

CAR-T

¡hágalo usted mismo!

Daniel Ernst

Laboratorios de Terapia Celular y de Citometría de Flujo

Programa de Linfoma

Clínica Alemana de Santiago

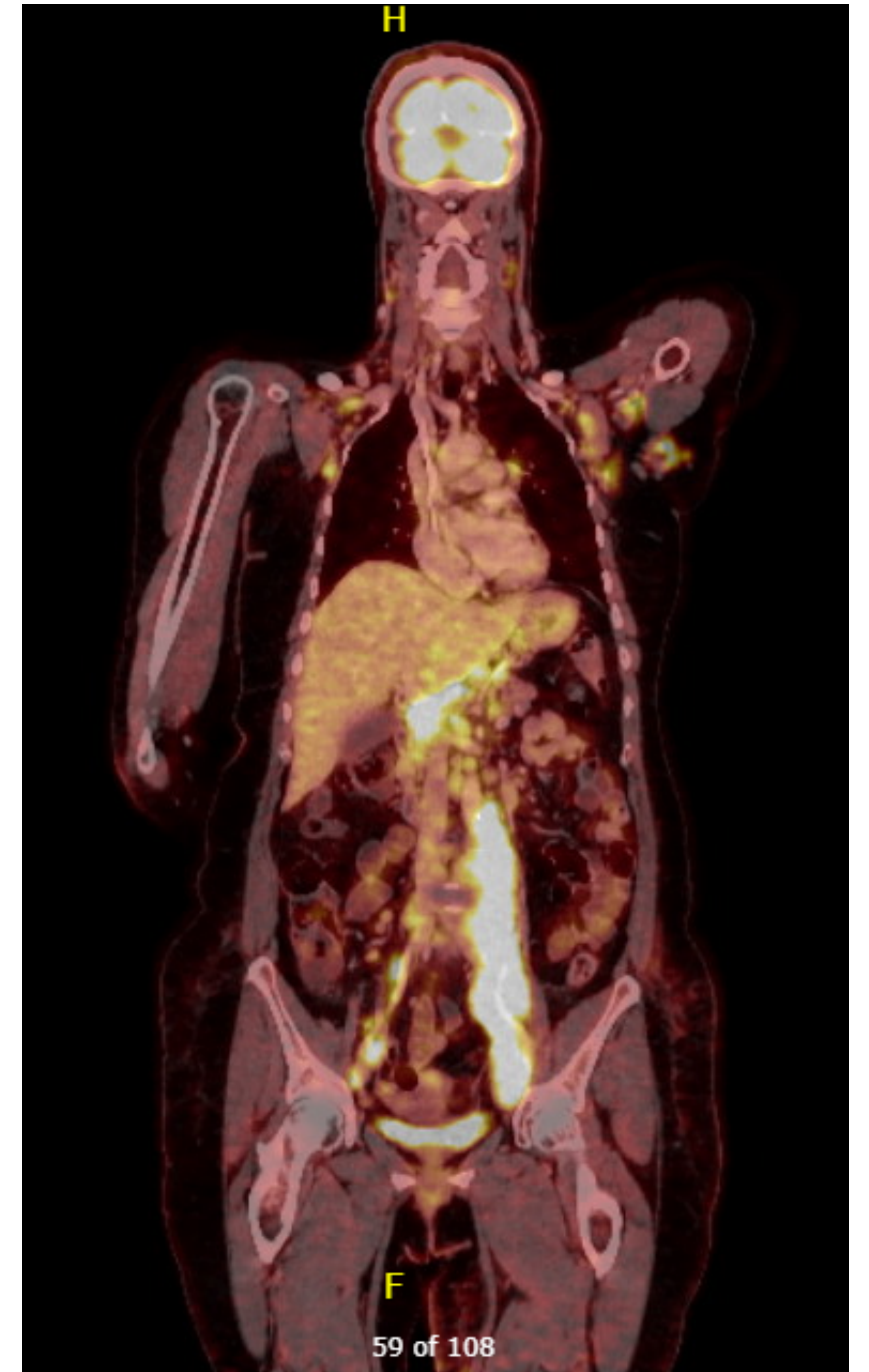
Abril - #LEx2025

Caso Clínico

IHT, mujer - 63a

Sept 2022

- MCL blastoide infiltrante en trompa de Falopio
- Ki-67 60% p53 neg (IHQ)
- MIPIb alto (7.4 pts)
 - proyección - **mOS 37m**



Caso Clínico

IHT - MCL blastoide Ki67 60% MIPIb alto

1L (Sep 2022) - RCHOP/RDHAP - **RMC DS3** - (s/ TAMO) - mantenimiento c/ R

2L (Abr 2023) - Zanubrutinib - **EP** - Zanu + Obinutuzumab - **EP**

3L (Jul 2023) - Ensayo Clínico (MK2140-006) Zilovetamab-vedotin - **RP DS4**

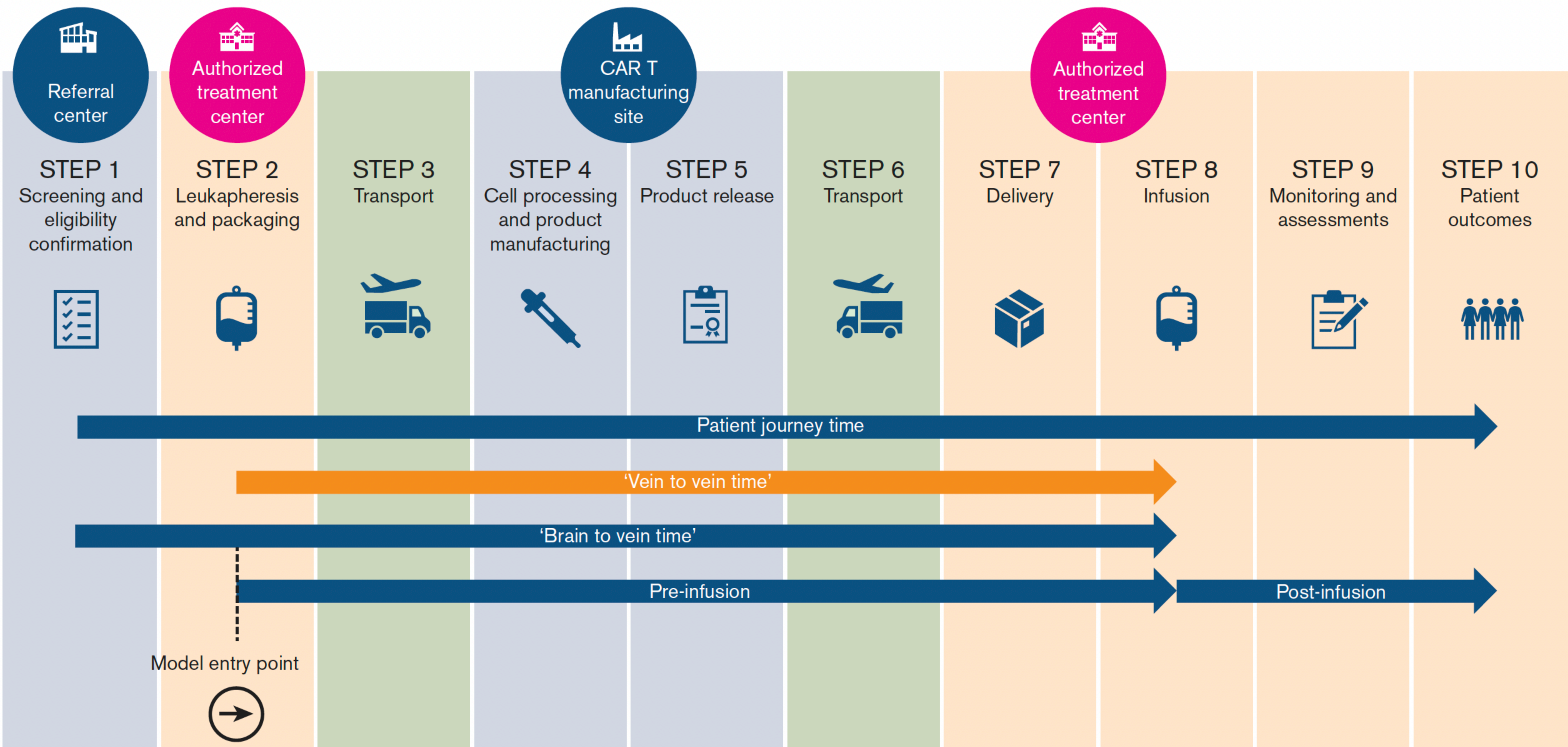
4L (Dic 2023) - Venetoclax + Obinutuzumab (**puente**)

5L (Ene 2024) - CAR-T Académico aCD19-41BB Lentiviral - **RMC DS3**

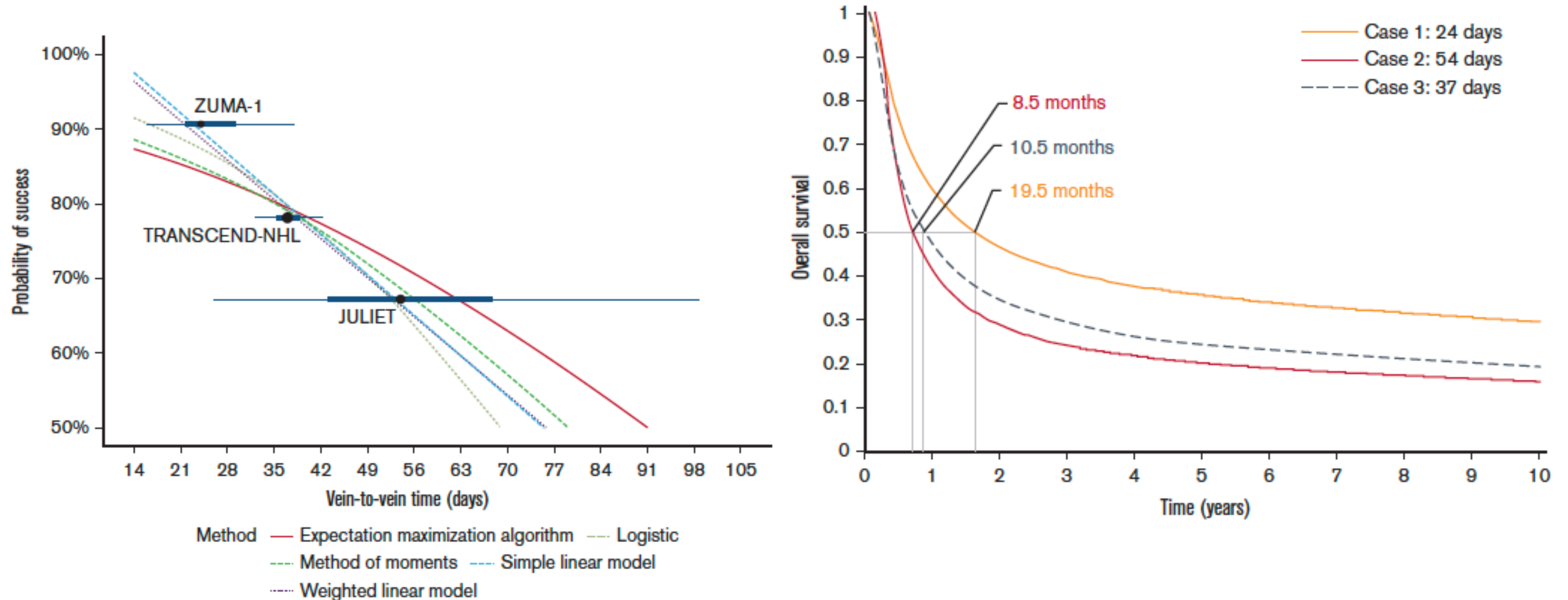
Partamos por el “¿por qué?”

