



HAL
open science

Condition de réalisation de la cytophérèse pour la mise à disposition du matériel biologique nécessaire à la production de CAR T-cells commerciaux : avis d'experts proposé par la SFGM-TC

Sylvie Carnoy, Jean-Louis Beaumont, Tarik Kanouni, Nathalie Parquet, David Beauvais, Olivier Hequet, Justina Kanold, Caroline Ballot, Valérie Mialou, Loïc Reppel, et al.

► To cite this version:

Sylvie Carnoy, Jean-Louis Beaumont, Tarik Kanouni, Nathalie Parquet, David Beauvais, et al.. Condition de réalisation de la cytophérèse pour la mise à disposition du matériel biologique nécessaire à la production de CAR T-cells commerciaux : avis d'experts proposé par la SFGM-TC. Bulletin du Cancer, 2021, 108 (3), pp.295-303. 10.1016/j.bulcan.2020.11.014 . hal-03211959

HAL Id: hal-03211959

<https://hal.science/hal-03211959v1>

Submitted on 22 Mar 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

Condition de réalisation de la cytophérèse pour la mise à disposition du matériel biologique nécessaire à la production de CAR T-cells commerciaux : avis d'experts proposé par la SFGM-TC

How to perform leukapheresis for procurement of the starting material used for commercial CAR T-cell manufacturing: a consensus from experts convened by the SFGM-TC

Sylvie Carnoy¹, Jean-Louis Beaumont², Tarik Kanouni³, Nathalie Parquet⁴, David Beauvais^{5*}, Olivier Hequet⁶, Justina Kanold⁷, Caroline Ballot⁸, Valérie Mialou⁹, Loïc Reppel¹⁰, Gandhi Damaj¹¹, Ibrahim Yakoub-Agha¹², Christian Chabannon¹³

¹ EFS Nord de France, site de Lille, 38-42 Avenue Charles Saint-Venant, 59000 Lille, France

² CHU Henri Mondor CRETEIL – UPEC, Unité d'Aphérèses Thérapeutiques, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, France

³ Unité d'Hémaphrèse, Service d'Hématologie, CHU de Montpellier, 191 Av. du Doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier, France

⁴ APHP, Service Apherese therapeutique, Hopital Saint-Louis, 1 Avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris, France

⁵ Univ. Lille, CHU Lille, Department of Hematology, 2 Avenue Oscar Lambret, 59000 Lille, France

⁶ Etablissement Français du Sang, Inserm U1111, Hospices Civils de Lyon, Departement of Apheresis, 165 Chemin du Grand Revoyet, 69310 Pierre-Bénite, France

⁷ Department of Pediatric Hematology and Oncology, CIC Inserm 501, CHU de Clermont-Ferrand, 1 Rue Lucie et Raymond Aubrac, 63100 Clermont-Ferrand, efsFrance

⁸ EFS Nord de France, laboratoire de thérapie cellulaire et banque de sang placentaire, site de Lille-Belfort, 10 boulevard de belfort, 59000 LILLE, France

⁹ Banque de tissus et cellules, Etablissement Français du Sang, Hôpital E. Herriot, 5 Place d'Arsonval, 69003 Lyon, France

¹⁰ CHRU de Nancy, Unité de Thérapie Cellulaire et banque de Tissus, rue du Morvan – 54511 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France

¹¹ Institut d'Hématologie, CHU de Caen, Université de Caen-Normandie, Avenue de la Côte de Nacre, 14000 Caen, France

¹² Univ Lille, CHU Lille, Inserm, Infinite, U1286, 2 Avenue Oscar Lambret, 59000 Lille, France

¹³ Institut Paoli-Calmettes Comprehensive Cancer Center, Centre de Thérapie Cellulaire, Aix-Marseille Univ, Inserm CBT-1409, 232 Boulevard de Sainte-Marguerite, 13009 Marseille, France

*** Auteur correspondant :** David Beauvais

UAM allogreffes de CSH – CHRU de Lille, F-59037 Lille CEDEX, France.

E-mail : david.beauvais@chru-lille.fr

Résumé

Les cellules T à récepteur antigénique chimérique (CAR T-cell) sont une nouvelle classe de traitements anticancéreux produits en manipulant génétiquement des lymphocytes T autologues ou allogéniques afin de générer l'expression d'un récepteur chimérique dirigé contre un antigène exprimé sur la membrane de cellules tumorales. En Europe, le tisagenlecleucel (Kymriah™) dispose d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique B en rechute/réfractaire chez l'enfant et le jeune adulte et celui du lymphome B diffus à grandes cellules (LBDGC) en rechute/réfractaire. L'AMM de l'axicabtagene ciloleucel (Yescarta™) porte sur le traitement du LBDGC et du lymphome primitif à cellules B du médiastin en rechute/réfractaire. Les deux médicaments de thérapie génique aujourd'hui autorisés en Europe sont constitués de cellules T autologues génétiquement modifiées pour exprimer un CAR dirigé contre CD19, un antigène exprimé tout au long de la différenciation lymphoïde B et sur de nombreuses hémopathies malignes B. Ce travail collaboratif fait partie d'une série de travaux d'experts et a pour but de proposer des conseils pratiques pour aider les préleveurs à effectuer le prélèvement des cellules mononucléées sanguines autologues et fournir le matériel cellulaire de départ à l'industriel fabricant, en vue de la production pharmaceutique de CAR T-cells.

