
TEZĂ DE DOCTORAT (Rezumat)

Managementul pacienților critici cu patologie hematologică malignă după imunoterapie și transplant de celule stem hematopoietice

Doctorand **Cătălin-Sorin Constantinescu**

Conducător de doctorat Șef.Lucr.dr. **Ciprian Tomuleasa**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Algoritmul de abordare clinică a pacientului aflat în stare critică după imunoterapie și transplant de celule stem hematopoietice	17
1.1. Scorul MEWS	18
1.2. Evaluarea ABCDE a pacientului cu potențial critic pe secția de hematologie	20
1.3. Screeningul sepsisului și introducerea scorului QuickSOFA (qSOFA)	22
1.4. Procalcitonina, Presepsin și proteina C-reactivă în imunoterapie și transplant	25
2. Sindromul de eliberare a citokinelor (CRS)	26
2.1. Fiziopatologia sindromului de eliberare a citokinelor (CRS)	26
2.2. Manifestările clinice ale CRS	28
2.3. Managementul actual al CRS	30
2.4. Terapii de substituție renală (RRT) cu posibilă aplicabilitate în CRS	32
2.5. Dovada conceptului în vederea aplicării ipotezei	37
3. Imunoterapiile de tipul Chimeric Antigen Receptor - T (CAR-T)	38
3.1. Introducere în terapia cu celule CAR-T	38
3.2. Proiectarea celulelor CAR-T	40
3.3. Perspective de viitor	43
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	47
2. Metodologie generală	47
3. Studiul 1 - Rolul predictiv al MEWS calculat la pacienții hematologici la momentul transferului către unitatea de terapie intensivă	49
3.1. Introducere	49
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	51
3.3. Material și metodă	51
3.4. Rezultate	52
3.5. Discuții	56
3.6. Concluzii	58
4. Studiul 2 - Testarea și evaluarea constructului CAR-T anti-CD41 <i>in vitro</i>	59

4.1. Introducere	59
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	61
4.3. Material și metodă	61
4.4. Rezultate	64
4.5. Discuții	74
4.6. Concluzii	75
5. Studiul 3 - Testarea și evaluarea constructului CAR-T anti-CD41 <i>in vivo</i>	77
5.1. Introducere	77
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	78
5.3. Material și metodă	78
5.4. Rezultate	80
5.5. Discuții	86
5.6. Concluzii	87
6. Studiul 4 – Experiența terapiei intensive la pacienții adulți tratați cu celule CAR-T. O revizuire sistematică și meta-analiză pentru crearea unui standard de îngrijire.	89
6.1. Introducere	89
6.2. Ipoteza de lucru/obiective	90
6.3. Material și metodă	90
6.4. Rezultate	92
6.5. Discuții	99
6.6. Concluzii	102
7. Concluzii generale	105
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	107
REFERINȚE	109
ANEXE	121

INTRODUCERE

În ultimii ani a avut loc o explozie a posibilităților de tratament a pacienților cu patologie hematologică. Odată cu dezvoltarea imunoterapiilor și ca urmare a creșterii experienței clinicianului în domeniul transplantului de celule stem, s-au depășit anumite bariere și s-a lărgit aria de oportunități în materie de îmbunătățire a calității vieții și de supraviețuire a acestor pacienți.

Elementul principal care a stat la baza acestei cercetări a fost încercarea de a găsi punctele comune dintre hematologie și terapie intensivă și alcătuirea unui plan de abordare clinic în vederea construirii unui standard de îngrijire complet și complex.

Pentru început, am considerat că utilizarea, pe secția de hematologie, a unui scor, respectiv Modified Early Warning Score (MEWS), ar fi optimă în orientarea clinică și ar ajuta la identificarea precoce a pacienților care se degradează treptat pe secție. Pe măsură ce am cercetat mai departe sfera hematologiei, am descoperit lipsa unei baze de date care să conțină toate imunoterapiile utilizate actualmente în hematologie și posibilele complicații ale acestora și astfel am alcătuit o bază de date cu toate imunoterapiile folosite și complicațiile frecvente ale acestora, care a fost publicată cu scopul de a fi consultată rapid de către medicii care nu sunt familiarizați cu aceste terapii.

