



Clarification des laits d'animaux
transgéniques
Michel NOGRÉ,
LFB Biotechnologies / rEVO Biologics

adebiotech

Innovation-Proteines-Prod

**Technologies innovantes
en séparation industrielle des protéines**

28, 29 et 30 octobre 2013


L'ENGAGEMENT ÉTHIQUE



Plan de la présentation

- Production de protéines thérapeutiques dans le lait d'animaux transgéniques : Quel rationnel?
 - Economique – Scientifique - Technologique
- Etude de cas : rFVIIa, Quels challenges?
 - Un système producteur « lactorecombinant »
 - Problématiques spécifiques au rFVIIa
 - Criticité pour la production d'une protéine à usage thérapeutique
- La clarification du lait : une étape cruciale dans la préparation d'une matière première à usage pharmaceutique
 - Impact des techniques classiques de traitement du lait
 - La structure du lait et les voies possibles de déstabilisation
 - Obtention d'une matière première maîtrisée
- Conclusions



Rationnel de la lacto-recombinaison





Pourquoi les animaux transgéniques?

- « Les animaux transgéniques peuvent produire des quantités de matière plus importantes et sous une forme plus concentrée que les méthodes de culture existantes, et présentent donc des avantages considérables tant dans le coût de production de la matière première que dans sa transformation en aval »
- « Dans certains cas ... l'utilisation d'animaux transgéniques pourrait être l'une des rares stratégies de production viable »

Reference: Use of transgenic animals in the manufacture of Biological Medicinal Products for Human Use (EMA, Dec 1994)





Économie de la production par lacto-recombinaison (échelle de 100 kg pour un anticorps monoclonal)



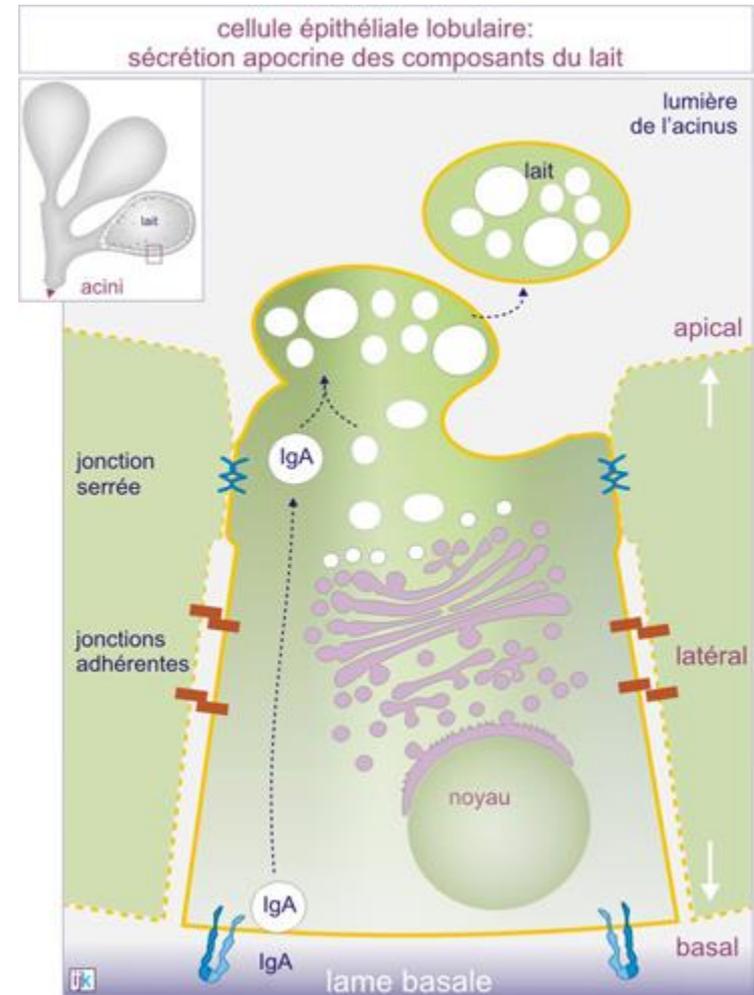
	Cellules CHO	Transgénèse
Jours de production (par an)	200 (20 lots)	300 (2 litres/chèvre/jour)
Capacité de réacteur requise	Cuves de 8,500 litres (plus ensemencement des cultures)	35 chèvres
Coût de production unitaire (g)	\$300 - \$3,000	\$105
Investissements	\$20 - 50 million	\$2 - 5 million