CAR-T

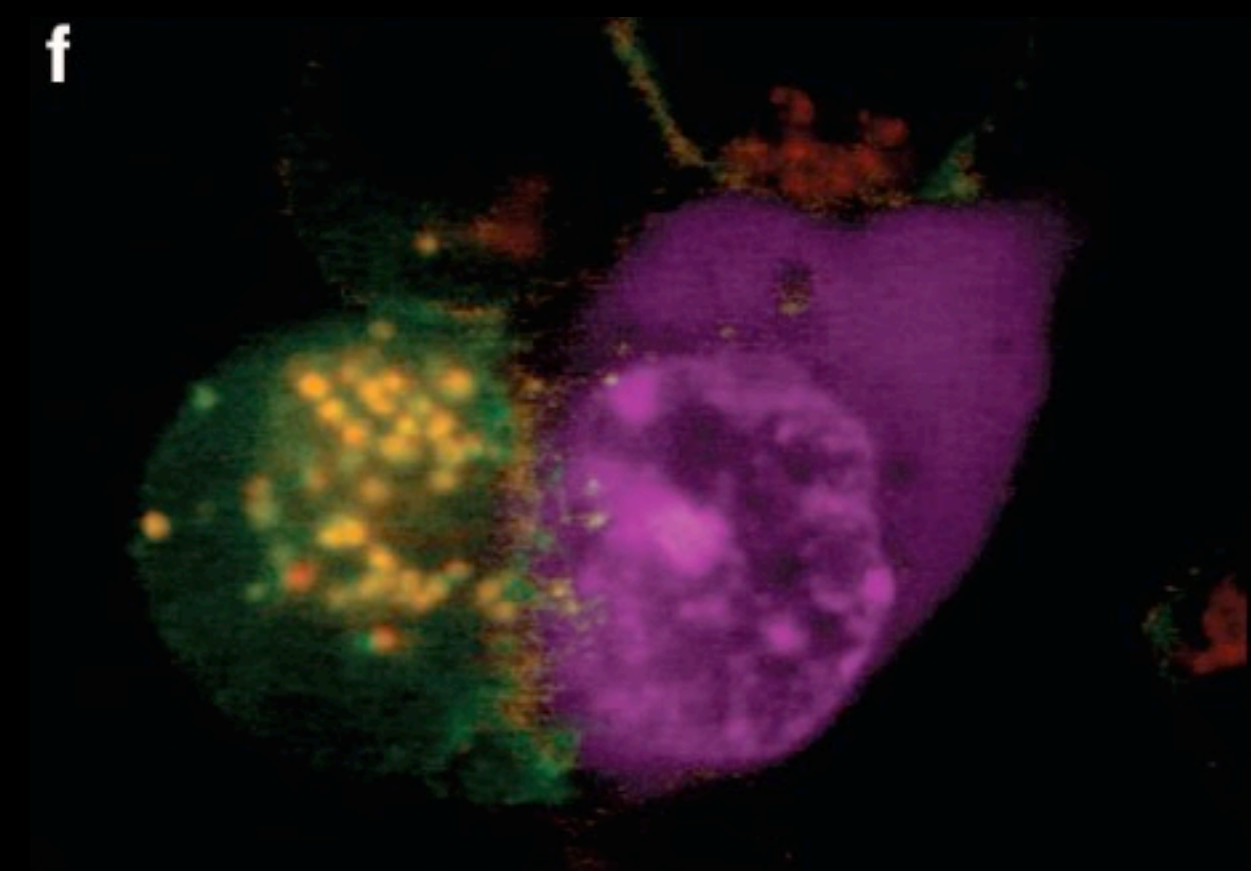
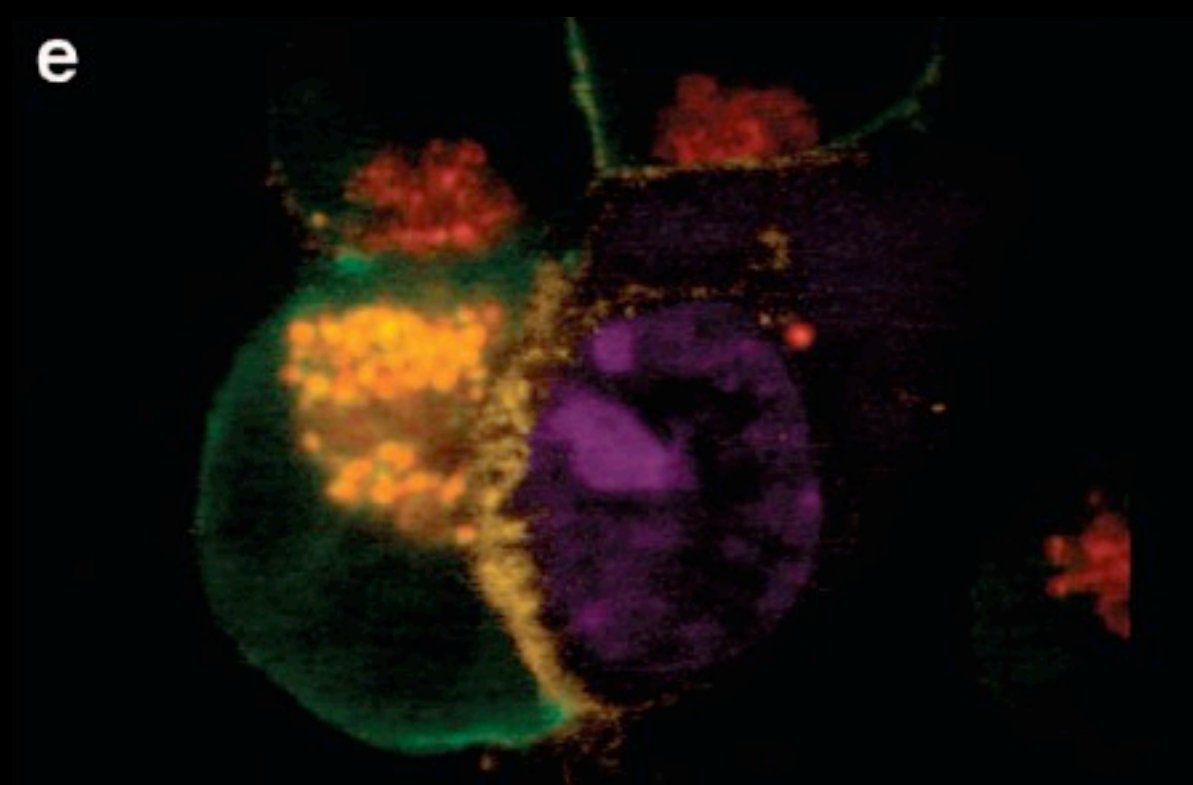
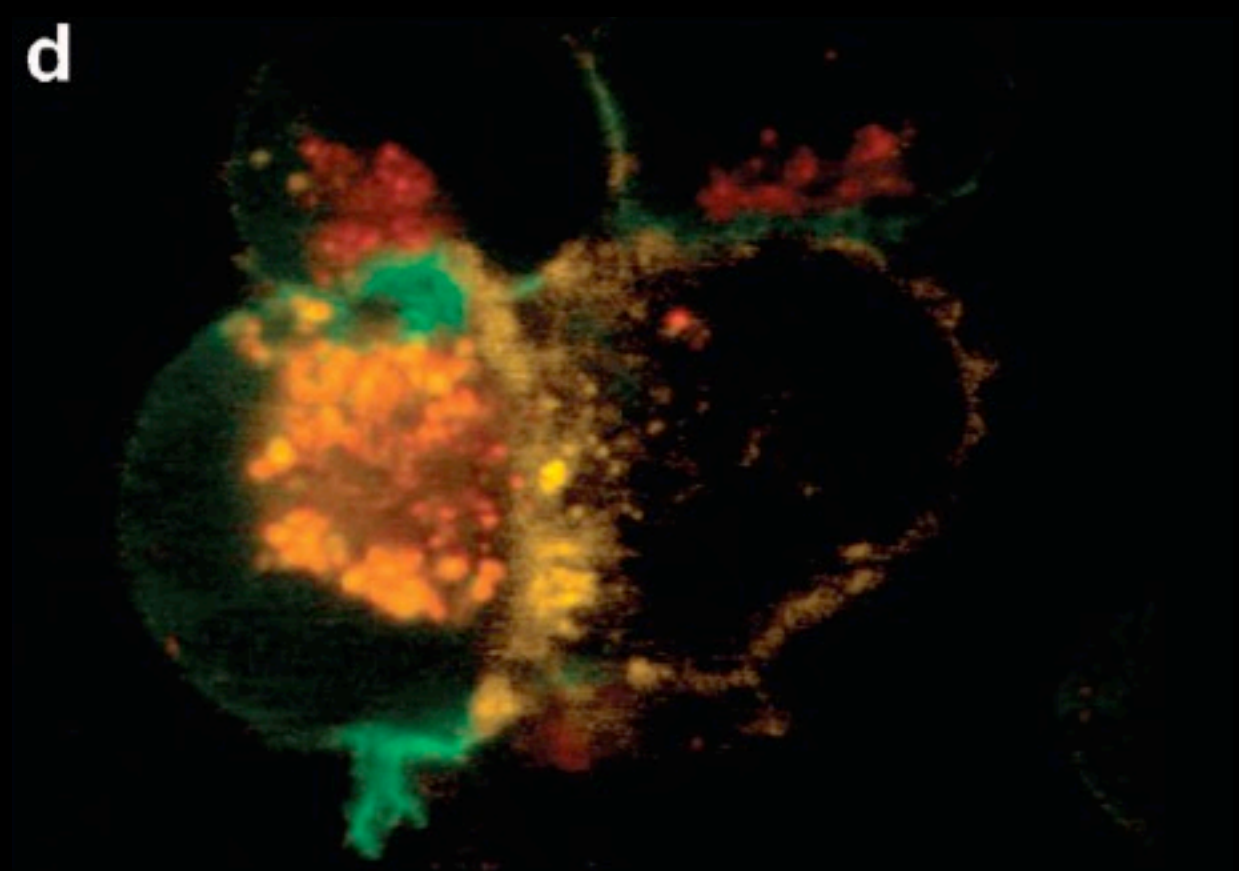
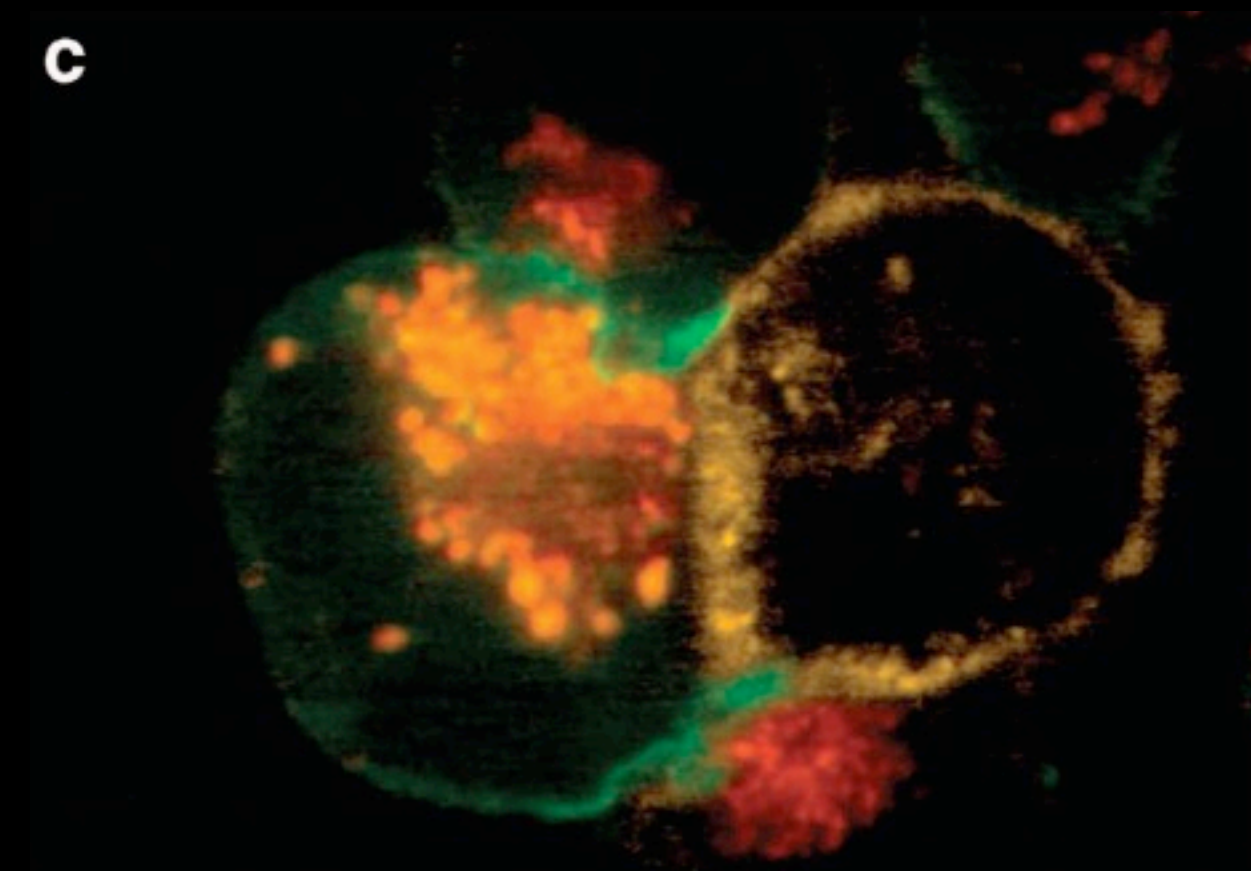
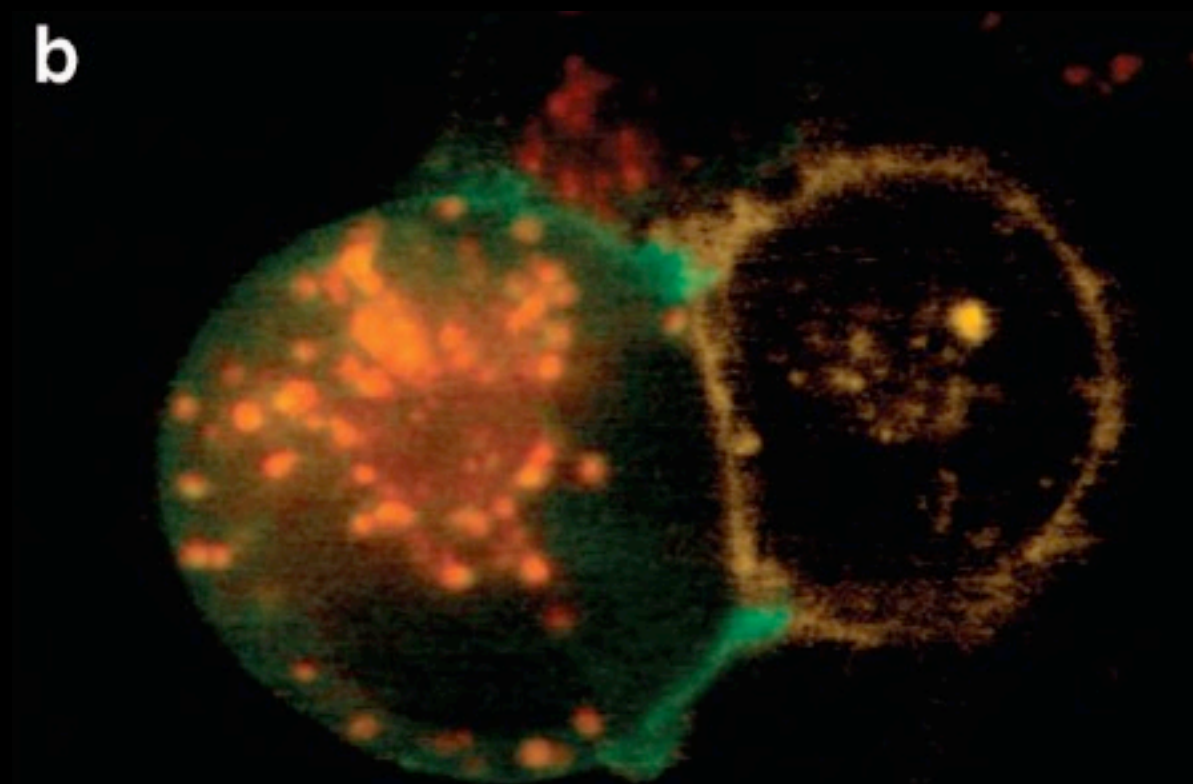
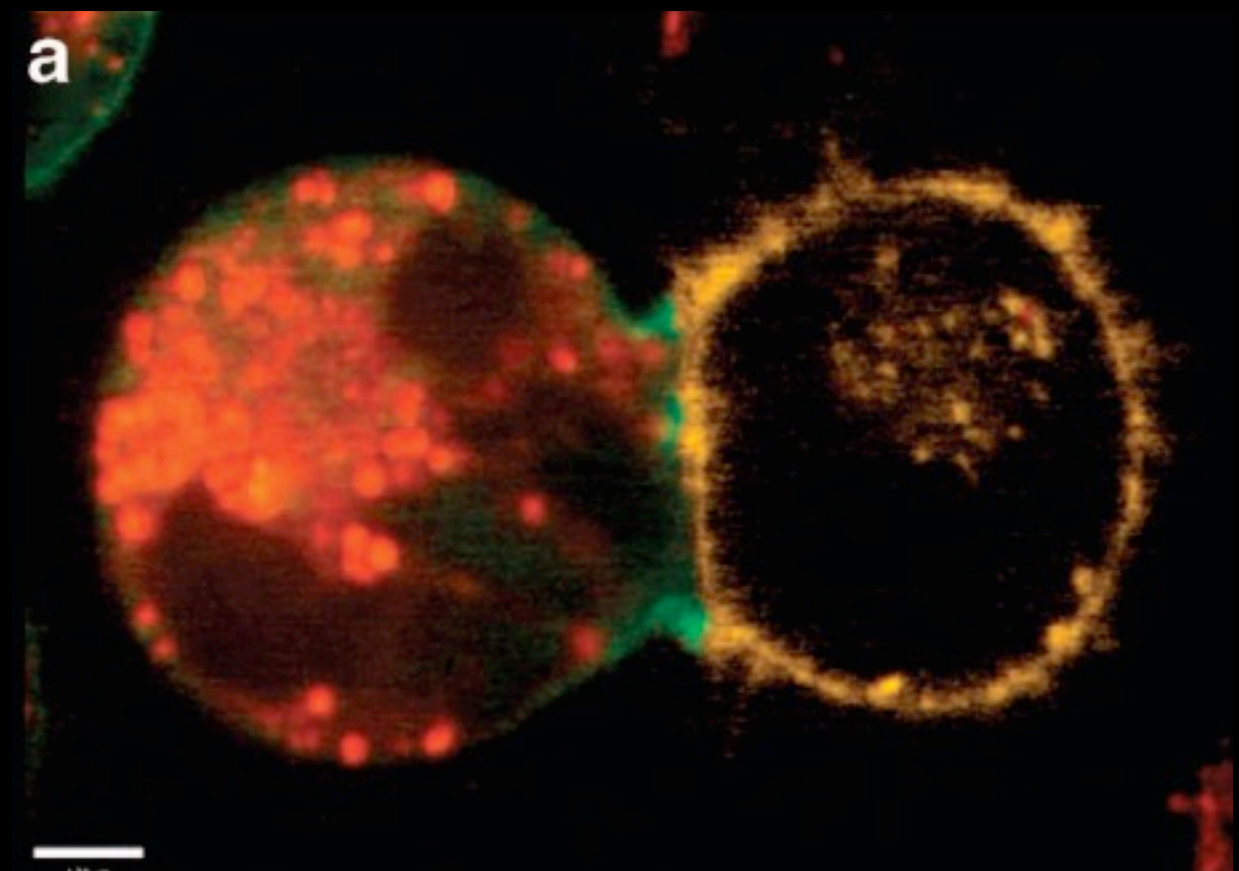
- *Standard of care* en las principales indicaciones de alto riesgo (DLBCL, FL, MCL, CLL)
- Potencial curativo > Trasplante
- **Barreras**
 - Alto Costo (\$300-\$500K **USD**)
 - Complejidad logística (**aféresis - manipulación celular y genética - shipping - criopreservación**)
 - Alta Complejidad Clínica
 - Tiempos **V2V** o **B2V**



“Don’t keep me waiting”: estimating the impact of reduced vein-to-vein time on lifetime US 3L+ LBCCL patient outcomes



Point of Care CAR-T



sinapsis inmune

Requisitos para hacer un CAR-T POC

THE 4 PILLARS OF CELL & GENE THERAPY

TARGET



GENE MOD



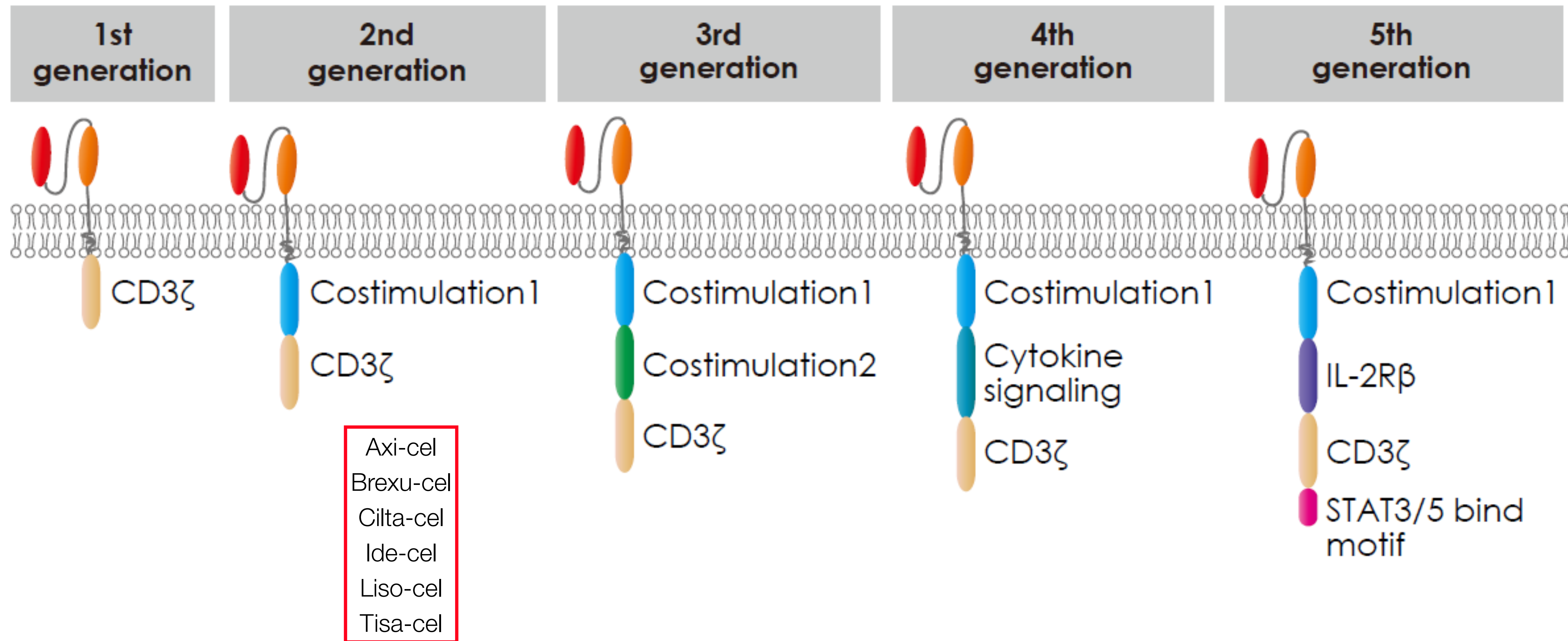
CELLS QC



DIS CTRL



Avances en manipulación genética



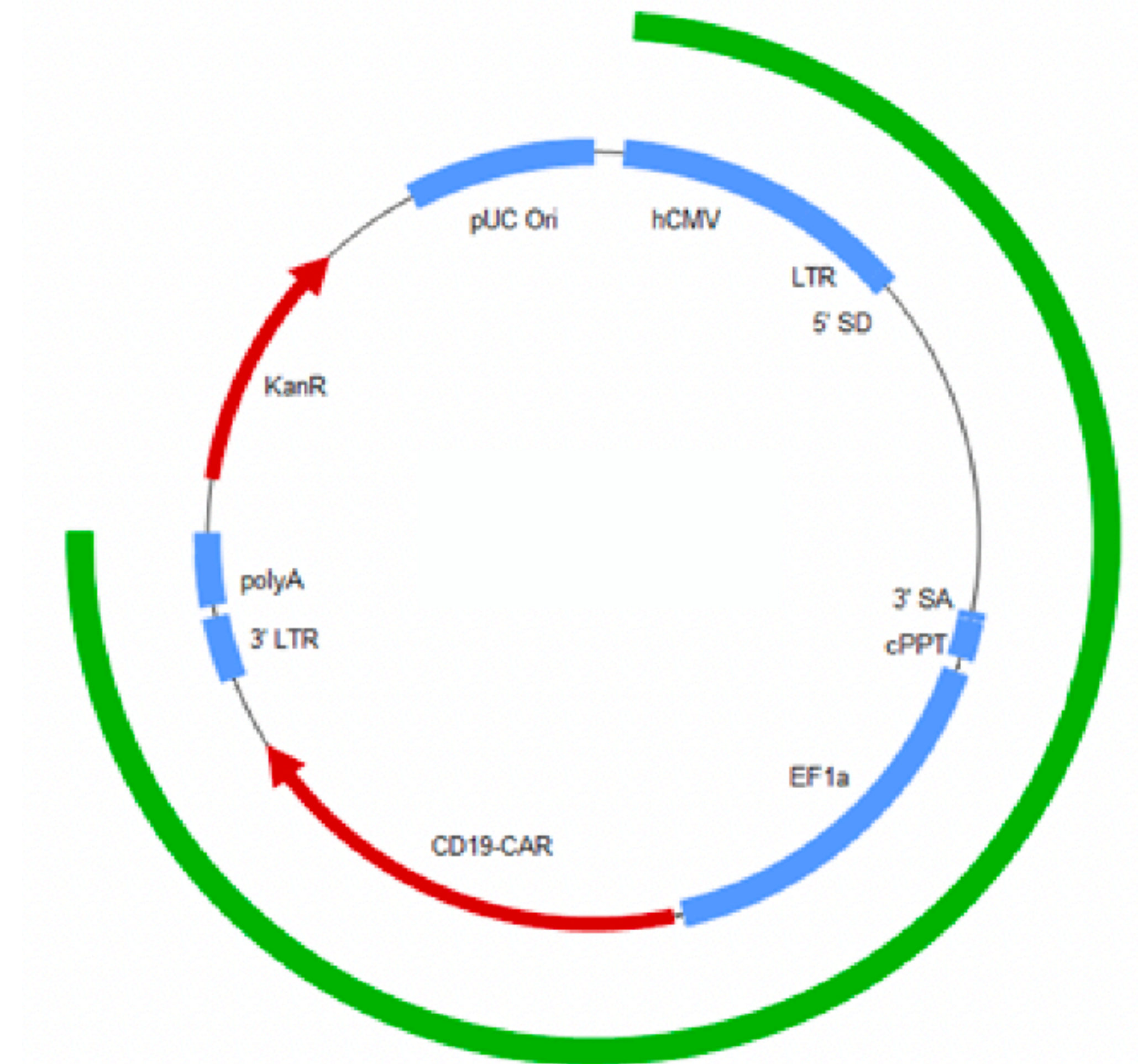
Métodos de manipulación genética

Método	Tipo	Mecanismo	Características	Ejemplos
Vector Viral	Lentivirus	Integración del gen CAR en el ADN	Integración estable, células replicativas y no replicativas	Tisa-cel; Liso-cel
	Retrovirus	Integración del gen CAR en el ADN	Integración estable, sólo células replicativas	Axi-cel
	Adenovirus	Infecta sin integrarse	Expresión transitoria, bajo riesgo mutagénico	Investigación
No Viral	Electroporación ARNm	Introducción del ARNm CAR vía descarga	Expresión transitoria	In-vitro Testing
	Electroporación ADN	Introducción del ADN plasmidial CAR	Integración aleatoria, baja eficiencia, requiere selección	Investigación
	Transposones	Integración vía transposasa (Sleeping Beauty, piggyBac)	Integración estable y aleatoria, menos eficiente, más fácil que virus	Investigación
Edición Génica	CRISPR/Cas9	Inserta el gen CAR en sitio específico	Alta precisión, combinable y permite deletar adicional	Investigación
	TALEN o ZFNs	Inserta el gen CAR en sitio específico	Alta precisión, difícil de manipular, alto costo	Infrecuente

