



CART sejt kezelések: a közeli és távoli jövő

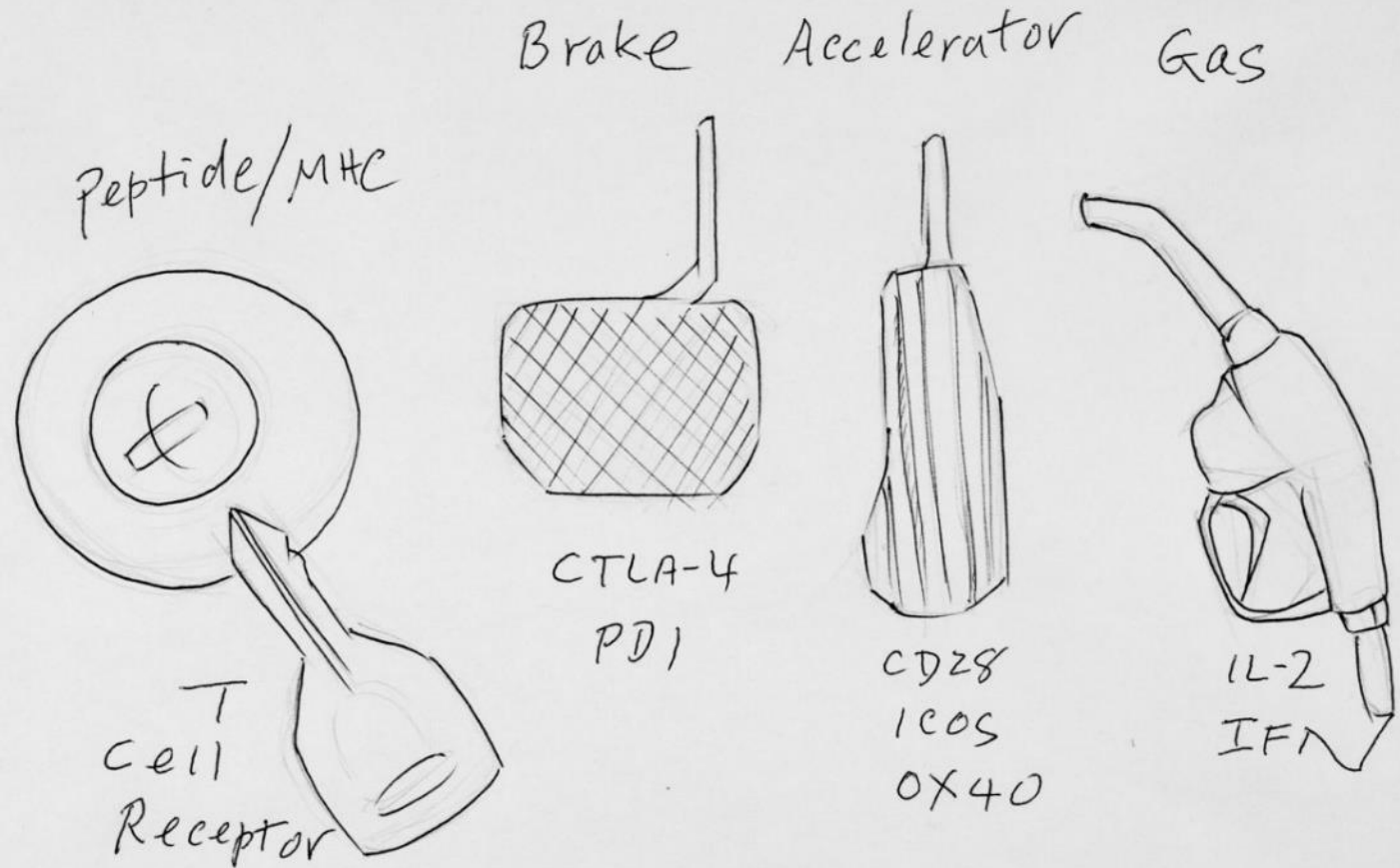
Dr. Kállay Krisztián Miklós Ph.D., orvosigazgató

**Dél-pesti Centrumkórház – Országos Hematológiai és Infektológiai
Intézet**

BIOLOGIA



Basic Mechanisms of T Cells Stimulation & Inhibition



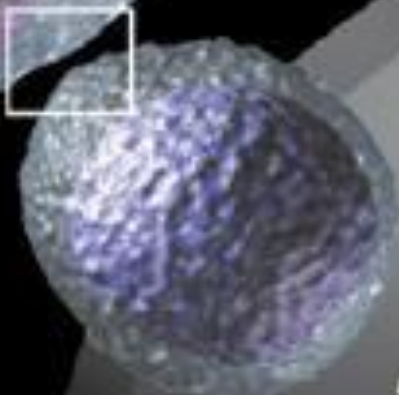
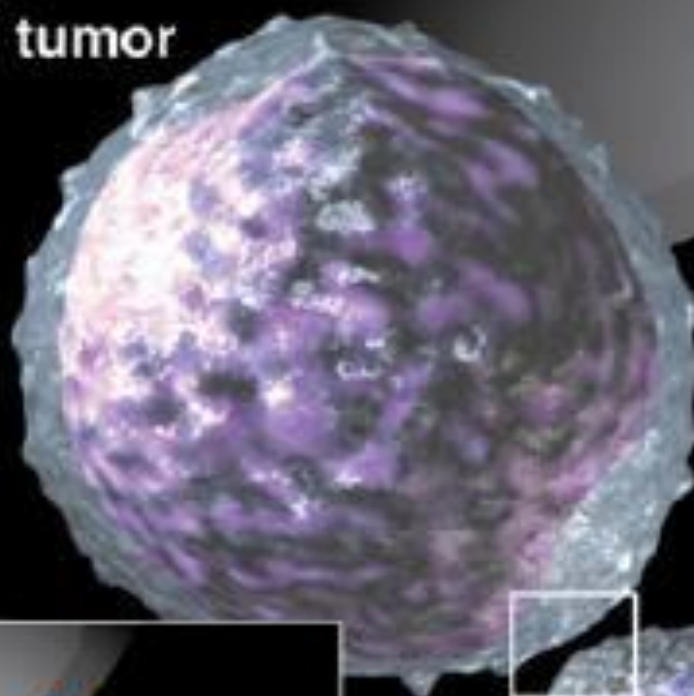
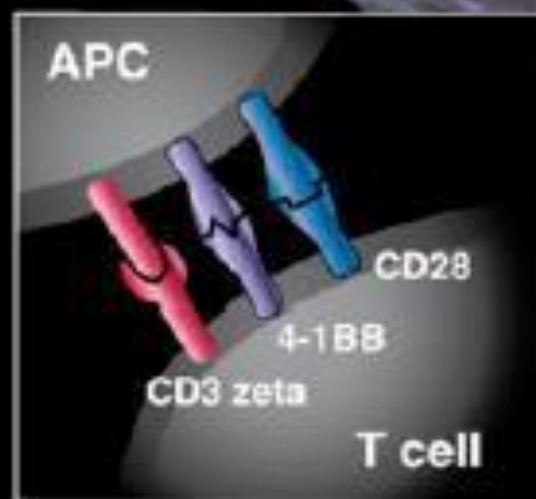
TAK MAK

