

CONSENSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA, HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULAR SOBRE CÉLULAS GENETICAMENTE MODIFICADAS



Consenso da Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular sobre Células Geneticamente Modificadas. V: Manufatura e Controle de Qualidade

Gil Cunha De Santis^a, Dante Mário Langhi Júnior^b, Andreza Feitoza^c, Alfredo Mendrone Junior^d, José Mauro Kutner^c, Dimas Tadeu Covas^{a,e}, Samuel Campanelli Freitas Couto^d, Renato L. Guerino-Cunha^f, Maristela Delgado Orellana^a, Sílvia Renata Cornelio Parolin Rizzo^g

^aHemocentro de Ribeirão Preto, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

^bEscola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (EPM UNIFESP), São Paulo, SP, Brasil

^cHospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil

^dFundação Pró-Sangue-Hemocentro de São Paulo, São Paulo, Brasil

^eInstituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil

^fDepartamento de Imagens Médicas, Hematologia e Oncologia Clínica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

^gPrograma de Acreditação AABB/ABHH da Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, São Paulo, SP, Brasil

PALAVRAS-CHAVES

Terapia celular
Terapia celular adotiva
Terapia com células CAR-T
Doenças malignas de células B
Mieloma múltiplo
Criopreservação
Controle de qualidade
Imunoterapia

RESUMO

As células T quiméricas do receptor de antígeno (CAR-T), especialmente contra o marcador CD19, presente em linfomas e leucemia aguda B, proporcionaram uma revolução no tratamento de doenças neoplásicas hematológicas. A manufatura das células CAR-T requer a adoção de métodos compatíveis com as boas práticas de manufatura. A manufatura de células CAR-T requer a coleta de células mononucleares do paciente (ou de seu doador), em geral por procedimento de aférese, a seleção de células T, a sua ativação, transdução e expansão ex vivo e, por fim, a sua armazenagem, na maioria das vezes criopreservado, até o momento de uso. Aspecto importante são os testes de controle de qualidade do produto final, por exemplo, a caracterização de sua identidade e pureza, testes para detectar contaminação por microrganismos (bactérias, fungos e micoplasma) e a sua potência. O descongelamento e a infusão intravenosa do produto não diferem muito do que é preconizado para produto de células progenitoras hematopoéticas. Depois da infusão, também é importante verificar a presença e a concentração no sangue periférico do paciente das células CAR-T, assim como monitorar o seu impacto clínico, por exemplo, a ocorrência de complicações de curto prazo, como a síndrome de liberação de citocinas e complicações neurológicas, e de longo prazo, o que requer o seguimento do paciente por muitos anos.

Correspondência: Hemocentro de Ribeirão Preto: Rua: Tenente Catão Roxo, 2.501, Ribeirão Preto-SP, Brasil, CEP: 14051-140
E-mail: gil@hemocentro.fmrp.usp.br

INTRODUÇÃO

A manufatura de produtos celulares para uso clínico está ainda em suas fases iniciais de desenvolvimento. Um exemplo é a produção de células geneticamente modificadas com especificidade contra antígenos expressos nos tumores, as células T quiméricas do receptor de antígeno (CAR-T, do inglês, chimeric antigen receptor T cell). Para os produtos de terapia celular, a evolução dos estudos de fase III até a aprovação do produto final, ou de sua plataforma de manufatura, pelas agências regulatórias governamentais é estimada em menos de 15%, enquanto para produtos farmacêuticos o índice é de quase 50% (1). A manufatura de um produto celular requer passos adicionais em relação à manufatura de um agente molecular, como seleção, purificação, eventual modificação de suas características, formulação, preservação e, por fim, distribuição das células de interesse. Pode inclusive ser necessária a adoção de ensaios laboratoriais para avaliar eventual alteração sofrida pelas células depois de sua administração, pois as células são “drogas vivas” que podem adquirir características não previstas inicialmente, ou perder as características que se esperava que conservassem. Pequenas mudanças no processo de manufatura podem acarretar alterações significativas no produto final, de modo que o controle de qualidade do produto oferece grandes desafios aos laboratórios de terapia celular e às agências regulatórias.