Glande mammaire: un bioréacteur performant

- Glande mammaire : Bioréacteur pour la production des protéines humaines transgéniques:
 - Une concentration élevée de cellules - 100 à 1000 fois plus élevée que la culture cellulaire.
 - La fonction naturelle de sécrétion (10-100 g / L de protéines selon les espèces), pas de régulation pour la protéine d'intérêt.
 - Système inductible
 - Capacités de modification post-traductionnelle (ingénierie cellulaire): glycosylation, gamma carboxylation...
 - Chèvres, brebis, vaches sont adaptées à la production de lait mais aussi lapines ou truies moyennant des aménagements (cycles, locaux d'élevage, matériel, moyen de stockage).



<http://www.cellbiol.net/layout/imagesHER/105%20epithelium%20glande%20mammaire.jpg>





Pourquoi le lait ? Un aliment pour une croissance adaptée à l'environnement

Composition moyenne du lait chez divers mammifères (g/L)						
		Lipides	Protéines		Glucides	Matières minérales
	Eau	Matières grasses	Totales	Caséines	Lactose	
<u>Humain</u> [Lait maternel]						
Femme	905	35	12-14	10-12	65-70	3
<u>Ruminants</u> [Lait d'élevage]						
Vache	900	35-40	30-35	27-30	45-50	8-10
Chèvre	900	40-45	35-40	30-35	40-45	5-8
Brebis	860	70-75	55-60	45-50	45-50	10-12
Renne	675	160-200	100-105	80-85	25-50	15-20
<u>Suidés</u>						
Truie	850	65-65	55-60	25-30	50-55	12-15
<u>Équidés</u>						
Ânesse, jument	925	10-15	20-22	40-44	40-45	6-9
<u>Carnivores et lagomorphes</u>						
Chienne	800	90-100	100-110	45-50	30-50	12-14
Chatte	850	40-50	90-100	30-35	40-50	10-13
Lapine	720	120-130	130-140	90-100	15-20	15-20
<u>Cétacés</u>						
Marsouin	430	450-460	120-130	-	10-15	6-8

- La lapine : Mammifère à haut potentiel de synthèse protéique



Pourquoi le lapin ?

Animal	Lactation (Volume)	Gestation (mois)	Maturité sexuelle (mois)	Descendants (nombre)	Mois entre naissance et lait
	1.5 mL	0.75	1	10	3 – 6
	2 – 5 L	1	6	8	7 – 8
	100 – 200 L	4	8	9	15 – 16
	200 – 400 L	5	6	2	16 – 18
	600 – 800 L	5	6	2	16 – 18
	~ 8 000 L	9	15	1	30 – 33

- Courte période de gestation (1 mois) et maturation sexuelle rapide (4 mois pour la femelle, 5 pour le mâle)
- Production laitière non négligeable
- Faibles coûts d'élevage → coûts de production réduits
- Facilité de mise à l'échelle du troupeau si les demandes augmentent (espèce très prolifique)





Pourquoi le lait de lapine ?

- Aucune souffrance de l'animal pour la collecte de la matière source
- Absence de maladie à prions chez le lapin
- Historique vétérinaire et réglementaire (Thymoglobuline ®, Rhucin ®)
(Animal de laboratoire: souches NZ)
- Expérience réglementaire avec Atryn® - Antithrombine issue de lait de chèvre transgénique :
 - 1^{er} médicament OGM autorisé en Europe (2006 - EMA) et aux US (2009 - FDA)



