



Адоптивная Т-клеточная терапия

Казарновский Максим

2016

Конференция

- Тема конференции –
адоптивная Т-клеточная терапия
- Основное внимание уделено
онкологии
- Выступали руководители
исследовательских групп
- Как правило, разработки
доведены до клиники



15-16 March 2016
Millennium Knightsbridge Hotel
London, UK
www.tcellcongress.com

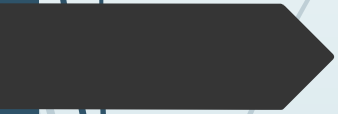




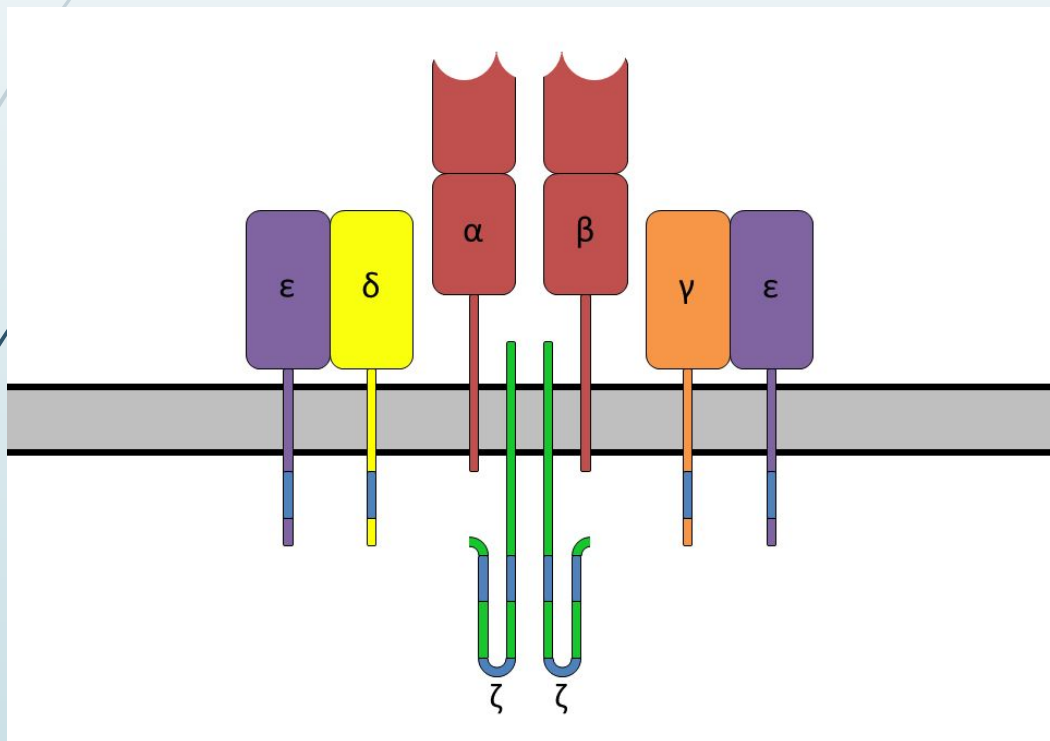
План презентации

- Общие вопросы онкологии и онкоиммунологии
- Современные методы адоптивной T-клеточной терапии рака
 - TIL – опухоль-резидентные лимфоциты
 - Рекомбинантные T-клеточные рецепторы
 - CAR-T-cells – T-клетки с химерным антигенным рецептором

Противоопухолевый иммунитет



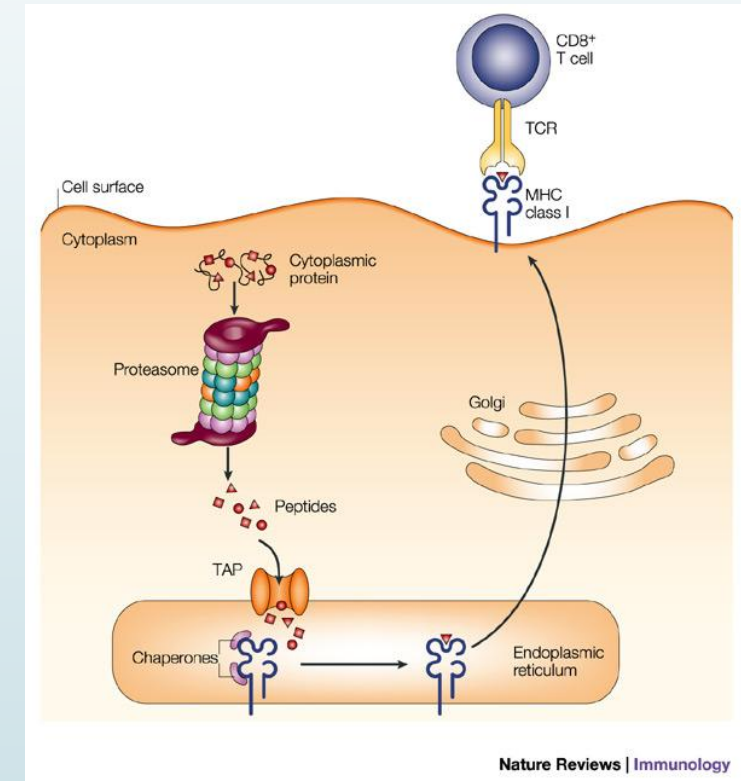
T-клеточный рецептор



- Гипервариабельный рецептор T-клеток
- Формируется путем перестройки генома T-клетки в ходе дифференцировки
- Лиганд рецептора заранее не определен
- Все рецепторы после дифференцировки способны слабо связывать главный комплекс гистосовместимости
- Активация рецептора в зависимости от микроокружения может привести к разным последствиям

Презентация клеточных пептидов клетками организма

- Практически все виды белков, синтезируемых клеткой, подвергаются деградации в 26s-протеасоме
- Генерируемые пептиды включаются в комплекс с белками главного комплекса гистосовместимости I-го класса (МНС-I)
- МНС-пептидные комплексы выводятся на поверхность клетки, где презентуются CD8+ Т-лимфоцитам
- Пептид, загруженный в МНС-I, называют антигеном (антигенным пептидом)



