



Article scientifique

Article

2021

Published version

Open Access

This is the published version of the publication, made available in accordance with the publisher's policy.

Suivi immunologique des patients traités par cellules CAR-T pour
hémopathie maligne: recommandations du groupe CARTi et de la Société
francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC)

Rubio, Marie Thérèse; Varlet, Pauline; Allain, Vincent; Ballot, Caroline; Cuffel, Alexis; Deschamps, Marina; Ferrand, Christophe; Foguene, Jacques; Forcade, Edouard; Huynh, Anne; Guihot, Amélie; Latouche, Jean-Baptiste; Lemarie, Claude; Martinroche, Guillaume [and 7 more]

How to cite

RUBIO, Marie Thérèse et al. Suivi immunologique des patients traités par cellules CAR-T pour hémopathie maligne: recommandations du groupe CARTi et de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). In: Bulletin du cancer, 2021, vol. 108, n° 12S, p. S53–S64. doi: 10.1016/j.bulcan.2021.04.008

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:163885>

Publication DOI: [10.1016/j.bulcan.2021.04.008](https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2021.04.008)



Suivi immunologique des patients traités par cellules CAR-T pour hémopathie maligne: recommandations du groupe CARTi et de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC)

Marie Thérèse Rubio¹, Pauline Varlet², Vincent Allain³, Caroline Ballot⁴, Alexis Cuffel³, Marina Deschamps⁵, Christophe Ferrand⁵, Jacques Foguene⁶, Edouard Forcade⁷, Anne Huynh⁸, Amélie Guihot⁹, Jean-Baptiste Latouche¹⁰, Claude Lemarie¹¹, Guillaume Martinroche¹², Florence Morin³, Stéphanie Nguyen¹³, Kathleen Schmit⁶, Sophie Servais¹⁴, Federico Simonetta¹⁵, Ibrahim Yakoub-Agha¹⁶, Sophie Caillat Zucman³

Reçu le 25 janvier 2021

Accepté le 9 avril 2021

Disponible sur internet le :
9 juillet 2021

1. CHRU Nancy, Hopital Brabois, Biopole de l'Université de Lorraine, CNRS UMR 7563 IMoPa, Service d'hématologie, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France
2. Université de Lille, CHU de Lille, Laboratoire d'Immunologie, LIRIC, INSERM U995, 59000 Lille, France
3. Université de Paris, Hôpital Saint-Louis, AP-HP Nord, Laboratoire d'Immunologie, France
4. Établissement Français du Sang Hauts-de-France, Unité de Thérapie Cellulaire EFS site de Lille, Normandie, France
5. Ets Bourgogne Franche-Comté, INSERM UMR1098, 25020 Besançon, France
6. CHU de Liège, domaine universitaire du Sart-Tilman B35, Laboratoire d'Hématologie Biologique, Unilab Lg, 4000 Liège, Belgique
7. CHU Bordeaux, service d'hématologie clinique et thérapie cellulaire, 33000 Bordeaux, France
8. IUCT Oncopole, service d'hématologie, Toulouse, France
9. Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP, département d'immunologie, 75013, Paris, France
10. CHU de Rouen, UMR Université/Inserm U1234, Laboratoire d'Immunologie et Biothérapies, France
11. Institut Paoli-Calmettes, and Inserm CBT 1409, Centre d'Investigations Cliniques en Biothérapie, Marseille, France
12. Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique, place Amélie Raba Léon, 33076 Bordeaux, France
13. Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP, service d'hématologie 75013, Paris, France
14. Université de Liège, CHU de Liège, service d'hématologie, 4000 Liège, Belgique
15. University of Geneva, Division of Hematology, Department of Oncology, Geneva University Hospitals and Faculty of Medicine and Translational Research Center for Oncohematology, Department of Internal Medicine Specialties, Geneva, Suisse
16. CHU de Lille, Univ Lille, INSERM U1286, Infinite, 59000 Lille, France

Correspondance :

Marie Thérèse Rubio, CHRU Nancy, Hopital Brabois, Biopole de l'Université de Lorraine, CNRS UMR 7563 IMoPa, Service d'hématologie, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France.
m.rubio@chru-nancy.fr

Mots clés

Cellules CAR-T
Suivi immunologique
Recommandations
Biomarqueurs
Prédiction

Keywords

CAR-T cells
Immune monitoring
Recommendations
Biomarker
Prediction

Résumé

Les cellules CAR-T représentent une nouvelle approche d'immunothérapie antitumorale dont l'efficacité dans les hémopathies malignes B a récemment conduit à leur autorisation de mise sur le marché. Les résultats des essais cliniques réalisés dans ce contexte ont montré que certaines caractéristiques immunologiques des patients avant (au moment de l'aphérèse) et après administration du traitement, ou des cellules CAR-T elles-mêmes, sont corrélées à la réponse au traitement ou à sa toxicité. Il n'existe cependant pas à ce jour de recommandations sur le suivi immunologique des patients traités en vie réelle. Les objectifs de cet atelier étaient de déterminer, sur la base des données de la littérature et de l'expérience des centres, les examens immunologiques à réaliser dans le cadre de la prise en charge d'un patient traité par cellules CAR-T. Ces recommandations portent sur la caractérisation des cellules immunes du patient au moment de l'aphérèse, la caractérisation des cellules CAR-T injectées, ainsi que le suivi des cellules CAR-T et des autres paramètres de reconstitution immunitaire chez le patient après administration du traitement. Une harmonisation des pratiques permettra de réaliser des études de corrélations clinico-biologiques chez les patients traités en vie réelle dans le but de déterminer des facteurs prédictifs de la réponse et de la toxicité. Ces données pourraient avoir un impact médico-économique majeur en permettant d'identifier les patients qui vont bénéficier de manière optimale de ces traitements coûteux.

Summary

Immunomonitoring of patients treated with CAR-T cells for hematological malignancy: Guidelines from the CARTi group and the Francophone Society of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy (SFGM-TC)

CAR-T cells represent a new anti-tumor immunotherapy which has shown its clinical efficacy in B-cell malignancies. The results of clinical trials carried out in this context have shown that certain immunological characteristics of patients before (at the time of apheresis) and after the administration of the treatment, or of the CAR-T cells themselves, are correlated with the response to the treatment or to its toxicity. However, to date, there are no recommendations on the immunological monitoring of patients treated in real life. The objectives of this workshop were to determine, based on data from the literature and the experience of the centers, the immunological analyses to be carried out in patients treated with CAR-T cells. The recommendations relate to the characterization of the patient's immune cells at the time of apheresis, the characterization of the injected CAR-T cells, as well as the monitoring of the CAR-T cells and other parameters of immune reconstitution in the patient after administration of the treatment. Harmonization of practices will allow clinical-biological correlation studies to be carried out in patients treated in real life with the aim of identifying factors predictive of response and toxicity. Such data could have a major medico-economic impact by making it possible to identify the patients who will optimally benefit from these expensive treatments.

Questions posées

Quels examens immunologiques à réaliser dans le cadre de la prise en charge d'un patient traité par cellules CAR-T académiques ou commerciales ?
Quels examens pour chaque étape de la prise en charge du patient ?
Quelles modalités pratiques des prélèvements et quelles techniques à utiliser pour chaque type de tests ?

État actuel de la question

Les cellules T portant un récepteur antigénique chimérique (CAR-T) ont révolutionné le traitement des hémopathies malignes B, conduisant à l'autorisation de mise sur le marché de deux produits commerciaux fin 2018 (Tisa-cel, KymriahTM et Axicel, YescartaTM) [1]. Les données de la littérature ont montré l'intérêt du suivi immunobiologique chez les patients traités par cellules CAR-T dans le cadre d'essais cliniques. Ainsi, certaines

caractéristiques immunologiques des patients, ou des cellules CAR-T elles-mêmes, ont pu être corrélées à l'efficacité ou la toxicité du traitement.

