

” Genom att använda den senaste tekniken inom syntetisk biologi är det möjligt att vi en dag kommer att ha ”allt-i-ett-celler” som kan detektera, diagnostisera och slutligen behandla tumörer genom mångfasetterade system som tumörceller har svårt att gardera sig mot.

Nytt forskningsområde:

Bygger nya biologiska system för att uppgradera immunförsvaret

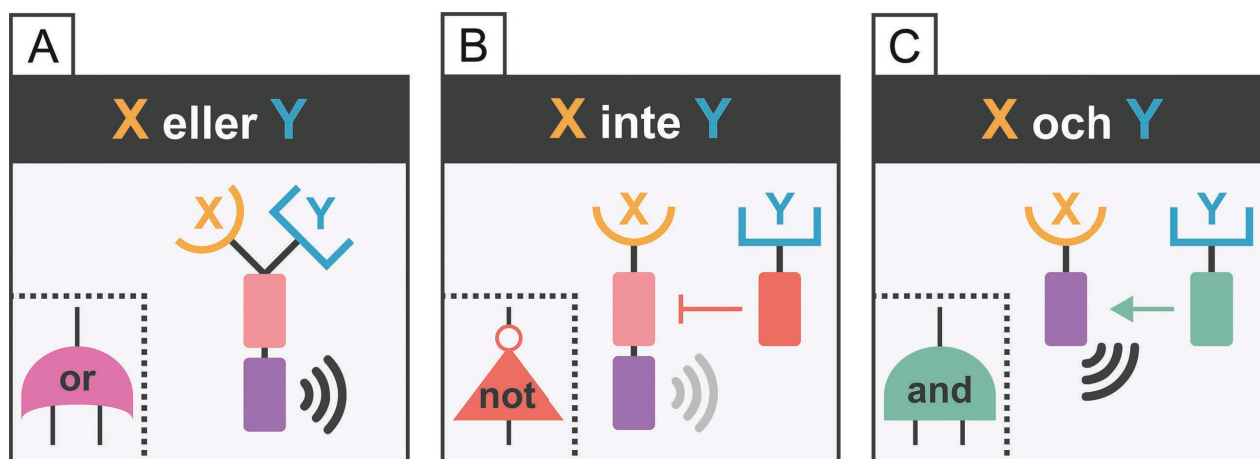
Syntetisk biologi är ett nytt forskningsområde där man på genetisk väg bygger ihop komplexa biologiska system med nya funktioner som inte existerar i naturen. På så sätt kan man konstruera molekylära komponenter som ger levande celler förmågan att utföra specifika uppgifter baserat på rätt input. Här beskriver **Axel Hyrenius Wittsten**, forskare vid Lunds universitet, hur man kan programmera om immun-celler till att mer effektivt söka upp och eliminera solida tumörer.

Vårt immunsystem har en enastående förmåga att söka igenom vår kropp efter sjuka celler. Nya vetenskapliga framsteg tillåter oss nu att dra nytta av immunceller för att rikta dem och förbättra deras förmåga att eliminera tumörceller, antingen via administration av immunostimulerande substanser som förbättrar en individs egen immunrespons mot tumörceller eller omprogrammering av en viss typ av immunceller, T-celler, för att lära dem att känna igen cancerceller via utvalda tumörmarkörer. Detta har gjort att vi nu befinner oss i ett skifte i vår syn på hur cancerbehandling kan komma att se ut i framtiden. Trots att små molekyler och protein idag utgör den farmakologiska grunden för den behandling som används i kliniken, så är vi nu vid en punkt där vi kan programmera om celler så de kan detektera och eliminera tumörer. Genom att använda den senaste tekniken inom syntetisk biologi är det möjligt att vi en dag kommer att ha "allt-i-ett-celler" som kan detektera,

diagnostisera och slutligen behandla tumörer genom mångfasetterade system som tumörceller har svårt att gardera sig mot.