O complicație frecventă a imunoterapiilor, în special a limfocitelor modificate genetic - Chimeric antigen receptor - T - Cells (CAR-T), este reprezentată de sindromul de eliberare a citokinelor - Cytokine release syndrome (CRS). Pe baza fiziopatologiei descrise în literatură a CRS, asemănătoare cu cea a sepsisului, am propus ca ipoteză de tratament utilizarea terapiei de epurare extrarenală ca terapie alternativă sau bridge-therapy, ipoteză care a fost publicată.

Pentru a obține o perspectivă mai complexă asupra imunoterapiilor, s-a obținut un construct nou CAR-T de tip CAR-T anti-CD41, care ar putea fi folosit în tratamentul leucemiilor acute megakarioblastice și care a constituit baza experimentelor descrise în această lucrare.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiu 1. Rolul predictiv al MEWS calculat la pacienții hematologici la momentul transferului către unitatea de terapie intensivă

Introducere

La ora actuală există multiple instrumente de “urmărire și declanșare” care pot fi folosite pentru evaluarea rapidă a pacienților pe secție, precum National Early Warning Score (NEWS), Quick-Sepsis-related Organ Failure Assessment (qSOFA) și Modified Early Warning Score (MEWS).

MEWS (**Tabel I**) a fost creat și ulterior adoptat pe scară largă în practica clinică ca un instrument utilizat pentru a identifica precoce pacienții cu risc de deteriorare clinică și care astfel ar necesita monitorizare suplimentară.

Tabel I. Modified Early Warning Score (MEWS) utilizat în studiul nostru.

Parametri vitali	3	2	1	0	1	2	3
Frecvență respiratorie (respirații/minut)	≤8		9-11	12-20		21-24	≥25
SpO ₂ (%)	≤91	92-93	94-95	≥96			
Temperatură (°C)		>38.9	38-38.9	36-37.9	35-35.9	34-34.9	<34
Tensiune arterială sistolică (mmHg)	≤90	91-100	101-110	111-199		>199-219	≥220
Frecvență cardiacă (bătăi/minut)	≤40		41-50	51-90	91-110	111-129	≥130
Nivel de conștiență AVPU/GCS	Inconștient (U) GCS 3	Răspunde la durere (P) GCS 4-9	Răspunde la voce (V) GCS 10-13	Alert (A) GCS 14-15			
Diureză (măsurată orar ml/h)	0	<20ml/h	<35ml/h		>200		

- GCS – Glasgow Coma Score; Scor AVPU - U – inconștient; P – răspunde la durere; V- răspunde la voce; A – alert

Ipoteza de lucru/Obiective

Scopul principal al acestui studiu a fost de a evalua capacitatea MEWS în a prezice mortalitatea pacienților hematologici la momentul transferului din secția de hematologie către unitatea de terapie intensivă.

Material și metodă

În studiul actual, am inclus 174 de pacienți cu afecțiuni hematologice transferați între 1 ianuarie 2018 și 1 mai 2020 din secția de hematologie către unitatea de terapie intensivă al Institutul Oncologic "Ion Chiricuța" (IOCN) din municipiul Cluj-Napoca, România. Studiul de față a fost longitudinal, retrospectiv și observațional.

Rezultate

În studiul nostru, cel mai bun model a fost reprezentat de un cutoff point de ≥ 6 , cu o AUC de 0,731, ceea ce demonstrează astfel o capacitate predictivă de mortalitate similară în populația de pacienți cu patologie hematologică.

Pacienții cu MEWS mare au avut o rată ridicată de deces, prin urmare un prognostic nefavorabil. Prognosticul dat de o valoare a MEWS crescută poate fi folosit ca obiectiv pentru a sensibiliza personalul medical în vederea creșterii calității actului medical, iar ameliorarea scorului în dinamică poate fi, de asemenea, folosit ca instrument de control al calității intervenției medicale.

În urma datelor obținute, un MEWS calculat de ≥ 3 ar trebui să declanșeze un set de acțiuni de urmărire a pacientului mai complexe, de la consemnarea mai frecventă și în dinamică a funcțiilor vitale de către asistentul medical până la monitorizare cu ajutorul unui monitor la pat. Un MEWS ≥ 4 ar trebui să inițieze un consult de terapie intensivă pentru evaluarea cazului.

Concluzii

Pentru a crește puterea acestor abordări pe bază de scoruri și pentru a stabili punctele limită care ar putea fi sugerate sunt necesare cohorte suplimentare pentru validarea acestora în alte centre de tratare a bolilor hematologice. Un sistem simplu de notare, cum ar fi MEWS, poate constitui o oportunitate de a oferi un prognostic pentru un pacient cu boală hematologică internat în terapie intensivă.

