

Механизмы резистентности В-линейного острого лимфобластного лейкоза при применении CD19-направленной иммунотерапии

Е. В. Глуханюк¹, А. В. Степанов², А. М. Попов¹, М. А. Масчан¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, 1;

²ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН»; Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Контакты: Михаил Александрович Масчан mmaschan@yandex.ru

Иммунотерапия — наиболее бурно развивающаяся область клинической онкогематологии. Существенные успехи иммунотерапии связаны с таргетированием антигена CD19, экспрессированного на поверхности опухолевых клеток при В-линейном остром лимфобластном лейкозе и В-клеточных лимфомах. CD19-направленная терапия в мире одобрена к клиническому применению в 2 форматах: CD3 × CD19 биспецифичный препарат (блинатумомаб) и аутологичный клеточный продукт CD19 CAR-T-лимфоциты (chimeric antigen receptor T-lymphocyte). Первый опыт клинического применения данных препаратов показал беспрецедентную эффективность в терапии рецидивов и рефрактерных форм В-линейных лейкозов и лимфом у детей и взрослых. Результаты первых исследований также продемонстрировали, что опухоли способны ускользать из-под иммунологического контроля и терять чувствительность к CD19-направленной иммунотерапии. Механизмы ускользания активно изучаются и включают разнообразные биологические пути: от альтернативного сплайсинга изоформ CD19 до иммуносупрессивного микроокружения опухоли. В настоящем обзоре кратко суммированы данные о механизмах резистентности В-линейных опухолей к CD19-направленной иммунотерапии и потенциальных путях ее преодоления.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, иммунотерапия, химерный антигенный рецептор, резистентность, CAR-T-лимфоциты, биспецифические антитела

Для цитирования: Глуханюк Е. В., Степанов А. В., Попов А. М., Масчан М. А. Механизмы резистентности В-линейного острого лимфобластного лейкоза при применении CD19-направленной иммунотерапии. Онкогематология 2018;13(4):27–36.

DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-4-27-36

CD-19-directed immunotherapy resistance mechanisms of B-precursor acute lymphoblastic leukemia

E. V. Glukhanyuk¹, A. V. Stepanov², A. M. Popov¹, M. A. Maschan¹

¹Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology; 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia;

²Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry; 16/10 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117997, Russia

Immunotherapy is the most rapidly evolving field in clinical malignant hematology. Targeting of the B-lineage surface antigen CD19 in B-lineage acute lymphoblastic leukemia and B-cell lymphoma is a story of great success. Recently two approaches of CD19 immunotargeting were approved for clinical application: CD3 × CD19 bi-specific T-cell engager blinatumomab and CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T-cells. Both approaches demonstrated an unprecedented activity in a cohort of patients with relapsed and refractory B-cell leukemia and lymphoma both in the adult and pediatric population. Early clinical research has showed that tumors are able to escape the immunological control and become resistant to the immune attack. Mechanisms of the tumor immune escape are being actively studied and include diverse pathways, such as alternative splicing of CD19 and immunosuppressive tumor microenvironment. Current review briefly summarizes data regarding the mechanisms of CD19-positive leukemia resistance to CD19 immune targeting and discusses potential approaches to overcome it.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, immunotherapy, chimeric antigen receptor, resistance, CAR-T-lymphocytes, bispecific antibodies

For citation: Glukhanyuk E. V., Stepanov A. V., Popov A. M., Maschan M. A. CD-19-directed immunotherapy resistance mechanisms of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. Onkogematologiya = Oncohematology 2018;13(4):27–36.

Введение

На сегодняшний день иммунотерапия относится к одной из самых бурно развивающихся областей борьбы с онкологическими заболеваниями. В области

лечения гемобластозов наиболее заметный прогресс достигнут в иммунотерапии В-линейных опухолей: первым клинически успешным подходом стало таргетирование поверхностного В-линейного антигена

CD19 с использованием эффекторных механизмов цитотоксических Т-лимфоцитов. Среди методов перенаправления Т-лимфоцитов на CD19-позитивные мишени наиболее эффективными оказались биспецифичные антитела, такие как блинатумомаб, и генетически модифицированные Т-лимфоциты, несущие химерный антигенный рецептор, специфичный к CD19 (CD19 CAR-T (chimeric antigen receptor T-lymphocyte)). По результатам успешных клинических испытаний эти подходы были одобрены для терапии пациентов с рецидивами и рефрактерными формами острого лимфобластного лейкоза.

Применение блинатумомаба и CD19 CAR-T позволило достичь весьма обнадеживающих результатов при лечении резистентных и рецидивирующих форм В-линейных заболеваний. Так, частота полных ремиссий при терапии В-линейного острого лимфобластного лейкоза (ВП-ОЛЛ) составила 56 % в когорте взрослых больных [1] и 45 % в когорте детей [2] при применении блинатумомаба и до 90 % у пациентов при использовании CD19 CAR-T [3]. Однако, несмотря на хороший инициальный ответ, доля неудач, обусловленных первичной резистентностью или рецидивами заболевания, остается довольно высокой.

Исследования последних лет позволили значительно продвинуться в понимании биологических и молекулярных основ развития рецидивов и рефрактерности, были получены данные по фармакодинамическим особенностям действия блинатумомаба и CD19 CAR-T, все больше работ посвящены вопросам выявления предикторных факторов, определяющих успех терапии. Все это дает надежду на разработку новых подходов к профилактике и терапии рецидивов ВП-ОЛЛ при применении таргетной иммунотерапии.

В настоящем обзоре суммированы современные представления о механизмах, обеспечивающих резистентность В-линейных опухолей к иммунотерапии, направленной на антиген CD19.

Механизм действия блинатумомаба и CD19 CAR-T-лимфоцитов

Блинатумомаб — биспецифичная молекула, обозначаемая в литературе как BiTE (bi-specific T-cell engager), состоящая из 2 одноцепочечных переменных фрагментов (scFv) моноклональных антител, специфичных к CD19 (линейно-специфичный маркер В-лимфоцитов) и эpsilon-цепи CD3 (линейно-специфичный маркер Т-лимфоцитов). Принцип работы антитела заключается в рекрутировании собственных Т-клеток и перенаправлении их эффекторных функций на клетки-мишени, несущие маркер CD19, к числу которых относятся бластные клетки из В-линейных предшественников. Рекрутирование способствует образованию промежуточной цитолитической связи с последующей активацией, пролиферацией Т-клеток и лизисом CD19-экспрессирующих клеток. Примечательно, что анти-CD19-scFv обладает большей аффин-

ностью, чем анти-CD3-часть, что может обуславливать высокую эффективность препарата даже при невысоком уровне CD3-клеток. Одной из особенностей BiTE является короткий период полувыведения, равный примерно 2 ч, что объясняет необходимость его продолжительного введения. Препарат применяется при лечении больных с рефрактерной формой неходжкинской лимфомы, минимальной остаточной болезнью ВП-ОЛЛ, рецидивирующим или рефрактерным ВП-ОЛЛ [4].