MULTIDISCIPLINÄRT FÄLT

Syntetisk biologi är ett multidisciplinärt fält i vilket man använder sig av kunskaper inom bland annat cellbiologi, signalvägar och DNA-manipulation för att designa och rekonstruera nya protein eller genetiska kretsar, vilket ger celler nya egenskaper och förmågor. En av de största framgångarna inom detta fält är utvecklingen av "Chimär Antigen Receptor" (CAR). Denna artificiella T-cellsreceptor (TCR) har förmågan att detektera definierade ytmarkörer (även känt som antigen) utan att behöva använda de naturliga TCR-signaleringskomplexen. Genom att uttrycka en CAR i T-celler kan man därmed rikta dessa programmerade T-celler mot tumör-associerade antigen för att effektivt eliminera maligna celler. Detta har lett till enastående



Figur 1. Logiska grindar i CAR-T-cellsterapi. **(A)** För att göra en CAR mer känslig kan man skapa den med två olika antigen-igenkännande domäner och på så sätt få CAR-T-celler att känna igen tumörceller via två separata antigen vilket gör det svårare för tumörceller att gömma sig från behandlingen. Detta kallas för en "OR-gate". **(B)** Ett sätt att särskilja maligna från friska celler är att lära CAR-T-celler att endast eliminera celler som uttrycker en angiven ytmarkör, men endast om den inte förekommer tillsammans med annan specificerad markör. Detta kallas för en "NOT-gate". **(C)** För att öka specificiteten av CAR-T-celler kan man konstruera dem till att eliminera celler endast ifall de uttrycker en kombination av två olika antigener. Detta gör att tumörceller kan särskiljas från friska celler genom en unik kombination av ytmarkörer. Detta kallas för en "AND-gate".

kliniska framgångar genom att rikta CAR-T-celler mot den allomfattande B-cellsmarkören CD19 hos svårbehandlade patienter med vissa typer av B-cells-associerad leukemi¹ och lymfom². Nyligen presenterades även lovande data från liknande kliniska prövningar i multipelt myelom³, där man istället valt att rikta behandlingen mot den B-cells-kopplade markören BCMA. Anmärkningsvärt är att dessa kliniska responser uppnås hos patienter som slutat svara på flertalet traditionella behandlingsmetoder.

Gemensamt för dessa terapier är att de effektivt kommer åt de maligna cellerna genom att slå ut alla B-celler, friska som sjuka, och att patienter i stort kan tolerera detta. Dessvärre tappar eller nedreglerar ibland de lymfatiska leukemicellerna uttrycket av CD19, vilket gör att de inte längre känns igen av CAR-T-cellerna. För att komma runt detta problem har nya CAR-T-cellsversioner tagits fram som kan aktiveras av både CD19 och/eller CD22⁴, den senare är också en B-cellsmarkör som uttrycks av leukemiceller (Figur 1A). Det har även gjorts försök att vidareutveckla CAR-T-cells-behandling mot myeloid leukemi, men detta har visat sig svårt just på grund av avsaknaden av bra antigen som särskiljer leukemiceller från frisk vävnad. Exempel på lovande markörer är CD93 och CD123, vilka uttrycks av myeloida leukemiceller men inte av friska essentiella blodceller. Dock uttrycker endotelceller både CD93 och CD123 vilket skulle orsaka oerhörd toxicitet vid potentiell CAR-T-behandling mot dessa två antigen. Som ett sätt att komma runt denna problematik har logiska syntetiska system utvecklats, i vilka specifika kombinationer av ytmarkörer avgör om CAR-T-celler ska aktiveras eller ej. Detta åstadkoms genom en syntetisk receptor som kan inhibera en CAR (iCAR) i närvaro av en sekundär markör, så som ett antigen uttryckt på endotelceller. I korthet innebär det att CAR-T-celler aktiveras och eliminerar myeloida leukemiceller via till exempel CD93, men som skonar endotelceller då de utöver CD93 också uttrycker en markör som ser till att iCAR stoppar aktivering av CAR-T-celler⁵ (Figur 1B). Alternativt

kan man också uppnå motsatsen där det krävs samtidig närvaro av två specifika antigen på de myeloida leukemicellerna för att CAR-T-celler ska bli ordentligt aktiverande och därmed eliminera de maligna cellerna. Konceptuellt har detta testats genom att dela upp de signaleringskomponenter som utgör en CAR i två olika receptorer, en riktad mot CD13 och en mot TIM3⁶. Detta innebär att dessa CAR-T-framförallt inriktar sig på leukemistamceller, som uttrycker både CD13 och TIM3, medan de i stort skonar normala blodstamceller som endast uttrycker CD13 (Figur 1C). Trots att dessa system fortfarande är i sin linda demonstrerar de möjligheten att kunna skapa de verktyg som krävs för att bredda CAR-T-cellers kliniska framgångar i hematologiska maligniteter.

