NVC/HOVON aanbeveling voor flowcytometrische immuunmonitoring van CAR T-cellen

Werkgroep:
P. van Balen (LUMC), E. Bremer (UMCG), J. Dobber (Amsterdamumc), S. van Dorp (Radboudumc), D. van Ens (Radboudumc), W. Hobo (Radboudumc), M.J. Kersten (Amsterdamumc), K. Meijer (UMCG), S. Nierkens (UMCU/Prinses Máxima Centrum), I.S. Nijhof (St Antonius Ziekenhuis), V.H.J. van der Velden (Erasmus MC).

Inleiding

Nieuwe immuuntherapeutische strategieën hebben het afgelopen decennium tot een doorbraak geleid in de behandeling van verschillende kankersoorten. Een van deze nieuwe therapieën betreft chimeric antigeen receptor (CAR)-gemodificeerde T-cellen. CARs bestaan uit een antigeen-bindingsdomein (*i.e.* veelal een single chain variabel fragment afkomstig van het variabele domein van een antistof) en het transmembraan- en intracellulair signaleringsdomein van de T-celreceptor met additionele co-stimulatoire signaleringsdomeinen (afkomstig van o.a. CD28, 4-1BB, CD137)(1;2). Het antigeen-bindingsdomein bepaalt de selectiviteit en affiniteit van de CAR. CAR T-cellen hebben het voordeel ten opzichte van normale T-cellen dat ze onafhankelijk van MHC-peptide presentatie en co-stimulatie tumorcellen kunnen herkennen en aanvallen. Het CAR T-cel productieproces bestaat in het kort uit: leukocytenaferese van de patiënt, isolatie van de T-cellen, expansie en genetische modificatie met het CAR-construct, gevolgd door cryopreservatie van de CAR T-cellen. De eerste CAR T-cellen die geregistreerd zijn als geneesmiddel bevatten de CD19 CAR en hebben indrukwekkende resultaten laten zien in onder andere $CD19^+$ B-cel acute lymfatische leukemie en lymfoompatiënten (3-6). Dit heeft de aanzet gegeven tot de ontwikkeling van nieuwe CARs (o.a. BCMA, APRIL, …) en de exploratie van CAR T-celtherapie in andere kankersoorten. Desondanks reageert niet elke patiënt op deze therapie en kunnen antigeen-negatieve ontsnappingsvarianten ontstaan (8; 9). Bovendien kunnen patiënten ernstige bijwerkingen ontwikkelen na CAR T-celtherapie, waaronder een cytokinestorm en/of neurotoxiciteit. Er zijn aanwijzingen dat CAR T-cel persistentie en effector/memory differentiatiestatus van het CAR T-celproduct belangrijk zijn voor de therapierespons (10). In dit kader is het wenselijk om naast de maligniteit, ook de CAR T-cellen *ex vivo* te monitoren in patiëntmonsters (o.a. perifeer bloed, beenmerg, liquor). Met deze werkgroep hebben wij een geharmoniseerd basispanel en bijbehorende gatingstrategie ontwikkeld voor de monitoring van CAR T-cellen na infusie. Aanvullend hierop kan gekozen worden voor extra kleuringen om het T-celdifferentiatiestadium (m.b.v. CCR7 (CD197)/CD45RO) en/of checkpoint-expressieprofiel (bijv. PD-1 (CD279)/CTLA-4 (CD152)) te onderzoeken.

Bronnen:

1. Sadelain, et al., The basic principles of chimeric antigen receptor design. Cancer Discov 2013
2. June et al, CAR T cell immunotherapy for human cancer. Science 2018
3. Mueller et al. Clinical Pharmacology of Tisagenlecleucel in B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. Clin Cancer Res 2018
4. Schuster et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. NEJM 2019
5. Crump et al. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. Blood 2019
6. Kuhnl et al. A national service for delivering CD19 CAR-T in large B-cell lymphoma - The UK real-world experience. Br J Haem 2022
7. Locke et al. Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. Lancet Oncol 2019
8. Song et al. Resistance Mechanisms to CAR T-Cell Therapy and Overcoming Strategy in B-Cell Hematologic Malignancies. Int J Mol Sci 2019
9. Shah et al. Multi Targeted CAR-T Cell Therapies for B-Cell Malignancies. Front Oncol 2019
10. Fraietta et al. Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. Nature Med 2018

