

Imunoterapie pomocí CAR T-lymfocytů

Daniel Lysák

Hematologicko-onkologické oddělení, FN Plzeň

Zásadní význam T-lymfocytů pro kontrolu nádoru byl ověřen jak na zvířecích modelech tak klinickými pozorováními. Adoptivní buněčná terapie dosáhla v poslední době výborné účinnosti, což podporuje zjištění, že imunitní systém může bojovat s nádorovým onemocněním. Použití buněčné imunoterapie bylo dříve omezeno technickými možnostmi izolace a expanze antigen specifických T-lymfocytů schopných selektivně zabít nádorové buňky. Jedna ze současných slibných strategií je založena na *ex vivo* manipulovaných pacientových T-lymfocytech, které jsou upraveny pomocí chimérického antigenního receptoru (CAR). Chimérické antigenní receptory obvykle kombinují vazebné místo pro antigen z monoklonální protilátky s efektorovou funkcí T-lymfocytů. Genetická manipulace dává T-lymfocytům požadovanou specifitu, ale také umožňuje ovlivnit jejich aktivační a proliferační potenciál. Takto upravené CAR T-lymfocyty mohou podstatně redukovat nádorovou masu, která exprimuje na nádorových buňkách cílový antigen. Byly testovány různé designy CAR receptorů, různé výrobní procesy a soubory pacientů. CAR T-lymfocyty představují efektivní terapeutický přístup, a to zejména u hematologických malignit. Podávání CD19 specifických CAR-modifikovaných T-lymfocytů, které se váží na B-lymfocyty, u ne Hodgkinových lymfomů a chronické lymfocytární nebo akutní lymfoblastické leukémie, bylo v nedávných klinických studiích velice efektivní. Budoucí výzkum musí v oblasti designu a přípravy CAR T-lymfocytů identifikovat kritické parametry, které jsou nezbytné pro efektivní využití adoptivního přenosu T-lymfocytů v onkologické léčbě. Personalizovaná buněčná terapie se pak může rozšířit a stát se slibným léčebným postupem pro hematologické malignity i solidní nádory.

Klíčová slova: CAR, chimérický antigenní receptor, T-lymfocyty, CD19, imunoterapie, biologická léčba.

Immunotherapy using CAR T-cells

A central role of T-cells in the control of cancer has been supported by both animal models and clinical observations. Adoptive cell therapy has recently achieved impressive efficacy, supporting the finding that the immune system can fight cancer. The broaden application of cell immunotherapy has been previously constrained by the technical abilities to isolate and expand antigen-specific T-cells potent to selectively kill tumor cells. One of the promising current strategies is based on *ex vivo* engineered patients T-cells, which are redirected by a chimeric antigen receptor (CAR). Chimeric antigen receptors usually combine the antigen binding site of a monoclonal antibody with the effector function of a T-cell. The genetic manipulation gives T-cells desired specificity but also enables to tailor their activation and proliferation potential. Such modified CAR T-cells can substantially reduce the tumor burden as long as the targeted antigen is present on the cancer cells. Various CAR designs, manufacturing processes, and study populations have been tested. CAR T-cells represent a powerful therapeutic approach, especially in hematologic malignancies. Administration of CD19-specific CAR-modified T cells, that target B-cell, in non-Hodgkin lymphomas and chronic lymphocytic or acute lymphoblastic leukemia, has been remarkably effective in recent clinical trials. The future research has to identify the critical parameters of CAR T-cells design and engineering that are necessary for effective utilization of adoptive T-cell transfer in cancer therapy. Finally, the personalized cell therapy may expand as a promising treatment approach to different hematologic malignancies and solid tumors.

Key words: CAR, chimeric antigen receptor, T-lymphocyte, CD19, immunotherapy, biological treatment.

Onkologie 2015; 9(1): 13–18

Úvod

Imunoterapie v poslední dekádě znamenala především využití monoklonálních protilátek (rituximab, herceptin a další) a tímto směrem se z větší části orientoval i klinický výzkum. Na jeho pozadí se ovšem rozvíjely i jiné imunoterapeutické přístupy, mezi které patří také adoptivní imunoterapie. Tento postup je založen na izolaci pacientových T-lymfocytů, jejich *in vitro* modifikaci a kultivaci a následném vrácení zpět do organismu.

Pokroky v genetickém inženýrství a *ex vivo* kulturačních technikách umožnily připravovat produkty buněčné terapie využitelné v protinádorové imunoterapii. Vedle obecných kvalitativních požadavků je efektivita a klinická využitel-

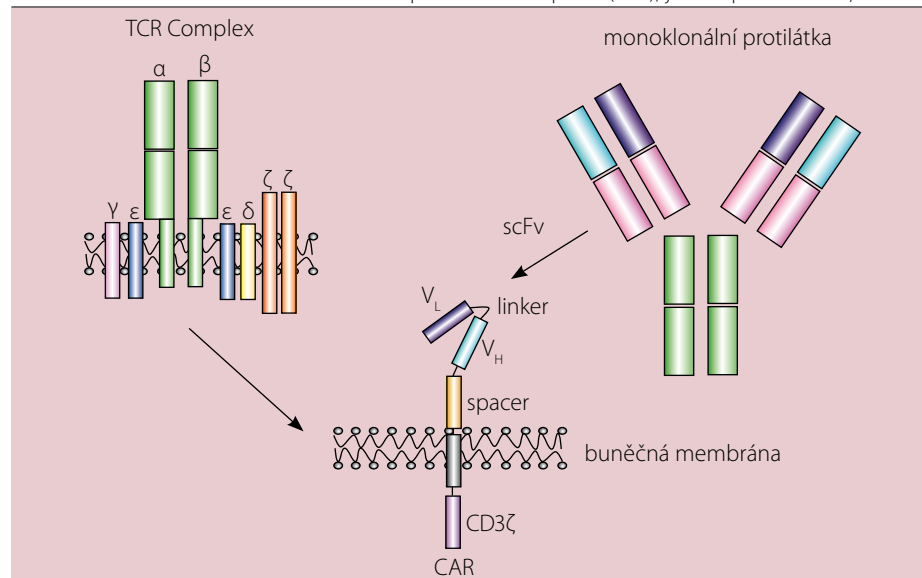
nost imunoterapeutických postupů založených na T-lymfocytech dána řadou dalších kritérií: a) schopnost lyzovat nádorovou buňku nesoucí specifický nádorový antigen, b) dostatečná afinita receptoru T-lymfocytů k antigenu, c) míra exprese antigenu na cílové buňce, d) engraftment, *in vivo* expanze a perzistence T-lymfocytů a e) co nejmenší orgánová toxicita mimo cílovou nádorovou tkáň.