Studiu 2. Testarea și evaluarea constructului CAR-T anti-CD41 *in vitro*

Introducere

Leucemia acută megakarioblastică (de tip M7) (M7-AMKL) este un tip rar de leucemie acută mieloblastică (LAM), reprezentând între 3% și 5% dintre tipurile de leucemii. Antigenul CD41 este specific LAM de tip M7, nemaifiind prezent pe suprafața altor tipuri de LAM.

Pasul următor a fost reprezentat de obținerea celulelor CAR-Jurkat care să țintească antigenul CD41 de pe suprafața celulelor de tip M7-AMKL.

Prin inginerie genetică s-a obținut constructul CAR și s-a introdus în celule (limfocite) prin transfecție cu ajutorul unui vector viral (lentivirus).

Ipoteza de lucru/Obiective

Principalul scop al acestui studiu este obținerea unui model nou de celule CAR-T (CAR anti-CD41) care ar putea fi folosite ca alternativă la produsele aflate în momentul de față pe piață. Obiectivele urmărite sunt reprezentate de demonstrarea eficacității în leucemia acută megacarioblastică/megakariocitară (M7-AMKL) și evaluarea profilului de siguranță al celulelor CAR-T anti-CD41 în stadiul pre-clinic, pe culturi celulare.

Material și metodă

S-a realizat cultivarea celulelor și realizarea biobăncii de celule, evaluarea semnalului de luminescență emis de celulele DAMI Luc2 (celule leucemice), cocultură DAMI Luc2 și CAR-Jurkat GFP+ anti-CD41 timp de 15 zile, evaluarea coculturilor efector-țintă (CAR-Jurkat GFP+ anti-CD41 - DAMI Luc2) la 24h, 48h și 72h prin citometrie de flux și determinarea integrității membranare prin evaluarea lactat dehidrogenazei (LDH) eliberate în mediul de cultură.

Rezultate

Efectul de inhibare al celulelor DAMI-Luc2 de către CAR-T Jurkat anti-CD41 este cel mai vizibil în primele 24 de ore în co-cultura unde raportul dintre celule este de 1:1, urmat de creșterea numărului de celule DAMI-Luc2 la 48h și 72h, dar într-o fază relativă de platou sincron cu celulele CAR-T Jurkat anti-CD41. În coculturile unde raportul este de 1:4 și 1:9 (CAR-T Jurkat anti-CD41/DAMI-Luc2) există în continuare un efect de inhibare al celulelor DAMI-Luc2 de către CAR-T Jurkat anti-CD41 care reiese în evidență la 24 de ore, ulterior păstrându-se un trend inițial ascendent urmat de o fază de platou al creșterii celulelor DAMI-Luc2. Mai mult, în cazul raportului inversat 4:1 și 9:1 (CAR-T Jurkat anti-CD41/DAMI-Luc2), efectul de inhibare evaluat la 24 de ore este aproape inexistent comparativ cu celelalte coculturi, în ciuda numărului crescut de celule CAR-T, iar la 48h și 72h se reia trendul crescător al celulelor DAMI-Luc2, aparent chiar accelerat față de coculturile anterioare. Acest aspect poate fi pus pe seama lipsei țintei celulelor CAR-T - antigenul (număr redus de celule DAMI-Luc2 cu antigenul CD41 comparativ cu CAR-T anti-CD41).

În urma determinării LDH din grupurile de cocultură și de culturi individuale, observăm o eliberare crescută a LDH în mediul de cultură în cazul grupurilor cu raportul CAR:DAMI 1:4 și 1:9, în timp ce în cadrul raportului 1:1, 4:1 și 9:1 nu se observă acest eveniment.

Acest lucru pune în evidență faptul că în aceste două grupuri apare efectul de permeabilizare membranelor indus de interacțiunea dintre efector și țintă.

Concluzii

CAR-T anti-CD 41 reprezintă un nou tip de imunoterapie bazată pe antigene tumorale care țintește antigenul CD41 de pe suprafața celulelor M7-AMKL. Din punctul de vedere al activității *in vitro* asupra celulelor tumorale, în urma interacțiunii efector-țintă, efectul cel mai evident de inhibare a creșterii tumorale este validat în primele 24 de ore, ulterior acesta capacitate fiind pierdută.

