

Imunoterapija T-stanicama transduciranim kimeričnim antigenim receptorima

Marošević, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:507358>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



zir.nsk.hr

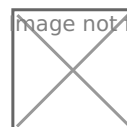


Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij
“Biotehnologija i istraživanje lijekova”

Marija Marošević

Imunoterapija T-stanicama transduciranim kimeričnim antigenim receptorima

Završni rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij
“Biotehnologija i istraživanje lijekova”

Marija Marošević

Imunoterapija T-stanicama transduciranim kimeričnim antigenim receptorima

Završni rad

Rijeka, 2020.

Mentor rada: Izv. prof. dr. sc. Ivana Munitić

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
Undergraduate university study
“Biotechnology and drug research”

Marija Marošević

Immunotherapy of tumors with T-cells carrying chimeric antigen receptors

Final paper

Rijeka, 2020.

Paper mentor: Izv. prof. dr. sc. Ivana Munitić

Završni rad obranjen je dana 30.07.2020. pod povjerenstvom:

1. Izv. prof. dr. sc. Mirela Sedić - predsjednik
2. doc. dr. sc. Ivana Ratkaj - član
3. Izv. prof. dr. sc. Ivana Munić - mentor

Rad ima 35 stranica, 9 slika i 21 literaturni navod.

Sažetak

Terapija T-stanicama s kimeričnim antigenim receptorima (CAR, prema engl. *chimeric antigen receptors*) je novi pristup u liječenju tumora. Trenutno dostupne terapije Kymriah i Yescarta namijenjene su liječenju B-staničnih leukemija pozitivnih na CD19, površinski antigen izražen na velikoj većini B stanica. Ovaj rad sadrži prikaz glavnih karakteristika CAR T-stanične terapije, njene prednosti i nedostatke te buduće perspektive. CAR korišten u obje navedene terapije je visoko specifičan za CD19, a građen je od antigen-specifičnog dijela teškog i lakog imunoglobulinskog lanca te T staničnih signalnih motiva. CAR T-stanice dobivaju se transduciranjem autolognih T-stanica periferne krvi bolesnika s virusnim vektorom koji nosi CAR sekvencu. CAR T-stanice ubijanje tumorskih stanica provode ispuštanjem citotoksičnih granula te uz pomoć liganada smrti i citokina. CAR T-stanična terapija pokazuje visoku stopu uspješnosti u kliničkim istraživanjima. Unatoč visokoj uspješnosti, za sada postoje samo dvije, gore navedene, terapije koje ciljaju isti antigen. Nuspojave CAR T-stanične terapije uključuju citokinu oluju i B staničnu imunodeficienciju. Citokina oluja može biti blaga do opasna po život te može oštetiti razne organe. Za njeno liječenje se koriste imunosupresivni lijekovi poput anti-IL-6 antitijela i kortikosteroida. Neki od pristupa poboljšanja učinkovitosti terapije su izrada CAR T-stanica korištenjem ne-virusnih vektora, CAR T-stanice s proupalnim citokinima i više-antigenskom specifičnošću. Korištenjem novih antigen-specifičnih molekula, čija se specifičnost modulira ovisno o ciljnom antigenu, otvara se mogućnost djelovanja na veći spektar antigena i/ili tumora. Stoga, u budućnosti CAR T-stanična terapija ima potencijal postati šire korištena terapija.

Ključne riječi: imunoterapija tumora, CAR T-stanice, B-stanične leukemije, tumorski antigeni

Summary

Chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy represents a new approach to tumor treatment. Currently available therapies of Kymriah and Yescarta are intended for the treatment of CD19-positive B-cell leukemias, a surface antigen expressed on the majority of B cells. This thesis discusses the main characteristics of CAR T-cell therapy, its advantages and disadvantages, and future perspectives. The CAR used in both therapies is highly specific for CD19 and is composed of an antigen-specific part of the heavy and light immunoglobulin chains and T cell signaling motifs. CAR T-cells are obtained by transducing autologous peripheral blood T-cells with a viral vector carrying the CAR sequence. CAR T cells kill tumor cells by releasing cytotoxic granules and using death ligands and cytokines. CAR T-cell therapy has had a high success rate in clinical trials. Despite the high success rate, there are currently only two therapies, mentioned above, that target the same antigen. Side effects of CAR T-cell therapy include cytokine storm and B cell immunodeficiency. Cytokine storm can be mild to life-threatening and can affect a variety of organs. Immunosuppressive drugs, such as anti-IL-6 antibodies and corticosteroids, are used to treat cytokine storm. Some of the approaches used to improve the therapeutic efficacy are CAR T cell production using non-viral vectors, CAR T cells with proinflammatory cytokines and multi-antigen specificity. The use of new antigen-specific molecules, whose specificity is modulated depending on the target antigen, opens the possibility of acting on a wider range of antigens and/or tumors. Therefore, in the future CAR T-cell therapy has the potential to become a more widespread therapy.

Key words: tumor immunotherapy, CAR T-cells, B-cell leukemias, tumor antigens

Sadržaj

Uvod.....	1
Svrha rada	4
Osnove T-stanične imunosti i CAR T-stanične terapije	5
Aktivacijske molekule i signalni putevi T-stanica	5
Inhibicijske molekule T-stanica	7
Tumorski antigeni – mete CAR T-stanica.....	8
Građa kimeričnog receptora	8
Izrada CAR T-stanica.....	11
Mehanizam ubijanja tumorskih stanica	15
<i>In vivo</i> proliferacija i migracija CAR T-stanica	15
Imunosna sinapsa	15
Podjela citotoksičnih učinaka	16
Primjena terapije	19
Kriteriji za terapiju.....	19
Nedostaci CAR T-stanične terapije	21
Nuspojave.....	21
Sindrom oslobađanja citokina	21
Ostali štetni utjecaji.....	21
Utjecaji na toksičnost terapije	22
Liječenje nuspojava.....	23
Prepreke do dugoročne remisije	24
Poboljšanja CAR T-stanične terapije	27
Budućnost CAR T-stanične terapije	29
Univerzalne CAR T-stanice.....	29
Standardiziranje CAR T-stanične terapije.....	31
Zaključak.....	32
Literatura.....	34
Životopis.....	Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.

Uvod

Suvremena medicina svakim danom nastoji bolesnicima pružiti najučinkovitiju skrb razvojem novih terapija i lijekova. Jedan od najvećih uspjeha medicine bio bi lijek protiv tumora. Put do cilja otežavaju različiti mehanizmi koji tumorima omogućavaju nesmetani rast. Primjerice, sprečavanjem izražaja tumorskih antigena tj. smanjenjem imunogeničnosti, tumori postaju "nevidljivi" imunosnim stanicama. Osim toga, tumorske stanice i/ili imunosupresivne stanice, poput tumorskih makrofaga, u tumorskom mikrokolišu mogu aktivno vršiti imunosupresiju lučenjem protuupalnih citokina ili izražajem liganada koji suprimiraju stanice stečene imunosti.^{1,2} Uz kirurške metode liječenja tumora, radijacija i kemoterapija već su dugo vremena terapija izbora u velikom broju onkoloških bolesnika. Nažalost, one za posljedicu imaju teške nuspojave, a česte su i mutacije tumorskih stanica koje dovode do otpornosti na terapiju.³ Pojava imuno-onkologije donosi nove mogućnosti liječenja pomoću antitijela, cjepiva, citokina i drugih terapija koje smanjuju imunosupresiju, čine tumor "vidljivim" i aktiviraju imunosne stanice.

S obzirom da je onkološkim bolesnicima često oslabljen imunosni odgovor, razvila se ideja o adoptivnom transferu T limfocita bolesnicima.² Takav pristup pokazao se korisnim u liječenju tumora još u 1980-ima, kada su transferom autolognih tumor infiltrirajućih limfocita (TILs, prema engl. *tumor-infiltrating lymphocytes*) liječeni bolesnici s melanomom i leukemijama.² Princip ove terapije je sakupljanje T-stanica iz tumora, njihova *ex vivo* ekspanzija i aktivacija te reinfuzija u bolesnika. Imunosni odgovor na tumore je slabiji od onog na patogene zbog tumorima inducirane imunosupresije. Ova terapija zaobilazi tumorsku imunosupresiju *in vitro* aktivacijom TILs-a, čime se potonje potiču na protutumorsko djelovanje.⁴ Ovaj terapijski pristup nije najidealniji zbog dugotrajne pripreme stanica i malog konačnog broja tumor-specifičnih klonova.⁴

Razvojem genetičkog i staničnog inženjerstva otkriva se novi spektar znanja koji je rezultirao modificiranjem i poboljšanjem dotadašnjih terapija, pa tako i infiltrirajućih limfocita. Genetičkim inženjerstvom i virusnom transdukcijom stvorene su T-stanice s tumor-specifičnim T-staničnim receptorom (TCR, prema engl. *T-cell receptor*) za prepoznavanje tumorskih antigena prezentiranih na molekulama glavnog sustava histokompatibilnosti (MHC prema engl. *major histocompatibility complex*).⁴ Terapijom T-stanicama s tumor-specifičnim TCR-om moguće je dobiti veliki broj ekspanziranih stanica iz malobrojnih tumor-specifičnih stanica periferne krvi. Ograničavajući čimbenik u toj terapiji je nužnost prezentiranja antigena na MHC molekulama koje se razlikuju od bolesnika do bolesnika i često uopće nisu dostatno izražene u tumorima.

Kako bi se omogućilo o MHC-u neovisno prepoznavanje antigena, genetskim inženjeringom antigenih receptora T-limfocita stvorene su T-stanice s kimeričnim antigenim receptorima (CAR, prema engl. *chimeric antigen receptors*).⁵ Kimerični antigeni receptori su rekombinantni receptori visoko specifični za odabrani tumorski antigen koji omogućuju aktivaciju i pokretanje T-staničnog protutumorskog odgovora. Za razliku od TCR T-stanica, CAR T-stanice prepoznaju površinske antigene koji ne moraju biti predloženi na MHC molekulama. Zahvaljujući MHC-neovisnom prepoznavanju antigena, CAR T-stanice prepoznaju veći broj antigena jer mogu prepoznati i antigene koji nisu prezentirani na MHC molekulama.⁵ Transdukcijom i ekspanzijom endogenih T stanica bolesnika, nastaju CAR T-stanice koje djeluju poput živih lijekova. CAR T-stanice zaobilaze neke od koraka *in vivo* aktivacije imunosnih stanica tako što su, do trenutka reinfuzije u bolesnika, ekspanzirane i aktivirane za protutumorsko djelovanje. Do sada su agencije za lijekove poput američke FDA (*Food and Drug Administration*) i europske EMA (*European Medicines Agency*) 2017. i 2018. odobrile dva lijeka na principu ove terapije.⁶ *Kymriah* (*Tisagenlecleucel*, CTL019; Novartis, Švicarska) je terapija autolognim T-stanicama koje su dobivene lentivirusnim vektorom i kodiraju anti-CD19

CAR koji specifično prepoznaje CD19 antigen na B-stanicama. Koristi se za liječenje djece i mlađih osoba s akutnim B-staničnim leukemijama i B-staničnim limfomima. *Yescarta (Axicabtagene ciloleucel; Gilead, USA)* je slična terapija, ali su anti-CD19 CAR T-stanice transducirane retrovirusom. Ova terapija namijenjena je odraslim bolesnicima s B-staničnim limfomima.

