

Utilisation de l'AppliFlex ST pour étudier l'effet de la concentration de CO₂ sur l'expansion des lymphocytes T

Wiegmann, V¹, Amini, A¹, Bernal, C². ¹Département d'ingénierie biochimique, UCL, Bernard Katz Building, WC1H 0AH Londres, Royaume-Uni ²Applikon Biotechnology BV, Heertjeslaan 2, 2629 JG, Delft, Pays-Bas

Introduction

Ces dernières années, la thérapie cellulaire adoptive (TCA) à base de lymphocytes T s'est révélée prometteuse dans le traitement des cancers systémiques tels que la leucémie lymphoblastique aiguë. Cependant, la robustesse et la reproductibilité du processus de traitement restent difficiles à garantir. Il est donc essentiel de comprendre l'effet des conditions de culture cellulaire sur l'expansion et la différenciation des lymphocytes T. Ce travail étudie l'effet du CO₂ sur l'expansion des lymphocytes T en utilisant le bioréacteur à usage unique AppliFlex ST, choisi pour ses atouts tels que des investissements initiaux réduits, une mise en place plus rapide et une diminution des risques de contamination croisée. L'influence du CO₂ présente un intérêt particulier en ce qui concerne les thérapies allogéniques potentielles à base de lymphocytes T et la culture à grande échelle qui y est associée, où l'élimination du CO₂ peut s'avérer insuffisante. Pour d'autres types de cellules mammifères, plusieurs études ont démontré que des concentrations élevées en CO₂ dissous peuvent gravement affecter le bioprocédé (par exemple, Brunner et al., 2018, Nguyen Dang et al., 2019), mais jusqu'à présent, aucune étude de ce type n'existe pour l'expansion des lymphocytes T.

Matériels & Méthodes

- Toutes les expériences ont été réalisées dans des bioréacteurs à usage unique AppliFlex ST d'un volume nominal de 500 mL (figure 1) équipés d'une pale marine.
- Le contrôleur my-Control a été utilisé pour les mesures et le contrôle des paramètres. Les conditions de culture sont décrites dans le tableau 1.
- Toutes les conditions ont été reproduites avec un n ≥ 2 donneurs.
- Les bioréacteurs ont été alimentés avec des mélanges gazeux de 5%, 10%, and 20% en CO₂ compensés avec du N₂ ou de l'O₂.
- La concentration en cellules viables et la viabilité ont été déterminées à l'aide d'un NucleoCounter NC-3000 (ChemoMetec A/S, Danemark) utilisant Via1-Cassettes (ChemoMetec A/S, Danemark).
- Les concentrations des nutriments et métabolites ont été mesurées à l'aide d'un Bioprofile Flex (Nova Biomedical, USA).

Conditions de culture cellulaire

Volume de travail	150 - 300 mL
Débit de gaz	1,0 vvm Gaz de surface
Contrôle du pH	7,2 avec CO ₂ †, 250 mM de bicarbonate ↓
Contrôle dO ₂	25% avec de l'air†, N ₂ ↓
Mode de fonctionnement	Fed-Batch (+100% du volume de travail initial)
Température	37°C
Densité d'ensemencement	0,4.10 ⁶ cellules mL ⁻¹
Agitation	200 rpm
Milieu	X-Vivo 15 + 5% FBS + 1% Pluronic F68

Tableau 1 | Conditions de culture pour les lymphocytes T dans l'AppliFlex ST



Figure 1 | AppliFlex ST (Gethinge)

Résultats & Discussion

- À des concentrations de CO₂ plus faibles, la croissance cellulaire est presque identique entre les donneurs. Seules les cellules du donneur 14 semblaient être affectées par une concentration accrue de CO₂. Dans ce cas, la croissance s'est arrêtée après 3 jours de culture et la viabilité a lentement diminué (figure 2 et tableau 2).
- Il est intéressant de noter que les cellules du donneur 14 cultivées avec 20% de CO₂ ont montré une augmentation de la production spécifique de lactate et de la consommation de glucose par rapport aux cellules cultivées à des concentrations plus faibles de CO₂. Une implication de la pCO₂ dans le métabolisme du lactate a déjà été démontrée pour d'autres cellules mammifères (Brunner et al., 2018).
- Grâce au procédé fed-batch décrit, la concentration en glucose a été maintenue au-dessus du niveau de déplétion et les concentrations en lactate et en ammoniac ont été maintenues respectivement en dessous de 6 g/L et 3 mmol/L. Certaines conditions étaient potentiellement limitées en glutamine dans les dernières phases de la culture. Une optimisation supplémentaire du procédé pourrait inclure une supplémentation accrue en glutamine.



