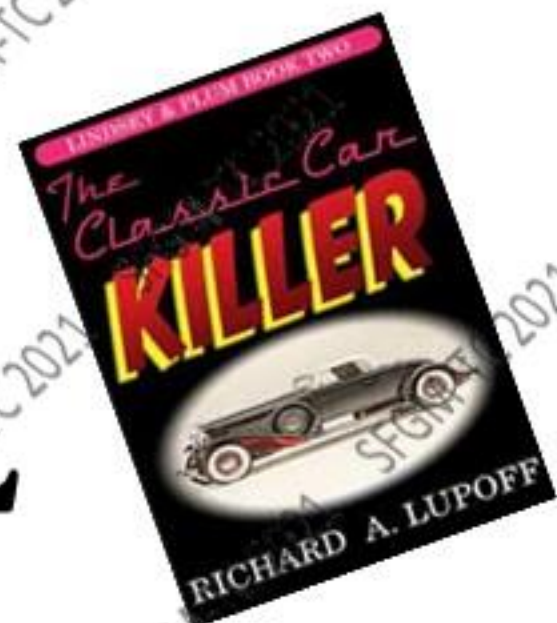




CAR-NATURAL KILLER



Une alternative aux CAR-T « off the shelf »...fiction ou réalité?



Cellules T autologues
Quantité, Qualité (exhaustion, microenvironnement etc)



Toxicité CART: CRS, ICANS
hospitalisation

Et les CART Myélome qui arrivent!!

1 patient= 1 produit

30 jours entre
la fabrication et l'injection: parfois
intenable pour des patients
francophones

Coût 320 000
euros/produit: 1 seule
injection!

Process: surcharge de
travail des services
d'hémobiothérapie, de
thérapie cellulaire,
pharmacies

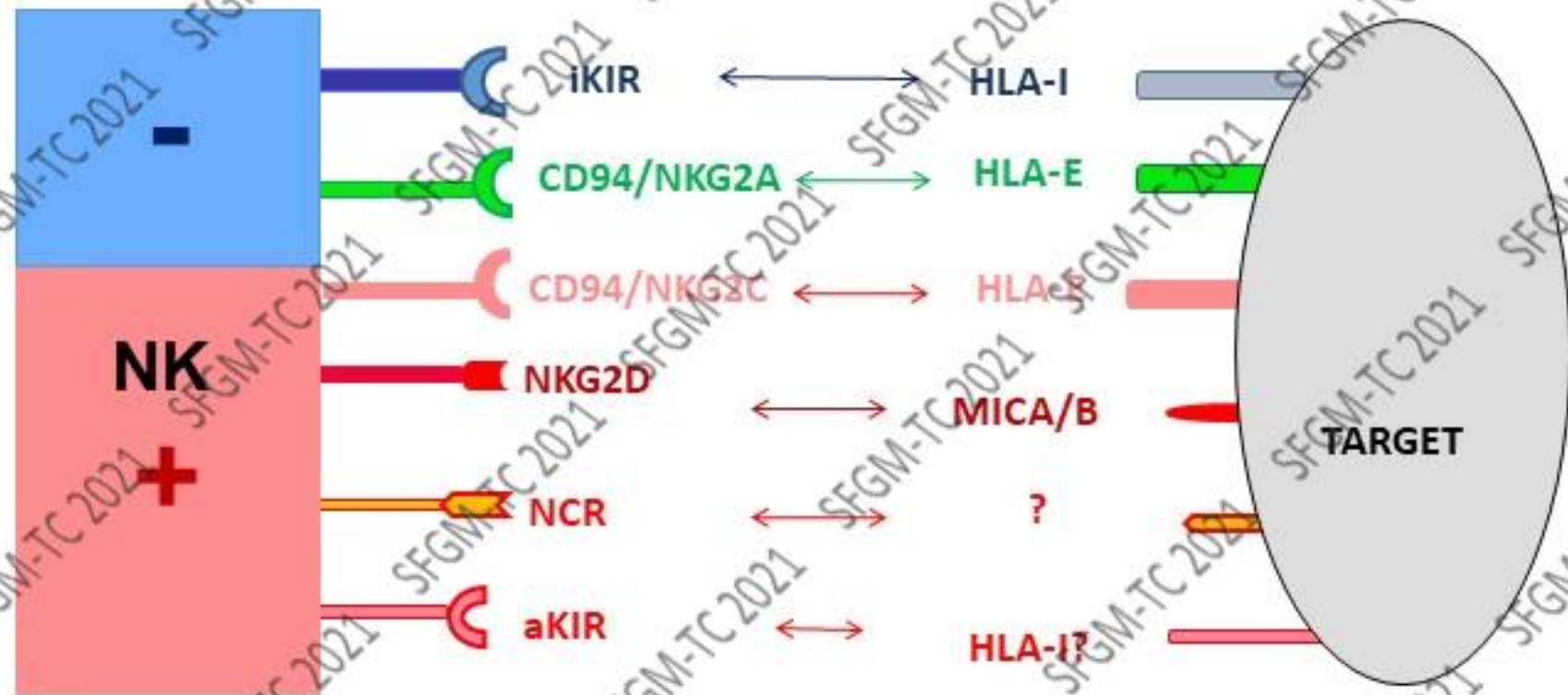


Les cellules NK

Biologie, Historique de la greffe haplo aux CAR



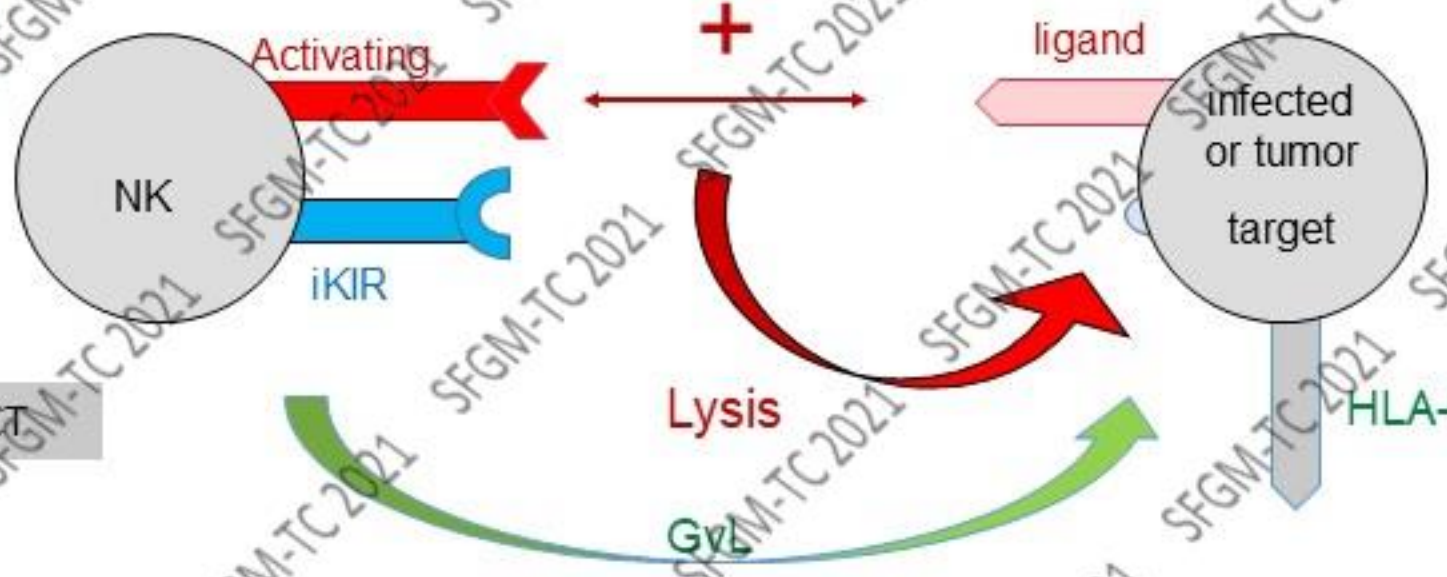
**La cytotoxicité NK dépend d'une balance
Inhibition/Activation**



Autologous



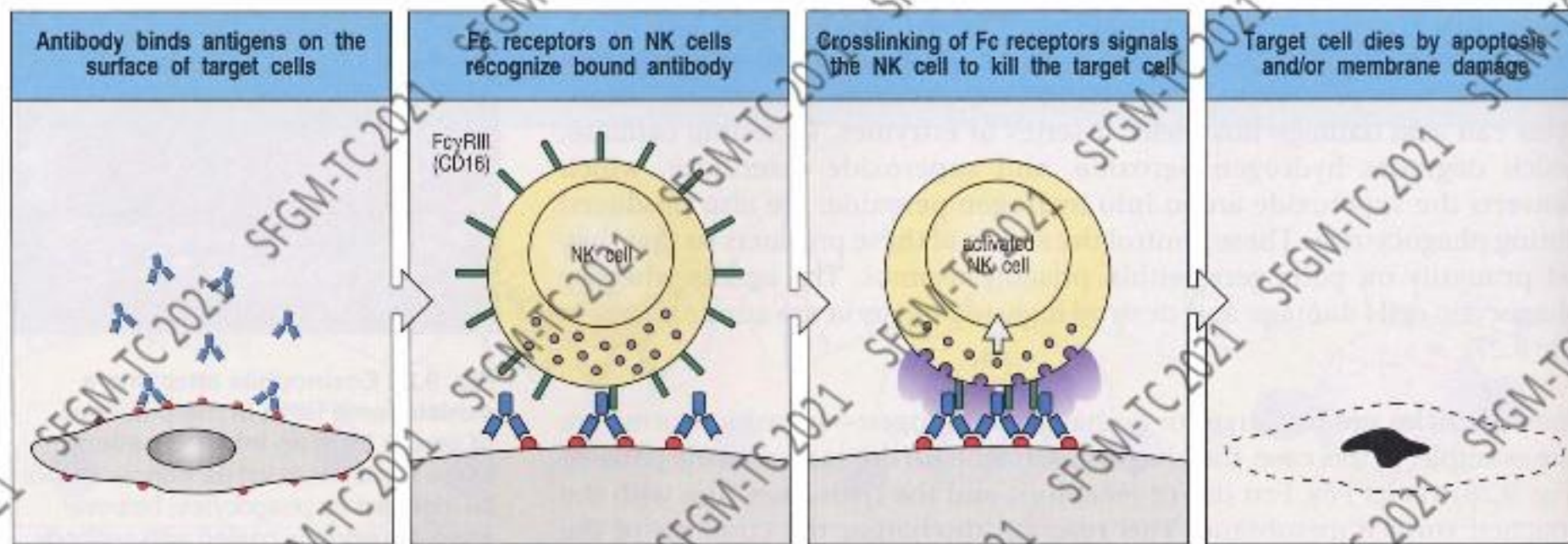
Stress



HLA MM HSCT

NK haplo
alloréactives

Lyse dépendante des anticorps = ADCC

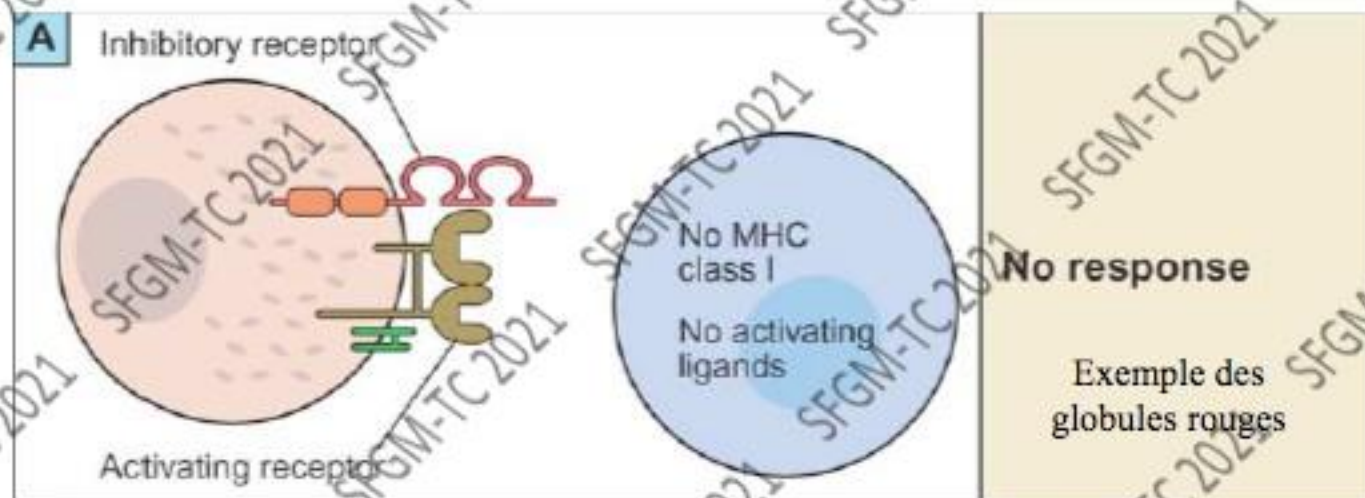


L'ADCC est également par d'autres cellules pour des récepteurs pour les IgG :
dont les macrophages, neutrophiles, éosinophiles
Mécanisme équivalent le CDC, par l'intermédiaire du complément