Cependant il n'existe pas à ce jour de données de suivi immunologique en vie réelle chez les patients traités par les cellules CAR-T commerciales. Compte tenu de l'enjeu clinique et économique de ces nouvelles stratégies thérapeutiques, il semble important d'harmoniser les explorations biologiques afin de pouvoir réaliser des études multicentriques chez des patients moins sélectionnés que dans les essais cliniques.

Dans cet objectif, un groupe de travail national (CARTi: immunomonitoring des patients traités par cellules CAR-T) s'est constitué début 2020, et a permis des échanges de procédures ainsi qu'une réflexion sur l'harmonisation des pratiques, à l'origine de cet atelier de la SFGM-TC.

Nous présentons ici dans un premier temps une synthèse des données de la littérature sur le suivi immunologique des patients traités par cellules CAR-T pour une hémopathie lymphoïde B, puis nous détaillons les différentes stratégies/techniques de monitoring utilisées dans les laboratoires, et proposons enfin des recommandations pour réaliser ce suivi en routine et/ou dans un cadre plus approfondi de recherche translationnelle. À terme, ces informations pourraient permettre de mieux sélectionner les patients pouvant bénéficier de ces traitements et/ou d'adapter leur prise en charge après administration des cellules CAR-T.

Corrélations avec l'évolution clinique

De nombreuses équipes ont cherché à identifier des biomarqueurs prédictifs de la réponse au traitement par cellules CAR-T chez les patients atteints d'hémopathie maligne B inclus dans des essais cliniques [2,3]. Les résultats sont très variables selon la pathologie considérée, les traitements antérieurs, l'intensité de la lymphodéplétion et le type de CAR utilisé (notamment le domaine de costimulation CD28 ou 4-1BB). Du fait d'une sélection rigoureuse des patients inclus dans les essais cliniques, et de la spécificité de chaque essai pour une pathologie et un type de cellules CAR-T, ces résultats sont difficilement transposables à la pratique en vie réelle pour les cellules CAR-T commercialisées aujourd'hui [4]. Néanmoins, des informations importantes peuvent être retenues.

Facteurs prédictifs de la réponse au traitement

La nature de l'hémopathie

La réponse aux cellules CAR-T et les facteurs qui l'influencent sont très différents selon le type d'hémopathie : leucémie aiguë lymphoblastique B (LAL-B), lymphome diffus à grandes cellules (DLBCL), leucémie lymphoïde chronique (LLC), myélome multiple (MM).

LAL-B

Chez les enfants et jeunes adultes atteints de LAL-B réfractaire ou en rechute (R/R) traités par des cellules CAR-T anti-CD19 (Tisagenlecleucel, domaine de costimulation 4-1BB), le taux de rémission complète est élevé (80 à 93 %), mais avec un taux de rechute important aboutissant à une survie sans rechute de 50 à 60 % douze mois après traitement [5]. Les deux facteurs principaux influençant la rechute sont l'absence de persistance des cellules CAR-T et la perte de l'antigène CD19 sur les cellules tumorales (cf paragraphes suivants).

DLBCL

Dans les DLBCL R/R, les trois principales cellules CAR-T anti-CD19 utilisées (Tisagenlecleucel-41BB, Axicabtagenequiloleucel-CD28 et Lisocabtagenemarleucel-41BB) permettent d'obtenir des taux de réponse objective de 50 à 80 % dont 40 à 60 % de rémission complète [6,7]. Le taux de RC obtenu avec le Tisagenlecleucel-41BB dans les lymphomes (40 %) est moins élevé que dans la LAL-B (>80 %) mais le taux de rechute semble plus faible [5,6]. Ainsi, chez les patients répondeurs, quel que soit les cellules CAR-T anti-CD19 utilisées, la probabilité de survie sans progression (PFS) à un an est de 70 à 80 %. Au total, la survie globale attendue à deux ans après traitement est d'environ 50 % et la PFS de 40 % [6-8]. Les principaux facteurs influençant la réponse/résistance aux cellules CAR-T sont la masse tumorale (PET-scan et LDH) et la capacité des cellules CAR-T à migrer dans le microenvironnement tumoral [9-11]. L'analyse immunohistochimique des marqueurs d'épuisement (PD-L1, PD-1, LAG3 et TIM3) sur biopsies tumorales avant traitement suggère que les niveaux d'expression des récepteurs inhibiteurs sur les cellules immunitaires, et de leurs ligands sur les cellules tumorales, sont plus faibles chez les répondeurs que chez les non répondeurs [12].

LLC

Dans la LLC, les données sont limitées mais le taux de résistance primaire est élevé, avec un taux de RC avec le Tisagenlecleucel de 15 à 30 %, soit plus faible pour ces cellules CAR-T en comparaison des LAL-B et des DLBCL [5,6,13].

MM

Dans le myélome, les résultats des traitements par des cellules CAR-T anti-BCMA (mono ou bi-spécifiques) sont encourageants, avec des taux de réponse aux alentours de 70 % mais une survie sans progression limitée à environ neuf mois [14]. Des données complémentaires sont donc nécessaires pour évaluer la durabilité de ce traitement.

Les traitements antérieurs et la qualité des cellules immunes au moment de l'aphérèse

Les chimiothérapies altèrent le phénotype et la fonctionnalité des lymphocytes T qui vont être utilisés pour la production des cellules CAR-T. En particulier, la déplétion en cellules T naïves ou mémoires précoces (CCR7⁺ CD27⁺) consécutive aux

chimiothérapies répétées est associée à un défaut d'expansion *in vitro* des lymphocytes T [15], à une moindre expansion *in vivo* après réinjection des cellules CAR-T ainsi qu'une moins bonne réponse clinique chez les patients ayant une LLC [13] ou un myélome [16]. En outre, la présence de cellules T exprimant des marqueurs d'épuisement (PD-1, LAG3, TIM-3) au moment de l'aphérèse est associée à un moins bon pronostic chez les patients atteints de LAL-B [17]. Dans la LLC, il a été montré qu'un traitement par ibrutinib augmentait les capacités fonctionnelles et prolifératives des lymphocytes T avant aphérèse et des cellules CAR-T générées à partir de ces lymphocytes T [18]. Ces données suggèrent que les aphéreses devraient être réalisées plus précocement au cours du traitement de l'hémopathie, à un moment où les lymphocytes T ne sont pas encore trop altérés.

Le traitement lymphodéplétant

La lymphodéplétion (en général fludarabine + cyclophosphamide) précédant l'infusion des cellules CAR-T est indispensable à leur expansion *in vivo*. Cette lymphodéplétion i) augmente la disponibilité en cytokines homéostatiques telles que l'IL-7 et l'IL-15 et favorise donc l'expansion des cellules CAR-T, ii) diminue transitoirement le nombre de cellules T régulatrices et possiblement celui des cellules myéloïdes suppressives, iii) altère le microenvironnement tumoral et favorise le trafic des cellules T au sein de la tumeur, et iv) inhibe la réponse immune anti-cellules CAR-T [2]. Des taux sériques élevés de MCP-1 et d'IL-7 [19] ou d'IL-15 [20,21] après lymphodéplétion semblent être associés à une meilleure expansion des cellules CAR-T et une meilleure réponse chez les patients atteints de DLBCL.

Amplitude d'expansion et persistance des cellules CAR-T après infusion

L'expansion initiale des cellules CAR-T après injection, qui est requise pour obtenir un rapport cellules effectrices/cellules cibles satisfaisant, semble être un facteur prédictif de réponse initiale au traitement dans les traitements par cellules CAR-T anti-CD19 dans la LAL-B de l'enfant et la LLC [13,22]. L'aire sous la courbe de l'expansion des cellules CAR-T (AUC) a été également rapportée comme corrélée à la réponse dans la LLC [13]. La persistance des cellules CAR-T semble quant à elle être un facteur prédictif de rémissions de longue durée [13,17,23,24]. Cette dernière peut être prédite par durée de l'aplasie des cellules B, autre facteur associé à la durée de la rémission post-infusion des cellules CAR-T, en particulier dans les LAL-B [13,17,23,24].

