

Nästa generations
CAR-T-celler *för*
ännu bättre behandling
av cancer

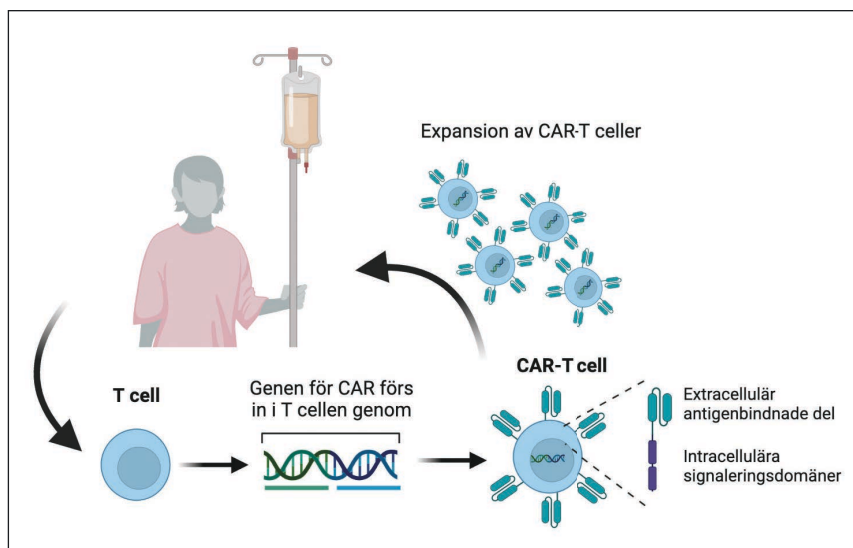
Cancerterapi baserad på patientens egna T-celler (vita blodkroppar) som isolerats fram och på genetisk väg modifierats att uttrycka en chimär antigenreceptor (CAR), så kallad CAR-T-cellsterapi, är idag en ytterst framgångsrik behandling av blodcancer (B-cellsleukemi), lymfkörtelcancer (B-cellslymfom) och benmärgscancer (multipelt myelom). CAR-T-cellsterapi är en avancerad behandling, så kallad ATMP (advanced therapy medicinal product) som faller under det vidare begreppet precisionsmedicin.

Det har nu gått drygt 10 år sedan Emelie Whitehead som första barn behandlades med CAR-T-celler. Emelie var fem år när hon 2010 drabbades av B-cell akut lymfatisk leukemi (B-ALL), en diagnos som i 90 procent av fallen leder till bot. Emelies leukemi blev dock resistent mot behandling och i april 2012 hade hennes läkare uttömt alla behandlingsalternativ. De rekommenderade hospicevård och förväntade sig att hon bara skulle leva några veckor till. Emelies föräldrar vägrade dock att ge upp och lyckades i sista stund få med Emelie i en nystartad klinisk prövning med CAR-T-celler vid Children's Hospital i Philadelphia, USA. I maj 2012 behandlades Emelie med sina egna genmodifierade T-celler. Behandlingen var tuff för den späda kroppen då cytokiner som utsöndras i samband med att CAR-T-cellerna förökade

sig och attackerade tumören ledde till en systemisk inflammation som höll på att kosta Emelie livet. Efter några dagar vaknade dock Emelie upp och den cancer som hon så tappert kämpat mot i två års tid fanns inte längre kvar. Ett mirakel!? Nej, snarare frukten av många års systematisk arbete att utveckla en ny immunologisk behandlingsform av cancer. Redan 1989 hade Zelig Eshhar vid Weizmann Institute of Science i Tel Aviv, Israel tagit fram den första prototypen av en CAR-T-cell.

TAR SIG IN I OCH DÖDAR TUMÖRCELLEN

CAR-T-celler produceras och expanderas i ett renrumslaboratorium utifrån friska T-celler som isolerats fram från cancerpatientens eget blod, figur 1. Med hjälp av en virusvektor



Figur 1. Chimär antigenreceptor (CAR)-T-celler framställs från cancerpatientens egna friska T-celler med hjälp av en integrerande viral vektor. CAR-T-cellerna expanderas därefter och förökas i antal innan de ges åter till patienten. CAR-proteinet som uttrycks från den integrerade genetiska koden finns inte naturligt. Den består av en extracellulär del som binder till ett specifikt antigen eller struktur som återfinns på tumörcellers yta. I samband med antigeninteraktion aktiveras CAR-molekylens intracellulära signaleringsdomäner vilket leder till att CAR-T-cellen dödar tumörcellen den har kontakt med. CAR-T-celler används idag framgångsrikt vid behandling av blodcancer, lymfkörtelcancer och benmärgscancer. CAR-T-cellbehandling av så kallade solida tumörer fungerar ännu inte tillfredställande men forskning för att förändra det pågår runt om i världen.

