



Procesamiento cerrado y semiautomatizado de células CAR T

Aviso de propiedad intelectual: El negocio biofarmacéutico de GE Healthcare fue adquirido por Danaher el 31 de marzo de 2020 y ahora opera bajo la marca Cytiva™. Ciertos materiales colaterales (como notas de aplicación, carteles científicos y libros blancos) se crearon antes de la adquisición de Danaher y contienen varias marcas comerciales y diseños de fuentes propiedad de GE. Con el fin de mantener la familiaridad de esos materiales para los clientes de larga data y para preservar la integridad de esos documentos científicos, esas marcas comerciales y diseños de fuentes propiedad de GE permanecen en su lugar, y Danaher y el negocio de Cytiva reconocen específicamente que GE es propietaria de dichos GE. marcas registradas y diseños de fuentes.

Cytiva.com

GE y el monograma de GE son marcas comerciales de General Electric Company. Otras marcas registradas que figuran como propiedad de General Electric Company contenidas en materiales anteriores a la adquisición de Danaher y relacionadas con productos dentro de la cartera de Cytiva ahora son marcas registradas de Global Life Sciences Solutions USA LLC o una afiliada que hace negocios como Cytiva.

Cytiva y el logotipo de la gota son marcas comerciales de Global Life Sciences IP Holdco LLC o una afiliada. Todas las demás marcas comerciales de terceros son propiedad de sus respectivos dueños.

© 2020 Cytiva

Todos los bienes y servicios se venden sujetos a los términos y condiciones de venta de la empresa proveedora que opera dentro del negocio de Cytiva. Una copia de esos términos y condiciones está disponible a pedido. Comuníquese con su representante local de Cytiva para obtener la información más actualizada.

Para obtener información de contacto de la oficina local, visite [Cytiva.com/contacto](https://www.cytiva.com/contacto)



Procesamiento cerrado y semiautomatizado de células CAR T

Existe un entusiasmo considerable en torno al potencial de tratamiento de las inmunoterapias con células T. A pesar del éxito clínico de las células T con receptor de antígeno quimérico (CAR), aún existen desafíos asociados con la oferta rutinaria de estos productos como alternativas de tratamiento. Estos desafíos incluyen el costoso proceso de fabricación que depende de flujos de trabajo abiertos largos y complejos con altos requisitos de mano de obra que influyen en la variabilidad del producto. Esta nota de aplicación describe los detalles de un sólido flujo de trabajo de fabricación de células CAR T que se puede adaptar para el cumplimiento de cGMP en la producción comercial de células CAR T. Este proceso CAR T semiautomatizado y cerrado logra 1×10^{10} Células T expandidas con más del 80 % de eficiencia de transducción de proteína fluorescente verde mejorada (eGFP) en un proceso de fabricación de 8 días.

Introducción

Solo en 2019, se espera que se diagnostiquen aproximadamente 1,7 millones de nuevos casos de cáncer en los EE. UU. y se espera que alrededor de 600 000 estadounidenses mueran de cáncer (1). Si bien la quimioterapia combinada con medicamentos continúa siendo el estándar de atención, un número cada vez mayor de adultos y niños son refractarios a las modalidades de tratamiento convencionales, lo que motiva la "próxima generación" de enfoques para la terapia del cáncer.

A diferencia de la quimioterapia convencional, ahora se están desarrollando enfoques novedosos basados en una comprensión más profunda de la inmunooncología. Entre estos enfoques, la terapia de células T adoptivas ha ganado una atención significativa por su potencial curativo. La aprobación de las terapias de células T con CAR autólogas de Novartis (Kymriah™) y Gilead/ Kite (Yescarta™) (2) subraya tanto la promesa como los desafíos futuros para que estas terapias estén disponibles para los pacientes.

Ahora existe una necesidad creciente de soluciones de flujo de trabajo integrales que respalden la ampliación y ampliación industrial de las terapias de células T con CAR. Para abordar estos desafíos, hemos investigado las operaciones de unidades CAR T individuales para identificar los reactivos y equipos modulares disponibles en el mercado que impulsan el cierre y la automatización del proceso como un método para mejorar la eficiencia del flujo de trabajo y la consistencia del producto.

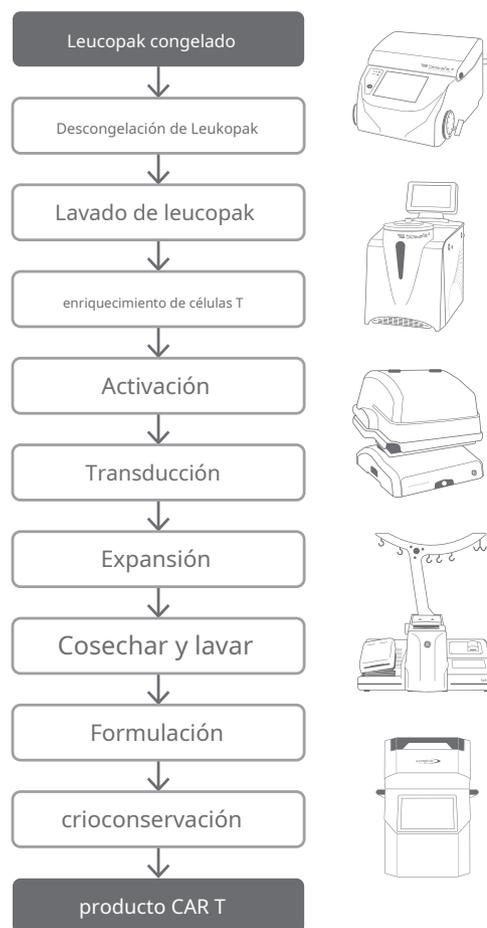


Figura 1. Flujo de trabajo para el proceso de fabricación semiautomático de células CAR T cerradas. El material de la celda al principio y al final del proceso se resalta en gris y las operaciones unitarias en blanco.

