

## BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO DE CÉLULAS CAR-T: UMA REVISÃO ABRANGENTE PARA A IMUNOTERAPIA DO CÂNCER

### GOOD PRACTICES FOR MANUFACTURING CAR-T CELLS: A COMPREHENSIVE REVIEW FOR CANCER IMMUNOTHERAPY

Ricardo Leandro Batista RAMOS<sup>1</sup>; Danilo Monteiro de MELO<sup>2</sup>; André Luiz de MELO<sup>3</sup>; Luiz Augusto de MELO<sup>4</sup>; Adriana de MELO<sup>5</sup>

1. Discente do Curso de Farmácia.; Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal - UNIPINHAL – Brasil; E-mail: ricardoleandro3012@hotmail.com

2. Médico, Mestre em Medicina, MBA em Gestão da Saúde - Diretor Geral do Grupo Maxi Science - Instituto Maximize Ciência, Tecnologia e Inovação (IMCTI) - Brasil; E-mail: danilomelo@maxi.institute

3. Agrônomo; Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal - UNIPINHAL – Brasil; E-mail: andre.agronomo@hotmail.com

4. Discente do Curso Técnico em Agropecuária; Etec Dr. Carolino da Motta e Silva – Brasil; E-mail: luizaugustodemelo44@gmail.com

5. Doutora em Farmacologia; Docente do Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal – UNIPINHAL; Cientista Líder do Grupo de Biotecnologia e Terapia Celular Avançada do Instituto Maximize Ciência, Tecnologia e Inovação (IMCTI) - Brasil – E-mail: koymelo@yahoo.com.br.

#### RESUMO

A imunoterapia com células T modificadas por receptores de antígenos quiméricos (CAR-T) tem mostrado eficácia contra malignidades de células B, sendo também investigada em diversos tumores hematológicos e sólidos. Essas células são produzidas ao extrair células T de um paciente e modificá-las para expressar o receptor CAR-T, o que permite que elas identifiquem e ataquem as células tumorais. Conforme essa terapia avança para ensaios clínicos mais avançados e se torna mais acessível, a conformidade do processo de fabricação com normas regulatórias globais é crucial. Há desafios significativos na expansão do processo de fabricação de uma única instituição para uma produção em larga escala em vários locais. Este artigo revê a experiência com a terapia CAR-T CD19 CTL019, discutindo as etapas de processamento celular, a escolha de vetores ideais para consistência e os desafios de expandir essa terapia para pacientes globalmente.

**Palavras-chave:** receptor de antígeno quimérico; linfócitos T; vetor lentiviral; boas práticas de fabricação, terapia celular.

#### ABSTRACT

Immunotherapy with chimeric antigen receptor-modified T cells (CAR-T) has shown efficacy against B cell malignancies and has also been investigated in several hematological and solid tumors. These cells are produced by extracting T cells from a patient and modifying them to express the CAR-T receptor, which allows them to identify and attack tumor cells. As this therapy moves into more advanced clinical trials and becomes more affordable, compliance of the manufacturing process with global regulatory standards is crucial. There are significant challenges in scaling up the manufacturing process from a single institution to large-scale production across multiple locations. This article reviews the experience with the CD19 CAR-T therapy CTL019, discussing the cellular processing steps, the choice of optimal vectors for consistency, and the challenges of expanding this therapy to patients globally.

**Keywords:** chimeric antigen receptor; T lymphocytes; lentiviral vector; good manufacturing practices, cell therapy.

Recebimento dos originais: 23/12/2023

Aceitação para publicação: 15/01/2024

## INTRODUÇÃO

A terapia com células T do receptor de antígeno quimérico (CAR) é uma terapia celular que redireciona as células T de um paciente para atingir e destruir especificamente as células tumorais. Os CARs são proteínas de fusão geneticamente modificadas compostas por (1) um de reconhecimento de antígeno derivado de um anticorpo monoclonal e (2) sinalização intracelular de células T e domínios coestimulatórios (Bittencourt et al., 2006; Durand et al., 2022; Kuwana et al., 1987; Simpson; Caballero, 2014).

O uso de células CAR T como tratamento para o câncer tem sido mais extensivamente investigado em pacientes com malignidades de células B, e os primeiros resultados têm sido encorajadores. Por exemplo, a terapia com células CAR T demonstrou taxas de resposta completa de 69% a 90% em pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda recidivante ou refratária (LLA) em estudos de fase 1 (Gamberale, 2014; Gomes et al., 2020). O desenvolvimento da terapia com células CAR T agora se expandiu além dos ensaios de fase 1 e passou para os ensaios multilocais de fase 2, e uma consideração importante para as instituições acadêmicas e a indústria é como expandir a produção de células CAR T de maneira eficiente.

Analisar as boas práticas de fabricação (BPF) aplicadas à produção de células CAR-T e identificar os requisitos regulatórios relevantes: Este objetivo visa investigar as diretrizes e regulamentos existentes que governam a fabricação de células CAR-T, como as protegidas por agências reguladoras, como a Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos, a European Medicines Agency (EMA) na União Europeia e outras autoridades relevantes. Serão identificados como principais diretrizes e requisitos de qualidade, incluindo aspectos relacionados à identificação de fontes de células, controle de qualidade de matérias-primas, boas práticas de cultivo celular, processos de expansão e ativação das células, controle de qualidade do produto final e rastreabilidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os critérios utilizados para a seleção da amostra foram: artigos que abordassem a temática em questão, nacionais e internacionais, abrangendo as diferentes áreas do conhecimento, publicados em periódicos indexados nas bases de dados eletrônicas Google Acadêmico e Biblioteca Eletrônica Científica Online (SciELO). A ordem de prioridade de escolha para a discussão de artigos deu-se da seguinte maneira:

