



Ny analysmetod för att visa på risk och effekt vid **immunterapi**

I en ny studie visar forskare vid Uppsala universitet, Akademiska sjukhuset och Immunneed AB skillnader i hur antikroppen rituximab interagerar med blod från friska personer jämfört med patienter med kronisk lymfatisk leukemi. Nu väcks hopp om att analysmetoden ska bana väg för viktiga genombrott inom immunterapeutisk forskning och vård. Den senaste kunskapen från detta högintressanta fält beskrivs här av forskarna **Mattias Mattsson** och **Sara Mangsbo**.

Vi har i en nyligen publicerad artikel¹ beskrivit användandet av en ny analysmetod (loopmodellen) som en i framtiden potentiellt möjlig metod att värdera anti-tumöreffekt samt risken för bieffekter vid immunterapi.

Målriktade antikroppsläkemedel har sedan mer än 20 år använts inom onkologi/hematologi och deras användningsområde, och antalet nya antikroppar ökar stadigt. Initialt utvecklades läkemedel som riktades mot tumörceller och dess ytproteiner, vilket leder till cellavdödning genom

ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) och CDC (complement-dependent cytotoxicity). Idag används också antikroppar för att målsöka immunceller och aktivera immunförsvaret genom att blockera negativa reglermekanismer. Exempel på detta är antikroppar mot check-point-molekyler (PD1/PDL1 eller CTLA-4) som förhindrar en negativ inhibering av immunförsvaret^{2,3}. En annan mekanism är agonistiska antikroppar som aktiverar receptorer inom tumörnekros-receptorfamiljen (TNFR) som stimulerar vårt immunförvar^{1,4}.



CD20, som målsöks av rituximab, uttrycks både på friska B-celler och maligna tumörceller. Rituximab är också den antikropp som alltsedan godkännandet 1997 fått störst användning inom onkologi/hematologi. Från att ha utvecklats för att behandla hematologiska sjukdomar har användningsområdet växt och idag behandlas bland annat även ett stort antal patienter med olika typer av autoimmuna sjukdomar⁹. Infusionsrelaterade reaktioner är välkända och vanliga, och en klinisk riskvärdering (tumörbörda, övrig sjuklighet mm) görs före behandlingsstart. Trots det föreligger en stor individuell skillnad i biverkningar av behandlingen. Behandlingseffekten varierar också från patient till patient.

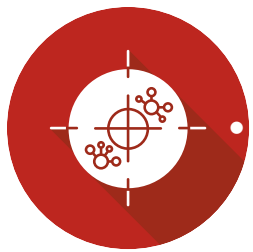
ANALYSERAR SÄKERHET OCH EFFEKT

Vid utvecklande av monoklonala antikroppar genomförs en utvecklingsfas, innan de förs in i kliniken, under vilken både säkerhet och effekt analyseras. Antikropparnas effekter/bieffekter beror inte enbart på typen av målcell utan också på hur deras konstanta del utformas. Vid tumörbehandling designas antikroppar vanligen med en IgG1 typ, detta på grund av att IgG1 leder till en lång halveringstid, men också för att säkerställa att antikroppen kan aktivera kaskadsystem (komplementsystemet) och receptorer i det medfödda immunförsvaret, de så kallade Fc-receptorerna. Dessa receptorer finns på de så kallade Naturliga Killer-cellerna (NK-celler) men också på monocyter, makrofager, B-celler och neutrofiler. Fc-receptorerna finns i olika format och mängder på olika immunceller. NK-cellerna kan aktiveras när en antikropp har dekorerat en cellyta och genom