April 2017

[Signature]

CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR (CAR)

CD19⁺ tumor

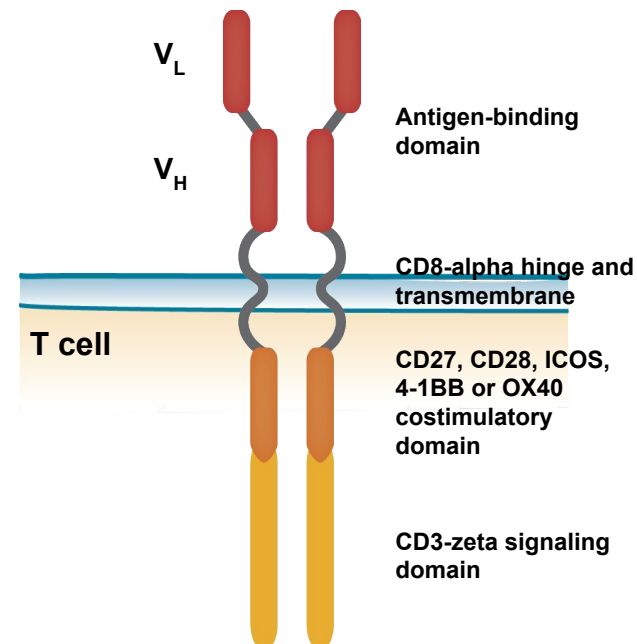
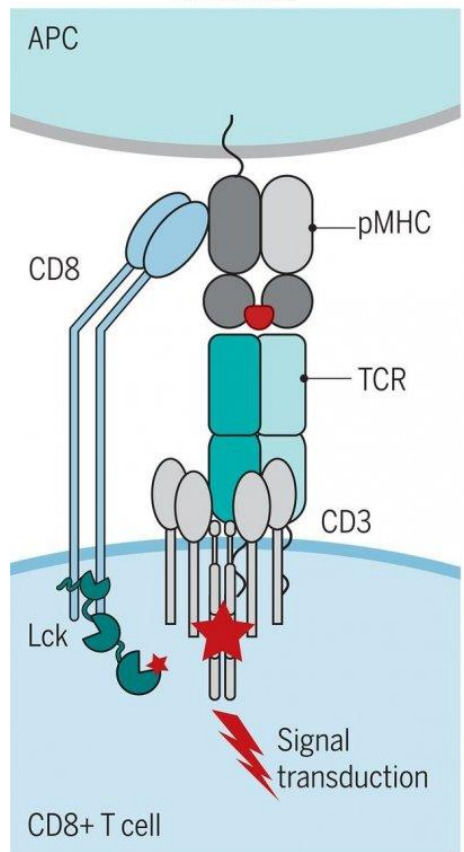


T cell



*Proliferation,
cytokine production,
CTL function,
tumor lysis*

A KÜLÖNBSÉG



A KÜLÖNBSÉG

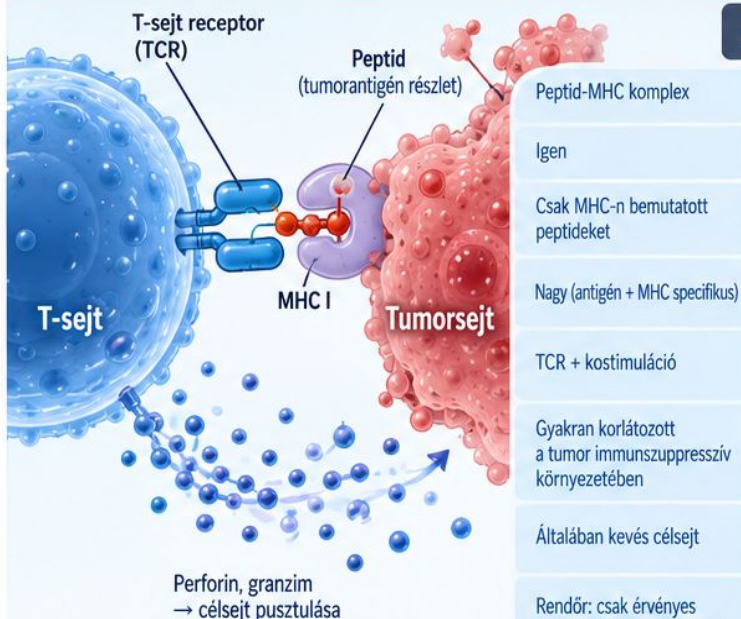
T-SEJT vs. CAR-T SEJT

Két különböző fegyver. Ugyanaz a cél: a rákos sejt elpusztítása.

A CAR-T nem kér engedélyt.
Célpontot lát – és támad.

A természetes (humán) T-sejt működése

MHC-restrikcióval – precíz, de korlátozott



Fő különbségek

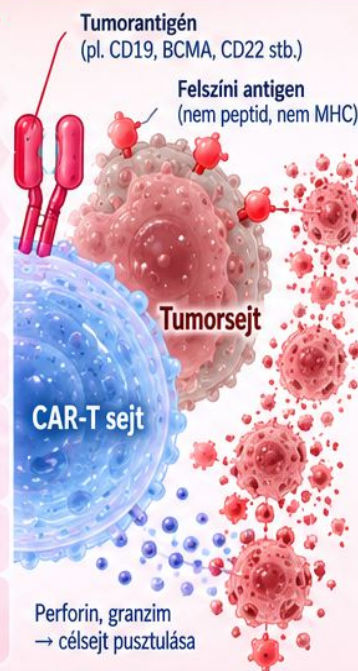
Peptid-MHC komplex	Antigénfelismerés
Igen	MHC-függőség
Csak MHC-n bemutatott peptideket	Felismer célpontot?
Nagy (antigén + MHC specifikus)	Specifitás
TCR + kostimuláció	Aktivációs jel
Gyakran korlátozott a tumor immunosuppresszív környezetében	Hatékonyság a tumorban
Általában kevés célsejt	Célsejtek száma
Rendőr: csak érvényes személyi igazolvánnyal lép be	Analógia

A CAR-T sejt működése

MHC-független – univerzális, erőteljes tumorelles válasz

Chimeric Antigen Receptor (CAR)

Felszíni antigén (natív fehérje, pl. CD19)
Nem
MHC-től függetlenül, közvetlenül a felszíni antigént
Antigénspecifikus (pl. csak CD19+), de MHC-független
A CAR intracelluláris jelződoménjei (CD3ζ + kostimuláció, pl. CD28, 4-1BB)
Magas – képes leküzdeni az immunosuppresszív mikro-környezetet
Sok célsejtet képes egymás után elpusztítani (serial killing)
Sorozatgyilkos: nem kér engedélyt, látja a célpontot és támad



A CAR-T EGY SOROZATGYILKOS:

- ✓ Nem kér MHC-t
- ✓ Több tumorsejtet is elpusztít
- ✓ Ugyanazt a célantigént újra és újra felismeri
- ✓ Folyamatosan aktív és proliferál
- ✓ Egy sejt – sok áldozat

Látja a célpontot.
Megöli. Továbbáll.
Ismétli.

