MASARYKOVA UNIVERZITA

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Buněčná imunoterapie CAR-T lymfocyty: principy, využití a možnosti vylepšení

Bakalářská práce

KAMILA KVASNIČKOVÁ

Vedoucí práce: Mgr. Michal Šmída, Dr. rer. nat.

Ústav experimentální biologie
Program Lékařská genetika a molekulární diagnostika

Brno 2022

MUNI
SCI

Bibliografický záznam

Autor:	Kamila Kvasničková Přírodovědecká fakulta Masarykova univerzita Ústav experimentální biologie
Název práce:	Buněčná imunoterapie CAR-T lymfocyty: principy, využití a možnosti vylepšení
Studijní program:	Lékařská genetika a molekulární diagnostika
Vedoucí práce:	Mgr. Michal Šmída, Dr. rer. nat.
Rok:	2022
Počet stran:	56
Klíčová slova:	chimerický antigenní receptor, T-lymfocyty, hematologické malignity, solidní nádory, imunoterapie

Bibliographic record

Author: Kamila Kvasničková
Faculty of Science
Masaryk University
Department of Experimental Biology

Title of Thesis: Cell immunotherapy with CAR-T cells: principles, applications and opportunities for improvements

Degree Programme: Medical Genetics and Molecular Diagnostics

Supervisor: Mgr. Michal Šmída, Dr. rer. nat.

Year: 2022

Number of Pages: 56

Keywords: chimeric antigen receptor, T-lymphocytes, hematologic malignancies, solid tumor, immunotherapy

Abstrakt

T-lymfocyty s chimérickým antigenním receptorem (CAR T-lymfocyty) jsou revolucí v léčbě nádorových onemocnění. Jsou vyráběny z pacientových T-lymfocytů a určeny pro specifické rozpoznání a eliminaci maligních buněk. Tato bakalářská práce se zabývá vývojem a výrobou CAR T-lymfocytů, dále pak jejich klinickým využitím a účinností u jednotlivých malignit. Popisovány jsou zde i problémy spojené s touto léčbou, důvody selhání u některých nádorových onemocnění a především cesty, které by mohly vést k odstranění těchto problémů a vylepšení fungování CAR T-lymfocytů.

Abstract

T-lymphocytes with chimeric antigen receptors (CAR T-lymphocytes) are a revolution in tumor therapy. They are made from patient T-lymphocytes and they are engineered for specific recognition and elimination of malignant cells. This bachelor thesis deals with the development and manufacture of CAR T cells, their clinical application, and their efficacy in individual malignancies. There are limitations of this therapy described, causes of its failure in some malignancies, and strategies, which could lead to the elimination of these problems and to the enhancement of CAR T-lymphocytes activity.

MUNI
SCI

MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KOTLÁŘSKÁ 2, 611 37 BRNO
IČ: 00216224
DIČ: CZ00216224

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Akademický rok: 2021/2022

Ústav:	Ústav experimentální biologie
Studentka:	Kamila Kvasničková
Program:	Lékařská genetika a molekulární diagnostika
Specializace:	Lékařská genetika a molekulární diagnostika

Ředitel *ústavu* PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje bakalářskou práci s názvem:

Název práce:	Buněčná imunoterapie CAR-T lymfocyty: principy, využití a možnosti vylepšení
Název práce anglicky:	Cell immunotherapy with CAR-T cells: principles, applications and opportunities for improvements
Jazyk závěrečné práce:	čeština

Oficiální zadání:
CAR-T lymfocyty jsou geneticky modifikované lymfocyty pacienta, které jsou přeprogramovány pro specifické cílení a eliminaci nádorových buněk. Tato technologie znamenala obrovský převrat v terapii nádorových onemocnění, především hematologických. Student v této práci popíše principy fungování a výroby CAR-T lymfocytů, jejich využití v terapii a účinnost u jednotlivých malignit. Především se však zaměří na problémy spojené s touto léčbou, popíše mechanismy zodpovědné za selhání CAR-T lymfocytů a na základě literatury navrhne potenciální možnosti k dalšímu zlepšení jejich účinnosti.

Vedoucí práce:	Mgr. Michal Šmída, Dr. rer. nat.
Datum zadání práce:	27. 9. 2021
V Brně dne:	8. 5. 2022

Zadání bylo schváleno prostřednictvím IS MU.

Kamila Kvasničková, 13. 10. 2021
Mgr. Michal Šmída, Dr. rer. nat., 18. 10. 2021
RNDr. Pavel Lízal, Ph.D., 20. 10. 2021

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu své práce Mgr. Michalu Šmídovi, Dr. rer. nat. za odborné vedení a cenné rady při zpracování této bakalářské práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího práce s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

V Brně 12. května 2022 .....

Kamila Kvasničková

1. Úvod 14

2. Imunoterapie 15

2.1. Humorální imunoterapie 15

2.2. Buněčná imunoterapie 16

3. CAR T-lymfocyty 18

3.1. Chimérický antigenní receptor (CAR) 18

3.1.1. Extracelulární doména 18

3.1.2. Spojovací doména (spacer) 19

3.1.3. Transmembránová doména 20

3.1.4. Intracelulární doména 21

3.2. Generace CAR T-lymfocytů 22

3.2.1. První generace 22

3.2.2. Druhá generace 22

3.2.3. Třetí generace 24

3.2.4. Čtvrtá generace 24

3.2.5. Pátá generace 25

3.2.6. Nové designy CAR T-lymfocytů 26

3.3. Výroba CAR T-lymfocytů 29

4. Klinické využití CAR T-lymfocytů 30

4.1. B buněčná akutní lymfoblastická leukémie (B-ALL) 31

4.2. Non-Hodgkinovy lymfomy (NHL) 32

4.3. Mnohočetný myelom (MM) 33

4.4. Hodgkinův lymfom (HL) 34

4.5. Chronická B-lymfatická leukémie (B-CLL) 34

4.6. Solidní nádory 36

5. Problémy spojené s terapií CAR T-lymfocyty 38

5.1. Finanční toxicita 38

5.2. Vedlejší účinky 38

5.2.1. Syndrom uvolnění cytokinů (CRS) 38

5.2.2. Neurologická toxicita (ICANS) 39

5.2.3. B buněčná aplazie 39

5.2.4. Syndrom lýzy nádoru (TLS) 40

6. Závěr 41

7. Literatura 42

Seznam zkratek

AFP	alpha fetoprotein
ALL	akutní lymfoblastická leukemie (acute lymphoblastic leukemia)
ANTXR1	anthrax toxin receptor 1
BBIR	receptor vázající biotin
BCMA	B-cell maturation antigen
CAIX	carbonic anhydrase 9
CAR	chimerický antigenní receptor (chimeric antigen receptor)
CD	diferenciační antigen (cluster of differentiation)
CEA	karcinoembryonální antigen
CLL	chronická lymfatická leukemie (chronic lymphatic leukemia)
CRS	syndrom uvoněných cytokinů (cytokine release syndrome)
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DGK	diacylglycerolkináza
DLBCL	difuzní velkobuněčný B lymfom (diffuse large B-cell lymphoma)
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
EGFR	epidermal growth factor receptor
EP-CAM	epithelial cell adhesion molecule
EPHA2	ephrin type-A receptor 2
FAP	familial adenomatous polyposis
FcγR	Fc gamma receptor
FDA	úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
FL	folikulární lymfom (lollicular lymphoma)
FRα	folate receptor alpha
GSPG4	general secretion pathway protein G
GUCY2C	guanylate cyklase 2C
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HGBL	high-grade B-lymfom (*high-grade B-lymphoma)*
HL	Hodgkinův lymfom (Hodgkin´s lymphoma)
ICANS	immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome
ICOS	indukovaná kostimulační molekula (inducible costimulator molecule)

IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IL	interleukin
IL13Rα2	interleukin-13 receptor alpha 2
ITAM	aktivační motiv imunoreceptoru založený na tyrosinu (immunoreceptor tyrosine based activation motif)
JAK	Janus kináza (Janus kinasa)
L1-CAM	L1 cell adhesion molecule
LAG-3	lymphocyte activation gene 3
LAK	zabíječi aktivovaní lymfokiny (lymphokine-activated killers)
MAGE-A1	melanoma antigen gene protein
MCL	lymfom z plášťových buněk (mantle cell Lymphoma)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
MM	mnohočetný myelom (multiple myeloma)
MUC1	mucin 1
MUC3A	mucin 3A
NHL	non-Hodgkinův lymfom (non-Hodgkin´s lymphoma)
NK	přirozený zabíječ (natural killer)
NKG2D	natural killer group 2, member D
PD-1	programmed death 1
PMBCL	primární mediastální velkobuněčný B lymfom (primary mediastinal large B-cell lymphoma)
PSCA	prostate stem cell antigen
PSMA	prostate-specific membrane antigen
ROR	RAR-related orphan receptors
scFV	jednořetězcový variabilní fragment (single-chain variable fragment)
STAT3	přenašeči signálu a aktivátory transkripce (signal transducer and activator of transcription)
TAA	antigen asociovaný s nádorem (tumor asociated antigen)
TAG72	tumor-asociated glycoprotein 72
TCR	T buněčný receptor (T-cell receptor)
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)

TIL	lymfocyty infiltrující nádory (tumor infiltrating lymphocytes)
TLS	syndrom lýzy tumoru (tumor lysis syndrome)
tMUC1	tumor associated mucin 1
TNF	faktor nekrotizující nádory (tumor necrosis factor)
TRAC	konstantní řetězec α T buněčného receptoru (T Cell Receptor Alpha Constant)
Trop2	Trophoblast cell-surface antigen-2
TRUCK	T buňky přesměrované pro univerzální zabíjení, zprostředkované cytokiny (*T cell redirected for universal cytokine-mediated killing)*
TSA	antigen specifický pro nádor (tumor specific antigen)

1. Úvod

Nádorová onemocnění se řadí mezi civilizační choroby a zároveň mezi nejčastější příčiny úmrtí. Jejich léčba je finančně velmi nákladná a léčebné náklady se každý rok zvyšují. Bohužel i přes všechny vědecké pokroky terapie rakoviny často selhává a kompletní vyléčení pacienta je spíše výjimečné. Tradičně byla terapie založena na radiačních a cytostatických prostředcích, které jsou ale nespecifické a mají silné vedlejší účinky. Snahou posledních let je proto vyvíjet cílenou terapii, která by specificky cílila pouze na nádorové buňky a ponechávala zdravé buňky netknuté. Navíc se ukázalo, že každý nádor je individuální, a je tedy potřeba přistupovat ke každému pacientovi individuálně dle jeho konkrétního nádoru, mutací obsažených v nádoru a přítomnosti konkrétních biomarkerů predikujících průběh nemoci či odpověď na léčbu. To se stalo základem pro tzv. personalizovanou medicínu.

Revoluční technologií personalizované medicíny posledních let jsou v laboratořích upravené pacientovy vlastní T-lymfocyty s chimérickým antigenním receptorem (zkráceně CAR T-lymfocyty), které se tak stávají unikátní zbraní proti maligním buňkám. Základy této technologie byly položeny na konci 80. let minulého století Gideonem Grossem a jeho týmem (Gross *et al.,* 1989). V následujících dvou desetiletích docházelo k vylepšování CAR T-lymfocytů a v roce 2011 došlo k prvnímu podání pacientům (Kalos *et al.,* 2011). Výsledky byly velmi dobré, což vedlo k dalším studiím a dále ke schválení několika léků, které jsou plně založeny na úpravě pacientových T-lymfocytů.

Tato bakalářská práce se v první části zabývá obecně CAR T-lymfocyty. Je popisováno složení jednotlivých částí a uváděny jsou i případné zkoumané alternativy. Dále jsou představeny jednotlivé generace CAR T buněk. Důraz je pak kladen na pohled do budoucnosti, kdy jsou představeny některé limity této technologie a nové designy, které by je mohly překonat.

Momentálně je schváleno šest léčivých přípravků využívajících technologii CAR. Druhá část této práce se věnuje jejich srovnáním, především pak jejich účinností proti jednotlivým malignitám. Kromě nemocí, na které se tato terapie již využívá, jsou zde popsány i nemoci, na které sice tento léčivý postup zatím není schválen, ale intenzivně se testuje. U jednotlivých kapitol je pak uvedena i příčina neúspěchů léčby a některé studie, které se snaží tyto nezdary překonat. Poslední část bakalářské práce se pak zabývá problémy, které jsou s touto léčbou CAR T-lymfocyty spojeny.

2. Imunoterapie

Termín imunoterapie (jinak také biologická léčba) zahrnuje všechny léčebné postupy, jejichž cílem je využití složek imunitního systému k indukci, znovunastolení nebo posílení protinádorové imunitní reakce. Imunoterapii můžeme rozdělit na humorální (využívající protilátky a cytokiny) a buněčnou (založenou na buňkách imunitního systému s protinádorovou kapacitou).

2.1. Humorální imunoterapie

Při humorální imunoterapii protilátkami se využívá jejich fyziologických funkcí. Protilátky se váží na cílový antigen a následně dochází k aktivaci různých mechanismů vedoucích ke smrti cílové buňky. Protilátky mohou ale také sloužit jako nosiče léčiv či toxinů. Při léčbě se používají tzv. monoklonální protilátky, což jsou produkty jednoho klonu plazmatických buněk mající unikátní specifitu.

