

# Chimäre Antigenrezeptor-exprimierende T-Zellen für die Krebsimmuntherapie

## Zusammenfassung

Mittels Gentechnik können T-Zellen mit chimären Antigenrezeptoren (CARs) für effektive Tumor-Therapien neuausgerichtet werden. Hohe Raten vollständiger, wenngleich häufig transients, Remissionen bei Patienten mit rezidivierten oder refraktären (r/r) akuten B-Zell-Leukämien (B-ALL) und B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen haben die klinische Wirksamkeit von anti-CD19-CAR-T-Zell-Therapien eindrucksvoll bewiesen. Die Konditionierung der Patienten mittels lymphodepletierender Chemotherapie ist für CAR-T-Zell-Therapien eine wesentliche Voraussetzung. Schwere Nebenwirkungen der CAR-T-Zell-Therapie, wie das Zytokin-Freisetzungssyndrom, erfordern engmaschiges klinisches Monitoring, können aber durch frühzeitige Diagnose und Gabe von Tocilizumab effektiv therapiert werden. In der EU wurden 2018 gentechnisch modifizierte CD19-CAR-T-Zellprodukte (Kymriah/Yescarta) für die Therapie von Patienten mit mehrfach vorbehandeltem r/r juveniler B-ALL und gewissen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen zugelassen.

## Summary

Genetic engineering with chimeric antigen receptors (CARs) can redirect T cells for efficient tumor therapy. High rates of complete, albeit often transient remissions in patients with relapsed or refractory (r/r) acute B-cell leukemia (B-ALL) and B-cell Non-Hodgkin lymphoma impressively demonstrate the clinical benefit of anti-CD19-CAR-T-cell-therapies. Preconditioning with lymphodepleting chemotherapy is essential for CAR-T-cell-therapy to be efficacious. Severe adverse side effects, such as the cytokine release syndrome (CRS), require timely diagnosis but can be controlled by infusion of Tocilizumab. In 2018 the genetically engineered CD19-CAR-T-cells (Kymriah/Yescarta) were licensed as third line therapy for juvenile r/r B-ALL and certain B-cell Non-Hodgkin lymphoma patients in the EU.

## EINLEITUNG

Trotz großer Fortschritte in der Krebsimmuntherapie, die durch den Einsatz monoklonaler Antikörper in Kombination mit verschiedenen konventionellen Therapieformen (Chemotherapie, Bestrahlung) in den letzten Jahren zur Behandlung von Leukämien und soliden Tumoren erzielt werden konnten, erleidet ein signifikanter Anteil der Patienten einen Rückfall und erliegt ihrer Erkrankung. Diese hohe Inzidenz von Tumorrezidiven wird dem Überleben von Chemotherapie-resistenten Tumorstammzellen und einem in Folge der Chemotherapie und der Tumorerkrankung supprimierten zellulärem Immunsystem und einer immunsuppressiven Tumorumgebung (Tumorenvironment, TME) zugeschrieben<sup>1</sup>. Die Wiederherstellung einer effektiven zellulären Immunität, die sich gegen Therapie-resistente Tumorzellen richten lässt, ist daher von zentraler Bedeutung für den Erfolg von Krebsimmuntherapien. Die Beobachtung, dass mit der Transfusion von allogenen Stammzellen und Spenderlymphozyten häufig auch ein protektiver Transplantat-gegen-Leukämie (Graft-versus-leukemia (GvL))-Effekt assoziiert ist, der zum Erfolg einer allogenen Stammzelltransplantation erheblich beiträgt, hat die Krebsimmuntherapie und den Einsatz von allogenen Spenderlymphozyten maßgeblich beeinflusst. Dieser vorteilhafte GvL-Effekt wird aber sehr häufig von

schädlichen Transplantat-gegen-Wirt-Effekten (engl.: Graft-versus-Host-Disease (GvHD)) begleitet, bei dem gesunde Zellen des Patienten durch T-Zellen eines allogenen Spenders als fremd erkannt und attackiert werden<sup>2</sup> und ist nur im Kontext einer allogenen Stammzelltransplantation anwendbar.

Zur Vermeidung einer GvHD, die mit schwerwiegenden Organschädigungen und Nebenwirkungen infolge weiterer notwendiger, immunsuppressiver Maßnahmen, wie z. B. Virämien, Lymphopenien usw. assoziiert ist, sind daher Strategien entwickelt worden, mit denen sich mittels Gentechnik patienteneigene, autologe T-Zellen spezifisch auf Tumorantigene neu ausrichten („retargeting“) und reaktivieren lassen. Zur Neuausrichtung der patienteneigenen T-Zellen auf Tumorantigene werden sogenannte chimäre Antigenrezeptoren (chimeric antigen receptors, CARs) genutzt, die sich von Antikörpern ableiten und Oberflächenantigene auf Tumorzellen spezifisch erkennen.

