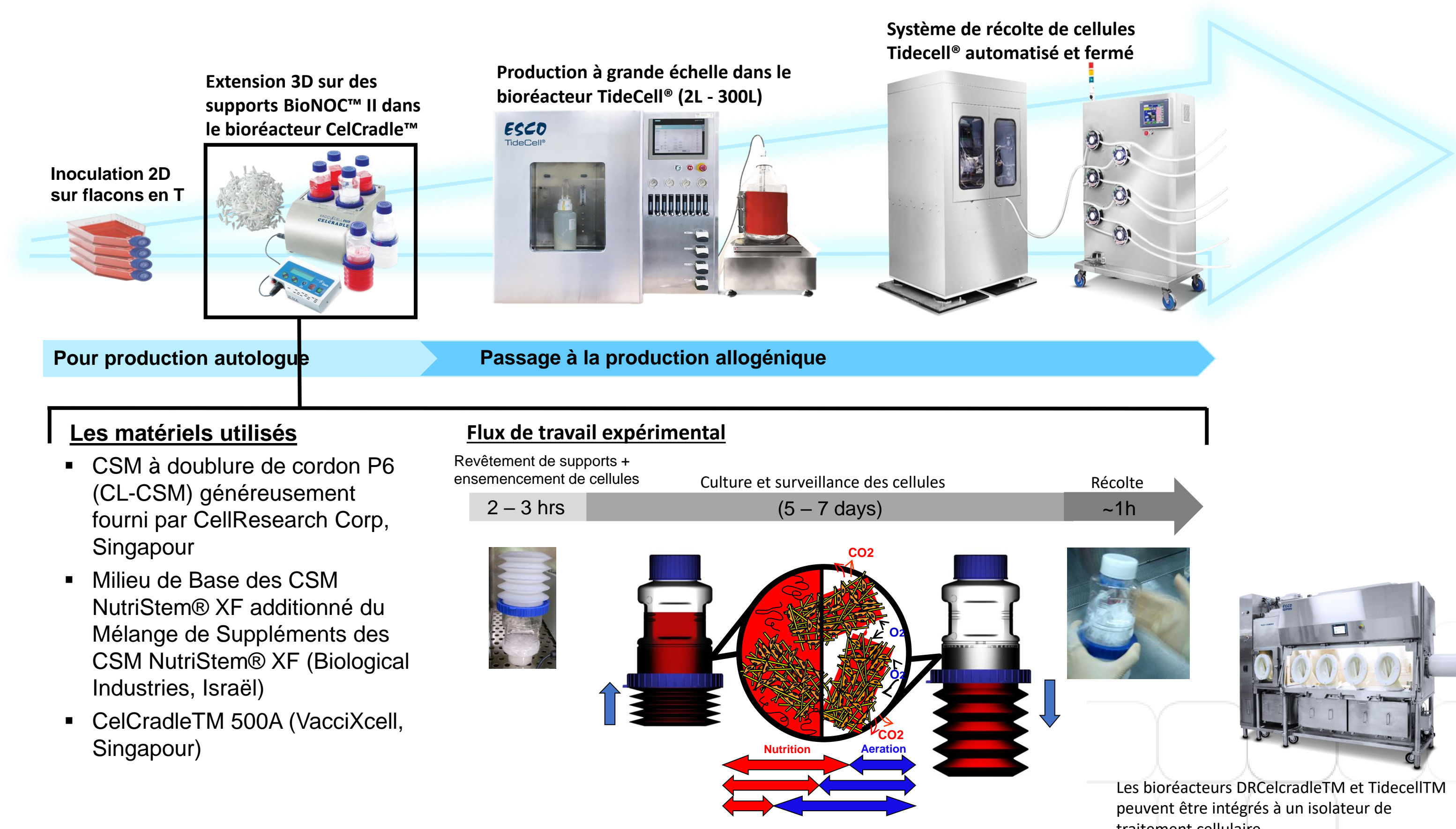


INTRODUCTION

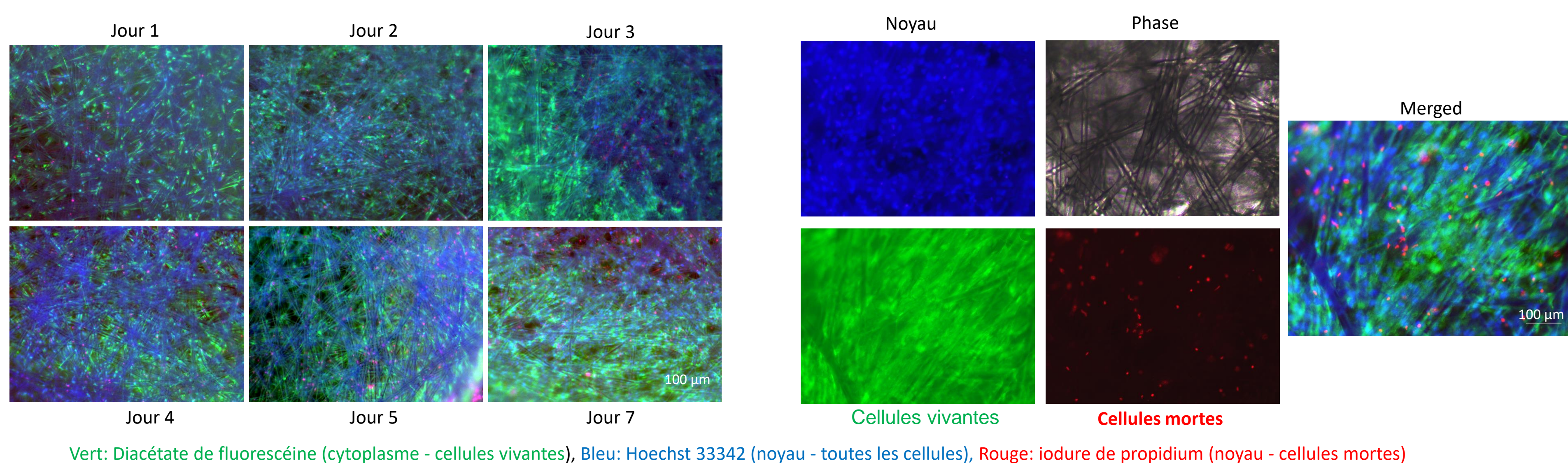
Les cellules souches mésenchymateuses humaines (CSM) ont suscité un grand intérêt médical en tant que nouvelle option thérapeutique ou de traitement et ont ouvert la voie à une nouvelle ère de la médecine régénérative. Cependant, la culture conventionnelle dans des boîtes en plastique et en suspensions est difficile à augmenter la production de CSM pour des applications cliniques. Pour relever ces défis, Esco Aster s'est appuyé sur les bioréacteurs de Mouvement de Marée pour développer une opération des bioprocédés évolutive pour la production des CSM dans un processus conforme aux bonnes pratiques de fabrication (BPF). Les CSM humaines isolées provenant de donneurs sains ont été développées dans des cultures adhérentes 2D conventionnelles pendant quelques passages avant d'être ensemencées dans des micro-supports (BioNOC™ II) dans une bouteille de CelCradle™. Les cellules ont été cultivées dans des milieux chimiquement définis et des rendements de récolte supérieurs à 90% ont été atteints, avec des viabilités cellulaires supérieures à 85% après 5-7 jours de culture. Conformément à la Société Internationale de Thérapie Cellulaire (ISCT), les critères de contrôle de la qualité et de libération des CSM caractérisés par leurs marqueurs de surface et leur multipotence (différenciations adipogéniques, ostéogéniques et chondrogéniques) garantissent plus de 95% des CSM en culture. De manière importante, les CSM cultivées sur le BioNOC™ II présentaient des caractéristiques in vivo similaires, avec des sécrétions de protéines de la matrice extracellulaire (MEC) et des modifications morphologiques fibroblastiques. Notre processus actuel est robuste et repose sur des outils de biotraitement standard dans la plupart des usines de fabrication en sous-traitance (CMOs). En surveillant et en optimisant les paramètres clés du processus, tels que le pH et les taux de consommation de glucose, nous visons à traduire facilement la production à l'échelle de laboratoire issue de la R&D universitaire / industrielle en une échelle de référence / pilote pour des essais cliniques et une production commerciale.

