



HAL
open science

CAR-T cells : indications actuelles en pédiatrie et perspectives de développement

Marie-Émilie Dourthe, Karima Yakouben, Delphine Chaillou, Emmanuelle Lesprit, Jean-Hugues Dalle, André Baruchel

► **To cite this version:**

Marie-Émilie Dourthe, Karima Yakouben, Delphine Chaillou, Emmanuelle Lesprit, Jean-Hugues Dalle, et al.. CAR-T cells : indications actuelles en pédiatrie et perspectives de développement. Bulletin du Cancer, 2018, 105, pp.S147 - S157. 10.1016/S0007-4551(19)30045-1 . hal-03486668

HAL Id: hal-03486668

<https://hal.science/hal-03486668v1>

Submitted on 20 Jul 2022

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

CAR-T cells : indications actuelles en pédiatrie et perspectives de développement

Marie-Émilie Dourthe^{1,2}, Karima Yakouben¹, Delphine Chaillou¹, Emmanuelle Lesprit³, Jean-Hugues Dalle^{1,2,4}, André Baruchel^{1,2,5,*}

1. Service d'Hématologie Pédiatrique, Hôpital Universitaire Robert Debré (APHP), 75019 Paris, France
2. Université Paris Diderot, 75010 Paris, France
3. Établissement français du sang, Hôpital universitaire Robert Debré, 75019 Paris, France
4. UMR 1149, 75890 Paris, France
5. EA 3518 Institut Universitaire d'Hématologie, 75010 Paris, France

*Auteur correspondant

André Baruchel

andre.baruchel@aphp.fr

Mots clés

CAR T cells
Leucémie aiguë
Lymphome B
Immunothérapie
Enfants

■ Résumé

Les leucémies aiguës lymphoblastiques B (LAL- B) représentent la première cause de cancer chez l'enfant. Malgré un taux de survie à 5 ans supérieur à 90 %, les LAL sont une des causes majeures de décès lié au cancer dans l'enfance. Une nouvelle classe d'immunothérapie se basant sur des lymphocytes T génétiquement modifiés pour exprimer à leur surface un récepteur antigénique chimérique (CAR) ciblant le CD19, marqueur présent sur la majorité des cellules leucémiques B, va potentiellement révolutionner la prise en charge des LAL B en rechute ou réfractaire. Les taux de réponse au traitement vont de 60 % à 90 % dans des essais de phase I/II incluant des patients en deuxième rechute ou plus ou porteurs d'une maladie réfractaire. Des rémissions persistantes voire des guérisons ont été observées. Ces très bons résultats préliminaires permettent d'envisager dans un futur proche leur utilisation en 1^{re} ligne dans le cas de maladies de particulièrement mauvais pronostic. Cependant la production de ces cellules, leur coût ainsi que la gestion des effets secondaires sont des enjeux majeurs pour le futur de cette thérapeutique. La survenue de rechutes « CD19 négatives » a conduit à élaborer des CARs multispécifiques. Les CAR-T cells allogéniques permettraient quant à elles d'avoir à disposition un arsenal thérapeutique adapté à la cible dès le diagnostic. Les perspectives de développement des CAR T cells résident désormais dans l'optimisation des techniques dans les leucémies et lymphomes et dans l'extension des domaines d'application aux tumeurs solides de l'enfant.

■ Abstract

CAR T cells: current indications in children and perspectives

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the first cause of cancer in children. Five-year overall survival is greater than 90% but leukemia remains a major cause of death from cancer in children. A new class of immunotherapy based on a chimeric antigen receptor "CAR" targeting the CD19 on the B leukemic cells and that is transduced in an autologous or allogenic T lymphocyte will allow to transform the prognosis of refractory or relapsed B-ALL. Overall response rates range

Keywords

CAR T cells
Acute leukemia
B cell lymphoma
Immunotherapy
Children

from 60 to 90% in phase I- II studies in patients with second relapse or more or with refractory disease. Persistent remissions and even cures have been observed. These very good results could lead to use this treatment in first line for patients with very high-risk disease. However, CAR-T cells production, costs and adverse events management represent major issues for the future of this therapeutic. The occurrence of CD19 negative relapses has led to develop bispecific CAR-T cells. Allogeneic CAR would permit to obtain a "CAR garage" off the shelf available from the diagnosis. Perspectives for CAR-T cells are immense but will involve technological progresses around the CAR conception and production, leading to further improve results in leukemias (ALL but also AML) and lymphomas and hopefully to the emergence of efficacy in childhood solid tumors.

Cet article fait partie du numéro supplément *Les cellules CAR-T : une révolution thérapeutique ?* réalisé avec le soutien institutionnel des partenaires Gilead : Kite et Celgene.

Principes

Les CARs sont des récepteurs composés d'un domaine de liaison extracellulaire se liant à un antigène défini spécifique de la cellule tumorale cible, combiné à un domaine de signalisation intracellulaire d'un lymphocyte T. Le domaine de liaison à l'antigène consiste en la combinaison de chaînes protéiques issues de la région variable d'une chaîne lourde (VH) et d'une chaîne légère (VL) d'une immunoglobuline reliée entre elles par un « linker » de petite taille (de 10 à 25 AA) pour former une protéine de fusion : scFv (pour single chain fragment variable). Cette protéine de fusion linéaire est hautement spécifique de son antigène cible. Le récepteur chimérique peut donc reconnaître une cellule tumorale portant cet antigène cible sans que celui-ci ne doive être présenté par une molécule du Complexe Majeur d'Histocompatibilité. Des antigènes tumoraux de nature non protéique peuvent aussi être ciblés. Le domaine intracellulaire du CAR transmet l'activation et les signaux de costimulation par l'intermédiaire de la chaîne zeta du CD3 (signal 1) et de molécules de costimulation nécessaires aux fonctions effectrices et à la multiplication du lymphocyte T (signal 2) [1].

Le processus de production des CAR T cells repose sur le respect de règles de bonnes pratiques de fabrication (« GMP ») permettant d'assurer la sécurité, l'efficacité et la reproductibilité de la production. Les lymphocytes du patient ou d'un donneur sain sont prélevés par leucaphérèse puis isolés et activés par des anticorps anti CD3 et/ou anti CD28. Parallèlement une construction génique contenant le scFv et les molécules de costimulation est intégrée à un vecteur de type lentivirus ou gamma-retrovirus dans la plupart des cas. L'utilisation d'un gamma retrovirus permet un processus simplifié par rapport au lentivirus qui nécessite des transfections répétées. Ce vecteur ADN ou ARN est ensuite introduit dans les lymphocytes du patient ou du donneur sain après stimulation *ex vivo*, ce qui facilite la transduction du vecteur. Une fois transduites les cellules monospécifiques pour le scFV sont amplifiées jusqu'à un nombre suffisant pour leur application clinique. Ils donnent lieu aux CAR autologues lorsqu'il s'agit de lymphocytes du patient ou aux CAR allogéniques lorsqu'il s'agit de lymphocytes d'un

donneur sain. Ils sont administrés au patient après contrôle de fonctionnalité et de l'absence de contamination infectieuse. La purification des lymphocytes T, leur modification génétique puis leur expansion en culture nécessitent une durée totale de production de l'ordre de 2 à 3 semaines [2,3]. Il est important de noter que le produit final, bien que constitué de cellules vivantes, a un statut de médicament (« living drug ») puisqu'il s'agit de cellules transformées.

Évolution des CAR T cells

Depuis leur développement initial en 1989 les CAR T cells ont évolué en générations successives suivant les caractéristiques de leur domaine intracellulaire (*Figure 1*) [4].

Les CAR de 1^{re} génération contiennent uniquement la sous-unité zeta de la molécule CD3 du complexe TCR/CD mais ne permettent pas de générer un effet anti tumoral satisfaisant [5].

