

7[^]

Conferenza Nazionale dei Servizi Trasfusionali

Vicenza | 24-26 maggio 2023



HPL sierico per la produzione di MSCs in GMP

Luciana Labanca

Centro Produzione e Validazione Emocomponenti

SC Banca del Sangue

AOU Città della Salute e della Scienza di Torino

La sottoscritta, in qualità di Presentatrice
dichiara che

nell'esercizio della Sua funzione e per l'evento in oggetto, NON È in alcun modo portatrice di interessi commerciali propri o di terzi; e che gli eventuali rapporti avuti negli ultimi due anni con soggetti portatori di interessi commerciali non sono tali da permettere a tali soggetti di influenzare le sue funzioni al fine di trarne vantaggio.



L'impiego di Lisato Piastrinico Umano (HPL) nei protocolli di isolamento ed espansione ex vivo delle Cellule Staminali Mesenchimali (MSCs) in GMP rappresenta ormai un'alternativa consolidata ed efficace rispetto all'uso di Siero Bovino Fetale.


Ai fini della sicurezza del prodotto finale i terreni di coltura e gli additivi utilizzati devono essere oggetto di un'attenta RA:

L'uso di additivi di origine animale aumenta il rischio di:

- Effetti immunizzanti: sviluppo di Ab anti FBS in pz trapiantati con MSC; reazioni immunologiche che potrebbero compromettere l'esito terapeutico.
- Trasmissione di agenti patogeni di origine animale, (noti, emergenti e sconosciuti)

Evitare l'uso di additivi di origine animale e orientarsi verso additivi di origine umana migliora la compliance alle GMP del processo di espansione cellulare

Cytotherapy, 2014; 0: 1–14

International Society for Cellular Therapy
ISCT 

Inactivated human platelet lysate with psoralen: a new perspective for mesenchymal stromal cell production in good manufacturing practice conditions

SARA CASTIGLIA^{1,†}, KATIA MARESCHI^{1,2,*}, LUCIANA LABANCA³, GRAZIELLA LUCANIA³, MARCO LEONE¹, FIORELLA SANAVIO¹, LAURA CASTELLO¹, DEBORAH RUSTICHELLI¹, ELENA SIGNORINO¹, MONICA GUNETTI¹, MASSIMILIANO BERGALLO², ANNA MARIA BORDIGA³, IVANA FERRERO^{1,2} & FRANCA FAGIOLI¹

¹*Pediatric Onco-Hematology, Stem Cell Transplantation and Cellular Therapy Division, City of Science and Health of Turin, Regina Margherita Children's Hospital, Turin, Italy,* ²*Department of Public Health and Pediatrics, University of Turin, Italy,* and ³*Blood Component Production and Validation Center, City of Science and Health of Turin, S. Anna Hospital, Turin, Italy*



Article

Inactivated Platelet Lysate Supports the Proliferation and Immunomodulant Characteristics of Mesenchymal Stromal Cells in GMP Culture Conditions

