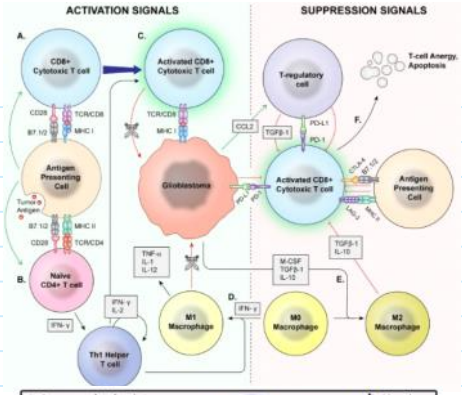
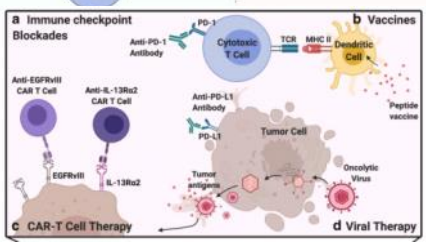
שיעור 8- טיפולים אימונותרפיים לגידולי מוח

יום חמישי 18 יולי 2024 10:17





Immunophenotype של מיקרו-סביבת הגידול:

- **CD8+ T cells** - תפקידם להרוג
- **CD4+ T cells -** עוזרים לאקטב את תאי ה+CD8. ביניהם נכללים תאי Th1, Th17 ועוד.
- **מקרופאגים** - יכולים להיות פרו-אינפלמטוריים או אימונוסופרסוריים
- ועוד תאים נוספים.

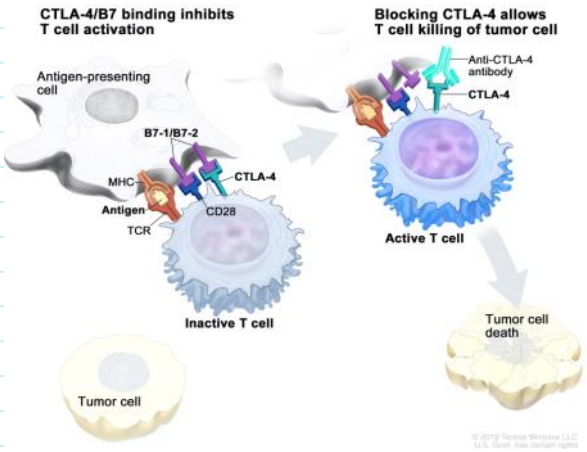
חייבים סיגנלים שמאקטבים את התגובה החיסונית נגד הגידול.
צריך לשמור על הומאוסטזיס, איזון בין אקטיבציה לסופרסיה של מערכת החיסון.
הגידול הוא חכם ויודע איך לעשות אימונוסופרסיה כדי להגן על עצמו ממערכת החיסון.

גישות אימונותרפיות לטיפול בגליובלסטומה:

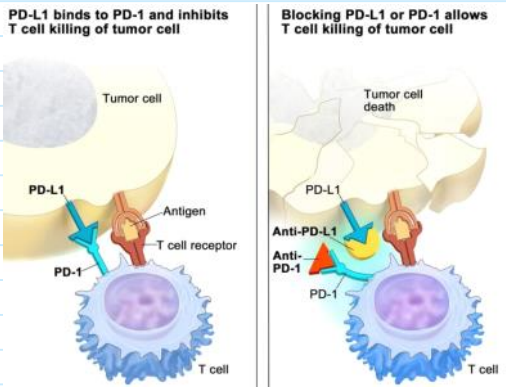
- Immune checkpoint blockades/inhibitors
- חיסונים
- CAR-T cells - תרפיה אימונוגנטית המבוססת על תאים
- וירוסים אונקוליטיים

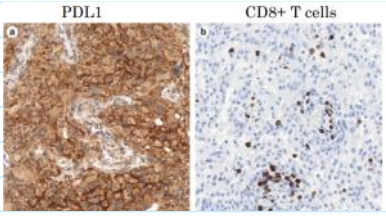
Immune checkpoint inhibitors -

יש כמה מרכיבים שמשתתפים בקשר בין תא APC לתא T. בנוסף ל-TCR על תא הT שמכיר את האנטיגן שמוצג על MHC ע"י ה-APC, יש מולקולות שגורמות **לקו-סטימולציה**. אחת מהן היא **CD28** (על תא ה-T) שמזהה את **B7** (על ה-APC). בשיש קו-סטימולציה ואקטיבציה, בשלב מסוים צריך לעצור את התגובה כדי שלא תהיה תגובה כרונית. לשם כך יש רצפטור בשם **CTLA-4** (ועוד כמה) שמבוטא על פני תא ה-T, מתחרה עם CD28 על הקישור ל-B7 וכך מעכב תגובה חיסונית.
חסימת CTLA-4 מאפשרת לתאי T להרוג את הגידול. אפשר לעשות זאת ע"י נוגדן נגד CTLA-4.



דוגמה נוספת ל-Immune checkpoint: **PD-1** שמבוטא על פני תאי T ו-**PD-L1** שמבוטא על תאי הגידול. הקישור בין PD-1 ל-PD-L1 גורם לתאי T להפסיק את פעילותם.
ניתן לחסום את הקישור ביניהם כדי לגרום לתאי ה-T להרוג את תאי הגידול. עושים זאת בעזרת מעכבים/נוגדנים, יש כאלה שחוסמים את PD-1 ויש כאלה שחוסמים את PD-L1.





בתמונה רואים **אימונוהיסטוכימיה של חולה גליובלסטומה**. ניתן לראות כי:

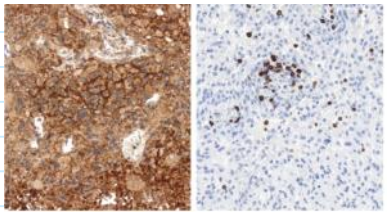
- במיקרו-סביבה של הגידול יש ביטוי מאוד גבוה של PDL-1 שחוסם את התגובה של תאי ה-T.
- בעיה נוספת בגליובלסטומה היא שבקושי יש אינפילטרציה של תאי T Bו.

בתמונה רואים כי יש חדירה של תאי T ציטוטוקסיים (CD8+) אבל בכמות קטנה מאוד.

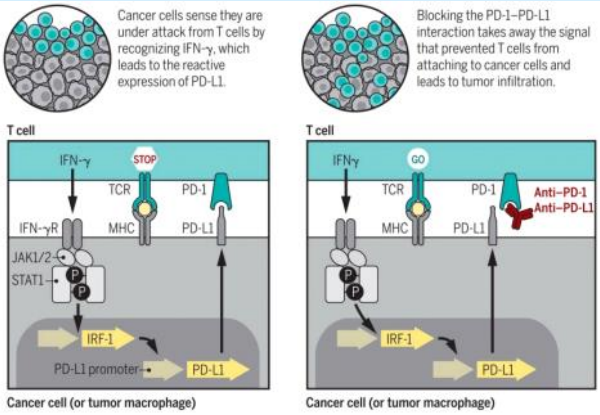
תאי ה-T.

- בעיה נוספת בגליובלסטומה היא שבקושי יש אינפילטרציה של תאי T וB.

בתמונה רואים כי יש חדירה של תאי T ציטוטוקסיים (CD8+) אבל בכמות קטנה מאוד.
כלומר יש סביבה אימונוסופרסיבית.

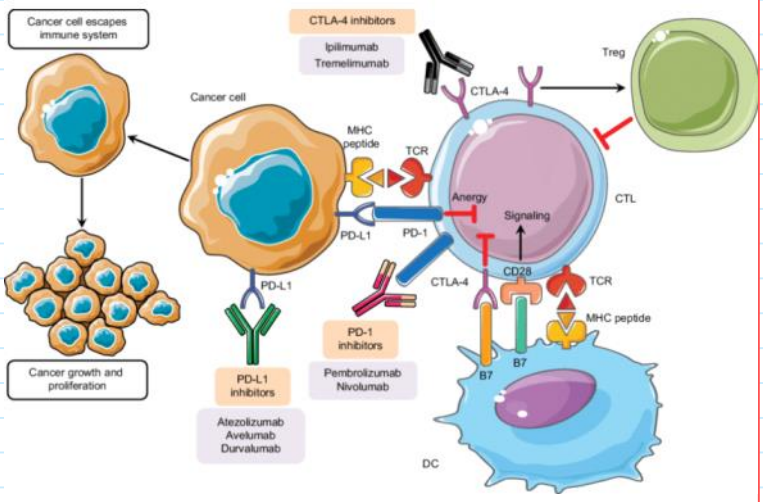


איך תאי הגידול יודעים לבטא PDL-1? תאי הסרטן מרגישים שתאי T תוקפים אותם ומזהים את האינטרפרון גמא שהם משחררים.
אינטרפרון גמא נקשר לרצפטור שלו על תא הסרטן. יש העברת סיגנל שבסופה פקטור שעתוק בגרעין נקשר לפרומוטור של PDL-1, מאקטב את השעתוק שלו, ואז הוא מתבטא על פני התא הסרטני. זה אחד המנגנונים.

