UPPSALA
UNIVERSITET

CAR T-celler - vägen mot en målinriktad cancerterapi

Elin Ekman

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2016
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

CAR T-celler - vägen mot en målinriktad cancerterapi

Elin Ekman

Självständigt arbete i biologi 2016

Sammandrag

Det har sedan länge varit känt att immunförsvaret spelar en viktig roll i att upptäcka och avlägsna begynnande tumörväxt. Detta har utnyttjats i immunterapin där man använder kroppens egna immunförsvar för att behandla cancer. I en specifik typ av immunterapi använder man T-celler och modifierar deras receptorer för att skapa T-celler med chimära antigen-receptorer även kallade CAR T-celler. Då vissa cancerceller uttrycker specifika antigener konstrueras CAR T-celler som är specifika för den tumörassocierade antigenen. CAR T-cellerna kommer då att specifikt kunna binda till tumören, utlösa cytokiner och döda tumörcellen.

CAR T-cellsterapin har fått stor uppmärksamhet på senare tid och nått stora framgångar inom behandling av leukemi samt lymfom. Patienter med återfall av akut lymfatisk leukemi har ofta en dålig prognos då cytostatika eller strålbehandling inte längre är en effektiv behandlingsform. Behandling med CAR T-celler har uppvisat mycket goda resultat för dessa patienter som annars betraktas som obotliga. De lyckade resultaten fick forskningen att fokusera på att bredda terapiformen till att behandla solida tumörer, något som har visat sig vara betydligt svårare. Detta beror delvis på att det är svårt för CAR T-cellerna att nå den solida tumören samt att dessa tumörer ofta skapar en immunhämmande miljö. Det största bakslaget för CAR T-cellsterapin är dock de allvarliga biverkningar som kan uppstå. Om det antigen som CAR T-cellerna är specifika för även uttrycks på normala celler kan det utlösa kraftiga inflammatoriska responser, något som har lett till dödsfall i vissa försök. På grund av dessa kraftiga biverkningar har metoder för att reglera CAR T-cellerna framställts. Dessa inkluderar bland annat inducerbara självmordsgener vilka kan aktiveras ifall toxiska biverkningar uppstår så att CAR T-cellerna elimineras. Flera system har även framtagits för att göra CAR T-cellerna så specifika som möjligt och undvika att de attackerar normal vävnad.

Trots allvarliga biverkningar och problem med att skapa effektiva och specifika CAR T-celler så har denna terapiform ändå nått stora framgångar. Stora förbättringar har gjorts på kort tid och många forskare menar att CAR T-cellsterapin kommer att kunna nå klinisk rutin inom en snar framtid.

Inledning

Vårt immunförsvar verkar genom att känna igen och attackera kroppsfrämmande ämnen såsom bakterier och virus. Även vissa typer av cancerceller kan urskiljas från normala celler och på så sätt attackeras av immunförsvaret. Detta har utnyttjats i immunterapi, en behandlingsform som har fått stor uppmärksamhet på senare år (Hadrup *et al.* 2012). År 2013 utnämnde tidskriften Science immunterapin till årets främsta vetenskapliga genombrott och stora resurser läggs på att utveckla denna terapiform.
Immunterapi fokuserar på att effektivisera och specificera kroppens immunresponser mot tumörceller. Det finns flera olika typer av immunterapier som kan klassificeras i två större grupper; aktiv och passiv terapi. Cellulära vacciner räknas som aktiv terapi medan behandling med antikroppar eller T-celler betraktas som passiv terapi. I denna studie kommer jag att

fokusera på en specifik metod av den senare klassen kallad för CAR T-cellterapi där CAR står för chimära antigen-receptorer (Lin & Okada 2016).

I CAR T-cellterapi modifieras T-cellernas receptorer så att de blir effektivare på att binda till tumörassocierade antigener (TAA). Dessa receptorproteiner har en extracellulär, en transmembran samt en intracellulär signal domän och kan modifieras till att känna igen många olika antigener såsom proteiner, kolhydrater och glykolipider (Chu *et al*. 2014). Tumörceller minskar ofta uttrycket av histokompatibilitetskomplex (MHC)-molekyler på cellytan för att slippa bli igenkända av immunförsvaret. MHC är membranproteiner som visar upp epitoper på cellytan så att T-cellerna ska kunna aktiveras ifall epitopen inte är kroppsegen. En av fördelarna med att använda CAR är att de kan känna igen TAA oberoende av MHC, något som normala T-celler inte klarar av. Detta medför även att CAR kan användas på ett stort spektrum av patienter med olika MHC-typer, något som är viktigt eftersom det finns många olika varianter och chansen att ha identiska MHC om man inte är släkt är väldigt låg (Seliger 2008).

För att producera CAR modifierade T-celler separeras två typer av T-lymfocyter ut från patientens blod genom en process kallad leukaferes. De isolerade T-cellerna infekteras sedan med en viral vektor, vanligtvis ett retrovirus innehållande CAR generna. Andra vektorer och metoder för genöverföring kan användas såsom mRNA elektroporering, transposon/transposas system eller plasmidbaserade system. De modifierade CAR T-cellerna odlas och injiceras sedan tillbaka i patienten (Qin *et al*. 2016). För att skapa en så optimal CAR T-cellterapi som möjligt så finns det två viktiga aspekter i framställandet av CAR proteiner. För det första måste en lämplig antigen väljas som har så hög specificitet för tumörcellerna som möjligt. Då inte alla cancerceller uttrycker antigener som särskiljer sig från normala celler så fungerar CAR T-cellterapi därmed inte för alla sorters cancer. För det andra måste aktivering och signalering optimeras. Om T-cellerna effektivt ska kunna döda tumörcellerna krävs inkorporering av flera signaldomäner i CAR så att T-cellerna kan bli helt aktiverade samt att utsöndringen av specifika cytokiner främjas (Srivastava & Riddell 2015). Problemet med de tidigaste versionerna av CAR var att T-cellerna inte blev helt aktiverade vilket ledde till svag cytokinutsöndring och därmed låg celldöd för de angripna tumörcellerna. Det är även viktigt att CAR T-cellerna kan dela sig, överleva samt behålla sin aktivitet. Detta är egenskaper som är nödvändiga för att skapa effektiva CAR T-celler med ett långvarigt cellminne. CAR T-cellterapi används idag främst för olika former av blodcancer då immunförsvaret är mer hämmat i solida tumörer vilket gör dessa typer svårangripna med denna terapiform (Zhang *et al*.2011). Ett ytterligare problem inom CAR T-cellterapin är oönskad toxicitet. Om antigenerna inte är tillräckligt specifika kan oönskade interaktioner medföra stora komplikationer, något som begränsar användningen av CAR T-celler (Fedorov *et al.* 2013).

Syfte
I denna uppsats vill jag undersöka hur CAR T-celler framställs, utvecklas och används i cancerbehandling. Jag vill vidare fokusera på de möjligheter som denna terapiform erbjuder samt hur oönskad toxicitet kan regleras eller förhindras.

T-cellernas roll i immunologisk övervakning

I tumörer kan man ofta finna en hög koncentration av lymfocyter och makrofager något som indikerar att det adaptiva immunförsvaret verkar spela en viktig roll i att detektera och eliminera begynnande tumörväxt. Detta är en process kallad

immunologisk övervakning (Smyth *et al.* 2006). Tumörantigener triggar det tumör-specifika adaptiva immunförsvaret, även om tumörceller i grunden är kroppsegna celler varpå de ofta endast är svagt immunogena. När T-lymfocyter stimuleras vid bindning till antigener differentieras de till cytotoxiska T-lymfocyter (CD8+) samt T-hjälparlymfocyter (CD4+). CD står för ”cluster of differentiation” vilka är transmembrana glykoproteiner som agerar som co-receptorer till T-cells receptorn.