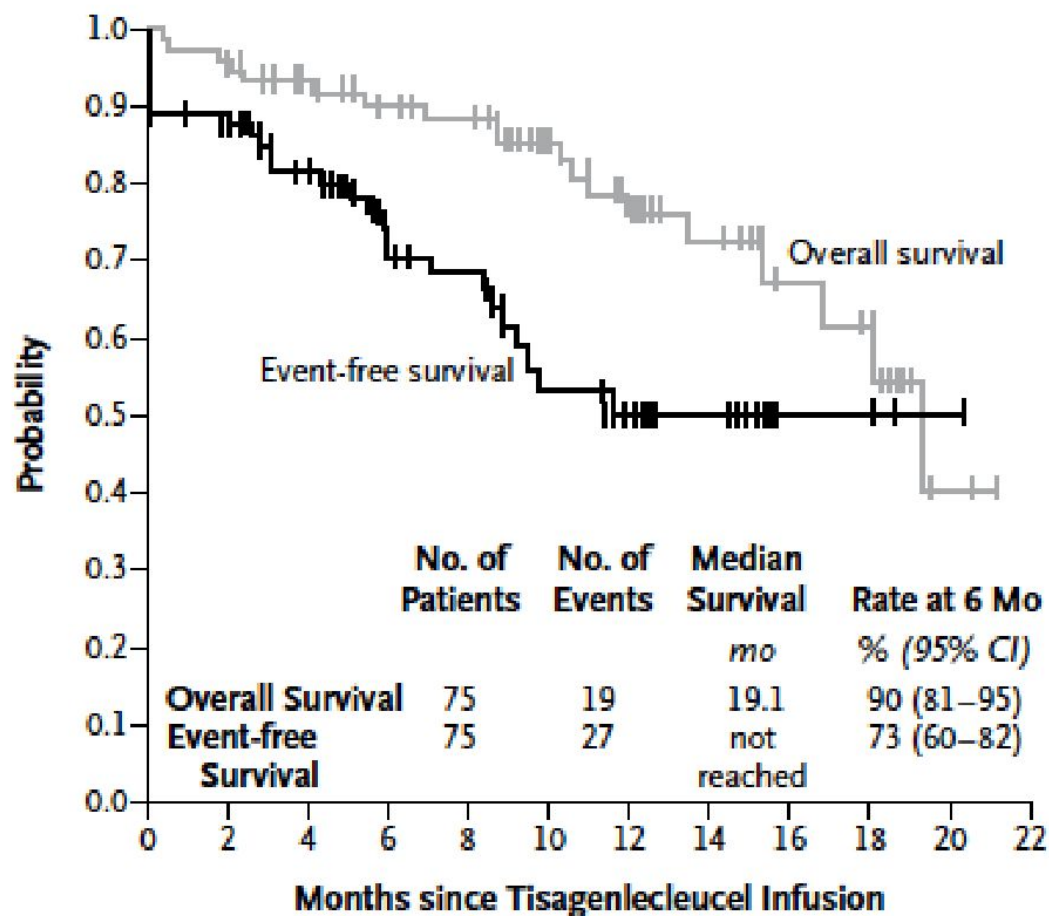
A természetes T-sejtek előnyei és korlátai

- ✓ Fiziológiás, finoman szabályozott működés
- ✓ Széles antigénrepertoár
- MHC-restrikció
- Tumorok gyakran elkerülik az MHC-megjelenítést

A CAR-T sejtek előnyei és kihívásai

- ✓ MHC-független, erőteljes tumorelles válasz
- ✓ Többszöri sejtpusztítás (serial killing)
- Csak a célantigénnel rendelkező sejtekre hat
- On-target, off-tumor toxicitás kockázata

B Event-free and Overall Survival



No. at Risk

Overall survival	75	72	64	58	55	40	30	20	12	8	2	0
Event-free survival	75	64	51	37	33	19	13	8	3	3	1	0



GENERATIONS OF CAR-T

1ST GENERATION



T-CELLS WITH A RECEPTOR/ RADAR WHICH THEY DIRECT AT THE TUMOUR CELLS

- THEY FIND THE TUMOUR CELLS
- THEY DON'T ELIMINATE THEM EFFECTIVELY
- THEY DON'T LAST LONG

2ND GENERATION



MODIFICATION OF THE 1ST GENERATION CAR-T, WHICH MAKES THEM MORE EFFECTIVE AGAINST TUMOURS

- THEY WORK EFFECTIVELY
- TUMOURS OCCASIONALLY INACTIVATE THEM
- THEY DON'T LAST LONG

3RD GENERATION



MODIFICATION OF THE 2ND GENERATION CAR-T IN ORDER TO REMAIN ACTIVE FOR LONGER

- THEY WORK EFFECTIVELY
- SOMETIMES THEY BECOME OVER-ACTIVATED AND CAN POSE A RISK
- THEY DON'T LAST LONG

4TH GENERATION OR TRUCK



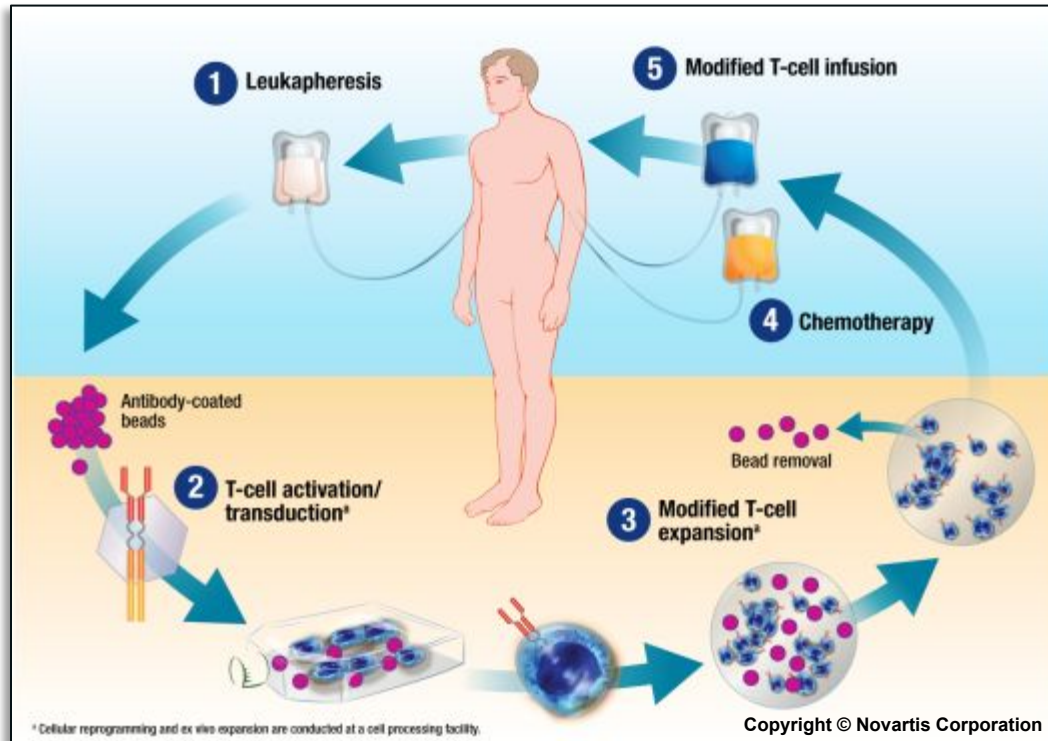
MODIFICATION OF THE 2ND GENERATION CAR-T IN ORDER TO MOBILIZE REINFORCEMENT FROM THE REST OF THE IMMUNE SYSTEM