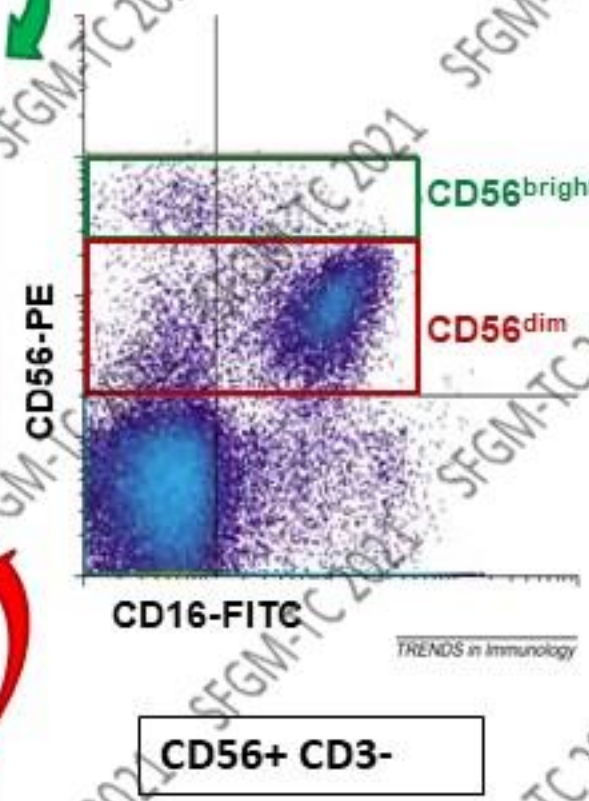
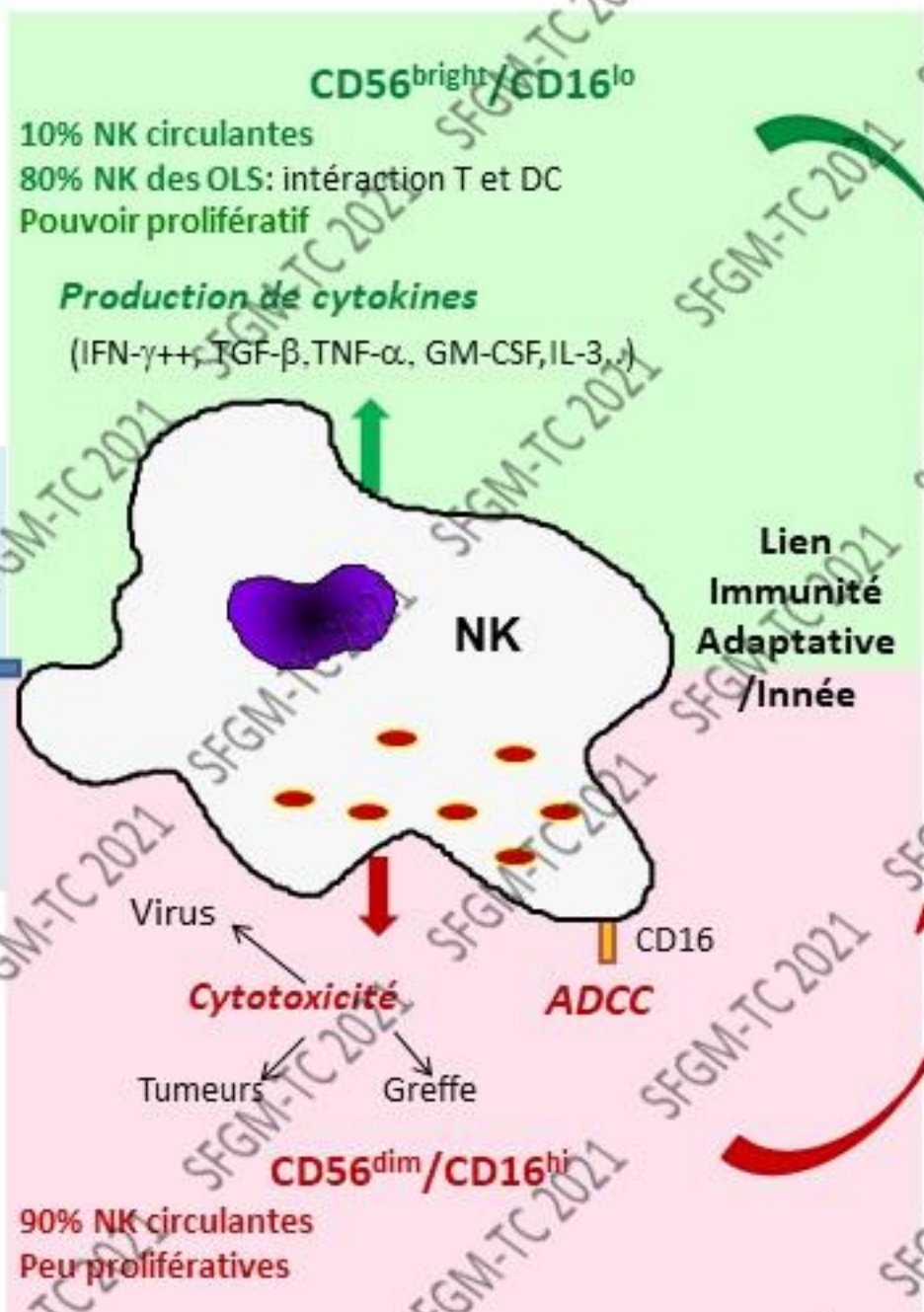
LES NK peuvent médier la GVL SANS GVH

GVL: en cas de mismatch KIR donneur/ HLA-I du receveur

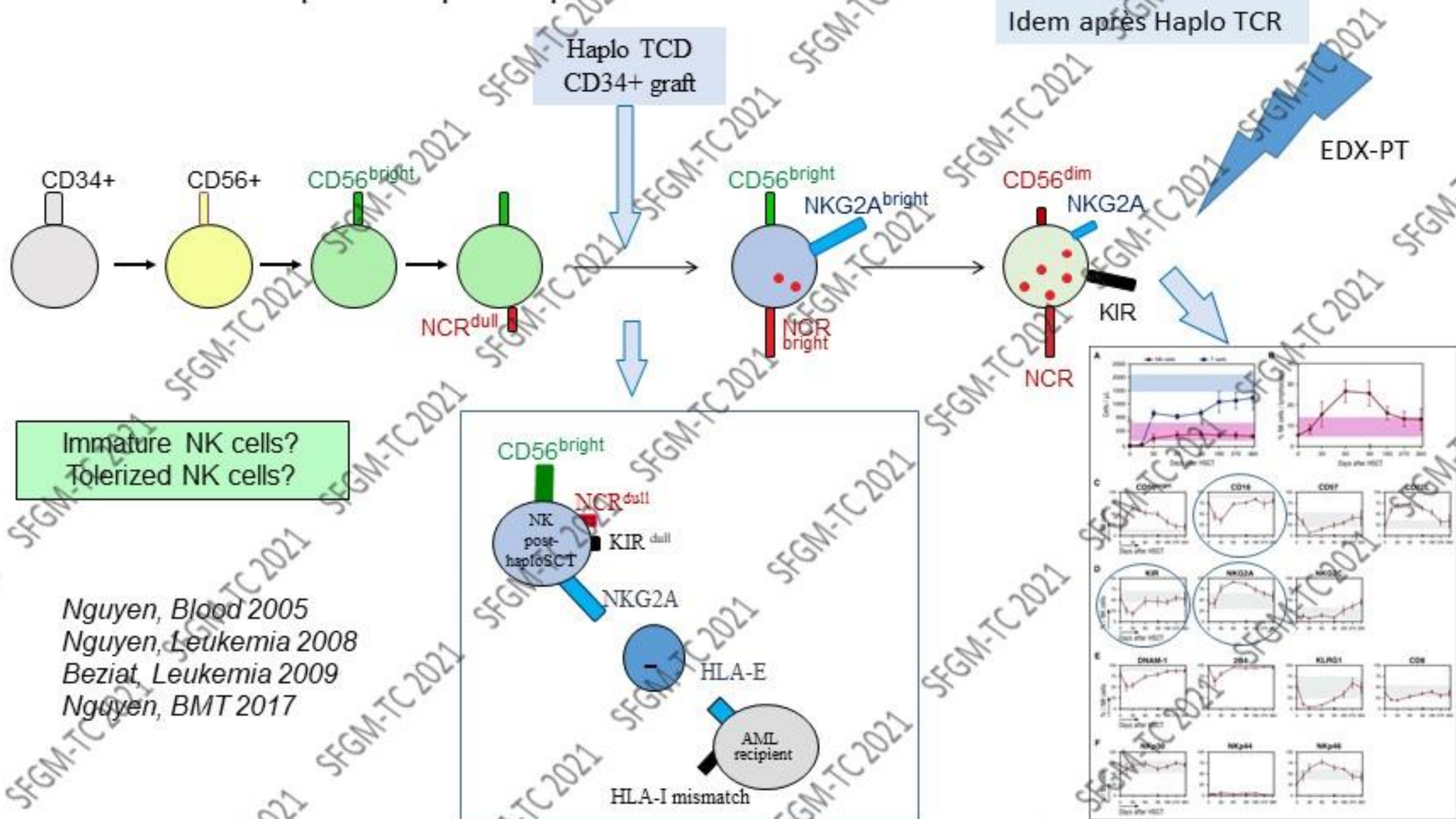
Pas de GVH, probablement car les ligands des récepteurs activateurs ne sont pas exprimés sur les tissus sains non hématopoïétiques du receveur



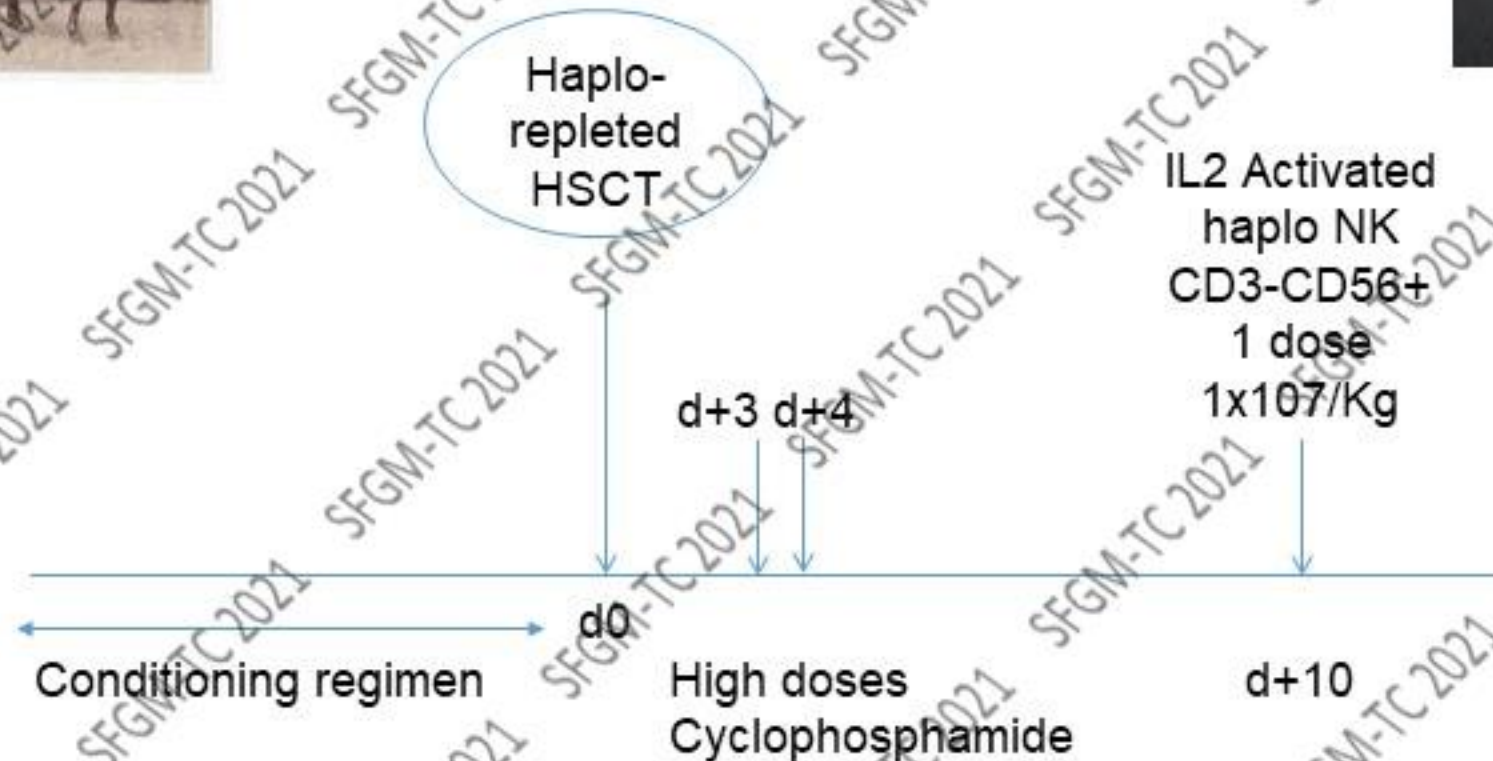
Les cellules NK CD56^{dim/bright}: 2 populations distinctes



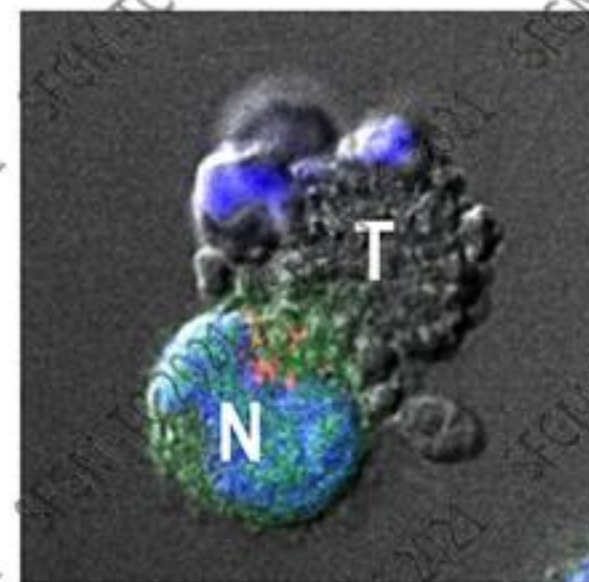
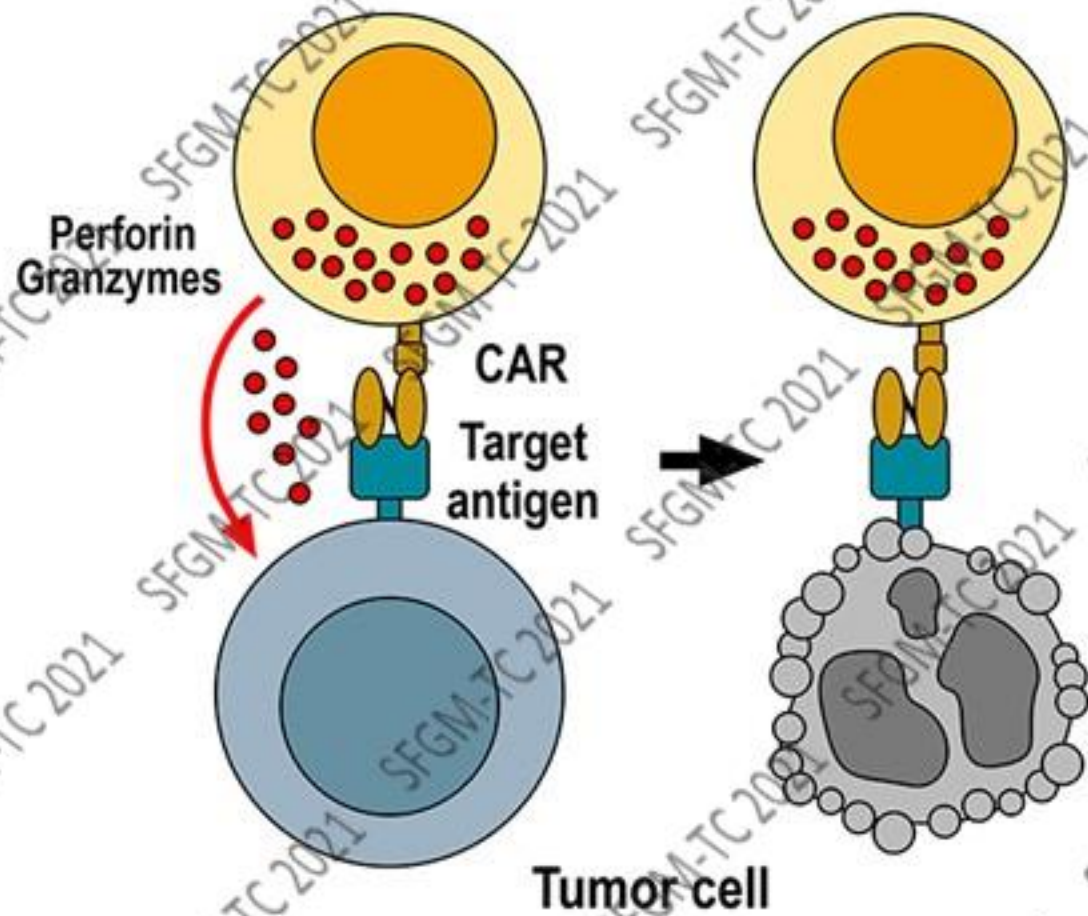
NKG2A+ overexpression post haplo inhibits the GvL effect ex vivo



