

Celične terapije s CAR-T



prof. dr. Alojz Ihan
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta
Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo
<http://www.imi.si/>

Univerza v Ljubljani



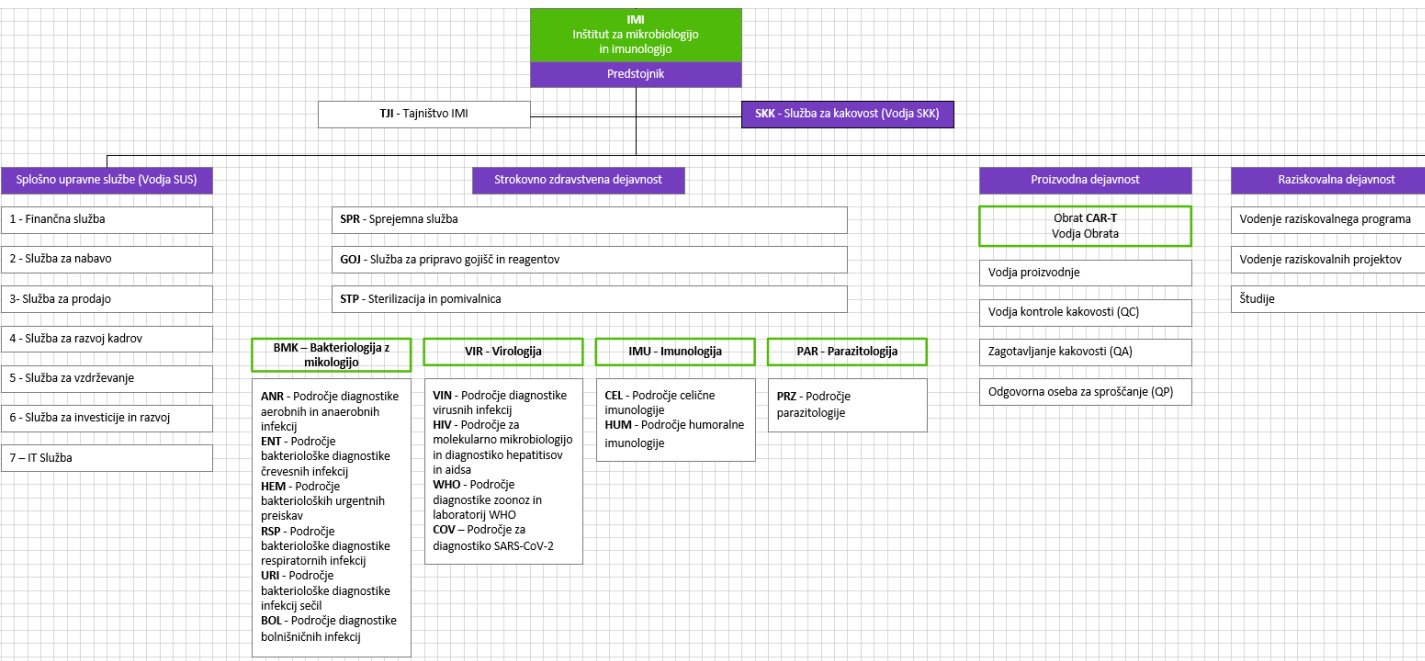
Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo (IMI)

- Osrednja, največja slovenska ustanova za mikrobiološko in imunološko diagnostiko
- Nad 600 vrst preiskav
- 320 000 vzorcev / leto
- 615 000 preiskav / leto
- 180 zaposlenih (15 zdravnikov, 36 dr.sci.)
- 7 profesorjev

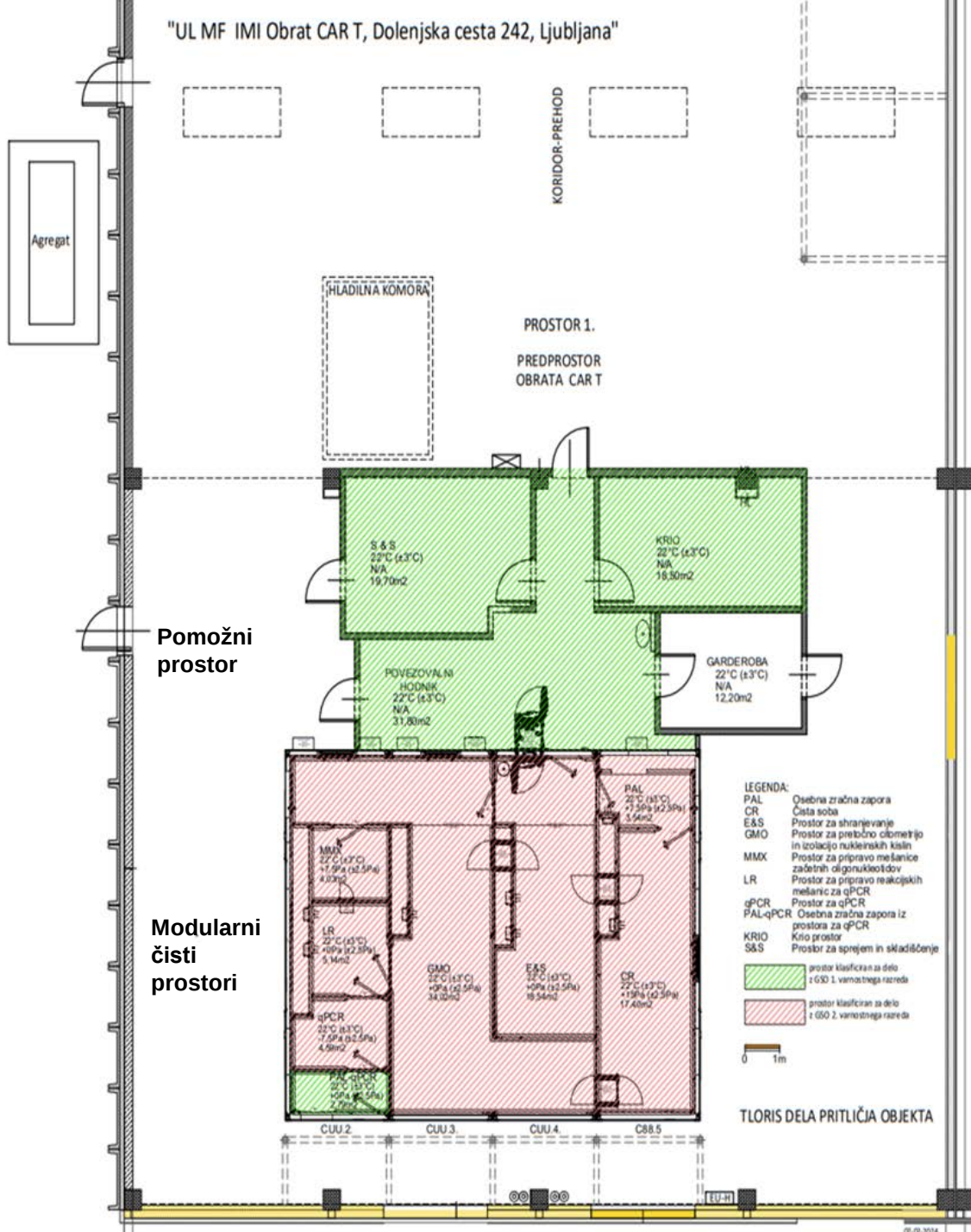


Proizvodnja naprednih celičnih zdravil – Obrat za proizvodnjo celic CAR-T

- Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo (IMI) na Medicinske fakulteti Univerze v Ljubljani je sklenil vzpostaviti GMP-skladen ATMP center za proizvodnjo CAR T celic, da bi zadostil povpraševanju po CAR T celični terapiji v Sloveniji.
- V sodelovanju s Kliničnim oddelkom za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani IMI vpostavlja proizvodnjo anti-CD19 CAR T-celic za zdravljenje akutne limfoblastne levkemije (B-ALL) in velikoceličnih B-limfomov.
- Obrat je zgrajen modularno (172 m² čistih prostorov v 600 m² proizvodni hali).



"UL MF IMI Obrat CAR T, Dolenjska cesta 242, Ljubljana"



Terapija s celicami CAR-T (ang. Chimeric antigen receptor T cells)

- Bolnikove limfocite T se odvzame iz krvi, jih v inkubatorju okuži z vektorskimi virusi, ki prinesejo v limfocite T nov gen (CAR), ki omogoča prepoznavanje bolnikovega tumorja.
- Tako pripravljene “umetne limfocite T” se v inkubatorju („umetna bezgavka“) dodatno razmnoži (2 tedna) in nato injicira v bolnika z namenom, da celice CAR-T napadejo in uničijo tumor.
- Sintetični receptorji CAR so oblikovani na osnovi enoverižne imunoglobulinske molekule tako, da limfocitom T omogočijo prepoznavo specifičnih tarčnih molekul na površini tumorskih celic. **Za razliko od receptorjev TCR, so receptorji CAR sposobni prepoznave površinskih antigenov neodvisno od molekul poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC).**

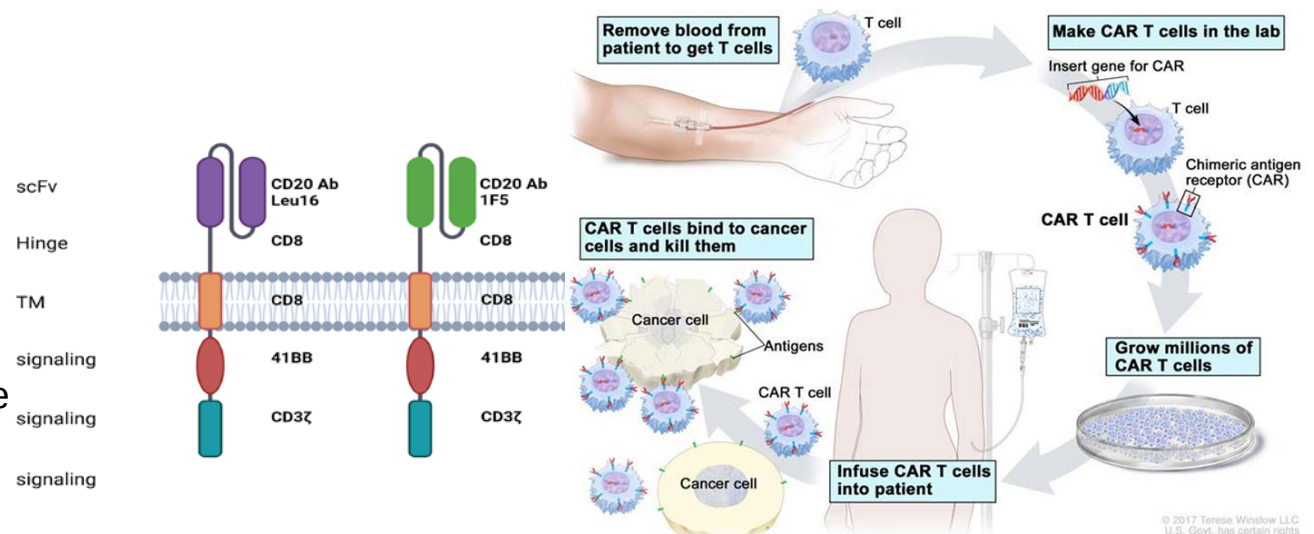
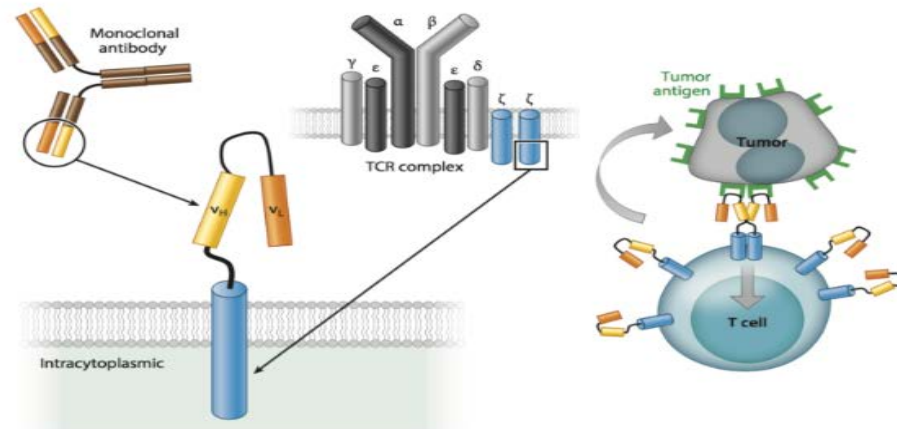


Celice CAR-T izražajo BCR površinski receptor + znotrajcelični ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif - CD3ζ)

Celice CAR-T – avtologne celice T, izdelane tako, da izražajo površinski receptor za ciljanje na specifičen (avto)antigen.