Développement du Processus



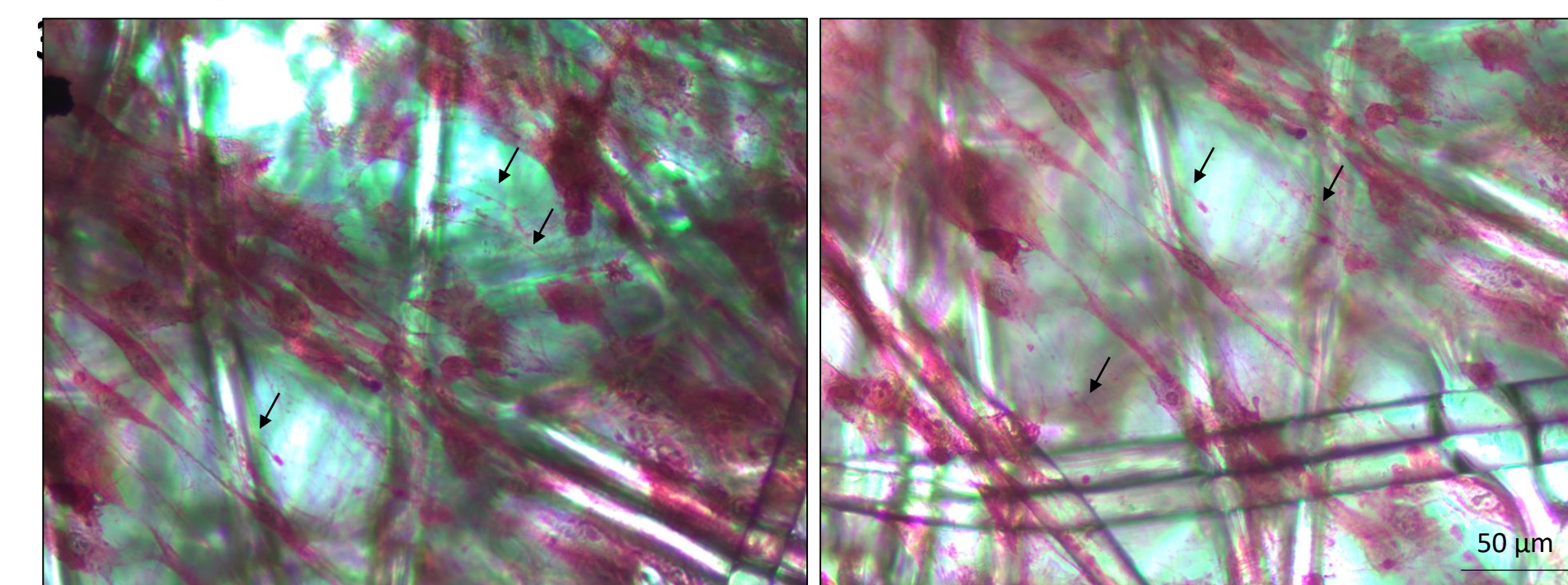
RÉSULTATS

SURVEILLANCE DE L'EXPANSION DES CSM DANS CELCRADLE™



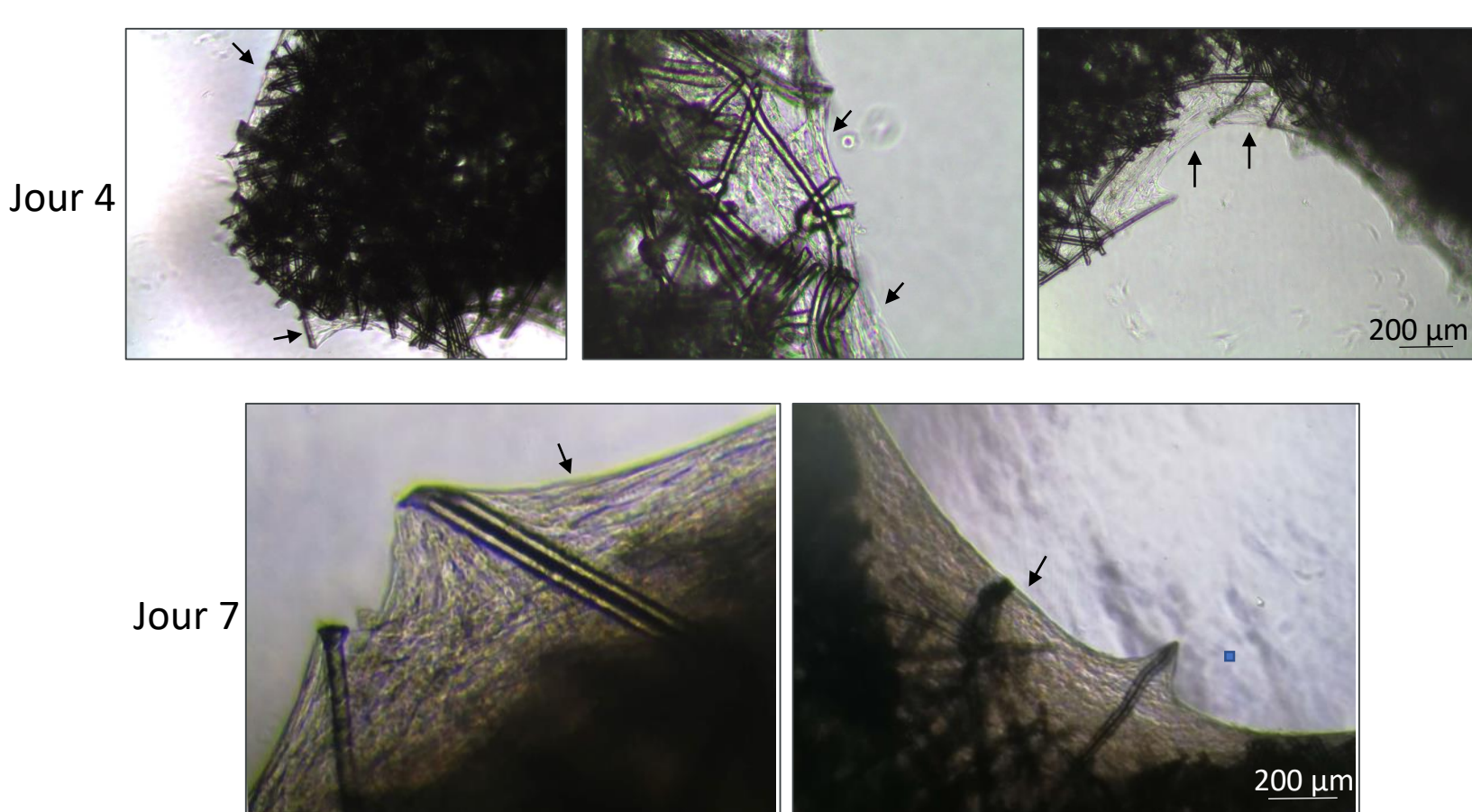
FORMATION DES MEC

Montage des Réseaux de Fibrilles de MEC sur BioNOC™ II