Jako první se používaly myší monoklonální protilátky, označované koncovkou *-omab*. Podání myší bílkoviny ale u pacientů vyvolávalo imunitní reakci, což jednak znemožňovalo optimální fungování protilátky a také mohlo vyvolávat anafylaktické šoky (Reynolds *et al.,* 1989). Proto se v současné době myší monoklonální protilátky prakticky nepoužívají.

Ve snaze zamezit vzniku imunitní reakce vznikají chimérické a humanizované protilátky. Při výrobě chimérických protilátek je z původní myší protilátky zachována část zodpovědná za vazbu antigenu a zbytek je nahrazen lidským imunoglobulinem. Pro rozlišení je využívána koncovka *-ximab*. Mezi chimérické protilátky patří léčivo rituximab, což byla první monoklonální protilátka schválená pro klinickou aplikaci u onkologických pacientů, určená pro léčbu např. non-Hodgkinova lymfomu (Grillo-López *et al.,* 2000).

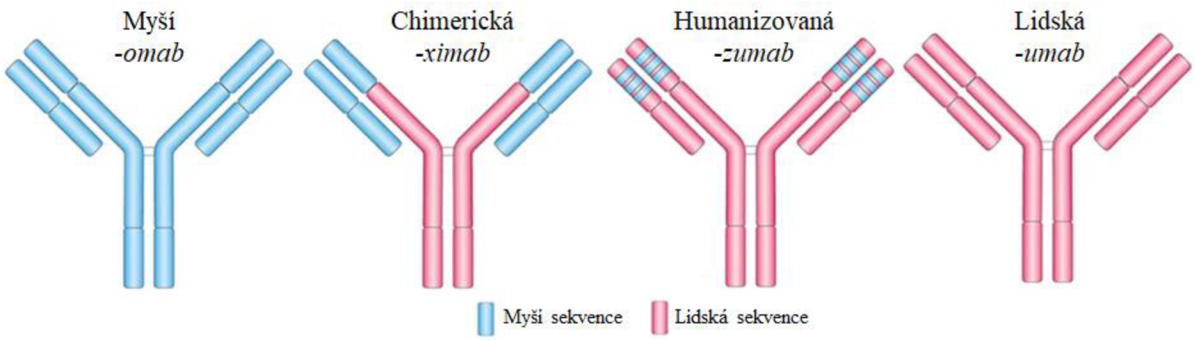
V případě humanizované protilátky je lidským imunoglobulinem nahrazeno vše kromě krátkých úseků, které přímo tvoří vazebné místo. Tyto jsou značeny koncovkou *-zumab*. Do této skupiny monoklonálních protilátek patří například tocilizumab, léčivo určeno mj. na léčbu syndromu uvolněných cytokinů vyvolaného CAR T-lymfocyty (viz dále) (Le *et al.,* 2018).

Poslední skupinou monoklonálních protilátek jsou lidské protilátky, značené koncovkou *-umab*. Jedná se například o látku daratumumab, používanou pro léčbu mnohočetného myelomu (Xia *et al.,* 2016).

Obr. 1 názorně ukazuje zastoupení myších a lidských sekvencí v jednotlivých typech protilátek.

Za zmínku stojí skupina protilátek označovaná jako inhibitory kontrolních bodů, které jsou namířeny proti inhibičním receptorům na T-lymfocytech. Nádorové buňky exprimují ligandy, které se na tyto receptory váží, a tím potlačují imunitní reakci. Podání inhibitorů kontrolních bodů vede ke zrušení inhibičního signálu a T buňky jsou opět schopny reakce proti maligním buňkám (Freeman *et al.,* 2000). Jedním ze schválených inhibitorů kontrolních bodů je například pembrolizumab (Kwok *et al.,* 2016).

Dalšími látkami patřícími do humorální imunoterapie jsou tzv. imunomodulancia neboli imunomodulační látky. Do této skupiny patří farmaka, která ovlivňují aktivitu imunitního systému. Takovým lékem je například lenalidomid, který se používá při léčbě mnohočetného myelomu (Alonso *et al.,* 2020). Mezi používaná imunomodulancia se řadí také kortikosteroidy. U akutní lymfoblastické leukemie (ALL) jsou nejčastěji užívány prednison and dexamethason. Obvykle se kortikosteroidy nepodávají samostatně, ale jako doplněk k chemoterapii (Inaba *et* Pui, 2010).



Obr. 1: Typy monoklonálních protilátek (Furman, 2021; upraveno)

2.2. Buněčná imunoterapie

Buněčná imunoterapie pak využívá přímo buňky imunitního systému. Jejím průkopníkem se stal William B. Coley v roce 1891. Přímo do nádoru aplikoval pacientům kulturu bakterií *Streptococcus erysipelatis.* U části pacientů skutečně došlo k remisím (Coley, 1891). Nicméně tato léčba měla řadu vedlejších účinků a nebylo možné ji použít u všech typů nádorů. Záhy tedy došlo k jejímu vytlačení radioterapií.

S dalším využitím imunitního systému v boji proti rakovině přichází Steven A. Rosenberg, když v 80. letech minulého století pacientům s metastatickým karcinomem podává autologní LAK buňky (z anglického *lymphokine-activated killer*; tedy zabíječi aktivovaní lymfokiny) a dávky interleukinu-2. Většina pacientů na léčbu zareagovala (Rosenberg *et al*., 1985).

Následovalo vylepšení této metody, kdy lymfocyty byly odebrány přímo z nádoru (tzv. tumor infiltrující lymfocyty; TIL). U pacientů byla vyvolána vyšší míra odezvy než u původní léčby (Rosenberg *et al.*, 1988). V následujících studiích byly pomocí genového inženýrství vytvořeny T-lymfocyty s transgenním T buněčným receptorem (TCR). Z TIL byl odebrán gen pro TCR a následně vložen do dárcovských T-lymfocytů (Morgan *et al.,* 2006).

Genové inženýrství využívá i dříve publikovaná studie zabývající se vytvořením chimérického antigenního receptoru (zkráceně CAR) a jeho vložením do T-lymfocytů (Gross et al., 1989). Na tento objev navazuje studie z roku 2003, která na myších prokazuje využitelnost takto upravených T buněk při léčbě leukémie (Brentjens *et al.,* 2003).

O osm let později byla uskutečněna pilotní klinická studie. Ta byla provedena na třech pacientech s CLL (chronická lymfatická leukémie). Všichni pacienti podstoupili v minulosti léčbu chemoterapií i biologickou léčbou, obojí bezvýsledně. Po podání CAR T-lymfocytů došlo u dvou pacientů k úplné remisi a u jednoho k částečné dlouhodobé remisi. Mimo slibného léčebného účinku tato studie prokázala také dlouhodobé přežívání upravených T buněk v organismu (Kalos *et al.,* 2011).

Dalším významným milníkem byla studie provedená o rok později. Tentokrát se jednalo o dvě dětské pacientky s ALL (akutní lymfoblastická leukémie). Obě dívky byly po opakovaných relapsech. Na léčbu CAR T-lymfocyty obě zareagovaly a došlo k remisi. U první pacientky je remise dlouhodobá, u druhé došlo po dvou měsících k relapsu (Grupp *et al.,* 2013).

Americká *Food and Drug Administration* schválila první komerční přípravky CAR T-lymfocytů ke klinickému použití 30. srpna 2017 pod názvem tisagenlecleucel a 18. října pod názvem axicabtagen ciloleucel (FDA, 2017a *et* FDA, 2017b). V následujících letech byly schváleny dalších čtyři léčivé přípravky (viz dále).

Mimo výše uvedených patří do buněčné imunoterapie i protinádorové vakcíny s dendritickými buňkami. Ty se připravují z periferních monocytů, na které je *in vitro* působeno směsí cytokinů. Takto vzniklé dendritické buňky jsou následně kultivovány s nádorovými antigeny a injekčně podány pacientovi, v němž stimulují T-lymfocyty k protinádorové odpovědi. Prvním schváleným preparátem byl sipuleucel-T (Cheever *et* Higano, 2011). V neposlední řadě se k buněčné imunoterapii řadí také transplantace hematopoetických kmenových buněk. Cílem tohoto zákroku je osídlit pacientovu kostní dřeň kmenovými buňkami dárce a tím u pacienta obnovit zdravou krvetvorbu.

3. CAR T-lymfocyty

3.1. Chimérický antigenní receptor (CAR)

Technologie CAR je unikátní kombinací protilátky (tedy B buněčného receptoru) s TCR. Takto upravený receptor spojuje schopnost protilátky specificky rozpoznat a navázat antigen se schopností TCR aktivovat T-lymfocyt (Gross *et al.,* 1989).

Právě využití B buněčného receptoru poskytuje CAR T-lymfocytům podstatnou výhodu při rozpoznání a vazbě antigenu oproti nativním T-lymfocytům. TCR při rozpoznávání cílového antigenu totiž potřebuje prezentaci antigenu na povrchu hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) na povrchu buněk. Tím pádem je specifita TCR omezena pouze na proteiny, a navíc pouze na ty části prezentované v komplexu s MHC. Protilátka naopak nevyžaduje prezentaci cílového antigenu na MHC a je schopná rozeznávat proteiny v nativní formě, ale také glykoproteiny, glykolipidy či sacharidy. Samotný B buněčný receptor by ale na rozdíl od TCR nebyl schopen dostatečně efektivně aktivovat T-lymfocyt a plně zapnout jeho efektorové funkce. Vytvoření chimérického antigenního receptoru v sobě tedy spojuje výhody protilátky s výhodami TCR.

Myšlenka vytvoření takového receptoru vychází ze základní molekulární struktury obou proteinů. Protilátka i TCR se skládají ze dvou polypeptidových řetězců spojených disulfidickými můstky. V případě TCR jsou řetězce pojmenovány α a β. Pokud se jedná o protilátku, nesou řetězce označení H (z anglického *heavy;* v překladu těžký) a L (z anglického *light;* v překladu lehký), kdy každý můžeme dále rozdělit na variabilní (V) a konstantní (C) doménu. A právě podobnost obou molekul umožňuje jejich vzájemnou záměnu.

Samotný chimérický receptor je pak složen z extracelulární domény odvozené z variabilní části protilátky, spojovací pantové oblasti, transmembránové domény a intracelulární domény odvozené z TCR (viz *obr. 2*).

Navzdory intenzivnímu výzkumu se stále ještě nepodařilo nalézt optimální design CAR. Každý konstrukt proto musí projít testováním bezpečnosti a funkčnosti. Velké množství studií ukazuje, že i malá změna může mít velký dopad na výsledný terapeutický efekt.

3.1.1. Extracelulární doména

Extracelulární doména je částí rozpoznávající antigen. Nejčastěji se proto používají dva variabilní řetězce monoklonálních protilátek (těžký i lehký) spojené flexibilní peptidovou

sekvencí, tzv. linkerem (Eshhar et al., 1993). Tento konstrukt je souhrnně nazýván scFv (z anglického *single-chain variable fragment*; v překladu jednořetězcový variabilní fragment).

Pro správné fungování CAR T-lymfocytu je klíčové zvolit vhodný antigen. Musí být dostatečně specifický pro nádorové buňky, aby nedocházelo k napadání zdravé tkáně. Častou volbou je antigen CD19 exprimovaný na povrchu maligních B buněk. Například scFv prvních schválených přípravků je odvozena z myší anti-CD19 protilátky FMC63 (Roberts *et al.,* 2017; Vairy *et al.,* 2018).

Nicméně antigen CD19 je přítomný i u zdravých B-lymfocytů, a ty jsou pak eliminovány CAR T-lymfocyty spolu s maligními buňkami. Studie z roku 2015 naznačuje, že pokud se sníží afinita receptoru, jsou CAR T-lymfocyty schopny rozeznat nádorovou tkáň od tkáně zdravé. V takovém případě by bylo možné účinné použití této imunoterapie i proti solidním nádorům, u kterých se jen těžko hledá vhodný antigen, který by byl exprimovaný na nádorových buňkách, a na zdravých buňkách by chyběl (Liu *et al.,* 2015).

Jelikož první scFv byly odvozeny od monoklonálních protilátek vytvořených v myších, obsahovaly myší polypeptidové řetězce, proti kterým někdy vznikala v organismu nežádoucí imunitní reakce. Snahou posledních let je tedy vytvářet plně humanizované scFv řetězce, které by byly bezpečnější (Wutti-In *et al.,* 2022).

Nicméně extracelulární doména nemusí být tvořena pouze scFv. Alternativně může být použit například interleukin-13. Tento model byl testován především pro léčbu glioblastomu (Kahlon *et al*., 2004). Další možností je využití polypeptidu. Byl vytvořen chimérický polypeptid T1E, který byl složen ze dvou růstových faktorů (TGF a EGF). Tento polypeptid se s vysokou afinitou váže na rodinu receptorů ErbB, jejichž exprese narůstá u řady karcinomů (Davies et al., 2012). V neposlední řadě byl testován i strukturální protein. Pro léčbu autoimunitního onemocnění *Pemphigus vulgaris*[1] byl jako extracelulární doména použit protein Desmoglein-3 (Ellebrecht *et al.,* 2016).