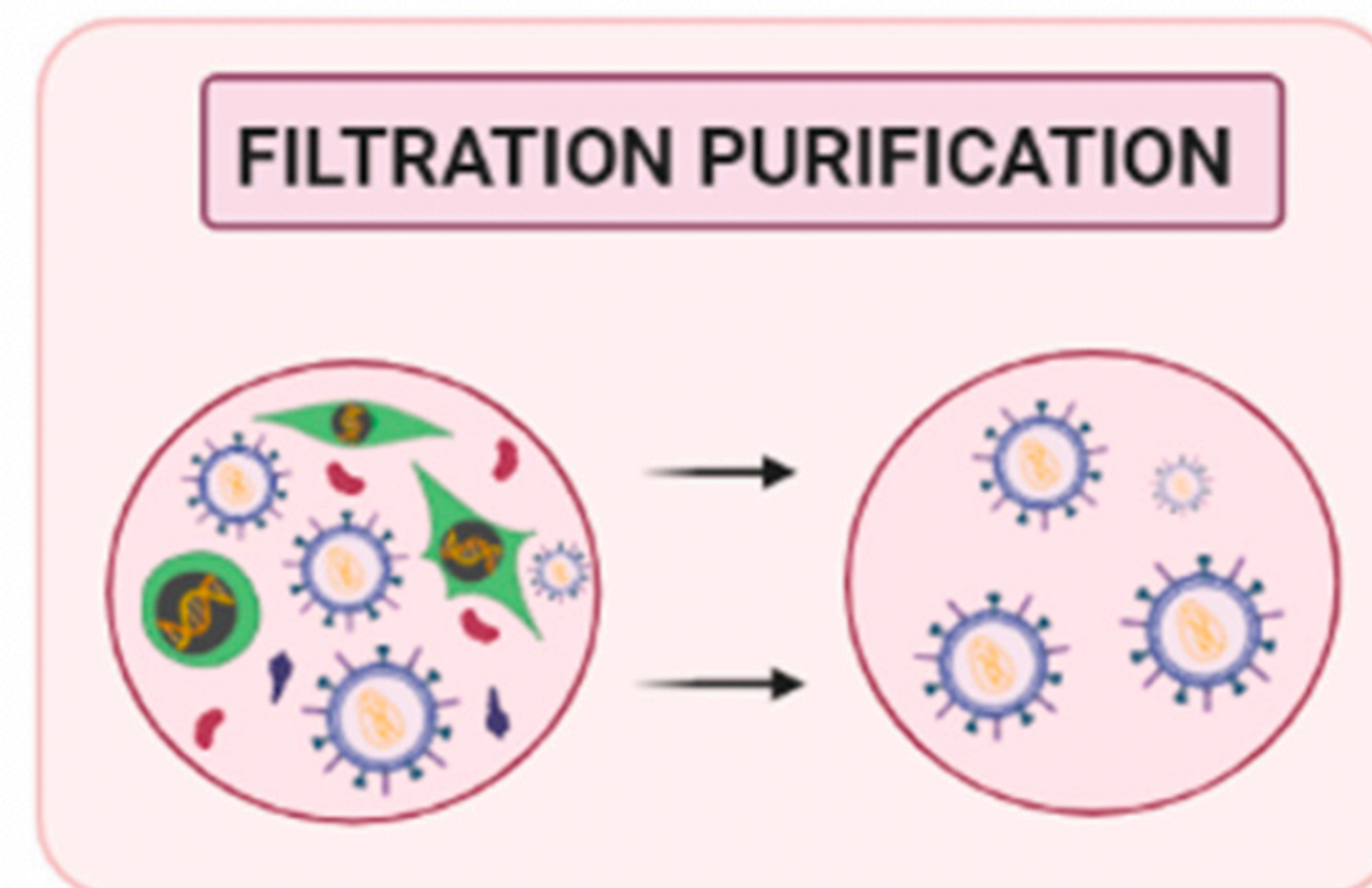
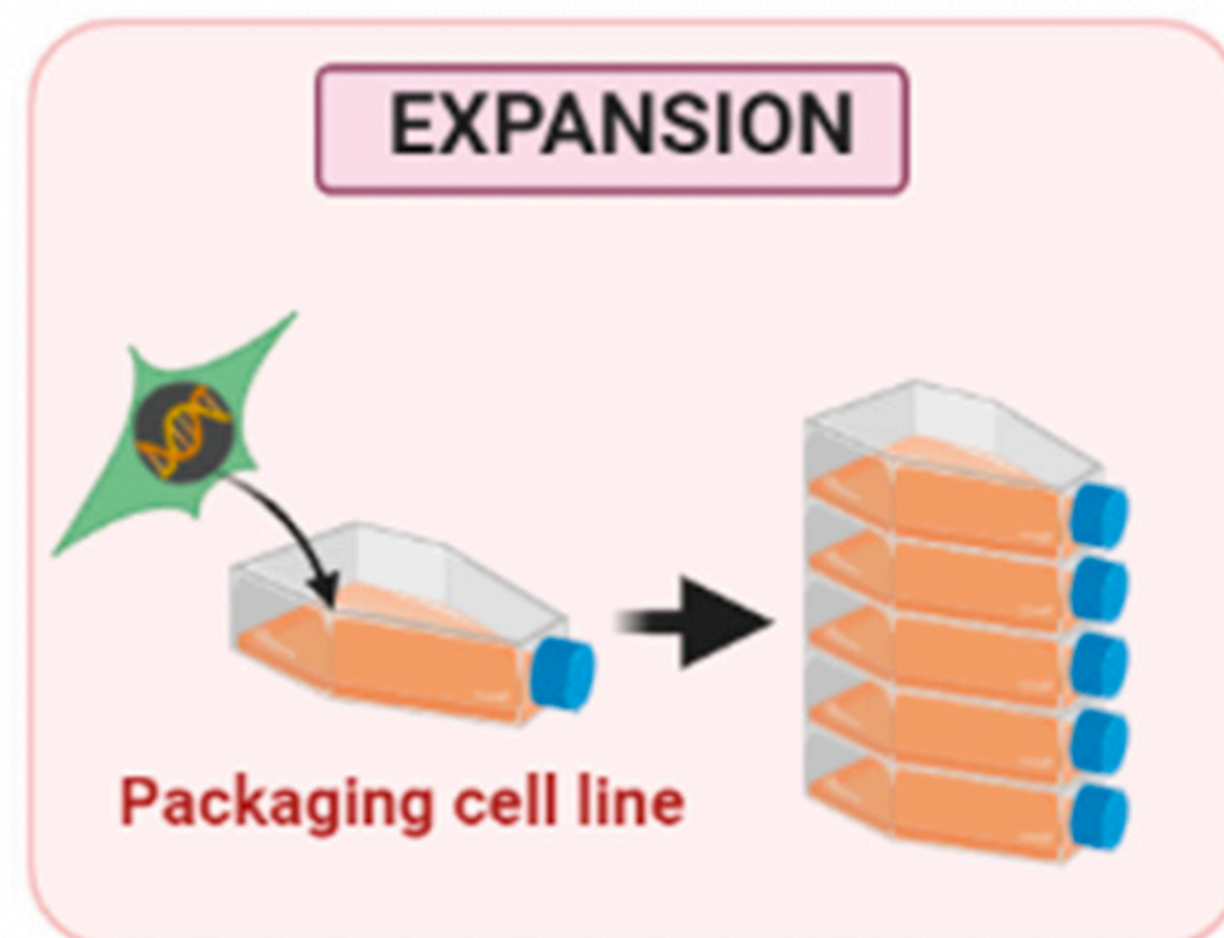
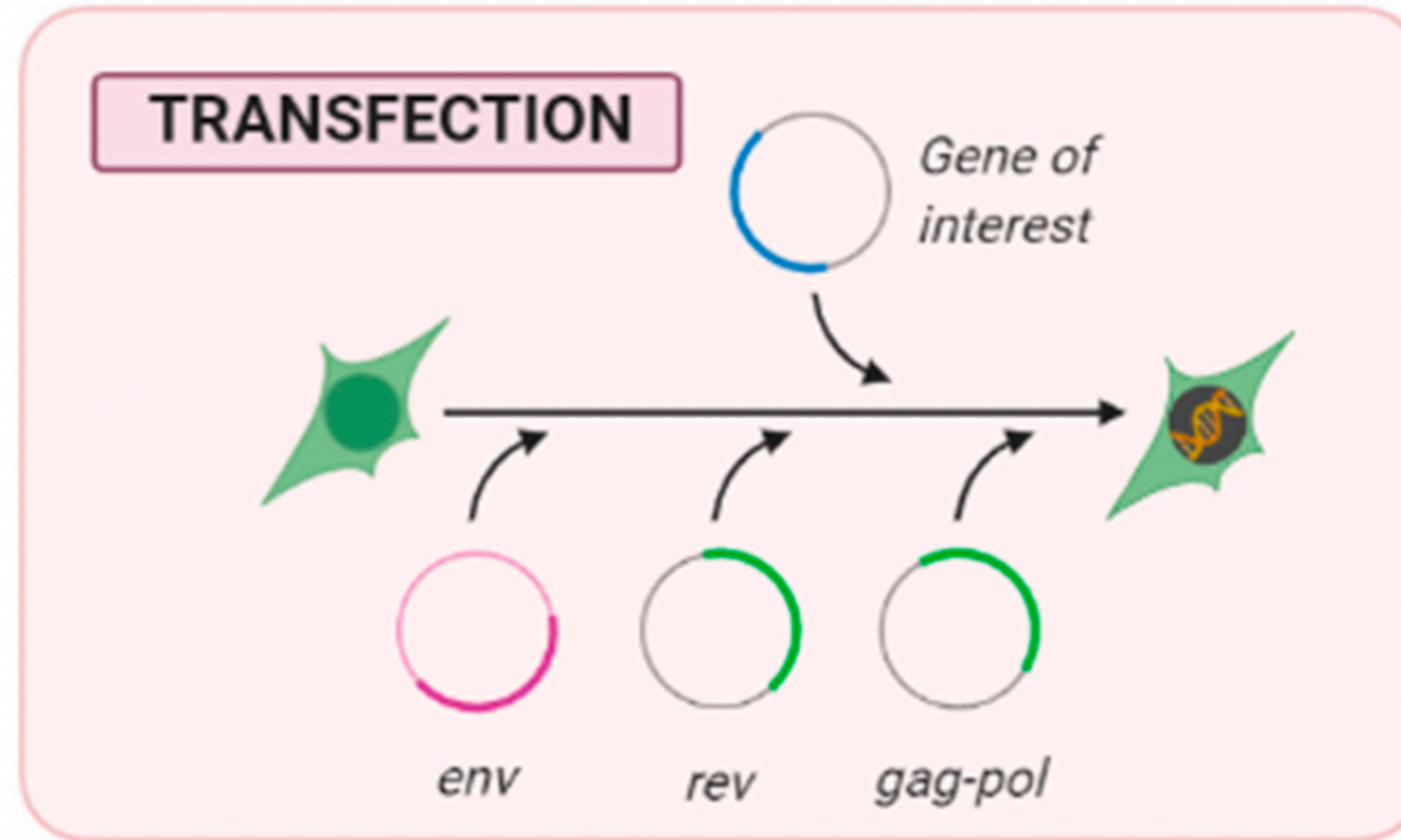
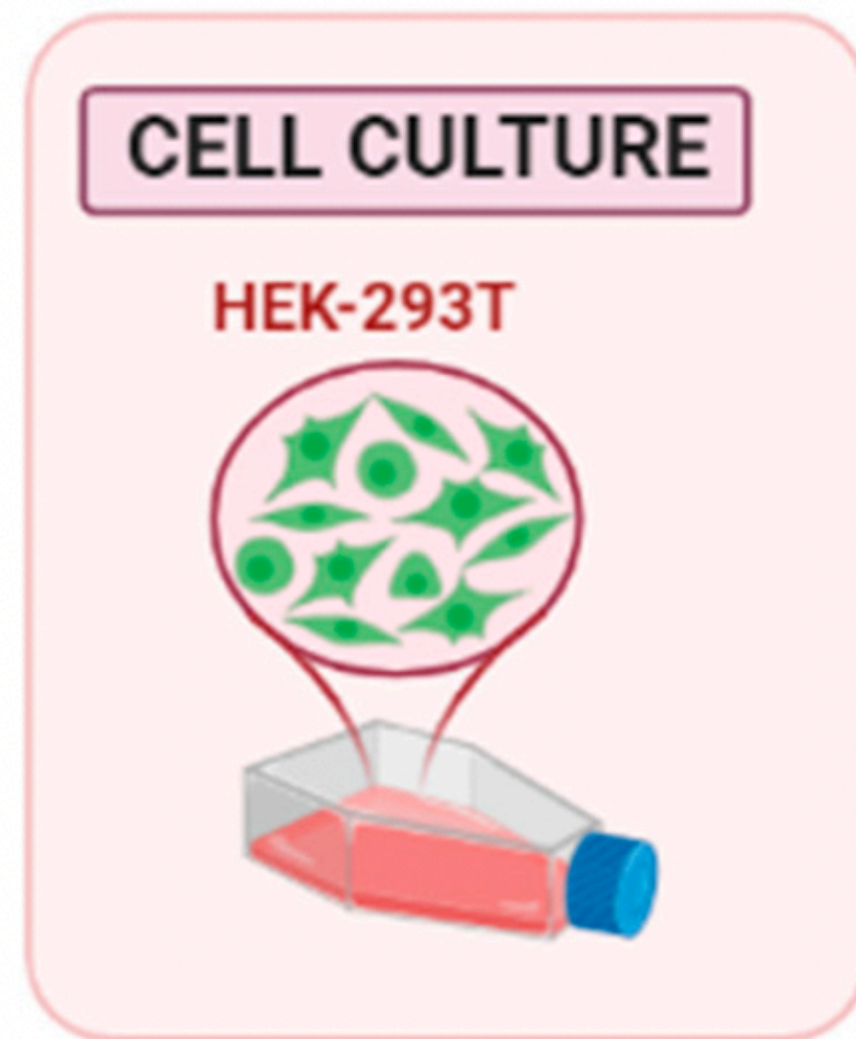
Elementos críticos del **vector viral**

Plasmidio base

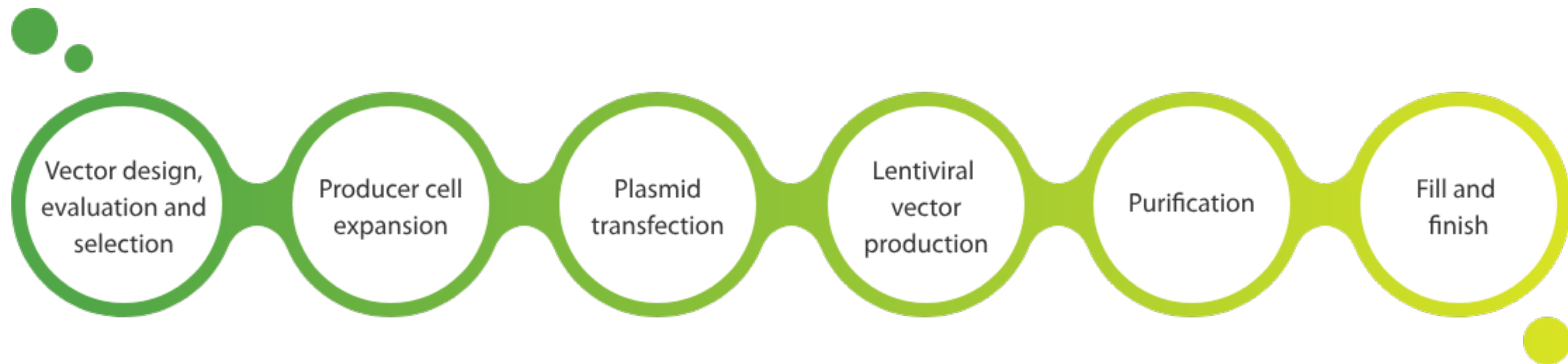
- *basado en VIH con genes inactivantes (8)*
- promotor (CMV)
- gen CAR anti-CD19
 - CD19 VL
 - CD19 VH
 - espaciador (CD8)
 - unión transmembrana (TNFRSF19)
 - coestimulador (CD28 ó 41BB/CD137)
 - estimulador (CD3z)
- gen de resistencia (Kanamicina)



