

Introduction au DSP - Récolte

Vos objectifs:

A la fin de cette leçon, vous devriez être capable de séquencer les étapes de la récolte.

Récolte

La récolte des cellules est une étape critique pour relier la production d'anticorps monoclonaux en amont à la purification en aval. Le choix de la meilleure technologie de récolte des cellules en fonction des caractéristiques du processus de culture cellulaire peut s'avérer difficile. Cette décision est prise dès le début du développement du procédé ; une bonne compréhension du procédé actuel, ainsi que des avantages et inconvénients des différentes technologies disponibles pour la récolte des cellules est nécessaire.

Les entreprises décideront de la technique de récolte qui convient le mieux à leur procédé et en fonction des variables qu'elles préfèrent.

La méthode et l'équipement de récolte choisis dépendent (1) du type de cellules, (2) du produit à récolter et (3) des propriétés des fluides de traitement. Les techniques traditionnelles (standard) comprennent la **microfiltration sur membrane**, la **filtration à flux tangentiel** (TFF, ou filtration à flux croisé), la **centrifugation** et la **filtration en profondeur**, ainsi que des solutions spécialisées qui doivent être couplées soit à la microfiltration ou à la centrifugation avec la TFF, soit ensuite à la filtration en profondeur.

Centrifugation

La centrifugation par empilement de disques (par exemple, d'Alfa Laval Inc. ou de Westfalia Separator Group Ltd.) est utilisée depuis un certain temps pour la récolte des cellules. Une centrifugeuse à disques utilise des disques coniques empilés et inclinés pour séparer les cellules entières et les gros débris cellulaires.

Le cisaillement peut toutefois endommager les cellules et augmenter ainsi le nombre de particules submicroniques, particules qui ne peuvent être éliminées. Au lieu de cela, les systèmes et techniques à faible cisaillement couplés à une filtration en profondeur en deuxième étape sont particulièrement utiles. L'utilisation d'une filtration en profondeur peut fournir une clarification supplémentaire, en éliminant les particules solides plus petites.

Filtration

L'industrie des bioprocédés a adopté des méthodes de clarification (filtration) par membrane issues d'autres technologies, mais elle a également développé des modules spécifiquement conçus à des fins biopharmaceutiques, notamment pour la clarification primaire des systèmes

de fermentation et de culture cellulaire. Lorsqu'une technique membranaire est utilisée, la taille et le potentiel d'encrassement de la membrane sont pris en compte.

La microfiltration est très sensible aux changements de qualité des matières premières comme la viabilité de la culture cellulaire, la densité cellulaire et les composants du milieu. Les densités cellulaires élevées et les viabilités cellulaires faibles peuvent entraîner une **pression transmembranaire** (PTM) élevée pour les membranes à flux constant, dont l'importance dépend de la taille du lot d'alimentation. La **pression transmembranaire** est relativement plus faible pour les opérations typiques de microfiltration à flux tangentiel (TFF) (MF-TFF). L'écoulement de la solution d'alimentation à travers la membrane réduit la concentration de la polarisation et crée une chute de pression, forçant une condition d'exclusion de taille. De tels filtres sont actuellement disponibles avec différentes tailles de pores, généralement entre 0,1µm et 1µm pour la récolte primaire (par exemple, le système ProStak d'EMD Millipore et PallSep Biotech de Pall Corporation).

La filtration en profondeur retient les particules, à la fois plus grandes et plus petites que la taille des pores, dans leurs milieux poreux. La rétention des particules implique à la fois l'exclusion par la taille et l'adsorption par des interactions hydrophobes et ioniques (ainsi que d'autres). La filtration en profondeur offre certains avantages mais n'est pas sans limites. Les technologies disponibles dans le commerce comprennent des membranes filtrantes (filtres en profondeur Seitz de Pall Corporation) ; des modules encapsulés (Supracap 200, de Pall Inc.) ; et des formats jetables et évolutifs (par exemple, le milieu filtrant en profondeur Millistak+ POD d'Emanuel Merck, Darmstadt Millipore).

Séparation cellulaire à l'aide de filtres en profondeur

Avantages

- Faible coût des matériaux et du matériel
- Facilité d'utilisation
- Temps de traitement rapides
- Grande flexibilité grâce aux options de mise à l'échelle (par exemple, pour les installations multiproduits)
- Filtration avec des forces de cisaillement minimales afin d'assurer la protection des cellules et des produits.
- Matériaux approuvés par la FDA
- Haute qualité du filtrat
- Équipement peu encombrant

Inconvénients

- Nécessité de contrôler la pression différentielle
- Nécessité d'enlever et d'éliminer les filtres.
- Limites de mise à l'échelle, comme les limites budgétaires ou les limites d'infrastructure.

Filtration à flux tangentiel : Les méthodes de récolte des bioréacteurs à petite échelle peuvent ne pas fonctionner pour des échelles de traitement comprises entre 10 000 et 20 000 litres. Comme l'a observé Ian Sellick, "les exigences de manipulation de lots aussi importants nécessitent l'emploi de systèmes de traitement plus grands et plus continus, souvent une forme de TFF". Le TFF convient aux séparations à base de particules fines, car il retient les particules et autres molécules trop grosses pour passer à travers les pores de sa membrane, et sont transportées le long du flux tangentiel.