**Этим способом адаптивный иммунитет анализирует белки,
синтезируемые в клетке**

Адаптивный клеточный иммунный ответ

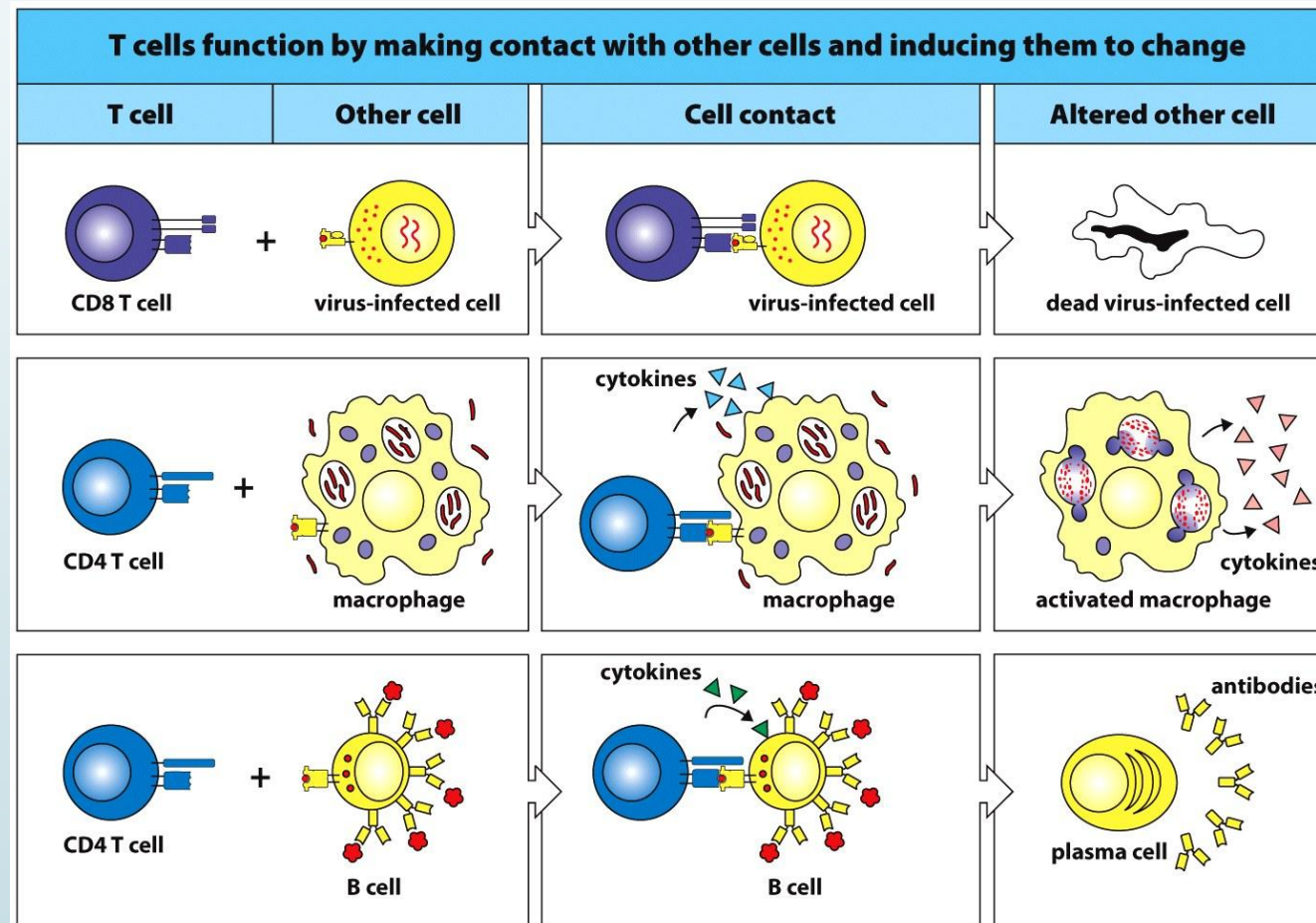


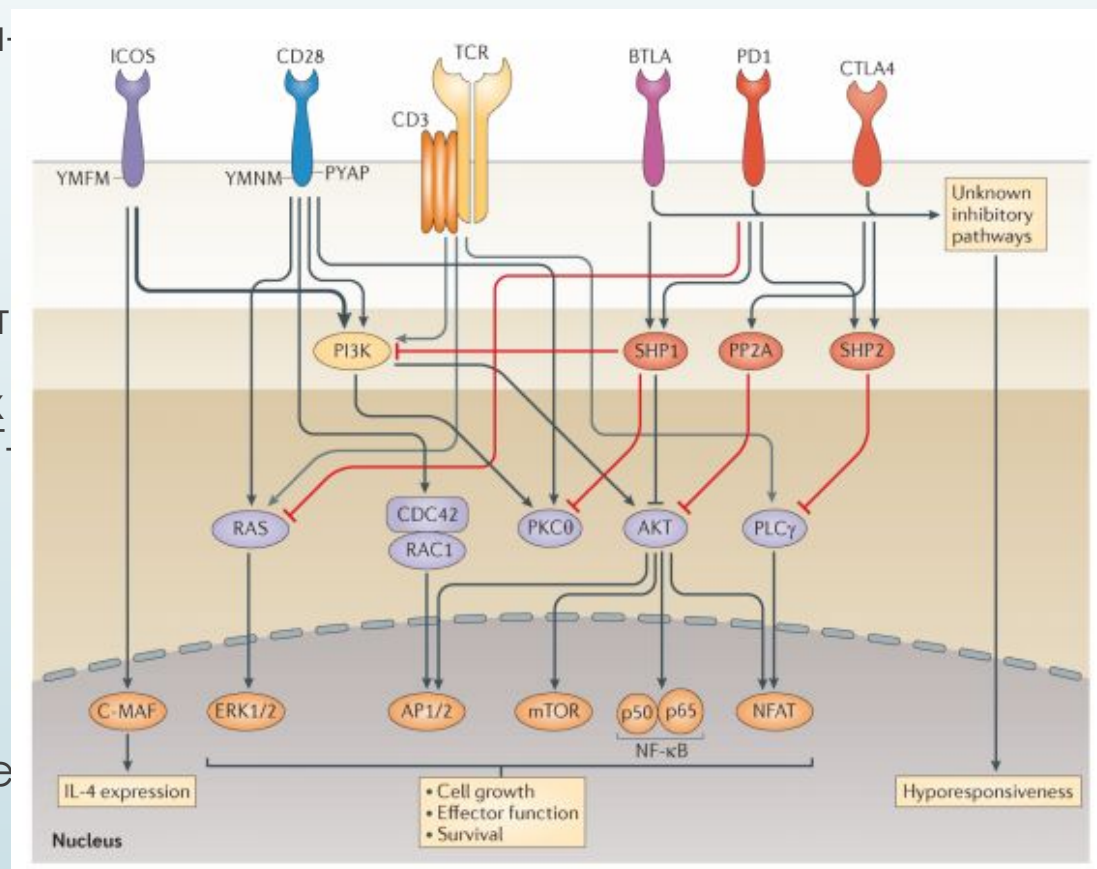
Figure 5.12 The Immune System, 3ed. (© Garland Science 2009)

- Для развития иммунного ответа Т-клетки должны быть активированы
- Профессиональные антиген-презентирующие клетки – макрофаги, дендритные клетки и В-лимфоциты
- Презентируется содержимое лизосом: белки, захваченные в ходе пиноцитоза, фагоцитоза, рецептор-опосредованного эндоцитоза
- Пептиды вводятся в комплекс с МНС II-го класса и презентуются наивным Т-клеткам (как CD4, так и CD8)



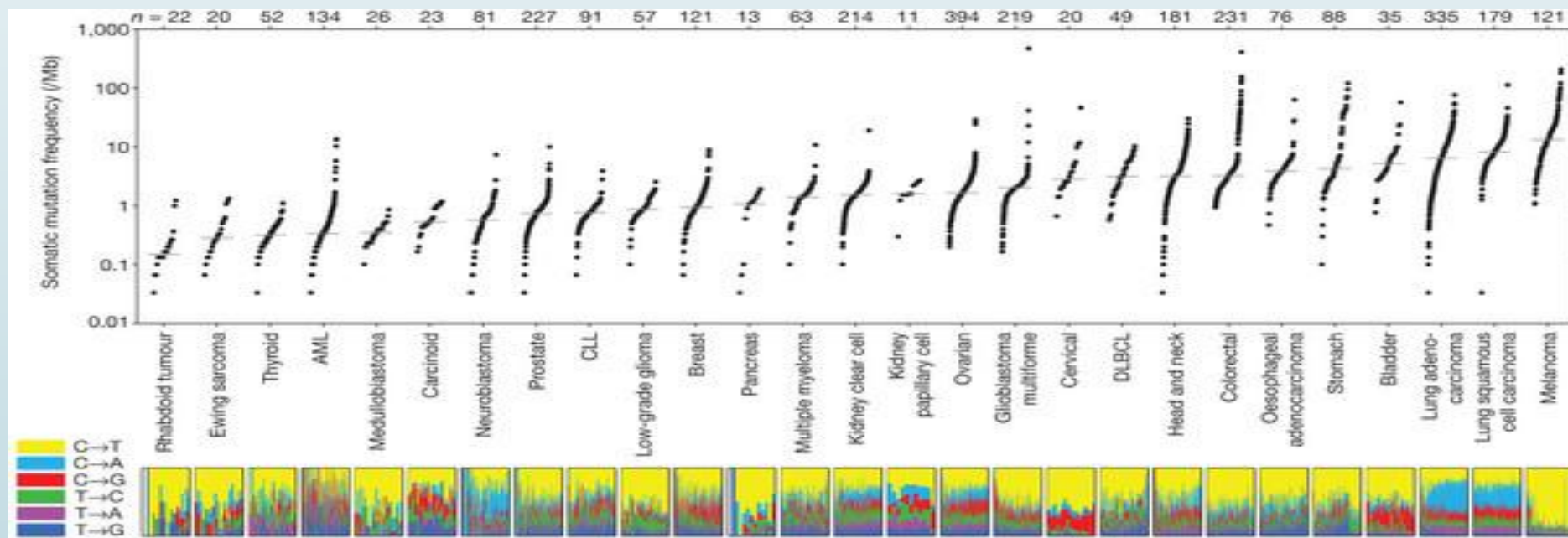
Костимуляторные молекулы антиген-презентирующих клеток

- Помимо презентации антигена антиген-презентирующие клетки осуществляют контроль воспалительного статуса ткани
- Повреждение ткани, наличие в ней лигандов Толл-подобных рецепторов, провоспалительных цитокинов приводит к появлению на их поверхности костимуляторных молекул, вызывающих дифференцировку наивных Т-клеток в Т-хелперы
- Отсутствие воспаления, противовоспалительные цитокины приводят к экспонированию коингибиторных молекул – Т-клетки подвергаются апоптозу, анергии или дифференцируются в индуцированные Т-регуляторы