Les CAR de 2^e génération contiennent, en plus de la sous-unité zeta de la molécule CD3, un autre gène exprimant le domaine de transduction du signal CD137 ou CD28 ou 4-1 BB [6,7]. Ils ont montré leur supériorité dans leurs capacités d'expansion et de persistance à long terme ainsi que dans l'obtention de réponses cliniques objectives par rapport aux CAR-T de première génération [8].

Les CAR de 3^e génération utilisent 2 unités de costimulation au choix parmi CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, CD27, NKG2D. L'addition de molécules de costimulation supplémentaires permettrait une augmentation de la prolifération ainsi que de la survie des CAR T cells [9].

Les CAR de 4^e génération contiennent en plus une cassette d'expression génique induite par le CAR (TRUCK), capable de sécréter des cytokines suite à la reconnaissance de l'antigène par le CAR [10].

Actuellement, dans la plupart des études utilisant des CAR autologues, les patients reçoivent une chimiothérapie de lymphodéplétion par cyclophosphamide et fludarabine suivie de l'injection des CAR T cells. En effet les 8 premières études rapportant les 38 premiers patients avec lymphome non

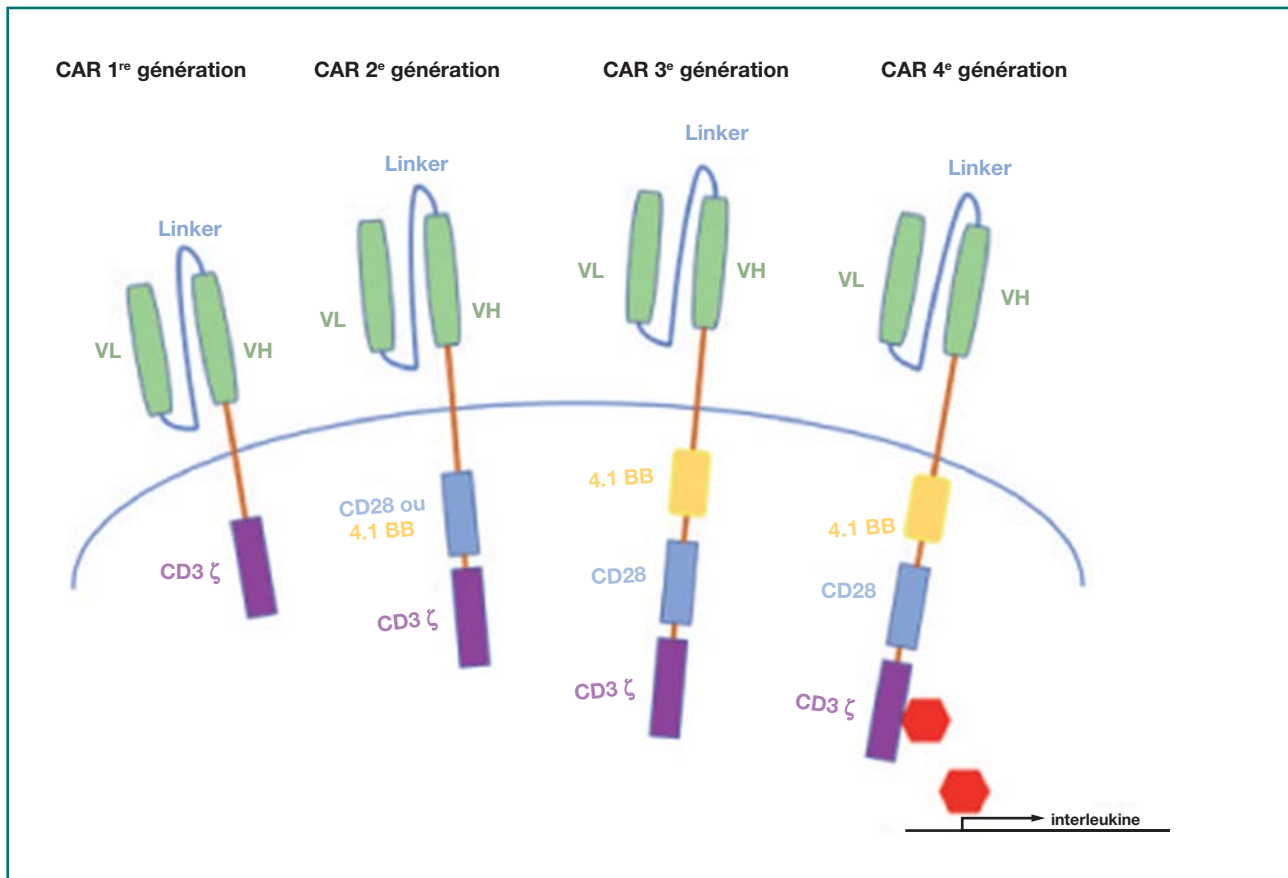


FIGURE 1
Évolution des CAR T cells.

VL = chaîne légère, VH = chaîne lourde, VH + VL + Linker = scFv

hodgkinien ayant reçu des CAR T cells de première ou deuxième génération sans conditionnement préalable n'ont pas présenté de réponse objective [2]. Une étude de phase I a confirmé l'intérêt de l'utilisation d'une chimiothérapie de lymphodéplétion pour obtenir une meilleure expansion et une meilleure persistance des CAR T cells. La supériorité de l'association cyclophosphamide et fludarabine sur le cyclophosphamide seul a été confirmée dans une étude incluant des patients adultes présentant une LAL B en rechute ou réfractaire avec une meilleure persistance des CAR T cells et une meilleure survie sans maladie [11,12].

Indications actuelles en pédiatrie

L'utilisation de CAR T cells a pour objectifs de cibler un antigène associé aux tumeurs. L'antigène doit être le plus spécifique possible de la cellule maligne afin d'obtenir un effet sélectif sans effet secondaire sur les cellules saines.

Le CD19 est considéré comme étant proche de l'antigène idéal. Il s'agit d'une protéine exprimée à la surface des cellules B et de leurs précurseurs ainsi que dans la majorité des leucémies aiguës lymphoblastiques B (LAL-B) de l'enfant. Le CD19 n'est pas

exprimé par les cellules souches hématopoïétiques. Son expression est donc restreinte à une lignée cellulaire dont l'absence peut être palliée par des injections substitutives d'immunoglobulines polyvalentes. Les LAL-B CD19+ sont ainsi l'indication de choix en pédiatrie pour l'utilisation des CAR T cells CD19 (Tableau 1).

Leucémie aiguë lymphoblastique B : cibler le CD19 (Tableau 2)

Les premières observations pédiatriques

Deux patients, un présentant une LAL-B en 2^e rechute à 2 ans du diagnostic initial et un présentant une LAL-B en 2^e rechute post allogreffe de moelle, ont reçu une injection de CAR T cells transduits avec un lentivirus comportant les gènes codant pour un CAR anti CD19 et 2 molécules de costimulation du lymphocyte T (CD3 zeta et 4-1BB). Le taux d'expansion des CTL étaient 1000 fois supérieur au taux initial de cellules injectées. Les cellules étaient détectées dans la moelle osseuse et dans le liquide céphalo rachidien. Une rémission complète a été obtenue chez les 2 patients. La première patiente est actuellement considérée comme guérie puisque sa survie sans rechute est supérieure à 6 ans. Le second

TABEAU 1
Nombre d'essais recensés dans le monde (à gauche)
et en France (à droite) chez l'enfant d'après Clinicaltrials.gov
au 02/07/2018.

