TITULO

Diploma de Experto
en Medicina Personalizada y de Precisión

PANMEP

El sistema de producción de la inmunoterapia adoptiva: producción GMP de vectores virales y terapia CAR

Maribel Lara Chica

Responsable de Producción de Vectores Virales GMP - IBiS (Instituto de Biomedicina de Sevilla) - HUVR (Hospital Universitario Virgen del Rocío) - UPRC

Junta de Andalucía
Consejería de Salud y Consumo

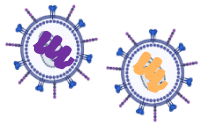
Universidad Internacional de Andalucía

MANUFACTURA DE TERAPIA CAR-T

CARs académicos HUVR:
Instalaciones y equipamiento requeridos

Producción de vectores lentivirales

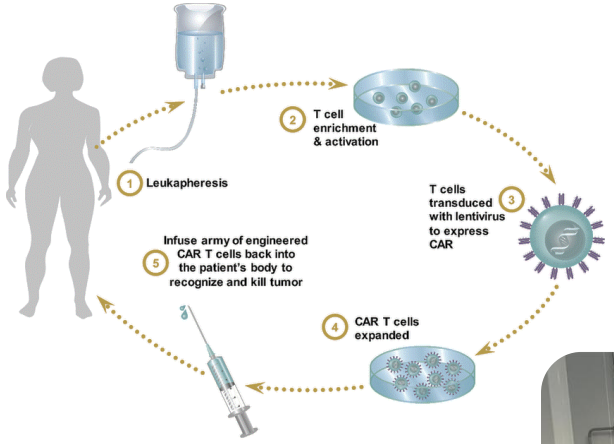
Sala Blanca de Producción de Vectores Lentivirales



CD19-CAR

BCMA-CAR

Proceso productivo CAR-T (autólogo)



Sala Blanca de Producción Celular

CARs académicos HUVR:
Instalaciones y equipamiento requeridos

Sala de Producción de Vectores Virales

Grado B de esterilidad con presión negativa

Cabina de flujo laminar (ambiente A)

Método manual versus automatización del proceso productivo

Nuestra sala de producción viral se encuentra localizada en el IBIS (colaboración con RAddytTA)

✓ Inspección (AEMPS) Octubre 2024

CARs académicos HUVR:
Instalaciones y equipamiento requeridos

Sala de Producción Celular

Grado D ó C de esterilidad con presión positiva

Cabina de flujo laminar (ambiente A)

Máquina Prodigy

Nuestra sala UPRC-Planta CTTC-Campus HUVR localizada en el CRTS (colaboración con RAddytTA)

- ✓ Disponemos actualmente de <u>2 Prodigy</u>
- ✓ Inspección (AEMPs)
  - ✓ Mayo 2022 (**aprobación**)
  - ✓ Abril 2025 (revisión)

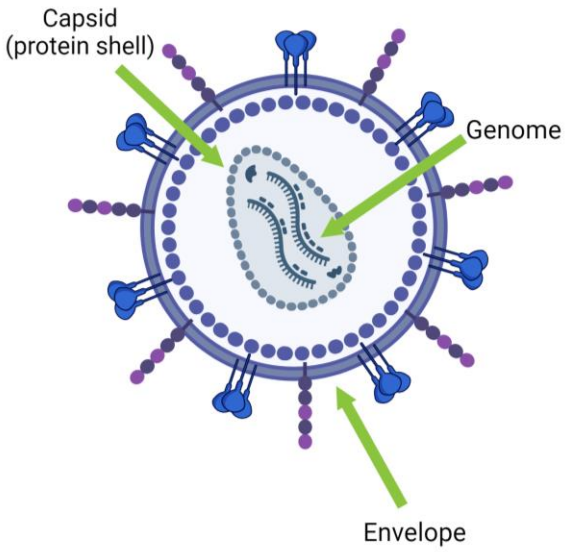
1. PRODUCCIÓN GMP DE VECTORES LENTIVIRALES

-Vectores: qué son y tipos

-¿Cómo generarlos (para terapia CAR T)?

-Producción manual *vs* automatizada (biorreactor)

-Visita Virtual Sala Blanca ViPro- IBiS - UPRC



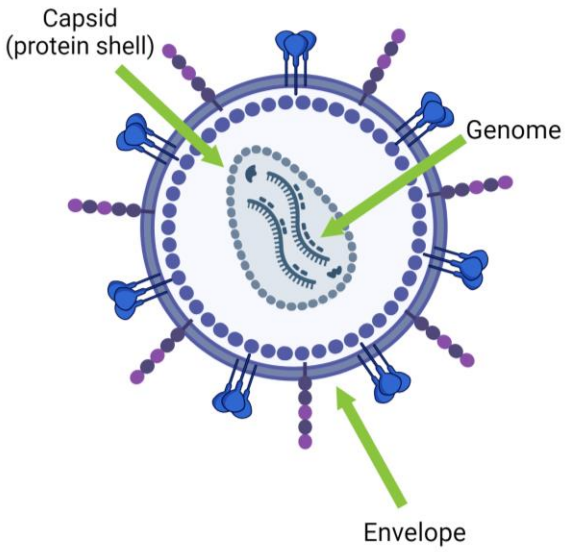
1. PRODUCCIÓN GMP DE VECTORES LENTIVIRALES

-Vectores: qué son y tipos

-¿Cómo generarlos (para terapia CAR T)?

-Producción manual *vs* automatizada (biorreactor)

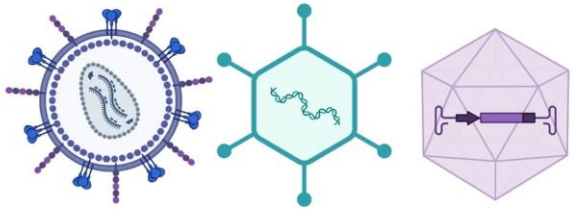
-Visita Virtual Sala Blanca ViPro- IBiS - UPRC



¿Qué es un vector?

Es un vehículo para hacer llegar y expresar (transducir) genes de interés a células de mamíferos que actualmente se utilizan de forma habitual en el creciente campo de la terapia celular y génica para el tratamiento de enfermedades monogénicas y terapias adoptivas como la terapia con células CAR-T.

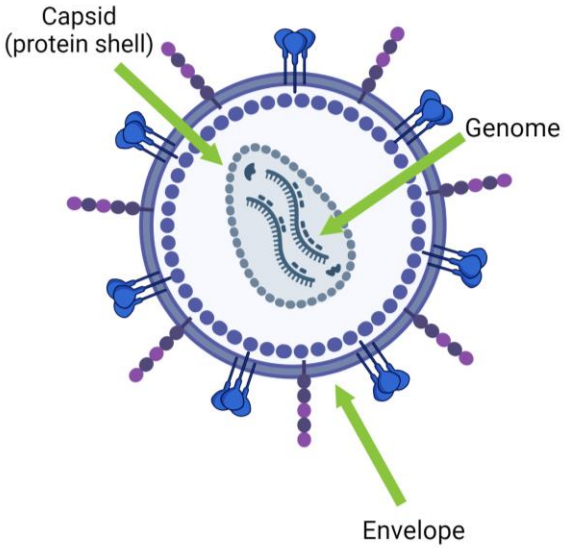
Tipos de vectores para terapia génica

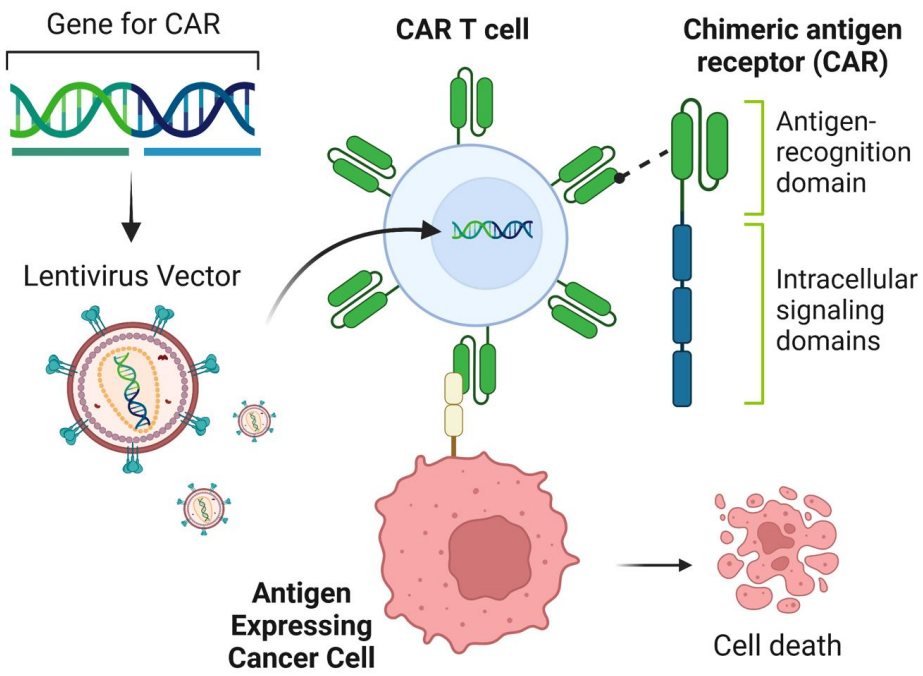


	Retro/Lenti	Adenovirus	AAV
Pathology	Cancer	Respiratory disease	No disease association in humans
Capacity	~ 8 kb	up to 35 kb	4.7 kb
Genome make up	ssRNA	dsDNA	ssDNA
Integrates?	Yes	No	Sometimes, but not required
Safety level	BSL2	BSL2	BSL1
Length expression	Stable - long term	Several weeks	Up to several years

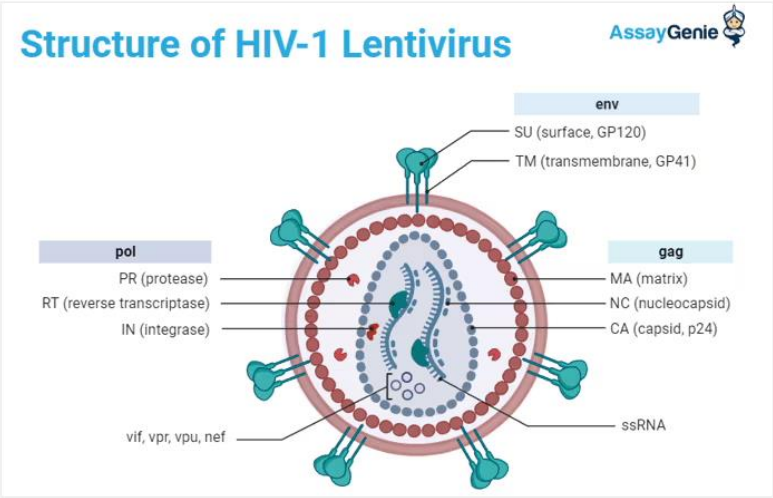
Vectores Lentivirales para terapia T CAR