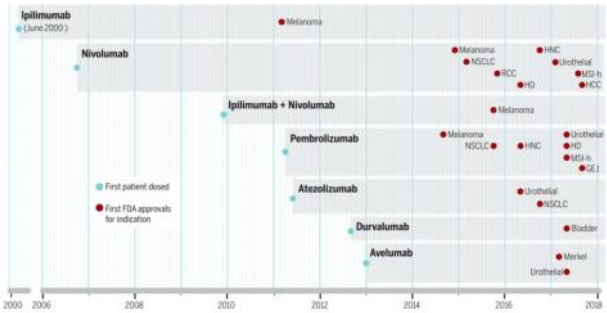


יש הרבה סוגים של checkpoint inhibitors:

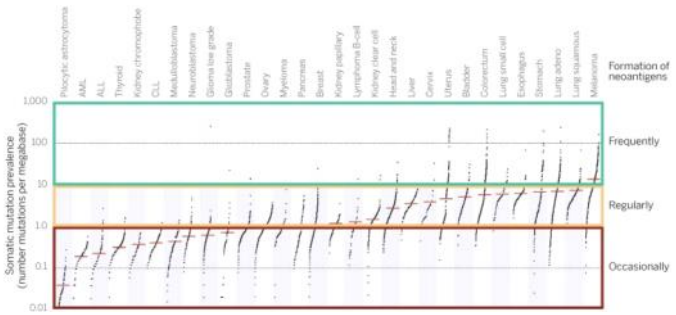
*סיומת mab = Monoclonal antibody
סיומת mib = inhibitor



הניסוי הקליני הראשון של אחת התרופות מסוג זה היה בשנת 2000 ואישור ה-FDA הראשון היה ב2007. לאחר מכן אושרו עוד הרבה תרופות דומות.

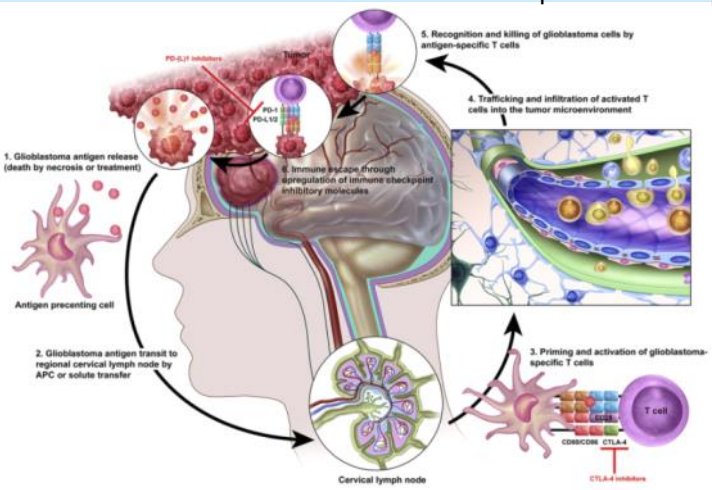


Neoantigens - אנטיגנים ייחודיים לתאי סרטן, שלא קיימים בתאים בריאים. יש קורלציה בין תדירות המוטציות בגידולים שונים לבין יצירה של neoantigens. לדוגמה, במלנומה יש הרבה מוטציות והרבה neoantigens.
נוכל לצפות ש-immune checkpoint blockades יעבדו הכי טוב בסוגי סרטן בהם יש הרבה neoantigens, כי שם יש תאי T שיוכלו לזהות את תאי הגידול.



מנגנון הפעולה של immune checkpoint blockades בגליובלסטומה:

גליובלסטומה הוא גידול, יש הרבה מוות נקרוטי של תאים. השאריות של התאים המתים משמשים כאנטיגנים המובאים ע"י ה-APC ל-cervical lymph nodes, שם הם מוצגים ומזוהים ע"י תאי T. כשתאי T מזהים את ה-neoantigens הם נודדים למוח, ושם הם אמורים להרוג את התאים הסרטניים. אבל זה לא קורה כי בסביבת הגידול יש הרבה PDL1. לכן על פי היגיון נוכל לשער ש- immune checkpoint blockade יעזור.



מתי כדאי לתת immune checkpoint blockade?

הדבר הראשון שעושים לחולה גליובלסטומה זה ניתוח להסרת הגידול.

טיפול שניתן **אחרי הניתוח** נקרא **adjuvant therapy.**

טיפול שניתן **לפני הניתוח** נקרא **neoadjuvant**.

אפשר לתת את ה-immune checkpoint blockade אחרי הניתוח, או לחילופין לתת לפני הניתוח ולהמשיך את הטיפול גם אחריו.

כל אפשרות כזו נחשבת לפרוטוקול שונה, על כל פרוטוקול בנפרד צריך לעשות ניסויים קליניים ולקבל אישור FDA.

הגרפים מראים תוצאות של ניסויים קליניים בשלב 1.

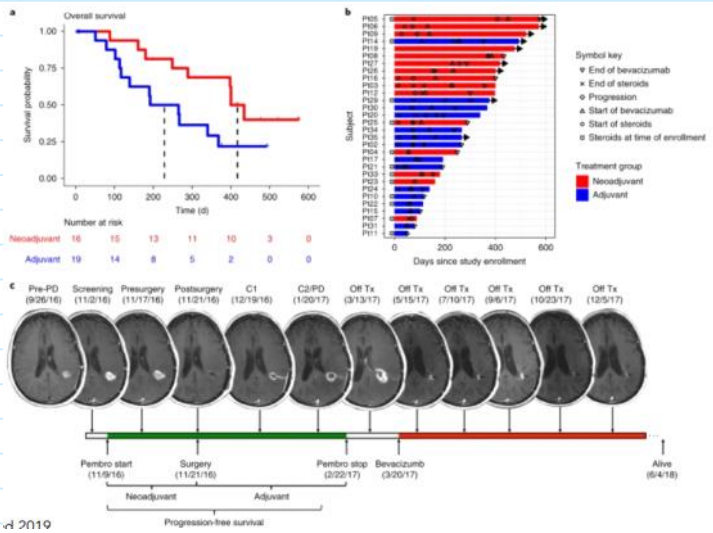
בכחול - כאשר נתנו checkpoint blockade אחרי הניתוח (adjuvant).

באדום -כאשר נתנו checkpoint blockade לפני הניתוח (neoadjuvant).

תוצאות: adjuvant therapy לא עזר. אבל כשנתנו את הטיפול לפני הניתוח והמשיכו אותו אחרי הניתוח זה עזר הרבה יותר.

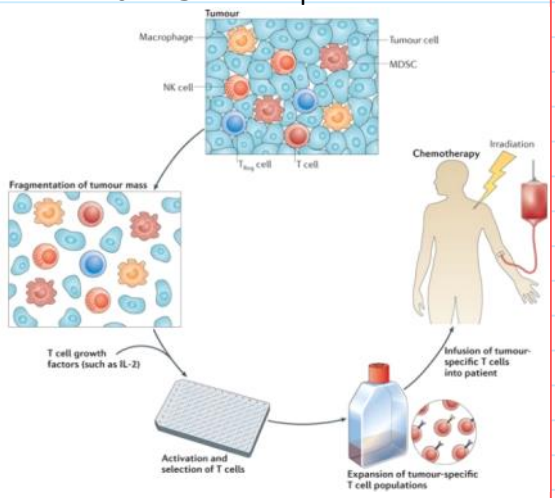
מנגנון אפשרי המסביר את התוצאות: אם נותנים את הטיפול לפני הניתוח, הטיפול כבר מתחיל לעבוד על תאי הT שקיימים וכך מכין את המיקרו-סביבה של הגידול לניתוח. בצורה כזו, במהלך הניתוח כבר קיימים תאי T פעילים. הניתוח עצמו הוא בעצם פציעה של הרקמה, זה גורם לדלקת, ולתאי T יש סלקציה חיובית להישאר ולהילחם. אם עושים ניתוח ואחר כך נותנים את הטיפול, זה כבר מאוחר מדי, תאי הT כבר מותשים, כבר עברו דיכוי.

*דילגה על השקופית שמסבירה את זה, מוסבר יותר טוב אצל סנדרה בעמ' 43

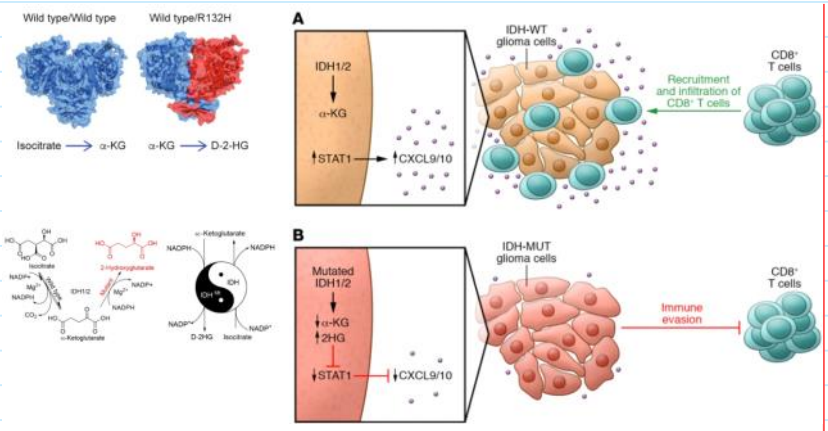


*הטיפול ניתן בצורה סיסטמית כי זה פחות פולשני מהזרקה למוח ויותר קל לקבל על זה אישור FDA. לכן עלולה להיות בעיה של מעבר דרך הBBB. כיום עושים כל מיני מודיפיקציות לנוגדן כדי שהוא יוכל לחדור יותר טוב.

tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) - שיטה של תרפיה באמצעות תאים. משתמשים בה בעיקר לטיפול בגידולים מוצקים. מפרקים את הגידול, עושים פרגמנטציה שלו לסוגי התאים השונים -> מגדלים בצלחת את תאי הT מתוך הגידול -> נותנים להם בצלחת IL-2 שהוא growth factor, כדי לגרום ל-ex vivo expansion של תאי ה-T שהגיעו מתוך הגידול -> מכניסים חזרה את תאי הT לחולה. כדי לפנות מקום לתאים שמכניסים חזרה נותנים תרופות אימונוסופרסיביות (ראגנטים כימותרפיים).



