CAR T-lymfocyty: horká novinka v léčbě nádorů

Štěpán Hrabovský

Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno, pracoviště Bohunice

Protinádorová imunoterapie se stala během posledních desetiletí již standardní součástí onkologického léčebného portfolia. Od prvních pokusů s protinádorovými vakcínami na konci 19. a v 1. polovině 20. století její cesta vedla přes objevení principů alogenní transplantace krvetvorných buněk v 70. letech, zavedení monoklonálních protilátek v letech 90., jejich zdokonalení ve formě imunokonjugátů a bispecifických protilátkových konstruktů až k dnešním checkpoint inhibitorům a T-lymfocytům s chimérickým antigenním receptorem (CAR T-lymfocyty). Ještě v nedávné době se léčba geneticky modifikovanými lymfocyty mohla zdát jako science-fiction, ale tyto „živé léky“ se již podávají pacientům s hematologickými malignitami i u nás v České republice. Někteří vidí v CAR T-lymfocytech přelomovou léčebnou metodu a světlou budoucnost onkologie, jiní snad jen přeceňovanou senzaci, jejíž nákladnost dalece převyšuje efektivitu. Tak či onak se CAR T-lymfocyty v nejbližší době dostanou do relativně rutinního používání v léčbě pacientů s rezistentními lymfoproliferacemi. Náš článek si klade za cíl přiblížit tuto zajímavou léčebnou metodu i čtenářům s odborným zaměřením mimo oblast hematologie a onkologie.

Klíčová slova: adoptivní imunoterapie, axikabtagen ciloleucel, CAR T-lymfocyty, chimérický antigenní receptor, protinádorová léčba, tisagenlecleucel.

CAR T-cells: hot news in cancer therapy

Cancer immunotherapy has become a standard therapeutic option in oncology over the past few decades. From the early anti-tumor vaccine experiments in the late nineteenth and early twentieth centuries, its journey led through the discovery of the allogeneic hematopoietic stem cell transplantation principles in the nineteen-seventies, introduction of monoclonal antibodies in the nineteen-nineties, their enhancing in the form of immunoconjugates and bispecific antibody constructs, up to today's checkpoint inhibitors and chimeric antigen receptor T-cells (CAR T-cells). Not so long ago, a treatment with genetically modified lymphocytes may have seemed quite like science fiction, but nowadays, these “living drugs” are already being administered to patients with hematological malignancies in the Czech Republic. Some may see CAR T-cells as a breakthrough treatment method and bright future of oncology, others perhaps just as an overhyped sensation, in which the cost far exceeds the efficacy. Either way, CAR T-cells will soon become a relatively routine treatment option for patients with resistant lymphoproliferative diseases. Our article aims to introduce this new interesting method to specialists outside the fields of hematology and oncology.

Key words: adoptive immunotherapy, axicabtagene ciloleucel, cancer treatment, CAR T-cells, chimeric antigen receptor, tisagenlecleucel.

Historie protinádorové imunoterapie

Pravděpodobně prvním zaznamenaným pokusem o protinádorovou imunoterapii jsou experimenty Williama B. Coleyho z New Yorku publikované v roce 1891. Pacientům s osteosarkomem aplikoval injekčně kultury pyogenního streptokoka, po čemž pozoroval u některých pacientů dokonce i dlouhodobě trvající kompletní remise (1). Efekt tohoto experimentu si dnes vysvětlujeme up-regulací produkce interleukinu 12 (IL-12) generalizovanou infekcí, zvýšením hladin interferonu γ (IFN γ) a tím

stimulací protinádorové aktivity T-lymfocytů a NK buněk. I přes působivé výsledky byl Coley za tyto pokusy odbornou veřejností kritizován, zčásti jistě proto, že část jeho pacientů zemřela na streptokokovou infekci. Svou metodu sice zdokonalil nahrazením živých bakterií za inaktivované, ale ve stínu začínající radioterapie tyto první krůčky imunoterapie na nějakou dobu upadly v zapomnění.