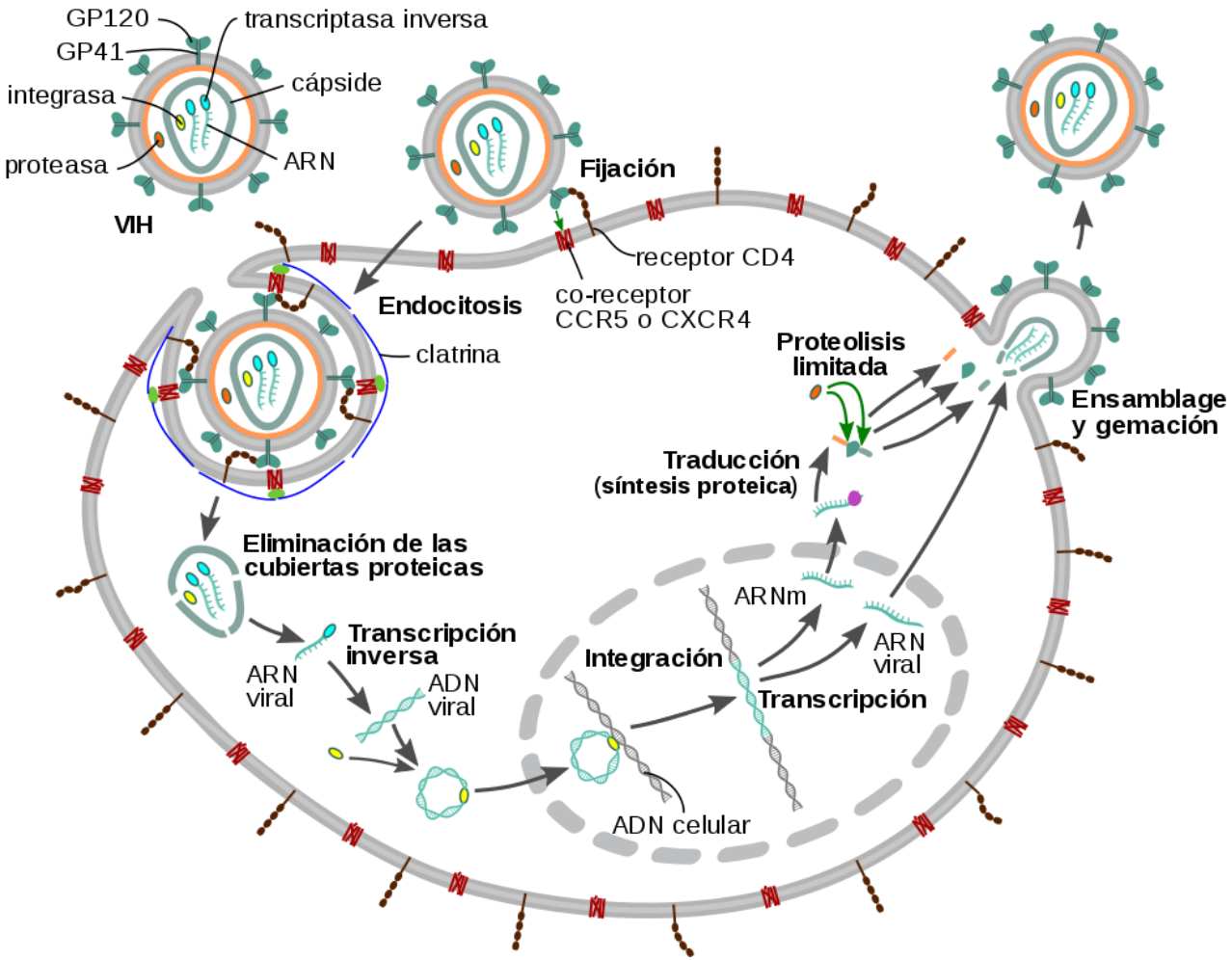
Los LV son los más usados en terapia celular adoptiva en los que se requiere la administración de genes, estando presentes en el 57% de los medicamentos de terapia avanzada ex vivo del Reino Unido (ATMP). En más de 100 ensayos clínicos en curso en EE.UU., China, la UE y Canadá se emplean vectores lentivirales tanto para la modificación ex vivo de células como para la terapia in vivo.





Vectores Lentivirales – estructura y funcionamiento



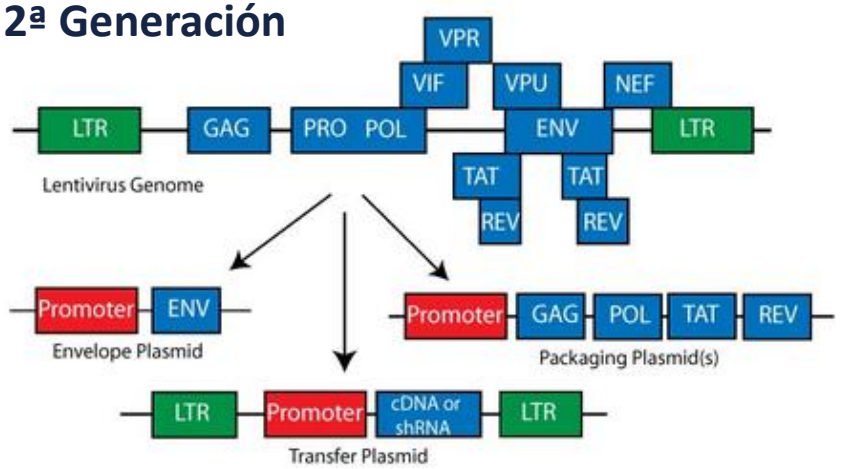


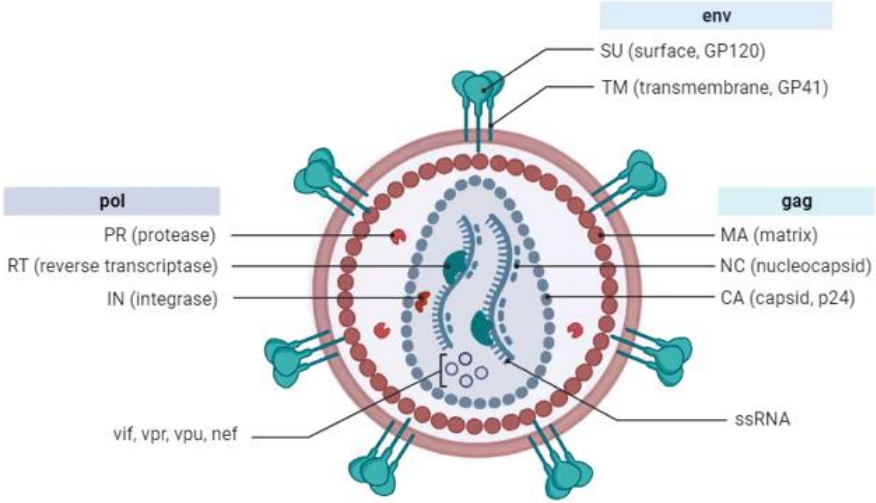
El genoma del VIH está organizado en:

- elementos trans que codifican **proteínas funcionales, estructurales y accesorias**, como el polipéptido Gag, la proteína de la envoltura y las enzimas funcionales
- elementos cis no codificantes, como las repeticiones terminales largas (LTR), ayudan a la **transcripción y empaquetamiento del genoma del ARN viral en partículas virales** e indican las regiones para la transcripción inversa y la integración en la célula receptora.

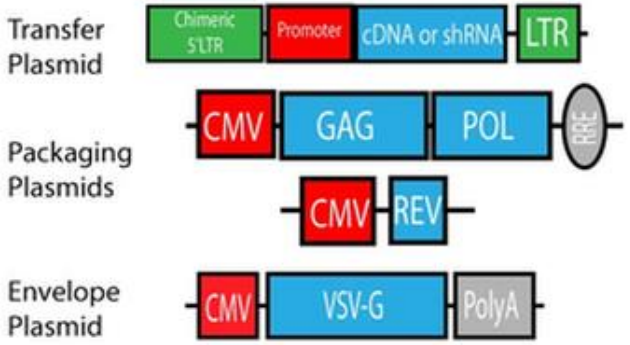
Vectores Lentivirales – genoma en plásmidos

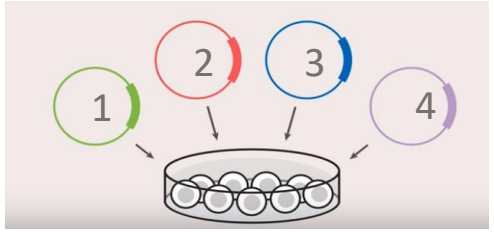
2ª Generación





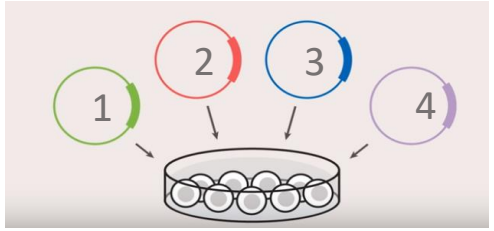
3ª Generación

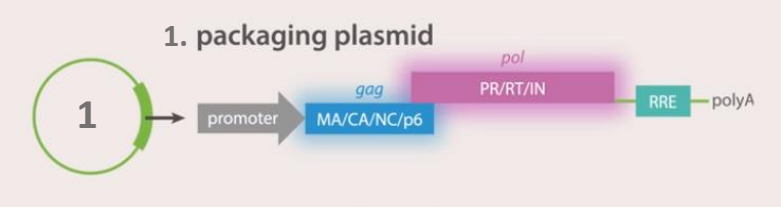




La división del genoma en plásmidos no superpuestos reduce al máximo los posibles eventos de recombinación, y generación de lentivirus competentes para la replicación

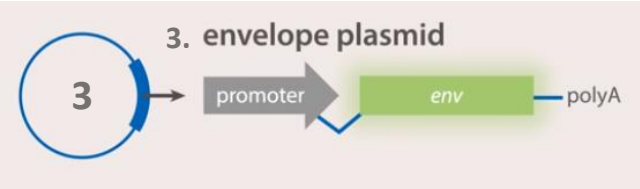
Vectores Lentivirales – plásmidos de 3ª generación



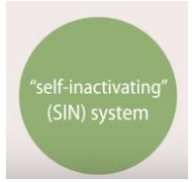


-***gag***: proteína estructural precursora de la partícula lentiviral que contiene los componentes cápsida y nucleocapsida
-***pol:*** proteína precursora que contiene componentes de la retrotranscriptasa inversa e integrasa
-PoliA al termino de la transcripción, impide la transcripción de genes situada aguas abajo

-rev: se une a RRE para facilitar la exportacion nuclear
-No codifica Tat, controla la expresión de las LTR
-PoliA al termino de la transcripción, impide la transcripción de genes situada aguas abajo

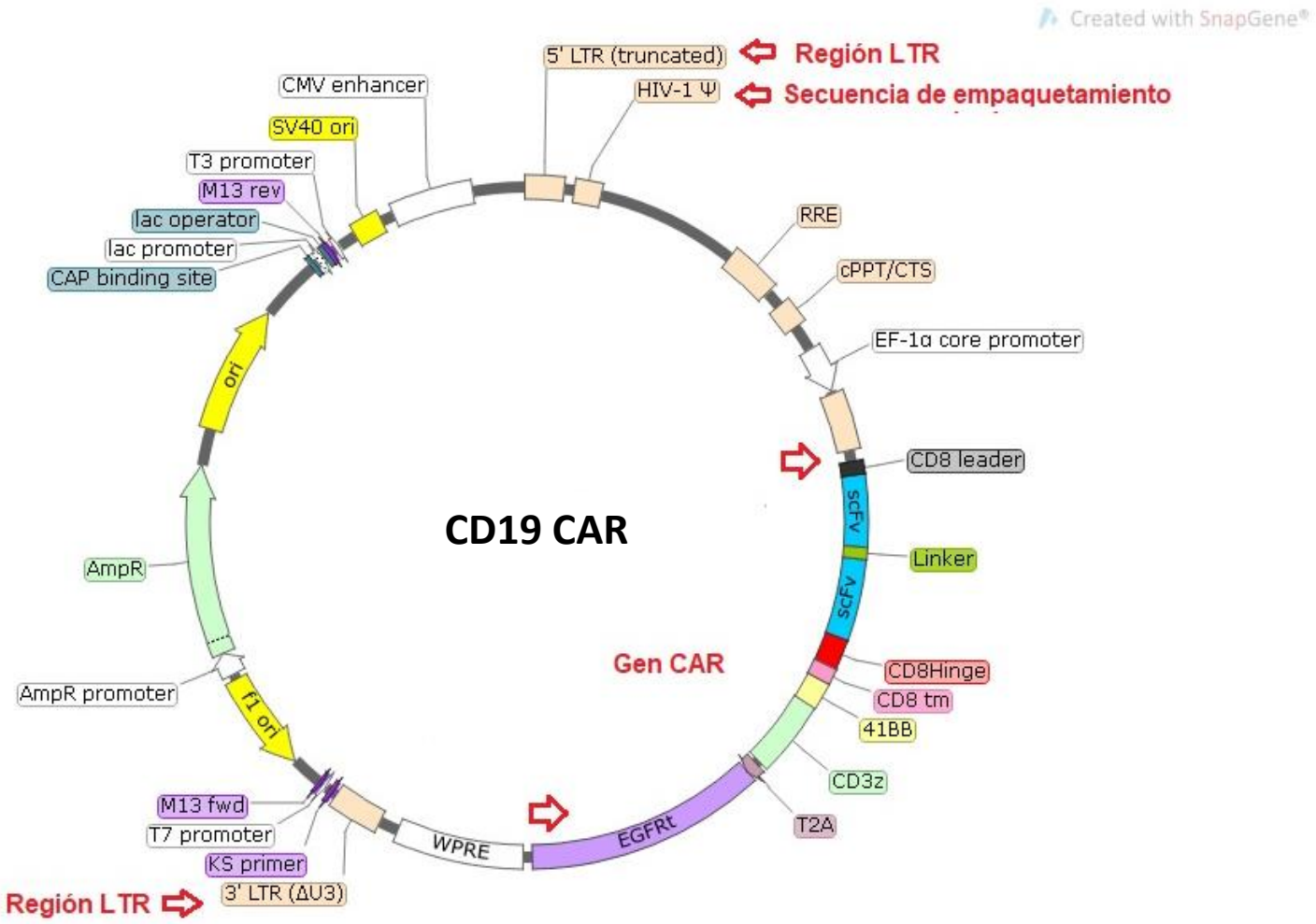


-**Envoltura con VSV-G**, mayor tropismo cellular y estabilidad mejorada durante el procesamiento
-PoliA al termino de la transcripción, impide la transcripción de genes situada aguas abajo



