

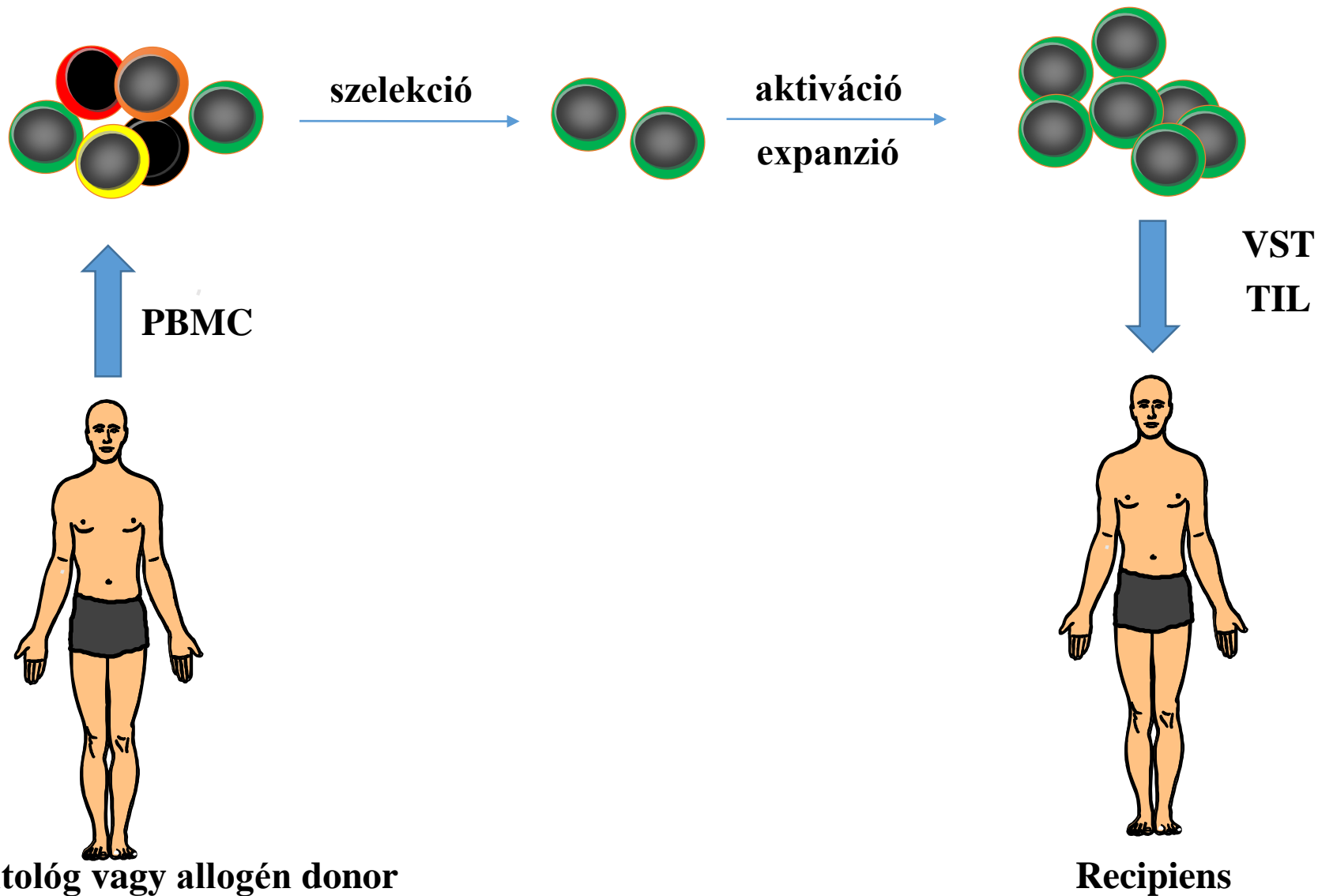
# **Szelektált és génmódosított immunsejtek Új fegyverek az infektológiában és az onkológiában**

**Szöőr Árpád**

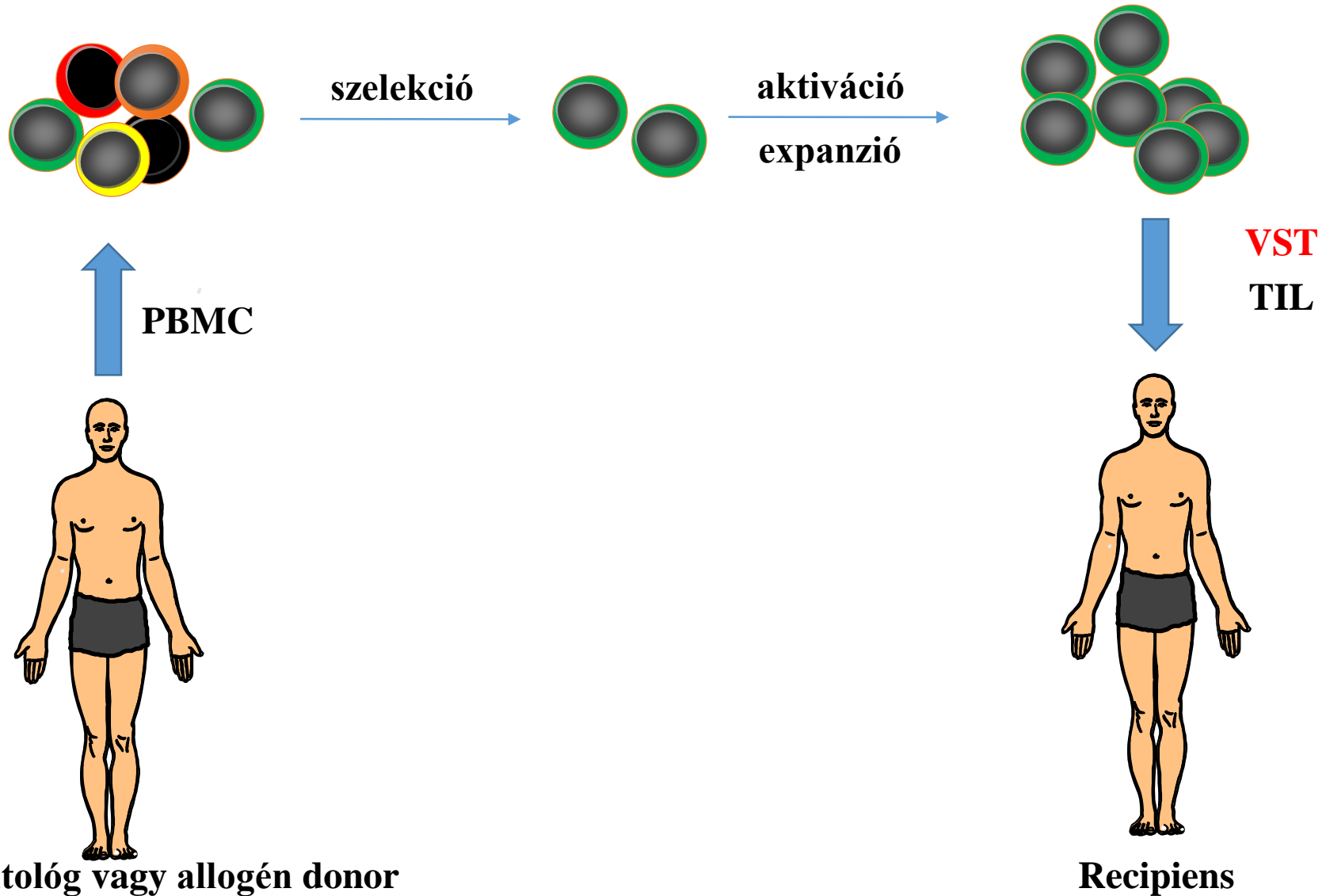
**Debreceni Egyetem ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet**



# Szelektált T-sejt terápia



# Szelektált T-sejt terápia – VST



# Probléma

---

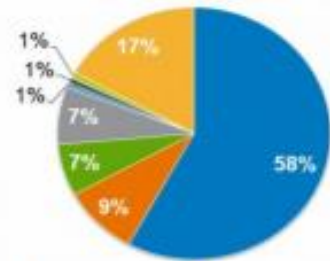
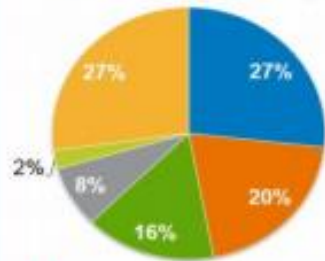
- **Fertőzések komplikációk HSCT-t követően:**
  - Világszerte általános probléma
  - HSCT-hez kapcsolódó immunszuppresszív kezelés következménye
  - **Karakterisztika:**
    - **Opportunista fertőzések**
    - **Atipikus tünetek**
    - **Késői diagnózis**
    - **Emelkedő mortalitás**

# HSCT kockázatai - fertőzések

## Causes of Death after HLA-Matched Sibling HCT done in 2014-2015

Died within 100 days post-transplant

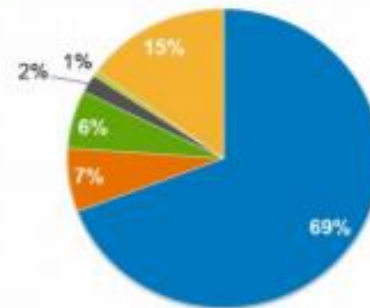
Died at or beyond 100 days post-transplant\*



\*Data reflects 3-year mortality

17

## Causes of Death after Autologous HCT done in 2014-2015



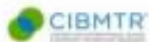
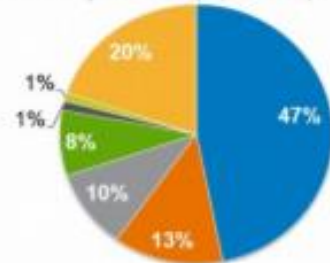
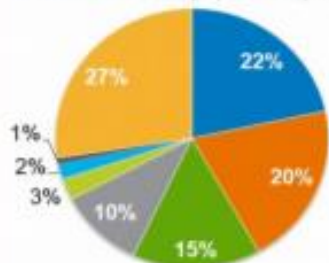
Data reflects 3-year mortality

18

## Causes of Death after Unrelated Donor HCT done in 2014-2015

Died within 100 days post-transplant

Died at or beyond 100 days post-transplant\*



\* Data reflects 3-year mortality

19

## Early mortality from infections

**autoHST 7%**  
**alloHST sibling 20%**  
**alloHST UD 20%**

# Jellemző vírusok

Latent infections		Sporadic infections	
virus	% seropositive patients	virus	% infections
HSV 1/2	50-90%	RSV	5-15%
VZV	>90%	Parainfluenza	5-10%
<b>CMV</b>	<b>45-90%</b>	Influenza	<5%
HHV-6	>90%	Adenovirus	<5%
<b>EBV</b>	<b>&gt;90%</b>	Rhinovirus	<5%
BKV	>90%	Metapneumovirus	5-20%

- **Vírusfertőzés – problémák:**
  - **Nincs hatékony terápia**
  - **A rendelkezésre álló terápia tovább ronthatja a beteg állapotát**
  - **Rezisztencia alakul ki**

# Megoldás

## Vírus Specifikus T-sejtek adoptív átültetése

VST transzfer stratégiák:

- nem manipulált limfocita infúziók HLA-match szeropozitív donoroktól:
  - Nagy rizikó – GVHD

# Megoldás

## Vírus Specifikus T-sejtek adoptív átültetése

VST transzfer stratégiák:

- nem manipulált limfocita infúziók HLA-match szeropozitív donoroktól:
  - Nagy rizikó – GVHD
- Szelektált készítmények
  - target nagy hatásfokú felismerése
  - Relatív biztonságos
  - Profilaktikusan is alkalmazható
  - Elsősorban autológ és HLA-match sejtek
  - Nem Off-The-Shelf



# Megoldás

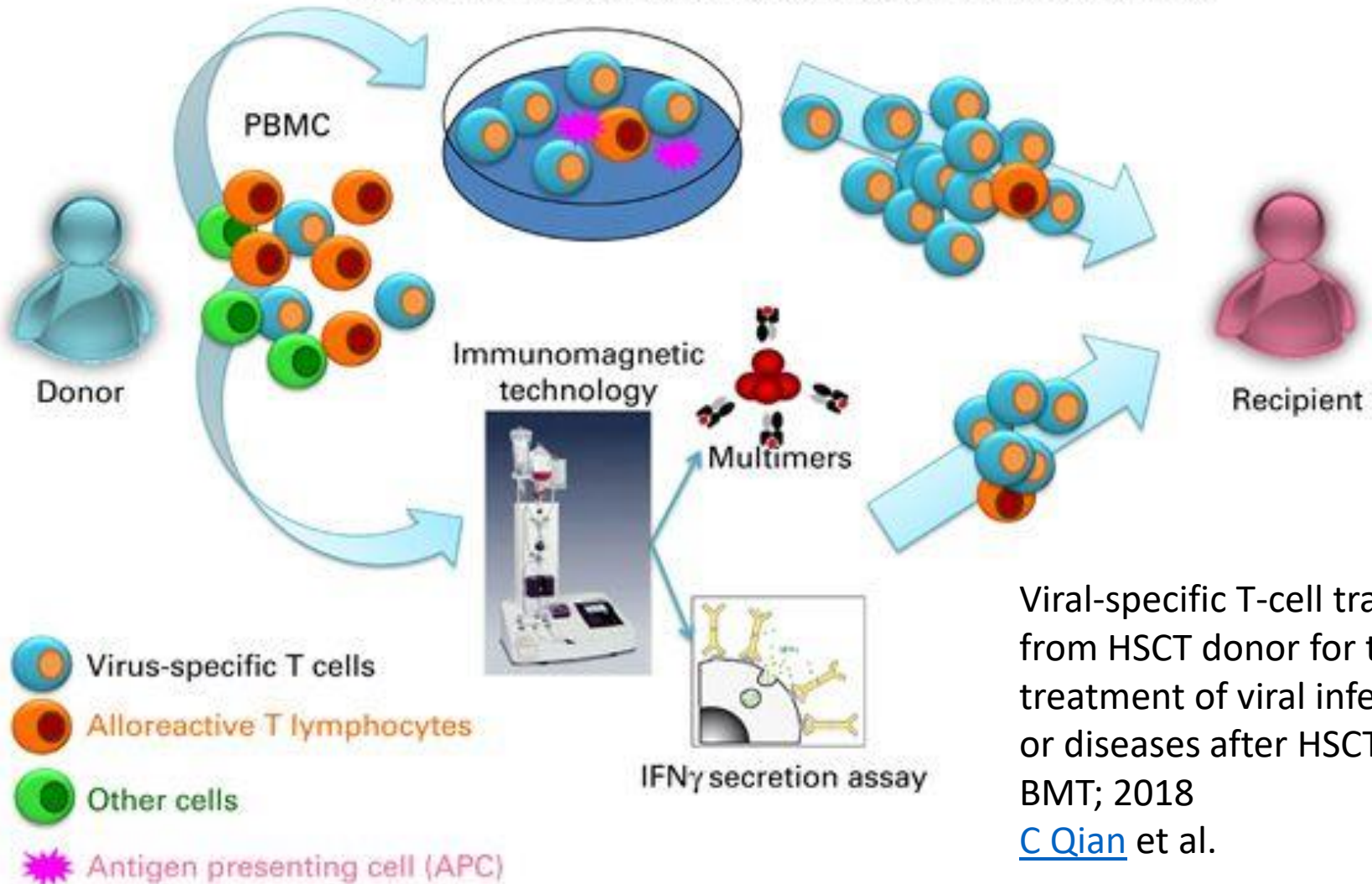
## Vírus Specifikus T-sejtek adoptív átültetése

