

# La raccolta di linfociti per CAR-T

**Manuela Rigno**

***UOC Medicina Trasfusionale Provincia di  
Vicenza***



REGIONE DEL VENETO



**ULSS8**  
BERICA

La sottoscritta Rigno Manuela, in qualità di Relatore dichiara che

nell'esercizio della Sua funzione e per l'evento in oggetto, NON È in alcun modo portatore 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 mie funzioni al fine di trarne vantaggio.

# CAR-T

Acronimo di Chimeric Antigenic Receptor: un recettore chimerico proteico trans-membrana sintetizzato in laboratorio T-cell  
Antigen receptor T cell therapy rappresenta attualmente la frontiera più avanzata della ricerca ematologica

Il primo farmaco di questa nuova classe di terapie cellulari (tisagenlecleucel, CTL019) è stato approvato agosto 2017 dalla FDA.

Il dossier registrativo, formato dai risultati degli studi clinici JULIET (per DLBCL) ed ELIANA (per LLA) ha dato solidi riscontri in termini di sicurezza della terapia.

Follow-up a 19 mesi dello studio JULIET hanno dimostrato una probabilità di sopravvivenza libera da recidive del 66% a 6 mesi, e che si è mantenuta costante intorno al 64% nel corso delle analisi a 12 e 18 mesi.

Le analisi condotte sui dati provenienti dallo studio ELIANA hanno evidenziato il 62% dei pazienti era ancora libero da recidiva 24 mesi dopo l'infusione del farmaco.

[Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jan 15; 90\(2\): 720–724.](#)

[Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors.](#)

[Z Eshhar, T Waks, G Gross, and D G Schindler](#)

L'intuizione è stata quella di unire la specificità dell'anticorpo a riconoscere il tumore con l'efficacia dei linfociti T → utilizzare le cellule del nostro sistema immunitario modificandoli "educandoli" a riconoscere particolari recettori.  
CAR-T cells: linfociti T modificati per esprimere recettori creati in laboratorio.

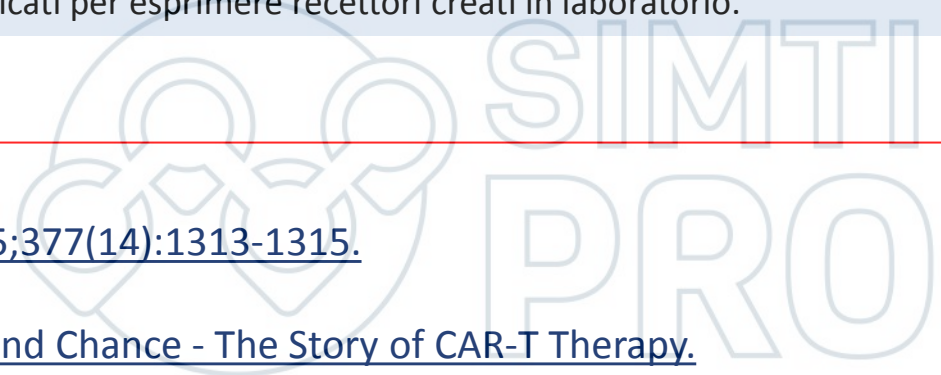
[N Engl J Med. 2017 Oct 5;377\(14\):1313-1315.](#)

[Tragedy, Perseverance, and Chance - The Story of CAR-T Therapy.](#)

[Rosenbaum L .](#)

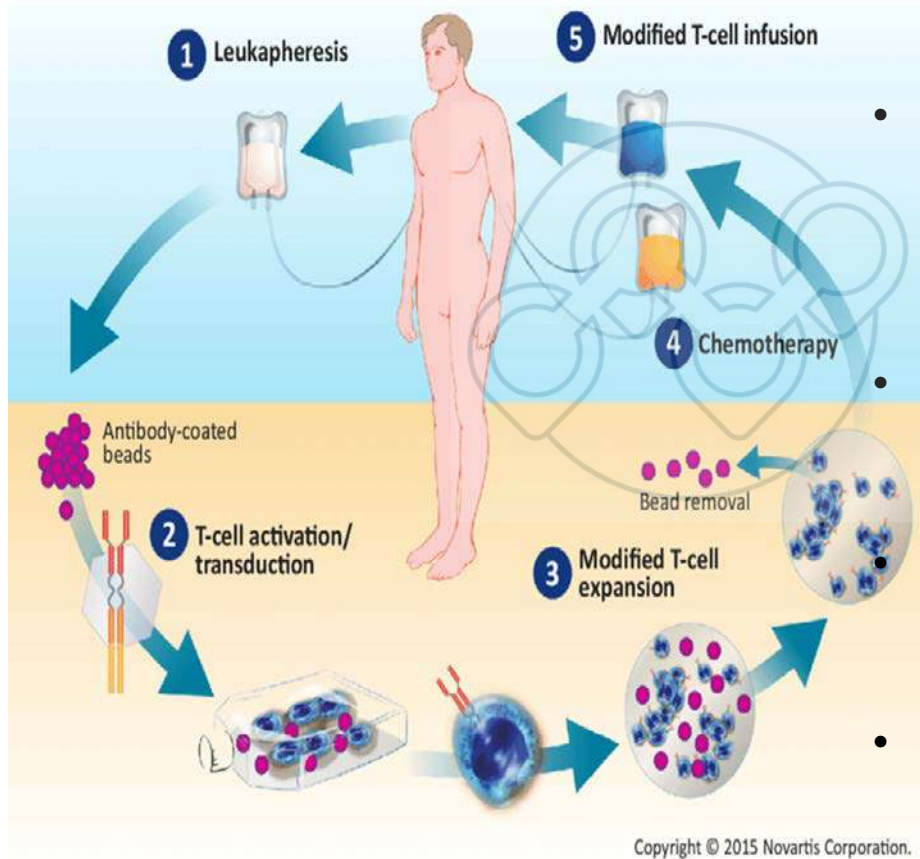
descrive la storia di questa terapia, per certi versi paradigmatica nel percorso spesso accidentato e non scevro da passioni e implicazioni etiche, comune a gran parte delle terapie innovative che stanno trasformando la farmaceutica.