Producción de **vectores virales**



Producción de **vectores virales** nivel Industrial





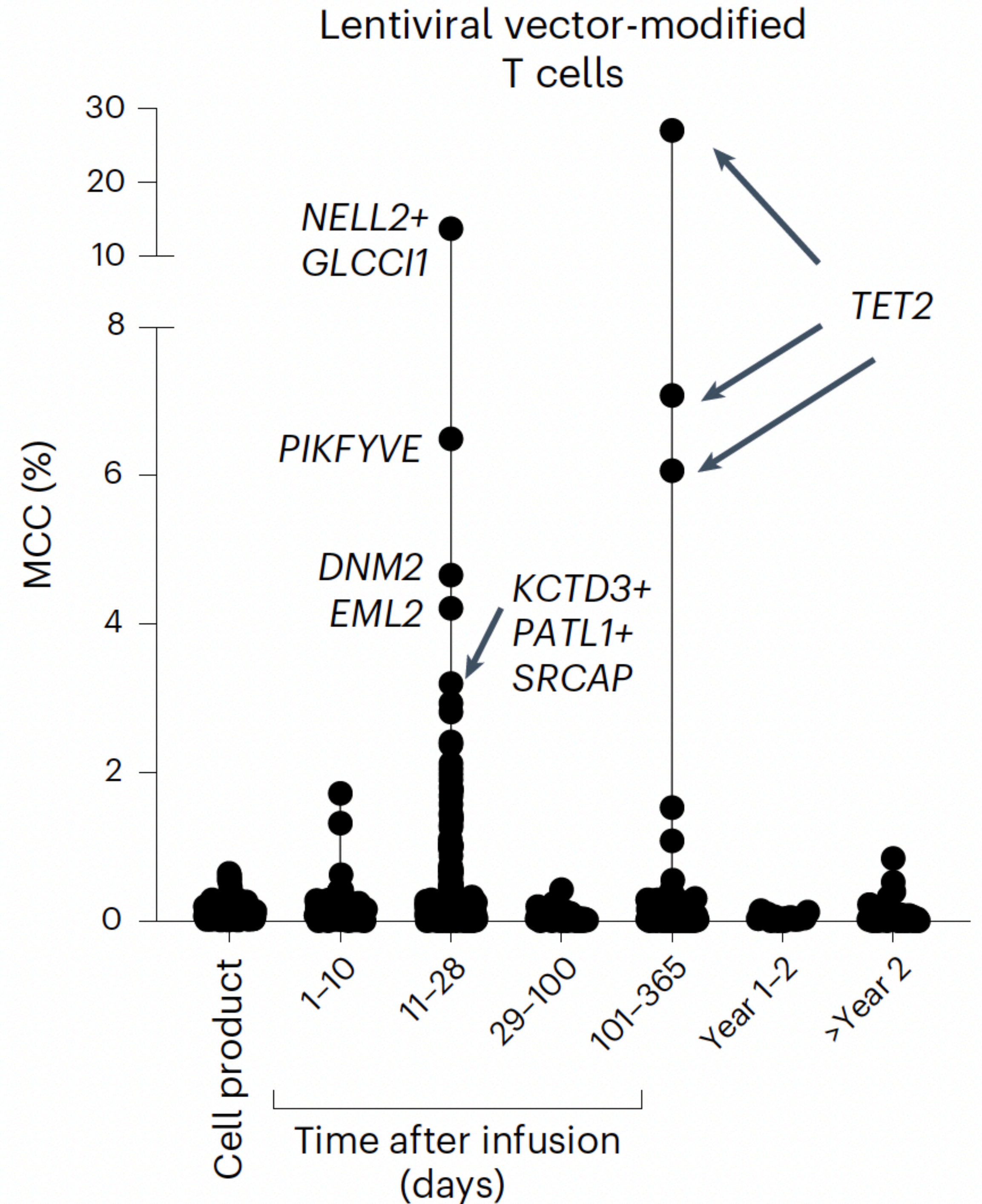
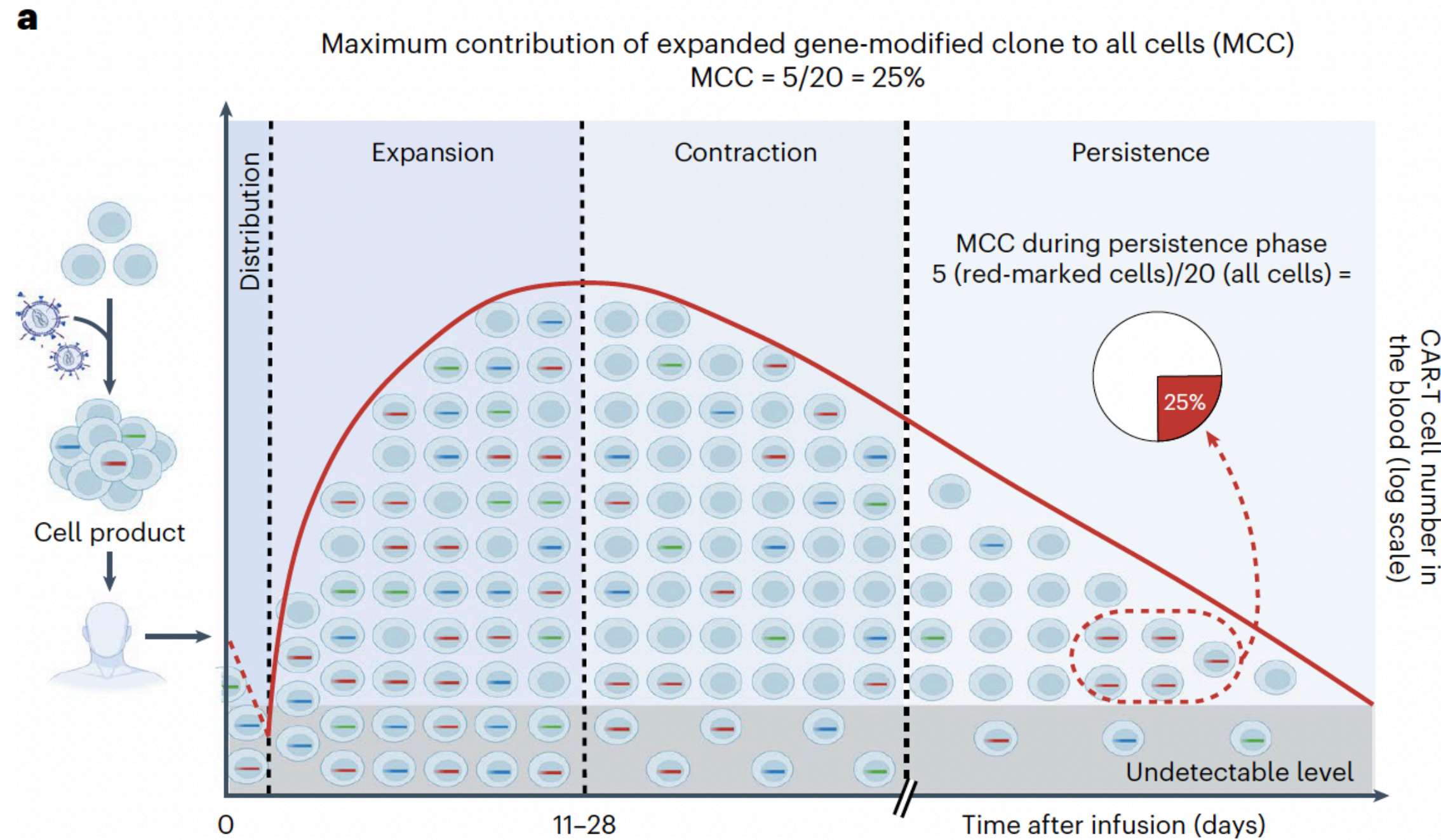
Claves en evaluación de vectores virales

Requisito	Tipo	Especificación
Apariencia	Inspección visual	Claro a levemente turbio
Funcionalidad	Capacidad de transducir y expresar CAR	Expresión de aCD19 CAR en células transducidas (>20%)
Integridad Genómica	Restricción enzimática, electroforesis capilar	Fragmentos teóricos +/-15%
pH	medición de pH	7.0 a 7.5
Concentración física	ELISA p24	ug/mL
Concentración funcional	qPCR de ADN proviral	1x10⁸ a 1x10⁹ TU/mL
Pureza	ADN plasmidio residual	<5 copias / uL
	ADN celular residual (host)	<5x10 ³ ng/mL
	ADN total residual	<1000 ng/mL
Esterilidad	Test de Esterilidad	Esteril
	Endotoxinas	<10 EU/mL
	Micoplasma	Negativo
	Replicabilidad Lentiviral residual	Negativo
Estabilidad	Preservación	6 meses a -20°C / 5 años a -70°C

Seguridad

SPM - 2.3% (<0.1% LNH-T CAR+)

Tiempo - 1.94a (51d - 14a)



THE 4 PILLARS OF CELL & GENE THERAPY

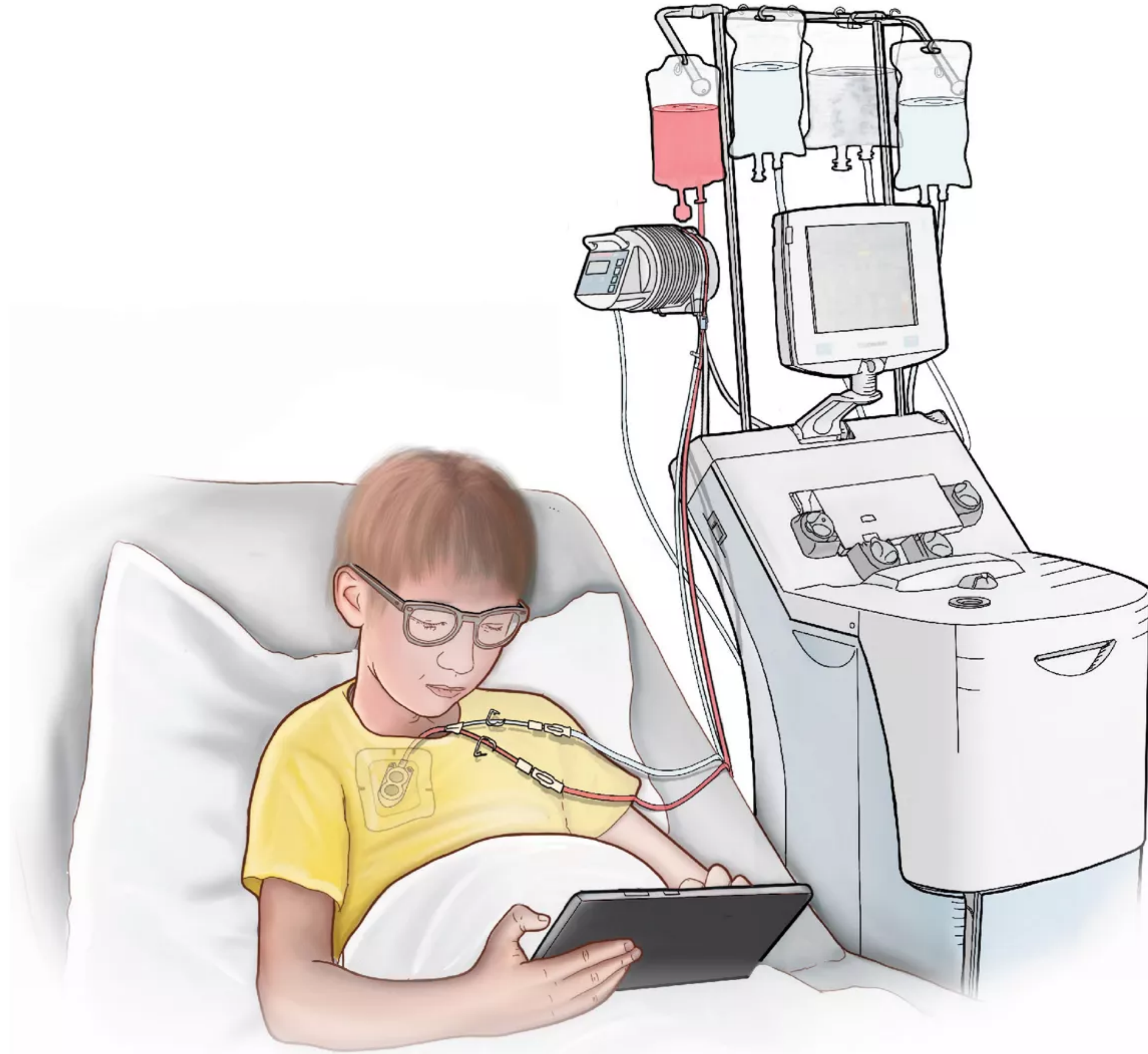
TARGET

GENE MOD

CELLS QC

DIS CTRL





Leucoaféresis

Table 2
Leukapheresis specifications for CAR T-cell manufacturing.

Tisagenlecleucel ^a	
CD3 count	$\geq 1 \times 10^9$
TNC count	$\geq 2 \times 10^9$
CD3/TNC%	$\geq 3\%$

General CAR T-cell leukapheresis guidance^b

ALC	Total blood volume processed
100 cells/ μ L	Consider 2-day collection
>100 cells/ μ L but <300 cells/ μ L	3.5–4 \times
>300 cells/ μ L but <500 cells/ μ L	3 \times
>500 cells/ μ L but <1000 cells/ μ L	2.5 \times
>1000 cells/ μ L	1.5 \times

CAR, chimeric antigen receptor; CD, cluster of differentiation; TNC, total nucleated cell.

^a Provided courtesy of Novartis Pharmaceuticals Corporation.

^b Based on the authors' clinical experience.



Contents lists available at ScienceDirect

CYTOTHERAPY

journal homepage: www.isct-cytotherapy.org

International Society
ISCT
Cell & Gene Therapy®

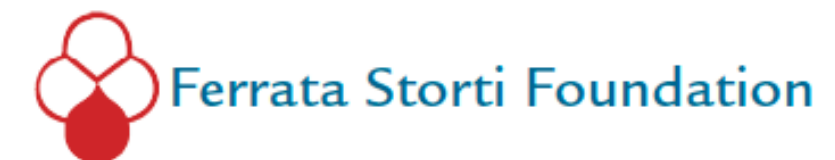
Review article

Leukapheresis guidance and best practices for optimal chimeric antigen receptor T-cell manufacturing

Muna Qayed^{1,*}, Joseph P. McGuirk², G. Doug Myers³, Vinod Parameswaran⁴, Edmund K. Waller⁵, Peter Holman⁶, Margarida Rodrigues⁷, Lee F. Clough⁶, Jennifer Willert⁶

Management of adults and children undergoing chimeric antigen receptor T-cell therapy: best practice recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) and the Joint Accreditation Committee of ISCT and EBMT (JACIE)

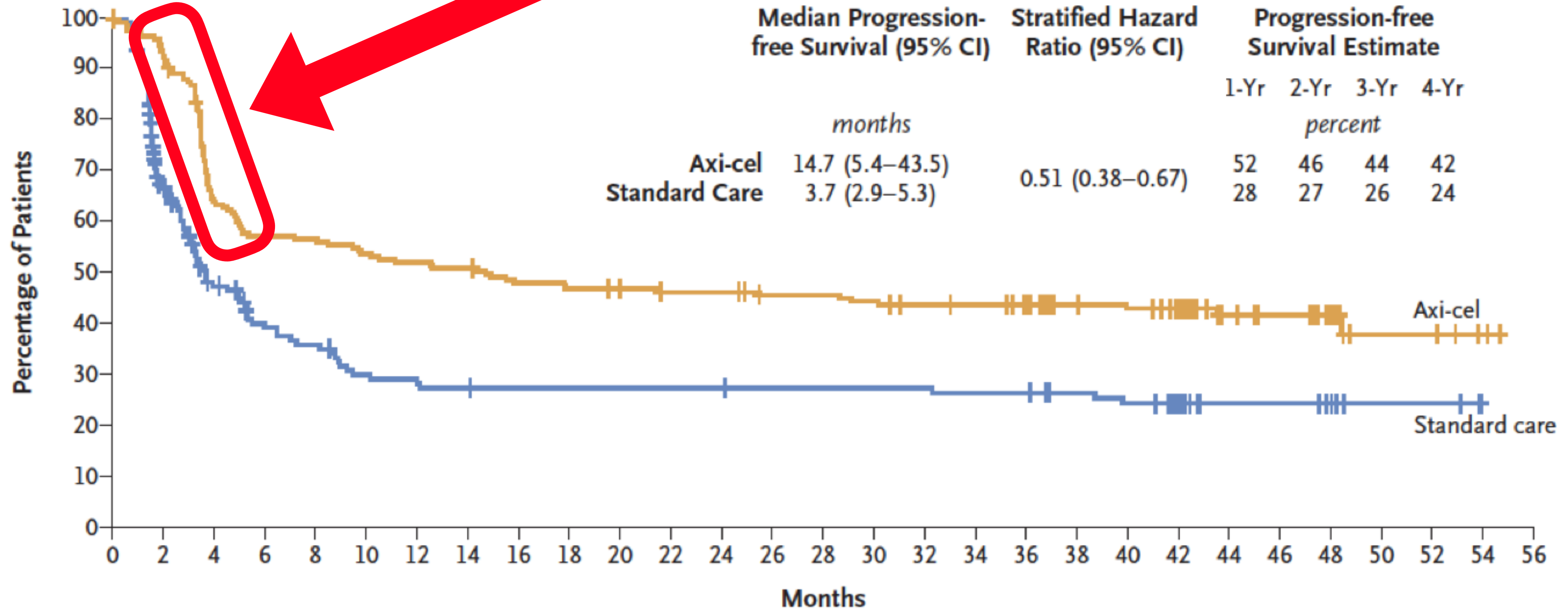
Ibrahim Yakoub-Agha,¹ Christian Chabannon,² Peter Bader,³ Grzegorz W. Basak,⁴ Halvard Bonig,⁵ Fabio Ciceri,⁶ Selim Corbacioglu,⁷ Rafael F. Duarte,⁸ Hermann Einsele,⁹ Michael Hudecek,⁹ Marie José Kersten,¹⁰ Ulrike Köhl,¹¹ Jürgen Kuball,¹² Stephan Mielke,¹³ Mohamad Mohty,¹⁴ John Murray,¹⁵ Arnon Nagler,¹⁶ Stephen Robinson,¹⁷ Riccardo Saccardi,¹⁸ Fermin Sanchez-Guijo,¹⁹ John A. Snowden,²⁰ Micha Srouf,²¹ Jan Styczynski,²² Alvaro Urbano-Ispizua,²³ Patrick J. Hayden²⁴ and Nicolaus Kröger²⁵



