

Neue CAR T-Zellen

Was ist in der Pipeline?

Chimärische Antigen-Rezeptor modifizierte T-Zellen (CAR T-Zellen) sind eine neue Form der adoptiven Immuntherapie, die in jüngster Vergangenheit aufgrund ihrer beispiellosen Effektivität selbst bei fortgeschrittenen, chemorefraktären Neoplasien grosse Aufmerksamkeit in der Fachwelt wie auch Laienpresse erweckt haben. Wie im Artikel von A. Theocharides et. al. im Detail geschildert, handelt es sich bei einem «CAR» um ein Fusionsprotein aus einer extrazellulären Bindungsdomäne (üblicherweise ein single-chain variable Fragment/scFv eines Antikörpers), Zwischensegmenten und einer intrazellulären Signaldomäne mit CD3 ζ und mehreren co-stimulatorischen Molekülen (1, 2).

+

Les lymphocytes T modifiés avec récepteurs antigènes chimériques (les cellules CAR-T) sont une nouvelle forme d'immunothérapie adoptive qui ont réveillé beaucoup d'attention dans un passé récent chez les experts ainsi que dans la presse laïque en raison de leur efficacité inégale, même dans les néoplasies avancées, chimio réfractaires. Comme décrit en détail dans l'article de A. Theocharides et. al. il s'agit dans le cas du «CAR» d'une protéine de fusion constituée d'un domaine de liaison extracellulaire (habituellement un fragment variable à chaîne unique (scFv) d'un anticorps), de segments intermédiaires, et d'un domaine de signalisation intracellulaire avec CD3 ζ et plusieurs molécules co-stimulatrices (1, 2).

Derartig modifizierte CAR T-Zellen erkennen, unabhängig vom MHC, ihr Zielantigen mit der Sensitivität eines Antikörpers und agieren mit potenziertem Effizienz einer T Zelle (3, 4). Im Unterschied zu herkömmlichen Zelltransfers frischer bzw. in vitro expandierter T Zellen, oder aber auch Vakzinierungsstrategien zur in vivo Expansion von Tumor-spezifischen Effektor-T Zellen, die grösstenteils mit unzureichender Persistenz und Zytotoxizität der T Zellen einhergehen, sind bereits geringe Zahlen dieser genetisch modifizierten CAR T-Zellen zu massiven Immunantworten über mehrere Monate bis Jahre hin fähig.

Prinzipien der Innovation bei CD19-positiven B-Zell Neoplasien

Am weitesten vorangeschritten in ihrer klinischen Entwicklung und Anwendung sind gegen das Oberflächenantigen CD19 gerichtete CAR T-Zellen, die insbesondere bei refraktären akuten B-lymphoblastischen Leukämien spektakuläre Remissionsraten bis zu 90% erreichen konnten (siehe auch Artikel von C. Lengerke in dieser Ausgabe) (5–7). Entsprechend untersuchen circa ein Drittel der rund 225 unter Clinicaltrials.gov registrierten CAR-T Zellstudien CD19 CAR T-Zellen in klassischer Form oder innovativer Modifikation. CD19 als spezifisches B-Lymphozytenantigen hat sich hierbei als vergleichsweise «einfaches» Target erwiesen, da die meisten Reifestufen der



Dr. med. Antonia M. S. Müller
Zürich

B-Zellentwicklung – und daher auch der Grossteil der Neoplasien dieser Zellreihe – CD19 exprimieren und prinzipiell einer entsprechenden Behandlung zugeführt werden könnten (Abbildung 1A und B). Die unvermeidliche Eradikation der gesunden B-Lymphopoese durch die CAR-T Zelltherapie führt zwar zur schweren B-Lymphopenie, doch diese ist erfahrungsgemäss im klinischen Alltag unter regelmässiger Immunglobulin-Substitution gut zu managen.