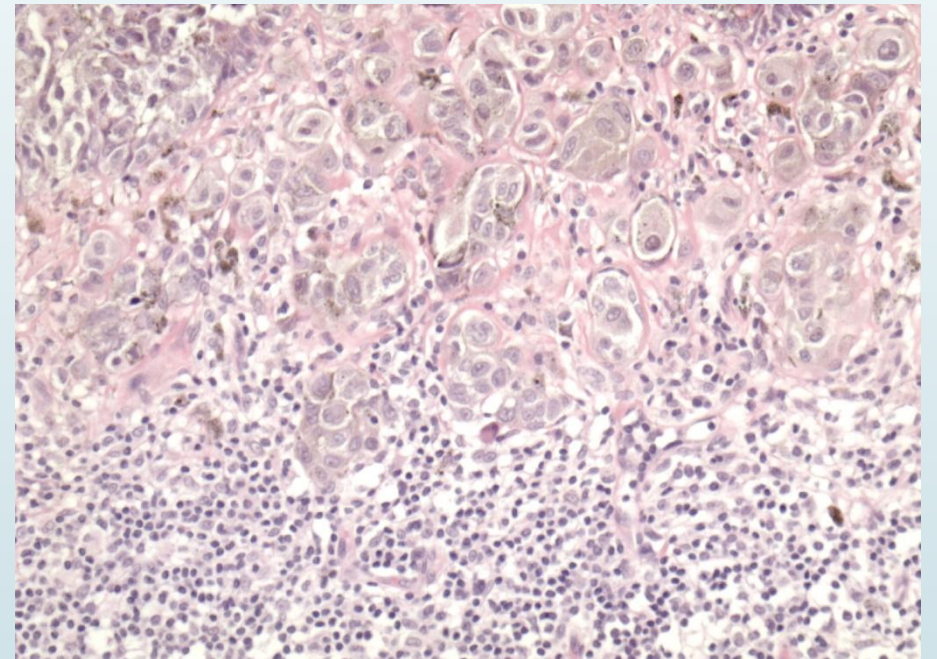
Неоантигены опухолей

- Неоантиген – новый антиген, возникший в клетке в результате мутации
- Геном опухолей содержит от сотен до сотен тысяч мутаций в кодирующих областях
- Большая часть этих мутаций иммуногенна – создает неоантигены и может распознаться лимфоцитами

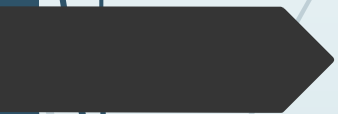


Опухолевая иммуносупрессия

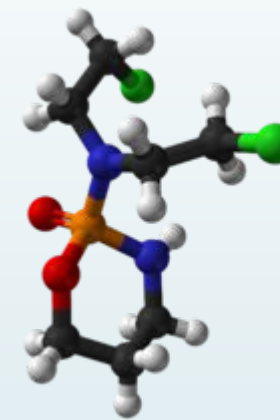
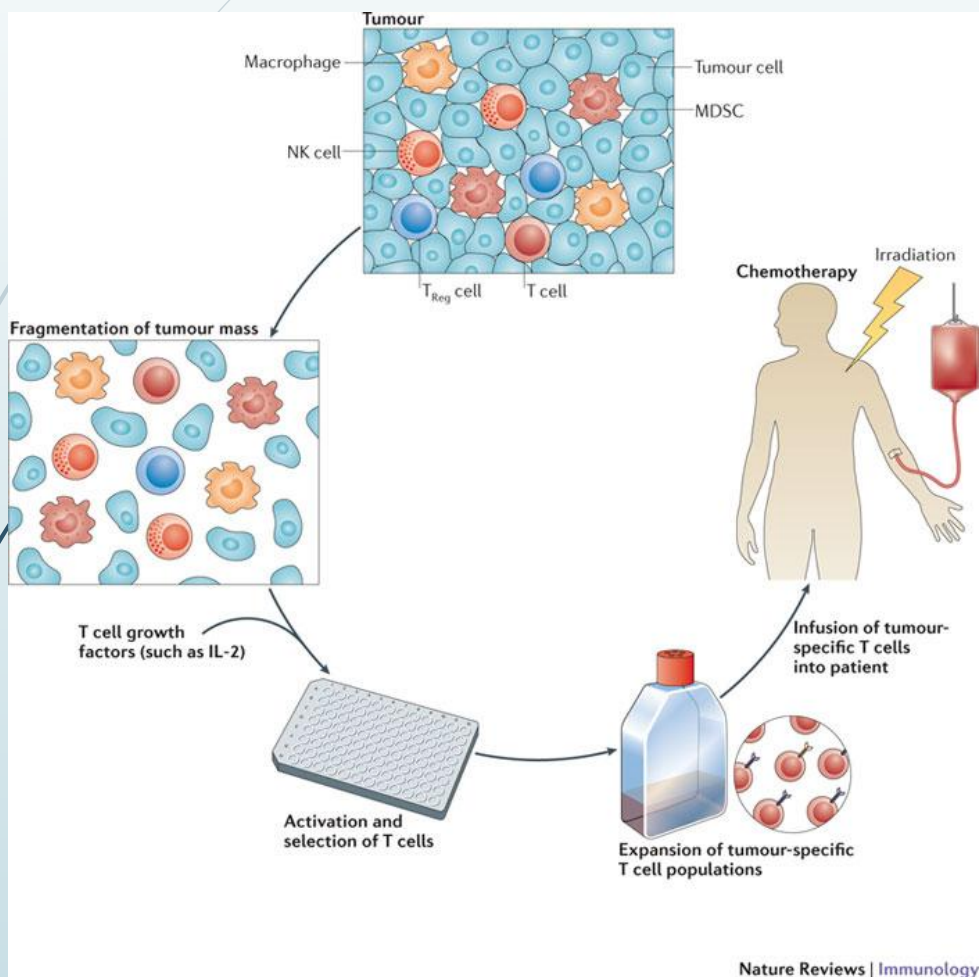
- На самых ранних этапах опухолевого перерождения опухоль приобретает способность подавлять иммунитет
- Механизмы иммуносупрессии:
 - Гуморальный – противовоспалительные цитокины и белки
 - Контактный – ингибиторные молекулы
 - Толерогенный – привлечение T-регуляторов и других иммуносупрессорных клеток в ткань опухоли
 - Подавление презентации антигенов
- В результате неоантиген-специфичные T-клетки либо вообще не попадают в опухолевую ткань, либо (чаще) находятся в ней в состоянии анергии



TIL (опухоль-ассоциированные
лимфоциты)



Общая схема терапии с помощью TIL



Пре- и постмедикация

- До биопсии – checkpoint blockade inhibitors:
 - αCTLA-4 – ограниченный цитостатический эффект + больше лимфоцитов и меньше регуляторов в опухоли
- Премедикация от биопсии до переливания – препараты, уничтожающие лимфоциты:
 - Циклофосфамид – дает токсичные метаболиты в отсутствие ферментов класса ALDH, уничтожает лимфоциты
 - Карбоплатин – препарат, создающий кросс-сшивки ДНК в активно делящихся клетках
- Постмедикация:
 - IL-2 – провоспалительный цитокин, способствует выживанию перелитых лимфоцитов
 - αPD-1 – подавление опухолевой иммуносупрессии



Плюсы и минусы терапии

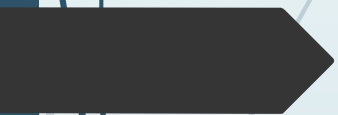
Преимущества:

- Использование собственных клеток пациента
- Отсутствие кросс-реактивности

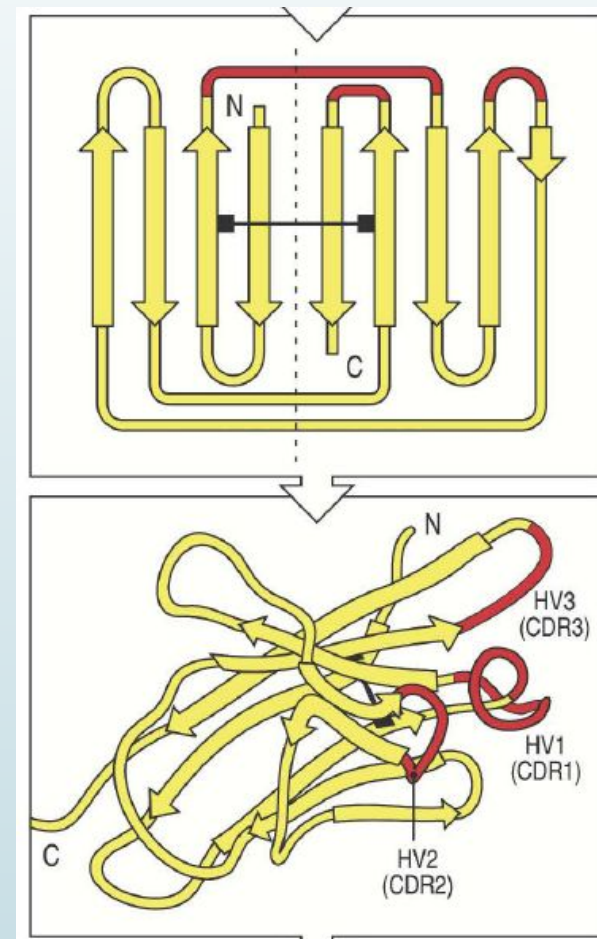
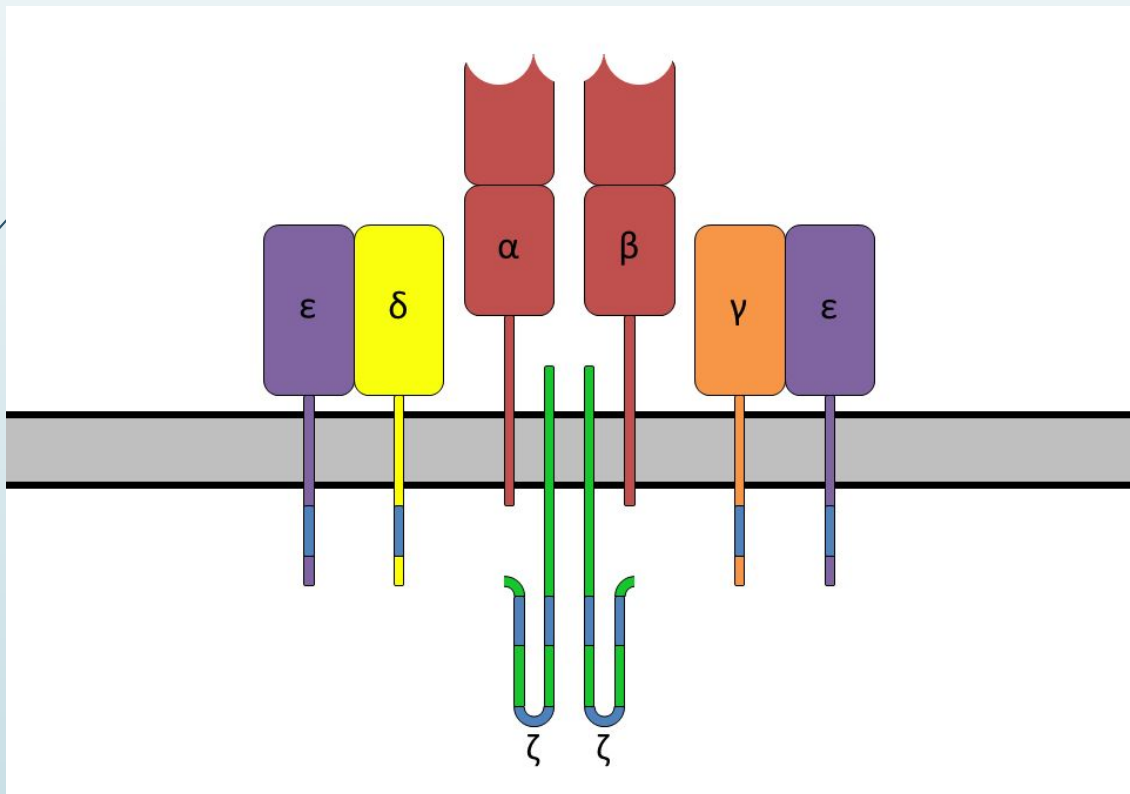
Недостатки:

- Зависимость от МНС
- Очень долгая подготовка (3-4 недели)
- Невозможность стандартизации, массового производства и коммерциализации
- Необходимость агрессивной химиотерапии

Лимфоциты с трансгенными TCR



Структура TCR





Плюсы и минусы терапии

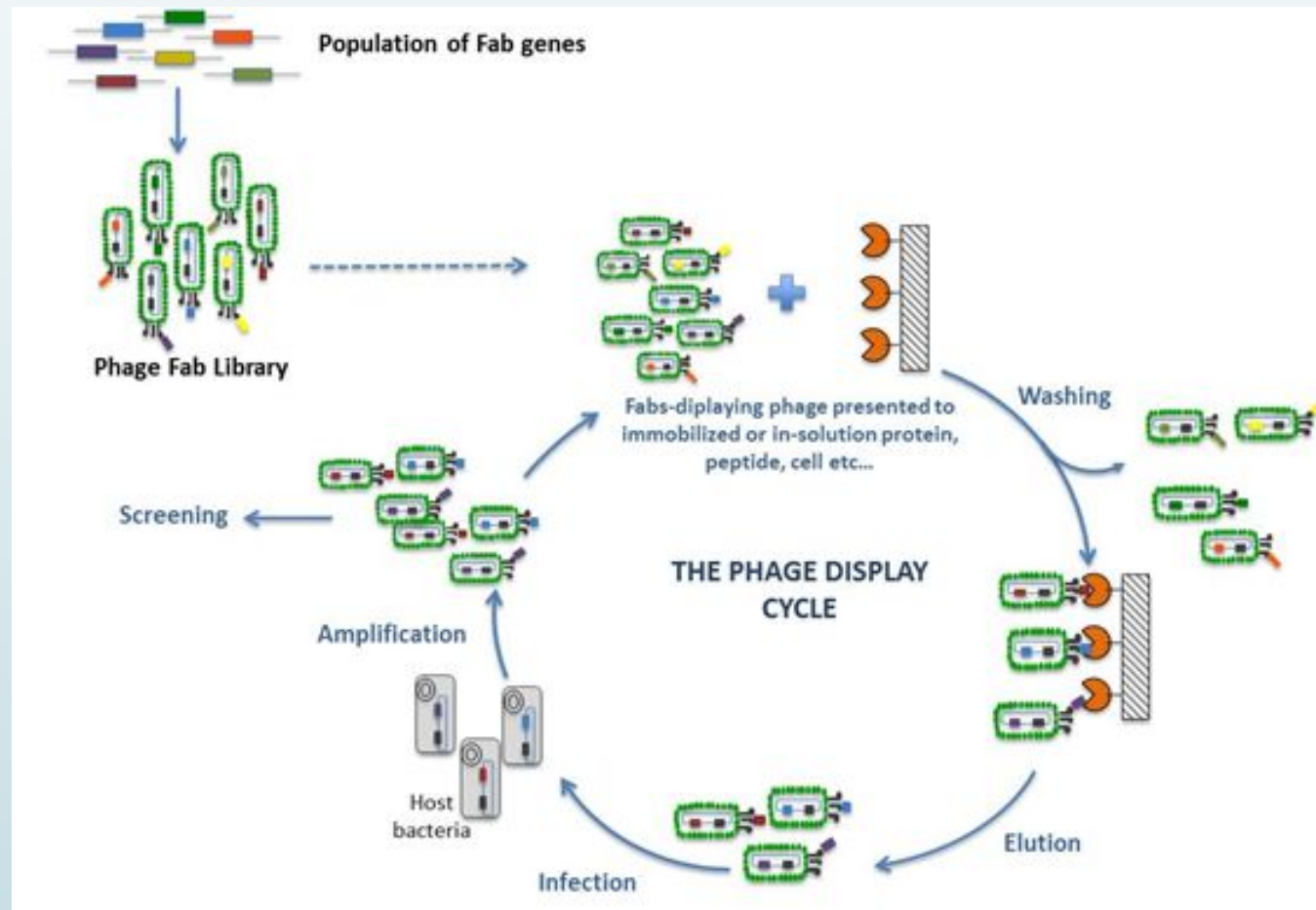
Преимущества:

- Возможность детектировать внутриклеточные антигены
- Возможность стандартизации и реализации в качестве препарата
- Малое (в сравнении с TIL) время подготовки к терапии

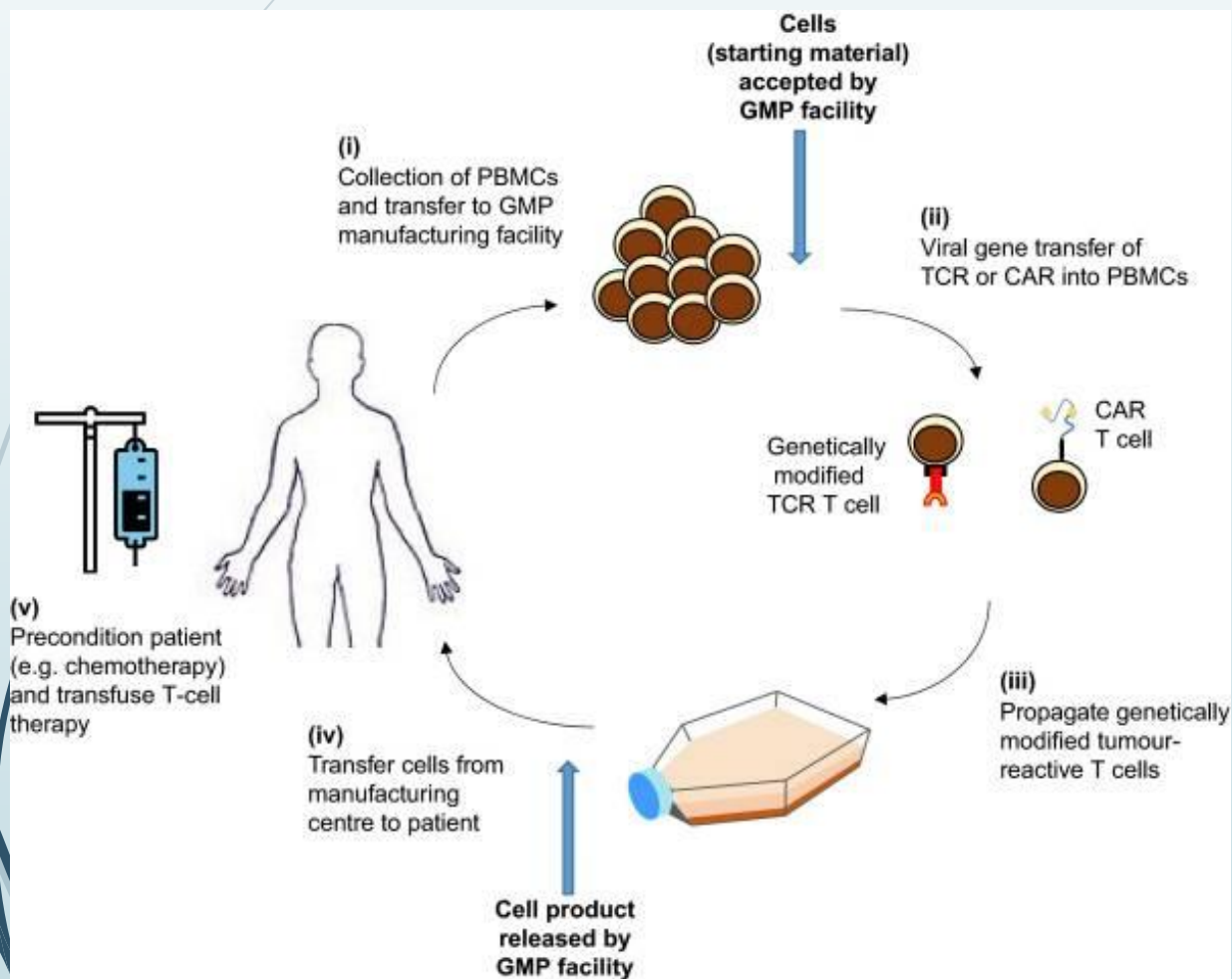
Недостатки:

- Зависимость от МНС
- Необходимость генотипирования пациентов
- Иммуногенность некоторых вариантов препарата
- Необходимость агрессивной химиотерапии

Отбор клонов ТiL – фаговый дисплей



Терапия



- Та же пре-/постмедикация, что и при использовании TIL
- Отдельные TCR проводят через регуляторные мероприятия, как генотерапевтические препараты
- Перед выводом на рынок TCR всесторонне исследуют и подвергают глубокой модификации
- Перед клиническим применением TCR анализируют на кросс-реактивность у данного пациента

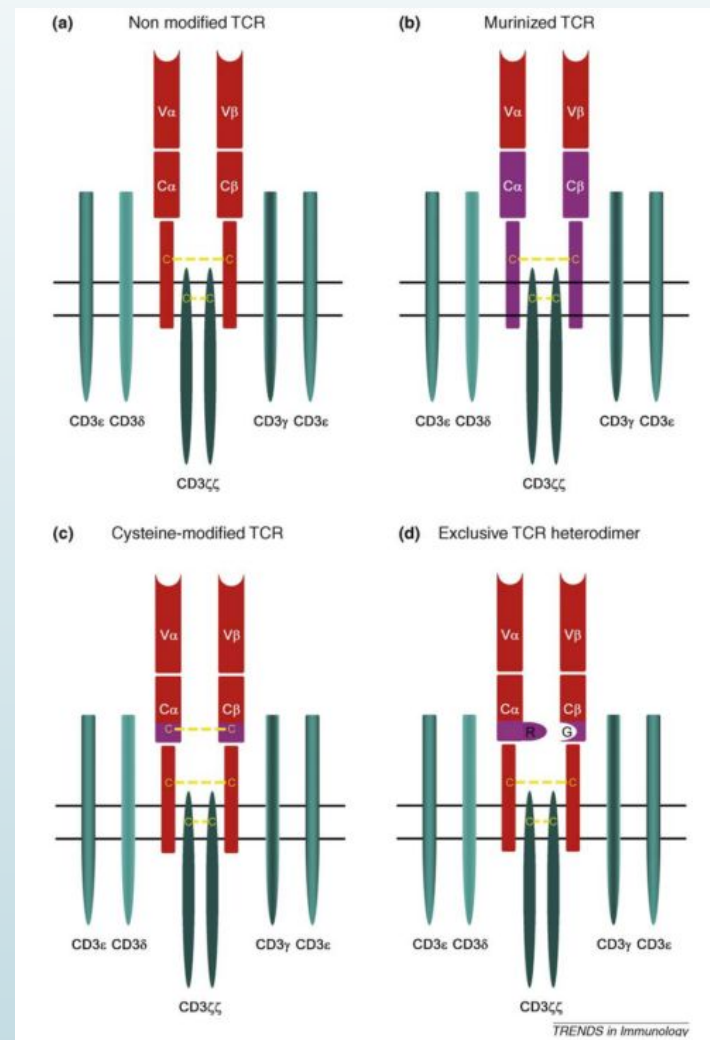


Задачи модификации TCR

- Случайное сочетание α и β цепей нативного и экзогенного TCR – как минимум 2 рецептора неизвестной специфичности
- Низкая представленность трансгенного TCR на поверхности
- Низкая аффинность TIL-TCR к неоантигенам
- Отсутствие помощи CD4 T-хелперов

Преодоление случайного взаимодействия цепей

- Увеличение взаимной аффинности цепей экзогенных TCR друг другу:
 - Введение дополнительных цистеинов
 - Использование альтернативных сайтов связывания второй цепи
- Снижение экспрессии эндогенных TCR:
 - РНК-интерференция
 - CRISPR



Повышение представленности экзогенного TCR на поверхности

- Количество TCR на поверхности определяется количеством CD3
- В норме количество CD3 на поверхности исчисляется тысячами и десятками тысяч на клетку
- Решение – введение в вектор CD3 под сильным промотором

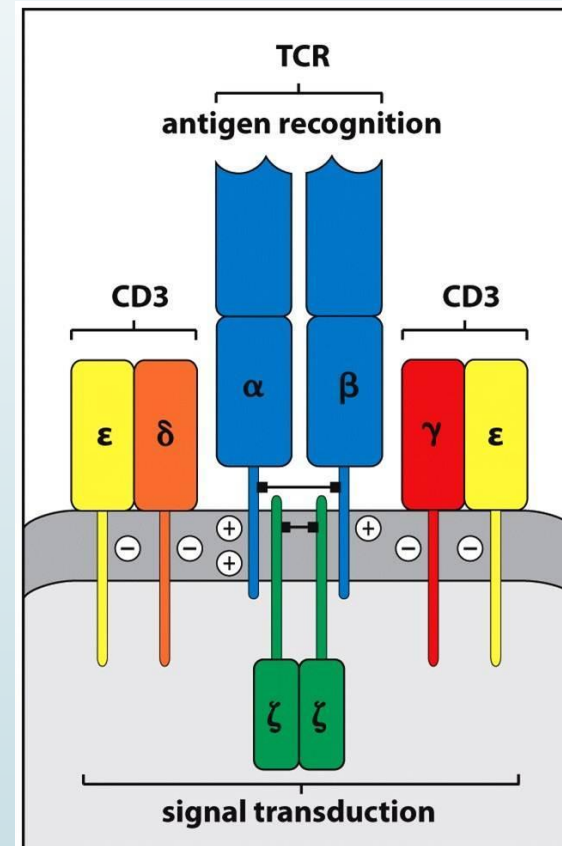
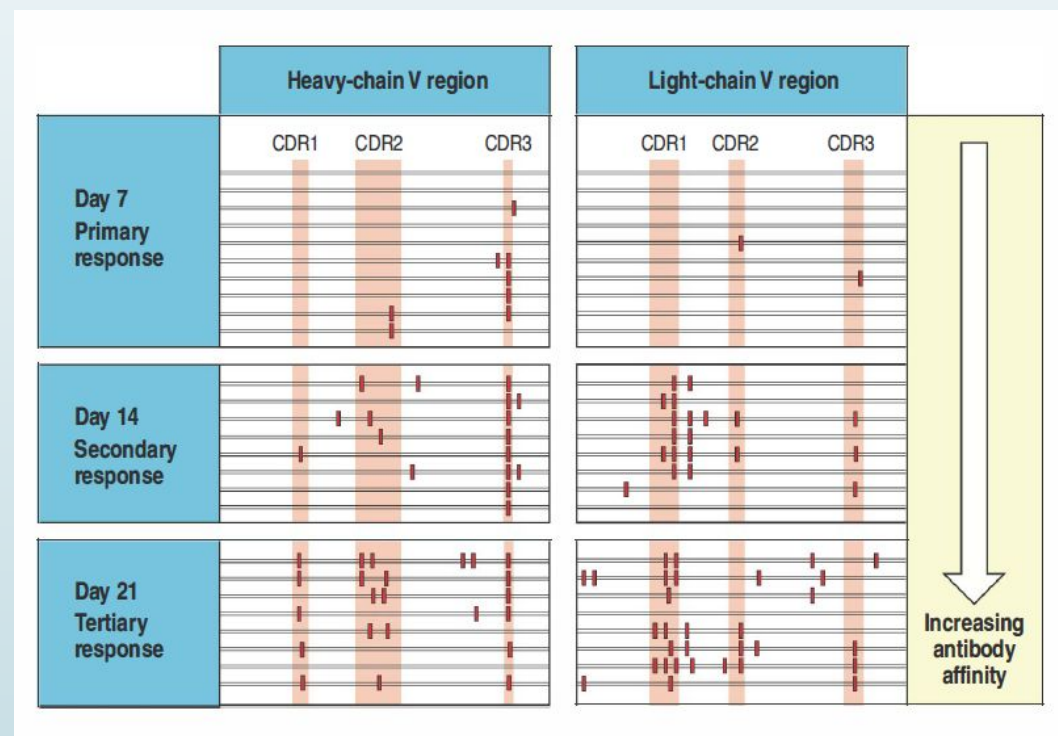


