

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉTUDE DES INTERACTIONS ENTRE LES CELLULES HEK-293 ET UN
ADSORBANT IMAC DANS UNE COLONNE À LIT EN EXPANSION

FRÉDÉRIC POULIN
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)

JUIN 2007

© Frédéric Poulin, 2007.



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-35695-1

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-35695-1

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

ÉTUDE DES INTERACTIONS ENTRE LES CELLULES HEK-293 ET UN
ADSORBANT IMAC DANS UNE COLONNE À LIT EN EXPANSION

présenté par : POULIN Frédéric

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. HENRY Olivier, Ph.D., président

M. LEGROS Robert, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. JOLICOEUR Mario, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

Mme AOMARI Hafida, M.Sc.A., membre

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier premièrement mon directeur de recherche, le professeur Robert Legros, qui m'a donné l'opportunité de réaliser un projet de recherche au sein de l'unité Bio-P² dans le domaine passionnant des bioprocédés pharmaceutiques, ainsi que mes codirecteurs, les professeurs Mario Jolicoeur et Gregory De Crescenzo. Merci pour avoir supporté et guidé mon travail par des idées inspirantes, pour m'avoir encouragé à me dépasser constamment et surtout pour la confiance témoignée.

Je remercie Renaud Jacquemart, étudiant post-doc, et Steve Hisiger, associé de recherche, qui m'ont introduit aux pratiques expérimentales et porté conseil tout au long de la réalisation du projet. Merci également aux techniciens du département de génie chimique pour l'approvisionnement du matériel, les travaux de conception et le support informatique.

Je veux remercier les étudiants et associés de recherche de l'unité Bio-P² pour leur amitié et pour le support moral et technique; j'aurais aimé avoir plus d'occasions pour vous connaître dans cette courte aventure. Merci en particulier à Cyril Boucher pour la préparation de milieux de culture.

Finalement, je suis reconnaissant envers le réseau de recherche Cellnet (CRSNG) pour le financement de ce projet sans quoi cette expérience enrichissante n'aurait pu être possible.

RÉSUMÉ

Les cellules mammifères suscitent présentement un engouement car, parmi toutes les espèces cellulaires, elles sont les seules capables de produire les protéines recombinantes pertinentes les plus complexes. En effet, plusieurs travaux se penchent actuellement, entre autres, sur l'optimisation des cultures de cellules mammifères et des méthodes de transfection. Dans le présent travail, une nouvelle stratégie intégrée est mise au point pour la production et la purification de protéines sensibles ou ayant une courte durée de vie. Cette stratégie, utilisant des colonnes d'adsorption en lit expansé (EBA), consiste à capturer en cours de culture des protéines sécrétées. Malheureusement, les cellules peuvent interagir avec l'adsorbant en expansion et affecter le bon fonctionnement de la colonne EBA. Afin de prévenir ces interactions biomasse/adsorbant, il est important de les comprendre et de les caractériser. L'objectif final de ce projet consiste à mettre au point la stratégie intégrée qui utilise des colonnes d'adsorption en lit expansé.

Dans un premier temps, une colonne EBA, munie d'un distributeur composé de billes de verre, a été développée. Des essais de fluidisation ont été effectués sur cette colonne avec un adsorbant EBA commercial (Streamline Chelating). L'expansion a été caractérisée avec le modèle de Richardson-Zaki dont les paramètres, calculés à partir des résultats expérimentaux ($n = 5.24$ et $U_t = 972$ cm/h), correspondent à une fluidisation EBA appropriée. Deuxièmement, des tests de purification de la protéine modèle TGF bêta RIII-ED ont été effectués sur trois types de colonnes IDA-Ni (IMAC). La détection par Western blot (c-Myc) a démontré que la protéine est concentrée par la méthode de purification employée sur deux types de colonnes à lit fixe. Troisièmement, des tests de culture de cellules HEK-293 (cellules modèles) ont été effectués sans adsorbant pour valider le montage de purification intégré. Malgré leur passage répété dans le circuit de recirculation (pompe + colonne agitée), les cellules ont montré qu'elles sont résistantes aux forces de cisaillement et à la capacité de transfert d'oxygène réduite. Dernièrement,

des tests d'adsorption en mode de purification intégrée ont permis de caractériser les interactions biomasse/adsorbant. Ces tests ont permis d'observer un niveau d'interaction modéré, une capacité d'adsorption de 17.1×10^6 cellules/ml et une constante de cinétique apparente de 0.009 min^{-1} .

ABSTRACT

Mammalian cells are presently showing a lot of interest because, from all cell species, they are the only ones capable to produce the most complex relevant recombinant proteins. Indeed, many works are currently focused on the optimisation of mammalian cells cultures and transfection methods. In this work, a new strategy is developed for the production and purification of highly sensitive and short half-life proteins. This strategy, using expanded bed adsorption (EBA) columns, consists in capturing during a culture the secreted proteins. Unfortunately, cells can interact with the expanded adsorbent and affect the proper operation of the EBA column. In order to prevent these interactions, it is important to understand and characterize them. The final objective of this project is to develop this expanded bed adsorption integrated strategy

First of all, an EBA column, fitted with a glass bead distributor, was developed. Fluidization tests were performed with this column using a commercially available EBA adsorbent (Streamline Chelating). The expansion was characterized with the Richardson-Zaki model whose parameters, determined from experimental results ($n = 5.24$ and $U_t = 972$ cm/h), were found to correspond to a proper EBA fluidization. Secondly, purification tests of the model protein TGF β III-ED were performed on three types of IDA-Ni (IMAC) columns. The Western blot detection (c-Myc) has shown that the protein is concentrated by the purification method used on two types of fixed bed columns. Thirdly, short cultures of HEK-293 were performed, without using adsorbent, to validate the integrated purification setup. The cells have shown that they could face the shear forces and reduced oxygen transfer capacity involved their repeated passing through the recirculation circuit (pump + agitated column). Finally, the adsorption tests performed in integrated purification mode allowed to characterize the biomass/adsorbent interactions. The level of interaction could be determined to moderate, the adsorption capacity to 17.1×10^6 cells/ml and the apparent kinetic constant to 0.009 min^{-1} .

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES.....	VIII
LISTE DES TABLEAUX	XI
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XIV
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	3
1.1 La purification intégrée	3
1.2 La culture des cellules mammifères.....	4
1.3 L'adsorption en lit expansé.....	4
1.3.1 L'hydrodynamique du lit expansé.....	5
1.3.2 Le système EBA.....	8
1.4 La chromatographie d'affinité aux ions métalliques.....	10
1.5 L'étude des interactions biomasse/adsorbant	11
1.5.1 Les méthodes d'évaluation des interactions biomasse/adsorbant .	11
1.5.2 Les influences des interactions biomasse/adsorbant.....	13
1.5.3 La cinétique d'adsorption de la biomasse.....	14
1.5.4 L'équilibre d'adsorption de la biomasse.....	15

CHAPITRE 2 ORGANISATION DU MÉMOIRE	17
CHAPITRE 3 ESSAIS DE FLUIDISATION DANS UNE COLONNE DÉVELOPPÉE AU LABORATOIRE	18
3.1 Matériel et méthode	18
3.2 Résultats et discussion	19
CHAPITRE 4 PURIFICATION DE LA PROTÉINE TGF BETA RIII-ED	23
4.1 Matériel et méthodes	23
4.1.1 Préparation de l'échantillon de protéines	23
4.1.2 Préparation des solutions tampons	23
4.1.3 Préparation d'adsorbant	24
4.1.4 Purification par écoulement gravitaire	26
4.1.5 Purification automatisée sur lit fixe	26
4.1.6 Purification en lit expansé	27
4.1.7 Détection de la protéine par Western blot	27
4.2 Résultats et discussion	28
4.2.1 Purification à écoulement gravitaire	29
4.2.2 Purification automatisée sur lit fixe	29
4.2.3 Purification en lit expansé	30
4.3 Conclusion	33
CHAPITRE 5 VALIDATION DU MONTAGE DE PURIFICATION INTÉGRÉE	34
5.1 Matériel et méthodes	34
5.1.1 Cellules et milieu de culture	34
5.1.2 Colonne	34
5.1.3 Cultures en mode de purification intégrée	35
5.1.4 Mesure de la concentration et de la viabilité cellulaire	36
5.2 Résultats et discussion	36
5.2.1 Cultures en mode de purification intégrée	37

CHAPITRE 6 ARTICLE: A STUDY OF THE INTERACTION OF HEK-293 CELLS WITH STREAMLINE™ CHELATING ADSORBENT IN EXPANDED BED OPERATION	40
6.1 Introduction	41
6.2 Materials and Methods	43
6.2.1 Cells and culture media	43
6.2.2 Adsorbent and column	43
6.2.3 Cell adsorption experiments	44
6.2.4 Cell concentration and viability measurement.....	46
6.3 Results and Discussion.....	46
6.3.1 Adsorption experiments	46
6.3.2 Adsorption equilibrium and kinetics	50
6.4 Conclusions.....	55
CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE	60
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	63
RÉFÉRENCES	66

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Caractéristiques des adsorbants commerciaux.....	10
Table 6.1. Operation parameters used for the cells adsorption experiments.	45
Table 6.2. Cell balance for experiment #1.....	48
Table 6.3. Experimental equilibrium data from Ni-primed adsorbent experiments (experiments #2 and 3) for viable and total cells.....	51
Table 6.4. Reported adsorption kinetic ratios c/c_0 evaluated at $t = 10$ min for various biomass-adsorbent systems.....	55

LISTE DES FIGURES

Figure 3.1. Montage de la colonne développée au laboratoire.	19
Figure 3.2. Profil d'expansion en fonction de la vitesse superficielle.....	20
Figure 3.3. Détermination expérimentale des paramètres de Richardson-Zaki.....	22
Figure 4.1. Détermination du volume de solution de chargement.....	25
Figure 4.2. Détermination du volume de tampon d'équilibration.	25
Figure 4.3. Détection par Western blot des échantillons de la purification à écoulement gravitaire. Pistes : 1 - Échelle; 2 - Échantillon de protéines (feedstock); 3 - Éluat (2 ^e VC).	29
Figure 4.4. Chromatogramme de la purification automatisée sur lit fixe.	31
Figure 4.5. Détection par Western blot des échantillons de la purification automatisée sur lit fixe. Pistes : 1 – Échelle; 2 - Échantillon de protéines (feedstock); 3 – Échantillon de protéines passé sur la colonne (flowthrough); 4 – Éluat 50 mM (tube # 8); 5 – Éluat 300 mM (tube # 12); 6 - Éluat 300 mM (tube # 13); 7 - Éluat 300 mM (tube # 14); 8 - Éluat 300 mM (tube # 15); 9 - Éluat 300 mM (tube # 16); 10 - Éluat 300 mM (tube # 17).	32
Figure 4.6. Chromatogramme de la purification en lit expansé.....	32
Figure 5.1. Schéma du montage pour les tests en mode de purification intégrée.....	36
Figure 5.2. Culture de HEK-293 avec recirculation sans colonne EBA (A), avec colonne EBA non-agitée (B) et avec colonne EBA agitée (C). Concentration de cellules viables aux ports d'échantillonnage d'entrée de colonne (■), de sortie de colonne (□) et du spinner contrôle (■); Viabilité aux ports d'entrée de colonne (▲), de sortie de colonne (△), et du spinner contrôle (▲).	39
Figure 6.1. Diagram of the experimental setup used for the cell adsorption experiments.	44

- Figure 6.2. Adsorption of HEK-293 cells in experiment #1 (panels A, B, C) and experiment #2 (panels D, E, F). Viable cells concentration at column inlet (■) and outlet (□); Total cells concentration at column inlet (●) and outlet (○); Viability at column inlet (▲) and outlet (△). 47
- Figure 6.3. Adsorption of HEK-293 cells on primed Streamline Chelating adsorbent in the cell injection experiment (experiment #3). Cells were injected at $t=3.5$ h and $t=7.8$ h determining the time limits of three adsorption phases: phase 1 (0, 3.5) h, phase 2 (3.5, 7.8) h and phase 3 (7.8, 12) h. Legend is the same as in Figure 6.2 for repeated symbols. Also: (★) bed expansion. 49
- Figure 6.4. Langmuir adsorption isotherm of Ni-primed adsorbent experiments for viable (open symbols) and total (solid symbols) cells. Legend for equilibrium data points are: for experiment #2 (○ and ●) and for cell injection experiment #3 phase 1 (□ and ■), phase 2 (△ and ▲) and phase 3 (◇ and ◆). The continuous (equilibrium) line relates the free and bound cell concentrations at equilibrium. The dashed lines represent the adsorption operating lines corresponding to the experimental conditions. 52
- Figure 6.5. Optical microscopy picture (100X magnification) of the monolayer adsorption of HEK-293 cells to Ni-primed StreamlineTM Chelating particles at the end of experiment #2 (8 h). 52
- Figure 6.6. Cell adsorption kinetics for “fresh” ($q_0 = 0$ cells/ml of adsorbent) Ni-primed adsorbent experiment #2 (○) and #3 phase 1 (■). 54
- Figure 7.1. Estimation des quantités de cellules adsorbées en mode de purification intégrée. Les lignes d’opération (trait gris) aux concentration libres de 1×10^6 et 4×10^6 cellules/ml sont assumées parallèles à la ligne d’opération expérimentale (0.2×10^6 cellules/ml). 62

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

BSA	Sérum albumine bovine (bovine serum albumin)
CTI	Indice de transmission de cellules (cell transmission index)
EBA	Adsorption en lit expansé (expanded bed adsorption)
RALF 3	Protéine (rapid alkalization factor)
HEK (293)	Cellules embryonnaires humaines de rein (human embryonic kidney)
HETP	Hauteur équivalente des plateaux théoriques (height of equivalent theoretical plates)
HEWL	Lysozyme de blanc d'œuf de poule (hen egg white lysozyme)
IDA	Acide iminodiacétique (iminodiacetic acid)
IMAC	Chromatographie par affinité aux ions métalliques immobilisés (immobilized metal ion affinity chromatography)
RTD	Distribution de temps de séjour (residence time distribution)
TGF bêta RIII-ED	Domaine extracellulaire de la protéine transmembranaire récepteur de type III du facteur de croissance transformant bêta (Transforming growth factor bêta type III receptor extracellular domain)
VC	Volume colonne (volume correspondant à 1x le volume d'adsorbant sédimenté)

INTRODUCTION

La purification de biomolécules en cours de culture est une stratégie qui a déjà présenté des avantages intéressants tel qu'une augmentation de productivité et une diminution de la dégradation du produit. Cependant, les techniques de purification jusqu'à maintenant employées ont montré des contraintes au niveau de la récupération du produit et de la séparation des cellules en continu, ce qui complique leur transposition à grande échelle. La nouvelle stratégie de purification développée dans ce travail permet d'échapper à ces contraintes en utilisant des colonnes d'adsorption en lit expansé.

Les cellules mammifères suscitent un intérêt grandissant depuis les dernières années en raison de leur habileté à produire des protéines recombinantes d'utilisation thérapeutique. Comparativement aux cellules eucaryotes inférieures et aux procaryotes, les cellules mammifères peuvent produire des protéines bioactives qui possèdent des profils de glycosylation complexes. Parmi les cellules mammifères, les cellules HEK-293 ont démontré plusieurs avantages tels que des rendements de transfection et des niveaux d'expression élevés ainsi qu'une facilité de culture en suspension.

L'adsorption en lit expansé (EBA) est une technique de chromatographie sur colonne qui permet de purifier de façon primaire les protéines contenues dans des milieux de culture non clarifiés (i.e. contenant cellules et débris). Dans un procédé utilisant la chromatographie sur colonne à lit fixe, une étape préalable de séparation des cellules, par filtration ou centrifugation, est nécessaire pour éviter les problèmes de colmatage de la colonne. Cette étape de séparation peut donc être évitée dans un procédé de purification utilisant l'EBA.

Les ligands d'affinité sont généralement plus spécifiques mais moins robustes que les populaires ligands échangeurs d'ions. Les ligands qui forment des chélates

métalliques (IMAC) représentent un compromis entre les ligands d'affinité et les ligands échangeurs d'ions en raison de leur bonne sélectivité et de leur robustesse. La force des liaisons formées entre la protéine et le ligand chélateur dépend de la présence de certains résidus d'acides aminés situés à la surface des protéines, tels que l'histidine, le tryptophane et la cystéine, du type de chélateur, de l'ion métallique immobilisé et des conditions environnementales dans lesquelles se trouve la protéine, tel que le pH et la force ionique.

En EBA, la faible sélectivité du ligand peut entraîner l'interaction des cellules avec les particules d'adsorbant expansées et diminuer la stabilité du lit et la performance de la colonne. Afin de prévenir ces interactions biomasse/adsorbant, il est important de pouvoir les quantifier et de comprendre les mécanismes qui les forment.

Le projet traité dans ce document porte sur le développement d'une stratégie intégrée de purification de protéines utilisant des colonnes d'adsorption en lit expansé. Les objectifs spécifiques visés sont :

- développer une méthode de purification par chromatographie d'affinité aux ions nickel immobilisés (IMAC) pour une protéine modèle donnée
- développer un montage de purification intégrée qui assure la viabilité des cellules modèles
- développer une méthode permettant d'évaluer la capacité d'adsorption de cellules et le niveau d'interaction entre les cellules et l'adsorbant IMAC.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 La purification intégrée

La purification intégrée est une stratégie qui consiste à adsorber, en cours de culture, les biomolécules d'intérêt qui sont sécrétées. La majorité des travaux qui utilisent la purification intégrée ont été effectués sur des cultures de cellules de plantes (1-4), mais aussi sur des cultures bactériennes (5). Dans l'ensemble, le constat de ces travaux est une productivité accrue par l'adsorption intégrée des métabolites secondaires produits. Les méthodes employées pour l'adsorption intégrée peuvent être répertoriées en deux catégories : avec ou sans contact entre les cellules et l'adsorbant.

