

Γενετικά τροποποιημένα, με χιμαιρικούς αντιγονικούς υποδοχείς, T-λεμφοκύτταρα στην αντιμετώπιση αιματολογικών κακοηθειών

Παναγιώτης Καλογιαννίδης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ: Τα τρέχοντα χημειοθεραπευτικά σχήματα, η μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων αλλά και η υποστηρικτική θεραπευτική αγωγή οδήγησαν σε αξιοσημείωτη βελτίωση στην έκβαση ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες. Ωστόσο, θεραπευτικές προσεγγίσεις υψηλής αποτελεσματικότητας και χαμηλής τοξικότητας εξακολουθούν να είναι ένας εξαιρετικά επιθυμητός όσο και προκλητικός στόχος στην αιματολογία και την ογκολογία γενικότερα. Στο πλαίσιο αυτό, οι κυτταρικές θεραπείες έχουν εξαιρετικές δυνατότητες. Η γνώση πως οι εγχύσιες λεμφοκυττάρων του δότη έχουν τη δυνατότητα να εξαλείψουν νόσο που υποτροπίασε μετά από μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων, αποτέλεσε την απαρχή της ιδέας για παραγωγή κυττάρων με ειδικότητα έναντι κακοήθων κυττάρων. Η γενετική τροποποίηση των T-λεμφοκυττάρων ώστε να εκφράζουν επιπρόσθετα του φυσικού τους υποδοχέα (T cell receptor, TCR) και χιμαιρικό υποδοχέα έναντι αντιγόνων επιφανείας (chimeric antigen receptor, CAR), συνδυάζει την ανεξάρτητη του HLA συστήματος σύνδεση με το αντιγόνο-στόχο και μεταφορά μηνύματος ενεργοποίησης στο τροποποιημένο κύτταρο, αποσκοπώντας σε αποτελεσματική αντινεοπλασματική δράση και σε μακρά διάρκεια παραμονής στον ασθενή. Οι τεχνητά παραγόμενοι CARs ενσωματώνονται στα T-λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος μέσω χρησιμοποίησης συστημάτων μεταφοράς γενετικού υλικού, κυρίως ιικών φορέων. Τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα αντιγόνα επιφανείας είναι κυρίως αυτά που χαρακτηρίζουν κύτταρα B-λεμφοκτικής προέλευσης. Η ανοσοθεραπεία με χορήγηση T-λεμφοκυττάρων εφοδιασμένων με CARs αναπτύσσεται για περίπου δύο δεκαετίες και στο διάστημα αυτό έχει εξελιχθεί από μία καινοτόμο αλλά πολύπλοκη τεχνολογία, σε μία αναδυόμενη εναλλακτική θεραπευτική επιλογή για αιματολογικές κακοήθειες. Ωστόσο, πολλά θέματα που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα και ασφάλεια της μεθόδου δεν έχουν διευκρινιστεί ακόμα πλήρως. Η παρούσα σύντομη ανασκόπηση συνοψίζει την πρόσφατη εξέλιξη σε βιολογικό και κλινικό επίπεδο αλλά και τις μελλοντικές κατευθύνσεις στην πορεία της ευρύτερης κλινικής εφαρμογής των κυτταρικών θεραπειών στην αντιμετώπιση των αιματολογικών κακοηθειών.

Haema 2016; 7(1): 27-36 Copyright EAE

Εισαγωγή

Η ισχυρότερη απόδειξη της σημασίας των ανοσολογικών μηχανισμών στην αντιμετώπιση αιματολογικών κακοηθειών προέρχεται από το πεδίο της μεταμόσχευσης αλλογενών αιμοποιητικών κυττάρων (allogeneic stem cell transplantation, alloHSCT) και την αναγνωρισμέ-

νη δράση των T-λεμφοκυττάρων του μοσχεύματος έναντι κακοήθειας¹.

Φυσιολογικά, τα T-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν καρκινικά αντιγόνα μέσω του ειδικού αβ-υποδοχέα τους (αβ T-cell receptor, TCR), προκαλούν καταστροφή των κυττάρων-στόχων, ενώ παράλληλα ενισχύουν την κυτταροτοξική δράση ενεργοποιώντας και άλλα στοιχεία του ανοσολογικού συστήματος. Από την άλλη πλευρά, τα κακοήθη κύτταρα εμποδίζουν έως και καταργούν τη δράση των κυτταροτοξικών κυττάρων είτε μέσω μείωσης της έκφρασης των ειδικών καρκινικών αντιγόνων τους είτε μέσω επαγωγής μηχανισμών που καταστέλλουν την κυτ-

Αιματολογική Κλινική, Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού Οστών, Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, Νοσ. «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη

Συγγραφέας υπεύθυνος για επικοινωνία: Παναγιώτης Καλογιαννίδης, E-mail: pkaloyannidis@yahoo.gr

ταροτοξική λειτουργία.

Η βασική επιδίωξη για την αντιμετώπιση αιματολογικών κακοηθειών αλλά και του καρκίνου γενικότερα, μέσω ειδικών, ανοσολογικού τύπου θεραπειών (όπως είναι οι κυτταρικές θεραπείες), είναι η δημιουργία εξειδικευμένων προϊόντων που συγκρινόμενα με τη συμβατική χημειοθεραπεία θα έχουν την ελάχιστη τοξικότητα αποδίδοντας παράλληλα τη μέγιστη αποτελεσματικότητα.

Γενετικά τροποποιημένα κύτταρα

Με στόχο να ενισχυθεί η δράση των T-κυττάρων έναντι των κακοήθων κυττάρων διερευνώνται μέθοδοι γονιδιακής τροποποίησης των φυσικών TCR ή και ενσωμάτωσης ειδικών TCR για αντιγόνα κακοήθων κυττάρων, όμως τα αποτελέσματα δεν είναι προς το παρόν τα αναμενόμενα ώστε να ενταχθούν σε ευρεία κλινική εφαρμογή^{2,3}.

Εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση αποτελεί η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων T-λεμφοκυττάρων που θα εκφράζουν επιπλέον του φυσικού TCR και χιμαιρικό υποδοχέα (chimeric antigen receptor, CAR) που αναγνωρίζει αντιγόνα υδατανθρακικής ή γλυκολιπιδιακής προέλευσης, που εκφράζονται στην επιφάνεια των κακοήθων κυττάρων, διευρύνοντας έτσι τη δεξαμενή των πιθανών αντιγόνων-στόχων⁴.

Θεραπείες που βασίζονται στη χορήγηση γενετικά τροποποιημένων ειδικών CAR/T-λεμφοκυττάρων (CAR/T-cells) αποτελούν ένα ταχέως εξελισσόμενο τομέα των εξειδικευμένων θεραπειών αλλά και της ανοσοθεραπείας γενικότερα, επιδεικνύοντας σε πολλές μελέτες φάσης I-II αξιολογούμενη αποτελεσματικότητα χωρίς σημαντική τοξικότητα.

Σχεδιασμός του χιμαιρικού υποδοχέα

Τα γενετικά τροποποιημένα T-λεμφοκύτταρα ώστε να εκφράζουν CARs συνδυάζουν την ιδιότητα των μονοκλωνικών αντισωμάτων να αναγνωρίζουν και να συνδέονται με το αντιγόνο-στόχο, με την κυτταροτοξική ικανότητα καθώς και την ικανότητα αυτοανανέωσης των T-λεμφοκυττάρων παρέχοντας έτσι πρόσθετα πλεονεκτήματα έναντι των φυσικών T-λεμφοκυττάρων⁵.

