

# Nouveau procédé physique de lyse cellulaire pour produits biopharmaceutiques sensibles, comparaison avec la méthode de référence.

Christian Rhême <sup>a)</sup>; Simon Crelier <sup>b)</sup>;  
Loredana Alibrando <sup>b)</sup>; Stéphanie Chédel <sup>b)</sup>; Sacha Stadelmann <sup>b)</sup>

<sup>a)</sup> Frewitt SA, Rte du Coteau 7, 1763 Granges-Paccot, Switzerland  
c.rheme@frewitt.com

<sup>b)</sup> HES-SO Valais-Wallis, Institut ITV, Rte du Rawyl 47, 1950 Sion, Switzerland  
simon.crelier@hevs.ch

## INTRODUCTION

La lyse cellulaire désigne le processus mis en œuvre pour libérer des molécules intracellulaires en rompant la membrane plasmique. Plus précisément, dans les applications biopharmaceutiques, la lyse cellulaire permet de libérer les protéines produites par des organismes tels que des levures ou des bactéries.

Les protéines sont en général particulièrement sensibles, notamment à la température et l'objectif est de récupérer un maximum de la molécule cible sans pour autant perdre en activité biologique.

Les nombreuses méthodes disponibles se divisent en deux classes, la lyse chimique et la lyse physique. La lyse chimique est couramment utilisée bien qu'elle soit génératrice de contaminations et nécessite ainsi de complexes étapes de purification supplémentaires. Sa mise à l'échelle industrielle peut de plus se révéler complexe et coûteuse.

### Homogénéisation à haute pression :

La lyse physique est généralement réalisée par homogénéisation à haute pression (HPH), ce procédé étant réalisé sur plusieurs cycles. Il est considéré comme la méthode physique de référence malgré les importantes élévations de température générées par la montée en pression et la présence de phénomènes non-maîtrisables tels la cavitation.

En présence de protéines thermosensibles, la pression utilisée est déterminante puisque l'élévation de température y est directement liée (échauffement adiabatique de l'ordre de +1 °C pour 4.2 MPa d'élévation de pression). On réalise donc souvent des lyses à basse pression, ce qui réduit le taux de protéines libérées et impose de nombreux cycles à travers l'homogénéisateur.

## NOUVEAU PROCEDE FREWITT

L'équipement proposé est un moulin destiné principalement à la production de particules pharmaceutiques actives d'une taille entre 100 et 500 nanomètres.

Basé sur la technologie «moulin à billes» (bead mill), cet équipement a été développé et optimisé pour les applications pharmaceutiques. Il se distingue notamment de ses concurrents par un design GMP, une haute efficacité énergétique permettant un process à température quasi-constante ainsi qu'une réduction drastique de la contamination du produit <sup>[1]</sup>.

Le moulin fonctionne principalement comme un agitateur, un média de broyage (généralement des billes de zircone) est utilisé pour transmettre sous forme de chocs l'énergie nécessaire à la rupture des membranes cellulaires. Grâce à la technologie unique Frewitt, l'énergie peut être très précisément dosée en fonction du type de cellules traitées, sachant que les bactéries nécessitent plus d'énergie que les levures par exemple.

La technologie décrite dans cet article est protégée par un brevet international.



Fig. 1 : Equipement NanoWitt-LAB de Frewitt SA

## METHODE

Deux systèmes cellulaires ont été sélectionnés pour les différents essais :

- 1) Suspension à 38.2 g/l de levures *S.cerevisiae* dont les mitochondries et le cytoplasme contiennent l'enzyme fumarase.
- 2) Suspension à 37.6 g/l de bactéries *E.coli* produisant la GFP (Green Fluorescent Protein) recombinante.

Pour les deux systèmes, le milieu est constitué d'eau physiologique, soit une solution de NaCl 9 g/l.

### Equipements de lyse :

La lyse par homogénéisation à haute pression est réalisée sur un équipement Stansted de type SPCH-10, la pression est fixée à 1000 bars et un volume de 50 ml est traité à chaque cycle. La température est mesurée avant et après chaque cycle, la suspension est refroidie entre chaque cycle.

Le nouveau procédé investigué est réalisé sur un équipement Frewitt de type NanoWitt-LAB (Fig. 1) en mode recirculation (Fig. 2), ce qui permet de traiter un volume de 250 ml de suspension et de prélever des échantillons à tout moment. Différentes vitesses d'agitation ont été utilisées pour ajuster l'énergie en fonction du travail à réaliser. Les billes choisies sont en zircone et leur diamètre se situe entre 400 et 600 micromètres. La température du produit est mesurée en continu à la sortie de la chambre.