La purification intégrée avec contact cellules/adsorbant peut être effectuée par l'ajout dans le milieu de culture de résines libres (en suspension) (4) ou de résines contenues dans un récipient perméable (3). Les productivités les plus élevées ont été observées avec l'emploi de cette stratégie, mais pour des raisons encore inexplicables (1). Cependant, le fait que l'adsorbant ne soit pas contenu dans une colonne complique la récupération du produit, surtout à grande échelle.

La purification intégrée sans contact cellules/adsorbant utilise une boucle de recirculation dans laquelle se trouve un dispositif de séparation placé en amont d'une colonne d'adsorption qui conserve les cellules dans le bioréacteur (1, 2). Puisque l'adsorbant est contenu dans une colonne, la récupération du produit est facilitée. Cependant, la séparation des cellules en continu peut présenter certaines difficultés, surtout à grande échelle, où les débits sont plus élevés.

1.2 La culture des cellules mammifères

Les cellules mammifères font l'objet d'un intérêt croissant en raison des récents progrès réalisés dans les domaines de la génomique et de la protéomique. Depuis quelques années, il existe un intérêt pharmaceutique pour des protéines recombinantes de plus en plus complexes, que seules les cellules eucaryotes supérieures arrivent à produire (6). Actuellement, plusieurs travaux se concentrent sur l'optimisation des cultures à grande échelle et des méthodes de transfection des cellules animales.

Parmi les cellules mammifères, la lignée cellulaire humaine HEK-293 est particulièrement reconnue pour atteindre des rendements élevés de transfection et pour être facilement cultivée en suspension et adaptée aux milieux sans sérum (7). Certains travaux se sont penchés sur la culture en suspension des cellules HEK-293 en flacons et en spinner (8), ou, à plus grande échelle, en bioréacteur (9, 10).

Le pH et l'osmolalité des cultures de cellules mammifères sont habituellement établis aux valeurs physiologiques de 7.4 et 285-295 mOsm/kg, respectivement. DeZagotita et al. (11) rapporte que, pour les cellules mammifères, des valeurs de pH entre 7.0 et 7.2 sont typiquement utilisées et constate l'apoptose des cellules hybridomes lorsque l'osmolalité est supérieure à 320 mOsm/kg.

1.3 L'adsorption en lit expansé

L'adsorption en lit expansé (EBA) est un procédé efficace de chromatographie sur colonne utilisé pour la purification de protéines issues de cultures cellulaires. Le principal avantage de l'EBA est que l'on peut y appliquer directement des cultures non-clarifiées, contrairement à la chromatographie sur colonne à lit fixe, qui elle, requiert une étape préalable de séparation des cellules (par filtration ou centrifugation).

1.3.1 L'hydrodynamique du lit expansé

Le principe hydrodynamique d'une colonne à lit expansé consiste à créer des conditions qui permettent la fluidisation de l'adsorbant tout en minimisant les effets de mélange. La fluidisation de l'adsorbant est effectuée en dirigeant l'écoulement de la phase liquide de façon ascendante vers le lit de particules sphériques (phase solide). De façon simplifiée, sur chaque particule s'exerce un bilan entre les forces de gravité, de portance et de traînée. Une particule de taille donnée est fluidisée lorsque la vitesse de l'écoulement dans la colonne (vitesse superficielle) est comprise entre sa vitesse minimale de fluidisation U_{mf} (Equation 1) (12) et sa vitesse terminale de sédimentation U_t , donnée par la loi de Stokes (Equation 2) (13). Au-delà de sa vitesse terminale, la particule est emportée par l'écoulement, à l'extérieur de la colonne.

$$U_{mf} = \frac{g(\rho_p - \rho_l)d_p^2}{1650\mu} \quad \text{Equation 1}$$

$$U_t = \frac{g(\rho_p - \rho_l)d_p^2}{18\mu} \quad \text{Equation 2}$$

où g est l'accélération gravitationnelle, ρ_p est la densité de la particule d'adsorbant, ρ_l est la densité de la phase liquide, d_p est le diamètre de la particule d'adsorbant et μ est la viscosité de la phase liquide.

La minimisation du mélange dans la colonne est possible en favorisant un écoulement piston et en utilisant des particules d'adsorbant ayant une distribution volumétrique de taille appropriée. Lorsque fluidisées, les particules de tailles différentes sont classifiées de sorte que les plus grosses particules se situent vers le bas de la colonne et les plus petites vers le haut. Il en résulte ainsi une diminution de la mobilité des particules et du mélange (14). La formation d'un écoulement piston est possible grâce au système de distribution de la colonne.

L'expansion du lit

Les caractéristique d'expansion d'un lit sont généralement exprimées par la corrélation de Richardson-Zaki (15) (Equation 3) :

$$U = U_t \cdot \varepsilon^n \quad \text{Equation 3}$$

où U est la vitesse superficielle, ε le taux de vide interstitiel, n est l'indice d'expansion et U_t est la vitesse terminale de fluidisation (évaluée avec la loi de Stokes (Equation 2)). Le taux de vide interstitiel est exprimé par l'équation 4 où H est la hauteur du lit à une vitesse superficielle donnée, H_0 est la hauteur du lit sédimenté et ε_0 est le taux de vide interstitiel du lit sédimenté (typiquement égal à 0.4).

$$\frac{H}{H_0} = \frac{1 - \varepsilon_0}{1 - \varepsilon} \quad \text{Equation 4}$$

L'indice d'expansion varie en fonction du régime d'écoulement et du ratio du diamètre moyen des particules par rapport au diamètre de la colonne. L'indice n peut être estimé à partir des équations présentées par Theodossiou et al. (16) selon le nombre de Reynolds particulaire évalué à la vitesse terminale Re_t (Equation 5). En régime laminaire ($Re_p < 0.4$), la valeur de n de 4.8 est typiquement utilisée (12).

$$Re_t = \frac{U_t \cdot \rho_l \cdot d_p}{\mu} \quad \text{Equation 5}$$

Les paramètres de Richardson-Zaki U_t et n peuvent également être évalués à partir des données expérimentales en traçant un graphique double logarithmique de ε en fonction de U à partir des équations 3 et 4 (16, 17).

Cependant, certains auteurs mettent en doute la validité des équations traditionnellement utilisées. Lin et al. (13) constatent une différence entre la vitesse terminale de sédimentation prédite théoriquement par Stokes et celle qui est obtenue par la corrélation des résultats expérimentaux. Cette différence est expliquée par le fait que la loi de Stokes s'applique pour la sédimentation de particules dans une solution infiniment diluée et ne tient pas compte des effets d'interférence entre particules.

Pour sa part, Hubbuch et al. (18) affirment que les corrélations de Richardson-Zaki et de Stokes ne sont pas valides pour représenter les expansions réalisées dans des conditions réelles de purification (avec des milieux de culture contenant des sels minéraux, des cellules, des débris cellulaires et ayant une viscosité relativement élevée). De plus, on rapporte que la corrélation de Richardson-Zaki ne s'applique pas pour des systèmes contenant de la biomasse (19).

La stabilité du lit

La stabilité d'un lit est généralement évaluée à partir de l'analyse de la distribution du temps de séjour (RTD) et de modèles qui décrivent le mélange axial (ou la dispersion axiale) dans la phase liquide. Les essais de RTD consistent à injecter des impulsions d'un traceur, tel que l'acétone, à l'entrée d'une colonne expansée et à évaluer le temps de séjour et la variance de la distribution de concentration mesurée à la sortie par le calcul des moments premier et second. Le modèle de Levenspiel (1972) (20) est fréquemment utilisé et permet le calcul du nombre de Bodenstein Bo , le coefficient de dispersion axiale D_{ax} , le nombre de plateaux théoriques N et la hauteur des plateaux théoriques $HETP$ (12, 21-23). Le nombre de Bodenstein est inversement proportionnel à la quantité de mélange axial de l'adsorbant et décrit un écoulement piston lorsque supérieur à 40 (18). Les paramètres N et $HETP$ sont issus du modèle de réacteurs parfaitement agités en série. La stabilité du lit est proportionnelle à N et inversement proportionnelle à $HETP$.

1.3.2 Le système EBA

Les colonnes EBA

Les colonnes EBA ont pour fonction de distribuer l'écoulement de la phase liquide en un profil piston, de permettre le passage des cellules et de retenir la phase liquide lorsque l'écoulement est arrêté. De plus, les colonnes possèdent un adaptateur de sortie mobile qui peut être positionné au dessus du lit sédimenté afin de réduire le volume mort, plus particulièrement lors de la phase d'élution ou de récupération du produit adsorbé sur la résine.

Les colonnes EBA peuvent être catégorisées selon leur système de distribution. Hubbuch et al. (18) rapportent les quatre types de colonnes suivantes, utilisées pour l'EBA : basées sur la création d'une contre-pression, à distributeur conique, basées sur une agitation locale et à distributeur rotatif.

Depuis les premiers travaux sur l'EBA, ce sont les colonnes basées sur la création d'une contre-pression qui ont principalement été utilisées. On retrouve dans cette catégorie les systèmes de distribution à plaque perforée, à treillis métallique, à fritte de verre et à billes de verre (18). Les colonnes de ce type présentent cependant des problèmes de colmatage et tendent à être remplacées, entre autres, par celles qui sont munies d'un distributeur rotatif.

Les colonnes EBA disponibles sur le marché sont fabriquées par GE Healthcare (Suède) (anciennement Amersham Biosciences) et UpFront Chromatography (Danemark). UpFront Chromatography propose des colonnes basées sur une agitation locale (FastLine) de 10, 20 et 50 mm de diamètre et des colonnes à distributeur rotatif de 100 et 300 mm de diamètre. GE Healthcare propose des colonnes à distributeur rotatif (Streamline Direct) de 24, 95, 280 et 600 mm de diamètre. Le diamètre de la colonne est choisi en fonction du débit requis (ou de la vitesse superficielle requise) pour obtenir un degré d'expansion de l'adsorbant entre 2 et 3 fois la hauteur du lit sédimenté. Pour sa

part, le profil d'expansion est principalement dû aux propriétés de l'adsorbant (taille et densité).

Les adsorbants EBA

La conception d'un adsorbant EBA est le résultat d'un compromis entre les propriétés physico-chimiques qui lui permettent d'avoir de bonnes caractéristiques de fluidisation et d'adsorption (par transfert de masse diffusif) (24).

Les premiers travaux sur l'EBA ont été effectués avec des adsorbants initialement développés pour la purification en lit fixes, mais les expansions désirées ont été obtenues à des vitesses superficielles inappropriées (10-30 cm/h) (14). Ainsi, les travaux de développement des particules d'adsorbant EBA se sont entre autres penchés sur les aspects de la taille et de la densité, et les deux constats suivants peuvent en être tirés :

- L'augmentation de la densité des particules permet d'utiliser des vitesses superficielles plus élevées sans avoir à augmenter la taille des particules (14).
- L'augmentation de la taille des particules permet d'utiliser des vitesses superficielles plus élevées mais elle augmente la résistance au transfert de masse (étant donné une distance accrue dans les pores) (14).

Les adsorbants EBA présentement disponibles sur le marché sont fabriqués par GE Healthcare (Suède), UpFront Chromatography (Danemark) et Pall (NY) (anciennement BioSeptra). GE Healthcare propose des adsorbants (Streamline) couplés à des ligands échangeurs d'ions, et d'affinité (rProtein A, Heparin, et Chelating). UpFront Chromatography propose un adsorbant (FastLine) couplé à un ligand multi-mode (échangeur d'ion et hydrophobique). Pall propose des adsorbants (HyperZ) couplés à des ligands échangeurs d'ions. Les caractéristiques des différents adsorbants sont présentées au Tableau 1 suivant.

Tableau 1. Caractéristiques des adsorbants commerciaux.

Adsorbant	Matériau	Diamètre (µm)	Densité (g/cm ³)
Streamline	Agarose + quartz	Moyen : 200 (100-300)	1.2
FastLine	Agarose + tungstène	Moyen : 70 (20-200)	2.5-3.5
HyperZ	Hydrogel + oxide de zirconium	Moyen : 75 (40-105)	3.2

1.4 La chromatographie d'affinité aux ions métalliques

L'affinité aux ions métallique (IMAC) est une méthode fréquemment utilisée pour la purification de protéines en raison de sa haute sélectivité et versatilité. Plusieurs auteurs présentent les mécanismes de l'IMAC (25-30). Le principe de l'IMAC est basé sur l'affinité naturelle qui existe entre certaines protéines et les ions métalliques immobilisés, par chélation, à un ligand (chélateur) sur un support polymérique. Cette affinité dépend de la présence de certains résidus d'acides aminés situés à la surface des protéines, tels que l'histidine, le tryptophane et la cystéine, mais aussi du type de chélateur, de l'ion métallique immobilisé et des conditions environnementales dans lesquelles se trouve la protéine, tel que le pH et la force ionique. La rétention de la protéine sur un adsorbant IMAC est un effet combiné d'interactions électrostatiques, hydrophobiques et de coordination (31).

1.5 L'étude des interactions biomasse/adsorbant

Les interactions entre les cellules contenues dans les milieux de culture et les particules d'adsorbant fluidisées peuvent amener des problèmes dans le bon fonctionnement de l'opération EBA. Ces interactions cellules/adsorbant peuvent être attribuées à deux types de contributions qui sont la probabilité de collision entre les cellules et les particules d'adsorbant ainsi que la probabilité d'adsorption (influencée par les forces électrostatiques, hydrophobiques et Van der Waals) (18). Pour le développement d'un procédé EBA robuste, il est important de comprendre et de quantifier ces interactions afin de pouvoir les minimiser.

1.5.1 Les méthodes d'évaluation des interactions biomasse/adsorbant

Les méthodes d'évaluation des interactions biomasse/adsorbant peuvent être regroupées en trois catégories qui évaluent la quantité de cellules adsorbées, les propriétés physico-chimiques de surface de la biomasse et de l'adsorbant et la stabilité du lit expansé (18).

Évaluation de la quantité de cellules adsorbées

La plus populaire des méthodes jusqu'à maintenant utilisées pour l'évaluation de la quantité de cellules adsorbées consiste à injecter une impulsion de cellules dans une colonne à lit expansé (13, 19, 32-35). Un indice de transmission de cellules (CTI), calculé à partir de l'aire des pics détectés à l'entrée et à la sortie de la colonne, quantifie le niveau d'interaction biomasse/adsorbant. Cette méthode relativement rapide a été utilisée pour évaluer l'influence de plusieurs paramètres d'adsorption (pH, conductivité, type d'adsorbant, type de biomasse, concentration de biomasse). Une deuxième méthode de quantification de cellules adsorbées consiste à mettre en contact la biomasse et l'adsorbant dans des flacons ou des tubes agités (32, 34). La mesure de la concentration de cellules non liées dans le temps permet de quantifier l'interaction

biomasse/adsorbant sous les aspects de la cinétique et de l'équilibre d'adsorption, tel que présentés dans les sections suivantes. Cette méthode simple permet d'évaluer simultanément, mais avec moins d'exactitude, plusieurs conditions d'adsorption. Une troisième méthode récemment utilisée est un compromis entre les deux premières méthodes. Elle consiste à évaluer l'adsorption des cellules, sur une période de temps prolongée, avec une colonne en lit expansé placée à l'intérieure d'une boucle fermée (36, 37). Cette méthode est plus longue à employer, mais représente les conditions réelles d'opération EBA.

Évaluation des propriétés de surface de la biomasse et de l'adsorbant

La mesure du potentiel zêta des cellules et des particules d'adsorbant peut être effectuée pour indiquer leurs charges respectives dans des conditions environnementales données. À partir de ces charges et du diamètre des cellules, le paramètre $-\zeta_a \zeta_b d$ peut être calculé pour quantifier la prédominance des interactions biomasse/adsorbant électrostatiques (13, 35), où ζ_a est le potentiel zêta de l'adsorbant, ζ_b est le potentiel zêta de la biomasse et d est le diamètre des cellules.

Évaluation de la stabilité du lit

L'analyse de la distribution de temps de séjour (RTD) en présence de biomasse est également possible avec l'usage d'un traceur, qui n'interfère pas avec les cellules, injecté dans la colonne EBA (19, 32, 34, 38, 39). Le modèle PDE de Villermux et Swaaij (40) est utilisé pour représenter les conditions de fluidisation avec des milieux contenant des cellules. La fraction de lit stable (ϕ) est le paramètre le plus utilisé de ce modèle pour quantifier la stabilité d'un lit expansé en présence de biomasse.

1.5.2 Les influences des interactions biomasse/adsorbant

La stabilité du lit

Tel qu'observé par Lin et al. (34), dans le cas de cellules *S.cerevisiae* appliquées à une conductivité élevée (18 mS/cm) sur une colonne échangeuse d'anions, la stabilité du lit n'est pas influencée par l'augmentation de la concentration de biomasse. Ceci est expliqué par le fait qu'à haute conductivité, les interactions biomasse/adsorbant sont faibles.

Tel qu'observé par Fernandez-Lahore et al. (32), dans le cas de cellules *S.cerevisiae* appliquées sur différentes colonnes, la stabilité du lit est faiblement diminuée en fonction d'une augmentation de biomasse pour des colonnes IDA-Cu et échangeuse de cations. De plus, la stabilité du lit est fortement diminuée en fonction d'une augmentation de biomasse pour une colonne échangeuse d'anions. Ceci est expliqué par le fait que les interactions biomasse/adsorbant sont plus prononcées pour la colonne échangeuse d'anions que les colonnes IDA-Cu et échangeuse de cations.

