

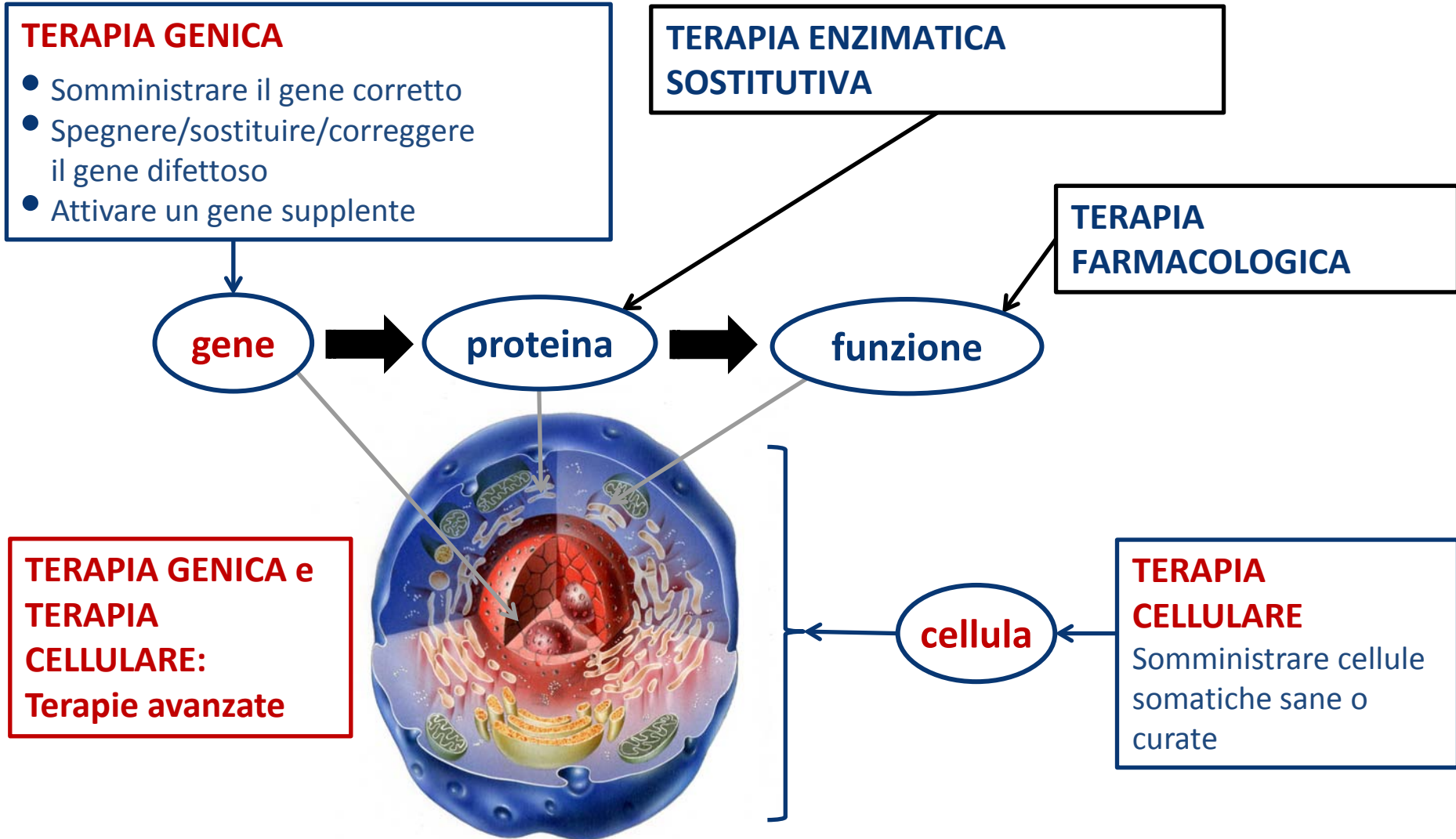
# Aferesi per ottenimento di prodotti per terapie cellulari innovative

Dott. Luca Santoleri

Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale  
Ospedale San Raffaele di Milano

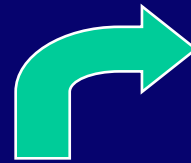
Ravenna, 25/11/2017

# Terapia genica e cellulare per le malattie rare



# LA TERAPIA DELLE MALATTIE GENETICHE CON CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE

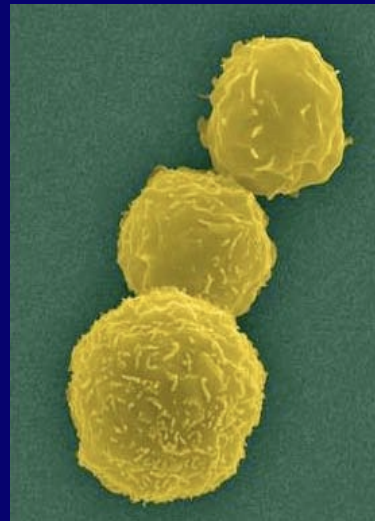
*Trapianto allogenico di cellule staminali da donatore sano*



**Midollo osseo**

**Sangue di cordone ombelicale**

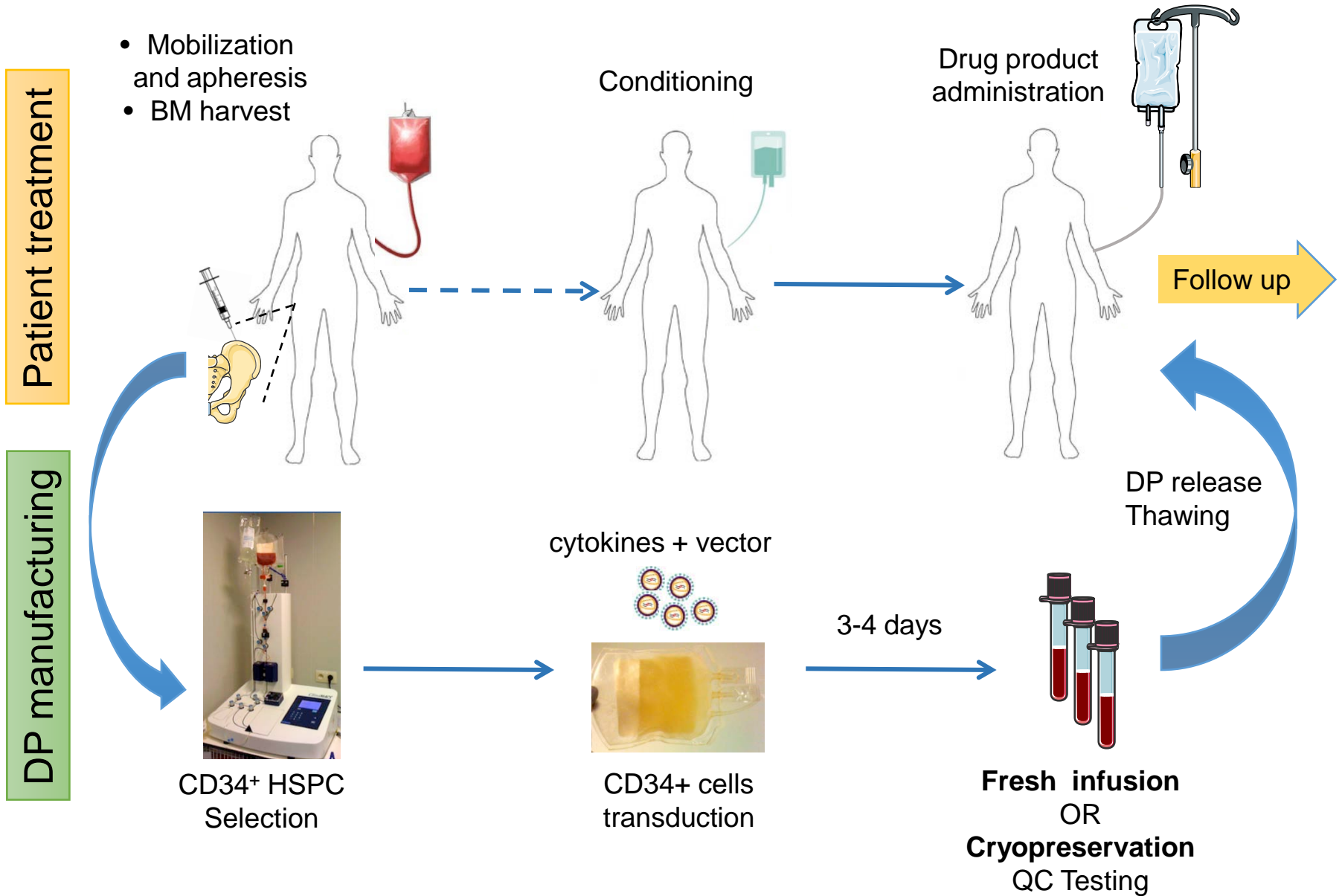
**Sangue periferico dopo stimolazione con fattori di crescita**



**Trapianto autologo di cellule staminali del paziente dopo correzione**



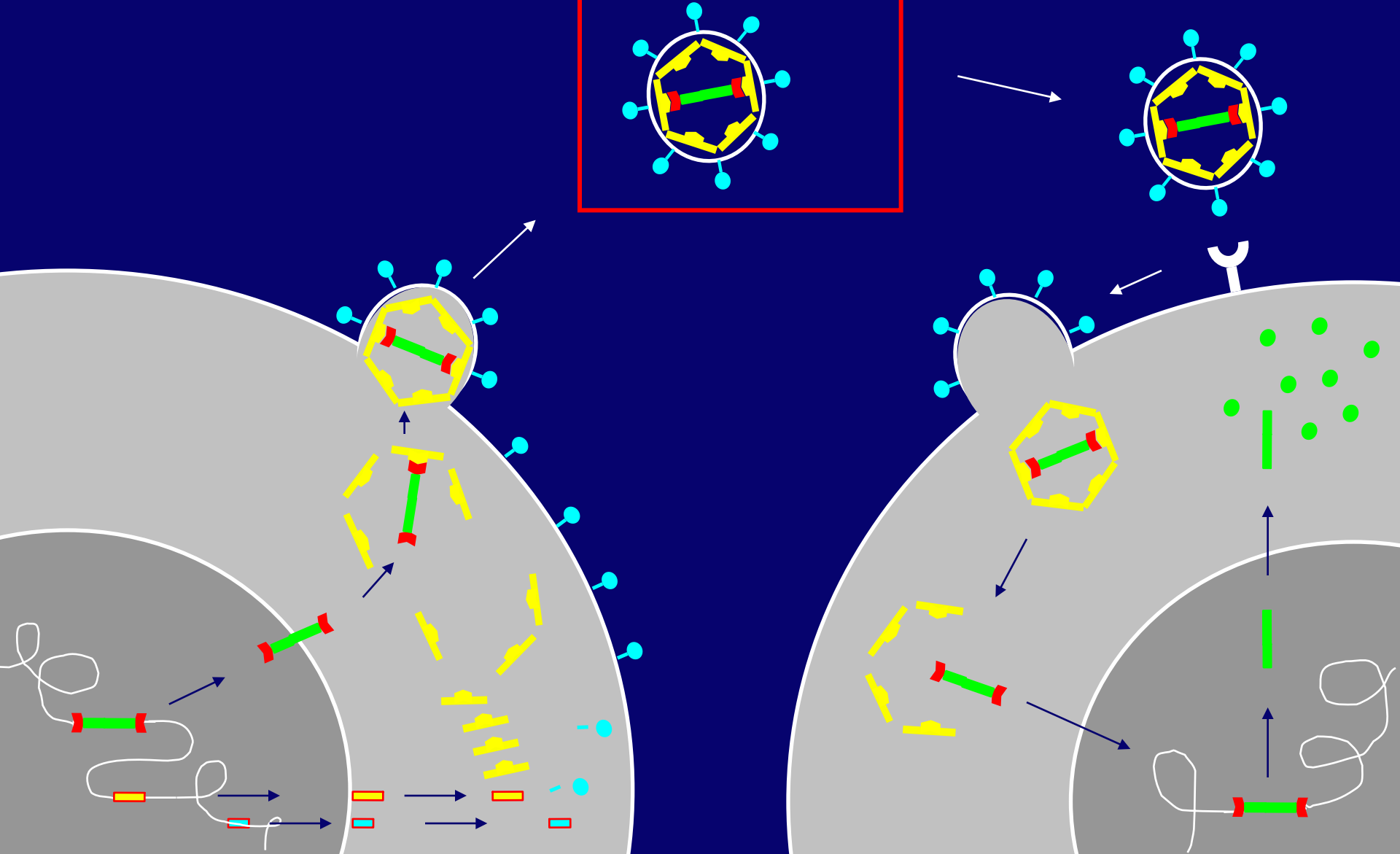
# Ex vivo HSC gene therapy for genetic diseases

