



HAL
open science

IL-1RAP, un candidat pour l'immunothérapie par CAR T-cells

Mathieu Neto da Rocha, Rim Trad, Walid Warda, Rafik Haderbache, Lucie Bouquet, Clémentine Nicod, Marina Deschamps, Christophe Ferrand

► **To cite this version:**

Mathieu Neto da Rocha, Rim Trad, Walid Warda, Rafik Haderbache, Lucie Bouquet, et al.. IL-1RAP, un candidat pour l'immunothérapie par CAR T-cells. *Médecine/Sciences*, 2019, 35 (6-7), pp.497-500. 10.1051/medsci/2019105 . hal-02970066

HAL Id: hal-02970066

<https://hal.science/hal-02970066v1>

Submitted on 17 Oct 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



IL-1RAP, un candidat pour l'immunothérapie par CAR T-cells

Mathieu Neto Da Rocha, Rim Trad, Walid Warda, Rafik Haderbache, Lucie Bouquet, Clémentine Nicod, Marina Deschamps, Christophe Ferrand

Établissement français du sang de Bourgogne Franche-Comté, Inserm UMR1098 - Université de Bourgogne Franche-Comté, 8, rue du Dr Jean-François-Xavier Girod, BP1937, 25020 Besançon, France.
christophe.ferrand@efs.sante.fr

Immunothérapie cellulaire et CAR T-cells

Les lymphocytes T (LT) circulants ou infiltrant la tumeur et les cellules NK (*natural killer*) sont les acteurs cellulaires majeurs de l'immuno-surveillance des cancers. En cas de progression tumorale, différentes immunothérapies modulatrices peuvent être proposées, comme l'utilisation de cytokines, l'inhibition des points de contrôle immunitaire, l'injection de cellules immuno-compétentes autologues ou allogéniques (c'est-à-dire une greffe de cellules souches hématopoïétiques [CSH]) modifiées ou non. Une possibilité est de renforcer des LT par génie génétique, en leur faisant exprimer un récepteur chimérique (*chimeric antigen receptor*, CAR) spécifique d'antigènes exprimés par les cellules tumorales, afin de les rediriger et de les activer contre la tumeur. Un CAR est composé d'un domaine de reconnaissance extracellulaire (*single chain fragment variable*, scFv) dérivé d'un anticorps monoclonal (*monoclonal antibody*, mAb) dirigé contre l'antigène tumoral ciblé, d'une région charnière, d'un domaine transmembranaire, et du domaine d'activation T intracellulaire de CD3 ζ associé à plusieurs domaines de co-stimulation (CD28, 4.1BB, ou OX40) destinés à augmenter l'activation des LT [12] (→).

(→) Voir la Synthèse de V. Catros, m/s n° 4, avril 2019, page 316

L'utilisation thérapeutique de ces CAR T-cells a constitué une véritable révolu-

tion dans le traitement des hémopathies malignes lymphoïdes B réfractaires au traitement ou en rechute, ou encore en situation d'impasse thérapeutique, en ciblant l'antigène CD19¹ dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) [1], les lymphomes, ou le myélome multiple. Les taux élevés de rémission observés ont d'ailleurs conduit à l'autorisation de mise sur le marché de deux médicaments dans le cadre des thérapies innovantes (Kymriah®, des laboratoires Novartis, et Yescarta®, des laboratoires Gilead) [13] (→).

(→) Voir la Chronique génomique de B. Jordan, m/s n° 11, novembre 2017, page 1003

L'utilisation de CAR T-cells ciblant divers antigènes (CD123, FLT3 [*Fms-like tyrosine kinase 3*], CD33, CLL-1 [*C-type lectin-like molecule-1*], etc.) est actuellement proposée dans des essais pré-cliniques pour le traitement des leucémies aiguës myéloblastiques (LAM), mais la cible antigénique idéale n'a pas encore été identifiée.