La structure du CAR : conséquences sur la persistance des cellules CAR-T et sur la rechute

L'ajout d'un domaine de costimulation CD28 ou 4-1BB a permis d'améliorer l'efficacité des cellules CAR-T, tout en ayant des effets distincts sur la susceptibilité des cellules CAR-T

à l'activation et à l'épuisement. *In vitro*, le domaine CD28 conduit à une différenciation des cellules CAR-T vers un phénotype effecteur mais facilite leur épuisement (« exhaustion »), qu'il soit induit par une signalisation indépendante de l'antigène (signal tonique) ou par une exposition persistante à l'antigène. Le domaine 4-1BB au contraire, préserve la capacité répliquative des cellules mémoires précoces et donc leur persistance, et évite l'épuisement des cellules CAR-T [25,26]. Les cellules CAR-T 4-1BB expriment plus de protéines anti-apoptotiques BCL2 et BCL-XL et ont un profil métabolique favorisant la formation des lymphocytes T mémoires [27]. *In vivo*, les cellules CAR-T 4-1BB ont une expansion moins forte ou moins rapide, et persistent plus longtemps, pendant des mois voire des années [5], alors que les cellules CAR-T CD28 ont une expansion plus importante et plus précoce mais persistent moins longtemps, rarement au-delà de quelques mois [22,28]. La persistance des cellules CAR-T semble être un facteur prédictif de la réponse dans toutes les indications, mais à un degré variable [7,13,14,23,29,30]. Elle a un impact majeur chez les enfants et les jeunes adultes traités pour une LAL-B R/R. Il y aurait donc un intérêt à favoriser les cellules CAR-T 4-1BB chez les patients qui ne peuvent bénéficier d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques une fois la rémission obtenue. Les cellules CAR-T CD28, moins persistantes, pourraient avoir un intérêt pour servir de « *bridge* » à la transplantation. Chez les patients atteints de DLBCL, l'effet des cellules CAR-T sur la réponse semble précoce, et l'intérêt de leur persistance est moins évident. Il est cependant possible que la persistance des cellules CAR-T circulants ne soit pas le reflet de ce qui se passe dans les ganglions tumoraux, ce qui pourrait expliquer les différences avec la LAL-B.

La structure du CAR peut également influencer le type de rechute dans les LAL-B. Ainsi, les résistances primaires ou les rechutes avec conservation de l'antigène CD19 sur les cellules leucémiques sont plus précoces et peut-être plus souvent associées aux cellules CAR-T CD28 [22]. À l'inverse, les rechutes tardives avec perte de l'antigène CD19 sur les cellules leucémiques seraient plus souvent observées après traitement par cellules CAR-T 4-1BB du fait d'une pression immune plus prolongée conduisant à la sélection d'un clone CD19 [5]. L'impact de la perte de l'antigène cible dans les DLBCL est moins clair.

Qualité du produit injecté

L'hétérogénéité du produit injecté d'un patient à l'autre contribue à la variabilité de l'efficacité et de toxicité des cellules CAR-T. L'analyse fonctionnelle sur cellule unique montre que les cellules CAR-T polyfonctionnelles (capables de produire plusieurs cytokines) sont associés à une meilleure réponse dans le lymphome [20]. L'analyse transcriptomique et phénotypique des cellules CAR-T chez les patients atteints de LLC montre qu'un profil naïf ou mémoire précoce (CD8⁺CCR7⁺CD27⁺), comprenant notamment les signatures IL-6/STAT3, est associé à une réponse

complète, alors qu'un profil de gènes impliqués dans la différenciation, la glycolyse, l'épuisement et l'apoptose est plus fréquent chez les patients non répondeurs [13]. Une étude récente de séquençage ARN sur cellule unique (scRNAseq) sur des résidus de poche d'axi-cel injectées à des patients DLBCL confirme l'existence de signatures transcriptomiques associées à une réponse complète ($CD8^+CCR7^+CD27^+$) ou inversement à une mauvaise réponse moléculaire (PD-1, LAG3, TIM3, IFN- γ signaling) [31].

En résumé, la nature et la capacité fonctionnelle des lymphocytes du patient au moment de l'aphérese ou au moment de la lymphodéplétion, et des cellules CAR-T au moment de leur injection puis chez le patient, semblent influencer la réponse au traitement dans différents essais cliniques.

Facteurs prédictifs des complications

Le syndrome de relargage de cytokines (CRS)

Le CRS correspond à un syndrome inflammatoire caractérisé par une production élevée de cytokines. Il s'agit d'une toxicité liée à l'activation des cellules CAR-T après reconnaissance de l'antigène cible sur les cellules tumorales, associée à une activation immune généralisée et notamment du système mono-macrophagique, qui peut conduire à un syndrome d'activation macrophagique [32,33]. Un CRS sévère peut être associé à une coagulopathie pouvant aller jusqu'à un tableau de CIVD [33]. De nombreux paramètres biologiques sont augmentés lors du CRS: CRP, ferritine, LDH, marqueurs de coagulopathie (angiotensinogène 2, facteur Willebrand, TP, D-dimères, fibrinogène). De nombreuses cytokines sont produites en grande quantité suite à [33-35]:

- l'activation des lymphocytes T (IL-6, IFN- γ , sIL2-R α , sIL-6R, GM-CSF, IL-2, TNF- α) ;
- l'activation et l'attraction des mono-macrophages (IFN α , IL-1 β , IL-6, IL1R α , IL10, IL-12, IL-13, IL-15, sIL6-R, TNF- α , CXCL10, CCL2, IL-8) ;
- en réponse aux dommages tissulaires (IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF). Cependant la plupart de ces facteurs ne permettent pas de prédire la survenue d'un CRS et ne sont pas discriminants pour faire le diagnostic différentiel entre CRS et sepsis sévère.

Par ailleurs, le monitoring en temps réel de ces cytokines n'est pas réalisable dans la plupart des centres.

Chez les enfants traités pour LAL-B (CAR anti-CD19 avec costimulation 4-1BB), il semble possible de prédire la survenue d'un CRS sévère par une signature cytokinique basée sur le ratio entre les valeurs basales et à J3 post-injection de trois cytokines (IFN- γ , CCL3, IL-13) [36]. Chez l'adulte traité pour LAL-B ou lymphome avec une construction de CAR similaire à l'étude précédente, une fièvre supérieure ou égale à 38,9 °C associée à un taux élevé de CCL2 dans les trois jours suivant l'injection pouvait prédire un CRS sévère [33].

Par ailleurs, une expansion rapide et intense des cellules CAR-T dans les jours suivant l'injection est souvent associée à la

survenue d'un CRS, mais n'a pas non plus de valeur prédictive. Ce sont donc essentiellement des facteurs cliniques (masse tumorale élevée, LAL-B, thrombopénie à l'état basal, lymphodéplétion intense, CAR portant une molécule de costimulation CD28) qui peuvent permettre d'anticiper un CRS sévère [33,34].

Neurotoxicité (« Immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome » ICANS)

L'inflammation systémique et la production de cytokines après injection des cellules CAR-T induit une cascade d'activation des cellules endothéliales et une altération de perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) permettant le passage des cellules CAR-T dans le cerveau. La physiopathologie de l'ICANS est encore mal connue mais semble liée à une atteinte endothéliale avec fréquente coagulopathie pouvant aller jusqu'à une CIVD [21,37-39]. Sa survenue plus fréquente avec les cellules CAR anti-CD19 a été récemment expliquée par l'expression à taux faibles de CD19 à la surface des cellules murales qui soutiennent les vaisseaux du cerveau (péricytes et cellules musculaires lisses) [40].

