

Technologie de séparation de cellules à usage unique et en continu appliquée à des procédés de purification de biomolécules (Collaboration Sanofi Genzyme / Sanofi Pasteur)



Caroline Lafoy(1), Julie Gostoli(1), Christophe Ecochard(1), Virginie Fabre(1), Eric Forma(2), Séverine Nury(2), Sébastien Passot(2), Eric Calvosa(2).

(1) Sanofi Genzyme – 23 Bd Chambaud de la Bruyère – 69007 LYON ; (2) Sanofi Pasteur – 1541 Avenue Marcel Merieux – 69280 MARCY L'ETOILE

Résumé

La **technologie de séparation de cellules** par centrifugation en continu et à usage unique a été évaluée sur le **système Unifuge® Pilot**. La preuve du concept a été faite pour deux applications intervenant dans les procédés de fabrication de biomolécules : en **clarification de culture cellulaire eucaryote** et pour la **concentration / lavages des cellules**. Cette technologie apparait particulièrement adaptée aux cellules fragiles du fait de la **faible force de cisaillement** engendrée lors de la centrifugation. L'adaptation des paramètres opératoires est également possible dans une large gamme de vitesse de centrifugation et de débit d'alimentation.

La séparation des cellules par centrifugation en continue à usage unique et circuit fermé, permet des **gains de temps de cycle** (suppression des étapes de nettoyage et de stérilisation). De plus cette technologie assure la **protection du produit et de l'environnement** lors de manipulation de système cellulaires sensibles.

Opportunité

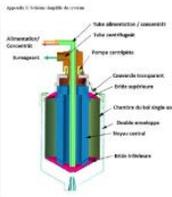
CLARIFICATION

La **clarification** des procédés de production avec des cellules eucaryotes est le plus souvent réalisée à l'échelle pilote par **filtration** et à l'échelle industrielle soit par filtration soit par **centrifugation en inox** de type Westfalia.

Cette étape reste fastidieuse, consommatrice de temps et peu efficace pour l'élimination des impuretés comme première étape de purification.

Clarification par filtration centrifugation en inox

Clarification en Continu À Usage Unique



Avec l'Unifuge® Pilot, toutes les étapes de centrifugation ont été réalisées en circuit fermé en assurant une protection optimale du produit. Les vitesses de rotation, récolte, débits ont été optimisées en fonction du procédé.

CONCENTRATION / LAVAGES DE CELLULES

Le **lavage des cellules** est actuellement réalisé en **centrifugeuse en batch**. Cette étape est chronophage et très manuelle avec de nombreuses phases ouvertes.

Le passage à une technologie en continu permet de **supprimer les phases ouvertes** et donc limite le risque pour l'opérateur et le produit. Le temps de cycle est attendu fortement diminué de même que les opérations manuelles.

Centrifugeuse à Godets

Séparation en Continu À Usage Unique

Chiffres clés : 3 centrifugeuses, 96 godets, 3 lavages, 10h d'étape en production

1 centrifugeuse en continu, 1 seul lavage 5h d'étape en production



Résultats

CLARIFICATION

Les conditions d'utilisation de la centrifugeuse Unifuge® sont très **flexibles** et permettent d'optimiser / adapter aisément le mode opératoire au procédé.

Lors de tous les essais, aucune anomalie du bol n'a été observée.

Une très bonne **reproductibilité** a été montrée de l'échelle 10 L à 200 L.

La centrifugeuse a été évaluée sur 2 **lignées cellulaires** avec des performances très satisfaisantes.

Les résultats présentés dans le tableau ci-contre montrent que très peu de cellules sont retrouvés dans le surnageant. De plus les pourcentages de protéines et d'ADN cellulaire sont inférieurs aux quantités obtenues dans la récolte brute ce qui traduit un **excellente séparation des cellules sans lyse**.

Principaux résultats
Sur l'efficacité de la centrifugation en continue.

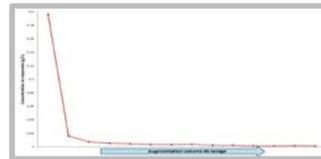
| Essai | Protéine %* | ADN cellulaire %* | [Cellules] % |
|-------|-------------|-------------------|--------------|
| 1 | 95 | 98 | <1 |
| 2 | 90 | 48 | <1 |
| 3 | 86 | 95 | <1 |

Débit de remplissage initial de 1 à 2 L/min
Débit d'alimentation durant la séparation de 1,5 à 3 L/min
Force appliquée durant la séparation de 1500 à 3000 g

* Le résultat exprimé en pourcentage traduit le rendement obtenu en quantité de protéines. La valeur devrait être fortement augmentée en cas de lyse cellulaire.

CONCENTRATION / LAVAGES DE CELLULES

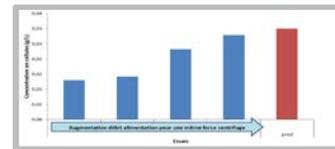
Efficacité de lavage des cellules au cours de la centrifugation sur Unifuge®



→ La centrifugeuse en continu permet une **diminution rapide de la concentration d'impuretés dans le surnageant** démontrant une efficacité dès les premiers volumes de lavage des cellules

→ L'absence d'impuretés dans le surnageant démontre également la conservation de l'**intégrité des cellules** au cours de la centrifugation : les cellules ne sont pas lysées

Perte des cellules dans le surnageant en fonction du débit d'alimentation du bol – comparaison avec les conditions de production



→ Les conditions optimales pour maximiser la récupération des cellules dans le culot sont obtenues pour les plus faibles débits d'alimentation du bol testés

→ En comparaison aux conditions de production, la **perte de cellules dans le surnageant est diminuée de moitié**

→ La capacité du bol a été évaluée à $\approx 2 \times 10^{13}$ cellules pour un bol de 1,7 - 1,8L.

Conclusions

- La technologie de séparation de cellules par Unifuge®Pilot présente de nombreux avantages par rapport aux techniques dites conventionnelles (filtrations, centrifugation en batch ou continue en inox).
- La **biosécurité** de l'opérateur, de l'environnement et la diminution du risque de contamination du produit sont assurées par un circuit intégralement fermé et à usage unique.
- Outre la **simplification** des étapes, les **performances - en rendement** de cellules ou en **efficacité de purification** - sont meilleures que les techniques standards avec moins de perte de cellules ou de lyse cellulaire.
- La **capacité du bol** de centrifugation est adaptée aux opérations réalisées avec un nombre de débordage nécessaire limité.
- Le changement d'échelle reste à documenter afin de permettre l'industrialisation de cette technologie.
- Cette technologie pourrait être une opportunité pour la **fabrication de banques cellulaires**.

- Simplification des opérations
- Procédé Continu
- Pas de Contrainte nettoyage
- Faible cisaillement cellulaire