



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Seguridad y eficacia de varnimcabtagene autoleucel (ARI-0001) en síndromes linfoproliferativos CD19 positivos

Valentín Ortiz-Maldonado Gibson

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Seguridad y eficacia de varnimcabtagene autoleucel (ARI-0001) en síndromes linfoproliferativos CD19 positivos

Memoria de tesis doctoral presentada por:

Valentín Ortiz-Maldonado Gibson

Para optar al grado de Doctor por la Universitat de Barcelona

Tutor y director de tesis

Dr. Julio Delgado González

Director de tesis

Dr. Manel Juan Otero

Programa de Doctorado de Medicina e Investigación Traslacional

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

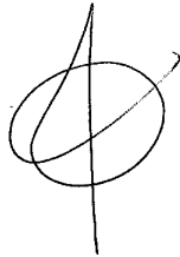
Universitat de Barcelona

Julio 2022

El Dr. Julio Delgado González, especialista sénior del servicio de Hematología del Hospital Clínic de Barcelona, y el Dr. Manel Juan Otero, jefe de servicio de inmunología del Hospital Clínic de Barcelona, certifican que la tesis doctoral titulada:

“Seguridad y eficacia de varnimcabtagene autoleucel (ARI-0001) en síndromes linfoproliferativos CD19 positivos”

que presenta el licenciado Valentín Ortiz-Maldonado Gibson, ha estado realizada bajo su supervisión en la Facultad de Medicina de la Universitat de Barcelona, la consideren finalizada y autorizan su presentación frente al tribunal correspondiente.



Dr. Julio Delgado González

Tutor y director de tesis



Dr. Manel Juan Otero

Director de tesis

Barcelona, 25 de julio de 2022

Senza conflitto non si progredisce.

È stata la mano di Dio (P.S., 2021)

Dedicatorias:

A mis queridos padres

Doy gracias por los padres extraordinarios que me dio la vida. Extremadamente generosos, incansables, hercúleos. Raúl y Cora me dieron la vida, las herramientas para transitar este mundo, y una banda de hermanos para compartirlo.

A los buenos profesores

A todas aquellas personas que, desinteresadamente, entregan su energía y conocimiento a sus alumnos. A todos aquellos que impulsan a la juventud y pasan el testigo.

A los de Mendoza, Buenos Aires, y Barcelona.

A los del Colegio, la Universidad, y el Hospital.

Agradecimientos:

Ingrata es la tarea de intentar agradecer a todos los implicados en este proyecto. Ingrata porque, en realidad, uno no sabe realmente cuando fue que empezó, ni cuantas ramificaciones del trabajo de cuantas incontables personas fueron necesarias para que ocurriera. No hay capacidad de síntesis que aguante.

Quiero agradecer especialmente a los directores de esta tesis. A Julio Delgado y a Manel Juan. Agradecerles por haberse atrevido. Por llevar esto adelante. Por la confianza y las horas invertidas. Agradecerles por los ánimos, y por la paciencia. Soy un verdadero afortunado por coincidir en el lugar adecuado, en el momento adecuado (y el objetivo adecuado).

Quiero agradecer especialmente a Álvaro Urbano, por la confianza y el respaldo en los momentos necesarios.

Quiero agradecer a todo el servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Clínic, por la continua demostración de fuerza y resiliencia. Vuestra perseverancia fue y es vital para que esto sea posible.

Quiero agradecer a todo el servicio de Inmunoterapia, por la increíble capacidad de crecimiento y adaptación. Quiero agradecerles por ser siempre la cara amable de un escenario siempre intenso.

Quiero agradecer especialmente a todos los miembros del CARTeam®, por ser un@s cracks. ¡Por la paciencia! (:P), y por transitar este camino de crecimiento a la par.

Quiero agradecer por supuesto, a mis amigos (ya me añadieron a sus agradecimientos de tesis, ¡ahora no me queda otra más que ponerlos en el mío!), por estar cuando toca, para lo que toca.

Quiero agradecer a todos los pacientes, por haber confiado en este proyecto de salud pública. Agradecer a los que ahora festejan la vida, y especialmente a aquellos en los que no pudo ser.

El agradecimiento es para todos vosotros.

Índice General:

Glosario:	8
1 - Introducción:	11
1.1. El sistema inmune y su intervención para el abordaje terapéutico del cáncer:	11
1.2. Origen y clasificación de las neoplasias linfoides B:	18
1.3. Pronóstico de los síndromes linfoproliferativos B CD19 positivos recaídos o refractarios: ..	20
1.4. La emergencia de los linfocitos T con receptores antigénicos quiméricos (CARs), o CAR-T: 29	
1.5. Pasos de la elaboración de productos CAR-T autólogos:	34
1.6. El impacto de la terapia CAR-T en el abordaje de las neoplasias hematológicas:	36
1.7. El acceso a terapias avanzadas CAR-T en España - una necesidad médica no cubierta:	45
1.8. Concepción, gestación y nacimiento del ARI-0001:	47
1.9. El ARI-0001 llega a su etapa clínica:	53
2 - Hipótesis:	55
3 - Objetivos:	56
4 - Resultados:	57
4.1. CART19-BE-01: A Multicenter Trial of ARI-0001 Cell Therapy in Patients with CD19+ Relapsed/Refractory Malignancies. (165)	57
4.2. Factors associated with the clinical outcome of patients with relapsed/refractory CD19+ acute lymphoblastic leukemia treated with ARI-0001 CART19-cell therapy. (166)	68
4.3. Results of ARI-0001 CART19 cell therapy in patients with relapsed/refractory CD19-positive acute lymphoblastic leukemia with isolated extramedullary disease. (167)	74
4.4. Results of ARI-0001 CART19 Cells in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia and Richter’s Transformation. (168)	85
5 - Discusión:	94
5.1. Sobre aspectos de calidad, fiabilidad y consistencia de la producción “POC”:	94
5.2. Sobre aspectos de logística:	104
5.3. Sobre aspectos de representatividad de la vida real en los pacientes tratados en el CART19- BE-01:	105
5.4. Sobre aspectos de seguridad:	114
5.5. Sobre el fraccionamiento de la dosis:	116
5.6. Sobre aspectos de SLC:	118
5.7. Sobre aspectos de neurotoxicidad o ICANS:	123
5.8. Sobre aspectos de MRP:	126

5.9. Sobre aspectos de eficacia:	128
5.10. Sobre aspectos de recaídas:	140
5.11. Sobre la definición de aplasia de linfocitos B:	145
5.12. Sobre ciertos aspectos en pacientes con LLA con EEMa:	146
5.13. Sobre el abordaje de la LLC con o sin S. de Richter:	151
5.14. Sobre ciertos aspectos generales finales y futuras direcciones del ARI-0001:	157
6 - Conclusiones:	163
7 - Referencias:	164
8 - Adenda:	182
9 - Anexos:	184
9.1. Artículo nº1:	184
9.2. Artículo nº2:	201

Glosario:

LLA: leucemia linfoblástica aguda

LNH: linfoma no Hodgkin

LDCBG: linfoma difuso de células B grandes

LPM: linfoma primario mediastínico

LF: linfoma folicular

LFtr: linfoma folicular transformado a linfoma difuso de células B grandes

LCM: linfoma de células del manto

LLC: leucemia linfocítica crónica

TR: transformación de Richter

R/R: recaído o refractario

HCB: Hospital Clínic de Barcelona

HSJD: Hospital Sant Joan de Dèu de Barcelona

IDIBAPS: instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer

SLC: síndrome de liberación de citocinas

ICANS: síndrome de neurotoxicidad asociada a células inmunes efectoras

NT: neurotoxicidad

MRP: mortalidad relacionada al procedimiento

RC: respuesta completa

RP: respuesta parcial

EMR: enfermedad medible residual

TRC: tasa de respuestas completas

TRG: tasa de respuestas globales

SLP: supervivencia libre de progresión

SG: supervivencia global

DR: duración de la respuesta

IO: inotuzumab-ozogamicina

BL: blinatumomab

TIL: linfocito infiltrante de tumor

TCR: receptor de linfocito T

TCR-T: linfocito T con receptor de linfocito T

CAR: receptor antigénico quimérico

CAR-T: linfocito T con receptor antigénico quimérico

CART19: linfocito T con receptor antigénico quimérico anti-CD19

ATMPs: medicamentos de terapias avanzadas

GTMPs: medicamentos de terapia génica

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

AEs: eventos adversos

SAEs: eventos adversos graves

SUSARs: eventos adversos graves sospechados

AALB: aplasia absoluta de linfocitos B

ALB: aplasia de linfocitos B

AUC: área bajo la curva

HAMAs: anticuerpos humanos anti-murinos

AlotPH: trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

AutoTPH: trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos

iBTK: inhibidores de la tirosina cinasa de Bruton

iPI3K: inhibidores del fosfatidilinositol 3-quinasa

iBCL-2: antagonistas de BCL-2

SOS: síndrome de obstrucción sinusoidal

NA: no alcanzado

AEMPS: agencia española de medicinas y productos sanitarios

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

VIH: virus de inmunodeficiencia humana

VHB: virus de la hepatitis B

VHC: virus de la hepatitis C

PBMCs: células mononucleadas de sangre periférica

PUC: programa de uso compasivo

MO: médula ósea

CoR: cociente de riesgos

AMO: aspirado de médula ósea

EEMa: enfermedad extramedular aislada

LCR: líquido cefalorraquídeo

CTC: common terminology criteria

DSMB: data safety monitoring board

FEHH: Fundación Española de hematología y hemoterapia

CI: consentimiento informado

CMN: células mononucleadas

POC: “point-of-care”

Tisa-cel: tisagenlecleucel

Axi-cel: axicabtagén ciloleucel

Liso-cel: lisocabtagén maraleucel

Brexu-cel: brexucabtagén autoleucel

Var-cel: varnimcabtagene autoleucel

1 - Introducción:

1.1. El sistema inmune y su intervención para el abordaje terapéutico del cáncer:

La inmunoterapia contra el cáncer ha avanzado considerablemente desde los primeros reportes que William Coley, un cirujano de Nueva York, realizó en 1893 (1). Él observó como la inoculación directa de cepas de estreptococos de erisipela en los tumores de pacientes con sarcomas “inoperables” conseguía reducciones considerables, o incluso “remisiones completas” en cuestión de días y semanas. Se comenzaba a vislumbrar un vínculo inesperado entre la “activación local” del sistema inmune y la respuesta tumoral. Ya durante las tres primeras décadas del siglo XX extendió el uso de un extracto bacteriano (la llamada toxina de Coley) en diferentes casos recogidos en sus historias clínicas.

Para entonces ya habían pasado casi 100 años desde que, en 1796, Edward Jenner, médico y científico británico había desarrollado y documentado la primera vacuna contra la viruela: un “enemigo externo”. De esta forma, humanidad comenzaba a visualizar como era posible intervenir al sistema inmune, para desarrollar inmunidad contra ciertos patógenos externos. La vacunación se extendió durante la segunda mitad del siglo XIX como herramienta de control de diferentes enfermedades, destacando los trabajos de Louis Pasteur contra enfermedades tan letales en esos tiempos como la rabia.

Sin embargo, más allá de las limitaciones tecnológicas y de comprensión de los tiempos de Coley, una serie de preguntas vitales cobran vida: ¿Puede una intervención médica generar una reacción en el sistema inmune que también permita eliminar un tumor? ¿Puede una intervención médica sobre el sistema inmune eliminar un “enemigo interno” como el cáncer? ¿Hay un vínculo entre el sistema inmune y el cáncer? Todas estas preguntas se han definido durante más de un siglo en un controvertido debate entre aquellos que consideraban que el sistema inmunitario no podía ser efectivo para algo interno y aquellos en los que veían en la función de reconocimiento y acción del sistema inmunitario una opción más de la lucha contra el cáncer. La efectividad inmediata de la cirugía, la radioterapia y sobre todo la quimioterapia, hicieron que la opción de inmunoterapia quedara desterrada durante la mayor parte del siglo XX. Era necesario sin duda la obtención de mayor conocimiento para la recuperación de esta opción.

No fue hasta la década de 1950, momento en el que nace el concepto de “inmunovigilancia del cáncer”. Dicho concepto nace de la mano de Paul Ehrlich (1956) y fue posteriormente enriquecido por Lewis Thomas y Frank Macfarlane Burnet, entre otros (2–7). En el mismo, se postulaba que la aparición de células malignas es, de hecho, un acontecimiento frecuente, pero que habitualmente es suprimido por la inmunidad natural. Y que, en contrapartida, el cáncer se desarrolla cuando esta inmunidad se debilita, donde los linfocitos cumplirían un rol fundamental (imagen 1).

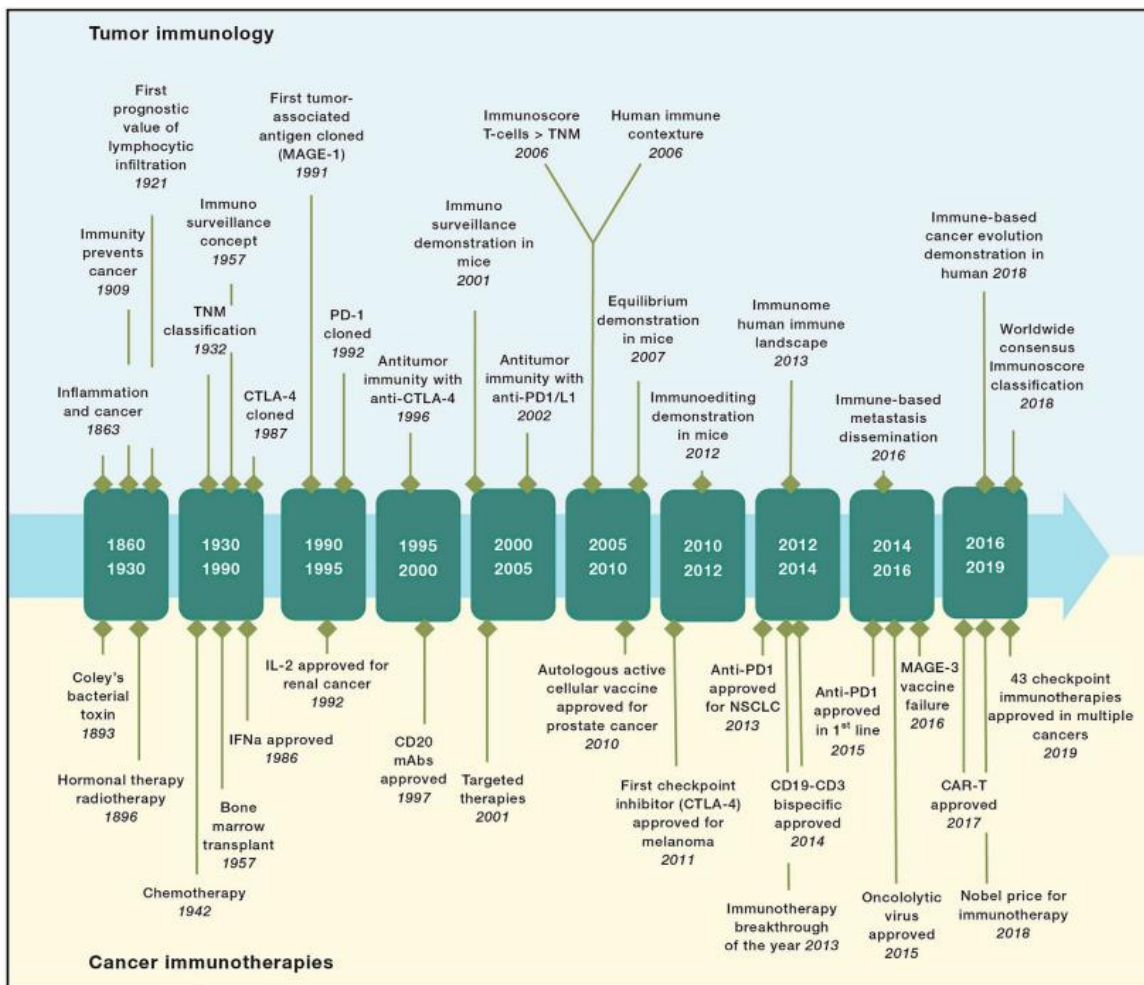


Imagen 1 (Galon et al, Cell 2020)(4): Historia de la inmunología tumoral y la inmunoterapia del cáncer

Desde entonces, el enfoque del tratamiento del cáncer se ha desplazado progresivamente desde el propio tumor hacia el sistema inmunitario del paciente, con el objetivo de movilizar al sistema inmune para que reconozca y finalmente elimine las células cancerosas.

Un claro ejemplo de este nuevo enfoque es el más reciente descubrimiento de los denominados puntos de control inmune (“immune checkpoints”) y de su rol en la modulación de la respuesta inmune. Estas moléculas forman parte de una serie de puntos de control inmunes que regulan estrechamente la activación celular T, de cara a evitar daños colaterales y la autoinmunidad. Sin embargo, dicho sistema puede también volverse en contra al ser también un mecanismo troncal de evasión inmune por parte de las células tumorales.

Estos puntos de control inmune están conformados por proteínas de estimulación e inhibición presentes tanto en la superficie de los linfocitos T (CD28, CTLA-4, PD-1, etc.), como en las correspondientes células presentadoras de antígenos (B7, PDL-1). Es el estudio de las interacciones de estos puntos de control inmune presentes en ambas células (linfocitos T y presentadoras de antígenos) lo que nos ha permitido comprender mejor los mecanismos de regulación de la actividad T (imagen 2) (8).

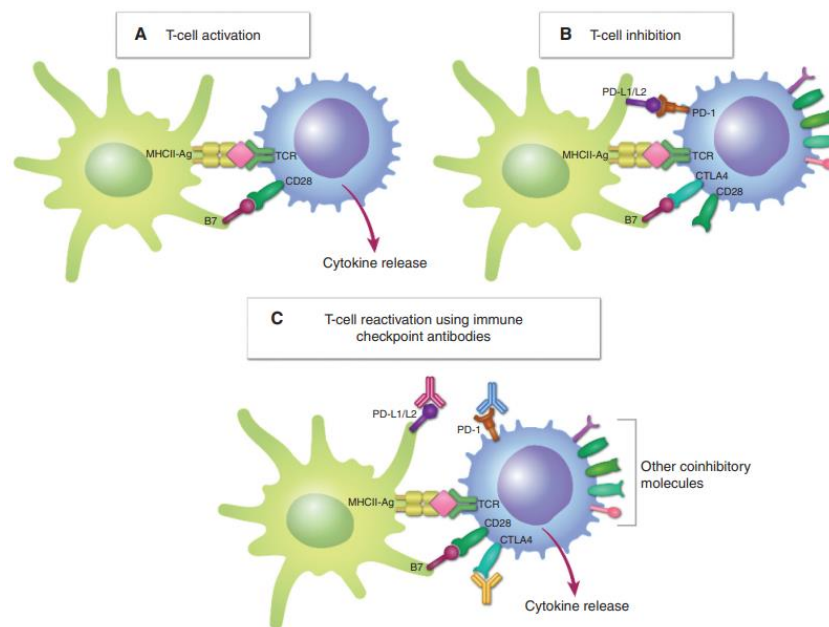


Imagen 2 (8): Regulación de la activación celular T y el abordaje de los puntos de control inmune.

Los estudios liderados por James Allison y Tasuku Honjo, entre otros (9–13), han permitido descifrar estos mecanismos abriendo todo un nuevo capítulo en la historia de la medicina. Esta comprensión ha derivado en el desarrollo de anticuerpos monoclonales capaces de activar o bloquear específicamente dichas moléculas. De esta forma, se puede modular la respuesta inmune

hacia nuestro interés, permitiendo, por ejemplo, desbloquear la inhibición o tolerancia celular T provocada por las células tumorales (14). Esta modulación tendría el potencial de permitir al sistema inmune ejercer nuevamente su rol de inmunovigilancia al romper este importante mecanismo de evasión inmune (15–17).

Estos resultados se tradujeron en la primera autorización de un inhibidor de punto de control inmune (CTLA-4) por la FDA (18,19), seguidos por la aprobación de otros dos anticuerpos anti-PD1 (pembrolizumab y nivolumab) y un anticuerpo anti-PD-L1 (atezolimumab) para el tratamiento del melanoma avanzado, el cáncer no microcítico de pulmón, carcinoma de células renales, y el linfoma de Hodgkin, entre otros (8,20). De hecho, el desarrollo de este tipo de inmunoterapia contra el cáncer no sólo fue seleccionado como el "avance del año" en 2013, sino que también significó el premio Nobel en medicina de 2018 a James Allison y Tasuku Honjo.

Finalmente, otras nuevas estrategias de inmunoterapia contra el cáncer han avanzado no sólo en la modulación in vivo del sistema inmune mediante la administración de fármacos. También se ha avanzado en su intervención mediante su extracción y manipulación ex vivo para luego reintroducirlo al paciente con una variedad de características inmunoefectoras nuevas (imagen 3).

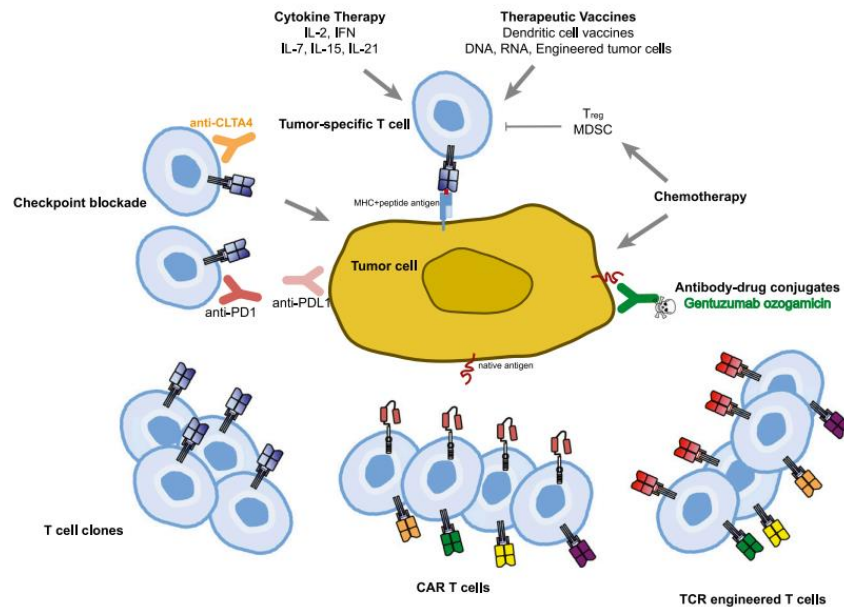


Imagen 3 (21): Abordajes terapéuticos para superar la tolerancia inmunológica a los tumores.

La denominada inmunoterapia celular adoptiva consiste en una amplia variedad de técnicas que incluyen esta manipulación ex vivo de células inmunes, con el objetivo de obtener un producto de terapia celular específico. Los mismos contarán con unas características inmunes efectoras específicas que pueden incluir tanto la potenciación de la especificidad natural de las mismas (p.ej. TILs), así como la redirección sintética de la misma mediante técnicas de transferencia génica (p.ej. TCR-T y CAR-T). Ambos tipos de modificaciones permitirán utilizarlas para el tratamiento de una variedad de neoplasias.

Dicha inmunoterapia celular adoptiva fue promovida en la década del 1980 por numerosos investigadores, inspirados por la eficacia observada con la administración de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) en pacientes con melanoma metastático (22). Dicha técnica había sido previamente desarrollada y liderada por investigadores tales como Steven A. Rosenberg y Philip D. Greenberg, entre otros (23–25) (imagen 4).

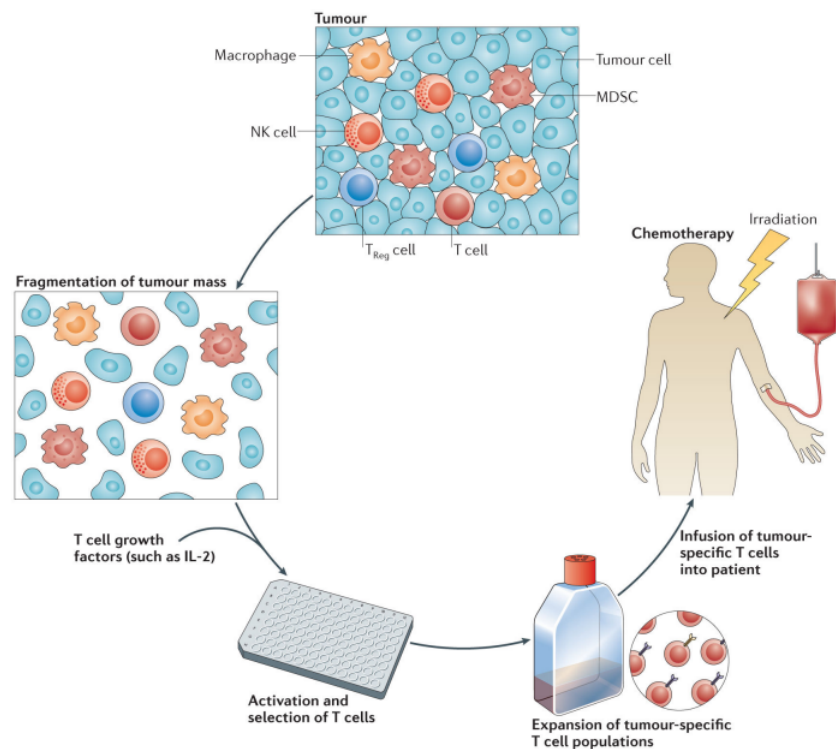


Imagen 4 (26): Aislamiento de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) y expansión de poblaciones de células T específicas de tumor.

Este proceso requiere del aislamiento de dichos TILs a partir de una muestra tumoral extraída del paciente. Tras la obtención de la muestra tumoral, los TILs son extraídos de la misma, seguidos de un proceso de selección, y posteriormente son expandidos ex vivo durante un período de semanas hasta obtener una celularidad suficiente. Una vez obtenida la celularidad deseada son administrados al paciente y estimulados in vivo mediante la administración de interleucinas para que ejecuten sus características inmunofectoras contra el mismo tumor del cual fueron extraídos.

Sin embargo, a pesar de que dicha técnica ha logrado demostrar respuestas considerables en un subgrupo de pacientes, se trata de una técnica con ciertas limitaciones. Aproximadamente el 50%-60% de los pacientes no conseguían aislar o expandir suficientes TILs de los tumores, lo cual limitaba considerablemente el número de pacientes que podían ser tratados.

Esta limitación en la obtención de suficiente cantidad de células inmunes efectoras del tumor puede ser solventada mediante los avances en cuanto a transferencia e ingeniería genética. A falta de suficientes linfocitos T específicos, se pueden obtener mayores cantidades linfocitos T no específicos, y redirigir su especificidad mediante distintas técnicas transferencia génica. De esta forma se incrementa ostensiblemente la probabilidad de obtención de la celularidad necesaria.

Esta redirección de la especificidad T hacia antígenos específicos presentes en células tumorales puede conseguirse a través de la transferencia de receptores de linfocito T (TCR) fisiológicos (TCR-T) (imagen 5) (26–32).

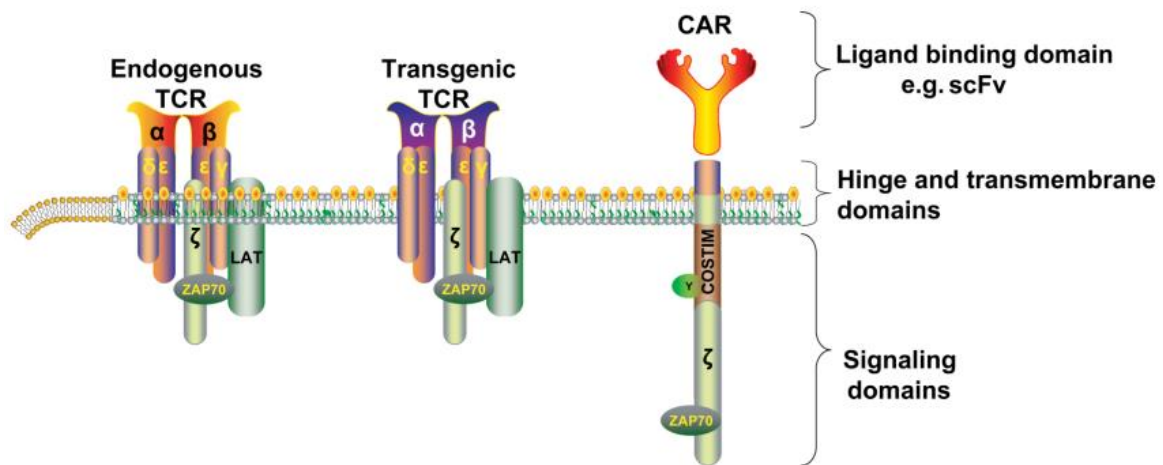


Imagen 5 (30): Linfocitos T modificados genéticamente con especificidad redirigida mediante TCR o CAR.

Tales TCR-T pueden ser generados a partir de linfocitos T aislados del tumor, y transducidos con un TCR específico de tumor mediante distintas técnicas de transferencia génica (imagen 6). Una vez transducidos con el nuevo TCR, son expandidos y posteriormente administrados al paciente, donde reconocen el antígeno tumoral presentado en el contexto del CMH. Dicho abordaje, ha logrado demostrar alcanzar respuestas clínicas en distintos estudios focalizados principalmente en melanoma, entre otras neoplasias (33–42).

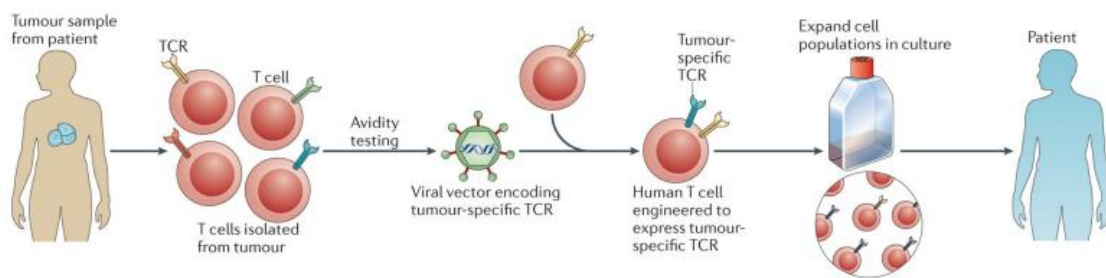


Imagen 6 (26): Las células T pueden ser identificadas y clonadas a partir de pacientes con una respuesta antitumoral. Sus receptores de células T (TCR) pueden clonarse e insertarse en retrovirus o lentivirus, que luego se utilizan para infectar células T autólogas del paciente que se va a tratar.

Este enfoque basado en TCR se caracteriza por permitir detectar y dirigir la respuesta celular T hacia antígenos intracelulares presentados por el CMH. Por lo tanto, esto significa que la aplicabilidad de dicha estrategia está restringida a la presentación de estos neoantígenos por el CMH de las células afectas. Esta limitación podría significar el fracaso de dicho abordaje en caso de tumores que disminuyan la expresión de sus CMH (43), un conocido mecanismo de evasión inmune (44–51).

Son estas limitaciones de la estrategia de terapia celular adoptiva con TCR-T las que impulsan la búsqueda de alternativas que permitan solventar esta limitación asociada al CMH (44). En este contexto es que la tecnología compuesta por linfocitos T transducidos con receptores antigénicos quiméricos (CAR) cobra valor, siendo desarrollada por primera vez por Gideon Gross y Zelig Eshhar del Instituto de Ciencias Weizmann en Israel a principios de los 1990 (45,46).

Dicha terapia CAR-T, compuesta por receptores antigénicos quiméricos desarrollados mediante biología sintética, han significado una revolución en el abordaje terapéutico del cáncer. En particular, han representado una nueva era en el tratamiento de las neoplasias linfoides B, el cual es el motivo que impulsa la presente tesis doctoral. A continuación, se desarrollarán las bases de este tipo de terapia y su aplicación a este grupo de enfermedades.

1.2. Origen y clasificación de las neoplasias linfoides B:

Las neoplasias de células B parecen reflejar en muchos aspectos las etapas de la diferenciación normal de las células B, por lo que pueden clasificarse en cierta medida según la etapa normal de diferenciación B correspondiente (47–50). Estas similitudes incluyen aspectos tanto morfológicos como inmunofenotípicos (51–53). La diferenciación normal de las células B comienza con las células B precursoras conocidas como células B progenitoras/linfoblastos (54). Estas células B progenitoras son las precursoras de toda la línea de células B, caracterizada por la expresión de CD19 a lo largo de la mayoría de los estadios madurativos derivados de la misma.

Estas células se someten al reordenamiento del gen de la inmunoglobulina VDJ dentro de la médula ósea y se diferencian progresivamente en células pre-B, células B inmaduras y finalmente en células B naïve maduras. Las células B naïve circulan por la sangre periférica y también ocupan los folículos linfoides primarios y las zonas del manto folicular (55). Al encontrarse con un antígeno que se ajusta a su receptor de Ig de superficie, las células B naïve se transforman, proliferan y, en última instancia, maduran hasta convertirse en células plasmáticas secretoras de anticuerpos y células B de memoria (imagen 7).

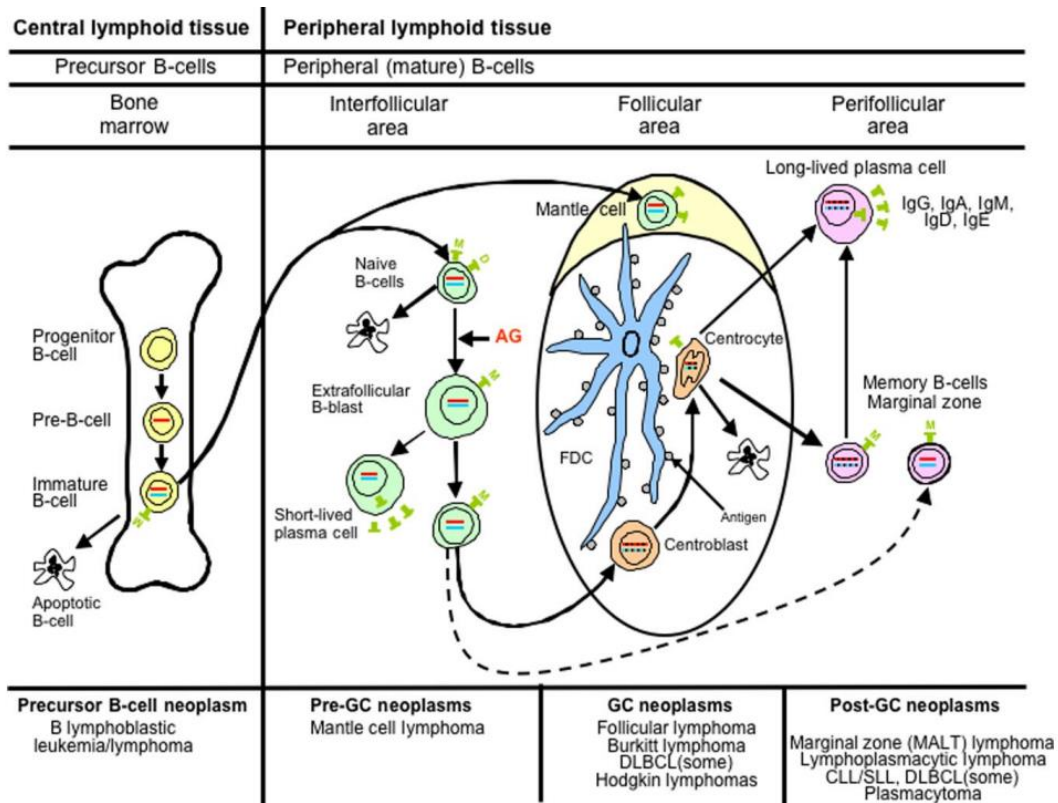


Imagen 7 (Jaffe et al, Blood 2008) (48): Representación diagramática de la diferenciación de las células B y relación con las principales neoplasias de células B.

La adquisición de una extensa variedad alteraciones genéticas y epigenéticas (mutaciones, translocaciones, deleciones, etc.) en cada uno de estos estadios pueden derivar en una desregulación madurativa y proliferativa que lleve al desarrollo de una amplia variedad de síndromes linfoproliferativos B.

A su vez, estas células B malignas suelen conservar la capacidad de permanecer o dirigirse a los tejidos en los que se encontraban madurando al momento del evento patogénico. De este modo las alteraciones de células precursoras B suelen afectar principalmente la médula ósea y la sangre periférica dando lugar a leucemias agudas linfoblásticas (LLA). Las alteraciones de células B naïve suelen afectar ganglios linfáticos y la sangre dando lugar a linfomas de células del manto (LCM). Las alteraciones de células B que ocurren en el centro germinal ganglionar suelen dar lugar a linfomas foliculares (LF), linfomas de Burkitt, linfomas difusos de células B grandes (LDCBG) y linfomas de Hodgkin. Finalmente, las alteraciones de células B que ocurren tras su paso por el

centro germinal suelen dar lugar a linfomas de la zona marginal y de MALT, a linfomas linfoplasmocíticos, leucemias linfocíticas crónicas, algunos LDCBG y mielomas de células plasmáticas.

1.3. Pronóstico de los síndromes linfoproliferativos B CD19 positivos recaídos o refractarios:

El pronóstico de los síndromes linfoproliferativos originados en el linfocito B es francamente desfavorable una vez estos recaen o son refractarios (R/R) a la primera o posteriores líneas de tratamiento. Independientemente del estadio madurativo del linfocito B a partir del cual surge la enfermedad, los pacientes presentan un pronóstico infausto con los tratamientos convencionales. Tanto aquellas enfermedades que surgen de estadios “tardíos” o “maduros”, como la leucemia linfocítica crónica (LLC) o linfomas no-Hodgkin (LNH), como aquellas que surgen de estadios “precozes” de precursores B tales como la leucemia linfoblástica aguda (LLA) comparten un destino similar.

En lo que respecta a la LLC, a pesar de los grandes avances en su abordaje terapéutico, sigue siendo considerada una enfermedad incurable en la mayoría de los pacientes. Sin embargo, la introducción de nuevas terapias dirigidas con inhibidores de la tirosina cinasa de Bruton (iBTK), de antagonistas de BCL-2 (iBCL-2) y de inhibidores del fosfatidilinositol 3-cinasa (iPI3K) ha cambiado el pronóstico de los pacientes con LLC R/R (56–58) (Imágenes 8, 9 y 10).

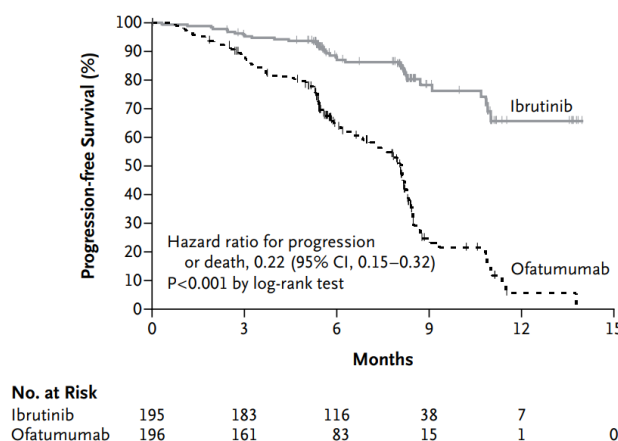


Imagen 8 (56): SLP en pacientes con LLC R/R tratados con ibrutinib vs ofatumumab.

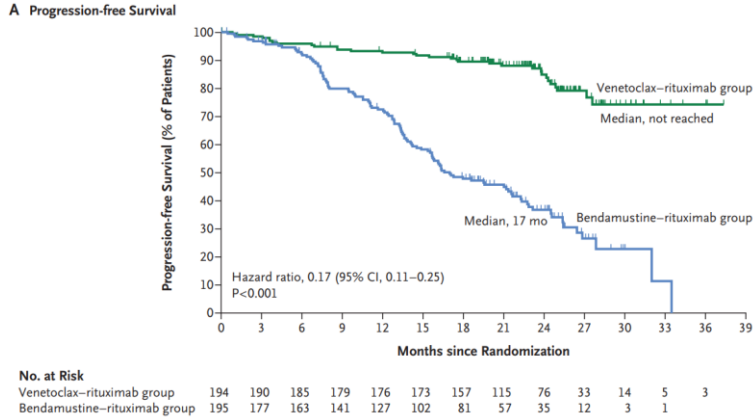


Imagen 9 (57): SLP en pacientes con LLC R/R tratados con R-venetoclax vs R-bendamustina.

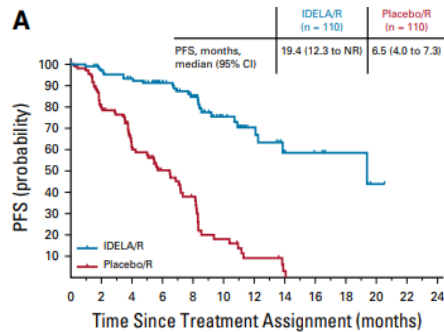


Imagen 10 (58): SLP en pacientes con LLC tratados con R-placebo o R-idelalisib.

No obstante, aquellos pacientes con LLC que no responden o recaen al tratamiento dirigido presentan un mal pronóstico. Esto ocurre especialmente en aquellos que presentan alteraciones del TP53 o cariotipo complejo (59), por lo que las guías actuales recomiendan valorar en estos pacientes la realización de un aloTPH (60,61). Sin embargo, dicho procedimiento presenta en esta población una mortalidad del aproximadamente el 20% y una incidencia de recaídas del 46% (62) (imagen 11 y 12). Por lo tanto, la mayoría de estos pacientes se encuentran con una necesidad médica no cubierta.

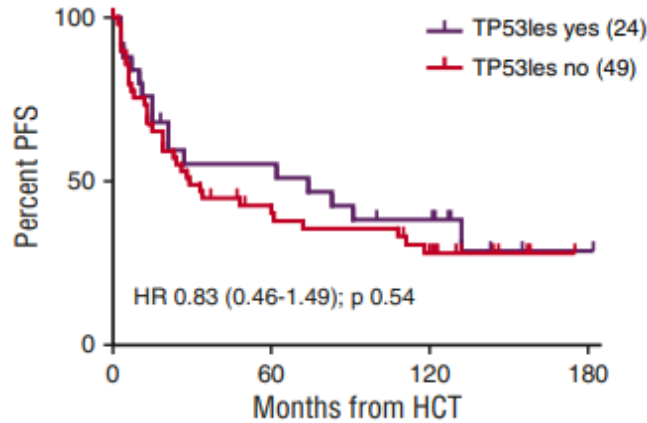


Imagen 11 (62): SLP de pacientes con LLC R/R que realizan un trasplante alogénico, diferenciados según lesiones del TP53.

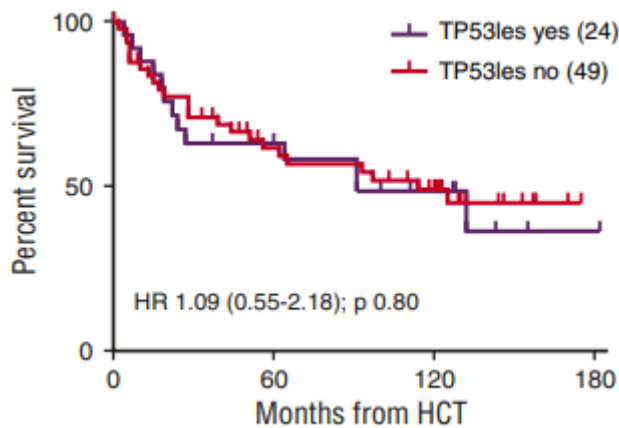


Imagen 12 (62): SG de pacientes con LLC R/R que realizan un trasplante alogénico, diferenciados según lesiones del TP53.

El pronóstico de los pacientes con linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) R/R también es desfavorable. Aquellos pacientes que no responden o recaen al tratamiento estándar de inmunoterapia convencional que incluya rituximab y antraciclínicos presentan una tasa de respuestas globales (TRG) al rescate convencional de tan solo el 26%. De hecho, su mediana de supervivencia global (SG) es de tan sólo 6,6 meses (63) (Imagen 13). Esto afecta especialmente a

aquellos pacientes que recaen dentro del primer año del trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (autoTPH).

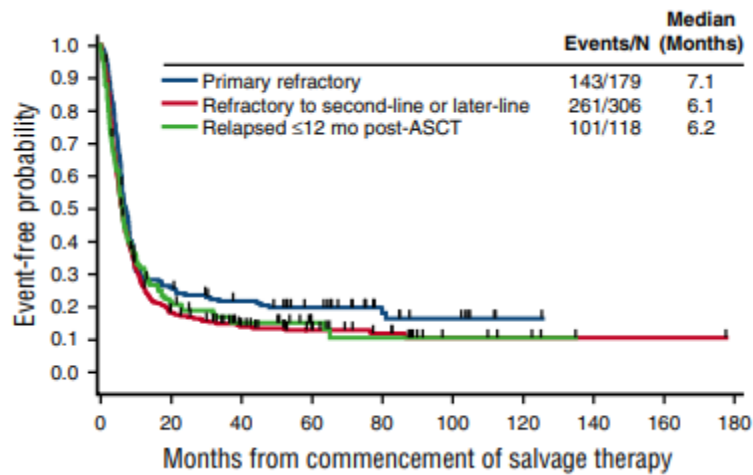


Imagen 13 (63): SG de pacientes con LDCBG R/R a partir del inicio de la terapia de rescate. Se muestra para los subgrupos refractarios.

En este contexto, el desarrollo de nuevos agentes de inmunoterapia, como nuevos anticuerpos monoclonales conjugados con toxinas (p.ej polatuzumab-vedotina), y anticuerpos activadores de la citotoxicidad celular tanto anti-CD19 (p.ej tafasitamab) como bi-específicos anti-CD20 (p.ej mosunetuzumab y glofitamab), han demostrado resultados prometedores. Dichos tratamientos han obtenido tasas de respuestas completas considerables de entre 29-57% (64–67) (Imágenes 14, 15, 16, 17 y 18). Sin embargo, estas combinaciones todavía no han demostrado realmente poseer un potencial curativo en la mayoría de estos pacientes de alto riesgo. De hecho, presentan seguimientos relativamente cortos que de momento no permiten demostrar lo contrario.

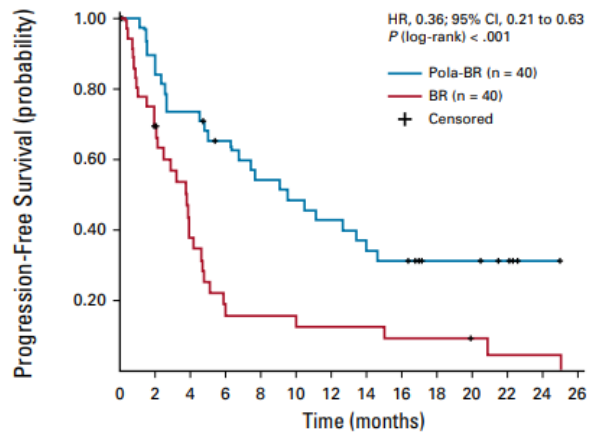


Imagen 14 (64): SLP de pacientes con LDCBG R/R tratados con polatuzumab vedotin combinado con bendamustina-rituximab (pola-BR) comparado con bendamustina-rituximab (BR).

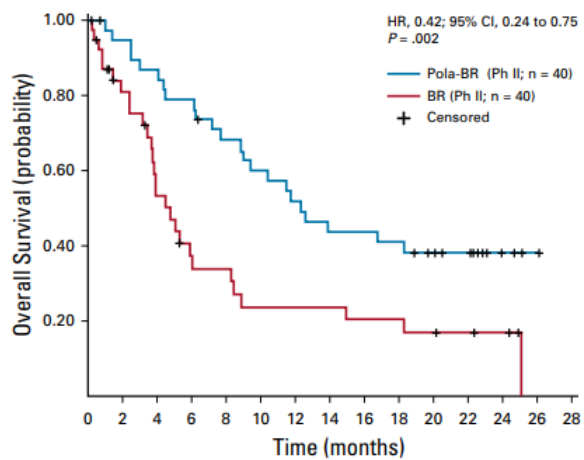


Imagen 15 (64): SG de pacientes con LDCBG R/R tratados con polatuzumab vedotin combinado con bendamustina-rituximab (pola-BR) comparado con bendamustina-rituximab (BR).

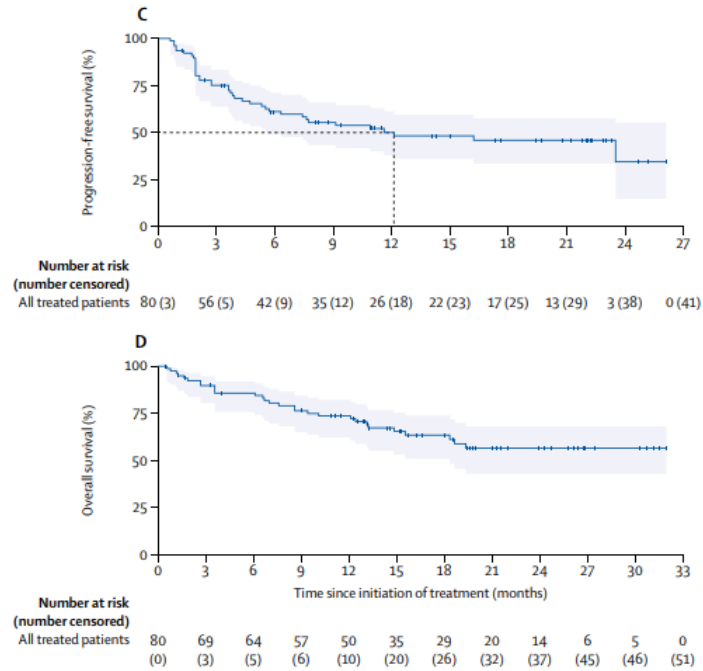


Imagen 16 (65): SLP y SG en pacientes con LDCBG R/R tratados con tafasitamab en combinación con lenalidomida.

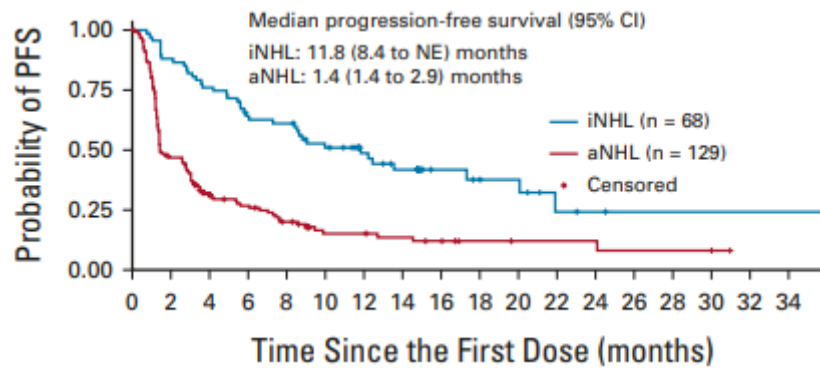


Imagen 17 (67): SLP en pacientes con linfoma no-Hodgkin R/R agresivos e indolentes tratados con mosunetuzumab en monoterapia.

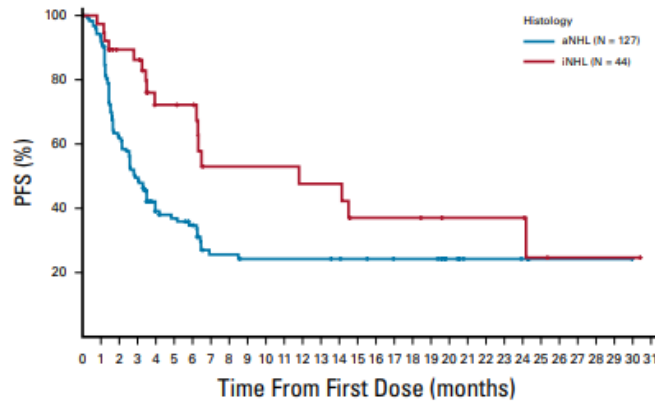


Imagen 18 (67): SLP en pacientes con linfoma no-Hodgkin R/R agresivos e indolentes tratados con glofitamab en monoterapia.

Finalmente, resultados similares son observados con la LLA. El pronóstico de la LLA R/R es también muy desfavorable con el tratamiento inmuno-quimioterápico convencional. Estos pacientes presentan tasas de respuesta completa (TRC) de alrededor del 30-45%, con una supervivencia global (SG) mediana de tan sólo 4-8 meses. Dicho pronóstico desfavorable es observado independientemente de la edad, tipo de terapia de rescate utilizada y la respuesta alcanzada tras dicho tratamiento de rescate (68–72) (Imagen 19).

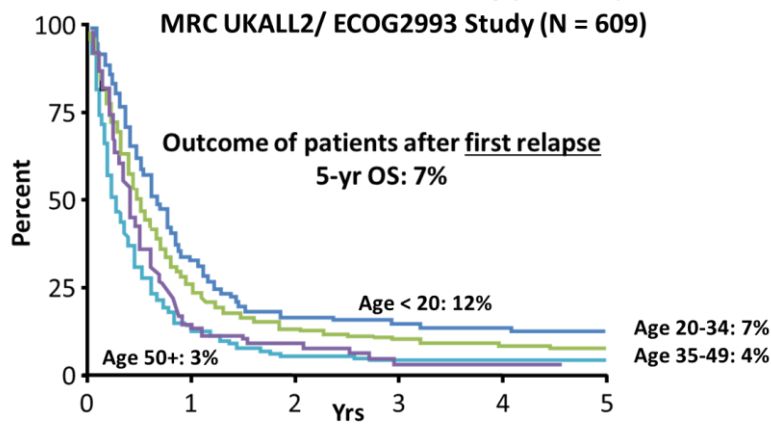


Imagen 19 (68): SG de los pacientes con LLA tras su primera recaída.

Aún más, el pronóstico es particularmente desfavorable para aquellos pacientes que recaen después de un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (aloTPH) (73,74) (Imagen 20 y 21).

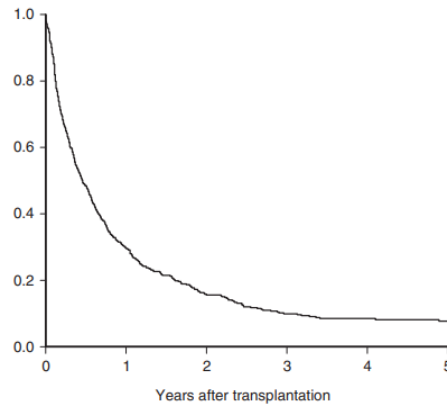


Imagen 20 (73): SG de pacientes con LLA que recaen tras un AloTPH. La SG estimada a 2 años fue del 16% ($\pm 2\%$ s.d.).

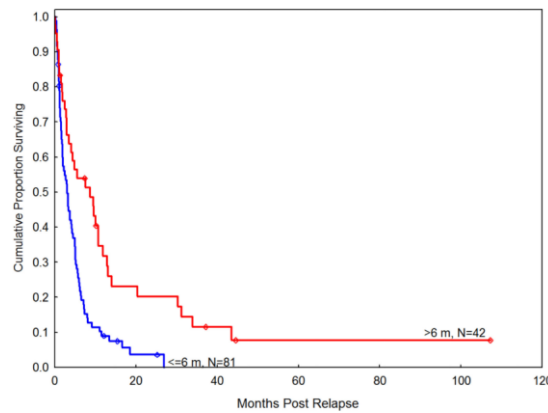


Imagen 21 (74): SG de los pacientes con LLA que recaen dentro de los primeros 6 meses del AloTPH comparado con la de aquellos que recaen tras los primeros 6 meses.

La aparición de nuevas terapias con anticuerpos monoclonales, tanto conjugados con toxinas (inotuzumab-ozogamicina) como biespecíficos activadores del linfocito T (blinatumomab) (83–87) han aumentado considerablemente la TRC de estos pacientes hasta un 40-80%. Sin embargo, dichas respuestas desafortunadamente no son duraderas, con una supervivencia libre de progresión (SLP) mediana menor a 6 meses con ambos fármacos (80,81) (Imagen 22 y 23).

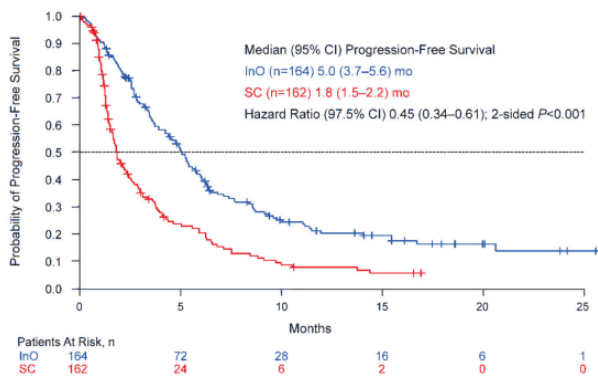


Imagen 22 (80): SG de los pacientes con LLN R/R tratados con inotuzumab-ozogamicina vs terapia convencional.

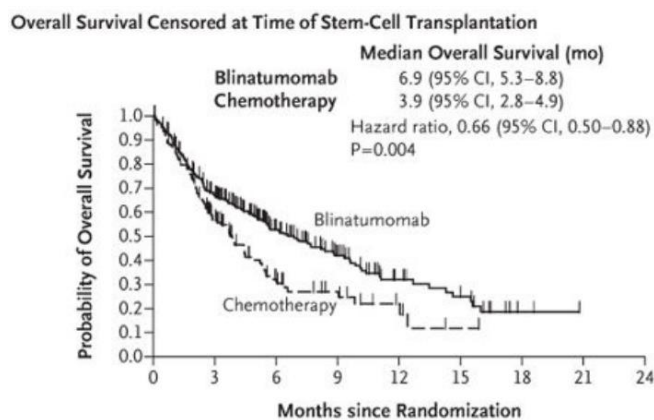


Imagen 23 (81): SG de los pacientes con LLN R/R tratados con blinatumomab vs quimioterapia.

En efecto, dichos tratamientos no han podido demostrar por sí solos de potencial curativo en ausencia de la realización posterior de un aloTPH de consolidación. Se tratan, por lo tanto, de una población con una necesidad médica francamente insatisfecha con el abordaje inmunoterápico convencional (82) (Imagen 24).

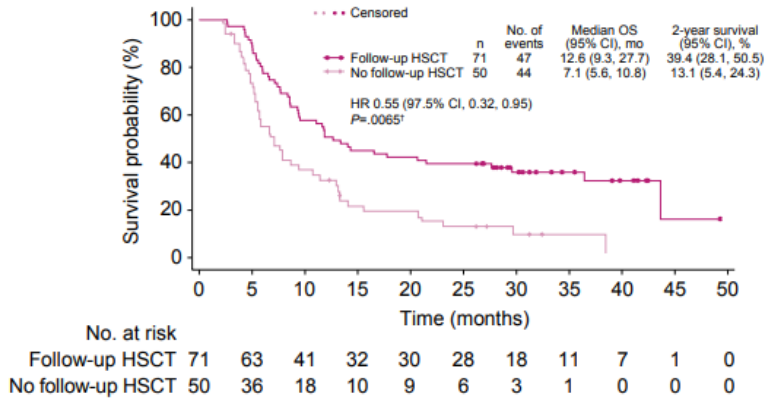


Imagen 24 (82): SG de los pacientes con LLA R/R tratados con inotuzumab-ozogamicina con y sin AtoTPH posterior.

1.4. La emergencia de los linfocitos T con receptores antigénicos quiméricos (CARs), o CAR-T:

Recientemente, varias instituciones han desarrollado una nueva modalidad de terapia adoptiva con compuesta por linfocitos T con receptor antigénico quimérico (CAR), o células CAR-T (21,30,45) (Imágenes 25).

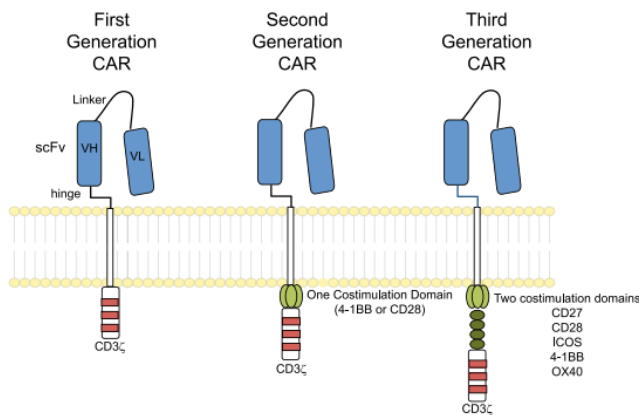


Imagen 25 (21): Los receptores antigénicos quiméricos se dirigen a antígenos de superficie de forma independiente del CMH. En los primeros ensayos se probaron CARs de primera generación con un único dominio citoplasmático. Los ensayos actuales están probando CARs de segunda y tercera generación que tienen combinaciones de dominios de señalización.

Dicha terapia consiste en la modificación de la especificidad de linfocitos T mediante la incorporación de material genético sintético que lleve a la expresión de dicho CAR. La expresión del CAR en la membrana celular linfocitaria confiere una nueva especificidad al linfocito T. Esto ocurre debido a que es capaz de vincular y activar de forma específica y potente la actividad celular T contra aquellas estructuras que expresen la diana antigénica a la cual está dirigido. A diferencia del mecanismo de activación linfocitoide T contra la enfermedad del AloTPH, la activación T en la terapia CAR-T ocurre de forma independiente de la vía del complejo mayor de histocompatibilidad (83) (Imagen 26).

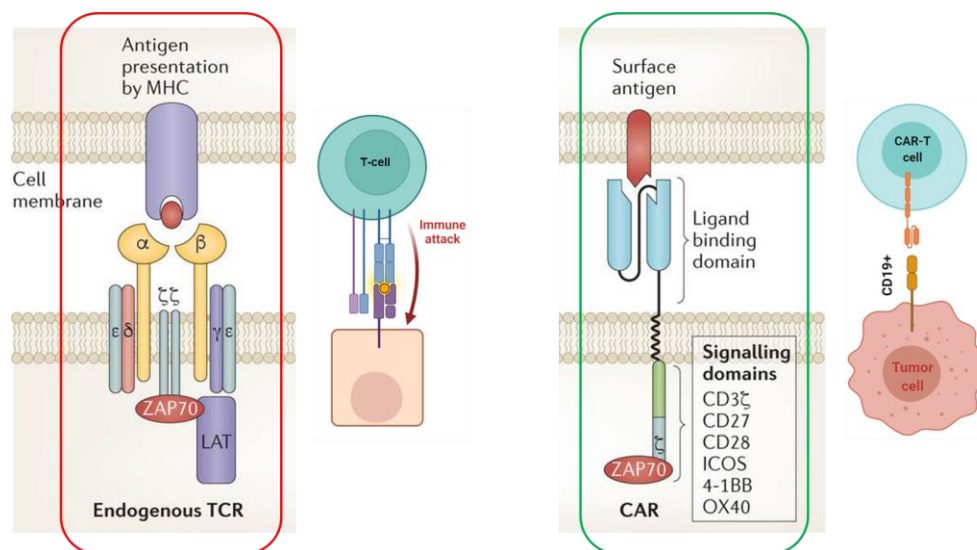


Imagen 26: Adaptado de Fesnak et al, Nat Rev Cancer 2016 (83): Comparación de la estructura básica de los receptores de células T (izquierda) y los receptores de antígenos quiméricos (derecha).

Esto es posible ya que la porción extracelular del CAR está compuesta por una secuencia variable monoclonal de un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a su diana antigénica. Una vez ocurre esta unión, es capaz de transmitir su señal de activación a través de sus dominios de bisagra extracelular (p.ej. CD8, CD28, IgG1, IgG4, etc.) y transmembrana (p.ej. CD8, CD4, CD28, ICOS, etc.) hasta los dominios intracelulares (92,93). Estos dominios intracelulares están

normalmente conformados por tanto el dominio de activación CD3 ζ , como de al menos un dominio de co-estimulación (p.ej. 4-1BB, CD28, OX40, ICOS, etc.) (86,87) (Imagen 27).

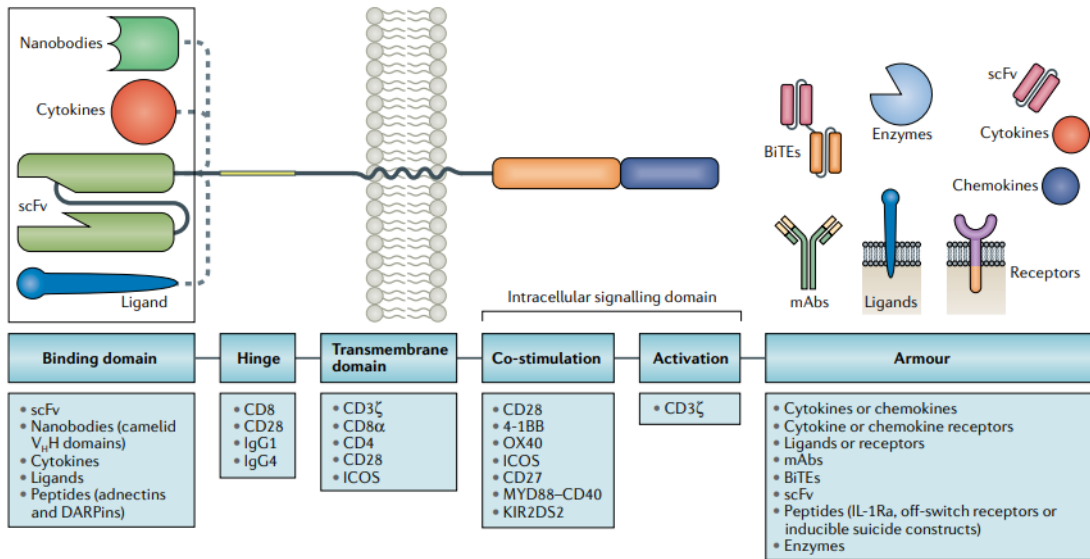


Imagen 27 (87): Plano del diseño de un CAR. Distintos segmentos de su estructura con distintas opciones de elección.

Son finalmente estos dominios intracelulares los cuales median los procesos de activación, proliferación y actividad citotóxica de la respuesta T de una forma independiente del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (88) (Imagen 28).

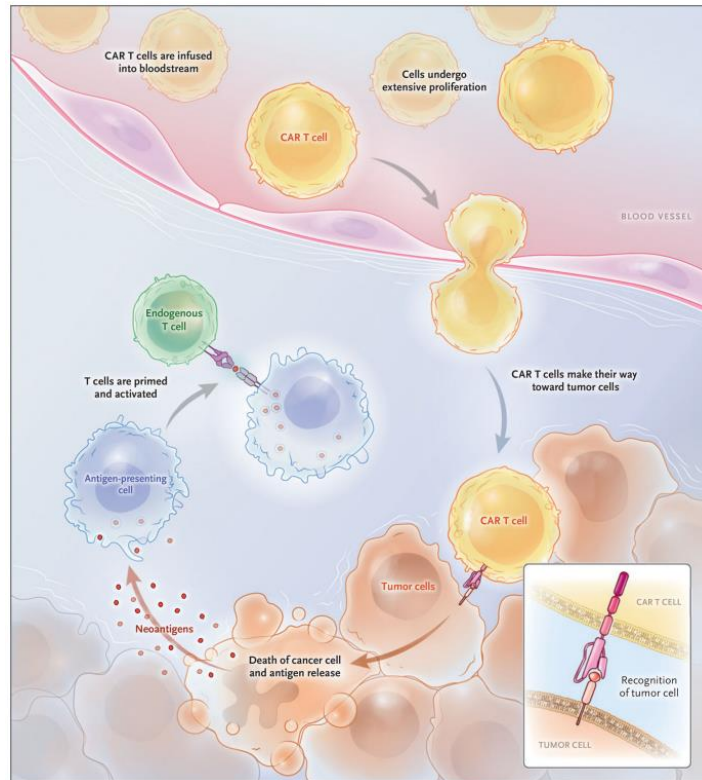


Imagen 28 (88): las células CAR-T se injertan, se dirigen al tumor y proliferan ampliamente después de la infusión.

Existen ilimitadas opciones de conformación de los constructos CAR (89). Estos pueden diferir en su especificidad (CD19, BCMA, CD20, etc.), el número de dianas (únicas o duales) o el origen del parátipo específico (murino, camélido, humanizado, etc.) (90–99). La disposición de los parátipos también puede variar (en tándem, monocistrónicos, bicistrónicos, etc.), así como en su afinidad y densidad de expresión y el tipo de segmento de bisagra utilizado (100,101). Además, dichos productos CAR-T pueden diferir en cuanto a la cantidad y tipo de moléculas co-estimuladoras intracelulares incorporados, así como en el método de ingeniería genética utilizado (transducción con lentivirus, retrovirus; electroporación con transposón, RNA mensajero) (102–108).

Por otra parte, algunos productos incluso incorporan la transducción de un gen de seguridad o “safety switch”, que puede servir como gen suicida. Algunos productos incorporan dicho gen al CAR como mecanismo de seguridad en caso de desear eliminar el CAR-T del paciente, permitiendo “activarlo” de forma deliberada mediante la administración de un fármaco inductor, entre otros (109,110).

Aún más opciones existen en función de las plataformas de procesamiento celular a ser utilizadas, el tipo de selección T utilizado, el tipo de biorreactor y el método de estimulación ex vivo. Finalmente, la formulación de poblaciones del producto final (ratio CD4/CD8, subpoblaciones efectoras, de memoria, etc.) abre la posibilidad de un rango de productos posibles prácticamente ilimitado (111).

A pesar de esta enorme cantidad de opciones potenciales, la mayoría de las células CAR-T que se han administrado a humanos hasta el momento actual tenían como diana el antígeno CD19. Esto es así debido a que la expresión del CD19 se encuentra mantenida en casi la totalidad de las células de estirpe linfoide B. Esto incluye a la mayoría de los casos de LLA, LNH-B y LLC (Imagen 29), enfermedades que representan la mayor parte de las hemopatías malignas.

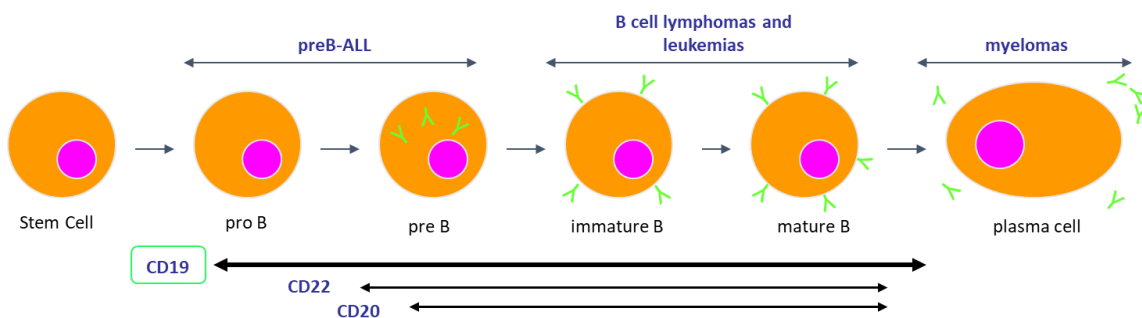


Imagen 29: Expresión del CD19: la misma se encuentra expresado extensamente a lo largo de la diferenciación de las células de estirpe B y, por lo tanto, de las enfermedades que surgen de ellas.

A pesar de que el CD19 se expresa en los linfocitos B sanos, dirigir la especificidad de los linfocitos T a la misma mediante un CAR es considerado seguro. Esto se debe a que la expresión del CD19 se encuentra restringida mayormente a las células de estirpe B, y a que no se expresa de forma significativa en células progenitoras hematopoyéticas, ni tampoco en otras estructuras vitales del organismo. Se considera por lo tanto una diana segura, con un componente de toxicidad “on-target off-tumor” muy acotado y aceptable. Por otro lado, la pérdida completa de la estirpe linfoide B es compatible con la vida, pudiendo corregirse mediante la administración de inmunoglobulinas. Esto, sumado a que la mayoría de los síndromes linfoproliferativos hematológicos surgen de la serie linfoide B, lleva a que el CD19 sea considerado en una diana de gran interés para el abordaje de múltiples patologías hematológicas, liderando de esta forma el desarrollo de productos CAR-T a nivel mundial.

1.5. Pasos de la elaboración de productos CAR-T autólogos:

Independientemente de la enfermedad a la que se desee tratar y del diseño del producto CAR-T autólogo a administrar los productos CAR-T autólogos se rigen por los mismos pasos fundamentales (Imagen 30).

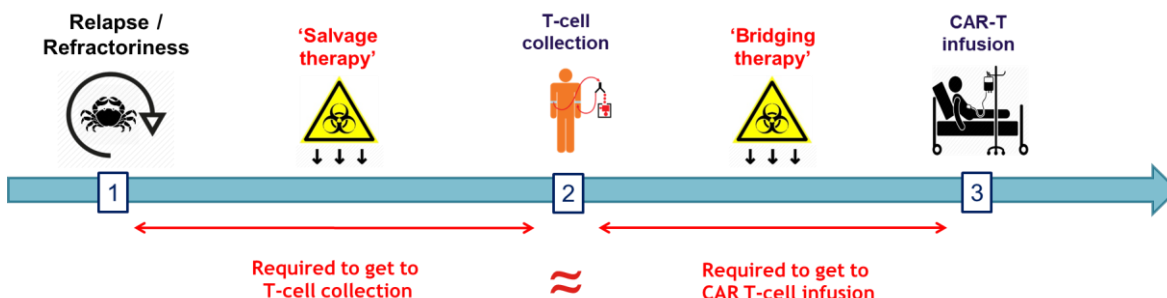


Imagen 30: Pasos de la terapia CAR-T autóloga: (1) identificación del paciente, (2) obtención de linfocitos T autólogos mediante leucocitaféresis, y (3) administración del producto CAR-T.

El proceso comienza con la identificación del paciente candidato. Una vez confirmada su elegibilidad se debe obtener una suficiente cantidad de linfocitos T autólogos como materia prima. La recolección de linfocitos T se realiza mediante un proceso de leucocitaféresis de sangre periférica (112). A diferencia de la recolección de progenitores hematopoyéticos, dicho procedimiento no requiere de ningún tipo de estimulación o movilización, ya que las células a recolectar se encuentran naturalmente presentes en sangre periférica.