SVÅRARE I SOLIDA TUMÖRER

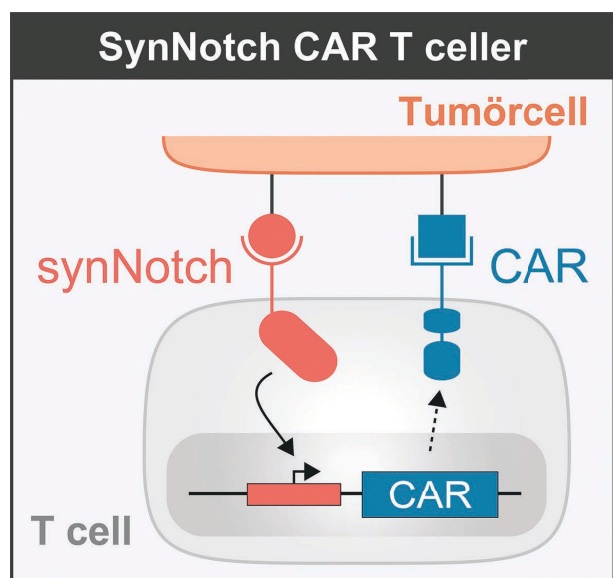
Det har visat sig vara ännu svårare att uppnå framgångsrika resultat med CAR-T-celler i solida tumörer. Utöver bristen av specifika tumörmarkörer utgörs svårigheterna här även av den immundämpande miljön i solida tumörer som kraftigt minskar immuncellers aktivitet. Många studier har fokuserat på att överuttrycka gener vid sidan om en CAR som har förmågan att stärka T-cellernas varaktighet och effektivitet, så som transkriptionsfaktorn c-Jun⁷, eller letat efter negativa regulatorer av CAR-T-cellsaktivitet som kan slås ut via CRISPR/Cas9. Man har även påvisat att man kan imitera naturlig transkriptionell reglering av endogen TCR-uttryck genom att integrera den genetiska sekvensen för en CAR i det faktiska genetiska lokuset som kodar för en del av TCR. Detta visade sig kraftigt öka CAR-T-cellers effektivitet, och denna precisa genetiska integration, som även slår ut den endogena TCR, minskar också risken för insertionell onkogenes och autoimmunitet eller alloreaktivitet från T-cellsprodukten⁸.

Med syntetisk biologi kan man också dra om ledningar i cellers biologiska nätverk för att adaptera dem för specifika och definierade behov. En av de mer lovande framgångarna

inom immunoterapi är utvecklingen av en syntetisk Notch-receptor (synNotch). Denna receptor bygger på den naturliga Notch-receptorn, men har modifierats så att den frisläpper en ortogonal transkriptionsfaktor vid inbindning av en specificerad ytmärk. Genom att koppla detta system i T-celler går det nu att driva transkriptionell aktivitet av valda genetiska element, så som en CAR, i respons av en tumör-associerad märk (Figur 2). Som en del av detta visade vi nyligen att vi kunde rikta synNotch mot den tumörspecifika märken ALPPL2, och på så sätt driva uttrycket av en CAR mot mindre specifika, men höguttryckta, tumör-associerade märken lokalt i en tumör. Genom detta system kunde vi effektivt eliminera mesoteliom och äggstockscancer genom antigen-kombinationerna ALPPL2/Mesothelin, ALPPL2/HER2 och/eller ALPPL2/MCAM⁹. Alternativt kan synNotch CAR-T-celler riktas mot vävnadsspecifika märken för att försäkra sig om att en CAR endast uttrycks lokalt i ett specifikt organ eller viss typ av vävnad. Detta har visats genom att rikta synNotch mot proteinet MOG som uttrycks i det centrala nervsystemet och på så sätt säkert uttrycka en CAR reaktiv mot både EphA2 och IL13R α 2 för att effektivt behandla glioblastom¹⁰.