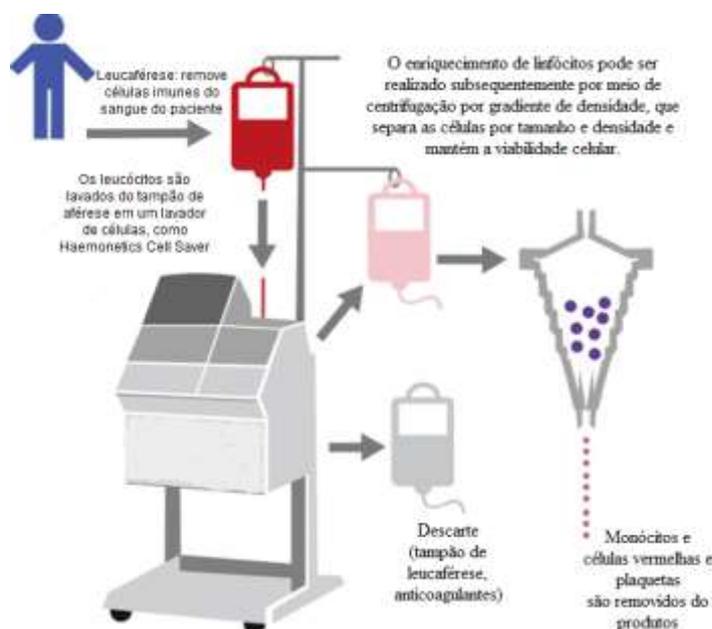
- (i) artigos publicados em periódicos internacionais;
- (ii) artigos publicados em periódicos nacionais reconhecidos;
- (iii) livros publicados por bons editores;
- (iv) teses e dissertações,
- (v) anais de conferências internacionais;
- (vi) anais de conferências nacionais.

Foram escolhidos artigos nacionais e internacionais que realizaram estudos relacionados à terapia celular com células T. A metodologia seguiu a leitura do título em buscas das palavras chaves, e em seguida realizou-se a leitura do resumo para verificar se o estudo realmente tratava o tema escolhido. Após selecionar os estudos que tratam da temática escolhida para esta pesquisa, realizou-se a leitura completa do artigo.

## RESULTADOS e DISCUSSÃO

### *Produção de Células CAR T*

A produção de células CAR T requer várias etapas cuidadosamente executadas, e o teste de controle de qualidade é realizado ao longo de todo o protocolo (Souza et al., 2020). Primeiro, o processo envolve o uso de leucaférese para remover o sangue do corpo do paciente, separar os leucócitos e devolver o restante do sangue à circulação. Após a colheita de um número suficiente de leucócitos, o produto da leucaférese é enriquecido em células T (Figura 1). Este processo envolve a lavagem das células do tampão de leucaférese, que contém anticoagulantes. O enriquecimento de linfócitos pode ser realizado subsequentemente por meio de centrifugação por gradiente de densidade, que separa as células por tamanho e densidade e mantém a viabilidade celular. A separação de subconjuntos de células T no nível da composição CD4/CD8 usando marcadores ou conjugados de esferas de anticorpos específicos é uma etapa adicional que pode ser realizada.



**Figura 1:** Leucaférese e Isolamento de Células T. Após um número suficiente de leucócitos ter sido colhido do sangue do paciente via leucaférese, os anticoagulantes no tampão de leucaférese são lavados do produto e as células são concentradas por elutriação centrífuga de contrafluxo, que separa as células por tamanho e densidade. (Keklik et al., 2018) .

A purificação de células apresentadoras de antígenos autólogas (APCs) do paciente para uso na ativação de células T exigiria várias etapas adicionais, tornando trabalhoso e difícil obter um potente produto de células CAR T. Por esse motivo, foi desenvolvida uma abordagem para ativar as células T de maneira mais padronizada e eficiente usando, por exemplo, grânulos revestidos com anticorpos monoclonais anti-CD3/anti-CD28 (Life Technologies). Embora o uso de anticorpos anti-CD3 sozinhos ou em combinação com células alimentadoras e fatores de crescimento, como IL-2, tenha sido a prática por muitos anos, em comparação com grânulos revestidos com anticorpos monoclonais anti-CD3/anti-CD28 ou células baseados em APCs

artificiais (aAPCs), a ativação e a expansão *ex vivo* são subótimas. Os grânulos, ou aAPCs, podem ser facilmente removidos da cultura por meio de separação magnética. Na presença de interleucina-2 e aAPCs, as células T podem crescer logaritmicamente em um biorreator de perfusão por várias semanas (Burgaleta Alonso de Ozalla, 2022; Zhang et al., 2020).

O uso de aAPCs derivadas da linha celular de leucemia mielóide crônica K562, que pode ser modificada para expressar os ligantes co-estimuladores necessários, também foi investigada como um método de expansão de células T *ex vivo*. As condições de cultura podem ser ainda mais refinadas para polarizar as células T para um fenótipo específico (isto é, Th2 ou Th17) durante a expansão. De fato, as células CAR T que foram polarizadas para um fenótipo Th17 demonstraram eficácia em um modelo pré-clínico, sugerindo que a polarização das células T é uma estratégia que pode entrar na clínica no futuro (Silva & Souto, 2022).

Durante o processo de ativação, as células T são incubadas com o vetor viral que codifica o CAR e, após vários dias, o vetor é removido da cultura por diluição e/ou troca do meio. O vetor viral usa maquinaria viral para se ligar às células do paciente e, ao entrar nas células, o vetor introduz material genético na forma de RNA. No caso da terapia com células CAR T, esse material genético codifica o CAR. O RNA é transcrito reversamente em DNA e integra-se permanentemente no genoma das células do paciente; portanto, a expressão de CAR é mantida à medida que as células se dividem e crescem em grandes números no biorreator (Burgaleta Alonso de Ozalla, 2022; Zhao et al., 2018). O CAR é então transcrito e traduzido pelas células do paciente, e o CAR é expresso na superfície celular. Os vetores lentivirais, que têm um perfil de sítio de integração mais seguro do que os vetores gama-retrovirais, são comumente usados em ensaios clínicos de terapias com células CAR T, incluindo CTL019. Outros métodos de transferência de genes, incluindo o sistema de transposon da Bela Adormecida ou transfecção de mRNA, foram investigados como abordagens alternativas para expressar um CAR em células T. Células CAR T geradas usando transfecção transiente de mRNA têm sido usadas na clínica; no entanto, essa abordagem requer várias rodadas de infusão de células CAR T (Padilha et al., 2022). Além disso, embora o sistema de transposon da “Bela Adormecida” seja considerado barato e tenha sido testado em ensaios clínicos de fase inicial, ainda existem várias preocupações, incluindo a eficiência relativa aos vetores lentivirais, o potencial desconhecido de mutagênese insercional e remobilização de transposons (Cadavid, 2011).