-Delección del promotor de la 5'LTR para reducir su actividad
-Delección LTR3':Anula practicamente la actividad promotora, minimiza el riesgo de aparición de virus recombinantes con capacidad para la replicación
-Señal de empaquetamiento, única secuencia posible necesaria para empaquetar el ARN en la cápsida del virus

Vectores Lentivirales – plásmido del vector CAR



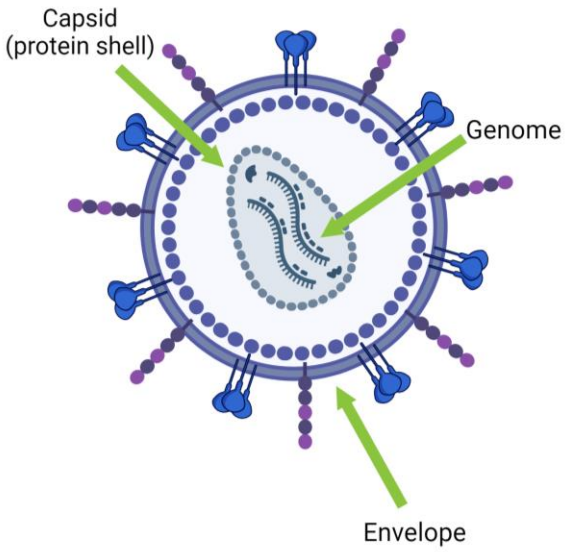
1. PRODUCCIÓN GMP DE VECTORES LENTIVIRALES

-Vectores: qué son y tipos

-¿Cómo generarlos (para terapia CAR T)?

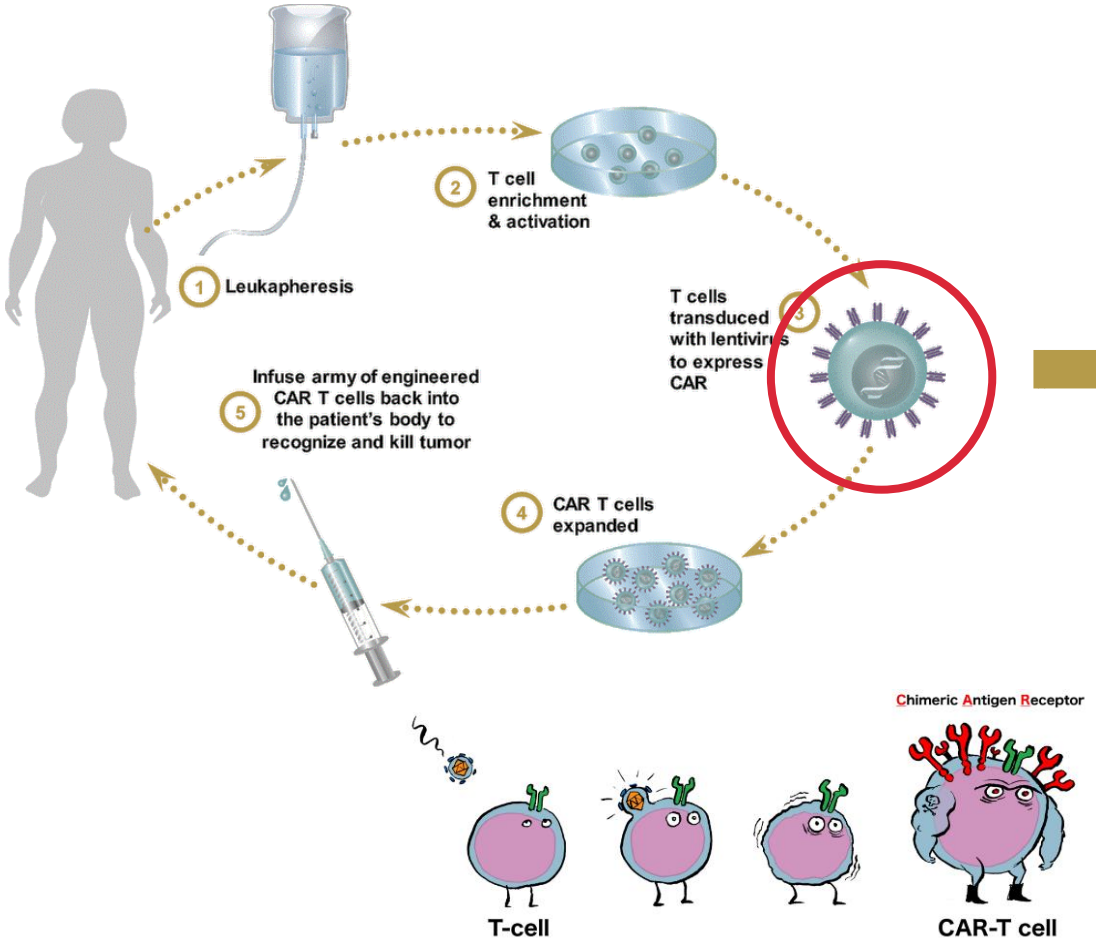
-Producción manual *vs* automatizada (biorreactor)

-Visita Virtual Sala Blanca ViPro- IBiS - UPRC

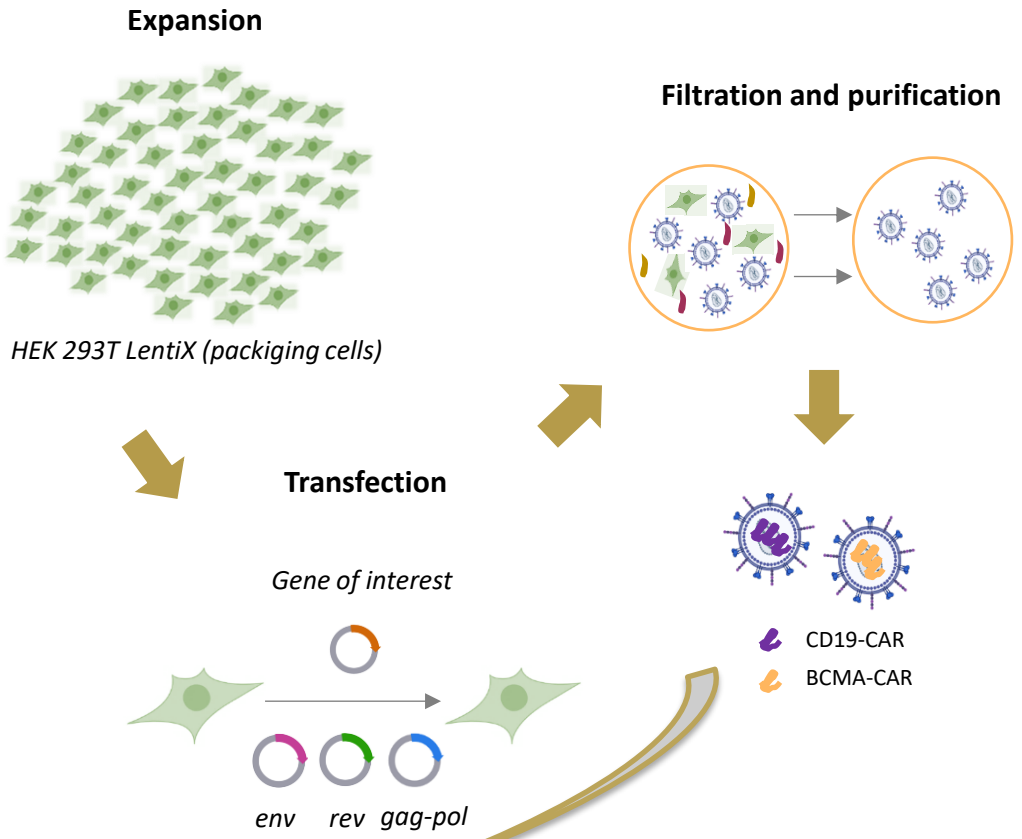


Vectores Lentivirales: cómo generarlos

Proceso productivo CAR-T (autólogo)



Producción de vectores lentivirales (manual)



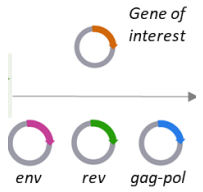
Vectores Lentivirales: cómo generarlos

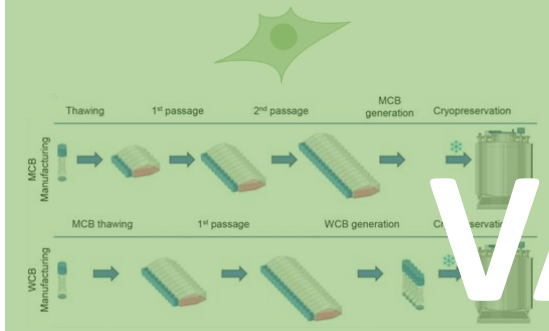
Lab IBiS (202)

Sala Blanca IBiS

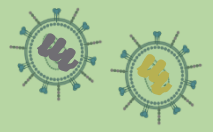
GOOD MANUFACTURING PRACTICE GMP QUALITY PRODUCT

agencia española de medicamentos y productos sanitarios





VALIDACIÓN



CD19-CAR

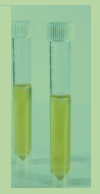
BCMA-CAR

Plásmidos → **MCB / WCB** → **Producción vector viral** → **Filtración, clarificación** → **Producto final**

Controles calidad

Tests esterilidad

Bacterial growth



Vectores Lentivirales: cómo generarlos

Limpieza sala y cualificación equipos

1 banco celular (Lenti-X) **maestro**

3 bancos celulares (Lenti-X) **de trabajo** consecutivos

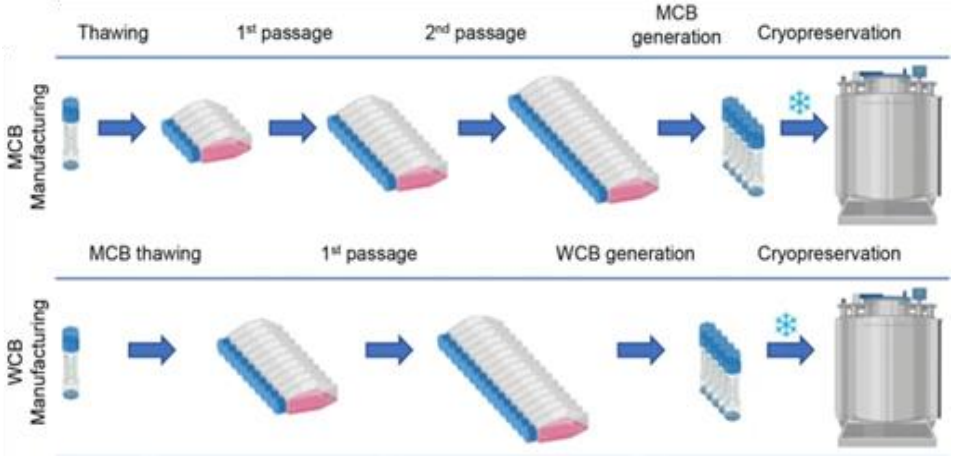
3 lotes de producción de **LV** consecutivos

Validación Media Fill (3 consecutivas)

agencia española de medicamentos y productos sanitarios

VALIDACIÓN

Validación de la Generación de MCB y WCB



1 banco celular (Lenti-X) **maestro**

***8-10 años**

35 crioviales de lote ($350 \cdot 10^6$ células)

3 bancos celulares (Lenti-X) **de trabajo** consecutivos

***1 año (6-12 pacientes)**

(más pacientes/año (10-20) en el futuro)

17 crioviales de lote ($170 \cdot 10^6$ células)
27 crioviales de lote ($270 \cdot 10^6$ células)
31 crioviales de lote ($310 \cdot 10^6$ células)
---
75 crioviales de lote ($750 \cdot 10^6$ células)
total

Controles de Calidad

Monitorización (en las etapas de producción):

- Placas de sedimentación y guanteo (bact)

