



Lymphocytes NKT invariants: applications dans l'allogreffe de CSH et comme source de cellules CAR à visée d'immunothérapie anti-tumorale

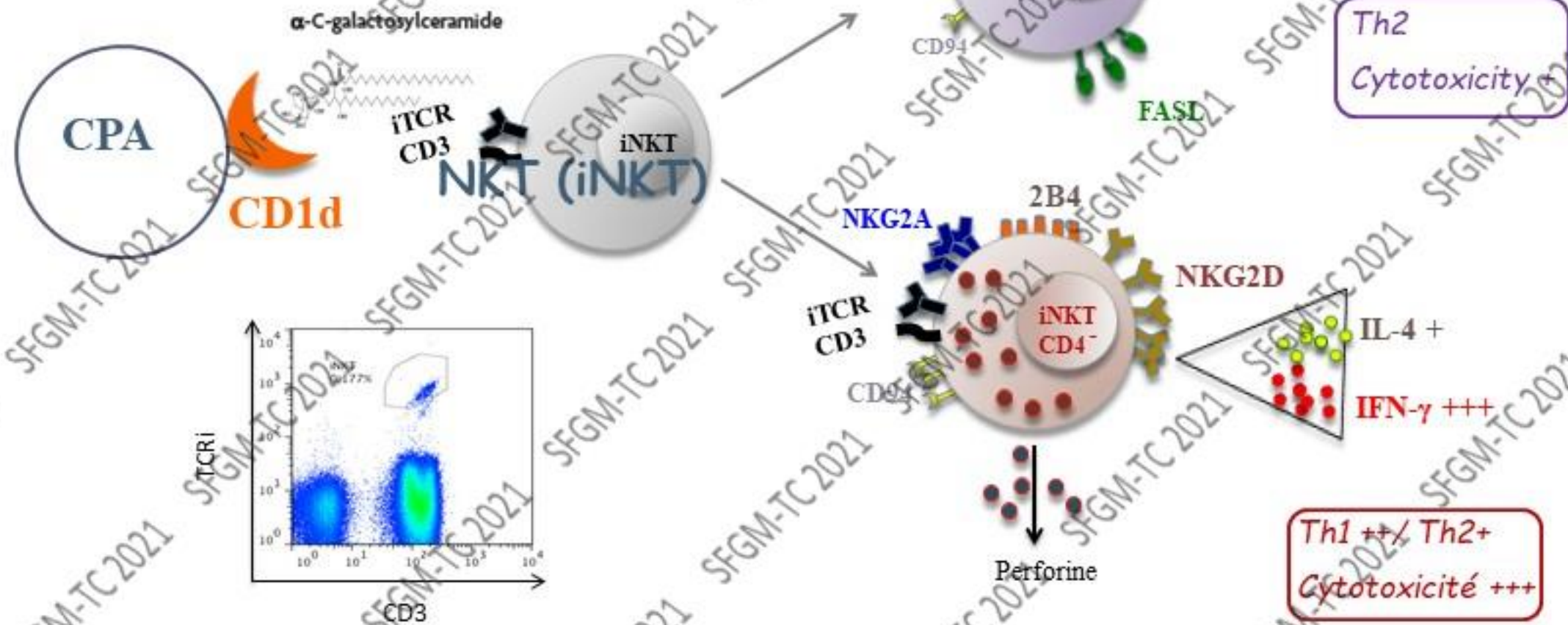
Marie Thérèse Rubio, MD, PhD

Service d'Hématologie, CHRU Nancy, France
CNRS UMR 7365 IMoPa, Equipe 6, Université de Lorraine, Nancy, France



Caractéristiques des Lymphocytes NKT invariants humains (iNKT)

- CD3⁺
- TCR hVα24-Jα18
- CD1d restricted-glycolipids
- < 0,1% of T lymphocytes



Les iNKT CD4+ murins protègent de la GVH murine et médient un effet GVL

Mécanisme régulateur de la GVH indirect dépendant d'IL-4 et des Tregs

blood

Low doses of natural killer T cells provide protection from acute graft-versus-host disease via an IL-4-dependent mechanism

Dennis B. Leveson-Gower,¹ *Janelle A. Olson,¹ *Emanuela I. Segal,¹ Richard H. Luong,² Jeanette Baker,¹ Robert Zeiser,² and Robert S. Negrin¹

TRANSPLANTATION

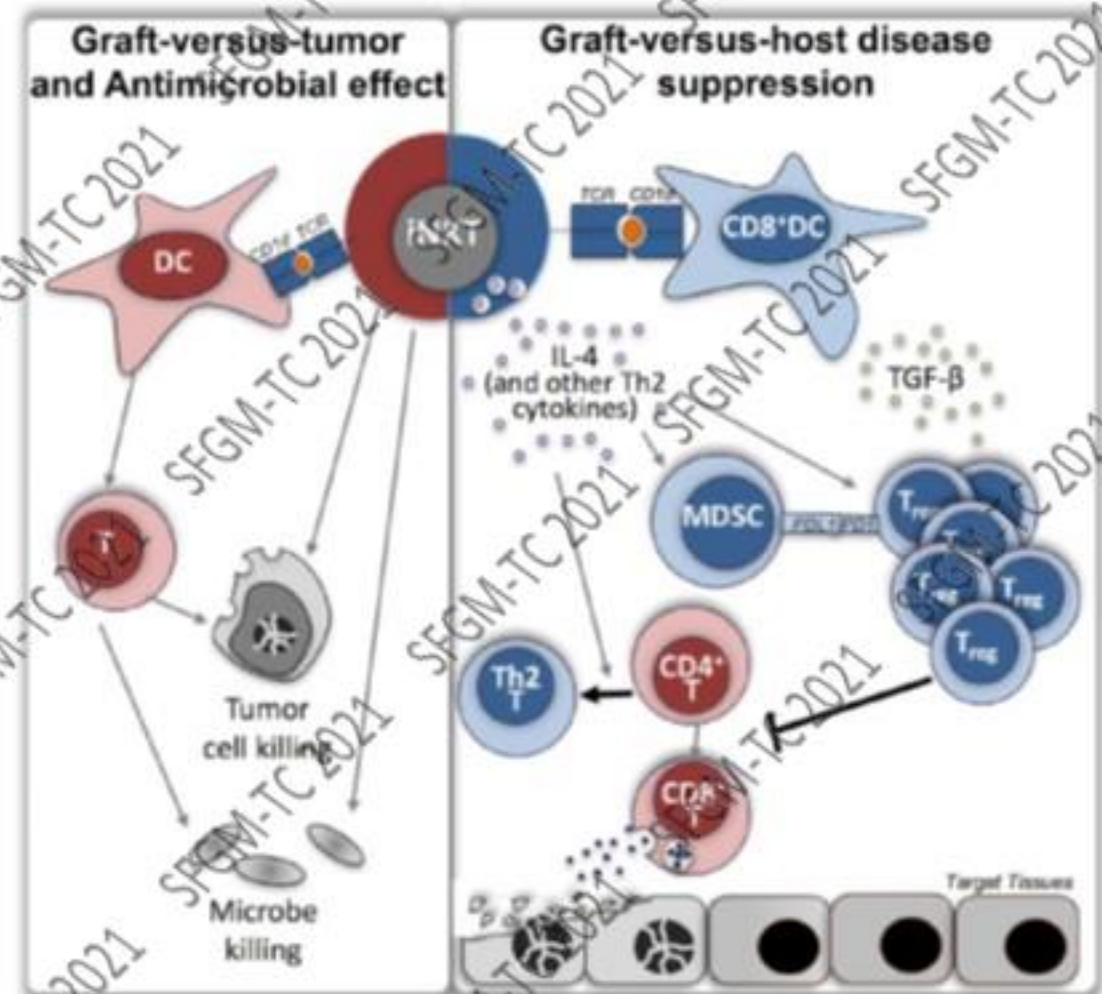
CD4⁺ invariant natural killer T cells protect from murine GVHD lethality through expansion of donor CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells

Dominik Schneidawind,¹ Antonio Pierini,¹ Maite Alvarez,¹ Yuqiong Pan,¹ Jeanette Baker,¹ Corina Buechele,² Richard H. Luong,³ Everett H. Meyer,¹ and Robert S. Negrin¹

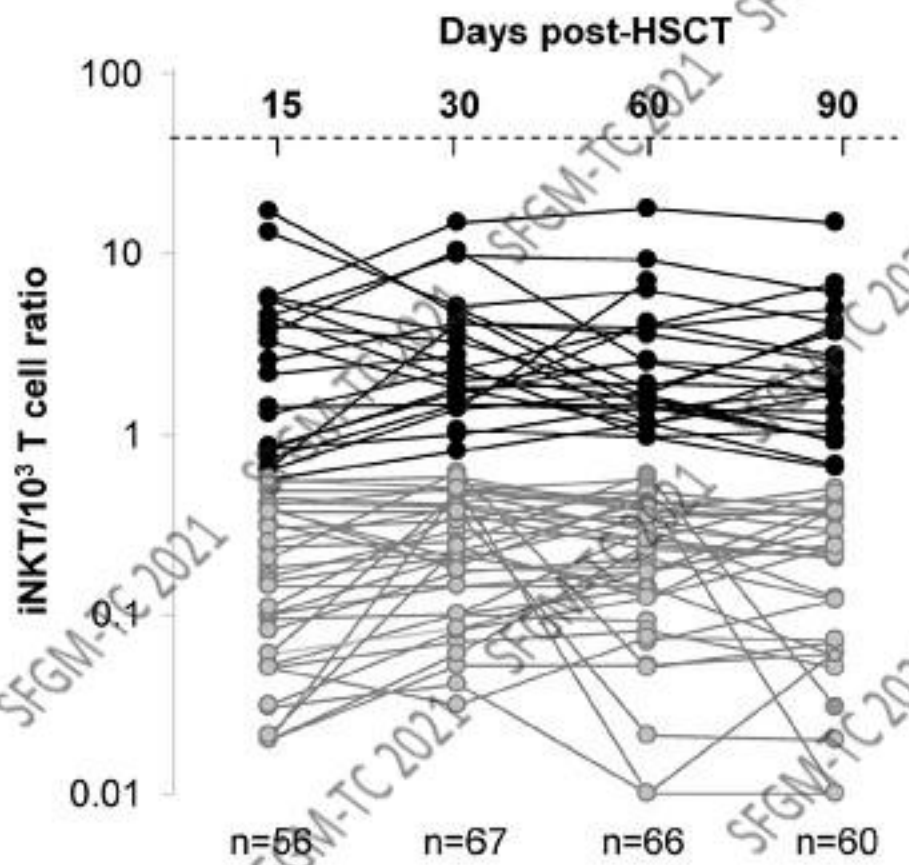
blood

Third party CD4⁺ invariant natural killer T cells protect from murine GVHD lethality