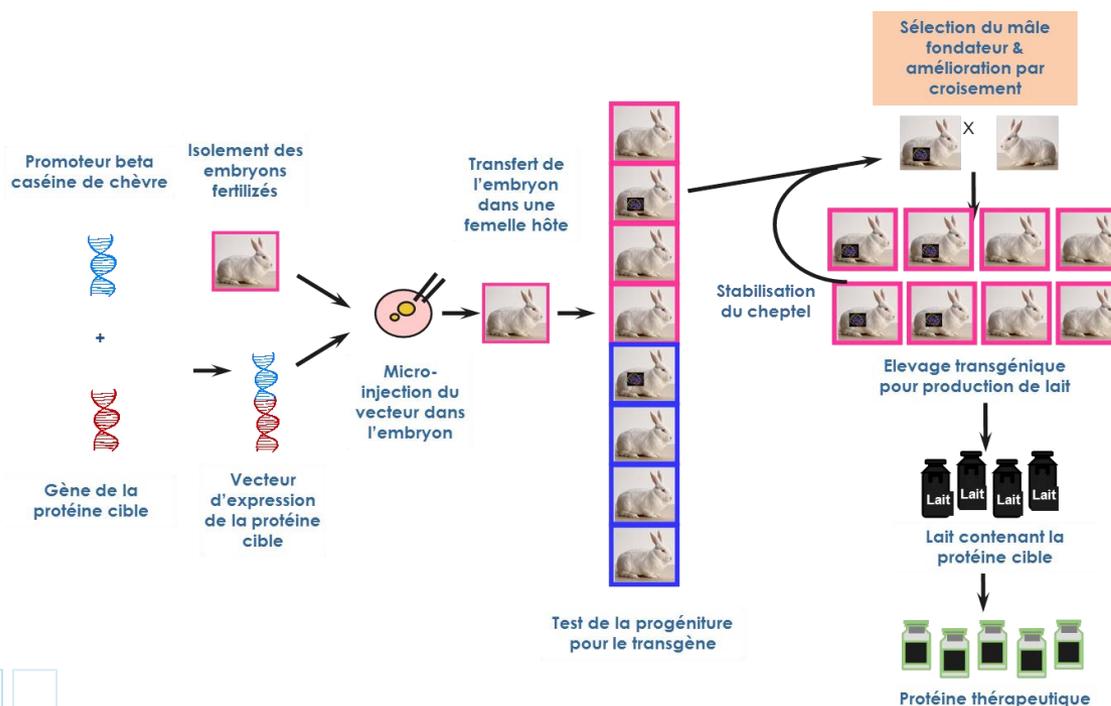
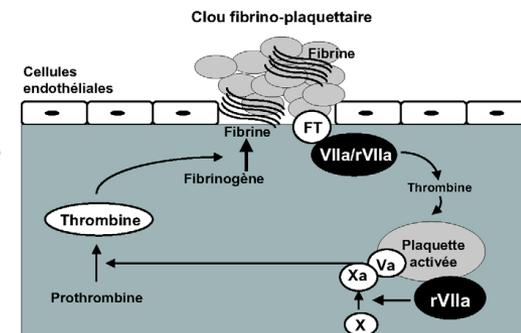
Etude de cas :
Production de Facteur
VII humain dans le lait
de lapines





Développement d'un rFVIIa humain (Protéine à activité anti-hémorragique)

- 2005 – 2007: Développement de lignées d'animaux transgéniques en collaboration avec GTC Biotherapeutics (rEVO Biologics, groupe LFB)
 - La lapine sécrète du FVII humain dans son lait dont l'activité coagulante est 500 à 1000x sa propre production sanguine.
 - Système de production du rFVIIa: **Rapide et adaptable**





■ Contraintes:

- Limites imposées par l'instabilité du Facteur VII :
 - ❖ Thermolabile : Dénaturation ~40-45°C
 - ❖ Sensibilité au pH acide <5
 - ❖ Sensibilité accrue à la protéolyse (Activation / Désactivation)
 - ❖ Interactions diverses au Calcium (Activation, Adsorption)
 - Traçabilité et constitution d'un lot de matière source:
 - ❖ Collectes individualisées ou minipools → Faibles volumes unitaires
 - ❖ Nombreux contrôles avant autorisation de mélange → Quarantaine
 - ❖ Volumes de stockage élevés → Conservation longue durée
- Techniques de l'industrie laitière difficilement applicables**





La clarification : une étape cruciale pour l'obtention d'une matière première pharmaceutique