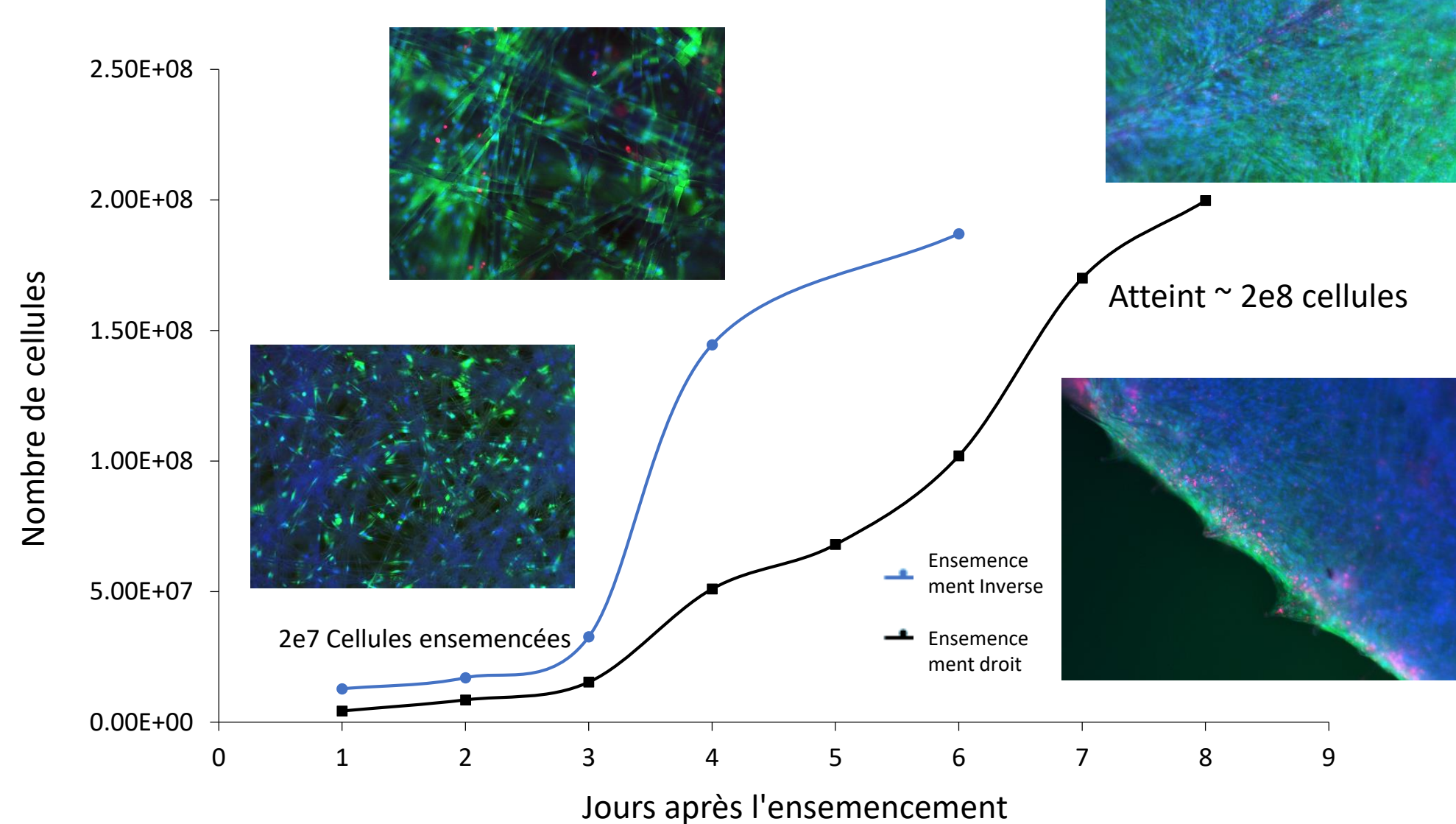
Les flèches noires pointent vers les MEC dans les CL-CSM cultivées pendant 4 jours dans BioNOC™ II - coloration des fibres de collagène au rouge picrosirius