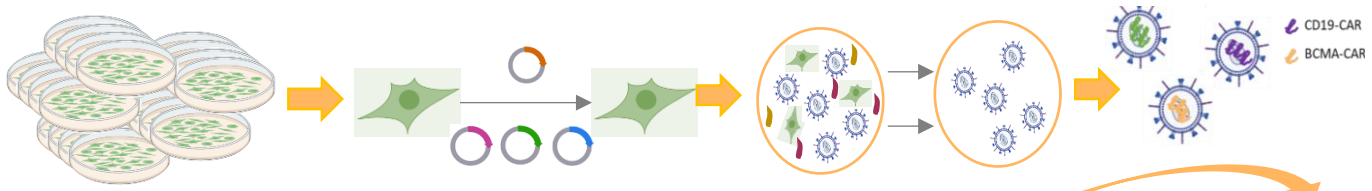
- Monitorización de partículas, en cabina y en sala

Tabla 4. Resumen controles. En letra gris controles para validación y estabilidad. Fondo en color, muestras en FBS y DMSO

Tipo muestra CC	Control de Calidad (CC)	Total muestra	Cantidad y tipo tubos	Vol. y nº cel. por tubo
Cél. en medio cultivo	CC-Virus adv-citop	1,5 x 10^6 cél.	3 eppendorfs	0,5 mL (0,5 x 10^6 cél.)
Células en FBS+DMSO	CC-STR	14 x 10^6 cél.	7 crioviales	0,2 mL (2x10^6 cél.)
	CC-Estabilidad	50 x 10^6 cél.	15 crioviales	0,33 mL (3,3 x 10^6 cel.)
	CC-Esterilidad Validación	18 x 10^6 cél.	1 criovial	1,8 mL (18x10^6 cél.)
	CC-Esterilidad	4 x 10^6 cél.	2 crioviales	0,2 mL (2x10^6 cél.)
	CC-Esteril. liberación	2 x 10^6 cél.	2 botellas hemocultivo	0,1 mL (1x10^6 cél.)
Sobrenadante	CC-Mico	3 mL	3 eppendorfs	1 mL (sin cél)
	CC-Virus adventicios	15 mL	3 falcon 15 mL	5 mL (sin cél)

***Tiempo estimado duración**

Validación de la Producción de Vectores Lentivirales



3 lotes de producción de **LV** consecutivos

Título funcional

Lote 1 : producciones 1 y 2 ($3.99 \cdot 10^8$ TU total)
Lote 2 : producciones 3 y 4 ($2.89 \cdot 10^8$ TU total)
Lote 3 : producciones 5 y 6 ($4.32 \cdot 10^8$ TU total)

1 paciente (MOI=5)

Controles de Calidad

Monitorización (en las etapas de producción):

- Placas de sedimentación y guanteo (bact)

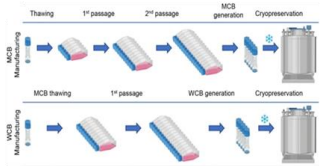
- Monitorización de partículas, en cabina y en sala

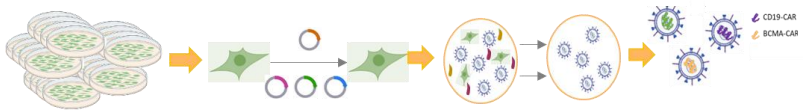
Tabla 5. Resumen controles. En letra gris controles para validación.

Tipo muestra CC	Control de Calidad (CC)	Total muestra	Cantidad y tipo tubos	Vol. y nº cel. por tubo
Mezcla (LV y TexMACS) + TexMACS	CC-Micoplasma	LV+ TexMACS = 250 µL TexMACS = 500 µL	3 eppendorfs	250 µL
Mezcla (LV y TexMACS)	CC-Esterilidad	400 µL	2 eppendorfs	200 µL
	CC- Esterilidad liberación	200 µL	1 tubo TSB 1 tubo tioglicolato	100 µL
	CC-Endotoxinas	100 µL	1 eppendorf	100 µL
	CC –ADN residual	360 µL	1 eppendorf	360 µL
	CC-Proteínas residual Lenti-X	80 µL	1 eppendorf	80 µL

Validación del Media Fill y documentación

Validación Media Fill





Mucha documentación

agencia española de medicamentos y productos sanitarios

INSPECCIÓN

28-30octubre2024

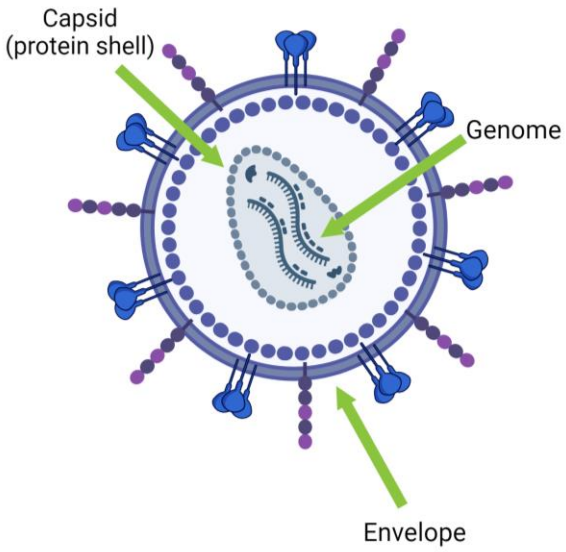
1. PRODUCCIÓN GMP DE VECTORES LENTIVIRALES

-Vectores: qué son y tipos

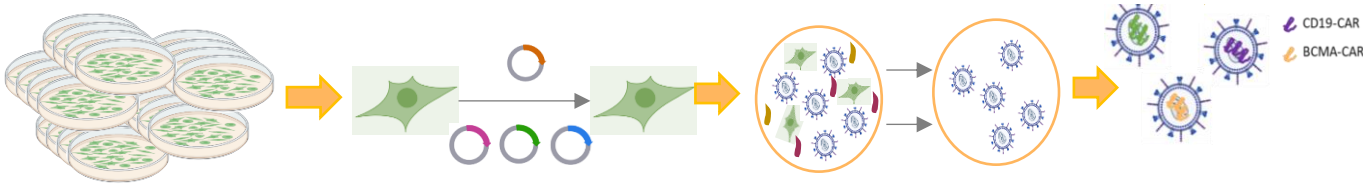
-¿Cómo generarlos (para terapia CAR T)?

-Producción manual *vs* automatizada (biorreactor)

-Visita Virtual Sala Blanca ViPro- IBiS - UPRC



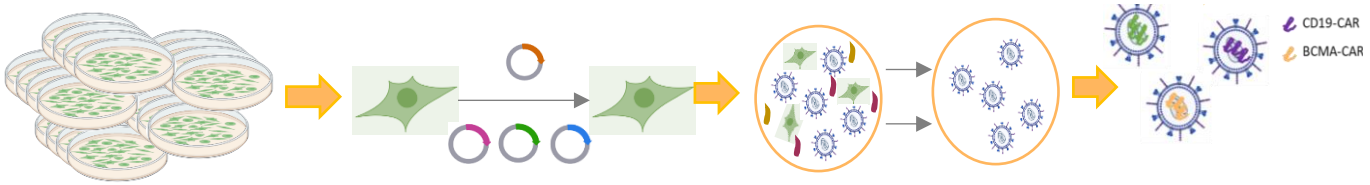
Producción de LVs: manual *vs* automatizada



	Producciones	Tiempo producción	Título funcional (TU)	
Manual (GMP)	3 ó 4	6-8 semanas	**5,8-8,2 . 10^8**	*1 paciente*
iCellis	< 1*	2 semanas	**10^9-10^{10}**	*4-6 pacientes*

*Una sola producción para varios pacientes

Producción de LVs Automatizada (biorreactor)



Expansión y Transfección

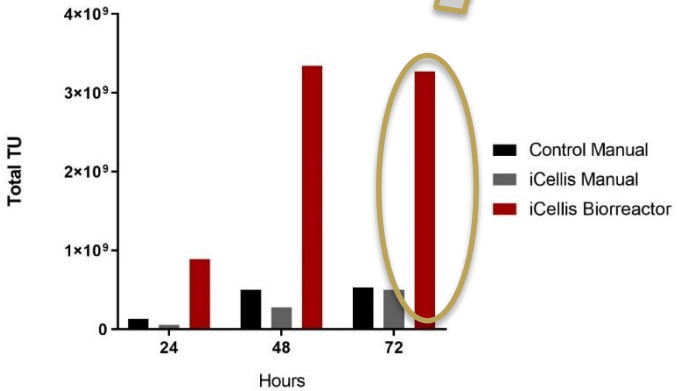
Filtración y purificación

> superficie
> volumen
< células iniciales

PALL Pall Corporation

cytiva

8 pacientes (TU total)
(1 paciente = 5 . 10^8)



Total TU loaded	Recovered		Lost (FT)	
	TU	%	TU	%
3,01E+09 (930mL)	4,56E+08	15,13%	1,60E+09	53,09%
›H adjustment ivity				
3,00E+07 (300mL)	2,28E+07	76%	3,50E+06	11,67%
3,60E+07 (300mL)	1,45E+07	40,40%	7,85E+06	21,81%

4-6 pacientes (TU total)

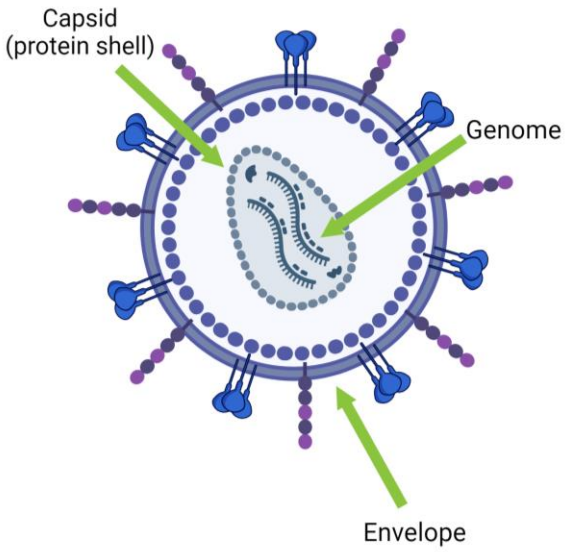
1. PRODUCCIÓN GMP DE VECTORES LENTIVIRALES

-Vectores: qué son y tipos

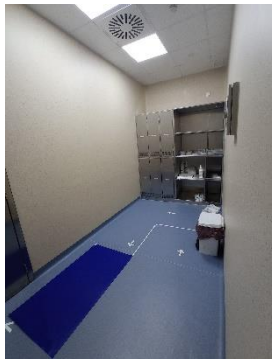
-¿Cómo generarlos (para terapia CAR T)?

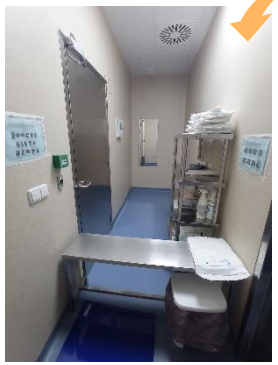
-Producción manual *vs* automatizada (biorreactor)

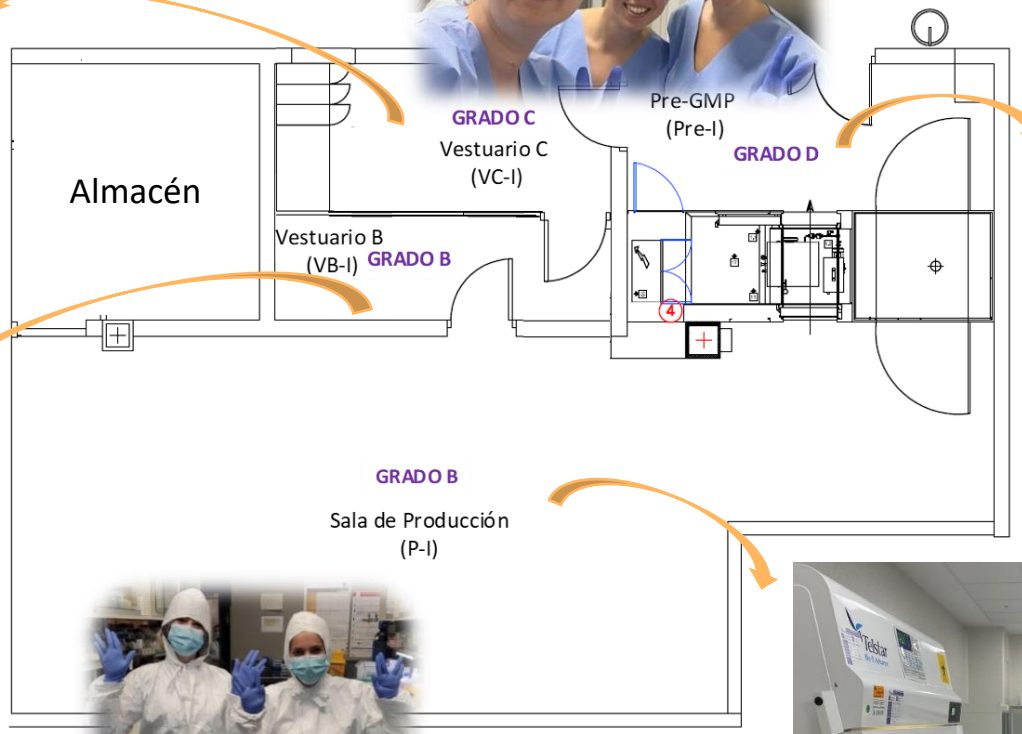
-Visita Virtual Sala Blanca ViPro- IBiS - UPRC



