

08 May 2018

**Mots-clés :** cellules de mammifères, anticorps monoclonaux, clarification, terre de diatomées, centrifugation, purification de protéines

# Récolte de cellules de mammifères rapide ne nécessitant pas de centrifugation pour la purification des anticorps à l'aide des kits de filtration Sartoclear Dynamics® Lab

James Stephenson, Catherine Bladen and Ian Wilkinson\*

Absolute Antibody Ltd, Wilton Centre, Redcar, TS10 4RF, United Kingdom

[www.absoluteantibody.com](http://www.absoluteantibody.com)

\* Correspondence

E-mail: [wilkinson@absoluteantibody.com](mailto:wilkinson@absoluteantibody.com), Tel: +44.1865.920810

## Résumé

Les systèmes d'expression d'anticorps monoclonaux utilisent généralement un peptide signal pour assurer la sécrétion de l'anticorps dans le milieu de culture cellulaire. Bien que cela permette d'éviter l'étape de lyse cellulaire et réduise la complexité de la purification, cette dernière requiert l'utilisation de techniques coûteuses et/ou longues pour séparer les cellules du liquide de culture cellulaire contenant les anticorps. Dans cette étude, nous décrivons nos tests avec Sartoclear Dynamics® Lab V, un nouveau système utilisé pour la clarification rapide des milieux de culture cellulaire, qui permet de s'affranchir de la centrifugeuse ou de tout autre équipement onéreux.

## Introduction

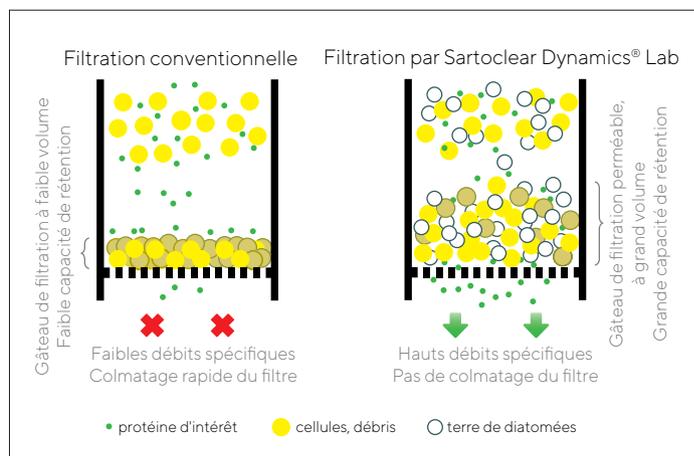
Les anticorps monoclonaux sont utilisés dans un large éventail d'applications, comprenant le développement biopharmaceutique, la recherche fondamentale et le diagnostic *in vitro*. La production d'anticorps à partir de cellules de mammifères nécessite de recourir à un processus de séparation des cellules à partir du liquide de culture cellulaire contenant les anticorps. Et ce, qu'il s'agisse d'une production standard utilisant des hybridomes, ou bien d'une production recombinante dans des lignées cellulaires d'ovaire de hamster chinois (CHO) ou de rein humain embryonnaire (HEK). A l'échelle du bioréacteur, généralement au-dessus de 50 litres, ceci est habituellement effectué en suivant des procédures telles que la centrifugation continue et la filtration en profondeur.<sup>1,2</sup>

Cependant, à l'échelle de la recherche, qui est en général inférieure à 10 litres de culture cellulaire par anticorps, ces méthodes deviennent à la fois inconfortables et coûteuses. Le type de clarification le plus récurrent dans le cadre de recherches repose en une centrifugation initiale, suivie d'une filtration du surnageant clarifié. Elle va être effectuée grâce à un filtre stérile avec un seuil de rétention de 0,2, 0,22 ou 0,45 µm, et ce, soit à l'aide d'une seringue manuelle, soit grâce à une unité de filtration sous vide. Ces filtres sont peu onéreux et faciles à utiliser avec les équipements standards que l'on trouve dans la plupart des laboratoires de biotechnologie. Toutefois, en raison de la conception peu profonde de ces filtres, ils peuvent être obstrués rapidement du fait de la présence de particules submicroniques restant en suspension.<sup>2</sup>

Chez Absolute Antibody, nous exprimons de façon transitoire des anticorps recombinants dans des cellules HEK293 et CHO-K1. Nous travaillons généralement avec près de 50 anticorps par semaine sur une échelle allant de 30 ml à 20 litres, possédant une capacité hebdomadaire totale approchant les 100 litres de cellules. Ces 6 dernières années, nous avons procédé à une centrifugation suivie d'une filtration à l'aide d'une unité sous vide, et ce pour tous nos anticorps. Au fur et à mesure que nos capacités ont augmenté, il en était de même pour nos besoins en centrifugeuses.