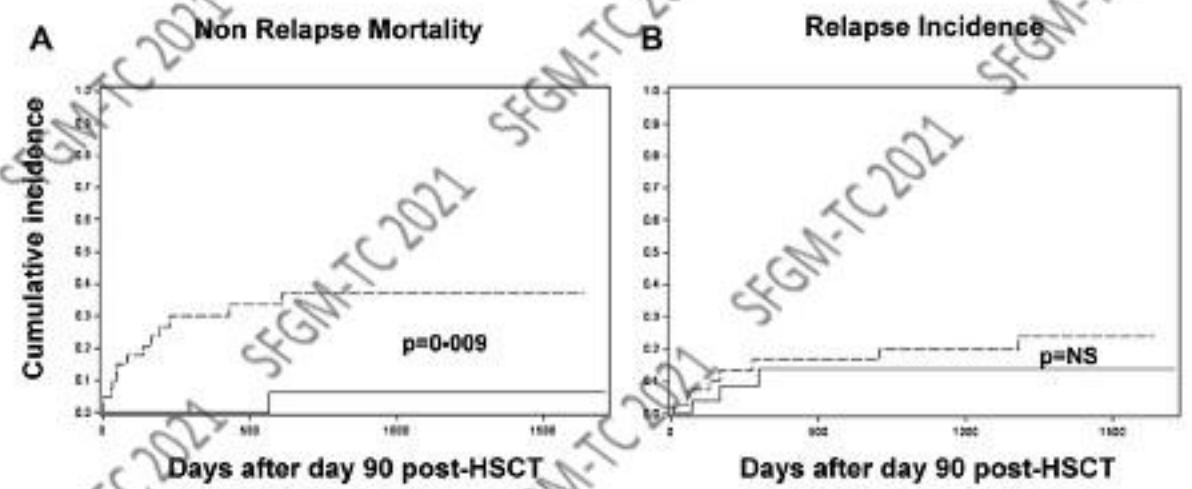
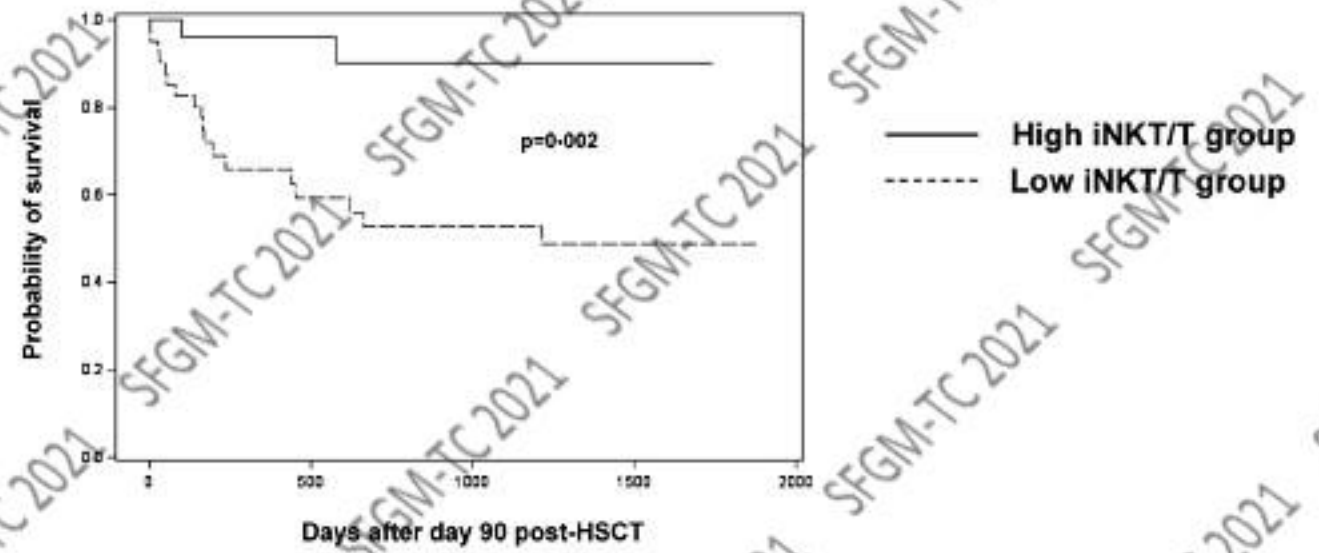
Dominik Schneidawind¹, Jeanette Baker¹, Antonio Pierini¹, Corina Buechele², Richard H. Luong³, Everett H. Meyer¹, Robert S. Negrin¹



Reconstitution iNKT après allogreffe de CSH chez l'homme: impact sur la survie



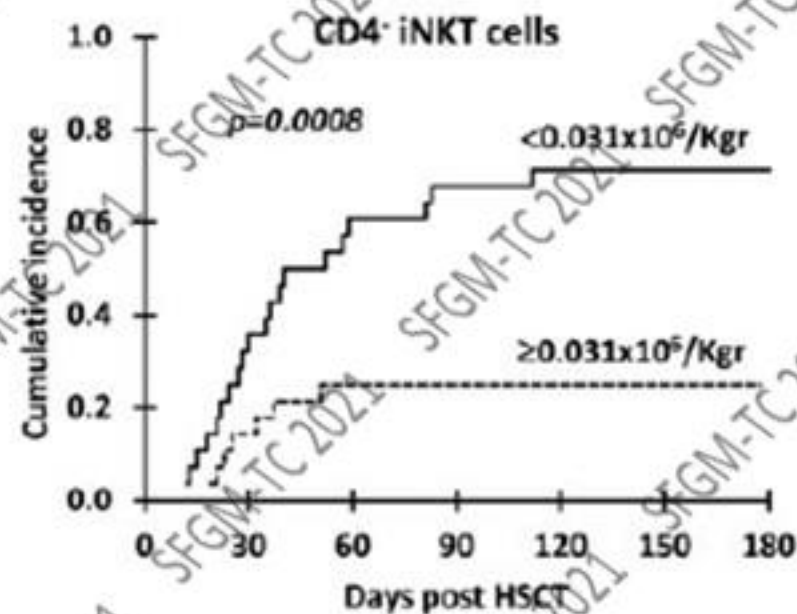
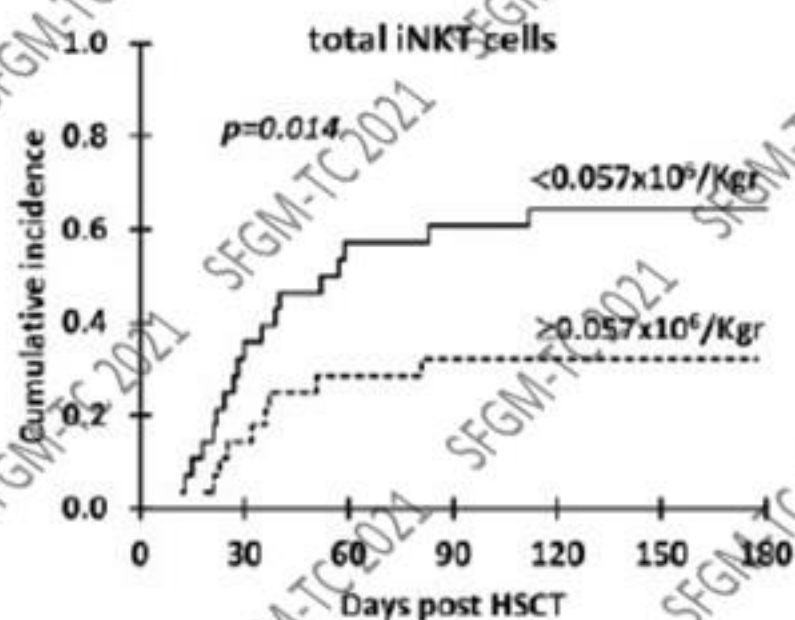
Chimerism analysis: DONOR origin
Independent of CD4⁺/CD8⁺ T cell recovery



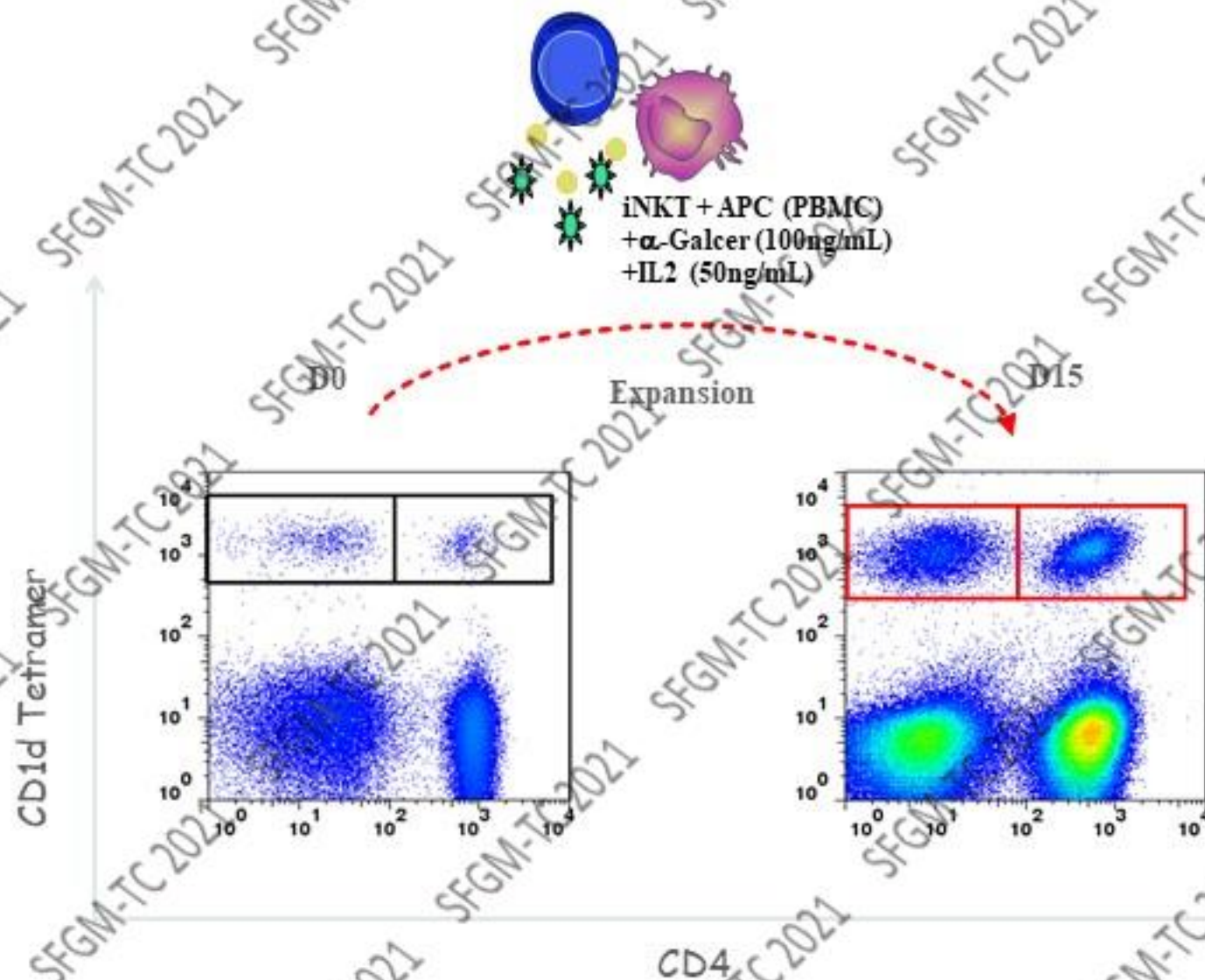
Une faible quantité de iNKT totaux et CD4⁺ dans les greffons de CSH est associée à un risque accru de GVH aigüe



Analyse du contenu des greffons de CSP → corrélation avec la survenue de GVH aigüe ?