*Eviter une multiplication bactérienne
(Fermentation, Endotoxines)*

*Eviter la formation de spores submicrons
(Particules résistantes)*

*Stabiliser l'activité biologique cible
(Relation calcium-dépendante)*

*Eliminer les débris cellulaires, les lymphocytes, cellules épithéliales...
(ADN de l'hôte)*

CRITICITÉ
Clarification
du Lait

*Eliminer la phase lipidique pour permettre des étapes de purification
(Chromatographie, TFF, UF, NF)*

*Stabiliser la matière pour le temps de Procédé
(au moins 24 heures)*

*Réduire la turbidité pour permettre des traitements virucides efficaces
(Phase colloïdale protectrice)*

*Inhiber des activités enzymatiques
(Peroxydases, Glycanases, Protéases...)*



Traitement du lait





Technologies classiques applicables au lait

- Stabilisation du lait par des traitements thermiques: Pasteurisation, UHT...
 - ❖ Impact négatif sur l'activité fonctionnelle du rFVIIa → **Maintien de la qualité microbiologique du lait par la congélation.**

- Elimination des matières en suspension/des émulsions: Ecrémeuse/Clarificateur
 - ❖ Inadapté aux faibles volumes → **Application de traitements au Lait brut.**

- Procédés « acide » ou « enzymatique »: Techniques « fromagère »
 - ❖ Impact négatif sur la structure tertiaire du rFVIIa → **Application de traitements non dénaturants la protéine d'intérêt.**

- Traitement membranaire direct du lait brut: Microfiltration tangentielle...
 - ❖ Faible recouvrement (interactions au calcium du lait) → **Application de traitements actifs sur le Calcium du lait**