PHRC 2014: Infusion of donor NK cells after haploidentical HSCT



CAR-NK



Perforin EGFP DAPI

Sources de cellules NK pour les CAR

Lignées NK-92



Cellules de sang de cordon



iPSC



PBMC: Cellules NK matures circulantes



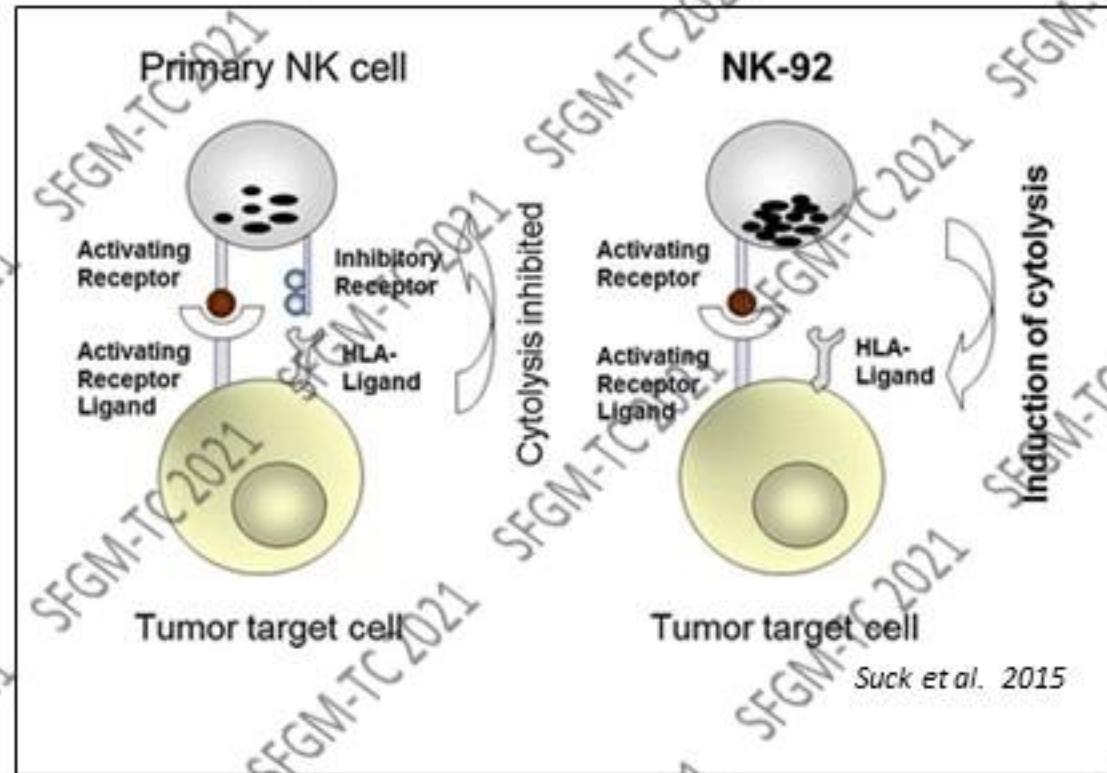
Lignée NK 92



Lignée cellulaire NK-92 isolée par le groupe de Klingemann en 1992 à partir d'un homme de 50 ans atteint d'un LNH NK

Avantages:

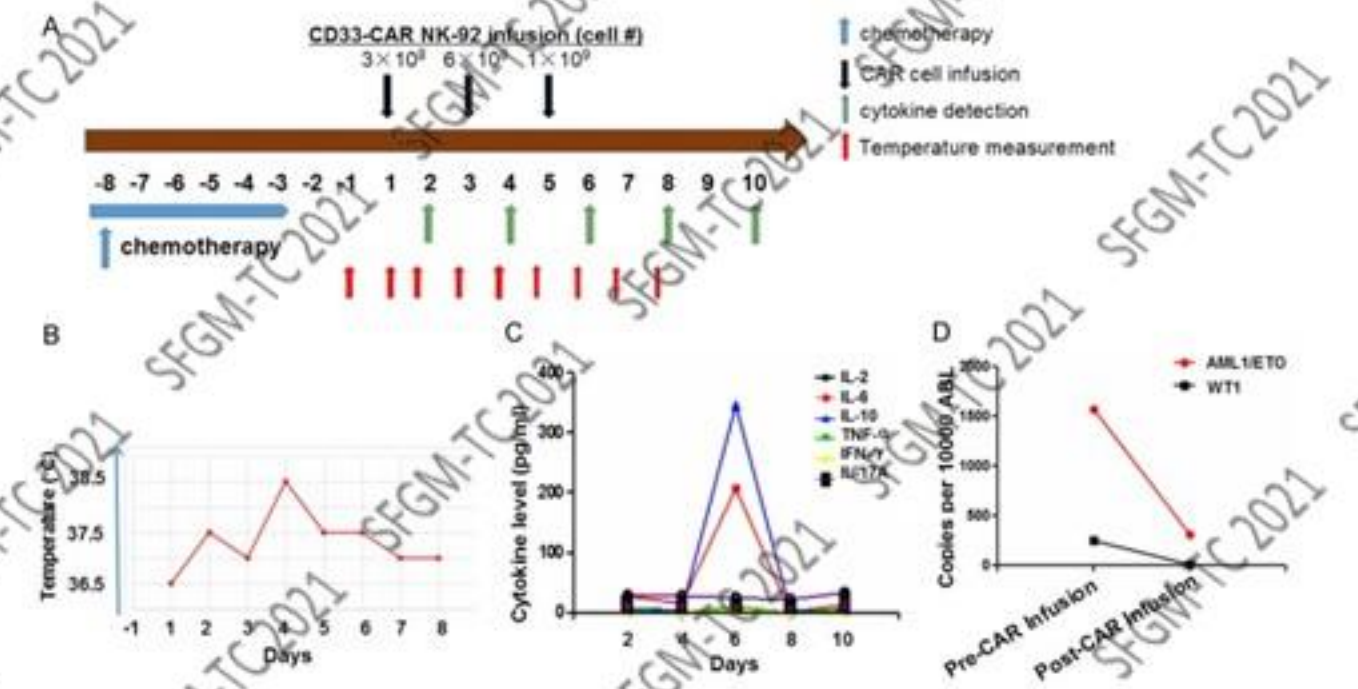
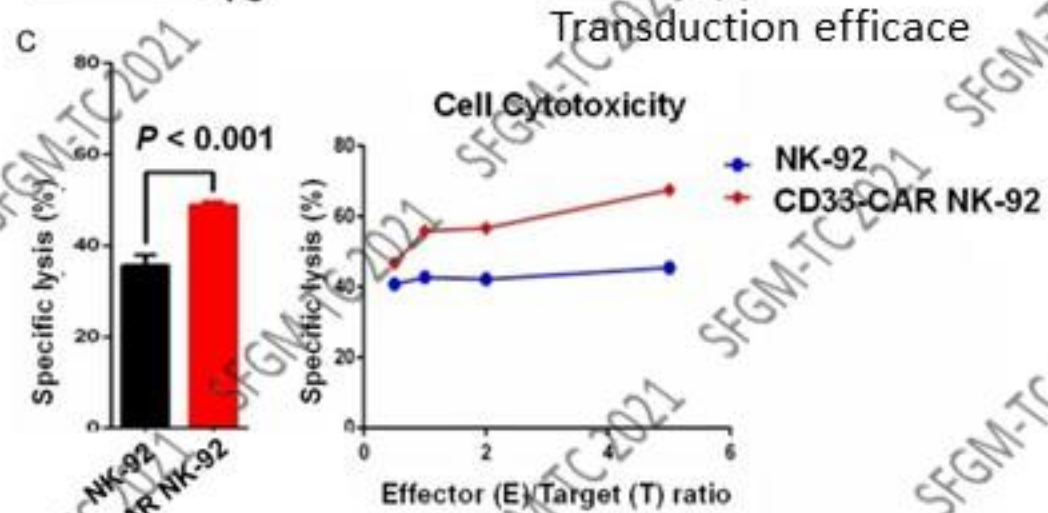
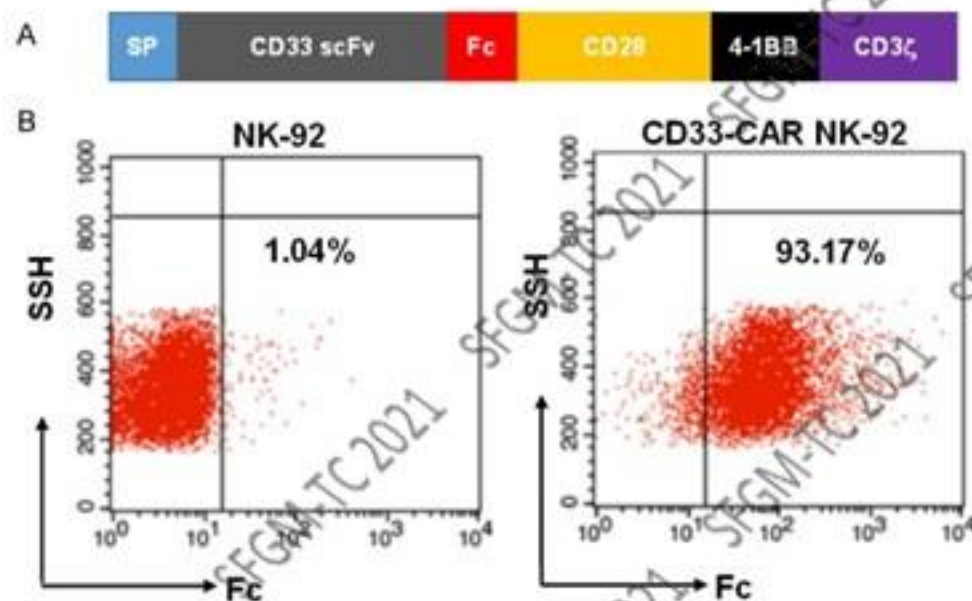
- Lignée tumorale
- prolifération à l'infini, standardisée
- Pas de prélèvements de donneurs sains
- CD56bright mais ++cytotoxiques
- Peu de KIR (pas inhibé par HLA-I)
- Facile à expandre in vitro et à transduire
- Off the shelf
- Peu coûteuses



Inconvénients

- Lymphome NK: à irradier, diminue cytotox et prolifération
- Expansion in vivo faible
- Nécessité plusieurs injections
- Pas de CD16 (pas d'ADCC)

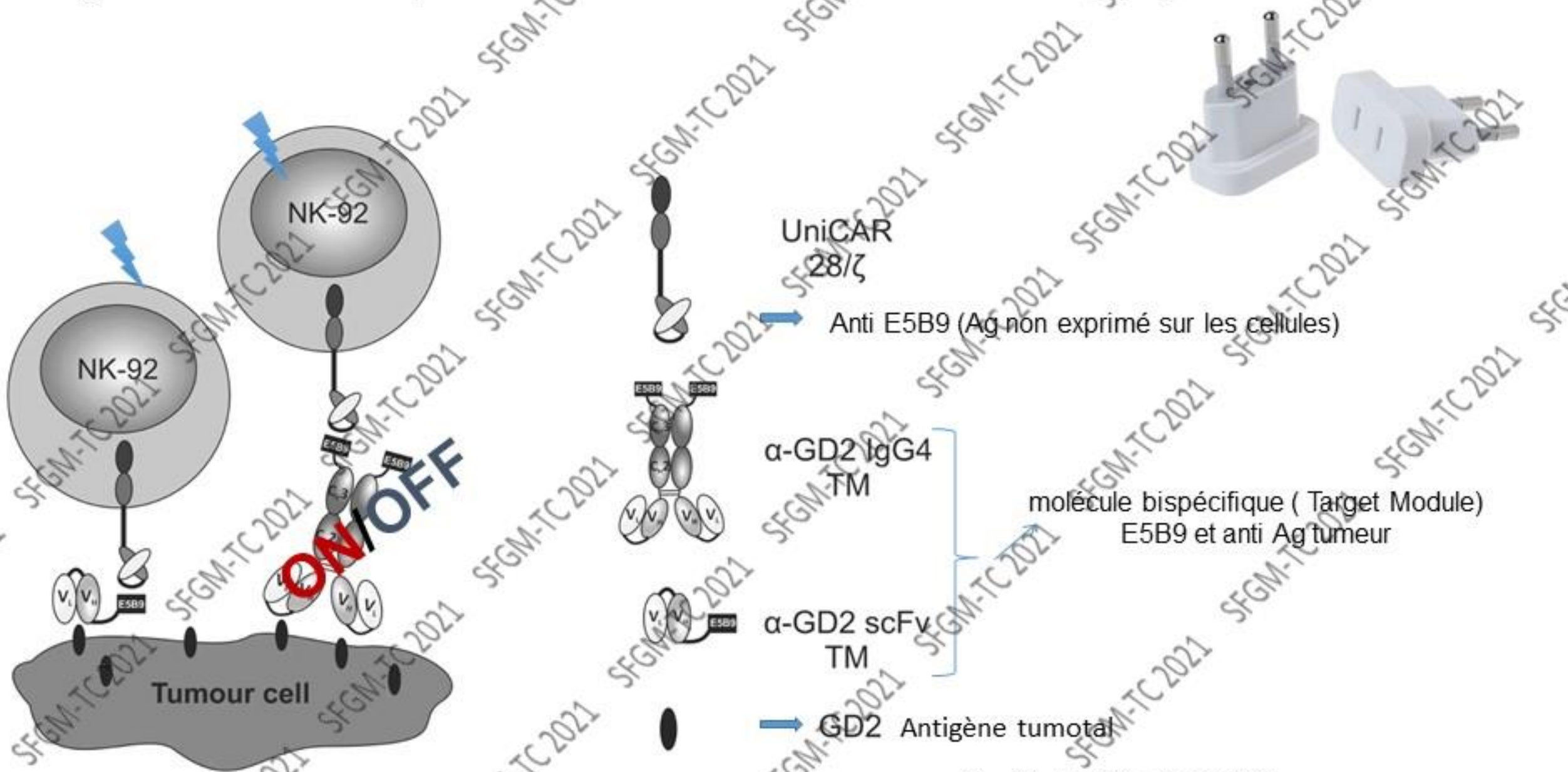
3 premiers case report chez l'homme, LAM, réponse très transitoire (10j à 4 mois)