La protéine IL-1RAP, un biomarqueur potentiel de certaines leucémies et tumeurs solides

La protéine membranaire accessoire du récepteur de l'interleukine 1 (*IL-1 receptor accessory protein*, ou IL-1RAP) s'associe aux récepteurs de l'IL-1 α , l'IL-1 β ,

et de l'IL-33, et est indispensable à leur signalisation, conduisant à un état pro-inflammatoire. Elle appartient à la famille de l'IL-1, qui est sécrétée très tôt au cours de la réponse immunitaire par les cellules dendritiques, les monocytes, et les macrophages. Il existe cinq variants d'épissage de l'ARNm de cette protéine, qui codent trois isoformes membranaires et deux isoformes solubles. Il a aussi été montré que l'IL-1RAP s'associe à deux récepteurs tyrosine kinase, FLT3 et c-KIT (*stem cell factor receptor*), et favorise ainsi la prolifération des cellules tumorales dans la LAM [2].

Le profil d'expression d'un groupe de gènes, dont le gène *IL-1RAP*, permet de discriminer les cellules souches hématopoïétiques normales de celles de leucémie myéloïde chronique (LMC). Dans ces cellules, la transduction de la séquence oncogénique p210 *BCR-ABL*² est à l'origine d'une augmentation de l'expression membranaire d'IL-1RAP, et les cellules LMC persistant après traitement par des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) expriment toujours IL-1RAP à leur surface, bien que plus faiblement [3]. L'expression d'IL-1RAP a été aussi identifiée comme un biomar-

² Le gène de fusion *BCR-ABL*, aussi appelé chromosome Philadelphie ou chromosome Ph1, est le résultat d'une translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22. La transcription de ce gène de fusion produit plusieurs protéines chimériques, dont une de 210 kDa, la p210 *BCR-ABL*, qui présente une activité tyrosine kinase dérégulée.

¹ CD19 est l'un des co-récepteurs qui modulent la réponse induite par la fixation d'antigènes sur le BCR (récepteur pour l'antigène des lymphocytes B). Il est fortement exprimé par les lymphocytes B transformés.