Både CD8+ samt CD4+ T-lymfocyter spelar en viktig roll i igenkänning och eliminering av cancerceller. CD8+ T-lymfocyter attackerar tumörceller som presenterar TAA på MHC klass I och producerar därefter gammainterferon (IFN-γ) (Dunn *et al.* 2004). IFN-γ är en cytokin som aktiverar en inflammatorisk respons genom att stimulera andra CD8+ T-lymfocyter men även naturliga mördarceller och makrofager. Det är dock fortfarande inte helt kartlagt hur IFN-γ triggar en anti-tumörrespons men det har visat sig att möss som saknar IFN-γ utvecklar fler tumörer jämfört med vildtyp, vilket indikerar att denna cytokin spelar en viktig roll i den immunologiska övervakningen. CD4+ T-lymfocyter kan förbättra de antigen-presenterande cellernas kapacitet samt effektivisera CD8+ T-lymfocyterna genom att utsöndra ett antal olika cytokiner (Kim *et al.* 2007). Observationen att det adaptiva immunförsvaret spelar en viktig roll i att kontrollera utvecklingen av cancerceller gav förhoppningar om att kunna utnyttja T-celler och modifiera dem för att effektivare kunna attackera tumörer (Koebel *et al.* 2007).

För maximal aktivering av T-celler krävs två separata signaler enligt den rådande ”två-stegs modellen”. Först utlöses ”signal 1” från T-cells receptorn (TCR) efter att receptorn har interagerat med en antigen presenterad av MHC. Därefter genereras ”signal 2” via co-stimulerande molekyler som förstärker den TCR-medierade responsen. Båda signaler behövs för optimal aktivering, funktion, cellproliferering och överlevnad (Chen 2004).

CAR proteinernas struktur och signalering

CAR proteiner är uppbyggda av en extracellulär, transmembran samt intracellulär domän. Den extracellulära domänen är vanligtvis en scFV (single-chain variable fragment) där den lätta kedjan av antikroppen kopplas ihop med de tunga kedjorna från tumörspecifika monoklonala antikroppar. Den extracellulära domänen ansvarar för igenkänning och bindning av antigener (Eshhar *et al.*1993). En länkregion mellan den extracellulära- och transmembrana domänen gör receptorn mer flexibel samt ökar räckvidden till TAA genom att låta CAR sticka ut längre än andra molekyler på plasmamembranet (Moritz & Groner 1995). Den intracellulära domänen ansvarar för fortplantningen av signalen från den extracellulära domänen och består oftast av en eller flera signaldomäner. Vanligtvis inkluderas Cluster of differentiation 3 med en ζ-kedja (CD3ζ) i den intracellulära domänen vilket är det vanligaste signalkompexet i T-celler. CD3ζ agerar som en co-receptor och är den sista delen i signaltransduktionen vilken inducerar den slutgiltiga aktiveringen av CAR T-cellerna (An *et al.* 2016).

Utvecklingen av CAR T-celler: från första till fjärde generationen

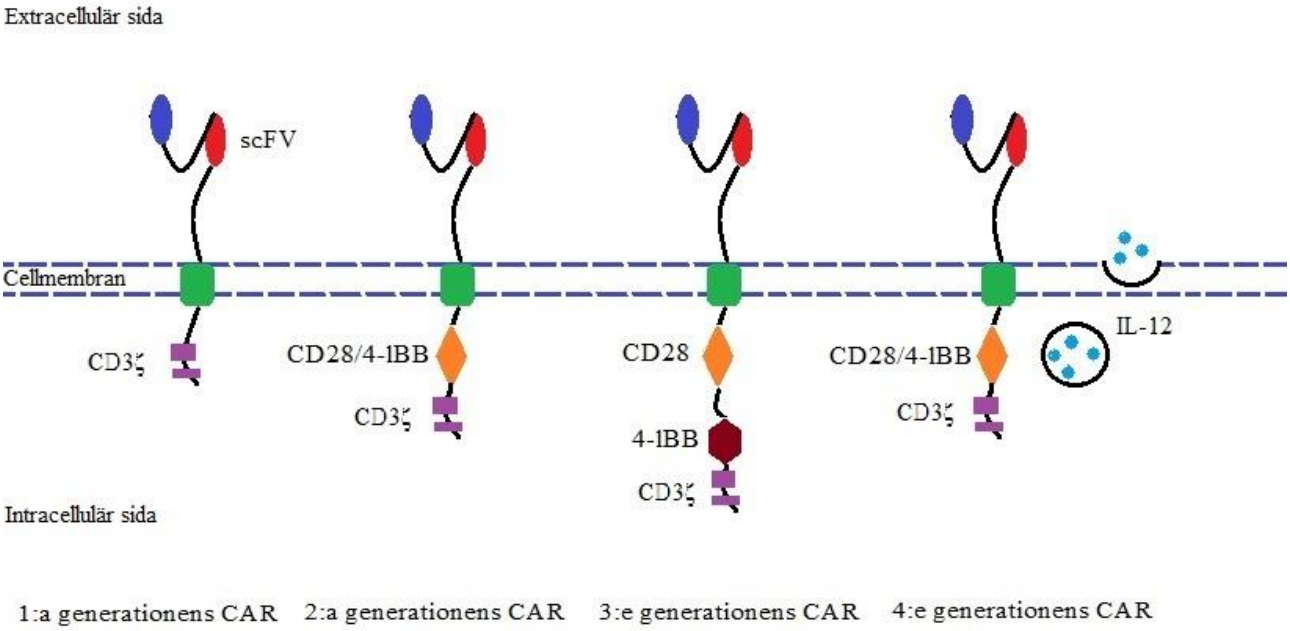
De CAR T-celler som finns tillgängliga idag kan generellt sätt grupperas in i fyra generationer beroende på antalet intracellulära signaldomäner (Figur 1). Första generationens CAR består endast av CD3ζ som intracellulär domän medan andra generationen inkluderar en co-stimulerande domän. Den tredje generationens CAR

består av två co-stimulerande domäner och ytterligare co-stimulerande molekyler. Den fjärde generationens CAR har även förmågan att utsöndra immunostimulerande cytokiner (Maus *et al.* 2014).

Första och andra generationens CAR
Den första generationens CAR kunde bara utlösa den första signalen vilket ledde till en svag cytokinutsöndring och cellproliferering vilket slutligen resulterade i apoptos (Harding *et al.* 1992). För att skapa effektivare CAR T-celler adderades en co-stimulerande domän till den andra generationens CAR för att simulera aktivering enligt två-stegs modellen. De domäner som inkorporerades var exempelvis Cluster of differentiation 28 (CD28) eller 4-lBB. Både CD28 samt 4-lBB är, likt CD8 och CD4, proteiner som bidrar med en co-stimulerande signal till T-cellsreceptorn (Maus *et al.* 2014). Den mest välkända co-stimulatoriska receptorn i T-celler är CD28 som utlöser den andra signalen vid T-cells aktiveringen. Aktivering av CD28 har visat sig trigga flera signalkaskader som bland annat aktiverar transkriptionen av cytokiner (Ward 1996). Andra generationens CAR T-celler visade sig vara betydligt effektivare på att lysera målcellerna och hade en högre cytokinutsöndring samt cellproliferering (Maher *et al.* 2002). Det har även visat sig att aktivering av CD28 ökar uttrycket av Bcl-xL, ett protein som motverkar programmerad celldöd i T-celler (Boise *et al.* 1995).

Tredje och fjärde generationens CAR
För att ytterliga förstärka cellaktiveringen från den andra generationens CAR utvecklades en tredje generationens CAR med ytterligare en co-stimulerande domän, genom att exempelvis kombinera CD28 med 4-lBB. Den additiva effekten av två co-stimulerande receptorer har visat leda till ännu mer effektiva CAR T-celler jämför med den andra generationen (Zhong *et al.* 2009).