VST transzfer stratégiák:

- nem manipulált limfocita infúziók HLA-match szeropozitív donoroktól:
  - Nagy rizikó – GVHD
- Szelektált készítmények
  - target nagy hatásfokú felismerése
  - Relatív biztonságos
  - Profilaktikusan is alkalmazható
  - Elsősorban autológ és HLA-match sejtek – új eredmények!!!
  - Nem Off-The-Shelf ??????????

# Szelekció háttere

Culture with antigen presenting cell (APC) 10 days to 8 weeks



Viral-specific T-cell transfer from HSCT donor for the treatment of viral infections or diseases after HSCT BMT; 2018  
[C Qian](#) et al.

# Szelektálás típusai

---

<b>Antigen/APC</b>	<b>Előny</b>	<b>Hátrány</b>
<b>Teljes vírus/vírus lizátum</b>	Hatásos antigén	Élő vírus, hosszas előállítás
<b>Vírus proteinek</b>	Kész termék	Kevésbé hatásos antigén
<b>Vírus vektorok</b>	Reprodukálható	Hosszú előállítás
<b>Peptid mixek</b>	Reprodukálható, kész termékek	Megelőzően immundomináns fenotípus tesztelése
<b>Dendritikus sejtek</b>	Potens stimulátor	Limitált sejtszám, nehézkes
<b>Monociták</b>	Könnyen izolálható	Kis hatékonyság
<b>Arteficiális APC</b>	Könnyen expandálható, előállítható	Donorvariabilis hatásosság

# Klinikai hatásosság - CMV

	Method of T cell selection	Antigen presentation	GVHD occurrences	CMV status	Reference/institution
18	IFN- $\gamma$ capture	Peptide mixes of pp65	3 patients with grade I aGVHD; 3 patients with grade II/III aGVHD; 3 patients with cGVHD	11 developed CMV reactivation, all responded to antivirals or repeat infusion of T cells	(46)/UCL <sup>a</sup>
7	<i>Ex vivo</i> expansion	CMV lysate and peptide mixes of pp65	No GVHD	Only 1 patient had persistent CMV viremia,	(54)/MKP <sup>b</sup>
14	<i>Ex vivo</i> expansion	Dendritic cells with CMV-infected fibroblasts	3 patients developed grade I/II aGVHD, all responding to steroids	No CMV disease, CMV immunity restored	(55)/FHCRC <sup>c</sup>
16	<i>Ex vivo</i> expansion	Dendritic cells with CMV-infected fibroblasts	3 patients with grade I aGVHD only	8 patients also required ganciclovir but subsequently cleared viremia	(10)/UCL
25	<i>Ex vivo</i> expansion	CMV antigen; only CD4 clonal population infused	1 case of GVHD	7 patients with CMV reactivation; 5 patients with clinical disease; 2 patient deaths from CMV	(56)/U of Perugia <sup>d</sup>
18	IFN- $\gamma$ capture	pp65 protein	1 case of GVHD	4 patients died of CMV-related disease; 15 patients with <i>in vivo</i> expansion	(57)/UCH <sup>e</sup>
9	<i>Ex vivo</i> expansion	Dendritic cells with peptide mix (pp65)	3 patients with grade III aGVHD, with one associated death; 2 patients with cGVHD	2 patients with reactivation not requiring treatment	(59)/U of Sydney <sup>g</sup>
16	<i>Ex vivo</i> expansion	Dendritic cells with peptide mix (pp65)	No GVHD	14 patients cleared CMV	(60)/MSKCC <sup>h</sup>

# Klinikai hatásosság - EBV

---

39	<i>Ex vivo</i> expansion	PBMCs with LCLs	No aGVHD or new cases of GVHD	EBV-specific immunity restored, clearance of viremia, no PTLD	(49)/SJCRH <sup>j</sup>
10	IFN- $\gamma$ capture	EBNA1 overlapping peptide mixtures	1 patient with Grade I/II aGVHD	Expansion of EBV-specific T cells in 8 patients and clinical/virologic response in 7 patients	(47)/UCH
114	<i>Ex vivo</i> expansion	PBMCs with LCLs	No <i>de novo</i> GVHD; 8 patients with reactivation of Grade I/II GVHD; 11 patients with limited cGVHD; 2 patients with extensive cGVHD	No PTLD development; remission of preexisting PTLD in 11 of 13 patients	(48)/BCM <sup>l</sup>
19	<i>Ex vivo</i> expansion	T cells with LCLs	No GVHD	Resolution of PTLD in 13 patients;	(64)/MSKCC
36	<i>Ex vivo</i> expansion	T cells with LCLs	No aGVHD, 4 patients with limited cGVHD	No PTLD development	(65)/SJCRH
42	<i>Ex vivo</i> expansion	T cells with LCLs	No GVHD	No PTLD development, reconstitution of EBV-specific immunity	(66)/SJCRH

# Klinikai hatásosság – több vírus ellen

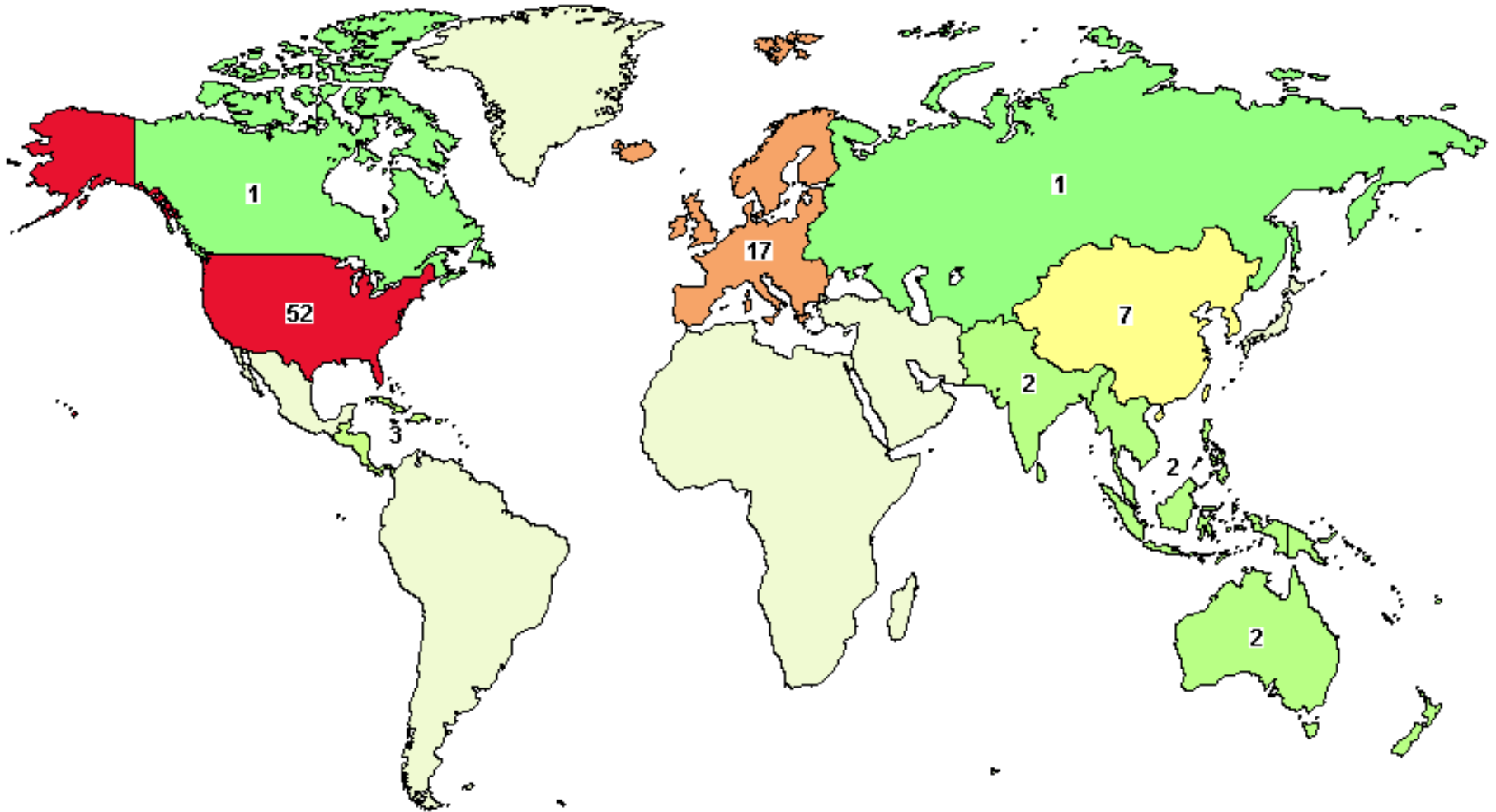
EBV-CMV-Adeno	10	<i>Ex vivo</i> expansion	Dendritic cells nucleofected with viral plasmids: EBV (LMP1, LMP2, bzlF), CMV (IE1, pp65), adenovirus (hexon, penton)	1 grade I/II GVHD	8 patients with CR; 1 patient with stable EBV disease without PTLD	(81)/BCM
EBV-Adeno	12	<i>Ex vivo</i> expansion	PBMCs with Ad5f35 vector and LCLs	No GVHD	Expansion of virus-specific immunity, resolution or prevention of clinical disease	(11)/BCM
EBV-CMV-Adeno	11	<i>Ex vivo</i> expansion	PBMCs with LCLs transformed with Ad5f35-CMVpp65 vector	No GVHD	Expansion of EBV- and CMV-specific immunity in all patients, adenovirus-specific immunity in patients with clinical disease; clearance of all clinical disease	(80)/BCM
EBV-CMV-Adeno- BKV-HHV6	11	<i>Ex vivo</i> expansion	PBMCs with pepmixes (LMP2, BZLF, EBNA1, penton, hexon, pp65, IE-1, VP1, large T, U11, U14, U90)	1 grade II aGVHD	No viral reactivation in 3 patients infused prophylactically; EBV—5 patients with CR, including PTLD; CMV—2 patients with CR, 1 PR; adenovirus—1CR; BKV—5 patients with CR, 1	(75)/BCM

# Klinikai hatásosság – 3rd party donor

EBV	8	<i>Ex vivo</i> expansion	PBMCs with LCLs	No GVHD	3 patients with CR; 1 patient with PR, subsequently refused treatment; 2 patients with no response; 2 patients passed away before evaluation (unrelated to VSTs)	(85)/U of Edinburgh <sup>p</sup>
EBV	33	<i>Ex vivo</i> expansion	PBMCs with LCLs	No GVHD	21 patients with CR or PR; 6 month OS 79%	(86)/U of Edinburgh
EBV-CMV-Adeno	50	<i>Ex vivo</i> expansion	PBMCs with LCLs transformed with Ad5f35-CMVpp65 vector	6 with grade I GVHD; 1 with grade II GVHD, 1 with grade III GVHD	17 of 23 with PR/CR for CMV; 14 of 18 PR/CR for adenovirus; 6 of 9 PR/CR for EBV	(22)/BCM
EBV	2	<i>Ex vivo</i> expansion	PBMCs with LCLs	No GVHD	Both with CR	(87)/MSKCC

