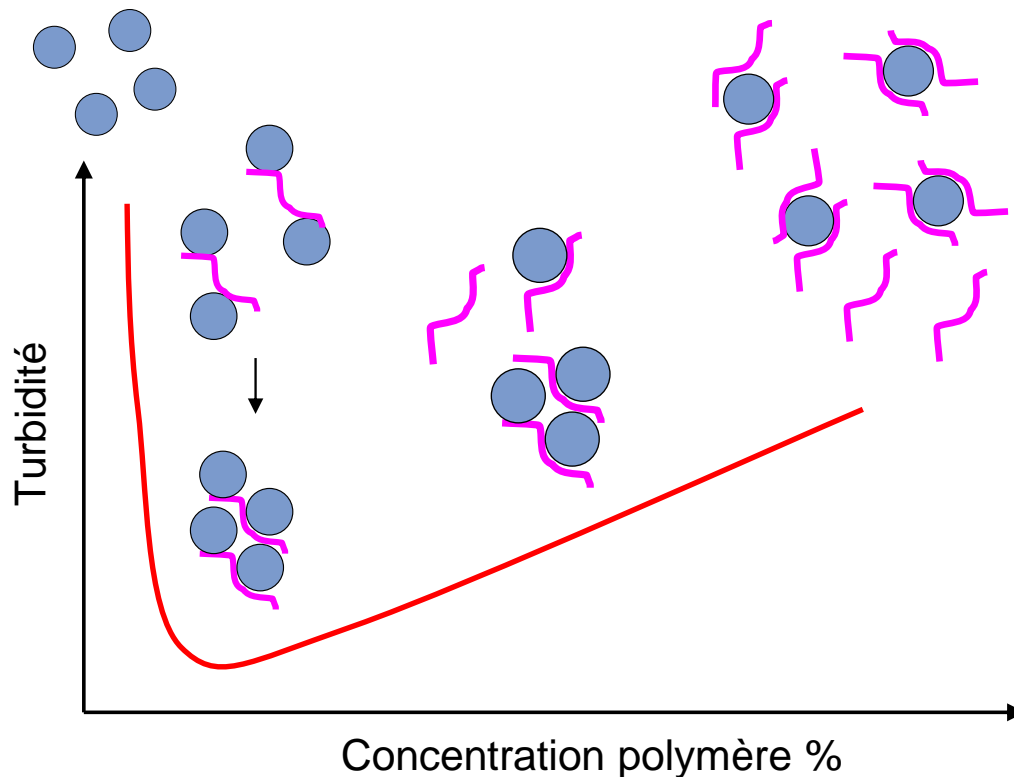
Polymères cationiques

- Pas besoin de changements de pH pour être utilisés
- Elimination du polymère résiduel à valider

Options de prétraitement
Acides
Polymères (PEI, PVA, PEG, ...)
Chitosan (polymère cationique, polysaccharide)
Sels (CaCl ₂ , K ₂ SO ₄ , KH ₂ PO ₄ , ...)

