

FORTBILDUNG

Chimeric Antigen Receptor T-Zellen

Eine neue Generation gentechnologisch manipulierter Immunzellen schafft den Sprung in die Klinik

Die Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Zell Therapie hat sich in den letzten Jahren zu einer Strategie entwickelt, welche T-Zellen nutzt um Tumorzellen zu eliminieren. Obwohl das Prinzip brillant ist und in der klinischen Anwendung bei fortgeschrittenem Tumorleiden zu vielversprechenden Resultaten geführt hat, braucht es noch zahlreiche Optimierungsprozesse, um diese Therapie einem breiteren Patientenkollektiv anbieten zu können. Dieser erste Beitrag zum Schwerpunkt-Thema erläutert das Prinzip der CAR T-Zelltherapie.

La thérapie par le récepteur antigène chimérique (CAR) des cellules T a évolué au cours des dernières années à une stratégie qui utilise les cellules T pour éliminer les cellules tumorales. Même si le principe est brillant et a conduit à des résultats prometteurs dans l'utilisation clinique dans des tumeurs malignes avancées, il faut encore de nombreux processus d'optimisation afin de pouvoir offrir cette thérapie à une population plus large de patients. Cette première contribution au thème principal explique le principe de la thérapie cellulaire CAR T.

Tumorzellen können durch das Immunsystem eliminiert werden. Diese Beobachtung ist die Grundlage für zelluläre Therapien wie die hämatopoietische Stammzelltransplantation und Vakzinierungsstudien. Der adoptive Transfer von genetisch modifizierten T-Zellen zur Elimination von Tumorzellen hat sich in den letzten Jahren zu einer vielversprechenden, potenten Methode entwickelt bei Patienten mit fortgeschrittenem Tumorleiden. Insbesondere die Generation von T-Zellen, welche einen chimären Antigenrezeptor (sogenannte CAR T-Zellen) verwendet, findet zunehmend Anwendung bei einer wachsenden Zahl an hämatopoietischen und soliden



Dr. med.
Alexandre P.A.
Theocharides
Zürich



Dr. med. Antonia
M. Müller
Zürich



Prof. Dr. med.
Markus G. Manz
Zürich

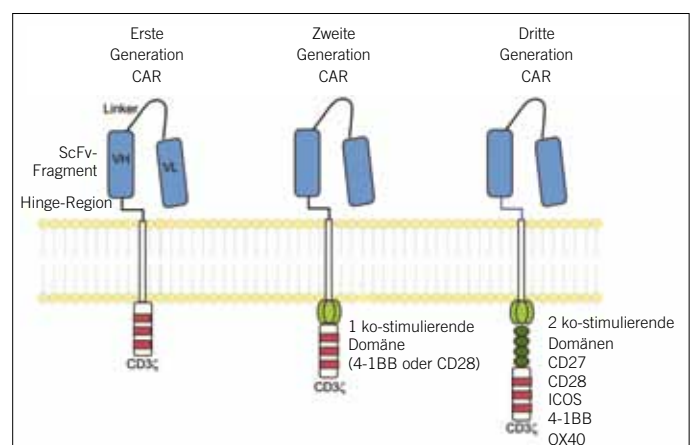


Abb. 1: Struktur des CARs. CAR Moleküle verbinden die extrazelluläre scFv mit der intrazellulären CD3 Domäne des T-Zell Rezeptors (erste CAR Generation). In der zweiten und dritten CAR Generation wurden eine, bzw. zwei ko-stimulierende Domänen eingebaut. Modifiziert nach (1).

Tumorleiden (1,2). Durch die Kombination der Spezifität von monoklonalen Antikörpern und der aktivierenden Domäne von T-Zellen sind CAR T-Zellen ausgesprochen zytotoxisch für Zielzellen, welche das Antigen tragen. Dabei läuft die Antigenerkennung nicht über den endogenen T-Zell Rezeptor, sondern über den artifiziell in die T-Zelle eingebrachten Antigen-Rezeptor.