Os sistemas de cultura de biorreator são projetados para fornecer os requisitos ideais de troca gasosa e mistura de cultura necessária para cultivar grande número de células para uso clínico (Figura 2). O WAVE Bioreactor (agora conhecido como Xuri; GE Healthcare Life Sciences), que utiliza uma plataforma de balanço, foi usado para expandir a terapia de células CAR T direcionadas a CD19 CTL019 (Pello et al., 2020; Zhu et al., 2018). Outro sistema de cultivo que pode ser utilizado é o G-Rex (Wilson Wolf), que tem a capacidade de expandir células a partir de baixas densidades de semeadura. O G-Rex usa membranas permeáveis a gás, permitindo que o frasco seja colocado diretamente em uma incubadora de cultura de células. Uma desvantagem deste sistema, no entanto, é que o frasco deve ser aberto durante a inoculação celular. O CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec) é um dispositivo único que realiza a preparação celular, enriquecimento, ativação, transdução, expansão, formulação final e amostragem (Fernández et al., 2019; Mock et al., 2016; Nickolay et al., 2016). Isso contrasta com outros métodos, que usam máquinas separadas para cultura celular, lavagem celular e outras etapas da preparação.

Foi demonstrado recentemente que o CliniMACs Prodigy é viável para gerar células CAR T, e espera-se que este dispositivo seja usado em breve para preparar células CAR T para ensaios clínicos (Zhu et al., 2016).



**Figura 2:** Cultura e Transdução de Células T. As células T são ativadas usando as APCs, transduzidas com o vetor viral que codifica o CAR e expandidas para grandes números em um biorreator. Após a expansão, as células são lavadas, concentradas e criopreservadas (Zhu et al., 2016).

Terminado o processo de expansão celular, a cultura celular, que pode atingir um volume de até aproximadamente 5 L, deve ser concentrada em um volume que possa ser infundido no paciente. As células lavadas e concentradas são criopreservadas em meio infusível e, após a liberação do produto, as células congeladas são transportadas e descongeladas no centro onde o paciente será tratado. Embora os aspectos de lavagem, isolamento e cultura de células sejam semiautomatizados, melhorar o rendimento das partes manuais atuais do processamento será fundamental para o desenvolvimento de terapias com células CAR T que podem ser usadas para uma ampla gama de indicações e populações maiores (Fernández et al., 2019; Glienke et al., 2022; Zhu et al., 2016).

### ***Desafios de trazer a terapia com células CAR T para uma população global de pacientes***

Embora já tenham sido estabelecidos protocolos para a fabricação de células CAR T de nível clínico, as terapias com células CAR T foram usadas para tratar apenas algumas centenas de pacientes até o momento. Ao expandir esse complexo processo de fabricação para tratar mais pacientes em ensaios maiores em um número maior de centros clínicos, o processo deve ser cuidadosamente avaliado para garantir a eficiência da produção sem comprometer a integridade e a potência do produto final (Zhu et al., 2016). Como as células CAR T podem ser usadas para atingir vários tipos de câncer, a escala de produção do vetor e das células CAR T também dependerá da incidência de cada indicação. Considerações adicionais incluem a geração consistente de vetores de alta qualidade para modificações genéticas previsíveis de células, compreendendo a segurança a longo prazo da terapia genética e antecipando preocupações regulatórias globais (Glienke et al., 2022; Mock et al., 2016; Nickolay et al., 2016; Zhu et al., 2016).

***Rumo ao processamento celular consistente: uso do vetor ideal***

Nos Estados Unidos, o vetor viral usado para transduzir o CAR em células T é considerado uma matéria-prima chave do processo de fabricação de células CAR T, e a célula T modificada é considerada o produto experimental, também conhecido como medicamento no União Europeia. Em contraste com o produto de células CAR T, que deve ser gerado individualmente para cada paciente, o vetor viral que codifica o CAR pode ser feito em grandes quantidades e armazenado a -80°C por 4 anos, segundo as pesquisas até o momento. Outros relatórios sugerem que os estoques de vetores virais congelados são estáveis por até 9 anos nessa temperatura (Mock et al., 2016; Nickolay et al., 2016).

Assim como no processo de fabricação de células CAR T, a geração dos estoques de vetores deve ocorrer em instalações de Boas Práticas de Fabricação (GMP). A esterilidade do vetor é crucial porque o produto final da célula CAR T não pode ser esterilizado por filtração; a fabricação do vetor sob condições controladas de sala limpa com processamento aberto mínimo e filtração estéril durante os estágios assépticos finais da produção, tudo apoiado e verificado por uma série de testes de segurança, garante a esterilidade e a ausência de células de embalagem do produto vetorial final. Além disso, o uso de um vetor lentiviral mínimo de terceira geração, incorporando os principais recursos de segurança, aumenta a segurança (Nickolay et al., 2016).

Segundo NICKOLAV e colaboradores, 2016, a fabricação em lote do vetor viral para terapias celulares leva no mínimo 2 semanas. A maior parte desse tempo é gasto cultivando números adequados de células, como células HEK293T, para produzir grandes quantidades de vetor viral com defeito de replicação (Nickolay et al., 2016). A partir de uma alíquota criopreservada de um banco de células, as células são expandidas em cultura por vários dias até o número apropriado para produção, permitindo uma expansão considerável do número original de células semeadas. As células são então transfectadas com plasmídeos que resultam coletivamente na produção do vetor lentiviral mínimo. Esses plasmídeos são tipicamente (1) uma construção de empacotamento Gag/Pol que codifica as proteínas estruturais virais (Gag) e enzimas (Pol); (2) uma construção que codifica uma glicoproteína de envelope adequada de uma fonte heteróloga, resultando em pseudotipagem de partícula de vetor (por exemplo, VSV-G); (3) uma construção para a expressão da proteína acessória viral Rev; juntamente com (4) um plasmídeo de vetor que codifica o construto de CAR, bem como outras sequências necessárias para transcrição reversa, empacotamento de RNA e integração (Mock et al., 2016).