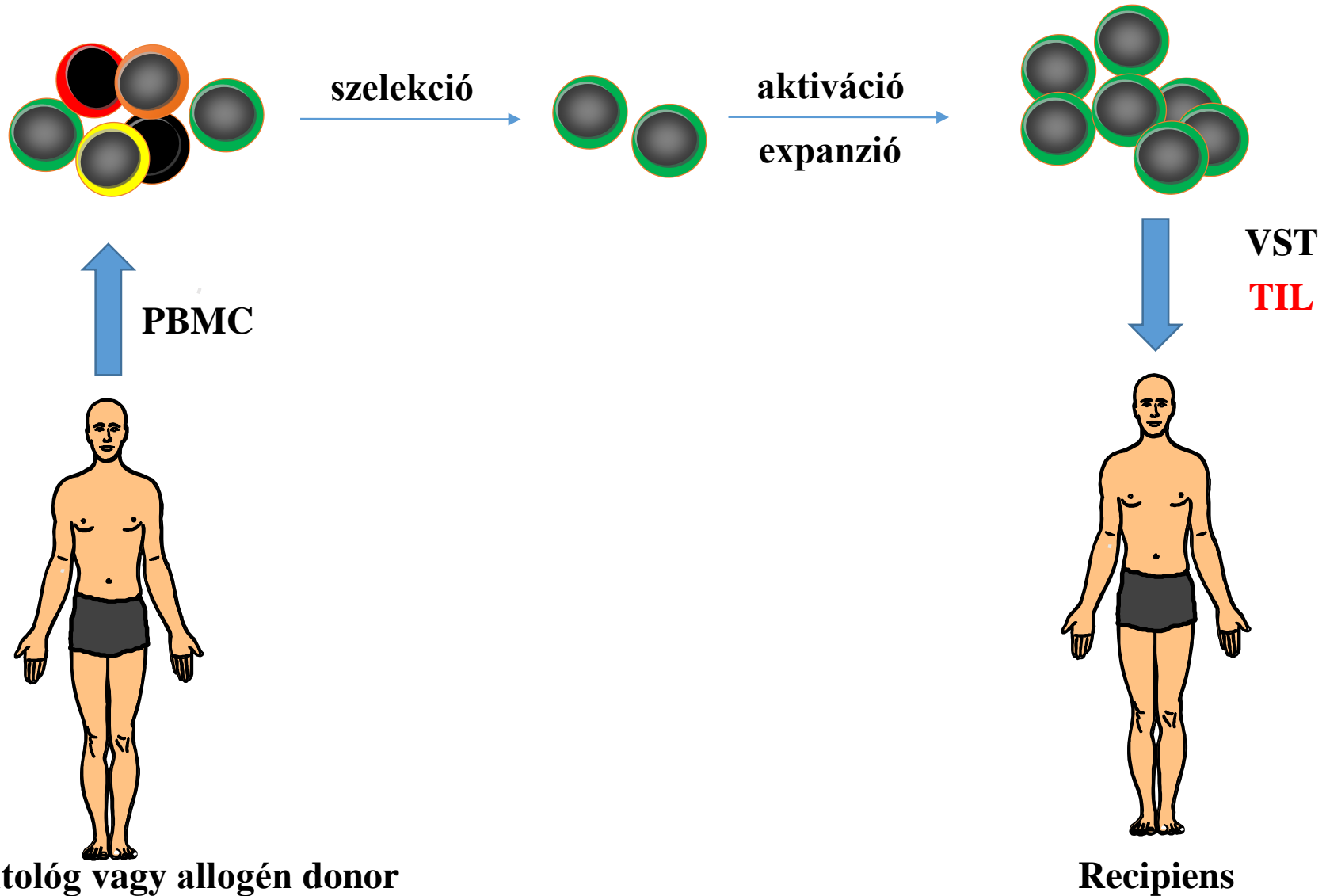
# VST SEJT TERÁPIA HELYE A VILÁGBAN

---

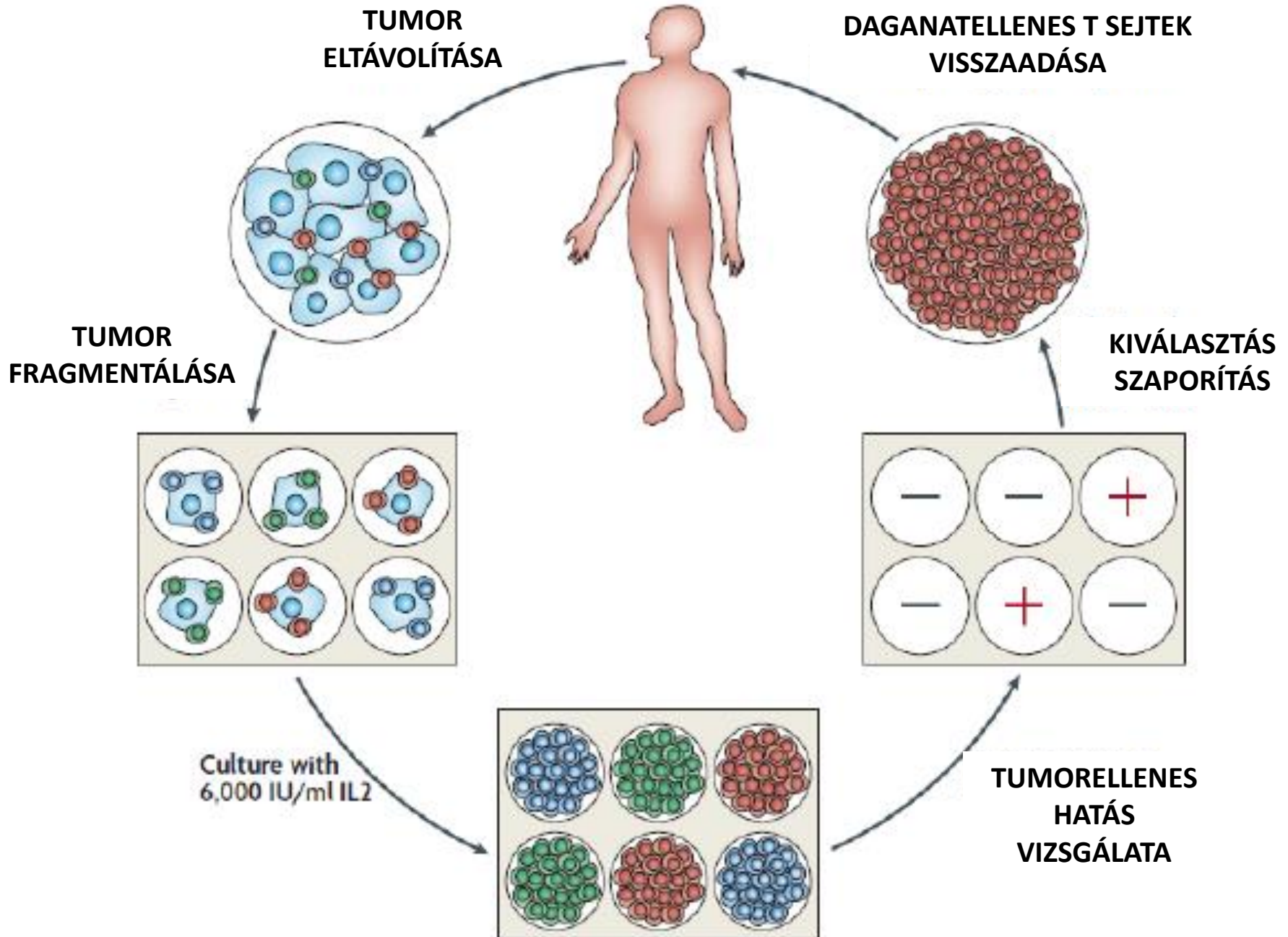




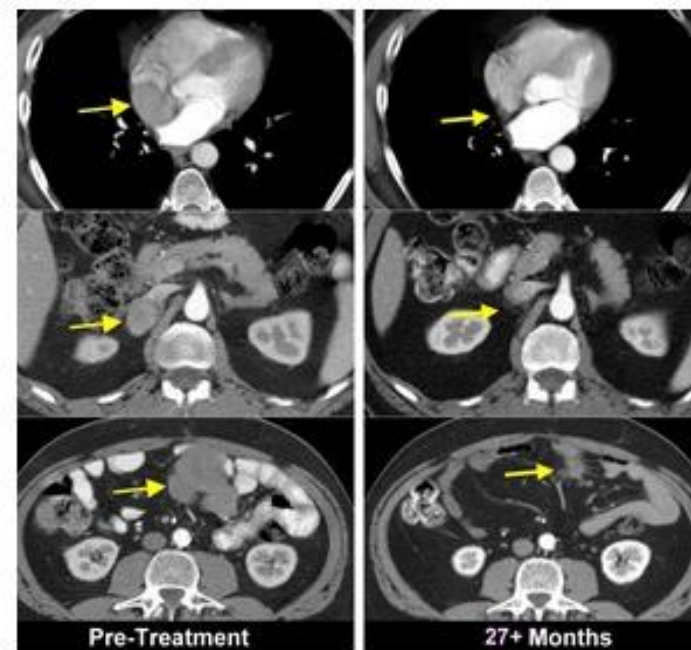
# Szelektált T-sejt terápiaák - TIL



# SZELEKCIÓ HÁTTERE



# TIL – Áttörés metasztatikus melanómában



Rosenberg et al. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma *Curr Opin Immunol*, 21(2), 233-240.

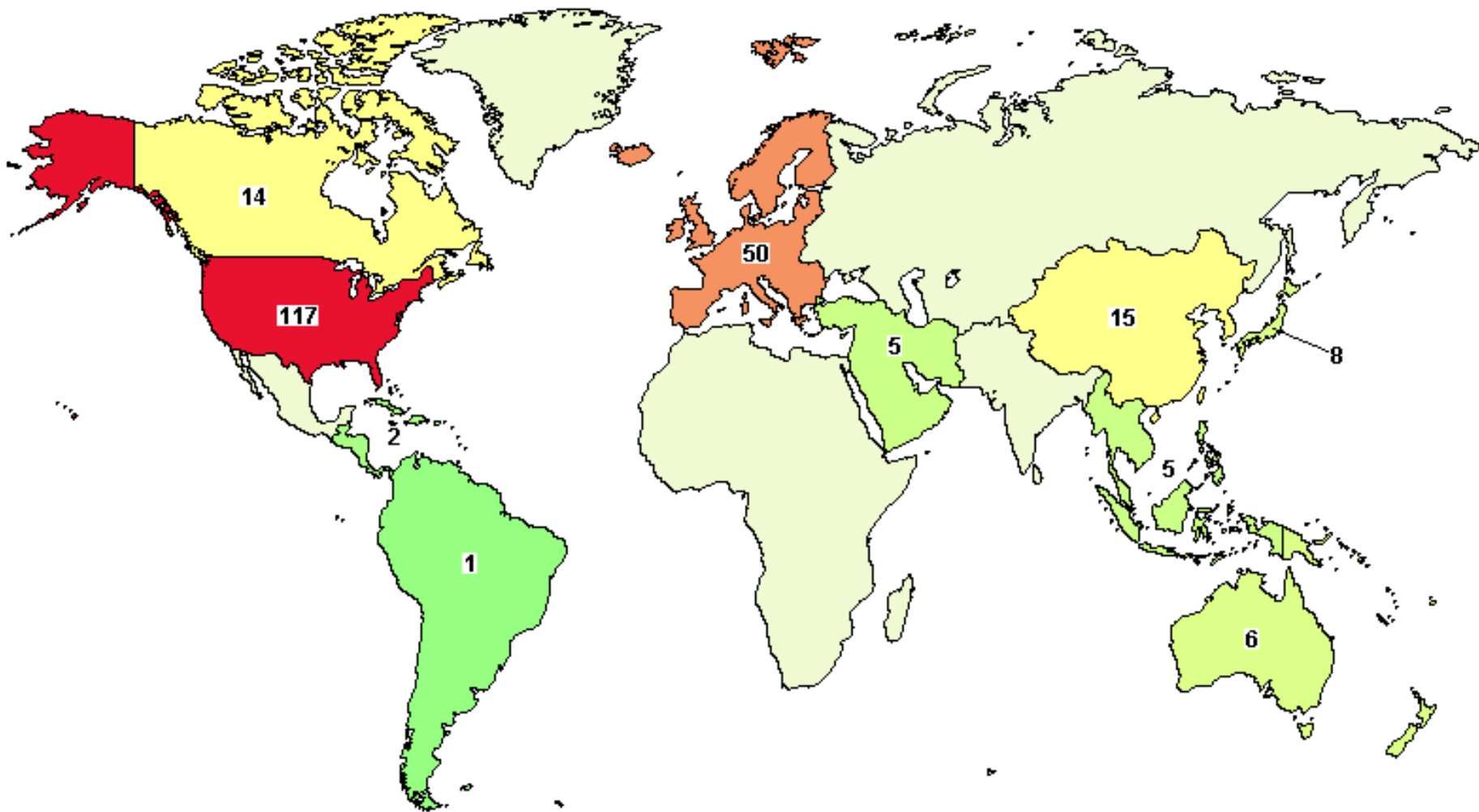
**LION**  
Biotechnologies

- **Tipikusan melanómában hatékony** © 2016, Lion Biotechnologies
- **A vizsgálatba bevont betegek 15-30%-ában CR**
- **Sok betegnek nincs tumorhoz kötött T-sejtje**

	TIL Type	Precondition	No. Patients	ORR
NCI	Selected	Cy/Flu	43	49%
NCI	Selected	Cy/Flu + 2-Gy TBI	25	52%
NCI	Selected	Cy/Flu + 12-Gy TBI	25	72%
NCI	CD8 <sup>+</sup> young	Cy/Flu + 6-Gy TBI	33/23	58%/48%
NCI	CD8 <sup>+</sup> young vs young	Cy/Flu	35/34	20%/35%
Sheba	Young	Cy/Flu	57	40%
Moffitt	Selected	Cy/Flu	13	46%
MD Anderson	Selected (if possible)	Cy/Flu	31	48%
	Average			47%