Panel:

CD3	CD4	CD8	CD14	CD20	CD45	CD45RO[a]	CD197[a]	CART	Viability[a]
Navios/ Cytoflex DX									
APC-A750 *UCHT1* *Beckman C*	Pacific blue *13B8.2* *Beckman C*	FITC *B9.11* *Beckman C*	ECD *RM052* *Beckman C*	Pacific Blue *B9E9* *Beckman C*	KO *J33* *Beckman C*	APC *UCHL1* *BD biosc*	PE-Cy7 *G043H7* *Beckman C*	PE, zie CAR tabel onder	7-AAD (PECy5) *Miltenyi/ Boom*
5 µl	2.5 µl	5 µl	2 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl		0.5 µg/mL
Lyric / FACSCanto II (3 laser) (zonder viability marker)									
APC-H7 *SK7* *BD biosc*	Pacific blue *RPA-T4* *Biolegend*	FITC *SK1* *BD biosc*	PerCP-Cy5.5 *MoP9* *Pharmingen*	Pacific Blue *2H7* *Biolegend*	PO (of HV500c) *HI30* *Invitrogen*	APC *UCHL1* *Pharmingen*	PE-Cy7 *2-LI-A* *Pharmingen*	PE, zie CAR tabel onder	--
3 µl	0.5 µl	5 µl	5 µl	1 µl	5 µl	5 µl	5 µl		
Lyric / FACSCanto II (3 laser) (met viability marker)									
APC-H7 *SK7* *BD biosc*	Pacific blue *RPA-T4* *Biolegend*	FITC *SK1* *BD biosc*	APC of PECy7 *MoP9* *Pharmingen*	Pacific Blue *2H7* *Biolegend*	PO of HV500 of KO (J33) *HI30* *Invitrogen*			PE, zie CAR tabel onder	7-AAD (PerCPCy5.5) *Miltenyi/ Boom*
3 µl	0.5 µl	5 µl	5 µl	1 µl	5 µl				0.5 µg/mL

[a] optioneel

CAR

CAR antigeen	Reagens	Volume
CD19*	FMC63-PE – *REA1297 (Miltenyi)* *Of* CD19 CART detection reagent biotin *Cat. 130-129-550 (Miltenyi)* + Anti-biotin PE - *REA746 (Miltenyi)*	1 µl 2 µl 2 µl

*FMC63-PE herkent o.a. de commerciële Yescarta en Kymriah CD19 CAR constructen, maar niet het ARI-0001 construct, hiervoor moet het indirecte gebiotinyleerde reagens gebruikt worden. Het indirecte reagens herkent ook de commerciële CD19 CAR constructen. Elk laboratorium moet zelf de afweging maken of alleen het indirecte reagens gebruikt wordt (arbeidsintensiever), of dat beide reagentia gebruikt worden, afhankelijk van het type CAR construct.

Protocol:

Onderstaand protocol geeft succesvolle aankleuring van CAR T-cellen (detectiegrens: 0.01% binnen WBC) in de deelnemende laboratoria. De genoemde volumina van monoklonalen zijn indicatief en elk laboratorium zal zelf de juiste concentratie moeten vaststellen middels titratie.

Kwantitatieve T-celbepaling (bloed)

- Bepaal het absolute aantal T-cellen in bloed, bijvoorbeeld met behulp van het totaal aantal leukocyten (WBC) verkregen uit de celteller, de TruCount tube of Aquios tetra-1/2 panels.