De senaste åren har en fjärde generation av CAR T-celler har utvecklats vilka har fått namnet TRUCK vilket står för ”T cells redirected for universal cytokine killing”. Dessa celler har förmågan att utsöndra immunostimulerande cytokiner såsom IL-12 i lokal tumörvävnad (Chmielewski *et al.* 2014). När TRUCK T-cellerna aktiveras genom CAR receptorn aktiveras också transkriptionen av IL-12. Denna cytokin har ingen direkt cancerhämmande effekt utan verkar istället genom att rekrytera NK-celler, makrofager och cytotoxiska T-celler till tumörvävnaden (Zhang *et al.* 2011). Det största motivet till att utveckla en fjärde generationens CAR T-celler är att försöka eliminera de cancerceller som saknar TAA och därmed lyckas överleva den riktade T-cells terapin. Då cancerceller ofta uppvisar en bred fenotyp är risken stor att vissa celler i en tumör kommer att sakna den antigen som CAR T-cellterapin har utvecklats för. Detta skulle kunna undvikas med att aktivera det medfödda immunförsvaret till tumören i en andra attack och därmed döda de kvarvarande celler som är osynliga för CAR T-cellerna (Chmielewski *et al.* 2011).



Figur 1. Schematisk teckning över de fyra generationernas chimära antigen receptorer (CAR). En CAR består av en extracellulär domän (blå/röd i figur), transmembran domän (grön i figur) samt intracellulär domän (lila/orange/röd i figur). Den extracellulära domänen är vanligtvis en scFV (single-chain variable fragment). Den intracellulära domänen ansvarar för signaltransduktionen och består oftast av en eller flera signaldomäner vilka benämns som Cluster of differentiation (CD) där CD3ζ är den vanligaste. Den första generationens CAR består endast av en intracellulär domän medan de senare generationernas CAR har ytterligare domäner såsom CD28 eller 4-lBB. Den fjärde generationens CAR kallad TRUCK har även förmågan att utsöndra vesiklar med immunostimulerande cytokiner såsom IL-12 (blåa prickar i figur). Bild omarbetad från (Haji-Fatahaliha *et al.* 2016).

Genöverföringstekniker

Flera olika metoder används för att överföra CAR-konstruktionen till de T-celler som har extraherats från patientens blod. En optimal genöverföring är säker, specifik samt ger ett starkt genuttryck. Det är dessutom nödvändigt att metoden fungerar *ex vivo* samt är kostnadseffektiv för att den skall kunna användas i större skala. Samtliga metoder som används idag har både sina fördelar och nackdelar. De vektorer som används för genöverföring idag kan delas in i virala och icke-virala vektorer. (Kalos & June 2013)

Virala vektorer

Användning av virala vektorer är den vanligaste metoden idag där γ-retrovirus eller lenti-virus oftast brukas. Dessa system är generellt sett effektiva och ger oftast en transduktionseffektivitet på ca 70%. (Shen *et al.* 2013). Då transgenen integreras i genomet med hjälp av virala integraser så försäkrar detta ett långvarigt uttryck av CAR-genen. Det finns dock en viss oro att detta skulle kunna medföra mutationer ifall transgenen integreras vid fel plast i genomet, så kallad ”insertional mutagenesis”. Om infogningen av transgenen sker intill en proto-onkogen kan detta orsaka mutationer som leder till ett oreglerat uttryck av proto-onkogenen med tumörbildning som följd, något som observerades i en studie där man använde retrovirus i genterapi (Hacein-Bey-Abina *et al.* 2003). Även om integreringen är specifik så tros flera faktorer påverka vart transgenen integreras såsom strukturen på kromatinet samt vissa effekter av cellcykeln (Ciuffi 2008).

Icke-virala vektorer
Genom att använda elektroporering kan plasmider eller mRNA som kodar för CAR-genen överföras till cellerna. Elektroporering är en metod där cellerna utsätts för en kortvarig elektrisk chock varpå de öppnar upp porer i plasmamembranet och kan därmed ta upp DNA eller RNA (Tropp 2012). Användning av plasmider har visat sig ha en låg effektivitet där endast 40% av cellerna uttrycker receptorn. Elektroporering med mRNA har däremot en effektivitet på över 90 % vilket alltså är betydligt effektivare än de virala vektorerna. Integrering av plasmider i genomet sker via homolog rekombination, något som sker med en mycket låg frekvens. På grund av detta är uttrycket av CAR i T-cellerna temporärt och avtar gradvis allt efter att plasmiderna bryts ned (Birkholz *et al.* 2009). Då mRNA degraderas relativt fort resulterar även detta i ett temporärt uttryck av CAR. Man har dock lyckats konstruera mRNA med en 5'cap samt längre poly(A)-svans vilket fördröjer nedbrytningen och resulterar i ett långvarigare uttryck av genen (Zhao *et al.* 2010). Även om det generellt sätt betraktas fördelaktigt med ett långvarigt uttryck av CAR-genen så finns det dock fördelar med att använda vektorer som inte integreras i genomet. Detta för att lättare kunna avbryta behandlingen ifall toxiska bieffekter uppstår, varpå elektroporering med mRNA är ett alternativ (Zhao *et al.* 2010).

Transposon/transposas system har även använts för transduktion av T-celler och baseras på ett tvåkomponentssystem; en plasmid med CAR-genen vilket fungerar som en transposon samt en annan plasmid som kodar för transposas (Maiti *et al.* 2013). Transposas är ett enzym vilket katalyserar överflyttningen av transposonen genom att klippa ut den introducerade genen och klistra in den på en specifik plats i genomet. Transgenen integreras i genomet varpå uttrycket blir långvarigt (Tropp 2012). Transposon/transposas system har en väldigt varierande transduktionseffektivitet på mellan 19–65% och skiftar delvis på grund av storleken på transgenen vilket gör att detta system ännu inte används i någon större utsträckning för att konstruera CAR T-celler (Maiti *et al.* 2013).

Kliniska försök: framgångar och komplikationer

Det är av yttersta vikt att de CAR som konstrueras är tumörspecifika för att undvika oönskad toxicitet. Problematiken vid valet av antigener ligger i att de flesta antigener inte är begränsade till tumörceller utan uttrycks även i normal vävnad. Dessutom finns det ytterligare faktorer som troligen påverkar CAR T-cellernas respons såsom bindningsaffinitet, strukturen på epitopen och mängden av antigen på tumörcellernas yta (Srivastava & Riddell 2015). Idag har man lyckats utveckla CAR T-celler mot flertalet tumörantigener och de kliniska försöken har haft varierande resultat.

Första generationens CAR
I ett tidigt försök år 2007 användes första generationens CAR T-celler för att attackera CD171 vilket är en celladhesions molekyl som uttrycks i neuroblastom, en cancerform som uppstår i det sympatiska nervsystemet. Ingen toxicitet utvecklades men CAR T-cellerna hade svårt att överleva och var ineffektiva (Park *et al.* 2007). Detta visade sig vara det största problemet med den förstagenerationens CAR, bara efter några dagar eller veckor kunde inga CAR T-celler detekteras i patienten (Maude & Barrett 2016). Även effektiviteten var låg och behandlingen hade ofta ingen märkbar verkan (Jensen *et al.* 2010). Försök med första generationens CAR var ändå informativa eftersom det konstaterades att CAR T-cellerna skulle behöva bli mer verksamma för att kunna användas i cancerterapi, något som ledde fram till inkorporering av en co-stimulerande domän och den andra generationens CAR. Man fann även att CAR

T-cellerna kunde starta en immunrespons från både B- och T-celler mot själva transgenen vilket kan resultera i att CAR T-cellerna elimineras (Lamers *et al.* 2011).

Andra och tredje generations CAR

CAR T-celler av den andra och tredje generationen har uppvisat lovande resultat i kliniska försök av första och andra fasen (Savoldo *et al.* 2011, Brentjens *et al.* 2013) Över hälften av alla kliniska försök innefattar CD19, ett glykoprotein som uttrycks i både normala och maligna B-celler men som inte återfinns i blodstamceller eller annan vävnad (An *et al.* 2016). Maligna B-celler kan bland annat orsaka akut lymfatisk leukemi (ALL), kronisk lymfatisk leukemi (CLL) samt non-Hodgkins lymfom (NHL). Den vanligaste behandlingen för dessa cancerformer baseras på konventionella metoder såsom kemoterapi, strålbehandling samt i vissa fall blodstamcellstransplantation. Dessa behandlingsmetoder är effektiva men för de patienter som får återfall är prognosen betydligt sämre varpå nya behandlingsmetoder krävs. Återfallen beror oftast på residualcancer, där ett litet antal maligna celler överlever behandlingen och orsakar återfall. (Wu *et al.* 2016).