Studiu 3. Testarea și evaluarea constructului CAR-T anti-CD41 *in vivo*

Introducere

În cadrul experimentului pe care urmărim să-l realizăm dorim să extragem informații legate de efectele imunoterapiei cu CAR-T Jurkat anti-CD41 într-un organism viu, unde pe lângă celulele administrate există și macrofage care contribuie la amplificarea efectului de citotoxicitate celulară.

Ipoteza de lucru/Obiective

Principalul scop al acestui studiu este validarea noului model de celule CAR-T (CAR-T Jurkat anti-CD41), descris în capitoul precedent, în stadiul pre-clinic *in vivo* pe animale.

Obiectivele urmărite sunt reprezentate de evaluarea efectelor acestui tip de imunoterapie în leucemia acută megacarioblastică/megakariocitară (M7-AMKL), interacțiunea efector-țintă și evaluarea profilului de siguranță al celulelor CAR-T anti-CD41 prin stabilirea unei doze care să prezinte bioactivitate. De asemenea, se va evalua riscul de declanșare a CRS.

Material și metodă

S-a efectuat cultivarea celulelor care s-au folosit în experiment, evaluarea profilului de toxicitate și evaluarea efectului *in vivo* al celulelor CAR-T Jurkat anti-CD41.

Rezultate

Nu s-a observat declanșarea furtunii citokinice și niciunul dintre șoriceii nu a decedat în urma administrării imunoterapiei.

Spre deosebire de lotul de control unde celulele leucemice au evoluat considerabil pe parcursul a 48h, la șoriceii la care s-au administrat 2 milioane de celule CAR-T s-a observat un efect de inhibiție a creșterii celulelor tumorale mai exprimat în primele 24h, ulterior cu pierderea efectului, aspect care corespunde la un raport de aproximativ CAR-T Jurkat anti-CD41:DAMI Luc 2 de 1:1 sau 1:1,5-2 (2 milioane CAR-T:2,5 milioane DAMI Luc2). Acest efect ar putea fi corelat cu

rezultatele descrise din co-culturi, unde un număr mai redus de celule CAR-T față de celulele tumorale are un efect mai puternic, explicat, mai probabil prin abundența de antigene pe care să le țintească. La șoriceii unde s-au administrat 5 milioane de celule CAR-T nu s-a observat un efect de inhibiție la 24h sau 48h, celulele leucemice prezentând creștere constantă. Neașteptat, la șoriceii la care s-au administrat 10 milioane de celule CAR-T, practic de patru ori mai multe celule CAR-T decât celule leucemice, s-a observat o inhibiție ușoară a creșterii celulelor leucemice după 48h. La șoriceii la care s-au readministrat celule CAR-T la 96h și reevaluați prin IVIS la 120h s-a observat că la cei cu 10 milioane de celule CAR-T au prezentat inhibiția cea mai semnificativă a celulelor leucemice. Prin urmare, *in vivo*, având în vedere prezența și a altor celule, precum macrofagele, este de așteptat un efect ușor diferit față de ce se întâmplă în culturile celulare. Așadar, șoriceii la care s-au administrat 10 milioane de CARs au prezentat cea mai puternică inhibiție tumorală, efect ce necesită studii suplimentare experimentale pentru a explica fenomenul.

Concluzii

Testele de toxicitate au atestat siguranța acestei noi imunoterapii *in vivo* și posibilitatea continuării cercetării în direcții multiple.

Rezultatele acestui studiu au pus în evidență existența unei interacțiuni dintre celulele CAR-T și celulele leucemice DAMI-Luc2 *in vivo*.

Studiu 4. Experiența terapiei intensive la pacienții adulți tratați cu celule CAR-T. O revizuire sistematică și meta-analiză pentru crearea unui standard de îngrijire.

Introducere

Am adunat informații din studiile disponibile în literatură și am conceput o meta-analiză, iar cu datele obținute am încercat să oferim perspective și să creăm un punct de plecare pentru crearea unui standard de îngrijire universal.

Ipoteza de lucru/Obiective

Scopul acestui studiu a fost de a evalua experiența din literatură și de a explora starea actuală a dovezilor, din perspectiva terapiei intensive, cu privire la pacienții care au primit celule CAR-T și au fost internați într-o secție de terapie intensivă pentru adulți.

Material și metodă

A fost întreprinsă o căutare sistematică în literatura de specialitate cu privire la baza de date a literaturii medicale care a inclus PubMed/MEDLINE cu studii publicate de la începutul acesteia până în august 2022.