Podané T-lymfocyty je potřeba přimět, aby rozpoznávaly a eliminovaly nádorové buňky. Toho je možné dosáhnout genetickou modifikací, díky které T-lymfocyty exprimují upravený povrchový receptor specificky reagující s nádorovými antigeny, tzv. chimérický antigenní receptor (CAR), namířený například proti znaku CD19. Koncept CAR modifikovaných T-lymfocytů byl vytvořen

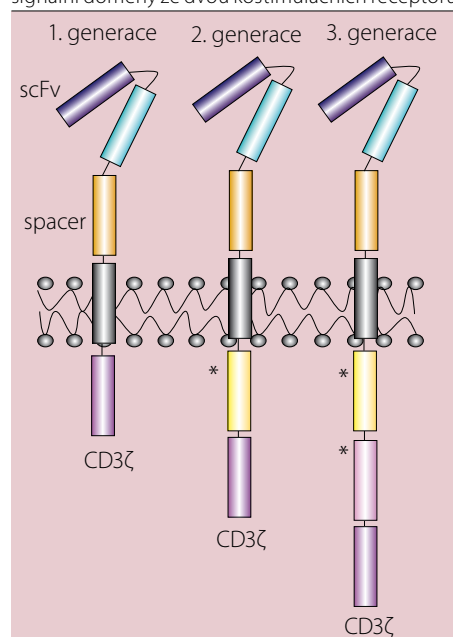
téměř před 20 lety (1). Od té doby technologie pro ovlivnění funkce T-lymfocytů výrazně pokročily a umožnily reálnou klinickou aplikaci.

Protinádorová imunoterapie založená na adoptivním přenosu imunokompetentních buněk zaznamenává novou vlnu zájmu ze strany kliniků. Po mnoho let je standardní léčbou některých závažných hematologických malignit alogenní transplantace kostní dřeně eventuálně kombinovaná s infúzí dárčevských lymfocytů. Tato procedura je ovšem zatížena nezanedbatelnou toxicitou a rizikem těžkých forem reakce štěpu proti hostiteli. Důležitým cílem moderní buněčné imunoterapie je její zacílení proti nádorovým buňkám na straně jedné a minimalizace působení na zdravé tkáně na straně druhé.

Obrázek 1. Základní struktura chimérického antigenního receptoru (CAR); nejčastější struktura CAR kombinuje extracelulární část tvořenou vazebným místem pro antigen z monoklonální protilátky a intracelulární doménu T- buněčného receptorového komplexu (TCR), jako například CD3 ζ řetězec



Obrázek 2. Rozdíly v generacích CAR antigenů; první generace chimérických antigenních receptorů se skládá z scFv fragmentu obsahujícího V_H a V_L variabilní regiony specifické k nádorovému antigenu, který je fúzován s cytoplazmatickou signální doménou z TCR (nejčastěji TCR ζ řetězec). Druhá generace přidává navíc jednu kostimulační signální doménu, zatímco třetí generace obsahuje signální domény ze dvou kostimulačních receptorů



* CD28, 4-1BB (CD137), OX40

Co je to CAR?

CAR (chimérický antigenní receptor) technologie kombinuje specifitu monoklonálních protilátek a cytotoxicitu T-lymfocytů. Základní struktura CAR antigenu se skládá z extracelulární domény, která se specificky váže na cílový antigen, a z intracelulární signální domény, která spouští cytotoxickou odpověď. Extracelulární vazebná doména je získána z V_H a V_L variabilního regionu monoklonální

protilátky specifické k danému antigenu (tzv. scFv, single chain variable fragment). Intracelulární část využívá nejčastěji CD3 ζ aktivační doménu z T-buněčného receptoru (TCR) ve spolupráci s jedním nebo více kostimulačními receptory (jako např. CD28, 4-1BB), viz obrázek 1. První generace CARů typicky obsahovala pouze intracelulární doménu z CD3 ζ řetězce, která je hlavním přenašečem signálu z endogenního TCR. Druhá generace byla obohacena o další signalizační doménu z různých kostimulačních receptorů (např. CD28, 4-1BB), která poskytuje dodatečnou signalizaci T-lymfocytům. Konečně třetí generace CARů kombinuje vícečetné signalizační domény (CD3 ζ /CD28/4-1BB, CD3 ζ /CD28/OX40 atd.), které dále zvyšují efekt CAR T-lymfocytů. Rozlišování „generací“ CARů tedy odkazuje na počet intracelulárních kostimulačních domén, viz obrázek 2. V preklinických a klinických studiích se ukázalo, že dodatečná signalizace druhé a třetí generace CARů zvyšuje protinádorovou aktivitu CAR T-lymfocytů. Kostimulační signály jsou nezbytné k dosažení plně funkční aktivace T-lymfocytů s dostatečnou mírou proliferace, cytotoxické aktivity, produkce cytokinů i k jejich přežití. Kostimulace T-lymfocytů je také prevencí vzniku anergie T-lymfocytů po vazbě na cílový antigen. Nádorové buňky a mikroprostředí totiž neposkytují dostatek kostimulačních signálů (jako CD80, CD86) a podporují vznik anergie T-lymfocytů. Začlenění kostimulačních molekul do struktury CAR molekul tuto nevýhodu překonává. Navíc využití kombinace signálních domén aktivujících různé signální dráhy kostimulační efekt zesiluje. Po navázání takto upraveného chimérického receptoru na antigen (např. CD20 nebo CD19) nacházející se na povrchu nádorových buněk dojde k aktivaci buněčných signálních kaskád T-lymfocytu, které napodobují

přirozenou aktivaci cytotoxického T-lymfocytu, a k následné lýze nádorových buněk.