Pathologies			
Cibles des CAR	Leucémies aiguës	Lymphomes	Tumeurs solides
CD19	77/1	43/0	
CD22	13/0	13/0	
CD33	5/0		
CD123	7/0		
CD20	7/0	8/0	
CD30	1/0	9/0	
CD5	1/0	1/0	
CD7	0/0	0/0	
GD2			11/0

a présenté une rechute sous la forme de cellules leucémiques CD19 négatives, 2 mois après le traitement [13].

Études pilotes

Au National Cancer Institute (Bethesda, Ma, États-Unis), un premier essai de phase I d'escalade de dose a étudié 21 patients. Ces patients présentaient une LAL-B ou un lymphome non hodgkinien et il s'agissait de CAR T cells CD19 autologues transduits avec un retrovirus comportant le gène codant pour un scFV anti-CD19 plus les gènes codant pour CD28 et CD3 zeta. La dose maximale tolérée a été définie à 1×10^6 CAR T CD19 par kg. Tous les effets secondaires ont été réversibles sans aplasie B secondaire [14]. 14 % des patients ont présenté un syndrome de relargage cytokinique (CRS, voir plus loin). Quatorze sur 21 patients ont obtenu une réponse complète à J28 post injection. Douze sur 20 patients

avec une LAL B étaient en rémission moléculaire. Dix patients ont ensuite été traités par une allogreffe de moelle et étaient toujours en rémission à un an de l'injection. Deux patients qui n'avaient pas bénéficié d'une allogreffe de moelle ont rechuté sous la forme d'une LAL B CD19-.

À l'Université de Pennsylvanie, une cohorte de 30 patients présentant une LAL B en rechute ou réfractaire (25 de moins de 22 ans, 5 de plus de 26 ans) a été traitée. Parmi les 30 patients, 18 présentaient une rechute post allogreffe de moelle, 3 présentaient une maladie réfractaire au blinatumomab (anti-corps bispécifique « BiTE »). Les patients recevaient de 0,76 à $20,6 \times 10^6$ CTL019 par kg (CAR T cells de 2^e génération, transduits avec un lentivirus codant pour un scFV anti CD19 et pour les domaines CD3 zeta et 4-1 BB) après une chimiothérapie de lymphodéplétion. 90 % des patients (27/30 patients) étaient en rémission morphologique complète à 1 mois. Parmi les 27 patients en rémission cytologique 19 ont conservé leur réponse sur une durée médiane de suivi de 7 mois. Parmi les 3 patients réfractaires au blinatumomab, 2 ont obtenu une rémission complète après l'injection de CAR-T cells. Les 2 patients qui présentaient des blastes dans le LCR au moment de la réinjection ont également obtenu une réponse complète y compris au niveau du système nerveux central. À 6 mois, la survie sans événement était de 67 % (intervalle de confiance 95 % : 51 à 88 %) et la survie globale de 78 % (IC 95 % : 65 à 95 %). La probabilité de persistance des CTL019 à 6 mois était de 68 % (IC 95 % : 50 à 92 %). Parmi les 18 patients traités par CTL019 après allogreffe de moelle la survie sans événement et la survie globale ne différaient pas de façon significative de l'ensemble des patients de l'étude. Après traitement par CTL019 5 patients ont reçu une thérapie supplémentaire dont 3 une allogreffe de moelle en rémission. Les effets secondaires rapportés étaient de 2 ordres : aigus et à long terme. L'effet secondaire majeur aigu était le syndrome de relargage des cytokines (CRS) associant élévation des cytokines inflammatoires, activation des lymphocytes T et prolifération. Le CRS était mineur à modéré chez 22 patients et

TABEAU 2
Études cliniques de phase précoce chez des patients d'âge pédiatrique traités par CAR T cells anti CD19.

	Lee <i>et al.</i> 2015 [14]	Grupp <i>et al.</i> 2013 [15]	Maude <i>et al.</i> 2014 [16]	Maude <i>et al.</i> 2018 [17]	Gardner <i>et al.</i> 2017 [18]
Nb patients	21	2	30	75	45
Age médian	15 ans	7 et 10 ans	14 ans		12,2 ans
Allogreffe	8	1	18		28
MRD négative	12/20	2/2	22/30	81 %	89 %
MRD : méthode d'évaluation	CMF	CMF	CMF	CMF	CMF
EFS			À 6 mois : 67 %	À 6 mois : 73 %	À 12 mois : 50,8 %
OS	À 9,7 mois : 51,6 %		À 6 mois : 78 %	À 6 mois : 90 %	À 12 mois : 69,5 %
CRS	16		100 %	77 %	93 %
Événement neurologique	6		13/30	40 %	49 %

Nb = nombre ; MRD = maladie résiduelle ; EFS = survie sans événement, OS = survie globale, CRS = syndrome de relargage cytokinique.

sévère chez 8 patients avec nécessité d'utilisation d'amines vasopressives. Neuf patients reçurent une injection de tocilizumab, anticorps bloquant le récepteur à l'IL-6, permettant une résolution des symptômes. Le second effet secondaire notable aigu était neurologique pour 13 patients. Les symptômes allaient de la confusion à l'encéphalopathie. Aucun patient n'a conservé de séquelle neurologique. À long terme, tous les patients qui présentaient une réponse au traitement ont développé une aplasie B qui a persisté jusqu'à un an après l'injection des CTL019. Sept patients ont présenté une rechute entre 6 semaines et 8,5 mois après l'injection, dont 3 patients après une perte précoce des CAR T cells. Après récupération de lymphocytes B (2 à 3 mois), 3 autres patients présentèrent une rechute. Le dernier présenta une rechute cytologique à 6 semaines [15].

À Seattle, une étude de phase I a également rapporté l'efficacité de CAR T cells anti-CD19, également transduits avec un lentivirus codant pour un scFV anti CD19 et pour les domaines CD3 zeta et 4-1 BB, mais ici caractérisés par un ratio CD4/CD8 défini, chez 45 patients âgés de 12 mois à 27 ans [11]. L'âge médian était de 12,2 ans. Le statut de la maladie au moment de l'injection était réparti comme suit : 3 en maladie réfractaire, 15 en première rechute, 22 en seconde rechute, 5 en 3^e rechute ou au-delà. Dix-sept patients n'avaient pas été allogreffés au préalable. Neuf patients présentaient un envahissement neuroméningé. Six patients avaient préalablement reçu du blinatumomab. Le taux de rémission complète avec maladie résiduelle (MRD) négative était de 89 %. Il était de 100 % pour les patients ayant reçu une chimiothérapie de lymphodéplétion par fludarabine cyclophosphamide. Quatre des 6 patients ayant reçu du blinatumomab antérieurement ont présenté une rémission complète avec MRD négative. La survie sans événement (EFS) estimée à 12 mois était de 50,8 % (IC95 %, 36,9-69,9 %) et la survie globale (OS) de 69,5 % (IC95 %, 55,8-86,5 %) avec une durée médiane de suivi de 9,6 mois. Dix-huit patients qui présentaient une réponse complète ont rechuté dont 17 uniquement au niveau médullaire et 1 au niveau méningé isolé. Sept rechutes étaient CD19-. Sur les 11 rechutes CD19+ la durée médiane entre injection et rechute était de 5,98 mois (1,25-14) avec une durée médiane entre la perte de l'aplasie B et la rechute de 3,7 mois (0-11). Onze patients ont été consolidés par une allogreffe de moelle dont 2 rechutèrent. L'analyse des 40 patients ayant obtenu une rémission complète MRD- a permis de mettre en évidence que la perte de l'aplasie B, reflet de la perte de CAR T cells fonctionnels, augmentait le risque de rechute CD19+. Huit patients reçurent une seconde injection de CAR T cells après perte précoce des cellules mais seulement 2 présentèrent une expansion de ces cellules. Les 6 patients n'ayant pas présenté une expansion des cellules avaient reçu une chimiothérapie initiale peu immunosuppressive (sans fludarabine). L'incidence globale de CRS était de 93 %, classé sévère pour 23 %. Seize patients reçurent du tocilizumab, 10 patients des corticoïdes. L'incidence globale d'événement neurologique était de 49 %, sévère pour 21 %. L'existence d'un CRS sévère était prédictive de la survenue d'une neurotoxicité sévère (p = 0,01).