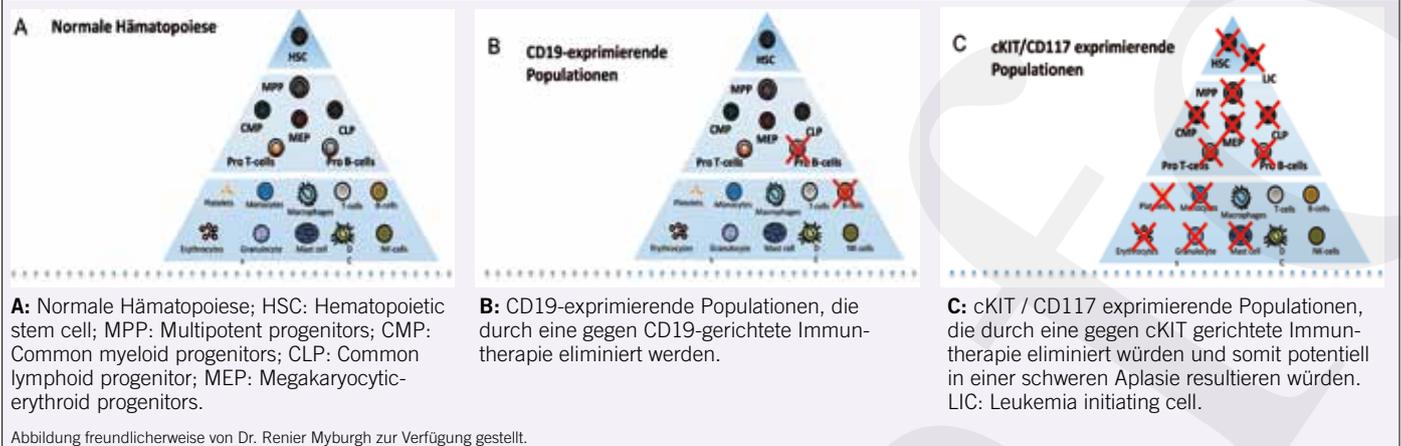
Innovative Ansätze im Bereich der CD19 CAR-T-Zelltherapie beschäftigen sich mit folgenden Problemen bzw. verfolgen verschiedene Zielsetzungen:

► **Verwendung allogener CAR T-Zellen.** Bislang im klinischen Einsatz befindliche CAR T-Zellen werden aus autologen T-Zellen des Patienten hergestellt. Lymphopenien beim Patienten sowie die mehrwöchige Prozessierungszeit bis zur Fertigstellung der Therapie stellen in der klinischen Praxis häufig ein schwerwiegendes Problem dar. Für die klinische Praxis sind daher allogene CAR T-Zellen z. B. als «Donor-Lymphozyten-Infusionen» nach allogener Stammzelltransplantation eine erstrebenswerte Therapieform. Voraussetzung hierfür ist die Inaktivierung der endogenen T-Zellrezeptoren der Zellen, da ansonsten durch unkontrollierte Alloreaktivität mit schweren Graft-versus-Host Reaktionen zu rechnen ist. Studien zum Einsatz allogener CAR-T Zell Infusionen nach allogener Stammzelltransplantation wurden initiiert, Resultate wurden jedoch bislang noch nicht berichtet (MSKCC, New York).

► **3rd-Party CAR T-Zellen.** Die Herstellung autologer wie auch HLA-identer allogener CAR T-Zellen ist zeit- und kostenaufwendig. Um eine Industrialisierung bzw. serielle Produktion zu ermöglichen wird die Etablierung von sogenannten 3rd-Party CAR T-Zellen, die aus Lymphozyten gesunder Spender hergestellt werden und somit *off-the-Shelf* verfügbar wären mit Stärke vorangetrieben. Auch in diesem Fall ist die genetische oder aber funktionelle Ausschaltung des endogenen T-Zellrezeptors Voraussetzung (8). Die Machbarkeit dieses Therapieansatzes und klinische Durchführbarkeit ist bereits beschrieben.