Il primo paziente a essere sottoposto in USA, nel 2012, a questo trattamento fu Emily, una bambina di 6 anni affetta da LLA che non rispondeva alle terapie classiche.  
Tuttora vivente



# CAR-T: processo

- Le terapie cellulari CAR-T fanno parte delle cosiddette immunoterapie adoptive cell transfer (**ACT**)
- Utilizzano come substrato i linfociti T del paziente, prelevati dal suo sangue tramite leucaferesi.
- le cellule subiscono una riprogrammazione genetica mediante tecniche di gene editing o ricorso a vettori virali che induce l'espressione sulla superficie dei linfociti T una proteina, nota come Recettore dell'Antigene Chimerico (**CAR**)
- In laboratorio è possibile isolare le regioni variabili dell'anticorpo che riconoscono in maniera estremamente specifica le molecole espresse sulla superficie dei tumori
- Le sequenze sintetiche così espresse sulla superficie cellulare sono in grado di riconoscere antigeni specifici sulla superficie della cellula tumorale (soprattutto il recettore CD19, ma anche CD20, CD23 ed ErbB2/HER2)
- Le cellule CAR-T così modificate si legano selettivamente alle cellule tumorali, attivandone i meccanismi di morte cellulare.



# CAR-T

**Extracellular receptor**  
that binds to the  
targeted antigen

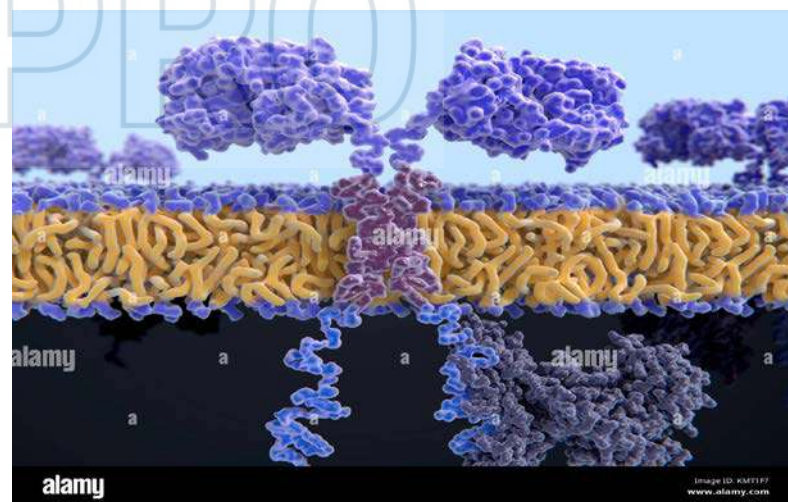
**Extracellular hinge component**  
that provides flexibility to  
enhance binding affinity

**Intracellular costimulatory  
domain** that enhances  
early expansion

**Transmembrane domain**  
that anchors the molecule  
to the T cell

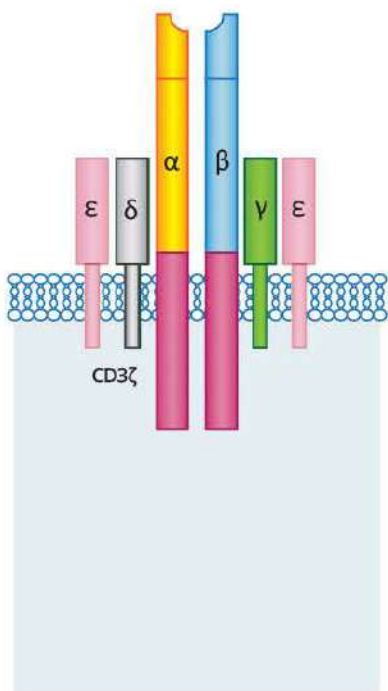
**Intracellular signalling domain**  
that initiates the biochemical  
cascade leading to immune activation

I recettori degli antigeni sono detti “chimerici” perché sono composti da diversi elementi: la regione variabile, di origine anticorpale, che riconosce gli antigeni espressi dal tumore e una regione spacer di collegamento ai domini di segnalazione all’interno del linfocita T