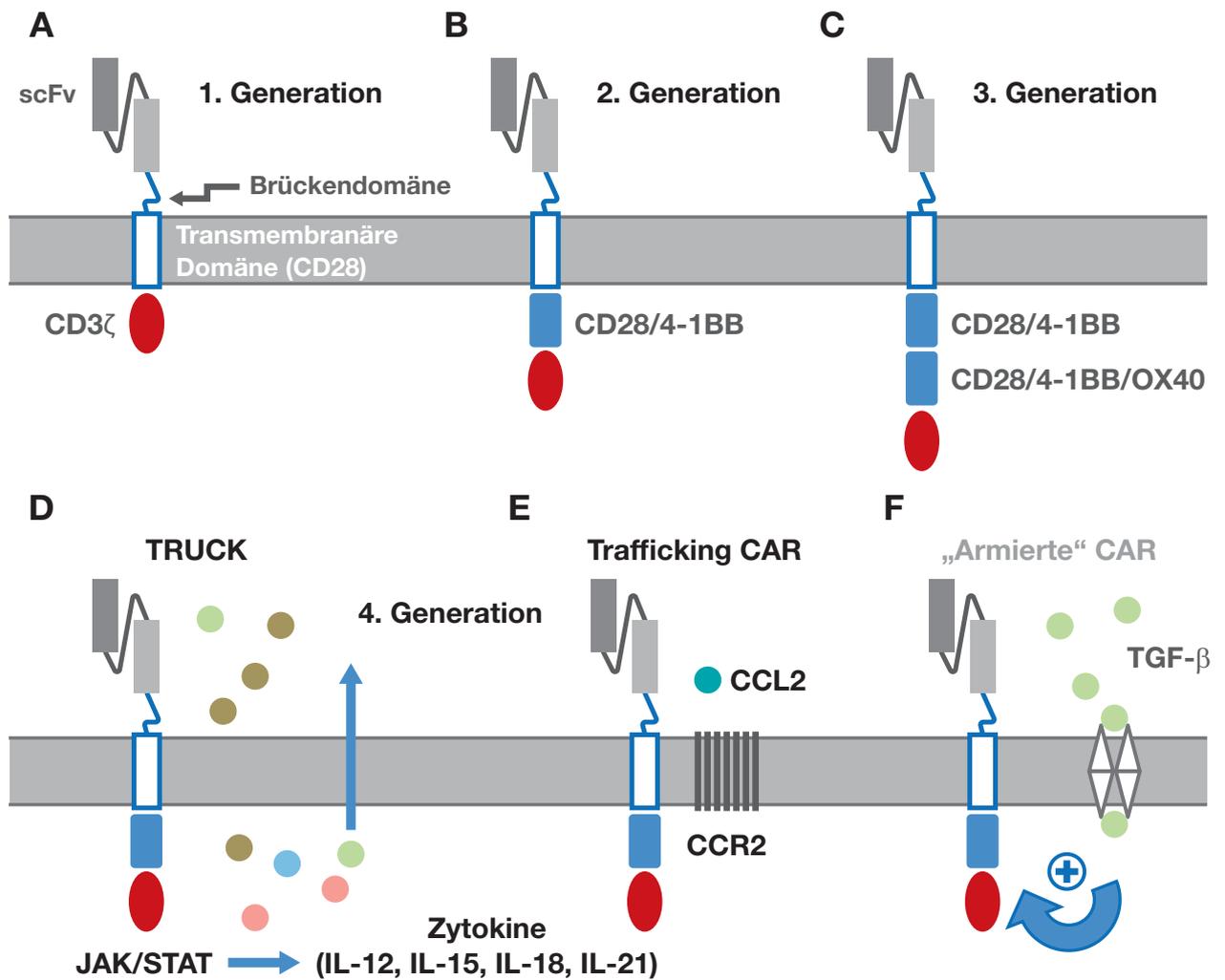
## CHIMÄRE ANTIGENREZEPTOREN

CARs bestehen typischerweise aus drei verschiedenen Modulen: i) der extrazellulären Antigen-Bindungsdo-

mäne, die spezifisch das Zielantigen erkennen und über eine Brückendomäne (Linker) mit ii) einer transmembranären Struktur verbunden ist, die den CAR in der Zellmembran verankert, und iii) einer oder mehreren intrazellulären Domänen, die für die Zellaktivierung verantwortlich sind<sup>3</sup> (**Abbildung 1A**). Während die Antigen-spezifische Domäne fast aller, einschließlich beider kommerzieller, CD19-CARs aus einem von den Antigen-bindenden Domänen eines Antikörpers abgeleiteten variablen Einzelkettenantikörperfragment (single chain variable fragment, scFv) besteht, leitet sich die transmembrane Domäne in der Regel von Molekülen ab, die eine kostimulatorische Rolle in der T-Zellfunktion spielen, wie z. B. dem CD4- oder CD8-Korezeptor des T-Zell-Rezeptor Komplexes<sup>4</sup>. Durch den CAR, der über einen retroviralen, lentiviralen oder virusfreien Gentransfer in die T-Zelle eingebracht wird, erhält die T-Zelle eine Antikörper-vermittelte Spezifität, die nicht Histokompatibilitäts-(HLA-)restringiert ist. Die Expression eines solchen chimären Antigenrezeptorkomplexes in Lymphozyten wurde bereits 1989 von Eshhar et al. beschrieben<sup>5</sup>. Weiterführende Arbeiten konnten zeigen, dass die Expression eines aus der extrazellulären und transmembranären Domäne von CD8 und der CD3 $\zeta$  bestehenden CARs eine Aktivierung von T-Zellen ermöglicht<sup>6</sup>. Seither wurde in zahlreichen präklinischen Arbeiten gegen eine Vielzahl potentieller Tumorantigene nachgewiesen, dass genetisch veränderte CAR-exprimierende T-Zellen in der Lage sind, Tumorzellen effektiv zu attackieren und abzutöten. Allerdings ließen sich diese ergebnisversprechenden Ergebnisse aus den präklinischen Modellen mit CAR-T-Zellen der ersten Generation wegen mangelnder in vivo Persistenz und Proliferation nicht in der Klinik verifizieren<sup>7</sup>. Um die Persistenz der transfundierten CAR-T-Zellen im Patienten zu verbessern, wurde eine weitere intrazelluläre aktivierende Domäne – wie die aktivierenden Domänen von CD28 – dem CAR-Konstrukt hinzugefügt<sup>8</sup>. CD28 gehört zu einer Familie kostimulatorischer Moleküle, die typischerweise auf T-Zellen in einem relativ frühen Differenzierungsstadium exprimiert werden. Die CD28 Liganden B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) werden physiologisch auf Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) exprimiert, fehlen aber auf vielen Tumorzellen, was die Effizienz der CARs der ersten Generation stark limitiert. CARs der zweiten Generation umgehen diese Limitierung, indem sie die Signaldomänen von CD28 mit der Domäne von CD3 $\zeta$  in einer Polypeptidkette desselben CARs verknüpfen<sup>9–12</sup> (**Abbildung 1B**). Diese Kombination von CD28 mit CD3 $\zeta$  in CARs der zweiten Generation bewirkt in genetisch modifizierten T-Zellen eine vollständige Zellaktivierung, eine vermehrte Freisetzung von IL-2 und eine

längere in vivo-Präsenz, sobald der CAR an ein passendes Antigen bindet. Neben CD28 können auch kostimulatorische Domänen der TNF-Rezeptor Familie, wie z. B. 4-1BB (CD137) oder OX40 (CD134) in denselben CAR-koexprimiert werden. Sofern diese zusammen mit CD28 und CD3 $\zeta$  in einem CAR kombiniert werden, spricht man von CARs der dritten Generation (**Abbildung 1C**).