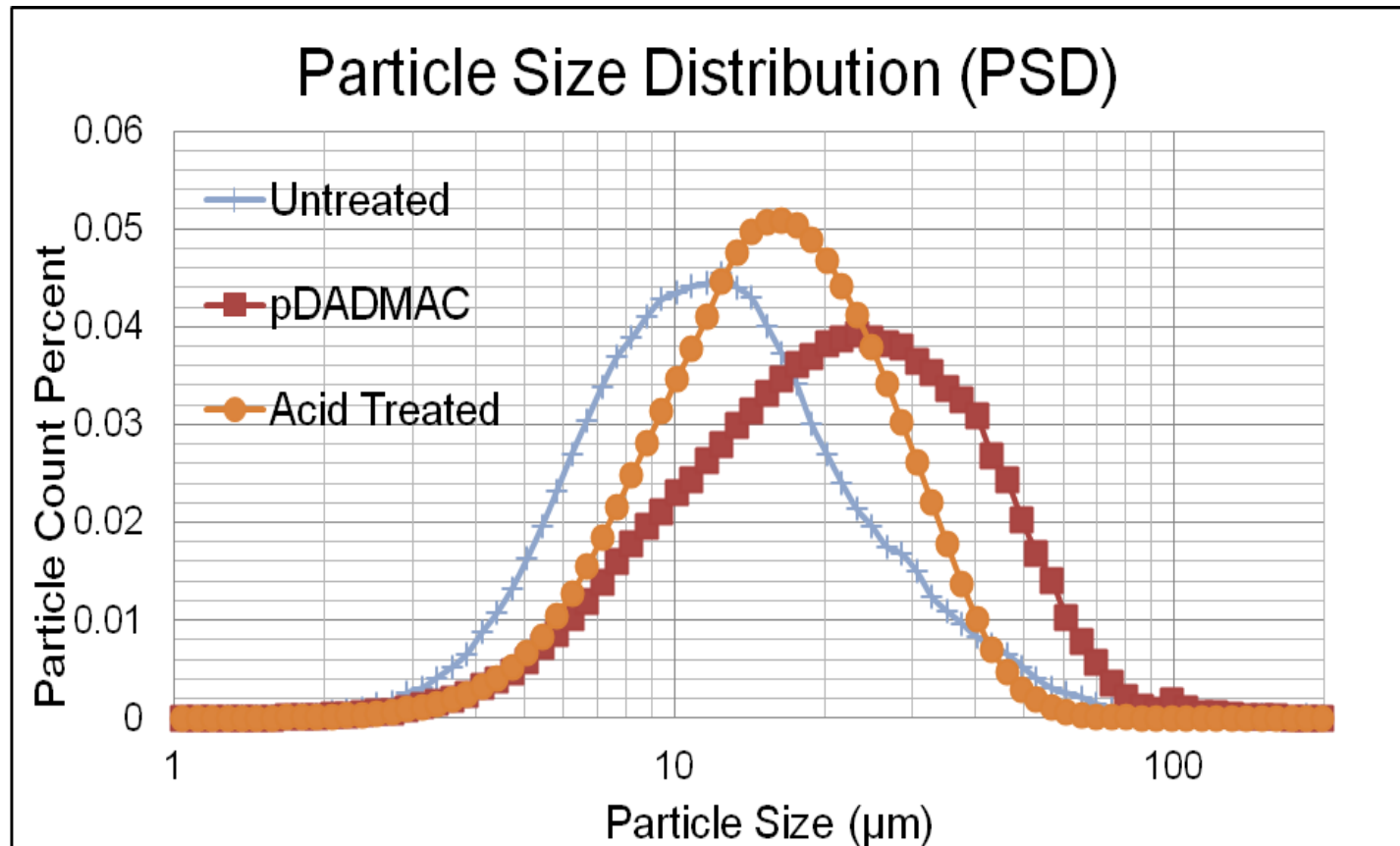
Floculants traditionnels

- Diminution de colloïdes en suspension par aggregation en plus gros amas (floculats) par l'addition d'un polymère soluble (polycation)
- Exemples de floculants traditionnels: Chitosan, pDADMAC, PEI, etc.



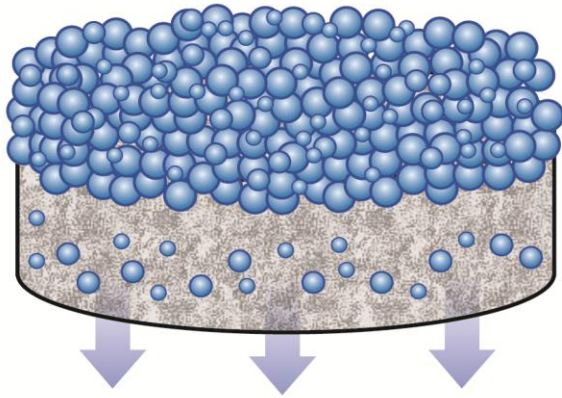
- une floculation performante dépend de la concentration de polymère ajoutée
- le surdosage en polymère n'est pas bénéfique
- la turbidité atteint un minima puis réaugmente

