

Valutazione dell'equilibrio bioenergetico e della capacità respiratoria di riserva di cellule T mediante analisi del flusso extracellulare

Autori

Jessica Walls e
Natalia Romero
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

Il kit per il fenotipo metabolico delle cellule T Agilent Seahorse XF è una soluzione affidabile per la valutazione completa in tempo reale del metabolismo delle cellule T. Il metabolismo si è messo in luce come un elemento chiave nel governare la sorte e la funzione delle cellule T. In effetti è stato dimostrato che la riprogrammazione metabolica delle cellule T può essere utilizzata come strategia per migliorare l'efficacia antitumorale di terapie a base di cellule T adottive. Il kit per il fenotipo metabolico delle cellule T XF consente la misurazione simultanea dell'attività glicolitica e mitocondriale in popolazioni di cellule T, combinata con la misurazione della capacità respiratoria mitocondriale. Questi parametri sono stati messi in correlazione con la funzione ottimale e una migliore persistenza delle terapie a base di cellule T. Precedentemente, la misurazione della capacità respiratoria mitocondriale mediante FCCP richiedeva l'ottimizzazione della concentrazione a seconda di tipo di cellule, stadio di differenziazione, donatore e stato di salute o malattia. Il kit per il fenotipo metabolico delle cellule T XF utilizza un disaccoppiante migliorato (BAM15) per misurazioni più uniformi ed accurate della capacità bioenergetica di cellule T con una minore necessità di ottimizzazione della concentrazione rispetto a FCCP. Questa nota applicativa evidenzia inoltre l'uso del kit nel valutare l'impatto della composizione del terreno di coltura durante l'espansione di cellule T secondo il flusso di lavoro di analisi di persistenza di cellule T XF. Tale flusso di lavoro consente la valutazione simultanea dell'attività e capacità glicolitica e mitocondriale, fornendo un profilo metabolico completo delle cellule T che può essere incorporato nel monitoraggio e miglioramento di design e sviluppo di terapie a base di cellule T.

Introduzione

Lo sviluppo di immunoterapie mediate da cellule ha rivoluzionato la ricerca sul cancro nonché lo studio del sistema immunitario. Uno dei tipi più promettenti di terapia cellulare comporta l'ingegneria genetica di innovative cellule CAR-T (cellule T esprimenti un recettore chimerico per antigene) per colpire cellule tumorali. Vi sono forti evidenze a sostegno dell'ipotesi che le proprietà metaboliche delle cellule T (cioè il modo in cui le cellule T fanno fronte alla domanda bioenergetica) svolgano un ruolo essenziale nel regolare la loro funzione antitumorale e nel determinare l'efficacia di immunoterapie a base di cellule T.¹

Le cellule T subiscono una serie di modificazioni del loro fenotipo metabolico, durante l'attivazione e la differenziazione in cellule effettrici e di memoria, che sono critiche per il mantenimento della funzione delle cellule T.² Le cellule T naïve sono in stato quiescente, con una bassa domanda metabolica soddisfatta principalmente mediante la respirazione mitocondriale. La stimolazione dell'antigene induce l'uscita dallo stato quiescente, un rapido aumento del prelievo di nutrienti, un aumento del metabolismo anabolico e una riprogrammazione del metabolismo mitocondriale. Queste modificazioni metaboliche sono critiche per il supporto di una rapida proliferazione e differenziazione delle cellule T per produrre citochine o molecole che innescano la citotossicità. Dopo aver rimosso con successo lo stimolo antigenico, le cellule T di memoria differenziate restanti ritornano a un fenotipo più quiescente supportato principalmente dall'attività mitocondriale e dall'elevata capacità respiratoria di riserva (SRC, spare respiratory capacity). In condizioni di stimolazione cronica o in un ambiente metabolicamente ristretto, le cellule T possono diventare metabolicamente disfunzionali, uno stato noto come esaurimento delle cellule T in cui le cellule T manifestano una capacità bioenergetica mitocondriale e una funzione effettrice diminuite (Figura 1).

Per via del forte impatto della modulazione metabolica sulla sorte e la funzione delle cellule T, la determinazione delle firme metaboliche di terapie a base di cellule CAR-T e altre cellule T adottive può svolgere un ruolo cruciale nel definire la persistenza e la funzione antitumorale di cellule T. Inoltre la modulazione o riprogrammazione dei percorsi metabolici delle cellule T può essere utilizzata come strategia per migliorare l'efficienza antitumorale delle cellule T.