Confluence élevée des CSM dans BioNOC™ II

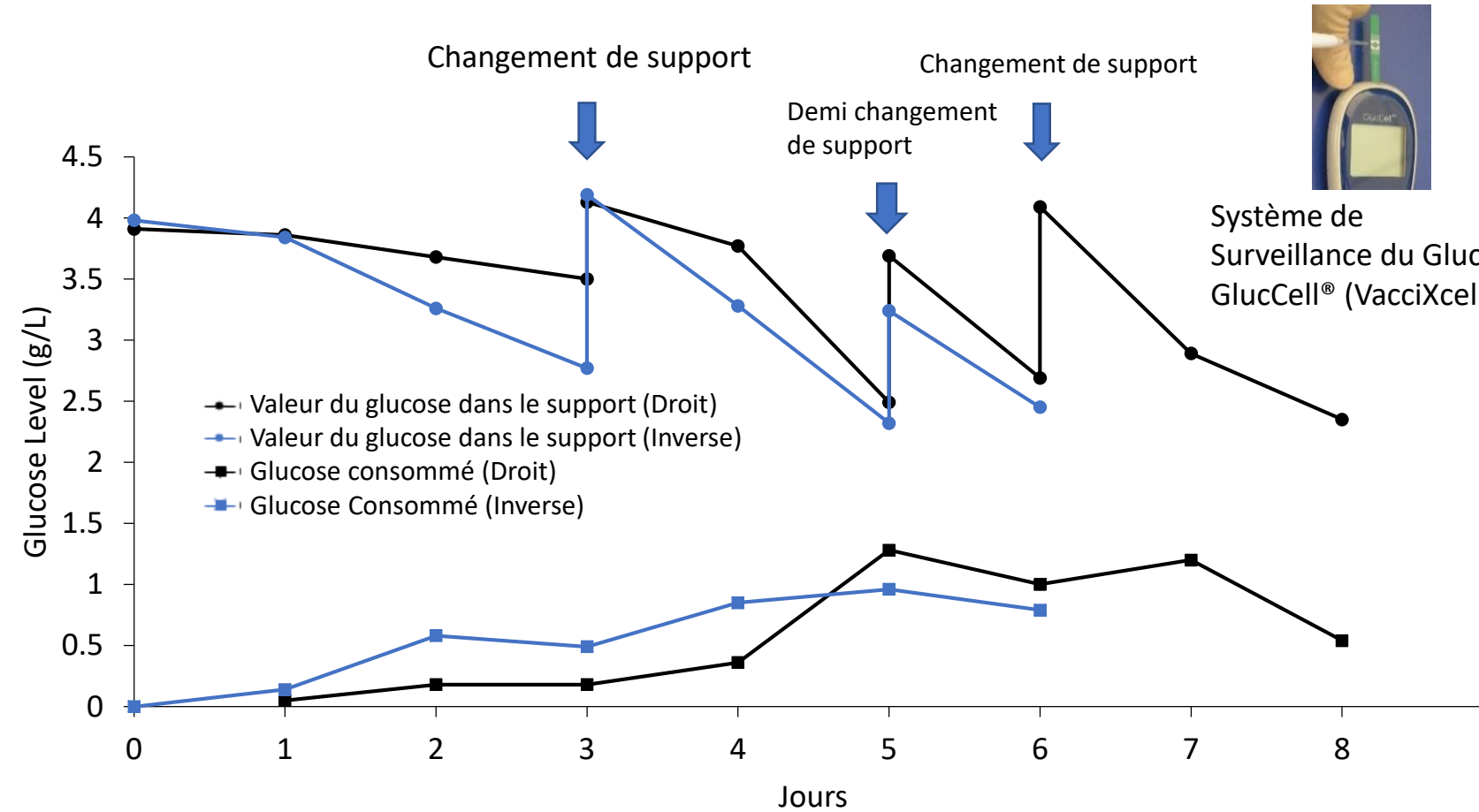


Les cellules peuvent être observées dépassant du bord lorsqu'elles sont en confluence élevée – un indicateur de cellules atteignant une croissance maximale