Zahvaljujući dobrim rezultatima ove terapije i mogućnostima današnje znanosti, CAR T-stanice se razvijaju i imaju potencijal postati široko primjenjiva terapija. Ovaj rad obuhvaća pregled glavnih karakteristika i dosadašnji napredak ove terapije kao i njene mogućnosti u budućnosti.

Svrha rada

Svrha ovog rada je pregledom literature utvrditi glavna obilježja terapije s CAR T stanicama, od koncepta i samih tehnika njihove izrade i proizvodnje, preko primjene terapije do praćenja pacijenata u tijeku i nakon terapije. Pritom ćemo navesti značaj terapije i njene prednosti u spektru dosadašnjih pristupa liječenju tumora. Također, uvidom u sadašnje propuste i nedostatke raspraviti ćemo prikladna rješenja i mogućnosti poboljšanja te terapije u budućnosti.

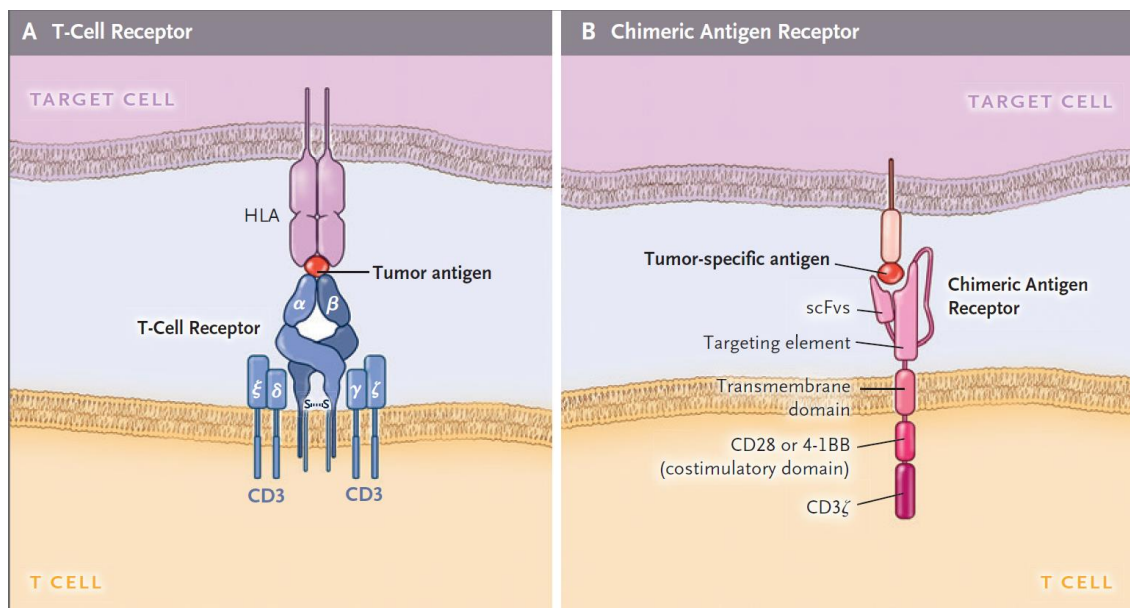
Osnove T-stanične imunosti i CAR T-stanične terapije

Kako bi se razumjeli principi CAR T-stanične terapije, najprije će se objasniti osnove T-stanične imunosti. Na Slici 1. prikazana je usporedba TCR-a i CAR-a.

Aktivacijske molekule i signalni putevi T-stanica

TCR prepoznaje antigen vezan na MHC kompleks izložen na antigen-prezentirajućim stanicama.⁷ Istovremeno CD8 ili CD4 molekule prepoznaju MHC molekulu (nije prikazano na slici). CD3ζ transmembranske signalne molekule zaslužne su za pokretanje aktivacijskih signala u T-stanicama jer u unutarstaničnom dijelu sadrže tri imunoreceptorska aktivacijska motiva temeljena na tirozinu (ITAM, prema engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) koji se fosforiliraju i pokreću aktivacijske signale.

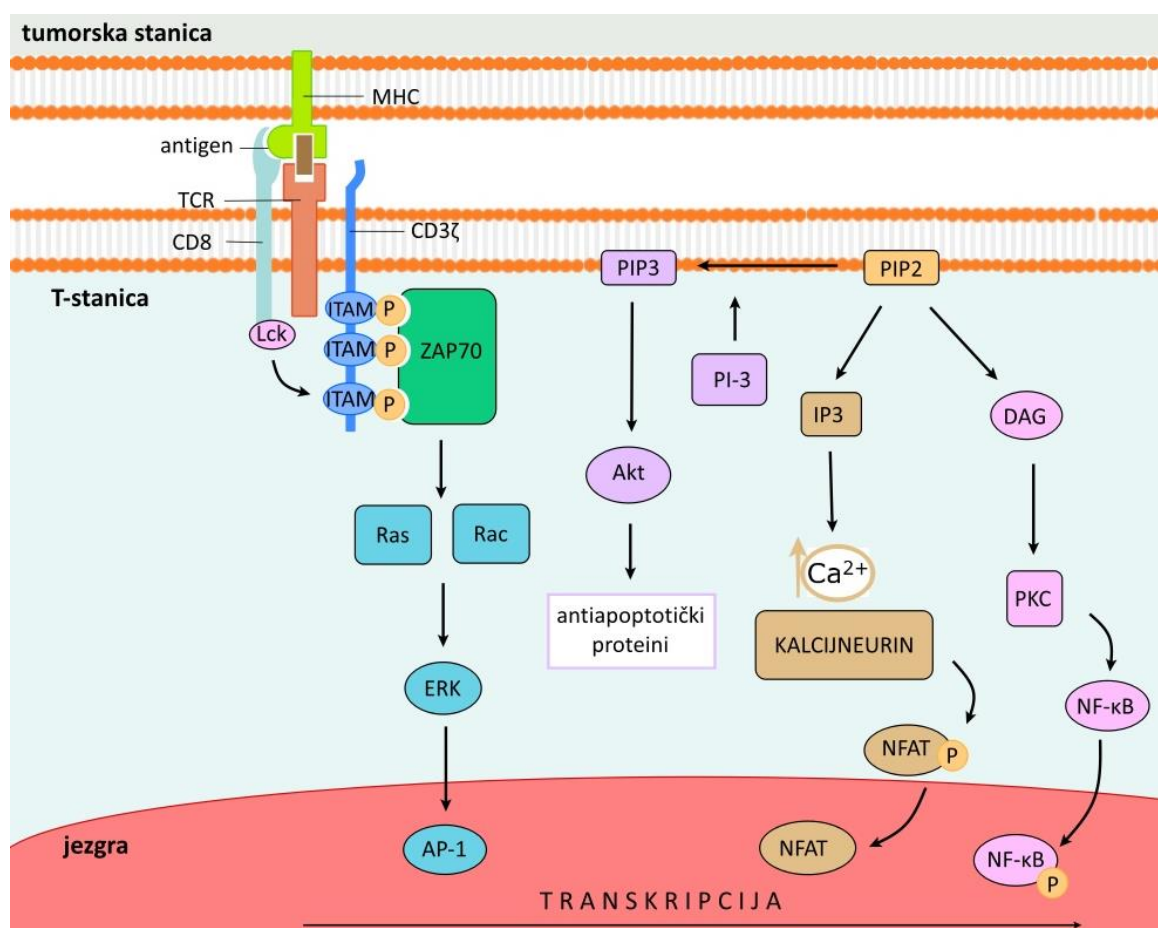
Interakciju T-stanice i antigen-prezentirajuće stanice učvršćuju adhezijske molekule, poput integrina, a glavni od njih je antigen povezan s funkcijom limfocita 1 (LFA-1, prema engl. *lymphocyte function associated antigen-1*). U procesu aktivacije T-stanica prepoznavanje samog antigena obično se naziva signal 1, ali za potpunu aktivaciju potreban je i signal 2. Stanice urođene imunosti nakon aktivacije postaju sposobne su pružiti kostimulaciju, tj. signal 2. Da bi se uopće razvio imunosni odgovor potrebna je kostimulacija koja dovodi do potpunog odgovora. Uloga kostimulacije je dodatno stimulirati T-stanice, a najbolje opisani T-stanični kostimulatori su B7 molekule. CD28 receptor na T-stanicama prepoznaje B7 molekule izražene na antigen-prezentirajućim stanicama i njihovo vezanje pokreće signale u T-stanici koji djeluju zajedno sa signalima prepoznavanja antigena. Stimulacija kostimulatorima osigurava aktivaciju stanica samo u slučaju produktivne imunosne reakcije i štiti od autoimunih djelovanja. Ipak, kostimulacija u tumorima nije dovoljno jaka zbog tumorske imunosupresije.



Slika 1. Usporedba građe i prepoznavanja antigena od strane TCR-a i CAR-a. TCR građen je od α i β lanca i aktivacijskih CD3 molekula (ξ , δ , γ , ζ). CAR građen je od scFv molekule te aktivacijskih (CD3 ζ) i kostimulacijskih (CD28/4-1BB) molekula.
Preuzeto iz June CH, Sadelain M. Chimeric Antigen Receptor Therapy. *N Engl J Med* 2018; 379: 64–73.

Aktivacijske signale u T-stanicama pokreće fosforilacija ITAM-a od strane limfocitno specifične protein tirozin kinaze (Lck, prema engl. *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) koju aktivira vezanje CD8 i MHC molekule (Slika 2.).⁷ Na fosforilirani ITAM veže se tirozin kinaza zvana ZAP-70 (prema engl. *zeta-associated protein of 70 kD*) koja se pritom aktivira. ZAP-70 potiče hidrolizu fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfata (PIP2) u staničnoj membrani na inozitol-1,4,5-trifosfat (IP3) koji povećava koncentraciju Ca^{2+} u citoplazmi što aktivira fosfatazu kalcijneurin. Kalcijneurin defosforilira transkripcijski nuklearni faktor aktiviranih T-stanica (NFAT, prema engl. *nuclear factor of activated T cells*) koji pokreće transkripciju faktora rasta T-stanica, interleukina 2 (IL-2). Drugi produkt hidrolize PIP2 proteina, diacilglicerol (DAG), aktivira protein kinazu C (PKC). Aktivirana PKC fosforilira transkripcijski nuklearni faktor- κB (NF- κB) koji u jezgri potiče transkripciju gena bitnih za aktivaciju. ZAP-70 aktivira Ras i Rac proteine koji aktiviraju izvanstaničnu signalno-reguliranu kinazu (ERK, prema engl. *extracellular signal-regulated kinase*). ERK potiče stvaranje transkripcijskog faktora aktivacijskog proteina 1 (AP-1, prema engl.

activating protein 1). Također, ZAP-70 aktivira fosfatidilinozitol-3 (PI-3) kinazu. PI-3 kinaza fosforilira PIP2 u fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat (PIP3) koji aktivira serin/treonin Akt kinazu. Ona stimulira ekspresiju antiapoptotičkih proteina i potiče preživljenje aktiviranih T-stanica.



Slika 2. Aktivacijski signalni putevi T-stanica. Fosforilacija ITAM-a pokreće signalne puteve kojima nastaju transkripcijski faktori za aktivacijske proteine poput IL-2.

