

# Corning® HYPERStack™ Cell Culture Vessel: Etude de performance

Note d'application



*Ana Maria P. Pardo, Vitaly Klimovitch, Ph.D., Rebecca Wood, Renée Gallagher, Hannah J. Gitschie et Mark Rothenberg, Ph.D. Corning Incorporated, Life Sciences, Kennebunk, Maine*

## Introduction

La production de grandes quantités de protéines recombinantes, d'anticorps, de virus, de vaccins et de cellules est généralement nécessaire pour les chercheurs et les fabricants dans le secteur des biotechnologies et de l'industrie pharmaceutique. Corning a développé une nouvelle gamme de systèmes de culture fermés et modulaires, conçue pour la culture de cellules adhérentes en grandes quantités. L'HYPERStack™ Cell Culture Vessel est issue de la technologie Corning HYPER (High Yield PERFORMANCE). Cette technologie brevetée, utilisant des films perméables aux gaz, élimine les espaces perdus entre récipients traditionnels ce qui permet d'augmenter les surfaces de culture cellulaire. L'HYPERFlask™ Cell Culture Vessel était la première application de cette technologie qui permet de fournir une surface de culture 1720 cm<sup>2</sup> (sur 10 couches) avec un encombrement identique à un flacon T175. La gamme HYPERStack™ présente approximativement le même encombrement que les chambres de culture empilées sur 2, 10 ou 40 niveaux avec les CellSTACK Cell Culture Chambers de Corning ou les Cell Factories de Nunc. Chaque module HYPERStack™ est composé de 12 chambres individuelles (ou «stackettes»), présentant un traitement Corning® CellBIND® Surface pour la fixation optimale des cellules. Un module individuel fournit 6000 cm<sup>2</sup> de surface de croissance. Les modules peuvent être assemblés pour former l'HYPERStack™- 36 couches (18 000 cm<sup>2</sup>) ou l'HYPERStack™-120 couches (60 000 cm<sup>2</sup>).



**Figure 1:** (A) HYPERStack™ 12 Cell Culture Vessel, (B) HYPERStack™ 36 Cell Culture Vessel, et (C) HYPERStack™ 120 Cell Culture Vessel.

Le système fermé et compact *HYPERStack™* Cell Culture Vessel le rend idéal pour la production à grande échelle de cellules, vaccins et protéines thérapeutiques. Pour démontrer les capacités de l'*HYPERStack™*, la croissance, la viabilité et la morphologie de plusieurs lignées cellulaires couramment utilisées ont été évaluées. De plus, l'environnement de croissance des cellules a été analysé au niveau des gaz dissous, des électrolytes, des nutriments et des métabolites cellulaires. Des environnements de croissance nécessitant ou non la présence de CO<sub>2</sub> ont été étudiés afin de déterminer l'utilisation de l'*HYPERStack™* dans des conditions de croissance différentes. La récupération après cryoconservation et l'évaluation des fonctions cellulaires ont également été déterminées après culture en *HYPERStack™* en utilisant la technique Corning® label-free Epic®. Enfin, les colorations au cristal violet ont permis de confirmer la distribution uniforme et l'adhérence des cellules ainsi que leur totale récupération après récolte.

## Matériel et méthodes

Tous les protocoles suivants incluent des contrôles témoins sur Corning HYPERFlask® Cell Culture Vessel et Corning CellBIND® Surface CellSTACK® Culture Chambers.

### Croissance et viabilité cellulaire

Les cellules CHOK1 (ATCC Cat. No CCL-61) et MDBK (ATCC Cat. No CRL-22) ont étéensemencées à 3000 cellules par cm<sup>2</sup> alors que les cellules HEK293 (ATCC Cat. No CRL-1573) ont étéensemencées à 5000 cellules par cm<sup>2</sup>. Les lignées ont été cultivées en utilisant en milieu IMDM (Mediatech, Inc Cat. No 10-016-CM), supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (PAA Laboratories, Inc Cat. No A15-201) préchauffé à température ambiante. Les suspensions cellulaires ont été préparées etensemencées en triplicat pour chaque type de produit (Tableau 1) à un volume de 0,217 ml/cm<sup>2</sup> pour atteindre des densités équivalentes pour chaque récipient. Les cultures sont maintenues dans un incubateur humidifié à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Des échantillons de milieu sont prélevés chaque jour et analysés sur Nova BioProfile® FLEX (Nova Biomedical Corporation) pour contrôler les électrolytes, la saturation en gaz, les nutriments et les métabolites de la culture. La morphologie cellulaire et la croissance ont été contrôlées visuellement en utilisant un microscope inversé Olympus (Olympus, Inc). En raison de la constitution de l'*HYPERStack™*, un dispositif HYPERViewer (Corning Cat. No 10045) a été utilisé pour visualiser les cellules.