Étude de phase 2

Une étude internationale de phase 2 multicentrique, ELIANA, menée sur 25 sites (dont 2 sites français) dans 11 pays, a confirmé ces excellents résultats sur une cohorte de 75 patients d'âge pédiatrique ou adultes jeunes traités pour une LAL B CD19+ en rechute ou réfractaire avec le produit CTL019 [16]. Quarante-six patients (61 %) avaient reçu une allogreffe de moelle. Le pourcentage médian de blastes au diagnostic était de 74 % (5-99 %). Le taux de rémission complète à 3 mois était de 81 % avec une maladie résiduelle négative en CMF. Le taux de survie sans événement et de survie globale était de 73 % (IC95 %, 60 à 82 %) et 90 % (IC95 %, 81 à 95 %) respectivement à 6 mois, et de 50 % (IC95 %, 35 à 64 %) et 76 % (IC95 %, 63 à 86 %) à 12 mois. 73 % des patients ont présenté des effets secondaires de grade 3-4. Un syndrome de relargage cytokinique est survenu chez 77 % des patients et 48 % d'entre eux ont dû recevoir du tocilizumab. Trente-cinq patients ont été transférés en unité de soins intensifs pour la gestion du CRS pendant une durée médiane de 7 jours : 19 ont reçu des amines vasopressives, 33 ont eu besoin d'apport d'oxygène dont 10 une ventilation mécanique, 7 ont été dialysés. 40 % des patients ont présenté une complication neurologique sans œdème cérébral dont 10 patients avec un grade 3. Tous les patients qui ont présenté une réponse au traitement ont développé une aplasie B avec une probabilité de maintien de cette aplasie à 6 mois de l'injection de 83 % (IC95 %, 69 à 91 %).

Suite aux résultats de ces études de phase précoce, les CTL019, tisagenlecleucel (CAR T cells de 2^e génération intégrant la sous unité zeta du CD3 et le domaine de costimulation 4-1 BB) a obtenu l'approbation de la FDA en août 2017 dans le traitement des LAL B réfractaires ou après 2 rechutes ou plus chez l'enfant et l'adulte de moins de 25 ans.

Une étude d'expansion internationale (CTL019 B2001X), ouverte aussi en France, propose à des patients de moins de 25 ans, pris en charge pour une LAL B CD19+ réfractaire ou en rechute et inéligibles à une allogreffe de moelle, une injection de CTL019 après chimiothérapie de lymphodéplétion (NCT02435849).

Lymphomes B

Depuis octobre 2017 l'axicabtagene ciloleucel, ciblant également le CD19 est le 2^e médicament à base de CAR T cells à avoir obtenu l'approbation de la FDA aux États-Unis, dans les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL, lymphome non hodgkinien le plus fréquent chez l'adulte), les lymphomes de haut grade et les lymphomes B primitifs du médiastin réfractaires de l'adulte. Le tisagenlecleucel a également obtenu l'approbation de la FDA en mai 2018 dans le traitement des DLBCL, lymphome B à grandes cellules de haut grade réfractaire ou rechute de l'adulte.

Dans une étude multicentrique de phase II menée chez 111 patients adultes traités pour un lymphome B réfractaire ou en rechute, les taux de réponse objective et de rémission complète après ce traitement étaient de 82 % et 51 % respectivement [17]. Le taux de survie globale à 18 mois était de 52 %. Un syndrome de relargage cytokinique de grade 3 ou supérieur survint chez

13 % des patients, une complication neurologique chez 28 % des patients.

Dans une revue publiée en 2017 sur l'utilisation de l'axicabtagene ciloleucel dans les lymphomes non hodgkiniens agressifs, 5 études principales sont rapportées, initialement monocentriques puis pluricentriques nationales [18]. Dans les 3 études monocentriques réalisées sur 7 à 22 patients évaluable, une réponse objective était obtenue pour 73 à 92 % des patients avec un taux de réponse complète de 14 à 62 %. Dans les 2 études nationales de phase I puis de phase II réalisées sur 7 et 101 patients respectivement, le taux de réponse objective était de 71 à 82 % avec un taux de réponse complète de 54 à 57 %. Parmi les 101 patients de l'étude de phase II, 13 % ont présenté un CRS supérieur ou égal à un grade 3 et 28 % un événement neurologique supérieur ou égal à un grade 3.

Aucune étude n'est publiée sur l'utilisation de CAR anti CD19 dans les lymphomes de l'enfant.

Actuellement, en France, aucun essai thérapeutique basé sur l'utilisation de CAR T cells CD19+ n'est ouvert pour les patients de moins de 18 ans présentant un lymphome B réfractaire ou en rechute. Deux essais sont ouverts chez l'adulte dans le lymphome du manteau et les lymphomes diffus à grandes cellules (NCT03484702, NCT02601313). Vingt-six essais de phase I et 17 essais de phase II sont ouverts dans le monde pour les patients d'âge pédiatrique présentant un lymphome B.

Indications émergentes en pédiatrie

Par ailleurs, de nouvelles cibles se développent :

- Pour permettre de lutter contre l'émergence de cellules leucémiques CD19⁻ après traitement par CAR T cells CD19.
- Pour cibler d'autres pathologies lymphoïdes (LAL T, lymphome de Hodgkin) ou myéloïdes (LAM).
- Pour cibler des tumeurs solides comme le neuroblastome.

Leucémies aiguës lymphoblastiques B : cibler le CD22

Le marqueur de surface CD22 est exprimé sur la plupart des cellules leucémiques de la lignée B. La perte de l'antigène CD19, dont les mécanismes sont divers, est logiquement à l'origine d'une résistance à l'immunothérapie anti CD19 [19,20]. Des études pilotes sont actuellement en cours chez l'enfant afin de tester la faisabilité d'un traitement par CAR T cells CD22+ dans le cadre de la prise en charge de LAL B réfractaire ou en rechute. Des constructions de CAR se basant sur différents épitopes de CD22 ont permis de démontrer une potentielle efficacité en l'associant aux domaines de signalisation du TCR 4-1 BB et CD28 [21]. Une étude de phase I avec escalade de dose a rapporté les résultats obtenus chez 21 patients d'âge pédiatrique et adulte incluant 17 patients préalablement traités par immunothérapie anti CD19. À une dose supérieure à 1×10^6 CD22-CAR T cells par kg, 11 patients sur 15 ont obtenu une rémission complète. La durée médiane de rémission était de 6 mois. Les rechutes étaient associées à une diminution de la densité d'expression du CD22

[22]. Un essai est actuellement ouvert à Stanford testant un CAR bispécifique antiCD19 /anti CD22 (NCT03241940)

Actuellement en France aucun essai thérapeutique n'est ouvert se basant sur ce traitement chez l'enfant.

Leucémie aiguë lymphoblastique T : cibler le CD5 et/ou le CD7

Problématique

Étendre l'indication des CAR T cells aux pathologies malignes T est problématique car la plupart des marqueurs T de surface pouvant être ciblés sont partagés par les cellules T normales et pathologiques. Cibler un marqueur T comme le CD5 ou le CD7 conduirait à une aplasie T et à une « lutte fratricide » à l'origine d'une destruction des cellules injectées. Cependant des études in vitro et précliniques montrent la faisabilité de cette démarche. Après cette « lutte fratricide » transitoire, les lymphocytes T activés transduits avec un CAR CD5 s'expandent. Ils ont la capacité de reconnaître et tuer des lignées de cellules T malignes, des cellules lymphoblastiques T primaires et de contrôler une maladie progressive dans des modèles murins de xénogreffe. La limitation de leur efficacité est due à une perte de l'expression du CD5 à la surface de cellules cibles [23].

