

# Note d'application

9 avril 2018

#### Mots-clés:

culture de cellules de mammifères, clarification, terre de diatomées, chromatographie d'affinité

# De la culture de cellules mammaliennes aux protéines pures: le Sartoclear Dynamics<sup>®</sup> Lab réduit considérablement le temps de récolte des cellules

Dennis Karthaus\*, Sarah Ludwig, Isabel Schuchardt, Stefanie Krame IBA GmbH, Rudolf-Wissell-Str. 28, 37079 Göttingen, Allemagne www.iba-lifesciences.com

\* Correspondence

E-Mail: karthaus@iba-lifesciences.com

#### Résumé

Dans cette étude, les nouveaux kits Sartoclear Dynamics® Lab V furent évalués pour leur capacité de rétention des cellules de mammifères MEXi-293E (HEK293) exprimant des IgG transitoires dans le milieu de culture. La méthode a été directement comparée à la méthode standard actuelle, qui nécessite deux étapes de centrifugation. Après clarification, l'IgG recombinante contenant un Twin-Strep-tag® a été purifiée en parallèle grâce à un processus de purification d'affinité à haute capacité Strep-Tactin®XT Superflow® ne nécessitant qu'une étape. Dans l'ensemble, l'utilisation du kit Sartoclear Dynamics® Lab a significativement réduit le temps nécessaire à la clarification des échantillons, jusqu'à 3,6 fois plus rapide, tout en conservant le rendement et la qualité des protéines. De plus, il peut facilement être intégré dans les processus actuels utilisés dans les laboratoires, raccourcissant considérablement le temps de préparation manuelle et simplifiant de ce fait la préparation des échantillons.

#### Introduction

L'importance des protéines recombinantes produites dans les lignées cellulaires de mammifères a augmenté au cours des dernières années, en particulier pour les applications thérapeutiques. Un des principaux objectifs dans ce domaine est la production efficiente de protéines extrêmement pures. Pour atteindre cet objectif, les facteurs clés sont le système d'expression, la plateforme de purification ainsi que son protocole. Un système d'expression transitoire permet la production rapide de protéines en milligramme et est le système de choix dans le cadre de recherches portant sur la production rapide de protéines recombinantes.

Les marqueurs d'affinité représentent un outil puissant et communément utilisé dans leur purification. Génétiquement attachés à la protéine d'intérêt, ils simplifient considérablement le processus de purification en utilisant la même stratégie simultanément pour un grand nombre de protéines différentes. L'importante affinité de liaison du Twin-Strep-tag® au Strep-Tactin®XT Superflow® à haute capacité en fait un outil puissant pour presque toutes les applications en aval, en particulier en le combinant à un processus de purification efficace ne nécessitant qu'une seule et unique étape. Cela facilite le processus global de production de protéines et fait du système STREP-tag® une plate-forme très attrayante.

La préparation d'échantillons peut être une procédure chronophage, tout particulièrement l'étape de centrifugation effectuée pour séparer les cellules de mammifères est fastidieuse. Ici, nous avons comparé le nouveau kit Sartoclear Dynamics® Lab avec une procédure de centrifugation standard concernant la préparation d'une IgG transitoirement exprimée par des cellules de mammifères et marquée avec Twin-Strep.

Les produits Sartoclear Dynamics® Lab se fondent sur le principe de la filtration sur diatomées : L'adjuvant de filtration composé de terre de diatomées (DE) est ajouté au bouillon de culture cellulaire pour retenir les cellules et les débris cellulaires, créant un gâteau de filtration dynamique et perméable permettant d'éviter le colmatage du filtre stérilisant. Grâce au Sartoclear Dynamics® Lab, il n'est plus nécessaire d'effectuer des étapes distinctes de centrifugation et de filtration, permettant ainsi d'économiser beaucoup de temps, de consommable et de ressources.

#### Matériels et méthodes

Une IgG fusionnée avec le marqueur Twin-Strep-tag® a été transitoirement exprimée dans un système d'expression mammalien HEK-293. Trois litres de cellules MEXi-293E (IBA GmbH, 2-6001-010) cultivées en suspension ont été transfectés avec le plasmide codant IgG conformément au protocole du fabricant. Les cellules ont été cultivées dans un environnement disposant des caractéristiques suivantes : 5% de CO<sub>2</sub>, 37°C et 125 tr/min. Deux jours après la transfection, la température a été baissée à 32°C. Après 16 jours, la suspension cellulaire a été divisée en trois aliquotes identiques de 1000 mL. Dans le but de défier le processus de clarification et de purification, les cellules ont été cultivées jusqu'à ce qu'une mort cellulaire importante se produise.