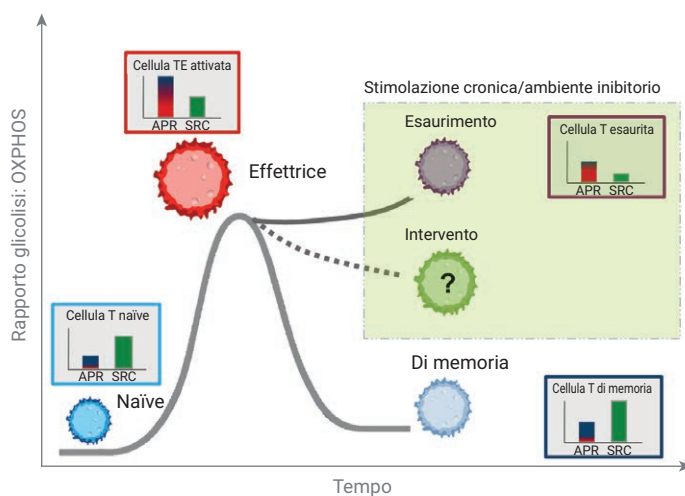


Figura 1. Aspetti fondamentali del metabolismo energetico delle cellule T con misurazioni dei fenotipi metabolici delle cellule T, in cui è illustrata una relazione tra il rapporto glicolisi/OXPHOS e sorte, idoneità e funzione della cellula. In condizioni di stimolazione cronica o in presenza di un ambiente inibitore come il microambiente tumorale, le cellule T possono svilupparsi in un fenotipo esaurito con funzione mitocondriale compromessa.

La caratterizzazione completa dei percorsi bioenergetici glicolitico e mitocondriale in cellule T in differenti stadi della vita di una cellula T, come anche le informazioni riguardo agli adattamenti metabolici ad ambienti cellulari differenti o segnali di stress, costituiscono risultati fondamentali per ottimizzare le terapie a base di cellule T e migliorare la potenza antitumorale dei prodotti immunoterapici. Progettata per indagare simultaneamente la funzione glicolitica e mitocondriale in cellule vive, la tecnologia Agilent Seahorse XF rappresenta una delle più importanti piattaforme utilizzate per studiare il metabolismo delle cellule immunitarie e ha contribuito in modo fondamentale all'attuale comprensione dell'immunometabolismo e al riconoscimento del ruolo fondamentale delle modificazioni metaboliche che si verificano durante l'attivazione e differenziazione delle cellule T.^{3,4}

Questa nota applicativa presenta il nuovo kit per il fenotipo metabolico delle cellule T Agilent Seahorse XF, progettato per consentire simultaneamente l'acquisizione di affidabili misurazioni dell'attività glicolitica e mitocondriale in popolazioni di cellule T, in combinazione con la capacità respiratoria mitocondriale. Queste misurazioni forniscono una caratterizzazione completa del profilo metabolico delle cellule T con un'unica analisi e possono essere usate per cercare correlazioni con una maggiore o minore funzione antitumorale di prodotti terapeutici a base di cellule T. Queste misurazioni possono risultare particolarmente preziose durante processi di sviluppo della terapia mirati a migliorare la persistenza delle cellule T o a evitare l'esaurimento metabolico post-attivazione nel microambiente tumorale.

Panoramica delle prestazioni del disaccoppiante mitocondriale utilizzato nelle cellule T

Lo studio della funzione mitocondriale delle cellule T mediante il test di stress mitocondriale Agilent Seahorse XF in combinazione con gli analizzatori Agilent Seahorse XF ha fornito le conoscenze fondamentali sul metabolismo energetico delle cellule T e sul suo ruolo nel determinare la sorte e la funzione delle cellule T.^{3,4} Il kit di test dello stress mitocondriale delle cellule Agilent Seahorse XF combina una serie di reagenti che consentono una caratterizzazione completa della funzione mitocondriale. In particolare, iniezioni in sequenza di un inibitore della sintesi dell'ATP (oligomicina), un disaccoppiante mitocondriale (carbonil cianuro *p*-(trifluorometossi)fenil idrazone, FCCP) e un inibitore mitocondriale (miscela di rotenone e antimicina A (rot/AA)) consentono il calcolo in cellule intatte del tasso di consumo di ossigeno associato alla produzione di ATP mitocondriale (respirazione ATP-linked), della respirazione massima disaccoppiata come anche della SRC, cioè della differenza tra la respirazione basale e la capacità respiratoria massima. Tali parametri sono stati ampiamente utilizzati per caratterizzare la funzione mitocondriale di popolazioni differenti di cellule T e per descrivere i processi che migliorano la potenza antitumorale delle cellule T.⁵⁻⁷ Nonostante l'ampio impiego di questa analisi nel campo dell'immunometabolismo, il suo utilizzo nelle cellule T presenta tuttavia alcune difficoltà, in primo luogo per via dell'utilizzo del disaccoppiante protonoforo FCCP.

Vi sono svariate ragioni per cui l'uso di FCCP con cellule T (e possibilmente con altre cellule immunitarie) non è ideale. In primo luogo, la concentrazione ottimale di FCCP varia in base a molti fattori, inclusi il tipo di cellula immunitaria, lo stadio di differenziazione, il donatore e lo stato di malattia. Se tale concentrazione non viene titolata od ottimizzata per ogni singolo esperimento, è possibile che la capacità respiratoria massima venga sottostimata. In secondo luogo, nelle cellule T naïve e in alcune altre cellule T differenziate, il tasso di consumo di ossigeno (OCR, oxygen consumption rate) dopo l'esposizione a FCCP non è stabile, il che dà come risultato un'elevata variazione tra le misure e potenzialmente la refertazione di un valore sottostimato della capacità respiratoria massima.