IDH (isocytrate dehydroginase) - אנזים שהופך איזוציטראט לאלפא קטוגלוטראט (α-KG).
כשיש מוטציה ב-IDH - האנזים עדיין פעיל, אבל לוקח את ה-α-KG ויוצר ממנו מטבוליט חדש לחלוטין: D-2-hydroxyglutarate (D-2-HG).
לפי הסיווג הקיים כיום, גליובלסטומה זה רק IDH1 WT.
אם יש IDH1 mutant הקלסיפיקציה שונה, זה לא נחשב גליובלסטומה, והפרוגנוזה יותר טובה.
כשיש IDH1 WT: IDH1 גורם לייצור α-KG. זה גורם לעלייה בפקטור שעתוק (STAT1) שגורם להפרשת כימוקינים. הכימוקינים גורמים לאינפילטרציה וגיוס של תאי CD8.
כשיש מוטציה ב-IDH1: אין α-KG אלא יש עלייה ב-D-2-HG, אשר מעכב את פקטור השעתוק STAT1 -> ירידה בהפרשת כימוקינים.
בתוצאה מכך תאי T לא יבואו לגידול, כלומר לא נמצא TILs. לכן טיפול מסוג זה לא יעבוד.
במקרה של IDH1, כשיש בו מוטציה זה דווקא טוב מהיבטים מסוימים כי יש מעכבים ל-IDH1(?)
האנזים IDH1 הוא האנזים הראשון שהוכיח כי יש קשר בין סרטן למטבוליזם. בנוסף, המטבוליט D-2-HG גם קשור לאפיגנטיקה, לפתיחה/סגירה של הכרומטין ולזמינות של הפרומוטור.

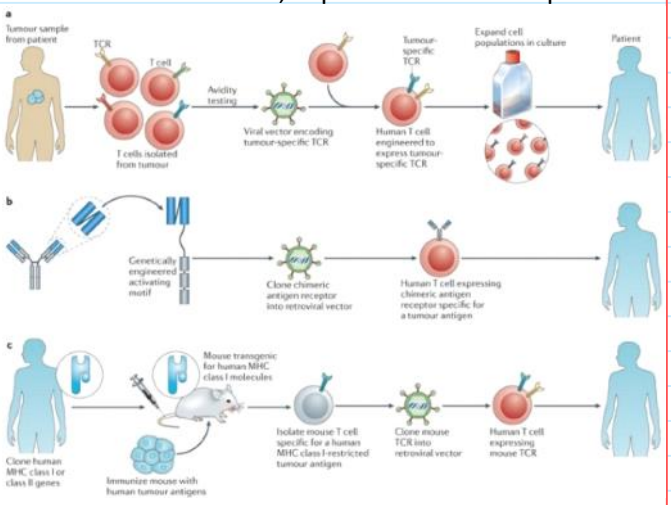


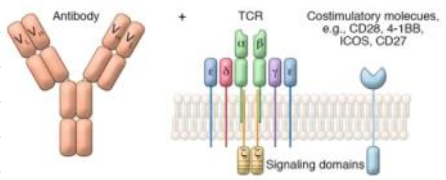
דרכים אפשריות להנדסה גנטית של תאי T שנלקחים מהגידול:

a. אחת הסיבות לכך שתאי T לא מזהים את הגידול בגליובלסטומה היא שאין להם TCRs שמזהים שום neoantigens. אפשר לקחת תאי T בריאים מהחולה, להנדס אותם גנטית מחוץ לגוף (ex-vivo), להכניס להם וקטור ויראלי המקודד ל-TCR ספציפי שיזהה את ה-neoantigens הקיימים אצל החולה, ולהכניס את התאים חזרה לחולה.

b. CAR-T cells - מפורט בהמשך.

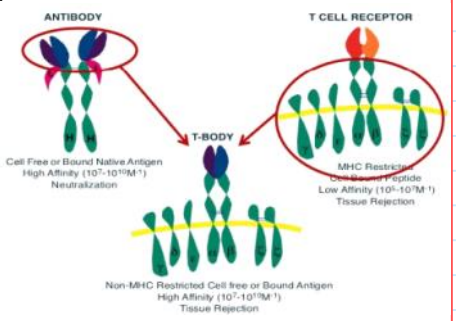
c. עושים חיסון לעכבר עם MHC הומני שנלקח מהביופסיה של החולה. העכבר מייצר תאי T עם TCR שמזהה MHC בקומפלקס עם פפטיד מהגידול של אותו אדם (neoantigen). מבודדים את תאי הT האלה מהעכבר ועושים cloning של ה-DNA המקודד ל-TCR של העכבר לוקטור ויראלי. בעזרת הוקטור, מבטאים את ה-TCR הזה בתאי הT של החולה ומחזירים אותם לגוף.



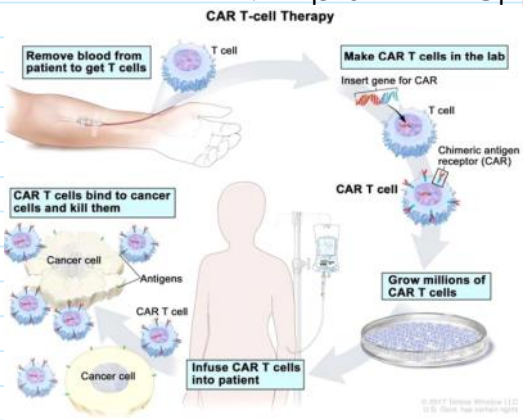


תזכורת: לנוגדן יש אזור וריאבילי שמזהה את האנטיגן.
ל-TCR יש חלק חוץ תאי וחלק תוך תאי. החלק החיצוני מורכב משרשראות אלפא ובטא ועוד קורצפטורים ושרשראות שקשורות ל-TCR.
החלק התוך תאי הוא מאוד חשוב - טירוזין קינאז שמעביר פוספורילציות.
בנוסף, כדיי לקבל תגובה חייבים גם קו-סטימולציה. אם יש רק זיהוי של הפפטיד ע"י TCR בלי קו-סטימולציה זה סיגנל ל-anergy (חוסר תגובה של תאי הT). רק בנוכחות של קוסטימולציה (ע"י מולקולות כמו CD28 ועוד) תהיה תגובה.

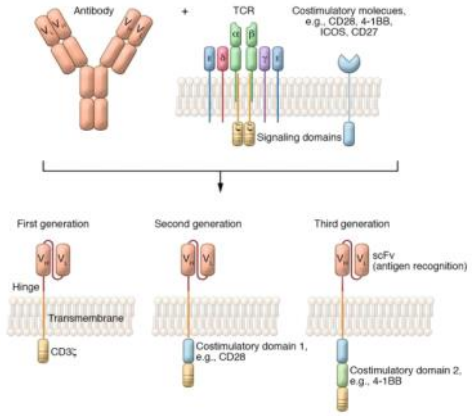
CAR-T cells - טיפול תאי לסרטן שהומצא ע"י זליג אשחר מויצמן.
הרעיון שלו היה לשלב את החלק החיצוני של הנוגדן שמזהה אנטיגן ללא תלות ב-MHC (נקרא single chain variable fragment = **scFv**), עם החלק הפנימי של הTCR שמפעיל את התגובה של תא ה-T **(CD3ζ)**.
כך הוא המציא את ה-**T body** - קיצור של T cell antibody, ואז שינו את השם ל- **CAR (chimeric antigen receptor) T cells.**
כיום משתמשים בשיטה זו כדי לרפא חולי לוקמיה.

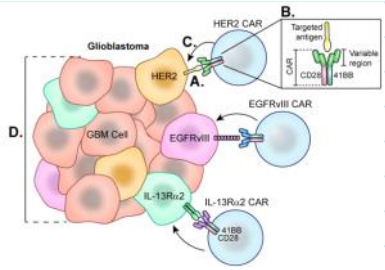


הטיפול: מוציאים דם מהחולה. מבודדים את הלימפוציטים/תאי הT. מגדלים את תאי הT מחוץ לגוף. מכניסים את הגן של הCAR וכך הופכים אותם ל-CAR-T cells. עושים expansion - מגדלים מיליונים של תאים מהונדסים באלה. ואז מכניסים אותם לחולה. תאי הT נקשרים לתאי הסרטן והורגים אותם.



הדור הראשון של ה-CARs היו בלי קוסטימולציה - רק החלק הוריאבילי של הנוגדן מחובר לחלק הפנימי של ה-TCR.
לאחר מכן הוסיפו לחלק הפנימי דומיין של קוסטימולציה כמו CD28 כי הראו שזה חשוב לסיגנל האנטי אפופטוטי - עוזר לתאי הT לשרוד ולהתרבות יותר. בהמשך הוסיפו דומיין נוסף של קוסטימולציה.