Geschichte der CAR T-Zellen

CAR T-Zellen wurden erstmalig vor 20 Jahren beschrieben (3). In der ersten Generation von CAR T-Zellen wurde die extrazelluläre variable Domäne eines Antikörpers (scFv) mit der intrazellulären Domäne des T-Zell-Rezeptorkomplexes CD3 ζ verlinkt (Abbildung 1). Die extrazelluläre variable Domäne des Antikörpers vermittelt, im Kontext der Tumortherapie, die Spezifität der CAR T-Zelle für ein bestimmtes, auf der Tumorzelle möglichst spezifisch exprimiertes Antigen. In die zweite und dritte Generation von CAR T-Zellen wurden sogenannte ko-stimulierende Domänen eingebaut. Die kostimulierenden Domänen der CAR T-Zellen erhöhen die anti-tumorale Aktivität und verlängern das Überleben der mit CARs versehenen T-Zellen. Die zweite Generation von CAR T-Zellen enthält ein ko-stimulierendes Signal (CD28 oder 4-1BB), die dritte Generation ein weiteres ko-stimulierendes Signal (CD27, CD28, 4-1BB, ICOS, CD40) (4,5). CARs können durch unterschiedliche Methoden in autologe T-Zellen eingeführt werden. Am häufigsten erfolgt dies durch retro- und lentivirale Transduktion, welche eine stabile und langdauernde Expression der CARs ermöglichen (6,7). Diese Technologien erlauben eine langfristige Kontrolle von Tumorzellen, bergen jedoch auch das (theoretische) Risiko der malignen Transformation der modifizierten T-Zellen (8). In bestimmten Situationen kann somit auch die transiente Expression von CARs zum Beispiel mittels Transfektion erwogen werden. Solche (experimentellen) Ansätze sind jedoch nur für eine kurzfristige Krankheitskontrolle von Nutzen.

Die zweite Generation von CAR T-Zellen enthält ein ko-stimulierendes Signal (CD28 oder 4-1BB), die dritte Generation ein weiteres ko-stimulierendes Signal (CD27, CD28, 4-1BB, ICOS, CD40) (4,5). CARs können durch unterschiedliche Methoden in autologe T-Zellen eingeführt werden. Am häufigsten erfolgt dies durch retro- und lentivirale Transduktion, welche eine stabile und langdauernde Expression der CARs ermöglichen (6,7). Diese Technologien erlauben eine langfristige Kontrolle von Tumorzellen, bergen jedoch auch das (theoretische) Risiko der malignen Transformation der modifizierten T-Zellen (8). In bestimmten Situationen kann somit auch die transiente Expression von CARs zum Beispiel mittels Transfektion erwogen werden. Solche (experimentellen) Ansätze sind jedoch nur für eine kurzfristige Krankheitskontrolle von Nutzen.

Produktion von CAR T-Zellen

Die genetisch modifizierten T-Zellen müssen für den therapeutischen Nutzen in vitro expandiert werden (Abbildung 2) (1). Aus einem Leukapherese-Produkt werden T-Zellen mit Hilfe von Antikörpern und/oder artifiziellen Antigen-präsentierenden Zellen expandiert. Das Produkt kann je nach Methode einen unterschiedlichen Anteil an Memory-T-Zellen enthalten. Memory-T-Zellen können im Gegensatz zu terminal differenzierten Effektor-T-Zellen replizieren und in vitro expandieren. Nach der Zubereitung des CAR-T-Zell Produktes erfolgen Qualitätskontrollen, bevor die Zellen in den Patienten infundiert werden. Damit die transfundierten T-Zellen im Patienten besser angehen und expandieren können, wird dieser mit einer Lymphozyten-depletierenden Chemotherapie vorbehandelt.

