

Développement d'un bioprocédé continu couplant la production et la purification d'un anticorps recombinant Sophie Maria

► To cite this version:

Sophie Maria. Développement d'un bioprocédé continu couplant la production et la purification d'un anticorps recombinant. Sciences agricoles. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT: 2017BORD0898 . tel-01718307

HAL Id: tel-01718307 https://theses.hal.science/tel-01718307

Submitted on 27 Feb 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE PRESENTEE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

Ecole doctorale : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Biochimie

Sophie MARIA

Développement d'un bioprocédé continu couplant la production et la purification d'un anticorps recombinant

Soutenue le 12 Décembre 2017

Membres du jury :

Mr SANTARELLI Xavier, Professeur des Universités à Bordeaux	Directeur de thèse
Mme CERUTTI Martine, Directrice de Recherche CNRS à Montpellier	Rapporteur
Mr DHULSTER Pascal, Professeur des Universités à Lille	Rapporteur
Mme CLOFENT-SANCHEZ Gisèle, Directrice de Recherche CNRS à Bordeau	ıx Examinateur
Mr FERRY Gilles, Chef de projet, Laboratoires Servier, Croissy Sur Seine	Examinateur
Mr WATIER Hervé, Professeur des Universités- Praticien Hospitalier à Tou	rs Examinateur
Mme POLES LAHILLE Aurore, Head of Process Development, Merck, Mart	illac Invité
Mr JOUCLA Gilles, Maitre de Conférences à l'ENSTBB de Bordeaux	Invité
Mme CABANNE Charlotte, Maitre de Conférences à l'ENSTBB de Bordeau	x Invité

Remerciements

J'exprime mes sincères remerciements à l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Je remercie Mme Martine CERUTTI et Mr Pascal DHULSTER pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse, ainsi que Mme Gisèle CLOFENT-SANCHEZ et Mr Hervé WATIER pour avoir bien voulu l'examiner. Un merci tout particulier pour Mr Gilles FERRY et Mme Aurore POLES LAHILLE pour nos discussions pendant (et en dehors) des comités de pilotage. Ces rendez-vous ont toujours été pour moi d'une grande aide et m'ont permis de prendre du recul sur mon travail.

Cette thèse a été financée par les Laboratoires Servier et la société GPC bio dans le cadre de la chaire Ingénierie des procédés, merci à eux pour leur soutien. Merci aussi à la société Novasep qui nous a prêté le BioSC[®] et Mr Thomas FLOUQUET pour son aide. Je remercie aussi la Fondation Université de Bordeaux pour leur organisation des comités de pilotage et leurs encouragements chaleureux.

Ce travail a été réalisé au sein des locaux de l'ENSTBB dans l'équipe EA4135 Biotechnologie des protéines recombinantes puis, suite à une restructuration, dans l'équipe SAMB du CMBN. Merci à Mr Bertrand GARBAY de m'avoir accueilli au sein de l'EA4135 et d'avoir continué à suivre mon parcours lors de nos discussions toujours très animées.

Merci à Mr Xavier SANTARELLI, mon directeur de thèse, pour m'avoir conseillé et apporté son savoir en chromatographie. Merci d'avoir pu rendre cette thèse possible.

Un grand merci à Mr Gilles JOUCLA sans qui ce travail n'aurait pas pu aboutir. Merci de m'avoir soutenue dans les moments compliqués (les nombreuses co-cultures ... !) et pour nos ateliers bricolages. Grâce à toi, mes compétences en électricité, perceuse et plomberie ont largement évoluées !

Un (autre) merci tout particulier à Mme Charlotte CABANNE, mon gourou, pour m'avoir fait confiance pour mes stages de Master, pour ton aide et ta gentillesse encore aujourd'hui. La thèse se termine maintenant mais je suis sûre que nous continuerons à nous voir. Merci à Mme Agnès HOCQUELLET pour son aide sur les calculs de génie des procédés et pour ta disponibilité à démarrer des autoclaves en plein milieu du weekend ! J'aurais préféré avoir moins besoin de tes compétences de microbiologiste mais les galeries API et autres techniques d'identifications des bactéries ont été souvent instructives.

Merci au reste de l'équipe SAMB...(A) ! Merci à la team Formation Continue, je sais à quel point vous avez contribué à la popularité de ce projet !

Merci à Antoine, que j'espère ne pas avoir trop énervé pendant la rédaction de cette thèse. Merci aussi aux stagiaires que j'ai eu le plaisir d'encadrer ou d'aider au laboratoire. Cantelle, Jona, Romain et Julien : votre aide a été précieuse dans la réalisation de ce travail.

Bien sûr, un grand merci à Sheldon, mon ami le bioréacteur, pour nos longues heures en tête à tête (pour me prendre ... la tête !). Merci à Teamviewer d'avoir animé mes nuits et mes weekends, mais surtout pour m'avoir permis de garder un œil sur Sheldon à distance. J'en profite pour (vivement) conseiller à mon successeur de réfléchir sérieusement à l'idée d'un robot pilotable à distance par Teamviewer ... C'est sûrement mon plus grand regret !

Merci aussi à Leroy Merlin qui aura été notre fournisseur officiel de consommables !

Un énorme merci à mes proches qui m'ont toujours soutenu, dans les études et dans la vie en général. Merci à mon futur mari, Julien, de m'avoir supporté quand Sheldon faisait des siennes et même de m'avoir accompagné le weekend pour le surveiller de près.

Abréviations

- ACN : Acétonitrile ADN : Acide désoxyribonucléique Anti-IL8 : Anti Interleukine 8 ATCC : American Type Culture Collection ATF : Alternating Tangential Filtration (Filtration Tangentielle Alternante) B: Taux de purge (j⁻¹) Bar : Unité de mesure de la pression équivalent à 100 000 pascals Cell : Cellules CD3 : Cluster de différenciation 3 CCDA : Cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps CDC : Cytotoxicité Dépendante du Complément CDR : Complementarity determining regions CF : Coût fixe CM : Coût moyen CMV : Coût moyen variable CHODP12 : Ovaire d'hamster chinois lignée DP12 CO₂ : Dioxyde de carbone COG : Coût par gramme (€) CSPR : Cell Specific Perfusion Rate CV : Volume de colonne ou Coût variable D : Taux de dilution (j⁻¹) DBC : Dynamic Binding Capacity DHFR : Dihydrofolate réductase
- DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : Diméthylsulfoxyde

Eflow : Exhaust flow (Débit de sortie)

FDA : Food and Drug Administration (EMA en Europe : European Medicines Agency)

Glc : Glucose (ou concentration en glucose)

Gln : Glutamine (ou concentration en glutamine)

H : Heure

H₂O : Eau

HAMA : Human Anti-Mouse Antibody

HCOOH : Acide méthanoïque

- HCP : Host Cell Protein (protéine de la cellule hôte)
- HPCE : High Performance Capillary Electrophoresis (Electrophorèse Capillaire Haute Performance)

IgG : Immunoglobuline G

kD : KiloDaltons

Lac : Lactate (ou concentration en lactate)

LPM : Litre Par Minute

M : Molaire

mAb : Anticorps monoclonaux

mL : Millilitre

MCB : Master Cell Bank (banque de travail)

MTX : Méthotréxate

MWCO : Molecular weight cut-off (seuil de coupure)

 N_2 : Azote

NaOH : Sodium hydroxide (soude)

NH₄ : Ammoniaque

NS1 : Cellules de myélome de souris

O₂ : Oxygène

PBS : Phosphate Buffer Saline

Pflow : Pressure flow (Débit de pression)

pH: Potentiel hydrogène

pl : Point isoélectrique

PID : Proportionnel Intégral Dérivé

pO2 : Pression en oxygène dissous

PER.C6 : Cellules de rétine humaine

qGlc : Consommation spécifique du glucose (pg/cell/jour)

qmAb : Productivité specifique en anticorps (pg/cell/jour)

qLac : Productivité spécifique en lactate (pg/cell/jour)

rDNA : ADN résiduel

RIS : Radio-immuno-scintigraphie

Rpm : Rotation par minutes

SEC-UPLC : Size-Exclusion Chromatography UltraPerformance Liquid Chromatography

SBC : Static Binding Capacity

SDS PAGE : Electrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécysulfate de sodium

SLS : Static Light Scattering (diffusion statique de la lumière)

SMCC : Sequential Multi Column Chromatography

SVF : Sérum de Veau Foetal

TFF : Tangential Flow Filtration (Filtration tangentielle)

WCB : Work Cell Bank (Banque de travail)

WFI : Water For Injection

 μ : Taux de croissance (h⁻¹ ou j⁻¹)

Résumé

Les anticorps monoclonaux sont une classe de biomédicaments en plein essor. Leur production est largement étudiée afin d'obtenir des rendements de plus en plus élevés et de réduire les coûts. Cette thèse décrit le développement d'un procédé complet en continu, de la production d'anticorps recombinants par des cellules mammifères jusqu'à leur purification. L'objectif est de coupler la culture cellulaire en mode perfusion à la purification par chromatographie semi-continue.

Le développement du procédé se fait en bioréacteur avec une lignée de cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO-DP12) transformée pour produire un anticorps anti-Interleukine 8 utilisée, comme modèle. Après adaptation, les cellules ont été cultivées en mode batch afin de connaitre le comportement de la lignée en environnement contrôlé. Ensuite, un procédé de perfusion de 2L de culture avec recyclage cellulaire a été mis en place. Le principal enjeu est de maintenir un état stationnaire avec une concentration cellulaire constante et déterminer le débit optimal d'alimentation spécifique par cellule (CSPR). Plusieurs méthodes ont été testées et comparées pour la détermination de ce CSPR optimal. Le procédé de culture en perfusion a ensuite été maintenu pendant 24 jours à des concentrations cellulaires de 10, 20 et 40 millions de cellules par mililitres.

Les anticorps produit par différents modes de culture ont été caractérisés (batch, fed-batch et perfusion). Les N-glycosylations, les variants de charge ainsi que la thermo-stabilité des anticorps ont été étudiés. Les résultats montrent que les anticorps produits présentent des caractéristiques similaires quel que soit le mode de production.

Pour la purification, une étude préliminaire a permis de caractériser le comportement du filtrat sur la résine chromatographique d'affinité MabSelect Sure LX en chromatographie classique. Un procédé semi-continu a été simulé grâce au logiciel BioSC® Predict puis testé et optimisé sur le chromatographe BioSC®. Il comprend la purification de l'anticorps mais aussi les étapes de nettoyages et de sanitisation.

Un premier essai de couplage production/purification a pu être réalisé avec succès pendant 32h et a permis d'obtenir un niveau de pureté similaire à la chromatographie classique. La productivité a été augmentée de 23% (en grammes d'anticorps purifié par litre de résine et par jour) et le volume de tampon utilisé a été réduit de 25%. De plus, le couplage production/purification a permis de s'affranchir du stockage de volumes importants de filtrat (7,2L de filtrat par jour de production en perfusion).

Enfin, une étude de coût de production, à l'échelle « laboratoire », a été réalisée afin de déterminer, en fonction de la productivité du clone et de la quantité d'anticorps à produire, la différence de rentabilité entre une production en batch ou en perfusion à différents CSPR.

<u>Mots-clés :</u> Cellules CHO, Production continue, Purification continue, Procédé continu, Anticorps recombinant, Filtration tangentielle.

Thèse réalisée dans l'équipe : CBMN UMR 5248

Equipe « Structure et Activité des Macromolécules Biologiques »

ENSTBB, 146 rue Léo Saignat, 33076 BORDEAUX CEDEX

Abstract

Monoclonal antibodies are a biopharmaceuticals class of growing interest. Their production is widely studied to obtain higher yields and to reduce costs. This thesis describes the development of a complete continuous process, from the production of recombinant antibodies by mammalian cells until their purification. The objective is to connect cell culture in perfusion mode to a semicontinuous chromatographic purification.

The development of the process was done in a bioreactor with a Chinese hamster ovary cell line (CHO-DP12) transformed to produce an anti-interleukin-8 antibody used as a cell model. After adaptation, the cells were cultured in batch mode in order to study the behavior of the cell line in controlled environment. Then, a 2L culture perfusion process with cell recycling was set up. The main challenge is to maintain a steady state with constant cell concentration and to determine the optimal cell-specific perfusion rate (CSPR). Several methods were tested and compared for the determination of this optimal CSPR. The perfusion process was maintained for 24 days at cell concentrations of 10, 20 and 40 million cells per mililiters.

The antibody produced by different culture methods was compared (batch, fed-batch and perfusion). The N-glycosylations, the charge variants as well as the thermo-stability of the antibody were studied. The results show that the produced antibody have similar characteristics whatever the chosen production mode.

For purification process, we performed a preliminary study to characterize the behavior of the supernatant on the chromatographic affinity resin MabSelect Sure LX. A semi-continuous process was simulated through BioSC[®] Predict software and then tested and optimized on the BioSC[®] chromatograph. It includes antibody purification but also cleaning and sanitizing steps.

A first production/purification coupling test was successfully carried out for 32 h. It provides antibodies at a purity level similar to that of the conventional chromatography. Productivity was increased by 23% (in grams of purified antibody per liter of resin per day) and the volume of buffer used was reduced by 25%. In addition, production/purification coupling prevented storage of large volumes of supernatant (7,2L of supernatant per production day in perfusion mode). Finally, a cost-of-production study, at research scale, was carried out to determine, depending on the productivity of the clone and the antibodies amount, the difference of costs between batch or perfusion production according to different CSPRs.

<u>Keywords:</u> CHO Cells, Continuous production, Continuous Purification, Continuous Process, Recombinant antibody, ATF.

Table des matières

Introduction

Etude bibliographique

I. Le	es anticorps monoclonaux	17
a.	Historique	17
b.	Mode d'action général des anticorps thérapeutiques	19
С.	Intérêt pharmacologique	19
11.	Différents modes de production	22
a.	Batch	22
b.	Fed-batch	22
С.	Production en continu	23
d.	Les systèmes de recyclages cellulaires	26
e.	Principe de purge cellulaire en perfusion	28
III.	Production de protéines recombinantes en perfusion	29
a.	Avantages	29
b.	Le CSPR : un critère important dans l'optimisation de la perfusion	34
С.	Inconvénients	35
d. perfusion ²	Pourquoi un regain d'intérêt ces dernières années pour les procédés ?	en 36
IV.	La purification en continu	37
a.	Purification d'anticorps monoclonaux	37
b.	La chromatographie d'affinité sur protéine A	40
C.	La chromatographie en continu	43
d.	La capacité d'une résine chromatographique	45
e.	Principe de la SMCC	49
f.	Avantages de la chromatographie en continu	51
V.	Couplage production-purification	52

Matériels et méthodes

١.	F	Production
â	э.	Adaptation et banques cellulaires55
ł	э.	Erlens et spin tube57
(2.	Cultures en bioréacteur : Batch de référence et optimisation de la perfusion 60
(d.	Culture en bioréacteur : Batch et Fed-Batch71
(2.	Autoclavage72
11.		Purification72
â	э.	Sur Akta72
ł	э.	Sur BioSC [®] 73
(2.	Purification d'échantillon par protéine pour comparaison mode de production74
.		Analyse75
õ	э.	UPLC-SEC
ł	э.	Métabolites : Glucose et Lactate75
(с.	Glycosylations76
(d.	Variants de charge77
(2.	Chromatographie d'interaction hydrophile78
f	Ξ.	Détermination des températures de dénaturation et d'agrégation par Optim78

Résultats

١.	Adaptation au milieu de culture	80
а	a. Différentes adaptations	80
b	c. Comparaison des différents types d'adaptations	81
С	c. Etude de stabilité de la lignée	82
II.	Batch de référence	84
а	a. Objectifs	84
b	p. Résultats	85
III.	Mise en place du système ATF	87
IV.	Détermination du CSPR	90
а	a. Objectifs	90
b	p. Perfusion par paliers	90
C	c. Perfusion sans purge cellulaire	100
d	d. Pseudo-perfusion	105
е	e. Tableau récapitulatif	114
f.	Conclusion	115
V.	Validation du CSPR	116
а	a. Description de l'expérience	117
b	p. Résultats	118
С	c. Conclusion	119
VI.	Purification	120
а	a. Paquage	120
b	p. DBC	121
С	c. Simulation	124
d	d. Test découplé	131
e	e. Conclusion	135

VII.	Couplage production-Purification	136
a.	Objectifs	136
b.	Résultats	136
C.	Conclusion	138
VIII.	Comparaison anticorps produits selon différents modes de production	139
a.	Objectifs	139
b.	Glycosylations	142
С.	Variants de charge	147
d.	Etude de la thermostabilité	149
e.	Homogénéité des échantillons	150
f.	Agrégats	151
g.	Conclusion	151
IX.	Etude de coût : Batch et perfusion	152
a.	Eléments exclus de l'étude	152
b.	Scénarios étudiés	153
С.	Résultats et discussions	157
d.	Conclusion	162
Conc	clusion et Perspectives	164
Anne	exes	167
Com	munications	170
Réfé	rences Bibliographiques	171

Introduction

L'essor de la biotechnologie ces dernières années a permis de faire une avancée dans le développement des procédés de production et de purification de protéines recombinantes. Plus précisément, les anticorps, étudiés dans ce travail, sont aujourd'hui de plus en plus présent sur le marché du médicament.

L'étude décrite dans ce manuscrit porte sur le développement d'un procédé couplant production et purification d'un anticorps recombinant. La lignée CHODP12 qui a été choisi produit un anticorps anti-Interleukine 8 qui sert de modèle au développement du procédé.

Ce manuscrit comporte 4 parties principales.

Dans un premier temps, une étude bibliographique permet de faire le point sur le développement des anticorps monoclonaux. Ensuite elle s'intéresse aux différents modes de productions de ces protéines recombinantes. Et enfin, elle tente d'identifier les enjeux de l'utilisation de la chromatographie semi-continue dans un procédé de purification d'anticorps.

Dans un second temps, le matériel et méthode permet d'expliquer les différents protocoles et équipements utilisés dans le cadre de ce travail.

Dans un troisième temps, la partie résultat est divisée en 7 chapitres. Le premier chapitre porte sur les expériences préliminaires à la production en bioréacteur (adaptation au milieu de culture, batch de référence, …). Le second chapitre s'intéresse à la détermination du CSPR par différentes techniques, leurs avantages et leurs inconvénients. Le troisième chapitre est consacré à la validation du CSPR en bioréacteur. Dans la quatrième partie, la mise au point de la partie purification est décrite. Le cinquième chapitre décrit l'expérience de couplage entre la production et la purification. Un sixième chapitre s'intéresse à la caractérisation d'anticorps issus de différents modes de production. Le dernier chapitre porte sur une étude de coût entre une production en batch et une production en perfusion à différents CSPR.

Dans un dernier temps, une partie conclusion et perspectives permet de mettre le point final à ce travail et propose des améliorations pour l'avenir.

Etude Bibliographique

I. Les anticorps monoclonaux

a. Historique

La technique de production des anticorps monoclonaux date d'une quarantaine d'années. En effet, c'est en 1975 que Georges Köhler et César Milstein ont montré qu'il était possible de générer des hybridomes capables de produire des anticorps spécifiques de manière stable. Un hybridome résulte de la fusion de lymphocytes B de souris immunisées et de cellules myélomateuses de souris. Il possède donc la capacité de sécréter des anticorps et de se multiplier rapidement et indéfiniment *in vitro* dans un milieu de culture (Milstein and Köhler 1975).



Figure 1 : Différentes générations d'anticorps thérapeutiques : anticorps murins, chimériques, humanisés et humains (Penichet 2004)

Cette découverte a permis de développer l'utilisation d'anticorps monoclonaux (mAb en anglais) en recherche et dans le domaine médical pour le diagnostic *in vitro* et pour la thérapie de diverses pathologies. En 1986, le premier anticorps monoclonal thérapeutique a été accepté par la FDA (Food and Drug Administration). Cet anticorps entièrement murin, le Muromomab-CD3, est dirigé contre le récepteur CD3 des lymphocytes T et s'est révélé efficace pour limiter les réactions inflammatoires à l'origine du rejet de greffe. Cependant, une utilisation chronique d'anticorps murins chez l'Homme induit le déclenchement d'une réaction immunitaire de l'hôte avec production d'anticorps humain « anti-souris » (appelé HAMA pour Human Anti-Mouse Antibody).

Pour cette raison, de nouveaux types d'anticorps plus proches des anticorps humains ont été développés. Aujourd'hui, le protocole majoritairement utilisé est l'insertion des gènes codants pour les chaines lourdes et légères d'un anticorps dans un vecteur qui est ensuite transféré dans des cellules eucaryotes. On parle alors d'anticorps recombinants. Parmi les cellules eucaryotes utilisées majoritairement, on rencontre les cellules de myélome de souris (NSO), les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO) et les cellules de rétine humaine (PER.C6). C'est ainsi que des anticorps chimériques (domaines variables murins, domaines constants humains), humanisés (CDR murins greffés sur les charpentes humaines) et humains (banques combinatoires de phages ou utilisation de souris transgéniques) ont été développés à partir du milieu des années 80 (Figure 1) (Ortega 2012).



Figure 2 : Mode d'action des anticorps thérapeutiques (Hansel *et al.* 2010)

b. Mode d'action général des anticorps thérapeutiques

Les mAb thérapeutiques peuvent agir suivant quatre modes d'action (Figure 2) (Hansel et *al.* 2010):

- Par antagonisme : les mAb peuvent se lier spécifiquement à un ligand et empêcher ainsi la transduction du signal.
- Par signalisation : l'anticorps peut induire spécifiquement la transduction d'un signal par liaison à un récepteur.
- Par cytotoxicité dépendante du complément (CDC) : le fragment constant des anticorps peut activer les protéines du complément, ce qui provoque la formation d'un complexe responsable de la lyse cellulaire.
- Par cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (CCDA) : réaction par laquelle des cellules non-immunocompétentes sont capables d'effectuer de la cytolyse par l'intermédiaire d'anticorps « désignant » la cellule à détruire.

c. Intérêt pharmacologique

Les mAb peuvent être utilisés à des fins diagnostiques ou thérapeutiques.

Pour le diagnostic, plusieurs anticorps ou fragments d'anticorps ont été développés dans le cadre de la radio-immuno-scintigraphie (RIS). Ces mAb, couplés à des radionucléotides émetteurs de rayon gamma, sont utilisés pour localiser des tumeurs, des nécroses ou des infections. L'immuno-imagerie *in vivo* permet de détecter des récidives ou des métastases plusieurs mois avant les examens conventionnels.

Les avantages thérapeutiques des mAb sont nombreux. En effet, ils possèdent une spécificité plus élevée que les molécules chimiques, avec une action plus précise, et une demi-vie plus longue, permettant d'espacer les traitements. Les aires d'applications thérapeutiques des mAb sont nombreuses, par exemple : l'oncologie, les allergies, les maladies auto-immunes (psoriasis, sclérose en plaque, polyarthrite rhumatoïde, ...) ou les transplantations. De plus, un même mAb peut avoir différentes indications thérapeutiques, ce qui augmente son intérêt. Par exemple, le rituximab (Mabthera[®]) a obtenu l'agrément pour des applications en oncologie, hématologie et rhumatologie en raison de sa capacité à diminuer le nombre de lymphocytes B par cytotoxicité dépendante du complément (Bernard, 2014).

Ainsi, depuis l'émergence des anticorps humanisés à la fin des années 90, le nombre de mAb ayant été approuvés par la FDA n'a cessé de croître (Figure 3)(Walsh 2014). Les mAb représentaient environ 27% des biomédicaments approuvés en 2014. En 2015, 47 mAb ont été approuvés. On estime qu'il y en aura 70 en 2020.



Figure 3 : (a) Biomédicaments (incluant les mAb) approuvés par continent et par date. (b) Nombre de biomédicaments (Incluant les mAb) approuvés par chaque période (certains peuvent être comptés deux fois car dans deux continents).(Walsh 2014)

Pour une meilleure rentabilité des procédés de productions des anticorps recombinants, les industriels cherchent en permanence à optimiser tout le processus de fabrication. Ces dernières années, des efforts importants ont été faits pour augmenter la production d'anticorps en améliorant les conditions de culture. La sélection des souches productrices les plus efficaces et les moins immunogènes a été le premier effort entrepris. De nombreux systèmes d'expression existent : bactéries, levures, plantes transgéniques, cellules mammifères (Figure 4). Différents critères sont pris en compte dans le choix d'un organisme producteur comme le coût, le rendement de production, la taille du génome et le risque de contamination. Les bactéries et les levures permettent de produire des protéines simples, rapidement et à faible coût, mais sont incapables de réaliser des modifications post-traductionnelles complexes. La majorité des mAb thérapeutiques approuvés actuellement sont donc produits en cellules mammifères, principalement pour leur capacité à produire des motifs de glycosylations compatibles avec le système immunitaire humain (Shukla and Thömmes 2010). Le coût de production reste plus élevé que pour les autres types d'organismes même si la productivité de ces cellules ont augmenté considérablement ces dernières années (Walsh 2014).



Figure 4 : Répartition des systèmes mammalien et non-mammalien au cours du temps pour la fabrication de biomédicaments (anticorps monoclonaux compris), (b) Répartition des systèmes d'expression pour la production de biomédicaments (anticorps monoclonaux compris) (Walsh 2014)

II. Différents modes de production

a. Batch

Une culture en mode batch, ou cuvée, est le système le plus simple à mettre en place (Figure 5). Les cellules sont inoculées dans un bioréacteur de façon stérile. Par la suite, aucun ajout n'est réalisé tout au long de la culture, en dehors de ceux nécessaires aux régulations des paramètres physico-chimiques (par exemple ajout de base pour la régulation du pH). L'accumulation de déchets toxiques (comme le lactate ou l'ammoniaque) et l'épuisement des nutriments du milieu de culture entrainent un ralentissement puis un arrêt de la croissance des cellules et enfin la mort cellulaire. Les cultures durent environ 5 à 7 jours pour les procédés les plus optimisés.

b. Fed-batch

Une culture en mode fed-batch, ou cuvée alimentée, diffère du mode batch par l'ajout de milieu enrichi toutes les 24h à 48h, ou de façon continue, à partir de la phase exponentielle de croissance cellulaire (Figure 5). Le milieu enrichi peut être optimisé et diverses stratégies d'alimentation sont possibles pour augmenter la durée des procédés jusqu'à 12 jours. La culture s'arrête pour les mêmes raisons qu'en batch, principalement à cause de l'accumulation de métabolites toxiques. Le volume initial correspond à environ 40-50% de la capacité du bioréacteur (Wlaschin and Hu 2006). La relative simplicité de mise en place d'un procédé fed-batch, tout en apportant une meilleure productivité que le mode batch, en fait le principal mode de production des protéines recombinantes à l'échelle industrielle.



Figure 5 : Schématisation des procédés batch (à gauche) et fed-batch (à droite)

c. Production en continu

Différents procédés permettent un mode de production en continu. Les stratégies développées ici concernent les cas où la protéine d'intérêt est sécrétée dans le filtrat (milieu de culture sans les cellules).

Chemostat

Le chemostat est surtout utilisé en microbiologie (Figure 6). Ce mode de culture consiste à alimenter le bioréacteur en continu tout en soutirant le même débit, ainsi le volume du bioréacteur reste identique.



Bioréacteur Figure 6 : Schématisation d'un procédé chemostat

Fed-batch concentré

Le fed-batch concentré consiste à retenir la protéine d'intérêt dans le bioréacteur tout en soutirant le filtrat (sans la protéine) et en alimentant en milieu de culture en continu (ou par séquence) (Figure 7). Ce type de procédé est complexe à mettre en place car il nécessite, en plus de l'ajout de milieu, un système de recyclage cellulaire. Ici le système de recyclage est généralement un système filtration dont le seuil de coupure est inférieur à la protéine d'intérêt (quelques kD généralement). La protéine d'intérêt et les cellules sont maintenues dans le bioréacteur, le filtrat est éliminé. Le volume de culture reste identique. L'avantage de ce procédé est de concentrer la protéine d'intérêt dans un faible volume ce qui facilite le stockage et la purification ultérieure. L'inconvénient de ce procédé est que la présence de protéases et/ou le long temps de résidence dans la culture peuvent endommager la protéine d'intérêt. Ce mode de production est donc réservé à des protéines particulièrement stables et robustes.



Figure 7 : Schématisation d'un procédé fed-batch concentré

Perfusion sans purge cellulaire

La perfusion sans purge consiste à alimenter le bioréacteur en continu avec du milieu de culture tout en soutirant le filtrat préalablement séparé des cellules (Figure 8). La concentration cellulaire évolue au cours du temps ce qui implique d'augmenter le débit d'alimentation en fonction des besoins des cellules.