Figure 5.6 The Immune System, 3ed. (© Garland Science 2009)

Повышение аффинности TCR

- Аффинность рецепторов TIL к неоантигенам низка из-за клональной селекции
- Смоделировать соматическую гипермутацию:
 - Для TCR ее можно вызвать искусственно – путем наработки гена TCR неточными полимеразами
 - Основной мишенью мутации является CDR3
- Удалить сайты N-гликозилирования – увеличивается аффинность
- Использовать мышинный TCR, полученный при иммунизации химерных по HLA мышей



X-scan – методика от Adaptimmune

MAGE-A3 Peptide: EVDPIGHLY

Alanine Scan:

	TCR Binding	Critical amino acids	Core motif for TCR recognition
p1 p2 p3 p4 p5 p6 p7 p8 p9 A V D P I G H L Y	X	E	→ E
E A D P I G H L Y	✓		X
E V A P I G H L Y	X	D	→ D
E V D A I G H L Y	X	P	→ P
E V D P A G H L Y	X	I	→ I
E V D P I A H L Y	✓		X
E V D P I G A L Y	✓		X
E V D P I G H A Y	✓		X
E V D P I G H L A	X	Y	→ Y

■ Alanine scanning now enhanced to include "X-scanning" (substituting every AA at each point)

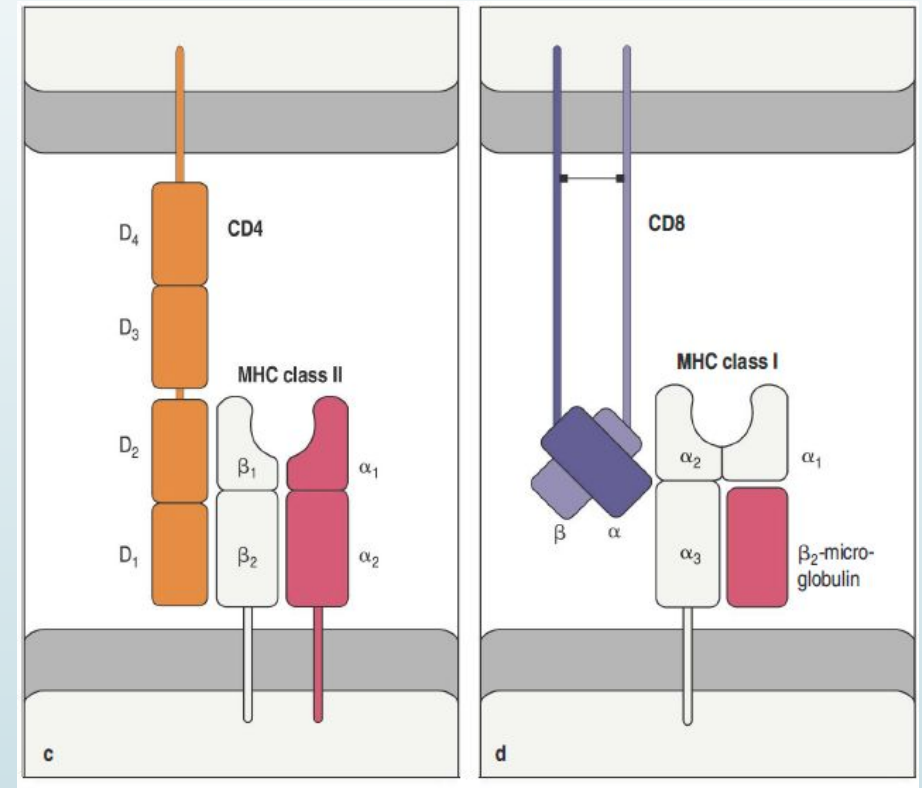
EXDPIXXXY	Protein
EKDPISDSY	Clostridium novyi
ELDPIYRKY	Clostridium perfringens
EKDPIKENY	Clostridium difficile
ENDPIINCY	Clostridium perfringens
EKDPIIDTSY	Clostridium tetani
EQDPIYRKY	Deinococcus radiodurans
EGDPILWWY	Desulfotalea psychrophila
EIDPINGGY	Dictyostelium discoideum (Slime mold)
EFDPYPSY	Epstein-Barr virus
EIDPISDPY	Finnegoldia magna
EVDPIPHNY	Geobacillus kaustophilus
EVDPIQESY	Halothermothrix orenii
EVDPIGHLY	Homo sapiens (Human) MAGE A3
EVDPIGHVY	Homo sapiens (Human) MAGE A6
EVDPIRHYY	Homo sapiens (Human) MAGE B18
ESDPIVAQY	Homo sapiens (Human) Titin, multiple isoforms
EPDPILDNY	Homo sapiens (Human), Mus musculus (Mouse) Protein Dos.
EKDPIIMNDY	Invertebrate indescendent virus
EKDPILERY	Kluyveromyces lactis
EPDPIQAY	Lactobacillus plantarum, Lactobacillus reuteri
EPDPIPEAY	Leuconostoc citreum

Only mammalian "hits"

- Каждая аминокислота последовательно заменяется на каждую другую (171 вариант для 9-аминокислотного пептида)
- При наличии связывания измененного пептида определяют его возможную экспрессию методом Blast или прямого секвенирования транскриптома пациента
- Параллельно проверяют активацию трансгенных Т-клеток на другие МНС-аллели данного пациента из библиотеки

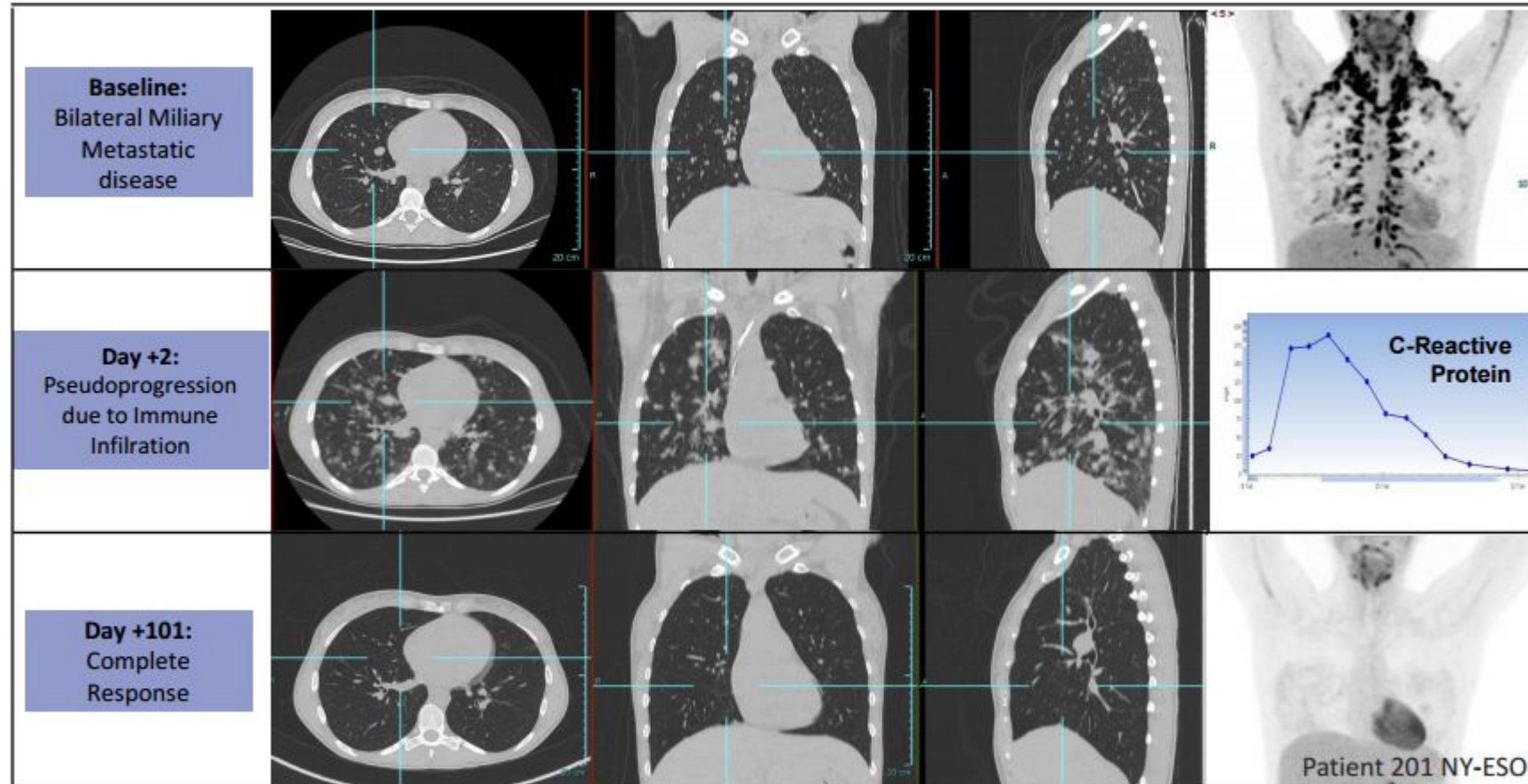
Привлечение Т-хелперов

- Получаемые для клиники трансгенные TCR ограничены взаимодействием с MHC-I и хорошо работают в CD8 Т-клетках - CTL
- CTL-опосредованный ответ ограничен без помощи CD4+ Т-хелперов
- Варианты усиления Т-хелперного ответа:
 - Введение в CD4+ Т-клетки трансгенного CD8
 - Дополнительное увеличение аффинности TCR – взаимодействие без корецептора