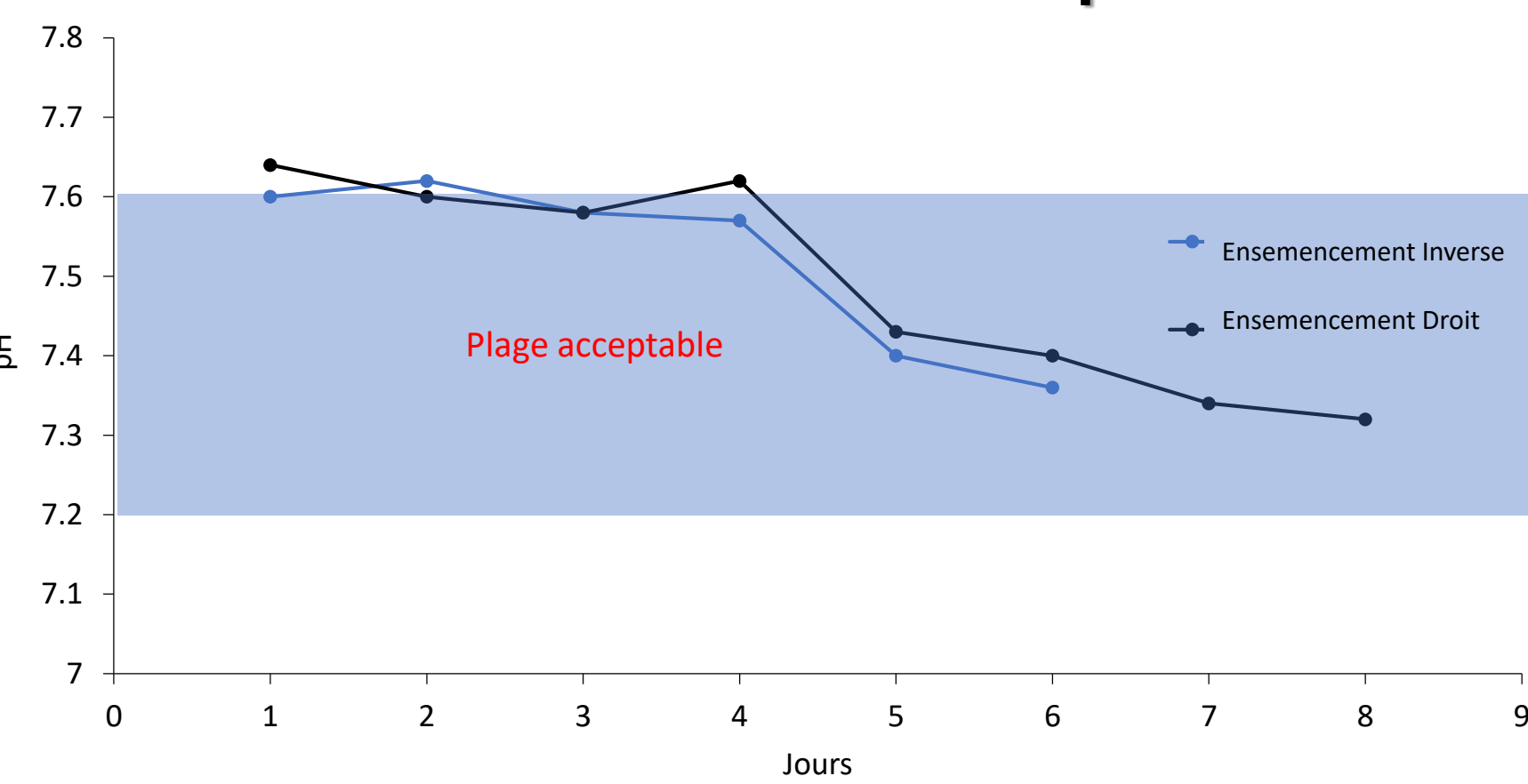
Croissance Cellulaire dans le CelCradle



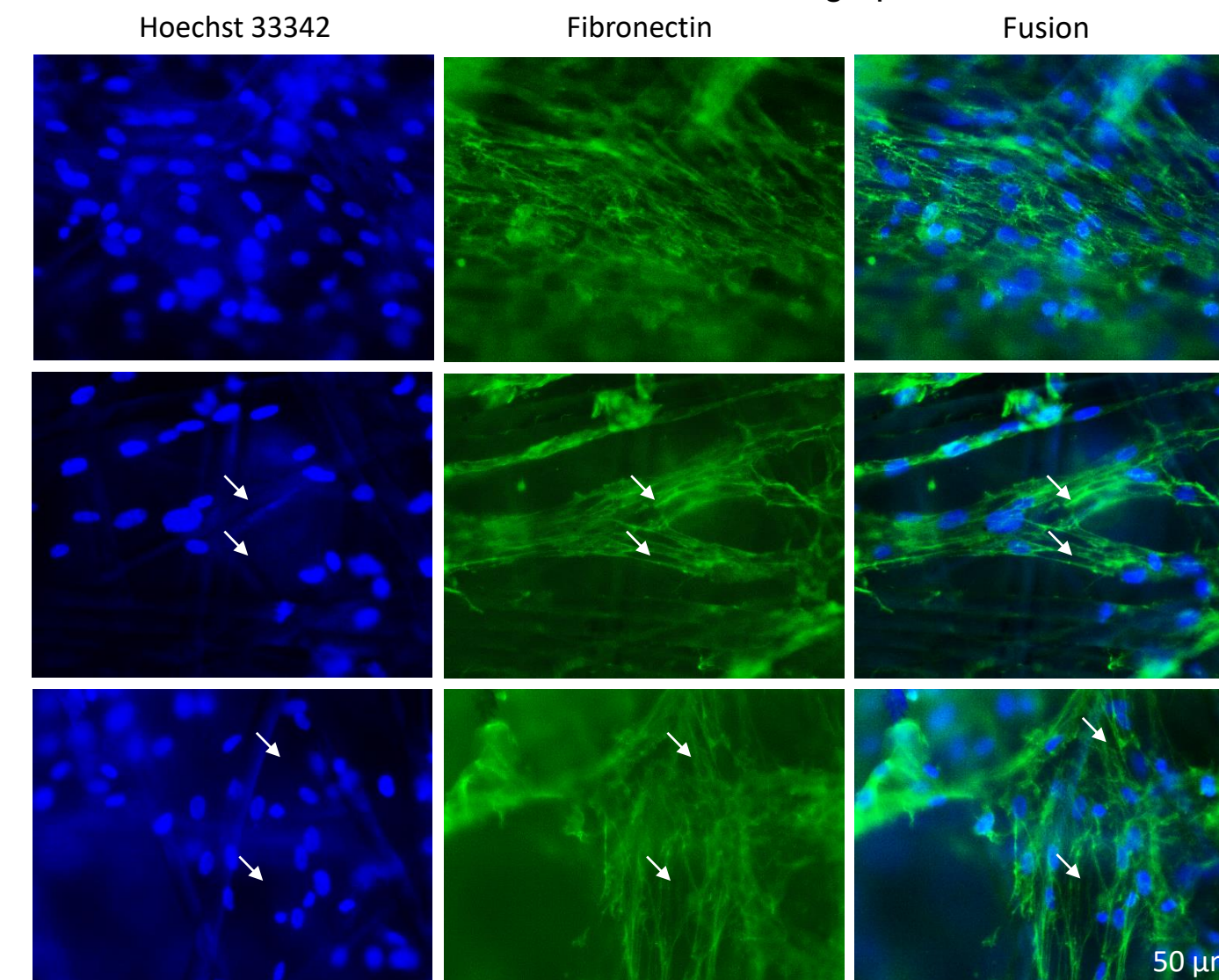
Consommation de Glucose