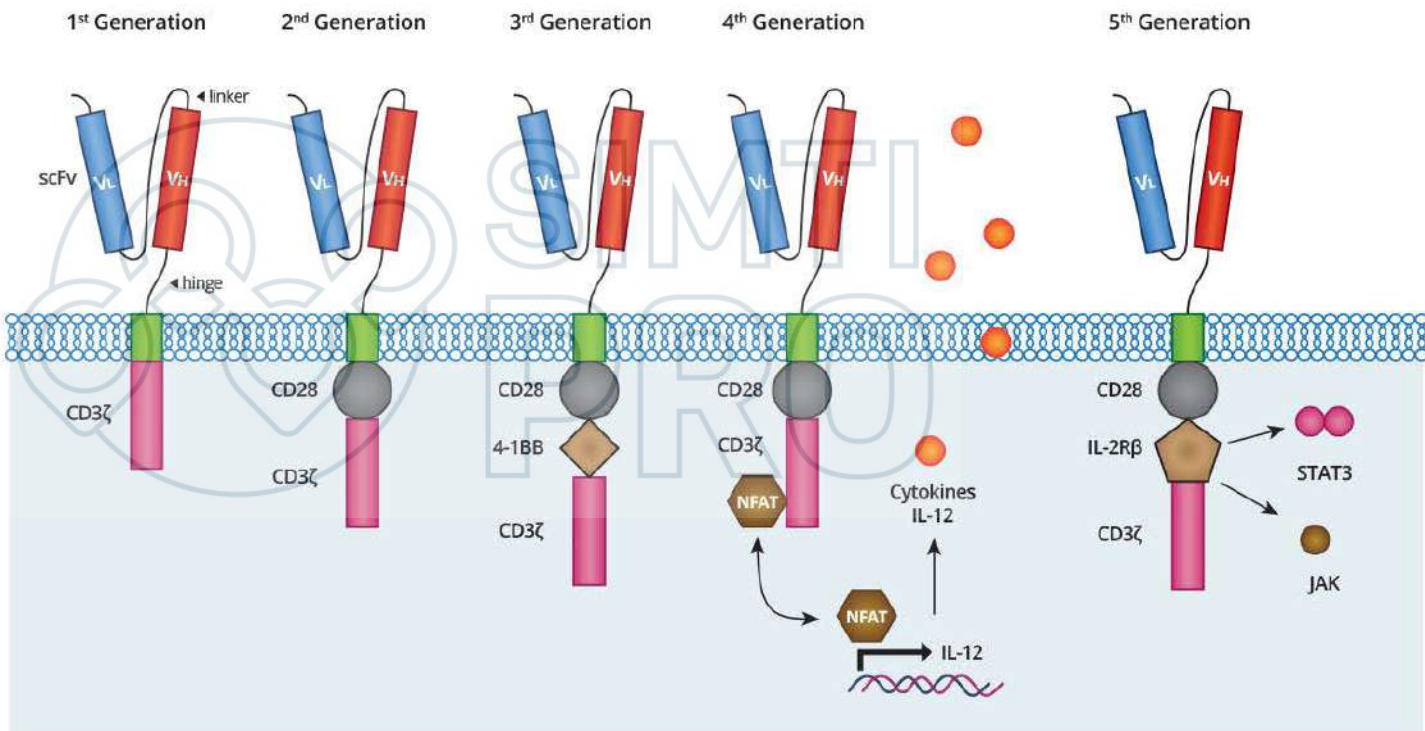


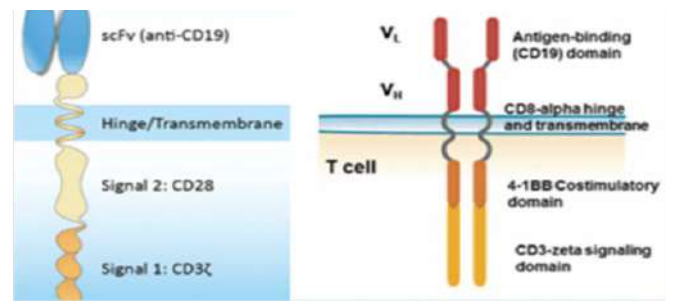
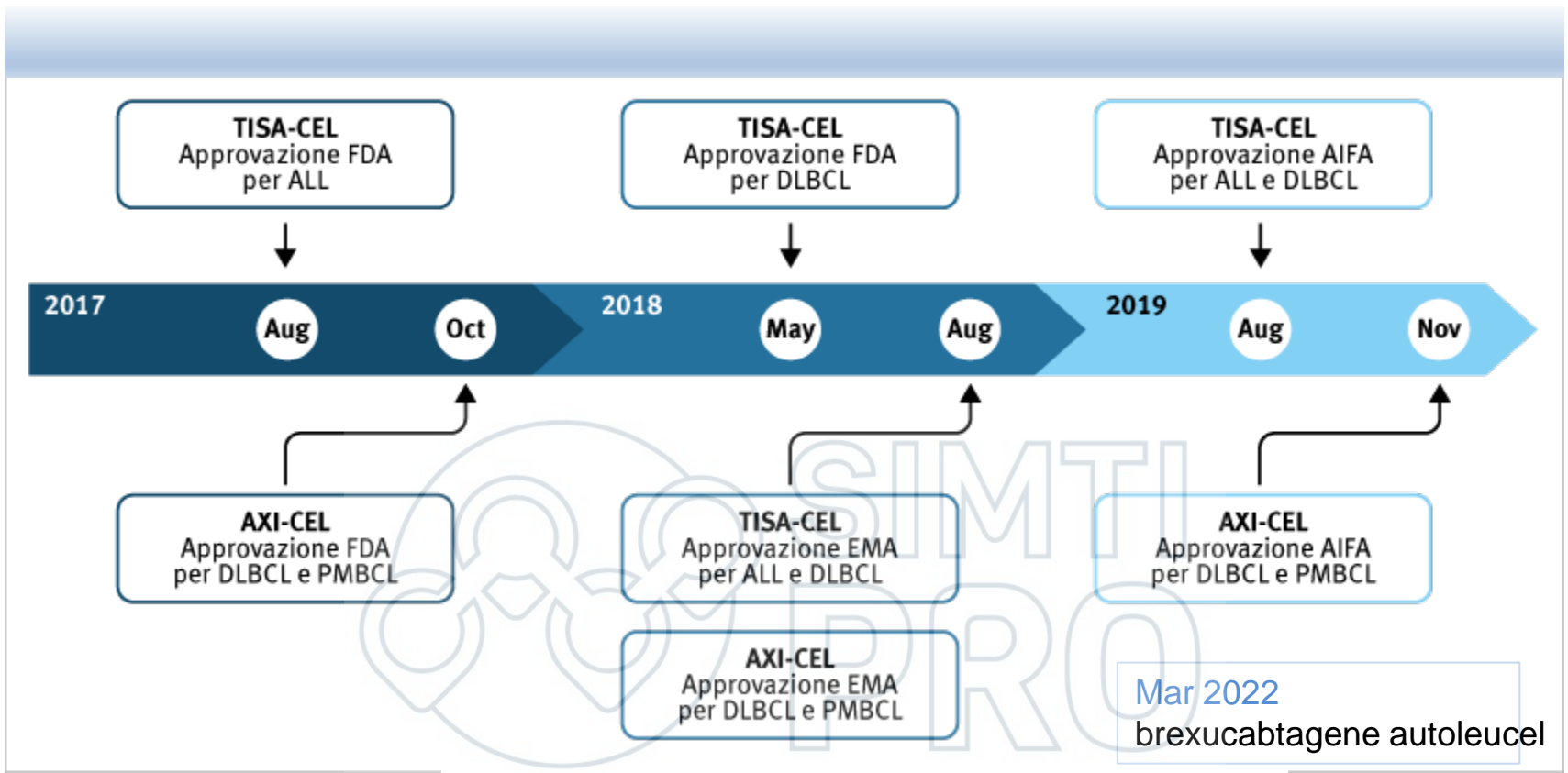
# CAR-T

Endogenous T Cell Receptor



Endogenous T Cell Receptor







# INDICAZIONI AIFA

**TISA-CEL**

- Linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) (Età > 18 aa < 70aa)
- Leucemia linfoblastica acuta (LLA) a cell B refrattaria (età < 25 aa)

**AXI-CEL**

- Linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL)
- Linfoma primitivo del mediastino a grandi cellule B (PMBCL) refrattario o recidivato

# OUTCOME AIFA

Per la leucemia linfoblastica acuta (LLA) a cellule B refrattaria, in recidiva posttrapianto o in seconda o ulteriore recidiva:

- l'81% dei pazienti che ha ricevuto la terapia CAR-T ha ottenuto una remissione completa della leucemia;
- l'80% dei pazienti che ha ottenuto una remissione completa di malattia era ancora libero da malattia 6 mesi dopo l'infusione della terapia CAR-T;
- il 76% dei pazienti che ha ricevuto la terapia CAR-T era ancora in vita a distanza di un anno dal trattamento.

