

Séance dédiée : « CAR-T cells : aspects médicaux, socio-économiques et éthiques »

COMMUNICATION

Cellules CAR-T allogéniques (UCART)

MOTS-CLÉS : PROTÉINES DE FUSION RECONSTITUANTES. ÉDITION DE GÈNES. NUCLÉASES EFFECTRICES DE TYPE ACTIVATEUR DE TRANSCRIPTION. IMMUNOTHÉRAPIE ADOPTIVE.

Allogeneic CAR T-Cells (UCART)

KEY-WORDS: CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR. GENETIC ENGINEERING. ADOPTIVE IMMUNOTHERAPY.

Roman GALETTO *

M. Roman GALETTO déclare être salarié de CELLECTIS SA.

RÉSUMÉ

Les cellules CAR-T sont des lymphocytes T exprimant des Récepteurs Antigéniques Chimériques (ou CARs), des récepteurs artificiels conçus pour reconnaître un antigène présent à la surface des cellules tumorales. Les cellules CAR-T exploitent ainsi la puissance du système immunitaire pour cibler et éradiquer les cellules cancéreuses. Des taux de rémission sans précédent ont été observés avec des cellules CAR-T ciblant l'antigène CD19 chez des patients atteints des leucémies à cellules B. Depuis, cette approche est considérée comme une avancée majeure dans l'immunothérapie des leucémies et de nombreux types de CAR-T ciblant d'autres antigènes tumoraux sont en cours de développement, de façon à étendre ces traitements à d'autres types de cancer, y compris les tumeurs solides. Les cellules CAR-T sont produites en général à partir de cellules isolées du patient à qui la thérapie est destinée (transfert autologue). Une alternative aux traitements autologues consiste à utiliser des cellules provenant de donneurs sains, et c'est grâce aux technologies de ciblage

* Collectis SA, 8 Rue de la Croix Jarry, 75013 Paris. e-mail : roman.galetto@collectis.com

Tirés-à-part : Roman GALETTO, même adresse

Article reçu le 26 juillet 2018 et accepté le 1^{er} octobre 2018

génique que l'on peut créer ces cellules CAR-T allogéniques. Les UCARTs (Universal CAR-Ts) sont des produits candidats fondés sur des cellules T ingénierées via la technologie TALEN[®], qui permet aux cellules T allogéniques d'être injectées à plusieurs patients afin qu'elles attaquent leur cellules cancéreuses sans attaquer l'hôte lui-même.

SUMMARY

Chimeric Antigen Receptors (CARs) are artificial protein receptors designed to recognize an antigen present on the surface of tumor cells. CAR-expressing T-cells (CAR-Ts) harness the power of the immune system in order to specifically target and eradicate cancer cells. Unprecedented remission rates have been observed in patients with B-cell leukemia treated with CAR T-cells targeting the CD19 antigen. Since then, this approach has been considered a major advance in leukemia immunotherapy, and many CAR-Ts targeting other tumor antigens are being developed, so as to extend these treatments to other types of cancer, including solid tumors. CAR T-cells are generally produced from T-cells isolated from the same patients for whom the therapy is intended. An alternative to this autologous approach is to use cells from healthy donors, and it is through gene editing technologies that these allogeneic CAR T-cells can be generated. UCARTs (Universal CAR T-cells) are T-cell-based product candidates that are engineered using TALEN[®] technology, allowing allogeneic T-cells to be injected into multiple patients to attack their cancer cells.

INTRODUCTION

Les cellules T armées de *Récepteurs Antigéniques Chimériques* (cellules CAR-T) utilisées dans les traitements d'immunothérapie adoptive font partie des approches les plus innovantes pour le traitement des tumeurs liquides. Les CARs sont des récepteurs recombinants exprimés à la surface des lymphocytes T ingénierés, procurant à ces dernières des propriétés anti-tumorales liées à la reconnaissance de l'antigène tumoral ciblé, leur conséquente activation, et le déclenchement d'une réponse cytotoxique suite à cette reconnaissance. Les cellules CAR-T sont donc des " médicaments vivants ", puisque ces lymphocytes T ingénierés vont aussi se multiplier dans l'organisme au contact avec l'antigène tumoral, augmentant ainsi leur capacité à détruire les cellules cancéreuses exprimant la protéine ciblée et permettant une surveillance active en cas de récurrence du cancer.