CAR-T cells כטיפול לגליובלסטומה - נמצא בניסויים קליניים, כולם עוד ב-Phase 1.
כשהתחילו לחקור CAR-T בגליובלסטומה, היו רק 3 טרגטים ידועים:

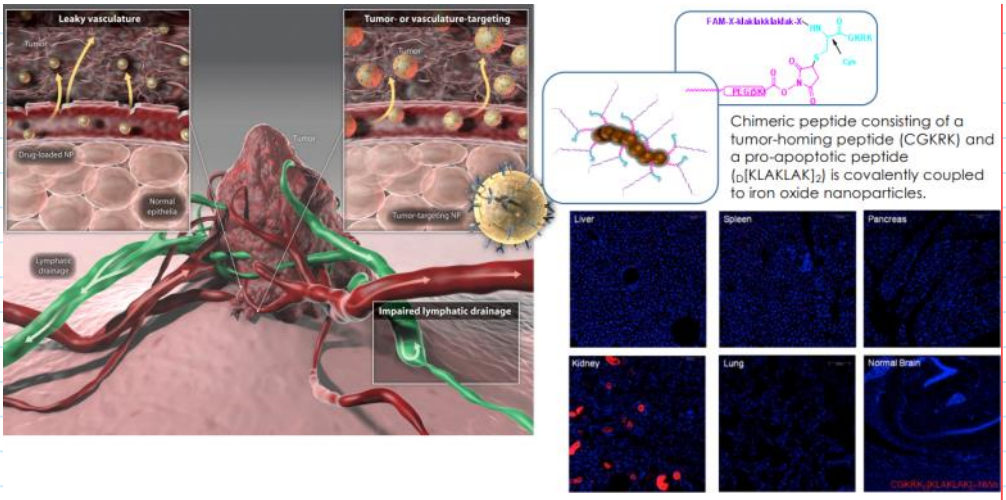
- HER2 - אנטיגן ידוע שיש נוגדן כנגדו
- EGFRvIII
- IL-13Rα2

השניים האחרונים הם neoantigens ספציפיים של גליובלסטומה.
כיום כבר יש הרבה יותר אנטיגנים שמכוונים נגדם את הCARs.
כיום ה-GBM הוא הטופ 1 ברשימה של ניסויים קליניים של CAR-T cells לטיפול בגידולים מוצקים.

מחקרים של דינורה:

tumor-targeting nanoparticles כטיפול פוטנציאלי ל-GBM -

התרכזו בפפטיד שנקרא **CGKRK** שהוא tumor-homing peptide כי הוא יודע ללכת ל-vasculature (כלי הדם) של הגידול ולא של שום מקום אחר בגוף. חיברו אותו לפפטיד פרו אפופטוטי. כלומר הפפטיד הראשון הוא החלק שמזהה את כלי הדם של הגידול, והפפטיד השני הוא החלק הפונקציונלי. את הפפטיד המאוחה הזה חיברו לננו-חלקיקים של iron oxide.
בעזרת זה הצליחו להאריך את החיים של עכברים.

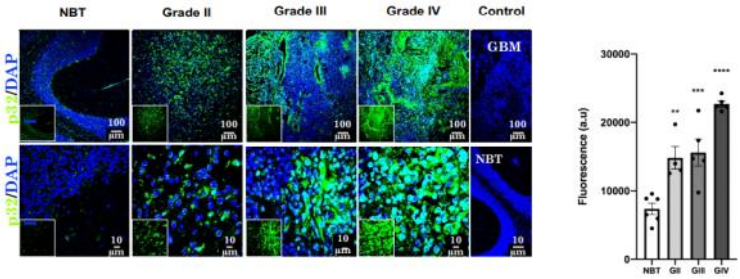


אם הפפטיד CGKRK מזהה משהו בגידול וחודר לתוכו, חייב להיות רצפטור שמזהה את הפפטיד. בעבודה הבאה ניסו לזהות את הרצפטור של CGKRK.

אחד המועמדים היה **p32**. בתאים בריאים p32 מתבטא רק במיטוכונדריה. בגידולים, הוא עובר טרנסלוקציה לממברנת התא. כלומר, יש כמה סוגי סרטן שמבטאים על פני התא p32 בנוסף למיטוכונדריה, אבל תאים בריאים לא.

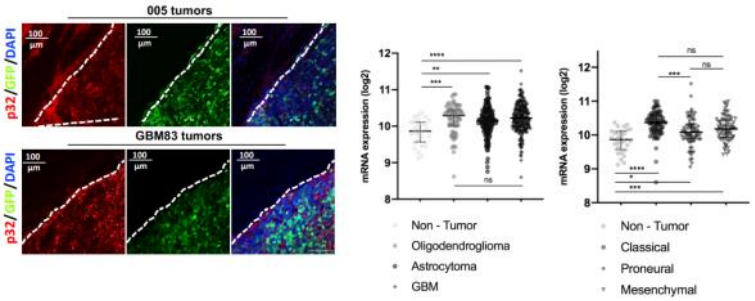
מכיוון ש-p32 מתבטא על פני התא ספציפית רק בגידולים, ניסו לעשות **CAR-T Cells כנגד p32**.

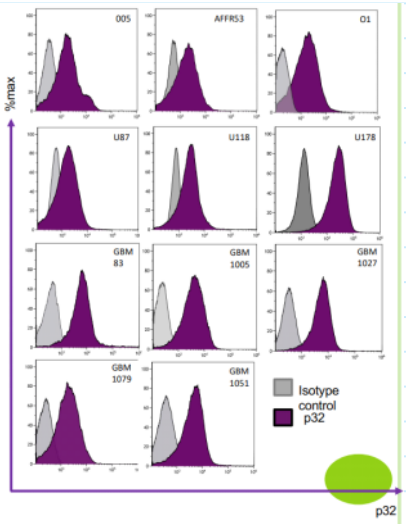
בהתחלה בדקו את הביטוי של p32 בביופסיות של גידולים מבני אדם בעזרת אימונופלורסנציה. הראו שיש קורלציה בין ביטוי p32 ל-grade של גידול המוח - יותר ביטוי ב- grade 4 שהיום כבר נחשב לסוג סרטן נפרד (GBM).



בדקו את הביטוי גם במודלים עכבריים:

הגידול מסומן בירוק, p32 באדום. ניתן לראות שיש יותר ביטוי של p32 בגידול מאשר באזורים אחרים.





זה שיש ביטוי של p32 זה לא אומר שהוא מתבטא על הממברנה. בשביל להראות זאת השתמשו ב-flow cytometry.

בסגול - p32

באפור - ביקורת של הנוגדן

בשורה הראשונה - תאים של עכבר

בשורה השניה - תאים קנויים של GBM

בשורה השלישית והרביעית - תאים מביופסיה של חולי GBM.

הראו שבכולם p32 מתבטא על פני התא.

כמו כן, הם הראו כי בתאים בריאים p32 מתבטא במיטוכונדריה אבל לא על פני התא, ואילו בתאי סרטן הוא מתבטא גם וגם. זה חשוב ל-CAR-T בהקשר של on/off target effects.

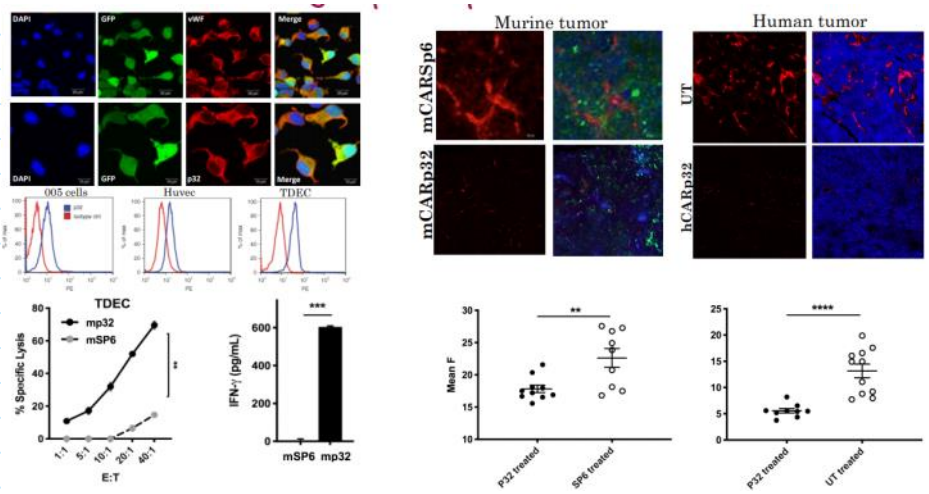
בגרפים הבאים רואים את הפעילות של ה-CAR-T cells נגד p32 במודל in-vivo:

בכל המודלים שנבדקו, ה-CAR-T cells העלו את שרידות העכברים.

בנוסף, בעכברים שטופלו ב-CAR-T cells היו בערך 30% שלא מתו.