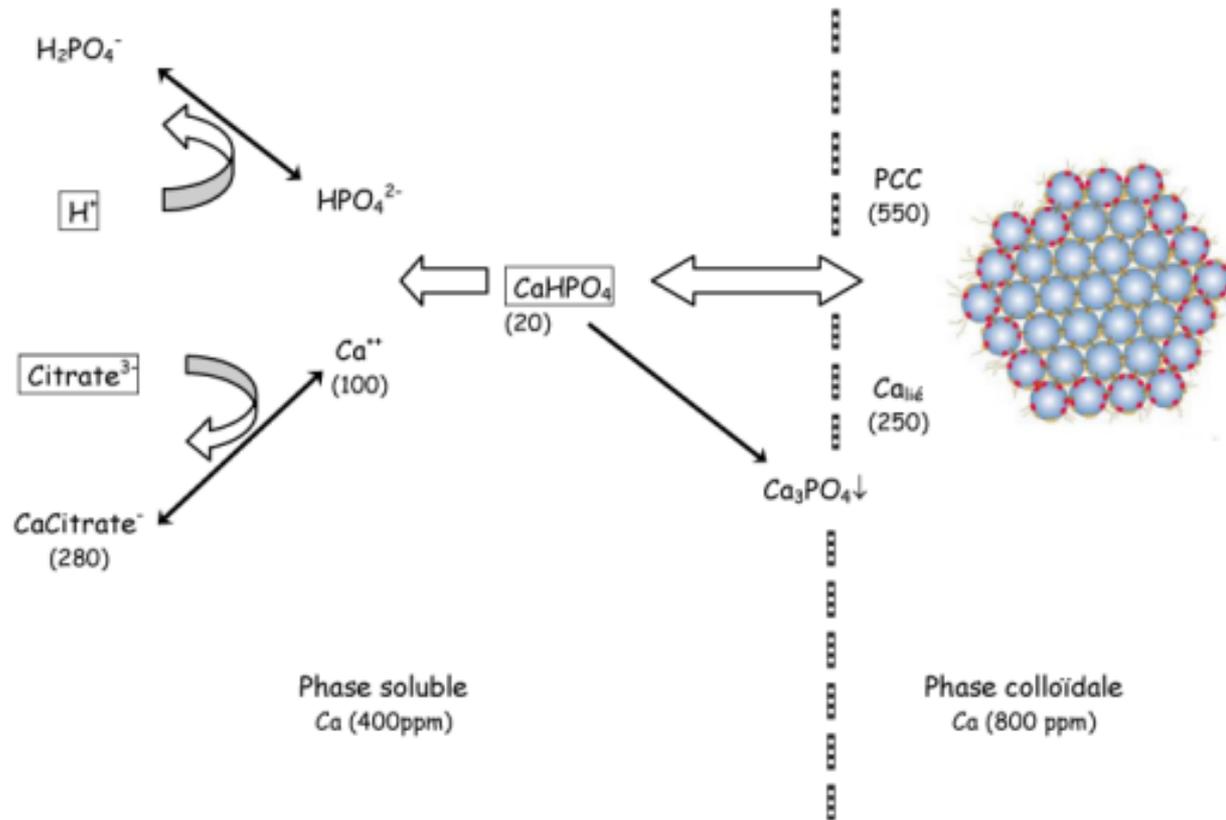


Le lait: Un équilibre Calcium-Phosphate-Citrate

1/3 du Calcium
En solution

2/3 du Calcium
Lié aux micelles

Les principaux équilibres salins du lait





Les micelles de caséines: une structure stable

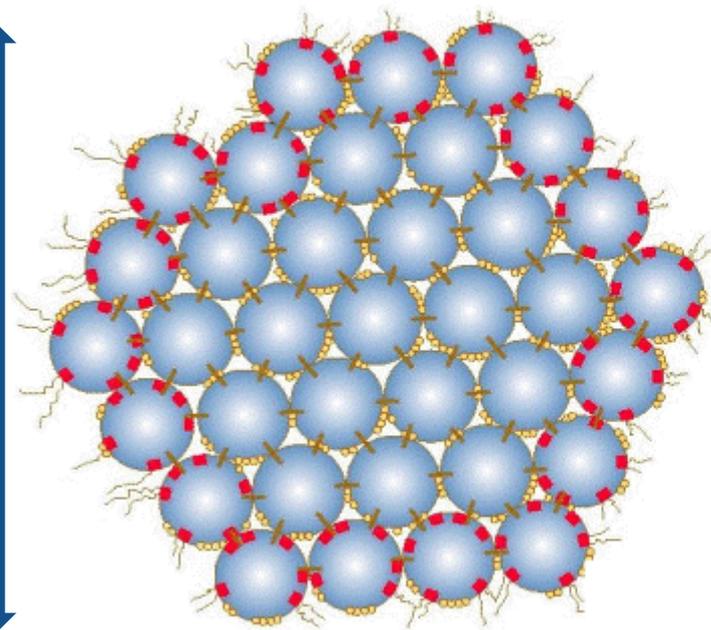
92% de caséines
Sous forme de
micelles:
Cœur hydrophobe
Périphérie hydrophile

8% minéral
Phosphate de calcium
Ca₉(PO₄)₆

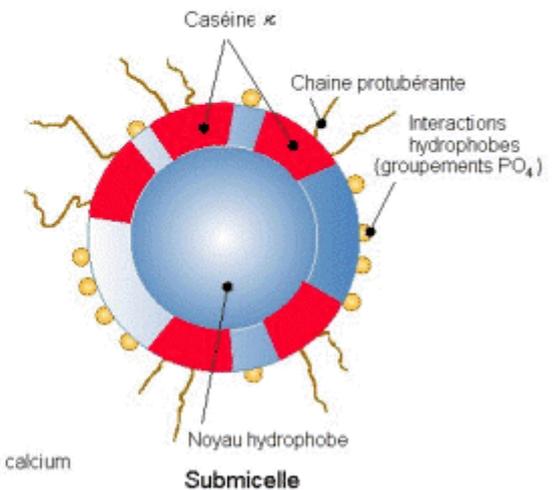
Lactosérum enchâssé
Enzymes...

Ø Moyen 120 nm
De 50 à 600 nm

Structure des micelles de caséine



— Phosphate de calcium



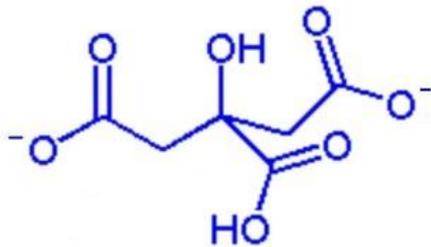
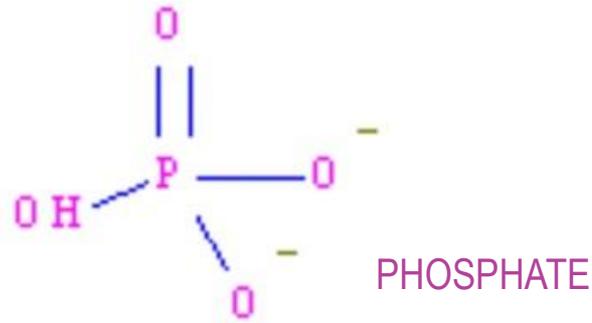
2/3 du Calcium
Lié aux micelles