Die möglicherweise immer noch unzureichende Wirksamkeit von CARs der zweiten und dritten Generation insbesondere gegen solide Tumore versucht man weiter zu verbessern, indem zusätzliche Domänen dem CAR-Konstrukt hinzugefügt werden, die Migration und Off-Tumor-Toxizität modulieren oder immunsuppressive Signale in Zell-aktivierende umwandeln<sup>3</sup> (**Abbildungen 1D, E und F**). Erste in vitro und präklinische Daten sind vielversprechend. Auch erste klinische Prüfungen laufen. So werden z. B. Prostata-spezifische Membranantigen (PSMA)-spezifische CAR-T-Zellen der vierten Generation bei Prostatakrebs klinisch erprobt (NCT03089203). Das hier verwendete CAR-Konstrukt ist mit einem mutierten dominant negativen TGF- $\beta$  Rezeptor ausgestattet, der es so „armierten“ CAR-T-Zellen ermöglichen soll, selbst im immunsuppressiven TME zu persistieren, sich zu teilen und zytotoxische antitumorale Funktionen auszuüben<sup>13</sup> (**Abbildung 1F**). Durch eine zusätzliche Expression von Chemokin-Rezeptoren, wie z. B. CCR2, kann sich die antitumorale Aktivität von CAR-T-Zellen erhöhen, die oftmals während der ex vivo Expansion die Expression von entsprechenden Chemokinrezeptoren verlieren (**Abbildung 1E**). So konnte in vitro gezeigt werden, dass genetisch veränderte CCR2-exprimierende CAR-T-Zellen, die gegen die Tumorantigene GD2 oder Mesothelin gerichtet waren, die Tumordinfiltration und Anti-Tumoraktivität bei Neuroblastomen<sup>14</sup> bzw. pleuralen Mesothelioma verstärkt<sup>15</sup>. Auch die Modulation der Expression verschiedener Zytokine, wie z. B. IL-12, IL-15, IL-18 oder IL-21, von CAR-T-Zellen kann insgesamt die Anti-Tumor-Aktivität des Immunsystems modulieren und verstärken (**Abbildung 1D**). In einem präklinischen Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass durch IL-18 produzierende CAR-T-Zellen die Transkriptionsfaktoren T-Bet und FoxO1 induziert werden, was wiederum die Tumordinfiltration von NKG2D+ natürlichen Killer (NK)-Zellen verstärkt und gleichzeitig zur Verminderung von immunsupprimierenden regulatorischen T-Zellen und Makrophagen beiträgt<sup>16</sup>. Ob sich diese vielversprechenden Ansätze zur Weiterentwicklung von CAR-T-Zellen mit größerer Persistenz und Wirksamkeit insbesondere auch gegen solide Tumore anwenden lassen, ist zurzeit noch nicht abzusehen.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung verschiedener CAR-Generationen.

CARs bestehen aus einer Antigen-bindenden extrazellulären Domäne, meist Antikörper-abgeleitet, die über eine Brückendomäne mit einer transmembranären Domäne verbunden ist, die den gesamten CAR stabil in der Zellmembran der T-Zelle verankert, und einer oder mehreren kostimulatorischen Signaldomänen, die der Aktivierung und dem Überleben der T-Zelle dienen. CARs der ersten Generation besitzen ausschließlich CD3ζ als Signaldomäne (A), während CARs der zweiten und dritten Generation über ein bzw. zwei weitere Signaldomänen verfügen, bei denen es sich in der Regel um aktivierende Signaldomänen von CD28 bzw. 4-1BB handelt (B und C). CARs der vierten Generation sind mit zusätzlichen Genen ausgestattet, die z. B. für die Expression von Zytokinen (D) oder Chemo-/Zytokinrezeptoren (E/F) kodieren, und es so „armierten“ CAR-T-Zellen ermöglichen, solide Tumore zu infiltrieren, und dort im immunsuppressiven TME zu überleben und ihre immunmodulierende oder zytotoxischen antitumoralen Funktionen auszuüben.

## GENERIERUNG VON CAR-T-ZELLEN, BRÜCKENTHERAPIE UND KONDITIONIERUNG

Klinische Dosen von CAR-T-Zellen können durch Transduktion primärer T-Zellen mit CAR-kodierenden retroviralen, lentiviralen Vektoren sowie mittels Elektroporation erzeugt werden. Dabei werden hochreine Fraktionen primärer T-Zellen als Ausgangsmaterial für die genetische Manipulation durch immunomagnetische Isolierung aus Leukapheresaten des Patienten gewonnen. Nach CAR-Gentransfer und Expansion in geeigneten Herstellungszentren werden CAR-exprimierende, autologe T-Zellen in der Regel kryokonserviert zu qualifizierten, stationären Behandlungszentren transportiert und nach Auftauen in konditionierte Krebspatienten retransfundiert. Die The-

rapie sollte unter der Leitung und Aufsicht von medizinischem Fachpersonal begonnen und für 28 Tage überwacht werden, das Erfahrung in der Behandlung von hämatologischen Malignomen besitzt und für die Anwendung und das Management von CAR-T-Zell-Therapien geschult ist. Sollten stationäre Überwachung und klinisches Management zur Vermeidung schwerer Nebenwirkungen der CAR-T-Zell-Therapie nicht praktikabel sein, ist eine Hospitalisierung anzustreben<sup>17</sup>.

Der Prozess der Generierung von CAR-T-Zellen beginnt mit der Gewinnung von Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Patienten mittels unstimulierter Leukapherese und wird gefolgt von Isolation und Aktivierung von T-Zellen, CAR-Gentransfer, Qualitätskontrolle sowie (meist) Kryokonservierung der generierten CAR-T-Zellen.

Während der Fertigstellung der CAR-T-Zellen wird ein weiteres Fortschreiten der Krebserkrankung mittels Chemotherapie sowie Immuntherapien im Rahmen einer sogenannten Brückentherapie kontrolliert; die Breite mit CAR-T-Zell-kompatibler Brückentherapien ist erheblich. Eine große Herausforderung hierbei ist, dass die Brückentherapien nicht den Erfolg der CAR-T-Zell-Therapie beeinträchtigen, d. h. typische Nebenwirkungen von Chemotherapien wie Infektionen, Blutungen oder Organschäden möglichst vermeiden soll. Auch die Folgen der sich anschließenden CAR-T-Zell-Therapie und der Lymphodepletion wie z. B. CRS, Enzephalopathie und Tumorlyse-Syndrom sollten berücksichtigt werden<sup>17</sup>. Drei bis fünf Tage vor der Transfusion von CAR-T-Zellen werden Krebspatienten mit lymphodepletierenden Medikamenten wie z. B. Fludarabin, Cyclophosphamid oder einer Ganzkörperbestrahlung konditioniert. Die Konditionierung ermöglicht das potenziell dauerhafte Überleben und die Vermehrung transfundierter CAR-T-Zellen im Krebspatienten und ist eine essentielle Voraussetzung für den Erfolg einer CAR-T-Zell-Therapie. Die wesentlichen Schritte der Erzeugung von CAR-T-Zellen und die Therapie sind in **Abbildung 2** dargestellt. Für eine detaillierte Zusammenfassung und Übersicht über den aktuellen Stand zum Management von Patienten unter CAR-T-Zell-Therapie sei an dieser Stelle auf kürzlich publizierte Richtlinien von Yakoub-Agha et al. verwiesen<sup>17</sup>.

## KLINISCHER NUTZEN VON CAR-T-ZELLEN

Erste klinische Erfahrungen mit CAR-T-Zellen wurden mit soliden Tumoren gemacht<sup>18,19</sup>, allerdings konnten überzeugende klinische Erfolge bisher überwiegend bei Patienten mit B-Zell-Leukämien mit CD19-spezifischen CARs der zweiten Generation erreicht werden<sup>20-22</sup>. Hohe Raten von kompletten Remissionen in Patienten mit akuter sowie chronischer r/r lymphatischer B-Zell-Leukämie (B-ALL/B-CLL) wurden nach Transfer von anti-CD19-spezifischen CAR-T-Zellen beobachtet<sup>21,23</sup>. Der weitere Einsatz von CAR-T-Zellen für die Therapie von B-CLL wurde allerdings durch die Entwicklung und Einführung einer ganzen Reihe von wirksamen und weit weniger aufwendigen Therapien mit Medikamenten wie Ibrutinib, Idelalisib, Venetoclas (ABT-199), Duvelisib (IPI-145) sowie Obinutuzumab zunächst verdrängt<sup>24</sup>.