Um dos aspectos críticos na confecção de um produto celular diz respeito à sua origem, se autóloga ou alogênica, mesmo que a finalidade seja a mesma. Os critérios de segurança costumam ser mais estritos em caso de uso alogênico de produto celular, especialmente em razão do maior risco de transmissão de agentes infecciosos do doador para o receptor. Por isso, o doador das células tem de ser submetido a uma série de ensaios laboratoriais para detectar os agentes mais comumente transmitidos, o que depende da região ou do país em que a doação é feita. Em geral, os testes obrigatórios para a doação de sangue são os mesmos para a doação de outros tipos celulares ou tecidos. Entretanto, o produto final também tem de ser testado para agentes infecciosos que possam ter contaminado o produto durante a fase de manufatura, por exemplo, bactérias, fungos e micoplasma. Aspecto importante para a segurança do produto é o método do cultivo das células, em sistema aberto ou sistema fechado. Evidentemente, os sistemas fechados conferem maior segurança ao processo de manufatura, pois reduzem substancialmente o risco de contaminação por agentes infecciosos. Ademais, os sistemas fechados, como os biorreatores, permitem ganho de escala ou de tempo no processo de expansão do número de células de interesse, aspectos críticos na terapia celular, mesmo em caso de produto celular autólogo de CAR-T, em que, frequentemente, o paciente se encontra em estado clínico que requer agilidade na administração do tratamento. Além da questão da esterilidade, o produto final também tem de ser testado quanto à presença de resíduos oriundos do processo de manufatura, por exemplo, a quantidade de microesferas (beads) em produto de células CAR-T.

O produto final também tem de ser avaliado quanto às suas características básicas, como o tipo celular que o constitui (identidade), e em que grau de pureza, assim como a potência que se espera que venha a ter, afinal, é a sua potência que determina em grande parte a sua utilidade clínica. Esse último item é par-

ticularmente difícil de avaliar num produto celular, em grande parte por não haver, em regra, ensaios disponíveis que possam prever com acurácia os efeitos que o produto celular provocará in vivo.

Coleta de linfócitos

A coleta de linfócitos para a manufatura de células CAR-T é feita, em geral, por meio da leucaférese (2). A maioria das instituições que coleta células progenitoras hematopoéticas (CPH) tem a competência de coletar linfócitos, até porque este procedimento não difere muito do primeiro do ponto de vista técnico. Ademais, a coleta de linfócitos não requer a sua mobilização para o sangue periférico (SP), como é de regra para as CPHs. O rendimento da coleta por aférese é de aproximadamente 40-50% das células mononucleares (e dos linfócitos) circulantes. O objetivo final é obter o mínimo de $1-2 \times 10^9$ células CD3+, o que pode não ser fácil em número significativo de pacientes com linfopenia, em grande parte por terem sido submetidos a várias linhas de tratamento quimioterápico. Concentrações de linfócitos inferiores a 300/ μ L podem tornar inviável a coleta. Além disso, depois de quimioterapia recente, a primeira subpopulação linfocitária a incrementar no SP é a de células NK, e não a de CD3+. Com a concentração de linfócitos de 500-600/ μ L, pode ser necessário o processamento de três ou mais volemias. Por exemplo, paciente com concentração de linfócitos de 500/ μ L no SP, e de 300/ μ L de células CD3+, teria a coleta de 150/ μ L dessa última subpopulação, ou seja, $1,5 \times 10^8$ por litro processado. Portanto, deve-se processar, nesse caso, pelo menos 10L de SP para atingir o objetivo mínimo ($1,5 \times 10^9$ de células CD3+), mas, de preferência, 15-20 L, correspondente a mais de 3 volemias, para, além de garantir a dose mínima, obter um certo “excedente”, que poderá ser benéfico para a confecção de produto final com “dose ótima”. Por isso, é importante quantificar os linfócitos CD3+ no SP antes do início (ou ao início) do procedimento de leucaférese, a fim de programar o processamento de volume que permita atingir o objetivo de coleta (3)(4). Em nossa experiência, o rendimento da coleta é de aproximadamente 50%, ou seja, a metade das células mononucleares que passam pela máquina de aférese é coletada. Os efeitos adversos da leucaférese são, em geral, pouco graves e de curta duração, como a hipocalcemia, que provoca principalmente parestesia nas extremidades. Um problema pode ser o acesso venoso periférico inadequado para o procedimento de aférese em grande número de pacientes, que, por essa razão, necessitam da implantação de cateter em veia central, com os riscos daí decorrentes (5).