Mots-clés : CAR T-cells ; cytophérèse ; lymphome diffus à grandes cellules B ; leucémie aiguë lymphoblastique B

Abstract

Chimeric antigen receptor (CAR) T-cells are a new class of cancer treatments manufactured through autologous or allogeneic T cells genetic engineering to induce CAR expression directed against a membrane antigen present at the surface of malignant cells. In Europe, tisagenlecleucel (Kymriah™) has a marketing authorization for the treatment of relapsed / refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia in children and young adults and for the relapsed / refractory diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). The marketing authorization for axicabtagene ciloleucel (Yescarta™) is the treatment of relapsed / refractory DLBCL and mediastinal B-cell lymphoma. Both products are "living drugs" and genetically modified autologous T cells directed against CD19 which is an antigen expressed throughout B lymphoid differentiation and on many B malignancies. This collaborative work - part of a series of expert works on the topic - aims to provide practical advice to assist collection facilities that procure the starting material i.e. blood mononuclear cells for autologous CAR T-cell manufacturing.

Keywords: CAR T-cells; cytopheresis; diffuse large B-cell lymphoma; B-cell acute lymphoblastic leukemia

Introduction

Trente ans se sont écoulés depuis les premières tentatives expérimentales de manipulation des cellules T pour leur faire exprimer des récepteurs antigéniques chimériques (*chimeric antigen receptors*, CAR) (1,2). L'objectif original était de produire des cellules T à récepteur chimérique de haute affinité pour l'antigène spécifique (CAR T-cell) permettant d'étudier les mécanismes de signalisation intracellulaire dans la cellule T et la redirection de la reconnaissance de l'antigène par la cellule T vers un antigène tumoral approprié (3). À la suite du perfectionnement des propriétés de signalisation d'un CAR dans la cellule T, les progrès ont été rapides, du laboratoire aux essais cliniques, de sorte que les CAR T-cell ciblées sur CD19 représentent une approche thérapeutique pour plusieurs hémopathies malignes B réfractaires/en rechute, notamment la leucémie aiguë lymphoblastique B (LAL-B) et le lymphome B diffus à grandes cellules (LBDGC) (4-8). Les CAR T-cells sont

aussi en cours d'évaluation pour d'autres hémopathies, comme le myélome multiple et la leucémie aiguë myéloïde, ainsi que dans des tumeurs solides (5,9-11).

Le tisagenlecleucel (Kymriah™, connu auparavant sous le nom de CTL019, Novartis, Bâle, Suisse) est composé de CAR T-cell autologues génétiquement modifiées *ex vivo* à l'aide d'un vecteur lentiviral porteur de la séquence génétique d'un CAR anti-CD19 incluant un domaine de co-stimulation 4-1BB. Il est indiqué pour le traitement des enfants et des jeunes adultes jusqu'à l'âge de 25 ans, atteints de LAL-B en rechute/réfractaire, et a reçu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) de la FDA (*Food and Drug Administration*) aux États-Unis le 30 août 2017. Le 1^{er} mai 2018, la FDA a étendu son AMM au traitement des patients adultes atteints de lymphome B à grandes cellules en rechute ou réfractaire après deux lignes au moins de traitement systémique, ce qui inclut les lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC) NOS (*not otherwise specified*, sans autre précision), les lymphomes B de haut grade et les LBDGC développés par transformation d'un lymphome folliculaire. Le 22 août 2018, l'Agence européenne du médicament (*European Medicines Agency*, EMA) a donné son approbation pour des indications similaires.

L'axicabtagene ciloleucel (Yescarta™), connu auparavant sous le nom de KTE-C19, (Gilead, États-Unis), est un produit de CAR T-cell autologues génétiquement modifiées *ex vivo* à l'aide d'un vecteur rétroviral porteur de la séquence génétique d'un CAR anti-CD19 incluant un domaine intracellulaire comportant la molécule de co-stimulation CD28. Il a été approuvé le 18 octobre 2017 par la FDA pour le traitement de patients adultes atteints de lymphome B à grandes cellules en rechute ou réfractaire après au moins deux lignes de traitement systémique, notamment le LBDGC NOS, le lymphome B primitif à grandes cellules du médiastin (LBPM), le lymphome à cellules B de haut grade et le LBDGC développé par transformation d'un lymphome folliculaire. L'EMA a autorisé son utilisation dans le LBDGC et le LBPM, après au moins deux lignes de traitement systémique, le 23 août 2018.

Les spécificités des CAR T-cells, tant dans leur mode de fabrication que dans leur profil d'efficacité et de toxicité en font une classe thérapeutique à part, très différente des médicaments produits par synthèse chimique ou par un procédé biotechnologique. Si l'on considère le procédé de fabrication, il s'agit – au moins pour ce qui concerne les CAR-T cell autologues – d'un médicament personnalisé, fabriqué à façon (le délai de fabrication appelé « *turnaround time* » par les Anglo-Saxons doit être intégré dans le processus de sélection des patients candidats et dans l'organisation de leur parcours thérapeutique), marqué par une variabilité interindividuelle significative, et dont la qualité est affectée par la qualité de la « matière première biologique ». L'obtention par

aphérèse de ce matériel de départ revêt donc une importance fondamentale. Cet article traite des conditions d'obtention décentralisée des cellules mononucléées sanguines autologues qui sont le matériel de départ à partir desquelles les CAR T-cell seront fabriquées dans un processus de production centralisé par un établissement pharmaceutique. Les éléments logistiques et techniques tels que l'importance de la période de *wash-out*, l'efficacité de collecte, l'anticoagulation et la cryopréservation sont explicités de manière détaillée.