El producto de aféresis no sólo contiene linfocitos T, sino que también contiene otras células mononucleadas (linfocitos B, macrófagos, etc.), además de una menor proporción de otros tipos celulares. El proceso de producción de CAR-T suelen requerir un paso inicial de enriquecimiento o selección celular T sobre este producto de aféresis (113,114). De esta forma se inicia el procesamiento celular con una “materia prima” T lo más pura posible.

A partir de este momento, el proceso suele regirse a estándares de manufactura tipo GMP (del inglés Good Manufacturing Practices), tanto en lo que respecta a la elaboración del material de transferencia génica como de la manipulación de los linfocitos T dentro del biorreactor (115–123).

Algunas de estas técnicas de enriquecimiento celular T incluyen técnicas de elutriación y/o procesos de selección magnética.

Una vez obtenido el producto celular T enriquecido, éste es introducido a un biorreactor en el que se elabora el CAR-T propiamente dicho (124,125). El proceso de transferencia génica dentro del biorreactor suele comenzar con a la activación celular T. Esto suele realizarse con una serie de moléculas agonistas de moléculas activadoras T, que pueden actuar sobre CD18 y CD3, entre otras moléculas de activación T. Una vez activado el linfocito T se procede a la transferencia del material genético del CAR. Esto puede realizarse ya sea mediante vectores virales (p.ej. lentivirus, retrovirus) como con otros métodos no virales (p.ej. transposón, CRISPR/Cas9, RNAm, etc.) (Imagen 31) (126–135).

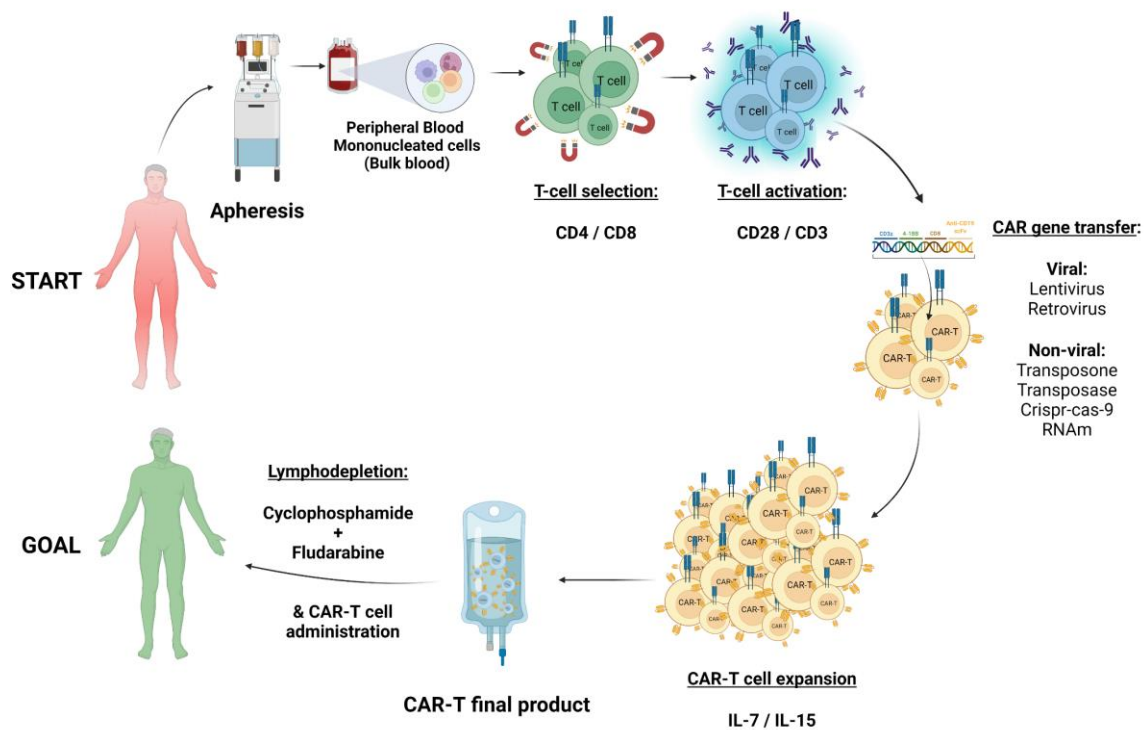


Imagen 31: Pasos de la elaboración de productos CAR-T autólogos: (1) leucocitaféresis, (2) selección de linfocitos T, (3) activación de linfocitos T, (4) transferencia genética de linfocitos T, (5) expansión de CAR-Ts, y (6) administración del producto CAR-T.

La transferencia y expresión del material genético de forma estable en el linfocito T conduce a la obtención de la célula CAR-T propiamente dicha. Esta transducción será realizada con una

eficiencia de transducción que podrá variar entre los distintos tipos de métodos utilizados, así como entre paciente y paciente. Una vez transducidas, las células CAR-T continuarán un proceso de expansión hasta la obtención de la celularidad absoluta requerida. Esto se lleva a cabo mediante la estimulación del CAR-T mediante distintos regímenes de interleucinas (P.Ej: IL-7 e IL-15) (136).

Una vez obtenida la celularidad CAR-T requerida, se procede a la finalización del proceso de producción celular y a la formulación de la o las bolsas con la dosis CAR-T deseada. Estas bolsas contenedoras de productos CAR-T deberán superar una serie de controles de calidad preestablecidos antes de proceder con su liberación y administración autóloga.

1.6. El impacto de la terapia CAR-T en el abordaje de las neoplasias hematológicas:

Distintos ensayos clínicos han evaluado la seguridad y eficacia de estos productos CAR-T en pacientes con LLA, LNH-B y LLC R/R a los tratamientos convencionales previamente mencionados. Los resultados obtenidos con distintos productos CAR-T anti-CD19 (CART19) han sido muy prometedores, alcanzando elevadas tasas de respuestas completas (TRC) en una amplia variedad de hemopatías malignas. Distintos productos CART19 han alcanzado TRC de hasta el 93% en pacientes con LLA (137–143), 54% en pacientes con LDCBG (144–146), 67% en pacientes con linfoma de células del manto (LCM) (147), 74% en pacientes con linfoma folicular (148,149), y del 59% en pacientes con LLC (150–157) (Imágenes 32, 33 y 34).

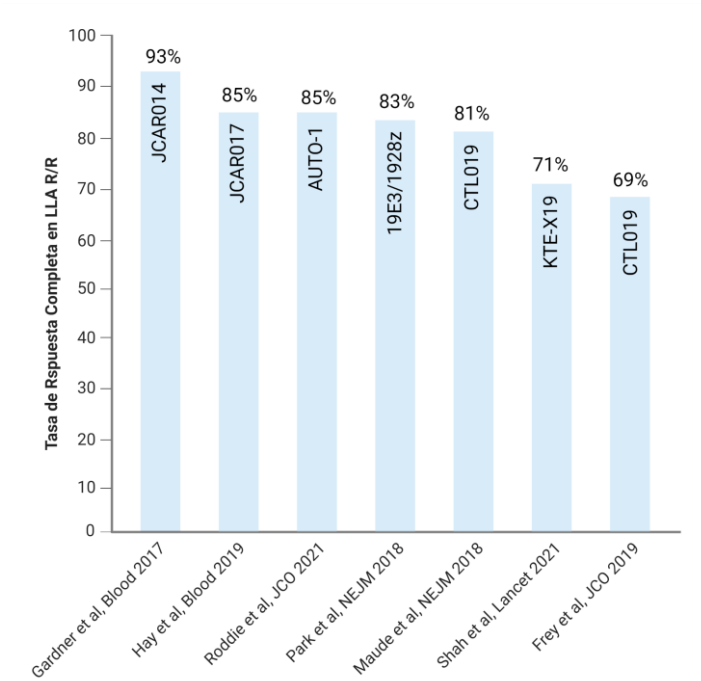


Imagen 32: Tasas de respuesta completa obtenidos con terapia CAR-T observados en LLA R/R.

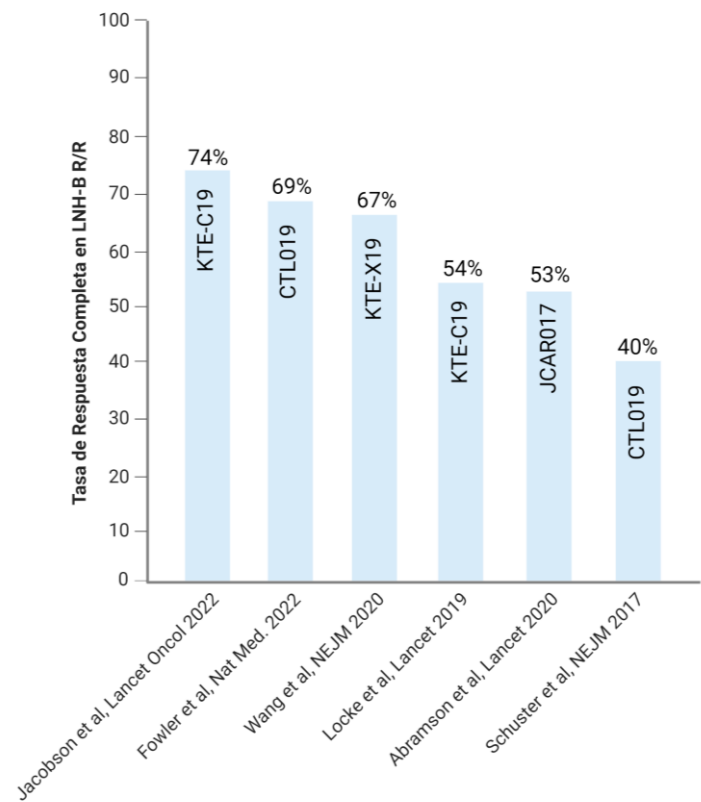


Imagen 33: Tasas de respuesta completa obtenidos con terapia CAR-T observados en LNH-B R/R.

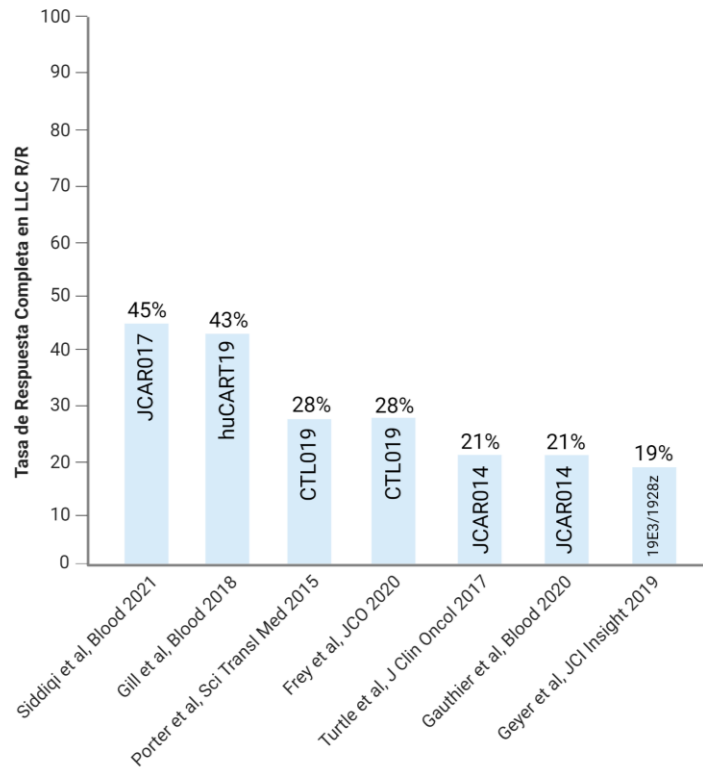


Imagen 34: Tasas de respuesta completa obtenidos con terapia CAR-T observados en LLC R/R.

De hecho, dichos resultados han llevado a la autorización de comercialización por parte de la FDA y la Comisión Europea (EC) de 4 productos CAR-T industriales anti-CD19: tisagenlecleucel, axicabtagén ciloleucel, brexucabtagén autoleucel y lisocabtagén maraleucel. Estos productos CAR-T, están actualmente autorizados para el tratamiento de pacientes con LLA, LDCBG, LF y LCM recaídos o refractarios, consolidando un cambio de paradigma en la forma en la que se tratan los síndromes linfoproliferativos refractarios (Imagen 35).

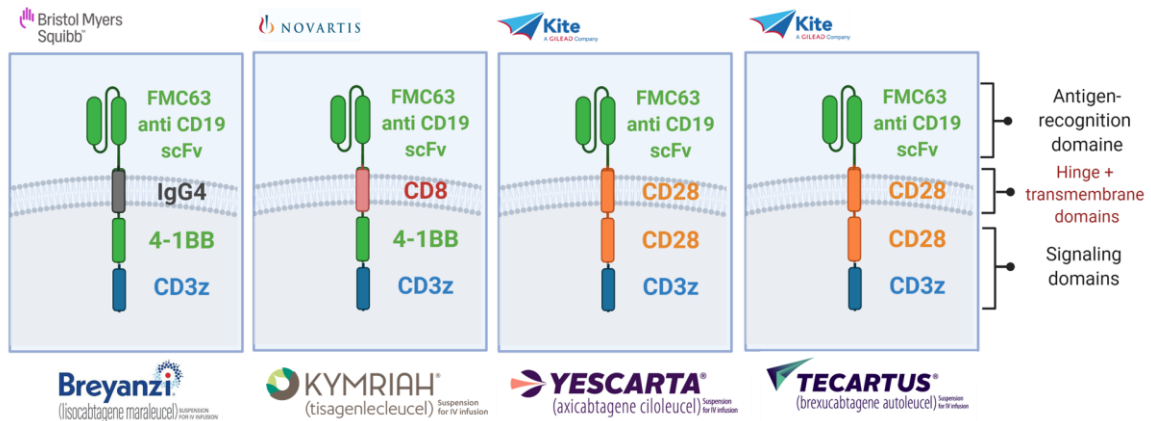


Imagen 35: Productos CAR-T anti-CD19 industriales con autorización de comercialización en EEUU y la UE.

Sin embargo, estas altas tasas de respuestas obtenidas por el CAR-T en estas poblaciones de pacientes múltiple refractarios también están asociadas a una considerable tasa de recaídas. En LLA, la tasa de supervivencia libre de progresión (SLP) al año se encuentra alrededor del 50%, en las mejores series (Imágenes 36-42).

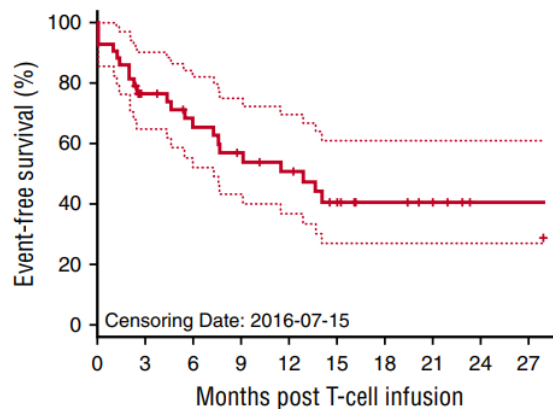


Imagen 36 (137): SLE en pacientes pediátricos y adultos jóvenes con LLA R/R tratados con el CART19 JCAR014.

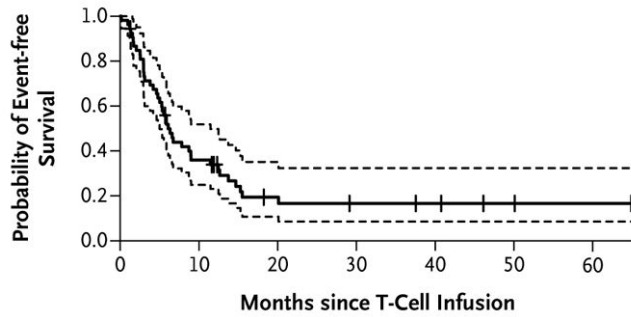


Imagen 37 (138): SLE en pacientes adultos con LLA R/R tratados con el CART19 19–28z.

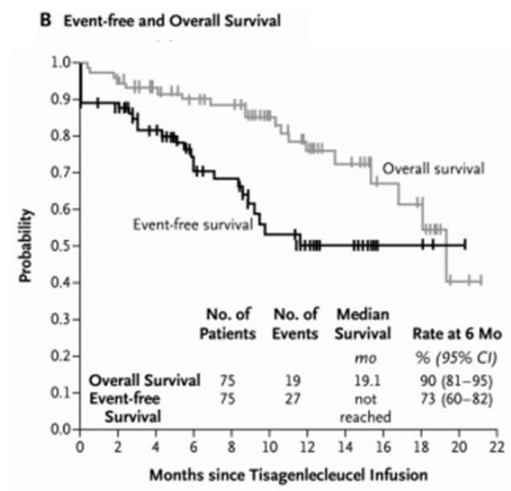


Imagen 38 (139): SLE y SG en pacientes pediátricos y adultos jóvenes con LLA R/R tratados con el CART19 CTL019.

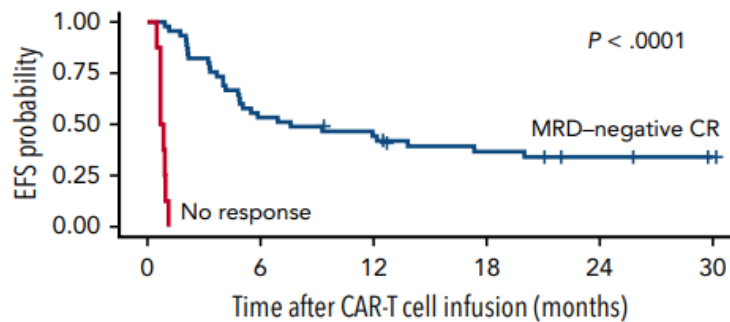


Imagen 39 (140): SLE en pacientes adultos con LLA R/R tratados con el CART19 JCAR017.

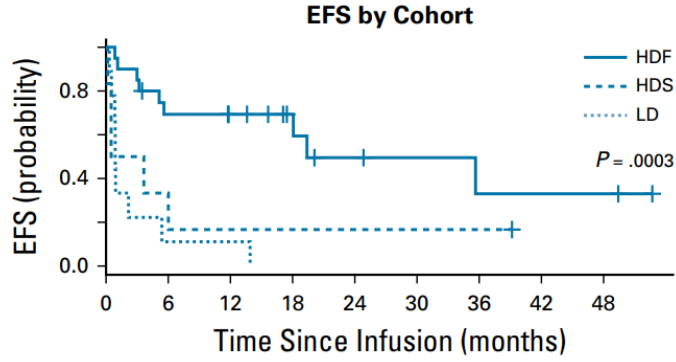


Imagen 40 (141): SLE en pacientes adultos con LLA R/R tratados con el CART19 CTL019.

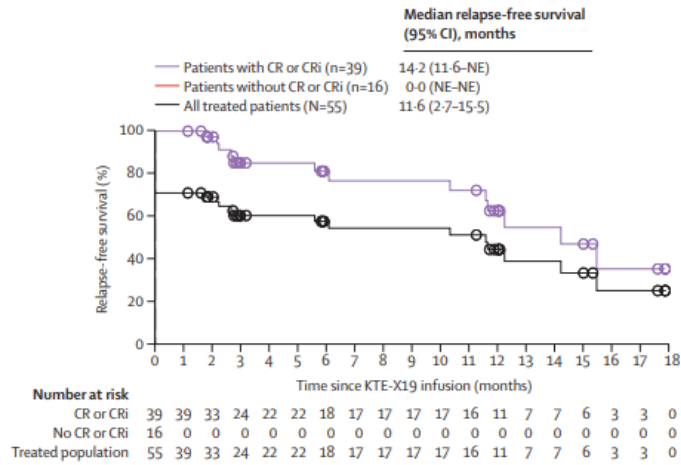


Imagen 41 (142): SLP en pacientes adultos con LLA R/R tratados con el CART19 KTE-X19.

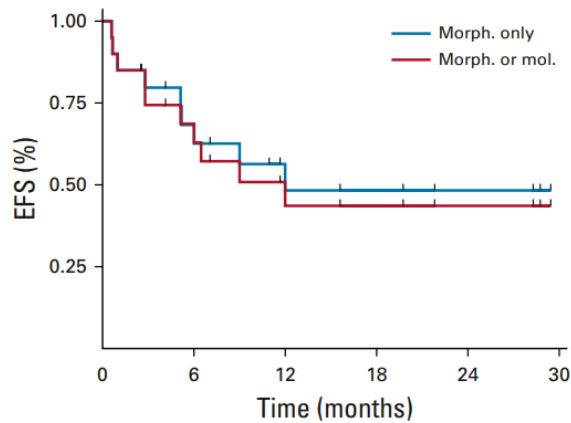


Imagen 42 (143): SLE en pacientes adultos con LLA R/R tratados con el CART19 AUTO-1.

En LNH sucede algo similar, con unas tasas de SLP al año de torno al 44% en las mejores series de LDCBG R/R (Imágenes 43-45), así como del 68% en LF R/R (imagen 46), y del 61% para aquellos pacientes con LCM (Imagen 47).

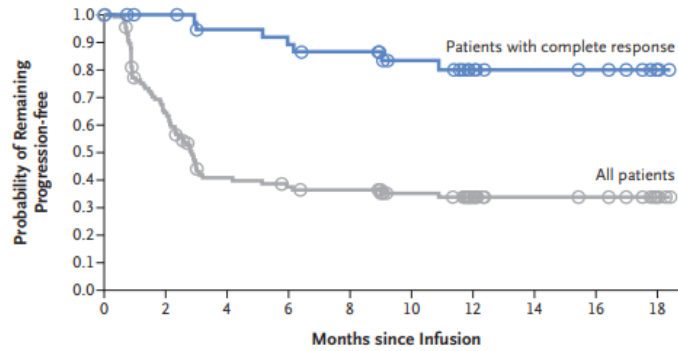


Imagen 43 (144): SLP en pacientes adultos con LDCBG R/R tratados con el CART19 CTL019.

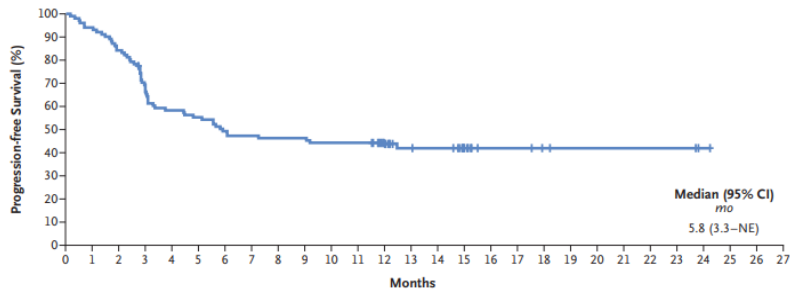


Imagen 44 (145): SLP en pacientes adultos con LDCBG R/R tratados con el CART19 KTE-C19.

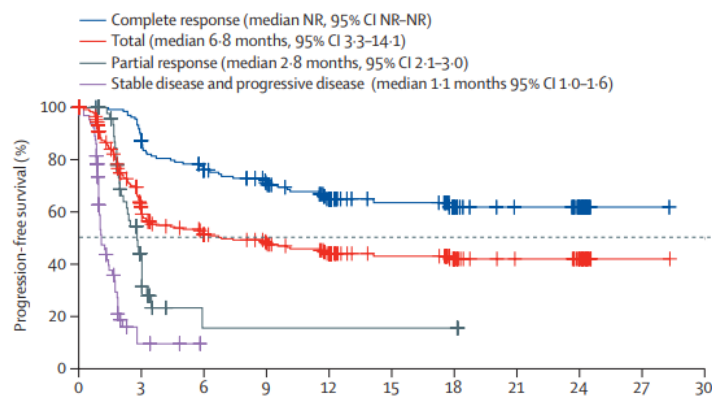


Imagen 45 (146): SLP en pacientes adultos con LDCBG R/R tratados con el CART19 liso-cel.

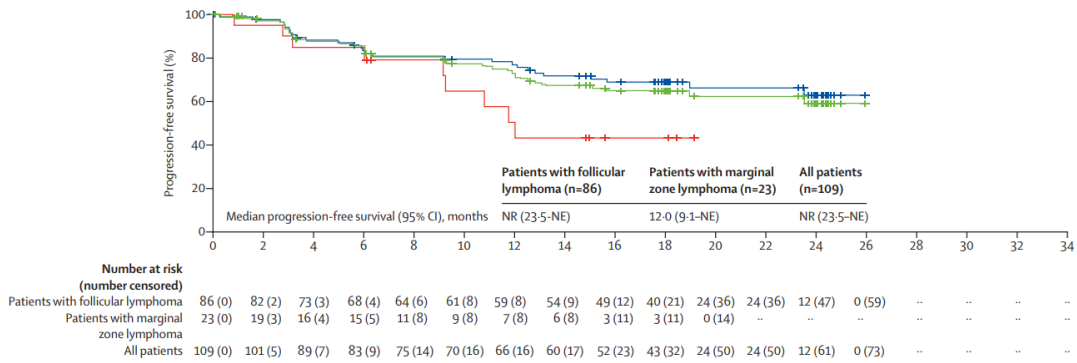


Imagen 46 (148): SLP en pacientes adultos con LF R/R tratados con el CART19 axi-cel

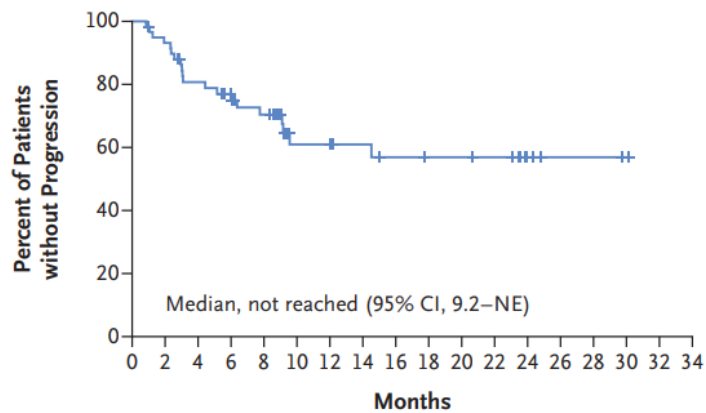


Imagen 47 (147): SLP en pacientes adultos con LCM R/R tratados con el CART19 KTE-X19.

Finalmente, en LLC el sentido de resultados no difiere, con medianas de SLP reportadas entre 7 meses y no alcanzada (Imágenes 48-52).

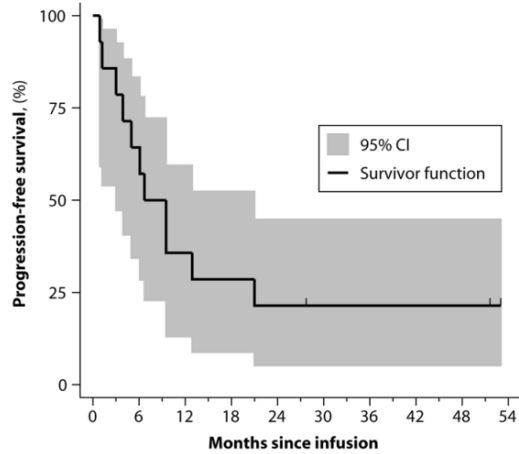


Imagen 48 (151): SLP en pacientes adultos con LLC R/R tratados con el CART19 CTL019.

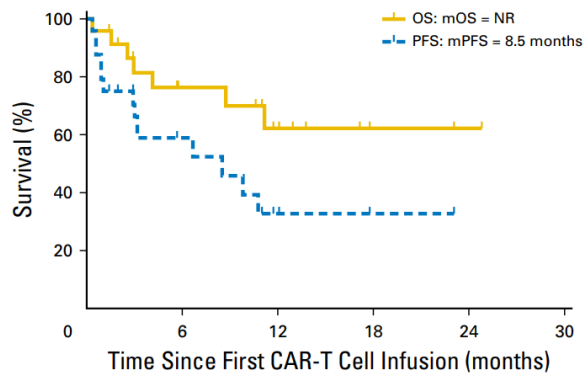


Imagen 49 (152): SLP y SG en pacientes adultos con LLC R/R tratados con el CART19 JCAR014.

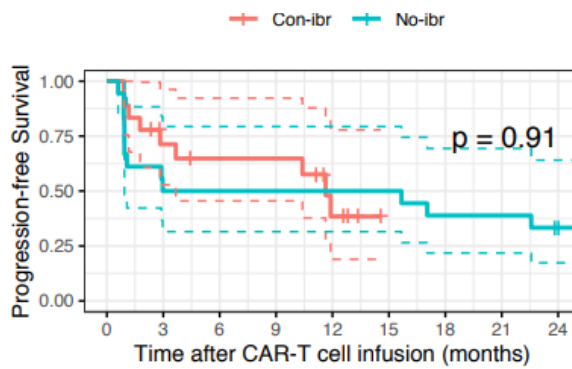


Imagen 50 (156): SLP en pacientes adultos con LLC R/R tratados con el CART19 JCAR014 tratados concurrentemente con o sin ibrutinib.

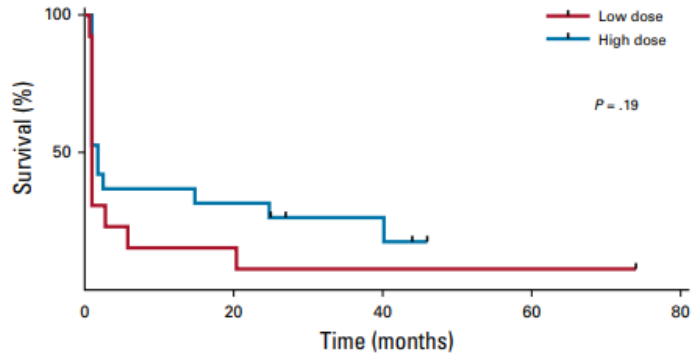


Imagen 51 (155): SLP en pacientes adultos con LLC R/R tratados con el CART19 CTL019.

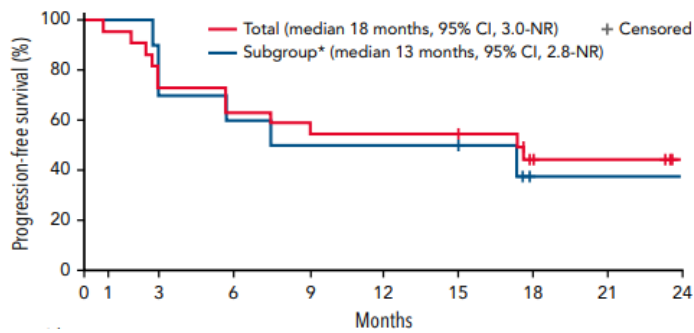


Imagen 52 (157): SLP en pacientes adultos con LLC R/R tratados con el CART19 liso-cel más ibrutinib.

Todo esto nos lleva a la conclusión de que, en promedio, al menos el 50% de los pacientes con LLA, LDCBG, LCM o LLC recaídos o refractarios que reciben una terapia CART19 serán también recaídos o resistentes al CART19.

1.7. El acceso a terapias avanzadas CAR-T en España - una necesidad médica no cubierta:

Los primeros reportes de la aplicación a escala clínica de terapias CAR-T en pacientes con síndromes linfoproliferativos llegaron con la publicación de la experiencia del grupo de la Universidad de Pennsylvania (UPenn) en 2010.

Curiosamente, el primer estudio que certificaba la factibilidad de este tipo de terapia tuvo como objeto un paciente con LLC (150). Esto tuvo una profunda repercusión en la comunidad científica, e inevitablemente provocó una cascada de publicaciones con distintos productos CAR-T en una variedad de síndromes linfoproliferativos, siendo estos principalmente en pacientes con LLA R/R (158–162).

A pesar del gran impacto de los resultados iniciales objetivados con estos primeros estudios, esta tecnología no se encontraba disponible para la mayoría de los pacientes con síndromes linfoproliferativos recaídos o refractarios de España.

De hecho, fueron los resultados derivados del ensayo clínico ELIANA (NCT02435849) (139) los que llevaron en agosto del 2017 a la autorización de comercialización por parte de la FDA del primer producto de terapia CAR-T de la historia. El CAR-T denominado tisagenlecleucel (Kymriah®, Novartis) fue autorizado para uso en pacientes con LLA R/R pediátrica y adultos jóvenes (≤ 25 años). Sin embargo, el acceso a dicha terapia en España y Europa no fue una realidad hasta la autorización por la Comisión Europea en agosto del 2018.

En cuanto al acceso a terapias CAR-T para otras patologías tales como el LDCBG y el LFt R/R tampoco fue hasta mayo 2018 que tisagenlecleucel (Kymriah®, Novartis) fue aprobado por la FDA, seguido por la aprobación por la Comisión Europea en agosto del 2018. Paralelamente, un segundo producto CAR-T denominado axicabtagén-ciloleucel (Yescarta®, Kite) fue aprobado en pacientes con LDCBG, LPM y LFt R/R por la FDA en octubre 2017, seguido en agosto 2018 por la Comisión Europea. Más recientemente, en marzo del 2021 y mayo del 2022 la FDA también extendería la autorización de comercialización de axicabtagén-ciloleucel y tisagenlecleucel para pacientes con LF R/R, respectivamente. De estos dos, axicabtagén-ciloleucel, recibiría la aprobación por la Comisión Europea en junio 2022 para su uso en LF R/R.

No obstante, a pesar dichas autorizaciones por la Comisión Europea, el acceso real en España a dichas terapias CAR-T no sería una realidad hasta mayo 2019. Fue entonces que el Consejo Interterritorial del SNS (CINSNS) aprobó el protocolo farmacoclínico de uso de tisagenlecleucel en el Sistema Nacional de Salud (SNS) para pacientes con LLA (≤ 25 años) y LDCBG. Esto fue seguido en noviembre 2019 de la aprobación del protocolo farmacoclínico de axicabtagén-ciloleucel (Yescarta®) para pacientes con LDCBG y linfoma primario mediastínico (LPM). Sin embargo, el alto coste derivado de la producción de estas terapias personalizadas, tasada en cifras que superan los 340.000 € por tratamiento, incrementaba el riesgo de someter al SNS español a posibles

problemas relacionados con su sustentabilidad, o incluso a un acceso limitado para los pacientes en indicación.

1.8. Concepción, gestación y nacimiento del ARI-0001:

La publicación en 2010 del primer “case report” por parte del grupo de la Universidad de Pennsylvania (UPenn) sobre la objetivación de la primera remisión completa en un paciente con LLC tras recibir un CAR-T (150), presentó un impacto profundo en el Hospital Clínic de Barcelona (HCB). El Dr. Manel Juan, del servicio de Inmunología del HCB analiza dicho artículo y contacta con el referente de LLC del HCB, el Dr. Julio Delgado, quienes coinciden en el interés común suscitado por dicho concepto. Se plantean, por lo tanto, si es factible replicar dicha experiencia en un centro académico europeo.

Esta unión, que ocurría en el contexto previamente mencionado de falta de acceso a terapias avanzadas, derivó a que desde el HCB se considerara la posibilidad de desarrollar una plataforma de desarrollo de terapias CAR-T desde un marco totalmente académico. El objetivo, era dar acceso a pacientes con necesidades médicas no cubiertas.

Para ello, se decidió comenzar con la que se consideró la mayor necesidad médica no cubierta que además presentaba la mayor probabilidad de éxito de uso: los síndromes linfoproliferativos CD19 positivos recaídos o refractarios.

Fue entonces que en 2013 se comenzó el proyecto multidisciplinar de desarrollo de nuestro propio constructo CAR19, con el liderazgo del Dr. Manel Juan desde el servicio de inmunología, y del Dr. Julio Delgado desde el servicio de Hematología. Esto fue el germen del inicio del desarrollo de lo que posteriormente sería conocido como células ARI-0001 (163).

Para ello, el Dr. Manel Juan acudió a Pensilvania durante una estancia de 2 meses para aprender de la mano del Dr. Carl June los fundamentos básicos requeridos para la producción de estas terapias. El plan original era el de elaborar un producto CAR-T similar al producto CTL019, utilizando el mismo monoclonal anti-CD19, el FMC63. Sin embargo, el permiso de uso de dicho monoclonal cuya patente había ya pasado a ser propiedad de Novartis fue denegado por los últimos. Entonces se tomó la decisión de intentar buscar una solución que permitiera iniciar el

desarrollo de un CAR-T académico de una forma completamente independiente de la industria farmacéutica.

Afortunadamente, al menos 2 décadas atrás, los doctores Pablo Engel, Carles Serra-Pages y Ramón Vilella del servicio de inmunología del HCB habían generado una amplia variedad de anticuerpos monoclonales murinos. Estos estaban dirigidos contra distintos antígenos de superficie presentes en distintas células del sistema inmune. De hecho, en el año 1991, de entre todos los monoclonales generados, los mismos habían desarrollado un hibridoma de anticuerpo monoclonal murino anti-CD19 (ScFv) denominado A3B1. Fue dicho hibridoma, desarrollado en 1991, el punto de partida del desarrollo del CAR-T ARI-0001.

Fue a partir de dicho hibridoma que la Dra. María Castellà y la Dra. Anna Boronat lideraron el desarrollo preclínico del gen del constructo CAR del ARI-0001. El mismo, está conformado por un promotor seguido del ScFv anti-CD19 A3B1, seguido de los dominios de bisagra y transmembrana del CD8, y de los dominios de coestimulación 4-1BB y CD3z (imagen 53).

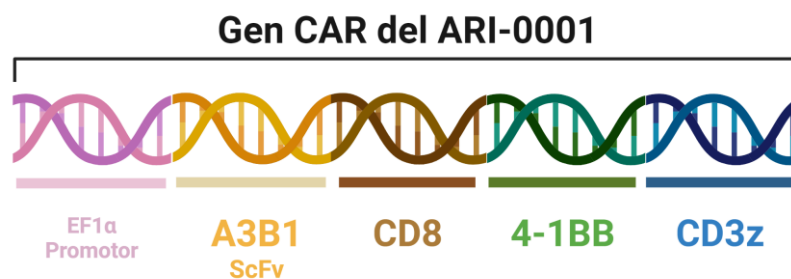


Imagen 53 (163): Adaptado de Castella et al, Mol Ther Methods Clin Dev 2018. Diagrama del constructo CAR del ARI-0001

Dicho constructo CAR fue elaborado y empaquetado en un vector lentiviral de tercera generación en la sala blanca GMP a partir de la línea celular humana HEK293T, en la Universidad de Barcelona (Imagen 54).

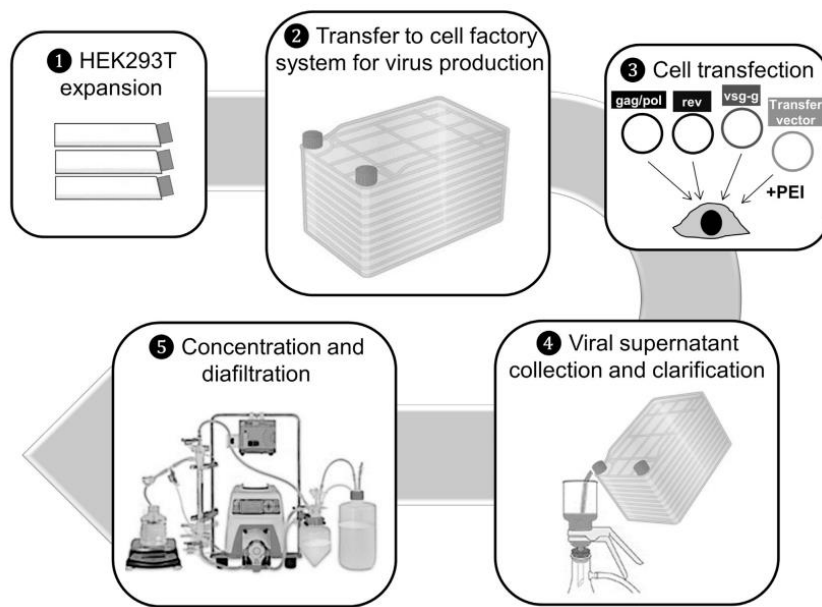


Imagen 54 (163): Diagrama que representa los principales pasos de la producción de lentivirus CAR19 a gran escala, tal y como se establece actualmente en el Hospital Clínic de Barcelona.

Este constructo, una vez expresado sobre la superficie de un linfocito T, constituye un CAR de segunda generación anti CD19, con el cual se realizó el desarrollo preclínico (Imagen 55).

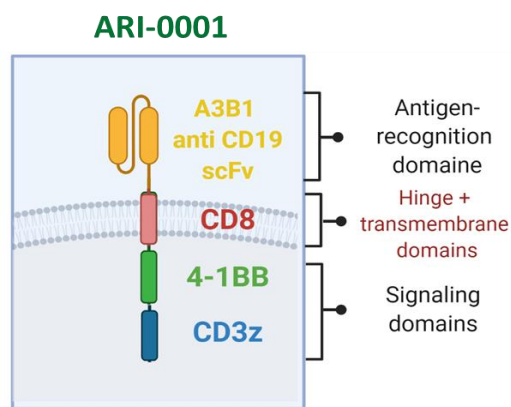


Imagen 55: Adaptado de Castella et al, Mol Ther Methods Clin Dev 2018 (163): expresión del CAR anti-CD19 A3B1 en la superficie del linfocito T (CAR-T ARI-0001).

El desarrollo preclínico del CAR-T ARI-0001 realizado por la Dra. María Castellà y la Dra. Anna Boronat logró validar la especificidad y la eficacia del ARI-0001 en líneas celulares tumorales CD19 positivas tanto a nivel de estudios in vitro como in vivo (Imágenes 56 y 57).

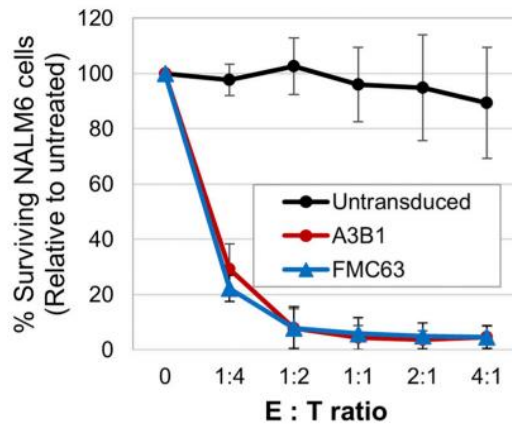


Imagen 56 (163): Comparación de la actividad antitumoral in vitro de las células CAR-T basados en el monoclonal anti-CD19 A3B1 y FMC63. En este ensayo de citotoxicidad las células CART19 fueron enfrentadas a la línea celular de LLA-B NALM6.

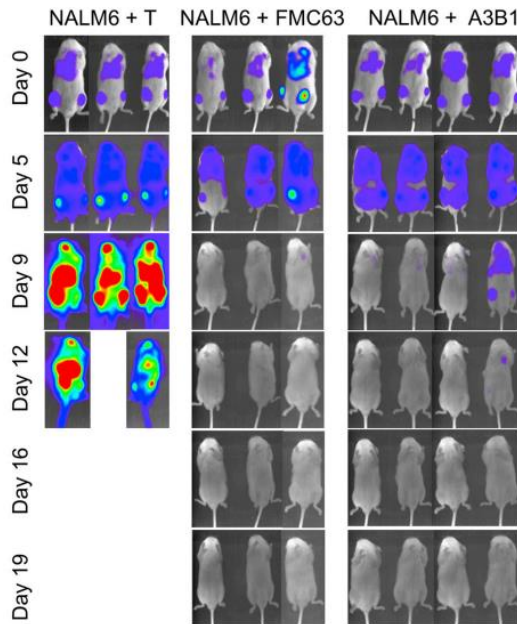


Imagen 57 (163): Comparación de la actividad antitumoral in vivo de las células CAR-T basados en el monoclonal anti-CD19 A3B1 y FMC63. Imágenes de bioluminiscencia que muestran la progresión de la enfermedad en aquellos ratones que no recibieron CAR-T.

Tras la finalización de los estudios preclínicos se realizó la validación de la plataforma de producción celular del servicio de inmunología del HCB, con la producción a escala clínica con 3 producciones de ARI-0001 realizadas en donantes sanos, utilizando como plataforma el biorreactor CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec) (Imagen 58).

Table 2. ARI-0001 Product Specification List and Acceptance Criteria

Parameter	Method	Acceptance Criteria	ARI0001/01	ARI0001/02	ARI0001/03
Appearance	visual inspection	cloudy liquid solution	cloudy liquid solution	cloudy liquid solution	cloudy liquid solution
Number of CAR19+ cells	Neubauer cell counting and flow cytometry	35×10^6 cells for a 70-kg patient ($>0.5 \times 10^6$ cells/kg)	$1,495 \times 10^6$	$1,746 \times 10^6$	$1,340 \times 10^6$
CAR19+ cells (%)	flow cytometry	$\geq 20\%$	26.0	41.9	39.7
CD3+ cells (%)	flow cytometry	$\geq 70\%$	97.9	98.6	98.6
Cell viability (%)	Neubauer cell counting with trypan blue exclusion	$\geq 70\%$	97.9	98.1	98.0
Sterility	microbial growth	sterile	sterile	sterile	sterile
Mycoplasma	PCR	absent	absent	absent	absent
Endotoxin	chromogenic assay	≤ 0.5 EU/mL	≤ 0.5 EU/mL	≤ 0.5 EU/mL	≤ 0.5 EU/mL
Adventitious viruses	PCR	absent	absent	absent	absent
Number of transgene copies/cell	real-time PCR	≤ 10 copies/cell	1.45	2.32	2.51
RCL (replication-competent lentivirus)	real-time PCR	absent	absent	absent	absent
Cytotoxic potency	flow cytometry	(a) NALM6 cell surviving fraction using CART19 ratio E:T 1:1 $<70\%$ or (b) difference in NALM6 cell surviving fraction between CART19 versus untransduced T using ratio E:T 4:1 $>50\%$	(a) 14.9; (b) 90.9	(a) 40.4; (b) 64.6	(a) 43.0; (b) 67.0

Imagen 58 (163): Lista de especificaciones del producto y criterios de liberación del ARI-0001 junto con sus tres producciones de validación.

Estos estudios de validación del desarrollo preclínico del ARI-0001 fueron publicados por Castellà et al en 2019 (163). Más tarde, dicho sistema CliniMACS Prodigy sería puesto a prueba con pacientes reales (164). Esto confirmó su capacidad de producción de CAR-T ARI-0001 a escala clínica en distintos síndromes linfoproliferativos CD19 positivos (Imagen 59).

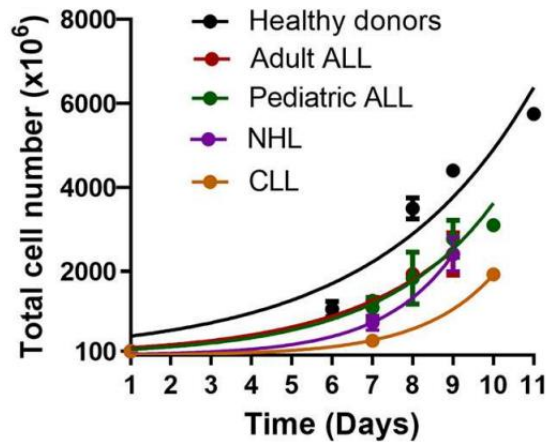


Imagen 59 (164): Cinética de expansión de las células ARI-0001 comparando los controles sanos y los diferentes tipos de enfermedad.

Tal como presenta la Dra. Castellà (163), el ARI-0001 parte de la leucocitaféresis de pacientes a partir de la sangre periférica. Dicho producto de aféresis es entonces conectado al biorreactor CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec), donde se elabora el ARI-0001 (Imagen 60).

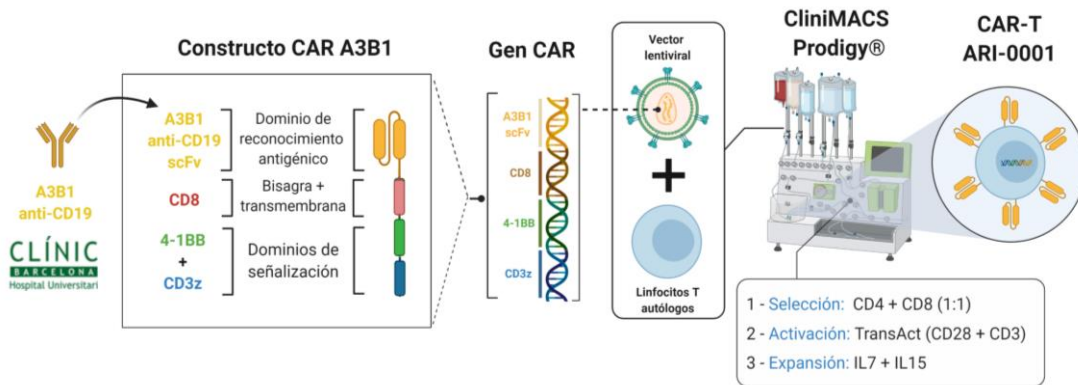


Imagen 60: Adaptado de Castella et al, Mol Ther Methods Clin Dev 2018 (163): células ARI-0001

La selección celular T se realiza ya dentro del biorreactor CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec), donde se realiza una selección magnética de los linfocitos T. Esta selección T se realiza mediante selección positiva CD4/CD8, con una ratio estimada de 1:1. Dicha selección reduce prácticamente a cero la posibilidad de introducir posibles linfocitos B malignos a la cámara de cultivo.

Tras esta selección, un total de 100×10^6 linfocitos T son finalmente introducidos a la cámara cerrada y estéril de cultivo del CliniMACS Prodigy. Allí son cultivados y activados usando anticuerpos agonistas anti-CD3 y anti-CD28, y tras 24hs de dicha activación son transducidas con un vector lentiviral portador del CAR19. Dichas células son entonces cultivadas y expandidas en un medio enriquecido en IL-7 e IL-15 hasta obtener la celularidad requerida, típicamente en unos 8-9 días (164).

1.9. El ARI-0001 llega a su etapa clínica:

Una vez desde el HCB se demostró ser capaz de producir productos CAR-T a escala clínica cumpliendo con todos los criterios de calidad predefinidos, la Agencia Española de Medicinas y Productos Sanitarios (AEMPS) autorizó en mayo del 2017 el inicio del ensayo clínico CART19-BE-01 (NCT03144583, nº PEI 16-187). Este se trataba del primer ensayo clínico de terapia CAR-T de nuestro centro: un ensayo clínico fase 1, abierto, prospectivo, no aleatorizado y multicéntrico, para el tratamiento de síndromes linfoproliferativos CD19 positivos.

El ensayo clínico CART19-BE-01 llevó a cabo el reclutamiento de pacientes adultos en el HCB y de pacientes pediátricos en el Hospital Sant Joan de Dèu (HSJD), con el primer paciente recibiendo tratamiento con ARI-0001 en julio del 2017. Este ensayo abrió las puertas al inicio de la trayectoria del ARI-0001 como tratamiento de pacientes con síndromes linfoproliferativos CD19 positivos.

Para que esto haya sido posible en cuanto a financiación fue necesario una extensiva colaboración público-privada. De hecho, el desarrollo preclínico del ARI-0001 fue económicamente posible principalmente por la financiación por múltiples becas públicas incluidas en el Plan Nacional de I+D+I (PI13/00676, PIE13/00033, PI17/01043 y PICIS14/00122). Además, contó con la co-financiación del ISCIII – Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria, el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), y el programa de Crowd-funding “Projecte ARI”.

Además, el investigador principal del ensayo CART19-BE-01, el Dr. Julio Delgado, pudo dedicarse al diseño y ejecución de dicho ensayo gracias a ser receptor de una beca de investigación de la Generalitat de Catalunya (PERIS IPFE SLT006/17/301); y yo mismo, subinvestigador de dicho ensayo, pude dedicarme exclusivamente al mismo gracias a haber sido receptor de una beca de

investigación por la Fundación Española de Hematología y Hemoterapia (FEHH). Finalmente, además de todas estas fuentes de financiación, el desarrollo clínico del ARI-0001 hubiera sido económicamente imposible de no haber contado con el soporte concedido por el director del Instituto Clínic de Enfermedades Hemato-Oncológicas (ICMHO), el Dr. Álvaro Urbano-Ispizua y por el director general del HCB, el Dr. Josep M. Campistol.

Tampoco el desarrollo del ARI-0001 hubiera sido viable de no haber contado con el soporte del director del Servicio de Inmunología del HCB, el Dr. Jordi Yagüe, ni mucho menos sin el respaldo del Dr. Josep M. Canals (Universidad de Barcelona). Tampoco hubiera sido factible sin la inestimable intervención del Dr. Gonzalo Calvo, del Servicio de Farmacología Clínica del HCB, en la interacción con la AEMPS. En definitiva, intentar mencionar a todos los actores involucrados es una empresa casi utópica, puesto que la cantidad de profesionales que han impulsado este proyecto parece ser inconmensurable. Este proyecto se trata pues, de un proyecto por y para la sanidad pública.

Los resultados del ensayo CART19-BE-01 condujeron a la AEMPS a conceder al ARI-0001 la autorización de uso mediante exención hospitalaria en febrero del 2021. Esta autorización habilitaba su uso como tratamiento de pacientes con LLA R/R mayores de 25 años. El ARI-0001 se convirtió de esta forma en el primer producto de terapia avanzada contra el cáncer en conseguir dicho tipo de autorización en la historia de Europa, marcando un hito para la academia europea.

A continuación, se presentan los resultados iniciales de esta emocionante aventura académica.

2 - Hipótesis:

El desarrollo y producción “point-of-care” de terapias CAR-T anti-CD19 para el tratamiento de pacientes con síndromes linfoproliferativos CD19 positivos es factible de realizar en una institución académica europea.

La elaboración académica “point-of-care” de productos de terapias avanzadas CAR-T es capaz de alcanzar resultados de seguridad y eficacia comparables a los obtenidos por otros productos CAR-T académicos o industriales en pacientes con LLA-B, LNH-B y LLC.

3 - Objetivos:

1. Definir la viabilidad del desarrollo clínico de un producto de terapias avanzadas CAR-T dentro de un entorno puramente académico y de su administración asistencial dentro del marco público del Sistema Nacional de Salud español.
2. Definir la viabilidad de la administración del producto CAR-T ARI-0001 en síndromes linfoproliferativos CD19 positivos siguiendo un modelo tipo “point-of-care” en un entorno puramente académico, incluyendo la tasa de producciones exitosas de productos CAR-T y la proporción de pacientes que finalmente reciben dichos productos CAR-T.
3. Caracterizar la seguridad (MRP, tasas de SLC, de ICANS, AEs y SAEs) y la eficacia (TRG, TRC, SLP, DR y SG) de la administración del producto CAR-T académico ARI-0001 en síndromes linfoproliferativos CD19 positivos (LLA y LNH).
4. Caracterizar la seguridad (MRP, tasas de SLC, de ICANS, AEs y SAEs) y la eficacia (TRG, TRC, SLP, DR y SG) de la administración del producto CAR-T académico ARI-0001 en pacientes con LLA RR con enfermedad exclusivamente extramedular.
5. Caracterizar factores asociados con el riesgo de recaída (SLP y HR) en pacientes con LLA RR tratados con ARI-0001.
6. Caracterizar la seguridad (MRP, tasas de SLC, de ICANS, AEs y SAEs) y la eficacia (TRG, TRC, SLP, DR y SG) de la administración del producto CAR-T académico ARI-0001 en pacientes con LLC/TR RR.

4 - Resultados:

Artículo nº1:

4.1. CART19-BE-01: A Multicenter Trial of ARI-0001 Cell Therapy in Patients with CD19+ Relapsed/Refractory Malignancies. (165)

Valentín Ortiz-Maldonado, Susana Rives, Maria Castellà, Anna Alonso-Saladrigues, Daniel Benítez-Ribas, Miguel Caballero-Baños, Tycho Baumann, Joan Cid, Enric Garcia-Rey, Cristina Llanos, Montserrat Torredadell, Neus Villamor, Eva Giné, Marina Díaz-Beyá, Laia Guardia, Mercedes Montoro, Albert Català, Anna Faura, E Azucena González, Marta Español-Rego, Nela Klein-González, Laia Alsina, Pedro Castro, Iolanda Jordan, Sara Fernández, Federico Ramos, Guillermo Suñé, Unai Perpiñá, Josep Maria Canals, Miquel Lozano, Esteve Trias, Andrea Scalise, Sara Varea, Joaquín Sáez-Peñataro, Ferran Torres, Gonzalo Calvo, Jordi Esteve, Álvaro Urbano-Ispizua, Manel Juan, Julio Delgado.

Molecular Therapy. 2021 Feb 3;29(2):636-644. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.09.027. Epub 2020 Sep 20. PMID: 33010231; PMCID: PMC7854276.

Resumen:

Se evaluó la administración de células ARI-0001 en pacientes adultos (Hospital Clínic de Barcelona) y pediátricos (Hospital Sant Joan de Dèu de Barcelona) con síndromes linfoproliferativos CD19+ recaídos o refractarios. Un total de 58 pacientes firmaron el consentimiento informado, de los cuales 54 realizaron la aféresis. De estos, 47 (87%) recibieron tratamiento con las células ARI-0001: 38 pacientes con leucemia linfoblástica aguda, 8 pacientes con linfoma no Hodgkin y 1 paciente con leucemia linfocítica crónica. Los pacientes tratados recibieron tratamiento de linfodepleción con ciclofosfamida (900mg/m²) y fludarabina (300mg/m²) seguidos de la administración de una dosis de 0,4-5 10⁶ células ARI-0001/kg.

Las células ARI-0001 fueron administradas inicialmente como dosis única (n=19) y posteriormente de forma fraccionada (n=28) en 3 fracciones de 10%, 30%, y 60%, con la administración de cada fracción separada al menos por 24hs en función de la ausencia de síndrome de liberación de citoquinas. En los pacientes con LLA, se observó una tasa global de SLC grado ≥ 3 del 13,2% (26,7% antes del fraccionamiento, frente al 4,3% observado después del fraccionamiento) y una incidencia de neurotoxicidad grado ≥ 3 del 2,6%. La mortalidad relacionada con el procedimiento (MRP) al día +100 fue del 7,9% (3/38), debido a 2 episodios de SLC grado 5 y 1 episodio de colitis pseudomembranosa grado 5 sumado a un SLC grado 4.

Dichos eventos de MRP fueron los que motivaron la realización de una enmienda mayor que permitió la administración fraccionada de la dosis y el uso de tocilizumab a partir de SLC grado 2. Tras dicha enmienda no se observó ningún nuevo episodio de MRP. En cuanto a eficacia en LLA, la tasa de RC con EMR negativa en el día +100 fue del 71,1%. La SLP al año fue del 47% (IC del 95%: 27%-67%), y la SG al año fue del 68,6% (IC del 95%: 49,2%-88%).

En cuanto a los pacientes con LNH, se observó una tasa global de SLC grado ≥ 3 del 25% (33% antes del fraccionamiento, frente al 20% observado después del fraccionamiento), y no se observaron casos de neurotoxicidad grado ≥ 3 ni de MRP a día +100. Sin embargo, un paciente con linfoma folicular falleció tras el día +100 debido a una necrólisis epidérmica tóxica de causa no definida. En cuanto a la eficacia en LNH, la tasa de respuestas globales y completas fue del 75% y 50% en el día +100, respectivamente. La mediana de SLP y de SG fue de 8,1 meses y de 11 meses, respectivamente.

En conclusión, la administración de células ARI-0001 proporcionó resultados de seguridad y eficacia que fueron comparables a los de otros obtenidos con otros productos CAR-T académicos o comerciales disponibles en el mercado en dicho momento.

CART19-BE-01: A Multicenter Trial of ARI-0001 Cell Therapy in Patients with CD19⁺ Relapsed/Refractory Malignancies

Valentín Ortíz-Maldonado,¹ Susana Rives,^{2,3} Maria Castellà,^{1,4} Anna Alonso-Saladrigues,² Daniel Benítez-Ribas,^{4,5} Miguel Caballero-Baños,⁵ Tycho Baumann,^{1,4} Joan Cid,^{4,6} Enric Garcia-Rey,⁷ Cristina Llanos,⁸ Montserrat Torreadell,^{3,9,10} Neus Villamor,^{4,11,12} Eva Giné,^{1,4,12} Marina Díaz-Beyá,^{1,4} Laia Guardia,¹ Mercedes Montoro,¹ Albert Català,^{2,3} Anna Faura,² E. Azucena González,⁵ Marta Español-Rego,⁵ Nela Klein-González,⁵ Laia Alsina,¹³ Pedro Castro,^{4,14,15} Iolanda Jordan,^{3,15,16} Sara Fernández,¹⁴ Federico Ramos,¹⁷ Guillermo Suñé,^{1,4} Unai Perpiñá,^{4,18} Josep M. Canals,^{4,18} Miquel Lozano,^{4,6,15} Esteve Trias,¹⁹ Andrea Scalise,²⁰ Sara Varea,²⁰ Joaquín Sáez-Peñataro,^{15,20} Ferran Torres,^{4,20} Gonzalo Calvo,^{19,20} Jordi Esteve,^{1,4,15,21} Álvaro Urbano-Ispizua,^{1,4,15,21} Manel Juan,^{4,5,13,15,19} and Julio Delgado^{1,4,12,15}

¹Department of Hematology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain; ²Department of Hematology/Oncology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; ³Institut de Recerca Pediàtrica Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; ⁴Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; ⁵Department of Immunology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁶Apheresis & Cell Therapy Unit, Department of Hemotherapy and Hemostasis, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁷Banc de Sang i Teixits, Barcelona, Spain; ⁸Clinical Research Unit, Fundació Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; ⁹Laboratory of Hematology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; ¹⁰Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain; ¹¹Hematopathology Unit, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain; ¹²Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Barcelona, Spain; ¹³Clinical Immunology Platform Clínic-Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; ¹⁴Medical Intensive Care Unit, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain; ¹⁵University of Barcelona, Barcelona, Spain; ¹⁶Intensive Care Unit, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; ¹⁷Department of Neurology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; ¹⁸Laboratory of Stem Cells and Regenerative Medicine, Department of Biomedicine, Production and Validation Center of Advanced Therapies (Creatio), University of Barcelona, Barcelona, Spain; ¹⁹Advanced Therapies Unit, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain; ²⁰Department of Pharmacology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain; ²¹Institute of Research Josep Carreras, Barcelona, Spain

We evaluated the administration of ARI-0001 cells (chimeric antigen receptor T cells targeting CD19) in adult and pediatric patients with relapsed/refractory CD19⁺ malignancies. Patients received cyclophosphamide and fludarabine followed by ARI-0001 cells at a dose of 0.4–5 × 10⁶ ARI-0001 cells/kg, initially as a single dose and later split into 3 fractions (10%, 30%, and 60%) with full administration depending on the absence of cytokine release syndrome (CRS). 58 patients were included, of which 47 received therapy: 38 with acute lymphoblastic leukemia (ALL), 8 with non-Hodgkin's lymphoma, and 1 with chronic lymphocytic leukemia. In patients with ALL, grade ≥ 3 CRS was observed in 13.2% (26.7% before versus 4.3% after the amendment), grade ≥ 3 neurotoxicity was observed in 2.6%, and the procedure-related mortality was 7.9% at day +100, with no procedure-related deaths after the amendment. The measurable residual disease-negative complete response rate was 71.1% at day +100. Progression-free survival was 47% (95% IC 27%–67%) at 1 year: 51.3% before versus 39.5% after the amendment. Overall survival was 68.6% (95% IC 49.2%–88%) at 1 year. In conclusion, the administration of ARI-0001 cells provided safety and efficacy results that are comparable with other academic or commercially available

products. This trial was registered as ClinicalTrials.gov: NCT03144583.

INTRODUCTION

Despite currently available therapies, most patients with relapsed/refractory (R/R) B cell malignancies such as acute lymphoblastic leukemia (ALL) and diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) remain incurable. R/R ALL is associated with a complete response rate (CRR) around 30%–45% and a median overall survival (OS) around 4–8 months, depending on age, type of salvage therapy, and response to it.^{1–4} The prognosis is particularly poor for patients relapsing after allogeneic hematopoietic cell transplantation (alloHCT).^{5,6} Novel agents such as inotuzumab ozogamicin (IO) or blinatumomab have increased the CR rate in this patient population, but responses are

Received 9 July 2020; accepted 16 September 2020;
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.09.027>.

Correspondence: Julio Delgado, Department of Hematology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain.

E-mail: jdelgado@clinic.cat

Correspondence: Manel Juan, Department of Immunology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain.

E-mail: mjuan@clinic.cat

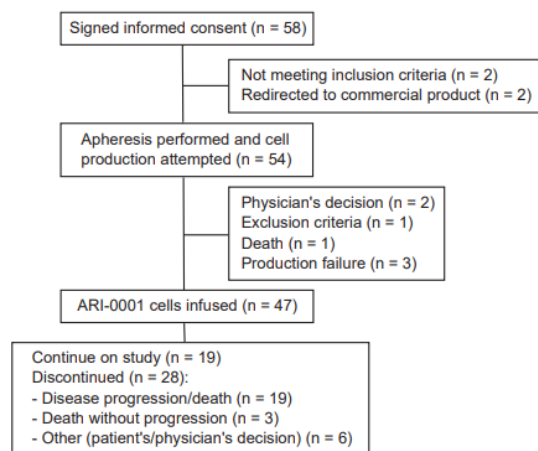


Figure 1. Consort Diagram of Patients Included in the CART19-BE-01 Trial

generally not durable.^{7,8} Outcomes are also poor in patients with R/R DLBCL, defined as no response to the last line of chemotherapy or relapse within 1 year of autologous hematopoietic cell transplant (autoHCT). A meta-analysis of patients with refractory DLBCL found that these patients achieve an overall response rate of 26% and median OS of 6.6 months.⁹

Adoptive cell therapy with T cells genetically engineered to express chimeric antigen receptors (CAR) targeting CD19 is a well-established approach for the treatment of B cell malignancies.¹⁰ These CAR constructs usually comprise an extracellular single-chain variable fragment (scFv) of a monoclonal antibody (mAb) attached to a transmembrane domain and two or more signaling domains. Two of these cell products (tisagenlecleucel and axicabtagene ciloleucel) were recently approved by the Food and Drug Administration (FDA) and European Medicines Agency (EMA) for the treatment of R/R ALL and DLBCL. Both products share the same scFv (derived from the FMC63 mAb) but have a different composition, including a different co-stimulatory domain and transduction vector, and yet both have remarkable clinical efficacy and a comparable safety profile.^{11–13}

In 2013, we started developing our own CAR19 construct. We identified the scFv sequence from our own CD19-A3B1 hybridoma, incorporated a transmembrane CD8 domain, a 4-1BB costimulatory domain, and a CD3 ζ signaling domain next to it, cloned the sequence into a 3rd generation lentiviral vector, and transduced healthy-donor T cells.¹⁴ Once the preclinical tests were completed, we scaled up both the lentiviral and cell production, this leading to the Spanish Agency for Medicines and Health Products (AEMPS) approval of our investigational new drug, called ARI-0001 cells (IMP no 16-187), and also this clinical trial (CART19-BE-01) in May 2017. Here we present the results of this clinical trial.

RESULTS

Baseline Characteristics

58 patients were enrolled in the study, but 4 of them never made it through the screening phase: 2 patients did not comply with inclusion/exclusion criteria and 2 were eventually referred for therapy with commercial products that became available at the time (Figure 1). Out of the remaining 54 patients, 47 received therapy with ARI-0001 cells, 19 in cohorts 1 and 2 (single dose infusion) and 28 in cohort 3 (fractionated infusion). These 47 patients (modified full analysis set [mFAS]) were diagnosed with ALL (38), DLBCL (4, one of them a Richter's transformation from chronic lymphocytic leukemia [CLL]), primary mediastinal B cell lymphoma,² follicular lymphoma (FL),² and CLL.¹ Baseline characteristics of patients included in the mFAS are shown in Table 1. Median age was 26 years (range, 3–67), and 17 patients (36%) were female. The full details of the only CLL patient were published elsewhere.¹⁵ The data cutoff date was November 5, 2019, when all infused patients had a minimum follow-up of 100 days or had experienced disease relapse or death. At that time, the median follow-up for survivors was 5.5 months (range, 1.9–23.6) from ARI-0001 cell infusion.

Out of 54 patients who proceeded to apheresis, 47 (87%) and 7 (13%) required one and two procedures, respectively. Reasons for a second procedure were bacterial contamination of the cell product⁵ and insufficient viral transduction.² All infused patients received fludarabine + cyclophosphamide lymphodepletion and received ARI-0001 cells a median of 54 days (range, 34–215) after study inclusion. The median vein-to-vein time was 42 days (range, 25–190) for the entire population. The original target dose ranged from 0.5 to 5×10^6 ARI-0001 cells/kg, with the condition imposed by the AEMPS that the first patient had to receive the minimum dose (0.5×10^6 ARI-0001 cells/kg). In cohort 3, one patient received 0.4×10^6 ARI-0001 cells/kg (i.e., the last fraction was omitted) due to cytokine release syndrome (CRS).

Toxicity

All adverse events (AEs) occurring from study inclusion, even before ARI-0001 cell infusion, were graded and reported (Tables S1 and S2). Grade ≥ 3 AEs were documented in 68.4% of patients with ALL and 75% of patients with non-Hodgkin's lymphoma (NHL) at day +100, whereas serious AEs (SAEs) were observed in 44.7% and 50% of patients with ALL and NHL, respectively (Table 2). Procedure-related mortality (PRM) at day +100 was 7.9% (95% confidence interval [CI] 1.7%–21.4%) for patients with ALL and 0% for patients with NHL. Suspected unexpected serious adverse reactions (SUSARs) were observed in 4 patients: 2 patients (aged 11 and 19, respectively) developed lethal CRS and a 35-year-old patient died of pseudomembranous colitis while recovering from grade 4 CRS. These 3 patients, belonging to cohorts 1 and 2, motivated the second major amendment of the study as previously described. The fourth SUSAR was reported in a patient with FL from cohort 3 who developed grade 4 toxic epidermal necrolysis while recovering from grade 2 CRS. In the last case, causality was investigated but could not be demonstrated (i.e., ARI-0001 cells could not be identified in the skin).

Table 1. Patients' Demographics and Baseline Characteristics

Characteristic	Cohorts 1 and 2 (Single Infusion)	Cohort 3 (Fractionated Infusion)	All Patients
Acute lymphoblastic leukemia	n = 15	n = 23	n = 38
Age (y), median (range)	20 (3–35)	29 (4–67)	24.5 (3–67)
Female sex, n (%)	4 (27)	10 (44)	14 (37)
ECOG performance status ≥ 1 , n (%)	4 (31)	5 (22)	9 (25)
Prior regimens, median (range)	4 (3–10)	4 (2–8)	4 (2–10)
Prior inotuzumab, n (%)	4 (27)	9 (39)	13 (34)
Prior blinatumomab, n (%)	3 (20)	6 (26)	9 (24)
Prior allogeneic HCT, n (%)	11 (73)	22 (96)	33 (87)
Bone marrow blast cell count $\geq 5\%$, n (%)	10 (67)	7 (30)	17 (45)
Non-Hodgkin's lymphoma	n = 3	n = 5	n = 8
Histology:			
• Diffuse large B cell lymphoma	1 (33.3)	3 (60)	4 (50)
• Primary mediastinal B cell lymphoma	2 (66.6)	0	2 (25)
• Follicular lymphoma	0 (0)	2 (40)	2 (25)
Age (y), median (range)	25 (19–51)	50 (22–62)	47.5 (19–62)
Female sex, n (%)	1 (33)	2 (40)	3 (37.5)
ECOG performance status ≥ 1 , n (%)	1 (33)	3 (60)	4 (50)
Prior regimens, median (range)	6 (5–7)	6 (4–9)	6 (4–9)
Prior allogeneic/autologous HCT, n (%)	3 (100)	1 (20)	4 (50)

HCT, hematopoietic cell transplantation; NA, not applicable/available.

Regarding AEs of special interest, CRS was reported in 55.3% (13.2% grade ≥ 3) and 87.5% (25% grade ≥ 3) of patients with ALL and NHL, respectively. In patients with ALL, we observed a reduction in the rate of grade ≥ 3 CRS after the second amendment, dropping from 26.7% (cohorts 1 and 2) to 4.3% (cohort 3; Table 2), this leading to a reduction in tocilizumab administration from 26.7% (cohorts 1 and 2) to 8.7% (cohort 3), and a reduction in corticosteroid use from 20% (cohorts 1 and 2) to 0% (cohort 3). Due to CRS, 1/23 (4%) patients from cohort 3 received only two ARI-0001 cell fractions, while no patient received only one fraction. The occurrence of CRS (any grade) was also reduced and delayed in cohort 3 (Figure S1). Moreover, grade ≥ 3 immune effector-cell associated neurotoxicity syndrome (ICANS) was only observed in 1 (2.6%) patient with ALL. The only grade ≥ 3 malignancy observed in the study was myelodysplasia in a 7-year-old girl diag-

nosed with ALL who had already received 6 lines of therapy, including IO and alloHCT.

Globally speaking, the most common AEs in patients with ALL were neutropenia (97.4%), anemia (84.2%), hypogammaglobulinemia (78.9%), thrombocytopenia (76.3%), and lymphopenia (73.7%). Liver toxicity was also frequent, including increased AST (50%), increased ALT (47.4%), increased GGT (39.5%) and increased alkaline phosphatase (36.8%), mostly in patients with prior alloHCT (Table S1). Similar figures were observed in patients with NHL (Table S2). Two patients with ALL (2/38, 5%) with prior history of alloHCT and IO therapy developed severe hepatic sinusoidal obstruction syndrome (SOS) that resolved with conventional supportive care.

Efficacy

In patients with ALL, the measurable residual disease (MRD)-negative CRR was 84.2% (95% CI 69%–94%) at day +28 and 71.1% (95% CI 54%–85%) at day +100. All evaluable patients (i.e., excluding those who died prematurely) developed absolute B cell aplasia that lasted for a median of 100 days (95% CI 56–100 days). Progression-free survival (PFS) at 1 year was 47% (27%–67%) for the whole ALL cohort, while the 1-year OS was 68.6% (49%–88%; 78% for children, 65% for adults; Figure 2). The median duration of response (DOR), considering only patients who responded to therapy by day +100, was 14.8 months. Out of 15 patients with progressive disease after ARI-0001 cell infusion, tumor cells expressed CD19 in 13 (87%), while 2 (13%) were CD19-negative. When we considered all patients with ALL recruited into the study, including those who did not receive therapy (n = 43), the 1-year PFS and OS were 43.5% (24%–63%) and 77.7% (62%–93%), respectively.