Effets du prétraitement sur la distribution de taille des particules

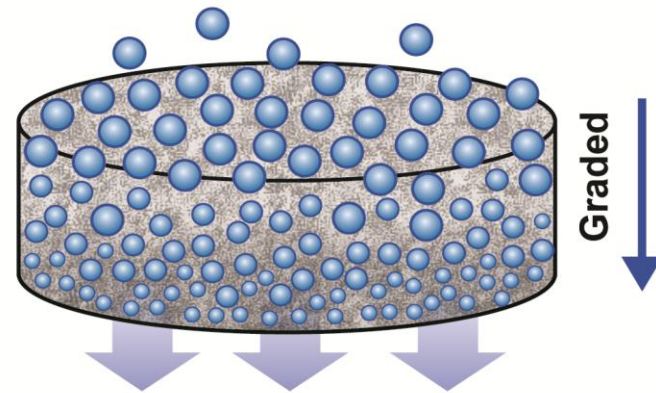


Préfiltres Clarisolve® pour récoltes cellulaires prétraitées

- Gamme de filtres en profondeur à gradient de densité adaptés à différentes distributions de taille de particules:
 - Particules ~ 20 μm – Clarisolve® 20 MS
 - Particules ~ 40 μm – Clarisolve® 40 MS
 - Particules ~ 60 μm – Clarisolve® 60 HX
- Composés de polypropylène, fibres de cellulose et adjuvant de filtration



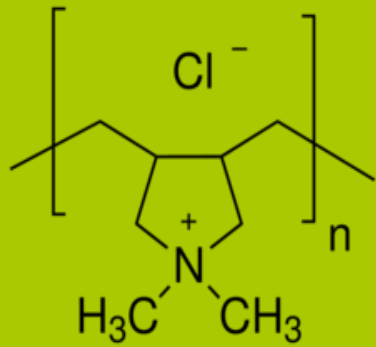
Filtre en profondeur traditionnel



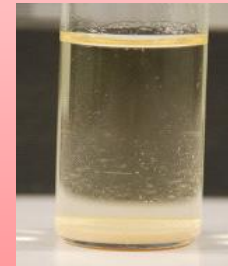
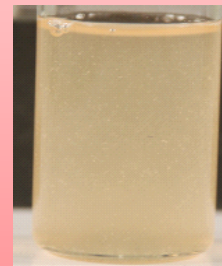
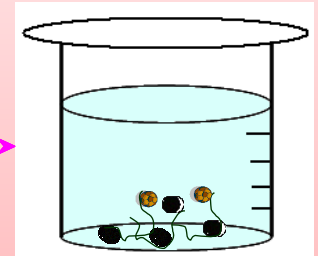
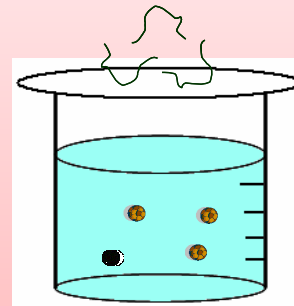
Filtre en profondeur Clarisolve®

Singh et al. Biotech Bioeng, Vol. 110(7), 2013, 1964-1972

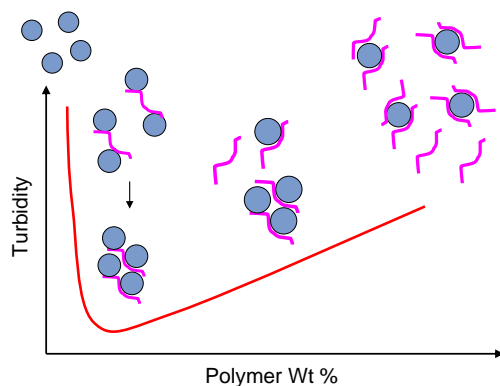
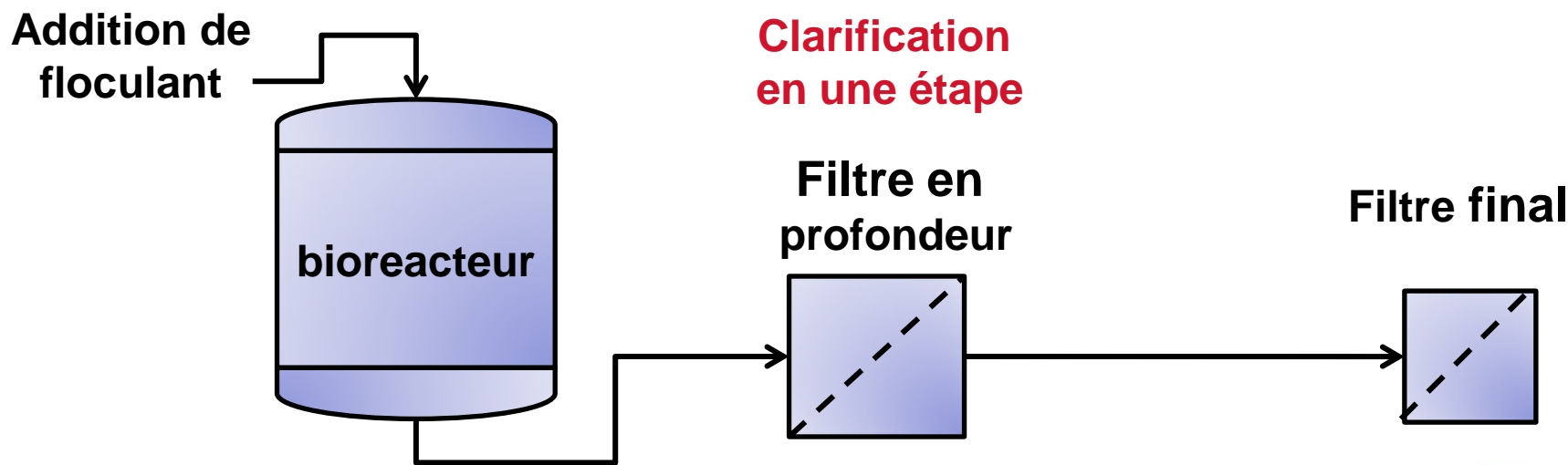
Agent de floculation pDADMAC en solution à 10%