Méthodologie

Ce travail est le fruit d'un consensus d'experts sur les modalités du prélèvement des cellules mononucléées sanguines autologues en vue de la fabrication d'un traitement par CAR T-cells autologues commerciaux. Il s'inscrit dans une série de travaux menée dans le but d'émettre des recommandations pratiques pour la prise en charge des patients relevant d'un traitement par CAR T-cell. Les conclusions sont basées sur une revue de la littérature publiée, sur l'examen des protocoles d'étude clinique évaluant des CAR-T cells en vue de leur enregistrement auprès des autorités sanitaires et de l'obtention de l'AMM et des résumés des caractéristiques du produit (RCP) des CAR T-cells commercialisées.

Ces recommandations sont destinées à rapporter les meilleures pratiques connues à ce jour dans un domaine nouveau et rapidement mouvant ; elles ont donc vocation à évoluer au fur et à mesure que l'expérience s'accumule avec les CAR T-cells déjà autorisées, et celles qui arriveront prochainement sur le marché. L'objectif est d'aider la communauté des professionnels de santé à produire des soins de qualité élevée et homogène dans un domaine fortement innovant. Elles s'appliquent principalement aux CAR T-cells actuellement commercialisées pour le traitement des hémopathies malignes. En l'absence de données issues d'essais randomisés, la décision a été prise de renoncer à toute gradation des recommandations. Lorsque les patients reçoivent un traitement par CAR T-cells dans le cadre d'essais cliniques, les praticiens se doivent de respecter les exigences énoncées dans les protocoles d'études concernés.

Préparation à l'aphérèse

Les différentes règles qui s'appliquent actuellement aux prélèvements à finalité thérapeutique de cellules et de tissus humains dans l'Union Européenne dérivent des directives Tissus et Cellules publiées en 2004 (2004/23/CE) et en 2006 (2006/17/CE et 2006/86/CE). La Commission européenne a récemment organisé une réunion des parties intéressées pour discuter la nécessité ou non de réviser les directives Tissus et Cellules. Bien

qu'un certain nombre d'arguments relatifs notamment à la fabrication de médicaments de thérapies innovantes (*advanced-therapy medicinal products*, ATMPs) aient été soulevés en faveur de la révision des directives, le processus de révision n'a pas formellement débuté à l'heure de la rédaction de ces recommandations, et les principes généraux relatifs à la sécurité de la personne prélevée et à la traçabilité des éléments dérivés du corps humains restent en vigueur.

Les règles actuelles se rapportent seulement à la relation donneur-receveur, en situation autologue ou allogénique, et n'abordent pas le problème de l'usage prévu du matériel recueilli. Il en résulte que les mêmes exigences s'appliquent aussi bien à la collecte de cellules mononucléées en vue de la greffe de cellules souches qu'à la fourniture de la matière première pour la fabrication des ATMP, sous réserve d'exigences supplémentaires spécifiques stipulées par le titulaire de l'AMM. En France, les principes énoncés dans les Directives Tissus - Cellules sont retrouvés dans les Règles de Bonnes Pratiques de Prélèvement (RBPP) récemment révisées et publiées en février 2020. L'expédition transfrontalière des produits cellulaires collectés implique le respect des règlements nationaux dans le pays d'origine et dans le pays de destination. L'obtention d'une autorisation d'exporter des éléments d'origine humaine autologues imposera de connaître les sérologies virales du patient et relève de la responsabilité de l'unité de thérapie cellulaire partenaire de l'unité de cytophèrese.

Le **Tableau 1** présente une *checklist* qu'il importe de vérifier avant de lancer la procédure de leucaphèrese.

Réalisation de la leucaphèrese

Le calendrier de la leucaphèrese doit être établi en étroite coordination avec la firme pharmaceutique, en utilisant les outils informatiques propriétaires mis à disposition garantissant à la fois une planification optimisée et une traçabilité individuelle des médicaments en cours de production et de leur administration, car l'insuffisance des capacités mondiales de fabrication est actuellement l'un des goulots d'étranglement limitant la disponibilité des traitements par CAR T-cell (13). Il est impératif d'obtenir la confirmation d'un accord sur un créneau de fabrication avant de fixer la date de l'aphèrese. Les délais entre la confirmation du créneau et celui-ci étant parfois courts, la procédure nécessite également une bonne coordination avec le service de soins cliniques. La mise en service en cours d'année 2020 – même retardée par la pandémie COVID-19 – de nouvelles usines de production localisées en Europe par les deux laboratoires pharmaceutiques détenteurs des AMM pour tisagenlecleucel et axicabtagene ciloleucel devrait améliorer cette situation dans des proportions encore difficiles à préciser (14). À mesure des progrès techniques et de l'augmentation prévisible du nombre de candidats

potentiels à ces traitements dans les années à venir, les limites de la capacité des centres à recueillir les cellules représenteront néanmoins l'un des défis à relever. De plus, la procédure nécessite une étroite collaboration avec le service de soins cliniques et la pharmacie hospitalière