Per il linfoma B diffuso a grandi cellule B (Diffuse Large B Cell Lymphoma - DLBCL) e del linfoma primitivo del mediastino a cellule B (Primary mediastinal B-cell Lymphoma – PMBCL) dopo fallimento di due o più linee di terapia sistemica:

- il 40-47% dei pazienti che ha ricevuto la terapia CAR-T ha ottenuto una remissione completa del linfoma;
- il 65% dei pazienti che ha ottenuto una remissione completa era ancora libero da malattia a distanza di 12 mesi dall'infusione;
- il 50-60% dei pazienti che ha ricevuto la terapia CAR-T era ancora in vita a un anno dal trattamento.

# REQUISITI AIFA

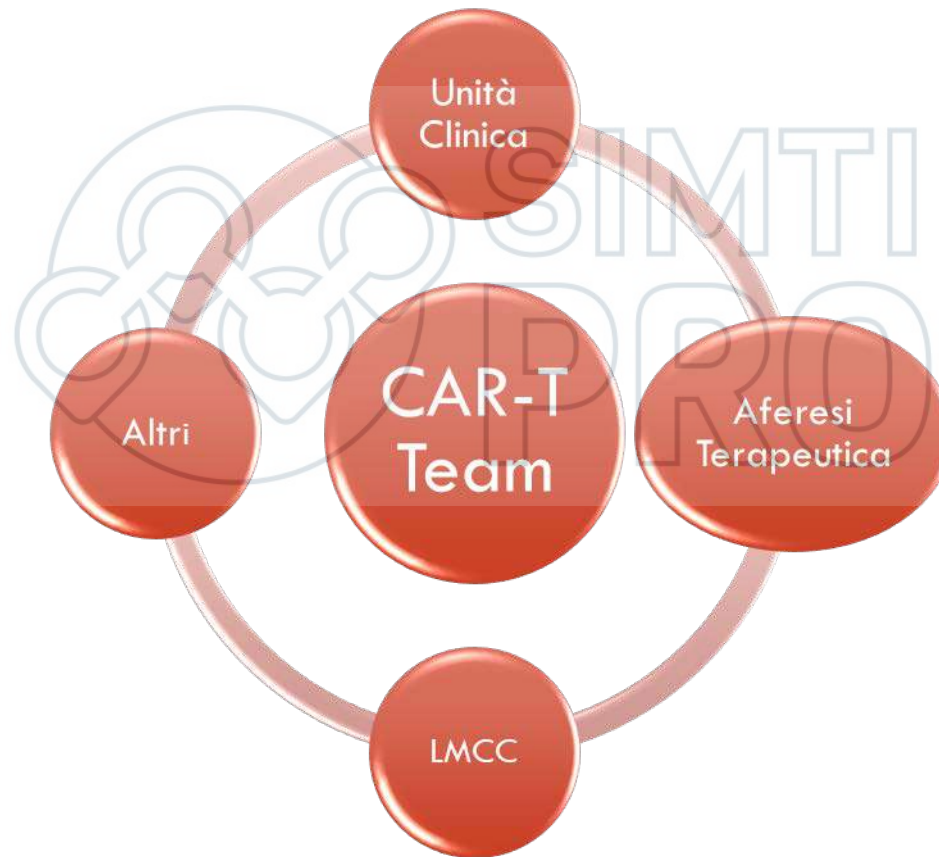


## I criteri richiesti da AIFA :

1. una certificazione rilasciata dal Centro nazionale trapianti e dal Centro nazionale sangue che attesta la rispondenza del Centro trapianti midollo osseo ai requisiti previsti dalle direttive europee;
2. l'accREDITAMENTO Jacie 7.0 per il trapianto allogenico;
3. la disponibilità di un'Unità di terapia intensiva e rianimazione;
4. la disponibilità di un team multidisciplinare qualificato per la gestione clinica del paziente e delle sue possibili complicanze

# REQUISITO 3.4.

la disponibilità di un team multidisciplinare qualificato per la gestione clinica del paziente e delle sue possibili complicanze





# CAR-Team VICENZA



Per il team dell'Aferesi terapeutica il percorso di qualifica è iniziato ufficialmente in data 23.05.2019 quando è stato organizzato il primo meeting per lo start up del CTL019, ove sono stati coinvolti i responsabili dell'Unità di aferesi, del Laboratorio di Manipolazione cellulare e crioconservazione e i referenti per la gestione della qualità.

Nel mese di luglio 2019 è stato ufficializzato il CAR-T team.

Il mese successivo è stato sottoscritto l'accordo quadro di fornitura per il farmaco tisagenlecleucel e l'accordo tecnico in materia di aferesi.

Nel settembre 2019 è stato richiesto ulteriore incontro per avviare un percorso di qualifica differente e separato per altra ditta farmaceutica, precedentemente autorizzato dal direttore Generale il 31 luglio 2019, seppur ancora in attesa di approvazione AIFA.

In data 21.11.19 è pervenuta la comunicazione ufficiale che l'Ospedale San Bortolo della qualifica per la terapia cellulare con CAR-T.

