

CAR T-клетки: поколения и модификации

Краткая аналитическая справка

2019 г.

T-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR) – это генно-инженерные T-клетки с CAR на своей поверхности. CAR является модифицированным поверхностным рецептором, который обеспечивает T-клеткам специфичность к предварительно определённой антигену-мишени, презентуемому на поверхности опухолевых клеток. Первые CAR были созданы около 30 лет назад и впоследствии подвергались поэтапной эволюции. В современной литературе выделяют пять поколений технологии CAR, разделённые по структуре и составу эндодомена.

Поколения CAR T-клеток

CAR первого поколения содержали один внутриклеточный домен ко-рецептора CD3 ζ , который содержит три мотива тирозин-активируемых иммунорецепторов (ITAM). CAR T-клетки первого поколения показывали свою эффективность в доклинических исследованиях, однако, ранние испытания на людях показали их минимальную активность из-за неполной активации¹.

CAR второго поколения, кроме внутриклеточного домена ко-рецептора CD3 ζ , содержали ко-стимулирующий домен во внутриклеточном сигнальном домене. Ко-стимулирующая молекула (CM) совместно с CD3 ζ обеспечивают активацию T-клеток, а также усиливают пролиферацию и обеспечивают выработку цитокинов. Существует несколько ко-стимулирующих доменов-кандидатов для этой роли, но чаще всего используются CD28 и 4-1BB (CD137).

CAR T-клетки третьего поколения, содержащие CD3 ζ и два ко-стимулирующих домена, не были более успешными, чем их аналоги второго поколения. Несмотря на эффективное уничтожение опухолевых клеток в кратковременных анализах их цитотоксичности *in vitro*, тестирование *in vivo* не было столь же результативным. Это могло быть связано с чрезмерной активацией CAR-T-клеток, что, в свою очередь, приводило к потере аутоотолерантности и последующему апоптозу здоровых клеток. А, во-вторых, у ряда пациентов наблюдалось ингибирование активности этих CAR-T-клеток².

CAR четвёртого поколения³ были получены путём добавления доменов, кодирующих иммуностимулирующие цитокины, к основанию конструкций второго

¹ Wassim Mchayleh, Prabhjot Bedi, Rajesh Sehgal, Melhem Solh. (2019). Chimeric Antigen Receptor T-Cells: The Future is Now. *JCM*. 8, 207;

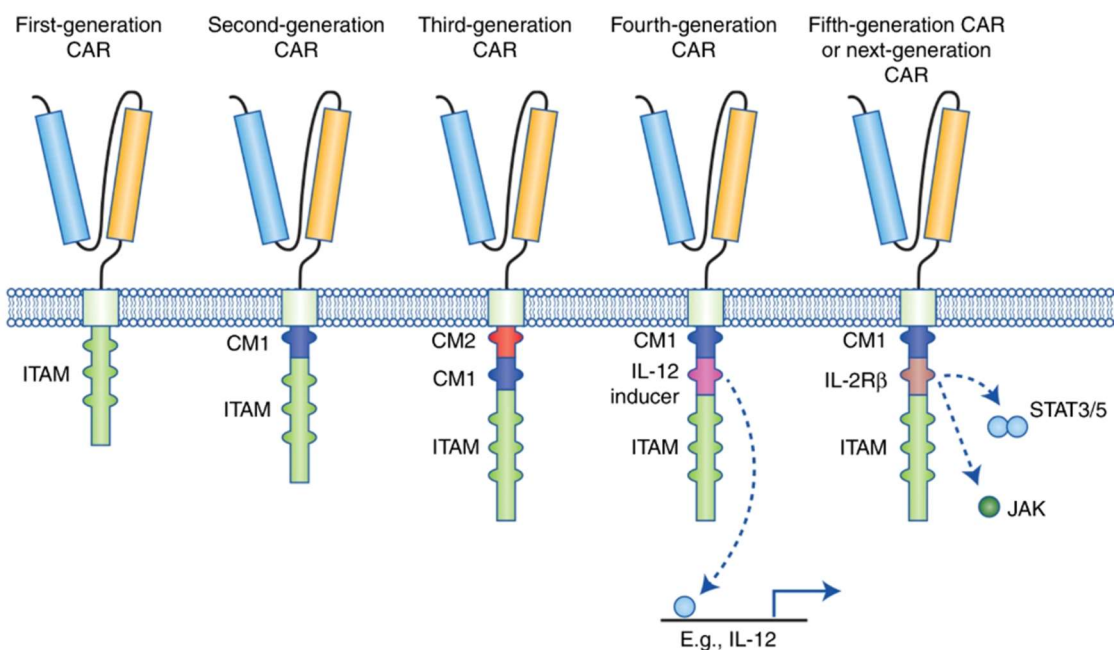
² Waleed Haso, Daniel W. Lee, Nirali N. Shah, Maryalice Stetler-Stevenson, Constance M. Yuan, et. al.. (2013). Anti-CD22–chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 121, 1165-1174;

