

# CAR-T THERAPY: THE ROLE OF THE HEMATOPOIETIC STEM CELL PROCESSING LABORATORY

LA TERAPIA CAR-T: IL RUOLO DEL LABORATORIO DI PROCESSAZIONE CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE

## Authors

Roberta Neri<sup>1</sup>, Mauro Patrone<sup>1</sup>, Marco Ladetto<sup>2</sup>, Lia Mele<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica (DiSIT), Università del Piemonte Orientale, Alessandria, Italy

<sup>2</sup> Dipartimento di Medicina Traslazionale, Università del Piemonte Orientale e AO "SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo", Alessandria, Italy.

<sup>3</sup> SC Medicina Trasfusionale-laboratorio di Processazione CSE, AO "SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo", Alessandria, Italy.

## Original article

**Key words:** Terapia CAR-T, Laboratorio di Processazione Cellule Staminali Emopoietiche, Accreditamento, Linfocitoferesi, Criopreservazione

## ABSTRACT

**Objectives:** Purpose of this paper is to review all the phases that involved, for the first time, the SC of Hematology and the SC of Transfusion Medicine, specifically, the CSE Processing laboratory, in implementing an innovative operative protocol of gene immunotherapy due to the inclusion of the first patient, affected by diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), stage IV, into the CAR-T therapeutic program. The program took place within the SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo Hospital of Alessandria.

**Methods:** Firstly, lymphocytes are taken from the patient through a technique called lymphocytoapheresis and inserted into a blood bag. The blood bag is sent to the CSE Processing laboratory, where, after sampling, the following steps are carried out: cell manipulation, possible cryopreservation of the product and subsequent dispatch to specialized production centers, called: Cell Factory. In this laboratory,

lymphocytes will be genetically manipulated to be able to express the CAR receptor and co-stimulating factors and, finally, expanded. After 4 weeks, the engineered lymphocytes will return as drug to the CSE Processing laboratory to be reinfused to the patient.

**Results:** At the end of the operative procedure a report is compiled. The report is issued by the laboratory and contains all the information of interest to the clinician.

**Conclusions:** The purpose of my annual experience as a graduate student was to describe the role of the CSE Processing laboratory within the drug production chain. Being experimental and extremely innovative, T-cell-based gene therapy cannot be considered

a routine practice. The centers authorized to administer the CAR-T are identified by the Regions and must possess specific organizational and infrastructural requirements. Even the manufacturers of CAR-T therapies have a qualification path that involves inspection by the company's monitors and a final audit. The Processing laboratory, together with the Apheretic collection laboratory, Pharmacy and Hematology, obtained the qualification of "European site Qualified for KYMRIA<sup>®</sup> (tisagenlecleucel) and YESCARTA<sup>®</sup> (axicabtagene ciloleucel) in 2021."

## ABSTRACT

### Obiettivi

Scopo di questo elaborato è quello di ripercorrere tutte le fasi che hanno coinvolto, per la prima volta, all'interno dell'Azienda Ospedaliera SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria, la SC di Ematologia e la SC di Medicina TrASFusionale, nello specifico, il laboratorio di Processazione CSE, nel mettere in atto un protocollo operativo innovativo di immunoterapia genica in occasione dell'inserimento all'interno del programma terapeutico CAR-T del primo paziente ematologico affetto da Linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL), IV stadio.

### Metodi

I linfociti T, prelevati dal paziente, attraverso una procedura di linfocitoaferesi, sono destinati al laboratorio di Processazione Cellule Staminali Emopoietiche (CSE). La sacca contenente i linfociti T viene inizialmente campionata per i controlli di qualità ed eventualmente criopreservata prima di essere inviata alla cell factory aziendale. Qui i linfociti verranno manipolati geneticamente per poter esprimere il recettore CAR e i fattori di co-stimolazione e, infine, espansi. Dopo circa 4 settimane, i linfociti ingegnerizzati torneranno come farmaco al laboratorio di Processazione CSE per essere reinfusi al paziente.

### Risultati

Alla fine della procedura operativa viene compilato un referto, emesso dal laboratorio, contenente tutte le informazioni di interesse per il clinico.

### Conclusioni

Descrivere il ruolo del laboratorio di Processazione CSE all'interno della catena produttiva del farmaco è frutto della mia esperienza annuale come tesista all'interno del laboratorio. Essendo, la terapia genica a base di cellule T sperimentale ed estremamente innovativa non può essere considerata una pratica di routine. I centri autorizzati alla somministrazione delle CAR-T sono identificati dalle Regioni e devono essere in possesso di specifici requisiti organizzativi e infrastrutturali. Anche le stesse aziende produttrici di terapie CAR-T dispongono di un percorso di qualifica che prevede l'ispezione da parte di monitor dell'azienda stessa e un audit finale. Il laboratorio di Processazione, insieme al settore di raccolta Aferetica, alla Farmacia e all'Ematologia, ha ottenuto nel 2021 la qualificazione di "European site Qualified for KYMRIA<sup>®</sup> (tisagenlecleucel) and YESCARTA<sup>®</sup> (axicabtagene ciloleucel)."

