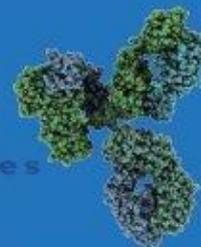




Innovation-Proteines-Prod



**Technologies innovantes
en séparation industrielle des protéines**



28, 29 et 30 octobre 2013

COMPTE-RENDU

Colloque Adebiotech

Innovation-Proteines-Prod

Technologies innovantes en séparation industrielle des protéines

28, 29 et 30 octobre 2013

Parc Biocitech

93230 Romainville

Avec le soutien de



COMITÉ D'ORGANISATION

Danielle LANDO, ADEBIOTECH

Rémi URBAIN, LFB BIOTECHNOLOGIES

David-Alexandre BADAROU, PHARMA BIOT'EXPERT

Yasmine ZOUICHA, Pall Life Sciences

*
* *
*

COMITÉ SCIENTIFIQUE

Sylvio BENGIO, Pall Life Sciences

Denis CHEREAU, TEREOS SYRAL

Pascal DHULSTER, PROBIOGEM LILLE

Vincent MONCHOIS, NOVASEP

Xavier SANTARELLI, ENSTBB-IPB / SBCN

Technologies innovantes en séparation industrielle des protéines

Compte rendu du Colloque

INNOVATION-PROTEINES-PROD

Par

Vignesh JANAKIRAMAN

(Doctorant, ENSTBB/IPB, EA 4135, Université de Bordeaux, France & VIT University, Inde)

Xavier SANTARELLI

(SBCN & ENSTBB/IPB, EA 4135, Université de Bordeaux, France)

et

Yasmine ZOUICHA

(Pall Life Sciences)

28, 29 et 30 octobre 2013 | Parc Biocitech 93230 Romainville

CONTEXTE ET REMARQUES GENERALES

Le colloque « Innovations-Protéines-Prod » a été organisé par l'association Adebiotech au Parc Biocitech à Romainville du 28 au 30 octobre 2013, en accord avec la mission de celle-ci qui est de rassembler les acteurs académiques et industriels pour les fédérer et favoriser le développement des biotechnologies en France.

Ce colloque a rencontré un grand succès, avec près de 200 participants membres de l'industrie et de la recherche publique. Plus particulièrement les représentants de l'industrie des biotechnologies en France ont représenté près de 80% des participants, répartis uniformément en grandes et petites entreprises. Des personnes éminentes dans le domaine des sciences séparatives, ont donné des conférences axées sur les domaines et de l'agro-alimentaire et de la biopharmacie.

Un grand nombre d'entreprises ont apporté leur soutien à l'organisation de ce colloque : eKope, LFB Biotechnologies, Novasep, Pall Life Sciences et Tereos Syral, ainsi que les entreprises 3M, Bio-Rad, eKope, Pall Life Sciences, Sartorius Stedim Biotech et Wyatt Technology France qui, grâce à leurs stands pour faciliter les échanges, ont pu nouer des relations fructueuses avec les participants.

Au cours des trois jours, la conférence a couvert l'ensemble des étapes d'une purification de protéines : extraction et clarification, purification, polishing (polissage) et sécurisation. Le compte rendu de la réunion porte sur les principaux points des présentations et des discussions émanant de chacune des sessions.

POINTS CLÉS ET PERSPECTIVES

Ce colloque a permis une rencontre inédite de deux univers différents sur des problématiques de sciences séparatives avec des industriels producteurs et fournisseurs de matériels ainsi que des experts académiques.

L'agro-industrie et la biopharmaceutique se sont ainsi rencontrées et ont pu constater qu'une fertilisation croisée pouvait avoir lieu.

Les nouvelles méthodes d'extraction et de clarification, la purification, le "Quality by Design" (QbD) et "PAT", ainsi que les procédés à usage unique ont été débattus avec, en point de mire, les aspects environnementaux qui sont bien intégrés dans les différentes démarches.

Les échelles de travail, et les exigences de qualité et les enjeux économiques différents n'ont pas empêché un débat fructueux.

En effet, il y a un grand contraste entre les produits à faible valeur ajoutée mais de grand tonnage produits par l'industrie agro-alimentaire et les produits à haute valeur ajoutée et à plus faible volume produits par la biopharmacie.

Les nouvelles technologies dans les deux univers, biopharmaceutique et agro-industrie, se montrent d'un intérêt certain pour chacun.

Quelque soit le secteur d'activité, une recherche partenariale sur les bioprocédés entre monde académique et industriel doit être favorisée pour permettre l'innovation notamment en procédés propres.