Surveillance du pH

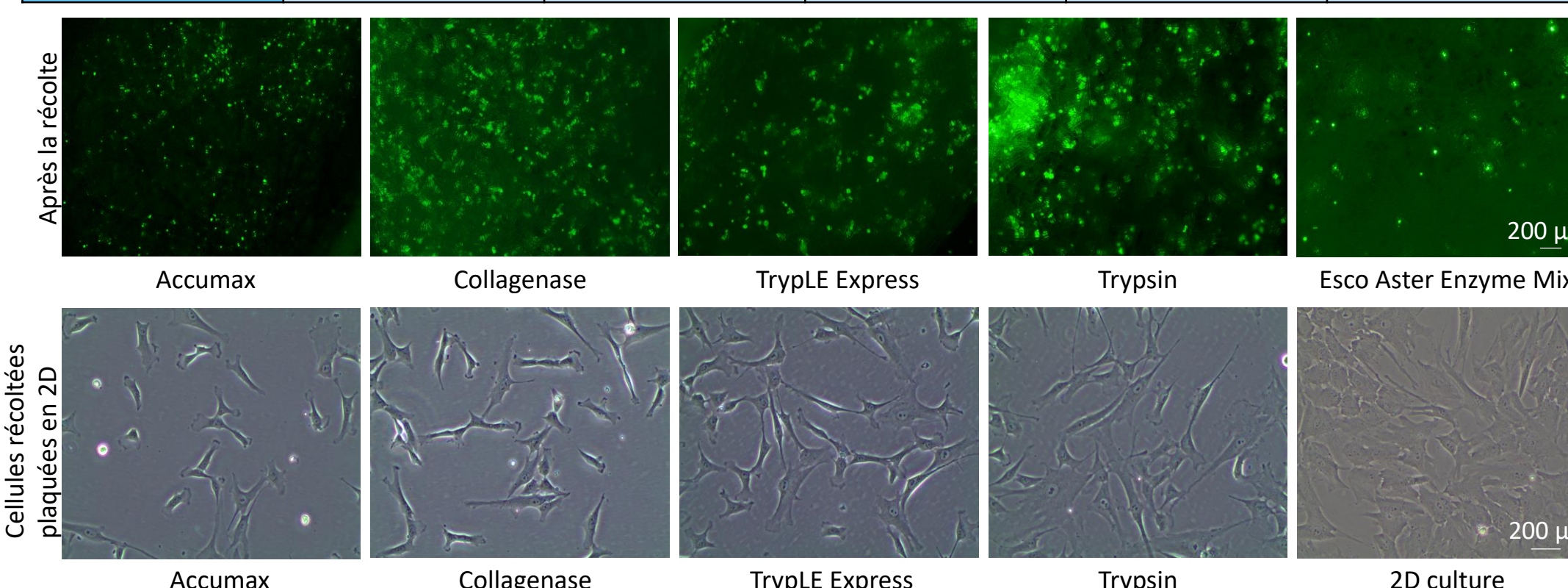


MEC-Fibronectine sécrétée par les CSM



RÉCOLTE DE CELLULES

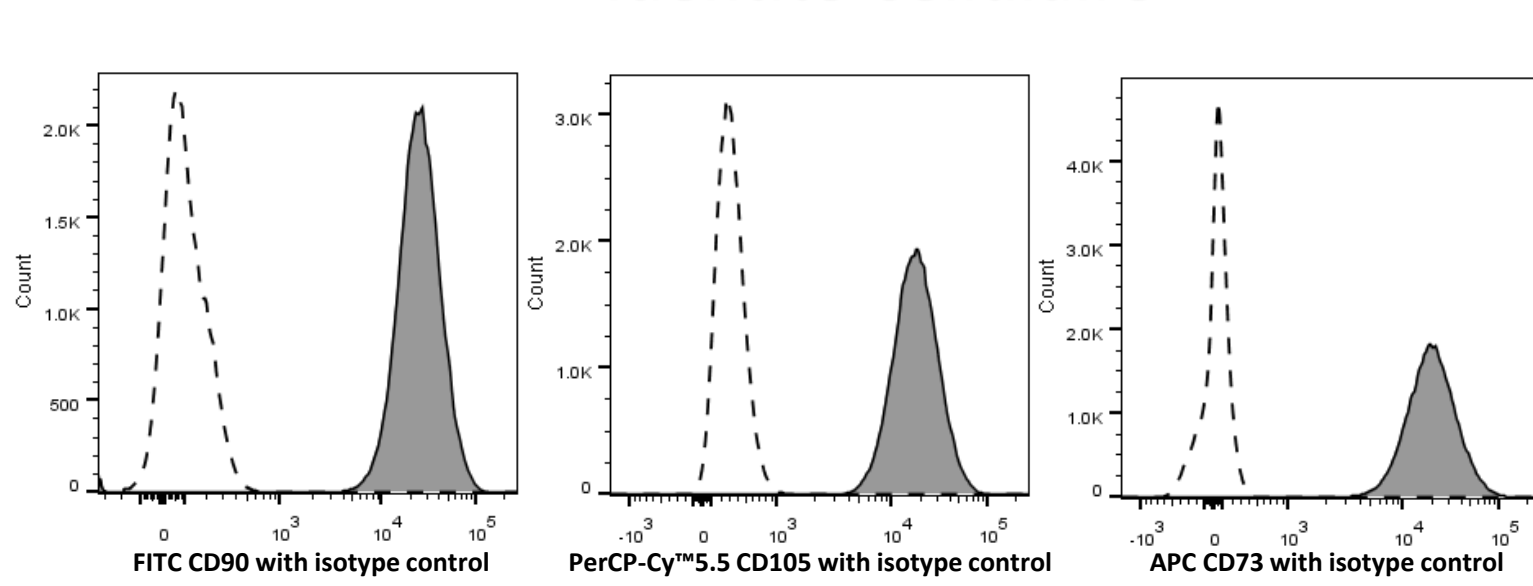
Enzymes	Accumax™	Collagenase	TrypLE™ Express	Trypsin	Esco Aster Enzyme Mix
Récolte (%)	87	68.3	78.3	56.3	91.8
Viabilité (%)	95.6	73.2	95.8	88.9	93.5