- SAFER
- THEY DON'T LAST LONG, BUT THEY TRIGGER AN ANTI-TUMOUR RESPONSE



DÉL-PESTI CENTRUMKÓRHÁZ
ORSZÁGOS HEMATOLÓGIAI
ÉS INFECTOLÓGIAI INTÉZET

CART SEJT FOLYAMATÁBRA A KLINIKUMBAN

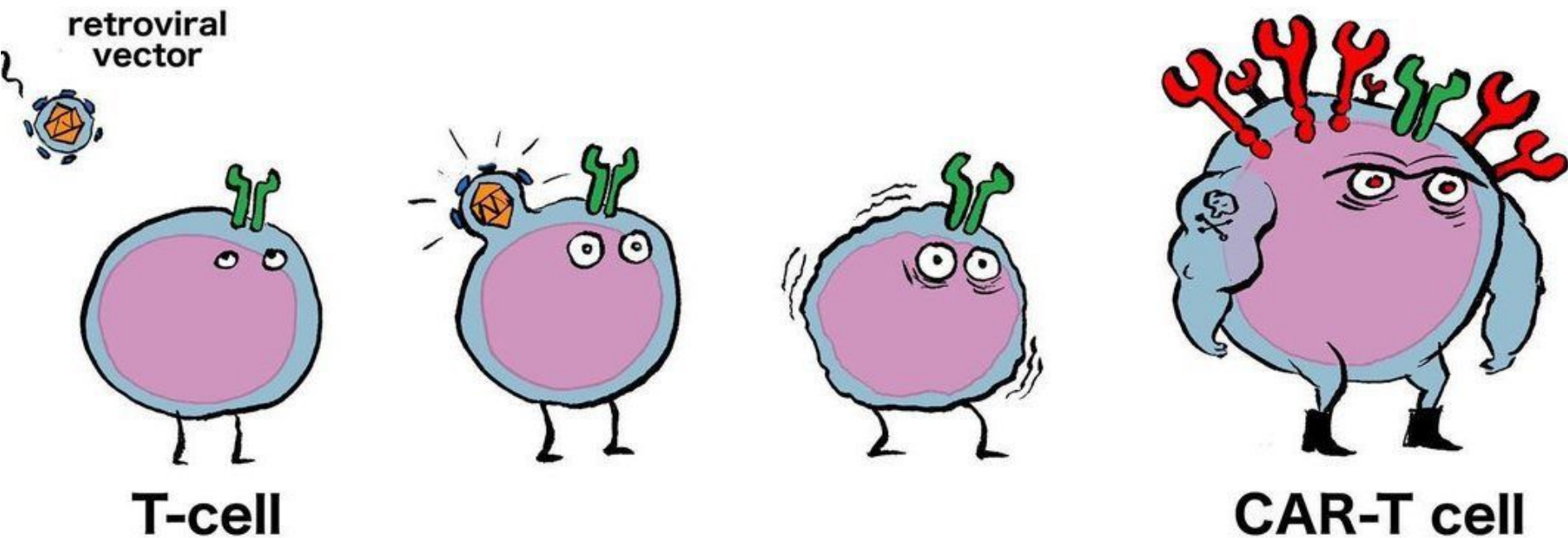


- 1. Leukapheresis:** a beteg sejtjeit legyűjtik (jelenleg csak autológ van!)
- 2. A T-sejteket genetikai transzdukcióval (transzfekcióval) ex vivo módosítják** - a legtöbbször lentivírus vektorral, mely a genomba írva új receptort szintetizáltat és expresszál
- 3. CTL019 sejtek ex vivo expanziója**
- 4. Lymphodepléció** - a beteg előkészítő kezelést kap (többnyire FluCy, környezet modifikálása, saját T-sejt kevesebb, citokin több legyen)
- 5. CTL019 sejtek visszaadása a betegbe**

Generating super-soldiers

the production of CAR-T cells

Chimeric Antigen Receptor



facebook.com/pedromics



DÉL-PESTI CENTRUMKÓRHÁZ
ORSZÁGOS HEMATOLÓGIAI
ÉS INFÉKTOLÓGIAI INTÉZET

REAL WORLD DATA



All patients discussed in the NCCP ALL from Nov 2018 up to July 16th 2020

Patient characteristics	N=60
Median age, years	8.44
Female / male, %	67 / 33
Median lines of prior therapy, n	2.5
Prior HSCT, %	48
Cytogenetics: B-other / MLL / Heh / others	42 / 17 / 12 / 29
Bridging therapy, %	95
Median dose infused (x10 ⁶ cells/kg)	2.5
OOS product*	1

Efficacy	Infused (n=49)		ITT (n=60)		ELIANA	
	6 mo	12 mo	6 mo	12 mo	6 mo	12 mo
CR/CRi by day 90, %	95		85			
MRD ⁻	79		79			
OS, %	98	86	90	78	90	76
EFS, %	75	68.2	79	61	73	50
Composite EFS, %	48	34	63	34		

- Baseline characteristics were similar between the MAP/IND and the SoC cohorts
- Median probability of ongoing B cell depletion is not reached
- Median follow-up for infusion and ITT cohorts were 9.9 and 11.9 mo, respectively
- Greater proportion of CD19⁺ relapses seen in this study vs ELIANA (60% vs 6%)

*Due to viability.