L'uso di FCCP nel test XF di stress mitocondriale delle cellule limita inoltre la capacità dell'analisi di fornire misurazioni quantitative dell'attività glicolitica, ovvero del tasso di produzione di ATP glicolitico. Il calcolo del tasso di produzione di ATP glicolitico usando misurazioni ECAR (tasso di acidificazione extracellulare) Seahorse XF richiede la correzione per il contributo della CO₂, che viene stimato utilizzando misurazioni di OCR basale ed OCR dopo l'aggiunta di rot/AA.⁸ Quando tuttavia si utilizza FCCP prima di rot/AA nell'analisi, è possibile che il contributo della CO₂ venga sottostimato, con effetti sulla quantificazione dell'attività glicolitica. Ciò è particolarmente importante nel caso di cellule che sono altamente ossidative, vale a dire cellule che per ottenere energia fanno affidamento principalmente sulla fosforilazione ossidativa (OXPHOS, oxidative phosphorylation) mitocondriale, in cui il contributo della CO₂ all'ECAR non è trascurabile.

La valutazione simultanea del tasso di produzione di ATP mitocondriale e del tasso di produzione di ATP glicolitico consente di caratterizzare la domanda energetica cellulare basale (cioè il tasso di produzione di ATP cellulare totale) e l'equilibrio metabolico basale (vale a dire il rapporto tra il tasso di produzione di ATP glicolitico e quello di ATP mitocondriale). Si tratta di parametri critici per determinare la sorte e la funzione delle cellule T, che tuttavia non sono forniti dal test di stress mitocondriale delle cellule XF, dando come risultato una caratterizzazione incompleta della bioenergetica delle cellule T.

Sviluppo del nuovo kit per il fenotipo metabolico delle cellule T Agilent Seahorse XF

Per consentire l'acquisizione simultanea di misurazioni bioenergetiche accurate, coerenti e quantitative sia per l'attività glicolitica che per quella mitocondriale in popolazioni di cellule T, è stato sviluppato il kit per il fenotipo metabolico delle cellule T Agilent Seahorse XF. Questo kit consente misurazioni accurate della capacità respiratoria massima in cellule T utilizzando il disaccoppiante BAM15 ((2-fluorofenil){6-[(2-fluorofenil)ammino](1,2,5-ossadiazolo[3,4-e]pirazin-5-yl)}ammina). BAM15 è un disaccoppiante innovativo per il quale viene segnalata una potenza simile a quella di FCCP ma con minore citotossicità e minore affinità per la membrana plasmatica, dando come risultato un più ampio intervallo di efficacia.⁹

Come mostrato nelle Figure da 2A a 2C (linee rosse), quando cellule T naïve vengono testate con il kit di test dello stress mitocondriale delle cellule XF, il tasso di variazione del livello di O₂ durante i tre minuti di misurazione dello strumento dopo l'iniezione di FCCP non è costante o lineare, dando come risultato calcoli di OCR variabili e una sottostima della respirazione massima (Figure da 2D a 2F, linee rosse). Può esserci inoltre una sovrastima significativa dell'OCR dopo l'iniezione di rot/AA, come indicato dal confronto tra le tracce cinetiche ottenute con l'iniezione di FCCP e con l'iniezione del veicolo (Figura 2D, traccia rossa o blu). Quando tuttavia si utilizza BAM15 come disaccoppiante anziché FCCP, si ottiene un aumento stabile dell'OCR dopo l'iniezione di BAM15 (Figure da 2A a 2C, linee verdi), il che dà come risultato una misurazione più accurata e precisa della respirazione massima (Figure da 2D a 2F, linee verdi).