La plupart des études cliniques ont été effectuées avec des cellules CAR-T autologues ciblant l'antigène CD19, antigène exprimé par plusieurs types de leucémies à cellules B, et ont montré des taux de rémission complète sans précédent et très encourageants. La communauté médicale est unanime sur le fait qu'il s'agit d'un changement du paradigme dans la façon de traiter le cancer, et nous sommes témoins du commencement d'une importante révolution dans le domaine de la thérapie génique et cellulaire.

Des nombreuses nouvelles cibles exprimées par les cellules tumorales sont en cours de validation afin de cibler un plus grand nombre de cancers qui pourraient être

traités avec des cellules CAR-T, pas seulement parmi les cancers hématologiques, mais aussi pour éradiquer des tumeurs solides.

Au cours du deuxième semestre de 2017, l'agence américaine du médicament (FDA) a approuvé la commercialisation sur le marché américain de deux médicaments fondés sur des cellules CAR-T autologues ciblant l'antigène CD19, en se basant sur les taux de rémission de plus de 80 % obtenus durant les essais cliniques. Ces traitements sont principalement destinés à des patients en récurrence ou réfractaires, ne pouvant pas subir de transplantation de cellules souches autologues, ou en échec des traitements conventionnels.

Les prix d'accès à ces traitements restent néanmoins très élevés puisqu'il s'agit d'une thérapie personnalisée dans laquelle les cellules du patient sont modifiées *ex vivo*. Par conséquent, le traitement avec ce type de produits des millions de patients atteints de cancer s'avère très difficile d'un point de vue économique.

Une approche alternative consiste à utiliser des cellules T allogéniques qui proviennent de donneurs sains et non du patient lui-même. Cette approche présente de nombreux avantages : la production d'une grande quantité de cellules CAR-T devient possible ; les doses de traitement seront immédiatement accessibles aux patients ; les coûts de production seront moins onéreux.

L'inconvénient réside dans le risque potentiel que l'hôte rejette les cellules allogéniques, ainsi que celui de développer une réaction du greffon contre l'hôte (GvHD, pour Graft versus Host Disease) qui peut s'avérer létale pour le patient.

Les outils d'ingénierie des génomes permettent de contourner le problème de GvHD, par le biais de la disruption de gènes exprimés dans les cellules T responsables de cette réaction, permettant ainsi la production des cellules CAR-T universelles (UCART) dites aussi " sur étagère ", qui ont le potentiel d'être immédiatement disponibles pour un grand nombre de patients et de redéfinir ainsi la façon dont nous pourrions traiter le cancer.

Architecture moléculaire et biologie des CARs

Les CARs traduisent la reconnaissance d'antigène en une cascade de signalisation qui évoque ou mime les fonctions effectrices des cellules T, telles que la sécrétion de facteurs cytotoxiques, ainsi que des cytokines pro-inflammatoires.

Les composants essentiels de ces récepteurs synthétiques sont un fragment extracellulaire ciblant l'antigène, suivi d'une charnière et d'un domaine transmembranaire. Ce dernier ancre le récepteur sur la surface cellulaire, tandis que la charnière projette le domaine de liaison à l'antigène vers l'espace extracellulaire. Après le domaine transmembranaire suivent les domaines de signalisation intracellulaires, qui sont déclenchés par l'engagement de l'antigène par le domaine extracellulaire pour activer les cellules CAR-T. Tous ces domaines sont dérivés de différentes protéines humaines, sélectionnées par leur fonctionnalité spécifique et assemblés pour générer le récepteur chimérique (Figure 1).