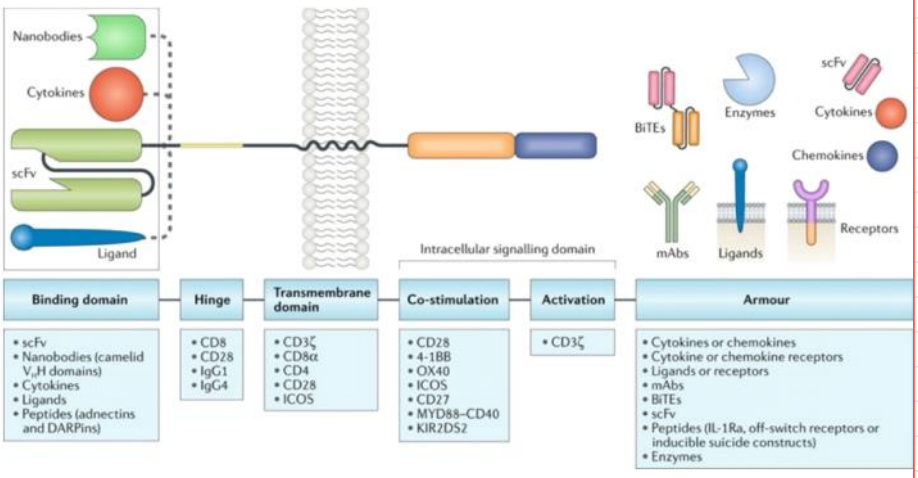
הרגו אותם ובדקו את המוח שלהם ולא ראו את הגידול (?) למרות שידעו שהיה להם גידול בתחילת הניסוי.

מתברר כי ה-CAR-T cells מזהים את ה-p32 שמתבטא גם בTDEC (שראינו בשיעור שעבר). ולכן יש לטיפול תפקיד דואלי: הוא גם anti-tumor (הורג את תאי הגידול עצמם) וגם anti-angiogenic (הורג תאי אנדותל שמבטאים p32).



וריאציות נוספות של CAR-T cells:

- בחלק החוץ תאי, במקום נוגדן אפשר לשים ליגנד/ציטוקין/nanobodies
- אפשר לשנות גם את ה-Hinge, הדומיין הטרנסממברנלי ודומיין הקו-סטימולציה.
- בחלק הפנימי בדרך כלל שמים CD3ζ chain, אבל אפשר בעיקרון גם להשתמש ב-γ.
- **Armour** - אפשר באותו וקטור לבטא גם דברים נוספים כגון: עוד ציטוקינים, BiTEs, ליגנדים, רצפטורים ועוד דברים נוספים שיכולים לעזור לנטרל את ה-immunosuppressive tumor microenvironment.



בעיות ב-CAR-T cells בגידולים מוצקים:

1. **On target, off tumor toxicity** - כן פוגעים בגידול אבל גם בתאים בריאים. כלומר צריך לשפר את **הספציפיות**.

פתרונות אפשריים:

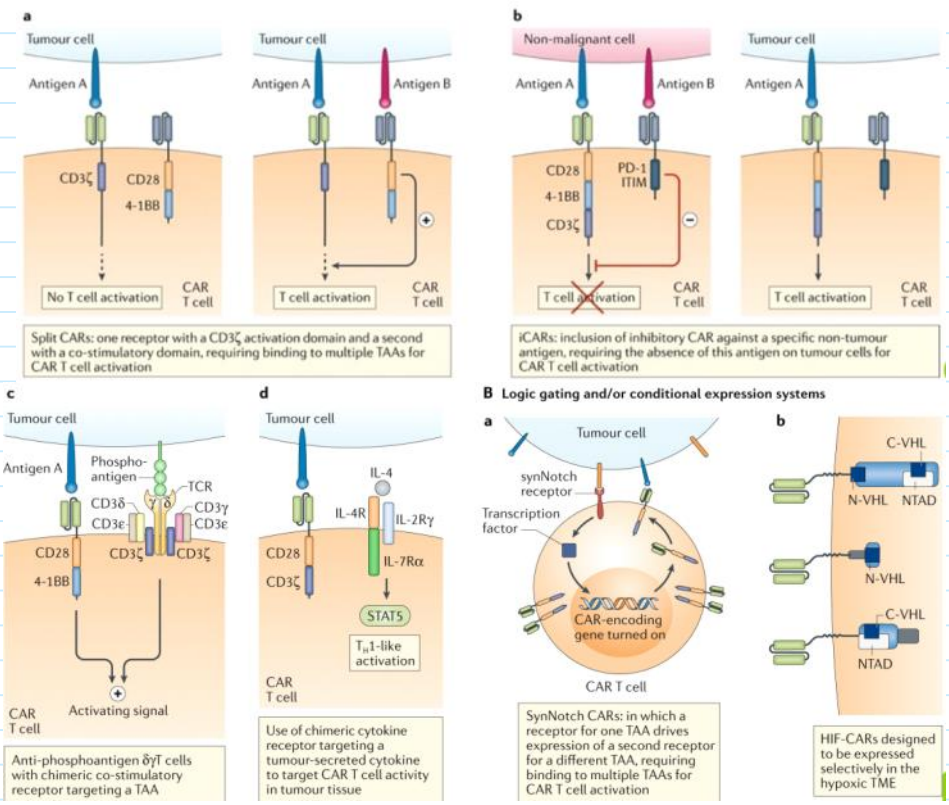
a. **Split CARs** - שיטה לכוון את ה-CAR T cell לשני אנטיגנים. על אותו תא T מבטאים שני רצפטורים (שני CARs). ה-CAR הראשון כולל את הscFv שמזהה אנטיגן A ואת CD3ζ (כמו בדור הראשון של CAR-T cells). בנוסף, אותו תא T מבטא עוד CAR עם scFv שמזהה אנטיגן B, ועם מולקולות קו-סטימולציה בחלק הפנימי. במצב כזה, צריך שתא הגידול יבטא גם את אנטיגן A וגם את אנטיגן B בשביל שה-CAR T cell יהרוג אותו. פתרון זה טוב במצב שיש אנטיגן שמתבטא גם בתאי סרטן וגם בתאים בריאים. אם הCAR T cell מכוון לשני אנטיגנים, הסיכוי ששניהם יחד מתבטאים גם בתאים בריאים הוא יותר נמוך.

b. **iCARs** - יכול להיות מצב בו תא בריא מבטא שני אנטיגנים (A ו-B) בעוד שהתא הסרטני מבטא רק אחד מהם (רק את A). אנחנו רוצים שהCAR T cell יפעל כנגד תא שמבטא רק את אנטיגן A ולא כנגד תא שמבטא את A ו-B. מבטאים באותו תא T שני CARs. הראשון - CAR רגיל עם scFv שמזהה את אנטיגן A, וחלק תוך תאי עם CD3ζ ומולקולות קו-סטימולציה. ה-CAR השני הוא CAR אינהיביטורי: יש לו scFv שמזהה את אנטיגן B, ובחלק התוך תאי יש PD-1. אם אנטיגן B נקשר לרצפטור, יהיה ביטוי של PD-1 שעוצר את הפעילות של תא הT. אבל אם רק A ייקשר, תא הT כן יפעל.

c. משתמשים ב-CAR שיש לו scFv שמזהה אנטיגן A ומולקולות קוסטימולציה אבל אין לו CD3ζ. בשיטה זו לא משתמשים בתאי T מסוג αβ אלא בתאי T מסוג **γδ**. לתאים אלה יש TCRs שמזהים **phospho-antigens**. ב-TCR הזה כבר יש שרשרת ζ, וה-CAR מספק את הקו-סטימולציה. במצב זה יש אקטוב של תא ה-T רק אם יש ביטוי גם של אנטיגן A וגם של phospho-antigen.

d. אם יש **ציטוקין** שמתבטא רק ב-tumor microenvironment (למשל IL-4), ניתן לבטא בתא ה-T רצפטור לאותו ציטוקין שעושה אקטיבציה לתא. בנוסף, מבטאים על אותו תא גם CAR רגיל (עם scFv, CD3ζ וקוסטימולציה).

e. **Logic gating/conditional expression** - התא מבטא SynNotch receptor - רצפטור שמזהה איזשהו אנטיגן ספציפי לתאי הגידול. הרצפטור הזה מתבטא כל הזמן. אבל רק כשהאנטיגן נקשר לאותו רצפטור, יש ביטוי של ה-CAR שמזהה אנטיגן נוסף. כלומר רק כשהתא מגיע לגידול ופוגש את האנטיגן הספציפי לגידול, מתחיל להתבטא ה-CAR.



2. אנחנו רוצים גם לשפר את **<u>היעילות</u>** של ה-CAR-T cells כך שיעבדו יותר טוב. בגידולים מוצקים יש הטרוגניות - אין אנטיגן אחד שמתבטא בכל התאים. לכן CAR שמזהה אנטיגן אחד לא יכול להרוג את כל הגידול.