Ο σχεδιασμός των σύγχρονων CARs ξεκίνησε, από τους Eshag και συν. προ 20-ετίας⁴. Στο βασικό σχεδιασμό αποτελούνται από ένα εξωκυττάριο τμήμα που προσφέρει τη θέση αναγνώρισης και σύνδεσης με το επιθυμητό αντιγόνο επιφανείας το οποίο προέρχεται από τις μεταβλητές περιοχές της βαρείας και ελαφράς αλυσίδας ενός μονοκλωνικού αντισώματος (monoclonal antibody, Mab) που συνδέονται μεταξύ τους με ένα μικρό συνθετικό πεπτιδίο (single chain variable fragment, scFv), ένα διαμεμβρανικό και ένα ενδοκυττάριο τμήμα που θα σηματοδοτήσει την ενεργοποίηση και την κυτταροτοξική λειτουργία του

γενετικά τροποποιημένου T-λεμφοκυττάρου. Επιπλέον, το εξωκυττάριο και διαμεμβρανικό τμήμα συνδέονται με εύκαμπτη συνδεσμική περιοχή (Εικόνα 1Α).

Το εξωκυττάριο τμήμα

Το scFv τμήμα είναι αυτό που καθορίζει την ειδικότητα του CAR^{6,7}. Ιδανικά μόρια-στόχοι είναι εκείνα που εκφράζονται μόνο σε κακοήθη κύτταρα ή σε κύτταρα που υποστηρίζουν την ανάπτυξη των κακοήθων κυττάρων. Στην περίπτωση αιματολογικών κακοηθειών, αντιγόνα επιφανείας ειδικά κυτταρικής σειράς, είναι αυτά που κατ'ά κύριο λόγο αποτελούν μόρια-στόχους των CARs. Τα ειδικά της λεμφικής σειράς αντιγόνα επιφανείας, CD19 και CD20, αν και εκφράζονται τόσο σε κακοήθη όσο και σε υγιή κύτταρα, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε κλινικές εφαρμογές κυτταρικής θεραπείας με CAR/T-cells.

Το τμήμα σύνδεσης εξωκυττάρου και διαμεμβρανικού τμήματος

Στον αρχικό σχεδιασμό το τμήμα αυτό εξυπηρετούσε μόνο τη σύνδεση του εξωκυττάρου με το διαμεμβρανικό τμήμα. Ωστόσο, αν και τα αποτελέσματα μελετών είναι αντικρουόμενα, φάνηκε ότι το μήκος του τμήματος σύνδεσης του εξωκυττάρου και διαμεμβρανικού τμήματος συμβάλλει στη λειτουργικότητα και αποτελεσματικότητα του CAR/T-cell^{7,8}.

Το διαμεμβρανικό τμήμα

Το διαμεμβρανικό τμήμα συνήθως προέρχεται από μέρη των CD3-ζ, CD4, CD8 ή CD28 μορίων. Όπως και το προηγούμενο τμήμα, αρχικά σχεδιάστηκε ως συνδετικό μέσο, όμως υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις πως και το διαμεμβρανικό τμήμα επηρεάζει τη δραστηριότητα του CAR/T-cell. Οι αρχικοί CAR που είχαν ως διαμεμβρανικό τμήμα προερχόμενο από το CD3-ζ μόριο αποδείχθηκαν λιγότερο σταθεροί από αυτούς που είχαν διαμεμβρανικό τμήμα προερχόμενο από το CD28 μόριο⁹.

Το ενδοκυττάριο τμήμα

Το ενδοκυττάριο τμήμα είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση του T-κυττάρου μετά την αναγνώριση και σύνδεση του αντιγόνου στόχου με το scFv. Αρχικά, η ενεργοποίηση του CAR/T-cell βασίζονταν στη σηματοδότηση ενός μόνο μονοπατιού είτε του εξαρτώμενου από το CD3-ζ μόριο του συμπλέγματος του φυσικού TCR υποδοχέα είτε του Fc υποδοχέα της IgE-γ αλυσίδας (CAR 1^{nc} γενιάς)¹⁰. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η ολοκληρωμένη και αποτελεσματική λειτουργία των T-cells απαιτεί, μετά την σύνδεση

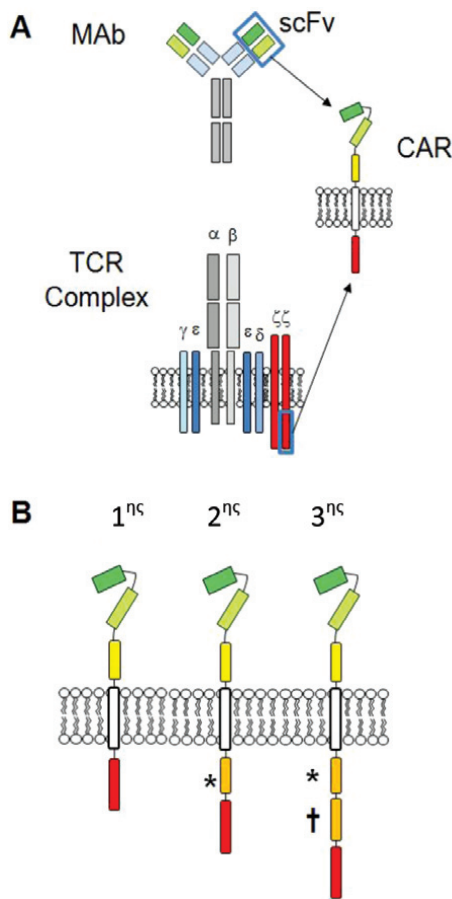
με τον αντιγονικό στόχο, την ενεργοποίηση των συνδεδεμένων μονοπατιών. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω σύνδεσης των μορίων (π.χ. CD80, CD86) που εδράζονται στη μεμβράνη επιφάνειας του κακοήθους κυττάρου και των υποδοχέων τους (π.χ. CD28) που εδράζονται στην μεμβράνη των T-cells¹¹. Σε απουσία ενεργοποίησης αυτού του μονοπατιού, επέρχεται “αν-ενέργεια” των T-cells με τελικό αποτέλεσμα την επαγωγή συνθηκών ανοσολογικής ανοχής. Τα κακοήθη κύτταρα με στόχο να αποφύγουν την κυτταροτοξική δράση των T-cells και να επάγουν την “ανοσολογική αν-ενέργεια” μειώνουν ή και καταργούν την έκφραση των συνδεδεμένων μορίων¹². Στην πορεία της κλινικής εφαρμογής θεραπειών με CAR/T-cells αποδείχθηκε πως η ενσωμάτωση ενός ή ακόμα και δύο συνδεδεμένων μορίων όπως των CD28, CD134, CD137, CD27 που θα ενεργοποιούνται άμεσα μετά τη σύνδεση με το αντιγόνο στόχο, αυξάνει την αποτελεσματικότητα και επιβίωση των συγκεκριμένων CAR/T-cells (CARs 2^{ης} ή

3^{ης} γενεάς), με αποτέλεσμα η συγκεκριμένη μέθοδος δημιουργίας CAR να θεωρείται επί του παρόντος η πλέον αποδεκτή^{9,13-17} (Εικόνα 1B).

Μέθοδοι γενετικής τροποποίησης των λεμφοκυττάρων

Τα DNA πλασμίδια που μεταφέρουν την πληροφορία έκφρασης CAR μπορεί να ενσωματωθούν στο γενετικό υλικό του κυττάρου στόχου μετά από εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (electroporation ή nucleoporation). Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ο χαμηλός βαθμός διαμόλυνσης που απαιτεί μεγάλο χρόνο *ex-vivo* καλλιέργειας των κυττάρων για να παραχθεί ικανοποιητικός αριθμός για κλινική χρήση, με αποτέλεσμα την “κυτταρική εξουθένωση” και άρα την πλημμελή λειτουργικότητα των T-λεμφοκυττάρων¹⁸.