El flujo de trabajo CAR T se muestra en la Figura 1. Evaluamos los reactivos de enriquecimiento y activación de células T disponibles comercialmente, las opciones de recipientes de cultivo cerrados a pequeña escala, las soluciones alternativas para mejorar la transducción y el momento específico de los pasos del proceso. El objetivo era desarrollar un proceso de plataforma modular que sea robusto y flexible para las diversas necesidades de los desarrolladores de CAR T.

materiales y métodos

Comparación de métodos de descongelación y lavado

Las células de tres leukopaks de donantes (HemaCare) se descongelaron directamente en un baño de agua a 37 °C seguido de lavados manuales de las células, o se descongelaron y procesaron de forma automatizada utilizando el software de protocolo Thaw-Large Volume*‡ en el Smart-Max™ AS Instrumento -310 (GE Healthcare Life Sciences) y software de protocolo SmartWash en el dispositivo de separación celular (GE) Sepax™ 2†. En ambos casos, las células T se enriquecieron posteriormente con el kit de selección positiva de CD3 humano EasySep™ Release (STEMCELL Technologies) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Comparación de métodos de enriquecimiento y activación de células T

Los leucopacos de tres donantes se procesaron con el software de protocolo Thaw-Large Volume en Smart-Max AS-310 y el software de protocolo SmartWash en Sepax 2. Luego, las células T se enriquecieron con el kit de selección positiva de CD3 humano EasySep Release, las microesferas de CD3 en un LS Columna con el separador QuadroMACS™ (Miltenyi Biotec) o una combinación de microesferas CD14 y CD19 analizadas en una columna LD con el separador QuadroMACS. Las fracciones que contenían las células T enriquecidas se activaron con activadores de células T CD3/CD28/CD2 humanas ImmunoCult™ (STEMCELL Technologies). Todos los demás materiales enumerados son de Miltenyi Biotec.

Toda la expansión posterior de células T se realizó utilizando un medio de cultivo celular preparado complementando el medio de expansión de células T (GE) Xuri™ con suero AB humano inactivado por calor al 5 % (Gemini) y 350 UI/mL de factor de crecimiento Xuri IL-2 (GE). Las células se inocularon en placas multipocillo tratadas con cultivo de tejidos Nunc™ (Thermo Fisher Scientific) a una densidad de 1×10^6 células/mL, contadas todos los días después del día 3, y diluidas a 5×10^5 células/mL.

Comparación de métodos de transducción de células T

Impacto del método de selección y el momento de la adición de lentivirus (LV) Se transdujo un subconjunto de células T activadas de los diversos métodos de enriquecimiento mencionados anteriormente el mismo día de la activación o 1 o 2 días después de la activación para medir el impacto del método de enriquecimiento y el tiempo antes de la adición viral en la eficiencia de la transducción. Los linfocitos T se transdujeron con el vector LV-eGFP (Tailored Genes) a una multiplicidad de infección (MOI) de 2,5 en placas multipocillo tratadas con cultivo de tejido Nunc. Los volúmenes se duplicaron con medios nuevos para mejorar la salud celular de 16 a 20 h después de la transducción. La eficacia de la transducción se midió en el citómetro de flujo CytoFLEX™ (Beckman Coulter) 48 h después de la adición del medio.

Impacto del método de transducción

Para comparar varios métodos de transducción de células T, se procesaron leucopacos de dos donantes usando el software de protocolo de volumen grande Thaw en Smart-Max AS-310 y el software de protocolo SmartWash en Sepax 2. Luego, las células T se enriquecieron usando la selección positiva de CD3 humano EasySep Release. Kit y se activó con los activadores de células T CD3/CD28/CD2 humanas de ImmunoCult. Las células se inocularon en matraces T tratados con cultivo de tejidos Nunc (Thermo Fisher Scientific) a una densidad de 1×10^6 células/mL y cultivadas en una incubadora (37°C, 5% CO₂) durante 1 día para permitir que se activen antes de la transducción.

Las células T activadas se transdujeron con LV-eGFP a una MOI de 2,5 mediante la inoculación del virus y las células en matraces Nunc T, matraces de agitación (Corning) o placas recubiertas con RetroNectin™ (Takara). Un subconjunto de linfocitos T activados se transdujo de forma automatizada y cerrada utilizando el software de protocolo SpinOcultation‡ C-Pro en el instrumento Sepax C-Pro (GE) con el mismo MOI.

Las células en matraces T y placas recubiertas con RetroNectin se cultivaron en una incubadora (37 °C, 5 % de CO₂). Las células transducidas con LV-eGFP utilizando el software de protocolo SpinOcultation C-Pro se inocularon en matraces de agitación Erlenmeyer, y ambos conjuntos de matraces de agitación se cultivaron en un MaxQ™ CO2 Plus Shaker (Thermo Fisher Scientific) en una incubadora (37 °C, 5% CO₂, 90 rpm). Los volúmenes se duplicaron con medios nuevos para mejorar la salud celular de 16 a 20 h después de la transducción. Las células se cultivaron durante 2 o 3 días adicionales para permitir que se activaran antes de realizar más manipulaciones. Después de un total de 4 o 5 días de cultivo, se contaron las células y se diluyeron a 5×10^5 células/mL todos los días durante 4 días adicionales. Al final del cultivo, se midió la eficiencia de transducción en el citómetro de flujo CytoFLEX.

Comparación de métodos de expansión T

Los leucopacos de cuatro donantes se procesaron con el software de protocolo Thaw-Large Volume en Smart-Max AS-310 y el software de protocolo SmartWash en Sepax 2. Luego, las células T se enriquecieron con el kit de selección positiva de CD3 humano EasySep Release y se activaron con ImmunoCult Human CD3/CD28. /Activadores de células T CD2. Las células se inocularon en matraces T tratados con cultivo de tejidos Nunc o en matraces de agitación Erlenmeyer y se sembraron a una densidad de 1×10^6 células/mL. Los matraces de agitación se colocaron en un MaxQ CO2 Plus Shaker a 90 rpm mientras los matraces en T permanecían estáticos. Las células se cultivaron en una incubadora (37 °C, 5 % CO₂) durante 3 días para activarlas antes de realizar las manipulaciones. Después de 3 días, las células se contaron y se diluyeron a 5×10^5 células/mL. Las células se mantuvieron durante 5 días y luego se realizó el análisis fenotípico en el citómetro de flujo CytoFLEX.

Producción de células T transducidas a gran escala

descongelar y lavar

Se descongeló un leucopaco congelado en Smart-Max AS-310 usando el software de protocolo de volumen grande Thaw. El leucopaco descongelado se conectó a través de un puerto de punta a un kit de separación de células (GE) Sepax CS-600.1 y se ejecutó en Sepax 2 utilizando el software de protocolo SmartWash. Aunque esta configuración se usó para generar este conjunto de datos, una alternativa equivalente más flexible está disponible usando un kit de procesamiento celular (GE) CT-60.1 Sepax C-Pro en el instrumento de procesamiento celular (GE) Sepax C-Pro usando el CultureWash C-Pro Software de Protocolo (Tabla 1).

Las células se diluyeron con solución salina tamponada con fosfato de HyClone™ Dulbecco sin calcio ni magnesio (DPBS-/-, GE) suplementada con AB de suero humano inactivado por calor al 2% y EDTA 1 mM (Sigma). Se realizó un lavado y las células se extrajeron en el volumen inicial de tampón de lavado.