L'adsorption de protéines

Tel qu'observé par Lin et al. (34), dans le cas de la protéine BSA appliquée sur une colonne échangeuse d'anions, la capacité et l'efficacité d'adsorption de la protéine sont diminuées en présence de biomasse. Cependant, cette tendance s'estompe plus le niveau d'interaction biomasse/adsorbant diminue (à plus haute conductivité).

Tel qu'observé par Fernandez-Lahore et al. (32), dans le cas des protéines BSA et HEWL appliquées sur différentes colonnes (échangeuses d'anions, de cations, d'interaction hydrophobiques et d'affinité aux ions métalliques), la capacité et l'efficacité d'adsorption de la protéine sont diminuées en présence de biomasse. Cette tendance est encore plus prononcée pour les colonnes qui démontrent des interactions biomasse/adsorbant plus fortes.

1.5.3 La cinétique d'adsorption de la biomasse

Tel que décrit par Fernandez-Lahore et al. (32) et Lin et al. (34), la cinétique d'adsorption s'effectue en deux phases au cours desquelles les interactions ne sont probablement pas les mêmes. Dans un premier temps, à des temps de contact faibles ($< 3h$), les cellules se lient rapidement à l'adsorbant par des forces électrostatiques et dans un deuxième temps, les cellules se lient plus lentement aux cellules préalablement adsorbées (32).

Pour représenter la cinétique d'adsorption des cellules au cours de la première phase, Daniels (1980) (41) propose un modèle d'adsorption basé sur la diffusion des cellules (équation 6).

$$\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = kt + k'\sqrt{t} \quad \text{Equation 6}$$

$$\text{avec } k = -4\pi\beta_0 RND \text{ et } k' \geq \frac{2kR}{\sqrt{\pi D}}$$

où A et A_0 sont la densité optique et la densité optique initiale respectivement, t est le temps, β_0 est une constante empirique reliant le nombre de cellules N_{cell} et la densité optique A ($A = 0.0001 \cdot N_{cell}^{\beta_0}$), N est le nombre de particules d'adsorbant de rayon R et D est le coefficient de diffusion. Le coefficient est obtenu graphiquement par la corrélation du modèle avec les données de cinétique d'adsorption. Selon Lin et al. (34), le coefficient D peut être utilisé comme un indicateur du niveau d'interaction biomasse/adsorbant, où des valeurs supérieures à $1 \times 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$ pourraient indiquer des interactions biomasse/adsorbant fortes.

La cinétique d'adsorption des cellules au cours de la première phase pourrait aussi être exprimée par une cinétique de premier ordre tel que :

$$\frac{dC}{dt} = -kC \quad \text{Equation 7}$$

$$\text{en intégrant devient : } \ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = -kt$$

où C et C_0 sont la concentration de cellules libres et concentration initiale de cellules libres respectivement et k est la constante de cinétique apparente.

1.5.4 L'équilibre d'adsorption de la biomasse

Dans un système d'adsorption batch, la quantité de protéine adsorbée augmente dans le temps jusqu'à un certain point où un équilibre est atteint. Ainsi, après quelques expériences d'adsorption à des concentrations de protéine initiales différentes, une relation expérimentale (appelée isotherme) est obtenue entre les quantités de protéines adsorbée (q^*) et libre (c^*) à l'équilibre. L'isotherme expérimentale peut être corrélé à un modèle d'isotherme tel que Langmuir, Freundlich et Freundlich-Langmuir (31).

Le modèle de Langmuir (équation 8) est le modèle le plus simple et le plus fréquemment utilisé pour représenter l'adsorption de protéines à l'équilibre. Il relie la capacité maximale q_m de l'adsorbant et la constante de dissociation K_d .

$$q^* = \frac{q_m c^*}{K_d + c^*} \quad \text{Equation 8}$$

L'isotherme de Langmuir est souvent représenté sous ses formes linéaires (semi réciproque, double réciproque et Scatchard) afin d'établir la validité des hypothèses sur lesquelles le modèle repose, i.e. de sites d'interaction indépendants, d'énergie égale et d'adsorption monocouche (31).

Les profils d'adsorption de cellules à l'équilibre peuvent être effectués pour caractériser les interactions biomasse/adsorbant à l'équilibre (32).

CHAPITRE 2

ORGANISATION DU MÉMOIRE

Ce mémoire possède une formule de présentation par article intégré dans le corps du texte au chapitre 6. L'article a été soumis au journal *Biotechnology Progress*.

Une revue de littérature des principaux sujets abordés dans ce travail est présentée au premier chapitre. Le chapitre 3 présente les résultats des tests d'expansion effectués sur une colonne développée au laboratoire. Le chapitre 4 présente les tests de purification qui ont permis de développer un protocole de purification par IMAC et d'identifier une protéine et un système d'expression modèles pour ce travail. Le chapitre 5 présente les tests qui permettent de valider la viabilité des cellules dans le montage de purification intégrée. Le chapitre 6 présente les tests qui ont permis d'évaluer la capacité et la cinétique d'adsorption de cellules par une colonne EBA garnie d'adsorbant IMAC. Le chapitre 7 présente une discussion générale et intégrée des résultats présentés aux chapitres 3 à 6.

CHAPITRE 3

ESSAIS DE FLUIDISATION DANS UNE COLONNE DÉVELOPPÉE AU LABORATOIRE

3.1 Matériel et méthode

Les essais de fluidisation sont effectués sur une colonne de verre (11 mm de diamètre interne, 40 cm de hauteur) dont le système de distribution est composé d'un lit de billes de verre de 425-600 μm (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, # cat. G9268) (Figure 3.1). Un tube d'alimentation en Norprene (MasterFlex, Vernon Hills, IL, # cat. HV-6204-14), entrant par un port latéral de la colonne, est dirigé vers le bas de la colonne dont l'extrémité est fermée. L'étanchéité entre le tube et le port d'entrée est assurée par un bouchon de caoutchouc. Environ 3 ml de billes de verre (volume nécessaire afin que le niveau du lit de billes soit supérieur au niveau du port latéral) sont utilisés pour distribuer uniformément l'écoulement de la phase liquide (eau déionisée à 20 °C) vers le haut de la colonne afin de fluidiser l'adsorbant (GE Healthcare Streamline Chelating, Uppsala, Suède, # cat. 17-1280-01). Le lit est expansé et stabilisé pendant 15 minutes à un débit donné par une pompe péristaltique (MasterFlex L/S Easy Load, # cat. HV-7518-10) avant que la hauteur du lit soit mesurée. Un volume d'adsorbant préalablement hydraté (mais non chargé d'ions métalliques) de 3.3 ml est utilisé lors des essais (correspondant à une hauteur sédimentée de 3.5 cm). La verticalité de la colonne est vérifiée avant les essais.

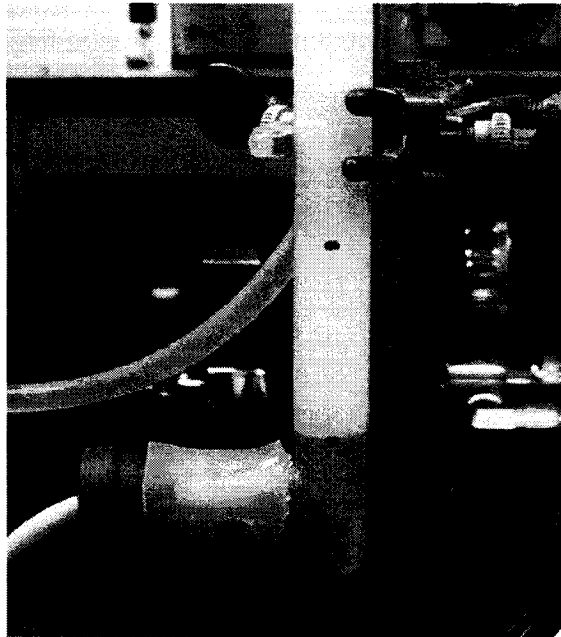


Figure 3.1. Montage de la colonne développée au laboratoire.

3.2 Résultats et discussion

Des essais de fluidisation sont effectués afin d'établir les caractéristiques d'expansion de la colonne développée au laboratoire utilisant l'adsorbant Streamline Chelating (non-chargé).

Le degré d'expansion expérimental (déterminé par le ratio de la hauteur du lit expansé à une vitesse superficielle donnée (H) par rapport à la hauteur du lit sédimenté (H_0)) est tracé en fonction de la vitesse de fluidisation (Figure 3.2). Le profil d'expansion linéaire obtenu correspond de façon très similaire au profil rapporté par Lin et al. (13) obtenu dans des conditions identiques (colonne ayant un distributeur composé de billes de verre, utilisant un adsorbant aux mêmes propriétés physiques (distribution de taille et densité) et fluidisé par de l'eau à température pièce. On observe également que la plage de degré d'expansion recommandée par le fabricant de l'adsorbant (de 2 à

3) peut être atteinte dans la plage de vitesse de fluidisation recommandée par le fabricant de l'adsorbant (de 150 à 300 cm/h). Ceci laisse croire que la colonne développée arrive à distribuer correctement l'écoulement d'entrée.

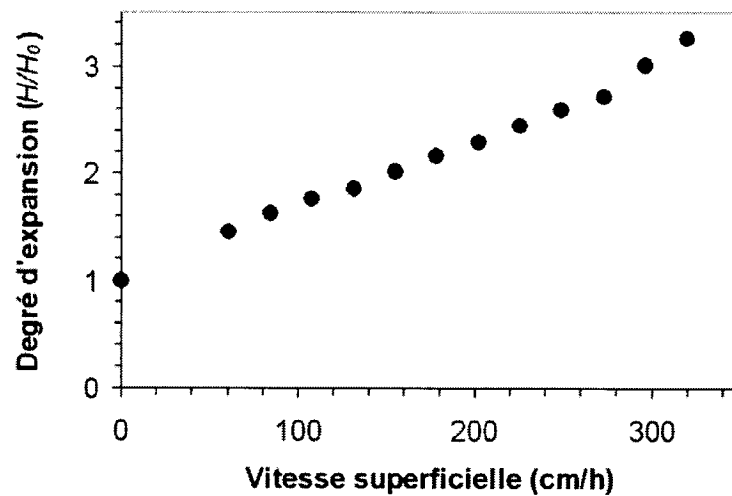


Figure 3.2. Profil d'expansion en fonction de la vitesse superficielle

La corrélation de Richardson et Zaki (Equation 3) (15) est utilisée conjointement avec l'équation 4 afin de décrire l'expansion du lit (12, 13, 16). Les paramètres n et U_t peuvent être évalués de façons théoriques et expérimentales et ensuite comparés.

La vitesse de sédimentation terminale U_t théorique est déterminée selon la loi de Stokes modifiée (13) :

$$U_t = \left(\frac{g(\rho_p - \rho_l)d_p^2}{18\mu} \right)^{0.93} \quad \text{Equation 9}$$

où g est l'accélération gravitationnelle, ρ_p est la densité de la phase solide, ρ_l est la densité de la phase liquide, d_p est le diamètre moyen des particules et μ est la viscosité de la phase liquide. La vitesse de sédimentation terminale est évaluée à 938 cm/h en assumant que les propriétés de l'adsorbant sont celles du manufacturier ($\rho_p = 1200 \text{ kg/m}^3$ et $d_p = 200 \text{ }\mu\text{m}$) et celles de l'eau à température pièce ($\rho_l = 1000 \text{ kg/m}^3$ et $\mu = 0.001 \text{ Pa}\cdot\text{s}$).

Puisque le nombre de Reynolds particulaire Re_t évalué à cette vitesse de sédimentation selon l'équation 5 est égal à 0.29, l'indice d'expansion n théorique est évalué à 4.84 selon l'équation suivante décrite par Theodossiou et al. (16).

$$n = (4.35 + 17.5 \cdot \frac{d_p}{d_c}) Re_t^{-0.03} = 4.84 \quad 0.2 < Re_t < 1 \quad \text{Equation 10}$$

Les paramètres n et U_t sont déterminés à partir des résultats d'expansion expérimentaux en traçant le graphique de $\text{Ln}(U)$ en fonction du $\text{Ln}(\varepsilon)$ (Figure 3.3). La pente et l'ordonnée à l'origine de la régression linéaire indiquent les valeurs de n et de $\text{Ln}(U_t)$, respectivement. Ainsi n est évalué à 5.24 et U_t à 972 cm/h.

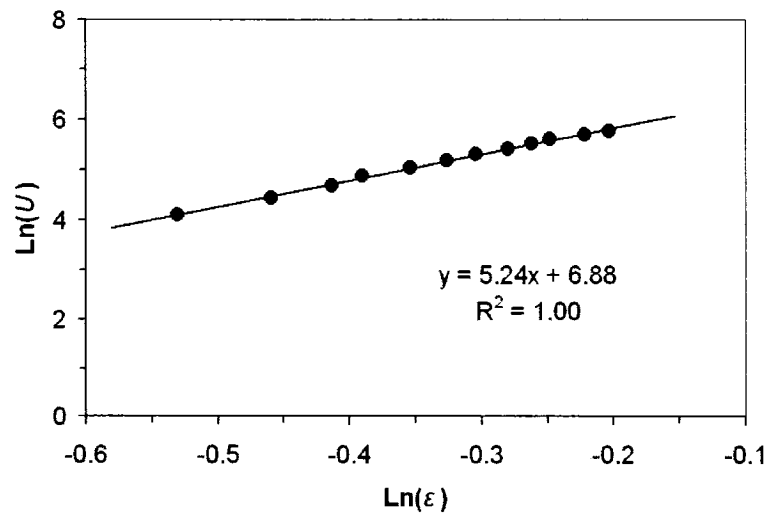


Figure 3.3. Détermination expérimentale des paramètres de Richardson-Zaki

Les valeurs théoriques et expérimentales de n (4.84 et 5.24 respectivement) et de U_t (938 cm/h et 972 cm/h respectivement) sont raisonnablement rapprochées et se comparent avec celles rapportées dans la littérature pour des colonnes de différent types et diamètres qui utilisent des phases liquides et solides aux propriétés similaires à celles qui ont été testées (12, 13, 23, 42).

CHAPITRE 4

PURIFICATION DE LA PROTÉINE TGF BETA RIII-ED

4.1 Matériel et méthodes

4.1.1 Préparation de l'échantillon de protéines

La protéine TGF bêta RIII-ED provient de 2 cultures en cuvée (2L) de cellules HEK-293 réalisées les 5 mai 2006 et 15 juin 2006 dans le cadre d'autres travaux de l'unité de recherche. Le milieu de culture contenant la protéine a été centrifugé pour retirer les cellules (300 g, 5 min) et ensuite conservé à -20 °C sous forme d'aliquots de 10 et 50 ml. Les aliquots de protéines sont utilisés directement ou ils sont dilués avec soit du tampon d'équilibration 2X (40 mM phosphate de sodium, 1 M NaCl, pH 7.15), soit du milieu de culture frais. La protéine TGF bêta RIII-ED possède un tag Myc-(His)₆ en C-terminale et une masse moléculaire de 40 kDa.

4.1.2 Préparation des solutions tampons

Les solutions tampons pour l'équilibration, le lavage et l'élution sont préparées à partir de phosphate de sodium monobasique (Sigma-Aldrich, # cat. S5011) et de chlorure de sodium (Sigma-Aldrich, # cat. S3014). Elles sont ajustées au pH 7.15 (pH de culture) avec de l'hydroxyde de sodium (Sigma-Aldrich, # cat. S8045) et de l'acide chlorhydrique (Sigma-Aldrich, # cat. H1758).

Le tampon 2X (40 mM phosphate de sodium, 1 M NaCl) est utilisé au besoin dans la préparation de l'échantillon de protéines. Le tampon 1X (20 mM phosphate de sodium, 0.5 M NaCl) est préparé à partir du tampon 2X, dilué avec un volume égal d'eau déionisée. Les solutions tampons pour le lavage et l'élution sont préparées à

différentes concentrations finales en imidazole (Sigma-Aldrich, # cat. I5513) de 20, 50, 100, 150, 250 et 500 mM et en ajustant le pH à 7.15.

4.1.3 Préparation d'adsorbant

La préparation de l'adsorbant Streamline Chelating consiste à charger les sites d'adsorption du support IMAC avec les ions d'un métal de transition (dans notre cas le nickel) et ensuite à retirer les ions faiblement liés au support. Le chargement en nickel est fait avec une solution de sulfate de nickel de 50 mM (Sigma-Aldrich, # cat. 203890) et le rinçage (ou équilibration) avec le tampon 1X.

Les volumes de solution nécessaires ont été déterminés expérimentalement par la mesure de la concentration de nickel (effectuée par spectroscopie de masse par le département de génie civil, de géologique et des mines) des échantillons récupérés à la sortie de la colonne lors du chargement et de l'équilibration de 0.5 ml d'adsorbant (1 VC = 0.5 ml). On observe que la saturation en nickel de l'adsorbant est atteinte après 6 VC (Figure 4.1) et que l'adsorbant ne libère pratiquement plus de nickel après le 10^{ème} VC de tampon 1X (Figure 4.2). Ces volumes de solution de chargement et d'équilibration sont utilisés pour chaque préparation de l'adsorbant Streamline Chelating sur colonne à écoulement gravitaire.