INTRODUCTION

Le colloque a débuté par les allocutions de bienvenue et la présentation du colloque de **Rémi URBAIN** (Président d'Adebiotech et Directeur des Partenariats scientifiques de LFB Biotechnologies). Ensuite, **Pierre LEPAGE** a présenté les enjeux techniques et économiques du "downstream processing" (procédés en aval) qui sont liés à la performance des systèmes utilisés en « upstream » (procédés en amont), et l'importance d'avoir des systèmes souples et efficaces qui permettent de réduire le coût et la durée des procédés tout en augmentant l'efficacité et en maintenant la qualité. Il a souligné également l'importance de s'orienter vers une industrie « verte », pour sauvegarder l'environnement.

L'état des lieux en Europe a été abordé en deux parties : les produits biotechnologiques pour la santé et les protéines d'origine animale et végétale destinés à l'alimentation.

Rémi URBAIN a présenté un état des lieux de l'industrie des nouveaux produits de santé humaine issues des biotechnologies. Il a également précisé la nouvelle approche du LFB avec sa plateforme « Cell for Cure », une installation de 2000m² dédiée au développement des procédés et à la production de lots GMP phase III de thérapie cellulaire.

Laurice POUVREAU de la société NIZO a mis en perspective les difficultés liées à l'extraction et la purification des protéines d'origine végétale et animale. Elle a insisté sur l'intérêt que représentent les produits issus de sources végétales avec notamment la potentialité de RuPI (Rubisco Protein Isolate) comme substitut à la viande.

Le dernier intervenant de la session, **David-Alexandre BADAROU** (Pharma Biot'Expert) a présenté les résultats de l'enquête sur les capacités de production en France qui a précédé ce colloque. Cette enquête, a montré entre-autres l'importance du potentiel d'innovation en France.

La session a clairement posé les enjeux et perspectives des protéines dans les secteurs pharmaceutiques, et agro-alimentaires. Les discussions qui ont suivi ont introduit les sessions suivantes.

SESSION 1 – EXTRACTION ET CLARIFICATION

La session sur l'extraction et la clarification a débuté par les exposés des représentants des différents fournisseurs sur leurs dernières technologies :

- **Pierre-Emmanuel POIZAT** (3M) a présenté un nouveau média multizone " Emphase AEX Hybrid Purifier " dont l'application dans la clarification avant une étape de capture avec Protéine-A.
- Le " S3 cell sorter " de Bio-Rad été présenté par **Laurence TALBOT**, soulignant la technologie « ProDrop » qui assure la correction du « drop delay » avec une meilleure précision.
- **Abdel KHADIR** (eKope Services) a présenté la nouvelle « Zenpure » capsule qui garantit zéro " hold-up volume " (volume mort) sans risque de dilution.
- **Vincent MONCHOIS** (Novasep) a présenté la membrane TFF (Tangential Flow Filtration) à usage unique « Sius » et ses « Skids », qui fournit des solutions TFF pour les procédés à usage unique, y compris les sondes et les tuyaux.
- Les progrès de la technologie des membranes céramiques de la gamme EXEKIA par rapport à leur efficacité dans la clarification de protéines dans le domaine de l'agro-industrie ont été démontrés par **Francis EDOUARD** (Pall Life Sciences) qui a rappelé que la société qu'il représente est pionnière dans la fabrication de membranes céramiques de haute pureté.
- **Philippe LANCIAL** (Sartorius Stedim Biotech) a présenté les membranes "Sartopore Platinum" et sa technologie de « TwinPleat », augmentant la performance et facilitant ainsi un meilleur contrôle sur le coût des procédés.
- **Nicolas MIGNARD** (Wyatt Technology) a présenté l'utilisation innovante des membranes dans la " Field Flow Fractionation " asymétrique (AF4) pour une séparation douce, rapide et non-destructive des protéines grâce à l'absence de phase stationnaire qui peut interagir, dégrader ou altérer les protéines.

Une tendance intéressante dépeinte dans la plupart des présentations est l'utilisation croissante de la technologie à usage unique pour la purification des protéines dans le domaine biopharmaceutique. Cela a été abordé dans la dernière partie de ce colloque.