Myšlenka ovlivnění imunitního systému ve prospěch protinádorového efektu byla znovu oprášena v 50. letech 20. století, kdy manželé

KORESPONDENČNÍ ADRESA AUTORA:

MUDr. Štěpán Hrabovský, hrabovsky.stepan@fnbrno.cz

Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno, pracoviště Bohunice, Jihlavská 20, 625 00 Brno

Cit. zkr: Vnitř Lék 2020; 66(7): 420–424

Článek přijat redakcí: 18. 11. 2019

Článek přijat po recenzích k publikaci: 10. 1. 2020

Grahamovi použili první moderní protinádorovou vakcínu u pacientek s gynekologickými nádory, z nichž 1/5 zaznamenala parciální remisi nebo alespoň zpomalení progresu nemoci (2). V 70. letech minulého století byly v University of Minnesota provedeny první alogenní transplantace krvetvorné tkáně u pacientů s hematologickými malignitami, tedy nahrazení pacientova imunitního systému nereagujícího proti tumoru imunitním systémem zdravého dárce.

Pionýrem specifické adoptivní imunoterapie se však stal až Steven A. Rosenberg z National Cancer Institute v Bethesdě, který v roce 1985 publikoval výsledky prvního použití *in vitro* interleukinem 2 (IL-2) aktivovaných leukocytů v léčbě metastatických nádorů (3). Tuto metodu poté zdokonalil použitím lymfocytů extrahovaných přímo z tumoru (tzv. tumor-infiltrujících lymfocytů – TIL), které již byly v prostředí tumoru přirozeně aktivovány antigeny specifickými pro daný tumor (4, 5).

Současně již v roce 1989 v izraelském Weizmann Institute of Science vznikl první návrh chimického antigenního receptoru (CAR) a 4 roky poté byla kultivována první generace T-lymfocytů s tímto arteficiálním receptorem (6). Původní záměr metody, léčba infekce virem lidské imunodeficiency (human immunodeficiency virus – HIV), se ale brzy ukázal být slepou uličkou (7, 8). Myšlenka využít CAR T-lymfocyty v léčbě nádorů na sebe nenechala dlouho čekat a v roce 2003 byla publikována první preklinická data o účinnosti CAR T-lymfocytů na myším modelu hematologických malignit (9–11). Po řadě studií I. a II. fáze byl pak v roce 2017 americkou Food and Drug Administration (FDA) schválen ke klinickému použití první komerční preparát CAR T-lymfocytů tisagenlecleucel a o několik měsíců později druhý preparát axikabtagen ciloleucel (Obr. 1). Oba prokázaly výrazné zvýšení počtu dosažených kompletních remisí a prodloužení

celkového přežití oproti standardní chemoterapii u pacientů s opakovaně relabujícími agresivními lymfoproliferacemi (12, 13).

V zemích Evropské unie jsou oba léky dostupné od srpna roku 2018. Indikací tisagenlecleucelu je léčba relabované nebo refrakterní akutní B lymfoblastické leukemie (R/R B-ALL) dětí a mladých dospělých do věku 25 let v případě druhého relapsu nebo relapsu po alogenní transplantaci krvetvorných buněk a opakovaně relabujícího nebo refrakterního difuzního velkobuněčného B lymfomu dospělých (R/R DLBCL). Axikabtagen ciloleucel je schválen pro léčbu R/R DLBCL a relabujícího nebo refrakterního primárního mediastinálního velkobuněčného B lymfomu (R/R PMBCL) dospělých. Léčba prvního pacienta CAR T-lymfocyty v České republice proběhla v září roku 2019.

Obr. 1. Tisagenlecleucel (Kymriah™) a axikabtagen ciloleucel (Yescarta®).

