

# Samenvatting en conclusies

Onlangs zijn celtherapieën van allerlei aard in de farmaceutische industrie steeds meer in de belangstelling gekomen, waarbij sommige zeer veelbelovende resultaten laten zien. Zo hebben CAR T-therapieën het landschap van hematologische maligniteiten getransformeerd, vooral voor de behandeling van resistente en terugkerende kankers. Wat betreft celtherapieën op basis van micro-organismen, zijn fecale microbiotaproducten steeds interessanter geworden om infecties van het gastro-intestinale systeem te voorkomen. Een gemeenschappelijke factor voor deze therapieën is echter dat ze vaak erg duur zijn. De hoge kosten van celtherapieën zijn voor een groot deel het gevolg van de ingewikkelde productieprocessen die nodig zijn om ze te produceren. Een van de resterende uitdagingen in dit opzicht betreft de houdbaarheid van celtherapieën, omdat ze over het algemeen zeer onstabiel zijn als vloeibare formulering. Aangezien celtherapieën meestal als vloeistof worden toegediend, vormt dit een belangrijke uitdaging. Gewoonlijk worden celtherapieën op basis van micro-organismen gevriesdroogd, terwijl humane celtherapieën worden ingevroren en bij zeer lage temperaturen worden opgeslagen om de stabiliteit van het product te behouden. Cryogene opslag draagt echter bij aan de hoge kosten van celtherapieën en heeft verschillende andere nadelen. In die zin zou het interessant kunnen zijn om cryogene opslag te vervangen door opslag van het gevriesdroogde product.

Vriesdrogen wordt al veel gebruikt in de farmaceutische industrie om onstabiele producten zoals therapeutische eiwitten te stabiliseren. Het begint met het bevriezen van het vloeibare product, waarna het ijs wordt gesublimeerd en eventueel achtergebleven water vervolgens door desorptie wordt verwijderd. Het resultaat is een product dat lange tijd stabiel is bij relatief hoge temperaturen (d.w.z. cryogene opslag is niet langer nodig). Gezien het kostenbesparende potentieel is het interessant om de toepassing van vriesdrogen in de context van celtherapieën verder te ontwikkelen. Het vriesdroogproces zelf heeft echter ook gebreken. Het wordt beschouwd als een traag proces, met soms slechte productkwaliteit (bijv. problemen met batch homogeniteit). Om deze problemen op te lossen, zijn nieuwe vriesdroogtechnologieën ontwikkeld. Een van deze technologieën is continu spin vriesdrogen, ontwikkeld door RheaVita BV. Gezien de voordelen van de spin vriesdroogbenadering, waarvan vele specifiek

van toepassing zijn op cellen (bijv. goede controle over de bevroeringsfase), was deze scriptie grotendeels gericht op de ontwikkeling van dit proces en de toepassing ervan op celtherapieën.

Een algemene inleiding in **Hoofdstuk 1** en de doelstellingen van de scriptie in **Hoofdstuk 2** werden gevolgd door het eerste experimentele deel in **Hoofdstukken 3 en 4**. Deze hoofdstukken richtten zich op de ontwikkeling van spin vriesdrogen als technologie, zodat het optimaal kon worden toegepast bij het onderzoek naar vriesdrogen van celtherapieën in latere hoofdstukken. In **Hoofdstuk 3** lag de focus op de spin-invriezingsfase van het proces. Hier werd een mechanistisch model ontwikkeld dat het temperatuursprofiel van het product in de tijd voorspelt naarmate het spin-invriezen vordert. Verschillende technieken zoals onzekerheids- en gevoeligheidsanalyses werden gebruikt om procesinzicht te ontwikkelen en te demonstreren. In **Hoofdstuk 4** werd de spin vriesdroogtechnologie verder ontwikkeld door een besturingssysteem voor het hele proces te creëren. Hier werd het spin vriesproces verder verbeterd om de temperatuur van het gas gelijktijdig met de gasstroomsnelheid te kunnen regelen. Daarnaast werd een controlesysteem gecreëerd om het daaropvolgende droogproces (d.w.z. zowel primaire als secundaire droging) te regelen. Beide besturingssystemen voor bevroeren en drogen werden gecombineerd en het proces werd gekarakteriseerd door vriesgedroogde stalen te produceren. De producteigenschappen van dit gevriesdroogde materiaal werden gekarakteriseerd en gerelateerd aan de procesinstellingen die in het proces werden gebruikt. Uiteindelijk werd een adequate procesbeheersing aangetoond en kon het systeem voor verder onderzoek worden gebruikt.