ADAP Phase I/II Study in Synovial Sarcoma

Radiographic Pseudoprogression and Response of Lung Metastases



AACR April 2015



CAR-T-cells – клетки с
химерным антигенным
рецептором

CAR – химерный антигенный рецептор

- Рецептор состоит из:
 - Антиген-связывающего участка (вариабельный фрагмент моноклонального антитела)
 - трансмембранного домена
 - сигнальных внутриклеточных доменов
- Активируется при контакте с клетками, несущими «целевой» поверхностный антиген
- Механизм запуска сигнализации не до конца ясен

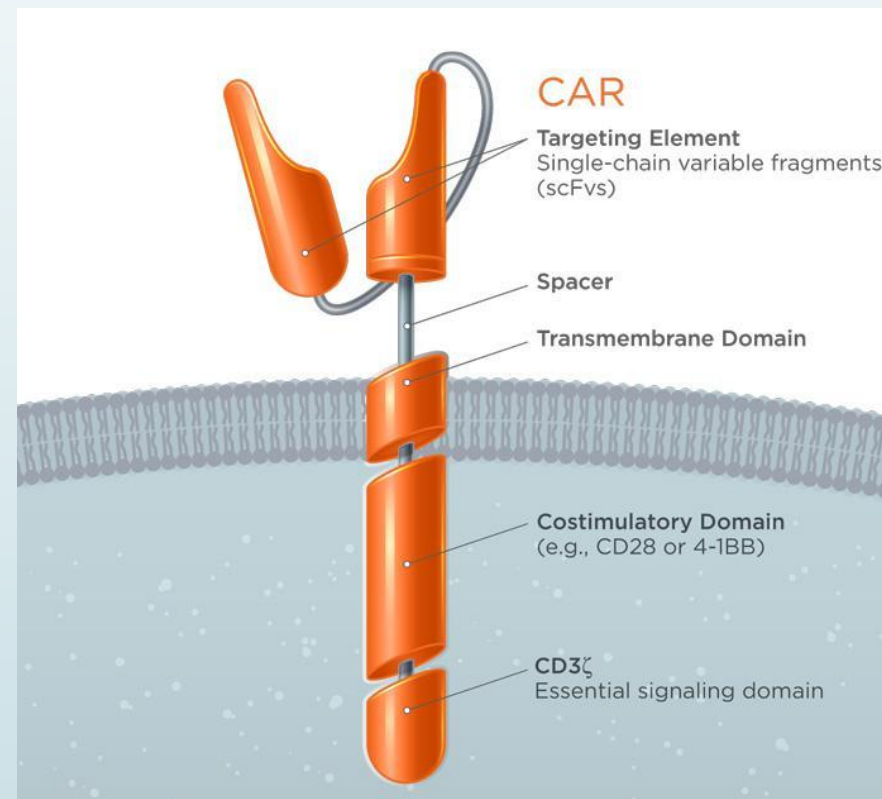
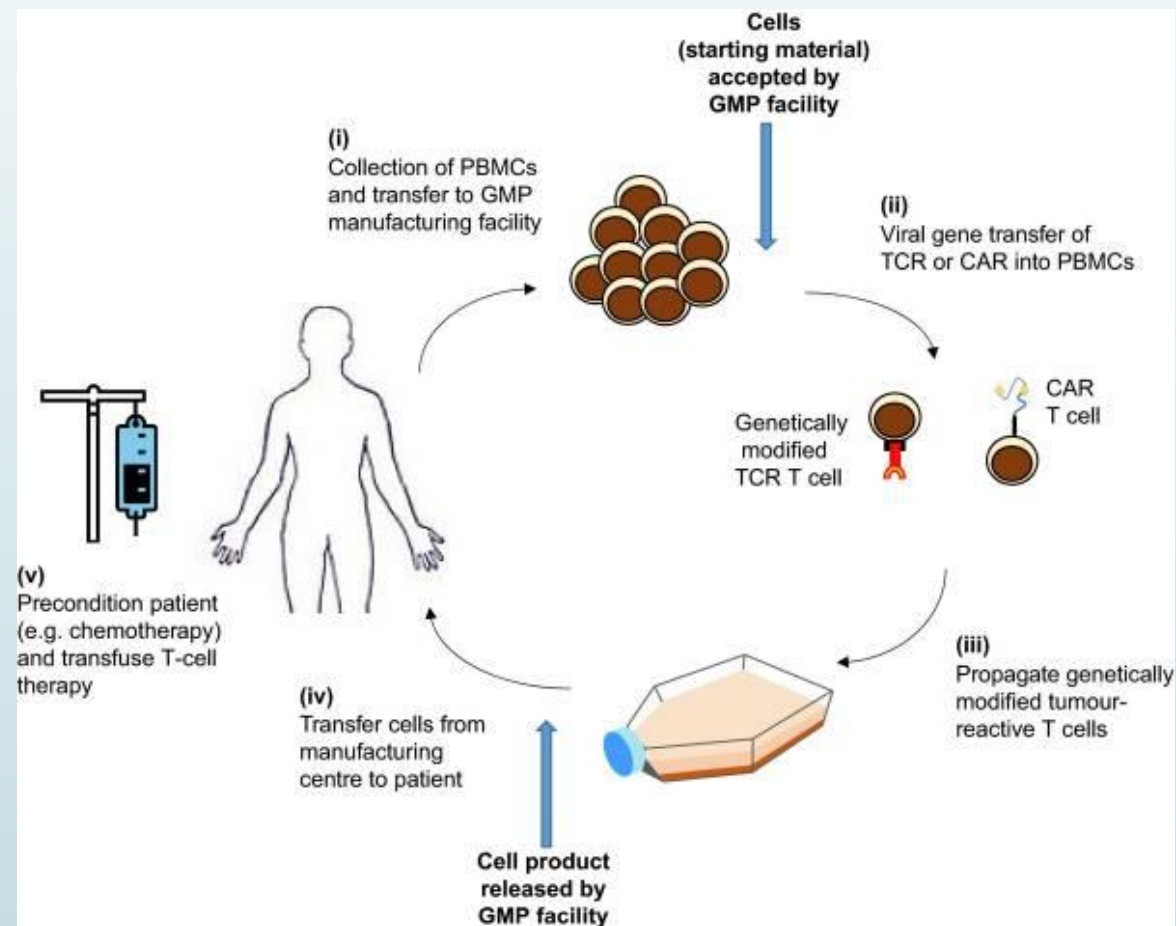
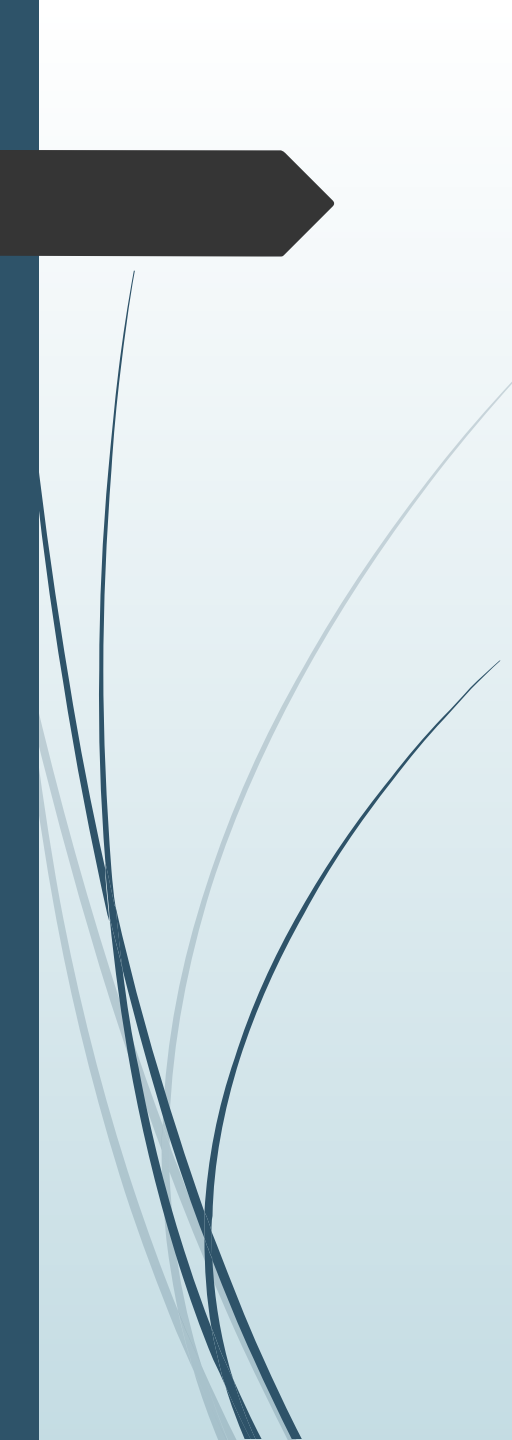