Принцип действия CD19 CAR-T — использование аутологичных или аллогенных Т-клеток, экспрессирующих химерный рецептор, сочетающий в себе scFv-часть от моноклонального антитела с заданной специфичностью и внутриклеточную сигнальную часть от Т-клеточного рецептора, его CD3 ζ -цепи. CAR-T-клетки 1-го поколения, снабженные только одной сигнальной последовательностью, не показали достаточной эффективности, так как их активация не приводила к достаточной пролиферации и полноценному созреванию эффекторных функций. В структуре внутриклеточного домена CAR-T-клеток 2-го поколения помимо домена CD3 ζ -цепи используется дополнительный костимуляторный домен, заимствованный от физиологических костимуляторных молекул CD28 или 4-1BB, что приводит к полной активации CAR-T-клеток при взаимодействии с клеткой-мишенью. Это определило значительно большую эффективность CAR-T-клеток 2-го поколения и их внедрение в клиническую практику [5].

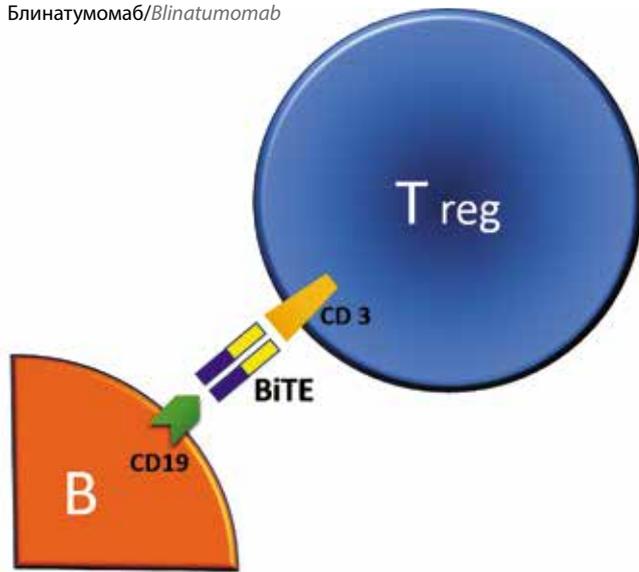
Принцип действия блинатумомаба и CD19 CAR-T проиллюстрирован на рис. 1.

CD19 как мишень для иммунотерапии В-клеточных заболеваний. Проблема CD19-селектирующего действия CD19-направленной иммунотерапии

Идеальная мишень для таргетной терапии с помощью антител — структура, которая стабильно, селективно и на достаточном уровне экспрессируется на поверхности всех опухолевых клеток. Рецептор CD19 частично удовлетворяет указанным требованиям. Его экспрессия на клетках ВП-ОЛЛ носит тотальный характер, что позволяет использовать таргетирование CD19 в режиме монотерапии. Необходимо учитывать, что антиген CD19 лишен опухолевой специфичности, являясь пан-В-клеточным антигеном. Таким образом, его таргетирование приводит к элиминированию всего В-клеточного пула, приводя к временному дефициту антителообразования.

Помимо широкой распространенности и устойчивой экспрессии, для идеальной мишени желательно, чтобы молекула выполняла незаменимые функции в опухолевой клетке. CD19 играет важную роль в функционировании пре-В-клеточного рецептора (pre-BCR) — участвует в pre-BCR-зависимой активации пути фосфоинозитол-3-киназы (PI3K) и активации pre-BCR-независимых путей (активация фактора MYC).

Блинатумомаб/Blinatumomab



CD19 CAR-T-клетка/CD19 CAR-T-cell

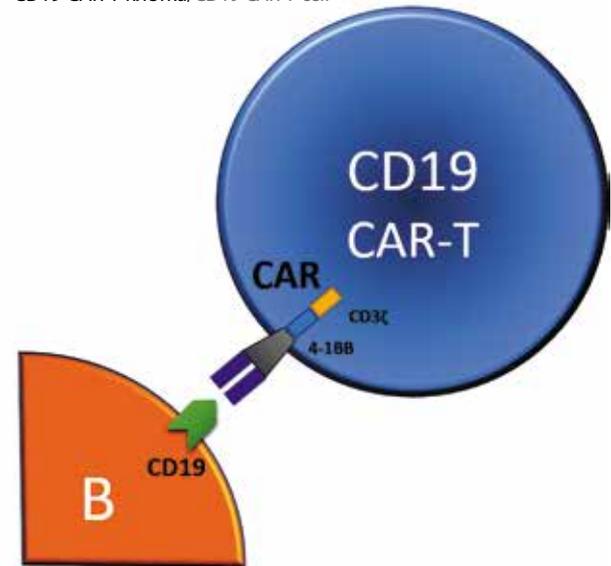


Рис. 1. Принцип CD19-направленной иммунотерапии (комментарии в тексте)
 Fig. 1. The principle of CD19-directed immunotherapy (comments in the text)

Однако для опухолевых клеток в экспериментах *in vitro* и *in vivo* было показано [6], что выживаемость и распространение бластных клеток при ВП-ОЛЛ не зависят от экспрессии CD19, а значит роль этого рецептора, по-видимому, ограничена. Таким образом, CD19, вероятно, является не столько «функциональной», сколько «навигационной» мишенью.

CD19-направленная терапия – мощный селективный фактор, приводящий к снижению экспрессии CD19 опухолевыми клетками вплоть до полной потери данного антигена. Появление CD19-негативных опухолевых клонов является не только одной из причин неудач применения CD19-направленной терапии [7], но и существенно осложняет мониторинг минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии в образцах костного мозга [9, 10], что требует использования расширенной панели моноклональных антител [11].

Современные представления о биологических основах неудач CD19-направленной иммунотерапии В-клеточных опухолей

По уровню экспрессии CD19 на поверхности опухолевых клеток при развитии рецидива или рефрактерности все случаи неудач можно разделить на 2 группы: CD19-позитивные и CD19-негативные рецидивы. Принципиальная разница между этими группами заключается в ведущей причине развития неудачи. Механизмом развития CD19-негативных рецидивов является «уход» опухолевых клеток путем потери или снижения экспрессии CD19, причина CD19-позитивных рецидивов – функциональный дефект эффекторных механизмов, т. е. Т-лимфоцитов.

Развитие CD19-позитивных рецидивов. Развитие данных рецидивов/рефрактерности связывают, прежде

всего, с недостаточно эффективной активацией и пролиферацией Т-клеток, являющейся критически важной как для CD19 CAR-T-клеток, так и для блинатумомаба (рис. 2).

Классический пример неудачного применения CD19 CAR-T-клеток – использование CD19 CAR-T 1-го поколения с относительно простым устройством химерного рецептора без дополнительных костимуляторных доменов во внутриклеточной части [5]. Взаимодействие с CD19-экспрессирующими клетками не приводило к достаточной активации CD19 CAR-T, что и явилось основой неудачи.