A suite de ces présentations de technologies par des fournisseurs, différents intervenants se sont succédés pour aborder différents sujets sur l'extraction et la clarification au travers d'applications soit pour l'industrie agro-alimentaire, soit pour la biopharmacie. Tout d'abord **Pierre SCHELLING** (Merck Millipore) a présenté de nouvelles approches dans le prétraitement et la clarification des cultures cellulaires à haute densité pour la production de protéines recombinantes. Une combinaison d'agents de floculation poly-cationiques comme le pDADMAC à ajouter directement dans les bioréacteurs, suivie d'une seule étape de clarification en utilisant un filtre en profondeur, ont montré l'amélioration des capacités de la filtration, tout en éliminant la

nécessité d'une deuxième étape de filtration. Ceci pourrait aider à réduire les coûts des procédés.

La présentation suivante traitant de la clarification des laits d'animaux transgéniques a été faite par **Michel NOGRÉ** (LFB Technologies/rEVO Biologics). Dans sa présentation, Michel Nogré a parlé de la production de protéines thérapeutiques recombinantes dans le lait d'animaux transgéniques, notamment du lapin pour la production du facteur VII à titre d'exemple. Il a été mis en évidence que le lapin est le candidat idéal en vue du rapport coût-efficacité, de la courte période de gestation, de l'absence de prions et de la facilité de manipulation des animaux. Il a conclu son discours en soulignant les aspects qui jouent un rôle dans le choix des procédés de clarification pour la récupération des protéines recombinantes à partir du lait : l'animal hôte, le taux de sécrétion de la protéine cible, le volume de lactation et le stockage. L'incorporation de la technologie à usage unique afin d'améliorer les aspects de biosécurité a été encore mise en avant.

Jean-Luc SIMON (Ingredia) a souligné les problèmes rencontrés par l'industrie laitière et notamment la pertinence des technologies utilisées pour la récupération des protéines fonctionnelles de haute valeur nutritionnelle. Il a détaillé les problèmes principaux dont le plus important étant les difficultés liées au stockage et la manipulation de gros volumes de lait en continu (environ 450 millions de litres par an) au début du processus d'extraction, la génération de coproduits du "cracking". La possibilité de modifications des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des protéines cibles entraîne des difficultés supplémentaires qui doivent être abordées.

Geneviève GÉSAN-GUIZIOU (INRA-Agrocampus Ouest, Rennes) a présenté les défis technologiques associés avec le fractionnement par membrane des protéines du lait. Tout en reconnaissant la pertinence de la technologie membranaire dans le fractionnement des protéines du lait, Geneviève Gésan-Guiziou a mis en évidence les limites et les difficultés dans leur mise en œuvre à l'échelle industrielle : la difficulté dans l'exercice de « nettoyage en place » pour les membranes, l'absence de méthodes de prédiction de la nature des interactions de la membrane avec des fractions du lait et la présence minimale d'une éco-conception.

Les nouvelles stratégies pour la purification des protéines végétales de fractions de feuilles ont été présentées par **Pascal DHULSTER** (Laboratoire ProBioGEM, Université Lille 1). Dans son exposé, Pascal Dhulster a présenté à une brève description des procédés industriels pour la purification des protéines blanches de la légumineuse de la luzerne : notamment la RuBisCO, qui est la protéine la plus abondante dans la fraction protéique blanche. Dans sa présentation, il a souligné l'intégration réussie de l'ultrafiltration/diafiltration pour réduire une grande partie des polyphénols et des sucres tout en augmentant la concentration de protéines d'un facteur trois. L'utilisation d'un certain nombre de supports chromatographiques (exclusion de taille, échangeurs d'anions, échangeurs de cations) pour la récupération de la RuBisCO a également été présentée.

Romain KAPEL (LRGP Nancy) a fait la dernière présentation de la session sur l'optimisation multicritère d'extraction solide/liquide de la fraction albumine à partir du tourteau de colza. L'approche décrite par Romain Kapel implique une étude des facteurs les plus influents (pH, forces ioniques, le ratio solide/liquide, température, etc.) qui entraînent la génération d'un modèle basé sur des facteurs influents sollicités par l'optimisation multicritère. L'analyse simultanée de paramètres qualitatifs (structure) et de paramètres quantitatifs (pureté, concentration) sont essentiels pour appréhender le procédé en temps réel.

Les présentations faites lors de cette session ont porté sur les principales difficultés et les défis associés à la mise en œuvre à grande échelle de ces technologies et les progrès réalisés qui conduisent à un grand potentiel d'industrialisation.

SESSION 2 – PURIFICATION

Lors de la deuxième session de nouvelles technologies et des exemples d'applications ont été présentées.