Les fabricants de CAR T-cell n'ont à ce jour pas émis d'exigence sur la nature des séparateurs cellulaires à utiliser pour la collecte des cellules mononucléées sanguines autologues. Par contre, les qualifications initiales et opérationnelles des dispositifs médicaux, le suivi des maintenances préventives et curatives, les validations de procédés et les preuves de la formation et de l'habilitation des personnels réalisant les séances de cytophérèse (incluant les règles spécifiques aux aphérèses pédiatriques, en particulier chez les enfants de petits poids) sont des éléments documentaires d'importance majeure dans la qualification d'un centre par le détenteur de l'AMM et par les autorités sanitaires de tutelle. Techniquement, une leucaphérèse sans mobilisation ressemble beaucoup à l'aphérèse pour la photothérapie extracorporelle en système ouvert ou pour le recueil des cellules mononucléées allogéniques en vue d'une immunothérapie après greffe (perfusion de lymphocytes du donneur, DLI [*donor lymphocyte infusion*]); jusqu'à présent, ni les fabricants de séparateurs de cellules ni les fabricants de CAR-T n'ont proposé de protocoles d'aphérèse spécifiques. Les principes de management de la qualité opposables aux unités de cytophérèse sont largement identiques à ceux énoncés dans la septième édition du référentiel *FACT-JACIE (Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy - Joint Accreditation Committee of the International Society for Cell Therapy and EBMT) Standards for Hematopoietic Cellular Therapies* et du référentiel *FACT Standards for Immune Effector Cells*, bien que des exigences supplémentaires soient souvent spécifiées, notamment celles des fournisseurs pharmaceutiques et des autorités de santé (15).

Un seul des fabricants de CAR T-cell commerciaux – Novartis – exige actuellement que la cryopréservation des cellules mononucléées sanguines autologues soit réalisée sur le site de prélèvement, avant expédition vers le site de fabrication du médicament. Il est stipulé que le taux de leucocytes doit être ajusté à la valeur de $1,0 (0,5-2,0) \times 10^9/L$, qu'un cryoprotecteur approuvé (par la firme et par les régulateurs locaux) soit ajouté lentement et que les cellules soient congelées avec des automates de descente en température programmée (permettant une traçabilité de la descente en température et l'évaluation de la conformité de ce tracé), avant leur stockage dans l'azote en phase gazeuse. Pour produire Kymriah™, Novartis accepte des cellules collectées dans les dix-huit mois précédents. Cette organisation particulière soulève la question de savoir si chez un certain nombre de patients sélectionnés à forte probabilité de rechute, il serait opportun de recueillir et cryopréserver de façon prospective des cellules mononucléées sanguines autologues destinées à la fabrication ultérieure de CAR T-cell. Cette proposition a même été étendue à la population générale par certaines sociétés privées, sans qu'un fondement

médical robuste puisse être apporté à l'appui de telles organisations qui restent non autorisées en France, et que la société internationale de thérapie cellulaire et génique (*International Society for Cell and gene Therapy, ISCT*) a évalué comme inutile (<https://isctglobal.org/news/464648/ISCT-issues-patient-advice-and-concern-on-unproven-T-cell-preservation-services-.htm>). Les fabricants demandent que le produit d'aphérèse - frais ou cryopréservé - soit conditionné en respectant leurs instructions et leur organisation, qui incluent la mise à disposition de leurs propres conteneurs spécifiques de transport. Les produits d'aphérèse frais sont conservés au réfrigérateur (+4-+10 °C) jusqu'à l'expédition.

Les exigences des fabricants pour le contrôle de qualité sur le produit cellulaire collecté sont limitées et la réalisation de contrôles de qualité sur les produits cellulaires prélevés relève à ce jour essentiellement de l'initiative des unités de thérapie cellulaire associées aux unités de cytophérèse, de façon à garantir la qualité de ces produits et de se prémunir en cas de litige avec le fabricant du médicament. Il peut aussi y avoir des différences entre les exigences de la FDA et celles de l'EMA (16). Il est recommandé de n'utiliser pour les différents tests que des méthodes validées et/ou accréditées. Outre les marqueurs sérologiques déjà mentionnés et obligatoires, les contrôles de qualité sur le produit peuvent logiquement inclure des tests microbiologiques ainsi que certaines données cellulaires permettant d'évaluer la représentation des cellules cibles de la manipulation génétique et leur fonctionnalité (quantification des leucocytes et sous-populations, cellules CD3+ et cellules CD45+ viables, viabilité cellulaire globale et plus spécifiquement viabilité des CD3). L'échantillonnage du produit cellulaire collecté doit être réalisé en conditions aseptiques (classe A : PSM ou flux laminaire) et respecter les exigences du fabricant de façon à ne pas compromettre les étapes de transformation en aval

Bien que l'aphérèse puisse être réalisée chez des patients ayant une lymphopénie aussi profonde que $0,2 \times 10^9/L$, la probabilité d'atteindre le nombre cible de lymphocytes autologues et de fabriquer avec succès le produit cellulaire est plus élevée chez les sujets dont le compte absolu de lymphocytes (CAL) est supérieur à $0,5 \times 10^9/L$. La réalisation de plusieurs séances de cytophérèse est possible avec KymriahTM et parfois nécessaire en particulier pour les enfants de petits poids candidats à un traitement pour LAL-B réfractaire ou en rechute, car la congélation est réalisée sur place, mais rarement nécessaire pour disposer du nombre suffisant de cellules T. Au-delà du nombre de lymphocytes T circulants, leur qualité fonctionnelle est vraisemblablement un élément important pour la qualité du produit final. Il existe des raisons de penser que les traitements antérieurs (corticoïdes, chimiothérapie, immunothérapie, greffe...) peuvent compromettre la qualité des cellules T circulantes. En l'état actuel des connaissances, nous ne disposons pas d'un biomarqueur prédictif de la fonctionnalité des lymphocytes T, qui soit facilement utilisable en clinique. En fonction de la vitesse de

progression tumorale, il peut être nécessaire d'administrer au patient une chimiothérapie d'attente (« *bridging chemotherapy* ») pendant la période de fabrication du médicament, donc après le prélèvement du matériel cellulaire permettant d'initier cette fabrication.