Os sistemas vetoriais devem empregar uma série de recursos de segurança importantes que coletivamente impedem a reaquisição da competência de replicação (por exemplo, Gag/Pol otimizado por códon que minimiza a homologia entre os componentes do vetor para evitar recombinação, sequências de repetição terminais longas auto-inativadas e remoção de todas as sequências desnecessárias e genes acessórios). Dentro de 48 horas após a transfecção, as células de produção começam a liberar o vetor lentiviral que expressa CAR, que pode ser coletado do meio de cultura. Ao longo de vários dias, a troca de meio permite a colheita de vários lotes de meio contendo vetor, normalmente duas colheitas (Fernández et al., 2019; Nickolay et al., 2016). Após a filtração para remover células e detritos de produção, o vetor viral é purificado por meio de processamento a fim de enriquecer o vetor viral enquanto remove as impurezas e formular o vetor em um tampão de armazenamento apropriado. O vetor pode ser

congelado neste ponto para permitir a produção de vários sub-lotes para produzir quantidades maiores do produto vetorial final para maior eficiência econômica. Uma vez que a quantidade alvo de vetor esteja disponível, um outro processo GMP, envolvendo filtração esterilizante e frasco em condições assépticas, é realizado. Uma vez concluída a produção, o vetor é criopreservado até o uso posterior (Fernández et al., 2019).

É importante estabelecer testes de controle de qualidade para segurança, esterilidade, pureza, potência, identidade e título para que os centros de fabricação possam ter certeza de que cada lote de vetor atende aos padrões definidos antes de ser usado para transduzir células T. Esses testes de controle de qualidade são descritos em documentos de orientação escritos pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA e são brevemente resumidos aqui. Os testes de segurança, que podem envolver experimentos pré-clínicos ou estudos de toxicidade em animais, visam determinar se o produto é seguro para humanos quando administrado adequadamente (Zhu et al., 2016).

A esterilidade do produto é testada para garantir que esteja livre de microrganismos contaminantes; no caso de vetores gamaretrovirais e vetores lentivirais, ensaios para retrovírus/lentivírus competentes para replicação (RCRs/RCLs) e o teste de micoplasma das células e meios usados no processo ajuda a determinar se o produto final de células CAR T está livre de agentes adventícios e é seguro para infusão em pacientes. As impurezas no produto vetorial são amplamente testadas para (1) verificar a purificação consistente fornecida pelo processo de fabricação do vetor e (2) consequentemente garantir que a qualidade do vetor seja consistente antes de seu uso no processo de fabricação de células T. O teste de impureza inclui o teste de impurezas relacionadas ao processo, como Benzonase (Merck KGaA; usado para degradar e facilitar a remoção de DNA) e albumina de soro bovino (originária do soro bovino fetal), e também inclui a caracterização tanto do DNA residual da célula hospedeira quanto do DNA plasmidial residual. Além disso, as células T são testadas quanto à contaminação bacteriana e fúngica do processo de cultura de células. A potência do produto vetorial é testada para avaliar se ele funciona conforme previsto e sua identidade é comprovada por meio de testes físicos, químicos ou biológicos relevantes (Glienke et al., 2022).

Nos primeiros ensaios clínicos realizados na Universidade da Pensilvânia, vários fornecedores de vetores foram usados durante a geração da terapia de direcionamento de CD19 CTL019. O uso de vetores de diferentes fornecedores como material de partida levanta questões adicionais sobre a comparabilidade da pureza, estabilidade e função do vetor. Portanto, é desejável que uma única fonte de vetor seja usada para a geração de células CTL019 em ensaios clínicos atuais e futuros. Além disso, o fornecedor de vetores deve ser capaz de atender aos requisitos, como conformidade com GMP, bem como atender à grande demanda de produção. Portanto, nossa abordagem foi adotar um processo de fabricação de vetor lentiviral que pudesse atender aos requisitos das autoridades de saúde globais e que tivesse a validação de processo de suporte apropriada.

Em outros estudos com o vetor lentiviral fabricado pela Oxford BioMedica (OXB), descobrimos que a qualidade consistente do vetor minimizava a variação de local para local no processo subsequente de fabricação de células CAR T (Peters et al., 2020). Para fornecer lotes de tamanho suficiente para atender aos requisitos clínicos e comerciais, o processo foi projetado e otimizado para fabricar vetores em uma série de vários sublotos em uma

determinada campanha de fabricação que dura várias semanas. Esta abordagem depende de uma etapa de purificação e formulação antes da criopreservação e um período de retenção subsequente. Uma vez demonstrado que os sub-lotes atendem a um subconjunto chave de especificações para esse estágio de fabricação, sub-lotes específicos são selecionados para preenchimento e o processamento final é concluído em um único dia (Peters et al., 2020; Zhu et al., 2018).

O sistema de fechamento do recipiente intermediário (e o volume de preenchimento associado), os parâmetros de processamento GMP (condições de congelamento/descongelamento, outras condições de processamento asséptico, recipiente final, etc.) e o tampão de formulação foram todos selecionados para garantir que qualquer perda no título seja mínima e para que o produto preenchido resultante atenda às especificações de destino e tenha um desempenho consistente e robusto no processo de fabricação de células T. Além disso, o estágio de espera é suportado por um programa de teste de estabilidade, que mostra que o título do vetor é estável no armazenamento por um período prolongado (Zhu et al., 2018).