Inhibicijske molekule T-stanica

Tumori inhibiraju imunosni odgovor izražajem liganada inhibicijskih receptora T-stanica, što predstavlja jedan od mehanizama imunosupresije. Inhibicijske molekule ograničavaju i prekidaju imunosne odgovore T-stanica. Dvije najvažnije inhibicijske molekule su protein 4 povezan sa citotoksičnim T-limfocitima (CTLA-4, prema engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4*), i protein programirane stanične smrti-1 (PD-1, prema engl. *programmed cell death-1*).⁷ Oba inhibicijska receptora

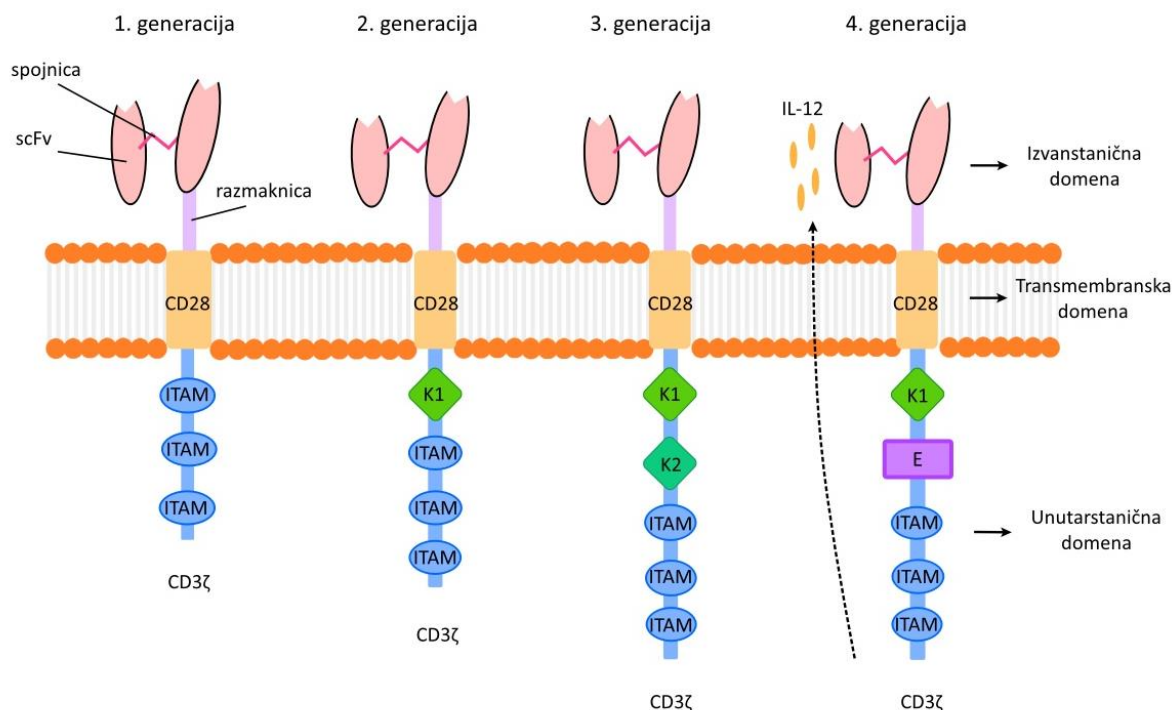
izražena su na aktiviranim T-stanicama. CTLA-4 veže se za B7 molekule, a PD-1 na ligand programirane stanične smrti-1 (PD-L1, prema engl. *programmed death ligand 1*) koji se nalazi na tumorskim i imunosupresivnim stanicama. Njihovim vezanjem dolazi do zaustavljanja T-stanične citotoksične funkcije.

Tumorski antigeni – mete CAR T-stanica

Potencijalne mete CAR-a su površinski antigeni, molekule proteina, ugljikohidrata ili glikolipida. Važno je da su ciljni antigeni prisutni samo na tumorskim stanicama kako bi potaknuli citotoksičnost T-stanica, a pritom ne bi došlo do neželjenog utjecaja na zdrava tkiva i organe. Dakle, idealna, učinkovita i sigurna antigenska meta trebala bi biti visoko zastupljena u tumorima i visoko specifična za tumore. Nažalost, idealna meta ne postoji, što se može vidjeti na primjeru CD19 antigena, korištenog u *Yescarta* terapiji. CD19 je izražen na B-stanicama tijekom svih razvojnih faza do diferencijacije u plazma stanice zbog čega je po zastupljenosti odličan odabir za liječenje B-staničnih tumora. U smislu specifičnosti, CD19 je loša meta jer se nalazi i na tumorskim i na zdravim B-stanicama što dovodi do dugoročne B-stanične aplazije.⁸

Građa kimeričnog receptora

Fuzijom pojedinih dijelova aktivacijskih i kostimulacijskih molekula i antigen-specifičnog jednolančanog varijabilnog fragmenta (scFv, prema engl. *single-chain variable fragment*) nastaje CAR koji prenosi signal slično TCR-u. Kimerični receptor se može podijeliti na izvanstaničnu, transmembransku i unutarstaničnu domenu (*Slika 3.*).



Slika 3. Razvoj građe CAR-a od prve do četvrte generacije. Prvu generaciju obilježava jednostavan dizajn sa jednom unutarstaničnom aktivacijskom jedinicom (ITAM). Drugoj generaciji dodana je jedna kostimulacijska jedinica (K1), a trećoj dvije (K1 i K2). Četvrta generacija građena je od aktivacijske (ITAM), kostimulacijske (K1) i ekspresijske jedinice za IL-12 (E).

Izvanstanična domena sastoji se od signalne antigen specifične regije i razmaknice. scFv služi kao antigen specifična komponenta koja provodi aktivacijski signal do unutarstanične domene. Sastoji se od varijabilnih dijelova lakog i teškog imunoglobulinskog lanca koji su povezani fleksibilnom spojnicom. Specifična scFv regija dobiva se iz antitijela miševa imuniziranih na željeni antigen, te se spojnicom spaja na ostale regije CAR-a.⁹ Dakle, CAR izgrađuju dijelovi mišjih i humanih molekula. Spojnica obično sadrži (Gly₄Ser)₃ slijed gdje glicin doprinosi fleksibilnosti, a serin topljivosti. Razmaknica, građena od dijelova CD28 ili IgG, povezuje izvanstanični dio receptora na transmembranski. Njene karakteristike mogu utjecati na funkciju i fleksibilnost receptora te prepoznavanje antigena. Razmaknica se može lako modulirati i prilagoditi prema ciljnim antigenima. U slučaju kraćih antigena bližih staničnoj membrani koriste se duže razmaknice i sl.^{10,11}

Transmembranska domena građena je od hidrofobnog alfa heliksa i određuje stabilnost receptora. Kao transmembranske domene koriste se CD28, CD3ζ, CD8a ili CD4 regije, a najbolje rezultate pokazuje uporaba CD28. Unutarstanična domena najvažniji je funkcionalni dio receptora. Najčešće korištena unutarstanična domena je CD3ζ koja sadrži tri ITAM-a koji pokreću aktivacijske signale stanica.^{10,11}

Poboljšanjem karakteristika kimeričnog receptora razvilo se četiri generacije receptora. Prva generacija receptora (*Slika 3.*) najjednostavnija je građom jer sadrži samo jednu aktivacijsku jedinicu, CD3ζ.

Transmembranska domena prve generacije receptora građena je od CD3, CD8 ili CD28 koji pružaju optimalnu aktivaciju stanica interakcijom s izvanstaničnom komponentom. Ovakva struktura dovoljna je za pokretanje fosfatidilinozitol i tirozin kinaznog puta i unosa kalcija u stanicu. Ipak, stanice prve generacije receptora imaju nepotpune aktivacijske signale zbog čega su sklone anergiji, odnosno stanju funkcionalne inaktivacije pri čemu više ne reagiraju na stimulaciju. Osim toga, CD3ζ sam po sebi nije dovoljan za stvaranje dovoljno IL-2 već je potrebna i kostimulacijska signalizacija, pa je za uspješnu staničnu funkciju potreban egzogeni IL-2.^{5,10}

Druga generacija receptora (*Slika 3.*) ima aktivacijsku (signal 1) i kostimulacijsku (signal 2) jedinicu koje omogućuju CAR T-stanicama ekspanziju jednaku onoj T-stanica periferne krvi. Uz aktivacijski CD3ζ, citoplazmatskoj domeni receptora dodana je kostimulacija koju pružaju CD28, 4-1BB, DAP10, OX40 ili ICOS molekule. Dvostruku signalizaciju druge generacije obilježava jače provođenje signala i veći ukupni potencijal. Uz to, kostimulacija potiče sintezu IL-2 koji sudjeluje u aktivaciji i čuva T-stanice od apoptoze.^{5,10} Kostimulacijske jedinice odobrenih CAR T-terapija građene su od CD28 i 4-1BB, a komparativne studije ispitale su utjecaje tih molekula na ishod terapije. 4-1BB dovodi do rasta CD8 centralnih memorijskih stanica, a CD28 razvoju efektorskih memorijskih stanica. Drugim riječima, 4-1BB je bolji za slučajeve kod

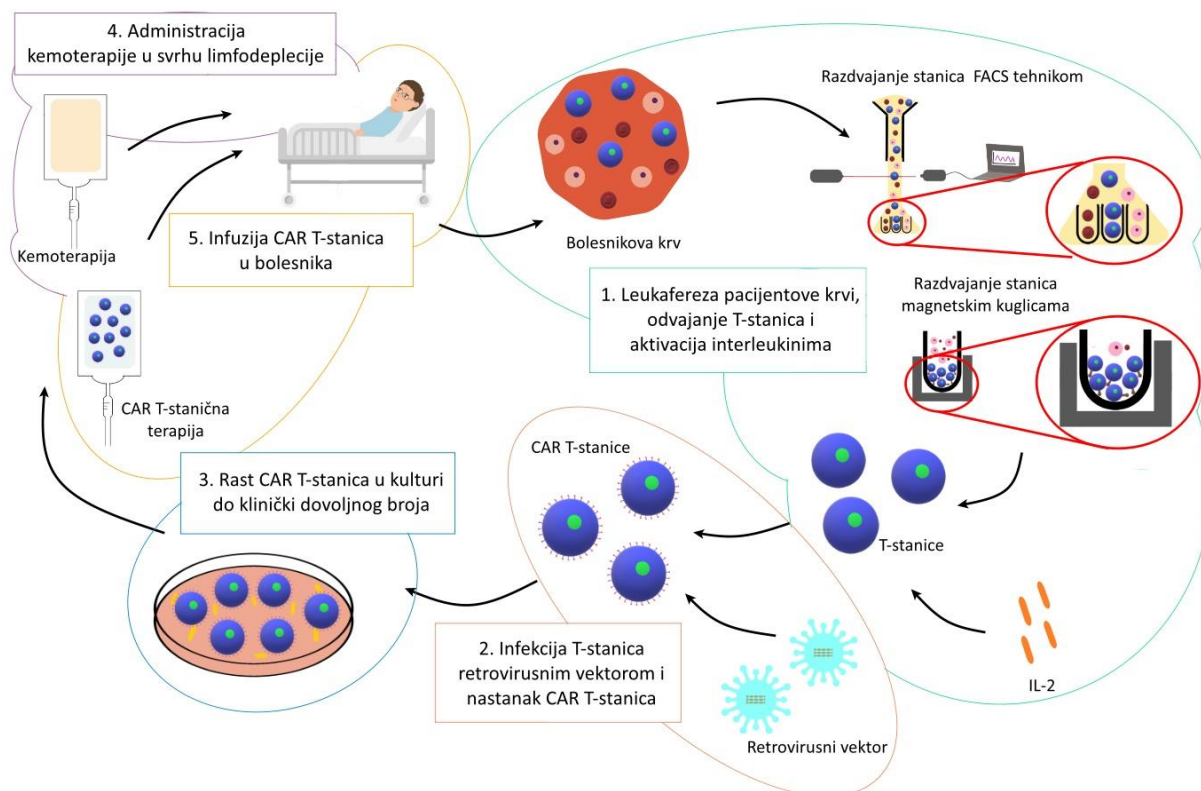
kojih je poželjna produžena funkcija, a CD28 kada je potrebna brza reakcija.¹¹