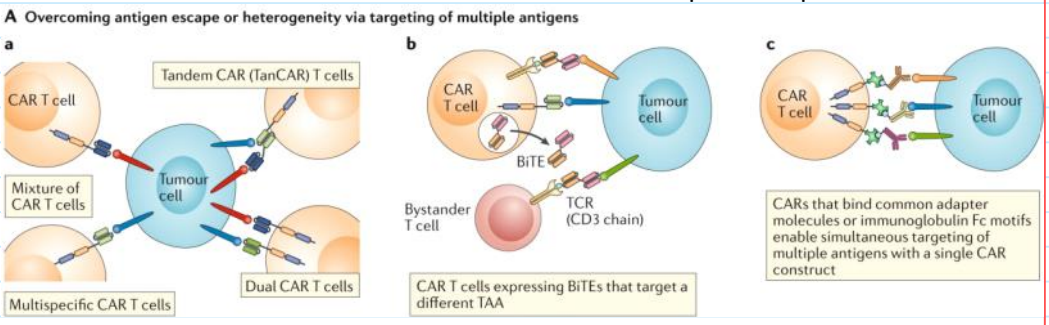
פתרונות אפשריים:

a. לתת **קוקטייל** של כמה CARs שכל אחד מזהה אנטיגן שונה. יש כמה סוגים:
   - **Mixture of CAR-T cells** - נותנים לחולה תערובת של תאי T שונים שכל אחד מזהה אנטיגן אחר.
   - **Dual CAR-T cells** - אותו תא T שמבטא שני CARs כנגד אנטיגנים שונים.
   - **Tandem CAR-T cells** - אותו CAR מבטא שני scFv נגד שני אנטיגנים שונים, אבל עם אותו חלק תוך תאי (מולקולה אחת שיכולה לזהות את שני האנטיגנים).

b. **ביטוי של BiTE** - על אותו תא T שמבטא את ה-CAR אפשר לבטא גם BiTE, שהוא engager שמזהה גם אנטיגן של הגידול וגם CD3 שמבוטא ע"י תאי T. כך הוא מגייס את ה-bystander T cells (תאי T לא מהונדסים שקיימים בחולה באופן טבעי) להילחם נגד הגידול.

c. CAR שבחלק החיצוני יש לו איזשהו engager, למשל מולקולה שקושרת ביוטין. בנוסף, נותנים לחולה נוגדן שהחלק ה-Fc שלו מזהה ביוטין (או את ה-engager שעל ה-CAR) ומצד שני מזהה כל אנטיגן. כלומר זה תרופה שהיא off the shelf - לא צריך לייצר אותה ספציפית לכל מטופל. משתמשים בספרייה של נוגדנים שמזהה תאי גידול. אם אנחנו יודעים איזה אנטיגנים יש לאותו חולה אפשר לתת לו נוגדנים כנגד האנטיגנים האלה ואז ה-CAR-T cells יפעלו נגד אותם אנטיגנים.

כל הרעיונות האלה עדיין בניסויים קליניים.

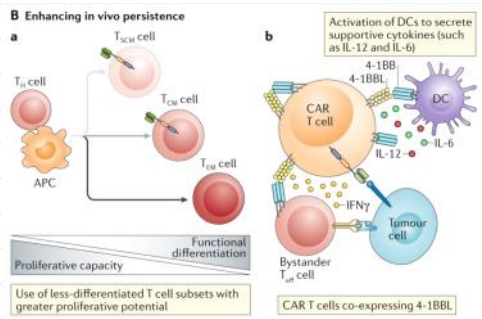


3. תאי T לא נשארים לנצח. רוצים להגביר את ה-**<u>persistence</u>** של ה-CAR-T cells כך שהם יחזיקו מעמד למשך כמה שיותר זמן.

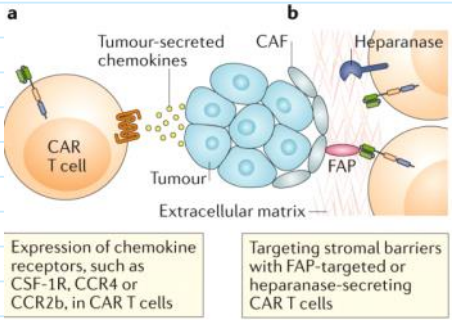
פתרונות אפשריים:

a. בעיקרון ככל שתא ה-T שנותנים לחולה יהיה **נאיבי** יותר, הוא יחזיק יותר זמן. כלומר אנחנו היינו רוצים להכניס את ה-CAR T cells לחולה כשהם הכי נאיביים שאפשר, עוד לא עברו אקטיבציה. אבל לא עושים זאת בקליניקה, כי כיום מכניסים את הגן של ה-CAR לתאי ה-T בעזרת לנטי-וירוס. הלנטי-וירוס חייב שתא ה-T יעבור אקטיבציה/priming. לכן לפני שמכניסים את הוקטור, מאקטבים את תא ה-T בצלחת עם anti CD3 ו-anti CD28. יש ניסיון לייצר CAR-T cells בלי לאקטב את התאים, אבל עוד לא הצליחו.

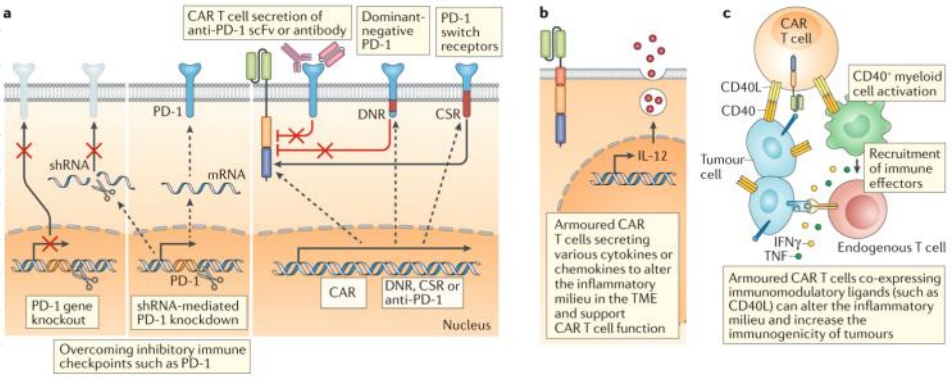
b. אפשר לייצר armor CAR-T cells שמייצרים גם ציטוקינים כמו IL-12 שעוצר אימונוסופרסיה ומאפשר לתאי הT לעבוד יותר זמן. אפשר גם לתת IL-2.



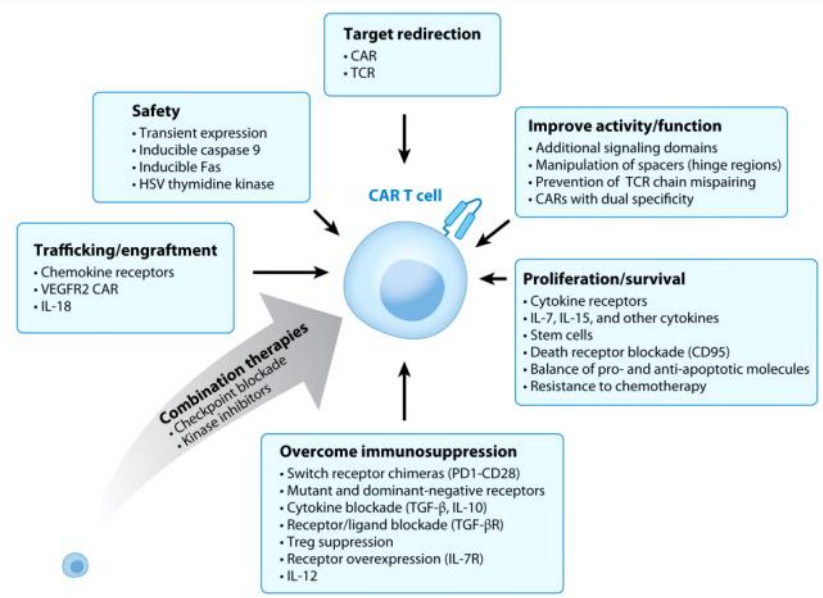
4. **הגדלת ה-Tumor homing and penetration -** מבחינה מכנית קשה ל-CAR-T לחדור למסה של הגידול (במיוחד לחלק הפנימי שלה). פתרון אפשרי: לשנות את הECM של הגידול כדי לשנות את המאפיינים המכניים של הגידול וכך תאי הT יחדרו יותר טוב.



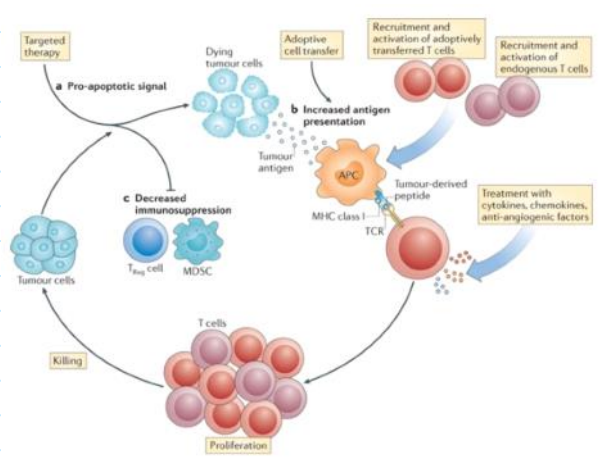
5. **immunosuppressive tumor microenvironment -** מנגנונים של הגידול כמו PD-1 והציטוקינים IL-10, TGFβ יכולים לעצור את הפעילות של תא הT. פתרונות אפשריים:



אסטרטגיות אפשריות להנדסה גנטית של תאי T:



Combination therapy - אפשר לשלב מספר טיפולים יחד כדי לגרום לתגובה טובה יותר של מערכת החיסון נגד תאי הסרטן. למשל, לשלב CAR-T cells ו-immune checkpoint inhibitors. כל פעם שמעלים שילוב אפשרי חדש צריך לעבור מחדש את כל המסלול של ניסויים קליניים, אישור FDA וכו', וזה גם נחשב לפטנט חדש.