Sala Blanca de Producción de Vectores Virales (ViPro)





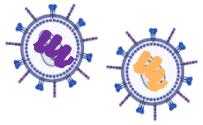


Vídeos

Terapia CAR-T: Salas Blancas de Producción

Producción de vectores lentivirales

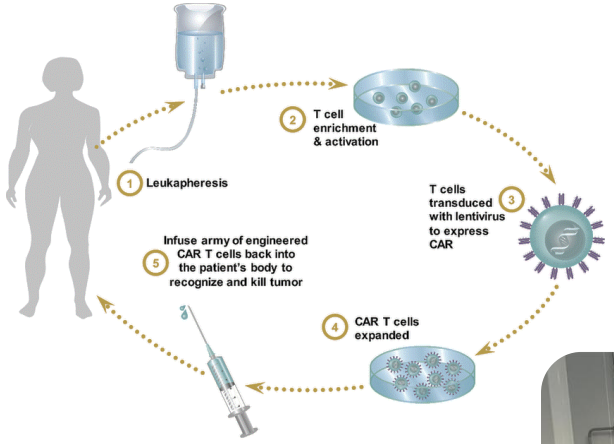
Sala Blanca de Producción de Vectores Lentivirales



CD19-CAR

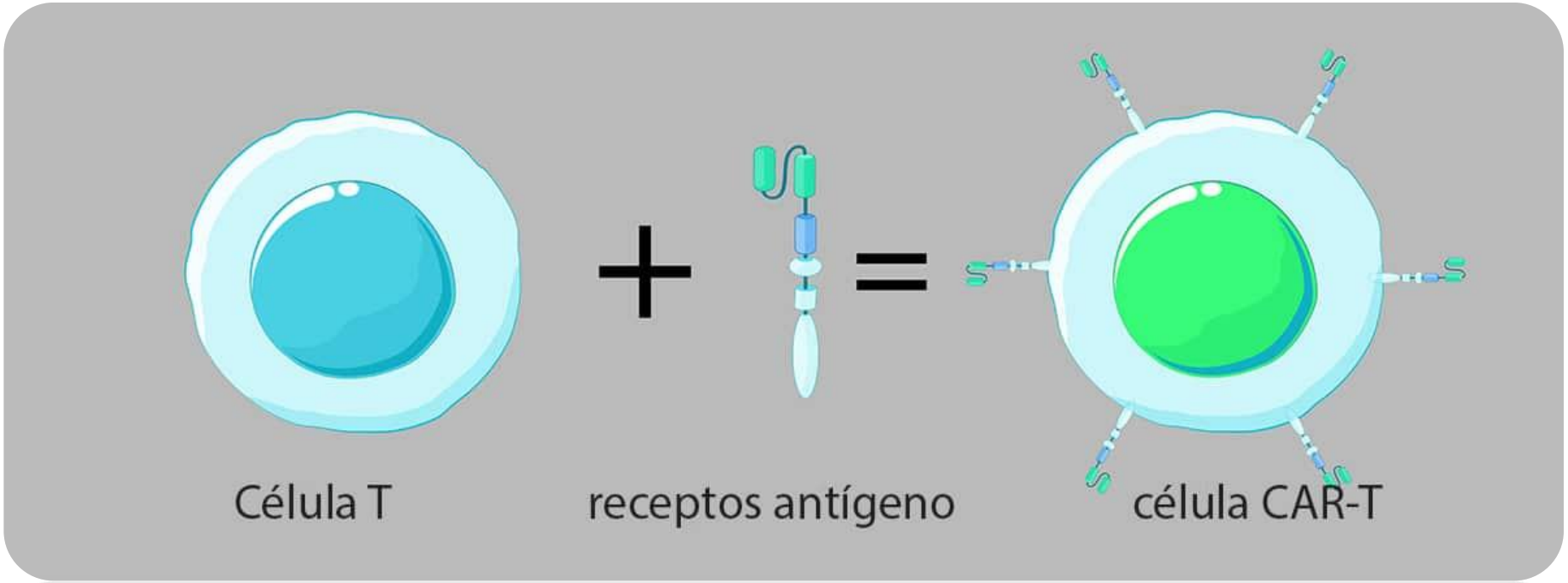
BCMA-CAR

Proceso productivo CAR-T (autólogo)

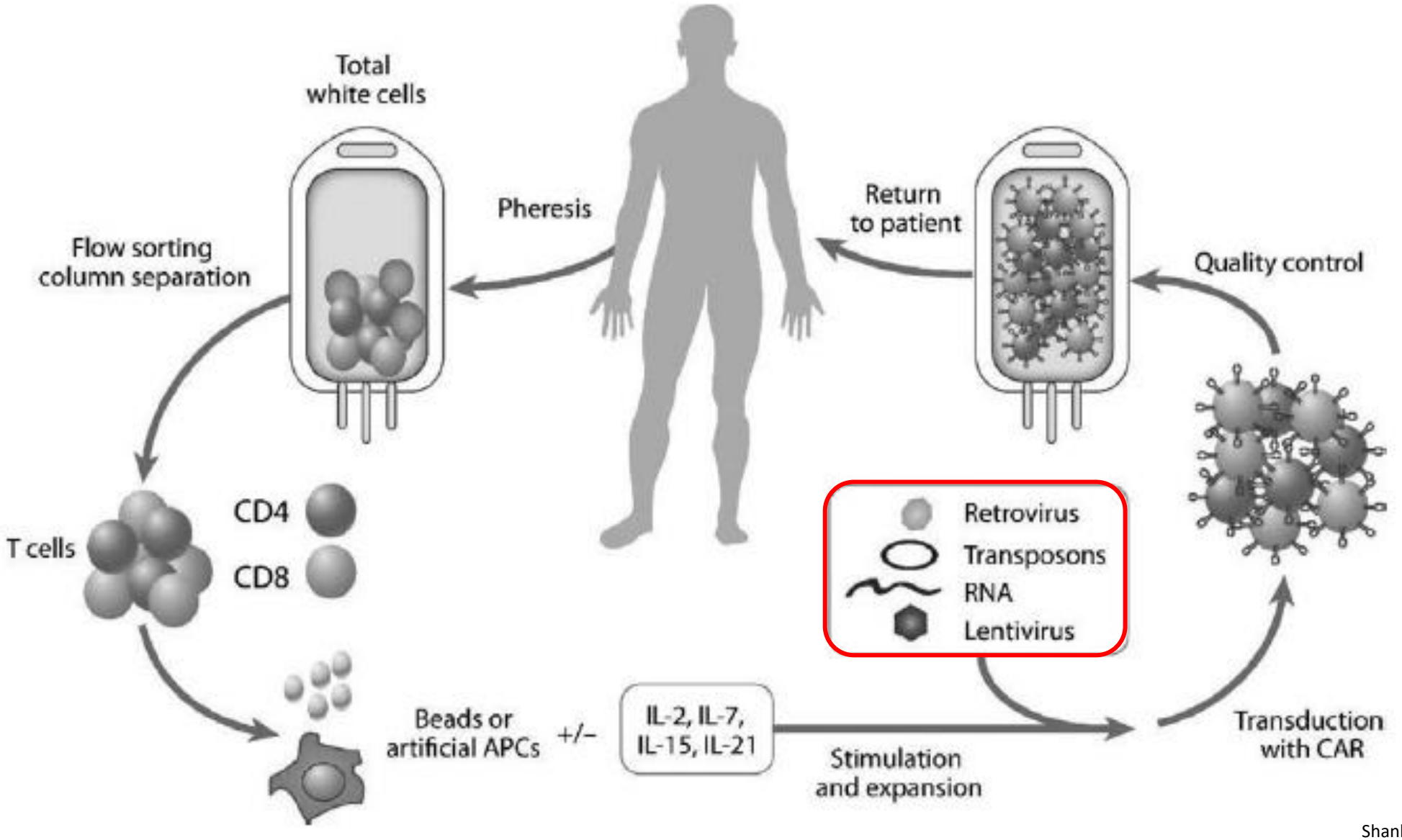


Sala Blanca de Producción Celular

2. PRODUCCIÓN GMP DE LINFOCITOS T-CAR (autólogo)



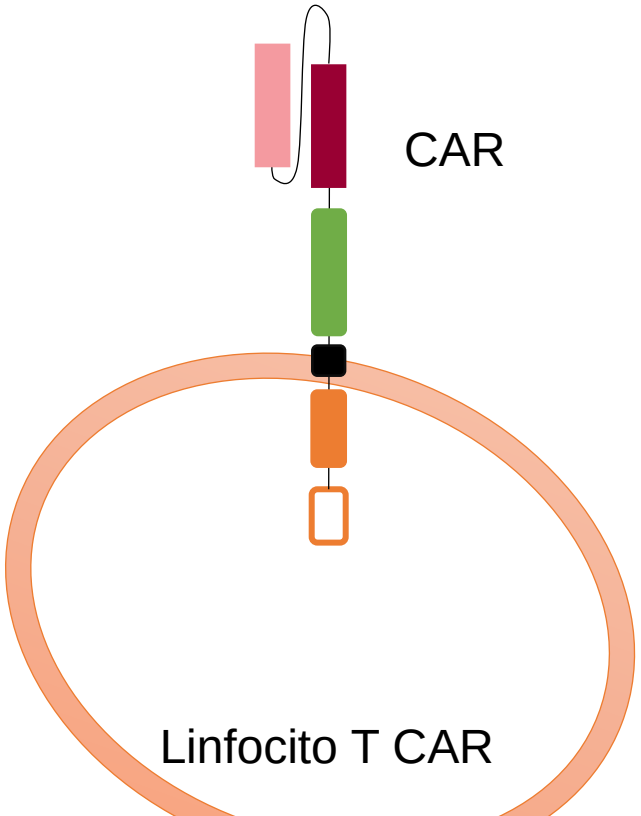
CAR T cell therapy: A unique and complex process