Product	Cat. No.	Purpose	Surface Area (cm <sup>2</sup> )	Seed Volume (mL)
2 Layer CellSTACK Chamber*	3310	Standard Control (for 12 layer vessel)	1,272	276
10 Layer CellSTACK Chamber**	3320	Standard Control (for 36 layer vessel)	6,360	1,380
HYPERFlask Vessel	10024	HYPER Technology Control	1,720	373 (+ 190 mL media to fill)
HYPERStack-12 Vessel	10012	Test Vessel	6,000	1,300
HYPERStack-36 Vessel	10036	Test Vessel	18,000	3,900

\*Used as control when setting up HYPERStack-12 studies.

\*\*Used as control when setting up HYPERStack-36 studies.

**Tableau 1** : détails des consommables de culture utilisés.

Les cellules sont récoltées après de 96 heures d'incubation en utilisant de la trypsine/EDTA à température ambiante (Mediatech Inc. Cat. No 25-052-CV) contenant 0,1% de Pluronic® F68 (Mediatech Inc. Cat. No 13-901-CI). Afin de s'assurer que toutes les cellules ont été récupérées, un lavage supplémentaire au PBS a été effectué. Un récipient supplémentaire a été utilisé pour chaque étude et coloré avec une solution de cristal violet (Fisher Cat. No 23-750025) pour évaluer la distribution des cellules au niveau de chaque couche. Chaque étude a été répétée trois

fois de manière indépendante.

### **Croissance CO<sub>2</sub> indépendante**

Les cellules Vero (ATCC Cat. No. CRL-1586) ont été adaptées aux conditions sans CO<sub>2</sub> en les cultivant en milieu Leibowitz L15 (Lonza Cat. No. 12-700Q) complété avec 4 mmol de L-glutamine (Mediatech, Inc Cat. No. 25-005-CI) et 10% de sérum de veau fœtal (PAA Laboratories, Inc Cat. No A15-201). Les cellules ont étéensemencées dans chaque récipient à 3000 cellules par cm<sup>2</sup> dans 0,217 ml/ cm<sup>2</sup> (Tableau 1) en utilisant les contrôles indiqués précédemment. Pour maintenir un système indépendant du CO<sub>2</sub> pendant la culture, des chambres de culture CellSTACK ont été munis d'un bouchon fermé. Les cultures ont été maintenues pendant 96 heures dans une pièce chaude à 37° C et 20% d'humidité relative (HR). Des échantillons de milieu sont prélevés chaque jour et analysés sur Nova BioProfile FLEX. Les cultures ont été par ailleurs surveillées et récoltées comme décrit ci-dessus pour tester la croissance cellulaire.