Rezultate

Cele mai importante rezultate sunt:

Internarea în terapie intensivă – 61% CI-95% [56-66] dintre pacienții tratați cu celule CAR-T și care au fost internați în terapie intensivă au fost bărbați.

Mortalitatea în terapie intensivă – în medie, 7% CI-95% [5-10] dintre beneficiarii terapiei CAR-T care au fost internați în terapie intensivă au decedat.

Mortalitatea în spital - 4% CI-95% [3-5] din totalul beneficiarilor de CAR-T au murit în spital.

Motivul internării în terapie intensivă – AKI - în medie, 15% CI-95% [11-19] dintre beneficiarii CAR-T au fost internați în terapie intensivă din cauza AKI.

Motivul internării în terapie intensivă – insuficiență respiratorie acută – în medie, 10% CI-95% [7-14] dintre beneficiarii CAR-T au fost internați în terapie intensivă din cauza insuficienței respiratorii acute.

Prezentare CRS – AKI - în medie, 13% CI-95% [9-18] dintre beneficiarii de CAR-T au fost internați în terapie intensivă cu AKI ca simptom principal al CRS.

Ventilație mecanică în timpul internării în terapie intensivă - în medie, 11% CI-95% [7,5-15] dintre beneficiarii CAR-T au necesitat ventilație mecanică invazivă în timpul internării în terapie intensivă.

Reinternarea la terapie intensivă în 30 de zile - în medie, 18% CI-95% [13,5-23] dintre beneficiarii CAR-T au fost readmiși în terapie intensivă în decurs de 30 de zile.

Durata spitalizării - durata spitalizării a fost în medie de 22,15 zile CI-95% [17-27].

Internarea la terapie intensivă după perfuzia CAR-T - în medie, zilele de la perfuzia CAR-T până la internarea în terapie intensivă au fost de 5,3 zile, CI 95% [3,90; 6,70].

Concluzii

Concluziile studiului nostru pot avea un impact asupra dezvoltării viitoare clinice și de cercetare, care este necesară în acest domeniu pentru a asigura intervenții de înaltă calitate.

Abstract of PhD Thesis

Management of critically ill patients with hematologic malignancies after immunotherapy and hematopoietic stem cell transplantation

PhD Student **Cătălin-Sorin Constantinescu**

PhD Coordinator Șef.Lucr.dr. **Ciprian Tomuleasa**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Clinical approach algorithm for the critically ill patient after immunotherapy and hematopoietic stem cell transplantation	17
1.1. MEWS score	18
1.2. ABCDE evaluation of the potentially critical patient on the hematology ward	20
1.3. Sepsis screening and introduction of the QuickSOFA (qSOFA) score	22
1.4. Procalcitonin, Presepsin and C-reactive protein in immunotherapy and transplantation	25
2. Cytokine Release Syndrome (CRS)	26
2.1. Pathophysiology of cytokine release syndrome (CRS)	26
2.2. Clinical manifestations of CRS	28
2.3. The current management of the CRS	30
2.4. Renal replacement therapies (RRT) with possible applicability in CRS	32
2.5. Proof of concept to apply the hypothesis	37
3. Immunotherapies of the Chimeric Antigen Receptor - T (CAR-T) type	38
3.1. Introduction to CAR-T cell therapy	38
3.2. Design of CAR-T cells	40
3.3. Future perspectives	43
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Work hypothesis	47
2. General methods	47
3. Study 1 - Predictive role of calculated MEWS in hematological patients at the time of transfer to the intensive care unit	49
3.1. Introduction	49
3.2. Work hypothesis	51
3.3. Material and method	51
3.4. Results	52
3.5. Discussions	56
3.6. Conclusions	58
4. Study 2 - In vitro testing and evaluation of the anti-CD41 CAR-T construct	59

4.1. Introduction	59
4.2. Work hypothesis	61
4.3. Material and method	61
4.4. Results	64
4.5. Discussions	74
4.6. Conclusions	75
5. Study 3 - In vivo testing and evaluation of the anti-CD41 CAR-T construct	77
5.1. Introduction	77
5.2. Work hypothesis	78
5.3. Material and method	78
5.4. Results	80
5.5. Discussions	86
5.6. Conclusions	87
6. Study 4 – Intensive care experience in adult patients treated with CAR-T cells. A systematic review and meta-analysis to create a standard of care.	89
6.1. Introduction	89
6.2. Work hypothesis	90
6.3. Material and method	90
6.4. Results	92
6.5. Discussions	99
6.6. Conclusions	102
7. General conclusions	105
8. The originality and innovative contributions of the thesis	107
REFERENCES	109
ANNEXES	121

INTRODUCTION

In recent years there has been an explosion of treatment possibilities for patients with hematological pathology. With the development of immunotherapies and as a result of the increased experience of the clinician in the field of stem cell transplantation, certain barriers have been overcome and the range of opportunities has been widened in terms of improving the quality of life and survival of these patients.