Obr. 2. Struktura jednotlivých generací chimických antigenních receptorů

CD3ζ – fragment T buněčného receptoru aktivující T-lymfocyt, IL12 – interleukin 12, IL-2Rβ – β řetězec receptoru interleukinu 2, JAK-STAT3/5 – signální dráha účastnící se aktivace T-lymfocytu

Co jsou CAR T-lymfocyty?

CAR T-lymfocyty jsou in vitro modifikované autologní T-lymfocyty pacienta, do kterých je vpraven gen pro chimérický antigenní receptor se specificitou proti definovanému povrchovému antigenu nádorové buňky. Oba v současnosti schválené preparáty CAR T-lymfocytů jsou cílené proti antigenu CD19. Ten je exprimován na povrchu všech vývojových stadií B-lymfocytů i na převážně většině malignit z B-lymfocytů vycházejících (14). V klinických studiích jsou již zkoušeny CAR T-lymfocyty cílené na nejrůznější další povrchové antigeny hematologických i solidních malignit, např. CD22, CD30, CD138, BCMA, EGFR, CEA, HER2, mezotelin, PD-L1 a řadu dalších (11). Dosavadní výsledky léčby CAR T-lymfocyty jsou velmi motivující. Již několik studií I. a II. fáze prokázalo 70–85 % navozených kompletních remisí u těžce předléčených pacientů s R/R ALL a 40–55 % u pacientů s R/R DLBCL (13, 15–17).

Samotný chimérický antigenní receptor první generace je proteinový konstrukt skládající se ze 4 částí:

- domény rozeznávající antigen odvozené z variabilní části imunoglobulinu,
- spojovacího hinge regionu,
- transmembránové domény,
- intracelulární domény odvozené z T-buněčného receptoru (T-cell receptor – TCR) (Obr. 2).

Cytotoxický CAR T-lymfocyt s takto složeným receptorem je přímo aktivován navázáním na cílový antigen nádorové buňky a dokáže zničit postupně i stovky nádorových buněk. Oproti přirozeným cytotoxickým T-lymfocytům nepotřebuje ke své aktivaci rozpoznání lidského leukocytárního antigenu I. třídy (human leukocyte antigen – HLA) cílové buňky ani spolupráci jiných imunitních buněk (10).

Tisagenlecleucel i axikabtagen ciloleucel jsou léčivé přípravky obsahující CAR T-lymfocyty 2. generace, které mají v intracelulární doméně přidánu kostimulační doménu zlepšující expanzi buněk a jejich přetrvávání v hostitelském organismu.

Výroba CAR T-lymfocytů

Výroba CAR T-lymfocytů je velmi komplikovaná a organizačně i časově náročná. Od indikace pacienta k léčbě do podání infuze trvá celý proces 2–6 týdnů (Obr. 3). Právě časová náročnost může být u pacientů s agresivními lymfoproliferacemi hlavním faktorem limitujícím použitelnost této léčby. Prvním krokem výroby je odběr mononukleárních buněk z periferní krve pacienta pomocí přístrojové leukaferézy. Tyto buňky jsou odeslány do „továrny“ na CAR T-lymfocyty. Tato výrobní zařízení jsou v USA, Německu, Nizozemsku a Francii.

Ve výrobním zařízení jsou z mononukleárních buněk separací odděleny T-lymfocyty, do kterých je vpraven gen pro CAR. Vektorem přenosu genu je nejčastěji modifikovaný lentivirus nebo gamaretrovirus, zkoušeny jsou ale i další postupy jako přenesení genu syntetickým transpozonom (technologie Sleeping Beauty) nebo přímá elektroporace mRNA do T-lymfocytů (18, 19). Takto modifikované T-lymfocyty jsou poté aktivovány a namnoženy za přítomnosti směsi

Obr. 3. Proces výroby CAR T-lymfocytů

Obr. 4. Automatický buněčný procesor Miltenyi CliniMACS Prodigy®, jedna z platforem používaných k výrobě CAR T-lymfocytů

cytokinů a živin. Celý proces probíhá v jedné z automatických platform, tzv. buněčných procesorů (Obr. 4). Hotový produkt je opět zmrazen na teplotu kapalného dusíku a odeslán na klinické pracoviště. Pacientovi je v mezidobí podána lymfodepleční chemoterapie, která prodlužuje následné přežívání CAR T-lymfocytů v hostitelském organismu. Samotné CAR T-lymfocyty jsou poté rozmrazeny a formou intravenózní infuze aplikovány pacientovi.