Kombinacijom aktivacijskih i kostimulacijskih jedinica stvorena je treća generacija CAR-a (*Slika 3.*) čiji je cilj povećanje proizvodnje citokina i sposobnosti ubijanja. Malobrojne kliničke studije nisu pokazale značajan napredak u odnosu na drugu generaciju, ali nužna su daljnja ispitivanja.¹⁰ Dodavanjem ekspresijske jedinice za IL-12 na osnovnu građu receptora druge generacije stvorene su T-stanice preusmjerene za citokinima posredovano ubijanje (nazvane TRUCK, *prema engl. T-cell redirected for universal cytokine-mediated killing*)^{3,12} (*Slika 3.*). Sposobne su izlučivati IL-12 koji im pomaže smanjiti utjecaj tumorskog mikrokoliša jer poboljšava proliferaciju i citotoksične sposobnosti stanica te aktivira ostale imunosne stanice. Klinička studija je pokazala da TRUCK stanice smanjuju aktivnost tumorskih makrofaga i imunosupresivnu inhibiciju preko PDL-1. Povećanje proliferacije i citotoksičnosti stanica te smanjenje apoptoze potiču na daljnju optimizaciju i poboljšanje dizajna CAR-a što im može proširiti mogućnosti i primjenu.³

Izrada CAR T-stanica

Proces izrade CAR T-stanica sadrži više kompleksnih koraka. Cijela izrada traje 2-4 tjedna, a započinje sakupljanjem T-stanica iz bolesnikove krvi leukaferезom (*Slika 4.*).^{10,13} Populacija T-stanica sastoji se od više podtipova stanica koje se razlikuju funkcionalno i fenotipski. Osnovne grupe T-stanica su CD8 i CD4 koje mogu biti naivne, centralne, efektorske i memorijske stanice. Različite stanice drugačije doprinose tijeku terapije. Naivne stanice i centralne memorijske stanice pokazuju povećanu sposobnost proliferacije u odnosu na efektorske.¹³ S druge strane, centralne i matične memorijske stanice imaju uspješnije *in vivo* rezultate. Stanice s najvećim citotoksičnim potencijalom su CD8, a primjena određenih omjera CD4:CD8 stanica povećava antitumorski efekt

zahvaljujući pomoćničkoj ulozi CD4 stanica. Općenito, sve T-stanice dobivene leukaferezom koriste se za terapiju.^{11,13}



Slika 4. Koraci izrade CAR T-stanica. Stanice bolesnikove krvi mogu se razdvajati protočnom citometrijom na temelju fluorescencije (FACS) ili magnetskim kuglicama. Nakon aktivacije interleukinima (IL-2) i rekombinacijom retrovirusnim vektorom, CAR T-stanice rastu u kulturi. Kemoterapija smanjuje broj limfocita, pa CAR T-stanice imaju slobodan pristup proliferirajućim citokinima.

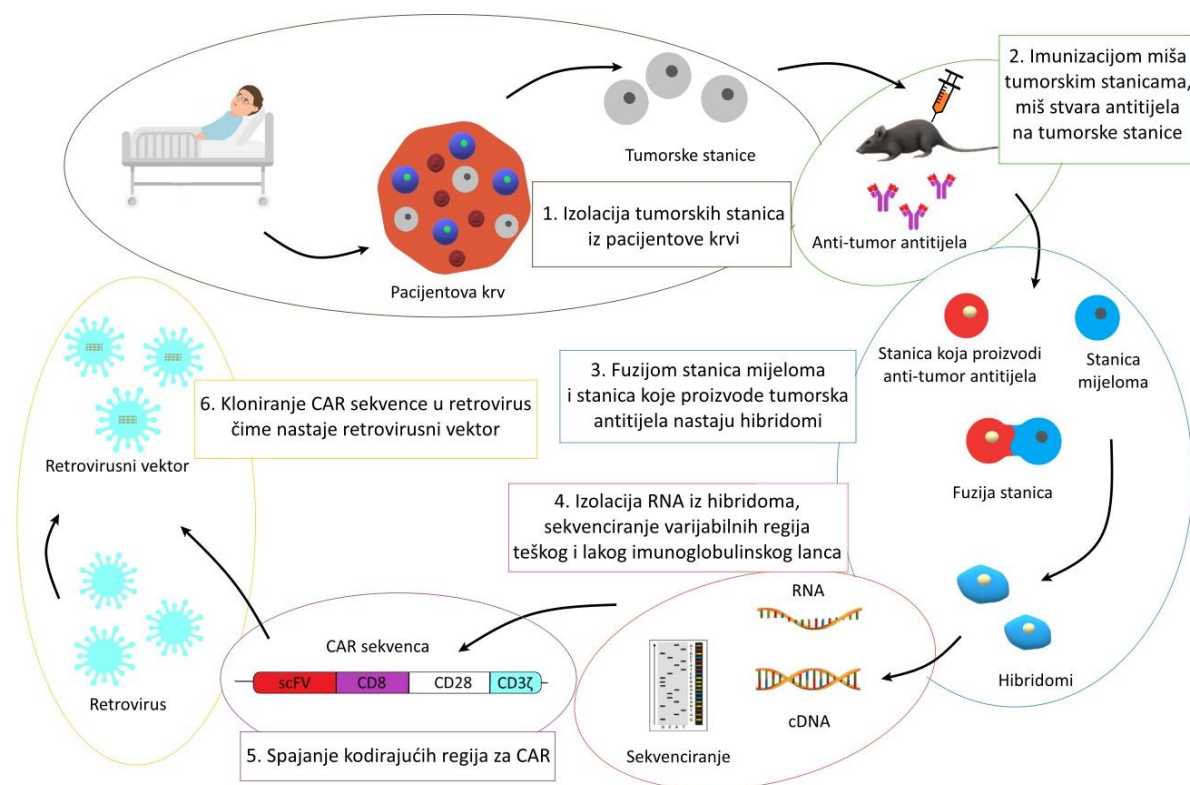
Slijedi ispiranje prikupljenih stanica i probir CD4 i CD8 stanica korištenjem markera ili antitijela. Odvajanje stanica korištenjem magnetskog polja odvija se tako da se na stanice vežu anti-CD4 i anti-CD8 antitijela s magnetskim kuglicama i primjenom magnetskog polja dolazi do odvajanja obilježenih stanica od ostalih (*Slika 4.*). Alternativni postupak separacije je i sortiranje stanica na temelju fluorescentnog signala (FACS, prema engl. *fluorescence-activated cell sorting*) (*Slika 4.*). Pritom se fluorescentna antitijela anti-CD4 i anti-CD8 vežu za stanice te se stanice sortiraju na temelju površinskih markera.^{14,15}

Probrane CD8 i CD4 T stanice se zatim aktiviraju autolognim antigen-prezentirajućim stanicama, anti-CD3 i anti-CD28 antitijelima i faktorima rasta poput IL-2.¹⁰ IL-2 potiče proliferaciju T-stanica i održava njihovo preživljenje. Osim IL-2, koriste se i drugi citokini za poboljšanje T-stanične proliferacije, opstanka i funkcije. Ekspanzija stanica s IL-7, IL-15 i IL-21 rezultira boljim antitumorskim funkcijama.¹¹ IL-7 potiče preživljenje naivnih i memorijskih stanica, dok IL-15 pozitivno utječe na preživljenje i proliferaciju CD8 memorijskih stanica koje imaju glavni citotoksični učinak.⁷ Razvoj pomoćničkih T-limfocita potiče IL-21. Veći kapacitet *in vivo* preživljavanja imaju stanice tretirane s IL-7 i IL-15 za razliku od onih tretiranih s IL-2 zbog većeg pozitivnog utjecaja na opstanak stanica.¹¹

Umnožene i aktivirane T-stanice se potom genetski modificiraju vektorom za CAR koji može biti virusni ili ne-virusni. Najviše se primjenjuju virusni vektori zbog velike učinkovitosti prijenosa i raznolikosti virusa pa tako i samih vektora. Također, većina virusa lako poprima gene stanica stoga su povoljni za stvaranje zaraznih virusnih vektora. Od virusnih, najčešće se koriste retrovirusni, lentivirusni i adenovirusni vektori.¹⁰

Wang i suradnici testirali su potencijal retrovirusnog vektora u transduciranju stanica s ciljem stvaranja CAR za B-stanične leukemije.⁹ (Slika 5.) Miševе su imunizirali stanicama kronične mijeloidne leukemije (CML, prema engl. *chronic myeloid leukemia*) kako bi razvili anti-CML antitijela. Iz žrtvovanih miševa su izvadili slezenu i njene stanice iskoristili za izradu hibridoma. Fuzijom stanica slezene i stanica mijeloma stvoreni su hibridomi. Nakon 28 dana hibridome i antitijela koje proizvode testirali su na specifičnost. Pokazalo se da se antitijela uspješno vežu na stanice CML, ali ne na zdrave stanice. Izolirali su ukupnu RNA iz anti-CML hibridoma i reverzno je prepisali u cDNA. Varijabilne regije teškog i lakog lanca anti-CML antitijela su amplificirali i sekvencirali. Zamjenom humane scFv regije sa mišjom iz anti-CML antitijela te spajanjem dijelova humanih CD8, CD28 i CD3ζ molekula, stvorena je sekvenca CAR-a. Ona je klonirana u retrovirusni vektor, koji je potom iskorišten za infekciju mišjih

embrionalnih fibroblasta. Uspješnu ekspresiju kimeričnog receptora na mišjim fibroblastima potvrdili su antitijelima specifičnim za humani CD3 ζ lanac. Njihovi rezultati upućuju na efikasnost retrovirusne transdukcije koja je razlog česte primjene ovog vektora.



Slika 5. Koraci izrade retrovirusnog vektora. Izoliranim tumorskim stanicama imuniziraju se miševi kako bi stvorili antitijela na tumorske stanice. Fuzijom stanica koje proizvode antitijela na tumorske stanice i mijeloma nastaju hibridomi čija RNA služi za određivanje specifične scFv regije. Spojene kodirajuće regije za CAR kloniraju se u retrovirus što daje retrovirusni vektor.