3.1.2. Spojovací doména (spacer)

Nejčastěji se pro spojení scFv části se zbytkem receptoru používá pantová oblast spolu s Fc-fragmentem odvozená od protilátky třídy IgG. Pantová oblast je jedním koncem napojena na extracelulární doménu a druhým na Fc-fragment, který je tvořen dvěma konstantními doménami těžkých řetězců (CH2-CH3).

[1] Život ohrožující autoimunitní onemocnění charakteristické tvorbou puchýřů.

Mohlo by se zdát, že tak nevýznamná oblast nemůže mít vliv na funkčnost celého konstruktu. Toto tvrzení vyvrací studie z roku 2014, která zkoumala optimální délku spojovací oblasti. Studovány byly tři typy chimérických receptorů: s dlouhým spacerem (obsahující celou výše popsanou oblast), s krátkým (obsahující pouze pantovou oblast) a se středním spacerem (byla odstraněna CH2 oblast). *In vitro* prokázaly všechny spacery obdobnou účinnost a v případě krátkého a středního spaceru byla tato funkčnost potvrzena i *in vivo*. Nicméně dlouhý spacer neprokázal *in vivo* žádný protinádorový efekt, a navíc u buněk obsahujících tento spacer byla indukována buněčná smrt (Hudecek *et al.,* 2015).

Důvodem je interakce oblasti CH2 s Fc gama receptory (FcγR). Tato interakce vede k off-target aktivaci myeloidními a lymfoidními buňkami, které tyto receptory exprimují na svém povrchu, a tím ke zhoršené protinádorové aktivitě (Hudecek *et al.,* 2015).

Z výše uvedeného vyplývá, že pro optimální fungování je nezbytné odstranit CH2 doménu, popřípadě ji vhodným způsobem upravit, aby se zamezilo interakci s FcγR.

Alternativou je využití zcela jiné domény, která má přirozeně nízkou afinitu vůči tomuto receptoru. Například spacer léčivého přípravku tisagenlecleucel je tvořen molekulou CD8α, která je odvozena od cytotoxického lymfocytu a přirozeně se vyskytuje ve spojení s TCR (Vairy *et al.*, 2018).

Stejně tak druhý schválený lék (axicabtagen ciloleucel) vychází z TCR a jako spacer používá molekulu CD28, která přirozeně slouží jako kostimulační receptor T-lymfocytů (Roberts *et al.,* 2017)

3.1.3. Transmembránová doména

Transmembránová doména je tvořena alfa helixem. Její funkcí je spojení extracelulární části s intracelulární a také ukotvení celého receptoru v membráně. Protože tato doména navazuje na spacer, je obvyklé, že se jedná o stejnou molekulu. Toto dokazuje složení schválených léčivých přípravků. Tisagenlecleucel používá molekulu CD8α jako spacer i jako transmembránovou doménu (Vairy *et al.*, 2018). A stejně tak axicabtagen ciloleucel využívá CD28 pro obě části (Roberts *et al.,* 2017).

Obecně se můžeme setkat s transmembránovou doménou tvořenou molekulami CD28, CD8α a CD4. Nicméně ze studií vyplývá, že nejstabilnější receptor vznikne použitím CD28 (Fujiwara *et al.,* 2020).

Naproti tomu použití CD3ζ se nedoporučuje, protože může docházet k tvorbě komplexů s nativními TCR, což vede k nežádoucí aktivaci T buněk (Bridgeman *et al.,* 2010).

3.1.4. Intracelulární doména

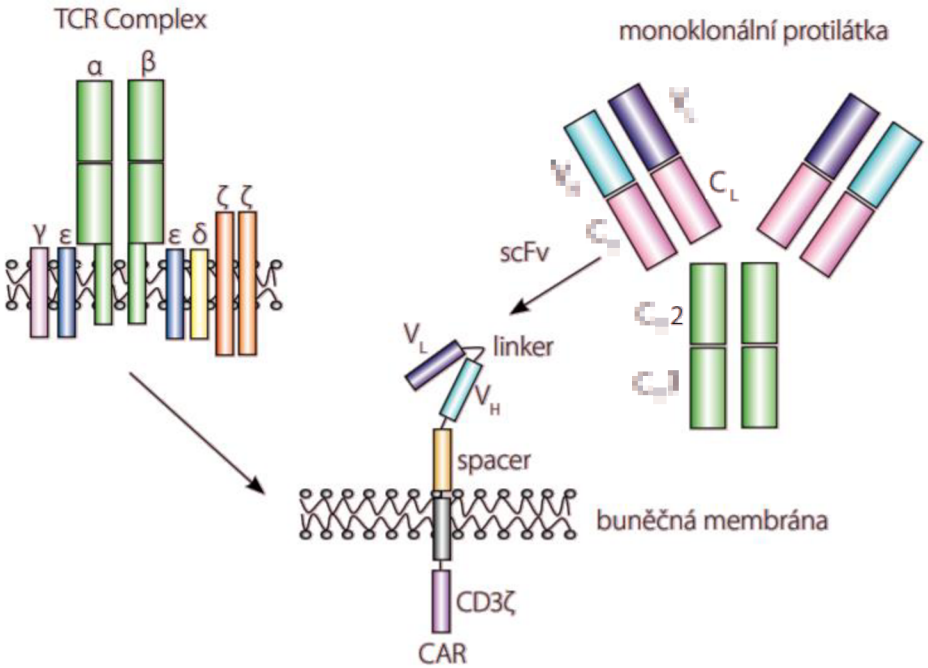
Funkcí intracelulární domény, jinak též signální domény, je vyslat a udržovat signál uvnitř T-lymfocytu po navázání antigenu. Pro sestrojení této části receptoru byla z velké části použita původní struktura TCR. Důvodem byla snaha o zachování přirozené cesty aktivace T buněk.

Kromě polypeptidových řetězců (viz výše) se TCR skládá z komplexu transmembránových proteinů (tzv. CD3 komplex), který je podstatný pro přenos signálu. CD3 komplex je složen z řetězců γ, δ, ε a ζ. Pro sestrojení CAR se jako nejvýhodnější ukázal řetězec ζ, protože má velmi krátkou extracelulární doménu, což umožňuje snadné připojení protilátky (Eshhar *et al.,* 1993).

Tyto podjednotky obsahují charakteristické sekvence aminokyselin zvané ITAM (z anglického *imunoreceptor tyrosin-based activation motif*). Jejich fosforylací dochází k aktivaci kaskády signálních proteinů vedoucí k aktivaci celé buňky.

Byly testovány i jiné domény obsahující ITAM. Příkladem může být studie srovnávající účinnost domény CD3ζ s doménou IgE-γ odvozenou od protilátek. Přestože doména IgE-γ byla funkční, její efektivita byla nižší (Haynes *et al.,* 2001).

Intracelulární doména dnes již není tvořena pouze molekulou CD3ζ, ale pro lepší fungování jsou přidávány jedna nebo více kostimulačních molekul (např. CD28, CD137, CD27).



Obr. 2: Základní struktura chimérického antigenního receptoru (Lysák, 2015; upraveno)

3.2. Generace CAR T-lymfocytů

Rozdílné složení intracelulárních domén vedlo k rozdělení CAR T-lymfocytů do více generací (viz *obr. 3*).

3.2.1. První generace

Chimérické receptory první generace reprezentují vůbec první CAR konstrukty, které byly sestrojeny. Tyto konstrukty mají základní složení: extracelulární doménu, spacer, transmembránovou doménu a intracelulární doménu. Neobsahují žádné kostimulační domény, a signalizační funkci tak zastává pouze molekula CD3ζ. Tento konstrukt se ukázal jako značně omezený a neefektivní. Nebyl schopen aktivovat klidové buňky a nedocházelo k trvalému uvolňování cytokinů (Brocker *et* Karjalainen, 1995; Gong *et al.,* 1999).

I přes ne příliš povzbudivé výsledky se objevovaly pre-klinické studie, které odhalovaly protinádorový potenciál takto upravených buněk (Stancovski *et al.,* 1993; Haynes *et al.,* 2001).

Studie, která naznačovala možné vylepšení strategie, byla uskutečněna v roce 2003. Některé nádorové buňky na svém povrchu exprimují kostimulační domény CD80 a CD86. Takové buňky byly CAR T-lymfocyty zničeny. Pokud se ale CD80 na povrchu nevyskytovalo, nebyly upravené T buňky při odstranění maligních buněk dostatečně efektivní (Brentjens *et al.,* 2003).

V současné době se nicméně CAR první generace již vůbec nepoužívají.

3.2.2. Druhá generace

Druhá generace překonává limity první generace přidáním kostimulačních domén. Prvním, kdo sestrojil CAR T-lymfocyt druhé generace, byl John Maher se svým týmem. Ke konstruktu přidali kostimulační doménu CD28. Použití právě této domény bylo logické, protože i v nativních T buňkách má kostimulační úlohu a TCR bez této molekuly není schopen optimálního fungování. V porovnání s první generací vedla druhá generace ke zvýšení produkce cytokinů, zvýšené proliferaci v reakci na antigen a lýze cílových buněk (Maher *et al.,* 2002).

Další studie zkoumající účinnost druhé generace CAR T-lymfocytů jako cílový antigen využila CD19 (v současnosti se jedná o nejpoužívanější antigen). Jako kostimulační doména byla opět použita molekula CD28. Zajímavostí této studie je nepochybně srovnání účinku druhé generace s výsledky studie o první generaci, která byla stejnými badateli provedena o několik

let dříve. I zde se potvrdil výrazně lepší účinek druhé generace – *in vivo* došlo k úplné eradikaci nádoru (Brentjenst *et al.* 2007).

Nicméně jako kostimulační doména nemusí být použita jen výše uvedená CD28. Další možností je využití 4-1BB proteinu, známého též jako CD137, patřícího do rodiny tumor nekrotizujících faktorů (TNF). V preklinické studii zkoumající účinek receptoru s připojeným 4-1BB byl jako cílový antigen vybrán CD19 a účinnost byla testována na lidských ALL buňkách. Tato úprava se ukázala jako velmi efektivní: pouze 1 % upravených T-lymfocytů stačilo k eliminaci až 93 % maligních buněk za pět dní (Imai *et al.,* 2004).

V roce 2004 byla zveřejněna studie porovnávající efektivitu kostimulačních domén. Srovnávány byly molekuly ICOS[2] a CD28 (patřící do rodiny CD28) a 4-1BB a OX-40[3] (patřící do rodiny TNFR). Všechny testované molekuly zvýšily výrazně produkci cytokinů. Přesto doména obsahující CD28 produkovala nejvíc interleukinu-2. Zahrnutí kterékoli ze signálních oblastí umožnilo T buňkám proliferovat v reakci na antigen. Lýzu cílových maligních buněk vyvolaly upravené T-lymfocyty do 40 hodin a v případě použití CD28 byla lýza ještě zvýšena (Finney *et al.,* 2004).

Autoři navíc uvádějí, že signalizace prostřednictvím ICOS, 4-1BB i OX-40 se přirozeně vyskytuje jako doplněk k signalizaci CD28, a proto by bylo možné dosáhnout optimální aktivace T buněk kombinací těchto domén (Finney *et al.* 2004).

Studie srovnávající jednotlivé kostimulační domény stále probíhají a výsledky neříkají jednoznačně, která z nich je nejlepší. Například studie z roku 2019 poukazuje na lepší proliferaci T-lymfocytů, pokud je použita molekula 4-1BB, ale na druhou stranu poukazuje na schopnost molekuly CD28 lépe kontrolovat růst nádoru (Drent *et al.,* 2019). Další studie z téhož roku popisuje schopnost kostimulační molekuly CD28 rychleji aktivovat T-lymfocyty. Oproti tomu upozorňuje, že použití molekuly 4-1BB vede k delší perzistenci CAR T-lymfocytů v krvi, což může vést k dlouhodobějšímu léčebnému účinku, a také, že tato kostimulační doména vykazuje lepší bezpečnostní profil (Ying *et al.,* 2019).

Protože počet molekul, které lze použít jako kostimulační domény, je relativně velký, vznikají stále nové studie testující další z nich. Příkladem je studie testující použití kostimulační domény 2B4 odvozené z NK buněk (Alvater *et al.,* 2009).

Přesto nejlepších výsledků dosahují molekuly 4-1BB a CD28. Dokazuje to i jejich přítomnost ve schválených přípravcích. Tisagenlecleucel obsahuje jako kostimulační doménu 4-1BB a axicabtagen ciloleucel využívá CD28 (Roberts *et al.,* 2017; Vairy *et al.,* 2018).

---

[2] Známý též jako CD278.
[3] Známý též jako CD134.

3.2.3. Třetí generace

V touze po vylepšení stávajících vlastností CAR T-lymfocytů vzniká třetí generace, která současně obsahuje dvě kostimulační domény. Jako jeden z prvních konceptů je testován konstrukt obsahující kromě obvyklé signální domény CD3ζ kostimulační domény CD28 a OX-40. Ve studii je tento koncept ihned srovnáván se dvěma receptory druhé generace: v jednom kostimulační signál poskytuje CD28, v druhém OX-40. Nepřekvapivě všechny konstrukty účinně zabíjí cílové buňky, ale jen kombinace signálních molekul vede ke zvýšené a prodloužené proliferaci a ke zvýšenému uvolňování cytokinů. Důležité také je, že CAR třetí generace si zachovávají proliferační i cytolytickou funkci i po vícenásobných setkáních s nádorovými buňkami (Pulè *et al.,* 2005).

