

利用LUNA-FX7™ 监测CAR-T细胞治疗产品

介绍

嵌合抗原受体(CAR)T细胞治疗是一种个性化免疫治疗和基因治疗的组合体，CAR-T细胞治疗是一种建立在从病人自体分离的并且工程化的T细胞而产生的活性药物。自从2018年美国FDA首次批准以来，CAR-T治疗已经获得了血液肿瘤病人的80%的治愈率。随着全部采用细胞治疗，同源的或者异源的CAR-T治疗产品是一个复杂的生物加工过程，需要严格遵照法规和QA/QC指导。为了确保最终产品的安全性，质量和效率。必须在整个生物过程的工作流中和培养过程中监测细胞的健康状态和活率。

在此，我们验证了LUNA-FX7™在CAR-T的完整过程包括1) 原始材料的收集，2) 后白细胞分离术，3) 分离/激活，4) 扩增，和5) 生产，全程苛刻条件下怎样监测和评估细胞的健康状态。Curocell Inc.是韩国一家开发创新抗癌免疫治疗的知名企业，慷慨地提供了两种随机选取的CAR-T细胞产品的细胞样品的计数数据(图1)。利用LUNA-FX7™的荧光模计数式，核酸染料AO/PI (Cat#F23001, Logos Biosystems) 进行细胞计数。简单来说，针对每个样品计数，2ul预混的AO/PO溶液与18ul细胞混合，加入到2-, 3-, 8-通道计数板，并且利用自动聚焦特性聚焦。最终剂量的测定，采用了分析体积高达5.1ul (是绝大多数自动计数体积的10倍之多) 的LUNA™ 1-通道计数板 (Cat#L72011)。



图1. 用于临床药物的CAR-T产品的每个步骤需要被鉴定通过有目的地设计细胞配方并且通过LUNA-FX7™自动细胞计数仪来确定细胞浓度和活率。

应用

表1. 荧光细胞计数模式下CAR-T细胞的Protocol 参数设置

Protocol Parameter	Value
GF exposure level (0.1-10)	5
RF exposure level (0.1-10)	5
Cell size calculation (BF/FL)	FL*
Min. cell size (1-89 μm)	4*
Max. cell size (2-90 μm)	70
GF threshold level (1-10)	5
RF threshold level (1-10)	5

* Changed from the DEFAULT values.

1. 全血样品中初始白细胞浓度和活率

全血收集后在白细胞分离之前，细胞用1xPBS进行100倍稀释，用于LUNA-FX7™细胞计数。尽管白细胞只占全血组成的2%，图2显示了LUNA-FX7™如何能够在异源群体中从无核细胞中（例如红细胞）轻易地区分有核细胞。