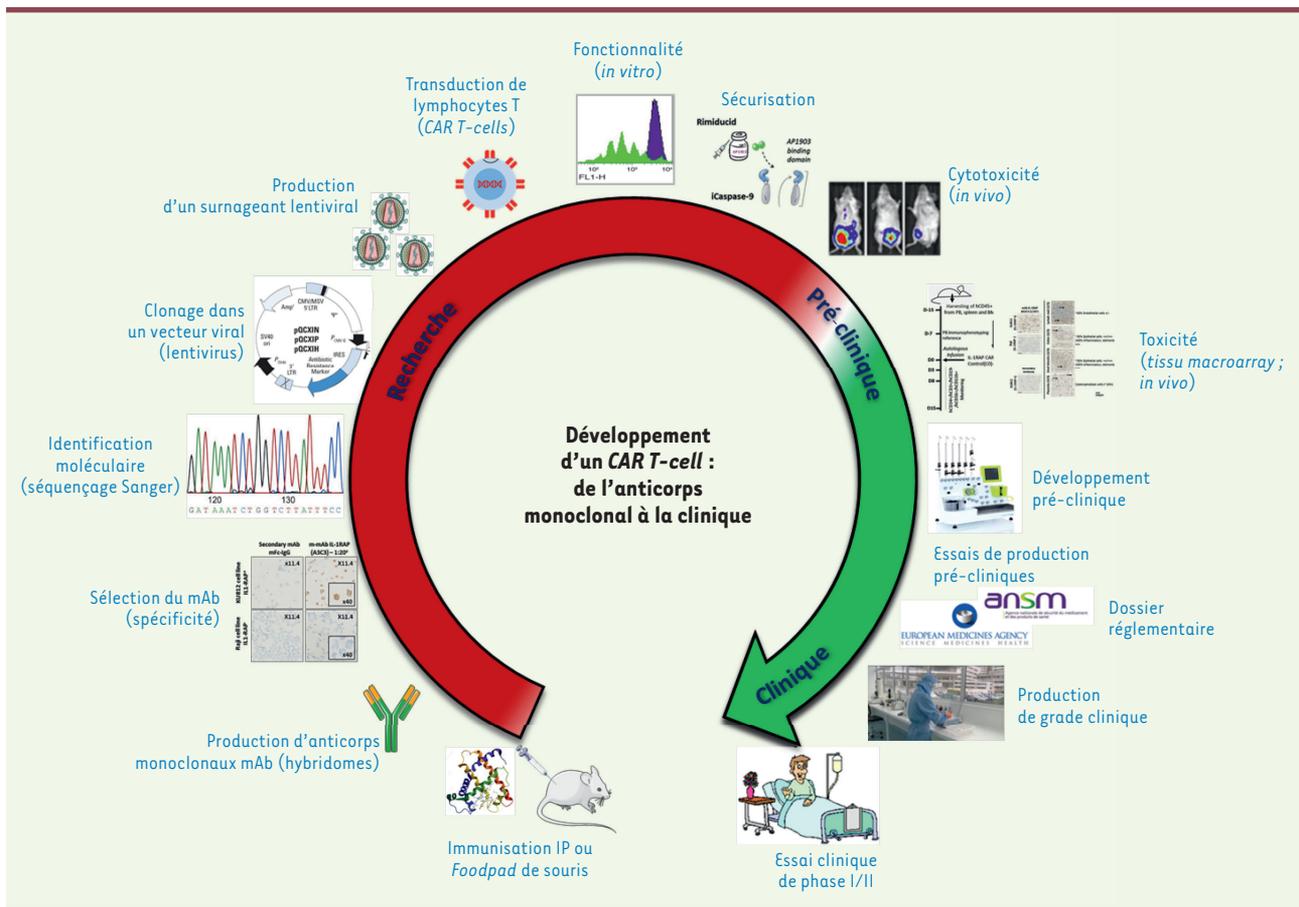


Figure 1. Principales étapes de développement d'une thérapie par CAR T-cells après identification de la cible. IP : intrapéritonéale.

queur des différentes phases cliniques de la LMC [4] et nous avons montré, dans un groupe de patients atteints de LMC traités par ITK (ClinicalTrials.gov: NCT02842320), que la diminution du nombre de cellules exprimant IL-1RAP était corrélée au ratio *BCR-ABL* (IS)³ [5]. Dans les LAL à chromosome Philadelphie (LAL Ph+), les gènes de fusion produisent des transcrits atypiques qui codent les protéines p190, p210 et p230. La présence d'IL-1RAP dans les cellules de LAL-p190 est controversée, alors qu'elle a été bien établie dans les cellules de LAL-p210 [6]. IL-1RAP est également exprimé dans les LAM à

caryotype normal, dans les LAM-7/7q⁻ (monosomie 7 ou délétions de 7q), et dans les syndromes myélodysplasiques à haut risque, cette expression étant associée à une moindre survie globale des patients [7]. Dans les tumeurs solides, l'expression d'IL-1RAP est augmentée dans les cancers du sein triple négatifs (RE- [récepteur de l'œstrogène] / RP- [récepteur de la progestérone] / HER2- [human epidermal growth factor receptor 2]), et est corrélée à une survie sans récurrence plus courte [8].

IL-1RAP et LMC, support de développement d'une immunothérapie par CAR T-cells

Un anticorps monoclonal spécifique d'IL-1RAP inhibe l'interaction de l'IL-1 avec son récepteur (donc la signalisation conduisant à la sécrétion de

cytokines pro-inflammatoires), ainsi que l'expansion des cellules primaires de LMC. Cet anticorps permet aussi de recruter des effecteurs cellulaires, tels que les cellules NK, qui contribuent à l'élimination des cellules leucémiques de LMC ou de LAM [9] par cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) [10]. L'ensemble de ces travaux a permis de proposer l'IL-1RAP comme une cible tumorale potentielle pouvant être utilisée en thérapie CAR T-cells. Avant le développement des inhibiteurs de tyrosine kinase, l'implication du système immunitaire avait été démontrée dans la réponse anti-tumorale, dans le traitement des LMC, à travers l'utilisation d'allogreffes de cellules souches hématopoïétiques, de la DLI (donor lymphocyte infusion), et de l'interfé-

³ La quantification du transcrite de fusion *BCR-ABL* se fait par RT-qPCR. L'analyse est réalisée sur un prélèvement sanguin. Dans le cadre du suivi thérapeutique, les résultats sont exprimés en valeur du ratio *BCR-ABL/ABL*, selon une échelle internationale (international scale, IS) que l'on note *BCR-ABL* (IS).