Le développement d'un ICANS est souvent associé à la survenue préliminaire d'un CRS sévère et aux facteurs qui favorisent ce CRS (masse tumorale élevée, pic d'expansion des cellules CAR-T, CAR avec costimulation CD28) [34,38,39]. Des taux élevés de cytokines inflammatoires dans le sang et dans le liquide céphalorachidien (LCR) à J3 post-injection des cellules CAR-T ont été associés à la survenue d'un ICANS sévère [34,38]. Chez des adultes traités pour LAL-B par CAR-T avec costimulation CD28, un score basé sur des taux sanguins élevés d'IL-15 et IL10 associés à un taux faible d'EGF à J3 peut prédire la neurotoxicité [38]. Dans une autre étude chez des adultes recevant des cellules CAR-T avec costimulation 4-1BB, l'apparition d'une fièvre supérieure ou égale à 38,9 °C associée à un taux sanguin élevé de CCL2 et IL-6 dans les trois jours après injection pouvaient prédire la survenue d'ICANS sévère [39].

Ainsi d'une manière générale, la survenue et la sévérité des toxicités sont corrélées à l'intensité du pic de prolifération et d'activation des cellules CAR-T. Les patients présentant une charge tumorale élevée avant traitement, et les cellules CAR-T avec un domaine de costimulation CD28 sont également à plus haut risque de toxicité. Plusieurs scores biologiques précoces (dans les trois jours suivant l'injection) prédictifs de la survenue de CRS ou d'ICANS ont été décrits. Cependant, ils semblent varier selon le type de CAR et de pathologie traitée, et n'ont pas été validés dans les expériences de vraie-vie.

Complications infectieuses

Un risque d'infection bactérienne, fongique ou virale a été observé chez les patients recevant des cellules CAR-T anti-CD19 avant J30 mais également après J30 [41].

Avant J30, les infections sévères sont essentiellement bactériennes et fongiques et sont liées à l'aplasie post-conditionnement. Les taux d'incidence sont ceux attendus chez des patients

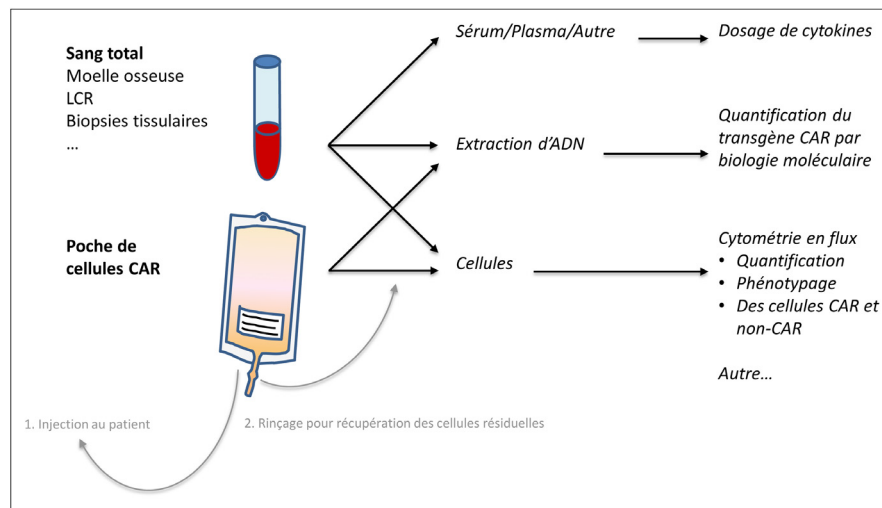


FIGURE 1

Différents matériels de départ et analyses réalisables en routine pour le suivi immunologique des traitements par cellules CAR-T

neutropéniques, soit entre 23 et 42 % [41-43]. Les facteurs de risque de développer une infection sévère précoce sont la survenue d'un CRS, d'une neurotoxicité, l'utilisation de tocilizumab et de corticoïdes [41].

Après J30, 14 à 44 % des patients développent des infections bactériennes ou virales [41-43]. Elles sont vraisemblablement liées à des neutropénies prolongées survenant chez environ 30 % des patients dans les essais cliniques, mais également à la persistance d'une hypogammaglobulinémie (nadir plus de six mois) et une lymphopénie T CD4 (inférieure à 200/mm³ à un an post-cellules CAR-T) [41]. Toutefois, le risque d'infection n'est pas corrélé au taux de lymphocytes T CD4 [41]. Dans une étude, les facteurs de risques associés à un plus haut risque d'infection tardive étaient l'administration d'une forte dose de cellules CAR-T et la survenue d'un CRS ou d'un ICANs sévères [42]. Enfin, si le risque d'infection bactérienne augmente avec le niveau d'hypogammaglobulinémie, les critères de substitution en IgIV ne sont pas clairement établis [44].

Ces données justifient le monitoring des lymphocytes T, B et NK ainsi que le taux de gammaglobulines après administration des cellules CAR-T. Une meilleure connaissance de la cinétique de la reconstitution immunitaire après injection de cellules CAR-T pourrait permettre de déterminer la durée de prophylaxie des infections opportunistes ainsi que le délai nécessaire avant de re-vacciner les patients, qui n'ont pas été définis [44].

Outils d'immunomonitoring

L'immunomonitoring des patients recevant des cellules CAR-T peut se faire sur le sang périphérique après administration des cellules CAR-T mais également dans certains tissus (moelle

osseuse, LCR). Le contenu de la poche médicament peut être analysé après administration et rinçage de la poche. Différentes approches de suivi peuvent être utilisées (cytométrie en flux, PCR et dosages de cytokines) (figure 1).

Cytométrie en flux

L'identification par cytométrie en flux (CMF) des cellules CAR-T repose principalement sur l'utilisation d'anticorps reconnaissant directement le CAR (anticorps anti-idiotype [45] ou anti-linker [46]) ou de protéine recombinante soluble correspondant à la cible du CAR [47]. Certaines constructions CAR intègrent un marqueur (tag) permettant sa détection à la surface cellulaire (EGFR tronqué par exemple [17]).

Du fait de la difficulté d'accès aux anticorps anti-CAR (non commercialisés), la technique de choix repose pour l'instant sur l'utilisation de protéines recombinantes commercialisées par différents fabricants. Pour le suivi des cellules CAR-T anti-CD19, la protéine CD19, le plus souvent de type CD19-Fc, est soit directement couplée à un fluorochrome (marquage en une seule étape), soit biotinylée. Dans ce dernier cas, le marquage est suivi d'une seconde étape (streptavidine ou anticorps anti-biotine couplés à un fluorochrome) (figure 2A). Cette stratégie en deux étapes augmente la sensibilité du signal, et est donc souhaitable pour détecter des faibles quantités de cellules CAR-T. La streptavidine pouvant être captée de manière non spécifique par des cellules apoptotiques, la réalisation d'un marquage sur des prélèvements fragiles (résidu du produit injecté, LCR, MO) nécessite l'utilisation concomitante d'un marqueur de viabilité. Les protéines recombinantes commercialisées (ACROBio-systems et Miltenyi, pour les plus fréquemment utilisées par les