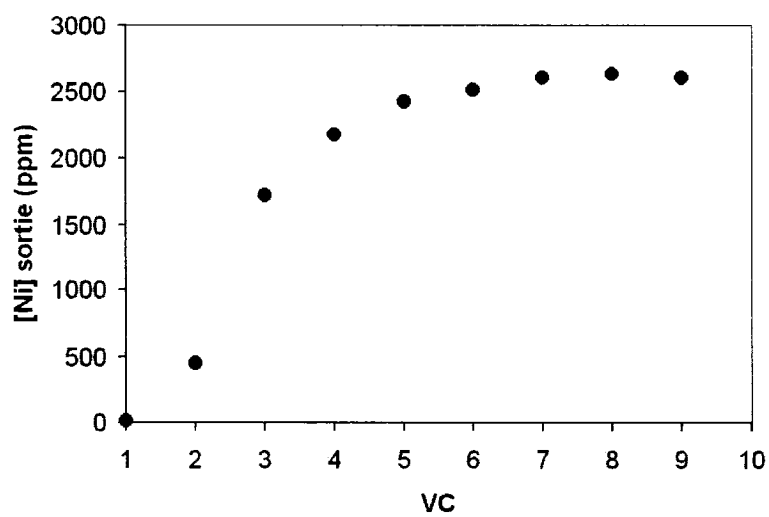


Figure 4.1. Détermination du volume de solution de chargement.

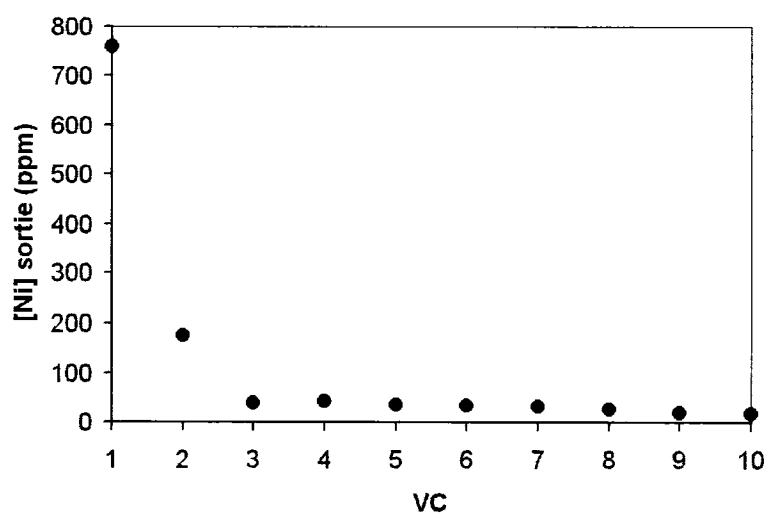


Figure 4.2. Détermination du volume de tampon d'équilibration.

4.1.4 Purification par écoulement gravitaire

Les essais de purification à écoulement gravitaire sont effectués sur des colonnes de plastique de 10 ml à écoulement gravitaire (Bio-Rad Poly-Prep, Hercules, CA, # cat. 731-1550) avec l'adsorbant Streamline Chelating. Sur une colonne équilibrée de 1 ml d'adsorbant neuf (1 volume-colonne = 1 VC = 1 ml), un échantillon de 50 VC, dilué 2X (1 :1) avec tampon concentré, est ensuite appliqué. Le lavage est effectué avec 10 VC de tampon 20 mM phosphate de sodium, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole et l'élution avec 8 VC de tampon 20 mM phosphate de sodium, 0.5 M NaCl, 250 mM imidazole. Des fractions de 1 ml sont récupérées pour analyse. Un débit inférieur à 2 ml/min est ajusté manuellement à l'aide d'une valve située à la sortie de la colonne.

4.1.5 Purification automatisée sur lit fixe

La purification automatisée sur lit fixe est effectuée avec un système AKTA™ Explorer 100 (GE Healthcare, # cat. 18-1112-41) et une colonne IMAC pré-assemblée et pré-chargée en nickel contenant 1 ml d'adsorbant (GE Healthcare HisTrap FF crude, # cat. 11-0004-58). La méthode de purification est programmée dans le système et exécutée par ce dernier. Des sondes de pH, conductivité et un détecteur d'absorbance UV sont situées à la sortie de la colonne et permettent l'acquisition en temps réel de leurs mesures par le système.

La colonne est équilibrée avec 5 VC de tampon 1X. 8 VC d'échantillon de protéines (préparé sans dilution) sont ensuite appliqués sur la colonne. Le lavage est effectué avec 10 VC de tampon 1X + 20 mM imidazole et l'élution avec 2 plateaux de 5 VC de tampons 1X + 50 et 1X + 300 mM imidazole consécutifs. La colonne est finalement ré-équilibrée avec 5 VC de tampon 1X et nettoyée par un cycle d'eau déionisée / NaOH 1 M / eau déionisée / 20% éthanol si elle n'est pas utilisée dans la journée. Des échantillons de 1 VC sont récupérés automatiquement lors de l'élution par le collecteur de fractions. Le débit utilisé pour chaque étape est de 1 ml/min.

4.1.6 Purification en lit expansé

La purification en lit expansé est effectuée avec un système automatisé BioPilot (Pharmacia, Suède), une colonne EBA de 1 cm de diamètre (UpFront Chromatography FastLine 10, Danemark, # cat. 7010-0000) et 7.8 ml d'adsorbant Streamline Chelating (correspondant à une hauteur sédimentée de 10 cm). Le système BioPilot possède des sondes de pH, de conductivité et d'UV (280 nm) qui ont été reliées au système d'acquisition et de contrôle (Virgo) de l'unité de recherche. Les différentes étapes de purification sont programmées dans le module de contrôle du système BioPilot mais puisque la méthode est en développement (nombre d'étapes, durées et concentrations utilisées à optimiser), elles sont segmentées en plusieurs programmes pour permettre plus de flexibilité.

L'adsorbant neuf est préparé sur colonne à écoulement gravitaire tel que présenté précédemment. 210 ml (27 VC) d'échantillon de protéines (préparé 1:4 avec du milieu de culture) sont appliqués sur la colonne préalablement équilibrée (avec du tampon 1X). Le lavage est effectué avec 420 ml (54 VC) de tampon 1X et l'élution avec 5 plateaux de 69, 54, 54, 57 et 78 ml (9, 7, 7, 7 et 10 VC) de tampons de 20, 50, 100, 250 et 500 mM imidazole respectivement. Des échantillons de 2 ml sont récupérés de façon semi-automatique (i.e. que des séries de 8 fractions peuvent être collectées de façon automatique). Le débit utilisé est de 3 ml/min pour toutes les étapes de la purification en lit expansé.

4.1.7 Détection de la protéine par Western blot

Les échantillons sont préparés avec du tampon d'échantillon 2X (125 mM Tris-base pH 6.8, 4% SDS w/v, 0.005% bleu de bromophénol w/v et 40% glycérol v/v) et ensuite bouillis pendant 5 min. Une échelle pré-teinte est utilisée (Bio-Rad Kaleidoscope Prestained Standards, broad range, # cat. 161-0324). La séparation SDS-PAGE est effectuée sur gel de 15% SDS-polyacrylamide de 0.75 mm avec le système

d'électrophorèse Mini-Protean 3 (Bio-Rad, # cat. 165-3301) selon la méthode de Laemmli (43). Les protéines sont transférées sur membranes de PVDF (Bio-Rad Immun-Blot PVDF Membrane, # cat. 162-176) (80 mA, 30 V, 12-18 h). L'immuno-détection primaire est effectuée avec un anticorps monoclonal de souris anti-Myc 9E11 (Santa Cruz Biotechnology, CA, # cat. sc-47694) dilué 1:5000. La détection secondaire est effectuée avec un anticorps anti-souris conjugué HRP qui est dilué 1 :15000 (Bio-Rad Immun-Star Goat Anti-Mouse (GAM)-HRP Conjugate, # cat. 170-5047). Les bandes sont ensuite révélées sur papier film Kodak BioMax Light Film (Sigma-Aldrich, # cat. Z370371) ou un équivalent à l'aide d'un substrat chimiluminescent (Bio-Rad Immun-Star HRP Substrate, # cat. 170-5040).

4.2 Résultats et discussion

Des essais préliminaires de purification IMAC (avec nickel) ont été effectués afin de développer une procédure qui permet de purifier une protéine recombinante donnée possédant un « tag » polyhistidine. La première protéine recombinante qui a démontrée des résultats de purification concluants a été déterminée comme modèle pour la suite du développement de la stratégie de purification intégrée.

Des essais ont été effectués en vain pour la purification de la protéine Ralf 3 (sécrétée par *N. tabaccum*) et de TGF bêta RII-ED (corps d'inclusion de *E. coli*). Les essais de purification de TGF bêta RIII-ED (sécrétée par HEK-293), présentés dans les sections suivantes, ont démontrés par contre des résultats positifs. Il est à noter que la quantification de la protéine d'intérêt et des protéines totales dans les échantillons récupérés au cours des essais de purification n'a pas été effectuée puisque ces essais servent uniquement à prouver de façon qualitative que la protéine ciblée est purifiée par la méthode employée.

4.2.1 Purification à écoulement gravitaire

Selon la détection par Western blot des échantillons de la purification effectuée sur colonne à écoulement gravitaire (Figure 4.3), on observe que la protéine TGF bêta RIII-ED (40 kDa) est présente dans l'échantillon appliqué sur la colonne (piste 2 - dilué 1:1 – culture du 5 mai 2006) et qu'elle est éluée de l'adsorbant (piste 3) par l'imidazole (250 mM). L'intensité (proportionnelle à la concentration) plus élevée de la bande 3 comparativement à la bande 2 indique que la purification est efficace puisqu'il y a concentration de la protéine d'intérêt. On observe qu'il y a également concentration de protéines de masse moléculaire plus élevées (environ 100 kDa) qui pourraient correspondre à des formes glycosylées de TGF bêta RIII-ED.

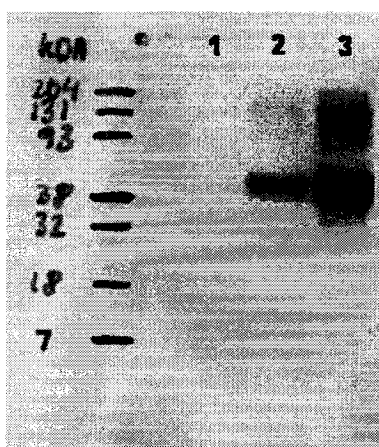


Figure 4.3. Détection par Western blot des échantillons de la purification à écoulement gravitaire. Pistes : 1 - Échelle; 2 - Échantillon de protéines (feedstock); 3 - Éluat (2^e VC).

4.2.2 Purification automatisée sur lit fixe

Le profil d'absorbance mesuré à la sortie de la colonne au cours de l'essai de purification automatisée sur lit fixe est présenté à la Figure 4.4. L'élution est effectuée par 2 plateaux de tampons de 50 mM et 300 mM d'imidazole dont les fractions de 1 ml

sont identifiées sur le chromatogramme par les numéros de 7 à 11 (50 mM) et de 12 à 17 (300 mM). La détection par Western blot de certains de ces échantillons (Figure 4.5) permet d'observer que la protéine TGF bêta RIII-ED contenue dans l'échantillon (40 kDa) est en très grande partie adsorbée par la colonne puisque sa présence n'est pas détectée dans l'échantillon de protéines passé sur la colonne (bande 3). Le pic formé par l'élution à 50 mM d'imidazole ne contient pas la protéine d'intérêt (bande 4), ce qui laisse croire qu'une quantité importante de protéines (non spécifiques) adsorbée sur la résine est donc éluée à cette étape. La protéine d'intérêt est détectée dans le pic formé par l'élution à 300 mM d'imidazole dans les fractions 12 et 13 (bandes 5 et 6) à des concentrations supérieures à celle de l'échantillon de protéines (bande 2). Les bandes 7 à 10 indiquent que la protéine n'est pas présente dans les fractions 14 à 17, bien que le niveau du signal d'absorbance soit soutenu pendant la récolte de ces fractions (i.e. qu'il ne diminue pas au niveau initial obtenu à la fraction 11). Ceci s'explique par le fait que l'imidazole a une absorbance à 280 nm.

4.2.3 Purification en lit expansé

Le chromatogramme de la purification en lit expansé (Figure 4.6) démontre que certaines protéines sont adsorbées par la colonne et éluées à différentes concentrations d'imidazole. La détection par Western blot d'un nombre trop faible d'échantillons n'a pu permettre de détecter la présence de TGF bêta RIII-ED parmi les 42 fractions récupérées au total lors des 4 premiers plateaux d'élution. Malgré un débit de fluidisation constant de 3 ml/min, l'expansion du lit a connu une légère baisse pendant le chargement de l'échantillon de protéines (degré d'expansion de 2.3), mais sa hauteur est graduellement revenue au niveau initial (degré d'expansion de 2.5) au cours des 2 derniers plateaux d'élution.

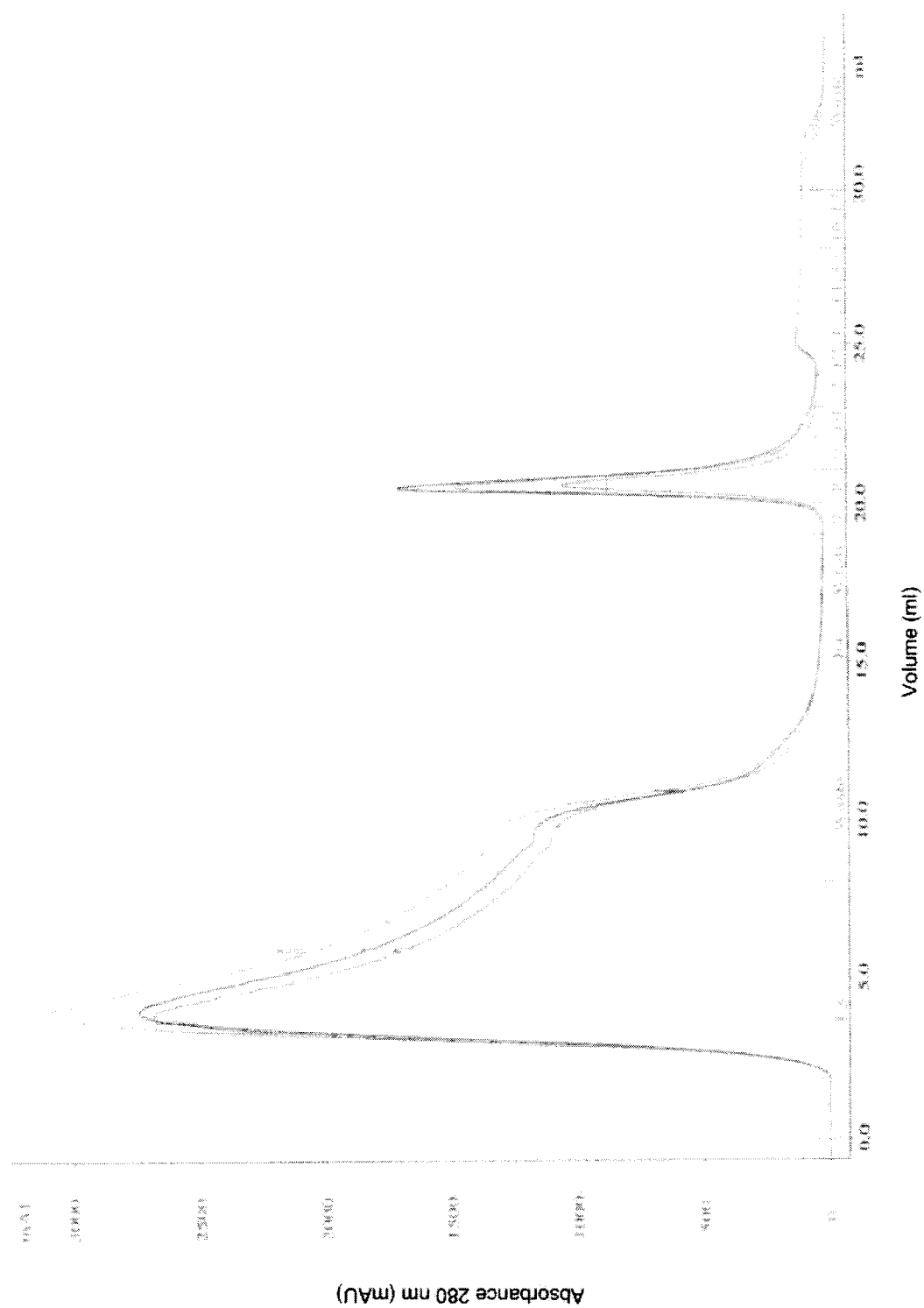


Figure 4.4. Chromatogramme de la purification automatisée sur lit fixe.

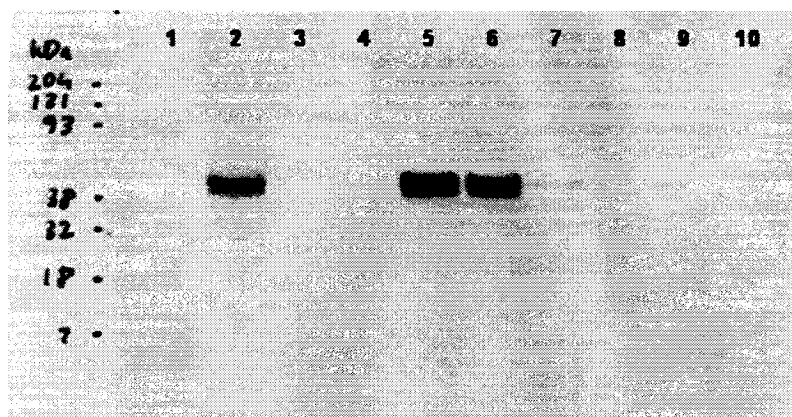


Figure 4.5. Détection par Western blot des échantillons de la purification automatisée sur lit fixe. Pistes : 1 – Échelle; 2 – Échantillon de protéines (feedstock); 3 – Échantillon de protéines passé sur la colonne (flowthrough); 4 – Éluat 50 mM (tube # 8); 5 – Éluat 300 mM (tube # 12); 6 – Éluat 300 mM (tube # 13); 7 – Éluat 300 mM (tube # 14); 8 – Éluat 300 mM (tube # 15); 9 – Éluat 300 mM (tube # 16); 10 – Éluat 300 mM (tube # 17).