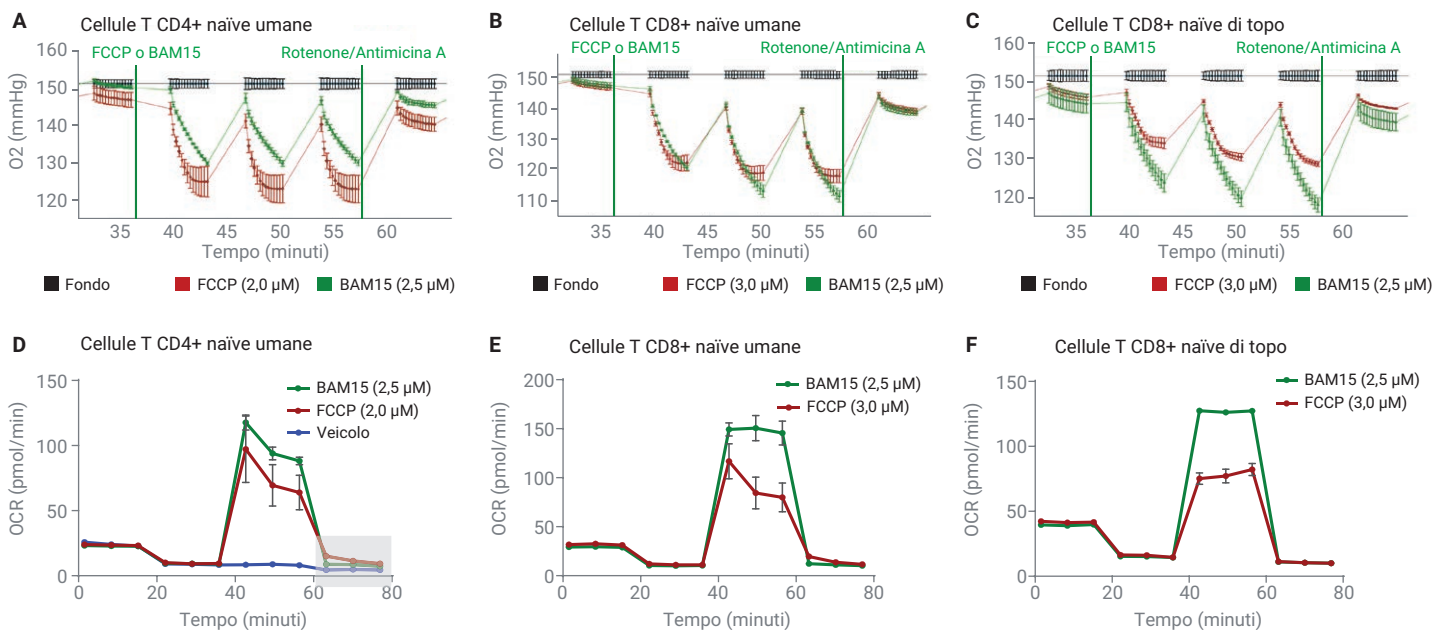
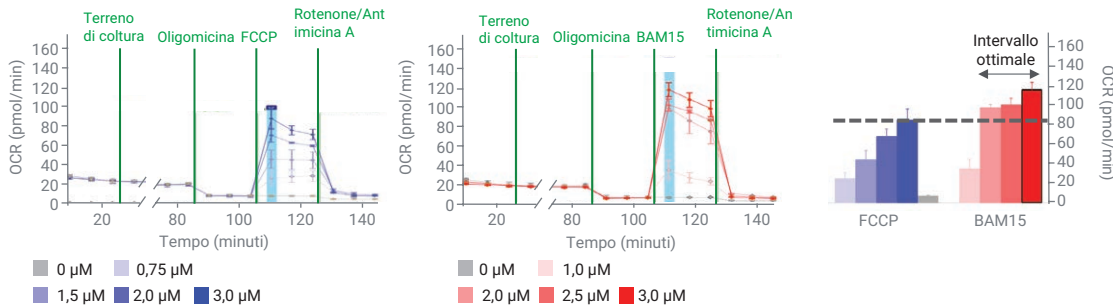


Figura 2. Confronto di misurazioni del consumo di ossigeno utilizzando FCCP e BAM15 come disaccoppiante. Tutte le cellule sono state seminate alla concentrazione di 2×10^6 cellule/pozzetto nel terreno di coltura di analisi RPMI Seahorse XF, pH 7,4, supplementato con 10 mM di glucosio, 2 mM di glutammina e 1 mM di piruvato. Modificazioni del livello di ossigeno extracellulare in cellule T CD4⁺ naïve umane (A), CD8⁺ naïve umane (B) e CD8⁺ di topo derivate da milza (C) dopo l'aggiunta di concentrazioni ottimali del disaccoppiante FCCP (linee rosse) o BAM15 (linee verdi). Tasso di consumo di ossigeno (OCR, Oxygen consumption rate) ottenuto dal test XF di stress mitocondriale delle cellule (linee rosse) o dall'analisi con kit per il fenotipo metabolico delle cellule T (linee verdi) in cellule T CD4⁺ naïve umane (D), CD8⁺ naïve umane (E) CD8⁺ di topo derivate da milza (F). La linea blu nel grafico 2D corrisponde alla condizione in cui è stato iniettato terreno di coltura di analisi anziché disaccoppiante.

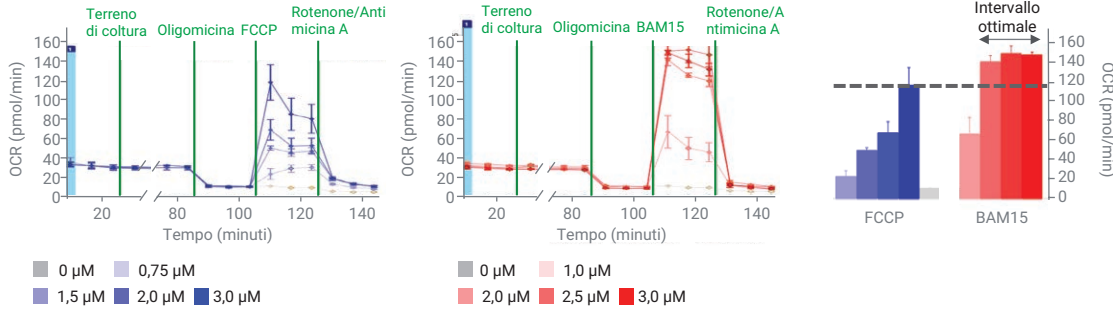
Questi test preliminari sono stati seguiti da ulteriori esperimenti in cui sono state utilizzate cellule T CD4⁺ naïve umane, CD8⁺ naïve umane, PBMC umane e CD8⁺ di topo derivate da milza, provenienti da almeno tre donatori differenti per tipo di cellula. In tutti i casi sono state effettuate titolazioni fianco a fianco utilizzando FCCP o BAM15. Utilizzando BAM15 come disaccoppiante si sono ottenuti uniformemente valori di respirazione massimale più elevati

