

# Cultiver efficacement des cellules HEK à l'aide d'un bioréacteur à usage unique de petite taille

Kasteel, L.<sup>1,2</sup>, Martens, D.<sup>1</sup> and Bernal, C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Université et Centre de recherche de Wageningen, Droevendaalsesteeg 1, 6700 AB Wageningen

<sup>2</sup> Getinge Applikon, Heertjeslaan 2, 2629 JG, Delft, Pays-Bas

## État de l'art

Les cellules HEK293 sont largement utilisées dans les applications biotechnologiques et thérapeutiques, et contribuent notamment aux thérapies géniques approuvées par la FDA depuis 2015 [1–6].

Les cellules HEK293 peuvent être cultivées avec succès en suspension à l'aide de bioréacteurs à cuve agitée [7–10], qui offrent évolutivité et reproductibilité. De plus, les bioréacteurs à usage unique réduisent le risque de contamination croisée.

Les cellules HEK293 sont cultivées selon différents modes de fonctionnement ; bien que le mode discontinu («batch») soit courant en raison de sa simplicité et de son coût, il a été démontré que les stratégies en mode alimentation discontinue («fed-batch») améliorent la densité cellulaire viable (VCD) et la viabilité (%) [8].

## Objectif

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'adéquation des bioréacteurs à usage unique de petite taille pour la culture de cellules HEK en suspension, en utilisant les modes de culture discontinue et par alimentation discontinue (ajout en bolus d'un milieu de culture efficace).