Struktura CARů je modulární a jednotlivé komponenty lze přizpůsobovat tak, aby byla optimalizována funkce receptoru pro daný typ antigenu resp. nádoru. Například pro antigeny lokalizované těsně u membrány cílové buňky je vhodné přidání flexibilního extracelulárního regionu (spacer/hinge), což umožní lepší vazbu a funkci CARu. Naopak v případě antigenů vystavených daleko od membrány lépe fungují CAR konstrukty bez spaceru. Typická struktura CARu se tak dá rozdělit minimálně na tři části: scFv fragment rozpoznávající antigen, extracelulární spacer, který spojuje scFv s transmembránovou a cytoplazmatickou signální doménou (2). Struktura receptorů se tedy může lišit mezi různými CARy a bude optimalizována s ohledem na typ nádorových antigenů, subpopulaci T-lymfocytů, které budou CAR exprimovat atd. Modulární systém umožňuje začlenit také povrchní markery, které jsou dále využitelné pro selekci a obohacení populace geneticky modifikovaných T-lymfocytů.

Tzv. čtvrtou generací CARů jsou TRUCK (T cells redirected for universal cytokine killing). Zde vektor kódující CAR konstrukt obsahuje také sekvenci pro cytokin (např. IL-12), který je produkován po vazbě CARu na nádorový antigen a kumuluje se v cílové tkáni. Akumulace prozánětlivého cytokinu má za cíl přitáhnout ostatní imunokompetentní buňky (NK buňky, makrofágy atd.), které mohou lokálně útočit i na nádorové elementy nezasažené nebo neviditelné (bez exprese nádorového antigenu) pro CAR T-lymfocyty (3). Regrese tumoru je ve výsledku dána protinádorovým efektem cytotoxických metabolitů jako IFN- γ či TNF- α . Lokální akumulace IL-12 v místě solidní nádorové léze nabízí řadu výhod, jako snížení závažné toxicity obvykle spojené se systémovou aplikací interleukinů, prezentace IL-12 ve tkáni, která je jinak obtížně terapeuticky dosažitelná (metastázy), dlouhodobé uvolňování IL-12 do nádorové tkáně s udržením „terapeutické“ hladiny.

Lze očekávat, že design CAR molekul se bude dále vyvíjet směrem ke kombinacím s kostimulačními ligandy, chimérickými kostimulačními receptory nebo cytokiny. To umožní další zvýšení efektivity CAR T-lymfocytů a rozšíření jejich využití.

Mechanismus účinku CAR T-lymfocytů

CAR T-lymfocyty kombinují vazebné vlastnosti monoklonálních protilátek a cytotoxickou kapacitu a schopnost proliferace T-lymfocytů. Výhodou modifikovaného CAR receptoru

je skutečnost, že rozeznání a vazba antigenu CAR T-lymfocytů nejsou závislé na standardní prezentaci antigenu v kontextu HLA molekuly. Na rozdíl od fyziologické TCR signalizace, která rozeznává komplex HLA-peptid, CAR váže cílovou molekulu bez nutnosti zpracování peptidu nebo rozpoznání HLA exprese. Identifikace antigenu CAR T-lymfocytem tedy není omezená HLA systémem ani nevyžaduje proteozomální štěpení a zpracování cílových epitopů. CAR terapie proto není citlivá na down-regulaci HLA exprese nebo narušené zpracování antigenů, které může být příčinou úniku nádoru z imunitního dohledu.

Oblíbený antigen CD19

Antigen CD19 je ideálním cílovým antigenem pro hematologické malignity vycházející z B-lymfocytární linie jako jsou chronická lymfocytární leukemie (CLL), B-akutní lymfoblastická leukemie (B-ALL), nehodgkinovské lymfomy z B řady (B-NHL). Exprese tohoto znaku je limitována výhradně na B-lymfocyty, na ostatních tkáňích mimo B-lymfocytární linii se nevyskytuje. Antigen není uvolňován do periferní krve a neinterferuje tedy s vazbou na CAR T-lymfocyty.

Vedle CD19 se v hemato-onkologii studují i další potenciální nádorově asociované antigeny (CD20, λ nebo κ řetězce či ROR1). Jako slibný se ukazuje ROR1 (tyrosine kinase-like orphan receptor), který je silně exprimován na buňkách CLL a lymfomu z buněk pláštěvé zóny a pravděpodobně i na některých solidních nádorech. Jeho výhodou je skutečnost, že není přítomen na zralých B-lymfocytech, takže případná imunoterapie by nemusela znamenat totální depleci celého poolu B-lymfocytů (4).

Příprava CAR T-lymfocytů

Genetická modifikace T-lymfocytů CAR konstruktem se provádí nejčastěji retrovirovým vektorem (lentiviry, retroviry) nebo pomocí transpozoz. Nevirové transpozozonové systémy jako piggyBac (PB) transposon či Sleeping Beauty (SB) transposon výrazně zvyšují míru integrace elektrotransferovaných DNA plazmidů. Elektroporace umožní průnik plazmidové DNA do buňky, a transpozozá následně integruje CAR plazmid do genomu buňky. Nevirový způsob transfekce transpozony je nejmodernější a pravděpodobně nejbezpečnější způsob genetické modifikace lidských buněk.

Výchozím materiálem pro přípravu CAR T-lymfocytů je leukaferetický produkt, ze kterého se izolují mononukleární leukocyty nebo T-lymfocyty. Po provedení transfekce/transdukce jsou T-lymfocyty dále *in vitro* kultivovány

v přítomnosti cytokinů (IL-2) a kostimulačních signálů (např. anti-CD3/CD28 protilátky). Během několika dní dochází k jejich aktivaci a několika násobné expanzi umožňující získat klinicky relevantní dávku. Vyrobené CAR T-lymfocyty se zpravidla kryokonzervují a po komplexní kontrole kvality včetně ověření účinnosti integrace CAR konstruktů a fenotypu aktivovaných buněk se propouštějí k aplikaci.