Figure 8 : Schématisation d'un procédé perfusion sans purge cellulaire

Perfusion avec purge cellulaire

Tout comme la perfusion sans purge, le bioréacteur est alimenté et le filtrat est soutiré en continu (Figure 9). La concentration cellulaire est maintenue constante grâce à une purge cellulaire. De plus, divers systèmes de régulation sont nécessaires pour maintenir le volume de culture et la concentration cellulaire constants. Les concentrations cellulaires maximales sont d'un ordre de grandeur plus élevées en perfusion (20-200x10⁶ cellules/mL) qu'en fed-batch (5-25x10⁶ cellules/mL) (Zhang 2017).



Figure 9 : Schématisation d'un système en perfusion

d. Les systèmes de recyclages cellulaires

Plusieurs systèmes de recyclage cellulaire existent (Figure 10). Un des premiers anticorps monoclonal produit en perfusion, le ReoPro[®] de Janssen Biotech utilisait la filtration rotative (spin filter). Ensuite d'autres systèmes ont été développés, comme par exemple, la filtration tangentielle. Cette technique présente l'avantage d'utiliser un module externe au bioréacteur, pouvant donc être remplacé en cours de culture en cas de colmatage des filtres. Cependant, la circulation du milieu est opérée par une pompe qui engendre des contraintes de cisaillement potentiellement dommageables pour les cellules. Pour limiter ce phénomène, la filtration tangentielle alternée (ou ATF) a été développée. Le milieu de culture avec les cellules, transite dans les fibres creuses en alternant aspiration et refoulement par l'intermédiaire d'un diaphragme qui se dégonfle et se gonfle. Ce système présente l'avantage d'éviter l'utilisation d'une pompe mais aussi d'alterner le sens du flux dans les fibres creuses, limitant ainsi le risque de colmatage. Les travaux de cette thèse ont été réalisés en mode perfusion couplé à un système ATF.



Figure 10 : Systèmes de recyclage cellulaire par filtration les plus fréquemment utilisés dans les procédés industriels par perfusion. Légende : Bleu : Culture (cellules + protéines) ; Vert : Cellules ; Jaune : Protéines

D'autres systèmes (Figure 11) sont utilisés comme la séparation par centrifugation, la séparation acoustique ou par sédimentation. Ces systèmes utilisent la différence de densité entre les cellules et le milieu de culture. Par contre, le filtrat présente des débris cellulaires et quelques cellules résiduelles qu'il sera indispensable d'éliminer par clarification avant les étapes de purification. L'avantage de ces systèmes est de pouvoir récupérer les cellules concentrées à la sortie du système de recyclage cellulaire ce qui permet de purger les cellules dans un faible volume. Le principe de purge cellulaire est présenté dans le paragraphe suivant.



Figure 11 : Autres systèmes de recyclage cellulaire développés pour les procédés en perfusion. Légende : Bleu : Culture (cellules + protéines) ; Vert : Cellules ; Jaune : Protéines

e. Principe de purge cellulaire en perfusion

Dans un procédé en perfusion où la concentration cellulaire est maintenue constante, une purge cellulaire est mise en place. Plusieurs stratégies sont alors possibles :

- Si le système de recyclage cellulaire le permet : faire une dérivation et récupérer les cellules concentrées. L'avantage est de réduire la perte de la protéine d'intérêt par la purge.
 L'inconvénient est de déterminer exactement la concentration cellulaire après concentration pour connaitre le débit à prélever.
- Prélever directement dans le bioréacteur : la concentration cellulaire sera celle du bioréacteur ainsi il est aisé de connaitre le débit à prélever. Toutefois dans certaines conditions, le volume à prélever peut-être important, la fraction de protéine d'intérêt présente dans la purge sera alors perdue ou devra être traitée par d'autres moyens.

Le taux de purge (B, Bleeding rate) représente le volume de purge cellulaire éliminé par jour par volume de culture. Le bilan de biomasse dans le bioréacteur est le suivant :

$$\frac{dX}{dt} = \mu \times X - B \times X$$

Où X est la concentration cellulaire et μ le taux de croissance.

Ainsi lorsque la concentration cellulaire est maintenue constante la relation devient :

$$B = \mu \quad (j^{-1})$$

Par conséquent le taux de purge à appliquer est égal au taux de croissance.

La perte de protéines d'intérêt due à la purge peut représenter une fraction trop importante de la production totale. Il faut alors définir une zone de travail pour réduire son importance. Différentes stratégies sont alors possibles (voir partie résultats chapitre « Validation du CSPR »).

III. Production de protéines recombinantes en perfusion

a. Avantages

Les premières protéines recombinantes thérapeutiques produites en perfusion ont été approuvées en 1992 par la FDA. Ces dernières années, 20 molécules biologiques thérapeutiques ont été produites en perfusion et approuvées (Tableau 1). La majorité des grandes firmes pharmaceutiques ont produit des anticorps monoclonaux thérapeutiques approuvés par la FDA, comme Merck Serono, Sanofi avec le rachat de Genzyme, etc... Tableau 1 : Produits biologiques produits par un procédé en perfusion et approuvés par la FDA (ND : Non documenté (Pollock 2013; Schmidt 2017))

Produit	Dénomination	Туре	Système rétention	Date 1ère	Fabricant
	Commune			approbation	
Recombinate [®]	octocog α	Facteur VIII	ND	1992	Baxter Int
ReoPro®	abciximab	Mab	Filtration rotative	1994	Janssen Biotech
Cerezyme®	imiglucérase	Enzyme	Sédimentation	1994	Genzyme
Avonex®	IFN β-1a	Interféron	ND	1996	Biogen
Gonal-f®	follitropine α	Hormone	Filtration rotative	1997	Merck Serono
Remicade®	infliximab	Mab	Filtration rotative	1998	Janssen Biotech
Simulect®	basiliximab	Mab	Filtration rotative	1998	Novartis
Rebif®	IFN β-1a	Interféron	ND	1998	Merck Serono
Kogenate-FS®	octocog α	Facteur VIII	Sédimentation	2000	Bayer
Xigris®	drotrécogine α	Protéine C	Sédimentation	2001	Eli Lilly
Campath®	alemtuzumab	Mab	ND	2001	Genzyme
Fabrazyme [®]	agalsidase β	Enzyme	Sédimentation	2003	Genzyme
Aldurazyme®	laronidase	Enzyme	ND	2003	Genzyme
Myozyme®	α -glucosidase	Enzyme	Sédimentation	2006	Genzyme
Lumizyme®	α -glucosidase	Enzyme	ND	2006	Genzyme
Naglazyme [®]	galsulfase	Enzyme	ND	2006	BioMarin Pharm
ReFacto [®]	octocog α	Facteur VIII	ND	2008	Wyeth
Xyntha®	octocog α	Facteur VIII	ND	2009	Wyeth
Simponi®	golimumab	Mab	ATF	2009	Janssen Biotech
Stelara [®]	ustekinumab	Mab	ATF	2009	Janssen Biotech
VPRIV®	velaglucerase	Enzyme	Centrifugation	2010	Shire
Advate®	octocog alfa	Facteur VIII	ND	2011	Baxter Int

En raison de la protéine d'intérêt

Parfois, les caractéristiques de la protéine à produire rendent le développement d'un procédé en perfusion nécessaire. En effet, certaines protéines sont dégradées rapidement dans un environnement complexe comme celui d'une culture présentant des protéases. Par exemple, le facteur VIII recombinant utilisé pour traiter l'hémophilie de type A est un hétérodimère de haute masse moléculaire (300 kD) qui possède 25 sites de N-glycosylation. Il a donc été produit en cellules mammifères, mais s'est révélé instable une fois sécrété dans le milieu de culture. Le caractère labile de cette molécule a donc entrainé l'utilisation d'un procédé en perfusion afin de récolter la molécule d'intérêt à l'extérieur du bioréacteur, au fur et à mesure de sa production pour la stabiliser le plus rapidement possible (Boedeker 2001).

D'autres molécules produites par des cellules mammifères présentent parfois, à haute concentration, des propriétés d'inhibition de la croissance cellulaire. L'avantage d'un système perfusion est alors de permettre l'évacuation du produit pour ne pas altérer la croissance des cellules dans le bioréacteur.

Augmentation de la productivité

En 2013, Pollock et *al.* ont étudié le fed-batch à deux stratégies de perfusion : l'ATF et le spin filter. Cette étude utilise la simulation Monte Carlo pour simuler les conditions attendues et ensuite classer les résultats en fonction de la priorité du résultat souhaité dans les scénarios commerciaux. L'analyse déterministe identifie que le système de recyclage utilisant l'ATF comme étant le plus intéressant au niveau efficacité/coût. En effet, il permet de réduire le coût par gramme d'anticorps produits (COG) de 20% par rapport au fed-batch. L'étude reconnait toutefois que le fed-batch nécessite moins de consommables et de tâches au cours de la culture, ce qui rend le fed-batch plus intéressant dans les cas où la durabilité environnementale est une priorité. Comme l'étude est basée sur la fabrication à l'échelle commerciale, les paramètres utilisés sont axés sur l'obtention d'une densité cellulaire maximale.

Dans un article publié en 2015, Croughan reconnait que la perfusion peut être le mode de production le plus avantageux en fonction du scénario. Il soutient que la mise en œuvre de systèmes de perfusion est réalisable dans la plupart des cas biopharmaceutiques où la protéine d'intérêt provient de lignées adaptées pour survivre dans un environnement extrême ou lors de la production de protéines instables. Cependant, la publication explique que bien que la perfusion ait été intégrée avec succès par de nombreuses entreprises, il n'y a toujours pas assez de preuves pour accepter la perfusion comme méthode globalement plus performante (Croughan *et al.* 2015). Toutefois, comme Carsten l'avait mis en évidence précédemment, les cultures de perfusion ont une durée de vie plus longue que le fed-batch, ce qui représente un risque supplémentaire en cas d'échec (Carsten *et al.* 2009).

L'utilisation en continu permet l'utilisation d'équipements plus petits (bioréacteurs et autres consommables) fonctionnant plus longtemps, tout en produisant des quantités de produits semblables à celles produites en fed-batch avec de très gros équipements. Cet avantage permet une plus grande flexibilité, en cas de capacité de production supérieure requise, des unités de production pouvant être ajoutées plus facilement. Malgré un temps de mise au point beaucoup plus long et un coût de fonctionnement élevé comparé aux procédés classiques, un procédé en perfusion peut être plus rentable en raison d'un investissement fortement réduit. L'efficacité d'une installation est affectée par les périodes de nettoyage, reconditionnement et préparation entre chaque lot de production. Les procédés en continus peuvent être maintenus pendant plusieurs semaines, ou mois, ce qui minimise les temps d'arrêt. Le taux d'utilisation des installations est d'environ 60% en Fed-batch contre plus de 90% en perfusion (Ozturk 2014).

Une étude de coût au niveau recherche est détaillée dans la partie résultat de ce manuscrit, selon la productivité du clone, le mode culture et les besoins en anticorps pour une année.

Homogénéité du produit

Dans un procédé en perfusion, lorsque la concentration cellulaire désirée est obtenue, plusieurs paramètres deviennent constants (Figure 12) :

- Le débit d'alimentation : en considérant que le besoin des cellules en milieu de culture est constant, et si on maintient la concentration cellulaire constante alors le débit d'alimentation en milieu est constant.
- Le débit de sortie du filtrat : pour garder un volume constant, les débits d'entrée doivent correspondre aux débits de sorties. Pour cela le débit de sortie du filtrat après ATF doit être constant.
- La purge cellulaire : le taux de purge est calculé grâce au taux de croissance qui est dépendant du clone du milieu et des conditions de culture. Il doit rester constant au cours de la culture. La purge permet de garder la concentration cellulaire constante.



Figure 12 : Schématisation d'un procédé perfusion et mise en évidence des paramètres qui influencent le débit de chaque pompe. CSPR : Cell Specific Perfusion Rate est le débit d'alimentation par cellules (voir paragraphe b de ce chapitre).

Pour toutes ces raisons, les concentrations en métabolites deviennent constantes dans le bioréacteur, ce qui inclut aussi la protéine d'intérêt. On atteint alors un état stationnaire que l'on peut maintenir pendant plusieurs semaines.

Dans cet état stationnaire, les cellules continuent de se diviser de façon exponentielle dans un environnement constant, et, grâce à la purge, la concentration cellulaire n'évolue pas. Cet environnement constant laisse supposer que les cellules produisent une protéine d'intérêt plus homogène qu'en batch ou en fed-batch où l'environnement est en constante évolution depuis l'inoculation jusqu'à la récolte.

De nombreuses études ont montré qu'au cours d'une culture en batch ou fed-batch, les glycosylations des anticorps évoluaient. En fin de culture, les cellules semblent produire plus de formes tronquées de glycosylations et des formes à forte teneur en mannose. Des analyses d'isoélectro-focalisation ont montré que les profils de variants de charge évoluaient, avec des espèces chargées apparaissant en fin de culture (Robinson *et al.* 1994). En 2017, Karst et son équipe ont montré que l'état stationnaire d'une culture en perfusion permettait d'obtenir des profils de glycosylations stables sur 20 jours (Karst *et al.* 2017). Cette équipe a aussi démontré qu'il est possible de moduler le profil de glycosylation en fonction de la concentration cellulaire et des caractéristiques du procédé.

b. Le CSPR : un critère important dans l'optimisation de la perfusion

Mis en évidence par Ozturk en 1996, le CSPR, ou Cell Specific Perfusion Rate, est un des critères les plus importants dans un procédé en perfusion(Ozturk 1996). Le CSPR met en évidence le débit d'alimentation spécifique qu'il faut apporter à chaque cellule par jour. L'unité de référence du CSPR est le picolitre par cellule et par jour (pL/cell/jour). La définition du CSPR minimum en fonction du clone utilisé lors de la production est l'une des étapes majeures du développement d'un procédé en perfusion.

En effet, en cas de sur-alimentation, le coût du milieu de culture fait drastiquement augmenter le coût total du procédé.

En cas de sous-alimentation au contraire, une accumulation de métabolites secondaires toxiques peut avoir lieu dans le bioréacteur. Des composés comme le lactate ou l'ammoniaque entrainent à fortes concentrations une baisse de la viabilité cellulaire, il est donc crucial d'éviter leur accumulation. Il a été montré qu'une concentration de 20 mM de NH₄⁺ entraine une réduction des glycanes sialylés (29% en présence d'une concentration de 20 mM de NH₄ contre 46% pour le témoin) (Yang, 2000).

Un CSPR trop faible peut aussi entrainer la mort cellulaire à cause d'une insuffisance en nutriments comme le glucose, la glutamine ou des acides aminés essentiels.

Différentes stratégies de recherche du CSPR minimum sont possibles dans le développement d'un procédé en perfusion, nous les avons comparées et présentées dans la partie Résultats de ce manuscrit.

c. Inconvénients

Jusqu'à récemment, le principal inconvénient d'un procédé perfusion était le stockage du filtrat. En effet, les volumes de filtrat soutiré chaque jour sont beaucoup plus important que ceux récoltés en fin de culture en fed-batch. Ceci pose des problèmes d'espace de stockage et donc de coût. Lors de cette phase, il faut également éviter toute contamination bactérienne. De plus, il faut maintenir la protéine d'intérêt dans des conditions où elle reste stable.

Ensuite, lors de la phase de purification, les volumes à purifier sont plus importants, ce qui nécessite des installations plus volumineuses, donc plus coûteuses, ou alors un nombre de cycles de purification plus important.

Un procédé en perfusion implique aussi une plus forte consommation de milieu de culture pour l'obtention d'une même quantité de produit. En raison des coûts importants de milieu de culture pour les cellules animales, l'utilisation du mode perfusion peut s'avérer rédhibitoire. Pour contrer ces inconvénients, l'optimisation des milieux de culture est un point clé.
d. Pourquoi un regain d'intérêt ces dernières années pour les procédés en perfusion ?

A l'heure actuelle, la fabrication de protéines thérapeutiques est en pleine maturation. En effet, de plus en plus d'industries effectuent une conversion de la production de molécules chimiques à la production de molécules biologiques. Toutefois de nombreux défis sont apparus ces dernières années : la pénurie fréquente de médicaments biologiques, la maitrise des coûts des soins de santé et les besoins croissants des pays en développement. Comme l'a suggéré la FDA, ces défis pourraient être résolus, entre autres, par une transition vers une technologie de production en continue (Woodcock 2014).

Cette transition est aujourd'hui possible grâce aux innovations technologiques des procédés en perfusion (notamment sur les systèmes de rétention cellulaire). De plus, des bioréacteurs à usage unique dont les volumes (jusqu'à 2000 litres) sont tout à fait compatibles avec l'utilisation du mode perfusion ont été développés. Ainsi, la production de plusieurs produits sur un même site de production peut être envisagée. L'utilisation de l'usage unique permet aussi la réduction des besoins en fluides (eau pour nettoyage, WFI, vapeur pour la stérilisation, ...) et donc la taille des installations dans l'usine. D'autre part, de nouvelles solutions pour suivre le procédé en temps réel ont émergé à partir de la technologie Raman ou du Proche-Infrarouge. Ces technologies permettent de s'affranchir des délais dus aux prélèvements et analyses hors-ligne. Pour la technologie Raman par exemple, une sonde est introduite dans le bioréacteur et, après une analyse multivariée, l'estimation de nombreux paramètres est possible (concentration cellulaire, glucose, lactate, protéine d'intérêt). Préalablement, l'usage de cette technologie nécessite de nombreuses optimisations afin de réaliser les modèles pour chaque paramètre. Ensuite, les informations obtenues peuvent être traitées par le logiciel pilotant le bioréacteur et agir sur celui-ci afin, par exemple, de maintenir l'état stationnaire. Ce rétrocontrôle peut s'avérer indispensable sur des cultures aussi longues et complexes. Afin de connaitre la densité cellulaire contenue dans le bioréacteur, l'utilisation d'un microscope in-situ peut être envisagé (Dhulster 2004).

Enfin, le développement de la chromatographie en continu a permis de supprimer l'étape de stockage intermédiaire de gros volumes de filtrat.

IV. La purification en continu

a. Purification d'anticorps monoclonaux

Après la production de l'anticorps, plusieurs étapes de purification ont lieu pour éliminer différents contaminants présents dans le filtrat de culture (Figure 13). Il s'agit d'obtenir une pureté compatible avec une utilisation thérapeutique et de respecter les normes en vigueur dans le cadre des biomédicaments (FDA 1999).Dans un premier temps, une étape dite de capture permet l'extraction de la molécule d'intérêt de l'extrait biologique brut. Il s'agit de fixer la protéine cible sur un support chromatographique, pour la stabiliser et la concentrer. Cette étape est communément une chromatographie d'affinité sur protéine A. Elle permet une capture spécifique, rapide et simple de l'anticorps et donc une bonne élimination des contaminants (protéines de la cellule hôte (HCP), ADN, composés du filtrat de culture, virus, ...)(Liu et al. 2010).



L'étape dite de purification intermédiaire permet l'élimination d'un grand nombre de contaminants dont les caractéristiques physico-chimiques sont proches de celles de l'anticorps.

Elle est généralement assurée par une Figure 13 : F chromatographie d'échange d'ions. Enfin, l'étape de monoclonal

Figure 13 : Procédé de purification industriel d'un anticorps monoclonal

polissage permet l'élimination de variants ou de formes tronquées de la protéine d'intérêt et ainsi augmente la pureté nécessaire du produit. Elle peut permettre aussi l'élimination de virus ou d'ADN résiduels. A la fin du procédé, une dernière étape de conditionnement permet le stockage de l'anticorps en vue de son utilisation.

A chaque étape du procédé, il faut minimiser la perte de la protéine d'intérêt dont la valeur est élevée. Les rendements de chaque étape et du procédé global doit être optimisé tout en permettant d'obtenir une pureté suffisante. Ceci est d'autant plus difficile que plusieurs étapes sont nécessaires pour atteindre la pureté souhaitée. Alors que les impuretés liées au processus telles que l'ADN et le HCP présentent des caractéristiques d'adsorption assez différentes et sont donc relativement faciles à éliminer, l'élimination des impuretés liées au produit telles que les agrégats, les fragments ou les isoformes constitue un défi (Steinebach *et al.* 2017).

Une étape de chromatographie se décompose en plusieurs opérations (Figure 14) :

- L'équilibration : permet d'éliminer le tampon de stockage dans lequel se trouve la résine et d'établir un pH et une force ionique dans la colonne en adéquation avec l'adsorption de la protéine sur la résine.
- Le chargement : le filtrat est alors injecté sur la colonne, les protéines qui ne se fixent pas à la résine peuvent être récoltés dans la fraction appelée « non-retenu ».
- Le lavage : généralement le tampon d'équilibration est utilisé pour éliminer de la résine les protéines qui ne sont pas spécifiquement accrochées au ligand.
- L'élution : la protéine d'intérêt liée au ligand est alors décrochée. Les conditions de cette phase doivent être étudiées précisément afin de décrocher sélectivement la protéine d'intérêt dans le plus petit volume possible.
- La neutralisation : cette phase est facultative, elle est utilisée lorsqu'il y a une grande différence de pH entre le tampon d'élution et de régénération, ce qui pourrait entrainer un précipité dans la colonne.
- La régénération : généralement de l'hydroxyde de sodium est utilisée pour éliminer les molécules contaminantes accrochées au ligand ou à la matrice. La molarité (de 0,1 M à 1M) et le temps contact (généralement inférieur à 30 minutes) est donnée par le fabricant et dépend de la résine utilisée.



Figure 14 : Les différentes opérations d'une étape de chromatographie (Handbook GE Healthcare)

b. La chromatographie d'affinité sur protéine A

La chromatographie d'affinité sur protéine A est à l'heure actuelle la technique la plus utilisée pour l'étape de capture dans les procédés de purification d'anticorps recombinants, car elle permet une séparation hautement sélective des lgG. Initialement, la protéine A était extraite de la paroi de la souche *KowanI* de *Staphylococcus aureus*. Le gène codant pour cette protéine de 42 kDa a été ensuite séquencé par Uhlén *et al.* permettant l'utilisation de protéine A produite par voie recombinante. Des résines utilisant la protéine A d'origine native ou recombinante existent sur le marché. Les résines de chromatographie sont constituées d'un ligand (ici, la protéine A) et d'un support (généralement une bille constituée d'un polysaccharide), reliés par un bras espaceur (Figure 15).



Figure 15 : Représentation d'un support de chromatographie d'affinité. La bille de polysaccharide (en gris) sur laquelle sont fixé des bras espaceur (en blanc) et la protéine A (en rouge). Les anticorps (en bleu) ont une grande affinité pour la protéine A. (Handbook GE Healthcare).

Species	Immunoglobulin	Binding to Protein A						
Human	IgG (normal)	++++						
	lgG1	++++						
	lgG2	++++						
	lgG3	-						
	lgG4	++++						
	IgM	-						
	IgA	-						
	IgE	-						
Mouse	lgG1	+						
	lgG2a	++++						
	lgG2b	+++						
	lgG3	++						
Rat	lgG1	-						
	lgG2a							
	lgG2b	-						
	lgG2c	+						
Goat	lgG	+/-						
Rabbit	lgG	++++						
Sheep	lgG	+/-						

Figure 16 : Affinité entre la protéine A et les Immunoglobulines de différentes espèces (Handbook GE healthcare)

La chromatographie sur protéine A présente de nombreux avantages puisqu'elle est extrêmement sélective permettant des niveaux de pureté très élevés dès l'étape de capture (~98%). En revanche, elle présente également de nombreux inconvénients notamment dus à sa nature protéique. Par exemple, elle peut être relarguée, c'est-à-dire décrochée de la bille, au cours de la purification et contaminer le produit d'intérêt. Ceci n'est pas envisageable pour un anticorps à visée thérapeutique. En effet la protéine A, issue d'un staphylocoque, entrainerait une réaction immunitaire potentiellement dangereuse pour le patient. La quantité de protéine A dans l'échantillon est donc soumis à une réglementation stricte (Tableau 2). D'autre part, les résines de chromatographie afin d'être réutilisées doivent être régénérées notamment via l'utilisation de NaOH 1M. Ceci peut affecter la protéine A et limiter son efficacité et la durée de vie de la colonne (nombre de cycles d'utilisation).

Tableau 2 : Normes établies par la FDA	concernant les anticorps	; thérapeutiques (FDA 1999)
--	--------------------------	--------------------	-----------

	Normes
HCPs	< 5 ppm
Agrégats	< 0,5%
rDNA	< 10 ng/dose
Protéine A	<0.5%

Depuis l'expiration du brevet de Repligen sur la fabrication du ligand recombinant de protéine A, de nombreux fournisseurs sont entrés sur le marché et de nombreuses améliorations ont pu avoir lieu, notamment en terme de sensibilité au NaOH (utilisée dans les procédures de nettoyage), et de capacité dynamique de fixation, (DBC) (Liu *et al.* 2015).

Le fabricant GE Healthcare, leader du marché, a développé deux gammes de résine protéine A : Sepharose et MabSelect. La gamme Sepharose, basée sur des billes d'agarose réticulée à 4%, inclut une protéine A native, une protéine A recombinante (qui oriente la protéine A grâce à un couplage epoxy limitant le relargage) et une protéine A recombinante modifiée (protéine A orientée et plus stable (grâce à un couplage amide) pouvant fixer deux IgG). La gamme Mabselect est basée sur des billes d'agarose réticulées à 6% ayant une meilleure résistance à la compression ce qui permet d'augmenter les débits de travail. La capacité de fixation dynamique est également améliorée. La modification de certains acides aminés de la protéine A a permis d'améliorer la résistance au NaOH.

La protéine A reconnait le fragment constant des immunoglobulines. Les résines protéine A ont une forte sélectivité pour l'anticorps, ce qui permet d'avoir une pureté élevée. Toutefois, ces résines coûtent très cher (entre 8000 et 15000€ le litre de résine) ce qui impactent le coût total de la purification (Swinnen et al. 2007). A titre d'exemple, une colonne industrielle de 100 litres, le coût de la résine seule est de 1 millions d'euros (Figure 17).



Figure 17 : Colonnes de chromatographie industrielle (GE Healthcare)

c. La chromatographie en continu

Les coûts de production dans l'industrie biopharmaceutique sont beaucoup plus élevés que dans les industries dites « traditionnelles », et ce, en raison de la complexité des bioprocédés et de leur validation. Pour obtenir un anticorps monoclonal, les étapes de production représentent 30% des coûts, celles de purifications représentent 50% et les 20% restants sont pour la formulation, les analyses, etc... Avec 50% des coûts, la purification est clairement un poste clé. La distribution des coûts de purification est généralement de 20% pour les infrastructures, 10% pour l'équipement, 20% pour les résines chromatographiques (35% si la résine protéine A est incluse dans le procédé) et 50% pour les tampons (Figure 18). Par exemple, pour une production en bioréacteur de 20 000 litres, environ 140 000 litres de tampons sont nécessaires pour les étapes de purification (incluant la filtration).



Figure 18 : Répartition des coûts, à gauche du bioprocédé en général, à droite de la partie purification

Le défi consiste à réduire les coûts de purification tout en traitant des volumes importants de filtrat. L'étape de capture est le point clé, l'objectif est de traiter un volume maximum d'échantillon (avec parfois de faibles quantités de protéine d'intérêt), de concentrer et de stabiliser la molécule d'intérêt. Les résines protéine A dont le coût est très élevé ne sont pas utilisées au maximum de leur capacité en chromatographie classique. En revanche, en chromatographie continue, l'utilisation de plusieurs colonnes en séries (SMCC : Sequential Multicolumn Chromatography) permet d'optimiser la capacité de la résine et ainsi de réduire le coût de l'étape de capture. Plus précisément, en chromatographie classique, la résine n'est utilisée qu'entre 50-80% de sa capacité maximale, alors qu'en chromatographie continue, il est possible d'approcher les 100% (Figure 19).



Figure 19 : Comparaison d'une chromatographie classique (dite "batch") à gauche et une chromatographie en continu (Novasep) à droite.

d. La capacité d'une résine chromatographique

La capacité de fixation d'une résine est un paramètre critique pour les supports de chromatographie car elle détermine la quantité de résine nécessaire pour purifier une certaine quantité de protéines. Ce terme définit la taille de la colonne nécessaire, les débits d'utilisation du système de chromatographie et, les coûts totaux de purification de la protéine.

Deux critères peuvent être pris en compte :

- La capacité de fixation statique (SBC : Static Binding Capacity)
- La capacité de fixation dynamique (DBC : Dynamic Binding Capacity)

La capacité de fixation statique (SBC, également appelée capacité de protéine totale) est normalement mesurée en mode discontinu dans un bécher. Elle correspond à la quantité maximale de protéine qui peut être fixée sur la résine dans des conditions de concentration de solvant et de protéines donnés.