Behandling av ALL

Bland barn är återfall av ALL en av de dödligaste formerna av barncancer. ALL är den cancerform där flest kliniska försök med CAR T-cell terapi har genomförts. Ett behandlingsförsök av fem patienter med återfall av ALL visade mycket goda resultat där inga cancerceller kunde detekteras i någon av patienterna efter behandling med CD19-specifika CD28/ CD3ζ CAR T-celler (Brentjens *et al.* 2013). Eftersom dessa patienter räknades som obotliga då de inte längre svarade på kemoterapin så blev resultaten från detta försök mycket uppmärksammade. Fler försök gjordes i en större skala för att grundligare undersöka CAR T-cellterapins potential. I en studie som genomfördes på 30 patienter med återkommande ALL så kunde inga cancerceller detekteras hos 90% av patienterna en månad efter första infusionen av CD19 specifika CAR T-celler (Maude SL *et al.* 2014). Liknade studier med behandling mot ALL visade att mellan 70 till 90 % av patienterna uppvisade en komplett respons vilket innebär att tumörbördan helt försvann. I samtliga försök med CD19 CAR T-celler uppvisar några patienter toxiska symptom vilka i de flesta fall var reversibla och kunde behandlas. (Kochenderfer *et al.* 2012, Brentjens *et al.* 2014, Lee *et al.* 2015).

Behandling av NHL och CLL

NHL består av en grupp lymfom där diffust storcelligt B-cellslymfom (DSBCL) är en variant. I ett första försök att behandla DSBCL med CD19 CAR T-celler uppnådde åtta utav femton patienter komplett respons och fyra patienter ett partiellt svar där tumörbördan minskades eller där de blev stabila i sin sjukdom (Kochenderfer *et al.* 2015). I en pågående studie där både DSBCL samt follikulärt lymfom (FL) behandlas svarar fyra utav åtta patienter väl på behandlingen (Schuster *et al.* 2014). Behandling av CLL har visat sig ha en lägre komplett respons jämfört med behandling mot ALL. Upp till 35 % av patienterna svarade med komplett respons eller partiellt svar i en av de mer omfattande försöken (Porter *et al.* 2014). Däremot visar sig CAR T-cellerna bibehålla mer beständig population över tid i behandling mot CLL jämfört med ALL, något som är positivt då man vill ha en beständig population för att minska risken för återfall. Behandling av NHL och CLL uppvisar dock fler toxiska fall jämfört med behandling mot ALL (Brown *et al.* 2014*)*.

Behandling av solida tumörer
Eftersom immunförsvaret naturligt kan trafikera blodkärl, benmärg och lymfan så har forskningen främst fokuserat på leukemi samt lymfom. Försök att behandla solida tumörer såsom bröstcancer och prostatacancer har inte haft samma framgångsrika resultat som för blodcancer (Katz *et al.* 2015). Ett av de mest lyckade försöken involverade CAR T-celler specifika mot tillväxtfaktorn GD2 som behandling mot neuroblastom där tre utav elva patienter uppnådde komplett respons (Louis *et al.* 2011). Flera faktorer bidrar till varför solida tumörer är svårbehandlade med CAR T-cellterapi. Förutom problemet med att dirigera CAR T-cellerna till tumören har det även visat sig att CAR T-cellerna har en mycket sämre cellproliferering vid behandling av solida tumörer. I de flesta fall har CAR T-celler bara kunna detekteras ett par dagar eller veckor efter första infusionen (Park *et al.* 2007, Tanyi *et al.* 2015). Mikromiljön i tumören tros spela en stor roll då det har visat sig att visa tumörceller kan utsöndra immunhämmande ämnen. Dessutom utnyttjar solida tumörer ofta andra metaboliska vägar jämfört med lymfom och leukemi då de förbrukar vissa aminosyror som är viktiga för T-cellernas funktion. Detta kan leda till att CAR T-cellerna blir inaktiverade och får dålig cellproliferering (Munn & Mellor 2007).

Det har även visat sig svårt att välja lämpliga antigener vilket har lett till allvarliga bieffekter. ERBB2 är en tillväxtfaktor som överuttrycks i bland annat mag-, tarm-, bröst- och äggstockscancer och det finns därför ett stort intresse för denna tillväxtfaktor som val av antigen i immunterapi. I ett försök att använda ERBB2 specifika CAR T-celler som behandling av tjocktarmscancer så fick patienten andnöd bara 15 minuter efter cellinfusionen och avled efter några dagar. Man upptäckte senare låga nivåer av ERBB2 på epitelceller i lungorna vilket hade triggat cytokinutsöndringen som ledde till patientens död. Forskarna ansvariga för studien diskuterade att den höga dosen av CAR T-celler som gavs ledde till den kraftigt toxiska responsen och att framtida försök bör göras med lägre doser för att undvika liknande utgång (Morgan *et al.* 2010).

Fjärde generationens CAR
Behandling med TRUCK-celler har ännu inte nått stadiet för kliniska försök utan endast ett fåtal pre-kliniska försök på möss pågår för närvarande. I en studie konstruerades TRUCK-celler med specificitet för MUC 16^{ecto} antigenen vilken uttrycks på tumörceller i äggstockarna. Man behandlade sedan möss med äggstockscancer med MUC16-TRUCK vilka kan utsöndra IL-12 respektive med en andra generationens MUC16-CAR. Det visade sig att de möss som behandlades med TRUCK-celler hade en högre överlevnad än de möss som behandlades med andra generationens CAR då TRUCK-cellerna visade sig bättre på att helt utrota tumören. TRUCK-cellerna var dessutom mer beständiga och hade en bättre cellproliferering (Koneru *et al.* 2015).
Förhoppningen är att den fjärde generationens CAR T-celler bättre skulle kunna angripa solida tumörer då de verkar vara mindre känsliga för den immunhämmande mikromiljön i tumören men ytterligare forskning lär krävas innan TRUCK T-cellerna kan nå första fasen för kliniska tester.

Toxicitet och säkerhet
CAR T-cellterapi kan utlösa allvarliga toxiska symptom som kan vara långvariga då CAR T-cellerna är utvecklade för att existera en längre tid i kroppen. Dessa potentiellt

livshotande bieffekter är en av de största faktorerna som begränsar användningen av T-cellsbaserad immunoterapi idag. Det finns dock möjliga vägar att kringgå dessa problem vilket kommer att diskuteras nedan. De tre vanligaste biverkningarna från CAR T-cellterapi är Cytokine release syndrome (CRS) , B-cellsaplasi samt neurologiska symptom (Dai *et al.* 2016).

Biverkningar av CAR T-cellterapi

Ett stort bekymmer är så kallad ”On-Target, Off-Tumor” toxicitet vilket beror på att normal vävnad uttrycker det antigen som CAR T-cellerna är specificerade för. Särskilt i CD19 specifika T-celler är B-cellsaplasi att vänta då även friska B-celler uttrycker CD19 och blir därför attackerade och förstörda. B-cellsaplasi är ett syndrom där B-cellerna blir missformade men är inte livshotande utan kan behandlas med antikroppar. Dessutom bildas nya B-celler kontinuerligt i benmärgen (Brentjens *et al.* 2011). CRS uppstår på grund av utsöndring av cytokiner i en stor mängd vilket leder till en inflammatorisk respons. CRS kan leda till feber, blodtrycksfall, kapillärläckagesyndrom samt disseminerad intravasal koagulation. De två sistnämnda symptomen kan leda till ödem och organsvikt respektive bildning av blodproppar samt inre blödningar. Cytokinhämmande läkemedel sant steroider används för att behandla CRS (Lee *et al.* 2015). Neurologiska symptom såsom delirium, afasi och anfall har rapporterats bland ALL patienter som behandlats med CD19 CAR T-celler (Brentjens *et al.* 2014).