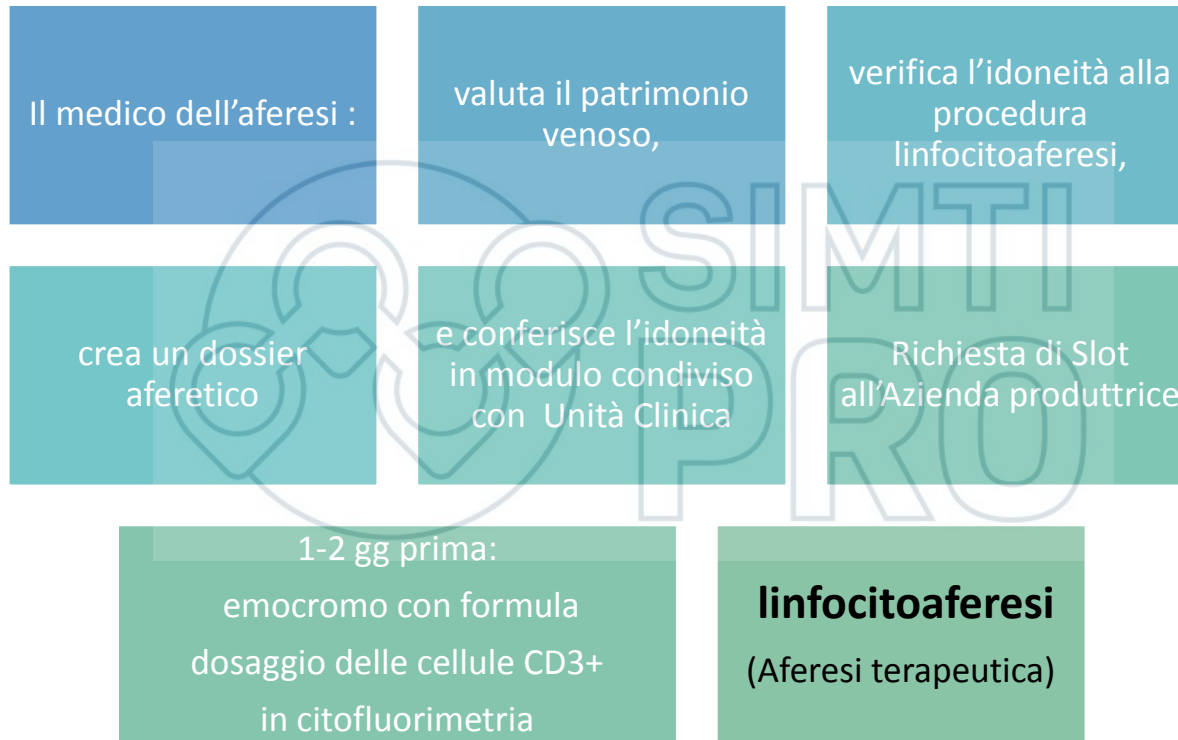
La fase di qualifica per la seconda ditta farmaceutica è stata realizzata con l'organizzazione di un Dry-run con accreditamento finale. Il 13 dicembre 2019 è pervenuta l'evidenza dell'accettabilità del piano di azioni correttive e preventive e all'autorizzazione all'acicabtagene ciloleucel .

**Il 20 gennaio 2020 è avvenuta la prima raccolta di linfociti finalizzata al CAR-T.**



# CAR-T: UNITA' DI RACCOLTA

## ULSS8 VICENZA

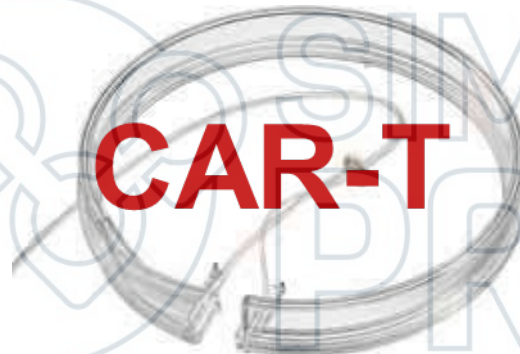


# LINFOCITOAFERESI

Linfocitoaferesi



CAR-T



# VOLUME DA PROCESSARE

## Axi-cel

- 12-15 Litri di sangue
- $CD3+ \geq 1 \times 10^9$

## Tisa-cel

- $TNC \geq 2 \times 10^9$
- $CD3+ \geq 3\%$  delle TNC totali





Transfusion.2017 May;57(5):1133-1141.

### **Autologous lymphapheresis for the production of chimeric antigen receptor T cells**

Elizabeth S Allen<sup>1</sup>, et al.

Of the 71 collections, 69 (97%) achieved the minimum and 55 (77%) achieved the target. Before apheresis, the 16 patients with yields below the target had significantly lower proportions and absolute numbers of circulating lymphocytes and CD3+ lymphocytes and higher proportions of circulating blasts and NK cells than those who achieved the target ( $470 \times 10^6$  lymphocytes/L vs.  $1340 \times 10^6$  lymphocytes/L,  $p = 0.008$ ;  $349 \times 10^6$  CD3+ cells/L vs.  $914 \times 10^6$  CD3+ cells/L,  $p = 0.001$ ; 17.6% blasts vs. 4.55% blasts,  $p = 0.029$ ). Enrichment of blasts in the product compared to the peripheral blood occurred in four patients, including the two patients whose collections did not yield the minimum number of CD3+ cells. Apheresis complications occurred in 11 patients (15%) and, with one exception, were easily managed in the apheresis clinic.

**Conclusions:** In most patients undergoing CAR T-cell therapy, leukapheresis is well tolerated, and adequate numbers of CD3+ lymphocytes are collected.

I fattori predittivi per raccolte insufficienti di cellule CD3+ includevano:

- Valori ridotti del numero assoluto di linfociti o cellule CD3+,
- proporzioni elevate di cellule NK
- proporzioni elevate di blasti circolanti.

I pazienti con queste caratteristiche devono essere considerati a rischio di produrre una resa inadeguata e, in alcuni casi, processare più sangue può consentire una raccolta adeguata.

## Studio retrospettivo

Int J Hematol. 2021 Oct;114(4):449-458.

Optimization of lymphapheresis for manufacturing autologous CAR-T cells

Ikumi Yamanaka 1, et al

La raccolta dei linfociti CD3+ tramite linfoafesi è essenziale per la produzione di cellule T del recettore dell'antigene chimerico autologo (CAR). L'ottimizzazione dei tempi e delle procedure per la linfoafesi è fondamentale perché i pazienti spesso hanno malattie progressive e ricevono farmaci che potrebbero ridurre la conta dei linfociti T. Abbiamo condotto uno **studio retrospettivo sui dati clinici di 28 pazienti** sottoposti a linfoafesi per la terapia CAR-T con tisagenlecleucel per identificare i fattori che potrebbero influenzare la resa dei linfociti CD3+. Il numero di cellule CD3+ nel sangue periferico era significativamente correlato con le rese di cellule CD3+ (coefficiente di correlazione  $r = 0,84$ ), che ci ha permesso di **stimare il volume di sangue da processare** prima dell'afesi (coefficiente di determinazione  $R^2 = 0,9$ ).