Augmentation modérée de la cytotoxicité vis-à-vis de la lignée LAM HL60

Am J Cancer Res, Tang 2018

Lignée NK 92: la plateforme UniCAR avec un « adaptateur »



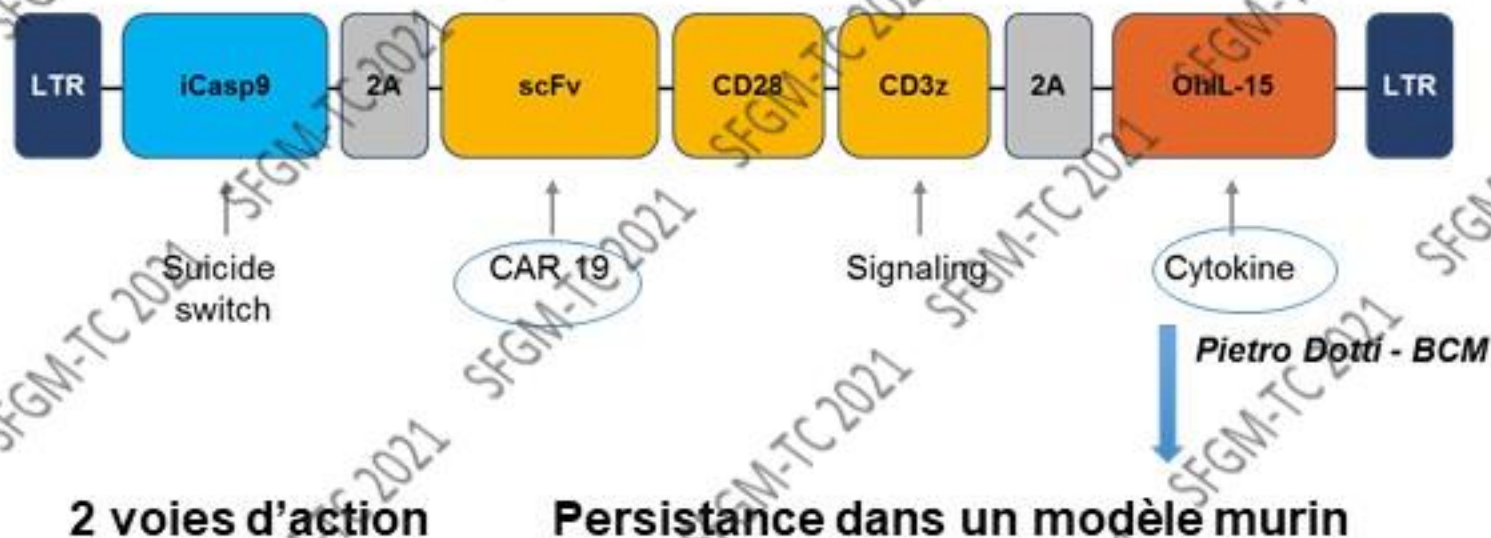
Cellules de sang de cordon



Avantages
Banques disponibles
CD56bright Prolifération +
Off the shelf

Inconvénients
Immatures: CD56dim faibles, peu de CD16
Persistance courte
Nécessité de travailler sur cordons frais

Equipe du MD Anderson; Liu & Rezvani



Characteristics of iC9/CAR.19/IL15-transduced CB-NK cells generated from 5 different CB units after 14 days of culture

	Starting Cell Number ($\times 10^6$)	NK Fold Expansion	NK Absolute Count at Day14 ($\times 10^8$)	CAR Transduction Efficiency (%)
CAR-CBNK#2	20	843.7	170	87.4
CAR-CBNK#3	20	7369.6	1530	64.4
CAR-CBNK#4	20	2514.3	500	47.8
CAR-CBNK#5	20	2221.8	440	67.5
Median	20	2221.8	440	66.6

>100 doses of CAR NK cells can be generated from one cord blood unit

Raji NT-NK CAR19-NK CAR19/IL15-NK

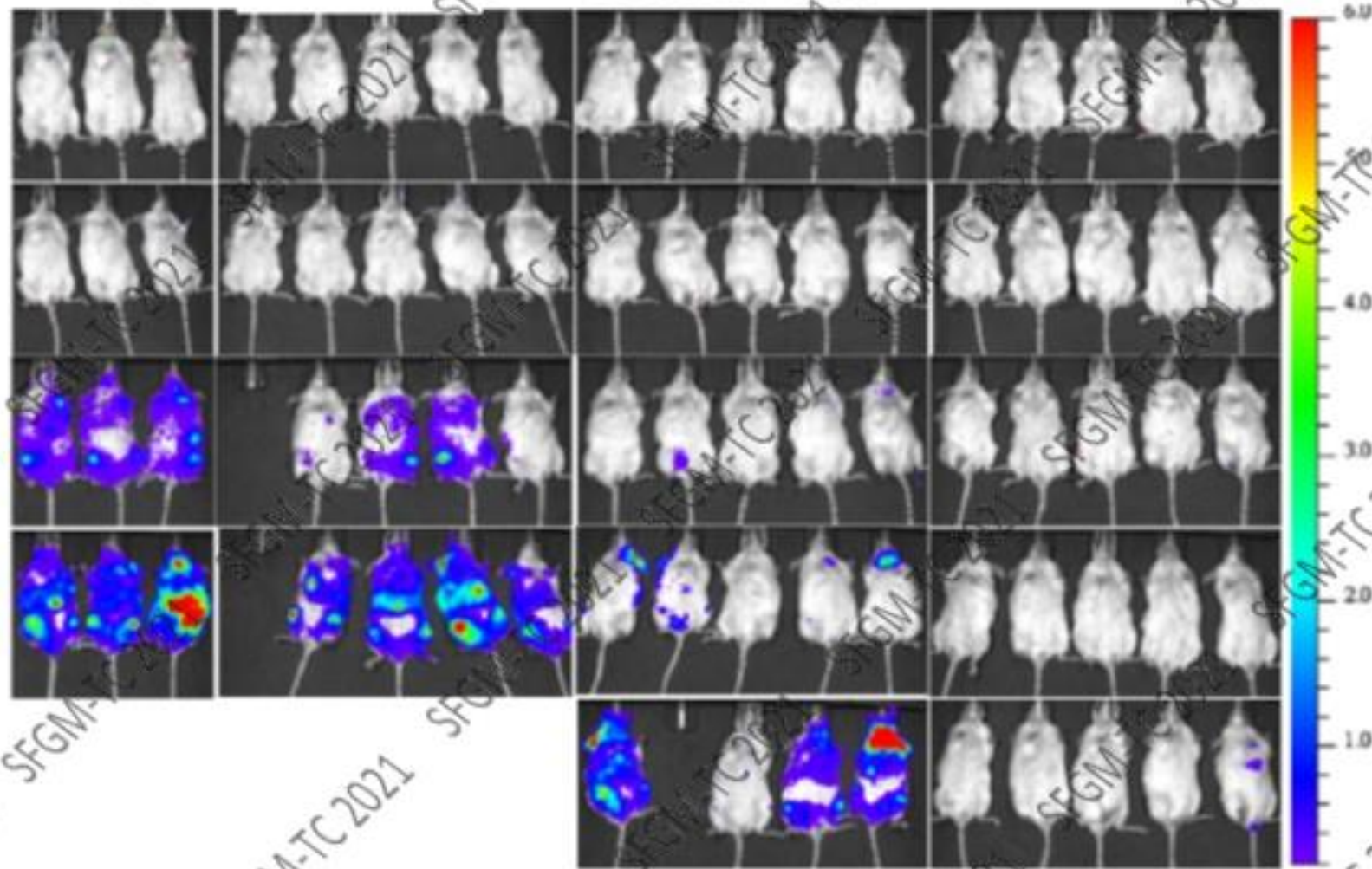
D0

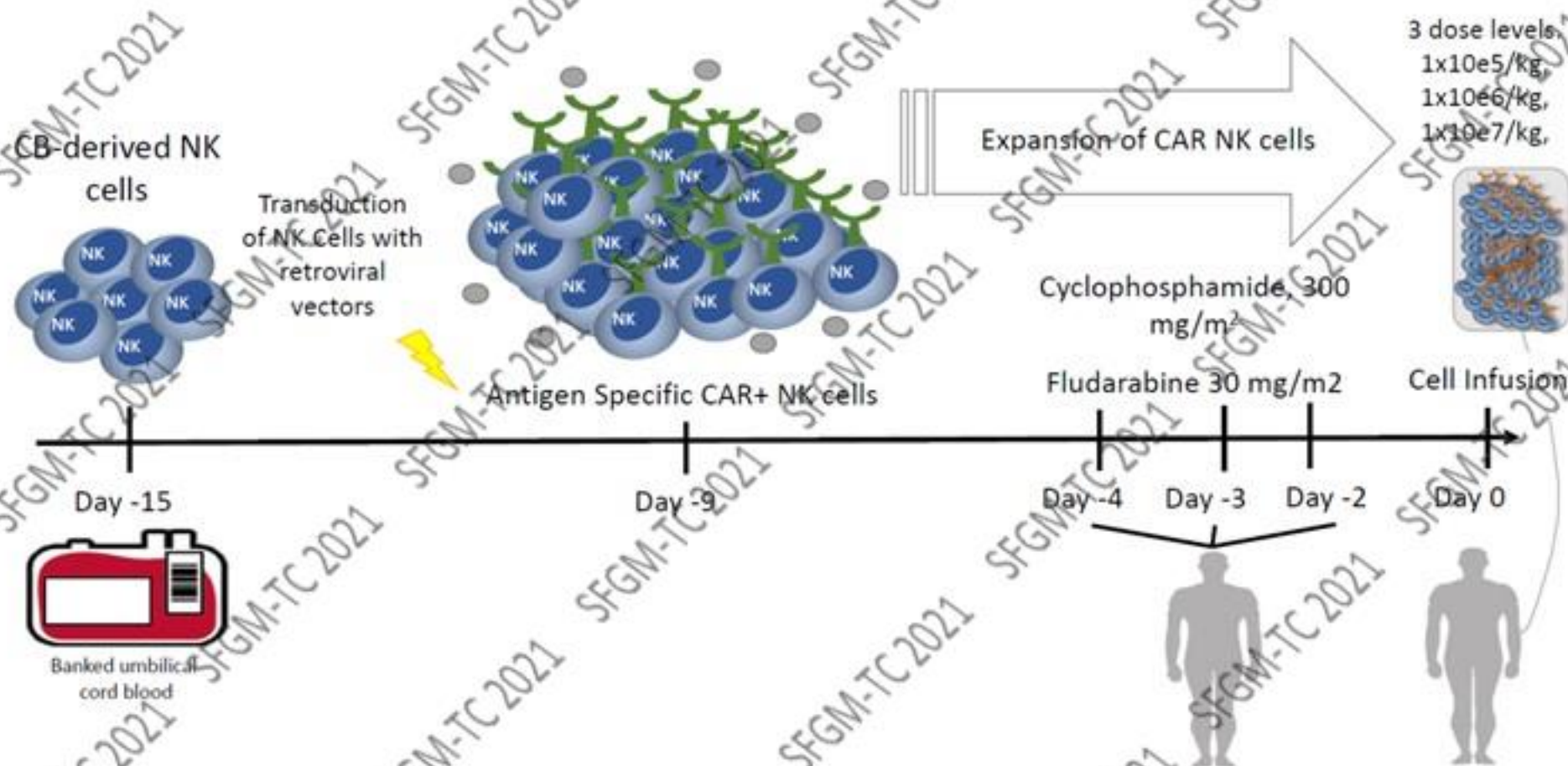
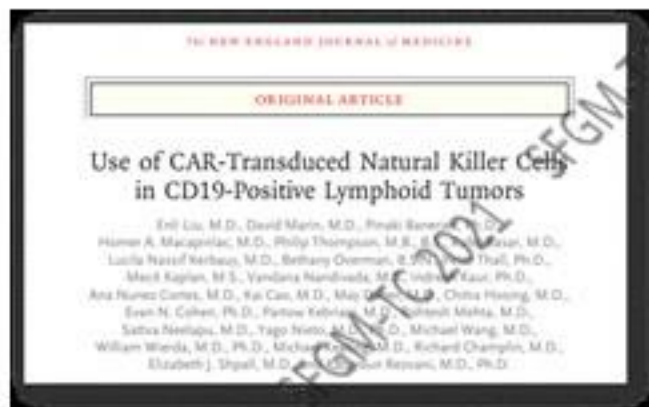
D7