La tolérance clinique de la cytophérèse est en règle générale satisfaisante, et les effets indésirables souvent moins sévères que ceux associés à la plupart des thérapies systémiques administrées aux patients candidats à un traitement par CAR-T Cells ; une exception à cette affirmation générale est représentée par les enfants de petits poids pour lesquels une procédure de collecte minimisant le volume sanguin extracorporel est préférentiellement choisie, et pour lesquels le prélèvement est conduit dans un contexte médicalisé plus complexe que celui d'un patient adulte. L'évaluation anticipée de l'état général et des complications dont le patient souffre est nécessaire à la fois lors d'une consultation en amont de la cytophérèse (lors de la visite d'aptitude, permettant la validation ou non du capital veineux) et surtout la veille de la cytophérèse. Il est important de prendre en charge des douleurs ou des complications (dyspnée, fièvre...) pour permettre une séance de cytophérèse efficace et confortable surtout en cas de lymphopénie. En effet, les patients collectés pour CAR-T cells ont des pathologies évolutives et sont collectés à distance d'un traitement par chimiothérapie ou d'une corticothérapie. Le **Tableau 2** fournit des recommandations pour les périodes de sevrage/élimination à respecter après différents traitements de sauvetage avant de commencer la leucaphérèse. Il faut insister à ce propos sur le fait que l'usage antérieur de blinatumomab n'est pas une contre-indication à la thérapie cellulaire par CAR-T anti-CD19 (17).

Prélèvement des cellules mononucléées sanguines autologues

L'expérience d'aphérèse locale doit être utilisée pour comparer les résultats d'aphérèse, quelle que soit la finalité du prélèvement (greffes ou productions de MTI) (18-20), et plus important encore, l'efficacité de collecte (EC) (21).

L'EC pour les cellules T et de même pour les cellules mononucléées totales est calculée à l'aide de la formule:

$$EC = \text{lymphocytes T par poche} / (\text{Lymphocytes T périphériques (G/l)} / \text{x volume sanguin traité en litres}) \times 100 \%$$

Ainsi, chez un donneur de DLI classique avec un nombre de cellules T du sang périphérique de 2×10^9 / L au début de l'aphérèse et 10×10^9 de cellules T dans la poche après une aphérèse de 8 litres, l'EC est calculée comme suit :

$$EC = 10 \times 10^9 / (2 \times 10^9 \times 8) \times 100 \% = 10/16 \times 100 \% = 62.5\%$$

L'EC est ensuite utilisée pour estimer le volume qui devra être traité pour atteindre la dose cible de lymphocytes T. Pour les fabricants indiquant des doses cibles pour les cellules mononucléées, l'EC peut être calculée en utilisant cette méthode et les volumes cibles calibrés en conséquence (voir ci-dessous). Cependant, tous les fabricants commerciaux de CAR T-cell ne fournissent pas le nombre de cellules cibles pour le produit d'aphérèse ; certains demandent plutôt le traitement d'un certain volume sanguin, indépendamment de la taille du patient et du nombre de lymphocytes. Une dose d'un à deux milliards de cellules T est généralement suffisante pour démarrer la fabrication de CAR T-cell. L'EC et un nombre cible permettent d'estimer le volume sanguin à traiter pour atteindre cet objectif.

La formule pour calculer le volume de processus cible est la suivante :

Volume traité (litres) = dose cible de lymphocyte T / (EC x concentration de lymphocytes T dans le sang)

Si un patient a, par exemple, un taux de CD3+ dans le sang périphérique de $0,2 \times 10^9/L$ dans ce cas, le volume cible sera calculé comme suit :

$$VC = LT \text{ cible} / (LT \text{ sang} \times EC)$$

$$VC = 10^9 / ((0,4 \times 200 \times 10^6) / \text{Litres}) = 1\,000/80 \text{ Litres} = 12,5 \text{ Litres}$$

Dans ce cas, la valeur utilisée pour l'EC correspond à l'EC associé au séparateur de cellules utilisé. Bien que l'EC de 62,5 % utilisé dans le calcul de notre premier exemple soit un EC assez élevé, une variation interindividuelle importante entre patients nécessite de travailler avec une marge d'erreur importante. Nous recommandons donc de travailler avec une efficacité de collecte atteinte par au moins 90 % des patients, sur la base des expériences locales. Le CE à 40 % utilisé dans le deuxième exemple est basé sur ce principe. Il est recommandé de comparer ses propres performances d'aphérèse. L'usage d'un algorithme comme celui-ci pour personnaliser le volume de collecte et le paramétrage du séparateur est souvent remplacé chez les patients adultes par une approche pragmatique substituant un paramétrage harmonisé prévoyant de traiter un nombre fixe de volumes sanguins (2 ou 3), mais peut à l'inverse être un facteur important à prendre en compte chez les enfants.