Siamo stati in grado di prevedere la resa delle cellule CD3+ e prevenire un'afesi prolungata misurando la conta delle cellule CD3+ circolanti nella pre-afesi e monitorando l'SCR (small cell ratio). In sostanza, questi risultati ci aiuteranno a stabilire una strategia per l'ottimizzazione delle procedure di linfoafesi per la produzione di cellule CAR-T in base al paziente.

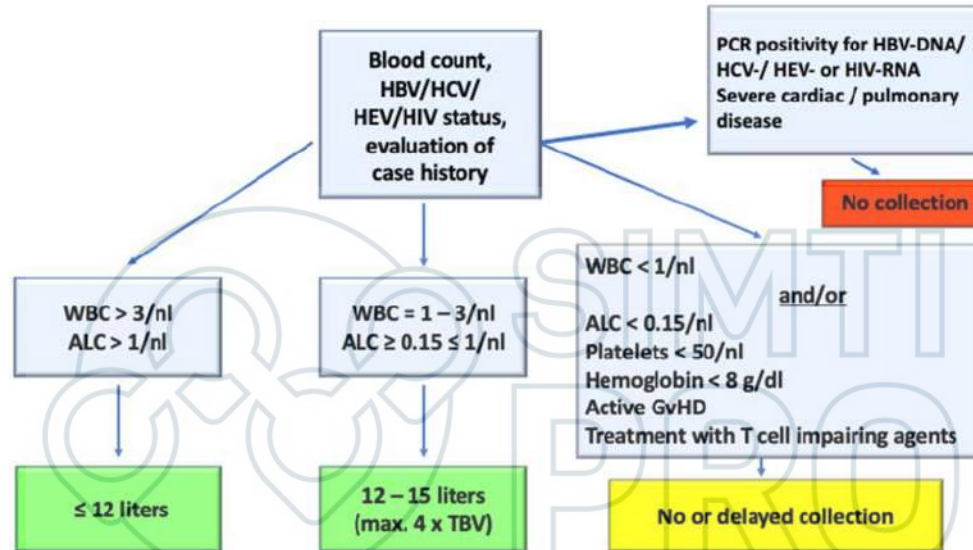
In questo studio prospettico, sono stati valutati 108 raccolte di linfociti mediante linfoafèresi per la terapia con cellule CAR T in pazienti con DLBCL r/r e B-ALL → sviluppo di **diagrammi**

- il livello pre-raccolta di Hb ridotto,
- una maggiore conta di cellule CD3<sup>+</sup> nel sangue periferico
- e una maggiore conta piastrinica prima dell'aferesi sono stati associati a CE2 significativamente ridotto per le cellule CD3<sup>+</sup>

Cells 2020 May 15;9(5):1225.

## Current Challenges in Providing Good Leukapheresis Products for Manufacturing of CAR-T Cells for Patients with Relapsed/Refractory NHL or ALL

Felix Korell



Algoritmo per prodotti cellulari CAR-T. Per aumentare le possibilità di una raccolta riuscita, è stato creato un algoritmo basato sulla conta dei leucociti e dei linfociti con un elenco aggiuntivo di criteri di esclusione che portano a una possibile sospensione o alla raccolta ritardata. WBC = conta leucocitaria, ALC = conta assoluta dei linfociti, TBV = volume totale del sangue.

La leucoaferesi era fattibile in tutti i pazienti e poteva essere eseguita in regime ambulatoriale.

Nei pazienti con una conta leucocitaria ridotta di 1-3/nL e una conta assoluta dei linfociti ≤1/nL, è necessario un volume di sangue minimo di 12-15 L per raccogliere un numero sufficiente di linfociti per la produzione di CAR-T

2022 Jun;37(3):223-236.

### **Lack of defined apheresis collection criteria in publicly available CAR-T cell clinical trial descriptions: Comprehensive review of over 600 studies**

[Suzanne R Thibodeaux](#)

L'obiettivo di questo studio era di raccogliere e valutare la variabilità dei parametri della raccolta aferetica negli studi clinici di terapia con cellule T CAR pubblicamente disponibili.

**Disegno dello studio:** Abbiamo cercato clinicaltrials.gov (un database di studi clinici disponibile pubblicamente) per cellule CAR-T dal 1 luglio 2020- 15 agosto 2020.

**Risultati:** l'aferesi è stata menzionata 1044 volte in 322 (51,9%) di 621 studi totali. I parametri di laboratorio menzionati includevano globuli bianchi (100 studi), conta assoluta dei neutrofili (220 studi), conta assoluta dei linfociti (102 studi), cellule CD3<sup>+</sup> (38 studi), emoglobina (233 studi, 54 studi hanno specificato il limite trasfusionale) e piastrine (269 studi, 48 studi hanno specificato il limite di trasfusione).

**Conclusioni:** I parametri di laboratorio utili per la raccolta aferetica di linfociti per CAR-T sono presenti in modo variabile e non si allineano coerentemente con le pratiche correnti.

Ulteriori osservazioni e lo sviluppo di linee guida cliniche incoraggeranno l'allineamento delle raccolte di aferesi per i prodotti cellulari CAR-T.



# PROTOCOLLO OPERATIVO VICENZA

## Programmazione

- SEPARATORE cellulare
- Circuito per leucoaferesi
- Raccolta di Linfociti
  
- Vol. Ciclo=500 ml
- Vol. Spill-Over 25 ml
- Vol. Buffy Coat=9,0 ml
- N. cicli=10

## Aggiustamento



- Stop fase
- Vol. Spill over= modificato
- Vol. Buffy Coat= modicabile se contaminazione di GR.
- N. cicli= modificati in base alla volemia del pz

# Soluzioni anticoagulanti

**Citrato:** per l'anticoagulazione distrettuale, (plasmaferesi per centrifugazione, plasmaferesi con eparinizzazione iniziale, emodialisi in pazienti con rischio di sanguinamento)

**Eparina:** usata sistematicamente nella emodialisi e nella plasmaferesi con membrane/filtri

# Acido Citrato Destrosio (ACD)

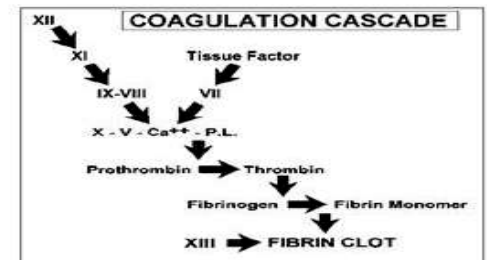
**Proprietà:** inibizione attività coagulative Ca-dipendenti

**Formulazione:** ACD-A (22 g citrato/500 ml)

**Dose:** 0,7-1,2 ml/min/L di volume totale sangue

**Neutralizzazione:** 10 ml Ca gluconato 10% ev

**Complicanze:** ipocalcemia, ipomagnesemia





# Acido Citrato Destrosio (ACD)

Calcemia: Calo rapido nei primi 15 minuti → produzione di paratormone.