D14

D21

D28





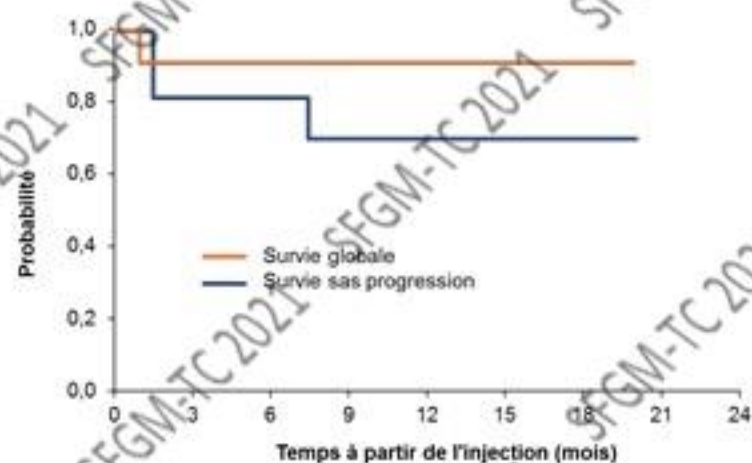
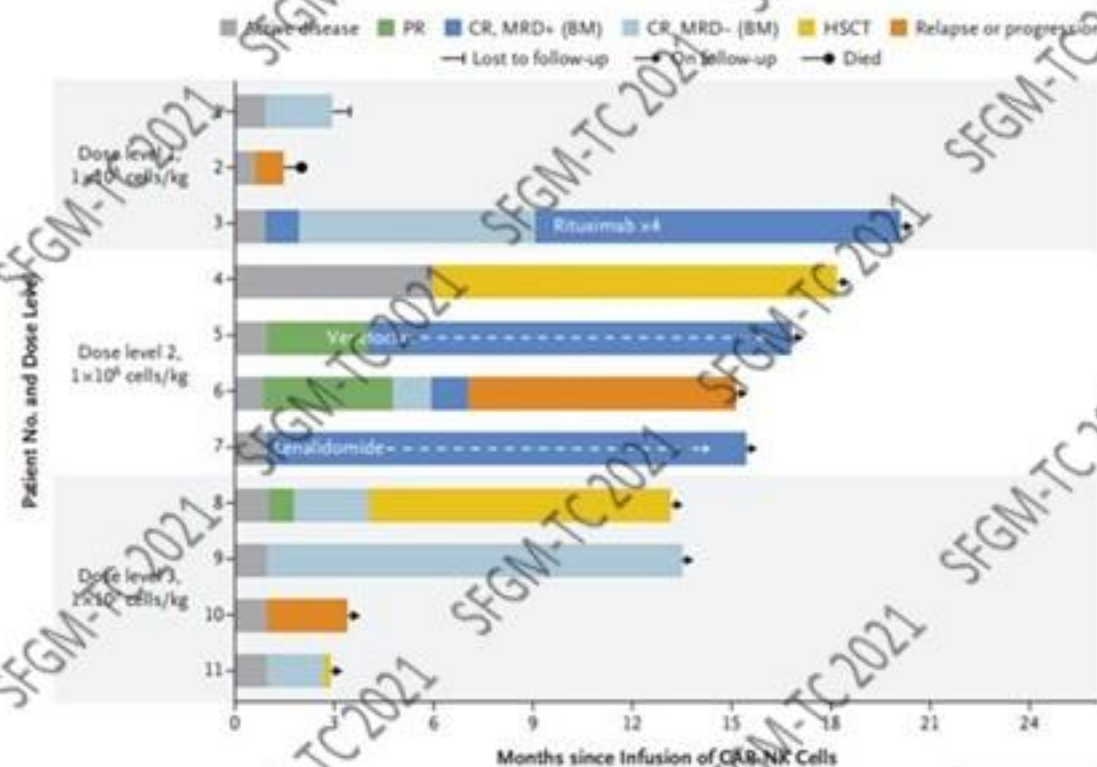
courtesy of K Reznani

11 LNH/LLC CD19+ avancées

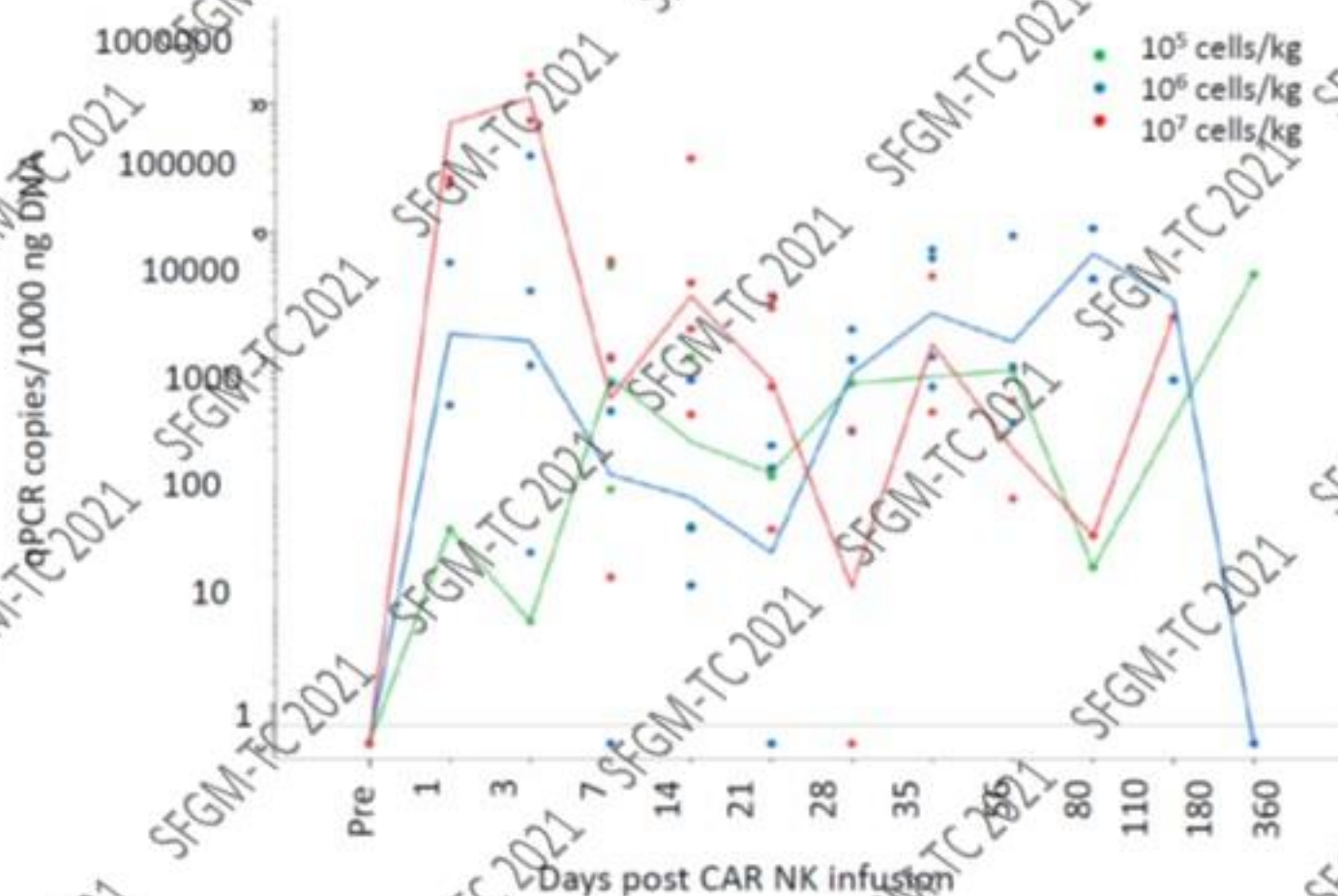
8 réponses dont 1 rechute

Pas de toxicité (CRS ou neuro)

Traitements d'entretien pour la majorité des répondeurs



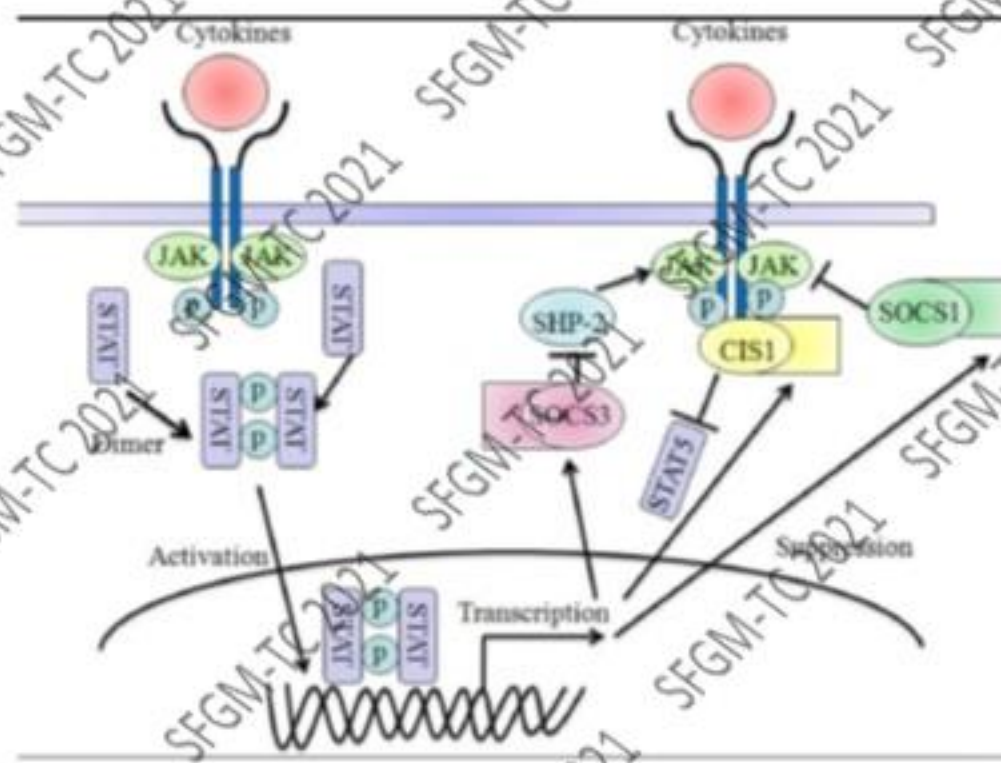
CAR NK cells are detectable up to 12 months post infusion



Can we enhance CAR NK cell function by targeting checkpoints?

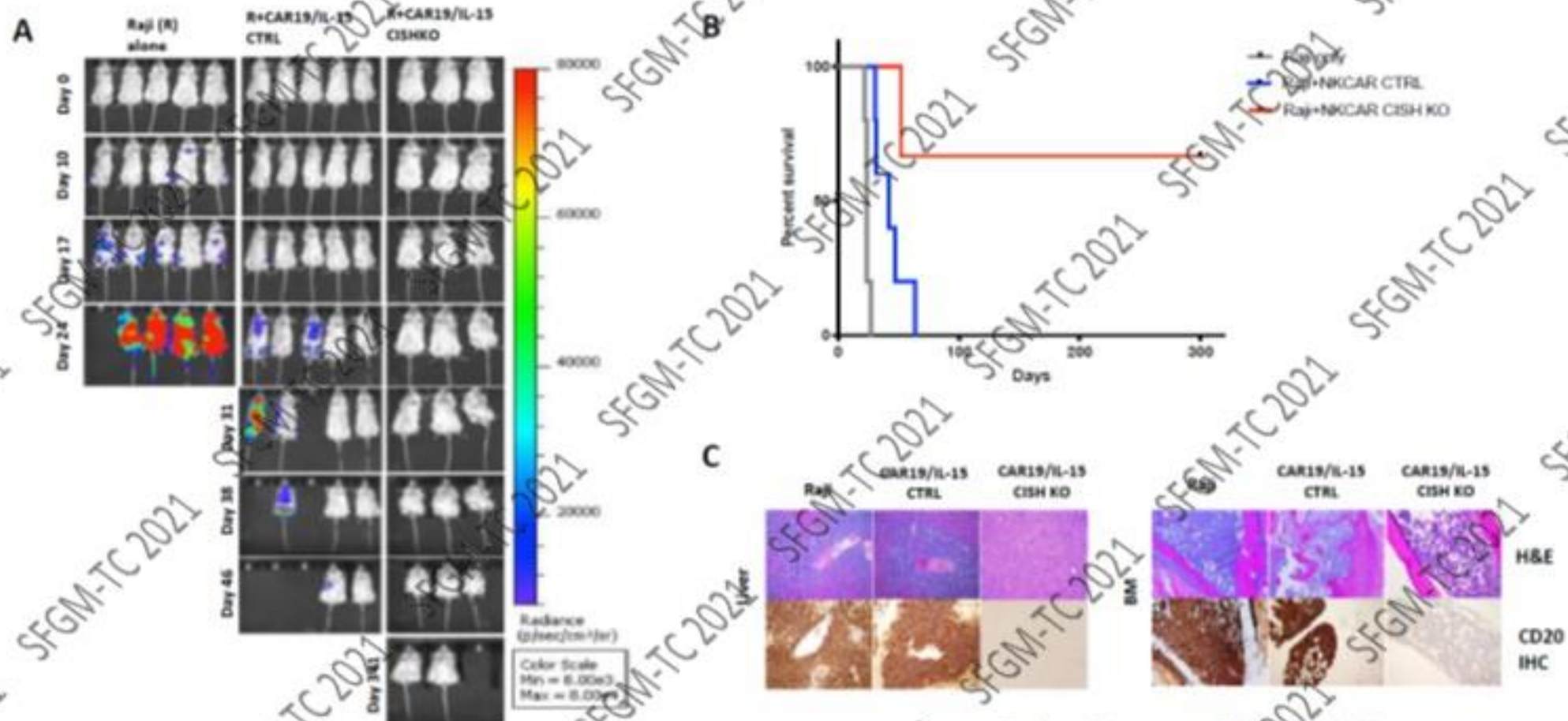
- Cytokine-Inducible SH2-containing protein
- Encoded by the *Cish* gene
- Negative feedback loop to suppress JAK/STAT signaling in both T and NK cells

Ablation of CIS releases a brake on NK cells, increasing their activity.