Nežádoucí účinky a komplikace

Léčba CAR T-lymfocyty s sebou nese riziko některých specifických a potenciálně velmi závažných komplikací. Prvním z nežádoucích účinků je syndrom z uvolnění cytokinů (cytokine release syndrome – CRS). Je způsoben suprafyziologickou odpovědí hostitelského organismu na imunoterapii, která vyúsťuje v aktivaci endogenních i infundovaných imunitních efektorových buněk a produkci prozářlivých cytokinů. Projeví se několik dní po infuzi CAR T-lymfocytů horečkou, v závažnějších případech hypotenzí, respiračním selháním a selháváním dalších orgánů. Těžká forma CRS připomíná v mnoha aspektech septický šok. Základní terapií jsou kortikoidy, tocilizumab a podpůrná léčba selhávajících orgánových funkcí. Tocilizumab je monoklonální protilátka proti receptoru pro interleukin 6 (IL-6R), který hraje ústřední roli v patogenezi CRS.

Další specifickou komplikací je syndrom neurotoxicity asociovaný s imunitními efektorovými buňkami (immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome – ICANS, nebo CAR T-related encephalopathy syndrome – CRES). Projevuje se také většinou v prvních dnech po infuzi CAR T-lymfocytů, příznaky mohou být velmi různorodé, typická je expresivní afazie, apraxie a tremor, může nastat dezorientace, paréza, kvantitativní porucha vědomí nebo epileptický záchvat. Hlavní léčbou jsou opět kortikoidy, případně antiepileptika, při souběhu s CRS se podává tocilizumab.

Mezi další komplikace patří aplazie zdravých B-lymfocytů, které jsou při léčbě anti-CD19 CAR T-lymfocyty zničeny spolu s maligními buňkami. Při chybění B-lymfocytů dochází ke hypogamaglobulinemii a zvýšenému riziku infekčních komplikací s nutností dlouhodobé substituce intravenózními imunoglobuliny (20, 21).

Budoucnost CAR T-lymfocytů

Nyní dostupné CAR T-lymfocyty jsou označovány jako 2. generace. Ve stadiu klinických studií jsou 3. generace CAR T-lymfocytů s kombinací více kostimulačních domén a 4. generace, tzv. TRUCK (T-cell Redirected Universal Cytokine Killing), které jsou schopny pomocí sekrece vlastního transgenního IL-12 zvýšit migraci naivních imunitních buněk do oblasti nádoru s cílem posílení imunitní reakce namířené proti nádorovým buňkám (22, 23). Pátá generace CAR T-lymfocytů má v intracelulární doméně β řetězec receptoru pro interleukin 2 (IL-2) s vazebným místem pro transkripční faktor STAT3. Tyto buňky jsou aktivovány třemi cestami prostřednictvím svého CD3, kostimulační domény i cytokinové signalizace dráhy JAK-STAT3/5 (24).

Jsou zkoušeny CAR T-lymfocyty se specifitou proti nejrozličnějším povrchovým antigenům exprimovaným na hematologických i solidních tumorech. V budoucnu se tedy možná dočkáme účinných CAR T-lymfocytů proti mnohočetnému myelomu, akutní myeloidní leukemii, glioblastomu, mezoteliomu, karcinomu střeva, prostaty, prsu, plic, pankreatu i dalších (11, 25).