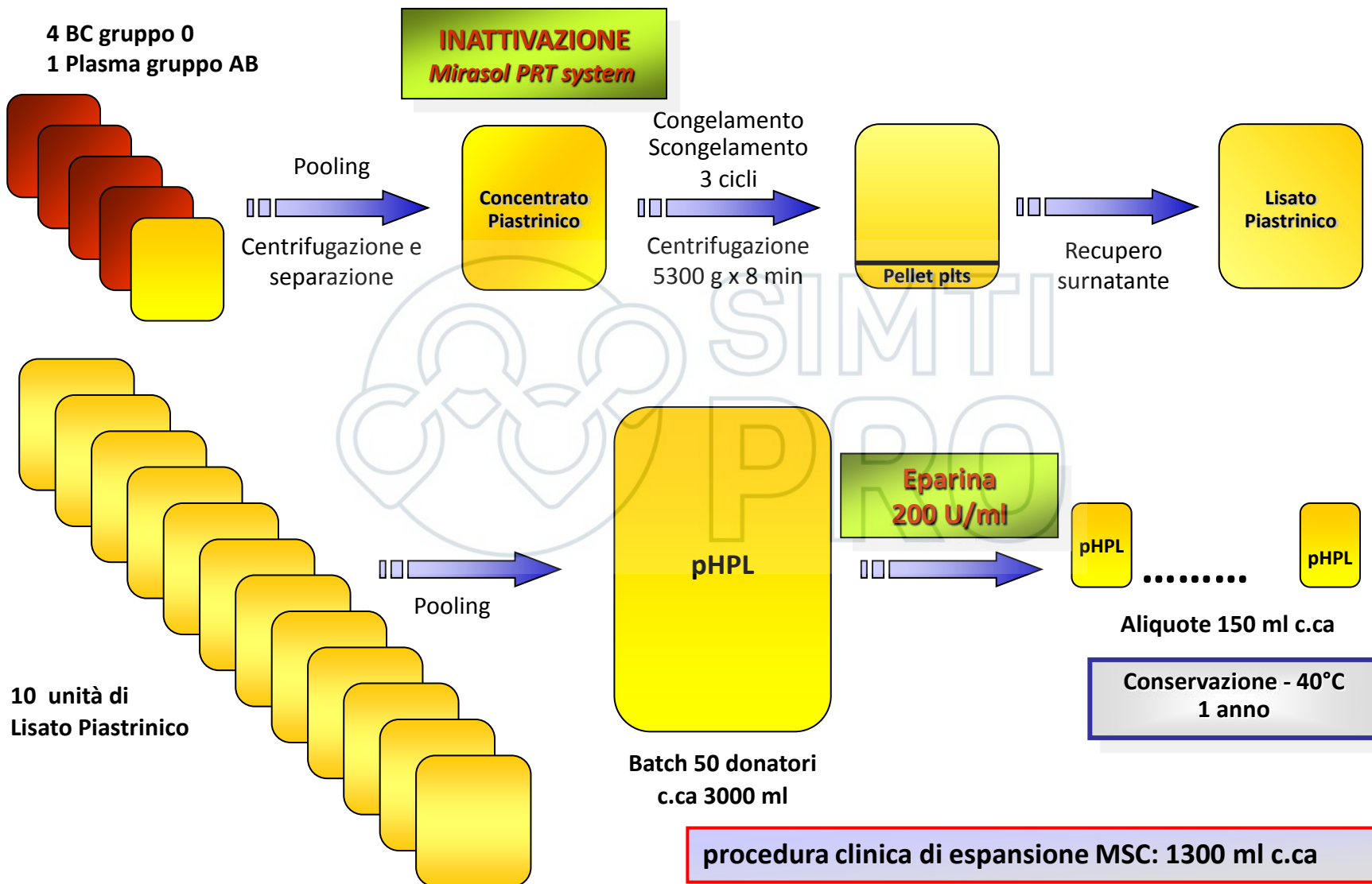
Katia Mareschi ^{1,2,*}, Sara Castiglia ^{2,†}, Aloe Adamini ², Deborah Rustichelli ², Elena Marini ¹, Alessia Giovanna Santa Banche Niclot ¹, Massimiliano Bergallo ¹, Luciana Labanca ³, Ivana Ferrero ² and Franca Fagioli ^{1,2}

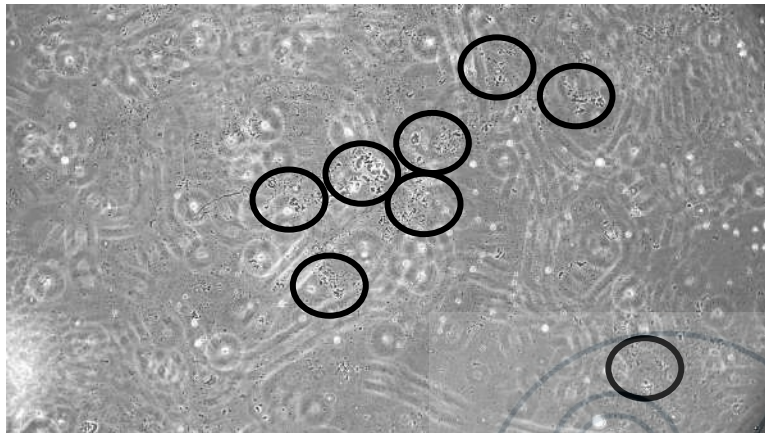
¹*Pediatric Onco-Hematology, Stem Cell Transplantation and Cellular Therapy Division, City of Science and Health of Turin, Regina Margherita Children's Hospital, Turin, Italy,* ²*Department of Public Health and Pediatrics, University of Turin, Italy,* and ³*Blood Component Production and Validation Center, City of Science and Health of Turin, S. Anna Hospital, Turin, Italy*



*efficacia come
alternativa al Siero
Bovino Fetale*

Produzione standard di Lisato Piastrinico Umano da pool





Debris in the culture medium during the expansion



Procedura di preparazione di HPL sierico che utilizza Ca-Gluconato per ridurre la presenza di fibrinogeno ed evitare l'aggiunta di eparina.