* Para la descongelación aguas arriba, utilizamos el software de protocolo Thaw-Large Volume en el instrumento Smart-Max. Una alternativa sería utilizar el instrumento VIA Thaw para el procesamiento tanto aguas arriba como aguas abajo. † En este estudio se utilizó el dispositivo de separación celular Sepax 2; sin embargo, se recomienda el Sepax C-Pro como instrumento equivalente para fines de fabricación.

‡ Próximamente, en breve, pronto. No hay garantía con respecto al lanzamiento de ningún producto (GE Healthcare se reserva el derecho de cambiar los planes y el calendario con respecto al lanzamiento de cualquier producto).

Tabla 1. Parámetros equivalentes de CultureWash C-Pro para imitar los parámetros de SmartWash:

Parámetro	SmartWash en Sepax 2	CultureWash C-Pro en Sepax C-Pro
Volumen de entrada	50–880 ml (70 ml)	20–1200 ml (70 ml)
Detectar volumen inicial	N/D (No)	Bandera (No)
Enjuague de bolsa de entrada	N/A (Sí)	Bandera (Sí)
Volumen de enjuague de la bolsa de entrada	N/D (50 ml)	25–100 ml (50 ml)
Pausa enjuague bolsa de entrada	N/D (No)	Bandera (No)
Volumen final	50–200 ml (70 ml)	8–500 ml (70 ml)
Relación de dilución	0,0–2,0 (2,0)	0,0–3,0 (2,0)
Volumen intermedio	N/D (10 ml)	5–50 ml (10 ml)
Detección de celdas ópticas	N/A (Sí)	Bandera (Sí)
Velocidad de dilución	N/D (17 ml/min)	10–120 ml/min (17 ml/min)
fuerza G	N/D (400 g)	100–800 g (400 g)
Tiempo de sedimentación	N/A (240 s)	120–600 s (240 s)
Ciclos de lavado	Estándar (1) o Lavado alto (2) (Estándar)	0–3 (1) y 0–3 (0)
Cuelgue la validación de la bolsa	N/A (Sí)	Bandera (Sí)
extracción manual	N/D (No)	Bandera (No)
Velocidad de llenado del producto	N/D (60 ml/min)	17–120 ml/min (60 ml/min)
Velocidad de extracción de residuos	N/D (75 ml/min)	17–120 ml/min (75 ml/min)

Los parámetros seleccionados están entre paréntesis. Si el parámetro no está disponible (N/A), los corchetes son los parámetros predeterminados.

Enriquecimiento y activación de células T

CD3-las células se enriquecieron utilizando el EasySep Release Human CD3 Positive Selection Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El medio de cultivo celular se preparó como se describe en "Comparación de métodos de enriquecimiento de células T". Las células T se activaron usando activadores de células T CD3/CD28/CD2 humanas de ImmunoCult de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células se inocularon en matraces de cultivo celular Erlenmeyer de 1 L (Corning) a una densidad de $1,5 \times 10^6$ células/mL. Las células se cultivaron en una incubadora (37 °C, 5 % de CO₂, 90 rpm) en un MaxQ CO2 Plus Shaker durante 1 día para activarlas antes de realizar más manipulaciones.

Transducción y cultura

Para la transducción a gran escala, se contaron las células 1 día después de la activación y se transfirieron 220 ml de suspensión celular a un paquete de transferencia de 600 ml (Fresenius Kabi). Se diluyó un volumen de LV-eGFP correspondiente a un MOI de 2,5 en 20 mL de medio de cultivo. El medio era la misma formulación utilizada en la activación. El virus se transfirió a una jeringa estéril (BD Biosciences) y se mantuvo en hielo. Las células y el virus se soldaron en el kit de procesamiento de células CT-60.1 Sepax C-Pro y se ejecutaron en el instrumento Sepax C-Pro usando el software de protocolo SpinOcultation C-Pro (Tabla 2).

Las células se contaron y se inocularon de nuevo en matraces de cultivo celular Erlenmeyer de 1 L a la densidad original antes de la transducción en medio de cultivo fresco. Las células se cultivaron durante 16 a 20 h en una incubadora en las mismas condiciones utilizadas para la activación. Después de 16 a 20 h, se agregó medio de cultivo al doble del volumen. Las células se cultivaron durante 2 días más.

Expansión celular

Se colocó un biorreactor Xuri Cellbag™ (GE) de 2 L en un Xuri Cell Expansion System W25 (GE) lleno con 5 % de CO₂, y se soldó asépticamente un depósito que contenía medio de cultivo. El medio era la misma formulación utilizada en el cultivo a pequeña escala. Se añadió un volumen inicial de 200 mL de medio de cultivo al

biorreactor y se dejó equilibrar durante la noche. Los parámetros del sistema se establecieron a 37 °C, caudal de gas de 0,05 l/min y un índice de oscilación de 10 rpm en un ángulo de 6 °.

Después de un total de 4 días en matraces de agitación Erlenmeyer, las células se inocularon en el biorreactor y se añadió medio de cultivo, dando un total de 500 ml de cultivo en el biorreactor. Una vez iniciados, los biorreactores se dejaron toda la noche mientras se añadía medio fresco al reactor a 1 L/d para alcanzar un volumen total de 1 L.

Desde el día 5 en adelante, se perfundió continuamente 1 L de medio/d para controlar los niveles de lactato, amonio y glucosa. Se realizaron muestreos diarios para número de células, viabilidad y análisis bioquímicos (lactato, amonio, glucosa y pH). Las células se mantuvieron en cultivo hasta el día 8.

Tabla 2. Parámetros de SpinOcultation C-Pro

Parámetro	Valor
Volumen inicial	220 ml
Enjuague de bolsa de entrada	Sí
Volumen de enjuague de la bolsa de entrada	50ml
Pausa enjuague bolsa de entrada	No
Detección de celdas ópticas	No
Volumen intermedio	40 ml
Ciclos de lavado	0
Fuerza g de concentración	400g
tiempo de concentracion	300 seg
Volumen de virus	25 ml ₁
Tiempo de espinoculación	90 minutos
Fuerza g de espinoculación	600 gramos
Volumen final	100ml
Volumen de espinoculación	60 ml

¹ Aunque el volumen del vector lentiviral en el medio de cultivo era de 20 mL, aquí se ingresó un valor de 25 mL para evitar un volumen de retención en la línea.

Análisis fenotípico y eficiencia de transducción

Las poblaciones de células T se analizaron mediante citometría de flujo los días 0, 4 y 8 de cultivo. Brevemente, 1×10^6 células se lavaron y bloquearon con reactivo de bloqueo de FcR humano (Miltenyi Biotec) antes de la tinción con CD3-BV510, CD4-APC-H7, CD8-BV650, CD45RO-BV421, CD62L-PE, CD25-BV786, CD279-APC y 7AAD (todos de BD Biosciences). La eficiencia de transducción se midió mediante la detección de eGFP en el canal de isotiocianato de fluoresceína (FITC) simultáneamente con el análisis fenotípico. Las células teñidas se analizaron en el citómetro de flujo CytoFLEX.