överförs en chimär genetisk kod som integreras i T-cellernas genom (DNA). Den chimära genetiska koden kodas av och översätts till ett protein, en CAR-molekyl med en extracellulär och en intracellulär del, som uttrycks på T-cellens yta. På utsidan hittar man ett antikroppsfragment med förmåga att känna igen en ytstruktur (ett antigen) hos tumörceller. På insidan består CAR-molekylen av så kallade signaleringsdomäner från en T-cellsreceptor och en eller flera co-receptorer. Det innebär att när CAR-T-cellen kommer i kontakt med antigenet hos en tumörcell så aktiveras CAR-T-cellen att utsöndra faktorer (perforin och granzym) som gör hål i tumörcellens cellmembran och tar sig in i och dödar tumörcellen. I samband med att en CAR-T-cell aktiveras kommer den också att dela på sig och CAR-T-cellerna förökas i antal. CAR-T-celler är därmed ett levande läkemedel med förmåga att föröka sig i kroppen och finnas kvar som minnes-CAR-T-cell i många år. De skyddar därmed patienterna mot återfall i sin tidigare cancersjukdom.

” Det finns i princip alltid tumörceller som helt saknar uttryck av tumörspecifika antigen, vilket innebär att en klon av tumörceller som saknar det antigen som CAR-T-cellerna riktar sig mot snabbt tar över, vilket i sin tur leder till att tumören blir resistent mot CAR-T-cellbehandlingen. Att tillverka CAR-T-celler mot många olika antigenstrukturer hos solida tumörer på en och samma gång kan vara en väg framåt.

Vid behandling av B-cellsleukemi och B-cellslymfom används i regel CAR-T-celler som riktar sig mot CD19, ett antigen som återfinns på ytan av såväl friska som cancerogena B-celler. Att friska B-celler slås ut vid behandling är en biverkan som kan accepteras då patienten kan ges intravenöst immunoglobulin som stödbehandling för att kompensera bortfallet av friska B-celler. En majoritet av alla leukemi/lymfompatienter svarar på CD19 CAR-T-cellbehandling och hos cirka hälften av de som svarar på behandlingen är effekten bestående. Vissa patienter svarar dock inte på alls på behandlingen med-

an andra patienter som initialt svarar får återfall, vilket beror endera på att CAR-T-cellerna försvinner från blodet (att minnes-CAR T-celler inte lyckats etableras) eller att tumören tappat sitt uttryck av CD19 och de CD19-riktade CAR-T-cellerna därmed förlorar sin förmåga att känna igen tumörcellerna.

TUMÖREN BLIR RESISTENT

När det gäller tumörer som uppkommer i kroppens olika vävnader eller i det centrala nervsystemet fungerar CAR-T-cellbehandling tyvärr ännu inte tillfredställande. Det beror framför allt på två saker, 1) mikromiljön i solida tumörer är i de flesta fall starkt immunhämmande vilket leder till att T-cellers aktivitet trycks ner; 2) solida tumörer är betydligt mer heterogena i sin karaktär än blodcancer, vilket innebär att målstrukturer (antigen) som CAR-T-celler vid behandling av solida tumörer produceras att riktas mot, är ojämnt fördelade inom tumören. Det finns i princip alltid tumörceller som helt saknar uttryck av tumörspecifika antigen, vilket innebär att en klon av tumörceller som saknar det antigen som CAR-T-cellerna riktar sig mot snabbt tar över, vilket i sin tur leder till att tumören blir resistent mot CAR-T-cellbehandlingen. Att tillverka CAR-T-celler mot många olika antigenstrukturer hos solida tumörer på en och samma gång kan vara en väg framåt.

Forskningsfältet verkar dock ha nått en samsyn i att för att CAR-T-celler ska kunna bli framgångsrika vid behandling av solida tumörer krävs det att nästa generations CAR-T-celler utrustas att 1) stå emot den immunhämmande mikromiljön i tumören eller ännu hellre transformera mikromiljön till att bli immunaktiverande; 2) aktivera andra immunceller, framför allt kroppsegna T-celler, att känna igen unika tumörspecifika målstrukturer som finns hos den individuella tumören, och därmed generera ett brett och kraftfullt immunsvaret som tumören har svårt att värja sig mot.