Eine grundlegende Erkenntnis aus diesen frühen CAR-T-Zell-Studien war, dass der Konditionierung der Patienten vor CAR-T-Zell-Transfusion ein wesentlicher Anteil für den Erfolg der Therapie zukommt. Eine Lymphodepletion mit Cyclophosphamid vor T-Zell-Transfusion verbesserte die Ansprechrate bei Patienten mit B-CLL<sup>20</sup>. Bei einer weiteren Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Kombination aus Cyclophosphamid und Fludarabin zur Lymphodepletion der alleinigen Cyclophosphamid-Gabe bei

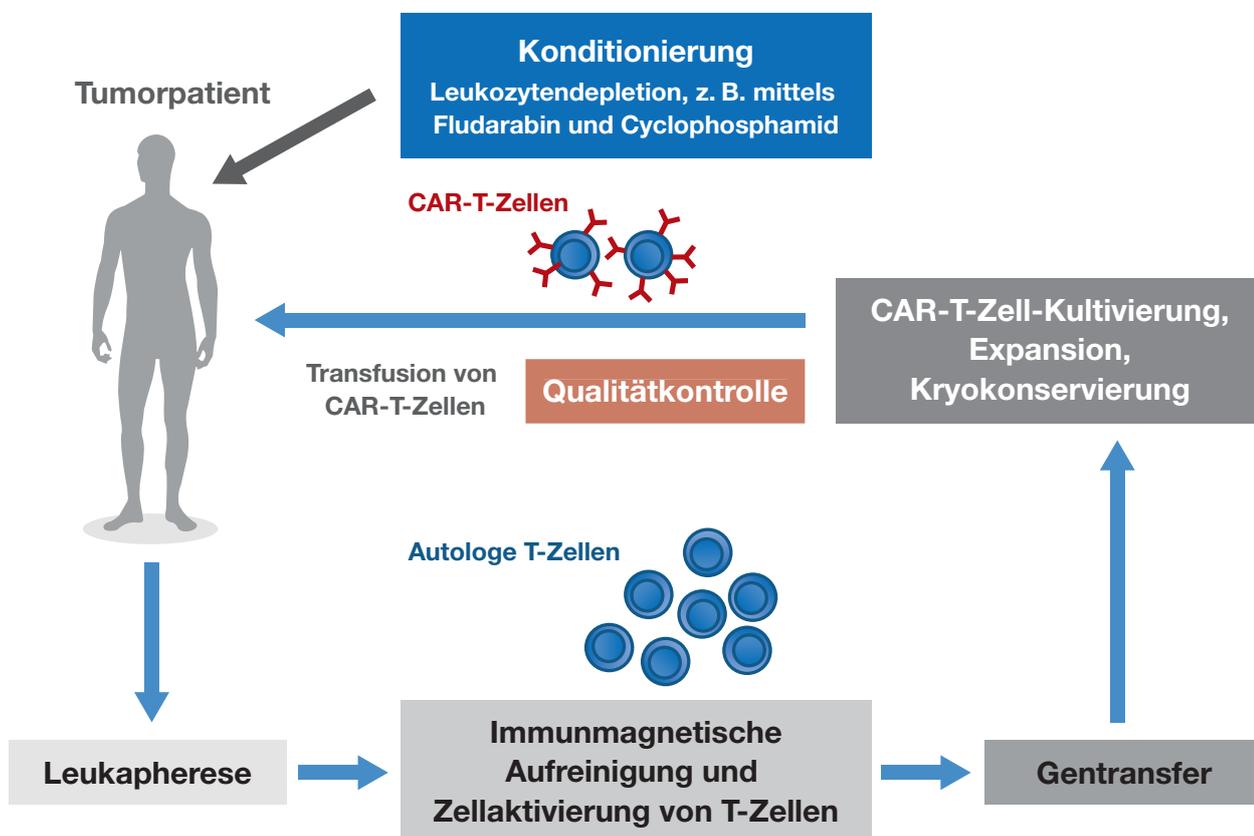


Abbildung 2: Herstellung und Therapie mit CAR-T-Zellen

Patienten mit B-ALL überlegen ist<sup>25</sup>. Insbesondere die Unterdrückung einer endogenen Immunantwort gegen CAR-T-Zellen durch eine Konditionierung mit Fludarabin scheint wesentlich die Abstoßung der transfundierten T-Zellen zu verhindern<sup>25</sup>.

Den bislang überzeugendsten klinischen Erfolg von CAR-T-Zellen konnte bei Patienten mit r/r B-ALL erzielt werden. Es wurde von kompletten, wenngleich mehrheitlich transienten Remissionsraten von 67–93 % berichtet<sup>26–30</sup>. Nach Transfusion und Antigenkontakt expandierten die CAR-T-Zellen in vivo, wobei die maximale Anzahl im peripheren Blut zirkulierender CAR-T-Zellen ein bis zwei Wochen nach Transfusion erreicht wurde. Gleichzeitig wurde eine kurzzeitige massive Zytokinfreisetzung sowie eine Abnahme der Blasten beobachtet. Nach einer Expansionsphase und Eliminierung der Blasten fiel die Anzahl von CAR-T-Zellen deutlich<sup>28</sup>. Die Stärke der T-Zell-Expansion korrelierte in allen Studien mit der klinischen Effektivität<sup>28</sup>. Non-responder zeigten die niedrigste Anzahl an CAR-T-Zellen im peripheren Blut. In den Fällen, in denen nach Erreichen einer kompletten Remission (complete remission, (CR)) Rezidive nachgewiesen werden konnte, war dies entweder mit dem Verlust der CD19-Expression, des

entsprechenden targetierten CD19-Epitops auf den Leukämiezellen oder, etwas häufiger, dem Verlust der transferten CAR-T-Zellen assoziiert<sup>26</sup>. Die Wirksamkeit der Transfusion von CD19-CAR-T-Zellen konnte nicht nur für die B-ALL sondern auch für weitere B-Zell-Neoplasien nachgewiesen werden, allerdings jedoch mit einer deutlich geringeren Rate an CR. In einer B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom (B-NHL) Studie, konnte ein Gesamtansprechen bei 15 von insgesamt 22 Patienten (68 %), davon 7/7 folliculäre Lymphome (FL) (100 %), 7/13 diffus großzellige B-Zell-Lymphome (diffuse large B cell lymphoma, DLBCL) (54 %) und 1/2 (50 %) Mantelzelllymphome gezeigt werden<sup>31</sup>. Weitere überzeugende Ansprechraten wurden in einer Studie erzielt, in der neun DLBCL-Patienten, zwei Patienten mit indolenten Lymphomen und vier mit CLL jeweils 4/7 DLBCL, 1/2 indolente Lymphome und 3/4 CLL CR erreichten. Die Rate an partiellen Remissionen (PR) lag bei 2/7 DLBCL, 1/2 (indolente Lymphome) und 1/4 CLL<sup>32</sup>. Im Rahmen einer weiteren Studie mit 28 B-NHL Patienten wurde wiederholt die große Bedeutung von Fludarabin im Kontext des Konditionierungsregimes für die CAR-T-Zell-Therapie gezeigt. Zwölf Patienten erhielten ausschließlich Cyclophosphamid als Konditionierung, 16 Patienten erhielten zusätzlich Fludarabin. In der Cyclophosphamid-