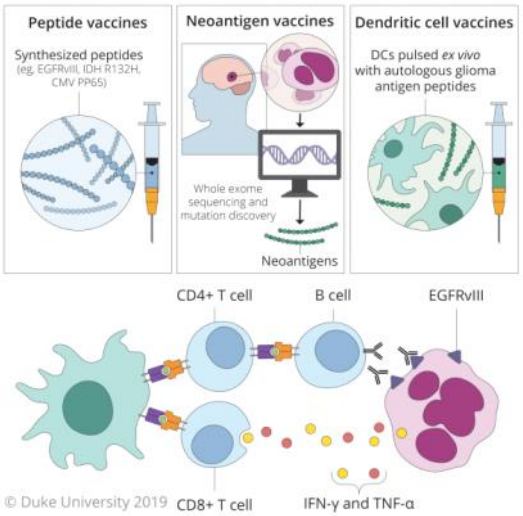


חיסונים נגד סרטן - יש כמה דרכים:

1. לחסן עם פפטידים
2. לזהות neoantigens ולחסן איתם
3. לחסן עם הAPC (למשל תאים דנדריטיים) שעברו הטענה של הפפטיד.

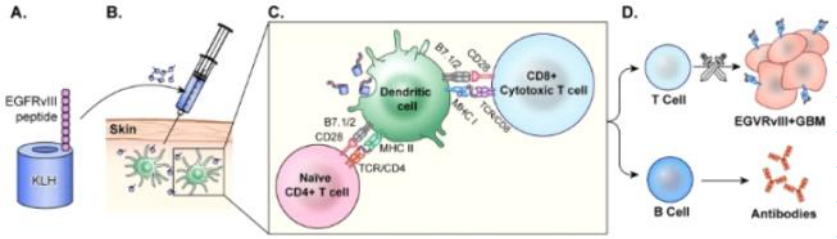
המטרה היא לאקטב תאי T ו-B נגד הגידול ולהרוג אותו.

הכל בפיתוח או בניסויים קליניים, כלום עוד לא אושר. יש כיום הרבה ניסויים קליניים לחיסונים נגד גליומה.



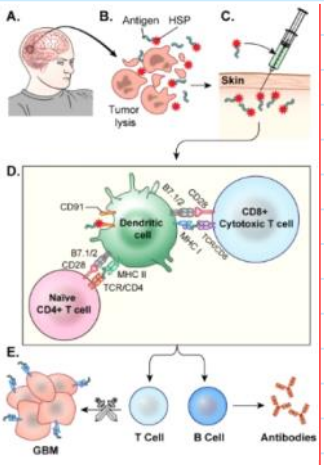
Peptide vaccine - חיסון בו מזריקים פפטיד. דוגמאות:

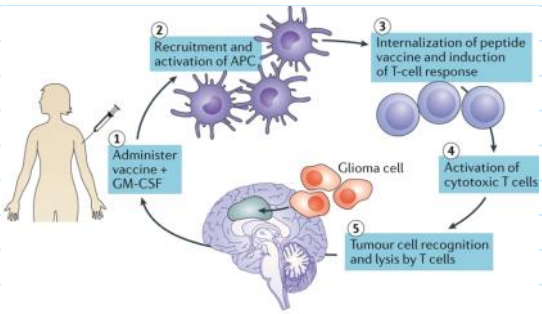
- **EGFR (epidermal growth factor receptor) variant 3 -** הגן EGFR קיים אצל כולנו בכל תאי הגוף. אבל יש מוטציה ספציפית בגן של EGFR שקיימת בגליובלסטומה - מחיקה של אקסון שגורמת לחלבון להיות פעיל כל הזמן, ללא צורך בליגנד. מוטציה זו פועלת לרענו ולטובת הסרטן. אבל מצד שני, ה-EGFR המוטנטי מהווה neoantigen ולכן אפשר לפתח CAR-T או חיסון נגדו. לוקחים פפטיד שמייצג את הוריאנט הזה של EGFR, ומזריקים אותו יחד עם אדג'ובנט (KLH). החיסון עובר עיבוד בתאים דנדריטים. התאים הדנדריטים מציגים את האנטיגן לתאי T ומאפשרים להם להרוג את הגידול.



- **IDH1 mutant -** בסוגי סרטן בהם יש IDH1 mutant, הוא מהווה neoantigen. ניסו לעשות חיסון נגד IDH1 mutant. ניסוי את זה בעכברים וזה עבד טוב. עכשיו זה נמצא בניסויים קליניים.

Heat Shock Protein (HSP) Vaccination - איך מבודדים אנטיגנים לחיסון? לאחר הסרת הגידול, אפשר לתפוס את הצ'פרונים שנקראים HSP. כל הפפטידים, כולל אנטיגנים של הגידול, עוברים עיבוד בעזרת צ'פרונים. יש assay שמאפשר לדוג את הצ'פרונים מתאי הגידול עם כל החלבונים שיש בהם. אפשר לקחת את כל התערובת הזו ונגד זה לעשות חיסון (כי זה פפטידים שבאו מהגידול). איך זה עובד? לאחר שמבודדים את ה-HSPs עם האנטיגנים שמחוברים אליהם, מזריקים אותם לגוף כחיסון. הקומפלקסים של HSP-tumor peptide עוברים עיבוד בתאי הAPC, מוצגים על MHC ויש אקטיבציה של תאי T נגדם. תאי CTL שעברו אקטיבציה יכולים לעבור את הBBB ולהרוג תאי גליובלסטומה.

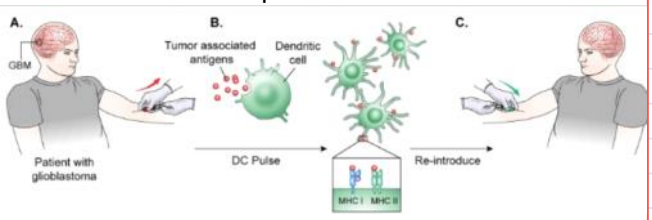




איך אמור לעבוד חיסון ל-GBM?

1. נותנים חיסון ביחד עם הציטוקין **GM-CSF** שמאקטב מקרופאגים.
2. יש גיוס ואקטיבציה של APCs
3. הפפטידים של החיסון עוברים אינטרנליזציה והצגה ע"י APCs, שמובילה לאקטיבציה של תאי T
4. אקטיבציה של CTLs
5. CTLs שעברו אקטיבציה נודדים למוח, מזהים את תאי הגידול והורגים אותם.

Cell-based vaccine - מבודדים את התאים הדנדריטים של החולה. מחוץ לגוף, עושים לתאים הדנדריטים הטענה של ה-tumor-associated antigens (אנטיגנים שמתבטאים ביתר בגידול אבל לא ספציפיים רק לתאי גידול). לאחר מכן מכניסים את התאים הדנדריטים חזרה לחולה כחיסון.

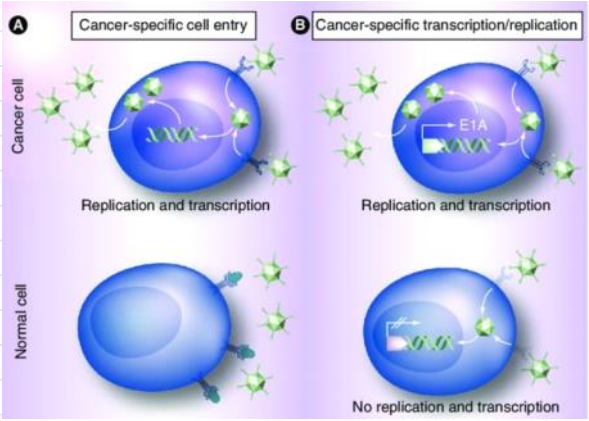


Oncolytic viruses-based immunotherapy (OVT) / virotherapy -

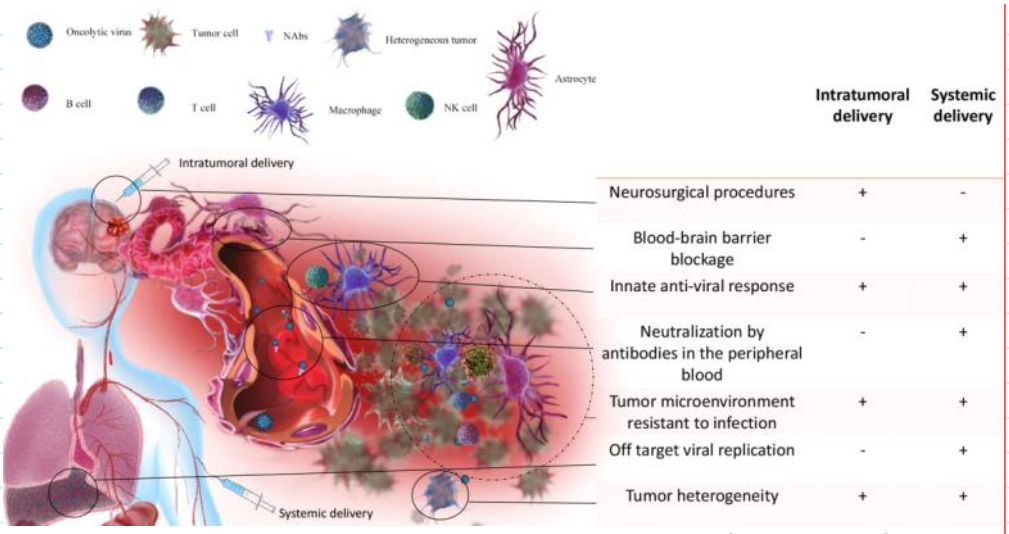
גידולי GBM נקראים cold tumors - כי אין מערכת חיסון שמגיבה נגדם. אנחנו רוצים להפוך את ה-GBM ל-hot tumor. אחת הדרכים לעשות זאת היא לתת **וירוסים אונקוליטיים** - וירוסים שהורגים תאי סרטן. הוירוסים האונקוליטיים יכולים לזהות את מי להדביק.