## INTRODUZIONE

Se per tanto tempo Chemioterapia e Radioterapia sono state le uniche terapie disponibili per le malattie oncologiche, ad oggi, la **terapia genica** offre una serie di trattamenti destinati a diventare la nuova frontiera nella cura contro il cancro. Le "CAR-T" (dall'acronimo inglese "Chimeric Antigen Receptor T cell therapies" ovvero "Terapie a base di cellule T esprimenti un Recettore Chimerico per antigene") sono nuove terapie personalizzate contro il cancro che agiscono direttamente sul sistema immunitario del paziente per renderlo in grado di riconoscere e distruggere le cellule tumorali (Figura 1); questo è il processo alla base dell'immunoterapia **adoptive cell transfer (ACT)**.

Il processo di manipolazione genetica determina l'espressione sulla superficie del linfocita T del recettore chimerico dell'antigene (CAR) [in verde scuro]. Questo permette di riconoscere l'antigene specifico della cellula tumorale e avviare il processo di attacco (Armeni P. et. al, 2020)

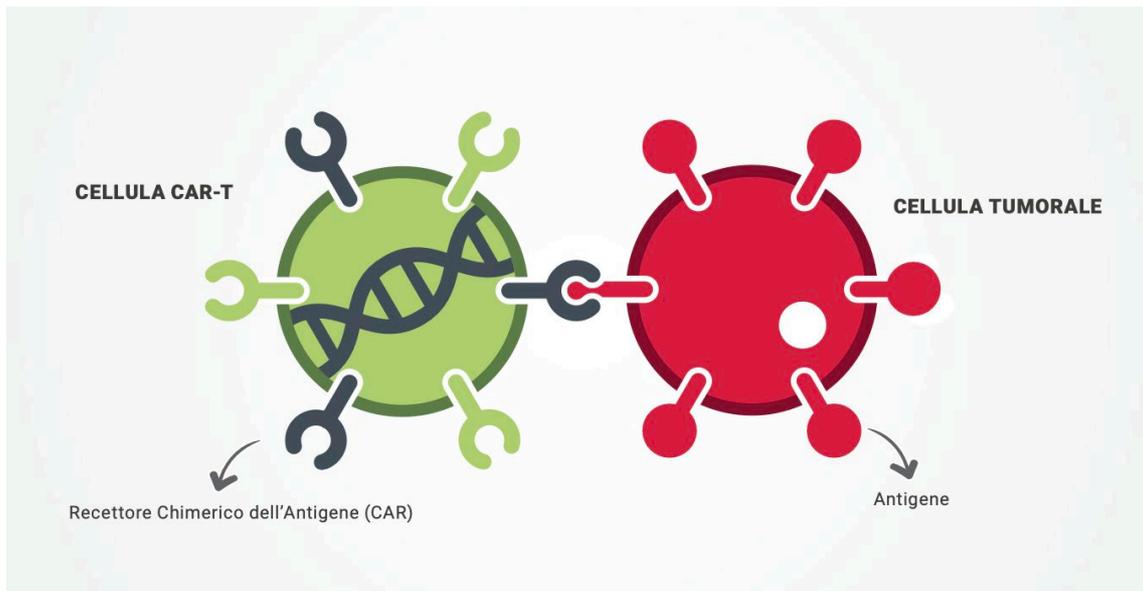
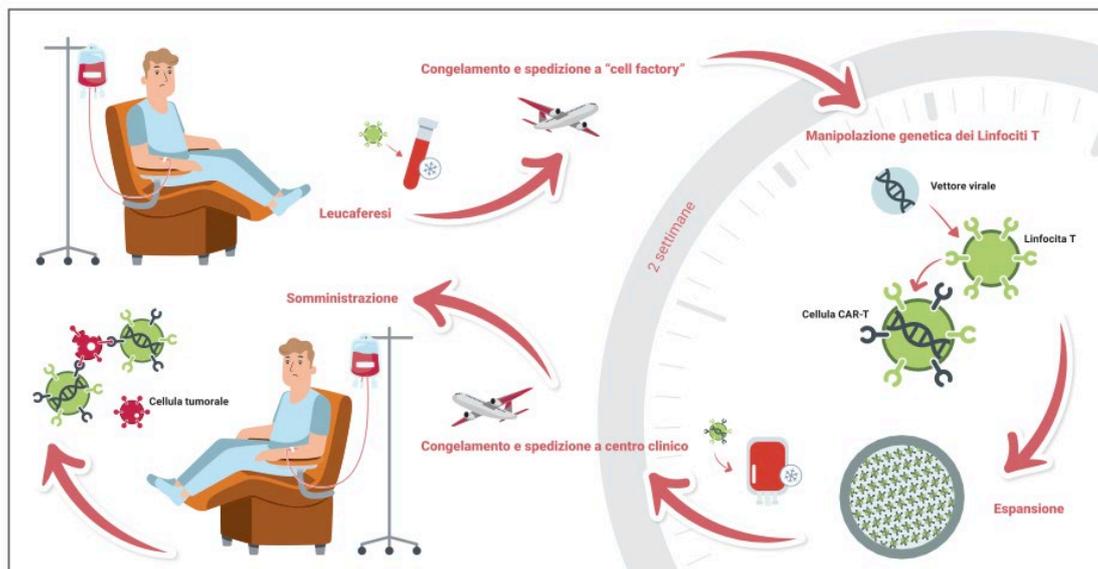