A otimização do vetor para a transdução de células CAR T antes de iniciar a fabricação em larga escala reduz a variabilidade e maximiza a eficiência. A escala de produção de vetores precisa levar em consideração o tamanho potencial da população de pacientes, indicação por indicação. Com base nisso, nossa estratégia é focar a oferta clínica atual, bem como a oferta comercial inicial, em plataformas de produção atuais e bem estabelecidas, enquanto investimos no desenvolvimento de processos de produção de última geração que fornecerão uma qualidade equivalente de vetor funcional em uma escala significativamente maior. Os vetores mais comuns usados na fabricação de células CAR T são sistemas de vetores com defeito de replicação baseados em dois tipos de retrovírus: gamaretrovírus e lentivírus (Nickolay et al., 2016). Tanto os gamma retrovírus quanto os lentivírus fornecem RNA que é transcrito reversamente em DNA na célula-alvo; esse DNA, que codifica o construto CAR, então se integra ao genoma do hospedeiro por meio de um processo catalisado pela enzima integrase e várias sequências-chave no construto do vetor. Uma vantagem adicional dos vetores derivados de lentivírus é que eles retêm a capacidade dos lentivírus de infectar células que não se dividem, aumentando assim sua capacidade de transduzir uma ampla variedade de células, incluindo células quiescentes e difíceis de transduzir. No entanto, conforme descrito anteriormente, a ativação de células T é necessária para aumentar a eficiência da transdução, e o vetor lentiviral é introduzido durante a ativação celular (Nickolay et al., 2016).

### ***Investigar a segurança a longo prazo de vetores virais requer acompanhamento do paciente***

Avaliar a segurança a longo prazo do uso de vetores virais para terapias celulares e genéticas exigirá um acompanhamento extenso. Conforme mencionado acima, as diretrizes das autoridades de saúde também exigem o acompanhamento de longo prazo dos estudos com vetores virais; no entanto, os requisitos podem diferir dependendo dos países envolvidos. Por exemplo, um estudo nos Estados Unidos (EUA) foi desenvolvido para monitorar pacientes que receberam a terapia de células T CAR CD19 CTL019 por 15 anos após o tratamento (Peters et al., 2020). Este estudo incluirá pacientes de qualquer idade que foram tratados com CTL019 para qualquer malignidade de células B. O objetivo principal deste estudo de acompanhamento

é descrever eventos adversos tardios suspeitos de estarem relacionados à terapia com células CD19 CAR T, como o desenvolvimento de novas malignidades, incidência ou exacerbação de um distúrbio neurológico ou autoimune preexistente ou nova incidência de um distúrbio hematológico. Os objetivos secundários deste estudo são monitorar a persistência das células CTL019 no sangue periférico e a eficácia da terapia a longo prazo. A persistência de células CTL019 será examinada usando qPCR para detectar o transgene CD19 CAR em pontos de tempo especificados. Além disso, será monitorada a proporção de pacientes que recidivam ou apresentam progressão da doença, bem como a incidência de morte de pacientes por qualquer causa à saúde reprodutiva e os resultados da gravidez também serão acompanhados em pacientes do sexo feminino que foram tratadas com células CAR T. Assim, o design e a fabricação cuidadosos de vetores virais para terapia com células CAR T para maximizar a segurança, juntamente com testes de qualidade e segurança e acompanhamento de longo prazo do paciente, garantem que a segurança do paciente seja a principal prioridade (Fernández et al., 2019).

#### ***Garantir a qualidade do produto ao passar de uma única instituição para um processo de fabricação em larga escala em vários locais***

Um grande desafio com a expansão da produção de terapias com células CAR T é a transição de um processo flexível em uma única instituição acadêmica para um processo altamente controlado que pode ser implementado em muitos locais de coleta, fabricação e tratamento. Portanto, uma coordenação efetiva entre os locais de coleta, fabricação e tratamento envolvidos é fundamental para garantir que o material seja manuseado corretamente e os pacientes sejam agendados adequadamente ao longo do processo terapêutico (Cadavid, 2011; De Almeida, 2022; Micklethwaite et al., 2021).

O sucesso no desenvolvimento de um processo de fabricação global de células CAR T será impulsionado por uma compreensão robusta do produto e do processo, a fim de estabelecer o perfil do produto alvo e os atributos críticos de qualidade. Para CTL019, o perfil do produto alvo inclui as qualidades já discutidas: células T altamente potentes e específicas do alvo que são capazes de expansão robusta e persistência de longo prazo in vivo. Usando este perfil de produto, foram explorados atributos críticos de qualidade. Número de células, eficiência de transdução, taxa de crescimento, fenótipo celular, e análise funcional são todos atributos críticos de qualidade do CTL019 que são bem compreendidos e controlados. O fenótipo celular inclui medidas como distribuição de subconjuntos de células T (auxiliar ou citotóxico, efetor ou memória, etc.) e funcionalidade (morte celular, liberação de citocinas, capacidade proliferativa, exaustão, apoptose, etc.). Esses atributos críticos de qualidade serão coordenados com a compreensão do processo para desenvolver um processo de fabricação consistente e uma estratégia de controle que garantirá um produto uniforme. Os exemplos incluem a porcentagem de células T CD3+ no produto e a medição da potência. No entanto, deve-se notar que os valores de positividade, viabilidade, fenótipo e potência do CAR variam de produto para produto. À medida que mais experiência é adquirida e esses dados começam a se tornar públicos, comparações justas sobre a utilidade e faixas apropriadas podem ser avaliadas (Burgaleta Alonso de Ozalla, 2022; De Almeida, 2022; Keklik et al., 2018; Zhang et al., 2020).

### ***Atendendo às expectativas regulatórias globais para a implementação bem-sucedida de terapias com células CAR T***

Os primeiros resultados da terapia com células CAR T sugerem benefício significativo para o paciente e, portanto, essa terapia tem potencial para sucesso clínico, o que pode levar a uma maior colaboração e harmonização regulatória global. O benefício para o paciente oferecido pelas terapias com células CAR T oferece uma oportunidade promissora para criar um terreno comum entre diferentes autoridades reguladoras e melhorar a cooperação internacional (Silva & Souto, 2022). Garantir a conformidade regulatória é um fator crítico para o desenvolvimento bem-sucedido dessa nova abordagem terapêutica, e isso será um desafio interessante em um ambiente global. A FDA regula as terapias celulares e genéticas há muitos anos e desenvolveu uma série de documentos de orientação relativos a esses produtos. No entanto, esses documentos de orientação não estão harmonizados com outros países ou regiões. Além disso, cada país principal tem um foco ligeiramente diferente ao revisar os pedidos de ensaios clínicos (Silva & Souto, 2022; Zhao et al., 2018).