Durant cette période, nous avons examiné un certain nombre d'options alternatives, dont l'utilisation de filtres conçus pour le brassage à domicile et des flocculants tel que le Chitosan.<sup>3</sup> Ces approches se sont avérées être lentes, sujettes au colmatage et ayant de faibles débits. De plus, les résultats n'étaient pas de bonne qualité (ex. contamination par endotoxines).

Le kit de filtration Sartoclear Dynamics® Lab a été conçu dans le but de réduire le temps et les efforts associés à la clarification de cultures de cellules de mammifères. L'ajout de terre de diatomées (DE) aux cultures favorise la formation d'un gâteau de filtration poreux pour éviter tout colmatage du filtre, permettant d'éliminer rapidement les cellules et débris cellulaires de l'échantillon (Figure 1). Ceci évite de recourir nécessairement à une étape de centrifugation, annulant ainsi les problèmes liés à la capacité et à la disponibilité de la centrifugeuse, et empêchant le colmatage des filtres. Nous avons testé le kit de filtration Sartoclear Dynamics® Lab V et l'avons comparé avec notre procédé standard.



**Figure 1: Les principes de la clarification de culture cellulaire à l'aide de la méthode conventionnelle et du kit de filtration Sartoclear Dynamics® Lab.**

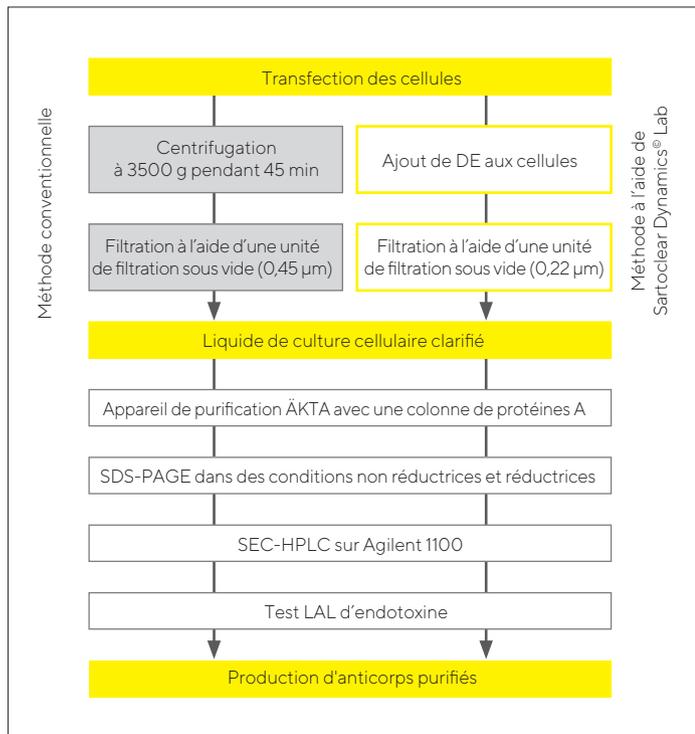
## Matériels et méthodes

Des cellules HEK293 ou CHO, adaptées à la suspension, sont cultivées dans des milieux sans sérum puis transfectées avec des plasmides d'ADN codant la chaîne lourde et légère d'un anticorps monoclonal. Les cellules sont récoltées pour procéder à la purification 6 à 14 jours après la transfection. Pour un lot d'expression typique de 1 litre, notre processus de clarification d'origine impliquerait une centrifugation à 3500 g à l'aide d'une centrifugeuse de table (2 × 500 ml) pendant 45 minutes, suivi d'une filtration nécessitant au moins une unité de filtration sous vide avec une membrane PES de 0,45 µm. Le surnageant filtré est ensuite chargé sur un appareil de purification ÄKTA, avec une colonne de 5 ml de protéines A, afin de procéder à la capture puis à l'élué de l'anticorps avec un tampon à faible pH.

Il est ensuite neutralisé, puis il s'en suit soit des étapes de purification supplémentaires (par exemple un échange de cations ou une chromatographie par exclusion de taille) soit directement un contrôle de qualité en fonction des exigences pour le lot d'anticorps particulier. Le contrôle de qualité est effectué à l'aide d'un SDS-PAGE (dans des conditions

non réductrices et réductrices), d'une SEC-HPLC (chromatographie d'exclusion stérique de type chromatographie liquide à haute performance), d'un test d'endotoxine et, si nécessaire, d'un test ELISA pour mesurer l'activité de fixation (Figure 2).

