
通过技术创新 驱动CAR-T制造优化

作者：writer 来源：本站

本文原地址：<https://www.iikx.com/news/progress/740.html>

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

2018年6月2日讯，随着CAR-T疗法获批上市，优化CAR-T细胞生产工艺成为迫切需求，市场急需更高效、成本更低的细胞生产工艺。2017年全封闭自动化CAR-TXpress™系统正式进入CAR-T市场，为全球带来新一代CAR-T生产工艺，可实现CAR-T细胞高效率、低成本生产，备受瞩目。

近日，《CELL GENE THERAPY INSIGHTS》杂志采访了这项创新技术平台的主要发明者Philip H Coelho，深入了解新一代CAR-T生产工艺CAR-TXpress™。

Philip H Coelho Philip H Coelho先生是博雅控股集团旗下热动力医疗(ThermoGenesis，纳斯达克股票代码：KOOL)的首席技术官(CTO)。

他是一位工程师，也是一位发明家，已获得40多项与细胞分选、细胞清洗、自动化细胞冻存、低温自动化机械技术、血液内凝血蛋白的收集相关的美国专利。在职期间，Coelho先生开发了Thermoline超快速血浆冷冻机和解冻机、CryoSeal自动化系统(将手术患者血液制成纤维蛋白胶)、BioArchive®机械系统(用于胎盘/脐血造血干细胞及祖细胞(HSPC)的程序降温 and 低温冻存)以及AutoXpress®系统(将脐血中的HSPC无菌自动收集至25ml双室冷冻袋)。BioArchive®系统以及AutoXpress®系统已在全球树立脐血处理以及存储的GMP最高标准。

9年来，Coelho先生与其工程师和细胞生物学家精英团队开发了符合GMP规范的新一代可编程系统，能提高从外周血、胎盘/脐带血、骨髓和白细胞产品中分离纯化干/祖细胞和免疫细胞的速度和效率。这些研究项目演化成为CAR-TXpress™技术平台，这是一种自动化、全封闭的生物制造平台，能够大规模生产高质量、临床级CAR-T细胞。Q：CAR-T生产工艺中哪些环节可以实现自动化或半自动化？Coelho先生：CAR-T细胞生产工艺的关键环节可以实现自动化，现如今行业迫切需要推进生产自动化。

值得注意的是，每一次的白细胞去除术(leukapheresis)都能从健康供体中获取约 5×10^9 个T细胞。这个数量远高于实际注入患者体内的基因修饰T细胞的数量(诺华Kymriah™： $0.2-5 \times 10^6/\text{kg}$ ，凯特Yescarta™： $2 \times 10^6/\text{kg}$)。更让人担心的是，采用当前手工生产工艺，可输注的T细胞数量会随着一周或更长的扩增周期而大量损耗。整个工艺流程均会发生关键细胞损耗，但最严重的可能发生在第一阶段——从患者血液中收集单个核细胞(MNC)，进行T淋巴细胞分离。常年在实验室生产CAR-T细胞的专业人员告诉我们，当前的手工工艺可导致细胞损耗率高达50%至90%，因此将此生产环节自动化尤为重要。

优良的自动化工艺应能够在去除血小板、红细胞、粒细胞以及清洗冷冻保护剂二甲亚砜(DMSO)的同时，将MNC损耗最小化，获取纯化的MNC，从而有效分选T细胞。成功的自动化系统还需要克服因不同来源的患者血液所带来的严重并发症的风险(现采或冻存的外周血或白细胞去除术的产品)。

下一个需要自动化的环节是从MNC中分选T淋巴细胞。自动化分选必须获取高纯度T细胞，以求最大限度提高下游处理效率。抗体分选后残余在T淋巴细胞群中的单核细胞会降低转导效率和T细胞的扩增。此外，如果单核细胞残余量较大(常发生于传统磁珠分离过程)，采用人工方法清除这些单核细胞亦无法避免目标T细胞再次损耗。获取高纯度T细胞后，优良的自动化激活工艺可避免再次引发并发症。例如，某些用于激活的磁珠产品本身就是个大问题，为此FDA要求临床医师在清洗前后对磁珠进行计数(磁珠数量常大于需要激活的细胞量)。当然，FDA不希望与细胞大小相同的磁珠随细胞输入患者体内。