Η γονιδιακή μεταφορά μπορεί επίσης να γίνει μέσω ιικών φορέων όπως οι γ-ρετροϊοί (gamma retroviral vectors). Αν και είναι περισσότερο αποδοτική μέθοδος αναφορικά με την ικανότητα διαμόλυνσης, υπάρχει η πιθανότητα εμφάνισης μεταλλαξιογένεσης λόγω ενσωμάτωσης του φορέα στη γειτονία ογκογονιδίων (insertional mutagenesis). Οι λεντιϊοί αποτελούν την άλλη μεγάλη οικογένεια ιών που δοκιμάστηκαν ως “οχήματα μεταφοράς” γονιδίων στο γενετικό υλικό των T-λεμφοκυττάρων και διαθέτουν το πλεονέκτημα της γενετικής τροποποίησης και κυττάρων εν ηρεμία, ιδιότητα που ελλείπει από τους γ-ρετροϊούς, καθώς και ασφαλέστερο προφίλ θέσεων ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα¹⁹⁻²¹.



Εικόνα 1. Α: Σχεδιασμός και βασικά μέρη του CAR. **Β:** CAR 1^{ης} γενεάς (χωρίς ενσωματωμένο συνδεδεμένο μορίο), CAR 2^{ης} γενεάς (με ενσωμάτωση ενός συνδεδεμένου μορίου), CAR 3^{ης} γενεάς (με ενσωμάτωση δύο συνδεδεμένων μορίων). *, †: συνδεδεμένα μόρια (π.χ., CD28/CD86 & CD80, CD134/OX40, CD137/4-1BB).

Ο ρόλος της χορήγησης χημειοθεραπείας πριν την χορήγηση λεμφοκυττάρων

Η χορήγηση χημειοθεραπευτικών-λεμφολυτικών παραγόντων πριν την έγχυση των CAR/T-cells βελτιώνει την έκπτυξη, παραμονή και την δραστηριότητά τους. Αυτά τα οφέλη είναι αποτέλεσμα της ελάττωσης των Tregs, της ελάττωσης της μάζας των κακοήθων κυττάρων και της αυξημένης παραγωγής κυτταροκινών (π.χ. IL-7 και IL-15) που ευνοούν την *in vivo* έκπτυξη των λεμφοκυττάρων^{22,23}.

Τρέχουσα κλινική εμπειρία

Όπως προαναφέρθηκε, στην πλειοψηφία των μελετών τα αντιγόνα-στόχοι ήταν το CD19 και CD20 και συνεπώς η μεγαλύτερη εμπειρία προέρχεται από την αντιμετώπιση λεμφικών κακοηθειών, B-κυτταρικής αρχής. Πρέπει όμως να σημειωθεί πως οι μελέτες είναι φάσης I-II, με μικρό αριθμό ασθενών και με ετερογενή χαρακτηριστικά όσον αφορά τα νοσήματα, τον αριθμό των εγχυθέντων κυττάρων, το είδος της προηγηθείσας θεραπείας, τα χηρ-

σιμοποιηθέντα συνδιεγερτικά μόρια και τον τρόπο διαμόλυνσης των κυττάρων.

1^η γενεάς CARs

Οι πρώτες κλινικές μελέτες διενεργήθηκαν με 1^η γενεάς CARs και αν και στις περισσότερες από αυτές η έγχυση συνδυάστηκε και με προηγούμενα χημειοθεραπεία, με στόχο τη μείωση του φορτίου της κακοήθειας αλλά και τη μείωση των T-ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (Tregs), τα αποτελέσματα ήταν γενικά μη ικανοποιητικά, καθώς επιτεύχθηκε μειωμένη έκπτωση και παροδική μόνο παραμονή των CAR/T-cells. Σε δύο μελέτες σε ασθενείς με λεμφικές κακοήθειες που χορηγήθηκε επαρκής αριθμός CAR/T-cells 1^η γενεάς, η επιβίωση των τροποποιημένων κυττάρων δεν διήρκεσε πάνω από 3 εβδομάδες^{24,25}.

2^η γενεάς CARs

Τα περισσότερο ικανοποιητικά αποτελέσματα έχουν επιτευχθεί με CARs 2^η γενεάς, καθώς εκτός της άμεσης κυτταροτοξικότητας βελτιώθηκε τόσο η έκπτωση όσο και η διάρκεια ζωής των CAR/T-cells.

Ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα από τη χρήση των 2^η γενεάς CAR/T-cells δημοσιεύτηκαν από την ομάδα του πανεπιστήμιου της Pennsylvania. Σε 3 ασθενείς με πολυ-χημειοανθεκτική CLL χορηγήθηκαν 2^η γενεάς CAR/T-cells μετά από χορήγηση Endoxan και Pentostatin ή Bendamustin. Όλοι παρουσίασαν ύφεση της νόσου (2 πλήρη, 1 μερική), ο ένας δε, εμφάνισε και σύνδρομο λύσης. Τα γονιδιακά τροποποιημένα κύτταρα εκπύχθηκαν >1000 φορές και συνέχισαν να ανιχνεύονται σε υψηλό αριθμό για διάστημα άνω των 6 μηνών και μάλιστα σε ιστούς εκτός του περιφερικού αίματος, όπως ο μυελός των οστών. Οι συγγραφείς υπολόγισαν πως κάθε γονιδιακά τροποποιημένο κύτταρο κατέστρεψε άνω των 1000 κακοήθων κυττάρων²⁶.

Πιο πρόσφατα, σε μελέτη των Kochenderfer και συν. 8 ασθενείς με χημειοανθεκτική νόσο (B-NHL ή CLL) αντιμετωπίστηκαν με συγχορήγηση 2^η γενεάς CAR/T-cells και χημειοθεραπείας. Οι 7/8 πέτυχαν ύφεση της νόσου (1 πλήρη, 6 μερική) και διαπιστώθηκε παραμονή των εγχυθέντων κυττάρων για 6-18 μήνες²².

Με στόχο την αντιμετώπιση περισσότερο επιθετικών αιματολογικών κακοηθειών όπως είναι η οξεία λευχαιμία, διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα αλλά και η τοξικότητα της χορήγησης CAR/T-cells ειδικών έναντι του CD19 μορίου, σε 2 παιδιατρικούς ασθενείς που έπασχαν από ανθεκτική οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία. Ο ένας είχε προηγουμένως υποβληθεί και σε alloHSCT. Η χορήγηση των CAR/T-cells είχε σαν αποτέλεσμα την επίτευξη πλήρους ύφεσης και στους δύο ασθενείς. Στον ένα διατηρείται για διάστημα πέραν των 12 μηνών, ενώ στον