Populace T-lymfocytů v periferní krvi zahrnuje různé subpopulace s odlišnou frekvencí, fenotypem a funkcí. Jejich rozdílné vlastnosti ovlivňují také jejich využitelnost pro potřeby imunoterapie. Příprava CAR T-lymfocytů z neselektovaných periferních mononukleárních buněk nebo T-lymfocytů modifikuje tyto různé subpopulace včetně těch, které jsou potřebné pro požadovaný klinický efekt. Nabízí se otázka, zda nemohou být zároveň modifikovány a aplikovány také subpopulace spojené s rizikem nežádoucí toxicity nebo rizikem snížení protinádorové odpovědi, např. regulační T-lymfocyty (Tregs). Navíc zastoupení jednotlivých subpopulací je výrazně inter-individuálně variabilní, závislé na věku i na předchozí expozici antigenům či chemoterapii. Většina uskutečněných klinických studií využívá právě geneticky modifikované lymfocyty generované z neselektovaných T-lymfocytů z periferní krve, tedy neodhadnutelnou směs různých lymfocytárních subpopulací. V menší míře probíhají studie využívající různé imunomagneticky izolované subpopulace T-lymfocytů, např. CD8+ centrální paměťové (T_{CM}) nebo efektorové paměťové T-lymfocyty (T_{EM}), které jsou separátně modifikovány, stimulovány a kultivovány a jejichž aplikace by měla umožnit synergistický účinek efektivních a vyloučení škodlivých subpopulací (5, 6). Jako slibné se jeví využití nově identifikované subpopulace – kmenových paměťových T-lymfocytů (T_{SCM}), které mají schopnost sebeobnovy a produkují T_{EM} , T_{CM} a efektorové T-lymfocyty (7). Optimální fenotyp T-lymfocytů pro přípravu CARů však zůstává zatím nejasný.

CAR T-lymfocyty byly zpočátku vyvíjeny a produkovány v akademickém prostředí. Povzbudivé výsledky z preklinických a zejména klinických studií z nich postupně vytvářejí mainstreamový léčebný postup a posouvají je k masivnější produkci. Geneticky modifikované T-lymfocyty patří podle národní i evropské legislativy mezi léčivé přípravky moderní terapie (LPMT) a jsou zároveň klasifikovány jako geneticky modifikované organismy spadající do nejméně rizikové 1. kategorie rizika uzavřeného nakládání. Jejich příprava musí probíhat podle zásad správné výrobní praxe a je vyhrazena pouze

specializovaným pracovištím. Zavedení rutinní produkce CAR T-lymfocytů bude vyžadovat další zlepšení technologie, jako například zefektivnění transfekce/transdukce, zkrácení doby kultivace (prolongovaná kultivace zhoršuje *in vivo* funkci), vyšší míru standardizace produkce atd.

Aplikace CAR T-lymfocytů

CAR T-lymfocyty po aplikaci proliferují a mohou dlouhodobě přežívat (měsíce až roky). Naopak nedostatečný engraftment modifikovaných T-lymfocytů je jedním z hlavních důvodů selhání imunoterapie (5). Osud klinicky aplikovaných CAR T-lymfocytů je ovlivněn řadou faktorů, které lze rozdělit do tří kategorií: 1) složení léčivého přípravku (dávka T-lymfocytů, jejich diferenciace a schopnost proliferace), 2) vliv nádoru (jeho typ, velikost a distribuce v organismu, nádorové mikroprostředí) a 3) faktory na straně pacienta (celkový stav, míra imunosuprese, přítomnost podpůrných cytokinů atd.) (3, 8).

Před aplikací CAR T-lymfocytů se z těchto důvodů zpravidla podává pacientovi nějaká lymfo-depleční chemoterapie, která má usnadnit jejich engraftment, přežití a klinickou funkci potlačením supresorových vlivů v hostitelském mikroprostředí. Jedná se zejména o působení regulačních T-lymfocytů (Tregs), myeloidních supresorových buněk (MDSC), tumor asociovaných makrofágů (TAM) nebo sekrece imunosupresivních cytokinů jako TGF- β nebo IL-10 (5). Příznivě také působí snížení endogenní lymfocytární kompetice pro cytokiny či snazší přístup k antigen prezentujícím buňkám.

Proliferační lymfocytů závisí také na vhodném poměru efektorových a cílových buněk. Na základě studií s CAR T-lymfocyty proti CD19 antigenu se ukazuje, že míra odpovědi negativně koreluje s velikostí nádorové masy a lepšího výsledku je dosahováno u pacientů s menším nádorem (9).

Pokud jsou *in vivo* podmínky příhodné a podané buňky dostatečně robustní, mohou v organismu pacienta přežívat až 9 let (10). Počty CAR modifikovaných T-lymfocytů a jejich perzistence v krvi pacienta je možné stanovovat pomocí PCR metod s využitím CAR specifických sond nebo detekcí CAR antigenu na povrchu lymfocytů průtokovou cytometrií.

Perzistence infundovaných CAR T-lymfocytů může být omezena endogenní imunitní odpovědí proti imunogenním determinantům geneticky modifikovaných buněk. Nejčastějším zdrojem scFv regionů jsou myši monoklonální protilátky. Použití humanizovaných scFv regionů by mohlo omezit imunogenicitu a také riziko eliminace geneticky modifikovaných buněk imunitním systémem.

Klinické využití a jeho výsledky

V současné době je ve světě otevřeno více než 50 klinických hodnocení zabývajících se CAR modifikovanými T-lymfocyty (www.clinicaltrials.gov), která se věnují nejen hematologickým maligním onemocněním, ale i solidním nádorům (meduloblastom atd.). Modelovým příkladem, na kterém byla technologie CAR vyvíjena, jsou B-lymfoidní neoplazie. Terapie CAR modifikovanými T-lymfocyty se specifitou proti CD19 antigenu (CTL019) prokázala výbornou efektivitu u pacientů s akutní lymfoblastickou a chronickou lymfocytární leukémií. Není překvapením, že jako první byly testovány právě CAR T-lymfocyty určené k léčbě hematologických malignit. Krevní nádory nabízejí množství dobře definovaných povrchových antigenů, snadnou dostupnost nádorových buněk i přirozenou preferenci homingu T-lymfocytů do hemopoetických orgánů jako je periferní krev, kostní dřeň či lymfatické uzliny.