Himerni antigenski receptorji (CAR) so proteini, ki imajo domeno za prepoznavanje antigena, kostimulatorne domene in T-celične aktivacijske domene (TCR zeta-veriga - CD3ζ).

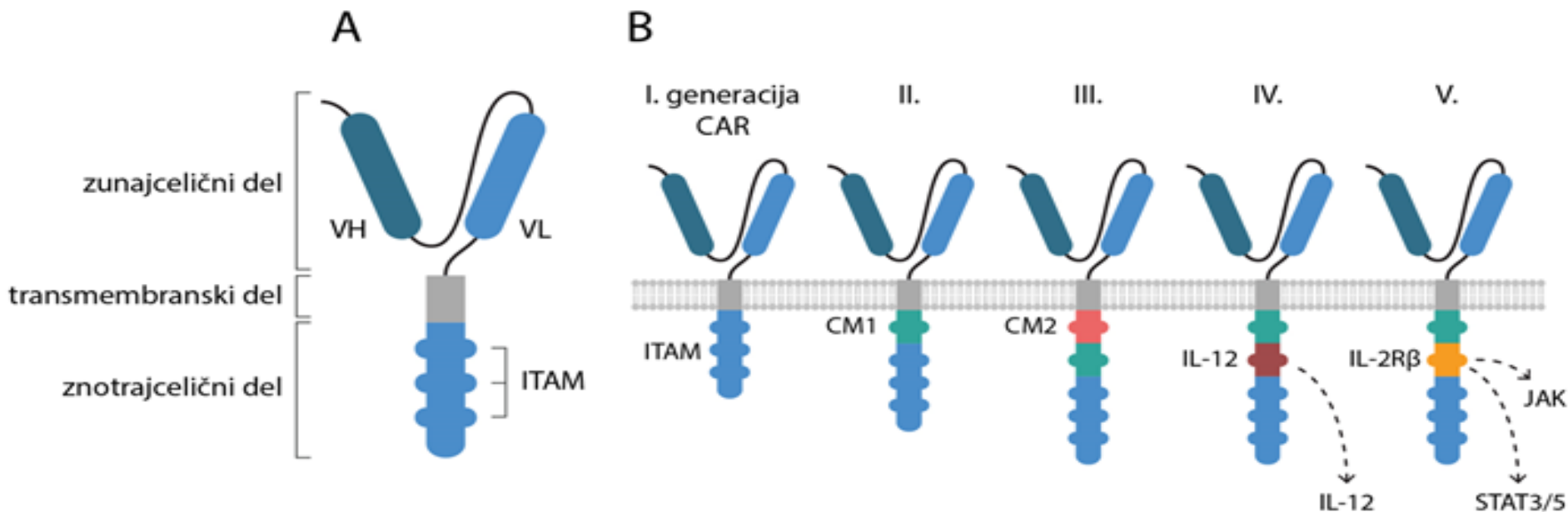
T celice, gensko spremenjene za specifično izražanje CAR prepoznati in odstraniti maligne celice, ki izražajo a ciljni antigen (CD19, BCMA, CD30 itd.)



© 2017 Terese Winslow LLC
U.S. Govt. has certain rights

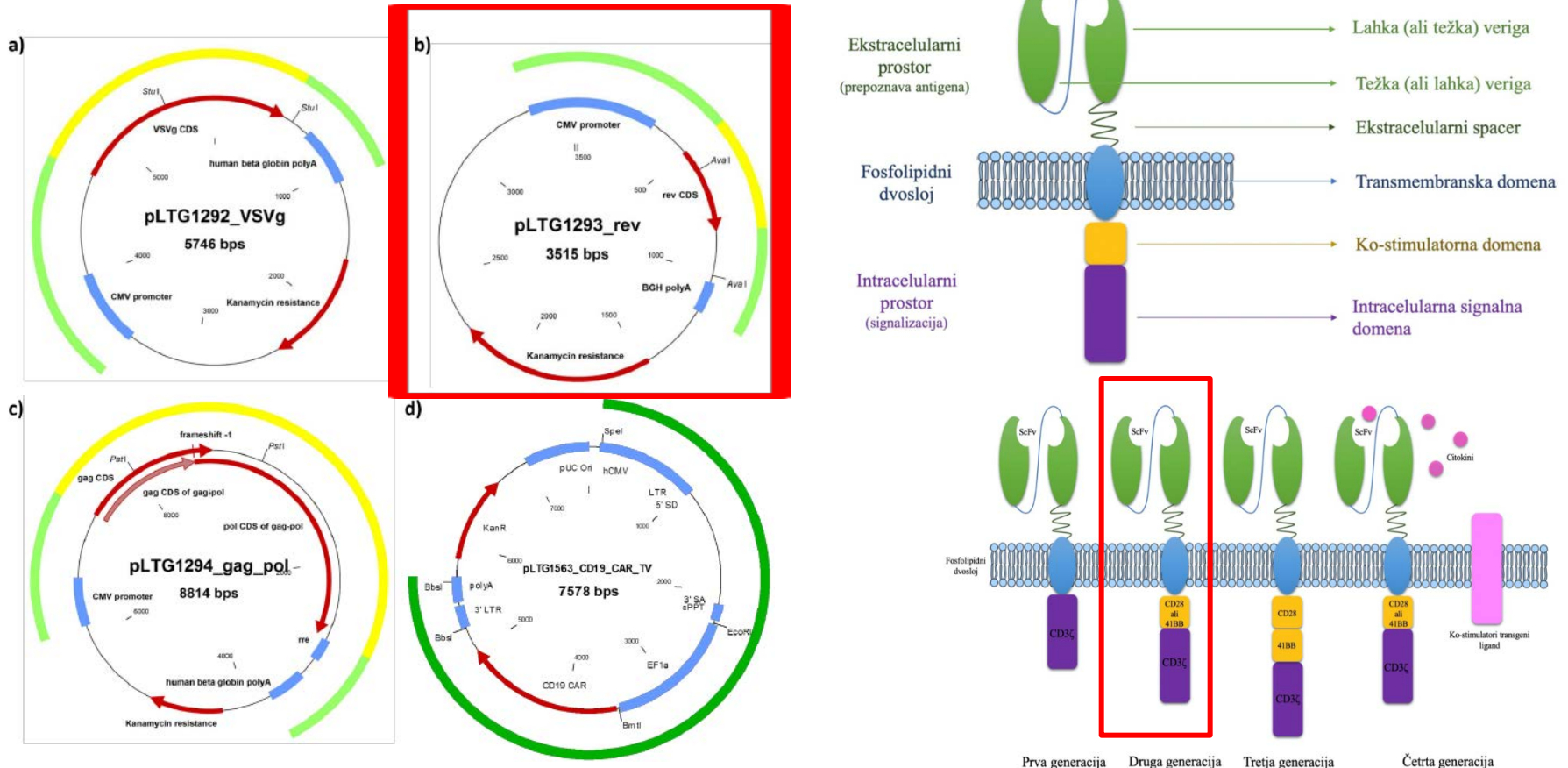
Genska modifikacija T celic

- 1. Uporaba himerno spremenjenih TCR receptorjev – CARs; Eksodomena TCR je spremenjena v fragment BCR – omogoča MHC neodvisno prepoznavo (lahko tumorji prenehajo z izražanjem MHC)
- 2. Uporaba kostimulativnih signalov; povečanje specifičnosti, ON/OFF switch.
- 3. Uporaba himernih receptorjev za izogibanje tumorski supresiji; IL-4/IL-7 himerni receptor, rezistenca na npr. rampamycin
- 4. Utišanje/izražanje novih genov; CCR4 receptor, utišanje endogenega TCR (nove metode CRISPR-CAS9, cinkovi prsti,...)



Vektor rLVVaCD19 CAR

Vektor rLVVaCD19 CAR druge generacije proizvajalca Lentigen, Miltenyi Biotec



Lentivirusni vektor je osnovan na podlagi sekvence HIV-1, ki pa je, zaradi več delecij v pomožnih genih HIV, replikativno inkompetenten.

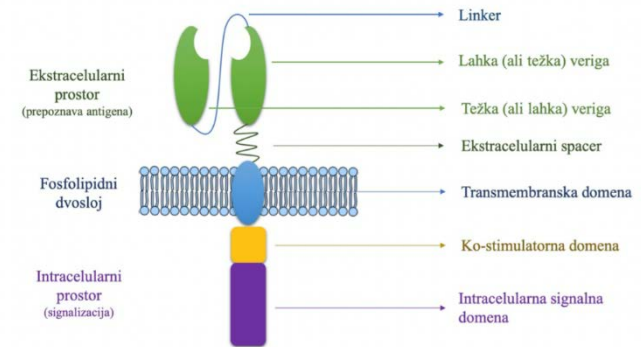
Vektor rLVVaCD19 CAR

Vektor rLVVaCD19 CAR druge generacije proizvajalca Lentigen, Miltenyi Biotec

Lahka in težka veriga aCD19 - veže antigen CD19

Vmesnik CD8 (angl. CD8 spacer, hinge) je zunajcelična povezovalna veriga, ki povezuje zunajcelični verigi scFv aCD19 s transmembransko domeno TNFRSF19 TM.

Vmesnik je sestavljen iz aminokislin, ki omogočajo fleksibilnost za optimalno vezavo antigen prepoznavne domene na antigen. Zaporedje vmesnika je pridobljeno iz človeškega CD8



Transmembranska domena TNFRSF19 TM (angl. TNF receptor superfamily member 19) povezuje zunajcelični in znotrajcelični del aCD19 CAR ter prispeva k njegovi stabilnosti. Domena je vstavljena v fosfolipidni dvosloj in je sestavljena iz hidrofobnih aminokislin. Zaporedje je identično aminokislinskemu zaporedju človeškega receptorja za dejavnik tumorske nekroze superdružine 19

Kostimulativna domena 4-1BB (CD137) je znotrajcelična domena CAR, ki spodbudi aktivacijo, proliferacijo in diferenciacijo limfocitov T ter sintezo citokinov. V primerjavi s celicami, ki vsebujejo alternativno kostimulativno domeno CD28, se celice s konstruktom, ki vsebujejo kostimulativno domeno 4-1BB, odzovejo počasneje ter obstanejo dlje časa v pogojih in vivo.

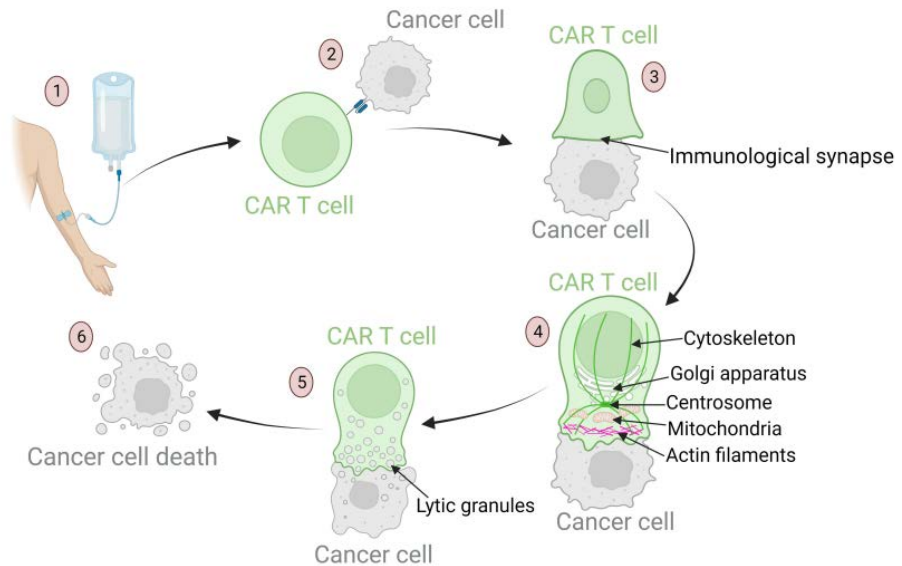
Signalna domena CD3 ζ (CD27) je znotrajcelična domena CAR in vsebuje zaporedja za rekrutiranje signalnih elementov, katerih naloga je posredovanje signala iz receptorja, kar posledično vodi v aktivacijo limfocitov T

Lentivirusni vektor je osnovan na podlagi sekvence HIV-1, ki pa je, zaradi več delecij v pomožnih genih HIV, replikativno inkompetenten.