CAR T-celkleuring (bloed, liquor, beenmerg)

- Als uitgangsmateriaal kan gebruik worden gemaakt van beenmerg, bloed, of liquor. Om de hoogst mogelijke gevoeligheid te behalen wordt gebruik gemaakt van bulk-gelyseerd materiaal.
- Neem vervolgens 50 µl celsuspensie en voeg hieraan 50 µl antistofmix toe (eindvolume = 100 µl).
  Let op: in geval het indirecte CAR-reagens wordt gebruikt, dan betreft het een 2-staps kleuring.
  - Pipetteer de monoklonalen, incubeer 15-30 minuten (donker, RT), was, zuig af.
  - Indien relevant voeg dan het biotinelabel toe en incubeer weer 10 minuten, gevolgd door wassen.
  - Neem tot slot de cellen op in buffer met 7-AAD.
- Meet de cellen met de flowcytometer; meet in geval van een liquormonster de buis zo ver mogelijk leeg, meet bij bloed en beenmerg bij voorkeur ten minste 100.000-500.000 cellen, afhankelijk van het tijdstip na CAR T-celinfusie of verwachte opbrengst.
  Wanneer een gevoeligheid van 0,01% van de leukocyten gewenst is moeten er tenminste 500.000 viabele leukocyten gemeten worden (waarbij tenminste 50 (bij 0,01%) CAR T positieve events in cluster worden gemeten voor een betrouwbare uitslag).

Gatingstrategie:

<u>Infinicyt/Diva/FACSSuite:</u>

- Verwijder debris en doubletten in de FSC-H/FSC-A en/of SSC-A/FSC-A plot.
- Verwijder dode cellen in de SSC-A/7-AAD plot.
- Identificeer generieke populaties:
  - B-cellen: CD45/SSC-A/CD20/CD3-
    Opmerking: CD20 kan geblokkeerd zijn door therapie met anti CD20 (Rituximab, etc).
    In dat geval kan met dit panel geen onderscheid gemaakt worden tussen B-cellen en NK-cellen.
  - Monocyten: CD45/SSC-A/CD14
  - T-cellen: CD45/SSC-A/CD3
    Opmerking: Verwijder in CD3/CD14 plot eventueel CD3+/CD14+ events.
    - CD4+ T-cellen: CD3/CD4
    - CD8+ T-cellen: CD3/CD8
- Controleer left-over events (als debris).
- Identificeer CAR-positiviteit in een histogram van de totale CD3+ T-celpopulatie. Het kan zijn dat er geen duidelijke scheiding is tussen de negatieve en positieve populatie. Gebruik dan NK-cellen als negatieve populatie om op te gaten (CD3-(CD20-) lymfocyten).
- Optioneel: identificeer binnen de totale CD3+ T-celpopulatie en binnen de CAR+CD3+ T-cellen de verschillende T-cel differentiatie stadia (naïef: CCR7+CD45RO-, centraal memory: CCR7+ CD45RO+, effector memory: CCR7- CD45RO+, terminale effector memory: CCR7- CD45RO-).
- Bepaal het percentage en absolute aantal CAR+ CD3+ T-cellen voor klinische rapportage.
- Optioneel voor interne analyse in het laboratorium: verhouding CD4/CD8 binnen de CAR+ CD3+ T-cellen, en informatie ten aanzien van het differentiatiestadium van de CAR T-cellen.

<u>Kaluza:</u>

Een voorbeeld gating-strategie in Kaluza is hieronder toegevoegd. Voor de B-cellen en differentiatiestatus van de CAR T-cellen zijn boolean gates toegepast.

Rapportage:

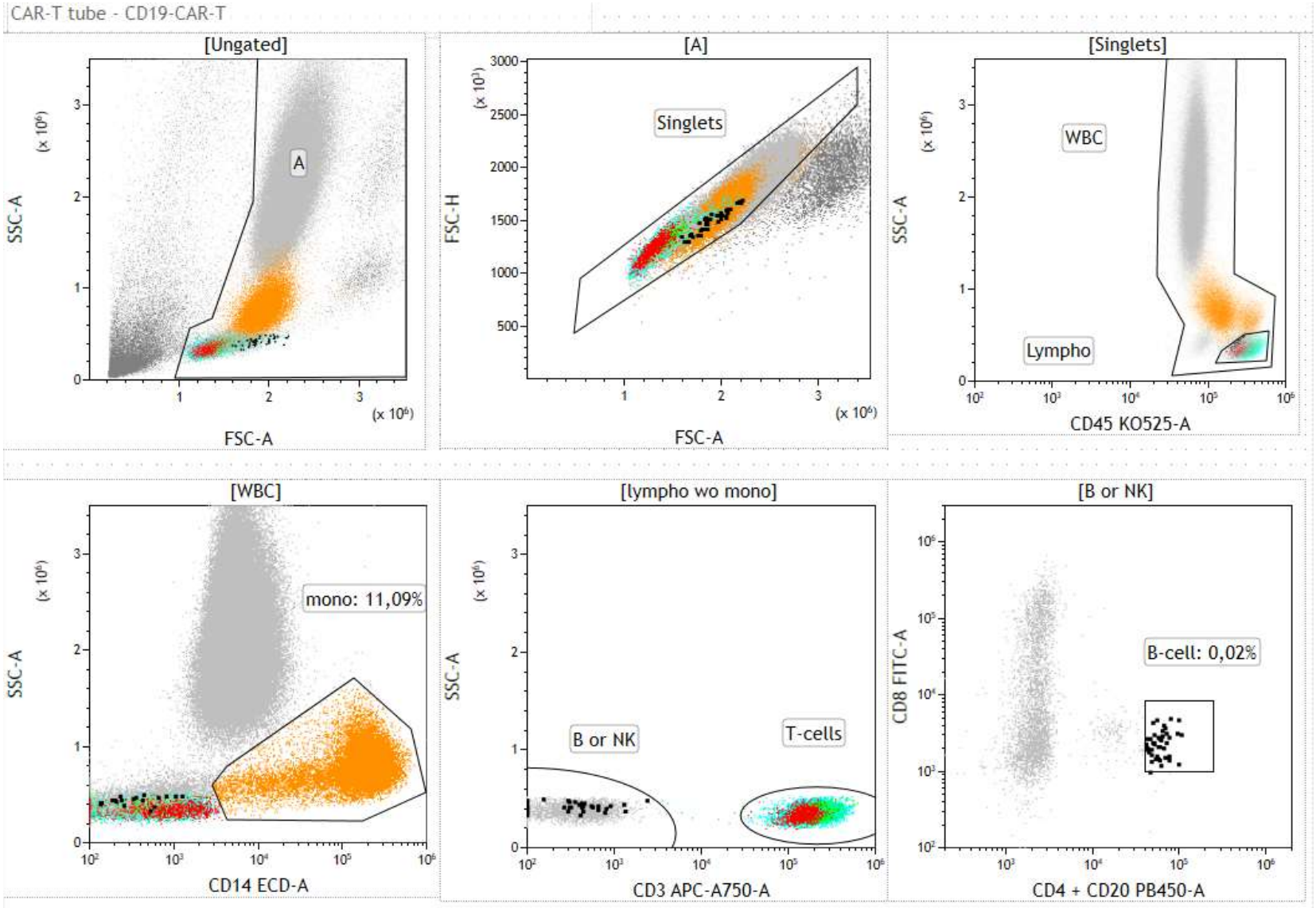
% CD3+ T-cellen binnen de WBC
% CAR+ T-cellen binnen CD3+ T-cellen
Absoluut aantal CD3+ CAR T-cellen

Ieder laboratorium moet zijn eigen Limit of Detection (LOD) en Limit of Quantitation (LOQ) bepalen
Advies:
LOQ: Zoals in het protocol aangegeven; (tenminste) 50 CAR T positieve events op 500.000 viabele leukocyten (LOQ 0,01%).
LOD: Tussen 20 en 50 CAR T positieve events bij 500.000 viabele leukocyten, dan rapportage: CAR T-cellen <0,01% (wel CAR T-cellen aantoonbaar).
Minder dan 20 CAR T positieve events bij 500.000 viabele leukocyten, dan rapportage: Geen CAR T-cellen aantoonbaar.