Q：您对企业采用自动化设备有何建议，理想情况下，这种投资何时能见到回报？

Coelho先生：如果是生产小部件，那么简单的投资回报(ROI)分析就可以。但我们并不是在生产小部件，而是在努力收集足量具有可行性的基因修饰T细胞，用来拯救生命，因此患者的生存率才是分析的关键。当然，硅谷制造模式值得参考：制造商升级芯片自动化生产工艺后，生产效率高、生产成本降低，同时产品质量也得以提升。然而，芯片制造商是不会遇到生物制药领域这种复杂问题的——患者提供的原始细胞在数量和质量上差异很大，生产设备的各个自动化环节需要在降低目标成本的同时，既要缩短生产耗时，又要提升细胞回收率、活率、纯度及稳定性。目前，将患者细胞输入自动化生产设备系统后，我们并不能随即从设备另一端轻易获取可用于治疗的CAR-T细胞产品。但是，在生产工艺流程中系统地引入自动化模块将能简化现有生产工艺，从而更易实现整个工艺流程的全自动化。

Q：与非自动化制造方法相比，CAR-TXpress™系统性能如何？

Coelho先生：我们相信，与传统手工生产系统相比，我们的自动化模块将在MNC纯化、细胞清洗、抗体分选以及T细胞激活方面表现更佳，并且大幅缩短处理时长。

有文献指出，采用Ficoll法从外周血中分离MNC，目标MNC的损耗率大于30%，且耗时近4小时。我们的自动化、全封闭系统X-

LAB™系统在30分钟左右即可实现MNC回收率大于90%，同时去除红细胞、粒细胞以及血小板。

文献还指出，采用常规手工工艺或是第一代机械化工工艺清洗已复苏白细胞产品导致T细胞损耗率高于30%。相反，自动化、全封闭系统X-WASH™能实现冷冻保护剂二甲亚砜(DMSO)去除率保持在99%以上，且T细胞损耗率低于10%，这比传统磁珠分离法高出10%至15%的水平。我们的试验证明，在生产工艺下游的扩增环节，经微泡激活的细胞可保持活性，并且扩增效果优于传统磁珠技术分选获取的T细胞的扩增效果。与现有手工技术相比，我们自主研发的模块式自动化技术每个工艺环节预计至少分别提升效率10-20%。

现阶段我们的实验数据基本都来自健康供体细胞，预计不久的将来我们就能取得真实患者提供的细胞，从而获得最新的比较数据。提取患者大量细胞进行新技术测试的确颇具挑战。这些重度患者最需要的是将活细胞尽多用于CAR-T治疗，而非研究。然而，我们正在与冻存了过量患者细胞的机构合作，这些机构会不定期地因患者在细胞进行处理前不幸地去世，或因患者提供了超过所需的数量，而留下过剩的细胞。鉴于这些细胞来自重症患者且已冻存，接下来的几个月内我们能够用这些最真实的细胞对我们的技术进行测试，希望所获数据与健康捐赠者细胞试验数据一致。

Q：这个设备平台是否具有可扩展性？是否需要大量定制？

Coelho先生：CAR-TXpress™平台设备可扩展，无需大量定制。事实上，我们设计的每个模块(X-LAB™，X-WASH™或X-BACS™)，都只需要对其控制模块进行编程。例如，如果需要纯化MNC，仅需将控制模块的程序根据原材料(即白细胞或外周血)稍作修改。一旦控制模块进行了编程，CAR-TXpress™系统将持续重复这个程序。为进行扩展测试，我们在当地一个GMP细胞处理实验室做了一组对比试验。将外周血分成两份等量样本，其中一份样本交由熟练技术员采用Ficoll法及磁珠法来分离并激活T细胞；将另一份样本交由熟练技术员使用X-LAB™和X-BACS™技术进行T细胞分离与激活，两组技术员同时开始操作。结果，第一组技术员用Ficoll法刚完成MNC纯化，采用CAR-TXpress™系统的技术员已经完成MNC纯化、分选，并已激活CD3+细胞。

我们特地将CAR-TXpress™设计为模块化系统，因为模块化系统本身可以为企业有效控制成本，而非瑞士军刀集成设备那般造价昂贵。采用模块化平台，便于自主设计高效工艺流程。此外，MNC纯化、分选和激活环节如果能够显著减少T淋巴细胞的损耗，完成转导后则可对已修饰T细胞进行简单冲洗，将之输注患者体内，使其在体内扩增。如果这种方法得到临床验证，则可大幅缩短从T细胞收集到临床注射CAR-T细胞的时长。

Q：CAR-TXpress™系统不用Ficoll法或磁珠法分离和分选细胞，那么它的基本原理是怎样的呢？

Coelho先生：Ficoll密度梯度分离法常用于从外周血或白细胞中分离纯化MNC，且已沿用40余年，采用手工操作，耗时长且效率低。所有实验技术员都用过这种方法。相信贵刊的很多读者也都意识到这种方法的种种缺陷。