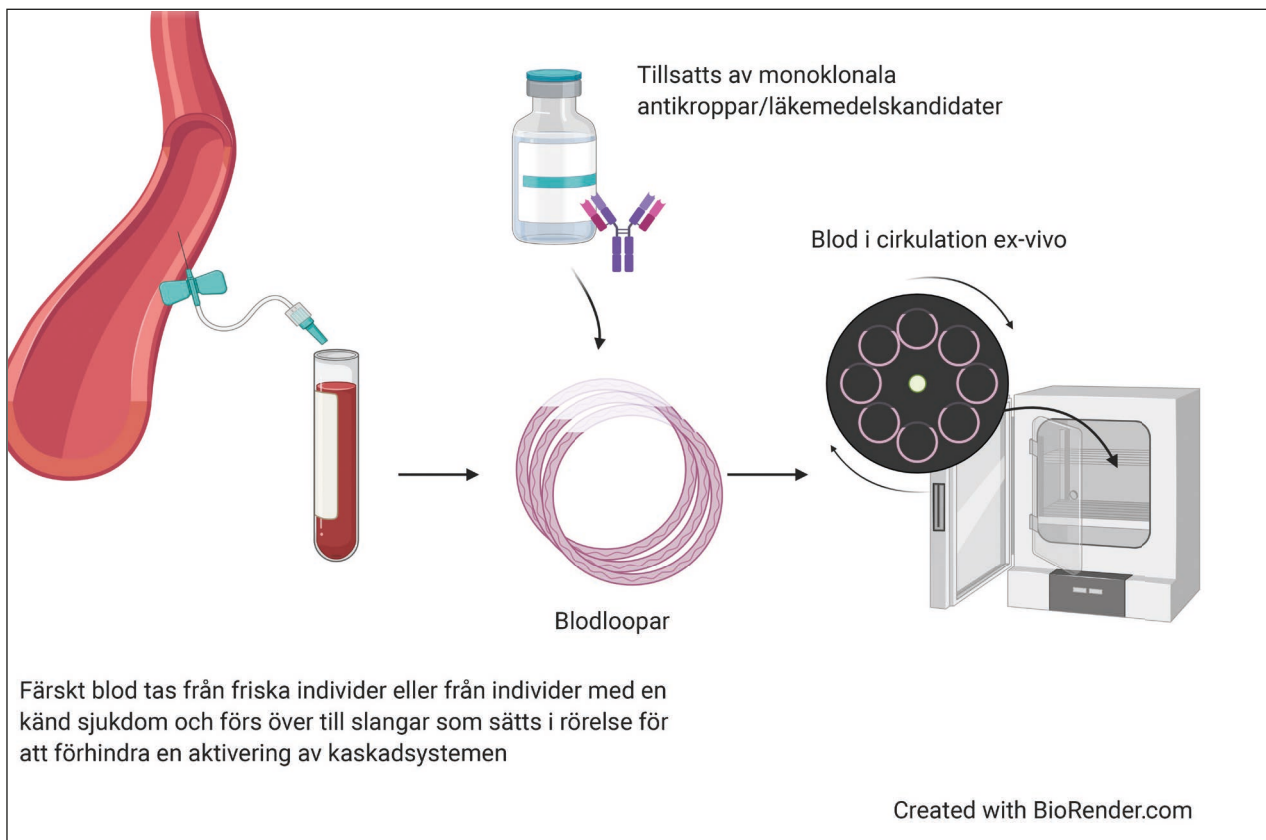
” Vid utvecklande av monoklonala antikroppar genomförs en utvecklingsfas, innan de förs in i kliniken, under vilken både säkerhet och effekt analyseras. Antikropparnas effekter/bieffekter beror inte enbart på typen av målcell utan också på hur deras konstanta del utformas.

att NK-cellen binder in till antikropparna via Fc-receptorn kan en aktivering av NK-cellen ske. Det leder till en degranulering av cytotoxinerna perforin och granzym som både skapar lytiska porer och aktiverar programmerad celldöd i den cell som blir utsatt för degranuleringen.

I läkemedelsutveckling analyseras därför också säkerhetsprofilen av dessa antikroppar med avseende på deras potential att initiera cytokinfrisättning, aktivera NK-celler (nyckelceller i aktiveringen av ADCC) och komplementsys-



••• Tema – immunterapi



Kredit: skapad med Biorender.com

temet. Ofta görs dessa analyser med hjälp av renade isolat av subtyper av immunceller eller isolerade fraktioner av komplementproteiner och inte i ett humant helblodssystem innehållande alla viktiga immunologiska komponenter. Då orsakerna till bieffekter är multifaktoriella leder detta till stora svårigheter att förutsäga risken för effekt på de olika immunologiska komponenterna, och i förlängningen biverkningar, baserat på varje enskild assay.