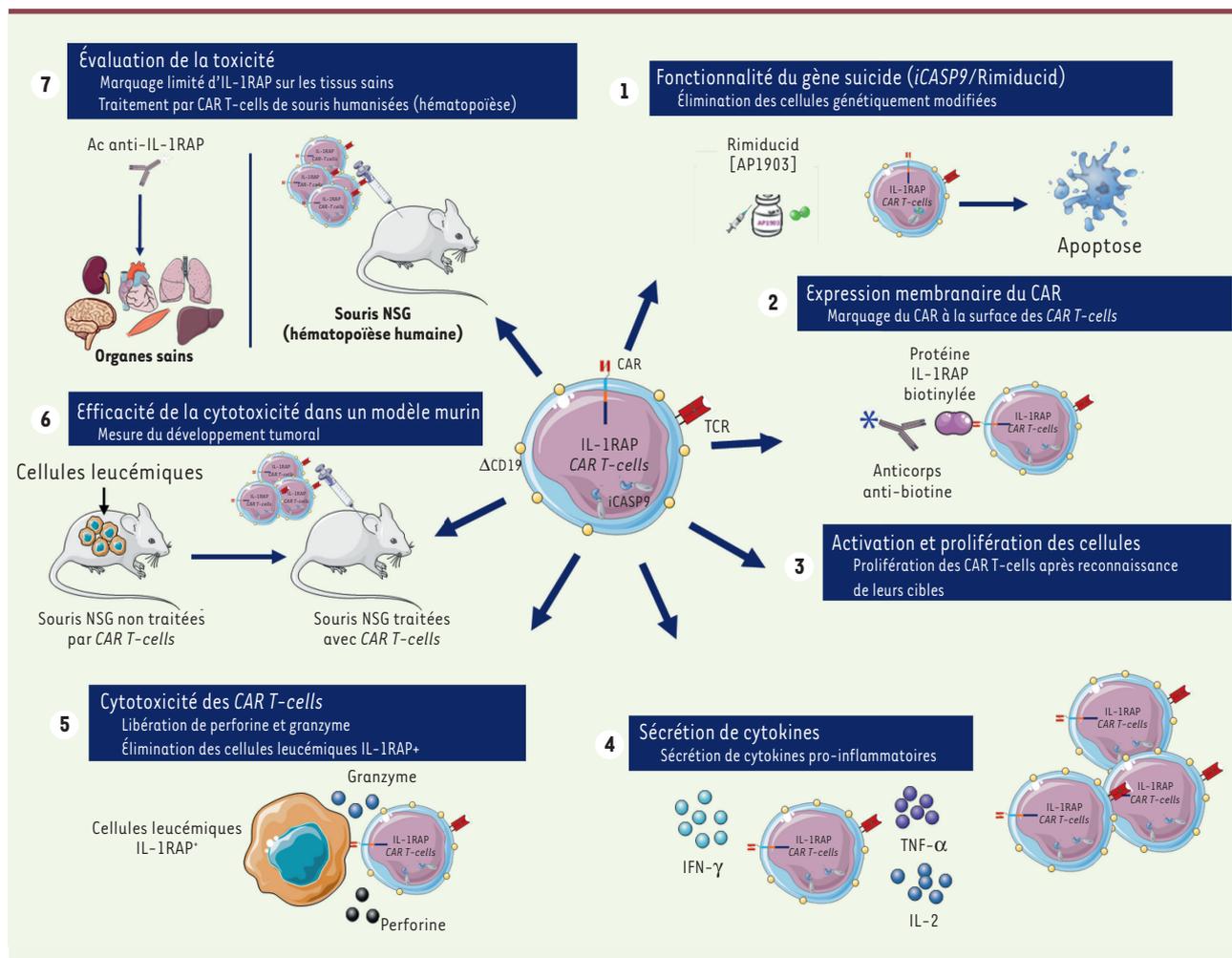


Figure 2. Tests in vitro et dans un modèle murin de l'efficacité d'une immunothérapie par CAR T-cells ciblant des cellules leucémiques exprimant IL-1RAP. Souris NSG : souris humanisées JAX™ transgéniques : NOD.Cg-Prkdc^{SCID} Il2rg^{tm1Wjl}/Szj (Charles River) ; *iCASP9* : gène codant la CASP9 inducible par Rimiducid® ; TCR : récepteur de la cellule T ; Δ CD19 : gène *CD19* tronqué dans sa partie intracellulaire.