SESSION 2A : TECHNOLOGIES CHROMATOGRAPHIQUES INNOVANTES

La session a débuté par une présentation par **Sylvio BENGIO** (Pall Life Sciences) sur le service de criblage à haut débit de supports chromatographiques pour la purification des protéines : « ScreenExpert ». La technique implique l'utilisation de microplaques 96 puits, permettant une étude simultanée multicritères de 80 conditions par jour en moyenne. Un exemple de mise au point de purification de fragments d'anticorps (FAb) en trois étapes sans l'utilisation de ligands d'affinité a été développé montrant ainsi qu'en 12 jours, il était possible de mettre au point des étapes de chromatographie.

Ensuite, **Fabien ROUSSET** (Novasep) a présenté la technologie de « BioSC SMCC » : chromatographie multi-colonnes séquentielle. Cette technologie en continue a démontré un grand potentiel pour réduire significativement les coûts des dépenses de résine et tampon, tout en augmentant la productivité du procédé de purification par rapport à la chromatographie conventionnelle en mode « batch ».

Mark A SNYDER (Bio-Rad) a présenté une nouvelle résine en mode mixte, « Nuvia cPrime », qui a les avantages d'être une résine efficace pour la récupération de certaines protéines qui ne peuvent être purifiées par des méthodes traditionnelles de capture par affinité. Tout en soulignant la robustesse de la résine, Mark A. Snyder a également insisté sur l'importance de l'optimisation de la méthode chromatographique pour correspondre à la protéine cible.

Olivier KITTEN a présenté les "Nanofitines" d'Affilogic, une nouvelle génération de petites protéines d'affinité hyper stables (~ 66 acides aminés) et utilisables dans de nombreux champs d'application, dont la capture de macromolécules. Olivier Kitten a souligné les trois grandes fonctions de Nanofitines : des liaisons personnalisées à des antigènes, une grande stabilité et une facilité de couplage sur des supports chromatographiques (et la possibilité de couplage à partir des deux extrémités de la protéine). Les Nanofitines sont également faciles à surexprimer dans *E. coli* (les niveaux d'expression de plus de 10g par litre ont été obtenus sans optimisation des processus), ce qui les rend très concurrentiels par rapport aux anticorps dans les procédés industriels.

Le dernier exposé de la session sur les aptamères d'ADN a été présenté par **Gérald PERRET** (LFB Biotechnologies) et **Mohamed OUHAMMOUCH** (INSERM) qui ont mis en évidence leur potentiel pour la capture par affinité de molécules cibles. La présentation a abordé les principaux avantages des aptamères par rapport à des anticorps conventionnels en termes de stabilité, de coût de production et de rendements élevés. Gérald Perret a également introduit la technologie « Aptapure » du LFB dans laquelle plusieurs aptamères d'ADN ont été générés contre diverses protéines humaines.

Les discussions qui ont suivi cette session ont souligné l'importance des méthodes rapides de criblage à haut débit, pour la sélection du meilleur procédé de récupération de biomolécules. Il a été clairement mis en avant que les progrès réalisés dans le secteur en aval de la production de biomolécules se traduisent directement sur les principales économies des procédés. Les potentiels de nouvelles approches de purification en termes de procédés comme la chromatographie multi-colonnes séquentielle inspirée des technologies utilisées en agro-alimentaire mais appliquée aux biomolécules thérapeutiques et de nouveaux supports de purification (résines en mode mixte, Nanofitines, aptamères), démontrent de grandes promesses pour une industrialisation.

SESSION 2B : APPLICATIONS

La session a débuté par une présentation de **Véronique SOLÉ** (INRA, Nantes) sur le fractionnement des protéines végétales en soulignant leurs spécificités, principes et limites. Véronique Solé a développé les applications de plusieurs techniques en extraction et purification de protéines de graines : les méthodes d'extraction (en tenant compte de la composition de la matière et de la solubilité de la molécule cible), les techniques chromatographiques (avec des exemples de méthodes d'échange d'ions qui ont été utilisées avec succès dans la purification des gliadines) et les méthodes de stockage (lyophilisation).

Florence LUTIN (Eurodia Industrie) a souligné les applications de l'échange d'ions et des technologies membranaires dans la purification des protéines végétales et du lait. Prenant le fractionnement du lait à titre d'exemple, Florence Lutin a développé plusieurs technologies utilisées dans l'industrie laitière : les systèmes de filtration membranaire, la déminéralisation par électrodialyse, la purification par chromatographie échangeuse d'ions, etc. Elle a également expliqué les progrès réalisés dans la production de protéines de lactosérum concentrées et le potentiel de ces technologies dans l'application pour des ressources végétales.