Cilj – deplecija (avto)antigen pozitivnih celic

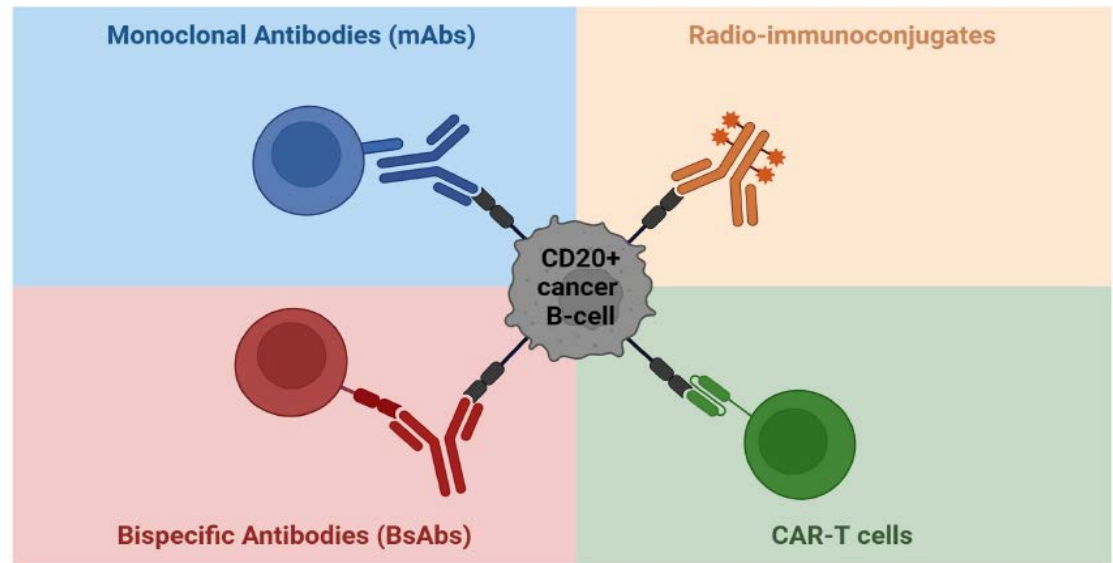
Trenutne terapije s T-celicami CAR NE prepoznajo in ne napadajo tumorsko specifičnih antigenov, temveč ubijejo specifično definirano pacientovo lastno vrsto celic

Cilj – deplecija (avto)antigen pozitivnih celic, npr. CAR-T, ki cilja na CD19, ubije bolnikove lastne celice B, ki izražajo CD19 (patogene in zdrave celice)

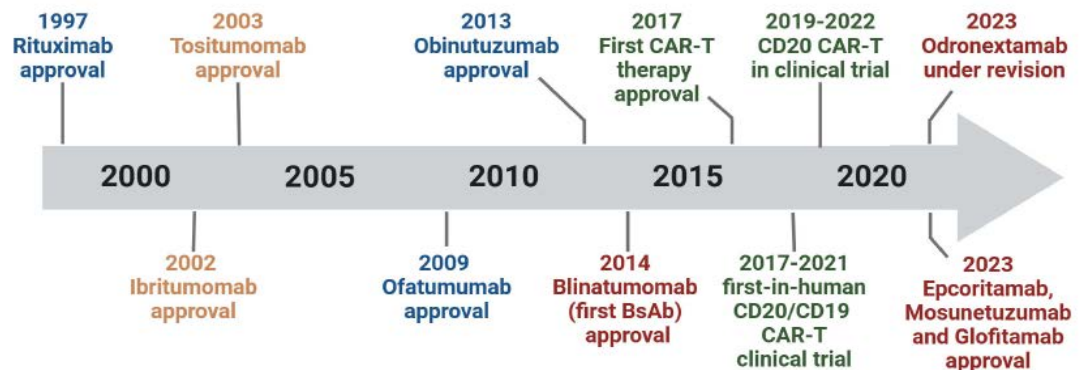


CAR T-terapija in terapije z monoklonskimi protitelesi

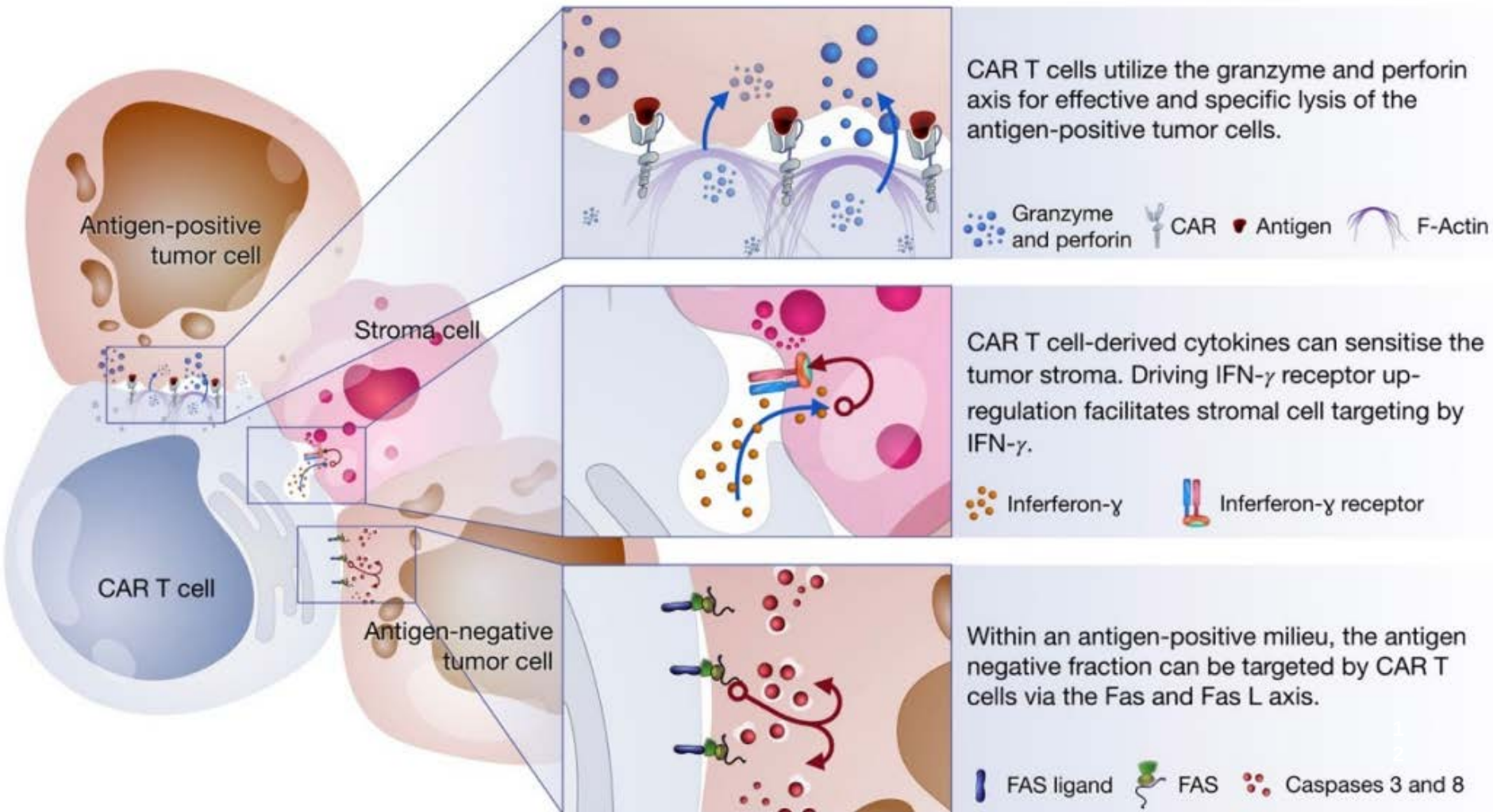
Terapija s T-celicami CAR je podobna obstoječim terapijam s protitelesi (npr. Rituksimab – himerno (mišje/človeško) monoklonsko protitelo proti proteinu CD20. Podoben mehanizem delovanja, ker se veže na limfocite B in jih uniči. CAR-T: dolgoročna odstranitev limfocitv B (leta) z enkratnim odmerkom; tkivu skrite celice; od komplementa neodvisna liza



Lahko se primerja tudi z bispecifičnimi terapijam z monoklonskimi protitelesi za vključitev T-celic (BiTE) (npr. blinatumomab – CD19/CD3). Obe terapiji temeljita na interakciji T-celic z malignim celicami. Neželeni učinki so lahko podobni tistim povezanim s T-celicami CAR. CAR-T: dolgoročna odstranitev limfocitv B (leta) enkratnim odmerkom;



CAR T- mehanizmi uničevanja tarčnih celic



Povzroča lizo antigen-pozitivne tumorske celice. Modulira tumorsko mikrookolje s senzibilizacijo tumorske strome. Povzroča lizo antigen-negativnih tumorskih celic prek apoptotičnih mehanizmov

Prednosti CAR-T terapij

Celice CAR T ohranijo dolgoročni učinek "presadka" proti tumorju

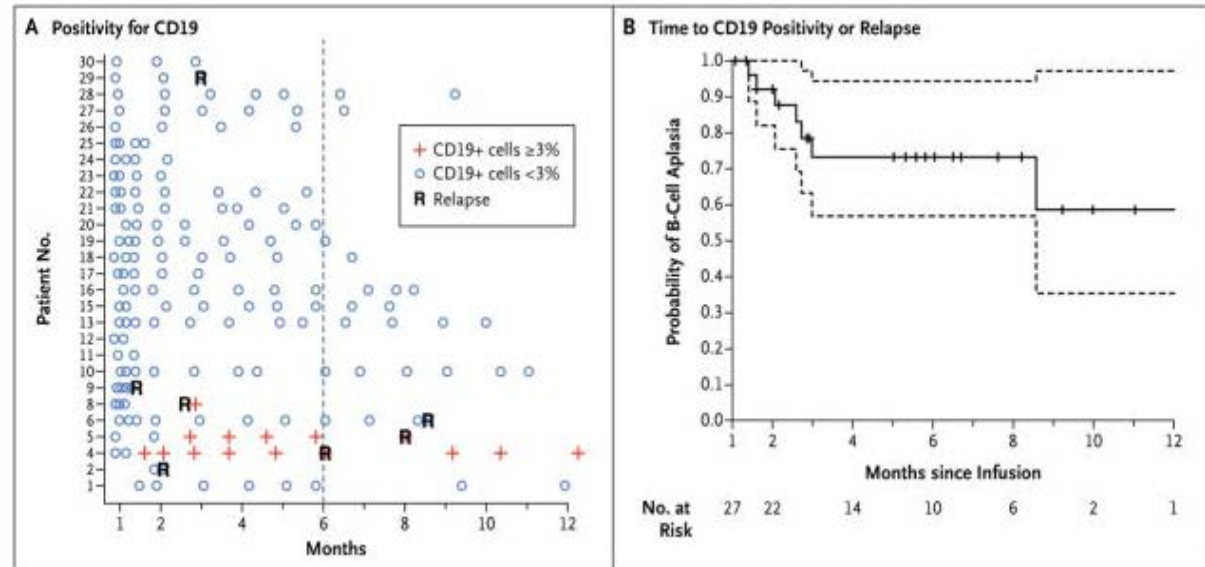
Od HLA neodvisno prepoznavanje antigena, zato univerzalna uporaba

Hitro ustvarjanje tumorsko specifičnih T-celic

Aktiven tako v CD4+ kot CD8+ T-celicah

Ker uporablja pacientove lastne celice, ni zapletov pri presadku proti gostitelju