Alternativně se jako druhá kostimulační molekula využívá 4-1BB. Výsledky jsou srovnatelné s předchozím konstruktem: T buňky reagují na stimulaci antigenem zvýšenou proliferací a produkcí cytokinů. Tyto schopnosti si T-lymfocyty zachovávají i po opakovaném setkání s antigenem. Přidáním 4-1BB také došlo ke značnému snížení indukované buněčné smrti a díky tomu mohly být buňky efektivněji rozšiřovány (Zhao *et al.,* 2009).

Účinnost chimérického antigenního receptoru třetí generace byla testována už i v klinické studii. Výsledky potvrdily využitelnost třetí generace v praxi (Till *et al.,* 2012).

3.2.4. Čtvrtá generace

CAR T-lymfocyty už dokázaly svou efektivitu při léčbě hematoonkologických onemocnění. Přes tyto skvělé výsledky je ovšem stále nemožné použít je při léčbě solidních nádorů, kde je jejich aktivita omezena. Toto omezení má řešit čtvrtá generace receptorů, nazývaná také TRUCK (z anglického *T cell redirected for universal cytokine-mediated killing;* v překladu T buňky přesměrované pro univerzální zabíjení zprostředkované cytokiny).

Tento typ receptoru je schopen produkovat cytokiny, například interleukin-12 (IL-12), což je cytokin řídící zánětlivou odpověď imunity. K produkci dochází po vazbě CAR na nádorový antigen. Uvolněný IL-12 se hromadí v nádorové lézi, tím zvyšuje migraci dalších buněk imunitního systému (např. makrofágů, NK buněk) do oblasti nádoru, kde dochází k imunitní reakci namířené proti maligním buňkám. Imunitní buňky mohou lokálně zaútočit i na nádorové buňky neoznačené, případně pro CAR T-lymfocyty neviditelné (neexprimující cílový antigen) (Chmielewski *et al.,* 2011).

IL-12 byl už v minulosti testován pro použití v terapii nádorů. Studie potvrdily protinádorový efekt, ale protože při systémovém podání dochází k závažné toxicitě, je použití této terapie značně omezené (Lacy *et al.,* 2009).

Při využití TRUCK ale dochází pouze k lokální produkci cytokinu v místě nádoru a díky transportu pomocí T buněk nejsou limitem ani hůře dostupné nádory (Chmielewski *et al.,* 2011).

Testovány jsou i další cytokiny. Například byly vyrobeny CAR T-lymfocyty produkující IL-15 a namířené proti antigenu na buňkách glioblastomu. Upravené T buňky prokázaly zlepšenou protinádorovou aktivitu (Krenciute *et al.,* 2017).

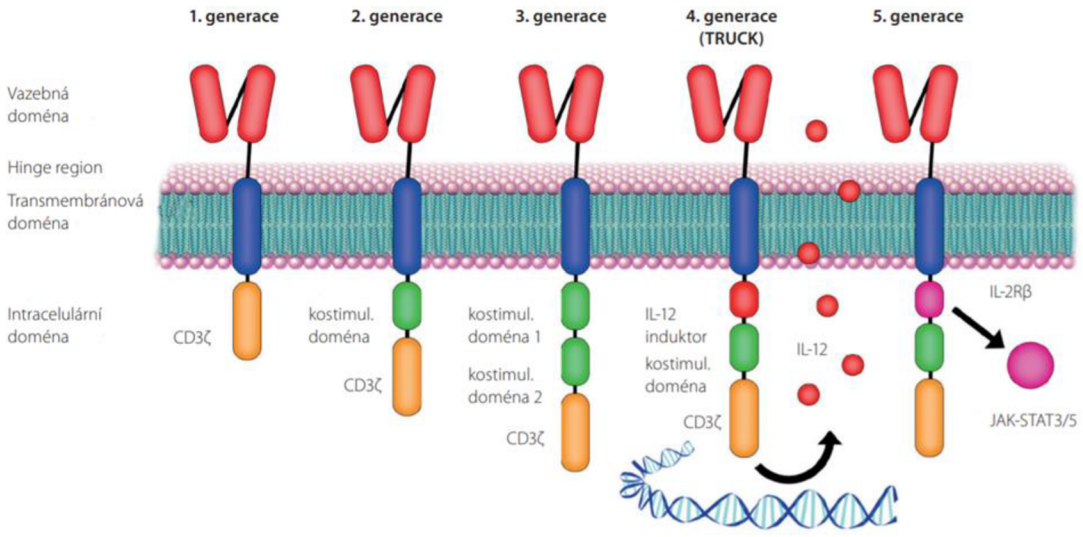
Preklinické studie ukazují účinnost čtvrté generace CAR. TRUCK vykazují vysoce zlepšené efektorové funkce, a navíc dle očekávání aktivují další buňky imunitního systému (Dragon *et al.,* 2020).

3.2.5. Pátá generace

Receptory páté generace vychází z generace druhé, a jejich intracelulární doména je tedy tvořena CD3ζ a kostimulační doménou CD28. Pátá generace chce kostimulační signály více podpořit, proto přidává β řetězec povrchového receptoru pro IL-2. Po vazbě CAR na cílový antigen dochází souběžně s aktivací CAR T-lymfocytu také k expresi tohoto receptoru a jeho aktivaci produkovaným IL-2. Tento kostimulační signál je dále přenášen do buňky a vede k paralelní aktivaci signální dráhy kinázy JAK vedoucí k aktivaci transkripčního faktoru STAT3. T buňky s receptory páté generace jsou tedy aktivovány prostřednictvím CD3ζ, kostimulační domény a konečně prostřednictvím cytokinové signální dráhy JAK-STAT3/5[4] (Kagoya *et al.,* 2018).

Účinky páté generace byly srovnávány s druhou generací, konkrétně s CAR T buňkami obsahujícími kostimulační doménu CD28 nebo 4-1BB. *In vivo* prokázaly nové CAR lepší perzistenci a dokázaly zabránit progresu leukémie. Účinnost byla testována i na solidních nádorech, a i zde došlo k lepší expanzi v periferní krvi, což vedlo k lepší kontrole nádorových buněk (Kagoya *et al.,* 2018).

[4]JAK-STAT je buněčná signalizační cesta, která přenáší signál z cytokinového receptoru skrz fosforylační kaskádu do jádra, kde zpravidla ovlivní expresi genů.



Obr. 3: Porovnání jednotlivých generací (Hrabovský, 2020)

3.2.6. Nové designy CAR T-lymfocytů

S tím, jak se CAR T-lymfocyty dostávají do praxe, se objevují nedostatky, které je snaha odstraňovat. Tak vznikají stále nové modely, stále nové metody vylepšení, aby byla zlepšena efektivita a snížena možná rizika (viz *obr. 4*).

Jedním ze zásadních problémů protinádorové léčby je možné snížení nebo úplné vymizení exprese cílového antigenu. Vzniká tak nádor rezistentní na léčbu. Možností, jak řešit tento problém, je například vytvoření bispecifických CAR. Tedy receptorů, které budou mít jako cílové dva antigeny vyskytující se na povrchu maligních buněk. Při ztrátě jednoho cílového antigenu na nádorových buňkách jsou tyto receptory schopny vázat druhý exprimovaný antigen a nedochází tak snadno k rezistenci. Tento model prokázal výrazně lepší kontrolu nádoru a studie naznačuje, že by mohl dosahovat i lepších terapeutických účinků (Hegde *et al.,* 2016).

Dalším nedostatkem této terapie je neschopnost kontroly aktivity CAR T buněk. Jedním z možných řešení je vytvoření CAR T-lymfocytu, který nemůže být aktivován, pokud na něj není navázána malá molekula, která aktivaci umožní (Wu *et al.,* 2015). Radikálnějším řešením je vytvoření CAR T-lymfocytu, který je možné v případě potřeby zcela vypnout. Příkladem může být bezpečnostní spínač buněk, který vzniká fúzí kaspázy 9 a modifikovaným FK506-vázajícím proteinem. V případě silných život ohrožujících nežádoucích účinků při léčbě, je možno podat FK506 ligand, čímž dochází k aktivaci kaspázy a rychlé buněčné smrti CAR T-lymfocytů (Di Stasi *et al.,* 2011).

V neposlední řadě je problémem časová náročnost výroby specifických CAR T-lymfocytů. Tento problém by mohl být vyřešen pomocí tzv. univerzálních CAR T-lymfocytů. Jedná se o alogenní lymfocyty, které pocházejí od jednoho dárce a mohou být podávány více příjemcům. Výroba alogenních CAR T-lymfocytů má dva závažné problémy, na jejichž vyřešení stojí budoucnost univerzálních CAR T buněk.

Prvním problémem je reakce štěpu proti hostiteli, tedy že podané T-lymfocyty rozpoznávají tkáň hostitele jako cizí, nebezpečnou a snaží se ji zničit. Této reakci se zabraňuje genetickou úpravou CAR T-lymfocytů, kdy se eliminuje exprese endogenního receptoru αβ TCR (Torikai *et al.,* 2012).

Druhým problémem je reakce hostitele proti štěpu, tedy opačný stav, kdy imunitní systém příjemce rozeznává dárcovské T buňky jako cizí a snaží se je zničit. Řešením je podání lymfodepleční léčby, která utlumí pacientův imunitní systém během léčby CAR T-lymfocyty. Nicméně zásadním problémem je toxicita této lymfodeplece i proti CAR T buňkám. Je tedy třeba nejprve provést úpravy, díky kterým se CAR T buňky stanou rezistentními. Jednou z testovaných variant je odstranění molekuly CD52 z povrchu CAR T-lymfocytů, která je cílovým antigenem pro monoklonální protilátku alemtuzumab. Ta pak může být použita pro lymfodepleci bez zničení vytvořených CD52-deficientních CAR T buněk (Poirot *et al.,* 2015). Jiným přístupem je odstranění β2 mikroglobulinu, který je součástí MHC. Jeho odstraněním je zabráněno prezentaci alloantigenů na povrchu CAR T buněk, které jsou díky tomu tolerovány imunitním systémem (Ren *et al.,* 2017a)

Zajímavé použití univerzálních CAR T-lymfocytů je založeno na kompletní absenci fragmentu rozeznávajícího specifické cílové antigeny. Namísto toho využívá silné vazby biotinu[5] a avidinu[6]. Extracelulární doména CAR neobsahuje žádný scFv o konkrétní specifitě vůči nádorovému antigenu, ale naopak obsahuje modifikovaný avidin, který tak tvoří imunitní receptor vázající biotin (BBIR). Pacientovi se pak kromě CAR T buněk podá jedna nebo více biotinem značených monoklonálních protilátek namířených proti cílovému antigenu. K aktivaci upravených T buněk tedy dochází až po vazbě avidin-biotin. Tato metoda je bezesporu flexibilnější a ekonomicky výhodnější. Výhodou je také velká dynamičnost procesu a volnost při výběru konkrétní protilátky proti specifickému antigenu, kdy protilátka může být kdykoliv vyměněna za jinou s jiným specifickým cílem (Urbanska *et al.,* 2012).

CAR T-lymfocyty se v současné době používají pouze proti malignitám vzniklým z B buněk. Nicméně je snaha zacílit upravené T buňky i proti malignitám vzniklým z T-lymfocytů.

[5] Vitamín B7.
[6] Glykoprotein ve vaječném bílku.

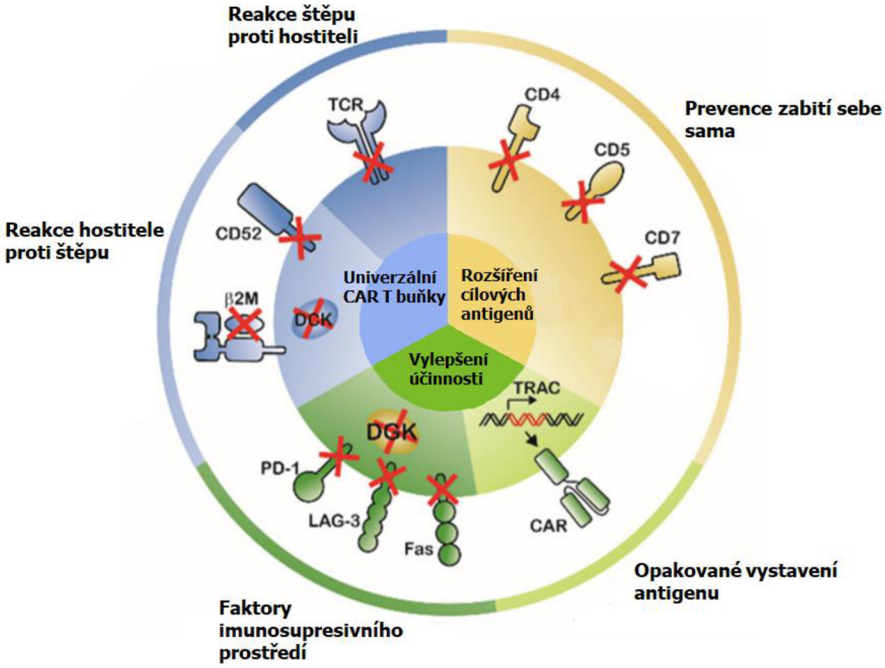
Jako cílové molekuly byly vybrány CD5 nebo CD7. Zásadním problémem je, že tyto antigeny jsou na povrchu všech T-lymfocytů, tedy i těch s CAR. V důsledku toho pak CAR T buňky kromě maligních zabijí i samy sebe. Řešením je odstranění vybraného cílového antigenu z povrchu CAR T-lymfocytů (Fleisher *et al.,* 2017; Cooper *et al.,* 2018). Stejným způsobem by mohl být využit i antigen CD4, který je také možným cílem T buněčných malignit (Pinz *et al.,* 2016).