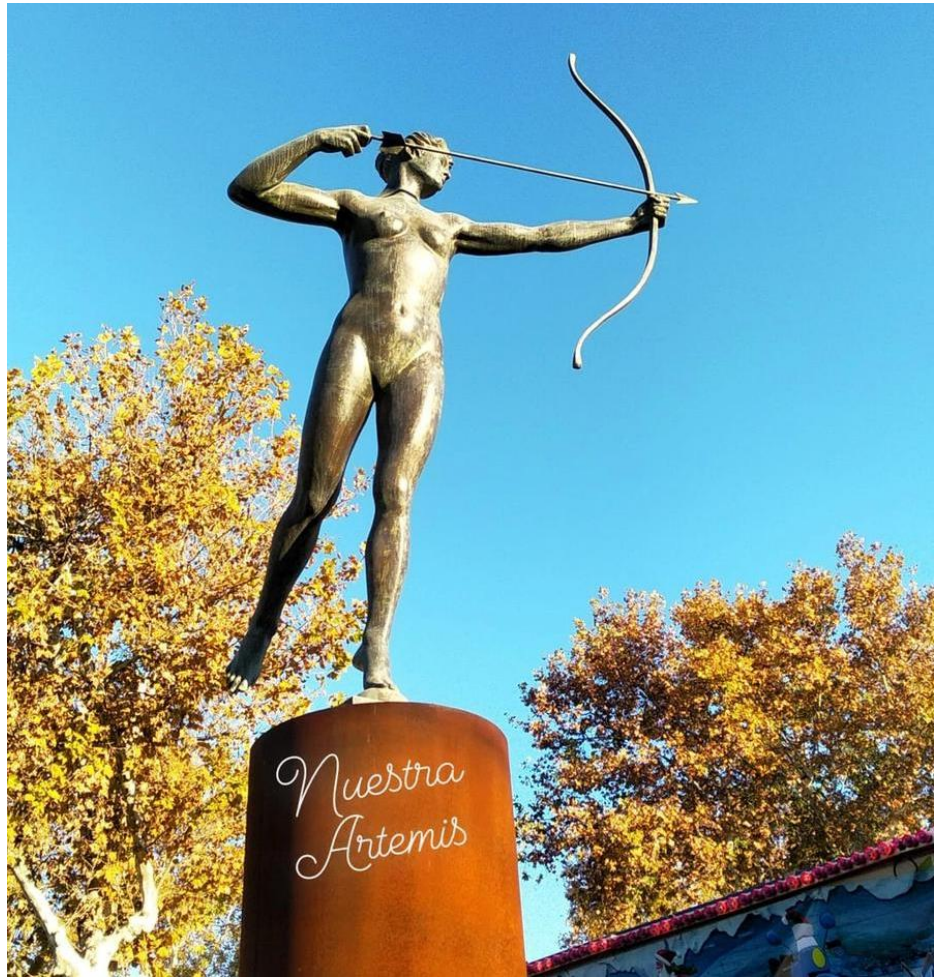


Shank et al. PHARMACOTHERAPY 2017

CARTemis-1

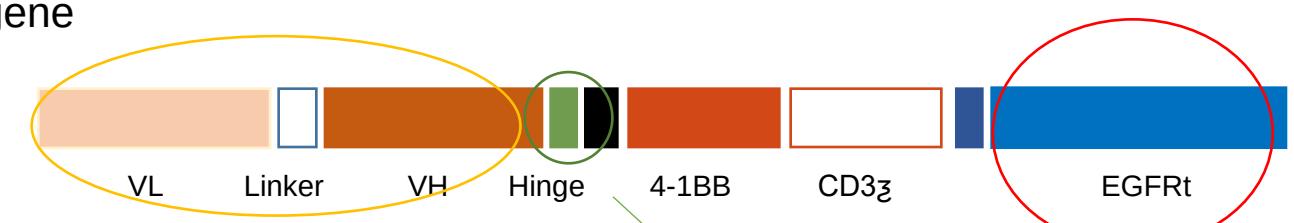
Primer CAR académico generado en el Hospital Virgen del Rocío





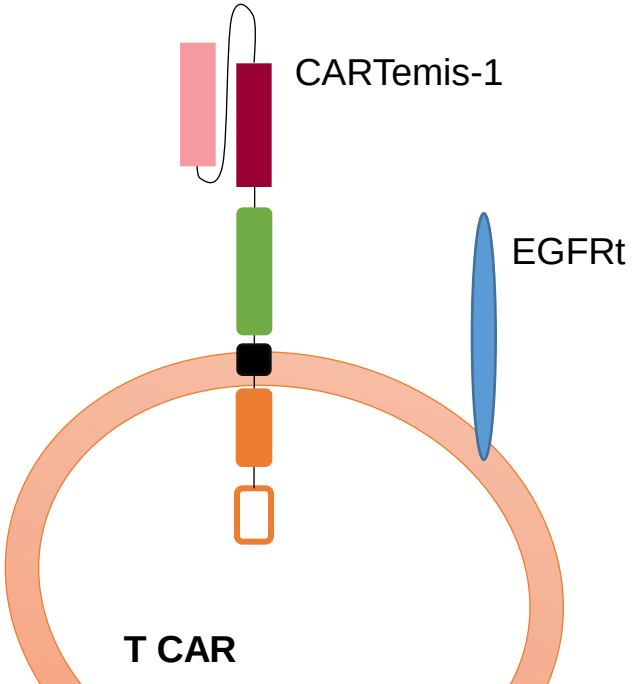
Generation of an academic CAR-T: CARTemis-1

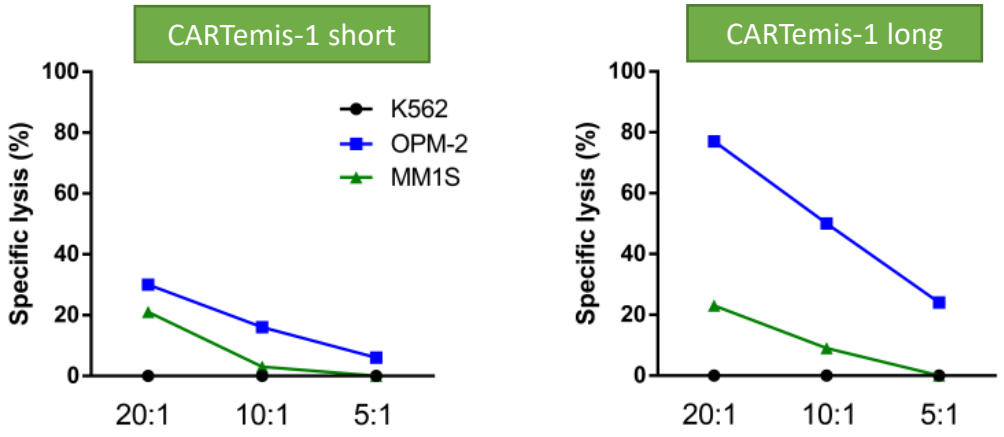
- Second generation CAR with 41BB costimulatory domain
- anti-BCMA CAR to treat Multiple myeloma patients
- CARTemis-1 presents several advantanges: Spacer domain optimized, no inhibition by soluble BCMA, addition of a safety gene



not inhibited by sBCMA

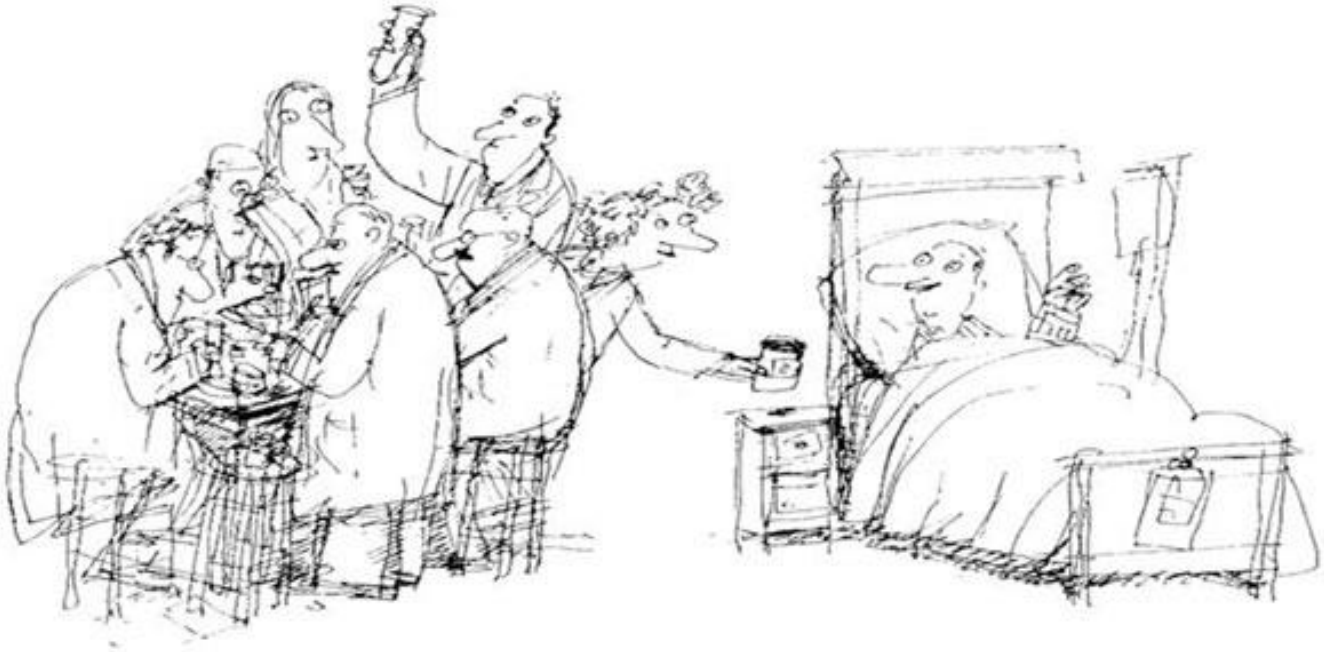
Safety and monitoring marker for our CAR T cells





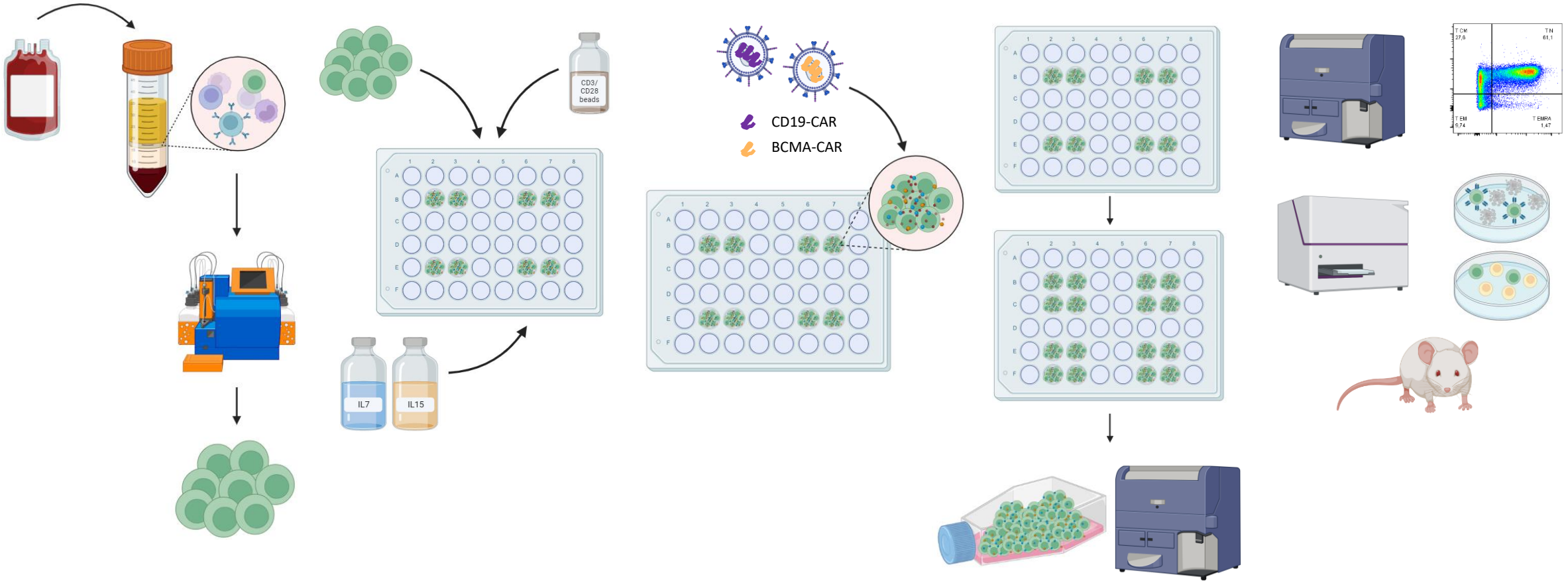
Sierro-Martínez et al., Cell Oncol, 2025

Challenge: To adapt laboratory procedures to clinical GMP conditions



CARTemis-1 cells manufacturing at the Lab

CD4+/CD8+ T-cells → aCD3/aCD28 beads activation → Lentiviral transduction → Expansion (IL7/IL15) CAR % analysis → Functional tests



CARTemis-1 cells manufacturing at the GMP level

CD4+/CD8+ T-cells → aCD3/aCD28 beads activation → Lentiviral transduction → Expansion (IL7/IL15) CAR % analysis → Quality controls and Release

FC is a indispensable tool in CAR T manufacturing and QC

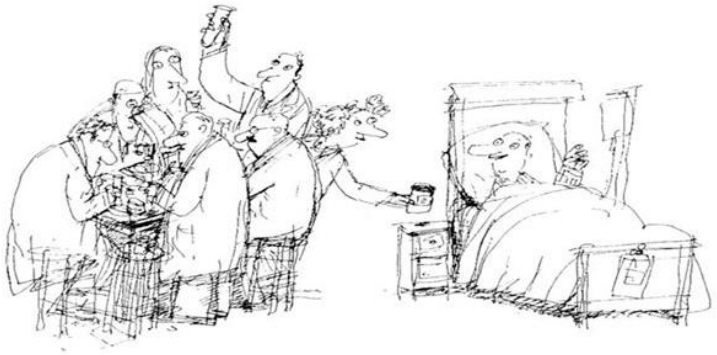
Criterios de Liberación

- Viabilidad ≥ 70%
- Dosis (0,5-6x106/Kg)
- % linfocitos T CAR ≥ 10%
- Gram negativo
- Endotoxina < 2 EU/ml
- Esterilidad negativa
- Micoplasma negativo
- RCL negativa
- Virus adventicios negativo