- Chlorure de polydiallyldiméthylammonium
- Polymère polycationique
- Purifié à des standards pour applications biopharmaceutiques (GMP grade)



Nouvelle approche de prétraitement & clarification



+



+



Floculation

- de préférence en format à usage unique
- Elimination de contaminants cellulaires

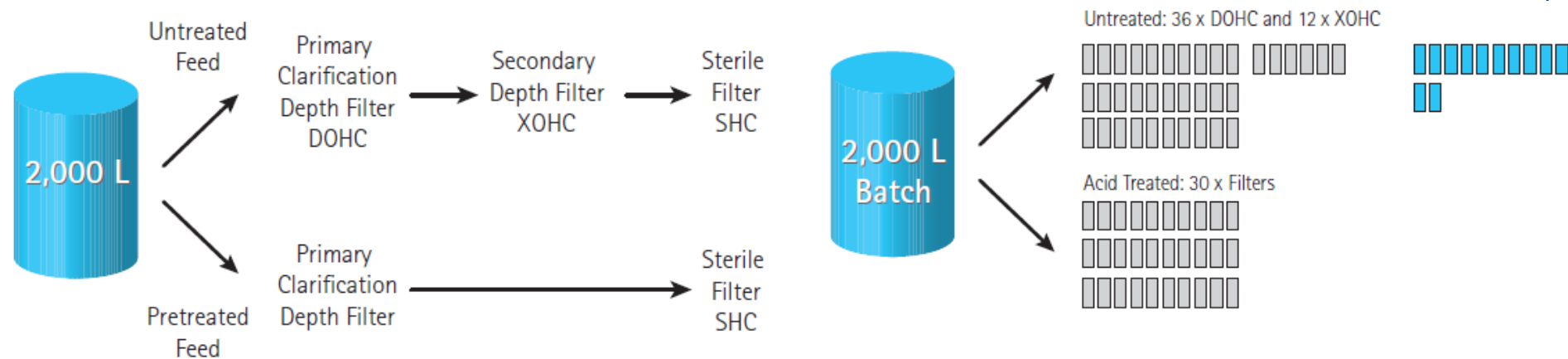
Nouveaux filtres en profondeur

- Filtres à gradient de densité optimisés
- Auto-contenus, plan, format POD

Filtre final

- Pas de clarification secondaire
- Réduction de la biocharge
- Capacité élevée du filtre membrane