В крупном исследовании по применению 19-28z CAR-T (CD19 CAR-T-клеток с коактивационным доменом CD28) у 53 взрослых больных с рецидивами/рефрактерными ВП-ОЛЛ было показано [12], что на общую выживаемость пациентов не оказывает существенного влияния ни продолжительность персистенции, ни величина пиковой экспансии (т. е. максимального количества) CD19 CAR-T-лимфоцитов. Прогностической значимостью обладает соотношение пиковой экспансии Т-клеток к исходной массе опухоли в костном мозге по отношению как к общей, так и к безрецидивной выживаемости. Прогностическая значимость данного соотношения сохраняется даже в случае включения в анализ последующей аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Известно, что при применении CD19 CAR-T-лимфоцитов при рецидивирующей или рефрактерной форме хронического лимфоцитарного лейкоза удается достичь устойчивой ремиссии лишь в 26 % случаев. Авторы проанализировали потенциальные прогностические факторы [13]. В исследование был включен 41 пациент с продвинутой стадией хронического лимфоцитарного лейкоза, получивший по крайней мере

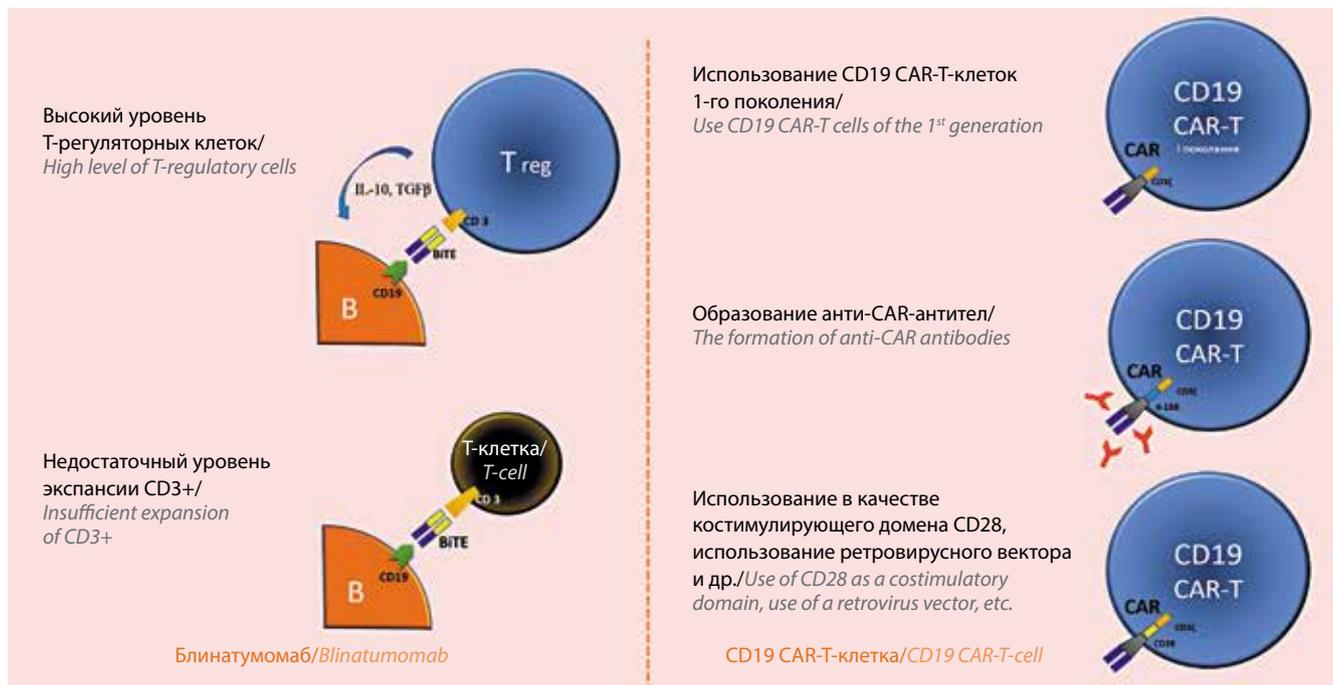


Рис. 2. Механизмы развития CD19-позитивных рецидивов и рефрактерности
Fig. 2. Mechanisms for CD19-positive relapse and refractory development

одно введение CD19 CAR-T-клеток. Хороший клинический эффект не зависел ни от характеристик пациентов, ни от особенностей болезни (возраст пациентов, предшествующая терапия, масса опухолевых клеток в периферической крови и прочие факторы). Ответ на терапию напрямую коррелировал с активностью экспансии Т-клеток после введения. Детальный транскрипционный анализ CAR-T-клеток перед введением показал, что большим потенциалом к экспансии обладают Т-клетки с повышенной экспрессией генов «памяти», что приводит к повышению активности, в частности IL-6/STAT3-сигнального пути, в отличие от клеток, в которых активны пути, связанные с «эффекторной» дифференцировкой, апоптозом и гликолизом. Продолжительная ремиссия была ассоциирована с повышенным уровнем CD27⁺CD45RO⁻CD8⁺-Т-клеток в клеточном материале до генерации CD19 CAR-T. Популяция полученных из этих клеток CAR-T-лимфоцитов обладает повышенной экспрессией рецептора к IL-6, и как следствие, более чувствительна к IL-6; эксперименты по блокаде IL-6/STAT3 приводили к ограничению пролиферации данных клеток, что может снижать уровень экспансии.

Важно отметить, что персистенция CD19 CAR-T-лимфоцитов зависит от типа используемого вектора и внутриклеточного сигнального домена. Так, ретровирусные векторы и CD28-сигнальный домен ассоциированы с меньшей длительностью персистенции CD19 CAR-T-лимфоцитов по сравнению с лентивирусными векторами и сигнальным доменом 4-1BB [14]. Кроме того, у части пациентов персистенция CD19 CAR-T-лимфоцитов может быть ограничена разви-

ем иммунного ответа с формированием антител, специфичных к антигенным детерминантам scFv мыши в составе химерного рецептора.

При применении блинатумомаба процесс экспансии Т-клеток выражается в пролиферации CD4⁺- и CD8⁺-популяций и повышении экспрессии на этих клетках маркеров активации – CD25, CD69, LFA-1. Примечательно, что степень экспансии (в виде увеличения числа CD3⁺-Т-клеток) коррелировала с клиническим ответом и была более выражена в группе пациентов, ответивших на терапию [15]. Более того, существуют данные о том, что уровень CD3⁻ и CD3/CD8-лимфоцитов до начала использования блинатумомаба не имеет самостоятельной прогностической значимости, важна именно их способность к экспансии [16].

