

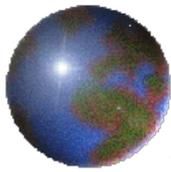
CAR T-Cells :

Aphérèse optimale pour la fabrication de CAR T dans le LNH : questions et challenges

 Docteur Tarik KANOUNI

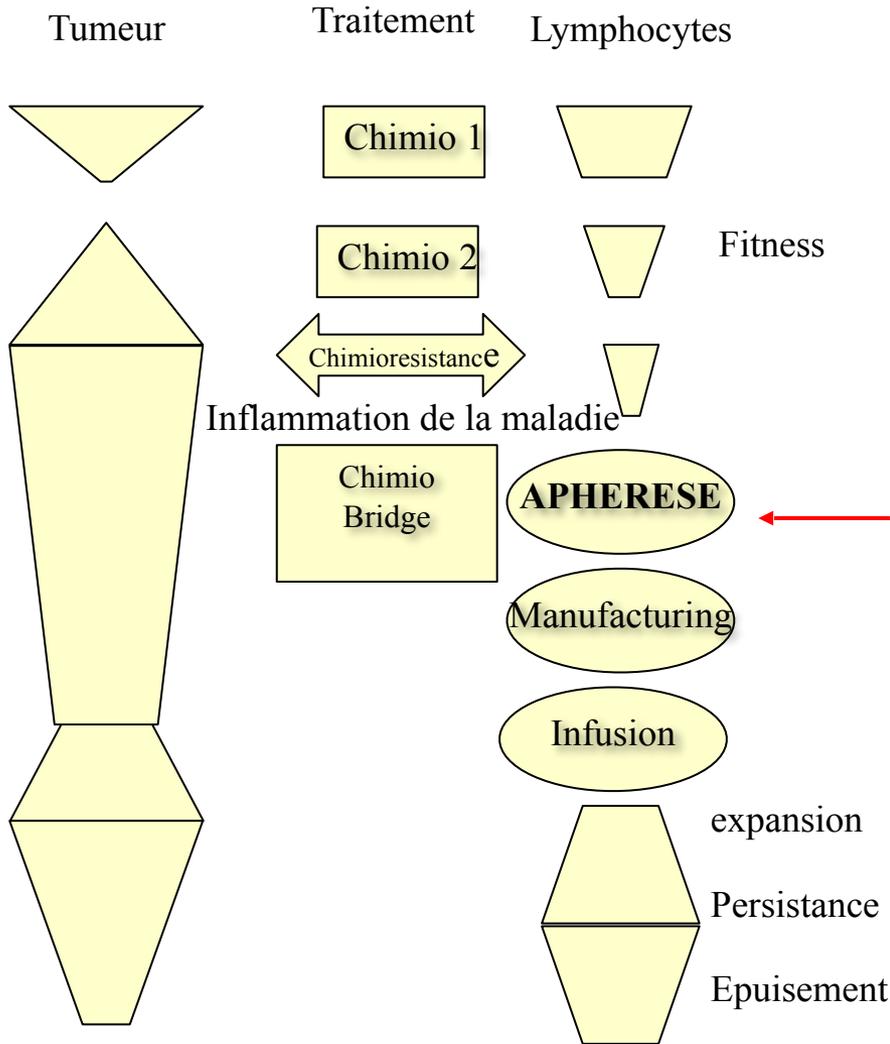
 Unité d'Aphérèse Thérapeutique et d'Hémovigilance,
• CHU SAINT ELOI MONTPELLIER

- Symposium Gilead Kite
- SFH 09/11/2021



Introduction : Challenges

Histoire de la maladie des patients CAR T



Que peut on faire de mieux « modestement » coté Aphérèse après 2 ans d'expérience !!!

Pour améliorer les X % de patients non répondeurs aux CART

1/ Pré Aphérèse

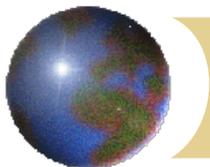
- ⊕ Gestion des conditions cliniques pré-aphérèse, course contre la montre: la maladie progresse!!
- ⊕ Période Wash-out thérapies antérieures ; période wash-out recommandé Corticoïdes et rationnel - impact sur aphérèse ?
- ⊕ influence des autres lignées sur la collecte et la manufacture du CAR T : PNN, monocytes ; transfusion nécessaire ?

Aphérèse

- ⊕ Analyse qualité des cellules récupérées
- ⊕ Extrapoler nb de cellules collectées à partir taux lymphocytes => Rendement
- ⊕ Cible quantitative, qualité des lymphocytes collectés – voir références en PJ

Post Aphérèse

- ⊕ Produits « out of specifications » :
 - ⊠ paramètres et range – peut-on le communiquer ?
 - ⊠ -incidence des OOS, observations biologiques,
 - ⊠ % de 2è aphérèse nécessaire
- ⊕ Facteur influençant la réponse
 - ⊠ Collecte précoce
 - ⊠ Expansion
 - ⊠ Persistance
 - ⊠ Fitness
 - ⊠ Epuisement
- ⊕ Logistique : hospitalisation, volume traité

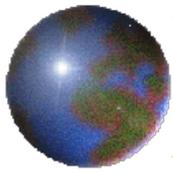


Période d'exclusion

Impact de l'exposition à la Bendamustine sur le pic d'expansion CAR T : Etude Zuma 2

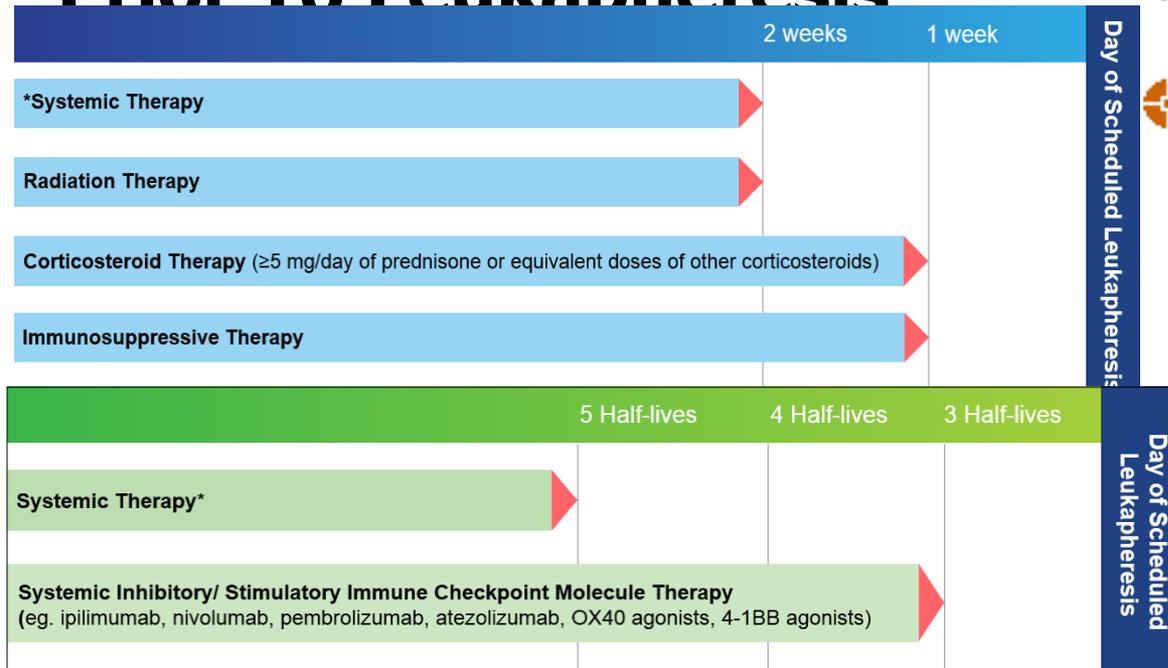
Table 2: Comparison of efficacy and safety outcomes, pharmacokinetics, pharmacodynamics and product attributes after 1:1 propensity score matching of ZUMA-2 patients by prior bendamustine exposure⁴

| Outcomes in ZUMA-2 patients after matching | Exposure ≤6m prior to leukapheresis | | Exposure >6m prior to leukapheresis | |
|--|-------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| | Bendamustine use (n= 11) | No bendamustine use (n=22) | Bendamustine use (n=22) | No bendamustine use (n=22) |
| Objective Response rates (ORR, %) | 82% | 100% | 91% | 100% |
| Complete Response (CR, %) | 36% | 73% | 64% | 77% |
| Ongoing response at 12 months (%) | 27% | 59% | 36% | 64% |
| Neurologic events worst Grade ≥ 3, (NE, %) | 9% | 46% | 23% | 55% |
| Cytokine Release Syndrome worst grade ≥ 3 (CRS, %) | 0% | 18% | 14% | 23% |
| Peak CAR T expansion (cells/ul, Q1-Q3) | 22.1 (13.4, 74.1) | 155.4 (27.3, 344.6) | 92.6 (15.6, 264.3) | 202.7 (53.0, 410.6) |
| AUC ₀₋₂₈ (cells/μl*d, Q1-Q3) | 293.9 (206.3, 1136.6) | 2043.2 (371.0, 4652.7) | 1131.4 (202.8, 2960.8) | 2279.2 (468.0, 4783.5) |
| Doubling Time (median #days, Q1-Q3) | 1.5 (1.3-1.8) | 1.3 (1.2-1.4) | 1.5 (1.2-1.7) | 1.3 (1.2-1.4) |
| # CD4 (cells/μl, Q1-Q3) | 80 (68-100) | 125 (83, 162) | 108 (58,138) | 135 (92,172) |



Période de wash-out Axicabtagene Ciloleuceel suggérées

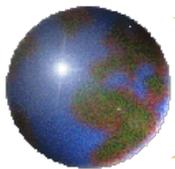
ZUMA-1 Study Cessation of Therapies Prior To Leukapheresis¹



Ces wash out sont suggérés

Faut il être partisan d'augmenter les marges quand c'est possible?