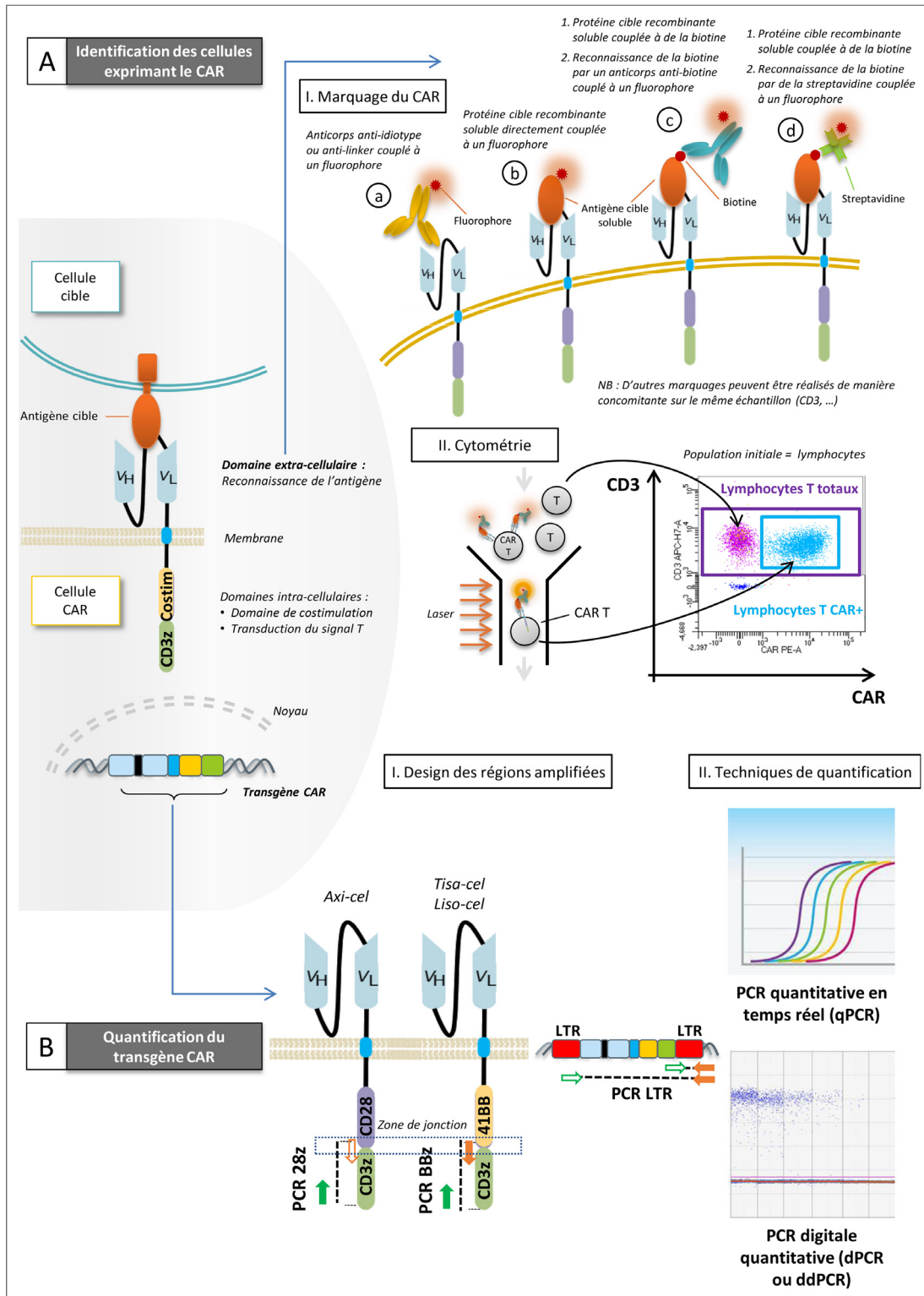


FIGURE 2

Principales méthodes de détection des cellules CAR-T. A. Identification des cellules exprimant le CAR par cytométrie en flux. Le marquage du CAR à la surface cellulaire (I) peut être réalisé grâce à un anticorps spécifique (a), ou grâce à la protéine cible du CAR

participants à l'atelier) diffèrent par leur fragment Fc (normal ou muté), ce qui peut influencer le bruit de fond résiduel via une liaison aux récepteurs Fc sur des cellules non-T (NK, monocytes) et peut nécessiter une saturation préalable par un « Fc block ». Des différences importantes de sensibilité et de spécificité de ces réactifs sont à prendre en compte impérativement dans la comparaison de résultats.

Le suivi des cellules CAR-T par CMF peut être réalisé de manière cinétique à partir de la réinjection, et sur différents types de prélèvements (résidu de la poche injectée, sang total, MO, LCR). La CMF présente de multiples intérêts, notamment :

- une facilité d'implémentation de la technique sur une plateforme hospitalière de routine ;
- la combinaison à une numération T/B/NK permettant la quantification en valeur absolue des cellules CAR-T et des lymphocytes B circulants (la lymphopénie B étant le témoin de la présence de cellules CAR-T fonctionnelles);
- l'identification des cellules exprimant bien le CAR à leur surface, et donc potentiellement fonctionnelles;
- la combinaison à d'autres marqueurs lymphocytaires permettant, outre la quantification des cellules CAR-T, de caractériser leur phénotype et celui des autres cellules immunes (T non-CAR, NK...), ainsi que leur fonctionnalité (cytokines intracellulaires, molécules cytotoxiques);
- v) un rendu en temps réel aux cliniciens, laissant la possibilité d'une éventuelle modification thérapeutique au vu des résultats.

L'analyse cinétique des cellules CAR-T permet de déterminer plusieurs valeurs importantes:

- le temps auquel les cellules CAR-T deviennent détectables après l'injection (Tfirst) ;
- le pic d'expansion (Cmax, taux maximal de cellules CAR-T en pourcentage ou valeur absolue) : le délai pour atteindre ce pic d'expansion (Tmax, en jours après l'injection) ;
- la quantité cumulée de cellules CAR-T présentes en circulation au cours du premier mois de traitement, définie par l'aire sous la courbe entre J0 et J28 (AUC0-28) ; le dernier point auquel les cellules CAR-T sont détectables (Tlast, en jours ou mois). Ces valeurs seront à considérer pour la prédiction de l'efficacité du traitement et du risque de rechute. Elles varient en fonction de la masse tumorale, la pathologie et le domaine de stimulation du CAR.

PCR

Les cellules CAR-T peuvent être également quantifiées par PCR quantitative en temps réel (qPCR) ou PCR digitale [d(d)PCR] [48] à partir de l'ADN extrait des cellules nucléées. Ces techniques mettent à profit la présence de séquences spécifiques dans le transgène CAR (séquence du vecteur, fragment du CAR, gène suicide...). Il est ainsi possible d'amplifier les séquences promotrices « *Long Terminal Repeat* » (LTR) du vecteur (rétrovirus ou lentivirus) utilisé pour la transduction du CAR [49]. Cette méthode peut présenter le risque de croisement avec des séquences LTR résiduelles présentes dans le génome ou de ne pas reconnaître des séquences LTR modifiées pour empêcher l'auto-réplication du virus (*Self-Inactivating Lentivirus Vector*, SIN-LTR). Une autre approche consiste à amplifier un fragment spécifique de la partie scFv du CAR [50], mais devra être adaptée pour chaque nouveau CAR. Alternativement, la PCR peut cibler les séquences de jonction avec les domaines de costimulation (CD28/CD3z dans le cas du Yescarta®, 4.1BB/CD3z dans le cas du Kymriah®) [51]. Par rapport à la qPCR, la d(d)PCR est plus sensible, plus spécifique et surtout plus reproductible dans les valeurs basses. Elle permet une quantification absolue directe sans avoir recours à une gamme de référence (figure 2B).

La détection des cellules CAR-T par PCR est plus sensible que la CMF. Elle sera donc particulièrement indiquée pour quantifier la persistance des cellules CAR-T à long terme lorsqu'elles ne sont plus détectables en CMF. Cependant la PCR ne permet pas de dire que le CAR est exprimé à la surface cellulaire, et peut parfois surestimer le nombre de cellules CAR⁺ (intégration de plusieurs copies du transgène, silencing du transgène). La PCR permet enfin de quantifier le nombre de copies de transgène moyen par cellule [52] ou l'efficacité de transduction dans le processus de production des cellules CAR-T. Toutes les valeurs déterminées en CMF (Cmax, Tmax, AUC0-28, Tlast) peuvent également être déterminées par PCR.