Prodotto molto più limpido anche senza aggiunta di eparina

Eliminazione di qualsiasi prodotto di origine animale (eparina)

Eliminazione di passaggi aggiuntivi di filtrazione

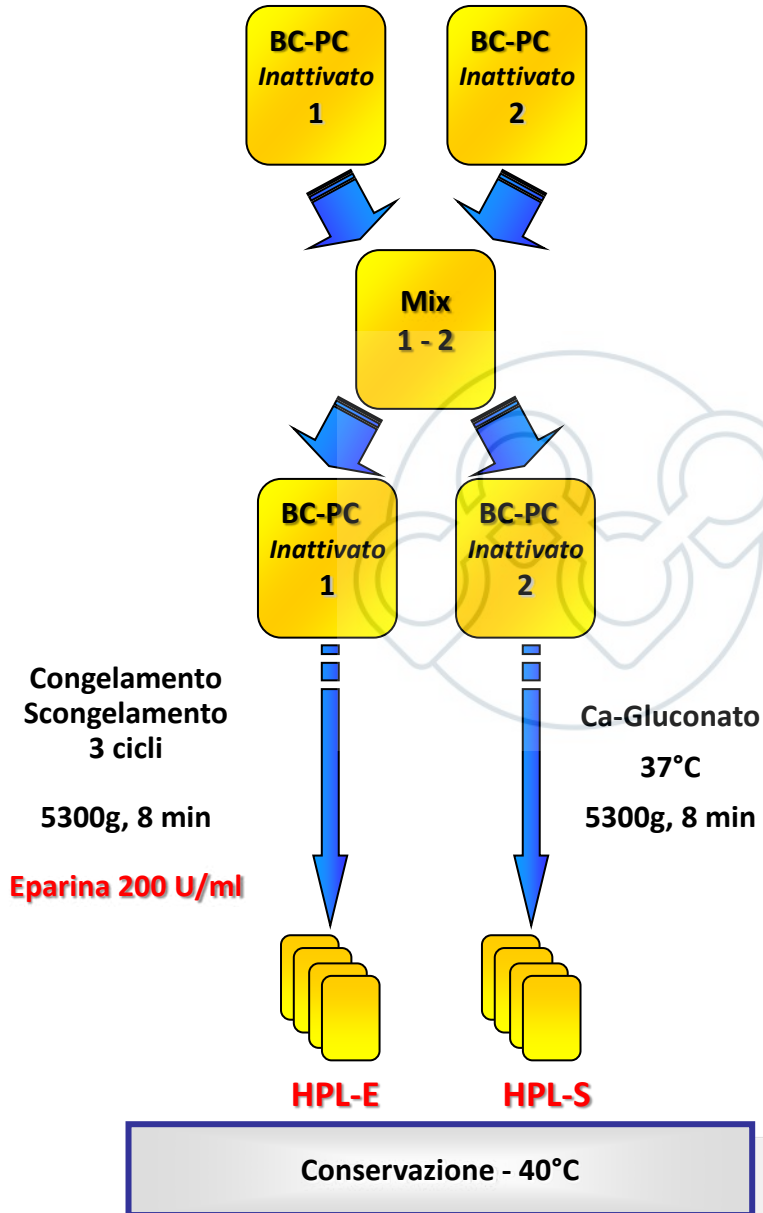
Miglioramento della sicurezza della **manipolazione cellulare in condizioni GMP**

Riduzione dei potenziali rischi per il paziente

Verificare se il nuovo metodo di produzione dell'HPL risulta efficace e preserva le caratteristiche chimico biologiche delle MSCs isolate dal midollo osseo (BM-MSCs) in condizioni di GMP:

- Ⓢ Caratteristiche biochimiche e rilascio GFs
- Ⓢ Efficacia nel sostenere la crescita delle MSC

Preparazione di HPL-E (*Eparina*) e HPL-S (*Squeezed*)



trattamento con 20 ml di Ca-Gluconato
(1000 mg/10 ml)

incubazione a 37°C fino a coagulo

Centrifugazione (5300g, 8 min)

recupero del surnatante HPL-S



Sono stati preparati tre lotti replicati: HPL-E (Eparina) e HPL-S (Squeezed)

Parametri esaminati su ogni lotto:

- Volume e conta plts (Sysmex XE2100) ad ogni step di processo
- Sterilità post trattamento / pre congelamento (Bact Alert, Biomerieux)
- Fattori coagulazione (ACL, Instrumentation Laboratory)
- Proteine totali (colorimetric test, Roche/Hitachi cobas C system)
- Fattori di crescita EGF, VEGF, FGF e PDGF (Invitrogen, ELISA Assay)

Analisi su BM-MSCs isolate da 5 campioni di BM ed espresse in due sistemi di coltura paralleli con HPL-E o HPL-S:

*Alpha Medium (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA), 1% of L-glutammine, 1% of pen/streptomycin and **10% of HPL-E or HPL-S**, rispettivamente.*

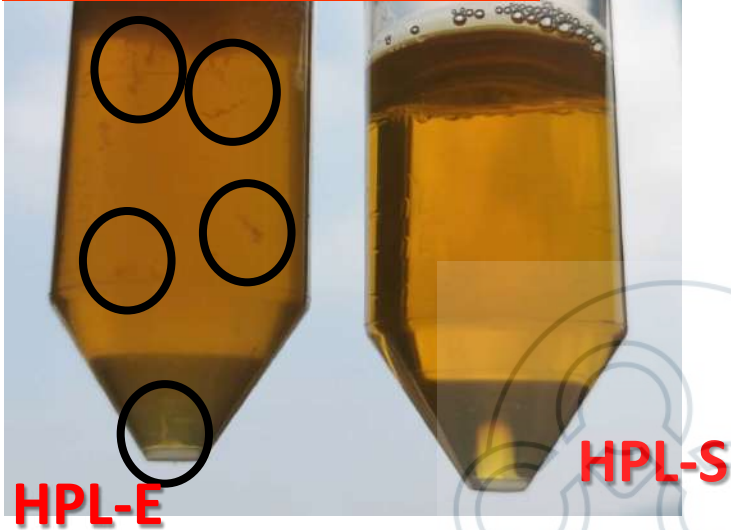
Parametri esaminati:

- Morfologia delle cellule
- CFU-F Colony Forming Unit Fibroblasts
- Crescita cellulare: cumulative Population Doubling (cPD)
- Analisi immunofenotipica **CD90, CD73, CD105, CD45-34-14, HLA-DR, CD19 e CD146** (Navios, Beckman Coulter)
- Analisi capacità differenziativa: in senso osteoblastico, adipocitario e condroblastico (Miltenyi Biotec).