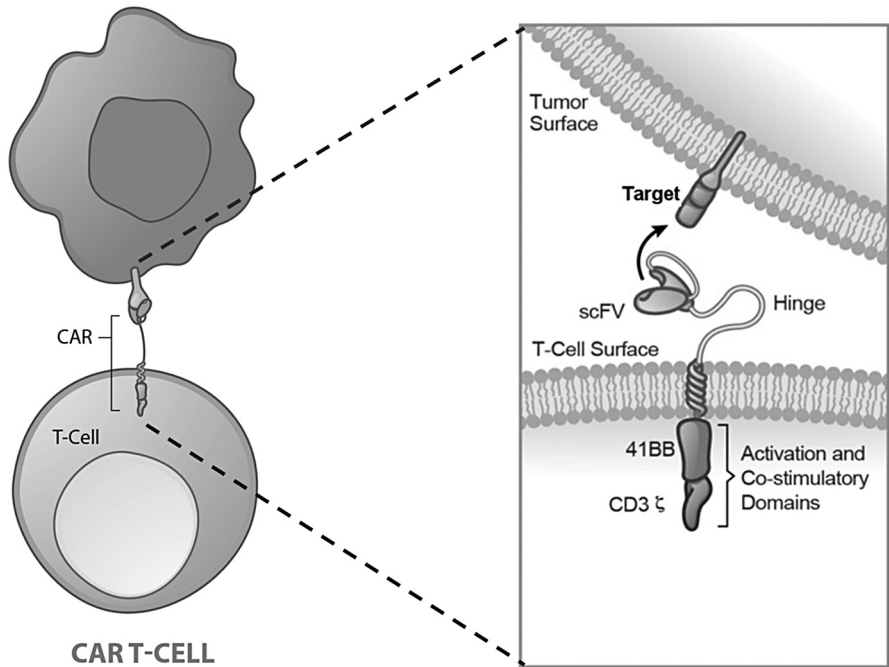


FIG. 1. — Représentation schématique d’une cellule CAR-T interagissant avec la cible exprimée dans la cellule tumorale (à gauche) et agrandissement de la synapse entre le CAR et sa cible, montrant les différents domaines des constructions CAR (à droite).

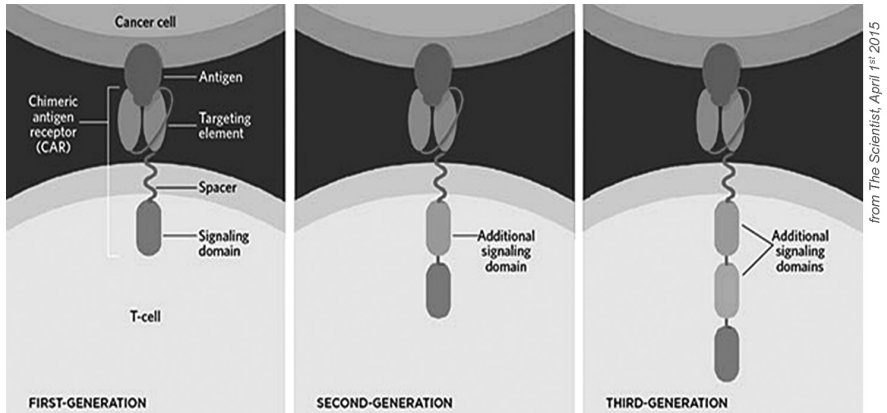


FIG. 2. — Évolution de la structure des récepteurs d’antigènes chimériques. Tous les CARs contiennent un domaine de signalisation dérivé du CD3zeta, qui fournit aux cellules un signal d’activation. Seul ce domaine de signalisation est présent dans les CARs de première génération. En revanche, un domaine de signalisation supplémentaire (ou domaine de co-stimulation) permettant aux cellules de proliférer et de persister plus longtemps *in vivo* est présent dans les CARs de deuxième génération. Dans le cas des CARs de troisième génération, deux de ces domaines co-stimulateurs sont ajoutés.

Les CAR permettent une reconnaissance de cellules tumorales, non restreinte par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH, ou HLA en anglais). Ainsi, une multitude d'antigènes exprimés dans les différents tissus peut être ciblée avec la technologie des cellules CAR-T.

Le domaine de reconnaissance de l'antigène ciblé

La spécificité antigénique du CAR est le plus souvent conférée par le module scFv (single chain variable fragment) dérivé d'un anticorps monoclonal, contenant les régions variables de la chaîne légère et lourde d'un anticorps, fusionnées par un lien flexible. Le choix du domaine de reconnaissance d'antigène est essentiel pour le développement des cellules CAR-T, puisque leur capacité à transduire un fort signal d'activation est influencée par de nombreux facteurs, y compris l'affinité de liaison à l'antigène, le niveau d'expression de la cible dans les cellules tumorales, la densité des antigènes sur la cellule cible, et l'accessibilité de l'épitope ciblé.

Les observations obtenues au cours d'études précliniques montrent que les CARs dérivés des scFv de haute affinité entraînent une augmentation de l'activité cytotoxique et de l'index thérapeutique. En contrepartie, l'ingénierie du scFv pour réduire l'affinité permet d'améliorer la discrimination parmi les cellules ayant une densité d'antigène variable, ce qui pourrait être utile pour améliorer la fenêtre thérapeutique pour les antigènes exprimés à des niveaux différents par les cellules tumorales et les tissus normaux.

D'autres facteurs tels que la proximité de l'épitope ciblé à la surface des cellules CAR-T peut également avoir de forts effets sur l'activité lytique et la production de cytokines, qui dans certains cas peut remplacer les effets d'affinité.