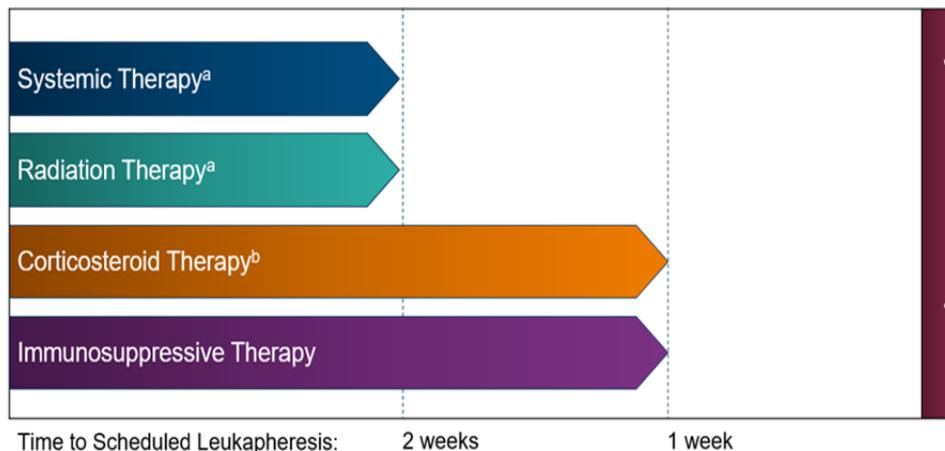
*Au moins 2 semaines ou 5 demi-vies, selon la période la plus courte, entre toute thérapie systémique et la date prévue de l'aphérèse (sauf pour molécules inhibitrices/ stimulatrices de point de contrôle immunitaire)



Période de wash-out KTE-X19 suggérées

Timing of Cessation of Therapies Prior To Leukapheresis (ZUMA-2)^{3,4}

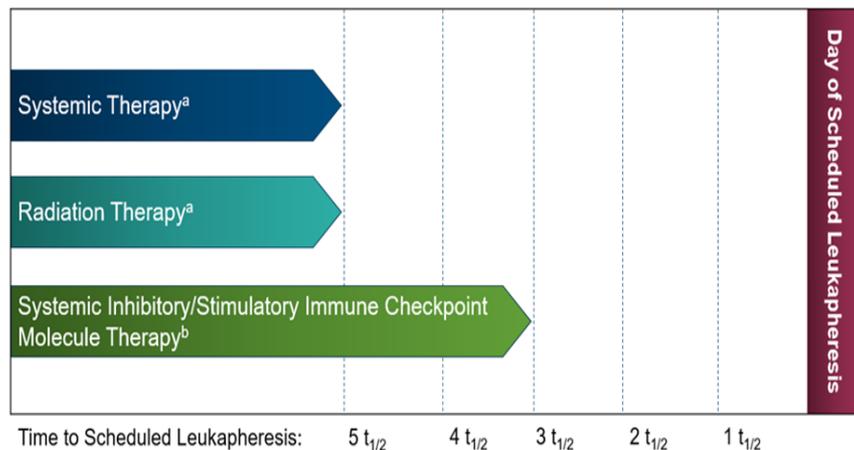
Figure 1. Timing (Weeks) of Cessation of Therapies Prior to Leukapheresis (ZUMA-2)^{3,4}



^aAu moins 2 semaines ou 5 demi-vies, selon la période la plus courte, entre toute thérapie systémique (sauf pour molécules inhibitrices/ stimulatrices de point de contrôle immunitaire) ou radiothérapie et la date prévue de l'aphérèse (voir figure 2 ci-dessous)

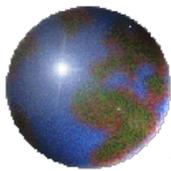
^b>5 mg/jour de prednisone (ou doses équivalentes d'autres corticostéroïdes).

Figure 2. Timing (Half-Lives) of Cessation of Therapies Prior to Leukapheresis (ZUMA-2)^{3,4}



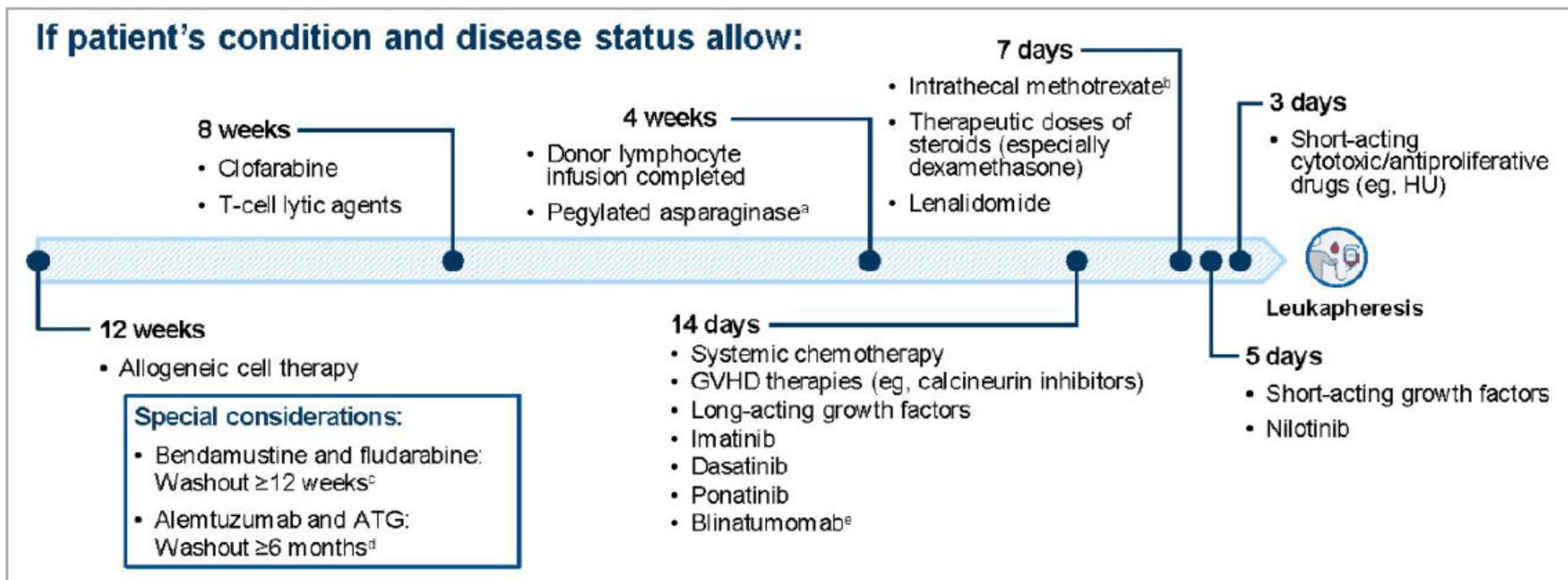
^aAu moins 2 semaines ou 5 demi-vies, selon la période la plus courte, entre toute thérapie systémique ou radiothérapie et la date prévue de l'aphérèse

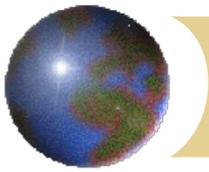
^bexemples : ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab, agonistes OX40, agonistes 4-1BB.



Recommandations pour Tisagenlecleucel

Figure 1: Recommended Timing to Stop Therapies Prior to Leukapheresis¹





Exclusion traitement / médicaments avant le recueil: Aphérèse garant de cette exclusion

⊕ Informations aux médecins

- ⊕ Hématologues, locaux régionaux
- ⊕ Interne

⊕ Information aux Coordinateurs

⊕ Information aux patients :

- ⊕ Orale à la consultation
- ⊕ Notification dans le consentement éclairé

⊕ Traçabilité :

⊕ A la consultation:

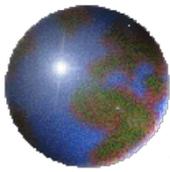
⊕ Au jour du recueil

- Tracer l'absence de prise médicamenteuse

La date du recueil est fixée le 07/11/2019

Période d'exclusion des médicaments interdits avant recueil

- Je lui indique que durant la semaine qui précède le recueil il fallait être vigilant sur certaine prise médicamenteuse pouvant influencer sur la qualité du recueil telle que la cortisone, et de nous faire par de tout modification de traitement au préalable.
- Chronologies des médicaments interdits
 - Date Dernière Chimiothérapie le 04/10/2019
 - Date des dernier FCH le à J5 de la Chimio sur 5 jours
 - Pas de cortisone ni immunosuppresseur
 - Médicaments pris récemment: Aucun.



Article

Clinical and Product Features Associated with Outcome of DLBCL Patients to CD19-Targeted CAR T-Cell Therapy

Sylvain Lamure ^{1,2,†}, François Van Laethem ^{3,†}, Delphine De Verbizier ⁴, Claire Lozano ⁵, Eve Gehlkopf ¹, Jean-Jacques Tudesq ^{1,†}, Chris Serrand ^{6,†}, Mehdi Benzaoui ^{2,7}, Tarik Kanouni ¹, Adeline Quintard ⁸, John De Vos ^{9,†}, Emmanuelle Tchernonog ¹, Laura Platon ¹⁰, Xavier Ayrignac ¹¹, Patrice Ceballos ¹, Anne Sirvent ¹, Mickael François ¹⁰, Hanane Guedon ¹, Philippe Quittet ^{1,†}, Cedric Mongellaz ², Aurélie Conte ¹², Charles Herbaux ^{1,13,†}, Caroline Bret ^{3,13}, Naomi Taylor ^{2,7}, Valérie Dardalhon ^{2,*} and Guillaume Cartron ^{1,2,*}

📍 Analyse de l'expérience de Montpellier à partir des données d'une étude publiée:

📍 60 patients adultes collectés entre le 01/02/2019 et le 01/03/2021

📍 Age médian 64 ans (min = 18, Max = 79)

📍 Diagnostic

📍 DLBCL (n = 43, 71%)

📍 LNH folliculaire transformé (n = 10, 17%)

📍 high-grade B-cell lymphoma (n = 7, 12%)

📍 Produits

📍 axi-cel (82%)

📍 tisa-cel (18%)

📍 Suivi médian

📍 6.9 mois (0.5–26.1 mois).