Subgroup analyses according to type of administration (cohorts 1 and 2 versus cohort 3) and age are depicted in Table 3. The apparent lower response rate observed in the pediatric population at day +100 is due to the early administration of a second ARI-0001 cell dose before that day in 2 patients. Both patients were in MRD-negative CR on day +100 but received the second infusion shortly before this time point due to early B cell recovery. If we count them both as responders, the CRR for pediatric patients would be 72% instead of 55%, and the CRR of the entire population would be 76% instead of 71%. On the other hand, the B cell aplasia lasted for longer in the pediatric population compared to adult patients (48% versus 10.5% at 1 year).

In patients with NHL, the overall response rate at day +100 was 75% (35%–97%), while the CRR was 50% (16%–84%). Full details, including the patient with CLL, are depicted in Figure 3.

Cytokines

Cytokine levels were available from 34 patients, 19 diagnosed with ALL, 5 diagnosed with NHL, and 1 diagnosed with CLL. The most informative cytokine levels were those determined at day +7, but peak values are also displayed for reference. The median absolute and relative values (to the pre-administration level) are depicted in

Table 2. Adverse Events of Special Interest

	Cohorts 1 and 2 (Single Infusion)	Cohort 3 (Fractionated Infusion)	All Patients
Acute lymphoblastic leukemia	n = 15	n = 23	n = 38
Grade \geq 3 adverse events, n (%)	11 (73.3)	15 (65.2)	26 (68.4)
Severe adverse events, n (%)	8 (53.3)	9 (39.1)	17 (44.7)
Grade \geq 3 CRS, n (%)	4 (26.7)	1 (4.3)	5 (13.2)
Grade \geq 3 ICANS, n (%)	1 (6.7)	0 (0.0)	1 (2.6)
Grade \geq 3 s malignancies, n (%)	1 (6.7)	0 (0.0)	1 (2.6)
Non-Hodgkin's lymphoma	n = 3	n = 5	n = 8
Grade \geq 3 adverse events, n (%)	3 (100)	3 (60)	6 (75)
Severe adverse events, n (%)	3 (100)	1 (20)	4 (50)
Grade \geq 3 CRS, n (%)	1 (33.3)	1 (20)	2 (25)
Grade \geq 3 ICANS, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Grade \geq 3 s malignancies, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

CRS, cytokine release syndrome; ICANS, immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome.

Table S3. Figure S4 shows the association between cytokine levels on day +7 and the development of CRS for patients with ALL. The only cytokine significantly associated with the occurrence of CRS was IL-6. Figure S5 shows the non-significant impact of fractionated administration of ARI-0001 cells on cytokine levels on day +7, also for patients with ALL.

ARI-0001 Expansion

ARI-0001 cells expanded with a median area under the curve (AUC) of 129.1 copies per cell per day (range: 15.6–4271.3). Peak expansion occurred at a median of 14.5 days after infusion (range: 2–236 days). There was no correlation between the AUC of ARI-0001 expansion and patient's age (younger or older than 18 years), type of administration (cohorts 1 and 2 [single dose] versus cohort 3 [fractionated]), development of CRS, diagnosis (ALL versus NHL), bone marrow blast percentage at study inclusion or response rate. Representative plots are displayed in Figures S6 and S7.

Human Anti-murine Antibodies

In patients with ALL, human anti-murine antibodies (HAMAs) were clearly detected (>20% positive cells by flow cytometry) in 9 patients, but we observed borderline results (10%–20% positive cells) in 5 further patients. Of note, 3 patients already had HAMAs before ARI-0001 cell infusion, which is quite intriguing because 2 of them were pediatric patients who had not received any monoclonal antibodies or an alloHCT. 2 of these patients experienced B cell recovery

1.8 and 3.2 months after ARI-0001 cell infusion but have not experienced disease relapse with current follow-up (one of them received a second infusion and is depicted in Figure S2D). The third patient who had detectable HAMAs before the cell infusion died of severe CRS. Out of the remaining 6 patients with HAMAs, 2 of them developed HAMAs after the second infusion of ARI-0001 cells (Figures S2A and S2E) and 1 before the second infusion of ARI-0001 cells (Figure S2F).

There was no significant association between the presence of HAMAs and B cell recovery or disease relapse (Fisher's exact test). Furthermore, there was no association between persistence of B cell aplasia and PFS (Mantel-Byar test, Figure S3).

Second ARI-0001 Cell Infusion

In cohorts 2 and 3, a second infusion was allowed as per protocol, and this was performed in 6 patients, 2 due to CD19⁺ relapse and 4 due early B cell recovery. Unfortunately, it only resulted in brief responses and/or B cell aplasia, and also led to the appearance of HAMAs in 3 patients (Figure S2).

DISCUSSION

To our knowledge, this is one of the first European academic clinical trials of CART19-cell therapy in patients with B cell malignancies, and certainly the first with the new construct A3B1:CD8:4-1BB:CD3z. The preliminary results observed in the first 10 patients led to the extension of the trial to include 54 patients in total, most of them diagnosed with ALL. An important caveat is that our study included both pediatric and adult patients with ALL, which are known to have a different prognosis,¹⁶ and this complicates the comparison with other studies. Other important differences are that (1) 87% of our patients with ALL had already received an alloHCT, compared to 33%–62% in other studies,^{11,17–21} and (2) response evaluation was performed at day +100, 4–10 weeks later than in other studies.^{11,17–21} This late response evaluation was necessary to capture ARI-0001 activity in patients with both ALL and NHL.

The preparation of ARI-0001 cells could be accomplished with one leukocytapheresis procedure in 87% of patients, and the cell production time ranged from 7 to 10 days. Still, the median vein-to-vein time was 42 days (range, 25–190) mostly due to 7 patients who required 2 aphereses and also numerous intervening medical complications that forced us to delay lymphodepleting chemotherapy and cell infusion.

We have observed that the safety profile of ARI-0001 cells is comparable to that of commercially available or other academic products.^{11,17–21} Of note, the excessive severity/lethality of CRS observed in the first 19 patients led to a major amendment of the protocol mandating the fractionated administration of ARI-0001 cells (cohorts 1 and 2 versus cohort 3). Consequently, the grade \geq 3 CRS rate dropped from 27% to 4% and the PRM was reduced from 20% to 0%. These results almost replicate the experience with CTL019 (later known as tisagenlecleucel) in adult patients with ALL, in which the grade \geq 3 CRS rate was reduced from 50% to 4%, and the PRM

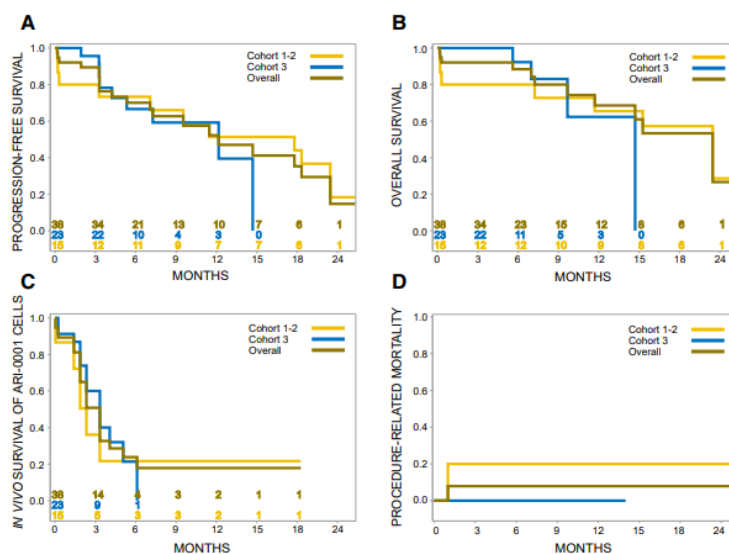


Figure 2. Clinical Outcome of Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia

(A–D) Progression-free survival (A), overall survival (B), *in vivo* survival of ARI-0001 cells, as measured by persistence of B cell aplasia (C), and procedure-related mortality (D) of patients with acute lymphoblastic leukemia belonging to the modified full analysis set ($n = 38$) according to type of administration (cohorts 1 and 2 versus cohort 3).

(14.8 months) and the median OS (20.2 months). If we focus on the survival of ARI-0001 cells, as measured by the persistence of B cell aplasia, it is also comparable to other clinical trials evaluating other CART19 constructs incorporating the 4-1BB costimulatory domain,^{18,19} but significantly shorter to what was obtained in the ELIANA trial.¹¹ Probably, T cell exhaustion accounts for this phenomenon, which also mirrors the tendency toward a longer survival of CART19-cells in pediatric compared to adult ALL populations.^{11,19,21}

from 50% to 0%, after the fractionated administration of this drug was introduced into the protocol.¹⁷ Still, the global CRS rate of 55% (13% grade ≥ 3) observed in our trial, considering all patients together, is quite comparable to similar trials of CART19 cells in ALL.^{11,18–21} Regarding neurotoxicity, there were no apparent differences before and after the amendment since only one (3%) patient developed grade ≥ 3 ICANS. These results are also comparable (if not better) to those obtained in similar trials of CART19 cells in ALL.^{11,17–21} We have no explanation for the reduced incidence of ICANS observed in our trial. Since the cell dose and patient management were comparable with other trials, we hypothesize that this could be a genuine feature of our A3B1-based construct. Moreover, there were no differences in safety according to age: grade ≥ 3 CRS rate was 18% for patients ≤ 18 years and 11% for those >18 years; and grade ≥ 3 ICANS was 0% and 4% for the same patient groups. Of note, two patients with ALL developed severe hepatic SOS, which, to the best of our knowledge, has not been reported before in patients receiving CART19 cells. Both patients had in common their relatively advanced age (54 and 67 years), prior alloHCT and prior administration of IO, which are all known risk factors for SOS. As a result, we currently perform a comprehensive liver evaluation in this patient population before the administration of ARI-0001 cells. From these results we can conclude that the fractionated administration of 1×10^6 ARI-0001 cells/kg can be considered safe and merits further evaluation in phase 2 trials.

In this study, ARI-0001 cells achieved a 71% MRD-negative CRR at day +100 with a median PFS of 12 months, which is comparable to results obtained with similar products in pediatric patients,^{11,18} and perhaps superior to studies performed exclusively in adults, in which the median PFS ranged from 6 to 8 months.^{17,21} Equally comparable are the median DOR of patients who were in remission by day +100

Then, we evaluated the results obtained in cohorts 1 and 2 (single-dose) versus cohort 3 (fractionated administration) and observed that the CRR (67% versus 74%), 1-year PFS (51% versus 39.5%), and 1-year OS (66% versus 62%) were not remarkably different. These comparisons should, however, be handled with care since the follow-up is significantly shorter for patients in cohort 3. On the other hand, we observed some important differences between pediatric and adult patients. The CRR was apparently lower for pediatric patients (55% versus 78%), clearly influenced by the second administration of ARI-0001 cells in two pediatric patients before day +100. In contrast, the 1-year PFS of pediatric patients was significantly higher compared to adults (82% versus 34%), and also the duration of B cell aplasia (48% versus 10.5%), all in keeping with prior experience in pediatric versus adult populations.^{11,17–21} Remarkably, almost all (96%) adult patients recruited into this trial had already failed an alloHCT and none underwent a second procedure as consolidation therapy. As such, the effect of ARI-0001 on PFS or OS was not confounded by the effect of a subsequent allograft. On the other hand, most (87%) relapses were CD19⁺ in keeping to other studies performed in adult ALL,^{19,21} but almost the opposite to what was observed with tisagenlecleucel in pediatric patients.¹¹ Once again, shorter T cell persistence may explain this phenomenon.^{11,19,21} Unfortunately, the low number of patients and the trial design prevented us from identifying any relationship between persistence of B cell aplasia and PFS. Finally, second ARI-0001 infusions had little efficacy in reverting early B cell recovery and/or disease relapse as seen by other investigators with similar products.²²

In conclusion, the administration of ARI-0001 cells, produced in a European academic setting, provided safety and efficacy results that are comparable with other academic or even commercial products.

Table 3. Efficacy of ARI-0001 Cells in Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia

Population	n	MRD-CRR at day +28, rate (95% CI)	MRD-CRR at day +100, rate (95% CI)	PFS Median (95% CI) 1-year rate (95% CI)	DOR Median (95% CI) 1-year rate (95% CI)	OS Median (95% CI) 1-year rate (95% CI)
Total	38	84.2 (69–94)	71.1 (54–85)	12.0 mo (4.2–20.2) 47% (27–67%)	14.8 mo (6.0–NA) 59% (34–83%)	20.2 mo (10.4–NA) 69% (49–88%)
Cohorts 1 and 2 (single dose)	15	73.3 (45–92)	66.7 (38–88)	17.6 mo (0.3–NA) 51% (25–77%)	15.7 (3.6–NA) 70% (42–98%)	20.2 mo (0.3–NA) 65.5% (41%–90%)
Cohort 3 (fractionated)	23	91.3 (72–99)	73.9 (52–90)	12.0 mo (4.2–14.5) 39.5% (4%–75%)	8.7 mo (2.0–NA) NA (NA–NA)	14.5 mo (6.8–14.5) 62% (24%–100%)
Age groups						
≤ 18 years	11	81.8 (48–98)	54.5 (23–83)	18.1 mo (14.5–NA) 82% (59%–100%)	NA mo (14.8–NA) 100% (100%–100%)	NR (7.1–NA) 78% (50%–100%)
>18 years	27	85.2 (66–96)	77.8 (58–91)	9.4 mo (3.3–20.2) 34% (12%–57%)	8.7 mo (3.9–16.6) 46% (18%–75%)	20.2 mo (12.8–NA) 64.5% (40%–89%)
≤ 25 years	19	78.9 (54–94)	63.2 (38–84)	17.6 mo (4.2–20.2) 64% (40%–89%)	14.8 mo (6.0–NR) 79% (51%–100%)	20.2 mo (14.5–NA) 82% (63%–100%)
>25 years	19	89.4 (67–99)	78.9 (54–94)	7.2 mo (3.2–NA) 25% (0%–52%)	8.7 mo (2.0–NR) 34% (0%–70%)	NR (6.9–NA) 50.5% (18%–84%)

MRD-CRR, complete response rate with negative measurable residual disease; PFS, progression-free survival; DOR, duration of response; OS, overall survival; mo, months; NA, not available.

In February 2020, a marketing authorization application under the Hospital Exemption Rule was submitted to the AEMPS. This exemplifies how initiatives from Academia and Pharmaceutical companies can be complementary and synergistic in the best interest of patients.

MATERIALS AND METHODS

Patient Population

The CART19-BE-01 study is a single-arm, multicenter, open-label pilot study evaluating the safety and efficacy of ARI-0001 cells in patients with R/R B cell malignancies. Eligible patients had to have all of the following: (1) CD19-positive B cell malignancy, including ALL, DLBCL, CLL, FL, or mantle-cell lymphoma (MCL); (2) age from 2 to 80 years; (3) ECOG performance status 0–2; (4) estimated life expectancy from 3 months to 2 years; and (5) adequate venous access. Patients were eligible if they suffered from (1) ALL in $\geq 2^{\text{nd}}$ relapse, either ineligible for or with relapsed disease after alloHCT; (2) DLBCL or MCL in $\geq 2^{\text{nd}}$ relapse, ineligible for or with relapsed disease after autoHCT; and (3) CLL or FL who had received a minimum of 2 lines of therapy (including rituximab) and experienced disease progression within 2 years of last therapy. Patients with CLL/FL could be ineligible for or with relapsed disease after alloHCT/autoHCT. Key exclusion criteria included history of other malignancy unless it had been in remission for more than 3 years; severe renal, hepatic, pulmonary, or cardiac impairment; active immunosuppressive therapy; HIV infection; active HBV or HCV infection; and active infection requiring systemic therapy. Of note, neither central nervous system involvement nor prior alloHCT were exclusion criteria for this trial. All patients provided written, informed consent. The AEMPS and Institutional Review Boards/Ethics Committees of each study site approved the trial, which was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki (last updated version, Fortaleza, Brazil, 2013).

Study Design, Endpoints, and Sample Size

The primary endpoint was safety as determined by PRM and grade 3–4 toxicity at day +100 and 1 year. AEs of special interest were CRS, neurotoxicity (currently known as ICANS) and second neoplasia. AEs were graded according to common terminology criteria (CTC), version 4.0. SAEs were defined as those AEs that were fatal, life-threatening, leading to (or prolonging) a stay in hospital or a transfer to the intensive care unit, or resulting in severe disability. For CRS, we used the grading system by Lee et al.²³ Secondary endpoints included objective response rate (ORR) as per conventional criteria,^{24–26} PFS, OS, DOR, B cell aplasia duration, and impact of therapy on quality of life. The ORR was assessed at day +100 for all patients (prespecified endpoint) and at day +28 for patients with ALL (exploratory endpoint).

The original sample size was 10 patients (cohort 1). 5 months after study initiation, a major amendment increased the sample size to 39 patients and allowed patients with either normal B cell recovery within 3 months (early B cell recovery), CD19⁺ disease relapse, or CD19⁺ refractory disease to receive a second dose of ARI-0001 cells (cohort 2). 12 months after study initiation, with 19 patients already recruited, a second major amendment increased the sample size to a total of 54 patients (cohort 3), mandated the fractionated administration of ARI-0001 cells (10%, 30%, and 60% of the total dose) contingent on the lack of CRS after each fraction, and allowed the early administration of tocilizumab in patients with grade 2 CRS (it was initially reserved to those with grade ≥ 3). This second amendment was motivated by 3 toxic deaths.

ARI-0001 Cells Production and Treatment

Full details of ARI-0001 cell production, including a comprehensive phenotypic characterization of these cells can be found elsewhere.²⁷

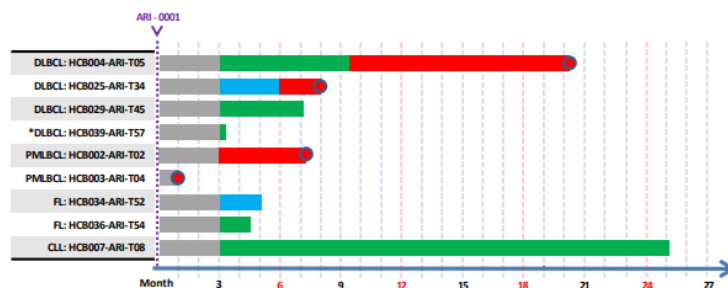


Figure 3. Swimmer Plot of Patients with Non-Hodgkin's Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia Belonging to the Modified Full Analysis Set (n = 9)

Green denotes complete remission, blue denotes partial remission, and red denotes refractory disease or disease progression. Sharp edges denote "alive at last follow-up," round edges denote "dead at last follow-up."

Patients were enrolled following screening and confirmation of eligibility, and underwent leukocytapheresis to obtain peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). ARI-0001 cells were manufactured using the CliniMACS Prodigy system (Miltenyi). Approximately 100×10^6 T cells were stimulated to expand with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies together with IL-7 and IL-15. 24 h after T cell activation, cells were transduced with a lentiviral vector containing the CAR gene construct at a multiplicity of infection of 10. Following expansion, that lasted from 7 to 10 days, the final ARI-0001 cell product was washed, cryopreserved, and tested for identity, potency, sterility, and adventitious agents.

Before ARI-0001 cell infusion, patients received fludarabine at 30 mg/m²/day plus cyclophosphamide at 300 mg/m²/day on days -6, -5, and -4 followed by ARI-0001 cells. In cohorts 1 and 2, patients received a single intravenous infusion of ARI-0001 cells, at a dose of $0.5\text{--}5 \times 10^6$ cells/kg, on day 0. Adult patients with ALL received $0.5\text{--}1 \times 10^6$ cells/kg, while pediatric patients with ALL and adult patients with NHL/CLL received 5×10^6 cells/kg (if available). In cohort 3, patients received the first fraction (10%) of ARI-0001 cells on day 0, followed by the second (30%) and third (60%) fraction. The second fraction was administered 24–48 h after the first, and the third 24–48 h after the second only if the patient had no signs or symptoms of CRS. Moreover, in cohort 3 all patients with ALL received a maximum ARI-0001 cell dose of 1×10^6 cells/kg regardless of age. All patients remained hospitalized to recovery through day +21 or until all procedure-related non-hematological toxicity returned to grade ≤ 1 or baseline. Patients were followed in the post-treatment assessment period and returned to the clinic at weeks 4, 5, 6, 8, 10, 12, and 14 (day +100), and monthly afterward for the first year. All patients completing the first year of follow-up were followed up for survival and disease status every 3 months in years 2 and 3. In case of a second ARI-0001 cell infusion, the entire procedure was repeated, including lymphodepleting chemotherapy, ARI-0001 cell dose (if available), hospital admission, and close follow-up.

The methods used to measure cytokines, ARI-0001 cells and HAMAs are available in the [Supplemental Information](#).

Statistical Analysis

Adverse events and response rates are presented with 95% exact Clopper-Pearson confidence intervals. PRM was calculated as a cumulative

incidence considering disease relapse as a competing event. OS, PFS, DOR, and persistence of B cell aplasia, were plotted using the Kaplan-Meier method. Due to the open-label non-randomized nature of the study, the statistical analysis was descriptive and no formal comparisons between cohorts are provided. However, for illustrative reasons, some p values are provided, which should be considered informative but not conclusive. Statistical analyses were performed using SAS version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA) and R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). The trial (EUDRA no 2016-2972-29) was registered at <https://clinicaltrials.gov/> (ClinicalTrials.gov: NCT03144583).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.09.027>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

V.O.-M., S.R., M.J., and J.D. designed the clinical trial and wrote the paper; J.E., G.C., and A.U.-I. provided significant contribution to the study planning and analysis; V.O.-M., T.B., J.E., E.G., M.D.-B., L.G., M.M., P.C., S.F., and J.D. looked after adult patients; S.R., A.A.-S., C.L., A.C., A.F., L.A., F.R., and I.J. looked after pediatric patients; D.B.-R., M.C.-B., E.A.G., M.E.-R., N.K.-G., E.T., and M.J. manufactured ARI-0001 cells and monitored ARI-0001-cell expansion and cytokine production; M.C., G.S., J.M.C., U.P., and M.J. designed the CAR construct and produced the lentiviral vector; N.V. and M.T. performed MRD tests; J.C., E.G.-R., and M.L. performed leukocytaphereses; F.T. and J.D. performed the statistical analysis; J.S.-P. was responsible for pharmacovigilance; S.V. was the study manager; A.S. drafted the regulatory dossier for the submission to the AEMPS; G.C. is the coordinator of Advanced Therapies at Hospital Clinic. All authors reviewed the study data, read, and approved the manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

V.O.-M.: consultant or advisory role (Kite Gilead, Celgene, Novartis), travel grants (Kite Gilead, Celgene, Novartis, Roche, Takeda, Janssen), honoraria (Kite Gilead). S.R.: consultant or advisory role (Novartis, Jazz, Shire/Servier, Amgen), travel grants (Novartis, Jazz, Shire/Servier, Amgen), honoraria (Novartis, Jazz, Shire/Servier, Amgen). A.A.-S.: consultant or advisory role (Novartis), travel grants (Novartis), honoraria (Novartis). T.B.: consultant of advisory role (Janssen), travel grants (Kite Gilead, Abbvie, Janssen), honoraria (Janssen, Abbvie, Roche, Kite Gilead). E.G.-R.: honoraria (Novartis).

C.L.: travel grants (Novartis), honoraria (Novartis). M.T.: travel grants (Novartis, Jazz Pharma, Shire/Servier, Amgen). E.G.: consultant or advisory role (Kite Gilead, Janssen, Roche), research funding (Kite Gilead, Janssen, Roche). M.D.-B.: consultant or advisory role (Celgene, Novartis, Jazz, Astellas). A.C.: consultant or advisory role (Novartis, Celgene), travel grants (Novartis, Celgene), honoraria (Novartis, Celgene). A.F.: consultant or advisory role (Novartis), travel grants (Novartis), honoraria (Novartis). P.C.: consultant or advisory role (Kite Gilead, Celgene, Janssen), travel grants (Kite Gilead, MSD, Janssen). F.R.: consultant or advisory role (GW), travel grants (GW), honoraria (GW). M.L.: Honoraria (Terumo BCT, Cerus, Grifols), research funding (Terumo BCT, Sanofi-Genzyme, Maco). A.S.: current employment (Bayer). J.S.-P.: consultant or advisory role (Bayer). G.C.: consultant or advisory role (Celgene, Novartis). J.E.: consultant or advisory role (Abbvie, Novartis, Celgene, Astellas, Jazz, Daiichi Dankyo, Roche, Amgen, Pfizer), travel grants (Celgene, Roche, Astellas, Daiichi Dankyo), research funding (Novartis, Celgene). A.U.-I.: consultant or advisory role (Kite Gilead, Celgene, Miltenyi), travel grants (Kite Gilead, Celgene). M.J.: consultant or advisory role (Kite Gilead, Grifols), honoraria (Kite Gilead, Grifols). M.C., D.B.-R., M.C.-B., J.C., N.V., L.G., M.M., E.A.G., M.E.-R., N.K.-G., L.A., I.J., S.F., G.S., U.P., J.M.P., E.T., S.V., F.T., and J.D. have no competing interests to disclose.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by CatSalut, Projecte ARI, and grants co-financed by the Instituto de Salud Carlos III –Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) PIC114/122, PI13/676, PIE13/33, and PI18/775. V.O.-M. is a recipient of a research grant from FEHH and J.D. is a recipient of a research grant from the Generalitat de Catalunya (PERIS IPFE SLT006/17/301). We thank the patients who participated in the study and their families, friends, caregivers, and referring physicians. We are very grateful to Drs. Miguel Ángel Perales (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York), Shannon Maude (Children’s Hospital of Philadelphia), Juan José Lasarte (Centro de Investigación Médica Aplicada, Navarra), and Michael Schmitt (Universitäts Klinikum Heidelberg), members of our data safety monitoring board, who helped us immensely during the trial, particularly with the management of patients with fatal toxicity. We are also indebted to the study staff and health care providers at Hospitals Clínic and Sant Joan de Déu, specifically to Anna Boronat and Raquel Martín-Ibáñez, who participated in the initial development of the construct; Judit Pich, Gabriela Recalde, Leticia Pereira, and Joan Albert Arnáiz, from the Clinical Trials Unit; Nuria Coderch and Christopher Mann from Asphalion; and Josep Maria Campistol, Antoni Castells, Aurea Mira, Manel del Castillo, Miquel Pons, and Marc Roda as the main representatives from both hospitals.

REFERENCES

1. Tavernier, E., Boiron, J.-M., Huguet, F., Bradstock, K., Vey, N., Kovacsovic, T., Delannoy, A., Fegueux, N., Fenaux, P., Stamatoullas, A., et al.; GET-LALA Group; Swiss Group for Clinical Cancer Research SAKK; Australasian Leukaemia and Lymphoma Group (2007). Outcome of treatment after first relapse in adults with

acute lymphoblastic leukemia initially treated by the LALA-94 trial. *Leukemia* 21, 1907–1914.

2. Oriol, A., Vives, S., Hernández-Rivas, J.M., Tormo, M., Heras, I., Rivas, C., Bethencourt, C., Moscardó, F., Bueno, J., Grande, C., et al.; Programa Español de Tratamiento en Hematología Group (2010). Outcome after relapse of acute lymphoblastic leukemia in adult patients included in four consecutive risk-adapted trials by the PETHEMA Study Group. *Haematologica* 95, 589–596.
3. Kantarjian, H.M., Thomas, D., Ravandi, F., Faderl, S., Jabbour, E., Garcia-Manero, G., Pierce, S., Shan, J., Cortes, J., and O’Brien, S. (2010). Defining the course and prognosis of adults with acute lymphocytic leukemia in first salvage after induction failure or short first remission duration. *Cancer* 116, 5568–5574.
4. Gökbuget, N., Stanze, D., Beck, J., Diedrich, H., Horst, H.-A., Hüttmann, A., Kobbe, G., Kreuzer, K.A., Leimer, L., Reichle, A., et al.; German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (2012). Outcome of relapsed adult lymphoblastic leukemia depends on response to salvage chemotherapy, prognostic factors, and performance of stem cell transplantation. *Blood* 120, 2032–2041.
5. Spyridonidis, A., Labopin, M., Schmid, C., Volin, L., Yakoub-Agha, I., Stadler, M., Milpied, N., Socie, G., Browne, P., Lenhoff, S., et al.; Immunotherapy Subcommittee of Acute Leukemia Working Party (2012). Outcomes and prognostic factors of adults with acute lymphoblastic leukemia who relapse after allogeneic hematopoietic cell transplantation. An analysis on behalf of the Acute Leukemia Working Party of EBMT. *Leukemia* 26, 1211–1217.
6. Poon, L.M., Hamdi, A., Saliba, R., Rondon, G., Ledesma, C., Kendrick, M., Qazilbash, M., Hosing, C., Jones, R.B., Popat, U.R., et al. (2013). Outcomes of adults with acute lymphoblastic leukemia relapsing after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 19, 1059–1064.
7. Kantarjian, H.M., DeAngelo, D.J., Stelljes, M., Martinelli, G., Liedtke, M., Stock, W., Gökbuget, N., O’Brien, S., Wang, K., Wang, T., et al. (2016). Inotuzumab Ozogamicin versus Standard Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 375, 740–753.
8. Kantarjian, H., Stein, A., Gökbuget, N., Fielding, A.K., Schuh, A.C., Ribera, J.-M., Wei, A., Dombret, H., Foà, R., Bassan, R., et al. (2017). Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 376, 836–847.
9. Crump, M., Neelapu, S.S., Farooq, U., Van Den Neste, E., Kuruvilla, J., Westin, J., Link, B.K., Hay, A., Cerhan, J.R., Zhu, L., et al. (2017). Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood* 130, 1800–1808.
10. June, C.H., and Sadelain, M. (2018). Chimeric antigen receptor therapy. *N. Engl. J. Med.* 379, 64–73.
11. Maude, S.L., Laetsch, T.W., Buechner, J., Rives, S., Boyer, M., Bittencourt, H., Bader, P., Verneis, M.R., Stefanski, H.E., Myers, G.D., et al. (2018). Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 378, 439–448.
12. Schuster, S.J., Svoboda, J., Chong, E.A., Nasta, S.D., Mato, A.R., Anak, Ö., Brogdon, J.L., Pruteanu-Malinici, I., Bhoj, V., Landsburg, D., et al. (2017). Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 377, 2545–2554.
13. Neelapu, S.S., Locke, F.L., Bartlett, N.L., Lekakis, L.J., Miklos, D.B., Jacobson, C.A., Braunschweig, I., Oluwole, O.O., Siddiqi, T., Lin, Y., et al. (2017). Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 377, 2531–2544.
14. Castella, M., Boronat, A., Martín-Ibáñez, R., Rodríguez, V., Suñé, G., Caballero, M., Marzal, B., Pérez-Amill, L., Martín-Antonio, B., Castaño, J., et al. (2018). Development of a Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor: A Paradigm for an Affordable CAR T Cell Production at Academic Institutions. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 12, 134–144.
15. Delgado, J., Caballero-Baños, M., Ortiz-Maldonado, V., Castellà, M., Magnano, L., Juan, M., and Urbano-Ispizua, Á. (2019). Chimeric Antigen Receptor T Cells Targeting CD19 and Ibrutinib for Chronic Lymphocytic Leukemia. *HemaSphere* 3, e174.
16. Rafei, H., Kantarjian, H.M., and Jabbour, E.J. (2020). Targeted therapy paves the way for the cure of acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 188, 207–223.

17. Frey, N.V., Shaw, P.A., Hexner, E.O., Pequignot, E., Gill, S., Luger, S.M., Mangan, J.K., Loren, A.W., Perl, A.E., Maude, S.L., et al. (2020). Optimizing Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for Adults With Acute Lymphoblastic Leukemia. *J. Clin. Oncol.* *38*, 415–422.
18. Gardner, R.A., Finney, O., Annesley, C., Brakke, H., Summers, C., Leger, K., Bleakley, M., Brown, C., Mgebroff, S., Kelly-Spratt, K.S., et al. (2017). Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults. *Blood* *129*, 3322–3331.
19. Hay, K.A., Gauthier, J., Hirayama, A.V., Voutsinas, J.M., Wu, Q., Li, D., Gooley, T.A., Cherian, S., Chen, X., Pender, B.S., et al. (2019). Factors associated with durable EFS in adult B-cell ALL patients achieving MRD-negative CR after CD19 CAR T-cell therapy. *Blood* *133*, 1652–1663.
20. Lee, D.W., Kochenderfer, J.N., Stetler-Stevenson, M., Cui, Y.K., Delbrook, C., Feldman, S.A., Fry, T.J., Orentas, R., Sabatino, M., Shah, N.N., et al. (2015). T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* *385*, 517–528.
21. Park, J.H., Rivière, I., Gonen, M., Wang, X., Sénéchal, B., Curran, K.J., Sauter, C., Wang, Y., Santomaso, B., Mead, E., et al. (2018). Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* *378*, 449–459.
22. Bezerra, E.D., Gauthier, J., Hirayama, A.V., Pender, B.S., Hawkins, R.M., Vakil, A., et al. (2019). Factors associated with response, CAR-T cell in vivo expansion, and progression-free survival after repeated infusions of CD19 CAR-T cells. *Blood* *134*, 201.
23. Lee, D.W., Gardner, R., Porter, D.L., Louis, C.U., Ahmed, N., Jensen, M., Grupp, S.A., and Mackall, C.L. (2014). Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* *124*, 188–195.
24. Alvarnas, J.C., Brown, P.A., Aoun, P., Ballen, K.K., Barta, S.K., Borate, U., Boyer, M.W., Burke, P.W., Cassaday, R., Castro, J.E., et al. (2015). Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 2.2015. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* *13*, 1240–1279.
25. Cheson, B.D., Fisher, R.I., Barrington, S.F., Cavalli, F., Schwartz, L.H., Zucca, E., and Lister, T.A.; Alliance, Australasian Leukaemia and Lymphoma Group; Eastern Cooperative Oncology Group; European Mantle Cell Lymphoma Consortium; Italian Lymphoma Foundation; European Organisation for Research; Treatment of Cancer/Dutch Hemato-Oncology Group; Grupo Español de Médula Ósea; German High-Grade Lymphoma Study Group; German Hodgkin's Study Group; Japanese Lymphoma Study Group; Lymphoma Study Association; NCIC Clinical Trials Group; Nordic Lymphoma Study Group; Southwest Oncology Group; United Kingdom National Cancer Research Institute (2014). Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J. Clin. Oncol.* *32*, 3059–3068.
26. Hallek, M., Cheson, B.D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, M.J., Montserrat, E., Rai, K.R., and Kipps, T.J.; International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (2008). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* *111*, 5446–5456.
27. Castella, M., Caballero-Baños, M., Ortiz-Maldonado, V., González-Navarro, E.A., Suñé, G., Antoñana-Vidólosa, A., Boronat, A., Marzal, B., Millán, L., Martín-Antonio, B., et al. (2020). Point-of-care CAR T-cell production (ARI-0001) using a closed semi-automatic bioreactor: experience from an academic phase I clinical trial. *Front. Immunol.* *11*, 482.

Artículo nº2:

4.2. Factors associated with the clinical outcome of patients with relapsed/refractory CD19+ acute lymphoblastic leukemia treated with ARI-0001 CART19-cell therapy. (166)

Valentín Ortiz-Maldonado, Susana Rives, Marta Español-Rego, Anna Alonso-Saladrígues, Mercedes Montoro, Laura Magnano, Eva Giné, Mariona Pascal, Marina Díaz-Beyá, Maria Castella, Albert Català, Anna Faura, Luis Gerardo Rodríguez-Lobato, Aina Oliver-Caldes, Alexandra Martínez-Roca, Montserrat Rovira, E Azucena González-Navarro, Juan Ramón Ortega, Joan Cid, Miquel Lozano, Enric Garcia-Rey, Sara Fernández, Pedro Castro, Iolanda Jordan, Neus Villamor, Marta Aymerich, Montserrat Torredadell, Àngela Deyà, Carlos Fernández de Larrea, Daniel Benitez-Ribas, Esteve Trias, Sara Varea, Gonzalo Calvo, Jordi Esteve, Álvaro Urbano-Ispizua, Manel Juan, Julio Delgado.

Journal for Immunotherapy of Cancer. 2021 Dec;9(12):e003644. doi: 10.1136/jitc-2021-003644. PMID: 34907029; PMCID: PMC8671976.

Resumen:

Se evaluaron los factores asociados con seguridad y eficacia a largo plazo obtenidos de todos los pacientes con LLA R/R reclutados en el ensayo CART19-BE-01 y el posterior PUC tratados en HCB y el HSJD. Desde julio 2017 hasta marzo 2021 un total de 53 pacientes recibieron tratamiento con células ARI-0001. Los pacientes recibieron linfodepleción con ciclofosfamida (900mg/m²) y fludarabina (300mg/m²) seguidos de la administración de una dosis de 0,1-5 10⁶ células ARI-0001/kg.

Las células ARI-0001 fueron administradas inicialmente como dosis única (n=15) y posteriormente (n=38) de forma fraccionada en 3 fracciones de 10%, 30%, y 60%. La administración de cada fracción fue separada al menos por 24hs en función de la ausencia de SLC. Los pacientes recibieron células ARI-0001 con una mediana de tiempo de vena a vena de 43 días (rango, 21-190). Se

infundió la dosis objetivo a todos excepto a 3 pacientes (5,7%) que recibieron $0,1-0,4 \times 10^6$ células ARI-0001/kg (10%-40%) debido al desarrollo de SLC. En cuanto a seguridad se observó una incidencia de SLC del 56,6% (IC 95%: 42,3%-70,2%), siendo de grado ≥ 3 en el 11,3% (IC 95%: 4,3% a 23%).

Los pacientes con $\geq 5\%$ de linfoblastos en MO tuvieron una mayor incidencia de SLC en comparación con aquellos con $<5\%$ de linfoblastos (cualquier grado: 82% vs 39%, $p=0,0022$; grado ≥ 3 : 27% vs 0%, $p=0,0036$). Además, la incidencia y la gravedad del SLC también se asoció con la administración de dosis única frente a la administración fraccionada de células ARI-0001 (cualquier grado: 87% frente a 45%, $p=0,0064$; grado ≥ 3 : 27% frente a 5%, $p=0,047$). En cuanto a eficacia, la tasa de RC con EMR negativa fue del 88,6% (IC del 95%: 77,0% a 95,7%) al día +28 y del 79,2% (IC del 95%: 65,9% a 89,2%) al día +100.

La SLP fue del 50,9% (IC del 95%: 38,4% a 67,4%) y del 32,9% (IC del 95%: 20,6% a 52,6%) a 1 y 2 años, respectivamente, mientras que la SG a 1 y 2 años fue del 70,2% (IC del 95%: 58,1% a 84,8%) y 53,9% (IC 95%: 40,5% a 71,8%), respectivamente. Mediante análisis univariante, sólo dos variables tuvieron un impacto en la SLP: la carga tumoral ($<5\%$ vs. $\geq 5\%$ de linfoblastos en MO en el momento del cribado), con una SLP a los 2 años de 52,5% (IC del 95%: 36,4% a 75,7%) frente a 10,7% (IC del 95%: 2,1% a 54,4%), y un CoR de 2,14 (IC 95%: 1,04 a 4,42) para los pacientes con un 5% o más de blastos ($p=0,077$ ajustada). Por otro lado, la pérdida de ALB tuvo un CoR de 4,41 (IC del 95%: 1,59 a 12,2), $p=0,0172$ ajustada. Ambas variables (carga tumoral y pérdida de ALB) también se confirmaron en el modelo multivariante, con un CoR de 2,05 (IC del 95%: 1,004 a 4,17) para los pacientes con un 5% o más de blastos en el momento del cribado ($p=0,0484$) y un CoR de 4,32 (95% CI 1,57 a 11,86) para los pacientes con pérdida de ALB ($p=0,0045$).

En conclusión, tanto la carga tumoral como la pérdida de ALB parecen tener un impacto significativo en la SLP y podrían guiar a los clínicos en el manejo de los pacientes tras la administración de ARI-0001.

Factors associated with the clinical outcome of patients with relapsed/refractory CD19⁺ acute lymphoblastic leukemia treated with ARI-0001 CART19-cell therapy

Valentín Ortiz-Maldonado ^{1,2}, Susana Rives,^{3,4} Marta Español-Rego,⁵ Anna Alonso-Saladrigues,³ Mercedes Montoro,¹ Laura Magnano,^{1,2} Eva Giné,^{1,2,6} Mariona Pascal,^{2,5} Marina Díaz-Beyá,^{1,2} Maria Castella,⁷ Albert Català,^{3,4,8} Anna Faura,³ Luis Gerardo Rodríguez-Lobato,^{1,2} Aina Oliver-Caldes ^{1,2}, Alexandra Martínez-Roca,¹ Montserrat Rovira,^{1,2} E Azucena González-Navarro,⁵ Juan Ramón Ortega,⁵ Joan Cid,^{2,9} Miquel Lozano,^{2,9,10} Enric Garcia-Rey,⁷ Sara Fernández,¹¹ Pedro Castro,^{2,10,11} Iolanda Jordan,^{4,10,12} Neus Villamor,^{2,6,13} Marta Aymerich,^{2,13} Montserrat Torredadell,^{4,8,14} Àngela Deyà,¹⁵ Carlos Fernández de Larrea,^{1,2,10} Daniel Benitez-Ribas,^{2,5} Esteve Trias,¹⁶ Sara Varea,¹⁷ Gonzalo Calvo,^{16,17} Jordi Esteve,^{1,2,10,18} Alvaro Urbano-Ispizua,^{2,10,18} Manel Juan ^{2,5,10,19}, Julio Delgado ^{1,2,6,10}

To cite: Ortiz-Maldonado V, Rives S, Español-Rego M, et al. Factors associated with the clinical outcome of patients with relapsed/refractory CD19⁺ acute lymphoblastic leukemia treated with ARI-0001 CART19-cell therapy. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2021;9:e003644. doi:10.1136/jitc-2021-003644

► Additional supplemental material is published online only. To view, please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/jitc-2021-003644>).

Accepted 04 November 2021



© Author(s) (or their employer(s)) 2021. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to
Dr Julio Delgado;
jdelgado@clinic.cat

Dr Manel Juan;
mjuan@clinic.cat

The prognosis of patients with relapsed/refractory (R/R) acute lymphoblastic leukemia (ALL) remains poor, particularly for those relapsing after allogeneic hematopoietic cell transplantation (alloHCT).¹ Novel agents such as inotuzumab ozogamicin or blinatumomab achieve increased response rates, but these are generally transient unless followed by alloHCT. Chimeric antigen receptors (CAR) targeting CD19 have shown promising results in R/R ALL, and one of these products (tisagenlecleucel) has been approved for the treatment of patients with R/R ALL up to 25 years of age.²

In 2013, we designed our own CAR19 construct, comprising a single chain variable fraction sequence from the A3B1 hybridoma and the 4-1BB/CD3z signaling domains (online supplemental figure 1). After scaling up both lentiviral and cell production,^{3,4} the Spanish Medicines Agency (AEMPS) approved our product (ARI-0001 cells) and the CART19-BE-01 trial.⁵ In October 2019, once the recruitment was completed, the AEMPS approved a compassionate use program (CUP) for patients fulfilling the same inclusion/exclusion criteria. The trial's preliminary results were published elsewhere.⁵ Here, we present the long-term results of all consecutive patients with R/R ALL recruited into the CART19-BE-01 trial and the subsequent

CUP. Detailed information on ARI-0001 cell manufacturing, inclusion/exclusion criteria, primary and secondary endpoints and assessment criteria can be found elsewhere.⁵

Before ARI-0001 cell infusion, patients received fludarabine at 30 mg/m²/day plus cyclophosphamide at 300 mg/m²/day on days -6, -5, and -4 followed by ARI-0001 cells. The first 15 patients received a single intravenous infusion of 0.5–1×10⁶ ARI-0001 cells/kg (adults) or 5×10⁶ ARI-0001 cells/kg (children) on day 0. The following 38 patients (23 from the CART19-BE-01 trial and 15 from the CUP) received 1×10⁶ ARI-0001 cells/kg regardless of age: the first fraction (10%) on day 0, followed by the second (30%) and third (60%) fraction. The second fraction was administered 24–48 hours after the first, and the third 24–48 hours after the second, only if the patient had no signs or symptoms of CRS (online supplemental figure 2). The reason for this amendment to the protocol were three cases of fatal toxicity (two patients, aged 11 and 19, who died of refractory CRS, and one patient, age 35, who died of pseudomembranous colitis as a complication of grade 4 CRS).⁵ The entire patients' disposition is depicted in online supplemental figure 3.

Adverse events and response rates are presented with 95% exact Clopper-Pearson CIs. The possible association between CRS



(all grades and grade ≥ 3), tumor burden at screening ($<5\%$ vs $\geq 5\%$ blasts in the bone marrow (BM)) and type of administration (single dose vs fractionated) was assessed using Fisher's exact test. We also analyzed the impact on progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) of the following variables: age (<25 vs ≥ 25 years), type of administration, tumor burden and loss of B-cell aplasia (BCA), the latter as a time-dependent covariate. PFS/OS curves were plotted using the Kaplan-Meier method for time-fixed covariates and the Simon-Makuch method for BCA loss. Landmark analyses were performed to identify the most appropriate timepoint for BCA loss. Univariate Cox regression was used to evaluate the impact of these covariates on PFS/OS, and those with Benjamini-Hochberg adjusted p values lower than 0.1 were introduced into a multivariate Cox regression. Schönfeld residuals were used to check the proportional hazards assumption. The trial was registered at clinicaltrials.gov (NCT03144583).

Fifty-three patients with R/R ALL received therapy with ARI-0001 cells: 38 in the context of the CART19-BE-01 trial and 15 as part of the CUP. The median age was 30 years (range, 3–68), while 24 (45%) patients were female. Baseline characteristics of the entire population are displayed in online supplemental table 1). The data cut-off date was March, 2021, when all infused patients had a minimum follow-up of 100 days or had experienced disease relapse or death before that date.

Patients received ARI-0001 cells a median of 55.5 days (range, 27–216) after inclusion, and the median vein-to-vein time (from apheresis to infusion) was 43 days (range, 21–190). The original target dose was infused to all except 3 (5.7%) patients who received $0.1\text{--}0.4 \times 10^6$ ARI-0001 cells/kg due to CRS. CRS was reported in 56.6% (95% CI 42.3%–70.2%) of patients, being grade ≥ 3 in 11.3% (95% CI 4.3% to 23%) and requiring treatment with tocilizumab and steroids in 20.7% and 11.3% of patients, respectively. Patients with $\geq 5\%$ lymphoblasts in the BM had a higher incidence of CRS (any grade: 82% vs 39%, $p=0.0022$; grade ≥ 3 : 27% vs 0%, $p=0.0036$) compared with those with $<5\%$ lymphoblasts. Moreover, the incidence and severity of CRS was also associated with single dose versus fractionated administration of ARI-0001 cells (any grade: 87% vs 45%, $p=0.0064$; grade ≥ 3 : 27% vs 5%, $p=0.047$). Neurotoxicity was observed in 13.2% (95% CI 5.5% to 25.3%) of patients, with one self-limited grade ≥ 3 occurrence (1.9%). No new second malignancies have been reported apart from a previously notified case of myelodysplasia (1/53; 1.9%).⁵

The safety profile of ARI-0001 cells was comparable to that of similar products, with grade ≥ 3 CRS/neurotoxicity rates lower than 5%.^{2,6} Moreover, both fractionated administration and tumor burden were significantly associated with the incidence of CRS, in keeping with similar studies.^{7–10} Of note, two patients enrolled in the CUP experienced grade ≥ 3 CRS with the first fraction (0.1×10^6 cells/kg), but successfully recovered after treatment with tocilizumab. Both patients had a high tumor burden

($>90\%$ blasts in the BM) at study inclusion, and yet they could receive therapy while avoiding irreversible toxicity.

The measurable residual disease (MRD)-negative CR rate was 88.6% (95% CI 77.0% to 95.7%) at day +28% and 79.2% (95% CI 65.9% to 89.2%) at day +100. All three patients who received less than 1×10^6 ARI-0001 cells/kg due to toxicity achieved an MRD-negative CR. All evaluable patients ($n=50$) developed absolute BCA that lasted for a median of 4.2 months (95% CI 3.32 to 7.53 months). PFS was 50.9% (95% CI 38.4% to 67.4%) and 32.9% (95% CI 20.6% to 52.6%) at one and 2 years, respectively, while the 1-year and 2-year OS were 70.2% (95% CI 58.1% to 84.8%) and 53.9% (95% CI 40.5% to 71.8%). Progressive disease has occurred in 27 (50.9%; 95% CI 36.8 to 64.9%) patients at a median of 5.3 (range, 0.2–23.1) months. Tumor cells expressed CD19 in 24 (89%) of these relapses, while three (11%) were CD19-negative. ARI-0001 cells served as a bridge to alloHCT in three (6%) patients. Second ARI-0001 infusions were documented in nine patients (three more than previously reported³: four due to CD19 +relapse and five in patients with early BCA loss). These resulted in transient responses and brief periods of BCA, but one of these responses allowed the patient to receive a second alloHCT.

Subgroup analyses are depicted in [figure 1](#) and online supplemental table 2. By univariate analysis, only two variables had a potential impact on PFS: tumor burden ($<5\%$ vs $\geq 5\%$ lymphoblasts in the BM at screening), with a 2-year PFS of 52.5% (95% CI 36.4% to 75.7%) vs 10.7% (95% CI 2.1% to 54.4%) and an HR of 2.14 (95% CI 1.04 to 4.42) for patients with 5% or more blasts (adjusted $p=0.077$). On the other hand, loss of BCA had an HR of 4.41 (95% CI 1.59 to 12.2), adjusted $p=0.0172$. Both variables (tumor burden and loss of BCA) were also confirmed in the multivariate model, with an HR of 2.05 (95% CI 1.004 to 4.17) for patients with 5% or more blasts at screening ($p=0.0484$) and an HR of 4.32 (95% CI 1.57 to 11.86) for patients with loss of BCA ($p=0.0045$). Regarding OS, none of the covariates evaluated had sufficient impact to justify a multivariate analysis. Seeing that BCA loss had such an impact on PFS, we performed a series of landmark analyses to identify the most appropriate cut-off for clinical practice. We chose 3 and 6 months as potential landmark times because the median time to BCA loss was 4.2 months in our series. According to these analyses, the 3-month time point was the closest to statistical significance (HR 1.83; 95% CI 0.82 to 4.11; $p=0.15$, (online supplemental table 3).

With more patients and longer follow-up, we identified two covariates of potential predictive value: tumor burden in the BM and loss of BCA. This contrasts with our previous report, where this potential effect was not fully evident.⁵ The adverse impact of tumor burden has been documented for other therapies, including alloHCT and CART19-cells,^{8,10} and is therefore not surprising. The importance of BCA loss is, on the other hand, more controversial. Our strategy was associated with a relatively short in vivo ARI-0001 cell survival (median 4.2 months)

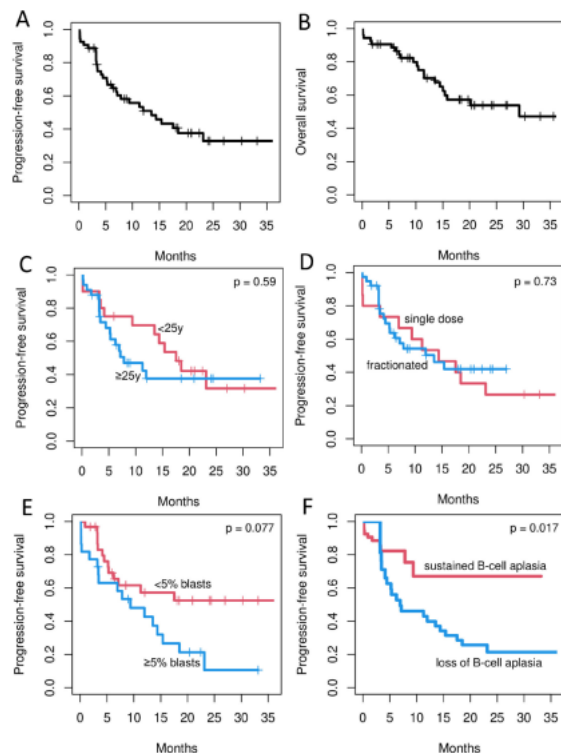


Figure 1 Progression-free (PFS) and overall survival (OS) of patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia treated with ARI-0001 cells. A, B show the PFS (A) and OS (B) of the entire population. C–F depict the PFS of patients according to age (C) (red curve: <25 years; blue curve: ≥25 years); type of administration (D) (red curve: single dose; blue curve: fractionated); percentage of blasts in the bone marrow (E) (red curve: <5%; blue curve: ≥5%); and loss of B-cell aplasia (F) (red curve: no; blue curve: yes). P values refer to the Benjamini-Hochberg-adjusted univariate analysis.

and most relapses had a CD19-positive phenotype, all in keeping with other studies.^{8,10} Consequently, further immune manipulation may be justified in patients with a short-lived BCA, perhaps less than 3 months, although this potential timepoint needs further validation.

In conclusion, both tumor burden and BCA loss appeared to have a significant impact on PFS and could guide clinicians in the management of patients after cell infusion. The validity of the fractionated cell administration was also confirmed and will be explored in a phase 2 trial. The results of the CART19-BE-01 trial led to the approval by the AEMPS of ARI-0001 cells for the treatment of patients with R/R ALL older than 25 years of age (Hospital Exemption). To the best of our knowledge, this is the first purely academic CART19-cell product approved in any European country for any indication. This also makes Spain the only country in Europe where patients with R/R ALL have at least one approved CART19-cell

product regardless of age (tisagenlecleucel for younger patients; ARI-0001 cells for older patients).

Author affiliations

- ¹Department of Hematology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain
- ²Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain
- ³Department of Pediatric Hematology and Oncology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain
- ⁴Institut de Recerca Pediàtrica Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain
- ⁵Department of Immunology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain
- ⁶Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer, Madrid, Spain
- ⁷Banc de Sang i Teixits, Barcelona, Spain
- ⁸Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, Madrid, Spain
- ⁹Apheresis & Cell Therapy Unit, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain
- ¹⁰Department of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain
- ¹¹Medical Intensive Care Unit, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain
- ¹²Pediatric Intensive Care Unit, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain
- ¹³Hematopathology Unit, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain
- ¹⁴Laboratory of Hematology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain
- ¹⁵Clinical Immunology and Primary Immunodeficiencies Unit, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain
- ¹⁶Advanced Therapies Unit, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain
- ¹⁷Department of Clinical Pharmacology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain
- ¹⁸Josep Carreras Leukemia Research Institute, Barcelona, Spain
- ¹⁹Clinical Immunology Platform, Hospital Clínic-Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

Twitter Aina Oliver-Caldes @ainitaoliver

Acknowledgements We are very grateful to Prof. Josep Maria Ribera (Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona), who critically read our manuscript. We thank the patients who participated in the study and their families, friends, caregivers and referring physicians. We are very grateful to Drs. Miguel Ángel Perales (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York), Shannon Maude (Children's Hospital of Philadelphia), Juan José Lasarte (Centro de Investigación Médica Aplicada, Navarra) and Michael Schmitt (Universitäts Klinikum Heidelberg), members of the CART19-BE-01 trial DSMB. We are also indebted to the study staff and health care providers at Hospitals Clínic and Sant Joan de Déu, specifically to Anna Boronat, Raquel Martín-Ibáñez, Unai Perpiñá, Josep M. Canals, Vanina Rodríguez and Guillermo Suñé, who participated in the initial development of the construct; Judit Pich, Gabriela Recalde, Leticia Pereira and Joan Albert Arnáiz, from the Clinical Trials Unit; Andrea Scalise, Joaquín Sáez-Periataro, Ferran Torres and Sandra Castaño, from the Department of Pharmacology; and Josep Maria Campistol, Antoni Castells, Aurea Mira, Manel del Castillo, Miquel Pons and Marc Roda as the main representatives from both hospitals.

Contributors VO-M, SR, MJ and JD designed the clinical trial and wrote the paper; JE, GC and AU-I provided significant contribution to the study planning and analysis; VO-M, JE, LM, EG, MD-B, MM, LGR-L, AO-C, AM-R, MR, PC, SF and JD looked after adult patients; SR, AA-S, AC, AF and IJ looked after pediatric patients; DB-R, EAG-N, ME-R, JRO, MP and MJ manufactured ARI-0001 cells and monitored B-cell aplasia; MC and MJ designed the CAR construct and produced the lentiviral vector; NV, MA and MT performed measurable residual disease tests; JC, EG-R and ML performed leukocytaphereses; JD performed the statistical analysis; ET, GC and SV coordinate the Advanced Therapies Unit at Hospital Clínic. All authors reviewed the study data, read and approved the manuscript.

Funding This study was funded by CatSalut, Projecte ARI and grants cofinanced by the Instituto de Salud Carlos III–Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria–and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) PIC114/122, PI13/676, PIE13/33, PI18/775. VO-M was a recipient of a research grant from FEHH and JD was a recipient of a research grant from the Generalitat de Catalunya (PERIS IPFE SLT006/17/301).

Competing interests VO-M: Consultant or advisory role (Kite Gilead, Celgene, Novartis), travel grants (Kite Gilead, Celgene, Novartis, Roche, Takeda, Janssen), honoraria (Kite Gilead). SR: Consultant or advisory role (Novartis, Jazz, Shire/Servier, Amgen, Celgene/Bristol-Myers, Kite Gilead), travel grants (Novartis, Jazz, Shire/Servier, Amgen, Celgene/Bristol-Myers, Kite Gilead), honoraria (Novartis, Jazz, Shire/Servier, Amgen, Celgene/Bristol-Myers, Kite Gilead). AA-S: Consultant or advisory role (Novartis), travel grants (Novartis), honoraria (Novartis). EG: Consultant or advisory role (Kite Gilead, Janssen, Genmab), research funding (Kite



Gilead, Janssen, Roche). MD-B: Consultant or advisory role (Celgene, Novartis, Jazz, Astellas). AC: Consultant or advisory role (Novartis, Celgene), travel grants (Novartis, Celgene), honoraria (Novartis, Celgene). AF: Consultant or advisory role (Novartis), travel grants (Novartis), honoraria (Novartis). LGR-L: Travel grants (Kite Gilead, Amgen, Janssen). ML: Honoraria (Grifols, Fresenius Kabi), research funding (Terumo BCT, Maco-Pharma). AM-R: Consultant or advisory role (Bristol Myers Squibb, Abbvie), travel grants (Kite Gilead, Roche, Takeda, Janssen, Abbvie), honoraria (Abbvie). EG-R: Honoraria (Novartis). PC: Consultant or advisory role (Kite Gilead, Celgene, Janssen), travel grants (Kite Gilead, MSD, Janssen). MT: Consultant or advisory role (Novartis). CFDL: Consultant or advisory role (Janssen, Celgene/Bristol-Myers, GSK), honoraria (Janssen, Celgene/Bristol-Myers, Amgen, GSK), research funding (Janssen, Celgene/Bristol-Myers, Amgen, Takeda). GC: Consultant or advisory role (Celgene, Novartis). JE: Consultant or advisory role (Abbvie, Novartis, Celgene, Astellas, Jazz, Daiichi Dankyo, Roche, Amgen, Pfizer), travel grants (Celgene, Roche, Astellas, Daiichi Dankyo), research funding (Novartis, Celgene). AU-I: Consultant or advisory role (Kite Gilead, Celgene/Bristol-Myers, Miltenyi), travel grants (Kite Gilead, Celgene/Bristol-Myers). MJ: Consultant or advisory role (Kite Gilead, Grifols), honoraria (Kite Gilead, Grifols).

Patient consent for publication Not applicable.

Ethics approval The CART19-BE-01 clinical trial and subsequent compassionate use program were approved by the Spanish Medicines Agency (AEMPS) and both Institutions' Review Boards and Ethics Committees. All participants provided written informed consent.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data availability statement Not applicable (this trial started recruitment in July 2017).

Supplemental material This content has been supplied by the author(s). It has not been vetted by BMJ Publishing Group Limited (BMJ) and may not have been peer-reviewed. Any opinions or recommendations discussed are solely those of the author(s) and are not endorsed by BMJ. BMJ disclaims all liability and responsibility arising from any reliance placed on the content. Where the content includes any translated material, BMJ does not warrant the accuracy and reliability of the translations (including but not limited to local regulations, clinical guidelines, terminology, drug names and drug dosages), and is not responsible for any error and/or omissions arising from translation and adaptation or otherwise.

Open access This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially,

and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

ORCID iDs

Valentín Ortiz-Maldonado <http://orcid.org/0000-0003-4699-6862>

Aina Oliver-Caldes <http://orcid.org/0000-0002-7921-5420>

Manel Juan <http://orcid.org/0000-0002-3064-1648>

Julio Delgado <http://orcid.org/0000-0002-5157-4376>

REFERENCES

- Gökbuğet N, Stanze D, Beck J, *et al.* Outcome of relapsed adult lymphoblastic leukemia depends on response to salvage chemotherapy, prognostic factors, and performance of stem cell transplantation. *Blood* 2012;120:2032–41.
- Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, *et al.* Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2018;378:439–48.
- Castella M, Boronat A, Martín-Ibáñez R, *et al.* Development of a novel anti-CD19 chimeric antigen receptor: a paradigm for an affordable CAR T cell production at academic institutions. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2019;12:134–44.
- Castella M, Caballero-Bañós M, Ortiz-Maldonado V, *et al.* Point-of-care CAR T-cell production (ARI-0001) using a closed semi-automatic bioreactor: experience from an academic phase I clinical trial. *Front Immunol* 2020;11:482.
- Ortiz-Maldonado V, Rives S, Castellà M, *et al.* CART19-BE-01: a multicenter trial of ari-0001 cell therapy in patients with CD19⁺ relapsed/refractory malignancies. *Mol Ther* 2021;29:636–44.
- Sheth VS, Gauthier J. Taming the beast: CRS and ICANS after car T-cell therapy for all. *Bone Marrow Transplant* 2021;56:552–66.
- Maude SL, Frey N, Shaw PA, *et al.* Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* 2014;371:1507–17.
- Park JH, Rivière I, Gonen M, *et al.* Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2018;378:449–59.
- Frey NV, Shaw PA, Hexner EO, *et al.* Optimizing chimeric antigen receptor T-cell therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2020;38:415–22.
- Hay KA, Gauthier J, Hirayama AV, *et al.* Factors associated with durable EFS in adult B-cell all patients achieving MRD-negative Cr after CD19 CAR T-cell therapy. *Blood* 2019;133:1652–63.

Artículo nº3:

4.3. Results of ARI-0001 CART19 cell therapy in patients with relapsed/refractory CD19-positive acute lymphoblastic leukemia with isolated extramedullary disease. (167)

Valentín Ortiz-Maldonado, Anna Alonso-Saladrigues, Marta Español-Rego, Nuria Martínez-Cibrián, Anna Faura, Laura Magnano, Albert Català, Daniel Benítez-Ribas, Eva Giné, Marina Díaz-Beyá, Juan Gonzalo Correa, Montserrat Rovira, Mercedes Montoro-Lorite, Alexandra Martínez-Roca, Luis Gerardo Rodríguez-Lobato, Raquel Cabezón, Joan Cid, Miquel Lozano, Enric Garcia-Rey, Nuria Conde, Georgina Pedrals, Maria Rozman, Montserrat Torreadell, Xavier Setoain, Sonia Rodríguez, Jordi Esteve, Mariona Pascal, Álvaro Urbano-Ispizua, Manel Juan, Julio Delgado, Susana Rives.

American Journal of Hematology. 2022 Mar 7. doi: 10.1002/ajh.26519. Epub ahead of print. PMID: 35253928.

Resumen:

Los pacientes con LLA-B recaída/refractaria con enfermedad extramedular aislada (EEMa) han sido sistemáticamente excluidos de la mayoría de los ensayos clínicos CART19 realizados hasta la fecha. En este artículo, se evaluaron los resultados de 18 pacientes con LLA R/R con EEMa tratados con las células CAR-T anti-CD19 ARI-0001 de enero de 2019 a septiembre de 2021 en dos centros (el HCB para pacientes adultos y el HSJD para pacientes pediátricos), incluyendo pacientes tratados en el ensayo CART19-BE-01 y el PUC consecutivo. La EEMa se detectó mediante PET-TAC en el 78% (14/18), y/o mediante análisis del líquido cefalorraquídeo en el 28% (5/18).

Los pacientes tratados recibieron tratamiento de linfodepleción con ciclofosfamida (900mg/m²) y fludarabina (300mg/m²) seguidos de la administración de una dosis de 1x 10⁶ células ARI-0001/kg. Las células ARI-0001 fueron administradas inicialmente como dosis única en el primer paciente (n=1) y posteriormente (n=17) de forma fraccionada en 3 fracciones de 10%, 30%, y 60%. La

administración de cada fracción fue separada al menos por 24hs en función de la ausencia de SLC. Los pacientes recibieron las células ARI-0001 con una mediana de tiempo de vena a vena de 42,5 días (rango, 26-166).


En cuanto a seguridad, el SLC se produjo en el 50% (9/18) de los pacientes, sin ningún caso de SLC o neurotoxicidad de grado ≥ 3 , con uso de tocilizumab en solo 1 caso (6%) debido a un SLC grado 2, y con sólo 1 caso de neurotoxicidad (6%) grado 1 que no requirió tratamiento. Finalmente, la mortalidad relacionada con el procedimiento fue del 0% a 2 años.

En cuanto a eficacia, se observó una tasa de respuestas globales en el 94% de los pacientes (intervalo de confianza [IC] del 95%: 73%-99%), con una tasa de respuestas completas objetivadas en el 78% de ellos (IC del 95%: 52%-94%). La SLP y la SG fueron del 49% (IC del 95%: 30%-79%) y del 61% (IC del 95%: 40%-92%) a los 2 años, respectivamente. Todos los pacientes con infiltración del LCR alcanzaron una RC. En los pacientes con enfermedad positiva por PET-TAC, se observaron RCM tan pronto como 3 semanas y tan tarde como 4 meses tras la administración de ARI-0001. Dos tercios de los pacientes con respuestas metabólicas parciales iniciales alcanzaron finalmente una RCM. Todos los pacientes que presentaron recaídas tras ARI-0001 volvieron a tener afectación extramedular, la mayoría en la localización original.

En conclusión, el tratamiento con células ARI-0001 en esta población de pacientes logró resultados de seguridad y eficacia comparables a los obtenidos con otros productos CAR-T similares en pacientes con enfermedad medular convencional. Creemos que las células ARI-0001 constituyen una opción terapéutica potencial en esta situación de gran necesidad médica no cubierta.

RESEARCH ARTICLE

Results of ARI-0001 CART19 cell therapy in patients with relapsed/refractory CD19-positive acute lymphoblastic leukemia with isolated extramedullary disease

Valentín Ortiz-Maldonado^{1,2} | Anna Alonso-Saladrigues^{3,4} | Marta Español-Rego⁵ |
Nuria Martínez-Cibrián¹ | Anna Faura³ | Laura Magnano^{1,2} | Albert Català^{3,4,6} |
Daniel Benítez-Ribas^{2,5} | Eva Giné^{1,2,7} | Marina Díaz-Beyá^{1,2} |
Juan Gonzalo Correa¹ | Montserrat Rovira^{1,2} | Mercedes Montoro-Lorite¹ |
Alexandra Martínez-Roca¹ | Luis Gerardo Rodríguez-Lobato^{1,2} | Raquel Cabezón⁵ |
Joan Cid^{2,8} | Miquel Lozano^{2,8,9} | Enric Garcia-Rey¹⁰ | Nuria Conde³ |
Georgina Pedrals³ | María Rozman^{2,11} | Montserrat Torredadell^{3,4,12} |
Xavier Setoain^{9,13,14} | Sonia Rodríguez¹⁵ | Jordi Esteve^{1,2} | Mariona Pascal^{5,16} |
Álvaro Urbano-Ispizua^{1,2,9} | Manel Juan^{2,5,9,16} | Julio Delgado^{1,2,7,9}  |
Susana Rives^{3,4,6}

¹Department of Hematology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

²Oncology & Haematology, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

³CAR T-cell Unit, Pediatric Hematology and Oncology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

⁴Leukemia & Pediatric Hematological Disorders, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

⁵Department of Immunology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

⁶Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain

⁷Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Madrid, Spain

⁸Apheresis Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

⁹Department of Medicine, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

¹⁰Apheresis Unit, Banc de Sang i Teixits, Barcelona, Spain

¹¹Hematopathology Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

¹²Hematology Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

¹³Department of Nuclear Medicine, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

¹⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Madrid, Spain

¹⁵Department of Radiology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

¹⁶Immunotherapy Platform, Hospital Clínic-Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

Correspondence

Julio Delgado, Department of Hematology,
Hospital Clínic, IDIBAPS, University of
Barcelona, C/ Villarroel 170, 08036 Barcelona,
Spain.
Email: jdelgado@clinic.cat

Funding information

This study was partially funded by CatSalut,
Proyecto ARI, and grants cofinanced by the

Abstract

We evaluated outcomes of 18 patients with isolated extramedullary disease (iEMD) relapsed/refractory (R/R) B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) treated with the CD19-directed CAR T cells ARI-0001 in two centers (adult and pediatric), including patients treated in the CART19-BE-01 trial and the consecutive compassionate use program. iEMD was detected by PET-CT in 78% (14/18), and/or by cerebrospinal fluid analysis in 28% (5/18). Patients received cyclophosphamide and fludarabine followed by

Instituto de Salud Carlos III -Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) PIC14/122, PI13/676, PIE13/ 33, and PI18/775; and Fundació La Caixa CP042702/LCF/PR/GN18/50310007. Valentín Ortiz-Maldonado is a recipient of a research grant from FEHH, and Julio Delgado, is a recipient of a research grant from the Generalitat de Catalunya (PERIS IPFE SLT006/17/301).

1×10^6 ARI-0001 cells/kg, initially as a single dose (first patient) and later split into three fractions (10%, 30%, and 60%). Cytokine release syndrome (CRS) occurred in 50% (9/18) of patients, with no cases of grade ≥ 3 CRS, and 1 case (6%) of grade 1 neurotoxicity. Tocilizumab was used in 6% of patients (1/18). Procedure-related mortality was 0% at 2 years. Objective responses were seen in 94% (95% confidence interval [CI]: 73%–99%) of patients, with complete responses (CR) seen in 78% (95% CI: 52%–94%) of them. Progression-free and overall survival were 49% (95% CI: 30%–79%) and 61% (95% CI: 40%–92%) at 2 years. In conclusion, the use of ARI-0001 cells in patients with R/R ALL and iEMD was associated with a safety and efficacy profile that is comparable with what is observed in patients with marrow involvement and in line with other CART19 products.

1 | INTRODUCTION

Several academic and commercial chimeric antigen receptor T cell products targeting CD19 (CART19) have achieved complete response (CR) rates of 60%–85% in patients with CD19-positive relapsed/refractory (R/R) acute lymphoblastic leukemia (ALL).^{1–12} Patients with isolated extramedullary disease (iEMD) have been systematically excluded from most CART19 clinical trials performed to date, including the pivotal trial for the only commercially available product,² probably due to the lack of consensus in the evaluation of response to therapy in these patients as well as concerns about poor efficacy and increased risk of neurotoxicity in individuals with central nervous system (CNS) disease. Consequently, data on safety and efficacy of CART19 therapy in patients with R/R ALL and iEMD remain scarce even though iEMD is particularly frequent in patients with relapsed disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation (alloHCT)¹³ or blinatumomab.¹⁴

The prognosis of patients who present with iEMD is controversial. Generally speaking, they have a better prognosis compared to those with blood and marrow disease, particularly in the pediatric population.¹⁵ On the other hand, tumor cells from patients with iEMD are biologically different from those from patients with blood or bone marrow disease,¹⁶ and probably possess a special ability to escape the immune-vigilance provided by T-cells. Indeed, the graft versus leukemia effect conferred by alloHCT appears less effective for EMD compared to blood or bone marrow disease in some series, but not in others.^{17,18} The results in small series of patients treated with CART19 cells are contradictory, but mostly revealing a worse outcome for patients with EMD.^{19–27}

Here we report the outcomes of all consecutive patients with R/R B-ALL and iEMD treated with ARI-0001 cells within the CART19-BE-01 clinical trial⁴ and subsequent compassionate use program (CUP).

2 | PATIENTS AND METHODS

2.1 | Patient population

This study includes all patients with CD19-positive R/R ALL treated with ARI-0001 cells in two centers (Hospital Clinic of Barcelona for adults and Hospital Sant Joan de Déu of Barcelona for pediatrics)

from January 2019 to September 2021, including patients treated in the CART19-BE-01 trial (trial registered as ClinicalTrials.gov: NCT03144583) and the consecutive CUP.^{4,28} The CART19-BE-01 study was a single-arm, multicenter, open-label pilot study evaluating the safety and efficacy of ARI-0001 cells (Figure 1) in patients with R/R B-cell malignancies. Eligible patients with ALL had to have all the following: (1) CD19-positive disease; (2) age from 2 to 80 years; (3) no CNS-3 involvement at infusion, although CNS-2 or CNS-3 that was controlled with intrathecal or systemic therapy prior to infusion was allowed (4) ECOG performance status 0–2; (5) estimated life expectancy from 3 months; and (6) adequate venous access. Patients were eligible if they suffered from ALL in second relapse or higher, or refractory to at least 2 lines of therapy, either ineligible for or with relapsed disease after alloHCT. Key exclusion criteria included history of other malignancy unless it had been in remission for more than 3 years; severe renal, hepatic, pulmonary, or cardiac impairment; active immunosuppressive therapy; HIV infection; active HBV or HCV infection; and active infection requiring systemic therapy. All patients provided written, informed consent. The Spanish Agency of Medicines and Sanitary Products (AEMPS) and Institutional Review Boards/Ethics Committees of each study site approved the trial and the CUP, which were conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki (last updated version, Fortaleza, Brazil, 2013).

For the purpose of this analysis, patients were selected if, at study inclusion, they had detectable disease in the cerebrospinal fluid (CSF)

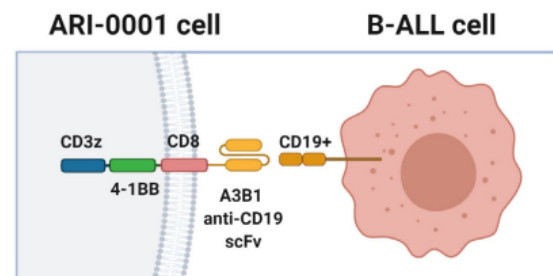


FIGURE 1 Diagram of ARI-0001 cells depicting the construct and the interaction of the CAR with the tumor cell

or by imaging studies and normal peripheral blood and bone marrow (less than 5% of blasts by morphology and negative measurable residual disease [MRD] by flow cytometry, with a minimum sensitivity of 0.01%).