Ensuite, **Camille VIOT** (CVG) a présenté de nouvelles applications de la technique d'électrodialyse bipolaire par rapport à la méthode conventionnelle. Par l'introduction de membranes ED bipolaires dans l'extraction des protéines du tourteau de soja, Camille Viot a présenté la simplification des procédés, tout en réalisant simultanément la déminéralisation et la teneur en protéines de conservation et de qualité.

Sandrine MILÉSI (Purifunction) a fait une présentation sur le prétraitement des échantillons par « eau subcritique » pour améliorer la récupération des protéines végétales et des petites molécules. Sa présentation a démontré une amélioration de la teneur en protéines du tourteau de riz lors du prétraitement par « eau subcritique » à 180°C. L'extraction par « eau subcritique » montré un grand potentiel en augmentant les rendements de molécules extractibles à partir de sources végétales, la solubilité des protéines et la déstructuration des liens protéines/polyphénols.

La dernière présentation de la session a été donnée par **Denis CHÉREAU** (plateforme IMPROVE, qui est la première plateforme européenne dédiée à l'extraction, la transformation et la valorisation de protéines végétales, en lien avec plusieurs grands partenaires académiques INRA, UPJV, UTC Compiègne, etc.). L'un des objectifs principaux de la plateforme est de réduire la forte dépendance de l'Europe pour l'importation de protéines végétales. Denis Chéreau a également donné des précisions sur les six thèmes principaux de la plateforme IMPROVE.

Cette session a démontré la demande croissante de méthodes de purification dans plusieurs domaines de recherche, notamment dans la récupération des protéines laitières

et végétales. La nécessité du développement de protéines et l'importance d'un renforcement de la collaboration entre le milieu universitaire et l'industrie à travers des plateformes comme IMPROVE à base de plantes a également été soulignée.

SESSION 2C : INDUSTRIALISATION DES PROCÉDES DE PURIFICATION

La première présentation de la session faite par **Paul DE PAUW** et **Johan GEEROMS** (Tereos Syral, un acteur majeur européen dans le traitement des céréales) a souligné la variabilité des matières premières pour la production de protéines industrielles.

Un certain nombre de procédés de purification industriels ont été expliqués pour l'extraction des protéines à partir de diverses sources comme la pomme de terre, le maïs, le blé, etc. Puis ont été décrites, pour l'industrie agroalimentaire, les applications polyvalentes de protéines d'origine végétale solubles. La présentation a finalement abordé le « Meriplast », un bioplastique à base de protéines, qui est complètement biodégradable.

La session s'est poursuivie avec une présentation d'**Aline LECOCQ** (Roquette Frères) sur l'extraction de la bêta-amylase à partir d'amidon végétal. Aline Lecocq a présenté un processus simplifié pour la récupération efficace de la bêta-amylase à partir d'amidon de blé, qui est une source naturelle de l'enzyme.

Frédéric SCHAB (Novasep) a fait une présentation sur les nouvelles solutions de purification de protéines chez Novasep, en prenant des procédés de purification, de l'échelle du laboratoire à la mise en œuvre industrielle. La présentation de Frédéric Schab a couvert un certain nombre de procédés industriels établis dans le domaine de la purification des protéines du lait (lactoferrine), la purification de protéines végétales et la récupération des acides aminés provenant de la fermentation (lysine). Son exposé a également présenté l'application réussie de la chromatographie continue d'échange d'ions dans la récupération de la lysine et la mise à l'échelle industrielle résultant dans une moindre dilution et une meilleure récupération.

La session suivante concernait les stratégies de purification des anticorps monoclonaux par **Nicolas MOUZ** (PX'Therapeutics). Après l'élaboration du procédé de purification existant pour la purification d'anticorps thérapeutiques, Nicolas Mouz a rappelé la nécessité de l'augmentation de la "capacité de développement" de la production des protéines thérapeutiques dans les plateformes "upstream" et "downstream".

Hervé GINISTY (GTP Technology) a terminé la session par une présentation sur la production et la purification des IgM recombinants produite sur la plateforme « CHO Xpress ». La présentation a mis l'accent sur plusieurs difficultés industrielles dans le procédé de production, en raison de la grande taille de la molécule d'IgM. En comparaison avec l'hydroxyapatite (le support classique), différents supports alternatifs ont été évalués (une résine d'affinité, deux supports de membrane d'échange d'ions et deux supports monolithes d'échange d'ions) pour la capture des IgM et l'élimination des "HCPs" (Protéines hôtes de la cellule). Les deux membranes et les supports monolithes se sont montrés compatibles avec la capture de l'IgM recombinant.