Exemple A - Clarisolve® & flocculation acide

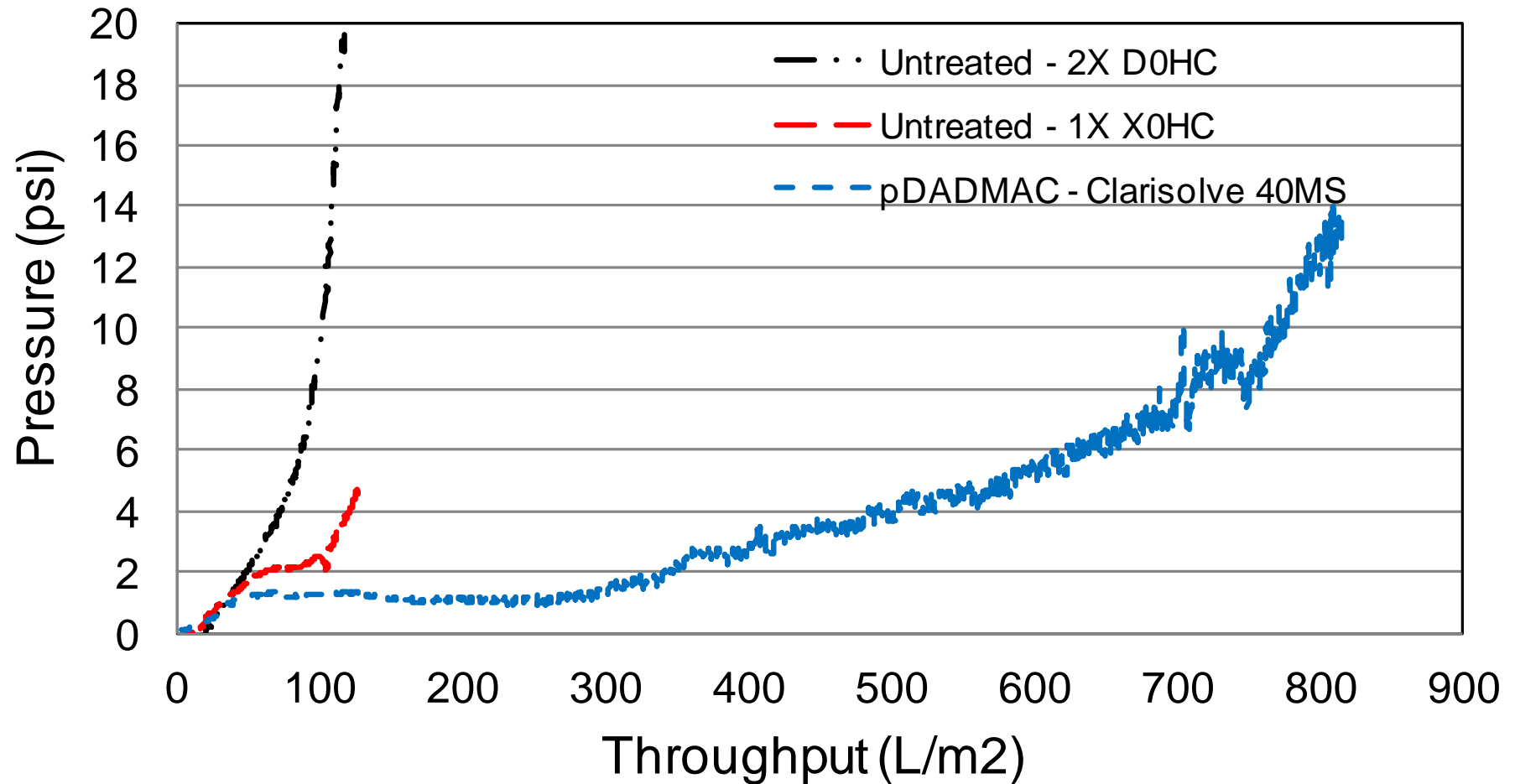


Clarification sur filtres en profondeur: 48 m²
 Volume de mouillage recommandé 100 L/m²
 Volume total = 4800 L