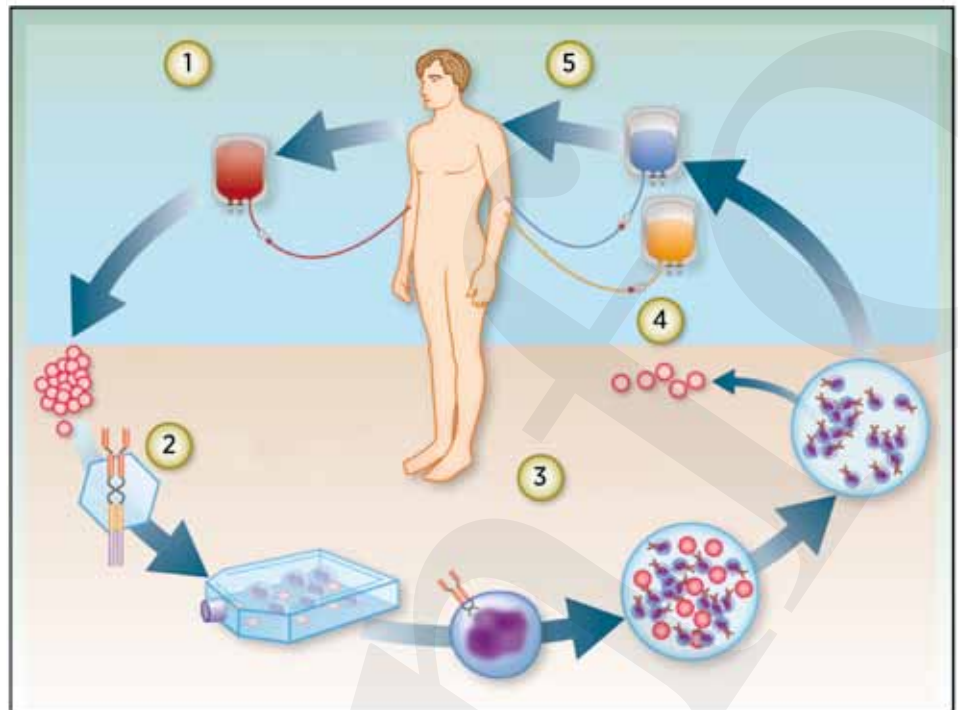


Abb. 2: Herstellung von CAR T-Zellen. Mit einer Leukapherese werden mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut des Patienten gewonnen und ex vivo expandiert. Danach werden die Zellen mit dem CAR Molekül transduziert und dem mit einer Chemotherapie vorbehandelten Patienten infundiert. Modifiziert nach (2) (©Novartis Pharmaceuticals Corporation. All rights reserved).

Wirkungsmechanismus von CAR T-Zellen

Für die spezifische Erkennung von Tumorantigenen ist die scFv-Domäne des CARs verantwortlich (2). Die Interaktion des CARs mit seinem Liganden hat eine höhere Affinität und Avidität als die physiologische Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor und dem Peptid-MHC-Komplex. Die Bindung des CARs an Tumorzellen führt zu einer Rekrutierung von T-Zellen an den Tumor und löst eine zytotoxische, tumorspezifische Reaktion aus. Die Erkennung durch CARs ist unabhängig von MHC-Molekülen und der Antigen-Präsentation und umgeht somit Mechanismen, die der Tumorzelle ein Ausweichen ermöglichen. Diese Mechanismen führen neben der Elimination von Tumorzellen zu einer massiven T-Zell-Proliferation in der Tumorumgebung.

CAR T-Zell Persistenz

Eine der aktuell wichtigsten Fragen auf dem Gebiet der CAR T-Zellen ist die Frage nach der Überlebensdauer der CAR T-Zellen (CAR T-Zell Persistenz) in vivo. In frühen Studien wurde auf eine Lymphozytendepletion des Patienten verzichtet. Vermutlich trug dies zum sehr kurzen Überleben und zur schwachen anti-tumoralen Aktivität der ersten CAR T-Zellen Generation bei (9). Die meisten aktuellen CAR T-Zell Protokolle beinhalten eine Lymphodepletion. Es wird angenommen, dass eine intensivere Lymphozytendepletion zu einer verlängerten CAR T-Zell Persistenz führt. Aktuell versuchen verschiedene Studien das Protokoll der Lymphozytendepletion zu optimieren, um die CAR T-Zell Persistenz zu verbessern (10).

Die CAR T-Zell Persistenz wird auch durch die ko-stimulierende Domäne beeinflusst (siehe oben). Es wurde gezeigt, dass CD28 zu einer verstärkten Expression von Genen führt, welche die Erschöp-

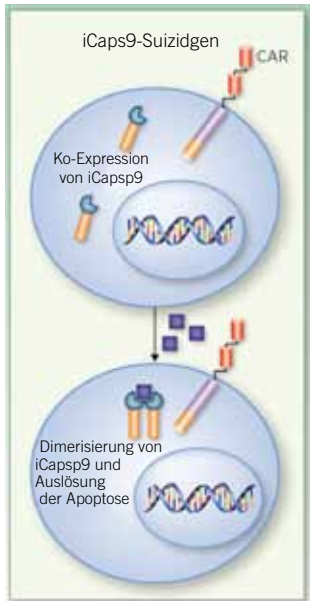


Abb. 3: Strategie zur Regulierung der CAR T-Zell Persistenz. T-Zellen werden mit dem CAR-Konstrukt und mit iCasp9 transduziert. Die Zugabe einer Small Molecules (AP1903) führt zur Dimerisierung von iCasp9 und zur Apoptose der CAR T-Zelle. Modifiziert nach (2).