TABLE 1 Baseline characteristics of patients included in this study

Characteristic	n = 18
Age (year), median (range)	27 (8–68)
Female sex, n (%)	5 (28%)
Abnormal cytogenetics, n (%)	12 (67%)
pH chromosome [t(9;22)]	2 (11%)
t(12;21)	2 (11%)
t(1;19)	1 (5%)
pH-like (CRLF2 rearrangement)	1 (5%)
t(8;14)	1 (5%)
Other	5 (28%)
Blast count in bone marrow at screening, median (range)	1% (0–4%)
Prior lines of therapy, median (range)	4.5 (2–6)
Prior blinatumomab, n (%)	6 (33%)
Prior inotuzumab ozogamicin, n (%)	9 (50%)
Prior allogeneic hematopoietic cell transplantation, n (%)	16 (89%)
Bridging chemotherapy ^a , n (%)	15 (83%)
Maintenance-like (e.g., 6-mercaptopurine, methotrexate)	5 (28%)
Intrathecal chemotherapy	3 (17%)
Tyrosine kinase inhibitors (dasatinib, ponatinib)	2 (11%)
Radiotherapy	2 (11%)
Inotuzumab ozogamicin	1 (5%)
Blinatumomab	1 (5%)
Intensive chemotherapy	8 (44%)
Extramedullary disease at screening ^a , n (%)	18 (100%)
Bone	7 (39%)
Cerebrospinal fluid	5 (28%)
Lymphadenopathy	3 (17%)
Breast	3 (17%)
Soft tissue	3 (17%)
Paranasal sinuses	2 (11%)
Muscle	2 (11%)
Mediastinum	2 (11%)
Lung	1 (6%)
Liver	1 (6%)
Stomach	1 (6%)
Pancreas	1 (6%)
Skin	1 (6%)

^aSome patients received more than one bridging therapy or had more than one extramedullary location and therefore the percentages do not sum 100%.

2.2 | Study design and endpoints

The primary endpoint of the CART19-BE-01 trial was safety as determined by procedure-related mortality (PRM) at day +100.⁴ Adverse events (AEs) of special interest were cytokine release syndrome (CRS) and immune-effector cell associated neurotoxicity syndrome (ICANS). Other AEs were retrospectively graded

TABLE 2 Adverse events of special interest or registered in >10% of patients included in this study

Adverse event	All grades, n (%)	Grade ≥ 3, n (%)
Lymphopenia	16 (89)	16 (89)
Hypogammaglobulinemia	16 (89)	0 (0)
Neutropenia	15 (83)	15 (83)
Anemia	12 (67)	1 (6)
Thrombocytopenia	11 (61)	7 (39)
Cytokine release syndrome	9 (50)	0 (0)
Increased AST	6 (33)	0 (0)
Increased ALT	6 (33)	1 (6)
Skin rash	6 (33)	1 (6)
Viral infection	5 (28)	1 (6)
Pyrexia	5 (28)	1 (6)
Increased GGT	4 (22)	1 (6)
Febrile neutropenia	4 (22)	3 (17)
Headache	4 (22)	0 (0)
Bronchitis	4 (22)	1 (6)
Increased alkaline phosphatase	3 (17)	0 (0)
Vomiting	3 (17)	0 (0)
Arthralgia	3 (17)	0 (0)
Peripheral edema	3 (17)	0 (0)
Dysgeusia	3 (17)	0 (0)
Water intoxication	3 (17)	0 (0)
Bacteremia	3 (17)	2 (11)
Pneumonia	2 (11)	2 (11)
Pulmonary aspergillosis	2 (11)	1 (6)
Tachycardia	2 (11)	0 (0)
Anorexia	2 (11)	0 (0)
Nausea	2 (11)	0 (0)
Hypotension	2 (11)	0 (0)
Bone pain	2 (11)	0 (0)
Coagulopathy	2 (11)	0 (0)
Abdominal pain	2 (11)	1 (6)
Pharyngitis	2 (11)	0 (0)
Otitis	2 (11)	0 (0)
ICANS	1 (6)	0 (0)

Abbreviation: ICANS, immune effector cell associated neurotoxicity syndrome.

according to common terminology criteria, version 4.0. For the purpose of this analysis, CRS and ICANS were retrospectively graded according with the ASTCT 2019 consensus grading guidelines.²⁹ Efficacy was analyzed using the NCCN criteria,³⁰ including bone marrow aspirate and CSF analysis; MRD assessment by flow cytometry; and PET-CT and MRI scanning in patients with known EMD. In selected patients with measurable disease by PET-CT, metabolic tumor volume was calculated as previously described.³¹ Secondary endpoints included objective and complete response rates (ORR/CRR), duration of response (DOR), progression-free survival (PFS), overall survival (OS) and duration of absolute B cell aplasia (BCA). The ORR/CRR was assessed at day +28, day +100, month +6, month +12 and month +18.

2.3 | ARI-0001 cell production and treatment

Patients were enrolled following screening and confirmation of eligibility and underwent a mononuclear cell collection using a Spectra Optia separator (Terumo BCT, Lakewood, CO). ARI-0001 cells were manufactured using the CliniMACS Prodigy system (Miltenyi).^{32,33} Approximately 100×10^6 T-cells were cultured and stimulated with IL-7, IL-15, anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Cells were then transduced with a lentiviral vector containing the CAR gene construct. The construct comprises the single chain variable fragment of the anti-CD19 A3B1 monoclonal

antibody attached to a transmembrane CD8 domain and 4-1BB/CD3z signaling domains (Figure 1). Following 6–9 days of expansion, the cell product was washed, cryopreserved,

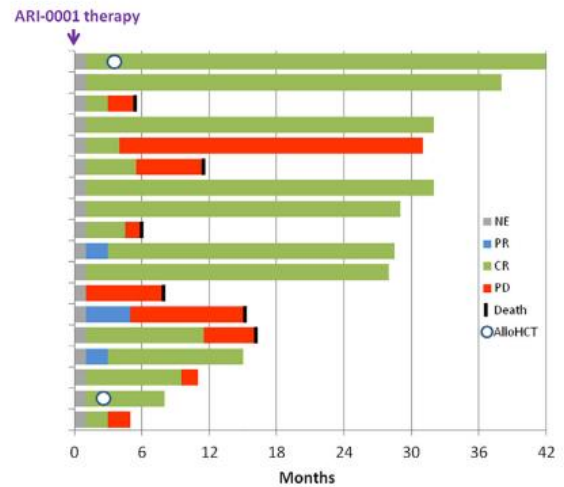


FIGURE 3 Swimmer plot for all patients with iEMD ($n = 18$). Green denotes complete remission, blue denotes partial remission, and red denotes refractory disease, progression, or relapse. Thick black lines denote “dead at last follow-up.” Open circle represent the occurrence of allogeneic hematopoietic cell transplantation

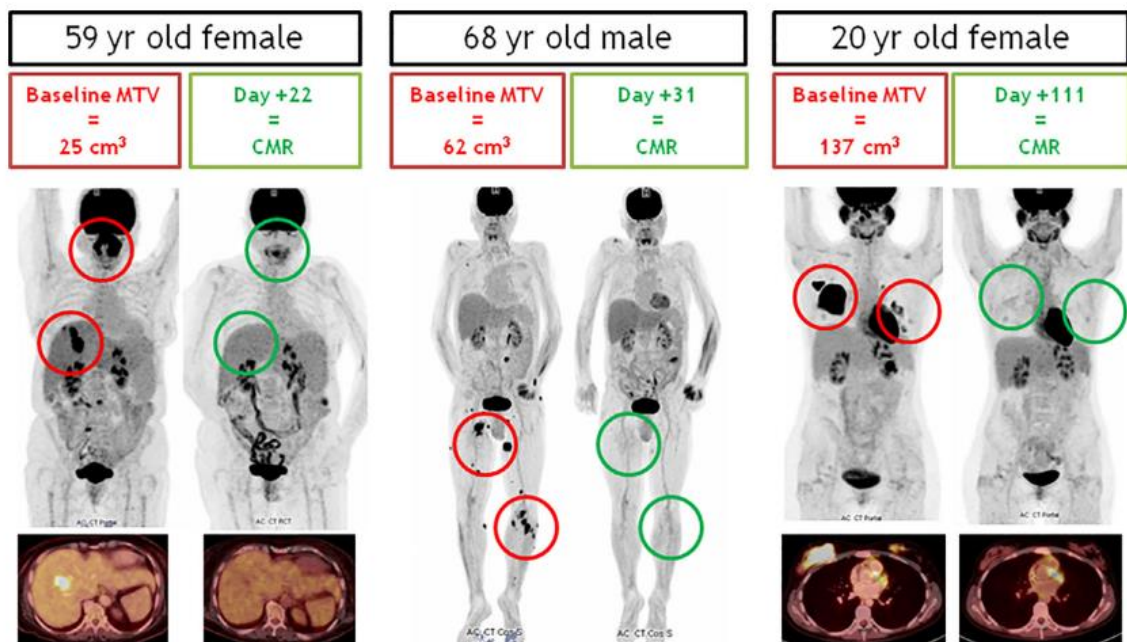


FIGURE 2 PET-CT scans of three different patients before and after ARI-0001 cell therapy. Post-therapy scans are those where the first complete metabolic response was documented, whenever that happened. Red circles highlight the most representative locations of abnormal [¹⁸F] fluorodeoxyglucose uptake before therapy, while green circles highlight the same locations after therapy. MTV, metabolic tumor volume; CMR, complete metabolic response

and tested for identity, potency, sterility, and adventitious agents.³²

Before ARI-0001 cell infusion, patients received fludarabine 30 mg/m²/day plus cyclophosphamide 300 mg/m²/day on days -6, -5, and -4 followed by a target dose of 1×10^6 ARI-0001 cells/kg. Even though the target dose changed during the CART19-BE-01 trial,⁴ all patients with iEMD received a target dose of 1×10^6 ARI-0001 cells/kg. The first patient with iEMD received a single intravenous infusion of ARI-0001 cells on day 0, whereas the remaining 17 patients received the first fraction (10%) of ARI-0001 cells on day 0, followed by the second (30%) and third (60%) fraction separated at least by 24 h each only if there were no signs or symptoms of CRS. This amendment was motivated by three

cases of lethal toxicity in the cohort of patients receiving a single intravenous infusion.⁴

2.4 | Statistical analysis

Response rates are presented with 95% exact Clopper-Pearson confidence intervals. PRM was calculated as a cumulative incidence considering disease relapse as a competing event. DOR, PFS, OS and duration of absolute BCA were plotted using the Kaplan-Meier method. Statistical analyses were performed using R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). The CART19-BE-01 trial (EUDRA no 2016-2972-29) is registered at clinicaltrials.gov (NCT03144583).

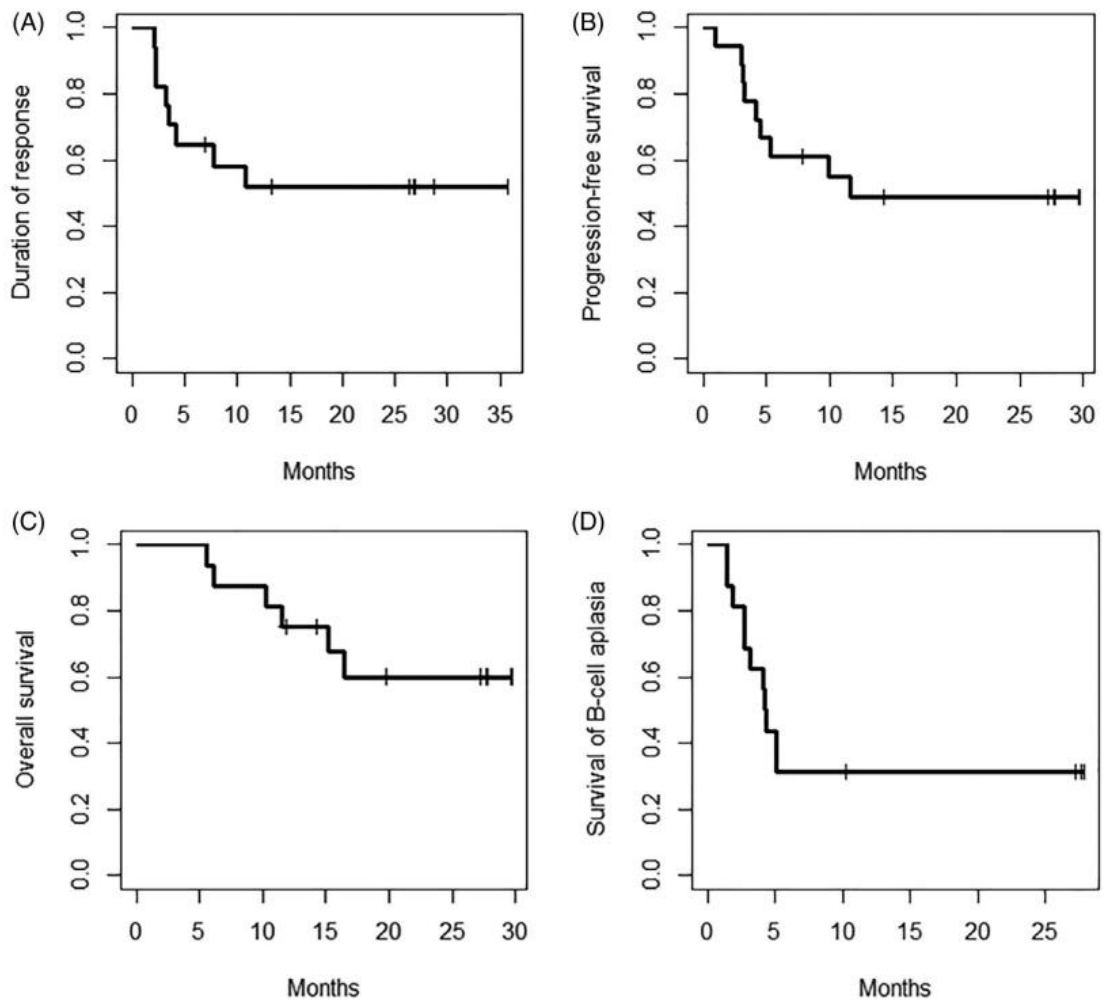


FIGURE 4 Clinical outcome of patients with acute lymphoblastic leukemia and iEMD in terms of (A) duration of response; (B) progression-free survival; (C) overall survival; and (D) survival of B-cell aplasia. Procedure-related mortality was not observed in the cohort and therefore not plotted

3 | RESULTS

3.1 | Baseline characteristics

A total of 59 patients (13 children, 46 adults) with R/R ALL were enrolled in the CART19-BE-01 study⁴ and the consecutive CUP. Of this, 18 (30%) patients with iEMD were identified. Table 1 displays their baseline characteristics. Median age at infusion was 27 years (range, 8–68), including 5 (28%) pediatric patients. All were highly pretreated, including prior alloHCT in 16 (89%) cases. Moreover, 15 (83%) patients required bridging chemotherapy while ARI-0001 cells were manufactured. Median bone marrow blast count at screening was 1% (range, 0–4) by morphologic assessment, with all patients having negative MRD by flow cytometry (0.01% sensitivity). Isolated EMD was detected by PET-CT in 78% (14/18) and CSF analysis in 28% (5/18). Patients received therapy a median of 50 days (range, 33–169) after study inclusion (i.e., signature of informed consent), and the median vein-to-vein time was 42.5 days (range, 26–166). In four patients, ARI-0001 cells were infused beyond 2 months of apheresis because of technical problems (e.g., bacterial contamination, defective viral transduction) leading to a second manufacturing procedure in three patients, and temporary interruption of the CART19-BE-01 trial in one patient.⁴ The cutoff date was October 2021. At that time, the median follow-up for survivors was 26.7 months (range, 4.6–49.0) from ARI-0001 cell infusion and 28.6 months (range, 5.8–50.8) from study inclusion.

3.2 | Toxicity

CRS (any grade) occurred in 9/18 patients (50%, 95% confidence interval [CI]: 26%–74%), with a median onset time of 3 days (range, 0–6), and a median duration of 2 days (range 0–10) (Table 2). There were no cases of grade ≥ 3 CRS and 1 case (6%) of grade 1 ICANS.

Tocilizumab was administered to one patient (6%) with grade 2 CRS. No patient received steroids for the treatment CRS or ICANS. Grade ≥ 3 neutropenia was observed in 15 patients (83%, 95% CI: 59%–96%), with a median duration of 8 days.^{3–18} There was one case (6%, 95% CI: 14%–27%) of grade ≥ 3 anemia, and there were seven cases (39%, 95% CI: 20%–61%) of grade ≥ 3 thrombocytopenia. We did not observe any procedure-related deaths in this cohort. Hypogammaglobulinemia (any grade) was documented in 16 patients (89%, 95% CI: 65%–99%) at 1 month, including 10 patients (56%, 95% CI: 31%–79%) with an IgG concentration lower than 4 g/L.

3.3 | Efficacy

The best ORR at any time was 94% (95% CI: 73%–99%), with a CRR of 78% (95% CI: 52%–94%). All patients with CSF infiltration achieved a CR. In patients with PET-positive disease, complete metabolic responses were observed as soon as 3 weeks and as late as 4 months after infusion (Figure 2). Two thirds of patients with initial partial metabolic responses eventually achieved a complete metabolic response (Figure 3). Bone marrow and peripheral blood were also evaluated, even though there was no measurable disease at study inclusion. These assessments revealed a MRD-negative CRR of 94% (95% CI: 73%–99%) and 78% (95% CI: 52%–94%) at day +28 and +100, respectively. DOR, PFS and OS were 52% (95% CI: 32%–83%), 49% (95% CI: 30%–79%) and 61% (95% CI: 40%–92%) at 2 years (Figure 4). Median duration of absolute BCA was 4.3 months (2.8-NE). Two patients received an alloHCT at day +142 and +151 post ARI-0001 treatment. The cumulative incidence of relapse/progression was 51% at 2 years (95% CI: 26%–76%), all of which were CD19-positive. BCA loss preceded relapse/progression in 8/9 (89%) of patients from the series. All patients with relapsed/progressive

TABLE 3 Toxicity and efficacy of ARI-0001 cells in patients included in this study according to their age

	≤ 18 years N = 5	> 18 years N = 13	≤ 25 years N = 8	> 25 years N = 10
Toxicity				
CRS (any grade), % (95% CI)	80 (28–99)	38 (14–68)	63 (24–91)	40 (12–74)
CRS (grade ≥ 3), % (95% CI)	0 (0–52)	0 (0–25)	0 (0–37)	0 (0–31)
ICANS (any grade), % (95% CI)	20 (1–72)	0 (0–25)	13 (0–53)	0 (0–31)
ICANS (grade ≥ 3), % (95% CI)	0 (0–52)	0 (0–25)	0 (0–37)	0 (0–31)
Efficacy				
Absence of MRD at day +28, % (95% CI)	100 (48–100)	92 (64–99)	100 (63–100)	90 (56–99)
Absence of MRD at day +100, % (95% CI)	80 (28–99)	77 (46–95)	88 (47–99)	70 (35–93)
Duration of BCA at 2 years, % (95% CI)	67 (30–100)	23 (9–62)	33 (11–100)	30 (12–77)
DOR at 2 years, % (95% CI)	80 (18–92)	42 (21–81)	75 (50–100)	33 (13–84)
PFS at 2 years, % (95% CI)	80 (18–92)	39 (19–77)	75 (50–100)	30 (12–77)
OS at 2 years, % (95% CI)	100 (NE)	50 (27–89)	100 (NE)	36 (15–87)

Abbreviations: BCA, B-cell aplasia; CRS, cytokine release syndrome; DOR, duration of response; ICANS, immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome; MRD, measurable residual disease (determined by flow cytometry in blood, marrow and cerebrospinal fluid); NE, not estimable; OS, overall survival; PFS, progression-free survival.

disease had EMD again, mostly in the original location, and five of them (56%) also had marrow disease upon relapse. Toxicity and efficacy results according to patients' age are displayed in Table 3.

4 | DISCUSSION

Thanks to the CART19-BE-01 trial, ARI-0001 cells are currently approved in Spain for the treatment of patients with R/R ALL older than 25 years of age under the Hospital Exemption Clause.³⁴ The drug was approved in February 2021 and the price/reimbursement was agreed with the Ministry of Health in June 2021. Our trial and the subsequent CUP have allowed for the inclusion of patients with iEMD, which had been excluded from many academic and commercially sponsored clinical trials. This is, therefore, one of the first series of patients with R/R ALL with iEMD treated with CART19-cells.

There are several aspects that characterize our population when compared with other similar reports¹⁹⁻²¹: (i) a high proportion (75%) of patients with prior exposure to blinatumomab and/or inotuzumab-ozogamicin; (ii) a high proportion (89%) of patients with who had already received an alloHCT; and (iii) the systematic evaluation by PET-CT and/or CSF analysis besides conventional blood and marrow analysis.

In our hands, the procedure was feasible, with 78% of patients receiving ARI-0001 cell therapy within 2 months from apheresis, and the entire cell production being accomplished with one procedure in 83% of patients. In terms of safety, we observed a 50% incidence of CRS with no cases of grade ≥ 3 CRS, which is comparable with similar studies.^{19,21-23} It must be noted, however, that all patients from our iEMD cohort except one received ARI-0001 cells in a fractionated manner, which has been associated with a lower CRS rate compared to the original single-dose administration.⁴ Besides fractionation, we also believe that the absence of bone marrow infiltration may play a role in the very low severe CRS rate, as observed by others.^{1,2,5,6,35} Similar to our previous report, ARI-0001 therapy did not seem to cause any significant ICANS, not even in those patients with CNS disease. All in all, the safety of our product seemed in line, if not better, with what has been reported for other CART19 products in a similar clinical context.¹⁹⁻²²

Efficacy was also comparable with other studies, with a 78% CRR including negative CSF and/or PET-CT, and a 2-year PFS rate of 49%. This PFS rate is particularly relevant because only two patients from this cohort underwent alloHCT while on CR and, therefore, the efficacy of our product is generally not confounded by subsequent therapy. Of note, EMD may take longer to respond to CART19-cells, as seen in some of our patients (Figures 2 and 3) and also, pseudo-progression may occur, complicating scan interpretation. Indeed, there is very little experience worldwide with the use of PET-CT in patients with ALL but, despite the difficulties, this technology has been very useful in our hands, and we believe it should be incorporated into the assessment of patients with ALL and EMD in the same way it is used for patients with lymphoma.

We measured the duration of absolute BCA in peripheral blood as a surrogate marker of ARI-0001 persistence and observed a median duration of 4.3 months in this patient population. Although this was equivalent to what we have seen in patients with ALL and marrow disease (data not shown) and other trials,^{5,6,8,11} it is also true that most relapses we observed were CD19-positive and were preceded by BCA loss. Moreover, the pattern of BCA loss followed by CD19-positive relapse has been frequently observed in patients with low tumor burden.³⁶ We therefore believe that our efforts should focus on improving ARI-0001 cell persistence and, indeed, we are already testing a higher cell dose (3×10^6 cells/kg) in subsequent phase 2 trials intended for both adult and pediatric patients with ALL.

In conclusion, the administration of ARI-0001 therapy in patients with R/R CD19-positive ALL with iEMD achieved safety and efficacy outcomes that are comparable with similar products in patients with the more conventional marrow disease. We believe ARI-0001 cells constitute a potential therapeutic option in this situation of high unmet medical need. In February 2021, ARI-0001 cell therapy was approved, under the Hospital Exemption Clause, by the Spanish Medicines Agency (AEMPS) for patients with R/R ALL older than 25 years, including patients with iEMD. This is the first purely academic CAR-T product to ever receive approval in a European Union country.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the patients who participated in the study and their families, friends, caregivers, and referring physicians. We are also indebted to the study staff and health care providers at Hospital Clinic of Barcelona and Hospital Sant Joan de Déu.

CONFLICT OF INTERESTS

Valentín Ortiz-Maldonado: consultant or advisory role (Kite Gilead, Celgene-BMS, Novartis, Janssen), travel grants (Kite Gilead, Celgene, Novartis, Roche, Takeda, Janssen), honoraria (Kite Gilead). Anna Alonso-Saladrigues: consultant or advisory role (Novartis), travel grants (Novartis), honoraria (Novartis). Anna Faura: consultant or advisory role (Novartis), travel grants (Novartis), honoraria (Novartis). Albert Català: consultant or advisory role (Novartis, Celgene), travel grants (Novartis, Celgene), honoraria (Novartis, Celgene). Eva Giné: consultant or advisory role (Kite Gilead, Janssen, Roche), research funding (Kite Gilead, Janssen, Roche). Marina Díaz-Beyá: consultant or advisory role (Celgene, Novartis, Jazz, Astellas). Alexandra Martínez-Roca: consultant or advisory role (Bristol Myers Squibb, Abbvie), travel grants (Kite Gilead, Abbvie, Janssen), speakers' bureau (Gilead, Abbvie); Luis Gerardo Rodríguez-Lobato: travel grants (Janssen, Amgen), honoraria (Janssen); Enric García-Rey: honoraria (Novartis). Miquel Lozano: consultant or advisory role (Grifols), research funding (Terumo BCT, Sanofi-Genzyme, MacoPharma). María Rozman: consultant or advisory role (Novartis). Xavier Setoain: consultant or advisory role (General Electric, Takeda). Jordi Esteve: consultant or advisory role (Abbvie, Novartis, Celgene, Astellas, Jazz, Daiichi Dankyo, Roche, Amgen, Pfizer), travel grants (Celgene, Roche, Astellas, Daiichi Dankyo), research funding (Novartis, Celgene). Álvaro Urbano-Ispizua:

consultant or advisory role (Kite Gilead, Celgene, Miltenyi), travel grants (Kite Gilead, Celgene). Manel Juan: consultant or advisory role (Kite Gilead, Grifols), honoraria (Kite Gilead, Grifols). Sonia Rodríguez: consultant or advisory role (Novartis, Jazz, Shire/Servier, Amgen, Collectis, Celgene/Bristol Myers Squibb), travel grants (Novartis, Jazz, Shire/Servier, Amgen, Celgene), honoraria (Novartis, Jazz, Celgene, Shire/Servier, Amgen). Marta Español-Rego, Nuria Martínez-Cibrián, Laura Magnano, Daniel Benítez-Ribas, Juan Gonzalo Correa, Joan Cid, Montserrat Rovira, Mercedes Montoro-Lorite, Raquel Cabezón, Enric Garcia-Rey, Georgina Pedrals, María Rozman, Susana Rives, Mariona Pascal and Julio Delgado have no competing interests to disclose.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Valentín Ortiz-Maldonado, Julio Delgado, and Susana Rives designed the clinical trial and wrote the paper; Jordi Esteve, Manel Juan, and Álvaro Urbano-Ispizua provided significant contribution to the study analysis; Valentín Ortiz-Maldonado, Nuria Martínez-Cibrián, Jordi Esteve, Luis Gerardo Rodríguez-Lobato, Eva Giné, Juan Gonzalo Correa, Marina Diaz-Beyá, Laura Magnano, Mercedes Montoro-Lorite, Montserrat Rovira, Alexandra Martínez-Roca and Julio Delgado looked after adult patients; Susana Rives, Anna Alonso-Saladrigues, Albert Català, Anna Faura, Nuria Conde and Georgina Pedrals looked after pediatric patients; Marta Español-Rego, Daniel Benítez-Ribas, Mariona Pascal, Raquel Cabezón and Manel Juan manufactured and monitored ARI-0001 cells; Xavier Setoain and Sonia Rodríguez evaluated PET-CT scans; María Rozman and Montserrat Torredadell performed morphologic and immunophenotypic evaluation of CSF and blood or marrow samples; Joan Cid, Enric Garcia-Rey and Miquel Lozano performed leukocytaphereses; Julio Delgado performed the statistical analysis. All authors reviewed the study data, read, and approved the manuscript.

PATIENT CONSENT

All patients treated with ARI-0001 cells (CART19-BE-01 trial or compassionate use program) provided informed consent in writing.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Julio Delgado  <https://orcid.org/0000-0002-5157-4376>

REFERENCES

- Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*. 2014;371(16):1507-1517.
- Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(5):439-448.
- Shah NN, Lee DW, Yates B, et al. Long-term follow-up of CD19-CAR T-cell therapy in children and young adults with B-ALL. *J Clin Oncol*. 2021;39:1650-1659.
- Ortiz-Maldonado V, Rives S, Castellà M, et al. CART19-BE-01: a multicenter trial of ARI-0001 cell therapy in patients with CD19+ relapsed/refractory malignancies. *Mol Ther*. 2021;29(2):636-644.
- Frey NV, Shaw PA, Hexner EO, et al. Optimizing chimeric antigen receptor T-cell therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2020;38(5):415-422.
- Park JH, Rivière 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.
- Curran KJ, Margossian SP, Kernan NA, et al. Toxicity and response after CD19-specific CAR T-cell therapy in pediatric/young adult relapsed/refractory B-ALL. *Blood*. 2019;134(26):2361-2368.
- Gardner RA, Finney O, Annesley C, et al. Intent to treat leukemia remission by CD19CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults. *Blood*. 2017;129(25):3322-3331.
- Gardner RA, Ceppl F, Rivers J, et al. Preemptive mitigation of CD19 CAR T-cell cytokine release syndrome without attenuation of antileukemic efficacy. *Blood*. 2019;134(24):2149-2158.
- Turtle CJ, Hanafi L-A, Berger C, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest*. 2016;126(6):2123-2138.
- Hay KA, Gauthier J, Hirayama AV, et al. Factors associated with durable EFS in adult B-cell ALL patients achieving MRD-negative CR after CD19 CAR T-cell therapy. *Blood*. 2019;133(15):1652-1663.
- Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2014;385(9967):517-528.
- Lee KH, Lee JH, Kim S, Lee JS, Kim SH, Kim WK. High frequency of extramedullary relapse of acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2000;26(2):147-152.
- Lau KM, Saunders IM, Goodman AM. Characterization of relapse patterns in patients with acute lymphoblastic leukemia treated with blinatumomab. *J Oncol Pharm Pract*. 2021;27(4):821-826.
- Nguyen K, Devidas M, Cheng SC, et al. Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study. *Leukemia*. 2008;22(12):2142-2150.
- Gaudichon J, Jakobczyk H, Debaize L, et al. Mechanisms of extramedullary relapse in acute lymphoblastic leukemia: reconciling biological concepts and clinical issues. *Blood Rev*. 2019;36:40-56.
- Shem-Tov N, Saraceni F, Danylesko I, et al. Isolated Extramedullary relapse of acute leukemia after allogeneic stem cell transplantation: different kinetics and better prognosis than systemic relapse. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23(7):1087-1094.
- Sakellari I, Gavrilaki E, Batsis I, et al. Isolated Extramedullary relapse as a poor predictor of survival after allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25(9):1756-1760.
- An F, Wang H, Liu Z, et al. Influence of patient characteristics on chimeric antigen receptor T cell therapy in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Commun*. 2020;11(1):5928.
- Zhang X, Lu XA, Yang J, et al. Efficacy and safety of anti-CD19 CAR T-cell therapy in 110 patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia with high-risk features. *Blood Adv*. 2020;4(10):2325-2338.
- Rubinstein JD, Krupski C, Nelson AS, O'Brien MM, Davies SM, Phillips CL. Chimeric antigen receptor T cell therapy in patients with multiply relapsed or refractory extramedullary leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020;26(11):e280-e285.
- Weng J, Lai P, Qin L, et al. A novel generation 1928zT2 CAR T cells induce remission in extramedullary relapse of acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):25.
- Zhang H, Hu Y, Wei G, Wu W, Huang H. Successful chimeric antigen receptor T cells therapy in extramedullary relapses of acute lymphoblastic leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2020;55(7):1476-1478.
- Myers RM, Taraseviciute A, Steinberg SM, et al. Blinatumomab non-response and high-disease burden are associated with inferior outcomes after CD19-CAR for B-ALL. *J Clin Oncol*. Published online November 12, 2021. doi:10.1200/JCO.21.01405.

25. Zhang X, Yang J, Li J, et al. Factors associated with treatment response to CD19 CAR-T therapy among a large cohort of B cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Immunol Immunother.* 2022;21(3):689-703.
26. Wan X, Yang X, Yang F, et al. Outcomes of anti-CD19 CAR-T treatment of pediatric B-ALL with bone marrow and extramedullary relapse. *Cancer Res Treat.* Published online September 17, 2021. doi:10.4143/crt.2021.399
27. Schultz LM, Baggott C, Prabhu S, et al. Disease burden affects outcomes in pediatric and young adult B-cell lymphoblastic leukemia after commercial tisagenlecleucel: a pediatric real-world chimeric antigen receptor consortium report. *J Clin Oncol.* Published online December 09, 2021. doi:10.1200/JCO.20.03585
28. Ortiz-Maldonado V, Rives S, Español-Rego M, et al. Factors associated with the clinical outcome of patients with relapsed/refractory CD19+ acute lymphoblastic leukemia treated with ARI-0001 CART19-cell therapy. *J Immunother Cancer.* 2021;9(12):e003644.
29. Lee DW, Santomasso BD, Locke FL, et al. ASTCT consensus grading for cytokine release syndrome and neurologic toxicity associated with immune effector cells. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019;25(4):625-638.
30. Alvarnas JC, Brown PA, Aoun P, et al. Acute lymphoblastic leukemia, version 2.2015: clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Cancer Netw.* 2015;13(10):1240-1279.
31. Rivas-Delgado A, Nadeu F, Enjuanes A, et al. Mutational landscape and tumor burden assessed by cell-free DNA in diffuse large B-cell lymphoma in a population-based study. *Clin Cancer Res.* 2021;27(2):513-521.
32. Castella M, Boronat A, Martín-Ibáñez R, et al. Development of a novel anti-CD19 chimeric antigen receptor: a paradigm for an affordable CAR T cell production at academic institutions. *Mol Ther - Methods Clin Dev.* 2019;12:134-144.
33. Castella M, Caballero-Baños M, Ortiz-Maldonado V, et al. Point-of-care CAR T-cell production (ARI-0001) using a closed semi-automatic bioreactor: experience from an academic phase I clinical trial. *Front Immunol.* 2020;11:482.
34. Juan M, Delgado J, Calvo G, Trias E, Urbano-Ispizua A. Is hospital exemption an alternative or a bridge to European medicines agency for developing academic chimeric antigen receptor T-cell in Europe? Our experience with ARI-0001. *Hum Gene Ther.* 2021;32(19-20):1004-1007.
35. Turtle CJ, Hay KA, Hanafi L-A, et al. Durable molecular remissions in chronic lymphocytic leukemia treated with CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells after failure of Ibrutinib. *J Clin Oncol.* 2017;35(26):3010-3020.
36. Dourthe ME, Rabian F, Yakouben K, et al. Determinants of CD19-positive vs CD19-negative relapse after tisagenlecleucel for B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2021;35:3383-3393.

How to cite this article: Ortiz-Maldonado V, Alonso-Saladrigues A, Español-Rego M, et al. Results of ARI-0001 CART19 cell therapy in patients with relapsed/refractory CD19-positive acute lymphoblastic leukemia with isolated extramedullary disease. *Am J Hematol.* 2022;1-9. doi:10.1002/ajh.26519

Artículo nº4:

4.4. Results of ARI-0001 CART19 Cells in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia and Richter's Transformation. (168)

Valentín Ortiz-Maldonado, Gerard Frigola, Marta Español-Rego, Olga Balagué, Nuria Martínez-Cibrián, Laura Magnano, Eva Giné, Mariona Pascal, Juan Gonzalo Correa, Alexandra Martínez-Roca, Joan Cid, Miquel Lozano, Neus Villamor, Daniel Benítez-Ribas, Jordi Esteve, Armando López-Guillermo, Elías Campo, Álvaro Urbano-Ispizua, Manel Juan, Julio Delgado.

Frontiers in Oncology. 2022 Jan 31;12:828471. doi: 10.3389/fonc.2022.828471. PMID: 35174095; PMCID: PMC8841853.

Resumen:

Se evaluó la administración de células ARI-0001 en los primeros 9 pacientes consecutivos con LLC R/R incluidos en el Hospital Clínic de Barcelona para tratamiento con células ARI-0001, seis de ellos con TR R/R concomitante, incluyendo pacientes tratados en el ensayo CART19-BE-01 y el PUC consecutivo. Los pacientes tratados tenían una mediana de edad 58 años (rango: 47-74), y tenían una mediana de 4 líneas previas de tratamiento (rango: 3-6). El tratamiento previo incluía ibrutinib y venetoclax en 8/9 (89%) y 5/9 (56%) pacientes, respectivamente. Todos menos 1 paciente (n=8) recibieron tratamiento de linfodepleción con ciclofosfamida (900mg/m²) y fludarabina (300mg/m²) seguidos de la administración de una dosis de 0,4-5 x10⁶ células ARI-0001/kg. La mediana del tiempo de vena a vena fue de 27 días (rango: 22-81). La dosis objetivo fue de 1 x10⁶ y 5 x10⁶ células ARI-0001/kg para los pacientes con LLC y LLC/RT, respectivamente.

Tres pacientes recibieron finalmente el 10-40% (0,4-0,5 x10⁶ células/kg), según el protocolo, debido al desarrollo de SLC. En cuanto a seguridad, no hubo episodios de MRP en esta serie de pacientes. En cuanto al SLC, se observó una incidencia de SLC del 87,5% (intervalo de confianza [IC] del 95%: 47-99%), con una tasa de SLC grado ≥3 del 12,5% (IC del 95%: 0,3-53%) observado en 1

paciente. Dicho caso de SLC grave recibió una dosis de $0,4 \times 10^6$ células/kg (40% dosis objetivo original). Tres pacientes (37,5%) recibieron tratamiento con tocilizumab. Por otro lado, no se objetivaron casos de neurotoxicidad.

En cuanto a eficacia, todos los pacientes tratados alcanzaron una aplasia absoluta de linfocitos B (ALB), cuya mediana de duración no se ha alcanzado (75% [IC del 95%: 50-100%] al año). Siete pacientes (87,5%; IC del 95%: 47-99%) respondieron según criterios de iwCLL/Lugano (RC, n = 4; RP, n = 3), mientras que un paciente con TR permaneció con enfermedad estable como mejor respuesta. Todos los pacientes alcanzaron una RC con EMR indetectable en sangre periférica y médula ósea. Con una mediana de seguimiento de 5,6 (rango, 1,2-45,3) meses, dos pacientes con TR que no habían alcanzado una RCM presentaron una progresión CD19-negativa en los ganglios linfáticos objetivada a 2,1 y 3,0 meses tras la administración del ARI-0001. Teniendo en cuenta a los 9 pacientes incluidos, la SG a 2 años fue del 62,5% (IC del 95%: 32-100%) desde la administración de células ARI-0001 y 51,4% (IC del 95%: 24-100%) desde la inclusión en el programa.

En conclusión, los resultados obtenidos con ARI-0001 fueron comparables a los de otros ensayos clínicos y pequeñas series de pacientes con LLC/TR tratados con productos CAR-T similares, que han alcanzado TRG en torno al 38-82% y TRC en torno al 20-45%. En nuestra experiencia, las células ARI-0001 pudieron elaborarse en todos los pacientes y pudieron ser infundidas en el 89% de ellos. Nuestros resultados sugieren que la administración de ARI-0001 es factible, segura y eficaz en pacientes con LLC o TR R/R.



Results of ARI-0001 CART19 Cells in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia and Richter's Transformation

Valentín Ortiz-Maldonado^{1,2}, Gerard Frigola³, Marta Español-Rego⁴, Olga Balagué^{2,3}, Nuria Martínez-Cibrián¹, Laura Magnano^{1,2}, Eva Giné^{1,2,5}, Mariona Pascal⁴, Juan G. Correa¹, Alexandra Martínez-Roca¹, Joan Cid^{2,6}, Miquel Lozano^{2,6,7}, Neus Villamor^{2,5,8}, Daniel Benítez-Ribas^{2,4}, Jordi Esteve^{1,2,7,9}, Armando López-Guillermo^{1,2,5,7}, Elías Campo^{2,3,5,7,8}, Álvaro Urbano-Ispizua^{1,2,7,9}, Manel Juan^{2,4,7} and Julio Delgado^{1,2,5,7*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Massimo Gentile,
Cosenza Hospital, Italy

Reviewed by:

Paolo Ghia,
Vita-Salute San Raffaele
University, Italy
Yi Luo,
Zhejiang University, China

*Correspondence:

Julio Delgado
jdelgado@clinic.cat

Specialty section:

This article was submitted to
Hematologic Malignancies,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 03 December 2021

Accepted: 12 January 2022

Published: 31 January 2022

Citation:

Ortiz-Maldonado V, Frigola G, Español-Rego M, Balagué O, Martínez-Cibrián N, Magnano L, Giné E, Pascal M, Correa JG, Martínez-Roca A, Cid J, Lozano M, Villamor N, Benítez-Ribas D, Esteve J, López-Guillermo A, Campo E, Urbano-Ispizua Á, Juan M and Delgado J (2022) Results of ARI-0001 CART19 Cells in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia and Richter's Transformation. *Front. Oncol.* 12:828471. doi: 10.3389/fonc.2022.828471

¹ Department of Hematology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain, ² Oncology and Hematology, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain, ³ Department of Pathology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁴ Department of Immunology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁵ Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Barcelona, Spain, ⁶ Apheresis & Cell Therapy Unit, Department of Hemotherapy and Hemostasis, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁷ Department of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain, ⁸ Hematopathology Unit, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁹ Stem Cell Transplant and Cell Immunotherapy Group, Institute of Research Josep Carreras, Barcelona, Spain

CART19 cells are emerging as an alternative therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). Here we report the outcome of nine consecutive patients with CLL treated with ARI-0001 CART19 cells, six of them with Richter's transformation (RT). One patient with RT never received therapy. The cytokine release syndrome rate was 87.5% (12.5% grade ≥ 3). Neurotoxicity was not observed in any patient. All patients experienced absolute B-cell aplasia, and seven (87.5%) responded to therapy. With a median follow-up of 5.6 months, two patients with RT experienced a CD19-negative relapse. In conclusion, ARI-0001 cell therapy was feasible, safe, and effective in patients with high-risk CLL or RT.

Keywords: CLL, CART, CD19, DLBCL, Richter disease

INTRODUCTION

Patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) who do not respond to targeted therapies have an unfavourable prognosis, particularly if tumor cells harbour high-risk genomic aberrations (e.g. *TP53* aberrations or complex karyotype) or the disease has transformed into diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), also known as Richter's transformation (RT) (1). Current guidelines recommend allogeneic hematopoietic cell transplantation (alloHCT) for patients with high-risk CLL or RT (1–3). Chimeric antigen receptor T-cells targeting CD19 (CART19) are also emerging as alternative options for these patients, even though there are currently no approved products for them.

At Hospital Clinic of Barcelona, we have developed our own CART19 product (A3B1:CD8:41BB : CD3z or ARI-0001), which has been recently approved by the Spanish Medicines Agency (AEMPS) for the treatment of patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia (ALL) older than 25 years of age (4).

The aim of this paper is to report the outcome of all consecutive patients with CLL treated with ARI-0001 cells, either within the CART19-BE-01 trial or a subsequent compassionate use program (CUP).

METHODS

Patient Eligibility and Clinical Trial Design

ARI-0001 cells are autologous T-cells transduced with a CD137-based second generation CAR construct designed to target CD19 (5). Full details of the ARI-0001 cell development, including its structure and phenotypic characteristics can be found elsewhere (5, 6). Two patients presented here were recruited into the CART19-BE-01 study (registered as NCT03144583) (7), and the remaining patients were included in a CUP with the same inclusion criteria: (i) CD19-positive B-cell malignancy (including DLBCL or CLL); (ii) age from 2 to 80 years; (iii) ECOG performance status 0-2; (iv) estimated life expectancy from 3 months to 2 years; and (v) adequate venous access (7). Patients with CLL were eligible if they had received a minimum of 2 lines of therapy, including rituximab, and experienced disease progression within 2 years of last therapy. Key exclusion criteria included history of other malignancy unless it had been in remission for more than 3 years; severe renal, hepatic, pulmonary or cardiac impairment; active immunosuppressive therapy; HIV infection; active HBV or HCV infection; and active infection requiring systemic therapy. Of note, neither central nervous system involvement nor prior alloHCT were exclusion criteria for this trial.

Whenever feasible, patients with CLL/RT were asked to take ibrutinib, at the approved dose or less in case of intolerance, for a minimum of two weeks until leukocytapheresis. Before ARI-0001 cell infusion, patients received fludarabine at 30 mg/m²/day plus cyclophosphamide at 300 mg/m²/day on days -6, -5, and -4 followed by ARI-0001 cells. The first patient received a single intravenous infusion of ARI-0001 cells, at a dose of 1 × 10⁶ cells/kg, on day 0. The remaining patients received a fractionated target dose of 1 × 10⁶ cells/kg (patients with CLL only) or 5 × 10⁶ cells/kg (patients with RT). The first fraction (10%) of ARI-0001 cells was administered on day 0, followed by the second (30%) and third (60%) fraction 24-48 hours after the first and second fraction, respectively, if the patient had no signs or symptoms of cytokine release syndrome (CRS). The implementation of the fractionated administration of ARI-0001 cells was motivated by 3 toxic deaths, all in patients with ALL (7). Intravenous immunoglobulin (Ig) replacement was recommended in case of IgG determinations lower than 4 g/L.

All patients provided written, informed consent. The AEMPS and our Institutional Review Board approved the trial, which was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki (last updated version, Fortaleza, Brazil, 2013).

Measurement of ARI-0001 Cells and CAR19 Transgene

ARI-0001 cells presence was evaluated by flow cytometry with an APC-conjugated AffiniPureF(ab')₂-fragment goat-anti-mouse IgG monoclonal antibody (goat-anti-mouse IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories). Moreover, a quantitative PCR assay was optimized and validated for monitoring ARI-0001 cell expansion and persistence. The number of transgene copies/cell was determined by quantitative real-time PCR, using Light Cycler[®] 480 SYBRGreen[®] I Master (Roche, Cat. N. 04707516001). Pairs of primers were designed against the GATA2 gene (control) and WPRE sequence (part of the transgene). Primer sequences are as follows: GATA2_F: 5'tggcgcacaactacatggaa 3'; GATA2_R: 5'cgagtcgaggtgattgaagaaga 3'; WPRE_F: 5'gtccttccatggctgctc 3'; WPRE_R: 5'ccgaaggagcagtagcaga 3'. The absolute quantification method was used to determine copy number. Standard curves were prepared using 1:10 serial dilutions of plasmids containing GATA2 or transgene. The final number of molecules in the reaction ranged from 10² to 10⁸ molecules. For GATA2 quantification, GATA2 cDNA was cloned in a pCRII-Topo vector (Invitrogen). pCCL-CAR19 vector was used in the same way to quantify transgene copy number. The following PCR program was used: 1) Initial denaturalization: 95°C, 5'; 2) 40 cycles of: 95°C, 10"; 58°C, 10"; 72°C, 5"; 3) melting curve.

Endpoints and Statistical Analysis

The primary endpoint of the CART19-BE-01 trial was safety as determined by procedure-related mortality (PRM) and grade 3-4 toxicity at day +100 and one year. Adverse events of special interest were cytokine release syndrome (CRS), neurotoxicity [currently known as immune effector-cell associated neurotoxicity syndrome (ICANS)] and second primary malignancies. Adverse events were graded according to common terminology criteria (CTC), version 4.0. CRS was originally graded as per Lee et al. (8), but was later retrospectively reassessed using ASTCT criteria (9).

Secondary endpoints were objective response rate (ORR) and complete response rate (CRR) at day +28 and +100, duration of response (DOR), duration of B-cell aplasia (DBCA), progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). ORR/CRR were assessed as per iwCLL (10) and Lugano (11) criteria as appropriate. Measurable residual disease (MRD) was determined in peripheral blood and bone marrow by flow cytometry, with a sensitivity of 10⁻⁴.

Adverse events and response rates are presented with 95% exact Clopper-Pearson confidence intervals. OS, PFS, DOR and DBCA, were plotted using the Kaplan-Meier method. Due to the open-label non-randomized nature of the study, the statistical analysis was descriptive and no formal comparisons between cohorts are provided. Statistical analyses were performed using SAS version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC) and R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). The trial (EUDRA n° 2016-2972-29) was registered at clinicaltrials.gov (NCT03144583).

RESULTS

We report the outcome of nine consecutive patients with CLL treated with ARI-0001 cells, six of them with concomitant RT (Table 1). In patients with RT, tumor histology was consistent

TABLE 1 | Patients' baseline characteristics, toxicity and outcome of patients with CLL, with or without RT, who were included in the ARI-0001 program (CART19-BE-01 trial or compassionate use).

Pt	Sex	Age	Prior therapy	IGHV	Genomic aberrations	IPI	Dose infused (x10 ⁶ /kg)	CRS grade	ICANS grade	Response (iwCLL)	Outcome
1	F	53	FCR, BR, I, V, IdR, O	U 13q-	-	-	1	1	0	PR	Alive and disease-free (45.4+ mo)
2	M	57	BR, R-CHOP, I, IdR, V	U 17p-, NOTCH1 and TP53 mutations	L	L	5	1	0	CR	Alive and disease-free (26.7+ mo)
3	F	51	R-CHOP, R-ESHAP, RIE	NA 17p-, t(11;21)	HI	HI	-	-	-	-	Died while awaiting infusion (delayed due to COVID-19 pandemic)
4	M	72	Ch, BR, I, CHOP	U TP53 mutation	HI	HI	0.5	2	0	CR	Alive and disease-free (12.5+ months)
5	M	74	I, IdR, V	U 13q-, 17p-, CK	H	H	5	0	0	SD	Died of CD19- relapse (7.0 mo)
6*	M	64	R-HyperCVAD, R-CHOP, I, M t(8;22), MYC rearrangement	M t(8;22), MYC rearrangement	H	H	0.5	1	0	PR	Died of CD19- relapse (3.7 mo)
7	F	65	FCR (x2), I	NA 13q-, 17p-, and TP53 mutation	-	-	0.4	3	0	CR	Alive and disease-free (4.2+ mo)
8	F	47	FCR, I, V, alloHCT	NA 13q-, 11q-, CK and TP53 mutation	HI	HI	1	1	0	CR	Alive and disease-free (1.4+ mo)
9	M	58	FCR, I, V	NA 13q-, 11q-, 17p-, CK	-	-	1	1	0	PR	Alive and disease-free (1.2+ mo)

Patients with concomitant RT are highlighted in grey.
 Pt, patient; F, female; M, male; FCR, fludarabine, cyclophosphamide and rituximab; BR, bendamustine and rituximab; I, ibrutinib; V, venetoclax; O, obinutuzumab; IdR, idelalisib and rituximab; R-CHOP, rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone; R-ESHAP, rituximab, etoposide, cyclophosphamide, adriamycin, vincristine and prednisone; R-HyperCVAD, rituximab, cyclophosphamide, adriamycin, vincristine and dexmethasone; alloHCT, allogeneic hematopoietic cell transplantation; IGHV, immunoglobulin heavy chain gene variable region; U, unmutated; M, mutated; NA, not available; CK, complex karyotype; IPI, international prognostic index (related to the diffuse large B-cell lymphoma); L, low risk; HI, high-intermediate risk; H, high risk; CRS, cytokine release syndrome; ICANS, immune effector cell associated neurotoxicity syndrome; CR, complete response; PR, partial response.
 *This patient was diagnosed with both chronic lymphocytic leukemia and B-cell prolymphocytic leukemia (B-PLL). Richter's transformation (in the form of plasmablastic lymphoma) occurred in the B-PLL clone. Blood and marrow evaluation documented a MRD-negative CR for both CLL and B-PLL

with DLBCL in patients 2-5 and 8, and plasmablastic lymphoma in patient 6. The median age was 58 (range: 47-74) years, with a male/female ratio of 56/44%. All patients had high-risk progressive disease (2, 3), with a median number of prior therapies of 4 (range: 3-6) and significant lymphadenopathy in all patients except one (89%). Prior therapy included ibrutinib and venetoclax in 8/9 (89%) and 5/9 (56%) patients, respectively (Table 1).

Besides patient 3, who was due cell infusion in April 2020 and never received it owing to the temporary suspension of our program caused by COVID-19, the remaining eight patients received ARI-0001 cells after lymphodepletion (7). The median vein-to-vein time was 27 (range: 22-81) days. The target dose was 1 x10⁶ and 5 x10⁶ ARI-0001 cells/kg for patients with CLL and CLL/RT, respectively (7), but two patients with CLL/RT only received 10-40% (0.4-0.5 x10⁶ cells/kg), as per protocol, due to cytokine release syndrome (CRS) requiring treatment with tocilizumab (7).

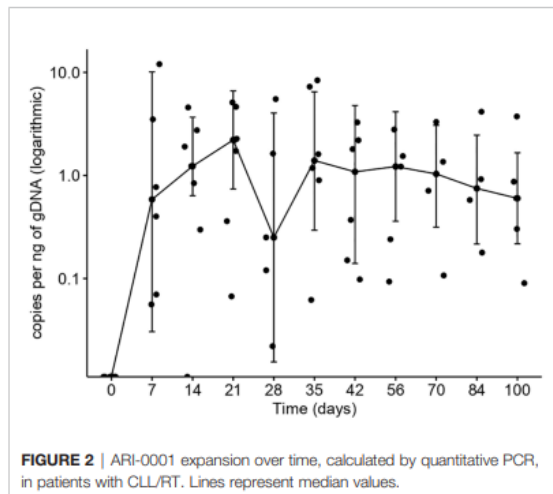
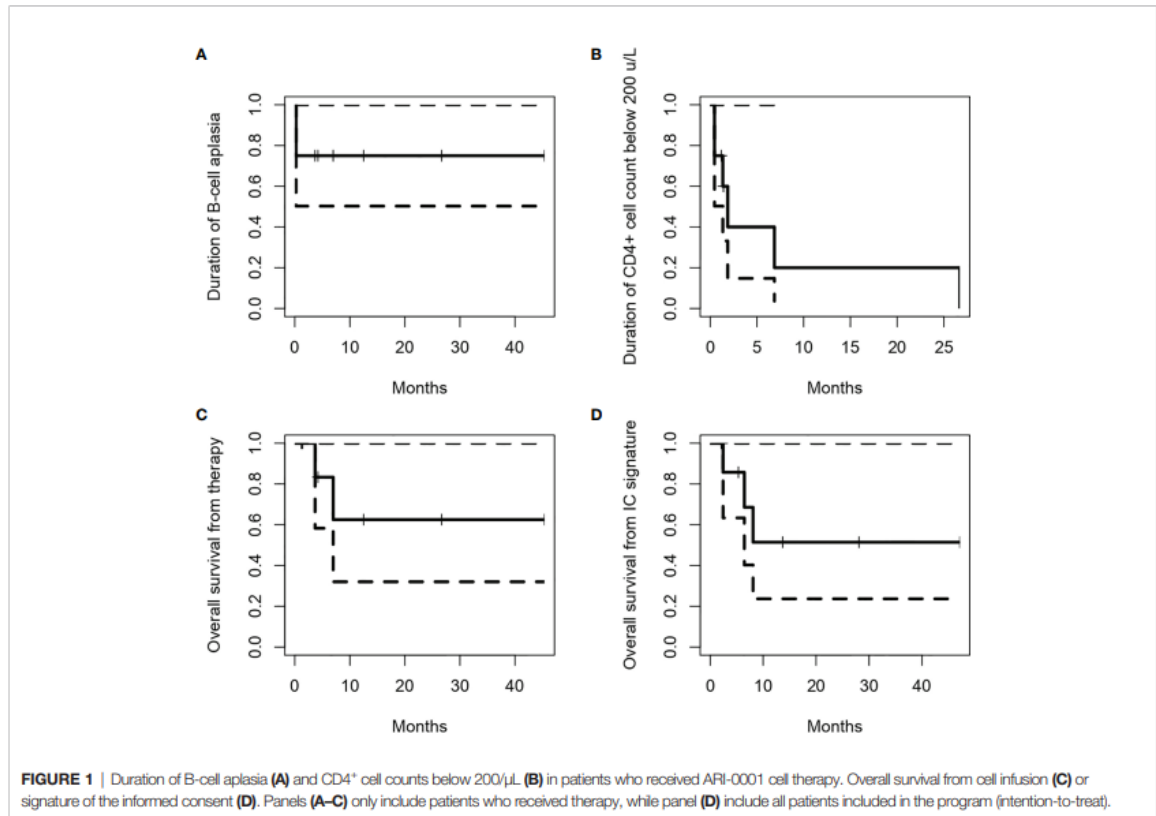
There was no procedure-related mortality in this cohort. The CRS rate was 87.5% (95% confidence interval [CI]: 47-99%), with a grade ≥3 CRS rate of 12.5% (95% CI: 0.3-53%). Three patients required tocilizumab, and none required corticosteroids. The only patient who developed grade 3 CRS was one of the patients who did not receive the full dose, as per protocol. ICANS was not observed, whilst grade 4 neutropenia was documented in 7/8 (87.5%) patients for a median of 11 (range: 6-40) days. Grade 4 thrombocytopenia was observed in 3/8 (37.5%) patients. Four patients suffered from grade ≥3 infections: two episodes of gastroenteritis by *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* and two occurrences of urinary tract infection by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*.

All infused patients experienced absolute B-cell aplasia (BCA), whose median duration had not been reached (75% [95% CI: 50-100%] at 1 year, Figure 1A). Four (50%) patients had IgG determinations below 3 g/L (two of them already at screening), and five (56%) have required frequent Ig replacement. All patients had CD4+ T-cell counts below 200/μL, which recovered (>200/μL) at a median of 1.98 months after the ARI-0001 cell infusion (Figure 1B). ARI-0001 cell expansion, as measured by quantitative PCR, is displayed in Figure 2.

Seven (87.5%; 95% CI: 47-99%) patients responded according to iwCLL/Lugano criteria (CR, n = 4; PR, n = 3) (10), while one patient with RT remained with stable disease. Measurable-residual disease (MRD) was undetectable in the peripheral blood and bone marrow of all patients. With a median follow-up of 5.6 (range, 1.2-45.3) months, two patients with RT experienced a CD19-negative relapse in the lymph nodes 2.1 and 3.0 months after cell infusion (Figure 3). The 2-year OS was 62.5% (95% CI: 32-100%) from ARI-0001 cell infusion and 51.4% (95% CI: 24-100%) from inclusion in the program (this last figure includes all nine patients) (Figures 1C, D).

DISCUSSION

Our results were comparable to other clinical trials and small series of patients with CLL/RT treated with similar CART19



products (12, 13), which have revealed ORRs around 38–82%, with CRRs around 20–45% (14–17). Of note, patients with RT were excluded from two pivotal trials performed in patients with DLBCL (18, 19) and, in a third trial, five patients with RT

were included but their specific clinical outcome was not reported (20).

Since ibrutinib improves preclinical CART19 efficacy (21, 22), a number of clinical trials are evaluating the concomitant use of ibrutinib and CART19 cells in patients with CLL (13, 23, 24). In our experience, ARI-0001 cells could be manufactured for all patients and infused in 89% of them. A very unfortunate patient died before cell infusion, not because of excessive manufacturing time but because of the COVID-19 pandemic. Robust *in vivo* ARI-0001 cell expansion and persistent absolute B-cell aplasia was observed in most patients (Figures 1, 2), this leading to undetectable MRD in the peripheral blood and bone marrow of all patients treated, even in those achieving a PR or stable disease in the lymph nodes. Unfortunately, two patients with RT have relapsed with CD19-negative disease despite no prior anti-CD19 therapy. This suggests that, perhaps, ARI-0001 cell therapy works better before RT occurs. However, we would still recommend ARI-0001 cell therapy for patients with RT since 3/5 patients remain in CR 1.4, 12.5 and 26.7 months after therapy.

In terms of toxicity, the fractionated administration of ARI-0001 cells appeared safe, with no cases of procedure-related mortality. The grade ≥ 3 CRS rate was 12.5% and there were no occurrences of ICANS. Despite the prolonged absolute B-cell

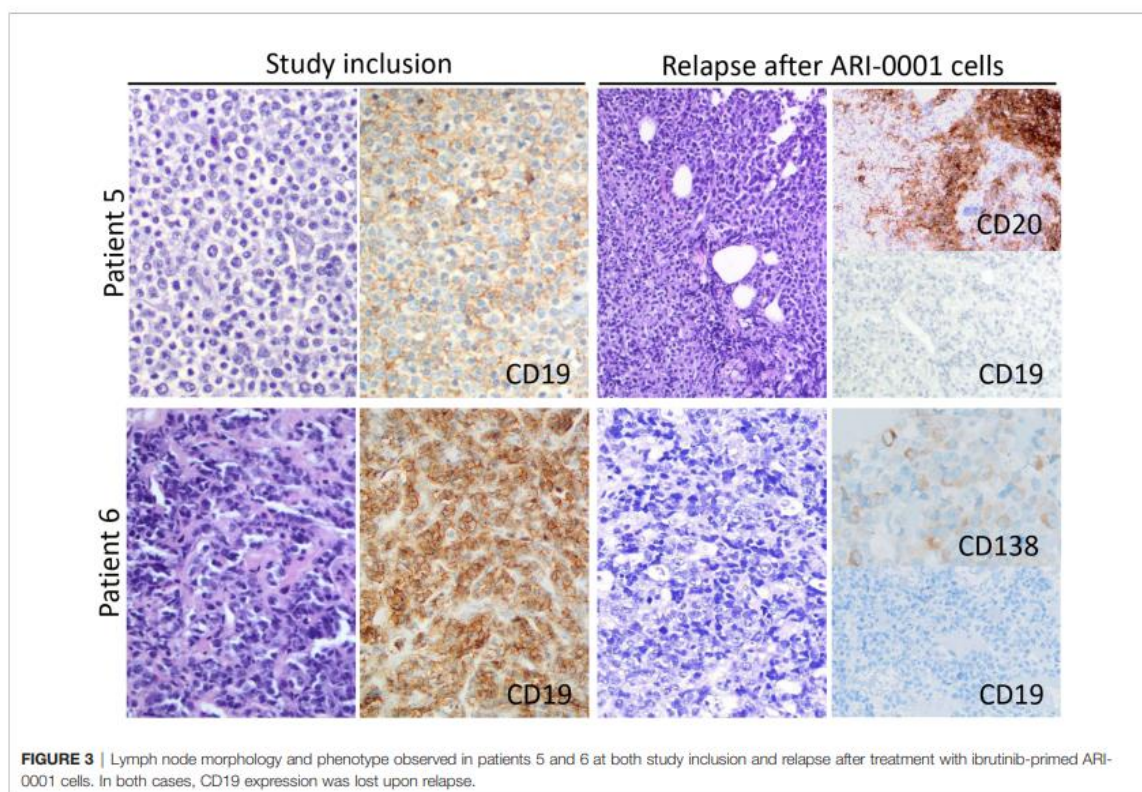


FIGURE 3 | Lymph node morphology and phenotype observed in patients 5 and 6 at both study inclusion and relapse after treatment with ibrutinib-primed ARI-0001 cells. In both cases, CD19 expression was lost upon relapse.

aplasia and frequent grade 4 neutropenia, the incidence of severe infections was not greater compared to similar trials (13, 15–17), and the brief exposition to ibrutinib had a minor impact on toxicity.

In conclusion, our results suggest that the administration of ARI-0001 cells is feasible, safe, and effective in patients with high-risk CLL or RT. The role of concomitant ibrutinib therapy is still debated, but we hope that ongoing and future clinical trials will help us answer this question.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Hospital Clinic de Barcelona. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JD, MJ, ÁU-I, and JE designed the clinical trial. ME-R, MP, DB-R, and MJ were responsible for ARI-0001 cell production and monitoring after infusion. VO-M, NM-C, LM, EG, JC, AM-R, AL-G, and JD looked after the patients during the study. GF, OB and EC were responsible for pathological evaluation of lymph node biopsies. JC and ML were responsible for leukocytapheresis. NV was responsible for immunophenotypic evaluation of peripheral blood and bone marrow samples. JD was responsible for the statistical analysis. VO-M and JD wrote the manuscript, which was approved by all authors. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the patients who participated in the study and their families, friends, caregivers and referring physicians. The authors are very grateful to Drs. Miguel Ángel Perales (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York), Shannon Maude (Children's Hospital of Philadelphia), Juan José Lasarte (Centro de Investigación Médica Aplicada, Navarra) and Michael Schmitt (Universitäts Klinikum Heidelberg), members

of the CART19-BE-01 trial DSMB. The authors are also indebted to the study staff and health care providers at Hospital Clinic, specifically to Anna Boronat, Raquel Martín-Ibáñez, Unai Perpiñá, Josep M. Canals, Vanina Rodríguez, Guillermo Suñé, Esteve Trias and Jordi Yagüe who participated in the development of the CART19 construct; Sara Varea, Judit Pich, Gabriela Recalde, Leticia Pereira and Joan Albert Arnáiz, from the Clinical Trials Unit; Gonzalo Calvo, Andrea Scalise, Joaquín Sáez-Peñaró, Ferran Torres and Sandra Castaño, from the Department of Pharmacology; and Josep Maria Campistol,

Antoni Castells, Aurea Mira and Marc Roda as the main representatives from the institution.

This study was funded by CatSalut, Projecte ARI and grants co-financed by the Instituto de Salud Carlos III-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria-and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) PIC14/122, PI13/676, PIE13/33, PI18/775; and Fundació La Caixa CP042702/LCF/PR/GN18/50310007. VO-M and JD were recipients of research grants from FEHH and Generalitat de Catalunya (PERIS IPFE SLT006/17/301), respectively.

REFERENCES

- Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia. *Nat Rev Dis Primers* (2017) 3:16096. doi: 10.1038/nrdp.2017.8
- Dreger P, Ghia P, Schetelig J, van Gelder M, Kimby E, Michallet M, et al. High-Risk Chronic Lymphocytic Leukemia in the Era of Pathway Inhibitors: Integrating Molecular and Cellular Therapies. *Blood* (2018) 132(9):892–902. doi: 10.1182/blood-2018-01-826008
- Kharfan-Dabaja MA, Kumar A, Hamadani M, Stilgenbauer S, Ghia P, Anasetti C, et al. Clinical Practice Recommendations for Use of Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Chronic Lymphocytic Leukemia on Behalf of the Guidelines Committee of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* (2016) 22(12):2117–25. doi: 10.1016/j.bbmt.2016.09.013
- Juan M, Delgado J, Calvo G, Trias E, Urbano-Ispizua A. Is Hospital Exemption an Alternative or a Bridge to European Medicines Agency for Developing Academic Chimeric Antigen Receptor T-Cell in Europe? Our Experience With ARI-0001. *Hum Gene Ther* (2021) 32(19–20):1004–7. doi: 10.1089/hum.2021.168
- Castella M, Boronat A, Martín-Ibáñez R, Rodríguez V, Suñé G, Caballero M, et al. Development of a Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor: A Paradigm for an Affordable CAR T Cell Production at Academic Institutions. *Mol Ther Methods Clin Dev* (2019) 12:134–44. doi: 10.1016/j.omtm.2018.11.010
- Castella M, Caballero-Baños M, Ortiz-Maldonado V, González-Navarro EA, Suñé G, Antoñana A, et al. Point-Of-Care CAR T-Cell Production (ARI-0001) Using a Closed Semi-Automatic Bioreactor: Experience From an Academic Phase I Clinical Trial. *Front Immunol* (2020) 11:482. doi: 10.3389/fimmu.2020.00482
- Ortiz-Maldonado V, Rives S, Castellà M, Alonso-Saladríguez A, Benítez-Ribas D, Caballero-Baños M, et al. CART19-BE-01: A Multicenter Trial of ARI-0001 Cell Therapy in Patients With CD19+ Relapsed/Refractory Malignancies. *Mol Ther* (2021) 29(2):636–44. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.09.027
- Lee DW, Gardner R, Porter DL, Louis CU, Ahmed N, Jensen M, et al. Current Concepts in the Diagnosis and Management of Cytokine Release Syndrome. *Blood* (2014) 124(2):188–95. doi: 10.1182/blood-2014-05-552729
- Lee DW, Santomasso BD, Locke FL, Ghobadi A, Turtle CJ, Brudno JN, et al. ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated With Immune Effector Cells. *Biol Blood Marrow Transplant* (2019) 25(4):625–38. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.12.758
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. iwCLL Guidelines for Diagnosis, Indications for Treatment, Response Assessment, and Supportive Management of CLL. *Blood* (2018) 131(25):2745–60. doi: 10.1182/blood-2017-09-806398
- Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano Classification. *J Clin Oncol* (2014) 32(27):3059–67. doi: 10.1200/JCO.2013.54.8800
- Kittai AS, Bond DA, William B, Saad A, Penza S, Efebera Y, et al. Clinical Activity of Axicabtagene Ciloleucel in Adult Patients With Richter Syndrome. *Blood Adv* (2020) 4(19):4648–52. doi: 10.1182/bloodadvances.2020002783
- Gauthier J, Hirayama AV, Purushe J, Hay KA, Lymp J, Li DH, et al. Feasibility and Efficacy of CD19-Targeted CAR T Cells With Concurrent Ibrutinib for CLL After Ibrutinib Failure. *Blood* (2020) 135(19):1650–60. doi: 10.1182/blood.2019002936
- Porter DL, Hwang W-T, Frey NV, Lacey SF, Shaw PA, Loren AW, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells Persist and Induce Sustained Remissions in Relapsed Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *Sci Transl Med* (2015) 7(303):303ra139. doi: 10.1126/scitranslmed.aac5415
- Frey NV, Gill S, Hexner EO, Schuster S, Nasta S, Loren A, et al. Long-Term Outcomes From a Randomized Dose Optimization Study of Chimeric Antigen Receptor Modified T Cells in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol* (2020) 38(25):2862–71. doi: 10.1200/JCO.19.03237
- Geyer MB, Rivière I, Sénéchal B, Wang X, Wang Y, Purdon TJ, et al. Safety and Tolerability of Conditioning Chemotherapy Followed by CD19-Targeted CAR T Cells for Relapsed/Refractory CLL. *JCI Insight* (2019) 5(9):e122627. doi: 10.1172/jci.insight.122627
- Siddiqi T, Soumerai JD, Dorritie KA, Stephens DM, Riedell PA, Arnason JE, et al. Phase 1 TRANSCEND CLL 004 Study of Lisocabtagene Maraleucel in Patients With Relapsed/Refractory CLL or SLL. *Blood* (2021) blood.2021011895. doi: 10.1182/blood.2021011895
- Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* (2017) 377(26):2531–44. doi: 10.1056/NEJMoa1707447
- Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* (2019) 380(1):45–56. doi: 10.1056/NEJMoa1804980
- Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, Lunning MA, Wang M, Arnason J, et al. Lisocabtagene Maraleucel for Patients With Relapsed or Refractory Large B-Cell Lymphomas (TRANSCEND NHL 001): A Multicentre Seamless Design Study. *Lancet* (2020) 396(10254):839–52. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31366-0
- Fraietta JA, Beckwith KA, Patel PR, Ruela M, Zheng Z, Barrett DM, et al. Ibrutinib Enhances Chimeric Antigen Receptor T-Cell Engraftment and Efficacy in Leukemia. *Blood* (2016) 127(9):1117–27. doi: 10.1182/blood-2015-11-679134
- Fan F, Yoo HJ, Stock S, Wang L, Liu Y, Schubert ML, et al. Ibrutinib for Improved Chimeric Antigen Receptor T-Cell Production for Chronic Lymphocytic Leukemia Patients. *Int J Cancer* (2021) 148(2):419–28. doi: 10.1002/ijc.33212
- Wierda WG, Dorritie KA, Munoz J, Stephens DM, Solomon SR, Gillenwater HH, et al. TRANSCEND CLL 004: Phase 1 Cohort of Lisocabtagene Maraleucel (Liso-Cel) in Combination With Ibrutinib for Patients With Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma. *Blood* (2020) 136(Supplement 1):39–40. doi: 10.1182/blood-2020-140622
- Gill SI, Vides V, Frey NV, Metzger S, O'Brien M, Hexner E, et al. Prospective Clinical Trial of Anti-CD19 CAR T Cells in Combination With Ibrutinib for the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia Shows a High Response Rate. *Blood* (2018) 132(Supplement 1):298. doi: 10.1182/blood-2018-99-115418

Conflict of Interest: VO-M: Consultant or advisory role (Kite Gilead, Celgene, Novartis), travel grants (Kite Gilead, Celgene, Novartis, Roche, Takeda, Janssen), honoraria (Kite Gilead). EG: Consultant or advisory role (Kite Gilead, Janssen,

Genmab), research funding (Kite Gilead, Janssen, Roche). AM-R: Consultant or advisory role (Bristol Myers Squibb, Abbvie), travel grants (Kite Gilead, Roche, Takeda, Janssen, Abbvie), honoraria (Abbvie). ML: Honoraria (Grifols, Fresenius Kabi), research funding (Terumo BCT, Maco-Pharma). JE: Consultant or advisory role (Abbvie, Novartis, Celgene, Astellas, Jazz, Daiichi Dankyo, Roche, Amgen, Pfizer), travel grants (Celgene, Roche, Astellas, Daiichi Dankyo), research funding (Novartis, Celgene). AL-G: Consultant or advisory role (Roche, Kite Gilead, Celgene/Bristol-Myers, Incyte), honoraria (Roche, Novartis, Takeda, Bayer, Sandoz, Kern), research grants (Roche, Kite Gilead, Celgene/Bristol-Myers, Novartis, Incyte, Janssen, Pfizer, Takeda). ÁU-I: Consultant or advisory role (Kite Gilead, Celgene, Miltenyi), travel grants (Kite Gilead, Celgene). MJ: Consultant or advisory role (Kite Gilead, Grifols), honoraria (Kite Gilead, Grifols).