| STUDIE         | ZUMA-1<br>(Axicabtagene Ciloleucl)        | JULIET<br>(Tisagenlecleucl)                                       | TRANSCEND<br>(Lisocabtagene Maraleucl)                       |
|----------------|---|---|--|
| Hersteller     | Kite/Gilead                               | Novartis  | Juno/Celgene   |
| Patienten      | Adulte Patienten mit r/r DLBCL- und PMBCL | Patienten <25 Jahren mit r/r ALL; Adulte Patienten mit r/r DLBCL. | Adulte Patienten mit r/r B-Zell NHL, DLBCL, MCL, PMBCL u. a. |
| Anzahl         | 101                                       | 111   | 114  |
| Wirksamkeit    | (Locke et al., 2019) Referenz 34          | (Schuster et al., 2018) Referenz 36                               | (Abramson et al., 2018) Referenz 37                          |
| Best ORR (CR)  | 82 % (54 %)                               | 52 % (40 %)   | 80 % (59 %)  |
| Nach 6 Monaten | 41 % (36 %)                               | 33 % (29 %)   | 47 % (41 %)  |
| 12-mon. PFS    | 44 %                                      | 66 %  | NB   |
| 18-mon. PFS    | 40 %                                      | 64 %  | NB   |
| 12-mon OS      | 59 %                                      | 49 %  | 63 %   |
| 18-mon OS      | 53 %                                      | 43 %  | NB   |
| 24-mon OS      | 51 %                                      | NB  | NB   |

**Tabelle 1:** Übersicht Multizentrische klinische Studien mit autologen anti-CD19-CAR-T-Zell-Therapien von B-Zell-Lymphomen  
Progressionsfreies Überleben (PFS), Gesamtüberleben (overall survival (OS)), nicht berichtet (NB), Gesamtansprechraten (objective response rate (ORR)), vollständige Remission (complete remission (CR)), diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL), primäres mediastinales B-Zell-Lymphom (PMBCL), Non-Hodgkin-Lymphom (NHL), Mantelzell-Lymphom (MCL)

Gruppe wurde eine Ansprechrate von 50 % erreicht<sup>33</sup>. In der Gruppe mit kombinierter Cyclophosphamid- und Fludarabin-Gabe verbesserte sich das Gesamtansprechen auf 67 %. Eine Studie mit CARs der zweiten Generation an 14 Patienten mit CLL ergab vier (29 %) CR und vier (29 %) PR<sup>34</sup>.

Diese vielversprechenden Ergebnisse kleinerer Studien sind von zulassungsrelevanten, multizentrischen klinischen Phase I/II Studien mit jeweils mehr als 100 teilnehmenden Patienten bestätigt worden (**Tabelle 1**). In der multizentrischen ZUMA-1 Studie wurden insgesamt 111 Patienten aufgenommen, von denen circa 70 % einen refraktären Verlauf ihrer Lymphome nach mindestens drei Therapielinien zeigten. Nach Therapie mit CD19-CD28-CD3 $\zeta$ -CARs von 101 Patienten wurde eine Gesamtansprechrate von 83 % und eine CR von 54 % gefunden<sup>35</sup>. Nach zwölf Monaten wurde eine Gesamtüberlebensrate von 59 % und nach 24 Monaten eine von 51 % festgestellt, was im Vergleich zur historischen SCHOLAR-1 Studie vor Verfügbarkeit von CAR-T-Zellen, bei der eine Gesamtüberlebensrate von 20 % bei Patienten nach 24 Monaten berichtet wurde<sup>36</sup>, eine signifikante Verbesserung der Therapie von Patienten mit r/r mit B-Zell-Lymphomen darstellt<sup>37</sup>. In einer zweiten multizentrischen Phase II Studie (JULIET), bei der CD19-CAR-T-Zellen zur Therapie von B-Zell-Lymphomen hergestellt aus kryokonservierten Leukapheresen zum Einsatz kamen, wurde ein CD19-4-1BB-CD3 $\zeta$ -CAR verwendet. Die Gesamtansprechrate von den insgesamt 99 auswertbaren Patienten betrug 54 %, wobei 40 % der Patienten eine CR aufwiesen. Nach zwölf bzw. 18 Monaten wurde eine Gesamtüberlebensrate von 49 % bzw. 43 % festgestellt. Es wurde zudem eine zur ZUMA-1-Studie vergleichbare Konversion von 15/28 Patienten mit PR zu einer CR berichtet<sup>38</sup>. In einer weiteren

multizentrischen Studie (TRANSCEND), bei der wie bei der JULIET-Studie ein CD19-4-1BB-CD3 $\zeta$ -CAR der zweiten Generation zur Verwendung kommt, werden zur Therapie der r/r B-Zell-Lymphome CD19-CAR-T-Zellen mit einem definierten Verhältnis von CD4+ und CD8+ T-Zellen hergestellt. Bisher konnten bei auswertbaren Patienten eine Gesamtüberlebensrate von 63 % nach zwölf Monaten festgestellt werden<sup>39</sup>. Nach Einschluss von 342 Patienten in die TRANSCEND-Studie, von denen 268 Patienten CAR-T-Zellen erhielten (78 %), wurde von einer Gesamtansprechrate von 73 % und CR von 53 % berichtet<sup>40</sup>. Daten zur Gesamtüberlebensrate nach 24 Monaten sind bisher nicht veröffentlicht worden. Die ZUMA-1- und JULIET-Präparate sind seit 2018 in Europa unter den Namen Tisagenlecleucel (Kymriah) und Axicabtagen Ciloleucel (Yescarta) (**Tabelle 2**) für die Behandlung von Patienten mit juveniler B-ALL, DLBCL oder einem primär mediastinalen B-Zell-Lymphom (PMBCL) nach zwei oder mehr Linien einer systemischen Therapie zugelassen; die Zulassung des TRANSCEND-Präparates als drittes CD19-targetierendes CAR-T-Zell-Präparat wird für 2020 erwartet.