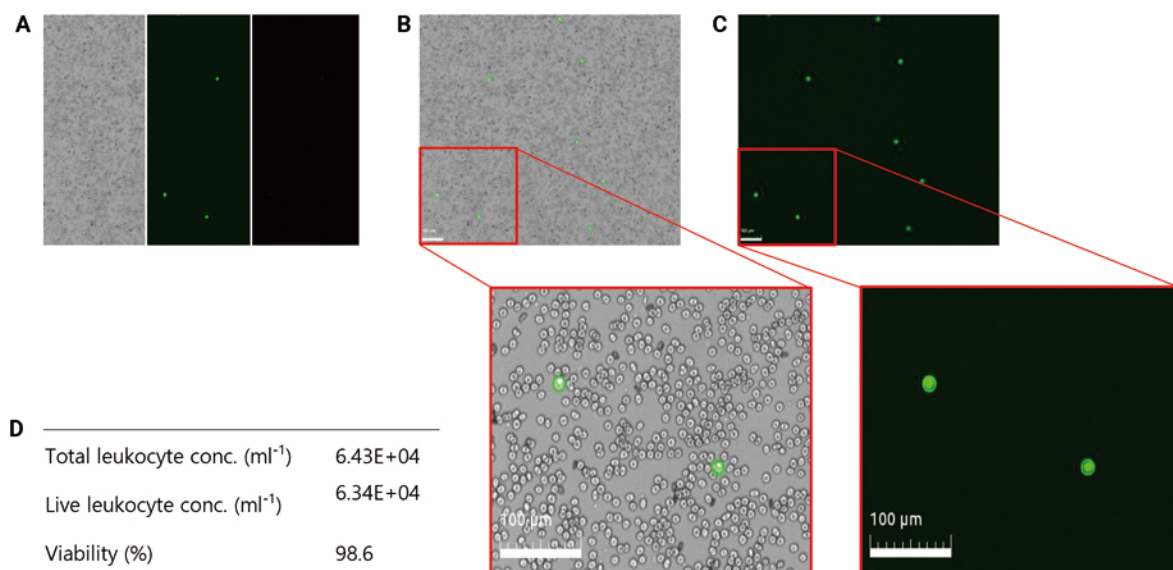


图2. 全血样品中的白细胞细胞的浓度和活率。白细胞分离前，全血细胞样品先用PBS进行1:100稀释，然后用AO/PI荧光染料进行染色并进行细胞计数。明场（BF），绿色通道（GF），和红色通道（RF）的平铺图像（图A.），标记后的叠加图像（活的/死的有核细胞）（图B,C），1/100稀释后血液中的总白细胞数和活率（D）。Protocol的设置显示在表1中。

2. 通过白细胞分离术分离白细胞

白细胞分离术是从全血细胞中分离白细胞的过程，图3显示了两种不同样本的活率。红细胞在两种样品中都没有看到，但是仍然能够观察到一些细胞碎片。这里，LUNA-FX7™ 仍然能够轻易地区分细胞和细胞碎片，或者非细胞杂质，最大限度降低假阳性的计数可能性。