📍 Séparateur cellulaire et programme

📍 OPTIA CMNC (continue)

📍 Volumes sanguins traités

📍 Médiane: 3,03; ET= 0,43; Min : 2,2 ; Max = 4,2

📍 Analyse sur 3 points

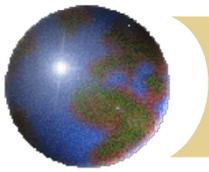
📍 Données du sang à prélever

- Lymphocytose/ Lymphopénie

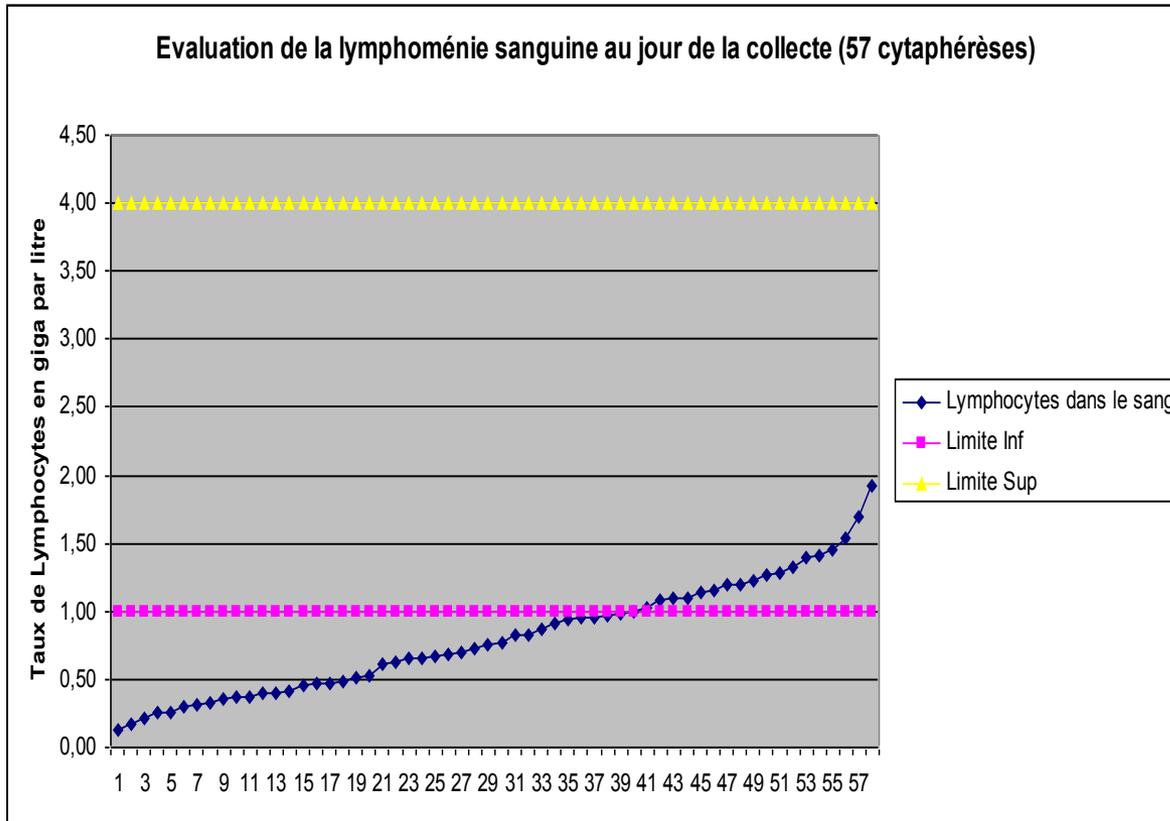
📍 Rendement des séparateurs cellulaires

- sur Ly, CD3 ..

📍 Relation avec le produit final



Evaluation de la lymphopénie en cytologie



Sur 57 patients CART

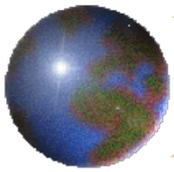
- 18 (31%) < 0,5 G/Litres
- 21 (36%) entre 0,5 et 1 Giga
- 18 (31%) > 1g/l

Patients en 2ème ou 3ème ligne de chimio

A terme: prédiction

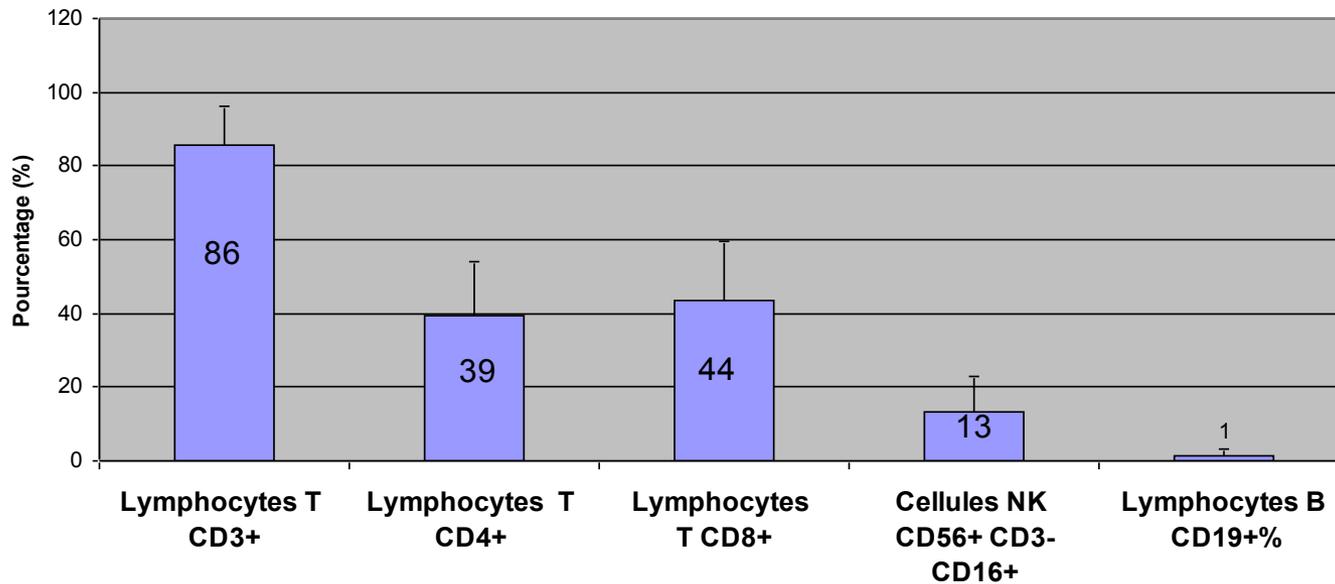
Etudier la prédiction de la lymphopénie

- Historique Chimio ou dose cumulé
- Type de chimio (Bendamustine ..)

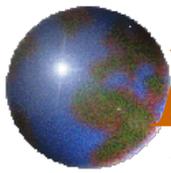


Phénotypage lymphocytaire

Phénotypage lymphocytaire le jour de la collecte CART
60 patients



- « Photographie » qualitative
- Majorité des lymphocytes sont CD3+
- Répartition homogène d'un patient à l'autre
- Lymphodéplétion B constante rapport avec le Anti CD20

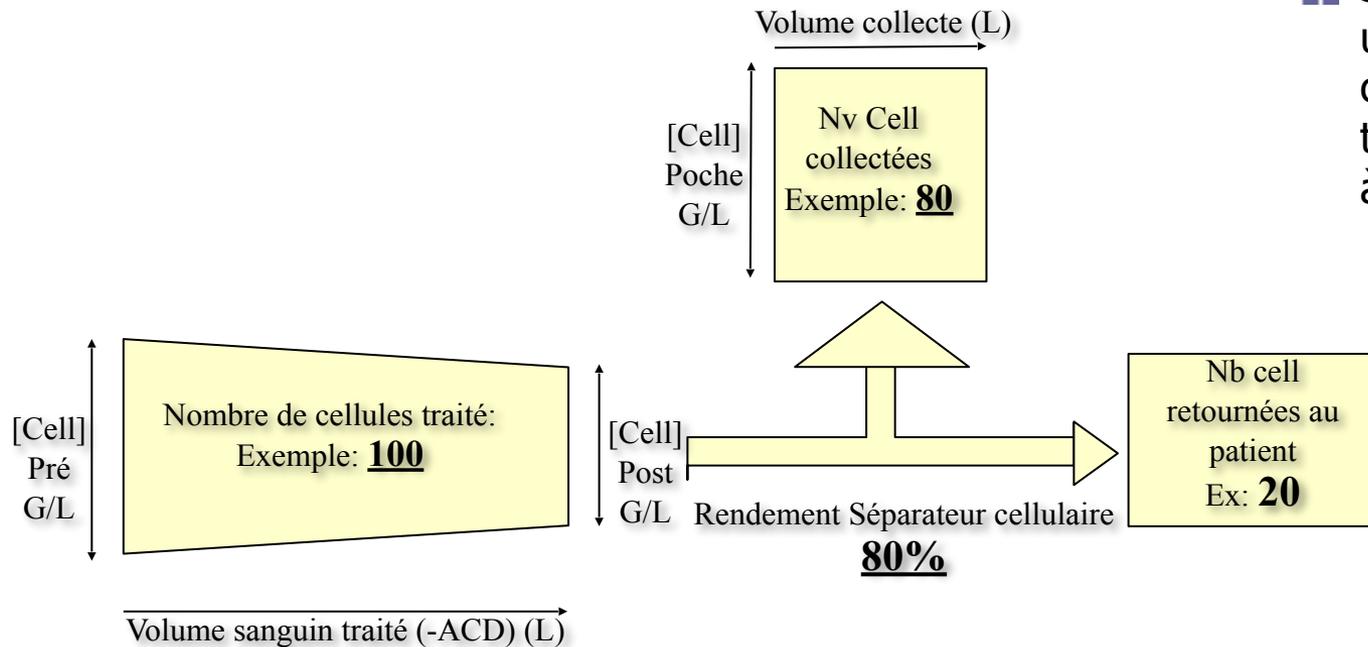


Rendement de collecte: le Concept

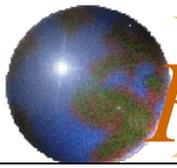
Concept: Rapport exprimé en pourcentage

- Quantité totale de cellules traitées dans un séparateur cellulaire
- Quantité totale de cellules récupérées dans la poche