La DBC est la capacité de fixation en conditions dynamiques, c'est à dire sous l'effet d'un débit. La DBC d'une résine chromatographique est donc la quantité de protéine d'intérêt qui peut se lier à la résine. La fixation de la protéine d'intérêt sur le ligand résulte de l'affinité entre les deux molécules, du coefficient de partage entre les deux phases (mobile et stationnaire) et de la résistance au transfert de masse. Ainsi l'équilibre entre les 2 phases est modifié au fur et à mesure que la concentration de la protéine à fixer diminue. Par conséquent, au fur et à mesure que l'échantillon est chargé sur la colonne, il se forme un gradient de concentration le long de la colonne. Par conséquent, la colonne ne peut pas être saturée, il reste des sites de fixation potentiels au bas de la colonne alors qu'une partie de la protéine d'intérêt commence à sortir de la colonne. Ce phénomène appelé fuite ou percée (breakthrough) permet de tracer la courbe de percée (Figure 21) et de déterminer la DBC.

Initialement, la concentration en protéines à adsorber (mAb) est constante dans la phase mobile. Malgré un débit constant et un gel idéalement paqué, le flux de tampon qui transporte les protéines va se déplacer de façon différentielle à l'intérieur de la colonne. Ces phénomènes de déplacements différenciés sont dus, essentiellement, à un phénomène physique appelé résistance au transfert de masse.



Figure 20 : Force exercée dans une colonne de chromatographie

Dans la phase mobile :

a) Le flux est plus important au milieu de la colonne qu'au bord de la colonne, c'est l'**effet de bord**.

b) Plus les tailles des billes et les pores de la bille chromatographique sont larges, plus les protéines à adsorber se dispersent et se déplacent de façon différenciée.

Dans la phase stationnaire :

La cinétique d'adsorption sur la phase stationnaire va dépendre des coefficients de diffusion de la phase mobile et de la phase stationnaire (épaisseur du **film de diffusion** à la surface de la phase stationnaire, **diffusion poreuse**), du diamètre des billes et de la cinétique d'interaction. La **cinétique d'interaction** (affinité) entre la protéine à adsorber et le ligand sur la phase stationnaire a un rôle capital sur la dispersion. Quand l'affinité est importante, la dispersion est diminuée. De même, le diamètre de la bille de chromatographie influence la dispersion.

Pour toutes ces raisons, malgré la maitrise de certains paramètres (volume injecté, concentration de protéines à adsorber, capacité statique de la résine, volume de résine, effet des contaminants), le gradient de concentration le long de la colonne de chromatographie ne peut pas

être anticipé. Par conséquent, l'expérimentateur, se limite à une utilisation partielle de la capacité de la colonne (60-80%) pour éviter des pertes du produit d'intérêt à haute valeur ajouté.

Pour déterminer la DBC expérimentalement, il faut injecter le filtrat contenant la protéine d'intérêt et récupérer les fractions en sortie de colonne. Après analyse, il faudra déterminer à partir quel volume de filtrat injecté la protéine a commencé à fuir. Il faut alors établir une courbe de percée (Figure 21) qui permet de déterminer la DBC. Pour cette étude, il est nécessaire d'utiliser un filtrat proche du filtrat final car les protéines autres que la protéine d'intérêt peuvent aussi interagir avec le support, ce qui influencera la DBC (Carta and Jungbauer 2010).

La DBC est aussi influencée par le débit de travail. En effet, la fuite de produit d'intérêt arrivera plus rapidement si le débit est élevé (Figure 22). Il est donc nécessaire de choisir une gamme de débits proches du débit de travail (Carta and Jungbauer 2010).



Figure 21 : (A) Capacité communément utilisée en chromatographie par batch ; (B) Capacité généralement utilisée en SMCC. Les lignes rouges représentent la fuite de protéine d'intérêt (Breakthrough) durant le chargement. En SMCC, la protéine d'intérêt qui fuit de la première colonne peut se fixer sur la deuxième colonne ce qui empêche de perdre du produit. (Handbook GE Healthcare)



Figure 22 : Courbe de percée à différentes vitesses : La vitesse a une influence sur la percée du produit. (Close et al. 2013)

e. Principe de la SMCC

La SMCC (Sequential Multicolumn Chromatography) est une technique de chromatographie continue, c'est-à-dire qu'une des étapes de chromatographie se déroule en continu. Un des premiers appareils commerciaux de SMCC est le BioSC[®] fabriqué par la société française Novasep. Cet appareil permet de mettre jusqu'à 6 colonnes en série. D'autres fabricants sont aujourd'hui sur le marché comme GE Healthcare, Pall Life Science, ChromaCon et Semba Biosciences.

Le principe de la SMCC est donc de diviser une colonne de chromatographie en plusieurs colonnes et ainsi d'utiliser chaque colonne au maximum de ses capacités. Chaque colonne est gérée par une série de vannes indépendantes. Ceci permet de réaliser en parallèle différentes opérations (chargement, lavage, élution, régénération, équilibration) indépendamment sur chaque colonne. Voici le fonctionnement pour 3 colonnes en série (Figure 23) :

Etape 1 : Les 3 colonnes sont équilibrées et prêtes à être chargées avec le filtrat.

<u>Etape 2 :</u> Le chargement du filtrat sur la colonne 1 commence, celle-ci est connectée à la colonne 2, elle-même connectée à la colonne 3. Ceci permet de fixer la protéine d'intérêt lorsque la fuite (ou percée) commence.

<u>Etape 3 :</u> Lorsque la colonne 1 est chargée au maximum de sa capacité, l'opération de chargement est arrêtée. Une opération de lavage de la colonne 1 débute, toutes les colonnes sont toujours en série. Ainsi, si le lavage décroche des protéines d'intérêt de la colonne 1, elles peuvent être refixées sur la colonne 2. C'est cette étape qui donne le nom de chromatographie semi-continue (en raison de l'arrêt du chargement).

<u>Etape 4 :</u> La colonne 1 n'est plus en série avec les autres colonnes. Elle peut ainsi subir les opérations d'élution, de régénération et d'équilibration. En parallèle, le chargement se poursuit sur la colonne 2, connectée en série avec la colonne 3.

<u>Etape 5 :</u> Lorsque la colonne 2 est chargée au maximum de sa capacité, l'opération de chargement s'arrête. Une opération de lavage de la colonne 2 débute, toutes les colonnes sont toujours en

série. Ensuite la colonne 2 est déconnectée du système pour être éluée, régénérée et équilibrée. Pendant ce temps, la colonne 1 est remise en série à la suite de la colonne 3.



Figure 23 : Principe de fonctionnement à 3 colonnes d'une SMCC

f. Avantages de la chromatographie en continu

La chromatographie continue présente de nombreux avantages par rapport à la chromatographie classique (Figure 24). La diminution de la consommation de tampon est très importante. En chromatographie classique, le volume des colonnes est élevé, entrainant une utilisation de volumes importants de tampon. La diminution du volume des colonnes en chromatographie continue permet de réduire le volume de tampon pour une même quantité de protéine purifiée.

La capacité de fixation de l'anticorps par volume de résine est largement augmentée grâce à l'utilisation de la totalité de la capacité de chaque colonne. De plus la productivité par jour est elle-aussi augmentée grâce à la succession des opérations sans intervention de l'opérateur. Pour toutes ces raisons, l'impact économique positif est indéniablement en faveur de l'utilisation de la chromatographie continue dans un bioprocédé.

		Batch mAb capture	BioSC SMCC N	lodelling Data	BioSC SMCC Modelling Data
		Single Column Batch Process	3 Columns	4 Columns	4 Columns
	Number of columns	1	3	4	4
	Bed Height (cm)	20	20	20	14
ų	Dynamic Capacity (g mAb/L resin)	16.8 g/L			
0 cm	Buffer Consumption (mL/g mAb)	1 500 mL/g			
30	Productivity (g mAb/L resin/day)	386 g/L/day			
4	Q'max Capacity (g mAb/L resin)		40.8 g/L		
) cm	Buffer Consumption (mL/g mAb)		630 mL/g		
75	Productivity (g mAb/L resin/day)		786 g/L/day		
ų	Q'max Capacity (g mAb/L resin)			40.8 g/L	
0 cm	Buffer Consumption (mL/g mAb)			630 mL/g	
120	Productivity (g mAb/L resin/day)			939 g/L/day	
ų	Q'max Capacity (g mAb/L resin)				40.8 g/L
C C	Buffer Consumption (mL/g mAb)				630 mL/g
95(Productivity (g mAb/L resin/day)				969 g/L/day

Figure 24 : Données de simulation de la purification par chromatographie sur protéine A d'un anticorps monoclonal générique (Novasep)

V. Couplage production-purification

Le terme de couplage production-purification désigne le fait de lier physiquement les étapes de production et de purification (Figure 25). L'intérêt de ce couplage est de supprimer le stockage intermédiaire entre la production et la purification qui est un des principaux inconvénients de la production en perfusion qui avec de gros volumes de filtrat à traiter.

Le développement des appareils de chromatographie continue ces dernières années a favorisé la recherche dans le domaine du couplage production-purification. Néanmoins, cela implique de contraintes technologiques supplémentaires. En effet, il faut nécessairement que les débits de sortie de production et les débits d'entrée de purification soit équivalents. Un réservoir tampon intermédiaire est généralement utilisé afin de prévoir la possibilité de variations ponctuelles de débits d'un côté ou de l'autre de la chaine.



Figure 25 : Exemple schématique d'un couplage production-purification

En 2012, une équipe de Genzyme (maintenant Sanofi) a mis au point le couplage production-purification (Warikoo *et al.* 2012)(Figure 26). Seule la première étape de purification était réalisée à partir d'un automate de purification GE Healthcare modifié pour l'utilisation de 4 colonnes en série. La culture a été stabilisée pendant 60 jours à une concentration comprise entre 50-60x10⁶ cellules/mL, le couplage a eu lieu pendant 30 jours. Ici le maintien de la stérilité du côté purification a été permis par l'ajout de sodium azide dans le filtrat afin d'éviter toute prolifération bactérienne. Cette stratégie a montré son efficacité à l'échelle laboratoire, toutefois elle parait impossible à mettre en place à l'échelle industrielle.



Figure 26 : Montage du couplage production-purification publié par Genzyme à partir d'un automate de purification modifié (Warikoo *et al.* 2012)

En 2015, la même équipe a mis au point un procédé en continu de la production suivie de toutes les étapes de purification (Godawat *et al.* 2015) (Figure 27). De la même manière, la stérilité de la partie purification a été maintenue grâce au sodium azide à 0,05%. Pendant les 30 jours de couplage, la qualité du produit s'est avérée stable. Dans les deux cas, le système de recyclage cellulaire était l'ATF, ce qui a permis des durées de production importantes sans colmatage.



Figure 27 : Procédé en continu du début jusqu'à l'obtention de la protéine purifiée (Godawat et al. 2015).

En 2015, Bayer Technology a publié une étude de faisabilité technique d'un procédé continu complet de la production jusqu'à la fin des étapes de purification (Figure 28). Leur étude a été un succès car la partie production a pu avoir lieu pendant 28 jours et la partie purification pendant 2,5 jours. Cependant, des études sont toujours en cours pour pouvoir augmenter la durée de la partie purification tout en gardant des conditions stériles pendant les manipulations *(Klutz et al.* 2015). Ici, pour l'étape de capture sur protéine A, l'appareil utilisé était le BioSMB de Pall Life Science. Cet appareil possède la particularité d'avoir une cassette stérile à usage unique incluant tous les tuyaux où passent les tampons et le filtrat, ainsi le maintien de la stérilité est facilité.



Figure 28 : Schéma de l'étude de faisabilité d'un procédé en continu complet (Klutz et al. 2015)

Ces études ont montré que le couplage production-purification était possible mais posait de réels problèmes technologiques pour maintenir des débits compatibles et surtout éviter toute prolifération bactérienne. Pour cela diverses stratégies sont possibles :

- Utiliser un inhibiteur bactérien comme le sodium azide, cette stratégie ne sera pas applicable à l'échelle industrielle (Godawat *et al.* 2015).
- Utiliser des consommables à usage unique stérile pour la purification en continu (Klutz *et al.* 2015).
- Développer un protocole de nettoyage et de sanitisation (voir résultats de ce manuscrit).

Matériels et méthodes

I. Production

a. Adaptation et banques cellulaires

Lignée cellulaire

La lignée cellulaire utilisée est CHO DP12 (ATCC, CRL-12445), dérivée de CHO K1, elle a été génétiquement modifiée pour produire un anticorps monoclonal anti-interleukine 8 (anti-IL8) humanisé. Pour cela, CHO-K1 DUX-B11 (DHFR-) a été transfectée avec un plasmide pSVENeoBa16 lui permettant de se développer en milieu sans insuline, et donc de réduire les coûts en milieu de culture (Mather 1989). Ensuite, cette lignée nommée CHO DP12 a été transfecté avec le vecteur p6G4V11N35E.choSD.10 par lipofection, ce vecteur permet la co-expression des chaines légères et lourdes d'un anticorps monoclonal anti-interleukine 8, un gène DHFR a aussi été ajouté : cette lignée est nommée CHO DP12 (Gonzalez et al. 2000) (Annexe 1). Le gène DHFR code pour une enzyme, la dihydrofolate réductase, essentiel dans la voie métabolique de la thymidine et par conséquent la synthèse d'ADN. Le plasmide co-exprimant le gène DHFR et les chaines lourdes et légères de l'anticorps, une première pression de sélection est réalisée en cultivant les cellules dans un milieu sans thymidine. Les cellules n'exprimant pas la DHFR, et donc l'anticorps, ne peuvent pas se multiplier dans cet environnement, elles sont éliminées. Afin de sélectionner les clones exprimant le plus de copie du gène DHFR, et donc en théorie les plus producteurs d'anticorps, une deuxième pression de sélection est imposée. Cette pression de sélection appelée amplification génique a lieu par ajout de méthotrexate (MTX) dans des concentrations croissantes. Le méthotrexate est un inhibiteur de l'activité de la DHFR (Urlaub et al. 1983). Les cellules cultivées dans ces conditions présentes donc une activité de la DHFR plus importante due à un plus grand nombre de copie du gène. Ces cellules sont donc susceptibles de produire l'anticorps antiinterleukine 8 en plus grande quantité.

Le clone CHO DP12 est initialement cultivé avec du DMEM supplémenté en sérum de veaux fœtal (SVF) puis a été adaptée en suspension grâce à du milieu CellVento110 puis du CellVento210

(Merck Millipore). Le CellVento110 est ici utilisé afin de faciliter l'adaptation des cellules grâce à une composition plus riche. Après adaptation, les cellules sont toujours cultivées en CellVento210, milieu industriel chimiquement défini sans protéine ni composé d'origine animale. Le milieu est supplémenté avec 4 mM de L-Glutamine et 2 g/L de sodium bicarbonate, le pH est ajusté à 7,1 avec du NaOH 5M. Le milieu contient environ 6,5 g/L de glucose.

Banques cellulaires

Les banques cellulaires sont mises en place par cryopréservation des cellules en azote liquide à -196°C. Cette méthode évite les contaminations par des micro-organismes ainsi que les dérives génotypiques et phénotypiques qui pourraient conduire à une baisse de la productivité des cellules. Lorsque les différents types d'adaptation ont été réalisés, une banque maitresse (Master Cell Bank : MCB) a été réalisée puis congelée.

Un cryotube issue de cette banque maitresse est décongelé puis les cellules amplifiées afin de réalisés une banque de travail (Working Cell Bank : WCB). Dans la mesure du possible, afin de travailler avec des cellules identiques, les cryotubes issues de la même banque de travail sont ensuite utilisés lors des différentes expérimentations. La congélation et la décongélation des banques se fait selon les données du fournisseur du milieu de culture. En résumé, la congélation s'effectue en présence de 10% de DMSO avec une rampe de descente en température progressive et la décongélation s'effectue rapidement à 37°C.

Phase d'amplification

Les cellules en suspension sont cultivées sous agitation à 120 rpm en Erlenmeyer en verres stérilisées par autoclave. Afin de respecter une agitation et une aération suffisantes des cultures, les Erlenmeyer ne sont remplis qu'au ¼ de leur capacité maximale. Les cultures sont maintenues à 37°C et 5% de CO2 dans un incubateur Certomat CT plus (Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, France) ou MIR-S100C (Sanyo).Un cryotube est décongelé le plus rapidement possible afin de limiter le temps de contact entre les cellules et le DMSO à température ambiante, puis les cellules sont ensemencées à 0,5x10⁶ cellules/mL dans 20 mL de milieu Cellvento210 préalablement équilibré (en pH et température). Plusieurs passages cellulaires sont nécessaires afin d'obtenir la quantité de cellules nécessaire pour les expérimentations. Les passages sont réalisés tous les 3 à 4

jours. Les cellules sont ré-ensemencées en milieu neuf préalablement équilibré (température et pH), à une concentration de 0.5×10^6 ou de 0.3×10^6 cellules/mL.

Détermination de la concentration cellulaire

Pour déterminer la quantité de cellules présentes dans les cultures avant le passage, un dénombrement est réalisé par microscope droit (Nikon Eclipse E200, objectif x10) à l'aide d'une cellule de Malassez. Les cellules sont diluées au ½ dans une solution de bleu de trypan à 0,4% (p/v) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) A l'aide de la chambre de comptage, il est possible de dénombrer les cellules et de discriminer les cellules mortes (apparaissant en bleu) des cellules vivantes, non colorées car capable d'exclure le bleu de trypan. Au-delà d'une concentration de 10x10⁶ cellules/ml, l'échantillon est dilué en PBS au 10ème avant le dénombrement.

En cas de nombreux échantillons à compter, un compteur de cellules TC20 (Biorad) a été utilisé. Les cellules diluées au bleu de trypan sont déposées sur une lame de comptage introduite dans l'appareil. Par analyse d'image, le TC20 détermine le nombre total de cellules et évalue la viabilité cellulaire. Comme précédemment, au-delà d'une concentration de 10x10⁶ cellules/ml, l'échantillon est dilué en PBS au 10ème avant le dénombrement.

b. Erlens et spin tube

Etude de stabilité de la lignée en Erlenmeyer

Des cultures de 100 mL sont réalisées en Erlenmeyer de 500 mL à partir de chacun des différents types d'adaptations. Chaque jour, pendant 20 jours, un prélèvement et une numération cellulaire sont réalisés en conditions stériles, puis l'erlenmeyer est remis à l'incubateur. Les cellules issues du prélèvement sont centrifugées et le filtrat est récupéré puis analysé en SEC-UPLC afin de déterminer la concentration d'anticorps produits.

Pseudo-perfusion en spin tube

La pseudo-perfusion est une méthode manuelle qui permet de déterminer les besoins en milieu de culture des cellules par jour.

La pseudo-perfusion a été réalisée en spin tube (TPP, Corning). Les spin tubes (ou Tube spin en anglais) sont des tubes à centrifuger stérile permettant les échanges gazeux à travers les ouvertures du bouchon vissant à filtre stérile en PTFE.

Les cultures sont maintenues en incubateur MIR-S100C (Sanyo) à 32°C ou 37°C à une agitation de 220rpm (Agitateur Certomat MO2), à 5% de CO_2 . Le volume final était de 10 mL dans les spin tubes de 50 mL coniques.

Chaque condition a été réalisée en triplicats.

Chaque jour, un comptage est réalisé (voir Détermination de la concentration cellulaire) pour connaitre le volume de culture à retirer pour revenir à la concentration cellulaire initiale. Ce volume est alors placé dans un tube à centrifuger « cellules », le reste de la culture dans un tube à centrifuger « milieu ». Les deux tubes sont centrifugés à 300g pendant 5 minutes (Figure 29). Ensuite, en fonction du volume de milieu usagé à garder, une partie est retirée si besoin et les cellules sont reprises en suspension. Le tube « milieu » sert à rajouter du milieu usagé si besoin, une partie de ce tube est aliquoté afin de réaliser les analyses pour déterminer la concentration en anticorps et en métabolites (glucose, lactate). Le volume de milieu neuf est ajouté en fonction de la condition voulue (Tableau 3).



Figure 29 : Procédure pour la pseudo-perfusion en spin tube. En haut à droite : le bouchon des spin tubes permet la diffusion des gaz.

N°	Temp (°C)	Concentration cellulaire (x10 ⁶ cell/mL)	Taux de dilution (j ⁻¹)	CSPR (pL/cell/jour)	% renouvellement pa jour		
1	32	10	0,25	25	22		
2	32	10	0,5	50	39		
3	32	10	1	100	63		
4	32	10	1,5	150	78		
5	37	10	0,25	25	22		
6	37	10	0,5	50	39		
7	37	10	1	100	63		
8	37	10	1,5	150	78		

Tableau 3 : Conditions de pseudo-perfusion. Chaque condition a été réalisée en triplicats.

c. Cultures en bioréacteur : Batch de référence et optimisation de la perfusion.

Les cultures en bioréacteur sont réalisées dans un bioréacteur GPC bio d'un volume utile de 5L, à 37° C, 30% de pO₂ et pH 7,1. Le logiciel Cbio permet le contrôle du procédé et l'acquisition des paramètres de culture (Figure 30).

Le logiciel TeamViewer permet de contrôler ce logiciel à distance depuis un smartphone, afin de pouvoir intervenir à distance 24h/24. De plus une webcam est installée vers le bioréacteur afin de vérifier à distance le bon déroulement des expérimentations. Ce système de contrôle à distance est apparu essentiel au vu de la durée des manipulations (jusqu'à 30 jours) et du besoin

d'intervenir rapidement en cas de problème. Une schématisation des flux de communications est disponible en annexe 2.

Figure 30: Vue d'ensemble du bioréacteur et son environnement



Stratégie d'alimentation en gaz



Figure 31 : Schéma de la stratégie d'alimentation en gaz

Différents gaz sont exploités lors de la culture (Figure 31). L'azote et l'oxygène peuvent être utilisés dans la régulation de la pression en oxygène dissout (pO2) lorsque la densité cellulaire devient importante (voir « les sondes mesures »). Le CO2 permet la régulation du pH, en cas de pH trop élevé. Ces trois gaz sont injectés par un diffuseur de gaz situé au fond de la cuve, le spargeur. L'air est quant à lui utilisé à plusieurs niveaux :

- Pour l'ATF : il permet d'agir sur le diaphragme pour provoquer son gonflement et par conséquence le mouvement de va-et-vient de culture dans la fibre creuse.
- Vers le ciel gazeux du bioréacteur, l'espace situé entre la culture et le haut du bioréacteur, un débit constant d'air est appliqué afin de garder le bioréacteur en surpression. La surpression permet de limiter l'entrée de contaminant ambiant dans le bioréacteur. De plus, ce débit d'air permet d'éliminer les gaz accumulés et participe à l'aération de surface de la culture.

 Vers le spargeur du bioréacteur, ce diffuseur de gaz situé au fond de la cuve permet de réguler la pO2 jusqu'à ce que la densité cellulaire devienne trop importante. A ce moment, un débit d'air constant est appliqué et la régulation pO2 se fait par ajout d'oxygène pur.

Les sondes de mesure

Différentes sondes de mesure sont installées sur la platine du bioréacteur et plongent dans le milieu de culture.

Tout d'abord une sonde pH (Mettler Toledo 405-DPAS-SC K8S/325) relié à un transmetteur Mettler toledo M300, permet d'acquérir le suivi du pH au cours de la culture et le réguler grâce à un système PID (Proportionnel-Intégral-Dérivé). En cas de pH trop élevé, du CO2 est injecté par un rotamètre dans le spargeur du bioréacteur. En cas de pH trop faible, de la soude 0,2M ou 0,5M est injectée directement dans le bioréacteur à l'aide d'une pompe située sur le contrôleur.

Une sonde pO2 (Mettler Toledo InPro 6830/12/320), couplée également à un système PID permet de maintenir une consigne à 30% de saturation de l'air. Préalablement à toute culture, la calibration est effectuée en prenant pour référence à 100% une solution de PBS à 37°C saturée en air. Jusqu'à 30x106 cellules/mL de l'air est injectée, au besoin, par le spargeur afin de maintenir cette consigne. Au-dessus de cette concentration cellulaire, une quantité d'air constante est injectée continuellement et la consigne est maintenue grâce à des ajouts d'oxygène pur.

Une sonde CO2 (Mettler Toledo InPro 5000) et un transmetteur Mettler Toledo 5100e relié au contrôleur permet le suivi de la concentration en CO2 dans la culture. Aucun système de régulation n'a été mis en place pour ce paramètre.

Une double enveloppe régulée grâce à une sonde température permet de maintenir une température constante à 37°C. Le chauffage est assurée par une résistance située dans le contrôleur du bioréacteur, le refroidissement est quant à lui permis grâce à un Frigomix 1000 (Sartorius Stedim Biotech)

Le système d'agitation de la culture comprend un moteur relié à un axe d'agitation à l'extrémité duquel se trouve une pâle marine de 6 cm de diamètre. La vitesse d'agitation est de

150 rpm en début de culture et est augmentée petit à petit en fonction de l'évolution de la concentration cellulaire. Une augmentation de l'agitation permet d'augmenter la vitesse de transfert et donc plus de facilité à maintenir une pO2 constante.

Les tuyaux utilisés sur l'ensemble de l'installation sont en silicone Tuflux de diamètre interne 3,2 mm (Sartorius Stedim Biotech). Pour les têtes de pompes, des tuyaux plus résistants en silicone platinium ont été utilisés, de diamètre différent en fonction des débits nécessaires à leur utilisation. L'utilisation de sililcone platinium dans les têtes de pompes s'est révélée nécessaire à cause de la durée de fonctionnement des pompes. Cette matière est plus résistante tout en étant autoclavable et ne relarguant pas de particules lors de son utilisation (Tableau 4).

Entrées (Figure 32)



Figure 32: Schéma des entrées "liquides" du bioréacteur

La soude permettant la régulation du pH est introduit par un tube de diamètre interne 1,6 mm à l'aide d'une pompe péristaltique à vitesse fixe située sur le contrôleur tournant à 4,8 mL/min (19 tours/min) (Figure 33).

Figure 33 : Pompes situées sur le contrôleur, la pompe numéro 1 (en haut) est utilisée pour injecter la soude.

Une pompe Masterflex à vitesse variable avec une tête de pompe modèle 7518 permet l'introduction du milieu de culture

stockée préalablement dans une poche Flexboy de capacité variable, entre 5 et 50L. Le diamètre de tuyau utilisé est 0,8 mm diamètre interne avec une paroi fine.



Figure 34 : Montage permettant la filtration du milieu de culture en cours de manipulation

Le milieu CellVento210 est préparé en poche Flexboy (Sartorius) de 50L puis stérilisé par filtration grâce à une pompe péristaltique et un (ou plusieurs) filtre(s) Opticap XL 300 (Merck Millipore) de seuil de coupure 0,5 µm-0,1µm. L'entrée de la poche de milieu filtré est ensuite clampée et les filtres sont rincés dans une bouteille séparée afin d'éviter la prolifération bactérienne.

		Pompe		Tuyau					
Usage	Pompe	Tête	Vitesse	Diamètre interne	Débit	Matière marque			
Base	BaseSitué sur le/19 rpm12contrôleur		1,6 mm	4,8 mL/min	Silicone platinium Masterflex				
Alimentation	Masterflex	7518	1-600 rpm	0,8 mm Variable		Silicone platinium Masterflex			
Purge cellulaire	Situé sur le contrôleur	/	63 rpm	3,2 mm	61 mL/min	Silicone Platinium Masterflex			
Sortie filtrat ATF	Masterflex	7518	1-600 rpm	0,8 mm	Variable	Silicone platinium Masterflex			
En dehors des pompes	dehors pompes		3,2 mm ; 4,8 mm ; 6,4 mm		Silicone Sartorius Tuflux				
				0,8 mm ; 1,6 mm ; 12,1 mm		Biopharm Plus			

Tableau 4 : Pompes et tuyaux utilisés sur le système perfusion. L'ensemble des tuyaux sont à « paroi fine ».

Balances

Plusieurs balances Precia Molen I200B sont utilisées afin de contrôler les poids, et en déduire les volumes, à différents endroits du système :

- En dessous de la fibre creuse afin de vérifier que les bons volumes de culture étaient échangés à chaque cycle. Cela permet de mettre en évidence un défaut de fonctionnement du diaphragme ou la présence de bulle d'air dans les fibres creuses, limitant l'aspiration de la culture.
- En dessous de la poche d'alimentation pour vérifier que le débit de la pompe d'alimentation est correct.
- En dessous de la bouteille de la purge cellulaire afin de s'assurer que les pulses de la pompe contrôlant la purge cellulaire correspondent au débit attendu (voir paragraphe « sortie »).