Stejně jako při léčbě monoklonálními protilátkami, i u CAR T-lymfocytů může dojít k imunitnímu úniku tumoru a vzniku rezistence k léčbě. Nejčastěji je to způsobeno down-regulací nebo úplnou ztrátou cílového antigenu maligní buňky. Klonální selekcí pak dojde k nahrazení původního citlivého klonu klonem rezistentním. Riziko

vzniku rezistentního klonu lze snížit např. použitím CAR T-lymfocytů se 2 nebo více různými CAR namířenými proti různým antigenům přítomným na maligní buňce, nebo T-lymfocytů s jedním bispecifickým CAR, který se dokáže vázat na 2 různé antigeny, anebo podáním dvou samostatných populací CAR T-lymfocytů cílených na různé antigeny tumoru (10, 25–28). Ve vývoji jsou i CAR NK buňky (natural killer), které kromě aktivace CAR receptorem mohou být v tumoru aktivovány i přirozeně prostřednictvím svého Fc-receptoru mechanismem cytotoxicity závislé na protilátce (antibody-dependent cellular cytotoxicity – ADCC) (10, 29, 30).

Dalším problémem léčby CAR T-lymfocyty bývá toxicita mimo lokalitu tumoru. Zvýšení selektivity CAR T-lymfocytů lze dosáhnout rovněž jejich vybavením dvěma různými CAR, kdy je potřeba k aktivaci T-lymfocytu navázání obou CAR na maligní buňku. Jiným zkoumaným přístupem je zabudování buněčného aktivačního nebo sebevražedného genového „vypínače“ do CAR T-lymfocytu. Expresce tohoto genu a tím i aktivita CAR T-lymfocytů je pak regulována jinou, jinak v organismu neškodnou, exogenně podanou látkou (25, 31).

Zajímavým konceptem jsou univerzální CAR T-lymfocyty využívající silnou vazbu biotinu a avidinu. Pacientovi se tak podá jedna nebo více monoklonálních protilátek značených biotinem namířené proti antigenům daného tumoru a univerzální CAR T-lymfocyty, jejichž CAR obsahuje sekvenci avidinu vázající biotin (biotin-binding immunoreceptor – BBIR). Tato metoda výroby CAR T-lymfocytů je flexibilnější a ekonomicky výhodnější pro plošné využití (32).

Časová náročnost výroby CAR T-lymfocytů může výrazně limitovat možnost jejich použití u pacientů s agresivními malignitami. Možným řešením je vývoj alogenních CAR T-lymfocytů s deficitem svého původního TCR, které tak nezpůsobují reakci štěpu proti hostiteli a mohou být podány bez ohledu na neshodu v HLA systému. Takové CAR T-lymfocyty mohou být rovněž vyrobeny předem z krve zdravých dárců a pro pacienta dostupné v podstatě ihned (33).

CAR technologie by mohla být účinná i v léčbě neonkologických onemocnění, především autoimunitních. Treg lymfocyty (regulatory T-cells) hrají důležitou roli při regulaci imunitní reakce. Pomocí CAR Treg lymfocytů by mohlo být dosaženo účinné cílené imunotolerance v místě autoimunitního zánětu, např. při diabetu I. typu, roztroušené skleróze či nespecifických střevních zánětech (34).

Závěr

CAR T-lymfocyty nyní v hematologii a onkologii jsou, a jistě i v dalších letech až desetiletích budou, velmi skloňovaným pojmem. S registrací nových CAR T-lymfocytárních produktů, rozšířením jejich indikací na další typy malignit a snížením jejich zatím extrémní finanční nákladnosti lze očekávat jejich použití u stále většího množství pacientů. Skutečnou účinnost a uplatnitelnost této léčebné metody v reálných klinických podmínkách však bezesporu odhalí až čas.

Tato publikace vznikla na Masarykově univerzitě v rámci projektu číslo MUNI/A/1395/2019, podpořeného z prostředků účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum, kterou poskytlo MŠMT v roce 2020.