La Figure 2 montre l'installation NanoWitt-LAB pendant le broyage de *E. coli*. La couleur verte-jaune de la suspension est due à la présence de GFP.



Fig. 2 : Lyse de bactéries *E.coli* en mode recirculation

### Equipements analytiques :

Tous les échantillons sont conservés sur glace puis centrifugés durant 10 minutes à 10'000 g à une température de 4 °C. Le surnageant est ensuite récupéré et conservé sur glace jusqu'à analyse.

La méthode de Bradford est utilisée pour la quantification des protéines totales, la mesure se fait après coloration à une longueur d'onde de 595 nm. Pour effectuer une courbe de calibration, une solution stock de BSA à 1 mg/ml est préparée ainsi qu'une plage

de dilutions jusqu'à 0.1 mg/ml. Un blanc est également mesuré avec de l'eau déminéralisée.

L'activité de la fumarase [2,3] a été mesurée grâce à une solution d'acide L-malique (substrat) 50 mM dans un tampon phosphate 100 mM de pH 7.6. La mesure de cinétique est réalisée immédiatement après l'ajout du substrat et l'évolution de l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 240 nm pendant 10 minutes.

La mesure de fluorescence de la GFP [4] est réalisée par excitation à 475 nm, l'émission est mesurée à 509 nm. Une courbe de calibration est mesurée avec des solutions de fluorescéine (substrat de référence) de concentrations variant entre 0.1 et 8.0 µmol/l.

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Homogénéisation haute pression (HPH):

Pour la suspension de levures *S.cerevisiae*, trois cycles ont été réalisés. La température maximale de la suspension atteint 39 °C, la concentration en protéines totale augmente linéairement avec le nombre de cycles pour atteindre 3 mg/ml, aucun plateau n'a cependant été atteint.

De même, l'activité de la fumarase augmente linéairement jusqu'à 4.5 U/ml mais n'a pas atteint de maximum.

Les cellules ne sont donc pas totalement lysées et il faudrait envisager un plus grand nombre de cycles. Selon la littérature [5], la concentration de protéines augmente encore après 10 cycles.

Dans le cas des bactéries *E.coli*, 5 cycles ont été réalisés. L'élévation de température lors de chaque cycle est de l'ordre de 10 °C, la concentration en protéines augmente lors des deux premiers cycles puis se stabilise à la valeur de 10.8 mg/ml.

La concentration en GFP nécessite quant à elle 4 cycles pour atteindre une valeur stable de 0.6 mg/ml.

### Nouveau procédé Frewitt:

Deux conditions de fonctionnement ont été testées pour la lyse de levures *S.cerevisiae*, soient une vitesse de rotation de 1000 puis de 1500 rpm.

A 1000 rpm, la température est restée stable durant tout le processus ( $\Delta T=0.2$  °C) et un maximum de 7.6 mg/ml a été atteint après 10 minutes pour la concentration de protéines.

A 1500 rpm, l'élévation de température s'est limitée à 1 °C (température maximale de 15.4 °C) et la concentration de protéines a atteint 10.2 mg/ml après 5 minutes seulement.

L'activité de la fumarase suit la même logique pour les deux vitesses de rotation testées. Un maximum est atteint après 10 minutes de lyse et les valeurs sont respectivement de 2.6 U/min à 1000 rpm et 3.3 U/min à 1500 rpm.

La lyse de bactéries *E.coli* a elle-aussi été réalisée à deux vitesses différentes, soient 1500 puis 2000 rpm.

L'élévation de température a été mesurée à 1.1 °C pour la vitesse de rotation de 1500 rpm et à 2.6 °C à 2000 rpm, la température maximale atteinte étant de 15.7 °C.

La concentration de protéines maximale a été atteinte en 20 minutes, confirmant le fait que les bactéries *E.coli* nécessitent plus d'énergie de lyse que les levures *S.cerevisiae*. Les valeurs sont de 6.2 mg/ml à 2000 rpm et de 12.2 mg/ml à 1500 rpm.

Des temps de 15 à 20 minutes ont aussi été nécessaires pour atteindre un maximum de concentration pour la GFP, 0.37 mg/ml ont été obtenus à 1500 rpm et 0.1 mg/ml à 2000 rpm.

Il est à noter que le test à 1500 rpm s'est avéré plus efficace que celui à 2000 rpm, d'où l'importance de pouvoir doser précisément l'énergie introduite dans la suspension à lyser.

### Comparaison des résultats:

La figure 3 compare les performances des deux technologies pour la levure *S. cerevisiae*, du point de vue des protéines totales (localisées en grande majorité dans le cytoplasme) et de la fumarase (présente dans les mitochondries).