Dans le processus en aval modifié, l'utilisation du Sartoclear Dynamics® Lab a remplacé les étapes de centrifugation et de filtration. Dans le cas d'une culture de 1 litre, 20 g d'adjuvant de filtration à base de DE ont été ajoutés à 1 litre de cellules. Les cellules et la terre de diatomées (DE) sont mélangées vigoureusement puis versées directement dans l'unité complète de filtration sous vide Sartolab® RF, incluse dans le kit Sartoclear Dynamics® Lab. Elle possède une capacité de 1000 ml et une membrane PES de 0,22 µm. La mise sous vide est aussitôt appliquée et le fluide de culture cellulaire est collecté dans une bouteille d'un litre. Ensuite, le filtrat est purifié puis passe le contrôle de qualité, comme décrit ci-dessus.



**Figure 2: Séquence de processus aval de production d'anticorps recombinants chez Absolute Antibody. Les cases grises montrent le processus classique de clarification utilisant la centrifugation et la filtration. Les cases en jaune présentent le nouveau processus avec Sartoclear Dynamics® Lab V.**

## Résultats et discussion

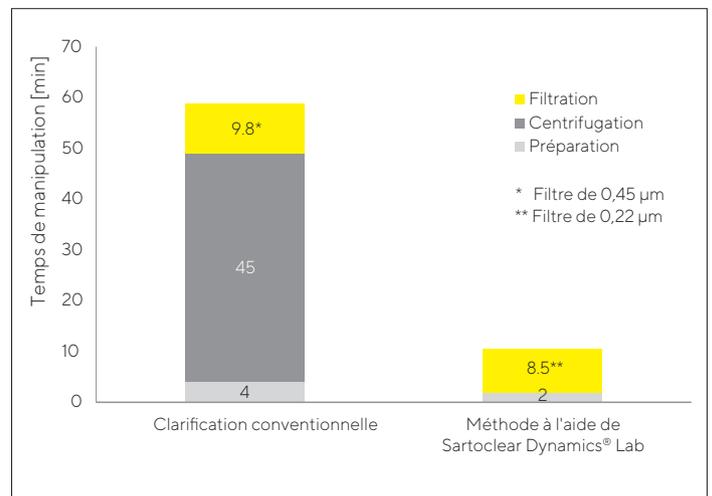
Pour évaluer les performances du kit Sartoclear Dynamics® Lab V par rapport à notre procédé standard, une culture de deux litres d'un anticorps IgG1 anti-EGFR humain (Cetuximab, numéro de catalogue « Absolute Antibody » : Ab00279-10.0) a été préparée dans des cellules HEK293.

Six jours après la transfection, la culture a été divisée en deux volumes égaux. Au moment de la récolte, la densité cellulaire était de  $2,4 \times 10^6$  cellules/ml avec une viabilité de 65 %.

Nous avons eu recours à notre méthode classique concernant le premier litre. Cela implique une étape de centrifugation de 45 minutes suivie d'une filtration nécessitant l'utilisation de 3 unités de filtration de 500 ml ayant des membranes en PES de 0,45 µm. Ces filtres colmatent généralement après passage d'environ 400 ml de surnageant, ce qui induit nécessairement l'utilisation de trois unités par litre de culture cellulaire.

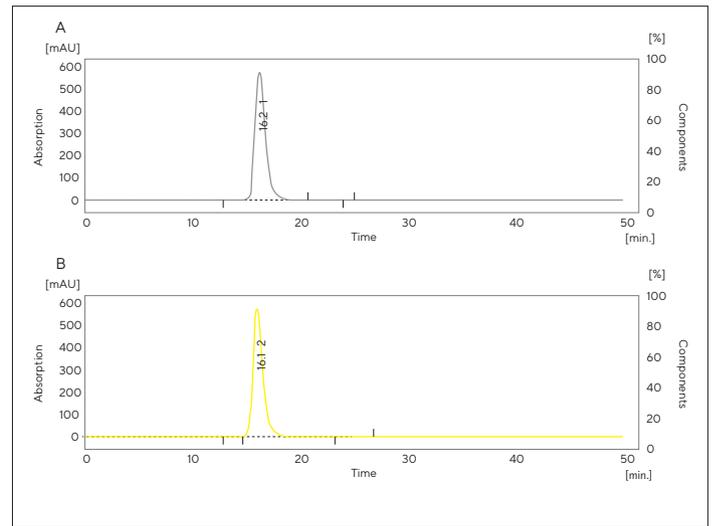
Les filtres avec des pores de 0,45 µm sont utilisés plutôt que ceux de 0,22 µm pour augmenter le volume de surnageant filtrable avant colmatage. La filtration du litre de cellules a duré 9 minutes et 48 secondes, ce qui représente un temps de traitement global d'environ 55 minutes.