Ciljni antigeni vključujejo beljakovine, ogljikove hidrate in glikolipide



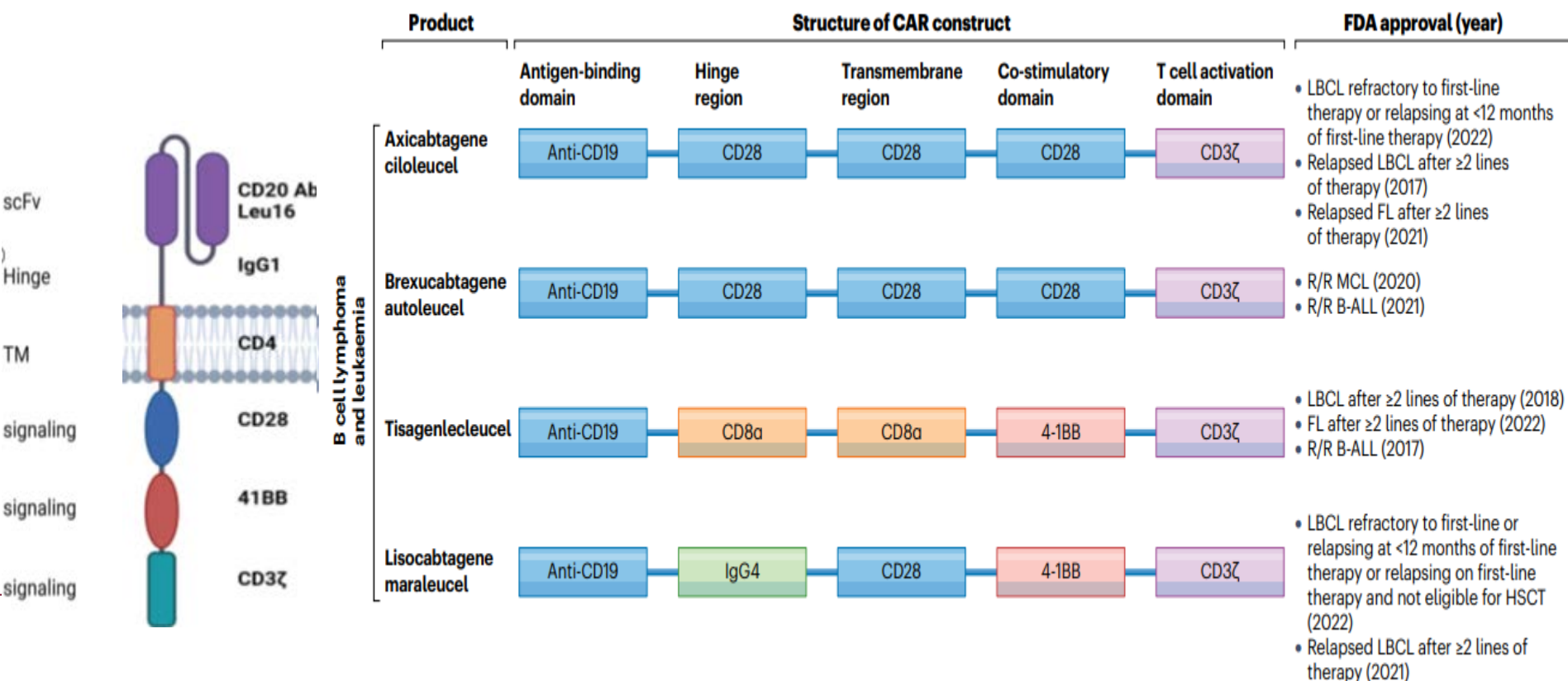
Aplazijo B-celic lahko uporabimo kot merilo delovanja CAR-T (CD19). Aplazija B-celic se je pojavila pri vseh bolnikih, ki so imeli odziv in so vztrajali do 1 leta po tem, ko celic CTL019 ni bilo več mogoče zaznati s pretočno citometrijo.

Z obdobjem spremljanja 24 mesecev 90-odstotna stopnja popolne remisije med bolniki, ki so prejeli CTL019 za ALL, pri kateri se je ponovila ali je bila neodzivna. Relapsi so bili povezani bodisi s pomanjkanjem obstojnosti CTL019 bodisi z različicami pobega CD19.

CAR-T celična zdravila, registrirana v EU (EMA)

CAR-T z izraženim anti-CD19 CAR
 Kymriah (tisagenlecleucel),
 Yescarta (axicabtagene ciloleucel),
 Tecartus (brexucabtagene autoleucel),
 Breyanzi (lisocabtagene maraleucel)

Ekspresija CD19 je omejena na B-celice in folikularne dendritične celice
 CD19 ni izražen na pluripotentnih matičnih celicah kostnega mozga
 CD19 se izraža na površini večine malignomov B-celic
 Protitelesa proti CD19 zavirajo rast tumorskih celic z izraženim CD19



CAR-T celična zdravila, registrirana v EU (EMA)

CAR-T z izraženim anti-CD19 CAR

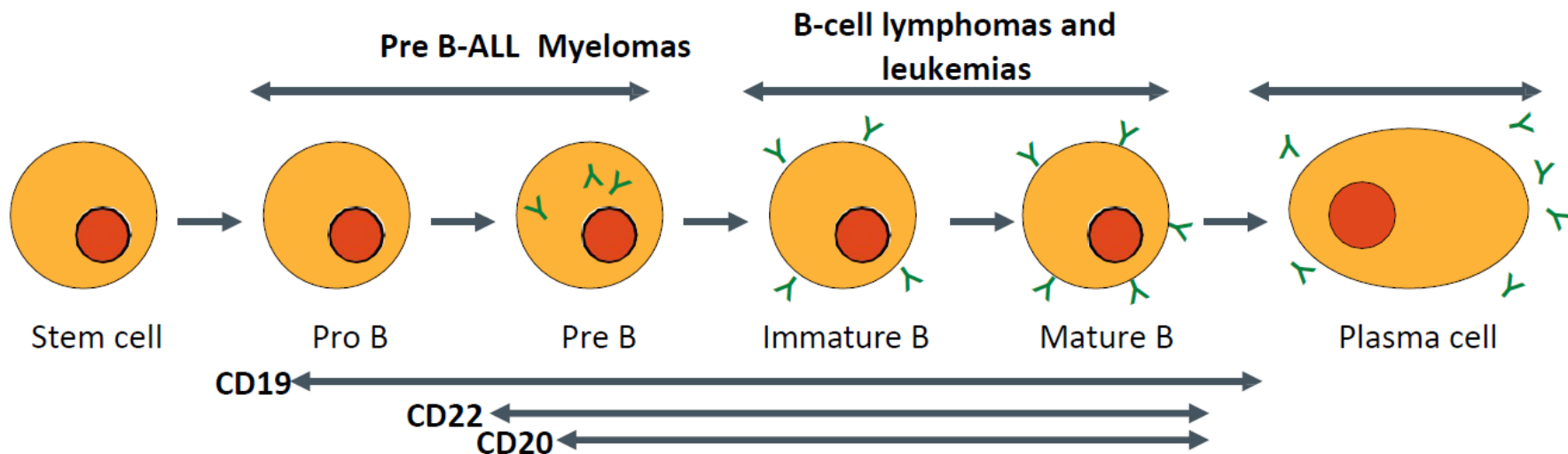
Kymriah (tisagenlecleucel),
Yescarta (axicabtagene ciloleucel),
Tecartus (brexucabtagene autoleucel),
Breyanzi (lisocabtagene maraleucel)

Ekspresija CD19 je omejena na B-celice in folikularne dendritične celice

CD19 ni izražen na pluripotentnih matičnih celicah kostnega mozga

CD19 se izraža na površini večine malignomov B-celic

Protitelesa proti CD19 zavirajo rast tumorskih celic z izraženim CD19



CAR-T celična zdravila, registrirana v EU (EMA)

CAR-T z izraženim anti-BCMA (B-cell maturation antigen) na površini normalnih in malignih plazmatk

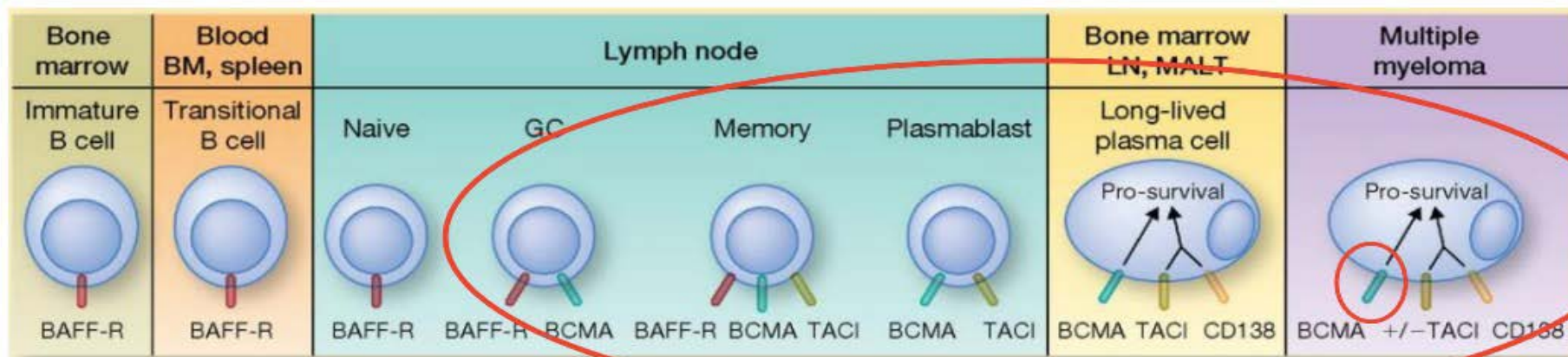
Abecma (idecabtagene vicleucel)

Carvykti (ciltacabtagene autoleucel)

BCMA kot tarča za multipli mielom

Antigen zorenja celic B - član superdružine receptorjev TNF

- Veže 2 liganda (BAFF in APRIL)
- Izražanje je v veliki meri omejeno na plazmatke in zrele limfocite B
- Izraženo na veliki večini celic multiplega mieloma



CAR T- terapije še niso odobrene kot prva linija zdravljenja

Posledično ni študij, ki bi primerjale učinkovitost različnih protitumorskih terapij (kemoterapija, monoklonska protitelesa, CAR-T, bispecifična protitelesa) v istem stadiju bolezni in pri enakem bolnikovem stanju.

Glede na to, da je za uspeh potrebna nedotaknjena populacija T-celic, se domneva, da lahko zgodnejše zdravljenje povzroči močnejše terapevtske rezultate v primerjavi z uporabo CAR-T kot „rešilnega zdravljenja“ po neuspehu kemoterapije. Poročila kažejo, da imajo lahko bolniki z obsežno izpostavljenostjo kemoterapiji težave zaradi manj ustreznega pripravka CAR-T (CD19-pozitivni recidivi)

Tisagenlecleucel (Kymriah®) has been approved by the US Food and Drug Administration (FDA) since 2017 for the treatment of:

- Patients up to 25 years of age with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) that is either refractory or in a second or later relapse
- Adult patients with relapsed or refractory large B-cell lymphoma—after two or more lines of systemic therapy—including: diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) not otherwise specified (NOS), high-grade B-cell lymphoma, and DLBCL arising from follicular lymphoma (FL)
- Adult patients with relapsed or refractory FL after two or more lines of systemic therapy

CAR T- klinične študije (clinicaltrials.gov)

Omogočijo vključitev bolnikov, ki ne izpolnjujejo meril za odobritev FDA/EMA registriranih zdravil

Bolnikom lahko ponudijo zdravljenje z izdelkom T-celic CAR, usmerjenim na alternativni antigen (tj. ne CD19 ali BCMA)

Trenutno obstajajo klinična preskušanja, ki bolnikom omogočajo, da prejmejo izdelek, odobren s strani FDA/EMA, ki ne ustreza proizvodnim specifikacijam

Proizvodne ovire še vedno vplivajo na število celic T, sposobnih za preživetje, dostavljenih v katerem koli danem odmerku izdelka T-celic CAR

Klinična preskušanja lahko bolnikom ponudijo možnost prejemanja terapije s T-celicami CAR v zgodnejših fazah bolezni

Multipli mielom

- CD38
- BCMA
- CD19
- CS1

Rak dojke

- ROR1
- TnMUC1
- CD70
- MNC2-CAR44 (targets MUC1)

Rak pljuč

- ROR1
- TnMUC1
- Mesothelin

Rak prostate

- PSMA
- PSCA

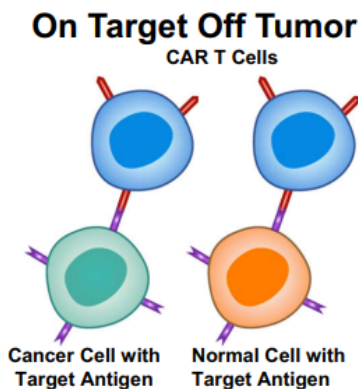
Izzivi kliničnih študij: neželjeni učinki "na tarčo izven tumorja,, (on-target off-tumor effects)

Ciljni tumorski antigeni CAR-T so pogosto izraženi tudi na normalnih tkivih v različnih ravneh.

Zlasti tumorski antigeni solidnih tumorjev so pogosto izraženi tudi na več normalnih tkivih na različnih ravneh.