e deviazioni standard minori in confronto ai valori ottenuti alle concentrazioni di FCCP ottimali (Figure da 3A a 3C). Gli esperimenti di titolazione hanno dimostrato inoltre che l'intervallo di concentrazione ottimale di BAM15 è più ampio rispetto all'intervallo ottimale per FCCP, il che indica che la necessità di ottimizzare la concentrazione del disaccoppiante per ciascun campione è minima quando si utilizza BAM15 (Figure 3A e 3B, grafici a barre al centro).

A Tracce cinetiche di cellule T CD4⁺ naïve umane e respirazione massimale a differenti concentrazioni



B Tracce cinetiche di cellule T CD8⁺ naïve umane e respirazione massimale a differenti concentrazioni



C Tutte le cellule T naïve testate

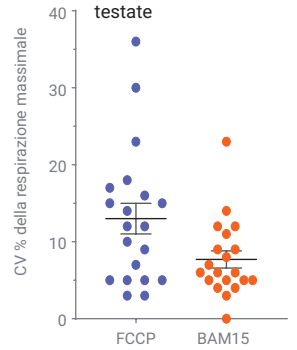


Figura 3. Confronto di misurazioni di respirazione massimale da esperimenti di titolazione con FCCP e BAM15 usando cellule T CD4⁺ (A) e cellule T CD8⁺ (B) naïve umane. I grafici a barre al centro rappresentano la respirazione massimale ottenuta a differenti concentrazioni del disaccoppiante. (C) CV percentuale della respirazione massimale ottenuto per la selezione di cellule T naïve testate con l'impiego di concentrazioni ottimali di FCCP oppure 2,5 μM di BAM15.

I tassi di produzione di ATP glicolitico calcolati utilizzando il kit per il fenotipo metabolico delle cellule T XF (con il disaccoppiante BAM15) sono stati inoltre confrontati con quelli ottenuti in esperimenti paralleli in cui viene utilizzato il kit di analisi in tempo reale del tasso di ATP Agilent Seahorse XF. I risultati mostrano che non ci sono differenze significative nei tassi di produzione basali di ATP glicolitico ottenuti con i due kit o analisi (Figura 4).

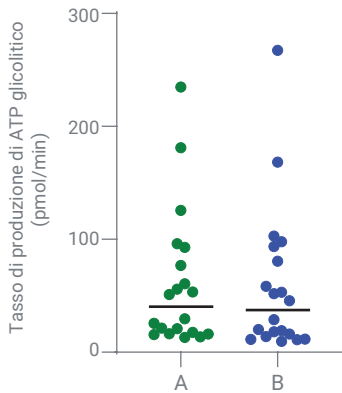


Figura 4. Confronto dei tassi di produzione basali di ATP glicolitico in cellule T naïve, calcolati utilizzando il kit di analisi in tempo reale del tasso di ATP Agilent Seahorse XF (B) o il kit per il fenotipo metabolico delle cellule T XF (A) con iniezione di BAM15 tra le iniezioni di oligomicina e rot/AA.

Infine, per valutare ulteriormente il kit per il fenotipo metabolico delle cellule T XF, è stata scelta un'ampia selezione di cellule T provenienti da cellule umane fino a cellule di topo, con donatori e stati di differenziazione differenti. Sono stati effettuati esperimenti di titolazione e i valori di OCR massimali ottenuti per concentrazioni di FCCP ottimali sono stati confrontati con i valori ottenuti a un'unica concentrazione di BAM15 (2,5 μ M) per le cellule T selezionate (Figura 5). In tutti i casi, l'OCR massimo ottenuto con 2,5 μ M di BAM15 è almeno il 90% dell'OCR massimo ottenuto per la concentrazione di FCCP ottimale con lo stesso tipo di cellule. L'OCR massimale ottenuto con 2,5 μ M di BAM15 è in media superiore del 20% rispetto al valore ottenuto con la concentrazione di FCCP ottimale, il che dimostra che il reagente BAM15 incluso nel kit può essere usato a una concentrazione fissa di 2,5 μ M per tutti i tipi di cellule T, ovvero richiede un'ottimizzazione minima.

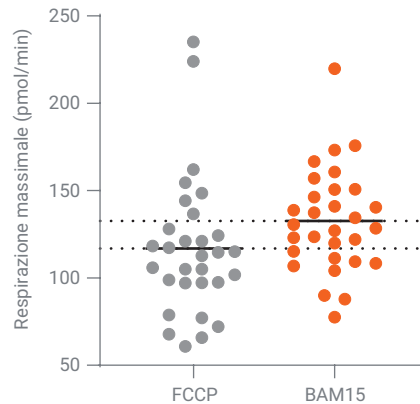


Figura 5. Confronto tra la respirazione massimale ottenuta per concentrazione di FCCP ottimale o per 2,5 μ M di BAM15 in un'ampia selezione di cellule T, incluse cellule T PBMC umane, CD4⁺ naïve, CD8⁺ naïve, CD4⁺ attivate, CD8⁺ attivate, CD8⁺ effettrici, CD8⁺ di memoria e CD8⁺ naïve e attivate di topo (n = 3 per tipo di cellula).