Klinická hodnocení využívají různé typy CARů nejčastěji druhé eventuálně třetí generace. Aplikované dávky se pohybují okolo 1×10^6 – 10^7 /kg hmotnosti pacienta nejčastěji v jedné infuzi. Nejvíce klinických zkušeností je, jak již bylo řečeno, k dispozici pro malignity vycházející z B-lymfocytární linie, jako jsou CLL a ALL.

Chronická lymfocytární leukemie a lymfomy

Standardní léčba chronické lymfocytární leukemie zaznamenala v posledních 10 letech výrazný vývoj zejména s příchodem monoklonálních protilátek a malých molekul zasahujících do signalizace BCR receptoru. Za jedinou kurativní léčbu je stále považována alogenní transplantace hemopoetických kmenových buněk, která nabízí 40–70% pravděpodobnost dlouhodobého přežití. Přes pokroky ve vývoji přípravných režimů a podpůrné péči zůstává stále nedořešena snaha o snížení rizika reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) při zachování maximálního efektu štěpu proti leukemii (GVL), který je pro dosažení dlouhodobé remise a vyléčení klíčový. GVL efekt potvrzuje schopnost T-lymfocytů eliminovat nádorové B-lymfocyty a vyléčit pacienty s refrakterní či relabující CLL jinak neřešitelnou konvenční chemoterapií.

Dosud bylo publikováno jen omezené množství pilotních studií na malých počtech pacientů s CLL, kterým byly aplikovány CD19 specifické CAR T-lymfocyty (11, 12). Výsledkem bylo až 60% odpovědí (CR/PR) u relabujících či refrakterních onemocnění. V jedné z prvních klinických prací aplikovali Kalos a kol. CD19-CAR T-lymfocyty třem pacientům s pokročilou a opa-

kovaně relabující CLL. Dva z těchto pacientů patřili díky přítomnosti delece chromozomu 17 (defekt p53) do kategorie tzv. vysoce rizikové CLL. Všichni pacienti obdrželi lymfodepleční chemoterapii následovanou jednou infuzí modifikovaných T-lymfocytů. Bylo dosaženo dvou kompletních a jedné parciální remise. Autoři zároveň potvrdili schopnost expanze CAR T-lymfocytů *in vivo* ($> 1\,000$ násobná expanze) a jejich dlouhodobou perzistenci delší než 6 měsíců (13).

První klinická data jsou k dispozici i pro pacienty s ne Hodgkinovskými lymfomy. Ve studii Kochenderfer a kol. bylo dosaženo po podání CD19-CAR T-lymfocytů kompletní remise u osmi z 15 pacientů s pokročilým NHL (PR u 4 pacientů) (14).

CAR T-lymfocyty je možné připravit nejen z vlastních lymfocytů pacienta, ale je možné modifikovat i alogenní lymfocyty dárcovského původu u pacientů po alogenní transplantaci kostní dřeně, kteří mají plně etablovaný dárcovský chimerismus (15, 16). Tím se otevírá možnost léčit potransplantační relapsy nebo implementovat imunoterapii jako součást časné konsolidace po alogenní transplantaci u vysoce rizikových hematologických malignit. Možnost využití CAR T-lymfocytů po alogenní transplantaci jako první představil Kochenderfer a kol. Lymfocyty byly aplikovány deseti pacientům s CLL/NHL, kteří zrelabovali po alogenní transplantaci a byly rezistentní na standardní infuzi dárcovských lymfocytů. Regrese nádoru bylo dosaženo u tří nemocných. V souvislosti s podáním CD19-CAR T-lymfocytů naopak nebyl pozorován žádný rozvoj či akcentace GVHD (15).

Akutní lymfoblastická leukemie

Relabující akutní lymfoblastická leukemie je obtížně léčitelné onemocnění s dlouhodobým přežitím pod 10%. Maude a kol. aplikovali CTL019 třiceti pediatrickým a dospělým pacientům s refrakterní nebo relabující B-ALL (15 pacientů s relapsem po alogenní transplantaci). Do jednoho měsíce bylo dosaženo kompletní remise u 90% nemocných, z čehož u 22 nemocných byla konstatována negativita minimální reziduální nemoci vyšetřované průtokovou cytometrií. Dlouhodobá remise bylo přítomná u 19 nemocných (až po dobu 24 měsíců) (17). Podobně nadějně výsledky uvádí i studie autorů Lee a kol., kteří dosáhli ve skupině 21 pacientů s relabující či refrakterní ALL/NHL (8 po alogenní transplantaci) 67% kompletních remisí s cca 60% MRD negativitou u B-ALL pacientů. Pravděpodobnost přežití bez leukemie v 10 měsících byla 52% (18).

Ostatní hematologické malignity

Na rozdíl od B-lymfoidních neoplazií jsou zkušenosti s léčbou akutní myeloidní leukemie pomocí CAR T-lymfocytů omezené, nicméně preklinické studie prokázaly antileukemický efekt např. CD123 specifických CAR-lymfocytů (19). Nově jsou otevřeny klinické studie testující CAR T-lymfocyty namířené proti antigenu CD30 u Hodgkinova lymfomu. Expresí antigenu CD19 na myelomových buňkách je slabá, přesto je možné CD19-CAR T-lymfocyty v této indikaci použít, protože jsou schopné rozpoznat méně než 100 molekul CD19 antigenu. Na druhou stranu se hledají i jiné vhodnější antigeny se silnější expresí. Jako vhodný kandidát se jeví například CD296 (B-cell maturation antigen, BCMA), který je zastoupen zejména na zralých B-lymfocytech a plazmatických buňkách včetně nádorových (20).