Cancer specific cell entry - הנדסה של וירוסים שמכילים על גבי הקפסיד חלבונים שיש להם קולטן רק על גבי תאים סרטניים. בשל כך, הדבקה של חולה בווירוס תגרום לכך שהווירוס יצליח להיכנס בעדיפות לתאי הגידול ולא לתאים בריאים. לאחר הכניסה לתא הסרטני, הווירוסים משתכפלים, משעתקים גנים ויראליים, מייצרים ויריונים ומשתחררים מהתא ע"י פיצוץ והרג שלו.

Cancer specific transcription/replication - הנדסה של וירוסים שמדביקים תאים אנושיים אך בעלי מידע שמאפשר להם להשתכפל ולעבור שעתוק רק בתאים סרטניים, למשל הודות לגורמי שעתוק ספציפיים לסרטן או פרומוטורים. בשל כך, רק בתאים סרטניים יתרחש תהליך ליטי ויצירה של ויריונים שיביאו להרג של התאים.



מכשולים בשיטת טיפול זו: בטבלה רואים בעיות שונות שקיימות בטיפול, בין אם מזריקים את הוירוסים האונקוליטיים לגידול (intratumoral) ובין אם נותנים אותם סיסטמית לוריד.



המנגנון של וירוסים אונקוליטיים:

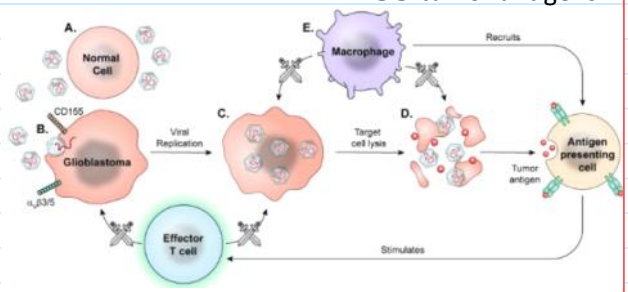
A. הוירוס המהונדס מוכנס למיקרו-סביבת הגידול. יכול להיות שתהיה הכנסה של מידע גנטי של הוירוס גם לתאים בריאים שנחשפו אליו, אבל הוירוסים מהונדסים ככה שהם לא ישתכפלו בתאים הבריאים.

B. הוירוסים מזהים את תאי הגידול ונכנסים אליהם בהתבסס על חלבונים ספציפיים.

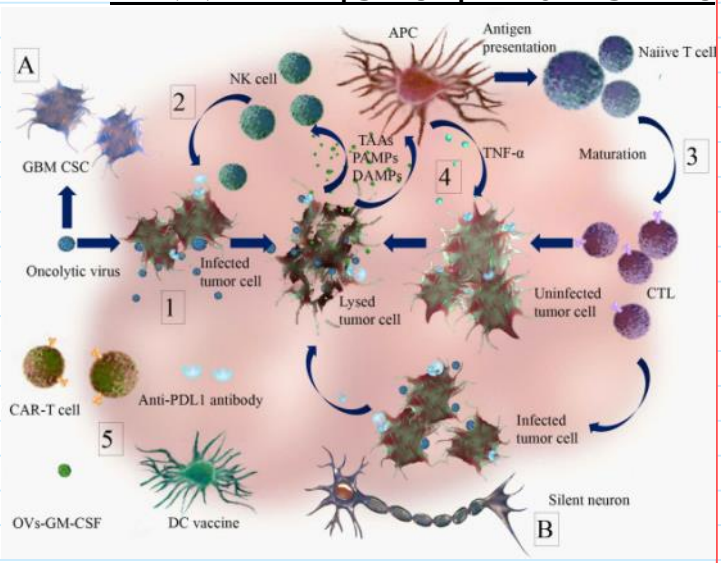
C. הוירוסים שהדביקו את תאי הגידול משתכפלים בתוכם תוך ניצול מנגנון השכפול של התא.

D. בסופו של דבר יש ליזיס של תא הגידול. הויריונים שנוצרו בתא משתחררים לסביבה ומדביקים תאי גידול נוספים.

E. מקרופאגים מזהים ומטרגטים תאים מודבקים בוירוס. הם מגייסים עוד APCs ותאי T אפקטוריים לתגובה חיסונית שניונית נגד ה-tumor antigens ששוחררו.

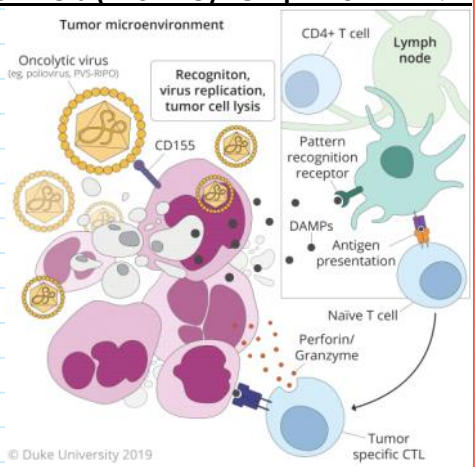


טיפולים של וירוסים אונקוליטיים שקיימים כיום נגד גליומה:

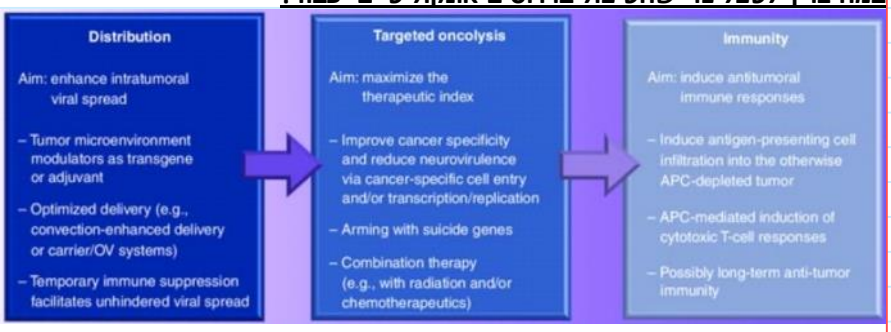


1. וירוסים אונקוליטיים יכולים להדביק תאי גידול באופן מועדף/סלקטיבי בגלל המחסור בתגובה חיסונית אנטי-ויראלית מולדת (לדוגמה מסלולי IFN) בהרבה תאי גידול.
2. הליזיס של תאי הגידול בעקבות ההדבקה בוירוס גורם לשחרור tumor associated antigens (TAAs), viral pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) ו-cell-derived damage-associated molecular patterns (DAMPs). מרכיבים אלה יכולים לגייס תאים דנדריטים ותאי NK כדי להרוג את התאים המודבקים בוירוס.
3. השחרור של TAAs, DAMPs, PAMPs, ציטוקינים וכימוקינים פרו-דלקתיים ע"י תאי הגידול שעברו ליזיס ותאי מערכת החיסון המולדת, מעודד הצגת אנטיגן ותגובות ספציפיות של מערכת החיסון הנרכשת נגד האנטיגנים.
4. התגובה החיסונית הורגת לא רק את תאי הגידול המודבקים, אלא גם תאי גידול שלא הודבקו באמצעות bystander effects.
5. וירוסים אונקוליטיים יכולים לעודד את הגיוס של tumor infiltrating lymphocytes לאזור הגידול. זה יכול לעזור להפוך את המיקרו-סביבה של הגידול ל"חמה" ומתאימה לטיפולים אימונותרפיים נוספים.

דוגמה לוירוס אונקוליטי: Recombinant polio-rhinovirus chimera (PVSRIPO) - מפורט בתמונה. נמצא בניסויים קליניים.



במה צריך לטפל כדי שהטיפול בוירוסים אונקוליטיים יעבוד?



בוחן:

Which of the following statements is **correct** regarding immune checkpoint immunotherapies?

- (●) High frequency of mutations together with high expression of neoantigens is a good predictor of immune checkpoint response
- ( ) A recent study using anti-PD1 inhibitor in GBM showed better response when administered after surgery (adjuvant).
- ( ) Blocking either PD1 or PDL1 improves B cell killing of tumor cells
- ( ) Histology analysis of glioblastoma cases revealed high PDL1 expression with high infiltration of cytotoxic lymphocytes

Clear selection

א. נכון - הראתה גרף של זה
ב. לא נכון - הטיפול יותר מוצלח בשניתן לפני הניתוח
ג. לא נכון - B cells לא קשורים
ד. לא נכון - יש מעט חדירה של cytotoxic lymphocytes