Схема терапии





Особенности CAR-T-клеточной терапии

Преимущества:

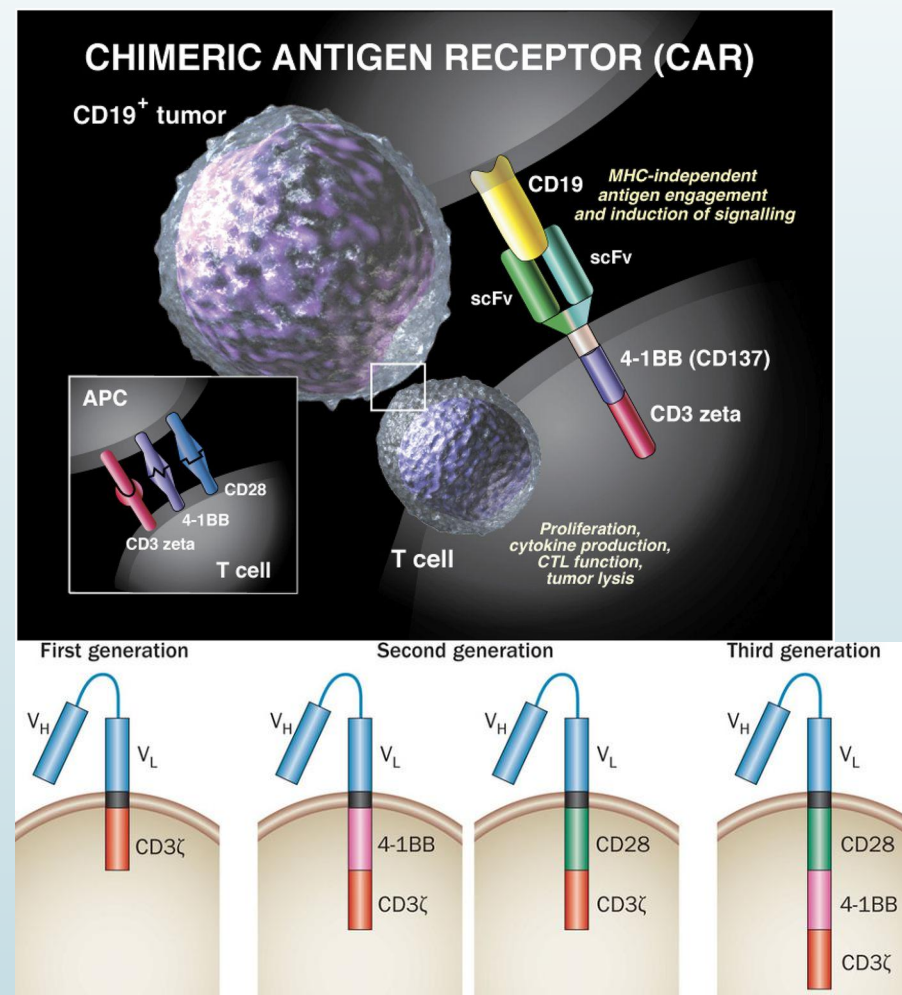
- Легко создать нужную специфичность
- Не требует МНС и антиген-презентирующих клеток
- Можно «нацелить» не только на белки, но и на липиды, гликолипиды, липопротеины и гликопротеины

Недостатки:

- «Целевым» может быть только поверхностный антиген
- Периодически наблюдается спонтанная активация и цитокиновый шторм
- Крайне сложно найти опухоль-специфический антиген – риск атаки здоровой ткани
- По-прежнему требуется агрессивная химиотерапия

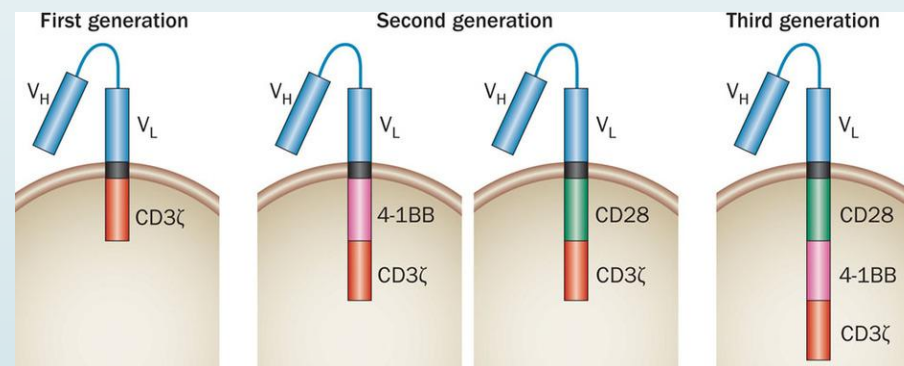
Текущее состояние CAR-T-клеточной терапии

- CD19+ лимфома – первый и пока единственный пример успешной CAR-T-cell терапии
- Попытки разработки CAR-T-клеточной терапии к другим антигенам пока проваливаются:
 - Низкая эффективность (особенно против солидных опухолей)
 - Кросс-реактивность
 - Системная токсичность
- Разработки системы CAR-T сконцентрированы вокруг повышения эффективности



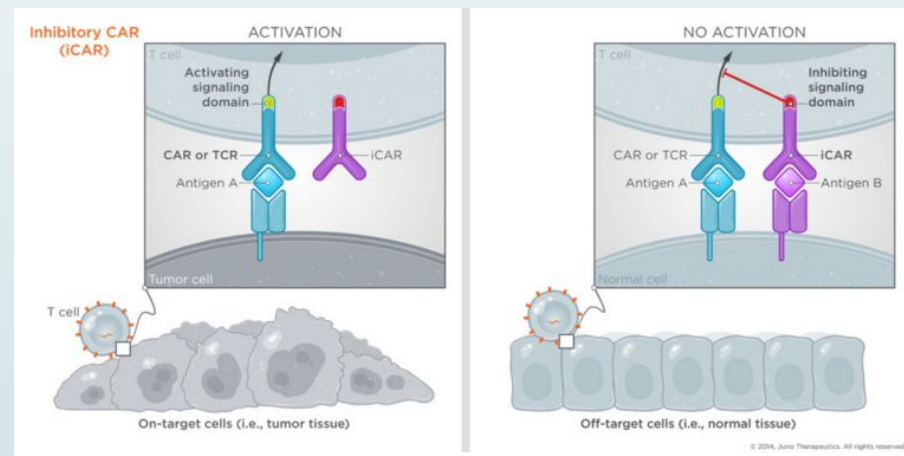
Улучшение сигнализации через CAR

- Первым сигнальным доменом, примененным в CAR была ζ -цепь CD3-комплекса
- 4-1BB и CD28 – молекулы корецепторов, активируемых при контакте с APC



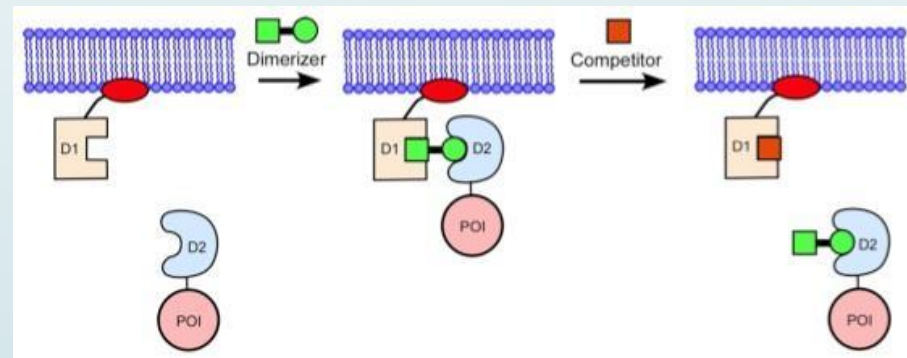
Преодоление системной ТОКСИЧНОСТИ

- Идея – ввести второй CAR с внутриклеточным доменом, ингибирующим сигналинг первого
- При контакте с клеткой, несущей оба антигена, кокластеризация обоих CAR предотвратит активацию T-клетки
- На аналогичном принципе можно создать систему, активирующую T-клетки только в ответ на 2 антигена



Преодоление системной токсичности - iCAR

- CAR модифицируется таким образом, чтобы интенсивностью сигнала можно было управлять с помощью малых молекул
- Для этого на внутриклеточной части CAR остается только «домен димеризации»
- Сигнальный участок присутствует в цитозоле в виде растворимого белка с доменом димеризации
- Добавлением димеризирующего агента можно управлять интенсивностью CAR-опосредованного ответа



Спасибо за внимание!