Završni koraci pripreme stanica su ispiranje neinkorporiranih vektora te daljnji uzgoj stanica do klinički dovoljnog broja za transfuziju u bolesnika (Slika 4.).¹⁰ Prije infuzije CAR T-stanica, bolesniku se daju sredstva za limfodepleciju poput ciklofosfamida i fludarabina.¹³ Time se smanjuje nadmetanje za citokine sa stanicama bolesnika i aktivnost regulatornih stanica, ali i stvara okolina pogodna za *in vivo* proliferaciju CAR T-stanica. Bolesnici primaju 0,2-0,5 $\times 10^6$ CAR T-stanica po kilogramu, odnosno 0,1-2,5 $\times 10^8$ CAR T-stanica po infuziji.¹⁶

Mehanizam ubijanja tumorskih stanica

In vivo proliferacija i migracija CAR T-stanica

CAR T-stanice, vraćene u krvotok bolesnika, podliježu proliferaciji i ekspanziji. Stanice se dijele potaknute aktivacijskim i kostimulacijskim signalima. Njihov broj se brzo povećava te nastaje velik broj specifičnih klonova efektorskih stanica koje napadaju tumore.¹³ Ipak, proliferacija je ponekad zaustavljena zbog imunosupresije. Kako bi se to izbjeglo, u CAR T-stanicama može se potaknuti ekspresija ili modificirati Akt kinazni put. Također, CAR s 4-1BB kostimulacijskom jedinicom pruža veće preživljenje i opstanak stanica u krvotoku.¹³

Vezanjem za kemokine koje ispuštaju tumori CAR T-stanice su usmjerene prema tumorskim stanicama.¹³ Neki od kemokina koji usmjeravaju stanice prema tumorima su CXCL2, CCL4, CCL2 i CXCL1, a vežu se za pripadajuće receptore na T-stanicama (CXCR2, CCR4, CCR2, CXCR1).¹¹ Migracija stanica u tumorsko područje započinje vezanjem za selektine na endotelnim stanicama što dovodi do kotrljanja stanica po endotelu.⁷ Vezanje kemokina za receptore povećava afinitet integrina LFA-1 stanice za ligande na endotelu pa je stanica čvrsto vezana za endotel. Dijapedezom, provlačenjem između stanica endotela, stanice dopijevaju u tumorsko područje. Modulacijom CAR T-stanica da prezentiraju receptore za tumorske kemokine može se poboljšati njihova sposobnost migracije, pa time i protutumorski učinak.¹³

Imunosna sinapsa

Nakon specifičnog prepoznavanja antigena, T-stanice stvaraju imunosnu sinapsu (IS) koja omogućava ubijanje ciljnih stanica.⁴ Imunosna sinapsa sastoji se od koncentričnih prstenova supramolekularnih aktivacijskih klastera (SMAC, prema engl. *supramolecular activating clusters*), visoko organiziranih struktura s posebnim funkcijama. Središnji SMAC (cSMAC, prema engl. *central SMAC*), kojeg čine TCR i Lck, odgovoran je za akumulaciju aktivacijskih signala i ubijanje ciljne stanice

dostavom citotoksičnih molekula. Periferni SMAC (pSMAC, prema engl. *peripheral SMAC*) okružuje središnji i stabilizira imunsku sinapsu pomoću adhezijskih molekula poput LFA-1. Agregacija aktina u distalnom SMAC-u (dSMAC, prema engl. *distal SMAC*) upotpunjuje strukturu imune sinapse.

Podjela citotoksičnih učinaka

Pretpostavlja se da je liza i smrt stanica posredovana perforinima i granzimima glavni mehanizam CAR T-stanične citotoksičnosti.⁴ Citotoksične granule ispunjene perforinima i granzimima dostavljaju se do ciljne stanice usidrene na mikrotubule CAR T-stanica (*Slika 6.*). Fuzijom sa staničnom membranom u području cSMAC-a granule otpuštaju svoj sadržaj u sinaptičku pukotinu. Djelovanjem perforina stvaraju se pore u ciljnoj stanici kroz koje je omogućen ulazak granzima. Granzimi su pro-apoptotske molekule koje induciraju o kaspazama ovisnu i neovisnu smrt ciljne stanice. Ovaj mehanizam je brz, učinkovit i specifičan te se može odviti bez stimulacije od strane dodatnih receptora i molekula.

Tumorske stanice posjeduju mehanizme obrane od napada imunskih stanica.⁴ Obrana ciljne stanice od perforina i granzima uključuje egtazinsku kiselinu (EGTA), kelator kalcija, koja blokira otpuštanje perforina iz granula. Neuspjela apoptoza perforinima i granzimima produžuje trajanje imune sinapse. Produžena sinapsa može dovesti do stvaranja upalnih citokina, kao što je IL-6, koji aktivira naivne makrofage, ali taj proces nije sasvim utvrđen u CAR T-staničnoj sinapsi. Prekid sinapse između stanica ovisan je o smrti ciljne stanice i o kaspazi ovisnom signalu za odvajanje.

U slučaju neuspjele citotoksičnosti perforinima i granzimima, stanicama pomažu drugi mehanizmi, poput Fas liganda, koji će potaknuti lizu ciljne stanice.⁴ Receptor smrti Fas prisutan je na površini mnogih stanica, pa tako i tumorskih, dok Fas ligand (FasL) prezentiraju aktivirane T-stanice (*Slika 6.*).⁴ Antigen-neovisan Fas-FasL put aktivira se trimerizacijom receptora i liganda, što pokreće o kaspazama ovisnu smrt ciljne stanice.

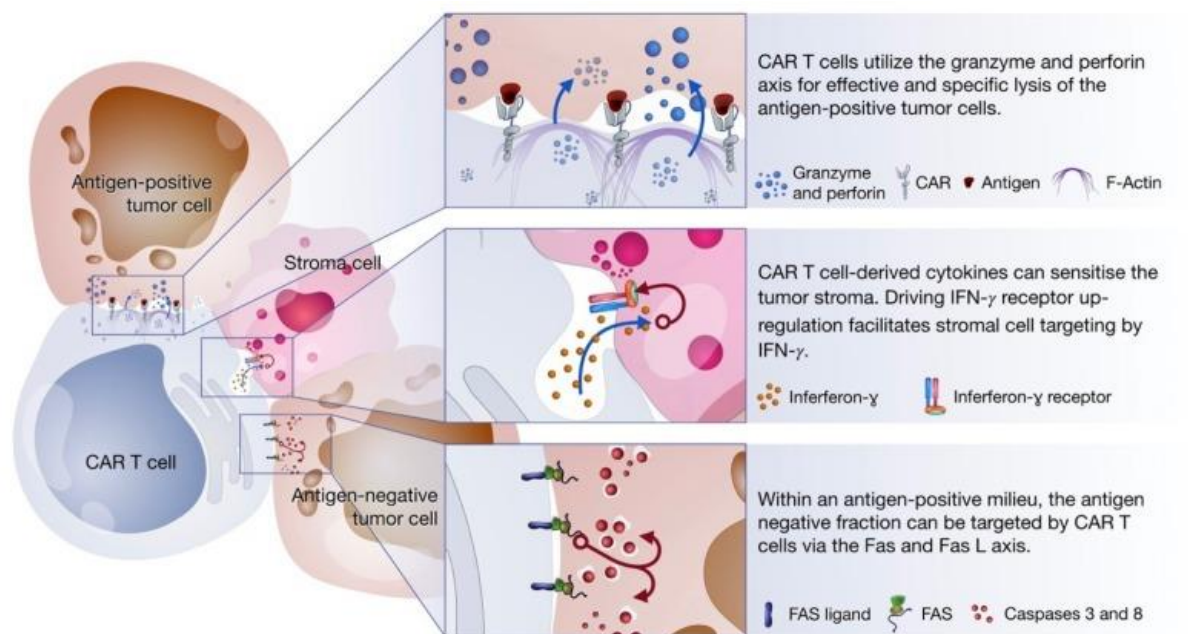
Ovaj mehanizam citotoksičnosti javlja se nakon aktivacije CAR T-stanica prepoznavanjem antigena što potiče izražaj FasL-a.

Fas molekule na tumorskim stanicama pozitivno doprinose CAR T-staničnoj citotoksičnosti. Također, pokazalo se da kombinacija degranulacije i Fas-FasL puta ima sinergistički učinak prilikom CAR T-stanične lize tumorskih stanica.⁴ Sinergija bi mogla biti ključna za postizanje stabilne i dugoročne CAR T-stanične kontrole tumora. Osim toga, Fas-FasL put mogao bi biti koristan kod komplikacija u liječenju kada je citotoksičnost perforinima i granzimima neuspješna ili je došlo do relapsa bolesti zbog gubitka specifičnih antigena, pošto ne zahtjeva specifično prepoznavanje antigena za pokretanje citotoksičnosti.⁴

Protutumorski učinak može se poboljšati i citokinima aktivacijom sekundarnih mehanizama.⁴ Djelovanjem na stromu tumora (*Slika 6.*), citokini potiču ekspresiju interferon gama receptora (IFN- γ) što potiče imuni odgovor ostalih stanica, kao što su makrofagi i prirodne stanice ubojice (NK, prema engl. *natural killer cell*). Mehanizam aktivacije ostalih imunih stanica ima pomoćničku ulogu u CAR T-staničnom ubijanju tumora.

TRUCK stanice četvrte generacije receptora rade na principu dostave i akumulacije citokina u tumorskom okolišu.⁴ Takvo ispuštanje citokina je kontrolirano i usmjereno na područje tumorskih stanica čime se zaobilaze nedostaci sistemske dostave. Ispuštanje citokina iz TRUCK stanica, najčešće IL-12, odvija se istovremeno sa specifičnim prepoznavanjem tumorskih antigena. Citokin IL-12 ima više funkcija koje zajedno poboljšavaju CAR T-staničnu citotoksičnost, a neke od njih su aktivacija stanica urođene imunosti i reprogramiranje imunosupresivnih stanica.

S obzirom da je tumorska imunosupresija bazirana na smanjenu ekspresije tumorskih antigena i protuupalnim citokinima, pomoćni mehanizmi ubijanja tumorskih stanica su od velike važnosti.⁴ Fas antigen-neovisnim receptorom smrti zaobilazi se nedostatak tumorskih antigena, a dostava citokina poziva u pomoć stanice urođene imunosti.



Slika 6. Vrste citotoksičnih učinaka CAR T-stanica. 1) Dostava perforina i granzima u sinaptičku pukotinu, 2) ispuštanje citokina i njihov učinak na stromalne stanice, 3) antigen-neovisno Fas-FasL djelovanje.

Preuzeto iz Benmeharek M-R, Karches C, Cadilha B, Lesch S, Endres S, Kobold S. Killing Mechanisms of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 1283.