Afin de pouvoir comparer les données moléculaires de quantification des cellules CAR-T, il est important de rapporter les résultats en nombre de copies de transgène par microgramme d'ADN génomique (plutôt que par nombre de cellules). Ces données peuvent être extrapolées en admettant qu'un génome diploïde (une cellule) équivaut à approximativement 7pg d'ADNg [51]. Ainsi, une PCR réalisée à partir de 100ng d'ADN

dans une forme soluble et soit directement couplée à un fluorophore (b), soit biotinylée et révélée par un anticorps anti-biotine (c) ou par de la streptavidine (d) eux-mêmes couplés à un fluorophore. Lors de l'acquisition au cytomètre (II), les lymphocytes T CD3 + sont distingués selon leur expression ou non du CAR, permettant d'établir le pourcentage de lymphocytes T CAR + parmi l'ensemble des lymphocytes T. B. Quantification du transgène CAR par biologie moléculaire. Les régions amplifiées par PCR sont conçues pour correspondre à des séquences ADN spécifiques aux transgènes CAR et varient selon les produits (I). Par simplicité de représentation sur la figure, ces séquences ADN amplifiées sont indiquées en regard des régions protéiques correspondantes du CAR (PCR 28z, PCR BBz). Une autre PCR peut être utilisée (PCR LTR), spécifique des régions LTR (Long Terminal Repeat) présentes sur le vecteur lentiviral. Deux techniques sensibles de quantification (II) sont utilisées: la PCR quantitative en temps réel et la PCR digitale quantitative. Les résultats sont habituellement rapportés en nombre de copies de transgène par microgramme d'ADN génomique




| | Produit d'aphérèse ou sang périphérique  | CART-cells  Sur poche après déperfusion | Patient  Dans le sang périphérique ou autre tissu quand précisé |
|--|--|--|---|
| Analyses Fortement recommandées | | | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Quantification des cellules CAR-T par CMF (% et VA): -à J0, 2 à 3x/sem jusqu'à J21, J28=M1, M2, M3, M6 puis/6 mois (arrêt en cas de disparition du signal) ✓ Quantification des Lymphocytes T (CD3, 4, 8), B et NK: -à chaque point d'analyse des CAR-T ✓ EPP et gammaglobulines : -à M1, M2, M3, M6 puis / 6 mois |
| Analyses Recommandées | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Phénotypage des lymphocytes: -T CD3, CD4, CD8 -B, NK -T naïfs/mémoires ✓ Congélation de sérum | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Phénotypage des CAR-T: -viabilité et % ✓ Phénotypage T : -CD3/4/8 | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Quantification des cellules CAR-T par PCR : -Après disparition du signal en CMF puis M2, M3, M6 puis / 6 mois ✓ Quantification des cellules CAR-T dans la MO et le LCR : -lors de prélèvements dans ces tissus ✓ Congélation de sérum: - Pour dosage de cytokines ou sBCMA à J0 et à chaque point de suivi des CAR-T |
| Analyses Optionnelles | | | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Phénotypage élargi des lymphocytes T: -à J0 et 1 fois par semaine tant que CAR-T > 1% des T CD3 -T naïfs/mémoires, marqueurs d'activation ((CD25, HLA-DR) et d'épuisement (PD1/Tim3/ LAG3) ✓ A chaque point de suivi des CAR-T : -reconstitution des populations immunes non CAR (T, NK, monocytes...) -dosages de cytokines ou congélation de sérum (protocoles recherche) ✓ Quantification des cellules CAR-T et phénotypage étendu dans d'autres prélèvements que le sang (PL, MO, ganglion..) |

FIGURE 3

Recommandations de suivi immunologique chez les patients traités par cellules CAR-T

revient à analyser environ 15 000 équivalents génomes (cellules).

Dosage de cytokines et facteurs solubles

L'exploration du profil de cytokines ou facteurs solubles produits avant ou pendant le traitement par CAR-T peut présenter un intérêt pour la prédiction de l'efficacité du traitement ou de ses effets secondaires. Ces analyses peuvent être réalisées sur sérum ou plasma avec comme prérequis un prélèvement décanté et congelé rapidement [53]. Le dosage des cytokines peut se réaliser par différentes techniques, les plus fréquemment utilisées étant l'ELISA ou la fluorimétrie en flux (Luminex™). Un système automatisé et miniaturisé d'ELISA microfluidique permet aujourd'hui le dosage d'un large panel de cytokines et facteurs solubles avec une très bonne sensibilité (ELLA Simple Plex, Biotechne, USA) [54].

Méthodologie suivie

Cet atelier a été conduit selon la méthodologie des ateliers d'harmonisation des pratiques de la SFGM-TC [55]. Il se base sur une analyse bibliographique avec une actualisation des ateliers précédents [32,37,56], ainsi que sur l'expérience des équipes et sur le travail du groupe national CARTi. Parallèlement, une évaluation des pratiques par questionnaire a été envoyée à l'ensemble des centres de la SFGM-TC.

Les recommandations de ce groupe de travail ont pour objectif d'harmoniser le suivi immunologique des patients traités hors essais thérapeutiques afin de pouvoir réaliser des études de corrélations clinico-biologiques multicentriques.

Pratiques actuelles

Dans la continuité du travail préliminaire du groupe national CARTi, une évaluation des pratiques par questionnaire a été menée dans l'ensemble des centres de la SFGM-TC. Sur dix-neuf réponses, treize centres réalisent un immunomonitoring du traitement par cellules CAR-T en routine.

Ce monitoring implique principalement des laboratoires d'immunologie mais aussi des laboratoires d'hématologie, de virologie ou de recherche. Le nombre de réinjections de cellules CAR-T commerciaux effectué dans ces dix-neuf centres en octobre 2020 était très variable (médiane à 16, avec cependant une forte disparité [0-165]).

La totalité des centres réalise ou prévoit un monitoring des cellules CAR-T par CMF associant:

- l'exploration des lymphocytes T, B, NK au moment de l'aphérèse (100 % des centres) ainsi que l'analyse des sous-populations T (62 % des participants) ;
- l'analyse du produit réinjecté (résidu de la poche) comprenant la viabilité, le pourcentage de cellules CAR-T et leur répartition CD4/CD8 (77 % des centres) ainsi que la distribution des sous-populations T (62 %) ;

- le suivi au cours du traitement sur sang périphérique, comprenant la numération des lymphocytes T/B/NK et la quantification des cellules CAR-T (% et valeur absolue) au sein des lymphocytes T (100 % des centres). D'autres marquages, comme les sous-populations T naïves/mémoires et les marqueurs d'activation ou d'épuisement sont réalisés dans 60 % des centres ;
- le rythme de suivi est très variable selon les centres, avec dans la majorité une exploration prévue au moins deux fois par semaine dans les 14 jours suivant la réinjection. Les résultats sont rendus aux cliniciens sous 24 heures pour la moitié des centres participants.

Un monitoring par PCR est effectué dans 50 % des centres actifs, la moitié optant pour la qPCR et l'autre moitié pour la ddPCR. Le suivi des cytokines est prévu dans 62 % des centres, avec un dosage le plus souvent rétrospectif sur prélèvements congelés. Le rythme de dosage et le panel de cytokines analysées sont très hétérogènes.

Recommandations

Au vu des données de la littérature chez les patients inclus dans des essais cliniques, et de l'expérience de certains centres chez les patients en vie réelle, un certain nombre de recommandations sont proposées par ce groupe de travail. Toutes ne sont pas équivalentes, et ne pourront être réalisées dans tous les laboratoires (essentiellement faute de moyens financiers).

Certaines analyses semblent incontournables en routine dans tout hôpital universitaire ayant l'agrément pour utiliser les cellules CAR-T (= « fortement recommandées »), étant donné que les informations qu'elles fournissent aux cliniciens peuvent les conduire à une modification de la prise en charge thérapeutique.

D'autres seront utiles pour identifier rétrospectivement des marqueurs prédictifs d'efficacité de ces traitements (= « recommandées »), et donc éventuellement mieux cibler les patients qui vont en bénéficier, d'où un intérêt médico-économique à terme.

D'autres enfin ont plus un objectif de recherche translationnelle visant à mieux comprendre les mécanismes d'action de ces traitements (= « optionnelles ») (*figure 3*).