Haematologica 2018
Volume 105(2):297-316

ZUMA-7

A Progression-free Survival



No. at Risk

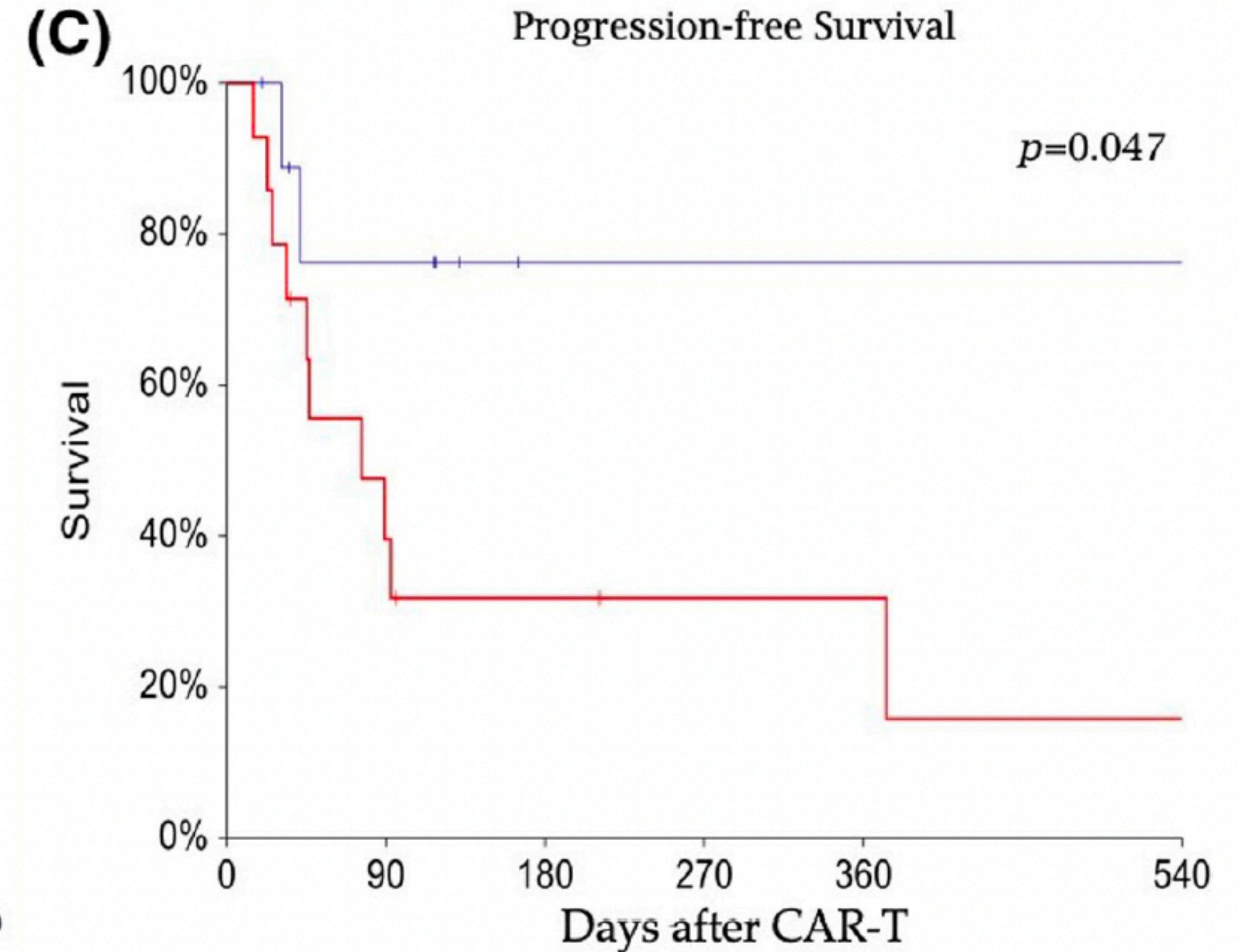
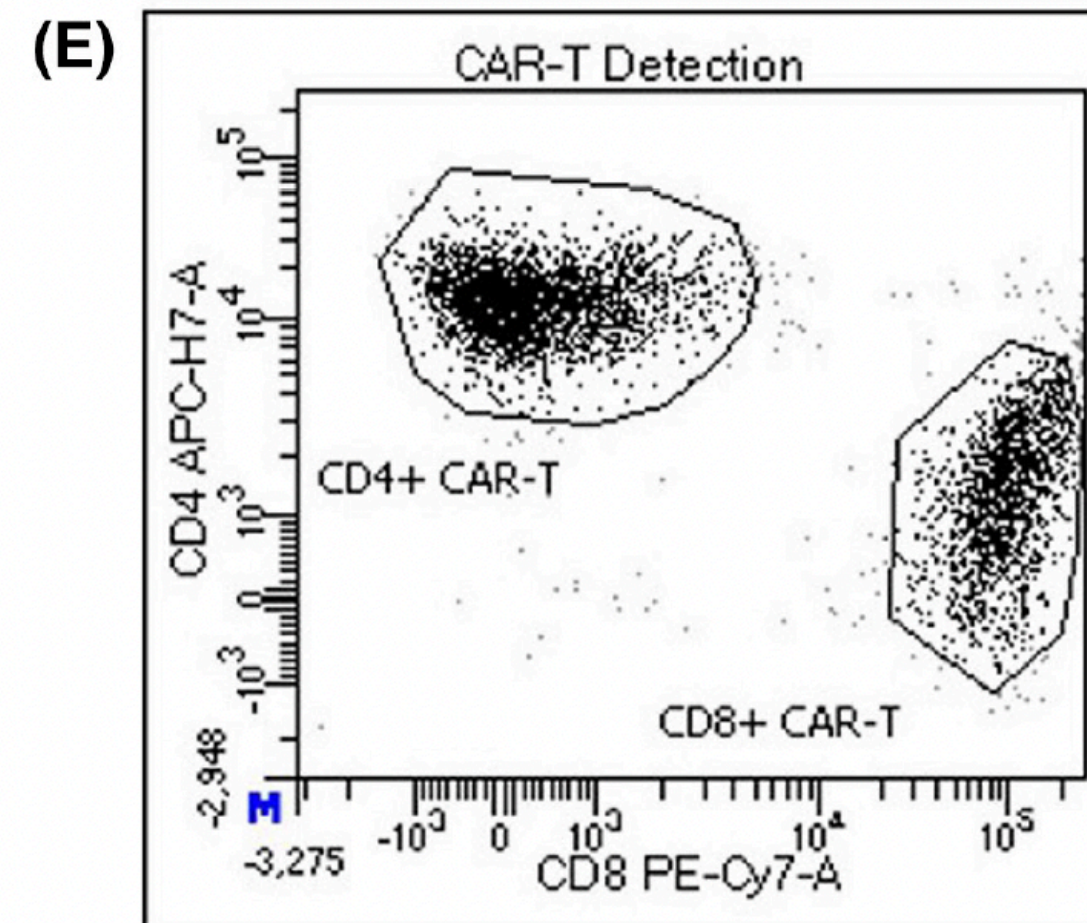
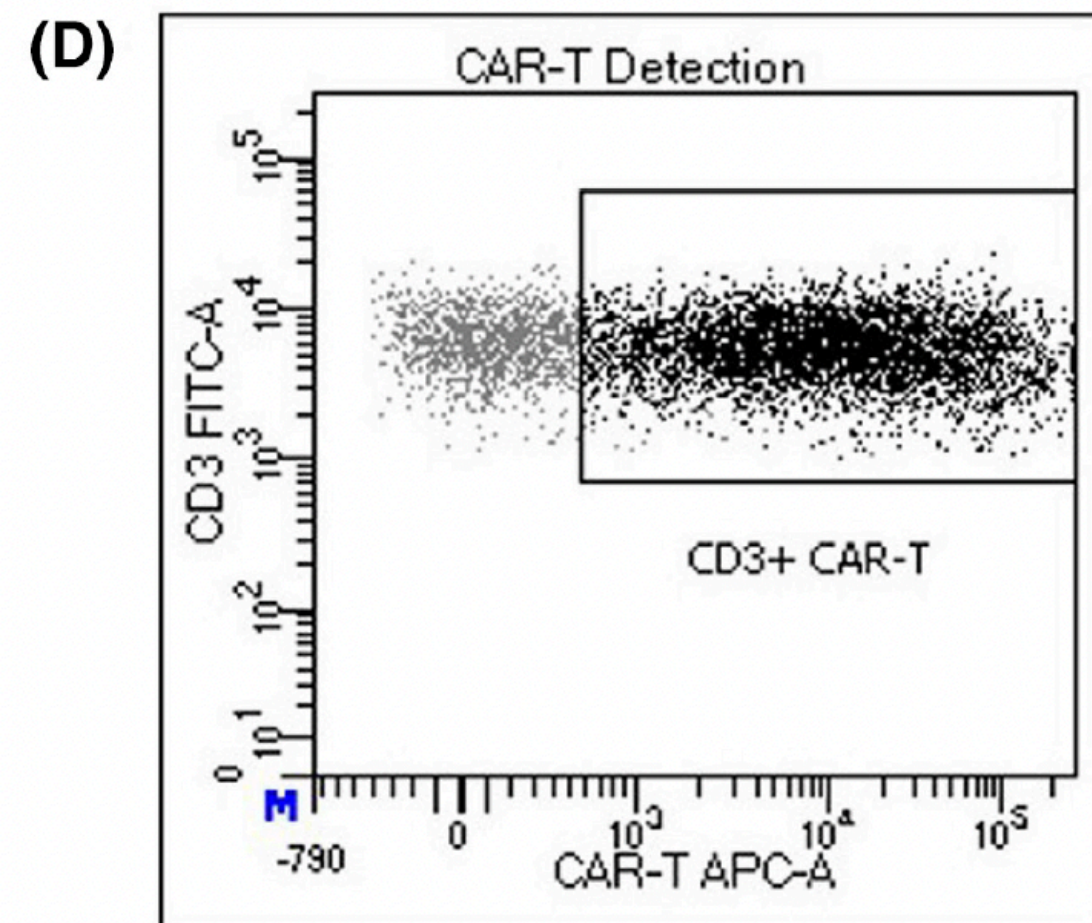
Axi-cel	180	166	112	100	99	94	91	89	83	81	79	77	77	73	73	71	68	67	63	54	52	45	32	29	22	7	7	3	0
Standard care	179	94	61	47	43	35	33	32	31	31	31	31	31	30	30	30	30	29	29	25	23	18	10	10	8	4	4	0	

Composición de subpoblaciones T

Ratio CD4 / CD8

31 pacientes (Axi / Brexu / Tisa)