³ Wassim Mchayleh, Prabhjot Bedi, Rajesh Sehgal, Melhem Solh. (2019). Chimeric Antigen Receptor T-Cells: The Future is Now. *JCM*. 8, 207;

поколения, что позволило увеличить экспансию CAR-T-клеток и, в то же время, делая их устойчивыми к иммуносупрессивной среде опухоли. Однако чрезмерная экспрессия иммуностимулирующих цитокинов приводила к ряду побочных эффектов⁴.

Пятое поколение также основано на CAR второго поколения, которое имеет усечённый цитоплазматический домен β -цепи рецептора IL-2 с сайтом связывания для фактора транскрипции STAT3. Антиген-специфическая активация этого рецептора одновременно запускает передачу сигналов через домены CD3 ζ , ко-стимулирующей домен CD28 и цитокиновый домен (JAK-STAT3/5)⁵, которая эффективно обеспечивает все три синергетических сигнала, физиологически необходимых, чтобы стимулировать полную активацию и пролиферацию T-клеток.

Ниже на рисунке схематически представлены данные поколения:



Также существуют дополнительные варианты CAR, которые являются вариациями разных поколений, например, двойные CAR (T-клетки несут сразу два идентичных CAR, нацеленных на два поверхностных антигена для улучшения распознавания клеток опухоли) и расщепленные CAR (T-клетки имеют разделённые домены ко-стимуляции и несут два различных CAR, которые требуют одновременного включения для того, чтобы активировать T-клетку). Оба варианта продемонстрировали высокую эффективность в

⁴ Oladapo O. Yeku, Renier J. Brentjens. (2016). Armored CAR T-cells: utilizing cytokines and pro-inflammatory ligands to enhance CAR T-cell anti-tumour efficacy. *Biochemical Society Transactions*. 44, 412-418;

⁵ Kagoya, Y. et al. A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects. *Nat. Med.* 24, 352 (2018).

доклинических моделях^{6,7,8}, и в настоящее время проводятся их клинические испытания^{9,10,11,12}.

Модификации CAR T-клеток

В настоящее время создаются различные модификации технологии CAR, которые улучшают их качества или расширяют возможности CAR T-клеток идентифицировать альтернативные мишени опухолевых клеток.

Для нацеливания иммунных клеток на опухоли, может использоваться хемокиновая сигнализация опухоли¹³. В исследованиях рака показано, что опухолевые клетки могут вырабатывать хемокины, которые передают сигналы раковым клеткам, способствуя их пролиферации и выживанию, а также их миграции. Для использования хемокинов в качестве идентификатора опухолевых клеток были созданы CAR T-клетки с поверхностными рецепторами хемокинов, например, CCR2¹⁴, CCR2b¹⁵, CCR4¹⁶, CCR7¹⁷, CXCR2¹⁸ или CXCR4¹⁹. Однако было выявлено, что опухоль может иметь разнообразный репертуар хемокинов²⁰, что делает необходимым проведение новых исследований для определения ключевых хемокинов для разных типов рака.