- Si le rendement est une donnée fiable constante dans le temps et d'un patient à l'autre
 - Alors je peut m'en service pour des prédictions

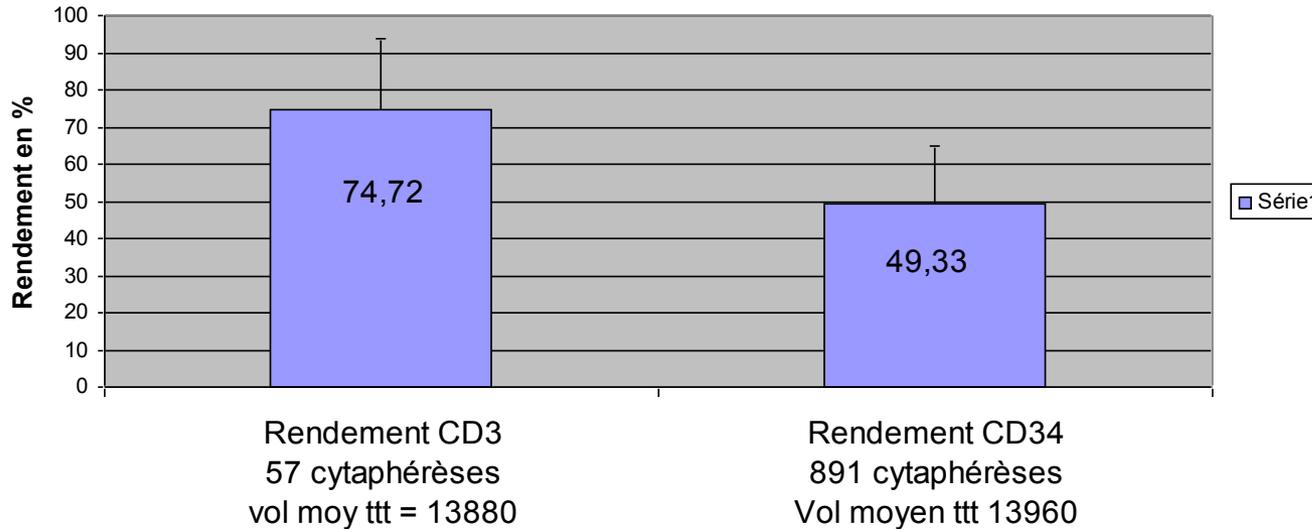


$$\text{Rendement (\%)} = \frac{[\text{cell}]_{\text{poche}} (\text{G/L}) \times \text{Vol Poche} (\text{L})}{\frac{[\text{cell}]_{\text{pré}} + [\text{cell}]_{\text{post}} (\text{G/L})}{2} \times \text{Vol ttt} (\text{L})}$$



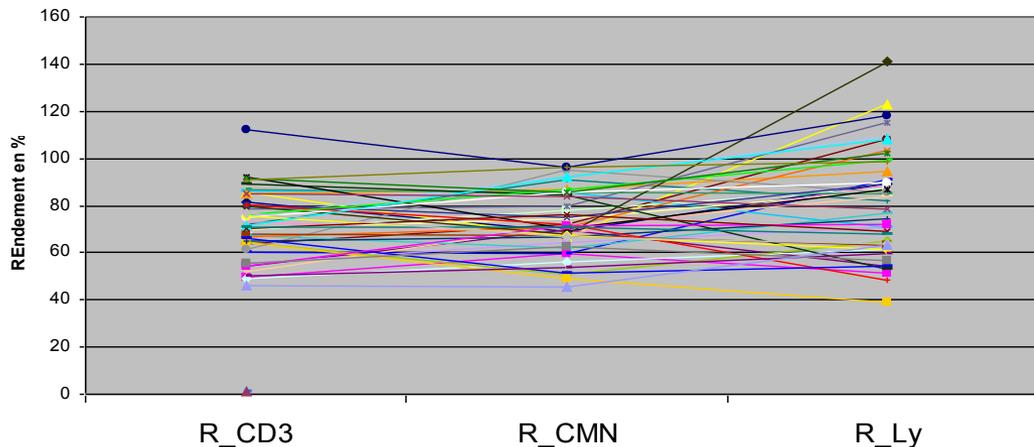
Rendement Recueil CART

Rendement moyen en CD3 en comparaison avec Rendement moyen en CD34 Sur OPTIA programme CMNC



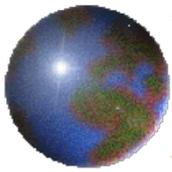
- ⊕ Analyse sur 57 Aphèreses
- ⊕ Volume moyen traité 13,88 L
- ⊕ Résultat de 74,72 %
- ⊕ Ecart type = 19,26
- ⊕ Toutes sur OPTIA et le programme CMNC
- ⊕ Rendement supérieur à celui de CD34 (analysé sur 891 Cyta)

Comaraison des rendement CD3 / Lymphocyte / CMN



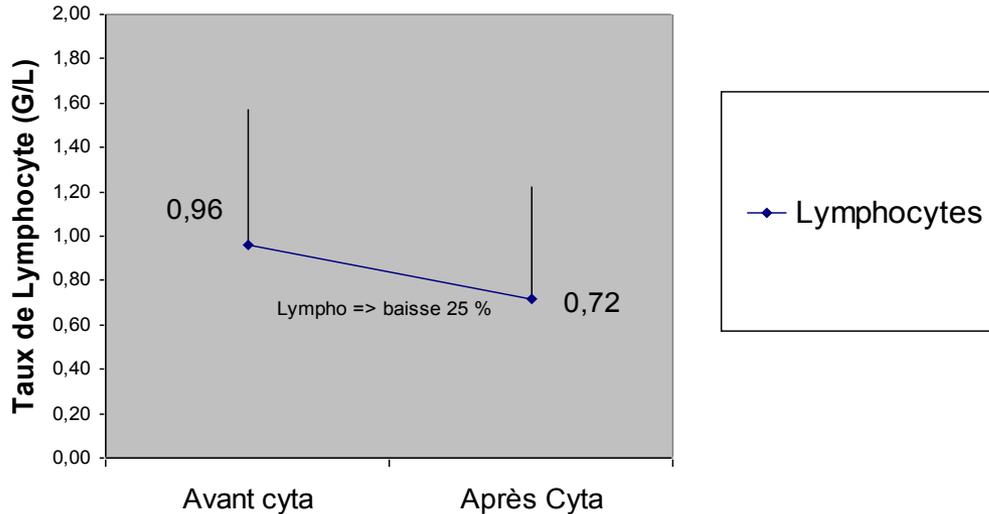
- ⊕ Equivalence des rendements?
- ⊕ Analyse sur 47 aphèreses:
- ⊕ CD3 (cytométrie)
- ⊕ Lymphocytes (cytologie)
- ⊕ CMN cytologie
- ⊕ CI équivalent

« source interne »



Rendement: baisse du taux de Lymphocytes en post Aphérèse

Evaluation pré - Post Aphérèse CART de paramètres sanguins collectés
Lymphocytes



🌀 Analyse faite sur 55 cytaphérèses avec données avant et après

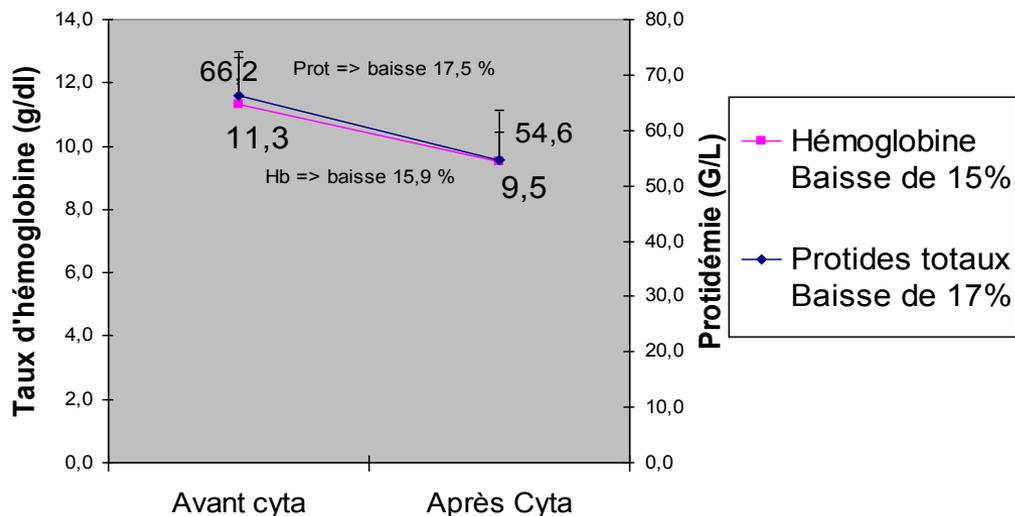
🌀 Intérêt de l'évaluation baisse en post cyta

- 🌀 Avec un Rendement à 74%, en ttt 1 masse sanguine je doit m'attendre à une baisse significative
- 🌀 or ici avec 3 masses ttt il n'y a qu'une baisse moyenne de 25%

🌀 Conclusion:

- 🌀 => pas de phénomène d'épuisement de la ressource avec le vol ttt
- 🌀 Je continue à être efficace même après 3 masses sanguines.