Portanto, quanto mais países estiverem envolvidos em ensaios clínicos, mais robusto será o processo de fabricação para atender a todas as questões e requisitos regulatórios. Para trazer harmonização na área emergente de terapias celulares e gênicas, em 11 de outubro de 2012, nove membros da comunidade reguladora global, incluindo o Brasil ANVISA; Agência Europeia de Medicamentos (EMA); Saúde Canadá; Instituto Nacional de Biológicos da Índia (NIB); Ministério da Saúde, Bem-Estar e Trabalho do Japão/Agência de Dispositivos Farmacêuticos e Médicos; Ministério de Segurança de Alimentos e Medicamentos da Coreia do Sul (anteriormente conhecido como Food and Drug Administration [KFDA]); Autoridade de Ciências da Saúde de Cingapura (HSA); Swissmedic; e a Food and Drug Administration dos EUA, reunidos para formar um grupo integrado com o objetivo de discutir as melhores práticas na regulamentação de terapias baseadas em células/genes e apoiar a harmonização (<https://www.iprf.org/en/working-groups/gene-therapy-working-group/>).

Os desenvolvedores de células CAR T devem ter uma compreensão completa desse cenário regulatório diversificado. Até que regulamentos harmonizados sejam estabelecidos e haja experiência comum entre as regiões, podemos esperar um nível significativo de incerteza no desenvolvimento do produto e uma maior confiança no julgamento subjetivo dos reguladores. Exemplificando esse desafio estão os diferentes requisitos associados à fabricação que existem entre as regiões. Por exemplo, triagem e teste de doadores, rastreabilidade e rotulagem, confidencialidade do paciente e requisitos de aférese podem variar amplamente entre os países. Isso é particularmente desafiador se o material inicial do doador e o produto final forem enviados através das fronteiras internacionais (Miranda et al., 2022; Padilha et al., 2022; Souza et al., 2020). Outro exemplo é que as definições dos materiais usados (ou seja, a partida ou matéria-prima) e os requisitos para controle de qualidade desses materiais variam entre as regiões. Equilibrar os requisitos de diferentes países com os requisitos de qualidade do material de partida pode ser um desafio, mas é crucial para ensaios multinacionais. Portanto, a origem, rastreabilidade, composição e certificação de cada reagente devem estar prontamente acessíveis. Por fim, como cada região possui documentos e recomendações exclusivos relacionados aos materiais usados na fabricação de terapia celular e genética, os requisitos para o soro humano ou animal usado para cultura de células diferem entre as regiões globais. Assim,

para abordar algumas dessas preocupações regulatórias, estamos estabelecendo protocolos para a fabricação de células CAR T usando reagentes que atendem aos requisitos de qualidade das principais regiões globais.

### ***Áreas adicionais de investigação ativa no desenvolvimento e fabricação de terapia celular CAR T***

Existem várias áreas pré-clínicas de investigação projetadas para melhorar as terapias com células CAR T e fornecer benefícios a uma população maior de pacientes. Um aspecto sob investigação é o subtipo de células T usadas para terapia com células CAR T. A população inicial de células usada para muitas terapias de células CAR T consiste em células T CD4 + e CD8 + na proporção presente no sangue periférico do paciente. No entanto, o uso de uma proporção fixa de 1:1 de células T CAR CD4 + :CD8 + em pacientes com LLA e linfoma não-Hodgkin foi investigado (Silva & Souto, 2022). Se a proporção de subconjuntos de células T se tornar um fator importante na terapia com células CAR T, os protocolos de fabricação podem precisar ser alterados para incluir as etapas extras de purificação necessárias para administrar células CAR T em uma proporção fixa de subconjunto.

Outras áreas de consideração para o futuro da fabricação de uma terapia com células CAR T incluem a mitigação de possíveis eventos adversos, tanto a curto quanto a longo prazo. Por exemplo, um efeito adverso relacionado à terapia com células CAR T é a síndrome de liberação de citocinas (SRC) grave, que ocorre em uma minoria de pacientes. A SRC é causada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias diretamente das células CAR T e células tumorais moribundas. Embora a maioria dos casos de SRC seja manejável com algoritmos de tratamento estabelecidos, especulou-se que os mecanismos para inativar as células CAR T em pacientes com efeitos adversos poderiam ser úteis para melhorar a segurança da terapia com células CAR T. O uso de um interruptor suicida incorporado à construção do CAR é uma estratégia que está sendo investigada atualmente como uma maneira potencial de esgotar especificamente as células CAR T de maneira controlada e pode se tornar importante à medida que a terapia com células CAR T é investigada em uma clínica cada vez maior população. Por exemplo, a chave de segurança iCasp9 foi efetivamente usada para reduzir a doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD) em pacientes que receberam transplante alogênico de células-tronco. No entanto, a depleção de células CAR T também pode anular o benefício potencial da vigilância tumoral mediada por células CAR T a longo prazo (Burgaleta Alonso de Ozalla, 2022; Silva & Souto, 2022; Zhang et al., 2020).

Outro método de aumentar potencialmente a segurança da terapia com células CAR T envolve melhorar a especificidade das células T modificadas. Essa abordagem pode ser especialmente importante para células CAR T direcionadas a tumores sólidos, que geralmente não possuem antígenos exclusivamente expressos no tumor. Um estudo pré-clínico mostrou que as células CAR T podem ser usadas para atingir tumores que expressam dois antígenos, PSCA e PSMA; as células CAR T não mataram as células tumorais que expressam apenas um desses antígenos. Estratégias combinatórias de reconhecimento de antígenos podem, portanto, ser importantes a serem consideradas ao projetar CARs para o tratamento de tumores sólidos. Em nossa experiência, a CRS ainda não foi observada em ensaios clínicos usando células CAR T para atingir tumores sólidos, talvez porque menos células tumorais são rapidamente mortas de uma só vez devido à massa tumoral sólida (Zhu et al., 2016).