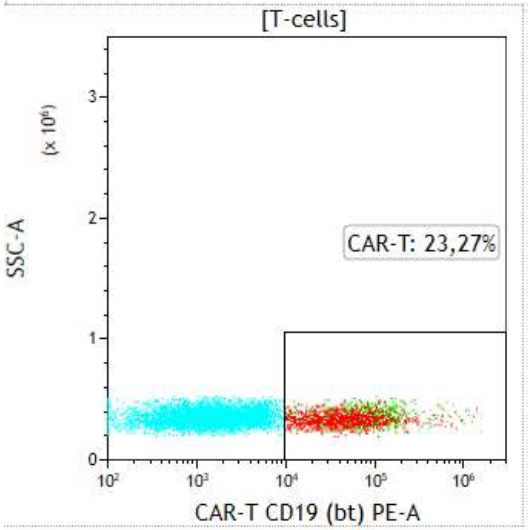
Wanneer 500.000 viabele cellen niet mogelijk is (b.v. in liquoren); steeds aangeven wat dan de LOQ is.

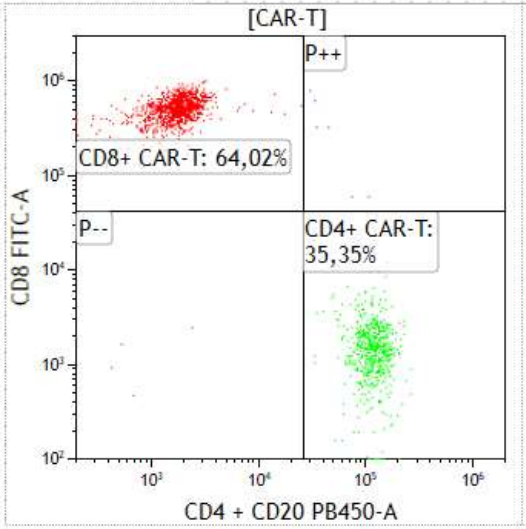
Optionele interne rapportage:
CD4/CD8 ratio binnen CAR+ T-cellen
% CD4+ CAR+ T-cellen binnen de CAR+ T-cellen
% CD8+ CAR+ T-cellen binnen de CAR+ T-cellen
Effector memory fenotype CD4+ CAR+ T-cellen
Effector memory fenotype CD8+ CAR+ T-cellen

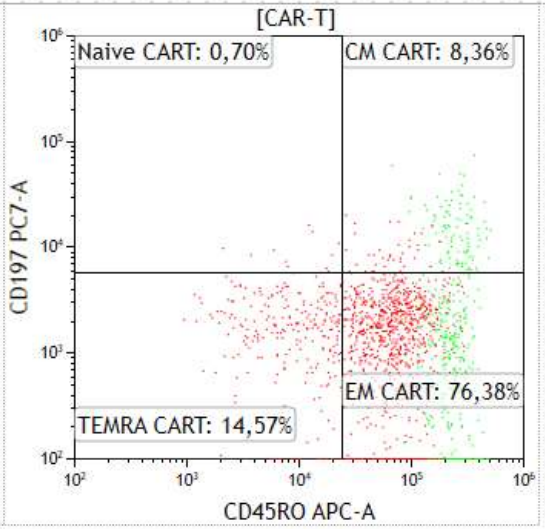
Voorbeeld Gating strategie in Kaluza (data verkregen met DxFlex) – ARI-0001 CD19 CAR T-cellen, detectie met indirect CD19 CAR-reagens