δεύτερο η νόσος υποτροπίασε 2 μήνες αργότερα, όμως ο κακοήθης κλώνος δεν εξέφραζε το αντιγόνο CD19 και συνεπώς τα κακοήθη κύτταρα δεν ήταν πλέον “αναγνωρίσιμα” από τα CAR/T-cells. Η τοξικότητα ήταν αποδεκτή, με σημαντικότερη ανεπιθύμητη ενέργεια την εμφάνιση του συνδρόμου της συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) ή “καταιγίδας κυτταροκινών”, που αντιμετωπίστηκε επιτυχώς με τη χορήγηση κατάλληλης αγωγής²⁷. Πρόσφατα, ερευνητές από το Memorial Sloan-Kettering Cancer Center δημοσίευσαν αποτελέσματα της μεγαλύτερης μέχρι σήμερα αξιολογηθείσας σειράς ασθενών (16 ασθενείς, σε 4 είχε προηγηθεί allo HSCT) που έπασχαν από ανθεκτική οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και έλαβαν αυτόλογα CAR/T-cells ειδικά έναντι του CD19 μορίου. Το ποσοστό συνολικής ανταπόκρισης ήταν 88%, ενώ ιδιαίτερα υψηλό ήταν και το ποσοστό μοριακής ύφεσης (75%). Είναι αξιοσημείωτο πως η χορήγηση των CAR/T-cells λειτούργησε σαν “γέφυρα” ώστε 12 ασθενείς που δεν ήταν υποψήφιοι για alloHSCT λόγω ιδιαίτερα ανθεκτικής νόσου, τελικά να αποκτήσουν τη δυνατότητα να υποβληθούν σε alloHSCT. Και σ’ αυτή τη μελέτη η σημαντικότερη επιπλοκή ήταν η εμφάνιση SIRS ενώ στους 4 ασθενείς που είχε προηγηθεί alloHSCT, η χορήγηση των CAR/T-cells δεν συνοδεύτηκε από εμφάνιση νόσου του μοσχεύματος κατά του ξενιστή²⁸.

Συγκριτική μελέτη μεταξύ 1^η vs. 2^η γενεάς CAR/T-cells από την ομάδα του Baylor College of Medicine (BCM) με 6 ασθενείς, κατέδειξε πως τα 2^η γενεάς CAR/T-cells εμφάνισαν καλύτερη έκπτωση, μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και ήταν δυνατή η επανέκπτυσή τους μετά από διέγερση του φυσικού τους TCR⁹.

3^η γενεάς CARs

Από την ομάδα του Seattle δημοσιεύθηκαν αποτελέσματα πιλοτικής μελέτης φάσης I με 3^η γενεάς CAR/T-cells. Τέσσερις ασθενείς με B-λεμφικές κακοήθειες έλαβαν τα ειδικά τροποποιημένα κύτταρα, οι 3 μετά από χορήγηση Endoxan. Δύο ασθενείς χωρίς μετρήσιμη νόσο προ της έγχυσης λεμφοκυττάρων, παραμένουν χωρίς νόσο για 12 και 24 μήνες. Ένας ασθενής πέτυχε ύφεση που διήρκεσε 12 μήνες και ένας δεν απάντησε στη χορήγηση. Για τους 3 ασθενείς που είχαν κλινικό όφελος τα γενετικά τροποποιημένα λεμφοκύτταρα ανιχνεύονταν για 9-12 μήνες μετά την έγχυση²⁹.

Εναλλακτικά μόρια-στόχοι και προέλευση των κυττάρων

Το αντιγόνο επιφανείας CD30 αποτέλεσε επίσης μόριο-στόχο για CAR/T-cells. Το μόριο CD30 εκφράζεται κυρίως σε λεμφώματα Hodgkin αλλά και σε κάποιους

υποτύπους Non Hodgkin λεμφωμάτων. Δεδομένων των κλινικών ανταποκρίσεων που διαπιστώθηκαν μετά από τη χορήγηση του μονοκλωνικού αντισώματος anti CD30 αλλά και των ενθαρρυντικών προκλινικών αποτελεσμάτων, κλινικές μελέτες είναι σε εξέλιξη^{5,30}.

Στις προαναφερθείσες μελέτες, τα T-λεμφοκύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για κλινική χρήση προέρχονταν από τους ίδιους τους ασθενείς (αυτόλογα T-Cells). Μία ενδιαφέρουσα προσέγγιση είναι αυτή των Kochenderfer και συν. που χορήγησαν κύτταρα του δότη γενετικά τροποποιημένα ώστε να εκφράζουν CAR 2^{nc} γενεάς για το CD19, σε 10 ασθενείς με B-κυτταρικής αρχής αιματολογικές κακοήθειες που παρουσίασαν ανθεκτική νόσο μετά από προηγηθείσα alloHSCT αλλά και εγχύσεις λεμφοκυττάρων του δότη (Donor lymphocyte infusions, DLIs). Στους ασθενείς δεν χορηγήθηκε καμία θεραπεία πριν την έγχυση των CAR/T-cells. Έπειτα από διάμεση περίοδο 30 ημερών διαπιστώθηκε σημαντική κλινική απάντηση της νόσου σε 3/10 ασθενείς (1 σταθερή πλήρη ύφεση και 1 σταθερή μερική ύφεση) ενώ η νόσος παρέμεινε σταθερή σε πέντε. Στους ασθενείς που παρουσίασαν απάντηση ή νόσος παρέμεινε σταθερή, τα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα ανιχνεύονταν για διάστημα άνω 4 εβδομάδων. Οι ανεπιθύμητες αντιδράσεις ήταν καλά ελεγχόμενες και αφορούσαν αύξηση θερμοκρασίας, ήπια πτώση της πίεσης και κόπωση³¹.

Αντίθετα με τις λεμφικές κακοήθειες, λιγότερη εμπειρία υπάρχει για τις μυελοειδείς αιματολογικές κακοήθειες αν και σε προκλινικές μελέτες φάνηκε πως ειδικά CAR/T-cells είναι δυνατόν να επιδείξουν ισχυρή κυτταροτοξική δράση έναντι μυελικής προέλευσης κακοήθων κυττάρων. Δημοσιευμένα αποτελέσματα υπάρχουν από μία μελέτη με CAR/T-cells έναντι του Lewis-Y αντιγόνου. Σε τέσσερις ασθενείς χορηγήθηκαν τροποποιημένα T-cells μετά από προηγηθείσα χημειοθεραπεία που συνοδεύτηκαν από παροδικές απαντήσεις σε 3 ασθενείς χωρίς άμεση τοξικότητα. Τα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα παρέμειναν ανιχνεύσιμα για τουλάχιστον 4 μήνες³². Ειδικά CAR/T-cells για το CD123 και CD33 αντιγόνο έχουν δοκιμαστεί σε προκλινικά μοντέλα³³. Ειδικά για το CD33 υπάρχουν ενστάσεις για το κατά πόσον είναι το ιδανικό αντιγόνο-στόχος καθώς είναι πανμυελικός δείκτης, και η χορήγηση των ειδικών T-λεμφοκυττάρων θα μπορούσε να οδηγήσει σε παρατεταμένη μυελική απλασία.

Ο δρόμος προς την ευρεία κλινική εφαρμογή

Αν και ειδικά CAR/T-cells είναι διαθέσιμα προς κλινική εφαρμογή από εικοσαετίας και πλέον, εν τούτοις, αποδείχθηκε πως ήταν δύσκολο να αναπτυχθούν σε τέτοιο βαθμό ώστε να αποτελέσουν θεραπευτική επιλογή, εκτός θεραπευτικών πρωτοκόλλων. Εκτός του προφανούς περιορισμού που πηγάζει από την ύπαρξη υψηλά

εξειδικευμένου κέντρου καθώς και επιστημονικού προσωπικού ικανού να παράγει CAR/T-cells, προκύπτουν και άλλα θέματα που πρέπει να απαντηθούν στο επόμενο διάστημα, ώστε οι κυτταρικές θεραπείες να αποτελέσουν εναλλακτική ή ακόμη και την πρώτη θεραπευτική επιλογή στην καθ'ημέρα κλινική πράξη.