Pour la leucaphérèse, deux lignes d'accès veineuses de gros calibre soutenant un flux sanguin adéquat sont nécessaires. Les voies veineuses récentes sont préférables aux cathéters de longue durée en raison du risque de contamination bactérienne. Pour les adultes, les adolescents et les enfants pesant plus de 15 kg, l'accès veineux périphérique suffit généralement. Chez les enfants de faible poids ainsi que très occasionnellement chez les

adultes, la mise en place d'un cathéter veineux central simple ou double voie de gros calibre peut être nécessaire et doit être idéalement planifié immédiatement avant la procédure de leucaphérèse. Comme pour toute aphérèse utilisant une voie centrale, le compte rendu de pose de la voie veineuse centrale – incluant la vérification de son bon positionnement - devra obligatoirement être transmis au médecin d'aphérèse avant toute mise en route du recueil. Avant l'aphérèse, l'identité du patient est confirmée à l'aide de procédures locales standard et la poche d'aphérèse est étiquetée conformément aux exigences réglementaires, du référentiel FACT-JACIE et du laboratoire pharmaceutique. Les identifiants spécifiques des patients requis par un fabricant donné de CAR T-cell peuvent varier, sont en règle générale anonymisés dans le cas d'un essai clinique, et sont nominatifs dans le cas de médicaments bénéficiant d'une AMM ; l'utilisation d'un identifiant unique par don (DIN : Donation Identification Number) est essentielle car il sera la base de toute la chaîne de traçabilité du prélèvement (« *Chain of custody* » / « *chain of identity* ») depuis le prélèvement jusqu' à la réinjection. L'étiquetage de la poche de recueil des cellules mononucléées sanguines autologues est réalisé au début de la procédure d'aphérèse.

L'anticoagulation est obtenue avec l'ACD-A habituellement à un rapport de 1:11 à 1:13, bien que cela puisse être réduit au fil du temps. La plupart des fabricants interdisent l'utilisation supplémentaire d'héparine car sa présence dans la poche de recueil peut interférer avec le traitement en aval. La quantité d'ACD-A autorisée par minute et, par conséquent, le débit d'entrée, est limitée par le volume sanguin total du patient. Si les veines le permettent, un débit plus élevé peut être obtenu en augmentant le débit de perfusion de l'ACD-A ; cela prédispose les patients à des changements électrolytiques importants qui doivent être surveillés régulièrement et, si nécessaire, corrigés par supplémentation en électrolytes (principalement du calcium et parfois du magnésium si persistance des signes d'hypocalcémie) en continu au pousse-seringue. Le prélèvement d'aphérèse doit avoir un hématoците cible inférieur à trois pour cent correspondant à une couleur claire sur les colorgrammes des séparateurs de cellules. Il est important d'éviter la collecte des polynucléaires qui peuvent entraîner des phénomènes d'agrégation lors de la phase de congélation/décongélation et peuvent être responsables d'une diminution de viabilité et donc de rendement des lymphocytes après décongélation. Les faibles dénombrements de cellules mononucléées typiques, observés chez les patients, permettent de réduire les débits de collecte, limitant ainsi la taille du produit et le prélèvement plasmatique du patient. Pour respecter ces objectifs, les règles et paramètres qui prévalent pour les collectes de cellules mononucléées sanguines autologues ou allogéniques à des fins de greffe peuvent être utilisés, aucun fabricant de CAR-T cells n'ayant à notre connaissance émis de recommandation ou d'exigence sur les valeurs du débit de la pompe à collecte ou du facteur de compactage par exemple. La poche de recueil des cellules mononucléées sanguines autologues sera préparée avant l'envoi à

l'aide de dispositifs de soudure stérile des tubulures en prenant en compte les exigences spécifiques des firmes pharmaceutiques relatives à la longueur minimale de tubulures restantes, à la conservation ou à l'élimination des ports d'échantillonnage ou d'injection présents sur le kit initial de prélèvement, aux modalités de soudures stériles de façon à permettre la mise en œuvre des étapes suivantes du procédé de production propre à chaque médicament et à chaque fabricant. Les données d'aphérèse doivent être enregistrées conformément à la réglementation et doivent comprendre, *a minima*, les heures de début et de fin d'aphérèse ainsi que le volume du produit. Toutes ces données sont à renseigner dans le système informatique permettant de communiquer avec le laboratoire pharmaceutique fabricant.

Conclusion

La cytophérèse réalisée pour les CAR T-cell commerciaux présente peu de spécificités techniques par rapport aux autres techniques de prélèvements de cellules mononucléées sanguines. Les règles qui s'appliquent lors de l'exécution de la cytophérèse sont donc essentiellement celles s'appliquant à l'exécution d'une cytophérèse dont la finalité serait le prélèvement de cellules souches sanguines ou de cellules mononucléées sanguines à des fins de greffes de cellules hématopoïétiques autologues ou allogéniques. La préparation de l'équipe d'aphérèse et de l'équipe de l'unité de thérapie cellulaire au partenariat avec un acteur industriel nécessite cependant une solide implantation de la culture du management de la qualité dans ces équipes (incluant une grande discipline et une grande attention portée aux détails tels que les conditions et le format dans lesquels des informations critiques sont collectées et transmises à l'industriel), et un investissement conséquent en temps pour subir les évaluations et audits imposés par chaque laboratoire pharmaceutique détenteur d'une AMM, et pour participer aux nécessaires formations sur les exigences spécifiques en termes de prélèvement et d'expédition du produit cellulaire collecté (22). Certaines conditions relatives au patient et à son histoire médicale doivent être évaluées par anticipation afin d'éviter un échec de prélèvement ou un prélèvement de mauvaise qualité susceptible de contribuer à un échec de production, ou à la production d'un médicament non conforme (« *Out-of-Specification* » ou OOS), en particulier le taux de lymphocytes et la période de *wash-out* après le dernier traitement antitumoral. Pendant la procédure, il convient de vérifier la bonne tolérance en particulier concernant le risque d'hypocalcémie. Une fois la poche d'aphérèse prélevée, celle-ci sera soit cryopréservée sur place, soit expédiée à l'état frais selon les procédures de chaque laboratoire pharmaceutique.