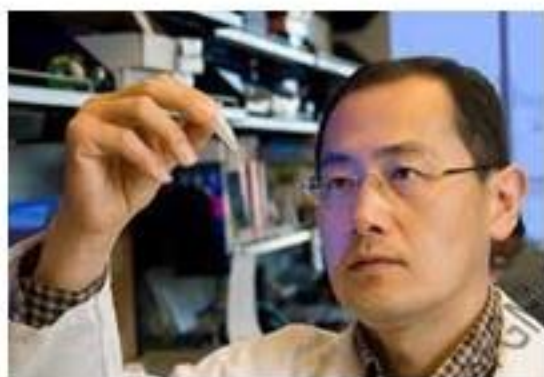


1. Warren et al. *Nature Reviews Immunology*, 2002
Warren. *Nature Reviews Immunology*, 2002, 2, 410-416.

CISH KO CAR19/IL15 NK cells improve tumor control and survival in a non-curative Raji lymphoma mouse model



Daher, Basar et al. Blood 2020

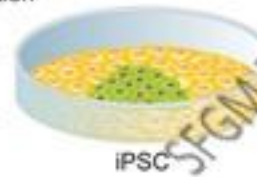
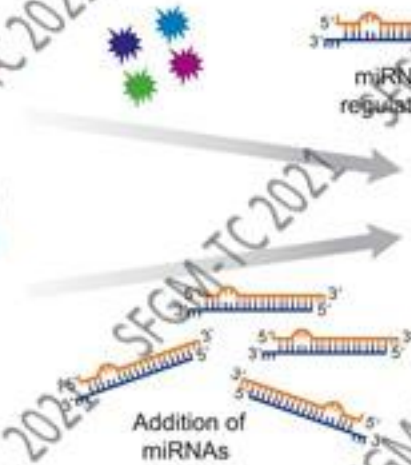


iPSC: cellules souches pluripotentes induites

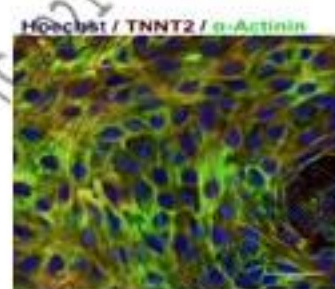
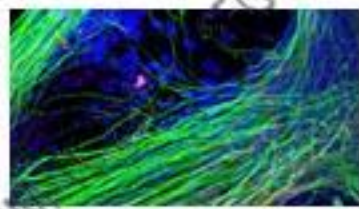
Shinya Yamanaka chercheur à l'université de Kobé, Prix Nobel 2012

Reprogrammation génétique de cellules différenciées en cellules souches pluripotentes pouvant se différencier en n'importe quel tissu, en réactivant 4 gènes: OCT-4, SOX-2, KLF-4 et MYC

OCT-4, SOX-2, KLF-4 et MYC

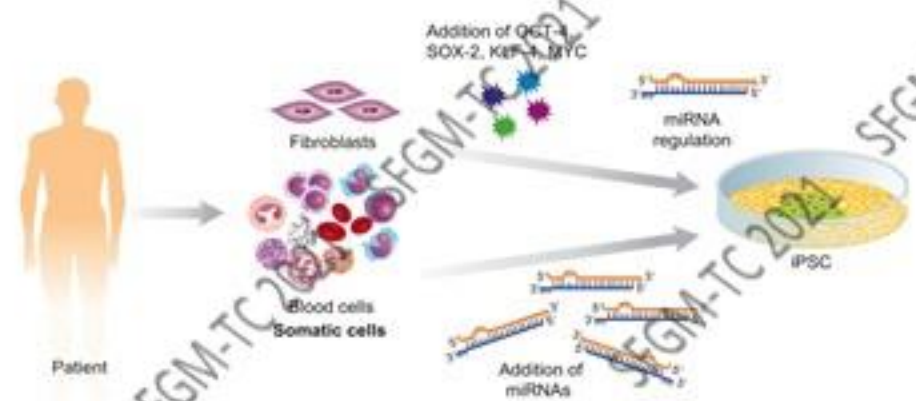


iPSC



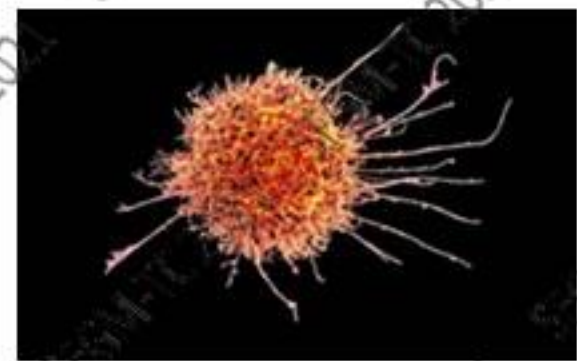
Aline F. Ferreira et al. J Cell Sci 2018; 131:jcs203018

Etude de cellules obtenues à partir de tissus pathologiques de patients permettant de comprendre la physiopathologie de la maladie et de tester les molécules thérapeutiques d'intérêt, réparation tissulaire



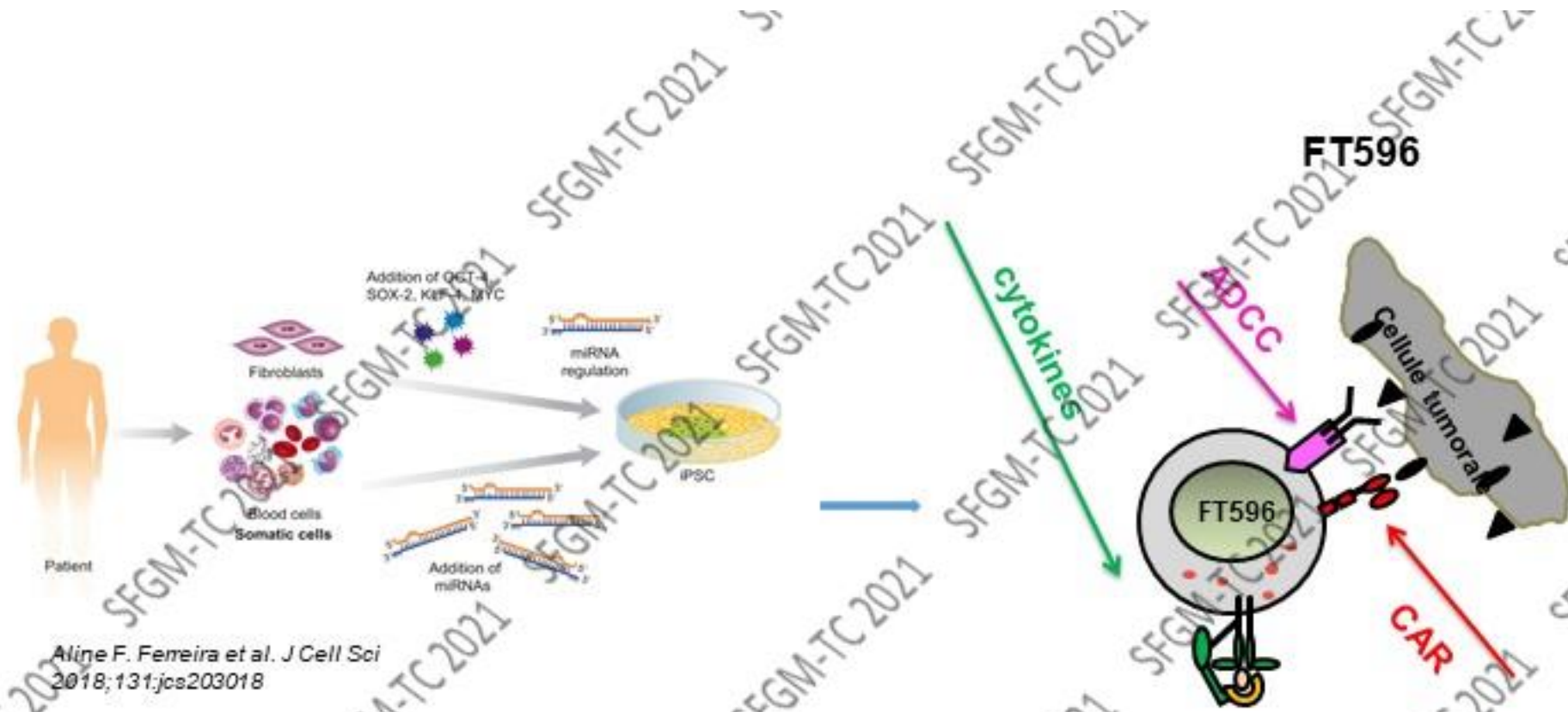
Aline F. Ferreira et al. *J Cell Sci* 2018;131:jcs203018

Cellule NK



Avantages
 Cellules immortelles
 Prolifération +++
 1 cellule pour 1 produit cellulaire

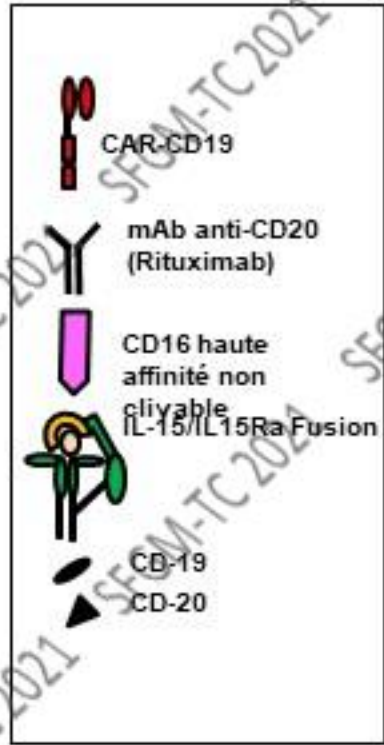
Inconvenient
 Risque oncogène (cMyc) → abandon de cMyc, utilisation de vecteurs non intégratifs
 Phéno immature: CD16 faible, NKG2A high, KIR lo: faible cytotoxicité



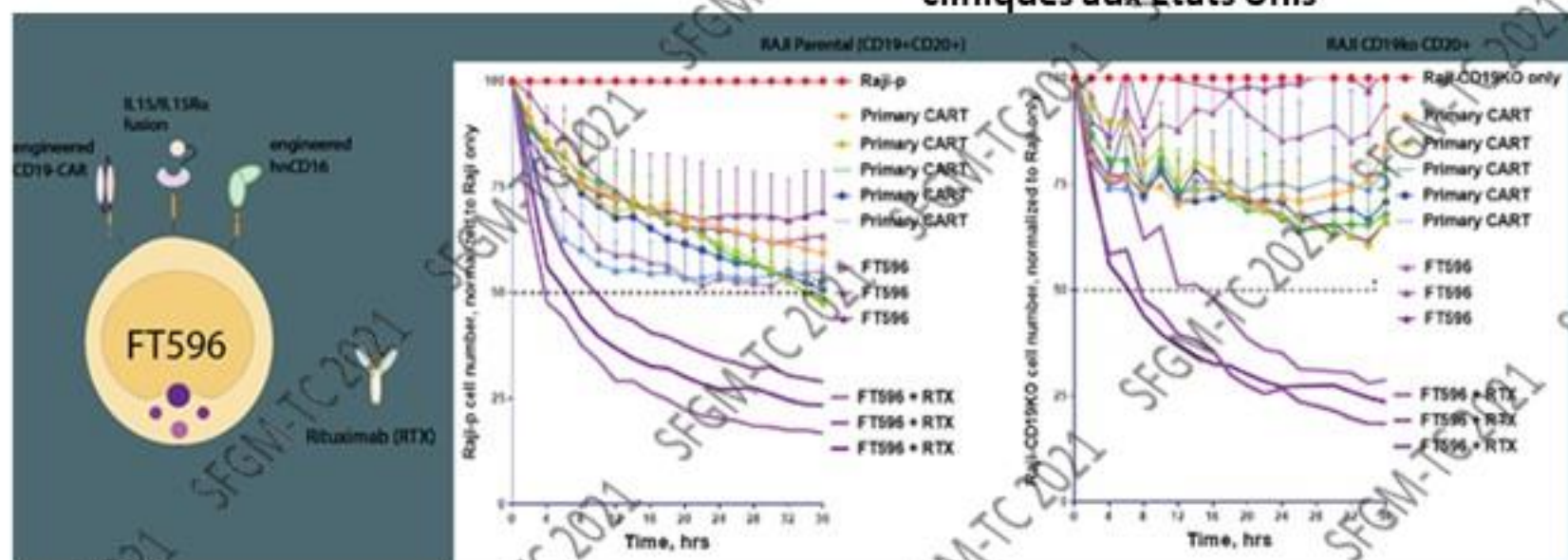
Aline F. Ferreira et al. *J Cell Sci* 2018;131:jcs203018

3 voies d'action

D'après Goodridge et al. ; Blood 2019



FT596: premier produit cellulaire CAR-NK allogénique « prêt à l'emploi », universel, dérivé des iPSC autorisé pour des essais cliniques aux Etats Unis



Goodridge et al. ; Blood 2019

ASH 2020: Bachanova V et al; **Initial Clinical Activity of FT596, a First-in-Class, Multi-Antigen Targeted, Off-the-Shelf, iPSC-Derived CD19 CAR NK Cell Therapy in Relapsed/Refractory B-Cell Lymphoma.** *Blood* (2020) 136 (Supplement 1): 8.

Femme de 76 ans DLBCL rec/ref après 8 lignes (dont autoSCT, T manipulées autologues, NK haplo).

A reçu 30x10⁶ FT96 après chimio LD

→ RP selon critères Lugano, dim > 70 % de l'absorption du 18F-fluorodésoxyglucose et dim > 50 % taille de la tumeur.

Seconde dose de FT596 envisagée. Essai de phase 1 cours (clinicaltrials.gov: NCT04245722).