Diese Studien zeigen eindrucksvoll, dass für Patienten mit therapie-refraktären B-Zell-Neoplasien in autologen CD19-CAR-T-Zellen eine hocheffektive neue Therapieoption zur Verfügung steht. Bezüglich der vergleichenden Wertigkeit der Präparate in bestimmten klinischen Szenarien wird von den anwendenden Klinikern über Registerstudien Aufklärung erwartet. Offenbar bewerten Kostenträger die Präparate als austauschbar und klinische Anwendbarkeit wird derzeit noch wesentlich von der zeitnahen Verfügbarkeit eines Herstellungsslots abhängig gemacht.

|                      | Tisagenlecleucel (Kymriah)<br>Novartis   | Axicabtagene Ciloleucel (Yescarta)<br>Gilead  |
|----------------------|--|---|
| <b>CAR-Konstrukt</b> | CD19-4-1BB-CD3 $\zeta$   | CD19-CD28-CD3 $\zeta$   |
| <b>Indikationen</b>  | Kinder oder Erwachsene < 25 Jahren mit r/r ALL, adulte Patienten mit r/r DLBCL nach zwei oder mehr Linien einer systemischen Therapie. | Adulte Patienten mit r/r DLBCL oder PMBCL nach zwei oder mehr Linien einer systemischen Therapie. |
| <b>Vektorsystem</b>  | Lentiviral   | Retroviral  |
| <b>Kosten*</b>       | 320.000 €  | 327.000 €   |

\* Deutsche Apotheker Zeitung (März 2019)

**Tabelle 2:** Kymriah und Yescarta

## CAR-T-ZELLTHERAPIE ASSOZIIERTE SCHWERWIEGENDE NEBENWIRKUNGEN

Der adoptive CD19-CAR-T-Zelltransfer wird häufig mit erheblichen Nebenwirkungen wie einem Tumorlyse-Syndrom, zentralnervösen Nebenwirkungen sowie Infektionen begleitet<sup>26</sup>. Die klinisch bedeutendste Komplikation nach Infusion von CAR-T-Zellen ist jedoch das Zytokin-Freisetzungssyndrom (cytokine release syndrome (CRS)), wie es auch nach Infusion medizinischer Anti-Tumor-Antikörper auftreten kann<sup>41</sup>. CRS ist eine systemische Entzündungsreaktion, die durch überschießende Zytokinfreisetzung hervorgerufen wird<sup>42</sup>. Während das CRS nach Transfusion monoklonaler Antikörper meist Minuten bis wenigen Stunden nach Infusion auftritt, zeigen sich nach adoptiven T-Zell-Transfers Symptome begleitet von einem deutlichen Anstieg proinflammatorischer Zytokine, insbesondere IL-6 und IFN- $\gamma$ , typischerweise erst nach einigen Tagen in denen die CAR-T-Zellen massiv proliferieren und nach Kontakt mit ihrem Zielantigen aktiviert werden. Eine hohe Tumorlast sowie hohe Dosen transfundierter CAR-T-Zellen sind Risikofaktoren für das Auftreten eines CRS<sup>26,43</sup>. Die systemische Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie z. B. IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  durch Aktivierung der CAR-T-Zellen kann auch weitere schädliche Aktivierungen des Immunsystems der Patienten auslösen. Klinische Symptome des CRS sind Fieber, Hypoxie und Hypotension. Von CAR-T-Zellen freigesetztes IL-6 wird hierbei als Hauptverursacher für diese Reaktion verantwortlich gemacht<sup>22,23,29</sup>. Tatsächlich wurden schwerwiegende, lebensbedrohliche CRS in Patienten mit B-ALL beobachtet, wobei sich klinische Ähnlichkeit mit einem Makrophagenaktivierungssyndrom bzw. einer hämophagozytischen Lymphohistiozytose zeigten. Patienten mit diesen Komplikationen hatten besonders hohe IL-6 Plasmaspiegel<sup>26</sup>. Hohe C-reaktive Protein (CRP)-Plasmaspiegel korrelieren ebenfalls mit dem Schweregrad der CRS und können daher als Marker für Therapie und unterstützende therapeutische Maßnahmen genutzt werden<sup>43</sup>. In zwei präklinischen Studien konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass ein Anstieg von IL-1 dem von IL-6 vorausgeht und durch eine IL-1-Blockade möglicherweise ein CRS und eine Neurotoxizität vermieden werden können<sup>44, 45</sup>. Wichtigster Faktor für die erfolgreiche Behandlung des CRS ist eine frühzeitige Diagnose und genaue Klassifizierung des Schweregrades der Erkrankung. Die Klassifizierung des Schweregrades des CRS erfolgt entsprechend des „Common Terminology for Adverse Events (CTCAE)“ des National Cancer Institute. Da diese für die Klassifizierung von unerwünschten Arzneimittelwirkungen nach Antikörperinfusion entwickelt wurden, wurde für das CRS nach T-Zell-Therapie eine modifizierte Version der CTCAE-

Klassifizierung vorgeschlagen<sup>46</sup>.

- Grad 1 beschreibt milde Symptomatik mit Fieber, Übelkeit, Müdigkeit, Kopfschmerzen und Myalgien bei kardiopulmonal stabilen Patienten;
- Grad 2 besteht bei zusätzlichem Auftreten von Hypotension oder Hypoxämie, die auf Sauerstoffgaben und Volumensubstitution bzw. niedrig dosierte Katecholamingaben ansprechen;
- hoher Katecholaminbedarf oder Grad 3 Endorganschäden bzw. Grad 4 Transaminasenanstieg werden als Grad 3 klassifiziert,
- die Notwendigkeit einer invasiven Beatmung oder Grad 4 Endorganschäden – mit der Ausnahme eines Grad 4 Transaminasenanstiegs – als Grad 4.

Bei Auftreten eines CRS  $\geq$  Grad 2 wird die Einleitung einer immunsuppressiven Therapie empfohlen<sup>17,46</sup>. Da IL-6 eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des CRS nach CAR-T-Zell-Infusion spielt, führt die therapeutische Blockade des IL-6-Signalwegs mit dem IL-6-Rezeptor-blockierenden Antikörper Tocilizumab oder einem neutralisierenden anti-IL-6 Antikörper (Siltuximab) in der Regel zur raschen Kontrolle der CRS-Symptomatik, ohne immun-supprimierende negative Effekte auf die gesamte zelluläre Immunität – insbesondere der antitumoralen Immunität der CAR-T-Zellen – was beim Einsatz von Glucocorticoiden temporär zu beobachten ist<sup>43</sup>. Daher wird der Einsatz von Glucocorticoiden aktuell nur bei Versagen von Tocilizumab für initial schweren Verlaufsformen eines CRS oder bei Neurotoxizität empfohlen<sup>46,47</sup>. Diese Empfehlungen unterliegen derzeit häufig Modifikationen entsprechend neuer Erfahrungen in der Anwendung. Nach Transfer von CAR-T-Zellen wurden auch Vigilanzminderung, Verwirrtheit, Aphasie, Myoklonien und weitere zentralnervöse Symptome beschrieben, die nicht eindeutig einem CRS zu zuordnen sind. Diese sind meist spontan reversibel<sup>32</sup>. Die Genese dieser zum Teil schwerwiegenden Neurotoxizität ist noch nicht bekannt; der Umstand, dass sie vorwiegend bei CD19-CAR-T-Zell-Therapie, seltener bei anderen molekularen Targets, zu beobachten ist, lässt On-target-off-organ Toxizität etwa infolge einer CD19 Expression auf zentralnervösen Strukturen vermuten, die allerdings mit konventionellen Techniken nicht nachzuweisen ist. Die Expression von CD19 auf normalen B-Zellen führt bei Patienten, die auf die CAR-T-Zell-Therapie ansprechen, zu einer begleitenden B-Zell-Aplasie, so lange die CAR-T-Zellen persistieren. Diese kann sich über mehrere Jahre erstrecken [26]. Bei persistierender B-Zell-Aplasie kann eine Substitution mit Immunglobulinen sinnvoll sein. Die Therapie mit CD19-spezifischen