Strategier för att förbättra säkerheten

Eftersom CAR T-cellterapi kan utlösa dessa kraftiga bieffekter behövs system för att konstruera säkrare CAR T-celler.

RNA CAR T-celler

Att transfektera T-celler med mRNA via elektroporering tros ha flera fördelar jämfört med att använda virala vektorer. Den transfekterade genen kan uttryckas i flera dagar men integreras inte i genomet. Detta skulle kunna vara en säkrare metod jämfört med att använda virala vektorer som integreras i genomet och därmed uttrycks kontinuerligt. Patienten skulle då få flera injektioner med RNA CAR T-celler och behandlingen kan snabbt avbrytas om toxicitet uppstår. Det är viktigt att CAR T-cellerna är aktiva under en längre tid för att nå maximal effektivitet samt för att undvika återfall. Dock kan mikromiljön i tumören inhibera och inaktivera cellerna som nämnt ovan. Genom att ge flera injektioner med celler som uttrycker CAR under en begränsad tid skulle man även kunna undvika att inaktiva och okänsliga CAR T- celler ackumuleras, något som skulle leda till en effektivare behandling (Zhao *et al.* 2010). Det finns dessutom en oro att användning av virala vektorer kan skapa mutationer vilket skulle kunna leda till maligna CAR T-celler, något som inte är ett bekymmer vid konstruktion av RNA CAR T-celler (Bushman 2007).

Transgena självmordsgener

Självmordgener inkorporerade i cellerna skulle kunna användas som en motåtgärd för att döda CAR T-cellerna ifall toxiska biverkningar uppstår. Kaspaser är en familj av cysteinproteinaser vilka spelar en viktig roll vid inflammation och apoptos hos däggdjur (Tropp 2012). Två kaspas-baserade system har utvecklats; herpes simplex virus-derived enzyme thymidine kinase (HSV-tk) samt inducable caspase-9 (iCasp9) Dessa system har visat sig vara effektiva på att eliminera CAR T-cellerna. (Dai *et al.* 2016).

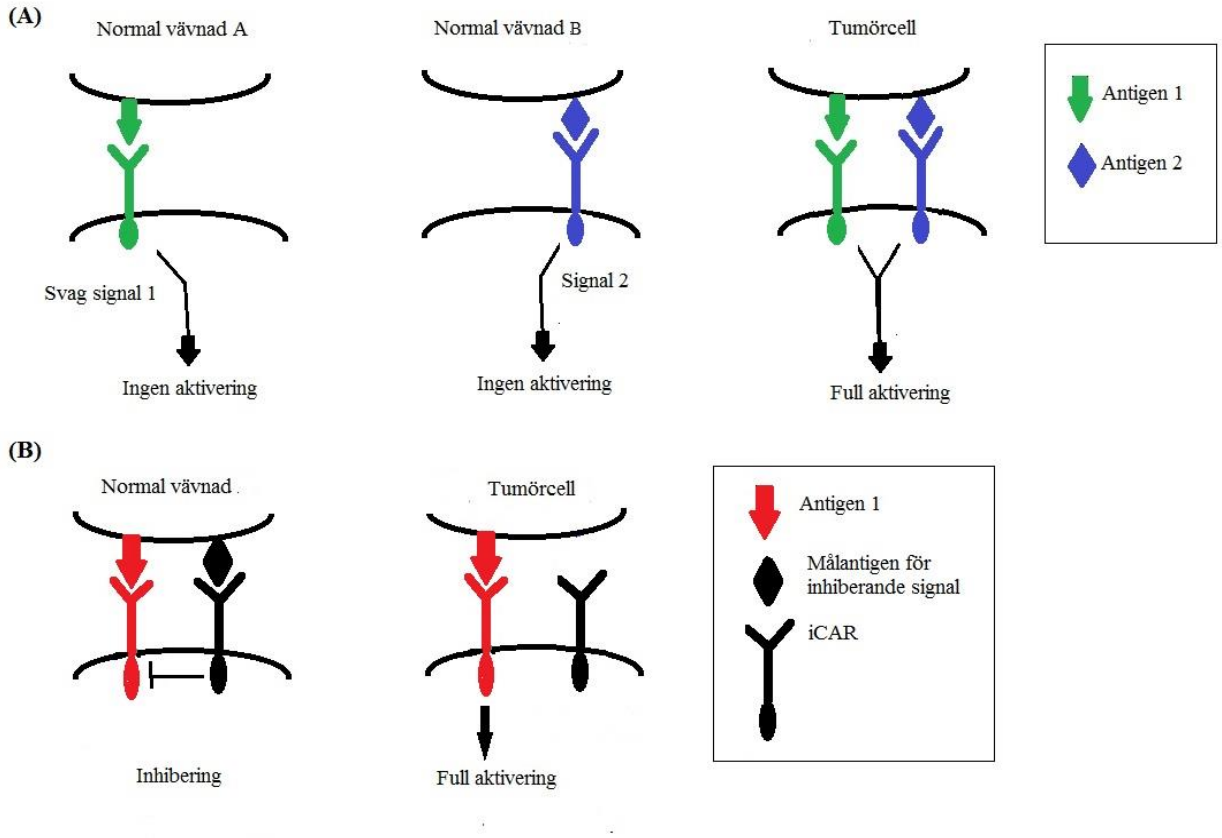
Det mest studerade och välkända självmordssystemet är HSV-tk. HSV-tk kodar för ett tymidinkinas vilket omvandlar ganciclovir (GCV) till den cytotoxiska metaboliten GCV-trifosfat som inhiberar DNA polymeras och triggar apoptos. Vid injektion av GCV kommer endast de celler som kodar för tymidinkinaset att kunna katalysera reaktionen av GCV varpå metoden har betraktats som säker då tymidinkinas inte uttrycks i kroppsegna celler (Dey & Evans 2011). Det inducerbara systemet med iCasp9 baseras på en självmordsgen samt en chemical induction of dimerization (CID) molekyl som används för att aktivera systemet. Själva iCasp9 genen är uppbyggd av humant kaspas-9 vilket är ett pro-apoptotiskt protein samt en domän där CID kan binda. När CID injiceras kommer molekylen att binda till en domän i kaspas-9 och kaspas-9 kan då bilda homodimerer. Bildningen av dessa homodimerer aktiverar proapoptotiska molekyler såsom kaspas-3 något som slutligen leder till apoptos (Straathof *et al.* 2005). I ett försök med tredjegenerationens CAR T-celler med iCasp9 lyckades 90% av cellerna elimineras endast 12 timmar efter injicering med CID vilket gör iCasp9 till en snabbare metod för att eliminera T-celler jämfört med HSV-tk (Budde *et al.* 2013). Problemet med dessa transgena själmordsgener är att transgenerna är potentiellt immunogena, det vill säga att de kan trigga oönskade immunresponser (Marktel *et al.* 2003).

Kombination av flera CAR

Genom att konstruera CAR T-celler som kan känna igen fler än endast en TAA kan man göra cellerna mer specifika genom att ytterligare skilja på tumörceller och normala celler. Detta kan göras genom att exempelvis skapa en delad signal där den ena CAR vid bindning till antigen 1 aktiverar signal 1 medan den andra CAR aktiverar signal 2 vid bindning till antigen 2 (Figur 2A). Båda receptorerna behöver således binda till sina specifika antigener för att CAR T-cellen ska bli helt aktiv. Detta skulle kunna förhindra ”On-Target, Off-Tumor” toxicitet ifall normal vävnad skulle uttrycka en av receptorerna. Detta kräver dock att man lyckas finna två TAA som är specifika för den cancertyp som ska behandlas.

En annan strategi är att skapa CAR T-celler med både aktiverande samt inhiberande receptorer, så kallade iCAR (Figur 2B). Den inhiberande iCAR är specifik för antigener som uttrycks på normala celler och hämmar CAR receptorn vid bindning till normala celler. På cancerceller kan dock CAR receptorn binda utan att bli inhiberad av iCAR. I en studie på möss visade man att CAR T-celler med iCAR kunde med hög precision urskilja på normala celler och tumörceller (Fedorov *et al.* 2013).