V současné době jsou pro terapii CAR T buňkami největší výzvou solidní nádory. Bylo zjištěno, že opakované setkávání CAR T-lymfocytů s antigenem může vést k utlumení efektorových funkcí CAR T buněk (Schietinger *et al.,* 2016). Možné řešení tohoto problému je začlenění genu pro CAR do lokusu TRAC (gen pro konstantní řetězec α TCR). Exprese CAR je díky tomu lépe regulována, takže ani opakované vystavení antigenu nevede k vyčerpání T buněk (Eyquem *et al.,* 2017).

Dalším problémem solidních nádorů je jejich imunosupresivní prostředí. Jedním z možných řešení je souběžná léčba inhibitory kontrolních bodů (viz kapitola 2.2.). Nicméně systémové podání těchto inhibitorů často způsobuje závažné vedlejší účinky (Naidoo *et al.,* 2015). Bylo proto nezbytné hledat jiné cesty, jak imunosupresivní prostředí obejít. Pomocí CRISPR/Cas9 byl odstraněn receptor PD-1, který se řadí mezi inhibiční kontrolní body imunitního systému. Touto úpravou došlo ke zlepšení protinádorové aktivity u myších modelů a přežití upravených T buněk (Rupp *et al.,* 2017). Kromě PD-1 jsou slibnými cíli inhibiční molekuly LAG-3 a FAS. LAG-3 je také řazen mezi kontrolní body imunitního systému. Bohužel po jeho odstranění nebylo pozorováno žádné funkční zlepšení (Zhang *et al.,* 2017). FASL je přítomen v imunosupresivním prostředí. Navázáním na receptor FAS na povrchu CAR T buněk indukuje jejich apoptózu. Úprava CAR T-lymfocytů spočívá v odstranění receptoru FAS z jejich povrchu. Takto pozměněné buňky skutečně vykazovaly sníženou indukovanou buněčnou smrt a vynikající expanzní schopnost (Ren *et al.,* 2017b).

Jinou možností je inhibice enzymu diacylglycerolkinázy (DGK). Tento enzym je považován za potenciální inhibiční kontrolní bod, protože jeho aktivace má za následek snížení odpovědi a zároveň jeho inhibice vedla ke znovuoživení efektorových funkcí. CAR T buňky bez enzymu DGK skutečně lépe infiltrovaly tumor a vykazovaly lepší efektorové funkce v imunosupresivním prostředí (Jung *et al.,* 2018).

Mimo možných řešení problémů s imunosupresivním prostředím solidních nádorů ukázaly tyto studie také užitečnost a důležitost metody CRISPR/Cas9 při úpravě genomu CAR T buněk.



Obr. 4: Vybrané strategie úpravy genů pro vývoj nových generací CAR T-lymfocytů (Jung *et* Lee, 2018; upraveno)

3.3. Výroba CAR T-lymfocytů

Výroba lymfocytů modifikovaných CAR je organizačně i časově náročná. Celý proces výroby trvá několik týdnů.

Prvním krokem je odběr pacientovy krve a leukoferéza (mimotělní separace leukocytů). T buňky se z odebraných leukocytů mohou izolovat více možnými způsoby: rozdělením buněk gradientovou centrifugací, magnetickou separací[7] aj. Po separaci je třeba T-lymfocyty aktivovat. Jednou z možností je využití pacientových dendritických buněk nebo B-lymfocytů. Nicméně tato metoda přináší řadu komplikací a příliš se nevyužívá. Nejčastěji se T buňky aktivují použitím anti-CD3 a anti-CD28 monoklonálních protilátek, často vázaných na speciální kuličky a většinou v kombinaci s aktivačními cytokiny jako např. IL-2. Anti-CD3 poskytuje silný proliferační signál a anti-CD28 zajišťuje kostimulační signál (Levine, 2015).

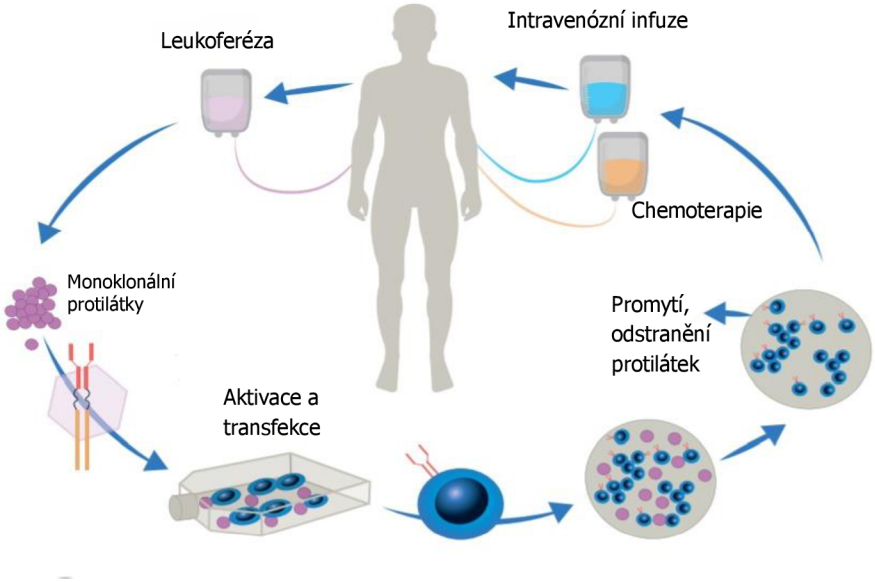
Následně dochází k vpravení genu pro CAR. Obvykle se k transfekci využívá virový vektor. Při výrobě tisagenlecleucelu je použita lentivirová částice (Vairy *et al.*, 2018). Druhý schválený lék (axicabtagene ciloleucel) využívá také virový vektor, v tomto případě retrovirovou částici (Roberts *et al.*, 2017). Alternativní možností je využití transpozonu (například tzv. Sleeping

[7] Buňky jsou označeny magnetickými protilátkami a prochází magnetický polem.

Beauty), což podle provedených studií může vést k účinnější a déle trvající expresi (Singh *et al.,* 2008).

Dalším krokem je kultivace v bioreaktoru trvající 9–11 dnů. Následuje promytí, odstranění aktivačních protilátek, detailní testování kvality výsledného produktu a jeho kryokonzervace. Zamražené buňky jsou odeslány zpět na klinické pracoviště. Pacientovi je mezitím podána lymfodepleční chemoterapie, která má usnadnit přežití pacienta do doby podání, a hlavně eliminovat co nejvíce nádorových buněk, a tím uvolnit místo v krvi pro modifikované CAR T-lymfocyty a usnadnit jejich funkci. Posledním krokem je tedy rozmražení a intravenózní podání upravených T buněk pacientovi (Levine, 2015).

Obr. 5 graficky znázorňuje proces výroby CAR T-lymfocytů.



Obr. 5: Výroba CAR T-lymfocytů (Fesnak et O´Doherty, 2017; upraveno)

4. Klinické využití CAR T-lymfocytů

V současné době je schváleno šest léků, které jsou založeny na technologii CAR. Jako první byly schváleny tisagenlecleucel a axicabtagen ciloleucel v roce 2017 (FDA, 2017a *et* FDA, 2017b). Další přípravek byl schválen v červenci roku 2020 pod názvem brexucabtagen autoleucel (FDA, 2020). O rok později byly schváleny hned dva léky: v únoru lisocabtagen maraleucel a v březnu idecabtagen vicleucel (FDA, 2021a *et* FDA, 2021b). V únoru následujícího roku FDA schvaluje k použití ciltacabtagen autoleucel (FDA, 2022).

Účinná látka	Obchodní název	Indikace	Spacer	Transmem. doména	Signální doména	Cílový antigen
Tisagenlecleucel	Kymriah	B-ALL[8], DLBCL[9] HGBL[10]	CD8α	CD8α	CD3ζ 4-1BB	CD19
Axicabtagen ciloleucel	Yescarta	DLBCL, PMBCL[11] HGBL	CD28	CD28	CD3ζ CD28	CD19
Brexucabtagen autoleucel	Tecartus	MCL[12], B-ALL	CD28	CD28	CD3ζ 4-1BB	CD19
Lisocabtagen maraleucel	Breyanzi	DLBCL, FL[13], HGBL PMBCL	IgG4	CD28	CD3ζ 4-1BB	CD19
Idecabtagen vicleucel	Abecma	MM[14]	CD8α	CD8α	CD3ζ 4-1BB	BCMA
Ciltacabtagen autoleucel	Carvykti	MM	CD8α	CD8α	CD3ζ 4-1BB	BCMA

Tab. 1: Porovnání schválených léčivých látek (Roberts *et al.*, 2017; Vairy *et al.*, 2018; Price *et al.*, 2020; Bhattarai et al., 2020; Kwilas *et al.,* 2021; Chattopadhyay *et al.,* 2022)

4.1. B buněčná akutní lymfoblastická leukémie (B-ALL)

Akutní lymfoblastická leukémie nebo také lymfocytární leukémie je maligní onemocnění vznikající transformací hematopoetické kmenové buňky lymfoidní linie. ALL může vycházet z prekurzorů B buněk nebo T buněk, nicméně výrazně častější jsou případy z B linie.

Jako cílový antigen je nejvhodnější CD19, který je exprimován na leukemických lymfoidních progenitorových buňkách B linie, ale zároveň se nevyskytuje na ostatních progenitorových buňkách (Uckun *et al.,* 1988). O účinnosti tohoto antigenu svědčí i jeho využití ve schválených lécích (viz *tab.1*).

Právě B-ALL byla jednou z prvních nemocí, na které byla zkoumána účinnost CAR T-lymfocytů a jednalo se o úplně první studii, kdy byly CAR T buňky podány dětem. Obě byly v minulosti neúspěšně léčeny chemoterapií. Po podání upravených T buněk došlo k remisi. U jednoho pacienta byla remise dlouhodobá, nicméně u druhého pacienta došlo po dvou měsících k relapsu v důsledku vzniku CD19-negativních buněk (Grupp *et al.,* 2013).

[8] B buněčná akutní lymfoblastická leukémie.
[9] Difuzní velkobuněčný B lymfom.
[10] High-grade B-lymfom.
[11] Mediastální velkobuněčný B lymfom.
[12] Lymfom z plášťových buněk.
[13] Folikulární lymfom.
[14] Mnohočetný myelom.

Během klinické studie zkoumající účinnost léčiva tisagenlecleucel byla dávka CAR T buněk podána 75 pacientům s relabující/refrakterní ALL. U více než poloviny těchto pacientů došlo v minulosti k relapsu po alogenní transplantaci hematopoetických buněk. Celková míra remise byla 81 % (Maude *et al.,* 2018).

Pacienti byli nadále sledováni a po 18 měsících byla míra přežití bez relapsu 66 % (Grupp *et al.,* 2019).

Úspěšnost CAR T-lymfocytů při léčbě ALL potvrzuje i další studie s lékem brexucabtagen autoleucel. Léčivo bylo podáno 55 pacientům s relabující/refrakterní ALL, ke kompletní remisi došlo u 39 z nich (tedy u 71 %). Do ukončení sběru dat 12 pacientů zůstalo v remisi a u 12 došlo k relapsu (Shah *et al.,* 2021).

V některých případech může docházet ke snížení exprese CD19. Poté je třeba hledat alternativní cílové antigeny. Pro ALL se nabízí například CD20 nebo CD22. Pro dosažení co nejlepšího účinku byl vytvořen chimérický antigenní receptor namířený proti všem třem antigenům zároveň (CD19, CD20, CD22). *In vitro* provedené pokusy dokazují efektivitu takto vytvořeného CAR konstruktu (Fousek *et al.,* 2021).

4.2. Non-Hodgkinovy lymfomy (NHL)

Non-Hodginovy lymfomy jsou heterogenní skupinou nádorových onemocnění vznikající z lymfatické tkáně. Patří sem lymfomy odvozené z B-lymfocytů (tvoří asi 80 %), T-lymfocytů i NK buněk. Léčba CAR T-lymfocyty je v současné době schválena pro pět typů NHL odvozených z B-lymfocytů: difuzní velkobuněčný B lymfom (DLBCL, nejčastější), folikulární lymfom (FL, druhý nejčastější), lymfom z plášťových buněk (MCL), primární mediastinální velkobuněčný B lymfom (PMBCL), high-grade B-lymfom (HGBL).

Stejně jako u B-ALL je nejvhodnějším antigenem CD19, proto je cílem všech schválených léků (viz *tab. 1*).