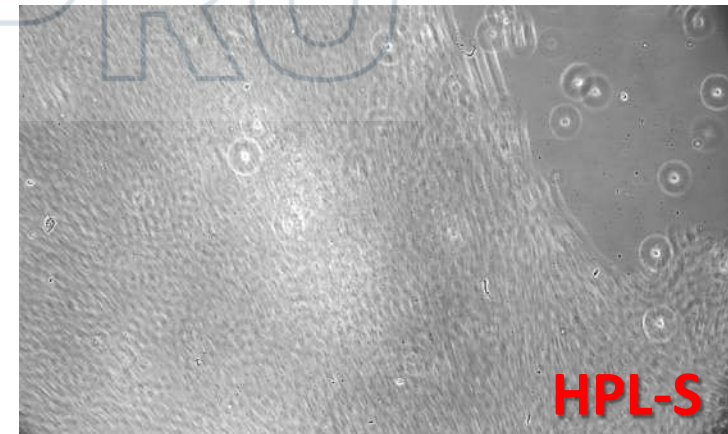
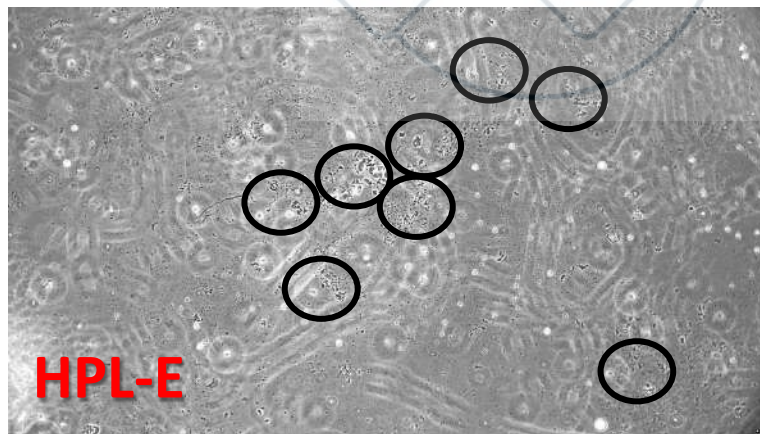
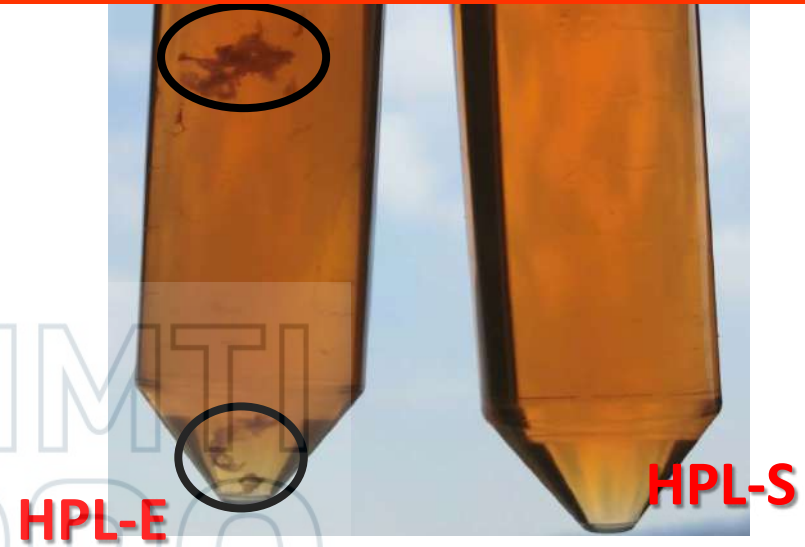
Statistical analyses: GraphPad Prism statistical software.