Les configurations TFF comprennent aussi bien des cassettes (plates) que des formats à fibres creuses. Dans son article, Sellick décrit un dispositif compact à cassettes TFF qui utilise des membranes et des filtres en polyéthersulfone (PES) pour former des voies d'écoulement diagonales qui empêchent la canalisation du produit (qui se produit lorsque la surface de la membrane n'est pas entièrement utilisée et que les canaux alimentent le rétentat). Il décrit également des modules à fibres creuses améliorés pour la perfusion de cellules qui utilisent un difluorure de polyvinylidène (PVDF) non liant. Les cassettes TFF jetables et pré-nettoyées offrent plusieurs avantages par rapport à de nombreux formats de cassettes traditionnels, notamment des économies, un risque moindre de contamination croisée et une plus grande souplesse de fabrication.

Source : <https://bioprocessintl.com/downstream-processing/chromatography/a-decade-of-harvesting-methods-331186/>

Nota bene : "e.g." = un exemple parmi d'autres / "i.e." = notamment

Optimisation

Des efforts ont été faits pour corrélérer les caractéristiques d'une culture cellulaire (par exemple, la viabilité, la densité) et l'efficacité d'un processus de récolte. Dans une étude portant sur une culture à haute densité cellulaire, la qualité de la récupération primaire dépendait de la densité et de la viabilité des cellules. Les densités cellulaires élevées et les viabilités faibles entraînent un plus grand nombre de cellules entières et d'impuretés solides telles que les colloïdes et les débris cellulaires. Des **titres** élevés* sont généralement générés dans des conditions de densités cellulaires élevées et de faible viabilité. En utilisant la **turbidité** comme marqueur de la qualité du produit, les chercheurs ont démontré une corrélation linéaire entre la viabilité des cultures cellulaires et l'efficacité de la clarification pour une condition de centrifugation donnée. Leurs résultats ont également montré que des débits d'alimentation plus élevés diminuaient la clarification en raison de temps de séjour plus courts

dans la centrifugeuse et que les corrélations pour la centrifugeuse étaient les mêmes que celles montrées pour l'étape ultérieure de filtration en profondeur.

L'utilisation croissante des technologies à usage unique dans les processus en amont peut nécessiter une modification des stratégies de récolte. Dans les procédés traditionnels de [culture en lots](#), la clarification de la récolte est généralement obtenue par centrifugation suivie d'une filtration en profondeur. Pour les procédés entièrement basés sur des produits jetables, la centrifugeuse à disques doit être remplacée par la filtration seule".

* **Titre** : (US : titer) = concentration d'une solution déterminée par titrage, le volume minimum d'une solution nécessaire pour atteindre le point final d'un titrage ; la concentration d'un anticorps, déterminée en trouvant la plus haute dilution à laquelle il est encore capable de provoquer l'agglutination de l'antigène.

Les défis d'échelle

La tendance actuelle vers un processus discontinu à **petite échelle** nécessitera des techniques de récupération primaire capables de fournir des délais rapides. Un système de filtres en fibre de verre, associé à une membrane de rétention pour fournir "une solution rapide qui peut être mise en œuvre avec très peu de préparation", pourrait être utilisé. Les membranes en fibre de verre et en polyéthersulfone sont intrinsèquement faibles en extractibles et ont été validées pour de faibles niveaux d'endotoxines et d'autres contaminants. Elles sont stérilisables à la vapeur et sont compatibles avec l'irradiation gamma, ce qui permet une stérilisation sous pression avec l'une ou l'autre de ces méthodes.

La TFF et la filtration en profondeur par centrifugation sont des méthodes typiques pour la récolte de lots à grande échelle. Cependant, le transfert de processus nécessite parfois des approches alternatives et rationalisées. Une étude de Genentech a évalué différents médias de filtration en profondeur à double couche et à un seul étage afin de trouver une alternative à son système de filtration en profondeur traditionnel à deux étages, pour l'utiliser sur un autre site. Le travail a consisté à effectuer des tests à différentes turbidités qui ont abouti à un système qui a démontré une capacité accrue à tous les niveaux sans colmatage significatif de la structure interne des pores des filtres en profondeur. Les chercheurs suggèrent en outre que "l'une des clés de l'augmentation de la capacité future des filtres en profondeur pourrait (...) consister à contrôler le regroupement des particules (...) ou à moduler le débit pour éviter ou exploiter les seuils de cisaillement critiques dans un filtre en profondeur".

Cultures cellulaires à haute densité

Au fur et à mesure que les titres ont augmenté durant cette dernière décennie, l'importance de méthodes efficaces de récupération des produits s'est également accrue. Avec des titres d'anticorps monoclonaux atteignant ~ 25 g/l et l'attente de valeurs encore plus élevées à l'avenir, la clarification des cultures cellulaires à haute densité présentera des défis uniques aux bioproduits. Des quantités toujours plus importantes de débris cellulaires devront être éliminées rapidement pour éviter les goulots d'étranglement dans les processus de purification.