Izbira antigena je ključnega pomena pri oblikovanju CAR za omejitev toksičnosti "na tarčo izven tumorja". Pri solidnih tumorjih je rešitev lahko ciljanje na tumorsko omejene posttranslacijske modifikacije, kot so čezmerno izraženi okrnjeni O-glikani: Tn (GalNAc1-O-Ser/Thr) in sialil-Tn (STn)

(NeuAca2–6-GalNAc1-O-Ser/Thr)



Antigen	Hematologic Malignancy	Potential Normal Tissue Impacted
CD5	T-ALL, T-cell lymphoma	Normal T cells
CD7	T-ALL, T-cell lymphoma	Normal T cells
CD19	ALL, CLL, NHL	Normal B cells
CD20	ALL, CLL, NHL	Normal B cells
CD22	B cell leukemias; B-cell lymphomas	Normal B cells
Igκ	CLL, NHL, myeloma	Normal B cells
ROR1	CLL, NHL	Pancreas parathyroid, adipose (fat) tissue
CD30	NHL, HL	Resting CD8 T cells
CD33	AML	Multipotent myeloid precursors, unipotent colony-forming cells, and maturing granulocytes and monocytes
CLL-1	AML	Peripheral blood leukocytes and in the spleen
CD138	Myeloma	Precursor and plasma B cells, epithelia
CD123	AML	Bone marrow myeloid progenitors, B cells, mast cells, monocytes, macrophages, endothelial cells
BCMA	Myeloma	B cells

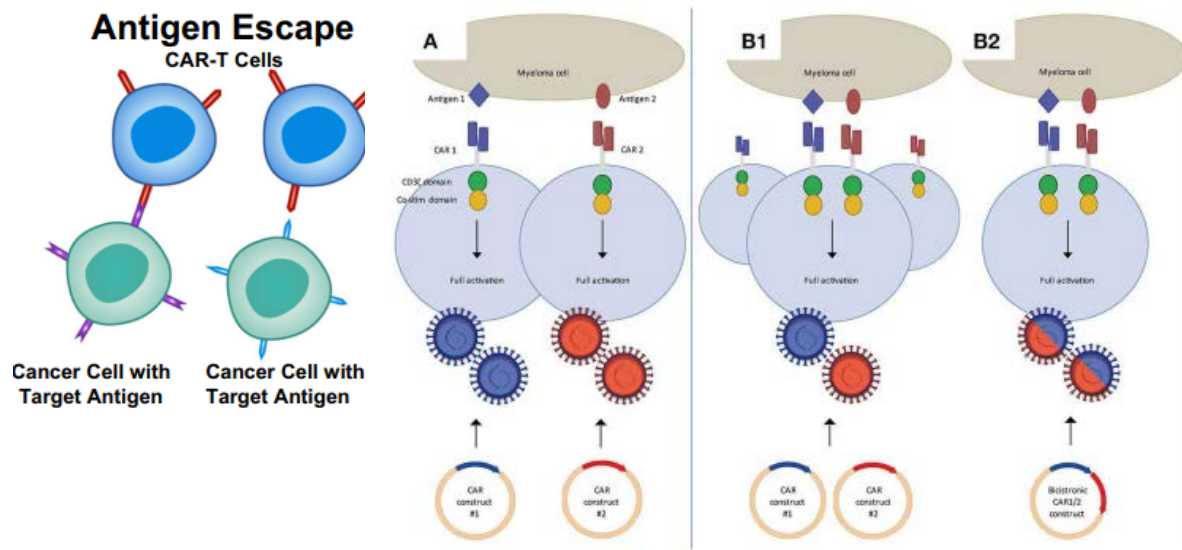
Izzivi kliničnih študij: „antigenski pobeg“

Celice CAR-T, čeprav so prisotne, ne kažejo tumorske supresije zaradi delne ali popolne izgube izražanja ciljnega antigena s tumorskimi celicami.

REŠITEV: Ciljanje na več antigenov (dvojni ali tandemski CAR)

Hematološki tumorji: CAR, usmerjeni na CD19/CD22, za zdravljenje ALL/DLBCL in CD19/BCMA, usmerjeni na multipli mielom

Solidni tumorji: HER2/IL13Ra2 (glioblastom) in HER2/MUC1 (rak dojke) CAR povzročijo boljše protitumorske odzive v primerjavi z enojno tarčno terapijo

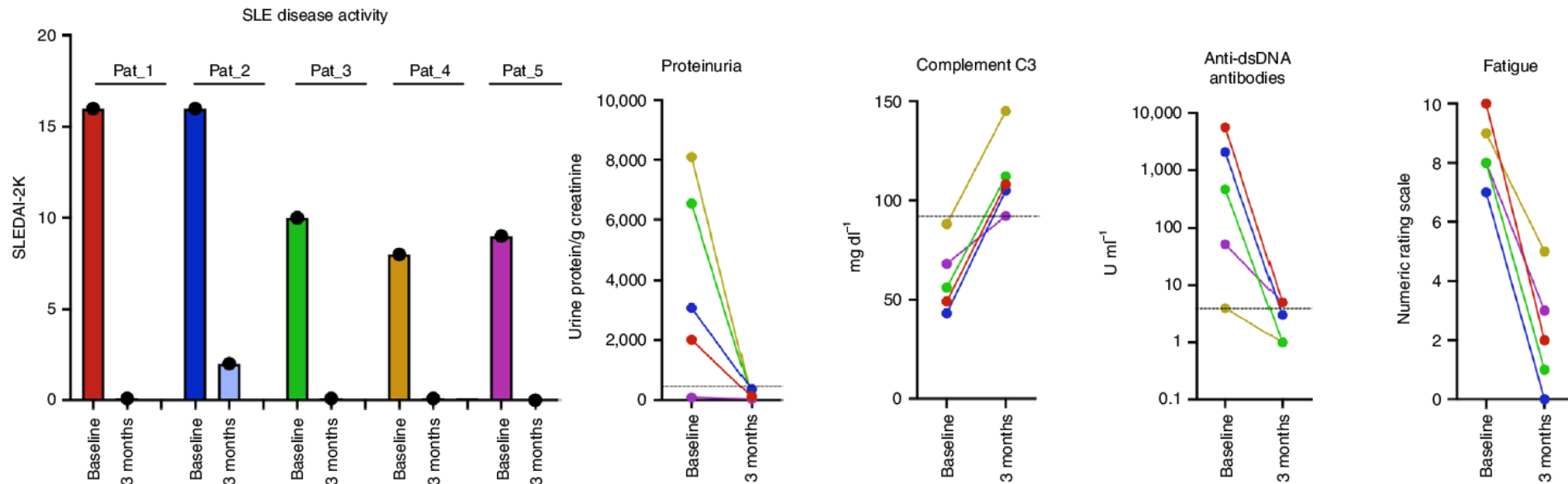


(A) Mixture of two pools of single CAR T-cells in which each pool targets a different antigen. These can be co-infused or sequentially infused into a patient. (B) Two CARs targeting distinct antigens expressed on one T-cell through the use of co-transduction (B1) or a bicistronic vector (B2).

Priložnosti kliničnih študij: avtoimunske bolezni

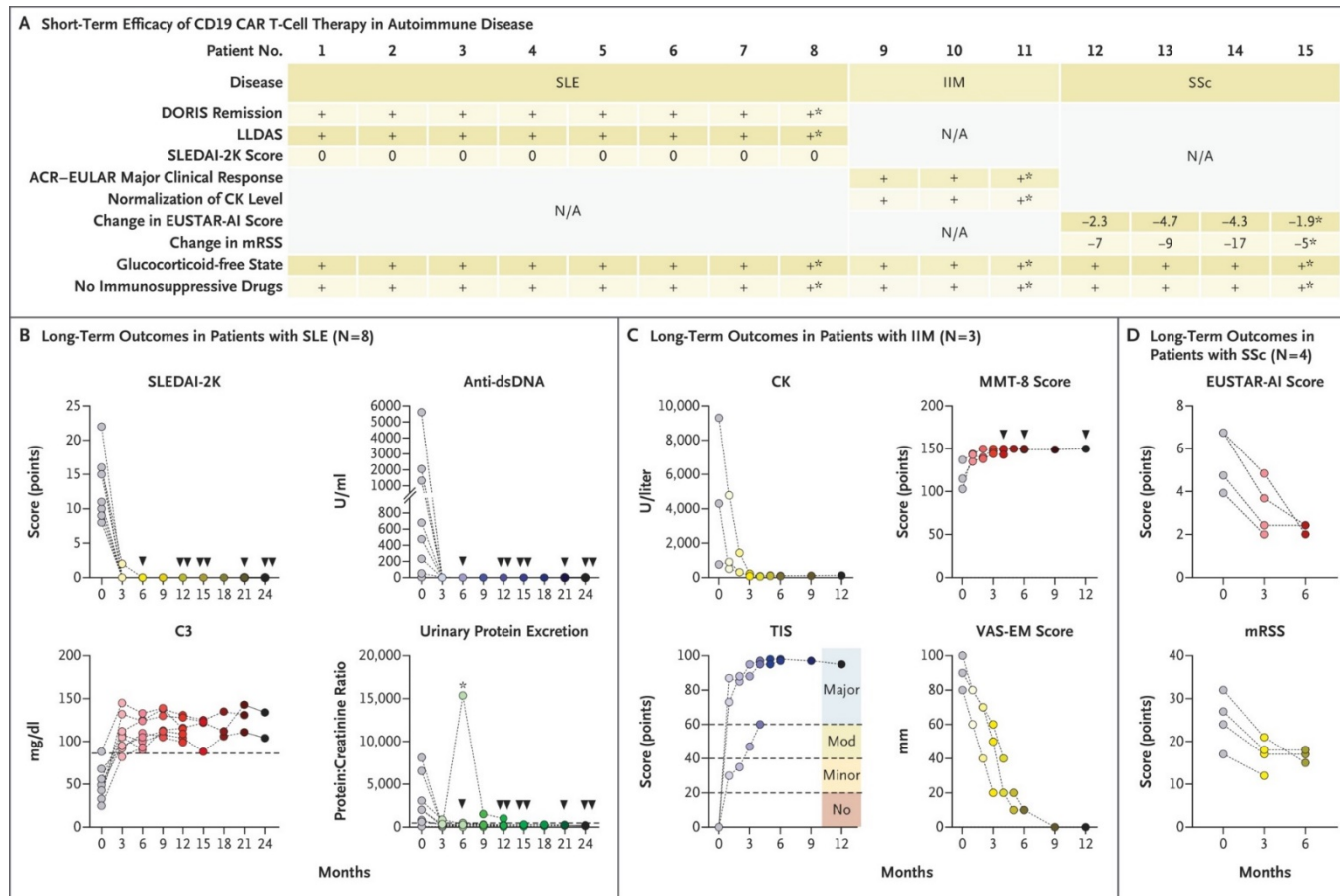
Anti-CD19 CAR T cell therapy for refractory systemic lupus erythematosus. Nat Med 28, 2124–2132 (2022)

SLE refractory to several immunosuppressive drug treatments were enrolled in a compassionate-use CAR T cell program. Remission of SLE according to DORIS criteria was achieved in all five patients after 3 months. Drug-free remission was maintained during longer follow-up (median (range) of 8 (12) months after CAR T cell administration) and even after the reappearance of B cells, which was observed after a mean ($\pm$ s.d.) of 110 ± 32 d after CAR T cell treatment. Reappearing B cells were naïve and showed non-class-switched B cell receptors. CAR T cell treatment was well tolerated with only mild cytokine-release syndrome.



Clinical Efficacy of CD19 CAR T-Cell Therapy in Autoimmune Disease

All the patients had a decrease in the score on the EUSTAR activity index. Immunosuppressive therapy was completely stopped in all the patients.



Clinical Efficacy of CD19 CAR T-Cell Therapy in Autoimmune Disease

15 patients with severe SLE (8 patients), idiopathic inflammatory myositis (3 patients), or systemic sclerosis (4 patients) who received a single infusion of CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cells after preconditioning with fludarabine and cyclophosphamide. Efficacy up to 2 years after CAR T-cell infusion was assessed by means of Definition of Remission in SLE (DORIS) remission criteria

Grade 1 cytokine release syndrome occurred in 10 patients. One patient each had grade 2 cytokine release syndrome, grade 1 immune effector cell–associated neurotoxicity syndrome, and pneumonia that resulted in hospitalization.