Les domaines charnières et transmembranaires

Le domaine charnière est un fragment peptidique court et flexible qui fournit une liberté conformationnelle au récepteur, afin de faciliter la liaison à l'antigène cible sur la cellule tumorale.

Il projette le scFv de la surface des cellules T vers l'espace extracellulaire, et la longueur optimale de ce domaine dépend de la proximité de l'épitope de liaison à la surface cellulaire. Les CARs ciblant des épitopes proximales nécessitent en générale des charnières plus longues, tandis que ceux ciblant les épitopes distaux nécessitent les plus courtes.

Le domaine transmembranaire dérive en général des protéines exprimées à la surface des cellules T, et sa fonction est seulement d'ancrer le CAR à la membrane cellulaire.

Les domaines intracellulaires d'activation et co-stimulation

La plupart des CARs développés jusqu'à présent contiennent un domaine d'activation dérivé du CD3 ξ , qui permet de transduire les signaux d'activation initiale, responsable de la prolifération et activité cytotoxique des cellules CAR-T. Les CARs dits de première génération ont montré une efficacité limitée en clinique, en raison du faible potentiel de prolifération des cellules CAR-T *in vivo* et malgré des observations de réponses antitumorales significatives. Les CARs de deuxième génération ajoutent aux CARs de première génération un domaine de co-stimulation permettant aux cellules de continuer à proliférer et persister plus longtemps *in vivo*. Les CARs contenant deux domaines de co-stimulation, dites de troisième génération, peuvent avoir une activité antitumorale supérieure.

Effectivement, l'incorporation d'un ou de plusieurs domaines co-stimulateurs pour fournir des signaux d'activation supplémentaires a entraîné des réponses cliniques et une persistance améliorées. Le choix du domaine co-stimulateur influence le phénotype des lymphocytes T. Par exemple, la co-stimulation par un domaine CD28 est associée avec un phénotype effecteur puissant, mais de courte durée, avec des niveaux élevés d'activité cytolytique, et de sécrétion de cytokines. En revanche, les cellules CAR-T porteuses d'un domaine costimulateur 4-1BB ont tendance à se développer et à persister plus longtemps *in vivo*, semblent moins sujettes à l'épuisement, et ont une tendance à générer des cellules T de mémoire centrale.

Bien que la plupart des études à ce jour soient faites avec des CARs contenant des domaines de co-stimulation dérivés de CD28 ou 4-1BB, plusieurs autres domaines sont en cours d'évaluation.

Les Cellules CAR-T autologues

Les traitements à base de cellules CAR-T qui ont été approuvés par la FDA, ainsi que la plupart de ceux qui sont actuellement évalués dans des essais cliniques, sont dérivés de cellules T autologues. Afin de générer ces cellules CAR-T, les lymphocytes du patient sont prélevés et soumis à différentes étapes d'ingénierie effectuées *ex vivo*. La première étape après le prélèvement des cellules consiste en général à enrichir une population de cellules T polyclonales et à l'activer, afin de permettre aux cellules T de proliférer *in vitro*. L'activation est en général réalisée avec des billes revêtues d'anticorps monoclonaux activateurs, les plus couramment utilisés étant les anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Après l'expansion initiale, la séquence codante pour la construction CAR doit être insérée. Cela peut être fait en utilisant des vecteurs viraux, la plupart du temps des vecteurs recombinants dérivés de rétro- et lenti-virus. Les cellules sont ensuite amplifiées dans des systèmes fermés de culture cellulaire, afin d'obtenir le nombre suffisant de cellules pour le traitement. Les cellules peuvent ensuite être purifiées et cryopréservées, afin d'effectuer le contrôle de qualité approprié avant la réinjection aux patients.

Comme décrit ci-dessus, la production de cellules CAR-T autologues nécessite la mise en place d'une procédure complexe (Figure 3) ainsi qu'un personnel formé