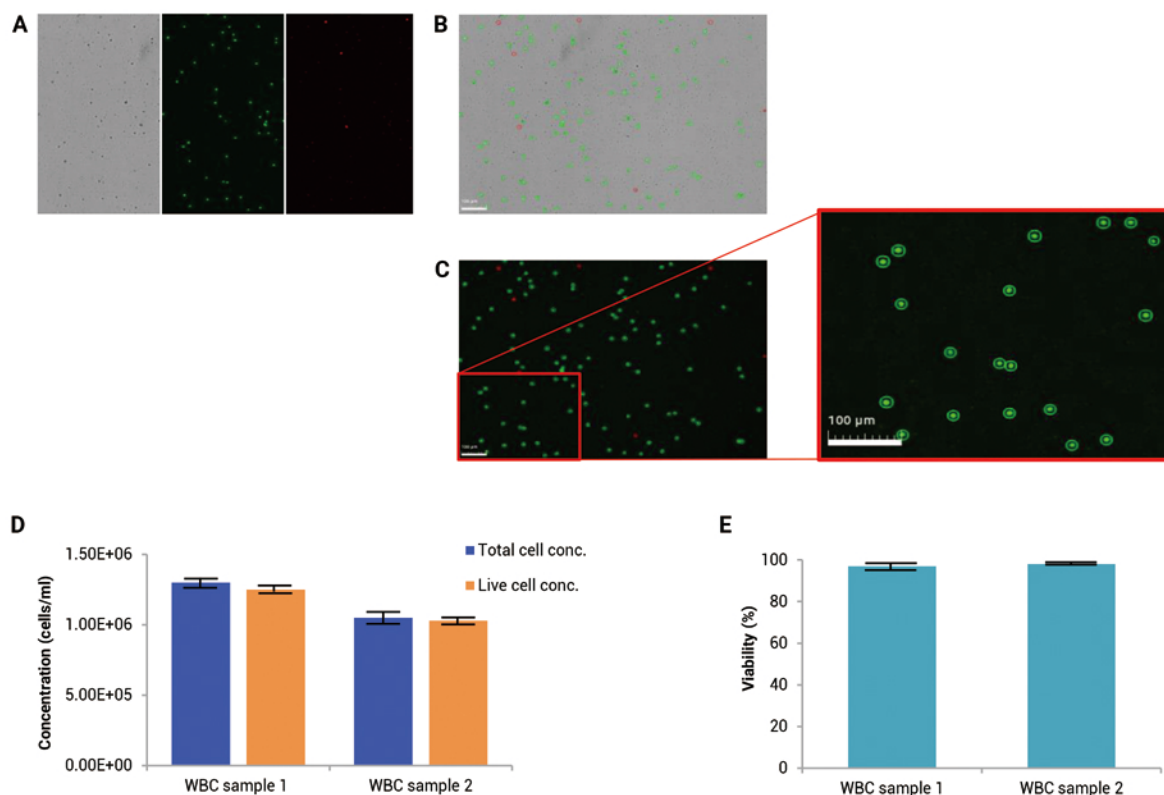
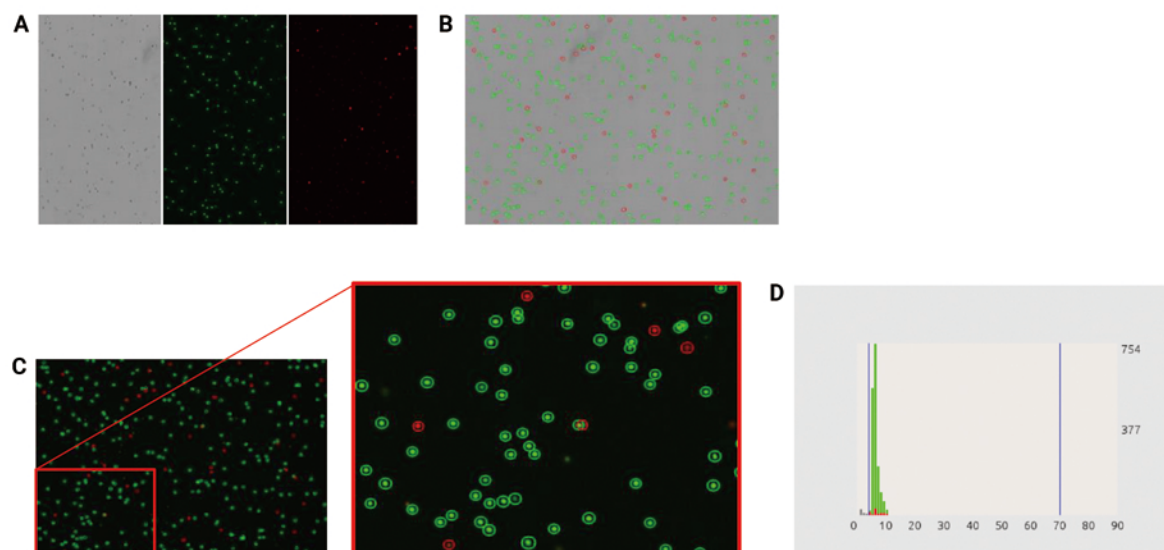


图3. 细胞浓度和白细胞分离后的活率。分离后的白细胞样品和BF, GF以及RF原始图像 (A.) 荧光标记的图像和放大的图像 (B, C) 绘制出的两种被评估的样品并以及细胞浓度和活率的图表 (D, E)。Protocol的设置显示在表1中。