Исследования также направлены на улучшение безопасности применения CAR T-клеток. После введения пациентам CAR T-клетки становятся активными и трудно контролируемы. Для контроля их активации могут использоваться медикаменты, например, рапалог (модифицированная версия рапамицина). Однако есть и другие способы контроля, например, использование механизма истощения T-клеток при побочных

⁶ Zhong, X.-S., Matsushita, M., Plotkin, J., Riviere, I. & Sadelain, M. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI(3)kinase/AKT/Bcl-X(L) activation and CD8(+) T cell-mediated tumor eradication. *Mol. Ther.* 18, 413–420 (2010);

⁷ Duong, C. P. M., Westwood, J. A., Berry, L. J., Darcy, P. K. & Kershaw, M. H. Enhancing the specificity of T cell cultures for adoptive immunotherapy of cancer. *Immunotherapy* 3, 33–48 (2010);

⁸ Wilkie, S. et al. Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. *J. Clin. Immunol.* 32, 1059–1070 (2012);

⁹ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03289455>;

¹⁰ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03125577>;

¹¹ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03258047>;

¹² <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03198052>;

¹³ Chow, M. T. & Luster, A. D. Chemokines in cancer. *Cancer Immunol. Res.* 2, 1125–1131 (2014);

¹⁴ Brown, C. E. et al. Tumor-derived chemokine MCP-1/CCL2 is sufficient for mediating tumor tropism of adoptively transferred T cells. *J. Immunol.* 179, 3332 (2007);

¹⁵ Craddock, J. A. et al. Enhanced tumor trafficking of GD2 chimeric antigen receptor T cells by expression of the chemokine receptor CCR2b. *J. Immunother. (1991)* 33, 780–788 (2010);

¹⁶ Rapp, M. et al. C-C chemokine receptor type-4 transduction of T cells enhances interaction with dendritic cells, tumor infiltration and therapeutic efficacy of adoptive T cell transfer. *Oncoimmunology* 5, e1105428 (2016);

¹⁷ Carlsten, M. et al. Efficient mRNA-based genetic engineering of human NK cells with high-affinity CD16 and CCR7 augments rituximab-induced ADCC against lymphoma and targets NK cell migration toward the lymph node-associated chemokine CCL19. *Front. Immunol.* 7, 105 (2016).

¹⁸ Kershaw, M. H. et al. Redirecting migration of T cells to chemokine secreted from tumors by genetic modification with CXCR2. *Hum. Gene Ther.* 13, 1971–1980 (2002);

¹⁹ Hillerdal, V. & Essand, M. Chimeric antigen receptor-engineered T cells for the treatment of metastatic prostate cancer. *BioDrugs* 29, 75–89 (2015);

²⁰ Van Overmeire, E., Laoui, D., Keirsse, J., Van Ginderachter, J. A. & Sarukhan, A. Mechanisms driving macrophage diversity and specialization in distinct tumor microenvironments and parallels with other tissues. *Front. Immunol.* 5, 127 (2014);

эффектах или подавление активности CAR T-клеток вблизи неопухолевых клеток. Наиболее продвинутым способом является модификация CAR T-клеток, которые экспрессируют усечённый человеческий полипептид EGFR (huEGFRt). Благодаря этому полипептиду, при инъекции цетуксимаба, CAR T-клетки будут ликвидироваться другими клетками иммунной системы^{21,22}.

Кроме этого, существуют модификации для улучшения реактивности активации CAR T-клеток. Были разработаны CAR, нацеленные на Fc (кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина) антител (например, анти-CD16-CAR²³), или нацеленные на метки, присоединённые к антителам (Uni-CAR²⁴), а также их производные, такие, как FITC (анти-FITC CAR²⁵). Сходной стратегией для повышения активности CAR является использование биспецифичных антител, которые специфически рекрутируют CAR T-клетки путём нацеливания их на ко-трансдуцированный маркерный антиген²⁶.

Другим подходом является использование системы NOT-gate²⁷. Система NOT-gate, представляет из себя CAR T-клетки, экспрессирующие несколько различных CAR. Суть данной системы заключается в том, что один CAR нацелен на специфический опухолевый антиген, а другой CAR, подключённый к ингибирующим сигнальным доменам (iCAR), -- на антиген здоровой клетки. Одновременное подключение CAR и iCAR к одинаковым иммунным синапсам в случае с опухолевой клеткой повышает активацию, а, в случае со здоровой, понижает, или вовсе активация не происходит, что значительно повышает специфичность T-клеток.