Test fonctionnel : expansion des iNKT du greffon de CSH



Analyses univariées: facteurs cellulaires du greffon de CSP associés à la survenue de GVH aigue de grade II-IV

Etude prospective

117 greffons de CSH

Comparaison du contenu cellulaire du greffon en fonction de la survenue de GVH aigue:

Parameter	aGVHD 0-I		aGVHD II-IV		p-value ^ω
	Mean	SD	Mean	SD	
<i>Graft cell subset frequencies (cell subset number/10⁶ T-cells)</i>					
CD4 ⁺ T	611.59	110.5	599.29	98.13	0.582
CD45RA⁺CD4⁺ T	277.13	101.6	314.73	96.71	0.0456
CD45RA ⁻ CD4 ⁺ T	329.37	89.8	284.56	91.52	0.089
CD8 ⁺ T	367.3	95.5	371.42	82.93	0.747
γδ ⁺ T	68.01	88.8	76.19	78.9	0.908
Tregs	12.13	9.1	9.6	7.14	0.313
NK	117.07	165.2	94.48	55.94	0.834
MAIT	29.07	27.5	21.92	13.62	0.429
Total iNKT	1.94	2.6	0.87	1.06	0.0017
CD4⁺ iNKT	0.56	1	0.32	0.47	0.0219
CD4⁻ iNKT	1.38	1.8	0.55	0.78	0.00059
<i>Expansion factor of iNKT cell subsets</i>					
CD4 ⁺ iNKT expansion factor	471.81	614.8	366.55	648.98	0.07539
CD4⁻ iNKT expansion factor	88.71	104.1	36.32	63.31	0.00007

Facteurs cliniques associés avec un risque accru de GVH aigue: type de donneur (risque phéno 10/10 ou 9/10 > géno-identique)

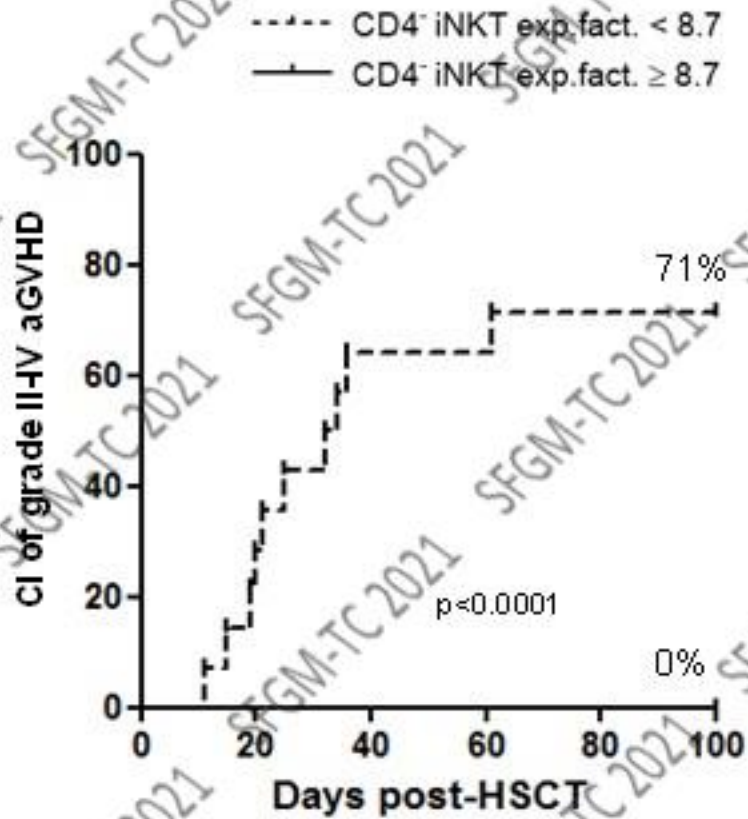
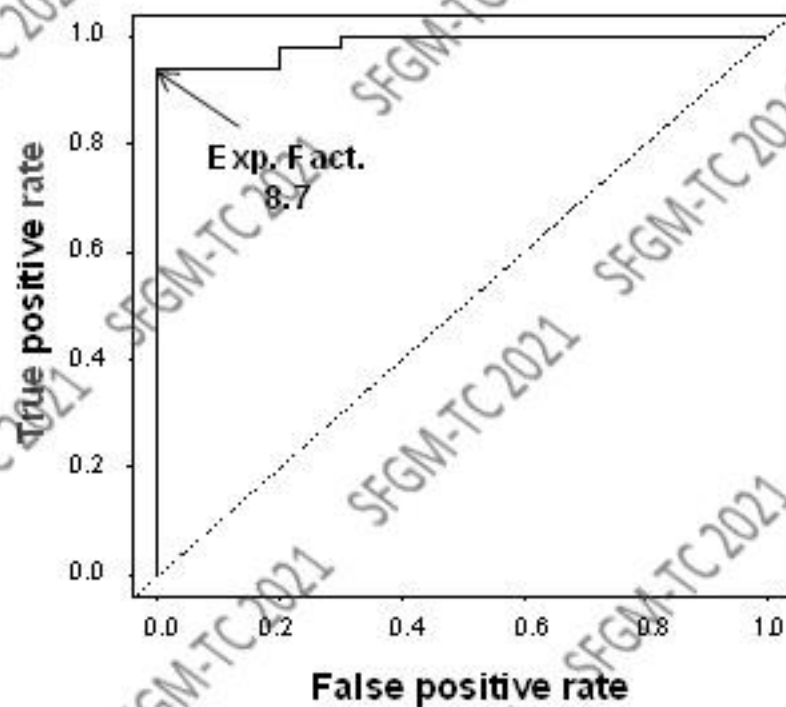
Analyses multivariées: facteurs associés à la survenue de GVH aigue de grade II-IV

Baseline parameters	Multivariate analysis			Bootstrap analysis
	OR	95% CI	<i>p</i> ^s	Median [95% CI]
Donor type				
HLA identical sibling		1		
Matched unrelated	8,22	3,04-22.2	0,00003	17.9 [3.65 – 767]
Mismatched unrelated	2,44	0,54-10.9	0,24	51.3 [0 – 10 ⁴]
Disease status at transplant				
CR/PR or SD		1		
PD	7,46	2,45-22.7	0,0004	18.9 [2.2 – 744]
CD4 iNKT/10³ T frequency				
Continuous variable	0,54	0,36-0.79	0,002	
CD4 iNKT expansion factor				
Continuous variable	0,68	0,56-0.82	0,00005	0.37 [0.15 – 0.54]

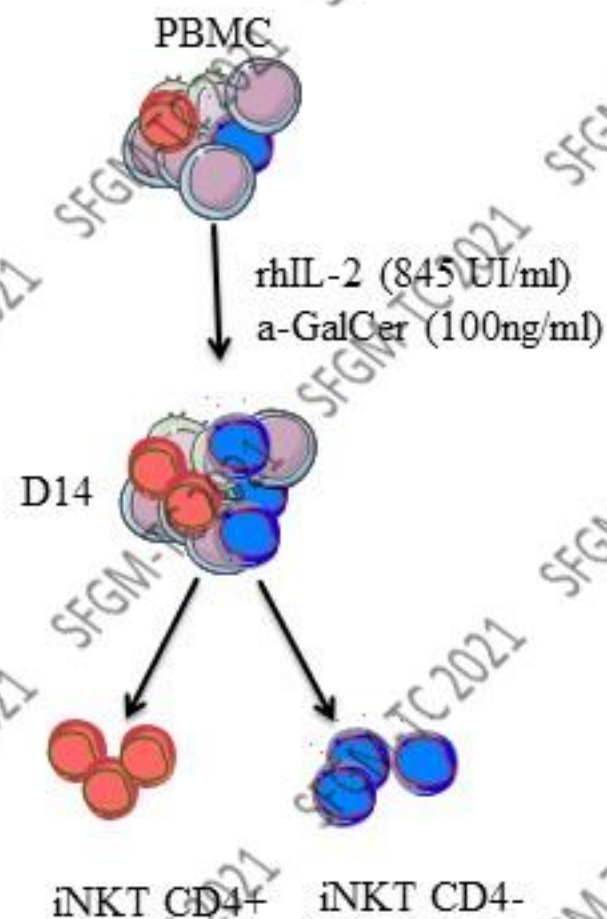
L'expansion des iNKTCD4⁻ des greffons de CSP prédit au mieux la survenue de GVH aigue dans les greffes HLA 10/10