Perspectives

Afin de réduire la « lutte fratricide » au cours de l'expansion des cellules T transduites plusieurs méthodes sont utilisées en préclinique : bloquer l'expression du CD7 par l'intermédiaire d'un PEBL (protein expression blocker) ou générer une disruption du gène CD7 au sein de lymphocytes T exprimant le CAR [24] sans compromettre leurs fonctions cytotoxiques.

Actuellement il existe un essai de phase I ouvert aux États-Unis utilisant les CAR CD5 (NCT03081910).

Leucémie aiguë myéloïde : cibler le CD33 et/ou le CD123

Le CD33 est un marqueur présent sur les cellules de leucémies aiguës myéloïdes (LAM) dans 87 % des cas mais également sur les progéniteurs myéloïdes normaux. Il est considéré comme une cible de choix depuis l'utilisation du gemtuzumab ozogamycin, anticorps monoclonal anti CD33 conjugué à l'immunotoxine calicheamicin, en combinaison avec de la chimiothérapie dans les LAM. L'utilisation de CAR T cells CD33 dans des modèles précliniques murins de LAM conduit à une éradication des blastes myéloïdes humains mais également à une myélotoxicité sévère. Afin d'éviter cet effet secondaire à long terme, des CAR T cells CD33 sont développés de manière à être exprimés de façon transitoire par l'utilisation d'un ARN modifié. Cette approche pourrait être utilisée pour obtenir une réponse satisfaisante avant allogreffe de moelle [25].

Le CD123 est un marqueur présent dans 78 % des LAM, mais également sur les progéniteurs et les cellules hématopoïétiques matures des cellules de la lignée myéloïde. Il est une cible de choix en s'attaquant aux cellules souches leucémiques. Des modèles précliniques montrent une efficacité in vivo de CAR

bispécifiques CD33/CD123 de 2^e génération et dont l'expression est uniquement transitoire [26].

L'expression de NKG2DL à la surface des cellules de LAM est rapportée dans plus de 2/3 des cas. Des lymphocytes T auto-logues ont été modifiés afin d'exprimer un CAR comprenant un récepteur NKG2D associé à la chaîne zeta du CD3. L'avantage est que les molécules NKG2DL sont très peu voire pas exprimées à la surface des cellules de tissu sain, ce qui rend ce traitement très spécifique des cellules tumorales. Cette technologie a été utilisée avec succès chez un patient de 52 ans présentant une LAM en rechute [27].

Lymphomes B : cibler le CD20

Le CD20 est un antigène présent à la surface des cellules B du stade pré B au lymphocyte B mature. Il est un marqueur de surface pour les lymphomes B comme le lymphome B diffus à grandes cellules. Les anticorps monoclonaux type rituximab ont transformé le pronostic des lymphomes B folliculaires et des DLBCL. Des essais précoces sont en cours pour cibler les lymphomes B réfractaires de l'adulte par des CAR T cells CD20+. Des CARs de première génération CD20+ ont été utilisés dans 2 études publiées avec des réponses obtenues respectivement pour 2/7 patients atteints d'un lymphome folliculaire ou du manteau et 0/2 patients atteints d'un lymphome B diffus à grandes cellules en rechute [1].

Lymphome de Hodgkin et lymphome anaplasique à grandes cellules : cibler le CD30

Le CD30 est un antigène présent dans les pathologies lymphoïdes type lymphome de Hodgkin (LH) et lymphome anaplasique à grandes cellules (ALCL). Une étude de phase I d'escalade de dose a été menée chez 9 patients réfractaires ou en rechute d'un LH ou d'un ALCL. Une injection de CAR T cells CD30+ exprimant la molécule de costimulation CD28 a été réalisée sans chimiothérapie préalable. Aucune toxicité n'a été attribuée aux CAR T cells. Sur les 7 patients présentant un LH, un patient a obtenu une rémission complète plus de 2 ans et demi après la 2^e injection, un patient pendant 2 ans et 3 ont connu une stabilisation de la maladie. Sur les 2 patients présentant un ALCL, un patient a été mis en rémission complète pendant 9 mois après la 4^e injection [28]. Actuellement, des essais cliniques précoces de CAR CD30 sont en cours, notamment aux États-Unis, dans les lymphomes Hodgkiniens et non hodgkiniens réfractaires CD30+. En France, aucun essai n'est ouvert dans cette indication, ni chez l'enfant, ni chez l'adulte.

Tumeurs solides : identifier la cible spécifique

Problématique

Plusieurs cibles surexprimées dans les tumeurs solides de l'adulte font l'objet de CAR T cells dédiées. La plupart des antigènes associés aux tumeurs sont également présents au sein de cellules normales. Cibler des antigènes de surface présents de façon non exclusive sur les cellules malignes conduit à des effets secondaires à court et/ou long termes plus ou moins acceptables. avec une augmentation des effets « on target / off tumor », soit une

augmentation de la toxicité [29]. De plus, le microenvironnement tumoral est à l'origine de 3 types de barrières empêchant une bonne accessibilité des CARs à la tumeur : environnementale (dysfonction des cellules endothéliales, hypoxie), inflammatoire (recrutement de cellules immunosuppressives, sécrétion de TGF beta, et de leucotriènes), et immunosuppressive (expression de ligands de PD -1).

Chez l'adulte l'utilisation de CAR T cells ciblant le récepteur tyrosine kinase ERBB2/HER2 a conduit à un décès chez le premier patient traité. Ce décès a été expliqué par la présence de cellules ERBB2+ à la surface de l'épithélium pulmonaire, conduisant à une défaillance pulmonaire et un syndrome de relargage cytokinique. Une défaillance hépatique est survenue après l'utilisation de CAR T cells ciblant le carbonic anhydrase IX (CAIX), antigène présent à la surface des cellules de carcinome rénal mais également sur l'épithélium biliaire sain.

Neuroblastome

Une des cibles actuellement étudiées dans les tumeurs solides est le GD2, ganglioside présent à la surface des neuroblastes mais également en moindre proportion sur les cellules nerveuses périphériques et le cervelet. L'utilisation sur des modèles précliniques de CAR T cells ciblant le GD2 a conduit à une neurotoxicité fatale [30]. Un essai de phase I a rapporté l'expérience de CAR GD2 de 1^{er} génération chez des patients atteints d'un neuroblastome. Sur 8 patients évaluable, 2, ont obtenu une réponse objective. Cependant l'utilisation de CAR de 2^e génération a été décevante avec une absence de réponse chez 11 patients après la 6^e semaine de traitement et l'absence de persistance des CAR [31].

Glioblastome

Une revue a rapporté récemment 3 études utilisant des CAR T cells en traitement des glioblastomes, pathologie dont la durée médiane de survie à la rechute n'excède pas 9 mois [32]. Une étude de phase I d'escalade de dose a évalué la faisabilité de l'administration de CAR T cells ciblant HER2 chez des patients présentant un glioblastome progressif sans lymphodéplétion préalable. Dix-sept patients ont été inclus dont 7 de moins de 18 ans avec une durée médiane de suivi de 8 mois (10 semaines-29 mois). Sur 16 patients évaluable, 1 a obtenu une réponse partielle pendant 9 mois, 7 une maladie stable pendant 8 semaines à 29 mois, 8 ont progressé. La survie globale médiane était de 11,1 mois (IC95 %, 4,1-27,2) après l'injection des CAR T cells [33].