对于需要CAR-T治疗的患者而言，目标MNC在生产工艺的第一环节就损耗了30%至60%，其中约

50%为T淋巴细胞，这些损失无法挽回，也不应让急需CAR-T细胞治疗的患者承担。磁珠法用于分离MNC中的T淋巴细胞，已沿用约25年，确实很有价值。然而，使用此方法规模化生产细胞以大面积供应患者群体时，其表现出来的低产能、低细胞回收率及低纯度会带来许多挑战。此外，正如前面所说的，用于激活的一些磁珠产品本身就存在问题(磁珠的量通常比激活细胞的数量还要多)，以至于FDA要求临床医生在细胞清洗前后对磁珠数量进行计数。相反，我们设计的脂质壳微泡在细胞分选激活后便被释放出来。转导扩增后，残余物质经洗涤自动去除。

Q：能否请您描述BACS的工作原理，告诉我们它与其他细胞分离法有何不同之处？

Coelho先生：我们的浮力激活技术(BACS)利用脂质外壳、链酶亲和素包裹气泡，气泡直径2-3微米，与生物素化抗体结合来选择、激活、或同时选择激活靶细胞，如T淋巴细胞。美国FDA非常了解微泡，并且批准在诊断造影技术中使用微泡。微泡可从任何部位直接输入至患者血管，分散到全身，采用恰当的超声信号能使微泡在体内爆破，从而传播信号，呈现出附近组织的影像，使临床诊断医生可以无创地观察该组织。常规细胞分选技术利用涂有抗体的磁珠来附着表面带有抗原的靶细胞，然后通过磁场环境来捕获靶细胞。

采用该技术，无论是靶细胞还是非靶细胞都向下流经具有磁场的狭窄通道。未附着磁珠的非靶细胞通过该通道时进入特定容器被清除。然而，靶细胞与非靶细胞的细胞混合物也会被磁场通道吸附，这也是该方法的局限性。因为捕获的细胞群中存在着非靶细胞，从而降低了终产物中的靶细胞纯度，且需要在转导和T细胞扩增前增设工艺环节去除污染的单核细胞。相反，CAR-TXpress™技术使用微泡/抗体复合物与靶细胞结合，改变了整体密度，离心分离时，非靶细胞下沉，靶细胞轻轻上浮，往非靶细胞相反的方向聚集。

离心过程中，附着微泡的靶细胞缓缓上升至血浆上层，T细胞回收率大于85%，单核细胞的去除率高于99%。这非常重要，因为初步处理环节留下的T细胞无需再用昂贵耗时的工艺进行扩增。如果需要激活T细胞，可将CD3+和CD28+抗体同时与微泡结合，这也是X-BACST™技术的另一个重要特性。

原因之一是脂质壳微泡几个小时内会完全释放，无需在操作前后进行微泡计数。我们认为CAR-TXpress™是一项突破性技术，具有简化生产工艺流程的潜力，我们期待与合作伙伴共同推进这一技术。

Q：如果治疗公司将BACS技术纳入其生产工艺流程，是否会存在监管障碍？

Coelho先生：每个国家都存在待解决的监管问题，但并非无法克服，最好的办法是建立一个主文件(Master File)。例如，热动力医疗持续更新有关X-LAB™、X-WASH™和X-BACST™系统的主文件，涵盖了MNC纯化、靶细胞分选与激活。这个主文件包含了FDA需要的所有相关信息，作为研究人员在临床试验新药申请(IND)中应用这些系统的参考依据。X-BACST™试剂盒也载入主文件，存入与抗体、缓冲液和微泡相关的所有信息。这些主文件也提供细胞制品中X-BACST™试剂残留物的信息。微泡由亲和性材料制成，这些材料在后续的处理过程中(转导、洗涤、扩增、多次洗涤)会不断减少。预计研究人员可在2019年初获取这些主文件。

Q：很多人认为材料供应商单一导致风险较高，您认为生产商应该采取哪些措施降低这些风险？

Coelho先生：首先需要明白，我们的产品可作为现有细胞处理环节的补充，对潜在客户来说这无疑是件好事情。况且，热动力医疗拥有30多年临床细胞处理设备开发经验，所生产设备可重复

使用数千次。因此，对于这些设备的需求，无需有采购数量的负担。更重要的是，与我们的电动设备配套使用的一次性处理套件和一次性试剂盒都能确保正常供应，因为我们正与大牌供应商签署长期供货协议。该供应商信誉卓着，会按我们的要求生产处理套件和试剂盒，并且制定了灾难和风险缓解方案。

更多 科学进展 请访问 <https://www.iikx.com/news/progress/>

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，[爱科学iikx.com](http://www.iikx.com)转发