Analyses fortement recommandées

- Suivi en CMF deux à trois fois par semaine pendant la durée d'hospitalisation initiale (ou au mois les trois premières semaines afin de capter le pic d'expansion, l'AUC0-28 et la décroissance), le jour de la sortie puis à M1, M2, M3, M6 puis tous les six mois (visites de suivi), avec:
 - Numération T (CD3/4/8), B, NK,
 - Quantification des cellules CAR-T dans le sang par CMF (pourcentage et valeur absolue),
- EPP et Gammaglobulines à M1, M2, M3, M6 puis tous les six mois ;

Analyses recommandées

Les différentes analyses recommandées dans le suivi des patients recevant des cellules CAR-T ont été classées selon le niveau de recommandation comme suit:

- bilan au moment de l'aphérèse (sang ou produit d'aphérèse):
 - phénotype lymphocytaire (T/B/NK, CD3/CD4/CD8 ; sous-populations T naïves/mémoires),
 - congélation de sérum pour dosage de cytokines/facteurs solubles;
- produit réinjecté (sur lavage de poche après déperfusion) ;
 - viabilité et % de cellules CAR-T,
 - couplé à un phénotypage CD3/4/8;
- suivi après injection:
 - quantification des cellules CAR-T dans le sang par PCR quand le signal CMF disparaît, puis à M2, M3, M6 puis tous les six mois,
 - congélation de sérum pour dosage de cytokines ou facteurs solubles : en l'absence de biomarqueur consensuel des risques de CRS ou ICANS, nous recommandons pour les centres qui peuvent le réaliser de conserver du sérum à J0 puis à chaque point de suivi des cellules CAR-T pour des études ultérieures. Dans le cadre du myélome, il est recommandé doser sBCMA qui semble associé à la réponse.

Analyses complémentaires optionnelles

- Suivi dans le sang périphérique après injection des cellules CAR-T :
 - Phénotypage élargi en CMF à J0 et quand supérieur à un pour cent de cellules CAR + (une fois par semaine):
 - T naïfs/mémoires, marqueurs d'activation (CD25, HLA-DR) et d'épuisement (PD-1/Tim3/LAG3),
 - Suivi de la reconstitution des populations immunes non-CAR (T, NK, monocytes...),
- Dosage de cytokines ou congélation de sérum aux points de suivi définis par les protocoles de recherche spécifiques des centres. Il est recommandé d'inclure les cytokines inflammatoires IL-6, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, CCL2, CCL3, IL-13, IL10 dont les taux ont été associés au CRS et à l'ICANS dans la littérature, ainsi que IL-7 et IL-15 dont les taux sont associés à l'expansion des cellules CAR-T ;
- Quantification des cellules CAR-T et phénotypage étendu dans d'autres prélèvements que le sang (LCR, MO, ganglion...) lorsqu'un prélèvement dans ces tissus est réalisé.

Conclusions et perspectives

Le suivi des paramètres immunologiques chez les patients recevant des cellules CAR-T est important à plusieurs titres :

- il permet de suivre la reconstitution immunitaire cellulaire et humorale fortement altérée chez ces patients dans les mois et potentiellement années qui suivent le traitement avec un risque infectieux persistant au-delà de J30 ;

- la capacité d'expansion des cellules CAR-T injectées (évaluée par l'AUC0-28 et le pic d'expansion maximal Cmax), qui semble associée à la réponse au traitement dans la LAL-B, doit être explorée dans les lymphomes et myélomes ;
- la qualité du produit d'aphérèse et du produit cellulaire administré est corrélée à la réponse ;
- bien que les données restent préliminaires, le monitoring de certaines cytokines inflammatoires précoces pourraient permettre de distinguer les patients à haut risque de CRS et d'ICANS.

Le travail du groupe national CARTi permet de partager et d'harmoniser les différents outils du monitoring qui pourra être réalisé dans les laboratoires de routine. Les recommandations de ce groupe de travail ont pour objectif d'harmoniser le suivi immunologique des patients traités hors essais thérapeutiques afin de pouvoir réaliser des études de corrélations clinico-biologiques multicentriques.

Ces données permettront à terme d'optimiser la prédiction et la prise en charge des complications sévères des traitements par cellules CAR-T et d'identifier des facteurs biologiques permettant de prédire le risque d'échappement ou de rechute. L'identification précoce des patients à haut risque d'échec thérapeutique pourrait permettre de proposer des études évaluant l'intérêt de traitements immunomodulateurs ou autres immunothérapies complémentaires aux cellules CAR-T.

Remerciements : La SFGM-TC remercie les partenaires industriels pour leurs soutiens financiers qui ont permis la réussite de cette onzième édition des ateliers d'harmonisation des pratiques: Accord, Amgen, Astellas, Biotest, Bluebirdbio, Incyte, Jazz pharmaceuticals, Macopharma, Mallinckrodt therakos, MSD FRANCE, Sanofi genzyme.

Déclaration de liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] June CH, Sadelain M. Chimeric Antigen Receptor Therapy. *N Engl J Med* 2018;379(1):64-73.
- [2] Majzner RG, Mackall CL. Clinical lessons learned from the first leg of the CAR T cell journey. *Nat Med* 2019;25(9):1341-55.
- [3] Du M, Hari P, Hu Y, Mei H. Biomarkers in individualized management of chimeric antigen receptor T cell therapy. *Biomark Res* 2020;8:13.
- [4] Hayden PJ, Sirait T, Koster L, Snowden JA, Yakoub-Agha I. An international survey on the management of patients receiving CAR T-cell therapy for haematological malignancies on behalf of the chronic malignancies working party of EBMT. *Curr Res Transl Med* 2019.
- [5] 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. *N Engl J Med* 2018;378(5):439-48.
- [6] 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.
- [7] 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. *Lancet Oncol* 2019;20(1):31-42.
- [8] Danylesko I, Chowhry G, Shouval R, Besser MJ, Jacoby E, Shimoni A, et al. Treatment with anti CD19 chimeric antigen receptor T cells after antibody-based immunotherapy in adults with acute lymphoblastic leukemia. *Curr Res Transl Med* 2019;68(1):17-22.
- [9] Vercellino L, Di Blasi R, Kanoun S, Tessoulin B, Rossi C, D'Aveni-Piney M, et al. Predictive factors of early progression after CAR T-cell therapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Adv* 2020;4(22):5607-15.
- [10] Dean EA, Mhaskar RS, Lu H, Mousa MS, Krivenko GS, Lazaryan A, et al. High metabolic tumor volume is associated with decreased efficacy of axicabtagene ciloleucel in large B-cell lymphoma. *Blood Adv* 2020;4(14):3268-76.
- [11] Cheng J, Zhao L, Zhang Y, Qin Y, Guan Y, Zhang T, et al. Understanding the mechanisms of resistance to CAR T-Cell therapy in malignancies. *Front Oncol* 2019;9:1237.
- [12] Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, Nasta SD, Mato AR, Anak O, et al. Chimeric antigen receptor T-Cells in refractory B-Cell lymphomas. *N Engl J Med* 2017;377(26):2545-54.
- [13] Fraietta JA, Lacey SF, Orlando EJ, Pruteanu-Malinici I, Gohil M, Lundh S, et al. Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med* 2018;24(5):563-71.
- [14] Raje N, Berdeja J, Lin Y, Siegel D, Jagannath S, Madduri D, et al. Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 2019;380(18):1726-37.
- [15] Das RK, Vernau L, Grupp SA, Barrett DM. Naive T-cell deficits at diagnosis and after chemotherapy impair cell therapy potential in pediatric cancers. *Cancer Discov* 2019;9(4):492-9.
- [16] Cohen AD, Garfall AL, Stadtmauer EA, Melnhorst JJ, Lacey SF, Lancaster E, et al. B cell maturation antigen-specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma. *J Clin Invest* 2019;129(6):2210-21.
- [17] Finney OC, Brakke HM, Rawlings-Rhea S, Hicks R, Doolittle D, Lopez M, et al. CD19 CAR T cell product and disease attributes predict leukemia remission durability. *J Clin Invest* 2019;129(5):2123-32.
- [18] 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. *Blood* 2016;127(9):1117-27.
- [19] Hirayama AV, Gauthier J, Hay KA, Voutsinas JM, Wu Q, Gooley T, et al. The response to lymphodepletion impacts PFS in patients with aggressive non-Hodgkin lymphoma treated with CD19 CAR T cells. *Blood* 2019;133(17):1876-87.
- [20] Rossi J, Paczkowski P, Shen YW, Morse K, Flynn B, Kaiser A, et al. Preinfusion polyfunctional anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells are associated with clinical outcomes in NHL. *Blood* 2018;132(8):804-14.
- [21] Kochenderfer JN, Somerville RPT, Lu T, Shi V, Bot A, Rossi J, et al. Lymphoma remissions caused by anti-CD19 chimeric antigen receptor T Cells are associated with high serum interleukin-15 Levels. *J Clin Oncol* 2017;35(16):1803-13.