Validation process of an academic CAR product for clinical use

In vitro tests

- Cell line experiments



In vivo tests

- Animal model experiments

Clinical scale

- Process validation under GMP conditions
- Minimum n=3 consecutive healthy donors

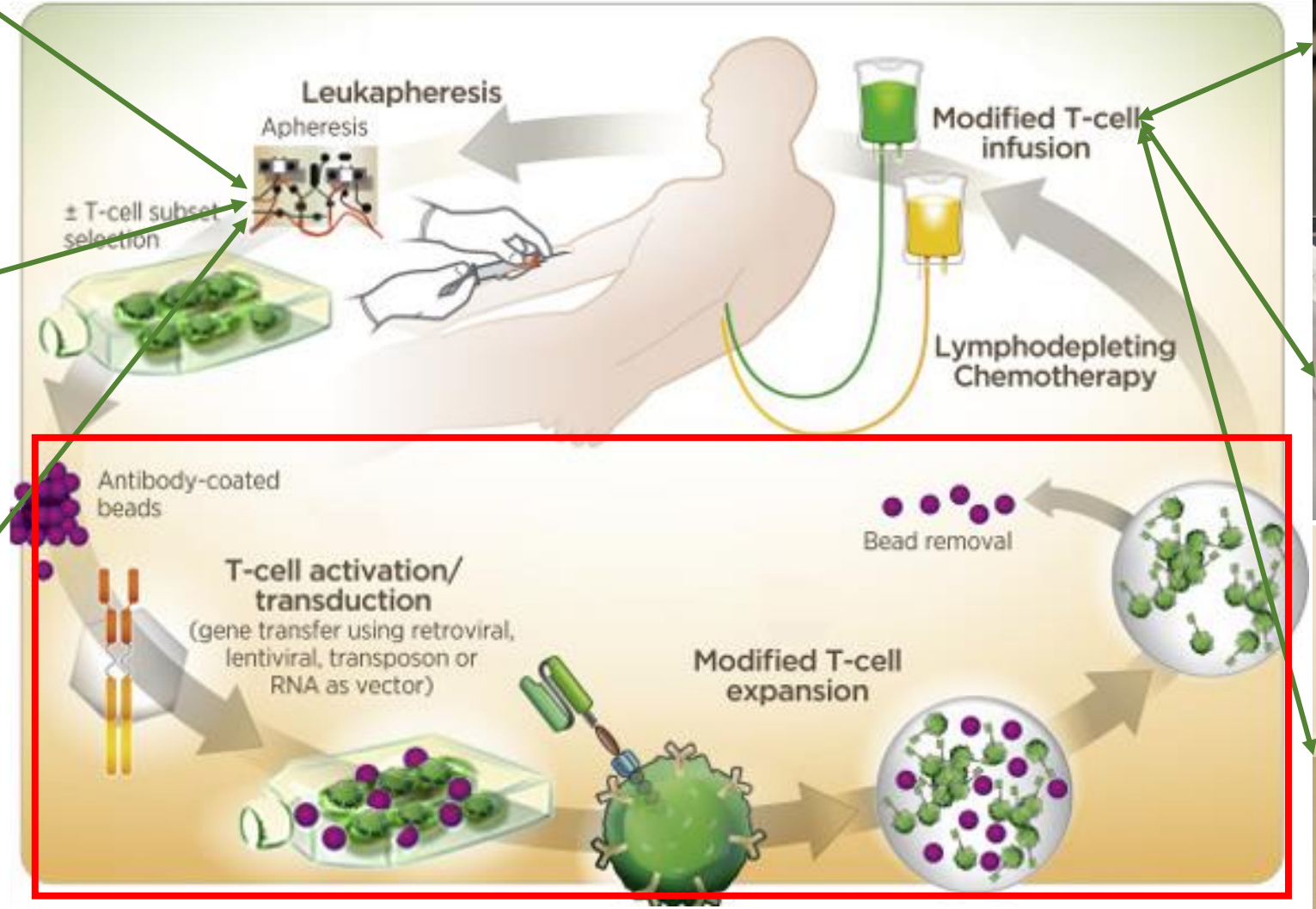
CAR CD19M*
CARTemis-1

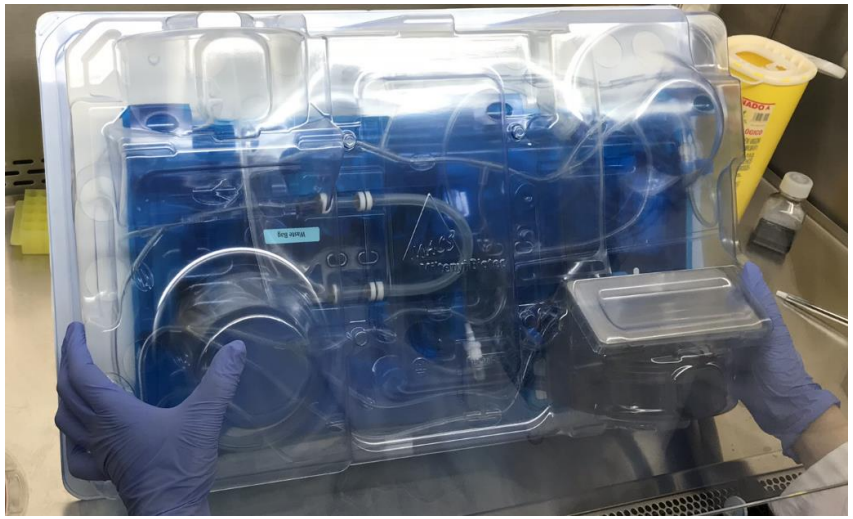
GMP documentation (IMPD)

Spanish Agency for Medicines and Health Products

CAR T cell Manufacturing in our hospital

GMP rooms





Unpacking and installation ~4-5 h
It is a closed system
It has a GMP grade

Pump
(transfers the liquids)

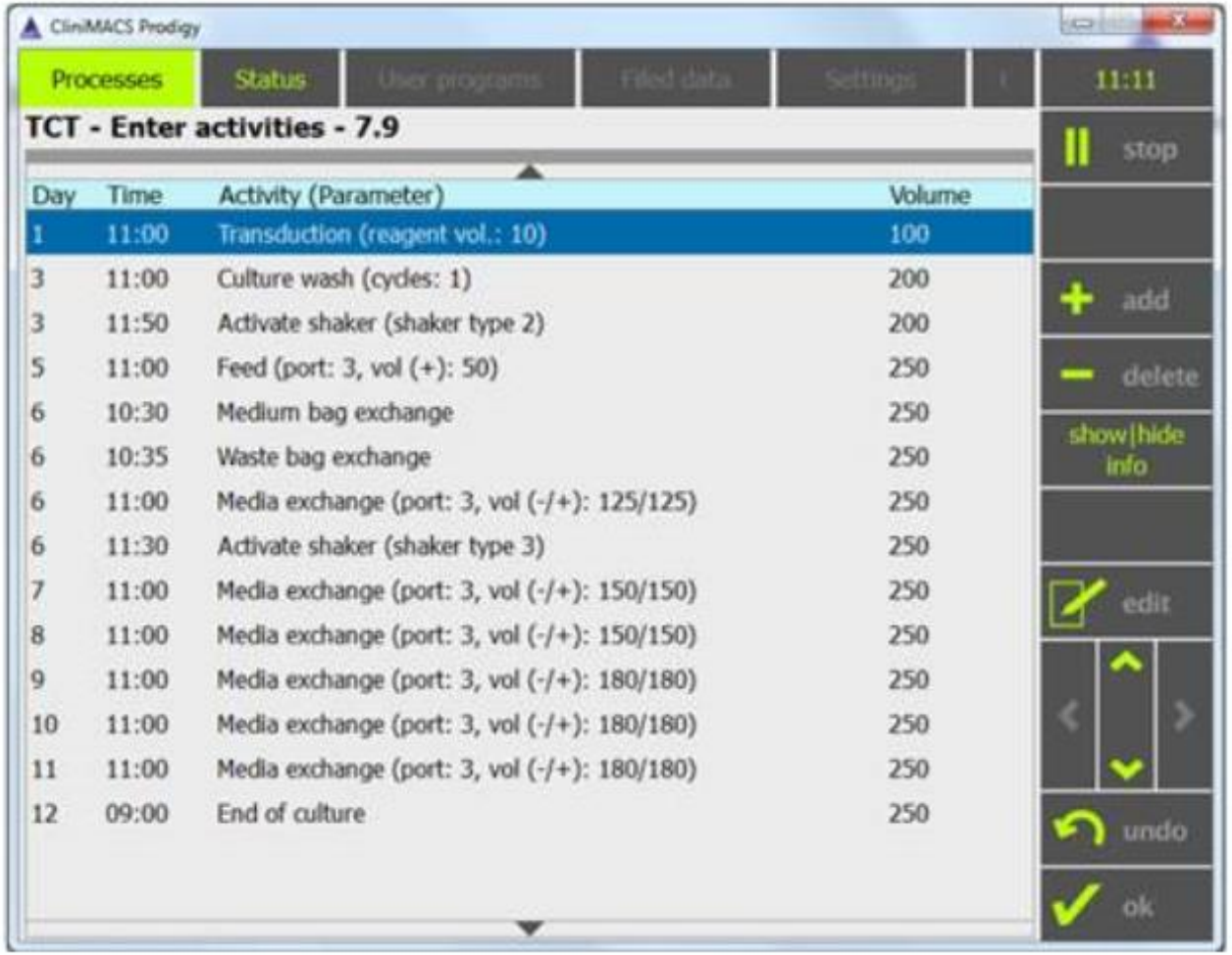
Cell culture unit with
microscope and camera

Centrifuge
(remove red cells)

Precolumn
(filtration)

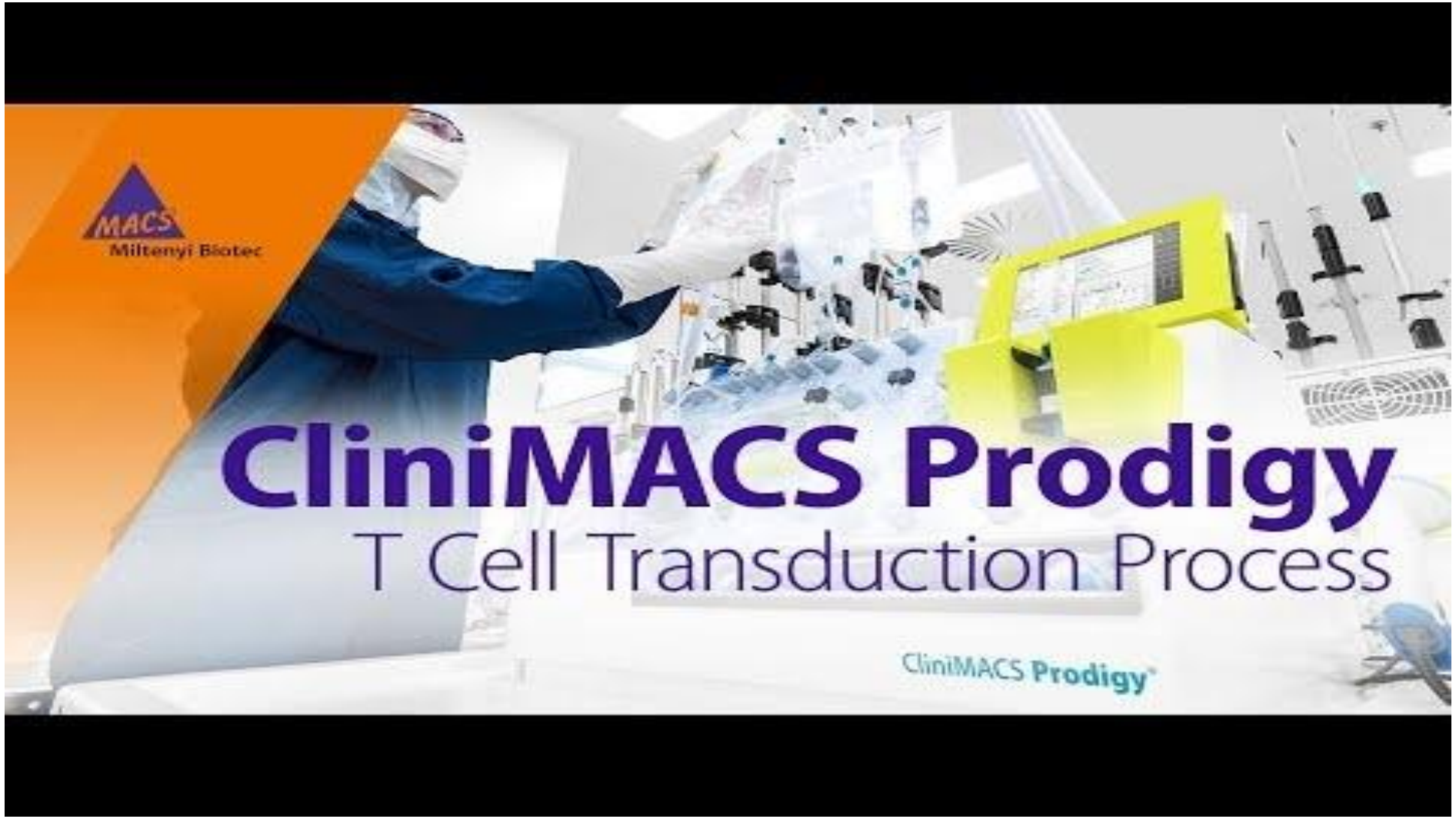
Magnetic column
(select T cells)