Θέματα προς επίλυση

Ποιος ο βέλτιστος υποπληθυσμός T-λεμφοκυττάρων για γονιδιακή τροποποίηση;

Ο ιδεώδης υποπληθυσμός T-λεμφοκυττάρων, υποψήφιος προς διαμόλυνση, θα πρέπει να πληροί κάποια ελάχιστα χαρακτηριστικά: ικανότητα μετανάστευσης σε περιοχές που εδράζονται τα κακοήθη κύτταρα-στόχοι, απάντηση στα συνδιεγερτικά μηνύματα ώστε να ασκούν την μέγιστη κυτταροτοξική δράση και να εκπύσσονται, και μακρά διάρκεια ζωής⁵.

Τα τελικής διαφοροποίησης κυτταροτοξικά T-cells (effector T-cells, Teff) είναι αυτά που κατά κύριο λόγο ασκούν τη δράση έναντι των κακοήθων κυττάρων αλλά η μικρή πολλαπλασιαστική τους ικανότητα και συνεπώς η μικρή διάρκεια παραμονής τους in vivo, τα καθιστά λιγότερο ικανά στο να αποτελέσουν την καλύτερη ομάδα T-κυττάρων για γενετική τροποποίηση. Οι έρευνες εστιάζονται κυρίως στη χρήση περισσότερο αδιαφοροποιητών κυττάρων, όπως τα κύτταρα μνήμης (memory cells, Tm), δηλαδή κύτταρα που έχουν έρθει σε επαφή με κοινά αντιγόνα (πχ συνήθων ιών) και συνεπώς μπορούν μελλοντικά να εκπτυχθούν γρήγορα σε εκ νέου επαφή του φυσικού TCR με το αντιγόνο και έχουν μακρά διάρκεια ζωής. Η ομάδα του Seattle διενεργεί κλινική μελέτη με θετικά επιλεγμένα Tm που τροποποιήθηκαν γονιδιακά ώστε να εκφράζουν CAR^{34,5}. Πρόσφατα έχει ταυτοποιηθεί υποπληθυσμός λεμφοκυττάρων που έχουν τα χαρακτηριστικά τόσο του αρχέγονου όσο και του “έμπειρου” T-cell (CD435RA+, CD62L+, CCR7+). Εφόσον επιβεβαιωθούν οι μεγάλες δυνατότητες πολλαπλασιασμού αλλά και διαφοροποίησης σε Tm και Teff κύτταρα, θα μπορούσε ο συγκεκριμένος υποπληθυσμός να αποτελέσει την ομάδα στόχο των T-cells για γονιδιακή τροποποίηση³⁵.

Βελτίωση της συνδιέγερσης αξιοποιώντας τον φυσικό TCR

Η ενεργοποίηση των βιολογικών μονοπατιών συνδιέγερσης, όπως ήδη αναφέρθηκε, αποτελεί βασική προϋπόθεση για την έκπτυξη, τη μακρά παραμονή και τελικά την αποτελεσματικότητα των T-cells.

Η ενσωμάτωση των συνδιεγερτικών μορίων (CD28, CD134, CD137 ή CD27) στον CAR δεν αποτελεί φυσιολογική παραλλαγή της λειτουργίας των T-cells και συνεπώς

μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την λειτουργία των γονιδιακά τροποποιημένων CAR/T-cell (πχ πρώιμος κυτταρικός θάνατος λόγω έντονης ενεργοποίησης ή αυξημένη τοξικότητα λόγω υπερβολικής παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών)⁵.

Μια ιδιαίτερα ελκυστική εναλλακτική προσέγγιση θα μπορούσε να είναι η χρησιμοποίηση για γονιδιακή τροποποίηση ειδικών έναντι ιών, T-λεμφοκυττάρων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η σηματοδότηση της συνδιέγερσης του CAR/T-cell θα γίνεται μέσω του φυσικού TCR υποδοχέα που έχει ήδη εκπαιδευτεί μέσω φυσικής οδού, να αναγνωρίζει ιικά αντιγόνα. Κατ' ακολουθία, ειδικά T-cells έναντι των συνήθων ιών (π.χ. ειδικά για Epstein Bar, cytomegalovirus) που είναι γενετικά τροποποιημένα να εκφράζουν CARs, μπορούν να εκτύσσονται όταν έρχονται σε επαφή με αντιγόνα ιών που είναι σε λανθάνουσα κατάσταση, εξασφαλίζοντας έτσι την απαιτούμενη συνδιέγερση και τη μακρά διάρκεια παραμονής των Tm και Teff στον ασθενή.

Η ομάδα από το BCM διερεύνησε την τακτική γονιδιακής τροποποίησης ειδικών για τον EBV T-λεμφοκυττάρων, ώστε να εκφράζουν και CARs 1⁹⁵ ή 2⁹⁵ γενεάς έναντι του CD20, σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε alloHCT για χημειοανθεκτικές B-λεμφικές κακοήθειες. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε πολλούς είχε χορηγηθεί το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-CD20. Καθώς τα γονιδιακά τροποποιηθέντα κύτταρα προέρχονταν από τους ασθενείς, το μείζον πρόβλημα που αντιμετώπισαν οι ερευνητές ήταν η μικρή διάρκεια παραμονή των CAR/T-cells, προφανώς διότι οι προηγηθείσες θεραπείες και ιδιαίτερα η χορήγηση του anti-CD20 επηρέασε τη λειτουργία τους³⁶. Με στόχο να ξεπεραστεί το συγκεκριμένο πρόβλημα, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν για γονιδιακή τροποποίηση λεμφοκύτταρα των υγιών dotών εφόσον ήταν οροθετικοί στον EBV. Σε μελέτη φάσης -1 χορηγήθηκαν αλλογενή EBV-ειδικά CAR/T-cells σε οκτώ ασθενείς, δεν διαπιστώθηκε σοβαρού βαθμού τοξικότητα (συμπεριλαμβανομένης και της GvHD) ωστόσο, εμφανής κλινική απάντηση διαπιστώθηκε μόνο σε 2/6 ασθενείς με μετρήσιμη νόσο³⁷. Η ίδια ομάδα χρησιμοποίησε για γενετική τροποποίηση ειδικά T-cells έναντι του CMV, που επίσης συχνά προσβάλλει ασθενείς και διατηρείται σε λανθάνουσα κατάσταση επί μακρόν³⁸.

Άλλες προσεγγίσεις που βελτιώνουν την έκπτυξη, παραμονή και δράση των CAR/T-cells

Το συνδιεγερτικό σήμα είναι μεν απαραίτητο αλλά όχι ικανό ώστε από μόνο του να αναστείλει τους κατασταλτικούς μηχανισμούς που προέρχονται από τα κακοήθη κύτταρα και οι οποίοι μειώνουν ή και αναστέλλουν πλήρως την άνοση αντίδραση του οργανισμού.

Η IL-2 έχει ιδιότητες αυξητικού παράγοντα για τα T-cells, απελευθερώνεται από τα CAR/T-cells μετά την σύνδεση με το αντιγόνο-στόχο, αλλά δεν είναι επαρκής ώστε από μόνη της να ανατρέψει την “αν-ενέργεια” που μπορεί να προκαλέσουν τα κακοήθη κύτταρα στα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος. Επιπλέον η IL-2 μπορεί να αυξήσει την προσέλκυση των Tregs στα σημεία δράσης των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων^{39,40}. Περισσότερο αποτελεσματικές κυτταροκίνες στο να αποτραπεί η προερχόμενη από τα κακοήθη κύτταρα αναστολή της κυτταροτοξικής δράσης είναι οι IL-15, IL-7, IL-12.