fung von T-Zell auslösen (11). Hingegen führt 4-1BB zu einer verminderten T-Zell Erschöpfung. Dies könnte gut erklären, warum CAR T-Zellen mit CD28 Expression in klinischen Studien während nur 3 Monaten, CAR T-Zellen mit 4-1BB jedoch bis 5 Jahre nach deren Infusion detektiert wurden. Die Wirkung der ko-stimulierenden Domänen der CAR T-Zellen wird aktuell weiter untersucht. Insbesondere erhofft man sich von CAR T-Zellen der 3. Generation eine verstärkte anti-tumorale Aktivität und möglicherweise auch eine günstige Wirkung auf die CAR T-Zell Persistenz. Eine lange CAR T-Zell Persistenz vermittelt zwar eine längere Krankheitskontrolle, sie kann jedoch auch zu länger anhaltenden Nebenwirkungen führen. Als Beispiel sei hier die B-Zell-Aplasie bei gegen den B-Zell-Marker CD19 gerichteten CAR T-Zellen zu erwähnen. Somit

ist also davon auszugehen, dass die Dauer der CAR T-Zell Persistenz auf den Tumor zugeschnitten und gegenüber potentiellen Nebenwirkungen abgewogen werden muss. In bestimmten Fällen ist eine transiente CAR T-Zell Persistenz erwünscht. Eine transiente Expression von CARs auf T-Zellen kann durch die Transfektion (nicht Transduktion) von T-Zellen mit einer mRNA, welche für den CAR kodiert erreicht werden (12). Die transiente Expression von CARs wird aktuell in klinischen Studien untersucht.

Kontrolle über CAR T-Zellen

CAR T-Zellen können, wie unmanipulierte T-Zellen, eine Gedächtnisfunktion aufweisen und durch Antigenstimulation expandieren. Sie sind also «lebende Medikamente». Eine mögliche Gefahr besteht jedoch in der unkontrollierten Proliferation und dem Schaden an gesundem Gewebe durch mit CARs versetzten T-Zellen. Es wäre also wünschenswert, die Aktivität von CAR T-Zellen mit einem «An / Aus-Knopf» zu kontrollieren. Solche Strategien werden aktuell untersucht und «ON-Switch», bzw. «Suicide-Switch» genannt (13). Das induzierbare Kaspase-9 (iCasp9)-System erlaubt es, mit einem sogenannten Small Molecule Apoptose in einer mit iCasp9 transduzierten Zelle auszulösen (Abbildung 3). iCasp9-exprimierende Zellen könnten also so «ausgeschaltet» und die CAR-T-Zell Persistenz reguliert werden. Das Anschalten einer CAR T-Zelle (ON-Switch) wurde bisher nur in experimentellen Modellen gezeigt. Hier kann der CAR nur in Anwesenheit eines Moleküls (z.B. Tacrolimus) in eine funktionelle Konformation überführt werden (14).

Es bestehen also noch zahlreiche Möglichkeiten die Funktion von CAR T-Zellen zu optimieren und zu regulieren, welche zu einer Erweiterung des therapeutischen Fensters führen könnten. Insbesondere wird in Zukunft auch an CAR T-Zellen geforscht und gearbeitet werden, welche mehr als nur ein Antigen auf Tumorzellen erkennen (15). Dies wird die Spezifität der CAR T-Zellen für einen bestimmten Tumor eines bestimmten Patienten erhöhen und eine noch individuellere, personalisierte Therapie erlauben.

Dr. med. Alexandre P.A. Theocharides

Dr. med. Antonia M. Müller

Prof. Dr. med. Markus G. Manz

Universitätsspital Zürich

Zentrum für Hämatologie und Onkologie

Rämistrasse 100, 8091 Zürich

Alexandre.Theocharides@usz.ch

Interessenskonflikt: Die Autoren haben keine Interessenskonflikte im Zusammenhang mit diesem Beitrag deklariert.