Con decremento del Ca del 25-35% si accompagna ipomagnasemia con ingravescenza dei sintomi da ipocalcemia

**Nessun evento maggiore con profilassi:  
Ca-gluconato ev+Mg Pidolato**

## Condizioni associate a IPOCALCEMIA

- Ipotiroidismo
- Ipomagnasemia
- Insufficienza renale cronica
- Insufficienza epatica
- Deficit di Vitamina D
- Pseudoparatoroidismo
- Iperfosforemia grave

maturità



## Farmaci che determinano IPOCALCEMIA

- Diuretici dell'ansa
- Bifosfonati
- Calcitonina
- Fenobarbital
- Fenitoina
- Fosfonoformato trisodico
- Estrogeni
- Cimetidina

# ACCESSI VENOSI: esperienza Vicenza

## TISA-CEL

90 % CVC BILUME AD ALTO FLUSSO

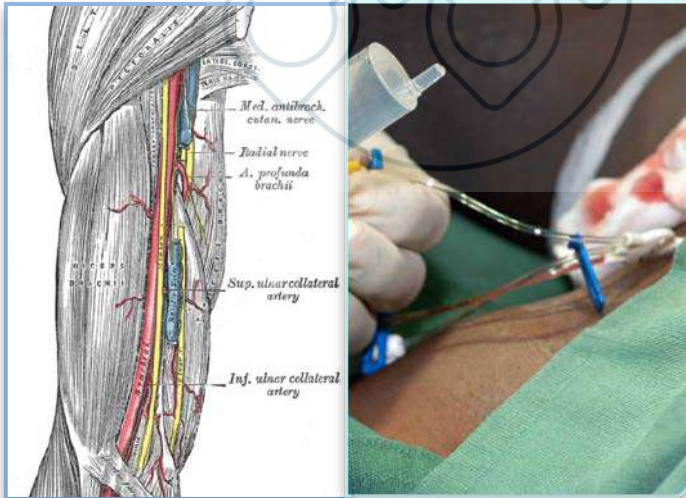
1% ACCESSI VENOSI PERIFERICI

## AXI-CEL

27% CVC BILUME AD ALTO FLUSSO

5% ACCESSI VENOSI PERIFERICI

16%  
ACCESSO VENOSO  
PERIFERICO+CVC MONOLUME  
VALVOLATO



REGIONE DEL VENETO



ULSS8  
BERICA



# ESPERIENZA VICENZA



## TISA-CEL

Volume medio sacca: 167.4 ml

TNC tot =  $11,54 \times 10^9 (\pm 4,3)$

linfociti CD3+vitali /TNC totali = 44,47%  
( $\pm 17,8$ )

volume ematico processato = 11057,22 ml

volemia media trattata di 2,57 ( $\pm 0,73$ ).

Ht: 4,8 ( $\pm 1,6$ )

## AXI-CEL

Volume medio sacca: 221,1 ml

TNC tot =  $15,94 \times 10^9 (\pm 7,59)$

linfociti CD3+vitali /TNC totali = 51,61%  
( $\pm 16,07$ )

volume ematico processato = 14492,7 ml

volemia media trattata di 3,17 ( $\pm 0,43$ ).

Ht: 4,2 ( $\pm 1,9$ )

# ESPERIENZA VICENZA

- I valori di TNC e di linfociti CD3+ ottenuti nel prodotto di raccolta mediante procedura aferetica presso l'UOC Medicina Trasfusionale di Vicenza sono rientrati negli standard stabiliti dalle singole Aziende farmaceutiche in tutti i pazienti sottoposti a linfocitoaferesi.
- In nessun caso è stato necessario programmare una seconda raccolta aferetica di linfociti causa inefficienza della raccolta medesima.