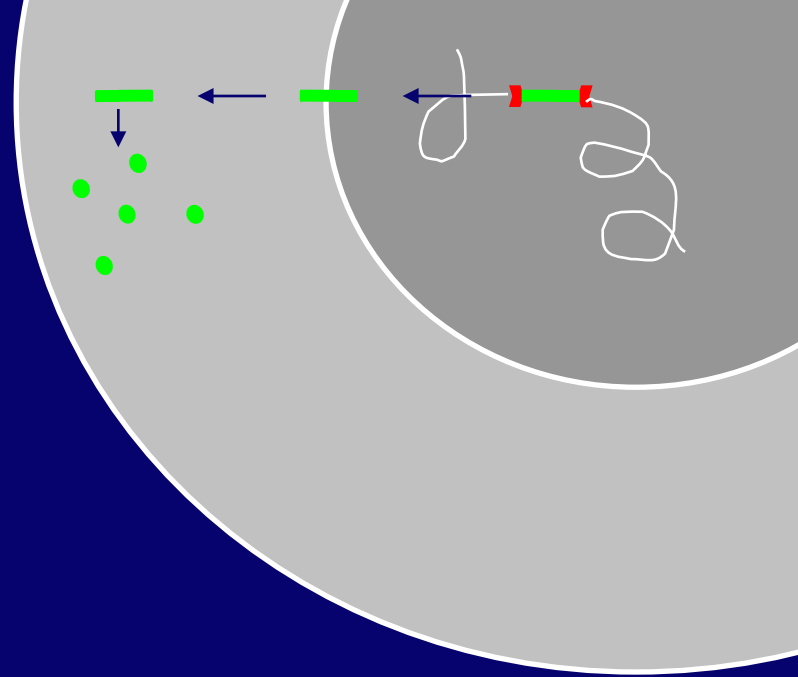
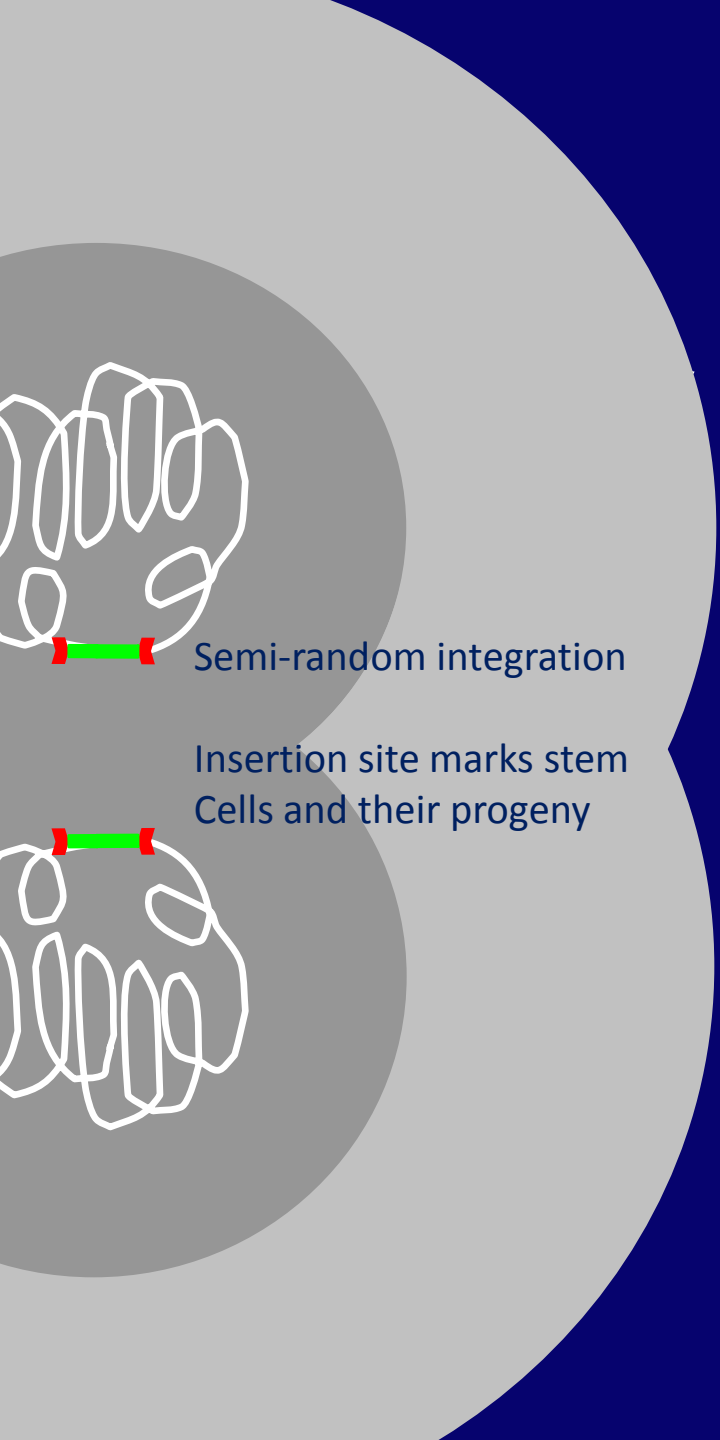


Cellula  
Produttrice

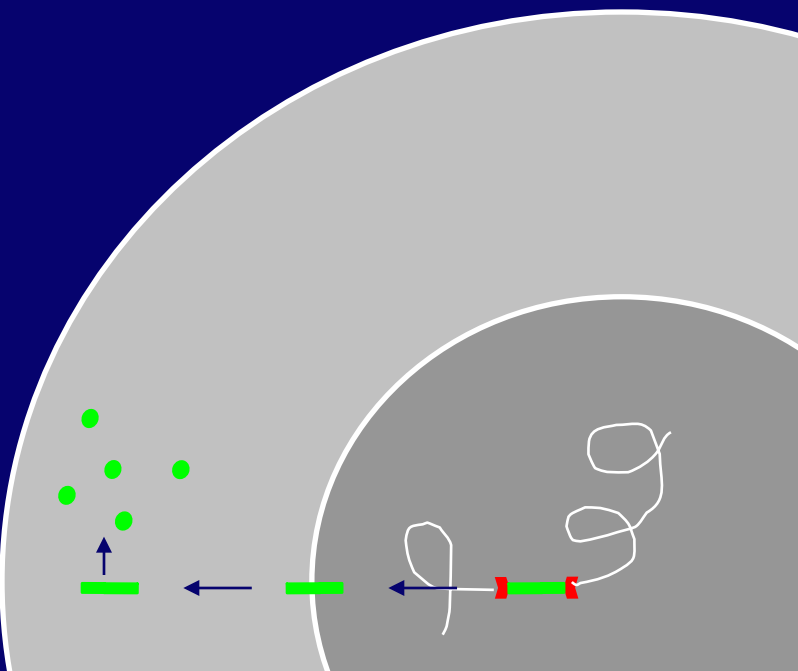
Vettore virale  
Trasporta il  
gene sano

Trasferimento  
genico





Transgene transferred to daughter cells



# Gene transfer in HSC – Clinical trials

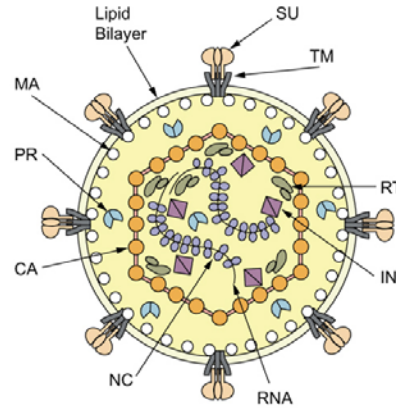
## Gamma -RETROVIRAL VECTOR



SCIDX1, WAS, CGD

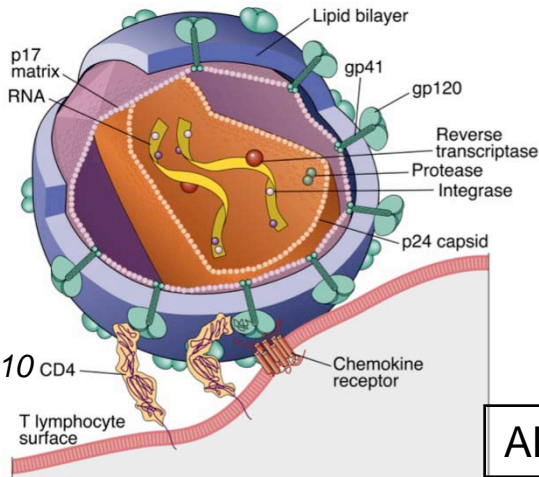


ADA SCID



**Efficacy  
But insertional  
mutagenesis**

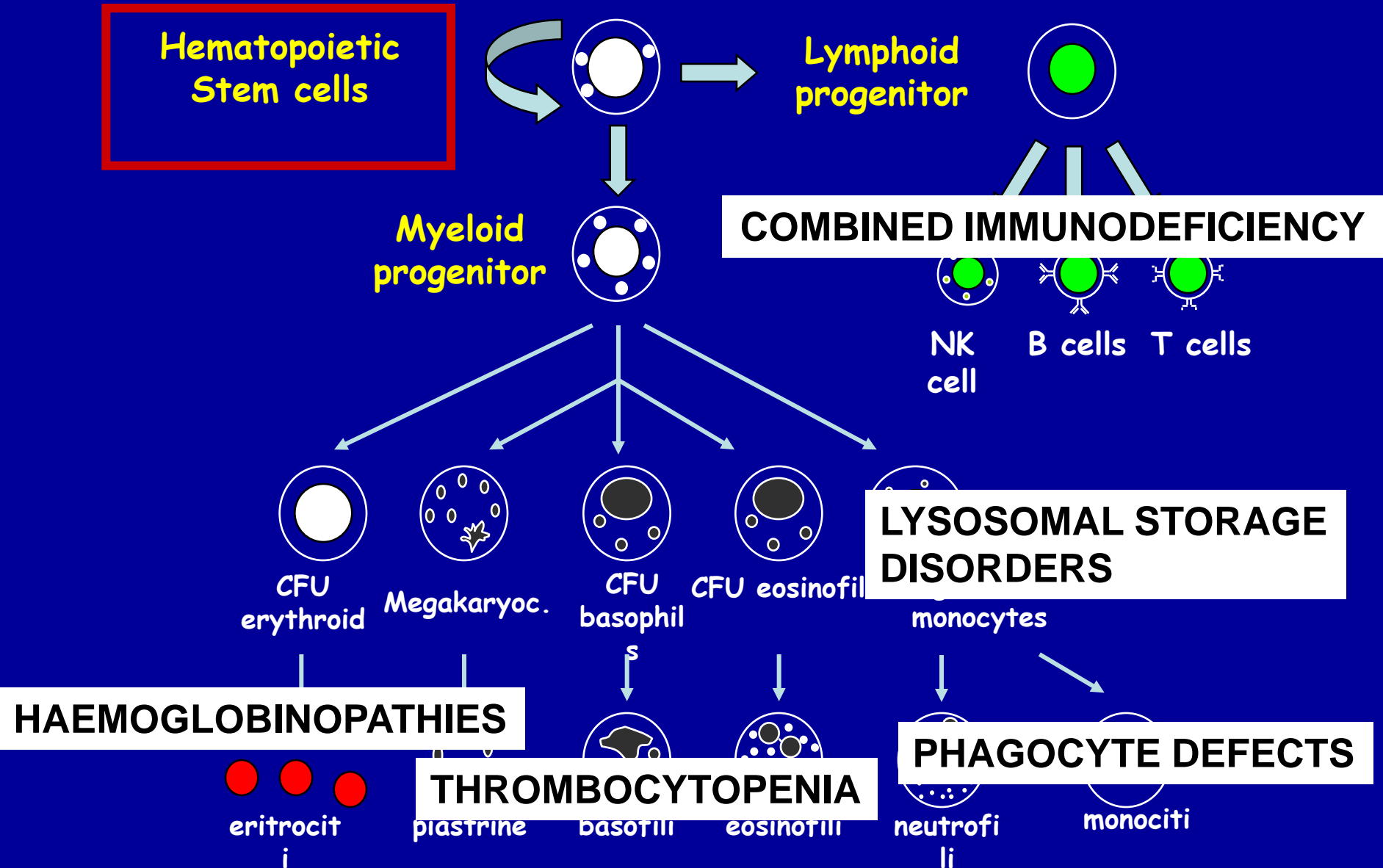
## LENTIVIRAL VECTOR



ALD, WAS, MLD, Bthl, SCD, CGD, ADA SCID

*Cartier et al, Science 2009*  
*Aiuti et al, NEJM 2009*  
*Hacein-Bey-Abina et al, NEJM 2010*  
*Cavazzana et al, Nature 2010*  
*Candotti et al, Blood 2012*  
*Aiuti et al Science 2013*  
*Biffi et al, Science 2013*  
*Hacein-Bey-Abina et al, JAMA 2015*

# Monogenic blood borne disorders candidate to gene therapy





# TERAPIA GENICA DEI TUMORI

- Introduzione di recettori (TCR, CAR antigene specifici)
- Introduzione di geni “TUMOR SUPPRESSOR”
- Utilizzo di geni suicidi con virus competenti per la replicazione
- Antigeni tumorali per aumentare l’immunogenicità
  - Cellule dendritiche
  - Linfociti
  - In vivo
- Citochine per favorire la risposta immune
  - Delivery locale, mirato
- Inibizione prodotti trascrizione geni tumorali
- Chemioresistenza per cellule staminali sane

## BRIEF REPORT

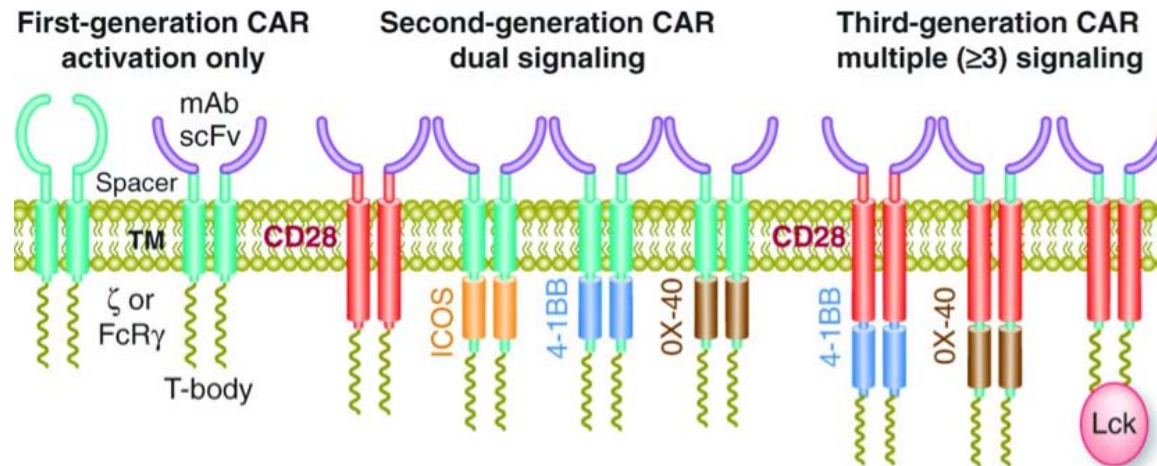
## Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia

David L. Porter, M.D., Bruce L. Levine, Ph.D., Michael Kalos, Ph.D., Adam Bagg, M.D., and Carl H. June, M.D.

## BRIEF REPORT

## Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia

Stephan A. Grupp, M.D., Ph.D., Michael Kalos, Ph.D., David Barrett, M.D., Ph.D., Richard Aplenc, M.D., Ph.D., David L. Porter, M.D., Susan R. Rheingold, M.D., David T. Teachey, M.D., Anne Chew, Ph.D., Bernd Hauck, Ph.D., J. Fraser Wright, Ph.D., Michael C. Milone, M.D., Ph.D., Bruce L. Levine, Ph.D., and Carl H. June, M.D.