Une balance i20 X112-A est située en dessous du bioréacteur. Le logiciel C-Bio du bioréacteur collecte les données de la balance. Elles sont utilisées pour maintenir une masse, et

par extrapolation un volume, constant. Pour cela, un programme a été mis au point dans le logiciel C-BIO afin de prendre en compte la variation de masse engendrée par le système ATF. En effet, toutes les 15s chaque cycle ATF fait varier le volume du bioréacteur d'environ 100 mL. Il a donc tout d'abord fallu mettre en place un calcul permettant de faire la moyenne de la valeur « balance » sur 3 minutes, appelée Moyenne3min. Ensuite, une séquence a été

45	SEQL	JENCE_A:	1
File		Help !	l
		<u> </u>	l
	1	MEASV Movenne3min 1005 > 23.25 Step & Else 2	
ă	2	MEASV Moyenne3min 1005 < 23.05 Step 4 Else 3	l
ŏ	3	GOTO Step 1	
ŏ	4	MEASV Moyenne3min 1C05 > 50.00 Step 1 Else 5	
ŏ	5	GAZUMP Pompe 1 F1 1PP1 change setpoint -1	
ð	6	HOLD 200Seconds	
۲	7	GOTO Step 1	l
	8	MEASV Moyenne3min 1C05 > 50.00 Step 1 Else 9	
۲	9	GAZUMP Pompe 1 F1 1PP1 change setpoint 1	l
۲	10	MEASV Pompe 1 F1 1PP1 > 80.00 Step 11 Else 12	l
۲	11	SETPT Pompe 1 F1 1PP1 80.0	l
۲	12	HOLD 200Seconds	
•	13	GOTO Step 1	

Figure 35 : Séquence utilisée pour maintenir un volume constant grâce à la pompe de sortie du filtrat

programmée afin de vérifier la valeur « Moyenne3min », si celle-ci était supérieur à 23,25 kg alors la consigne de la pompe de sortie était augmentée de 1%, afin d'accélérer le débit de sortie, donc de diminuer le masse, donc le volume de culture. A l'inverse, si la valeur «Moyenne3min » était inférieur à 23,05 kg, la consigne de la pompe de sortie était diminuée de 1%, ceci afin de ralentir le débit de sortie et donc augmenter la masse, donc le volume de culture.

Une boucle a été mise en place grâce à la fonction GOTO permettant de faire tourner la séquence pendant toute la durée d'une manipulation. Les fonctions HOLD permettent de laisser le temps au système de se stabiliser après un changement de vitesse de la pompe. Les fonctions situées en étape 4 et 8 permettent de s'assurer qu'il n'y a pas eu de « bug » dans le calcul de la valeur « Moyenne3min ». De plus l'étape 10 contraint la pompe à ne pas dépasser 80 rpm ce qui pourrait entrainer un trop grand déséquilibre du système.

En fonction des besoins des manipulations (asservissement de la pompe d'alimentation ou asservissement de la pompe de sortie ATF), la séquence a été modifiée pour utiliser la pompe d'alimentation en milieu de culture à la place de la pompe de sortie. Pour cela, il suffisait d'inverser les ordres. Par exemple si la valeur « Moyenne3min » était inférieur à 23,05 kg, la consigne de la pompe d'alimentation était augmenté de 1%.

En effet différentes stratégies de maintien du volume constant sont possibles (Figure 36) :

- Figure 36 A : Le débit d'entrée du milieu de culture est piloté par la séquence et le débit de la sortie du filtrat ATF est constant : dans ce cas le débit de sortie est constant, du filtrat sera donc disponible à tout moment pour la purification en continue. Cependant le débit d'alimentation en milieu pourra varier légèrement au cours du temps donc modifié l'alimentation des cellules, mais la moyenne sur quelques heures donnera le débit voulu.
- Figure 36 B : Débit d'entrée du milieu est constante et le débit de sortie du filtrat est ATF piloté par la séquence : ici l'alimentation des cellules est constante ce qui permet d'appliquer un CSPR constant. Cette stratégie peut poser un problème si le volume du réservoir intermédiaire n'est pas suffisant, et provoquerait une rupture en alimentation pour la partie purification. Cette solution a été largement préférée au cours des manipulations. En tenant compte des débits des étapes de production et de purification, le réservoir intermédiaire a pu être correctement dimensionné.



Figure 36 : Schéma des différentes stratégies de maintien du volume constant Soit le débit d'entrée en milieu de culture est piloté (A). Soit le débit de sortie du filtrat ATF est piloté (B).

Sorties

Les principaux flux de sortie sont la purge cellulaire (milieu de culture avec les cellules) et le filtrat du système ATF (milieu de culture sans cellules) (Figure 37).



Figure 37 : Principaux flux de sortie

La purge cellulaire est contrôlée par le logiciel C-Bio grâce à un programme. La pompe fonctionne séquentiellement (Figure 38).

L'idéal serait d'appliquer un débit de purge constant directement liée au taux de croissance µ. Ici ce n'est pas possible car le



débit de purge serait bien trop faible (environ 0,6 mL/min), ce qui provoquerait la sédimentation des cellules dans la canule de purge. Par conséquent, nous ne pourrions éliminer la quantité de cellules désirée. Nous avons donc fait le choix de travailler par pulse de quelques secondes au débit de 61 mL/min.

La fréquence et la durée des pulses sont calculés grâce au taux de croissance des cellules, plusieurs fois par jour, lors du comptage, le programme pouvait être ajusté afin de maintenir la concentration cellulaire constante. Le système ATF (ATF2 – Refine) se compose de plusieurs éléments (Figure 40) :

- Un diaphragme sous le système : quand celui-ci se dégonfle sous l'effet d'une dépression générée par le système de contrôle, la culture est aspirée dans la fibre creuse. Quand le diaphragme se gonfle grâce à une surpression d'air comprimé, la culture est renvoyée dans le bioréacteur.
- Une canule plongeante connecté à un tube flexible permet d'amener la culture jusqu'à la fibre creuse.
- Une cartouche de fibres creuses (CFP-2-E-4X2MA, 56-4102-23 GE Healthcare) constitué de 50 fibres creuses avec un lumen de 1mm et une surface de filtration totale de 850 cm², permet la filtration du filtrat dont le débit est contrôlée grâce à une pompe

péristaltique située en sortie. Le seuil de coupure des pores est de 0,2 µm.

 Un système de contrôle permettant le contrôle des pressions sur le diaphragme afin d'obtenir un flux régulier de va-et-vient (Figure 39).



Figure 39 : Contrôleur Refine



Figure 40 : Schéma du montage des principaux composants de l'ATF et coupe d'une cartouche de fibres creuses.

Le choix du débit en pression et en dépression doit prendre en compte le taux de cisaillement γ dans chaque fibre creuse celui-ci est égal à :

$$\gamma = \frac{4 q}{\pi R^3}$$

Où q est le débit dans le lumen des fibres creuses et R le rayon du lumen.

Par exemple, pour un débit de 0,8 litre par minutes, avec 50 fibres creuses et un lumen de diamètre 1 mm, le taux de cisaillement est de 2709 s⁻¹. Plusieurs études ont fait le lien entre le taux de cisaillement et la baisse du taux de croissance ou de viabilité des cellules, généralement sur des hybridomes, parfois avec des taux de cisaillement faible (1266 s⁻¹). Cependant les cellules CHO semblent particulièrement résistantes, des taux de cisaillement de 3400 s⁻¹ n'ont pas entrainé de dommages cellulaires (Clincke *et al.* 2013). Le débit de 0,8 litres par minutes a donc été choisi.

Réservoir intermédiaire

Avant d'arriver à l'appareil de purification semi-continue, le filtrat est stocké dans un réservoir intermédiaire. Ce réservoir intermédiaire est une bouteille de 10L.

Lorsque le couplage de la production n'avait pas lieu avec l'automate de purification, le filtrat était alors stocké dans une poche Flexboy (Sartorius) de capacité variable puis évacué tous les 3 jours environ.

d. Test de perméabilité

Les tests de perméabilité sont effectués sur un appareil de diafiltration/ultrafiltration Sartoflow Slice DW (Sartorius Stedim Biotech). Différentes pressions transmembranaires sont exercées sur la fibre creuse et les débits d'eau à la sortie du perméat sont calculés. La pente des débits à la sortie du perméat sur la pression transmembranaire exercée permettent de comparer la perméabilité d'une fibre creuse avant et après utilisation. Les manipulations sont réalisées avec de l'eau osmosée.

e. Culture en bioréacteur : Batch et Fed-Batch

Lors des manipulations pour la comparaison des modes de production, des bioréacteurs BioStat B Plus (Sartorius Stedim) ont été utilisés, d'un volume de 2L pour le batch et de 5L pour le Fed-batch. L'ensemencement s'est fait à 0,3 x 10⁶ cellules/mL pour le batch et 0,5 x 10⁶ cellules/mL pour le fed-batch. Pour la culture en batch, aucun ajout nutritionnel ni soutirage du milieu (à l'exception de la prise d'échantillon) n'a été effectué. L'alimentation du fed-batch s'est déroulé selon les préconisations du fournisseur du milieu (Merck Millipore) et sont rapportés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Préconisations du fournisseur Merck Millipore pour l'alimentation d'une culture en fed-batch (Fiche produit CellVento210, Merck Millipore)

Culture day	Addition order	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Cellvento™ Feed-210 (% v/v)	1				3		3		6		6		6		6	
Glucose	2	Monitor daily and maintain at 4g/L														
Cys/Tyr stock solution (% v/v)*	3				0.10		0.15		0.2		0.2		0.2		0.2	

Le pH, la pression en oxygène dissous (pO2) et la température sont contrôlé par un système PID couplé à des sondes. La valeur de la consigne pH 7,1 est contrôlée par ajout de CO₂ par le spargeur du bioréacteur ou par ajout de base (NaOH 0,2 M) dans la cuve du bioréacteur. La consigne pO2 est fixée à 30% de la saturation de l'air, la régulation se fait par ajout d'oxygène soumis à l'ouverture d'une électrovanne pilotée par le système de régulation PID. L'aération est fournie par un spargeur situé au fond de la cuve. La température du milieu de culture est maintenue à 37°C par un système de recirculation d'eau dans une double-enveloppe entourant la cuve.

Deux pâles (une rushton et une marine) fixé sur un axe d'agitation connecté à un moteur permettent l'homogénéité du milieu de culture, la vitesse d'agitation est de 200 rpm.
f. Autoclavage

Avant et après chaque manipulation, le bioréacteur complet (tubing et sonde compris) est stérilisé par autoclavage (121°C, 30 minutes) avec 2L de PBS. A l'issue de l'autoclave, le PBS est retiré par surpression de manière stérile et l'inoculum est injecté stérilement dans le bioréacteur par une canule. Les prélèvements permettant la numération cellulaire et le dosage des métabolites sont permis grâce à une canule plongeante et un système de prélèvement stérile.

Des connecteurs stériles Opta[®] SFT (Sartorius Stedim Biotech) sont autoclavés avec différentes parties du montage puis sont assemblés avant utilisation.

II. Purification

Les tampons sont préparés avec des réactifs Sigma-Aldrich puis filtrés et dégazés, avant chaque utilisation, sur des membranes de nitrates de cellulose 0,2 µm (Merck Millipore) par filtration sous vide. Un conductimètre HI8820N (Hanna Instrument) et un pH mètre HI2210 (Hanna Instrument) ont été utilisés afin d'ajuster et de valider les paramètres des tampons.

a. Sur Akta

Les filtrats utilisées, préalablement filtrés sur membrane de nitrate de cellulose 0,2 µm (Millipore), ont été produits lors des étapes d'optimisation du procédé de production.

Paquage

Le paquage de la résine MabSelect Sure LX (GE Healthcare) a été réalisé dans des colonnes vides Tricorn (Ge Healthcare) suivant les recommandations du fournisseur sur un automate de purification Akta Purifier 100 (Ge Healthcare). Les hauteurs équivalentes à un plateau théorique (HEPT) ainsi que l'asymétrie ont été évaluée par injection d'acétone à 2% (v/v) correspondant à 1% du volume de la colonne, afin de valider le paquage.

Test des conditions de purification

Les conditions de purifications ont été choisies grâce à l'expérience du laboratoire puis testées sur les colonnes paquées au laboratoire sur un Akta Purifier 100 (GE Healthcare). Les fractions de chaque phase (non-retenue, lavage, élution, nettoyage, neutralisation, régénération, équilibration) ont été récoltées puis analysées par SEC-UPLC. Le filtrat utilisé, préalablement filtré sur membrane 0,2 µm, avait été produit en batch pendant l'optimisation des paramètres de production.

DBC

Les études de capacité dynamique de fixation ont été réalisées sur Akta Purifier 100 (GE Healthcare). Pour chaque manipulation, 1,5 L de filtrat a été injecté sur une colonne de 1 mL. Des fractions de 15 mL ont été récoltées puis analysées en SEC-UPLC afin de déterminer la courbe de percée pour chacune des vitesses sélectionnées (300 ; 360 et 420 cm/h).

b. Sur BioSC[®]

Un BioSC[®] de 3^{ème} génération (Novasep) a été utilisé comme automate de purification semi-continue. Lors des étapes d'optimisation, les filtrats utilisées, préalablement filtrés sur membrane de nitrate de cellulose 0,2 μm (Millipore), ont été produits lors des étapes d'optimisation du procédé de production.

Le logiciel BioSC[®] Predict (Novasep) a été utilisée pour les simulations lors du développement de la purification en semi-continue.

c. Purification d'échantillon par protéine pour comparaison mode de production

Afin d'effectuer une comparaison des anticorps produits par différents modes de productions, plusieurs filtrats ont été purifié par chromatographie d'affinité sur protéine A à l'aide d'un automate de purification Akta Purifier 100 (GE Healthcare). Pour le mode de culture par perfusion, les filtrats C10 et C40 ont été obtenus lors des manipulations visant à optimiser les paramètres de production. Le filtrat C10 a été obtenus à partir d'une culture de 10x106 cellules/mL lors de la manipulation « validation du CSPR » au moment où la culture était stabilisée. Le filtrat C40 a été obtenu à partir d'une culture de 40x106 cellules/mL lors de la manipulation de couplage production-purification au moment où la culture était stabilisée. Pour le batch et le fed-batch, les filtrats ont été obtenues à partir des cultures comme expliqué dans le paragraphe matériels et méthodes après centrifugation à 300g pendant 20 minutes puis filtration sur membrane de cellulose 0,2 μm (Millipore).

A chaque fois, 400 mL de filtrat a été injecté sur une colonne de 3 mL de résine MabSelect Sure LX en utilisant les conditions de purification mis au point précédemment. La fraction d'élution contenant l'anticorps a été récolté et ensuite analysés par différentes méthodes pour connaitre les caractéristiques des anticorps produits (glycosylation, variants de charge, agrégation, ...).

III. Analyse

a. UPLC-SEC

Un système UPLC ACQUITY(Waters) a été utilisé pour évaluer le pourcentage d'agrégat et quantifier l'anticorps dans les échantillons. Une colonne analytique de chromatographie d'exclusion stérique (SEC) ACQUITY UPLC BEH 200 a été utilisée afin de séparer les molécules en fonction de leur encombrement stérique. 8 µL d'échantillon a été chargé sur la colonne régulé à 30°C. La phase mobile est composée d'un tampon sodium phosphate 0,1M +Na₂SO₄ 0,1M pH 6,8. L'élution est effectuée à 0,3 mL/min pendant 9 minutes. Les aires des pics sont déterminées par intégration du signal à 215 nm et comparé à une gamme étalon d'anticorps monoclonal humain (source confidentielle).

b. Métabolites : Glucose et Lactate

Les dosages glucose et Lactate ont été réalisés respectivement avec les kits Enzytec fluid D-Glucose (Référence 5140) et Enzytec fluid L-Lactic Acid (Référence 1255). Ces dosages enzymatiques ont été faits en microplaque UV 96 puits, en suivant les protocoles des fournisseurs. Pour la lecture à 340 nm, un lecteur de microplaque SpectroStar Nano (BMG Labtech, Ortenberg, Allemagne) a été utilisé.

c. Glycosylations

Trois méthodes de détermination des glycosylations ont été effectuées.

Méthode 1 : Déglycosylation et perméthylation

L'analyse a été réalisée par la société Protéodynamics. Les échantillons ont été déglycosylés avec de la PNGase F. Les N-glycans ont été purifiés et perméthylés puis analysé en spectrométrie de masse MALDI-TOF (les spectres ont été réalisés en triplicats). Les spectres ont été analysés afin d'établir un profil semi-quantitatif N-Glycanniques pour chaque échantillon.

Méthode 2 : Anticorps digérés, réduits et alkylés

L'analyse a été réalisée par la plateforme Génomique de Bordeaux. Les échantillons ont été digérés en solution par la trypsine pendant la nuit. Les peptides générés ont ensuite été réduits et alkylés puis analysés sur LC/MS Lumos. Les phases mobiles sont composés d'un mélange de solvant A 95/05/0.1 H2O/ACN/HCOOH et B 20/80/0.1 H2O/ACN/HCOOH. L'élution est réalisée avec un gradient linéaire de 4 à 40% de B en 108 minutes. Un volume de 10 µL de peptides est ensuite chargé sur la colonne à 20 µL/min. Les spectres de masse ont été interrogés sous Proteome Discoverer. Les 4 échantillons analysés en triplicat sont compilé en un bilan unique rapportant pour chaque forme de peptide la quantité dans les 12 échantillons.

Méthode 3 : Anticorps dénaturés, déglycosylés et marqués.

L'analyse a été réalisée par les Laboratoires Servier à Croissy sur Seine. Les échantillons ont été dénaturés 70°C pendant 10 minutes puis digérés par PNGase F pendant 1h à 37°C afin de déglycosylés les anticorps. Puis les échantillons ont été marqués pendant 2h à 55°C puis analysés sur une puce à l'aide d'un appareil d'électrophorèse capillaire microfluidique LabChip GX II (Figure 41). Une SDS page est réalisée après les étapes de dénaturations et de déglycosylations pour vérifier que la totalité des échantillons ont réagis (Figure 41).



Figure 41 : Protocole pour analyse des glycans par LabChip

d. Variants de charge

Deux méthodes d'analyses des variants de charge ont été réalisées.

Methode 1 : LabChip

L'analyse des variants de charge ont été réalisés sur LabChip à l'aide d'une puce DNA 5K/RNA/CZE (PerkinElmer) grâce au protocole fournis par le fabriquant. Le protocole du fabriquant Protein charge variant assay user guide a été suivi (Figure 42). L'anticorps présentant un pl théorique situé entre 8,7 et 9,0, le pH du running buffer a été choisi à 6,2 et le protocole de test utilisé est Protein Charge Variant 68s. Le running buffer a été préparé avec 300 µL de pH 5,6 (rouge) et 900 µL de pH 7,2. Les résultats sont donnés sous forme de profil de la fluorescence en fonction du temps, l'intégration de chaque pics est alors possible pour déterminer l'abondance relative de chaque variants.



Figure 42 : Préparation des échantillons pour l'analyse des variants de charge sur LabChip (Image Fournisseur)

Méthode 2 : HPCE

Une deuxième analyse des variants de charge a été réalisée par électrophorèse capillaire cIEF HPCE MAURICE (R&D system). L'analyse a été réalisée par les Laboratoires Servier à Croissy sur Seine. Les échantillons ont été dialysés afin d'être dans un tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,4 avec une membrane de dialyse MWCO 10kDa. Les concentrations des échantillons ont été ajustées à 0,2 mg/mL. Les échantillons ont été analysés avec un kit Pharmalyte 3-10 6%, des marqueurs de pI 8,4 et 9,99 ont été ajoutés. La quantification se fait par intégration des pics d'absorbance UV en fonction du pI. L'intégration de chaque pic est alors possible pour déterminer l'abondance relative de chaque variants.

e. Chromatographie d'interaction hydrophile

L'analyse a été réalisée par les Laboratoires Servier à Croissy sur Seine. L'homogénéité des échantillons a été étudiée par chromatographie d'interaction hydrophile. Une colonne TSKgel HIC, phase butyl, 2,5 µm de taille de particules, 4,6 x 3,5 mm du fabriquant TOSOH BIOSCIENCE a été utilisée. Le tampon A est composé de 1,5 M ammonium sulfate, 25 mM potassium phosphate et le tampon B de 25 mM potassium phosphate, 14% isopropanol. Un gradient de 2-60% de B pendant 15 min est réalisé à un débit de 0,4 mL/min. Les échantillons sont préalablement dialysés en tampon PBS à 1 g/L. Des profils de l'absorbance à 280 nm en fonction du temps sont obtenus, l'intégration des pics permet de comparer les profils des anticorps entre eux.

f. Détermination des températures de dénaturation et d'agrégation par Optim.

L'analyse a été réalisée par les Laboratoires Servier à Croissy sur Seine. Un appareil Optim 1000 (Avacta) est utilisé. La détermination de la température de dénaturation est étudiée grâce à la fluorescence intrinsèque. La température d'agrégation est déterminée par l'étude de la diffusion statique de la lumière. Les échantillons sont préalablement dialysés pour être dans un tampon PBS à 1g/L. La rampe de température va de 25°C à 95°C à une vitesse de 0,3°C par minute.

La détermination de la stabilité thermique (dénaturation) est ensuite possible à partir du profil du barycentre Fluo (en nm) en fonction de la température. Lorsque la courbe du barycentre

Fluo s'élève une première fois ce correspond au Tm1 puis une deuxième élévation correspond au Tm2.

La détermination de la stabilité colloïdale (agrégation) est possible à partir du profil du signal SLS (qui quantifie les agrégats) en fonction de la température. Au moment de la température d'agrégation de l'échantillon, la courbe s'élève, à cette température, l'agrégation commence.

Résultats

I. Adaptation au milieu de culture

a. Différentes adaptations

Au début de cette étude, deux types d'adaptations sur la lignée CHO DP12 ont été réalisées puis comparées :

- CHO DP12 adaptée depuis la lignée adhérente issue de l'ATCC : type bleues
- CHO DP12 adaptée depuis la lignée préalablement adaptée en suspension au milieu
 CDCHO : type vertes

Ce deuxième type de cellules, elles-aussi, issues de l'ATCC, a été adapté en suspension et au milieu CDCHO (Thermo Fisher Scientific) au laboratoire en 2012. Le milieu CDCHO est un milieu chimiquement défini utilisable en industrie, il est nécessaire de le supplémenter en L-Glutamine. L'adaptation est réalisée par passage successif en gardant un ratio minimum de 1/3 ancien milieu-2/3 nouveau milieu. Le milieu CDCHO (+ 8mM L-Gln ; 8% CO2) est progressivement remplacé par un milieu Cellvento110 (4mM L-Gln ; 5% CO2) qui est un milieu enrichi en nutriment. Après 3 passages en Cellvento110, le milieu est progressivement remplacé par le milieu Cellvento210 qui correspond au milieu choisis pour cette étude. Le Cellvento110 et le Cellvento210 sont développés par Merck Millipore spécifiquement pour les lignées DHFR-. D'après le fournisseur, le CellVento110 est plus riche en nutriment, comme le glucose, que le CellVento210. L'adaptation des cellules est donc plus facilitée avec le CellVento110 qu'avec le CellVento210. Pour les productions, le CellVento210 a été préféré, car fourni en grande quantité par la société Merck Millipore. Les cellules issues de cette adaptation sont nommées **« type vertes »**.

Une seconde adaptation a été réalisée à partir des cellules CHO DP12 adhérentes issues directement de l'ATCC. Lors de cette adaptation, l'objectif était d'adapter les cellules en suspension dans le milieu Cellvento210 et maintenir une pression de sélection en début d'adaptation grâce au MTX. Pour se faire le milieu DMEM+SVF (+4mM L-Gln) a été remplacé

progressivement par le Cellvento110, tout en gardant 200 nM de MTX pour la pression de sélection. Au bout de 4 passages, les cellules en suspensions ont été prélevés et centrifugés 5 minutes à 300g, le culot a été repris dans du Cellvento110 200 nM de MTX, le DMEM et le SVF était alors en grande majorité éliminés. Les deux passages suivants ont permis de diminuer progressivement la concentration en MTX, puis les cellules ont été adaptées au milieu Cellvento210 grâce à la méthode utilisés pour le type vert. Les cellules issues de cette adaptation sont nommées « type bleues ».

Une banque maitresse (MCB), puis une banque de travail (WCB), ont été réalisées pour les deux types d'adaptation en vue d'être comparées par la suite.

b. Comparaison des différents types d'adaptations

A partir de la banque de travail, deux cryotubes ont été décongelés, l'un issus de l'adaptation verte et l'autre bleue, afin de faire un suivi de croissance et de production de ces deux adaptations (après amplification pendant 7 jours).



Figure 43 : Courbe de croissance de deux adaptations de cellules CHO au milieu Cellvento210.



Figure 44 : Suivi de la concentration en anticorps pour deux adaptations de cellules CHO au milieu CellVento210.

Les courbes de croissance (Figure 43) sont similaires pour les deux types d'adaptation, par contre le suivi de la production de l'anticorps anti Il-8 montre un profil différent (Figure 44). En effet, la productivité spécifique du type bleu en phase exponentielle est de 0,7 pg/cellules/jour alors que pour le type vert, la productivité spécifique est de 2,5 pg/cellules/jour. En raison de sa meilleure productivité spécifique, le type **vert** est choisi pour réaliser toutes les cultures qui sont présentées dans ce manuscrit. Des études de stabilité de la lignée CHO-DP12 ont déjà été réalisées, leurs résultats montrent que différentes sous-population peuvent avoir des caractéristiques de croissance et de production différentes(Beckmann et al. 2011)(Heinrich et al. 2011).

c. Etude de stabilité de la lignée

Au cours d'une culture en perfusion, il est important qu'il n'y ait pas de dérive de la lignée, aussi bien au niveau de la croissance que de la productivité, ceci afin de garder un état stationnaire (voir bibliographie). Pour vérifier cela, une étude de stabilité de la lignée est réalisée sur 28 jours. La culture est entretenue tous les 3 à 4 jours, un comptage cellulaire est réalisé et le filtrat est analysé pour connaitre la concentration en anticorps (Figure 45 et Figure 46). La durée d'étude a été choisie pour correspondre à la durée moyenne des cultures en perfusion.



Figure 45 : Etude du temps de génération à différents jours pour l'adaptation "verte" utilisée pour les cultures en bioréacteurs. Les écarts types reflètent les écarts sur des triplicats biologiques.



Figure 46 : Etude de la productivité spécifique en anticorps à différents jours pour l'adaptation "verte" utilisée pour les cultures en bioréacteurs. Les écarts types reflètent les écarts sur des triplicats biologiques.

Les résultats montrent une stabilité satisfaisante de la lignée avec un temps de génération d'environ 25h et une productivité spécifique d'environ 3 pg/cellules/jour. Les cellules sont donc compatibles avec une culture en perfusion sur plusieurs semaines.

II. Batch de référence

a. Objectifs

Un batch est un mode de culture discontinu, ne nécessitant ni ajout ni soutirage au court de la culture, excepté pour maintenir les paramètres de culture classique, pH et pO2. L'objectif d'un batch de référence est de connaitre le comportement de la lignée en milieu contrôlé, déterminer les paramètres PID (Proportionnel Intégral Dérivé) et les conditions de cultures (par exemple la vitesse d'agitation moyenne et maximale).

Ces paramètres PID dépendent :

- De la logique du système de régulation (qui peut être différente d'un fournisseur à l'autre)
- Du matériel de culture comme les sondes de mesure ou les actionneurs (temps de réponse, etc...)
- De la dynamique de la culture (métabolisme ou type de cellules par exemple)

Comme le matériel, fourni par la société GPC Bio que nous utilisons est récent et dédié à ce projet il est indispensable d'ajuster ces paramètres PID.

Les paramètres PID représentent des paramètres critiques pour les régulations pH, pO2 et Température. Lors d'un écart entre la mesure et le point de consigne, ces paramètres permettent de définir la manière donc les actionneurs (pompe d'injection de base, vanne d'ouverture de l'air, vanne d'ouverture d'eau chaude, etc...) vont réagir pour atteindre le point de consigne. Il s'agit de chercher un optimum entre la stabilité, la précision, l'amortissement et la rapidité afin d'obtenir une réponse adéquate.

Le paramètre P, pour Proportionnel, est un facteur correctif qui va être appliqué proportionnellement à l'écart mesure/consigne, plus le P est élevé plus la pente est abrupte et donc la réponse forte. Un P trop important peut entrainer de fortes variations (par exemple des sauts de pH important).

Le paramètre I, pour Intégral, est un facteur correctif qui tient compte de l'intégrale de la différence entre la consigne et la valeur mesurée, il permet une régulation plus fine en se rapprochant de la consigne.