### **Analyse fonctionnelle**

Des cellules HEK-293 fraîchement repiquées ont été utilisées pour ensemenecer des HYPERStack™-12 ou deux couches de CellSTACK Culture Chamber suivant la méthode décrite ci-dessus. Après avoir atteint 90% de confluence, les cellules ont été récoltées et les rendements cellulaires déterminés. La numération des cellules et la viabilité ont été déterminées par la méthode d'exclusion du bleu trypan en utilisant l'analyseur Nova BioProfile FLEX. Après analyse, les cellules ont été concentrées par centrifugation à 270 g pendant 7 min. Les culots cellulaires ont été resuspendus en milieu de congélation (10% DMSO + 90% de milieu de croissance) pour obtenir une concentration finale de 5,0x10<sup>6</sup> cellules par flacon et congelés. Afin d'évaluer les fonctions cellulaires, les cellules de chaque flacon ont été décongelées dans 3 mL de milieu de croissance complet préchauffé (10% de FBS, IMDM). La concentration et la viabilité cellulaire ont été déterminées après centrifugation à 220 g pendant 5 minutes pour éliminer les traces de DMSO. Les culots cellulaires ont été remis en suspension dans un milieu de croissance frais à une concentration finale de 6,0x10<sup>5</sup> cellules/ml. Une plaque Epic® 384 puits coatée avec de la fibronectine (Corning Cat. No. 5042) a été préchauffée à température ambiante, rempli de 10µl/puits de milieu de croissance, puis brièvement centrifugée pour éliminer l'air piégé. La moitié de la plaque Epic a été rempli avec 30µl/puits de suspension cellulaire provenant des HYPERStack™-12 et l'autre moitié avec 30 µl/puits de suspension cellulaire provenant des CellSTACK Culture Chamber. Après une brève centrifugation, les plaques ont été incubées pendant une nuit dans un incubateur humidifié à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Le jour suivant, les réponses cellulaires des HEK-293 au SFLLR (5 µM) (Bachem Cat. No. H-2938.0025), un antagoniste Par-1, ou au carbachol (50 µM) (Sigma Cat. No. C4382), un antagoniste aux récepteurs de l'acétylcholine, ont été évaluées en utilisant le dosage Epic® label-free.

## **Résultats**

### **Viabilité et croissance cellulaire**

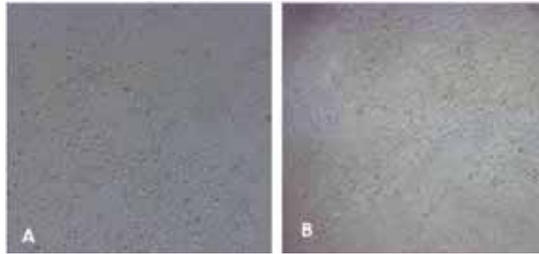
La capacité de l'HYPERStack™ Cell Culture Vessel à être utilisé comme système fermé pour la production à grande échelle de cellules adhérentes a été évaluée. L'utilisation des membranes perméables aux gaz développées par Corning permet la fabrication de récipients compacts, offrant des surfaces utiles de croissance plus élevées (en cm<sup>2</sup>) rapportées à l'encombrement dans l'espace, et qui permet une utilisation optimale du volume des incubateurs. En effet un récipient HYPERStack™-12 par exemple représente un volume d'encombrement identique à un

récepteur de culture de 2 étages mais offre une surface de croissance presque équivalente à un récepteur de culture de 10 étages. (Tableau 2).

Footprint	ISTACK® Chambers		Nunc Cell Factory Chambers		Corning HYPERStack™ Vessels	
	No. Layers	Surface Area (cm <sup>2</sup> )	No. Layers	Surface Area (cm <sup>2</sup> )	No. Layers	Surface Area (cm <sup>2</sup> )
2 Stack	2	1,272	2	1,264	12	6,000
10 Stack	10	6,360	10	6,320	36	18,000
40 Stack	40	25,440	40	25,280	120	60,000

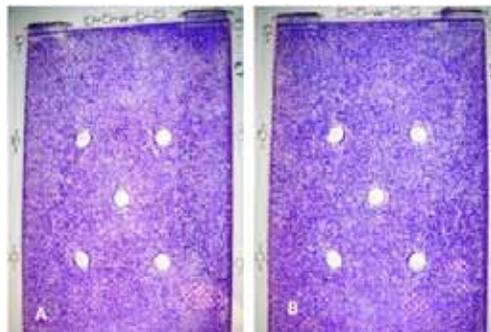
**Tableau 2** : comparaison des surfaces de culture.

La comparaison de l'*HYPERStack™* par rapport aux récepteurs de contrôle à tout d'abord été effectuée au niveau de la morphologie des cellules, le phénotype, la distribution et la croissance. L'observation microscopique n'a indiqué aucune différence visible dans la morphologie ou la distribution de cellules de même qu'aucune anomalie phénotypique visible (Figure 2).



