

# Flacons Spinner à usage unique pour le scale-up des cultures ou la production de protéines

Hilary A. Sherman and Todd Upton, Ph.D., Corning Incorporated, Life Sciences



## Résumé

La culture de cellules en suspension est de plus en plus utilisée dans les protocoles de drug discovery, et les consommables de culture adaptés au scale up évoluent au même rythme. Historiquement, des flacons plastiques à usage unique ou des spinners en verre ont été utilisés. Toutefois, l'agitation en flacon peut être un facteur limitant à l'efficacité du scale up, et l'utilisation des spinners en verre pose des problèmes pratiques et des pertes de temps pour le lavage, l'assemblage, la stérilisation et la validation. Les spinners Corning de 1L et 3L en plastique sont conçus pour être à usage unique sans requérir aucune préparation. Nous avons testé les spinners jetables avec différentes lignées cellulaires comprenant les SF9 (données non présentées), les CHO-S et une lignée cellulaire d'hybridome utilisée pour la production d'anticorps sécrétés. La densité cellulaire ainsi qu'une variété de paramètres métaboliques ont été contrôlés quotidiennement. Les données indiquent des performances équivalentes entre les cultures en suspension en spinners à usage unique de 1L et 3L par rapport aux récipients en verre standards.

## Matériel et méthodes

Les cellules sont cultivées dans des récipients en verre de 1L (Corning Cat. No. 4500-1L), dans des spinners jetables de 1L (Corning Cat. No. 3561), ou 3L (Corning Cat. No. 3563). Les récipients de 1L ont été remplis avec 500 mL de milieu, ceux de 3L avec 1,5 L de milieu et ont été placés sur un agitateur Corning (Cat. No. 440814) à 30 ou 60 rpm. Des prélèvements de 1mL ont été réalisés quotidiennement pour analyse métabolique et test de viabilité en utilisant un analyseur BioProfile FLEX (Nova Biomedical).

Les cellules CHO-S ont étéensemencées à  $2,5 \times 10^5$  cellules/mL en milieu sans sérum CD CHO (Gibco) supplémenté avec 8 mM de Lglutamine et 1X de supplément HT (Mediatech). Les récipients contenant des cellules CHO-S ont été incubés (en air humide à 37°C et CO<sub>2</sub> 5%) pendant 96 heures sous agitation à 60 rpm.

Les cellules d'hybridome, lignée cellulaire brevetée, ont étéensemencées à  $5 \times 10^4$  cellules/mL et incubées (en air humide à 37°C et CO<sub>2</sub> 5%) pendant 96 heures sous agitation à 30 rpm. Ces cellules ont été cultivées en IMDM (Mediatech) complété par 10% de sérum de veau fœtal (Mediatech). A 4 jours de culture, un supplément de 1 mL d'échantillon a été prélevé et a été centrifugé à 1000 rpm pendant 5 minutes. Les surnageants ont été collectés et surgelés en vue de procéder à un test ELISA pour la production d'anticorps.

Un kit ELISA (Alpha Diagnostic International - réf 6340) a été utilisé pour quantifier la production d'IgG2a de souris. Les échantillons ont été dilués 500x et ont été traités en suivant le protocole du fabricant. Les lectures de DO ont été réalisées avec un lecteur Spectromax Molecular Device à 450 et 630 nm pour normaliser le bruit de fond.

## Résultats

Pour comparer la croissance cellulaire en fonction du récipient de culture utilisé, les cellules CHO-S et les hybridomes ont été cultivées en parallèle dans les spinners en verre et à usage unique de 1L et 3L avec des prélèvements quotidiens d'échantillons. Aucune différence significative au niveau de la densité de cellules vivantes pour les CHO-S et les hybridomes n'a été observée en fonction des différents flacons de culture et des volumes (Figures 1 and 2).



Figure 1: 96 hour growth of CHO-S cells in glass and disposable 1L spinner flasks from 3 studies at 60 rpm (n = 6).  $\pm$  S.E. indicated by error bars;  $p < 0.05$ .