Le paramètre D, pour Dérivé, est un facteur correctif qui tient compte de la vitesse à laquelle la valeur mesurée s'approche (ou s'éloigne) du point de consigne. Dans certaines conditions cela permet de réduire les oscillations du système.

Deux autres paramètres sont importants dans notre système de régulation : le temps de cycle et la DeadBand.

- Le temps de cycle correspond à la période de mise à jour du calcul PID (en secondes), un temps de cycle trop long entrainera, au final, un temps de réponses trop long des actionneurs.

- La DeadBand pour « zone morte » est un paramètre dont la définition peut différer suivant le fabriquant du système. En effet, pour la majorité des fabricants (InForce, Sartorius Stedim Biotech, etc...) la deadband représente la zone où il n'y a pas de régulation. Par exemple pour une régulation pH à 7 avec une deadband à 0,5 : le système de régulation n'agira pas entre 6,5 et 7,5. Pour les modèles de bioréacteurs fabriqués par GPC bio comme celui utilisé lors de cette étude, la deadband représente une zone où seuls les trois termes PID agissent, en dehors de la deadband, seul le terme P est pris en compte.

b. Résultats

Lors de la culture, plusieurs arrêts des régulations ont eu lieu à cause d'alarme au niveau de la mesure de la température. Pendant quelques dixième de secondes, le logiciel n'a pas pu récupérer les valeurs de température ce qui a provoqué des arrêts d'urgence. Le problème a été contourné en enlevant l'arrêt d'urgence pour cette sonde et en ne gardant que l'alerte visuelle.

La vitesse d'agitation a été augmentée au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration cellulaire, 150 rpm en début de culture pour finir à 250 rpm sans dommage particulier sur la viabilité cellulaire. Concernant les régulations pH, pO2 et température, la définition des meilleurs paramètres PID a été réalisée en donnant des résultats satisfaisants.

Afin de réguler le pH à 7,1, du NaOH à 0,2M est utilisé pour augmenter le pH et du CO2 est utilisé pour diminuer le pH. Au cours de la culture, et ce malgré une optimisation des paramètres PID, 300 mL de NaOH ont été ajoutés. Afin de réduire ce volume, du NaOH à 0,5 M sera utilisé.

Le graphique suivant permet de constater que le suivi de croissance en erlenmeyer est similaire à celui en bioréacteur, au moins jusqu'à 90h. Toutefois, une différence au niveau de la productivité en anticorps est supposée avec des concentrations en anticorps de 90 mg/L en Erlenmeyer contre 58 mg/L en bioréacteur, pour une concentration cellulaire similaire. Il semble que le comportement de la lignée varie entre les conditions de culture en Erlenmeyer ou en bioréacteur.



Figure 47 : Etude de la croissance des cellules en Erlenmeyer et en bioréacteur pendant le batch de référence (en haut). Etude de la concentration en anticorps dans le filtrat pour des cultures en Erlenmeyer et en bioréacteur pendant le batch de référence.

III. Mise en place du système ATF

Le filtrat est constitué de métabolites produits ou de nutriments non-consommés par les cellules. Parmi ces molécules se trouvent notre molécule d'intérêt : l'anticorps anti-interleukine 8.

La séparation des cellules et du filtrat peut-être réalisé par différents systèmes, ici il a été choisi le système ATF : Alternating Tangential Filtration.

Le système ATF est constitué d'une fibre creuse reliée à un diaphragme. Par dépression provoquée par le contrôleur, le diaphragme se dégonfle, la culture, composée du filtrat et des cellules, est aspirée dans la fibre creuse. Ensuite par surpression, provoquée elle aussi par le contrôleur, le diaphragme se gonfle, ce qui entraine une partie de la culture dans le bioréacteur pendant qu'une partie du filtrat passe à travers les fibres. Ce débit de sortie du filtrat est contrôlé par une pompe en sortie.

Certaines caractéristiques du contrôleur sont à optimiser (Figure 48) :

- La pression et la dépression exercée sur le diaphragme
- Le débit d'air en pression et dépression.

C24 Set Up Screen			C24 Set Point & Process Ranges			
Set Point - LPM		ATF 2	Max P	-Flow SP	01.5	Lpm
Priow UU.8 EFlow 00.8			Min F	P-Flow SP	00.2	Lpm
Batch Data			Max E	E-Flow SP	01.5	Lpm
Number Cycles 000000000			Min B	E-Flow SP	00.2	Lpm
				Max PRV	30.0	Psi
Advanced	Start Up Guide	Reset		Min PRV	-14.7	Psi
Menu	System Stop		Menu	System Stop		Previous

Figure 48 : Paramètres pilotables par le contrôleur Refine

Lors de la stérilisation par autoclave, la canule qui relie la fibre creuse avec le bioréacteur ne plonge pas dans le liquide, cela afin d'éviter de vider le bioréacteur par surpression engendré par l'autoclave. A la sortie de l'autoclave, la fibre creuse, le tubing et la canule sont donc remplis d'air. Une fois l'inoculum dans le bioréacteur, il faut chasser cet air. Cette étape est indispensable avant l'inoculation afin d'éviter un fort stress des cellules dû aux contraintes de cisaillements engendrées par la présence des bulles. Pour cela un débit de pression (Pflow) supérieur au débit de dépression (Eflow) est mis en place. Après plusieurs optimisations, un Pflow de 1,5 LPM et un Eflow de 0,8 LPM présente la meilleure combinaison afin de chasser cet air. Pour accélérer le processus, il est possible de pincer le tubing pendant la phase d'exhaust afin d'éviter aux bulles d'air de revenir dans la fibre creuse.

Une fois que l'air est chassé, les paramètres de culture classiques sont rentrés dans le module afin de permettre à la culture de faire des va-et-vient dans la fibre creuse. Une combinaison Pflow et Eflow à 0,8 LPM entraine des résultats satisfaisants, sur plusieurs jours de cultures, les cellules ne présentent pas de mortalité cellulaire accrue, ce qui est souvent retrouvée avec d'autres système de recyclage cellulaire (voir Bibliographie paragraphe systèmes de recyclage cellulaire).

Avant de pouvoir utiliser une fibre creuse neuve, il est nécessaire de la rincer abondamment afin d'enlever toute trace du glycérol dont sont enduites les fibres. Le glycérol est utilisé ici comme conservateur mais posera problème au moment de la culture. Pour l'éliminer, une grande quantité d'eau est nécessaire. La fibre creuse est connectée à un appareil de ultrafiltration/diafiltration modifié pour l'occasion afin d'utiliser les pompes et les capteurs de pression en amont de la fibre creuse. Après avoir fait passer environ 20 L d'eau en prenant soin de faire passer l'eau dans la sortie rétentat et filtrat, il est nécessaire de faire un test de perméabilité (Figure 49). Ce test permet d'évaluer l'impact de la culture sur la fibre creuse, un colmatage est par exemple possible en présence d'une forte concentration cellulaire ou d'un fort taux de mortalité qui entraine l'accumulation de débris cellulaires.



Figure 49 : Test de perméabilité d'une fibre creuse avant (en bleu) et après utilisation pendant une culture de 20 jours (en orange).

Il s'agit de mesurer le débit de perméat à différentes pressions transmembranaires appliquées à la fibre creuse. Pour cela, il faut ouvrir la sortie perméat et à l'aide d'une pince Hoffman, contrôler la fermeture du rétentat afin d'exercée la pression voulue sur la fibre creuse. A l'aide d'une pompe péristaltique, faire passer de l'eau dans la fibre creuse et regarder le débit en sortie de perméat pour chaque pression. Les moyennes de ces mesures réalisées en triplicats sont présentées dans le graphique ci-dessus. En cas de colmatage ou de « percée » de la fibre creuse, les pentes obtenues avant et après utilisation sont très différentes, ce qui n'a pas été le cas cours des différentes expérimentations.

IV. Détermination du CSPR

a. Objectifs

Le CSPR (Cell Specific Perfusion Rate) est un critère important dans la mise en place d'un procédé perfusion (voir bibliographie). La définition donnée par Ozturk pourrait être traduite par débit d'alimentation spécifique, c'est-à-dire le débit de milieu de culture nécessaire à chaque cellule et chaque jour afin de permettre la croissance et maintenir la viabilité des cellules. Plusieurs techniques sont envisageables pour déterminer l'impact du CSPR en fonction des cellules et du milieu utilisé :

- La perfusion par paliers (ou push-to-low)
- La perfusion sans purge
- La pseudo-perfusion

Divers critères (croissance, métabolisme, production d'anticorps, …) seront étudiés et comparées afin de déterminer l'intérêt de l'utilisation de ces techniques dans la détermination du CSPR. Lors de ces essais, nous avons pris le parti d'utiliser le milieu CellVento210 tel quel, sans supplémentation (ni glutamine, ni glucose supplémentaire).

b. Perfusion par paliers

La perfusion par paliers consiste à réaliser une culture en maintenant constante la concentration cellulaire constante tout en faisant varier le débit d'alimentation (Figure 50). Par conséquent le CSPR diminue lorsque le débit d'alimentation diminue. La variation du débit d'alimentation s'effectue par paliers afin de laisser le temps aux cellules de stabiliser leur métabolisme. Décrite en 2006 par Konstantinov (Konstantinov *et al.* 2006), cette technique est aussi appelée « push to low ».



Figure 50 : Schématisation du système de perfusion sans purge



Figure 51 : Evolution de la concentration cellulaire et du CSPR en fonction du temps. Culture en bioréacteur avec 2L de culture maintenus constant en mode perfusion. Le système de rétention cellulaire utilisé est l'ATF, mis en fonction au jour 5 concomitamment à l'alimentation en milieu. La purge cellulaire est mise en route au jour 7 afin de stabiliser la concentration cellulaire à 10x10⁶ cellules/mL.

La culture s'effectue en bioréacteur. Dans un premier temps, une phase d'amplification cellulaire est nécessaire afin d'atteindre 10x10⁶ cellules/mL, cette phase dure 7 jours. Au 5^{ème} jour, l'alimentation en milieu ainsi que la récolte du filtrat par l'ATF sont mis en place. Les cellules peuvent donc croître sans limitation de nutriment ou accumulation de déchets. Au 7^{ème} jour, une purge des cellules est mise en place pour maintenir la concentration cellulaire constante.

Si l'on effectue un bilan de matière sur les cellules dans le bioréacteur nous avons :

$$\frac{dX}{dt} = \mu \times X - B \times X$$
$$\mu = \frac{\left(\frac{dX}{dt} + B X\right)}{X}$$

Avec B le taux de purge ou « Bleeding rate » (volume de purge / volume de bioréacteur / jour) qui est le rapport entre le débit de purge et le volume du bioréacteur :

$$B = \frac{F_{purge}}{V} \quad (j^{-1})$$

Où F_{purge} est le débit de purge et V le volume du bioréacteur.

Pour obtenir l'équilibre pseudo-stationnaire, c'est-à-dire lorsque variation de la concentration cellulaire $\frac{dx}{dt}$ est nulle, nous obtenons la relation :

$$B = \mu \quad (j^{-1})$$

Ainsi lorsque la concentration cellulaire atteint $10x10^6$ cellules/mL, la purge cellulaire est mise en place. Le taux de purge doit être ajusté au taux de croissance μ . Pendant la première phase, le μ calculé est de 0,44 j⁻¹. Par conséquent il est nécessaire d'appliquer un taux de purge de 0,44 volume de purge/volume de bioréacteur/jour pour maintenir la concentration cellulaire constante dans le bioréacteur. Le volume de culture étant de deux litres, il faut donc purger 880 mL de culture par jour, ce qui donne un débit de purge de 0,6 mL/min.

Concernant l'étude du CSPR, celui-ci était fixé à 200 pL/cell/jour au départ ce qui correspond à un débit d'alimentation de 2,8 mL/min. Le CSPR a ensuite été diminué par paliers de 50 pL/cell/jour, jusqu'à atteindre un CSPR de 50 pL/cell/jour. La culture a été arrêtée car la viabilité

chutait en dessous de 80% lors de ce dernier palier. Chaque jour, des prélèvements ont été effectués sur la culture afin de déterminer la concentration cellulaire et le filtrat a été conservé pour effectuer les analyses ultérieurement.

Le filtrat a été analysé par SEC-UPLC afin de déterminer la concentration en anticorps. La productivité spécifique en anticorps (q_{mAb}) a ensuite pu être calculée.

La productivité spécifique en anticorps (q_{mAb}) tient compte de la variation de la quantité d'anticorps dans le bioréacteur, additionnée à la quantité d'anticorps sortie par l'ATF et la quantité d'anticorps évacué dans la purge.

$$q_{mAb}(\text{pg/cell/jour}) = \frac{1}{X} \left[\frac{dmAb_{Br}}{dt} + (D - B)mAb_{ATF} + B \times mAb_{Br} \right]$$

 mAb_{Br} = Concentration en anticorps dans le bioréacteur

 mAb_{ATF} = Concentration en anticorps à la sortie de l'ATF

- V = Volume du bioréacteur
- B : Taux de purge

En prenant l'hypothèse que la concentration en anticorps à la sortie de l'ATF est identique à la concentration dans le bioréacteur : $mAb_{ATF} = mAb_{Br}$

On obtient :
$$q_{mAb} = \frac{1}{X} \frac{dmAb_{Br}}{dt} + CSPR \times mAb_{Br}$$

A l'état stationnaire, il n'y a pas d'accumulation donc : $\frac{dmAb_{Br}}{dt} = 0$

Donc:
$$q_{mAb} = CSPR \times mAb_{Br}$$

A partir de ces calculs, il est possible de tracer un graphique de la productivité spécifique en anticorps en fonction du CSPR (Figure 52). Ce graphique montre que lorsque l'on diminue le CSPR la productivité spécifique a tendance à légèrement augmenter entre 200 et 100 pL/cell/jour. Cette productivité spécifique en anticorps est d'environ 2 pg/cell/jour. L'augmentation est nette à 50 pL/cell/jour mais elle doit être imputée à la réduction du taux de croissance qui augmente la productivité spécifique jusqu'à la mort de cellules. Ce graphique permet surtout de vérifier l'impact d'une diminution du CSPR sur la productivité spécifique en anticorps (Konstantinov *et al.* 2006). Ici les résultats sont satisfaisants, il n'y a pas de baisse de la production d'anticorps lorsque l'on diminue le CSPR. Si cela n'avait pas été le cas, il aurait fallu trouver un compromis entre l'économie de milieu de culture et la perte de productivité.



Figure 52 : Productivité spécifique en anticorps en fonction du CSPR pendant l'expérience de perfusion par paliers. Culture en bioréacteur avec 2L de culture maintenus constant en mode perfusion avec l'ATF comme système de rétention cellulaire. La purge maintient la concentration cellulaire à 10x10⁶ cellules/mL

L'étude du métabolisme permet de comprendre l'état physiologique des cellules, et d'évaluer l'impact que peut avoir le CSPR sur celles-ci. L'analyse peut être réalisée sur trois niveaux différents. Le premier correspond à la simple analyse de variation de concentrations de substrats ou métabolites. La seconde, plus informative, correspond à l'analyse des vitesses de consommation ou de production. Le rapport de ces vitesses peut aussi être étudié en troisième niveau, il s'agit alors de la comparaison des rendements.

Les concentrations en glucose et lactate dans le filtrat des cultures ont donc tout d'abord été analysées (Figure 3).



Figure 53 : Evolution de la concentration en glucose et en lactate au cours de l'expérience de perfusion par paliers. Culture en bioréacteur avec 2L de culture maintenus constant en mode perfusion avec l'ATF comme système de rétention cellulaire. La purge maintient la concentration cellulaire à 10x10⁶ cellules/mL

De la même manière que pour la production spécifique en anticorps, il est possible de calculer la consommation spécifique en glucose et la production spécifique en lactate :

$$q_{Glc}(en \text{ pg/cell/jour}) = \frac{1}{X} \left[-\frac{dGlc_{Br}}{dt} + (D-B)Glc_{ATF} + B \times Glc_{Br} \right]$$

Εt

$$q_{lac}(en \text{ pg/cell/jour}) = \frac{1}{X} \left[\frac{dLac_{Br}}{dt} + (D - B)Lac_{ATF} + B \times Lac_{Br} \right]$$

En considérant que les concentrations en glucose et en lactate sont similaires dans le bioréacteur, dans le filtrat après ATF et dans la purge, on peut écrire :

$$q_{Glc} = \frac{1}{x} \left(-\frac{dGlc}{dt} + D(Glc_{milieu} - Glc) \right) \text{ et } q_{Lac} = \frac{1}{x} \left(\frac{dLac}{dt} + D \times Lact \right)$$

 q_{Glc} et q_{Lac} sont exprimés en pg/cell/jour. $\frac{dGlc}{dt}$ et $\frac{dLac}{dt}$ correspondent à la variation de la concentration de glucose ou lactate dans le bioréacteur entre deux points successifs. *D* correspond

au taux de dilution. Glc_{milieu} est la concentration en glucose dans le milieu de culture (6,5 g/L ici). *Glc* et *Lac* sont les concentrations en glucose et en lactate au point final.

La variation de la concentration dans le bioréacteur apparait comme négligeable dans le cas de cette expérience ce qui montre que l'on atteint un état quasi-stationnaire.

A partir de ces calculs, il est possible d'étudier les flux métaboliques de glucose et de lactate dans le cadre d'une culture en perfusion (Figure 54 et Figure 55).

Figure 53, nous observons que le glucose résiduel chute à chaque palier de CSPR en raison de la réduction du flux d'alimentation en milieu. Lors du dernier palier (CSPR=50 pl/cell/jour) la concentration en glucose résiduel est quasi nulle. Par contre la concentration en lactate produit dans le milieu ne chute sensiblement qu'au dernier palier (CSPR=50 pl/cell/jour). Ceci semblerait indiquer qu'il n'y ait une modification du métabolisme uniquement sur le dernier palier. Cependant, lorsque l'on étudie les vitesses et que l'on tient compte du taux de dilution, nous constatons que la diminution du CSPR entraine une diminution des flux de consommation du glucose et de production du lactate à chaque palier de CSPR (Figure 54). Cette observation a déjà été faite par Ozturk (Ozturk 1996). Au CSPR de 50 pl/cell/day, q_{Lact} n'est pas stabilisée. Il est probable que les cellules se trouvent en limitation de glucose et modifient leurs flux métaboliques pour consommer le lactate (Young 2013).En effet, pour ce CSPR, la concentration en glucose résiduel est inférieure à 0,1 g/L.

La Figure 55 permet de montrer que les chutes du q_{Glc} et du q_{Lac} sont effectivement proportionnelles ($q_{Lac} = 0,75 \ q_{Glc} - 162$). L'équation de la régression linéaire permet d'obtenir plusieurs informations :

$$q_{Lac} = 0,75 \ q_{Glc} - 162$$

- Le rendement maximal de conversion de glucose en lactate : $Y \frac{Lac}{Glc} max = 0,75$. Au maximum, 75% du glucose peut être convertit en lactate, pour ces cellules et ce milieu de culture.
- Un facteur b correspondant au glucose utilisé pour l'augmentation de la biomasse et le maintien de la viabilité. Ici ce facteur est égal à 162 pg/cell/jour.
- Il est possible de calculer une valeur théorique de q_{Glc} où q_{Lac} est nulle, c'est-à-dire une condition où le glucose consommé ne génère pas de lactate. Ici cette valeur est de 216 pg/cell/jour.

Des résultats similaires avaient été obtenus par Ozturk sur une lignée CHO : qLac = 0,75 x qGlc -83 (Ozturk 1996) (ce qui donne, lorsque q_{Lac} est nulle, q_{Glc} égale à 111 pg/cell/jour).



Figure 54 : Productivité spécifique en glucose et consommation spécifique en lactate en fonction du CSPR pour l'expérience de perfusion par paliers. Culture en bioréacteur avec 2L de culture maintenus constant en mode perfusion avec l'ATF comme système de rétention cellulaire. La purge maintient la concentration cellulaire à 10x10⁶ cellules/mL



Figure 55 : Relation entre la consommation spécifique de glucose et la production spécifique de lactate. Culture en bioréacteur avec 2L de culture maintenus constant en mode perfusion avec l'ATF comme système de rétention cellulaire. La purge maintient la concentration cellulaire à 10x10⁶ cellules/mL

Il est ensuite possible d'étudier le rapport des vitesses métabolique spécifique. Dans le cas du ratio de la vitesse de production du lactate sur la vitesse de consommation, le rendement $Y \frac{Lac}{Glc}_{apparent}$ en fonction du CSPR est tracé en Figure 56. Le rapport $Y \frac{Lac}{Glc}_{apparent}$ est similaire pour un CSPR entre 100 et 200 pL/cell/jour, de l'ordre de 50%. Ce qui signifie que 50% du glucose est transformé en lactate. Pour un CSPR de 50 pL/cell/jour, le rapport $Y \frac{Lac}{Glc}_{apparent}$ chute, le glucose (puis le lactate) est alors majoritairement utilisé par les cellules pour maintenir la viabilité cellulaire. En effet, en limitation de glucose, les cellules tentent de maintenir leur intégrité. Ici l'alimentation en milieu est trop faible, d'où la chute de la viabilité cellulaire pour un CSPR de 50 pL/cell/jour.



Figure 56 : Rendement du lactate sur le glucose en fonction du CSPR. Culture en bioréacteur avec 2L de culture maintenus constant en mode perfusion avec l'ATF comme système de rétention cellulaire. La purge maintient la concentration cellulaire à 10x10⁶ cellules/mL

La perfusion par paliers est la méthode la plus représentative des conditions de perfusion finales. En effet les essais sont effectués en bioréacteur et en état stationnaire. Cependant sa mise en place et la durée de l'expérimentation sont très chronophages, surtout si on multiplie les différents paliers de CSPR.

En effet, afin d'atteindre un état stationnaire il est indispensable de prolonger les paliers sur plusieurs jours. Cette durée dépend du temps de résidence et par conséquent plus on abaisse le CSPR plus le temps de résidence augmente. Ainsi pour un CSPR de 50 pl/cell/jour à une concentration de $10x10^6$ cellules/ml le temps de résidence (τ =1/D) est de 2 jours. Si l'on souhaite attendre 3 temps de résidence pour obtenir la stabilisation de l'état stationnaire ce palier doit alors être maintenu 6 jours au minimum.

Nous avons envisagé d'autres méthodes de détermination du CSPR pour définir plus rapidement des conditions qui pourront ensuite être testées en perfusion par paliers. Moins de paliers seront alors nécessaires. Cependant il est important de vérifier si ces méthodes sont de bons modèles de la perfusion par paliers. Parmi ces méthodes, la perfusion sans purge permet l'utilisation d'un environnement contrôlé en bioréacteur.

c. Perfusion sans purge cellulaire

La perfusion sans purge consiste à alimenter le bioréacteur avec un débit constant tout en laissant augmenter la densité cellulaire (Figure 57). Ainsi, au fur et à mesure de la culture, le débit d'alimentation spécifique, le CSPR, diminue (Figure 58). Quand le débit d'alimentation spécifique devient trop faible, une augmentation de la mort cellulaire entraine la fin de la manipulation.



Figure 57 : Schématisation du système de perfusion sans purge cellulaire (débit d'alimentation : 1,4 mL/min ; Taux de dilution D : 1 RV/jour)

Ici, la concentration cellulaire évolue au cours de la manipulation, il n'y a pas de purge cellulaire. Cependant, le taux de croissance μ est un critère important en perfusion et est donc suivi tout au long de l'expérience. Après une première phase de latence, le μ se stabilise à 0,43 j⁻¹ (contre 0,44 j⁻¹ précédemment) et ce jusqu'à ce que le glucose vienne à manquer.

De la même manière que pour la perfusion par paliers, des prélèvements sont effectuées afin d'analyser les principaux métabolites ainsi que la production d'anticorps.



Figure 58 : Evolution de la concentration cellulaire, de la concentration en anticorps et du CSPR en fonction du temps. Culture en bioréacteur avec 2L de culture maintenus constant en mode perfusion avec l'ATF comme système de rétention cellulaire, sans purge cellulaire.

Après la mise en place de la perfusion, les cellules consomment le glucose jusqu'à l'épuisement, malgré l'ajout en continu de milieu. Le débit d'alimentation devient alors insuffisant. Les cellules, après épuisement du glucose, consomment le lactate, qui petit à petit est épuisé à son tour et on observe une chute brutale de la viabilité.

En parallèle, la productivité spécifique en anticorps est étudiée en fonction du CSPR (Figure 59). Ici aussi la productivité spécifique est de l'ordre de 2 pg/cell/jour. L'évolution du CSPR semble avoir peu d'influence sur celle-ci. La productivité des cellules en anticorps ne semble donc pas affectée par la réduction du débit d'alimentation en milieu.



Figure 59 : Productivité spécifique en anticorps en fonction du CSPR pendant l'expérience de perfusion sans purge. Culture en bioréacteur avec 2L de culture maintenus constant en mode perfusion avec l'ATF comme système de rétention cellulaire, sans purge cellulaire.

De la même manière que pour la technique précédente, il est possible d'étudier les productivités et consommations spécifiques en métabolites. Le graphique de la consommation spécifique de glucose et la productivité de lactate en fonction du CSPR a une allure identique à la Figure 54 de la perfusion par paliers (Figure 60). A un CSPR de 150 pL/cell/jour, qGlc est égale à 700 pg/cell/jour en perfusion sans purge contre 876 pg/cell/jour en perfusion par paliers. Si nous comparons les qLac, nous trouvons alors 300 pg/cell/jour pour la perfusion sans purge et 456 pg/cell/jour pour la perfusion par paliers à un CSPR de 150 pL/cell/jour.



Figure 60 : Productivité spécifique en glucose et consommation spécifique en lactate en fonction du CSPR pour l'expérience de perfusion sans purge. Culture en bioréacteur avec 2L de culture maintenus constant en mode perfusion avec l'ATF comme système de rétention cellulaire, sans purge cellulaire.



Figure 61 : Relation entre la consommation spécifique de glucose et la production spécifique de lactate. Culture en bioréacteur avec 2L de culture maintenus constant en mode perfusion avec l'ATF comme système de rétention cellulaire, sans purge cellulaire.

Il est possible de calculer une valeur théorique de q_{Glc} où q_{Lac} est nulle, soit q_{Glc} =67 pg/cell/jour (contre 216 pg/cell/jour en perfusion par paliers) (Figure 61). En perfusion sans purge le rendement maximal semble être de 0,43, ce qui veut dire que 43% du glucose peut être transformé en lactate (contre 0,75 en perfusion par paliers). Le facteur b, correspondant au

glucose utilisé pour l'augmentation de la biomasse et le maintien de la viabilité, est égal à 29 pg/cell/jour (contre 163 pg/cell/jour en perfusion par paliers).



Figure 62 : Rendement du lactate sur le glucose en fonction du CSPR. Culture en bioréacteur avec 2L de culture maintenus constant en mode perfusion avec l'ATF comme système de rétention cellulaire, sans purge cellulaire.

Comme en perfusion par paliers, le rendement $Y \frac{Lac}{Glc}$ apparent a été étudié (Figure 62). Il est stable à 40% jusqu'à un CSPR de 60 pL/cell/jour (50% en perfusion sans purge). Ensuite à partir de 30 pL/cell/jour, on observe une chute de ce ratio à cause de la limitation en glucose et du changement de métabolisme des cellules (consommation de lactate).

Ces résultats sont à analyser avec précaution car ne représentent les données d'une seule expérimentation (en perfusion sans purge) et seront à répéter. Cependant il semblerait que la perfusion sans purge donne des résultats assez similaires à la perfusion par palier, en terme de productivité en anticorps et de métabolisme des cellules. Il semblerait par ailleurs que les flux spécifiques de glucose et de lactate soient légèrement moins élevés en perfusion sans purge, comparé à la perfusion par paliers. Le principal inconvénient de cette technique est de ne pas permettre la stabilisation du CSPR, donc de ne pas se placer en état stationnaire. Ainsi il faut parfois plusieurs heures avant de voir les effets d'une sous-alimentation sur la population cellulaire d'un bioréacteur. C'est aussi pour cela que la manipulation a pu se poursuivre jusqu'à atteindre un CSPR technique est plus rapide que la perfusion par paliers pour tester des conditions d'alimentation sur une culture en bioréacteur.