К CAR применяют геномное редактирование с помощью технологии CRISPR-Cas9. Были предприняты попытки улучшения сопротивления иммуносупрессии путём отключения генов, кодирующих ингибирующие рецепторы или сигнальные молекулы, таких, как PD-1²⁸ или CTLA-4²⁹. Например, при дефиците PD-1, модифицированные CAR T-клетки показали повышенную противоопухолевую активность³⁰. Однако такая

²¹ Di Stasi, A. et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N. Engl. J. Med.* 365, 1673–1683 (2011);

²² Wang, X. et al. A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells. *Blood* 118, 1255–1263 (2011);

²³ Caratelli, S. et al. FCγ chimeric receptor-engineered T cells: methodology, advantages, limitations, and clinical relevance. *Front. Immunol.* 8, 457 (2017);

²⁴ Cho, J. H., Collins, J. J. & Wong, W. W. Universal chimeric antigen receptors for multiplexed and logical control of T cell responses. *Cell* 173, 1–13 (2018);

²⁵ Tamada, K. et al. Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies. *Clin. Cancer Res.* 18, 6436 (2012);

²⁶ Kobold, S. et al. Selective bispecific T cell recruiting antibody and antitumor activity of adoptive T cell transfer. *J. Natl. Cancer Inst.* 107, dju364-dju (2015);

²⁷ Tokarew, N., Ogonek, J., Endres, S. et al. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells. *Br J Cancer* 120, 26–37 (2019).

²⁸ Rupp, L. J. et al. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. *Sci. Rep.* 7, 737 (2017);

²⁹ Ren, J. et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget* 8, 17002–17011 (2017);

³⁰ Ren, J. et al. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition. *Clin. Cancer Res.* 23, 2255–2266 (2017);

модификация увеличивает риск неконтролируемой пролиферации Т-клеток и аутоиммунных реакций.

Для улучшения чувствительности CAR Т-клеток был разработан химерный переключатель рецепторов (CSRs), чтобы дать иммунным клеткам способность преодолевать иммуносупрессивную микросреду опухоли и на ингибирующее воздействие отвечать активацией. Было показано, что Т-клетки, трансдуцированные с помощью PDR-1-CD28 CSR, имеют повышенное фосфорилирование внеклеточной сигнальной киназы (ERK) и экспрессию гранзима В, повышенную пролиферацию и секрецию цитокинов, что указывает на ко-стимуляцию Т-клеток при связывании PD-L1³¹. Другой вариацией подхода CSR являются химерные цитокиновые рецепторы, например, IL-4R-IL-7R. Данная модификация позволяет переводить иммуносупрессивные сигналы в иммунно-активирующие сигналы. Было показано, что при включении этого рецептора иммуносупрессивные эффекты от IL-4, наоборот, увеличивают пролиферацию и повышают противоопухолевую активность *in vivo*³².

Существует также модификация, направленная на увеличение сопротивления к истощению CAR Т-клеток. Под истощением подразумевается снижение противоопухолевой активности, десенсибилизации и истощения внутренних ресурсов CAR Т-клеток под воздействием иммуносупрессии опухоли. В недавнем исследовании были созданы JUN CAR Т-клетки со сверхэкспрессией c-Jun³³. Данная модификация показала свою эффективность против пяти моделей опухолей, а также имеет улучшенный контроль опухолевого роста.

Альтернативный подход к использованию CAR Т-клеток заключается в модификациях, направленных на сверхэкспрессию провоспалительных цитокинов, превращая CAR Т-клетки в поддерживающие фабрики. Для этих целей используются CAR Т-клетки четвёртого поколения, известные как TRUCK. В настоящее время созданы следующие TRUCK-экспрессирующие провоспалительные цитокины: IL-12³⁴, IL-18^{35,36} и IL-15^{37,38}. Такие CAR Т-клетки имеют большой потенциал в комбинированной терапии, и на данный момент проводятся клинические исследования.