## Matériel et méthodes

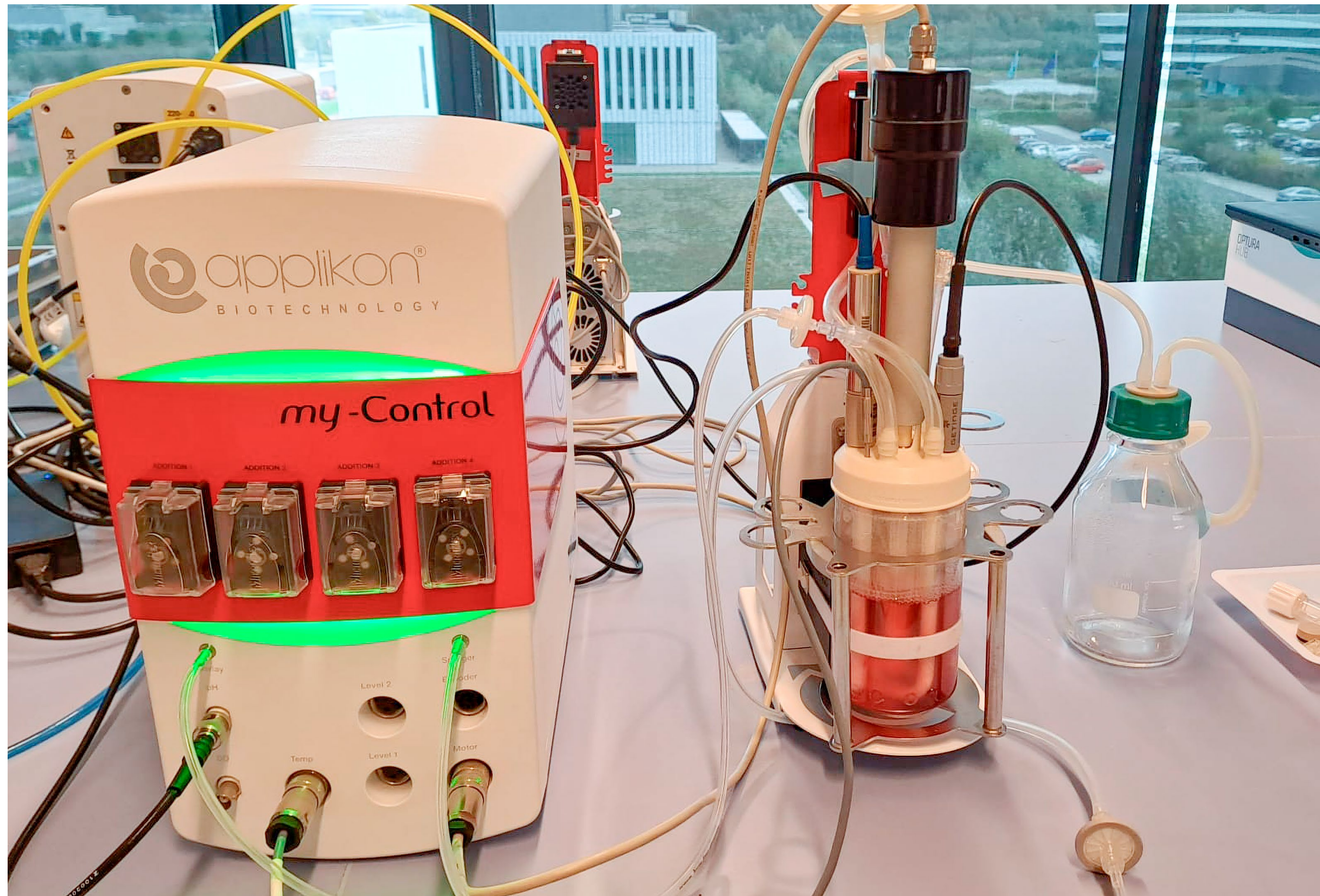


Figure 1 | Configuration du biocontrôleur my-Control avec l'AppliFlex ST 500 mL.

## Lignée cellulaire et milieux de culture

Les cellules Expi293F™ (Fisher Scientific) ont été cultivées dans le milieu d'expression Expi293™ Expression Medium (Gibco™). Les précultures ont été réalisées à partir d'une banque de cellules cryoconservées dans de l'azote liquide avec 10 % de DMSO.

## Préculture en flasques agitées

Les cellules ont été cultivées dans des flasques agitées munies d'un bouchon filtrant d'une contenance de 125 mL, avec un volume de travail de 30 mL. Les cultures ont été réensemencées tous les 3 à 4 jours, en partant d'une densité de 0,4–0,5 × 10<sup>6</sup> cellules/mL pour atteindre environ 4 × 10<sup>6</sup> cellules/mL. Conditions d'incubation : 37°C, 130 rpm, 8 % de CO<sub>2</sub>, et 85 % d'humidité relative (conformément aux instructions du fournisseur). Les cultures n'ont pas été utilisées au-delà de 20 passages.

## Bioréacteurs AppliFlex ST

Les bioréacteurs à usage unique utilisés dans le cadre de cette étude sont disponibles pour deux applications distinctes : la recherche et le développement (R&D) et la production clinique (BPF). Les dimensions, configurations et matériaux sont identiques pour les deux types. La différence réside dans le post-traitement d'un matériau de contact, la documentation de qualification et les exigences de production, où la version BPF est fournie pour répondre à toutes les exigences des applications cliniques. Afin de vérifier les performances et de s'assurer qu'aucun transfert de technologie n'est nécessaire entre les modèles R&D et BPF, une expérience Fed-batch 3 a été réalisée avec la version BPF. Les autres expériences présentées dans ce poster ont été réalisées avec les versions R&D.

## Configuration du bioréacteur et conditions de culture

Des expériences en mode discontinu («batch») et en mode discontinu alimenté («fed-batch») ont été menées dans un bioréacteur à usage unique AppliFlex ST de 500 mL (volume utile : 250 mL), équipé d'un capteur optique d'oxygène dissous (DO) réutilisable LumiSens et d'un capteur de pH AppliSens, contrôlés via le système Applikon my-Control (figure 1). Une vitesse de pointe de 0,66 m/s a été utilisée pour l'agitation (450 tr/min dans ce cas).