Concentração e enriquecimento das células T

Esta etapa visa a reduzir os contaminantes celulares que podem comprometer a qualidade do produto final. Entre as células contaminantes com efeito negativo no processamento estão os monócitos, os granulócitos, as plaquetas e os eritrócitos. Por exemplo, os monócitos e os granulócitos inibem a expansão e a transdução das células T.

A lavagem com solução salina, manual ou automática, remove as plaquetas e o plasma remanescente. A seguir, vem a etapa da separação das células mononucleares, em Ficoll® ou LSM®, ou através de equipamentos como Sepax II ou Rotea, por exemplo. No entanto, depois dessas duas etapas, com frequência sobra

grande número de monócitos, que, entretanto, podem ser removidos pelo método de aderência a uma superfície ou por elutriação. Uma alternativa aos métodos mencionados é a separação imunomagnética, em que é possível reter as células de interesse e eliminar todas as outras que não expressam o marcador da célula a reter (CD4+/CD8+, no caso de CAR-T)(6); (7). A contaminação por células NK pode ser um problema, de modo que alguns autores recomendam a sua remoção sempre que seu número exceder 10% do total. O produto final desta etapa tem de ser avaliado quanto às suas características imunofenotípicas. Essa fase pode ser finalizada com a criopreservação das células, para armazená-las até o momento de proceder às fases posteriores, ou então ter seguimento nas fases de ativação e de transdução (8).

Ativação das células T

A ativação das células T é uma fase crítica do processo de manufatura de células CAR-T, configurando um pré-requisito para a etapa de transdução. Normalmente, a ativação das células T se dá por meio da sua interação com células apresentadoras de antígenos, como, por exemplo, as células dendríticas (CD). Como o cultivo de células T com CD é trabalhoso, outros métodos que mimetizam essa interação foram postos em prática, como a ativação por anticorpos. A ativação é proporcionada por meio da adição do anticorpo (ou de seu fragmento Fab) anti-CD3, em combinação com o anticorpo anti-CD28, à suspensão celular, imobilizados (anticorpos solúveis parecem ser menos eficazes) num substrato, por exemplo, microesferas imunomagnéticas (beads) (ex. Dynal Dynabeads; Human T-activator). As microesferas magnéticas têm o diâmetro de 4,5 µm e são recobertas pelos anticorpos ativadores. O problema dessa estratégia é a necessidade de remover, com o emprego de um ímã, a quase totalidade (< 100 microesferas para 3 x 10⁶ células) das microesferas do produto antes de sua infusão, um procedimento relativamente trabalhoso e que requer, como ensaio de controle de qualidade, a sua quantificação no produto final (9). Outros substratos podem ser utilizados em lugar das microesferas, cuja principal vantagem seria a de prescindir do procedimento de remoção, como, por exemplo, a estreptactina (StreptActin) associada aos fragmentos Fab dos anticorpos anti-CD3/CD28, que pode ser removida com o procedimento de lavagem da suspensão celular, ou uma nanomatriz biodegradável à qual os referidos anticorpos estariam ligados (10); (8).

Transdução

O processo de transdução requer o emprego de um vetor viral, lentivírus ou retrovírus, ou não viral, como o transposon/transposase. Os retrovírus foram os primeiros a ser usados, entretanto, os lentivírus são atualmente os preferidos, por razões de segurança e porque oferecem a vantagem de também transduzir células que não estejam em divisão (11).

