



Spectroscopie Raman: transformer le contrôle des bioprocédés des anticorps monoclonaux avec les outils PAT



■ Introduction

Les biothérapies ont profondément transformé le paysage médical en offrant des traitements plus ciblés et personnalisés que les thérapies classiques à base de petites molécules chimiques. Représentant aujourd'hui plus de 50 % des nouveaux médicaments, des avancées en ingénierie des bioprocédés et en automatisation sont indispensables pour améliorer le rendement des systèmes biologiques et ainsi réduire les coûts de la bioproduction.

Dans le cadre d'un plan de relance économique, CLIMBIN a vocation à mettre à disposition une solution innovante en technologie analytique de procédé par spectrométries optiques moléculaires (TAP-SOM), au sein d'un consortium de partenaires français dans un contexte de volonté d'acquisition de souveraineté de la filière bioproduction nationale.



Mesurer pour mieux Agir



- Objectifs

L'objectif principal du projet est la production et qualification d'une solution analytique de suivi des paramètres critiques de procédé et de qualité d'une bioproduction ainsi que la quantification et qualification des différents éléments d'intérêt (métabolites de la production, protéines et biomédicaments thérapeutiques).

Cette solution doit permettre un suivi de la bioproduction *in situ*, en temps réel, sans prélèvements, palliant ainsi aux pratiques conventionnelles d'analyse en bioprocédé. Couplée à une analyse de données chimiométrique embarquée, cette dernière doit être adaptée à une diversité de bioréacteurs et d'échelles de production en vue de la supervision de l'ensemble de la bioproduction. Elle est démontrée sur le processus de fabrication d'anticorps thérapeutiques sur une lignée cellulaire issue d'ovaires de hamster de Chine (cellules CHO).

- Matériel & méthodes

Unique sur le marché, VISERION permet jusqu'à 4 mesures Raman simultanées au moyen de 4 sondes et 4 lasers. Des lasers avec différentes longueurs d'onde d'émission de 785 ou 830 nm peuvent être combinés, chacun avec une puissance réglable. Un système de refroidissement à très basse température permet une analyse spectroscopique de haute qualité avec des niveaux de bruit très bas, facilitant ainsi l'utilisation des temps d'intégration longs, qui peuvent être critiques pour les bioprocédés.

Le VISERION embarque un PC industriel intégré dans le boîtier en acier inoxydable pour offrir la meilleure robustesse. Plusieurs interlocks garantissent la sécurité laser. Le logiciel – conforme au 21 CFR part 11 – permet non seulement l'enregistrement des mesures, la modulation des paramètres d'acquisition de ces dernières, mais également l'intégration de modèles chimiométriques, permettant le monitoring des paramètres critiques du procédé. Le système a la capacité de communiquer avec d'autres logiciels d'automates en utilisant le protocole de communication OPC-UA afin d'automatiser complètement le suivi de production.

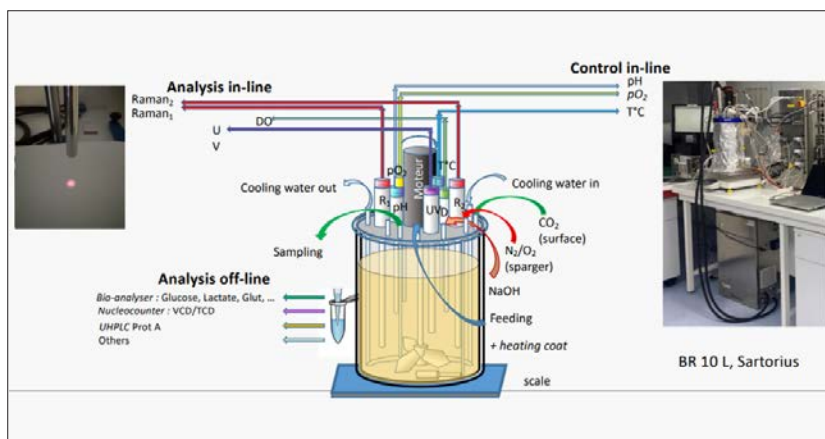
Indatech a développé tout un écosystème autour de la sonde optique Raman, qui permet une grande flexibilité de la mesure Raman grâce à une sonde à immersion couplée à un ensemble d'embouts configurables permettant de s'adapter à différents contextes et applications de mesure. L'utilisateur peut facilement basculer entre des embouts en transflexion ou avec des distances de travail (WD) variables.

Le principe de la sonde à transflexion implique l'utilisation d'une surface réfléchissante. Cela double le chemin optique, augmentant la sensibilité aux échantillons à faible concentration. Dans le cas de la mesure Raman, INDATECH a développé un embout de transflexion qui réduit également considérablement la lumière parasite, inhérente aux longs temps d'intégration de la mesure Raman dans des milieux complexes tels que les cultures cellulaires. Cet embout est très efficace pour éliminer la lumière ambiante pendant la production, mais la rend d'autant plus sensible aux augmentations de la densité/turbidité du milieu. Une sonde sans transflexion mesure simplement la lumière après un seul passage dans l'échantillon, ce qui la rend plus adaptée aux échantillons plus concentrés ou opaques. Un autre avantage de l'embout sans transflexion est que la distance de travail peut être modulée, ce qui permet une adaptation supplémentaire aux caractéristiques du milieu mesuré.