Risultati: differenze macroscopiche

Dopo scongelamento

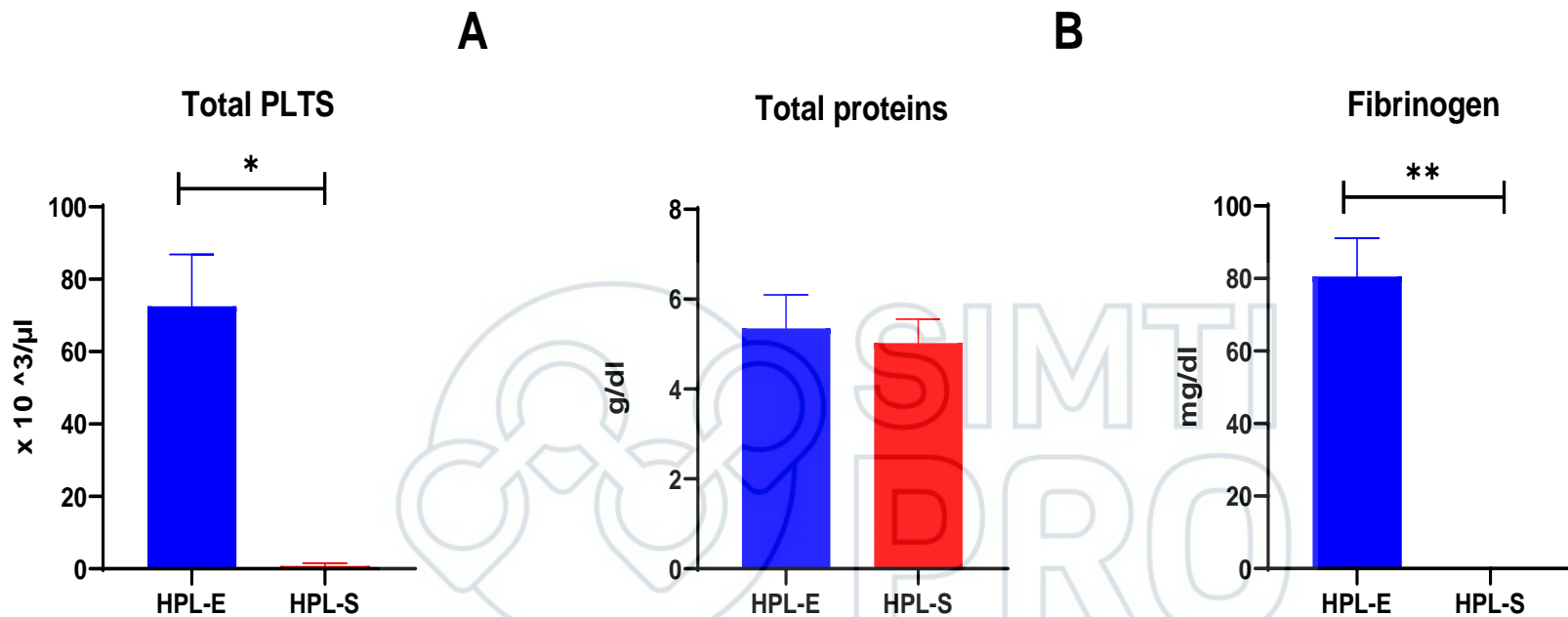


α -Mem + 10% of HPL after 3 days from filtration



MSCs in the BM-MSCs in HPL-E and in HPL-S during the culture

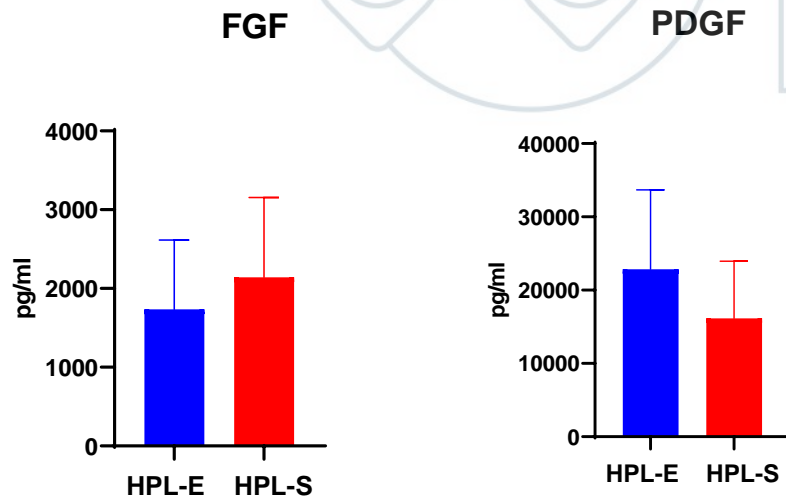
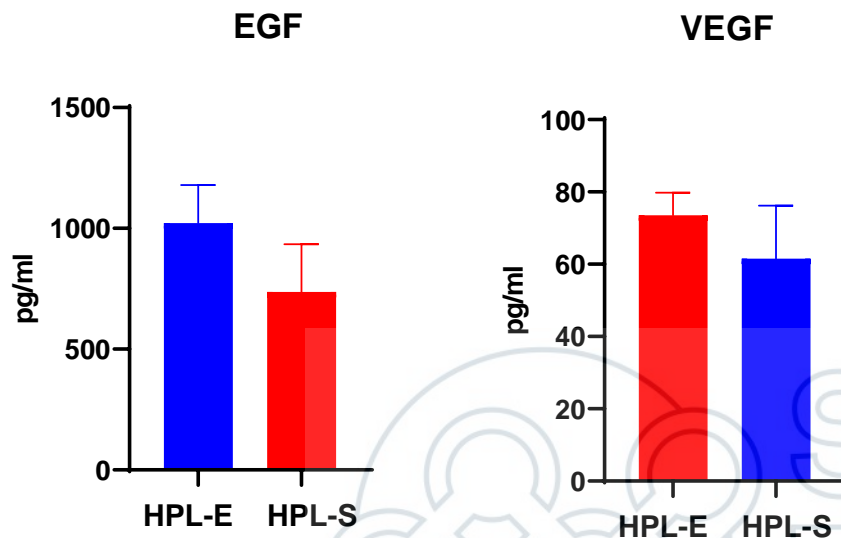
Risultati: analisi biochimica



* e ** indicano, rispettivamente, una differenza significativa ($p < 0,05$) e altamente significativa ($p < 0,01$).