O processo da transdução se dá com a incubação das células T ativadas com o vetor viral (ou não viral) que alberga o transgene (os fragmentos correspondentes às sequências CAR, à molécula coestimulatória B4-1BB ou CD28 e à molécula sinalizadora CD3ζ) a ser introduzido nas células. O emprego de vetor não viral (ex. sleeping beauty e piggyBac) é considerado relativamente simples, entretanto, de menor eficácia de transdução, e também apresenta o risco de integração aleatória do transgene, e, por-

tanto, da ocorrência de mutagênese insercional. Em contrapartida, o emprego de vetor viral apresenta custo muito mais alto, por depender de um laborioso processo de produção, além de requerer infraestrutura de sala limpa e da adoção de medidas de segurança, tanto de caráter ambiental quanto referentes ao produto final(9).

Expansão celular

Depois da fase de transdução, as células CAR-T têm de passar por processo de expansão de seu número antes de sua infusão no paciente. Essa fase pode ser realizada em frascos T de cultivo celular, em bolsas plásticas, em biorreatores ou no sistema ClinMACS Prodigy (Miltenyi BioTec). Os frascos T caracterizam-se por ser um sistema aberto, com os riscos daí decorrentes, e têm de ser manipulados individualmente as suas várias unidades para o processo de cultivo de um único lote de células, o que o torna pouco prático, especialmente se se pretende aumentar a escala de produção. Os biorreatores oferecem muitas vantagens, tais como a de contar com um sistema fechado de cultivo, o que atende às questões de segurança microbiológica, além de permitir o manuseio de um único equipamento, assim como o sistema Prodigy, que possibilita a realização de praticamente todo o processo de manufatura em um único sistema fechado, o que permite prescindir de infraestrutura de sala limpa de alta classificação. Entretanto, esse sistema é relativamente dispendioso, pois, além do equipamento em si, todos os insumos nele utilizados são de natureza exclusiva, ou seja, não permitem adaptações às realidades locais (10); (8)

Criopreservação

A criopreservação de células CAR-T não é etapa obrigatória em todos os casos, entretanto, esse procedimento pode ser necessário por razões logísticas, como, por exemplo, angariar tempo suficiente a fim de preparar o paciente para a infusão do produto celular ou para atender às normas regulatórias quanto à realização de ensaios laboratoriais de controle de qualidade. A criopreservação também pode ser necessária em caso de envio do produto celular para outro serviço, inclusive de fora do país. Em contrapartida, a urgência de uso de células CAR-T em neoplasias hematológicas tem tornado mais frequente o seu uso “a fresco”, ou seja, sem a etapa da criopreservação, a despeito de seu relativamente reduzido tempo de estabilidade quando armazenado em forma líquida a temperaturas de geladeira, além de assim, haver maior probabilidade de crescimento de microrganismos contaminantes.

Até o momento, não se conhecem plenamente os efeitos do processo de criopreservação (aqui incluído o de descongelamento) sobre as células CAR-T. São duas as principais considerações relativas a essa questão no contexto da manufatura das células CAR-T; a primeira diz respeito ao seu impacto na qualidade das células T, especialmente quanto aos seus efeitos na eficácia das etapas posteriores de transdução e expansão, e a segunda, ao impacto da criopreservação das células CAR-T na sua viabilidade e na função in vivo.

Quando o produto de partida é criopreservado, o número de células viáveis no início do processamento é significativamente inferior àquele observado em produto fresco, entretanto, a capacidade de expansão, a eficácia da transdução, a percenta-

gem de células CD3+ e a razão CD4:CD8 do produto final não diferiram entre os dois tipos de produto inicial, criopreservado e fresco. Além disso, não foi demonstrada influência do tempo de armazenagem do produto criopreservado quanto aos parâmetros elencados acima (12). Os mesmos autores mostraram que produtos que sofreram dupla criopreservação (antes do início do processamento e depois do término da manufatura das células CAR-T) tiveram maior recuperação de células CAR-T (final) que de células mononucleares (inicial). Outro achado importante foi que não houve diferença quanto aos desfechos clínicos com a infusão de produto fresco e produto criopreservado na mesma dose de células. Por fim, o índice de falha na produção das células CAR-T não diferiu entre os grupos com produto inicial fresco ou criopreservado (12). Outro grupo, no entanto, sugeriu que a capacidade de secretar interleucina-2, fator de necrose tumoral- α e interferon-gama, estava reduzida nos produtos celulares previamente criopreservados (13). Outro estudo retrospectivo (fase I/II), em pacientes com linfoma não Hodgkin, também sugeriu não haver diferença quanto aos desfechos clínicos entre o grupo que recebeu produto criopreservado (n= 15) e produto fresco (n= 8), por exemplo, a taxa de resposta clínica e a ocorrência da síndrome da liberação de citocinas e a neurotoxicidade foram similares nos dois grupos (14).