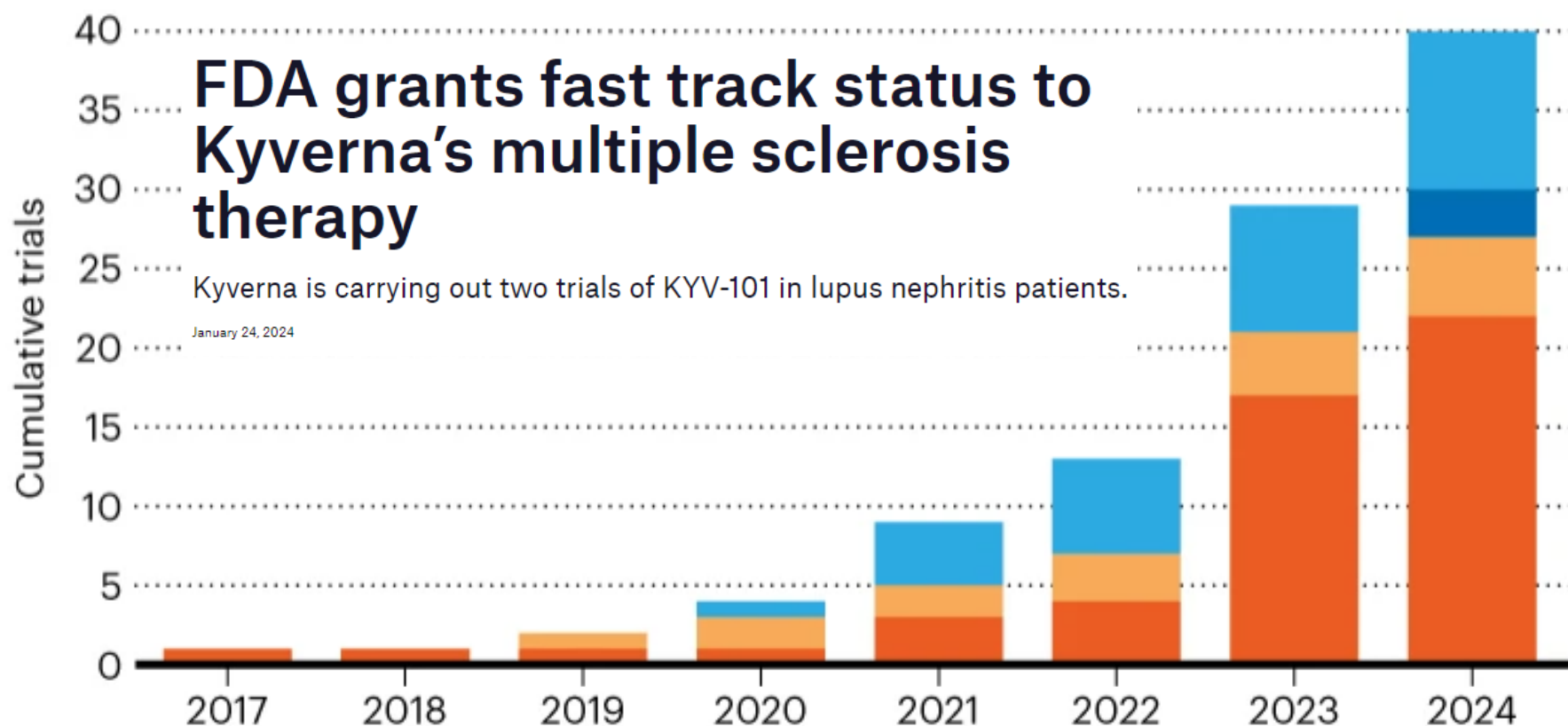
The median follow-up was 15 months (range, 4 to 29). The mean ($\pm$ SD) duration of B-cell aplasia was 112 ± 47 days. All the patients with SLE had DORIS remission, all the patients with idiopathic inflammatory myositis had an ACR–EULAR major clinical response, and all the patients with systemic sclerosis had a decrease in the score on the EUSTAR activity index. Immunosuppressive therapy was completely stopped in all the patients.

CD19 CAR T-cell transfer appeared to be feasible, safe, and efficacious in three different autoimmune diseases, providing rationale for further controlled clinical trials.

ENLISTING IMMUNE CELLS TO TREAT AUTOIMMUNE DISEASE

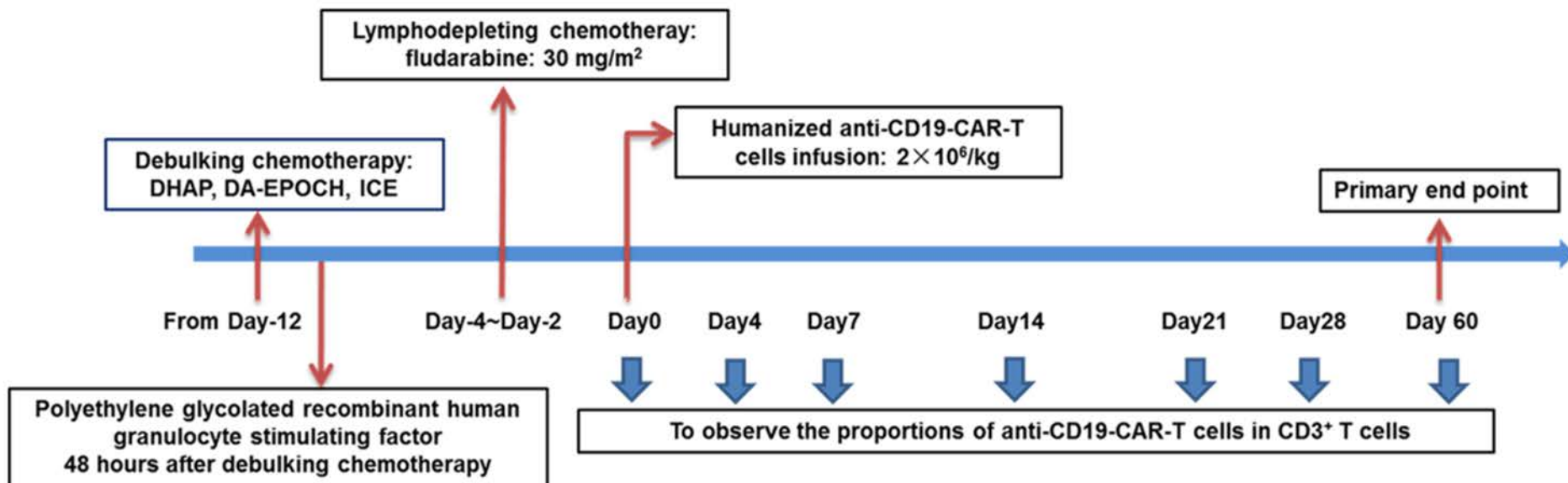
The number of clinical trials of CAR T cells — engineered immune cells — used to treat autoimmune disorders has grown rapidly over the past seven years. Testing of CAR-T therapy for the autoimmune disorder lupus accounts for the bulk of the trials.

■ Lupus ■ Myasthenia gravis ■ Multiple sclerosis ■ Other



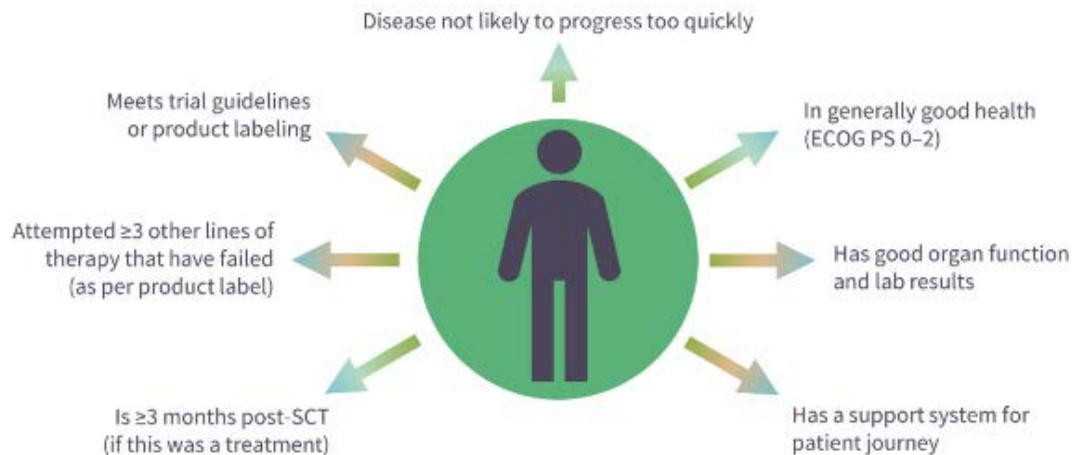
Potek terapije s celicami CAR-T

- Izbor bolnikov
- Zbiranje bolnikovih celic T
- Postopki pri pridobivanju CAR-T
- Debulking - kemoterapija za zmanjšanje bremena bolezni
- Limfodeplecija – kemoterapija za zmanjšanje endogenih, nemodificiranih celic T in izboljšanje odziva na terapijo s celicami CAR-T
- Aplikacija celic CAR-T
- Spremljanje zdravljenja in neželenih učinkov



Omejitve izbora bolnikov za CAR T-celično terapijo

- Nevrološka, srčna, pljučna, jetrna in ledvična funkcija po odobritvi onkologa
- Brez nenadzorovanih okužb
- Ne more imeti akutne GVHD
- Velika tumorska masa, ki vpliva na delovanje organov; lahko koristi razbremenitev s kemoterapijo pred uvedbo CAR-T
- Bolniki morajo imeti funkcionalno rezervo, da prenesejo limfodeplecijsko terapijo, običajno ciklofosfamid in fludarabin.
- Ker sta nevrotoksičnost in delirij komponenti toksičnosti T-celic CAR, nekatere ustanove razmišljajo o psihiatričnem pregledu



Zbiranje bolnikovih celic T

Priprava pred zdravljenjem, da se določi zdravstveno stanje in funkcionalna rezerva bolnika

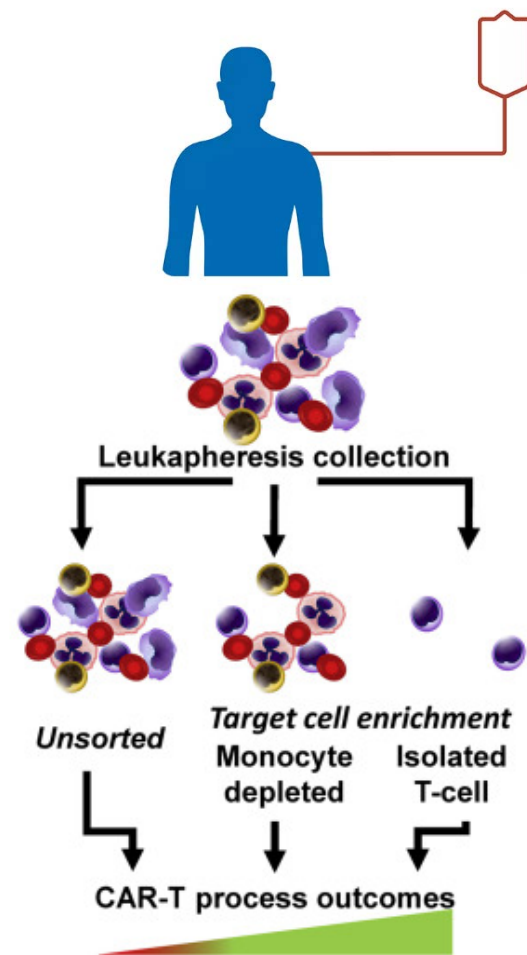
Lahko vključuje: BMA, PFT, funkcionalna testiranja, ECHO, MRI/CT, celične in biokemijske preiskave

Celice T, pridobljene z biopsijo ali aferezo

V različnih obdobjih pridobivanja celic se lahko ugotovi, da je vzorec nezadosten

Kakovost vzorca je lahko odvisna od predhodne izpostavljenosti kemoterapiji in stopnje imunske pomanjkljivosti

Po izolaciji celic T od bolnika se celice dostavijo v proizvodni laboratorij za pripravo CAR-T celičnega zdravila



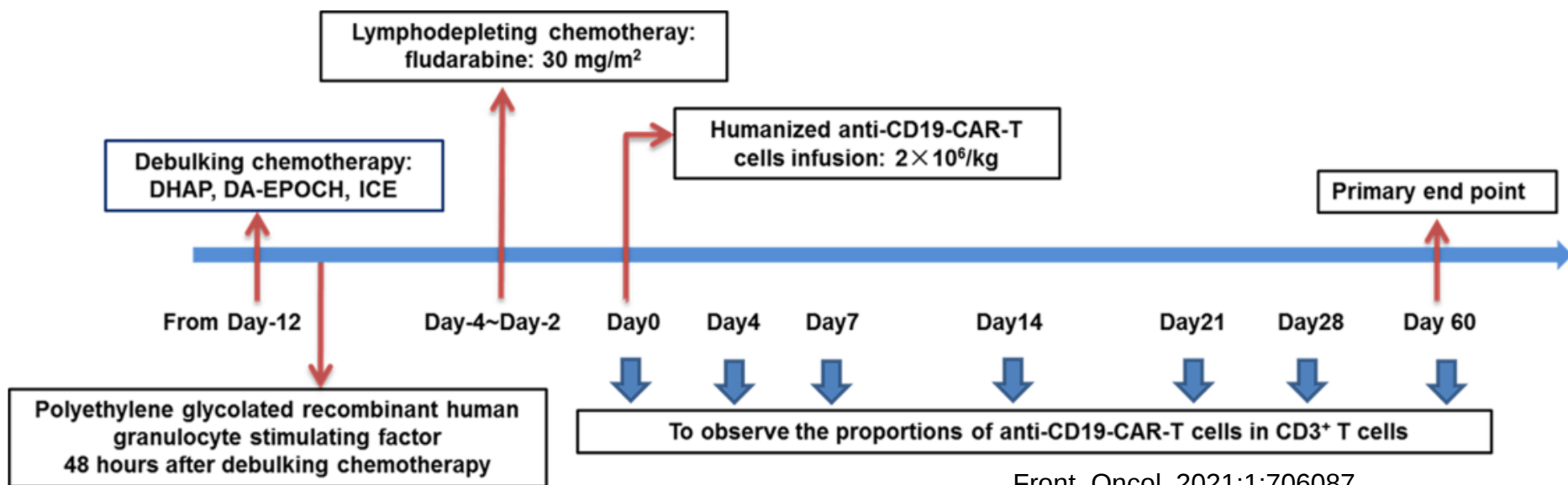
Zou Y, et al. *J Hematol Oncol.* 2018;11:130.