► **Strategien zur Vermeidung CD19-negativer Rezidive nach CAR T-Zelltherapie.** Als weiteres Problem in der Behandlung lymphoproliferativer Neoplasien hat sich herausgestellt, dass Krankheitsrezidive nach CD19-gerichteter CAR-T Zelltherapie oftmals sogenannte «Tumor-Antigen-Escape-Mechanismen» in Form des

ABB. 1 Skizzierte Darstellung der Hämatopoese



Antigenverlusts von CD19 aufweisen (5,9). Die Pathophysiologie dieses Phänomens ist bislang nicht gänzlich geklärt, möglicherweise jedoch durch den selektiven Druck unter CD19-gerichteter Immuntherapie und sogenanntes *Tumor-Editing* zu verstehen (10). In Bezug auf CD19 Therapien wurden verschiedene *Tumor-Escape* Strategien beobachtet, zum einen, dass CD19 Isoformen prinzipiell zwar noch auf der Oberfläche exprimiert werden, jedoch aufgrund von Mutationen und alternativem Splicing nicht mehr erkannt werden können (11); in anderen Fallbeschreibungen konnte CD19 zwar im Zytoplasma, nicht aber auf der Zelloberfläche detektiert werden (12). Zudem wurde in seltenen Fällen dokumentiert, dass akute B-lymphoblastische Leukämien ihre Linienzugehörigkeit wechseln mit Frührezidiv in Form einer klonal verwandten AML nach CAR-T-Zellbehandlung einer CD19-positiven ALL (13). Diese klinische Problematik war Anlass der Entwicklung sogenannter dualer CAR T-Zellen mit kombinatorischer Antigen Erkennung durch Ausstattung der T-Zellen mit zwei CARs, d. h. einem anti-CD19-CAR in Kombination mit einem z. B. gegen CD22, CD20 oder CD123 gerichteten CAR (14). Derartige duale CARs sollen die Effizienz der CAR T-Zellen komplementieren, im Sinne von Primärsignal und Ko-Stimulation (9).

CAR T-Zellen in der Behandlung des multiplen Myeloms

Obleich Myelomzellen grösstenteils keine Expression von CD19 aufweisen konnten verschiedene Gruppen zeigen, dass die mutmassliche Myelom-Stammzelle CD19 auf der Oberfläche tragen kann (15). Die Annahme, dass eben diese Myelom-Stammzellen besonders therapie-resistent sind und somit am ehesten für die Unheilbarkeit der Erkrankung verantwortlich sind liefert die Rationale zur Überprüfung der Wirksamkeit von CD19 CAR T-Zellen bei Patienten mit Myelom. In der Tat konnte in einer Fallbeschreibung (16) sowie in einer auf der Jahrestagung der *American Society of Hematology (ASH)* im Dezember 2016 präsentierten Fallserie der University of Pennsylvania ein Ansprechen auf CTL019 CAR T-Zellen demonstriert werden. In letzterer erhielten 10 Patienten 12–14 Tage nach Hochdosis-Melphalan mit autologer Stammzellretransfusion CTL019 CAR T-Zellen und erzielten eine sehr gute partielle Remission (VGPR; n = 6), ein partielles Ansprechen (n = 2) bzw. einen Krankheitsprogress (n = 2).

Sehr vielversprechende erste Daten liegen auch zum Einsatz von CAR T-Zellen, die gegen BCMA (*B cell maturation antigen*) gerichtet sind vor. BCMA ist relevant für die Reifung von B Zellen in Plasmazellen, wird stark exprimiert von Myelomzellen und vermittelt als Oberflächenprotein insbesondere starke anti-apoptotische Signale. In einer ersten publizierten Phase I Dosis-Eskalationsstudie konnte bereits ein Ansprechen bis hin zur stringenten kompletten Remission demonstriert werden (17). Weitere BCMA CAR-T Zellprodukte befinden sich in klinischer Prüfung, u.a. an der University of Pennsylvania und zeigen gemäss ersten Berichten auf dem ASH Meeting 2016 zufolge teilweise ein ausgesprochen gutes Ansprechen. Ebenfalls getestet werden CD138 CAR T-Zellen, da dieses Antigen vom Grossteil der gesunden und pathologischen Plasmazellen exprimiert wird. Bedenken bezüglich dieses Antigens beruhen auf der Tatsache, dass CD138 auch von Epithelzellen exprimiert wird und somit mit Toxizität an Haut und Schleimhäuten zu rechnen ist.