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Ortiz-Maldonado, Frigola, Español-Rego, Balagué, Martínez-Cibrián, Magnano, Giné, Pascal, Correa, Martínez-Roca, Cid, Lozano, Villamor, Benítez-Ribas, Esteve, López-Guillermo, Campo, Urbano-Ispizua, Juan and Delgado. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

5 - Discusión:

En la presente tesis doctoral se presentan cuatro artículos que analizan la utilidad de la producción académica del producto CAR-T anti-CD19 ARI-0001 para síndromes linfoproliferativos CD19 positivos recaídos o refractarios.

El primer artículo (165) se centra en los resultados iniciales de seguridad y eficacia obtenidos con ARI-0001 dentro del ensayo clínico CART19-BE-01, donde se trataron pacientes adultos y pediátricos con LLA, LNH y LLC recaídos o refractarios. El segundo artículo (166) se centra en los resultados obtenidos con ARI-0001 en LLA a largo plazo. Además, abarca una población más amplia al incluir tanto a los pacientes tratados dentro del ensayo clínico CART19-BE-01 como también a los pacientes tratados dentro del programa de uso compasivo. El tercer artículo (167) focaliza específicamente en aquellos pacientes con LLA que presentan enfermedad exclusivamente extramedular al momento de recibir la terapia ARI-0001. Finalmente, el cuarto artículo (168) se centra en el primer análisis de los resultados iniciales obtenidos con ARI-0001 en una pequeña población de pacientes con LLC y TR.

5.1. Sobre aspectos de calidad, fiabilidad y consistencia de la producción “POC”:

En el primer artículo de la presente tesis doctoral (165) se presentan los resultados obtenidos a corto plazo de los pacientes incluidos en el ensayo clínico CART19-BE-01. Si bien se trata de una publicación con un seguimiento relativamente corto (mediana de seguimiento de 5,5 meses), nos permite analizar de forma clara aspectos de relevancia con respecto a la factibilidad de la producción de Medicamentos de Terapias Avanzadas (ATMPs) CAR-T en centros académicos. En definitiva, en este trabajo se demuestra que esta tarea es factible de realizar en centros académicos europeos. Concretamente, demuestra que un centro español que trabaja en el marco del SNS es capaz de realizar de forma exitosa un proyecto de desarrollo de terapias avanzadas desde los estadios preclínicos iniciales (163) y llevarlo a una escala clínica para una amplia variedad de patologías (165) .

Un aspecto central en cuanto a evaluar la validez de una entidad que aspira a elaborar ATMPs es justamente que las mismas demuestren la fiabilidad con la que los elaboran. Dicha fiabilidad

puede medirse de distintas formas, una de ellas siendo la tasa de producciones exitosas / la tasa de fallos de producción de productos CAR-T. Este resultado permite no sólo evaluar la fiabilidad de un proceso de manufactura en concreto, sino que también permite comparar distintos procesos, permitiendo poner en contexto los resultados obtenidos para cada uno de ellos.

Múltiples estudios publicados tanto industriales como académicos en terapia CAR-T fallan en comunicar las respectivas tasas de fallos de producción celular. Esto dificulta evaluar cuáles son los márgenes de éxito de producción serían considerados habituales o incluso “aceptables”. Esto cobra una particular relevancia para aquellos ATMPs que sean elaborados por entidades académicas, especialmente aquellas que vayan a ser elaboradas en el mismo punto de atención o “point-of-care” (POC) de los pacientes.

Aquellas entidades que aspiren a elaborar ATMPs, incluyendo a los Medicamentos de Terapia Génica (GTMPs) tales como los productos CAR-T deberán mantener los estándares de calidad suficientes para poder ser autorizados por las entidades regulatorias correspondientes. Alcanzar y mantener estos estándares de calidad requieren de unos recursos humanos, estructurales y económicos tales que suelen ser prohibitivos para la mayoría de las entidades públicas y académicas. Esto deriva en la siguiente paradoja: entidades académicas de financiación pública cumplen un rol fundamental en el descubrimiento y desarrollo de nuevas terapias. Sin embargo, una vez alcanzadas se ven forzadas a entregar dicho fruto a entidades privadas ante la “incapacidad” de escalar el desarrollo de dichas terapias a instancias clínicas avanzadas.

Esto lleva a que la comunidad tienda a confundir estas dificultades de desarrollo completo de ATMPs (CAR-Ts en este caso) con una posible “menor calidad” de aquellos productos de origen académico de producción no-industrial. Los productos CAR-T académicos “POC” deben por lo tanto demostrar que mantienen un nivel de calidad comparable al de aquellos de producción industrial. Esto abarca aspectos tanto de la calidad de los productos CAR-T en sí, la fiabilidad/robustez del proceso de producción y la velocidad de respuesta en los tiempos de inicio y entrega de dichos productos, entre otros. A continuación, intentaremos analizar y comparar estos aspectos de calidad.

En el primer artículo (165) demostramos el HCB fue capaz de elaborar el producto CAR-T ARI-0001 de forma robusta, con una tasa de producciones exitosas en el 94,4% de los pacientes. Estos resultados consideramos que se encuentran en línea con los resultados publicados en los ensayos clínicos pivotaes para tisagenlecleucel (139) en LLA R/R pediátrica y adultos jóvenes (92,4%), para

brexucabtagene ciloleucel (142) en LLA R/R del adulto (92%) y para tisagenlecleucel (144) en LDCBG R/R (93%). Aún más, este 94,4% de producciones exitosas para los pacientes del CART19-BE-01 es una cifra particularmente alta considerando que con los mismos se realizó la curva de aprendizaje inicial de nuestra unidad de inmunoterapia (Imagen 61).

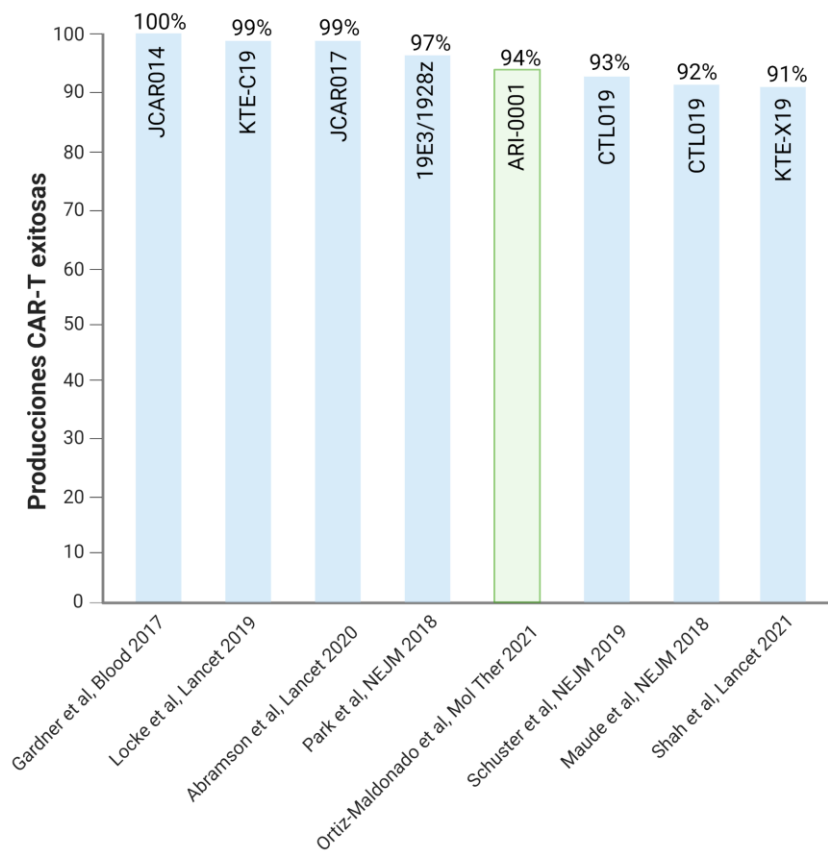


Imagen 61: Tasas de producciones CAR-T exitosas en ensayos clínicos de terapia CART19

Otro aspecto de relevancia en cuanto a marcadores de calidad de terapia CAR-T es el tiempo requerido para administrar el tratamiento a los pacientes. Este es un punto de relevancia, debido a que a mayor tiempo de espera en la entrega de productos mayor será tanto la probabilidad de progresión de la enfermedad de base y por lo tanto de muerte. Distintos grupos, incluidos nosotros mismos, hemos demostrado el impacto directo que tiene la carga tumoral de patologías como LLA en la eficacia de las terapias CAR-T, el cual puede ser claramente identificado en distintos estudios (138,140,166,169). Este tiempo requerido para esta terapia puede contabilizarse de distintas formas y consta de distintos apartados.

Por una parte, puede contabilizarse el “*tiempo desde la firma del CI hasta la leucacitaféresis*”. Esta valoración puede evaluar la capacidad de absorción de pacientes que tienen las distintas entidades que manufacturan productos CAR-T. Sin embargo, dicho margen de tiempo podría no ser del todo representativo, ya que distintos estudios pueden programar la fecha de firma del CI para cuando se estima que habrá un slot disponible de aféresis/producción celular.

Por otra parte, la realización de una *leucacitaféresis* no siempre viene vinculado del inicio de una producción celular de forma inmediata, ya que dichas células mononucleadas (CMN) podrían criopreservarse a espera de un slot libre de procesamiento celular. La *leucacitaféresis* y su criopreservación en diferido con respecto al inicio del procesamiento celular es una maniobra que puede ser de gran utilidad especialmente en aquellos pacientes que se encuentren en una situación de progresión clínica de su enfermedad. Estas situaciones suelen obligar al equipo médico a iniciar algún tipo de terapia de control o rescate de forma urgente, lo cual puede interferir con la necesidad de recolectar linfocitos T.

Al criopreservar antes de una terapia de rescate el equipo médico puede asegurar lo siguiente: (a) la obtención de linfocitos T con menor toxicidad acumulada, (b) la obtención de suficiente celularidad T que en un futuro intento podría dejar de ser posible, y (c) iniciar el proceso de producción del CAR-T una vez liberado un slot de producción sin tener que esperar a una nueva recuperación de la hemoperiferia. No obstante, la criopreservación de la leucacitaféresis puede no formar parte de una maniobra médica, sino que incluso suele ser la norma para ciertas instituciones. Distintas industrias farmacéuticas criopreservan la leucacitaféresis antes del inicio de manufactura debido a motivos logísticos típicos de la producción industrial centralizada: dichos productos suelen tener que trasladarse miles de kilómetros del centro de aféresis al centro de producción.

Por otra parte, el abordaje tipo POC utilizado en el HCB facilita el inicio de la producción celular en fresco, sin criopreservación inicial, en el 73% de los pacientes tratados. Esto nos permitió iniciar la producción celular en menos de 24hs tras la leucacitaféresis en tres cuartas partes de los pacientes tratados. Sin embargo, el impacto que pueda tener sobre la funcionalidad T que cada episodio de criopreservación y descongelamiento es un aspecto que queda pendiente de analizar. Si bien se especula que cada episodio podría disminuir la funcionalidad T todos los productos CAR-T comercializados mantienen la criopreservación T en al menos 1-2 episodios para cada producto CAR-T. Nuevos ensayos clínicos CAR-T buscan eliminar la criopreservación, explorando los

potenciales beneficios de administrar productos CAR-T en fresco, pero sus resultados se encuentran pendientes al momento de la escritura de esta tesis.

Otro marcador de calidad podría ser el “*tiempo de producción celular*”. En términos generales, un menor tiempo de producción celular beneficia a los pacientes. Esto es así ya que un menor tiempo de producción va asociado a un menor tiempo de espera y, por lo tanto, menores probabilidad de progresión de la enfermedad, así como mayores probabilidades de éxito.

Este tiempo puede dividirse en 3 segmentos principales: (Imagen 62).

- a) El tiempo requerido de traslado de los productos celulares: del centro de aféresis al centro de producción y viceversa (ida y vuelta).
- b) El tiempo requerido “core” o central de manufactura del producto CAR-T.
- c) Y el tiempo requerido para completar los controles de calidad que permiten la liberación del producto una vez completada la producción celular.

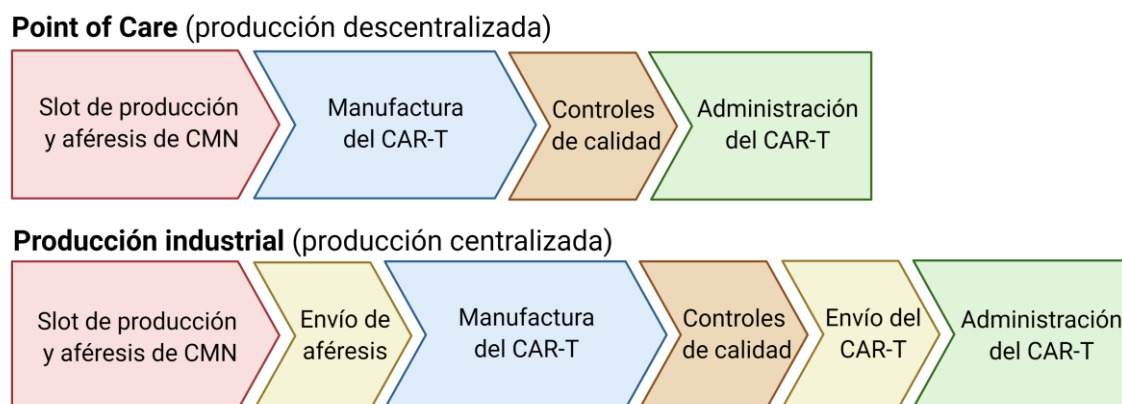


Imagen 62: Tiempos del proceso CAR-T: abordaje centralizado vs descentralizado

Estos 3 segmentos pueden resumir la rapidez con la que una entidad productora de CAR-T es capaz de suministrar productos CAR-T a pacientes. Si los analizamos uno por uno, podemos ver cómo: (a) los tiempos de traslado pueden variar dependiendo si la planta de manufactura se encuentra en el mismo hospital donde se trata al paciente (POC), en contraste con lo que pasaría si el centro de producción se encuentra en otra ciudad, país o incluso continente (centralizado). Si bien el tiempo requerido para estos trasportes no se encuentran detallados en los artículos pivotaes de productos industriales, se puede estimar que estos podrían tener una duración de

entre 2 y 4 días. Esto contrasta con los escasos minutos que requiere el traslado de los productos celulares dentro de un mismo hospital POC.

Por otra parte, el tiempo propiamente dicho o “core” de manufactura en los distintos biorreactores, una vez establecido, es difícilmente optimizable sin modificar sustancialmente el proceso de manufactura y, por ende, sin que sea considerado un producto “diferente”. En cuanto a la duración del proceso de producción celular, hemos sido capaces de producir los productos ARI-0001 en una mediana de 8,5 días (rango 7-10), tal como habíamos reportado previamente (164). Estos resultados son difícilmente comparables con los obtenidos en múltiples otros estudios debido a la falta de información al respecto en la mayoría de los estudios publicados.

Sin embargo, algunos estudios reportan una duración mediana de producción celular “core” de 15 días (137) para LLA pediátrica, mientras que otros estudios reportan una duración mediana de producción y liberación del producto de 13 días (142) para LLA del adulto. Otros estudios publican cifras de producción y liberación de productos CAR-T para pacientes con LDCBG de 17 días (170) y 24 días (146). Esto nos lleva a considerar los tiempos en los que actualmente nos toma la elaboración “core” de ARI-0001 como claramente en línea con lo observado por otros grupos industriales o académicos.

No obstante, a pesar de que el tiempo de producción y liberación de los productos suele encontrarse por debajo de los 21 días en la mayoría de los estudios, el tiempo que transcurre desde la aféresis hasta la administración del producto CAR-T tiende a ser superior. Dicho período de tiempo, denominado “tiempo de vena a vena”, y especialmente el tiempo transcurrido desde la firma del CI hasta la administración del tratamiento puede duplicar o incluso triplicar a los tiempos “core” de producción y liberación celular. Una muestra de ello es como pasamos de los 8,5 días de mediana de producción del ARI-0001 a los 42 días de mediana de “vena a vena”, o incluso los 54 días de mediana entre la firma del CI y la administración del producto dentro del ensayo clínico CART19-BE-01 (165).

Estos resultados son comparables con estudios que presentan fenómenos similares, con 45 días entre el reclutamiento y el tratamiento con tisa-cel en LLA pediátrica (139), o como los 15 días de mediana de producción “core” de JCAR014 en LLA pediátrica se traducen en 53 días de mediana desde el CI hasta la recepción del tratamiento (137). Similares resultados han sido publicados en pacientes adultos con LDCBG, con tiempos de vena a vena de 37 días (146), y tiempos de reclutamiento hasta tratamiento de 54 días de mediana (144). Sin embargo, una comparación más

extensiva no es factible debido a que la mayoría de estos estudios no publican la mediana del CI al tratamiento ni la mediana de vena a vena.

Los motivos por los cuales los tiempos de administración de un producto pueden llegar a duplicar o incluso triplicar los propios tiempos de producción tienen su justificación en los siguientes aspectos: primero, los aspectos requeridos para la liberación de dichos productos. Tal y como hemos descrito previamente (163), la liberación de cada producto ARI-0001 requiere de la realización de una serie de análisis que incluyen análisis de viabilidad celular, pureza, eficiencia de transducción, potencia y esterilidad. Dichos estudios para ARI-0001 han presentado duraciones que en ocasiones han superado las 5 semanas, demoras debidas principalmente a la externalización de los estudios de esterilidad para el CART19-BE-01.

Una vez el producto supera todos los análisis de calidad es liberado y se tiene autorización para su uso dentro de ensayo. Una vez se obtiene esta autorización se puede proceder con la programación del inicio de la linfodepleción (LD). La misma no puede iniciarse inmediatamente ya que para ello es necesario tener lista la programación de una gran cantidad de aspectos logísticos (espacio de hospital de día, cama disponible, pruebas pre LD, alojamiento tras el alta hospitalaria, etc.). Esto suele ser aún más complejo cuando el paciente debe trasladarse de otra comunidad autónoma, el cual correspondía a más del 90% de los pacientes tratados en el CART19-BE-01.

Esto añade al menos 1 semana al inicio de la linfodepleción, el cual, de llevarse a cabo sin incidencias añade casi una semana hasta la administración del producto CAR-T. Por otra parte, incluso si la liberación de los productos CAR-T y la entrega de estos se realicen en un plazo menor a 3 semanas de la aféresis, es frecuente que pacientes deban recibir algún tipo de tratamiento antineoplásico de control como “terapia puente”. En estos casos, puede suceder que el tiempo necesario para la recuperación de dichos tratamientos puente sea superior al tiempo que toma al producto CAR-T en regresar al centro de tratamiento.

Finalmente, estos pacientes múltiple-refractarios son por definición pacientes con alto riesgo de complicaciones infecciosas, los cuales al ocurrir requieren del retraso de la administración de la linfodepleción y terapia CAR-T.

En cuanto al ensayo CART19-BE-01, si bien la mediana del tiempo de “vena a vena” de 42 días se encuentra en línea con lo observado en otros estudios industriales consideramos que es un tiempo que puede acortarse significativamente. De hecho, con estos 42 días de mediana de vena a vena

del CART19-BE-01 se realizó el desarrollo de la curva de aprendizaje y de crecimiento de nuestra institución en cuanto a capacidad de producción y tratamiento. Actualmente dicha mediana ha podido reducirse considerablemente.

Hay varios factores que han contribuido a estos 42 días de mediana de “vena a vena” del CART19-BE-01. Entre ellos podemos destacar que nuestra capacidad inicial de producción celular era francamente inferior a la actual. Con tan sólo un biorreactor Miltenyi Prodigy, nuestra capacidad inicial de elaborar el CAR-T ARI-0001 era de hasta 2 productos al mes. El segundo y tercer biorreactor Miltenyi Prodigy estuvieron funcionalmente disponibles a partir de septiembre 2017 y mayo 2019, respectivamente, tras lo cual se pudo incrementar nuestra capacidad de producción celular a 4 y 6 productos al mes, respectivamente. Sin embargo, dicho incremento en la capacidad de producción siempre fue más bien precedida por el incremento de la demanda por parte de los pacientes. Esto llevó a que durante un período significativo de tiempo nuestro “cuello de botella” se encontraba en la producción celular. En total, un 23% (11/47) de los pacientes realizaron una criopreservación de su leucocitaféresis en espera de un slot de producción celular disponible. Dicha “lista de espera” que afectó a al menos un cuarto de los pacientes del CART19-BE-01 ha podido ser subsanado, y actualmente desde el incremento de nuestra capacidad de producción ocurre en menos ocasiones.

Por otra parte, es importante mencionar que un 14,9% (7/47) de los pacientes tratados requirieron de repetir la producción celular. Seis de ellos debido a producciones consideradas contaminadas o con riesgo de contaminación, y 1 debido a ser considerado “fuera de especificaciones” al contar con una eficiencia de transducción menor al 20% a pesar de haber alcanzado la celularidad CAR-T absoluta requerida. A su vez, es relevante mencionar que el 82% (9/11) de los fallos de producción observados dentro del ensayo CART19-BE-01 fueron debido a contaminaciones bacterianas. Dichas contaminaciones ocurrieron en el contexto de la curva de aprendizaje del personal técnico encargado de la producción celular. Dicha experiencia permitió optimizar las prácticas de manufactura que nos ha llevado actualmente a no presentar ningún nuevo episodio de contaminación para ARI-0001 desde enero del 2019.

Esta reducción tan significativa desde enero 2019 de la tasa de contaminaciones de ARI-0001 (0%) ha contribuido en la reducción del tiempo de “vena a vena”. Finalmente, el crecimiento en los recursos humanos de la unidad de inmunoterapia del HCB ha permitido tener personal capacitado los 365 días del año, lo cual permite iniciar y finalizar producciones celulares incluso en días

festivos. Por lo tanto, la limitación previa que requería de programar las producciones celulares de forma tal que el inicio y final no fueran en días festivos fue eliminado. Esto, sumado a la incorporación de un cuarto sistema Miltenyi Prodigy en febrero 2021 ha contribuido en acortar los tiempos de espera al incrementar la capacidad de producciones celulares de ARI-0001 hasta nuestra capacidad actual máxima de aprox. 12 producciones por mes (Imagen 63).

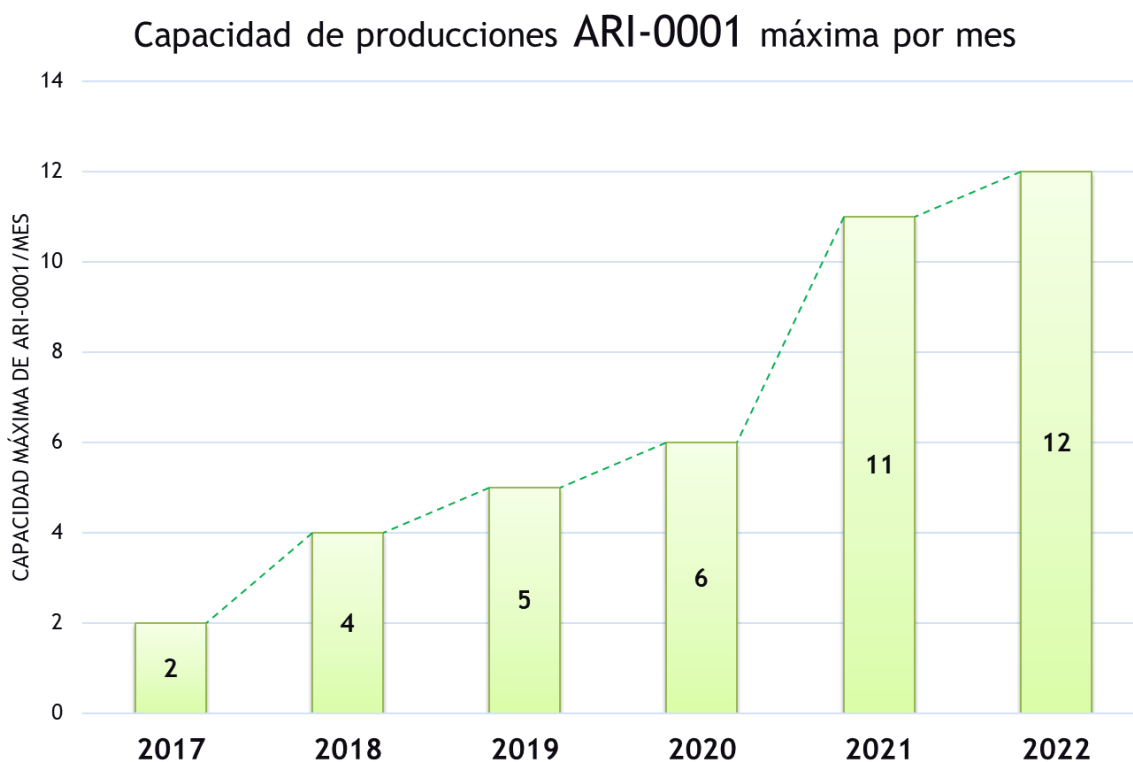


Imagen 63: Crecimiento en capacidad de producción de productos CAR-T del HCB entre 2017 y 2022

Finalmente, otro de los factores que contribuyeron considerablemente al tiempo de “vena a vena” del CART19-BE-01 fue el tiempo requerido para la liberación del producto una vez este completaba su producción. Como hemos mencionado previamente, la liberación del ARI-0001 requiere que cada producto cumpla con ciertos requisitos predefinidos de viabilidad celular, pureza, eficiencia de transducción, copias por genoma, potencia y esterilidad (163). La obtención de los resultados tras la finalización del procesamiento celular ocurre de forma casi inmediata para los análisis de viabilidad celular, de pureza y de eficiencia de transducción, cuyos resultados se obtienen en el mismo día del análisis mediante citometría de flujo. Paralelamente, los análisis de

copias CAR por genoma y de potencia requieren de procesos algo más elaborados, obteniendo los resultados 48hs tras el inicio de estas.

No obstante, fueron los controles de esterilidad los que más contribuyeron a la demora en la liberación del producto. Esto se debía a que durante el ensayo CART19-BE-01 los controles de esterilidad se externalizaron en una empresa privada (Laboratorio Echevarne), cuyos tiempos de liberación de resultados presentaba una duración mínima de 21 días. Sin embargo, la realidad fue que en ocasiones puntuales la respuesta por parte de Echevarne supero incluso las 5 semanas. Esta considerable demora generó una serie de desafíos logísticos que en ocasiones reducía la predictibilidad en cuanto la liberación estimada de cada producto y la consecuente programación del ingreso de cada paciente.

Estas dificultades ocasionadas y demoras añadidas por esta externalización de los controles de esterilidad han sido subsanados tras el CART19-BE-01. Una vez finalizado el mismo los controles de esterilidad han podido ser asumidos internamente por microbiología del HCB. Esto nos ha aportado mayor autonomía y, sobre todo, ha reducido sustancialmente el tiempo de liberación de los productos ARI-0001. Si bien la mediana de producción de ARI-0001 se mantiene estable en torno a 8 días para LLA, es el tiempo de liberación de estos productos (controles de calidad) el que se ha reducido considerablemente. Dicho tiempo requerido para los controles de calidad ha pasado de un mínimo de 21 días para el CART19-BE-01 a la mediana actual de 8 días. Esto reduce actualmente el tiempo combinado de producción y liberación de los productos ARI-0001 a una mediana de 16 días (Imagen 64).

Tiempo promedio (días) de producción y liberación de productos ARI-0001

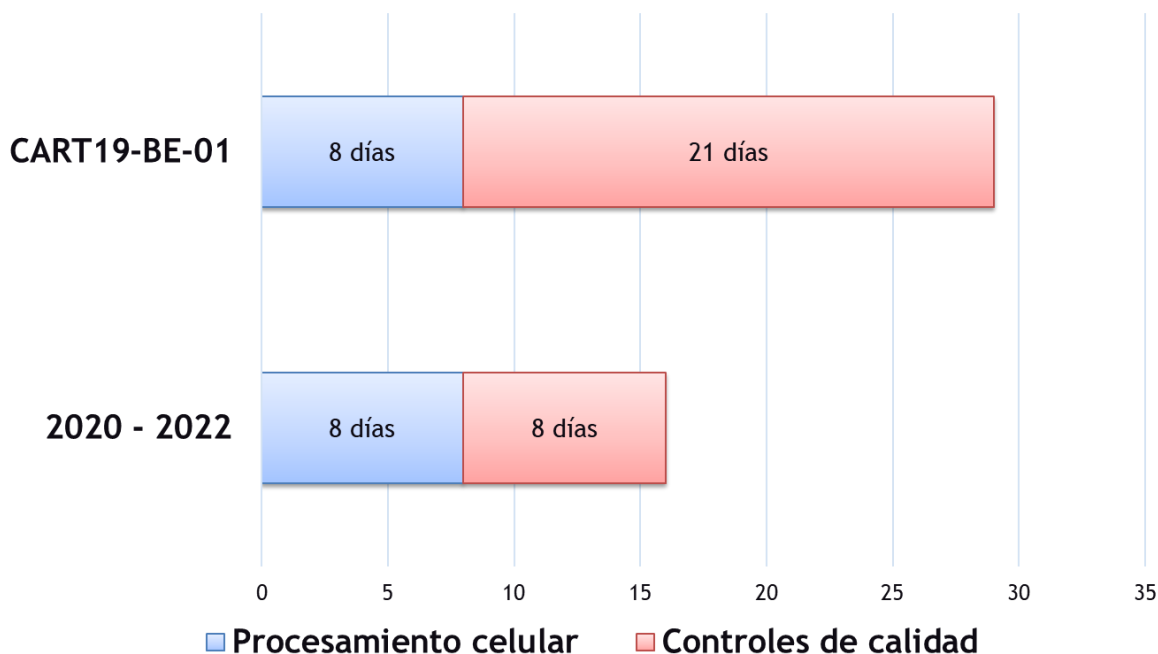


Imagen 64: Evolución de la velocidad de liberación de ARI-0001 entre el CART19-BE-01 y la actualidad

5.2. Sobre aspectos de logística:

Finalmente, es relevante mencionar que otro factor a tener presente en cuanto a los desafíos logísticos del ensayo CART19-BE-01 fue el origen de los pacientes tratados en el mismo. El 83% (39/47) de los pacientes tratados procedían de comunidades autónomas fuera de Cataluña. De hecho, la demografía de los pacientes tratados incluyó a una amplia representación de la geografía española, con pacientes provenientes de Madrid (n= 9), Castilla y León (n= 6), País Vasco (n= 5), Murcia (n= 4), Mallorca (n= 4), Valencia (n= 3), Cantabria (n= 2), Extremadura (n= 1), Andalucía (n= 1), Asturias (n= 1), Navarra (n= 1), Galicia (n= 1) y Aragón (n= 1), con sólo 8 pacientes (17%) procedentes de Cataluña (Imagen 65).

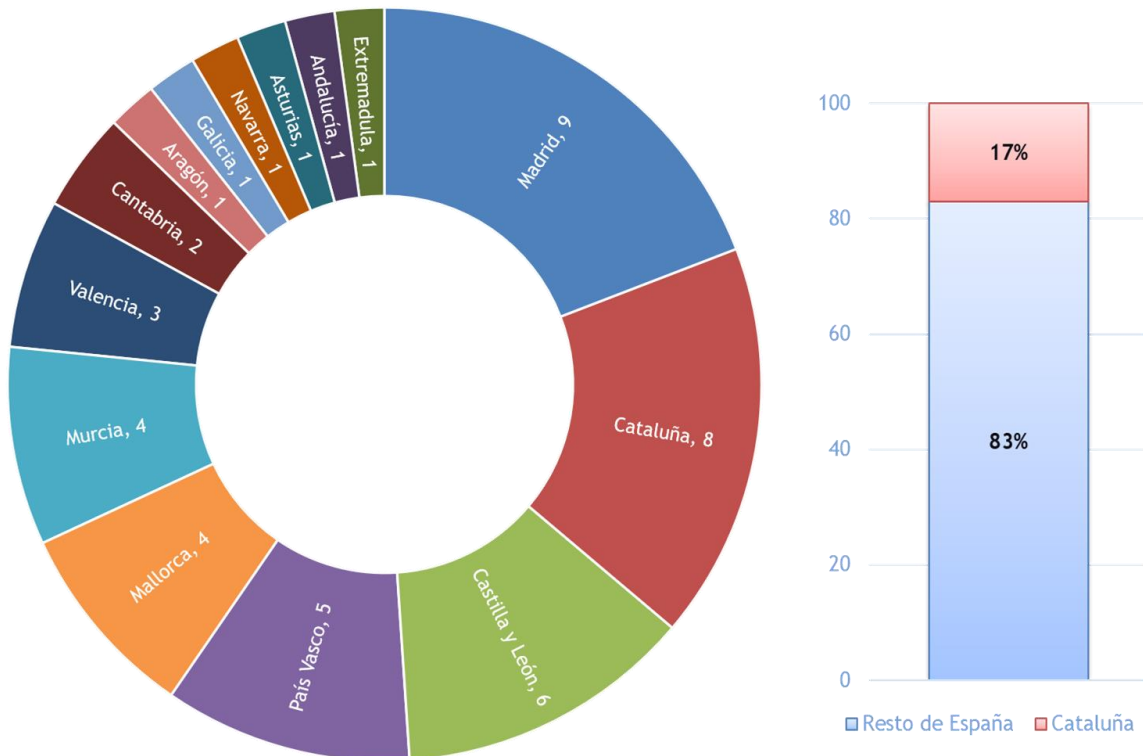


Imagen 65: Procedencia de los pacientes tratados en el ensayo CART19-BE-01.

El hecho de que la mayoría de los pacientes hayan tenido que trasladarse de CCAA ha añadido ciertos desafíos logísticos y burocráticos que también ha aportado a los 42 días de mediana de “vena a vena” publicados en el CART19-BE-01. Consideramos que esto, una vez más, pone en valor los resultados de rapidez de administración de dicho ensayo, el cual se encuentra en línea con otros estudios multicéntricos de la industria farmacéutica, los cuales permitían una menor proporción de traslado de pacientes.

5.3. Sobre aspectos de representatividad de la vida real en los pacientes tratados en el CART19-BE-01:

Otros aspectos de relevancia a mencionar en relación con los resultados obtenidos en todos los ensayos clínicos en general, inclusive en terapia CAR-T, son los de la representatividad de los pacientes incluidos. Para el adecuado análisis y puesta en valor de los resultados de cada ensayo

es necesario intentar identificar parámetros que permitan evaluar que tan representativos de la realidad son los pacientes tratados dentro de cada ensayo. La posible existencia de estrictos criterios de inclusión y exclusión pueden llevar a una selección positiva de pacientes cuya situación general sea significativamente más favorable a la de la población general afecta. Esto podría llevar a considerar los resultados de un ensayo como escasamente representativos de la realidad. Si bien en ocasiones es difícil identificar si los pacientes tratados en un ensayo son realmente representativos de la vida real, existen ciertos parámetros que nos pueden ayudar a identificarlo.

Una forma de analizar globalmente que tan representativos de la realidad han sido los pacientes incluidos en el ensayo CART19-BE-01 son parámetros tales como: **(a)** la proporción de fallos de screening o la proporción de pacientes que realizaron la leucocitaféresis como marcadores subrogados de que tan estrictos se ha sido a la hora de confirmar el reclutamiento y la intensidad terapéutica; **(b)** la proporción de pacientes que realizaron la aféresis y que finalmente no recibieron el producto CAR-T como marcadores subrogados de que tan estrictos a la hora de confirmar la intensidad terapéutica tras el período puente; **(c)** la proporción de pacientes que firmaron el CI y que no recibieron la terapia CAR-T, como marcador subrogado global de que tan rigurosa (o potencialmente poco representativa de la realidad) fue la selección de pacientes; y **(d)** cuales fueron los tratamientos previos realizados con estos pacientes, como marcadores de que tan representativo de la vida real ha sido el manejo terapéutico de dichos pacientes. A continuación, procuraremos analizar punto por punto.

(a) Proporción de fallos de screening / pacientes que realizaron leucocitaféresis:

En el ensayo clínico CART19-BE-01, 58 pacientes firmaron el CI, de los cuales 54 (un 93%), realizaron la leucocitaféresis para producción de ARI-0001. Esto deja un 7% de pacientes que finalmente no procedieron con la aféresis. Esta proporción de pacientes excluidos al momento del screening podría ser comparable a la observada en otros estudios, cuya proporción fue del 3,8% para LLA del adulto con AUTO-1 (143), 6% para LLA del adulto (138) y 14% para LLA pediátrica con tisa-cel (139). Sin embargo, este 7% podría compararse favorablemente a otros estudios donde esta proporción de pacientes excluidos al screening ha llegado a ser del 30% para LDCBG (144) (Imagen 66).

Fallos de screening (%) en ensayos clínicos de terapia CART19

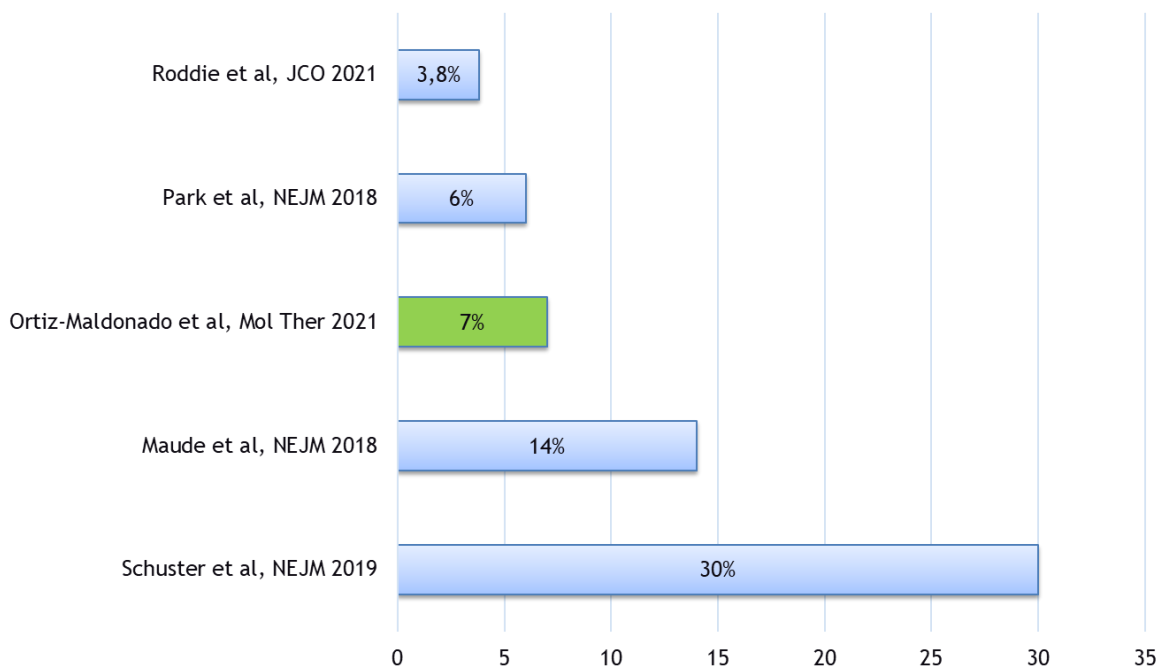


Imagen 66: Comparativa de fallos de screening en ensayos clínicos de terapia CAR-T.

Otros estudios no reportan la cantidad real de pacientes que firmaron el CI, reportando sólo a partir de aquellos cuyo reclutamiento fue confirmado (137,142,146,170). Por este motivo es que se desconoce cuál es la proporción real de pacientes excluidos dentro de los mismos. Consideramos que una proporción de pacientes excluidos al screening menor al 10% es indicativo de que los criterios de inclusión fueron lo suficientemente permisivos y apuntan a validar a los pacientes tratados como representativos de la vida real. Esto cobra mayor valor observar que incluso 2 de estos 4 pacientes que no procedieron a la aféresis una vez firmado el CI no fue por presentar criterios de exclusión, sino por decisión del paciente. Estos 2 pacientes retiraron su CI ya que inmediatamente tras su inclusión dentro del ensayo CART19-BE-01, el producto CAR-T axi-cel recibió la aprobación de uso por la Comisión Europea. Por este motivo estos dos pacientes tuvieron disponible la posibilidad de recibir tratamiento convencional con axi-cel comercial, el cual pudieron recibir dentro de un programa de acceso precoz.

(b) Proporción de pacientes con leucocitaféresis pero no infundidos:

De los 54 pacientes que procedieron con la *leucocitaféresis* dentro del ensayo CART19-BE-01, 47 pacientes (un 87%) finalmente recibieron su terapia CAR-T ARI-0001. Esto deja un saldo de 13% de pacientes que a pesar de haberse intentado producir su CAR-T este finalmente no fue administrado. Consideramos que este 13% observado en el CART19-BE-01 es comparable al 9,2% de productos no administrados para LDCBG con axi-cel (170), al 18% para LLA pediátrica con tisa-cel (139), al 20% para LLA del adulto con AUTO-1 (143), al 21,8% para LDCBG con liso-cel (146), y al 22,5% para LLA del adulto con brexu-cel (142). Aún más, consideramos que este 13% de productos ARI-0001 no administrados se compara favorablemente con el 32% para LLA del adulto (138) y con el 32,7% para LDCBG con tisa-cel (144) (Imagen 67).

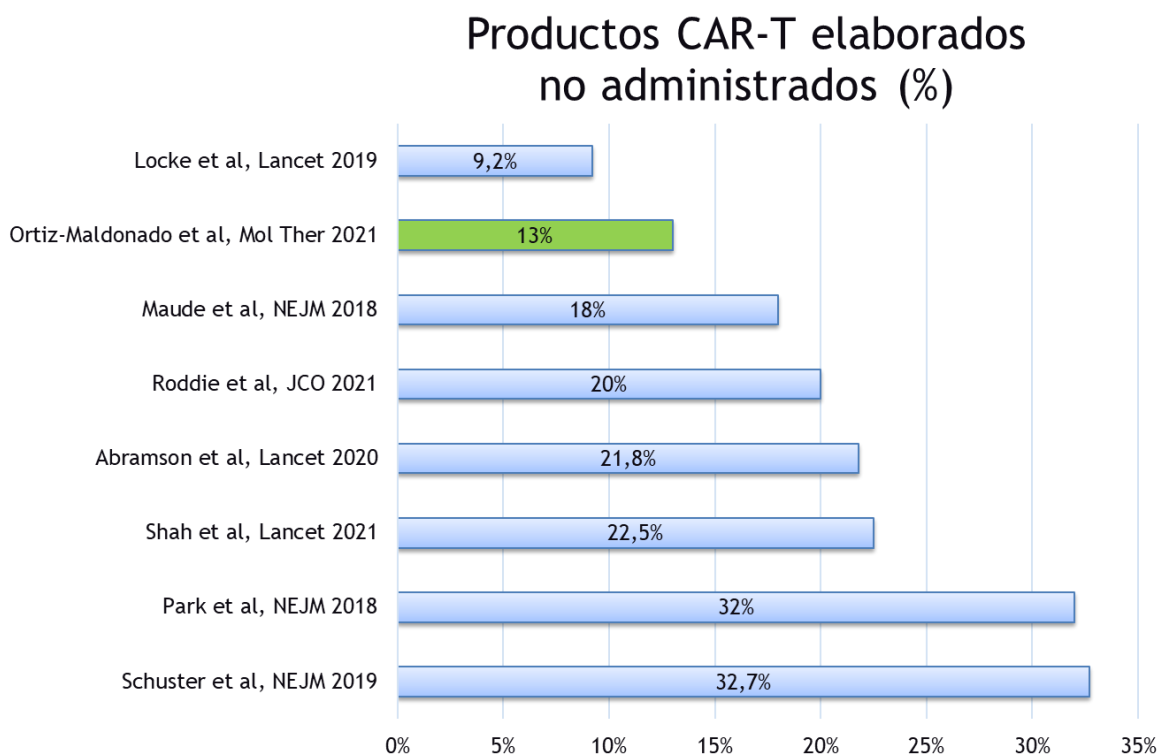


Imagen 67: Comparativa de productos CAR-T no administrados en ensayos clínicos de terapia CAR-T.

En términos globales, este 13% se mantiene cercano al margen inferior en cuanto a productos CAR-T no administrados. Consideramos que dicho parámetro refleja la escasa exclusión de pacientes durante el período puente, como posible marcador de la representatividad de los pacientes tratados o ausencia de selección positiva. Finalmente, es relevante mencionar que de

este 13% (n=7 pacientes) que no recibieron su tratamiento, sólo 1 paciente no lo recibió por desarrollar un criterio de exclusión. Dicho paciente no recibió su terapia CAR-T ARI-0001 debido al desarrollo incontrolable de una enfermedad del injerto contra el receptor grave refractaria, correspondiendo a tan solo un 1,8% del total de pacientes que realizaron la aféresis. El resto de los pacientes no lo recibieron debido a fallos de producción celular (n=3), muerte por progresión de enfermedad (n=1), y finalmente por retirada voluntaria del CI (n=2). Con respecto a estos 2 pacientes que retiraron su CI antes de recibir su ARI-0001 es relevante mencionar que, al momento de dicha retirada, los pacientes eran considerados como aptos para recibir el tratamiento, el cual se encontraba listo para administrar.

Sin embargo, dichos pacientes retiraron su CI justo antes de recibir su ARI-0001 tras haber sido informados de que otros 3 pacientes del ensayo fallecieron a causa del tratamiento con ARI-0001 en un plazo de 28 días. Estas 3 muertes tóxicas motivaron además una suspensión imprevista del tratamiento de pacientes dentro del ensayo en junio del 2018. Finalmente, tras evaluación por parte del DSMB se pudo reiniciar en julio 2018 tras la aprobación por parte de la AEMPS de una segunda enmienda mayor del protocolo que permitía la administración fraccionada de las dosis y el tratamiento del SLC con tocilizumab de forma precoz. Sin embargo, debido a esta delicada e imprevista situación el equipo médico de referencia de ambos pacientes decidió redirigir a dichos pacientes a otras terapias alternativas antes de la puesta en marcha de las enmiendas correspondientes. De haberse mantenido los pacientes dentro de ensayo con la enmienda ya instaurada, la tasa de pacientes que habrían recibido el CAR-T habría subido del 87% al 90,7%. Sin embargo, consideramos que ambas proporciones pueden ser consideradas excepcionalmente altas dentro de lo habitualmente observado para terapias CAR-T autóloga.

(c) Proporción de pacientes reclutados no infundidos:

Una forma de analizar globalmente la selección de pacientes incluidos y tratados dentro del ensayo CART19-BE-01 y de la representatividad de estos es analizar de forma conjunta ambos parámetros mencionados previamente en los apartados (a) y (b). Esto abarca el análisis de la proporción de pacientes que firmaron el CI y que no recibieron la terapia CAR-T, como marcador global de que tan rigurosa (y potencialmente poco representativa de la realidad) fue la selección de pacientes. En el ensayo CART19-BE-01 un total de 58 pacientes firmaron el CI, de los cuales 47 (un 81%) finalmente recibieron tratamiento con ARI-0001. Esto deja un 19% de pacientes incluidos sin recibir ARI-0001, cuyos motivos fueron previamente mencionados en los puntos (a) y (b). Este

19% de pacientes incluidos no tratados del CART19-BE-01 es comparable al 23% observado para LLA del adulto con AUTO-1 (143). Sin embargo, podría ser comparado favorablemente con el 30% observado para LLA pediátrica con tisa-cel (139), con el 36% para LLA del adulto (138) o con el 46,6% observado para LDCBG con tisa-cel (144). Otros estudios pivotaes no publican la cantidad de pacientes incluidos no tratados (142,146,170), por lo que se desconoce la magnitud real de la selección positiva de pacientes realizada dentro de los mismos.

(d) Tratamientos previos realizados:

Finalmente, otro aspecto para evaluar la representatividad de los pacientes tratados dentro de los ensayos consiste en analizar los tratamientos realizados previamente antes del tratamiento a estudio. Esto es importante ya que permite evaluar si el manejo terapéutico realizado previamente en los pacientes incluidos es representativo de la vida real. Además, permite evaluar si los pacientes seleccionados han recibido o no tratamientos que podrían reducir la probabilidad de respuesta al tratamiento experimental, y compararlo así con lo esperado en la vida real. En lo que respecta la LLA R/R, su abordaje terapéutico moderno incluye la realización de un AloTPH como procedimiento potencialmente curativo una vez el abordaje con quimioterapia falla. Para poder llevar pacientes quimiorrefractarios al dicho AloTPH, la comunidad médica cuenta con una amplia variedad de fármacos de inmunoterapia. Fármacos modernos tales como el blinatumomab y el inotuzumab carecen de potencial curativo en monoterapia, pero sí permiten incrementar considerablemente las probabilidades de poder llevar a los pacientes a dicho AloTPH. Es por este motivo que consideramos que los resultados obtenidos en ensayos clínicos en terapia CAR-T para LLA que fallen en incluir a pacientes expuestos a estos fármacos de forma representativa podrían no ser considerados representativos de la vida real.

En el ensayo clínico CART19-BE-01, los pacientes con LLA tratados con ARI-0001 habían sido expuestos a una mediana de 4 líneas previas de tratamiento al momento del screening. Esto poner en valor los resultados obtenidos dentro del CART19-BE-01 al comparar dicha mediana de líneas previas de tratamiento con la mediana de 3 líneas previas publicada para LLA pediátrica con tisa-cel (139), a la mediana de 3 líneas previas publicada para LLA del adulto con AUTO-1 (143), y a la mediana de 2 líneas previas publicada para LLA del adulto con brexu-cel (142) (Imagen 68).

Mediana de líneas previas de tratamiento

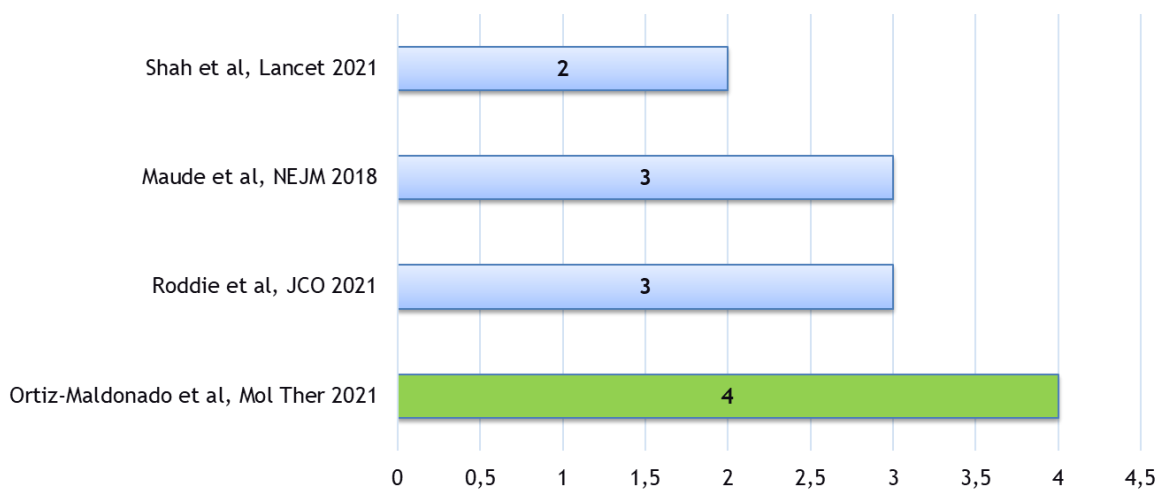


Imagen 68: Comparativa de mediana de líneas previas de tratamiento en ensayos clínicos de terapia CAR-T en LLA R/R.

Otros estudios no publican la mediana de tratamientos previos recibidos (137,138). Es por esto por lo que consideramos que los pacientes con LLA tratados dentro del CART19-BE-01 han recibido una mayor cantidad de tratamientos previos, con todo lo que ello conlleva en cuestiones de toxicidad acumulada y selección de clonas tumorales resistentes.

La exposición previa a fármacos de inmunoterapia modernos tales como el blinatumomab o el inotuzumab es relevante debido a potenciales implicancias sobre aspectos de seguridad y eficacia de las terapias CAR-T. El uso previo de dichos fármacos pueden ser factores desfavorables por un lado reduciendo la tasa y duración de respuestas completas, tal como se ha demostrado para aquellos pacientes no respondedores al blinatumomab (169). Por otro lado, también podrían tener potenciales implicancias en cuanto a la seguridad de los tratamientos CAR-T, ya que, por ejemplo, el uso previo de inotuzumab podría incrementar el riesgo de complicaciones graves potencialmente mortales, tales como el síndrome de obstrucción sinusoidal (165).

En lo que respecta a la exposición a estas terapias, observamos que en el CART19-BE-01 los pacientes incluidos habían sido considerablemente expuestos a dichos fármacos. La proporción de pacientes incluidos que habían sido previamente expuestos a terapias dirigidas anti-CD19 u anti-CD22 fue del 24% para blinatumomab, y del 34% para inotuzumab, proporciones que podría ser

consideradas como representativa de la vida real. Este uso previo podría ser considerado comparable con lo publicado en otros ensayos, con un uso previo del 25% de blinatumomab y 50% de inotuzumab para LLA del adulto tratados con AUTO-1 (143), y con un uso previo del 45% para blinatumomab y del 22% para inotuzumab en LLA del adulto tratados con brexu-cel (142) (Imagen 69).

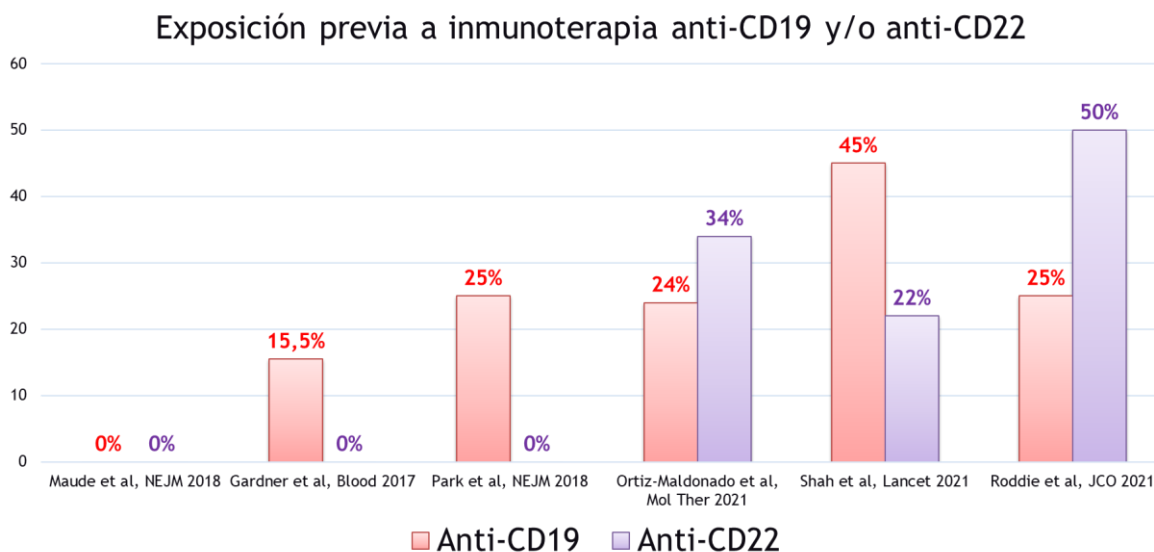


Imagen 69: Comparativa de exposición previa a fármacos de inmunoterapia en ensayos clínicos de terapia CAR-T.

Sin embargo, pone en valor los resultados obtenidos dentro del CART19-BE-01 al compararse favorablemente con el uso previo de 15,5% para terapias anti-CD19 en LLA pediátrica con JCAR014 (137) y del 25% de uso de terapias anti-CD19 para LLA del adulto tratado con su 19–28z CAR-T (138). Ambos estudios no reportan haber incluido pacientes expuestos previamente a inotuzumab. Si bien la ausencia de exposición a inotuzumab es esperable para la población pediátrica al no estar indicado en la misma, no es representativo para la población adulta. Finalmente, otros estudios como el publicado para LLA pediátrica con tisa-cel (139) no presentaban pacientes expuestos ni a blinatumomab ni a inotuzumab. Esto, reduce la representatividad de los resultados obtenidos con dichos pacientes al no ajustarse a la realidad de los pacientes con LLA R/R de la época.

Finalmente, es relevante mencionar que esta mayor cantidad de líneas previas observadas en los pacientes del CART19-BE-01 también se refleja en la proporción de pacientes incluidos tras al menos un AloTPH. En el CART19-BE-01, un 87% de los pacientes tratados con LLA habían realizado previamente un AloTPH. Este 87% representa una de las mayores proporciones de pacientes post AloTPH observadas en ensayos clínicos CAR-T en LLA. Otros estudios en LLA publican proporciones de pacientes con AloTPH previos considerablemente inferiores, con un 65% de AloTPH previos en LLA del adulto con AUTO-1 (143), un 62% para LLA pediátrica con JCAR014 (137), un 61% para LLA pediátrica con tisa-cel (139), un 43% para LLA adultos con JCAR017 (140), un 42% para LLA del adulto tratados con brexu-cel (142), e incluso un 36% para LLA del adulto tratado con su 19–28z CAR-T (138) (Imagen 70).

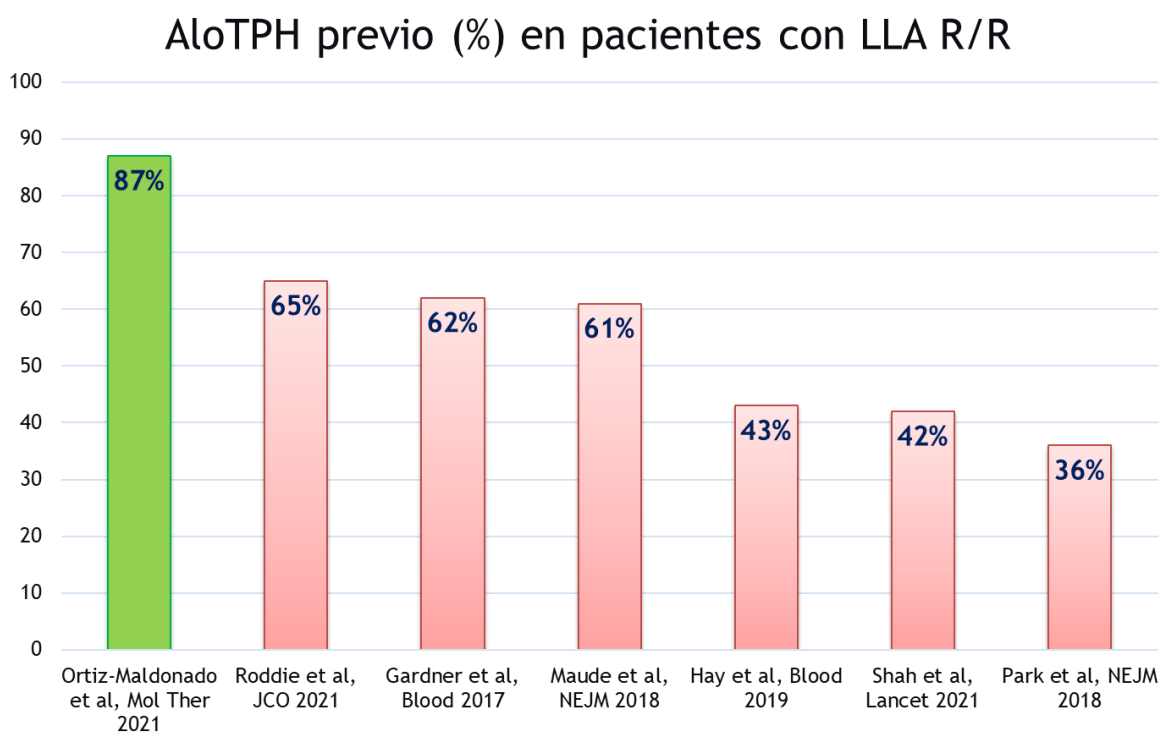


Imagen 70: Comparativa de exposición previa a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos en ensayos clínicos de terapia CAR-T.

Consideramos el hecho de que casi el 90% de los pacientes hayan sido tratados dentro del CART19-BE-01 tras haber fracasado a un AloTPH añade valor a los resultados obtenidos tanto en cuestiones de seguridad como de eficacia. De seguridad al tratarse de una población con mayor

toxicidad acumulada derivada del AtoTPH, y de eficacia, al presentar por lo tanto una menor (u marginal) tasa de realización de AtoTPH “de consolidación” posteriores, esto último reduciendo las posibles dudas en relación con el valor antitumoral del ARI-0001.

En cuanto a los pacientes con LNH tratados con ARI-0001 dentro del ensayo CART19-BE-01 es relevante mencionar que su número limitado (n=8) impide extraer conclusiones sólidas. Sin embargo, se puede mencionar que se trataba de una pequeña población de pacientes extremadamente tratados, presentando una mediana de 6 líneas previas de tratamiento, incluyendo un 50% de pacientes con un trasplante de progenitores hematopoyéticos. Esto pone en valor los resultados obtenidos en estos escasos pacientes al compararse con la mediana de 3 líneas previas de tratamiento realizadas en los ensayos clínicos pivotaes para LNH-B agresivos para axi-cel (170), tisa-cel (144), y liso-cel (146). Finalmente, la proporción del 50% de trasplante previo de los pacientes con LNH del CART19-BE-01 puede ser comparable a la observada del 21%, 35% y 49% observada en los estudios previamente mencionados.

5.4. Sobre aspectos de seguridad:

Existen múltiples complicaciones en la terapia CAR-T (171–176), las cuales se han descrito siendo capaces de afectar virtualmente toda la economía del organismo (Imagen 71).

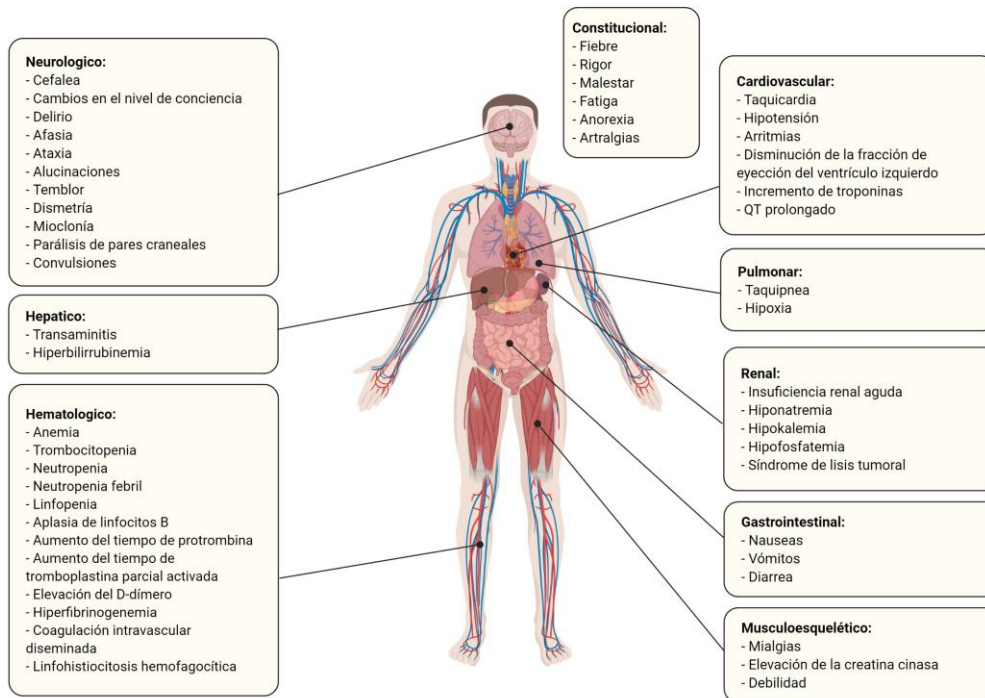


Imagen 71: Adaptado de Brudno et al, Blood 2016 (174). Manifestaciones del SLC/ICANS.

Más allá del síndrome de liberación de citocinas (SLC) y la neurotoxicidad mediada por CAR-T (ICANS), los pacientes tratados con terapias CAR-T presentan otras numerosas complicaciones que incluyen citopenias, alteraciones de la hemostasia, alteraciones hepáticas, e infecciones (177), entre otras. Sin embargo, son el riesgo y la gravedad del SLC y del ICANS las dos principales complicaciones que dominan en gran medida el concepto de seguridad de esta tecnología en su aplicación en hemopatías malignas. Tanto el SLC como el ICANS son los principales determinantes de la duración del ingreso de los pacientes, del requerimiento de estancia en unidades de cuidados intensivos y de mortalidad asociada al procedimiento. Por estos motivos es que el SLC y el ICANS son las dos principales complicaciones analizadas para cada producto CAR-T, en cada enfermedad, y en cada ensayo clínico a la hora de procurar comparar seguridad.

5.5. Sobre el fraccionamiento de la dosis:

En el ensayo CAR19-BE-01, la administración de células ARI-0001 comenzó mediante la administración de la totalidad de la dosis de CAR-T (100%) en una única administración. Dicha posología correspondía a una dosis correspondiente a 1×10^6 CAR-T/kg para LLA del adulto y LLC, y 5×10^6 CAR-T/kg para LLA pediátrica y LNH-B. Un total de 16 pacientes habían recibido tratamiento con ARI-0001 sin presentar toxicidades limitantes de dosis hasta que 3 pacientes con LLA de 11, 19 y 35 años fallecieron a causa del tratamiento: 2 de ellos por SLC grado 5, y otro debido a una colitis pseudomembranosa grave sobreañadida a un SLC grado 3, respectivamente. Las 3 muertes ocurrieron de forma agrupada en un plazo de tan sólo 28 días entre mayo y junio del 2018, lo cual derivó en la suspensión de todos los tratamientos dentro del mismo.

Los 3 pacientes presentaban muy elevadas cargas tumorales, con 47%, 72% y 100% de infiltración medular por LLA al screening, respectivamente. Los 3 pacientes presentaron un SLC que inició en menos de 24hs, con 2 de ellos progresando rápidamente a SLC grave en 24-48hs tras su inicio. El tercer paciente (con colitis concurrente) alcanzó criterios de SLC grave algo más tarde a los 6 días de la administración del CAR-T.

El protocolo de manejo del SLC utilizado entonces era el propuesto por Lee et al. Blood 2014 (178), el cual se basaba en el uso de medidas de soporte médico hasta un SLC grado 2, e iniciando el tratamiento específico con tocilizumab y corticoides recién partir del SLC grado 3 en adelante (Imagen 72).

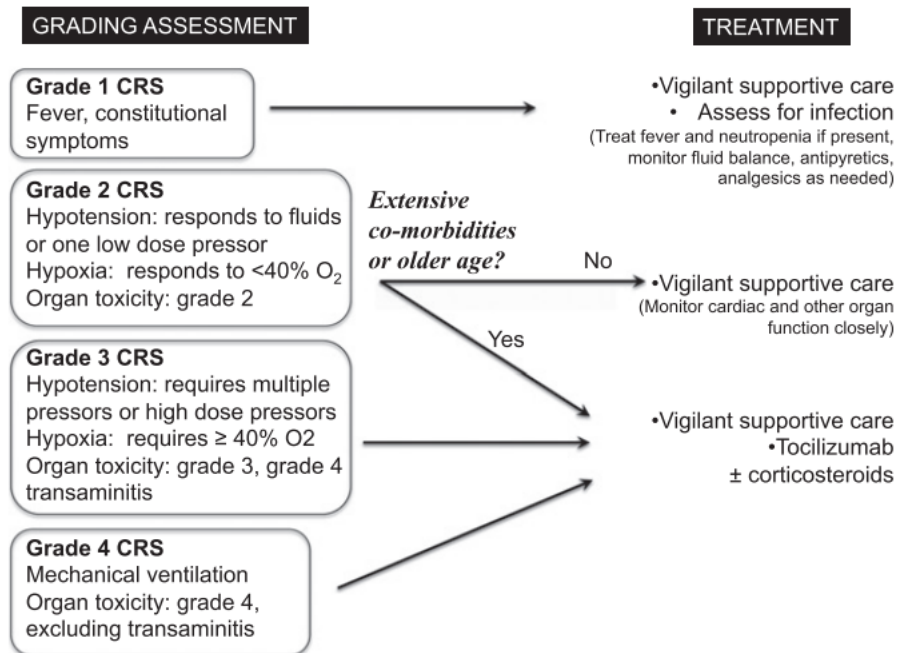


Imagen 72: Lee et al, Blood 2014 (178): Algoritmo de tratamiento para el manejo del SLC.

Los pacientes debían, por lo tanto, desarrollar un SLC grave antes de poder iniciar el tratamiento específico. Siguiendo las instrucciones del protocolo, los pacientes iniciaron tratamiento del SLC a partir del SLC grado 3, recibiendo tocilizumab y tratamiento corticoide. Sin embargo, los 3 pacientes evolucionaron desfavorablemente, falleciendo los 3 dentro de las 72hs del inicio del tratamiento específico anti-SLC en los días +4, +5, y +8, respectivamente.

El paciente de 35 años que había desarrollado un SLC grado 3 que se encontraba en vías de resolución tras el inicio del tratamiento específico, sin embargo, posteriormente presentó un franco deterioro de forma irreversible. La necropsia realizada en este caso demostró la presencia de una colitis grave, con persistencia de enfermedad a nivel medular.

No obstante, las necropsias de los pacientes que fallecieron puramente por SLC grado 5 observaron estudios medulares que sorprendentemente se encontraban en remisión morfológica. Dichos pacientes, a pesar de tratarse con una muy alta carga tumoral previo al tratamiento (47% y 72%) fallecieron en remisión morfológica a tan sólo +4 y +5 días del ARI-0001. Esto refleja el poder terapéutico de este tipo de tecnología, el cual irónicamente, representa también el principal peligro de esta. La terapia CAR-T es capaz eliminar en muy poco tiempo una cantidad de biomasa

superior a la que el organismo es capaz de amortiguar, provocando una alteración irreversible de su homeostasis.

El desarrollo de estos 3 eventos de mortalidad relacionados al procedimiento motivaron la realización de una segunda enmienda mayor que implicó los siguientes cambios: (a) pasar de una administración de dosis única a una fraccionada, con tres alícuotas con el 10, 30, y 60% correspondientes de la dosis objetivo a administrarse separados por no menos de 24hs en función de la ausencia de SLC, (b) el adelantamiento del inicio del tratamiento específico del SLC con tocilizumab del SLC grado 3 a un SLC grado 2, y (c) la reducción de la dosis pediátrica a una dosis de 1×10^6 CART/kg, similar a la de adultos. Estos cambios fueron propuestos por los miembros del DSMB del CART19-BE-01, con la recomendación del fraccionamiento realizada por la Dra. Shanon Maude, con quien estamos eternamente agradecidos (Imagen 73).

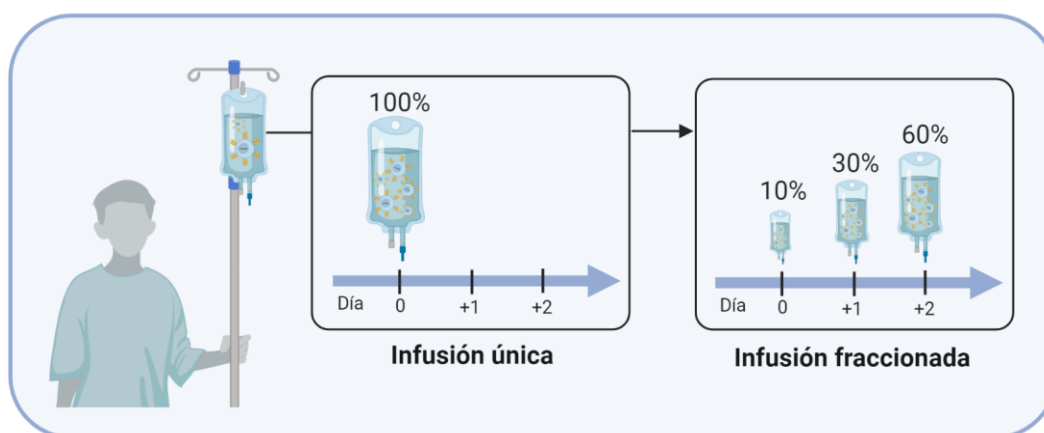


Imagen 73: Adaptado de Ortiz-Maldonado et al, Mol Ther 2021 (165): Modificación en la administración del ARI-0001.

5.6. Sobre aspectos de SLC:

El inicio del fraccionamiento de las administraciones del ARI-0001 modificaron considerablemente los resultados de seguridad en cuanto a SLC y MRP. (a) Los pacientes con LLA que recibieron tratamiento con ARI-0001 dentro del ensayo CART19-BE-01 como *dosis única* (n=15), presentaron una tasa de SLC global del 73,3%, siendo este grave (grado 3 o superior) en el 26,7%. Dicho SLC

inició de mediana al día 0, con una duración mediana de 5 días. Además, para el control de dicho SLC, un 26,7% de los pacientes recibieron tratamiento con tocilizumab y un 20% recibieron corticoides. Finalmente, la mortalidad relacionada con el procedimiento fue del 20% (3/15). Por otra parte, (b) una vez instaurado el fraccionamiento de dosis (n=23), la tasa global de SLC se redujo al 43,5%, siendo este grave en tan sólo el 4,3%. Dicho SLC inició más tarde, con una mediana de inicio al día +3, y con una duración más corta con una mediana de 4 días de duración. En resumen, el fraccionamiento de dosis permitió reducir la incidencia, la gravedad, la precocidad y la duración del SLC, reduciendo la mortalidad relacionada con el procedimiento al 0% (Imagen 74).

	Dosis única	Dosis fraccionada
Leucemia aguda linfoblástica	n = 15	n = 23
SLC grado ≥ 1 , n (%)	11 (73,3)	10 (43,5)
SLC grado ≥ 3 , n (%)	4 (26,7)	1 (4,3)
Tocilizumab (SLC), n (%)	4 (26,7)	2 (8,7)
Corticoides (SLC), n (%)	3 (20,0)	0
Tiempo a SLC (días), mediana	0	3
Duración del SLC (días), mediana	5	4

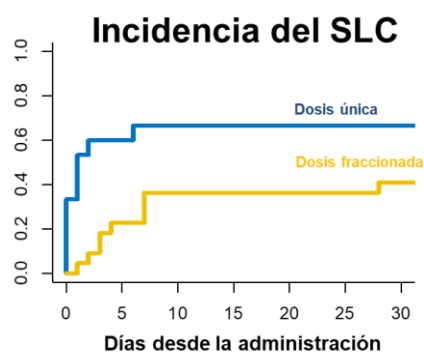


Imagen 74: Adaptado de Ortiz-Maldonado et al, Mol Ther 2021 (165): Incidencia y gravedad del SLC antes y después del fraccionamiento de la dosis del ARI-0001 en pacientes con LLA.