Figura 1: La cellula CAR-T

Le CAR-T rientrano tra le cosiddette terapie avanzate, frutto dei progressi scientifici nel campo delle biotecnologie cellulari e molecolari. Sono, più nello specifico, terapie geniche, poiché agiscono attraverso l'inserzione di materiale genetico all'interno delle cellule dell'organismo umano. Le cellule CAR-T utilizzano specifiche *cellule immunitarie*, i linfociti T, che sono prelevati dal paziente, ingegnerizzati, per poi essere reinfusi nel paziente stesso al fine di attivare la risposta del sistema immunitario contro la malattia (Figura 2) (AIFA: Agenzia Italiana del Farmaco, 2019).

Figura 2: Produzione e somministrazione della CAR-T, dal paziente al paziente (Armeni P. et. al, 2020)



I vantaggi dell'immunoterapia con cellule CAR-T rispetto all'impiego di anticorpi monoclonali comprendono la capacità di *eliminare anche cellule tumorali che esprimono una bassa densità di molecola bersaglio*, l'abilità di proliferare e auto-amplificarsi in seguito ad attivazione e una miglior distribuzione e infiltrazione nei tessuti. Inoltre, le cellule CAR-T sono cosiddette terapie "vive" in quanto caratterizzate dalla possibilità di entrare nel pool di cellule della memoria che, persistendo nel tempo, forniscono una miglior protezione a lungo termine dalle recidive di malattia. Grazie a questa tecnologia e all'attacco specifico delle cellule CAR-T verso una molecola chiamata CD19, sono stati ottenuti risultati straordinari in termini di risposta al trattamento in pazienti, pediatrici e giovani adulti, affetti da leucemia linfoblastica acuta a precursori B-cellulari refrattaria/recidivata e in pazienti adulti affetti da linfomi a grandi cellule B che avevano fallito almeno due linee di trattamento convenzionale (Belardelli G., 2019). Nonostante questo, le cellule CAR-T non sono prive di effetti collaterali, l'utilizzo di questa terapia è spesso associato all'insorgenza di eventi avversi

anche gravi, per esempio possiamo avere la sindrome da rilascio di citochine (SRC), la riduzione dei linfociti B e degli anticorpi e infine reazioni avverse neurologiche (Shimabukuro-Vornhagen A., 2018), (Hirayama A.V., 2019). Per quanto riguarda il valore delle CAR-T, esso si aggira mediamente sui 350,000 €. Data la natura "one-shot" del trattamento, il prezzo dei farmaci ad oggi approvati, KYMRIAH® (tisagenlecleucel) e YESCARTA® (axicabtagene ciloleucel), coincide con il costo terapia per paziente, il quale si determina sulla base di alcune motivazioni. La prima è che l'investimento sostenuto e il processo produttivo delle cellule CAR-T è estremamente complesso. Si tratta, infatti, di un processo di produzione personalizzato, fatto ad hoc per ogni singolo paziente, a differenza di quanto succede per i farmaci la cui produzione, pur spesso complessa, è scalabile e programmabile in modo strategico. La seconda motivazione alla base della definizione del prezzo è dovuta alla popolazione di riferimento cui sono state destinate finora queste terapie, un target molto limitato, con un basso numero di pazienti. Nonostante l'elevato costo unitario per paziente delle terapie CAR-T, l'incertezza sugli effetti ed il disallineamento temporale tra i costi sostenuti per le terapie e benefici, le terapie CAR-T sono di fatto rimborsate in tutti i principali Paesi Europei. In Italia, è stato messo in atto un meccanismo di pagamento particolare, detto "payment at results". Il pagamento della terapia viene diviso in tre tranche: la prima pagata al momento dell'infusione, la seconda a sei mesi e la terza a dodici mesi. Le ultime due sono quindi determinate dai risultati ottenuti. (AIFA Report tecnico Kymriah®, 2020), (AIFA Report tecnico YescartaTM, 2020).

#### L'iter di accreditamento di un centro che somministra CAR-T

Il percorso che conduce un centro clinico alla possibilità di somministrare terapie complesse come quelle a base di cellule CAR-T è strutturato su diversi livelli:

Un primo livello istituzionale, definito dall'aderenza alle Linee Guida diffuse dall'AIFA che stabiliscono quali siano i centri che tecnicamente hanno la possibilità di somministrare le CAR-T. Questi devono essere autorizzati ad effettuare il trapianto allogenico di cellule staminali del sangue e sono in possesso di un accreditamento JACIE per il trapianto allogenico in tutte le sue componenti (EBMT - European Society for Blood and Marrow Transplantation. JACIE Accreditation). Un secondo livello regionale, chiamato così poiché l'autorizzazione alla somministrazione del farmaco è demandata alle Regioni, le quali hanno la facoltà di individuare al loro interno uno o più centri che soddisfino i suddetti requisiti.