Prvním schváleným léčivem založeným na principu CAR T-lymfocytů je axicabtagen ciloleucel. Do klinické studie zkoumající účinnost tohoto léku na refrakterní velkobuněčný B lymfom bylo zahrnuto 111 pacientům (lék byl podán 101), z nichž 77 mělo diagnózu DLBCL (do této skupiny byli zahrnuti i pacienti s HGBL), dále bylo zařazeno 8 pacientů s diagnózou PMBCL a 16 pacientů s transformovaným FL. Celkově došlo k odpovědi u 83 pacientů (tedy 82 %). U pacientů s DLBCL byla odpověď zaznamenána u 63 (82 %), u zbylých pacientů došlo k odpovědi u 20 z nich (83 %). Celková míra přežití po 18 měsících byla 52 % (Neelapu *et al.,* 2017).

Studie, která měla aktualizovat naměřená data, uvádí, že po čtyřech letech byla míra celkového přežití 44 % (Jacobson *et al.,* 2021).

Nejnovější studie testovala účinnost léku axicabtagen ciloleucel na pacientech, kterým byl diagnostikován tzv. difuzní velkobuněčný B lymfom s vysokým rizikem. Kompletní odpověď byla zjištěna u 78 % pacientů (Neelapu *et al.,* 2022).

V další studii, tentokrát s lékem tisagenlecleucel, bylo po infuzi sledováno 93 pacientů s refrakterním/relabujícím DLCBL (opět zde byli zahrnuti i pacienti s HGBL). Celková míra odpovědi byla 52 %; kompletní odpověď mělo 40 % pacientů (Schuster *et al.,* 2019).

Dalším schváleným lékem je lisocabtagen maraleucel. Při studii účinnosti byl lék podán 269 pacientům s relabujícím/refrakterním velkobuněčným B lymfomem. Objektivní odpověď byla zaznamenána u 186 z nich (73 %). Ve studii bylo zahrnuto 137 pacientů s DLCBL, z toho objektivní odpověď byla zaznamenána u 89. Dále bylo zahrnuto 36 pacientů s HGBL, kdy objektivní odpověď byla zaznamenána ve 25 případech, 15 pacientů s diagnózou PMBCL (objektivní odpověď u 11) a konečně 3 pacienti s FL (Abramson *et al.,* 2020).

Prozatím posledním schváleným lékem je brexucabtagen autoleucel, který je indikován pro léčbu MCL. Ve studii bylo hodnoceno 60 pacientů s relabujícím/refrakterním MCL. Objektivní odpověď byla prokázána u 93 % z nich a po 12 měsících sledování bylo v remisi 57 % hodnocených pacientů (Wang *et al.,* 2020).

4.3. Mnohočetný myelom (MM)

Mnohočetný myelom je maligní nádorové onemocnění způsobené proliferací plazmatických buněk s následnou tvorbou ložisek v kostní dřeni.

V současné době jsou pro léčbu mnohočetného myelomu schváleny dva léky na principu CAR T-lymfocytů (viz *tab. 1*). Oba konstrukty mají jako cílový antigen molekulu označovanou BCMA (z anglického *B-cell maturation antigen*; tedy antigen zrání B buněk).

BCMA neboli CD269 je antigen, který se nalézá na plazmatických buňkách mnohočetného myelomu (Novak *et al.,* 2004).

Prvním schváleným lékem využívajícím technologii CAR T-lymfocytů je idecabtagen vicleucel. Pro ověření jeho účinnosti byl podán 128 pacientům s relabujícím/refrakterním myelomem. Po roce sledování byla léčebná odpověď u 94 pacientů (73 %) a úplná odpověď byla detekována u 42 z nich. U 36 % pacientů byly CAR T-lymfocyty detekovatelné v krvi po 12 měsících (Munshi *et al.,* 2021).

O rok později byl schválen další lék, ciltacabtagen autoleucel, který potvrzuje efektivitu CAR T buněk při léčbě myelomu. Lék byl podán 97 pacientům s relabujícím/refrakterním myelomem. Celková míra odpovědi byla 97 % (tedy 94 pacientů), z toho 65 pacientů dosáhlo úplné odpovědi (Berdeja *et al.,* 2021).

4.4. Hodgkinův lymfom (HL)

Hodgkinův lymfom je maligní nádorové onemocnění lymfatické tkáně vznikající z B buněk. V současné době nejsou CAR T buňky schváleny pro léčbu tohoto onemocnění. Nicméně proběhlé studie ukazují potenciál této terapie při léčbě Hodgkinova lymfomu.

Jako cílový antigen pro léčbu byl zvolen CD30. CAR T buňky s tímto antigenem byly podány pacientům s relabujícím/refrakterním HL. Ze 37 hodnocených pacientů byla celková míra odezvy zaznamenána u 62 % (Ramos *et al.,* 2020).

Na základě výsledků této studie momentálně probíhá multicentrická studie, která by měla důkladněji ověřit efektivitu CAR T-lymfocytů při léčbě HL a potenciálně vést i ke schválení pro klinické využití (Meier *et al.,* 2022).

4.5. Chronická B-lymfatická leukémie (B-CLL)

Chronická B-lymfatická leukémie je nízce agresivní lymfoproliferativní onemocnění vznikající transformací a akumulací vyzrálých B-lymfocytů.

B-CLL byla vůbec první indikace, u které byly CAR T-lymfocyty klinicky testovány. Jako cílový antigen byl použit CD19 (stejně jako v následujících studiích). Upravené T buňky byly podány třem pacientům s pokročilou B-CLL rezistentní na chemoterapii. U dvou pacientů léčba vedla k úplné odpovědi a dlouhodobé remisi. U posledního pacienta byla odpověď částečná (Kalos *et al.,* 2011).

Pacienti byli nadále sledováni. Po deseti letech jsou oba nadále v remisi a v jejich krvi jsou CAR T-lymfocyty stále detekovatelné a představují 0,1 % celkových T-lymfocytů u jednoho a 0,8 % u druhého pacienta (Melenhorst *et al.,* 2022).

Přestože byla B-CLL první nemocí, na které byla zkoumána účinnost CAR T buněk, v současné době stále není schválen žádný léčivý přípravek využívající tuto technologii pro léčbu B-CLL.

Ve srovnání s jinými B buněčnými malignitami jako DLBCL nebo ALL je léčebná odpověď na CAR-T terapii u pacientů s B-CLL podstatně slabší. Důvody této nízké účinnosti jsou však

dosud ne zcela jasné. U pacientů s B-CLL byla zaznamenána časná imunodeficience, což posléze vede k omezené expanzi T buněk při výrobě CAR T-lymfocytů a následné omezené proliferaci *in vivo* (Zhao *et al.,* 2018).

Jednou z možností, která by léčbu CAR T-lymfocyty umožňovala, je předchozí terapie ibrutinibem[15]. Třem pacientům, kteří byli alespoň rok léčeni ibrutinibem, byly podány CAR T-lymfocyty. Výsledky prokázaly, že dlouhodobá léčba ibrutinibem skutečně zvrátila dysfunkci T buněk a zvýšila proliferaci CAR T-lymfocytů (Fraietta *et al.,* 2016).

Proběhly první fáze studie zkoumající účinek již schváleného léčiva lisocabtagene maraleucel na CLL při podání spolu s ibrutinibem. Z 19 sledovaných pacientů mělo odpověď 18 (Wierda *et al.,* 2020).

Další příčinou, která může stát za neúspěšnou léčbou CLL pomocí CAR T-lymfocytů, je mikroprostředí, které se liší od prostředí nalezeného u pacientů s ALL. Například působením maligních buněk CLL dochází u T-lymfocytů k odlišné expresi genů, které se podílejí především na buněčné diferenciaci nebo cytotoxicitě buněk (Görgün *et al.,* 2005). Dále byl v T buňkách, které byly v kontaktu s maligními buňkami, zjištěn defekt v tvorbě imunitní synapse[16]. Tvorbu synapsí je možné zlepšit podáním léku lenalidomid (Ramsay *et al.,* 2008). První studie potvrzují, že CAR T-lymfocyty si zachovávají funkční imunitní synapse v přítomnosti lenalidomidu, a mohou tak účinněji zpomalovat onemocnění ve srovnání s buňkami bez přítomnosti lenalidomidu (Tettamanti *et al.,* 2022).

V neposlední řadě bylo zjištěno, že T buňky pocházející od pacientů s CLL mají zvýšenou expresi imunitních kontrolních bodů (konkrétně CTLA-4 a PD-1). To může vést k vyčerpání T-lymfocytů a ke ztrátě jejich cytotoxicity. Tento problém by mohl být vyřešen podáním inhibitorů kontrolních bodů spolu s CAR T-lymfocyty (Palma *et al.,* 2017).

V roce 2018 proběhla studie se 41 pacienty, která měla za cíl identifikovat vlastnosti CAR T-lymfocytů, jež by vedly k úspěšné léčbě CLL. Studie prokázala, že CAR T buňky od pacientů s kompletní odpovědí mají zvýšenou expresi genů spojených s imunitní pamětí. Oproti tomu u pacientů, kde léčba nebyla úspěšná, byla v CAR T buňkách zaznamenána zvýšená exprese genů regulujících například buněčné vyčerpání nebo apoptózu. Získání optimálních CAR T-lymfocytů by bylo možné zkrácením doby kultivace nebo například metabolickým inženýrstvím. Studie také naznačuje, že získané poznatky by mohly vést ke zdokonalení výběru pacientů, kteří s největší pravděpodobností na léčbu zareagují (Fraietta *et al.,* 2018).

---

[15] Blokátor Brutonovy tyrosinkinázy – schválené léčivo na CLL.

[16] Místo kontaktu mezi antigenem a lymfocytem s koncentricky organizovanými receptory a adhezivními molekulami.

4.6. Solidní nádory

Solidní nádory vytvářejí pevná ložiska tvořena nádorovými buňkami, jedná se např. o sarkomy, karcinomy, nádory mozku a nervů aj. V současné době není schválen žádný léčivý přípravek s CAR T-lymfocyty proti solidním nádorům. Důvodem je řada vlastností, kterými se solidní nádory liší od hematologických malignit a které tím znesnadňují výrobu CAR T buněk.

Hlavním problémem je výběr vhodného cílového antigenu. Solidní tumory často na svém povrchu neexprimují antigeny specifické pro nádory (TSA), tzn. proteiny, které se na běžných buňkách nevyskytují. Obvyklejší jsou antigeny asociované s nádory (TAA), které nejsou výlučně specifické pro nádorové buňky, ale jsou exprimované i na buňkách zdravé tkáně. Úroveň exprese se pak může odlišovat kvantitativně, časově nebo místně.

V neposlední řadě je problémem solidních nádorů jejich kompaktnost. Zatímco se hematologické maligní buňky vyskytují jednotlivě v krevním řečišti a kontakt s nimi je tak usnadněn, v případě solidních nádorů nemusí být CAR T-lymfocyty schopny do masy nádoru proniknout. Solidní nádory jsou také často méně prokrveny, takže přístup CAR T buněk z krevního řečiště je znesnadněn. Dalším důležitým faktorem je, že v nádorové mase se vyskytuje silně inhibiční mikroprostředí se zvýšenou expresí solubilních i na membránu navázaných inhibičních molekul, které tlumí aktivitu složek imunitního systému (Marofi *et al.,* 2021).

Tab. 2 uvádí antigeny některých solidních nádorů testované jako cíle pro terapii CAR T buňkami.

Malignita	Testované cílové antigeny
Kolorektální karcinom	NKG2D, EP-CAM, HER2, GUCY2C, TAG-72, CD46, CD1333
Karcinom jater	CEA, Glypican3, AFP, CD133
Karcinom žaludku	Mezotelin, ANTXR1, MUC3A, Trop2, Claudin18.2, NKG2D, HER2, FR-α
Karcinom pankreatu	MUC1, Mezotelin, αvβ6, CEA, PSCA, FAP, CD47, HER2, NKG2D, CD133
Karcinom ledvin	CAIX
Melanom	GD2, GSPG4, Glypican3, HER2
Karcinom děložního hrdla	αvβ6, L1-CAM
Neuroblastom	GD2, CD56, Glypican 2, CD171
Glioblastom	EGFRvIII, HER2, B7-H3, NKG2D, CAIX, αvβ3, IL13Rα2
Meduloblastom	HER2, B7-H3, EPHA2, IL13Rα2
Karcinom vaječníku	Mezotelin, αvβ6, B7-H3, CD47, NKG2D
Karcinom prostaty	PSA, PAP, PSCA, PSMA, EpCAM
Karcinom plic	MAGE-A1, CD32A, ROR, EGFRvIII
Karcinom prsu	CEA, c-MET, tMUC1, NKG2D, HER2

Tab. 2: Cílové antigeny pro terapii CAR T-lymfocyty vybraných solidních nádorů, upraveno (Marofi et al., 2021; Patterson *et al.,* 2020).

V současné době probíhá intenzivní výzkum ohledně efektivity CAR T terapie při použití proti solidním tumorům. Celá řada konstruktů proti jednotlivým antigenům je v první fázi klinické studie, případně první fázi ukončila.

Příkladem může být studie s CAR namířeným proti CD133, do které bylo zahrnuto 23 pacientů (14 pacientů s hepatocelulárním karcinomem, 7 s karcinomem pankreatu a 2 s kolorektálním karcinomem). Částečná odpověď byla zaznamenána u tří pacientů a u 14 pacientů došlo ke stabilizaci onemocnění. U 21 pacientů se během sledovacího období *de novo* nevyvinuly detekovatelné léze. Dále analýza tkání ukázala, že CD133+ buňky byly po infuzích CAR T-lymfocytů eliminovány (Wang *et al.,* 2018).