CAR-T-Zellen kann mit schweren, teilweise lebensbedrohlichen, Komplikationen einhergehen, deren adäquate Diagnostik und Therapie Personal mit Erfahrung in der Applikation von T-Zelltherapien erfordert; eine Akkreditierung von CAR-T-Therapiezentren für die Anwendung von Immuneffektorzellen wird dementsprechend durch JACIE empfohlen. Nach Transfusion von CAR-T-Zellen können schwere Nebenwirkungen beobachtet werden, die zum Teil auf die Zieldomäne der CAR-T-Zellen zurückgeführt werden. Diese unter dem Begriff der „On-target-off-organ“-Aktivierung von CAR-T-Zellen zusammengefassten Nebenwirkungen ergeben sich insbesondere dann, wenn das Zielantigen der CAR-T-Zellen nicht ausschließlich auf Tumorzellen exprimiert wird. Dies bezeichnet die oben beschriebene B-Zell-Aplasie nach CD19-CAR-T-Therapie, wird zum Beispiel bei CARs gegen Her2/neu (ErbB2)-Antigen beobachtet, welches auf einigen soliden Tumoren (Kolon-, Mammakarzinom u.a.) überexprimiert wird, aber ubiquitär in geringen Dichten auch auf gesundem Gewebe, wie Myokard, Lungenepithel und Lebergewebe. Ein Todesfall nach Anti-Her2/neu spezifischer CAR-T-Zelltherapie ist auf derartige „On-target-off-organ“-Nebenwirkungen bei einem Patienten mit Kolonkarzinom zurückzuführen, der unter einer Therapie mit Anti-Her2-CAR-T-Zellen ein tödlich verlaufendes akutes Lungensyndrom erlitt<sup>48</sup>. Die Lymphodepletion vor CAR-T-Zell-Therapie gilt ebenfalls als begünstigender Faktor für Infektionen. Ein Fall mit letalem Verlauf nach CAR-T-Zell-Therapie wird darauf zurückgeführt, dass es im Rahmen der Lymphodepletion als Begleittherapie der CAR-T-Zell-Therapie in einem Patienten mit CD19+ CLL zu einer Ausbreitung einer mutmaßlich latent vorbestehenden bakteriellen Infektion kam, in deren Folge der Patient an einer Sepsis verstarb<sup>49</sup>.

## AUSBLICK

Das große therapeutische Potential von CAR-T-Zell-Therapien hat sich bisher insbesondere bei Patienten mit bestimmten r/r B-Zell-Lymphomen gezeigt. Die fast regelmäßig zu beobachtenden schweren Nebenwirkungen sind durch engmaschige Überwachung und verschiedene Therapien mittlerweile in der Regel gut zu beherrschen. Mögliche langfristige Folgeschäden durch CAR-T-Zell-Therapien sind allerdings weitgehend ungeklärt. Von der europäischen Zulassungsbehörde werden auf Basis von Risikoabschätzungen als potentielle langfristige Komplikationen der derzeit zugelassenen CAR-T-Zell-Präparate eine für die Dauer der Persistenz der CD19-CAR-T-Zellen anhaltende Immunschwäche (B-Zell-Aplasie), Sekundärtumore und Autoimmunerkrankungen aufgeführt; derzeit

liegen keine Langzeitdaten vor, die diese Risiken bestätigen oder ausschließen könnten. Zurzeit kann auch noch nicht abschließend beurteilt werden, ob CAR-T-Zell-Therapien alleine geeignet sind, eine dauerhafte Heilung von Krebspatienten ohne allogene hämatopoetische Stammzelltransplantationen herbeizuführen. Um die den Zulassungsinhabern auferlegte Langzeitnachverfolgung der Patienten für mindestens 15 Jahre zu gewährleisten, wird bei der Europäischen Gesellschaft für Blut und Knochenmarktransplantation (European Society for Blood and Marrow Transplantation, (EBMT)) ein Register eingerichtet, in das die CAR-T-Zell-Anwender klinische Daten einzutragen angehalten sind. Aus den bisherigen klinischen Erfahrungen mit CD19-CAR-T-Zellprodukten kann man ableiten, dass zur Erzielung therapeutischer Effekte:

- i) eine chemotherapeutische Lymphodepletion für eine in vivo Persistenz und Expansion der CAR-T-Zellen als Vorbehandlung der Patienten erforderlich ist,
- ii) das therapeutische Ansprechen bei Überschreiten nicht streng mit der initial transfundierten Anzahl der CAR-T-Zellen korreliert,
- iii) die in vivo Persistenz und Expansion der CAR-T-Zellen für ein nachhaltiges therapeutisches Ansprechen bei B-ALL notwendig ist und
- iv) ein CRS ausgelöst durch massive Aktivierung der CAR-T-Zellen bei Patienten mit dramatischem Ansprechen auf die CAR-T-Zelltherapie die bedeutendste Komplikation darstellt, sich jedoch mit der therapeutischen Blockade des IL-6-Signalwegs mit dem IL-6-Rezeptor-Antikörper Tocilizumab gut beherrschen lässt.

Eine Vielzahl weiterer klinischer Studien unter Verwendung von CARs u. a. gerichtet gegen die Antigene CD20 und CD22 für die Therapie von B-Zell-Lymphomen, CD30, sowie CD33 für die Behandlung von akuten myeloiden Leukämien (AML) und BCMA für die Therapie von Multiplen Myelomen, sind derzeit in Vorbereitung oder rekrutieren bereits. Insbesondere im Hinblick auf den therapeutischen Nutzen von CAR-T-Zell-Therapien bei soliden Tumoren bleibt abzuwarten, ob sich patientenrelevante klinische Ansprechraten mit CARs (ggf. der vierten Generation) erzielen lassen. Trotz des großen Erfolgs und der damit verbundenen hohen Erwartungen unterliegt die CAR-T-Zell-Therapie verschiedenen Einschränkungen. Die Kosten für eine CD19-CAR-T-Zell-Dosis (Kymriah/ Yescarta) belaufen sich zurzeit in Europa auf circa 320.000,- €. Kosten für Krankenhausaufenthalt sowie weiterer therapeutischer Maßnahmen sind hierbei noch nicht berücksichtigt. Bei der JULIET-Studie wurden für die benötigte Herstellungsdauer klinischer Dosen von

durchschnittlich sieben bis acht Wochen bzw. von drei bis vier Wochen bei der ZUMA-1-Studie berichtet. Während dieser Zeit schieden circa 30 % der ursprünglich eingeschlossenen Patienten aus der JULIET-Studie wegen Progression der Erkrankung oder Tod<sup>50</sup> aus. Aktuell wird von kürzeren Produktionszeiten für CAR-T-Zellen von zwei bis drei Wochen ausgegangen<sup>51,52</sup>, wodurch

schiedener Bites können mehrere Tumorantigene adressiert werden, wodurch auf ein „Tumorescape“ durch Verlust der Expression einzelner Tumorantigene wesentlich schneller reagiert werden kann. Allerdings beträgt die Halbwertszeit von Bites in Patienten nur wenige Stunden, so dass täglich mehrere Infusionen erforderlich sind. Im Gegensatz zur CAR-T-Zell-Therapie generiert die The-