Solidní nádory

Významný klinický efekt CAR terapie u hematologických nádorů je dán mimo jiné skutečností, že nádorové buňky mohou být CAR T-lymfocyty snadno dosaženy a že zároveň exprimují množství kostimulačních receptorů, které funkci T-lymfocytů usnadňují. Výsledky studií u solidních nádorů jsou zatím navzdory úspěchům u hematologických malignit spíše zklamáním (21). Budoucí vývoj v této oblasti se bude vedle výběru vhodného cílového antigenu s dobrým expresním profilem soustředit na zlepšení homingu a migrace lymfocytů do místa nádoru, prodloužení jejich perzistence a překonání imunosupresivních faktorů generovaných nádorovým mikroprostředím.

Komplikace léčby

Nefyziologická aktivace modifikovaných T-lymfocytů neznamená pouze akcentaci jejich funkce, ale také riziko toxicity, která může v některých případech aplikaci doprovázet. Typickou komplikací je syndrom z uvolnění velkého množství cytokinů (cytokiny release syndrome, CRS). Po aplikaci CAR T-lymfocytů dochází v souvislosti s jejich aktivitou a proliferací k vzestupu některých cytokinů jako IL-10, IL-6, IFN- γ . Symptomy CRS jsou u většiny pacientů mírné ve formě chřipkových příznaků jako vysoká horečka, myalgie. Na druhou stranu u části nemocných se rozvíjí těžký inflamatorní syndrom s hypotenzí, koagulopatií, plicním edémem vedoucí eventuálně až k multiorgánovému selhání a vyžadující resuscitační péči. Plně vyjádřený CRS může být fatální, ovšem určitá míra uvolnění cytokinů je pravděpodobně nutnou součástí aktivace a proliferace T-lymfocytů

a tedy i jejich klinického efektu (22). Není zcela jasné, které buňky produkují hlavní množství cytokinů. Je dokonce možné, že IL-6 je produkován umírajícími nádorovými buňkami anebo aktivovanými makrofágy, které jsou atrahovány k odklizení lyzovaných nádorových buněk.

Část pacientů s těžkým CRS vykazuje symptomy podobné hemafagocytární lymfohistiocytóze (HLH) nebo syndromu aktivace makrofágů (MAS). V těchto případech je horečka doprovázena hepatosplenomegalií, jaterní dysfunkcí, hypofibrinogenemií a hyperferitinemií. Přechodná nicméně významná proliferace T-lymfocytů a uvolnění cytokinů může pravděpodobně spouštět kaskádu imunitní aktivity vedoucí k abnormální stimulaci makrofágů a dostačující k rozvoji HLH/MAS.

Obvyklou léčbou CRS jsou kortikosteroidy. Spekuluje se však, zda jejich podání nemůže mít negativní vliv na terapeutickou proliferaci T-lymfocytů a omezit tak jejich protinádorovou aktivitu. Jako vhodnější strategie se jeví přímé ovlivnění zvýšených cytokinových hladin. Při těžkých formách CRS je možné zvážit podání monoklonální protilátky proti IL-6 receptoru (tocilizumab), která blokuje vazbu IL-6 na jeho receptor (22, 23). Tocilizumab je velmi efektivní při potlačení symptomů CRS, aniž by snižoval aktivitu CAR T-lymfocytů (22). Zda ovšem přerušení cytokinové kaskády nevede také k narušení protinádorového efektu, zůstává zatím nejasné. Každopádně se protilátka v řadě klinických studií používá, někdy dokonce preemptivně u pacientů s očekávaným vysokým rizikem plně rozvinutého CRS.

Očekávaným vedlejším účinkem po aplikaci CAR T-lymfocytů specifických proti CD19 antigenu je protrahovaná aplazie B-lymfocytů s hypogamaglobulinemií. Aplazie byla pozorována u všech pacientů, kteří na léčbu CAR T-lymfocyty dobře zareagovali (11). Doba trvání deplece závisí především na perzistenci infundovaných T-lymfocytů a slouží zároveň jako nepřímý ukazatel efektivity léčby. Defekt humorální imunity je spojen se zvýšeným rizikem infekčních komplikací a je třeba jej řešit substitucí imunoglobuliny. V ideálním případě by CAR T-lymfocyty měly v organizmu přetrvávat dostatečně dlouho, aby umožnily kontrolu onemocnění. Po dosažení kompletní remise by mohly být eliminovány a umožnit tak obnovu endogenních B-lymfocytů a revakcinaci pacientů.

V rámci CTL019 studií se u části pacientů v různých institucích objevila neurologická symptomatologie jako otupělost, záchvaty, afázie, změny mentálních funkcí. Tyto nežádoucí účinky byly vždy reverzibilní a mohou být pravděpo-

dobně vztaženy k CRS i když přesný mechanismus jejich vzniku není jasný (24).

Tak jako u jiných typů imunoterapie se může i v případě CAR T-lymfocytů uplatnit „tumor escape“ mechanismus. Byla pozorována downregulace antigenu CD19 u pacienta s ALL s rozvojem CD19 negativního nádorového klonu (23). Řešením může být kombinovaná imunoterapie zahrnující CAR T-lymfocyty a protilátku proti CD20 antigenu nebo vývoj CARů namířených proti různým B- buněčným antigenům (např. kombinovaná specifita proti CD19 a CD22 antigenům). Nejen u hematologických ale i u solidních nádorů může terapie T-lymfocyty narážet na řadu limitací, které snižují její účinek. V průběhu progresu onemocnění se uplatňuje variabilita fenotypu i funkčních vlastností nádorových buněk, která může způsobit, že některé nádorové subklony jsou pro lymfocyty „neviditelné“. Uplatňuje se řada mechanismů snižujících protinádorovou efektivitu T-lymfocytů jako například porucha apoptózy vedoucí ke zvýšené odolnosti nádorových buněk proti cytolytickému útoku T-lymfocytů, nádorové stroma bránící průniku T-lymfocytů nebo potlačení T-lymfocytů pomocí T-regulačních lymfocytů, myeloidních supresorových buněk a makrofágů. Tyto okolnosti mohou vysvětlovat perzistenci či relaps nádoru navzdory přítomnosti cirkulujících nádorově specifických T-lymfocytů (25). Pro překonání těchto omezení se testuje řada přístupů jako optimalizace vazby na cílový antigen, modulace inhibičních receptorů (např. PD-1, CTLA-4), poskytnutí dalších kostimulačních signálů nebo případně zlepšení engraftmentu a přežití T-lymfocytů.