60 patients greffés in RC avec un donneur HLA 10/10

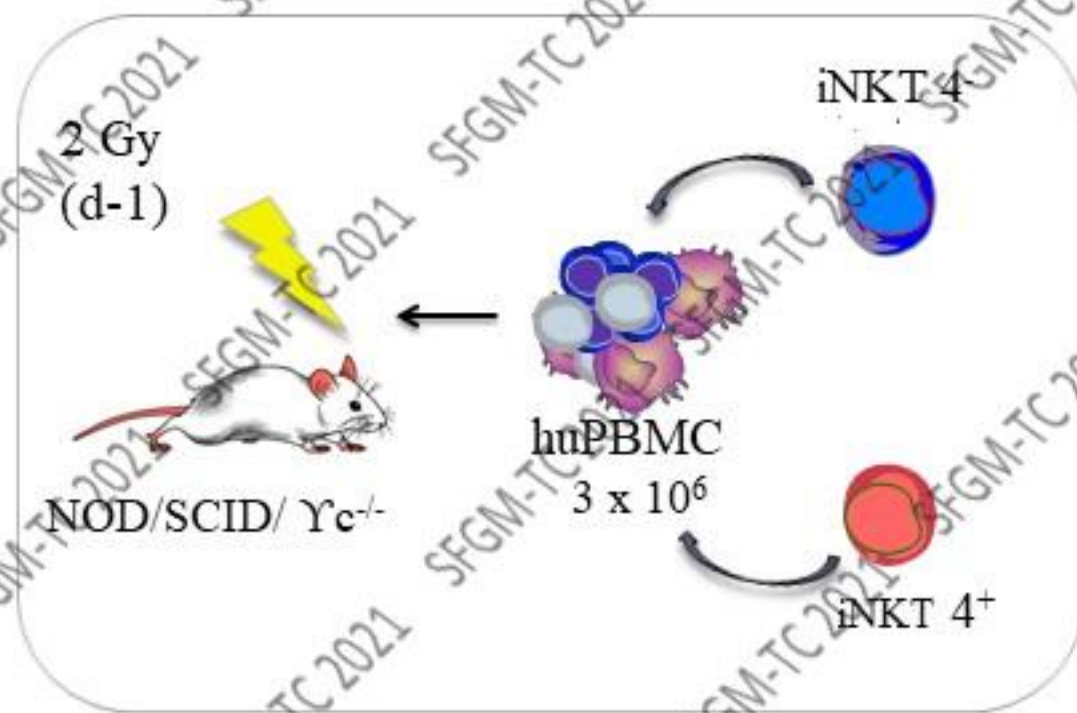
Roc curve, AUC=0.986



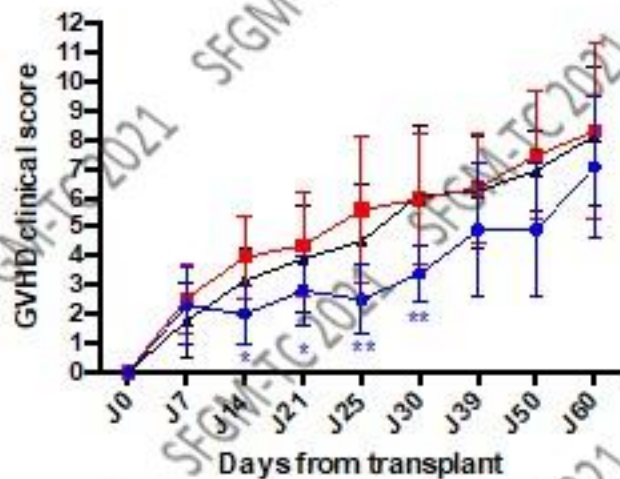
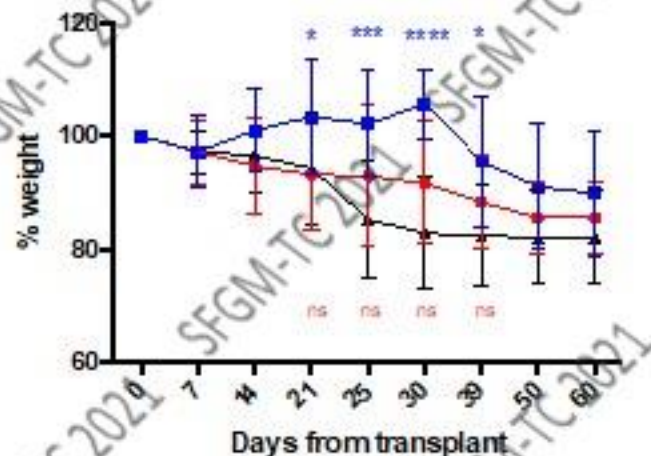
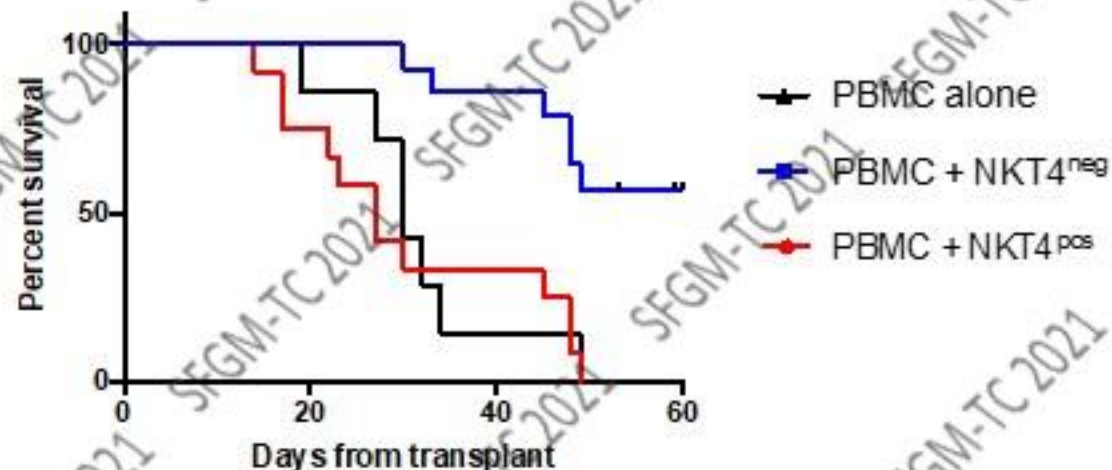
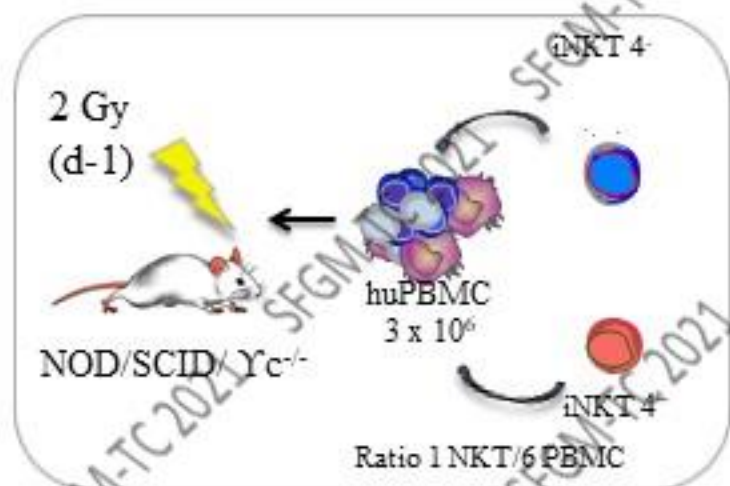
Modèle murin de Xeno-GVH : rôle et mécanismes des iNKT humains *in vivo* ?



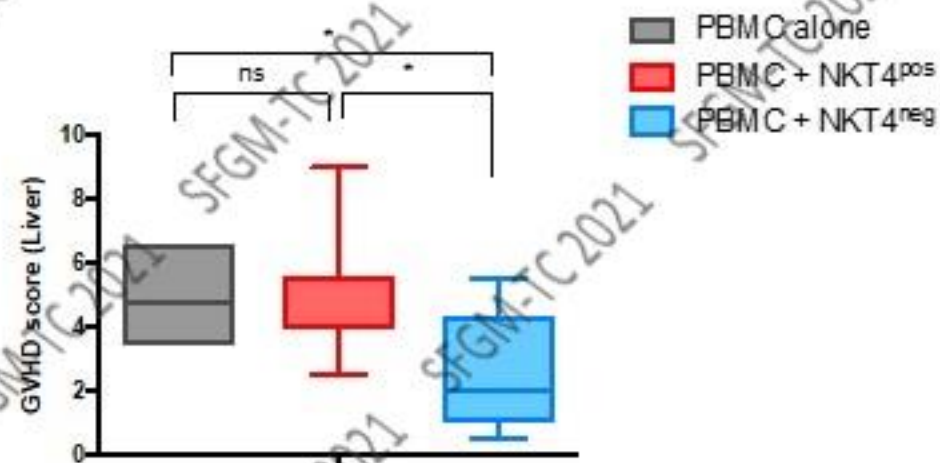
Cell sorting



Seuls les iNKT CD4- contrôlent la GVH dans un modèle pré-clinique de xéno-GVH



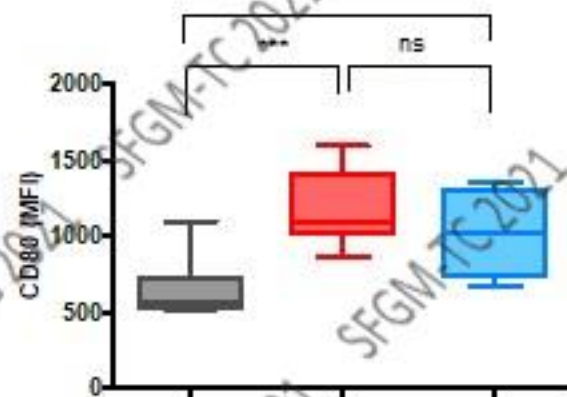
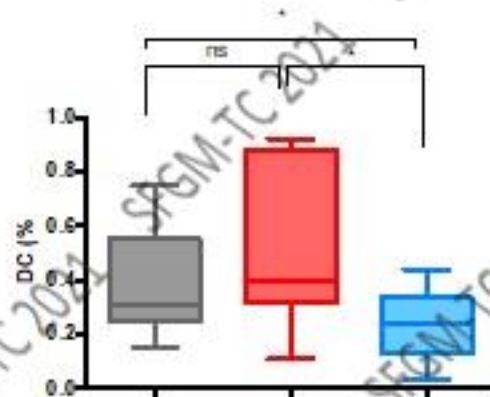
Liver GVHD D28



Les iNKT CD4⁻ lysent d'avantage les cellules dendritiques et inhibent leur maturation que les iNKT CD4⁺

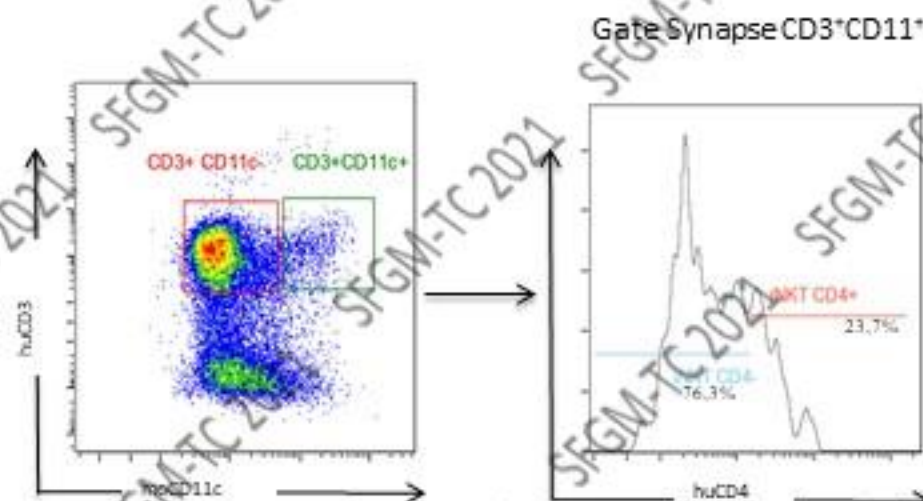


Day 21

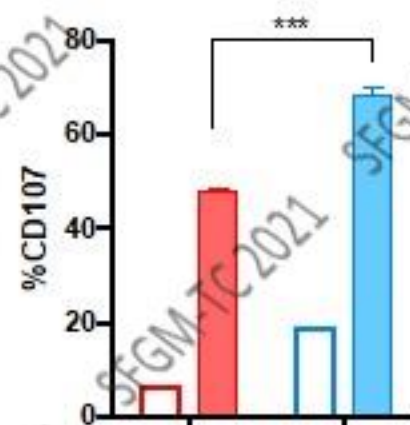


■ PBMC alone
■ PBMC + NKT4^{pos}
■ PBMC + NKT4^{neg}

Co-culture in vitro:
DC médullaires murines + iNKT CD4⁻ et CD4⁺ (1/1)