В отношении блинатумомаба критичным является то, что помимо рекрутирования классических цитотоксических популяций CD3/CD8-лимфоцитов на CD19-экспрессирующие клетки, блинатумомаб способен привлекать Т-регуляторные лимфоциты (Treg), обладающие иммуносупрессивным действием. Прогностическую значимость показал уровень Treg (CD4/CD25/FOXP3⁺) до начала курса лечения блинатумомабом: в группе больных, ответивших на терапию (22 из 42 пациентов), средний уровень Treg составил 4,82 %; в группе больных, не ответивших на терапию (20 из 42 пациентов), – 10,25 % [16]. Уровень 8,525 % явился «пограничным» и позволял отграничить 100 % ответивших и 70 % не ответивших на терапию пациентов. В работе приведено объяснение эффекта *in vitro*: Treg, несущие CD3, также способны рекрутироваться блинатумомабом,

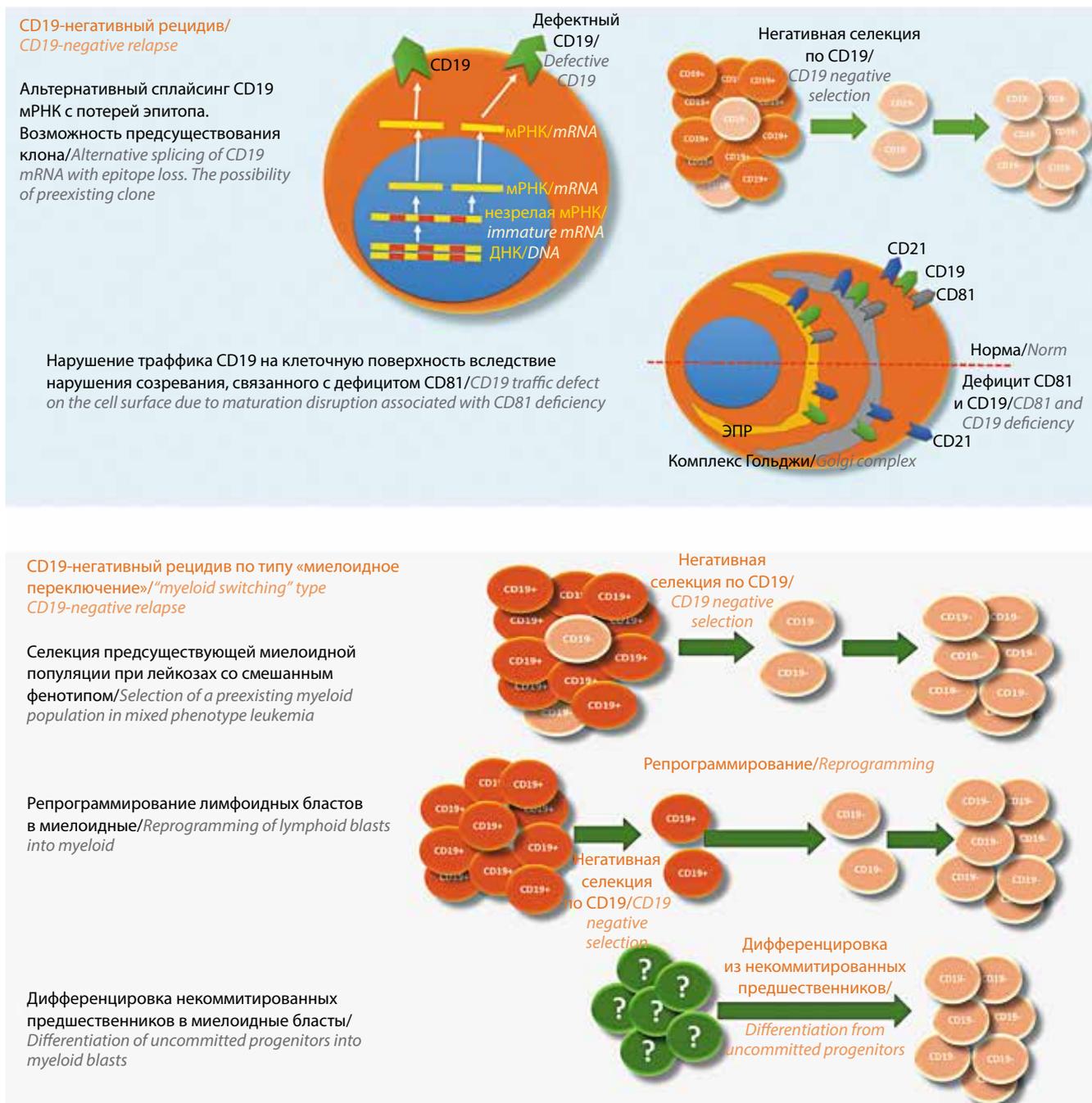


Рис. 3. Механизмы развития CD19-негативных рецидивов. ЭПР – эндоплазматическая сеть
Fig. 3. Mechanisms for CD19-negative relapse development. EPR – endoplasmic reticulum

и, активируясь, индуцировать иммуносупрессивный ответ за счет локального повышения концентрации IL-10 и TGF- β . Авторы отмечают, что для пациентов с высоким уровнем Treg перед курсом блинатумомаба может быть оправдана стратегия *in vivo* деpleции Т-клеток с помощью, например, курсов химиотерапии, включающих циклофосфамид и флударабин. Несмотря на деpleцию всех популяций Т-лимфоцитов, гипотетическая польза от снижения уровня Treg превышает вред от уменьшения эффекторных популяций.

Развитие CD19-негативных рецидивов. CD19-негативные рецидивы представляют качественно иной тип

рецидивов – они сопровождаются потерей «навигационного» маркера под действием мощного селектирующего фактора таргетной иммунотерапии. Описано несколько механизмов потери экспрессии CD19: 1) альтернативный сплайсинг CD19 мРНК; 2) дисфункция комплекса CD81; 3) миелоидное переключение (рис. 3).

1. Альтернативный сплайсинг CD19 мРНК. В 2015 г. E. Sotillo и соавт. впервые описали механизм возникновения CD19-негативных опухолевых клеток вследствие образования особых сплайс-вариантов мРНК CD19 с удаленным экзоном 2 [17]. Делеция данного

экзона приводила к синтезу неполноценного CD19 без эпитопа, распознаваемого клоном FMC63, на основе которого создан как блинатумомаб, так и большинство используемых CD19 CAR-T-лимфоцитов. Кроме механизма возникновения *de novo* существуют данные о возможности существования опухолевых клеток, экспрессирующих такие сплайс-варианты до начала терапии. Так, показана принципиальная возможность существования клеток с дефектным CD19-рецептором как у детей и взрослых с CD19-позитивным ВП-ОЛЛ, так и при исследовании В-клеточных предшественников в костном мозге здоровых лиц [18]. В условиях действия CD19-направленной терапии данные популяции могут явиться источником для развития CD19-негативного рецидива.