Uma estratégia adicional sob investigação é o uso de células CAR T alogênicas disponíveis no mercado. Esta plataforma usa a edição do genoma para inativar o gene TCR $\alpha$  endógeno, que limita a capacidade das células alogênicas de causar GVHD. Células CAR T disponíveis no mercado demonstraram eficácia em modelos de xenoenxerto de linfoma; mas, embora haja um relato de uso compassivo em um paciente, os resultados do uso controlado em ensaios clínicos ainda não foram relatados (Glienke et al., 2022; Zhu et al., 2016).

Como a qualidade das células do paciente usadas para a transdução de CAR afeta a eficácia do produto final de células CAR T também deve ser investigado mais detalhadamente. Foi demonstrado recentemente que a redução de um fenótipo esgotado de células T está associada a uma melhor eficácia das células CAR T (Zhu et al., 2016). Portanto, a escolha dos domínios de sinalização de CAR, a seleção de subconjuntos de células e o ajuste das condições de cultura de células para diminuir a porcentagem de células que se esgotam durante os processos de transdução e expansão podem ser críticos para gerar o produto de células CAR T da mais alta qualidade .

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dado o sucesso das células CAR T no tratamento de pacientes nos Estados Unidos com malignidades de células B, a expansão da capacidade de fabricação de células CAR T permitirá o exame da segurança e eficácia das terapias com células CAR T em coortes maiores de pacientes em todo o mundo. No entanto, uma série de desafios regulatórios e de fabricação precisam ser considerados ao tentar trazer uma terapia celular com um processo de fabricação complexo para uma população internacional de pacientes maior. Atualmente, estamos fabricando a terapia de células T CAR CD19 CTL019 de uma forma que agilizará o processo de uso da terapia globalmente. Para conseguir isso, estabelecemos colaborações robustas com instituições acadêmicas e fornecedores para investigar minuciosamente o produto e o processo para garantir que nossos materiais sejam controlados para manter a alta qualidade.

### REFERÊNCIAS

- BITTENCOURT, R. A. DE C., PEREIRA, H. R., FELISBINO, S. L., MURADOR, P., OLIVEIRA, A. P. E. DE, & DEFFUNE, E. (2006). Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. *Acta Ortopédica Brasileira*, 14(1), 22–24. <https://doi.org/10.1590/s1413-78522006000100004>
- BURGALETA ALONSO DE OZALLA, C. (2022). Visión actual de la terapia con células CAR-T. *Revista de Investigación y Educación En Ciencias de La Salud (RIECS)*, 7(1), 83–90. <https://doi.org/10.37536/riecs.2022.7.1.312>
- CADAVID, L. F. (2011). SISTEMAS INMUNES ALTERNATIVOS *Alternative Immune Systems*. In *Acta biol. Colomb* (Vol. 16, Issue 3).
- DE ALMEIDA, A. V. N. (2022). MODIFICAÇÃO PROGNÓSTICA DE CÂNCERES HEMATOLÓGICOS ATRAVÉS DO TRATAMENTO COM CÉLULAS CAR-T. *Brazilian Journal of Case Reports*, 2(Suppl.6), 26. <https://doi.org/10.52600/2763-583x.bjcr.2022.2.suppl.6.26>
- DURAND, V. R., BEZERRA, A. P., RIBEIRO, M. G. G., SILVA, N. F., & CARVALHO, Y. C. DE. (2022). A EFICÁCIA IMUNOMODULATÓRIA DO ANTICORPO MONOCLONAL OCRELIZUMAB NO TRATAMENTO DA ESCLEROSE MÚLTIPLA. <https://doi.org/10.51161/ii-conbrai/6004>
- FERNÁNDEZ, L., FERNÁNDEZ, A., MIRONES, I., ESCUDERO, A., CARDOSO, L., VELA, M., LANZAROT, D., DE PAZ, R., LEIVAS, A., GALLARDO, M., MARCOS, A., ROMERO, A. B., MARTÍNEZ-LÓPEZ, J., & PÉREZ-