Une aliquote a été soumise à deux étapes consécutives de centrifugation suivant la méthode standard d'élimination des cellules. La première centrifugation a été effectuée à 300 x g pendant 10 minutes à une température de 4°C pour enlever les cellules en douceur et éviter leur éclatement. Le surnageant a de nouveau été centrifugé à 10 000 x g pendant 20 minutes, toujours à 4°C pour éliminer les débris cellulaires ainsi que les cellules restantes, étape indispensable avant la purification sur colonne d'affinité. Les deux aliquotes restantes ont été traitées à l'aide du kit Sartoclear Dynamics® Lab (Sartorius, SDLV-1000-40C-E). 40 ou 60 g de terre de diatomées ont été ajoutés et chaque solution a été mélangée pour obtenir une suspension homogène avant d'être filtrées sur un filtre stérilisant (PES, 0.22 µm). Une solution tampon W (IBA GmbH, 2-1003-100) et une solution BioLock (IBA GmbH, 2-0205-050) ont été ajoutées au filtrat conformément aux recommandations du fabricant pour la préparation des échantillons destinés à la purification de protéines. L'IgG a été purifiée dans un Strep-Tactin®XT Superflow® à haute capacité avec un écoulement par gravité (IBA GmbH, 2-4030-010). Les échantillons ont été introduits dans les colonnes grâce aux dispositifs Wet Fred (IBA GmbH, 2-0910-001) qui permettent une purification parallèle semi-automatisée de grands volumes d'échantillons. Après l'injection des échantillons effectuée, les colonnes ont été lavées avec 5 volumes de colonnes de solution tampon W (IBA GmbH, 2-1003-100). La protéine a été éluée dans des conditions physiologiques en ajoutant 3 volumes de colonnes de solution tampon BXT (IBA GmbH, 2-1042-025). La concentration protéique a été mesurée grâce à un photomètre Nanodrop réglé à 280 nm.

Après la purification, les échantillons (le surnageant centrifugé, le filtrat, celui avec la solution tampon W et BioLock, et enfin les fractions d'élutions) ont été analysés sur gel SDS-PAGE dans des conditions réductrices. De plus, les échantillons ont été transférés sur une membrane en nitrocellulose, et la chaîne lourde d'IgG possédant un Twin-Strep-tag® a été détectée avec le conjugué STREP-tactin®-HRP (IBA GmbH, 2-1502-001), conformément au protocole du fabricant.

Pour finir, les fractions d'élution provenant de chaque expérience après élimination des cellules ont été analysées par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) grâce à un système de purification ÄktaTM utilisant une colonne Superdex 200 Increase de 3,2 x 300 mm (GE Healthcare, 28990946).

#### Résultats et discussion

Le pic de densité cellulaire viable était de  $1,5 \times 10^7$  cellules/ml et la viabilité de 95 % après 13 jours de culture. 16 jours après la transfection, les chiffres étaient respectivement de  $6,8 \times 10^6$  cellules/ml et la viabilité de 63 %. Par conséquent, la culture contenait beaucoup de cellules mortes et de débris cellulaires, entravant l'étape d'élimination des cellules. Le temps de manipulation concernant la préparation des échantillons et le processus d'élimination des cellules ont été directement comparés pour les deux méthodes (Figure 1).

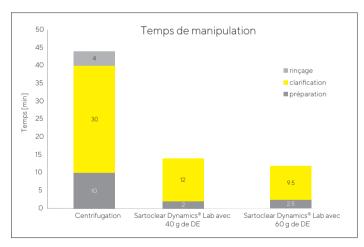


Figure 1: Comparaison des méthodes de clarification en fonction du temps de manipulation. 1 litre de culture cellulaire HEK293 a été clarifié en suivant le procédé standard (centrifugation) ou en utilisant le kit Sartoclear Dynamics® Lab avec un adjuvant de filtration de 40 ou 60 g. Le Sartoclear Dynamics® Lab réduit considérablement le temps nécessaire à la clarification des milieux de culture cellulaire HEK293.

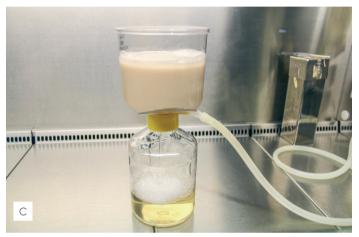
Dans le cas de la méthode standard par double centrifugation, il a fallu prendre en compte dans le temps de préparation des échantillons l'équilibrage du poids des tubes et la récupération du surnageant. Concernant le kit Sartoclear Dynamics® Lab, le temps de préparation comprenait l'ajout de la terre de diatomée (DE) à la suspension cellulaire.