L'injection locale de CAR T cells ciblant la sous unité a2 du récepteur de l'interleukine 13 dans les glioblastomes a montré une activité clinique sans toxicité notable (qui aurait pu être attendue après injection par voie systémique) [34]. L'injection intra tumorale pourrait être une voie d'amélioration dans l'utilisation des CAR T cells dans les tumeurs du système nerveux central.

Enfin, une étude de phase I a évalué l'utilisation de CAR T cells EGFRVIII chez des patients présentant un glioblastome résiduel ou en rechute. Cette étude a montré la faisabilité, sans CRS ni autre toxicité, de l'administration de CAR T cells dans cette indication.

Elle a également permis de montrer que l'injection intraveineuse de ces lymphocytes T modifiés avaient la capacité de passer la barrière hématoencéphalique car ils étaient retrouvés au sein de la tumeur [35].

Sarcomes

Une étude de phase I/II a évalué la faisabilité de CAR ciblant HER2 dans les sarcomes. Dix-neuf patients ont été inclus dont 12 de moins de 18 ans. Sur 17 patients évaluable, 4 ont présenté une maladie stable pendant 12 semaines à 14 mois sans toxicité significative [36].

Perspectives de développement et moyens

Place dans l'arsenal thérapeutique des LAL B

Actuellement, l'indication validée aux États-Unis (et en attente en Europe) des CAR T cells est le traitement des LAL-B CD19+ réfractaires ou en 2^e rechute ou plus, chez des patients de moins de 25 ans. Devant les taux de réponse importants secondaires à l'administration de cette thérapeutique il serait envisageable de considérer leur utilisation i) à la place d'une allogreffe de moelle pour les patients avec une maladie avancée (plus de 2 rechutes, rechute post allogreffe de moelle) puis pour les 1^{res} rechutes de haut risque et en 1^{re} ligne pour les LAL réfractaires et ii) à la place d'une chimiothérapie intensive prolongée en 1^{re} ligne pour les LAL de haut risque. Pour envisager cette indication, il est nécessaire de confirmer les résultats initiaux en termes d'efficacité (plus de patients traités et suivi plus prolongé) et de comprendre et maîtriser les effets secondaires spécifiques liés aux CAR T cells. Il est également indispensable d'améliorer leur accessibilité. En effet les CAR autologues ont l'inconvénient de requérir la présence d'un nombre suffisant de lymphocytes T chez le patient ainsi qu'un temps d'ingénierie parfois trop long. Ainsi sont développés des CAR allogéniques permettant de disposer à tout moment de lymphocytes T dirigés contre les cellules cibles définies (cf infra).

La place de l'allogreffe de moelle par rapport à l'administration des CAR T cells est également discutée. En effet la survie des patients traités par CAR T cells ne diffère pas selon qu'ils ont reçu une allogreffe de moelle au préalable ou pas [11]. Le traitement par CAR T cells permettrait soit d'obtenir une maladie résiduelle négative, facteur prédictif d'un meilleur succès de la greffe, soit de se passer d'une allogreffe de moelle, pourvoyeuse d'effets secondaires non négligeables.

Amélioration de l'accessibilité

CAR allogéniques

Le développement de CARs universels à partir de lymphocytes T issus de donneurs sains présente de nombreux avantages. Il permet de passer outre les difficultés de recueil de lymphocytes chez un patient préalablement traité par chimiothérapie. Il permet également de mettre à disposition immédiate des cellules

T modifiées « sur l'étagère » (off the shelf) selon la cible choisie. Le principe est d'inactiver le TCR endogène de la cellule T en question pour ainsi limiter le risque de réaction du greffon contre l'hôte. Deux nourrissons en rechute de LAL B avec réarrangement de MLL, ont ainsi reçu des CAR allogéniques anti-CD19. Ceux-ci subissent une triple manipulation 1) délétion de la chaîne alpha du récepteur T (TCR), 2) délétion du gène codant pour CD52 grâce à des « ciseaux moléculaires » (TALEN : transcription activator like effector nuclease), 3) insertion par vecteur lentiviral d'une construction (scFV anti-CD19-41BB-CD3 zeta). Les enfants ont reçu une lymphodéplétion intensifiée : Fludarabine, Cyclophosphamide et alemtuzumab (anti CD52). Malgré cela, l'expansion des cellules a été restreinte dans le temps. Une des hypothèses expliquant cette difficulté est la reconnaissance puis la destruction de ces lymphocytes modifiés par les cellules NK qui ont la capacité de cibler les cellules déficientes en CMH de classe I. Un des patients, non compatibles pour les allèles du CMH de classe I, a développé une réaction du greffon contre l'hôte par contamination lors de l'injection des CAR T cells par des lymphocytes T pour lesquels l'inactivation du TCR n'avait pas fonctionné [37]. Néanmoins, ces deux enfants ont reçu une allogreffe post CAR et vont bien avec un recul significatif (3 ans pour le premier patient).

Actuellement, deux essais internationaux de phase I/II sont en cours. Ils évaluent la faisabilité de l'utilisation de ces CARs universels anti-CD19 chez des patients d'âge pédiatrique (étude PALL, NCT02808442) ou adulte (étude CALM, NCT02746952) pris en charge pour une LAL B réfractaire ou en 2^e rechute (ou 1^{re} rechute si post-greffe). L'utilisation des CAR allogéniques se conçoit actuellement plus comme un pont vers la réalisation d'une allogreffe de moelle en situation de meilleur minimum tumoral.

D'autres CAR T cells allogéniques sont en cours d'essai, notamment anti CD123 (NCT03190278).

CAR multispécifiques

Deux stratégies de combinaisons de CAR sont développées, à l'origine de CAR bi-spécifiques ou dual-CAR. Soit le lymphocyte T exprime un CAR contenant 2 domaines de liaison différents « en tandem » (TanCAR) soit le lymphocyte T exprime 2 CAR différents (dual-CAR).

Cibler un antigène unique peut être insuffisant pour discriminer de façon certaine la cellule tumorale des cellules saines. Pour augmenter la spécificité, il est possible de créer un lymphocyte T qui, lorsqu'il reconnaît une cible n°1 par un CAR, entraîne un signal d'activation de la transcription d'un gène codant pour un CAR n°2, les 2 CAR reconnaissant 2 cibles spécifiques de la cellule tumorale, c'est le dual CAR [38]. Il permet de limiter la toxicité sur les cellules saines.

De plus, environ 20 % des rechutes de LAL B post injection de CAR CD19 sont liées à la perte d'expression du CD19 à la surface de la cellule leucémique. Ce phénomène serait dû soit à l'élimination des cellules porteuses de cet antigène soit à la sélection positive de sous clones CD19⁻ existant avant l'injection de CAR. L'utilisation de Tan-CAR CD19+CD22+ ou CD19+CD123+

permettraient ainsi de limiter cette pression de sélection. Ils ont montré leur efficacité dans l'émergence de rechutes CD19⁻ en préclinique [39].

Ces combinaisons de CAR ont montré une activité tumorale supérieure aux CAR ciblant un antigène unique in vivo en préclinique [40].

CAR combinés à une autre immunothérapie

L'utilisation de l'inhibiteur de tyrosine kinase Bruton, ibrutinib en préclinique dans les pathologies B malignes a montré une augmentation de l'activité des CAR T cells en diminuant la présence de récepteurs inhibiteurs à leur surface [41].

La combinaison de l'inhibiteur de PD1 pembrolizumab à des CAR T cells CD19 a été étudiée chez 4 enfant pris en charge pour une LAL B en rechute. L'administration du pembrolizumab a permis une augmentation de la détection et de la persistance des CAR associée à des réponses cliniques objectives [42].