Antes da criopreservação, o produto da aférese deve ser armazenado entre as temperaturas de 2 e 8°C, uma vez que assim a viabilidade é mantida elevada por, pelo menos, três dias, enquanto entre 10 e 25°C ocorre queda significativa da viabilidade com apenas 24 horas de armazenagem (15). A criopreservação de células CAR-T requer o emprego de um ou mais agentes crioprotetores, entre os quais o dimetilsulfóxido (DMSO), na maioria das vezes na concentração final de 5 a 10%. Panch e colaboradores usaram o DMSO na concentração final de 5%, associado ao hidroxietilamido a 6% e à albumina a 4%. O descongelamento foi feito em banho-maria a 37°C, seguido de diluição com Plasma-Lyte A contendo heparina 10 U/mL (12). A velocidade de conge-

lamento deve ser lenta (1-3°C/min) e o processo de descongelamento deve ser rápido. O congelamento com equipamentos que permitem congelar a temperatura programada tem sido empregado com maior frequência, pois garantem maior segurança do processo, entretanto, alguns grupos têm congelado produto de CAR-T à temperatura de 80°C negativos, em congelador mecânico. Esse último método também permite que se atinja a velocidade de congelamento de 1-3°C/min, desde que se valide a temperatura para o volume padrão da bolsa de CAR-T, que, no caso, deve ter aproximadamente 100 mL (volumes menores estão expostos a velocidades maiores de congelamento, o que pode comprometer a viabilidade das células). Recomenda-se que a armazenagem do produto de células CAR-T seja feita a temperaturas inferiores a 150°C negativos, imerso ou, preferentemente, para evitar a possibilidade de contaminação cruzada, na fase de vapor de tanque de nitrogênio líquido (16); (8).

Descongelamento e infusão

O descongelamento do produto de células CAR-T deve ser rápido, por exemplo, em banho-maria a 37°C, eventualmente, à beira do leito, seguido de infusão sem ulterior manipulação, ou de infusão precedida por diluição das células com soluções compatíveis. As vantagens da diluição são basicamente duas: reduzir a concentração de DMSO à qual as células ficarão expostas até a sua efetiva infusão (que deve durar aproximadamente 15-30 minutos), a fim de reduzir a toxicidade do DMSO às células, e talvez a de prevenir a formação de grumos celulares após o descongelamento (acredita-se que solução contendo citrato ofereça essa potencialidade). Além disso, a diluição pode possibilitar menor perda de células no circuito em caso de produto final de pequeno volume.

A figura 1 descreve as principais etapas no processo de manufatura das células CAR-T e exemplos de tecnologias e dispositivos disponíveis.