- L'oxygène dissous (DO) a été maintenu à 40 % de saturation en air par injection d'oxygène pur via un sparger à tube ouvert («open pipe»).
- Le pH a été maintenu à 7,1 par injection de CO<sub>2</sub> via le sparger, avec un espace en surface continuellement purgé à l'air pour éliminer l'excès de CO<sub>2</sub>.
- Le bioréacteur a été inoculé à 0,4 × 10<sup>6</sup> cellules/mL lorsque le mode de fonctionnement discontinu («batch») a été utilisé, comme précédemment réalisé dans les flasques agitées lors du passage et du maintien en culture.
- Le bioréacteur a été inoculé à 0,65 × 10<sup>6</sup> cellules/mL pendant l'expérience avec le mode discontinu alimenté (Fed-batch 1). La concentration de l'inoculum était de 1,0 × 10<sup>6</sup> cellules/mL dans les expériences Fed-batch 2 et Fed-batch 3. Dans ces expériences, au milieu de la phase exponentielle (2–2,5 × 10<sup>6</sup> cellules/mL), le milieu Efficient-Pro™ Feed 2 a été ajouté en doses bolus de 0,4 % (v/v) toutes les 24 heures à l'aide de la pompe intégrée du système my-Control, conformément aux recommandations du fournisseur du milieu.

## Échantillonnage et analyse

Des duplicats d'échantillons ont été prélevés quotidiennement pour :

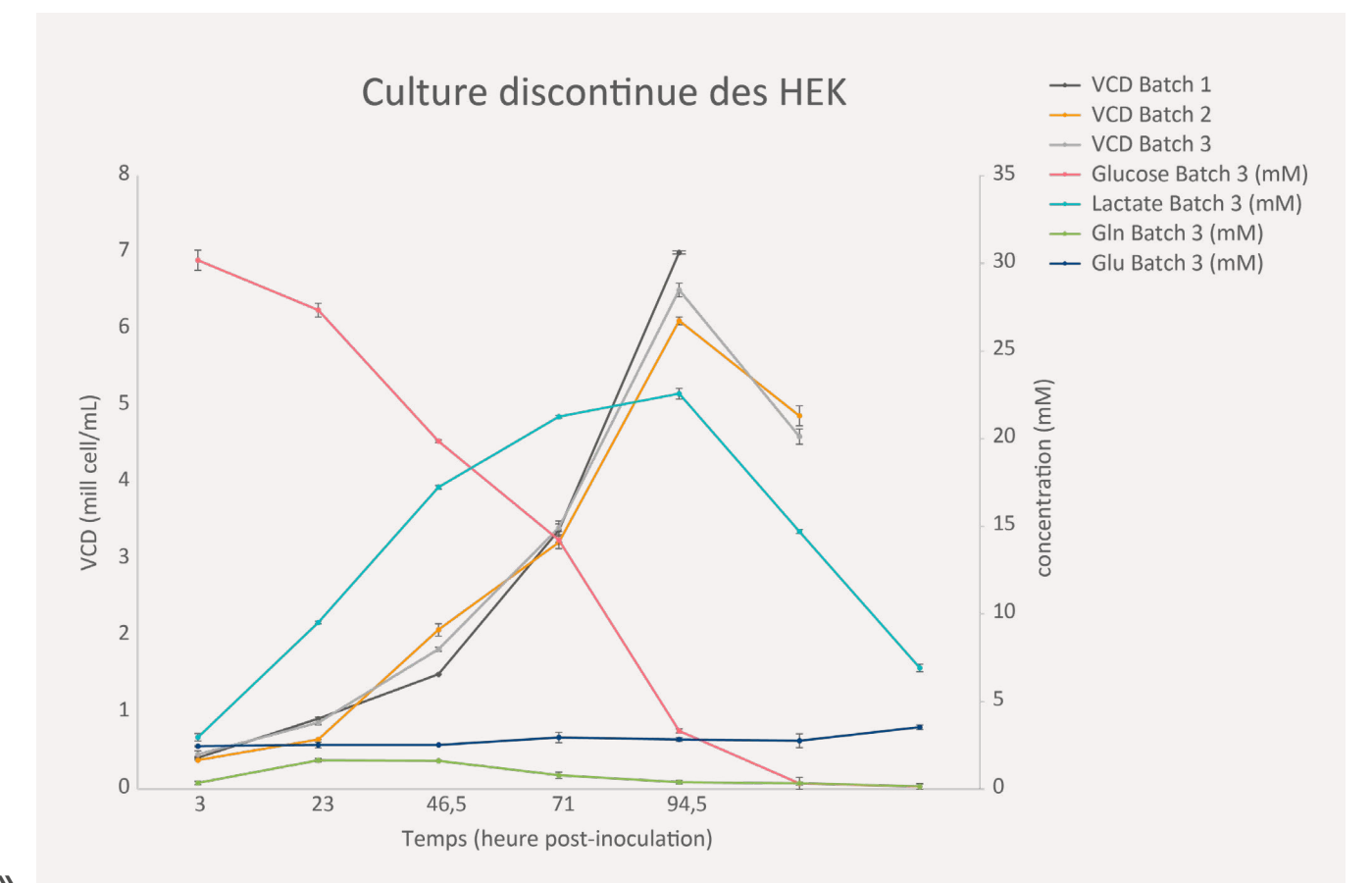
- La densité cellulaire viable (VCD) et la viabilité, déterminées à l'aide d'un hémocytomètre et d'un colorant au bleu de trypan.
- L'analyse des métabolites (glucose, lactate, glutamine, glutamate) a été réalisée sur un analyseur biochimique YSI à l'université de Wageningen. Les surnageants ont été conservés à –20°C avant l'analyse. Ces analyses ont été effectuées pour les expériences Batch 3, Fed-batch 2 et Fed-batch 3.