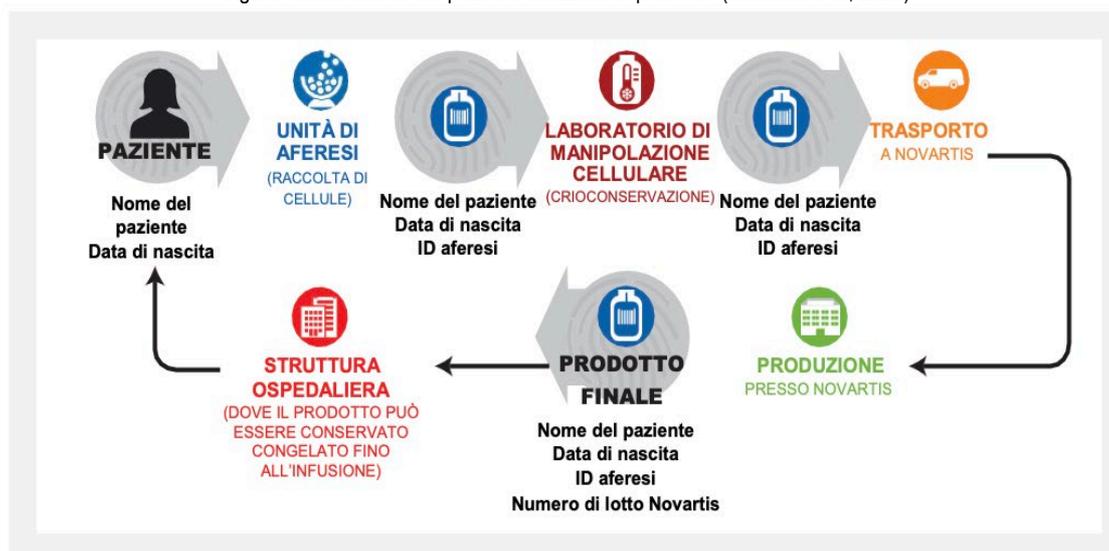
Il processo di qualifica inizia con l'invio da parte del produttore della documentazione che descrive i requisiti tecnici. A questa fa seguito un primo incontro tra i rappresentanti dell'azienda e i referenti del centro. A tutto ciò fa seguito un audit, con un team di ispettori dell'azienda che verifica sul campo la presenza dei requisiti tecnici richiesti. Viene dunque inviato un report con le osservazioni del team ispettivo e le eventuali richieste di adeguamento, a cui il centro risponde con una documentazione che attesti l'attuazione degli adeguamenti richiesti. L'azienda produttrice emette l'attestazione di qualifica al momento in cui la documentazione inviata dal centro viene considerata soddisfacente.

#### La catena d'identità (COI)

La catena d'identità (COI) (Figura 3) all'interno di un percorso ampio come la produzione di cellule CAR-T, che prevede la collaborazione di più strutture specializzate, è fondamentale per garantire la tracciabilità e il monitoraggio dettagliato di tutti i materiali e i dati del paziente in ogni fase del processo (Randhawa G., 2020).

L'autorizzazione per l'eleggibilità del paziente viene attribuita dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) e deve essere richiesta dall'ematologo della struttura ospedaliera di interesse. Una volta ottenuto il consenso, il medico si occuperà di inserire i dati del paziente in CellChain\*<sup>1</sup>. A questo punto, la Farmacia confermerà che l'anagrafica del paziente sia corretta e, potrà così partire l'aferesi. Tutti i dati relativi a questa procedura e alla manipolazione cellulare, compreso il congelamento del materiale, saranno inseriti all'interno del modulo ADF\*<sup>2</sup>.

Figura 3: Identificativi del paziente utilizzati nel processo (Randhawa G., 2020)



\*1CellChain: portale online di Novartis che coordina la produzione e la logistica nella gestione del processo CAR-T.

\*2ADF: modulo dati di aferesi (ADF) presente all'interno della piattaforma CellChain, comunica online a Novartis le informazioni sul paziente, sull'aferesi, l'analisi del materiale di leucaferesi e la procedura di crioconservazione.

### Storia clinica del paziente

Tabella 1: storia clinica del paziente

<i>Anno</i>	<i>Anamnesi ematologica</i>	<i>Terapia</i>
2017	Linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) stadio IV B IPI 2; fenotipo "germinal center"	R-CHOP* <sup>1</sup> x6 + 2 Rituximab
2018	Recidiva	Terapia di 2° linea: protocollo sperimentale REC-ANZ, 3 cicli di R-DHAP* <sup>2</sup> + raccolta di cellule staminali periferiche (CSP) (raccolta pari a 2,42 CD34 <sup>+</sup> x10 <sup>6</sup> /Kg)
2019		ABTM con reinfusione di CSP pari a 2,42 CD34 <sup>+</sup> x10 <sup>6</sup> /Kg
2021	Recidiva	Terapia di 3°linea: in considerazione del quadro di recidiva di malattia dopo 2 anni dal trapianto autologo si è deciso di sottoporre il paziente a terapia secondo schema R-ICE* <sup>3</sup>
<b>Conclusioni e programma consigliato</b>		
Seconda recidiva tardiva di Linfoma diffuso a grandi cellule B, stadio IIIA non bulky. IPI 1 (età) e post trapianto autologo (2019). Sulla base dell'anamnesi attuale e dopo la terapia di terza linea secondo lo schema R-ICE, il paziente è candidato all'avvio del programma CAR T.		