Le second litre a été traité à l'aide du kit Sartoclear Dynamics® Lab V. Deux sachets de 10 grammes de DE ont été ajoutés aux cellules, puis le tout a été mélangé vigoureusement. Les cellules ont ensuite été versées dans un filtre Sartolab® RF de 1000 ml de 0,22 µm et le vide a été appliqué. La filtration s'est terminée sans avoir rencontré de colmatage et a duré 8 minutes et 27 secondes, depuis l'ajout de la DE jusqu'à la filtration finale. Cela représente environ 15 % du temps nécessaire avec la méthode conventionnelle, comme le montre la figure 3.

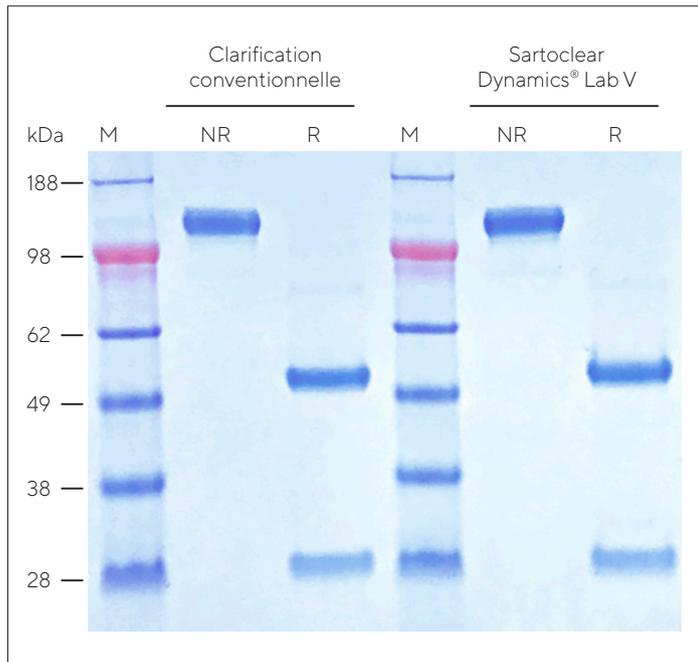


**Figure 3: Comparaison des méthodes de clarification en fonction du temps de manipulation. Chaque litre de culture cellulaire, d'une densité de  $2,4 \times 10^6$  cellules/ml, a été respectivement clarifié à l'aide de la méthode conventionnelle et avec le Sartoclear Dynamics® Lab. Ce dernier permet d'éviter le recours nécessaire à une étape de centrifugation et réduit considérablement le temps nécessaire pour clarifier les cultures de cellules de mammifères.**

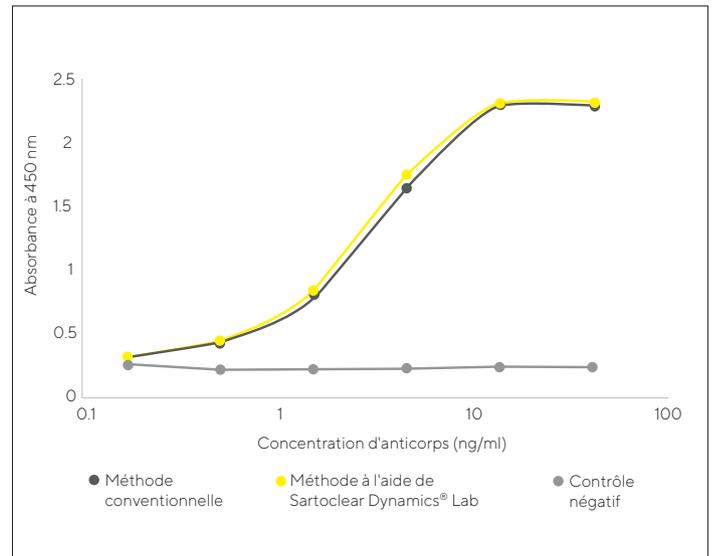
Pour confirmer que l'utilisation du Sartoclear Dynamics® Lab V n'a eu aucun effet sur la qualité de l'anticorps, la purification et le contrôle de qualité des échantillons ont été effectués séparément. Les anticorps purifiés finaux n'ont montré aucune différence détectable dans la qualité du produit, telle que démontré par le test SDS-PAGE (Figure 4) ou encore SEC-HPLC (Figure 5). Une mesure de l'endotoxine a été effectuée pour chaque échantillon, les deux montrant des résultats inférieurs à 0,05 EU/mg, qui est la limite de détection la plus basse du kit de test que nous utilisons régulièrement. Pour confirmer que la modification du processus n'a eu aucun effet sur la fonction de l'anticorps, un test ELISA indirect a été effectué pour mettre en lumière la fixation sur l'EGFR-Fc humain (numéro de catalogue « Absolute Antibody » : Pr00117-10.9). Comme le montre la figure 6, le choix de la méthode de clarification cellulaire n'a eu aucun impact sur l'activité de fixation. De plus, les rendements finaux obtenus grâce aux deux procédés étaient presque identiques, ce qui montre que l'ajout de DE n'a aucunement impacté la qualité et la quantité d'anticorps.