#### QUELLEN UND KONTAKTE:

Nähere Informationen zu CD19-CAR-T-Zell-Therapien können beim Krebsinformationsdienst des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) eingeholt werden:

([krebsinformationsdienst.med](http://krebsinformationsdienst.med)) oder [kid.med@dkfz.de](mailto:kid.med@dkfz.de).

Nähere Informationen der Europäischen-Kommission zu Tisagenlecleucel finden Sie unter:

<http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/h1297.htm>

und zu Axicabtagen Ciloleucel unter:

<http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/h1299.htm>

ein höherer Anteil von Patienten behandelt werden kann. Allerdings verzögern aufwendige Qualitätskontrollen der CAR-T-Zell-Produkte den therapeutischen Einsatz um mindestens eine bis zwei weitere Wochen. Die Qualität der klinischen Dosen kann wegen stark schwankender Zusammensetzung, Anzahl und Funktionalität von T-Zellen sowie Effizienz des CAR-Gentransfers erheblich variieren<sup>53</sup>. Die aufwendige Herstellung von wirksamen klinischen Dosen kann fehlschlagen. Dies war für sieben Prozent der Patienten der Grund für das Ausscheiden aus der JULIET-Studie<sup>50</sup> und für zwei Prozent aus der TRANSCEND-Studie<sup>40</sup>.

Auch die Konkurrenzsituation ist zu betrachten. Klinische Studien mit sogenannten „bispezifischen T-Zell-Engagern“ (bispecific T-cell engagers, kurz: Bites), mit deren Hilfe ebenfalls autologe T-Zellen des Patienten gegen Tumorzellen neu ausgerichtet werden, belegen deren klinischen Nutzen. Bites sind eine relative günstige und jederzeit verfügbare Alternative oder Ergänzung zur Therapie mit CAR-T-Zellen. Bei der Anwendung von Bites entfällt die komplexe und zeitaufwendige Gewinnung und genetische Modifikation von autologen T-Zellen. Bites bestehen aus miteinander verbundenen variablen Einzelkettenfragmenten von Antikörpern, die spezifisch gegen anti-CD3 und ein entsprechendes Tumorantigen gerichtet sind. Nach Infusion vermitteln Bites einen direkten Kontakt zwischen Tumorzelle und CD3-exprimierender T-Zelle, wodurch die Lyse der Tumorzelle initiiert wird. Durch Infusionen ver-

rapie mit Bites kein dauerhaftes, antitumorales T-Zell-Gedächtnis, ist dafür aber zur schnellen Reduktion der Tumormasse geeignet. Allerdings ist – wie schon erwähnt – bei mehrfach vorbehandelten Tumorpatienten die Anzahl und Funktionalität autologer T-Zellen stark beeinträchtigt, was die Wirksamkeit von Bites stark einschränken kann.

Das Risiko eines Tumorescapes bedingt durch den Verlust des Zielantigens bzw. Epitops, die eine Ursache für die limitierte Wirksamkeit von CD19-CAR-T-Zell-Therapien darstellt<sup>54,55</sup>, kann zumindest konzeptionell durch die gleichzeitige Verwendung mehrerer CARs, die gegen weitere B-Zell-Oberflächenantigene wie CD20 oder CD22 gerichtet sind, begegnet werden<sup>56</sup>. Die Herstellung und die Therapie mit multiplen CAR-exprimierenden T-Zellen erhöht die Komplexität der CAR-T-Zell-Therapie jedoch erheblich. Des Weiteren werden zur Steigerung der Persistenz und Funktionalität von CAR-T-Zellen während der Zellkultur Phosphoinositid-3-Kinase-Inhibitoren jüngst in klinischen Studien eingesetzt<sup>57</sup>. Allogene Donorlymphozyten, aber auch embryonale oder induzierte pluripotente Stammzellen, bieten potenziell eine Alternative zur Verwendung autologer T-Zellen, deren reduzierte Funktionalität und Zahl nach mehreren immunsuppressiven Tumorthérapien die Herstellung wirksamer Dosen von CAR-T-Zellen erheblich erschweren kann. Jedoch ist die Verwendung von allogenen CAR-T-Zellen aufgrund potenziell schwerwiegender Nebenwirkungen (GvHD etc.), fehlender klinischer Erprobung oder Zulassung für

die meisten Krebspatienten derzeit noch keine therapeutische Option. Zielgerichteter Austausch oder Herunterregulierung von T-Zell-Rezeptor-Genen oder MHC könnte zukünftig den therapeutischen Einsatz von allogenen T-Zellen ermöglichen<sup>58</sup>. Ebenfalls „Off-the-Shelf“ erzeugte therapeutische Dosen primärer allogener CAR-exprimierender NK-Zellen oder NK92-Zellen, deren Funktionalität nicht durch mehrfache Tumorthérapien beeinträchtigt ist, könnten in Zukunft für rasche Behandlungen von Patienten mit sehr kritischem Verlauf genutzt werden, sofern eine Persistenz der Zellen für die Krankheitskontrolle nicht höchste Priorität besitzt<sup>59</sup>.

## Die Autoren



**Dr. rer. nat. Marcus Odendahl**  
Wissenschaftlicher Mitarbeiter  
DRK-Blutspendedienst Nord-Ost gemeinnützige GmbH  
m.odendahl@blutspende.de



**Prof. Dr. med. Halvard Böning**  
Leiter der Abteilung für Zelltherapeutika / Cell Processing (GMP)  
DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gemeinnützige GmbH  
h.boenig@blutspende.de



**Jiri Eitler, PhD**  
Wissenschaftlicher Mitarbeiter  
DRK-Blutspendedienst Nord-Ost gemeinnützige GmbH  
j.eitler@blutspende.de



**Prof. Dr. med. Torsten Tonn**  
Medizinischer Geschäftsführer  
DRK-Blutspendedienst Nord-Ost gemeinnützige GmbH  
t.tonn@blutspende.de

Die Literaturhinweise zu diesem Artikel finden Sie im Internet zum Download unter: [www.drk-haemotherapie.de](http://www.drk-haemotherapie.de)