ALL, acute lymphoblastic leukemia; CR, complete remission, CRi, complete remission with incomplete hematologic recovery; EFS, event-free survival; Heh, high hyperdiploidy; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; IND, investigational new drug; ITT, intention-to treat; MAP, Managed Access Program; MLL, mixed-lineage leukemia; mo, months; MRD, minimal residual disease; NCCP, National CAR-T Cell Panel; OOS, out of specification; OS, overall survival; SoC, standard of care.,

3. Ghorashian S et al. Presented at 2020 ASH Annual Meeting [Poster 1016].



DÉL-PESTI CENTRUMKÓRHÁZ
ORSZÁGOS HEMATOLÓGIAI
ÉS INFECTOLÓGIAI INTÉZET

REAL-WORLD TREATMENT OF R/R B-ALL USING TISAGENLECLEUCEL THAT IS OOS FOR COMMERCIAL RELEASE

⁴ (2/2)

PRWCC, US

Survival	MAP/IND (n=24)		SoC (n=161)	
	6 mo	12 mo	6 mo	12 mo
OS, %	96	85	83	70
EFS, %	65	55	63	51
Safety (n=49)				
Grade ≥3 CRS, %	17		19	
ICANS, %	8		22	

- Probability of continued remission at 12 mo in MAP/IND vs SoC in pts with CR: 75% versus 63%
- Efficacy and safety were not affected by use of OOS tisagenlecleucel to treat pts with r/r B-ALL under commercial settings
- Larger studies are needed to identify cut-off beyond which OOS could affect the outcomes

B-ALL, B-cell acute lymphoblastic leukemia; CR, complete response; CRS, cytokine release syndrome; EFS, event-free survival; ICANS, immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome; IND, investigational new drug; MAP, Managed Access Program; mo, months; OOS, out of specification; OS, overall survival; pts, patients; r/r, relapsed/ refractory; SoC, standard of care.

4. Rossoff J et al. Presented at 2020 ASH Annual Meeting [Poster 1936].



DÉL-PESTI CENTRUMKÓRHÁZ
ORSZÁGOS HEMATOLÓGIAI
ÉS INFECTOLÓGIAI INTÉZET

WHEN YOU THINK
MORE CHEMOTHERAPY
IS THE ONLY OPTION

WHEN YOU EXPERIENCE
THE MAGIC OF
CAR T-CELL THERAPY



1. GYEREK: CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA (CHOP)

- Emily Whitehead: első CAR-T kezelést kapó gyermek
- 2012. május, Children's Hospital of Philadelphia
- The Emily Whitehead Alapítvány: gyermekkori daganatok immunoterápiás kezelésére kutatási támogatás





Kymriah



KÖZELI JÖVŐ



IN-HOUSE PRODUCTION

- Experimentális
- Európában általában a Miltényi platformon, lentivírus vektorral
 - CliniMACS Prodigy
- Ugyanolyan szigorú törvényi szabályozás (gyógyszergyár, ATMP)
- Egyszerűbb, gyorsabb, olcsóbb, rugalmasabb megvalósítás

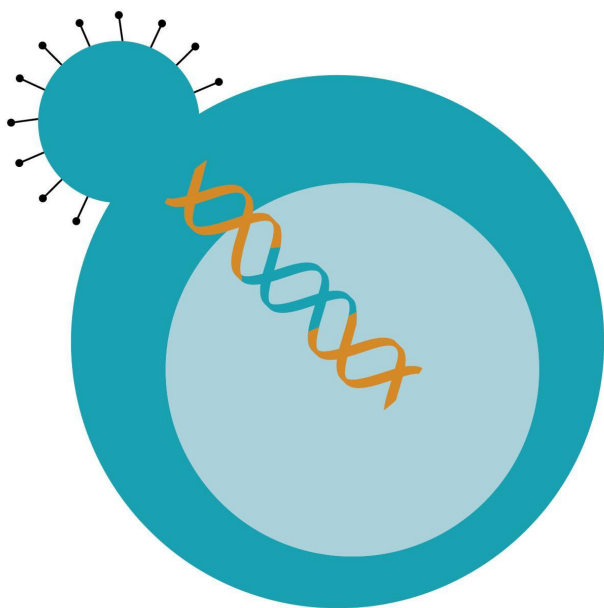


CLINIMACS PRODIGY WITH ELECTROPORATOR – DPC: 2 DB

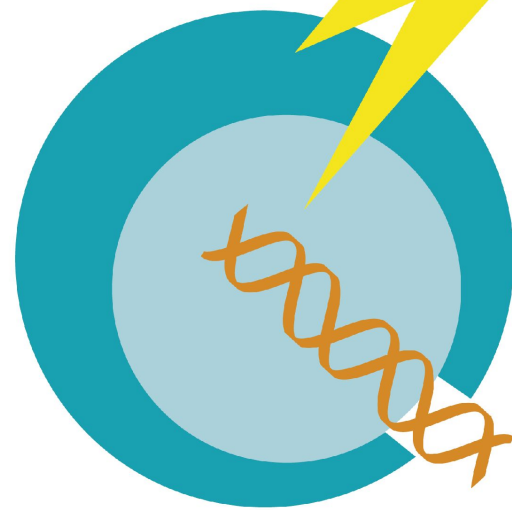


DÉL-PESTI CENTRUMKÓRHÁZ
ORSZÁGOS HEMATOLÓGIAI
ÉS INFECTOLÓGIAI INTÉZET

A KÜLÖNBSÉG



+



-



DÉL-PESTI CENTRUMKÓRHÁZ
ORSZÁGOS HEMATOLÓGIAI
ÉS INFEKTOLÓGIAI INTÉZET

CART GYÁR



- Egy platform
 - Több módszer (elektroporáció, transzfekció)
 - Több sejt-típus (CAR-T, CAR-NK, dendritikus, őssejt, génterápia, stb.)
 - Több betegség (ALL, DLBCL, MM...)
- Nem fagyasztott sejt