Dans le cadre du développement des procédés industriels, cette session a mis en lumière de nouvelles matières premières polyvalentes qui présentent un potentiel pour la récupération efficace de protéines. La nécessité de la mise en œuvre de technologies innovantes a été discutée en détails lors de la table ronde qui a suivi.

TABLE RONDE : INDUSTRIALISATION DES PROCÉDÉS DE PURIFICATION

Animateurs : **Patrick SANTAMBIEN** (Directeur de l'Innovation Technologique, LFB Biotechnologies), **François LAWNY** (Senior Consultant, VP Biotechnology, Triskel Integrated Services) avec la participation des intervenants de la session 2C.

La table ronde a commencé par une discussion sur les défis majeurs dans les procédés "downstream" : les aspects économiques de mise à l'échelle, la productivité des procédés par rapport au nombre d'opérations unitaires, l'utilisation des technologies à usage unique en chromatographie et en filtration, et la rationalisation des procédés.

Un contraste a été établi entre les produits à faible valeur ajoutée mais à grand volume de l'industrie agro-alimentaire et les produits de haute valeur ajoutée à faible volume de l'industrie biopharmaceutique, et les différences dans les systèmes de purification selon la nature du produit ont été mises en évidence comme les débits appliqués et les niveaux de puretés requis.

Les innovations dans le domaine de la purification des anticorps monoclonaux ont été abordées, ainsi que la question de savoir si des procédés plus simples venant de l'agro-industrie pouvaient être utilisés pour la purification de produits à haute valeur ajoutée. En réponse, Jean GUILLERM (Novasep) a fait une référence au procédé de chromatographie continue pour la récupération des protéines, procédé qui promet des dépenses d'exploitation plus faibles (réduction de la consommation de tampons et de résines, réduction du temps de procédé) tout en conservant la même ou une meilleure récupération par rapport aux procédés classiques.

Ensuite, les difficultés de production des immunoglobulines dans des plantes transgéniques ont été attribuées à des différences dans les schémas de glycosylation, qui finissent par provoquer une réponse immunitaire lorsqu'elles sont utilisées chez l'humain.

Un point supplémentaire mis en évidence était la difficulté dans les procédés de la mise en œuvre industrielle même si les procédés sont scientifiquement valables, avec la difficulté de production de fibrinogène recombinant dans le maïs par exemple.

SESSION 2D : POLISHING ET SÉCURISATION

La dernière session de purification a été axée sur le "polishing" ou polissage des biomolécules, avec notamment l'élimination des particules virales. Cela a débuté par une présentation par **Nicolas DUMEY** (Texcell) sur la sécurité virale des médicaments d'origine biologique. La présentation a souligné que bien que les étapes d'inactivation virale soit considérées comme plus robustes que celles d'élimination, la nanofiltration apparaît comme une option satisfaisante en terme de réduction de charge virale. Mr Dumey a également rappelé la nécessité de mettre en place des procédés de clairance virale en adéquation avec l'analyse de risque réalisée sur le produit d'intérêt. Le niveau de LRV est à déterminer en fonction de différents paramètres, dont la charge virale estimée dans l'équivalent d'une dose patient et la marge de sécurité à prendre.

La présentation suivante donnée par **Oliver TRIEBSCHE** (Pall Life Sciences) a exploré l'optimisation des procédés en utilisant la chromatographie sur membrane et les technologies de filtration pour la rétention virale. La conférence a abordé dans un premier temps l'intégration de la chromatographie sur membrane comme colonne de garde en amont d'une colonne de capture prenant en exemple la purification de l'IL-7. Ce procédé, en plus d'améliorer les performances et la durée de vie de la colonne de capture, a également présenté une augmentation substantielle de la rétention virale sur

l'ensemble du procédé. Et dans un deuxième temps, de nouveaux filtres montrant des performances élevées en rétention virale ont été présentés.

Amélie RAVENEAU (Sartorius Stedim Biotech) a terminé la session par une présentation sur l'élimination des contaminants par chromatographie sur membrane. Elle a démontré la prédominance accrue de la technologie membranaire dans les procédés industriels, et sa capacité à éliminer l'ADN, les " HCPs " et les virus. L'exposé a également porté sur les dernières innovations en matière de technologie membranaire : par l'optimisation du volume vide des membranes et la nouvelle membrane de Sartorius « Sartobind STIC », qui est tolérante aux sels.