För att förstå hur det skulle kunna gå till är det viktigt att känna till principen för hur T-celler normalt sett identifierar och eliminerar infekterade, maligna eller skadade celler. Alla kroppens celler visar upp små fragment av de proteiner som finns i cellen på sin yta med hjälp av cellytepresentatorer, vilka benämns HLA. Detta för att kroppens T-celler ska kunna skanna av om något i cellen är förändrat. HLA-presentatorerna speglar med andra ord förändringar inuti en cell på cellens yta så att immunsystemet kan upptäcka dessa intracellulära förändringar och vid behov eliminera cellen. Varje T-cell har en unik T-cellsreceptor (TCR) för att identifiera en unik epitop (del av ett proteinantigen) som presenteras av HLA. Vår samlade T-cellsrepertoar, T-celler med olika TCR och därmed specificitet för olika epitoper, har förmågan att känna av i princip varje förändring i en cell. En T-cell känner igen en virusinfekterad cell på grund av att den infekterade cellens HLA presenterar epitoper från virusprotein på cellens yta, vilket leder till att T-cellen utsöndrar faktorer som dödar den virusinfekterade cellen. Tumörcellers HLA presenterar epitoper från muterade cancerspecifika proteiner på sin yta, vilket T-celler har förmåga att känna igen. Muterade kroppsegna proteiner är dock inte lika immunogena som främmande virusproteiner, vilket medför att immunsystemet är betydligt effektivare på att eliminera virusinfekterade celler än tu-

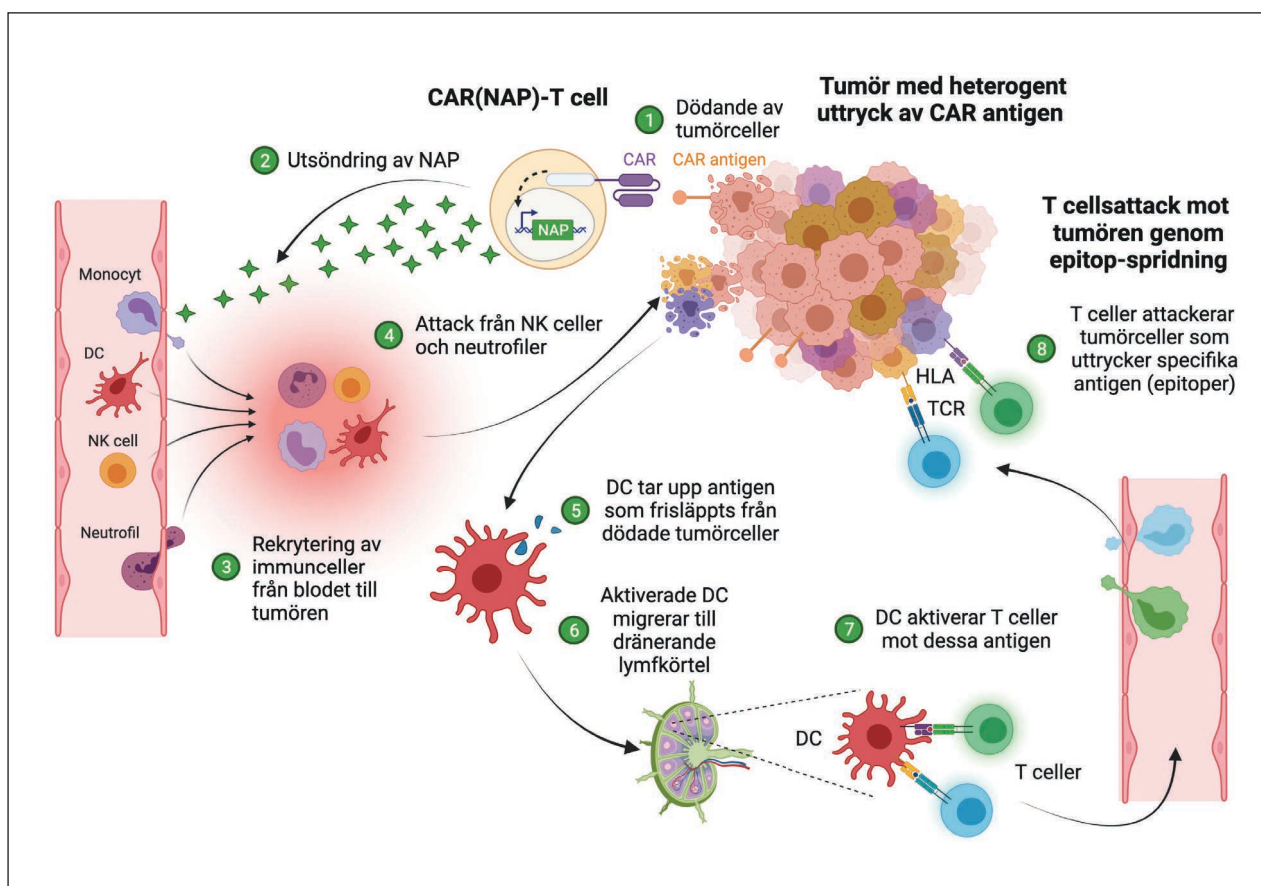
mörceller. Det medför att många tumörer förblir i princip osynliga för immunsystemets T-celler.