V jiné studii byl jako cílový antigen vybrán mezotelin. Zahrnuto bylo 27 pacientů, z nichž 25 mělo diagnózu maligní pleurální mezoteliom, 1 metastatický karcinom plic a 1 metastatický karcinom prsu. Krom infuze CAR T-lymfocytů byl pacientům podán i pembrolizumab[17]. Následně bylo hodnoceno 16 pacientů. Nejlepší zaznamenaná odpověď byla částečná, a to u dvou z nich. Stabilizace onemocnění se podařilo dosáhnout u 9 pacientů, kdy u 8 se stabilita udržela déle než 6 měsíců i bez další léčby (Adusumilli *et al.,* 2021).

Další velmi slibný cílový antigen (HER2) byl testován při léčbě glioblastomu. V první fázi klinické studie byly CAR T buňky, namířené proti antigenu HER2, podány 17 pacientům. Jeden pacient měl částečnou odpověď déle než 9 měsíců a u 7 pacientů bylo onemocnění

[17] Inhibitor kontrolního bodu.

stabilizováno. V krvi byly CAR T-lymfocyty detekovatelné až po dobu 12 měsíců. Výsledky této studie umožňují další testování léčiva ve druhé fázi klinických testů (Ahmed *et al.,* 2017).

Celkově proběhla a stále probíhá obrovská řada klinických studií cílených na různé antigeny a na různé typy solidních nádorů. Nicméně obecným problémem všech těchto studií je stále nízká efektivita, kdy je dosaženo většinou pouze částečné odpovědi, a to pouze u malého procenta pacientů. Dalším hlavním problémem je poměrně vysoká toxicita léčby z důvodu nespecifické exprese zvolených cílových antigenů.

5. Problémy spojené s terapií CAR T-lymfocyty

Přestože u řady onemocnění zaznamenala terapie CAR T buňkami úspěch, jsou zde i podstatné nevýhody, které použití této léčby limitují.

5.1. Finanční toxicita

Finanční toxicita je pojem, který se v souvislosti s novými léčebnými přístupy stále více skloňuje. Léčba CAR T buňkami stojí nemalé částky. Například jedna dávka léčiva axicabtagen ciloleucel vyjde na 373 000 USD (v přepočtu 7,5 milionu Kč) a tisagenlecleucel dokonce na 475 000 USD (v přepočtu skoro 10 milion Kč). Přesto Melanie Whittington uvádí, že tato částka není konečná. Je třeba připočíst například náklady spojené s vedlejšími účinky (viz dále) nebo třeba hospitalizaci pacienta. Jen tyto náklady pak mohou být i dvakrát až třikrát vyšší než samotné pořízení léku (Whittington *et al.,* 2018).

I proto je třeba zvýšit účinnost této nákladné terapie a zároveň zavést biomarkery, které by byly schopny predikovat léčebnou odpověď u jednotlivých pacientů a tím selektovat konkrétní pacienty vhodné k léčbě CAR T-lymfocyty.

5.2. Vedlejší účinky

Terapie CAR T-lymfocyty má několik závažných vedlejších účinků, které ale často vznikají kvůli úspěšně probíhající léčbě.

5.2.1. Syndrom uvolnění cytokinů (CRS)

Cytokiny jsou základními regulátory imunitního systému – zajišťují komunikaci mezi buňkami. Stejně jako nativní T-lymfocyty uvolňují CAR T buňky po navázání na antigen

cytokiny, aby aktivovaly další složky imunitního systému. Uvolnění cytokinů do krve je tedy žádoucí a nezbytné pro úspěšnou aktivaci imunitního systému a tím i pro úspěšné odstranění maligních buněk (Brudno *et* Kochenderfer, 2016).

Syndrom uvolnění cytokinů (jinak také cytokinová bouře) je pak stav, kdy dojde k nadměrnému uvolnění cytokinů v důsledku hromadné aktivace velkého množství CAR T-lymfocytů po jejich vazně na cílový antigen na nádorových buňkách. Tato cytokinová bouře může vést k orgánovému selhání a v krajním případě i smrti. Klinicky se tento stav projevuje horečkou, únavou, nevolností a posléze selháváním jednotlivých orgánů.

Pro léčbu CRS vyvolaného terapií CAR T-lymfocyty schválila americká *Food and Drug Administration* v roce 2017 tocilizumab, protilátku proti jednomu z hlavních cytokinů, IL-6 (Le *et al.,* 2018).

Tab. 3 ukazuje, že CRS je nejčastější vedlejší efekt léčby. Byl zaznamenán ve všech klinických studiích, a to obvykle u více než poloviny pacientů.

5.2.2. Neurologická toxicita (ICANS)

Druhým nejčastějším vedlejším účinkem léčby CAR T-lymfocyty je neurologická toxicita. Mezi klinické příznaky patří snížené vědomí, zmatenost, bolest hlavy, záchvaty, halucinace, obrna lícního nervu aj. (Brudno *et* Kochenderfer, 2016).

Přesný důvod vzniku neurotoxicity není znám. Nejčastěji se vyskytuje souběžně se syndromem uvolněných cytokinů, nicméně jsou zaznamenány i nezávislé výskyty. Jako jeden z možných mechanismů byla navržena dysfunkce hematoencefalické bariéry. Při zánětlivém stavu dochází k jejímu narušení, což spouští řadu patofyziologických reakcí v mozku. Lékem volby pro pacienty s neurologickými symptomy jsou kortikosteroidy (Xiao *et al.,* 2021).

Neurotoxicita byla zaznamenána ve všech klinických studiích, nejčastěji u méně než poloviny pacientů (viz *tab. 3*).

5.2.3. B buněčná aplazie

V případě dosud schválených produktů CAR T-lymfocytů cílených proti B buněčným antigenům je dalším očekávatelným vedlejším účinkem léčby tzv. B buněčná aplazie, tedy úplná absence B-lymfocytů v těle pacienta. Tento stav souvisí s takzvanou *„on-target off-tumor“* toxicitou – antigen se nachází i na zdravých buňkách (v tomto případě B-lymfocytech), které jsou tím pádem CAR T buňkami rozpoznány a zničeny stejně jako buňky maligní. Pacienti

bez B-lymfocytů jsou velmi ohroženi například bakteriálními infekcemi. Nicméně nejde o život ohrožující komplikaci léčby.

Pro odstranění dopadu tohoto vedlejšího účinku je pacientům přibližně v měsíčních intervalech podáván subkutánní imunoglobulin (Arnold *et al.,* 2020).

B buněčná aplazie je vedlejší účinek, jehož četnost nebyla uveden ve všech studiích. Nicméně z *tab. 3* vyplývá, že v případě uvedení ve studii trpěla tímto nežádoucím účinkem většina pacientů.

5.2.4. Syndrom lýzy nádoru (TLS)

Syndrom lýzy nádoru vzniká po nekróze velkého množství maligních buněk za krátký časový úsek. Nekróza vede k uvolnění intracelulárních látek a metabolitů do krevního řečiště. Ledviny nejsou schopny vyloučit všechny tyto toxické látky, což má za následek řadu klinických příznaků; např. hyperkalémie, hyperfosfatémie, hyperurikémie nebo hypokalcémie. V závažném případě může dojít k selhání ledvin. Prevencí je především hydratace, případně mohou být podány léky usnadňující metabolismus odpadních látek (Miao *et al.,* 2021)

TLS byl nejméně častým vedlejším účinkem. Ve studiích byl zaznamenán jen u jednotek pacientů (viz *tab. 3*).

Účinná látka	Indikace	Celkový počet pacientů	CRS	ICANS	B aplazie	TLS
Tisagenlecleucel	B-ALL	75	58 (77 %)	30 (40 %)	75 (100 %)	3 (4 %)
	NHL	93	64 (58 %)	23 (21 %)	N[18]	1 (1 %)
Axicabtagen ciloleucel	NHL	101	94 (93 %)	65 (64 %)	N	N
Brexucabtagen autoleucel	B-ALL	55	49 (89 %)	33 (60 %)	N	1 (2 %)
	MCL	68	62 (91 %)	43 (63 %)	N	1 (1 %)
Lisocabtagen maraleucel	NHL	269	113 (42 %)	80 (30 %)	241 (92 %)	2 (1 %)
Idecabtagen vicleucel	MM	128	107 (84 %)	23 (18 %)	N	N
Ciltacabtagen autoleucel	MM	97	92 (95 %)	20 (21 %)	N	N

Tab. 3: Vedlejší účinky v klinických studiích schválených léčiv (Maude et al., 2018; Shah et al., 2021; Neelapu et al., 2017; Schuster et al., 2019; Abramson *et al.,* 2020; Wang *et al.,* 2020; Munshi *et al.,* 2021; Berdeja *et al.,* 2021).

[18] Neuvedeno ve studii.

6. Závěr

Technologie CAR T-lymfocytů byla poprvé představena před více než třiceti lety. Od té doby se původní myšlenka rozvíjela a zdokonalovala. To dalo vzniknout hned pěti generacím chimérických receptorů. Zatímco první generace se v současné době vůbec nevyužívá, CAR T-lymfocyty druhé generace jsou součástí šesti dnes schválených léků. Další generace jsou testovány a jejich schválení pro klinické využití se očekává v budoucnu.

Účinek této léčby můžeme vidět na klinických studiích, kdy tato technologie byla úspěšná i u pacientů, u nichž jiné možnosti léčby selhaly. V klinických studiích schválených léků na léčbu obvykle reagovaly více než dvě třetiny pacientů.

I přes úspěchy, které CAR T buňky slaví při léčbě hematologických onemocnění vzniklých z B linie, je zde řada obtíží, které je třeba překonat. Jedná se například o cenu této technologie nebo dobu potřebnou pro úpravu pacientových buněk. Velké naděje se proto vkládají do vývoje univerzálních CAR T-lymfocytů, které by byly finančně dostupnější, a především připraveny k aplikaci prakticky okamžitě.

Nicméně největší výzvou je momentálně léčba solidních nádorů. Imunosupresivní prostředí, absence jedinečného nádorového antigenu, nedostatečné prokrvení masy nádoru, to vše ztěžuje použití CAR T-lymfocytů. V současné době je proto hlavním cílem nalézt způsob, jak CAR T buňky vylepšit tak, aby si poradily i s obtížemi, které přináší léčba solidních nádorů. Jak ukazují některé studie, zaměřující se na zlepšení funkcí CAR T-lymfocytů, významnou roli pro budoucnost této technologie bude mít CRISPR/Cas9, který umožňuje přesnou editaci genomu.

CAR T technologie uplatňuje svůj potenciál i mimo onkologii. Do budoucna snad bude možné použití CAR T buněk i při léčbě například autoimunitních onemocnění nebo virových infekcí.

7. Literatura

Abramson J.S., Palomba M.L., Gordon L.I., Lunning M.A., Wang M., Arnason J., Mehta A., Purev E., Maloney D.G., Andreadis C., Sehgal A., Solomon S.R., Ghosh N., Albertson T.M., Garcia J., Kostic A., Mallaney M., Ogasawara K., Newhall K., Kim Y., Li D., Siddiqi T. 2020. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. Lancet. 396(10254):839-852.

Adusumilli P.S., Zauderer M.G., Rivière I., Solomon S.B., Rusch V.W., O'Cearbhaill R.E., Zhu A., Cheema W., Chintala N.K., Halton E., Pineda J., Perez-Johnston R., Tan K.S., Daly B., Araujo Filho J.A., Ngai D., McGee E., Vincent A., Diamonte C., Sauter J.L., Modi S., Sikder D., Senechal B., Wang X., Travis W.D., Gönen M., Rudin C.M., Brentjens R.J., Jones D.R., Sadelain M. 2021. A Phase I Trial of Regional Mesothelin-Targeted CAR T-cell Therapy in Patients with Malignant Pleural Disease, in Combination with the Anti-PD-1 Agent Pembrolizumab. Cancer Discov. 11(11):2748-2763.

Ahmed N., Brawley V., Hegde M., Bielamowicz K., Kalra M., Landi D., Robertson C., Gray T.L., Diouf O., Wakefield A., Ghazi A., Gerken C., Yi Z., Ashoori A., Wu M.F, Liu H., Rooney C., Dotti G., Gee A., Su J., Kew Y., Baskin D., Zhang Y.J., New P., Grilley B., Stojakovic M., Hicks J., Powell S.Z., Brenner M.K., Heslop H.E., Grossman R., Wels W.S., Gottschalk S. 2017. HER2-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified Virus-Specific T Cells for Progressive Glioblastoma: A Phase 1 Dose-Escalation Trial. JAMA Oncol. 3(8):1094-1101.

Alonso R., Cedena M.T., Wong S., Shah N., Ríos-Tamayo R., Moraleda J.M., López-Jiménez J., García C., Bahri N., Valeri A., Sánchez R., Collado-Yurrita L., Martin T., Wolf J, Lahuerta J.J., Martínez-López J. 2020. Prolonged lenalidomide maintenance therapy improves the depth of response in multiple myeloma. Blood Adv. 4(10):2163–2171.

Altvater B., Landmeier S., Pscherer S., Temme J., Juergens H., Pule M., Rossig C. 2009. 2B4 (CD244) signaling via chimeric receptors costimulates tumor-antigen specific proliferation and in vitro expansion of human T cells. Cancer. Immunol. Immunother. 58(12):1991-2001.