Le temps de manipulation pour l'élimination des cellules par centrifugation était jusqu'à 5 fois plus élevé que pour la préparation de l'échantillon avec le kit Sartoclear Dynamics® Lab. En outre, le temps de filtration pour éliminer les cellules était 2,5 fois (avec 40 g DE) et 3,1 fois (avec 60 g DE) moins important avec le kit Sartoclear Dynamics® Lab. En utilisant ce dernier, la procédure complète n'a respectivement pris que 12 et 14 minutes. En revanche, la préparation totale des échantillons et l'élimination des cellules par centrifugation, le tout cumulé, a nécessité un temps de traitement global de 44 minutes. En résumé, l'utilisation du kit Sartoclear Dynamics® Lab avec l'ajout de DE pour préparer les échantillons a permis d'avoir un temps de traitement global jusqu'à 3,6 fois moins important.

Il est intéressant de noter que l'échantillon centrifugé n'était pas stérile. Ce n'était pas un problème dans la présente application car la purification de la colonne était immédiatement enclenchée après clarification dans des conditions non stériles. Néanmoins, dans le cas où le surnageant récolté doit être stérile, il faut ajouter une étape de filtration supplémentaire après la centrifugation. En revanche, en suivant la procédure Sartoclear Dynamics® Lab, tous les échantillons sont filtrés stérilement lors le processus de clarification. Outre la réduction du temps de traitement, l'utilisation du système Sartoclear Dynamics® Lab est bénéfique en termes de flexibilité, ne requérant aucun matériel additionnel si ce n'est une pompe à vide (Figure 2). Le processus de centrifugation nécessite une centrifugeuse et un rotor pour des tubes ayant un volume suffisant.













**Figure 2:** Mélange de 40 g d'adjuvant de filtration dans la culture de cellules de mammifères, puis clarification avec une unité de filtration stérilisante Sartolab RF comprise dans le kit Sartoclear Dynamics® Lab (A - F). Un tube est connecté à une pompe à vide.

Pour exclure toutes liaisons non spécifiques de l'IgG aux composants du Sartoclear Dynamics®, les rendements protéiniques ont été déterminés une fois la purification des colonnes d'affinité effectuée. Les rendements en IgG de l'échantillon centrifugé étaient comparables aux échantillons traités par le Sartoclear Dynamics® Lab (Figure 3), excluant ainsi tout effet négatif de ce dernier sur les rendements protéiniques.

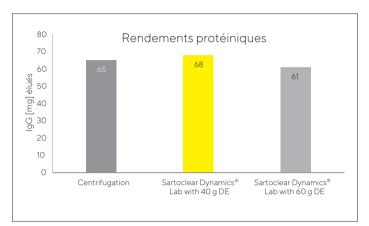
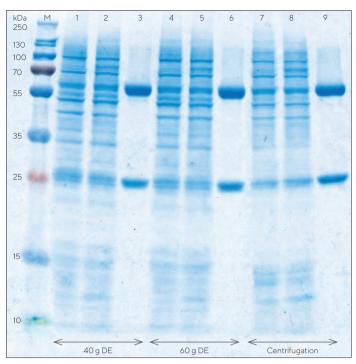


Figure 3: Comparaison des méthodes de clarification en fonction du rendement en protéines. Les rendements en anticorps monoclonaux après purification sont comparables quelle que soit la méthode de clarification utilisée.

Pour tester son effet sur la qualité des produits, les échantillons ont été analysés par gel SDS-PAGE (Figure 4) et par analyse SEC (Figure 6). Les bandes correspondant à la chaine lourde et légère de l'IgG étaient présentes dans les fractions d'élution de tous les échantillons, et aucune différence n'a été observée entre les échantillons centrifugés et ceux clarifiés par Sartoclear Dynamics® Lab. Un immunotransfert a détecté la chaine lourde Twin-Strep-tag® dans tous les échantillons (Figure 5), confirmant l'identité de la protéine d'intérêt. De plus, le résultat de l'analyse sur gel SDS-PAGE a démontré l'efficience de la purification à haute capacité Twin-Strep-tag® : Strep-Tactin®XT Superflow® à partir du surnageant de cellules de mammifères au cours d'un processus de purification simple en une seule étape.