En conjunto, la tasa de SLC observada en los pacientes con LLA dentro del ensayo CART19-BE-01 fue del 55,3%, siendo esta grave en el 13,2%, a expensas de un uso de tocilizumab del 15,8% y de corticoides del 7,9%, con una MRP del 7,9%. Sin embargo, si nos focalizamos en la realidad del ARI-0001 desde el inicio del fraccionamiento, hemos objetivado una tasa de SLC global del 43,5%, siendo esta grave (grado 3 o superior) en el 4,3%. Todo esto a expensas de un uso de tocilizumab del 8,7% y de corticoides del 0%, con una MRP del 0%.

Estos resultados adquieren perspectiva al ser comparados con los resultados de los principales estudios publicados hasta la fecha. En efecto, podría decirse que la tasa global de SLC del 55,3% observada con ARI-0001 en LLA (o del 43,5% desde el fraccionamiento) es comparable con la tasa

de SLC del 55% observada para AUTO-1 en LLA de adultos (143). Sin embargo, impresiona ser francamente menor a las tasas de SLC observadas en otros estudios para LLA, con tasas de SLC del 77% para tisa-cel pediátrica (139), del 85% para 19–28z en adultos (138), del 89% para brexu-cel en adultos (142), del 93% para JCAR014 pediátrica (137) y del 94% para CTL019 (tisa-cel) en adultos (141).

Aún más, estos resultados se confirman cuando analizamos la tasa de SLC grave (grado 3 o superior) obtenida con ARI-0001 en LLA, especialmente con los resultados obtenidos desde el inicio del fraccionamiento. Dicha incidencia de SLC grave se ha reducido del 26,7% al 4,3% desde el inicio del fraccionamiento, resultando en un 13,2% global. Esta tasa de SLC grave del 13,2% impresiona ser mayor a la observada para AUTO-1 en LLA de adultos (143), que sorpresivamente reportan de ser del 0%. Sin embargo, es claramente favorable al compararla con las tasas de SLC graves observadas en otros estudios para LLA, con tasas de SLC grave del 23% para JCAR014 pediátrica (137), del 24% para brexu-cel en adultos (142), del 26% para 19–28z en adultos (138), del 47% para tisa-cel pediátrica (139), y del 72% para CTL019 (tisa-cel) en adultos (141) (Imagen 75).

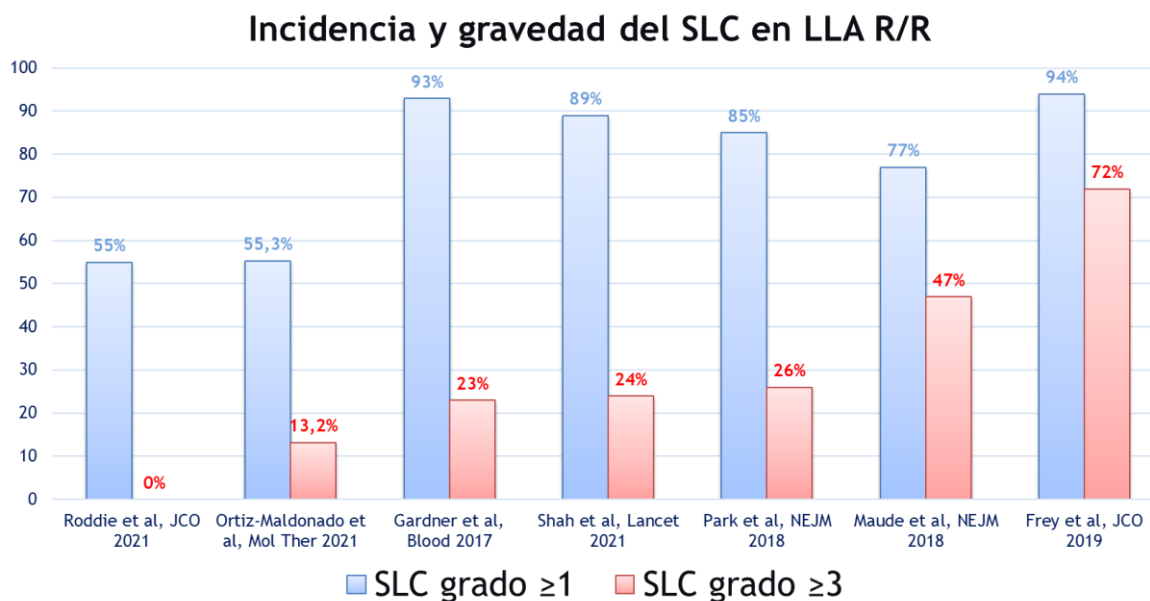


Imagen 75: Comparativa de la incidencia y gravedad del SLC en los principales ensayos de terapia CAR-T en LLA.

Un aspecto de gran relevancia de cara a analizar la incidencia y gravedad del SLC, además del producto CAR-T administrado, es el protocolo de control específico para SLC utilizado con los pacientes. Un mismo producto CAR-T podría obtener distintos resultados de incidencia y gravedad de SLC en función de cómo se realice el abordaje terapéutico de las mismas. Diferencias en cuanto a la práctica del uso de tocilizumab podrían conseguir cambios significativos en la incidencia y gravedad de estas toxicidades. Por ejemplo, la administración fraccionada de dosis de tanto AUTO-1 como ARI-0001 en LLA han obtenido tasas de SLC globales muy similares, del 55% para AUTO-1 vs 43,5% para ARI-0001 (fraccionado) (143,165). Sin embargo, las tasas de SLC grave tienden a invertir la tendencia, con incidencias del 0% para AUTO-1 vs 4,3% para ARI-0001. Dicho cambio en la tendencia podría estar relacionada a la marcada diferencia en cuanto al uso de tocilizumab, con un uso del 35% en aquellos tratados con AUTO-1 vs del 8,7% con ARI-0001.

Esto nos lleva a analizar el uso de tocilizumab y corticoides de cara a poner en contexto los resultados de incidencia y gravedad de SLC obtenidos con los distintos productos. En este aspecto, los resultados de incidencia y gravedad del SLC obtenidos con ARI-0001 en LLA se ponen en mayor valor al comparar el uso global de tocilizumab en los distintos ensayos clínicos. Esto es así, ya que el uso de global tocilizumab dentro del ensayo CART19-BE-01 fue del 15,8% (8,7% desde el fraccionamiento), uso que se compara favorablemente al ser francamente menor al uso publicado del 35% para AUTO-1 en LLA de adultos (143), al 35,8% para 19-28z en adultos (138), al 37% para JCAR014 pediátrica (137), al 48% para tisa-cel pediátrica (139), y por sobre todo francamente menor al 80% para brexu-cel en adultos (142). Otros estudios para tisa-cel (CTL019) de adultos no reportan el uso de tocilizumab (141) (Imagen 76).

SLC y uso de tocilizumab

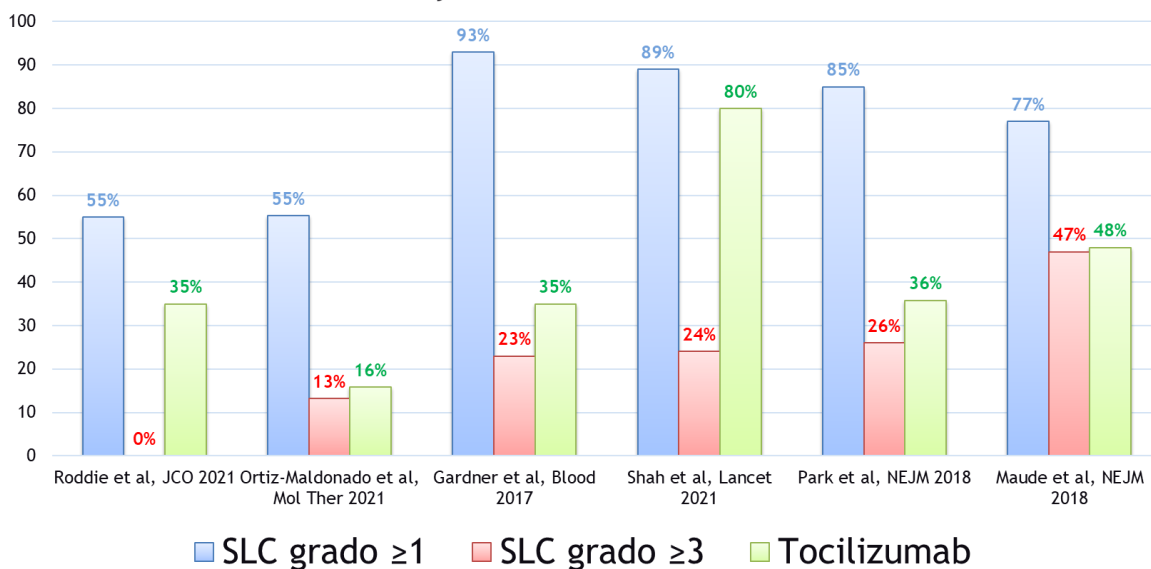


Imagen 76: Contextualización de la incidencia y gravedad del SLC según el consumo de tocilizumab en los principales ensayos de terapia CAR-T en LLA.

En cuando a la población de LNH tratados con ARI-0001 dentro del ensayo CART19-BE-01, se han objetivado unas tasas de SLC globales del 87%, y graves del 25%. Esta aparente mayor tasa de SLC global y grave observado con ARI-0001 en LNH podría estar relacionado con diferencias en la dosis administrada de ARI-0001 con respecto a LLA. De hecho, en el CART19-BE-01 se administró una dosis de 5×10^6 CAR-T/kg en LNH, dosis que fue superior a la de 1×10^6 CAR-T/kg utilizado en LLA. Esta mayor tasa de SLC en LNH fue acompañada también por un mayor uso de tocilizumab, siendo este administrado en el 37,5% de los pacientes. A pesar de ello, ningún paciente falleció por SLC, cuyos episodios fueron controlados sin requerir del uso de corticoides. El fraccionamiento de la dosis en LNH también impresionó reducir la tasa de SLC grave, siendo esta del 33% con la dosis única y del 20% tras el inicio del fraccionamiento.

Finalmente, si comparamos los resultados obtenidos con lo publicado en otros estudios pivotaes en LDCBG, podemos ver que la tasa de SLC global obtenida con ARI-0001 en LNH del 87% podría ser comparable con la del 92% obtenida con axi-cel (170). Por otra parte, impresiona ser mayor a la del 58% obtenida con tisa-cel (144), y a la del 42% obtenida con liso-cel (146). Resultados similares se obtienen al comparar las tasas de SLC graves, donde si bien la tasa de SLC grave del

25% obtenida con ARI-0001 podría ser comparable con la del 22% obtenida con tisa-cel (144), es por otra parte mayor a la del 11% obtenida con axi-cel (170), y aún más a la del 2% obtenida con liso-cel (146). Estos resultados en cuanto a incidencia y gravedad del SLC se ven reflejados en el uso de tocilizumab, con un uso con ARI-0001 del 37,5% que podría ser comparable con el 43% de uso para axi-cel(170), pero que es mayor al 18% de uso con liso-cel (146) y al 14% de uso con tisa-cel (144). Sin embargo, consideramos que el limitado tamaño de la población de LNH tratada con ARI-0001 (n=8) impide de momento extraer conclusiones sólidas en este aspecto.

5.7. Sobre aspectos de neurotoxicidad o ICANS:

La incidencia y gravedad de la neurotoxicidad o ICANS es uno de los factores que más preocupan a los equipos médicos tratantes. Esto es debido a que dicha complicación contribuye considerablemente a la morbilidad del procedimiento CAR-T, siendo uno de los mayores factores implicados en la duración de la hospitalización. El análisis de la incidencia y gravedad de esta complicación con ARI-0001 hace evidente uno de los aspectos a destacar del ARI-0001.

La tasa global de neurotoxicidad o ICANS observada con ARI-0001 en LLA en el ensayo CART19-BE-01 fue del 18,4%, lo cual consideramos que es comparable a la incidencia del 20% observado para AUTO-1 en LLA de adultos (143). Sin embargo, es francamente menor a la incidencia del 40% para tisa-cel pediátrica (139), al 40% para CTL019 (tisa-cel) en adultos (141), al 44% para 19–28z en adultos (138), al 49% para JCAR014 pediátrica (137) y por sobre todo al 60% para brexu-cel en adultos (142).

Aún más, estas diferencias se hacen aún más evidentes cuando analizamos la tasa de neurotoxicidad o ICANS grave (grado 3 o superior). Sólo un paciente con LLA del CART19-BE-01 presentó un episodio transitorio de NT/ICANS grave, el cual además resolvió espontáneamente sin uso de tratamiento corticoideo. Esto deja una tasa de NT/ICANS grave del 2,6% para ARI-0001 en LLA. Si bien estos resultados podrían ser comparables al 6% observado para CTL019 (tisa-cel) en adultos (141), es francamente menor al 13% observado para tisa-cel pediátrica (139), al 15% observado para AUTO-1 en LLA de adultos (143), al 21% para JCAR014 pediátrica (137), al 26% para brexu-cel en adultos (142) y al 42% para 19–28z en adultos (138) (Imagen 77).

Incidencia y gravedad de la NT/ICANS

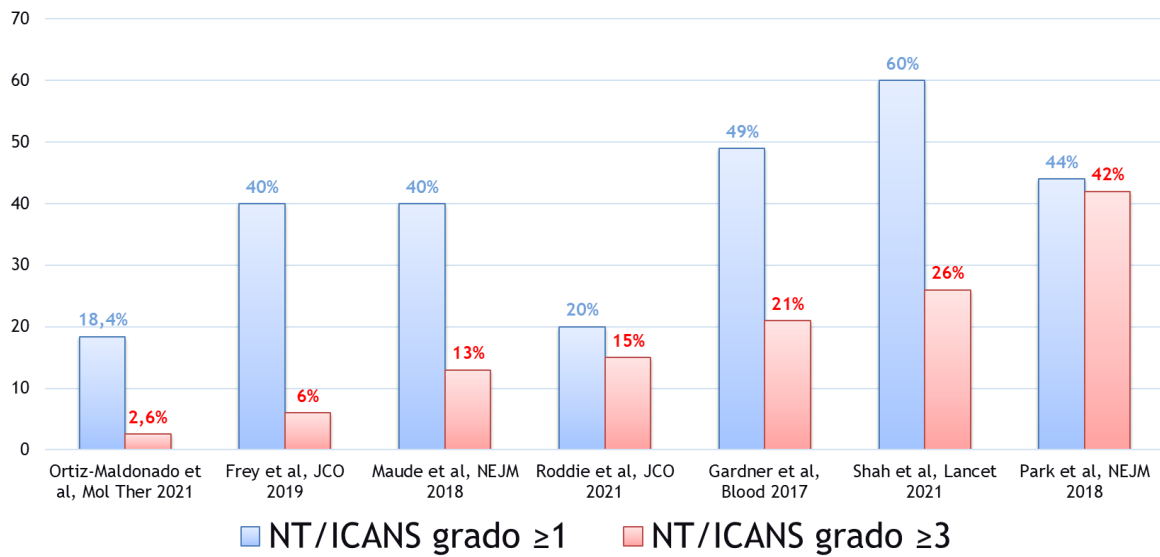


Imagen 77: Comparativa de la incidencia y gravedad de la NT/ICANS en los principales ensayos de terapia CAR-T en LLA.

Estos resultados toman mayor relevancia al reconocer que ningún paciente tratado con ARI-0001 recibió tratamiento corticoideo para ICANS (7,9% para SLC), cuando el mismo fue administrado en el 20% para AUTO-1 en LLA de adultos (143), en el 23% para JCAR014 pediátrica (137), en el 32% para 19–28z en adultos (138), e incluso en el 75% para brexu-cel en adultos (142). Otros estudios para tisa-cel pediátrica (139) y CTL019 (tisa-cel) en adultos (141) no reportan los datos de uso de corticosteroides (Imagen 78).

NT/ICANS y uso de corticosteroides en LLA R/R

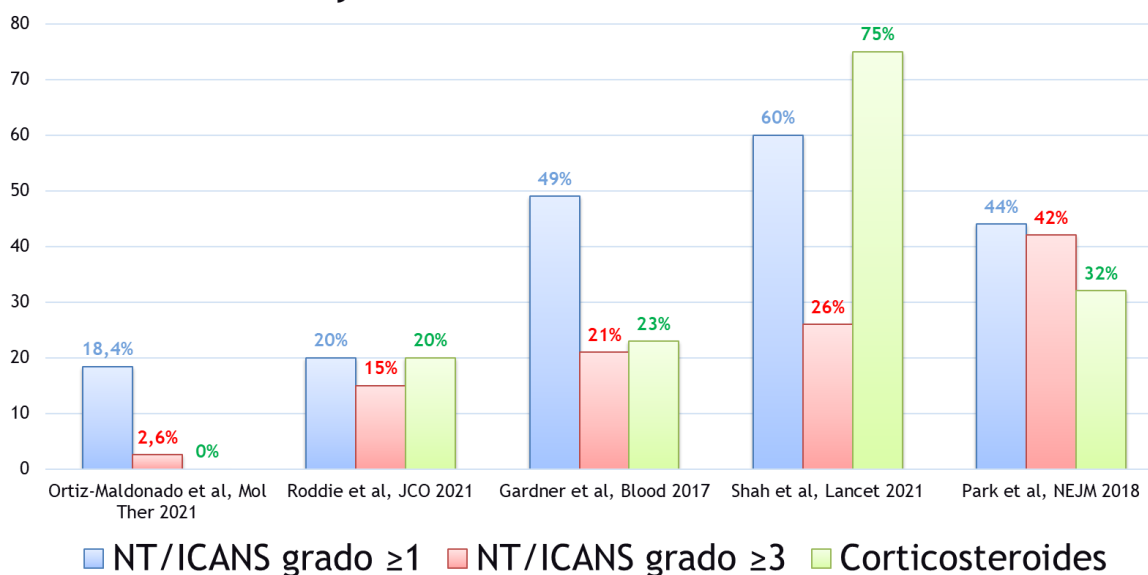


Imagen 78: Contextualización de la incidencia y gravedad de la NT/ICANS según el consumo de corticosteroides en los principales ensayos de terapia CAR-T en LLA.

Resultados similares fueron obtenidos en la cohorte de pacientes con LNH tratados con ARI-0001 dentro del CART19-BE-01, con una tasa de NT/ICANS global del 0%. Dicho resultado se compara favorablemente a las tasas del 26% (global) y 12% (grave) obtenida con tisa-cel (144), a las tasas del 30% (global) y 10% (grave) obtenida con liso-cel (146), y a las tasas del 67% (global) y 32% (grave) obtenida con axi-cel (170). Estos resultados toman mayor relevancia al observar que ningún paciente con LNH tratado con ARI-0001 recibió tratamiento corticoideo, en comparación con el 10% de uso para liso-cel (146), el 12% de uso para tisa-cel (144), y al 27% de uso para axi-cel (170) (Imagen 79).

NT/ICANS y uso de corticosteroides en LNH R/R

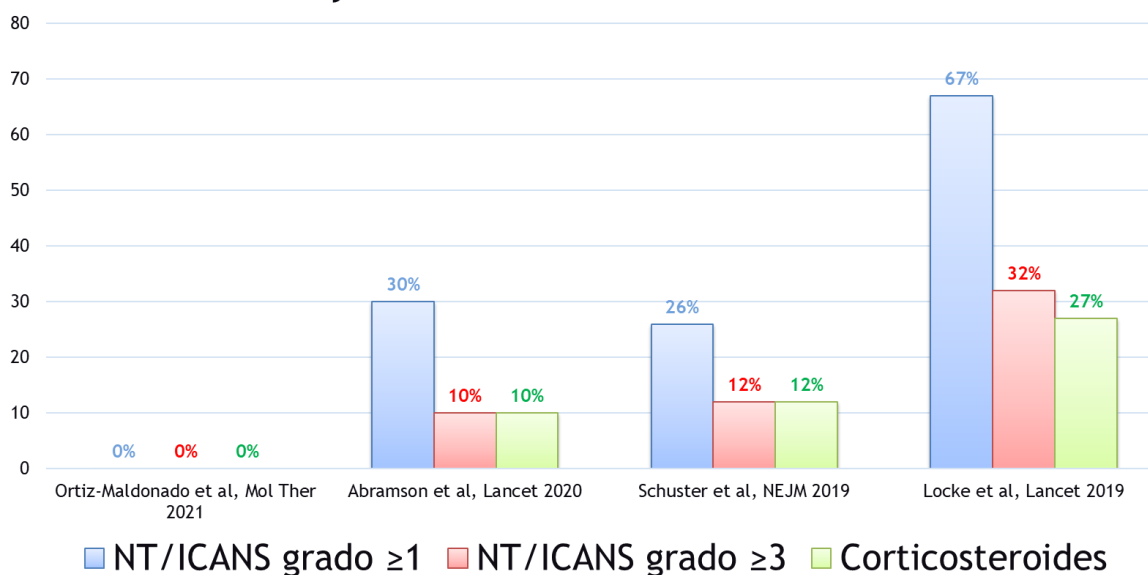


Imagen 79: Contextualización de la incidencia y gravedad de la NT/ICANS según el consumo de corticosteroides en los principales ensayos de terapia CAR-T en LNH.

En resumen, hemos observado una incidencia y gravedad de neurotoxicidad / ICANS con ARI-0001 que impresiona ser considerablemente inferior a otros productos similares. Los motivos que justifican la marcada diferencia con otros productos permanecen desconocidos para nosotros. Sin embargo, consideramos que la evidencia acumulada de uso de ARI-0001 sí impresiona corroborar estos resultados como una característica idiosincrática del ARI-0001.

5.8. Sobre aspectos de MRP:

Finalmente, una forma de analizar globalmente la seguridad de los tratamientos CAR-T administrados más allá del SLC y de la NT/ICANS es el análisis de la mortalidad relacionada con el procedimiento (MRP). La MRP global observada con ARI-0001 en LLA del ensayo CART19-BE-01 fue del 7,9%, afectando a 3 pacientes (2 por SLC grado 5 y otra por colitis pseudomembranosa grave sobre un SLC grado 3). Estos episodios de MRP, mencionados previamente, se tradujeron al

momento de su desarrollo en una MRP estimada del 20% (sobre los primeros 15 pacientes con LLA tratados).

Esto motivo el cambio de forma de administración del ARI-0001 hacia una administración fraccionada. Desde entonces, la MRP en LLA ha bajado al 0%, sin ningún nuevo evento de MRP en LLA hasta la publicación de este documento. Estos resultados son comparables al 5,3% publicado para tisa-cel pediátrica (139) y al 5,4% publicado para brexu-cel en adultos (142). Por otra parte, se comparan favorablemente al 11,4% de MRP publicado para CTL019 (tisa-cel) en adultos (141) y al 15% publicado para AUTO-1 en LLA de adultos (143). Otros estudios impresionan reportar una MRP del 0% para JCAR014 pediátrica (137), y del 1,9% para 19–28z en adultos (138). Sin embargo, dichos estudios no especifican claramente la ausencia de episodios de MRP no relacionados con el SLC, por lo que su incidencia real de MRP se desconoce (Imagen 80).

Mortalidad relacionada con el procedimiento en LLA R/R

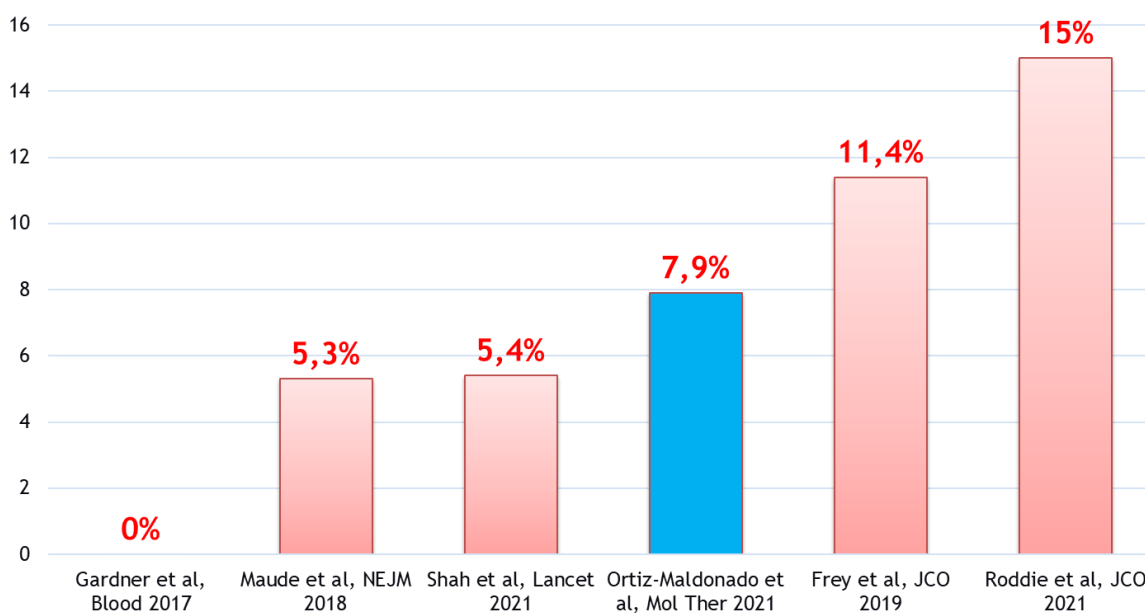


Imagen 80: Contextualización de la incidencia de MRP en los principales ensayos de terapia CAR-T en LLA.

El inicio del fraccionamiento de la dosis ha significado un antes y un después para la seguridad global de ARI-0001. El haber alcanzado una MRP del 0% cobra aún más valor cuando se pone en contexto la población de LLA tratada: una población frágil y de alto riesgo sometidos a una mediana de 4 líneas de tratamiento y con casi un 90% de recaídas postrasplante. Aún más, dichos

resultados en seguridad adquieren aún mayor solidez al observar que el uso de tocilizumab realizado con esta población se encuentra entre los más reducidos de las series de LLA publicadas.

La administración fraccionada de ARI-0001 permite el abordaje seguro intra-paciente de todo el espectro de situaciones posibles en cuanto a control de la enfermedad al reducir globalmente la incidencia y gravedad del SLC. Esto beneficia a los pacientes con baja carga tumoral al permitir que reciban su tratamiento CAR-T virtualmente sin desarrollar SLC. Por otra parte, también beneficia a aquellos pacientes que llegan con cargas tumorales medias, permitiendo realizar el tratamiento con una baja proporción de complicaciones graves. Y finalmente, permite que aquellos pacientes con muy altas cargas tumorales puedan recibir el tratamiento reduciendo marcadamente la probabilidad de que las complicaciones graves lleguen a ser irreversibles.

Es especialmente a este último grupo de pacientes, los que llegan al CAR-T con una muy alta carga tumoral, los que consideramos que más se benefician de este tipo de abordaje, ya que les permite recibir una dosis de forma paulatina ajustada a la capacidad de tolerancia de estos. Son este tipo de pacientes los que al recibir sus terapias CAR-T en una sola administración se encuentran en un elevado riesgo de desarrollar eventos de MRP preferentemente evitable. Y si bien es este el grupo de pacientes que consideramos que más se benefician del fraccionamiento, es relevante mencionar que todos los subgrupos se benefician, ya sea con baja, media o alta carga tumoral. Además, la naturaleza imprevisible de estas hemopatías malignas no permite saber cuál será la situación real de los pacientes al momento de la recepción del CAR-T. Esto afecta incluso a aquellos pacientes que inician el proceso (leucocitaféresis) estando en remisión, ya que su situación puede cambiar en cuestión de días. Si bien la administración fraccionada añade cierta complejidad tanto en la manufactura del CAR-T como en su administración, consideramos que su aplicación beneficia a la mayoría de los pacientes.

5.9. Sobre aspectos de eficacia:

Los resultados iniciales de eficacia de ARI-0001 para LLA fueron publicados para los pacientes tratados dentro del ensayo CART19-BE-01 (165), con una mediana de seguimiento para los supervivientes de 5,5 meses. En el mismo, se objetivó una tasa de RC, con EMR negativa al día +28 del 84,2%. La SLP mediana fue de 12 meses, con una tasa de SLP al año del 47%. En cuanto a la DR,

se obtuvo una mediana de 14,8 meses, con una probabilidad de DR al año del 59%. Finalmente, la mediana de SG fue de 20,2 meses, con una probabilidad de SG al año del 69%.

Los resultados de eficacia a largo plazo fueron actualizados más recientemente (166), con una mediana de seguimiento para los supervivientes de 19 meses. En este análisis, los resultados de largo plazo de los pacientes del CART19-BE-01 se sumaron los resultados de pacientes con LLA tratados dentro de un programa de uso compasivo (PUC), con un total de 53 pacientes tratados. En el mismo se objetivó una tasa de RC EMR negativa al día +28 del 88,7%, el cual fue similar al reportado previamente. La mediana de SLP fue de 13,5 meses, con una probabilidad de SLP a 1 y 2 años del 50,9% y 32,9%, respectivamente. Por otra parte, la mediana de SG fue de 29,2 meses, con una probabilidad de SG a 1 y 2 años del 70,2% y 53,9%, respectivamente.

En cuanto a las diferencias de eficacia en cuanto a edad (adultos vs pediátricos), en el seguimiento extendido y de mayor población no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al pronóstico de los pacientes adultos o pediátricos. A diferencia de lo observado previamente en los resultados iniciales del CART19-BE-01, los pacientes adultos y pediátricos sorprendentemente no presentaron diferencias estadísticamente significativas en tasa de RC ni en riesgo de recaída al ARI-0001.

De cara a poner en contexto los resultados de eficacia obtenidos con ARI-0001 partiremos de la tasa de RC EMR negativa del 88,7% obtenida con el seguimiento extendido (166). Este 88,7% obtenido con ARI-0001 podría ser comparable a las tasas de 93% para JCAR014 pediátrica (137), de 85% para JCAR017 en adultos (140), de 85% para AUTO-1 en LLA de adultos (143), de 83% para 19-28z en adultos (138), y de 81% para tisa-cel pediátrica (139). Sin embargo, consideramos que podría ser superior a las tasas de RC del 69% para CTL019 (tisa-cel) en adultos (141) y del 71% para brexu-cel en adultos (142) (Imagen 81).

Tasa de RC EMR negativa en LLA R/R

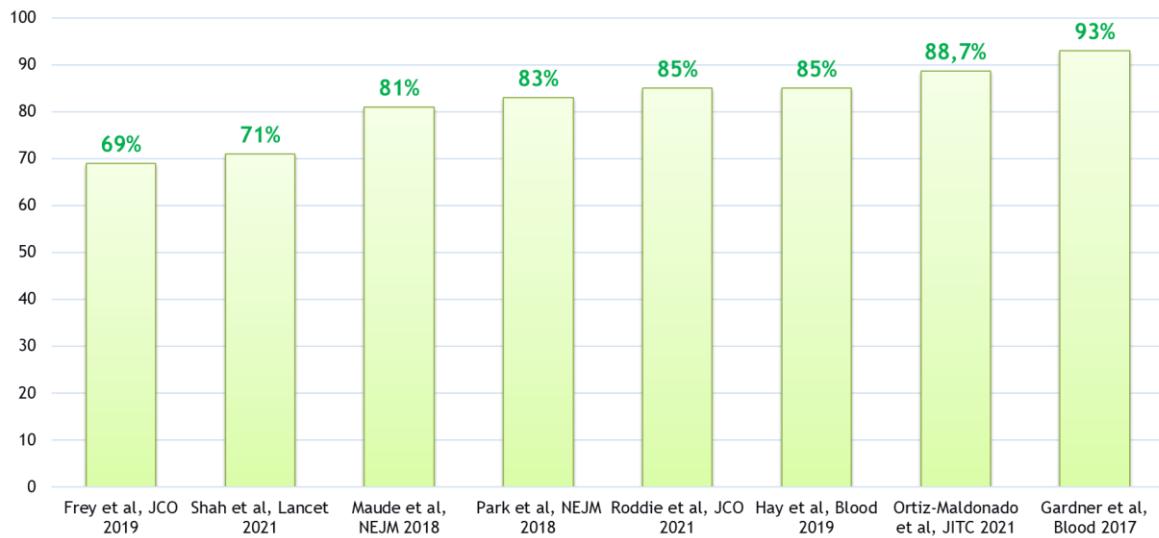


Imagen 81: Comparativa entre tasas de RC EMR negativa en los principales ensayos de terapia CAR-T en LLA.

En cuanto a SLP, la probabilidad de SLP al año observada para ARI-0001 del 50,9% (166) podría ser comparable al 51% para JCAR014 pediátrica (137), al 50% para tisa-cel pediátrica (139) e incluso al 43% para AUTO-1 en LLA de adultos (143). Sin embargo, la mediana de SLP de 13,5 meses para ARI-0001 podría ser comparada favorablemente con la mediana de 11,6 meses para brexu-cel en adultos (142), así como con la mediana aproximada de 9 meses para AUTO-1 en LLA de adultos (143), y la mediana de 7,6 meses para JCAR017 en adultos (140), la mediana 6,1 meses para 19–28z en adultos (138), y la mediana de 5,6 meses para CTL019 (tisa-cel) en adultos (141) (Imágenes 82 y 83).

Mediana de SLP en LLA R/R (meses)

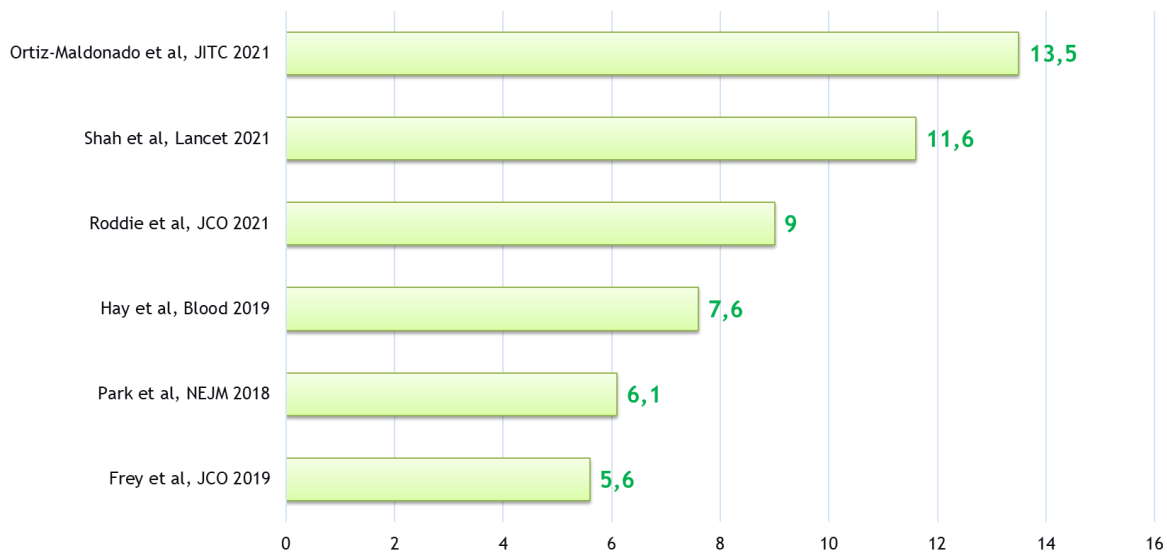


Imagen 82: Comparativa entre medianas de SLP en los principales ensayos de terapia CAR-T en LLA.

Probabilidad de SLP a 12 meses en LLA R/R

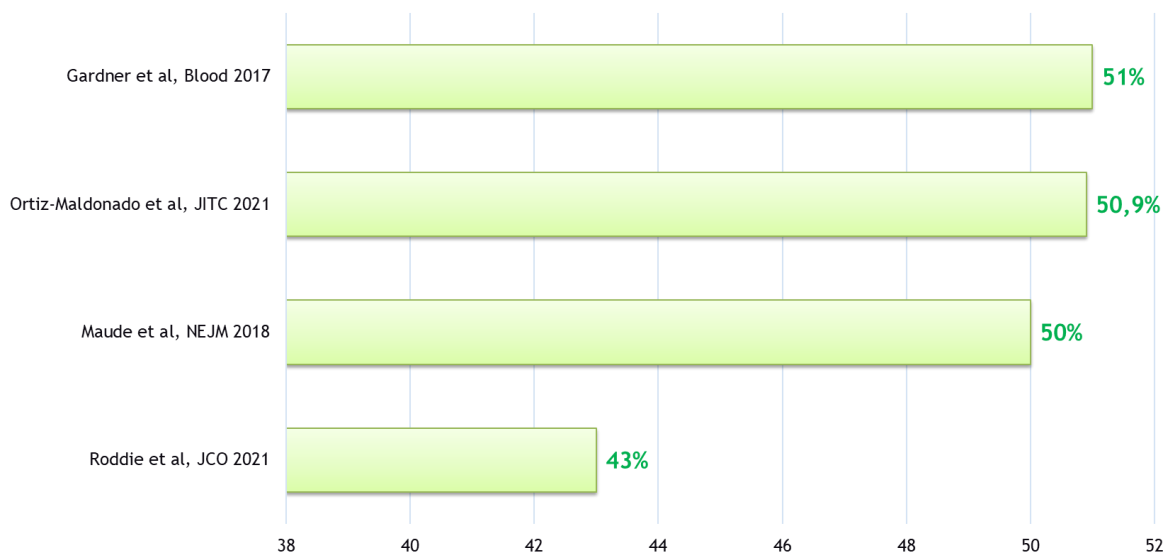


Imagen 83: Comparativa entre probabilidad de SLP al año en los principales ensayos de terapia CAR-T en LLA.

En cuanto a SG, la probabilidad al año para ARI-0001 del 70,2% podría ser comparable al 76% obtenido para tisa-cel pediátrica (139), al 69,5% para JCAR014 pediátrica (137), y al 64% para AUTO-1 en LLA de adultos (143). Sin embargo, la mediana de SG obtenida con ARI-0001 de 29,2 meses se podría comparar favorablemente con las medianas de 20 meses para JCAR017 en adultos (140), de 19,1 meses para CTL019 (tisa-cel) en adultos (141), de 18,2 meses para brexu-cel en adultos (142), y de 12,9 meses para 19–28z en adultos (138) (Imágenes 84 y 85).

Probabilidad de SG a 12 meses en LLA R/R

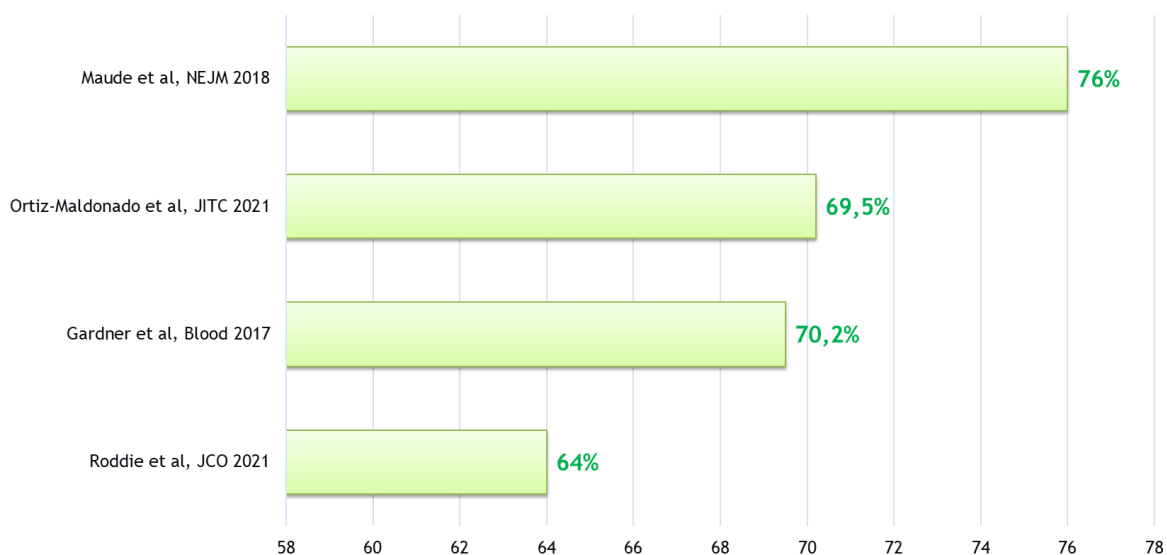


Imagen 84: Comparativa entre probabilidad de SG al año en los principales ensayos de terapia CAR-T en LLA.

Mediana de SG en LLA R/R tratados con CART19 (meses)

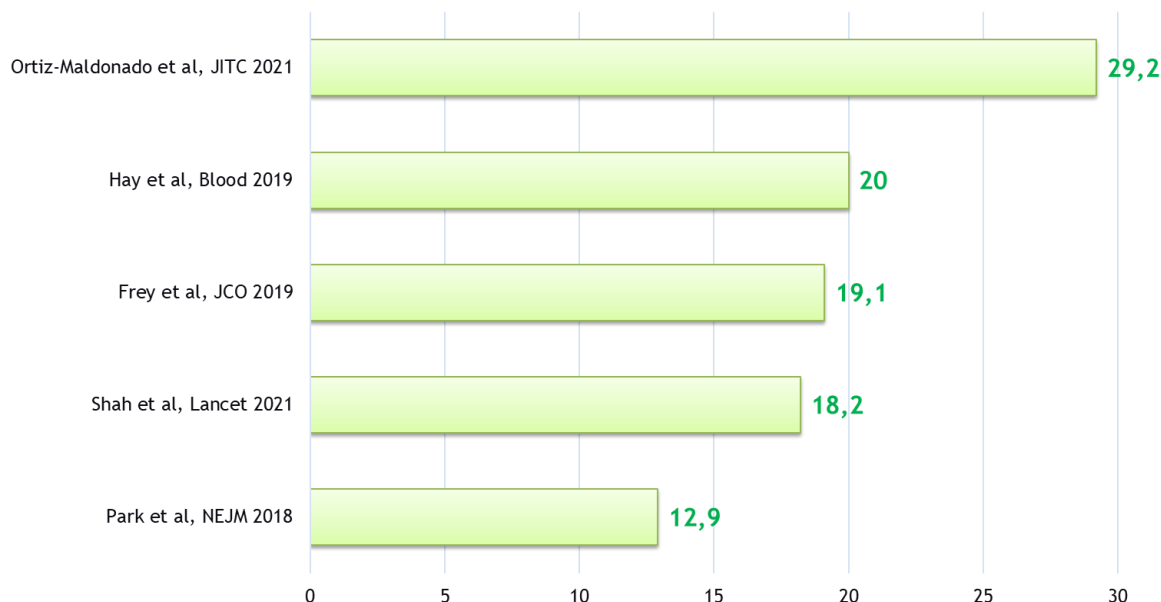


Imagen 85: Comparativa entre medianas de SG de los principales ensayos de terapia CAR-T en LLA.

Finalmente, es relevante mencionar que los resultados de eficacia obtenidos en LLA pueden ser alterados por la posibilidad de la realización de un AloTPH de consolidación posterior. Los ensayos clínicos en terapia CAR-T suelen dejar a elección del equipo médico la posibilidad de realizar este procedimiento como “consolidación”. Este procedimiento, realizado normalmente en pacientes en RC post CAR-T, se realiza con la intención de reducir el riesgo de recaída en aquellos pacientes seleccionados.

En lo que respecta a los pacientes con LLA tratados dentro del ensayo CART19-BE-01 podemos mencionar que sólo 3 pacientes de 38 (7,9%) realizaron un AloTPH post CAR-T mientras estaban en RC. Sin embargo, sólo 2 de estos pacientes realizaron dicho AloTPH para reducir el riesgo de recaída. Estos 2 procedimientos fueron realizados aproximadamente al mes +5 post CAR-T en 2 pacientes pediátricos, y fueron realizados por presentar una pérdida precoz de la aplasia absoluta de linfocitos B. El tercer paciente, también pediátrico, realizó un AloTPH muy tardío en el mes +24. Sin embargo, dicho procedimiento no fue realizado como estrategia de disminuir el riesgo de recaída, sino por el desarrollo de un síndrome mielodisplásico, encontrándose en RC EMR de su LLA al momento de su realización.

En el ensayo CART19-BE-01 solo 2 pacientes recibieron un AloTPH “de consolidación”, siendo esto un 5,2% del total. Focalizando en los pacientes respondedores (n=34), vemos que sólo 2 pacientes (un 5,9%) realizaron consolidación mediante un aloTPH mientras se encontraban en RC. Ningún adulto realizó dicho procedimiento tras el CAR-T. Por este motivo, consideramos que los resultados obtenidos con el ARI-0001 no han sido afectados significativamente por la realización de un AloTPH de consolidación post CAR-T. La escasa realización de AloTPH de consolidación dentro del CART19-BE-01 ponen en valor los resultados de eficacia obtenidos al reducir factores confusores.

Si ponemos estos resultados en contexto, observamos que esto cobra aún más valor cuando se los compara con lo realizado en otros estudios donde la proporción AloTPHs de consolidación en pacientes respondedores. Esto es así, ya que el 5,9% de AloTPH de consolidación realizado con ARI-0001 es menor al 13% para tisa-cel pediátrica (139), al 17,5% para AUTO-1 en adultos (143), al 25% para brexu-cel en adultos (142), al 26% para JCAR014 pediátrica (137), al 37,5% para CTL019 (tisa-cel) en adultos (141), al 39% para su 19–28z CAR-T en adultos (138), y por sobre todo al 40% para JCAR014 en adultos (140) (Imagen 86).

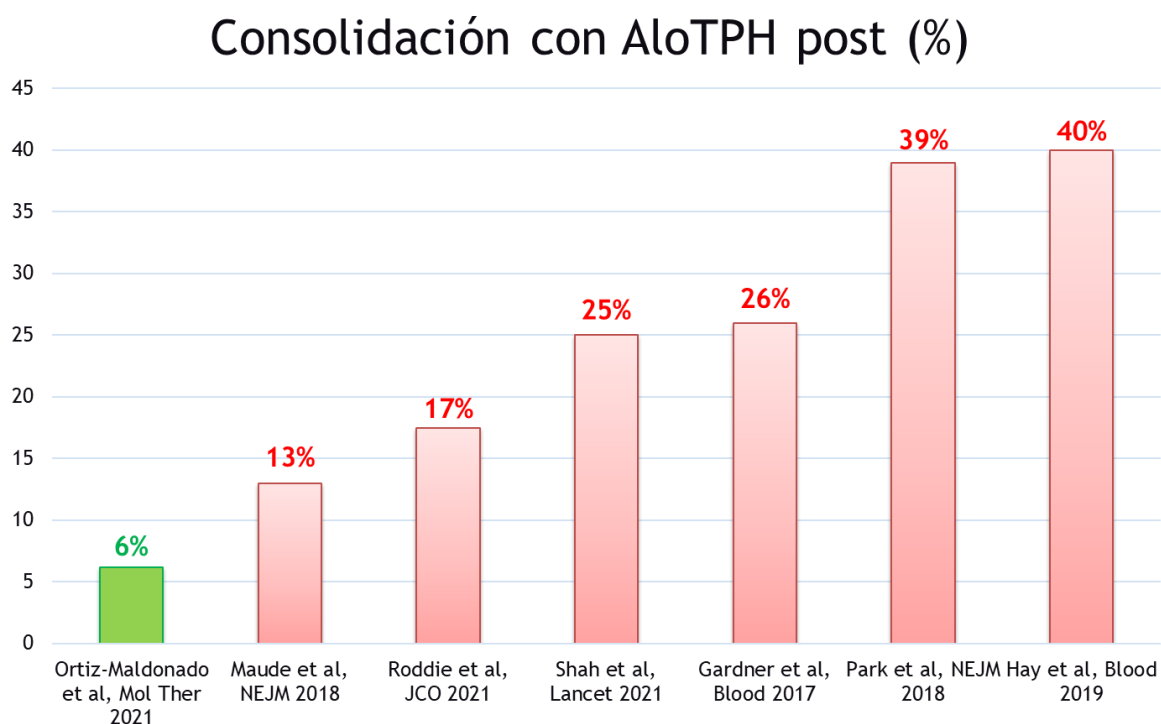


Imagen 86: Comparativa de realización de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos como consolidación de respuestas en pacientes en RC de ensayos clínicos de terapia CAR-T.

Esta comparativamente menor actividad de AloTPH de consolidación post ARI-0001 podría estar relacionada con la mayor proporción de pacientes tratados con ARI-0001 que ya habían realizado un aloTPH previo. En la serie de pacientes del CART19-BE-01, 87% de los pacientes con LLA habían realizado previamente al menos un AloTPH, una proporción francamente superior al 36-65% del resto de estudios mencionados (137–143), aunque también podría reflejar diferencias en el manejo médico de los pacientes entre distintas instituciones (Imagen 87).

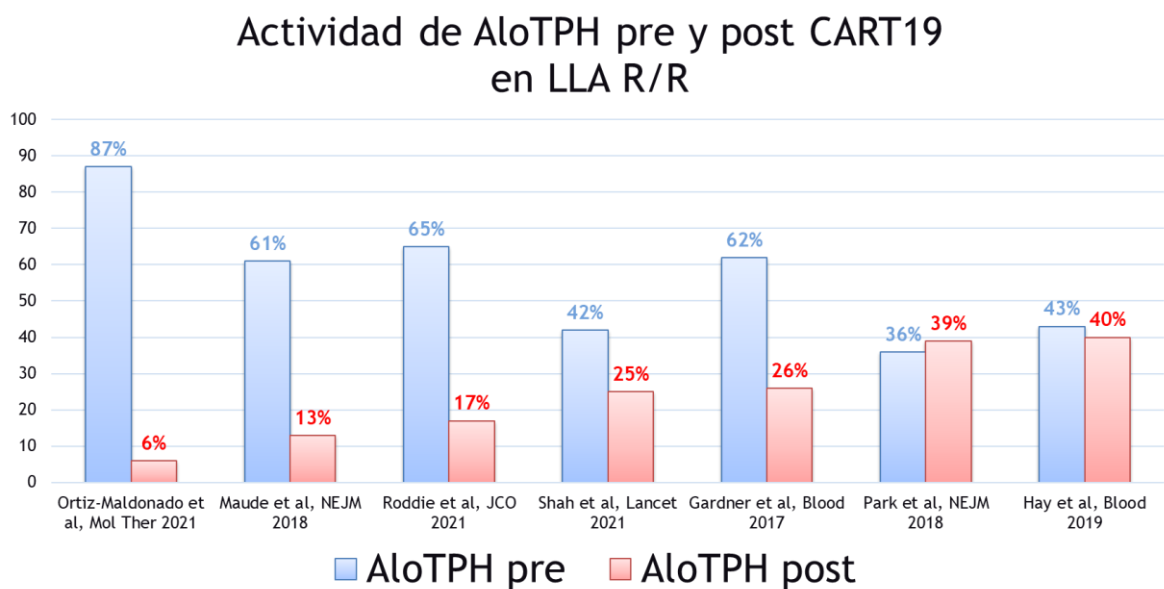


Imagen 87: Comparativa de realización de la actividad de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos pre y post terapia CAR-T de ensayos clínicos de terapia CAR-T para LLA.

En este aspecto, es relevante mencionar que el valor añadido por la realización de un AloTPH de consolidación en pacientes con LLA en RC post CAR-T es algo que no ha sido adecuadamente evaluado. Hasta la fecha de esta tesis no existen publicados ningún estudio que evalúe formal y adecuadamente el valor de este de una forma reglada. Dichos procedimientos fueron realizados sin seguir criterios preestablecidos, dependiendo del criterio propio de cada equipo tratante. Aún más, los estudios no suelen notificar los motivos por los cuales se realizaron dichos AloTPH de consolidación, por lo que realmente desconocemos que pacientes fueron trasplantados. Sin

embargo, distintos estudios evalúan post hoc la evolución de aquellos pacientes a los que se le realizó dicho procedimiento y han procurado evaluar su impacto en comparación a aquellos que no lo habían realizado.

En este aspecto, por un lado, Frey et al (JCO 2019) (141) identificó una diferencia de SLP estadísticamente significativa en favor del AloTPH de consolidación en una serie de adultos tratados con CTL019 (tisa-cel). No obstante, en dicho estudio no se observó una diferencia estadísticamente significativa para SG (Imagen 88).

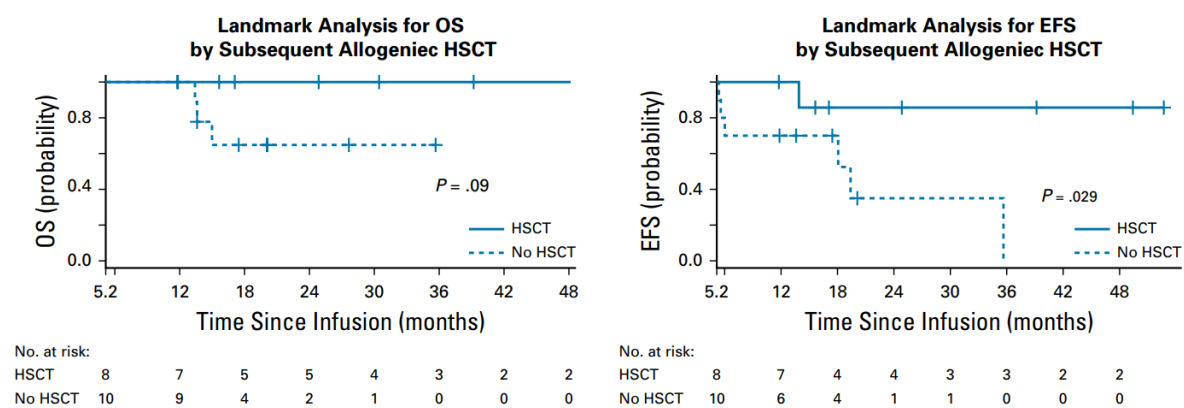
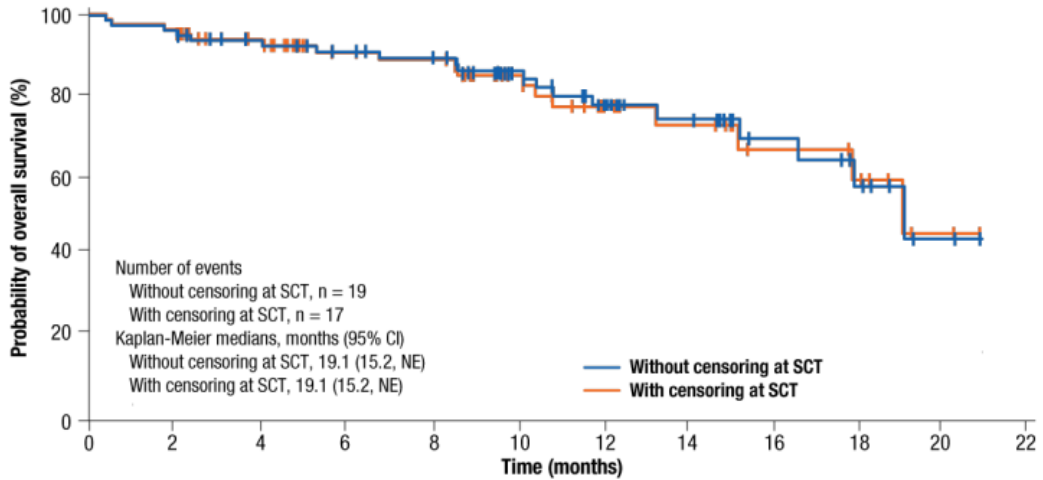


Imagen 88 (141): SG y SLE de pacientes adultos con LLA tratados con CTL019 en función de la realización o no de un AloTPH de consolidación.

Sin embargo, esta protección marginal que Frey et al (JCO 2019) (141) observo con el AloTPH no fue corroborada en ninguno del resto de estudios europeos o americanos de relevancia. Sorprendentemente, los análisis de SLP y SG no presentaron diferencias estadísticamente significativas que favorecieran el AloTPH ni con tisa-cel pediátrica (139), ni con brexu-cel en adultos (142), ni con 19–28z en adultos (138), ni con AUTO-1 en LLA de adultos (143) (Imágenes 89, 90 y 91).



Patients at risk

Without censoring at SCT	75	72	64	58	55	40	30	20	12	8	2	0
With censoring at SCT	75	72	60	48	45	31	21	15	9	7	2	0

Imagen 89 (139): SG de pacientes pediátricos y adultos jóvenes con LLA tratados con CTL019 en función de la realización o no de un AtoTPH de consolidación.

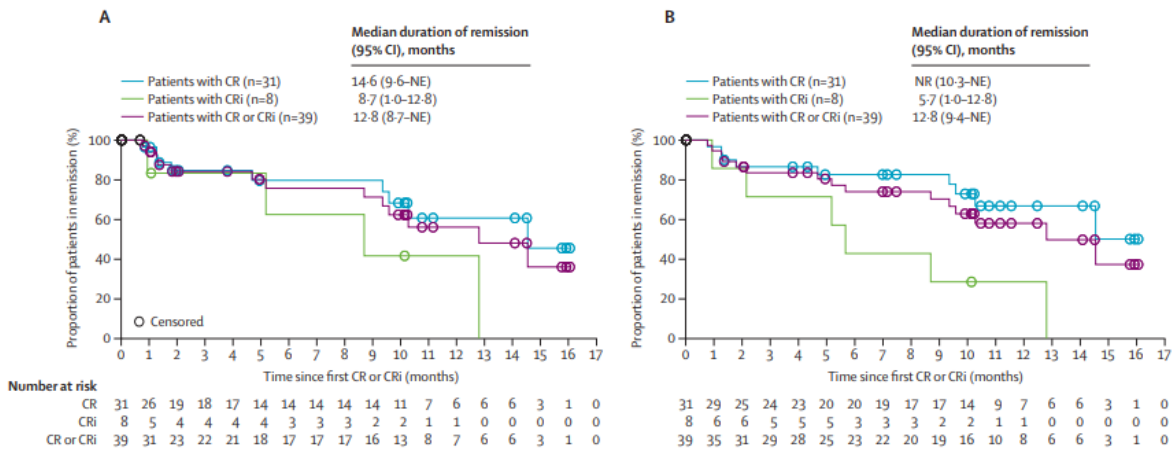


Imagen 90 (142): Mediana de DR de pacientes adultos con LLA tratados con KTE-X19 con (A) o sin (B) censura al momento de un AtoTPH de consolidación.

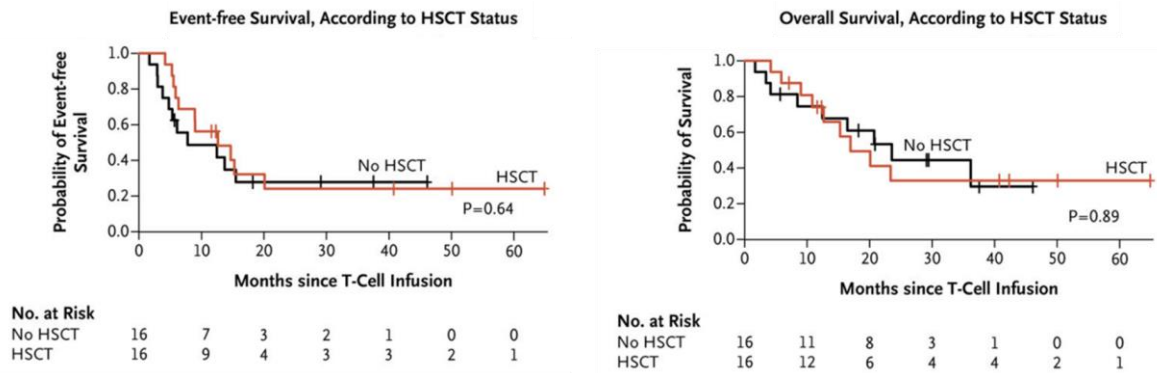


Imagen 91 (138): SLE y SG de pacientes adultos con LLA tratados con el CAR-T 19–28z con o sin AtoTPH de consolidación.

Por lo tanto, consideramos que el AtoTPH de consolidación post CAR-T no ha demostrado añadir valor al manejo de estos pacientes con LLA R/R. El rol del AtoTPH post CAR-T se encuentra pendiente de revisar.

En cuanto a LNH, los resultados de eficacia obtenidos con ARI-0001 dentro del ensayo CART19-BE-01 son escasamente valorables debido el limitado tamaño poblacional (n=8) y a su diversidad histológica. Sin embargo, la mediana de 6 líneas previas de tratamiento, el doble de líneas que lo publicado por los pivotaes de productos CAR-T comerciales, ponen en valor los resultados obtenidos con los mismos. Dicho esto, consideramos que las tasas de respuestas globales y completas del 75% y 50%, respectivamente, se encuentran en línea con las respectivas tasas del 52% y 40% observados con tisa-cel (144), con el 73% y 53% observados con liso-cel (146), y con el 82% y 54% observados con axi-cel (170) (Imagen 92).

Tasa de respuestas a CART19 en LNH-B R/R

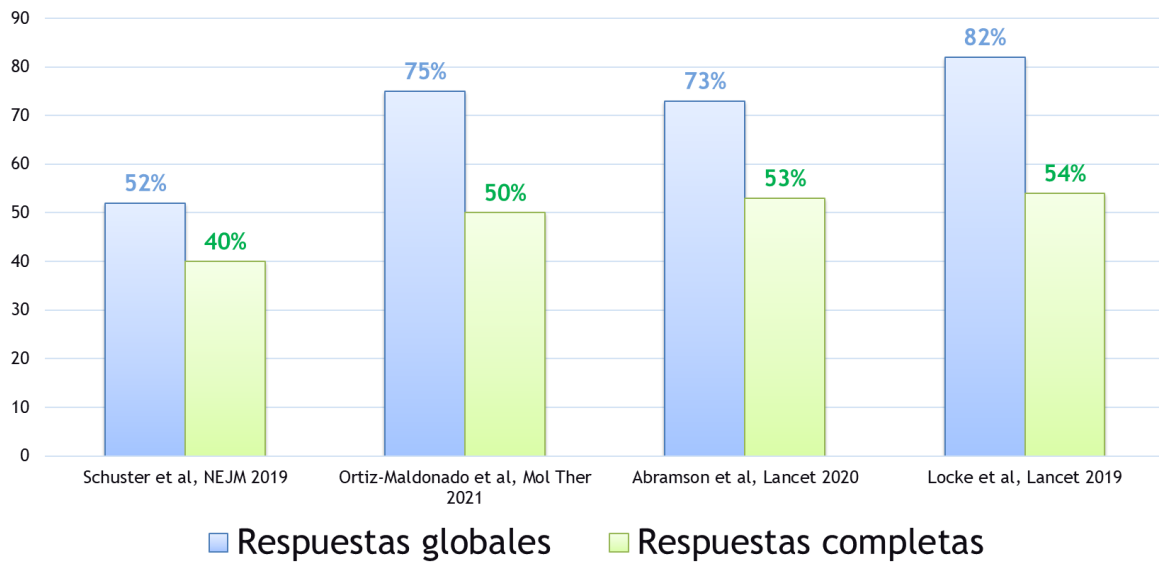


Imagen 92: Comparativa de tasas de respuesta globales y completas de pacientes adultos con LNH-B tratados en ensayos clínicos CAR-T.

Algo similar ocurre con la mediana de SLP, que para los pacientes tratados con ARI-0001 fue de 8,1 meses. Esta mediana de SLP se compara favorablemente con los 6,8 meses observados con liso-cel (146), a los 5,9 meses observados con axi-cel (170), y a los aproximadamente 3,5 meses observados con tisa-cel (144). Sin embargo, estos resultados de eficacia obtenidos con ARI-0001 son muy preliminares, y requerirá de confirmación con una mayor población de pacientes tratados (Imagen 93).

Mediana de SLP en LNH-B R/R (meses)

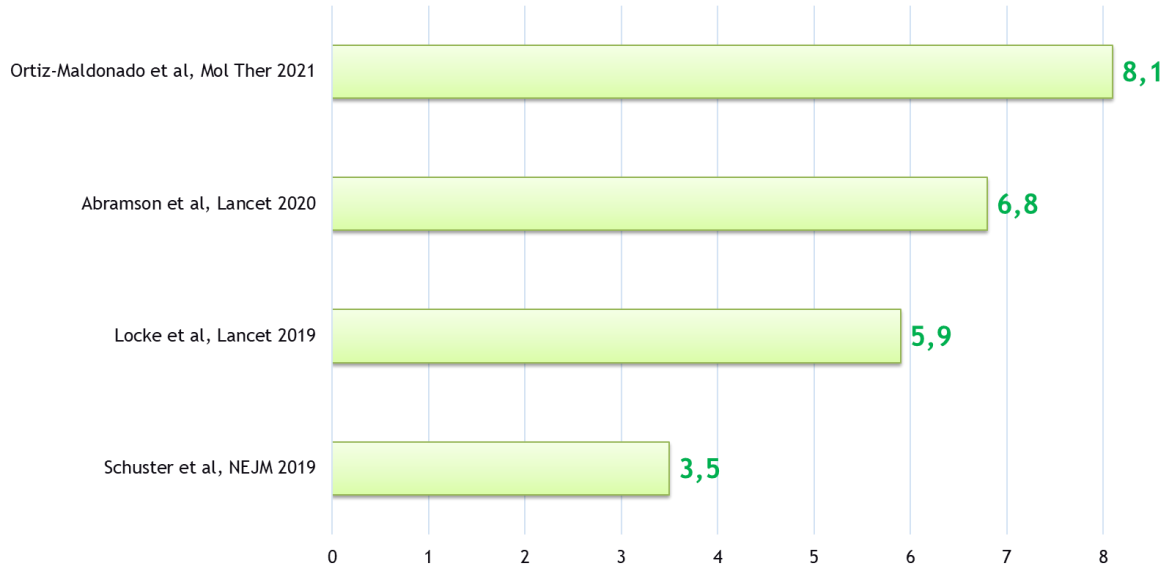


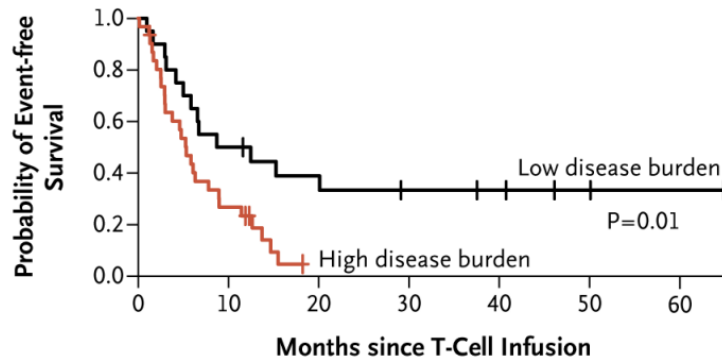
Imagen 93: Comparativa de mediana de SLP de pacientes adultos con LNH-B tratados en ensayos clínicos CAR-T.

5.10. Sobre aspectos de recaídas:

En el segundo artículo presentado (166), hemos analizado una serie de posibles factores de riesgo para la recaída de los pacientes con LLA R/R tratados con células ARI-0001. De todas las variables analizadas, sólo 2 presentaron un impacto estadísticamente significativo: la carga tumoral y la aplasia absoluta de linfocitos B. Nuestros resultados con ARI-0001 muestran como aquellos pacientes que inician el proceso CAR-T con una carga tumoral igual o superior al 5% de blastos en la médula ósea presentan un riesgo de recaída significativamente superior. En contrapartida, los mejores resultados en cuanto a duración de respuesta y *plateau* son obtenidos en aquellos pacientes que llegan al CAR-T con una baja carga tumoral (<5% blastos en MO). Estos resultados se traducen en una SLP a los 2 años del 52,5% (para aquellos con <5% de blastos en MO), vs el 10,7% de aquellos con 5% o más de infiltración medular ($p = 0,077$). Dichos resultados confirman lo observado para otros productos CAR-T, tanto comerciales como académicos, tanto basados en coestimuladoras CD28 o 4-1BB (138,169). Estos resultados confirman la relevancia fundamental que tiene el control o la carga tumorales en relación con la duración de la respuesta a la terapia

CART19 (Imágenes 94, 95 y 96), resultados que van en la misma dirección de lo ya observado para otras terapias celulares, tales como el AtoTPH (179–182).

A Event-free Survival, According to Disease Burden



No. at Risk

Low burden	20	10	7	5	4	2	1
High burden	31	8	0	0	0	0	0

Imagen 94 (138): Comparativa de mediana de SLE de pacientes con LLA tratados con el CAR-T 19–28z en función de la carga tumoral.

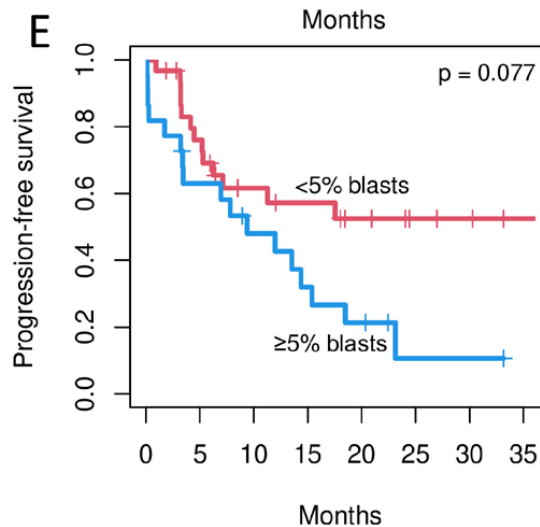


Imagen 95 (166): Comparativa de mediana de SLP de pacientes con LLA tratados con el CAR-T ARI-0001 en función de la carga tumoral.

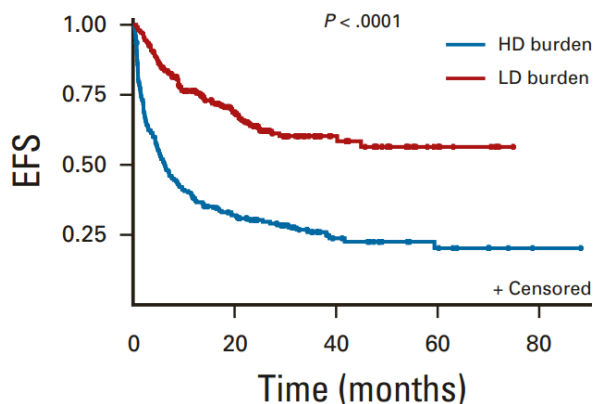


Imagen 96 (169): Comparativa de mediana de SLE de pacientes adultos con LLA tratados con CART19 en función de la carga tumoral.

Otro aspecto fundamental en cuanto al riesgo de recaídas CD19 positivas es la duración de la aplasia de linfocitos B (ALB). En nuestro segundo artículo (166), objetivamos como aquellos pacientes que perdían la ALB absoluta presentaban un mayor riesgo de recaídas CD19 positivas, con un cociente de riesgos de 4,41 ($p = 0,043$). Estos resultados se suman a lo reportado por Finney OC et al (J Clin Invest. 2019) (183), donde analizan la importancia del momento en el que se objetiva la pérdida de la ALB. En dicho estudio, se analizó la relación del riesgo de recaídas y la ALB en una población de pacientes pediátricos y adultos jóvenes con LLA R/R tratados con un CART19. En el mismo, se observó como el riesgo de recaídas CD19 positivas era mayor en aquellos pacientes con una duración de ALB igual o menor a 63 días (75% de recaídas CD19+). Dicho riesgo disminuía en aquellos pacientes con ALB “intermedias” que duraban entre 63 y 6 meses (50% de recaídas CD19+), y finalmente era menor en aquellos con ALB igual o mayor a 6 meses (22% de recaídas CD19+) (Imagen 97).

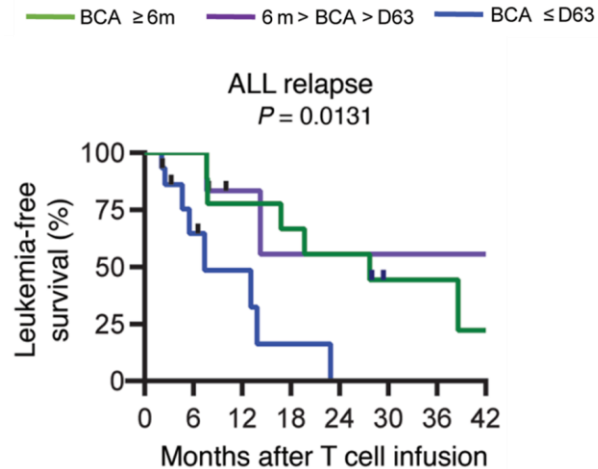


Imagen 97 (183): SLP de pacientes adultos con LLA tratados con CART19 en función de la duración de la aplasia de linfocitos B.

Con respecto al estatus antigénico al momento de la recaída como marcador del mecanismo de esta podemos clasificar a las mismas entre CD19 positivas o CD19 negativas(184–187). Aquellas recaídas CD19 positivas están relacionadas con la pérdida de persistencia funcional del CART19, y suele ir precedida de la pérdida de la ALB. Por otra parte, las recaídas CD19 negativas ocurren por una mutación del CD19 o de una selección de una clona CD19 negativa ya presente antes de recibir el CAR-T (188–191). Ambas recaídas CD19 negativas ocurren por que dicha clona de LLA logra escapar a la presión inmunológica dirigida exclusivamente al CD19. Estas, suelen ir acompañadas de la persistencia de la ALB, ya que suele darse en pacientes con persistencia funcional del CAR-T al momento de la recaída.

En lo que respecta para LLA en el ensayo CART19-BE-01 observamos que el 89% (17/19) de las recaídas observadas con ARI-0001 fueron CD19 positivas. En contrapartida, el 11% (2/19) restante de las recaídas fueron producidas por escape antigénico CD19 negativo. Si analizamos esta incidencia en función de la edad de los pacientes, observamos que la proporción de recaídas CD19 positivas es algo menor en los pacientes pediátricos (66%) en comparación a los pacientes adultos (94%), con un 33% de las recaídas de pacientes pediátricos siendo CD19 negativas en comparación al 6% de las recaídas observadas en adultos. Esto podría estar correlacionado con la aparente mayor duración de la ALB observado en los pacientes pediátricos en comparación con los adultos (mediana de 100 vs 70 días). Estos hallazgos van en la misma línea con lo observado en el resto de

los estudios, con una tendencia general para los distintos productos de persistir menos según aumenta la edad de los pacientes (137–140,143,165,192,193) (Imágenes 98 y 99).