- [22] Park JH, Riviere I, Gonen M, Wang X, Senechal B, Curran KJ, et al. Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2018;378(5):449–59.
- [23] 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;129(25):3322–31.
- [24] Schultz L. Chimeric antigen receptor T Cell therapy for pediatric B-ALL: narrowing the gap between early and long-term outcomes. *Front Immunol* 2020;11:1985.
- [25] Long AH, Haso WM, Shern JF, Wanhainen KM, Murgai M, Ingaramo M, et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med* 2015;21(6):581–90.
- [26] Calderon H, Mamonkin M, Guedan S. Analysis of CAR-mediated tonic signaling. *Methods Mol Biol* 2020;2086:223–36.
- [27] Kawalekar OU, O'Connor RS, Fraietta JA, Guo L, McGettigan SE, Posey AD Jr, et al. Distinct signaling of coreceptors regulates specific metabolism pathways and impacts memory development in CAR T cells. *Immunity* 2016;44(2):380–90.
- [28] Salter AI, Ivey RG, Kennedy JJ, Voillet V, Rajan A, Alderman EJ, et al. Phosphoproteomic analysis of chimeric antigen receptor signaling reveals kinetic and quantitative differences that affect cell function. *Sci Signal* 2018;11(544).
- [29] 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.
- [30] Mueller KT, Maude SL, Porter DL, Frey N, Wood P, Han X, et al. Cellular kinetics of CTL019 in relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2017;130(21):2317–25.
- [31] Deng Q, Han G, Puebla-Osorio N, Ma MCJ, Strati P, Chasen B, et al. Characteristics of anti-CD19 CAR T cell infusion products associated with efficacy and toxicity in patients with large B cell lymphomas. *Nat Med* 2020;26(12):1878–87.
- [32] Yakoub-Agha I, Moreau AS, Ahmad I, Borel C, Hadhoum N, Masouridi-Levrat S, et al. Management of cytokine release syndrome in adult and pediatric patients undergoing CAR-T cell therapy for hematological malignancies: Recommendation of the French Society of Bone Marrow and cellular Therapy (SFGM-TC). *Bull Cancer* 2019;106(15):S102–9.
- [33] Hay KA, Hanafi LA, Li D, Gust J, Liles WC, Wurfel MM, et al. Kinetics and biomarkers of severe cytokine release syndrome after CD19 chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy. *Blood* 2017;130(21):2295–306.
- [34] Brudno JN, Kochenderfer JN. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood Rev* 2019;34:45–55.
- [35] Wang Z, Han W. Biomarkers of cytokine release syndrome and neurotoxicity related to CAR-T cell therapy. *Biomark Res* 2018;6:4.
- [36] Teachey DT, Lacey SF, Shaw PA, Melenhorst JJ, Maude SL, Frey N, et al. Identification of predictive biomarkers for cytokine release syndrome after chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Discov* 2016;6(6):664–79.
- [37] Cornillon J, Hadhoum N, Roth-Guepin G, Quessar A, Platon L, Ouachee-Chardin M, et al. Management of CAR-T cell-related encephalopathy syndrome in adult and pediatric patients: Recommendations of the French Society of Bone Marrow transplantation and cellular Therapy (SFGM-TC). *Bull Cancer* 2019.
- [38] Santomasso BD, Park JH, Salloum D, Riviere I, Flynn J, Mead E, et al. Clinical and biological correlates of neurotoxicity associated with CAR T-cell therapy in patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Discov* 2018;8(8):958–71.
- [39] Gust J, Hay KA, Hanafi LA, Li D, Myerson D, Gonzalez-Cuyar LF, et al. Endothelial activation and blood-brain barrier disruption in neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CD19 CAR-T cells. *Cancer Discov* 2017;7(12):1404–19.
- [40] Parker KR, Migliorini D, Perkey E, Yost KE, Bhaduri A, Bagga P, et al. Single-cell analyses identify brain mural cells expressing CD19 as potential off-tumor targets for CAR-T immunotherapies. *Cell* 2020;183(1):126–142 e117.
- [41] Logue JM, Zucchetti E, Bachmeier CA, Krivenko GS, Larson V, Ninh D, et al. Immune reconstitution and associated infections following axicabtagene ciloleucel in relapsed or refractory large B-cell lymphoma. *Haematologica* 2020.
- [42] 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* 2018;131(1):121–30.
- [43] Park JH, Romero FA, Taur Y, Sadelain M, Brentjens RJ, Hohl TM, et al. Cytokine release syndrome grade as a predictive marker for infections in patients with relapsed or refractory B-Cell acute lymphoblastic leukemia treated with chimeric antigen receptor T Cells. *Clin Infect Dis* 2018;67(4):533–40.
- [44] Hill JA, Seo SK. How I prevent infections in patients receiving CD19-targeted chimeric antigen receptor T cells for B-cell malignancies. *Blood* 2020;136(8):925–35.
- [45] Jena B, Maiti S, Huls H, Singh H, Lee DA, Champlin RE, et al. Chimeric antigen receptor (CAR)-specific monoclonal antibody to detect CD19-specific T cells in clinical trials. *PLoS One* 2013;8(3):e57838.
- [46] Chen PH, Lipschitz M, Weirather JL, Jacobson C, Armand P, Wright K, et al. Activation of CAR and non-CAR T cells within the tumor microenvironment following CAR T cell therapy. *JCI Insight* 2020;5(12).
- [47] Hu Y, Huang J. The chimeric antigen receptor detection toolkit. *Front Immunol* 2020;11:1770.
- [48] Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(16):9236–41.
- [49] Mika T, Maghnouj A, Klein-Scory S, Ladigan-Badura S, Baraniskin A, Thomson J, et al. Digital-droplet PCR for quantification of CD19-directed CAR T-Cells. *Front Mol Biosci* 2020;7:84.
- [50] Wang H, Du X, Chen WH, Lou J, Xiao HL, Pan YM, et al. Establishment of a quantitative polymerase chain reaction assay for monitoring chimeric antigen receptor T Cells in peripheral blood. *Transplant Proc* 2018;50(1):104–9.
- [51] Fehse B, Badbaran A, Berger C, Sonntag T, Riecken K, Geffken M, et al. Digital PCR assays for precise quantification of CD19-CAR-T cells after treatment with axicabtagene ciloleucel. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2020;16:172–8.
- [52] Lin HT, Okumura T, Yatsuda Y, Ito S, Nakauchi H, Otsu M. Application of droplet digital PCR for estimating vector copy number states in stem cell gene therapy. *Hum Gene Ther Methods* 2016;27(5):197–208.
- [53] Flower L, Ahuja RH, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Effects of sample handling on the stability of interleukin 6, tumour necrosis factor-alpha and leptin. *Cytokine* 2000;12(11):1712–6.
- [54] Aldo P, Marusov G, Svancara D, David J, Mor G. Simple plex: a novel multi-analyte, automated microfluidic immunoassay platform for the detection of human and mouse cytokines and chemokines. *Am J Reprod Immunol* 2016;75(6):678–93.
- [55] Tipton R, Yakoub-Agha I. How we harmonize HSCT clinical practices among the SFGM-TC centers. *Bull Cancer* 2016;103(115):S193–7.
- [56] Yakoub-Agha I, Ferrand C, Chalandon Y, Ballot C, Castilla Llorente C, Deschamps M, et al. Prerequisite for hematopoietic cellular therapy programs to set up chimeric antigen receptor T-cell therapy (CAR T-cells): Guidelines from the Francophone Society of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy (SFGM-TC). *Bull Cancer* 2017;104(125):S43–58.