Les résultats de l'analyse SEC ont montré que le choix de méthode de préparation des échantillons n'avait aucune incidence sur le taux d'agrégation (25 %) de l'IgG. Le pic principal (75 %) correspond à l'IgG monomérique. On peut supposer que le taux d'agrégation élevé résulte de la faible viabilité des cellules au moment de la récolte. Les protocoles du fabricant recommandent de récolter les cellules avant que leur viabilité ne soit inférieure à 75 %.



**Figure 4:** Analyse sur un gel SDS-PAGE de surnageants de culture de cellules clarifiés par centrifugation et Sartoclear Dynamics® Lab ainsi que des fractions d'élution après purification. La pureté des protéines était de 100 % dans toutes les fractions d'élution indépendamment de la méthode de clarification. Echantillons 1, 4 et 7) surnageants; 2, 5 et 8) surnageants avec BioLock et tampon W; 3, 6 et 9) élution.

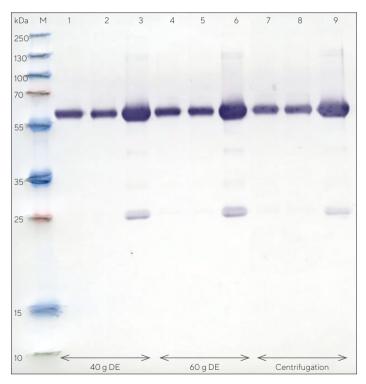


Figure 5: Analyse par immunotransfert de surnageants de culture de cellules clarifiés par centrifugation et Sartoclear Dynamics® Lab ainsi que des fractions d'élution après purification. Le marqueur Twin-Strep-tag® de la chaîne lourde d'anticorps monoclonaux a été détecté par le conjugué Strep-Tactin®-HRP. Echantillons 1, 4 et 7) surnageants; 2, 5 et 8) surnageants avec BioLock et tampon W; 3, 6 et 9) élution.

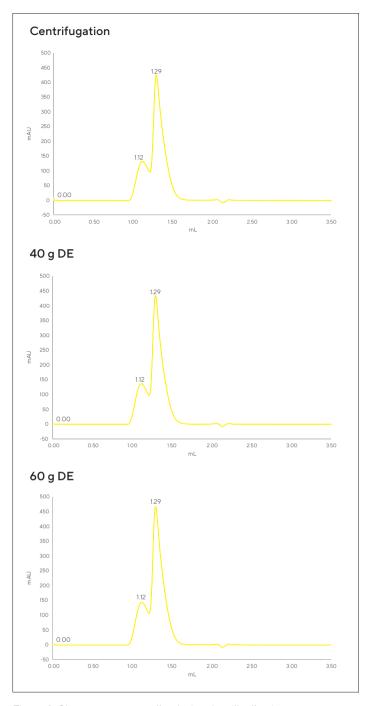


Figure 6: Chromatogrammes d'exclusion de taille d'anticorps monoclonaux élués après purification à partir du surnageant de culture de cellules clarifiés par centrifugation, Sartoclear Dynamics® Lab avec 40 g et 60 g d'adjuvant de filtration (DE = Diatomaceous Earth). La méthode de clarification n'a eu aucune influence sur le niveau d'agrégation d'anticorps monoclonaux. Le pic à 1,12 ml représente la quantité maximum d'anticorps monoclonaux agrégés (25 %) et le pic à 1,29 ml la quantité maximum d'anticorps monoclonaux monomères (75 %).

### Conclusion

En résumé, l'efficace expression transitoire dans la lignée cellulaire MEXi-293E (HEK293), combinée à une purification à haute capacité Strep-Tactin®XT Superflow®, qui est simple et fonctionne en une seule et unique étape, génère plus de 60 mg d'IgG hautement pure par litre de culture cellulaire. L'utilisation de Sartoclear Dynamics® Lab a considérablement réduit le temps d'élimination des cellules par rapport au procédé standard fondé sur la centrifugation, sans affecter pour autant le rendement en protéines ni la qualité du produit.

## Abbréviations

HEK Human embryonic kidney = rein embryonnaire

PES Polyethersulfone = polyéthersulfone

DE Diatomaceous earth = terre de diatomées

SEC Size exclusion chromatography = chromatographie d'exclusion stérique

#### Germany

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

For further contacts, visit www.sartorius.com

#### France

Sartorius France 2 rue Antoine-Laurent de Lavoisier 91410 Dourdan Phone +33170 62 50 00 mail: service.france@sartorius.com