CLINIMACS PRODIGY MATRIX

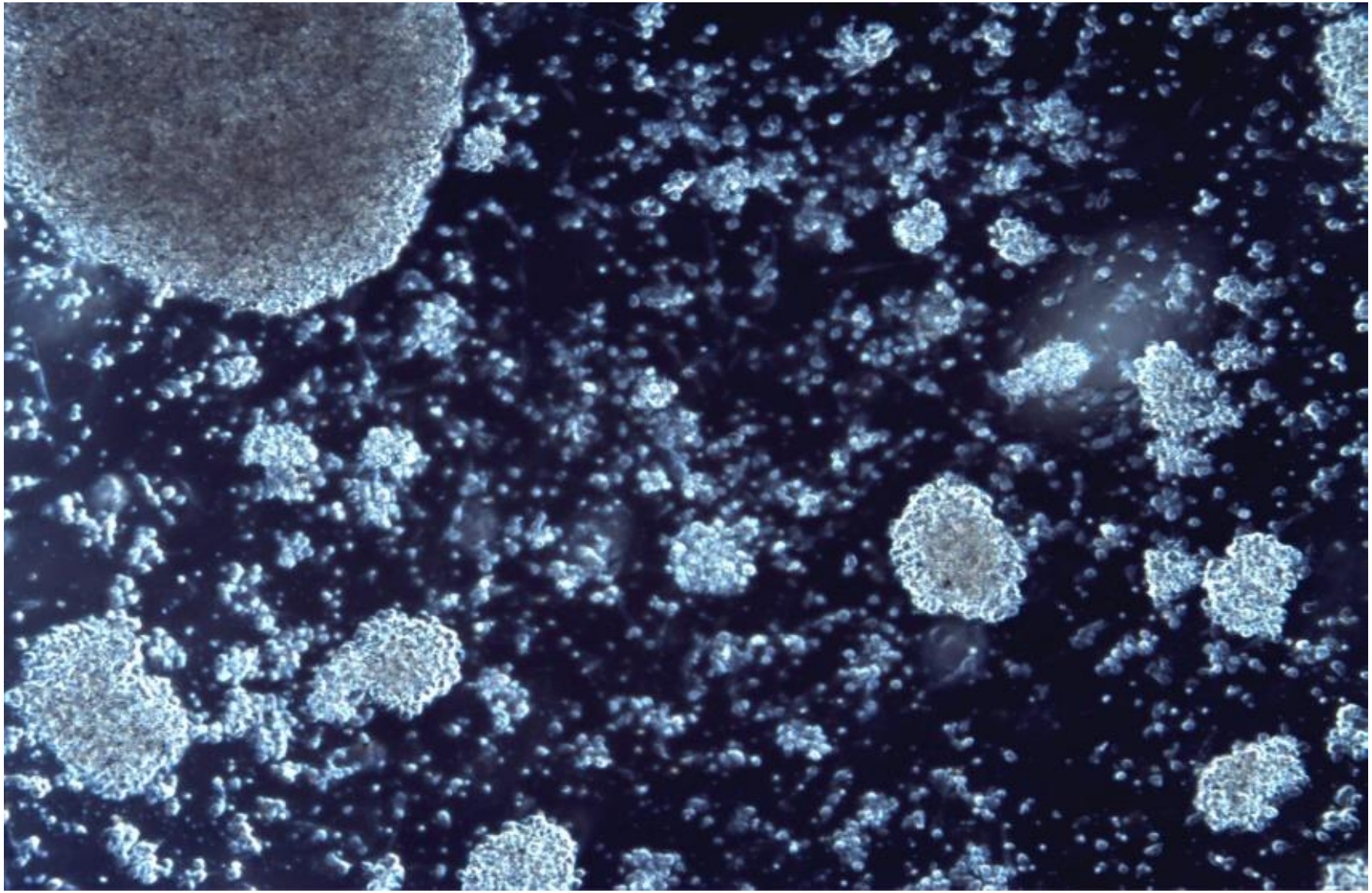


Day	Time	Activity (Parameter)	Volume
1	11:00	Transduction (reagent vol.: 10)	100
3	11:00	Culture wash (cycles: 1)	200
3	11:50	Activate shaker (shaker type 2)	200
5	11:00	Feed (port: 3, vol (+): 50)	250
6	10:30	Medium bag exchange	250
6	10:35	Waste bag exchange	250
6	11:00	Media exchange (port: 3, vol (-/+): 125/125)	250
6	11:30	Activate shaker (shaker type 3)	250
7	11:00	Media exchange (port: 3, vol (-/+): 150/150)	250
8	11:00	Media exchange (port: 3, vol (-/+): 150/150)	250
9	11:00	Media exchange (port: 3, vol (-/+): 180/180)	250
10	11:00	Media exchange (port: 3, vol (-/+): 180/180)	250
11	11:00	Media exchange (port: 3, vol (-/+): 180/180)	250
12	09:00	End of culture	250

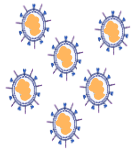
The CliniMACS Prodigy® offers a unique all-in-one solution for cell processing in a closed GMP-compliant system. Reliable and reproducible results through standardized and sensor-controlled processes

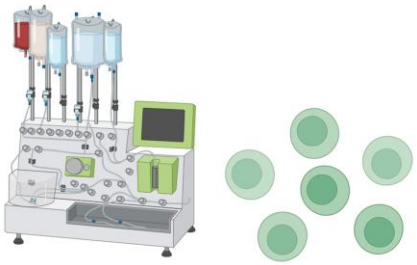


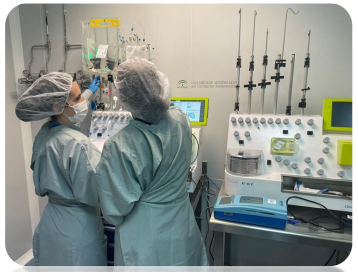
“Cielo estrellado de misiles contra el tumor”

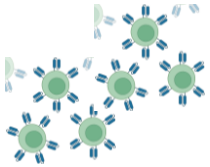


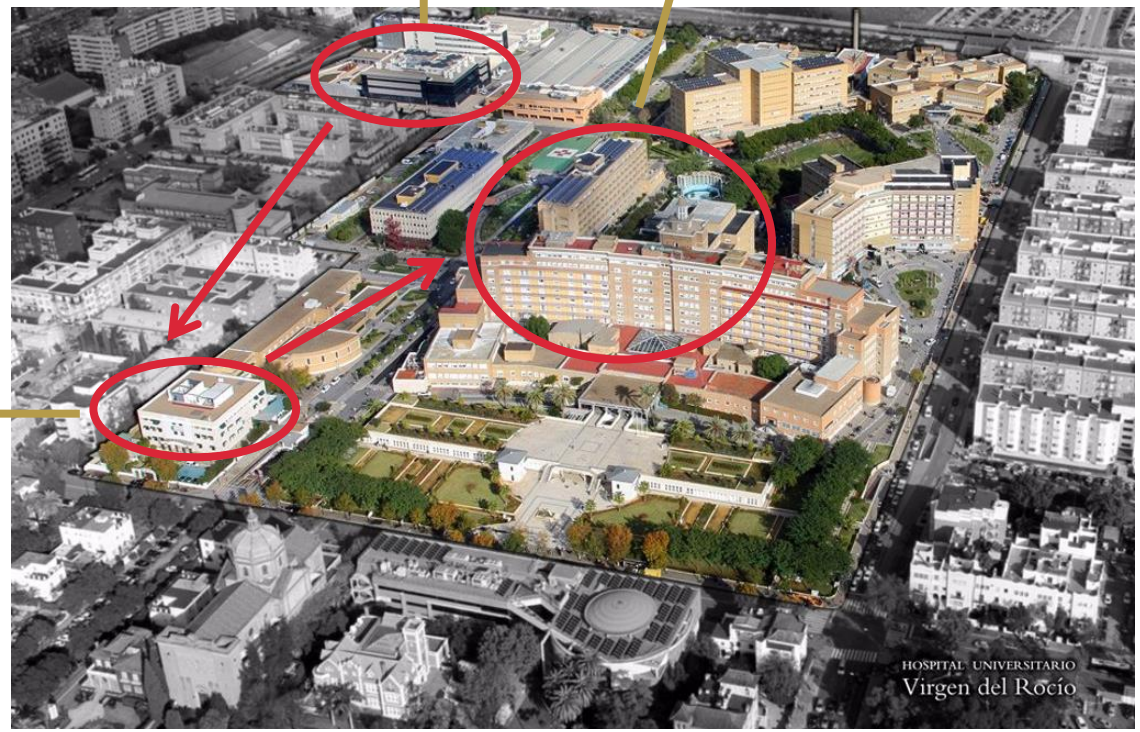
POC (point of care)



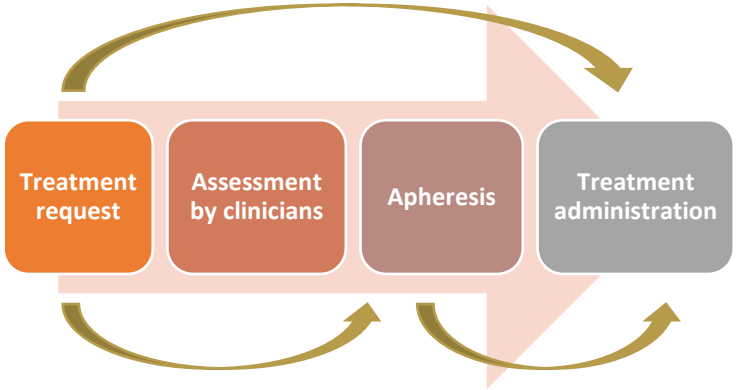








~~70 days~~ → 27-28 days
(70,23±23,12)



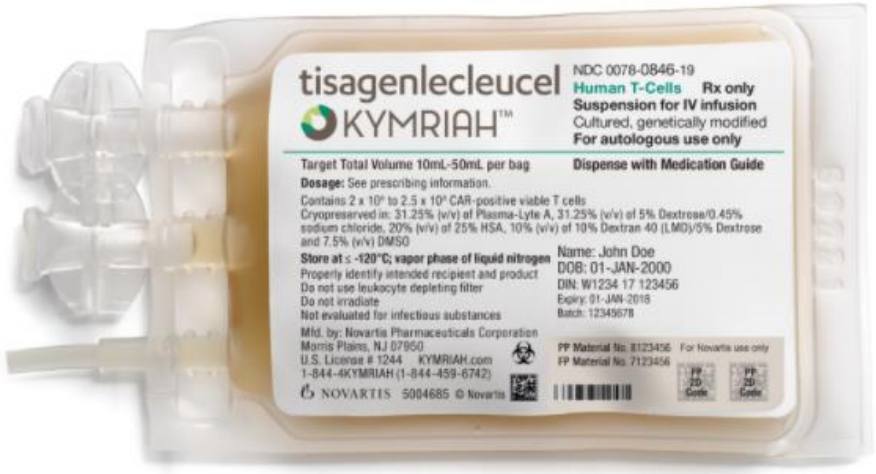
18 days
(18,13±14,46)

~~52 days~~ → 9-10 days
(52,45±20,82)

CARS from Pharma

Academic CARS *"in house"*

CARS comerciales / CARS académicos



Precio	**360.000 €**	**60.000 €**
Enfermedad	**leucemia linfoblástica aguda**	**Mieloma multiple / Linfomas**
Tiempo administración tratamiento	**52 días**	**9 días**

Instituto de Biomedicina de Sevilla

U.G.C. Hematología
Hospital Universitario Virgen del Rocío

Instituto de Biomedicina de Sevilla

U.G.C. Hematología
Hospital Universitario Virgen del Rocío