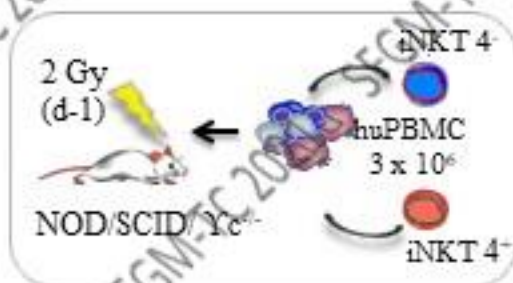
CD107 = dégranulation



moBMDc	INKT 4 ^{pos}	INKT 4 ^{neg}
-	+	-
-	-	+
+	+	-
+	-	+

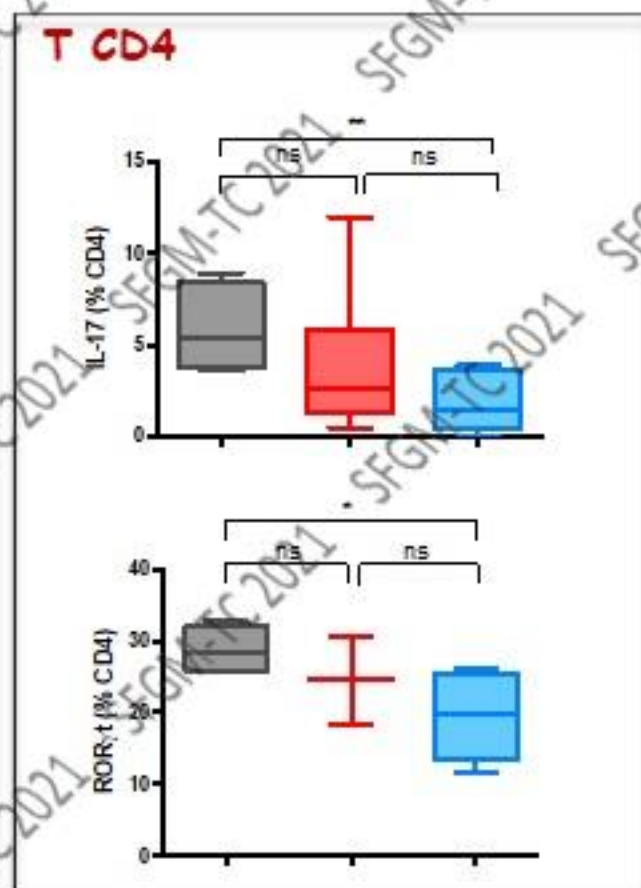
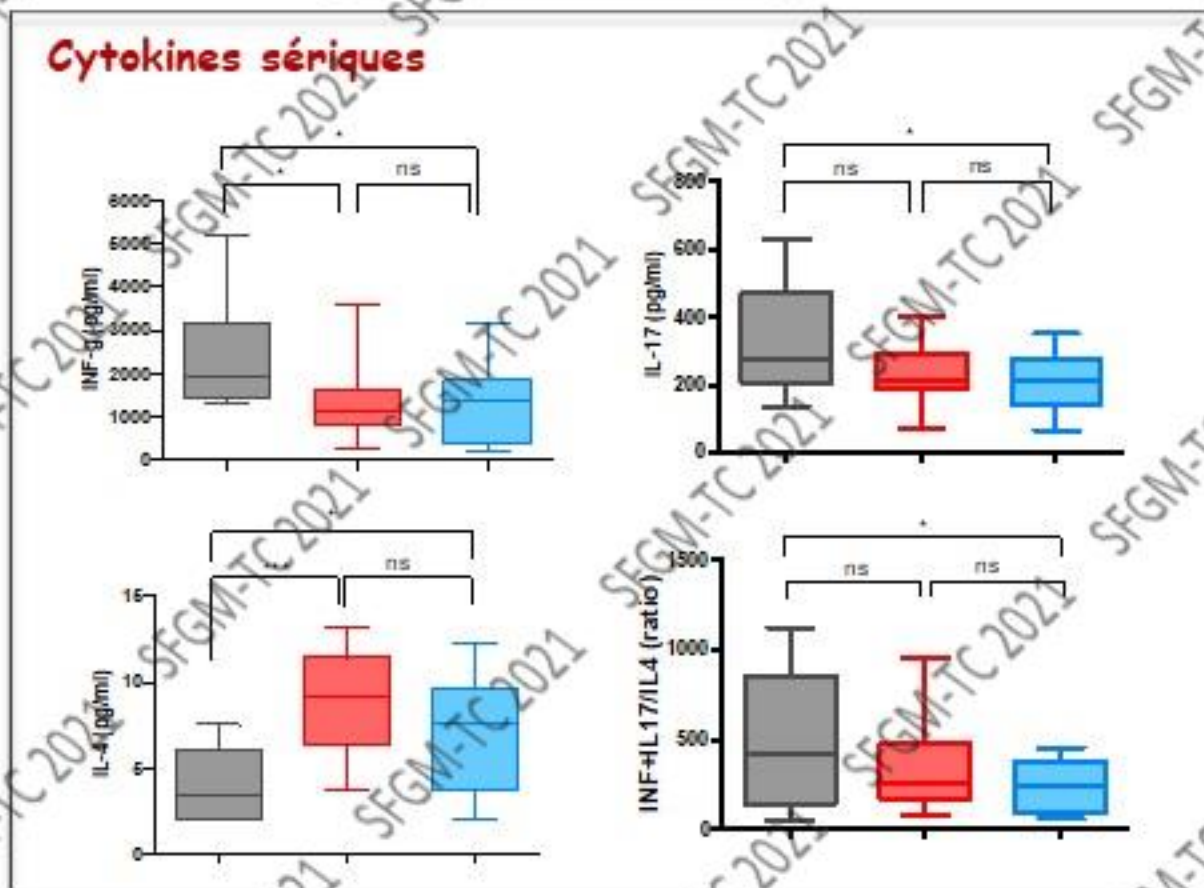
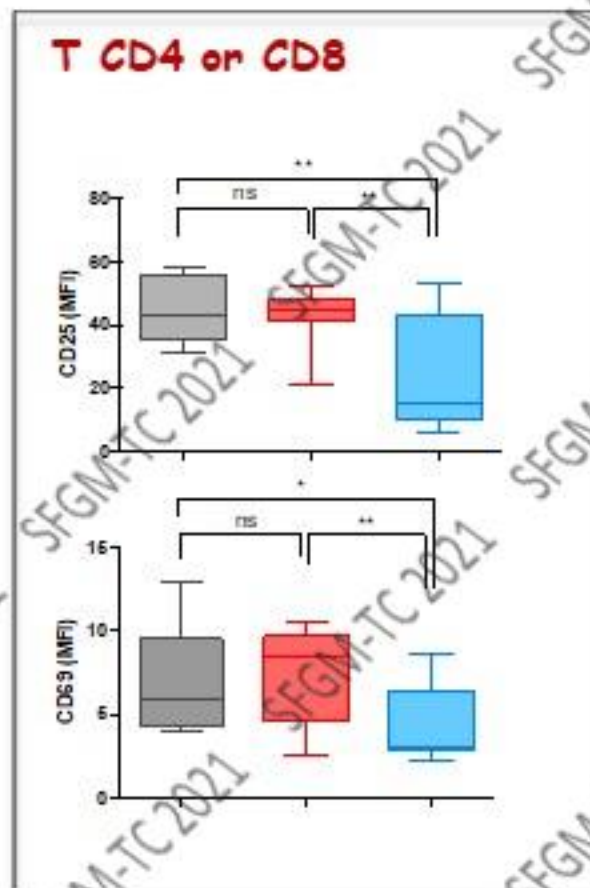
Les iNKT CD4⁻ diminuent l'activation des LT et leur orientation Th1 et Th17 *in vivo*

- PBMC alone
- PBMC + NKT4^{pos}
- PBMC + NKT4^{neg}



À J28:

- ✓ % cellules T activées (CD25/CD69)
- ✓ Taux de cytokines sériques (IFN- γ /IL-17)
- ✓ Production de cytokines par les T CD4





ExpiNKT project

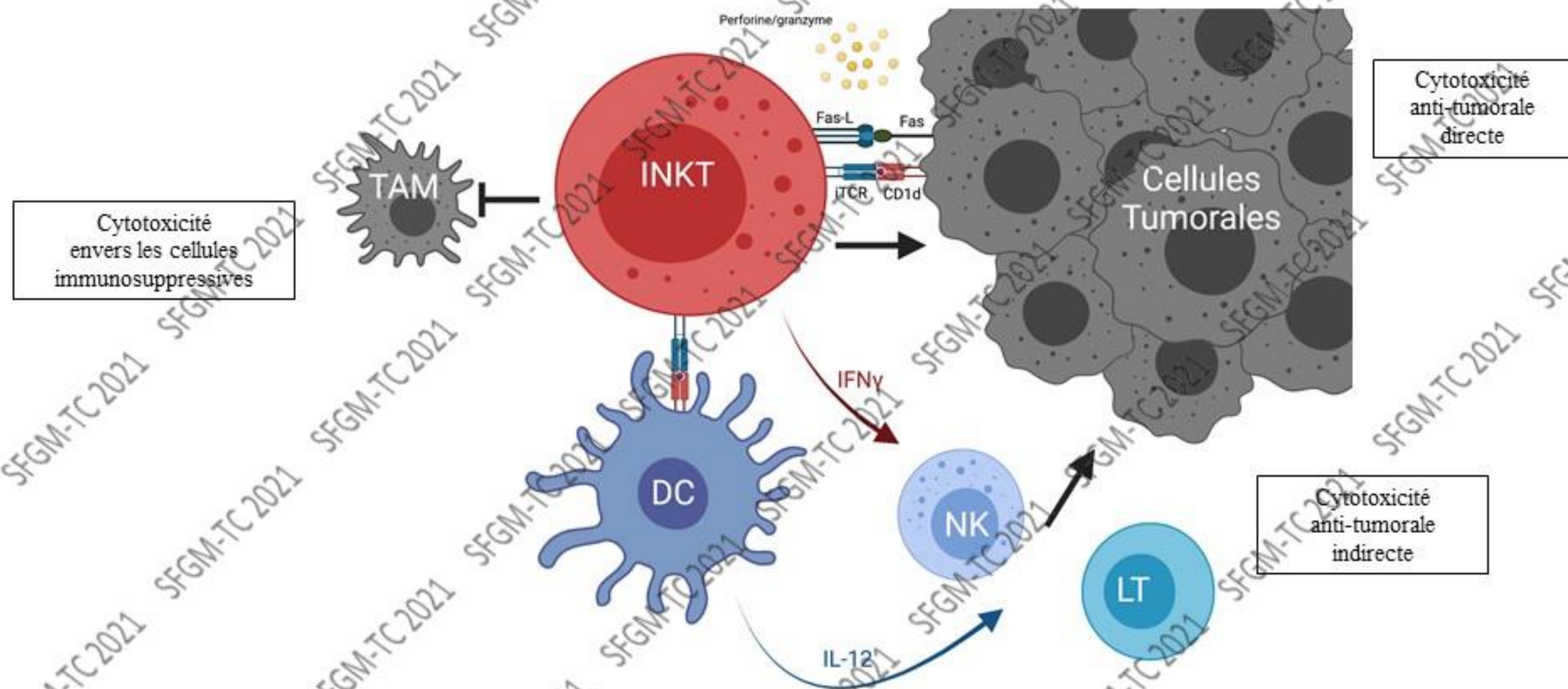
Grant from INCa and DGOS



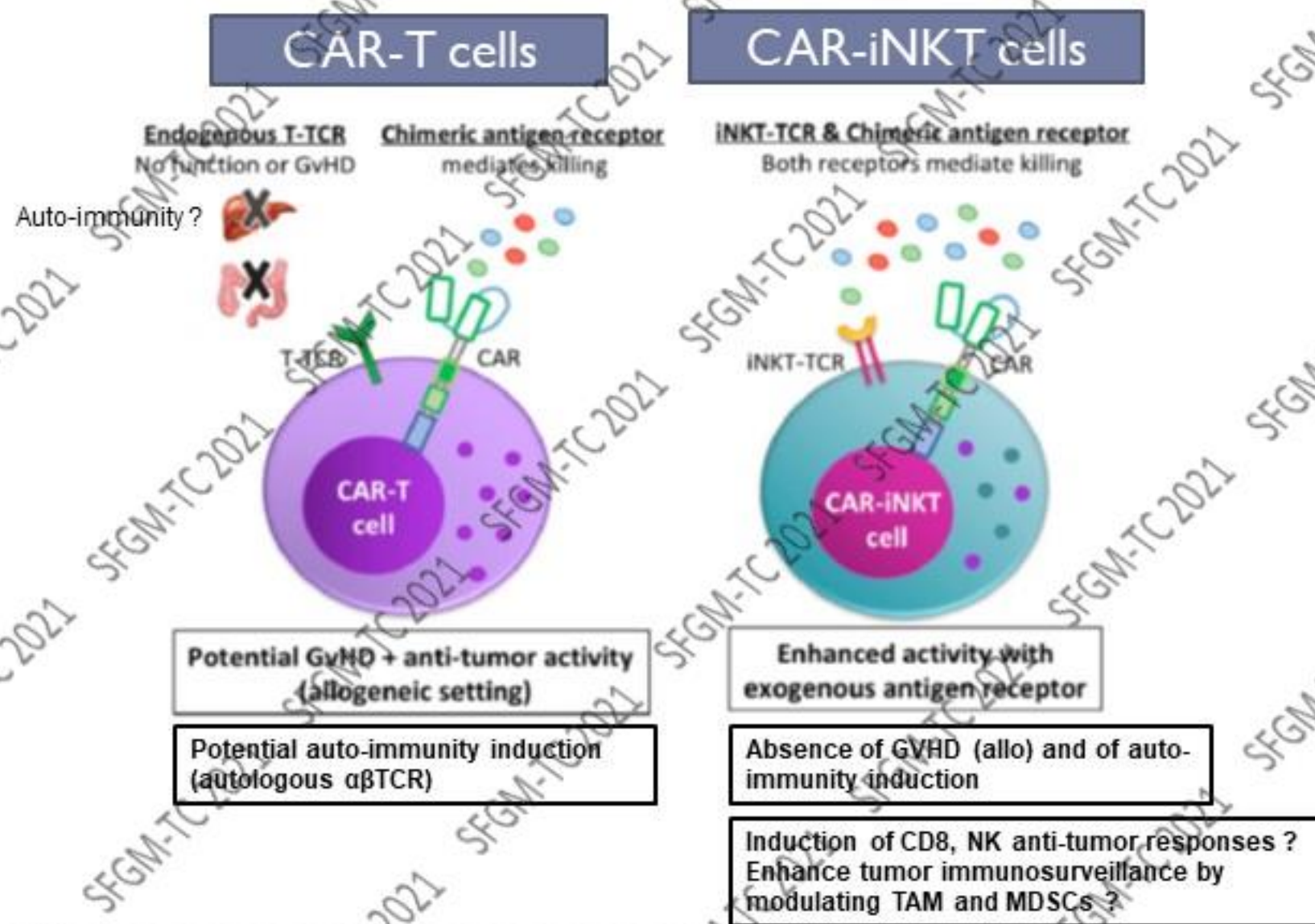
« Expansion of invariant NKT cells for a cell immunotherapeutic approach allowing the control of graft versus host-disease and preserving the graft versus leukemia effect after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation »

- **Technique mise au point à grade GMP**
- **Dépôt de brevet en cours**
- **Essais thérapeutiques en prévention de la GVH à venir**

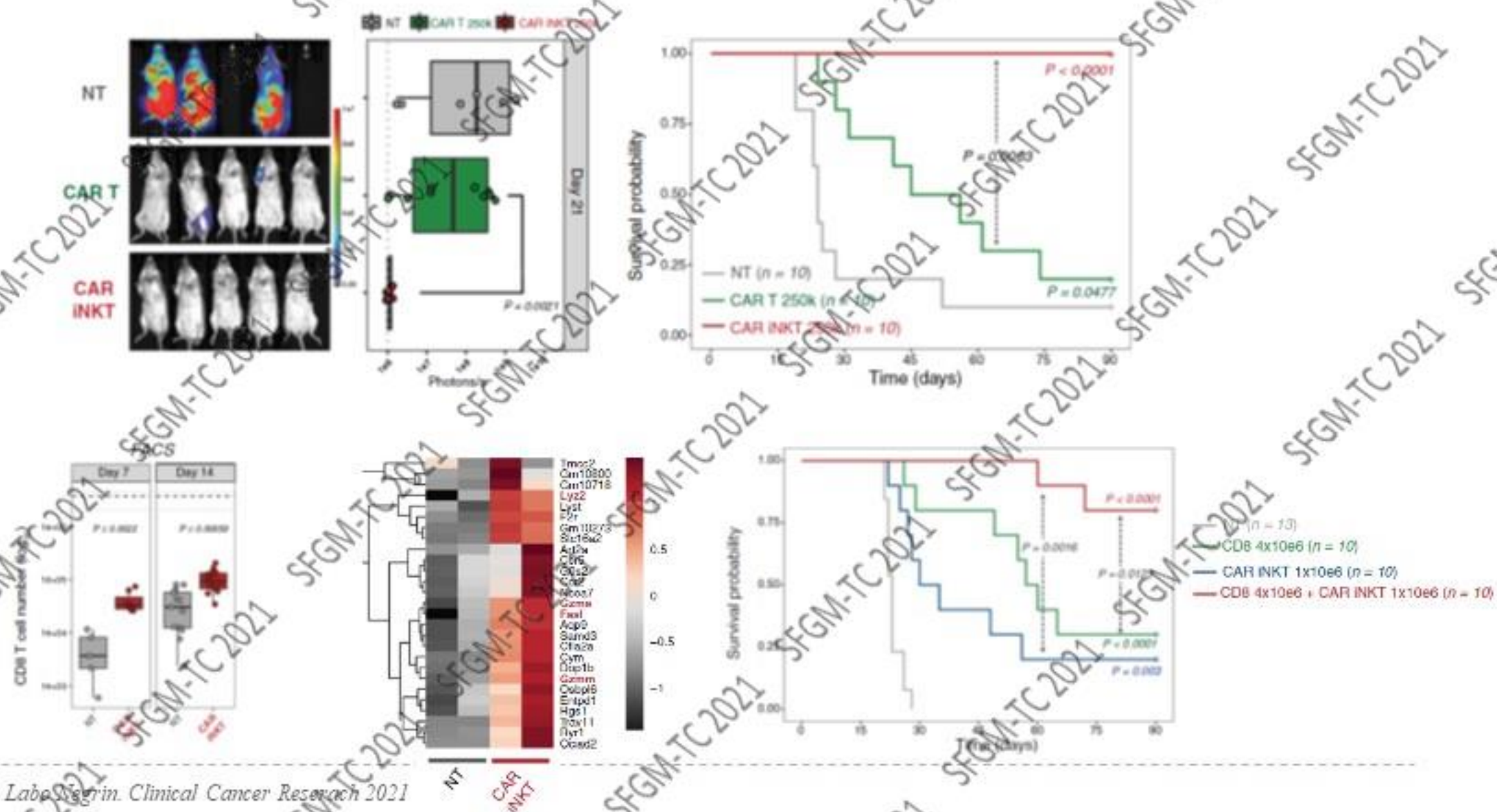
Propriétés anti-tumorales directes et indirectes des lymphocytes iNKT



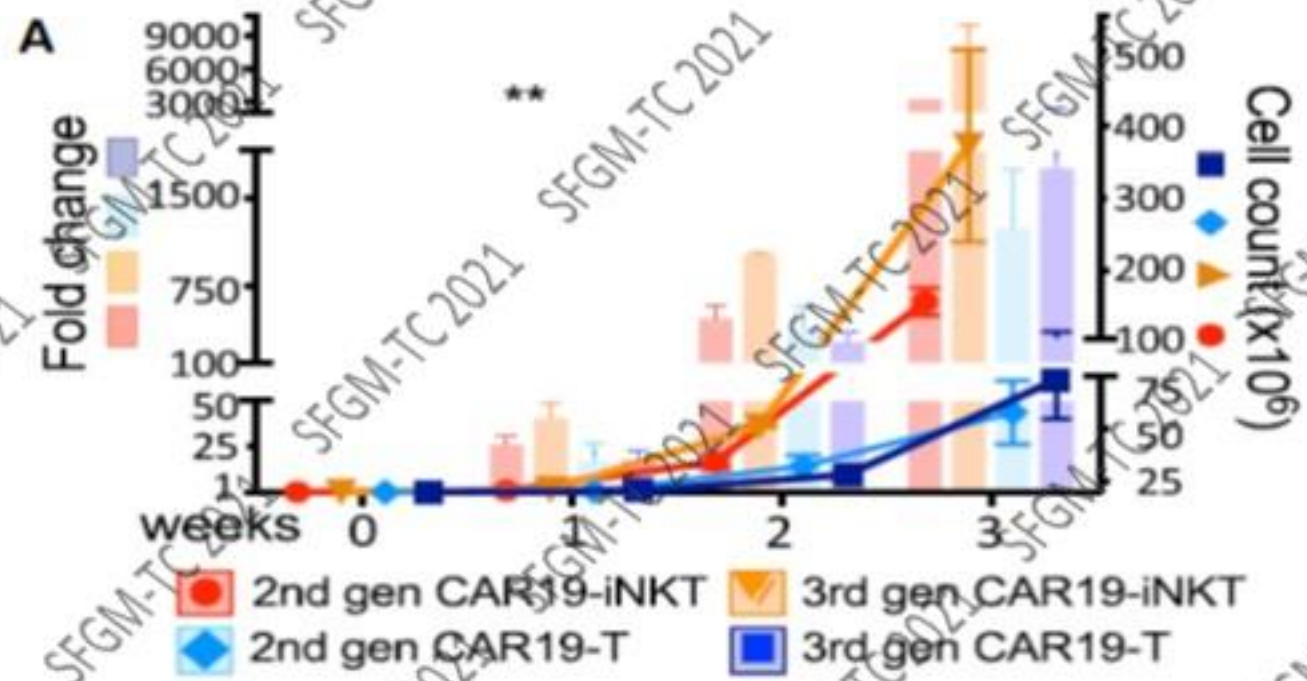
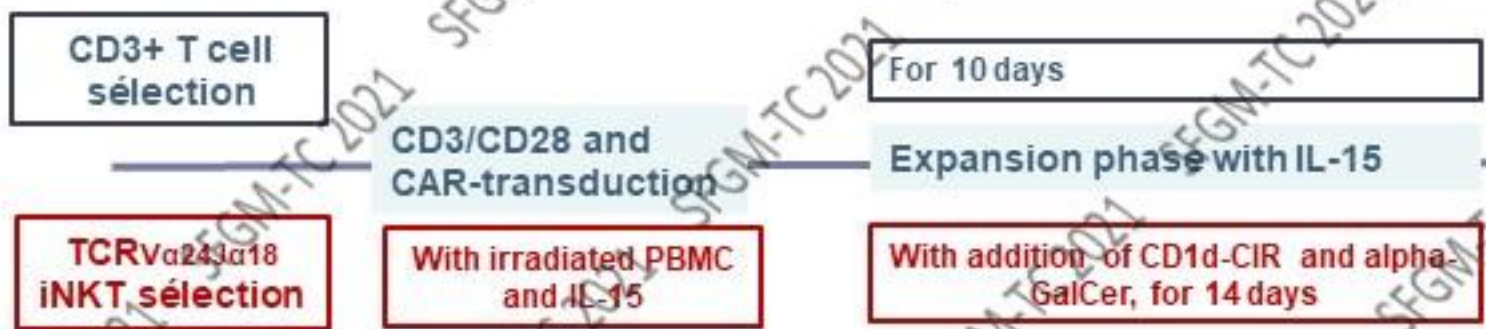
Advantages théoriques des CAR iNKT versus CAR T cells



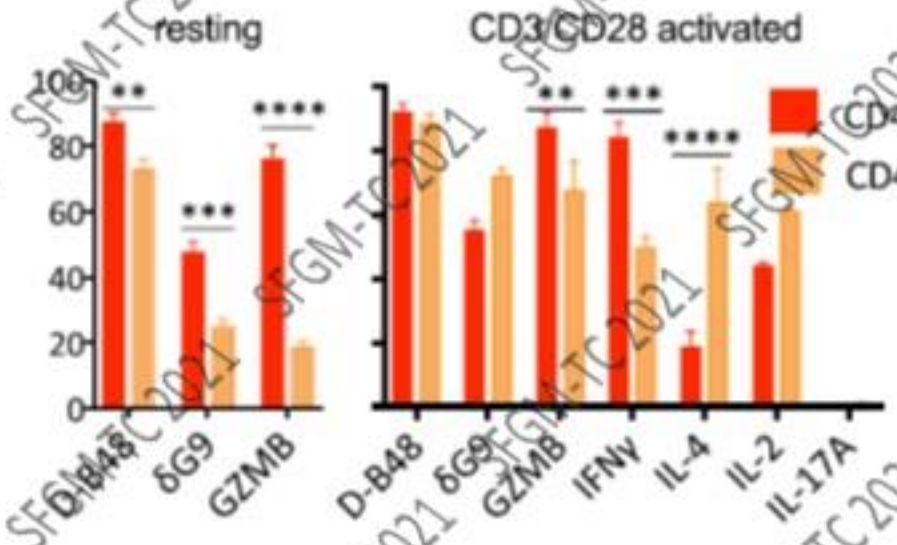
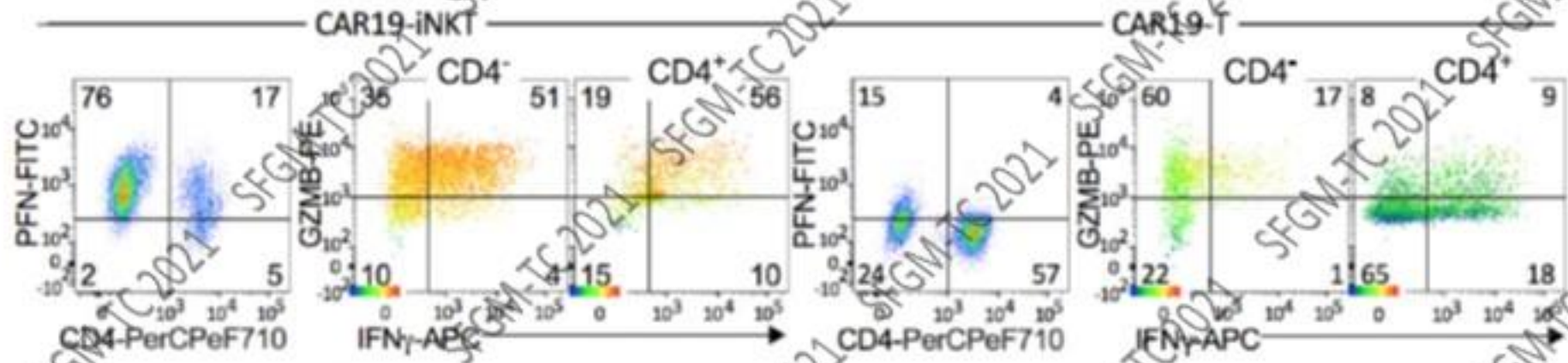
Les CART iNKT anti-CD19 allogéniques ont une activité anti-tumorale indirecte supérieure aux CAR-T dans un modèle murin en activant des T CD8 non CAR