Ytterligare en metod för att särskilja normala celler från tumörceller är att utnyttja det faktum att tumörceller ofta överuttrycker vissa antigen såsom epidermal tillväxtfaktorreceptor (EGFR). Denna tillväxtfaktor uttrycks även i normala celler men i betydligt lägre nivåer. En CAR T-cell med hög bindingsaffinitet för EGFR skulle binda även till normala celler. Genom att istället skapa en CAR med lägre affinitet för antigenen kan man lyckas urskilja tumörceller från normala celler då CAR T-cellerna huvudsakligen kommer att aktiveras av tumörceller som överuttrycker antigenen. I en studie med så kallade ”low-affinity CARs” visade det sig att CAR T-celler med låg affinitet för antigenen var lika effektiva som de med hög affinitet gällande att binda till tumörceller medan de uppvisade låg aktivitet bland normala celler (Liu *et al.* 2015).



Figur 2. A) Kombination av två CAR ger en delad signal där endast tumörceller som har båda antigenerna kan aktivera CAR T-cellen. B) Inhiberade iCAR hämmar CAR aktivering vid bindning till antigener som uttrycks på normala celler. Omritad efter (Dai *et al.* 2016).

Diskussion

CAR T-cellterapin har visat sig vara en effektiv terapiform som har uppvisat häpnadsväckande resultat och fått mycket uppmärksamhet på senare tid. Det är just inom behandling av ALL med CD19 CAR T-celler där terapin har haft störst framgång. Patienter med återkommande leukemi där strålbehandling och cytostatika inte längre fungerar har blivit cancerfria efter CAR T-cellterapin, resultat som måste betraktas som mycket framgångsrika. Detta har fått forskare att försöka designa CAR T-celler för att nå liknande framgångar i behandling av andra cancertyper, något som visat sig vara svårt. Solida tumörer har visat sig svårbehandlade då det är komplicerat att få CAR T-cellerna att nå tumörerna samt att mikromiljön i tumören hämmar cellernas aktivitet. Att vidare förstå hur miljön i tumören utför en hämmande effekt på CAR T-cellerna kommer att vara viktigt för att konstruera CAR T-celler för behandling av solida tumörer, något som tros bli nästa steg inom denna terapiform.

Flera aspekter är kritiska i designen av CAR T-celler såsom valet av antigen, co-stimulerande domäner samt strategier för att förbättra säkerheten såsom transgena själmordsgener eller iCAR. Att utveckla CAR T-celler som effektivt kan elimineras om toxiska bieffekter uppstår är nödvändigt för att överföra terapin till klinisk rutin. De transgena självmordsgenerna har visat sig vara effektiva men den potentiellt immunogena effekten kan begränsa deras användning. Användning av flera CAR med delad signal har inte uppvisat några immunogena responser men problemet ligger i att

finna minst två tumörassocierade antigener specifika för den aktuella cancertypen. Genom att utnyttja iCAR kringgås detta problem men det är då viktigt att den inhiberande receptorn är utformad efter en antigen som uppvisas på alla normala celler. CAR T-celler med lägre affinitet för tillväxtfaktorer som överuttrycks på cancerceller skulle kunna vara effektiva men det finns alltid en möjlighet att ”On-Target, Off-Tumor” toxicitet uppstår så längre normala celler uttrycker antigenen även om de finns i betydligt lägre koncentration än hos cancerceller.

Till skillnad från kemiska läkemedel är CAR T-celler ett levande läkemedel som kan amplifieras i kroppen efter transfusion. Detta kan leda till en ökad dos av CAR T-celler med biverkningar som följd. Arbete på att försöka beräkna sambandet med den dos som ges och den aktiva dos som uppstår i kroppen är viktigt för att fastställa säkra men effektiva doser.

CAR T-cellerna har snabbt utvecklats från den första generationens ineffektiva celler. I takt med att förståelsen för hur T-cellernas signalering och aktivering fungerar har betydligt effektivare celler kunnat konstrueras. Förhoppningen finns att den fjärde generationens TRUCK-celler skulle visa sig verksammare mot solida tumörer men ännu har inga försök på människor genomförts. De flesta forskare är eniga att det är för tidigt att prata om att man kan bota cancer med CAR T-cellterapi då metoden är så ny. Behandlade patienter måste följas upp under längre tid för att fastställa hur länge effekten håller i sig. Det är dock mycket ovanligt med så pass långa remissioner som har uppvisats hos ALL- patienter behandlade med CAR T-celler, något som är lovande inför uppföljningen av de försök som har gjorts. Trots de komplikationer som har uppträtt efter CAR T-cellterapi och de problem som denna komplexa terapiform står inför är dock forskarna inom området eniga om att CAR T-cellterapin har öppnat upp en ny era inom cancerbehandlingen.
Det är mycket möjligt att CAR T-cellterapin når klinisk rutin inom en snar framtid och kan erbjuda en effektiv och specialiserad cancerbehandling.

Tack

Tack till min handledare Ida Lundholm samt min seminariegrupp för vägledning under arbetet. Jag vill även tacka Susanne Ekman för inspiration och värdefulla råd.

Referenser

An N, Tao L, Li S, Xing H, Tang T, Tian Z, Rao Q, Wang W, Wang J. 2016. Construction of a new anti-CD19 chimeric antigen receptor and the anti-leukemia function study of the transduced T cells. Oncotarget **7**: 10638–10649.

Birkholz K, Hombach A, Krug C, Reuter S, Kershaw M, Kaempgen E, Schuler G, Abken H, Schaft N, Doerrie J. 2009. Transfer of mRNA encoding recombinant immunoreceptors reprograms CD4(+) and CD8(+) T cells for use in the adoptive immunotherapy of cancer. Gene Therapy **16**: 596–604.

Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, Thompson CB. 1995. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-xL. Immunity **3**: 87–98.

Brentjens R, Davila M, Riviere I, Wang X, Bartido S, Park J, Bouhassira D, Curran K, Chung S, Stefanski J, Borquez-Ojeda O, Giralt S, Sadelain M. 2014. Efficacy

and Toxicity Management of 19-28z CAR T Cell Therapy in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. Molecular Therapy **22**: S295–S296.
Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, Bartido S, Stefanski J, Taylor C, Olszewska M, Borquez-Ojeda O, Qu J, Wasielewska T, He Q, Bernal Y, Rijo IV, Hedvat C, Kobos R, Curran K, Steinherz P, Jurcic J, Rosenblat T, Maslak P, Frattini M, Sadelain M. 2013. CD19-Targeted T Cells Rapidly Induce Molecular Remissions in Adults with Chemotherapy-Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. Science Translational Medicine **5**: 177ra38.
Brentjens RJ, Riviere I, Park JH, Davila ML, Wang X, Stefanski J, Taylor C, Yeh R, Bartido S, Borquez-Ojeda O, Olszewska M, Bernal Y, Pegram H, Przybylowski M, Hollyman D, Usachenko Y, Pirraglia D, Hosey J, Santos E, Halton E, Maslak P, Scheinberg D, Jurcic J, Heaney M, Heller G, Frattini M, Sadelain M. 2011. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. Blood **118**: 4817–4828.
Budde LE, Berger C, Lin Y, Wang J, Lin X, Frayo SE, Brouns SA, Spencer DM, Till BG, Jensen MC, Riddell SR, Press OW. 2013. Combining a CD20 Chimeric Antigen Receptor and an Inducible Caspase 9 Suicide Switch to Improve the Efficacy and Safety of T Cell Adoptive Immunotherapy for Lymphoma. Plos One **8**: e82742.
Bushman FD. 2007. Retroviral integration and human gene therapy. Journal of Clinical Investigation **117**: 2083–2086.
Chen LP. 2004. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. Nature Reviews Immunology **4**: 336–347.
Chmielewski M, Hombach AA, Abken H. 2014. Of CARs and TRUCKs: chimeric antigen receptor (CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma. Immunological Reviews **257**: 83–90.
Chmielewski M, Kopecky C, Hombach AA, Abken H. 2011. IL-12 Release by Engineered T Cells Expressing Chimeric Antigen Receptors Can Effectively Muster an Antigen-Independent Macrophage Response on Tumor Cells That Have Shut Down Tumor Antigen Expression. Cancer Research **71**: 5697–5706.
Ciuffi A. 2008. Mechanisms Governing Lentivirus Integration Site Selection. Current Gene Therapy **8**: 419–429.
Dai H, Wang Y, Lu X, Han W. 2016. Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy. Journal of the National Cancer Institute **108**: djv439.
Dey D, Evans GRD. 2011. Suicide Gene Therapy by Herpes Simplex Virus-1 Thymidine Kinase (HSV-TK). doi 10.5772/18544.
Fedorov VD, Themeli M, Sadelain M. 2013. PD-1-and CTLA-4-Based Inhibitory Chimeric Antigen Receptors (iCARs) Divert Off-Target Immunotherapy Responses. Science Translational Medicine **5**: 215ra172.
Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCcormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. 2003. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. Science **302**: 415–419.