La formation des micelles est contrôlée par l'équilibre entre les forces d'attraction et de répulsion dans les micelles - Attraction hydrophobe localisée au cœur et répulsions électrostatiques périphériques.



Minéraux: maintien de la stabilité des micelles

1/3 du Calcium
En solution





Clarification par déstabilisation des micelles

- Objectif : rendre le lait filtrable au seuil $0,2\mu\text{m}$ le plus rapidement possible:
 - Matière Première Pharmaceutique: [Qualité définie et stabilité microbiologique](#)
 - Appliquer un procédé de purification: [Pour éliminer les impuretés](#) (chromatographies)
 - Appliquer des étapes de sécurisation: [Pour inactiver efficacement des virus](#)

- 2 traitements de clarification sont déduits de la structure du lait:
 - Traitement aux sels de Phosphates :
 - Ajout d'un excès de [phosphate de sodium](#)
 - Traitement aux sels de Citrate :
 - Ajout d'un excès de [citrate de sodium](#)





Traitement au Phosphate de sodium

■ Transfert du calcium des micelles aux sels de phosphate :

■ **Principe:** Déplacement de l'équilibre phosphocalcique

- Déminéralisation des micelles de caséines
- Alcalinisation (pH7 → pH9)
- Formation de sels insolubles de phosphate de calcium $[\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_2]$
- Précipitation des caséines sensibles au calcium (Floculation)

■ **Résultats:**

- 3 phases à séparer (Lipides, caséines précipitées et lactosérum)
- Perte par piégeage dans la masse de précipité
- Perte par adsorption au phosphate de calcium formé

■ **Conclusions:**

- Orientation vers les techniques de centrifugation / Filtre-Pressé
- Difficulté d'extraction
- Faible potentiel pour l'industrie pharmaceutique





Traitement au Citrate de sodium

■ Transfert du calcium des micelles aux sels de citrate :

■ Principe: Déplacement du calcium vers le soluté

- Formation de sels solubles
- Neutralisation (pH 6 → pH 7,5)
- Dispersion des micelles par décalcification

■ Résultats

- 2 phases à séparer (Lipides et du lactosérum riche en caséines)
- Pas de précipitation minérale ou protéique (lait turbide)
- Stabilisation de l'activité biologique du FVII (anticoagulant)

■ Conclusion:

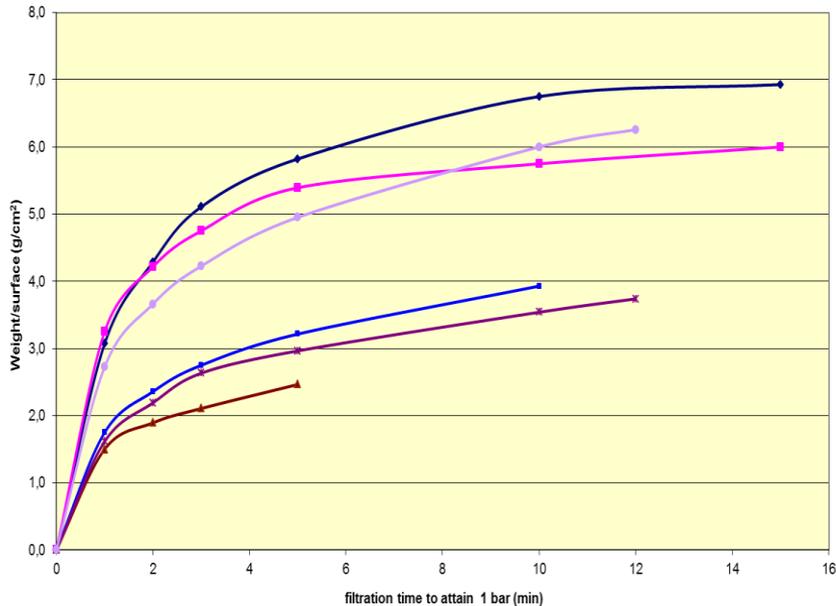
- Orientation vers les technologies de filtration
- Facilité de mise en œuvre
- Adéquation aux faibles volumes (qq mL) et aux larges volumes (150 à 300L de lait).
- Bon potentiel pour l'industrie pharmaceutique