2. Нарушение траффика CD19 на клеточную поверхность вследствие нарушения созревания, связанного с дефицитом CD81. В работе F. Braig и соавт. описан случай развития CD19-негативного рецидива после 2-го курса терапии блинатумомабом у пациента с ВП-ОЛЛ и транслокацией t(11;19) [19]. Бластные клетки во время рецидива сохранили В-линейный фенотип, также сохранялась транслокация t(11;19). Опухолевые клетки экспрессировали полноразмерную форму мРНК CD19, что исключало развитие рецидива по механизму образования сплайс-изоформ. Примечательно, что в CD19-негативных бластах была снижена экспрессия CD81 и CD21. Обе эти молекулы участвуют в формировании корцепторного комплекса CD19/CD81/CD21/CD225 на поверхности В-клеток. CD81 участвует в процессе гликозилирования CD19 в эндоплазматическом ретикулуме, что далее способствует траффика CD19 в составе рецепторного комплекса на поверхность клетки. Авторы провели анализ статуса гликозилирования CD19, который оказался неполноценным, и пришли к выводу о связи дефицита CD81 с дефицитом поверхностного CD19. Неясной осталась причина дефицита CD81. Мутации в гене *CD81* приводят у человека к развитию первичного иммунодефицитного состояния — общей вариабельной иммунной недостаточности. Однако ни мутаций в гене *CD81*, ни признаков данного иммунодефицитного состояния у пациента не выявлено.

3. Рецидивы по механизму миелоидного переключения. В группе CD19-негативных рецидивов отдельного внимания заслуживают рецидивы по типу миелоидного переключения. Основными механизмами этого переключения являются селекция предсуществующей миелоидной популяции, характерной для лейкозов со смешанным фенотипом (в том числе варианты с наличием крайне низкого, недетектируемого количества миелоидных клеток), и механизм возникновения клеток с миелоидным фенотипом *de novo*, как правило, связанный с лейкозами, ассоциированными с перестройками гена *KMT2A*. Примечательно, что при возникновении миелоидной популяции *de novo* для части пациентов миелоидные бласты сохраняют специфическую рекомбинацию в локусе гена тяжелой

цепи IgG (*IGH*), что может свидетельствовать в пользу механизма репрограммирования лимфоидных бластов в миелоидные [20, 21]; для других пациентов специфическая рекомбинация в *IGH* не сохраняется, что может свидетельствовать о миелоидной дифференцировке из некоммутированных предшественников. Возможность возникновения миелоидных популяций из стволовых клеток и некоммутированных предшественников после проведенного курса терапии блинатумомабом убедительно показана на когорте больных с BCR-ABL1-позитивным ВП-ОЛЛ [22].

Стратегии предотвращения и лечения рецидивов

Понимание биологических и молекулярных основ развития рецидивов и рефрактерности — необходимая основа для разработки стратегий по их предотвращению и лечению. Следуя классификации механизмов неудач, данные стратегии можно условно разделить на 2 группы: направленные на профилактику и лечение случаев «ухода» от таргетной терапии и направленные на «усиление» Т-клеточного звена.

Стратегии предотвращения потери эффективности Т-клеточного звена

Сокращение инициального бластоза в костном мозге.

По данным некоторых клинических исследований по оценке эффективности как блинатумомаба [23], так и CD19 CAR-T-клеток [12], показано снижение частоты достижения полной ремиссии в случае высокого бластоза в костном мозге — 50 % и более. Таким образом, снижение инициально высокого уровня бластных клеток может быть потенциальной стратегией, повышающей эффективность терапии. В случае использования блинатумомаба при редукции бластоза могут быть оправданы схемы химиотерапии, включающие Т-лимфодеплетирующие агенты, такие как циклофосфамид и флударабин, в том числе снижающие высокий уровень иммуносупрессивных Treg — важного отрицательного прогностического фактора [13].

Повторное применение. Распространенной схемой применения блинатумомаба является 6-недельный цикл (42 дня): 4-недельный курс (28 дней) продленного введения препарата, после которого следует контрольное обследование с исследованием аспирата костного мозга для оценки статуса ремиссии, 2-недельный перерыв (14 дней) и 4-недельный повторный курс (28 дней) продленного введения препарата с последующей повторной оценкой статуса ремиссии.

Существует ряд наблюдений по эффективности повторного применения блинатумомаба в случае возникновения CD19-позитивного рецидива после предшествующего успешного достижения ремиссии при первичном применении блинатумомаба. В исследовании [24] сообщается о достижении полной ремиссии у 4 (36 %) из 11 пациентов после 1-го курса введения, что соотносится с частотой достижения ремиссии в исследованиях при первичном применении блинатумомаба (44 %) [23].

Возможность применения CD19 CAR-T-лимфоцитов после неудачного курса лечения блинатумомабом. Ранее были опубликованы данные об успешном применении CD19 CAR-T-клеток после неудачного использования блинатумомаба. В исследовании [12] 9 (69 %) из 13 пациентов с рецидивом ВП-ОЛЛ, рефрактерных к лечению или имеющих прогрессирование во время курса терапии блинатумомабом, достигли полной ремиссии после применения CD19 CAR-T. В качестве мишени для блинатумомаба и CD19 CAR-T выступает один и тот же рецептор – CD19, оба подхода используют один и тот же фундаментальный принцип – цитотоксический эффект опухолевых клеток аутологичными Т-клетками. Очевидно, что применение клеточной терапии после неудачного использования блинатумомаба при сохранении экспрессии опухолевыми клетками CD19 может быть оправдано. Прямых исследований по сравнению эффективности блинатумомаба против CD19 CAR-T нет, однако существуют некоторые косвенные данные в пользу большей эффективности клеточной терапии. Авторы вышеупомянутой статьи [12], признавая неполную корректность сравнения (в виду различного дизайна исследований, разницы выборки, получаемого лечения), производят попытку сравнительного анализа собственных данных по долговременной эффективности клеточной терапии в когорте взрослых больных с рецидивирующей формой ВП-ОЛЛ ($n = 53$) с эффективностью блинатумомаба в аналогичной когорте больных ($n = 271$) в опубликованном ранее крупном исследовании [23]. Сравнивая обе когорты больных, авторы отмечают следующие различия: среди больных, получивших клеточную терапию, выше процент предлеченных больных – 68 % пациентов получали CAR-T-лимфоциты в качестве 3-й и последующей линии терапии против 24 % пациентов, получивших блинатумомаб. Более того, из когорты пациентов, получивших блинатумомаб, были исключены Ph-позитивные случаи и случаи рецидивов с бластомой в костном мозге менее 5 %.

В когорте пациентов, получивших клеточную терапию, была выше доля больных, достигших полной ремиссии при инициально высоком бластоме в костном мозге (50 % и более), – 69 % против 34 % пациентов, получивших блинатумомаб; также для таких больных отмечена большая медиана выживаемости – 12,9 мес против 7,7 мес. Вероятной причиной этого является более устойчивая и продолжительная персистенция CD19 CAR-T-клеток.

Инфузии донорских или аутологичных лимфоцитов при применении блинатумомаба. Несмотря на отсутствие [16] убедительных данных о корреляции абсолютного уровня лимфоцитов (в частности CD3⁺-клеток) перед началом курса терапии блинатумомабом и успешности терапии, теоретически оправданной может быть инфузия аутологичных лимфоцитов, особенно при глубокой аплазии кроветворения.

У пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток потенциально эффек-

тивными могут также быть инфузии донорских лимфоцитов [26], преследующие цель не только возмещения пула CD3⁺-клеток (при условии лимфопении), но и формирования более общего феномена «трансплантат против лейкоза».