	Plts x 10 ³ /μL		Proteine g/dL	Fibrinogeno mg/dL
	Post mix	Post trattamento		
HPL-E	1037,25	72,50 ± 14.40	5,35 ± 0,75	80,50 ± 10,65
HPL-S		0,75 ± 0,75	5,025 ± 0,53	-

Risultati: analisi fattori di crescita



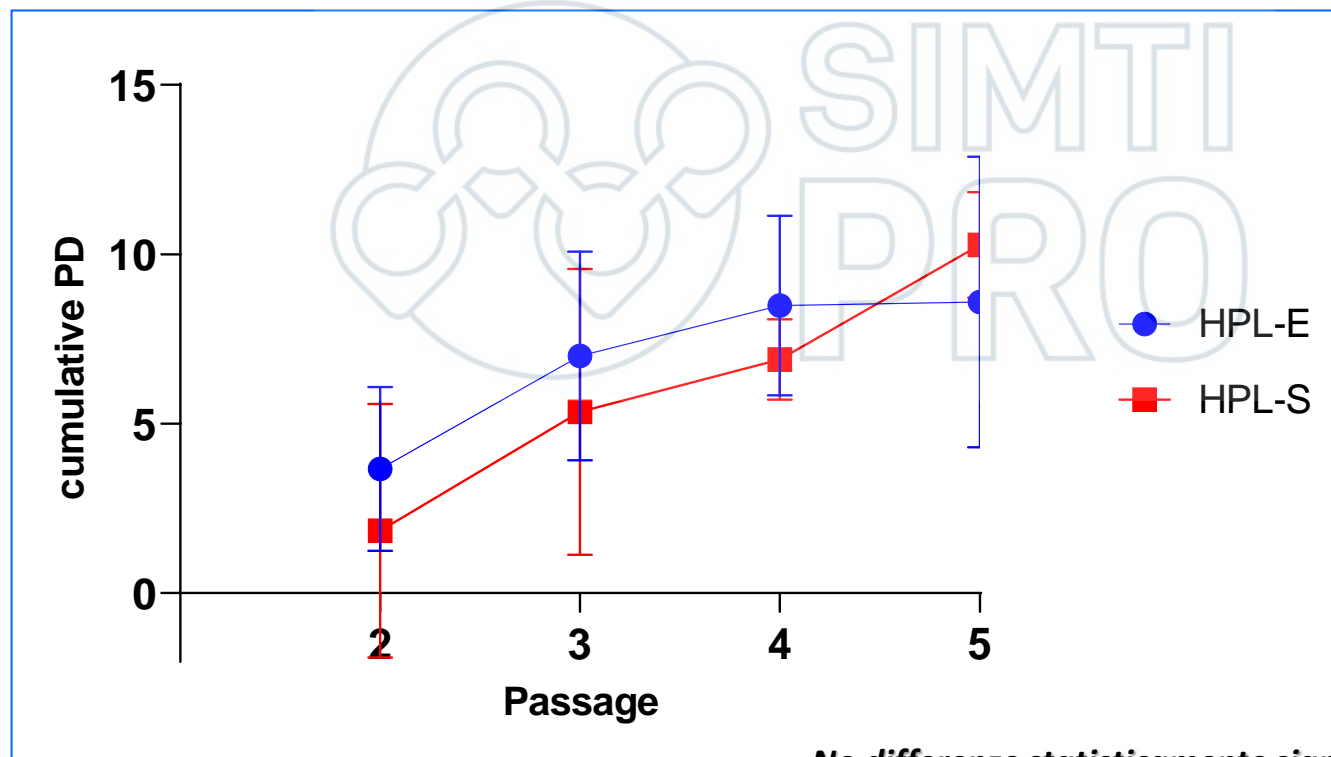
Non si osservano differenze significative tra HPL-E e HPL-S