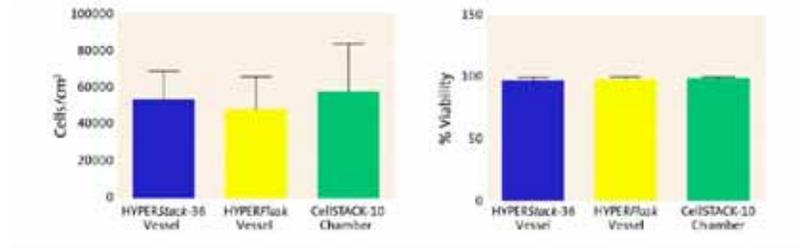
**Figure 2** : Analyse visuelle des cultures de cellules HEK-293; microscope inversé; grossissement 4 X.  
(A) 10-layer Cell STACK et (B) *HYPERStack™*-12 en utilisant l'appareil *HYPERViewer*.

Pour évaluer l'effet sur la morphologie, la densité et la distribution des cellules, les récepteurs ont été colorés avec du cristal violet. Le cristal violet est un colorant histologique qui fixe les cellules à la surface de croissance et les colore en violet. La coloration au cristal violet montre ici la distribution uniforme des cellules au sein des «stackettes» individuelles et sur les différents niveaux de l'*HYPERStack™* (Figure 3).

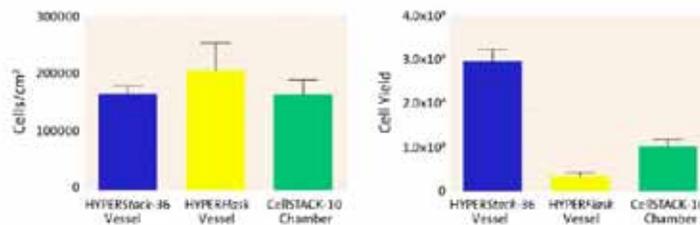


**Figure 3.** Analyse de la distribution cellulaire sur cellules MBDK colorées au cristal violet après 96 heures d'incubation. Couche 3 (A) et couche 8 (B) d'un récepteur *HYPERStack™*.

Des évaluations complémentaires ont été effectuées une fois la confluence des cultures atteinte et après récolte. L'exclusion du bleu trypan a été utilisée pour déterminer la densité et la viabilité cellulaire et les comptages ont été convertis en cellules/cm<sup>2</sup> pour comparer les trois types de récipients. Basé sur cette valeur de densité, les *HYPERStack™*s présentent des densités équivalentes aux récipients de contrôle, avec une viabilité cellulaire au-dessus de 95% (Figures 4 et 5). En outre, des rendements cellulaires totaux environ 3x plus élevés ont été observés avec les *HYPERStack™*s comparativement aux récipients contrôle pour un encombrement similaire (Figure 5).



**Figure 4.** Analyse de la croissance cellulaire des cellules HEK-293 cultivées en *HYPERStack™*-36, CellSTACK 10 couches et *HYPERFlask* après 96 heures d'incubation dans un incubateur humidifié à 37° C et 5% de CO<sub>2</sub>. Les T-tests par paire (valeurs 0.166 and 0.678) n'indiquent aucune différence statistique dans la densité cellulaire entre les récipients. Les données englobent neuf couples conditions/récipients à partir de 3 études indépendantes.



**Figure 5.** Analyse de la croissance cellulaire des cellules CHO-K1 cultivées en *HYPERStack™*-36, CellSTACK 10 couches et *HYPERFlask* après 96 heures d'incubation dans un incubateur humidifié à 37° C et 5% de CO<sub>2</sub>. Les T-tests par paire (valeurs 0.09 and 0.881) n'indiquent aucune différence statistique dans la densité cellulaire entre les récipients. Les rendements cellulaires totaux sont 3x plus élevés avec les *HYPERStack™*s par rapport aux CellSTACK 10 couches. Les données englobent 3 études indépendantes.