Так или иначе оба подхода требуют дальнейших исследований для изучения эффективности.

Стратегии предотвращения и лечения рецидивов путем «ухода» от таргетной терапии

1. Одновременное и последовательное таргетирование дополнительных мишеней. Альтернативно, потенциальными мишенями при лечении В-линейных злокачественных заболеваний могут выступать CD22, CD20 и прочие маркеры, в разной степени экспрессирующиеся на поверхности бластных клеток.

Подходы, сфокусированные на одновременное таргетирование нескольких мишеней (мультитаргетирование), направлены главным образом на предотвращение рецидивов. Последовательное же таргетирование чаще используется при лечении рецидивов с потерей или снижением экспрессии CD19 на поверхности клеток.

Мультитаргетирование теоретически возможно при применении блинатумомаба или CD19 CAR-T вместе с моноклональными антителами (например, ритуксимабом (анти-CD20-антитело) или инотузумабом озогамидином (анти-CD22-антитело, конъюгированное с озогамидином)).

Одновременное таргетирование с помощью CAR-T-клеток может осуществляться с помощью либо пулирования CAR-T-клеток, направленных на разные мишени, либо использования технологии биспецифичных (несущих 2 вида химерных рецепторов к 2 видам мишеней) или тандемных (несущих 1 химерный рецептор, направленный одновременно на 2 вида мишеней) CAR-T.

Показано, что таргетирование одновременно CD19 и CD123 может эффективно предотвращать рецидивы вследствие потери антигена на клинически-релевантной преклинической модели CD19-негативного рецидива ВП-ОЛЛ [25]. Авторы использовали бластные клетки от пациента с CD19-негативным рецидивом ВП-ОЛЛ с фенотипом CD19⁺/CD123⁺, полученные до начала лечения CD19 CAR-T, и с фенотипом CD19⁻/CD123⁺, полученные во время развития рецидива. Популяции вводили иммунодефицитным мышам в соотношении 1:1. В исследовании продемонстрировано, что одновременное таргетирование CD19 и CD123 пулированными популяциями CD123 CAR-T- и CD19 CAR-T-лимфоцитами эффективно уничтожает все бластные клетки, вне зависимости от экспрессии CD19. Следует отметить, что таргетирование CD123 потенциально применимо для предотвращения развития рецидивов по механизму миелоидного переключения.

Другими комбинациями антигенов для профилактики CD19-негативных рецидивов являются CD19/

CD22 [27] и CD19/CD20 [28]. Существуют подходы с использованием триспецифичных антител, распознающих 2 опухолевых эпитопа и 1 «иммунологический»; в настоящее время такие антитела активно исследуются для лечения солидных опухолей. Что касается исследований в онкогематологии, показано, что триспецифические антитела (CD123/CD33/CD16) способны рекрутировать и перенаправлять NK-клетки (с помощью CD16) на бластные клетки при остром миелоидном лейкозе [29]. Биспецифическое антитело CD22/CD19, конъюгированное с токсическим препаратом, проходит клинические испытания для лечения рефрактерных В-клеточных заболеваний [30].

В качестве мишени для борьбы с CD19-негативными рецидивами (стратегия последовательного таргетирования) чаще всего используются анти-CD22-препараты при условии достаточной экспрессии данного маркера на опухолевых клетках — конъюгат моноклонального антитела с цитотоксическим препаратом инотузумабом озогамидином [31] и CD22 CAR-T-лимфоциты [32] — для обоих методов лечения показана возможность достижения полной ремиссии при лечении CD19-негативных рецидивов.

В ходе преclinical исследований на ксенографтной модели была показана эффективность анти-CD123 CAR-T, способных уничтожать CD19-негативные бластные клетки [25].

2. Комбинированная иммунная терапия. Активность как блинатумаба, так и CAR-T-клеток, может быть ограничена иммуносупрессивным микроокружением, которое представлено не только клеточными популяциями (Treg, MDSC и др.), но и экспрессией опухолевыми клетками лигандов для особых рецепторов на поверхности Т-клеток — белков «иммунных контрольных точек». На поверхности Т-клеток в разной степени представлены рецепторы PD-1, CTLA-4, TIM-3. Взаимодействие PD-1 с лигандами PD-L1 и PD-L2 приводит к ингибированию Т-клеточных функций и состоянию анергии. Повышение экспрессии PD-L1 и PD-L2 опухолевыми клетками является одним из важных механизмов «ухода» из-под иммунного надзора.

Показано, что опухолевые клетки при развитии CD19-негативного рецидива после применения блинатумаба способны повышать экспрессию PD-L1 [33]. В преclinical моделях при адаптивной Т-клеточной терапии отмечается повышенная экспрессия на CAR-T-клетках рецепторов PD-1 и TIM-3; комбинированная терапия с блокадой PD-1 доказано повышает эффективность CAR-T-клеток против Her2⁺-опухолей [36].

Описан случай успешного применения такого подхода [38]. У пациента с PD-L1⁺ диффузной В-крупноклеточной лимфомой после введения CAR-T-клеток отмечалось прогрессирование заболевания, и на 26-й день был введен пембролизумаб (ингибитор PD-1). Введение препарата повысило число циркулирующих

CAR-T-клеток и привело к уменьшению размеров опухоли [38].

Использование комбинации анти-CD19-направленной иммунотерапии и анти-PD-1/CTLA-4-терапии, безусловно, является заманчивым и биологически оправданным направлением. Однако помимо ожидаемого эффекта потенцирования терапевтического действия необходимо помнить о возможности обострения побочных эффектов.

3. Комбинация с другими таргетными препаратами.

Существуют ограниченные данные об успешном и безопасном применении комбинации ингибиторов тирозинкиназ и блинатумаба при лечении Ph-позитивных лейкозов, Ph-подобных лейкозов (при делеции в гене *IKZF1*) и лейкозов с мутацией FLT3-ITD [34, 35].

4. Создание усовершенствованных CAR-T-клеток (*armored CAR-T-лимфоцитов*).

Многочисленные разработки ведутся в направлении создания так называемых armored CAR-T-клеток — усовершенствованных клеток, способных секретировать или экспрессировать на своей поверхности различные молекулы, стимулирующие функции CAR-T-клеток и/или модулирующие опухолевое микроокружение. Усовершенствованные CAR-T-клетки обладают большей активностью и, зачастую, специфичностью и могут снижать вероятность возникновения рецидивов путем потери антигена [37]. Приведем несколько примеров.