ron α (IFN α) en traitement de première ligne. C'est une des raisons qui nous a conduits à établir la « preuve de concept » d'une immunothérapie par CAR T-cells dans cette hémopathie maligne. Son application clinique sera sans doute restreinte, bien qu'elle laisse entrevoir la possibilité d'éliminer les cellules souches hématopoïétiques tumorales quiescentes, qui échappent au spectre d'action des inhibiteurs de tyrosine kinase. Sur la base de ces constatations, nous avons développé un programme de production d'un CAR ciblant cette protéine d'intérêt (Figure 1) afin de modifier génétiquement des LT autologues.

« Preuve de concept » d'une immunothérapie par CAR T-cells ciblant IL-1RAP

Nous avons produit un anticorps monoclonal, en immunisant des souris BALB/c avec la protéine humaine recombinante IL-1RAP. Cet anticorps (#A3C3, Diaclone SA, Besançon, France : B-L43) a été sélectionné par cytométrie en flux, et analysé par *western blot*, immunocytochimie ou microscopie de fluorescence sur un panel de lignées cellulaires leucémiques, sur du sang placentaire, et sur des prélèvements provenant de patients atteints de LMC. Les séquences nucléotidiques codant les régions hypervariables de cette immunoglobuline, V(D)J (pour

les chaînes lourde, IgH) et VJ (pour les chaînes légères, IgL), constituant le scFv, couplées à celles codant les séquences d'activation T de troisième génération (CD28-4.1BB-CD3 ζ), ont été clonées dans un vecteur lentiviral. Cette construction (pSDY-5'LTR-*iCASP9*-T2A-CAR-P2A- Δ CD19-3'LTR) comporte également un système de suicide cellulaire inducible constitué d'un gène inducible par le Rimiducid® codant la caspase-9 (gène *iCASP9*), qui permet d'éliminer des CAR T-cells activées indésirables (*safety switch*), ainsi qu'un gène codant une protéine de surface (Δ CD19) permettant l'identification et la sélection des CAR T-cells. Le surna-

geant des cultures cellulaires produisant le virus recombinant permet de transduire des LT *ex vivo*.

L'activation du système suicide iCASP9/Rimiducid® *in vitro* ou dans un modèle murin de xéno greffe permet d'éliminer plus de 90 % des CAR T-cells après 48 heures d'exposition au Rimiducid®. Ce système contribuera à limiter les effets indésirables liés aux CAR T-cells (syndrome de relargage de cytokines, neurotoxicité, etc.) ou à la transduction inopinée de cellules leucémiques résiduelles provenant de la cytophère. En effet, dans ce cas, l'expression du CAR à la surface va masquer l'épitope de l'antigène tumoral, qui devient indétectable par les effecteurs cytotoxiques, conduisant ainsi à un échappement [11]. *In vitro*, en présence de cellules leucémiques cibles exprimant IL-1RAP à leur surface, les CAR T-cells IL-1RAP sont capables de proliférer et de sécréter de l'interféron γ , des cytokines pro-inflammatoires, de la perforine et du granzyme B, et finalement d'éliminer ces cellules tumorales. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* dans des modèles murins de xéno greffe tumorale (Figure 2).

Les premières études de toxicité potentielle d'un CAR IL-1RAP ont été réalisées par immunocytochimie avec l'anticorps #A3C3 sur *tissue macroarray* comportant 30 tissus différents issus de trois donneurs sains ; seuls 6 tissus se sont révélés faiblement immunoréactifs. À

noter que ni les cellules souches hématopoïétiques exprimant CD34, ni les LT ou les polynucléaires, n'expriment IL-1RAP à un taux détectable par cytométrie. Par contre, en situation autologue, les CAR T-cells IL-1RAP ciblent partiellement les monocytes, mais avec une efficacité moindre que pour les cellules leucémiques. Nous avons confirmé, *in vitro* par culture de cellules progénitrices hématopoïétiques en présence des CAR T-cells IL-1RAP autologues, mais aussi dans un modèle murin reconstitué avec des cellules souches hématopoïétiques de sang placentaire humain, que la reconstitution hématopoïétique n'est pas affectée, sauf la population monocyttaire dans une faible mesure.