# TIL SEJT TERÁPIA HELYE A VILÁGBAN

---



# SEJTTERÁPIA GÉNMODOSÍTOTT (DESIGNER) T-SEJTEKKEL



**GYORS**  
**SZABÁLYOZHATÓ**  
**HATÉKONY**  
**SPECIFIKUS**

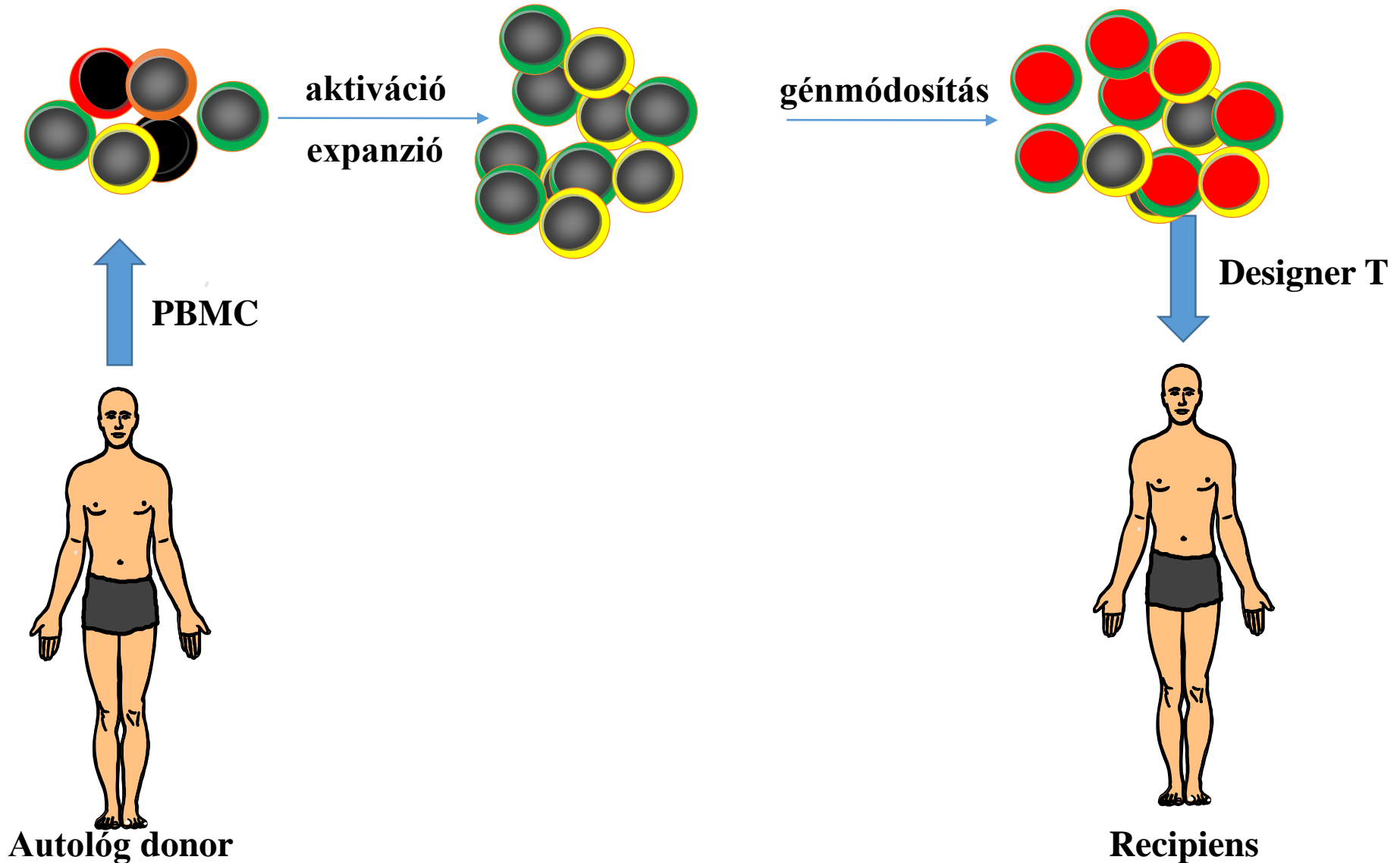


„Megpróbáljuk jobbá tenni a természet alkotását...”-Dr. Carl June





# Designer T-sejt terápia



# Génmódosítás lehetőségei

---

- **Szekretált molekulák:**
  - **Citokinek (IL7;IL15;IL2)**
  - **BiTE**
  - **Checkpoint inhibitor**
  - **ECM targetálás**
  
- **Membránhoz kötött molekulák:**
  - **Target specifikus TCR**
  - **CAR**
  - **Citokin receptorok**

# Génmódosítás lehetőségei

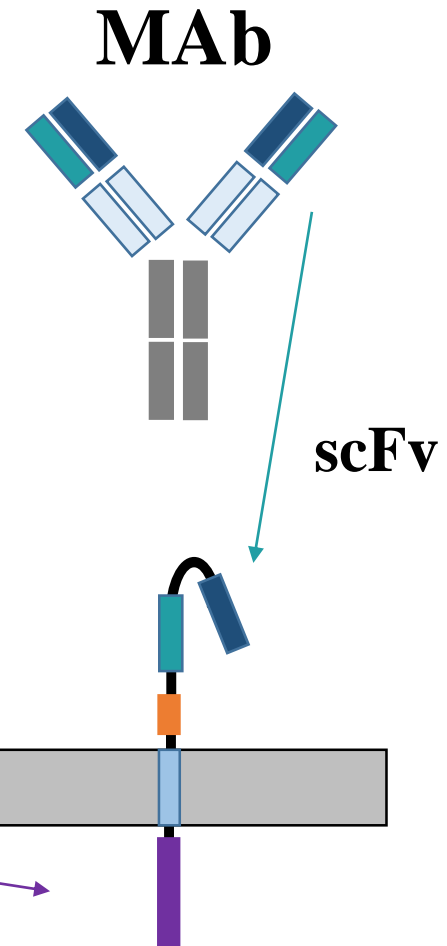
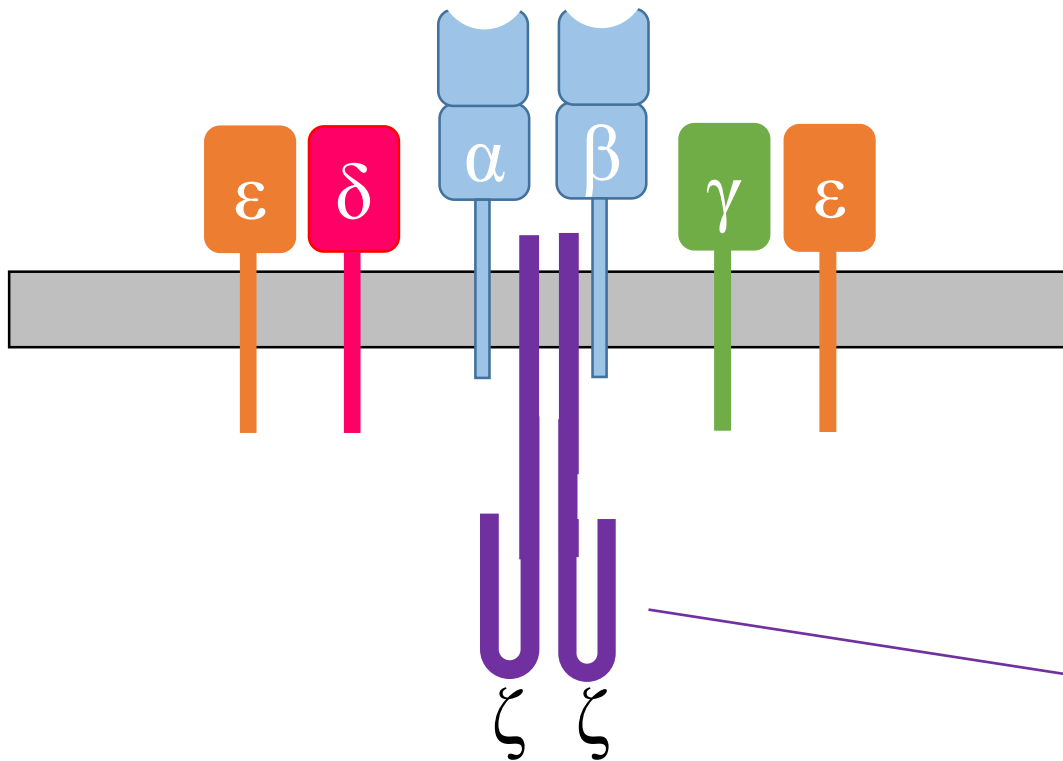
---

- **Szekretált molekulák:**
  - **Citokinek (IL7;IL15;IL2)**
  - **BiTE**
  - **Checkpoint inhibitor**
  - **ECM targetálás**
  
- **Membránhoz kötött molekulák:**
  - **Target specifikus TCR**
  - **CAR**
  - **Citokin receptorok**



# Kiméra antigén receptor (CAR)

## T sejt receptor komplex



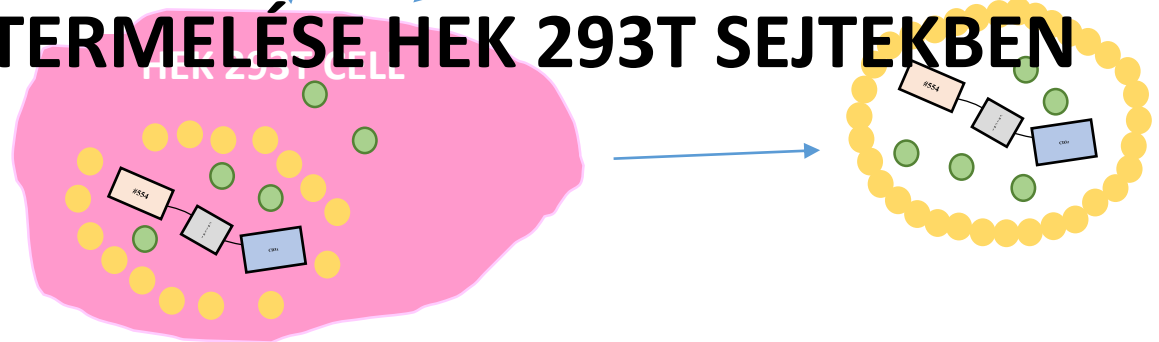
## Kiméra antigén receptor (CAR)

# CAR T-sejtek előállítása – retrovírusok termelése

---

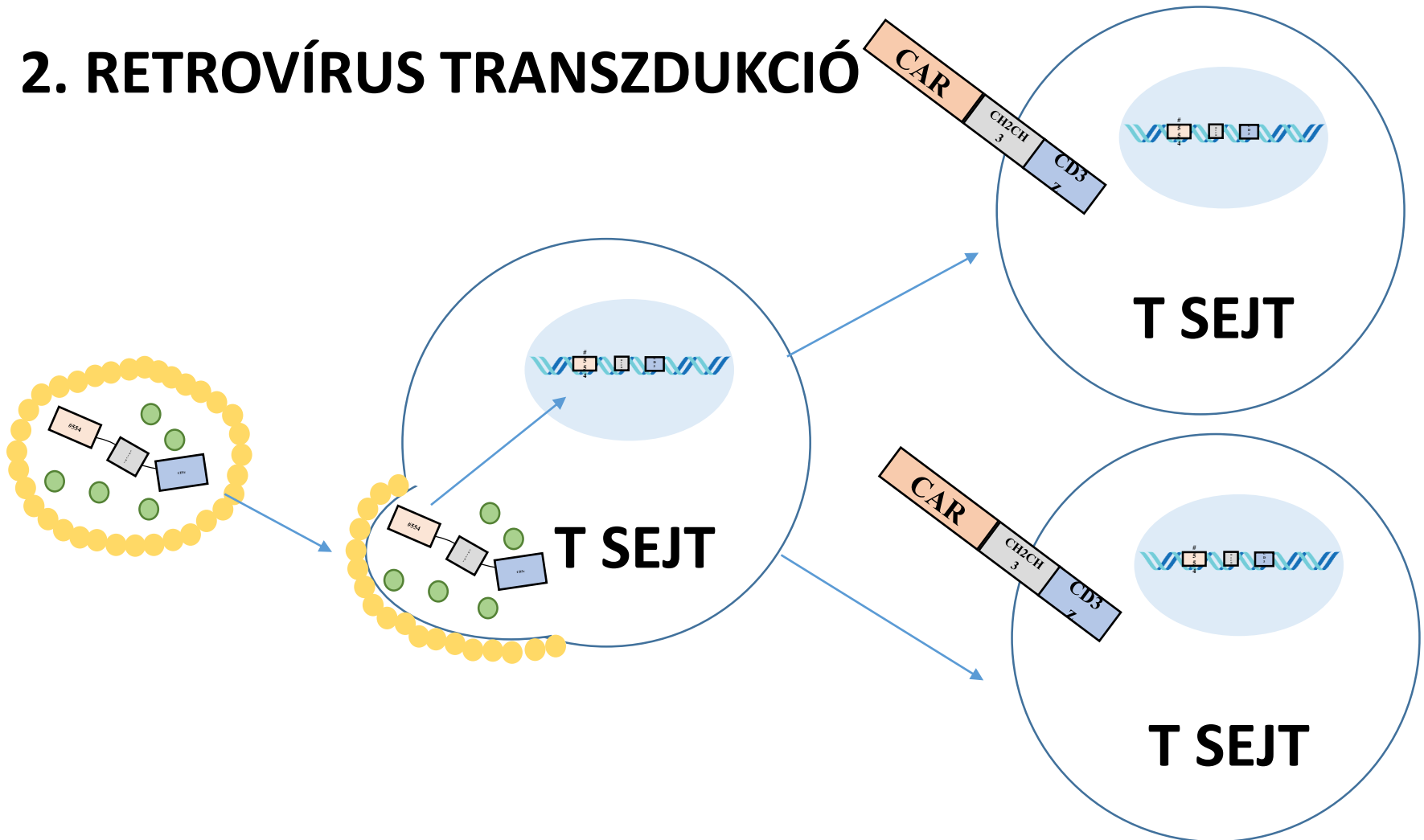


## 1. RETROVÍRUS TERMELESE HEK 293T SEJTEKBEN



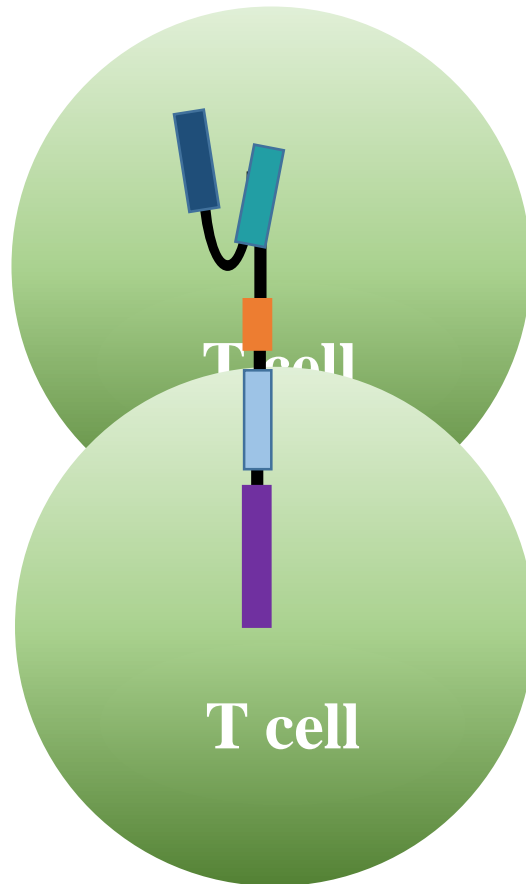
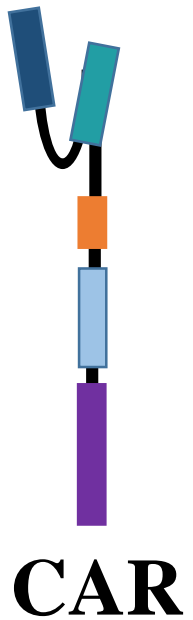
# CAR T-sejtek előállítása – transzdukció