³¹ Prosser, M. E., Brown, C. E., Shami, A. F., Forman, S. J. & Jensen, M. C. Tumor PD-L1 co-stimulates primary human CD8+cytotoxic T cells modified to express a PD1:CD28 chimeric receptor. *Mol. Immunol.* 51, 263–272 (2012);

³² Leen, A. M. et al. Reversal of tumor immune inhibition using a chimeric cytokine receptor. *Mol. Ther.* 22, 1211–1220 (2014);

³³ Lynn, R.C., Weber, E.W., Sotillo, E. et al. c-Jun overexpression in CAR T cells induces exhaustion resistance. *Nature* 576, 293–300 (2019);

³⁴ Koneru, M., Purdon, T. J., Spriggs, D., Koneru, S. & Brentjens, R. J. IL-12 secreting tumor-targeted chimeric antigen receptor T cells eradicate ovarian tumors in vivo. *Oncoimmunology* 4, e994446 (2015);

³⁵ Hu, B. et al. Augmentation of antitumor immunity by human and mouse CAR T cells secreting IL-18. *Cell Rep.* 20, 3025–3033 (2017);

³⁶ Chmielewski, M. & Abken, H. CAR T cells releasing IL-18 convert to T-Bet high FoxO1 low effectors that exhibit augmented activity against advanced solid tumors. *Cell Rep.* 21, 3205–3219 (2017);

³⁷ Hoyos, V. et al. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia* 24, 1160–1170 (2010);

³⁸ Tamang, D. L. et al. Induction of granzyme B and T cell cytotoxic capacity by IL-2 or IL-15 without antigens: multiclonal responses that are extremely lytic if triggered and short-lived after cytokine withdrawal. *Cytokine* 36, 148–159 (2006).

Заключение

CAR T-терапия используется в основном при гематологических злокачественных новообразованиях, когда неконтролируемое размножение и рост злокачественных клеток опухоли затрагивает жидкие среды организма, как кровь и лимфа³⁹. В настоящее время CAR-T-клеточная терапия одобрена FDA⁴⁰ в качестве стандарта лечения некоторых форм агрессивной, рефрактерной неходжкинской лимфомы и рецидивирующего или рефрактерного острого лимфобластного лейкоза⁴¹. Кроме того, на стадии клинических исследований находятся CAR-T-клеточные терапии для других форм онкогематологических заболеваний, таких, как В-крупноклеточной лимфомы, хронического лимфолейкоза, малой лимфоцитарной лимфомы⁴².

Однако, несмотря на то, что эффективность CAR T-клеточной терапии не вызывает сомнений, для ряда гематологических злокачественных новообразований, важно понимать, что при более, чем 100 типах рака, гематологические раковые заболевания составляют лишь небольшую часть диагностированных раковых заболеваний и являются причиной только 6% из всех зарегистрированных случаев смерти⁴³. За последние несколько лет попытки лечения плотных, или солидных, злокачественных опухолей с помощью T-клеток CAR оказываются малоэффективными. Исследователи столкнулись со множеством ограничений и проблем, связанных как с самими опухолями, так и с побочными эффектами от применения CAR T-клеток, например, возникновения цитокинового шторма и нейротоксичности T-клеток⁴⁴.

³⁹ Paolo A. Ascierto, David F. Stronck, Ena Wang Developments in T Cell Based Cancer Immunotherapies — Springer International Publishing, 2015;

⁴⁰ <https://blog.dana-farber.org/insight/2017/10/fda-approves-car-t-cell-therapy-non-hodgkin-lymphoma/>;

⁴¹ Abutalib S.A. and Levine B.L. (2019). Update on FDA-approved CAR T-cell products. *The ASCO Post*;

⁴² Carl H. June, Michel Sadelain. (2018). Chimeric Antigen Receptor Therapy. *N Engl J Med.* **379**, 64-73;

⁴³ Chizuka, A. et al. Difference between hematological malignancy and solid tumor research articles published in four major medical journals. *Leukemia* 20, 1655 (2006);

⁴⁴ D'Aloia, M. M., Zizzari, I. G., Sacchetti, B., Pierelli, L. & Alimandi, M. CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors. *Cell Death Dis.* 9, 282 (2018).