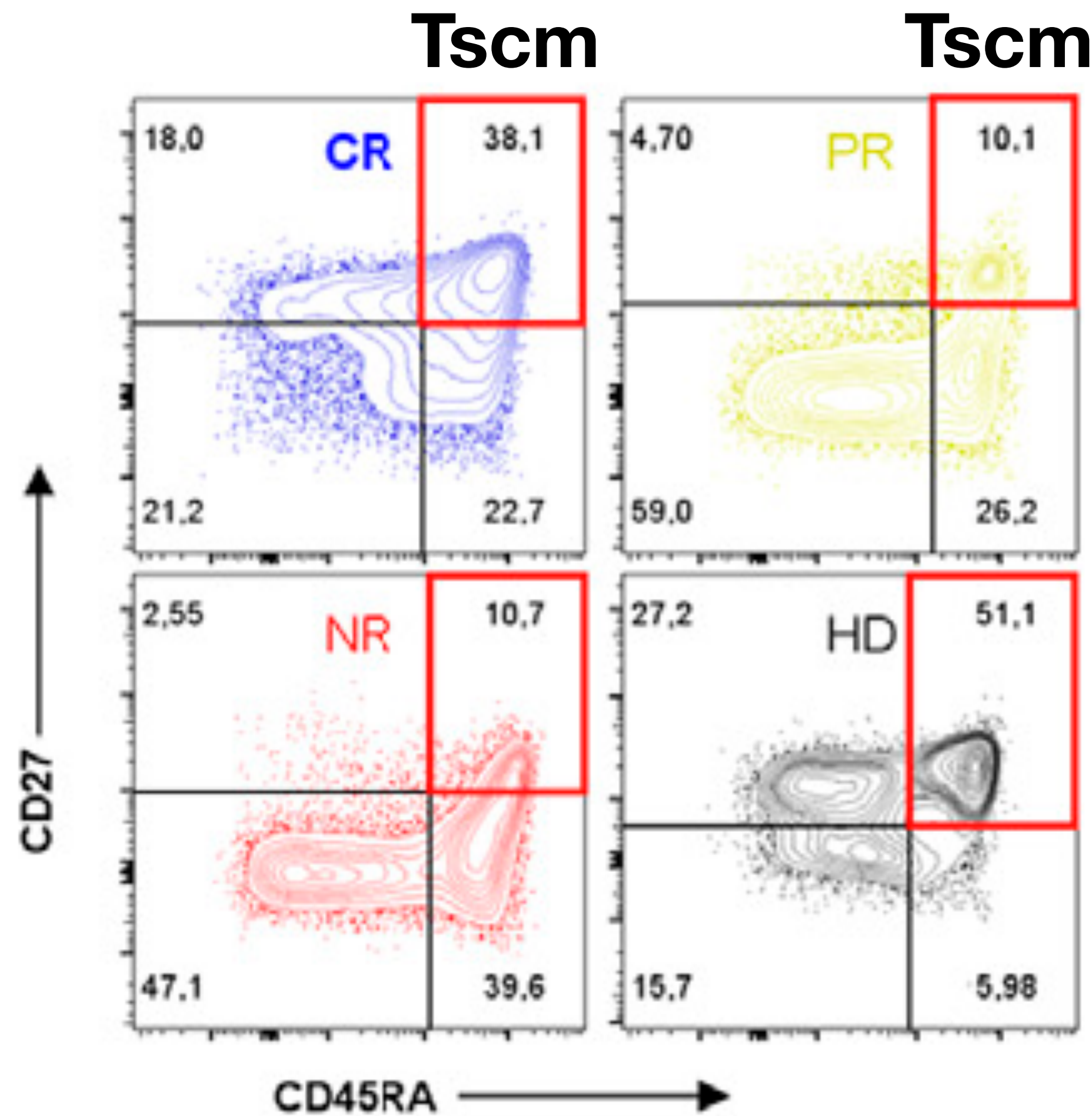
mCD4/CD8 ratio - 1.44



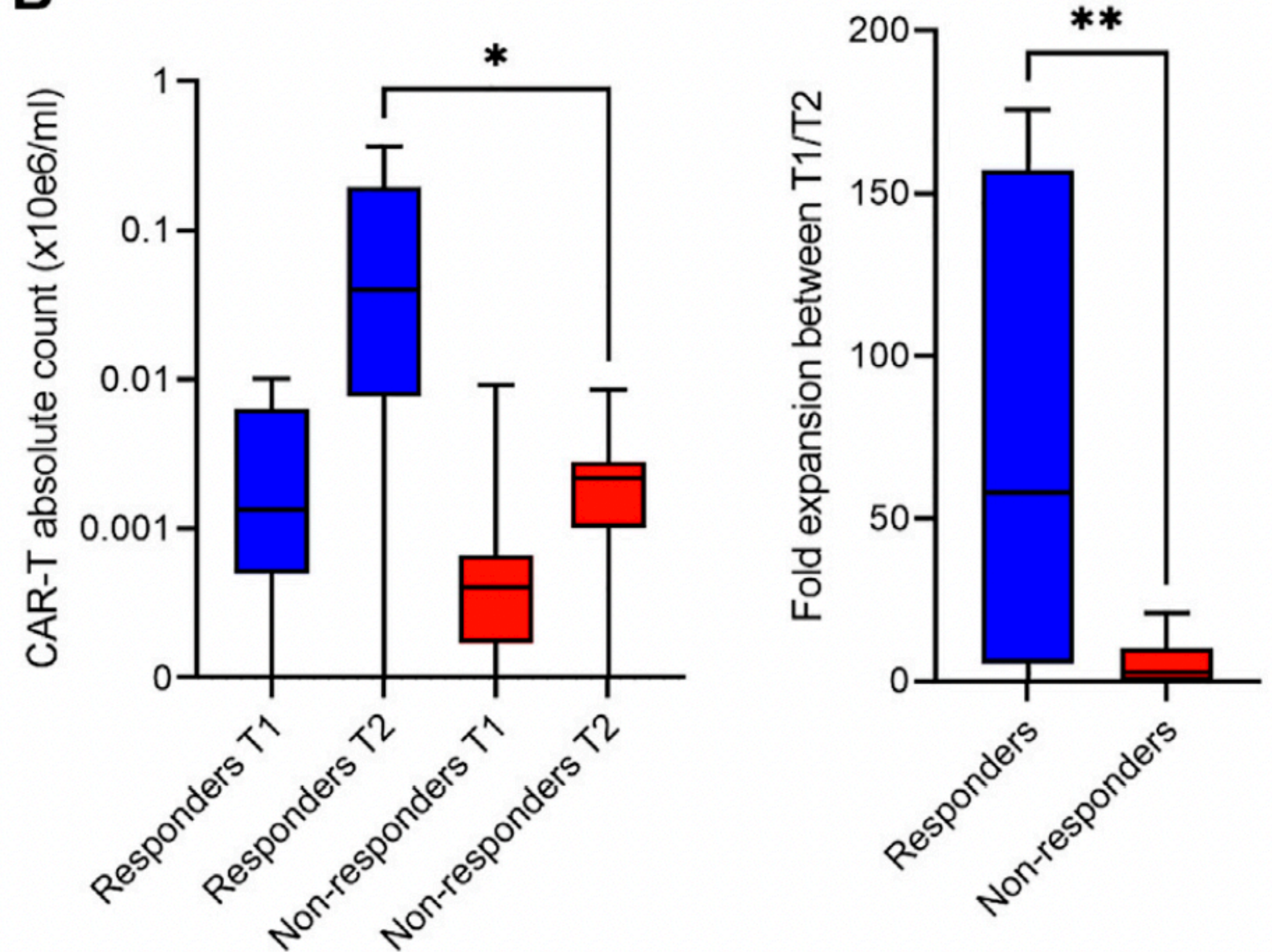
- Infused CAR+CD4+/CD8+ ratio < 1.12

- Infused CAR+CD4+/CD8+ ratio > 1.12

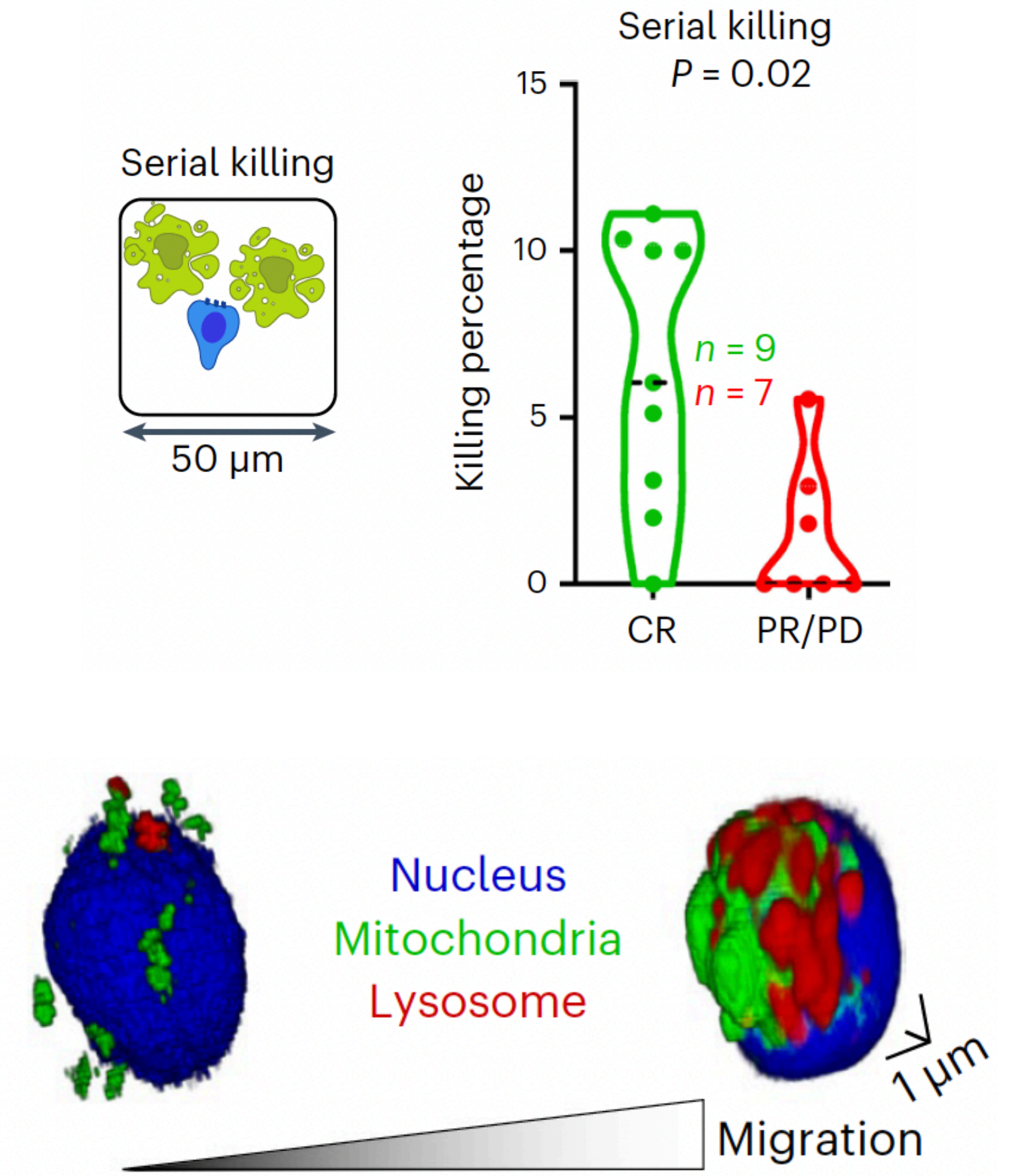
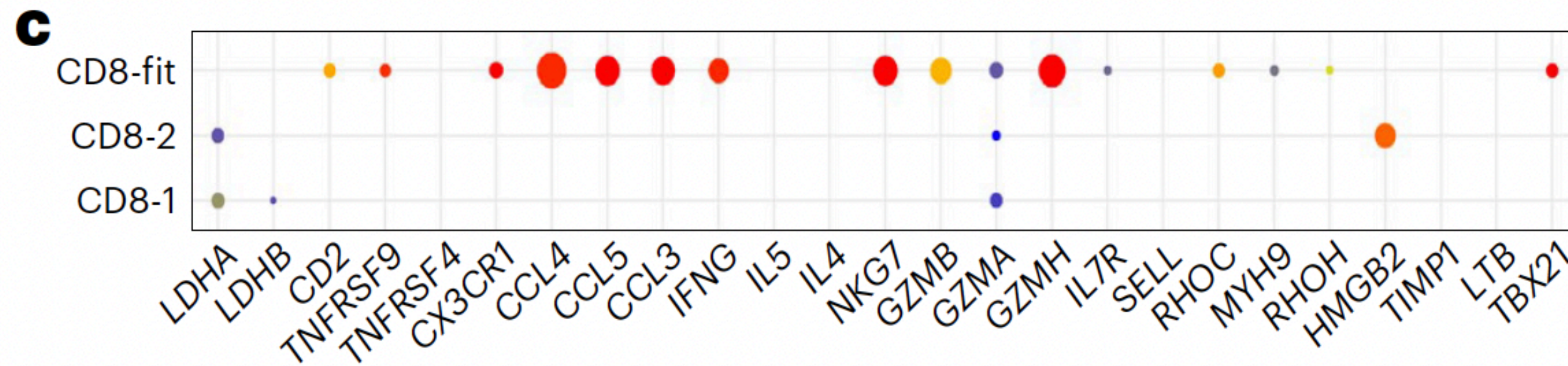
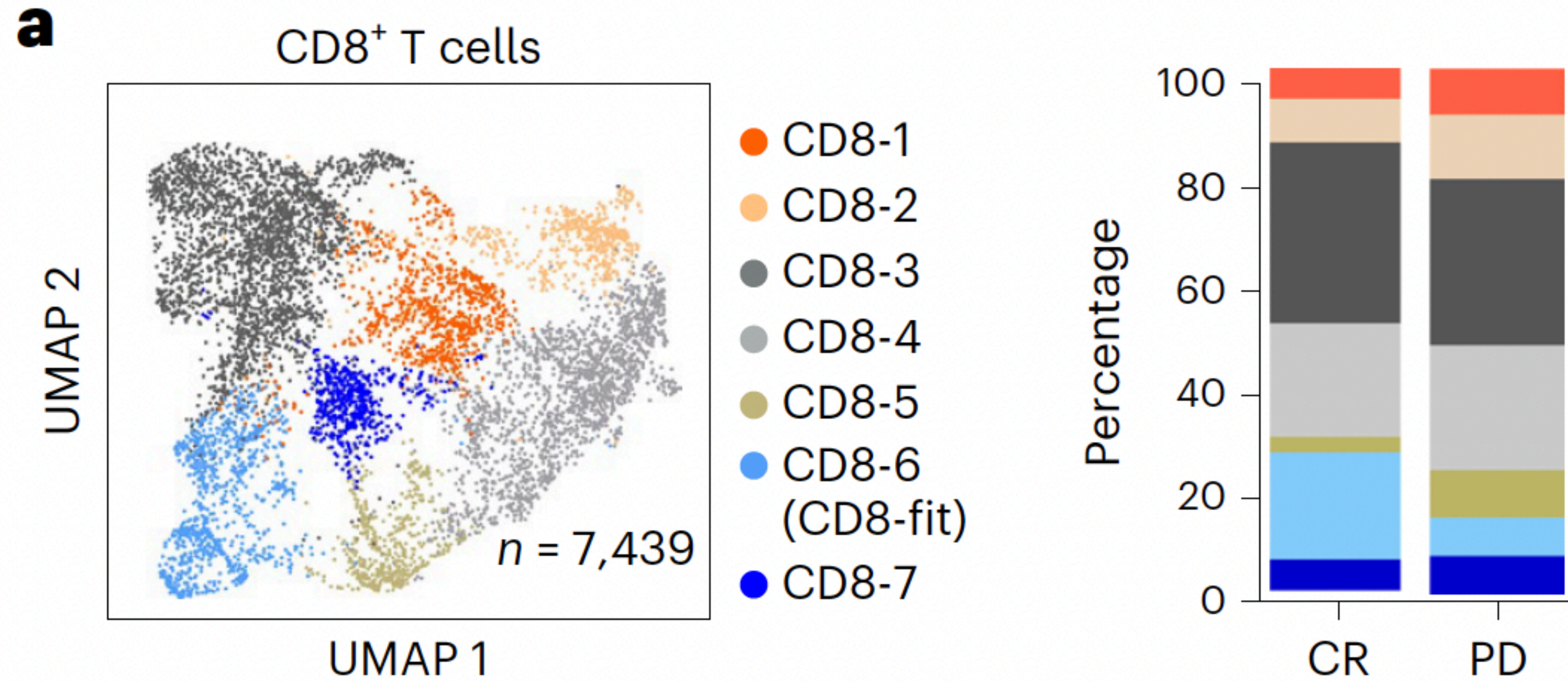
Composición de subpoblaciones T en aféresis



B



CAR+ CD8-fit T cells

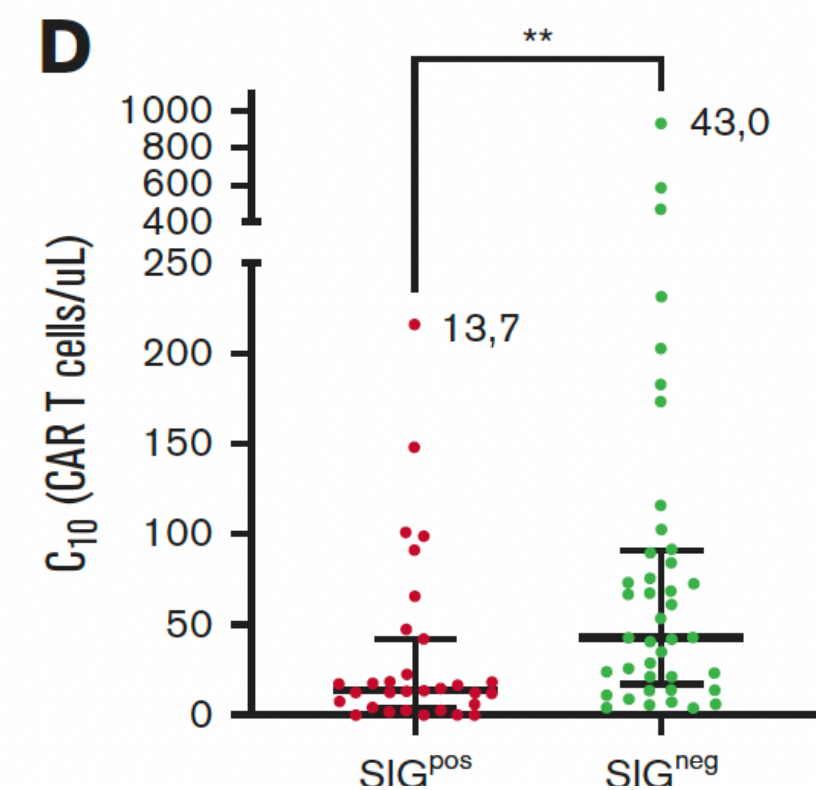
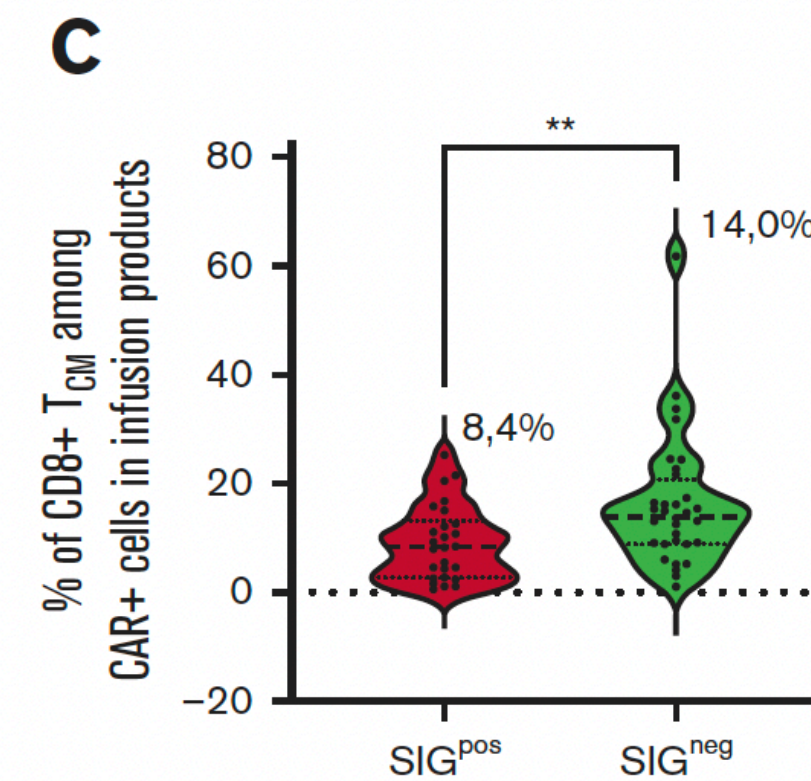
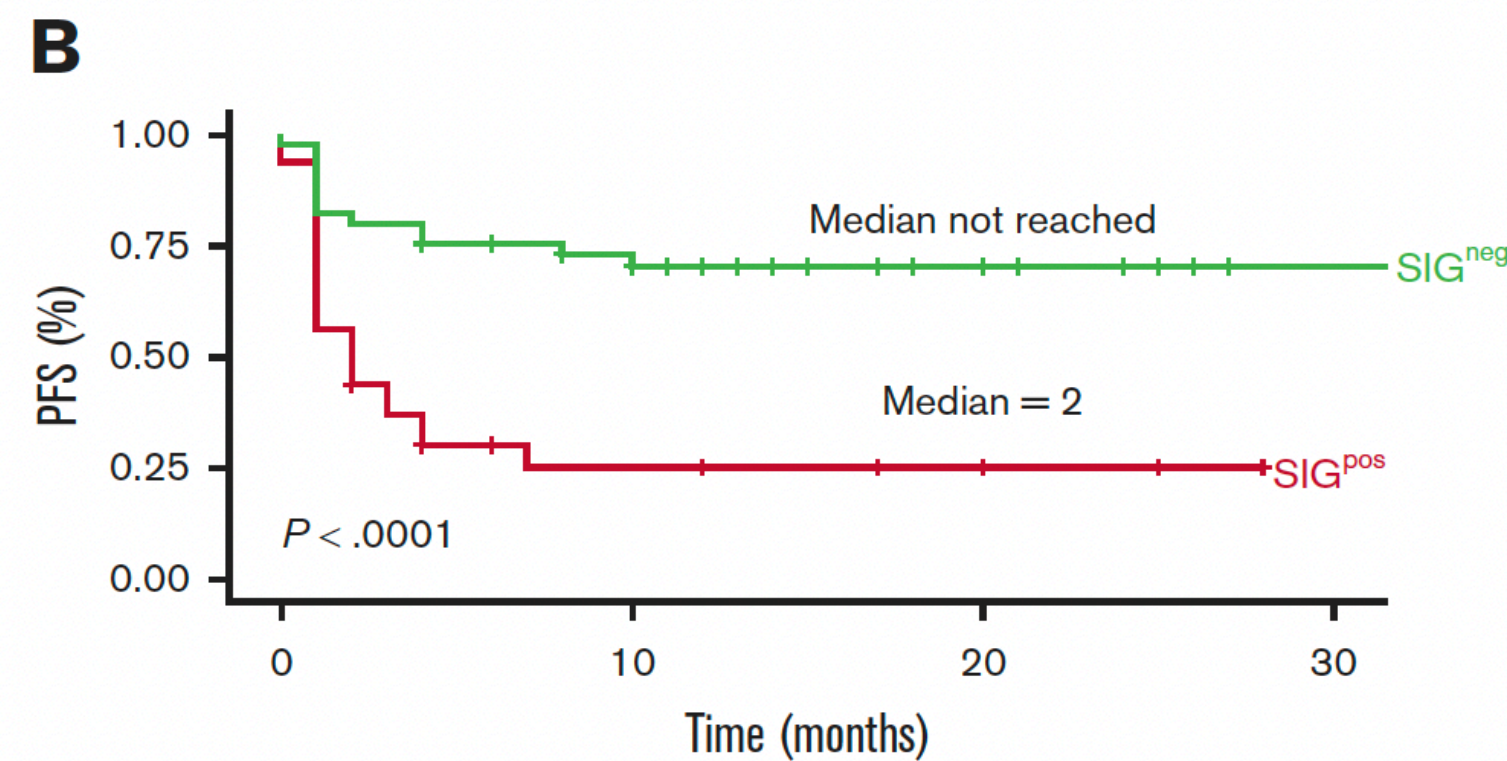
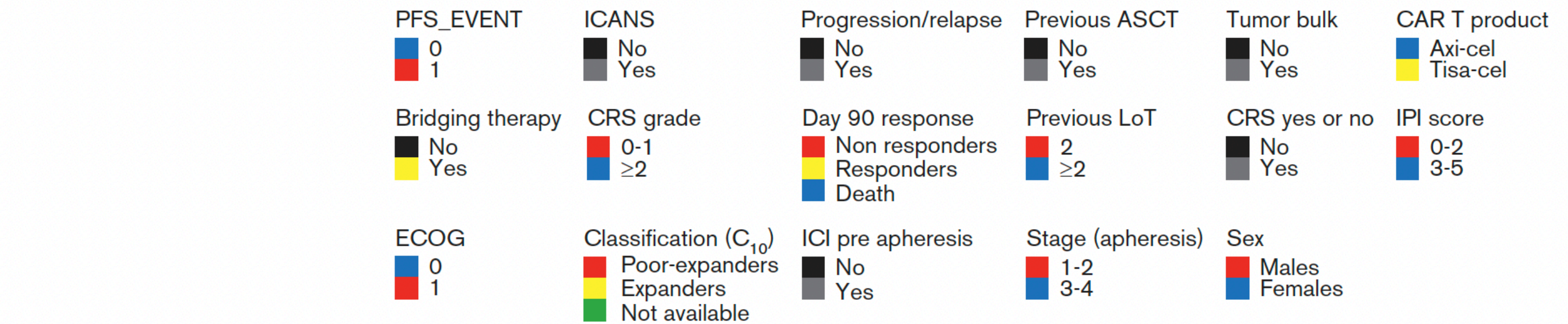
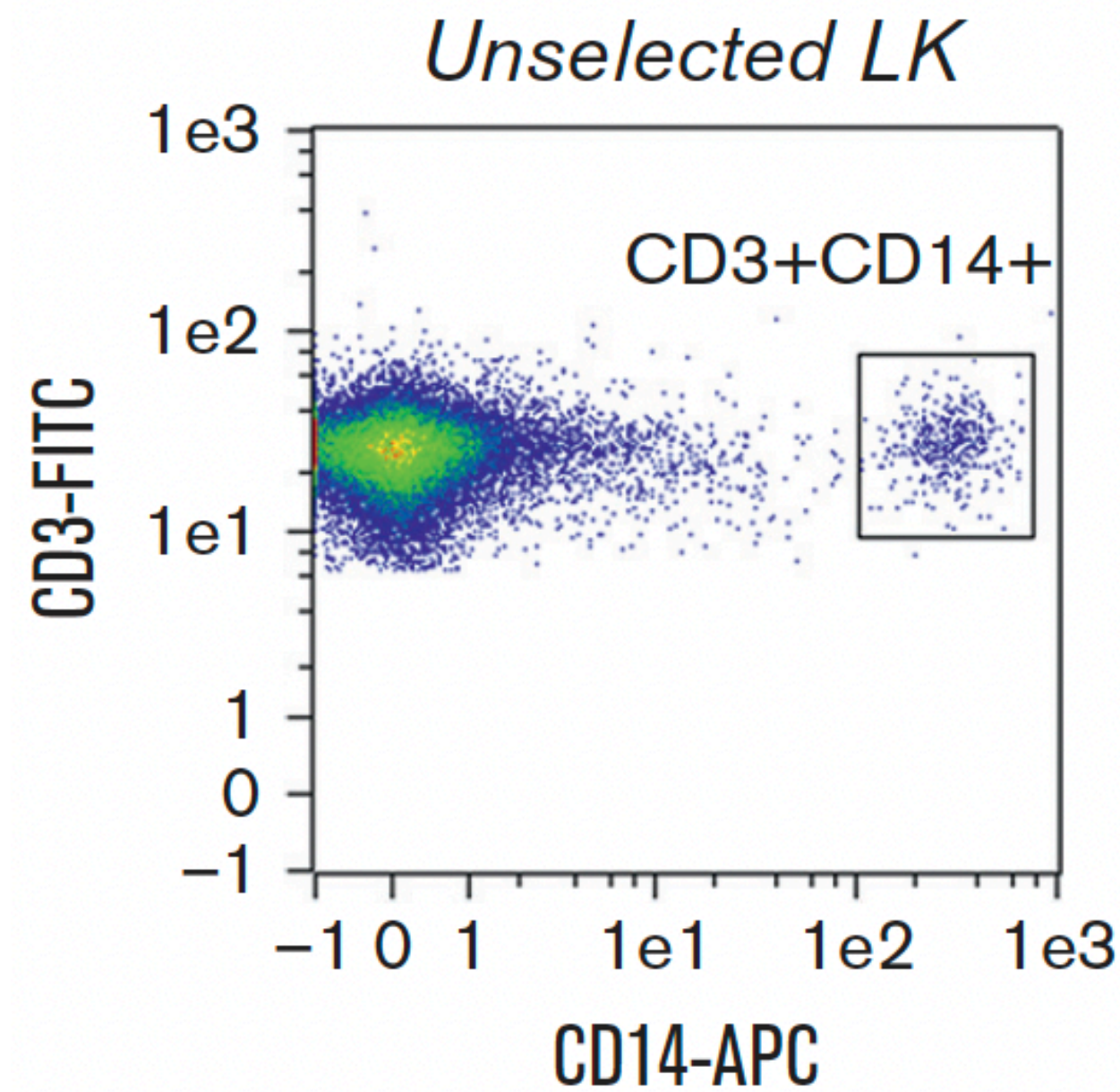
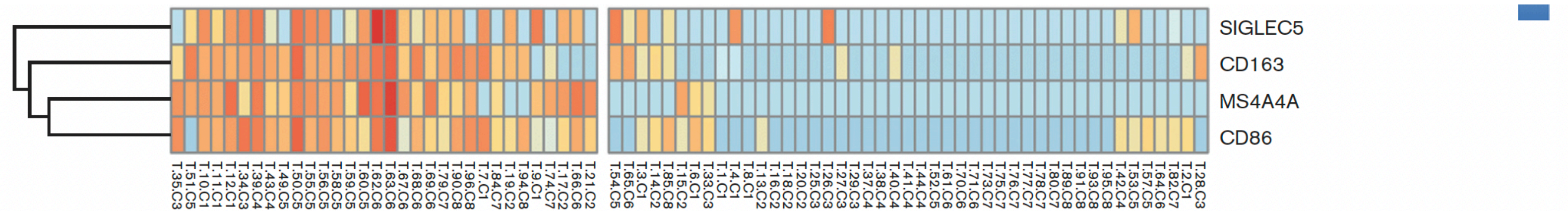