Evaluation pré - Post Aphérèse CART de paramètres sanguins non collectés
Hémoglobine et Protides sériques totaux

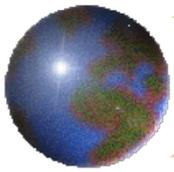


🌀 Baisse à pondérer par un phénomène de dilution par l'ACD

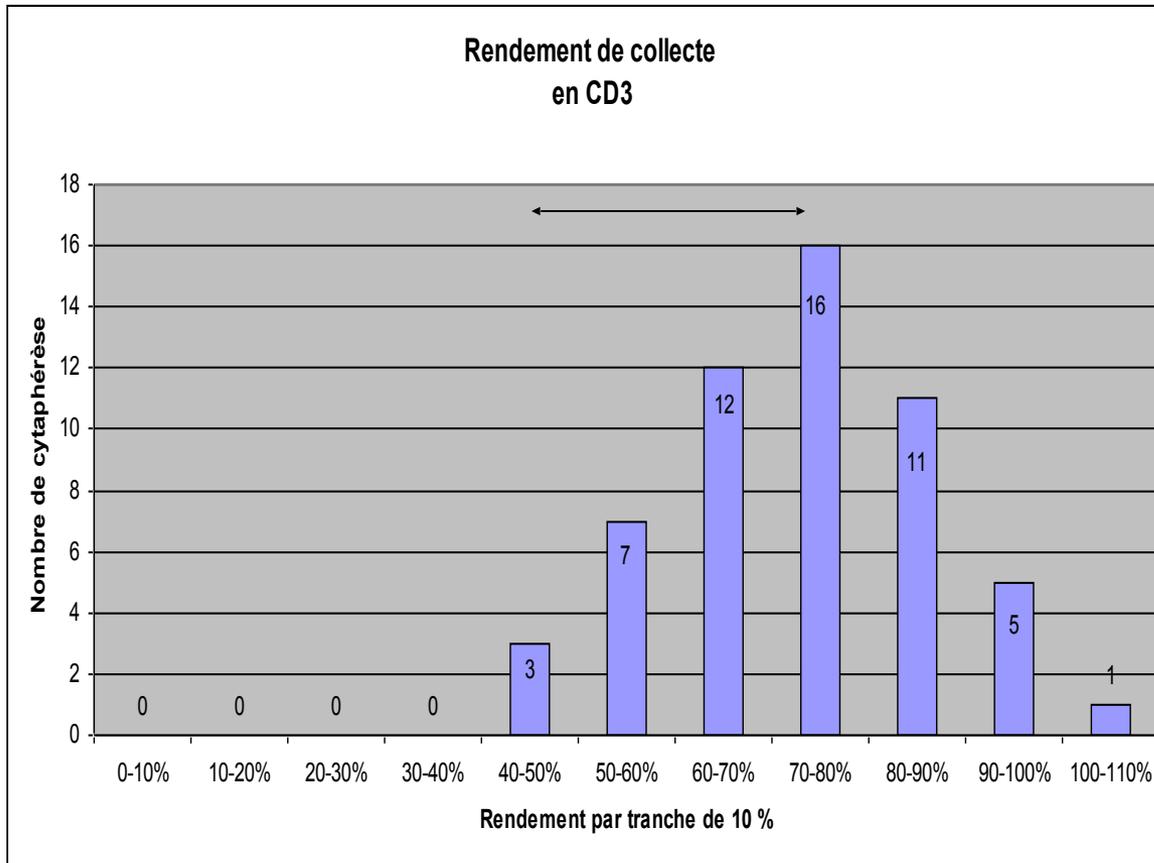
🌀 Analyse faite sur 55 cytaphérèses avec données avant et après sur 2 paramètres **non épurés**

- 🌀 Hémoglobine: baisse de 15,9%
- 🌀 Protides: baisse de 17,5

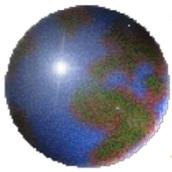
« source interne »



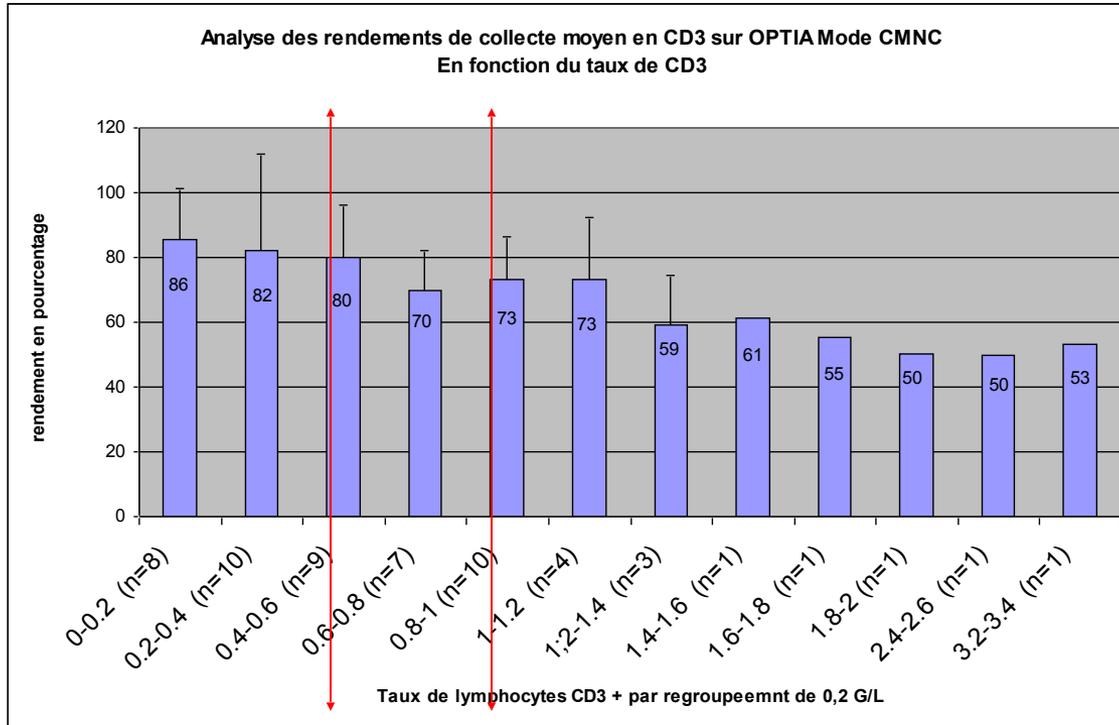
Rendement sur collecte: Intervalle de confiance



- ➊ Moyenne de 74,72
 - ➋ Ecart type de 17
 - ➌ Intervalle de confiance: quel risque je prends de me tromper si je prends cette moyenne comme référence.
 - ➍ distribution des rendements **gaussienne** => intervalle de confiance prend toute sa valeur
 - ➎ Jamais de rendement inférieur à 40% (hors problème technique)
- « *source interne* »

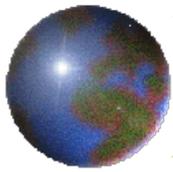


Rendement sur collecte: Répartition



- Une de nos préoccupations est de collecter efficacement les patients ayant un taux de lymphocytes bas.
- Analyse du rendement en fonction de la lymphodéplétion dans le sang
- Le rendement est constant quelque soit le taux de lymphocyte.
- Surtout pour les lymphopénies sévère $< 0,2\text{G/L}$ = n = 8

« source interne »



Application d'un algorithme

❖ Critère pour appliquer l'algorithme/ Rendement:

- ❑ Stables dans le temps au delà de 3 masses sanguine sans épuisement de la ressource
- ❑ En moyenne de 72% mais modéré à 40% => intervalle de confiance 99%
- ❑ Stable quelle que soit la concentration de la cellules à récupérer
- ❑ Au total: fiable pour extrapoler nb de cellules à collectées

$$❖ \text{Rendement (\%)} = \frac{[cell]_{poche} \left(\frac{G}{L}\right) * Vol_{Poche}(L)}{[cell]_{sg} \left(\frac{G}{L}\right) * Vol_{ttt}(L)}$$

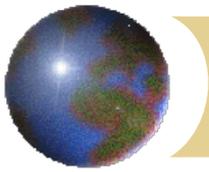
$$❖ \text{Rendement (\%)} = \frac{Objectif (Giga)}{[cell]_{sg} \left(\frac{G}{L}\right) * Vol_{ttt}(L)}$$

$$❖ Vol_{ttt} (L) = \frac{Objectif (Giga)}{[cell]_{sg} (G/L) * Rend\% pondéré}$$

❖ Exemple Collecte de CMN

- ❑ Objectif CMN: 5 Giga
- ❑ Concentration Sang 1 G/L
- ❑ Rendement : 70% mais pondéré - 30% = 40%