Genetická manipulace vždy vyvolává otázky dlouhodobé bezpečnosti daného léčebného postupu a to zejména s ohledem na možnou genotoxicitu. Léčbu CAR T-lymfocyty podstoupily již stovky nemocných, z nichž je řada sledována po dobu několika let. Do současné doby nejsou známy žádné případy genotoxického nežádoucího účinku vzniklého v souvislosti s aplikací CAR T-lymfocytů ať již transdukovaných virovým vektorem nebo transfekovaných plazmidy a elektroporací (26, 27).

Riziko cytokiny zprostředkované toxicity je možné snížit redukcí nádorové masy před aplikací CAR T-lymfocytů, neboť byl opakovaně pozorován silný CRS u pacientů s velkou vstupní masou nádoru (25). V rámci snah o zvýšení bezpečnosti léčby CAR T-lymfocyty a omezení zejména dlouhodobé toxicity bylo také testováno využití sebevražedných genů jako prostředku eliminace nadměrné nebo již nepo-

třebné imunitní odpovědi. Nejčastěji se jedná o systém herpes simplex virus thymidinkináza/gancyklovir (HSV-TK/GCV), který činí lymfocyty senzitivní na gancyklovir a po jeho podání nutí lymfocyty do apoptózy. Testují se i alternativní sebevražedné geny (Caspase 9 či Fas) a nebo indukovaná exprese antigenu CD20 na modifikovaných T-lymfocytech, které mohou být v případě potřeby odstraněny pomocí rituximabu (28).

Závěr

Technologie CAR T-lymfocytů zaznamenává díky prvním klinickým výsledkům s CD19 specifickými CAR T-lymfocyty významný rozvoj a zájem ze strany základního i biotechnologického výzkumu. CAR T-lymfocyty proti antigenu CD19 mají významný proti-leukemický potenciál u pacientů s ALL a CLL s dlouhodobou odpovědí přesahující 4 roky. Klinicky významnou aktivitu vykazují také u refrakterních nehodgkinovských lymfomů (zejména FL, DLBCL) a přijatelnou bezpečnost a slibnou efektivitu nabízejí i u mnohočetného myelomu. Aplikace může být spojena s projevy toxicity, zejména syndromem z uvolnění cytokinů nebo dlouhodobou aplazií B-lymfocytů. Přes nesporné úspěchy CAR terapie u B-lymfoidních neoplazií zůstává stále otevřena řada otázek – optimalizace CAR signalizace, hledání vhodných cílových antigenů, zlepšování postupů kultivace T-lymfocytů a selekce jejich subtypů, snížení toxicity léčby atd. Probíhají multicentrické studie, které mají definovat optimální strategii pro léčbu pomocí CAR T-lymfocytů. Je nezbytné dále prověřit jejich bezpečnost, účinnost a stanovit vhodný model pro jejich klinické využití a pro řešení nežádoucích účinků léčby.

Další vývoj směřuje k využití nových cílových antigenů a signálních domén, které dále mohou rozšířit indikační spektrum této terapie i její očekávanou účinnost. S pokračujícím vývojem v oblasti monoklonálních protilátek nebo imunomodulačních molekul (PD-1 apod.) se rovněž nabízí kombinace těchto modalit s imunoterapií založenou na T-lymfocytech. Tyto multimodální přístupy však budou vyžadovat další preklinický a klinický výzkum.

Podpořeno projekty MZ ČR – RVO (Fakultní nemocnice Plzeň – FNPI, 00669806), programem rozvoje vědních oborů Karlovy Univerzity (projekt P36) a grantem Nadace pro transplantace kostní dřeně.

Literatura

1. Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler DG. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(2): 720–724.