La gamme d'embouts proposée par Indatech peut donc être adaptée à tout type de milieu aux propriétés physico-chimiques et aux comportements optiques variés.

La configuration du dispositif VISERION retenue pour CLIMBIN à l'issue de plusieurs campagnes de mesures expérimentales, est composée de deux voies de mesures, à 785 nm, chacun équipé d'embouts sans transflexion, garantissant la meilleure sensibilité dans les conditions physico-chimiques du bioprocédé suivi. Il s'agit d'une culture de cellules CHO, très utilisées dans les industries pharmaceutiques et biotechnologiques, pour la production de biomédicaments thérapeutiques, en particulier des anticorps.

La base de données est constituée de 5 lots de cultures cellulaires, alimentés en 3 cycles, en bioréacteur BioBlu 10C (10 L) (Figure 1). Le suivi se fait en continu en ligne avec les deux sondes Raman (une sonde par bioréacteur) à travers une mesure toutes les 30 minutes, et en parallèle un échantillonnage avant et après alimentation pour les mesures de référence (métabolites, nutriments, densité cellulaire). L'ensemble de l'analyse de données a été réalisée sous PLS_Toolbox (Eigenvector Research) s'exécutant dans l'environnement MATLAB (The Mathworks).



Run	Bio-reactors	Number of samples	
		Raman spectra	References
1	1	758	31
2	2	1140	31
	3	1140	31
3	4	768	20
	5	629	20
TOTAL		4 435	133

Figure 1 : Présentation de la configuration de mesure et des lots de données acquis

• Résultats & discussions

Une première analyse exploratoire a été effectuée sur le premier batch de la culture cellulaire via une analyse en composante principales (ACP), présentée dans la Figure 2.

La première représentation graphique de PC1 vs PC2 montre l'évolution de la culture en fonction de la densité cellulaire, que l'on observe via l'évolution de la ligne de base sur les spectres Raman. Les composantes 3, 4 et 5, en revanche, couvrent l'information chimique, confirmé par l'apparition de pics bien définis dans les *loadings*.

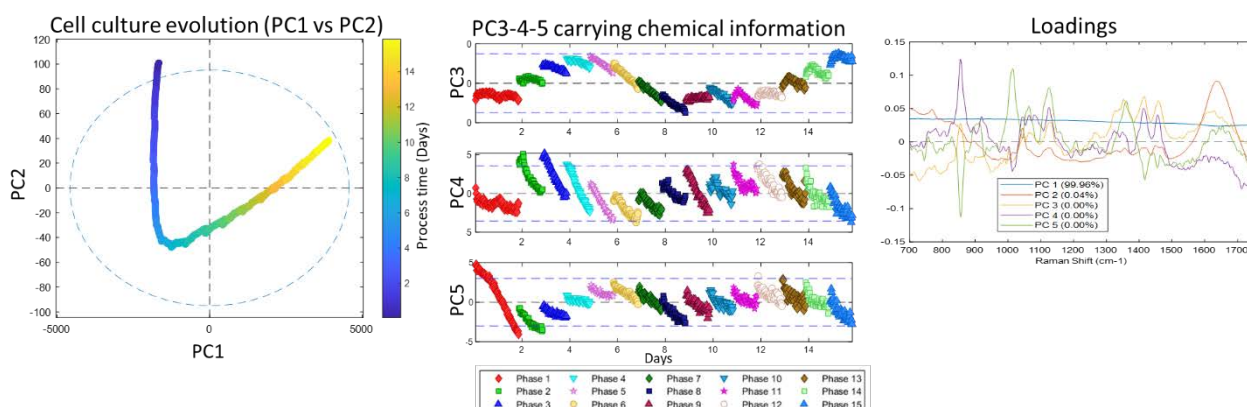


Figure 2 : Analyse exploratoire du premier bioréacteur

En effectuant cette même analyse exploratoire sur l'ensemble des 5 lots, il convient de confirmer les observations faites sur un seul batch. La PC1 semble en effet associée à l'évolution de la densité cellulaire, de l'effet de diffusion induit par cette dernière, tandis que la PC2 est représentative de l'effet de sondes, c'est-à-dire des différences observables entre les deux sondes Raman. Les composantes 3, 4 et 5 permettent d'observer les évolutions chimiques au cours des procédés.

A la suite d'une analyse exploratoire ont été réalisés plusieurs modèles de prédiction, notamment des modèles utilisant la méthode PLS (*Partial Least Squares* ou une régression par les moindres carrés partiels) à partir de la même base de données constituée de 5 lots pour un total de 4435 spectres Raman s'appuyant sur 133 mesures de référence. Ces modèles de prédiction cherchent à prédire des paramètres critiques du processus (CPP) et des attributs critiques de qualité (CQA) comme la densité cellulaire et la quantification d'anticorps, ainsi que d'un maximum de métabolites de production (glucose, lactate, glutamine...). La validation croisée a été réalisée sur 5 blocs, par batch, c'est-à-dire en méthode 1-batch-out.