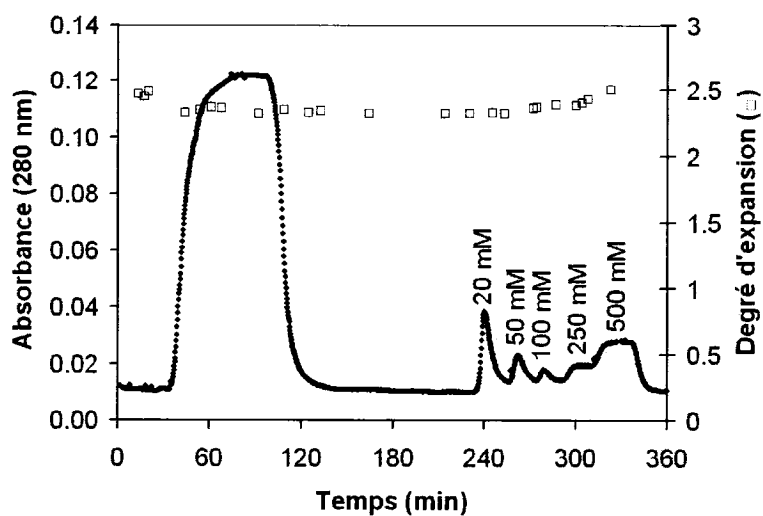


Figure 4.6. Chromatogramme de la purification en lit expansé.

4.3 Conclusion

Dans un procédé chromatographique, l'adsorption est contrôlée par le temps de résidence de la protéine d'intérêt dans la colonne ($\bar{t} = V / F$). Un temps de résidence court dans la colonne ne permet pas à la protéine de se lier à l'adsorbant tandis qu'un temps de résidence long résulte en l'adsorption d'une quantité importante de protéines non spécifiques. Au cours des purifications par écoulement gravitaire et automatisée sur lit fixe, on observe que le temps de résidence ($\bar{t} = 1 \text{ ml} / 1 \text{ ml/min} = 1 \text{ min}$) est suffisant pour permettre à une quantité importante de protéine d'intérêt d'être adsorbée. Puisque les échantillons recueillis au cours de la purification en lit expansé n'ont pas été analysés par Western blot, on ne peut conclure quant à l'effet du temps de résidence dans la colonne ($\bar{t} = 10.9 \text{ ml} / 3 \text{ ml/min} = 3.6 \text{ min}$) qui est plus élevé comparativement aux purifications sur lit fixe.

CHAPITRE 5

VALIDATION DU MONTAGE DE PURIFICATION INTÉGRÉE

5.1 Matériel et méthodes

5.1.1 Cellules et milieu de culture

Les cellules HEK-293 EBNA (293E) et le milieu de culture supplémenté proviennent de l'Institut de Recherche en Biotechnologie (CNRC, Montréal, Québec, Canada). Le milieu de culture de base est une formulation sur mesure (Invitrogen, CA, # commande 03-5106EH) qui est supplémentée tel que décrit par Durocher et al. (7). Les cultures sont effectuées dans des conditions humidifiées (37 °C, 10% CO₂) en flacons de plastique de 25, 75, 150 et 225 cm² (Corning, MA, # cat. 430639, 430641, 430825, 431082) pour les sous-cultures et en spinner de 250 ml (Bellco Biotechnology, NJ, # cat. 1965-80250) pour les essais de culture en mode de purification intégrée. Le pH du milieu de culture frais est ajusté à 7.15 et sa conductivité est mesurée à 15.1 mS/cm (GE Healthcare pH/C-900 monitor, # cat. 18-1107-76).

5.1.2 Colonne

Une colonne EBA de 1 cm (UpFront Chromatography FastLine 10) est utilisée pour certains essais de culture en mode de purification intégrée. La hauteur de l'adaptateur de sortie est positionnée à 20 cm afin d'obtenir un temps de résidence de 6 min (correspondant au temps de résidence estimé pour une colonne de 7.8 ml d'adsorbant expansé à 30 cm à un débit de 4 ml/min).

5.1.3 Cultures en mode de purification intégrée

Les essais de culture sont effectués en utilisant une boucle de recirculation soit sans colonne, avec colonne non agitée (sans barreau magnétique) ou avec colonne agitée (avec barreau magnétique) tel que représenté par le schéma du montage (Figure 5.1). Les cultures en spinner sont inoculées à une concentration de 0.1×10^6 cellules/ml ou 0.2×10^6 cellules/ml avec des cellules en phase exponentielle de croissance. Une culture contrôle (sans boucle de recirculation) est inoculée dans les mêmes conditions que chaque culture testée. Les suspensions cellulaires en spinner sont légèrement agitées pendant les tests. Les volumes de culture sont de 200 ml et 225 ml pour les tests effectués sans et avec colonne respectivement. La recirculation des cellules dans la boucle est effectuée par une pompe péristaltique (MasterFlex L/S EasyLoad, IL, # cat. HV-7518-10) dont le débit est maintenu constant à 4.1 ml/min (correspondant à une vitesse superficielle de 315 cm/h dans la colonne). Une conduite de silicone (MasterFlex BioPharm Silicone Pump Tubing, # cat. SA-96420-14) de 275 cm forme la boucle de recirculation. Des échantillons de 1.5 ml (incluant le volume de purge) sont prélevés sous conditions aseptiques aux ports d'échantillonnage d'entrée et de sortie de la colonne à des intervalles de 20 min.

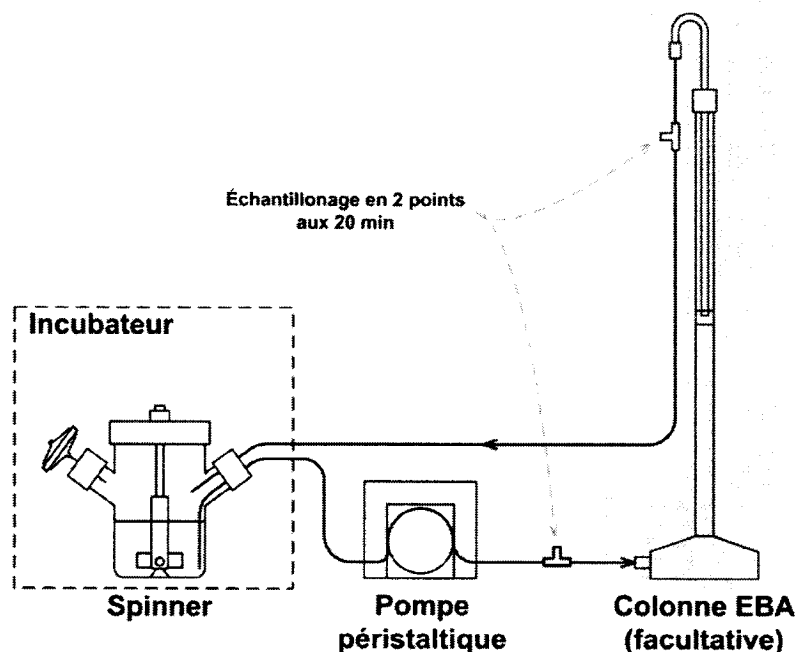


Figure 5.1. Schéma du montage pour les tests en mode de purification intégrée.

5.1.4 Mesure de la concentration et de la viabilité cellulaire

La concentration et la viabilité des cellules sont mesurées avec un hémocytomètre (Reichert Brightline, NY) par coloration au bleu de Trypan (Sigma-Aldrich, # cat. T8154). Les échantillons sont concentrés par centrifugation (300 g, 5 min) pour obtenir des comptes cellulaires statistiquement représentatifs.

5.2 Résultats et discussion

Des cultures en cuvée de très courtes durées (8 h) sont effectuées afin d'évaluer si les cellules HEK-293 sont propices à la culture en mode de purification intégrée, du

point de vue de la viabilité. Entre autres, est évalué par ces tests l'impact des différentes composantes (pompe, colonne et barreau magnétique de la colonne) sur la viabilité des cellules. La durée du test est déterminée à partir des essais préliminaires effectués sur colonne EBA garnie d'adsorbant (non présentés) qui ont démontré que les cellules étaient considérablement adsorbées dès les premières heures de recirculation. Les concentrations utilisées pour ces tests sont quand à elles déterminées à 0.1×10^6 et 0.2×10^6 cellules/ml puisqu'elles sont les concentrations typiques auxquelles sont inoculées les sous-cultures. Dû à la trop courte durée de culture, la mesure de la concentration cellulaire ne peut être indicative de la croissance puisque le temps de dédoublement des cellules HEK-293 est de l'ordre de 48 h (selon les données des sous-cultures – lorsqu' inoculées en flacons à une concentration de 0.2×10^6 cellules/ml). Les essais effectués avec des colonnes garnies d'adsorbant sont présentés sous forme d'article au chapitre suivant.

5.2.1 Cultures en mode de purification intégrée

Culture sans colonne

La culture recirculée sans colonne (inoculée à 0.1×10^6 cellules/ml) montre une viabilité et une concentration de cellules viables constantes pour toute la durée du test (Figure 5.2A). Ainsi, puisque la viabilité des cellules est constante, on observe que la pompe péristaltique utilisée à un débit de 4.1 ml/min n'endommage pas les cellules. Le temps de résidence moyen des cellules dans le circuit de recirculation ($\bar{t} = V / F = 5.5 \text{ ml} / 0.068 \text{ ml/s} = 80 \text{ sec}$) ne semble pas non plus être suffisant pour affecter leur viabilité (étant donné une capacité de transfert d'oxygène réduite dans la boucle).

Culture avec colonne non-agitée

La culture avec colonne non-agitée (inoculée à 0.2×10^6 cellules/ml) montre également des profils constants de viabilité et de concentrations de cellules viables

(Figure 5.2B). On observe par contre une plus grande dispersion des valeurs de concentration par rapport aux mesures présentées dans les Figures 5.2A et 5.2C qui est probablement due à des erreurs de manipulation (volume de resuspension des cellules non constant lors du dénombrement). Le temps de résidence moyen des cellules dans le circuit de recirculation avec colonne (dont le tube de sortie est positionné à 20 cm de hauteur) passe maintenant à environ 6 min ($\bar{t} = V / F = 25 \text{ ml} / 4.1 \text{ ml/min}$) et la viabilité des cellules ne semble toujours pas être affectée par un manque d'oxygène. Les concentrations cellulaires constantes (à l'entrée et à la sortie de la colonne) indiquent que les cellules ne sont pas retenues de façon significative dans une zone morte du circuit (par exemple dans le distributeur ou le tube de sortie de la colonne).

Culture avec colonne agitée

La culture avec colonne agitée, inoculée à 0.1×10^6 cellules/ml, montre des profils constants de viabilité et de concentration de cellules viables (Figure 5.2C). L'ajout du barreau magnétique (dont la vitesse de rotation correspond à celle utilisée lorsque la colonne est garnie d'adsorbant) ne semble donc pas affecter ces paramètres à cause de forces de cisaillement qui pourraient être excessives.

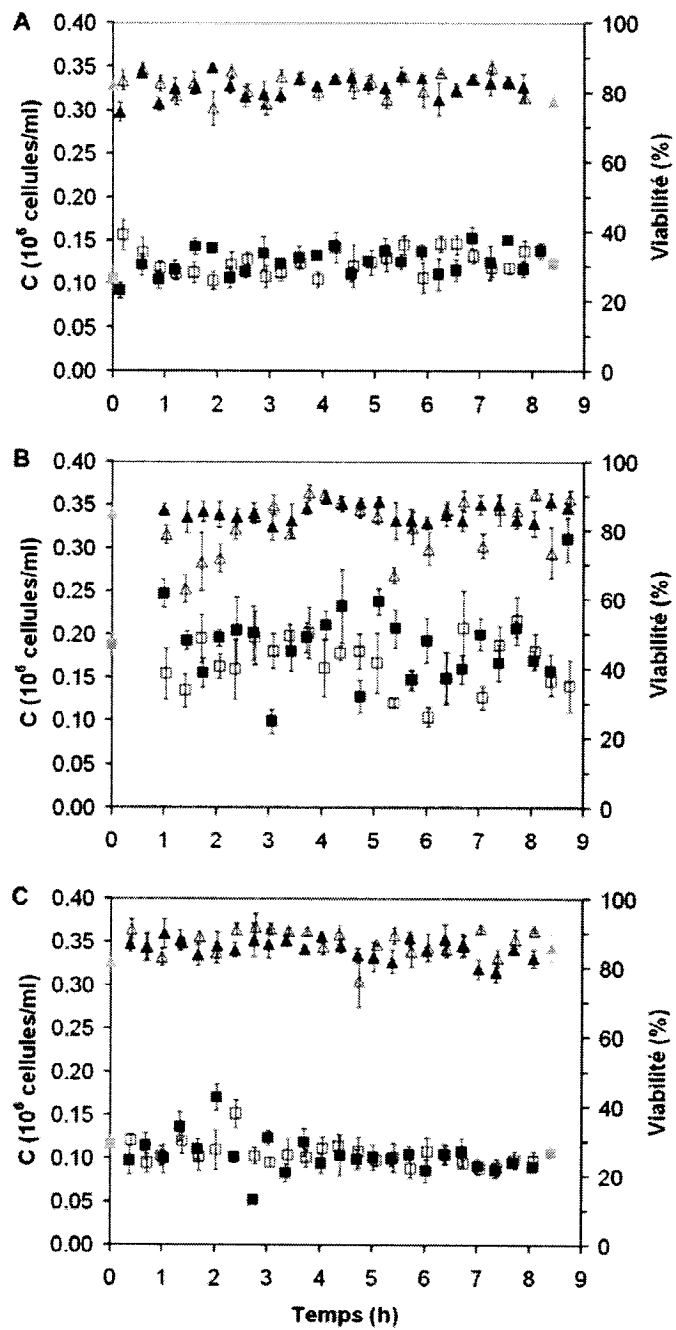


Figure 5.2. Culture de HEK-293 avec recirculation sans colonne EBA (A), avec colonne EBA non-agitée (B) et avec colonne EBA agitée (C). Concentration de cellules viables aux ports d'échantillonnage d'entrée de colonne (■), de sortie de colonne (□) et du spinner contrôle (●); Viabilité aux ports d'entrée de colonne (▲), de sortie de colonne (△), et du spinner contrôle (▲).

CHAPITRE 6

ARTICLE: A STUDY OF THE INTERACTION OF HEK-293 CELLS WITH STREAMLINE™ CHELATING ADSORBENT IN EXPANDED BED OPERATION

*Frédéric Poulin, Renaud Jacquemart, Gregory De Crescenzo, Mario Jolicoeur, Robert Legros**

Biotechnology and pharmaceutical processes research unit (Bio-P²), Department of Chemical Engineering, École Polytechnique, Montréal, Québec, Canada.

* To whom correspondence should be addressed. Tel: 514-340-4711 ext. 4818. Fax: 514 340-4159. Email: robert.legros@polymtl.ca.

Abstract

Expanded bed adsorption (EBA) is an efficient protein purification process reducing time and steps of downstream processing (DSP) since non clarified culture media can be processed directly without prior treatments such as filtration or centrifugation. However, cells and debris can interact with the adsorbent and affect bed stability as well as purification performance. In order to optimize EB operating conditions these cell- and cell debris-adsorbent interactions have to be understood and characterized. The adsorption of Human Embryonic Kidney cells (HEK-293) on unprimed and nickel-primed metal affinity adsorbent was studied in a closed loop EBA setup. With the unprimed adsorbent, the overall level of interaction observed was non significant. With the nickel-primed adsorbent and an initial cell concentrations varied from 0.08×10^6 to 0.2×10^6 cells/ml, biomass/adsorbent interaction was found to be moderate and the adsorption kinetics was determined to $0.009\text{-}0.011 \text{ min}^{-1}$. The cell/adsorbent adsorption equilibrium was well described by a Langmuir-type behavior and the maximum capacity of the adsorbent was evaluated to 17.1×10^6 cells/ml of adsorbent.

6.1 Introduction

Mammalian cells have recently gained growing interest in the industry because of their ability to produce bioactive recombinant proteins for therapeutic applications. Compared to lower eukaryotes or prokaryotes, mammalian cells are able to provide active recombinant proteins with relevant glycosylation patterns because of post-translational modifications (1). Among mammalian cells, Human Embryonic Kidney (HEK-293) cells have shown many advantages such as high transfection yields, high expression levels and ease of growth in suspension culture (1).

To complement the increased interest for recombinant proteins, purification processes have also recently gained attention and known developments. Expanded bed adsorption (EBA) was introduced as a protein purification process that combines, in a single operation, the traditional multi-step approach, i.e. separation, concentration and purification. The principle of EBA consists in directing the mobile phase in an upward flow through a bed of adsorbent beads, thus creating fluidized conditions, resulting in increased interparticulate voidage. Bioparticles contained in unclarified feedstocks (i.e. culture suspensions, homogenates or crude extracts) are expected to pass unhindered through the adsorbent bed while target proteins are adsorbed. A bed of adsorbent particles is considered expanded when a suitable stationary phase is fluidized to form a stable classified bed with minimum channelling and backmixing effects. In these conditions, the protein purification performance of EBA is supposed to be similar to packed bed adsorption (2). Many examples have been described in the literature for the EBA purification of proteins from mammalian cell cultures, more precisely from CHO cells (3-6) and hybridoma cells (7-10). Up to now, there is no case reported for the purification of proteins from HEK-293 cells by EBA.