Hadrup S, Donia M, thor Straten P. 2012. Effector CD4 and CD8 T Cells and Their Role in the Tumor Microenvironment. Cancer Microenvironment **6**: 123–133.
Haji-Fatahaliha M, Hosseini M, Akbarian A, Sadreddini S, Jadidi-Niaragh F, Yousefi M. 2016. CAR-modified T-cell therapy for cancer: an updated review. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology **44**: 1339–1349.
Harding F, Mcarthur J, Gross J, Raulet D, Allison J. 1992. Cd28-Mediated Signaling Co-Stimulates Murine T-Cells and Prevents Induction of Anergy in T-Cell Clones. Nature **356**: 607–609.
Jensen MC, Popplewell L, Cooper LJ, DiGiusto D, Kalos M, Ostberg JR, Forman SJ. 2010. Antitransgene Rejection Responses Contribute to Attenuated Persistence of Adoptively Transferred CD20/CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor Redirected T Cells in Humans. Biology of Blood and Marrow Transplantation **16**: 1245–1256.
Kalos M, June CH. 2013. Adoptive T Cell Transfer for Cancer Immunotherapy in the Era of Synthetic Biology. Immunity **39**: 49–60.
Katz SC, Burga RA, McCormack E, Wang LJ, Mooring W, Point GR, Khare PD, Thorn M, Ma Q, Stainken BF, Assanah EO, Davies R, Espat NJ, Junghans RP. 2015. Phase I Hepatic Immunotherapy for Metastases Study of Intra-Arterial Chimeric Antigen Receptor-Modified T-cell Therapy for CEA(+) Liver Metastases. Clinical Cancer Research **21**: 3149–3159.
Kim R, Emi M, Tanabe K. 2007. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. Immunology **121**: 1–14.
Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, Wilson WH, Spaner DE, Maric I, Stetler-Stevenson M, Phan GQ, Hughes MS, Sherry RM, Yang JC, Kammula US, Devillier L, Carpenter R, Nathan D-AN, Morgan RA, Laurencot C, Rosenberg SA. 2012. 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 **119**: 2709–2720.
Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, Somerville RPT, Carpenter RO, Stetler-Stevenson M, Yang JC, Phan GQ, Hughes MS, Sherry RM, Raffeld M, Feldman S, Lu L, Li YF, Ngo LT, Goy A, Feldman T, Spaner DE, Wang ML, Chen CC, Kranick SM, Nath A, Nathan D-AN, Morton KE, Toomey MA, Rosenberg SA. 2015. Chemotherapy-Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Indolent B-Cell Malignancies Can Be Effectively Treated With Autologous T Cells Expressing an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor. Journal of Clinical Oncology **33**: 540–U31.
Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, Smyth MJ, Schreiber RD. 2007. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. Nature **450**: 903–U24.
Koneru M, Purdon TJ, Spriggs D, Koneru S, Brentjens RJ. 2015. IL-12 secreting tumor-targeted chimeric antigen receptor T cells eradicate ovarian tumors in vivo. Oncoimmunology **4**: e994446.
Lamers CHJ, Willemsen R, Elzakker P van, Steenbergen-Langeveld S van, Broertjes M, Oosterwijk-Wakka J, Oosterwijk E, Sleijfer S, Debets R, Gratama JW. 2011. Immune responses to transgene and retroviral vector in patients treated with ex vivo–engineered T cells. Blood **117**: 72–82.
Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, Fry TJ, Orentas R, Sabatino M, Shah NN, Steinberg SM, Stroncek D, Tschemia N, Yuan C, Zhang H, Zhang L, Rosenberg SA, Wayne AS, Mackall CL. 2015. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic

leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. Lancet **385**: 517–528.
Liu X, Jiang S, Fang C, Yang S, Olalere D, Pequignot EC, Cogdill AP, Li N, Ramones M, Granda B, Zhou L, Loew A, Young RM, June CH, Zhao Y. 2015. Affinity-Tuned ErbB2 or EGFR Chimeric Antigen Receptor T Cells Exhibit an Increased Therapeutic Index against Tumors in Mice. Cancer Research **75**: 3596–3607.
Louis CU, Savoldo B, Dotti G, Pule M, Yvon E, Myers GD, Rossig C, Russell HV, Diouf O, Liu E, Liu H, Wu M-F, Gee AP, Mei Z, Rooney CM, Heslop HE, Brenner MK. 2011. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. Blood **118**: 6050–6056.
Maiti SN, Huls H, Singh H, Dawson M, Figliola M, Olivares S, Rao P, Zhao YJ, Multani A, Yang G, Zhang L, Crossland D, Ang S, Torikai H, Rabinovich B, Lee DA, Kebriaei P, Hackett P, Champlin RE, Cooper LJN. 2013. Sleeping Beauty System to Redirect T-cell Specificity for Human Applications. Journal of Immunotherapy **36**: 112–123.
Marktel S, Magnani Z, Ciceri F, Cazzaniga S, Riddell SR, Traversari C, Bordignon C, Bonini C. 2003. Immunologic potential of donor lymphocytes expressing a suicide gene for early immune reconstitution after hematopoietic T-cell-depleted stem cell transplantation. Blood **101**: 1290–1298.
Maude S, Barrett DM. 2016. Current status of chimeric antigen receptor therapy for haematological malignancies. British Journal of Haematology **172**: 11–22.
Maus MV, Grupp SA, Porter DL, June CH. 2014. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. Blood **123**: 2625–2635.
Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. 2010. Case Report of a Serious Adverse Event Following the Administration of T Cells Transduced With a Chimeric Antigen Receptor Recognizing ERBB2. Molecular Therapy **18**: 843–851.
Moritz D, Groner B. 1995. A spacer region between the single chain antibody- and the CD3 zeta-chain domain of chimeric T cell receptor components is required for efficient ligand binding and signaling activity. Gene therapy **2**: 539–546.
Munn DH, Mellor AL. 2007. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. Journal of Clinical Investigation **117**: 1147–1154.
Park JR, DiGiusto DL, Slovak M, Wright C, Naranjo A, Wagner J, Meechoovet HB, Bautista C, Chang W-C, Ostberg JR, Jensens MC. 2007. Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. Molecular Therapy **15**: 825–833.
Porter DL, Frey NV, Melenhorst JJ, Hwang W-T, Lacey SF, Shaw P, Chew A, Grupp SA, Capobianchi J, Gilmore J, Kalos M, Litchman M, Lledo L, Loren AW, Mahnke Y, Marcucci KT, McConville H, Shen A, Wood PA, Zheng Z, Levine BL, June CH. 2014. Randomized, Phase II Dose Optimization Study of Chimeric Antigen Receptor Modified T Cells Directed Against CD19 (CTL019) in Patients with Relapsed, Refractory CLL. Blood 124:
R. Brown J, MD, PhD, L. Porter D, MD, M. O'Brien and S, MD. Novel Treatments for Chronic Lymphocytic Leukemia and Moving Forward. Journal of Clinical Oncology 2014:
Savoldo B, Ramos CA, Liu E, Mims MP, Keating MJ, Carrum G, Kamble RT, Bollard CM, Gee AP, Mei Z, Liu H, Grilley B, Rooney CM, Heslop HE, Brenner MK, Dotti G. 2011. CD28 costimulation improves expansion and

persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. Journal of Clinical Investigation **121**: 1822–1826.