Η IL-15 προάγει τον πολλαπλασιασμό, αναστέλλει την απόπτωση και την κυτταρική εξουθένωση των Teff-cells, βελτιώνει τη διάρκεια ζωής των Tm-cells και μειώνει την ανασταλτική δράση των Tregs επί των κυτταροτοξικών T-cells. Έχει χορηγηθεί ως ανασυνδυασμένος παράγοντας για την in vivo βελτίωση της δράσης υιοθετούμενης ανοσοθεραπείας. CAR/T-cells προγραμματισμένα να παράγουν IL-15 μετά τη σύνδεση με το αντιγόνο στόχο, έχουν δοκιμαστεί σε προκλινικά μοντέλα και αναμένονται με ενδιαφέρον τα αποτελέσματα κλινικών μελετών^{41,42}.

Η εξωγενής χορήγηση IL-7 αποδείχθηκε εξαιρετικά ανεκτή. Οι Vera και συν. τροποποίησαν γενετικά το σηματοδοτικό μονοπάτι της IL-7/IL-7Ra, ώστε τα CAR/T-cells επιλεκτικά να επιδεικνύουν σημαντική έκπτυξη μετά από εξωγενή χορήγηση IL-7⁴³.

Η ίδια ομάδα πρότεινε μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα προσέγγιση σχεδιάζοντας CAR/T-cells που θα έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν μηνύματα που φυσιολογικά προκαλούν αναστολή της κυτταροτοξικής δράσης σε μηνύματα που θα επάγουν τη δραστηριότητα των CAR/T-cells. Σε ζωικό μοντέλο χορήγησαν CAR/T-cells με ειδικότητα του εξωκυττάρου τμήματος του CAR για τον υποδοχέα της IL-4, η οποία εκκρίνεται από το περιβάλλον των κακοήθων κυττάρων και προάγει Th2 δράση και άρα συνθήκες ανοχής για τα T-cells. Το ενδοκυττάριο τμήμα είναι αυτό του υποδοχέα της IL-7 που επάγει την κυτταροτοξική δράση των T-cells. Στο συγκεκριμένο ερευνητικό μοντέλο, οι ερευνητές διαπίστωσαν πως η δέσμευση του υποδοχέα της IL-4 στα τροποποιημένα CAR/T-cells τελικά οδήγησε στη διατήρηση του Th1 φαινοτύπου και σε ενδυνάμωση του πολλαπλασιασμού και της κυτταροτοξικής τους δράσης⁴⁴.

Η IL-12 προάγει τις Th1 δράσεις, τη δραστηριότητα των T-cells ενώ οδηγεί σε απόπτωση τα Tregs καθώς και κύτταρα που επάγουν την αναστολή της αντι-κακοήθους δράσης των T-cells. Γονιδιακά τροποποιημένα CAR/T-cells που εκκρίνουν IL-12 ήδη δοκιμάζονται σε κλινική μελέτη του National Cancer Institute⁵.

Για την καλύτερη δράση των CAR/T-cells έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης, μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του CTL4 και του υποδοχέα ή του συνδέτη του programmed death 1 (PD-1) μορίου, που ενεργοποιούν μονοπάτια

που ασκούν ανασταλτική δράση στα ενεργοποιημένα T-cells^{46,47}.

Βελτίωση της ασφάλειας των CAR/T-cells

Μέθοδοι γονιδιακής μεταφοράς

Οι ρετροϊκοί και λεντι-ϊκοί φορείς αποτελούν τα πλέον αποδεκτά μέσα για μεταφορά και ενσωμάτωση των επιθυμητών πληροφοριών στο γενωμικό υλικό των T-cells. Οι ανησυχίες για τις βλαπτικές επιδράσεις που μπορεί να προκαλέσουν στον ασθενή οι συγκεκριμένοι φορείς, υπό τη μορφή της εισχωρητικής μεταλλαξιόγνεσης, προέρχονται από την κλινική εμπειρία διαμόλυνσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (hematopoietic stem cells, HSCs). Μέχρι σήμερα παρόμοια τοξικότητα δεν έχει αναφερθεί σε διαμόλυνση T-λεμφοκυττάρων. Πιθανή εξήγηση είναι πως τα T-cells είναι περισσότερο διαφοροποιημένα κύτταρα από τα HSCs και συνεπώς λιγότερο “επιρρεπή” στις βλαπτικές επιδράσεις της «ημιτυχαίας» ενσωμάτωσης των ιικών φορέων στο γονιδίωμα, η οποία μπορεί να προκαλέσει εισχωρητική μεταλλαξιόγνεση⁴⁸.

Οι ομάδες του MD Anderson Cancer Center (MDACC) και BCM πρότειναν μία περισσότερο ασφαλή μέθοδο μεταφοράς που βασίζεται σε σύστημα transposon / transposase (Sleeping Beauty και PiggyBac) που συγκριτικά με τα ιικά συστήματα μεταφοράς έχει καλύτερη ικανότητα έγκλεισης, ακόμη και μεγάλων τμημάτων DNA. Πρόσφατα η συγκεκριμένη μέθοδος πήρε την έγκριση για κλινική εφαρμογή από τον οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών^{49,50}.

Βελτίωση της τοξικής επίδρασης στα μη κακοήθη κύτταρα

Στην περίπτωση των αιματολογικών κακοηθειών, τα μόρια-στόχοι των CAR/T-cells (CD19, CD20, CD33), απέχουν πολύ από το να αποτελούν ιδεώδεις αντιγονικούς στόχους, καθώς εκφράζονται επίσης στην πλειοψηφία των φυσιολογικών κυττάρων του αιμοποιητικού ιστού. Αν και η τοξικότητα που προκαλούν (πχ μακροχρόνια μείωση των φυσιολογικών B-λεμφοκυττάρων και υπογαμμασφαιριναιμία μετά από χορήγηση CAR/T-cells ειδικών για CD20/19) είναι κλινικά διαχειρίσιμη, δεν παύει να αποτελεί ένα σημαντικό εμπόδιο για ευρεία κλινική εφαρμογή.

Με στόχο να μειωθεί η τοξικότητα στα φυσιολογικά B-λεμφοκύτταρα η ομάδα του BCM σχεδίασε κλινική μελέτη που είναι σε εξέλιξη, με CAR/T-cells ειδικά έναντι κ-ελαφρών αλύσων. Με αυτό τον τρόπο θα καταστρέφονται τα κ-κλωνικά κακοήθη κύτταρα, όπως επίσης και τα φυσιολογικά που εκφράζουν κ-ελαφρές αλύσους, όμως θα διασώζονται τα φυσιολογικά B-λεμφοκύτταρα που εκφράζουν λ-ελαφρές αλυσίδες, περιορίζοντας συνε-

πώς την τοξικότητα στα φυσιολογικά B-λεμφοκύτταρα⁵¹.

Άλλα μόρια που εκφράζονται σε μεγαλύτερη συχνότητα σε κακοήθη από ότι σε φυσιολογικά κύτταρα του αιμοποιητικού ιστού και που σε προκλινικά μοντέλα φαίνεται πως μπορεί να αποτελέσουν επιλεκτικούς στόχους των CAR/T-cells είναι τα CD23, CD70, ROR1 και CD44v6. Η ασφάλεια και αποτελεσματικότητα τους αναμένεται να αξιολογηθούν σε προσεχείς κλινικές μελέτες⁵²⁻⁵⁵.