PBMC

Source utilisée dans la majorité des essais de thérapie cellules NK adoptives chez l'homme (hors CAR)

10 à 15% des lymphocytes circulants

Cellules matures, CD56^{dim} cytotoxiques

Pas une lignée tumorale

Pas de risque oncogénique

Prélever des donneurs sains

1 donneur pour 1 patient

Donneur haplo familial, mismatch KIR ligand

Pas facile à transfecter

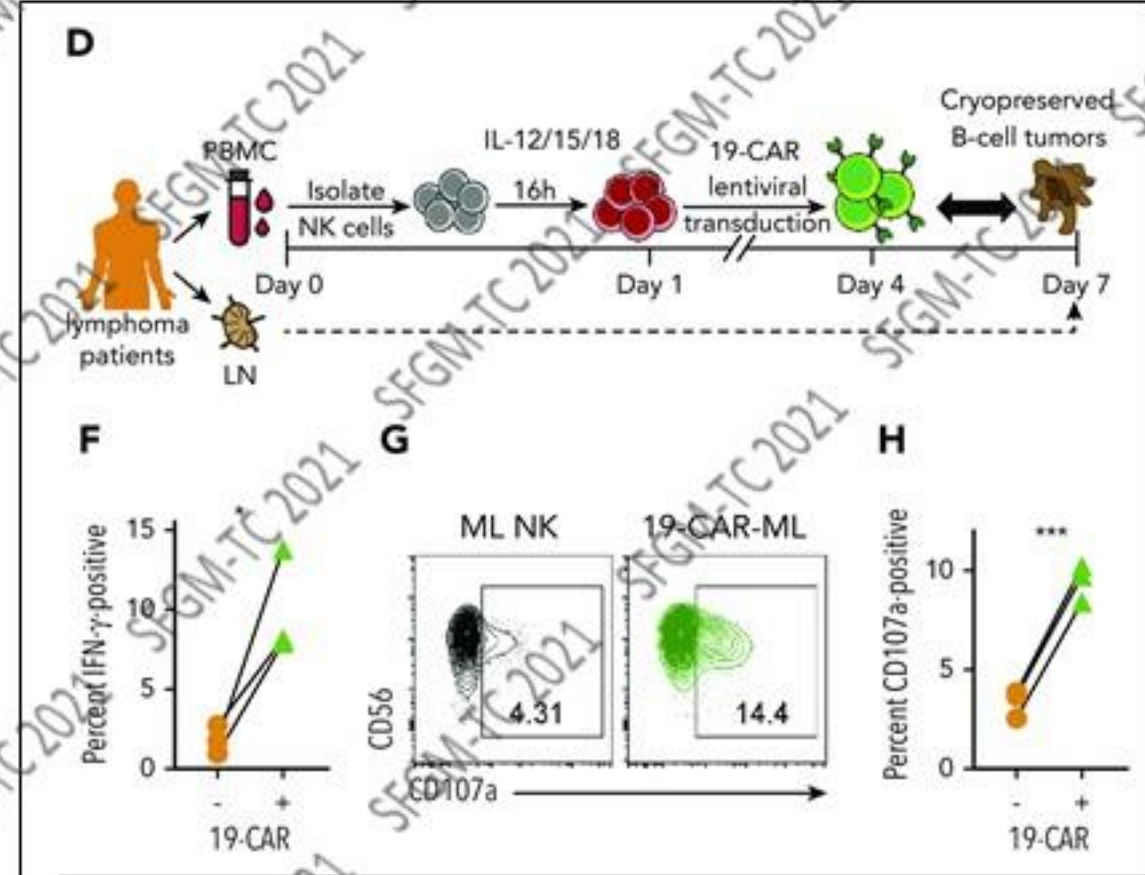
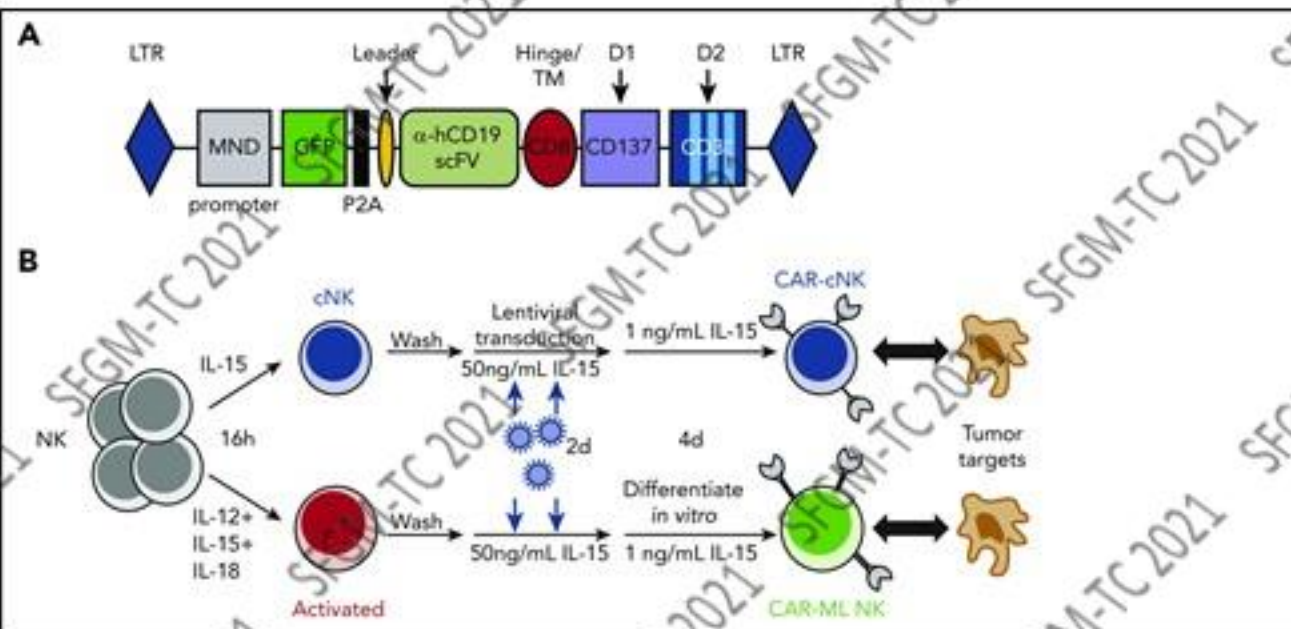
Nécessité de les expandre



PBMC

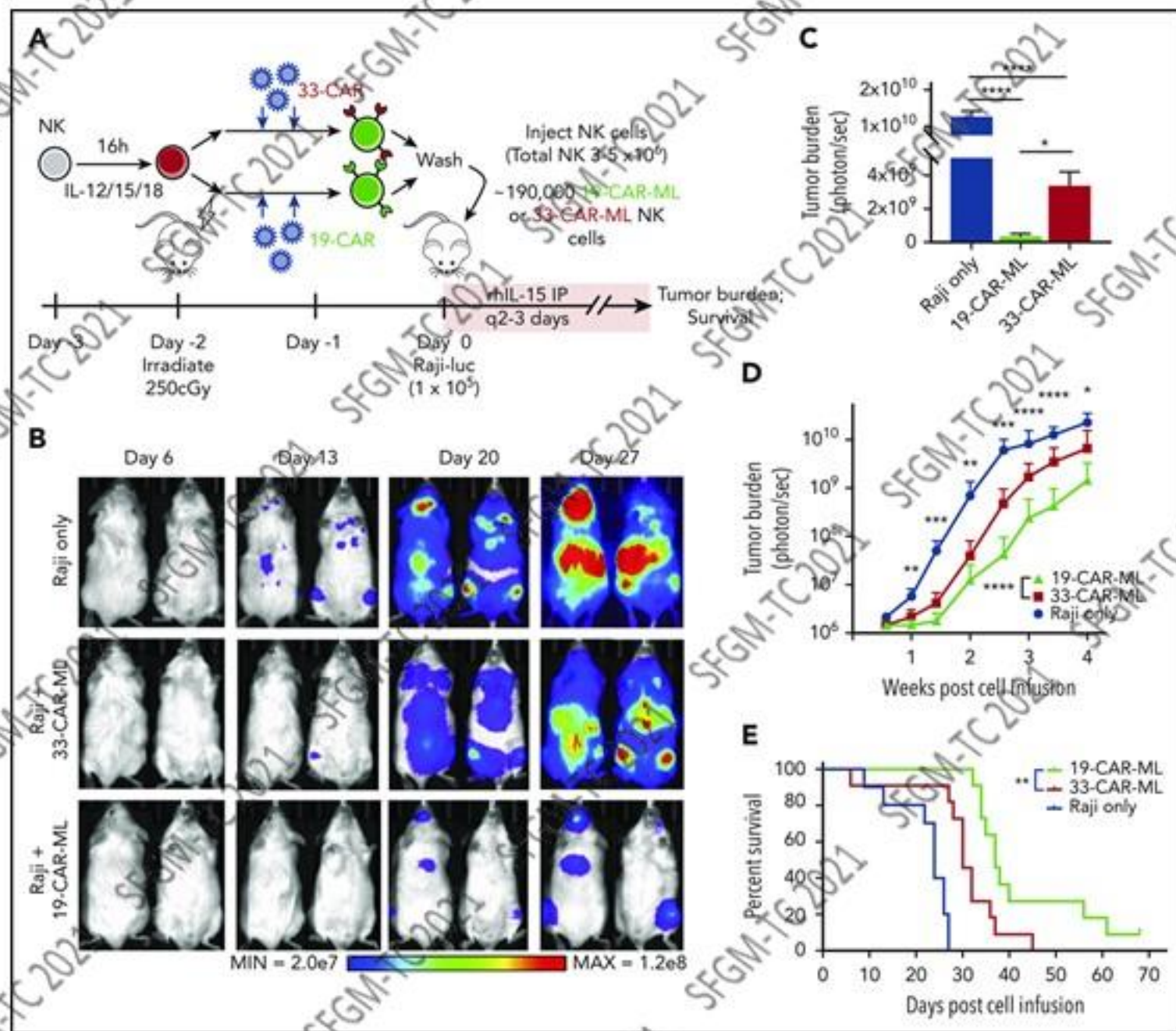
CAR-modified memory-like NK cells

PBMC Autologues patients DLBCL, ex vivo



Modèle souris
xenogénique Raji+

Efficacité anti tumorale des CAR-NK
ML CD19



PBMC

NKG2D-CAR-transduced natural killer cells efficiently target multiple myeloma; Leivas, *Blood Cancer J* 2021

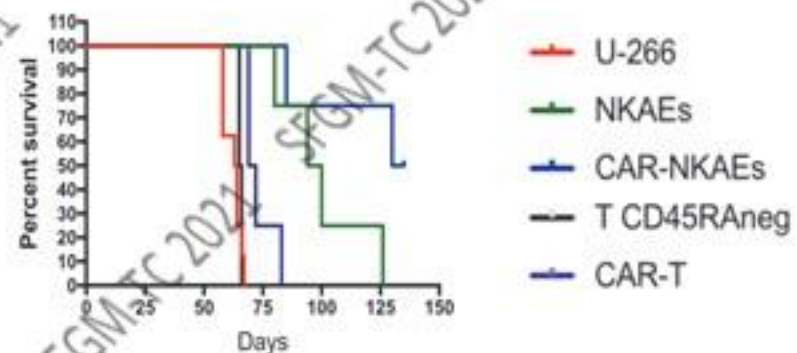
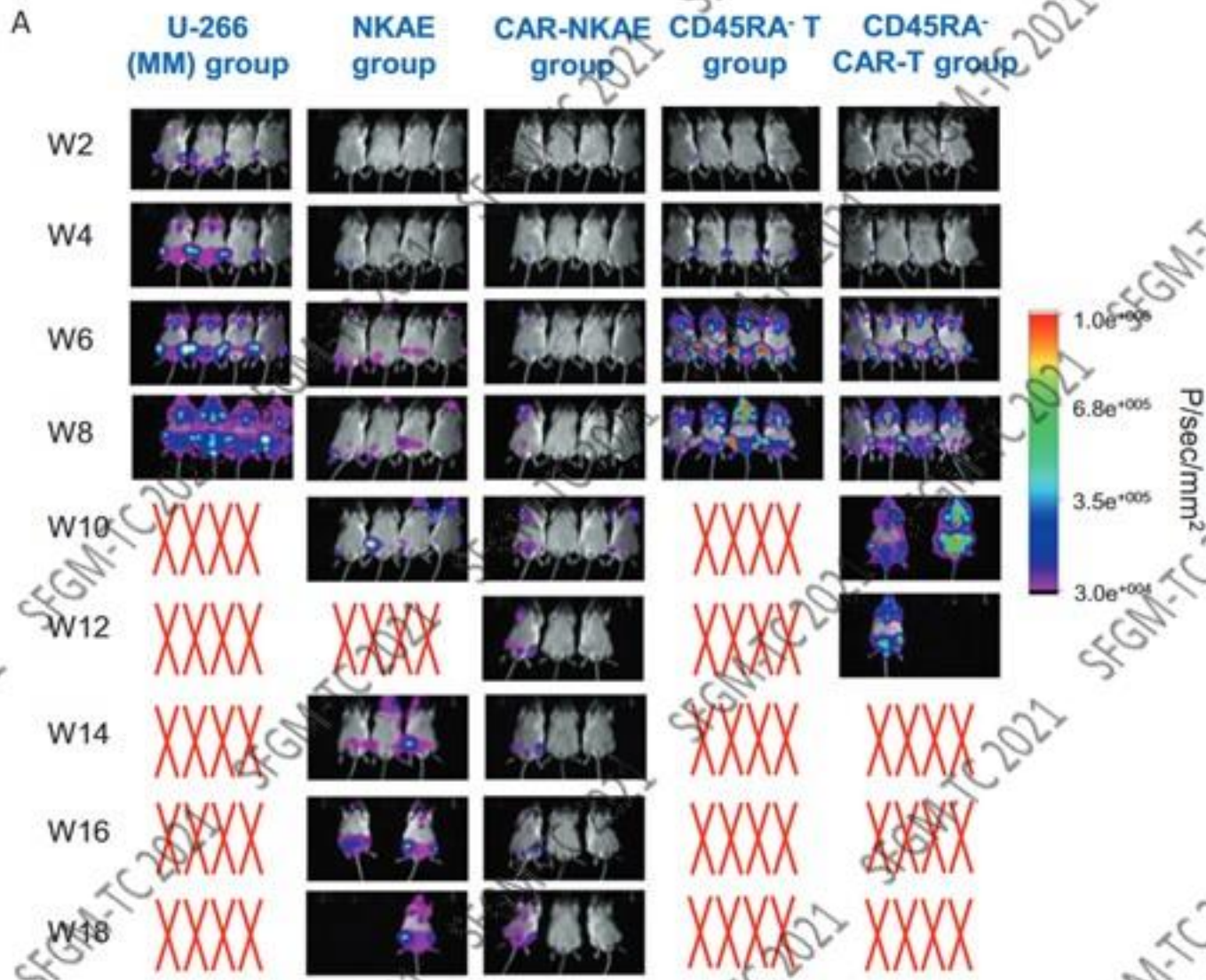
NKG2D-4-1BB-CD3z-CAR

NKG2D, récepteur activateur
Ligand: MICA, MICB, ULBP sur plusieurs
cellules tumorales dont MM

Source: NK activées expandues (AE) ou
T mémoire (CD45RA-)