Cosecha y criopreservación

Las células T se recolectaron usando el instrumento de procesamiento de células Sefia™ S-2000, el software de protocolo FlexCell y el kit de procesamiento de células CT-800.1 (GE) (Tabla 3). Brevemente, 1×10^6 células T se redujeron en volumen a 50 ml a una velocidad de flujo de 75 ml/min. Se realizaron dos ciclos de lavado usando PLASMA-LYTE A (Baxter) suplementado con albúmina sérica humana al 10% (Gemini). Los lavados se realizaron a $400 \times g$ durante 5 min. Luego se extrajeron las células a 1×10^6 células/ml en PLASMA-LYTE A con 50 % de CryoStor™ CS10 (BioLife Solutions) y 5 % de albúmina de suero humano en tres bolsas de congelación CryoMACS™ 50 (Miltenyi Biotec). Las tres bolsas criogénicas se cargaron en el congelador VIA Freeze™ Quad (GE) con una velocidad de enfriamiento de $-1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta que la temperatura alcanzó los $-100 \text{ }^\circ\text{C}$. Después de la congelación, todas las células se transfirieron al almacenamiento de nitrógeno líquido.

Tabla 3. Parámetros utilizados en el software de protocolo FlexCell

Parámetro	Valor
Volumen inicial	Volumen de entrada de 1×10^{10} células (mL)
Detectar volumen inicial	No
Habilitar sensor de peso de bolsa inicial	No
Habilitar el sensor de peso de la bolsa de basura	Sí
fuerza G, concentración	400g
Tiempo de sedimentación, concentración	300 s
Volumen intermedio, concentración	50ml
Velocidad de la bomba	75 ml/min
Ciclos de lavado	2
fuerza G, lavado	400g
Tiempo de sedimentación, lavado	300 s
Volumen intermedio, lavado	20 ml
Volumen final bolsa 1	20 ml
Volumen final bolsa 2	20 ml
Volumen final bolsa 3	20 ml
Cambiar bolsa para resuspensión	No
Extracción de volumen muerto	No
Habilitar temperatura de proceso	No
Temperatura de proceso	20°C
Habilitar la temperatura del producto final	Sí
Temperatura del producto final	4°C
Tiempo de acondicionamiento del producto final	0
Habilitar dilución final	Sí
Tasa de inyección de dilución final	17 ml/min

Resultados y discusión

Comparación de métodos de descongelación y lavado

Hay métodos manuales abiertos disponibles para descongelar y lavar células de leucopacos. Sin embargo, estos no cumplen con los requisitos GMP en evolución y pueden presentar riesgos asociados con la variabilidad del operador y la contaminación. Alternativamente, se puede utilizar un enfoque cerrado y automatizado para descongelar y lavar las células. Este enfoque puede reducir los requisitos de mano de obra manual y la variabilidad del producto.

La descongelación y el lavado con el software de protocolo Thaw-Large Volume en Smart-Max AS-310 junto con el software de protocolo SmartWash en Sepax 2 dieron como resultado resultados de viabilidad y recuperación celular comparables a los de un método manual ($p \geq 0,05$ mediante la prueba t de 2 muestras, $n = 3$) (Figura 2A). Las células del método automatizado también proporcionaron una recuperación, pureza y viabilidad de células T comparables ($p \geq 0,05$ mediante la prueba t de 2 muestras, $n = 3$) (Fig. 2B).

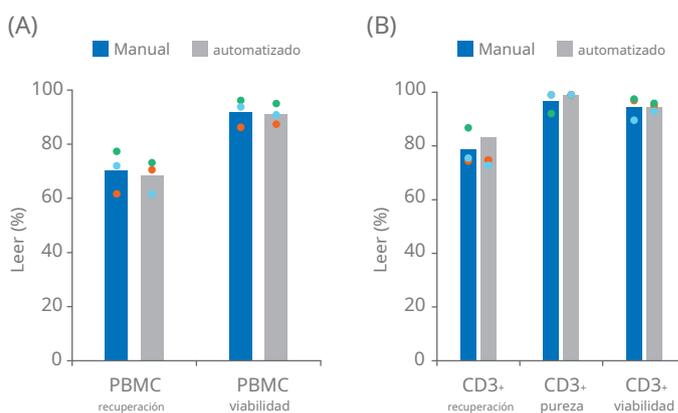


Figura 2. Recuperación y viabilidad tras descongelación y lavado manual y automatizado. (A) Recuperación y viabilidad de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) viables inmediatamente después de la descongelación y lavado manual o automático; (B) recuperación, pureza y viabilidad de células T enriquecidas después de EasySep Release Human CD3 Positive Selection. Las barras representan el promedio de los triplicados biológicos con valores de donantes individuales mostrados por puntos.

Comparación de métodos de enriquecimiento de células T

Hay varios métodos comercialmente disponibles para enriquecer las poblaciones de células T. Dos sistemas comunes son CD3-selección y CD14-/CD19-agotamiento. Con el fin de determinar el protocolo óptimo para enriquecer las células T, dos CD3-métodos de selección y un CD14-/CD19-método de agotamiento fueron evaluados.

Como era de esperar, el agotamiento del CD14.y CD19-poblaciones resultaron en purzas de células T significativamente más bajas que cualquiera de las CD3-métodos de selección ($p < 0,001$ por ANOVA unidireccional, $n = 3$) (Fig. 3B). El enriquecimiento de células T con el kit de selección positiva de CD3 humano EasySep Release resultó en recuperaciones significativamente más altas que la selección con el sistema QuadroMACS ($p = 0,01$ por ANOVA de una vía, $n = 3$) (Fig. 3B). Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad y la cinética de expansión de 5 días entre cualquiera de las poblaciones de células T enriquecidas ($p \geq 0,05$ por ANOVA de una vía, $n=3$) (Fig. 3C).