Amélioration de l'efficacité dans les tumeurs solides

L'accessibilité des CAR T cells à la cible joue également un rôle indispensable dans les tumeurs solides. Le microenvironnement tumoral constitué de lymphocytes T régulateurs, cellules myéloïdes immunosuppressives, checkpoints immuns peut diminuer l'efficacité des CAR T cells. Des essais cliniques sont actuellement menés évaluant l'intérêt de combiner des anticorps bloquant PD1/PD-L1 à des CAR T cells GD2 dans les neuroblastomes [43]. Dans les tumeurs du système nerveux central, le rôle de la barrière hématoencéphalique ainsi que la circulation des lymphocytes T dans le SNC sont des freins éventuels à l'accessibilité des CAR au sein de la tumeur [32]. Enfin, les tumeurs solides peuvent présenter un défaut de présentation d'antigène à la surface cellulaire ce qui réduit l'action des CAR injectés.

Diminution de la toxicité

La toxicité aigüe induite par les CAR T cells nécessite une prise en charge adaptée. Des recommandations françaises ont été élaborées afin de définir les pré requis à la mise en place de protocoles de recherche clinique évaluant l'efficacité et la toxicité de cette thérapie, incluant la proximité de services de réanimation adaptés [44]. Néanmoins d'autres innovations en termes d'ingénierie permettent d'espérer diminuer les effets secondaires à plus long terme.

CAR d'expression transitoire

Pour diminuer le risque d'auto immunité induite par les CAR, il est possible d'introduire un système inductible au sein du lymphocyte T modifié capable de déclencher sa mort cellulaire lors de l'administration d'une molécule spécifique [45].

CAR inductible

La dernière génération de CAR en cours de développement consiste en l'utilisation d'un récepteur chimérique en 2 parties : une partie intracellulaire et transmembranaire sur la cellule qui contient les domaines d'activation et de costimulation du

lymphocyte et une partie qui formera le domaine extracellulaire que l'on injecte secondairement. Cette partie contient la sous unité capable de reconnaître l'antigène cible. Ces 2 parties sont reliées par un domaine *leucine zipper* et permettent de combiner plusieurs sous unités reconnaissant différentes cibles à la surface de la même cellule T. Leur activité peut également être stoppée par l'injection d'une molécule inhibitrice qui se fixe par l'intermédiaire du domaine *leucine zipper* [46]. Cette méthode pourrait augmenter la facilité d'accès aux CAR en limitant le temps de préparation des cellules et limiterait la survenue d'effets secondaires par la possibilité de stopper leur activité.

CAR NK

Les lymphocytes NK sont des cellules du système immunitaire inné qui peuvent cibler les cellules tumorales directement. Elles ne sont pas à la source de réaction du greffon contre l'hôte et peuvent constituer une source de CAR universels à disposition avec une bonne activité antitumorale et sans alloimmunité. De nombreuses études précliniques ont testé les CAR NK avec de multiples antigènes cibles dans les pathologies hématologiques malignes et les tumeurs solides. Un essai précoce est en cours aux États-Unis dans les pathologies lymphoïdes B CD19 réfractaires ou en rechute. Le CAR est transduit par un vecteur contenant également une expression d'IL15, nécessaire à la prolifération des cellules NK, et une caspase 9 inductible, gène suicide capable de déclencher l'apoptose de la cellules T pouvant être activé pharmacologiquement si nécessaire [47].

Vecteur alternatif de transduction

La plupart des CAR T cells utilisés actuellement en clinique sont transduits par l'intermédiaire de vecteurs type lentivirus ou rétrovirus. La construction de vecteurs rétroviraux est standardisée mais nécessite un processus long et laborieux. L'utilisation de lentivirus est encore plus contraignante économiquement. Il est donc nécessaire d'évaluer de nouveaux systèmes de vectorisation comme les transposons non viraux. Des études précliniques testent actuellement la production de CARCIK CD19, cellules « cytokine induced killer » issues de donneurs qui expriment le CAR par l'intermédiaire d'un transposon. Ces cellules exercent un effet antitumoral dose-dépendant et persistent in vivo sur des modèles de xéno greffes issues de patients. Elles présentent comme avantage d'être moins coûteuses, plus faciles d'accès et utilisables chez des patients lymphopéniques [39].

La transduction de CAR par l'intermédiaire d'un transposon type « sleeping beauty » et/ou « minicircle », a été montrée comme étant plus efficace : augmentation du nombre de cellules transduites et augmentation de la stabilité de la transduction, et plus sûre car non viral par rapport à l'utilisation de plasmides conventionnels [48,49]. Un essai est actuellement en cours à Monza en Italie.

Conclusion

Si leurs résultats se confirment à plus long terme, les CAR T cells vont vraisemblablement révolutionner le traitement des LAL de

la lignée B de l'enfant et du jeune adulte, voire de l'adulte [39]. Cependant, cette thérapeutique pose de multiples problèmes : complexité de mise en œuvre, coût extrême (tisagen lecleucel : 475000 dollars aux États-Unis), délais de production, toxicité immédiate et à moyen, voire long terme. Les rechutes liées à l'évolution clonale amènent à élaborer des stratégies d'optimisation avec l'utilisation de CAR multispécifiques. Les effets secondaires induits ont conduit à créer des nouvelles technologies qui permettront d'« allumer » ou d'« éteindre » le CAR en fonction de la réponse souhaitée et des effets secondaires rencontrés. La place exacte de ce traitement dans l'arsenal thérapeutique des LAL B en rechute ou réfractaire reste encore à définir. Les CAR T cells peuvent permettre d'obtenir une rémission moléculaire avant une allogreffe de moelle mais également se suffire à elles-mêmes en induisant des rémissions prolongées et la guérison.

Les résultats précoces des essais cliniques des CAR T cells CD19 dans les pathologies malignes B ont conduit à vouloir étendre l'utilisation de cette thérapeutique T adoptive aux tumeurs solides pédiatriques. Il reste encore de nombreux obstacles à franchir pour l'appliquer avec succès dans cette indication [43].

Remerciements

Hôpital Robert Debré : Jérôme Naudin, Stéphane Dauger, Serge Malbezin, Julie Roupert
Hôpital Saint Louis : Jérôme Larghero, Valérie Vanneau, Isabelle Madelaine

Déclaration de liens d'intérêts :

Les auteurs n'ont pas transmis leurs liens d'intérêts.
Cet article fait partie du numéro supplément *Les cellules CAR-T : une révolution thérapeutique* ? réalisé avec le soutien institutionnel des partenaires Gilead : Kite et Celgene.