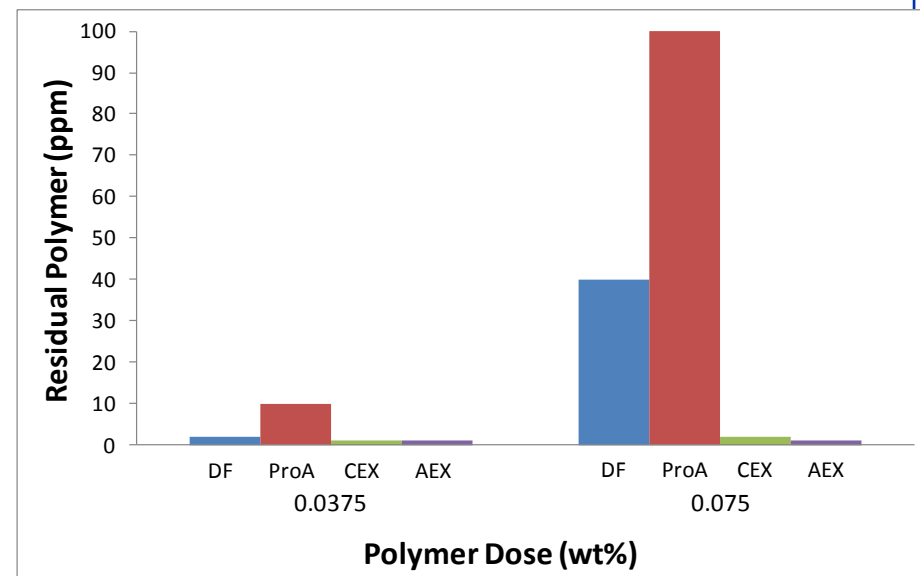
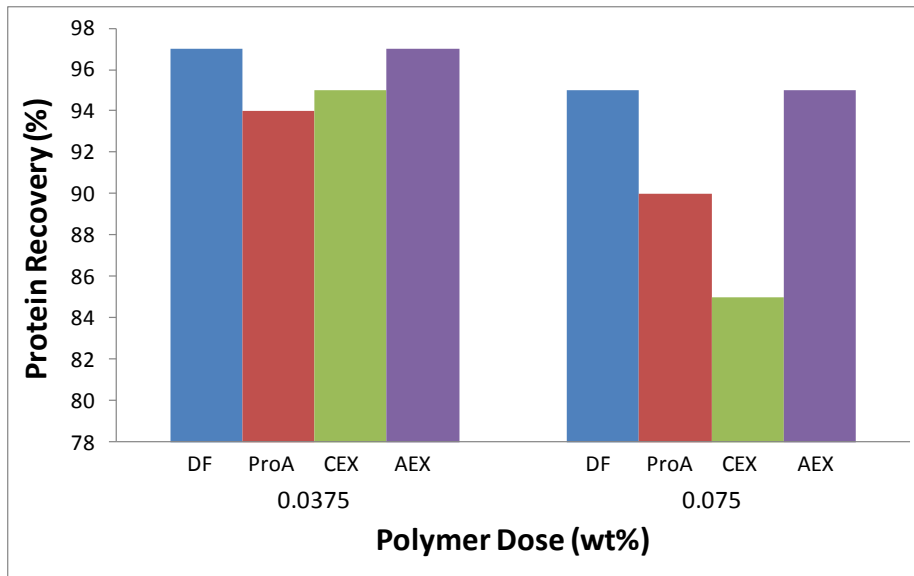
Clarification avec Clarisolve 20MS après prétraitement acide: 15m²
 Volume de mouillage recommandé 100 L/m²
 Volume total = 1500 L

→ ~ 70 % de réduction de la consommation de liquide de mouillage

Exemple B - Clarisolve® & flocculation pDADMAC



Effets d'une floculation au pDADMAC sur les étapes ultérieures



- Bonne récupération de protéine d'intérêt, accompagnée d'une élimination d'impuretés cellulaires (ADN, protéines de l'hôte)
- Le surdosage en pDADMAC lors de la floculation doit cependant être évité
- Le pDADMAC résiduel peut être réduit à une concentration inférieure à 1 ppm

Conclusions

Les techniques de prétraitement peuvent faciliter la clarification d'une culture cellulaire à haute densité.

- Les filtres de clarification primaire Clarisolve® sont optimisés pour des récoltes cellulaires prétraitées (porosité des filtres et capacité de rétention de particules solides optimisées)
- Les filtres Clarisolve® sont adaptées à différents types de prétraitement par différents agents de précipitation ou floculation
- La capacité obtenue permet d'envisager une solution de clarification complète, à usage unique pour des volumes allant jusqu'à 2'000 L dans certaines applications

Le polymère cationique pDADMAC est une option de floculation efficace, disponible désormais pour applications biopharmaceutiques.

- Floculation rapide des protéines contaminantes de l'hôte d'expression
- Le polymère résiduel peut être réduit à une concentration inférieure au seuil de détection (1 ppm) par les étapes de purification ultérieures
- Des études de toxicité n'ont pas démontrées ni effet cytotoxique, ni toxicité aiguë à 1 ppm.

Merci de votre attention

Pour plus d'informations, prière de consulter:
www.merckmillipore.com/clarisolve