Applicazione del kit per il fenotipo metabolico delle cellule T XF per ottimizzare la persistenza dei prodotti terapeutici a base di cellule T

Un attributo critico da prendere in considerazione quando si valutano terapie a base di cellule CAR-T e altre cellule T adottive è la firma metabolica delle cellule, in quanto svolge un ruolo fondamentale nel definire la persistenza e la funzione antitumorale delle cellule T. In effetti è stato segnalato che le cellule CAR-T che acquisiscono un fenotipo effetttore con attività metabolica elevata durante l'espansione *in vitro* manifestano persistenza e attività antitumorale scarse *in vivo*. Tuttavia le cellule CAR-T che manifestano un'attività metabolica medio-bassa durante l'espansione *in vitro* e un'elevata capacità respiratoria di riserva conferiscono una buona immunità antitumorale, caratterizzata da capacità di proliferazione migliorate, superiori tassi di uccisione di cellule tumorali e produzione di citochine.¹⁰ Svariate pubblicazioni indicano che le condizioni di espansione durante la fabbricazione possono dare luogo a prodotti a base di cellule T con un fenotipo metabolico indesiderato, il che dà come risultato una ridotta potenza *in vivo*. Tali pubblicazioni evidenziano inoltre che il condizionamento metabolico delle cellule T durante l'espansione può indurre una riprogrammazione metabolica che dà come risultato una maggiore persistenza *in vivo* e una migliore funzione antitumorale.^{5,11,12}

Progettato per facilitare lo sviluppo di terapie a base di cellule T, il kit per il fenotipo metabolico delle cellule T XF offre un'immagine completa del profilo metabolico delle cellule T con un'unica analisi che include domanda energetica basale totale, equilibrio metabolico basale e capacità respiratoria di riserva, tutti parametri che sono stati utilizzati in precedenza per descrivere gli stati metabolici delle cellule T con persistenza aumentata o ridotta.¹⁰ Tale kit è pertanto ideale per valutare e ottimizzare le condizioni di espansione delle cellule T che danno come risultato il fenotipo metabolico desiderato, al fine di ottenere un'aumentata persistenza delle cellule T.

In questo caso il kit per il fenotipo metabolico delle cellule T XF è stato utilizzato per valutare il possibile impatto della composizione del terreno di coltura cellulare (RPMI contenente 10 mM di glucosio + 10% di FBS o terreno di coltura ImmunoCult XF (STEMCELL Technologies)) come anche dell'aggiunta di differenti interleuchine (IL-2 o IL-15) sul profilo metabolico dei prodotti a base di cellule T. Studi precedenti indicano che cellule che vengono espanse in IL-15 presentano un fenotipo meno differenziato rispetto a cellule coltivate in IL-2.¹³ In questo studio, cellule pan-T provenienti

da differenti donatori umani sani sono state attivate con sfere magnetiche coniugate con anticorpi CD3/CD28. Dopo tre giorni le sfere magnetiche sono state rimosse e le cellule si sono espanse nelle condizioni di terreno di coltura indicate (Figura 6). Le cellule sono state mantenute in coltura a una densità cellulare di 1×10^6 cellule/mL, rinnovando il terreno di coltura e regolando il volume ogni tre giorni. Al giorno 7, 14 e 22 i campioni sono stati rimossi e analizzati usando l'analisi di persistenza di cellule T XF supportata dal kit per il fenotipo metabolico delle cellule T XF, attenendosi alle condizioni di analisi raccomandate.¹⁴

In primo luogo si è confrontata la SRC nel corso dell'espansione delle cellule. Come mostrato nella Figura 6A, al giorno 7 si osserva una differenza nella SRC di cellule espanse in IL-15 o IL-2, indipendentemente dal terreno di coltura cellulare usato durante l'espansione. L'aumento della SRC di cellule espanse in IL-15 risulta accentuato al giorno 22, in particolare nel caso di cellule coltivate nel terreno di coltura ottimizzato ImmunoCult XF (Figura 6C). L'aumento della SRC è caratteristico del fenotipo di tipo memoria ed è stato precedentemente associato a un aumento di persistenza.