Since its introduction in 1975 by Porath and coworkers (11), immobilized metal affinity chromatography (IMAC) has become a widely used method for separation and purification of proteins because of its high selectivity and versatility. IMAC is based on

the affinity of proteins to metallic ions fixed by chelation to a chromatographic support. The affinity depends on the presence of certain surface exposed amino acid residues such as histidine, tryptophan and cysteine. Protein interactions with the immobilized metal ion adsorbent result from the combined effect of electrostatic, hydrophobic and/or coordination interactions (12). The use of IMAC in an EBA column has been evaluated for the direct recovery of proteins from yeast cells (13), mammalian cells (5), bacterial cells (14-19), and human plasma (20). Streamline™ Chelating is an IMAC adsorbent designed for EBA, but can also be used as a weak cation exchange adsorbent when no metal ion is primed to its iminodiacetic acid (IDA) ligand.

However, cells and debris tend to interact with chromatography supports, resulting in a decrease of bed stability and of sorption efficiency (21). The characterization of biomass-adsorbent interactions and the understanding of the mechanisms involved are therefore critical steps in the development and optimization of an EBA process. Various methods for the evaluation of biomass-adsorbent interaction have been reviewed (22). Cell adsorption experiments can be performed by the finite bath method (32, 34) and by expanded bed operation (25, 26) in order to take into account all hydrodynamic and physicochemical aspects.

The objectives of this work are thus: 1) to evaluate the extent of the interactions between the human embryonic kidney (HEK-293) cells and the Streamline Chelating adsorbent and 2) to provide a better understanding of the mechanisms of these interactions. In that respect, the adsorption of viable and non-viable cells was analyzed, in regard to kinetic and equilibrium aspects, under real expanded bed conditions.

6.2 Materials and Methods

6.2.1 Cells and culture media

HEK-293E cells and low-calcium HSFM culture medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, cat.# 03-5106EH), supplemented as detailed in (1), were provided by Dr. Y. Durocher (Biotechnology Research Institute, National Research Council, Canada). Cells were grown under humidified conditions (37 °C, 10 % CO₂) in 25, 75, 150 and 225 cm² T-flasks (Corning, Lowell, MA, cat.# 430639, 430641, 430825, 431082) for maintenance and sub-cultures and in 250 ml spinner-flasks (Bellco Biotechnology, Vineland, NJ, cat.# 1965-80250) for adsorption experiments. The culture media pH was adjusted to 7.15 and its conductivity was measured to 15.1 mS/cm (GE Healthcare Monitor pH/C-900, Uppsala, Sweden, cat.# 18-1107-76).

6.2.2 Adsorbent and column

The EBA Streamline™ Chelating adsorbent was a generous gift from GE Healthcare (cat.# 17-1280-01). Unprimed adsorbent was used as a weak cation exchanger, and primed adsorbent with nickel ions was used as IMAC. Priming of the adsorbent was achieved by loading nickel ions onto packed bed columns (Bio-Rad Poly-Prep, Hercules, CA, cat.# 731-1550) using 6 column-volumes (CV) of 50 mM nickel sulfate (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, cat.# 203890) solution and subsequently washing with 10 CV of distilled water. A volume of 7.8 ml (corresponding to a settled bed height of 10 cm) of fresh adsorbent was used for each experiment. The adsorbent was equilibrated at pH 7.15 with a buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl) and autoclaved before use.

The EBA column (Fastline10), purchased from UpFront Chromatography (Copenhagen, Denmark, cat.# 7010-0000), had an inner diameter of 10 mm. The rotation speed of the magnetic bar serving as flow distributor was set to prevent the formation of

preferential flow in the expanded bed. The position of the outlet adaptor was manually adjusted to approximately 1 cm above the expanded bed during the experiments. Also, the verticality of the column was checked prior to each experiment.

6.2.3 Cell adsorption experiments

Cell adsorption experiments were performed with the experimental setup presented in Figure 6.1. The spinner flask was inoculated with cells in exponential growth phase. A control culture, without the purification loop, was inoculated at the same conditions as the cell adsorption experiment. The cell suspensions were incubated in the spinner flask with gentle agitation during the whole experiment. The equilibration buffer was removed from the autoclaved adsorbent and replaced with culture media. The adsorbent was then transferred to the column aseptically. The total liquid volume of the system was 225 ml for all experiments.

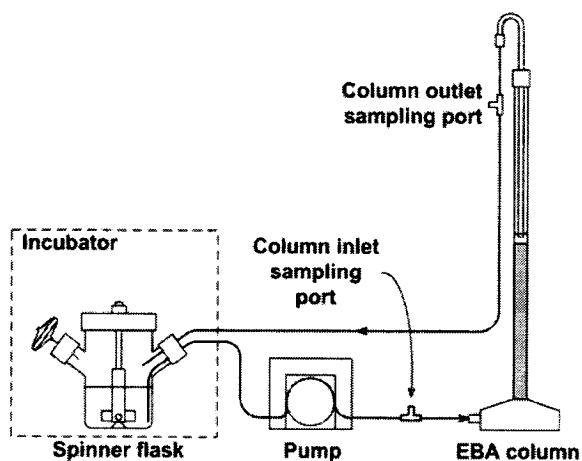


Figure 6.1. Diagram of the experimental setup used for the cell adsorption experiments.

The system was closed under aseptic conditions. The peristaltic pump (MasterFlex L/S EasyLoad, Vernon Hills, IL, cat.# HV-7518-10) was then started and the first

sample was taken as soon as the column outlet pipe was filled. A superficial velocity of 315 cm/h (corresponding to a flow rate of 4.1 ml/min) was maintained in the column. Samples of 1.5 ml were taken at the column inlet and outlet every 20 min (including purge volume).

Three experiments were performed at the conditions presented in Table 6.1. The first experiment used the StreamlineTM Chelating adsorbent without priming. Due to the negative charge of the unprimed binding sites, the adsorbent acts as a weak cation exchanger. In the third experiment, cells were added twice in the spinner flask at defined times in order to disturb the equilibrium and to measure the adsorption response. The amount of cells and media injected in the spinner was calculated in order to 1) compensate the loss of volume due to sampling and 2) to re-establish the cell concentration to the initial level.

Table 6.1. Operation parameters used for the cells adsorption experiments.

Experiment #	Adsorbent	Inoculation concentration (10 ⁶ viable cells/ml)	Duration (h)
1	Unprimed IDA	0.10	8
2	IDA-Ni	0.08	8
3	IDA-Ni	0.20	12

6.2.4 Cell concentration and viability measurement

The concentration and viability of the cells were measured with a hemocytometer (Reichert Brightline, Buffalo, NY) using Trypan blue exclusion staining (Sigma-Aldrich, cat.# T8154). The samples were concentrated by centrifugation (300 g, 5 min) to get statistically representative cell counts.

6.3 Results and Discussion

6.3.1 Adsorption experiments

In a first series of experiments, HEK-293 cells interaction with the unprimed adsorbent was characterized. As can be seen in Figure 6.2 (A, B, C), cell adsorption onto unprimed EBA resin was determined to be low. Even at the early stage of the experiment, cells were present at the column outlet in a concentration similar to the column inlet, thus confirming little adsorption. In fact, the column inlet and outlet cell concentrations fluctuated around a slowly decreasing linear trend. This linear decay was slightly more pronounced for total cells than for viable cells (see Figure 6.2B versus Figure 6.2A), indicating that non-viable cells are preferably adsorbed. A cell balance was established to determine the amount of viable, non-viable and total (viable + non-viable) cells adsorbed during the experiment (Table 6.2). The amount of adsorbed cells was determined according to:

$$q_a = q_0 - (q_f + q_{sampling}) \quad (1)$$

where q_a is the amount of adsorbed cells, q_0 is the amount of initial free cells, q_f is the amount of final free cells (at $t = 8$ h) and $q_{sampling}$ is the amount of cells withdrawn by sampling. From the cell balance, non-viable cells were found to preferably adsorb as

compared to viable cells since, after 8h, 40 % of initial non-viable cells were adsorbed versus 13 % for viable cells. The adsorption of non-viable cells was also observed in the increase in viability of approximately 5-6 % calculated from the cell balance (78-84 %) and confirmed from the experimental measurements (77-83 %, See Figure 6.2C).

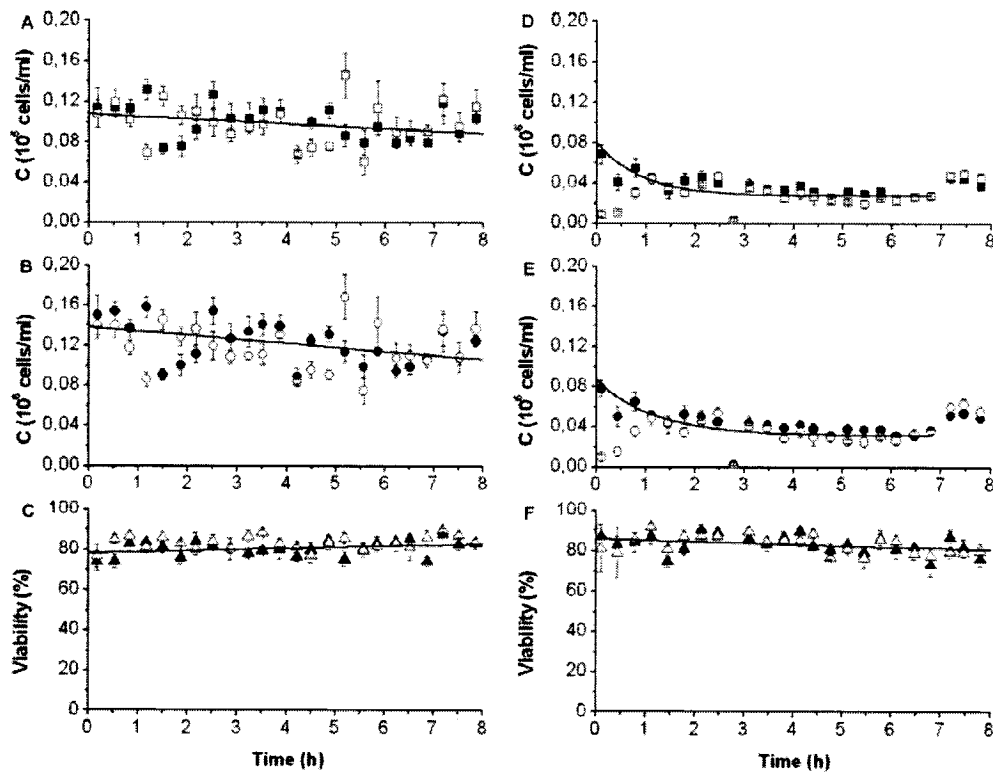


Figure 6.2. Adsorption of HEK-293 cells in experiment #1 (panels A, B, C) and experiment #2 (panels D, E, F). Viable cells concentration at column inlet (■) and outlet (□); Total cells concentration at column inlet (●) and outlet (○); Viability at column inlet (▲) and outlet (△).

Table 6.2. Cell balance for experiment #1.

Cells	q_0 (10^6 cells)	q_f (10^6 cells)	$q_{sampling}$ (10^6 cells)	q_a (10^6 cells)
Total	31.1	16.2	8.87	6.02
Viable	24.1	13.6	7.28	3.21
Non-viable*	6.98	2.57	1.60	2.81

*The amounts of non-viable cells were determined as the difference of viable cells from total cells.

The cell concentration measured during the Ni-primed adsorbent experiments #2 and 3 showed typical adsorption profiles (Figure 6.2 D, E, F and Figure 6.3) that have been analyzed in details in the following adsorption equilibrium and kinetic sections. During adsorption experiment #3, the bed expansion (H/H_0) considerably varied while the flow velocity remained constant at 315 cm/h (see Figure 6.3C). During the initial phase of experiment #3, the degree of expansion increased linearly from 2.6 to 3.2 in approximately 2.5 h, which corresponded to the time at which the first adsorption equilibrium was reached. This overexpansion phenomenon, due to cell/adsorbent interaction has also been observed by Vergnault et al. (25). It is believed that the adsorption of cells to the external surface of the adsorbent reduces the density of the particles (27), thus increasing interparticulate voidage in the present case. During the following phases, the bed expansion remained constant even when increasing the concentration of free cells by cell additions (at $t = 3.5$ h and $t = 7.8$ h), and even during cell adsorption during phases 2 and 3 (Figure 6.3C). Such a stable bed expansion has also been reported by Vergnault et al. (25) while free cell concentration profile was observed to be decreasing. These differences in bed expansion stability (Phase 1 versus phase 2 and 3, see Figure 6.3) are more likely to be attributed to different types of interactions between cells and beads, that is, preferential cell interactions with the beads themselves occurring during phase 1, and preferential cell interactions with previously adsorbed cells occurring during phase 2 and 3. Indeed, according to the calculated cell

surface coverage of adsorbent particles (see adsorption equilibrium section) during phase 1, cells are exposed to non-covered adsorbent particles while during phase 2 and 3, cells are exposed to adsorbent particles already covered at 22% and 33% of their cell adsorption capacity.

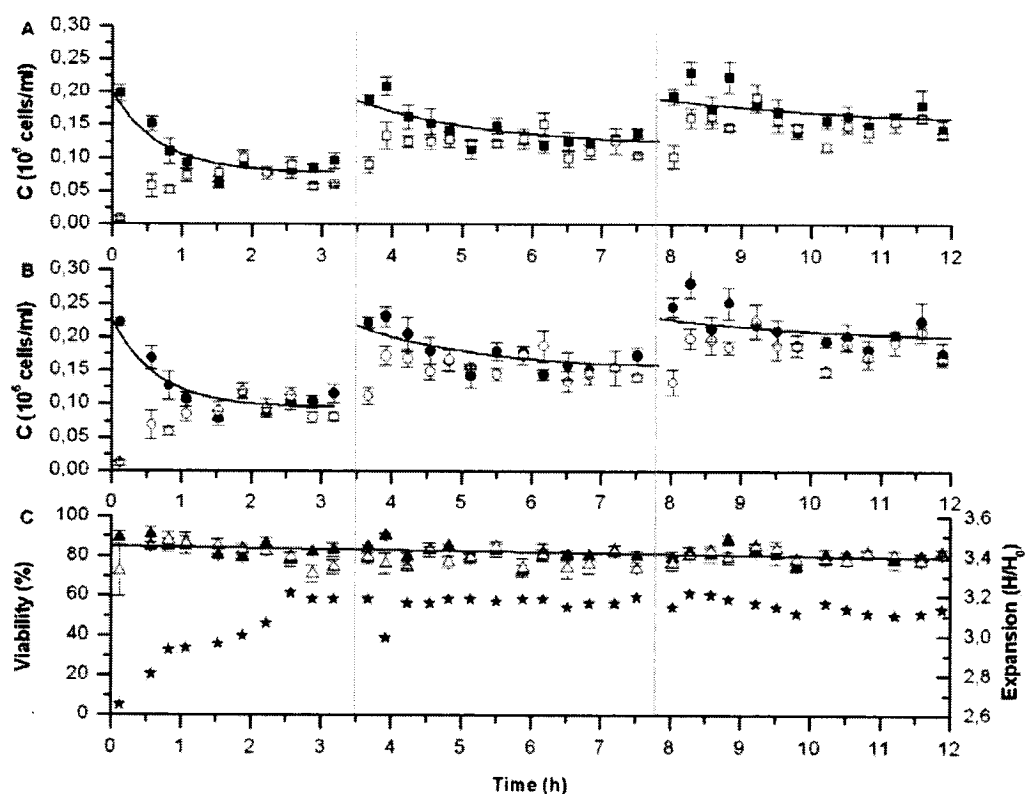


Figure 6.3. Adsorption of HEK-293 cells on primed Streamline Chelating adsorbent in the cell injection experiment (experiment #3). Cells were injected at $t=3.5$ h and $t=7.8$ h determining the time limits of three adsorption phases: phase 1 (0, 3.5) h, phase 2 (3.5, 7.8) h and phase 3 (7.8, 12) h. Legend is the same as in Figure 6.2 for repeated symbols. Also: (★) bed expansion.

6.3.2 Adsorption equilibrium and kinetics

Adsorption processes reach equilibrium when the column outlet and inlet concentrations are equal. The equilibrium data, in terms of free and bound cells (viable and total), observed during the nickel-charged adsorbent experiments #2 and 3 (Figure 6.2 D, E, F and Figure 6.3) were correlated with the Langmuir isotherm of the form:

$$q^* = \frac{q_m c^*}{K_d + c^*} \quad (2)$$

where q_m is the maximum capacity of the adsorbent, c^* is the equilibrium concentration of unbound cells, K_d is the dissociation constant, and q^* is the equilibrium concentration of bound cells at the end of phase i (with $q^*_{i-1}=0$ when $i=1$) determined according to:

$$q^*_{i-1} = \frac{c_0 V_0 - (c^* V^* + q_{\text{sampling}})}{V_a} + q^*_{i-1} \quad (3)$$

where c_0 is the initial free cells concentration, V_0 is the initial liquid phase volume, V^* is the liquid phase volume at equilibrium, q_{sampling} is the cumulative amount of free cells sampled during phase i and V_a is the sedimented volume of adsorbent. The experimental equilibrium data presented in Table 6.3 are fitted with the Langmuir isotherm (using least squares minimization) giving correlation coefficients of 0.99 and greater for viable and total cells (Figure 6.4). Furthermore, the linear nature of the double reciprocal, semireciprocal and Scatchard plots of our experimental data (results not shown) indicates that the equilibrium adsorption is adequately described by Langmuir-type adsorption mechanism (28). Therefore, the model hypothesis of independent interaction sites, equal energy, and monolayer adsorption coverage can be assumed for the binding of HEK-293 cells to the IDA-Ni adsorbent. The adsorption of cells in monolayer was observed on an adsorbent particle sampled at the end of

experiment #2 (Figure 6.5). Sharma and Agarwal (12) reported that the Langmuir isotherm model gives a good approximation for the equilibrium adsorption of proteins to IMAC adsorbents at low ionic strength (≤ 0.5 M NaCl), where electrostatic (ionic) interactions are enhanced and hydrophobic interactions are reduced. This observation is in agreement with our results, considering that the experimental system studied is under low ionic strength conditions (0.15 M NaCl equivalent).