## Environnement cellulaire

Pour évaluer la performance de l'*HYPERStack™*, l'environnement de croissance a été contrôlé quotidiennement. Des échantillons de milieux ont été prélevés sur tous les récipients et analysés pour contrôler les électrolytes, les gaz dissous, les nutriments et les métabolites présents. La figure 6 montre par exemple les résultats issus des milieux de culture de CHO-K1 en *HYPERStack™*-12, CellSTACK 2 couches et *HYPERFlask™* sur une période de 96 heures de croissance. La figure 6A montre une équilibration classique des électrolytes dans le milieu de croissance qui est généralement complétée en 24 à 48 heures. La figure 6B montre une composition normale en nutriments et métabolites observée sur 96 heures de croissance. Les résultats montrent un appauvrissement en nutriments et une augmentation des métabolites en phase avec la prolifération cellulaire. La figure 6C indique une saturation en %CO<sub>2</sub> et %O<sub>2</sub> dans l'environnement de croissance. De façon identique aux électrolytes,

l'équilibration en CO<sub>2</sub> est complète après 24 à 48 heures. L'environnement de croissance en *HYPERStack™* est identique à celui de l'*HYPERFlask™*, qui est construite en utilisant la même technologie perméable aux gaz. Une fois l'équilibrage des milieux de croissance terminée, les deux récipients utilisant la technologie HYPER se comportent de manière comparable au contrôle CellSTACK, qui utilise l'interface classique gaz-liquide dans le récipient de culture.

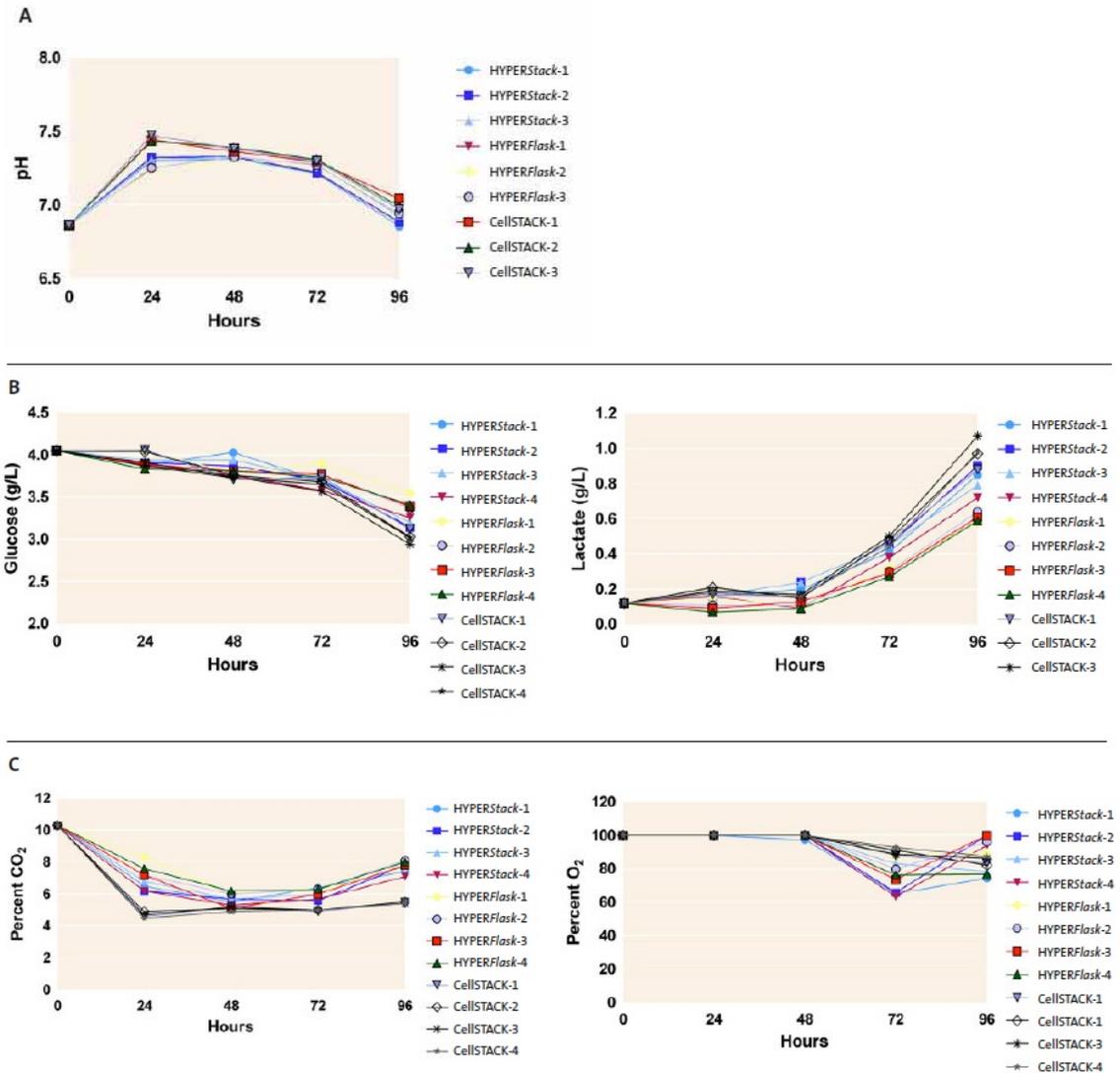
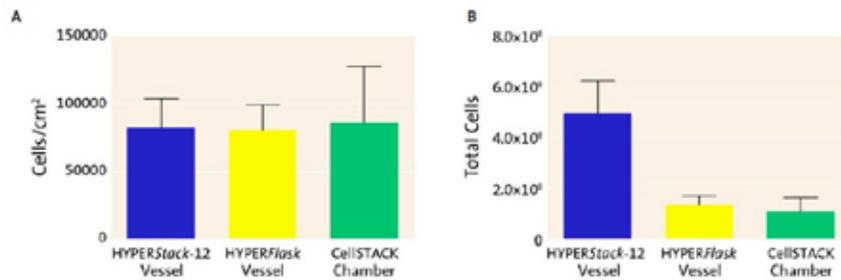