\*1La definizione CHOP, con la quale convenzionalmente si definisce questo trattamento, deriva dalle iniziali dei chemioterapici di cui esso si compone, vale a dire ciclofosfamide, adriamicina (detta anche doxorubicina), vincristina, a cui si associa un farmaco steroideo, il prednisone.

\*2R-DHAP è l'acronico del regime chemioterapico in associazione con il farmaco Rituximab. Di solito viene somministrato per 2-3 cicli, poi seguito da chemioterapia ad alte dosi e trapianto autologo di cellule staminali.

Il regime R-DHAP consiste in:

- Rituximab: un anticorpo monoclonale, diretto contro l'antigene di superficie delle cellule B CD20;
- Desametasone: un ormone glucocorticoide;
- H: ad alto dosaggio;
- Aracitarabina: un antimetabolita;
- Platino (cisplatino): un antineoplastico a base di platino e alchilante.

\*3 In caso di tumori linfoidi a cellule B CD20-positivi, il regime ICE è spesso combinato oggi con rituximab. Questo regime viene quindi chiamato R-ICE.

Il regime R-ICE consiste in:

- Rituximab: un anticorpo monoclonale anti-CD20, che è in grado di uccidere le cellule B portatrici di CD20 sia normali che maligne;
- Ifosfamide: un agente antineoplastico alchilante del gruppo oxazafosforine;
- Carboplatino: un farmaco antineoplastico a base di platino, anche un agente antineoplastico alchilante;
- Etoposide: un inibitore della topoisomerasi.

## PROTOCOLLO OPERATIVO

L'unità di Aferesi, tramite una procedura di linfocitoaferesi, preleva al paziente una sacca di sangue periferico contenente i linfociti CD3+.

L'azienda che effettuerà l'ingegnerizzazione dei linfociti ha elaborato un manuale con alcune indicazioni a cui sia il settore di Aferesi sia quello di Processazione devono attenersi, pena la non idoneità del materiale:

- Conta dei linfociti CD3+:  $\geq 1 \times 10^9$  cellule CD3+
- Conta TNC:  $\geq 2 \times 10^9$  cellule TNC
- CD3+% di TNC:  $\geq 3\%$

La sacca è poi inviata al laboratorio di Processazione CSE, dove, per prima cosa, si esegue il campionamento della sacca per effettuare i controlli di qualità:

1. Emocromo per valutare il numero di globuli bianchi
2. Conteggio in citofluorimetria dei linfociti CD3+
3. Emocoltura per la ricerca di batteri aerobi, anaerobi e funghi

Successivamente, si procede con il trasferimento del campione in una sacca adatta alla centrifugazione, si pesa la sacca e dal risultato ottenuto si sottrae la tara.

La centrifugazione della sacca è una procedura fondamentale perché permette di separare i componenti presenti all'interno ottenendo così, sul fondo, i globuli rossi, al centro il buffy coat all'interno del quale si trovano i linfociti e, come surnatante, il plasma che verrà utilizzato per la soluzione di congelamento.

A questo punto si può procedere con i calcoli:

Il target di concentrazione finale deve essere di  $1 \times 10^8$  WBC/mL in formulazione criogenica. L'intervallo target deve essere compreso tra  $0,5 \times 10^8$  e  $2,5 \times 10^8$  WBC/mL (da  $50 \times 10^3$  a  $250 \times 10^3$  WBC/ $\mu$ L).

Calcolare la concentrazione finale di WBC al congelamento mediante la formula:

Vol. iniziale (mL) x (WBC x  $10^3$ /mL)/Vol. finale (mL)

Si può decidere in quante sacche suddividere il nostro campione restando all'interno del range di WBC richiesto per ogni sacca.

Una volta appurato il volume finale e aver deciso la suddivisione delle sacche si procede calcolando il quantitativo di plasma necessario per la soluzione di congelamento, composta da una percentuale di plasma autologo del paziente e una percentuale di Dimetilsolfossido (DMSO).

### Manipolazione cellulare

L'intera procedura è svolta in condizioni di sterilità, all'interno di una cleanroom sotto cappa biohazard Faster, Classe II secondo EN12469.