## 2. RETROVÍRUS TRANSZDUKCIÓ

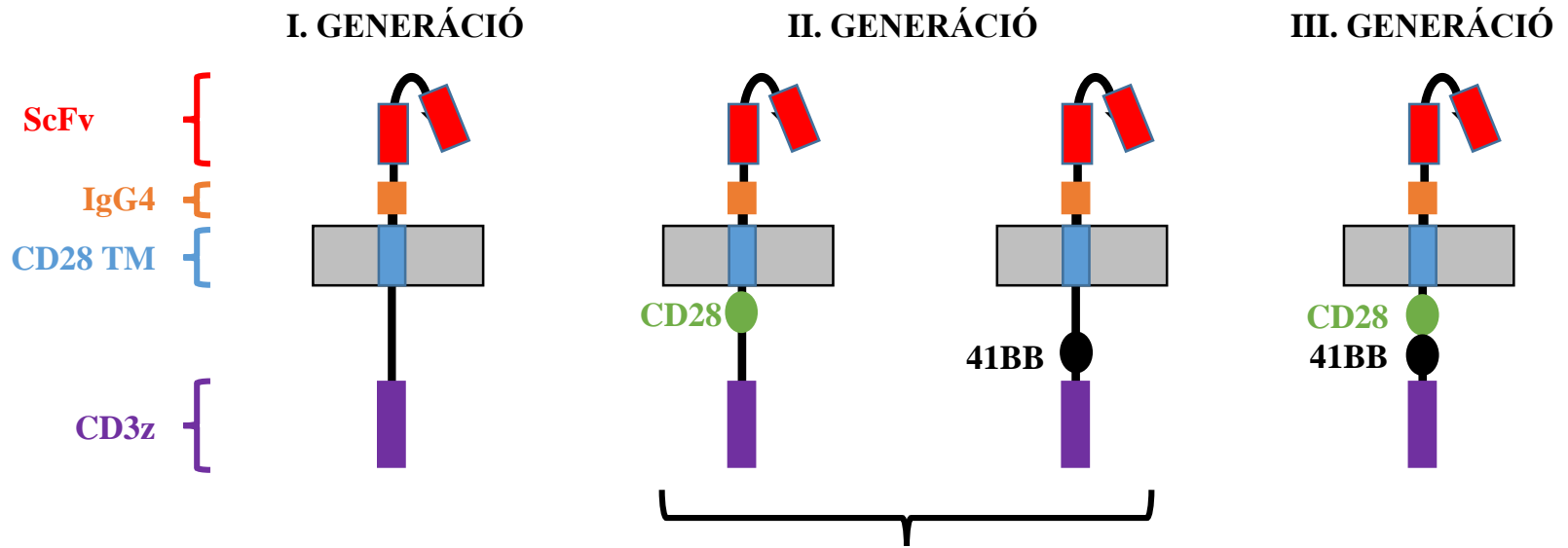


# Kiméra antigén receptor (CAR)- működés

---



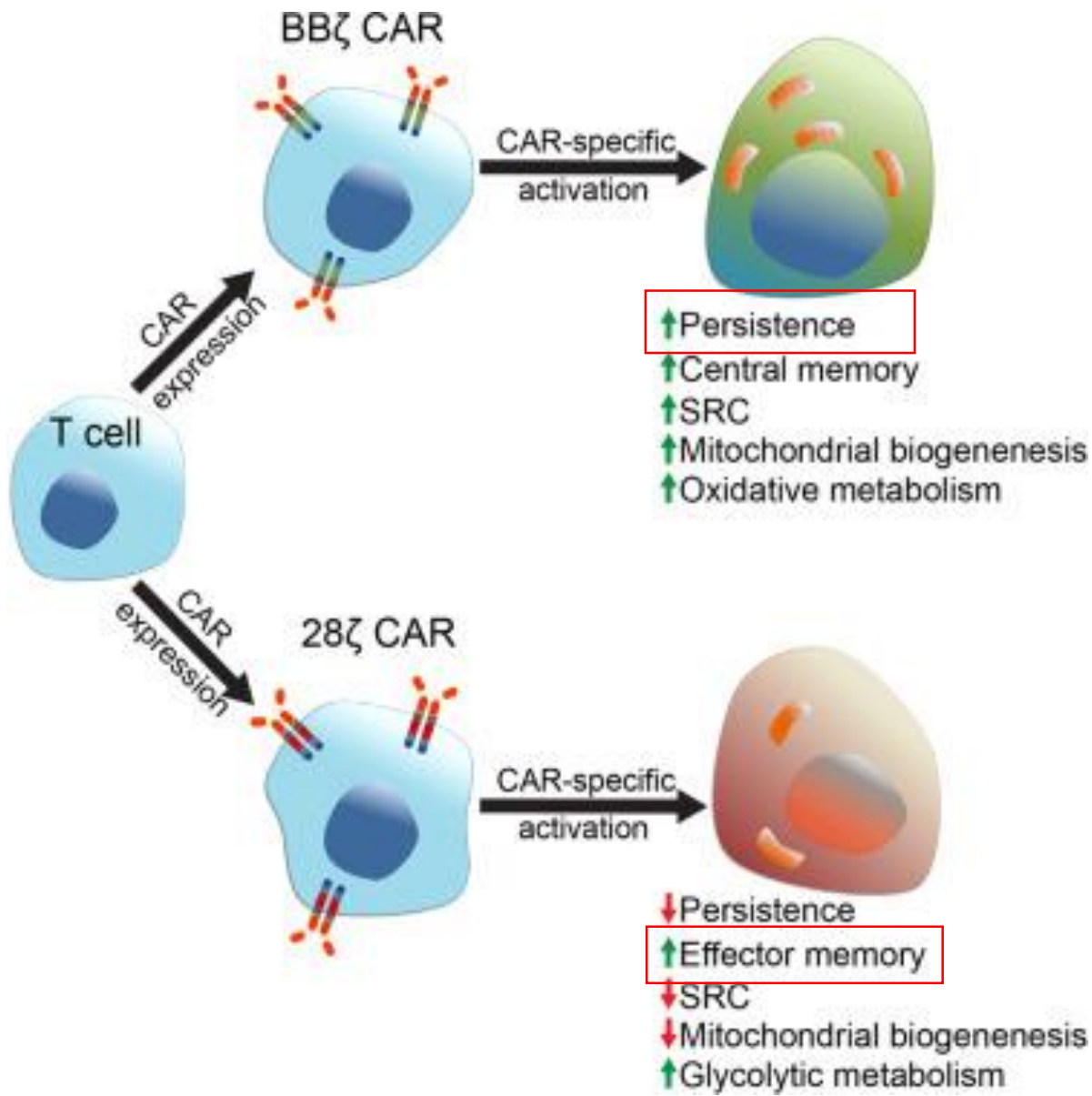
# Kiméra antigén receptor (CAR)-generációk



**KOMBINÁCIÓ:**  
-citokin  
-checkpoint inhibitor  
-costimulátor  
-ECM felismerés  
-onkolitikus vakcina vírus  
-BiTE

IV. GENERÁCIÓ - TRUCK

# Dogma



## Immunity

Volume 44, Issue 2, 16 February 2016, Pages 380-390



Article

### Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells

Omkar U. Kawalekar<sup>1</sup>, Roddy S. O'Connor<sup>2</sup>, Joseph A. Fraietta<sup>1</sup>, Lili Guo<sup>3</sup>, Shannon E. McGettigan<sup>1</sup>, Avery D. Posey Jr.<sup>1</sup>, Prachi R. Patel<sup>1</sup>, Sonia Guedan<sup>1</sup>, John Scholler<sup>1</sup>, Brian Keith<sup>1</sup>, Nathaniel W. Snyder<sup>3,4</sup>, Ian A. Blair<sup>3</sup>, Michael C. Milone<sup>1,2,5</sup>, Carl H. June<sup>1,2,5</sup> & □

# CAR T SEJT TERÁPIA KLINIKAI ALKALMAZÁSA

## EMILY WHITEHEAD – B SEJTÉS LEUKÉMIA

---

2012



2016



**EMILY WHITEHEAD ÉS CSALÁDJA CARL JUNE PROFESSZORRAL**

**NOVARTIS: 1 milliárd USD**

**SEAN PARKER: 250 millió USD**

# CAR T SEJT TERÁPIA KLINIKAI ALKALMAZÁSA B SEJTÉS LEUKÉMIA

	University of Pennsylvania <sup>31</sup>	Memorial Sloan Kettering Cancer Center <sup>28</sup>	National Institutes of Health <sup>30</sup>
Target antigen	CD19	CD190	CD190
CAR generation	2nd	2nd	2nd
Vector	Lentivirus	Retrovirus	Retrovirus
Costimulatory domain	4-1BB	CD28	CD28
Duration of culture	8-12 days		11 days
No. of ALL patients	30	16	20
Conditioning regimen	Individualized, mainly fludarabine based.	Cyclophosphamide 3 g/m <sup>2</sup> day 2	Fludarabine 25 mg/m <sup>2</sup> days 4, 3, 2 Cyclophosphamide 900 mg/m <sup>2</sup> day 2
Median follow-up	7 months	NR	10 months
Overall survival	78%	NR	51.6%
No. of patients undergoing allo-HSCT	3	7	10
Response	90%	88%	70%
Morphologic CR	73%	75%	60%
MRD negative CR			
Duration of CAR T-cell persistence	11 months	3 months	68 days

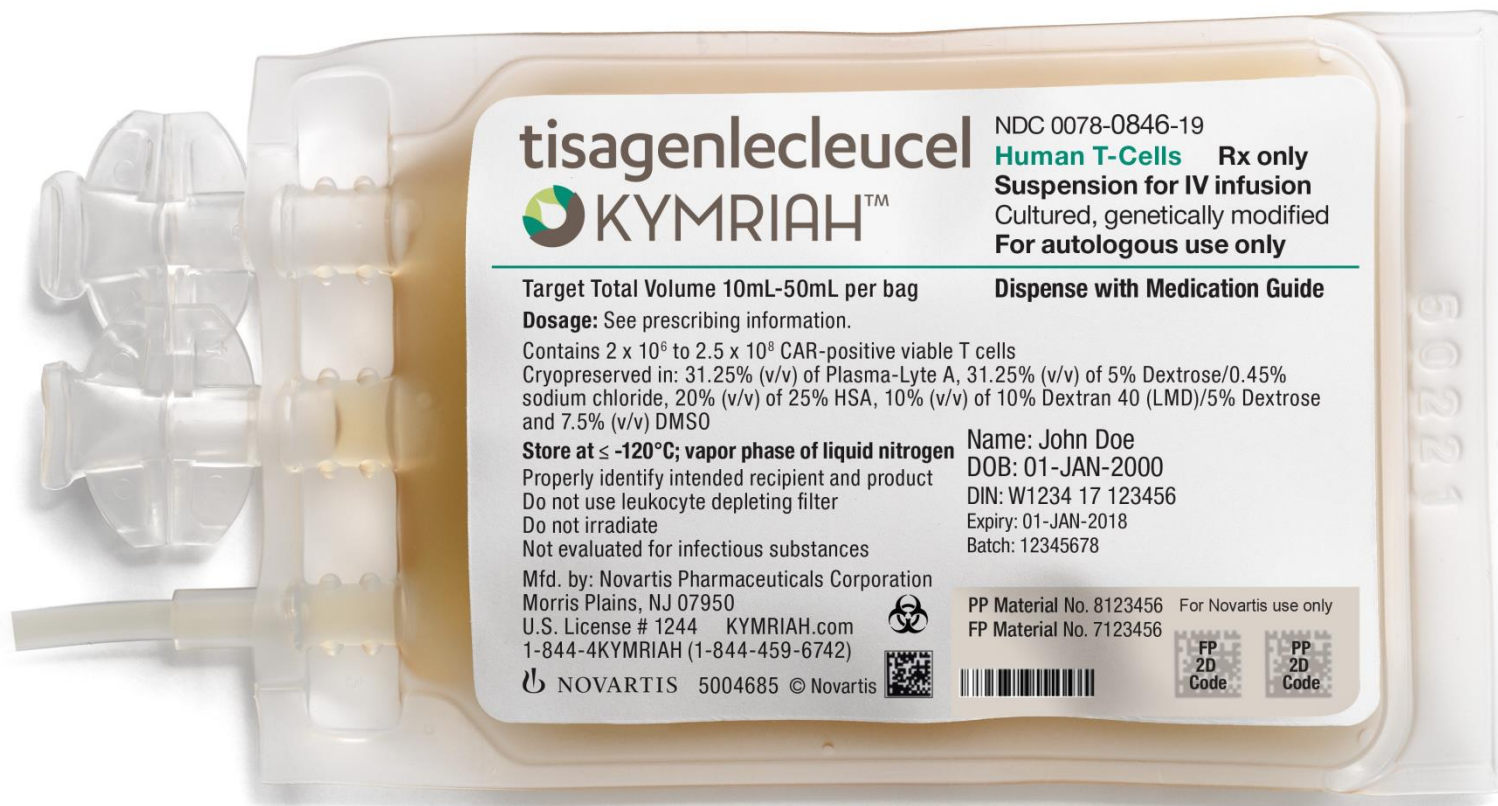


# **CAR T SEJT TERÁPIA KLINIKAI ALKALMAZÁSA EREDMÉNYEK KOCKÁZATOK**

---

- Számos leukémiában hatékony, de szervi daganatban nem működik kielégítően
- Egy kezelés a betegek nagy részében (70-80%) gyógyulást eredményez
- Átmeneti súlyos mellékhatások – CRS - tocilizumab
- Hosszú távon a mellékhatások kérdésesek - neurotoxicitás
- Betegre kell szabni – nem univerzális
- Csak speciális központokban elérhető
- **NAGYON DRÁGA!!!**