*Sci Transl Med.* 2013 Aug 7;5(197):197ra103. doi: 10.1126/scitranslmed.3006034.

### Identification of a Titin-derived HLA-A1-presented peptide as a cross-reactive target for engineered MAGE A3-directed T cells.

Cameron BJ, Gerry AB, Dukes J, Harper JV, Kannan V, Bianchi FC, Grand F, Brewer JE, Gupta M, Plesa G, Bossi G, Vuidepot A, Powlesland AS, Legg A, Adams KJ, Bennett AD, Pumphrey NJ, Williams DD, Binder-Scholl G, Kulikovskaya I, Levine BL, Riley JL, Varela-Rohena A, Stadtmauer EA, Rapoport AP, Linette GP, June CH, Hassan NJ, Kalos M, Jakobsen BK.

Immunocore Ltd., 57c Milton Park, Jubilee Avenue, Abingdon, OX14 4RX, UK.

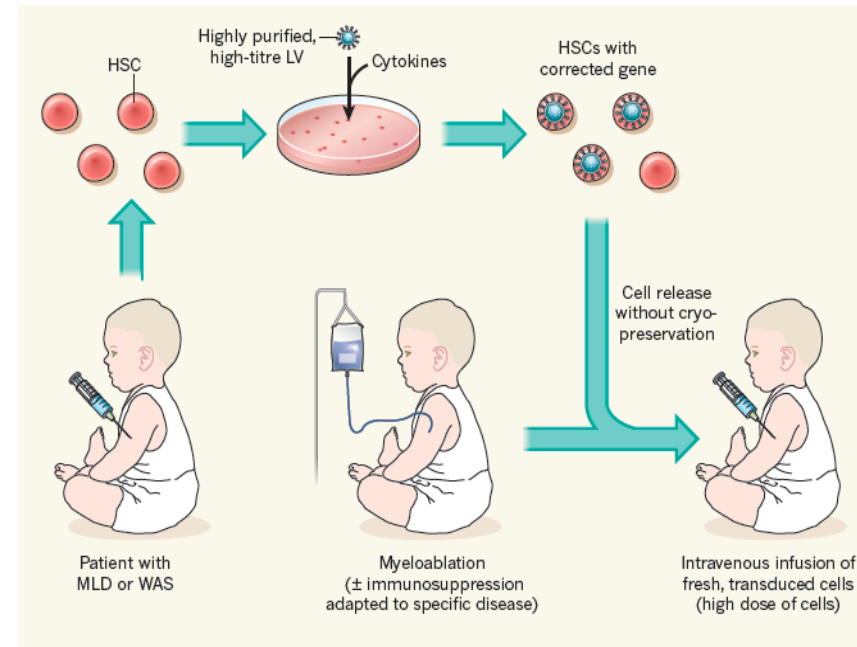
# Conclusioni

---

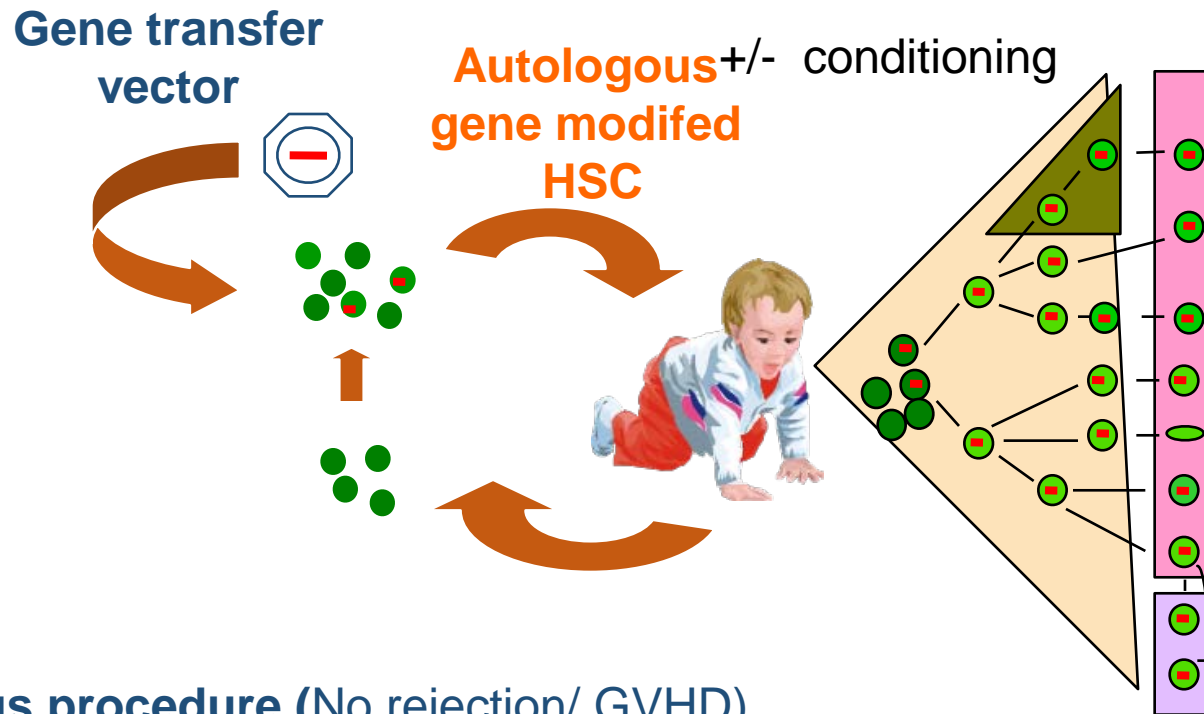
- I farmaci basati su terapie avanzate sono altamente innovativi e personalizzati che potrebbero una possibilità di cura definitiva per malattie rare a base genetica e tumori
- Il primo farmaco di terapia genica con cellule staminali ematopoietiche ingegnerizzate ex vivo (per ADA-SCID) è stato approvato nella Comunità Europea nel 2016
- Sono in corso studi clinici di terapia genica per varie malattie con risultati promettenti

# Key parameters for successful HSC gene therapy

- Understanding disease biology
- Therapeutic levels in target cells/tissues
- Safety of vector design
- Cell dose and gene transfer efficiency
- Preparatory conditioning regimen
- Infrastructure and environment

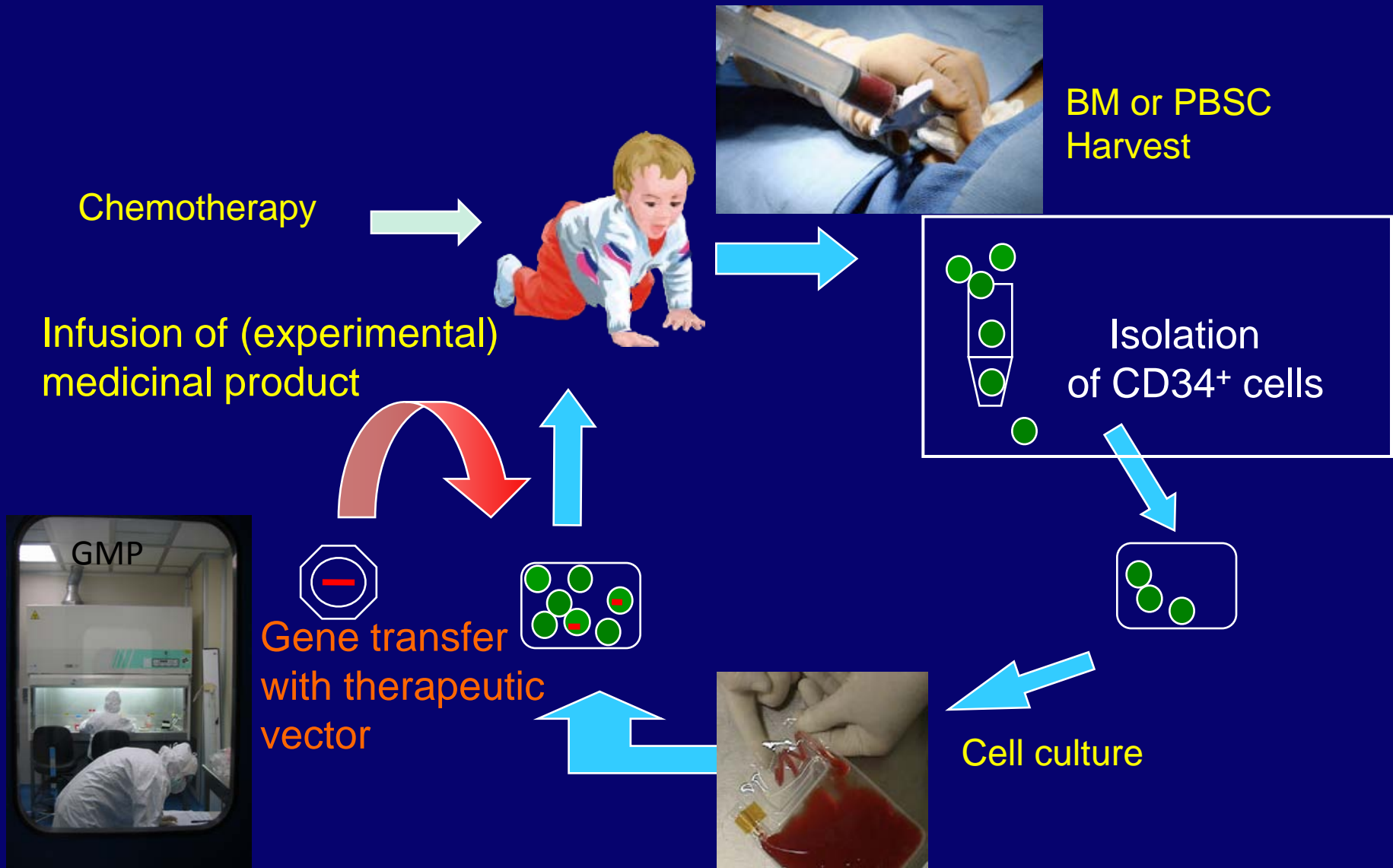


# Main advantages of HSC gene therapy

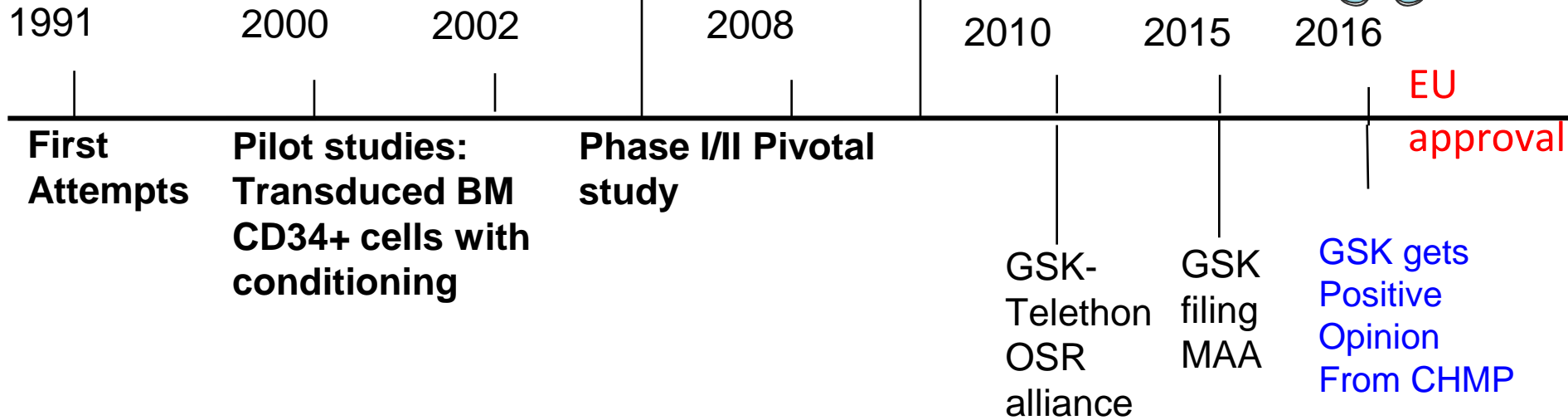


- Autologous procedure (No rejection/ GVHD)
- Potential reduced toxicity vs BMT (chemotherapy)
- Potential lower morbidity and mortality vs BMT
- Exploit natural selective advantage (primary immunodeficiency)