Schuster SJ, Svoboda J, Nasta SD, Porter DL, Chong EA, Mahnke Y, Lacey SF, Melenhorst JJ, Chew A, Shah G, Hasskarl J, Litchman M, Wasik MA, Landsburg DJ, Mato AR, Garfall AL, Frey NV, Marcucci KT, Shea J, McConville H, Zheng Z, Levine BL, June CH. 2014. Phase IIa Trial of Chimeric Antigen Receptor Modified T Cells Directed Against CD19 (CTL019) in Patients with Relapsed or Refractory CD19+ Lymphomas. Blood **124**: 3087–3087.

Shen C-J, Yang Y-X, Han EQ, Cao N, Wang Y-F, Wang Y, Zhao Y-Y, Zhao L-M, Cui J, Gupta P, Wong AJ, Han S-Y. 2013. Chimeric antigen receptor containing ICOS signaling domain mediates specific and efficient antitumor effect of T cells against EGFRvIII expressing glioma. Journal of Hematology & Oncology **6**: 33.

Srivastava S, Riddell SR. 2015. Engineering CAR-T cells: Design concepts. Trends in Immunology **36**: 494–502.

Straathof KC, Pule MA, Yotnda P, Dotti G, Vanin EF, Brenner MK, Heslop HE, Spencer DM, Rooney CM. 2005. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. Blood **105**: 4247–4254.

Tanyi JL, Haas AR, Beatty GL, Morgan MA, Stashwick CJ, O'Hara MH, Porter DL, Maus MV, Levine BL, Lacey SF, Nelson AM, McGarvey M, Kerr NDS, Plesa G, June CH. 2015. Safety and feasibility of chimeric antigen receptor modified T cells directed against mesothelin (CART-meso) in patients with mesothelin expressing cancers. Cancer Research, doi 10.1158/1538-7445.AM2015-CT105.

Tropp BE. 2012. Molecular Biology - Genes to Proteins, 4:e uppl. Jones & Bartlett Learning, London.

Wu J, Jia S, Wang C, Zhang W, Liu S, Zeng X, Mai H, Yuan X, Du Y, Wang X, Hong X, Li X, Wen F, Xu X, Pan J, Li C, Liu X. 2016. Minimal Residual Disease Detection and Evolved IGH Clones Analysis in Acute B Lymphoblastic Leukemia Using IGH Deep Sequencing. Frontiers in Immunology **7**: 403.

Zhang L, Kerkar SP, Yu Z, Zheng Z, Yang S, Restifo NP, Rosenberg SA, Morgan RA. 2011. Improving Adoptive T Cell Therapy by Targeting and Controlling IL-12 Expression to the Tumor Environment. Molecular Therapy **19**: 751–759.

Zhao Y, Moon E, Carpenito C, Paulos CM, Liu X, Brennan AL, Chew A, Carroll RG, Scholler J, Levine BL, Albelda SM, June CH. 2010. Multiple Injections of Electroporated Autologous T Cells Expressing a Chimeric Antigen Receptor Mediate Regression of Human Disseminated Tumor. Cancer Research **70**: 9053–9061.

Zhong X-S, Matsushita M, Plotkin J, Riviere I, Sadelain M. 2009. Chimeric Antigen Receptors Combining 4-1BB and CD28 Signaling Domains Augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL Activation and CD8+ T Cell–mediated Tumor Eradication. Molecular Therapy **18**: 413–420.

[CAR T-celler - vägen mot en målinriktad cancerterapi]: etisk bilaga

Elin Ekman

Självständigt arbete i biologi 2016

Etiska aspekter på användningen av CAR T-celler

Kliniska studier på CAR T-celler utförs i dagsläget på svårt sjuka patienter som betraktas som obotligt sjuka då konventionell cancerbehandling inte längre fungerar. I de studier där patienter med återkommande ALL har behandlats har prognosen varit så dålig som endast ett par månaders överlevnad. Med CAR T-cells behandling har merparten av de behandlade patienterna uppnått komplett respons och därmed förlängt överlevnaden avsevärt (Maude *et al.* 2014). CAR T-cells terapin är utan tvekan framgångsrik men har stött på en del bakslag i form av allvarliga biverkningar och dödsfall vilket i vissa fall gör CAR T-cellsterapin till en riskfylld behandling. CAR T-cellsterapin har i nuläget endast erbjudits till obotligt sjuka patienter och den fråga jag vill diskutera är om det är rätt att utföra klinisk forskning på patienter med mycket dålig prognos med en överlevnad på endast ett par månader?

Behandling med CAR T-celler medför stora risker. I svåra fall har patienter avlidit endast ett par dagar efter injektion av CAR T-celler (Morgan *et al.* 2010). Även om patienten obehandlad skulle avlida på grund av sin sjukdom efter ett par månader borde dödfallet räknas som lika allvarligt som om det hade drabbat en patient med en bättre prognos. De sista månaderna som finns kvar i patientens liv kan vara mycket värdefulla, både för patienten själv men även för anhöriga. Avlider patienten på grund av behandlingen som erbjudits kan detta resultera i stor chock för anhöriga även om man redan visste att tiden var kort. Jag tycker att ett människoliv är lika mycket värt oberoende av hur lång tid någon har kvar att leva varpå de dödsfall som CAR T-cellsterapin har orsakat är mycket allvarliga och därför inte kan avfärdas med att patienten ändå skulle dö.

Men å andra sidan är cancerforskningen livsviktig och för att kunna föra in ny behandling i klinisk rutin krävs det försök på människor. Hade jag själv blivit erbjuden en möjlighet att förlänga mitt liv eller till och med bli fri från en obotlig cancer är sannolikheten stor att jag hade tagit den. Jag tycker att patienter som erbjuds att deltaga i studier med CAR T-celler ska bli noggrant informerade om de risker som medför behandlingen varpå de själva får utvärdera om det är en risk värd att ta för att kunna få en chans till ett längre liv. Viktigt att påpeka är även att CAR T-cellsterapin har förlängt livet på flertalet patienter som troligtvis hade varit avlidna ifall behandling inte erbjudits. Utan fortsatta kliniska försök kan inte denna terapiform nå den breda massan där den kan göra ännu större nytta.

Jag anser att trots de allvarliga konsekvenser som CAR T-cellsterapin kan medföra så är de fördelar forskningen ger större än nackdelarna. Det är däremot viktigt att grundlig forskning har genomförts innan nya former av CAR T-celler testas på människor för att minska risken för oönskade bieffekter. Det är även av yttersta vikt att de patienter som deltar i studier blir noggrant informerade om potentiella risker med behandlingen.

Forskningsetik

I denna uppsats har jag valt vad jag anser är tillförlitliga och granskade artiklar. Jag

har försökt att ge ett brett perspektiv och inte vinkla arbetet i någon riktning för att kunna ge en rättvis bild över de fördelar och nackdelar som finns med CAR T-cellsterapi. Jag har även försökt att fastställa vad det nuvarande forskningsläget är samt hur en realistisk framtid kan se ut.

Referenser

Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, Chew A, Gonzalez VE, Zheng Z, Lacey SF, Mahnke YD, Melenhorst JJ, Rheingold SR, Shen A, Teachey DT, Levine BL, June CH, Porter DL, Grupp SA. 2014. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. New England Journal of Medicine **371**: 1507–1517.

Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. 2010. Case Report of a Serious Adverse Event Following the Administration of T Cells Transduced With a Chimeric Antigen Receptor Recognizing ERBB2. Molecular Therapy **18**: 843–851.