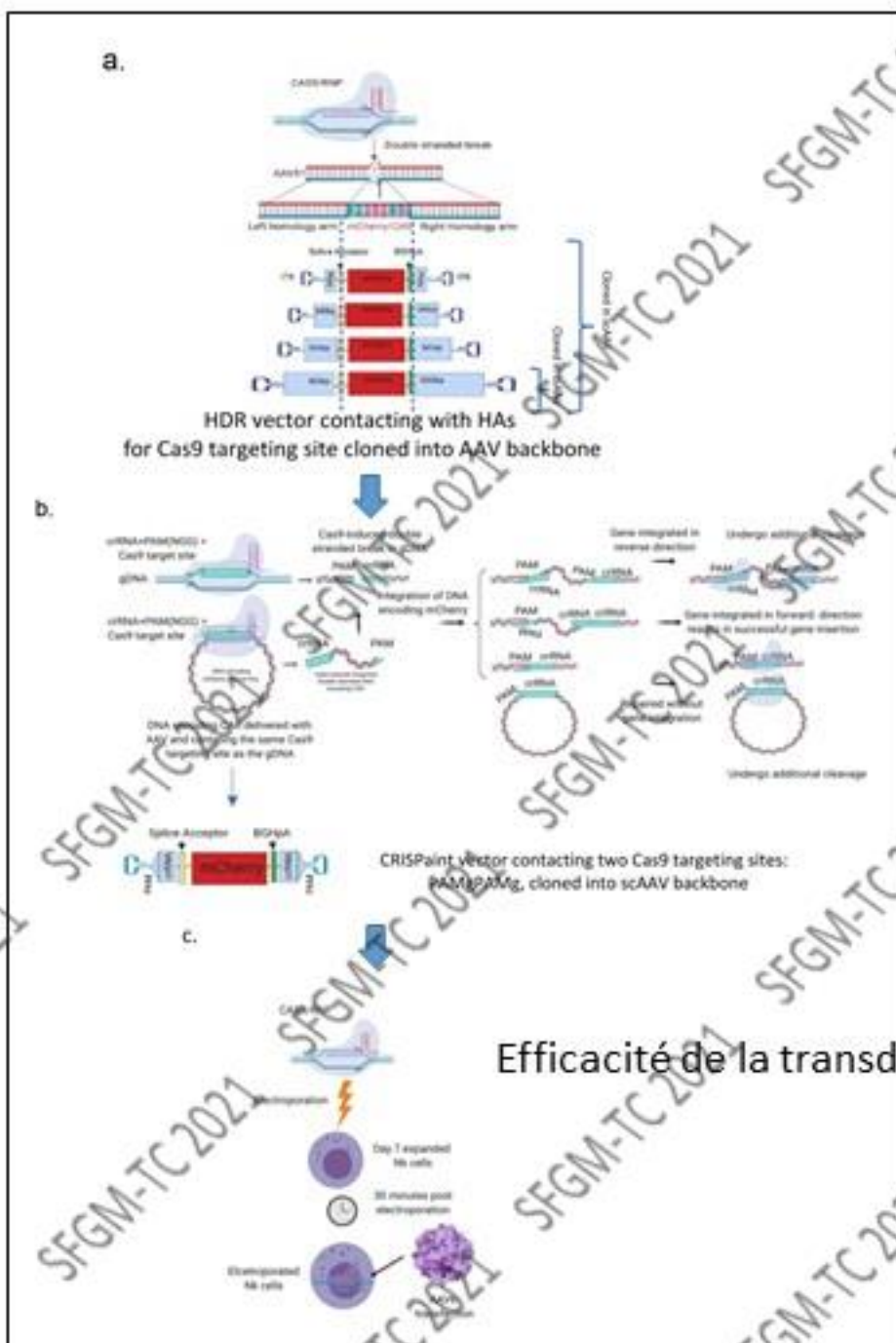
Efficacité transduction T mémoire 53% < 21% NKAE

Cytotoxicité CAR NKAE-NKG2D > CAR-CD45- T-NKG2D

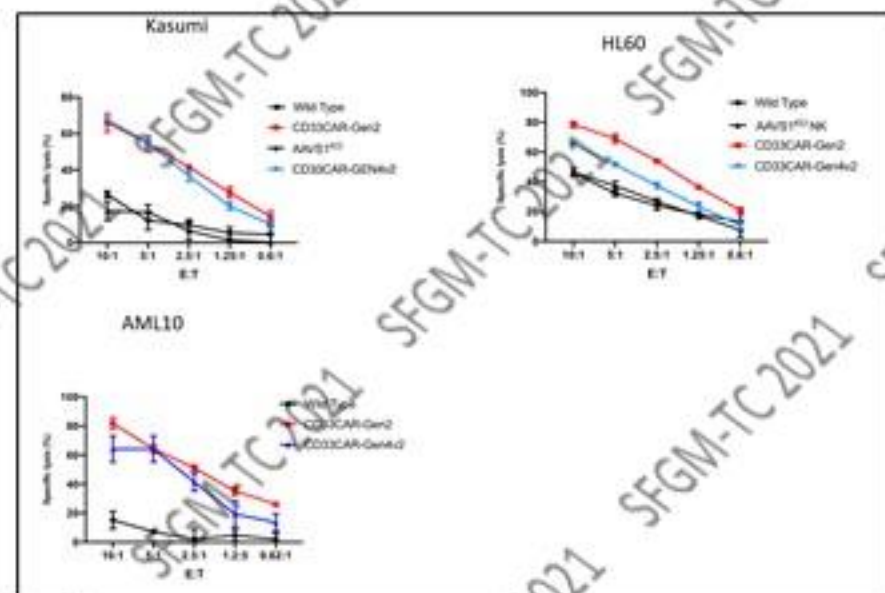
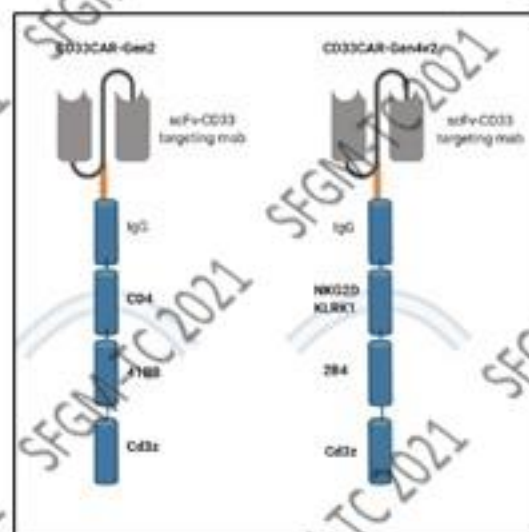


PBMC

CRISPR-Targeted CAR Gene Insertion Using Cas9/RNP and AAV6 Enhances Anti-AML Activity of Primary NK Cells.



Efficacité de la transduction 68 % CAR+

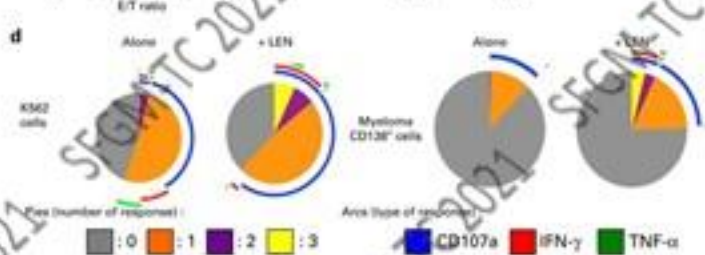
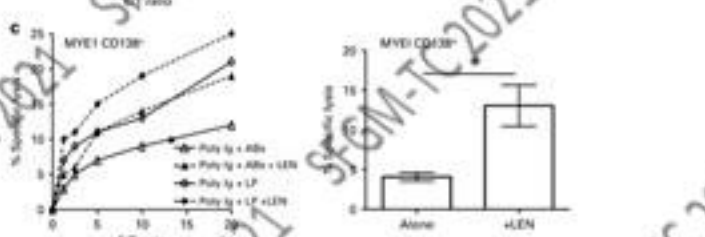
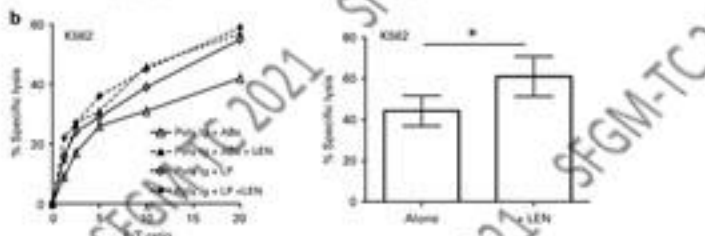
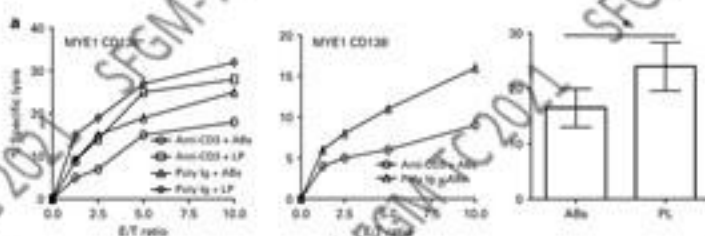
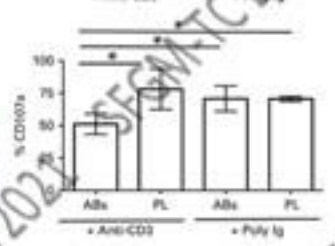
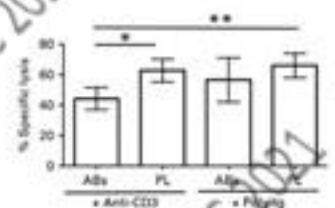
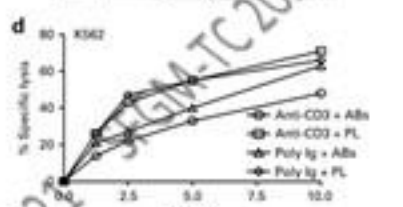
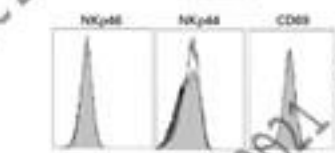
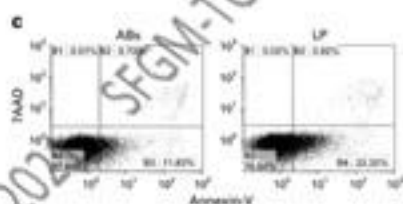
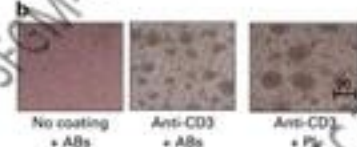
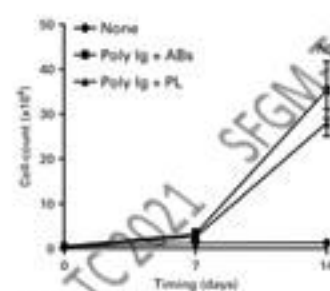
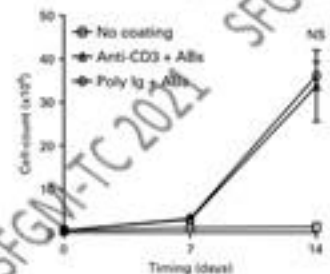
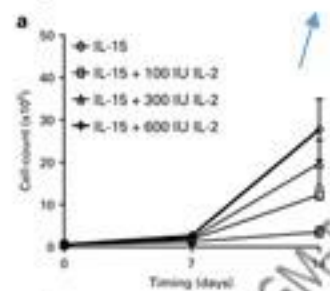


Kararoudi N, Likhite S, Elmas E, Yamamoto K, et al. *BioRxiv*; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.03.17.435886>

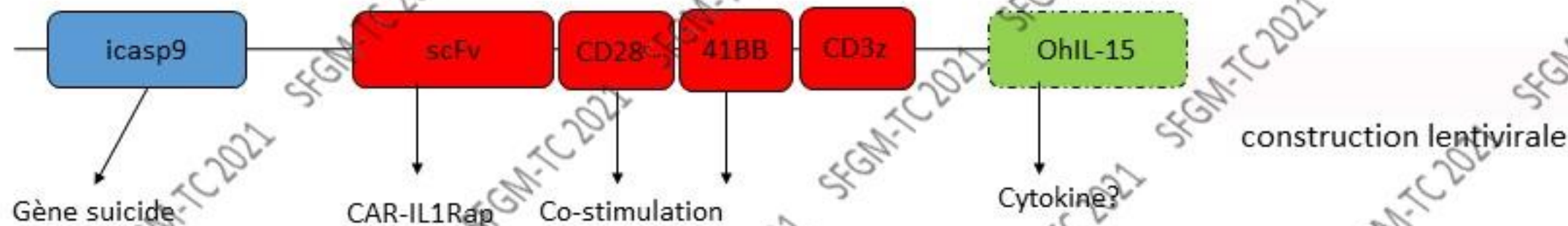
PBMC de donneurs sains

Mise au point d'un cocktail de culture de NK donneurs allogéniques
Ig polyvalents, lysats plaquettaires, lenalidomide

Expansion de 25 à 55 fois



INSERM/EFS BFC/UFC UMR1098 (Interactions hôte-grafton-tumeur & ingénierie cellulaire et génique)
Besançon, **Christophe Ferrant**



Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris)
UPMC CR7, Inserm U1135, CNRS ERL8255,
Equipe 14 « Cellules NK & Pathologies »,
DR **Vincent Vieillard**



Mise au point des conditions de culture et d'expansion, tests fonctionnels : comparaison PBMC et cordons

Financement de la Ligue contre le Cancer

CONCLUSIONS

CAR-NK

Produit Allogénique
"Off the shelf"
coût peu élevé
1 cordon > 100 doses
Lignée NK92, iPSC illimitée
Peu/pas de GVHD, pas de typage HLA
Peu de CRS, ICANS
cytotoxicité CAR + NK Récepteur médié +ADCC

Succès de la transfection faible
Persistance courte
Mécanismes de persistance pas bien élucidés
(rôle de la chimio lymphodépétante? IL15?)

CAR-T

Produit Autologue
Temps de production élevé
Coût élevé
1 patient, 1 produit
Si allogénique:
risque de GVHD, nécessité de typage HLA
Toxicité: CRS? ICANS (50% USI)
Lyse via CAR uniquement

Succès de la transfection élevé
Persistance longue

Clinical gov: 1047 essais CAR-T vs ... 24 essais CAR-NK!!!