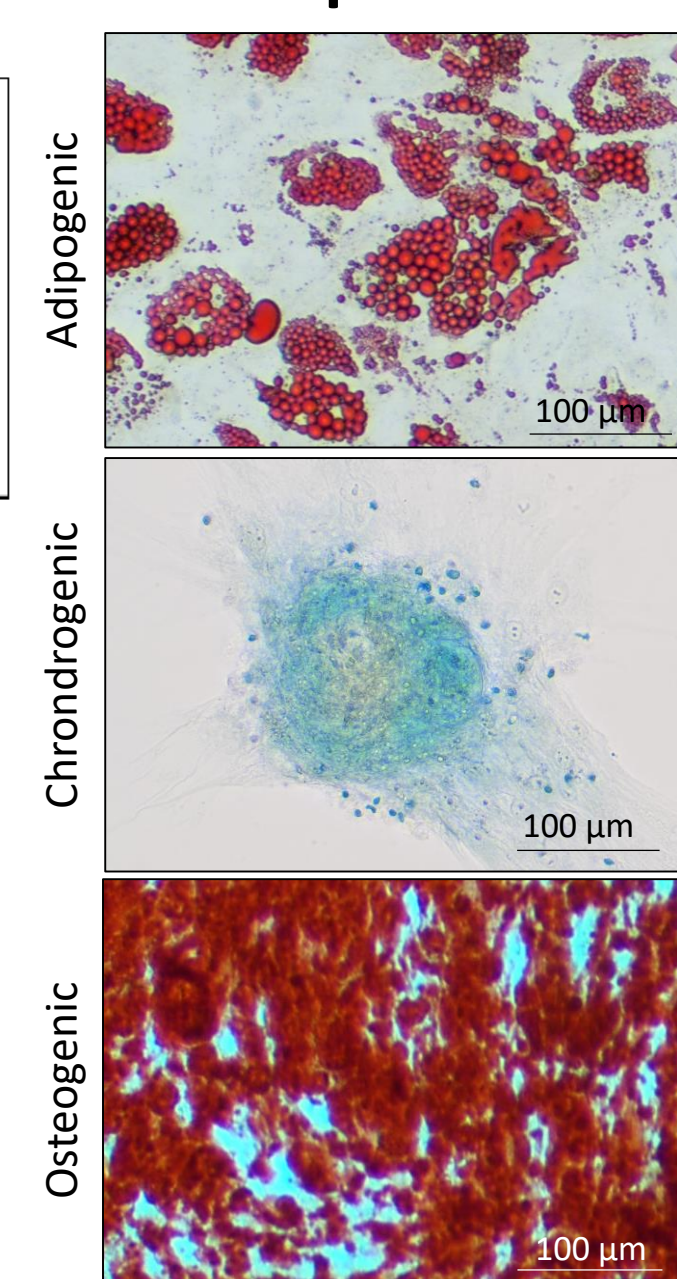
* L'efficacité de la récolte varie selon le type de cellules souches et le cocktail d'enzymes utilisés

CONTRÔLE DE QUALITÉ & CRITÈRES DE LIBÉRATION

Identité Cellulaire



Multipotence



Les CL-CSM récoltées dans BioNOC II à P7

Name	Statistic	#Cells
Specimen_001_sample_001.fcs	100000	
P1	66.2	66207
CD73+ CD90+	99.6	65923
CD73+ CD105+	99.8	65789
CD34- CD45- HLA-DR-	98.5	64787

98,5% des CSM conservent le caractère souche dans le BioNOC II 3D

CONCLUSIONS

- Bioréacteur à lit fixe à usage unique, facilement transposable de la table à l'échelle industrielle
- Opérations de train de semences simplifiées
- Expansion des CSM dans un Processus Conforme aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) en vigueur

Facteur / Attribut	Performance des CSM
Attachement des Cellules	Efficacité d'ensemencement élevée > 90% Revêtement en fibronectine pour supports sans sérum (convient à la production de GMPC)
Croissance et Surveillance des Cellules	Facilité de visualisation des cellules sur la matrice via les taches de colorants Confluents obtenues aux jours 5 à 8 Contrôle et surveillance des paramètres de processus
Récolte des Cellules	> 90% de cellules récoltées avec les enzymes propriétaires d'Esco Aster appropriés
Sécrétion d'ECM	Fibronectine et collagène observés Plus pertinents pour les conditions in vivo avec croissance 3D
Qualité des Cellules	Caractère souche et différenciation de tri-lignage de la Viabilité préservée des récoltes de CSM > 90%, avec des cellules saines obtenues après la récolte

Comparaison des cultures 2D et 3D de BioNOC™ II CSM @ P6

Paramètre	2D	3D
Morphologie cellulaire	Polyédrique	Broche en forme de fibroblastique comme
Densité cellulaire	2,5 millions / flacon T75	2e8 cellules/ CelCradle™
Utilisation des supports	15 ml	500 ml
Nombre de cellule: utilisation du support	166,000 cellules: 1 ml	400,000 cellules: 1 ml
Pour obtenir 2e8 cellules	80 flacons T75 avec support de 1200 ml	1 CelCradle™ avec support de 500 ml
% de rétention cellulaire caractère souche	79%	98%

Les CSM sont capables d'obtenir une expansion environ 10 fois supérieure sur le CelCradle™

Ensemencement actuel entre 2-3e7 cellules par CelCradle™ pour obtenir 2e8 cellules. Projeté pour obtenir 4e9 cellules dans le TideCell® de 2L et 9e12 cellules dans le TideCell® de 300L

* La densité finale varie en fonction de l'âge, de la source des cellules souches et du type de support utilisé