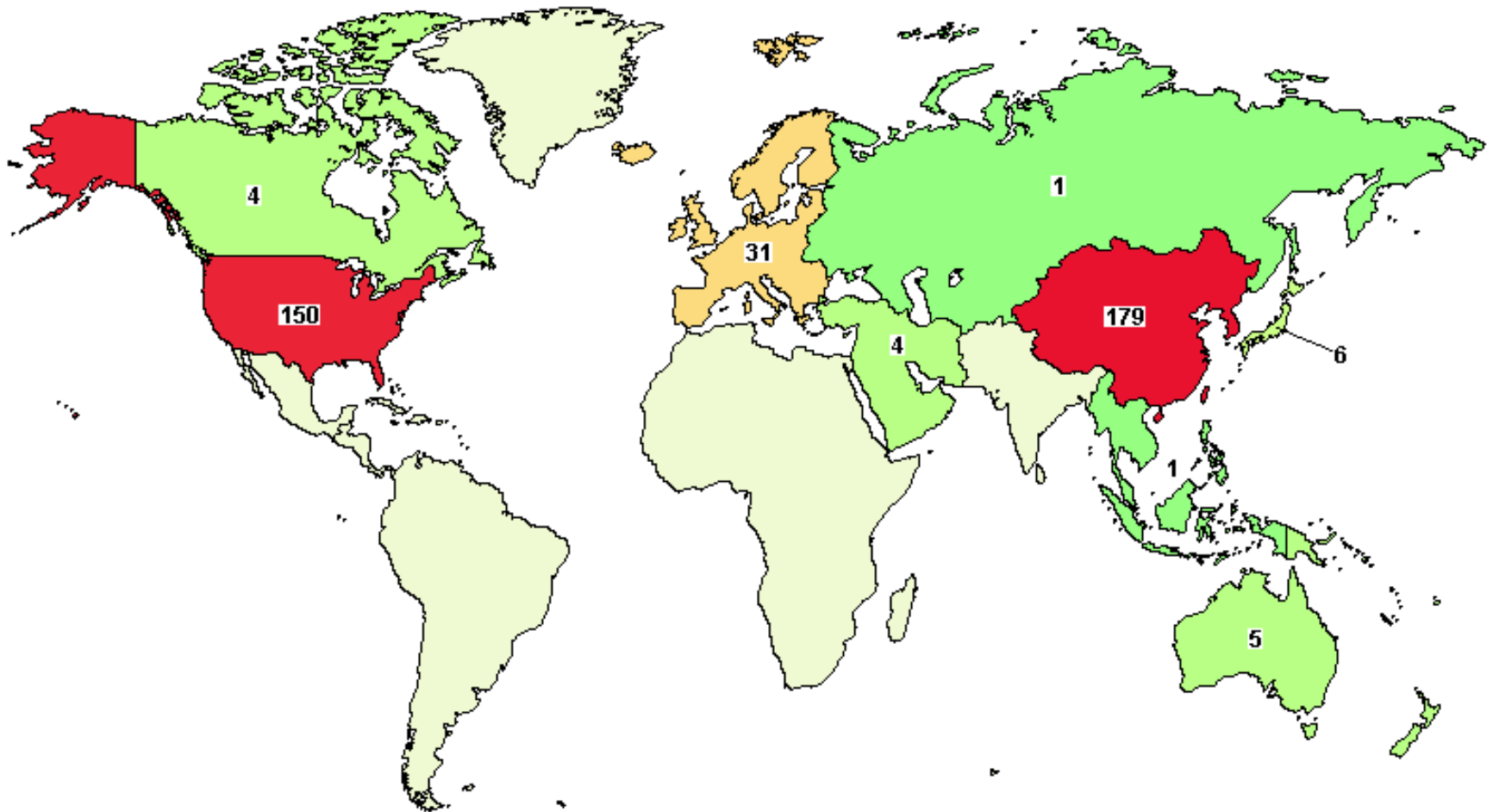
# KYMRIAH- A GYÓGYULÁS ÁRA



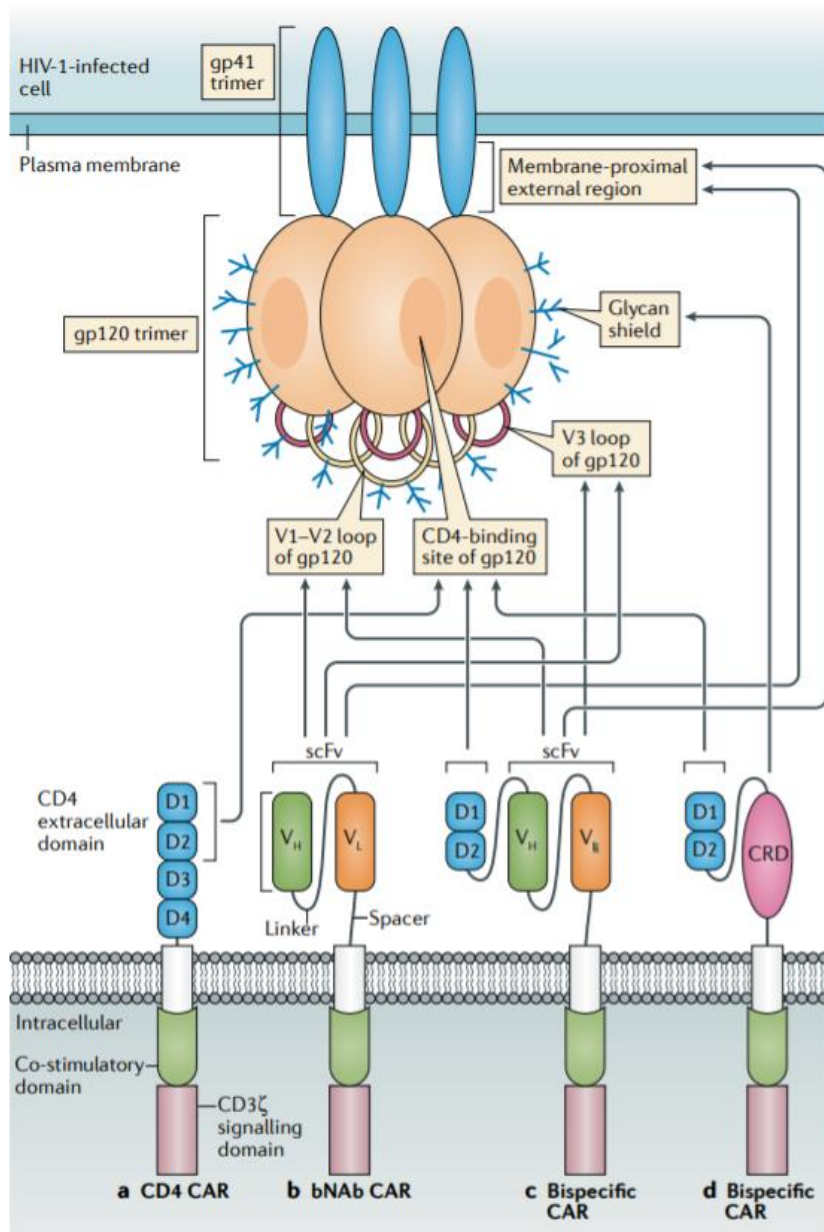
**1 kezelés ára: 475000USD (130 millió HUF) – B-ALL  
300000USD – DLBCL**

# CAR T SEJT TERÁPIA HELYE A VILÁGBAN

---



# CAR T-SEJTEK AZ INFEKTOLÓGIÁBAN



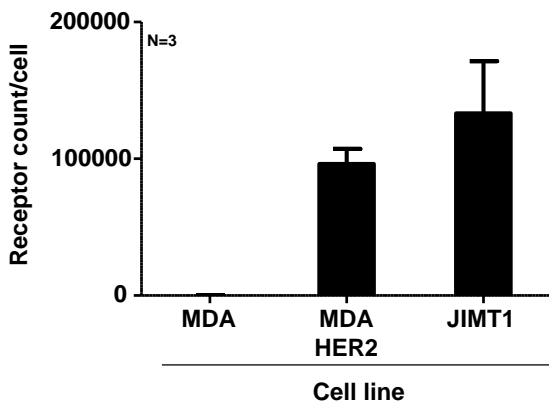
Nat Rev Immunol. 2018 Oct;  
CAR T cells for infection, autoimmunity and  
allotransplantation.

Maldini CR1, Ellis GI1, Riley JL2.

# A HER2 mint terápiás target

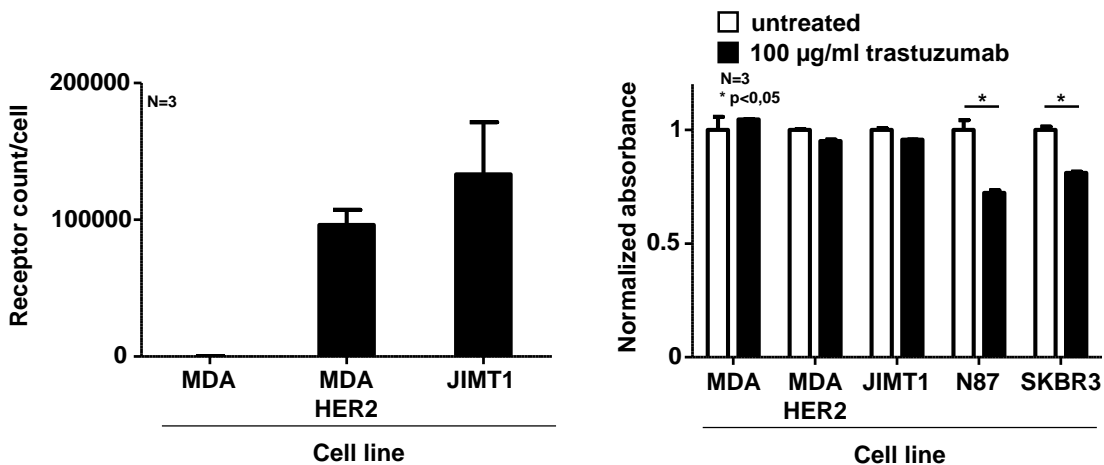
---

**A trastuzumab és a kiméra antigén receptorral módosított T-sejtek tumorellenes hatásának összehasonlítása  
terápiarezisztens emlőtumor sejtvonalakon**



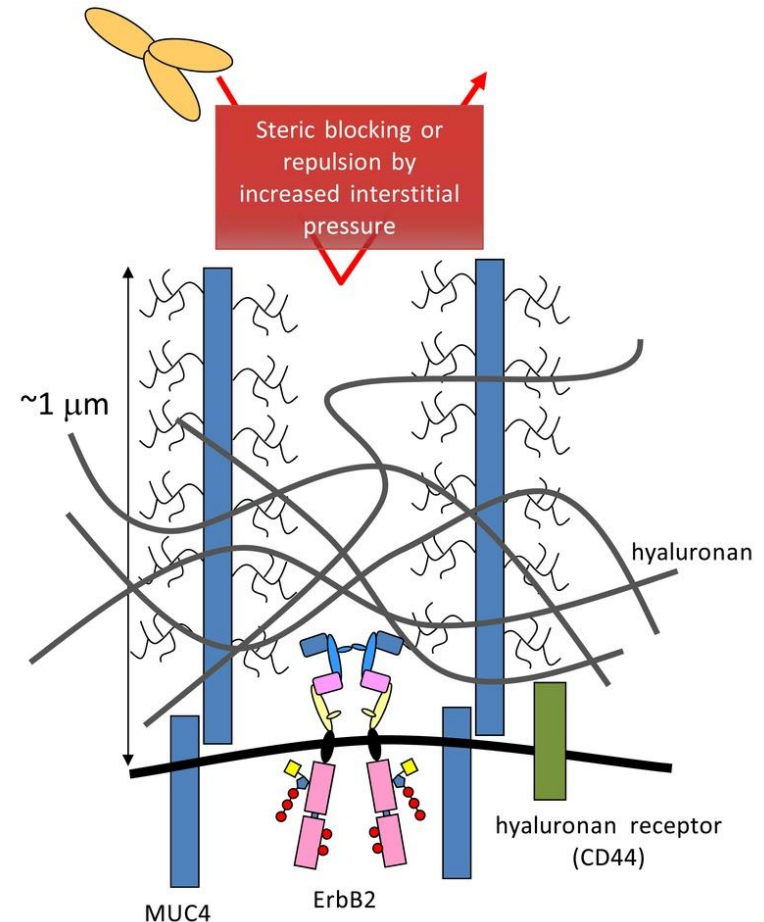
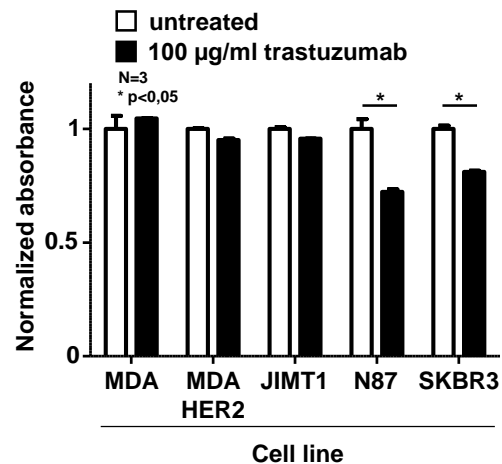
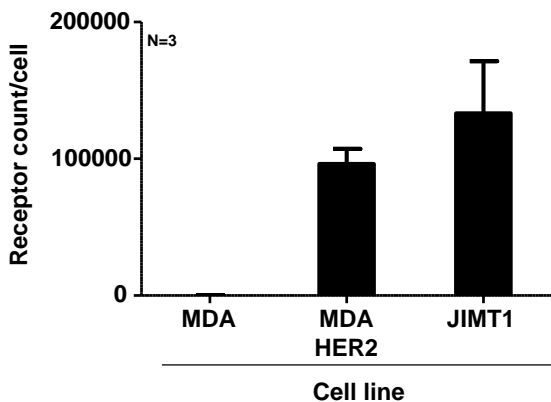
# A HER2 mint terápiás target