$$❖ Vol_{ttt} (L) = \frac{5 (Giga)}{[1](G/L) * 0,4} = 12,5 L$$



Objectif CART

Axi-cel

 5×10^9 CMN totaux

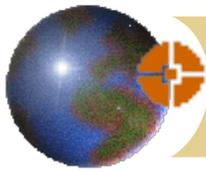
Tisa-cel

 $\geq 1 \times 10^9$ CD3+

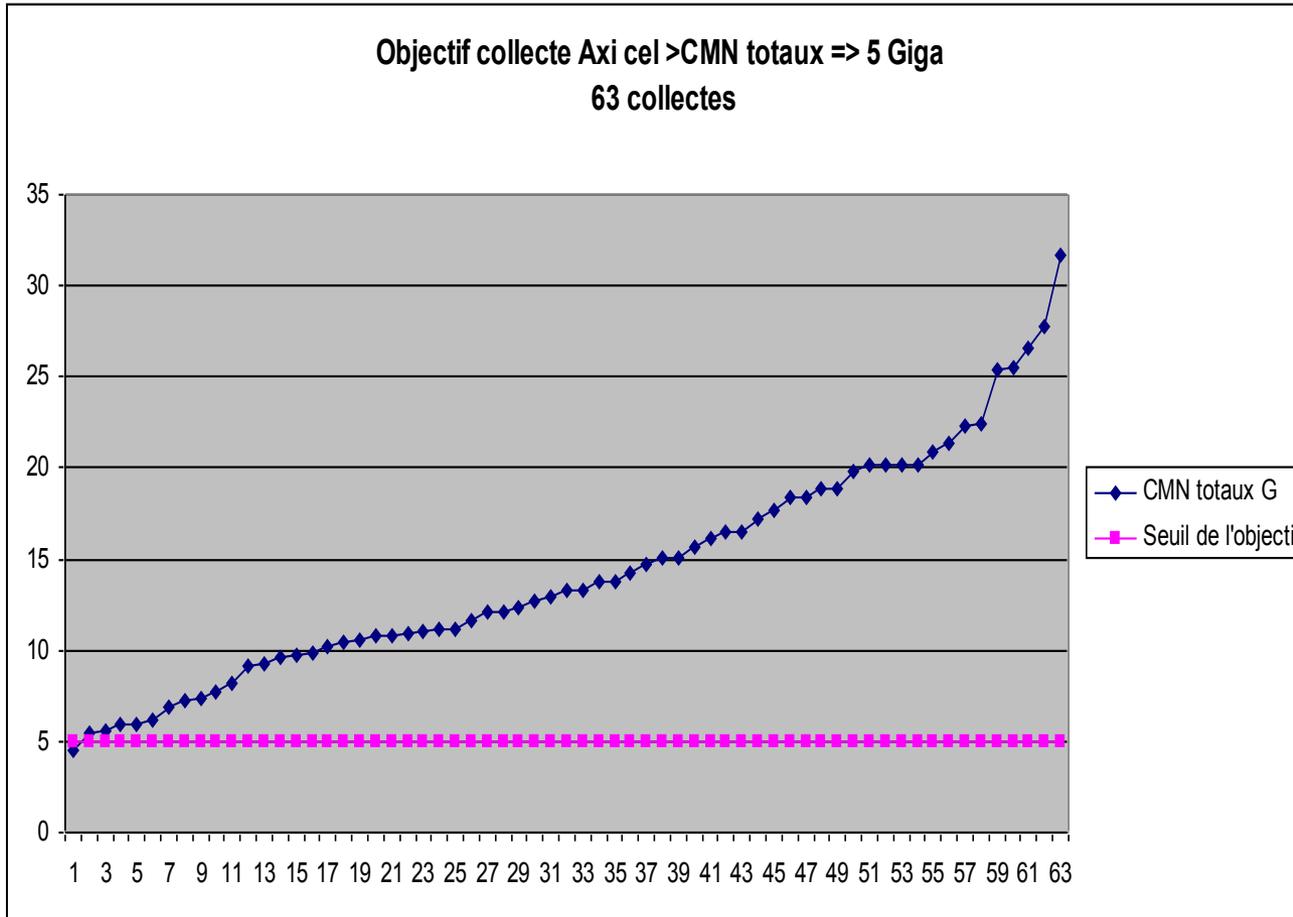
 $\geq 2 \times 10^9$ TNC

 $\geq 3\%$ de CD3 / TNC

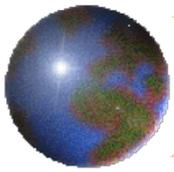
BMS



Objectif $>5 \cdot 10^9$ CMN totaux (Axicabtagene Ciloleucel)



- Objectif Axi cell: $>5 \cdot 10^9$ CMN totaux
- 63 collectes
- Prélevés sur OPTIA CMNC
- 1 échec relatif/ 63 à 4,47 10^9 CMN
 - Ly 0,17 G/L
 - Mono 0,4 G/L
 - Vol ttt = 2 masses sanguine



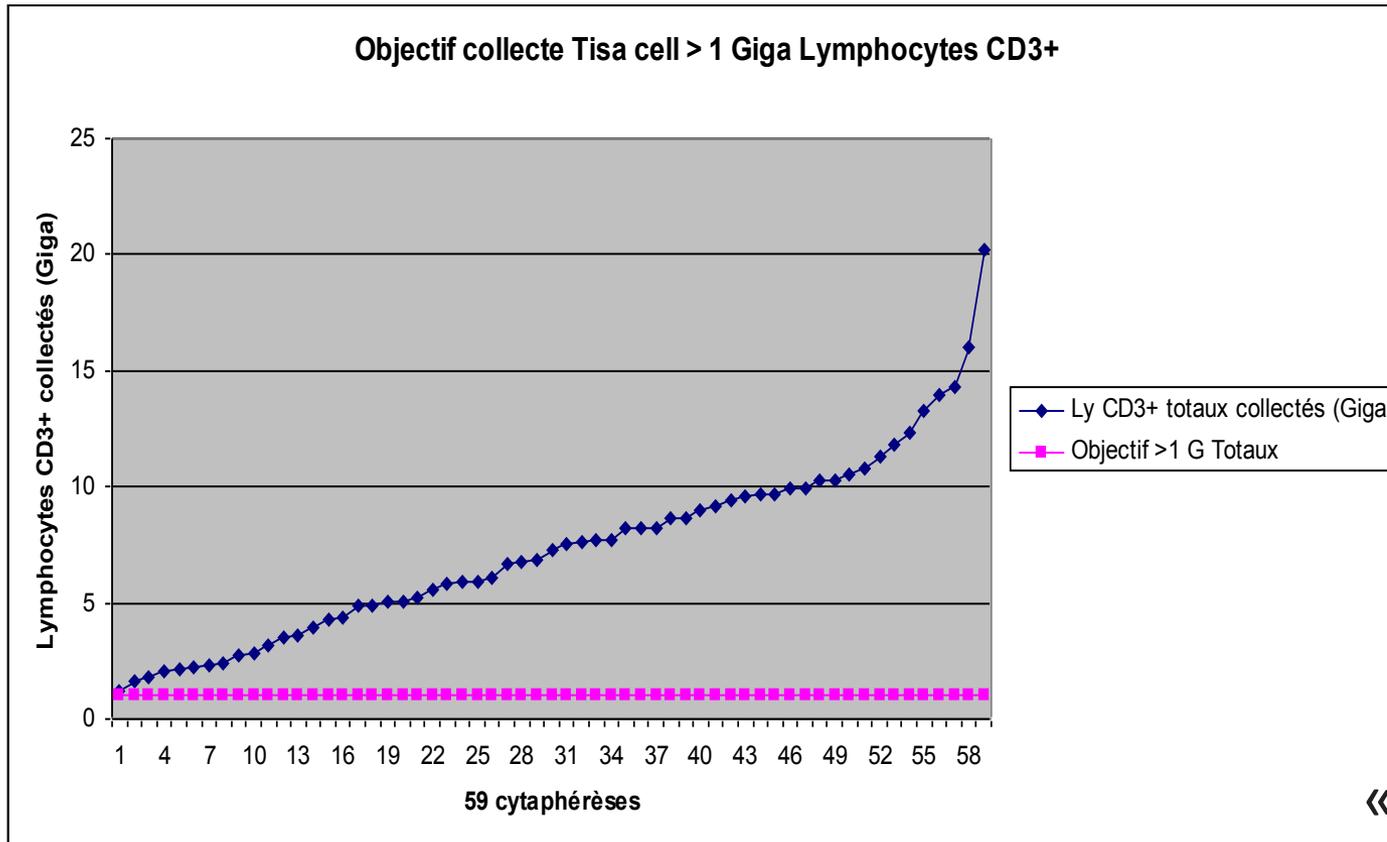
Objectif 1: Tisa-cel

 CD3 collectés totaux $\geq 1 \times 10^9$

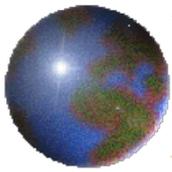
-  Objectif Tisa cel:
-  $>1 \times 10^9$ CD3+ totaux
-  Analyse sur 59 collectes

 Prélevés sur OPTIA CMNC

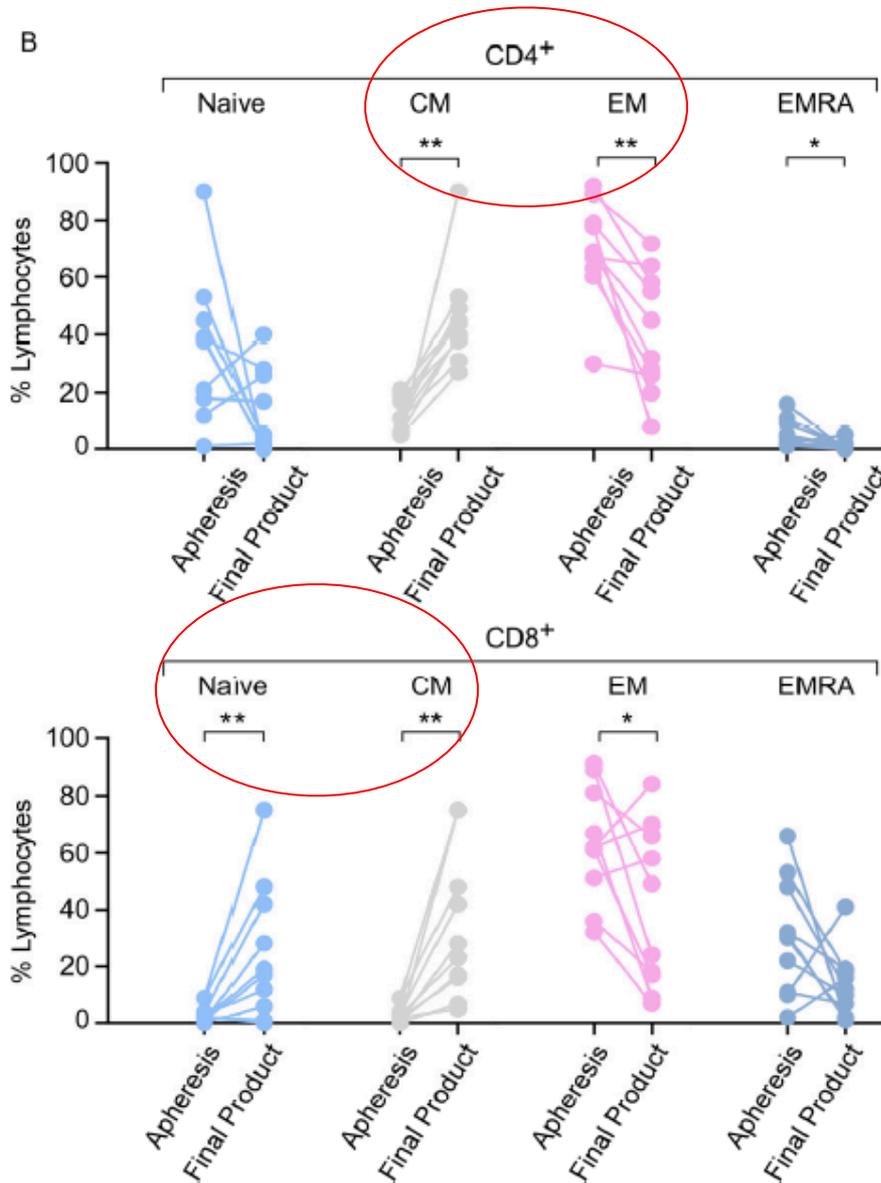
 100% réussite



« source interne »