Figure 6. Analyse de l'environnement de croissance cellulaire des lignées CHO-K1 sur une période de 96 heures.

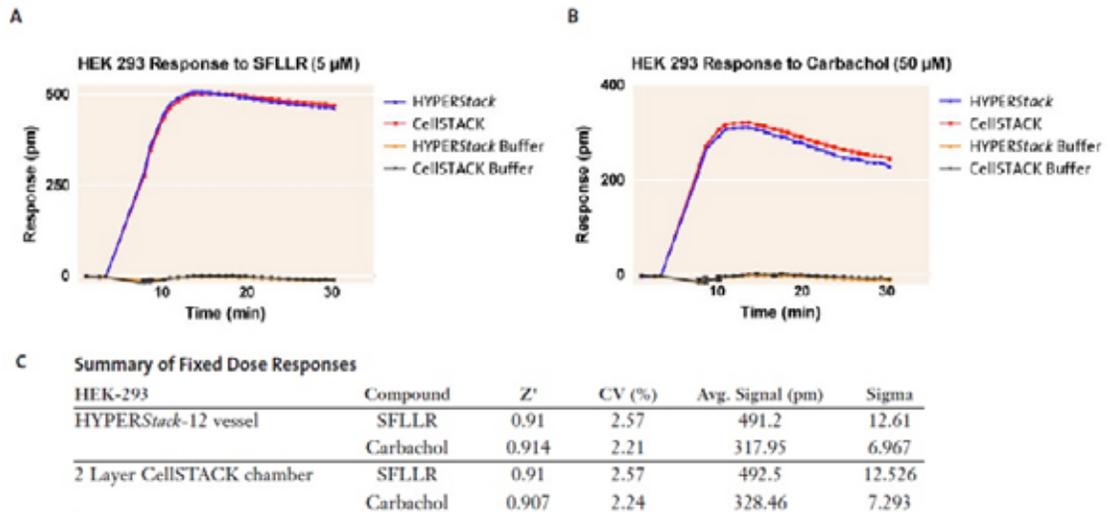
### Croissance indépendante du CO<sub>2</sub>