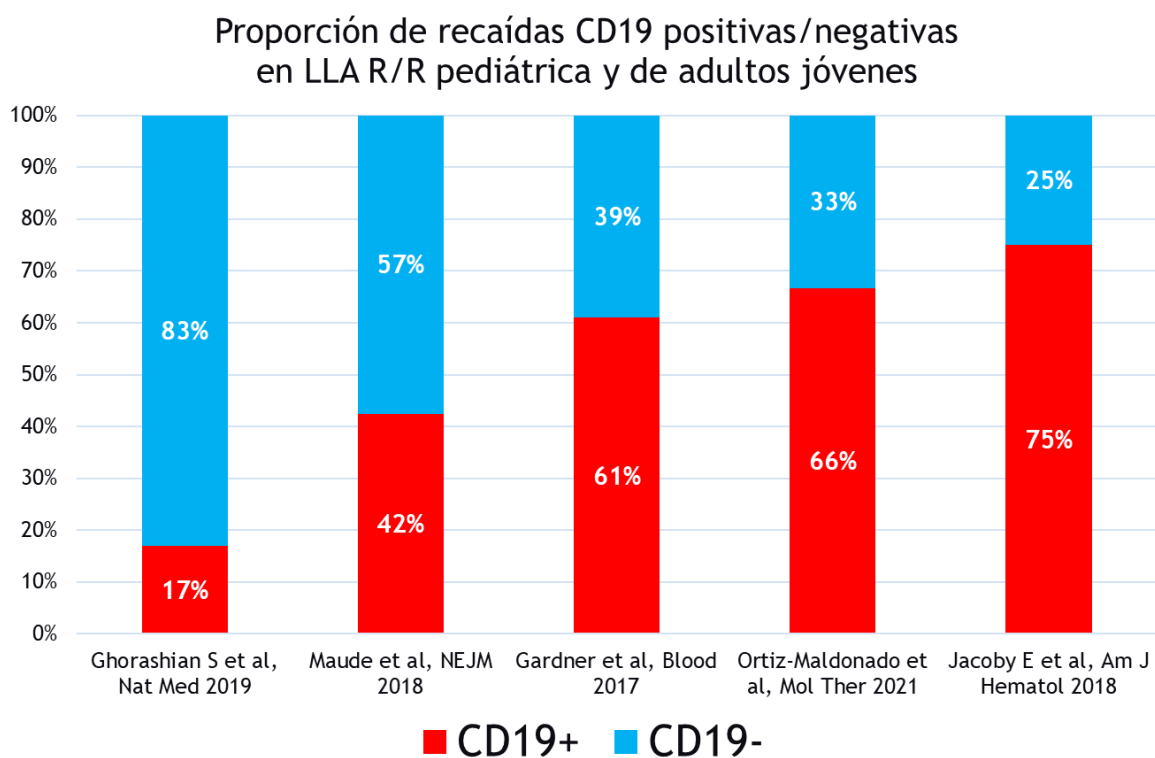


Imagen 98: Comparativa de proporción de recaídas según estatus antigénico para pacientes pediátricos y adultos jóvenes con LLA R/R tratados con terapia CART19.

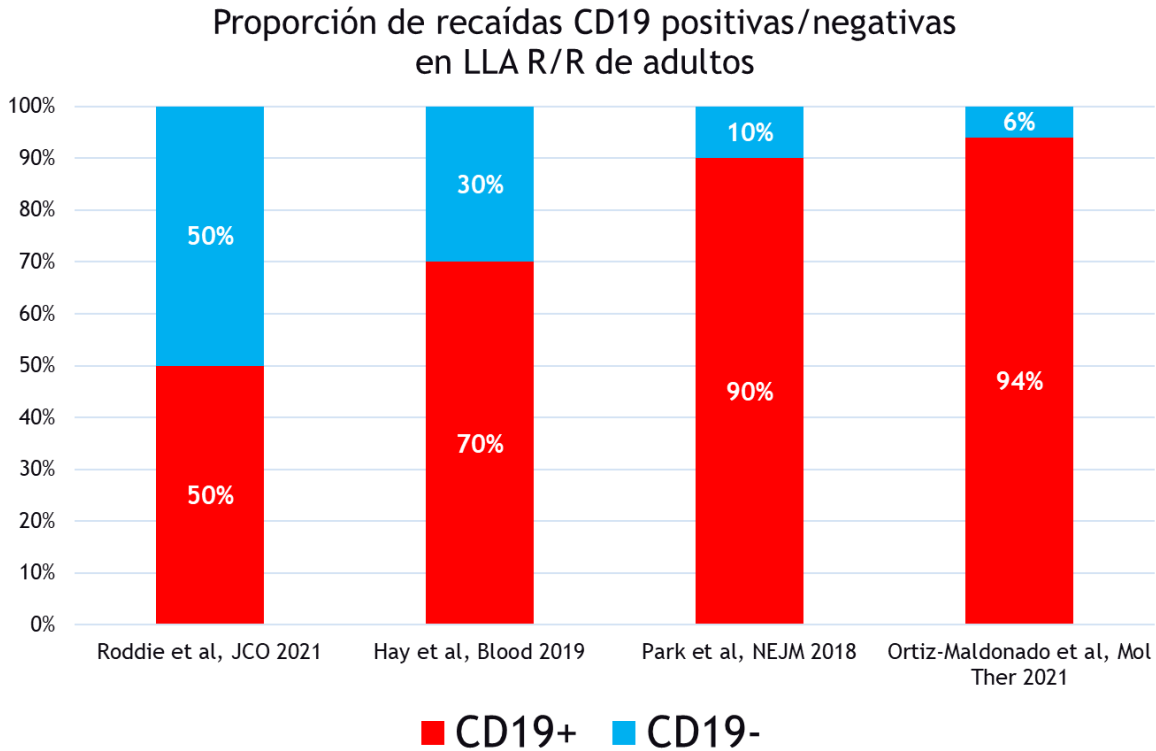


Imagen 99: Comparativa de proporción de recaídas según estatus antigénico para pacientes pediátricos y adultos jóvenes con LLA R/R tratados con terapia CART19.

5.11. Sobre la definición de aplasia de linfocitos B:

Sin embargo, vale la pena mencionar que el valor de la ALB no se encuentra estandarizado ya que su análisis no es fácilmente comparable entre estudios. Esto ocurre debido a que distintos grupos utilizan distintas definiciones de ALB. Para el ensayo CART19-BE-01, se utilizó la definición de aplasia *absoluta* de linfocitos B, eso es, un valor de corte establecido como cualquier nivel de detección por citometría de flujo (1 linfocito B/microlitro o más).

Otros estudios utilizan definiciones de ALB algo más arbitrarias. Por ejemplo, los resultados publicados para tisa-cel pediátrica (139) utilizan una definición de pérdida de ALB que requiere de “≥1% de células CD19+ sobre leucocitos viables o ≥3% células CD19+ sobre linfocitos en sangre periférica”. Otros estudios para LLA del adulto (143) refieren que consideran a los pacientes en ALB cuando presentan un recuento de linfocitos B < 0,11 x 10e9 linfocitos B/L. Y otros estudios

directamente no indican cual fue la definición de ALB utilizada ni cual fue el punto de corte utilizado para definirla (137,138,140–142).

Estas diferencias en la forma de reportar la ALB y su duración pueden generar diferencias considerables que tiendan a sobreestimar o infraestimar la proporción de pacientes que alcanzan ALB y su duración, por lo que todavía se requiere de consenso de cara a analizar adecuadamente su valor.

5.12. Sobre ciertos aspectos en pacientes con LLA con EEMa:

En el tercer artículo presentamos los resultados obtenidos con ARI-0001 en 18 pacientes adultos y pediátricos con LLA R/R que al momento de recibir la terapia CAR-T presentaban enfermedad que sólo afecta el componente extramedular (167). Esta se trata de una población frecuentemente excluida de los ensayos clínicos en terapia CAR-T debido a (1) la ausencia de enfermedad medible por métodos convencionales a nivel medular, y (2) por tratarse de una enfermedad enriquecida en linfoblastos con una posible capacidad especial por evadir al sistema inmune. Esto ha llevado a que la autorización de los 2 productos CAR-T industriales para LLA R/R, tisa-cel y brexu-cel, no incluya aquellos pacientes con LLA R/R cuya única expresión de enfermedad se encuentra a nivel extramedular, dejando a esta población de pacientes sin acceso a esta tecnología.

En cuanto a las características de estos 18 pacientes observamos que se trataban de pacientes muy previamente tratados, con una mediana de 4,5 líneas previas de tratamiento. Como era de esperar, se trataban de unos pacientes con una gran proporción de recaídas post AtoTPH (89%) y post blinatumomab (33%). Ambos conocidos factores de riesgo para este tipo especial de recaídas (194,195).

De los resultados obtenidos cabe destacar 2 aspectos en comparación a los resultados obtenidos con CART19 en población general de LLA. El primero es la marcada diferencia en cuanto a la toxicidad relacionada al tratamiento CAR-T en cuanto a tasas y gravedad del SLC. En esta población (EEMa), observamos una tasa de SLC global del 50%, con una incidencia de SLC grave del 0%. Además, el uso de tocilizumab se redujo al tan sólo 6%. En cuanto a ICANS, se objetivo una tasa global del 6%, sin ningún ICANS grado 2 o superior, y sin ningún paciente requiriendo tratamiento con corticoides (0%).

Este 0% de SLC grave con ARI-0001 en EEMa contrasta considerablemente con las tasas de SLC graves publicadas para LLA con afectación medular “convencional”, las cuales se observan entre el 13-72% (137–143,165). Aún más, también es menor a la incidencia del 13% obtenida con ARI-0001 en la población general. El uso de tocilizumab en EEMa también refleja el mismo hallazgo, siendo este de tan sólo 6%. Este 6% es marcadamente inferior en comparación al 16-80% también publicado en otras series con afectación medular convencional, incluyendo a la población general tratada con ARI-0001 (137–143,165) (Imágenes 100 y 101).

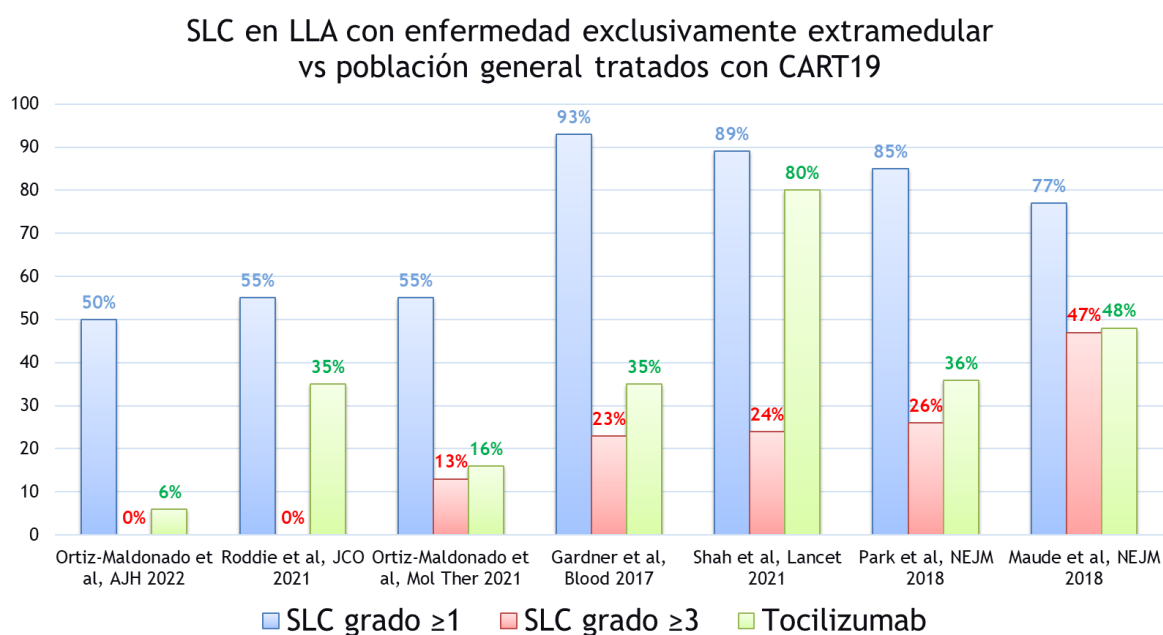


Imagen 100: Comparativa de la incidencia y gravedad de SLC y el consumo de tocilizumab en pacientes con LLA R/R con enfermedad exclusivamente extramedular tratados con ARI-0001 y la población general tratada con CART19.

Incidencia y gravedad del SLC y de la NT/ICANS en pacientes con LLA R/R tratados con ARI-0001

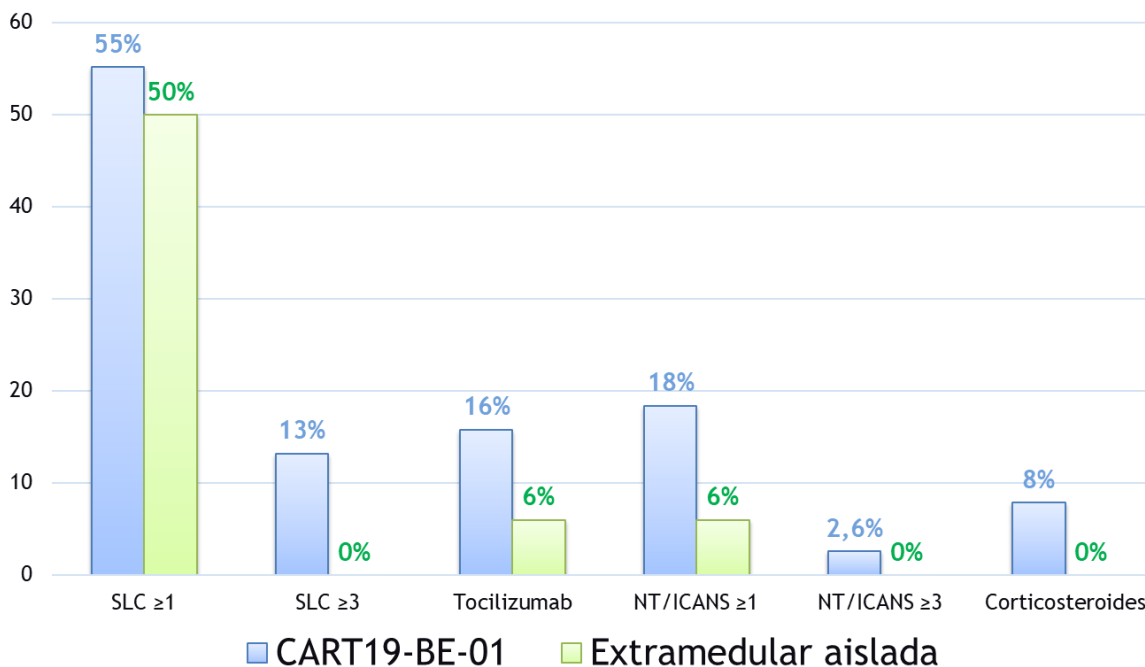


Imagen 101: Comparativa de incidencia y gravedad de toxicidades específicas y el consumo de tocilizumab y corticoides en pacientes con LLA R/R tratados con ARI-0001 en función del tipo de afectación tumoral.

En cuanto al ICANS, nuevamente, una incidencia global en EEMa del 6% que también contrasta con el 18-60% de otras series con afectación medular. Esto se agudiza aún más cuando evaluamos la incidencia de ICANS grave, con una incidencia en EEMa del 0%. Esta ausencia de ICANS grave contrasta marcadamente con lo publicado habitualmente de entre 2,6-42% (137–143,165). Estos resultados cobran más solidez al observar que ningún paciente con EEMa recibió tratamiento corticoideo, en comparación a un uso del 8-75% para el resto de las series (Imagen 102).

NT/ICANS en LLA con enfermedad exclusivamente extramedular vs población general tratados con CART19

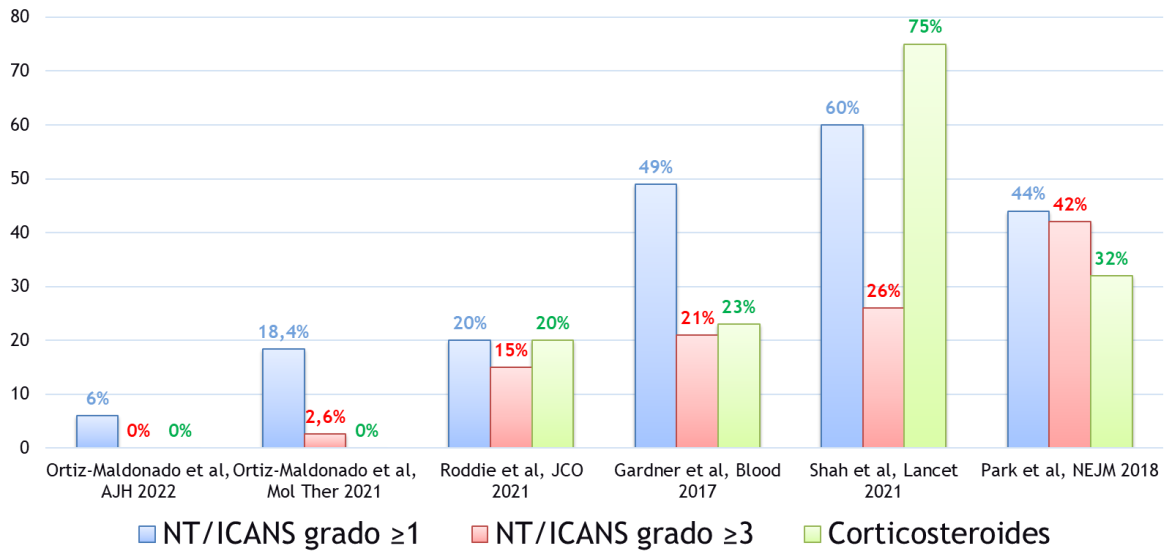


Imagen 102: Comparativa de la incidencia y gravedad de NT/ICANS y el consumo de corticosteroides en pacientes con LLA R/R con enfermedad exclusivamente extramedular tratados con ARI-0001 y la población general tratada con CART19.

En resumen, consideramos que la afectación extramedular aislada reduce el riesgo de toxicidad sistémica, especialmente el de el SLC. Una posible explicación es que la falta de afectación medular e intravascular puede reducir marcadamente el daño endotelial al reducir la liberación de factores proinflamatorios directamente en el torrente sanguíneo. La liberación de dichos factores proinflamatorios en el espacio extramedular, fuera del torrente sanguíneo, podría enlentecer su difusión al componente intravascular. Esto podría actuar reduciendo y retrasando su pico de concentración, aportando más tiempo a la homeostasis a realizar los ajustes requeridos para mantener el equilibrio.

El segundo concepto por destacar es que los resultados de eficacia no impresionan ser inferiores a los obtenidos en aquellos pacientes con enfermedad medular “convencional”. En esta población se ha obtenido una tasa de respuestas completas del 78%, que si bien impresiona ser algo inferior al 84% observado en la población general del ensayo CART19-BE-01 sigue manteniéndose dentro de lo observado con otros productos CAR-T en poblaciones de LLA con afectación medular (137–143,165) (Imagen 103).

Tasa de RC a CART19 en LLA R/R

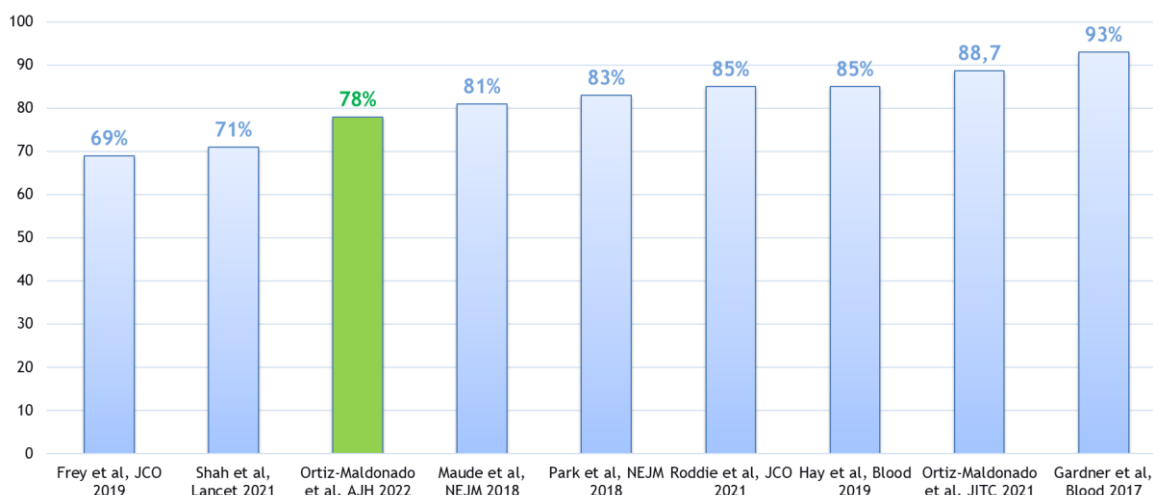


Imagen 103: Comparativa de la tasa de respuestas completas en pacientes con LLA R/R tratados con CART19. La columna azul representa esta población de pacientes con afectación exclusivamente extramedular, y el resto las poblaciones generales del resto de estudios.

Lo mismo sucede con la SLP del 49% a los 2 años, que es comparable a la observada con la serie general de ARI-0001 del 33% (165), y a la del resto de series comentadas previamente (137–143). Por todo esto es que consideramos que esta población de pacientes con EMMa sí puede beneficiarse del acceso a terapias CAR-T de una forma similar a aquellos con afectación medular convencional. Por estos resultados es que consideramos que esta población no debería de ser excluidos de su acceso a las mismas a pesar de no haber sido incluidos en los ensayos clínicos pivotaes.

Los resultados obtenidos en este estudio permiten tener una noción del potencial terapéutico de la terapia CART19 en una población con una afectación puramente extramedular. Estos resultados complementan lo observado recientemente por otros grupos donde se analiza su seguridad y eficacia de la terapia CART19 en pacientes con afectación medular asociada a extramedular, así como en pacientes con afectación de SNC aislada o asociada a enfermedad medular (196,197).

5.13. Sobre el abordaje de la LLC con o sin S. de Richter:

En el cuarto artículo (168) presentamos de forma exploratoria los primeros resultados de seguridad y eficacia obtenidos con ARI-0001 en una pequeña cohorte de pacientes con LLC con o sin TR. Dichos pacientes habían sido muy politratados, con una mediana de 4 líneas previas de tratamiento, incluyendo al ibrutinib en el 100% de ellos. Por otra parte, un 75% de los pacientes presentaban alteraciones del TP53, y un 37,5% presentaban un cariotipo complejo. Finalmente, un 62,5% de los pacientes presentaban además TR, por lo que se trata de una pequeña cohorte de pacientes, pero con un muy mal pronóstico.

En cuanto a factibilidad del procedimiento ARI-0001 en LLC se puede decir que, en términos generales, fue comparable a lo observado previamente en LLA y LNH. Se pudo elaborar los productos ARI-0001 en el 100% de los casos en una mediana de 9 días sin ningún fallo de producción. Además, el tiempo de vena a vena en LLC tuvo una duración de 27 días de mediana, en comparación a los 54 días observados en el ensayo CART19-BE-01. Esta aparente menor duración del tiempo de vena a vena en LLC puede explicarse debido a que la mayoría de estos casos de LLC fueron realizados a partir del año 2020, momento en el que ya habíamos completado la curva de aprendizaje y la optimización de los circuitos y liberación de productos. Por lo tanto, consideramos que la factibilidad de elaboración y administración de productos CAR-T en LLC y TR es ampliamente comparable a la de ARI-0001 en LLA y LNH, así como a la de otros productos CAR-T comerciales o académicos en dichas patologías.

En cuanto a seguridad, destaca la incidencia del SLC que impresiona ser superior a la observada con ARI-0001 en pacientes con LLA (165). A pesar de que ambas patologías presentaban expresión de la enfermedad en la sangre y en la médula, conocidos factores de riesgo para el SLC, observamos que la incidencia global de SLC para LLC fue del 87,5%, en comparación al 55% de la LLA. Sin embargo, la incidencia de SLC grave (grado 3 o superior) impresiona ser comparable entre ambas patologías, siendo del 12,3% para LLC y del 13,2% para LLA. Esto podría ser explicado por el mayor uso de tocilizumab en LLC, siendo este del 37,5% para LLC en comparación al 15,8% en LLA. El mayor uso de tocilizumab previene el desarrollo de SLC grave en pacientes con SLC leves, por lo cual podría ser el motivo de la aparente similitud de SLC graves (Imagen 104).

Incidencia y gravedad del SLC y NT/ICANS en pacientes con LLA y LLC/TR tratados con ARI-0001

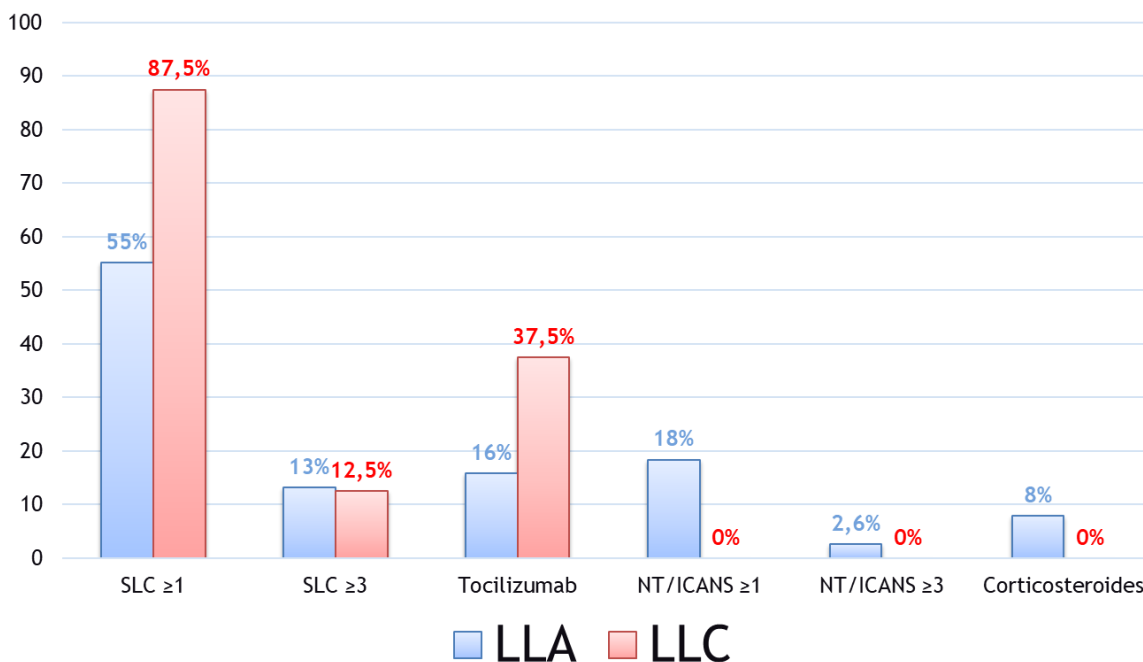


Imagen 104: Comparativa de incidencia y gravedad de toxicidades específicas y el consumo de tocilizumab y corticoides en pacientes con LLA y LLC R/R tratados con ARI-0001.

Aún más, el mayor uso de tocilizumab en pacientes con LLC en comparación con LLA podría estar relacionado a ciertas diferencias en el manejo de las toxicidades entre ambas poblaciones. El mayor uso de tocilizumab en LLC podría estar relacionado con la edad de la población, siendo esta más envejecida en LLC (mediana de 58 años), en comparación a la de LLA (mediana de 24,5 años).

No obstante, esta mayor incidencia de SLC en LLC/TR en comparación a LLA para ARI-0001 se continúa manteniendo dentro de los estándares observados en la mayoría de los estudios de LLC. De hecho, focalizando en la tasa de SLC graves, observamos que la incidencia con ARI-0001 del 12,3% es comparable a las del 9% observadas con JCAR017 (157), del 11% observadas con JCAR014 (152), del 12% observadas con 19E3/1928z (154), y la del 16% observadas con huCART19 (153). Aún más, puede incluso compararse favorablemente con las tasas de SLC grave del 24% y 43% observados con CTL019 (151,155). Por otra parte, la tasa de SLC grave impresiona ser comparativamente mayor a la del 0% observada con JCAR14 (156). Sin embargo, este último resultado contrasta con la incidencia del 11% observado previamente con el mismo producto

(152). Esta marcada diferencia podría estar relacionada a la co-administración de ibrutinib realizada en el estudio publicado por Gauthier et al (156). El rol de la administración concomitante de ibrutinib como estrategia de mitigación de toxicidades queda pendiente de mayor análisis (Imagen 105).

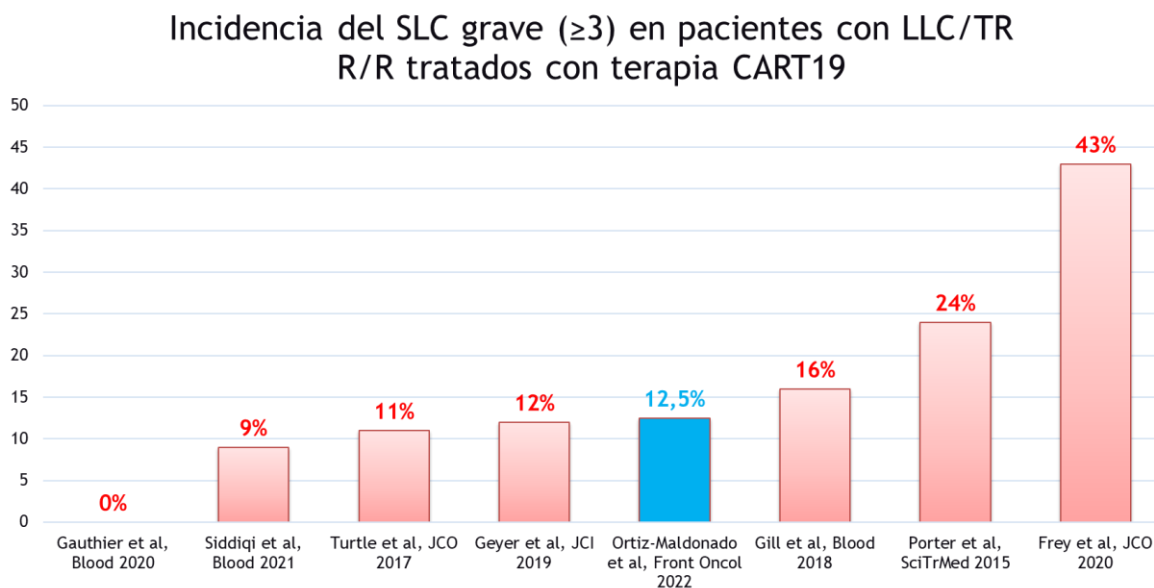


Imagen 105: Comparativa de incidencia de SLC grave en pacientes con LLC R/R tratados con CART19.

En cuanto a la NT o ICANS, es relevante mencionar que ninguno de estos pacientes con LLC/TR presentaron episodios tras la administración del ARI-0001. Esta ausencia de casos de neurotoxicidad/ICANS contrasta marcadamente con la incidencia de NT/ICANS graves (grado 3 o superior) de entre el 5% y el 26% observadas con JCAR017, JCAR014, huCART19, CTL019 y 19E3/1928z (151–157). Esto confirma los hallazgos de su escasa incidencia y gravedad ya observados previamente con ARI-0001 en LLA y LNH, lo que confirma esta característica idiosincrática del ARI-0001 (Imagen 106).

Incidencia de NT/ICANS grave (≥ 3) en pacientes con LLC/TR R/R tratados con terapia CART19

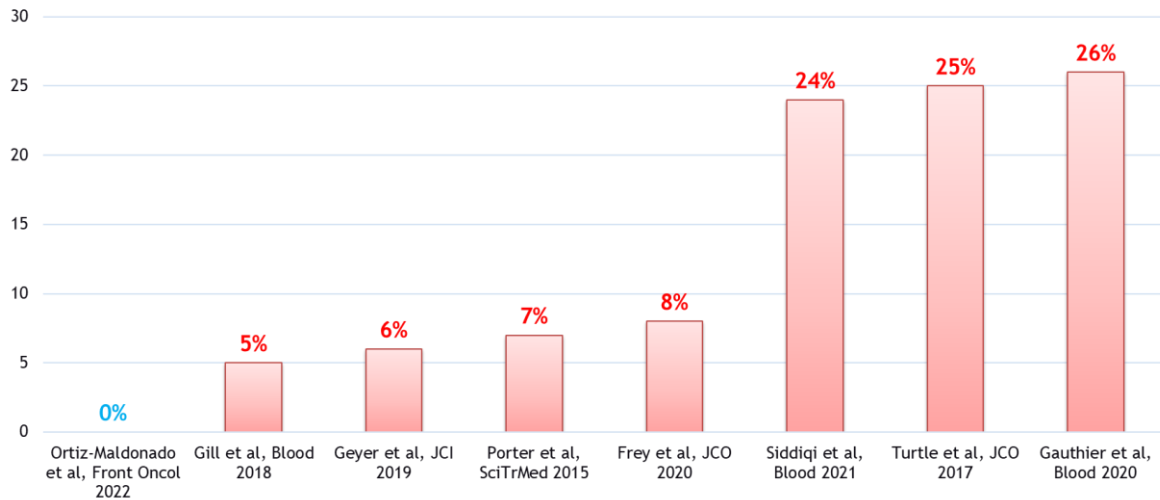


Imagen 106: Comparativa de incidencia de NT/ICANS grave en pacientes con LLC R/R tratados con CART19.

Finalmente, en cuanto a resultados de eficacia, los pacientes tratados con ARI-0001 presentaron una TRG del 100%. Sorprendentemente, el 100% de los pacientes alcanzaron una RC con EMR negativa del componente de LLC tanto en médula ósea como en sangre periférica. Hasta el momento de la escritura de esta tesis ninguno de estos pacientes presentó recaída de su componente de LLC (Imagen 107). Esta tasa del 100% de respuesta a nivel medular se compara favorablemente a 88% y 72% obtenido con JCAR014 +/- ibrutinib (152,156), al 65% obtenido con JCAR017 (157), y al 12% obtenido con el CAR-T 19E3/1928z (154).

Tasa de RC EMR negativa en MO en pacientes con LLC R/R tratados con terapia CART19

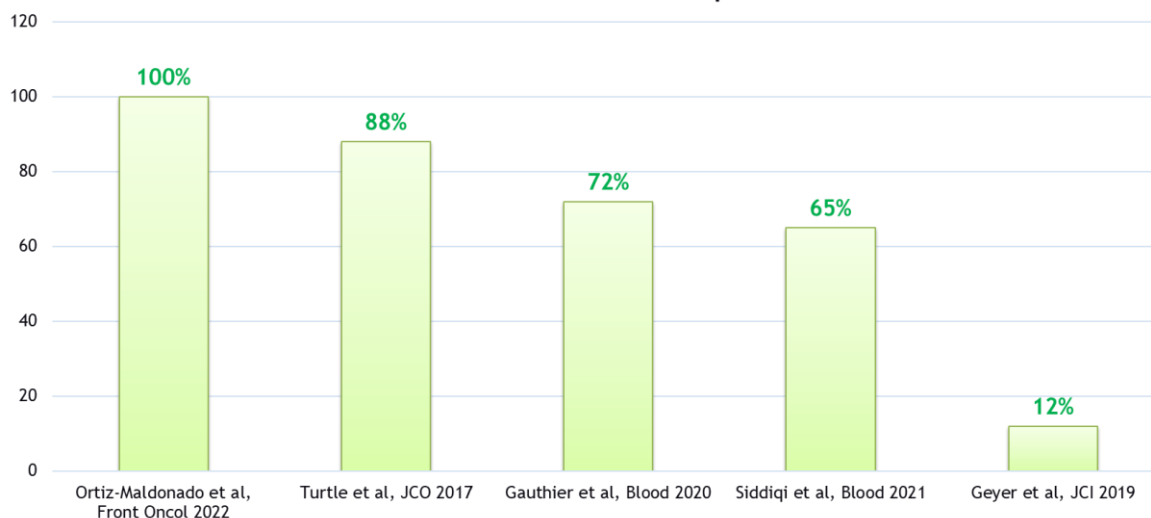


Imagen 107: Comparativa de tasas de respuestas completas con enfermedad medible residual indetectable por citometría de flujo en médula ósea de pacientes con LLC R/R tratados con terapia CART19.

En lo que respecta al componente de linfoma agresivo (TR) se observó una TRG del 80%, con una tasa de RCM del 60%. Es relevante mencionar que aquellos pacientes con TR que no alcanzaron una RCM fueron pacientes que, tras una breve respuesta inicial, presentaron progresión por escape antigénico CD19 negativo. El hecho de que los únicos pacientes que no han alcanzado una RC hayan sido por la pérdida de la expresión del CD19 en realidad confirma la considerable presión terapéutica ejercida por el ARI-0001 sobre la enfermedad.

Así como ocurrió con el componente de LLC, es notable observar que ningún paciente con TR en RC tras ARI-0001 ha presentado recaída de su enfermedad sin necesidad de realizar ulteriores tratamientos. Estos resultados de eficacia obtenidos con ARI-0001, si bien escasos en tamaño de cohorte, impresionan compararse favorablemente con las tasas de RC de entre 19% y 45% observadas con JCAR017, JCAR014, huCART19, CTL019 y 19E3/1928z (151–157). Esto incluye incluso a aquellos ensayos donde la terapia CAR-T fue administrado en combinación con ibrutinib (153,156) (Imagen 108).

Tasa de respuestas en pacientes con LLC/TR tratados con terapia CART19

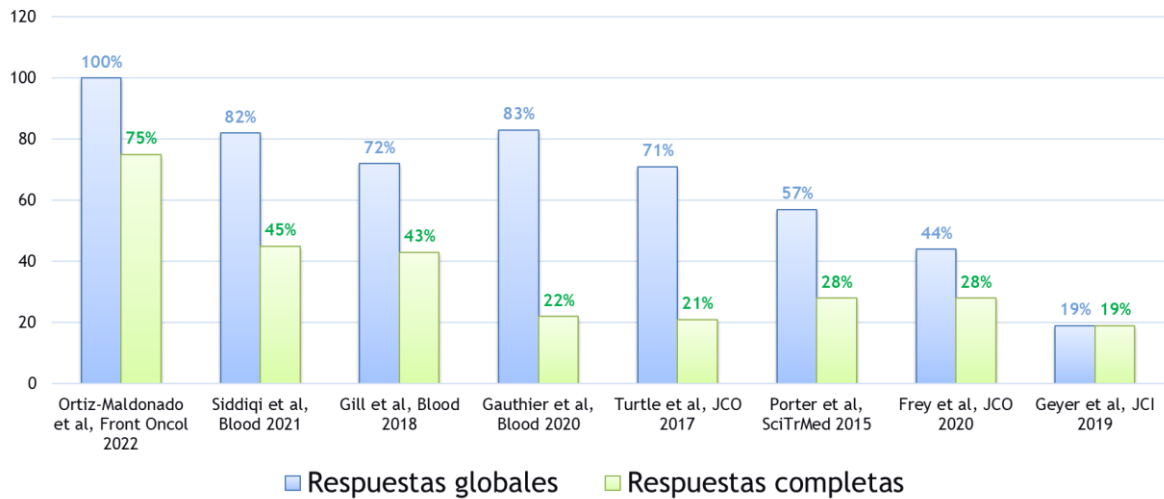


Imagen 108: Comparativa de tasas de respuestas globales y completas en pacientes con LLC R/R con o sin transformación de Richter tratados con CART19.

La búsqueda de asociación de ibrutinib previo y durante la terapia CAR-T en LLC surge de estudios que demostraban como la disfuncionalidad T observada en pacientes con LLC (205) (198) podía ser revertida con el uso de fármacos como el ibrutinib (199–203). De hecho, esto llevó a que en nuestra serie de pacientes con LLC/TR los pacientes solieran recibir tratamiento con ibrutinib al menos una semana antes de la aféresis (204), el cual era suspendido previo a la administración del ARI-0001. Sin embargo, a pesar de los datos preclínicos que apuntan hacia la optimización de la eficacia de las células CAR-T de pacientes con LLC esto todavía queda por comprobar que se traslade al nivel clínico.

Por lo tanto, consideramos que los resultados iniciales obtenidos con ARI-0001 en monoterapia para LLC/TR refractario son francamente promisorios. Estos resultados nos animan a continuar explorando los resultados en esta población de pacientes. En caso de confirmar dichos resultados en cohortes mayores, los resultados con ARI-0001 podrían convertirse en los potenciales candidatos a ser considerados como “Gold Standard” en terapia CAR-T LLC.

5.14. Sobre ciertos aspectos generales finales y futuras direcciones del ARI-0001:

El desarrollo de terapias avanzadas requiere de un esfuerzo hercúleo por parte de un sinfín de profesionales, cosa que normalmente es accesible solamente para un puñado de industrias farmacéuticas. Dicho esto, conseguir desarrollar estos tipos de productos desde una institución académica y dentro del marco del SNS podría parecer una utopía.

Realizar este tipo de proyectos desde una institución académica en el SNS requiere de un trabajo sincronizado de múltiples equipos de profesionales que, en definitiva, deberán emular a los actores presentes en poderosas empresas multinacionales. Eso sí, con un presupuesto, recursos humanos y estructurales infinitamente inferiores.

El presente proyecto no es más que un esfuerzo que apuesta por la sanidad pública y por la democratización del acceso a las terapias avanzadas. Se trata de un proyecto que busca acelerar el desarrollo de soluciones a pacientes con necesidades urgentes que no tienen respuesta adecuada por parte de las vías tradicionales.

Este proyecto busca avanzar en un asunto largamente adeudado en la relación academia-SNS: que el descubrimiento y desarrollo inicial de productos farmacéuticos habitualmente financiados con fondos públicos, realizado por instituciones públicas académicas, se queden en un ámbito público. Que sea la sanidad pública quien coseche los frutos de sus inversiones, y que estos no se pierdan al ser adquirido por entidades privadas con fines de lucro una vez estas comienzan a prosperar.

En febrero del 2021, la AEMPS concedió la autorización de uso excepcional de ARI-0001 fuera de ensayos clínicos mediante la cláusula de exención hospitalaria en pacientes con LLA-B R/R mayores de 25 años. Esta autorización introdujo al ARI-0001 en la cartera común de servicios del SNS en junio del 2021. Dicha autorización de uso ha sido todo un hito al tratarse de la primera autorización de este tipo para cualquier medicamento contra el cáncer a nivel europeo. Esto, más allá del ARI-0001 y la LLA, sienta un precedente para otras numerosas instituciones académicas que consideren embarcarse en esta vía de desarrollo alternativa (205,206).

No obstante, esta autorización cuenta con una considerable limitación. La misma se restringe exclusivamente al Hospital Clínic de Barcelona. Esto hace que los pacientes con LLA-B R/R mayores de 25 años que requieran de tratamiento con ARI-0001 deban trasladarse hasta nuestro centro para poder recibirlo. Mas del 90% de los pacientes tratados con ARI-0001 con esta patología

proviene fuera de Cataluña, dato que desvela una de las principales virtudes y limitaciones de esta autorización. Por un lado, que el 90% de los pacientes hayan provenído de fuera de Cataluña muestra como el acceso a esta terapia ha sido extensivo a todo el territorio del SNS. Por otro lado, muestra como la mayor parte de los pacientes han debido realizar un esfuerzo logístico y económico considerable para poder recibirla y mantener el seguimiento posterior necesario.

El HCB, como entidad académica de financiación eminentemente pública carece de recursos económicos que faciliten el traslado y alojamiento de los pacientes y familiares desplazados. De hecho, cuenta exclusivamente con los recursos de soporte social estándar presentes en todo centro español. Gracias a ello, junto con el soporte de algunas entidades de ayudas para pacientes con cáncer, como la de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), hemos podido asegurar el adecuado tratamiento y seguimiento de todos los pacientes referidos. Sin embargo, siempre recordaremos casos de pacientes con situaciones sociales límites, a los cuales se les ha debido de ayudar incluso a cubrir necesidades básicas como alimentos y vestimenta.

Son estos casos los que nos representan un mayor desafío como institución, y del que nos enorgullece poder decir que hemos conseguido llevar adelante, y habernos asegurado de que ningún paciente referido se quede afuera por motivos sociales. Sin embargo, sin duda esto somete a nuestro centro a un estrés considerable, ya que el mismo no ha sido estructurado para asumir este nivel de complejidad médico-social. Si bien nuestra capacidad global como institución de recepción ha presentado un crecimiento exponencial en estos últimos 5 años, la necesidad de que el ARI-0001 salga de las puertas de nuestro centro se hacen cada vez más evidentes.

Para que este proyecto de sanidad pública sea exitoso por completo, será necesario limitar al máximo las dificultades de acceso al mismo. Para ello, una estrategia de distribución geográfica a nivel nacional tendría un gran sentido a nivel del SNS. Así como ya existen 11 centros españoles autorizados para administrar productos CAR-T industriales distribuidos geográficamente en Cataluña, Madrid, Valencia, Andalucía, Castilla y León, y Canarias, algo similar tendría sentido con productos académicos dentro del SNS. Aquellos centros académicos del SNS que sean capaces de elaborar y administrar terapia ARI-0001 manteniendo los estándares de seguridad y eficacia requeridos por el SNS podrían formar parte de una red nacional académica. Al igual que con los productos CAR-T industriales, el acceso de esta red al ARI-0001 permitiría extender su acceso dentro del SNS a una mayor cantidad de pacientes que lo requieran. Esto sería una gran apuesta

por una sanidad pública de calidad, y podría posicionar a España a la vanguardia del acceso las terapias avanzadas en Europa y el mundo.

Para ello, el HCB se encuentra trabajando a la par con otros centros del SNS dentro del ensayo clínico CART19-BE-02. Dicho estudio es un ensayo clínico fase 2, abierto, prospectivo, no aleatorizado, multicéntrico y nacional, para el tratamiento de pacientes adultos con LLA RR con ARI-0001. Se trata de un ensayo en el que participan centros de Cataluña, Madrid, Navarra, Murcia y Castilla y León, con el que buscamos conseguir una serie de objetivos. Uno de ellos es el de incrementar el acceso a esta terapia en otras CCAA, reduciendo de esta forma el desplazamiento de una buena proporción de los pacientes.

Otro de los objetivos de este ensayo es conseguir que otros centros de excelencia del territorio nacional adquieran experiencia de uso con ARI-0001. Esto será necesario de cara a forjar una red de centros de referencia nacional para tratamiento con ARI-0001 que tenga una distribución con sentido práctico y geográfico. Una vez concluido el reclutamiento del CART19-BE-02, aquellos centros participantes que hayan adquirido una experiencia con ARI-0001 suficiente podrían solicitar la extensión de la autorización de uso del ARI-0001 mediante la exención hospitalaria al SNS. Una potencial extensión de dicha autorización a los centros participantes del CART19-BE-02 implicaría un cambio de paradigma en la estrategia del SNS en cuanto al acceso a terapias avanzadas.

Aún más, los resultados obtenidos con ARI-0001 en LLA R/R en el CART19-BE-01 no sólo han conseguido que la AEMPS haya autorizado su exención hospitalaria, si no que dichos resultados incluso han tenido un fuerte impacto a nivel europeo. En diciembre del 2021, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) ha otorgado la designación PRIME a ARI-0001 para pacientes con LLA R/R mayores de 25 años. La designación de ARI-0001 como medicamento de necesidad prioritaria por parte de la mayor entidad regulatoria europea implica también un cambio de paradigma en cuanto al desarrollo de terapias avanzadas a nivel europeo. De esta forma, el ARI-0001 se convierte en el primer producto de desarrollo completamente académico en recibir este tipo de designación en la historia de Europa.

Sin embargo, si bien la designación PRIME por la EMA ha sido todo un hito para un producto académico, la misma no garantiza que ARI-0001 consiga su autorización de uso a nivel europeo. Esto dependerá de los resultados combinados del CART19-BE-01, con los resultados obtenidos fuera de ensayo (PUC más EH), y por sobre todo de los resultados del ensayo clínico pivotal

CART19-BE-02. No obstante, además de la obtención de unos estándares de seguridad y eficacia de excelencia, para conseguir esta aprobación de uso europeo será necesario que el HCB avance en toda una nueva dimensión como entidad responsable. Para que el ARI-0001 consiga una autorización europea será necesario que el HCB sea capaz de responder ante la EMA con el mismo nivel de profesionalidad requerido para con otros productos farmacéuticos comerciales de propiedad industrial.

Por otro lado, el ensayo clínico CART19-BE-02 buscamos evaluar la seguridad y eficacia de dar una dosis de CAR-T superior a la administrada previamente en el ensayo clínico CART19-BE-01. En el ensayo CART19-BE-02 se buscará administrar una dosis de 3×10^6 células CAR-T/kg en aquellos pacientes que toleren adecuadamente la dosis estándar de 1×10^6 células CAR-T/kg (Imagen 109).

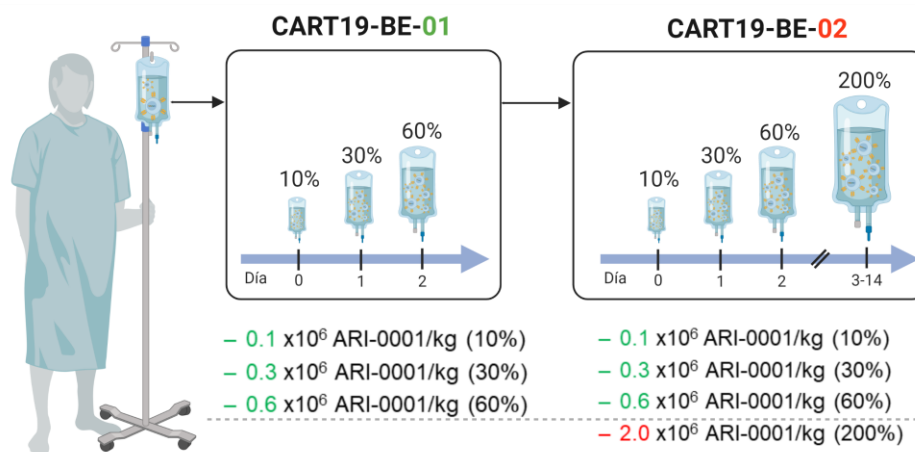


Imagen 109: Esquema de diferencias en el abordaje terapéutico de los ensayos clínicos CART19-BE-01 y CART19-BE-02.

Con esto buscamos evaluar si manteniendo la estrategia de administración fraccionada somos capaces de incrementar la dosis de forma significativa manteniendo resultados de seguridad adecuados. El objetivo de intentar incrementar la dosis es el de intentar incrementar aún más la tasa de RC EMR indetectable a largo plazo. Este ensayo se encontraba en las fases finales de reclutamiento al momento de presentar esa tesis doctoral, y esperamos tener los resultados primarios de seguridad y eficacia de la totalidad de los pacientes a principios del 2023.

Finalmente, es necesario mencionar que este proyecto de desarrollo académico puede convivir perfectamente con otros proyectos donde haya una colaboración con entidades privadas. Un ejemplo de ello son los proyectos de entidades privadas que buscan desarrollar productos de terapias avanzadas mediante el uso de vectores académicos. En este sentido, el HCB ha firmado un convenio con Immuneel, una industria farmacéutica de la India. Este proyecto busca facilitar el acceso a terapias CAR-T para el tratamiento de pacientes con síndromes linfoproliferativos en la India. Para ello, el HCB proveerá de los vectores utilizados con el ARI-0001 y realizará la transferencia de la tecnología y “know-how” necesarios para dicho desarrollo. De hecho, al momento de la presentación de esta tesis doctoral, un ensayo clínico fase 1 en terapia CAR-T ya se encuentran en marcha en la India utilizando el vector de ARI-0001.

Otro ejemplo de la factibilidad de esta asociación público-privada es el convenio firmado con CellPoint, una industria farmacéutica de los Países Bajos. Esta industria busca desarrollar una terapia CAR-T para pacientes con LLC/TR R/R a nivel europeo. Para ello, el HCB proveerá de los vectores utilizados con el ARI-0001 y participa activamente en el diseño y ejecución de los ensayos clínicos requeridos para dicho desarrollo. De hecho, al momento de la presentación de esta tesis doctoral, el ensayo clínico fase 1 utilizando el mismo vector del ARI-0001 ya se encontraba en marcha. Esta alternativa de colaboración público-privada es, por lo tanto, otra forma de extender el acceso del desarrollo de terapias avanzadas a patologías menos frecuentes. Es incluso, una alternativa especialmente relevante para países en vías de desarrollo cuyos recursos más limitados requieran del desarrollo a nivel nacional de este tipo de productos.

Esta tesis viene a resumir los resultados principales de los primeros 5 años del ARI-0001 (ahora llamado “varnimcabtagene autoleucel” o “var-cel”) en la esfera clínica. En 5 años, hemos visto como la sala de hematología intensiva del HCB ha pasado de estar repleta de inducciones de pacientes con LLA, ha estar repleta de pacientes recibieron terapia CAR-T. En tan sólo 5 años, los residentes del HCB se encuentran con una realidad completamente diferente a la que viví personalmente durante mi residencia. En 5 años hemos pasado de administrar 8 tratamientos CAR-T en todo el año 2017, a administrar un promedio de casi 8 tratamientos por mes en 2022, representando un ritmo de crecimiento promedio anual mayor al 60%.

Nos encontramos en un momento histórico y de enormes cambios en el abordaje del cáncer. La llegada de terapias avanzadas dirigidas nos permite contar con terapias cada vez más eficaces y menos tóxicas. En 5 años el ARI-0001 consiguió en España la primera autorización como exención

hospitalaria para el cáncer en la historia de Europa. En estos 5 años también consiguió el primer reconocimiento de medicamento de prioridad en la historia de Europa para un producto académico. Por mi parte, me siento extremadamente afortunado de haber podido presenciar este cambio desde mi puesto de trabajo. Ahora vamos a por los próximos 5 años. ¡A ver qué pasa!

6 - Conclusiones:

1. El desarrollo clínico de productos de terapias avanzadas CAR-T dentro de un entorno puramente académico y su administración asistencial es factible de realizar dentro del marco del Sistema Nacional de Salud público español.
2. La manufactura del CAR-T ARI-0001 de forma “point of care” es factible en un entorno académico europeo. La robustez y fiabilidad de la producción “point of care” del CAR-T ARI-0001 en síndromes linfoproliferativos CD19 positivos obtuvo tasas de éxito de producción y de administración a pacientes comparables a los de otros productos académicos o comerciales.
3. La administración del CAR-T ARI-0001 en síndromes linfoproliferativos CD19 positivos proporcionó resultados de seguridad y eficacia comparables a los de otros productos académicos o comerciales. Los resultados del ensayo CART19-BE-01 condujeron a la aprobación en febrero del 2021 por parte de la AEMPS de las células ARI-0001 para el tratamiento de pacientes con LLA R/R mayores de 25 años (Exención Hospitalaria).
4. La administración de la terapia ARI-0001 en pacientes con LLA R/R con EEMa logró resultados de seguridad y eficacia comparables a los de otros productos CART19 en pacientes con LLA con afectación medular convencional. Consideramos que las células ARI-0001 constituyen una opción terapéutica en esta situación de gran necesidad médica no cubierta.
5. Tanto la carga tumoral como la pérdida de la aplasia de linfocitos B en pacientes con LLA R/R parecen tener un impacto significativo en el riesgo de recaída y podrían guiar a los médicos en el manejo de los pacientes después de la administración de las células ARI-0001.
6. Los resultados iniciales sugieren que el tratamiento con células ARI-0001 parece ser factible, seguro y eficaz en pacientes con LLC o TR R/R, e impresiona proporcionar resultados comparables a los de otros productos académicos o comerciales.

7 - Referencias:

1. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *The American Journal of the Medical Sciences*. 1893;
2. Burnet FM. *The Concept of Immunological Surveillance*. Vol. 13, *Progr. exp. Tumor Res.* Karger; 1970.
3. Burnet FM. *Immunological Surveillance in Neoplasia*. Vol. 7, *Transplant. Rev.* 1971.
4. Galon J, Bruni D. *Tumor Immunology and Tumor Evolution: Intertwined Histories*. Vol. 52, *Immunity*. Cell Press; 2020. p. 55–81.
5. Foley EJ. Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res*. 1953 Dec 13;835–7.
6. Graham JB GRM. The effect of vaccine on cancer patients. *Surg Gynecol Obstet*. 1959 Aug;109(2):131–8.
7. Gross L. Intradermal Immunization of C3H Mice against a Sarcoma That Originated in an Animal of the Same Line. *Cancer Res* [Internet]. 1943;326–33. Available from: <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/3/5/326/2385615/crs0030050326.pdf>
8. Sharma P, Siddiqui BA, Anandhan S, Yadav SS, Subudhi SK, Gao J, et al. The next decade of immune checkpoint therapy. Vol. 11, *Cancer Discovery*. American Association for Cancer Research Inc.; 2021. p. 838–57.
9. Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 Have Opposing Effects on the Response of T cells to Stimulation. *J Exp Med* [Internet]. 1995; Available from: <http://rupress.org/jem/article-pdf/182/2/459/1107143/459.pdf>
10. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science* (1979) [Internet]. 1996; Available from: <http://science.sciencemag.org/>
11. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO Journal*. 1992;11(11):3887–95.
12. Haidong Dong, Gefeng Zhu, Koji Tamada, Lieping Chen. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature Medicine* [Internet]. 1999; Available from: <http://medicine.nature.com>
13. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation [Internet]. Vol. 192, *J. Exp. Med.* 2000. Available from: <http://www.jem.org/cgi/content/full/192/7/1027>
14. Schietinger A, Greenberg PD. Tolerance and exhaustion: Defining mechanisms of T cell dysfunction. Vol. 35, *Trends in Immunology*. 2014. p. 51–60.

15. Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T. A rheostat for immune responses: The unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. Vol. 14, *Nature Immunology*. 2013. p. 1212–8.
16. Zou W, Wolchok JD, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Science Translational Medicine*. 2016 Mar 2;8(328).
17. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. Vol. 24, *Current Opinion in Immunology*. 2012. p. 207–12.
18. Hodi FS, O’Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2010 Aug 19;363(8):711–23.
19. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O’Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2011 Jun 30;364(26):2517–26.
20. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. Vol. 168, *Cell*. Cell Press; 2017. p. 707–23.
21. Maus M v, Grupp SA, Porter DL, June CH. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood* [Internet]. 2014; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/123/17/2625/1376066/2625.pdf>
22. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clinical Cancer Research*. 2011 Jul 1;17(13):4550–7.
23. Rosenberg SA, Spiess P, Ilafreniere R. A New Approach to the Adoptive Immunotherapy of Cancer with Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *Science* (1979). 1986;
24. Greenberg PD, Klarnet JP, Kern DE, Cheever MA. Therapy of Disseminated Tumors by Adoptive Transfer of Specifically Immune T Cells! Vol. 32, *Tumor Res*. Karger; 1988.
25. Yee C, Riddell SR, Greenberg PD. Prospects for adoptive T cell therapy. *Current Opinion in Immunology*. 1997;9:702–8.
26. Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: Harnessing the T cell response. Vol. 12, *Nature Reviews Immunology*. 2012. p. 269–81.
27. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, et al. Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes NIH Public Access [Internet]. Vol. 314, *Science*. 2006. Available from: www.sciencemag.org/cgi/content/full/1129003/DC1
28. Abad JD, Wrzensinski C, Overwijk W, de Witte MA, Jorritsma A, Hsu G, et al. T-Cell Receptor Gene Therapy of Established Tumors in a Murine Melanoma Model. *J Immunother*. 2008;

29. Kerkar SP, Sanchez-Perez L, Yang S, A. Borman Z, Muranski P, Ji Y, et al. Genetic engineering of murine CD8+ and CD4+ T cells for preclinical adoptive immunotherapy studies. *Journal of Immunotherapy*. 2011 May;34(4):343–52.
30. Kalos M, June CH. Adoptive T Cell Transfer for Cancer Immunotherapy in the Era of Synthetic Biology. Vol. 39, *Immunity*. 2013. p. 49–60.
31. June CH, Maus M v., Plesa G, Johnson LA, Zhao Y, Levine BL, et al. Engineered T cells for cancer therapy. Vol. 63, *Cancer Immunology, Immunotherapy*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2014. p. 969–75.
32. Schmitt TM, Ragnarsson GB, Greenberg PD. T Cell Receptor Gene Therapy for Cancer. *Human Gene Therapy*. 2009;
33. Dudley ME, Wunderlich J, Nishimura MI, Yu D, Yang JC, Topalian SL, et al. Adoptive Transfer of Cloned Melanoma-Reactive T Lymphocytes for the Treatment of Patients with Metastatic Melanoma. *J Immunother*. 2001;
34. Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8 T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: In vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *PNAS* [Internet]. 2002; Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.242600099
35. Meidenbauer N, Marienhagen J, Laumer M, Vogl S, Heymann J, Andreesen R, et al. Survival and Tumor Localization of Adoptively Transferred Melan-A-Specific T Cells in Melanoma Patients. *The Journal of Immunology*. 2003 Feb 15;170(4):2161–9.
36. Mackensen A, Meidenbauer N, Vogl S, Laumer M, Berger J, Andreesen R. Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8 + T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2006 Nov 1;24(31):5060–9.
37. Naomi N. Hunder HWJCDWHJZRRRAJSGJAT and CYee. Treatment of Metastatic Melanoma with Autologous CD4+ T Cells against NY-ESO-1. *NEJM* [Internet]. 2008; Available from: www.nejm.org
38. Khammari A, Labarrière N, Vignard V, Nguyen JM, Pandolfino MC, Knol AC, et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous melan-a/mart-1-specific cytotoxic t lymphocyte clones. *Journal of Investigative Dermatology*. 2009;129(12):2835–42.
39. Wallen H, Thompson JA, Reilly JZ, Rodmyre RM, Cao J, Yee C. Fludarabine modulates immune response and extends in vivo survival of adoptively transferred CD8 T cells in patients with metastatic melanoma. *PLoS ONE*. 2009 Mar 9;4(3).
40. Butler MO, Friedlander P, Milstein MI, Mooney MM, Metzler G, Murray AP, et al. Establishment of antitumor memory in humans using in vitro-educated CD8+ T cells. *Science Translational Medicine*. 2011 Apr 27;3(80).
41. Chapuis AG, Ragnarsson GB, Nguyen HN, Chaney CN, Pufnock JS, Schmitt TM, et al. Transferred WT1-reactive CD8+ T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients. *Science Translational Medicine*. 2013 Feb 27;5(174).

42. Yee C, Lizee G, Schueneman AJ. Endogenous T-Cell Therapy: Clinical Experience. *The Cancer Journal* [Internet]. 2015;21(6). Available from: www.journalppo.com
43. Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of Immune Evasion by Tumors. Vol. 90, *Advances in Immunology*. 2006. p. 51–81.
44. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of Human Solid Tumors from T-cell Recognition: Molecular Mechanisms and Functional Significance. *Advances in Immunology*. 2000;74.
45. Esteban' F, Redondo² M, Delgado³ M, Garrido⁴ F, Ruiz-Cabello⁴ F. MHC class I antigens and tumour-infiltrating leucocytes in laryngeal cancer: long-term follow-up. Vol. 74, *British Journal of Cancer*. 1996.
46. Esteban F, Concha A, Huelin C, Perez-Ayala M, Pedrinac S, Ruiz-Cabello F, et al. Histocompatibility antigens in primary and metastatic squamous cell carcinoma of the larynx. *Int J Cancer*. 1989;43:436–42.
47. T. Cabrera A, Collado M.A, Fernandez A, Ferron J, Sancho F, Ruiz-Cabello F, Garrido. High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive colorectal carcinomas. *Tissue Antigens*. 1998;
48. Cabrera T, Fernandez MA, Sierra A, Garrido A, Herruzo A, Escobedo A, et al. High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas. *Human Immunol*. 1996;
49. Natali PG, Nicotra MR, Bigotti A, MARCENARO L, Giacomini P, Russo C. Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors (monoclonal antibodies/HLA-A2/histocompatibility antigens). Vol. 86, *Immunology*. 1989.
50. Ferrone S, Marincola FM. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunology Today*. 1995;
51. van Driel WJ, Tjong MY, Hilders CGJM, Trimbos BJ, Fleuren GJ. Association of Allele-Specific HLA Expression and Histopathologic Progression of Cervical Carcinoma. *Gynecologic Oncology*. 1996;62:33–41.
52. Harris DT, Hager M v., Smith SN, Cai Q, Stone JD, Kruger P, et al. Comparison of T Cell Activities Mediated by Human TCRs and CARs That Use the Same Recognition Domains. *The Journal of Immunology*. 2018 Feb 1;200(3):1088–100.
53. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity (chimeric genes/antibody variable region). Vol. 86, *Immunology*. 1989.
54. Eshhar Z, Gross G. Chimeric T cell receptor which incorporates the anti-tumour specificity of a monoclonal antibody with the cytolytic activity of T cells: a model system for immunotherapeutical approach. Vol. 62, *Br. J. Cancer*. Macmillan Press Ltd; 1990.

55. Steven H. Swerdlow, Elias Campo, Nancy Lee Harris, Elaine S. Jaffe, Stefano A. Pileri, Harald Stein, et al., editors. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th Edition. International Agency for Research on Cancer (IARC); 2008.
56. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Isaacson PG. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood* [Internet]. 2008; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/112/12/4384/1482660/zh802408004384.pdf>
57. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IB de O, Berti E, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*. 2022 Jul 22;
58. Lebien TW, Thomas *, Tedder F. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* [Internet]. 2008; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/112/5/1570/1485355/zh801708001570.pdf>
59. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. Vol. 111, *Blood*. American Society of Hematology; 2008. p. 3941–67.
60. Jennings D, Foon KA. Recent Advances in Flow Cytometry: Application to the Diagnosis of Hematologic Malignancy. *Blood*. 1997;90(8).
61. Wood BL, Arroz M, Barnett D, DiGiuseppe J, Greig B, Kussick SJ, et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: Optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. In: *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*. 2007.
62. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. Vol. 131, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013. p. 959–71.
63. Inghirami G, Foitl DR, Sabichi A, Zhu Y, Knowles DM. Autoantibody-Associated Cross-Reactive Idiotype-Bearing Human B Ig V, Gene and CD5 Antigen Expression. *Blood*. 1991;
64. Byrd JC, Brown JR, O'Brien S, Barrientos JC, Kay NE, Reddy NM, et al. Ibrutinib versus Ofatumumab in Previously Treated Chronic Lymphoid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2014 Jul 17;371(3):213–23.
65. Seymour JF, Kipps TJ, Eichhorst B, Hillmen P, D'Rozario J, Assouline S, et al. Venetoclax–Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2018 Mar 22;378(12):1107–20.
66. Sharman JP, Coutre SE, Furman RR, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, et al. Final Results of a Randomized, Phase III Study of Rituximab With or Without Idelalisib Followed by Open-Label Idelalisib in Patients With Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol* [Internet]. 2019;37:1391–402. Available from: <https://doi>.
67. Dreger P, Ghia P, Schetelig J, van Gelder M, Kimby E, Michallet M, et al. High-risk chronic lymphocytic leukemia in the era of pathway inhibitors: integrating molecular and cellular therapies on behalf of the European Research Initiative on CLL (ERIC) and the European

Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Blood [Internet]. 2018; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/132/9/892/1467212/blood826008.pdf>

68. Kharfan-Dabaja MA, Kumar A, Hamadani M, Stilgenbauer S, Ghia P, Anasetti C, et al. Clinical Practice Recommendations for Use of Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Chronic Lymphocytic Leukemia on Behalf of the Guidelines Committee of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. Vol. 22, *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. Elsevier Inc.; 2016. p. 2117–25.
69. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017 Jan 19;3.
70. Krämer I, Stilgenbauer S, Dietrich S, Böttcher S, Zeis M, Stadler M, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for high-risk CLL: 10-year follow-up of the GCLLSG CLL3X trial. *Blood*. 2017 Sep 21;130(12):1477–80.
71. Crump M, Neelapu SS, Farooq U, Van E, Neste D, Kuruvilla J, et al. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study Key Points. *Blood* [Internet]. 2017; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/130/16/1800/1402936/blood769620.pdf>
72. Sehn LH, Herrera AF, Flowers CR, Kamdar MK, Mcmillan ; Andrew, Hertzberg ; Mark, et al. Polatumumab Vedotin in Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2019;38:155–65. Available from: <https://doi>.
73. Salles G, Duell J, González Barca E, Tournilhac O, Jurczak W, Liberati AM, et al. Tafasitamab plus lenalidomide in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (L-MIND): a multicentre, prospective, single-arm, phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 2020 Jul 1;21(7):978–88.
74. Budde LE, Assouline S, Sehn LH, Schuster SJ, Yoon SS, Hyun Yoon D, et al. Single-Agent Mosunetuzumab Shows Durable Complete Responses in Patients With Relapsed or Refractory B-Cell Lymphomas: Phase I Dose-Escalation Study. *J Clin Oncol* [Internet]. 2021;40:481–91. Available from: <https://doi>.
75. Hutchings M, Morschhauser F, Iacoboni G, Carlo-Stella C, Fritz ;, Offner C, et al. Glofitamab, a Novel, Bivalent CD20-Targeting T-Cell-Engaging Bispecific Antibody, Induces Durable Complete Remissions in Relapsed or Refractory B-Cell Lymphoma: A Phase I Trial. *communications J Clin Oncol* [Internet]. 2021;39:1959–70. Available from: <https://doi>.
76. Fielding AK, Richards SM, Chopra R, Lazarus HM, Litzow MR, Buck G, et al. Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. *Blood*. 2007;
77. Tavernier E, Boiron JM, Huguet F, Bradstock K, Vey N, Kovacs T, et al. Outcome of treatment after first relapse in adults with acute lymphoblastic leukemia initially treated by the LALA-94 trial. *Leukemia*. 2007;21(9):1907–14.

78. Oriol A, Vives S, Hernández-Rivas JM, Tormo M, Heras I, Rivas C, et al. Outcome after relapse of acute lymphoblastic leukemia in adult patients included in four consecutive risk-adapted trials by the PETHEMA study group. *Haematologica*. 2010 Apr;95(4):589–96.
79. Kantarjian HM, Thomas D, Ravandi F, Faderl S, Jabbour E, Garcia-Manero G, et al. Defining the course and prognosis of adults with acute lymphocytic leukemia in first salvage after induction failure or short first remission duration. *Vol. 116, Cancer*. 2010. p. 5568–74.
80. Gökbuget N, Stanze D, Beck J, Diedrich H, Horst HA, Hü A, et al. Outcome of relapsed adult lymphoblastic leukemia depends on response to salvage chemotherapy, prognostic factors, and performance of stem cell transplantation. *Blood [Internet]*. 2012; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/120/10/2032/1357333/zh803612002032.pdf>
81. Spyridonidis A, Labopin M, Schmid C, Volin L, Yakoub-Agha I, Stadler M, et al. Outcomes and prognostic factors of adults with acute lymphoblastic leukemia who relapse after allogeneic hematopoietic cell transplantation. An analysis on behalf of the Acute Leukemia Working Party of EBMT. *Leukemia*. 2012;26(6):1211–7.
82. Poon LM, Hamdi A, Saliba R, Rondon G, Ledesma C, Kendrick M, et al. Outcomes of Adults with Acute Lymphoblastic Leukemia Relapsing after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2013 Jul;19(7):1059–64.
83. Staerz UD, Kanagawa O, Bevan MJ. Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells. *Nature*. 1985;
84. Dreier T, Baeuerle PA, Fichtner I, Grün M, Schlereth B, Lorenczewski G, et al. T Cell Costimulus-Independent and Very Efficacious Inhibition of Tumor Growth in Mice Bearing Subcutaneous or Leukemic Human B Cell Lymphoma Xenografts by a CD19-/CD3- Bispecific Single-Chain Antibody Construct. *The Journal of Immunology*. 2003 Apr 15;170(8):4397–402.
85. Spiess C, Zhai Q, Carter PJ. Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. *Vol. 67, Molecular Immunology*. Elsevier Ltd; 2015. p. 95–106.
86. Brinkmann U, Kontermann RE. The making of bispecific antibodies. *Vol. 9, mAbs*. Taylor and Francis Inc.; 2017. p. 182–212.
87. Goebeler ME, Bargou RC. T cell-engaging therapies — BiTEs and beyond. *Vol. 17, Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Research; 2020. p. 418–34.
88. Kantarjian HM, DeAngelo DJ, Stelljes M, Martinelli G, Liedtke M, Stock W, et al. Inotuzumab Ozogamicin versus Standard Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2016 Aug 25;375(8):740–53.
89. Kantarjian H, Stein A, Gökbuget N, Fielding AK, Schuh AC, Ribera JM, et al. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2017 Mar 2;376(9):836–47.
90. Kantarjian HM, DeAngelo DJ, Stelljes M, Liedtke M, Stock W, Gökbuget N, et al. Inotuzumab ozogamicin versus standard of care in relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia:

Final report and long-term survival follow-up from the randomized, phase 3 INO-VATE study. *Cancer*. 2019 Jul 15;125(14):2474–87.

91. Fesnak AD, June CH, Levine BL. Engineered T cells: The promise and challenges of cancer immunotherapy. Vol. 16, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2016. p. 566–81.
92. Savoldo B, Ramos CA, Liu E, Mims MP, Keating MJ, Carrum G, et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *The Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 2011;121. Available from: <http://www.jci.org>
93. Milone MC, Fish JD, Carpenito C, Carroll RG, Binder GK, Teachey D, et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Molecular Therapy*. 2009;17(8):1453–64.
94. Labanieh L, Majzner RG, Mackall CL. Programming CAR-T cells to kill cancer. Vol. 2, *Nature Biomedical Engineering*. Nature Publishing Group; 2018. p. 377–91.
95. Rafiq S, Hackett CS, Brentjens RJ. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. Vol. 17, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Research; 2020. p. 147–67.
96. June CH, Sadelain M. Chimeric Antigen Receptor Therapy. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2018 Jul 5;379(1):64–73. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1706169>
97. Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. Vol. 3, *Cancer Discovery*. 2013. p. 388–98.
98. Yu B, Jiang T, Liu D. BCMA-targeted immunotherapy for multiple myeloma. Vol. 13, *Journal of Hematology and Oncology*. BioMed Central Ltd; 2020.
99. Till BG, Jensen MC, Wang J, Chen EY, Wood BL, Greisman HA, et al. Adoptive immunotherapy for indolent non-hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood*. 2008 Sep 15;112(6):2261–71.
100. Till BG, Jensen MC, Wang J, Qian X, Gopal AK, Maloney DG, et al. CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. *Blood* [Internet]. 2012; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/119/17/3940/1351355/zh801712003940.pdf>
101. Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, Dudley ME, Stetler-Stevenson M, Feldman SA, et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood*. 2010 Nov 18;116(20):4099–102.
102. Ali SA, Shi V, Maric I, Wang M, Stroncek DF, Rose JJ, et al. T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. *Blood*. 2016 Sep 29;128(13):1688–700.