## Résultats

### Culture discontinue

Les cellules HEK293 ont été cultivées dans le bioréacteur AppliFlex ST de 500 mL en mode discontinu («batch») (figure 2). Les trois réplicats ont montré une grande reproductibilité, avec une VCD maximale moyenne d'environ 6,5 × 10<sup>6</sup> cellules/mL. Ce pic s'est produit lorsque les réserves de glucose et de glutamine ont été épuisées et que la concentration en lactate a également atteint son maximum.

Figure 2 | Densité cellulaire viable (VCD) de trois réplicats en culture discontinue («batch») et profils de concentration en glucose, lactate, glutamine et glutamate de l'expérience «Batch 3».



### Culture discontinue alimentée

La figure 3 illustre la VCD de trois expériences en culture discontinue alimentée ainsi que les profils de concentration en glucose, lactate, glutamine et glutamate de deux séries. La VCD des trois cultures présente le même profil. Le glucose et la glutamine étaient pratiquement épuisés 80 heures après l'inoculation, suivis par la consommation de lactate, ce qui indique un changement métabolique. La dynamique du glutamate est restée stable, en accord avec les besoins métaboliques des cellules. Les ajouts quotidiens en bolus d'Efficient-Pro™ Feed 2 sont indiqués par des flèches bleues. Les cultures en alimentation discontinue ont atteint une VCD moyenne maximale d'environ 9 × 10<sup>6</sup> cellules/mL, contre environ 6,5 × 10<sup>6</sup> cellules/mL en culture discontinue (7–9). Cela montre qu'il est possible d'obtenir de meilleurs résultats en augmentant la quantité d'alimentation vers la fin de la culture.