Table 6.3. Experimental equilibrium data from Ni-primed adsorbent experiments (experiments #2 and 3) for viable and total cells.

Experiment # / phase	Viable cells		Total cells	
	c*	q*	c*	q*
	(10^6 cells/ml)	(10^6 cells/ml gel)	(10^6 cells/ml)	(10^6 cells/ml gel)
2	0.027	1.47	0.031	1.53
3 / phase 1	0.078	3.56	0.095	3.83
3 / phase 2	0.120	5.46	0.153	5.66
3 / phase 3	0.149	6.58	0.195	6.63

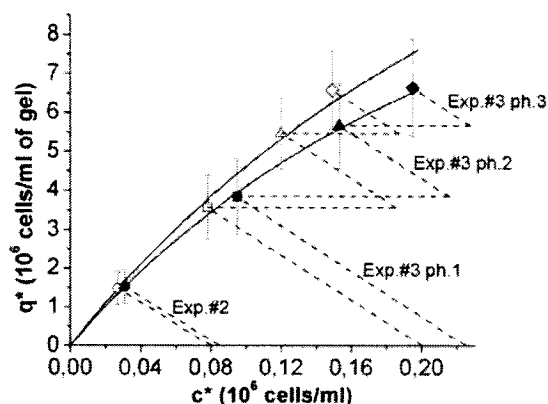


Figure 6.4. Langmuir adsorption isotherm of Ni-primed adsorbent experiments for viable (open symbols) and total (solid symbols) cells. Legend for equilibrium data points are: for experiment #2 (○ and ●) and for cell injection experiment #3 phase 1 (□ and ■), phase 2 (△ and ▲) and phase 3 (◇ and ◆). The continuous (equilibrium) line relates the free and bound cell concentrations at equilibrium. The dashed lines represent the adsorption operating lines corresponding to the experimental conditions.

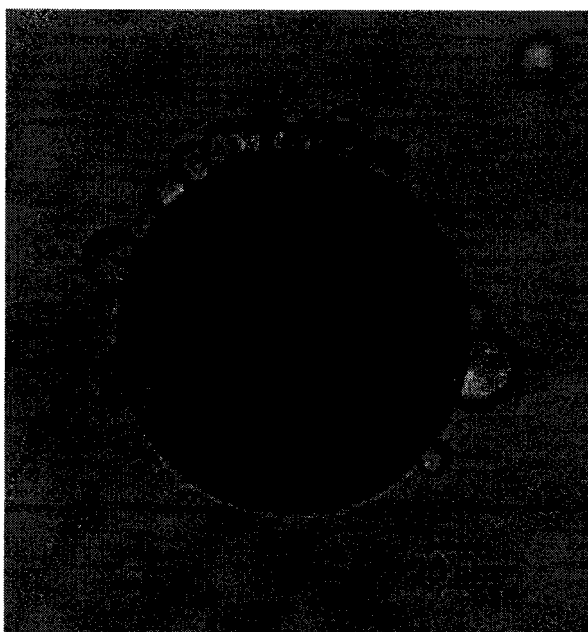


Figure 6.5. Optical microscopy picture (100X magnification) of the monolayer adsorption of HEK-293 cells to Ni-primed Streamline™ Chelating particles at the end of experiment #2 (8 h).

From the isotherm regression, the maximum capacity of the adsorbent (q_m) and the dissociation constant (K_d) are estimated, under expanded bed adsorption conditions, for viable cells, to 22.4×10^6 cells/ml of adsorbent and 0.385×10^6 cells/ml, and for total cells, to 17.1×10^6 cells/ml of adsorbent and 0.316×10^6 cells/ml, respectively. From the Langmuir isotherm (Figure 6.4), we observe that viable cells have more affinity with the adsorbent than non-viable cells. At the end of phase 3 of experiment #3, a maximum surface coverage (percentage of maximum capacity) of 39 % is achieved, meaning that 61 % of total surface sites are unoccupied at this stage. The equilibrium capacity obtained is of the same order of magnitude than the reported value of approximately 500×10^6 cells/ml of gel for the adsorption of *S. cerevisiae* to a copper-primed Streamline Chelating adsorbent in finite bath mode (23).

The adsorption kinetics of cells in a closed system can be described by the decay of free cell concentration with time. In our experimental setup, since the liquid volume in the purification loop is much smaller than in the spinner-flask, the free cell concentration in the system can be taken as the cell concentration at the column inlet. This approach was also used in other EBA cell uptake studies (25, 26). A first order kinetic model, based on an “apparent” adsorption rate constant, can be used to depict the early cell capture period of experiments using “fresh” Ni-primed adsorbent (where initial bound cells concentration on the adsorbent is zero):

$$\ln\left(\frac{c(t)}{c_0}\right) = k_{app}t \quad (4)$$

where $c(t)$ is the cell concentration at time t , c_0 is the initial concentration and k_{app} is the apparent kinetic rate constant. The kinetic profiles of experiments #2 and #3 (phase 1) presented in Figure 6.6 show very similar behaviour. The resulting kinetic constants

are obtained from the model fitting of experiment #2 ($k_{app} = 0.0087 \text{ min}^{-1}$, $R^2 = 0.4425$) and experiment #3 ($k_{app} = 0.0111 \text{ min}^{-1}$, $R^2 = 0.9686$) for the first 90 min period.

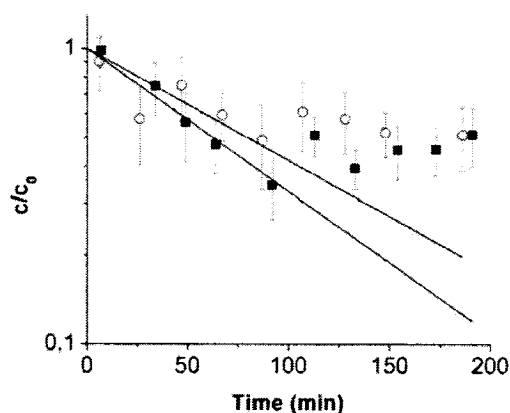


Figure 6.6. Cell adsorption kinetics for “fresh” ($q_0 = 0$ cells/ml of adsorbent) Ni-primed adsorbent experiment #2 (○) and #3 phase 1 (■).

The kinetics model proposed by Daniels (29) used in other cell adsorption studies (23, 24) did not represent well our experimental data (results not shown). As verified by Lin et al. (24), it is believed that the Daniels model better describes systems showing strong biomass-adsorbent interactions. The value of c/c_0 at $t = 10$ min, which can be used as a criteria to identify strongly interacting systems (24), can also serve to compare the adsorption kinetics disregarding the model and the experimental method used. When compared to values of c/c_0 at $t = 10$ min reported in other studies (presented in Table 6.4), the adsorption kinetics of our experimental system can be described as moderately fast and with moderate biomass-adsorbent interactions.

Table 6.4. Reported adsorption kinetic ratios c/c_0 evaluated at $t = 10$ min for various biomass-adsorbent systems.

Cells	Adsorbent type	Method	c/c_0 at $t=10\text{min}$	Reference
HEK-293	IMAC	EBA	0.90	This work
<i>S. cerevisiae</i>	Anion exchange	Finite bath	0.65	(23)
<i>S. cerevisiae</i>	Anion exchange	Finite bath	0.90-0.96	(24)
<i>S. cerevisiae</i>	Anion exchange	EBA	0.70-0.90	(25)

6.4 Conclusions

In this work, the interaction affinity of HEK-293 cells to unprimed and nickel-primed Streamline Chelating support was quantified by closed loop EBA experiments and further analyzed in terms of adsorption equilibrium and kinetics.

With the unprimed adsorbent acting as a weak cation exchanger, non-viable cells demonstrated more affinity to the adsorbent than viable cells, as confirmed by an increase of free cells viability during the experiment. Overall, low amount of cells are attracted to the unprimed adsorbent showing low levels of biomass-adsorbent interactions.

With the nickel-primed adsorbent, the observed monolayer adsorption of the cells was well correlated to a Langmuir-type equilibrium behaviour. Also, the maximum capacity of the adsorbent at equilibrium could be estimated although total surface coverage was not reached in the experiments. Compared to other systems, the adsorption

kinetics we determined could be described as moderate and with moderate biomass-adsorbent interactions.

For the development of a robust EBA protein purification process, the level of biomass-adsorbent interactions should be minimized in further work. In order to minimize these interactions efficiently, the purification performance, measured by protein breakthrough, should be studied in conjunction to the level of biomass-adsorbent interaction (measured as in this work). Therefore, important operating IMAC parameters such as pH, ionic strength and metal ion should be studied in order to minimize the biomass-adsorbent interactions.

Acknowledgement

The authors thank GE Healthcare for the donation of the Streamline Chelating resin and CellNet research network (NSERC) for the financial support of this work.

References and notes

- (1) Durocher, Y.; Perret, S.; Kamen, A., High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res* 2002, 30, (2), E9.
- (2) Chase, H. A., Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds. *Trends in Biotechnology* 1994, 12, (8), 296-303.
- (3) Blank, G. S.; Zapata, G.; Fahrner, R.; Milton, M.; Yedinak, C.; Knudsen, H.; Schmelzer, C., Expanded bed adsorption in the purification of monoclonal antibodies: a comparison of process alternatives. *Bioseparation* 2001, V10, (1), 65-71.

- (4) Batt, B. C.; Yabannavar, V. M.; Singh, V., Expanded bed adsorption process for protein recovery from whole mammalian cell culture broth. *Bioseparation* 1995, 5, (1), 41-52.
- (5) Lütkemeyer, D.; Ameskamp, N.; Priesner, C.; Bartsch, E.-M.; Lehmann, J., Capture of proteins from mammalian cells in pilot scale using different STREAMLINE adsorbents. *Bioseparation* 2001, V10, (1), 57-63.
- (6) Beck, J., T.; Williamson, B.; Tipton, B., Direct coupling of expanded bed adsorption with a downstream purification step. *Bioseparation* 1999, V8, (1), 201-207.
- (7) Gonzalez, Y.; Ibarra, N.; Gomez, H.; Gonzalez, M.; Dorta, L.; Padilla, S.; Valdes, R., Expanded bed adsorption processing of mammalian cell culture fluid: comparison with packed bed affinity chromatography. *Journal of Chromatography B* 2003, 784, (1), 183-187.
- (8) Ameskamp, N.; Priesner, C.; Lehmann, J.; Lütkemeyer, D., Pilot scale recovery of monoclonal antibodies by expanded bed ion exchange adsorption. *Bioseparation* 1999, V8, (1), 169-188.
- (9) Ohashi, R.; Otero, J. M.; Chwistek, A.; Yamato, I.; Hamel, J. F. P., On-Line Purification of Monoclonal Antibodies Using an Integrated Stirred-Tank Reactor/Expanded-Bed Adsorption System. *Biotechnol. Prog.* 2002, 18, (6), 1292-1300.
- (10) Thommes, J.; Bader, A.; Halfar, M.; Karau, A.; Kula, M.-R., Isolation of monoclonal antibodies from cell containing hybridoma broth using a protein A coated adsorbent in expanded beds. *Journal of Chromatography A* 1996, 752, (1-2), 111-122.
- (11) Porath, J.; Carlsson, J. A. N.; Olsson, I.; Belfrage, G., Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 1975, 258, (5536), 598-599.
- (12) Sharma, S.; Agarwal, G. P., Interactions of Proteins with Immobilized Metal Ions: Role of Ionic Strength and pH. *Journal of Colloid and Interface Science* 2001, 243, (1), 61-72.
- (13) Willoughby, N. A.; Kirschner, T.; Smith, M. P.; Hjorth, R.; Titchener-hooker, N. J., Immobilized metal ion affinity chromatography purification of alcohol dehydrogenase from baker's yeast using an expanded bed adsorption system. *Journal of Chromatography A* 1999, 840, (2), 195-204.

- (14) Noronha, S.; Kaufman, J.; Shiloach, J., Use of Streamline chelating for capture and purification of poly-His-tagged recombinant proteins. *Bioseparation* 1999, 8, (1), 145-151.
- (15) Abdullah, N.; Chase, H. A., Removal of poly-histidine fusion tags from recombinant proteins purified by expanded bed adsorption. *Biotechnology and Bioengineering* 2005, 92, (4), 501-513.
- (16) Clemmitt, R. H.; Chase, H. A., Facilitated downstream processing of a histidine-tagged protein from unclarified E. coli homogenates using immobilized metal affinity expanded-bed adsorption. *Biotechnology and Bioengineering* 2000, 67, (2), 206-216.
- (17) Gibert, S.; Bakalara, N.; Santarelli, X., Three-step chromatographic purification procedure for the production of a His-tag recombinant kinesin overexpressed in E. coli. *Journal of Chromatography B* 2000, 737, (1-2), 143-150.
- (18) Sahin, A.; Tetaud, E.; Merlin, G.; Santarelli, X., LdARL-1 His-tagged recombinant protein: Purification by immobilized metal affinity expanded bed adsorption. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2005, 818, (1 SPEC ISS), 19-22.
- (19) Clemmitt, R. H.; Bruce, L. J.; Chase, H. A., On-line monitoring of the purification of GST-(His)₆ from an unclarified *Escherichia coli* homogenate within an immobilized metal affinity expanded bed. *Bioseparation* 1999, 8, (1), 53-67.
- (20) Chang, Y.-K.; Horng, J.-T.; Huang, R.-Z.; Lin, S.-Y., Direct capture of factor IX from unclarified human plasma by IMEBAC. *Biochemical Engineering Journal* 2006, 29, (1-2), 12-22.
- (21) Feuser, J.; Halfar, M.; Lutkemeyer, D.; Ameskamp, N.; Kula, M. R.; Thommes, J., Interaction of mammalian cell culture broth with adsorbents in expanded bed adsorption of monoclonal antibodies. *Process Biochemistry* 1999, 34, (2), 159-165.
- (22) Hubbuch, J.; Thommes, J.; Kula, M. R., Biochemical engineering aspects of expanded bed adsorption. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2005, 92, 101-23.
- (23) Fernandez-Lahore, H. M.; Geilenkirchen, S.; Boldt, K.; Nagel, A.; Kula, M. R.; Thommes, J., The influence of cell adsorbent interactions on protein adsorption in expanded beds. *J Chromatogr A* 2000, 873, (2), 195-208.

- (24) Lin, D. Q.; Fernandez-Lahore, H. M.; Kula, M. R.; Thommes, J., Minimising biomass/adsorbent interactions in expanded bed adsorption processes: A methodological design approach. *Bioseparation* 2001, 10, (1-3), 7-19.
- (25) Vergnault, H.; Mercier-Bonin, M.; Willemot, R.-M., Physicochemical parameters involved in the interaction of *Saccharomyces cerevisiae* cells with ion-exchange adsorbents in expanded bed chromatography. *Biotechnology Progress* 2004, 20, (5), 1534-1542.
- (26) Vergnault, H.; Willemot, R.-M.; Mercier-Bonin, M., Non-electrostatic interactions between cultured *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells and adsorbent beads in expanded bed adsorption: Influence of cell wall properties. *Process Biochemistry* 2007, 42, (2), 244-251.
- (27) Lin, D.-Q.; Kula, M.-R.; Liten, A.; Thömmes, J., Stability of expanded beds during the application of crude feedstock. *Biotechnology and Bioengineering* 2003, 81, (1), 21-26.
- (28) Jiang, W.; Hearn, M. T. W., Protein Interaction with Immobilized Metal Ion Affinity Ligands under High Ionic Strength Conditions. *Analytical Biochemistry* 1996, 242, (1), 45-54.
- (29) Daniels, S., Mechanisms involved in sorption of microorganisms to solid surfaces. In *Adsorption of microorganisms to surfaces*, Bitton, G.; Marshall, K., Eds. John Wiley & Sons: New York, 1980; pp 7-57.

CHAPITRE 7

DISCUSSION GÉNÉRALE

Tel que rapporté par Hubbuch et al. (18), les colonnes EBA dont les systèmes de distribution reposent sur la création d'une contre-pression (i.e. les distributeurs à plaques perforées, à treillis, à fritte de verre ou à billes de verre) ont une tendance à retenir les cellules lorsque des milieux de culture non-clarifiés sont employés. L'accumulation de cellules dans le distributeur peut causer de la turbulence et affecter la distribution de l'écoulement. De plus, dans le contexte de purification intégrée, les colonnes EBA pourraient être utilisées pendant des cultures en suspension qui s'échelonnent sur plusieurs jours à des taux de recirculation élevés. Il est donc primordial dans ce cas particulier de minimiser le risque de filtration des cellules par la colonne. Pour ces raisons, la colonne développée au laboratoire, malgré les bonnes caractéristiques de fluidisation présentées au chapitre 3, n'est pas envisagée pour les travaux de purification intégrée.

La purification de TGF bêta RIII-ED avec 2 types de colonnes IMAC à lit fixe a été démontrée par la détection de la protéine, sur Western blot, dans les fractions d'élution (chapitre 4). On observe que la purification de la protéine est autant possible lorsqu'un échantillon est non dilué (purification automatisée, pH 7.15, 150 mM NaCl) ou qu'il est dilué avec du tampon 2X (purification à écoulement gravitaire, pH 7.15, 575 mM NaCl), malgré la différence de force ionique entre les 2 échantillons. En mode de purification intégrée, le pH et la force ionique de culture doivent être conservés le plus près possible des valeurs physiologiques pour des raisons de viabilité cellulaire. Le pH et la force ionique ne peuvent alors être utilisés sur les plages complètes généralement recommandées pour l'IMAC (pH : 5-9 et force ionique : 0-3 M NaCl), du moins durant la phase de chargement de la protéine d'intérêt.