Pour de nombreux bioprocédés à grande échelle, les récipients utilisés pour les cultures sont incubés dans des chambres chaudes sous condition atmosphérique à cause de l'encombrement dû à l'ampleur des cultures. La possibilité d'utiliser l'*HYPERStack™* dans cet environnement peut être avantageux pour l'utilisateur en augmentant la production de cellules tout en diminuant le besoin d'espace supplémentaire dans les incubateurs. Grâce à la technologie HYPER de

Corning qui utilise un film perméable aux gaz, il est nécessaire d'utiliser des milieux indépendants du CO<sub>2</sub>, qui doivent être tamponnés sans l'utilisation de bicarbonate de sodium et compatible avec les conditions atmosphériques. Pour évaluer les performances de l'*HYPERStack™* dans un environnement de salle chaude, l'*HYPERStack™* et les récipients de contrôle ont été ensemencés avec des cellules Vero adaptées au milieu L-15. Le milieu L-15 est spécifiquement formulé pour permettre la croissance cellulaire dans les conditions de CO<sub>2</sub> atmosphériques par effet tampon des phosphates, des acides aminés non basiques, du galactose et du pyruvate de sodium. Basé sur le nombre de cellules/cm<sup>2</sup> récupérée par récipient et analysé en utilisant le T-test apparié, il n'y avait aucune différence significative (valeurs p-test; 0.643 pour l'*HYPERFlask™* et 0,660 pour le CellSTACK) entre le ratio de croissance observé dans les 3 récipients (Figure 7A). Le rendement total en *HYPERStack™* était 4x plus élevé que les empilements de récipients de contrôle de même encombrement (Figure 7B).



**Figure 7.** Croissance indépendante du CO<sub>2</sub> sur cellules Vero cultivées en pièce chaude en conditions atmosphérique sur une période de 96 heures.



**Figure 8.** Analyse Fonctionnelle sur cellules HEK-293 en utilisant la technologie Corning Epic® label-free

## Analyse fonctionnelle

En raison de l'environnement unique lié à la technologie HYPER, où les cellules se développent directement sur un film perméable au gaz, il est important d'identifier tout changement dans le comportement et la physiologie des cellules. La technologie Epic® label-free, méthode très sensible pour détecter tout changement dans la réponse cellulaire en utilisant un biocapteur optique, a été employée pour évaluer les changements fonctionnels dans les cellules cultivées à partir de deux récipients différents. En utilisant La technologie Epic® label-free, nous avons évalué les changements dans la physiologie des cellules HEK-293 après challenge avec le SFLLR (5 µM), un antagoniste Par-1, et le carbachol (50 µM), un antagoniste aux récepteurs de l'acétylcholine. Après l'addition du composé de test, les réponses à ces stimuli ont été comparées après une croissance initiale en récipients *HYPERStack™* ou CellSTACK. Les cellules HEK-293 ont été ensuite congelées puis décongelées et immédiatement utilisées dans un essai de réponse cellulaire. Les résultats n'indiquent aucune différence statistique significative des fonctions cellulaires en réponse au SFLLR ou au carbachol entre les cellules provenant de l'*HYPERStack™* ou du CellSTACK (figure 8A et 8B). De plus, les valeurs ne montrent aucune différence sur deux paramètres importants en lien avec la fiabilité du dosage: le %CV et les valeurs Z' (figure 8C). S'il y avait un impact sur la santé et la physiologie des cellules, ces deux mesures devraient être indirectement altérées.

## Résumé des analyses

- Les performances de l'*HYPERStack™* sont comparables à celles de l'*HYPERFlask™* et du CellSTACK au niveau des conditions de croissance, de la morphologie cellulaire et du rendement exprimé en nombre de cellules/cm<sup>2</sup>.
- L'*HYPERStack™* permet de produire 2,5 à 3 x plus de cellules que les récipients de contrôle pour un encombrement équivalent.
- Dans le cas de l'utilisation d'un milieu de culture indépendant du CO<sub>2</sub>, L'*HYPERStack™* peut être utilisé avec succès dans une pièce chaude pour la production de grandes quantités de cellules adhérentes ou de produits cellulaires.
- Les cellules après culture en *HYPERStack™* sont comparables à celles obtenues en chambre CellSTACK au niveau de leur réponse cellulaire analysée avec le système Corning Epic® label-free.