Production et expansion de CAR iNKT vs CAR-T anti-CD19 humains



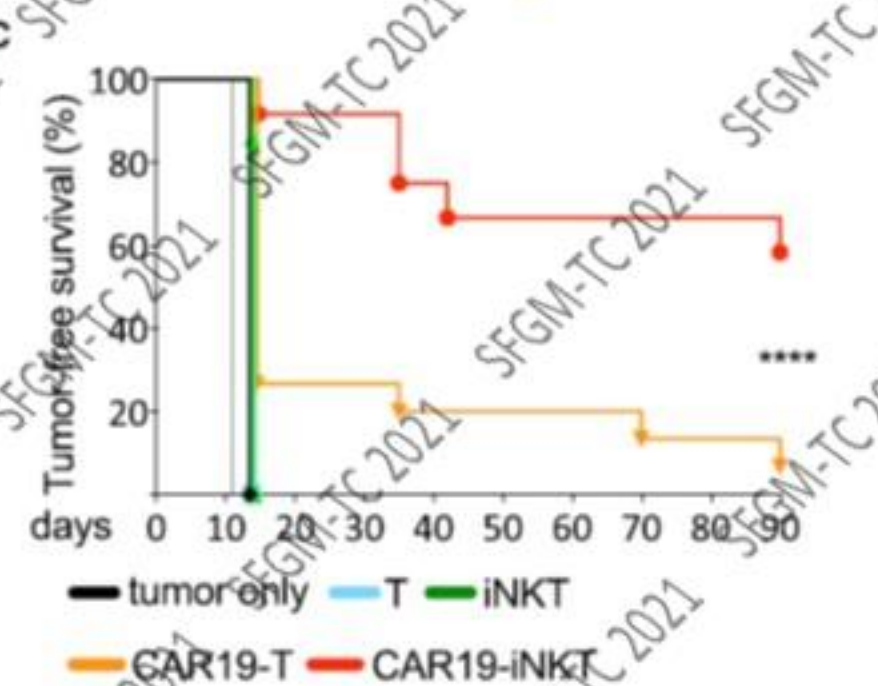
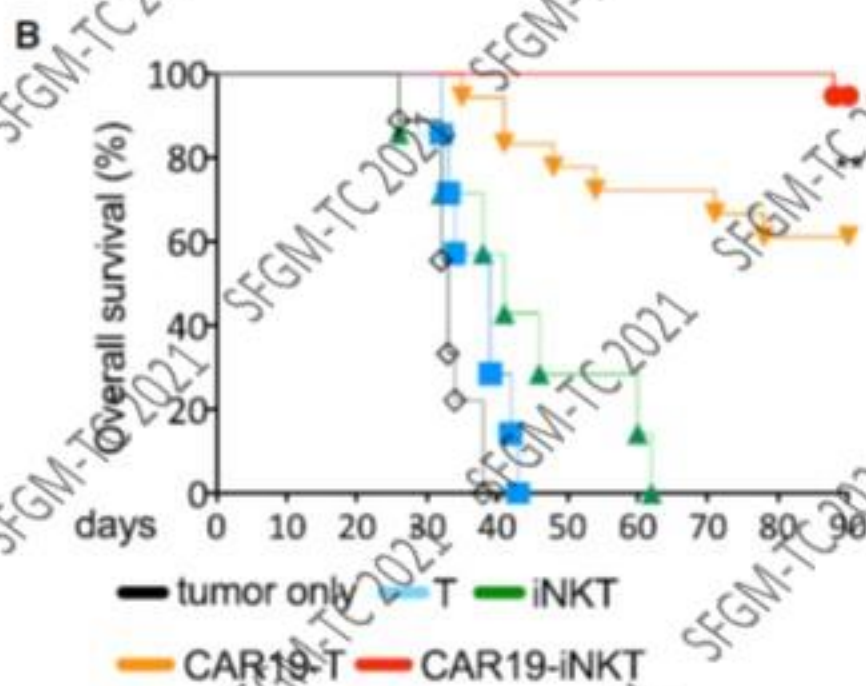
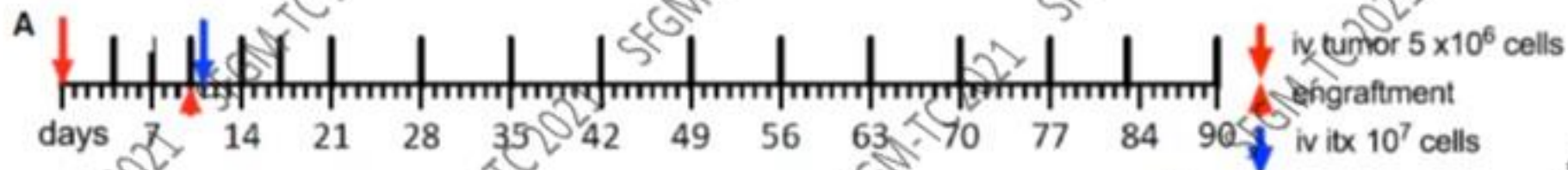
Les CAR iNKT anti-CD19 CAR iNKT produisent plus d'IFN- γ et molécules cytotoxiques que les CAR-T anti-CD19



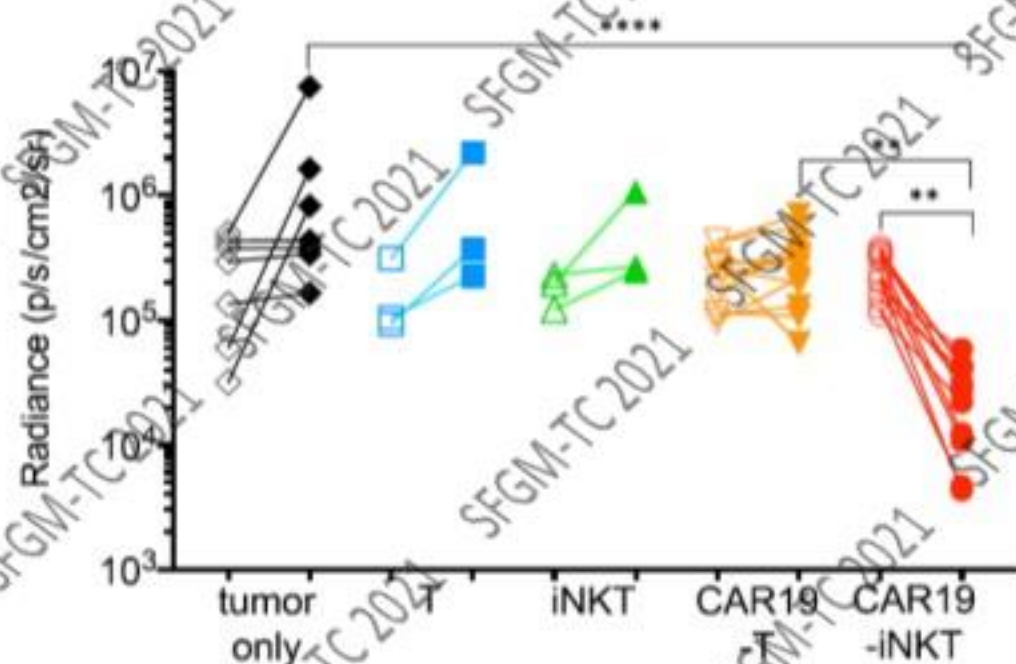
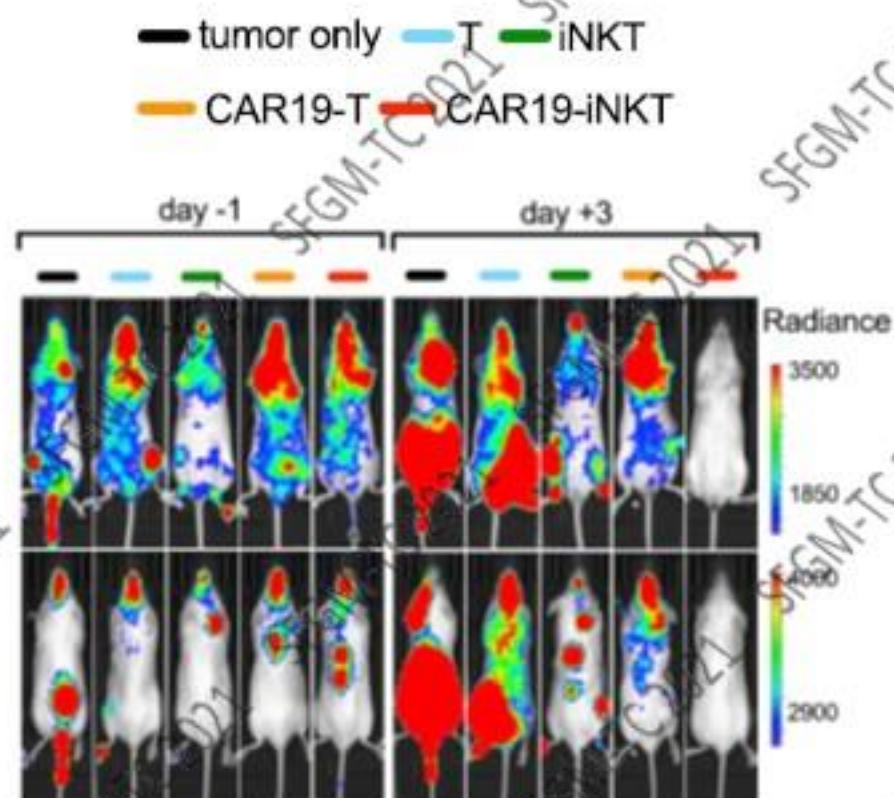
Les CAR iNKT CD4⁻ produisent plus d'IFN- γ et molécules cytotoxiques que les CAR iNKT CD4⁺