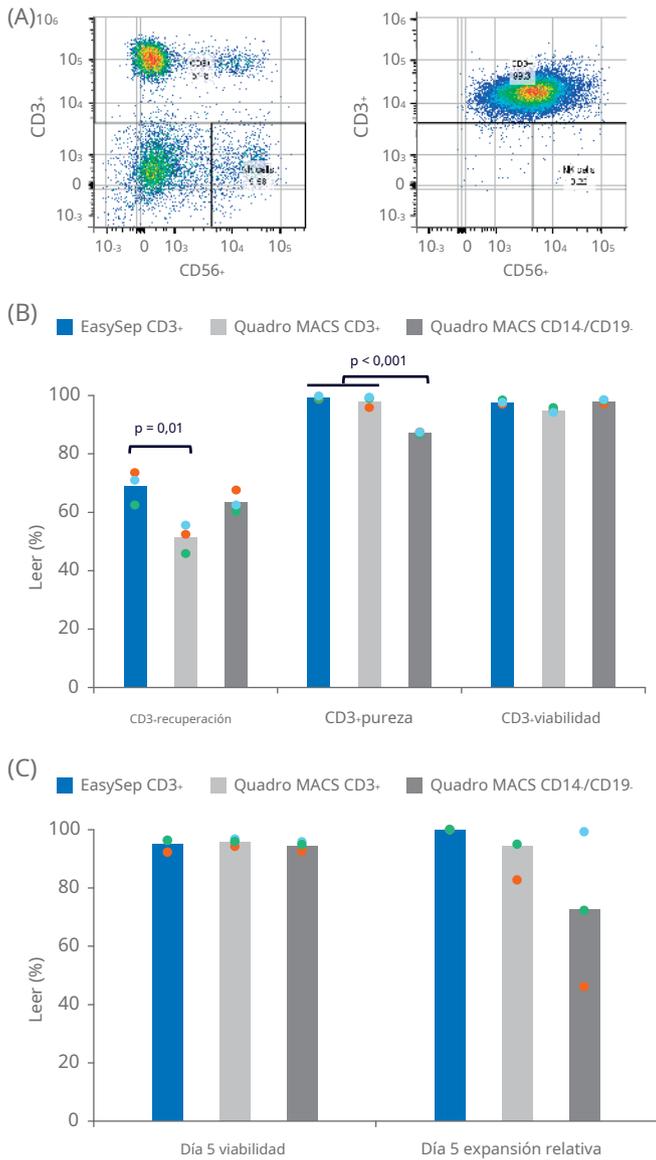


Fig. 3. Comparación de métodos de enriquecimiento. (A) Representación de Flowjo™ de celdas cerradas antes y después de EasySep CD3-selección; (B) recuperación, pureza y viabilidad de las células T después de EasySep CD3-selección, QuadroMACS CD3-selección, o QuadroMACS CD14-/CD19-agotamiento; (C) Viabilidad del día 5 y expansión acumulada del pliegue en relación con EasySep CD3-crecimiento de células T enriquecido del donante respectivo. Las barras representan el promedio de los triplicados biológicos con valores de donantes individuales mostrados por puntos.

Comparación de métodos de transducción de células T

Para optimizar la transducción, se evaluó el punto de tiempo para realizar la transducción después de la activación inicial de las células T. Para mantener la duración del proceso lo más corta posible, se priorizaron los puntos de tiempo anteriores. Actualmente se utilizan varios métodos para transducir células T. Sin embargo, varios de estos se basan en el procesamiento manual y abierto en placas o matraces, que es poco probable que se ajusten a los requisitos de GMP. Como alternativa, probamos el software de protocolo SpinOcultation C-Pro automatizado y funcionalmente cerrado en el instrumento Sepax C-Pro para transducir las células T con LV-eGFP.

La Figura 4 muestra los resultados de la determinación del día óptimo para la transducción. Células T enriquecidas a través de CD3-la selección tuvo eficiencias de transducción más altas que el método de agotamiento cuando se transdujo el día 0 ($p = 0,000$ por ANOVA unidireccional, $n = 3$) y el día 1 ($p < 0,001$ por ANOVA unidireccional, $n = 3$). Sin embargo, no se observaron diferencias en las células transducidas 2 días después de la activación ($p \geq 0,05$ por ANOVA de una vía, $n = 3$). En general, la mayor eficiencia de transducción se observó transduciendo CD3+ células seleccionadas 1 día después de la activación ($p < 0,02$ por ANOVA unidireccional, $n = 3$).

Como se describe en los métodos, se compararon varios enfoques de transducción manual utilizados actualmente por numerosos grupos (matraces en T, matraces de agitación y RetroNectin) con el software de protocolo SpinOcultation C-Pro en el instrumento Sepax C-Pro. El método de transducción cerrada automatizado con SpinOcultation C-Pro en Sepax C-Pro dio como resultado una viabilidad comparable (Fig. 5A) y una eficiencia de transducción al final del cultivo (Fig. 5B).

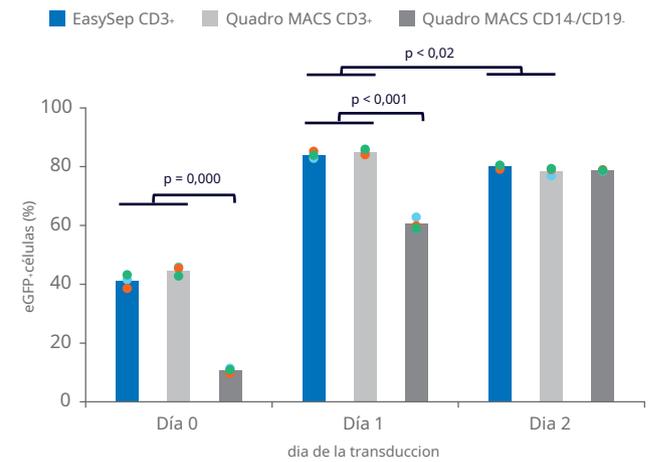


Figura 4. Determinación del día óptimo para la transducción. Porcentaje de células T positivas para eGFP 72 h después de la transducción en varios días después de la activación. Las barras representan el promedio de los triplicados biológicos con valores de donantes individuales mostrados por puntos.

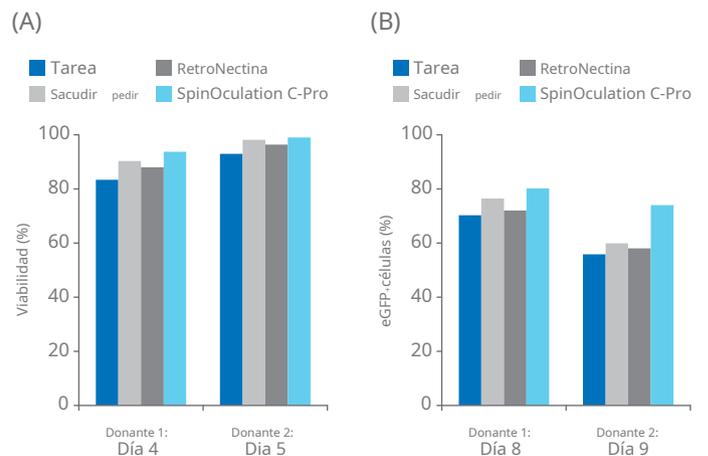


Figura 5. Comparación de métodos de transducción. (A) Viabilidad de las células usando varios métodos de transducción después de la fase de activación del cultivo (3 días o 4 días después de la transducción); (B) porcentaje de células T positivas para eGFP al final del cultivo (7 u 8 días después de la transducción). Las barras representan el promedio de los triplicados técnicos que se realizaron para cada uno de los dos donantes biológicos.