Une dernière technique est utilisable pour cribler plus de conditions et effectuer une première sélection : c'est la pseudo-perfusion.

d. Pseudo-perfusion

La pseudo-perfusion se déroule en environnement peu contrôlé (exemple : un incubateur CO₂). Chaque jour, le manipulateur ajuste la concentration cellulaire et renouvelle le milieu pour que les cellules soient au CSPR voulu. Les manipulations sont faites en spin tube (Tube Falcon avec une membrane permettant la diffusion des gaz par le bouchon) (Figure 63). Afin d'atteindre un état pseudo stationnaire, il faut attendre plusieurs temps de résidence. Ici nous avons choisis d'attendre un minimum de 3 temps de résidence par conditions. Différentes conditions ont été testées en parallèle :

- 2 températures : 32°C et 37°C
- 4 CSPR : 25 ; 50 ; 100 et 150 pL/cell/jour



Figure 63 : Schématisation de la manipulation de pseudo-perfusion, en haut à droite : un spin tube avec son bouchon permettant la diffusion des gaz.

Afin de simuler une alimentation en perfusion en bioréacteur, il a fallu déterminer le taux de renouvellement à effectuer pour simuler un taux de dilution donné (et donc un CSPR). Par exemple pour un taux de dilution de 1 volume renouvelé/volume de culture/jour, il ne faut pas

remplacer 100% du milieu en 24h. En effet, dans le cas d'un bioréacteur en perfusion, en 24h pour ce taux de dilution et contrairement à ce que l'on pourrait penser, le milieu n'est pas renouvelé en totalité (Figure 64).



*Figure 64 : Evolution de la concentration en milieu neuf dans un bioréacteur, avec un taux de dilution de 1 volume renouvelé/volume de bioréacteur par jour. Graphique d'après (*Chotteau 2013)

A partir d'un bilan de matière, il est possible de connaitre le taux de renouvellement pour chaque taux de dilution et donc chaque CSPR. En prenant comme hypothèse le cas d'un bioréacteur parfaitement mélangé où la concentration en substrat dans le bioréacteur est égale à la concentration de substrat en sortie. Nous avons :

Donc :

Débit x [Substrat]_{entrée} = Débit x [Substrat]_{sortie} + Volume bioréacteur x
$$\frac{d[Substrat]}{dt}$$

$$F \ge C_0 = F \ge C + V \frac{dC}{dt}$$

La concentration en substrat de sortie C évolue au cours du temps. En isolant $\frac{dC}{dt}$, on obtient :

$$\frac{F}{V}(C_0 - C) = \frac{dC}{dt}$$

Il est alors possible d'intégrer le temps de 0 à t et la concentration de 0 à c :

$$\frac{F}{V} \int_0^t dt = \int_0^c \frac{dC}{C_0 - C}$$

 \leftrightarrow

$$\frac{F}{V}t = -\ln\frac{C_0 - C}{C_0}$$

$$C_0 \times e^{\frac{-F}{V}t} = C_0 - C$$

 \leftrightarrow

 \leftrightarrow

$$C = C_0 [1 - e^{\frac{-F}{v}t}]$$

Sachant que : Taux de dilution $D = \frac{D \acute{e} bit}{Volume} = \frac{F}{V}$, alors :

$$\mathbf{C} = C_0 \left[1 - e^{-t \times D} \right]$$

Et :

$$\frac{C}{C0} = 1 - e^{-t \times D}$$

A partir de cette équation, il est possible de déterminer le taux de renouvellement pour chaque taux de dilution et donc chaque CSPR.

On a :

t= 1 jour (le renouvellement est effectué toutes les 24h)

Donc, par exemple :

Pour D = 1 j⁻¹:

$$\frac{C}{C0} = 1 - e^{-1 \times 1} = 1 - e^{-1} = 1 - 0,368 = 0,63 = 63\% \ de \ renouvellement$$
Tableau 6: Pourcentage	de milieu à renouveler	tous les jours selon i	le taux de dilution D
5		5	

Taux de dilution D (j ⁻¹)	% de milieu renouvelé par jour
0,25	22 %
0,5	39 %
1	63 %
1,5	78 %

Chaque jour, le taux de renouvellement voulu est appliqué aux différents spins tube. Chaque culture est réalisée en triplicats.

Température : 32°C

L'intérêt d'une culture à 32°C est de réduire la croissance des cellules et donc la perte en anticorps dû à une purge excessive. L'expérience a montré qu'à cette température le taux de croissance était proche de 0 et que la productivité en anticorps était largement réduite par rapport à 37°C. Grâce au μ très faible, il serait possible d'avoir un taux de purge très faible, mais on risquerait alors d'accumuler certains déchets métaboliques comme le lactate ou l'ammoniaque qui peuvent avoir un effet délétère sur les cellules à fortes concentrations.

Il apparait donc plus adapté de faire un test à une température légèrement plus importante (comme 35°C par exemple) dans une prochaine étude.

Température 37°C

A 37°C, les 4 CSPR ont été testés mais seul trois présentent des résultats analysables. En effet, à un CSPR de 25 pL/cell/jour, les cellules ont présenté une mortalité importante au bout de 4 jours. L'alimentation est donc apparue comme limitante dans ce cas.



Figure 65: Evolution des taux de croissance pour chaque CSPR à différents jours de culture. Culture en spin tube renouvelée chaque jour à différents taux de renouvellement, à 37°C.

La stabilisation du taux de croissance est plus longue quand le CSPR est bas. Le taux de croissance est similaire pour les trois CSPR étudiés et est d'environ 0,55 j⁻¹ (contre 0,43 j⁻¹ en perfusion par paliers et 0,44 j⁻¹ en perfusion sans purge). Cette différence peut s'expliquer par l'absence de régulation (Température, pH, pO₂, ...) qui peut favoriser la croissance pour certaines lignées cellulaires. En effet, l'ajout de NaOH augmente l'osmolarité et pourrait avoir une influence sur le métabolisme des cellules et donc sur leur taux de croissance.

Ici les calculs sont faits à partir d'équation en batch. On étudie l'évolution entre deux renouvellements de milieu (réalisés tous les 24h). Les deux derniers points sont pris en compte pour étudier des environnements plus ou moins stabilisés. Le point 6B-7A correspond à l'évolution entre le jour 6 et le jour 7. Le point 7A-8B correspond à l'évolution entre le jour 7 et le jour 8. Pour calculer la productivité spécifique en anticorps, l'équation suivante est utilisée :

$$q_{mAb} = \frac{1}{X} \left(\frac{\Delta \ mAb}{\Delta t} \right)$$

Où X est la concentration cellulaire au point final, ΔmAb est la difference de concentration en anticorps entre deux temps et Δt la différence entre les deux temps.



Figure 66: Productivité spécifique en anticorps en fonction du CSPR. Culture en spin tube renouvelée chaque jour à différents taux de renouvellement, à 37°C.

Le graphique de l'évolution de la productivité spécifique en anticorps en fonction du CSPR semble indiquer que pour le point 7B-8A il y a une diminution de la productivité en anticorps lorsque le CSPR diminue, ce qui n'est pas le cas pour le point 6B-7A qui est plutôt stable. Les valeurs moyennes sont d'environ 2 pg/cell/jour ce qui correspond aux valeurs en perfusion par paliers et en perfusion sans purge. Cependant ici, il semblerait que la diminution du CSPR ait une influence néfaste sur la productivité cellulaire

L'étude des principaux métabolites a ensuite été effectuée. Les équations utilisées sont les suivantes :

$$q_{Glc} = \frac{1}{X} \left(-\frac{\Delta Glc}{\Delta t} \right)$$
$$q_{Lact} = \frac{1}{X} \left(\frac{\Delta Lact}{\Delta t} \right)$$

Où X est la concentration cellulaire au point final, $\Delta Glc \ et \ \Delta Lac$ sont les differences de concentration en glucose ou lactate entre deux temps et Δt la difference entre les deux temps.



Figure 67 : Productivité spécifique en glucose et consommation spécifique en lactate en fonction du CSPR. Culture en spin tube renouvelée chaque jour à différents taux de renouvellement, à 37°C.

Les flux spécifiques en glucose et en lactate sont globalement plus faibles que pour les deux autres techniques (q_{Glc}, pour un CSPR de 150 pL/cell/jour, est de 800 pg/cell/jour maximum en perfusion sans purge et perfusion par paliers, contre 300 pg/cell/jour ici maximum). Cependant la tendance de la courbe est similaire. En effet, on observe une chute des productivités spécifiques lorsque l'on diminue le CSPR.



Figure 68 : Relation entre la consommation spécifique de glucose et la production spécifique de lactate. Culture en spin tube renouvelée chaque jour à différents taux de renouvellement, à 37°C.

Le rendement maximal de conversion du glucose en lactate est de 48% pour cette technique (43% pour la perfusion sans purge, 70% pour la perfusion par paliers) (Figure 68). Le facteur b est ici de 68 pg/cell/jour. Le rendement apparent $Y \frac{Lac}{Glc}_{apparent}$ est de 20% (40% pour la perfusion sans purge et 50% pour la perfusion par paliers) (Figure 69).

De manière générale, les vitesses spécifiques de consommation et de production, ainsi que les rendements sont plus faibles pour cette technique. Cependant, le taux de croissance est supérieur et la productivité spécifique en anticorps est du même ordre.

Les différences de résultats s'expliquent essentiellement par l'environnement noncontrôlée des spin-tubes, ainsi que par le protocole de manipulation. En effet, entre deux renouvellements, les cellules peuvent changer de métabolisme à cause d'une limitation en glucose suivi d'une consommation du lactate. Il est donc tout à fait normal d'obtenir des flux spécifiques trois fois plus faibles. Puis après le renouvellement, elles doivent se réadapter à une forte concentration en substrat. De plus, les centrifugations et les temps de manipulation (en dehors de l'incubateur) impliquent une différence de comportement des cellules par rapport à une culture parfaitement contrôlée en bioréacteur. Toutefois, cette technique nous a permis de nous rendre compte plus rapidement de l'impact de certains critères. Par exemple, cette technique nous a montré qu'une température de culture à 32°C engendrait un µ très faible ainsi qu'une baisse de la productivité spécifique en anticorps.



Figure 69 : Rendement apparent du lactate sur le glucose en fonction du CSPR. Culture en spin tube renouvelée chaque jour à différents taux de renouvellement, à 37°C.

e. Tableau récapitulatif

	Perfusion par paliers	Perfusion sans purge	Pseudo-perfusion
Temps (en prenant en compte la phase d'amplification).	40 jours	15 jours	20 jours
Etat stationnaire	oui	non	Pseudo état stationnaire
Environnement bioréacteur	oui	oui	non
Nombre de conditions criblées	1 critère (CSPR)	1 critère (CSPR)	Multicritères (CSPR, température,)
μ (en j ⁻¹)	0,44	0,43	0,55
qmAb (pg/cell/jour)	2	2	2 en moyenne mais diminue quand le CSPR diminue
CSPR limitant	50	25	50
qGlc (pg/cell/jour) pour un CSPR de 150 pL/cell/jour	800	700	300
qLac (pg/cell/jour) pour un CSPR de 150 pL/cell/jour	600	300	80
Y Lac Glc apparent	50-60%	40%	20%

f. Conclusion

En conclusion, les trois techniques permettent de déterminer un CSPR minimale avec plus ou moins d'efficacité.

La perfusion par paliers est la méthode la plus proche des conditions finales de culture. Cette technique permet donc d'avoir les résultats les plus proches de la réalité d'une culture en continu. Toutefois, avec 40 jours de manipulation (incluant l'amplification cellulaire), elle est chronophage. De plus, elle ne permet de cribler qu'un seul critère par manipulation.

La perfusion sans purge est une méthode intermédiaire permettant de se placer en condition contrôlée mais sans état stationnaire. Cette méthode permet d'obtenir un µ similaire à celui obtenu en perfusion par paliers, avec un comportement de la productivité en anticorps (qmAb) en fonction du CSPR là aussi similaire à la perfusion par paliers. Elle pourrait être utilisée après avoir réalisée un premier criblage (en pseudo-perfusion par exemple) afin de réduire le nombre de conditions.

La pseudo-perfusion est une méthode de criblage qui permet de tester une multitude de conditions. C'est une méthode de choix lorsque l'on veut tester plusieurs températures ou encore plusieurs complémentations d'un milieu de culture.

Cependant nous observons certaines déviations par rapport à la perfusion par paliers, principalement sur le taux de croissance et les flux de glucose et de lactate. Ces derniers sont fortement impactés en raison de l'intervalle de 24h entre deux renouvellements de milieu. En effet pendant cette durée le glucose peut être complétement épuisé, le lactate produit puis consommé. Afin de se rapprocher des conditions de perfusion, il serait préférable d'effectuer un renouvellement du milieu toutes les 12h plutôt que toutes les 24h. L'inconvénient principal est de ne pas être en environnement contrôlée ce qui peut influencer les résultats. Cependant, en première intention, la pseudo-perfusion est une technique intéressante.

V. Validation du CSPR

D'après le précédent chapitre, le CSPR limitant apparait comme être 50 pL/cell/jour. Pour permettre d'avoir une certaine marge de sécurité, les expérimentations suivantes seront réalisées à un CSPR de 100 pL/cell/jour.

Jusqu'ici, l'étude de ce CSPR a été effectuée à 10x10⁶ cellules/mL (en perfusion par paliers et en pseudo-perfusion). Dans de telles conditions, on a :

- Débit Alimentation : 1,4 mL/min \rightarrow 2L par jour
- Débit purge : 0,6 mL/min \rightarrow 860 mL par jour
- Débit sortie ATF : 0,8 mL/min \rightarrow 1,14 L par jour \rightarrow 57% du filtrat est valorisable

Lorsque l'on stabilise à une concentration cellulaire plus élevée, le débit de purge ne change pas (car le μ ne change pas), ce qui permet d'avoir un débit de sortie ATF plus important (car le débit d'entrée augmente pour garder le même CSPR). Par exemple à 20x10⁶ cellules/mL, on a :

- o Débit Alimentation : 2,8 mL/min \rightarrow 4L par jour
- o Débit purge : 0,6 mL/min \rightarrow 860 mL par jour
- Débit sortie ATF : 2,2 mL/min → 3,17 L par jour → 79% du filtrat est valorisable

Une concentration cellulaire plus élevée permet de valoriser un pourcentage de filtrat plus important. C'est le cas aussi pour une stabilisation à 40×10^6 cellules/mL :

- o Débit Alimentation : 5,6 mL/min \rightarrow 8L par jour
- Débit purge : 0,6 mL/min \rightarrow 860 mL par jour
- Débit sortie ATF : 5 mL/min → 7,2 L par jour → 90% du filtrat est valorisable

Cette dernière condition permet de valoriser jusqu'à 90% du filtrat total.

a. Description de l'expérience

L'expérience de validation du CSPR se déroulera en plusieurs phases Figure 70 :

- <u>Mode batch</u>: pendant 7 jours la concentration cellulaire augmente jusqu'à atteindre 10x10⁶ cellules par mL. A partir du 5^{ème} jour, le système de perfusion est mis en place et alimente les cellules à environ 150 pL/cell/jour.
- <u>Stabilisation à 10x10⁶ cellules par mL</u>: L'alimentation est réglée sur une alimentation de 100 pL/cell/jour (1,4 mL/min). La purge est débuté par pulse dont le débit final correspond à 0,6 mL/min (voir Matériels et méthodes).
- <u>Augmentation cellulaire</u>: La purge est arrêtée. L'alimentation est réglée pour suralimenter les cellules et éviter de passer en dessous de 100 pL/cell/jour. Les changements étant manuels, ils sont effectués deux fois par jour après un comptage cellulaire.
- <u>Stabilisation à 20x10⁶ cellules par mL</u>: L'alimentation est réglée sur une alimentation de 100 pL/cell/jour (2,8 mL/min). La purge est effectué par pulse dont le débit lissé correspond à 0,6 mL/min (voir Matériels et méthodes).
- <u>Augmentation cellulaire</u>: La purge est arrêtée. L'alimentation est réglée pour suralimenter les cellules et éviter de passer en dessous de 100 pL/cell/jour. Les changements étant manuels, ils sont effectués deux fois par jour après un comptage cellulaire.
- <u>Stabilisation à 40x10⁶ cellules par mL</u>: L'alimentation est réglée sur une alimentation de 100 pL/cell/jour (5,6 mL/min). La purge est effectué par pulse dont le débit lissé correspond à 0,6 mL/min (voir Matériels et méthodes).

Le reste des paramètres de production (inoculation, régulation, …) sont identiques à ceux mis en place dans les expérimentations précédentes. La culture se fait à 37°C, pH 7,1 et pO2 régulé à 30%.



Figure 70 : Evolution de la concentration cellulaire et de la viabilité pour l'expérience de validation du CSPR. Culture en bioréacteur avec 2L de culture maintenus constant en mode perfusion. Le système de rétention cellulaire utilisé est l'ATF, mis en fonction au jour 5 concomitamment à l'alimentation en milieu. La purge cellulaire est mise en route au jour 7 afin de stabiliser la concentration cellulaire à 10x10⁶ cellules/mL. Puis arrêté au jour 13 puis repris au jour 17 pour stabiliser la concentration cellulaire à 20 x10⁶ cellules/mL. Au jour 20, une rupture du tuyau d'alimentation a entrainé l'arrêt brutal de la manipulation.

b. Résultats

La manipulation s'est bien déroulé à 10x10⁶ cellules par mL, la viabilité était correcte (supérieure à 95%) et la concentration en anticorps s'est stabilisé à 30 µg/mL (ce qui donne une productivité spécifique de 3 pg/cell/jour, cohérent avec les résultats du chapitre précédent).

La stabilisation à 20×10^6 cellules par mL a été effectuée après 3 jours d'arrêt de la purge. La concentration cellulaire est stable, la viabilité est correcte et la concentration en anticorps s'est stabilisée en moyenne à 32 µg/mL. Toutefois au 20^{eme} jour, une rupture du tuyau d'alimentation (au niveau de la tête de pompe) a entrainé l'arrêt brutal de la manipulation. Malgré l'utilisation de matériaux spécifiques pour les tuyaux dans les têtes de pompe, ainsi que le déplacement du tuyau tous les deux jours au niveau de la tête de pompe pour limiter l'usure, cela n'a pas été suffisant.

Une inspection journalière plus précise du tuyau passant dans les têtes de pompe sera effectuée pour les expérimentations futures.

c. Conclusion

Malgré l'interruption précoce de la manipulation, différentes observations ont pu être faites. Tout d'abord, un CPSR de 100 pL/cell/jour a été maintenu avec succès pendant 6 jours (pour la 1^{ère} stabilisation) et 3 jours (pour la 2^{ème} stabilisation avant arrêt brutal) et ce, pour 2 concentrations cellulaires (10x10⁶ cellules par mL et 20x10⁶ cellules par mL). Le CSPR de 100 pL/cell/jour est donc validé.

Le filtrat récolté à chaque phase a été stocké en vue de son utilisation pour mettre au point



la partie purification (voir ci-après) (Figure 71).

Figure 71 : Système de production en perfusion avec une alimentation par poche (en bas sur le chariot) et une sortie du filtrat en poche (en haut sur le chariot). Le filtrat stocké ensuite en chambre froide en vue de son utilisation pour mettre au point la partie purification. Des connecteurs stériles sont situées à plusieurs endroits du système (en blanc à côté de la poche du haut sur le chariot) ce qui permet de pouvoir changer de poche de manière totalement stérile en cours d'expérimentation.

VI. Purification

a. Paquage

Pour les étapes de purification, la résine choisie est la MabSelect Sure LX (GE Healthcare), une résine d'affinité utilisant la Protéine A. Cette résine est plus résistante à la soude, composé utilisé dans l'étape de régénération, et sa capacité de fixation est plus importante que les autres résines protéine A sur le marché. Ces qualités en font une des résines les plus utilisées en industrie malgré son prix (10 000€ le litre environ).

L'étape préliminaire à la purification est le paquage de la colonne, ce qui consiste à mettre la résine dans une colonne afin de pouvoir la connecter à un appareil de chromatographie. Il existe des colonnes pré-paquées directement chez le fabriquant mais le catalogue des longueurs et diamètres de colonnes n'est pas exhaustif. Pour avoir plus de liberté dans le choix de ces critères, il est intéressant de paquer ses colonnes au laboratoire.

A la suite du paquage, il est impératif de vérifier l'efficacité de la colonne. Pour cela, une molécule (ici l'acétone) est injectée sur la colonne et le pic, qui doit être unique, est étudié (Figure 72). Des informations essentielles en sont retirées, le nombre de plateaux théoriques (N) et l'asymétrie. Les colonnes sélectionnées doivent avoir un nombre de plateaux théoriques compris entre 1000 et 3000 plateaux/mètres, et une asymétrie comprise entre 0,8 et 1,2. Dans un procédé de purification en continu, les colonnes paquées misent en série doivent être le plus homogène possible car leurs comportements doivent être identiques pendant la durée de la purification.

Neuf colonnes paquées (1 mL, 4,5 cm de long, 0,6 cm de diamètre) ont présentés ces caractéristiques et ont donc été sélectionnées pour réaliser les manipulations suivantes.

Par la suite, six colonnes de 3,5 mL ont elles aussi été paquées avec les mêmes résultats.



Figure 72 : Chromatogramme de l'injection d'acétone sur une colonne Mabselect Sure LX afin de déterminer les caractéristiques de la colonne. Encadré en orange, les valeurs HEPT et asymétrie les plus importantes à suivre.

b. DBC

Le paramètre le plus important à connaitre sur la résine pour un procédé en continu est la capacité dynamique de fixation (DBC en anglais). Ce paramètre correspond à la quantité de protéines d'intérêt (ici l'anticorps) qu'un volume de résine est capable de fixer à un débit donné. Sur la fiche d'information fournie par le fabricant, une estimation de la DBC est fournie mais il est nécessaire de faire l'expérience avec le filtrat et l'anticorps pour se positionner au plus proche des paramètres de l'expérience finale. Les expériences suivantes ont donc été faites avec le filtrat de la manipulation « Validation du CSPR ».

Pour se faire, la colonne est connectée sur un Akta purifier et environ 1,5 L de filtrat doit être injecté sur la colonne et des fractions doivent être collectées pour suivre la « fuite » de l'anticorps. Grâce à la DBC théorique et à la concentration du filtrat, il est possible d'avoir une approximation du volume nécessaire à cette manipulation. Cette expérience doit être réalisée à plusieurs vitesses de travail, qui doivent encadrer la vitesse d'expérience finale et respecter les vitesses préconisées par le fabricant. Les vitesses linéaires sont indépendantes de la géométrie de la colonne, ce qui permet un changement d'échelle simplifié. Ici les vitesses linéaires choisies sont 300 cm/h, 360 cm/h et 420 cm/h ce qui, pour une colonne de 1 mL (diamètre : 0,5 cm ; Longueur : 3,55 cm), ce qui correspond respectivement à des vitesses de 1 mL/min ; 1,2 mL/min et 1,5 mL/min (Figure 73).



Figure 73 : Chromatogramme de l'étude de la capacité dynamique de fixation d'une colonne MabSelect Sure LX à 420 cm/h (1,5 mL/min). Ici 1200 L de filtrats a été chargés sur la colonne de 1 mL. Puis les phases de lavage, élution, neutralisation et régénération ont été réalisées. Des fractions de 15 mL ont été récoltées pendant toute la durée du chargement, puis analysées en SEC-UPLC afin de suivre la « fuite » de l'anticorps.

A la suite de cette manipulation, les fractions collectées sont analysées par SEC-UPLC afin de détecter la « fuite » de l'anticorps. Il est donc ensuite possible de tracer la courbe de DBC qui correspond au pourcentage de fuite en fonction de la quantité de protéine par mL de résines (Figure 74).



Figure 74 : Courbe de percée (fuite) de l'anticorps sur une colonne MabSelect Sure LX de 1 mL à 3 débits linéaires : 300 cm/h ; 360 cm/h et 420 cm/h

La Figure 74 montre que plus la vitesse de travail est rapide (ici 420 cm/h) plus la fuite apparait rapidement, mais la saturation totale met plus de temps. Au contraire, pour des vitesses plus faibles, la percée est plus lente mais la saturation complète de la colonne intervient plus rapidement.

Par la suite des colonnes de 3,5 mL/min ont été utilisées. Il n'était pas nécessaire de refaire les études de capacité dynamique de fixation car les colonnes ont été dimensionnées pour être utilisées pour les mêmes vitesses linéaire de travail, les vitesses volumiques sont par contre plus élevées. Ce besoin est intervenu avec l'idée de stabiliser la concentration cellulaire à 40 x10⁶ cellules/mL au lieu de 10x10⁶ cellules/mL comme ce qui avait envisagé au début de la thèse. En effet, le gain dans le pourcentage d'anticorps valorisable est très important (Voir Chapitre Validation du CSPR), ce qui entraine une meilleure rentabilité du procédé. Le débit de purification (qui est égal au débit de sortie après ATF) passe alors de 0,8 mL/min (pour 10 x10⁶ cellules/mL) à 5 mL/min (pour 40 x10⁶ cellules/mL). Le débit linéaire de 400 cm/h correspond à un débit de 5 mL/min avec des colonnes de 3,5 mL. L'utilisation de colonnes de plus gros diamètres est

recommandée à cause de la surpression engendrée par un fort débit dans une colonne à faible diamètre, comme cela aurait pu être le cas avec les colonnes de 1 mL.

c. Simulation

Le logiciel Predict développé par Novasep permet de simuler les principaux paramètres de purification pour une chromatographie semi-continue sur le BioSC[®].

Pour cela, différents onglets permettent de rentrer les informations sur le déroulement d'une chromatographie classique et sur la résine. Le dernier onglet correspond aux paramètres de la chromatographie semi-continue sur BioSC[®].

Batch Process

Le premier onglet permet de rentrer les informations sur la colonne utilisée pour une chromatographie classique (ici appelée chromatographie batch).

Les conditions de purification ont été choisies d'après l'expérience du laboratoire ainsi que la notice du fabriquant. Les conditions suivantes ont été utilisées :

- Equilibration et lavage : PBS
- Elution : Glycine 0,1 M pH 3 (fraction tamponnée au 9/10 avec Tris 0,9M pour neutraliser le pH)
- Neutralisation : PBS
- Régénération : NaOH 0,2M

Un test de ces conditions sur un chromatographe Akta Purifier 100 a été effectué et les fractions ont été collectées puis analysées par SEC-UPLC (Figure 75). L'analyse montre que les conditions de purification sont satisfaisantes car le pic d'élution ne présente pas d'agrégats et contient la quantité d'anticorps injecté. De plus les fractions de lavage, neutralisation et régénération ne contiennent pas d'anticorps. Les conditions de purification décrites ci-dessus seront utilisées pour toutes les manipulations suivantes.



Figure 75 : Analyse par SEC-UPLC des fractions collectées pendant la manipulation de tests des conditions de purifications. La présence d'anticorps dans le filtrat est montrée avec un temps de rétention de 3,948 minutes (reconnaissance automatique du logiciel à partir d'une gamme étalon (voir Matériels et méthodes). L'anticorps n'est pas retrouvé dans les fractions de lavages, neutralisation et régénération. Le chromatogramme pour l'élution tamponnée montre un pic d'anticorps sans la présence d'agrégats.

Après avoir vérifié le bon déroulement de la chromatographie classique (en batch), il est alors possible de rentrer les informations dans l'onglet « My batch process » (Figure 76).

BioSC [®] Predict					8		B	?
Feed titer 0,08 g/L	My project name							
Column diameter 0,6 cm	Purification semi contin	ue d'un anti	corps prod	luit par perl	fusion.			
	My batch process	condition	S	_	_	_	_	
	Step Linear velocity [cm/h] Bed volume (BV)	Load 360 50	Wash1 360 10	Wash2 360 10	Elute Ne 360 36 10 10	eutr Rege 60 150 0 5	e Equi 300 25	+
Bed height 3,55 cm								
	My batch process	performa	ince					
Column volume 1,00 mL	Productivity Buffer consumption Cycle time		73,8 17,500 78,1	g pro L buf min	oduct/L meo ffers/g prod	dia/24h duct	1	
				ÌQQ	j			

Figure 76 : Premier onglet du logiciel BioSC[®] Predict. Il faut rentrer les conditions utilisées en chromatographie classique ainsi que la colonne utilisée. Wash1 et Wash 2 représentent la phase de lavage.

My Breakthough curves

Le deuxième onglet « My Breakthough curves » permet de rentrer les informations de l'étude de capacité dynamique de fixation réalisée précédemment (voir paragraphe DBC). Il suffit d'exporter les données excel en « .csv » et de les charger dans le logiciel BioSC[®] Predict. Le logiciel trace ensuite la courbe de percée pour chaque vitesse étudiée. On peut alors connaitre la capacité statique de fixation, 62 g/L de résine, pour cette résine et avec ce filtrat (Figure 77).



Figure 77 : Deuxième onglet du logiciel BioSC[®] Predict. Il faut rentrer les valeurs de capacité dynamique de fixation préalablement étudiée.