2. Jena B, Moyes JS, Huls H, Cooper LJN. Driving CAR-based T-cell therapy to success. *Curr Hematol Malig Rep* 2014; 9(1): 50–56.
3. 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. *Immunological Reviews* 2014; 257(1): 83–90.
4. Shah N, Rezvani K, Hosing C, Kebriaei P, Wierda W, Cooper L, Shpall E. Progress in novel cellular therapy options for chronic lymphocytic leukemia: the MD Anderson perspective. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* 2014; 14S: S18–S22.
5. Wiecezorek A, Uharek L. Genetically modified T cells for the treatment of malignant disease. *Transfus Med Hemother* 2013; 40(6): 388–402.
6. Turtle CJ. Chimeric antigen receptor modified T cell therapy for B cell malignancies. *Int J Hematol* 2014; 99(2): 132–140.
7. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, Almeida JR, Gostick E, Yu Z, Carpenito C, Wang E, Douek DC, Price DA, June CH, Marincola FM, Roederer M, Restifo NP. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*. 2011; 17(10): 1290–1297.
8. Hosing C, Kebriaei P, Wierda W, Jena B, Cooper LJN, Shpall E. CARs in chronic lymphocytic leukemia – ready to drive. *Curr Hematol Malig Rep* 2013; 8(1): 60–70.
9. Davila ML, Brentjens R, Wang X, Riviere I, Sadelain M. How do CARs work? Early insights from recent clinical studies targeting CD19. *Oncoimmunology* 2012; 1(9): 1577–1583.
10. Heslop HE, Slobod KS, Pule MA, Hale GA, Rousseau A, Smith CA, Bollard CM, Liu H, Wu M-F, Rochester RJ, Amrolia PJ, Hurwitz JL, Brenner MK, Rooney CM. Long-term outcome of EBV specific T-cell infusions to prevent or treat EBV related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood* 2010; 115(5): 925–935.
11. Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, Wilson WH, Spaner DE, Maric I, et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood* 2012; 119(12): 2709–2720.
12. Brentjens RJ, Riviere I, Park JH, Davila ML, Wang X, Stefanski J, Taylor C, Yeh R, Bartito S, Borquez-Ojeda O, Olszewska M, Bernal Y, Pegram H, Przybylowski M, Hollyman D, Usachenko Y, Pirraglia D, Hoseney J, Santos E, Halton E, Maslak P, Scheinberg D, Jurcic J, Heaney M, Heller G, Frattini M, Sadelain M. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood* 2011; 118(18): 4817–4828.
13. Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, June CH. T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia. *Sci Transl Med* 2011; 3(95): 95ra73.
14. Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, Somerville RP, Carpenter RO, Stetler-Stevenson M, Yang JC, Phan GQ, Hughes MS, Sherry RM, Raffeld M, Feldman S, Lu L, Li YF, Ngo LT, Goy A, Feldman T, Spaner DE, Wang ML, Chen CC, Krnack SM, Nath A, Nathan DA, Morton KE, Toomey MA, Rosenberg SA. Chemotherapy-Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Indolent B-Cell Malignancies Can Be Effectively Treated With Autologous T Cells Expressing an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor. *J Clin Oncol* 2014; 10.1200/JCO.2014.56.2025.
15. Kochenderfer JN, Dudley ME, Carpenter RO, Kassim SH, Rose JJ, Telford WG, Hakim FT, Halverson DC, Fowler DH, Hardy NM, Mato AR, Hickstein DD, Gea-Banacloche JC, Pavletic SZ, Sportes C, Maric I, Feldman SA, Hansen BG, Wilder JS, Blacklock-Schuber B, Jena B, Bishop MR, Gress RE, Rosenberg SA. Donor-derived CD19-targeted T cells cause regression of malignancy persisting after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2013; 122(25): 4129–4139.
16. Cruz CR, Micklethwaite KP, Savoldo B, Ramos CA, Lam S, Ku S, Diouf O, Liu E, Barrett AJ, Ito S, Shpall EJ, Krance RA, Kamble RT, Carrum G, Hosing CM, Gee AP, Mei Z, Grilley BJ, Heslop HE, Rooney CM, Brenner MK, Bollard CM, Dotti G. Infusion of donor-derived CD19-redirected virus-specific T cells for B-cell malignancies relapsed after allogeneic stem cell transplant: a phase 1 study. *Blood* 2013; 122(17): 2965–2973.
17. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, Chew A, Gonzalez VE, Zheng Z, Lacey SF, Mahnke YD, Melenhorst JJ, Rheingold SR, Shen A, Teachey DT, Levine BL, June CH, Porter DL, Grupp SA. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remission in leukemia. *N Engl J Med* 2014; 371(16): 1507–1517.
18. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, Fry TJ, Orentas R, Sabatino M, Shah NN, Steinberg SM, Stroncek D, Tschernia N, Yuan C, Zhang H, Zhang L, Rosenberg SA, Wayne AS, Mackall CL. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 2014; doi: 10.1016/S0140-6736(14)61403-3.
19. Gill S, Tasian SK, Ruella M, Shestova O, Li Y, Porter DL, Carroll M, Danet-Desnoyers G, Scholler J, Grupp SA, June CH, Kalos M. Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells. *Blood* 2014; 123(15): 2343–2353.
20. Carpenter RO, Evbuomwan MO, Pittaluga S, Rose JJ, Raffeld M, Yang http://clincancerres.aacrjournals.org/content/19/8/2048.long – aff-1 S, Gress RE, Hakim FT, Kochenderfer JN. B-cell Maturation Antigen Is a Promising Target for Adoptive T-cell Therapy of Multiple Myeloma. *Clin Can Res* 2013; 19(8): 2048–2060.
21. Gilham DE, Debets R, Pule M, Hawkins RE, Abken H. CAR-T cells and solid tumors: tuning T cells to challenge an inveterate foe. *Trends Mol Med* 2012; 18 (7): 377–384.
22. Maude SL, Barrett D, Teachey DT, Grupp SA. Managing cytokine release syndrome associated with novel T cell-engaging therapies. *Cancer J* 2014; 20(2): 119–122.
23. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, Teachey DT, Chew A, Hauck B, Wright JF, Milone MC, Levine BL, June CH. Chimeric antigen receptor–modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2013; 368(16): 1509–1518.
24. Maus MV, Grupp SA, Porter DL, June CH. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood* 2014; 123(17): 2625–2635.
25. Sadelain M, Brentjens R, Riviere I. The basic principles of chimeric antigen receptor (CAR) design. *Cancer Discov* 2013; 3(4): 388–398.
26. Hackett PB, Largaespada DA, Cooper LJ. A transposon and transposase system for human application. *Mol Ther* 2010; 18(4): 674–683.
27. Bonini C, Grez M, Traversari C, Ciceri F, Marktel S, Ferrari G, Dinauer M, Sadat M, Aiuti A, Deola S, Radizzani M, Hagenbeek A, Apperley J, Ebeling S, Martens A, Kolb HJ, Weber M, Lotti F, Grande A, Weissinger E, Bueren JA, Lamana M, Falkenburg JH, Heemskerk MH, Austin T, Kornblau S, Marini F, Benati C, Magnani Z, Cazzaniga S, Toma S, Gallo-Stampino C, Introna M, Slavin S, Greenberg PD, Bregni M, Mavilio F, Bordignon C. Safety of retroviral gene marking with a truncated NGF receptor. *Nat Med* 2003; 9(4): 367–369.
28. Wang W, Wang Y. Equipping CAR-Modified T Cells with a Brake to Prevent Chronic Adverse Effects. *Current Gene Therapy* 2012; 12(6): 493–495.

Článek přijat redakcí: 19. 1. 2015

Článek přijat k publikaci: 2. 2. 2015

doc. MUDr. Daniel Lysák, Ph.D.

Hematologicko-onkologické oddělení

Fakultní nemocnice Plzeň

Alej Svobody 80, 304 60 Plzeň

lysak@fnplzen.cz