Remerciements

Les auteurs remercient tous ceux qui ont bien voulu répondre à l'enquête internationale sur la prise en charge des patients recevant une thérapie cellulaire CAR T-cells.

Conflits d'intérêts

SC, JLB, TK, NP, DB, OH, JK, CB, VM, LR, GD : aucun

IYA : honoraires de Novartis, Kite/Gilead, Celgene/BMS et Janssen. Il est l'investigateur principal de plusieurs essais cliniques évaluant des médicaments de la classe CAR-T Cells.

CC : honoraires de Novartis, Kite/Gilead, Celgene/BMS, Janssen, Bellicum Therapeutics, Sanofi SA ; investigateur de plusieurs essais cliniques évaluant des médicaments de la classe CAR-T Cells.

Références

1. Kuwana Y, Asakura Y, Utsunomiya N, et al. Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;149(3):960-968.
2. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(24):10024-10028.
3. Quesnel B. CAR T-cells: A John von Neumann legacy? *Curr Res Transl Med.* 2018;66(2):35-36.
4. Sadelain M, Brentjens R, Riviere I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov.* 2013;3(4):388-398.
5. Gauthier J, Yakoub-Agha I. Chimeric antigen-receptor T-cell therapy for hematological malignancies and solid tumors: Clinical data to date, current limitations and perspectives. *Curr Res Transl Med.* 2017;65(3):93-102.
6. Ghobadi A. Chimeric antigen receptor T cell therapy for non-Hodgkin lymphoma. *Curr Res Transl Med.* 2018;66(2):43-49.
7. Grupp S. Beginning the CAR T cell therapy revolution in the US and EU. *Curr Res Transl Med.* 2018;66(2):62-64.
8. Yassine F, Iqbal M, Murthy H, Kharfan-Dabaja MA, Chavez JC. Real world experience of approved chimeric antigen receptor T-cell therapies outside of clinical trials [published online ahead of print, 2020 Aug 15]. *Curr Res Transl Med.* 2020;S2452-3186(20)30038-6.
9. Feldmann A, Arndt C, Bergmann R, et al. Retargeting of T lymphocytes to PSCA- or PSMA positive prostate cancer cells using the novel modular chimeric antigen receptor platform technology "UniCAR". *Oncotarget.* 2017;8(19):31368-31385.
10. Atanackovic D, Radhakrishnan SV, Bhardwaj N, Luetkens T. Chimeric Antigen Receptor (CAR) therapy for multiple myeloma. *British Journal of Haematology.* 2016;172(5):685-698.
11. Radhakrishnan SV, Bhardwaj N, Luetkens T, Atanackovic D. Novel anti-myeloma immunotherapies targeting the SLAM family of receptors. *Oncoimmunology.* 2017;6(5):e1308618.
12. Kansagra AJ, Frey NV, Bar M, et al. Clinical Utilization of Chimeric Antigen Receptor T Cells in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: An Expert Opinion from the European Society for Blood and Marrow

Transplantation and the American Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25(3):e76-e85.

13. Couzin-Frankel J. Supply of promising T cell therapy is strained. *Science*. 2017;356(6343):1112-1113.
14. Hu Y, Tan Su Yin E, Yang Y, et al. CAR T-cell treatment during the COVID-19 pandemic: Management strategies and challenges. *Curr Res Transl Med*. 2020;68(3):111-118. doi:10.1016/j.retram.2020.06.003
15. Yakoub-Agha I, Ferrand C, Chalandon Y, et al. Prérequis nécessaires pour la mise en place de protocoles de recherche clinique évaluant des thérapies cellulaires et géniques par lymphocytes T dotés de récepteur chimérique à l'antigène (CAR T-cells) : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bull Cancer*. 2017;104(12S):S43-S58.
16. Kohl U, Arsenieva S, Holzinger A, Abken H. CAR T Cells in Trials: Recent Achievements and Challenges that Remain in the Production of Modified T Cells for Clinical Applications. *Hum Gene Ther*. 2018;29(5):559-568.
17. Park JH, Riviere I, Gonen M, et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(5):449-459.
18. Allen ES, Stroncek DF, Ren J, Eder AF, West KA, Fry TJ, et al. Autologous lymphapheresis for the production of chimeric antigen receptor T cells. *Transfusion*. 2017 May;57(5):1133-41.
19. Bersenev A. CAR-T cell manufacturing: time to put it in gear. *Transfusion*. 2017 May;57(5):1104-6.
20. Even-Or E, Di Mola M, Ali M, Courtney S, McDougall E, Alexander S, et al. Optimizing autologous nonmobilized mononuclear cell collections for cellular therapy in pediatric patients with high-risk leukemia. *Transfusion*. 2017 Jun;57(6):1536-42.
21. Ceppi F, Rivers J, Annesley C, Pinto N, Park JR, Lindgren C, et al. Lymphocyte apheresis for chimeric antigen receptor T-cell manufacturing in children and young adults with leukemia and neuroblastoma. *Transfusion*. 2018 Jun;58(6):1414-20.
22. Granata A, Drezet A, Faucher C, Lemarie C, Calmels B, Chabannon C. New developments in the use of apheresis to collect haematopoietic cells for cell transplantation and cell therapies. *ISBT Science Series*. 2016;11(S1):100-4.