Risultati: CFU-F e cumulative Population Doubling (cPD)

	HPL - E	HPL-S
CFU-F/10 ⁶ cells	127,00 ± 37,93	92,00 ± 32,47

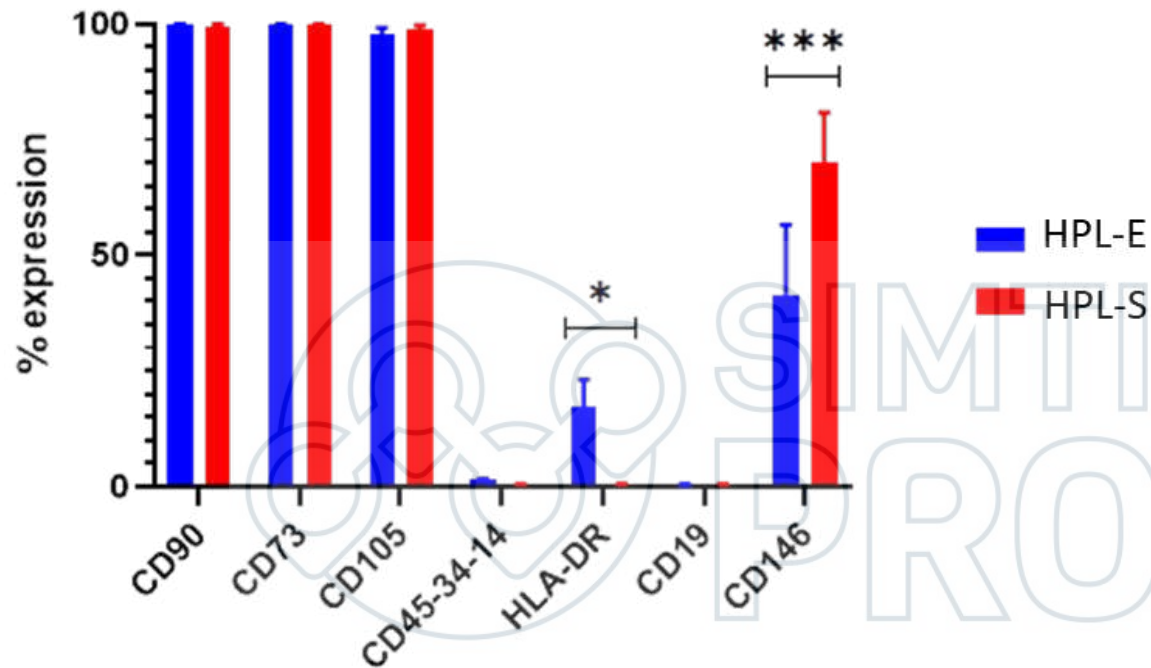
No differenze statisticamente significative

*5 batches di produzione di
BM-MSCs*



No differenze statisticamente significative

Risultati: analisi immunofenotipica e capacità differenziativa



* e *** indicano, rispettivamente, una differenza significativa ($p < 0,05$) e altamente significativa ($p < 0,001$).

La capacità differenziativa in senso osteoblastico, adipocitario e condroblastico con HPL-E e con HPL-S non ha mostrato differenze.

Il Lisato Piastrinico sierico (HPL-S) rappresenta una valida alternativa al Lisato Piastrinico Standard (HPL-E), nelle procedure di isolamento ed espansione delle MSC in condizioni GMP.

Il trattamento con Calcio Gluconato:

- ha consentito di eliminare fibrinogeno e piastrine per cui:
 - Non necessaria l'aggiunta di eparina e di qualsiasi additivo animale per evitare la coagulazione del mezzo attraverso la formazione fibrina
 - Meno piastrine, meno detriti, HPL-S più limpido
 - Non necessaria la filtrazione del terreno di coltura durante il processo produttivo delle MSCs
 - Mitigazione del rischio di contaminazione durante produzione cellulare
- non ha avuto effetti sul rilascio di proteine e GFs
 - Nessun effetto sulla crescita cellulare delle BM-MSc
 - Preservazione delle caratteristiche immunofenotipiche e multipotenti tipiche delle MSCs

Grazie!