BMA, bone marrow aspirate; echo, echocardiogram; PFT, pulmonary function testing.

Debulking - kemoterapija za zmanjšanje bremena bolezni

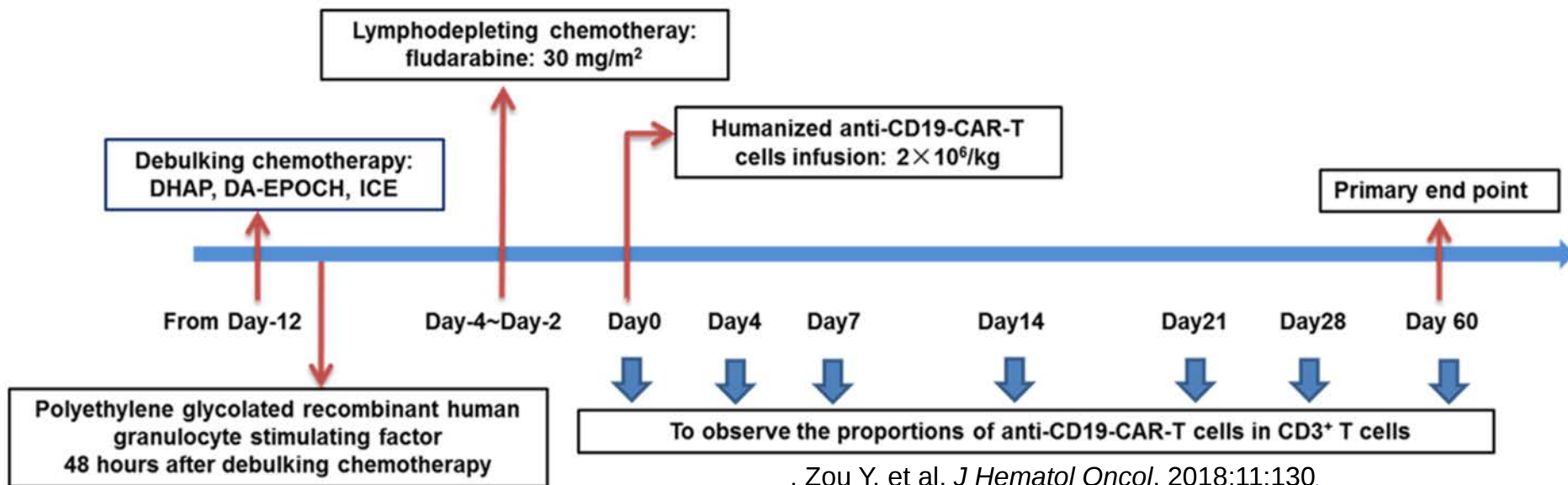
Zmanjšati maso tumorskih celic, da se zmanjša verjetnost sindroma tumorske lize (CRS), ker so bolniki z obsežno boleznijo ali čezmerno količino blastov v kostnem mozgu znatno bolj izpostavljeni CRS. Običajno se uporabi standardni režim (npr. ICE, EPOCH, hiper-CVAD), tudi če je bila bolezen predhodno neodzivna ali odporna na kemoterapijo

EPOCH, etoposide phosphate, prednisone, vincristine sulfate, cyclophosphamide, and doxorubicin hydrochloride; ICE, ifosfamide, carboplatin, and etoposide; hyper-CVAD, hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and dexamethasone.



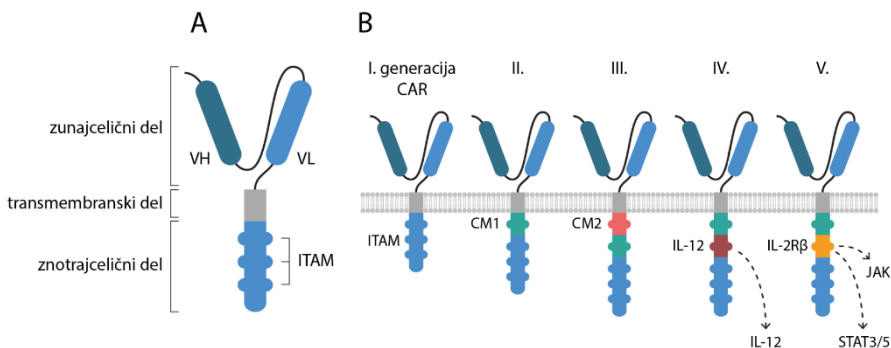
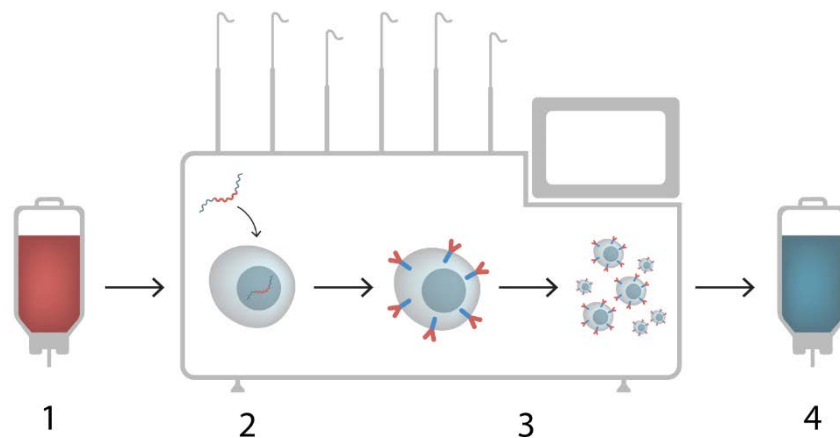
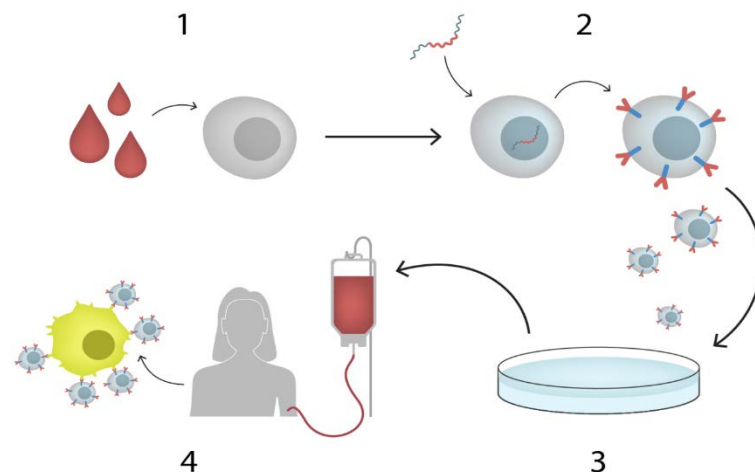
Limfodeplecija - za zmanjšanje endogenih, nemodificiranih celic T in izboljšanje odziva na terapijo s celicami CAR-T

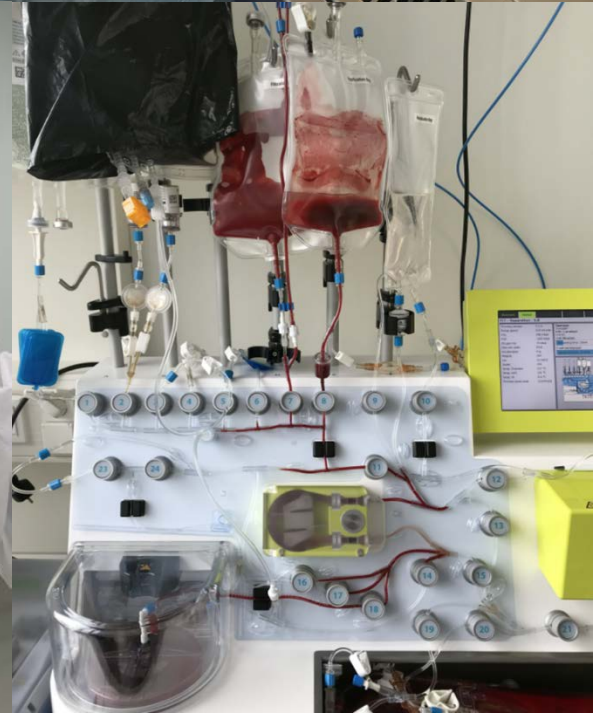
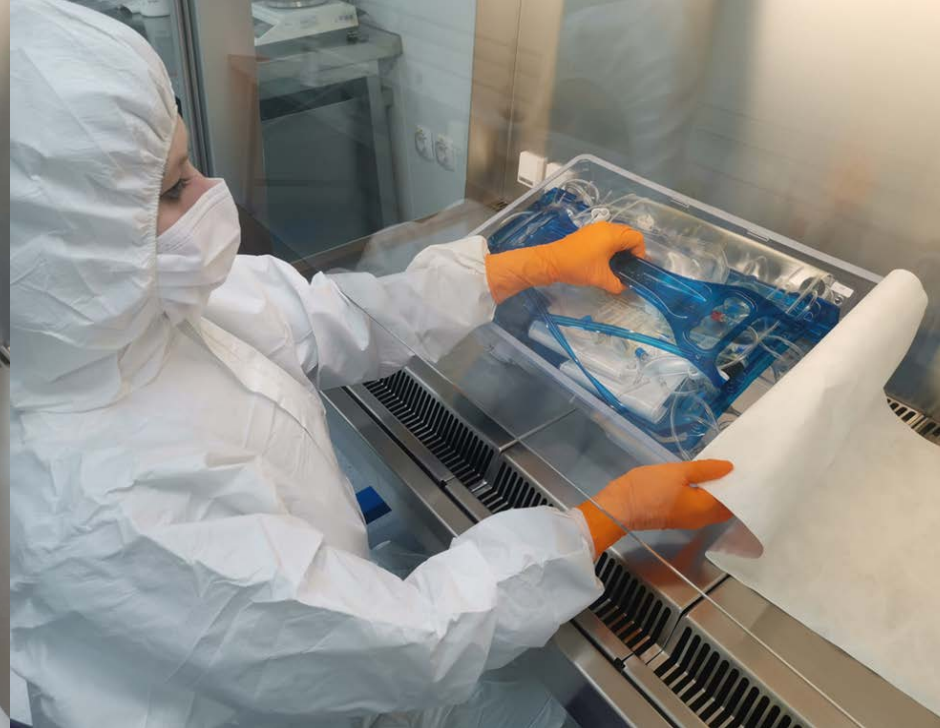
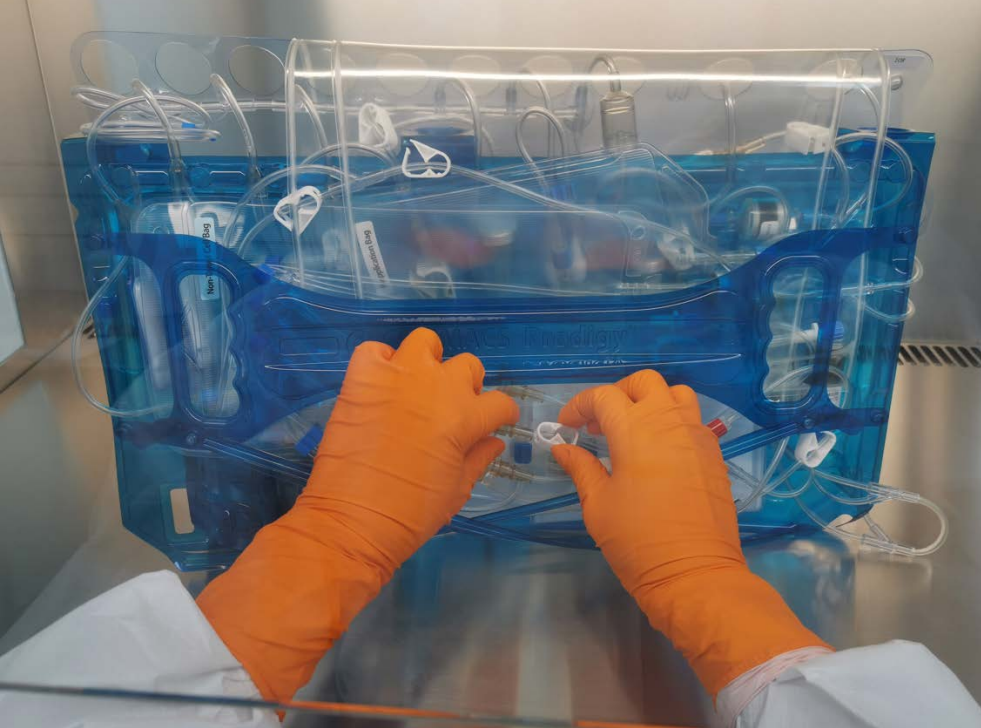
Limfodeplecija je kemoterapija pred infuzijo celičnega produkta. Navadno sestoji iz terapije s ciklofosfamidom in fludarabinom. Ob pancitopeniji se v skladu s smernicami lahko opusti. Ne gre za mieloablacijo kot pri presaditvi krvotvornih matičnih celic.