3. T细胞分离和激活

白细胞分离后, T细胞被进一步分离然后被激活, 获得均一的T细胞群落。在这种情况下, 样品质量上有一个显著的对比。



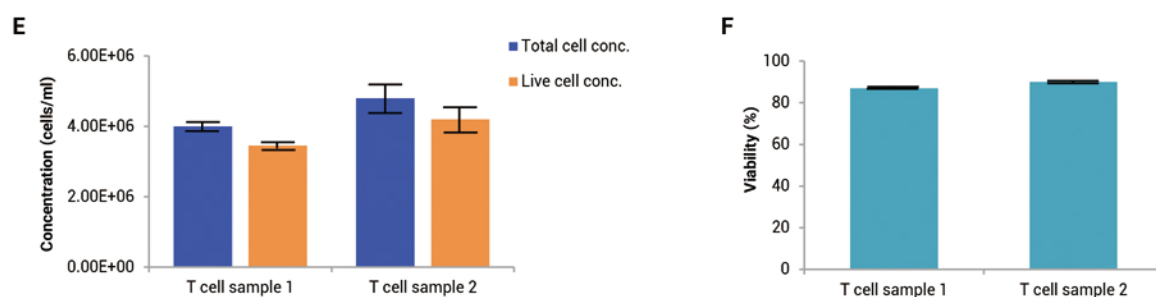


图4. 分离和激活后的细胞浓度和活率。分离和激活后T细胞被计数，而且BF, GF和RF原始图像 (A.) 以及荧光标记的图像和放大的图像 (B, C)。假阳性的细胞碎片可以通过最小化细胞尺寸设置而消除掉 (D)。两种样本被评估并且细胞浓度和活率被绘成图表 (E, F)。Protocol 设置显示在表1中。

4. CARs 表达T 细胞

分离和激活的T细胞通过逆转录病毒转导来产生嵌合抗原受体 (CARs)，转导后，新的工程化的CAR-T在体外进行扩增。图5显示了增殖后的CAR-T细胞的细胞活率和细胞数。

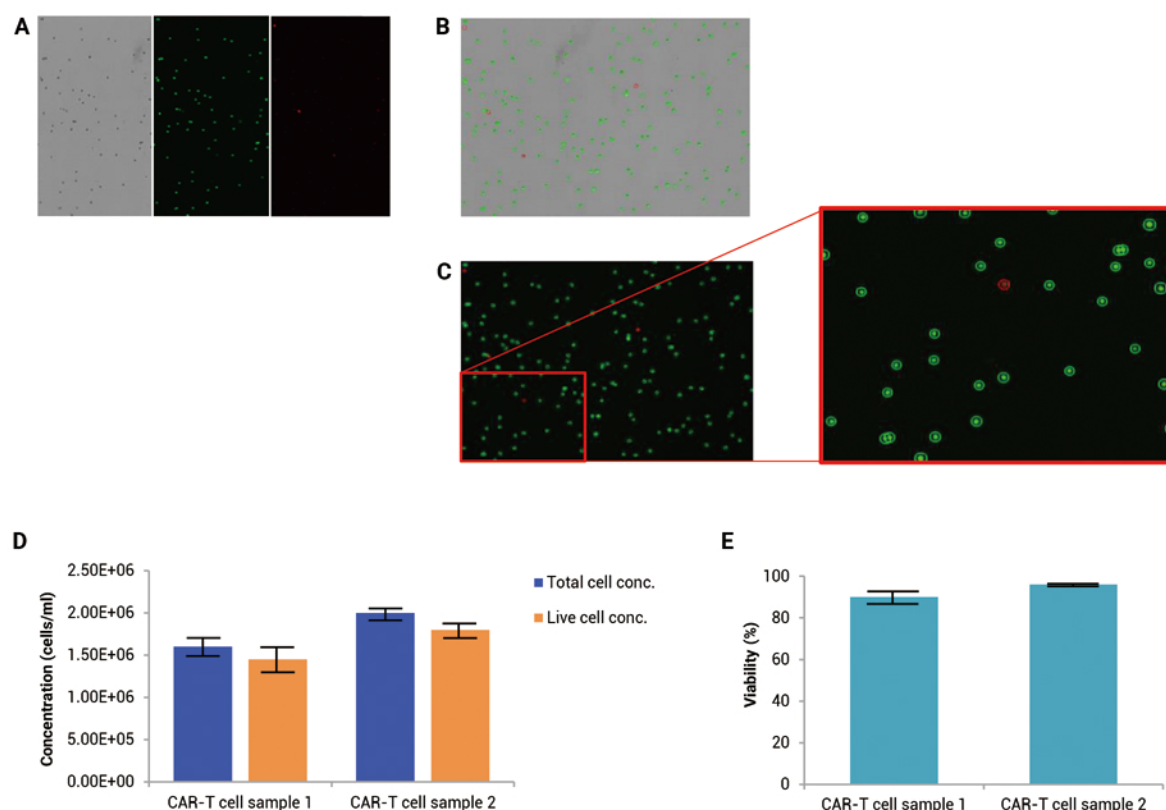


图5. CAR-T细胞增殖后的细胞浓度和活率。原始的和标记的图像 (A, B, C) 和CAR-T细胞样品的细胞浓度及活率 (D, E)。Protocol 的设置见表1。