CAR T-Zelltherapien für myeloische Leukämien

Deutlich schwieriger erweist sich die Entwicklung von CAR T-Zellen für hämatologische Neoplasien der myeloischen Reihe. Insbesondere die akute myeloische Leukämie ist eine Stammzellerkrankung, bei der die leukämische Stammzelle phänotypisch nicht sicher von der gesunden Blutstammzelle abgrenzbar ist, und bislang keine selektiv tumor-spezifische Zielantigene identifiziert werden konnten (18). Abbildung 2C zeigt exemplarisch anhand des hämatopoietischen Stammzellmarkers CD117/cKIT, der häufig auch auf leukämischen Zellen zu finden ist, die weitreichende Expression dieses Oberflächenantigens auf verschiedenen Reifestufen des hämatopoietischen Systems. Eine langandauernde CAR-T Zellvermittelte Immunreaktion gegen sämtliche cKIT exprimierende Blutzellen würde klinisch zur prolongierten aplastischen Anämie und hämatopoietischen Insuffizienz führen.

Eine gegen die leukämische Stammzelle gerichtete Immuntherapie bedarf demnach modifizierter, innovativer CAR T-Zellen, die entweder sicher kurzlebig sind (und dennoch stark und selektiv genug ihre Effektorfunktion ausüben), oder gezielt medikamentös, z. B. bei Co-Expression von RQR8 durch Gabe Rituximab, eliminiert werden können. Selbst bei effizienter Eradikation der CAR T-Zellen ist jedoch mit derartigem Kollateralschaden der gesunden hämatopoietischen Stammzelle mit prolongierter Aplasie zu rechnen, so

dass derartige Therapien möglicherweise nur mit Anschlusskonzept einer Stammzelltransplantation klinisch umsetzbar sein werden.

In früher klinischer Überprüfung zur Behandlung der AML befinden sich wenige Studien zu CAR T-Zellen, die gegen CD123 (klinische Studie der University of Pennsylvania noch nicht publiziert) (19), CD33 und das Lewis Y Antigen (20) gerichtet sind.

CAR T-Zelltherapien für solide Tumoren

Unter *Clinicaltrials.gov* sind über 150 Studien registriert, die rund 30 «neue» Targets, (GPC3 beim hepatozellulären Karzinom; GD2 bei Neuroblastom; ERBB2 (Her-2/neu), EpCAM, Mesothelin 8 etc.) untersuchen. In der Entwicklung von CAR T-Zellen für solide Tumoren zeigen sich jedoch substantielle Hürden. Zum einen sind die meisten Tumor-assoziierten Antigene nur schwach immunogen und häufig aufgrund eines abschirmenden *Tumor-Microenvironments* Zelltherapien schwer zugänglich, so dass keine ausreichenden anti-Tumor Effekte erwirkt werden können. Zum anderen werden Tumor-assoziierte Antigene zwar auf Tumorgewebe über-exprimiert, sind jedoch meist in geringerer Dichte auch auf gesunden Zellen zu finden. Aufgrund der extremen Potenz der CAR-T Zelltherapie muss mit starken «Off-Target» Effekten mit schwersten Kollateralschädigungen gesunder Gewebe gerechnet werden. Die Potenz – und auch fehlende Sicherheit - derartiger Immuntherapien wurde eindrücklich am Fall einer CAR-T Zelltherapie gegen ERBB2 (Her-2/neu) zur Behandlung einer Patientin mit fortgeschrittenem, hepatisch und pulmonal metastasierten Kolon-Karzinom demonstriert: Innerhalb von 15 Minuten nach Infusion von 10^{10} Zellen (nach nonmyeloablativer Konditionierung) erlitt die Patientin eine respiratorische Insuffizienz mit radiologisch ausgeprägten pulmonalen Infiltraten. Die Patientin starb 5 Tage nach Applikation der experimentellen Therapie an den Folgen eines sogenannten Zytokinsturms. Mutmasslich gelangten die genetisch manipulierten T-Zellen unmittelbar nach Infusion in die Lunge und wurden durch bereits niedrige Expressionslevel von ERBB2 auf den pulmonalen Epithelzellen aktiviert (21).