La figure 4 fait une comparaison analogue mais pour la bactérie *E. coli*. C'est par contre la GFP qui fait cette fois office de molécule-cible

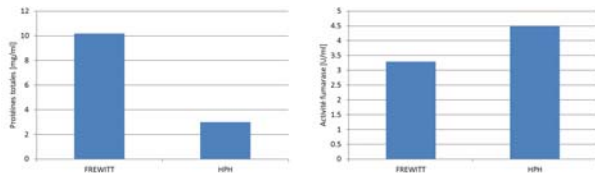


Fig. 3 : *S.cerevisiae*, protéines totales (g.) et fumarase (d.)

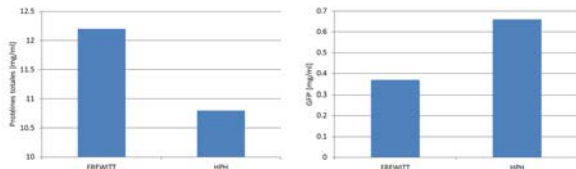


Fig. 4 : *E.coli*, protéines totales (g.) et GFP (d.)

La Figure 5 montre la disparition progressive de la GFP dans les culots de centrifugation de *E. coli* au cours de la lyse. Ceci montre que la molécule-cible a pu être extraite avec succès dans la phase liquide (éliminée ici après centrifugation).

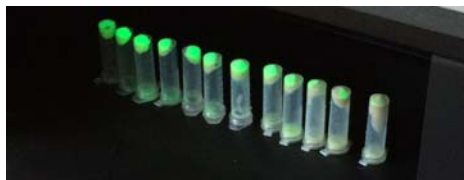


Fig. 5 : Evolution du taux de GFP dans les culots après centrifugation en fonction du temps de lyse par procédé Frewitt (t=1 min jusqu'à t=15 min de gauche à droite)

## CONCLUSION

Développé pour réaliser des opérations de broyage nanométrique de principes actifs en conditions GMP, l'équipement NanoWitt démontre des qualités très intéressantes dans cette application de lyse cellulaire.

Avec des paramètres optimaux, le processus peut être réalisé sans aucune élévation de température ou avec une élévation maîtrisée de 2 à 3 °C au maximum tout en permettant un taux de récupération de protéines totales supérieur pour les bactéries *E.coli* et même largement supérieur dans le cas des levures *S.cerevisiae* par rapport au procédé par homogénéisation à haute pression considéré comme le « gold standard » en la matière.

Concernant l'activité de la fumarase et la concentration de GFP, le procédé par homogénéisation à haute pression garde un léger avantage. Cependant, si les températures de l'ordre de 30 degrés générées par la haute pression devaient se révéler inacceptables pour les molécules à libérer, alors des conditions plus douces devraient être utilisées<sup>[5]</sup> (multiples cycles à basse pression) avec pour conséquence une baisse de rentabilité et probablement de répétabilité.

Le nouveau procédé proposé dans cette étude présente donc une efficacité de lyse intéressante et surpasse les technologies concurrentes en termes de respect de l'intégrité des principes actifs thermosensibles.

Il permet un processus continu, reproductible et la température de la suspension peut être maintenue stable. De plus, le processus peut être suivi et contrôlé par divers capteurs PAT (Process Analytical Technology).

La construction de l'équipement est spécialement étudiée pour une utilisation GMP, les matériaux satisfont les exigences de la FDA et une utilisation en processus aseptique en isolateur avec système de stérilisation en place est disponible.

Les excellents résultats obtenus lors des validations de mise à l'échelle (scale-up) réalisées pour les applications de broyage de principes actifs nanométriques seront certainement confirmés aussi pour cette application de lyse cellulaire.

## REFERENCES

1. C. Rhème, C. Lefebvre, X. Gao, « Investigating a novel Approach to drastically minimize Zirconium Contamination during the Production of Drug Nano-Suspensions by wet stirred Media Milling », Frewitt
2. O.Pines et al, «The cytosolic pathway of L-malic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of fumarase »
3. « Fumarase Activity Colorimetric Assay Kit MAK206 », Sigma-Aldrich
4. T. C. V. Penna, M. Ishii, O. Cholewa, et L. C. D. Souza, « Thermal characteristics of recombinant green fluorescent protein (GFPuv) extracted from *Escherichia coli* », Letters in Applied Microbiology, vol. 38, no2, p. 135-139
5. « Broyage cellulaire homogénéisateur haute pression », Microfluidics Inc.