- MARTÍNEZ, A. (2019). GMP-Compliant Manufacturing of NKG2D CAR Memory T Cells Using CliniMACS Prodigy. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02361>
- GAMBERALE, R. (2014). CAR T cells: Fundamentos de esta prometedora terapia inmunológica. *Hematología*, 18, 28–31.
- GLIENKE, W., DRAGON, A. C., ZIMMERMANN, K., MARTYNISZYN-EIBEN, A., MERTENS, M., ABKEN, H., ROSSIG, C., ALTVATER, B., ALEKSANDROVA, K., ARSENIYEV, L., KLOTH, C., STAMOPOULOU, A., MORITZ, T., LODE, H. N., SIEBERT, N., BLASCZYK, R., GOUDEVA, L., SCHAMBACH, A., KÖHL, U., ... Esser, R. (2022). GMP-Compliant Manufacturing of TRUCKs: CAR T Cells targeting GD2 and Releasing Inducible IL-18. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.839783>
- GOMES, B. M. S., CARNEIRO, J. F., CASTRO, M. S., GOMES, T. C. A., MARTINS, C. A., PUTON, C., MACÊDO, P. P. R., ALCÂNTARA, R. Q., KATOPODIS, P. P., & SILVA, A. M. T. C. (2020). O USO DE CAR-T CELL NO TRATAMENTO DE LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA: REVISÃO SISTEMÁTICA. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, 42, 420–421. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.707>
- KEKLIK, M., KEKLIK, E., KALAN, U., OZER, O., ARIK, F., & SARIKOC, M. (2018). Comparison of Plateletpheresis on the Haemonetics and Trima Accel Cell Separators. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 22(1), 87–90. <https://doi.org/10.1111/1744-9987.12607>
- KUWANA, Y., ASAKURA, Y., UTSUNOMIYA, N., NAKANISHI, M., ARATA, Y., ITOH, S., NAGASE, F., & KUROSAWA, Y. (1987). Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 149(3), 960–968. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(87\)90502-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(87)90502-X)
- MICKLETHWAITE, K. P., GOWRISHANKAR, K., GLOSS, B. S., LI, Z., STREET, J. A., MOEZZI, L., MACH, M. A., SUTRAVE, G., CLANCY, L. E., BISHOP, D. C., LOUIE, R. H. Y., CAI, C., FOOX, J., MACKAY, M., SEDLAZECK, F. J., BLOMBERG, P., MASON, C. E., LUCIANI, F., GOTTLIEB, D. J., & BLYTH, E. (2021). Investigation of product-derived lymphoma following infusion of piggyBac-modified CD19 chimeric antigen receptor T cells. *Blood*, 138(16), 1391–1405. <https://doi.org/10.1182/blood.2021010858>
- MIRANDA, I. M. D. A., FARIAS, A. G. D. S., SCHNEIDER, V. F. D. A., NUNES, L. D. L., & PRZYSIEZNY, P. E. (2022). EFICÁCIA E MECANISMO DE FUNCIONAMENTO DAS CÉLULAS CD19 CAR T NO TRATAMENTO DE CÂNCER HEMATOLÓGICO. <https://doi.org/10.51161/ii-conbrai/6313>
- MOCK, U., NICKOLAY, L., PHILIP, B., CHEUNG, G. W. K., ZHAN, H., JOHNSTON, I. C. D., KAISER, A. D., PEGGS, K., PULE, M., THRASHER, A. J., & QASIM, W. (2016). Automated manufacturing of chimeric antigen receptor T cells for adoptive immunotherapy using CliniMACS prodigy. *Cytotherapy*, 18(8), 1002–1011. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.05.009>
- NICKOLAY, L., MOCK, U., PHILLIP, B., CHEUNG, G. W. K., ZHAN, H., PEGGS, K., JOHNSTON, I., KAISER, A., PULE, M., THRASHER, A., & QASIM, W. (2016). 455. Automated Lentiviral Transduction of T Cells with CARS Using the CliniMACS Prodigy. *Molecular Therapy*, 24, S180–S181. [https://doi.org/10.1016/s1525-0016\(16\)33264-6](https://doi.org/10.1016/s1525-0016(16)33264-6)
- PADILHA, M. D. M., RAMOS, S. A. A., DUARTE, A. C., SOUSA, R. M. DE, BALCAZAR, O. D. A., MACHADO, C. L. R., PIMENTEL, C. P., HIRAI, K. E., COSTA, G. M. DA, & HOLANDA, G. M. (2022). Imunomodulação de células cancerosas por imunoterapias CAR-T, mAbs, CTLA-4 e neoantígenos direcionados. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, 15(3), e9959. <https://doi.org/10.25248/reas.e9959.2022>
- PELLO, O. M., LANZAROT, D., COLORADO, M., AMUNARRIZ, C., INSUNZA, A., ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, L., DÍEZ DE VELASCO, M., SAINZ-SAINZ, N., & ARROYO, J. L. (2020). Optimal large-scale CD34+ enrichment from a leukapheresis collection using the clinimacs prodigy platform. *Clinical Case Reports*, 8(12), 2650–2653. <https://doi.org/10.1002/ccr3.3232>

- PETERS, S. A., PETERSSON, C., BLAUKAT, A., HALLE, J. P., & DOLGOS, H. (2020). Prediction of active human dose: learnings from 20 years of Merck KGaA experience, illustrated by case studies. In *Drug Discovery Today* (Vol. 25, Issue 5, pp. 909–919). <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.01.002>
- SILVA, L. V. DA, & SOUTO, M. P. (2022). PANORAMA GERAL SOBRE AS CÉLULAS CAR-T: AVANÇOS NA IMUNOTERAPIA CELULAR CONTRA O CÂNCER. <https://doi.org/10.51189/conbiotec/41>
- SIMPSON, A., & CABALLERO, O. (2014). Monoclonal antibodies for the therapy of cancer. *BMC Proceedings*, 8(S4). <https://doi.org/10.1186/1753-6561-8-s4-o6>
- SOUZA, K. S., SILVA, M. R. F. DA, MIRANDA, F. S. L., LEITE, K. M., SILVA, J. DOS S., SOUSA, R. M. DE, BRITO, L. P. DE, SILVA, R. R. DOS S., SANTOS, M. D. V., LIMA, F. L. O., SANTOS, G. DOS, SILVA, R. P. L. DA, SILVA, D. C. B. DA, NUNES, F. S., OLIVEIRA, M. B. M. DE, & FARIAS, I. C. C. (2020). Imunoterapia dirigida com células T-CAR para tratamento de leucemia linfóide aguda. *Research, Society and Development*, 9(11), e72891110372. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i11.10372>
- ZHANG, Q., PING, J., HUANG, Z., ZHANG, X., ZHOU, J., WANG, G., LIU, S., & MA, J. (2020). Terapia con células CAR-T en el cáncer: tribulaciones y camino a seguir. *Journal of Immunology Research*, 2020.
- ZHAO, J., LIN, Q., SONG, Y., & LIU, D. (2018). CAR universales, células T universales y células T CAR universales. *Journal of Hematology & Oncology*, 11(132), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0677-2>
- ZHU, F., SHAH, N. N., XU, H., SCHNEIDER, D., ORENTAS, R., DROPULIC, B., HARI, P., & KEEVER-TAYLOR, C. A. (2016). CAR-T Cell Production Using the Clinimacs® Prodigy System. *Blood*, 128(22), 5724–5724. <https://doi.org/10.1182/blood.v128.22.5724.5724>
- ZHU, F., SHAH, N., XU, H., SCHNEIDER, D., ORENTAS, R., DROPULIC, B., HARI, P., & KEEVER-TAYLOR, C. A. (2018). Closed-system manufacturing of CD19 and dual-targeted CD20/19 chimeric antigen receptor T cells using the CliniMACS Prodigy device at an academic medical center. *Cytotherapy*, 20(3), 394–406. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.09.005>