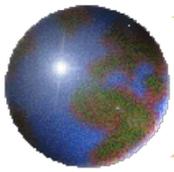


Relation collecte versus transformation CART

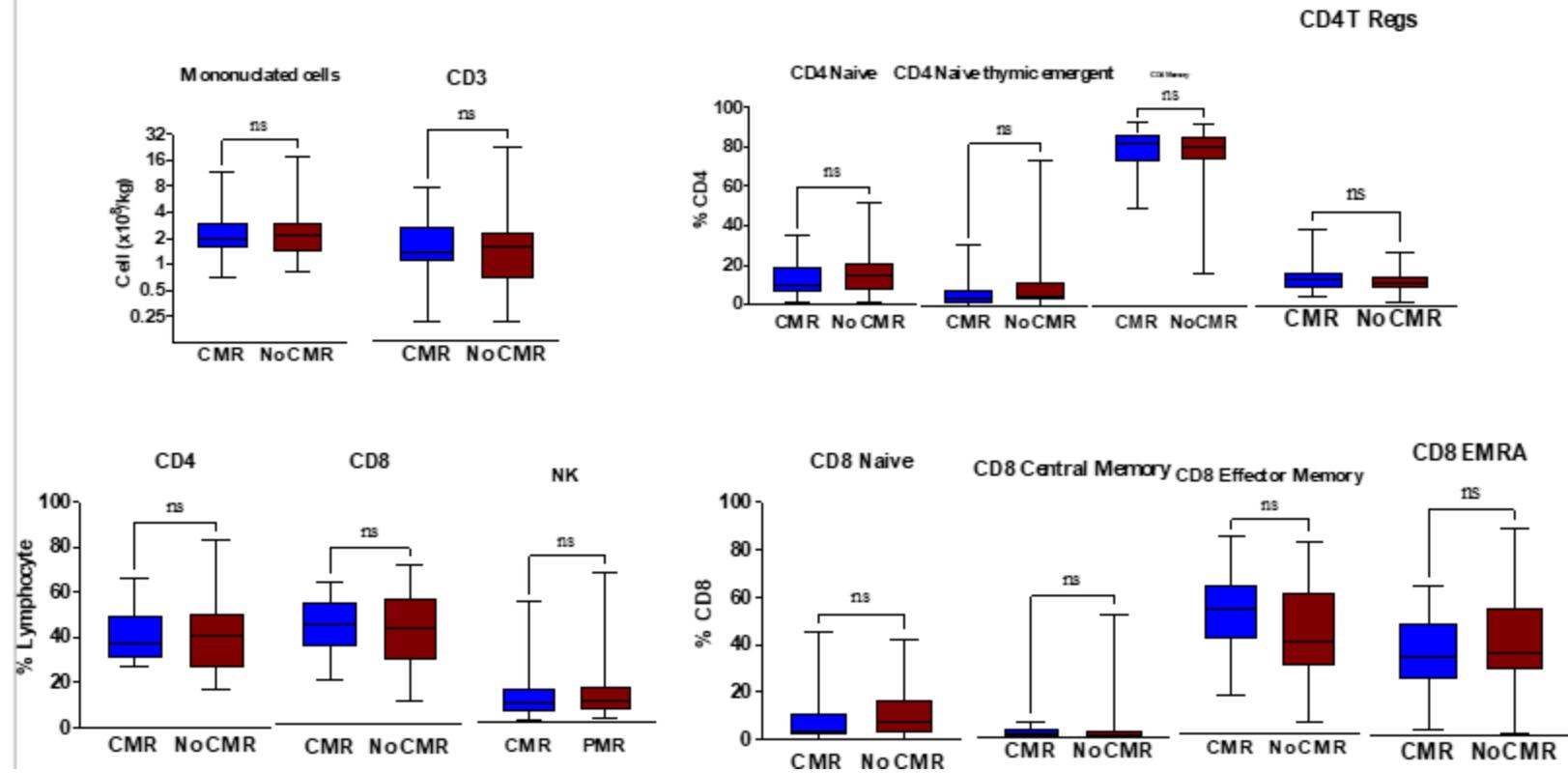


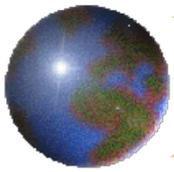
Dynamique des sous-ensembles phénotypique
Collecte versus fabrication de CAR T

CM: Naive central memory
EM: effector memory
EMRA: effector memory RA



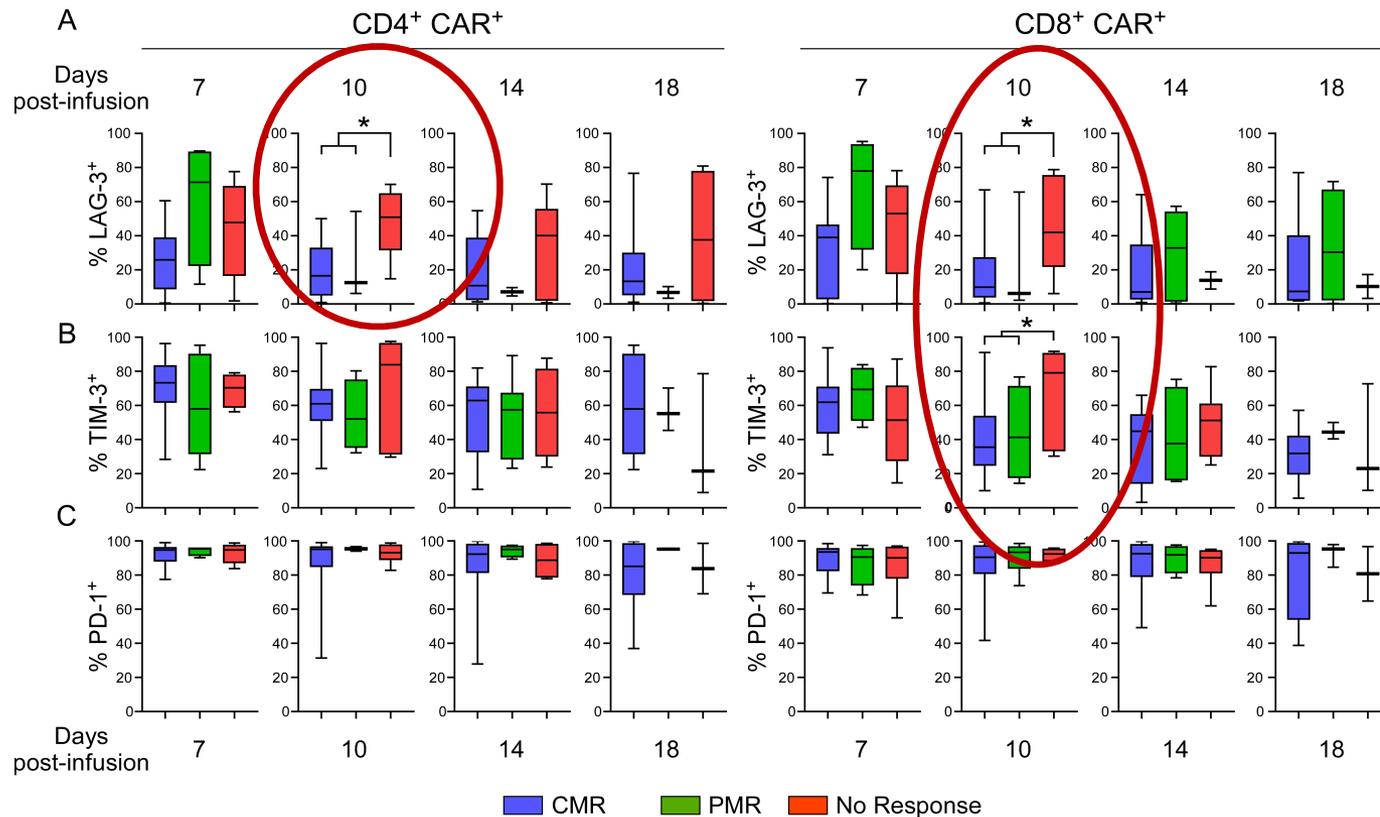
Dans l'aphérèse le mix des sous populations ne semble pas déterminant pour la réponse, sauf peut être les CD8 effectrices mémoires (rouge = non réponse, bleu = réponse)

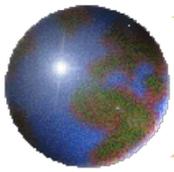




Epuisement de cellules CART

À J10 dans le sang périphérique un fort taux de cellules CART exhausted ($lag3^+ Tim3^+$) est retrouvé chez les non répondeurs