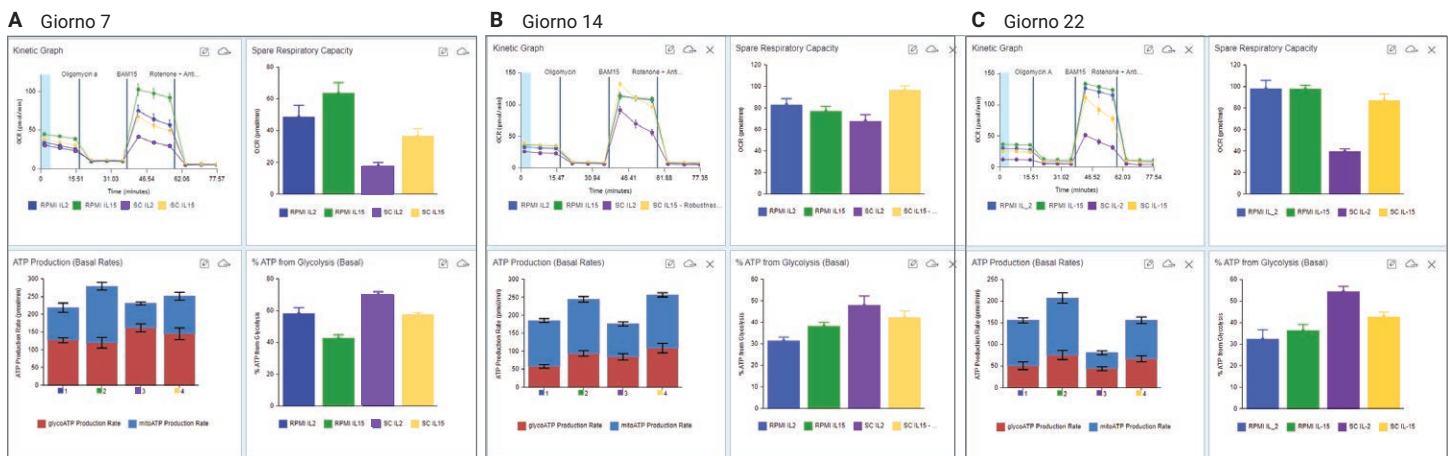


Figura 6. Effetti della condizione di espansione delle cellule sulle misurazioni metaboliche di cellule T. Cellule pan-T di sangue periferico umano sono state attivate con Dynabeads Human Activator CD3/CD28 nel terreno di coltura per espansione cellulare di cellule T ImmunoCult XF e coltivate a 37 °C in un incubatore con 5% di CO₂. Due giorni dopo l'attivazione, le Dynabeads sono state rimosse, quindi le cellule sono state suddivise in 4 gruppi e rimesse in sospensione alla concentrazione di 1×10^6 cellule/mL nelle seguenti 4 condizioni di terreno di coltura: Blu: RPMI supplementato con 2 mM di glutammina, 10% di FBS e IL-2 (300 U/mL); verde: RPMI supplementato con 2 mM di glutammina, 10% di FBS e IL-15 (10 ng/mL); viola: terreno di coltura ImmunoCult XF supplementato con IL-2 (300 U/mL); giallo: terreno di coltura ImmunoCult XF supplementato con IL-15 (10 ng/mL). Campioni sono stati acquisiti e analizzati al giorno 7, al giorno 14 e al giorno 22 dopo l'attivazione. I dati riportati per ciascun giorno includono tracce cinetiche dell'OCR (in alto a sinistra), SRC (in alto a destra), tassi di produzione di ATP (in basso a sinistra) e percentuale di ATP proveniente da glicolisi (in basso a destra).

Il passaggio successivo è stato esaminare i risultati aggiuntivi resi possibili da questa analisi per meglio caratterizzare e migliorare le condizioni di espansione, ovvero i tassi di produzione di ATP basali da glicolisi e mitocondri (Figura 6, i due grafici inferiori di ciascun pannello). Le cellule espanse nel terreno di coltura ImmunoCult XF contenente IL-15 hanno un equilibrio metabolico maggiormente ossidativo (minore percentuale di ATP da glicolisi) rispetto al caso del terreno di coltura contenente IL-2 (Figura 6, grafico in basso a destra in ciascuno dei pannelli, barre gialle rispetto a barre viola). Le cellule espanse e differenziate nel terreno di coltura RPMI presentano inoltre una maggiore domanda metabolica (maggiore tasso di produzione di ATP basale

totale) rispetto a cellule espanse e differenziate nel terreno di coltura ImmunoCult XF, indipendentemente dall'interleuchina utilizzata (Figura 6, grafico in basso a sinistra in ciascun pannello). Un'aumentata domanda metabolica è associata al fenotipo di cellula T effettrice. In effetti, quando l'espressione dei marcatori superficiali CCR7-A e CD45RO-A è stata analizzata utilizzando il citometro a flusso NovoCyte Advanteon, si è osservato che le cellule espanse nel terreno di coltura ImmunoCult XF hanno mantenuto un maggiore rapporto di popolazione di memoria centrale CCR7-A⁺/CD45RO-A⁺ rispetto a cellule espanse in RPMI, che risultavano arricchite del fenotipo di memoria effettrice (Figura 7).