Si procede tramite la vestizione dei DPI necessari:

- Cuffia copricapo
- Camice sterile
- Calzari
- Mascherina

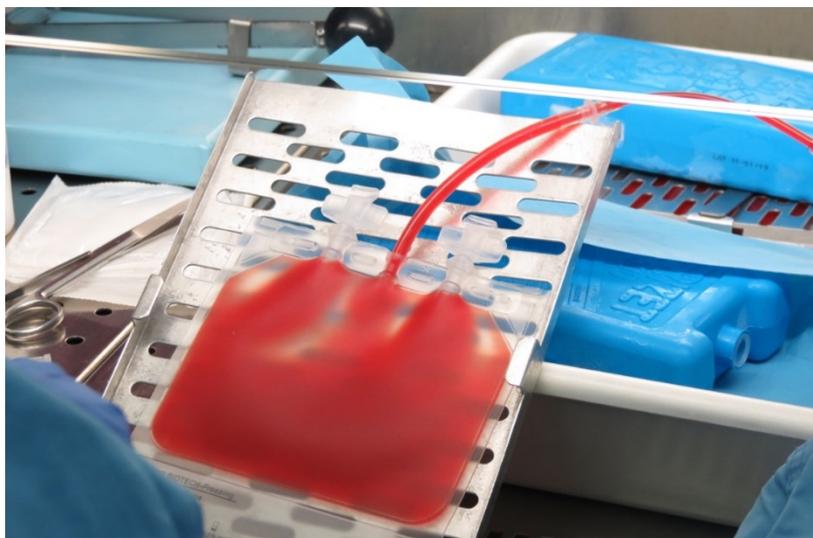
Una volta estratta la sacca dalla centrifuga ogni componente risulterà essere ben separato, per prima cosa, con l'aiuto di un estrattore di plasma si preleva il plasma dalla sacca e lo si inserisce all'interno di una provetta Falcon. Anche il campione verrà prelevato dalla sacca da centrifuga e inserito in due nuove sacche adatte alla criopreservazione. La soluzione di congelamento, composta da plasma e Dimetilsolfossido (DMSO), sarà preparata all'interno della sacca da centrifuga rimasta vuota. Si preleva dunque il plasma e lo si inserisce all'interno della sacca, allo stesso modo, si procede con il Dimetilsolfossido, avendo però l'accortezza di porre la sacca all'interno di una vaschetta ri-piena di ghiaccio: il Dimetilsolfossido (DMSO) è un crioprotettore, legandosi all'acqua rallenta la formazione di cristalli di ghiaccio evitando lo shock da iperosmolarità che si produce durante la loro formazione, tuttavia, sviluppa calore, per questo motivo è importante mantenere sempre sotto controllo la temperatura. Pronta la soluzione di congelamento verrà distribuita all'interno delle sacche in cui è stato inserito il campione. Dalla seconda sacca, come riportato nei calcoli, si rimuovono 6mL di prodotto, 1mL per 5 criovials e 1mL per il set di emocoltura (Figura 4).

Figura 4: le criovials saranno utilizzate per test di vitalità cellulare, mentre il set di emocoltura sarà inviato al laboratorio di microbiologia per la verifica di possibili contaminazioni



A questo punto, si inseriscono le sacche all'interno delle griglie per la crioconservazione (Figura 5).

Figura 5: griglia metallica utilizzata per mantenere schiacciata la sacca dopo aver rimosso correttamente l'aria presente all'interno



Una volta terminato il processo di manipolazione cellulare segue la fase di congelamento.

## Congelamento

È necessario effettuare il congelamento a velocità controllata sia delle sacche sia delle criovials di controllo qualità (QC), utilizzando lo strumento Ice Cube 14s: congelatore a velocità controllata.

Le cellule devono stabilizzarsi in vapori di azoto liquido ad una temperatura pari o inferiore a  $-120^{\circ}\text{C}$  per almeno una notte (8 ore) (Figura 6).

Figura 6: la sacca al termine della discesa programmata risulta essere congelata e pronta per essere crioconservata prima della spedizione



## Trasporto e imballaggio

Le sacche saranno inviate alla cell factory aziendale in cui avverrà il successivo passaggio nella catena produttiva di una cellula CART: l'ingegnerizzazione con l'inserimento del recettore CAR.

La spedizione del materiale di leucoaferesi crioconservato avverrà tramite un corriere specializzato e dovrà essere spedita nel dry vapor shipper (Figura 7) fornito dall'azienda farmaceutica e consegnato dal corriere.

Il dry vapor shipper è stato progettato per il trasporto sicuro di campioni biologici a temperature criogeniche ed è costituito da due componenti:

- Un contenitore esterno di protezione per la spedizione.
- Un dewar chiuso caricato con azoto liquido. All'interno del dewar, l'azoto liquido viene assorbito in un sistema di isolamento composto da schiuma.

Le temperature verranno continuamente monitorate durante la spedizione da una sonda di temperatura all'interno del dewar collegata ad un data logger applicato al coperchio del dewar.