ATTACKERA I EN ANDRA VÅG

Forskare har försökt utrusta CAR-T-celler med cytokiner och kemokiner som kan aktivera T-celler att känna igen förändringar i muterade proteiner hos tumörceller att attackera tumören i en andra våg. Ett problem har varit att cytokiner/kemokiner som CAR-T-celler på detta artificiella sätt producerar utsöndras vid ofysiologiska, alltför höga nivåer, vilket i vissa fall också lett till toxicitet. Vi har nu tagit detta koncept ett steg längre och utrustat CAR-T-celler med inducerbar frisättning av ett protein som härstammar från *Helicobacter Pylori* och benämns neutrofilaktiverande protein (NAP). Det har tidigare visats att NAP kan omvandla en immunhämmande mikromiljö till att bli immunaktiverande, vilket är vad som eftersträvas vid immunterapi av cancer. Vi har nu visat

att utsöndring av NAP från CAR-T-celler leder till frisättning av en mängd cytokiner och kemokiner från närliggande immunceller. Man får på så vis en bred immunaktivering i tumörmikromiljön och det viktiga, tror vi, är att frisättningen av kroppsegna cytokiner och kemokiner på detta sätt sker vid fysiologiska nivåer. Utvecklingen av CAR(NAP)-T-celler har tagit flera år, men de prekliniska försök vi genomfört ser mycket lovande ut och vi har tidigare i år publicerat detta arbete i den välrenommerade tidskriften *Nature Biomedical Engineering* (doi: 10.1038/s41551-022-00875-5).

I publikationen påvisar vi att CAR(NAP)-T-celler fungerar betydligt bättre än konventionella CAR-T-celler i samtliga undersökta tumörmodeller, oberoende av tumörcellernas ursprung och oberoende av vilket antigen som CAR-T-cellerna riktade sig mot samt oberoende av haplotyp hos de möss som användes i försöken. Vi etablerade också tumörmodeller där enbart hälften av tumörcellerna i en tumör har det antigen



Figur 2. Förklaringsmodell för hur CAR(NAP)-T-celler, CAR-T-celler som utsöndrar NAP, kan aktivera ett brett antitumoralt T-cellssvar. CAR-T-celler framställs för att binda till en specifik struktur (CAR-antigen) som återfinns på tumörcellers yta och därigenom döda tumörceller. CAR(NAP)-T-celler dödar tumörceller (steg 1) samtidigt som de utsöndrar NAP (steg 2). NAP rekryterar immunceller från blodet (steg 3) som i sin tur utsöndrar immunaktiverande cytokiner och kemokiner. NK-celler och neutrofiler som rekryterats attackerar dessutom tumörcellerna (steg 4). NAP lockar även till sig dendritiska celler (DC) som tar upp cellrester från avdödade och döende tumörceller (steg 5) och bryter ner dess protein till små fragment. DC migrerar därefter via lymfan till en dränerande lymfkörtel (steg 6) där de med hjälp av sina HLA visar upp proteinfragmenten. T-celler med T-cellsreceptorer (TCR) som känner igen tumörspecifika proteinfragment, så kallade epitoper, aktiveras (steg 7) och lämnar därefter lymfkörteln. De aktiverade T-cellerna tar sig via blodbanan tillbaka till tumören och dödar tumörceller som via HLA presenterar tumörspecifika epitoper (steg 8). Dödandet som induceras av de aktiverade endogena T-cellerna är helt oberoende av om tumörcellerna uttrycker det antigen som CAR(NAP)-T-cellerna riktar sig mot eller ej. På så vis kan man komma runt problemet med en immunhämmande mikromiljö och heterogent och ojämnt uttryck av antigen i solida tumörer.