A trastuzumab és a kiméra antigén receptorral módosított T-sejtek tumorellenes hatásának összehasonlítása  
terápiarezisztens emlőtumor sejtvonalakon

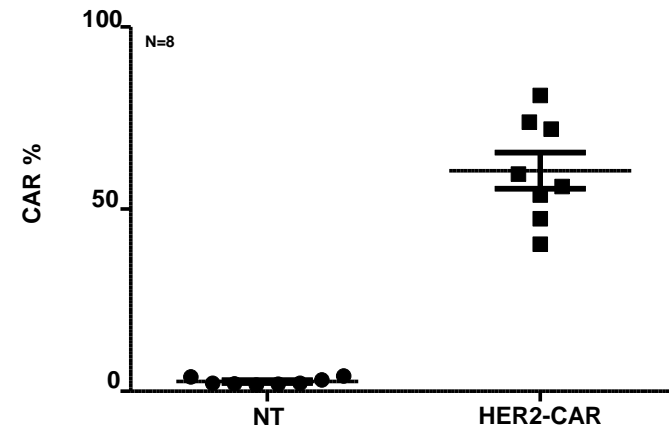
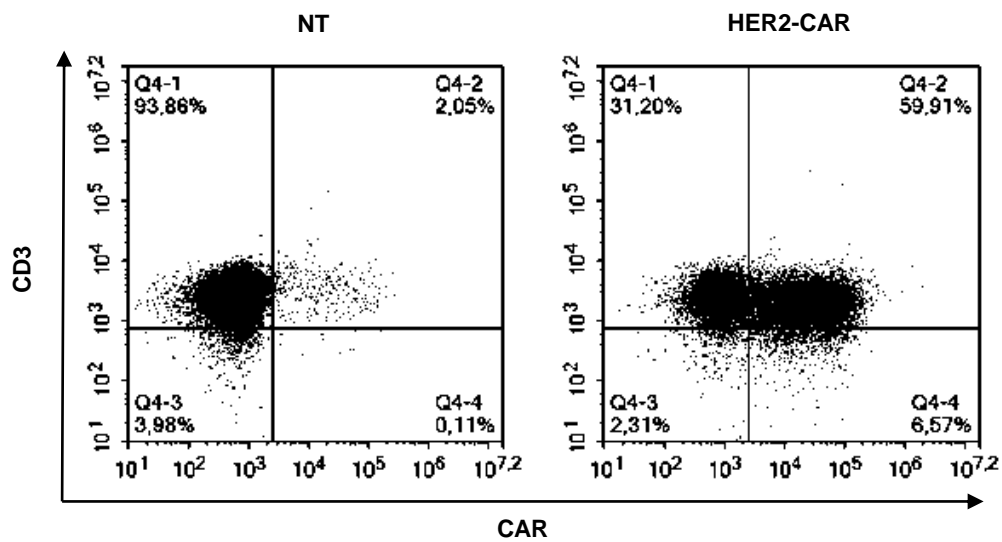
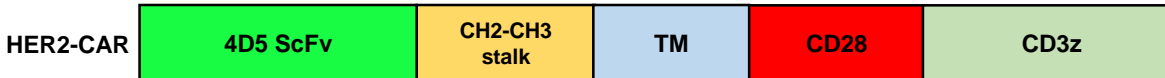


# A HER2 mint terápiás target

A trastuzumab és a kiméra antigén receptorral módosított T-sejtek tumorellenes hatásának összehasonlítása  
terápiarezisztens emlőtumor sejtvonalakon

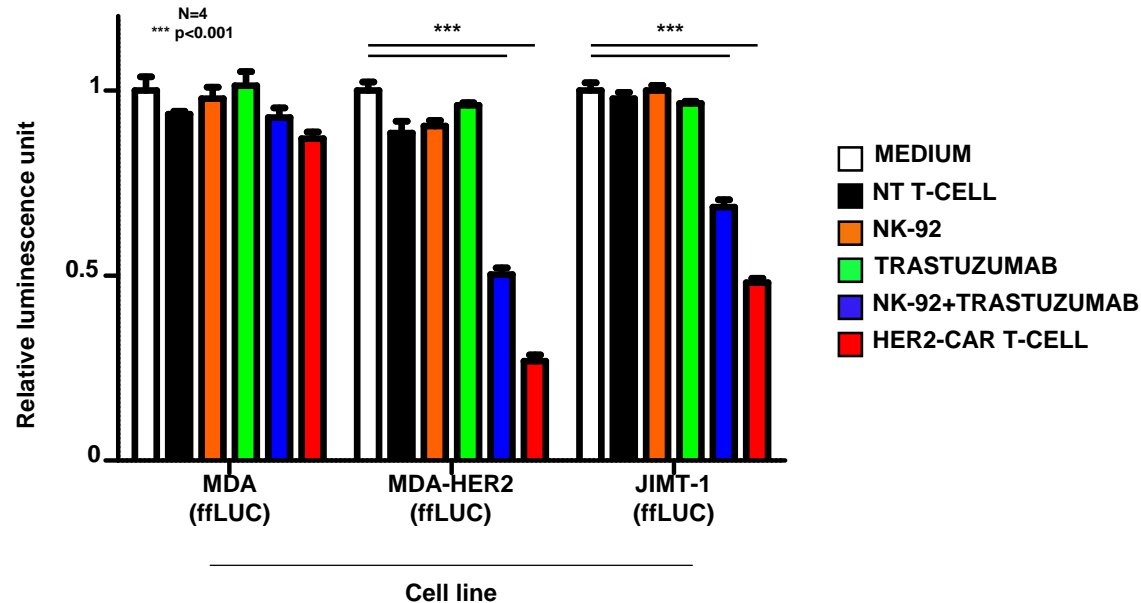
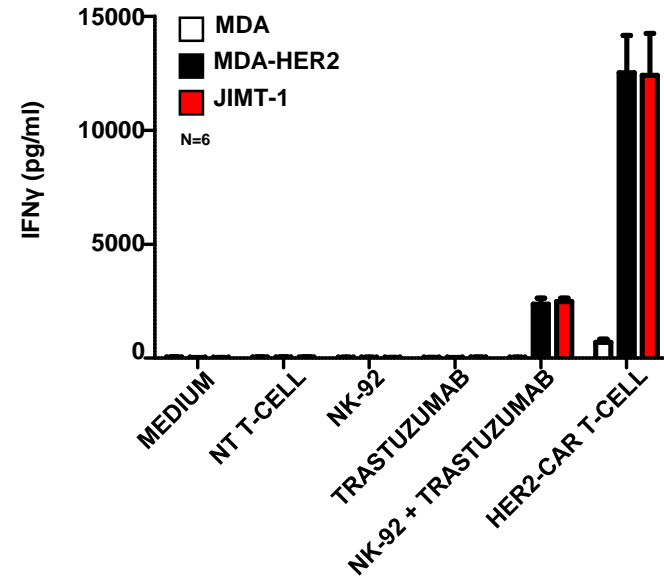
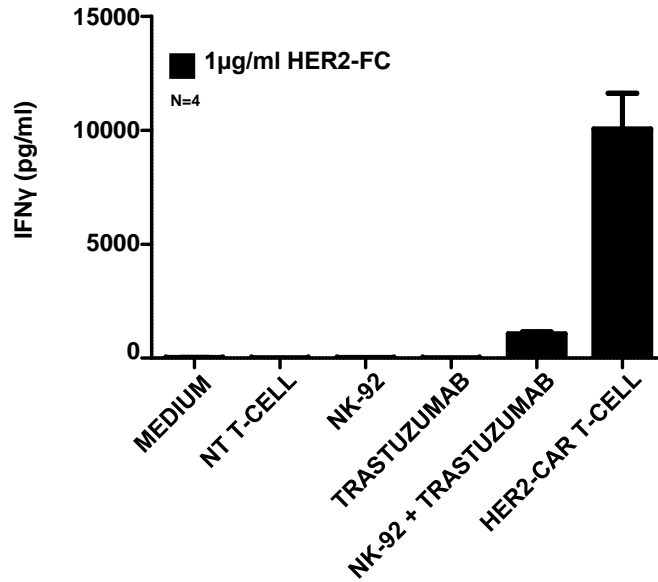


# HER2-CAR T-SEJTEK ELŐÁLLÍTÁSA

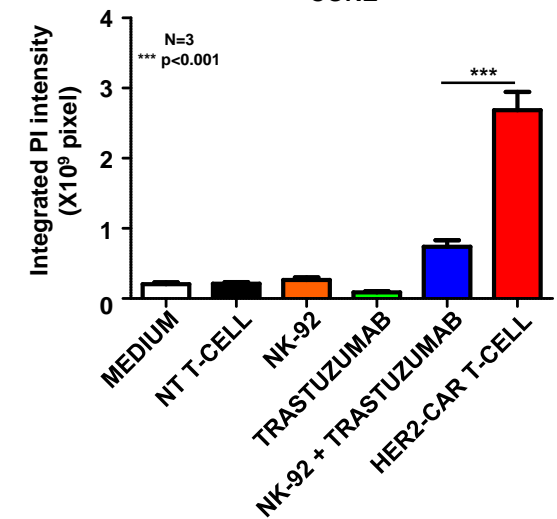
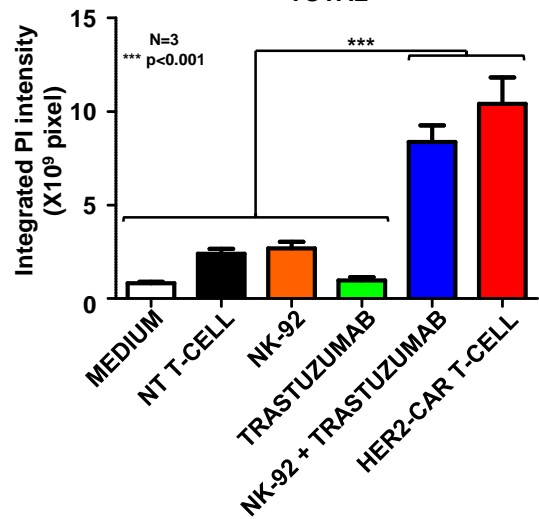
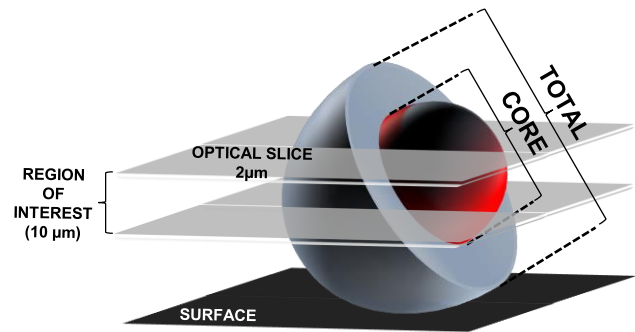
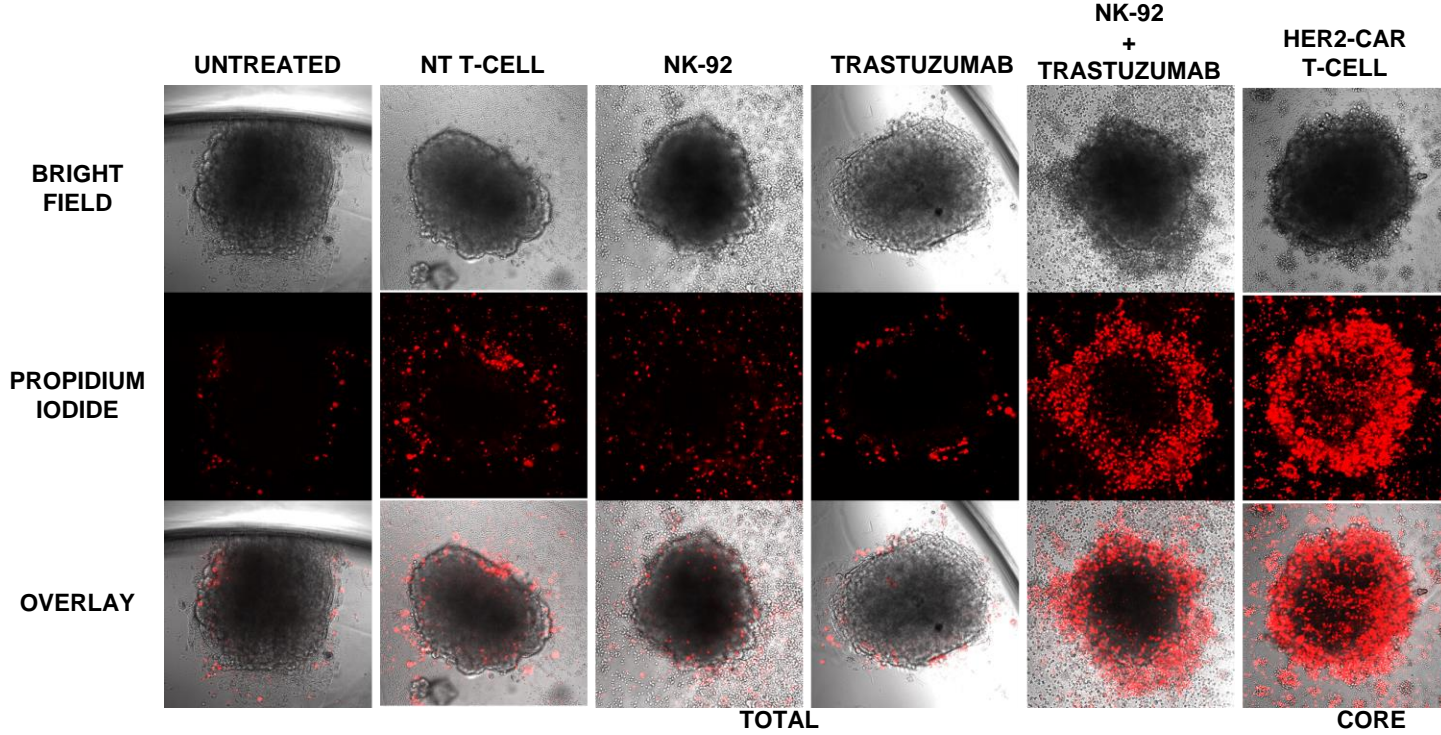