# Gene therapy with genetically modified HSC



# First HSC GT product to obtain EU approval Strimvelis (GSK2696273)



*Ferrari et al., Science 1991*  
*Bordignon et al. Science 1995*

*Aiuti et al., Science 2002*  
*Aiuti et al., New Engl J Med 2009*

*Cicalese, Ferrua et al,*  
*Blood 2016*



**TERUMOBCT**  
Unlocking the Potential of Blood

# PRINCIPI ESSENZIALI

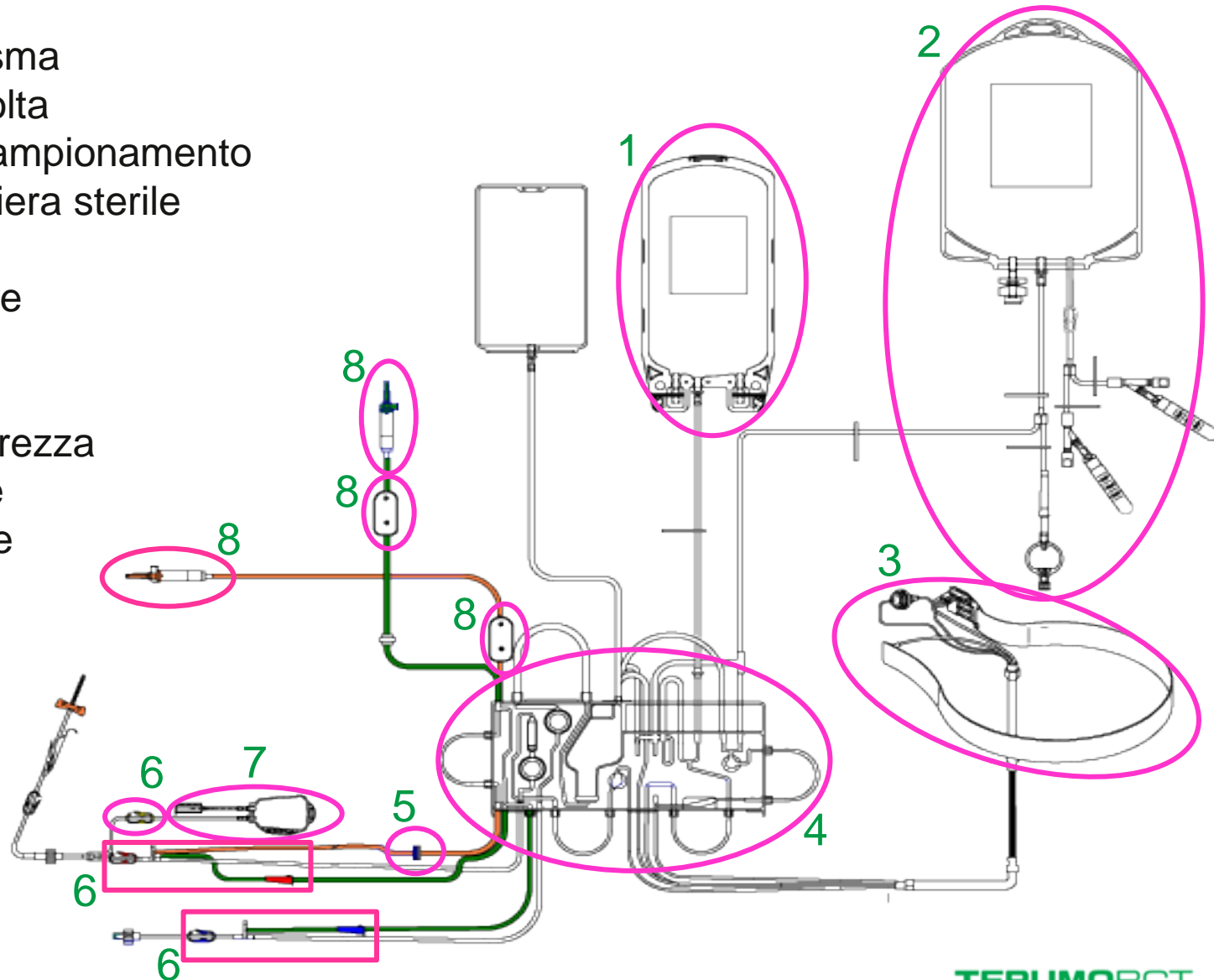
SISTEMA DI AFERESI  
SPECTRA OPTIA®



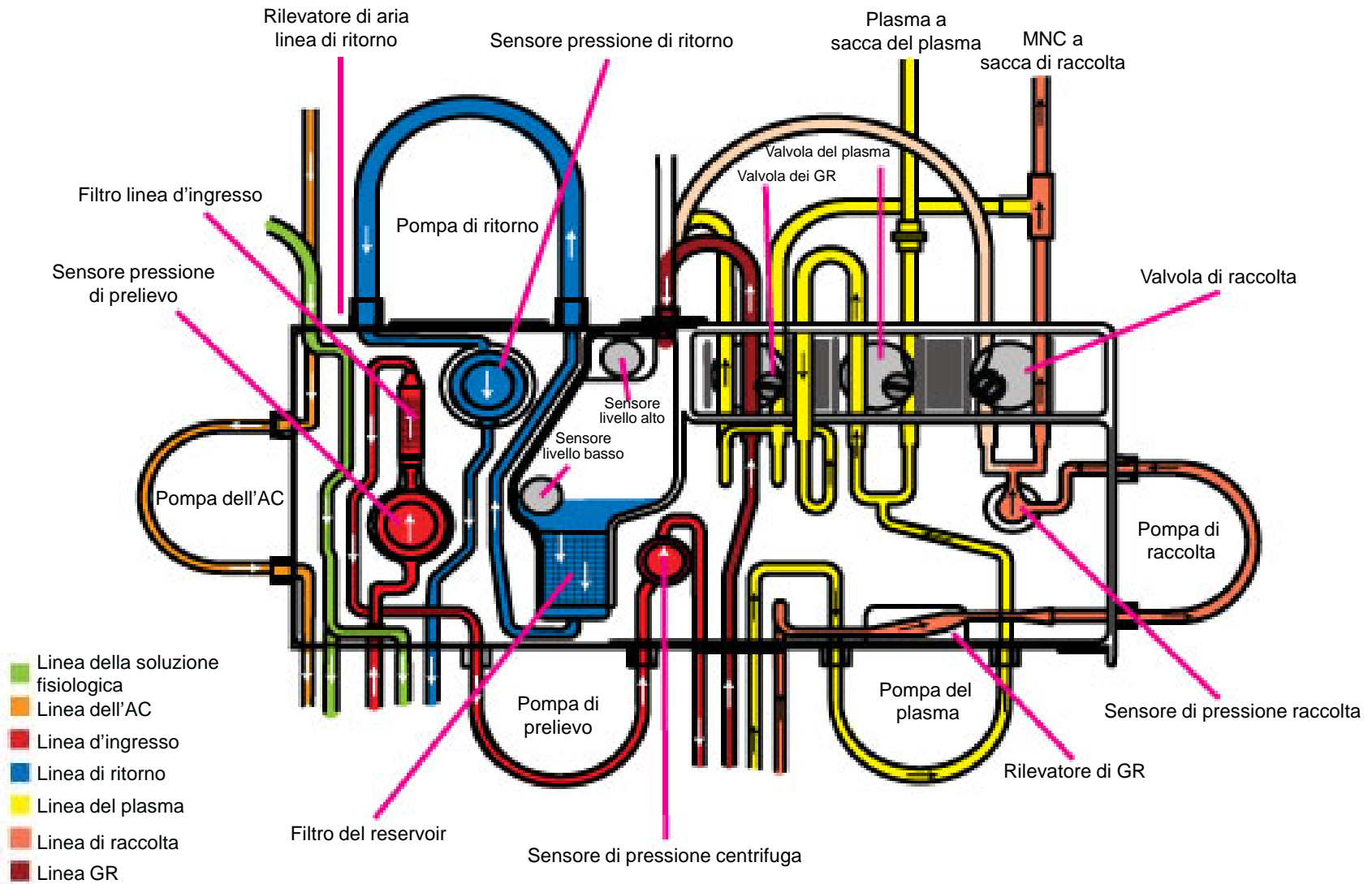


# Circuito di raccolta

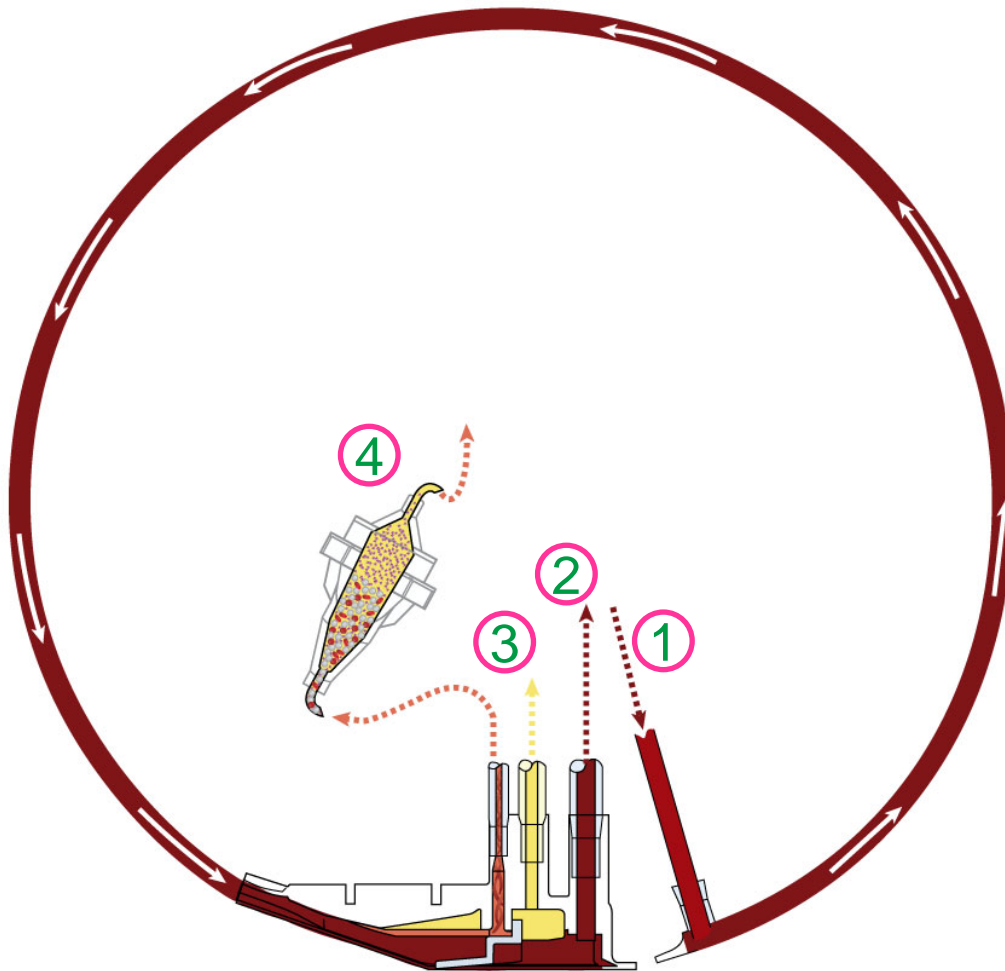
1. Sacca del plasma
2. Sacca di raccolta
  - Bulbi di campionamento
  - Filtro barriera sterile
3. Cintura
  - Connettore
  - Camera
4. Cassetta
5. Valvola di sicurezza anticoagulante
6. Clamp colorate
7. Sacca di deviazione
8. Perforatori e tubi colorati
  - Filtri barriera sterili



# Principi di base della raccolta di MNC



# Separazione delle cellule: la cintura



1. Il sangue intero entra nella cintura.
2. I GR affluiscono passivamente nel reservoir.
3. Il plasma viene pompato nel reservoir oppure raccolto.
4. Il buffy-coat viene aspirato dalla cintura.
  - Le piastrine vengono pompate nel reservoir o le cellule vengono pompate nella sacca di raccolta.

# Separazione delle cellule: il connettore

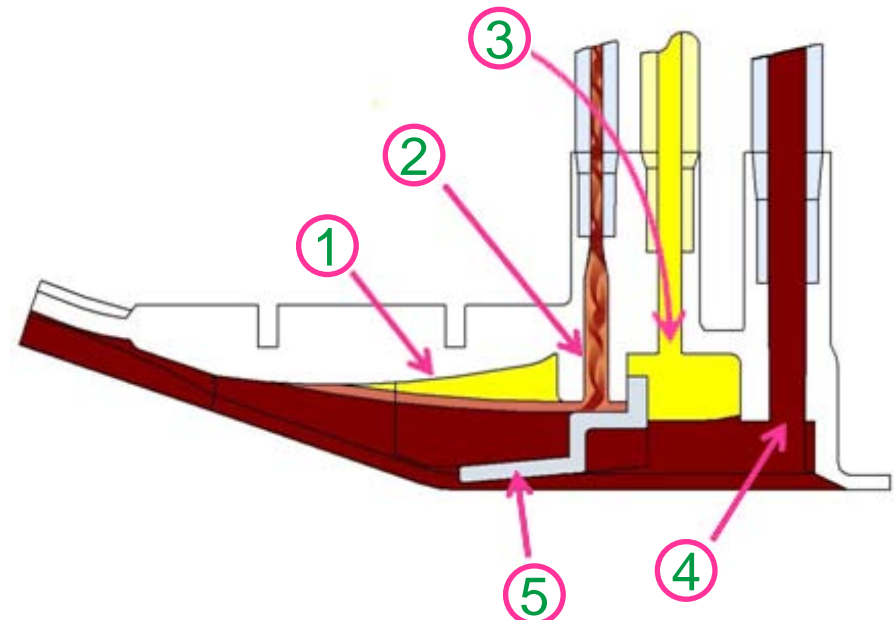
La forza centrifuga separa il sangue nel connettore in strati in base alla **densità relativa** delle cellule:

 Piastrine: da 1,04 a 1,08

 MNC: da 1,06 a 1,09

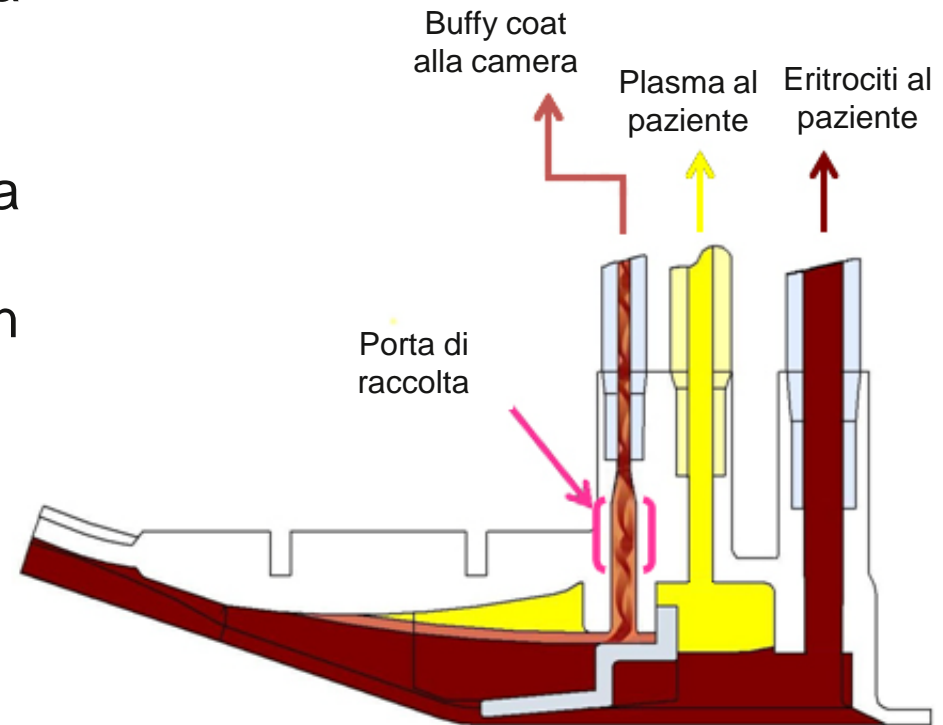
 GR: da 1,08 a 1,11

1. Barriera della parete interna
2. Porta di raccolta
3. Porta del plasma
4. Porta degli eritrociti
5. Barriera limitatrice