Comparación de métodos de expansión de células T

Hay varios métodos abiertos para el cultivo de células T a pequeña escala antes de entrar en un biorreactor, siendo el cultivo en matraces T el método más común. También existen métodos cerrados como las bolsas permeables a los gases y G-Rex™, pero en nuestras evaluaciones anteriores, estos no pudieron alcanzar la misma cinética de crecimiento observada en los matraces T (datos no publicados). Investigamos los matraces de agitación Erlenmeyer como una alternativa de cultivo cerrado que podría igualar la expansión de pliegues de las células T inoculadas en los matraces T.

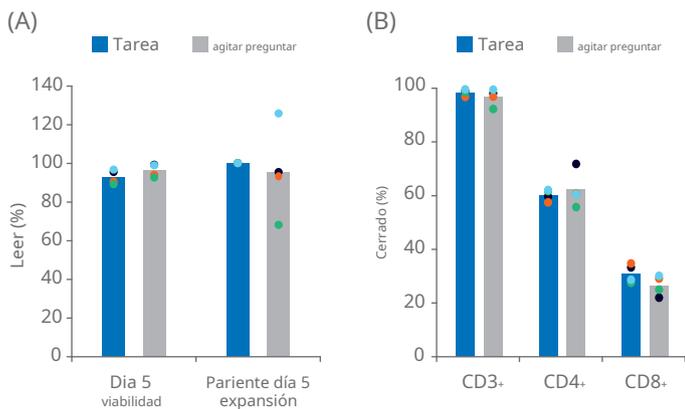


Figura 6. Comparación de métodos de cultivo a pequeña escala. (A) Viabilidad del día 5 y expansión de veces acumulada en relación con el crecimiento de células T en el matraz T del donante respectivo; (B) análisis fenotípico de células T y subpoblaciones CD4+ y CD8+ células por citometría de flujo al final del cultivo. Las barras representan el promedio de cuatro repeticiones biológicas con valores individuales mostrados por puntos.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad o expansión de las células T ($p \geq 0,05$ mediante la prueba t de 2 muestras, $n = 4$) (Fig. 6A). La comparación fenotípica de las células al final del cultivo se muestra en la Figura 6B. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la pureza de las células T o CD4+ y CD8+ subpoblaciones ($p \geq 0,05$ por prueba t de 2 muestras, $n = 4$).

Producción de células T transducidas a gran escala

La descongelación y el lavado automatizados de leucopacos utilizando el software de protocolo de volumen grande Thaw en Smart-Max AS-310 y el software de protocolo SmartWash en Sepax 2 se implementaron junto con el enriquecimiento de células T utilizando el kit de selección positiva de CD3 humano EasySep Release, SpinOclution C-Pro Software de protocolo en el instrumento Sepax C-Pro y activación y expansión a pequeña escala en matraces de agitación y Xuri Cell Expansion System W25 (Fig. 7).

A partir de tres ciclos de producción a gran escala, pudimos obtener más del 75 % de recuperación celular de los pasos de descongelación y lavado utilizando la configuración descrita, con una viabilidad superior al 90 % (Fig. 8A). Las poblaciones de células T enriquecidas se obtuvieron mediante separación magnética utilizando el sistema EasySep, que aumentó la pureza de las células T desde un 53 % a un 62 % en la población de entrada inicial hasta más del 95 % en la salida, independientemente de las diferentes poblaciones iniciales de células (Fig. 8B).

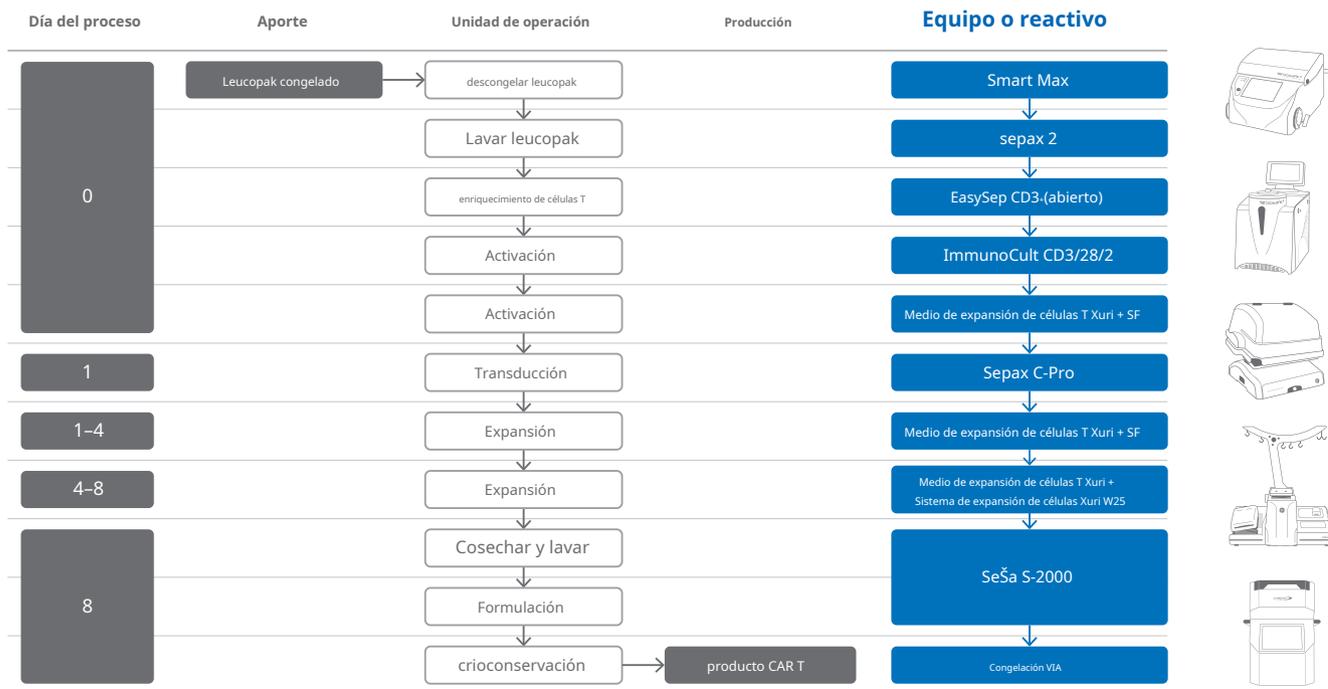


Figura 7. Proceso de flujo de trabajo. Diagrama de los pasos y sistemas utilizados para preparar una dosis clínicamente relevante de células CAR T a partir de unidades de leucoaféresis congeladas. La mayoría de los pasos fueron funcionalmente cerrados y automatizados, y el proceso es compatible con las pautas de GMP. El lavado Leucopak se probó en Sepax 2, pero hay disponible comercialmente un producto equivalente, Sepax C-Pro. SF = matraz de agitación.