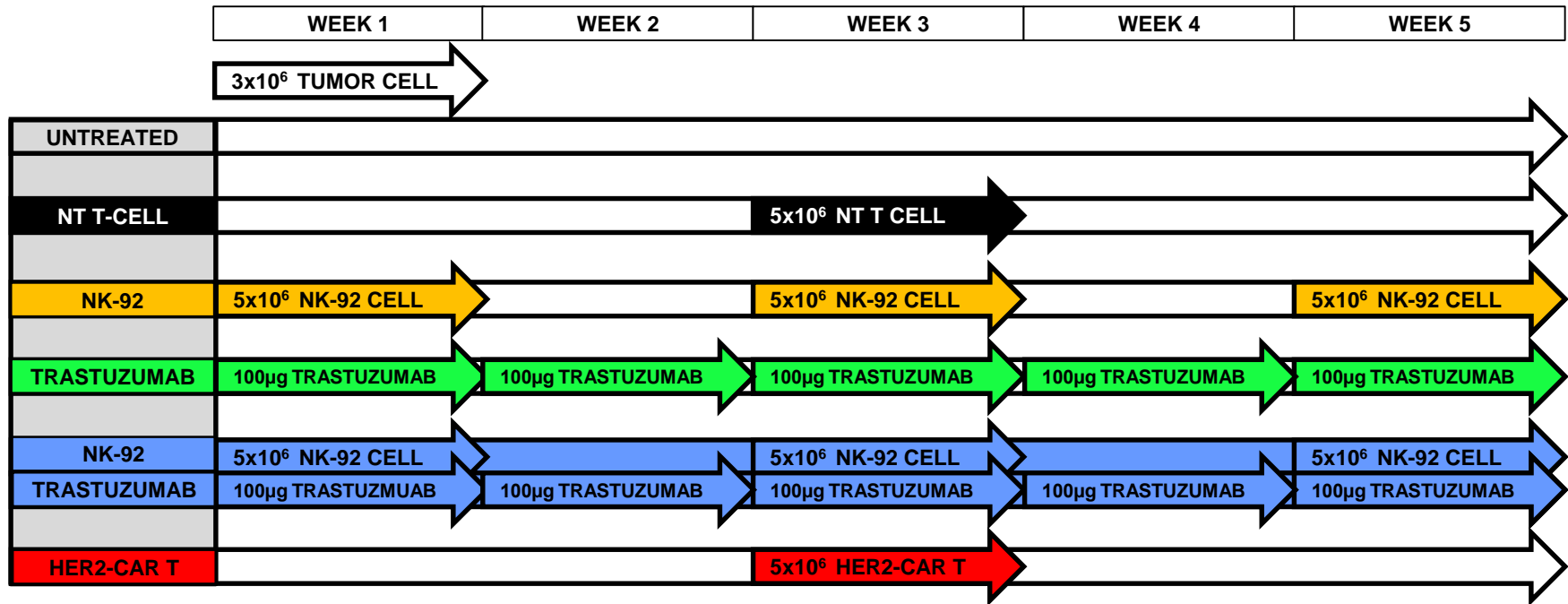
# HER2-CAR T-SEJTEK IN VITRO MŰKÖDÉSE KOKULTÚRA ESSZÉ



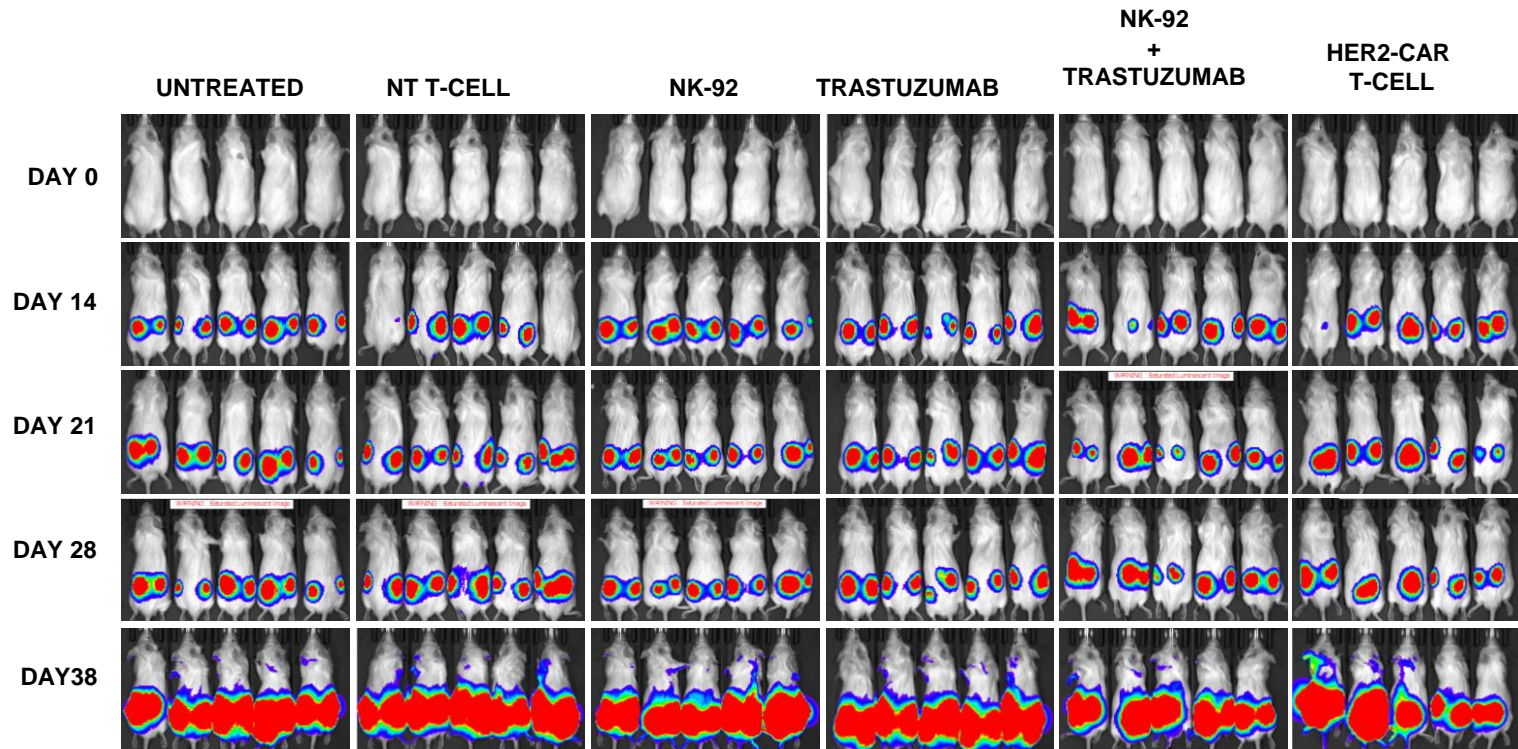
# HER2-CAR T-SEJTEK IN VITRO MŰKÖDÉSE SZFEROID



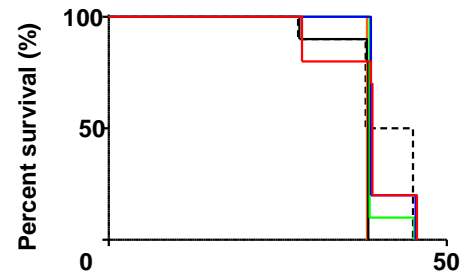
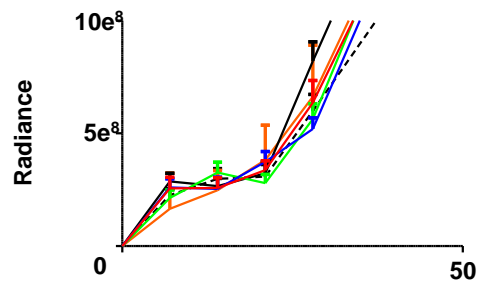
# HER2-CAR T-SEJTEK IN VIVO MŰKÖDÉSE



# HER2-CAR T-SEJTEK IN VIVO MŰKÖDÉSE



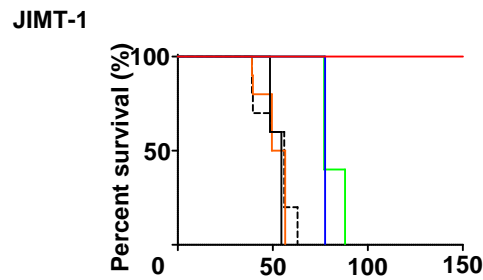
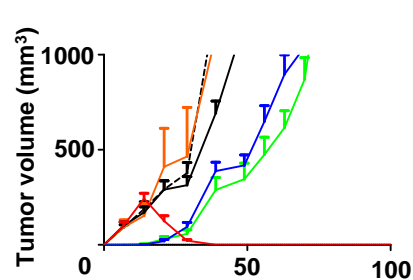
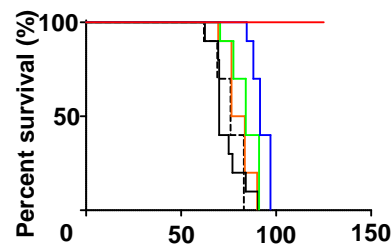
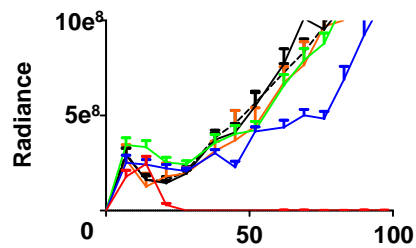
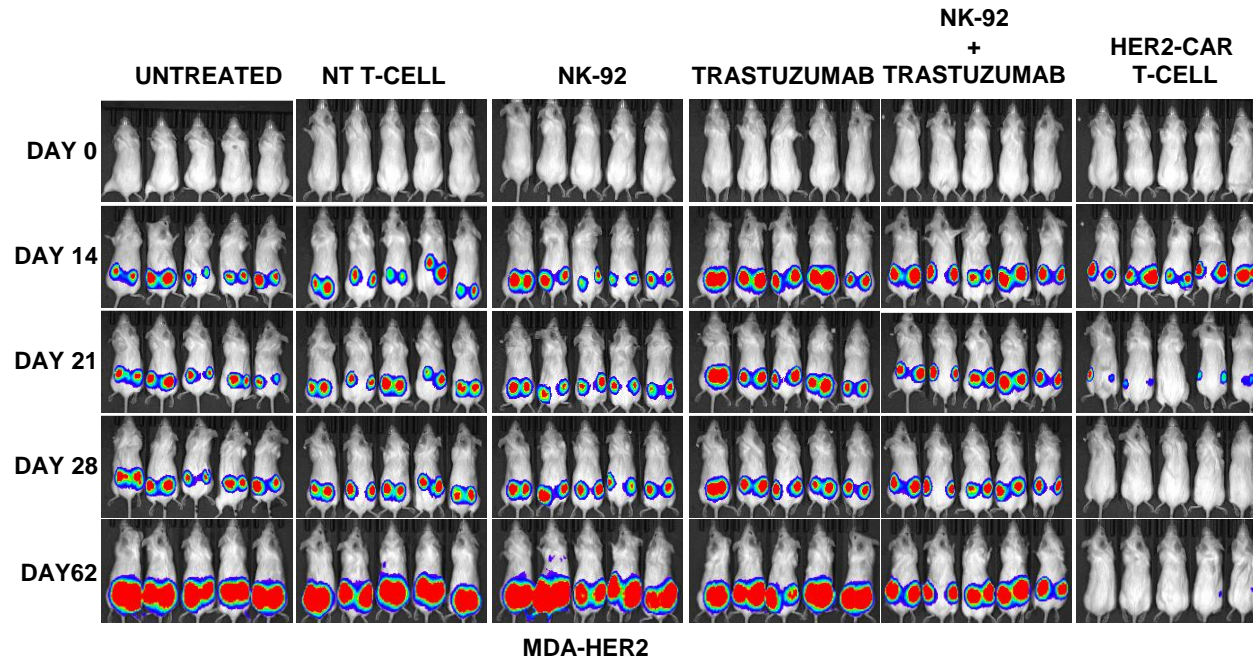
MDA



- UNTREATED
- NT T-CELL
- NK-92
- TRASTUZUMAB
- NK-92+TRASTUZUMAB
- HER2-CAR T-CELL

Days

# HER2-CAR T-SEJTEK IN VIVO MŰKÖDÉSE



- UNTREATED
- NT T-CELL
- NK-92
- TRASTUZUMAB
- NK-92+TRASTUZUMAB
- HER2-CAR T-CELL

Days



# Köszönetnyilvánítás



- Vereb György
- Szöllősi János
- Tóth Gábor
- Ujlaky-Nagy László
- Vágóné Toldi Hajnalka
- Garlati Bettina
- Kassakürti Zsanett
- An Thuy
- Nádudvari Zoé



- Hinrich Abken
- Tobias Riet
- Astrid Holzinger



- Stephen Gottschalk
- Andras Heczey
- Paulina Velasquez
- Challice Bonifant
- Abishek Vaidya