som CAR-T-cellerna är riktade mot. I sådana tumörmodeller lyckades konventionella CAR-T-celler inte bota några möss alls och inte ens förlänga överlevnaden hos mössen. Behandling med CAR(NAP)-T-celler däremot förlängde överlevnaden avsevärt och lyckades bota en betydande andel av mössen. Vi kunde vidare påvisa att detta berodde på att frisättning av NAP bidrog till aktivering av professionella antigenpresterande dendritiska celler (DC) som genom HLA-presentation av tumörspecifika antigenfragment (epitoper) som de plockat upp från avdödade tumörceller i sin tur aktiverade T-celler att känna igen dessa tumörspecifika epitoper. Fenomenet att aktivera T-celler mot fler måltavlor hos tumören, som benämns epitop-spridning, kunde påvisas i flertalet tumörmodeller vilket indikerar att effekten kan vara universell. I figur 2 presenteras en modell för hur vi tänker oss att CAR(NAP)-T-celler

saknar NAP-antikroppar. Detta försök genomfördes för att säkerställa att behandlingen kan förväntas fungera även för cancerpatienter som i ett tidigare skede haft en *Helicobacter Pylori*-infektion. En annan viktig frågeställning var att undersöka om utsöndringen av NAP från CAR(NAP)-T-celler leder till ökande toxicitet. Glädjande nog kunde vi visa att så inte var fallet för möss som behandlades med CAR(NAP)-T-celler jämfört med möss som behandlats med konventionella CAR-T-celler. Vi har också visat (ännu opublicerade data) att inkubation av NAP-protein i humant blod inte leder till alltför hög frisättning av cytokiner eller aktivering av celler i blodet, utan att frisättning och aktivering sker till signifikant lägre nivåer än för vissa andra redan godkända immunologiska läkemedel. Sammantaget ger det oss en stark tillförlit att kunna gå vidare och utvärdera CAR(NAP)-T-celler vid behandling av cancer.

” Vi har också visat (ännu opublicerade data) att inkubation av NAP-protein i humant blod inte leder till alltför hög frisättning av cytokiner eller aktivering av celler i blodet, utan att frisättning och aktivering sker till signifikant lägre nivåer än för vissa andra redan godkända immunologiska läkemedel. Sammantaget ger det oss en stark tillförlit att kunna gå vidare och utvärdera CAR(NAP)-T-celler vid behandling av cancer.

inducerar epitop-spridning i samband med att de attackerar tumörer med ett heterogent uttryck av the antigen CAR-T-cellerna riktar sig mot.

Vidare visade vi att den terapeutiska effekten hos CAR(NAP)-T-celler var precis lika god hos möss som vaccinerats att producera antikroppar mot NAP som hos möss som

FÖRSTA KLINISKA STUDIEN PÅ GÅNG

Därför förbereds nu en första klinisk studie med CAR(NAP)-T-celler vid Akademiska sjukhuset i Uppsala och Karolinska Universitetssjukhuset i Huddinge. CAR(NAP)-T-cellerna kommer att vara riktade mot CD20, ett antigen, som liksom CD19 är högt uttryckt i B-cellslymfom. Lymfompatienter som kommer att inkluderas i studien är de som endera inte kan behandlas inom redan godkända behandlingsprogram med CD19 CAR-T-celler eller patienter som fått återfall efter sin CD19 CAR-T-cellbehandling. Vi hoppas att CD20-riktade CAR(NAP)-T-celler ska inducera aktivering av patientens egna kroppsegna T-celler och därmed leda till en lägre återfallsfrekvens än vad som är fallet vid behandling med redan godkända CD19-riktade CAR-T-celler. Vidare hoppas vi kunna uppnå behandlingseffekt även för lymfompatienter som tidigare behandlats med CD19 CAR-T-celler men fått återfall med ett lymfom som saknar CD19-uttryck, och som idag saknar effektiv behandling.

Uppsala universitet kommer att vara sponsor för denna första akademiskt drivna studie där forskningsmedel för att bekosta studien kommer in dels från Cancerfonden genom ett utökat stöd till undertecknad, Magnus Essand, och dels från Elicera Therapeutics, ett spinn off-företag som satts upp av forskarkollegorna Di Yu och undertecknad vid Uppsala universitet. Genom att bilda Elicera Therapeutics har vi lyckats få in industrirelaterade forskningsanslag, dels från Vinnova och dels ett större så kallat Acceleratoranslag från European Innovation Council (EIC) som går direkt in i denna första kliniska studie. Vi planerar dessutom för en studie med CAR(NAP)-T-celler för behandling av den svårartade hjärntumörformen glioblastom, då med CAR(NAP)-T-celler som riktar sig mot proteinet interleukin 13 receptor alfa 2 (IL-13Ra2) som överuttrycks på cellytan av en majoritet av alla glioblastom. Denna studie hoppas vi kunna dra igång inom två till tre år.

MAGNUS ESSAND, PROFESSOR, INSTITUTIONEN FÖR IMMUNOLOGI, GENETIK OCH PATOLOGI, UPPSALA UNIVERSITET, MAGNUS.ESSAND@IGP.UU.SE