Dans la Figure 3 sont présentés l'ensemble des modèles de prédiction aux caractéristiques de modélisation viables, et aptes à être utilisés pour une validation en nouveaux bioréacteurs. En effet, les facteurs de corrélation commencent à 0.86-0.87 pour le lactate et la glutamine et vont jusqu'à 0.98 pour les anticorps IgG.

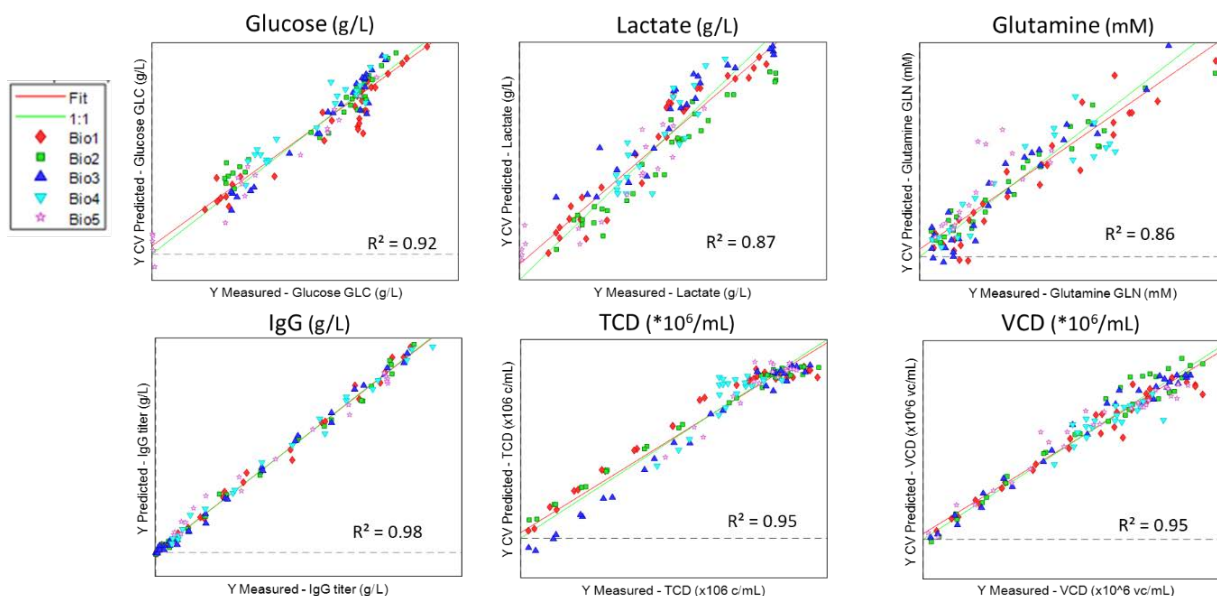


Figure 3 : Modèles de calibration sur 6 paramètres critiques de production

- Conclusions & perspectives

La spectroscopie Raman en ligne, couplée à des outils d'apprentissage automatique, permet une analyse non destructive et un contrôle qualité automatisé des bioprocédés, tels que la production d'anticorps monoclonaux (mAbs) dans les cultures de cellules CHO.

Grâce à la surveillance en temps réel des paramètres critiques du processus (CPP) et des attributs critiques de qualité (CQA), la reproductibilité et le rendement des lots peuvent être considérablement améliorés.

La fiabilité de l'outil et de son application sera permise entre autre par l'utilisation de configurations optimisées de la sonde de mesure, de l'acquisition de nombreux jeux de données réalisés sur des lots bien contrôlés (« *golden* »/non conformes) et des données spectrales de qualité pertinentes. Associé à des méthodes d'analyse appropriées, le dispositif permettra ainsi un étalonnage précis de la méthode spectroscopique en ligne par rapport aux méthodes hors ligne de référence.

La même méthodologie peut être appliquée à une gamme plus large d'applications biopharmaceutiques dans la quête de l'automatisation des processus et du contrôle intégré.

- Remerciements

L'équipe Indatech tient à remercier tous les partenaires impliqués dans le projet CLIMBIN :



Data acquisition & treatment

M. Rubini
M. Soucé
M. Bouannounou
T. Haddoudi
A. Rayyad
Pr. I Chourpa



Raman sensor

J. Louet
Dr. F. Chauchard



Data treatment

J. Poulain
J. Boyer
Dr. S. Roussel



Cell culture & Data acquisition

A. Berger
T. Saillard
M. Vergès
B. Cavallini
S. Arnould



Cell culture & Data acquisition

Dr. S. Hamla
B. Ebel
Dr. E. Guedon
Pr. E. Olmos

Financial support of **bpi france**