Les essais de validation du montage de purification intégrée présentés au chapitre 5 ont démontré une excellente viabilité sur une période de 8 h, équivalente aux cultures contrôles. On observe que la viabilité des cellules n'est pas influencée par les forces de cisaillement exercées par la pompe et le barreau magnétique de la colonne et par la diminution de la capacité de transfert d'oxygène dans le circuit. Pour des essais futurs de plus longue durée, un temps de résidence court dans le circuit et un taux de recirculation réduit pourrait améliorer la viabilité des cellules. Le temps de résidence moyen pourrait également être diminué en utilisant une plus petite quantité d'adsorbant dans la colonne. Par contre, la quantité minimale d'adsorbant nécessaire pour obtenir un lit expansé bien distribué correspond à une hauteur sédimentée de 6 cm dans une colonne de 1 cm de diamètre (16). À débit constant, le taux de recirculation peut être diminué en augmentant le volume du bioréacteur.

Les résultats obtenus lors des tests d'adsorption, présentés au chapitre 6, indiquent qu'il existe une interaction modérée, entre les cellules HEK-293 et le support chromatographique chargé en nickel. Par contre, tel que rapporté par Fernandez-Lahore et al. (32), la performance de purification d'une colonne qui possède une interaction pour une biomasse donnée est certainement diminuée, mais peut toujours être acceptable. Tel qu'indiqué par Durocher et al. (7), la densité cellulaire des cultures de HEK-293 après transfection transitoire est de l'ordre de 1×10^6 à 4×10^6 cellules/ml sur une période de 9 jours. Selon la corrélation de Langmuir établie pour l'équilibre d'adsorption de cellules, il est estimé graphiquement qu'une colonne, soumise à des concentrations de 1×10^6 à 4×10^6 cellules/ml, pourrait retenir 8.5×10^6 et 15.4×10^6 cellules/ml d'adsorbant, respectivement (Figure 7.1) (pour un temps de résidence moyen d'environ 5 min). Pour une culture de 2 L, ces quantités ne sont pas considérables par rapport à la quantité totale de cellules d'un bioréacteur de 1×10^6 et 4×10^6 cellules/ml (de l'ordre de 3-6%).

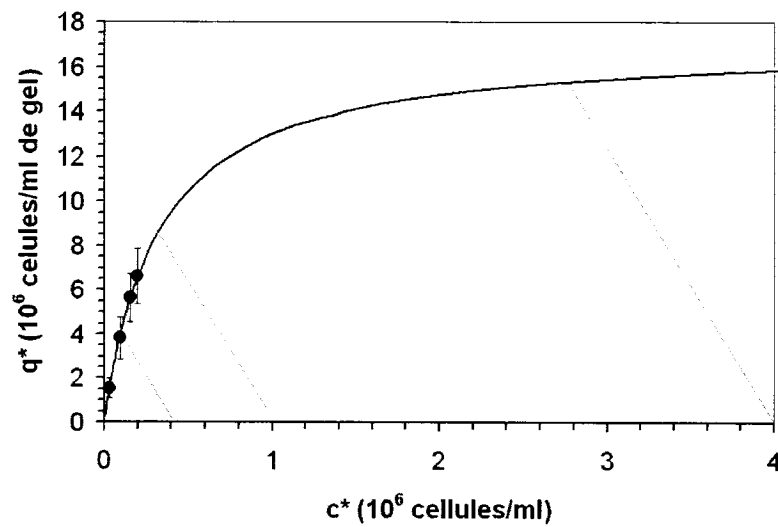


Figure 7.1. Estimation des quantités de cellules adsorbées en mode de purification intégrée. Les lignes d'opération (trait gris) aux concentration libres de 1×10^6 et 4×10^6 cellules/ml sont assumées parallèles à la ligne d'opération expérimentale (0.2×10^6 cellules/ml).

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Dans ce travail portant sur le développement d'une stratégie de purification intégrée utilisant des colonnes d'adsorption en lit expansé, les objectifs fixés ont été atteints. Dans l'ensemble, les résultats obtenus représentent un premier pas prometteur vers l'objectif final, celui d'effectuer la purification (EBA) en cours de culture d'une protéine sécrétée. Premièrement, une méthode de purification par chromatographie d'affinité aux ions nickel immobilisés (IMAC) a été développée pour une protéine modèle donnée (TGF bêta RIII-ED). Les résultats obtenus ont permis de déterminer qu'un temps de résidence de 1 min est suffisant pour l'adsorption de la protéine d'intérêt et que l'élution de la protéine peut être effectuée par l'ajout d'imidazole (élution compétitive). Deuxièmement, un montage de purification intégrée permettant l'adsorption en cours de culture de protéines sensibles, i.e. qui se dégradent rapidement, a été développé. Les résultats obtenus ont permis d'identifier qu'à des concentrations de cellulaires de 0.1×10^6 à 0.2×10^6 cellules/ml, les cellules HEK-293 conservent leur viabilité sur une durée de 8 h. Troisièmement, une méthode d'évaluation de la capacité d'adsorption des cellules HEK-293 et le niveau d'interaction entre les cellules et l'adsorbant IMAC a été développée. La capacité maximale d'adsorption de la résine Streamline Chelating chargée en nickel, déterminée à partir du modèle de Langmuir, a été évaluée à 17.1×10^6 cellules/ml de gel. Les résultats obtenus ont permis de déterminer un niveau d'interaction biomasse/adsorbant modéré.

Pour la suite du développement de la stratégie, dans le cadre de travaux futurs, l'étude de l'adsorption de la protéine pourrait être effectuée, par des test de point de rupture, dans de nouvelles conditions d'interaction correspondant aux densités cellulaires (1×10^6 - 4×10^6 cellules/ml) et aux durées (2 - 9 jours) typiques des cultures de HEK-293. Dans le cas où la purification n'atteindrait pas les performances souhaitées en raison d'interactions cellules/adsorbant trop importantes, des travaux pour minimiser

ces interactions pourrait être entrepris et un dispositif de séparation de cellules, tel qu'un filtre acoustique (capable d'atteindre une efficacité de séparation de cellules mammifères d'environ 80-90% à des concentrations cellulaires de 1×10^6 à 20×10^6 cellules/ml et un débit de 0.7 à 7.0 ml/min), pourrait être utilisé afin de réduire la concentration cellulaire dans la boucle de recirculation. Dans tous les cas, puisque la performance de la purification devra être évaluée, une méthode de quantification spécifique de la protéine TGF bêta RIII-ED devrait aussi être développée, tel que par ELISA.

Afin de réduire le niveau d'interaction biomasse/adsorbant, l'utilisation d'un autre ion métallique que le nickel, tel que le cobalt, ou d'un adsorbant IMAC tétradentate pourrait être évalué. L'utilisation d'un autre type d'adsorbant plus spécifique que l'IMAC, tel qu'un adsorbant d'affinité aux protéines, pourrait aussi être considéré afin de réduire le niveau d'interaction biomasse/adsorbant. La modification du pH et de la force ionique de la culture est difficilement envisageable pour des raisons de viabilité puisque leurs valeurs doivent être conservées près des valeurs physiologiques.

Les recommandations suivantes peuvent être faites sur le montage et la méthode de purification intégrée. L'utilisation de sondes UV à l'entrée et à la sortie de la colonne, telle que rapportée dans d'autres travaux (32, 33, 36), pourrait permettre de mesurer l'absorbance (proportionnelle à la densité cellulaire) en temps réel et d'éliminer le nombre important de manipulations exigé par les mesures sur hémocytomètre. Une deuxième boucle de recirculation contenant du milieu de culture frais pourrait servir à maintenir le lit d'adsorbant dans un état expansé avant de recevoir la culture à purifier. Cette boucle, aussi maintenue en condition d'asepsie, inclurait un réservoir de milieu, une pompe, des valves 2-positions (permettant de recirculer une boucle à la fois) et la tubulure. Dans le cas où une seule colonne ne pourrait être utilisée pendant toute la durée de la culture, l'ajout d'une deuxième colonne permettrait une stratégie où il y aurait toujours une colonne en chargement (et l'autre colonne serait éluée et régénérée

pendant ce temps). Toutes ces possibilités futures, combinées avec les résultats positifs obtenus jusqu'à présent dans le domaine laissent entrevoir un avenir prometteur pour la méthode de purification intégrée présentée ici.

RÉFÉRENCES

- (1) De Dobbeleer, C.; Cloutier, M.; Fouilland, M.; Legros, R.; Jolicoeur, M., A high-rate perfusion bioreactor for plant cells. *Biotechnology and Bioengineering* **2006**, 95, (6), 1126-1137.
- (2) Klvana, M.; Legros, R.; Jolicoeur, M., In situ extraction strategy affects benzophenanthridine alkaloid production fluxes in suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. *Biotechnology and Bioengineering* **2005**, 89, (3), 280-289.
- (3) Lee-Parsons, C. W. T.; Shuler, M. L., The effect of ajmalicine spiking and resin addition timing on the production of indole alkaloids from *Catharanthus roseus* cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering* **2002**, 79, (4), 408-415.
- (4) Williams, R. D.; Chauret, N.; Bédard, C.; Archambault, J., Effect of polymeric adsorbents on the production of sanguinarine by *Papaver somniferum* cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering* **1992**, 40, (8), 971-977.
- (5) Song, M.-J.; Bae, J.; Lee, D.-S.; Kim, C.-H.; Kim, J.-S.; Kim, S.-W.; Hong, S.-I., Purification and characterization of prodigiosin produced by integrated bioreactor from *Serratia* sp. KH-95. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2006**, 101, (2), 157-161.
- (6) Butler, M., Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl Microbiol Biotechnol* **2005**, 68, (3), 283-91.
- (7) Durocher, Y.; Perret, S.; Kamen, A., High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res* **2002**, 30, (2), E9.
- (8) Muller, N.; Girard, P.; Hacker, D. L.; Jordan, M.; Wurm, F. M., Orbital shaker technology for the cultivation of mammalian cells in suspension. *Biotechnology and Bioengineering* **2005**, 89, (4), 400-406.
- (9) Pham, P. L.; Perret, S.; Doan, H. C.; Cass, B.; St-Laurent, G.; Kamen, A.; Durocher, Y., Large-scale transient transfection of serum-free suspension-growing HEK293

EBNA1 cells: Peptone additives improve cell growth and transfection efficiency. *Biotechnology and Bioengineering* **2003**, 84, (3), 332-342.

- (10) Baldi, L.; Muller, N.; Picasso, S.; Jacquet, R.; Girard, P.; Huy, P. T.; Derow, E.; Wurm, F. M., Transient gene expression in suspension HEK-293 cells: Application to large-scale protein production. *Biotechnology Progress* **2005**, 21, (1), 148-153.
- (11) deZengotita, V. M.; Schmelzer, A. E.; Miller, W. M., Characterization of hybridoma cell responses to elevated pCO₂ and osmolality: intracellular pH, cell size, apoptosis, and metabolism. *Biotechnol Bioeng* **2002**, 77, (4), 369-80.
- (12) Chang, Y. K.; Chase, H. A., Development of operating conditions for protein purification using expanded bed techniques: the effect of the degree of bed expansion on adsorption performance. *Journal of Engineering and Applied Science* **1996**, 49, (5), 512-526.
- (13) Lin, D.-Q.; Miao, Z.-J.; Yao, S.-J., Expansion and hydrodynamic properties of cellulose-stainless steel powder composite matrix for expanded bed adsorption. *Journal of Chromatography A* **2006**, 1107, (1-2), 265-272.
- (14) Chase, H. A., Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds. *Trends in Biotechnology* **1994**, 12, (8), 296-303.
- (15) Richardson, J. F.; Zaki, W. N., Sedimentation and fluidisation -- 1. *Institution of Chemical Engineers -- Transactions* **1954**, 32, (1), 35-52.
- (16) Theodossiou, I.; Elsner, H. D.; Thomas, O. R. T.; Hobley, T. J., Fluidisation and dispersion behaviour of small high density pellicular expanded bed adsorbents. *Journal of Chromatography A* **2002**, 964, (1-2), 77-89.
- (17) Liu, X. M.; Liu, H.; Wu, B. C.; Li, S. C.; Ye, L. L.; Wang, Q. W.; Huang, P. T.; Chen, Z. L., Suspended aggregates as an immobilization mode for high-density perfusion culture of HEK-293 cells in a stirred tank bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2006**, V72, (6), 1144-1151.
- (18) Hubbuch, J.; Thommes, J.; Kula, M. R., Biochemical engineering aspects of expanded bed adsorption. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **2005**, 92, 101-23.

- (19) Lin, D.-Q.; Thommes, J.; Kula, M.-R.; Hubbuch, J. J., The influence of biomass on the hydrodynamic behavior and stability of expanded beds. *Biotechnology and Bioengineering* **2004**, 87, (3), 337-346.
- (20) Levenspiel, O., *Chemical reaction engineering*. 3rd edition ed.; John Wiley & Sons: New York, 1972; p 668.
- (21) Bruce, L. J.; Chase, H. A., Hydrodynamics and adsorption behaviour within an expanded bed adsorption column studied using in-bed sampling. *Chemical Engineering Science* **2001**, 56, (10), 3149-3162.
- (22) Bruce, L. J.; Chase, H. A., Evaluation of the effect of in-bed sampling on expanded bed adsorption. *Bioseparation* **1999**, 8, (1), 77-83.
- (23) Thommes, J.; Bader, A.; Halfar, M.; Karau, A.; Kula, M.-R., Isolation of monoclonal antibodies from cell containing hybridoma broth using a protein A coated adsorbent in expanded beds. *Journal of Chromatography A* **1996**, 752, (1-2), 111-122.
- (24) Anspach, F. B.; Curbelo, D.; Hartmann, R.; Garke, G.; Deckwer, W.-D., Expanded-bed chromatography in primary protein purification. *Journal of Chromatography A* **1999**, 865, (1-2), 129-144.
- (25) Porath, J., Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif* **1992**, 3, (4), 263-81.
- (26) Porath, J., IMAC--Immobilized metal ion affinity based chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **1988**, 7, (7), 254-259.
- (27) Porath, J.; Carlsson, J. A. N.; Olsson, I.; Belfrage, G., Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **1975**, 258, (5536), 598-599.
- (28) Sulkowski, E., The saga of IMAC and MIT. *Bioessays* **1989**, 10, (5), 170-5.
- (29) Sulkowski, E., Purification of proteins by IMAC. *Trends in Biotechnology* **1985**, 3, (1), 1-7.

- (30) Gaberc-Porekar, V.; Menart, V., Potential for Using Histidine Tags in Purification of Proteins at Large Scale. *Chemical Engineering & Technology* **2005**, 28, (11), 1306-1314.
- (31) Sharma, S.; Agarwal, G. P., Interactions of Proteins with Immobilized Metal Ions: Role of Ionic Strength and pH. *Journal of Colloid and Interface Science* **2001**, 243, (1), 61-72.
- (32) Fernandez-Lahore, H. M.; Geilenkirchen, S.; Boldt, K.; Nagel, A.; Kula, M. R.; Thommes, J., The influence of cell adsorbent interactions on protein adsorption in expanded beds. *J Chromatogr A* **2000**, 873, (2), 195-208.
- (33) Feuser, J.; Walter, J.; Kula, M.-R.; Thömmes, J., Cell/adsorbent interactions in expanded bed adsorption of proteins. *Bioseparation* **1999**, 8, (1), 99-109.
- (34) Lin, D. Q.; Fernandez-Lahore, H. M.; Kula, M. R.; Thommes, J., Minimising biomass/adsorbent interactions in expanded bed adsorption processes: A methodological design approach. *Bioseparation* **2001**, 10, (1-3), 7-19.
- (35) Hubbuch, J. J.; Brixius, P. J.; Lin, D.-Q.; Mollerup, I.; Kula, M.-R., The influence of homogenisation conditions on biomass-adsorbent interactions during ion-exchange expanded bed adsorption. *Biotechnology and Bioengineering* **2006**, 94, (3), 543-553.
- (36) Vergnault, H.; Mercier-Bonin, M.; Willemot, R.-M., Physicochemical parameters involved in the interaction of *Saccharomyces cerevisiae* cells with ion-exchange adsorbents in expanded bed chromatography. *Biotechnology Progress* **2004**, 20, (5), 1534-1542.
- (37) Vergnault, H.; Willemot, R.-M.; Mercier-Bonin, M., Non-electrostatic interactions between cultured *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells and adsorbent beads in expanded bed adsorption: Influence of cell wall properties. *Process Biochemistry* **2007**, 42, (2), 244-251.
- (38) Fernández-Lahore, H. M.; Kleef, R.; Kula, M. R.; Thömmes, J., The influence of complex biological feedstock on the fluidization and bed stability in expanded bed adsorption. *Biotechnology and Bioengineering* **1999**, 64, (4), 484-496.
- (39) Lin, D.-Q.; Kula, M.-R.; Liten, A.; Thömmes, J., Stability of expanded beds during the application of crude feedstock. *Biotechnology and Bioengineering* **2003**, 81, (1), 21-26.

- (40) Villermaux, J.; Van Swaaij, W. P. M., Modele representatif de la distribution des temps de sejour dans un reacteur semi-infini a dispersion axiale avec zones stagnantes. Application a l'ecoulement ruisselant dans des colonnes d'anneaux Raschig. *Chemical Engineering Science* **1969**, 24, (7), 1097-1111.
- (41) Daniels, S., Mechanisms involved in sorption of microorganisms to solid surfaces. In *Adsorption of microorganisms to surfaces*, Bitton, G.; Marshall, K., Eds. John Wiley & Sons: New York, 1980; pp 7-57.
- (42) Thelen, T. V.; Ramirez, W. F., Bed-height dynamics of expanded beds. *Chemical Engineering Science* **1997**, 52, (19), 3333-3344.
- (43) Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, 227, (5259), 680-5.