Primjena terapije

Najpoznatiji pedijatrijski bolesnik koji je primio CAR T-staničnu terapiju bila je Emily Whitehead, tada 6-godišnjakinja s akutnom limfoidnom leukemijom.³ Sudjelovala je u prvoj fazi kliničkih istraživanja CAR T-stanične terapije. Zahvaljujući terapiji, Emily je već 8 godina bez leukemije. Njen slučaj primjer je učinkovitosti CAR T-stanične terapije, ali nije jedini. Uspješnost CAR T-stanične terapije u kliničkim istraživanjima je čak do 94% u teškim oblicima B-staničnih leukemija.¹⁷ Učinkovitost Kymriah terapije ispitana je u studiji sa 63 bolesnika od kojih je 83% imalo potpuni odgovor na terapiju. U sličnoj studiji, nakon primljene terapije, 90% bolesnika je preživjelo duže od godinu dana, a 43% je imalo potpuni odgovor. Učinkovitost Yescarte u jednoj studiji pokazala je ukupnu stopu remisije od 72%, potpuni odgovor imalo je 51% bolesnika, a djelomičnu remisiju 21%. Nažalost, liječenje leukemija vrlo je skupo. Trošak liječenja bolesnika s kroničnim leukemijama u SAD-u procjenjuje se na cjeloživotni trošak od \$604000 po osobi.¹⁷ Troškovi CAR T-stanične terapije nešto su niži, ali i dalje izrazito skupi, sa cijenom od \$475000 za Kymriah i \$373000 za Yescartu po bolesniku.^{17,18} Iako postoje odobrene terapije, još uvijek nema optimalnog modela postupanja s osobama koje primaju CAR T-staničnu terapiju. Stoga su Hayden i suradnici napravili međunarodno istraživanje i sakupili informacije o načinima postupanja i rezultatima liječenja u klinikama gdje se provodi liječenje CAR T-staničnom terapijom.⁶ Njihov pregled sadrži mišljenja liječnika s iskustvom rada s CAR T-staničnom terapijom o trenutnim postupanjima i pristupu osobama koje primaju terapiju.

Kriteriji za terapiju

Svi bolesnici s B-staničnim leukemijama i limfomima ne mogu primiti terapiju, a o tome odlučuju parametri poput dobi, povijesti bolesti, pratećih bolesti i leukaferenze.⁶ Većina sudionika istraživanja smatra da ne treba postojati gornja dobna granica za terapiju, dok dio smatra da bi ona trebala biti između 65-75 godina starosti.⁶ Učinkovitost terapije povezana

je s dobi. Donja dobna granica za terapiju ne postoji za većinu sudionika, dok nekolicina njih smatra da bi ona trebala biti između 2-3 godine starosti. Također, većina je izjavila da ne može dati mišljenje o dobnoj granici zbog općenite složenosti određivanja dobne granice za bilo koju terapiju.

Ukoliko bolesnik ima povijest malignih bolesti trebao bi biti zdrav i bez terapije najmanje tri godine kako bi mogao primiti CAR T-staničnu terapiju.⁶ Isključujući kriterij smatra se imunosupresija koja je u tijeku te prisutnost bilo kojeg oblika infekcije. Zbog toga bolesnici s HIV-om ili hepatitisom ne mogu primiti CAR T-staničnu terapiju. Također, osobe s hipoksemijom i bolesti središnjeg živčanog sustava neće primiti terapiju. Bolesnici sa srčanim bolestima ne mogu pristupiti leukaferezi, a da bi se terapija mogla odvijati leukaferezom je potrebno sakupiti najmanje $0,1 \times 10^9$ limfocita/L.

Nedostaci CAR T-stanične terapije

Nuspojave

Sindrom oslobađanja citokina

CAR T-stanična terapija svojim djelovanjem u tijelu bolesnika dovodi do razvoja nuspojava. Jedan od štetnih učinaka je sindrom oslobađanja citokina (CRS, prema engl. *cytokine release syndrome*).¹⁹ CRS je upalni sindrom kojeg uzrokuju citokini koje otpuštaju CAR T-stanice i ostale stanice koje sudjeluju u ubijanju tumora. Neki od citokina koji dovode do razvoja CRS-a su IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 i drugi. Znakovi CRS-a se javljaju u prvih 14 dana nakon infuzije i obično se nakon sedam dana smanjuju bez liječničke intervencije. Kao prvi simptom CRS-a javlja se vrućica koja se može pojaviti prvog dana infuzije terapije ili najkasnije devetog dana nakon infuzije.¹⁹ Uz vrućicu javlja se i tahikardija i hipotenzija. Bolesnici mogu biti hipoksični zbog nastanka plućnog edema uzrokovanog povišenom razinom citokina u cirkulaciji. Ukoliko dođe do zatajenja disanja, bolesnicima se daje mehanička ventilacija. Drugi simptomi koji se mogu pojaviti su glavobolja i umor.

Ostali štetni utjecaji

CAR T-stanice mogu štetno utjecati i na više unutrašnjih organa.¹⁹ Uzrokuju povećanje jetrenih enzima i bilirubina. Pojavljuje se i bubrežna insuficijencija, a težim slučajevima potrebna je hemodijaliza. Također, može doći i do neravnoteže elektrolita u obliku hiponatrijemije, hipokalijemije i hipofosfatemije. Osim toga, CAR T-stanična terapija ima utjecaj i na mišiće te dovodi do upalnog oštećenja mišića. Iako su u većini slučajeva organska oštećenja reverzibilna, važno je pratiti funkciju organa bolesnika tijekom terapije.

Primjena kemoterapije prije infuzije CAR T-stanica uzrokuje anemiju, trombocitopeniju i neutropeniju.¹⁹ S obzirom da anti-CD19 CAR T-stanice napadaju i zdrave B-stanice, uobičajena je pojava B-stanične aplazije. Kao nadoknada za B-staničnu aplaziju bolesnicima se intravenozno daju

imunoglobulini. Nažalost, hematološki poremećaji ponekad su uzrok smrti bolesnika.

Neurološki učinci CAR T-stanica skupno se nazivaju sindrom encefalopatije povezan s CAR T-stanicama (CRES, prema engl. *CAR T-cell related encephalopathy syndrome*).¹⁹ CRES se može javiti zajedno sa simptomima CRS-a, ali to nije pravilo. Vrijeme pojave neuroloških simptoma varira pa se oni mogu javiti dan nakon infuzije stanica ili čak nekoliko tjedana nakon infuzije. Neurološki učinci su razni i nisu lokalizirani na jedno područje središnjeg živčanog sustava. Neki od simptoma koje pacijenti mogu imati su delirij, halucinacije, kognitivni nedostaci, drhtanje, motorni i senzorni problemi te akutni napadaji. Manji dio bolesnika umire zbog nastanka moždanog edema.

Zbog oslabljenog imunosnog sustava utjecajem kemoterapije, bolesnici su skloni virusnim, bakterijskim i gljivičnim infekcijama.¹⁹ Bolesnici koji imaju teže CRS simptome imaju veći rizik za razvoj infekcije. Teški oblici infekcija mogu biti uzrok smrti bolesnika.

Utjecaji na toksičnost terapije

Pojedini čimbenici CAR T-stanične terapije mogu dovesti do razvoja slabijih ili težih oblika nuspojava. Veća doza CAR T-stanica i kemoterapija fludarabinom povezana je s razvojem težeg oblika CRS-a i neuroloških simptoma.¹⁹ Dolazi do ispuštanja većeg broja citokina pa je i CRS teži. Pacijenti sa težim oblikom bolesti u koštanoj srži mogu razviti teški oblik CRS-a i CRES-a. Kod takvih slučajeva bolesnicima se daju niže doze CAR T-stanica koje neće ugroziti učinkovitost terapije. Naime, teži oblici tumora mogu pružiti jaču stimulaciju antigenima koja je dovoljna za jednaku učinkovitost terapije bez obzira na dozu. Teški oblik neurološke toksičnosti uzrokuju povećane razine citokina i proteina cerebrospinalne tekućine (CSF, prema engl. *cerebrospinal fluid*) te povećane razine citokina u CSF-u u odnosu na razinu u krvi.¹⁹ Razlog tomu je sposobnost CAR T-stanica da prelaze krvno-moždanu barijeru i tako mogu povećati

razinu citokina u CSF-u. Uz to, struktura CAR-a može utjecati na težinu nuspojava. CAR sa CD28 kostimulacijskom jedinicom dovodi do ranije pojave CRS-a, za razliku od onih sa 4-1BB kostimulacijskom jedinicom.¹⁹ Moždani edem pojavljuje se u terapiji s CAR koji sadrže 4-1BB kostimulacijsku jedinicu. Također, CAR T-stanice sa CD28 razmaknicom i transmembranskom domenom pojačano proizvode citokine što može rezultirati težim nuspojavama.

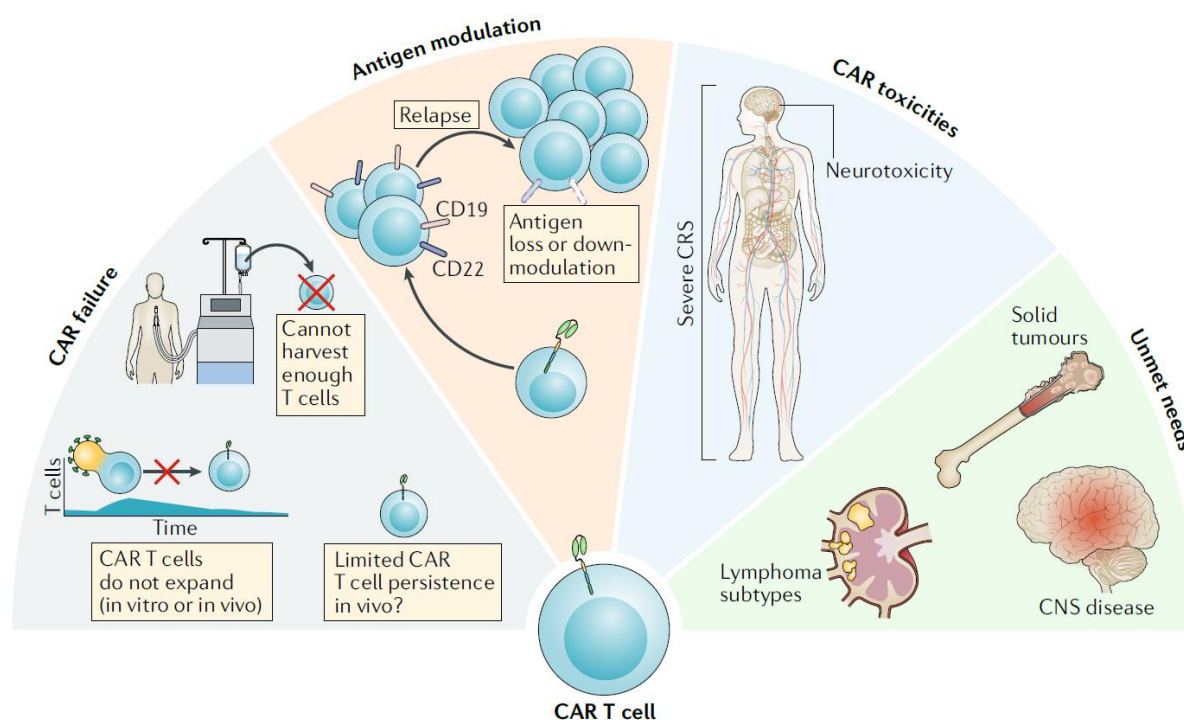
Liječenje nuspojava

Najčešće nuspojave uključuju infekcije te oštećenja pluća, kardiovaskularnog i živčanog sustava.¹⁹ Terapija za bolesnike koji imaju nuspojave CAR T-stanične terapije općenito uključuje transfuziju, vazokonstriktore po potrebi, faktore rasta, nadoknadu elektrolita i terapiju antibiotikom širokog spektra.