The main element behind this research was to try to find the common points between hematology and intensive care and to put together a clinical approach plan in order to build a complete and complex standard of care.

To begin with, we considered that the use, on the hematology ward, of a score, namely the Modified Early Warning Score (MEWS), would be optimal in clinical guidance and would help in the early identification of patients who gradually deteriorate on the ward. As I researched further into the field of hematology, I discovered the lack of a database containing all the immunotherapies currently used in hematology and their possible complications, and so I compiled a database of all the immunotherapies used and their common complications, which has been published for quick reference by physicians unfamiliar with these therapies.

A frequent complication of immunotherapies, especially of genetically modified lymphocytes - Chimeric antigen receptor - T - Cells (CAR-T), is represented by cytokine release syndrome (CRS). Based on the physiopathology described in the literature of CRS, similar to that of sepsis, we proposed as a treatment hypothesis the use of extrarenal purification therapy as an alternative therapy or bridge-therapy, a hypothesis that has been published.

To gain a more complex perspective on immunotherapies, a novel anti-CD41 CAR-T CAR-T construct was obtained that could be used in the treatment of acute megakaryoblastic leukemias and formed the basis of the experiments described in this paper.

PERSONAL CONTRIBUTION

Study 1. Predictive role of calculated MEWS in hematological patients at the time of transfer to the intensive care unit

Introduction

Currently, there are multiple "track and trigger" tools that can be used for the rapid assessment of patients on the ward, such as the National Early Warning Score (NEWS), the Quick-Sepsis-related Organ Failure Assessment (qSOFA) and the Modified Early Warning Score (MEWS).

The MEWS (Table I) was created and subsequently widely adopted in clinical practice as a tool used to early identify patients at risk of clinical deterioration and who would thus require further monitoring.

Table I. Modified Early Warning Score (MEWS) used in our study.

Vital parameters	3	2	1	0	1	2	3
Respiratory rate (breaths/minute)	≤8		9-11	12-20		21-24	≥25
SpO ₂ (%)	≤91	92-93	94-95	≥96			
Temperature (°C)		>38.9	38-38.9	36-37.9	35-35.9	34-34.9	<34
Systolic blood pressure (mmHg)	≤90	91-100	101-110	111-199		>199-219	≥220
Heart rate (beats/minute)	≤40		41-50	51-90	91-110	111-129	≥130
Level of consciousness AVPU/GCS	Unconscious (U) GCS 3	Respond to pain (P) GCS 4-9	Respond to voice (V) GCS 10-13	Alert (A) GCS 14-15			
Diuresis (measured hourly ml/h)	0	<20ml/h	<35ml/h		>200		

• GCS - Glasgow Coma Score; AVPU score - U - unconscious; P - responds to pain; V - respond to the voice; A - alert

Working hypothesis/Objectives

The primary aim of this study was to assess the ability of the MEWS to predict mortality in hematological patients at the time of transfer from the hematology ward to the intensive care unit.

Material and method

In the current study, we included 174 patients with hematological conditions transferred between January 1, 2018 and May 1, 2020 from the

hematology department to the intensive care unit of the "Ion Chiricuța" Oncological Institute (IOCN) in Cluj-Napoca, Romania. The present study was longitudinal, retrospective and observational.

Results

In our study, the best model was represented by a cutoff point of ≥ 6 , with an AUC of 0.731, which thus demonstrates a similar predictive capacity of mortality in the population of patients with hematological pathology.

Patients with high MEWS had a high death rate, hence a poor prognosis. The prognosis given by an increased MEWS value can be used as an objective to sensitize the medical staff in order to increase the quality of the medical act, and the improvement of the dynamic score can also be used as a tool to control the quality of the medical intervention.