103. Ramos CA, Ballard B, Zhang H, Dakhova O, Gee AP, Mei Z, et al. Clinical and immunological responses after CD30-specific chimeric antigen receptor-redirectioned lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation*. 2017 Sep 1;127(9):3462–71.
104. Maciocia PM, Wawrzyniecka PA, Philip B, Ricciardelli I, Akarca AU, Onuoha SC, et al. Targeting the T cell receptor β -chain constant region for immunotherapy of T cell malignancies. *Nature Medicine*. 2017;23(12):1416–23.
105. Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, Wang G, Eshhar Z, Mavroukakis SA, et al. A Phase I Study on Adoptive Immunotherapy Using Gene-Modified T Cells for Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;
106. Lamers CHJ, Willemsen RA, van Elzaker P, van Krimpen BA, Gratama JW, Debets R. Phoenix-ampho outperforms PG13 as retroviral packaging cells to transduce human T cells with tumor-specific receptors: Implications for clinical immunogene therapy of cancer. *Cancer Gene Therapy*. 2006 May;13(5):503–9.
107. Hombach A, Heuser C, Gerken M, Fischer B, Lewalter K, Diehl V, et al. T cell activation by recombinant Fc ϵ R1 g-chain immune receptors: an extracellular spacer domain impairs antigen-dependent T cell activation but not antigen recognition [Internet]. Vol. 7, *Gene Therapy*. 2000. Available from: www.nature.com/gt
108. Hombach A, Hombach AA, Abken H. Adoptive immunotherapy with genetically engineered T cells: Modification of the IgG1 Fc spacer domain in the extracellular moiety of chimeric antigen receptors avoids off-target activation and unintended initiation of an innate immune response. *Gene Therapy*. 2010 Oct;17(10):1206–13.
109. Maiti SN, Huls H, Singh H, Dawson M, Figliola M, Olivares S, et al. Sleeping beauty system to redirect T-cell specificity for human applications. *Journal of Immunotherapy*. 2013 Feb;36(2):112–23.
110. Dupuy AJ, Akagi K, Largaespada DA, Copeland NG, Jenkins NA. Mammalian mutagenesis using a highly mobile somatic Sleeping Beauty transposon system. *Nature*. 2005 Jul 14;436(7048):221–6.
111. Huang X, Wilber AC, Bao L, Tuong D, Tolar J, Orchard PJ, et al. Stable gene transfer and expression in human primary T cells by the Sleeping Beauty transposon system. *Blood* [Internet]. 2006; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/107/2/483/1279773/zh800206000483.pdf>
112. Singh H, Manuri PR, Olivares S, Dara N, Dawson MJ, Huls H, et al. Redirecting specificity of T-cell populations for CD19 using the sleeping beauty system. *Cancer Research*. 2008 Apr 15;68(8):2961–71.
113. Biffi A, Bartholomae CC, Cesana D, Cartier N, Aubourg P, Ranzani M, et al. Lentiviral vector common integration sites in preclinical models and a clinical trial reflect a benign integration bias and not oncogenic selection. *Blood* [Internet]. 2011; Available from: <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>

114. Scholler J, Brady TL, Binder-Scholl G, Hwang WT, Plesa G, Hege KM, et al. Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. *Science Translational Medicine*. 2012 May 2;4(132).
115. Singh H, Figliola MJ, Dawson MJ, Olivares S, Zhang L, Yang G, et al. Manufacture of Clinical-Grade CD19-Specific T Cells Stably Expressing Chimeric Antigen Receptor Using Sleeping Beauty System and Artificial Antigen Presenting Cells. *PLoS ONE*. 2013 May 31;8(5).
116. Straathof KC, Pulè MA, Yotnda P, Dotti G, Vanin EF, Brenner MK, et al. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood*. 2005 Jun 1;105(11):4247–54.
117. Stasi A di, Tey SK, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C, et al. Inducible Apoptosis as a Safety Switch for Adoptive Cell Therapy *Abs t r ac t*. Vol. 365, *N Engl J Med*. 2011.
118. Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, Gooley TA, Cherian S, Hudecek M, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *Journal of Clinical Investigation*. 2016 Jun 1;126(6):2123–38.
119. Yamanaka I, Yamauchi T, Henzan T, Sakoda T, Miyamoto K, Mishima H, et al. Optimization of lymphapheresis for manufacturing autologous CAR-T cells. *International Journal of Hematology*. 2021 Oct 1;114(4):449–58.
120. Stroncek DF, Lee DW, Ren J, Sabatino M, Highfill S, Khuu H, et al. Elutriated lymphocytes for manufacturing chimeric antigen receptor T cells. *Journal of Translational Medicine*. 2017 Mar 16;15(1).
121. Mock U, Nickolay L, Philip B, Cheung GWK, Zhan H, Johnston ICD, et al. Automated manufacturing of chimeric antigen receptor T cells for adoptive immunotherapy using CliniMACS prodigy. *Cytotherapy*. 2016 Aug 1;18(8):1002–11.
122. Jensen MC, Riddell SR. Design and implementation of adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells. *Immunological Reviews*. 2014 Jan;257(1):127–44.
123. Vormittag P, Gunn R, Ghorashian S, Veraitch FS. A guide to manufacturing CAR T cell therapies. Vol. 53, *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd; 2018. p. 164–81.
124. Roddie C, O'Reilly M, Dias Alves Pinto J, Vispute K, Lowdell M. Manufacturing chimeric antigen receptor T cells: issues and challenges. *Cytotherapy*. 2019 Mar 1;21(3):327–40.
125. Hollyman D, Stefanski J, Przybylowski M, Bartido S, Borquez-Ojeda O, Taylor C, et al. Manufacturing validation of biologically functional T cells targeted to CD19 antigen for autologous adoptive cell therapy. *Journal of Immunotherapy*. 2009 Feb;32(2):169–80.
126. Gee AP. Manufacturing genetically modified T cells for clinical trials. Vol. 22, *Cancer Gene Therapy*. Nature Publishing Group; 2015. p. 67–71.
127. Gee AP. GMP CAR-T cell production. Vol. 31, *Best Practice and Research: Clinical Haematology*. Bailliere Tindall Ltd; 2018. p. 126–34.

128. Tumaini B, Lee DW, Lin T, Castiello L, Stroncek DF, Mackall C, et al. Simplified process for the production of anti-CD19-CAR-engineered T cells. *Cytotherapy*. 2013 Nov;15(11):1406–15.
129. de Wolf C, van de Bovenkamp M, Hoefnagel M. Regulatory perspective on in vitro potency assays for human T cells used in anti-tumor immunotherapy. Vol. 20, *Cytotherapy*. Elsevier B.V.; 2018. p. 601–22.
130. Sanber KS, Knight SB, Stephen SL, Bailey R, Escors D, Minshull J, et al. Construction of stable packaging cell lines for clinical lentiviral vector production. *Scientific Reports*. 2015 Mar 12;5.
131. Somerville RPT, Devillier L, Parkhurst MR, Rosenberg SA, Dudley ME. Clinical scale rapid expansion of lymphocytes for adoptive cell transfer therapy in the WAVE[®] bioreactor. *Journal of Translational Medicine*. 2012 Apr 4;10(1).
132. Zhu F, Shah N, Xu H, Schneider D, Orentas R, Dropulic B, et al. Closed-system manufacturing of CD19 and dual-targeted CD20/19 chimeric antigen receptor T cells using the CliniMACS Prodigy device at an academic medical center. *Cytotherapy*. 2018 Mar 1;20(3):394–406.
133. Sadelain M. Insertional oncogenesis in gene therapy: How much of a risk? *Gene Therapy*. 2004 Apr;11(7):569–73.
134. Bear AS, Morgan RA, Cornetta K, June CH, Binder-Scholl G, Dudley ME, et al. Replication-competent retroviruses in gene-modified T cells used in clinical trials: Is it time to revise the testing requirements? Vol. 20, *Molecular Therapy*. 2012. p. 246–9.
135. Levine BL, Humeau LM, Boyer J, MacGregor RR, Rebello T, Lu X, et al. Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *PNAS* [Internet]. 2006; Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0608138103
136. Lamers CHJ, Willemsen R, van Elzakker P, van Steenberghe-Langeveld S, Broertjes M, Oosterwijk-Wakka J, et al. Immune responses to transgene and retroviral vector in patients treated with ex vivo-engineered T cells. *Blood*. 2011 Jan 6;117(1):72–82.
137. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. In Vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector. *Science* (1979) [Internet]. 1996; Available from: www.sciencemag.org
138. Sinn PL, Sauter SL, McCray PB. Gene therapy progress and prospects: Development of improved lentiviral and retroviral vectors - Design, biosafety, and production. Vol. 12, *Gene Therapy*. 2005. p. 1089–98.
139. Wang X, Olszewska M, Qu J, Wasielewska T, Bartido S, Hermetet G, et al. Large-scale Clinical-grade Retroviral Vector Production in a Fixed-Bed Bioreactor. *J Immunother* [Internet]. 2015; Available from: <http://links.lww.com/JIT/A368>
140. Gogol-Doring A, Ammar I, Gupta S, Bunse M, Miskey C, Chen W, et al. Genome-wide profiling reveals remarkable parallels between insertion site selection properties of the

- MLV retrovirus and the piggyBac transposon in primary human CD4+ T cells. *Molecular Therapy*. 2016 Mar 1;24(3):592–606.
141. Saito S, Nakazawa Y, Sueki A, Matsuda K, Tanaka M, Yanagisawa R, et al. Anti-leukemic potency of piggyBac-mediated CD19-specific T cells against refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cytotherapy*. 2014;16(9):1257–69.
 142. Ramanayake S, Bilmon I, Bishop D, Dubosq MC, Blyth E, Clancy L, et al. Low-cost generation of Good Manufacturing Practice-grade CD19-specific chimeric antigen receptor-expressing T cells using piggyBac gene transfer and patient-derived materials. *Cytotherapy*. 2015;17(9):1251–67.
 143. Maus M v, Thomas AK, Leonard DGB, Allman D, Addya K, Schlienger K, et al. Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB. *Nature Biotech [Internet]*. 2002; Available from: <http://biotech.nature.com>
 144. Gardner RA, Finney O, Annesley C, Brakke H, Summers C, Leger K, et al. Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults. *Blood*. 2017 Jun 22;129(25):3322–31.
 145. Park JH, Rivière I, Gonen M, Wang X, Sénéchal B, Curran KJ, et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2018 Feb;378(5):449–59.
 146. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2018 Feb;378(5):439–48.
 147. Hay KA, Gauthier J, Hirayama A v, Voutsinas JM, Wu Q, Li D, et al. Factors associated with durable EFS in adult B-cell ALL patients achieving MRD-negative CR after CD19 CAR T-cell therapy. *Immunobiology and Immunotherapy [Internet]*. 2019; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/133/15/1652/1553069/blood883710.pdf>
 148. Frey N v, Shaw PA, Hexner EO, Pequignot ; Edward, Gill ; Saar, Luger SM, et al. Optimizing Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for Adults With Acute Lymphoblastic Leukemia [Internet]. Vol. 38, *J Clin Oncol*. 2019. Available from: <https://doi.org/10>.
 149. Shah BD, Ghobadi A, Oluwole OO, Logan AC, Boissel N, Cassaday RD, et al. KTE-X19 for relapsed or refractory adult B-cell acute lymphoblastic leukaemia: phase 2 results of the single-arm, open-label, multicentre ZUMA-3 study. *The Lancet*. 2021 Aug 7;398(10299):491–502.
 150. Roddie C, Dias J, O'reilly MA, Abbasian M, Cadinanos-Garai A, Ketki Vispute ;, et al. Durable Responses and Low Toxicity After Fast Off-Rate CD19 Chimeric Antigen Receptor-T Therapy in Adults With Relapsed or Refractory B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol [Internet]*. 2021;39:3352–63. Available from: <https://doi>.

151. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2019 Jan 3;380(1):45–56.
152. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2017 Dec 28;377(26):2531–44.
153. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, Lunning MA, Wang M, Arnason J, et al. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *The Lancet*. 2020 Sep 19;396(10254):839–52.
154. Wang M, Munoz J, Goy A, Locke FL, Jacobson CA, Hill BT, et al. KTE-X19 CAR T-Cell Therapy in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2020 Apr 2;382(14):1331–42.
155. Jacobson CA, Chavez JC, Sehgal AR, William BM, Munoz J, Salles G, et al. Axicabtagene ciloleucel in relapsed or refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (ZUMA-5): a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2022 Jan;23(1):91–103.
156. Fowler NH, Dickinson M, Dreyling M, Martinez-Lopez J, Kolstad A, Butler J, et al. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory follicular lymphoma: the phase 2 ELARA trial. *Nature Medicine*. 2022 Feb 17;28(2):325–32.
157. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2011 Aug 25;365(8):725–33.
158. Porter DL, Hwang WT, Frey N v., Lacey SF, Shaw PA, Loren AW, et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Science Translational Medicine*. 2015 Sep 2;7(303).
159. Turtle CJ, Hay KA, Hanafi LA, Li D, Cherian S, Chen X, et al. Durable Molecular Remissions in Chronic Lymphocytic Leukemia Treated With CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells After Failure of Ibrutinib. *JCO [Internet]*. 2017; Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2017>.
160. Gill S, Brien O', Brogdon J. Anti-CD19 CAR T Cells in Combination with Ibrutinib for the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood Adv [Internet]*. 2022; Available from: <http://ashpublications.org/bloodadvances/article-pdf/doi/10.1182/bloodadvances.2022007317/1884839/bloodadvances.2022007317.pdf>
161. Geyer MB, Rivière I, Sénéchal B, Wang X, Wang Y, Purdon TJ, et al. Safety and tolerability of conditioning chemotherapy followed by CD19-targeted CAR T cells for relapsed/refractory CLL. *JCI Insight*. 2019;4(9).

162. Frey N v., Gill S, Hexner EO, Schuster S, Nasta S, Loren A, et al. Long-term outcomes from a randomized dose optimization study of chimeric antigen receptor modified T cells in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2020;38(25):2862–71.
163. Gauthier J, Hirayama A v, Purushe J, Hay KA, Lymp J, Li DH, et al. Feasibility and efficacy of CD19-targeted CAR T cells with concurrent ibrutinib for CLL after ibrutinib failure [Internet]. Vol. 135, *Blood*. 2020. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article-pdf/135/19/1650/1726901/bloodbld2019002936.pdf>
164. Siddiqi T, Soumerai JD, Dorritie KA, Stephens DM, Riedell PA, Arnason J, et al. Phase 1 TRANSCEND CLL 004 study of lisocabtagene maraleucel in patients with relapsed/refractory CLL or SLL. *Blood*. 2022 Mar 24;139(12):1794–806.
165. Brentjens RJ, Rivière I, Park JH, Davila ML, Wang X, Stefanski J, et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood*. 2011 Nov 3;118(18):4817–28.
166. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Science Translational Medicine*. 2013 Mar 20;5(177).
167. Davila ML, Riviere I, Wang X, Bartido S, Park J, Curran K, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Science Translational Medicine*. 2014 Feb 19;6(224).
168. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2014 Oct 16;371(16):1507–17.
169. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: A phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet*. 2015 Feb 7;385(9967):517–28.
170. Castella M, Boronat A, Martín-Ibáñez R, Rodríguez V, Suñé G, Caballero M, et al. Development of a Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor: A Paradigm for an Affordable CAR T Cell Production at Academic Institutions. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*. 2019;12.
171. Castella M, Caballero-Baños M, Ortiz-Maldonado V, González-Navarro EA, Suñé G, Antoñana-Vidósola A, et al. Point-of-care CAR T-cell production (ARI-0001) using a closed semi-automatic bioreactor: Experience from an academic phase i clinical trial. *Frontiers in Immunology*. 2020;11.
172. Ortiz-Maldonado V, Rives S, Castellà M, Alonso-Saladrígues A, Benítez-Ribas D, Caballero-Baños M, et al. CART19-BE-01: A Multicenter Trial of ARI-0001 Cell Therapy in Patients with CD19+ Relapsed/Refractory Malignancies. *Molecular Therapy*. 2021 Feb 3;29(2):636–44.

173. Ortiz-Maldonado V, Rives S, Español-Rego M, Alonso-Saladrigues A, Montoro M, Magnano L, et al. Factors associated with the clinical outcome of patients with relapsed/refractory CD19 + acute lymphoblastic leukemia treated with ARI-0001 CART19-cell therapy. Vol. 9, *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. BMJ Publishing Group; 2021.
174. Ortiz-Maldonado V, Alonso-Saladrigues A, Español-Rego M, Martínez-Cibrián N, Faura A, Magnano L, et al. Results of ARI-0001 CART19 cell therapy in patients with relapsed/refractory CD19-positive acute lymphoblastic leukemia with isolated extramedullary disease. *American Journal of Hematology*. 2022 Jun 1;
175. Ortiz-Maldonado V, Frigola G, Español-Rego M, Balagué O, Martínez-Cibrián N, Magnano L, et al. Results of ARI-0001 CART19 Cells in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia and Richter's Transformation. *Frontiers in Oncology*. 2022 Jan 31;12.
176. Myers RM, Taraseviciute A, Steinberg SM, Lambie AJ, Sheppard J, Yates B, et al. Blinatumomab Nonresponse and High-Disease Burden Are Associated With Inferior Outcomes After CD19-CAR for B-ALL. *J Clin Oncol* [Internet]. 2021;40:932–44. Available from: [https://doi](https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.1234).
177. Locke FL, Ghobadi A, Jacobson CA, Miklos DB, Lekakis LJ, Oluwole OO, 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. *The Lancet Oncology*. 2019 Jan 1;20(1):31–42.
178. Teachey DT, Bishop MR, Maloney DG, Grupp SA. Toxicity management after chimeric antigen receptor T cell therapy: One size does not fit "ALL." Vol. 15, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 218.
179. Neelapu SS, Tummala S, Kebriaei P, Wierda W, Gutierrez C, Locke FL, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy-assessment and management of toxicities. Vol. 15, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 47–62.
180. Mahadeo KM, Khazal SJ, Abdel-Azim H, Fitzgerald JC, Taraseviciute A, Bollard CM, et al. Management guidelines for paediatric patients receiving chimeric antigen receptor T cell therapy. Vol. 16, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group; 2019. p. 45–63.
181. Brudno JN, Kochenderfer JN. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: Recognition and management. Vol. 127, *Blood*. American Society of Hematology; 2016. p. 3321–30.
182. Brudno JN, Kochenderfer JN. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. Vol. 34, *Blood Reviews*. Churchill Livingstone; 2019. p. 45–55.
183. Maus M v., Alexander S, Bishop MR, Brudno JN, Callahan C, Davila ML, et al. Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) clinical practice guideline on immune effector cell-related adverse events. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2020 Dec 16;8(2).
184. Hill JA, Li D, Hay KA, Green ML, Cherian S, Chen X, et al. Infectious complications of CD19-targeted chimeric antigen receptor-modified T-cell immunotherapy. *Blood* [Internet]. 2018;

Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/131/1/121/1367372/blood793760.pdf>

185. Lee DW, Gardner R, Porter DL, Louis CU, Ahmed N, Jensen M, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood*. 2014 Jul 10;124(2):188–95.
186. Bader P, Kreyenberg H, Henze GHR, Eckert C, Reising M, Willasch A, et al. Prognostic value of Minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: The ALL-REZ BFM Study Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2009 Jan 20;27(3):377–84.
187. Bourlon C, Lacayo-Leñero D, Inclán-Alarcón SI, Demichelis-Gómez R. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Adult Philadelphia-Negative Acute Lymphoblastic Leukemia in the First Complete Remission in the Era of Minimal Residual Disease. Vol. 20, *Current oncology reports*. NLM (Medline); 2018. p. 36.
188. Pavlů J, Labopin M, Niittyvuopio R, Socié G, Yakoub-Agha I, Wu D, et al. Measurable residual disease at myeloablative allogeneic transplantation in adults with acute lymphoblastic leukemia: A retrospective registry study on 2780 patients from the acute leukemia working party of the EBMT. *Journal of Hematology and Oncology*. 2019 Oct 23;12(1).
189. Greil C, Engelhardt M, Ihorst G, Duque-Afonso J, Shoumariyeh K, Bertz H, et al. Prognostic factors for survival after allogeneic transplantation in acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplantation*. 2021 Apr 1;56(4):841–52.
190. Finney OC, Brakke H, Rawlings-Rhea S, Hicks R, Doolittle D, Lopez M, et al. CD19 CAR T cell product and disease attributes predict leukemia remission durability. *Journal of Clinical Investigation*. 2019 May 1;129(5):2123–32.
191. Xu X, Sun Q, Liang X, Chen Z, Zhang X, Zhou X, et al. Mechanisms of Relapse After CD19 CAR T-Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Prevention and Treatment Strategies. Vol. 10, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
192. Singh N, Orlando E, Xu J, Xu J, Binder Z, Collins MA, et al. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapies. Vol. 65, *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press; 2020. p. 91–8.
193. Spiegel JY, Patel S, Muffly L, Hossain NM, Oak J, Baird JH, et al. CAR T cells with dual targeting of CD19 and CD22 in adult patients with recurrent or refractory B cell malignancies: a phase 1 trial. *Nature Medicine*. 2021 Aug 1;27(8):1419–31.
194. Adam J. Lamble, Regina M. Myers, Agne Taraseviciute, Samuel John, Bonnie Yates, Seth M. Steinberg, et al. Preinfusion factors impacting relapse immunophenotype following CD19 CAR T cells. *Blood Adv* [Internet]. 2022; Available from: <http://ashpublications.org/bloodadvances/article-pdf/doi/10.1182/bloodadvances.2022007423/1895018/bloodadvances.2022007423.pdf>

195. Sotillo E, Barrett DM, Black KL, Bagashev A, Oldridge D, Wu G, et al. Convergence of acquired mutations and alternative splicing of CD19 enables resistance to CART-19 immunotherapy. *Cancer Discovery*. 2015 Dec 1;5(12):1282–95.
196. Gardner R, Wu D, Cherian S, Fang M, Laila-Aicha L, Hanafi A, et al. Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood* [Internet]. 2016; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/127/20/2406/1393485/2406.pdf>
197. Jacoby E, Nguyen SM, Fountaine TJ, Welp K, Gryder B, Qin H, et al. CD19 CAR immune pressure induces B-precursor acute lymphoblastic leukaemia lineage switch exposing inherent leukaemic plasticity. *Nature Communications*. 2016 Jul 27;7.
198. Fischer J, Paret C, Malki K el, Alt F, Wingerter A, Neu MA, et al. CD19 Isoforms Enabling Resistance to CART-19 Immunotherapy Are Expressed in B-ALL Patients at Initial Diagnosis. *J Immunother* [Internet]. 2017; Available from: www.immunotherapy-journal.com.
199. Jacoby E, Bielorai B, Avigdor A, Itzhaki O, Hutt D, Nussboim V, et al. Locally produced CD19 CAR T cells leading to clinical remissions in medullary and extramedullary relapsed acute lymphoblastic leukemia. *American Journal of Hematology*. 2018 Dec 1;93(12):1485–92.
200. Ghorashian S, Kramer AM, Onuoha S, Wright G, Bartram J, Richardson R, et al. Enhanced CAR T cell expansion and prolonged persistence in pediatric patients with ALL treated with a low-affinity CD19 CAR. *Nature Medicine*. 2019 Sep 1;25(9):1408–14.
201. Lee KH, Lee JH, Kim S, Lee JS, Kim SH, Kim WK. High frequency of extramedullary relapse of acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation [Internet]. Vol. 26, *Bone Marrow Transplantation*. 2000. Available from: www.nature.com/bmt
202. Lau KM, Saunders IM, Goodman AM. Characterization of relapse patterns in patients with acute lymphoblastic leukemia treated with blinatumomab. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. 2021 Jun 1;27(4):821–6.
203. Fabrizio VA, Phillips CL, Lane A, Baggott C, Prabhu S, Egeler E, et al. Tisagenlecleucel outcomes in relapsed/refractory extramedullary ALL: A Pediatric Real World CAR Consortium Report. *Blood Advances*. 2022 Jan 25;6(2):600–10.
204. Leahy AB, Newman H, Li Y, Liu H, Myers R, DiNofia A, et al. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for CNS relapsed or refractory acute lymphocytic leukaemia: a post-hoc analysis of pooled data from five clinical trials. *The Lancet Haematology*. 2021 Oct 1;8(10):e711–22.
205. Riches JC, Gribben JG. Understanding the Immunodeficiency in Chronic Lymphocytic Leukemia. Potential Clinical Implications. *Hematol Oncol Clin N Am* . 2013 Apr;27(2):207–35.
206. Christopoulos P, Pfeifer D, Bartholomé K, Follo M, Timmer J, Fisch P, et al. Definition and characterization of the systemic T-cell dysregulation in untreated indolent B-cell lymphoma and very early CLL. *Blood* [Internet]. 2011; Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/

207. Scrivener S, Goddard R v., Kaminski ER, Prentice AG. Abnormal T-cell function in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. Vol. 44, *Leukemia and Lymphoma*. 2003. p. 383–9.
208. Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, Gorgün G, le Dieu R, Blum W, et al. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *Journal of Clinical Investigation*. 2008 Jun 1;
209. Ali K, Soond DR, Piñeiro R, Hagemann T, Pearce W, Lim EL, et al. Inactivation of PI(3)K p110 δ breaks regulatory T-cell-mediated immune tolerance to cancer. *Nature*. 2014;510(7505):407–11.
210. Fraietta JA, Beckwith KA, Patel PR, Ruella M, Zheng Z, Barrett DM, et al. Ibrutinib enhances chimeric antigen receptor T-cell engraftment and efficacy in leukemia Key Points. *Blood* [Internet]. 2016; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/127/9/1117/1395722/1117.pdf>
211. Brusa D, Serra S, Coscia M, Rossi D, D’Arena G, Laurenti L, et al. The PD-1/PD-L1 axis contributes to T-cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2013;98(6):953–63.
212. Delgado J, Caballero-Baños M, Ortiz-Maldonado V, Castellà M, Magnano L, Juan M, et al. Chimeric antigen receptor T cells targeting CD19 and ibrutinib for chronic lymphocytic leukemia. *Hemasphere*. 2019 Apr 1;3(2).
213. Juan M, Delgado J, Calvo G, Trias E, Urbano-Ispizua Á. Is Hospital Exemption an Alternative or a Bridge to European Medicines Agency for Developing Academic Chimeric Antigen Receptor T-Cell in Europe? Our Experience with ARI-0001. *Human Gene Therapy*. 2021 Oct 1;32(19–20):1004–7.
214. Trias E, Juan M, Urbano-Ispizua A, Calvo G. The hospital exemption pathway for the approval of advanced therapy medicinal products: an underused opportunity? The case of the CAR-T ARI-0001. Vol. 57, *Bone Marrow Transplantation*. Springer Nature; 2022. p. 156–9.

8 - Adenda:

Publicaciones adicionales relacionadas derivadas al desarrollo y administración de ARI-0001 y que han sido publicados durante el periodo de mi doctorado.

1. Castella M, Boronat A, Martín-Ibáñez R, Rodríguez V, Suñé G, Caballero M, Marzal B, Pérez-Amill L, Martín-Antonio B, Castaño J, Bueno C, Balagué O, González-Navarro EA, Serra-Page C, Engel P, Vilella R, Benitez-Ribas D, **Ortiz-Maldonado V**, Cid J, Tabera J, Canals JM, Lozano M, Baumann T, Vilarrodona A, Trias E, Campo E, Menendez P, Urbano-Ispizua Á, Yagüe J, Pérez-Galán P, Rives S, Delgado J, Juan M. Development of a Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor: A Paradigm for an Affordable CAR T Cell Production at Academic Institutions. **Mol Ther Methods Clin Dev.** **2018** Dec 6;12:134-144. doi: 10.1016/j.omtm.2018.11.010. PMID: 30623002; PMCID: PMC6319086. Impact factor de 5.849, Cuartil 1, area "Biochemistry, Genetics and Molecular Biology/molecular medicine".
2. Delgado J, Caballero-Baños M, **Ortiz-Maldonado V**, Castellà M, Magnano L, Juan M, Urbano-Ispizua Á. Chimeric Antigen Receptor T Cells Targeting CD19 and Ibrutinib for Chronic Lymphocytic Leukemia. **Hemasphere.** **2019** Feb 8;3(2):e174. doi: 10.1097/HS9.000000000000174. PMID: 31723815; PMCID: PMC6746038. Impact factor de 8.3, Cuartil 1, area "medicine/hematology".
3. Castella M, Caballero-Baños M, **Ortiz-Maldonado V**, González-Navarro EA, Suñé G, Antoñana-Vidósola A, Boronat A, Marzal B, Millán L, Martín-Antonio B, Cid J, Lozano M, García E, Tabera J, Trias E, Perpiña U, Canals JM, Baumann T, Benítez-Ribas D, Campo E, Yagüe J, Urbano-Ispizua Á, Rives S, Delgado J, Juan M. Point-Of-Care CAR T-Cell Production (ARI-0001) Using a Closed Semi-automatic Bioreactor: Experience From an Academic Phase I Clinical Trial. **Front Immunol.** **2020** Mar 20;11:482. doi: 10.3389/fimmu.2020.00482. PMID: 32528460; PMCID: PMC7259426. Impact factor de 7.97, Cuartil 1, area "medicine/immunology & allergy".
4. Ortiz de Landazuri I, Egri N, Muñoz-Sánchez G, **Ortiz-Maldonado V**, Bolaño V, Guijarro C, Pascal M, Juan M. Manufacturing and Management of CAR T-Cell Therapy in "COVID-19's Time": Central Versus Point of Care Proposals. **Front Immunol.** **2020** Oct 15;11:573179. doi: 10.3389/fimmu.2020.573179. PMID: 33178200; PMCID: PMC7593817. Impact factor de 7.97, Cuartil 1, area "medicine/immunology & allergy".

5. Bartoló-Ibars A, Uribe-Herranz M, Muñoz-Sánchez G, Arnaldos-Pérez C, **Ortiz-Maldonado V**, Urbano-Ispizua Á, Pascal M, Juan M. CAR-T after Stem Cell Transplantation in B-Cell Lymphoproliferative Disorders: Are They Really Autologous or Allogenic Cell Therapies? **Cancers**. **2021** Sep 17;13(18):4664. doi: 10.3390/cancers13184664. PMID: 34572890; PMCID: PMC8470158. Impact factor de 6.32, Cuartil 1, area “medicine/oncology”.
6. Garcia-Prieto CA, Villanueva L, Bueno-Costa A, Davalos V, González-Navarro EA, Juan M, Urbano-Ispizua Á, Delgado J, **Ortiz-Maldonado V**, Del Bufalo F, Locatelli F, Quintarelli C, Sinibaldi M, Soler M, Castro de Moura M, Ferrer G, Urdinguio RG, Fernandez AF, Fraga MF, Bar D, Meir A, Itzhaki O, Besser MJ, Avigdor A, Jacoby E, Esteller M. Epigenetic Profiling and Response to CD19 Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy in B-Cell Malignancies. **J Natl Cancer Inst**. **2022** Mar 8;114(3):436-445. doi: 10.1093/jnci/djab194. PMID: 34581788; PMCID: PMC8902331. Impact factor de 13.506, Cuartil 1, area “medicine/oncology”.
7. Bueno C, Barrera S, Bataller A, **Ortiz-Maldonado V**, Elliot N, O'Byrne S, Wang G, Rovira M, Gutierrez-Agüera F, Trincado JL, González-González M, Morgades M, Sorigué M, Bárcena P, Zanetti SR, Torrebadell M, Vega-Garcia N, Rives S, Mallo M, Sole F, Mead AJ, Roberts I, Thongjuea S, Psaila B, Juan M, Delgado J, Urbano-Ispizúa A, Ribera JM, Orfao A, Roy A, Menendez P. CD34+CD19-CD22+ B-cell progenitors may underlie phenotypic escape in patients treated with CD19-directed therapies. **Blood**. **2022** Jul 7;140(1):38-44. doi: 10.1182/blood.2021014840. PMID: 35421218. Impact factor de 22.113, Cuartil 1, area “medicine/hematology”.

9 - Anexos:

9.1. Artículo nº1:

CART19-BE-01: A Multicenter Trial of ARI-0001 Cell Therapy in Patients with CD19+ Relapsed/Refractory Malignancies. (165)

Valentín Ortiz-Maldonado, Susana Rives, Maria Castellà, Anna Alonso-Saladrigues, Daniel Benítez-Ribas, Miguel Caballero-Baños, Tycho Baumann, Joan Cid, Enric Garcia-Rey, Cristina Llanos, Montserrat Torreadell, Neus Villamor, Eva Giné, Marina Díaz-Beyá, Laia Guardia, Mercedes Montoro, Albert Català, Anna Faura, E Azucena González, Marta Español-Rego, Nela Klein-González, Laia Alsina, Pedro Castro, Iolanda Jordan, Sara Fernández, Federico Ramos, Guillermo Suñé, Unai Perpiñá, Josep Maria Canals, Miquel Lozano, Esteve Trias, Andrea Scalise, Sara Varea, Joaquín Sáez-Peñataro, Ferran Torres, Gonzalo Calvo, Jordi Esteve, Álvaro Urbano-Ispizua, Manel Juan, Julio Delgado.

Molecular Therapy. 2021 Feb 3;29(2):636-644. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.09.027. Epub 2020 Sep 20. PMID: 33010231; PMCID: PMC7854276.

Supplemental Information

**CART19-BE-01: A Multicenter Trial
of ARI-0001 Cell Therapy in Patients
with CD19⁺ Relapsed/Refractory Malignancies**

Valentín Ortíz-Maldonado, Susana Rives, Maria Castellà, Anna Alonso-Saladrigues, Daniel Benítez-Ribas, Miguel Caballero-Baños, Tycho Baumann, Joan Cid, Enric Garcia-Rey, Cristina Llanos, Montserrat Torredadell, Neus Villamor, Eva Giné, Marina Díaz-Beyá, Laia Guardia, Mercedes Montoro, Albert Català, Anna Faura, E. Azucena González, Marta Español-Rego, Nela Klein-González, Laia Alsina, Pedro Castro, Iolanda Jordan, Sara Fernández, Federico Ramos, Guillermo Suñé, Unai Perpiñá, Josep M. Canals, Miquel Lozano, Esteve Trias, Andrea Scalise, Sara Varea, Joaquín Sáez-Peñataro, Ferran Torres, Gonzalo Calvo, Jordi Esteve, Álvaro Urbano-Ispizua, Manel Juan, and Julio Delgado

SUPPLEMENTAL INFORMATION

SUPPLEMENTAL TABLES

Table S1: Adverse events (any grade) in patients with acute lymphoblastic leukemia

	Cohort 1-2 (single infusion, n=15) Occurrences/ Subjects (%)	Cohort 3 (fractionated infusion, n=23) Occurrences/ Subjects (%)	All patients (n=38) Occurrences/ Subjects (%)
Neutropenia	15/15 (100%)	24/22 (95.7%)	39/37 (97.4%)
Anemia	14/14 (93.3%)	19/18 (78.3%)	33/32 (84.2%)
Hypogammaglobulinemia	10/10 (66.7%)	22/20 (87.0%)	32/30 (78.9%)
Thrombocytopenia	15/13 (86.7%)	16/16 (69.6%)	31/29 (76.3%)
Lymphopenia	19/11 (73.3%)	17/17 (73.9%)	36/28 (73.7%)
Cytokine release syndrome	11/11 (73.3%)	10/10 (43.5%)	21/21 (55.3%)
AST increased	14/10 (66.7%)	11/9 (39.1%)	25/19 (50.0%)
ALT increased	15/9 (60.0%)	9/9 (39.1%)	24/18 (47.4%)
GGT increased	9/7 (46.7%)	8/8 (34.8%)	17/15 (39.5%)
AlkPhos increased	9/7 (46.7%)	7/7 (30.4%)	16/14 (36.8%)
Vomiting	6/5 (33.3%)	8/5 (21.7%)	14/10 (26.3%)
Febrile neutropenia	5/3 (20.0%)	6/6 (26.1%)	11/9 (23.7%)
Viral infection	11/7 (46.7%)	2/2 (8.7%)	13/9 (23.7%)
Headache	6/4 (26.7%)	7/5 (21.7%)	13/9 (23.7%)
Pyrexia	4/3 (20.0%)	3/3 (13.0%)	7/6 (15.8%)
Erythema	6/5 (33.3%)	1/1 (4.3%)	7/6 (15.8%)
Tachycardia	3/3 (20.0%)	2/2 (8.7%)	5/5 (13.2%)
Decreased appetite	2/2 (13.3%)	3/3 (13.0%)	5/5 (13.2%)
Arthralgia	1/1 (6.7%)	6/4 (17.4%)	7/5 (13.2%)
Hypotension	4/4 (26.7%)	1/1 (4.3%)	5/5 (13.2%)
Herpes zoster	3/3 (20.0%)	2/2 (8.7%)	5/5 (13.2%)
Eyelid edema	1/1 (6.7%)	5/3 (13.0%)	6/4 (10.5%)
Nausea	3/3 (20.0%)	1/1 (4.3%)	4/4 (10.5%)

	Cohort 1-2 (single infusion, n=15) Occurrences/ Subjects (%)	Cohort 3 (fractionated infusion, n=23) Occurrences/ Subjects (%)	All patients (n=38) Occurrences/ Subjects (%)
Bone pain	2/2 (13.3%)	3/2 (8.7%)	5/4 (10.5%)
Dysgeusia	0/0 (0.0%)	4/4 (17.4%)	4/4 (10.5%)
Coagulopathy	2/2 (13.3%)	0/0 (0.0%)	2/2 (5.3%)
Abdominal pain	2/2 (13.3%)	0/0 (0.0%)	2/2 (5.3%)
Toothache	2/2 (13.3%)	0/0 (0.0%)	2/2 (5.3%)
Bilirubin increased	2/2 (13.3%)	0/0 (0.0%)	2/2 (5.3%)
Acidosis	2/2 (13.3%)	0/0 (0.0%)	2/2 (5.3%)
Hypoalbuminemia	2/2 (13.3%)	0/0 (0.0%)	2/2 (5.3%)
Water intoxication	2/2 (13.3%)	0/0 (0.0%)	2/2 (5.3%)
Dizziness	2/2 (13.3%)	0/0 (0.0%)	2/2 (5.3%)
Epistaxis	4/2 (13.3%)	0/0 (0.0%)	4/2 (5.3%)
Ecchymosis	2/2 (13.3%)	0/0 (0.0%)	2/2 (5.3%)

AEs occurring in more than 10% of patients per cohort are depicted in the Table.

Table S2: Adverse events (any grade) in patients with non-Hodgkin's lymphoma

	Cohort 1-2 (single infusion, n=3) Occurrences/ Subjects (%)	Cohort 3 (fractionated infusion, n=5) Occurrences/ Subjects (%)	All patients (n=8) Occurrences/ Subjects (%)
Neutropenia	7/3 (100%)	6/5 (100%)	13/8 (100%)
Lymphopenia	6/3 (100%)	5/5 (100%)	11/8 (100%)
Anemia	7/3 (100%)	4/4 (80.0%)	11/7 (87.5%)
Thrombocytopenia	6/3 (100%)	5/4 (80.0%)	11/7 (87.5%)
Cytokine release syndrome	3/2 (66.7%)	5/5 (100%)	8/7 (87.5%)
Hypogammaglobulinemia	2/2 (66.7%)	4/4 (80.0%)	6/6 (75.0%)
GGT increased	5/3 (100%)	3/3 (60.0%)	8/6 (75.0%)
ALT increased	2/1 (33.3%)	2/2 (40.0%)	4/3 (37.5%)
AST increased	2/1 (33.3%)	2/2 (40.0%)	4/3 (37.5%)
Nausea	1/1 (33.3%)	1/1 (20.0%)	2/2 (25.0%)
Infusion site reaction	4/1 (33.3%)	1/1 (20.0%)	5/2 (25.0%)
Pneumonia	1/1 (33.3%)	1/1 (20.0%)	2/2 (25.0%)
Bilirubin increased	1/1 (33.3%)	1/1 (20.0%)	2/2 (25.0%)
AlkPhos increased	4/2 (66.7%)	0/0 (0.0%)	4/2 (25.0%)
Headache	0/0 (0.0%)	2/2 (40.0%)	2/2 (25.0%)
Syncope	0/0 (0.0%)	2/2 (40.0%)	2/2 (25.0%)
Cough	1/1 (33.3%)	1/1 (20.0%)	2/2 (25.0%)
Erythema	1/1 (33.3%)	1/1 (20.0%)	2/2 (25.0%)
Bradycardia	1/1 (33.3%)	0/0 (0.0%)	1/1 (12.5%)
Cardiac arrest	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Iridocyclitis	1/1 (33.3%)	0/0 (0.0%)	1/1 (12.5%)
Aphthous ulcer	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Diarrhea	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Dysphagia	1/1 (33.3%)	0/0 (0.0%)	1/1 (12.5%)
Vomiting	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Hemorrhoidal hemorrhage	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Palatal edema	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)

	Cohort 1-2 (single infusion, n=3) Occurrences/ Subjects (%)	Cohort 3 (fractionated infusion, n=5) Occurrences/ Subjects (%)	All patients (n=8) Occurrences/ Subjects (%)
Neutropenic colitis	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Peripheral edema	1/1 (33.3%)	0/0 (0.0%)	1/1 (12.5%)
Pyrexia	2/1 (33.3%)	0/0 (0.0%)	2/1 (12.5%)
Bacteraemia	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Conjunctivitis	1/1 (33.3%)	0/0 (0.0%)	1/1 (12.5%)
Influenza	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Cytomegalovirus pneumonia	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Cytomegalovirus viraemia	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Septic shock	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Skin infection	0/0 (0.0%)	2/1 (20.0%)	2/1 (12.5%)
Candida pneumonia	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Herpes ophthalmic	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Device related infection	1/1 (33.3%)	0/0 (0.0%)	1/1 (12.5%)
Viral rhinitis	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Subdural haematoma	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Creatinine increased	1/1 (33.3%)	0/0 (0.0%)	1/1 (12.5%)
Uric acid increased	2/1 (33.3%)	0/0 (0.0%)	2/1 (12.5%)
Hyperglycaemia	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Hypernatraemia	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Hypokalaemia	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Arthralgia	1/1 (33.3%)	0/0 (0.0%)	1/1 (12.5%)
Myopathy	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Neoplasm skin	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Superior vena cava syndrome	1/1 (33.3%)	0/0 (0.0%)	1/1 (12.5%)
Urinary tract obstruction	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Acute kidney injury	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Penile edema	1/1 (33.3%)	0/0 (0.0%)	1/1 (12.5%)
Catarrh	1/1 (33.3%)	0/0 (0.0%)	1/1 (12.5%)

	Cohort 1-2 (single infusion, n=3) Occurrences/ Subjects (%)	Cohort 3 (fractionated infusion, n=5) Occurrences/ Subjects (%)	All patients (n=8) Occurrences/ Subjects (%)
Pneumonia viral	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Respiratory failure	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Seborrheic dermatitis	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Toxic epidermal necrolysis	0/0 (0.0%)	1/1 (20.0%)	1/1 (12.5%)
Shock	1/1 (33.3%)	0/0 (0.0%)	1/1 (12.5%)

AEs occurring in more than 10% of patients per cohort are depicted in the Table.

Table S3: Cytokine levels (all patients with results available)

	Day +7 value (pg/mL) (median, range)	Peak value (pg/mL) (median, range)	Day +7/pre- administration ratio (median, range)
Interferon-gamma	8.3 (0.3-32031)	22.2 (0.3-32031)	1.56 (0.14-10010)
Interleukin-2	3.2 (0.3-37.4)	3.2 (0.3-37.4)	1 (0.4-29.6)
Interleukin-6	3.2 (0.1-10000)	3.2 (0.1-10000)	1.05 (0.059-4673)
Interleukin-8	11.0 (1.7-212.8)	21.9 (1.8-492.6)	1.29 (0.12-81.3)
Interleukin-10	26.4 (0.2-10000)	42.8 (0.2-10000)	1.6 (0.15-915.8)
Interleukin-15	7.9 (0.8-83)	11.5 (3.2-83)	0.56 (0.1-5.5)
Tumor necrosis factor alpha	14.1 (0.5-148.7)	26.7 (1.1-148.7)	1.4 (0.5-59)

SUPPLEMENTAL FIGURES

Figure S1: Cumulative incidence of cytokine release syndrome (any grade) in patients with acute lymphoblastic leukemia according to type of administration [cohort 1-2 (blue curve – single dose) vs. cohort 3 (yellow curve - fractionated)]. This difference was statistically significant ($P = 0.025$, Gray's test).

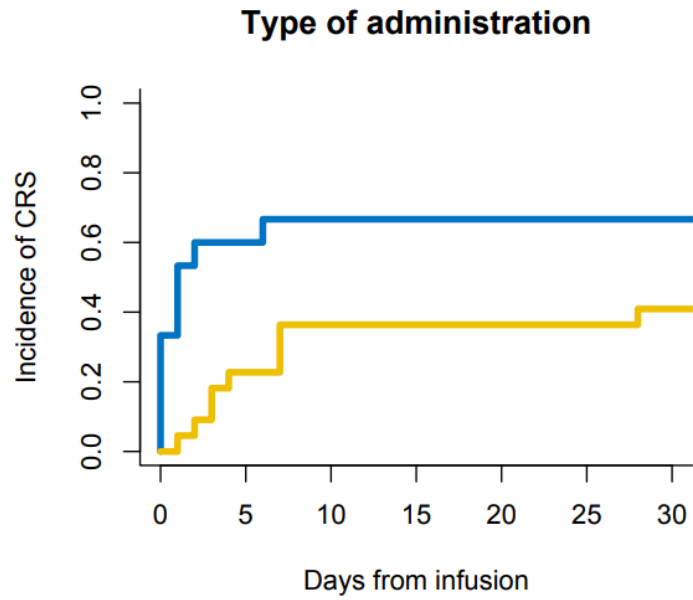


Figure S2: ARI-0001 expansion, normal B-cells, and human anti-murine antibodies (HAMAs) over time in all patients who received a second cell infusion. Patients in panels A-E were diagnosed with acute lymphoblastic leukemia while the patient depicted in panel F was diagnosed with diffuse large B-cell lymphoma. ARI-0001 expansion was measured using quantitative PCR in copies per ng of genomic DNA, normal B-cells were measured as percentage of all lymphocytes and HAMAs were measured as percentage of positive cells.

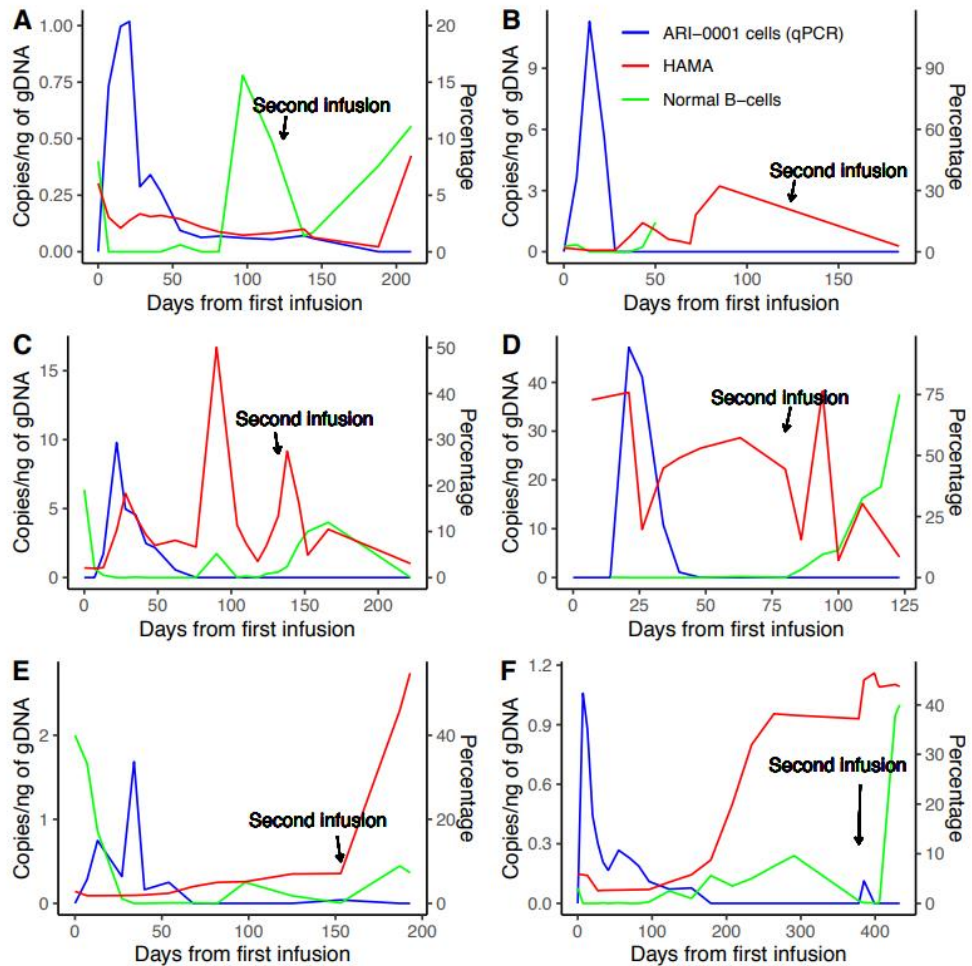


Figure S3: Simon-Makuch curve depicting the impact of B-cell aplasia on progression-free survival in patients with acute lymphoblastic leukemia (blue curve = sustained B-cell aplasia, yellow curve = B-cell recovery). The difference was not statistically significant ($P = 0.33$, Mantel-Byar test).

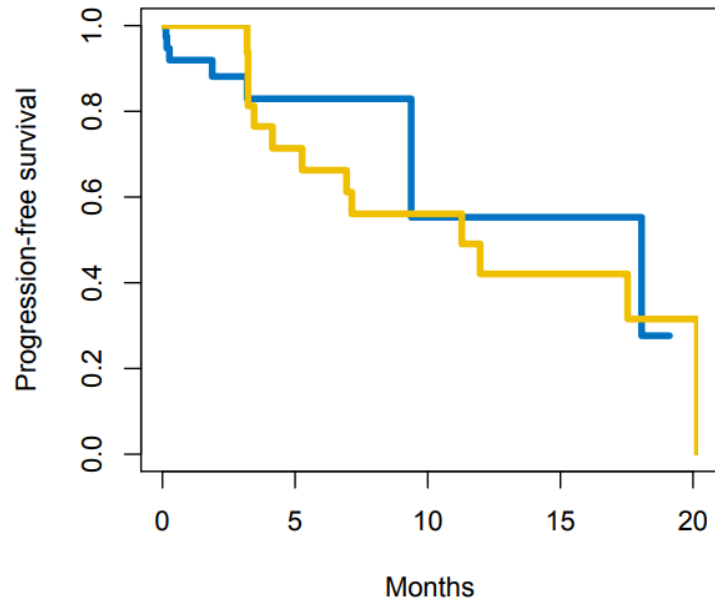
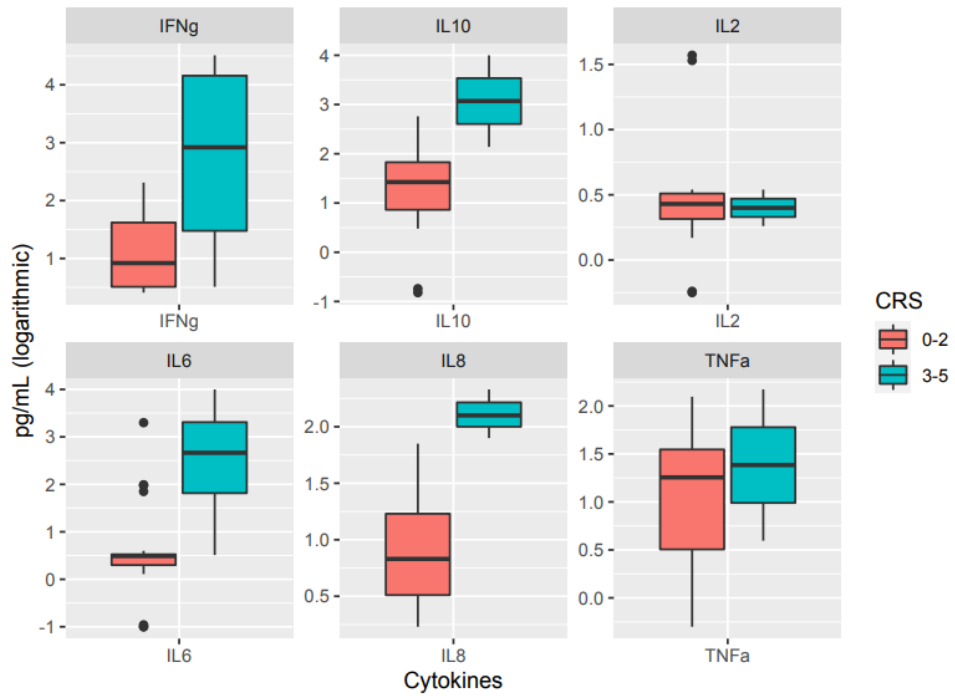
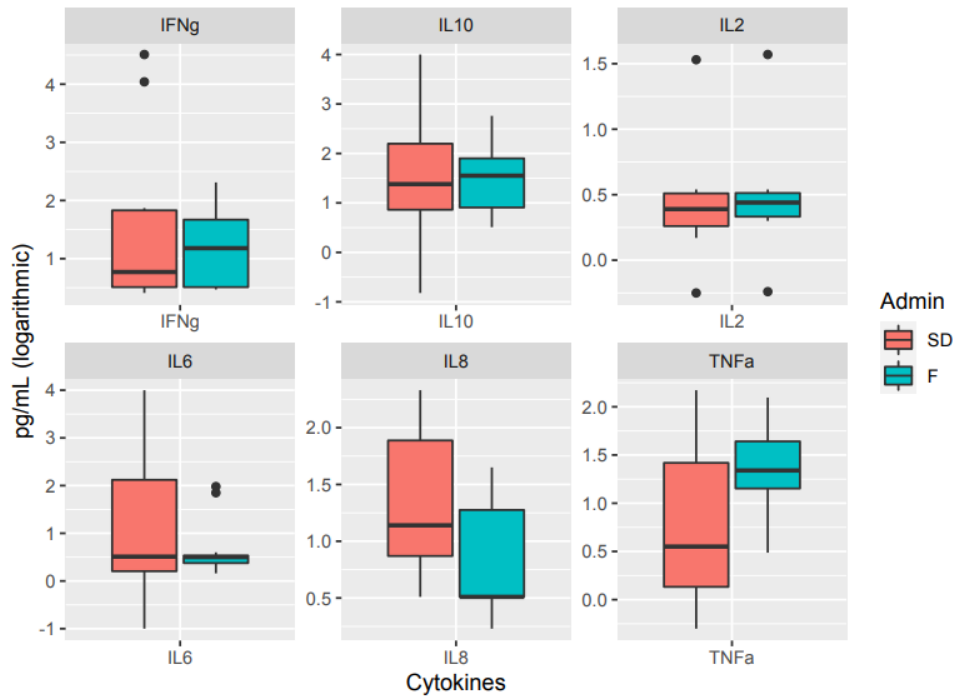


Figure S4: Cytokine levels (patients with acute lymphoblastic leukemia with results available on day +7) according to the presence of cytokine release syndrome (grade 0-2 vs. grade ≥ 3)



Differences were only statistically significant (Wilcoxon's rank sum test) for IL6 ($P = 0.018$) and borderline significant for IL8 ($P = 0.11$) and IL10 ($P = 0.065$)

Figure S5: Cytokine levels (patients with acute lymphoblastic leukemia with results available on day +7) according to the type of ARI-0001 administration (cohort 1-2 [single dose] vs. cohort 3 [fractionated])



There were no statistically significant differences (Wilcoxon's rank sum test).

Figure S6: ARI-0001 expansion over time, as calculated by quantitative PCR, in patients with acute lymphoblastic leukemia according to age (younger or older than 18 years). Lines represent median values

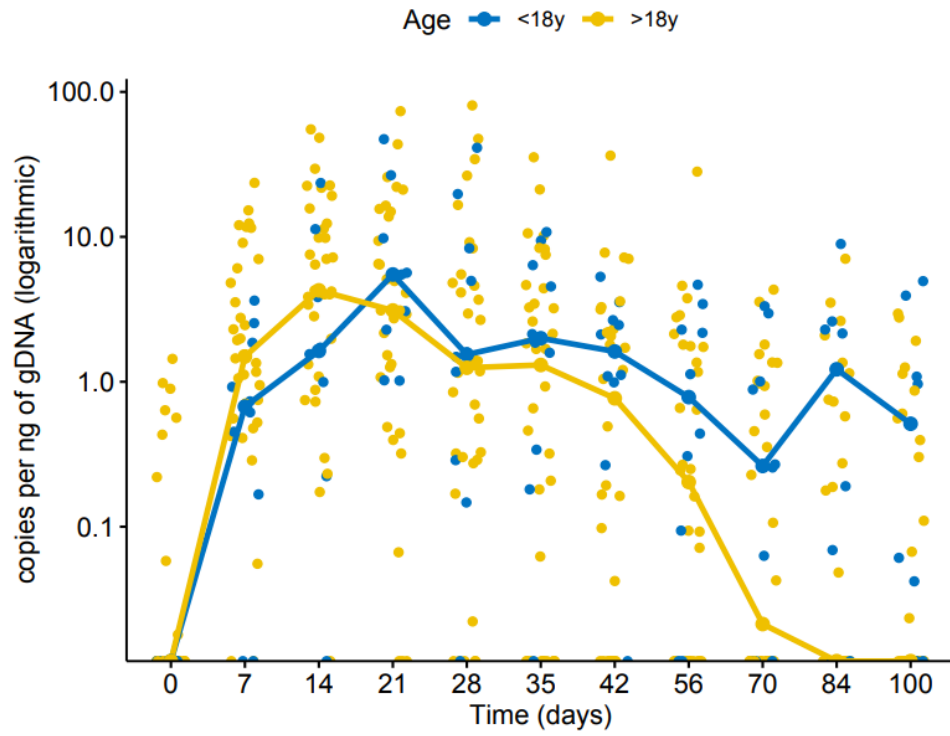
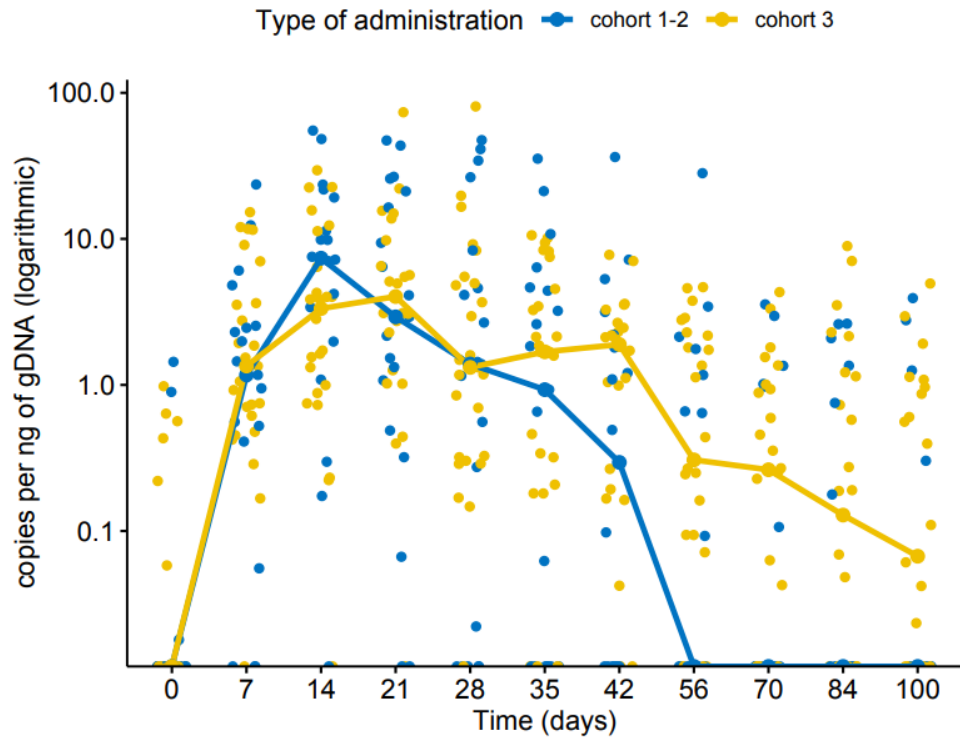


Figure S7: ARI-0001 expansion over time, as calculated by quantitative PCR, in patients with acute lymphoblastic leukemia according to type of administration (single dose [cohort 1-2] vs. fractionated [cohort 3]). Lines represent median values



SUPPLEMENTARY METHODS

Measurement of serum cytokines

Patient serum was extracted on day 0 (prior to ARI-0001 administration), weekly for the first two months and then monthly for the first year. Serum samples were processed and stored at -80°C for subsequent analysis by the Cytokine Human Magnetic 16-Plex Panel for the Luminex platform, specifically designed for quantifying human IFN- γ , IL2, IL6, IL8, IL10 and TNF- α (Millipore). All assays were carried out according to the manufacturer's specifications. Quality and assay standard controls were included for independent runs per the manufacturer's protocol. Luminex assays were read using a Luminex 200 system.

Measurement of ARI-0001 cells and CAR19 transgene

ARI-0001 cells presence was evaluated by flow cytometry with an APC-conjugated AffiniPureF(ab')₂-fragment goat-anti-mouse IgG monoclonal antibody (goat-anti-mouse IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories). Moreover, a quantitative PCR assay (qPCR) was optimized and validated for monitoring ARI-0001 cell expansion and persistence. The number of transgene copies per ng of genomic DNA (gDNA) was determined using Light Cycler® 480 SYBRGreen® I Master (Roche, Cat. N. 04707516001). Pairs of primers were designed against the GATA2 gene (control, with just one copy per genome) and WPRE sequence (part of the CAR transgene). Primer sequences are as follows: GATA2_F: 5'tggcgcaactacatggaa 3'; GATA2_R: 5'cgagtcgaggtgattgaagaaga 3'; WPRE_F: 5'gtccttccatggtgctc 3'; WPRE_R: 5'ccgaaggacgtagcaga 3'. The absolute quantification method was used to determine the number of copies. Standard curves were prepared using 1:10 serial dilutions of plasmids containing GATA2 or transgene. The final number of molecules in the reaction ranged from 10^2 to 10^8 . For GATA2 quantification, GATA2 cDNA was cloned in a pCRII-Topo vector (Invitrogen). The pCCL-CAR19 vector was used in the same way to quantify the transgene copy number. The following PCR program was used: 1) Initial denaturalization: 95°C , 5'; 2) 40 cycles of: 95°C , 10'; 58°C , 10'; 72°C , 5'; 3) melting curve. qPCR values are therefore expressed as copies of transgene per ng of gDNA.

Human anti-murine antibodies

The presence of human anti-murine antibodies (HAMA) was monitored in patient serum (same timings as for cytokine levels) by cell fluorescence. The HEK293T cell line was transduced with the CAR19 lentivirus (multiplicity of infection of 2) in the presence of polybrene (8 mcg/mL, Santa Cruz Biotechnology) for 48 hours at 37°C . Once CAR19 expression was verified by flow cytometry, the transduced HEK293T cell line was incubated with the patients' serum. The presence or absence of anti-CAR19 antibodies (HAMAs) was determined by flow cytometry using a FITC-conjugated anti-human IgG antibody (Life Technologies). A sample was considered positive when the percentage of positive cells was greater than 20%, and borderline positive when the percentage of positive cells ranged from 10 to 20%.

Analysis of ARI-0001 cell product

As part of standard release criteria, ARI-0001 products were evaluated for anti-CD19 CAR surface expression and percentage of CD3+, CD4+ and CD8+ T cells. More than 20% of ARI-0001 cells and 70% CD3-positive cells were required, with no particular CD4/CD8 ratio. Samples were run through the fluorescence-activated cell sorting (FACS) flow cytometer BD FACSCanto II (BD Biosciences) and data analyzed using the BD FACSDiva Software. Cell viability was measured using the trypan blue exclusion method, and required to be over 70%. The presence of bacteria or adventitious viruses was ruled out by conventional microbiologic or molecular tests. The absence of endotoxin was confirmed using a kinetic chromogenic assay. Detailed results of the first 28 products were published elsewhere (Castella et al. *Frontiers in Immunology* 2020).

Additional statistical methods

Comparisons between qualitative variables (presence of HAMAs, disease relapse, loss of B-cell aplasia) were performed using Chi-square or Fisher's exact test as appropriate. The association between cytokine levels and the occurrence of CRS or type of ARI-0001 administration (single dose vs. fractionated) was evaluated using Wilcoxon's rank sum test. The area under the curve for ARI-0001 expansion (as per qPCR) was calculated using the 'AUC' function (spline method) from the 'DescTools' package. The cumulative incidence of CRS was plotted using the 'cmprsk' package and the difference between single-

dose and fractionated cohorts was evaluated using Gray's test. The impact of persistence of B-cell aplasia on progression-free or overall survival was evaluated using the Mantel-Byar method, and graphically represented by means of a Simon-Makuch curve (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

9.2. Artículo nº2:

Factors associated with the clinical outcome of patients with relapsed/refractory CD19+ acute lymphoblastic leukemia treated with ARI-0001 CART19-cell therapy. (166)

Valentín Ortiz-Maldonado, Susana Rives, Marta Español-Rego, Anna Alonso-Saladrigues, Mercedes Montoro, Laura Magnano, Eva Giné, Mariona Pascal, Marina Díaz-Beyá, Maria Castella, Albert Català, Anna Faura, Luis Gerardo Rodríguez-Lobato, Aina Oliver-Caldes, Alexandra Martínez-Roca, Montserrat Rovira, E Azucena González-Navarro, Juan Ramón Ortega, Joan Cid, Miquel Lozano, Enric Garcia-Rey, Sara Fernández, Pedro Castro, Iolanda Jordan, Neus Villamor, Marta Aymerich, Montserrat Torreadell, Àngela Deyà, Carlos Fernández de Larrea, Daniel Benitez-Ribas, Esteve Trias, Sara Varea, Gonzalo Calvo, Jordi Esteve, Álvaro Urbano-Ispizua, Manel Juan, Julio Delgado.

Journal for Immunotherapy of Cancer. 2021 Dec;9(12):e003644. doi: 10.1136/jitc-2021-003644. PMID: 34907029; PMCID: PMC8671976.

SUPPLEMENTARY APPENDIX**Factors associated with the clinical outcome of patients with relapsed/refractory CD19⁺ acute lymphoblastic leukemia treated with ARI-0001 CART19-cell therapy**

Valentín Ortiz-Maldonado et al.

SUPPLEMENTARY TABLES**Supplementary Table 1: Baseline characteristics of patients with relapsed-refractory acute lymphoblastic leukemia who received ARI-0001 cell therapy**

Characteristic	n = 53
Age in years, median (range)	30 (3-68)
Female sex, n (%)	24 (54)
Presence of Philadelphia chromosome, n (%)	6 (11)
Prior lines of therapy, median (range)	4 (2-8)
Prior IO, n (%)	28 (53)
Prior blinatumomab, n (%)	12 (23)
Prior alloHCT, n (%)	42 (79)
Measurable disease at screening, n (%)	42 (79)
Extramedullary disease, n (%)	19 (36)
≥ 5% blasts in the bone marrow, n (%)	22 (42)
CNS disease, n (%)	7 (13)
Follow-up in months from infusion, median (range)	19 (3-40)

Abbreviations: IO, inotuzumab ozogamicin; alloHCT, allogeneic hematopoietic cell transplantation; CNS, central nervous system.

Supplementary Table 2: Subgroup analysis of efficacy of ARI-0001 cells in patients with acute lymphoblastic leukemia

Population	n	Progression-free survival		Overall survival	
		Median (95% CI) 2-year rate (95% CI)	Univariate HR (95% CI), p value*	Median (95% CI) 2-year rate (95% CI)	Univariate HR (95% CI), p value*
Total	53	13.52 mo (7.14-NA) 32.9% (20.6-52.6%)		29.2 mo (15.0-NA) 53.9% (40.5-71.8%)	
Single dose	15	14.4 mo (6.94-NA) 26.7% (11.5-61.7%)		29.2 mo (11.5-NA) 53.3% (33.2-85.6%)	
Fractionated	38	13.5 mo (5.3-NA) 42.0% (27.5-64.2%)	0.88 (0.41-1.86), p = 0.73	NA (14.5-NA) 54.4% (38.4-77.1%)	0.91 (0.36-2.31), p = 0.84
< 25 years	20	17.53 mo (13.52-NA) 31.6% (14.5-68.9%)		29.2 mo (15.8-NA) 57.2% (38.4-85.1%)	
≥ 25 years	33	7.83 mo (5.23-NA) 37.6% (23-61.6%)	1.34 (0.64-2.81), p = 0.59	NA (11.5-NA) 53.4% (36.7-77.8%)	1.25 (0.52-3.01), p = 0.84
< 5% blasts in BM	31	NA (7.14-NA) 52.5% (36.4-75.7%)		NA (29.2-NA) 72% (56.2-92.2%)	
≥ 5% blasts in BM	22	9.38 mo (3.45-NA) 10.7% (2.1-54.4%)	2.14 (1.04-4.42), p = 0.077	15.4 mo (10.4-NA) 33.4% (17.6-63.5%)	2.55 (1.06-6.17), p = 0.134
Loss of BCA	53		4.41 (1.59-12.21), p = 0.0172		1.28 (0.44-3.68), p = 0.84

Abbreviations: BM, bone marrow; IO, inotuzumab ozogamicin; alloHCT, allogeneic hematopoietic cell transplantation; BCA, B-cell aplasia; CI, confidence interval; mo, months; NA, not available/not reached; HR, hazard ratio.

*Adjusted according to Benjamini-Hochberg method

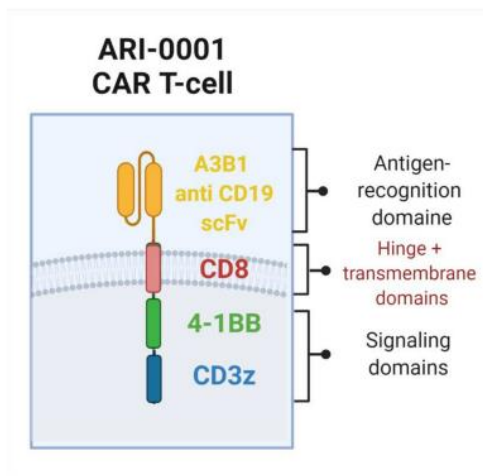
Supplementary Table 3: Landmark analyses evaluating the impact of loss of B-cell aplasia at different time points

Population	n	Progression-free survival	
		Median (95% CI) 2-year rate (95% CI)	Univariate HR (95% CI), p value
Loss of BCA < 3 mo	15	11.4 (1.14-NE) 22.5% (8.4-60.3%)	1.83 (0.82-4.11), p = 0.15
Loss of BCA ≥ 3 mo	30	15.5 mo (6.38-NE) 49.3% (32.5-74.8%)	
Loss of BCA < 6 mo	17	17.1 (8.38-NE) 43.5% (23.0-82.2%)	1.39 (0.45-4.28), p = 0.56
Loss of BCA ≥ 6 mo	15	NE (7.52-NE) 55.3% (31.2-98.0%)	

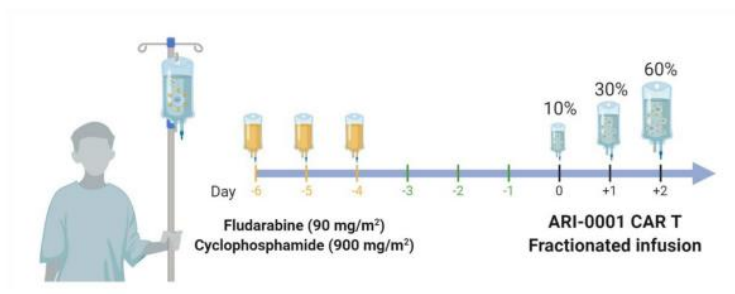
Abbreviations: BCA, B-cell aplasia; CI, confidence interval; NE, not estimable; HR, hazard ratio.

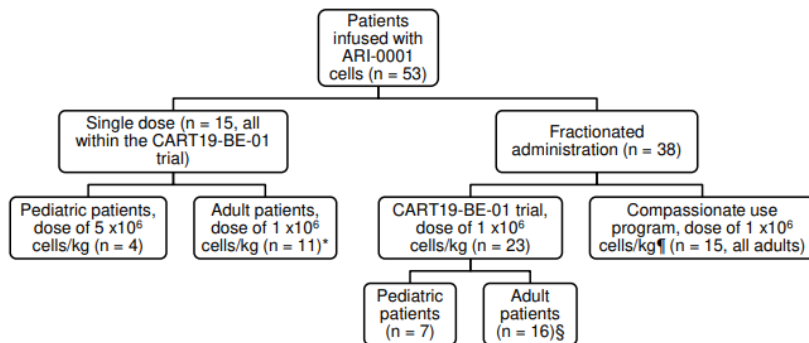
SUPPLEMENTARY FIGURES

Supplementary Figure 1: Diagram of ARI-0001 chimeric antigen receptor construct



Supplementary Figure 2: Diagram of the lymphodepleting chemotherapy and ARI-0001 cells infusion used in the CART19-BE-01 clinical trial and subsequent compassionate use program



Supplementary Figure 3: Patients' disposition

*The first patient ever treated with ARI-0001 cells only received 0.5×10^6 cells/kg as mandated by the Spanish Medicines Agency.

§One adult patient recruited into the CART19-BE-01 trial received 0.4×10^6 cells/kg because of cytokine release syndrome after the second fraction.

¶Two adult patients recruited into the compassionate use program received 0.1×10^6 cells/kg because of cytokine release syndrome after the first fraction.