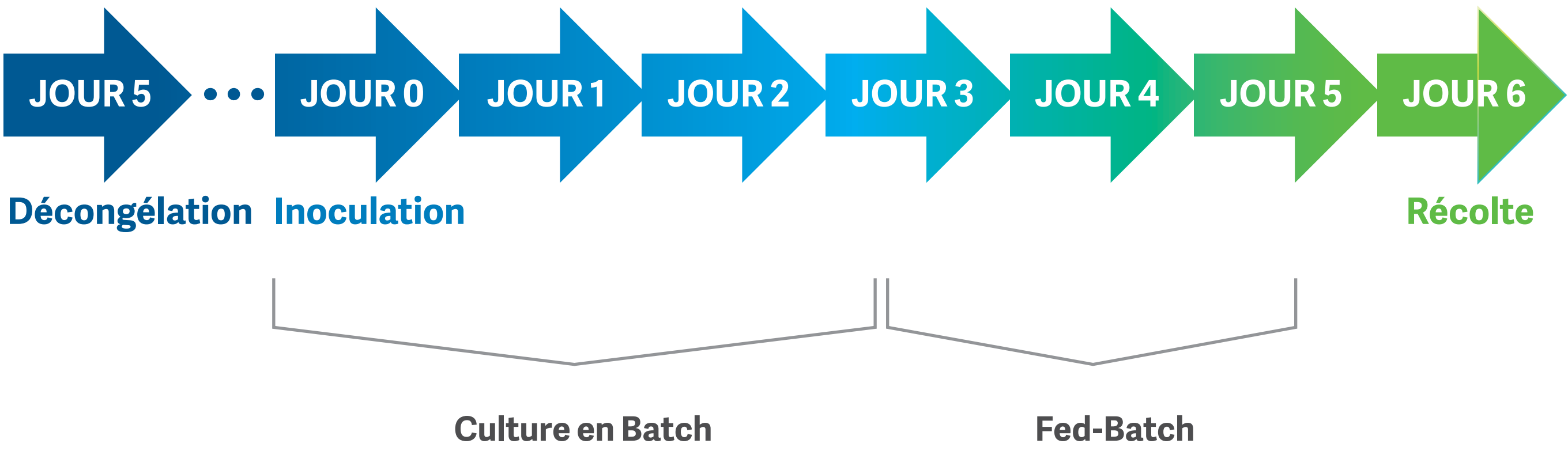
Figure 2 | Croissance et métabolisme des lymphocytes T primaires expansés dans le bioréacteur à usage unique AppliFlex ST. Tous les gaz entrants contenaient soit 5%, 10% ou 20% de CO₂.

Taux d'expansion

	Donneur 8	Donneur 14	Donneur 17
5% CO ₂	27,8	30,4	24,3
10% CO ₂	x	24,8	27,9
20% CO ₂	x	3,6	23,2

Tableau 2 | Expansion finale des lymphocytes T dans l'AppliFlex ST sous différentes concentrations de CO₂

Déroulement du procédé



Conclusions

- Les bioréacteurs à usage unique AppliFlex ST 500 mL ont été utilisés avec succès pour la multiplication des lymphocytes T primaires.
- Différentes concentrations de CO₂ dans le gaz entrant ont été testées afin d'évaluer leur effet sur la croissance et le métabolisme des lymphocytes T primaires. Toutes les cellules donneuses testées ont toléré des concentrations allant jusqu'à 10 % de CO₂. À 20 % de CO₂, les cellules testées d'un donneur ont cessé de croître et ont présenté un changement de métabolisme, tandis que les cellules de l'autre donneur n'ont pas été affectées.
- Les résultats montrent que la sensibilité à la toxicité du CO₂ dépend du donneur. En ce qui concerne la fabrication à grande échelle de thérapies à base de lymphocytes T allogéniques, il est donc essentiel de tenir compte de la résistance au CO₂ lors de la sélection de la lignée cellulaire.

Références

• Brunner M, Doppler P, Klein T, Herwig C, and Fricke J. Elevated pCO₂ affects the lactate metabolic shift in CHO cell culture processes. Eng. Life Sci. 18(3), 204–214 (2018).

• Nguyen Dang A, Mun M, Rose CM, et al. Interaction of cell culture process parameters for modulating mAb afucosylation. Biotechnol. Bioeng. bit.26908 (2019)

Remerciements

Ce travail est soutenu par le Conseil britannique de recherche en sciences physiques et techniques (EPSRC). Nous tenons également à remercier Applikon Biotechnology pour le soutien financier supplémentaire à la bourse de doctorat en ingénierie de cet étudiant.