Références

- [1] Ramos CA, Heslop HE, Brenner MK. CAR-T Cell Therapy for Lymphoma. *Annu Rev Med* 2016;67:165-83.
- [2] Davila ML, Sadelain M. Biology and clinical application of CAR T cells for B cell malignancies. *Int J Hematol* 2016;104:6-17.
- [3] Wang X, Rivière I. Manufacture of tumor- and virus-specific T lymphocytes for adoptive cell therapies. *Cancer Gene Ther* 2015;22:85-94.
- [4] Zhang C, Liu J, Zhong JF, Zhang X. Engineering CAR-T cells. *Biomark Res [Internet]*. 2017;5:22.
- [5] Cooper LNJ, Topp MS, Serrano LM, Gonzalez S, Chang W-C, Naranjo A, et al. T-cell clones can be rendered specific for CD19: toward the selective augmentation of the graft-versus-B-lineage leukemia effect. *Blood* 2003;101:1637-44.
- [6] Milone MC, Fish JD, Carpenito C, Carroll RG, Binder GK, Teachey D, et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 2009;17:1453-64.
- [7] Carpenito C, Milone MC, Hassan R, Simonet JC, Lakhai M, Suhoski MM, et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:3360-5.
- [8] Savoldo B, Ramos CA, Liu E, Mims MP, Keating MJ, Carrum G, et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest* 2011;121:1822-6.
- [9] van der Stegen SJC, Hamieh M, Sadelain M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. *Nat Rev Drug Discov* 2015;14:499-509.
- [10] Pegram HJ, Purdon TJ, van Leeuwen DG, Curran KJ, Giralt SA, Barker JN, et al. IL-12-secreting CD19-targeted cord blood-derived T cells for the immunotherapy of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2015;29:415-22.
- [11] Gardner RA, Finney O, Annesley C, Brakke H, Summers C, Leger K, et al. Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults. *Blood* 2017;129:3322-31.
- [12] Turtle CJ, Hanafi L-A, Berger C, Sommermeyer D, Pender B, Robinson EM, et al. Addition of Fludarabine to Cyclophosphamide Lymphodepletion Improves In Vivo Expansion of CD19 Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells and Clinical Outcome in Adults with B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* 2015;126:3773-3773.
- [13] Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2013;368:1509-18.
- [14] Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Lond Engl* 2015;385:517-28.
- [15] Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* 2014;371:1507-17.
- [16] Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 2018;378:439-48.
- [17] Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis IJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 2017;377:2531-44.
- [18] Roberts ZJ, Better M, Bot A, Roberts MR, Ribas A. Axicabtagene ciloleucel, a first-in-class CAR T cell therapy for aggressive NHL. *Leuk Lymphoma* 2017;1-12.
- [19] Jacoby E, Nguyen SM, Welp KM, Qin H, Yang Y, Chien CD, et al. Lineage Switch As a Relapse Mechanism of Pre-B Acute Lymphoblastic Leukemia Following CD19 CAR. *Blood* 2015;126:2524-2524.
- [20] Sotillo E, Barrett DM, Black KL, Bagashev A, Oldridge D, Wu G, et al. Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. *Cancer Discov* 2015;5:1282-95.
- [21] Haso W, Lee DW, Shah NN, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Pastan IH, et al. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2013;121:1165-74.
- [22] Fry TJ, Shah NN, Orentas RJ, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Ramakrishna S, et al. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nat Med* 2018;24:20-8.
- [23] Mamonkin M, Rouce RH, Tashiro H, Brenner MK. A T-cell-directed chimeric antigen receptor for the selective treatment of T-cell malignancies. *Blood* 2015;126:983-92.
- [24] Gomes-Silva D, Srinivasan M, Sharma S, Lee CM, Wagner DL, Davis TH, et al. CD7-

- edited T cells expressing a CD7-specific CAR for the therapy of T-cell malignancies. *Blood* 2017;130:285-96.
- [25] Kenderian SS, Ruella M, Shestova O, Klichinsky M, Aikawa V, Morrisette JJD, et al. CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2015;29:1637-47.
- [26] Cartellieri M, Feldmann A, Koristka S, Arndt C, Loff S, Ehninger A, et al. Switching CAR T cells on and off: a novel modular platform for retargeting of T cells to AML blasts. *Blood Cancer J* 2016;6:e458.
- [27] Sallman DA, Brayner J, Sagatys EM, Loney C, Breman E, Agaoglu S, et al. NKG2D-based chimeric antigen receptor therapy induced remission in a relapsed/refractory acute myeloid leukemia patient. *Haematologica* 2018;103.
- [28] Ramos CA, Ballard B, Zhang H, Dakhova O, Gee AP, Mei Z, et al. Clinical and immunological responses after CD30-specific chimeric antigen receptor-redifferentiated lymphocytes. *J Clin Invest* 2017;127:3462-71.
- [29] Castellarin M, Watanabe K, June CH, Kloss CC, Posey AD. Driving cars to the clinic for solid tumors. *Gene Ther* 2018;25:165-75.
- [30] Richman SA, Nunez-Cruz S, Moghimi B, Li LZ, Gershenson ZT, Mourelatos Z, et al. High-Affinity GD2-Specific CAR T Cells Induce Fatal Encephalitis in a Preclinical Neuroblastoma Model. *Cancer Immunol Res* 2018;6:36-46.
- [31] Majzner RG, Heitzeneder S, Mackall CL. Harnessing the Immunotherapy Revolution for the Treatment of Childhood Cancers. *Cancer Cell* 2017;31:476-85.
- [32] Migliorini D, Dietrich P-Y, Stupp R, Linette GP, Posey AD, June CH. CAR T-Cell Therapies in Glioblastoma: A First Look. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2018;24:535-40.
- [33] Ahmed N, Brawley V, Hegde M, Biela-mowicz K, Kalra M, Landi D, et al. HER2-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified Virus-Specific T Cells for Progressive Glioblastoma: A Phase 1 Dose-Escalation Trial. *JAMA Oncol* 2017;3:1094-101.
- [34] Brown CE, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner JR, Naranjo A, et al. Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *N Engl J Med* 2016;375:2561-9.
- [35] Choi BD, O'Rourke DM, Maus MV. Engineering Chimeric Antigen Receptor T cells to Treat Glioblastoma. *J Target Ther Cancer* 2017;6:22-5.
- [36] Ahmed N, Brawley VS, Hegde M, Robertson C, Ghazi A, Gerken C, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) — Specific Chimeric Antigen Receptor — Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma. *J Clin Oncol* 2015;33:1688-96.
- [37] Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, Adams S, Amrolia 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 25;9.
- [38] Roybal KT, Rupp LJ, Morsut L, Walker WJ, McNally KA, Park JS, et al. Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits. *Cell* 2016;164:770-9.
- [39] Biondi A, Magnani CF, Tettamanti S, Gaipa G, Biagi E. Redirecting T cells with Chimeric Antigen Receptor (CAR) for the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Autoimmun* 2017;85:141-52.
- [40] Ruella M, Barrett DM, Kenderian SS, Shestova O, Hofmann TJ, Perazzelli J, et al. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *J Clin Invest* 2016;126:3814-26.
- [41] Fraietta JA, Beckwith KA, Patel PR, Ruella M, Zheng Z, Barrett DM, et al. Ibrutinib enhances chimeric antigen receptor T-cell engraftment and efficacy in leukemia. *Blood* 2016;127:1117-27.
- [42] Maude SL, Hucks GE, Seif AE, Talekar MK, Teachey DT, Baniewicz D, et al. The effect of pembrolizumab in combination with CD19-targeted chimeric antigen receptor (CAR) T cells in relapsed acute lymphoblastic leukemia (ALL). *J Clin Oncol* 2017;35:103-103.
- [43] June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science* 2018 23;359:1361-5.
- [44] Yakoub-Agha I, Ferrand C, Chalandon Y, Ballot C, Castilla Llorente C, Deschamps M, et al. [Prerequisite for hematopoietic cellular therapy programs to set up chimeric antigen receptor T-cell therapy (CAR T-cells): Guidelines from the Francophone Society of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy (SFGM-TC)]. *Bull Cancer (Paris)* 2017;104:S43-58.
- [45] Di Stasi A, Tey S-K, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med* 2011;365:1673-83.
- [46] Cho JH, Collins JJ, Wong WW. Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses. *Cell* 2018;173:1426-38.
- [47] Mehta RS, Rezvani K. Chimeric Antigen Receptor Expressing Natural Killer Cells for the Immunotherapy of Cancer. *Front Immunol* 2018;9:283.
- [48] Kebriaei P, Singh H, Huls MH, Figliola MJ, Bassett R, Olivares S, et al. Phase I trials using Sleeping Beauty to generate CD19-specific CAR T cells. *J Clin Invest* 2016;126:3363-76.
- [49] Hudecek M, Gogishvili T, Monjezi R, Wegner J, Shankar R, Kruesemann C, et al. Minicircle-Based Engineering of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. Recent Results Cancer Res Fortschritte Krebsforsch Progres Dans Rech Sur Cancer 2016;209:37-50.