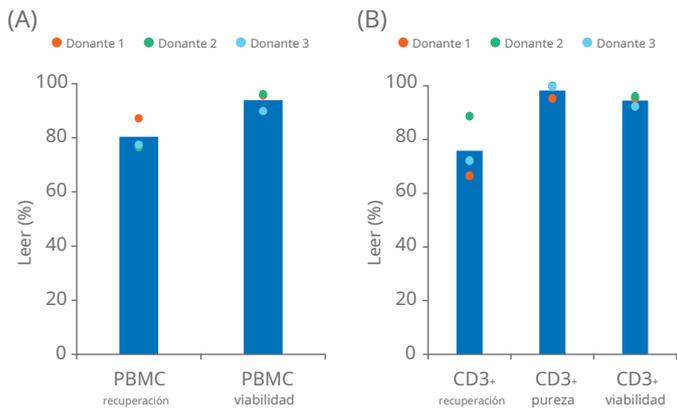


Figura 8. Pureza y recuperación de células T después del enriquecimiento. (A) Recuperación viable de PBMC y viabilidad después del software de protocolo SmartWash en Sepax 2; (B) Recuperación, pureza y viabilidad de células T enriquecidas después de la selección positiva de CD3 humano de liberación EasySep. Las barras representan el promedio de los triplicados biológicos con valores de donantes individuales mostrados por puntos.

Después del aislamiento, las células se activaron, transdujeron y expandieron en matraces de agitación durante 4 días antes de transferirlas al Xuri Cell Expansion System W25. Después de 4 días, se transdujo más del 68% de la población de células T (Fig. 9A). Las células T se expandieron en el Xuri Cell Expansion System W25 en más de 78 veces desde la población celular inicial (Fig. 9B). La transducción se mantuvo por encima del 84% durante todo el cultivo (Fig. 9B), lo que resultó en más de 1×10^{10} células T transducidas en el día 8, en promedio (Fig. 9C).

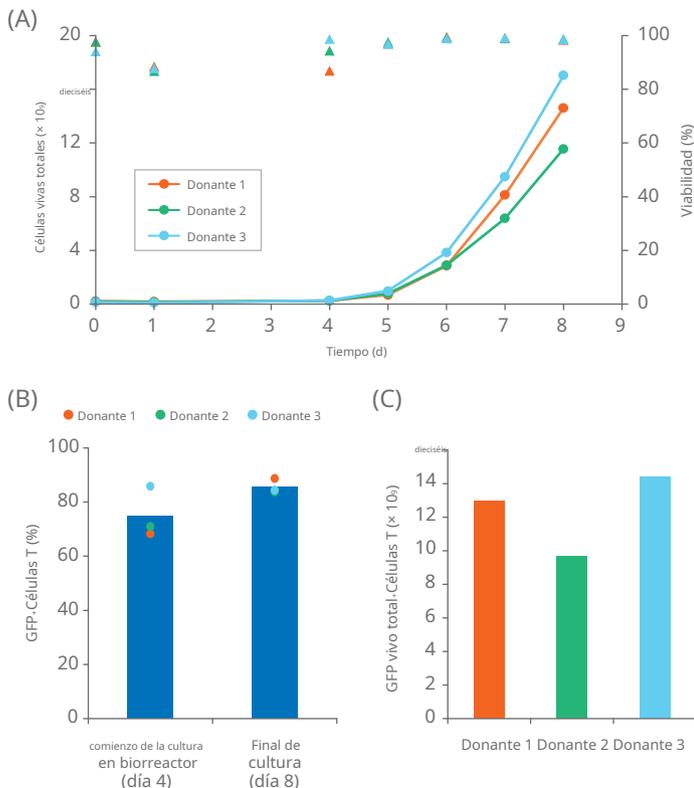


Figura 9. Crecimiento de cultivo y eficiencia de transducción. (A) Crecimiento acumulativo y viabilidad de las células T. Las líneas representan el perfil de expansión y los triángulos representan la viabilidad durante el proceso CAR T; (B) porcentaje de GFP transducido. Células T después de la activación en matraces de agitación y después del cultivo en el Xuri Cell Expansion System W25. Las barras representan el promedio de los triplicados biológicos con valores de donantes individuales mostrados por puntos; (C) GFP acumulado. Células T el día 8 para los donantes 1, 2 y 3.

Después del cultivo, las células T transducidas expandidas se recolectaron utilizando el software de protocolo FlexCell en el instrumento de procesamiento de células Sefia S-2000 antes de la criopreservación. Después de la reducción de volumen, el lavado y la criofórmula, la recuperación total de células vivas fue superior al 95% sin una disminución de la viabilidad (Fig. 10A). Las bolsas criogénicas de células se criopreservaron utilizando el VIA Freeze Quad antes de transferirlas al almacenamiento con nitrógeno líquido.

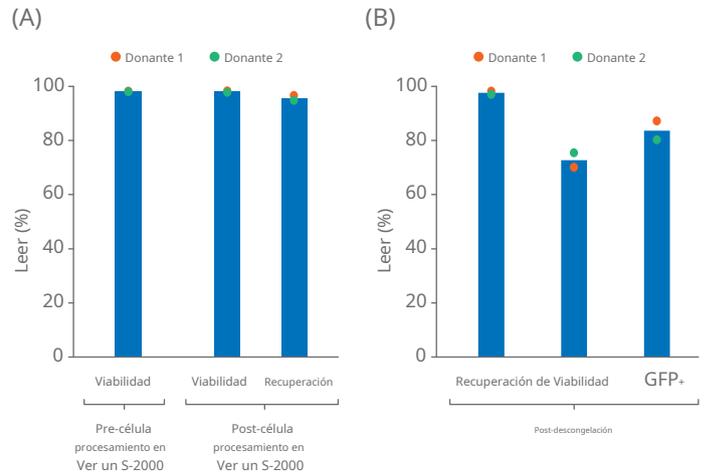


Figura 10. Recuperación y viabilidad de las células T. (A) Recuperación y viabilidad de las células T cultivadas, de los donantes 1 y 2 después de la recolección utilizando el software de protocolo FlexCell en el instrumento Sefia S-2000; (B) recuperación posterior a la descongelación y viabilidad de las células T transducidas criopreservadas después de la criofórmula utilizando el software de protocolo FlexCell en el instrumento Sefia S-2000.