Tableaux

Tableau 1. Checklist avant l'aphérèse

Tableau 2. Période de sevrage thérapeutique et d'élimination (*wash-out*) avant la leucaphérèse (adapté d'après Kansagra *et al.*, BBMT 2018) (12)

Tableau 1. Checklist avant l'aphérèse

Avant l'aphérèse	Recommandations	Commentaire
Indice de performance ECOG	ECOG \leq 2	À la discrétion du praticien d'aphérèse. Les patients éligibles à un prélèvement de cellules souches sanguines autologues sont potentiellement des patients également éligibles pour un traitement par CAR T-cells. Si nécessaire le prélèvement peut être fait en secteur de soins intensifs.
Jours après la dernière chimiothérapie	Attendre la récupération hématologique après la chimiothérapie cytotoxique	
Corticothérapie	Idéalement, sept jours sans corticothérapie pour minimiser l'effet sur le recueil et la fonctionnalité des lymphocytes	Une période plus courte, voire réduite à trois jours, est considérée comme acceptable par Kansagra <i>et al.</i> (12) Hydrocortisone à dose physiologique de substitution autorisée
Tests sanguins indispensables		
Hépatite B, hépatite C, VIH, syphilis et HTLV	Obligatoires en France. Résultats datant de moins de 30 jours. Les résultats doivent être disponibles lors du transfert du produit cellulaire prélevé vers le transporteur en charge de l'acheminer vers l'établissement pharmaceutique destinataire	Seuls les tests sérologiques sont exigés ; les tests moléculaires ADN ou ARN ne sont pas nécessaires si toutes les sérologies sont négatives
Tests sanguins pour vérifier la faisabilité de l'aphérèse		
CRP	Recommandé	Chez les patients avec infection active, l'éligibilité pour l'aphérèse devra être jugée au cas par cas
Ionogramme sanguin et fonction rénale	Recommandé	L'aphérèse est susceptible d'augmenter le risque de désordres hydro-électrolytiques et de diminuer la tolérance des apports liquidiens
Valeurs hématologiques exigées pour une performance optimale de l'aphérèse		
Hémoglobine	Adulte : Hb > 9 g/dL, Ht > 0,24 Enfant : Hb > 12 g/dL, Ht > 0,38	Pour optimiser l'interface durant le recueil. Transfusion autant que de besoin de concentrés globulaires (produits irradiés)
Compte absolu des neutrophiles (CAN)	> 1,0 x 10 ⁹ /L	Témoignant de la récupération de la chimiothérapie précédente
Compte absolu des lymphocytes (CAL)	> 0,2 x 10 ⁹ /L*	Un compte plus élevé est exigé chez les jeunes enfants
Plaquettes	Adulte : > 30 x 10 ⁹ /L Enfant : > 50 x 10 ⁹ /L	Transfusion autant que de besoin
Hémogramme complet	A réaliser le jour de l'aphérèse, en amont et en aval de la procédure. À répéter au terme de la procédure d'aphérèse	Permet la programmation du séparateur. L'aphérèse peut éliminer plus de 30 % des plaquettes circulantes
Autres		
Bilan cardiologique avec ECG	Recommandé	Tracé ECG de référence pour prise en charge si hypocalcémie majeure liée au citrate
En fonction du contexte		
PCR SARS-COV 2	Prélèvement naso-pharyngé	Recommandation susceptible de varier selon le contexte épidémique

Abréviations : ECOG : *Eastern Cooperative Oncology Group* ; CRP : protéine C-réactive ; Hb : taux d'hémoglobine ; Ht : hématocrite.

* Ce seuil s'applique spécifiquement à la récupération après corticothérapie, où un CAL > 0,2 x 10⁹/L est un marqueur de l'effectivité du sevrage des corticoïdes

Tableau 2. Période de sevrage thérapeutique et d'élimination (*wash-out*) avant la leucaphérèse (adapté d'après Kansagra *et al.*, BBMT 2018) (12)

Type de traitement	Recommandations	Commentaire
Allo-CSH	Les patients doivent être sevrés d'immunosuppression et sans signes de GvHD	Un délai minimum d'un mois est recommandé
DLI	4 semaines	Un délai de 6-8 semaines est plus sûr pour écarter tout risque de GvHD
Chimiothérapie	3-4 semaines, en fonction de l'intensité de la chimiothérapie	Récupération des cytopénies exigée
Traitement ciblé sur le SNC	Une semaine	
Agents cytotoxiques/antiprolifératifs de courte durée d'action	3 jours	Récupération des cytopénies exigée
Corticothérapie par voie générale	Idéalement, sept jours pour minimiser l'effet potentiel sur le recueil des lymphocytes	Un délai plus court, voire réduit à trois jours, est considéré comme acceptable. Quel que soit le calendrier, un CAL > 0,2 x 10 ⁹ /L est souhaitable, en raison de l'effet probable d'une corticothérapie récente sur la qualité des lymphocytes.

Abréviations : allo-CSH : allogreffe de cellules souches hématopoïétiques ; GvHD : maladie du greffon contre l'hôte ; DLI : perfusion de lymphocytes du donneur (*donor lymphocyte infusion*) ; CAL : compte absolu des lymphocytes.