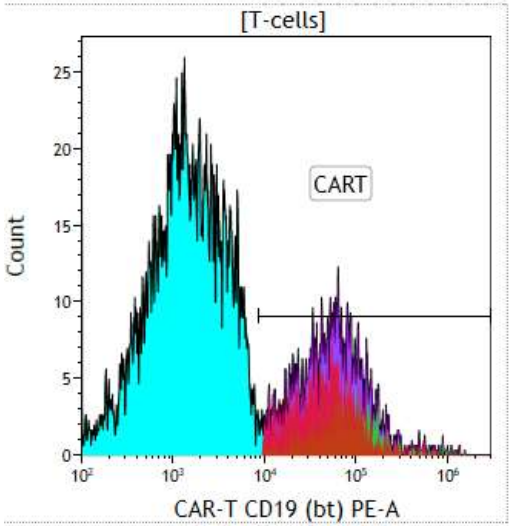


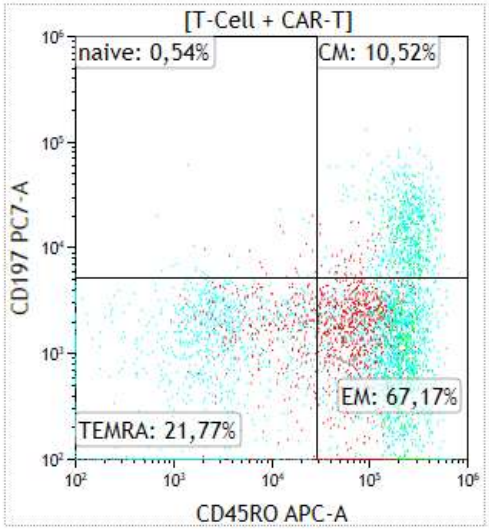
CAR-T tube - CD19-CAR-T





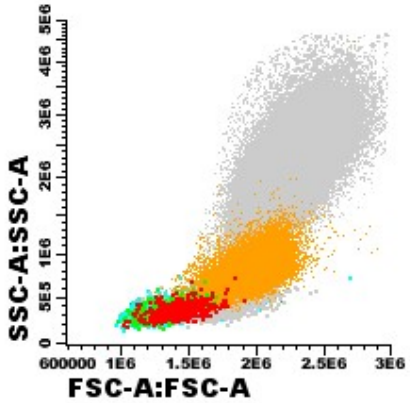


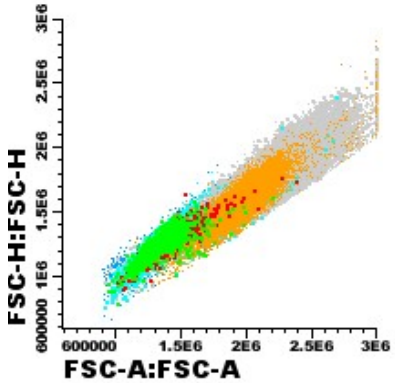


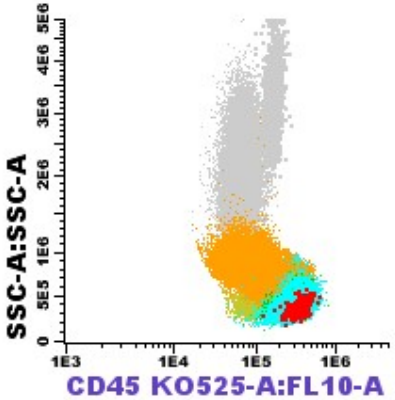


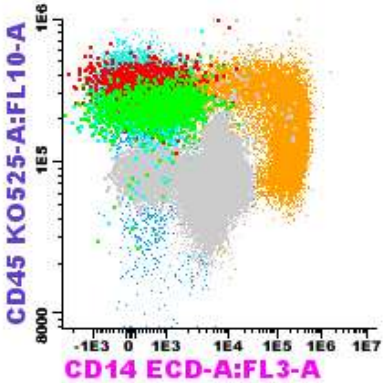
Gate	Number	%Total
All	290.132	100,00
B-cell	44	0,02
T-cells	7.404	2,55
CAR-T	1.723	0,59
CD4+ CAR-T	609	0,21
CD8+ CAR-T	1.103	0,38
WBC	246.502	84,96