Figura 7: Dry vapor shipper: può contenere un massimo di 4 criosacche più relative vials di controllo qualità (QC) oppure 5 criosacche



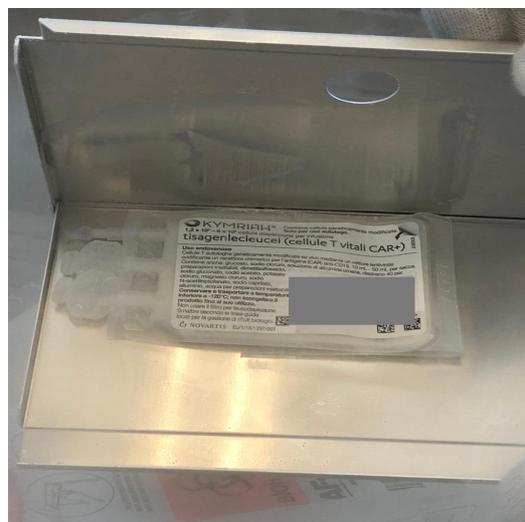
Il materiale di leucoferesi crioconservato deve essere mantenuto in vapori di azoto per equilibrarsi durante la notte (8 ore). Si estraggono le sacche dai vapori e si inizia la procedura di imballaggio secondo le linee guida fornite dall'azienda.

A questo punto, le cassette imballate, contenenti il materiale di leucoferesi crioconservato e le vials di controllo qualità (QC), vengono caricate nel supporto/rack di metallo. Si procede chiudendo il dry shipper e controllando sempre che tutta l'etichettatura sia corretta.

### Ricezione del farmaco

All'incirca un mese dopo la spedizione, il farmaco (Figura 8) viene rispedito all'unità di Processazione per essere stoccato in azoto liquido in attesa dell'infusione al paziente.

Figura 8: Tisagenlecleucel: farmaco a base di cellule T vitali CAR+



## RISULTATI

Alla fine della procedura operativa viene compilato un referto con le informazioni di interesse per il clinico. Tutti i dati sono riassunti nel referto: Linfocitoferesi per CAR-T (Figura 9) emesso dal laboratorio.

Figura 9: REFERTO: Linfocitoferesi per CAR-T

 Azienda Ospedaliera di ALESSANDRIA Santi Antonio e Biagio e Cesare Arrigo	<b>REFERTO</b> <b>Linfocitoferesi per CAR-T</b> <b>NOVARTIS</b>		Mod STUT CAR-TN 147	
			Rif. PSTUT CAR-TN 111	Pag. 1 di 2
			Rev. 00	del
Paziente		nato il:		
Diagnosi: Linfoma diffuso a grandi cellule		Reparto: Ematologia		
Peso Paziente				
<b>Data raccolta</b>				
<b>Dati basali</b>				
WBCx10 <sup>9</sup> /µL	4.52			
Hb gr/dl	9.7			
CD3+/µL	923.00			
Previsione CD3+ x10 <sup>9</sup> tot	9.97			
<b>Dati prodotto aferetico</b>				
Volume ml	92.91			
WBCx10 <sup>9</sup> /µL	133.42			
WBC x10 <sup>9</sup> tot	12.40			
Granulociti %				
Mono+Linfo%	99			
Vitalità TNC %	99.60			
CD3+/µL	70983			
CD3+ x10 <sup>9</sup> tot	6.59			
Prove di sterilità	NEG			
<b>Caratteristiche Raccolta</b>				
Separatore cellulare	Spectra Optia			
Volume processato/litri	11900			
Procedura terminata ore	16.06			
Esami validazione	NEG			

 <b>Azienda Ospedaliera di ALESSANDRIA</b> Santi Antonio e Biagio e Cesare Arrigo	<b>REFERTO</b>		Mod. STUT
	<b>Linfocitoaferesi per CAR-T NOVARTIS</b>		CAR-TN 147
			Rev. 00 del <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span>
		RII PSTUT CAR-TN 111	Pag. 2 di 2

N° Unità	SACCA 021621004993-R1 SACCA	SACCA 021621004993-R2 SACCA			TOTALE
Volume (ml)	40	34			
CD3+ x 10 <sup>9</sup> tot	3.29	2.79			6.08
WBC x10 <sup>9</sup> tot	6.20	5.26			11.46
Data aferesi	<span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span>	<span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span>			
Data e Ora crioconservazione	<span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span>	<span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span>			
Vitalità cellulare %	99.6	99.6			
Markers Infettivologici	NEGATIVI				
Prove di sterilità	NEGATIVE				
Stoccaggio prima dell'invio a Novartis	vapori tank 4	vapori tank 4			
Vials di QC 1 mL	1+4 per Novartis				
Operatore					
Data invio a Novartis/Operatori	22/04/2021	22/04/2021			
Data ricezione e stoccaggio KYMRIAH/Operatori	20/05/2021 LUAFQ61 EX 26/01/2022				
Data consegna KYMRIAH all'Ematologia/Operatore	31/05/2021				

Per quanto, la descrizione dell'impiego clinico sia al di là degli obiettivi del lavoro, si segnala che la sacca è poi stata infusa al paziente affetto da linfoma diffuso a grandi cellule in recidiva post-autotrapianto in data 31/05/21. Il paziente ha ben tollerato la procedura senza tossicità di rilievo e appare alla TC in remissione completa, (siamo in attesa della PET).