My BioSC[®]

Le troisième onglet « My BioSC[®] » permet de rentrer les principaux paramètres de la chromatographie semi-continue (Figure 78) :

- Un nombre de colonne : la liberté est laissé au logiciel de déterminer un nombre de colonne compris entre 2 et 6.
- La longueur d'une colonne : les colonnes étant déjà paquées et les DBC réalisées, nous avons fixé ce paramètre à 4,5 cm
- La vitesse de chargement : elle est fixée ici par le débit de sortie de l'ATF. Malgré la présence d'un réservoir intermédiaire entre la production et la purification, il est nécessaire que ces débits soient le plus proche possibles.



- Concentration du filtrat.

Figure 78 : Troisième onglet du logiciel BioSC[®] Predict. On peut laisser plus ou moins d'espaces de liberté au logiciel.

Après avoir cliqué sur « Optimize », le logiciel simule un ou plusieurs scénarios possibles avec les paramètres qui lui ont été imposés. Pour notre procédé, un seul scénario s'est révélé possible surement à cause du manque de liberté laissé au logiciel.

Le logiciel nous propose donc (Figure 79) :

- Utilisation de deux colonnes
- Chaque période va durer 719 minutes (c'est-à-dire 12h) : Une période correspond à toutes les étapes sur une colonne (Load, Wash1, Wash2, Elute, Neutr, Rege, Equi).
- Un temps de cycle de 1440 minutes (c'est-à-dire 24h) car il y a 2 colonnes avec des périodes de 12h.

My BioSC sequence details							
Period	719,0) min	Bed heigh			4,5 cn	
Cycle time	1,44E3	3 min	Column v	olume		3,53 m	L
Number of columns	2	2	Total colu	mn volu	me	7,07 m	L
BioSC Wash sequence	10,000) BV	Load per j	period		52,7 g/	L bed
Step	Load	Wash1	Wash2	Elute	Neutr	Rege	Equi
nCol	1,917	0,010	0,010	0,010	0,010	0,012	0,031
nPush	0,010	0	0	0	0	0	0
Linear velocity [cm/h]	400,00	360,00	360,00	360,00	360,00	150,00	300,00
Bed volume (BV)	1054,000	10,000	10,000	10,000	10,000	5,000	25,000

Figure 79 : Proposition du logiciel BioSC® Predict avec les paramètres qui lui ont été imposés

Il est ensuite possible d'assigner une entrée et une sortie pour chaque étape dans la fenêtre « My BioSC® parameters » (Figure 80). Les débits de chaque étape apparaissent dans le tableau. Ce tableau est exportable pour être directement utilisé sur l'ordinateur pilotant le BioSC®. Dans la fenêtre « chronogramme », le logiciel permet de voir le temps que va mettre chaque étape sur chacune des colonnes. Dans le cas de notre procédé, le temps de loading (donc de chargement du filtrat sur les colonnes) est très long et largement dominant par rapport aux autres étapes (Figure 81). My BiosSC parameters

	Description	Projet Thèse]
Number of cycles		3			
Р	eriod duration	719,0 min			
Р	ush duration	100 %			
U	V cut threshold	1 %			
	Zone name	Inlet line	Outlet line	Number of column	Flowrate
1	Load	Inlet 2	Outlet line 1	1,917	5,236 mL/min
2	Wash1	Inlet 3	Outlet line 1	0,010	4,712 mL/min
3	Wash2	Inlet 3	Outlet line 2	0,010	4,712 mL/min
4	Elute	Inlet 4	Outlet line 3	0,010	4,712 mL/min
5	Neutr	Inlet 3	Outlet line 4	0,010	4,712 mL/min
6	Rege	Inlet 5	Outlet line 5	0,012	1,963 mL/min
7	Equi	Inlet 3	Outlet line 4	0,031	3,927 mL/min
					Export

Figure 80 : Fenètre du logiciel du BioSC® predict permettant d'assigner une entrée et une sortie à chaque étape du procédé.



Figure 81 : Chronogramme sous BioSC[®] Predict. Permet de voir le temps que va mettre chaque étape sur chacune des colonnes.

X

d. Test découplé

Le but du test découplé est de tester les conditions de purification proposé par la simulation en condition réel sans pour autant être directement couplé au procédé de perfusion. Pour cela, une poche de filtrat de la manipulation « validation du CSPR » a été utilisée.

Eviter la prolifération bactérienne

Ce test étant prévu pour durer plusieurs jours, afin d'étudier les possibles difficultés rencontrées lors du couplage production/purification, il parait important d'éviter la prolifération bactérienne au cours du test. Pour se faire un protocole de décontamination de l'appareil et des voies utilisées lors de la purification a été mis en place. Le NaOH 0,2M utilisé lors de la purification a été choisi. Ce choix a été appuyé par la facilité de mise en place (le tampon étant impliqué dans la purification) ainsi que par la facilité à traiter le produit en sortie d'appareil. Le principe de ce protocole est de remplir toutes les voies utilisées, en amont et à l'intérieur de l'appareil, avec la soude et de laisser au contact pendant une nuit. Les bouteilles contenant les tampons ont été préalablement stérilisés par autoclave et les tampons ensuite filtrés à l'aide de filtres membrane. Les bouteilles sont ensuite connectées à la voie utilisée lors de la purification, en prenant préalablement soin de fermer les sorties des bouteilles dans la partie stérile (Figure 82).

Les colonnes ne sont ajoutées qu'après et la soude n'est laissée au contact que pendant dix minutes. En effet, la résine Mabselect sure LX, comme toute les résines protéine A, est sensible à la soude. Toutefois grâce à une amélioration de sa résine, GE Healthcare, son fabricant, permet l'utilisation de soude jusqu'à 0,5M pendant un temps de contact de 15 minutes (30 minutes à 0,1M).

Les voies sont ensuite rincées avec le PBS stérile pendant 1h, après vérification du pH afin de valider le rinçage. Ensuite, les pinces sont déplacées et les voies sont mises dans les tampons utilisés pour la purification. Après équilibration des colonnes avec le tampon d'équilibration (PBS), le test peut commencer.



Figure 82 : Protocole de décontamination de la fluidique en entrée du BioSC® pour éviter la prolifération bactérienne. Les tampons sont stérilisés sur membrane 0,2 µm dans des bouteilles autoclavées. Les parties bleues correspondent aux tuyaux à laver à la soude 0,2 M pendant toute la nuit.

Déroulement du test découplé

La séquence de purification est lancée. La première colonne à être chargée est toujours la colonne 2. Le premier cycle est particulier, il est nommé « start of production ». Pendant ce cycle, seule une colonne est connectée (la colonne 1 est déconnectée par le système de vanne), et ce pour permettre un chargement complet de la colonne. Sans cela, la colonne 2commencerait par des étapes d'élution, régénération sans avoir été chargée préalablement.

Le cycle commence sur la colonne 2. Puis la colonne 1 est mise en série avec la colonne 2 afin que ce qui sort de la colonne 2 passe sur la colonne 1. Au bout de 11h, la colonne 2 est saturée. Un lavage en série commence : la colonne 2 est rincée avec du PBS et ce qui sort de la colonne passe sur la colonne 1 ce qui permet aux anticorps qui se serait décrochés de la colonne 2 de s'accrocher sur la colonne 1 et donc de limiter la perte de la protéine d'intérêt. Pendant ce temps (7 minutes) le chargement est stoppé (c'est ce qui donne le nom de chromatographie semicontinue). Le start of production s'est déroulé sans problème, les volumes collectés étaient similaires aux volumes théoriques, aucune hausse de pression n'est détectée (Figure 83). Le chargement dans la colonne 1 s'est aussi déroulé normalement.



Figure 83 : Chromatogramme du start of production. On détecte les différentes phases du cycle. Le grand pic après le chargement correspond à l'élution. Les valeurs négatives reflètent d'un détecteur UV mal calibrés.



Figure 84: Colonnes utilisées lors du test découplé. En haut les colonnes au début. En bas les colonnes en fin de manipulation, le surpaquage est important.

Au moment du chargement dans la colonne 2, on observe une hausse de la pression continue jusqu'à un point de rupture à 36h, en effet à ce moment-là, la pression est de 8 bar ce qui entraine le déclenchement de l'alarme Pression et l'arrêt du système de purification. Au niveau du haut de la colonne, le fritté qui permet de retenir les billes semble bouché par un précipité blanc (Figure 84). Depuis le début de la manipulation, il avait été observé que les blocs de vannes qui permettaient l'entrée du filtrat dans la colonne étaient devenus très chauds. A la fin du premier chargement sur la colonne 2 (pendant le start of production, lorsque la colonne 2 était saturée), une partie du filtrat est restée bloquée au niveau de cette vanne d'entrée, pour permettre le lavage et l'élution de la colonne. Avec la température, cela a pu contribuer à former un précipité de protéine qui a ensuite bouché le fritté de la colonne lors du deuxième chargement, ce qui a entrainé une augmentation de la pression sans le système.

Ce problème est dû à l'impulsion électrique nécessaire pour garder les vannes ouvertes durant le chargement (dont la durée est de 11h). Cette impulsion électrique génère de la chaleur qui provoque la précipitation des protéines, surtout après un temps de contact prolongé (entre deux chargements). Ce problème n'est pas retrouvé dans les appareils BioSC[®] à l'échelle industrielle car ils sont équipés de vannes pneumatiques. De plus les durées de chargement sont généralement beaucoup plus courtes (quelques minutes), ici c'est la faible productivité du clone qui entraine un si long temps de chargement.



Figure 85 : Dispositif mis en place pour le test découplé

e. Conclusion

Le test découplé a duré 36h et s'est arrêté à cause de la surpression dans la colonne 2. Cette surpression est provoquée par le précipité en haut de la colonne qui entraine un surpaquage de celle-ci (c'est-à-dire un écrasement des billes de la résine de chromatographie). L'hypothèse est que la surchauffe des vannes d'entrée provoque le précipité d'un ou plusieurs des constituants du filtrat.

Cependant, ce test a permis de réaliser deux élutions complètes et une semi-complète. L'analyse des fractions de flowthrough (non-retenu) et de lavage a permis de constater qu'il n'y avait pas de pertes d'anticorps pendant ces phases. Afin de limiter la surchauffe des vannes d'entrée de colonnes lors de la prochaine manipulation, un protocole a été mis en place :

- Présence de deux ventilateurs en direction des vannes
- Le filtrat est refroidi à l'entrée du BioSC[®] par un cryostat avec une température de sortie de 10°C.
- La climatisation de la pièce est augmentée.

VII. Couplage production-Purification

a. Objectifs

L'objectif était le couplage production-purification afin d'obtenir un flux continu entre la production et la purification.

b. Résultats

Production

Les paramètres de production sont basés sur les expérimentations précédentes. La manipulation « validation du CSPR » a permis de montrer qu'un CSPR de 100 pL/cell/jour était satisfaisant pour des densités de 10x10⁶ cellules/mL et 20x10⁶ cellules/mL. Ici une densité de 40x10⁶ cellules/mL sera appliquée. En effet, de précédentes manipulations ont montré qu'il n'y avait pas de colmatage de la fibre creuse à cette densité, ce qui semblait être le principal problème.

L'intérêt de se placer à une concentration cellulaire supérieure est de réduire le pourcentage de perte due à la purge cellulaire (voir Validation du CSPR).

Tout d'abord, pendant 3 jours, le bioréacteur est démarré en mode batch, sans ajout ni soutirage (sauf pour réguler les différents paramètres physico-chimiques). Ensuite l'alimentation est commencée en veillant à garder un CSPR supérieur à 100 pL/cell/jour et en prenant en compte la croissance cellulaire entre deux prélèvements.

Lorsque la concentration cellulaire a atteint 40x10⁶ cellules/mL, la purge cellulaire a été mise en place afin de maintenir la densité cellulaire constante, en prenant en compte la croissance cellulaire. En effet la purge cellulaire est directement reliée au taux de croissance des cellules.

La concentration en anticorps s'est stabilisée à 50 µg/mL, soit une concentration légèrement plus élevé que lors des expérimentations précédentes.

Purification

De la même manière que lors du test découplé, les lignes ont été lavées à la soude puis rincées avec les tampons nécessaires à la purification. Le même programme a été utilisé que pour le test découplé. Les seuls ajustements sont ceux permettant de réduire la surchauffe des vannes d'entrée.

Les étapes de start of production et le chargement sur la colonne 1 se sont bien déroulées. Toutefois au bout de 32h, pendant le chargement de la colonne 2, le système est entré en surpression, pour les mêmes raisons que précédemment (Figure 86).

Une étude de la thermostabilité par Optim (voir caractérisation des anticorps ci-après) du milieu de culture, du flowthrough (non-retenu lors de la purification) et du filtrat n'a pas permis d'avoir d'informations complémentaires.



Figure 86 : Lors du couplage production/purification, la colonne est entrée en surpression à cause du fritté (en haut de la colonne) bouché. Ce bouchon s'est formé par un précipité de protéines dû à la chaleur.

c. Conclusion

La partie production s'est déroulée sans problème. La purge cellulaire permet de maintenir une densité cellulaire constante et entraine l'état d'équilibre stationnaire du système. Le CSPR de 100 pl/cell/jour choisis est satisfaisant pour les cellules pendant la durée de la manipulation, ici 25 jours.

La partie purification présente des difficultés matérielles plus difficilement surmontables. En effet les durées de chargement sont très longues ce qui entrainent des impulsions électriques longues dans les vannes d'entrée. Les durées de chargement sont corrélées avec la concentration en anticorps dans le filtrat. Dans notre cas, les concentrations en anticorps sont très faibles (de l'ordre de 30 µg/ml). Après des contacts avec le fabriquant du BioSC[®], Novasep, des tests sur un nouveau modèle de vannes est programmé.

Toutefois, cette expérience a permis de réaliser deux élutions complètes et une semicomplète. L'analyse des fractions de flowthrough (non-retenu) et de lavage a permis de constater qu'il n'y avait pas de pertes d'anticorps pendant ces phases. L'analyse des anticorps purifiés en SEC-UPLC montre un profil de pureté similaire à celui des anticorps purifiés par chromatographie classique.

VIII. Comparaison anticorps produits selon différents modes de production

a. Objectifs

Selon le mode de production, une protéine peut avoir des caractéristiques différentes. Ces caractéristiques doivent être connues afin de répondre aux attentes des autorités, telles que la FDA ou la EMA, ce qui permet ensuite d'obtenir une autorisation de mise sur le marché.

Nous nous proposons d'étudier l'impact que pourrait avoir le mode de production sur les attributs de qualité de notre anticorps. Afin de répondre à cet objectif, différents productions ont été réalisées par batch (Figure 87), fed-batch (Figure 88) et perfusion (à deux densités différentes : $10x10^{6}$ cellules/mL et $40x10^{6}$ cellules/mL). Les cultures ont été ensuite centrifugées et le filtrat est purifié par chromatographie d'affinité sur protéine A selon le protocole de purification. Les 4 anticorps sont ensuite analysés par différentes techniques afin d'être caractérisés.



Figure 87: Suivi de culture d'une production en batch dans l'objectif de la comparaison d'anticorps produits par différents modes de production.



Figure 88 : Suivi de culture d'une production en fed-batch dans l'objectif de la comparaison d'anticorps produits par différents modes de production

b. Glycosylations

Les glycosylations peuvent affecter le mode d'action des anticorps (voir Bibliographie paragraphe « Regain d'intérêt … »). Il est donc intéressant de caractériser les profils de glycosylations des anticorps purifiés. De nombreux types de N-glycosylations sont possibles sur les anticorps (Figure 89). Pour notre anticorps, un seul site de N-glycosylation a été détecté.

Trois techniques ont été comparées :

- Une technique sur puce par LabChip.
- Deux techniques de spectrométrie de masse
 - <u>Analyse des glycopeptides :</u> les anticorps sont réduits, alkylés, et digérés à la trypsine ensuite les glycopeptides sont analysés LC/MS
 - <u>Analyse des N-glycans perméthylés</u>: les anticorps sont déglycosylés par la PNGase F, ensuite les N-glycans ont été purifiés et perméthylés puis analysés en MALDI-TOF.



Figure 89 : Principaux types de glycosylations retrouvés sur les anticorps (Sha et al. 2016)

LabChip

Cette analyse a été réalisée par les laboratoires Servier de Croissy Sur Seine.

L'analyse des glycosylations par LabChip permet d'avoir des informations sur les structures glycanniques les plus connues et les moins ramifiées (pas d'informations pour des structures bisecting ou possédant des acides sialiques). Pour chaque échantillon, la structure GOF est majoritaire. On retrouve la structure Man-5 dans les 4 échantillons. Ici l'échantillon batch (B) présente une fluorescence totale plus faible que les autres échantillons sans qu'une explication concluante ne soit trouvée.

	Pourcentage relatif (%)					
	В	C10	C40			
Man 5	10,25	11,73	9,17	11,07		
GOF	58,5	62,64	58,34	65,16		
G1	5,58	6,11	7,5	5,32		
G1F	22,28	16,82	21,31	17,22		
G2F	3,35	3,1	3,68	1,13		

Tableau 7 Pourcentage relatif en structures glycanniques pour des anticorps produits par différents modes de production.



Figure 90 : Graphique de la fluorescence en fonction de la taille, obtenu par LabChip permettant d'identifier les structures glycanniques.
Analyse des glycopeptides par LC/MS

Cette analyse a été réalisée par la plateforme génomique de Bordeaux.



Figure 91 : Comparaison des profils N-glycanniques d'anticorps produits par différents modes de production. L'analyse s'effectue en LC/MS sur les glycopeptides. En gris : batch ; en vert : fed-batch ; en bleu : perfusion à 10x10⁶ cell/mL ; en jaune : perfusion à 40x10⁶ cell/mL.

Chaque échantillon a été analysé 3 fois et les moyennes de ces résultats sont présentées sur la Figure 91.

Pour cette analyse, les anticorps sont réduits, alkylés, et digérés à la trypsine. Ensuite les glycopeptides sont analysés par LC/MS. Lors de l'analyse par LC/MS, les glycopeptides peuvent présenter des pouvoirs d'ionisation différents selon la structure glycannique. L'intensité des ions analysés ensuite ne permet donc pas d'avoir une idée précise de l'abondance relative de chaque espèce. Cette technique est donc utilisée pour avoir un résultat qualitatif afin de comparer des lots de production différents.

L'analyse révèle différentes structures, certaines sont « simples » (comme un oligomannose 5) et correspondent aux résultats des analyses sur LabChip. Cependant des structures plus complexes, avec un acide sialique ou une structure bisecting, qui ne sont pas identifiables en analyse LabChip, apparaissent avec cette analyse.

Analyse des N-glycans perméthylés

Cette analyse a été réalisée par la société Proteodynamics. Ici le C40 n'a pas été analysés. Les valeurs pour le procédé en perfusion correspondent à l'échantillon C10 (perfusion stabilisé à 10x10⁶ cellules/mL).

Préalablement à l'analyse par MALDI-TOF, les échantillons ont été déglycosylés par la PNGase F, ensuite les N-glycans ont été purifiés et perméthylés. La perméthylation permet de remplacer les résidus hydroxyl par des méthyls. En conséquence, tous les N-glycans ont le même pouvoir d'ionisation. L'intensité des ions permet de donner un pourcentage d'abondance relatif pour chaque échantillon (Figure 92). Cette technique est utilisée pour avoir un résultat qualitatif et quantitatif (Wada *et al.* 2007)(Morelle and Michalski 2007).



Figure 92 : Comparaison des profils N-glycanniques d'anticorps produits par différents modes de production. L'analyse s'effectue en MALDI TOF sur les N-glycans perméthylés. En gris : batch ; en vert : fed-batch ; en bleu : perfusion à 10x10⁶ cell/mL

Grâce à ses résultats, il apparait que les abondances relatives données par la technique précédente (analyse des glycopeptides) donnent des valeurs assez proches de cette technique. Cependant parfois, des structures sont sous-estimées dans l'analyse des glycopeptides. Par exemple le structure G1F (m/z 2040) est estimée à environ 30% dans l'analyse des N-glycans perméthylés, contre 10% dans l'analyse des glycopeptides.

Il est possible, grâce aux résultats quantitatifs de l'analyse des N-glycans perméthylés d'avoir une analyse plus fine des structures glycanniques de ces anticorps.

Les anticorps B, C et FB possèdent des profils N-glycanniques classiques pour des IgG exprimées en cellules CHO avec une forte dominance des structures biantennées fucosylées GOF (m/z 1836) ; biantennées fucosylées avec un ou deux galactoses G1F (m/z 2040) et G2F (m/z 2244).

On observe un niveau de fucosylation supérieur à 97% pour B et C et à 95% pour FB.

Le niveau de galactosylation est calculé selon la formule : (G1F + G1FN + G1FS)*0,5 + G2F + G2FS. On observe un taux de galactosylation de 22,6 % pour B et de 20,5% pour C. L'échantillon FB montre un taux de galactosylation plus faible de 14,3%.

On observe également quelques variations parmi les structures glycanniques mineures. L'échantillon FB contient par exemple un oligomannose (Man)5(GlcNAc)2 (m/z 1580) et un Nglycan probablement bisecting (GlcNAc)3+(Man)3GlcNAc)2 (m/z 2081) qui ne sont pas détectés dans les échantillons B et C. On constate également que les trois anticorps contiennent des faibles quantités de deux glycannes G1FS (m/z 2401) et G2FS (m/z 2605) avec acide sialique (acide N acetyl neuraminique ou NeuAc).

Conclusion

Différentes structures ont été mises en évidence par ces trois techniques.

La technique par LabChip semble être la moins descriptive.

La technique d'analyse des glycopeptides permet d'avoir une bonne approche de la totalité des structures mais l'abondance relative ne permet pas d'avoir une analyse quantitative de qualité, à cause d'une différence de pouvoir d'ionisation.

La technique d'analyse des N-glycans perméthylés permet d'avoir l'approche la plus complète qualitativement et quantitativement.

En conclusion, hormis le fait que la glycosylation de l'échantillon fed-batch semble moins aboutie (moins de galactosylations) les trois techniques ne montrent pas d'impact majeur du mode de production dans la structure glycannique de ces anticorps.

c. Variants de charge

Cette analyse a été réalisée par les laboratoires Servier de Croissy Sur Seine.

L'analyse des variants de charge a été réalisée sur LabChip à l'aide d'une puce DNA 5K/RNA/CZE grâce au protocole expliqué dans le chapitre matériels et méthodes.

Les électrophérogrammes obtenus sont présentés Figure 93.



Figure 93 : Electrophérogrammes d'échantillons d'anticorps purifiés produits par différents modes de productions. En bleu : Batch ; En rouge : Fed-batch ; En marron : Perfusion stabilisée à 10x10⁶ cell/mL ; en vert : Perfusion stabilisée à 40x10⁶ cell/mL.

Les résultats montrent une grande proportion de pic principal avec une petite proportion de fraction acide mais une absence de fraction basique. Deux isoformes acides sont ici présentes, A1 et A2, A2 ayant un degré d'acidité supérieure à A1. Les différents anticorps montrent les mêmes résultats. D'après ces résultats, le mode de production n'influencerait pas le profil de variant de charge d'un anticorps. Une deuxième analyse des variants de charge a été réalisée par électrophorèse capillaire HPCE, réalisée par les laboratoires Servier de Croissy Sur Seine.



Figure 94 : Analyse des variants de charge réalisée par HPCE. En bleu : batch ; rouge : fed-batch ; vert : Perfusion stabilisée à 10x10⁶ cell/mL ; en violet : Perfusion stabilisée à 40x10⁶ cell/mL.

Les résultats de cette analyse montrent bien deux pics acides comme l'expérimentation précédente mais aussi un pic basique et ce, pour tous les échantillons testés. La différence de résultats peut s'expliquer par une meilleure résolution de la seconde analyse permettant de mieux séparer le pic majoritaire et donc de faire apparaître le pic basique.

Ici encore, le mode de production ne semble pas entrainer de modifications dans les charges des anticorps produits.

d. Etude de la thermostabilité



Figure 95 : Etude de la thermostabilité par Optim. De gauche à droite : batch, fed batch, Perfusion stabilisée à 10x10⁶ cell/mL ; Perfusion stabilisée à 40x10⁶ cell/mL.

Cette analyse a été réalisée par les laboratoires Servier de Croissy Sur Seine.

La thermostabilité des 4 échantillons se révèlent relativement similaire. La température de dénaturation est identique pour les 4 échantillons (Tm1 environ 70°C et Tm2 environ 82°C). La température entrainant l'agrégation est environ de 73°C. Le mode de production ne semble pas affecter la stabilité des anticorps à la chaleur (Figure 95 et Tableau 8).

Tableau 8: Température de dénaturation (Tm 1 et 2) et d'agrégation (tonset) pour des anticorps produits par différents modes de production. Batch (B), fed-batch (FB), Perfusion stabilisée à 10x10⁶ cell/mL (C10); Perfusion stabilisée à 40x10⁶ cell/mL (C40).

Batch	T°C moy denat 1	T°C moy denat 2	T°C moy tonset
В	69.81	82.12	73.56
FB	69.59	81.76	72.40
C10	69.05	81.39	72.48
C40	69.74	81.79	72.52
C40 Tris-Gly (control)	70.05	83.44	72.91

e. Homogénéité des échantillons

Cette analyse a été réalisée par les laboratoires Servier de Croissy Sur Seine.

Une chromatographie d'interaction hydrophobe a été réalisée afin de mettre en évidence l'homogénéité de chacun des échantillons (Figure 96). Le pourcentage du pic majoritaire est calculé pour donner le pourcentage d'homogénéité. Les échantillons B et C40 (perfusion à 40x10⁶ cell/mL) présentent des pourcentages d'homogénéité à 78%, 74% pour C10 (perfusion à 10x10⁶ cell/mL) et 69% pour FB. Les résultats sont trop proches pour pouvoir conclure une différence d'homogénéité en fonction du mode de production.



Figure 96 : Chromatographie d'interaction hydrophobe de différents anticorps produits par des modes de production distincts. B : Batch ; FB : fed-batch ; C10 : perfusion stabilisée à 10x10⁶ cell/mL ; C40 : perfusion stabilisée à 40 x10⁶ cell/mL.

f. Agrégats

Le pourcentage d'agrégat est évalué par SEC-UPLC pour les 4 échantillons (Figure 97). Les échantillons produits par batch (B), perfusion à 10 x10⁶ cell/mL (C10) et perfusion à 40x10⁶ cell/mL (C40) présentent un taux d'agrégats extrêmement faible (<0,5%). L'échantillon produit en fedbatch (FB) présente un taux d'agrégat légèrement plus élevé (2,5%).



Figure 97 : Chromatogramme en SEC-UPLC pour étudier le pourcentage d'agrégats pour des anticorps produits par différents modes de production. B : Batch ; FB : fed-batch ; C10 : perfusion stabilisée à 10x10⁶ cell/mL; C40 : perfusion stabilisée à 40 x10⁶ cell/mL.

g. Conclusion

En conclusion, les différentes analyses ne nous ont pas permis de voir de différences significatives dans les différents échantillons. Le mode de production ne semble pas affecter l'anticorps dans les procédés que nous avons utilisés.

Pour valider ces résultats, il faudrait multiplier les échantillons produits dans les différentes conditions. De plus, le fed-batch n'a pas été optimisé. Son optimisation aurait pour conséquence de prolonger la durée de culture, ce qui pourrait avoir une influence sur les caractéristiques des anticorps produits.

IX. Etude de coût : Batch et perfusion

Ce chapitre porte sur l'étude financière comparative entre les procédés de production batch et perfusion à l'échelle laboratoire. Cette étude a été réalisée par Jona Eselaye pendant son stage de fin d'étude dans le cadre de son Master de management en biotechnologie (RMIT de Melbourne).

Cette étude compare le coût d'une stratégie de perfusion basée sur l'ATF par rapport à une culture en batch, pour une production à partir de cellules CHO à une échelle laboratoire. Les deux méthodes de production utilisent un bioréacteur stérilisable (en inox) ainsi que des consommables à usages uniques (tuyaux, filtres, pipettes,...).

Le laboratoire produit généralement de petites quantités d'anticorps à des fins de recherche avec des priorités particulières tels que la réduction des coûts et une faible durée de culture. La productivité et la réduction des coûts ont été les principaux paramètres étudiés en fonction des exigences de production (c'est-à-dire le nombre de productions requises) et de la capacité de production du laboratoire.

a. Eléments exclus de l'étude

Impact de l'échec de la culture

Pour cette étude, il est supposé que chaque culture se déroule avec succès. La capacité maximale de fonctionnement par année de chaque procédé est prise en compte. Cependant, en réalité, il y a toujours un risque de contamination de la culture, de faible croissance cellulaire et d'autres facteurs qui doivent soit prolonger la durée de la culture, soit entrainer sa défaillance. Tout cela peut avoir un impact sur les coûts variables totaux et entrainer une perte de ressources (temps, ...). Une culture en mode batch, dont la durée et la complexité est plus faible, entraine un risque moins important d'échec qu'une culture en mode perfusion.