LITERATURA

1. Coley WB. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann Surg* 1891; 14: 199–220.
2. Graham JB, Graham RM. The effect of vaccine on cancer patients. *Surg Gynecol Obstet* 1959; 109: 131–138.
3. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985; 313: 1485–1492.
4. Decker WK, da Silva RF, Sanabria MH, et al. Cancer Immunotherapy: Historical Perspective of a Clinical Revolution and Emerging Preclinical Animal Models. *Front Immunol* 2017; 8: 829.
5. Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med* 1988; 319: 1676–1680.
6. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 10024–10028.
7. Romeo C, Seed B. Cellular immunity to HIV activated by CD4 fused to T cell or Fc receptor polypeptides. *Cell* 1991; 64: 1037–1046.
8. Roberts MR, Qin L, Zhang D, et al. Targeting of human immunodeficiency virus-infected cells by CD8+ T lymphocytes armed with universal T-cell receptors. *Blood* 1994; 84: 2878–2889.
9. Brentjens RJ, Latouche JB, Santos E, et al. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med* 2003; 9: 279–286.
10. Firor AE, Jares A, Ma Y. From humble beginnings to success in the clinic: Chimeric antigen receptor-modified T-cells and implications for immunotherapy. *Exp Biol Med* (Maywood) 2015; 240: 1087–1098.
11. Filley AC, Henriquez M, Dey M. CART Immunotherapy: Development, Success, and Translation to Malignant Gliomas and Other Solid Tumors. *Front Oncol* 2018; 8: 453.
12. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 2018; 378: 439–448.
13. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 2017; 377: 2531–2544.
14. Robillard N, Wuillème S, Moreau P, et al. Immunophenotype of normal and myelomatous plasma-cell subsets. *Front Immunol* 2014; 5: 137.
15. Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T-cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* 2014; 371: 1507–1517.
16. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 2019; 380: 45–56.
17. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 2015; 385: 517–528.
18. Monjezi R, Miskey C, Gogishvili T, et al. Enhanced CAR T-cell engineering using non-viral Sleeping Beauty transposition from minicircle vectors. *Leukemia* 2017; 31: 186–194.
19. Zhao Y, Moon E, Carpenito C, et al. Multiple injections of electroporated autologous T cells expressing a chimeric antigen receptor mediate regression of human disseminated tumor. *Cancer Res* 2010; 70: 9053–9061.
20. Brudno JN, Kochenderfer JN. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood Rev* 2019; 34: 45–55.
21. Lee DW, Santomasso BD, Locke FL, et al. ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2019; 25: 625–638.
22. Zang YW, Gu XD, Xiang JB, et al. Clinical application of adoptive T cell therapy in solid tumors. *Med Sci Monit* 2014; 20: 953–959.
23. Chmielewski M, Hombach AA, Abken H. Of CARs and TRUCKs: chimeric antigen receptor (CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma. *Immunol Rev* 2014; 257: 83–90.
24. Tokarew N, Ogonek J, Endres S, et al. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells. *Br J Cancer* 2019; 120: 26–37.
25. Bagley SJ, O'Rourke DM. Clinical investigation of CAR T cells for solid tumors: lessons learned and future directions. *Pharmacol Ther* 2019; 16: 107419.
26. Majzner R, Mackall CL. Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy. *Cancer Discov* 2018; 8: 1219–1226.
27. Hegde M, Mukherjee M, Grada Z, et al. Tandem CAR T cells targeting HER2 and IL13Ra2 mitigate tumor antigen escape. *J Clin Invest* 2016; 126: 3036–3052.
28. Huang L, Wang N, Li C, et al. Sequential infusion of anti-CD22 and Anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells for adult patients with refractory/relapsed B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2017; 130: 846.

**Další literatura u autora
a na www.casopisvnitrnilekarstvi.cz**