Das bislang einzige «exklusive» Tumorantigen, das als Target für eine CAR-T-Zelltherapie dienen kann scheint EGFRvIII (Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor Variante 3) zu sein, ein Tumor-assoziiertes Antigen das häufig von Glioblastomen exprimiert wird (22). Präklinische Untersuchungen im Mausmodell konnten die Effizienz der EGFRvIII-CAR T-Zellen mit Reduktion des Tumorstadiums belegen. Mehrere klinische Studien sind derzeit im Gang. Eine andere Strategie zielt durch Verwendung von CD133 CAR T-Zellen auf die Elimination der «Krebsstammzelle» ab, ohne hierbei die Therapie auf eine spezifische Tumorentität zu beschränken (23,24). Zu berücksichtigen ist jedoch, dass CD133 auch von normalen Epithelzellen und vaskulärem Endothel exprimiert wird.

Zusammenfassung

Die jüngsten Fortschritte in der CAR-T-Zelltechnologie haben ein neues Zeitalter der adoptiven Zelltherapie eingeläutet. Klinisch anwendbar ist diese Form der hochpotenten Immuntherapie bislang jedoch nur bei CD19-exprimierenden B-Zell Neoplasien. Vor klinischer Etablierung von CAR T-Zellen, die gegen myeloische Neoplasien und solide Tumoren gerichtet sind muss aufgrund signifikanter *Off-Target* Schädigung deren Sicherheit erhöht werden. Verschiedenste Strategien sind in Entwicklung, wie die Integration sogenannter Suicide-Gene (z. B. induzierbare Caspase 9), oder aber Rezeptoren, die medikamentös zur gewollten Elimination der CAR T-Zellen führen können. Durch derartige Techniken kann dann die Toxizität der CAR T-Zellen gesteuert und bei Bedarf abgestellt werden.

Dr. med. Antonia M. S. Müller

Zentrum für Hämatologie und Onkologie
Klinik für Hämatologie, Rämistrasse 100, 8091 Zürich
AntoniaMaria.Mueller@usz.ch

Interessenskonflikt: Die Autorin hat keine Interessenskonflikte im Zusammenhang mit diesem Beitrag deklariert.

Take-Home Message

- ◆ Aufgrund der ausgesprochenen Attraktivität und Effizienz dieser zielgerichteten Immuntherapie laufen präklinische und klinische Forschung im Bereich der modifizierten T-Zelltherapien auf Hochtouren. Dies spiegelt sich in der Registrierung von über 225 CAR-T Zell Studien, die rund 30 verschiedene Target-Antigene angreifen wider.
- ◆ CD19 ist ein «einfaches» Zielantigen, da mit dem Verlust der gesunden B-Zellreihe in der Klinik gut umgegangen werden kann. CD19-negative Krankheitsrezidive im Sinne eines Antigenverlusts nach CAR-T Zelltherapie stellen eine Herausforderung dar, welcher man durch die Entwicklung dualer CAR T-Zellen, die mehrere Oberflächenantigene gleichzeitig angreifen können, entgegenzutreten versucht.
- ◆ Insbesondere bei soliden Tumoren erschwert sich die Entwicklung von CAR T-Zellen, die gegen Tumor-assoziierte Antigene gerichtet sind, da diese Antigene selten selektiv genug sind sondern in aller Regel in niedriger Dichte auch auf gesunden Geweben exprimiert werden, was zu starker, oftmals intolerabler *Off-Target Toxizität* führen kann.
- ◆ Die CAR-T Zelltherapie ist bislang eine zeitaufwendige, teure Individualtherapie. Erst die serielle Herstellung unter Verwendung von *3rd-Party* Lymphozyten gesunder Spender anstelle von autologen Patientenlymphozyten wird eine Industrialisierung dieser Therapie erlauben.