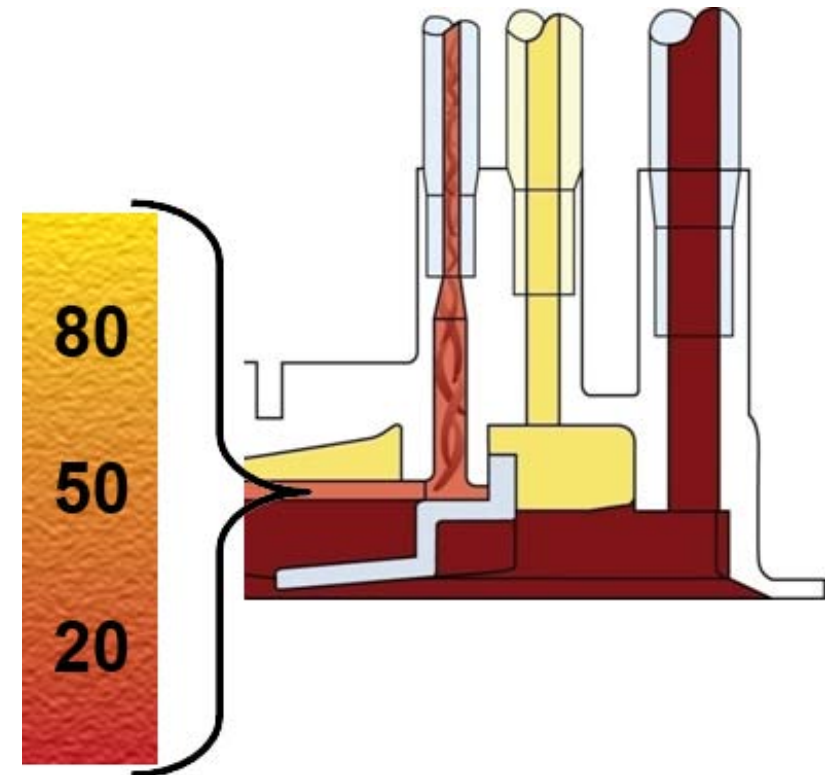
# Separazione delle cellule: il connettore

- Il sistema AIM controlla la concentrazione delle cellule (preferenza della raccolta) che attraversano la porta di raccolta regolando la portata della pompa del plasma.
- Per impostazione predefinita, la preferenza della raccolta assume un valore tra 20 e 60 in base al numero di GB e di piastrine del paziente.






# Preferenza della raccolta

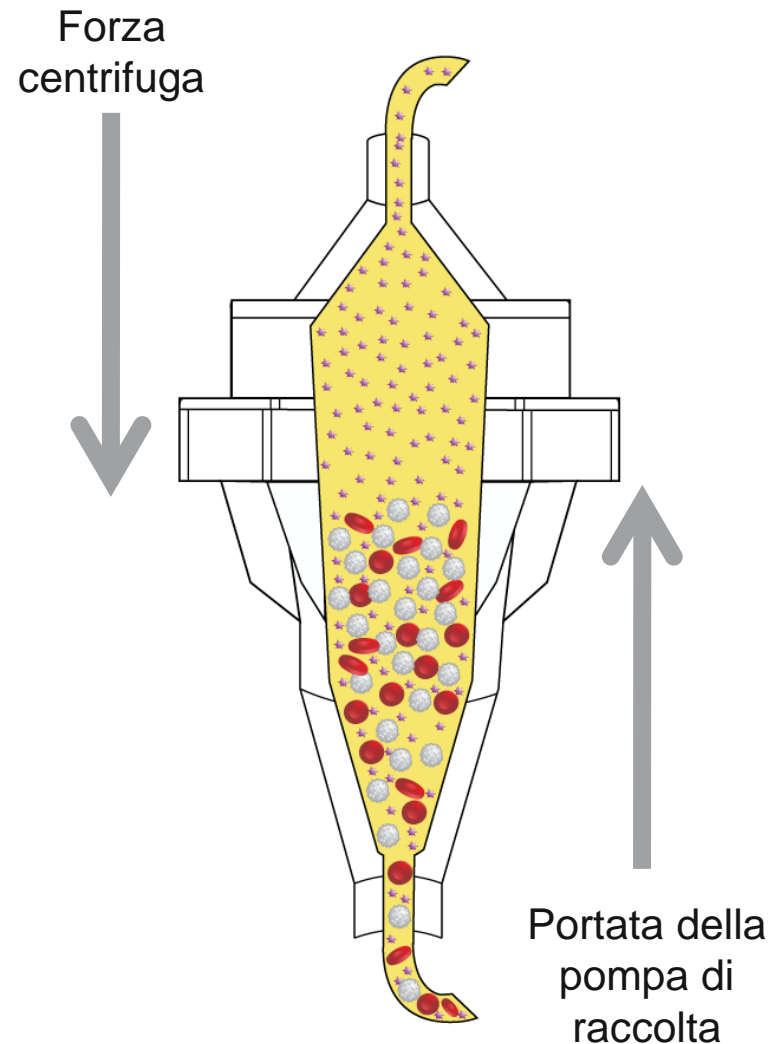
- Influisce sulla concentrazione di cellule che affluiscono nella camera e quindi sulla velocità di riempimento della camera.
- Deve correlarsi alle conte immesse per i leucociti e le piastrine del paziente.



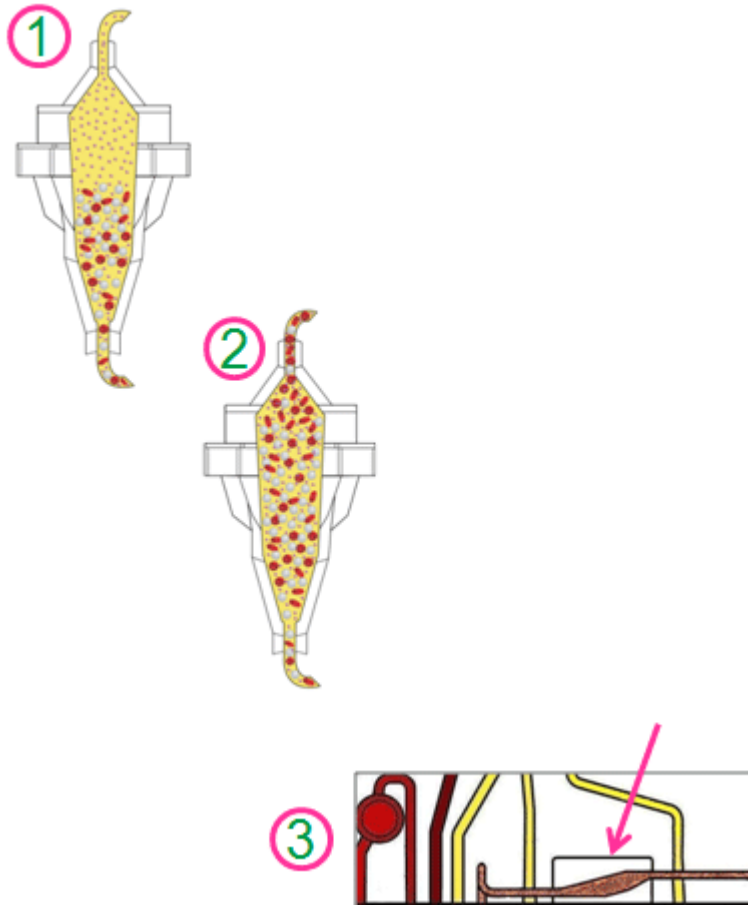
# Separazione delle cellule: la camera

La forza centrifuga e la portata della pompa di raccolta separano le cellule pompate nella camera in base alle relative **dimensioni**:

-  Piastrine: da 2 a 3  $\mu\text{m}$
-  GR: da 6 a 8  $\mu\text{m}$
-  MNC: da 10 a 15  $\mu\text{m}$



# Fase di accumulo



## Barra dei messaggi: “Riempimento della camera.”

1. Le cellule si accumulano nella camera.
  - Le piastrine vengono reinfuse continuamente al paziente.
2. Quando la camera è piena, le cellule cominciano a fuoriuscire e passano davanti al rilevatore di GR.
3. Il rilevatore di GR individua le cellule e attiva una fase di raccolta.

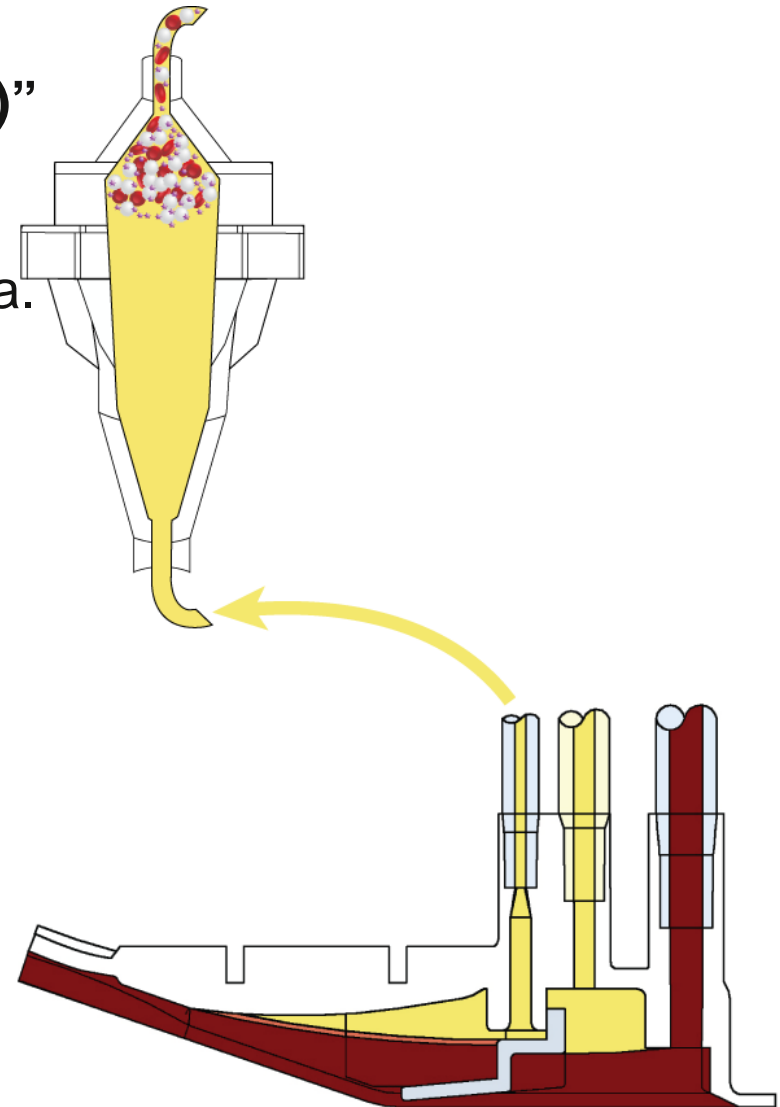


## Fase di raccolta: il lavaggio della camera

### Barra dei messaggi: “Raccolta cellule mononucleate (MNC)”

Il plasma viene pompato attraverso la camera per rimuovere il contenuto facendolo confluire nella sacca di raccolta.

1. Il rilevatore di GR rileva le cellule ed emette un segnale acustico.
2. La pompa di raccolta si ferma e la pompa del plasma e la centrifuga rallentano.
3. La valvola di raccolta si sposta in posizione di raccolta e la pompa di raccolta si riavvia.
4. La portata della pompa di raccolta aumenta e la pompa del plasma si arresta.

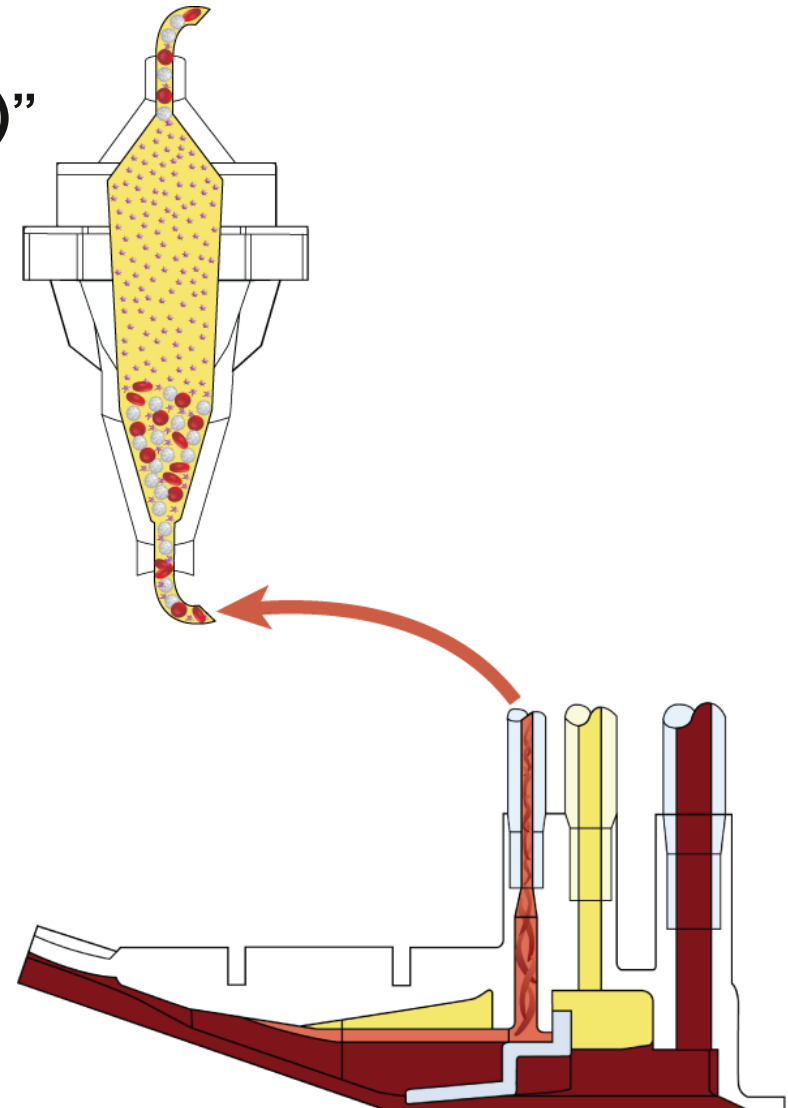


# Fase di raccolta: la raccolta camera

## Barra dei messaggi:

### “Raccolta cellule mononucleate (MNC)”

1. La pompa di raccolta si arresta.
2. La velocità della centrifuga aumenta e così pure il fattore di sedimentazione.
3. La pompa del plasma si riavvia.
4. La pompa di raccolta ricomincia a svuotare le cellule nella linea di raccolta a valle della valvola di raccolta.
5. La valvola di raccolta assume la posizione di ritorno.