Meilleure survie avec les CAR iNKT dans un modèle préclinique de LNH B

CD1d-CIR (human B lymphoma cell line CD1d-transduced) in NSG mice

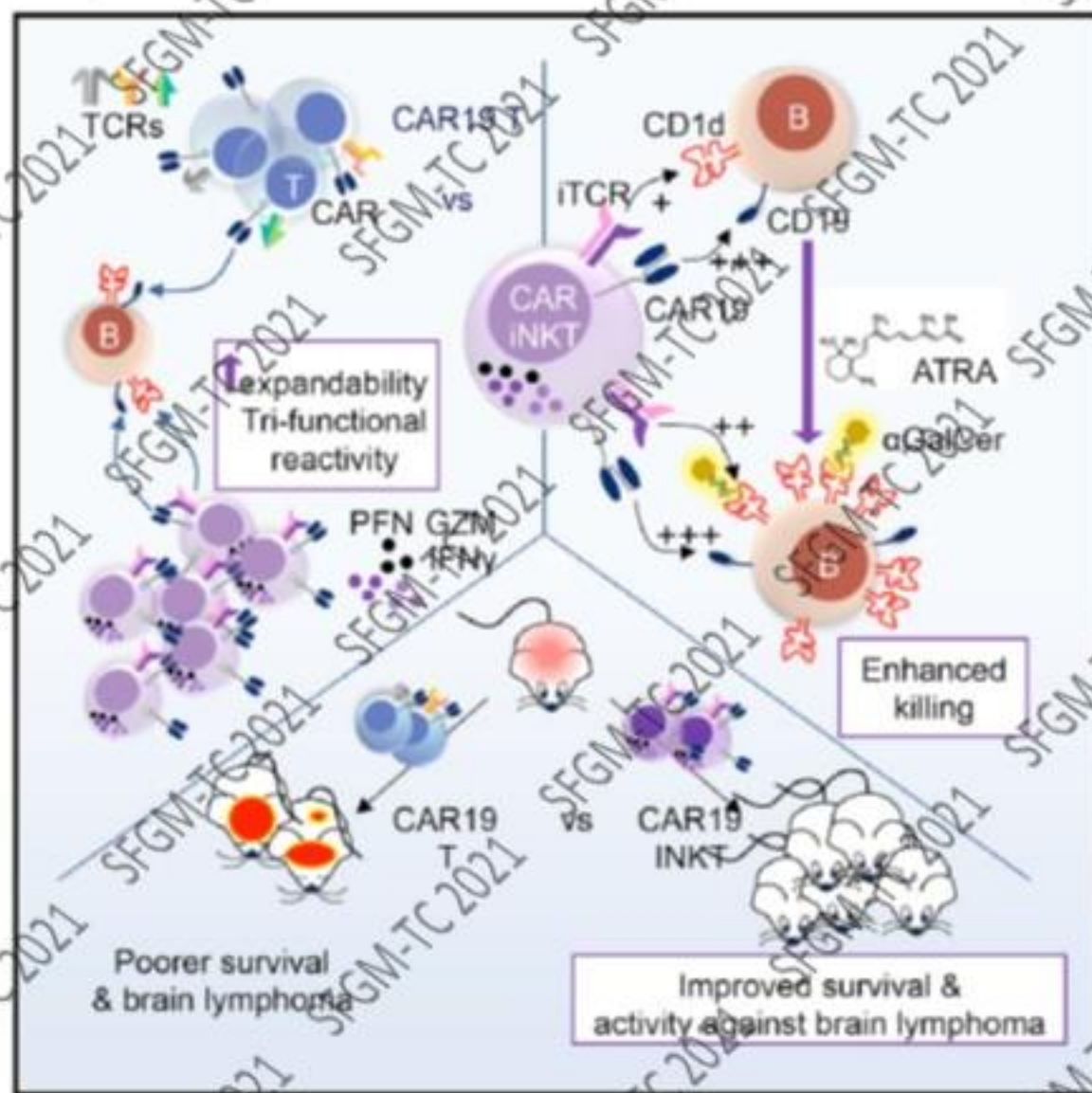


Meilleur control tumoral des CAR iNKT vs CAR-T dans le modèle de LNH B



CD1d-CIR (human B lymphoma cell line CD1d-transduced) in NSG mice

Anti-CD19 CAR iNKT vs CAR-T: conclusions de l'étude pré-clinique



Autres articles démontrant l'intérêt des CAR-iNKT

Invariant NKT cells with chimeric antigen receptor provide a novel platform for safe and effective cancer immunotherapy

Andras Heczey,¹ Daofeng Liu,¹ Genqwen Tian,² Amy N. Courtney,¹ Jie Wei,¹ Ekaterina Marinova,¹ Xiuhua Gao,¹ Linjie Guo,¹ Eric Yvon,³ John Hicks,² Hao Liu,¹ Gianpietro Dotti,^{2,3} and Leonid S. Metelitsa^{1,2,3}

¹Texas Children's Cancer Center, Department of Pediatrics, ²Department of Pathology and Immunology, ³Center for Cell and Gene Therapy, and ⁴Division of Biostatistics, Dan L. Duncan Cancer Center, Department of Medicine, Baylor College of Medicine, Houston, TX

BLOOD, 30 OCTOBER 2014 • VOLUME 124, NUMBER 18

Key Points

- GD2-specific CAR renders NKT cells cytotoxic against NB cells and results in potent in vivo antitumor activity without graft-versus-host disease.

IL-21 Selectively Protects CD62L⁺ NKT Cells and Enhances Their Effector Functions for Adoptive Immunotherapy.

Ngai H^{1,2}, Tian G^{1,2}, Courtney AN¹, Ravari SB¹, Guo L¹, Liu B¹, Jin J¹, Shen ET¹, Di Pierro EJ¹, Metelitsa LS^{3,2,4}.

[Immunity](#). 2018 Oct 1;201(7):2141-2153.

NKT Cells Coexpressing a GD2-Specific Chimeric Antigen Receptor and IL15 Show Enhanced *In Vivo* Persistence and Antitumor Activity against Neuroblastoma.

Xu X¹, Huang W¹, Heczey A^{1,2,3}, Liu D¹, Guo L¹, Wood M¹, Jin J¹, Courtney AN¹, Liu B¹, Di Pierro EJ¹, Hicks J², Barragan GA¹, Ngai H¹, Chen Y⁴, Savoldo B⁴, Dotti G⁴, Metelitsa LS^{5,2,3}.

[Clin Cancer Res](#). 2019 Dec 1;25(23):7126-7138.

Développement de CAR iNKT anti-IL1Rap et anti-CD123 pour le traitement des leucémies aiguës myéloblastiques (LAM)

Laboratoire IMoPA, UMR 7365, CNRS-UL,
Équipe 6 CECITA
« Ingénierie cellulaire, immunothérapies
et approches translationnelles »

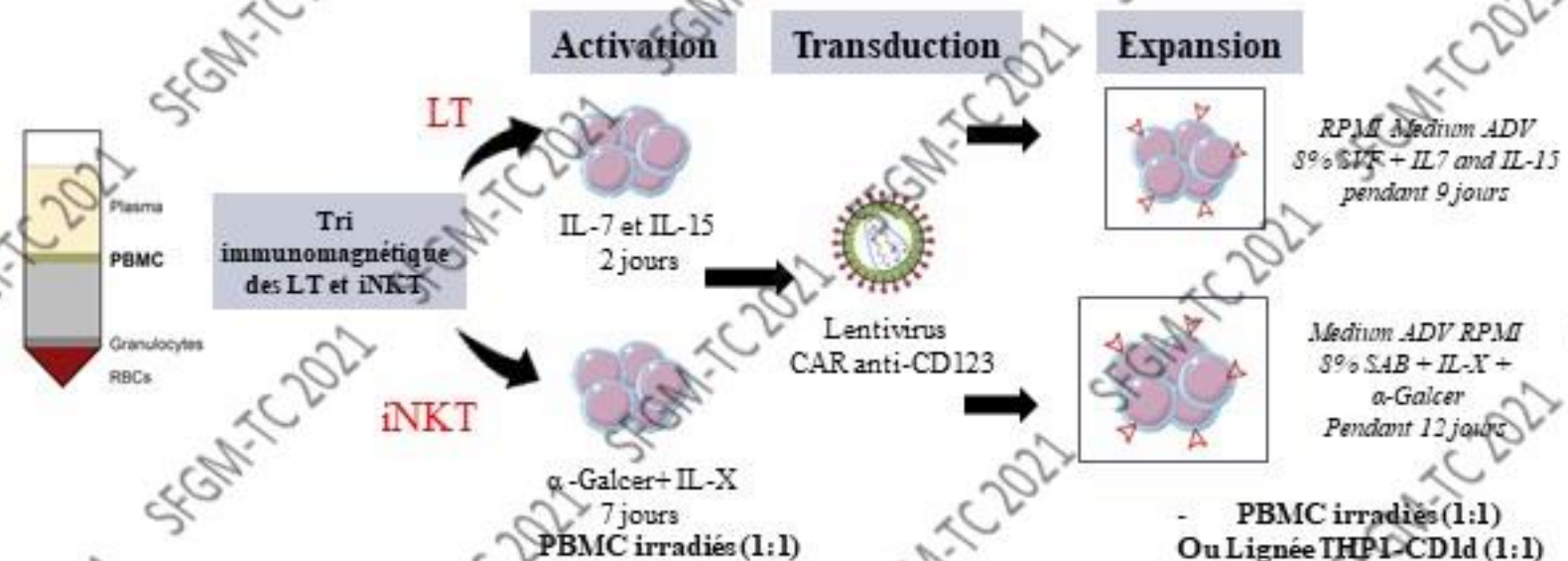
MT Rubio
D. Moulin

Jordan Brouard
Thomas Grinda
Dai Tran

INSERM UMR 1098, EFS Bourgogne
Franche Comté, France

Team TIM-C

C. Ferrand
M. Deschamps,
F. Garnache Ottou



Résultats préliminaires:

- Cellules fonctionnelles: **supériorité des CAR iNKT** vs CAR-T en termes de production d'IFN- γ , Granzyme et Perforine
- **Cytotoxicité directe *in vitro*** comparable à H1b de coculture sur des lignées CD123+, cytotoxicité supérieure des iNKT vis-à-vis des cibles exprimant faiblement CD123
- **Etudes *in vivo*** dans le modèle pré-clinique NSG à venir (collaboration avec Besançon)
- **Etudes mécanistiques** et démonstration de la modulation du microenvironnement leucémique à venir

Conclusions/perspectives

Les lymphocytes iNKT :

- représentent une population lymphocytaire immunomodulatrice intéressante pour contrôler la GVH sans altérer l'effet GVL de la greffe de CSH
- le sous type CD4 négatif humain est particulièrement cytotoxique et paraît le plus approprié dans le contexte GVH/GVL
- peuvent être expandus à grade clinique à grande échelle pour des approches d'immunothérapie

Intérêt probable des CAR-iNKT dans l'immunothérapie anti-tumorale:

- en cours d'études cliniques dans les hémopathies lymphoïdes (anti-CD19) et médulloblastome (anti-GD2)
- explorations en cours dans les LAM : confirmation de leur effet immunomodulateur du microenvironnement leucémique dans des modèles pré-cliniques en cours au laboratoire
- application à d'autres tumeurs solides où le microenvironnement tumoral joue un rôle majeur dans l'échappement tumoral ?

CNRS UMR 8547
Hôpital Necker

Pr Olivier Hermine
Dr Maud D'Aveni
Dr Tereza Coman
Marie Bouillié

Hematology department
Necker

Pr Olivier Hermine
Pr Felipe Suarez
Dr David Sibbon

Financements

FONDATION
imagine
INSTITUT DES MALADIES GÉNÉTIQUES

agence de la
Biomédecine

INCa/DGOS

La Ligue contre
le Cancer

Associations:
-Capucine
-Laurette Fugain
-Leucémie espoir

Hematology Department

Pr P. Feugier

BMT group:
M. D'Aveni
A. Campidelli
S. Pagliuca

Pediatric BMT team

Pr P. Chastanier
C. Pochon
J. Valduga

UTCT

Pr D. Bensoussan
Dr V. Decot
Dr L. Reppel

IMoPA
Institute of Hematology & Transplantation

Director:
Pr J.Y. Jouzeau

Equipe 6

Pr D. Bensoussan
Pr MT Rubio

Dr M. D'Aveni
Dr V. Decot
Dr L. Reppel
Dr N. De Isla
Dr C. Huselstein
Pr M. De Carvahlo
Dr A. Aarninck

Jordan Brouard

L. Boulangé
C. Pochon
AB. Notarantonio
Thomas Grinda
Dai Tran

Inserm
Institut national
de la santé et de la recherche médicale

INSERM UMR
1098, EFS
Bourgogne Franche
Comté, France

Team TIM-C

P. Saas,
O. Adotevi

M. Deschamps
C. Ferrand

F. Garnache Ottou