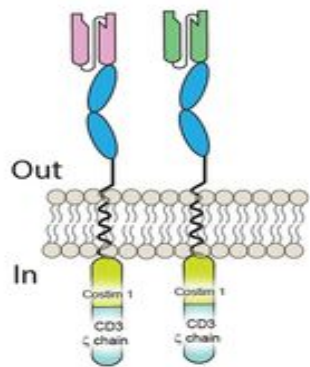


TÁVOLI JÖVŐ

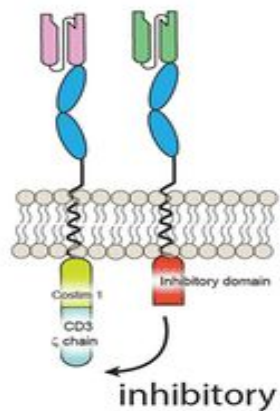


CART TÁVOLI JÖVŐ

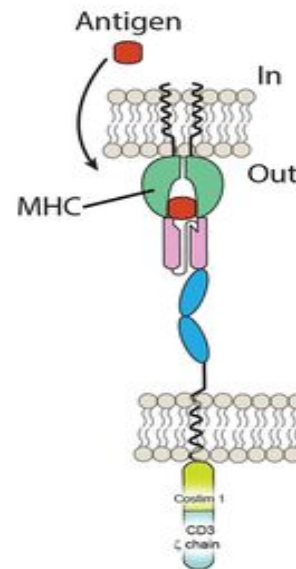
A Bi-specific CAR



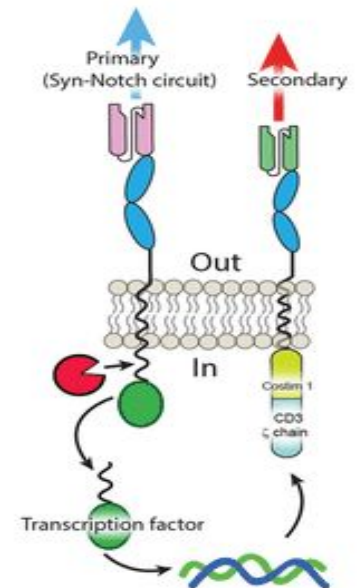
B iCAR



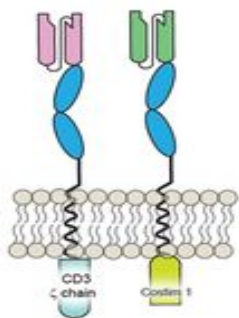
C intra-CAR



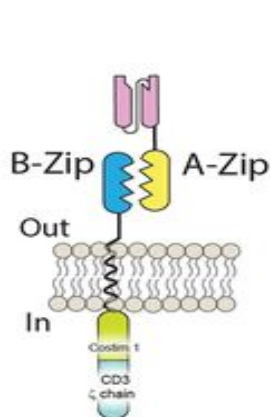
D Syn-Notch CAR



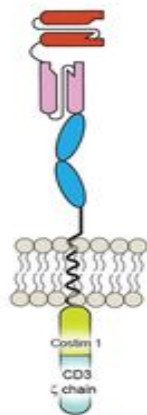
E Split CAR



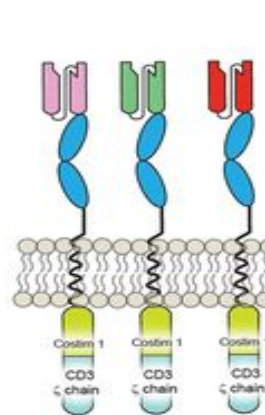
F Supra CAR



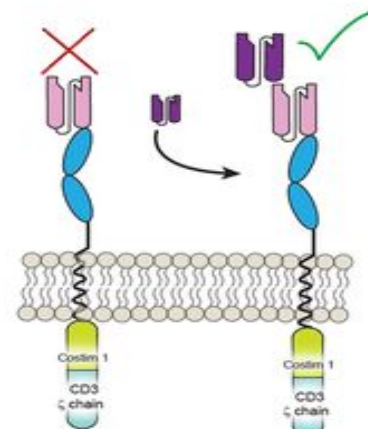
G TanCAR



H Trivalent CAR



I Uni-CAR

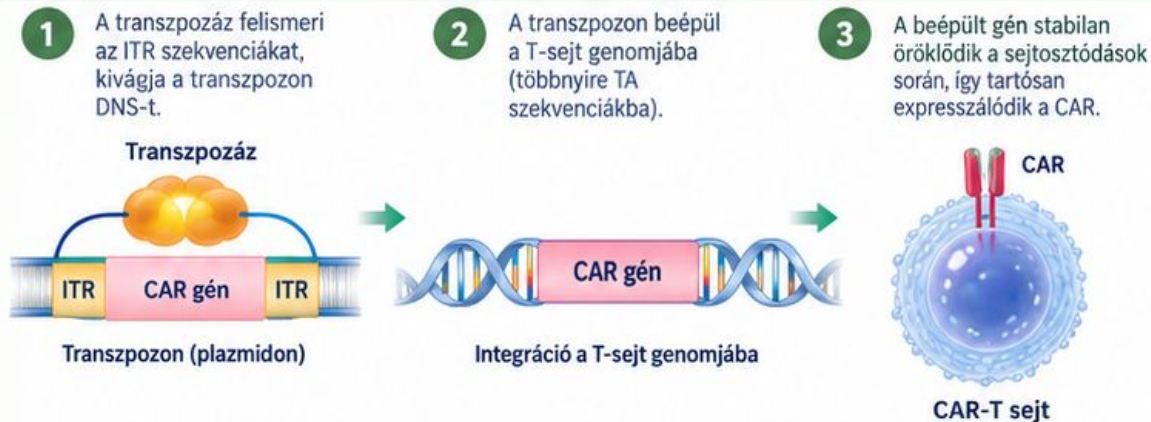


CAR-T sejt létrehozása Sleeping Beauty transzpozonnal

Biztonságos, stabil génbeviteli módszer, nem virális vektorral

Saját T-sejtek.
Tartós CAR expresszió.
Klinikai alkalmazásban.

Hogyan működik a Sleeping Beauty transzpozon?



A Sleeping Beauty rendszer előnyei

- ✓ Nem virális → alacsonyabb költség, egyszerűbb gyártás
- ✓ Stabil, tartós génexpresszió
- ✓ Nagy méretű genetikai kazetták is bevihetők (pl. több gén, biztonsági kapcsolók)
- ✓ Jó biztonsági profil (kevés insertió mutagenézis)
- ✓ Jól alkalmazható zárt, automatizált rendszerekben (pl. Miltenyi CliniMACS Prodigy)
- ✓ Széles körű preklinikai és klinikai tapasztalat (pl. T-sejtes malignitások, szolid tumorok)

Összefoglalva:

A Sleeping Beauty transzpozon egy hatékony, nem virális génbeviteli technológia, amely lehetővé teszi biztonságos és tartós CAR-T sejtek előállítását klinikai alkalmazásra.



DÉL-PESTI CENTRUMKÓRHÁZ
ORSZÁGOS HEMATOLÓGIAI
ÉS INFEKTOLÓGIAI INTÉZET

CAR-T sejt létrehozása CRISPR vagy base editing módszerrel

Precíz gényszerkesztés a biztonságosabb, hatékonyabb és univerzálisabb CAR-T sejtekért

A CRISPR és a base editing gényszerkesztési technológiák lehetővé teszik a T-sejtek célzott módosítását, javítva a CAR-T sejtek biztonságosságát és hatékonyságát.

1 Leukaferézis

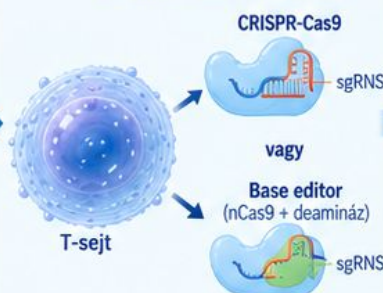
A beteg vérből T-sejteket gyűjtünk.



- Perifériás vérből leukaferézis
- T-sejtek izolálása
- Aktiválás (anti-CD3/CD28, IL-2)

2 Gényszerkesztés (CRISPR vagy base editing)

RNS-alapú rendszer bejuttatása a T-sejtbe (elektroporációval).