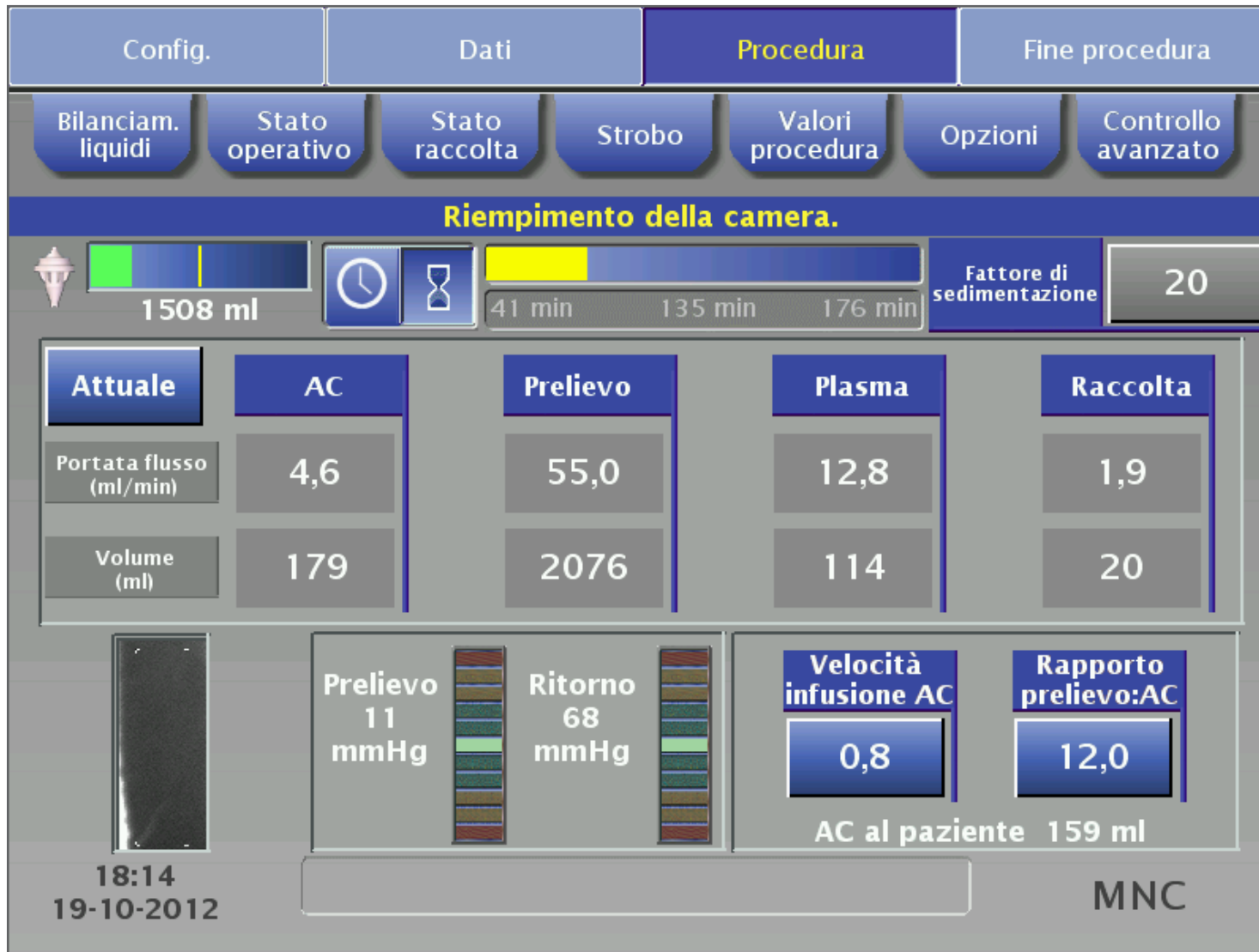
(.wmv)

Uscire dalla modalità Presentazione e fare doppio clic sulla casella verde per riprodurre il filmato sulla raccolta.

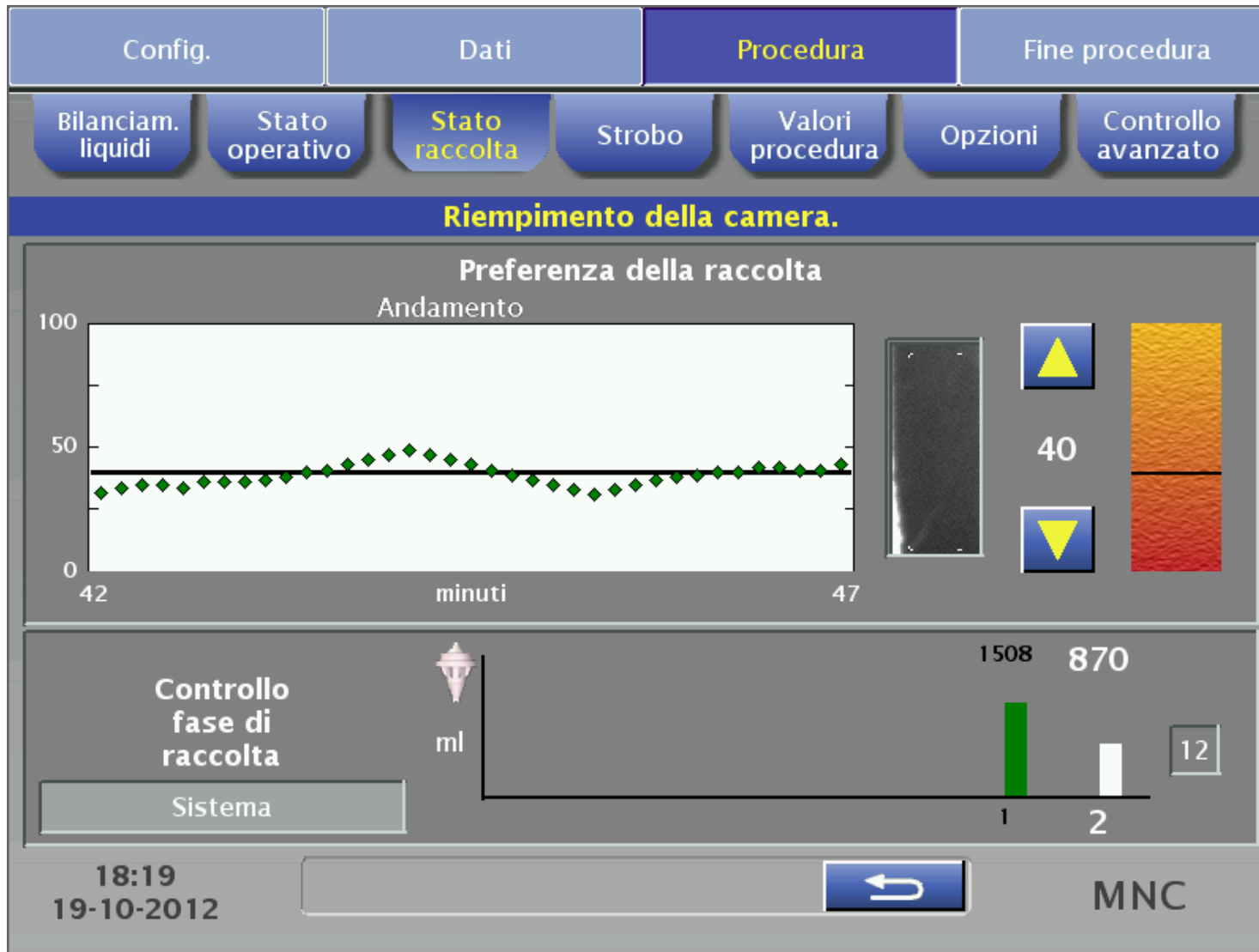
# Monitoraggio della procedura

- Procedura principale
- Stato della raccolta
- Connettore
- Linea di raccolta fino al reservoir
- Raccolta del contenuto della camera

# Procedura principale

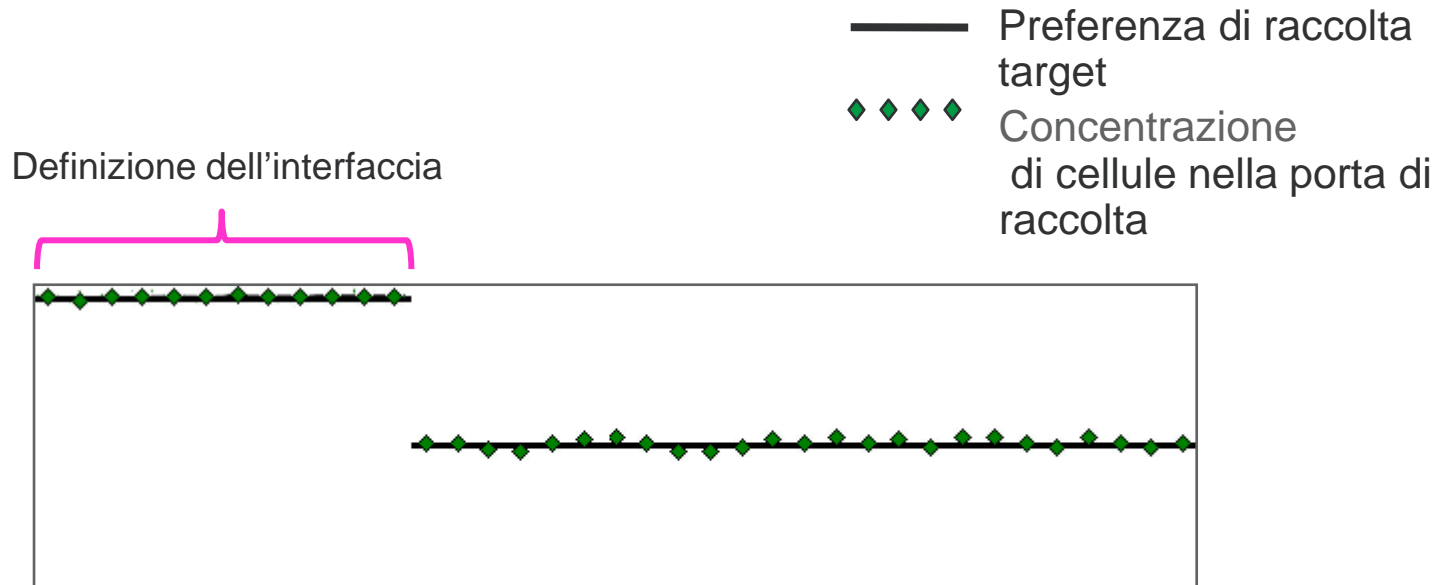


# Stato della raccolta



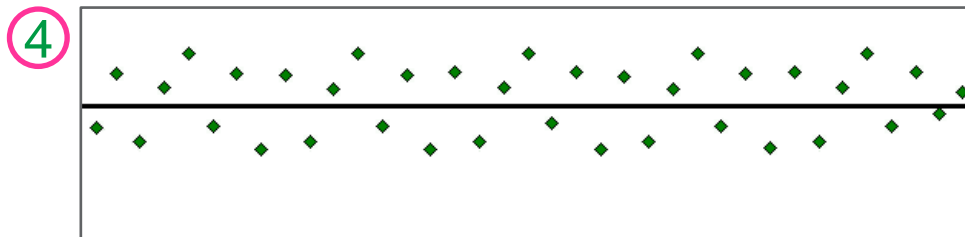
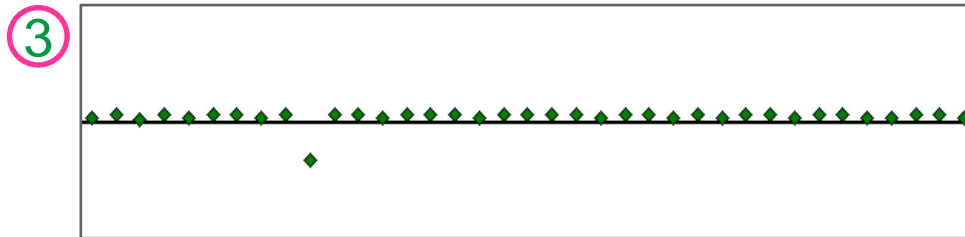
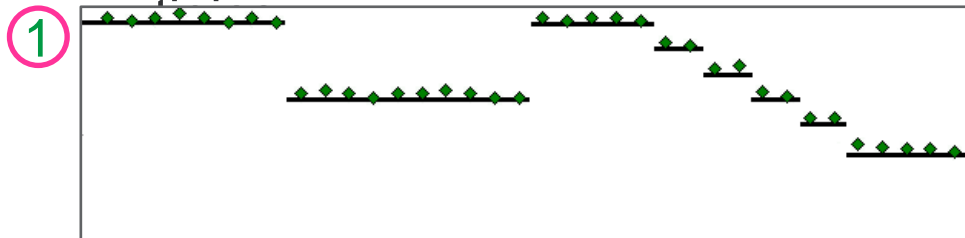
# Stato della raccolta (continua)

Grafico dell'andamento della preferenza di raccolta



# Stato della raccolta (continua)

Grafico dell'andamento dell'preferenza della raccolta: comportamento



1. Il sistema sta rimuovendo il buffy-coat.
2. Il sistema sta trattando un buffy-coat accumulato.
3. Un aumento o una riduzione momentanei della concentrazione di cellule nella porta di raccolta.
4. Il sistema sta cercando di mantenere una preferenza di raccolta omogenea con conte cellulari basse.