Το σύνδρομο της φλεγμονώδους απάντησης ή “καταιγίδας των κυτταροκινών”

Η ενεργοποίηση του CAR/T-cell μετά τη δέσμευση του εξωκυττάρου τμήματος με τον αντιγονικό στόχο είναι δυνατόν να οδηγήσει σε σοβαρού βαθμού τοξικότητα λόγω αθρόας έκκρισης προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως TNF-α και IL-6. Ο βαθμός τοξικότητας μπορεί να μετριαστεί με τη χορήγηση προοδευτικά αυξανόμενου αριθμού κυττάρων και με την έγκαιρη χορήγηση αντισωμάτων έναντι των συγκεκριμένων κυτταροκινών⁵.

Μη ειδικά μέτρα για μείωση της τοξικότητας

Δεδομένης της εγγενούς ιδιότητας των CAR/T-cells να επιβιώνουν μακροχρόνια και να πολλαπλασιάζονται και εκπτύσσονται, είναι φανερό πως η τοξικότητα μπορεί να παραμένει επί μακρόν ή και να επιδεινώνεται με την πάροδο του χρόνου. Η αδυναμία ελέγχου της σοβαρού βαθμού ή προοδευτικά επιδεινούμενης τοξικότητας θα μπορούσε να αντιμετωπιστεί με την εισαγωγή “γονιδίων αυτοκτονίας” στα CAR/T-cells. Προκλινική μελέτη με CAR/T-cells εφοδιασμένα με “γονίδιο αυτοκτονίας” επαγόμενο από την caspase-9, έδειξε πως η ενσωμάτωση του “γονιδίου αυτοκτονίας” δεν επηρέασε την έκπτυξη, βιωσιμότητα και κυτταροτοξική δράση των γονιδιακά τροποποιημένων κυττάρων ενώ η ενεργοποίησή του συνοδεύτηκε από σημαντική μείωση του αριθμού τους⁴¹.

Η επιλογή πολλαπλών αντιγονικών στόχων από ένα μόνο γενετικά τροποποιημένο T-λεμφοκύτταρο μπορεί επίσης να βοηθήσει στην ελάττωση της τοξικότητας. Η ενσωμάτωση δύο CARs στα T-λεμφοκύτταρα προσφέρει το πλεονέκτημα ενεργοποίησης από κακοήθη κύτταρα που θα εκφράζουν ταυτόχρονα και τα 2 αντιγόνα στόχους προστατεύοντας τα φυσιολογικά κύτταρα εφόσον δεν εκφράζουν τα συγκεκριμένα αντιγόνα επιφανείας. Τέτοια μοντέλα CAR/T-cells έχουν δοκιμαστεί σε προκλινικές μελέτες με αντιγόνα που εκφράζονται σε συμπαγείς όγκους και τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά. Χρειάζεται ωστόσο να επιβεβαιωθούν και στην κλινική πράξη, καθώς η έκφραση των αντιγόνων επιφανείας στα κακοήθη κύτταρα διαφέρει ποιοτικά αλλά και ποσοτικά μεταξύ των ασθενών⁵⁶.

Συμπεράσματα

Σήμερα περίπου 30 κλινικές μελέτες που διερευνούν την ασφάλεια και αποτελεσματικότητα ειδικών CAR/T-cells έναντι κακοήθων κυττάρων του αιμοποιητικού ιστού, είναι σε εξέλιξη⁵⁷. Τα αποτελέσματα των δημοσιευμένων κλινικών μελετών, καταδεικνύουν πως οι κυτταρικές θεραπείες περνούν από τη φάση των “πολλά υποσχόμενων” στη φάση των “κλινικά εφαρμόσιμων” θεραπειών στο

πεδίο των αιματολογικών κακοηθειών. Η συνεχής πρόοδος στην έρευνα των CAR/T-cells, η καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας του ανοσολογικού συστήματος αλλά και των ανασταλτικών μηχανισμών από την πλευρά των κακοήθων κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντός τους θα βοηθήσουν ώστε, στο άμεσο μέλλον, να αναπτυχθούν απλούστερες, φθηνότερες και ταχύτερες μέθοδοι παραγωγής περισσότερο αποτελεσματικών αλλά και ασφαλέστερων, γονιδιακά τροποποιημένων T-λεμφοκυττάρων.

Genetic modified, with chimeric antigen receptor, T lymphocytes therapies in hematological malignancies

by Panagiotis Kaloyannidis

*Haematology Clinic - Bone Marrow Transplantation Unit, Gene and Cell Therapy Center
"G. Papanikolaou" General Hospital, Thessaloniki, Greece*

ABSTRACT: Current chemotherapy protocols, hematopoietic stem cell transplantation and supportive care have led to remarkable improvements in the outcome of patients with hematologic malignancies. However, therapeutic approaches of high efficacy and low toxicity remain a highly desirable, albeit challenging goal in hematology and oncology in general. In this context, cellular-based therapies have enormous capabilities. The knowledge that donor lymphocyte infusions have the potential to eradicate relapsed disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, provided the conceptual basis of the effort to generate T lymphocytes with specific activity against tumor cells. The genetic modification of T-cells to express an additional to their native TCR, chimeric antigen receptor- (CAR-), combines the HLA-independent binding of cell surface target molecules with the delivery of a tailored activating signal to the engineered immune cells, with the goal to deliver effective anti-tumor activity and long term persistence. Engineered CARs are incorporated into peripheral blood T cells by using various vector transfer systems, most commonly integrating viral vectors. The B-cell origin antigens are the most widely used surface antigen targets. CAR/T-cell-based immunotherapy has been under development for almost 20 years, over which period it has progressed from a novel and complex technology to an emerging alternative therapeutic modality for hematological malignant diseases. However, several issues in terms of safety and efficacy still remain to be addressed. This brief review summarizes the most recent biological and clinical developments and highlights the future directions towards the wide application of cellular therapies in hematological malignancies.

Βιβλιογραφία

1. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 1990;75:555-562.
2. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*. 2006;314:126-129.
3. van Loenen MM, de Boer R, Hagedoorn RS, van Egmond EH, Falkenburg JH, Heemskerk MH. Optimization of the HA-1-specific T-cell receptor for gene therapy of hematologic malignancies. *Hematologica*. 2011;96:477-481.
4. Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler DG. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:720-724.
5. Dotti G, Gottschalk S, Savoldo B, Brenner MK. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunol Rev*. 2014;257:107-126.
6. Chmielewski M, Hombach A, Heuser C, Adams GP, Abken H. T cell activation by antibody-like immunoreceptors: increase in affinity of the single-chain fragment domain above threshold does not increase T cell activation against antigen-positive target cells but decreases selectivity. *J Immunol*. 2004;173:7647-7653.
7. Hudecek M, Lupo-Stanghellini MT, Kosasih PL, et al. Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen

- receptor T cells. *Clin Cancer Res.* 2013;19:3153-164.
8. Hombach A, Heuser C, Gerken M, et al. T cell activation by recombinant FcεpsilonRI gamma-chain immune receptors: an extracellular spacer domain impairs antigen-dependent T cell activation but not antigen recognition. *Gene Ther.* 2000;7:1067-1075.
 9. Savoldo B, Ramos CA, Liu E, et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest.* 2011;121:1822-1826.
 10. Haynes NM, Snook MB, Trapani JA, et al. Redirecting mouse CTL against colon carcinoma: superior signaling efficacy of single-chain variable domain chimeras containing TCR-zeta vs Fc epsilon RI-gamma. *J Immunol.* 2001;166:182-187.
 11. Brownlie RJ, Zamoyska R. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:257-269.
 12. Gajewski TF, Meng Y, Blank C, et al. Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. *Immunol Rev.* 2006;213:131-145.
 13. Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, Rivière I, Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol.* 2002;20:70-75.
 14. Song DG, Ye Q, Poussin M, Harms GM, Figini M, Powell DJ Jr. CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells in vivo. *Blood.* 2012;119:696-706.
 15. Campana D, Schwarz H, Imai C. 4-1BB chimeric antigen receptors. *Cancer J.* 2014;20:134-140.
 16. Pulè MA, Straathof KC, Dotti G, Heslop HE, Rooney CM, Brenner MK. A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Mol Ther.* 2005;12:933-941.
 17. Carpenito C, Milone MC, Hassan R, et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:3360-3365.
 18. Till BG, Jensen MC, Wang J, et al. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood.* 2008;112:2261-2271.
 19. Ellis J. Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors. *Hum Gene Ther.* 2005;16:1241-6.
 20. Bonini C, Grez M, Traversari C, et al. Safety of retroviral gene marking with a truncated NGF receptor. *Nat Med.* 2003;9:367-369.
 21. Cavalieri S, Cazzaniga S, Geuna M, et al. Human T lymphocytes transduced by lentiviral vectors in the absence of TCR activation maintain an intact immune competence. *Blood.* 2003;102:497-505.
 22. Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood.* 2012;119:2709-2720.
 23. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2011;17:4550-4557.
 24. Jensen MC, Popplewell L, Cooper LJ, et al. Antitransgene rejection responses contribute to attenuated persistence of adoptively transferred CD20/CD19-specific chimeric antigen receptor redirected T cells in humans. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16:1245-1256.
 25. Till BG, Jensen MC, Wang J, et al. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood.* 2008;112:2261-2271.
 26. Kalos M, Levine BL, Porter DL, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med.* 2011;3:95ra73.
 27. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368:1509-1518.
 28. Davila ML, Riviere I, Wang X, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med.* 2014;6:224ra25.
 29. Till BG, Jensen MC, Wang J, et al. CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. *Blood.* 2012;119:3940-3950.
 30. Hoyos V, Savoldo B, Dotti G. Genetic modification of human T lymphocytes for the treatment of hematologic malignancies. *Haematologica.* 2012;97:1622-1631.
 31. Kochenderfer JN, Dudley ME, Carpenter RO, et al. Donor-derived CD19-targeted T cells cause regression of malignancy persisting after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2013;122:4129-4139.
 32. Ritchie DS, Neeson PJ, Khot A, et al. Persistence and efficacy of second generation CAR T cell against the LeY antigen in acute myeloid leukemia. *Mol Ther.* 2013;21:2122-2129.
 33. Tettamanti S, Marin V, Pizzitola I, et al. Targeting of acute myeloid leukaemia by cytokine-induced killer cells redirected with a novel CD123-specific chimeric antigen receptor. *Br J Haematol.* 2013;16:389-401.
 34. Terakura S, Yamamoto TN, Gardner RA, Turtle CJ, Jensen MC, Riddell SR. Generation of CD19-chimeric antigen receptor modified CD8+ T cells derived from virus-specific central memory T cells. *Blood.* 2012;119:72-82.
 35. Gattinoni L, Klebanoff CA, Restifo NP. Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat Rev Cancer.* 2012;12:671-684.
 36. Cruz CR, Micklethwaite KP, Savoldo B, et al. f CD19-directed/multivirus-specific CTLs post HSCT for B cell malignancies. *Mol Ther* 2012;20:S207.
 37. Cruz CR, Micklethwaite KP, Savoldo B, et al. Infusion of donor-derived CD19-redirection virus-specific T cells for B-cell malignancies relapsed after allogeneic stem cell transplant: a phase 1 study. *Blood.* 2013;122:2965-2973.
 38. Myers D, Sun J, Rooney CM, et al. Administration of GD2 chimeric antigen receptor modified, tri-virus specific cytotoxic T lymphocytes after HLA mismatched allogeneic stem cell

- transplantation for relapsed, refractory neuroblastoma. *Mol Ther* 2013;22:S5-S6.
39. Li XC, Demirci G, Ferrari-Lacraz S, Groves C, Coyle A, Malek TR. IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo. *Nat Med*. 2001;7:114-118.
 40. Nelson BH. IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *J Immunol*. 2004;172:3983-3988.
 41. Hoyos V, Savoldo B, Quintarelli C, et al. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia*. 2010;24:1160-1170.
 42. Perna SK, De Angelis B, Pagliara D, et al. Interleukin 15 provides relief to CTLs from regulatory T cell-mediated inhibition: implications for adoptive T cell-based therapies for lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2013;19:106-117.
 43. Vera JF, Hoyos V, Savoldo B, et al. Gene transfer of IL-7R alpha (IL-7R) on antigen-specific cytotoxic T cells (CTLs) restores their ability to respond to IL-7 cytokine. *Blood* 2007;110:2756 (Abstract).
 44. Leen AM, Sukumaran S, Watanabe N, et al. Reversal of tumor immune inhibition using a chimeric cytokine receptor. *Mol Ther*. 2014;22:1211-1220.
 45. Zhang L, Kerkar SP, Yu Z, et al. Improving adoptive T cell therapy by targeting and controlling IL-12 expression to the tumor environment. *Mol Ther*. 2011;19:751-759.
 46. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363:711-723.
 47. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*. 2012;366:2455-2465.
 48. Cavazzana-Calvo M, Fischer A, Hacein-Bey-Abina S, Aiuti A. Gene therapy for primary immunodeficiencies: Part 1. *Curr Opin Immunol*. 2012;24:580-584.
 49. Singh H, Manuri PR, Olivares S, et al. Redirecting specificity of T-cell populations for CD19 using the Sleeping Beauty system. *Cancer Res*. 2008;68:2961-2971.
 50. Nakazawa Y, Huye LE, Dotti G, et al. Optimization of the PiggyBac transposon system for the sustained genetic modification of human T lymphocytes. *J Immunother*. 2009;32:826-836.
 51. Ramos CA, Savoldo B, Liu E, et al. Clinical responses in patients infused with T lymphocytes redirected to target κ -Light immunoglobulin chain. *Mol Ther* 2013;22:S114.
 52. Giordano Attianese GM, Marin V, Hoyos V, et al. In vitro and in vivo model of a novel immunotherapy approach for chronic lymphocytic leukemia by anti-CD23 chimeric antigen receptor. *Blood*. 2011;117:4736-4745.
 53. Shaffer DR, Savoldo B, Yi Z, et al. T cells redirected against CD70 for the immunotherapy of CD70-positive malignancies. *Blood*. 2011;117:4304-4314.
 54. Hudecek M, Schmitt TM, Baskar S, et al. The B-cell tumor-associated antigen ROR1 can be targeted with T cells modified to express a ROR1-specific chimeric antigen receptor. *Blood*. 2010;116:4532-4541.
 55. Casucci M, Falcone L, Nicolis di Robilant B, et al. Dual Transgenesis of T cells with a novel CD44v6-specific chimeric antigen receptor and a suicide gene for the safe and effective targeting of chemoresistance in hematopoietic tumors. *Blood* 118[21]. Abstract.
 56. Wilkie S, van Schalkwyk MC, Hobbs S, et al. Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. *J Clin Immunol*. 2012;32:1059-1070.
 57. Davila ML, Bouhassira DC, Park JH, et al. Chimeric antigen receptors for the adoptive T cell therapy of hematologic malignancies. *Int J Hematol*. 2014;99:361-371.