Composición de células T vs monocitos

Complejos Linfocitos T / Monocitos

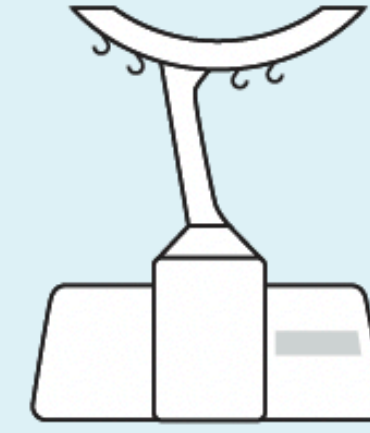
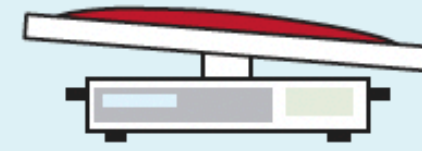
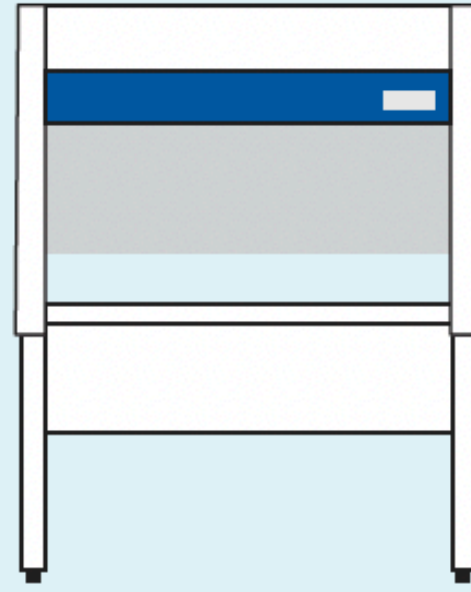
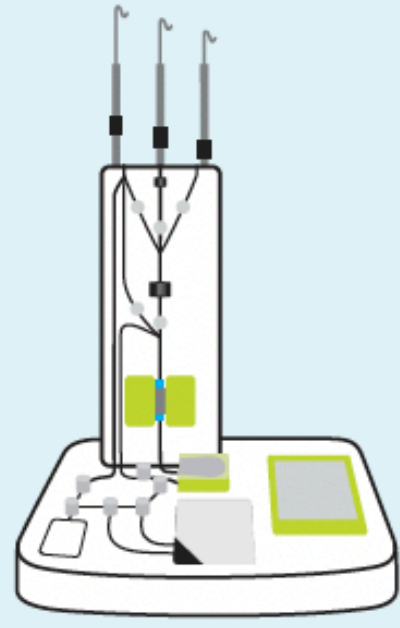
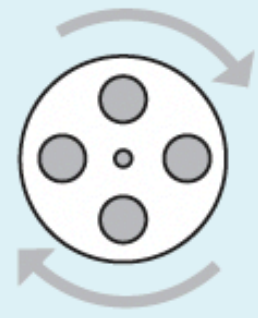
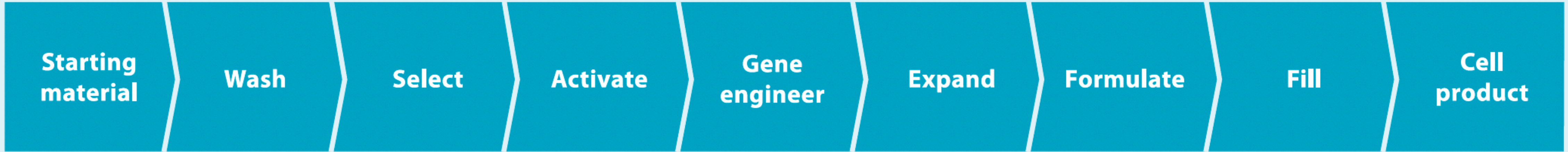
95 pacientes (Axi / Tisa)

CMF / NGS



Plataformas para hacer un CAR-T POC

Annual process



Starting material

Wash

Select

Activate

Gene engineer

Expand

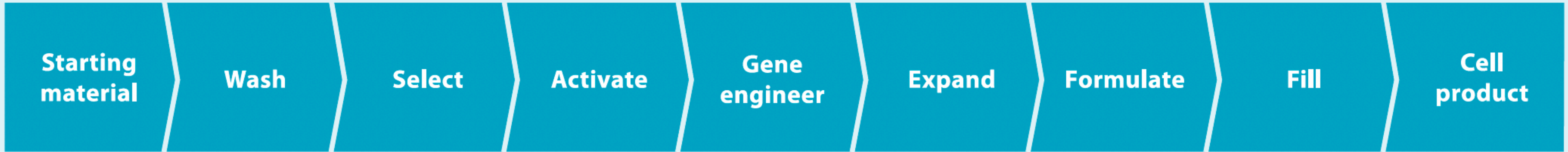
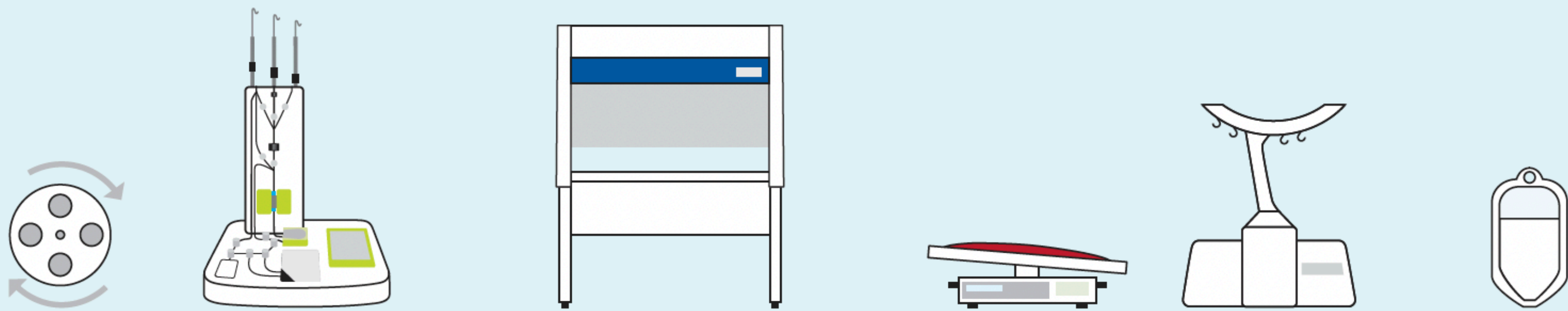
Formulate

Fill

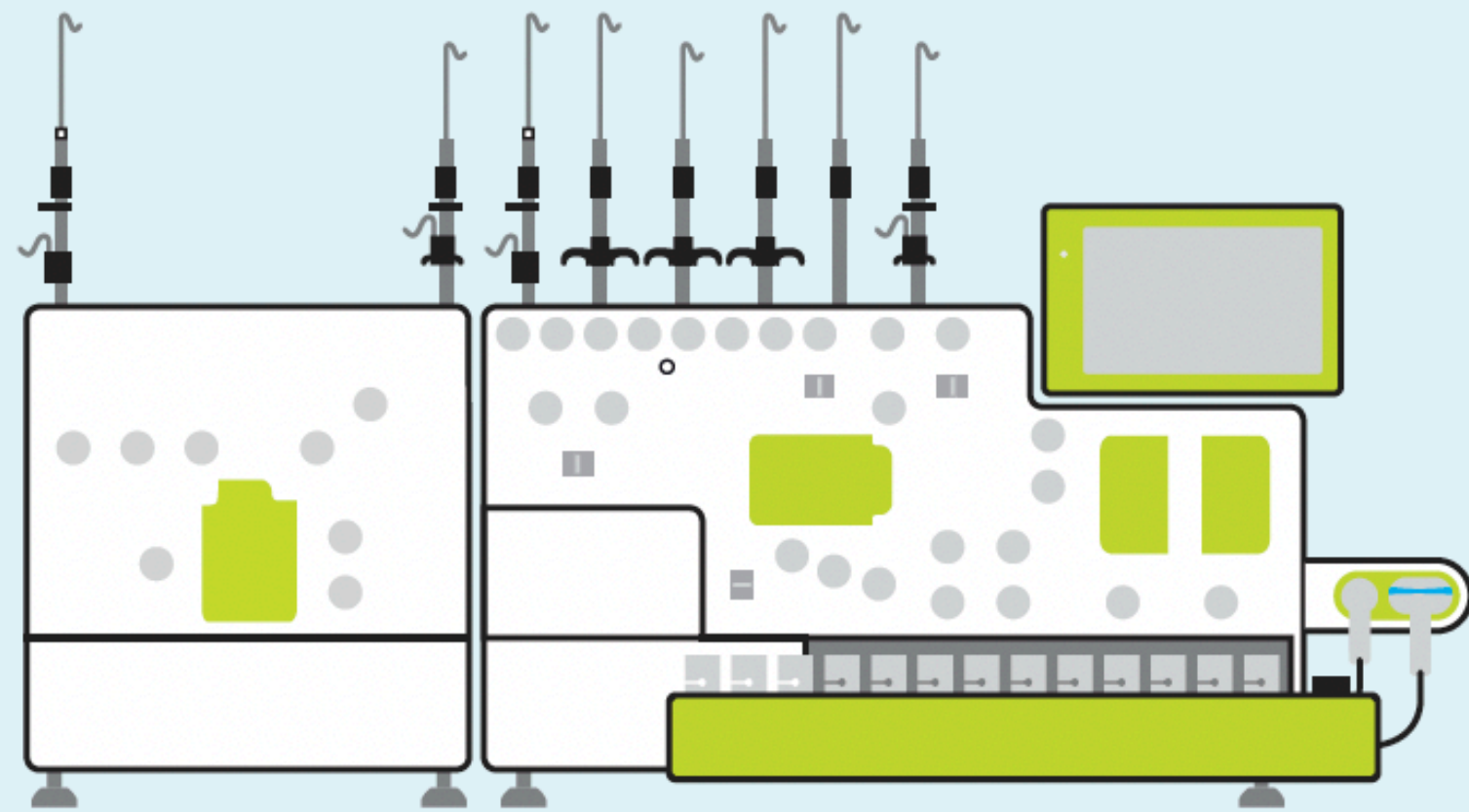
Cell product



Manual process



Automated process



Plataformas **cerradas full-scale cGMP**



CliniMACS Prodigy - Miltenyi



Cocoon - Lonza

Plataformas **abiertas** escalamiento cGMP

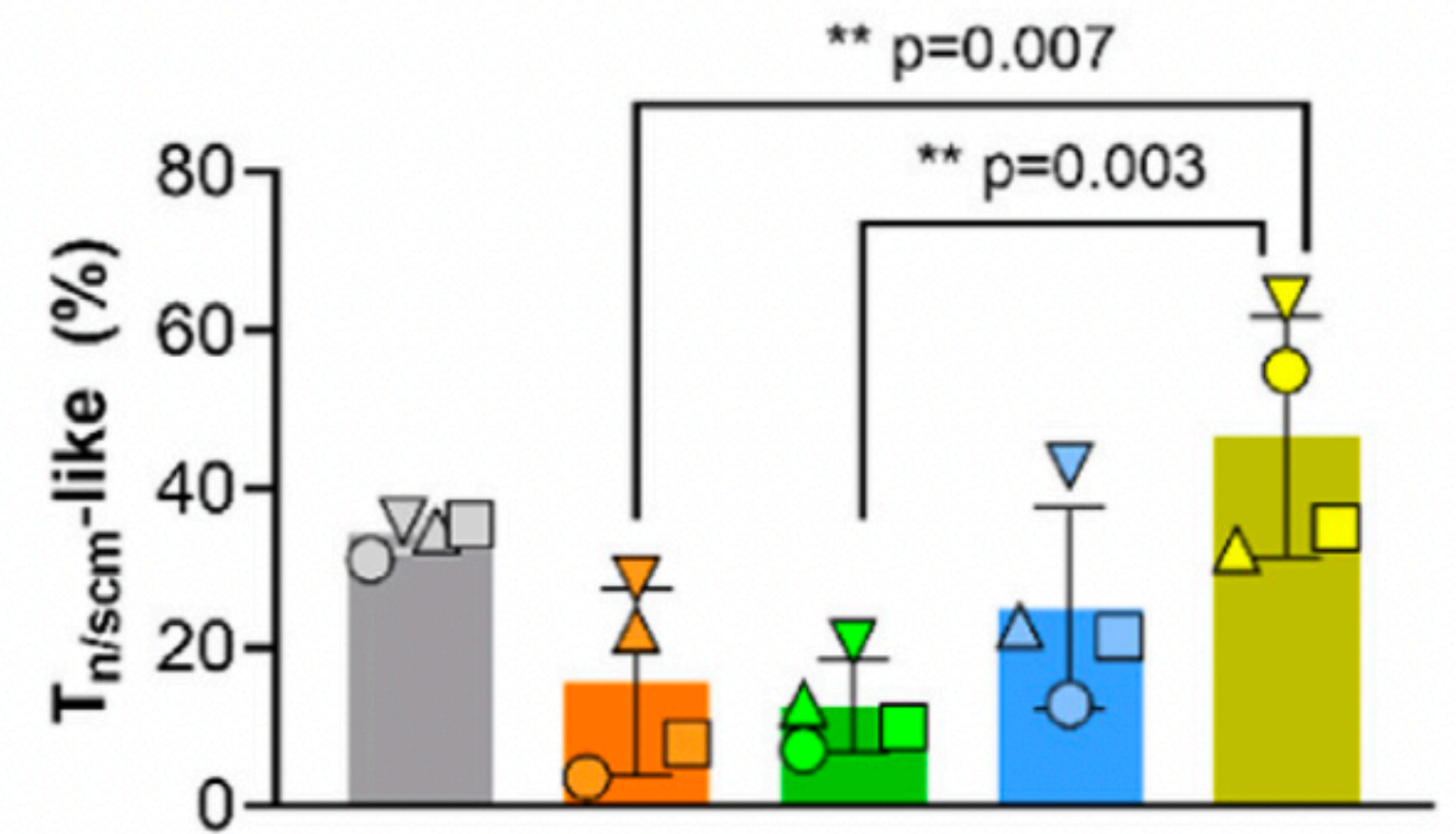
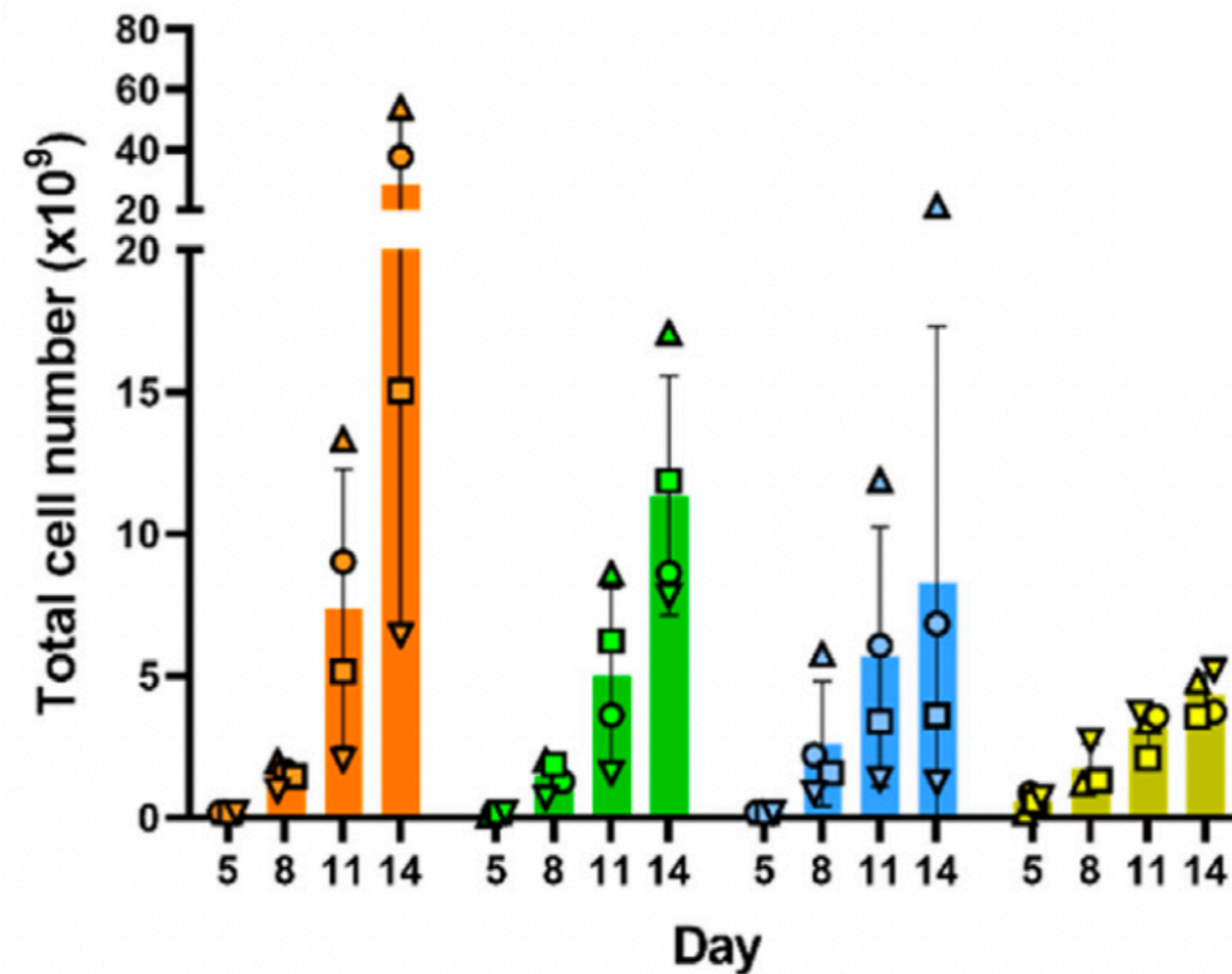
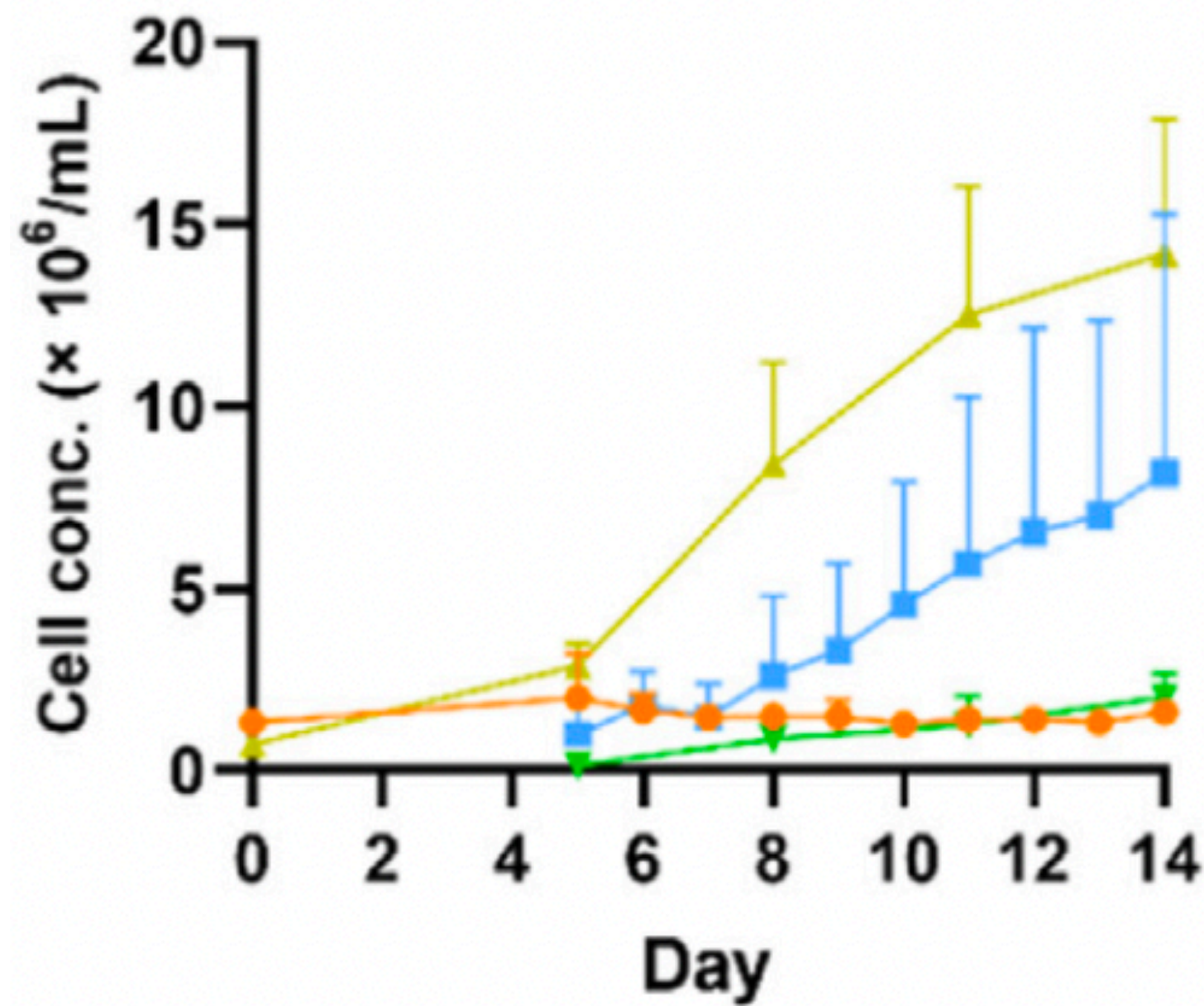
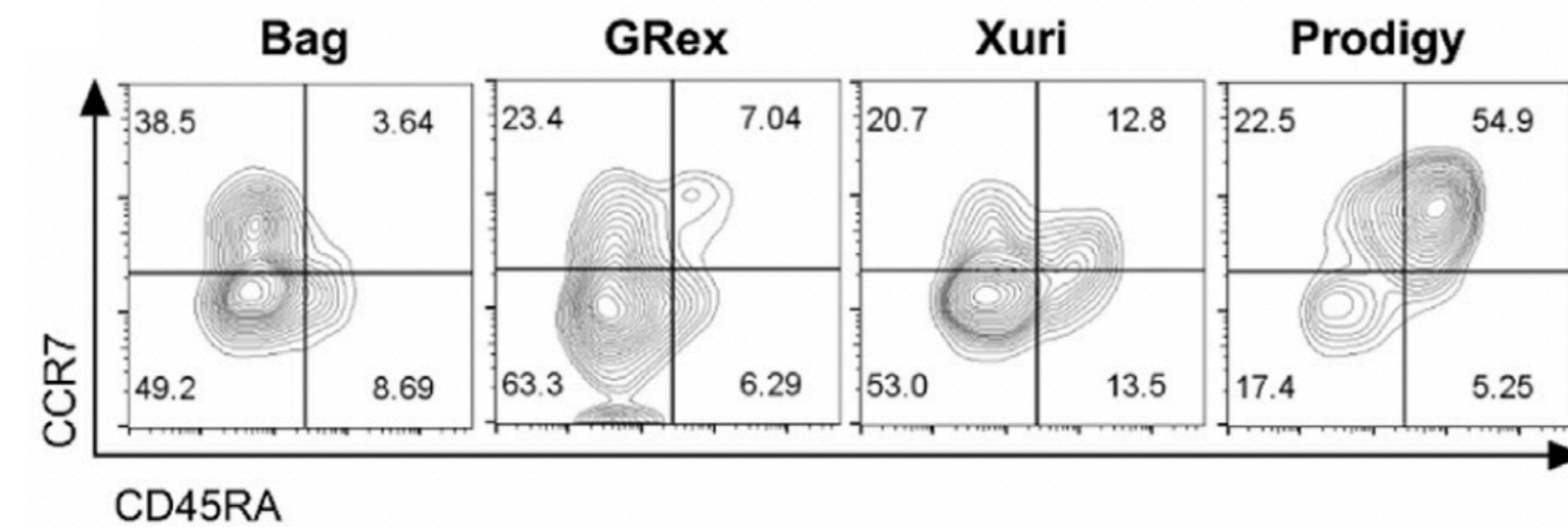
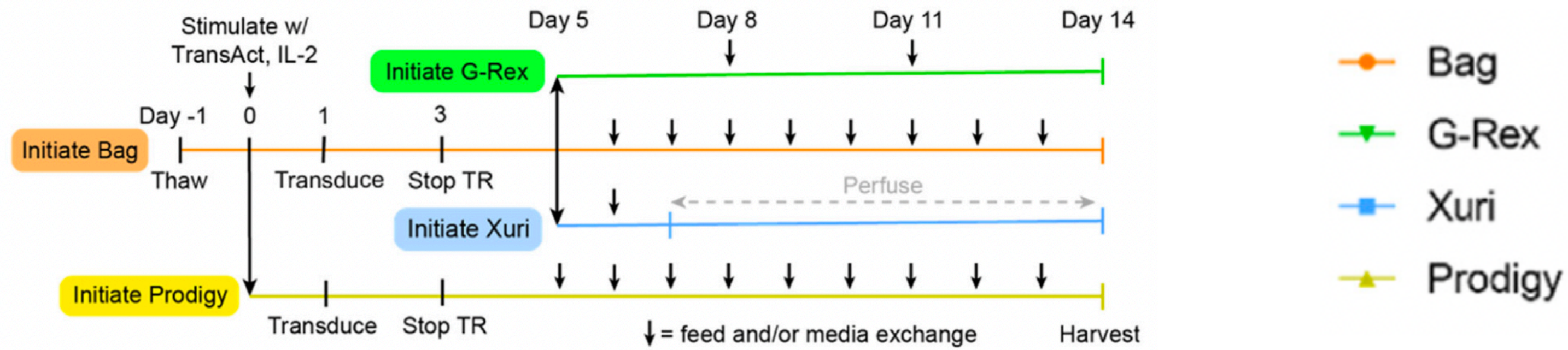