## Stato della raccolta (continua)

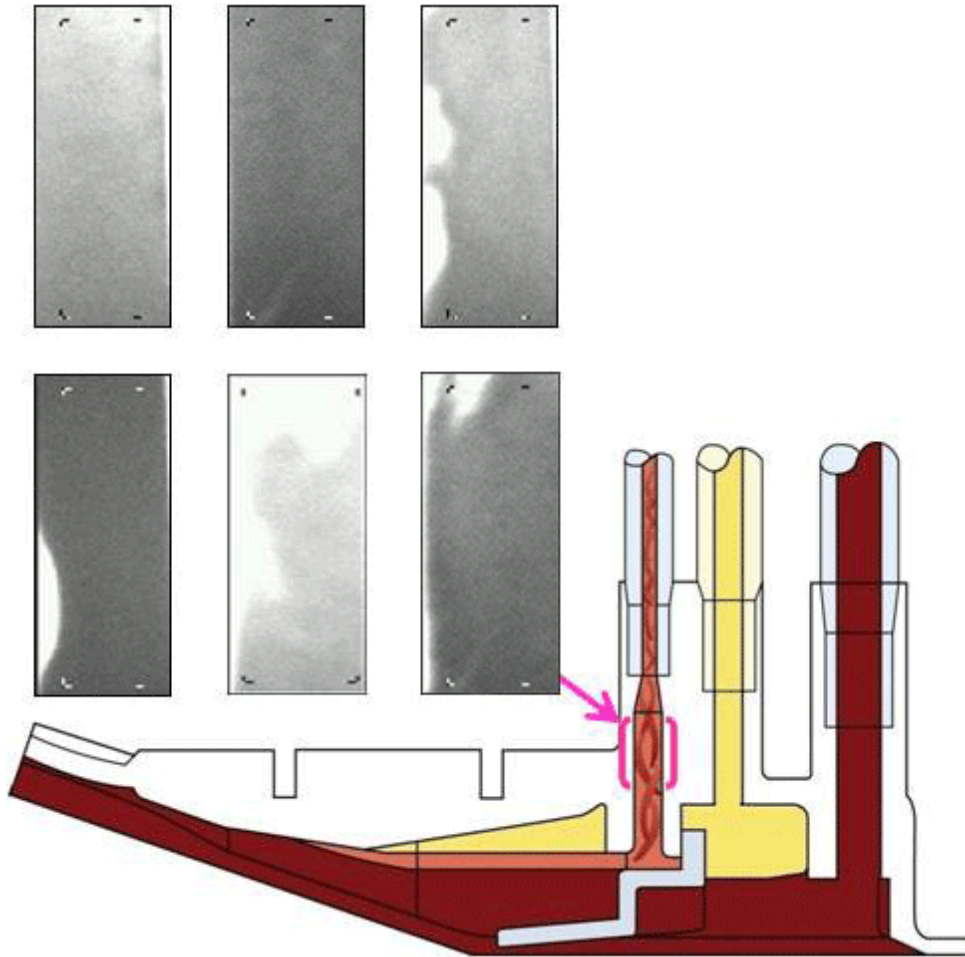


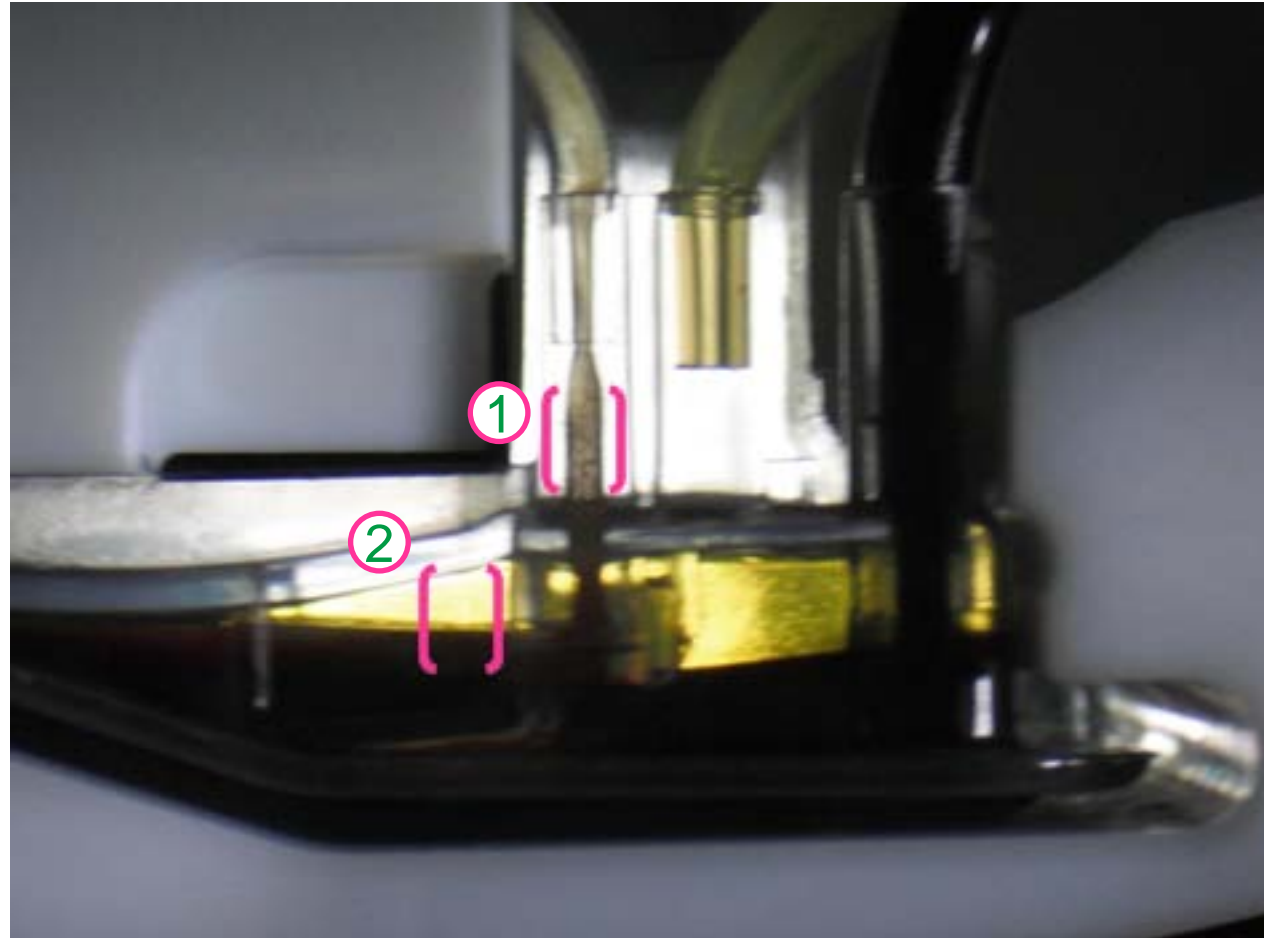
Immagine della porta di raccolta:

- Il sistema AIM acquisisce immagini della porta di raccolta.
- Le immagini mostrano la variazione nella concentrazione di cellule nella porta di raccolta.



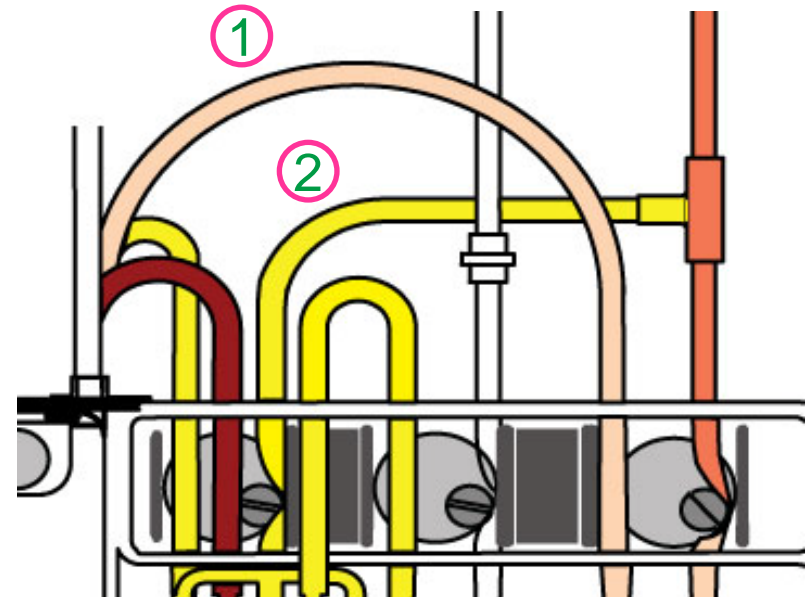
# Connettore

1. Porta di raccolta
2. Interfaccia



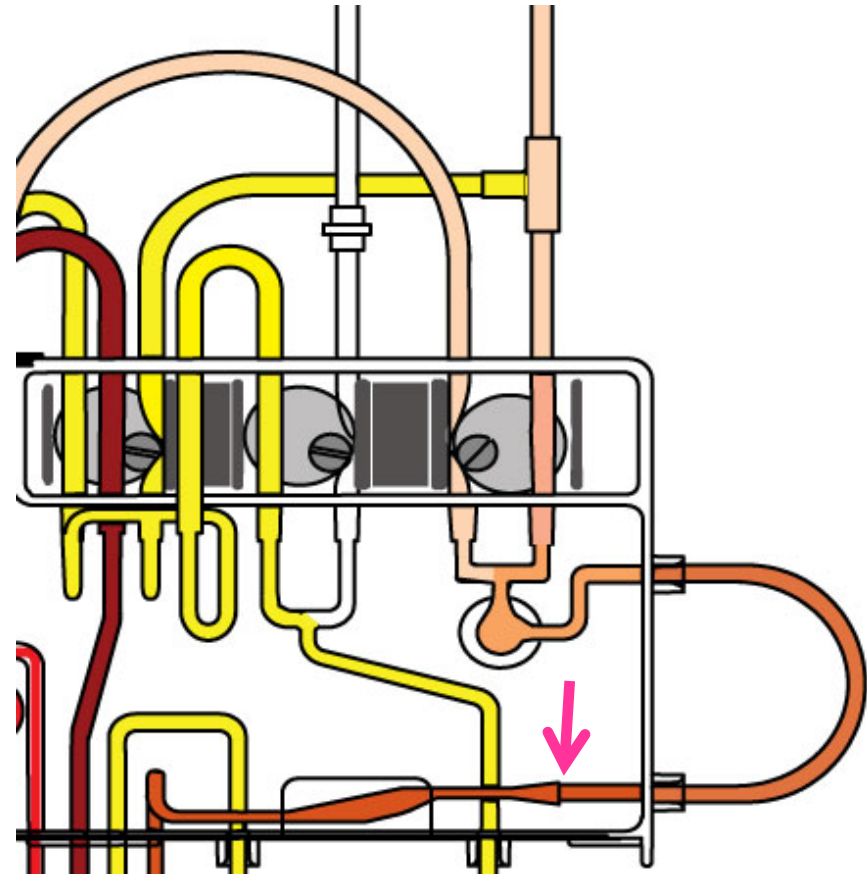
## Linea di raccolta fino al reservoir

1. Cercare le piastrine concentrate nella linea di raccolta (1) (plasma ricco di piastrine).
2. Confrontare quanto osservato nella linea di raccolta (1) con la linea del plasma (2) per confermare la differenza.



# Raccolta del contenuto della camera

- Osservare la linea di raccolta durante la fase di raccolta.
  - Dovrebbe indicare un ematocrito pari a circa il 3-4%.
- Valutare il prodotto nella sacca di raccolta dopo ciascuna fase di raccolta.



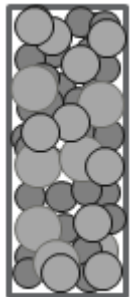
# Ottimizzazione

- Preferenza della raccolta
- Fase di accumulo
- Purezza verso resa del prodotto
- Portata della pompa di prelievo
- Impostazione del target della procedura
- Volume di prodotto
- Diminuzione della durata della procedura

# Preferenza di raccolta

La preferenza di raccolta determina la concentrazione delle cellule che attraversano la porta di raccolta.

- Deve essere correlata alla conta leucocitaria e piastrinica del paziente affinché le cellule possano essere pompate dalla cintura in modo efficiente.
- Calcolo della preferenza di raccolta:  
 $60 - [(0,2 \times \text{conta GB}) + (0,08 \times \text{conta piastrine})]$



1. Nel caso di un paziente con conte più elevate (maggior numero di cellule), è necessario che la preferenza di raccolta sia più bassa (più scura).

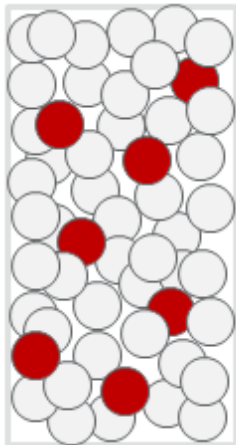


2. Nel caso di un paziente con conte più basse (minor numero di cellule), è necessario che la preferenza di raccolta sia più alta (più chiara).

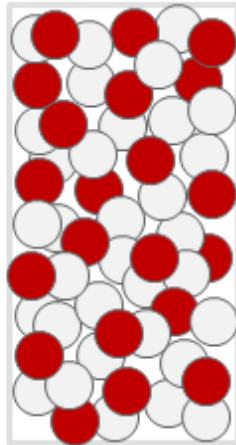
# Preferenza di raccolta (continua)

1. Preferenza di raccolta bassa (meno luce può attraversare la porta): elevata concentrazione di cellule
  - a. Paziente: conte MNC e piastrine elevate e pochi GR
  - b. Paziente: conte MNC e piastrine basse e molti GR
2. Preferenza di raccolta alta (più luce può attraversare la porta): bassa concentrazione di cellule
  - a. Paziente: conte MNC e piastrine basse e pochi GR
  - b. Paziente: conte MNC e piastrine elevate e GR scarsi o assenti

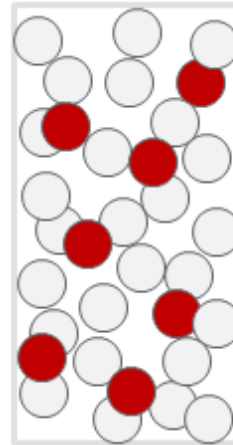
1a



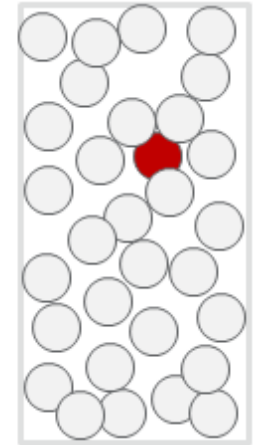
1b



2a

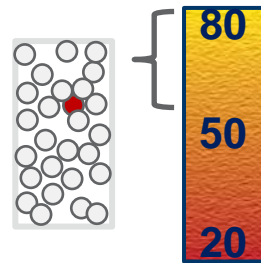


2b



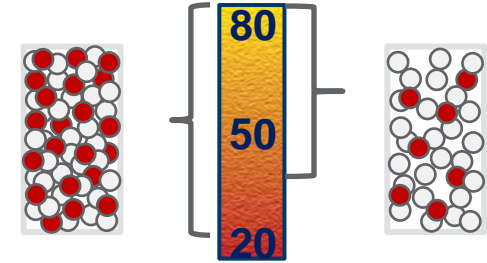
# Purezza verso resa del prodotto

## Purezza



- Iniziare con una preferenza di raccolta  $\geq 60$
- Esempio:
  - Donatore con incompatibilità ABO
  - Fotochemioterapia extracorporea

## Resa



- Iniziare con una preferenza di raccolta  $\leq 50$
- Raccolta camera: 4 ml
- Esempio:
  - Pazienti con conte MNC basse o donatori non mobilizzati
  - Infusione di linfociti da donatore (anche le conte cellulari del donatore sono basse o normali)

# Portata della pompa di prelievo

Il mantenimento di una velocità di prelievo costante produce una posizione dell'interfaccia più stabile e la raccolta ottimale delle cellule.