SÅ KAN LOOPMODELLEN ANVÄNDAS

Inom organtransplantationer och vid användande av kroppsfrämmande material finns sedan tidigare etablerat en äldre och bredare analysmetod. Denna metod kan användas för analys av hur blod kan förstöra olika typer av avancerade cellterapier (IBMIR-reaktionen)⁶ men också för analys av hur olika ytor som används vid ortopediska ingrepp eller dentologi⁷ kan aktivera vårt medfödda immunförsvar och därmed skapa en inflammation vid ytan som satts in i kroppen. Metodiken kallas för Chandler-loop-modellen (inklusive olika varianter), och är en *in vitro*-simulering av blodsystemet, där både immunceller och kaskadsystem är närvarande och där analyser av interaktioner mellan till exempel ytor, terapier och blod kan genomföras.

Av intresse är att en vidareutveckling och validering av loopmodellen numera gör att den kan användas för att ana-

” Metodiken kallas för Chandler-loop-modellen (inklusive olika varianter), och är en *in vitro*-simulering av blodsystemet, där både immunceller och kaskadsystem är närvarande och där analyser av interaktioner mellan till exempel ytor, terapier och blod kan genomföras.

lysera hur nya typer av immunterapier kan påverka både vårt medfödda och adaptiva immunförsvar, då med avseende på hur behandlingen påverkar immuncellerna och kaskadsystemen⁸⁻¹⁰. Det unika är att vidareutvecklingar av just Chandler-loop-modellen, förutom att ge en bred bild av ovan nämnda effektsystem, möjliggör att blod kan hållas i cir-



••• Tema – immunterapi

kulation utan att det aktiverar koagulationssystemet, och därmed krävs inte en hög dos anti-koagulant som tillsatts och provmiljön innehåller intakta nivåer av komplementfaktorer.

” Vi kunde (som förväntat) se, att när rituximab möter blod hos friska personer utan maligna immunceller, försvinner de immunceller som uttrycker CD20, men vi kunde också visa att detta inte följs av cytokinfrisättning, aktivering av komplementkaskad-systemet, och inte heller en aktivering av NK-celler.

UNIKT SYSTEM MED POTENTIellt STORT VÄRDE

Vi har tidigare använt den vidareutvecklade loopmodellen för att testa om vi kan förutspå om en antikropp kan ge upphov till oväntade biverkningar i form av cytokinfrisättning från immunceller i blodet från friska försökspersoner. I Fletcher et al. 2018 analyserade vi de kända riskantikropparna, TGN1412 (CD28-riktad antikropp), OKT3 (CD3-riktad antikropp) samt alemtuzumab (CD52-riktad antikropp) och kunde då etablera att modellen kan ge en profil av hur dessa antikroppar aktiverar cytokinfrisättning och, när det gäller alemtuzumab, även dess komplementaktiveringsprofil. I denna modell kan även mätas hur målceller aktiveras eller försvinner, beroende på vilken antikropp som använts¹¹. Detta är unikt och av stort värde. Illustrativt är den katastrofala fas I-studien med CD28-riktade antikroppen TGN1412 i London 2006¹², som visade att det ofta krävs helt unika modeller för varje individuell riskantikropp för att kunna värdera en potentiell biverkningsprofil¹¹.

Rituximab kan, som nämnts, målsöka och döda CD20-uttryckande celler genom både antikroppsmedierad celldöd (ADCC) och komplement-medierad celldöd (CDC). Dess effekt och eventuella bieffekter är beroende av både typ av sjukdom, engagerade organ, tumörbörda samt andra individuella skillnader mellan patienter (ålder, kön, kroppsvikt). Dess effekter och bieffekter kan vara orsakade av bland annat komplementaktivering, direkt cytokinfrisättning och även allergimedierade mekanismer. Rituximab är vanligen en säker och väl tolererad behandling men det är välkänt att

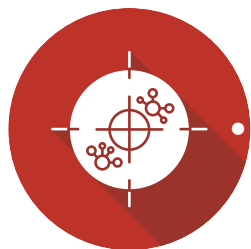
behandlingen kan leda till varierande grad av cytokinfrisättningsreaktioner, tumörlys samt även (mer sällsynt) allergiska reaktioner. Vidare leder behandlingen till B-cellsdepletion med risk för sekundära infektioner.