5. CAR-T 细胞产品

增值的CAR-T细胞被冷冻保存并且调整成合适的剂量。图6显示了两种具有不同细胞活率的细胞样品的浓度和活率。

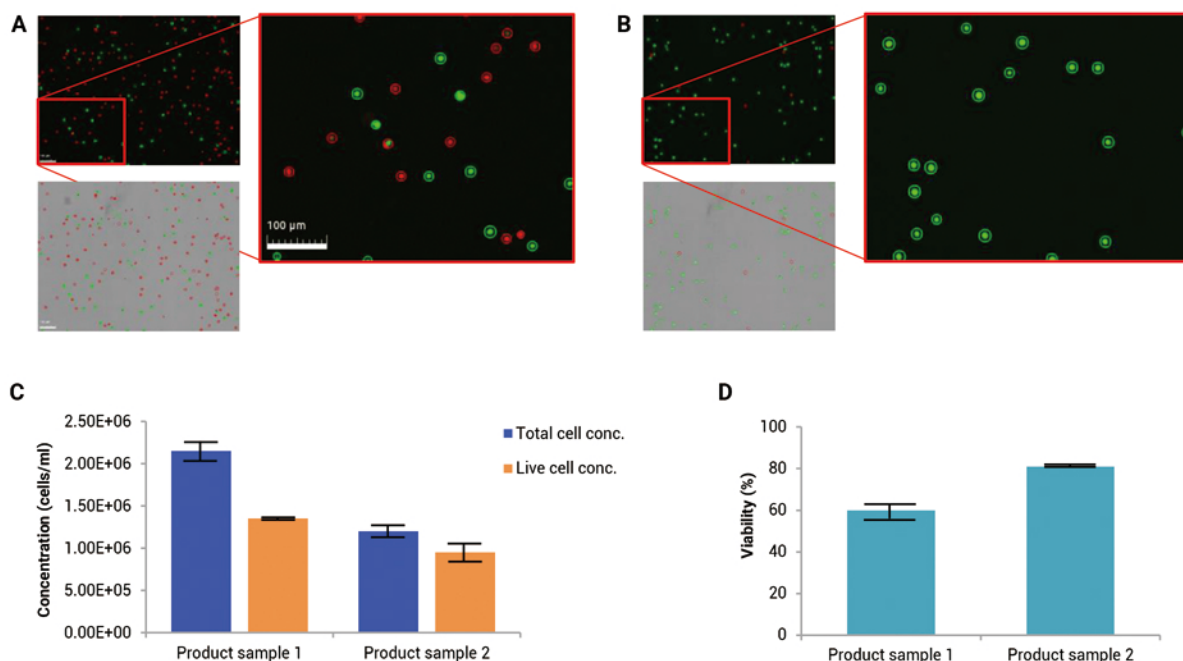


图6, CAR-T细胞最终产品的细胞浓度和活率, 低活率样本(A)标记的图像和高活率样本(B)以及相应的细胞浓度和活率(C,D), Protocol的设置显示在表1中。

结论

从最初的原始细胞材料收集到最终剂量检测, LUNA-FX7™提供了用户所需要的准确性和灵活性来监测整个CAR-T生产过程中的细胞健康状态和活率。甚至, 与预设的验证计数板联用, 内置的QC软件和选配的21CFR Part 11兼容性软件可保证它与严谨的质控和监管法规相匹配。

参考文献:

¹ Poorebrahim M, Sadeghi S, Fakhr E, et al. Production of CAR T-cells by GMP-grade lentiviral vectors: latest advances and future prospects. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2019;56(6):393-419. doi:10.1080/10408363.2019.1633512

² Zhang C, Liu J, Zhong JF, Zhang X. Engineering CAR-T cells. *Biomark Res.* 2017;5:22. Published 2017 Jun 24. doi:10.1186/s40364-017-0102-y

ACKNOWLEDGEMENTS

We, Aligned Genetics, Inc. would like to express our sincere appreciation to Curocell Inc. for sharing the count data produced with the LUNA-FX7™, enabling us to write this application note.