- CRISPR: célzott génkiütés (knock-out)
- Base editing: precíz nukleotidcsere (pl. C → T vagy A → G), DNS kettősszalú törés nélkül
- RNP vagy mRNS forma (tranzienst)

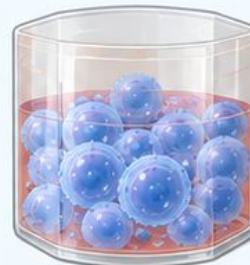
3 Célpont gének módosítása

A biztonságosság és univerzalitás érdekében több gén egyidejű szerkesztése lehetséges.

- ✗ TRAC (TCRα) → TCR kiütése (nincs alloreaktivitás)
- ✗ B2M / CIITA → MHC I/II kiütése (univerzális, „off-the-shelf” lehetőség)
- + CAR transzgén beépítése → célantigén (pl. CD19, BCMA)
- + Biztonsági kapcsolók → pl. iCasp9 (elimináció toxicitás esetén)
- + Rezisztencia gének módosítása → pl. PD-1 kiütése, citokin rezisztencia
- + Precíz javítás base editinggel → pl. inhibitoros pontmutációk (PD-1, TGFβR)

4 Expanzió

A szerkesztett CAR-T sejteket tenyésztjük.



- 7–14 napos tenyésztés
- Citokinek (IL-2, IL-7, IL-15)
- Minőségellenőrzés (szerkesztési hatékonyság, off-target analízis, sterilizálás)

5 Késztermék

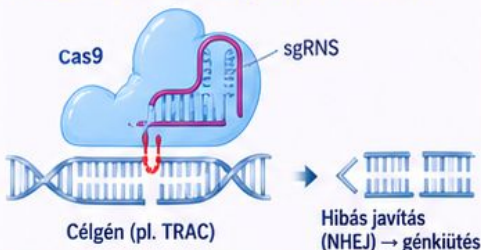
Infúzióra kész, gényszerkesztett CAR-T sejtek.



- Formulálás és krioprezerválás
- Dózis meghatározása
- Infúzió a betegnek
- Utánkövetés (hatékonyság, toxicitás)

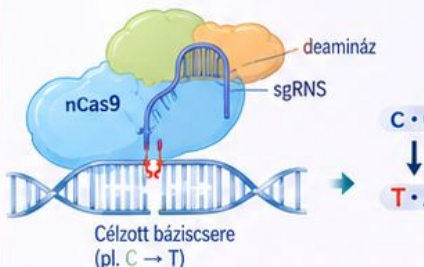
CRISPR-Cas9 működése (kock-out)

A Cas9 enzim a célzott helyen kettősszalú DNS-törést hoz létre, amit a sejt hibajavító rendszere hibásan javít → génkiütés (knock-out).

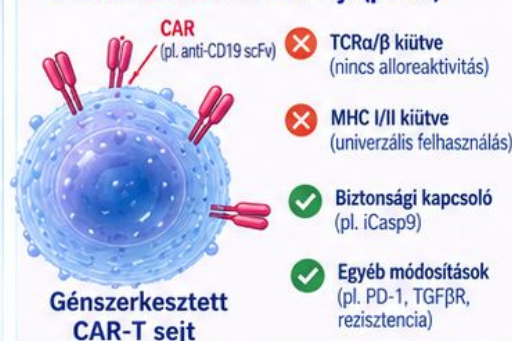


Base editing működése (pontmutáció)

A nCas9-hoz kapcsolt deamináz egyetlen nukleotidot alakít át (pl. C → T vagy A → G) kettősszalú törés nélkül.



Gényszerkesztett CAR-T sejt (példa)



Lehetséges szerkesztési célpontok

TRAC / TRBC	TCR kiütése
B2M / CIITA	MHC I/II kiütése
PDCD1 (PD-1)	Rezisztencia kimerüléssel szemben
TGFBR2	Rezisztencia TGF-β ellen
CAR beépítése	Célantigén-specifikus aktivitás
iCasp9	Biztonsági eliminációs kapcsoló

Előnyök

- ✓ Nagyobb biztonság (kevesebb alloreaktivitás, kontrollálhatóság)
- ✓ Precíz, célzott módosítás
- ✓ Univerzális, „off-the-shelf” CAR-T lehetősége
- ✓ Fokozott perzisztencia és hatékonyság
- ✓ Kisebb gyártási variabilitás (standardizálható)

Kihívások

- ! Off-target módosítások kockázata
- ! Szerkesztési hatékonyság optimalizálása
- ! Komplex szabályozási elvárások
- ! Hosszú távú biztonságosság igazolása

Klinikai perspektíva



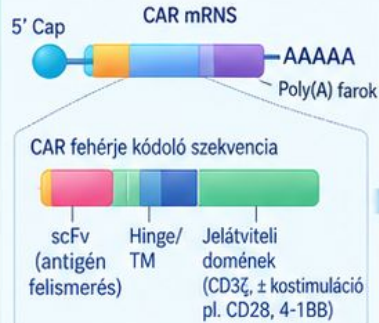
A CRISPR és base editing technológiákkal készült CAR-T sejtek közelebb visznek az univerzális, biztonságosabb, hatékonyabb és szélesebb körben alkalmazható sejterápiákhoz.

In vivo CAR-T sejt előállítása mRNS segítségével

Ideiglenes, nem integráló génbevétel – egyszerűbb, biztonságosabb, off-the-shelf megközelítés

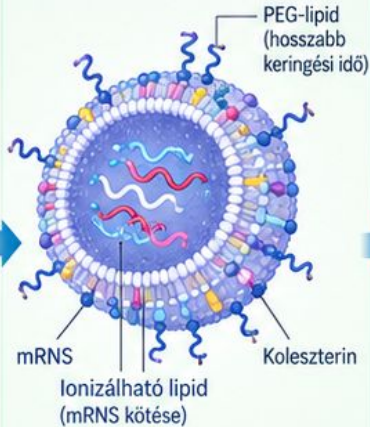
Lényege: a CAR kódoló mRNS-t nanorészecskékkel (pl. lipid nanopartikulum, LNP) juttatjuk a beteg szervezetébe, ahol az mRNS a T-sejtekben átmenetileg CAR fehérje expressziót indukál.