## CONCLUSIONI

Le terapie avanzate, tra cui le cellule CAR-T, rappresentano la più grande sfida biotecnologica della medicina contemporanea per malattie delle quali non esiste una cura; sono considerati a tutti gli effetti dei veri e propri farmaci e per questo inquadrati all'interno della regolamentazione europea. Nel mondo occidentale l'Italia è il fanalino di coda nell'applicazione di questa terapia con pochissimi pazienti trattati al di fuori delle poche strutture accreditate. L'arrivo di una terapia genica innovativa a base di cellule CAR-T all'interno dell'Azienda Ospedaliera SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo offre speranze e prospettive importanti per la ricerca e la cura contro il cancro. Il successo del processo produttivo è sicuramente da attribuire alla collaborazione tra tutti i settori coinvolti nella produzione: si parte dall'Ematologia, si passa per l'unità di Aferesi, i linfociti T del paziente sono poi manipolati dal laboratorio di Processazione CSE e una volta trasformati nelle cell factory in cellule T esprimenti il recettore CAR, sono pronte per tornare indietro sotto forma di farmaco, coinvolgendo anche la Farmacia. Descrivere il ruolo del settore di Processazione CSE all'interno della catena produttiva del farmaco è frutto della mia esperienza annuale come tesista all'interno del laboratorio. Essendo, **la terapia genica a base di cellule T sperimentale ed estremamente innovativa** non può essere considerata una pratica di routine. I centri autorizzati alla somministrazione delle CAR-T sono identificati dalle Regioni e devono essere in possesso di specifici requisiti organizzativi e infrastrutturali, quali: la certificazione del Centro Nazionale Trapianti in accordo con le direttive UE, l'Accreditamento JACIE per il trapianto allogenico, un centro di Aferesi, un laboratorio di Processazione con personale qualificato ed adeguatamente formato, la disponibilità di un'unità di Terapia Intensiva e la presenza di un team multidisciplinare adeguato alla gestione clinica del paziente e delle possibili complicanze. Anche le stesse aziende produttrici di terapie CAR-T dispongono di un percorso di qualifica che prevede l'ispezione da parte di monitor dell'azienda stessa e un audit finale. In questo contesto il laboratorio di Processazione ha ottenuto la qualificazione di "European site Qualified for KYMRIA<sup>®</sup> (tisagenlecleucel) and YESCARTA<sup>®</sup> (axicabtagene ciloleucel)."

Quella che per molto tempo è stata solo una speranza, finalmente si è concretizzata con l'inserimento del primo paziente all'interno del percorso CAR-T, le brillanti prospettive terapeutiche del farmaco fanno ben sperare che questo paziente possa essere solo il primo di una lunga serie.

## Bibliografia

1. AIFA Report tecnico Kymriah<sup>®</sup> (tisagenlecleucel), (2020). Disponibile a: [https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1028586/Kymriah\\_Report\\_Tecnico\\_03.12.2019.pdf](https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1028586/Kymriah_Report_Tecnico_03.12.2019.pdf)
2. AIFA Report tecnico Yescarta<sup>TM</sup> (axicabtagene ciloleucel), (2020). Disponibile a: [https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1307543/Yescarta\\_Report\\_Tecnico\\_28.07.2021.pdf](https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1307543/Yescarta_Report_Tecnico_28.07.2021.pdf)
3. AIFA: Agenzia Italiana del Farmaco, Le terapie geniche CAR-T, (2019), [https://www.aifa.gov.it/documents/20142/0/Terapie\\_CAR-T.pdf/d02dc46b-b2f6-03a3-5dce-7ac4e7f7b3b8](https://www.aifa.gov.it/documents/20142/0/Terapie_CAR-T.pdf/d02dc46b-b2f6-03a3-5dce-7ac4e7f7b3b8)
4. Armeni P., Ceradini F., Fagioli F. et al. (2020) CELL THERAPY OPEN SOURCE: le terapie car-t, dal laboratorio al paziente, edizione Rarelab Srl, ©Gilead Sciences.
5. Belardelli G. (2019), Car-T rivoluzione anticancro. L'Italia non perda questa sfida". Intervista a Franco Locatelli. Disponibile a: [https://www.huffingtonpost.it/entry/car-t-rivoluzione-anticancro-franco-locatelli\\_it\\_5d9b51e6e4b099389803c8d0](https://www.huffingtonpost.it/entry/car-t-rivoluzione-anticancro-franco-locatelli_it_5d9b51e6e4b099389803c8d0)
6. EBMT - European Society for Blood and Marrow Transplantation. JACIE Accreditation. Disponibile a: [www.ebmt.org/jacie-accreditation](http://www.ebmt.org/jacie-accreditation)
7. Hirayama A.V. and Turtle C. J. (2019), Toxicities of CD19 CAR-T cell immunotherapy, Am J Hematol. 94:S42-S49.
8. Randhawa G. (2019) Novartis Technical Operations, Manuale di riferimento alla leucoafesi di Novartis KYMRIA<sup>®</sup> (tisagenlecleucel) CTL019.
9. Shimabukuro-Vornhagen A., Gödel P. and Subklewe M. et al. (2018), Cytokine release syndrome, Journal for Immunotherapy of Cancer 6:56