Za smanjenje nuspojava koriste se imunosupresivni lijekovi.¹⁹ Srednji do teški oblik CRS-a liječi se tocilizumabom, anti-IL-6 antitijelom, antagonistom receptora za IL-6. Tocilizumab je u mnogim slučajevima pokazao brzo i potpuno smanjenje nuspojava. Primjena tocilizumaba može imati i neželjene učinke poput citopenija i infekcija te težih oblika neurotoksičnosti.¹⁹ Pojedini teški slučajevi CRS-a zahtijevaju liječenje kortikosteroidima uz tocilizumab. Iako su kortikosteroidi učinkoviti u rješavanju CRS-a, obično su rezervna terapija, ukoliko tocilizumab nema učinka, jer imunosupresivnim djelovanjem mogu smanjiti učinkovitost CAR T-stanica. Neurološke nuspojave CAR T-stanične terapije uspješno se liječe kortikosteroidima.¹⁹ Bolesnicima s akutnim napadom intravenozno se administrira deksametazon. Tocilizumab nije učinkovit u slučaju neurotoksičnosti zbog slabe sposobnosti prelaska krvno-moždane barijere i ulaska u središnji živčani sustav. Administracija imunosupresivnih lijekova se nastavlja sve dok je bolesnik u životnoj opasnosti i dok se nuspojave ne smanje.

Prepreke do dugoročne remisije

Uzroci neuspjele CAR T-stanične terapije mogu biti razni te se mogu svrstati u nekoliko grupa.¹⁶ Na Slici 7. sažet je prikaz potencijalnih prepreka učinkovitoj terapiji.



Slika 7. Prepreke CAR T-stanične terapije do dugoročne remisije. Nedovoljan broj prikupljenih stanica leukaforezom i slaba ekspanzija i postojanost dovode do neuspjele izrade CAR T-stanica. Mehanizam otpornosti na terapiju je promjena antigena kojom se smanjuje ili potpuno gubi izražaj ciljnog tumorskog antigena. Nuspojave CAR T-stanične terapije mogu biti pogubne za pojedine pacijente. CAR T-stanična terapija nije jednako djelotvorna i primjenjiva na ostale bolesti poput podtipova limfoma, solidnih tumora i tumora središnjeg živčanog sustava. Preuzeto iz Shah NN, Fry TJ. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2019; 16: 372–385.

Neuspjeli proces izrade CAR T-stanica prvi je potencijalni razlog neuspjele terapije.¹⁶ Nedovoljan broj T-stanica skupljenih iz periferne krvi za izradu terapije javlja se kada je bolesniku administrirana kemoterapija ili drugi citotoksični lijekovi prije leukaforeze. Slabiji stupanj ekspanzije tijekom izrade CAR T-stanica i omjer CD4 i CD8 stanica može utjecati na konačni ishod terapije. Vrsta vektora kojim se reprogramiraju T-stanice u CAR T-stanice određuje učinkovitost prijenosa gena, ali ima ulogu i u učinkovitosti terapije premda ti aspekti nisu sasvim utvrđeni. Također,

građa CAR utječe na *in vivo* proliferaciju i ekspanziju CAR T-stanica. Administracija terapije ponekad se ne može ostvariti pravovremeno, prije nego pacijenti razviju komplikacije kada im se terapija ne može administrirati.

Mutacija tumora i promjene antigena dovode do ponovne pojave bolesti.¹⁶ Povratak bolesti može biti antigen-pozitivan kada tumor izražava isti ciljni antigen kao i u prethodnoj pojavi bolesti. Antigen-pozitivan povratak bolesti javlja se zbog smanjenja CAR T-stanične kontrole nad tumorom. Može se liječiti ponovnom infuzijom CAR T-stanica, ali ona nema dobre rezultate liječenja. Modulacija ili gubitak izražaja ciljnog antigena je mehanizam izbjegavanja imunosnih stanica kojim tumori postaju "nevidljivi" i mogu dalje nesmetano rasti. Alternativnim splicingom nastaju izoforme ciljnog antigena sa izmijenjenim specifičnim dijelom ili smanjenim izražajem. Potpuni gubitak izražaja antigena nije nužan za smanjenje učinkovitosti terapije već je dovoljan smanjeni izražaj antigena. Pretpostavlja se da je potrebna minimalna vrijednost izražaja antigena kako bi terapija bila djelotvorna. Jedan od mehanizama izbjegavanja imunosnih stanica je i tzv. linijsko prebacivanje. Pojavljuje se u višelinijskim leukemijama gdje dolazi do prelaska iz mijeloidne u limfoidnu i obratno.

Važno je napomenuti da se do sada CAR T-stanična terapija pokazala se učinkovitom u liječenju B-staničnih leukemija, ali to nije slučaj s ostalim tumorima.¹⁶ Solidni tumori predstavljaju posebnu prepreku zbog svoje heterogenosti i nemogućnosti odabira jednog optimalnog ciljnog antigena. Potencijal ciljanja jednog antigena kod solidnih tumora je upitan zbog sposobnosti gubitka ili smanjenja ekspresije antigena. Također, imunosupresivni tumorski mikrokoliš može inaktivirati CAR T-stanice. U slučaju tumora središnjeg živčanog sustava ključna je optimalnu dostavu CAR T-stanica u tumorsko područje. Intrakranijalna i intraventrikularna dostava stanica pokazuje bolje rezultate od intravenozne. Dosadašnje

studije pokazuju sigurnost i učinkovitost terapije, ali gubitak antigena i heterogenost tumora najveće su prepreke.

Poboljšanja CAR T-stanične terapije

Kako bi se poboljšale karakteristike CAR T-stanica i učinkovitost terapije ispituju se novi načini izrade, građe i djelovanja CAR T-stanica.

T-stanice transduciraju se u CAR T-stanice virusnim vektorima što nosi svoje rizike poput nepredvidljivih mutacija prilikom ugradnje vektora koje smanjuju kvalitetu i sigurnost konačnog proizvoda.⁴ Zbog toga povećava se primjena ne-virusnih vektora i ispituje se njihov potencijal kao alata za genetsku modifikaciju T-stanica. Sustav transpozona jedna je od ne-virusnih metoda koja radi na principu izrezivanja i umetanja CAR sekvence u DNA stanice. CRISPR (prema engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) tehnologija stvara lomove u genomu gdje se mogu umetnuti željeni sljedovi.²⁰ CRISPR se sastoji od endonukleaze kaspaze 9 (Cas9) koja pod vodstvom RNA vodilje izrezuje DNA molekulu. ZNF (prema engl. *zinc-finger nuclease*) i TALEN (prema engl. *transcription activator-like effector nuclease*) rade na principu stvaranja lomova i odgovora na oštećenje DNA čime su omogućene promjene u genima na specifičnim mjestima.⁴ TALEN i ZNF su nukleaze specifične za određena mjesta u genomu i moguća je izrada specifičnih parova nukleaza za svaku željenu gensku metu.²⁰ Ove tehnike pružaju manji rizik mutacija te lakšu i jeftiniju izradu.

U svrhu poboljšanja CAR T-stanične postojanosti moguće je stanice aktivirati antigen-prezentirajućim stanicama koje prezentiraju ciljni CAR antigen.¹⁶ Dugoročnost terapije može se produžiti inhibitorima T-staničnih signalnih puteva, kao što je PD-1.¹⁶ Blokiranje PD-1:PDL-1 vezanja pokazuje poboljšanje učinkovitosti terapije. Također, CAR T-stanice sa sposobnošću ispuštanja proupalnih citokina mogle bi smanjiti imunosupresiju i utjecaj tumorskog mikrokoliša na aktivnost stanica.¹⁶

Tumorska heterogenost i modulacija antigena mogu se zaobići promjenama u CAR i sposobnosti prepoznavanja antigena.¹⁶ Izrada CAR s više-antigenskom specifičnošću mogla bi smanjiti rizik od povratka bolesti. Nekoliko kliničkih istraživanja ispituje mogućnosti više-antigenskih

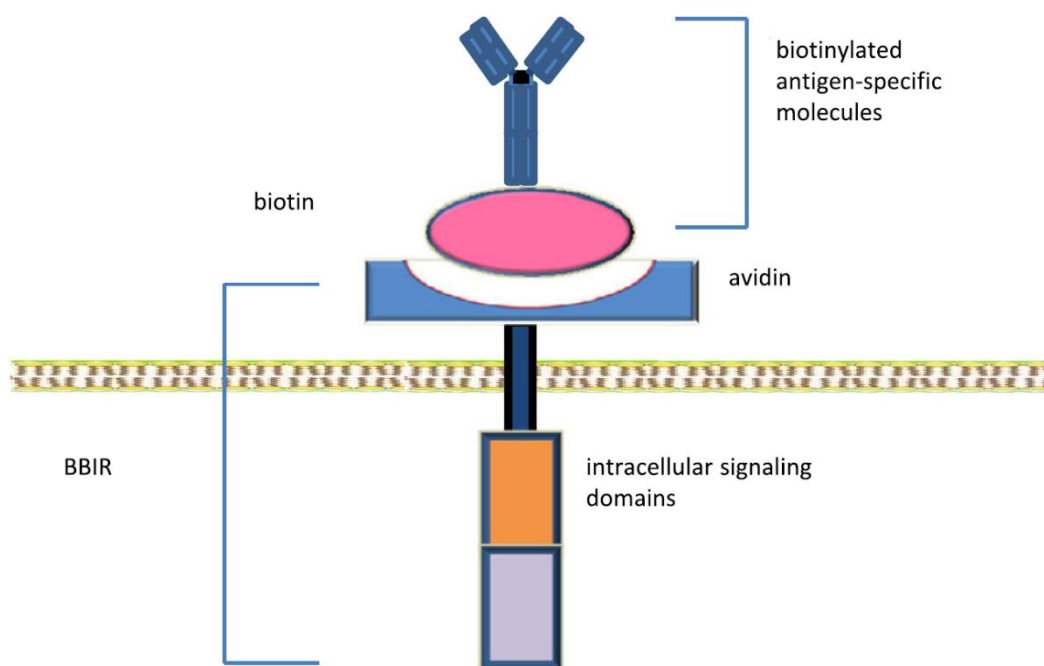
receptora. Kako bi poboljšali odnos između zastupljenosti i specifičnosti ciljnih antigena, znanstvenici su osmislili tri pristupa kombinacije prepoznavanja antigena CAR specifičnog za dva antigena.⁸

Budućnost CAR T-stanične terapije

Univerzalne CAR T-stanice

Novi oblici CAR T-stanica izrađuju se s namjerom povećanja fleksibilnosti i širenja mogućnosti prepoznavanja antigena.²⁰ Stvaranje univerzalnih CAR sa gotovo beskonačnom sposobnošću prepoznavanja antigena uključuje neki oblik posredničkog sustava koji će povezati ciljni antigen i antigen-specifičnu jedinicu CAR-a.