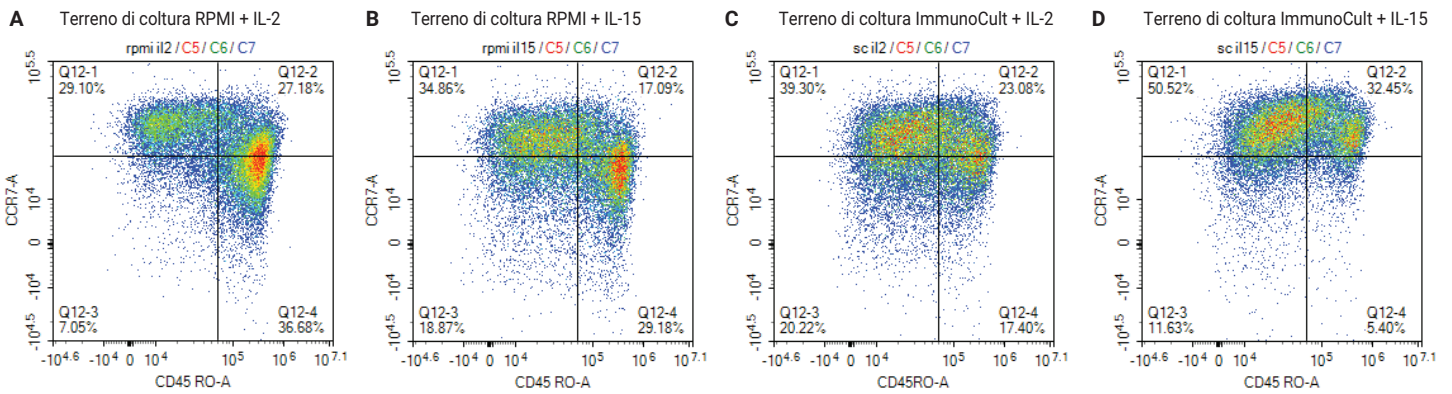


Figura 7. Citofluorimetria a flusso dei marcatori superficiali CCR7-A e CD45RO-A con campioni al giorno 22 espansi con differenti condizioni di terreno di coltura come indicato nei grafici. Il terreno di coltura RPMI è supplementato anche con 2 mM di glutammina e 10% di FBS.

Conclusione

Questo documento presenta un'analisi ottimizzata per la caratterizzazione completa del profilo metabolico di cellule T. Questa analisi combina l'uso dell'analizzatore XF e del kit per il fenotipo metabolico delle cellule T XF, fornendo un disaccoppiante ottimizzato che consente misurazioni affidabili della respirazione massimale e della capacità respiratoria di riserva in cellule T, con un'ottimizzazione minima della concentrazione del disaccoppiante.

Questa analisi consente inoltre agli utilizzatori di ottenere informazioni quantitative riguardo all'attività glicolitica nello stesso campione di cellule, insieme a un'esclusiva misurazione della domanda bioenergetica cellulare basale.

Per migliorare l'abilità di sviluppare e prevedere l'efficacia di terapie a base di cellule T è necessario utilizzare una combinazione di strumenti e analisi tra loro ortogonali che forniscano un insieme completo di dati per caratterizzare prodotti terapeutici a base di cellule CAR-T. È chiaro che la caratterizzazione metabolica delle cellule T è uno degli attributi critici che devono essere analizzati per migliorare la persistenza e la potenza antitumorale dei prodotti a base di cellule T. L'analisi di persistenza di cellule T XF offre risultati multiparametrici che forniscono una caratterizzazione completa del profilo metabolico delle cellule T partendo dallo stesso campione e può essere incorporata come analisi di routine per ottimizzare il design e la fabbricazione di prodotti terapeutici derivati da cellule T.

Bibliografia

1. Chang C. H.; Pearce, E. L. *Nature Immunology* **2016**, 17, 364–368. <https://dx.doi.org/10.1038%2Fni.3415>.
2. Sukumar *et al.* *Current Opinion in Immunology* **2017**, 46, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.03.011>.
3. Wei *et al.* *Frontiers in Immunology* **2021**, 12, 717014. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.717014>.
4. Voss *et al.* *Nature Reviews Immunology* **2021**, 21, 637–652. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00529-8>.
5. Geiger *et al.* *Cell* **2016**, 167, 829–842. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.031>.
6. Kawalekar *et al.* *Immunity* **2016**, 44, 380–390. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.021>.
7. Scharping *et al.* *Immunity* **2016**, 45, 374–388. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.009>.
8. Natalia, R. Quantifying Cellular ATP Production Rate Using Agilent Seahorse XF Technology. *White paper di Agilent Technologies*, numero di pubblicazione **5991-9309EN**.
9. Kenwood *et al.* *Molecular Metabolism* **2014**, 3, 114–123. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2013.11.005>.
10. Rostamian *et al.* *Cancer Letters* **2021**, 500, 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.12.004>.
11. Hermans *et al.* *PNAS* **2020**, 117(11), 6047–6055. <https://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1920413117>.
12. Geltink *et al.* *Nature Metabolism* **2020**, 2, 703–716. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0256-z>.
13. Alizadeh *et al.* *Cancer Immunol. Res.* **2019**, 7(5), 759–772. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0466>.
14. Manuale per l'uso del kit per il fenotipo metabolico delle cellule T Agilent Seahorse XF. *Agilent Technologies*, numero di pubblicazione **5994-3493EN**.

www.agilent.com/xfpro

Solo per scopi di ricerca. Non utilizzabile per procedure diagnostiche.

RA44573.6858796296

Le informazioni fornite potrebbero variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Stampato negli Stati Uniti, 8 febbraio 2022
5994-4494ITE