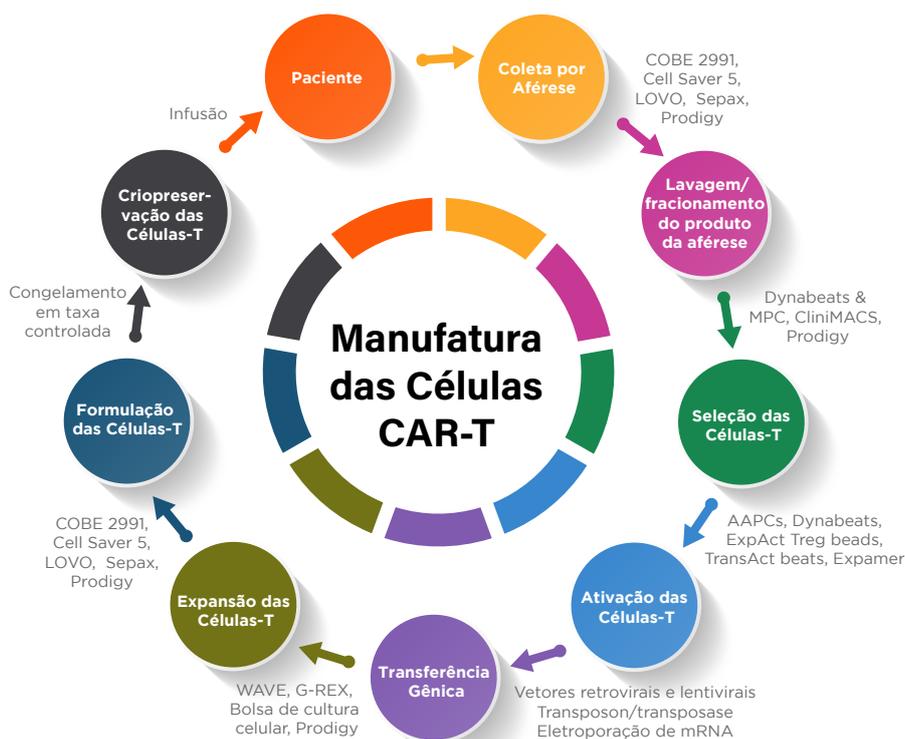


Figura 1: Principais etapas no processo de manufatura das células CAR-T e exemplos de tecnologias e dispositivos disponíveis. Abreviações: AAPC (do inglês, artificial antigen-presenting cells); MPC (do inglês, magnetic particle concentration)

II- Controle de qualidade

O controle de qualidade de um produto celular visa a avaliar os seus dois aspectos principais, que são as suas características intrínsecas associadas à expectativa de sua eficácia e também quanto às questões de segurança, tanto para o paciente quanto para o pessoal da manufatura e o meio-ambiente. Por isso, todos os tópicos de controle de qualidade discutidos abaixo atendem a esses dois objetivos (Tabela 1).

Identidade

A identidade do produto celular é determinada por meio da caracterização imunofenotípica das células nele contidas. No caso de produto de células CAR-T, tem-se de determinar a quantidade de células CD3+, assim como das subpopulações CD4+ e CD8+ ou das células de memória. Também é imprescindível quantificar as células que apresentam a modificação genética pretendida, ou o seu resultado, por exemplo, as CAR-T que expressam o receptor para o marcador CD19, o que informa ainda sobre a eficácia do processo de transdução.

Pureza

Além das células de interesse, também é importante avaliar o conteúdo de células “contaminantes”, como as populações de linfócitos NK e B e também de monócitos. As impurezas não celulares também têm de ser identificadas, como a endotoxina. Idealmente, as ferramentas usadas para a modificação genética não devem estar presentes no produto final, ou, se presentes, ter sua quantidade significativamente reduzida.

Viabilidade

A viabilidade das células tem de ser determinada imediatamente antes da criopreservação do produto, ou antes de sua infusão, em caso de produto fresco. Os métodos mais empregados são o da exclusão de corante vital, como o azul de tripan, ou a contagem por citometria de fluxo das células marcadas com 7-aminoactinomicina D (7AAD). Considera-se que a viabilidade tenha de ser $\geq 70\%$.

Potência

Recomenda-se avaliar a potência do produto celular, especialmente quando se tratar de ensaio clínico de fase 3 (uso compassivo ou ensaio clínico de fase 1 não requerem essa avaliação), apesar das dificuldades de extrapolar eventuais resultados obtidos em animais ou em ensaios in vitro para uma situação clínica de tratamento de um paciente. No caso das células CAR-T, ensaio de citotoxicidade de células-alvo (em geral, não é possível utilizar células-alvo autólogas, de modo que se podem empregar células de linhagem que expressam o marcador-alvo) pode trazer informação relevante, extrapolável, pelo menos em parte, para o contexto clínico. No entanto, espera-se que as células CAR-T sofram processo de expansão in vivo, de magnitude difícil de prever, fenômeno que pode aumentar a sua potência in vivo além daquela que se pudesse prever por ensaios in vitro ou mesmo em modelo animal. O ensaio pode ser direto, de prefe-

rência quantitativo (também pode ser qualitativo), por exemplo, a porcentagem de células-alvo efetivamente mortas (citotoxicidade), mas também pode ser indireto, por exemplo, a quantificação de citocinas (ex. INF- α) liberadas após estímulo das células CAR-T pelas células-alvo.