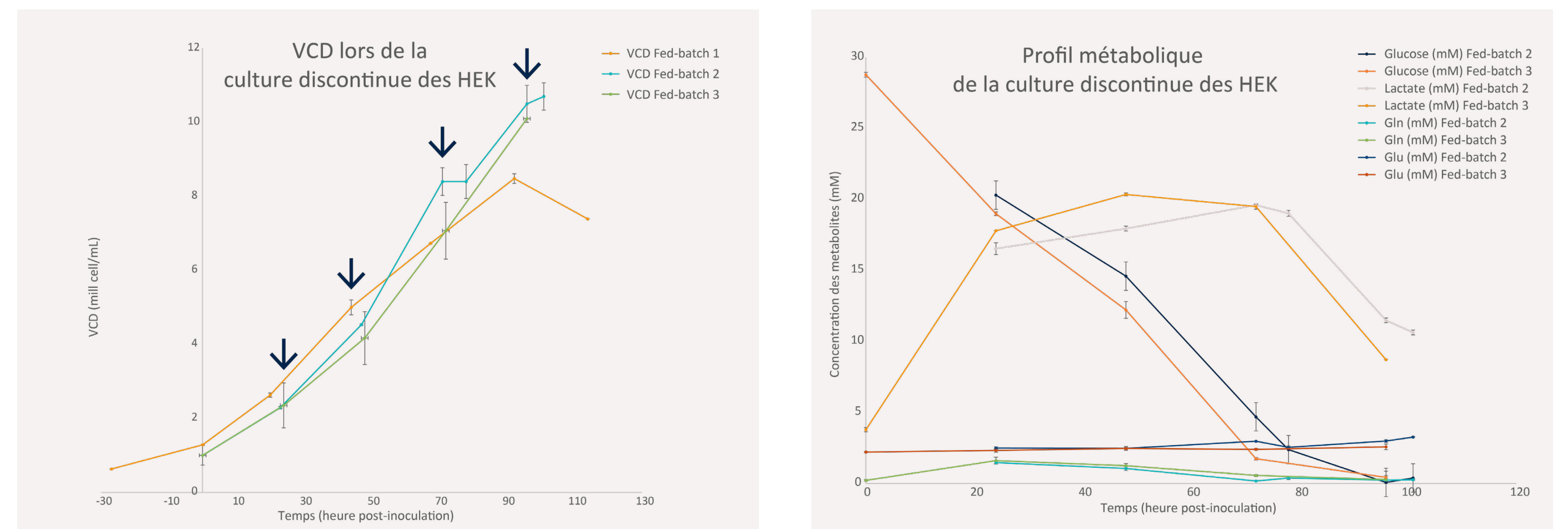
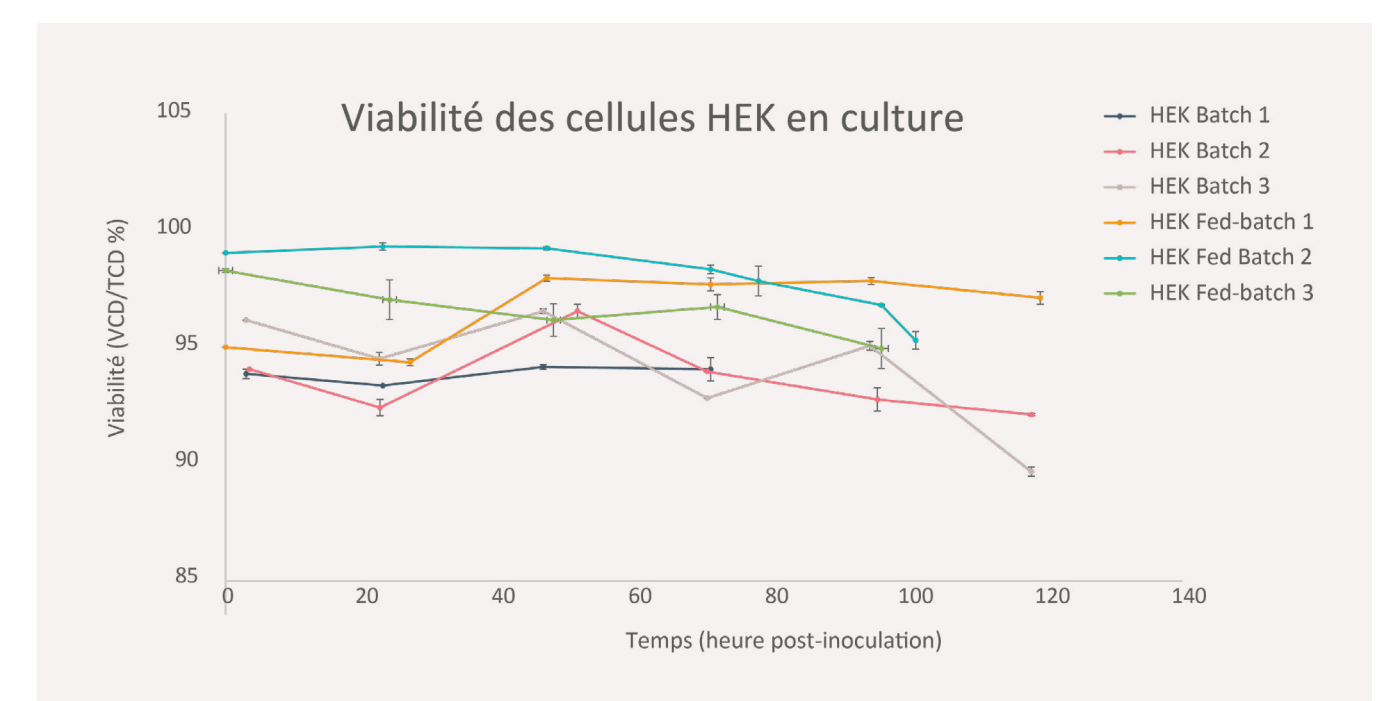