Following the data obtained, a calculated MEWS of ≥ 3 should trigger a set of more complex patient follow-up actions, from more frequent and dynamic recording of vital signs by the nurse to monitoring with a bedside monitor. A MEWS ≥ 4 should initiate an intensive care consult for case evaluation.

Conclusions

To increase the power of these score-based approaches and to establish cut-off points that could be suggested, additional cohorts are needed to validate them in other hematologic centers. A simple scoring system such as the MEWS may provide an opportunity to provide a prognosis for a patient with hematological disease admitted to intensive care.

Study 2. Testing and evaluation of the anti-CD41 CAR-T construct in vitro

Introduction

Acute megakaryoblastic leukemia (M7 type) (M7-AMKL) is a rare type of acute myeloblastic leukemia (AML), accounting for 3% to 5% of leukemia types. The CD41 antigen is specific to LAM type M7, no longer present on the surface of other types of LAM.

The next step was to get CAR-Jurkat cells to target the CD41 antigen on the surface of M7-AMKL cells.

Through genetic engineering, the CAR construct was obtained and introduced into cells (lymphocytes) by transfection using a viral vector (lentivirus).

Working hypothesis/Objectives

The main goal of this study is to obtain a new model of CAR-T cells (CAR anti-CD41) that could be used as an alternative to products currently on the market. The objectives pursued are the demonstration of efficacy in acute megakaryoblastic/megakaryocytic leukemia (M7-AMKL) and evaluating the safety profile of anti-CD41 CAR-T cells in the pre-clinical stage, in cell cultures.

Material and method

Cell cultivation and cell biobanking, evaluation of the luminescence signal emitted by DAMI Luc2 cells (leukemic cells), co-culture of DAMI Luc2 and CAR-Jurkat GFP+ anti-CD41 for 15 days, evaluation of effector-target co-cultures (CAR-Jurkat GFP+ anti-CD41 - DAMI Luc2) at 24h, 48h and 72h by flow cytometry and determination of membrane integrity by evaluating lactate dehydrogenase (LDH) released into the culture medium.

Results

The inhibitory effect of DAMI-Luc2 cells by Jurkat anti-CD41 CAR-T is most visible in the first 24 hours in the co-culture where the ratio of cells is 1:1, followed by the increase in the number of DAMI-Luc2 cells at 48h and 72h, but in a relative plateau phase synchronous with anti-CD41 Jurkat CAR-T cells. In co-cultures where the ratio is 1:4 and 1:9 (CAR-T Jurkat anti-CD41/DAMI-Luc2) there is still an inhibitory effect on DAMI-Luc2 cells by CAR-T Jurkat anti-CD41 which stand out at 24 hours, subsequently maintaining an initial upward trend followed by a plateau phase of DAMI-Luc2 cell growth. Moreover, in the case of the inverted ratio 4:1 and 9:1 (CAR-T Jurkat anti-CD41/DAMI-Luc2), the inhibitory effect evaluated at 24 hours is almost non-existent compared to the other co-cultures, despite the increased number of CAR-T cells, and at 48h and 72h the increasing trend of DAMI-Luc2 cells resumes, apparently even accelerated compared to the previous co-cultures. This may be attributed to the lack of CAR-T cell target - antigen (reduced number of DAMI-Luc2 cells with CD41 antigen compared to anti-CD41 CAR-T). Following the determination of LDH from the co-culture and individual culture groups, we observe an increased release of LDH into the culture medium in the case of the groups with the ratio CAR:DAMI 1:4 and 1:9, while in the ratio 1:1, 4 :1 and 9:1 this event is not observed.

This highlights the fact that in these two groups the membrane permeabilization effect induced by the interaction between the effector and the target occurs.

Conclusions

Anti-CD 41 CAR-T is a new type of tumor antigen-based immunotherapy that targets the CD41 antigen on the surface of M7-AMKL cells. From the point of view of the in vitro activity on tumor cells, following the effector-target interaction, the most obvious tumor growth inhibition effect is validated in the first 24 hours, after which this capacity is lost.

Study 3. In vivo testing and evaluation of the anti-CD41 CAR-T construct

Introduction

In the experiment we aim to carry out, we want to extract information related to the effects of immunotherapy with CAR-T Jurkat anti-CD41 in a living organism, where in addition to the administered cells there are also macrophages that contribute to the amplification of the cellular cytotoxicity effect.