Segurança

A segurança do produto celular é um dos pilares do controle de qualidade de que ele é objeto. O risco conferido por um produto de células geneticamente modificadas depende do tipo e da origem das células, do tipo de vetor usado ou do método de modificação genética, do processo de manufatura, do conteúdo de células contaminantes e dos elementos não celulares e da sua finalidade de uso. Serão aqui abordados os dois principais tópicos relacionados à segurança do produto de células CAR-T: a detecção de contaminação microbiológica e a comprovação da ausência de vírus replicante no produto final (evidentemente, em caso de emprego de vetor viral). Há ainda a questão da segurança a longo prazo, necessária, em grande parte, por causa da administração de células geneticamente modificadas, cujos efeitos adversos não são plenamente conhecidos. Portanto, o controle de qualidade de um produto de células CAR-T não se encerra com a sua administração. Os pacientes têm então de ser acompanhados por anos a fio, a fim de que se possa avaliar o aparecimento de complicação tardia, como outra neoplasia.

A contaminação microbiológica pode ser avaliada por métodos de cultura de bactérias ou fungos em amostra da suspensão celular, associados ou não a métodos como a coloração de Gram, e a pesquisa de micoplasma. Um problema da cultura microbiológica é a ausência de sistemas validados para um produto celular (eles foram validados para o sangue). Em geral, é empregado um sistema automatizado de cultura, como o Bactec (Becton Dickinson) ou o BacT/ALERT 3D (bioMérieux), que teriam de ser validados localmente para o produto de células CAR-T. No Brasil, é obrigatória a realização de cultura para bactérias aeróbicas e anaeróbicas e para fungos, e, em caso de produto que requereu “manipulação extensa” (RDC 508, de 27 de maio de 2021)(17), como ocorre com o produto de células CAR-T, também é obrigatória a realização de teste laboratorial para a detecção de micoplasma “em amostras do produto pós-processamento e antes da criopreservação, antes ou após a adição de crioprotetores”. A detecção de micoplasma pode ser feita por meio do emprego de método de PCR (reação em cadeia da polimerase) ou o ensaio MycoAlert (Lonza) (8).

É preciso ainda aplicar ensaios de detecção de vetor viral replicante no produto final, a menos que sua ausência tenha sido plenamente estabelecida no material de partida e que tenha sido minimizado o risco de sua ocorrência durante o processo de manufatura.

Estabilidade

A integridade e a funcionalidade das células têm de ser avaliadas, especialmente para definir seu tempo de validade quando criopreservadas. No início de atividade de produção de células CAR-T é razoável que essa informação ainda não esteja disponível, entretanto, deve haver implementado um plano de avaliação da estabilidade.

CONCLUSÃO

As células CAR-T representam um divisor de águas no tratamento de doenças neoplásicas hematológicas. A sua manufatura requer a adoção de métodos compatíveis com as boas práticas de manufatura, o que requer instalações adequadas, qualificação

de pessoal e o estabelecimento de procedimentos operacionais para todas as fases do processo, da coleta de células mononucleares até a sua administração. O resultado clínico depende, em grande parte, do rigoroso controle de para cada etapa da confecção do produto e se estende inclusive para além do momento de sua infusão no paciente.

Tabela 1- Parâmetros e ensaios de controle de qualidade de produto de células CAR-T

Parâmetro	Ensaio (objetivos)
Identidade	Contagem de células CAR-T por citometria de fluxo (expressão do CAR)
Pureza	Células contaminantes (o mínimo de outras células: monócitos, linfócitos NK etc) Contagem de microesferas (< 100/3 x 10 ⁶ células) Endotoxina (ausência) Citocinas (ausência; concentração mínima não estabelecida)
Viabilidade	7-AAD ou azul de tripan, ou equivalente (≥ 70% de células viáveis)
Potência	Citotoxicidade de células alvo (tumor em animais ou células de linhagem) Concentração de citocinas à exposição das células CAR-T com as células-alvo
Segurança	Esterilidade microbiana (ausência de bactérias, fungos e micoplasma) Vírus replicante no produto (ausência)
Estabilidade	Preservação da expressão do transgene Criopreservação (≥ 70% de células viáveis, avaliação periódica)