Fluides et énergies et maintenance

Plusieurs autres paramètres n'ont pas été quantifiés dans cette étude :

- La consommation électriques et les gaz utilisés lors des cultures
- L'eau Ultrapure utilisée pour la préparation du milieu de culture
- L'eau et la vapeur utilisée pour le nettoyage et l'autoclavage.
- L'utilisation des salles de culture cellulaire (entretien des locaux, maintenance des appareils, ...)

 \rightarrow Ces coûts ont été exclus car il s'agit coût partagé dans tous les départements de l'institut et la contribution exacte du bioprocédé n'a pas été mesurée.

b. Scénarios étudiés

Plusieurs scénarios ont été étudiés en faisant varier les paramètres suivants :

- L'objectif de production d'anticorps dans l'année (2 ; 5 ; 20 ou 100 g)
- La productivité spécifique en anticorps de la lignée :
 - 5 pg/cellules/jour : équivalent à la productivité de la lignée modèle utilisée dans la thèse.
 - o 20 pg/cellules/jour
 - o 80 pg/cellules/jour : productivité d'un très bon clone industriel actuel
- Le CSPR (débit d'alimentation par cellules et par jour) appliqué dans le cas de la culture en perfusion :
 - o 20 pL/cellules/jour : CSPR faible grâce à un milieu optimisé
 - 100 pL/cellules/jour : CSPR moyen avec un milieu industriel adapté aux cellules (cas utilisé dans la thèse).
 - o 200 pL/cellules/jour : CSPR élevé à cause d'un milieu peu efficace.

Les procédés ont été schématisés en Figure 98 et en Figure 99.



Figure 98 : Schématisation de la mise en place d'un procédé batch. Lors de l'étape de production, le bioréacteur est seulement connecté à des bouteilles de base ou d'antimousse.



Figure 99 : Mise en place d'un procédé de perfusion avec un recyclage cellulaire par ATF. Lors de la phase de production, le bioréacteur est alimenté en milieu de culture en continu et en base ou antimousse si besoin. La sortie du filtrat ATF se déroule en continu et une purge cellulaire permet de maintenir la densité cellulaire constante. Les tableaux 1 et 2 indiquent les coûts pris en compte dans l'étude. Les cultures dont les durées ou les exigences dépassaient la capacité du laboratoire ont été exclues de l'analyse des coûts.

Les différents coûts ont été classés :

 Coûts fixes (CF): Correspond aux installations qui représentent un investissement (bioréacteur, balance, ...). Ici les valeurs par années ont été déterminées à l'aide d'un taux de dépréciation de 10 ans.

CF = Investissement

 Coûts variables (CV): Correspond aux équipements à usage unique, aux salaires pour le temps d'installation et de pilotage du procédé ainsi qu'au milieu de culture requis pour maintenir la culture. Les coûts variables augmentent en fonction de la quantité de production.

$$CV = Exploitation + Salaire + Milieu$$

La somme des coûts fixes et des coûts variables représentent les coûts totaux (CT).

$$CT = CF + CV$$

Les coûts moyens représentent les coûts pour produire un gramme d'anticorps.

On peut distinguer :

 Les coûts moyens (CM) qui représentent les coûts totaux nécessaire pour produire un gramme d'anticorps

$$CM = CT/Q$$

Où Q est la quantité d'anticorps produits (en gramme)

Les coûts moyens variables (CMV) qui représentent les coûts variables (CV)
 rapporté au gramme d'anticorps

$$CMV = CV/Q$$

Hypothèses clés

Tableau 9 : Hypothèses et coûts pour un procédé batch

Procédé batch : hypothèses			
Volume de culture standard (L)			
Coût du milieu de culture (€/L)			
Durée de la culture (jour)			
Concentration en anticorps obtenus en fin de la culture pour une productivité de 5 pg/cell/jour (mg/L)			
Concentration en anticorps obtenus en fin de la culture pour une productivité de 20 pg/cell/jour (mg/L)			
Concentration en anticorps obtenus en fin de la culture pour une productivité de 80 pg/cell/jour (mg/L)			
Nombre de personne requis pour préparer et piloter la culture			
Temps nécessaires à l'amplification (h)			
Temps nécessaire pour la mise en place et la culture (h)			
Temps nécessaire au pilotage et prélèvement chaque jour (h)			
Salaire horaire d'un personnel (€)			
Capacité maximum par an (cultures)			
Investissement (par an)			
Bioréacteur (incluant logiciel et système de régulation)			
Incubateur			
Lignée cellulaire			
Total			
Exploitation (par culture)			
Equipement			
Salaire (préparation)			
Total			
Tableau 10 · Hypothèses et coûts pour un procédé perfusion			

Procédé perfusion : hypothèses			
Volume de culture standard (L)	2		
Coût du milieu de culture (€/L)	80		
Durée de la culture (jour)	20 + 4 (amplification)		
Concentration cellulaire à l'état stationnaire (x10 ⁶ cellules/ml)	80		
Nombre de personnel requis pour préparer et piloter la culture	1		
Temps nécessaires à l'amplification (h)	16		
Temps nécessaire pour la mise en place et la culture (h)	12		
Temps nécessaire au pilotage et prélèvement chaque jour (h)	2		
Salaire horaire d'un personnel (€)	16		
Capacité maximum par an (cultures)	6		
Investissement (par an)			
Bioréacteur (incluant logiciel et système de régulation)	3500		
Incubateur	1000		
Système ATF	1900		
Balance	200		
Pompe péristaltique	800		
Lignée cellulaire	800		
Total	8200		
Exploitation (par culture)			
Equipement	283		
Salaire (préparation)	448		
Total	731		

c. Résultats et discussions

Des simulations en fonction de l'objectif de production, de la productivité du clone pour les deux types de procédé ont été menées pour calculer le volume de milieu requis pour la culture. Pour chaque simulation, le nombre de cultures requises et la durée totale de la culture ont également été obtenus. Certains scénarios (voir paragraphe b), ne sont pas réalisables dans les limites de la capacité de production du laboratoire.

Coûts moyens (CM)

Ces résultats ont permis de tracé des diagrammes de coûts moyens de productions (Figure 100) en fonction de l'objectif de production annuel et de la productivité spécifique du clone. L'ordonnée de chaque graphique a été fixée à 8000€ pour permettre de comparer les différentes conditions entre elles. Ces graphiques permettent de déterminer quelle condition de culture est la plus rentable pour remplir les objectifs annuels du laboratoire, en fonction du clone disponible.



Figure 100 : Coûts moyens de chaque procédé pour différentes productivité spécifique en fonction de la quantité d'anticorps produits

A faible productivité cellulaire (5 pg/cell/jour), la perfusion à bas CSPR (20 pL/cell/jour) est la méthode la moins coûteuse lorsque l'on tient compte des coûts fixes et variables. A de faibles quantités de production (2-5 g/an), la production en batch à un coût similaire à la perfusion à CSPR intermédiaire (100 pL/cell/jour). Toutefois, il est impossible de produire 20 g d'anticorps par an en batch. De plus, aucune condition de culture ne permet de produire 100 g d'anticorps par an à cette productivité cellulaire. Idéalement, un CSPR faible devra être privilégié car le coût total par gramme d'anticorps produits augmente significativement lorsque le CSPR passe de 20 pL/cell/jour à 200 pL/cell/jour.

A une productivité cellulaire de 20 pg/cell/jour, le batch peut produire de faible quantités d'anticorps (2 g/an) à moindre coût, mais ne permet pas d'atteindre les 100g d'anticorps par an. La perfusion à faible CSPR est la méthode la plus rentable plus les quantités modérés et élevées (5 à 100 g). Cependant, pour des quantités de 5g et 20g, la différence de coût n'est pas significative entre un batch et une perfusion à bas CSPR.

Le batch est la méthode la moins coûteuse pour les clones très producteurs (80 pg/cell/jour), cependant, l'objectif de 100g d'anticorps par an n'est toujours pas réalisable. Ainsi, la perfusion devra être utilisée pour produire des quantités élevées.

Coûts moyens variables :

Il est ensuite possible de s'intéresser aux coûts moyens variables (CMV) de chacun des scénarios. Les coûts sont alors divisés par la quantité d'anticorps produits (Figure 101). L'analyse des coûts variables a un intérêt si on considère que le laboratoire dispose déjà du matériel (Coûts fixes) et que l'on souhaite analyser l'impact de l'utilisation de ce matériel (batch, perfusion, efficacité du CSPR) sur le coût de la production.



Figure 101 : Coûts moyens variables de chaque procédé pour différentes productivité spécifique en fonction de la quantité d'anticorps produits.

Pour une faible productivité spécifique, l'impact du CSPR sur le coût est très important. En effet, pour produire 5 grammes d'anticorps par an, cela coûtera 500€ par gramme d'anticorps pour un CSPR de 20 pL/cellules/jour, contre 3500€ par gramme pour un CSPR de 200 pL/cellules/jour (soit 7 fois plus). Le mode batch a un coût intermédiaire (environ 2900€/g de mAb) mais ne permet pas de produire 20g d'anticorps par an.

Plus le clone utilisé à une productivité spécifique élevée, plus les coûts moyens variables diminuent, et ce pour tous les modes de productions étudiés. Pour une productivité de 80 pg/cell/jour et un objectif de production faible (2 ou 5 grammes par an), le batch est la méthode la moins coûteuse. Cela n'est jamais le cas pour les productivités les plus faibles. Une augmentation de la productivité permet de lisser l'impact du CSPR sur le coût moyen variable, pour des quantités d'anticorps produits faibles (jusqu'à 20 grammes par an). En effet, pour produire 5 grammes d'anticorps à 20 pL/cell/jour, cela coûtera 172€/gr de mAb contre 352€/gr de mAb pour un CSPR de 200 pL/cell/jour (soit 2,23 fois plus).

d. Conclusion

Dans le cas où l'on dispose d'un clone fortement producteur (80 pg/cell/jour), la production en batch est plus économique (surtout en termes de coûts moyens). Cependant, ce mode de production ne permet pas d'obtenir de très gros rendements annuels (supérieurs à 20 g).

Pour un clone moyennement producteur (20 pg/cell/jour), l'écart de coûts moyens entre un mode batch et un mode perfusion dépend de l'objectif de production. En effet pour de faibles quantités (2 grammes), le batch est plus économique que la perfusion, ce qui n'est pas le cas pour produire 20 grammes d'anticorps. L'étude des coûts moyens variables montrent que le procédé en perfusion à bas ou moyen CSPR (20 et 100 pL/cell/jour) est plus rentable que le batch.

Pour un clone faiblement producteur, comme celui utilisé lors du développement du procédé en perfusion étudié dans cette thèse, les différences de coûts entre le batch et la perfusion sont plus importantes. En effet, dans ce cas, l'étude des coûts moyens montrent que le batch est moins économique qu'un procédé de perfusion dont le CSPR a été étudié (20 ou 100 pL/cell/jour). Pour le procédé mis au point durant la thèse, avec un clone dont la productivité est environ de 5 pg/cell/jour et un CSPR de 100 pL/cell/jour, les coûts moyens variables sont d'environ 2000€ par grammes de mAb produits, contre presque 3000€ par gramme pour le batch.

Les cultures en perfusion semblent plus rentables que les cultures en batch, seulement si le milieu de culture est strictement optimisé pour diminuer le CSPR. Ainsi, un mode perfusion utilisant 20 pL/cell/jour de milieu de culture est plus rentable qu'une culture par batch, ce qui n'est jamais le cas pour un mode perfusion utilisant un CSPR de 200 pL/cell/jour. Les clones ayant une productivité spécifique élevée (20 pg et 80 pg par jour) contribueront également à réduire considérablement le coût en réduisant la durée de production ce qui entraine une diminution des coûts variables. Dans l'ensemble, un système perfusion à bas CSPR utilisant un clone fortement producteur est la méthode la plus rentable à court terme à l'échelle d'un laboratoire de recherche. Cependant, l'équipement supplémentaire nécessaire à la mise en place d'un système perfusion peut engendrer des coûts fixes importants. De plus, un batch demande moins d'investissement en terme de temps dans l'élaboration du milieu de culture idéal et dans l'étude du procédé en général. Toutefois les comparaisons entre la perfusion et le batch ne sont possibles que pour des objectifs de production de moins de 20 g par an. Dès lors, la perfusion est la seule méthode possible pour produire 100 g d'anticorps par an, et c'est aussi la stratégie la plus efficace pour réduire les coûts variables par gramme d'anticorps produits.

Conclusions et perspectives

L'objectif de cette thèse était le développement d'un procédé couplant production et purification en continu d'un anticorps recombinant.

Lors de la mise au point de la production en cellules CHO, différentes études ont été réalisées. Tout d'abord les cellules ont été adaptées en suspension dans un milieu de culture industriel : le CellVento210 fourni par la société Merck Millipore. Les différentes cellules adaptées ont ensuite été cultivées en Erlenmeyer et en bioréacteur afin d'étudier leur comportement général. De plus, des mises au point sur le matériel de culture (bioréacteur, gaz, etc...) ont eu lieu afin de satisfaire au mieux les besoins des cellules et améliorer le maintien la stérilité du système.

Une étude sur la détermination du CSPR minimal (débit d'alimentation spécifique par cellules et par jour) a été réalisée afin d'alimenter les cellules au plus proche de leur besoin. Trois techniques ont été comparées sur la base de critères spécifiques (productivité spécifique en anticorps, flux métaboliques en glucose et lactate, ...).

Après une validation du CSPR à plusieurs concentrations cellulaire, la partie purification a pu être développée.

La première étape visait à déterminer les conditions de purification après avoir paqué les colonnes. Ensuite une étude de la capacité dynamique de fixation de la résine avec le filtrat (produit en perfusion) a été effectuée. Ces données ont permis au logiciel BioSC[®] Predict de simuler le déroulement d'une chromatographie semi-continue à partir des paramètres de liberté qui lui a été donné.

Un test découplé (sans connexion directe avec le bioréacteur) a été réalisé afin de vérifier la séquence de purification mis au point par le logiciel. Cette expérience a duré 36h avant d'être arrêté à cause d'une surpression dans l'appareil. L'hypothèse retenue est que le surnageant a précipité en haut des colonnes à cause d'une surchauffe des vannes de l'appareil de purification. Cette surchauffe est engendrée par une durée de chargement très longue sur les colonnes (11h). Ce genre de problème n'a pas lieu avec des clones plus producteurs, comme ceux utilisés couramment dans l'industrie. De plus l'appareil qui a été utilisé dans le cadre de cette thèse est à l'échelle laboratoire. Dans l'industrie, les vannes des BioSC[®] sont pneumatiques (version industrielle du BioSC), il n'y a donc pas de problème de surchauffe.

Le couplage production-purification a été réalisé après avoir tenté de limiter la surchauffe des vannes. Pour cela, le filtrat en entrée de colonne a été refroidi par un Cryostat et deux ventilateurs ont été orientés en direction des vannes. La perfusion s'est maintenue avec succès à une concentration cellulaire stabilisée à 40x10⁶ cellules/mL. La culture s'est déroulée sur 28 jours (dont 18 jours en perfusion avec purge). Le couplage entre la production et la purification a été maintenue pendant 32h avant un arrêt de l'appareil de purification, pour cause de surpression.

Une étude de l'impact du mode de production sur les caractéristiques de l'anticorps a été réalisée. Les échantillons testés ont été obtenus à partir de culture en batch, fed-batch et perfusion. Les profils de glycosylations, les variants de charge, la thermostabilité, les agrégats ainsi que l'homogénéité des échantillons ont été étudiés. Les résultats ne montrent pas d'impact majeur du procédé de production sur les anticorps.

Enfin, une comparaison des coûts de production en batch et en perfusion (à différents CSPR) a été effectuée. L'étude a été menée à l'échelle laboratoire avec le matériel utilisé lors de la thèse. Différents scénarios ont été étudiés. Ils ont permis de constater que, dans certaines conditions, les procédés en perfusion semblent plus avantageux économiquement que les procédés batch.

Plusieurs axes de perspectives émergent à la fin de cette thèse.

Tout d'abord pour la partie production, l'utilisation de matériels permettant le suivi en ligne des principaux métabolites serait à envisager. En effet, le suivi en ligne permettrait un rétrocontrôle automatique sur le logiciel du bioréacteur en cas de dérive de la culture. A l'heure actuelle, le suivi est effectué hors ligne (lors des prélèvements) ce qui ne permet pas d'agir en temps réel sur le bioréacteur. La technologie Raman semble la plus adaptée pour ce type de procédé. Des études ont déjà été menées et ont démontré que la technologie permet de déterminer la concentration en cellules, en anticorps et en principaux métabolites (glucose, lactate, glutamine, ammoniaque, ...).

165

Les différentes techniques utilisées pour la détermination du CSPR pourront être dupliquées afin de valider les résultats obtenus lors de la thèse. Ensuite le milieu de culture pourrait être optimisé pour pouvoir diminuer le CSPR dans le procédé. Pour cela, il faudrait analyser les acides aminés consommés au cours de la culture. Une supplémentation du milieu de culture en acides aminés ou en glucose pourrait être ensuite envisagée.

Pour la partie purification, l'utilisation d'un clone plus producteur pourrait permettre de réduire le temps de chargement et donc éviter la surchauffe des vannes. De plus, ce type de procédé permettrait de se rapprocher des conditions utilisées en industrie pharmaceutique.

De nouvelles expérimentations seront réalisées prochainement avec de nouvelles vannes mis au point par la société Novasep. Ces vannes devraient être moins susceptibles de chauffer lors de temps d'ouverture trop importante.

L'utilisation d'un appareil de purification permettant l'utilisation de cassettes à usage unique serait intéressante. En effet, le protocole de nettoyage et de sanitisation serait difficilement adaptable à une production industrielle. La société Pall Life Science a développé le BioSMB dont la tubulure est à usage unique, ce qui permet de faciliter l'étape de sanitisation.

Annexes



Annexe 1 : Carte plasmidique du vecteur p6G4V11N35E.choSD.10 intégré dans le génome CHO DP12.



Annexe 2 : Schématisation des flux de communications permettant le contrôle du bioréacteur



Annexe 3 : Schématisation du système

Communications

Poster

Determination of the minimum cell specific perfusion rate for the development of a continuous culture process for CHO cells. Maria S., Bonneau L., Santarelli X., Joucla G. (Présenté au congrès BioProcess 2016 de Vienne (Autriche), aux journées de l'Ecole doctorale SVS de Bordeaux (2016 et 2017), aux journées du CBMN (Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-objets) au Congrès Bioreactors Symposium 2017 de Lille, ainsi qu'au Congrès 6th Annual Cell Culture & Bioprocessing Congress 2017 de Londres).



Oral

Communication orale au congrès GFPP (Groupement Français des Protéines et des Peptides) en Mars 2017 à Arcachon (33).

Références Bibliographiques

- Beckmann, T. Thüte, T. Heinrich, C. Büntemeyer, H. Noll. T 2011. "Proteomic and Metabolomic Characterization of CHO DP-12 Cell Lines with Different High Passage Histories." BMC Proceedings 5: P92. doi:10.1186/1753-6561-5-S8-P92.
- Bernard, J. 2014. "Biomédicaments En France." http://www.leem.org/sites/default/files/Biomédicaments-etat-des-lieux-2014.pdf.
- Boedeker, D. Berthold G. 2001. "Production Processes of Licensed Recombinant Factor VIII Preparations." *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 27 (4): 385–94. doi:10.1055/s-2001-16891.
- Carstens, J.N. Clark H.R. Jensen, J.P. 2009. "Perfusion ! Jeopardy or the ultimate advantage? Bioprocess Internationnal Webinar.
- Carta, G. and Jungbauer, A. 2010. "Adsorption Kinetics." In *Protein Chromatography*, edited by Wiley, 161–99. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. doi:10.1002/9783527630158.ch6.
- Chotteau, V. 2013. "How to Develop a Perfusion Process." In *Continuous Bioprocessing*, edited by Refine technology, Continuous, 27–39. http://www.continuous-bioprocessing.com/.
- Clincke, MF. Mölleryd, C. Zhang, Y. Lindskog, E. Walsh, K. Chotteau, V. 2013. "Very High Density of CHO Cells in Perfusion by ATF or TFF in WAVE Bioreactor: Part I: Effect of the Cell Density on the Process." *Biotechnology Progress* 29 (3): 754–67. doi:10.1002/btpr.1704.
- Close, Edward J., Jeffrey R. Salm, Timothy Iskra, Eva Sørensen, and Daniel G. Bracewell. 2013.
 "Fouling of an Anion Exchange Chromatography Operation in a Monoclonal Antibody Process: Visualization and Kinetic Studies." *Biotechnology and Bioengineering* 110 (9): 2425–35. doi:10.1002/bit.24898.
- Croughan, M.S. Konstantinov, K. Cooney, C. 2015. The future of Industrial Bioprocessing : batch or continuous ? *Biotechnology and Bioengineering* 112(4) 648-651 doi: 10.1002/bit.25529

- FDA. 1999. "Guidance for Industry Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products," 301–827. http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm.
- Godawat, R. Konstantinov, K. Rohani, M. Warikoo, K. 2015. "End-to-End Integrated Fully Continuous Production of Recombinant Monoclonal Antibodies." *Journal of Biotechnology* 213 (November): 13–19. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.06.393.
- Gonzalez, T. Leong, S. Leonard. S.2000. Nucleic acids encoding humanized anti-IL-8 monoclonal antibodies. Patent US 6025158 A
- Guez, J.S. Cassar J.Ph. Wartelle, F. Dhulster, P. Suhr, H. Real time in-situ microscopy for animal cell concentration monitoring during high density culture in bioreactor.
- Hansel, T.T. Kropshofer, H. Singer, T. Mitchell, J. George, A 2010. "The Safety and Side Effects of Monoclonal Antibodies." *Nature Reviews. Drug Discovery* 9 (4). Nature Publishing Group: 325– 38. doi:10.1038/nrd3003.
- Heinrich, C. Wolf, T. Kropp, C. Northoff, S. Noll, T. 2011. "Growth Characterization of CHO DP-12
 Cell Lines with Different High Passage Histories." *BMC Proceedings* 5: P29. doi:10.1186/1753-6561-5-S8-P29.
- Karst, D.J. Scibona, E. Serra, E. Bielser, J.M. Souquet, J. Stettler, M. Broly, M. Soos, M. Morbidelli,
 M. Villiger. T.K. 2017. "Modulation and Modeling of Monoclonal Antibody N-Linked
 Glycosylation in Mammalian Cell Perfusion Reactors." *Biotechnology and Bioengineering* 1–
 13. doi:10.1002/bit.26315.
- Klutz, S. Magnus, J. Lobedann, M. Schwan, P. Maiser, B. Niklas, J. Temming, M. Schembecker, G. 2015. "Developing the Biofacility of the Future Based on Continuous Processing and Single-Use Technology." *Journal of Biotechnology* 213 (November): 120–30. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.06.388.

- Konstantinov, K. Goudar, C. Maria N, Meneses, R. Thrift, J. Chuppa, S. Matanguihan, C. Michaels,
 E. Naveh, D. 2006. "The 'push-to-Low' approach for Optimization of High-Density Perfusion
 Cultures of Animal Cells." Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 101: 75–98.
 doi:10.1007/10_016.
- Liu, H. Ma, J. Winter, C. Bayer,C. 2010. "Recovery and Purification Process Development for Monoclonal Antibody Production." *mAbs*. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2958570&tool=pmcentrez&ren dertype=abstract.
- Liu, Z. Mostafa,S.S. Shukla, A.A. 2015. "A Comparison of Protein A Chromatographic Stationary Phases: Performance Characteristics for Monoclonal Antibody Purification." *Biotechnology and Applied Biochemistry* 62 (1): 37–47. doi:10.1002/bab.1243.
- Mather J. 1989. Method for culturing recombinant cells, issued March 15, 1989. Patent :US20010000488.
- Milstein, C. Köhler, G. 1975. "Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined." *Nature* 256: 495–97. doi:doi:10.1038/256495a0.
- Morelle, W. Michalski, J.C. 2007. "Analysis of Protein Glycosylation by Mass Spectrometry." *Nature Protocols* 2 (7): 1585–1602. doi:10.1038/nprot.2007.227.
- Ozturk, S. 1996. "Engineering Challenges in High Density Cell Culture Systems." *Cytotechnology* 22 (1–3): 3–16. doi:10.1007/BF00353919.
- Ozturk, S. 2014. "Opportunities and Challenges for the Implementation of Continuous Processing in Biomanufacturing." In *Continuous Processing in Pharmaceutical Manufacturing*, 457–78. doi:10.1002/9783527673681.ch18.
- Penichet, M. Morisson, S. 2004. "Design and Engineering Human Forms of Monoclonal Antibodies" Drug Development Research 61:121–136 doi: 10.1002/ddr.10347
- Pollock, J. Ho, S.V. Farid, S.S. 2013. "Fed-Batch and Perfusion Culture Processes: Economic, Environmental, and Operational Feasibility Under Uncertainty." *Biotechnol. Bioeng* 110: 206–19.

- Robinson, D. K. Chan, C. P. Yu, C, Tsai, P.K. Tung, J. Seamans, T. C. Lenny, A. B. Lee, D. K. Irwin, J. Silberklang, M. 1994. "Characterization of a Recombinant Antibody Produced in the Course of a High Yield Fed-Batch Process." *Biotechnology and Bioengineering* 44 (6): 727–35. doi:10.1002/bit.260440609.
- Schmidt, SR. 2017. "Drivers, Opportunities, and Limits of Continuous Processing." BioProcess International, March. http://www.bioprocessintl.com/manufacturing/continuousbioprocessing/drivers-opportunities-limits-continuous-processing/.
- Sha, S. Agarabi, C. Brorson, K. Lee, D-Y. Yoon, S. 2016. "N-Glycosylation Design and Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies." *Trends in Biotechnology* 34 (10): 835–46. doi:10.1016/j.tibtech.2016.02.013.
- Shukla, A. Thömmes, J. 2010. "Recent Advances in Large-Scale Production of Monoclonal Antibodies and Related Proteins." *Trends in Biotechnology* 28 (5): 253–61. doi:10.1016/j.tibtech.2010.02.001.
- Steinebach, F. Ulmer, N. Decker, L. Aumann, L. Morbidelli, M. 2017. "Experimental Design of a Twin-Column Countercurrent Gradient Purification Process." *Journal of Chromatography A* 1492 (April): 19–26. doi:10.1016/j.chroma.2017.02.049.
- Swinnen, K., Krul, A. Van Goidsenhoven, I. Van Tichelt, N. Roosen, A. Van Houdt, K. 2007. "Performance Comparison of Protein A Affinity Resins for the Purification of Monoclonal Antibodies." *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 848 (1): 97–107. doi:10.1016/j.jchromb.2006.04.050.
- Urlaub, G. Käs, E. Carothers, A.M. Chasin L.A. 1983. "Deletion of the Diploid Dihydrofolate Reductase Locus from Cultured Mammalian Cells." *Cell* 33 (2): 405–12. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6305508.
- Wada, Y. Azadi, P. Costello, C.E. Dell, A. Dwek, R.A. Geyer, H. Geyer, R. 2007. "Comparison of the Methods for Profiling Glycoprotein Glycans : HUPO HGPI (Human Proteome Organisation Human Disease Glycomics / Proteome Initiative) Multi-Institutional Study." *Medical Physics* 17 (4): 411–22.

- Walsh, G. 2014. "Biopharmaceutical Benchmarks 2014." *Nature Biotechnology* 32: 992–1000. http://www.nature.com.inc.bib.cnrs.fr/nbt/journal/v32/n10/pdf/nbt.3040.pdf.
- Warikoo, V. Godawat, R. Brower, K. Jain, S. Cummings, D. Simons, E. Johnson, T. et al. 2012.
 "Integrated Continuous Production of Recombinant Therapeutic Proteins." *Biotechnology and Bioengineering* 109 (12): 3018–29. doi:10.1002/bit.24584.
- Wlaschin, K.F. Hu, W.S. 2006. "Fedbatch Culture and Dynamic Nutrient Feeding." Adv Biochem Engin/Biotechnol 101: 43–74. doi:10.1007/10 015.
- Young, J.D. 2013. "Metabolic Flux Rewiring in Mammalian Cell Cultures." *Current Opinion in Biotechnology* 24 (6). NIH Public Access: 1108–15. doi:10.1016/j.copbio.2013.04.016.
- Zhang, Y. 2017. "High Cell Density Perfusion Process Development for Antibody Producing Chinese Hamster Ovary Cells." Thèse de doctorat Stockolm.