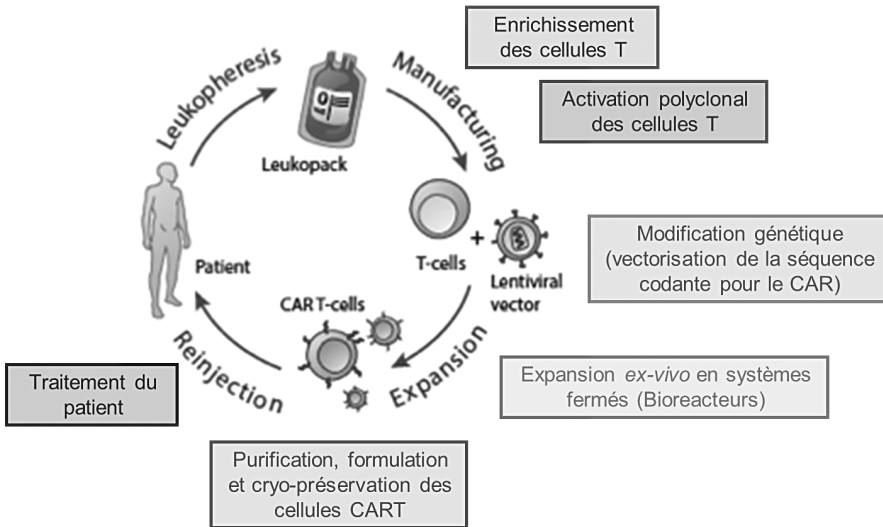


FIG. 3. — Différentes étapes dans la production de cellules CAR-T autologues. Les lymphocytes T du patient sont prélevés, activés et amplifiés *ex vivo*. Les cellules sont ensuite transduites avec un vecteur viral afin d'introduire la séquence codante pour le CAR. Après une amplification supplémentaire des cellules CAR-T, elles sont purifiées et congelées avant d'être réinfusées chez le patient.

capable de générer ces thérapies personnalisées, ce qui engendre des coûts élevés de production et, en conséquence, de commercialisation. En outre, la fabrication de cellules CAR-T pourrait être problématique pour certains patients ayant un faible nombre de cellules T, comme cela est le cas de ceux qui ont été lourdement prétraités par chimiothérapie.

Les UCARTs : Cellules CAR-T universelles

L'utilisation de cellules allogéniques pour générer des cellules CAR-T se présente comme une approche moins coûteuse que la production autologue pour chaque patient, car elle permettrait de générer plusieurs doses de CAR-T à partir d'un seul cycle de production, rendant ainsi le traitement accessible à un plus grand nombre de patients. L'inconvénient de cette approche est néanmoins que les cellules T allogéniques pourraient reconnaître les tissus du patient comme du non-soi, en interagissant avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) par leur récepteur des cellules T (TCR), générant une GvHD aiguë qui pourrait être létale pour le patient.

Différentes approches ont été envisagées pour développer des cellules CAR-T allogéniques. La plupart d'entre eux utilisent des nucléases sur mesure (TALEN[®], CRISPR/Cas9, Méganucléases ou Zinc Finger Nucleases) ciblant différents composants du TCR $\alpha\beta$, ou du complexe CMH de classe I. D'autres stratégies prévoient

l'utilisation de molécules inhibitrices du TCR coexprimées avec le CAR, masquant ainsi le récepteur et abrogeant son potentiel de signalisation.

Nous avons été en mesure de générer ces cellules CAR-T universelles (UCART) en utilisant la technologie brevetée d'édition de gènes par TALEN® (TALEN signifie Transcription Activator-Like Effector Nuclease). La procédure pour générer ces cellules est largement similaire à celle utilisée pour les cellules T autologues, sauf qu'une étape d'ingénierie supplémentaire est ajoutée dans notre processus de fabrication (Figure 4), afin de limiter la possibilité de GvHD. Cette étape a lieu après l'activation des cellules T du donneur et consiste en l'électroporation d'ARN messager codant pour des nucléases spécifiquement conçues pour cibler la région constante du gène codant pour la chaîne alpha du récepteur des lymphocytes T (TRAC). Ce faisant, les TCR $\alpha\beta$ natifs des cellules donneuses sont inactivés et ne sont plus exprimés à la surface des cellules, ce qui diminue considérablement le risque de développer une GvHD, car les cellules n'ont plus la possibilité de reconnaître les cellules du patient comme du non-soi.