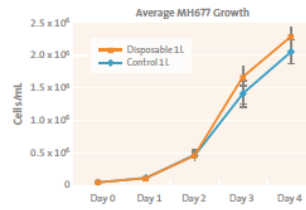
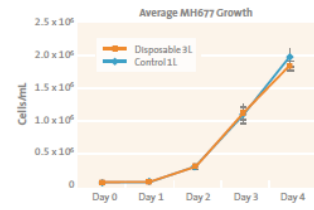


Figure 2: 96 hour growth of MH677 cells in glass and disposable 1L and 3L spinner flasks from 3 studies at 30 rpm (n = 6).  $\pm$  S.E. indicated by error bars;  $p < 0.05$ .



Le rendement moyen pour les cellules MH677 était légèrement supérieur dans les spinners à usage unique comparé au verre mais non statistiquement significatif. L'utilisation de l'analyseur Nova BioProfile FLEX a permis de mesurer 13 paramètres métaboliques différents dont le lactate, l'ammoniaque, le pH et le dioxyde de carbone dissout. Des exemples de résultats pour la saturation en oxygène et la consommation de glucose sont montrés sur la Figure 3. Comme pour le nombre de cellules, nous n'observons pas de différence significative pour la consommation d'oxygène et de glucose. La même tendance se confirme pour les 13 autres paramètres métaboliques mesurés.

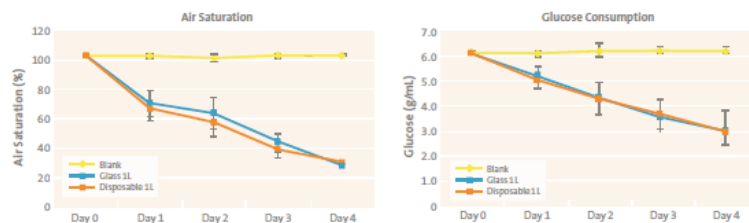


Figure 3: Left: Air saturation of CHO-S cultures taken over a 96 hour period. Right: Glucose consumption of CHO-S cultures sampled over a 96 hour period.  $\pm$  S.E. indicated by error bars;  $p < 0.05$ .

Pour vérifier la fonctionnalité des cellules dans les spinners à usage unique, nous avons mesuré la production d'anticorps IgG2a de souris, une protéine sécrétée par la lignée d'hybridome utilisée. Comme montré sur la Figure 4, aucune différence significative n'a été observée pour la production de protéines en spinners de 1L ou 3L. De plus, les quantités d'anticorps produites étaient identiques à celles obtenues dans les récipients en verre (résultats non montrés).

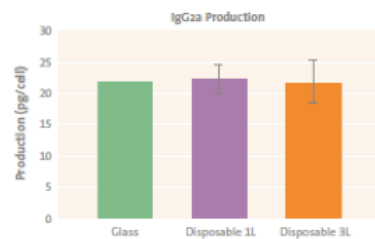


Figure 4: Mouse IgG2a production after 96 hour growth of MH677 cells in 1L control and disposable 3L spinner flasks from 3 studies at 30 rpm (n=6). For 1L control n=2 for glass and n=4 for plastic.  $\pm$  S.E. indicated by error bars;  $p < 0.05$ .

## Conclusions

- ▶ Les flacons spinners à usage unique de grand volume sont équivalents aux spinners en verre pour la croissance cellulaire et la viabilité.
- ▶ Divers types cellulaires peuvent être cultivés en flacons spinners à usage unique de grand volume.
- ▶ L'aération des cultures est équivalente entre les flacons spinners à usage unique et ceux en verre.
- ▶ Le métabolisme cellulaire n'est pas affecté par la culture en spinners à usage unique.
- ▶ Les cellules cultivées en spinner à usage unique produisent des quantités équivalentes de protéines sécrétées, comme les IgG2a de souris, par rapport aux cultures en spinners en verre.