Cette session a porté sur le "polishing" des biomolécules, et mis en lumière des technologies novatrices qui ont amélioré l'efficacité de retraitement de virus/"HCPs" dans la préparation des produits, en particulier pour des applications thérapeutiques et l'importance de leur conformité avec les organismes de réglementation.

SESSION 3 – QUALITY BY DESIGN ET PAT

La présentation introductive de la session par **Christian VALENTIN** (Sanofi Pasteur) concernait le concept du "Quality by Design" (QbD). Dans ce cadre il a également abordé le contrôle en continu des procédés au moyen de l'approche "Process Analytical Technology" (PAT) pour maîtriser et adapter en permanence le procédé et ainsi garantir la qualité de la production finale. L'application "QbD" dans la production de biomolécules a été expliquée avec deux études de cas : un anticorps monoclonal et un vaccin. Christian Valentin résume le "QbD" comme une méthode par laquelle les procédés sont contrôlés en temps réel en utilisant des outils "PAT", laissant place aux plans d'expériences (Design of Experiments "DoE") dans des espaces de conception définis (Design space) pour piloter et ajuster le procédé en temps réel afin de renforcer la maîtrise de la qualité du produit et la conformité du procédé aux bonnes pratiques de fabrication.

Margit HOLZER (Ulysse Consulting) a souligné les impacts et les avantages des "PAT" dans les procédés industriels en " DSP ". Les applications des "PAT" dans trois méthodes de mise en œuvre différentes ont été discutées avec des études de cas : un système " in-line " pour le suivi de dilution dans l'alimentation, un système " at-line " pour le suivi en parallèle de purification de lipides dans une chromatographie en procédé "batch" et un système " on-line " dans les méthodes de chromatographie multi-colonnes séquentielles permettant d'ajuster la composition de l'éluant à travers un procédé de rétroaction.

La mise en œuvre de "QbD" nécessite des outils qui permettent une caractérisation de biomolécules à haut débit. La présentation de **David LASCOUX** (Waters) explique comment le système UPLC avec une diminution de l' HETP conduit à une plus grande résolution avec un gain de temps permettant une analyse en continue des procédés. La présentation d'**Arnaud VONARBURG** (FortéBIO, Pall Life Sciences) concernait l'application la " BioLayer Interferometry des systèmes FortéBIO dans des procédés " downstream ". En effet les instruments « BLitz » et « Octet, » permettent l'étude des interactions intermoléculaires à haut débit des protéines et ce, sans nécessité de marquage, une alternative aux méthodes ELISA.

En conclusion, cette session a souligné la nécessité d'intégrer la qualité par la conception des procédés de purification et a mis en évidence plusieurs outils disponibles pour permettre l'incorporation de "QbD".

SESSION 4 – PROCÉDÉS À USAGE UNIQUE

La dernière session du colloque a mis l'accent sur la pertinence des procédés à usage unique dans le procédés "downstream" avec une introduction présentée par **Sarah HANNANE** et **David-Alexandre BADAROU** (Pharma Biot'Expert) concernant les avantages et les limites de la technologie à usage unique dans la purification et un commentaire sur l'écart entre les procédés de production et de purification.

Jean GUILLERM (Biopharma Process Expert, Novasep) a ensuite présenté un procédé d'ultrafiltration à usage unique comme une solution pour réduire les coûts de développement et production. Dans sa présentation, Jean Guillerm a expliqué les principaux avantages de l'usage unique pour les cassettes d'ultrafiltration notamment en réduisant les coûts d'investissement et les dépenses de fonctionnement, la consommation d'eau et le temps.

Hélène PORA (Pall Life Sciences) a conclu la session par les aspects réglementaires et l'impact environnemental des produits à usage unique. Hélène Pora a souligné l'absence d'exigence réglementaire concernant les procédés à usage unique et qu'il fallait se référer aux normes existantes de l'industrie pharmaceutique. Concernant les déchets générés par les technologies à usage unique, ceux-ci sont négligeables par rapport aux autres déchets générés par l'industrie pharmaceutique. Elle a décrit différentes options de traitements.