**Figure 5:** SEC-HPLC de l'anticorps anti-EGFR purifié par la protéine A (Cetuximab, numéro de catalogue «Absolute Antibody» : Ab00279-10.0) après clarification classique par centrifugation et filtration (A), puis en utilisant le Sartoclear Dynamics® Lab V (B). Les deux échantillons montrent des profils identiques.



**Figure 4:** Image de gel SDS-PAGE (NR – non réduite, R – réduite, M – marqueurs) de l'anticorps anti-EGFR purifié par la protéine A (Cetuximab; numéro de catalogue «Absolute Antibody» : Ab00279-10.0) après clarification classique par centrifugation et filtration, puis en utilisant le Sartoclear Dynamics® Lab V.



**Figure 6:** Test ELISA indirect montrant la fixation des anticorps à l'EGFR-Fc. Les anticorps anti-EGFR (Cetuximab) ont été purifiés par notre procédé conventionnel et en utilisant Sartoclear Dynamics® Lab V. Il n'y a essentiellement aucune différence dans l'activité de fixation.

## Conclusion

Nous avons ici clairement démontré que l'utilisation du Sartoclear Dynamics® Lab V permet d'effectuer une clarification rapide de cultures de cellules de mammifères, et ce sans le recours nécessaire à une centrifugation. Pour ce faire, nous avons pris deux litres de culture cellulaire transitoirement transfectés avec un anticorps, puis nous avons comparé une méthode standard de clarification basée sur une centrifugation, avec l'utilisation du Sartoclear Dynamics® Lab V, qui repose sur l'utilisation de terre de diatomées. Nous n'avons pas été capables de trouver la moindre différence significative en termes de qualité ou de quantité concernant le produit final, comme l'ont montré un grand nombre de tests (SDS-PAGE, SEC-CLHP, ELISA et endotoxines). Cela démontre ainsi que l'utilisation de terre de diatomées n'impacte aucunement la qualité du produit. Il est aussi important de noter que l'utilisation du kit Sartoclear Dynamics® Lab V permet un important gain de temps s'approchant des 85 %. Cela en fait une option attrayante pour augmenter la productivité et le débit de l'étape de clarification des systèmes d'expression et de purification des protéines secrétées.

## Références

- 1 Kempken, R., Preissmann, A., and Berthold, W. (1995). Clarification of animal cell cultures on a large scale by continuous centrifugation. *J. Ind. Microbiol.* 14, 52-57.
- 2 Liu, H.F., Ma, J., Winter, C., and Bayer, R. (2010). Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *MAbs* 2, 480-499.
- 3 Riske, F., Schroeder, J., Belliveau, J., Kang, X., Kutzko, J., and Menon, M.K. (2007). The use of chitosan as a flocculant in mammalian cell culture dramatically improves clarification throughput without adversely impacting monoclonal antibody recovery. *J. Biotechnol.* 128, 813-823.

## Abréviations

DE	Diatomaceous Earth = Terre de diatomées
PES	Polyéthersulfone
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
SEC-HPLC	Chromatographie d'exclusion stérique - Chromatographie en phase liquide à haute performance
ELISA	Dosage immuno-enzymatique sur support solide
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique

**Germany**

Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG  
Otto-Brenner-Strasse 20  
37079 Goettingen, Germany  
Phone +49 551 308 0

**USA**

Sartorius Corporation  
565 Johnson Avenue  
Bohemia, NY 11716  
Phone +1 631 254 4249  
Toll-free +1 800 635 2906

 For further contacts, visit  
[www.sartorius.com](http://www.sartorius.com)