För att gå vidare och studera hur effekten av rituximab skiljer sig åt mellan personer utan tumörceller i blod, jämfört med personer med cirkulerande tumörceller, använde vi oss av loopmodellen i den nyligen publicerade studien och inkluderade både friska individer (n=5) samt patienter med kronisk lymfatisk leukemi (KLL) (n=6). Detta för att, för första gången, analysera hur denna ex vivo-blodmodell kan ge information om indikationsspecifika immunsvaret när rituximab möter blod¹. Detta genom att jämföra cytokinfrisättning, komplementaktivering och B-cellsdepletion hos försökspersonerna.

FYND VID ANALYS MED LOOPMODELLEN

Vi kunde (som förväntat) se, att när rituximab möter blod hos friska personer utan maligna immunceller, försvinner de immunceller som uttrycker CD20, men vi kunde också visa att detta inte följs av cytokinfrisättning, aktivering av komplementkaskadsystemet, och inte heller en aktivering av NK-celler. Däremot sågs hos patienter med en diagnoserad KLL-sjukdom och cirkulerande tumörceller mätbara immunsvaret som kunde relateras till en aktivering av ADCC och CDC med åtföljande komplementaktivering samt även cytokinfrisättning från cirkulerande NK-celler. Det förelåg också en signifikant variation i cytokinfrisättning mellan patienterna. Vid uppföljning efter studien har tre av sex patienter behandlats med CD20-antikroppar (rituximab och obinutuzumab) och då utvecklat varierande grad av CRS. Intressant nog noterades det även anekdotiskt att en KLL-patient, som inte hade cirkulerande NK-celler, inte heller uppvisade någon mätbar cytokinfrisättning i loopsystemet och uppvisade inte antikroppsmedierad celldöd. Däremot uppmättes celldöd när en monoklonal antikropp som målsöker CD52 användes. CD52 uttrycks på bland annat B-celler, T-celler och monocyter.

Vidare studerade vi i loop-modellen hur olika typer av modifierade rituximab-varianter samt blockering av CDC och ADCC påverkade immunsvaret. Vi kunde då se att en försämrad komplementaktivering genom en blockering av komplement eller genom användande av en muterad antikropp, som försämrade komplementaktiveringen, påverkade behandlingens effekt (mätt med effektmått celldöd) negativt. När NK-cellernas funktion blockerades genom att blockera Fc-receptorn CD16, skedde en förskjutning av effekten av antikroppen från ADCC mot CDC (celldöd) men detta gav också en ökad cytokinfrisättning vilket skulle kunna leda till ökad risk för biverkningar i form av cytokinfrisättningssyndrom. Denna förskjutning kan bero på en ökad aktivering av granulocyter som förstärks genom en interaktion med andra Fc-receptorer så som CD32, istället för CD16, alternativt en komplementmedierad granulocytaktivering. För att förstå detta bättre måste ytterligare stu-



••• Tema – immunterapi

dier genomföras. Vidare kunde vi i modellen studera förskjutningar i uttrycket av CD20 på B-celler samt CD16 på NK-celler som en följd av rituximabexponering möjligen orsakad av "shaving" eller trogocytos. Vi kunde även beskriva att den mängd B-lymfocyter som antikroppen kunde avdöda varierade och att effekt och biverkningsprofil tedde sig individspecifk.

MÖJLIGT FÖRUTSPÅ EFFEKT/BIEFFEKT?

I förlängningen skulle användandet av loop-modellen kunna innebära en möjlighet att förutspå hur en patient kommer att svara på en specifik antikroppsbehandling, genom att använda analysen patientspecifikt före terapistart. Detta eftersom mängden NK-celler, kvaliteten hos NK-cellerna (deras cytolytiska förmåga) och även individuella skillnader i komplementsystemets kapacitet (aktivering och inhibering av komplementkaskaden) mellan individer påverkar behandlingseffekten vid antikroppsbasead behandling.