IL-12 является провоспалительным цитокином, который вырабатывается дендритными клетками, макрофагами и нейтрофилами; он повышает цитотоксическую активность CD8⁺-Т- и NK-клеток и стимулирует Th1-клеточный ответ. Ввиду мощного потенцирующего противоопухолевого действия производились попытки системного применения рекомбинантного IL-12, например, при множественной миеломе; введение сопровождалось развитием серьезных побочных эффектов [36]. В целях индукции локальной секреции IL-12 авторы создали CAR-T-лимфоцит с использованием бицистронного вектора, кодирующего химерный рецептор анти-CD19 и химерный ген, кодирующий α - и β -субъединицы мышинового IL-12 [37]. Полученные клетки были успешно протестированы на мышинной модели EL4 тимомы, экспрессирующей человеческий CD19. В работе показано, что локальная повышенная продукция IL-12 аутокринно стимулирует цитотоксические свойства и секреторную активность (в частности, продукцию IFN γ) CAR-T-клеток. Более того, IL-12 способен элиминировать иммуносупрессивную активность Treg, что позволит, по мнению авторов, обходиться без предшествующего введению CAR-T-клеток кондиционирования [37].

Другим интересным примером может служить создание CAR-T-клеток, экспрессирующих химерные цитокиновые рецепторы. Примечательно, что путем комбинирования внутри- и внеклеточного домена можно добиться трансформации сигнала, например, от «противовоспалительного» цитокина в «провоспалительный»

сигнал. Конструирование химерного рецептора с внеклеточной частью в виде α -субъединицы рецептора «противовоспалительного» цитокина IL-4 (IL4Ra) с внутриклеточной β -субъединицей рецептора «провоспалительного» цитокина IL-2 позволило успешно активировать Т-клетки при последующем системном введении IL-4 [8].

Отдельного внимания заслуживают стратегии по разработке CAR-T-клеток с функцией блокады белков «контрольных точек». В исследовании авторы разработали CD19 CAR-T-лимфоциты, в которых с помощью системы CRISPR/Cas9 нарушена экспрессия PD-1 [37]. Помимо этого, у данных CAR-T-клеток нарушен синтез TCR и β 2-микроглобулина (необходимого для экспрессии HLA I класса), что теоретически делает данные клетки «универсальными» – пригодными для аллогенного использования.

Любопытны эксперименты по конструированию химерных рецепторов с переключением иммуносу-

прессивных эффектов на провоспалительные. Например, был сконструирован CAR-T-лимфоцит, экспрессирующий рецептор с внеклеточным доменом PD-1 и внутриклеточным – от CD28, и успешно протестирован на животных моделях [37].

Заключение

Таким образом, клиническое применение эффективного иммунологического таргетирования линейного тканеспецифичного маркера В-лимфоцитов при В-линейных опухолях привело к новому пониманию многообразия механизмов ускользания опухоли из-под иммунного надзора. Дальнейшая расшифровка этих механизмов безусловно приведет к созданию усовершенствованных лекарств, клеточных препаратов и комбинированных режимов терапии, которые сделают полное излечение при рефрактерных В-линейных опухолях реальностью.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kantarjian H.M., Stein A.S., Bargaou R.C. et al. Blinatumomab treatment of older adults with relapsed/refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia: results from 2 phase 2 studies. *Cancer* 2016;122(14):2178–85. DOI: 10.1002/cncr.30031. PMID: 27143254.
- Von Stackelberg A., Locatelli F., Zugmaier G. et al. Phase I/phase II study of blinatumomab in pediatric patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2016;34(36):4381–9. DOI: 10.1200/JCO.2016.67.3301. PMID: 27998223.
- Wang M. CAR T-cell therapy effective in B acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol* 2017;18(6):e314. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30364-9. PMID: 28528746.
- Zugmaier G., Klingler M., Schmidt M., Subklewe M. Clinical overview of anti-CD19 BiTE[®] and *ex vivo* data from anti-CD33 BiTE[®] as examples for retargeting T-cells in hematologic malignancies. *Mol Immunol* 2015;67(2 Pt A):58–66. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.02.033. PMID: 25883042.
- Ruella M., Maus M.V. Catch me if you can: leukemia escape after CD19-directed T-cell immunotherapies. *Comput Struct Biotechnol J* 2016;14:357–62. DOI: 10.1016/j.csbj.2016.09.003. PMID: 27761200.
- Weiland J., Pal D., Case M. et al. BCP-ALL blasts are not dependent on CD19 expression for leukaemic maintenance. *Leukemia* 2016;30(9):1920–3. DOI: 10.1038/leu.2016.64. PMID: 27055873.
- Mejstriková E., Hrusak O., Borowitz M.J. et al. CD19-negative relapse of pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia following blinatumomab treatment. *Blood Cancer J* 2017;7(12):659. DOI: 10.1038/s41408-017-0023-x. PMID: 29259173.
- Wilkie S., Burbridge S.E., Chiapero-Stanke L. et al. Selective expansion of chimeric antigen receptor-targeted T-cells with potent effector function using interleukin-4. *J Biol Chem* 2010;285(33):25538–44. DOI: 10.1074/jbc.M110.127951. PMID: 20562098.
- Глуханюк Е.В., Илларионова О.И., Кашпор С.А. и др. Изменение экспрессии CD19 опухолевыми клетками при применении блинатумомаба у детей с рецидивами и рефрактерным течением В-линейного острого лимфобластного лейкоза. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2017;16(4):21–6. [Glukhanyuk E.V., Illarionova O.I., Kashpor S.A. et al. Changes in CD19 expression after blinatumomab treatment in pediatric patients with relapsed/refractory B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii = Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2017;16(4):21–6. (In Russ.)]. DOI: 10.24287/1726-1708-2017-16-4-21-26.
- Illarionova O., Glukhanyuk E., Kashpor S., et al. Changes in leukemic blasts CD19 expression in children with relapsed/refractory B-cell precursor ALL treated with blinatumomab. *Blood* 2017;130(Suppl. 1):3991.
- Cherian S., Miller V., McCullough V. et al. A novel flow cytometric assay for detection of residual disease in patients with B-lymphoblastic leukemia/lymphoma post anti-CD19 therapy. *Cytometry B Clin Cytom* 2016;94(1):112–20. DOI: 10.1002/cyto.b.21482. PMID: 27598971.
- Wang X., Sénéchal B., Curran K.J. et al. Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2018;378(5):449–59. DOI: 10.1056/NEJMoa1709919. PMID: 29385376.
- Fraietta J.A., Lacey S.F., Orlando E.J. et al. Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor(CAR) T-cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med* 2018;24(5):563–71. DOI: 10.1038/s41591-018-0010-1. PMID: 29713085.
- Zhang L., Song Y., Liu D. CD19 CAR-T-cell therapy for relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia: factors affecting toxicities and long-term efficacies. *J Hematol Oncol* 2018;11(1):41–5. DOI: 10.1186/s13045-018-0593-5. PMID: 29544528.
- Nägele V., Kratzer A., Zugmaier G. et al. Changes in clinical laboratory parameters and pharmacodynamic markers in response to blinatumomab treatment of patients with relapsed/refractory ALL. *Exp Hematol Oncol* 2017;6(1):14. DOI: 10.1186/s40164-017-0074-5. PMID: 28533941.
- Duell J., Dittrich M., Bedke T. et al. Frequency of regulatory T-cells determines the outcome of the T-cell-engaging antibody blinatumomab in patients with B-precursor ALL. *Leukemia* 2017;31(10):2181–90. DOI: 10.1038/leu.2017.41. PMID: 28119525.