De volgende hoofdstukken richtten zich op de toepassing van de in de vorige hoofdstukken ontwikkelde processen om celgebaseerde producten te bevroeren en vriesdrogen. In **Hoofdstuk 5** werd het vriesdrogen van een bacteriesoort met ontstekingsremmende eigenschappen, *R. mucilaginosa*, onderzocht. In het bijzonder wordt deze bacterie onderzocht voor ontstekingsziekten van de longen. Een veelbelovende toedieningsmethode zou zijn om deze bacteriën te vernevelen om ze in de long te transporteren, waar ze hun ontstekingsremmende werking kunnen uitoefenen. Net als alle celtherapieën zijn bacteriën echter niet lang stabiel als vloeibare suspensie. Daarom werd onderzocht of deze bacteriën gevriesdroogd konden worden om langdurige stabiliteit te verkrijgen. Daartoe werd spin vriesdrogen vergeleken met conventioneel vriesdrogen en werd een formulatieexperiment uitgevoerd om de langdurige stabiliteit te optimaliseren. Na formulatieoptimalisatie behield *R. mucilaginosa* zijn levensvatbaarheid en ontstekingsremmende activiteit tot een jaar. Invloedrijke factoren waren de opslagtemperatuur, het vochtgehalte van het product en de vriesdroogmethode.

**Hoofdstuk 6** beschreef het vriesontdooien van Jurkat T-cellen met behulp van spin-vriezen in zowel een DMSO-bevattende formulering als een DMSO-vrije formulering. In dit werk lag de focus op het verduidelijken van de impact van elke fase van

het spin invriesproces in een poging optimale omstandigheden te vinden voor een daaropvolgend vriesdroogproces. Het bleek dat bijna alle fasen van het proces de levensvatbaarheid van de cellen na het proces op verschillende manieren beïnvloeden. De koelsnelheid die werd gebruikt vóór de vorming van ijs had een impact op de levensvatbaarheid van de cellen, waarschijnlijk als gevolg van osmotische effecten die formulatiespecifiek waren. De mate van onderkoeling op het moment van ijskristallisatie bleek geen invloed te hebben, wat wij toeschrijven aan de methode van temperatuurcontrole van het product tijdens het spin invriezen. De snelheid waarmee ijskristallen groeien was verwacht invloedrijk. Ten slotte had de koelsnelheid na volledige bevroering van het ijs ook een formulatie-afhankelijke impact, wat werd toegeschreven aan herkristallisatie-effecten en een risico op intracellulaire kristallisatie.

In **Hoofdstuk 7** werd geprobeerd Jurkat T-cellen te vriesdrogen om langdurige stabiliteit te verkrijgen. Multivariate data-analyse werd gebruikt om de status van de cellen te beoordelen, ondanks de afwezigheid van levende cellen. Er werd ontdekt dat specifieke formulatiecomponenten de gelijkensis van de gevriesdroogde cel met een positieve controle beïnvloeden. Daarnaast werd de intracellulaire levering van beschermende stoffen beoordeeld. Hoewel de werkelijke hoeveelheid geleverde beschermende stof onduidelijk is, resulteerde geen van de onderzochte technieken in cellen die meer op de positieve controle leken dan cellen die geen laadbehandeling hadden ondergaan. Tot slot gaf de spin vriesdroog techniek aanleiding tot cellen die niet meer beschadigd waren dan die gevriesdroogd met conventioneel vriesdrogen.

Tot slot besprak **Hoofdstuk 8** het uitgevoerde werk van deze scriptie in een bredere internationale context en besprak toekomstige perspectieven. Het bredere internationale contextgedeelte bestond uit drie delen. In het eerste deel worden de relevantie en effectiviteit van celtherapieën besproken om de belofte van deze nieuwe klasse therapeutica te illustreren. Ten tweede werden de kosten van celtherapieën besproken, inclusief de redenen voor deze hoge kosten en manieren om deze te verminderen. Ten derde werd de belofte van off-the-shelf humane celtherapieën besproken en werd de plaats van vriesdrogen in deze context beschreven. Het gedeelte toekomstige perspectieven beschreef onderzoeksinitiatieven die relevant zijn voor deze scriptie en voor het vakgebied van vriesdrogen van celtherapeutica in het algemeen. Relevante onderwerpen in dit laatste deel omvatten de intracellulaire levering van beschermende stoffen, het belang van de reconstitutiestap voor deze producten en het verschil tussen vriesontdooien en vriesdrogen.

Samenvattend bevat deze scriptie zowel de procesontwikkeling van het spin vriesdroogproces als de toepassing ervan op het onderzoek naar vriesdrogen en cryopreservatieprocessen. Hoewel er nog veel uitdagingen zijn, vertegenwoordigt deze scriptie weer een stap richting de succesvolle toepassing van vriesdrogen op celtherapieën.