Xuri W25 - Cytiva



BCT Quantum - Terumo

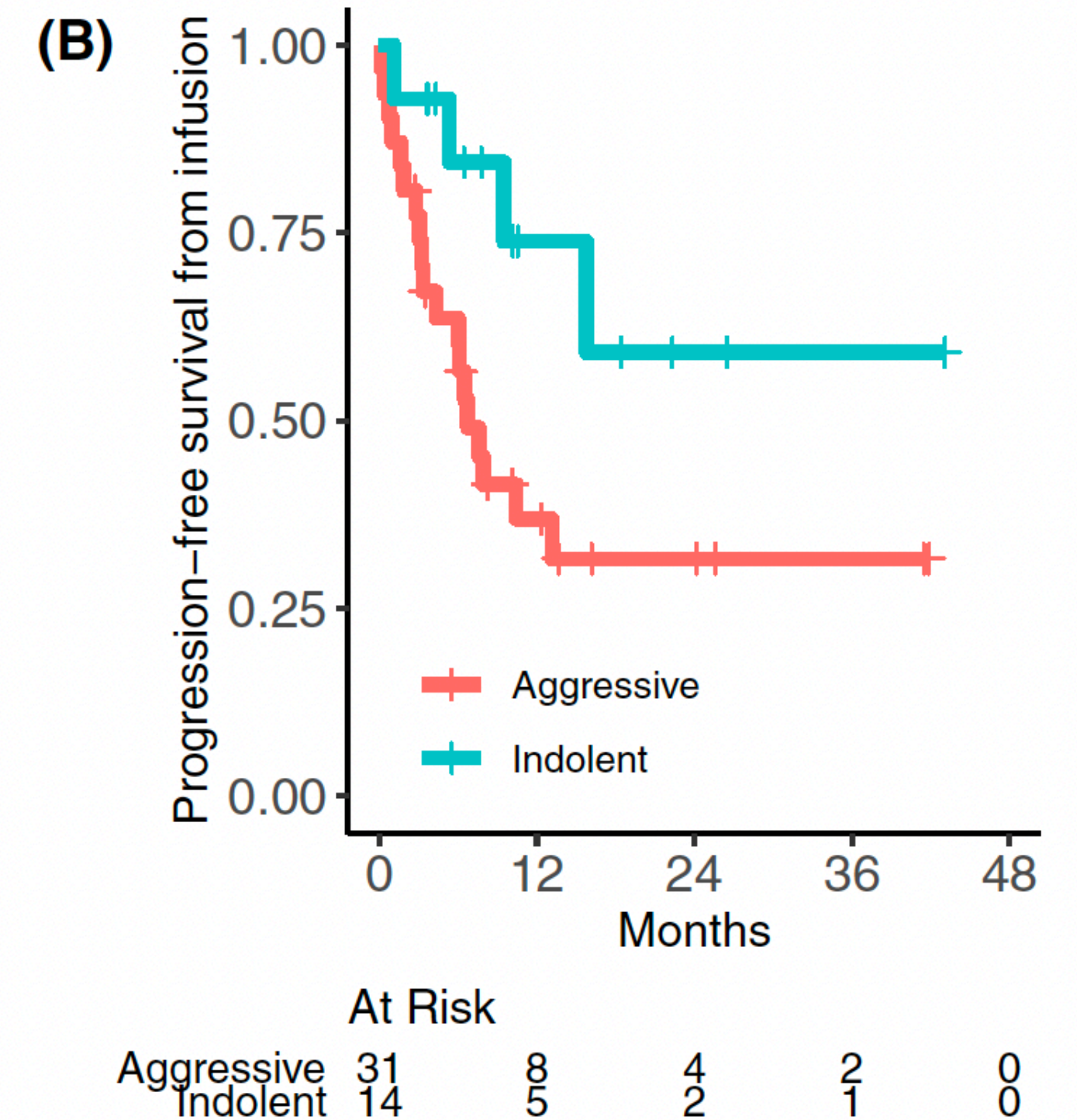
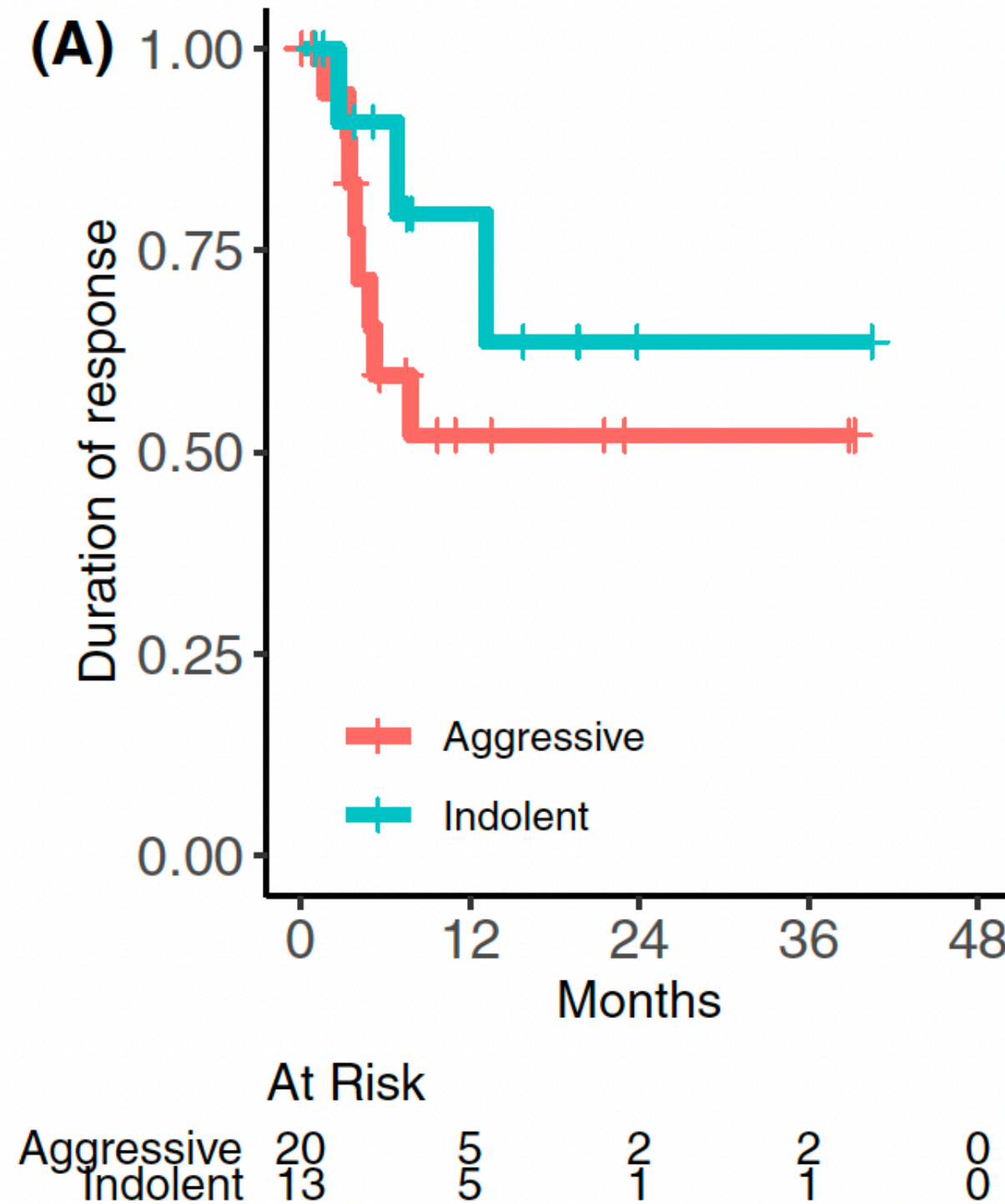
Rendimiento de plataformas automatizadas



Resultados con plataformas automatizadas

ARI-001 Varnimcabtagene-autoleucel en LNH-B R/R

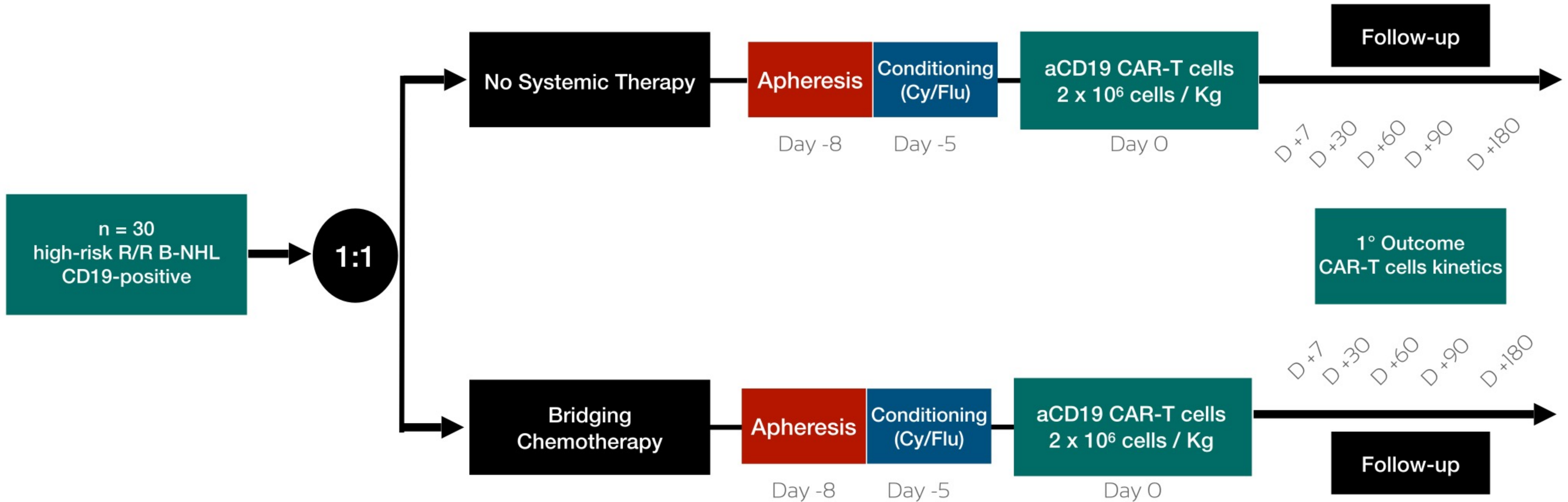
Characteristic	Patients (n = 51)
Disease type, n (%)	
Diffuse large B-cell lymphoma	5 (10)
Primary mediastinal large B-cell lymphoma	2 (4)
High-grade lymphoma	1 (2)
Grey-zone lymphoma	2 (4)
Primary effusion lymphoma	1 (2)
Transformed follicular lymphoma	1 (2)
Primary central nervous system B-cell lymphoma	2 (4)
Richter transformation	10 (20)
Burkitt lymphoma	3 (6)
Follicular lymphoma	12 (23)
Mantle-cell lymphoma	9 (17)
Marginal zone lymphoma	2 (4)
Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma	1 (2)
Age, median (range)	57 (19–74)
Female sex, n (%)	22 (43)
Prior therapies, median (range)	4 (2–9)
Prior autologous haematopoietic cell transplantation, n (%)	18 (35)
Prior allogeneic haematopoietic cell transplantation, n (%)	8 (16)



CRS 84% / 4% (\geq G3)

ICANS 7% / 2% (\geq G3)

“CD19-directed CAR-T cells with or without bridging therapy in high-risk relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphomas”





Conclusiones



CÓMO ENTRENAR A TU

LINFOCITO

Hága usted mismo el CAR-T

Conclusiones

- Generar acceso a CAR-T cells es una necesidad no satisfecha en LATAM
- CAR-T POC es una alternativa atractiva en poblaciones nicho sin acceso comercial
- La reducción en tiempos V2V agrega potencialmente un beneficio en sobrevida
- Antes de comenzar el desarrollo de una unidad de CAR-T POC considerar:
 - Manejar las especificaciones y la confiabilidad del método de manipulación genética
 - Evaluar la cadena de producción que mejor le asegure un producto óptimo a infundir
 - Establecer la ruta regulatoria para llevar a cabo la producción
 - Desarrollar un sistema de gestión de calidad cGMP
 - Predefinir los costos de instalación, validación y producción clínica