Literatur am Online-Beitrag unter: www.medinfo-verlag.ch

Take-Home Message

- ◆ Die Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Zell Therapie hat sich in den letzten Jahren zu einer Strategie entwickelt, welche modifizierte, auf den Tumor zugeschnittene T-Zellen gezielt nutzt, um Tumorzellen zu eliminieren.
- ◆ CAR T-Zellen der zweiten und dritten Generation enthalten ko-stimulierende Signale. Diese können durch unterschiedliche Methoden in autologe T-Zellen eingeführt werden, wodurch die anti-tumorale Aktivität erhöht und das Überleben der mit CARs versehenen T-Zellen verlängert wird.
- ◆ Derzeit werden zahlreiche Möglichkeiten erforscht, die Funktion von CAR T-Zellen zu optimieren und zu regulieren, insbesondere im Hinblick darauf, dass diese mehr als nur ein Antigen auf Tumorzellen erkennen können und dadurch eine noch weiter personalisierte Therapie erlauben.

Message à retenir

- ◆ La thérapie par le récepteur antigène chimérique (CAR) des cellules T a évolué au cours des dernières années à une stratégie qui utilise des cellules T modifiées et adaptées spécifiquement à la tumeur pour éliminer les cellules tumorales.
- ◆ Les cellules T CAR de la seconde et troisième génération contiennent des signaux co-stimulateurs. Ceux-ci peuvent être introduits dans des cellules T autologues par de divers procédés, en augmentant ainsi l'activité anti-tumorale et prolongeant la survie des cellules T fournies de CARs.
- ◆ A présent de nombreuses possibilités sont en train d' être explorées pour optimiser et régler la fonction des cellules T CAR, en particulier compte tenu du fait qu'elles peuvent détecter plus d'un seul antigène sur les cellules tumorales et permettent ainsi un traitement encore plus personnalisé.

Literatur:

1. Maude SL, Shpall EJ, Grupp SA. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for ALL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014;2014:559-64.
2. Maus MV, June CH. Making Better Chimeric Antigen Receptors for Adoptive T-cell Therapy. *Clin Cancer Res* 2016;22:1875-84.
3. 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 U S A* 1989;86:10024-8.
4. Campana D, Schwarz H, Imai C. 4-1BB chimeric antigen receptors. *Cancer J* 2014;20:134-40.
5. Barrett DM, Singh N, Porter DL, Grupp SA, June CH. Chimeric antigen receptor therapy for cancer. *Annu Rev Med* 2014;65:333-47.
6. Biffi A, Bartolomae CC, Cesana D, et al. Lentiviral vector common integration sites in preclinical models and a clinical trial reflect a benign integration bias and not oncogenic selection. *Blood* 2011;117:5332-9.
7. Scholler J, Brady TL, Binder-Scholl G, et al. Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. *Sci Transl Med* 2012;4:132ra53.
8. Riet T, Holzinger A, Dorrie J, Schaft N, Schuler G, Abken H. Nonviral RNA transfection to transiently modify T cells with chimeric antigen receptors for adoptive therapy. *Methods Mol Biol* 2013;969:187-201.
9. Yao X, Ahmadzadeh M, Lu YC, et al. Levels of peripheral CD4(+)FoxP3(+) regulatory T cells are negatively associated with clinical response to adoptive immunotherapy of human cancer. *Blood* 2012;119:5688-96.
10. Cui Y, Zhang H, Meadors J, Poon R, Guimond M, Mackall CL. Harnessing the physiology of lymphopenia to support adoptive immunotherapy in lymphoreplete hosts. *Blood* 2009;114:3831-40.
11. Long AH, Haso WM, Shern JF, et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med* 2015;21:581-90.
12. Rabinovich PM, Komarovskaya ME, Wrzesinski SH, et al. Chimeric receptor mRNA transfection as a tool to generate antineoplastic lymphocytes. *Hum Gene Ther* 2009;20:51-61.
13. Dotti G, Gottschalk S, Savoldo B, Brenner MK. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunol Rev* 2014;257:107-26.
14. Wu CY, Roybal KT, Puchner EM, Onuffer J, Lim WA. Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. *Science* 2015;350:aab4077.
15. Kloss CC, Condomines M, Cartellieri M, Bachmann M, Sadelain M. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat Biotechnol* 2013;31:71-5.