UTVECKLAR SYNTETISKA NÄTVERK

Trots lovande resultat från dessa prekliniska studier vet vi att den immundämpande miljön hos dessa tumörer troligen även kommer att reducera effektiviteten av synNotch CAR-T-celler hos patienter. Men fördelen med synNotch är att



Figur 2. SynNotch CAR-T-celler. SynNotch är en ny klass av syntetiska receptorer som har förmågan att driva preciserad transkriptionell aktivitet när den känner igen och binder en specificerad ytmärk. Ett lovande användningsområde för SynNotch är att öka specificiteten av cell-baserad immunoterapi. Genom att designa SynNotch att känna igen ett primärt antigen, till exempel en tumör- eller vävnadsspecifika märk, kan man få konstruerade T-celler att lokalt driva uttrycket av en CAR mot ett sekundärt tumör-associerat antigen. Det innebär att man kan lokalisera den cytotoxiska CAR-aktiviteten till en tumör eller specifik vävnad och på så sätt undvika ödesdigra sidoeffekter ifall den märken känns igen uttrycks av friska och essentiella celler i andra delar av kroppen.

den även gör det möjligt att lokalt leverera immunomodulerande proteiner för att återaktivera kroppens eget immunförsvar mot tumörcellerna. Min forskargrupp jobbar med att utveckla just sådana avancerade syntetiska nätverk för att göra designade T-celler mer motståndskraftiga i immundämpande tumörmiljöer och förlänga deras kliniska verkningstid. Vi strävar också efter att stimulera kroppens endogena immunceller i tumörmiljön för att på så sätt förbättra den totala effekten av den immunterapeutiska behandlingen.

I denna text beskrivs endast ett axplock av alla de innovationer som sker inom syntetisk biologi och immunoterapi. Vi vet att många hinder återstår för att vi ska kunna göra cellbaserad immunoterapi till en effektiv och säker behandlingsstrategi för ett brett spektrum av tumörer, men det görs kontinuerligt nya framsteg. Ju mer vi lär oss från syntetiska system desto större möjligheter har vi att modifiera och specialisera celler i vår kamp mot cancer.

REFERENSER

1. S. L. Maude et al., Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 378, 439–448 (2018).
2. S. J. Schuster et al., Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 380, 45–56 (2019).
3. J. G. Berdeja et al., Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study. *Lancet.* 398, 314–324 (2021).
4. J. Y. Spiegel et al., CAR T cells with dual targeting of CD19 and CD22 in adult patients with recurrent or refractory B cell malignancies: a phase 1 trial. *Nat. Med.* 27, 1419–1431 (2021).
5. R. M. Richards et al., NOT-Gated CD93 CAR T Cells Effectively Target AML with Minimized Endothelial Cross-Reactivity. *Blood Cancer Discov.* 2, 648–665 (2021).
6. X. He et al., Bispecific and split CAR T cells targeting CD13 and TIM3 eradicate acute myeloid leukemia. *Blood.* 135, 713–723 (2020).
7. R. C. Lynn et al., c-Jun overexpression in CAR T cells induces exhaustion resistance. *Nature.* 576, 293–300 (2019).
8. J. Eyquem et al., Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature.* 543, 113–117 (2017).
9. A. Hyrenius-Wittsten et al., SynNotch CAR circuits enhance solid tumor recognition and promote persistent antitumor activity in mouse models. *Sci Transl Med.* 13 (2021), doi:10.1126/scitranslmed.abd8836.
10. J. H. Choe et al., SynNotch-CAR T cells overcome challenges of specificity, heterogeneity, and persistence in treating glioblastoma. *Sci Transl Med.* 13 (2021), doi:10.1126/scitranslmed.abe7378.

AXEL HYRENIUS WITTSTEN,
FORSKARE VID LUNDS UNIVERSITET,
AXEL.HYRENIUS_WITTSTEN@MED.LU.SE