17. Sotillo E., Barrett D.M., Black K.L. et al. Convergence of acquired mutations and alternative splicing of CD19 enables resistance to CART-19 immunotherapy. *Cancer Discov* 2015;5(12):1282–95. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-1020. PMID: 26516065.
18. Fischer J., Paret C., Malki E. et al. CD19 isoforms enabling resistance to CART-19 immunotherapy are expressed in B-ALL patients at initial diagnosis. *J Immunother* 2017;40(5):187–95. DOI: 10.1097/CJI.000000000000169. PMID: 28441264.
19. Braig F., Brandt A., Goebeler M. et al. Resistance to anti-CD19/CD3 BiTE in acute lymphoblastic leukemia may be mediated by disrupted CD19 membrane trafficking. *Blood* 2017;129(1):100–4. DOI: 10.1182/blood-2016-05-718395. PMID: 27784674.
20. Rayes A., McMasters R.L., O'Brien M.M. Lineage switch in MLL-rearranged infant leukemia following CD19-directed therapy. *Pediatr Blood Cancer* 2016;63(6):1113–5. DOI: 10.1002/pbc.25953. PMID: 26914337.
21. Gardner R., Wu D., Cherian S. et al. Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood* 2016;127(20):2406–10. DOI: 10.1182/blood-2015-08-665547. PMID: 26907630.
22. Nagel I., Bartels M., Duell J. et al. Hematopoietic stem cell involvement in BCR-ABL1 – positive ALL as a potential mechanism of resistance to blinatumomab therapy. *Blood* 2017;130(18):2027–32. DOI: 10.1182/blood-2017-05-782888. PMID: 28827408.
23. Fielding A.K., Ph D., Schuh A.C., Dombret H. et al. Blinatumomab versus chemotherapy for advanced acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2017;376(9):836–47. DOI: 10.1056/NEJMoa1609783. PMID: 28249141.
24. Topp M.S., Stelljes M., Zugmaier G. et al. Blinatumomab retreatment after relapse in patients with relapsed/refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2018;32(2):562–5. DOI: 10.1038/leu.2017.306. PMID: 28990581.
25. Ruella M., Barrett D.M., Kenderian S.S. et al. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *J Clin Invest* 2016;126(10):3814–26. DOI: 10.1172/JCI87366. MID: 27571406.
26. Ueda M., de Lima M., Caimi P. et al. Concurrent blinatumomab and donor lymphocyte infusions for treatment of relapsed pre-B-cell ALL after allogeneic hematopoietic cell transplant. *Bone Marrow Transplant* 2016;51(9):1253–5. DOI: 10.1038/bmt.2016.104. PMID: 27088374.
27. Qin H., Haso W., Nguyen S.M., Fry T.J. Preclinical development of bispecific chimeric antigen receptor targeting both CD19 and CD22. *Blood* 2015;126(23):4427.
28. Zah E., Lin M.Y., Silva-Benedict A. et al. T-cells expressing CD19/CD20 bispecific chimeric antigen receptors prevent antigen escape by malignant B-cells. *Cancer Immunol Res* 2016;4(6):498–508. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0231. PMID: 27059623.
29. Spiess C., Zhai Q., Carter P.J. Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. *Mol Immunol* 2015;67(2 Pt A):95–106. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.01.003. PMID: 25637431.
30. Bachanova V., Frankel A.E., Cao Q. et al. Phase I study of a bispecific ligand-directed toxin targeting CD22 and CD19 (DT2219) for refractory B-cell malignancies. *Clin Cancer Res* 2015;21(6):1267–72. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2877. PMID: 25770294.
31. Kantarjian H.M., DeAngelo D.J., Stelljes M. et al. Inotuzumab ozogamicin versus standard therapy for acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2016;375(8):740–53. DOI: 10.1056/NEJMoa1509277. PMID: 27292104.
32. Fry T.J., Stetler-Stevenson M., Shah N.N. et al. Clinical activity and persistence of anti-CD22 chimeric antigen receptor in children and young adults with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood* 2015;126(23):1324.
33. Köhnke T., Krupka C., Tischer J. et al. Increase of PD-L1 expressing B-precursor ALL cells in a patient resistant to the CD19/CD3-bispecific T-cell engager antibody blinatumomab. *J Hematol Oncol* 2015;8:111. DOI: 10.1186/s13045-015-0213-6. PMID: 26449653.
34. Assi R., Kantarjian H., Short N.J. et al. Safety and efficacy of blinatumomab in combination with a tyrosine kinase inhibitor for the treatment of relapsed philadelphia chromosome-positive leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2017;17(12):897–901. DOI: 10.1016/j.clml.2017.08.101. PMID: 28927784.
35. Sokolov A.N., Parovichnikova E.N., Troitskaya V.V. et al. Blinatumomab + tyrosine kinase inhibitors with no chemotherapy in BCR-ABL-positive or IKZF1-deleted or FLT3-ITD-positive relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia patients high molecular remission rate and toxicity profile. *Blood* 2017;130(Suppl 1):3884.
36. Lacy M.Q., Jacobus S., Blood E.A. et al. Phase II study of interleukin-12 for treatment of plateau phase multiple myeloma (EIA96): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Leuk Res* 2009;33(11):1485–9. DOI: 10.1016/j.leukres.2009.01.020. PMID: 19243818.
37. Jaspers J.E., Brentjens R.J. Development of CAR T-cells designed to improve antitumor efficacy and safety. *Pharmacol Ther* 2017;178:83–91. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.03.012. PMID: 28342824.
38. Chong E.A., Melenhorst J.J., Lacey S.F. et al. PD-1 blockade modulates chimeric antigen receptor (CAR) – modified T-cells: refueling the CAR. *Blood* 2017;129(8):1039–42. DOI: 10.1182/blood-2016-09-738245. PMID: 28031179.

Вклад авторов

Е. В. Глуханюк: драфт манускрипта;
 А. В. Степанов, А. М. Попов, М. А. Масчан: написание финальной версии статьи.

Authors' contributions

E. V. Glukhanyuk: manuscript draft;
 A. V. Stepanov, A. M. Popov, M. A. Maschan: writing the final version of the article.

ORCID авторов/ORCID of authors

Е. В. Глуханюк/E. V. Glukhanyuk: <https://orcid.org/0000-0003-2921-9770>
 А. В. Степанов/A. V. Stepanov: <https://orcid.org/0000-0003-1616-4408>
 А. М. Попов/A. M. Popov: <https://orcid.org/0000-0002-0889-6986>
 М. А. Масчан/M. A. Maschan: <https://orcid.org/0000-0003-1735-0093>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа была выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 17-74-30019).

Financing. The work was performed with the support of Russian Science Foundation (Grant No. 17-74-30019).

Статья поступила: 25.10.2018. Принята к публикации: 28.11.2018.

Article received: 25.10.2018. Accepted for publication: 28.11.2018.