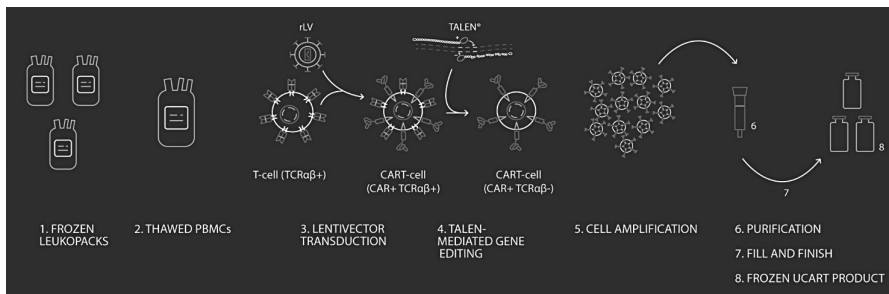


Figure 4. Représentation du processus de fabrication des cellules UCART, compatible GMP, développé et implémenté par Cellectis. Les cellules congelées, récupérées à partir de donneurs sains, sont décongelées et activées avant d'être transduites avec un vecteur lentiviral recombinant contenant la séquence codante du CAR. Les cellules sont ensuite électroporées avec de l'ARNm codant pour le TALEN® afin d'inactiver le gène et d'éliminer le complexe TCR $\alpha\beta$ de la surface des cellules T. Les cellules sont ensuite amplifiées et les cellules TCR $\alpha\beta$ (+) restantes sont déplétées à la fin de l'étape d'amplification et avant la congélation.

L'élimination du récepteur TCR $\alpha\beta$ de la surface des cellules donneuses n'affecte pas leur capacité à proliférer ex vivo, et n'a pas d'impact sur la capacité cytotoxique de ces cellules car le récepteur chimérique fait office de TCR. Elles peuvent donc être amplifiées dans les bioréacteurs une fois les phases d'ingénierie terminées, et les lymphocytes TCR $\alpha\beta$ (-) sont purifiés à la fin de la phase d'expansion afin d'éliminer les cellules TCR $\alpha\beta$ (+) restantes, qui pourraient déclencher la GvHD post-perfusion chez le patient. Après cette étape de purification, les cellules sont congelées dans des formes posologiques définies, et soumises à des tests approfondis de contrôle de qualité avant d'être validées pour une administration thérapeutique.

CONCLUSION

L'ingénierie des cellules CAR-T, qui redirige les fonctions immunitaires contre des cellules malignes, est le début d'une nouvelle ère dans le traitement des cancers, marquée par d'encourageants succès dans le cas des cellules CAR-T anti CD19 contre des leucémies à des cellules B. Même si la plupart des essais cliniques actuelles se concentrent sur les CAR-T autologues ciblant principalement des antigènes exprimés dans les hémopathies malignes, des efforts sont également déployés pour cibler les antigènes exprimés dans les tumeurs solides. Le développement de thérapies allogéniques à base de cellules CAR-T demeure encore une fraction mineure dans le paysage des cellules CAR T par rapport à l'approche autologue. Cependant, l'édition de génomes va contribuer à changer et redéfinir la façon dont les patients seront traités. Les traitements en cours de développement basés sur des cellules CAR-T allogéniques sont destinés à être produits à des milliers d'exemplaires et administrés à un grand nombre de patients. Ces cellules UCART, sont dites " sur étagère ", ce qui présente d'importants avantages :

- Disponibilité immédiate pour les patients
- Les patients n'ont pas à fournir leurs cellules T
- Peuvent être expédiées dans le monde entier et à l'avance
- Coûts des produits et coûts logistiques compétitifs
- Peuvent être administrées de manière répétée si nécessaire

Aujourd'hui, de tels produits sont certes difficiles à concevoir et à fabriquer, mais ils auront l'avantage d'être facilement disponibles et simples d'utilisation pour le personnel hospitalier. Dans un avenir proche, ces traitements pourraient devenir des traitements de référence.

RÉFÉRENCES

- [1] Poirot L, Philip B, Schiffer-Mannioui C, Le Clerre D, Chion-Sotinel I, Derniame S, et al. Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for " Off-the-Shelf " Adoptive T-cell Immunotherapies. *Cancer Res.* 2015;75:3853-64.
- [2] Almásbak H, Aarvak T, Vemuri MC. CAR T Cell Therapy: A Game Changer in Cancer Treatment. *J Immunol Res.* 2016;2016:5474602.
- [3] Fesnak AD, June CH, Levine BL. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2016;16:566-81.
- [4] Jackson HJ, Rafiq S, Brentjens RJ. Driving CAR T-cells forward. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016; 13:370-83.
- [5] Levine BL, Miskin J, Wonnacott K, Keir C. Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016;4:92-101.

- [6] Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, Adams S, Amroliya P, Stafford S, et *al.* Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci Transl Med.* 2017;9(374).
- [7] Labanieh L, Majzner RG, Mackall CL. Programming CAR-T cells to kill cancer. *Nature Biomedical Engineering.* 2018. Volume 2, pages377—391.