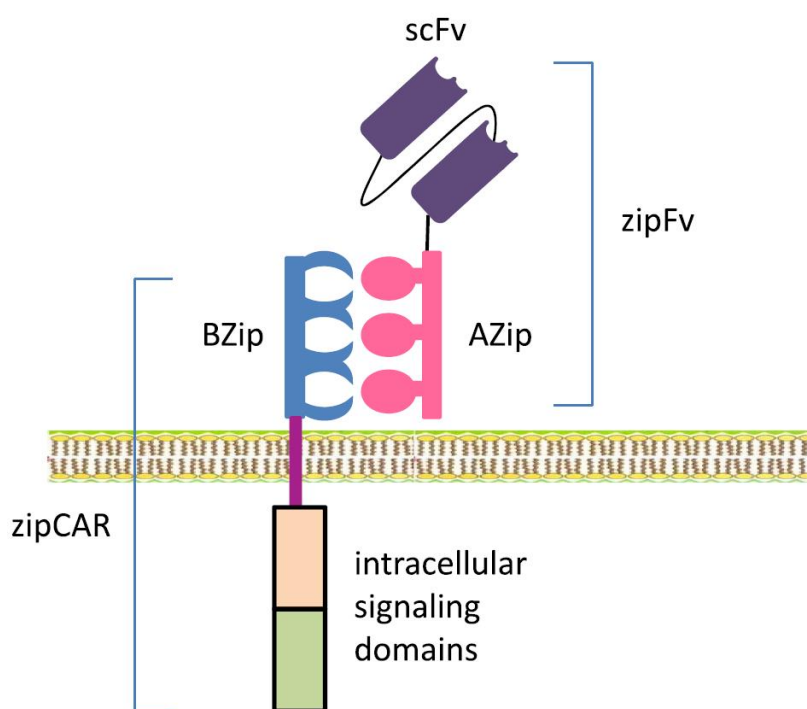
Biotin-vezujući imunološki receptor (BBIR, prema engl. *biotin-binding immune receptor*) jedan je od pristupa stvaranja univerzalnih CAR.²⁰ BBIR građen je od avidinske jedinice kao izvanstanične domene koja veže biotinizirane antigen-specifične molekule poput scFV ili drugih tumor-specifičnih molekula (*Slika 8.*). Tako struktura receptora uvijek ostaje ista, dok se antigen-specifična biotinizirana molekula modulira ovisno o ciljnom antigenu.



Slika 8. Građa BBIR CAR. Avidinska izvanstanična jedinica prepoznaje biotinizirane antigen-specifične molekule koje se vežu za tumore. Njihovo vezanje aktivira T-staničnu citotoksičnost. Preuzeto iz Zhao J, Lin Q, Song Y, Liu D. Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells. J Hematol Oncol J Hematol Oncol 2018; 11: 132.

Vezanjem biotiniliranih tumor-specifičnih molekula BBIR CAR T-stanice mogu prepoznati razne tumorske antigene.²⁰ Jedna od prednosti ovih stanice je što mogu vezati biotinilirane molekule pri vrlo niskim koncentracijama. BBIR CAR T-stanice pokazuju visoku razinu inhibicije rasta humanog tumora jajnika na mišjim ksenografskim modelima i imaju potencijal promijeniti CAR T-terapiju.

Drugi pristup izrade univerzalnih CAR je razdvojni, univerzalni i programabilni (SUPRA, prema engl. *split, universal, and programmable*) CAR sustav.²⁰ SUPRA CAR je dvodijelni sustav koji radi na principu patentnog zatvarača. Univerzalni receptor s leucinskim dijelom (zipCAR, prema engl. *zipper adaptor*) veže se na odgovarajući leucinski dio antigen-specifičnog scFv-a (zipFv) (Slika 9.).



Slika 9. Građa SUPRA CAR. Leucinski dijelovi univerzalnog receptora (BZip) i antigen-specifičnog scFv-a (AZip) vežu se poput patentnog zatvarača.

Preuzeto iz Zhao J, Lin Q, Song Y, Liu D. Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells. *J Hematol Oncol* Hematol Oncol 2018; 11: 132.

Struktura zipCAR-a ostaje ista, a zipFv se može mijenjati ovisno o antigenu. Ovaj pristup omogućuje kontroliranje toksičnosti terapije prilagođavanjem jačine vezanja leucinskih dijelova što određuje stupanj T-stanične signalizacije i aktivacije. SUPRA CAR pokazuju snažan protutumorski učinak, za razliku od CAR T-stanica, na mišjim ksenograftskim modelima raka dojke i leukemija.

Standardiziranje CAR T-stanične terapije

Učinkovitost CAR T-stanične terapije je prepoznata, ali ona još uvijek nije standardizirana.²¹ Kako bi terapija bila primjenjiva na većem broju pacijenata nužna je njezina standardizacija. Proces izrade terapije mora rezultirati sigurnim i učinkovitim proizvodom koji koristi većem dijelu pacijenata. Opis atributa proizvoda i poznavanje parametara koji utječu na sigurnost i učinkovitost može doprinijeti izradi sigurne i učinkovite terapije. Vrsta korištenih stanica određuje učinkovitost terapije, a one su često pod utjecajem inhibitora jer bolesnici primaju kemoterapiju. Također, kvaliteta, čistoća i snaga vektora ključna je za kvalitetu CAR T-stanica. Reagensi koji se koriste tijekom izrade i *ex vivo* aktivacije stanica, poput antitijela, citokina i seruma utječu na konačni proizvod. Zbog kompleksnosti izrade i heterogenosti terapije nužna su veća ispitivanja kvalitete CAR T-stanične terapije. Također, praćenje bolesnika nakon infuzije stanica može biti presudno za učinkovitost terapije. Stoga su potrebne zakonske uredbe koje će opisivati temeljne kriterije proizvodnje i standardizacijom svih aspekata terapije garantirati sigurnost i učinkovitost CAR T-stanica.

Zaključak

CAR T-stanična terapija promijenila je pogled na liječenje malignih bolesti. Trenutno dostupne terapije Kymriah i Yescarta pokazuju veliku uspješnost u liječenju pedijatrijskih i mladih bolesnika. Namijenjene su liječenju B-staničnih leukemija ciljanjem CD19 antigena kojeg izražavaju B-stanice. CD19 kao ciljni antigen CAR ima svoje prednosti i nedostatke. Izražen je tijekom svih faza razvoja B-stanica što znači da je odlično zastupljen, ali je slabo specifičan jer ne omogućuje razlikovanje zdravih od tumorskih stanica. Razvojem građe receptora shvaćena je važnost kostimulacijske signalizacije, bez koje se CAR T-stanice ne mogu prikladno aktivirati ni preživjeti, pa je navedena sastavni dio Kymriaha i Yescarte. Proces izrade CAR T-stanica je dug, zahtjevan i skup, a svaki korak može odrediti učinkovitost konačnog proizvoda. Kymriah i Yescarta su veliki financijski teret za primatelja terapije zbog čega ove terapije nisu svima lako dostupne. Mehanizam ubijanja tumora CAR T-stanica i T-stanica periferne krvi ima male razlike u trajanju imune sinapse tijekom prepoznavanja antigena, ali CAR T-stanice i T-stanice jednako učinkovito ubijaju ciljne stanice. Probir bolesnika koji će primiti terapiju odvija se po strogim kriterijima koji uključuju povijest bolesti i prateće bolesnikove bolesti. CAR T-stanična terapija ima raznolike nuspojave koje mogu imati teške i po život opasne oblike poput CRS-a i neuroloških nuspojava. Nuspojave se lijeće imunosupresivnim lijekovima, ali treba biti oprezan kako se ne bi smanjila djelotvornost CAR T-stanica. Bolesnici koji primaju terapiju trebaju multidisciplinarnu skrb i učinkovitu kontrolu nad nuspojavama kako bi odgovor na terapiju bio pozitivan. Karakteristike same terapije, poput građe CAR-a, mogu utjecati na razvoj nuspojava. U pojedinim slučajevima terapija može biti neuspjela. Problemi tijekom izrade terapije ili teške nuspojave mogu biti razlog neučinkovitosti CAR T-stanica. Također, tumorski mehanizmi izbjegavanja imunosnog sustava, kao što su izoforme antigena i smanjenje antigenskog izražaja, omogućuju ponovnu pojavu tumora. Stoga su potrebna poboljšanja terapije u smjeru smanjenja nuspojava i povećanja antigenske specifičnosti CAR kako bi

terapija imala bolji protutumorski učinak. Budućnost CAR T-stanične terapije može donijeti univerzalnu staničnu terapiju s širim mogućnostima djelovanja primjenom novih antigen-specifičnim molekulama. Uz nove terapijske pristupe, budućnost treba donijeti standardizaciju trenutnih terapija kako bi one bile sigurne, učinkovite i široko primjenjive.

Literatura

- 1 Morgan MA, Schambach A. Engineering CAR-T Cells for Improved Function Against Solid Tumors. *Front Immunol* 2018; **9**: 2493.
- 2 June CH, Sadelain M. Chimeric Antigen Receptor Therapy. *N Engl J Med* 2018; **379**: 64–73.
- 3 Han X, Wang Y, Han W-D. Chimeric antigen receptor modified T-cells for cancer treatment. *Chronic Dis Transl Med* 2018; **4**: 225–243.
- 4 Benmeharek M-R, Karches C, Cadilha B, Lesch S, Endres S, Kobold S. Killing Mechanisms of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. *Int J Mol Sci* 2019; **20**: 1283.
- 5 Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The Basic Principles of Chimeric Antigen Receptor Design. *Cancer Discov* 2013; **3**: 388–398.
- 6 Hayden PJ, Sirait T, Koster L, Snowden JA, Yakoub-Agha I. An international survey on the management of patients receiving CAR T-cell therapy for haematological malignancies on behalf of the Chronic Malignancies Working Party of EBMT. *Curr Res Transl Med* 2019; **67**: 79–88.
- 7 Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*. Fifth edition. Elsevier: St. Louis, Missouri, 2016.
- 8 Wei J, Han X, Bo J, Han W. Target selection for CAR-T therapy. *J Hematol Oncol/J Hematol Oncol* 2019; **12**: 62.
- 9 Wang D, Zhang L, Li Y, Wang H, Xiao Q, Cao W *et al*. Construction and expression of humanized chimeric T cell receptor specific for chronic myeloid leukemia cells. *Biotechnol Lett* 2012; **34**: 1193–1201.
- 10 Zhang C, Liu J, Zhong JF, Zhang X. Engineering CAR-T cells. *Biomark Res* 2017; **5**: 22.
- 11 Eisenberg V, Hoogi S, Shamul A, Barliya T, Cohen CJ. T-cells “à la CAR-T(e)” – Genetically engineering T-cell response against cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2019; **141**: 23–40.
- 12 Chmielewski M, Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opin Biol Ther* 2015; **15**: 1145–1154.
- 13 Van Schandevyl S, Kerre T. Chimeric antigen receptor T-cell therapy: design improvements and therapeutic strategies in cancer treatment. *Acta Clin Belg* 2020; **75**: 26–32.

- 14 Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* 2017; **37**: 163–176.
- 15 Partington KM, Jenkinson EJ, Anderson G. A novel method of cell separation based on dual parameter immunomagnetic cell selection. *J Immunol Methods* 1999; **223**: 195–205.
- 16 Shah NN, Fry TJ. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2019; **16**: 372–385.
- 17 Seimetz D, Heller K, Richter J. Approval of First CAR-Ts: Have we Solved all Hurdles for ATMPs? *Cell Med* 2019; **11**: 215517901882278.
- 18 Iriguchi S, Kaneko S. Toward the development of true “off-the-shelf” synthetic T-cell immunotherapy. *Cancer Sci* 2019; **110**: 16–22.
- 19 Brudno JN, Kochenderfer JN. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood Rev* 2019; **34**: 45–55.
- 20 Zhao J, Lin Q, Song Y, Liu D. Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells. *J Hematol Oncol* 2018; **11**: 132.
- 21 Dai X, Mei Y, Cai D, Han W. Standardizing CAR-T therapy: Getting it scaled up. *Biotechnol Adv* 2019; **37**: 239–245.