1 mRNS konstrukció tervezése



- In vitro transzkripcióval előállított, módosított nukleotidokat tartalmazó mRNS (pl. N1-metil-pszeudouridin)
- Stabilitást növelő elemek (5' cap, 3' UTR, poly(A))
- Cél: magas fehérjeexpresszió, alacsony immunogenitás

2 Nanorészecske (LNP) formulálás



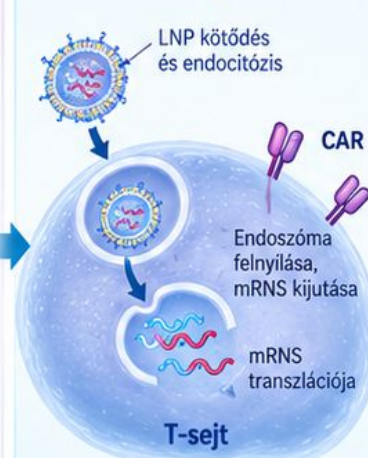
- Lipid nanopartikulum (LNP) vagy más hordozó (pl. polimer nanorészecske, ekzoszóma)
- Védi az mRNS-t a lebomlástól
- Segíti a sejtbevételt és az endoszómából való kijutást
- Lehetővé teszi a T-sejtek szelektív vagy preferenciális célzását (pl. felszíni ligandokkal, antitesttel)

3 Beadás a betegnek



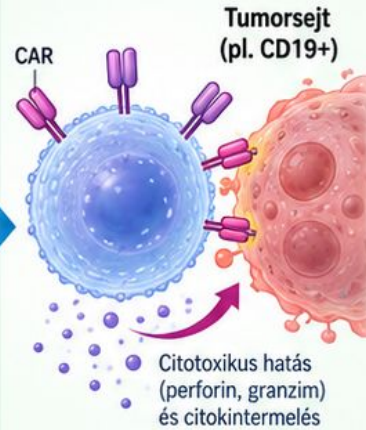
- Egyszerű, ambuláns intravénás infúzió
- Nincs leukaferézis, ex vivo sejtmodosítás és visszaadás
- Ismételhető adagolás lehetséges
- Elvileg kombinálható más terápiákkal (pl. checkpoint gátlók)

4 Felvétel a T-sejtekbe és fehérjeszintézis



- Az LNP-t a T-sejtek endocitózissal veszik fel
- Az mRNS a citoplazmában fehérjévé fordítódik
- A CAR fehérje a sejtfelszínre kerül
- A T-sejt ideiglenesen CAR-pozitív válik (integráció nélkül)

5 Tumorsejt felismerés és elimináció



- A CAR-T sejtek felismerik a tumorantigént (pl. CD19, BCMA, HER2 stb.)
- Célzott sejtpusztítás
- A hatás átmeneti (néhány nap – 1-2 hét), mivel az mRNS lebomlik, a CAR expresszió megszűnik
- Szükség esetén ismételt adagolással fenntartható a hatás

Az in vivo mRNS CAR-T előnyei

- ✓ Egyszerű, gyors alkalmazás (nincs ex vivo gyártás)
- ✓ Nem integrálódik a genomba → kisebb hosszú távú kockázat (pl. inserciós mutagenézis)
- ✓ Kontrollálható, átmeneti expresszió → nagyobb biztonság
- ✓ Ismételhető adagolás
- ✓ Potenciálisan szélesebb hozzáférés, alacsonyabb költség
- ✓ Kombinálható más immunterápiákkal

Fő kihívások

- ✗ Hatékonyság: elegendő T-sejt transzfekció in vivo
- ✗ T-sejt specifikus célzás (más sejttípusok elkerülése)
- ✗ Rövid, átmeneti expresszió (gyakori ismétlés szükséges)
- ✗ Immunválasz az LNP-re vagy az mRNS-re
- ✗ Heterogén expressziós szint
- ✗ Még klinikai fejlesztési fázisban, kevés humán adat

Klinikai fejlesztés állása

- Több preklinikai és korai fázisú klinikai vizsgálat folyik (pl. CD19, BCMA, mesothelin, HER2 célpontok).
- Különböző LNP formulációk és T-sejt célzó ligandok (pl. anti-CD5, anti-CD3) vizsgálata.
- Eddig biztonságosnak tűnik, mérsékelt hatékonysággal – további optimalizálás szükséges.

Az onkohematológiai ellátás átalakulása

Ugyanaz a cél: több és jobb életévet adni – kevesebb szenvedéssel

A jövő
már elkezdődött.

MÚLT ÉS JELEN Kemoterápia-központú kezelés

Hatékony, de nem specifikus:
a gyorsan osztódó ráksejteket
és az egészséges sejteket is károsítja.



Kemoterápia

- Nem specifikus hatás
- Ismételt ciklusok



Sok toxicitás

- Myeloszuppresszió
- Hányinger, mucositis
- Hajhullás, szervkárosodás
- Életminőség romlása



Hosszú kórházi tartózkodás

- Hetek–hónapok
- Izoláció, központi vénás
kanül



Kórházi fertőzések

- Neutropéniás láz
- Bakteriális, gombás, vírusos
fertőzések



Korlátozott lehetőségek relapszus esetén

- Rosszabb prognózis
- Kevés terápiás opció

TUDOMÁNYOS
FEJLŐDÉS
INNOVÁCIÓ
SZEMÉLYRE SZABOTT
MEDICINA

JÖVŐ

Sejterápiák, immunterápiák és célzott kezelések

Precíz, személyre szabott,
tartós válasz – kevesebb toxicitással
és kórházi tartózkodással.

Sejterápiák



- CAR-T sejtek
- CAR-NK sejtek
- TCR-T sejtek
- Egyéb genetikai
módosított sejtek

Immunterápiák



- Monoklonális antitestek
- Bispecifikus antitestek
(pl. BiTE)
- Checkpoint gátlók
- Vakcinák

Célzott kis molekulasúlyú inhibitorok



- Orálisan szedhető
- Specifikus genetikai/molekuláris
célpontok (pl. BTK, BCL2, FLT3,
IDH, JAK, BCR-ABL stb.)
- Hosszú távú kontroll



Nagyobb hatékonyság

- Mélyebb, tartós válaszok
- Akár gyógyulás lehetősége



Kevesebb toxicitás

- Jobb tolerálhatóság
- Megőrzött életminőség



Rövidebb kórházi tartózkodás

- Több kezelés ambulánsan
- Kórház melletti apartmanok
- Gyorsabb hazatérés



Kevesebb kórházi fertőzés

- Rövidebb expozíció
- Kevesebb invazív eszköz



Személyre szabott megközelítés

- Molekuláris profil alapján
- Kombinációs lehetőségek
- Újabb terápiák relapszus esetén



A beteg mindennapjai – régen és most



Hosszú kórházi
kezelések



Ismételt
kemoterápiás ciklusok



Fertőzésveszély,
izoláció



Sok mellékhatás,
romló életminőség



Távol a családtól,
iskolától, munkától

A beteg mindennapjai – a jövőben



Orálisan szedhető
targetált szerek



Rövid, célzott
infúziós kezelések



Otthonközeli ellátás,
apartmanban tartózkodás



Gyors visszatérés
a mindennapi élethez



Jobb életminőség,
több együtt töltött idő
a családdal



DÉL-PESTI CENTRUMKÓRHÁZ
ORSZÁGOS HEMATOLÓGIAI
ÉS INFECTOLÓGIAI INTÉZET

NO ONE LEFT BEHIND