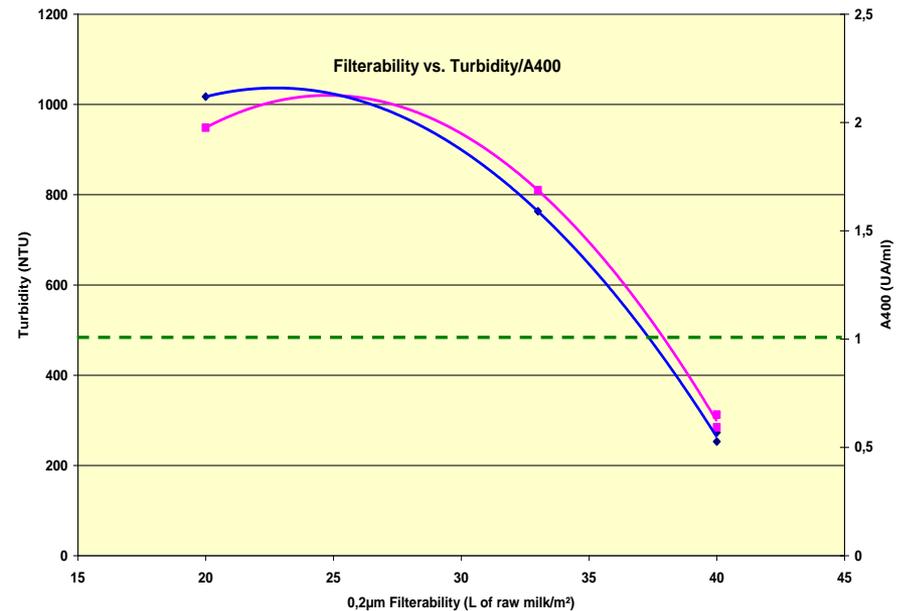
Criticité de l'étape de clarification par filtrations (DFF + 0,2 μ m)

0.2 Filterability screening for Phase I process (micro-scale assay)



■ Phase-1: Screening de filtres

- Nature / Filtrabilité
- Efficacité de clarification
- Sélection de séquences



■ Phase-2: Optimisation / Changement d'échelle

- Conditions expérimentales optimales
- Paramètres critiques:
 - ✓ Température du traitement
 - ✓ ratio Citrate/Calcium
 - ✓ Turbidité après préfiltration





Clarification : Intégration des contraintes du développement pharmaceutique



Taille Labo

Etude des lignées
Etude des lactations
Etude de génération
Etude de Stabilité
...

Pilote

Développement Procédé
Robustesse
Etudes réglementaires
Etudes précliniques
Développement galénique
...

Industrielle

Intégration des technologies Single-use
Développement pharmaceutique
Développement clinique et réglementaire
Développement industriel et commercial
...





CONCLUSIONS

- La clarification de lait d'animaux exprimant une protéine thérapeutique est une étape importante du développement biopharmaceutique. Cette étape amont permet une qualification de la matière première pharmaceutique pour le procédé de fabrication du futur médicament.
- L'adéquation des technologies de clarification doit être évaluée au regard de leur compatibilité avec les caractères fonctionnels et structuraux de la protéine d'intérêt. L'impact sur le profil produit recherché (TPP) doit être pris en compte dès la conception du procédé.
- Le choix technologique prend en compte les contraintes et les avantages apportées par la lactorecombinaison. A chaque protéine, sa méthode de clarification: celle-ci peut varier selon l'hôte, le taux de sécrétion de la protéine cible, les volumes de lactation ou les moyens de conservation. Le choix intègre également les évolutions des procédés avec les aspects de biosécurité (matériel à usage unique).





Merci