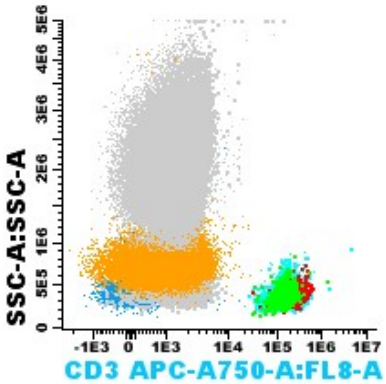
Voorbeeld Gatingstrategie in Infinicyt

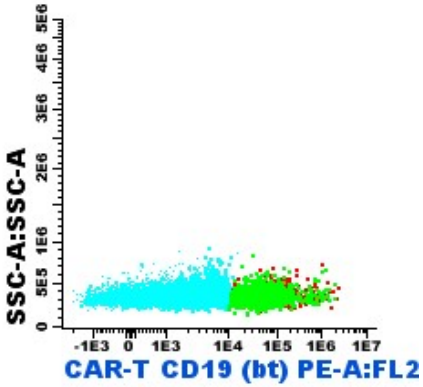


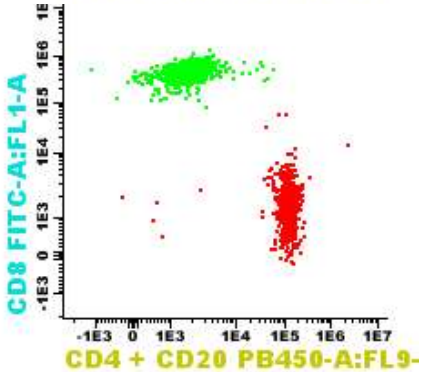




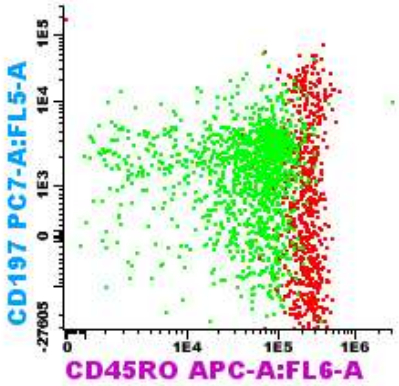


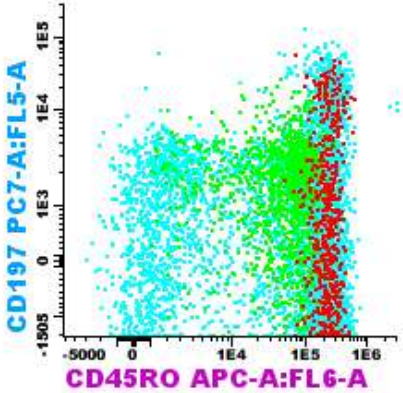


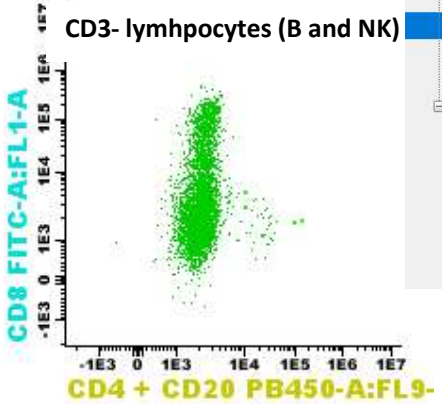




NUCLEATED CELLS	100.00	245410
Other NUCLEATED CELLS	NA	0
LYMPHOCYTES	4.57	11196
Other LYMPHOCYTES	0.00	1
B CELLS	NA	0
T-cells	3.03	7426
CD4/CD8 ratio: 1.29		
Other T-cells	0.00	11
CD4	1.13	2770
CD8+	0.88	2148
TcR-GD+	0.27	667
CAR-T	0.75	1830
Other CAR-T	NA	0
CD4+ CART	0.26	626
CD8+ CART	0.49	1204
NK cells	1.54	3769
MYELOID CELLS	95.43	234214
Other MYELOID CELLS	NA	0
Eosinophils	0.36	878
Neutrophils	82.97	203639
Monocytes	11.21	27514
Baso/DC's	0.89	2183
Blasten	NA	0







CD3- lymhpocytes (B and NK)