Ces travaux représentent la première « preuve de concept » qu'une thérapie par CAR T-cells IL-1RAP permet de cibler et d'éliminer les cellules leucémiques IL-1RAP+. Après avoir étudié sa sécurité et sa tolérance et démontré son efficacité dans des essais cliniques de phase I et II, cette immunothérapie pourra être comparée aux traitements existants et peut-être, au terme de ces essais, proposée comme alternative à ces traitements. ♦

IL-1RAP as a candidate for CAR T-cells immunotherapy

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2018 ; 378 : 439-48.
2. Mitchell K, Barretero L, Todorova TI, et al. IL1RAP potentiates multiple oncogenic signaling pathways in AML. *J Exp Med* 2018 ; 215 : 1709-27.
3. Jaras M, Johnels P, Hansen N, et al. Isolation and killing of candidate chronic myeloid leukemia stem cells by antibody targeting of IL-1 receptor accessory protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 ; 107 : 16280-5.
4. Zhao K, Yin LL, Zhao DM, et al. IL1RAP as a surface marker for leukemia stem cells is related to clinical phase of chronic myeloid leukemia patients. *Int J Clin Exp Med* 2014 ; 7 : 4787-98.
5. Warda W, Larosa F, Neto Da Rocha M, et al. CML Hematopoietic stem cells expressing IL1RAP can be targeted by chimeric antigen receptor-engineered T cells. *Cancer Res* 2019 ; 79 : 663-75.
6. Blatt K, Menzl I, Eisenwort G, et al. Phenotyping and target expression profiling of CD34⁺/CD38⁻ and CD34⁺/CD38⁺ stem and progenitor cells in acute lymphoblastic leukemia. *Neoplasia* 2018 ; 20 : 632-42.
7. Barretero L, Will B, Bartholdy B, et al. Overexpression of IL-1 receptor accessory protein in stem and progenitor cells and outcome correlation in AML and MDS. *Blood* 2012 ; 120 : 1290-8.
8. Zheng P, Zhang Y, Zhang B, et al. Synthetic human monoclonal antibody targets hIL1 receptor accessory protein chain with therapeutic potential in triple-negative breast cancer. *Biomed Pharmacother* 2018 ; 107 : 1064-73.
9. Agerstam H, Hansen N, von Palffy S, et al. IL1RAP antibodies block IL-1-induced expansion of candidate CML stem cells and mediate cell killing in xenograft models. *Blood* 2016 ; 128 : 2683-93.
10. Agerstam H, Karlsson C, Hansen N, et al. Antibodies targeting human IL1RAP (IL1R3) show therapeutic effects in xenograft models of acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015 ; 112 : 10786-91.
11. Ruella M, Xu J, Barrett DM, et al. Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell. *Nat Med* 2018 ; 24 : 1499-503.
12. Catros V. Les CAR-T cells, des cellules tueuses spécifiques d'antigènes tumoraux : de nouvelles générations pour le traitement des tumeurs solides. *Med Sci (Paris)* 2019 ; 35 : 316-26.
13. Jordan B. Immunothérapie CAR-T : une autorisation qui fait date. *Med Sci (Paris)* 2017 ; 33 : 1003-6.

LA FONDATION PREMUP : UN OPÉRATEUR DE TERRAIN EN PÉRINATALITÉ RECONNU POUR SON EXCELLENCE ET SON INTERDISCIPLINARITÉ

La Fondation de coopération scientifique PremUp, unique en Europe, intervient sur la prévention du handicap à la naissance, par la protection de la santé de la femme enceinte et du nouveau-né.



FONDATION DE COOPÉRATION SCIENTIFIQUE SUR LA GROSSESSE ET LA PRÉMATURITÉ