Figure 3 | Densité cellulaire viable (VCD) de trois séries en culture discontinues alimentées («fed-batch») et profils de concentration en glucose, lactate, glutamine et glutamate pour les expériences Fed-batch 2 et 3. Les flèches bleues indiquent l'ajout en bolus.

### Viabilité

La viabilité cellulaire s'est maintenue entre 94 et 100 % tout au long des 100 heures de culture, avec des résultats légèrement meilleurs dans les cas de culture discontinue alimentée («fed-batch»). Ces résultats concordent avec ceux d'études antérieures, confirmant ainsi les avantages de ce mode de culture.

Figure 4 | Profil de viabilité (%) des six expériences.

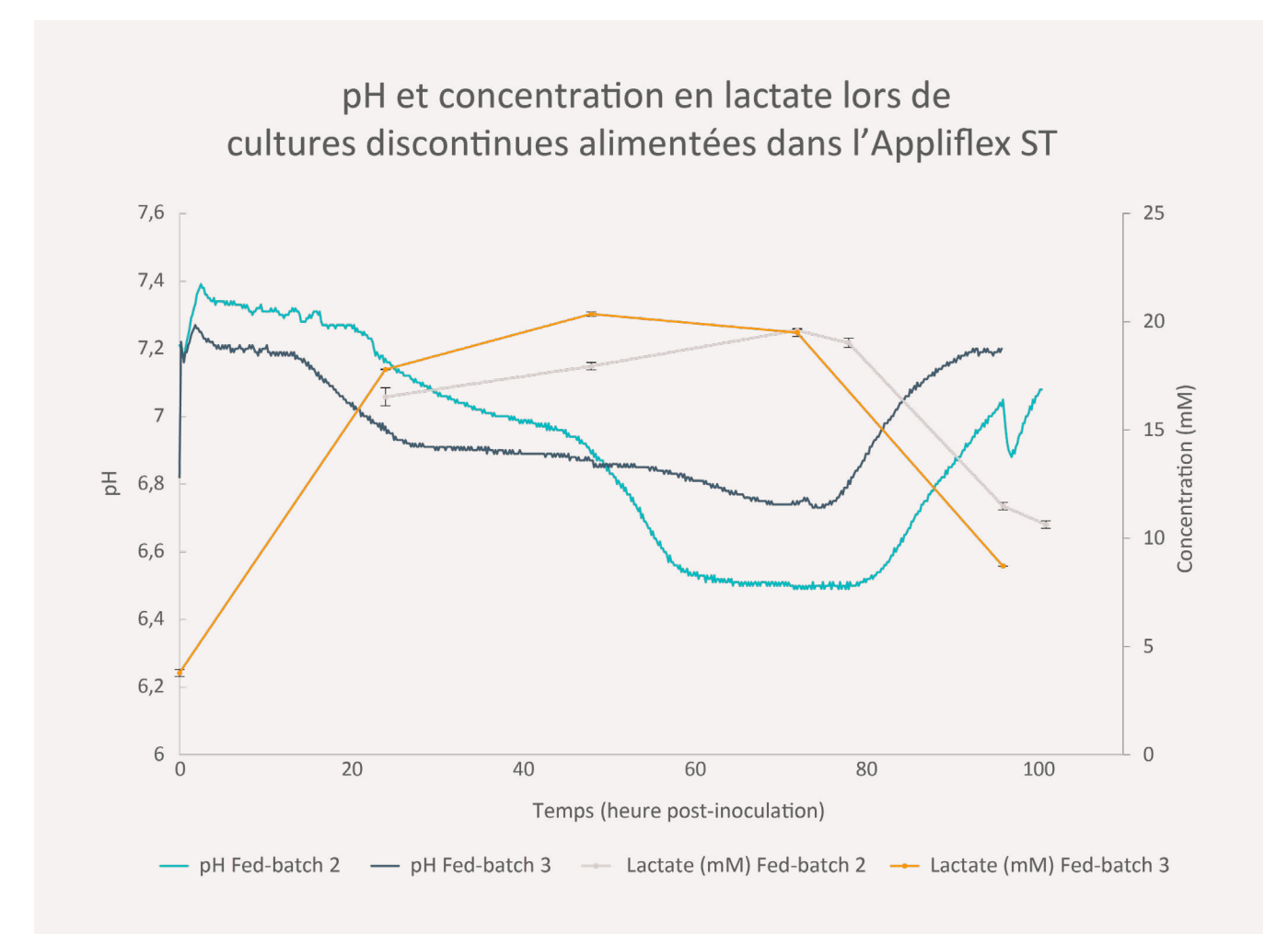


### Corrélation entre le pH et le lactate

La figure 5 illustre la relation entre les concentrations extracellulaires de lactate et le pH au fil du temps.

Les profils de pH des cultures Fed-batch 2 et Fed-batch 3 sont comparés aux profils de concentration de lactate. 72 heures après l'inoculation, la concentration de lactate a diminué en raison de la consommation de la culture en phase finale, ce qui a coïncidé avec une élévation du pH, comme cela a été rapporté dans les cultures HEK293 (11-12).

Figure 5 | Profils du pH et de la concentration extracellulaire en lactate au cours de deux cultures HEK293 réalisées en réplicat dans le bioréacteur AppliFlex ST.



## Conclusion

Les résultats montrent que les cellules HEK293 peuvent être cultivées avec succès dans le bioréacteur AppliFlex ST.