Message à retenir

- ◆ En raison de l'attrait prononcé et l'efficacité de cette immunothérapie ciblée une recherche préclinique et clinique dans le domaine des thérapies de cellules T modifiées est en plein essor. Cela se traduit par l'enregistrement de plus de 225 études de cellules CAR T qui attaquent environ 30 antigènes cibles différents.
- ◆ Le CD19 est un antigène cible « simple », comme on peut bien être avec la perte de la lignée des cellules B saines à l'hôpital. Les récurrences de la maladie CD19-négative dans le sens d'une perte d'antigène après la thérapie cellulaire CAR-T sont un défi que l'on cherche à contrer par le développement des cellules à double CAR-T, qui peuvent attaquer plusieurs antigènes de surface simultanément.
- ◆ En particulier pour les tumeurs solides, le développement des cellules CAR-T qui sont dirigées contre des antigènes associés aux tumeurs se complique parce que ces antigènes sont rarement assez sélectifs mais sont exprimés habituellement en faible densité sur des tissus sains, ce qui peut provoquer une *toxicité Off-Target* forte, souvent intolérable.
- ◆ La thérapie avec des cellules CAR T jusqu'à présent est une thérapie individuelle, qui prend beaucoup de temps, et qui est coûteuse. Seule la production en série en utilisant des lymphocytes de *3^{ème} partie* de donateurs sains au lieu de lymphocytes de patients autologues permettra l'industrialisation de cette thérapie.

Literatur:

1. Curran, K.J., H.J. Pegram, and R.J. Brentjens, Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: current understanding and future directions. *J Gene Med*, 2012. 14(6): p. 405-15.
2. Dai, H., et al., Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy. *J Natl Cancer Inst*, 2016. 108(7).
3. Eshhar, Z., et al., 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 U S A*, 1993. 90(2): p. 720-4.
4. Eshhar, Z., The T-body approach: redirecting T cells with antibody specificity. *Handb Exp Pharmacol*, 2008(181): p. 329-42.
5. Turtle, C.J., et al., CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest*, 2016. 126(6): p. 2123-38.
6. Lee, D.W., 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(9967): p. 517-28.
7. Maude, S.L., et al., Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*, 2014. 371(16): p. 1507-17.
8. Torikai, H. and L.J. Cooper, Translational Implications for Off-the-shelf Immune Cells Expressing Chimeric Antigen Receptors. *Mol Ther*, 2016. 24(7): p. 1178-86.
9. Wang, Z., et al., New development in CAR-T cell therapy. *J Hematol Oncol*, 2017. 10(1): p. 53.
10. Ruella, M. and M.V. Maus, Catch me if you can: Leukemia Escape after CD19-Directed T Cell Immunotherapies. *Comput Struct Biotechnol J*, 2016. 14: p. 357-362.
11. Sotillo, E., et al., Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. *Cancer Discov*, 2015. 5(12): p. 1282-95.
12. Yu, H., et al., Repeated loss of target surface antigen after immunotherapy in primary mediastinal large B cell lymphoma. *Am J Hematol*, 2017. 92(1): p. E11-E13.
13. Gardner, R., et al., Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood*, 2016. 127(20): p. 2406-10.
14. Ruella, M., et al., Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *J Clin Invest*, 2016. 126(10): p. 3814-3826.
15. Hajek, R., S.A. Okubote, and H. Svachova, Myeloma stem cell concepts, heterogeneity and plasticity of multiple myeloma. *Br J Haematol*, 2013. 163(5): p. 551-64.
16. Garfall, A.L., et al., Chimeric Antigen Receptor T Cells against CD19 for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*, 2015. 373(11): p. 1040-7.
17. Ali, S.A., et al., T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. *Blood*, 2016. 128(13): p. 1688-700.
18. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000. 100(1): p. 57-70.
19. Gill, S., et al., Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloblastosis using chimeric antigen receptor-modified T cells. *Blood*, 2014. 123(15): p. 2343-54.
20. Ritchie, D.S., et al., Persistence and efficacy of second generation CAR T cell against the LeY antigen in acute myeloid leukemia. *Mol Ther*, 2013. 21(11): p. 2122-9.
21. Morgan, R.A., et al., Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther*, 2010. 18(4): p. 843-51.
22. Li, G. and A.J. Wong, EGF receptor variant III as a target antigen for tumor immunotherapy. *Expert Rev Vaccines*, 2008. 7(7): p. 977-85.
23. Hermann, P.C., et al., Cancer stem cells in solid tumors. *Semin Cancer Biol*, 2010. 20(2): p. 77-84.
24. Mueller, M.T., P.C. Hermann, and C. Heeschen, Cancer stem cells as new therapeutic target to prevent tumour progression and metastasis. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2010. 2: p. 602-13.