REFERÊNCIAS

- Aijaz A, Li M, Smith D, Khong D, Leblon C, Fenton OS, et al. Biomanufacturing for clinically advanced cell therapies. *Nat Biomed Eng.* 2018;2(6):362–76.
- Fesnak A, Lin C, Siegel DL MM. CAR-T Cell Therapies From the Transfusion Medicine Perspective. *Transfus Med Rev.* 2016;30(3):139–45.
- Allen ES, Stroncek DF, Ren J, Eder AF, West KA, Fry TJ, et al. Autologous lymphapheresis for the production of chimeric antigen receptor T cells. *Transfusion.* 2017;57(5):1133–41.
- Korell F, Laier S, Sauer S, Veelken K, Hennemann H, Schubert M-L, et al. Current Challenges in Providing Good Leukapheresis Products for Manufacturing of CAR-T Cells for Patients with Relapsed/Refractory NHL or ALL. *Cells.* 2020;9(5):1225.
- Ceppi F, Rivers J, Annesley C, Pinto N, Park JR, Lindgren C, et al. Lymphocyte apheresis for chimeric antigen receptor T-cell manufacturing in children and young adults with leukemia and neuroblastoma. *Transfusion.* 2018;58(6):1414–20.
- Stroncek DF, Lee DW, Ren J, Sabatino M, Highfill S, Khuu H, et al. Elutriated lymphocytes for manufacturing chimeric antigen receptor T cells. *J Transl Med.* 2017 Dec 16;15(1):59.
- Highfill SL, Stroncek DF. Overcoming Challenges in Process Development of Cellular Therapies. *Curr Hematol Malig Rep.* 2019;14(4):269–77.
- Roddie C, O'Reilly M, Dias Alves Pinto J, Vispute K, Lowdell M. Manufacturing chimeric antigen receptor T cells: issues and challenges. *Cytotherapy.* 2019;21(3):327–40.
- Vormittag P, Gunn R, Ghorashian S, Veraitch FS. A guide to manufacturing CAR T cell therapies. *Curr Opin Biotechnol.* 2018;53:164–81.
- Gee AP. GMP CAR-T cell production. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2018 Jun;31(2):126–34.
- Merten O-W, Hebben M, Bovolenta C. Production of lentiviral vectors. *Mol Ther - Methods Clin Dev.* 2016;3:16017.
- Panch SR, Srivastava SK, Elavia N, McManus A, Liu S, Jin P, et al. Effect of Cryopreservation on Autologous Chimeric Antigen Receptor T Cell Characteristics. *Mol Ther.* 2019;27(7):1275–85.
- Xu H, Cao W, Huang L, Xiao M, Cao Y, Zhao L, et al. Effects of cryopreservation on chimeric antigen receptor T cell functions. *Cryobiology.* 2018 Aug;83:40–7.
- Su T, Ying Z, Lu X an, He T, Song Y, Wang X, et al. The clinical outcomes of fresh versus cryopreserved CD19-directed chimeric antigen receptor T cells in non-Hodgkin lymphoma patients. *Cryobiology.* 2020;96:106–13.
- Tyagarajan S, Schmitt D, Acker C, Rutjens E. Autologous cryopreserved leukapheresis cellular material for chimeric antigen receptor-T cell manufacture. *Cytotherapy.* 2019 Dec;21(12):1198–205.
- Woods EJ, Thirumala S, Badhe-Buchanan SS, Clarke D, Mathew AJ. Off the shelf cellular therapeutics: Factors to consider during cryopreservation and storage of human cells for clinical use. *Cytotherapy.* 2016;18(6):697–711.
- Brasil. MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC No 508, de 27 de maio de 202. Dispõe sobre as Boas Práticas em Células Humanas para Uso Terapêutico e pesquisa clínica, e dá outras providências [Internet]. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-508-de-27-de-maio-de-2021-323013606>

Este artigo está em processo de publicação na revista *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*.