Working hypothesis/Objectives

The main aim of this study is to validate the new CAR-T cell model (CAR-T Jurkat anti-CD41), described in the previous chapter, in the pre-clinical stage in vivo on animals.

The objectives pursued are the evaluation of the effects of this type of immunotherapy in acute megakaryoblastic/megakaryocytic leukemia (M7-AMKL), the effector-target interaction and the evaluation of the safety profile of the anti-CD41 CAR-T cells by establishing a dose that presents bioactivity. The risk of triggering CRS will also be assessed.

Material and method

Cultivation of the cells used in the experiment, evaluation of the toxicity profile, and evaluation of the in vivo effect of Jurkat anti-CD41 CAR-T cells were performed.

Results

No cytokine storm was observed and none of the mice died following administration of the immunotherapy.

In contrast to the control group, where the leukemic cells evolved considerably during 48h, in the mice that were administered 2 million CAR-T cells, a more pronounced tumor cell growth inhibition effect was observed in the first 24h, later with loss of effect, which corresponds to an approximate Jurkat CAR-T anti-

CD41:DAMI Luc 2 ratio of 1:1 or 1:1.5-2 (2 million CAR-T:2.5 million DAMI Luc2). This effect could be correlated with the results described in co-cultures, where a lower number of CAR-T cells compared to tumor cells has a stronger effect, explained most likely by the abundance of antigens to target. In mice where 5 million CAR-T cells were administered, no inhibitory effect was observed at 24h or 48h, with leukemic cells showing constant growth. Unexpectedly, in mice given 10 million CAR-T cells, virtually four times more CAR-T cells than leukemia cells, mild inhibition of leukemia cell growth was observed after 48h. In mice re-administered with CAR-T cells at 96h and reevaluated by IVIS at 120h it was observed that those with 10 million CAR-T cells showed the most significant inhibition of leukemia cells. Therefore, in vivo, given the presence of other cells, such as macrophages, a slightly different effect is expected from what happens in cell cultures. Therefore, the mice to which 10 million CARs were administered showed the strongest tumor inhibition, an effect that requires additional experimental studies to explain the phenomenon.

Conclusions

Toxicity tests attested to the safety of this new immunotherapy in vivo and the possibility of further research in multiple directions. The results of this study highlighted the existence of an interaction between CAR-T cells and DAMI-Luc2 leukemia cells in vivo.

Study 4. Intensive care experience in adult patients treated with CAR-T cells. A systematic review and meta-analysis to create a standard of care.

Introduction

We collected information from studies available in the literature and designed a meta-analysis, and with the obtained data we tried to provide insights and create a starting point for the creation of a universal standard of care.

Working hypothesis/Objectives

The aim of this study was to evaluate the literature experience and explore the current state of evidence, from an intensive care perspective, regarding patients who received CAR-T cells and were admitted to an adult intensive care unit.

Material and method

A systematic literature search was undertaken of the medical literature database that included PubMed/MEDLINE with studies published from its inception to August 2022.

Results

The most important results are:

- Admission to intensive care – 61% CI-95% [56-66] of patients treated with CAR-T cells and admitted to intensive care were men.
- ICU mortality – on average, 7% CI-95% [5-10] of CAR-T recipients who were admitted to ICU died.
- In-hospital mortality - 4% CI-95% [3-5] of all CAR-T recipients died in hospital.
- Reasons for admission to intensive care – AKI - on average, 15% CI-95% [11-19] of CAR-T recipients were admitted to intensive care due to AKI.
- Reasons for admission to intensive care – acute respiratory failure – on average, 10% CI-95% [7-14] of CAR-T recipients were admitted to intensive care due to acute respiratory failure.
- CRS – AKI presentation - on average, 13% CI-95% [9-18] of CAR-T recipients were admitted to intensive care with AKI as the main symptom of CRS.
- Mechanical ventilation during ICU admission - on average, 11% CI-95% [7.5-15] of CAR-T recipients required invasive mechanical ventilation during ICU admission.
- Readmission to intensive care within 30 days - on average, 18% CI-95% [13.5-23] of CAR-T recipients were readmitted to intensive care within 30 days.
- Length of hospital stay - average length of hospital stay was 22.15 days CI-95% [17-27].
- ICU admission after CAR-T infusion - mean days from CAR-T infusion to ICU admission were 5.3 days, 95% CI [3.90; 6.70].

Conclusions

The findings of our study may have an impact on future clinical and research development, which is needed in this field to ensure high-quality interventions.