Postopki pri pridobivanju CAR-T

- Levkofereza (produkt: PBMC)
- Prodigy – imunomagnetna selekcija Th in Tc (zaprt sistem)
- Inkubacija z antigenom
- Izolacija aktiviranih LyT
- Genetska modifikacija
- Pomnoževanje-bioreaktor
- Spiranje
- Kontrola/transport
- Aplikacija





Terapije navadno trajajo 2 – 4 tedne

Isolation of PBMCs from whole blood or apheresis product



1

T-cell selection (+ enrichment if required) and activation



2

Transduction with the gene of interest using viral or other vector systems



3

CAR-T cell expansion (in static or dynamic culture)



4



5



Final formulation and fill steps

6



Cryopreservation of CAR-T cell product

7

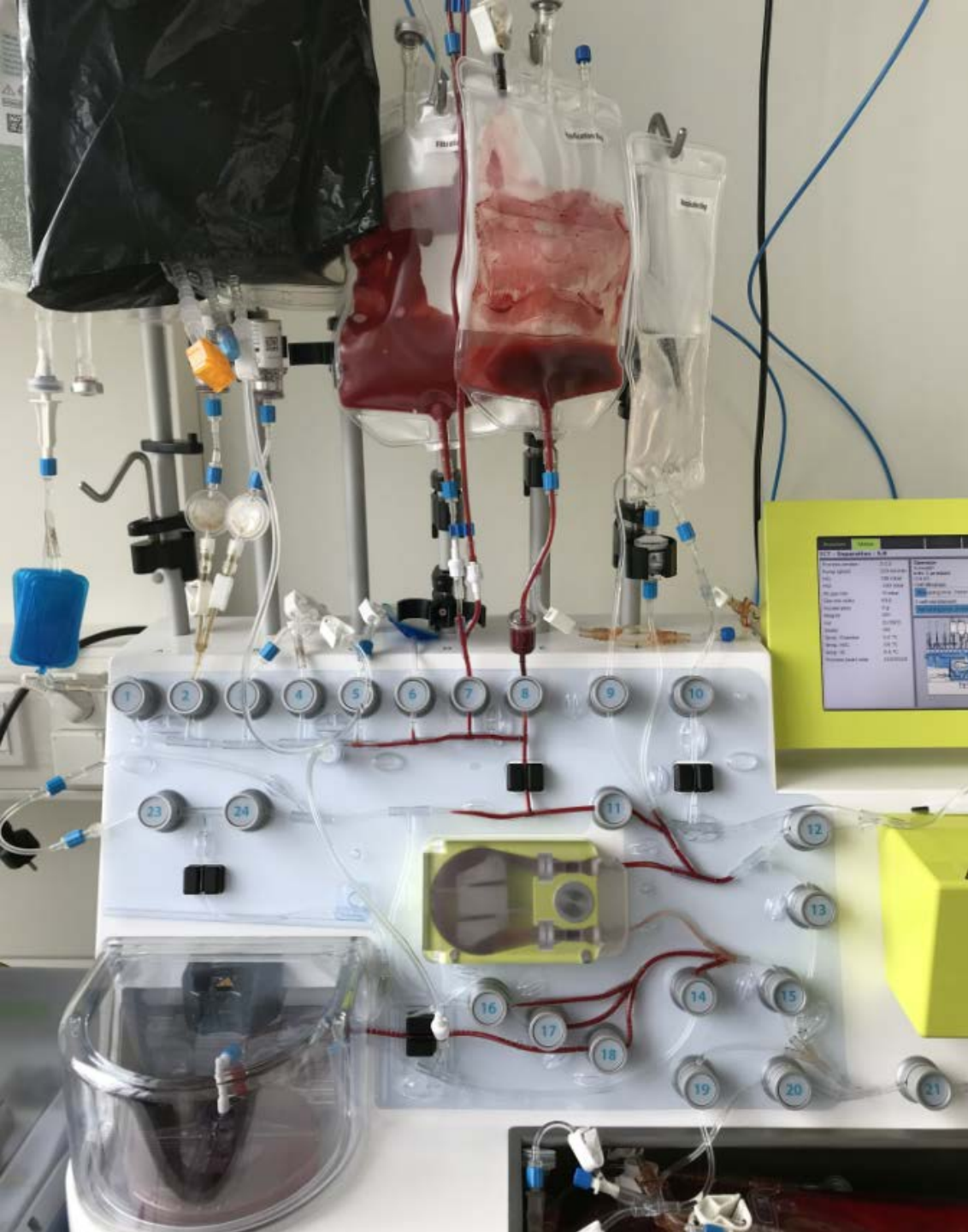


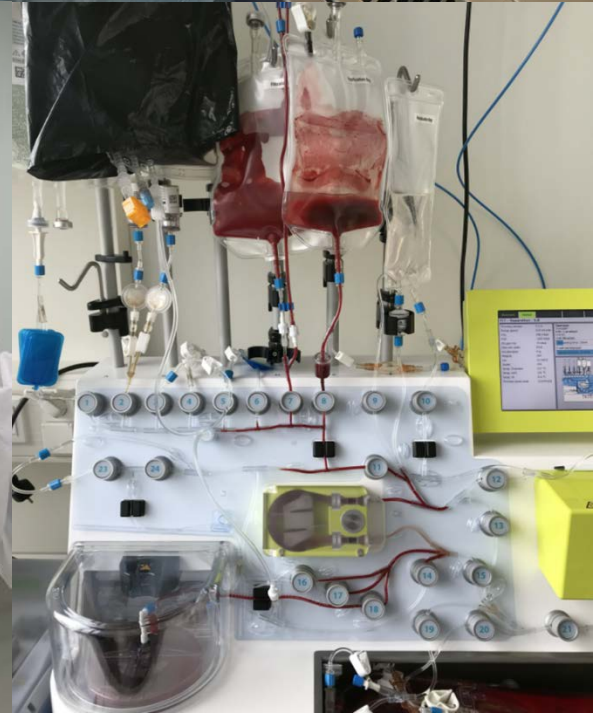
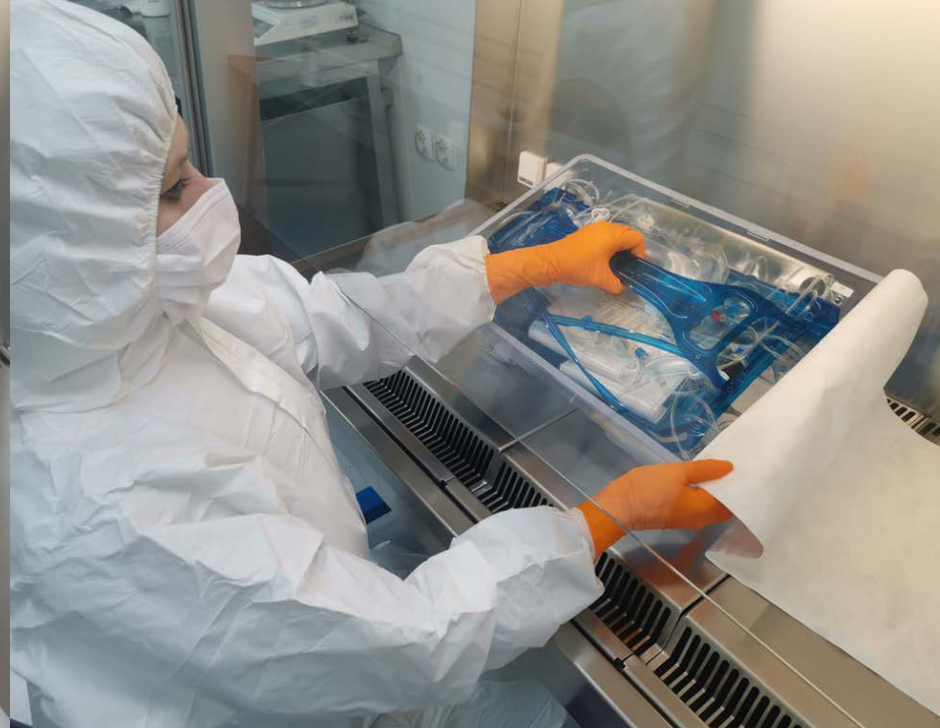
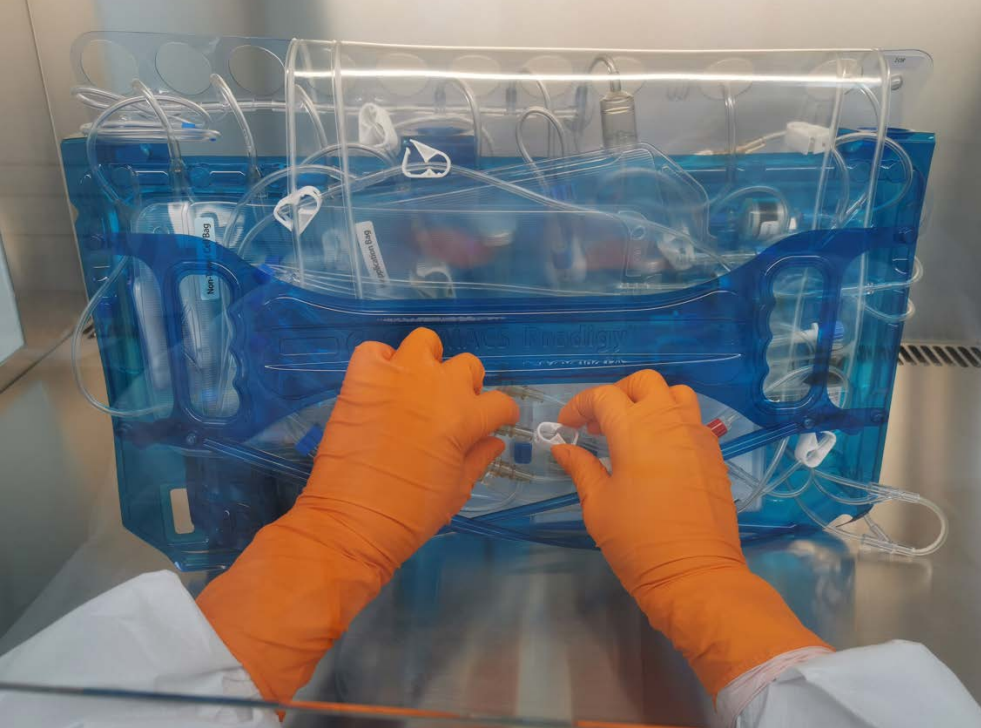
Quality control testing for identity, sterility, purity, and potency

8



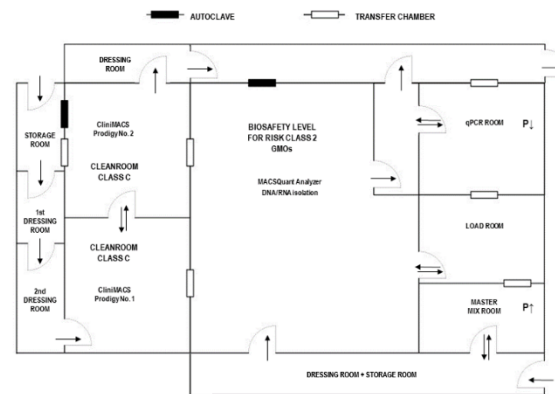
Shipment to clinical site and product administration





Vzpostavitev pogojev za začetek terapije: prostori, dovoljenja, šolanje

- vzpostavitev čistih sob razreda D (ISO8), ki ustrezajo tudi pogojem za delo z GSO 2. varnostnega razreda,
- vpostavitev laboratorija za kontrolo kakovosti proizvodnje CAR-T,
- uvedba proizvodne CAR T celične terapije in kontrole kakovosti,
- pridobitev dovoljenja za uporabo izdelka, ki vsebujejo GSO
- pridobitev dovoljenja za pripravo nerutinsko pripravljenih zdravil za napredno zdravljenje s strani JAZMP
- šolanje osebja za delo z CliniMACS Prodigy
- šolanje osebja za delo z MACSQuant Analyzer
- validacija qPCR za kontrolo kakovosti



Hvala!!