La stratégie en mode discontinu alimenté («fed-batch») améliore considérablement la densité cellulaire viable, surpassant le mode discontinu («batch»). Les tendances métaboliques (appauvrissement en glucose et en glutamine, production et consommation de lactate) concordent avec les données publiées, confirmant ainsi la fiabilité et la reproductibilité du système. Dans l'ensemble, le bioréacteur AppliFlex ST à petite échelle est efficace pour la culture de cellules HEK, le développement de procédés évolutifs et les études expérimentales à haut débit. Ces résultats valident son adéquation pour l'optimisation des procédés en amont dans un environnement contrôlé et miniaturisé. Les expériences futures pourraient viser à optimiser l'ajout en bolus afin d'améliorer encore la densité cellulaire viable et d'explorer d'autres stratégies de contrôle du pH, telles que le contrôle bilatéral.

## Références

- [1] Mullard, A. (2021). Nat Rev Drug Discov. ; [2] Mullard, A. (2016). Nat Rev Drug Discov. ; [3] Mullard, A. (2017). Nat Rev Drug Discov. ; [4] Mullard, A. (2018). Nat Rev Drug Discov. ; [5] Mullard, A. (2019). Nat Rev Drug Discov. ; [6] Mullard, A. (2020). Nat Rev Drug Discov. ; [7] M. Y. Tran and A. A. Kamen. (2022). Front. Bioeng. Biotechnol. ; [8] J. Martínez-Monge et al. (2018). Appl Microbiol Biotechnol. ; [9] Stefan Seidel et al., (2023). Bioengineering. ; [10] Thailin Lao et al., (2023). Biomedicine. ; [11] R. Román et al., (2018). J Biotechnol. ; [12] J. Martínez-Monge et al. (2019). Biotechnol Bioeng.