- Riduce al minimo l'attivazione di allarmi dovuti alla pressione.
- Ottimizza la definizione dell'interfaccia e la separazione del buffy-coat.
- Ottimizza la rimozione del buffy-coat.

Velocità del flusso di prelievo  $\leq 26.500 \div (\text{conta GB} + \text{conta piastrine})$



# Volume di prodotto

Per diminuire il volume di raccolta:

- Diminuire il volume di raccolta target.
- Immettere un volume di 1 ml per la raccolta camera.

Per aumentare il volume di raccolta:

- Aumentare il volume di raccolta target.
- Raccogliere il plasma nella sacca di raccolta.

# Diminuzione della durata della procedura

- Aumentare la velocità del flusso di prelievo.
  - In tal modo, aumenta anche la velocità di infusione dell'anticoagulante.
- Aumentare la velocità di infusione dell'anticoagulante.
  - Ciò aumenta la velocità del flusso di prelievo.
- Aumentare il rapporto prelievo:AC.
  - In tal modo, diminuisce l'anticoagulazione nel circuito extracorporeo, con un conseguente aumento delle possibilità di aggregazione.
  - Ciò aumenta la portata della pompa di prelievo senza un aumento della velocità di infusione dell'anticoagulante.
- Diminuire la durata della procedura target.

# Pazienti pediatrici o con VTS basso

- Limiti minimi per l'immissione di dati
- Gestione dell'anticoagulante
- Bilanciamento dei liquidi
- Priming personalizzato – GR
- Priming personalizzato – GR (60%)
- Utilizzo del volume di prelievo per le fasi di raccolta
- Perdita di piastrine



## Limiti minimi per l'immissione di dati

- Dati del paziente
  - Altezza: 30 cm
  - Peso: 2 kg
  - VTS: 300 ml  
(il sistema non calcola il VTS se il peso è <25 kg)
- Portata della pompa di prelievo
  - 10 ml/min

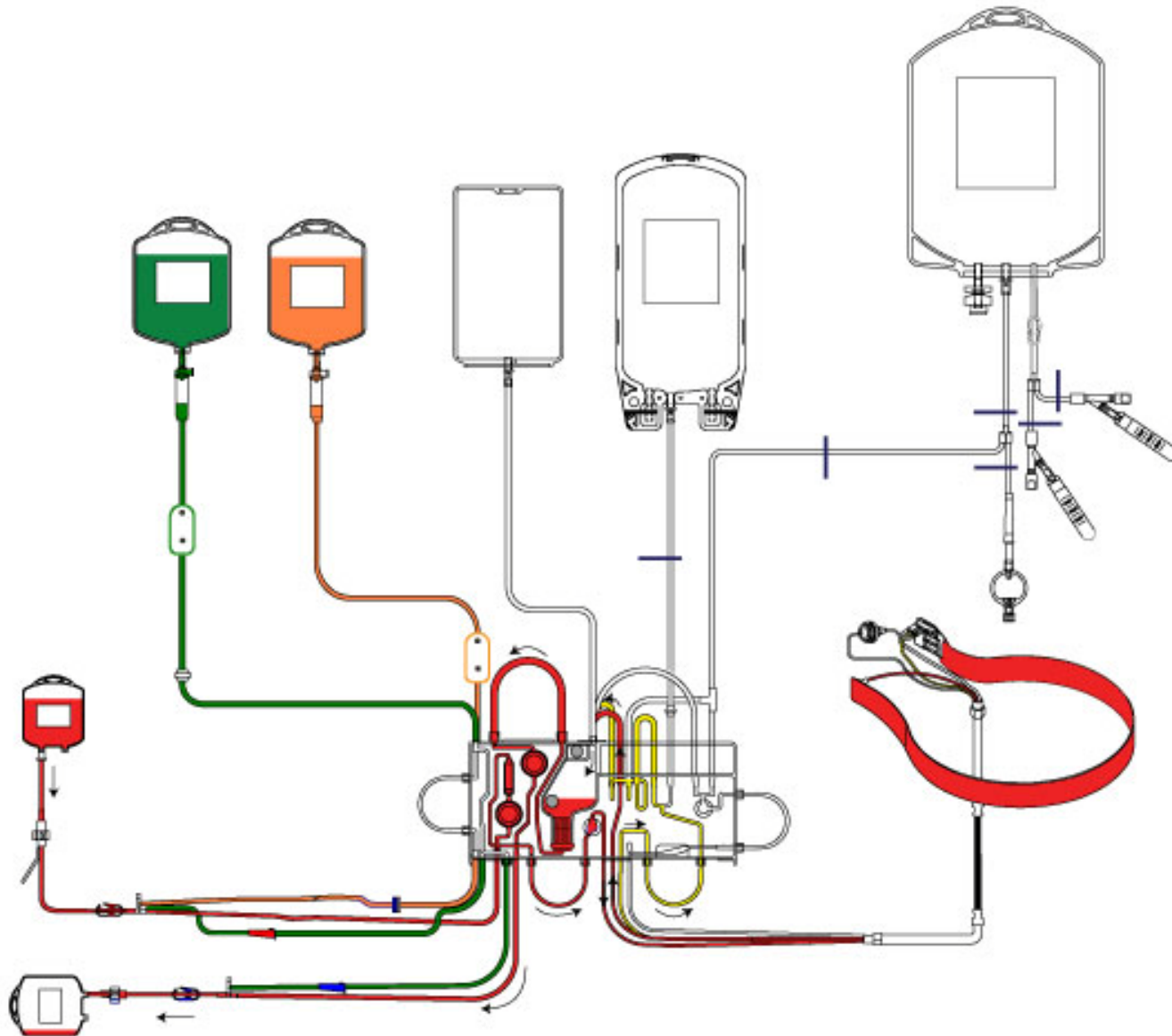
## Bilanciamento dei liquidi

- Gestione dei liquidi in ingresso e in uscita
  - Volume di anticoagulante al paziente rispetto al volume raccolto
- Riscaldatore
  - Comfort del paziente
- Priming personalizzato
  - Aumento della tolleranza del volume del circuito extracorporeo

# Priming personalizzato – GR

Config.	Dati	Procedura	Fine procedura
<b>Inserire i dati del priming personalizzato.</b>			
<div style="border: 1px solid gray; padding: 10px; margin: 10px auto; width: 80%;"> <div style="text-align: center; margin-bottom: 5px;"><b>GR</b></div> <div style="text-align: center; margin-bottom: 5px;"><b>Plasma</b></div> <div style="text-align: center;"><b>Albumina</b></div> </div>			
Unità GB Hct (%)	Portata massima flusso di prelievo (ml/min)	Volume (ml)	
<b>60</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	
17:30 19-10-2012	<b>Conferma</b>		 <b>MNC</b>

# Priming personalizzato – GR



# Priming personalizzato – GR (60%)

Paziente		200 ml di GR	Niente priming ematico	240 ml di GR	Niente priming ematico
		Niente riscaldatore		Riscaldatore di 40 ml	
VTS	Hct (%)	Variazione dell'Hct (%) del paziente			
300 ml	25	+5	-13	+8	-14
	30	+4	-14	+7	-16
	35	+3	-15	+6	-17
	40	+2	-16	+4	-18
600 ml	25	+3	-7	+5	-8
	30	+2	-8	+4	-9
	35	+2	-8	+3	-10
	40	+1	-9	+2	-11
1000 ml	25	+2	-5	+3	-5
	30	+2	-5	+2	-6
	35	+1	-5	+2	-6
	40	+1	-6	+2	-7

Nota: la tabella descrive la variazione approssimativa dell'Hct del paziente dopo il priming personalizzato.



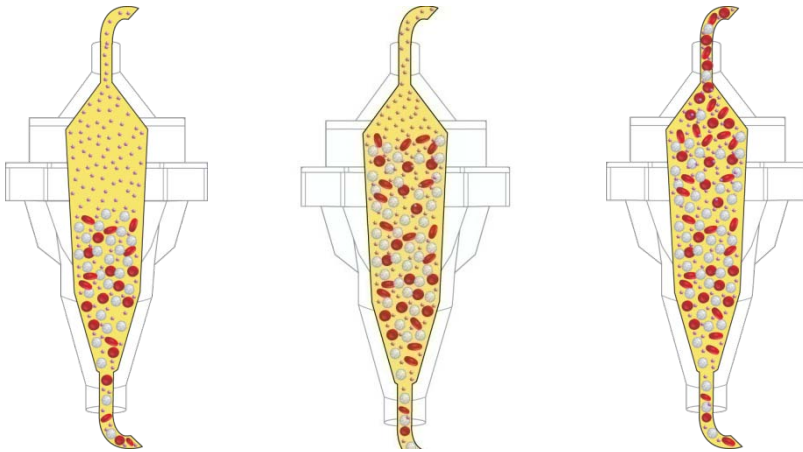
## Determinazione delle fasi di raccolta

**Esempio: VTS del paziente = 1000 ml; Rapporto = 12:1;  
Target = 3 x VTS**

(circa 3270 ml di volume di prelievo target)

- Determinare il volume di raccolta (o il numero di fasi di raccolta) idoneo.
- Impostare il volume di prelievo come controllo della fase di raccolta per eseguire un numero di fasi di raccolta sufficiente.
  - Per avviare tre fasi di raccolta con un volume di raccolta pari a 60 ml, inserire 1090 ml come volume di prelievo per il controllo della fase di raccolta.
  - Per avviare due fasi di raccolta con un volume di raccolta pari a 40 ml, inserire 1635 ml come volume di prelievo per il controllo della fase di raccolta.
  - Oppure permettere al sistema di avviare la fase di raccolta. Se una fase di raccolta non ha avuto luogo entro la fine della procedura, avviarla premendo Raccogli in sacca, dopodiché porre fine alla procedura.

# Perdita di piastrine



Nel decidere il numero di camere da riempire, prendere in considerazione la perdita di piastrine del paziente.

- La perdita di piastrine con ogni fase di raccolta è inversamente proporzionale al numero di cellule target presenti nella camera.
- Maggiore il numero di fasi di raccolta, maggiore la perdita di piastrine.

# ESPERIENZA OSR

Sex	Età (anni)	Peso (Kg)	Patol	Mobilizzazione	plerixafor	giorno di mobilizzazione	I giorno	GB totali pre raccolta	CD34 mcl pre aferesi	CD34/Kgx10e6	II giorno	GB totali pre raccolta	CD34 mcl pre aferesi	CD34/Kgx10e6	Target CD34x10e6/kg
M	7	24	LEUCOD	gcsf	no	5		31400	150	10.65					10.65
M	11	26	WAS-TP GENICA	gcsf	no	4		33500	43.55	6.71		33100	72.82	9.00	15.71
M	12	37	WAS	gcsf	SI	4		73400	146.80	13.90		67823	161	12.4	26.00
M	14	53	WAS	gcsf	SI	3		42723	98.26	12.64		44800	197.12	16.16	28.80
M	14	48	BTHAL	gcsf	SI	4		61200	410.04	53.31					53.31
M	13	30	THAL	gcsf	SI	4		26610	85.15	16.79		29251	184.2813	30.91	47.70
M	13	53	thal	gcsf	si	4		30400	231.04	30.65		42569	442.7176	15.76	46.41
M	7	20	THAL	gcsf	SI	4		40692	309.26	50.09					50.09
M	1	10	was	gcsf	SI	4		36127	509.39	41.95					41.95
F	6	18	ADA/SCID	gcsf	SI	4		44344	310.41	30.95					30.95
F	6	17	THAL	gcsf	SI	4		48885	254.20	31.09					31.09
M	2	11	WAS	gcsf	si	4		27657	459.11	31.75					31.75
F	4	16	BTHALASSE MIA	gcsf	si	4		22663	67.99	7.54		29340	249.39	23.08	30.62

# Qualificazione contenuto di cellule staminali emopoietiche nella sacca da aferesi

Aferesi PBSC



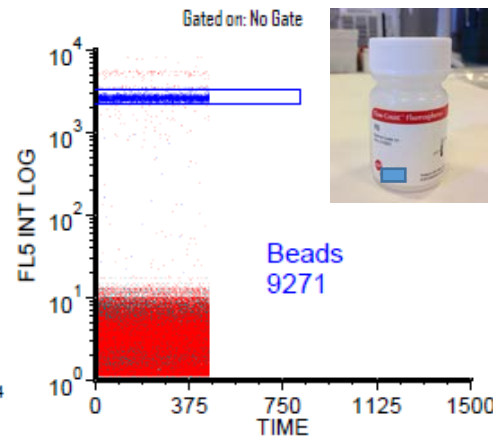
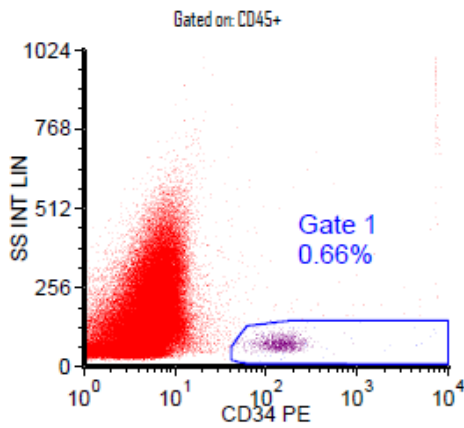
Campione di 0.5-1ml



Analisi in Citometria a flusso



Utilizzo di anticorpo monoclonale anti-CD34 coniugato con fluorocromo



Conta assoluta (cellule/microlitro) con l'utilizzo di fluorosfere a concentrazione nota

**CD34+ $\times 10^6$ /Kg = 6.39**



# Domande?