REGIONE DEL VENETO

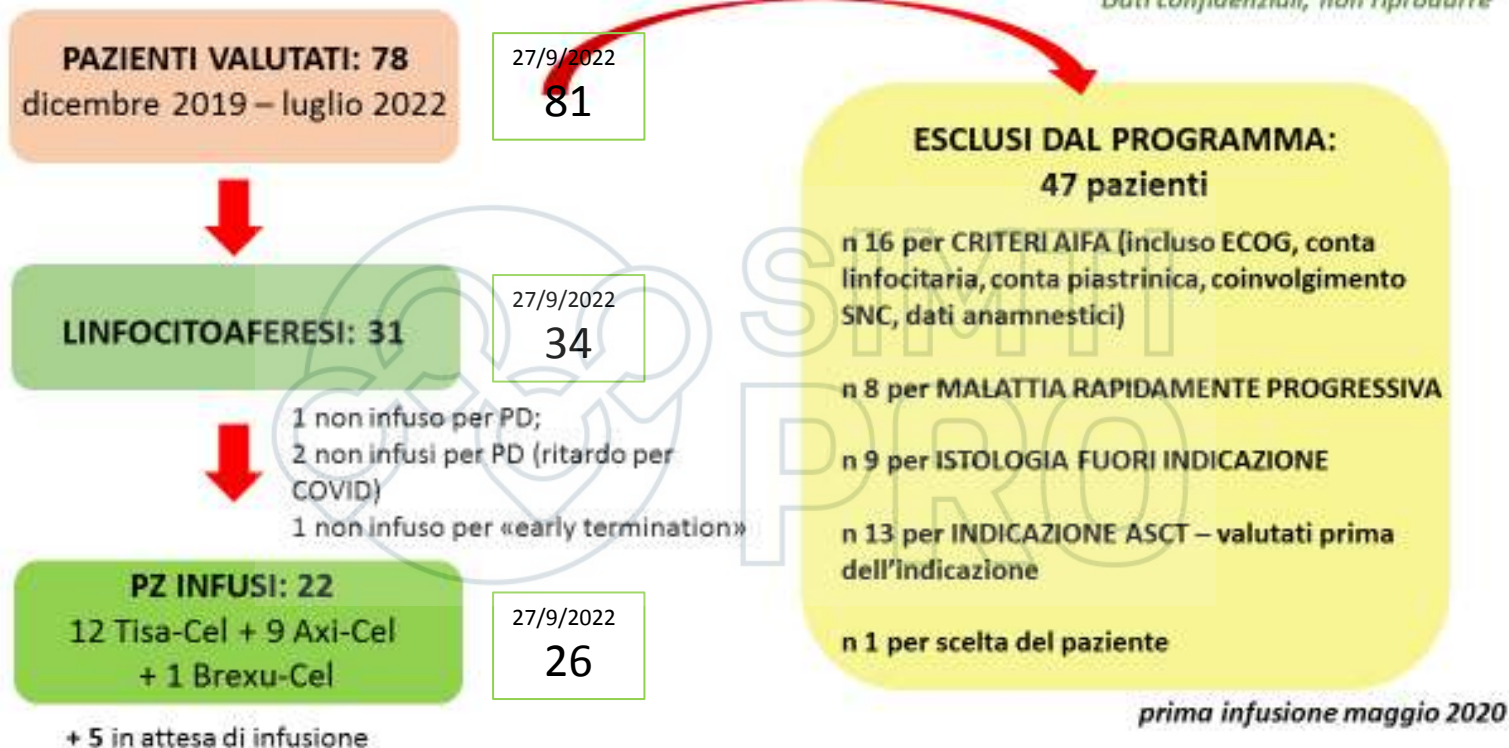


ULSS8  
BERICA



# Il flusso dei pazienti – agg luglio 2022

*Dati confidenziali, non riprodurre*



REGIONE DEL VENETO



ULSS8  
BERICA



# ESPERIENZA VICENZA

- A oggi i pazienti trattati con prodotto CAR-T finale e valutati a un mese di follow up con PET sono 26,
- tutti DLBCL, tranne 1 linfoma primitivo del mediastino e 2 linfoma mantellare (nessuna linfoblastica).
- 2 di questi infusi con prodotto “out of specification” per mancato raggiungimento del target cellulare nella fase di espansione in vitro
- La rivalutazione di malattia a 3 mesi ha mostrato un tasso di risposta completa pari al 40-50% dei pz, in linea con i dati della letteratura.

# CONCLUSIONI

Ulteriori osservazioni e lo sviluppo di linee guida cliniche incoraggeranno l'allineamento delle raccolte di aferesi per i prodotti cellulari CAR-T.

Uniformizzazione degli standard di raccolta



**Criteria condivisi e target uniformi**

# TEAM AFERESI

Medicina Trasfusionale Vicenza

Direttore F. Fiorin

## Medici

Drssa Rigno Manuela

Drssa Errigo Gabriella

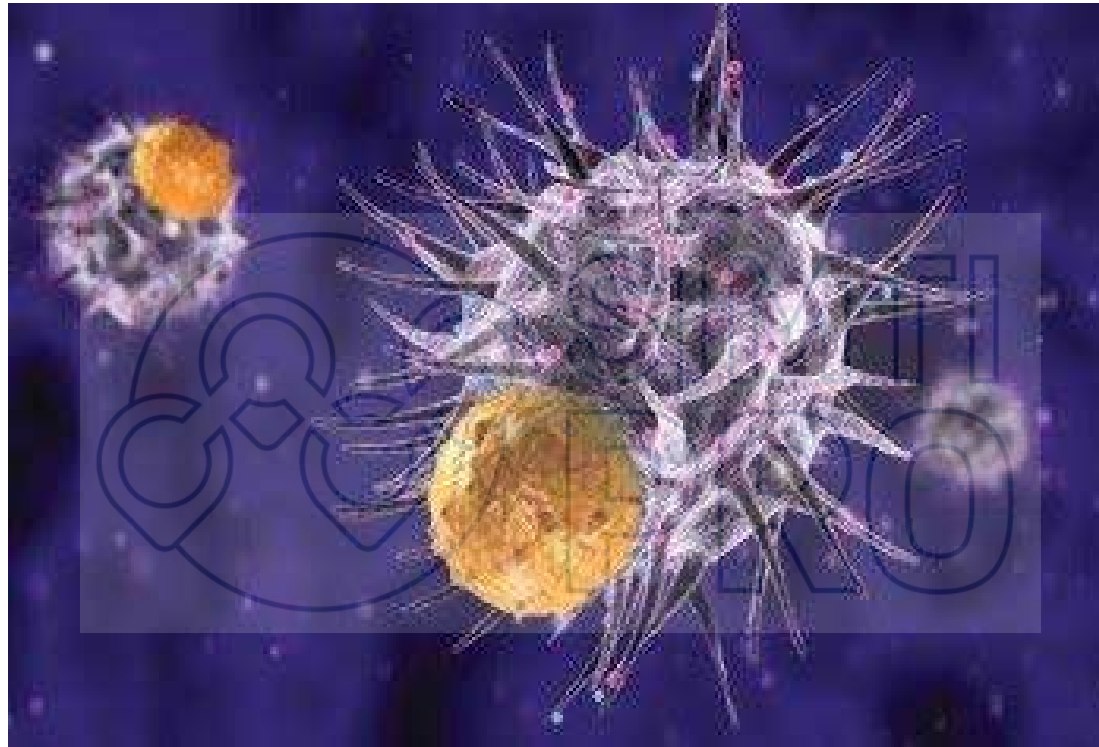
Drssa Castelli Monica

## Infermieri

- Sartori Barbara
- Anzolin Keti
- Zampieri Carla
- Vezzano Giulia
- Leonetti Nicola



# GRAZIE PER L'ATTENZIONE



**Manuela Rigno**

*UOC Medicina Trasfusionale Provincia di Vicenza*