La Figura 10B muestra la viabilidad y la recuperación después de la descongelación con VIA Thaw™ CB1000 (GE) después del lavado manual, la centrifugación y el intercambio de tampones para evaluar las células después de la criopreservación (como sustituto del producto finalmente infundido en el paciente). Como se muestra, más del 70% de las células se recuperaron con una viabilidad superior al 97%. Los resultados también muestran que la transducción se mantuvo por encima del 80% a través del proceso de criopreservación.

Conclusiones

El flujo de trabajo utilizado en este estudio es adecuado para la producción industrializada de células CAR T autólogas, ya que incorpora varias operaciones unitarias automatizadas y funcionalmente cerradas. Esta producción de células T transducidas a gran escala proporcionó dosis clínicamente relevantes (1×10^{10} células por donante) con alta eficiencia de transducción ($> 80\%$ eGFP+). Fenotípicamente, el producto final demostró características de una población de células T activadas. El trabajo futuro podría enfocarse en ajustar cada paso para reducir los costos mientras se mantiene un proceso robusto y escalable. Por ejemplo, los parámetros del bioproceso, como la agitación y la velocidad de balanceo, así como la estrategia de perfusión, podrían mejorarse aún más al reducir la cantidad de intercambio de medios y optimizar la velocidad y el ángulo de balanceo.

En general, la metodología presentada aquí es compatible con los flujos de trabajo industriales para la fabricación de CAR T. Esta nota de aplicación muestra la viabilidad de una expansión de células T semiautomática y el cierre de operaciones de unidades clave. En particular, la expansión a pequeña escala en frascos de agitación demuestra la posibilidad de una alternativa al cultivo estático convencional en bolsas permeables al gas o frascos cerrados.

Agradecimientos

Todo el trabajo se realizó en colaboración con CCRM a través de la financiación de FedDev Ontario y GE Healthcare Life Sciences en el Centro de Tecnologías Células Terapéuticas Avanzadas (CATCT), Toronto, Ontario, Canadá. El informe y la interpretación de los resultados de la investigación son responsabilidad del autor o autores.

Referencias

1. Informe: Datos y cifras sobre el cáncer, Sociedad Estadounidense del Cáncer. [En línea.] <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2019.html> (2019). Consultado el 22 de mayo de 2019.
2. Productos de terapia génica y celular aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-genetherapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products>. [En línea.] Consultado el 22 de mayo de 2019.

Información sobre pedidos

Producto	Código de producto
Instrumento Smart-Max AS-310	3500
Software de protocolo de descongelación de gran volumen*‡	-
Dispositivo de separación de células Sepax 2†	14000
Software de protocolo SmartWash Sepax 2	14305
CS-600.1 Kit de separación de células Sepax	10006
Instrumento de procesamiento celular Sepax C-Pro	29264741
Software de protocolo CultureWash C-Pro	29264736
Software de protocolo SpinOcultation C-Pro‡	-
Kit de procesamiento de células CT-60.1 Sepax C-Pro	29264739
Instrumento de procesamiento celular Sefia S-2000	29285527
Software de protocolo FlexCell Sefia	16301
Kit de procesamiento de células CT-800.1 Sefia	20001
Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS)	SH30028.03
Medio de expansión de células T Xuri 1000 mL	29185231
Xuri IL-2 (1 mg)	29062790
Sistema de expansión de celdas Xuri W25	29064568
Xuri Cell Expansion System Cellbag Perfusión, pH y OD, 2 L	29105498
Cuádruple de congelación VIA	VFQ_30010
Bolsa de 50 ml Placa SBS para congeladores VIA Freeze	ASY_30038
VIA descongelar CB1000	TBA_30001

* Para la descongelación aguas arriba, utilizamos el software de protocolo Thaw-Large Volume en el instrumento Smart-Max. Una alternativa sería utilizar el instrumento VIA Thaw para el procesamiento tanto aguas arriba como aguas abajo.

† En este estudio se utilizó el dispositivo de separación celular Sepax 2; sin embargo, se recomienda el Sepax C-Pro como instrumento equivalente para fines de fabricación.

‡ Próximamente, en breve, pronto. No hay garantía con respecto al lanzamiento de ningún producto (GE Healthcare se reserva el derecho de cambiar los planes y el calendario con respecto al lanzamiento de cualquier producto).

gelifesciences.com/terapiacelular

GE, GE Monogram, Cellbag, HyClone, Sefia, Sepax, Smart-Max, VIA Freeze, VIA Thaw y Xuri son marcas comerciales de General Electric Company. Los biorreactores Cellbag con sensores ópticos integrados se venden bajo una sublicencia de Sartorius Stedim Biotech con los números de patente de EE. UU. 6,673,532, 7,041,493 y/o sus equivalentes extranjeros, y visite www.pall.com/patents.

CryoMACS y QuadroMACS son marcas comerciales de Miltenyi Biotec GmbH. CryoStor es una marca comercial de BioLife Solutions, Inc. CytoFLEX es una marca comercial de Beckman Coulter Inc. EasySep e ImmunoCult son marcas comerciales de STEMCELL Technologies. FlowJo es una marca comercial de FlowJo, LLC. G-Rex es una marca comercial de Wilson Wolf Corporation. Kymriah es una marca registrada de Novartis AG. MaxQ y Nunc son marcas comerciales de Thermo Fisher Scientific. RetroNectin es una marca registrada de Takara. Yescarta es una marca comercial de Kite Pharma Inc. Todas las demás marcas comerciales de terceros son propiedad de sus respectivos dueños.

©2019 Compañía General de Electricidad.

Todos los bienes y servicios se venden sujetos a los términos y condiciones de venta de la empresa dentro de GE Healthcare que los suministra. Una copia de esos términos y condiciones está disponible a pedido. Comuníquese con su representante local de GE Healthcare para obtener la información más actualizada. GE

Healthcare Bio-Sciences AB, Björkgatan 30, 751 84 Uppsala, Suecia

GE Healthcare Bio-Sciences Corp., 100 Results Way, Marlborough, MA 01752, EE. UU. GE

Healthcare Europe GmbH, Munzinger Strasse 5, D-79111 Freiburg, Alemania

GE Healthcare Japan Corp., Sanken Bldg., 3-25-1, Hyakunincho Shinjuku-ku, Tokio 169-0073, Japón GE

Healthcare UK Ltd., Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, HP7 9NA, Reino Unido

Para obtener información de contacto de la oficina local, visite gelifesciences.com/contact.

KA8037280619AN JB68224 EE. UU.