Vidare skulle systemet kunna användas för att i ett "brett" helblodssystem kunna värdera risken för uppträdande av bieffekter. Något som kan vara av värde både i utvecklandet av nya terapier, speciellt för att minimera riskerna för försökspersoner under utvecklingsfasen, och även vid användande av etablerade behandlingar, för att värdera den individuella risken för cytokinfrisättningsreaktioner och tumörlyssyndrom.

Begränsningen i vår studie ligger i antal observationer men vi tycker det är av stort värde att gå vidare med att studera om blodloopen skulle kunna användas för att både karakterisera effekt och biverkningsprofil vid olika typer av immunterapi i framtiden.

Fotnot, competing interests: Sara Mangsbo har grundat Immuneed AB (www.immuneed.com) som tillhandahåller den tekniska plattformen som möjliggör analyser av effekter och immunotoxicitet när läkemedel möter blod/blodkomponenter. Sara Mangsbo sitter också i styrelsen för Immuneed AB.

REFERENSER

1. Eltahir, M., et al., Profiling of donor-specific immune effector signatures in response to rituximab in a human whole blood loop assay using blood from CLL patients. *Int Immunopharmacol*, 2021. 90: p. 107226.

2. Sandin, L.C., et al., Local CTLA4 blockade effectively restrains experimental pancreatic adenocarcinoma growth in vivo. *Oncoimmunology*, 2014. 3(1): p. e27614.

3. van Hooren, L., et al., Local checkpoint inhibition of CTLA-4 as a monotherapy or in combination with anti-PD1 prevents the growth of murine bladder cancer. *Eur J Immunol*, 2017. 47(2): p. 385-393.

4. Mangsbo, S.M., et al., The human agonistic CD40 antibody ADC-1013 eradicates bladder tumors and generates T-cell-dependent tumor immunity. *Clin Cancer Res*, 2015. 21(5): p. 1115-26.

5. Edwards, J.C.W., et al., Efficacy of B-Cell-Targeted Therapy with Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine*, 2004. 350(25): p. 2572-2581.

6. Cabric, S., et al., Islet surface heparinization prevents the instant blood-mediated inflammatory reaction in islet transplantation. *Diabetes*, 2007. 56(8): p. 2008-15.

7. Thor, A., et al., The role of whole blood in thrombin generation in contact with various titanium surfaces. *Biomaterials*, 2007. 28(6): p. 966-74.

8. Fletcher, E.A.K., et al., Formation of Immune Complexes with a Tetanus-Derived B Cell Epitope Boosts Human T Cell Responses to Covalently Linked Peptides in an Ex Vivo Blood Loop System. *J Immunol*, 2018. 201(1): p. 87-97.

9. Mangsbo, S.M., et al., Complement activation by CpG in a human whole blood loop system: mechanisms and immunomodulatory effects. *J Immunol*, 2009. 183(10): p. 6724-32.

10. Vogel, S., et al., Antibody induced CD4 down-modulation of T cells is site-specifically mediated by CD64(+) cells. *Sci Rep*, 2015. 5: p. 18308.

11. Fletcher, E.A.K., et al., Extracorporeal human whole blood in motion, as a tool to predict first-infusion reactions and mechanism-of-action of immunotherapeutics. *Int Immunopharmacol*, 2018. 54: p. 1-11.

12. Suntharalingam, G., et al., Cytokine Storm in a Phase 1 Trial of the Anti-CD28 Monoclonal Antibody TGN1412. *New England Journal of Medicine*, 2006. 355(10): p. 1018-1028.

MATTIAS MATTSSON, INSTITUTIONEN FÖR IMMUNOLOGI, GENETIK OCH PATOLOGI, UPPSALA UNIVERSITET OCH HEMATOLOGEN, VO BLOD- OCH TUMÖRSJUKDOMAR, AKADEMISKA SJUKHUSET, UPPSALA, MATTIAS.MATTSSON@AKADEMISKA.SE



SARA MANGSBO, INSTITUTIONEN FÖR FARMACEUTISK BIOVETENSKAP, SCIENCE FOR LIFE LABORATORY, UPPSALA UNIVERSITET OCH IMMUNEED AB, UPPSALA, SARA.MANGSBO@FARMBIO.UU.SE