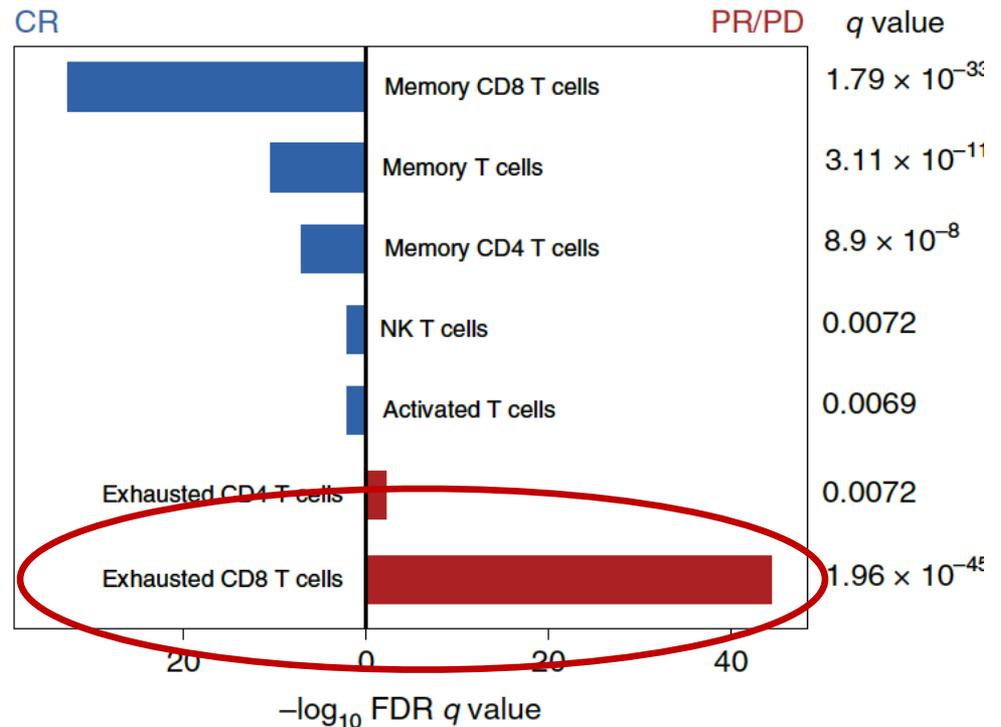
Épuisement de cellules CART

L'épuisement/exhaustion est un phénomène qui limite la réponse immunitaire à l'issue d'une stimulation très soutenue et prolongée par l'antigène tumoral ou infectieux

L'exhaustion observée à l'issue de la production des CART semble pouvoir être associée à une mauvaise qualité du produit.

Item CD8 mémoire

a



nature
medicine

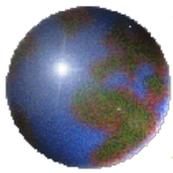
ARTICLES

<https://doi.org/10.1038/s41591-020-1061-7>

Check for updates

Characteristics of anti-CD19 CAR T cell infusion products associated with efficacy and toxicity in patients with large B cell lymphomas

Qing Deng^{1,5}, Guangchun Han^{2,5}, Nahum Puebla-Osorio¹, Man Chun John Ma¹, Paolo Strati¹, Beth Chasen³, Enyu Dai², Minghao Dang², Neeraj Jain¹, Haopeng Yang¹, Yuanxin Wang², Shaojun Zhang², Ruiping Wang², Runzhe Chen², Jordan Showell¹, Sreejoyee Ghosh¹, Sridevi Patchva¹, Qi Zhang¹, Ryan Sun⁴, Frederick Hagemeister¹, Luis Fayad¹, Felipe Samaniego¹, Hans C. Lee¹, Loretta J. Nastoupil¹, Nathan Fowler¹, R. Eric Davis¹, Jason Westin¹, Sattva S. Neelapu^{1,2,5}, Linghua Wang^{2,5} and Michael R. Green^{1,2,5}



Impact d'une collecte précoce

Product Characteristics: Higher Frequency of CCR7+CD45RA+ T Cells in ZUMA-12 Compared With ZUMA-1

#



L'étude Zuma-12 est en première ligne



On constate qu'il y a un taux plus élevé de cellules mémoires CXCR7 dans Zuma 12 /Zuma 1



Ces Cellules CxCR7+ => homing des Lymphocytes => rôle potentiel pour la persistance de l'effet CART



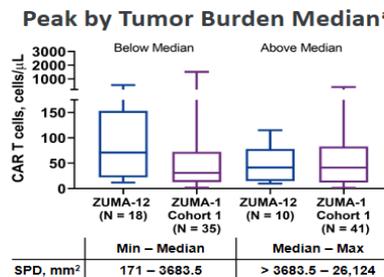
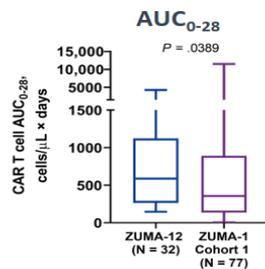
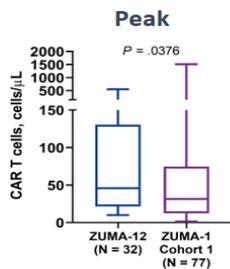
Ce taux élevé est associé

- ⊠ Expansion plus importante
- ⊠ Auc plus importante

| Parameter Median (Range) | ZUMA-12 ^a (N = 32) | ZUMA-1 Cohort 1 ^b (N = 77) |
|--|----------------------------------|--|
| Total no. of T cells infused × 10 ⁶ , n | 306 (169 – 603) | 295 (149 – 760) |
| Total no. of CAR T cells infused × 10 ⁶ , n | 170 (95 – 200) | 160 (96 – 200) |
| Total no. of CCR7+CD45RA+ T cells ^c infused × 10 ⁶ , n | 105 (35 – 254) | 40 (2 – 215) |
| CCR7+CD45RA+ T cells ^c , % | 34 (7 – 76) | 14 (1 – 76) |
| Doubling time, days | 1.6 (1.3 – 3.4) | 1.5 (1.0 – 4.7) |

- Levels of CCR7+CD45RA+ T cells in preinfusion product have been associated with a favorable PK profile¹

CAR T Cell Expansion Was Greater in ZUMA-12 Compared With ZUMA-1

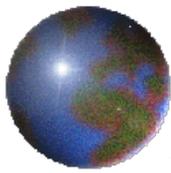


cette étude montre qu'un prélèvement **de cellules moins prétraitées** serait associé à une meilleure expansion, suggérant un meilleur **fitness des cellules**."

- Median tumor burden was lower in ZUMA-12 than in ZUMA-1 Cohort 1 (2091 mm² vs 3684 mm², respectively)
- Median time to peak levels of CAR T cells in blood was 8 days for ZUMA-12
- PK profiles were similar in patients with double- or triple-hit lymphoma and DLBCL with IPI score ≥ 3

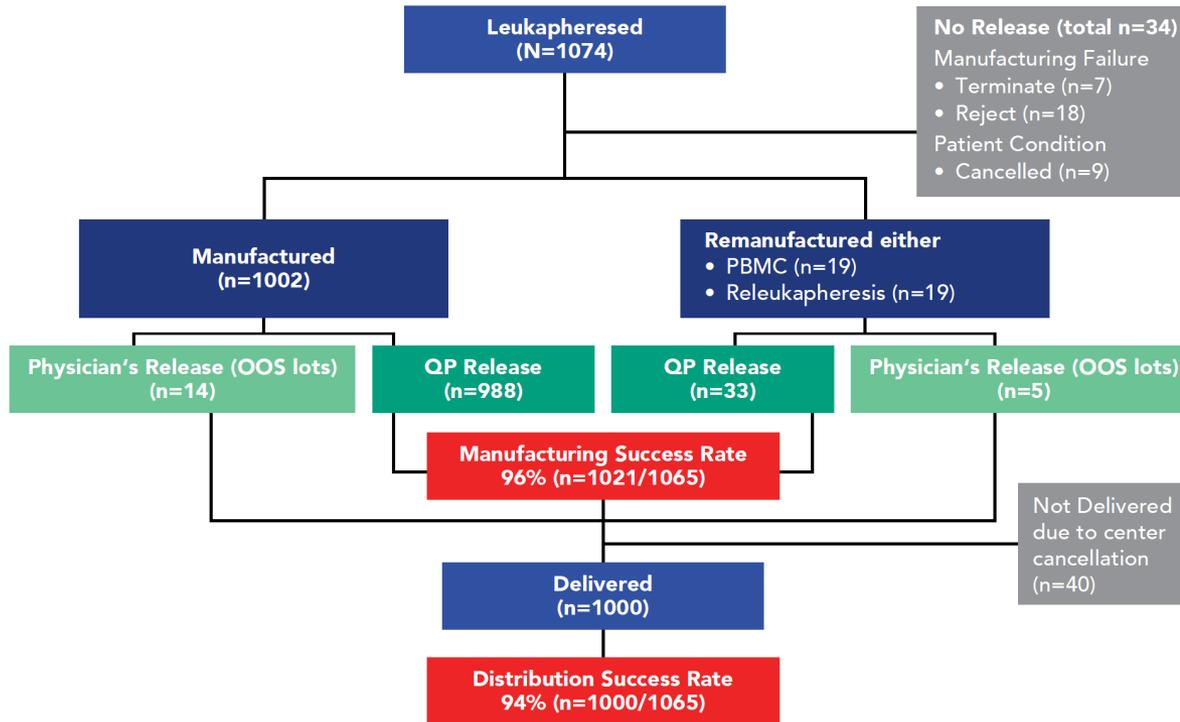
1. Locke FL, et al. *Blood Adv.* 2020;4(19):4896–4911.

Neelapu SS, et al. ASH 2020. Abstract #405. #: hors AMM



Non-conformité => OOS (Out Of Specification) => données

Manufacturing



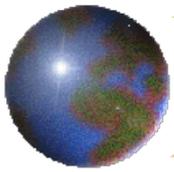
Distribution/Patient Preparation



Axi cel September 6, 2018, until September 5, 2020,
1074 patients from 15 countries production aux US

1074 leukapheresed patients,
1002 axi-cel lots were manufactured one time
988 lots within specifications for QP release.
14 lots were OOS and were released by exception on

19 patients (1.8%) from frozen PBMC
19 patient (1.8%), from new leukapheresis



Conclusion

- ✚ Sur la technique d'Aphérèse et les objectifs, sont atteints mais une optimisation est possible
- ✚ Peu de données réellement prédictives biologiques en pré Aphérèse
- ✚ Cliniquement rôle important des équipes sur la gestion des médicaments interdits et ainsi la prévention des non conformités
- ✚ De l'importance d'un prélèvement plus en amont sur les lymphocyte moins pré traités