TABLE RONDE: ÉCONOMIE DES PROCÉDÉS : TRADITIONNELS VS INNOVANTS

*Animateurs : **Vincent MONCHOIS** (Directeur R&D, Novasep), **Philippe de BRAECKELAER** (Directeur Général Adjoint, CVG) avec la participation de **Jacques DUMAS** (Head of Protein Biotehrapeutics, Sanofi), **Margit HOLZER** (Directrice Scientifique, Ulysse Consulting), **Paul COLONNA** (Directeur Scientifique Adjoint Nourriture, Nutrition et Bioéconomie, INRA Nantes)*

Un certain nombre de points ont été relevés au cours de la conférence pour amener une discussion sur l'économie des procédés. La discussion importante étant la mise en œuvre de la technologie à usage unique dans les procédés. Tout en fournissant des avantages de gain de temps (éliminer la nécessité de la stérilisation et le nettoyage) et de coûts (réduction de CAPEX), les produits à usage unique impactent l'environnement par les déchets générés. Un point important dans ce contexte serait de veiller à l'utilisation de plastique recyclable et de haute qualité (relargable (lessivable) et extractible) mais ceci serait en contradiction avec le risque biologique. Il a été noté que l'usage unique implique une dépendance vis-à-vis d'un fournisseur (un fournisseur pour un produit) et que le manque de standardisation peut causer un problème. La qualité des outils d'analyse en ligne sur l'usage unique doit être améliorée pour être à la hauteur des outils hors ligne. Il a été précisé qu'en ultrafiltration, il n'y a pas de dérives en termes de débitmètre et de conductimètre en usage unique.

Un point important est de diminuer la consommation d'énergie et d'eau, car l'agro-industrie utilise beaucoup d'eau notamment sous forme de vapeur comme fluide caloporteur. Trouver un autre fluide pourrait être intéressant.

En ce qui concerne la récupération des produits issus des végétaux, la grande consommation d'eau (presque 15-25 l d'eau consommées par gramme de produit généré) était un souci majeur. En agro-industrie, des quantités importantes d'eau sont utilisées dans la production : 70% pour l'irrigation, 20% en transformation et 10% en distribution

et usage final. Donc il faut faire attention à l'impact environnemental et faire un effort sur toute la chaîne dès le début de la chaîne qui est le plus consommateur. La transformation en agro-industrie (amidonnière et sucrière) travaille essentiellement sur le recyclage de l'eau permettant ainsi de réduire les coûts.

Les problématiques biopharmaceutiques et agro-industrielles sont très différentes, notamment pour l'utilisation d'équipement en usage unique et les volumes de travail associés.

Un problème, relatif aux nettoyages sur des membranes pour les produits issus de lait, semble crucial et demande des améliorations certaines.

L'application des technologies existantes de l'agro-industrie (extraction à l'eau subcritique, électrodialyse) à l'industrie pharmaceutique de haute valeur ajoutée a été discutée. Alors que l'extraction à l'eau subcritique est efficace avec un concept relativement simple, il n'a pas été vu de mise en œuvre dans le secteur biopharmaceutique surtout dû au type de molécules à isoler (macromolécules biologiques). En outre, la sensibilité des molécules cibles joue un rôle clé dans le choix des méthodes de purification.

Un autre point a été soulevé concernant l'hésitation, sinon la frilosité, des industriels de la biopharmaceutique concernant les techniques innovantes, comme la chromatographie continue (existant depuis plus de six ans) déjà éprouvée dans d'autres secteurs d'activité. En réponse, il a été dit que les procédés doivent être pris dans leur globalité et, que changer une seule étape n'étaient pas toujours adéquat et que les départements d'innovation ont toujours du mal à faire passer l'innovation en production.

Pour l'agro-industrie, l'hésitation est moindre car les changements de procédés sont plus liés à l'amortissement des procédés déjà en place.

Une recherche partenariale entre le monde académique et le monde industriel a été citée pour favoriser l'innovation notamment en procédés propres avec une recherche en bioprocédés.

Appports Institutionnels

Nathalie MANAUD (Directrice opérationnelle du Consortium de Valorisation Thématique, AVIESAN) a présenté les perspectives actuelles en protéines de la santé. Le CVT Aviesan a été installé afin de promouvoir le transfert efficace des résultats de l'université à l'industrie. Nathalie Manaud a souligné dans sa présentation la création de « Covalliance », qui vise à promouvoir la coordination entre les différentes structures de développement.

Paul COLONNA (Directeur Scientifique Adjoint Nourriture, Nutrition et Bioéconomie, INRA Nantes) a ensuite présenté les perspectives sur l'industrie agromaturation, en mettant l'accent sur la chimie verte. Comme il y a une forte demande pour les produits de protéines (~ 1,7 millions de tonnes par an) en raison de leurs larges applications, il est impératif de récupérer les protéines avec une perte minimale tout en conservant une conformation correcte.