Arnold D.E., Maude S.L., Callahan C.A., DiNofia A.M., Grupp S.A., Heimall J.R. 2020. Subcutaneous immunoglobulin replacement following CD19-specific chimeric antigen

receptor T-cell therapy for B-cell acute lymphoblastic leukemia in pediatric patients. Pediatr Blood Cancer. 67(3):e28092.

Berdeja J.G., Madduri D., Usmani S.Z., Jakubowiak A., Agha M., Cohen A.D., Stewart A.K., Hari P., Htut M., Lesokhin A., Deol A., Munshi N.C., O'Donnell E., Avigan D., Singh I., Zudaire E., Yeh T.M., Allred A.J., Olyslager Y., Banerjee A., Jackson C.C., Goldberg J.D., Schecter J.M., Deraedt W., Zhuang S.H., Infante J., Geng D., Wu X., Carrasco-Alfonso M.J., Akram M., Hossain F., Rizvi S., Fan F., Lin Y., Martin T., Jagannath S. 2021. Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study. Lancet. 398(10297):314-324.

Bhattarai N., Lucas T., Schultz K.L.W., 2020. CMC BLA Review Memo – BREYANZI. [online:https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/breyanzi-lisocabtagene-mar]

Brentjens R.J., Latouche J.B., Santos E., Marti F., Gong M.C., Lyddane C., King P.D., Larson S., Weiss M., Rivière I., Sadelain M. 2003. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. Nat. Med. 9(3):279-86.

Brentjens R.J., Santos E., Nikhamin Y., Yeh R., Matsushita M., La Perle K., Quintás-Cardama A., Larson S.M., Sadelain M. 2007. Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. Clin Cancer Res. 13(18 Pt 1):5426-35.

Bridgeman J.S., Hawkins R.E., Bagley S., Blaylock M., Holland M., Gilham D.E. 2010. The optimal antigen response of chimeric antigen receptors harboring the CD3zeta transmembrane domain is dependent upon incorporation of the receptor into the endogenous TCR/CD3 complex. J. Immunol. 184(12):6938-49.

Brocker T., Karjalainen K. 1995. Signals through T cell receptor-zeta chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes. J. Exp. Med. 181(5):1653-1659.

Brudno J.N., Kochenderfer J.N. 2016. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. Blood. 127(26):3321-30.

Coley W.B. 1891. II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. Ann. Surg. 14(3):199-220.

Cooper M.L., Choi J., Staser K., Ritchey J.K., Devenport J.M., Eckardt K., Rettig M.P., Wang B., Eissenberg L.G., Ghobadi A., Gehrs L.N., Prior J.L., Achilefu S., Miller C.A.,

Fronick C.C., O'Neal J., Gao F., Weinstock D.M., Gutierrez A., Fulton R.S., DiPersio J.F. 2018. An "off-the-shelf" fratricide-resistant CAR-T for the treatment of T cell hematologic malignancies. Leukemia. 32(9):1970-1983.

Davies D.M., Foster J., Van Der Stegen S.J., Parente-Pereira A.C., Chiapero-Stanke L., Delinassios G.J., Burbridge S.E., Kao V., Liu Z., Bosshard-Carter L., Van Schalkwyk M.C., Box C., Eccles S.A., Mather S.J., Wilkie S., Maher J. 2012. Flexible targeting of ErbB dimers that drive tumorigenesis by using genetically engineered T cells. Mol. Med. 18(1):565-76.

Di Stasi A., Tey S.K., Dotti G., Fujita Y., Kennedy-Nasser A., Martinez C., Straathof K., Liu E., Durett A.G., Grilley B., Liu H., Cruz C.R., Savoldo B., Gee A.P., Schindler J., Krance R.A., Heslop H.E., Spencer D.M., Rooney C.M., Brenner M.K. 2011. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. N. Engl. J. Med. 365(18):1673-83.

Dragon A.C., Zimmermann K., Nerreter T., Sandfort D., Lahrberg J., Klöß S., Kloth C., Mangare C., Bonifacius A., Tischer-Zimmermann S., Blasczyk R., Maecker-Kolhoff B., Uchanska-Ziegler B., Abken H., Schambach A., Hudecek M., Eiz-Vesper B. 2020. CAR-T cells and TRUCKs that recognize an EBNA-3C-derived epitope presented on HLA-B*35 control Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferation. J. Immunother. Cancer. 8(2):e000736.

Drent E., Poels R., Ruiter R., van de Donk N.W.C.J., Zweegman S., Yuan H., de Bruijn J., Sadelain M., Lokhorst H.M., Groen R.W.J., Mutis T., Themeli M. 2019. Combined CD28 and 4-1BB Costimulation Potentiates Affinity-tuned Chimeric Antigen Receptor-engineered T Cells. Clin. Cancer. Res. 25(13):4014-4025.

Ellebrecht C.T., Bhoj V.G., Nace A., Choi E.J., Mao X., Cho M.J., Di Zenzo G., Lanzavecchia A., Seykora J.T., Cotsarelis G., Milone M.C., Payne A.S. 2016. Reengineering chimeric antigen receptor T cells for targeted therapy of autoimmune disease. Science. 353(6295):179-84.

Eshhar Z., Waks T., Gross G., Schindler D.G. 1993 Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.90(2):720-4.

Eyquem, J., Mansilla-Soto, J., Giavridis, T. van der Stegen S.J.C., Hamieh M., Cunanan K. M., Odak A., Gönen M., Sadelainet M. 2017. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. Nature 543, 113–117.

Fesnak A., O'Doherty U. 2017. Clinical Development and Manufacture of Chimeric Antigen Receptor T cells and the Role of Leukapheresis. European Oncology & Haematology. 3(1):28–34.

Finney H.M., Akbar A.N., Lawson A.D. 2004. Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. J. Immunol. 172(1):104-13.

Fleischer L.C., Raikar S.S., Moot R., Knight K.A., Doering C.B., Spencer H. T. 2017. Engineering CD5-Targeted Chimeric Antigen Receptors and Edited T Cells for the Treatment of T-Cell Leukemia. Blood. 130 (1): 1914.

Fousek K., Watanabe J., Joseph S.K., George A., An X., Byrd T.T., Morris J.S., Luong A., Martínez-Paniagua M.A., Sanber K., Navai S.A., Gad A.Z., Salsman V.S., Mathew P.R., Kim H.N., Wagner D.L., Brunetti L., Jang A., Baker M.L., Varadarajan N., Hegde M., Kim Y.M., Heisterkamp N., Abdel-Azim H., Ahmed N. 2021. CAR T-cells that target acute B-lineage leukemia irrespective of CD19 expression. Leukemia. 35(1):75-89.

Fraietta J.A., Beckwith K.A., Patel P.R., Ruella M., Zheng Z., Barrett D.M., Lacey S.F., Melenhorst J.J., McGettigan S.E., Cook D.R., Zhang C., Xu J., Do P., Hulitt J., Kudchodkar S.B., Cogdill A.P., Gill S., Porter D.L., Woyach J.A., Long M., Johnson A.J., Maddocks K., Muthusamy N., Levine B.L., June C.H., Byrd J.C., Maus M.V. 2016. Ibrutinib enhances chimeric antigen receptor T-cell engraftment and efficacy in leukemia. Blood. 127(9):1117-27.

Fraietta J.A., Lacey S.F., Orlando E.J., Pruteanu-Malinici I., Gohil M., Lundh S., Boesteanu A.C., Wang Y., O'Connor R.S., Hwang W., Pequignot E., Ambrose D.E., Zhang C., Wilcox N., Bedoya F., Dorfmeier C., Chen F., Tian L., Parakandi H., Gupta M., Young R.M., Johnson F.B., Kulikovskaya I., Liu L., Xu J., Kassim S.H., Davis M.M., Levine M.L., Frey N.V., Siegel D.L., Huang A.C., Wherry E.J., Bitter H., Brogdon J.L., Porter D.L., June C.H., Melenhorst J.J. 2018. Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. Nat. Med. 24, 563–571.

Freeman G.J., Long A.J., Iwai Y., Bourque K., Chernova T., Nishimura H., Fitz L.J., Malenkovich N., Okazaki T., Byrne M.C., Horton H.F., Fouser L., Carter L., Ling V., Bowman M.R., Carreno B.M., Collins M., Wood C.R., Honjo T. 2000 Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. J. Exp. Med. 192(7):1027-34.

Fujiwara K., Tsunei A., Kusabuka H., Ogaki E., Tachibana M., Okada N. 2020. Hinge and Transmembrane Domains of Chimeric Antigen Receptor Regulate Receptor Expression and Signaling Threshold. Cells. 9(5):1182.

Furman W.L. 2021 Monoclonal Antibody Therapies for High Risk Neuroblastoma. Biologics.15:205-219.

Gong M.C., Latouche J.B., Krause A., Heston W.D., Bander N.H., Sadelain M. 1999. Cancer patient T cells genetically targeted to prostate-specific membrane antigen specifically lyse prostate cancer cells and release cytokines in response to prostate-specific membrane antigen. Neoplasia. 1(2):123-7.

Görgün G., Holderried T.A., Zahrieh D., Neuberg D., Gribben J.G. 2005. Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells. J. Clin. Invest. 115(7):1797-805.

Grillo-López A.J., White C.A., Dallaire B.K., Varns C.L., Shen C.D., Wei A., Leonard J.E., McClure A., Weaver R., Cairelli S., Rosenberg J. 2000. Rituximab: the first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma. Curr. Pharm. Biotechnol. 1(1):1-9.

Gross G., Waks T., Eshhar Z. 1989. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86(24): 10024-8.

Grupp S.A., Kalos M., Barrett D., Aplenc R., Porter D.L., Rheingold S.R., Teachey D.T., Chew A., Hauck B., Wright J.F., Milone M.C., Levine B.L., June C.H. 2013. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. N. Engl. J. Med. 368(16):1509-1518.

Grupp S.A., Maude S.L., Rives S., Baruchel A., Boyer M., Bittencourt H., Bader P., Buchner J., Laetsch T.W., Stefanski H., Myers G.D., Qayed M., Pulsipher M.A., De Moerloose B., Yanik G.A., Davis K.L., Martin P.L., Nemecek E.R., Peters C., Krueger J.,

Balduzzi A., Boissel N., Mechinaud F., Leung M., Eldjerou L., Bleickardt E., Mueller K. T., Hiramatsu H. 2019. Tisagenlecleucel for the Treatment of Pediatric and Young Adult Patients with Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia: Updated Analysis of the ELIANA Clinical Trial. Biology of Blood and Marrow Transplantation. 25(3):S126-S127.

Haynes N.M., Snook M.B., Trapani J.A., Cerruti L., Jane S.M., Smyth M.J., Darcy P.K. 2001. Redirecting mouse CTL against colon carcinoma: superior signaling efficacy of single-chain variable domain chimeras containing TCR-zeta vs Fc epsilon RI-gamma. J. Immunol. 166(1):182-7.

Hegde M., Mukherjee M., Grada Z., Pignata A., Landi D., Navai S.A., Wakefield A., Fousek K., Bielamowicz K., Chow K.K., Brawley V.S., Byrd T.T., Krebs S., Gottschalk S., Wels W.S., Baker M.L., Dotti G., Mamonkin M., Brenner M.K., Orange J.S., Ahmed N. 2016. Tandem CAR T cells targeting HER2 and IL13Rα2 mitigate tumor antigen escape. J. Clin. Invest. 126(8):3036-52.

Hrabovský Š. 2020. CAR T-lymfocyty: horká novinka v léčbě nádorů. Vnitř. Lék. 66(7): 420–424

Hudecek M., Sommermeyer D., Kosasih P.L., Silva-Benedict A., Liu L., Rader C., Jensen M.C., Riddell S.R. 2015. The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. Cancer. Immunol. Res. 3(2):125-35.

Chattopadhyay M., Lucas T., Price G., Ye Z. 2022. CBER CMC BLA Review Memo – CARVYKTI [online: https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/carvykti]

Cheever M.A., Higano C.S. 2011. PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. Clin. Cancer Res. 17(11):3520-6.

Chmielewski M., Kopecky C., Hombach A.A., Abken H. 2011. IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively Muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression. Cancer. Res. 71(17):5697-706.

Imai C., Mihara K., Andreansky M., Nicholson I.C., Pui C.H., Geiger T.L., Campana D. 2004. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 18(4):676-84.

Inaba, H., Pui, C. H. 2010. Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia. The Lancet. Oncology. 11(11):1096–1106.

Jacobson C., Locke F.L., Ghobadi A., Miklos D.B., Lekakis L.J., Oluwole O.O., Lin Y., Hill B.T., Timmerman J.M., Deol A., Reagan P.M., Stiff P., Flinn I.W., Farooq U., Goy A.H., Muñoz J., Siddiqi T., Shen R.R., Bot A., Dong J., Singh K., Spooner C., Karalliyadda R., Kim J.J., Zheng Y., Neelapu S.S. 2021. Long-Term (≥4 Year and ≥5 Year) Overall Survival (OS) By 12- and 24-Month Event-Free Survival (EFS): An Updated Analysis of ZUMA-1, the Pivotal Study of Axicabtagene Ciloleucel (Axi-Cel) in Patients (Pts) with Refractory Large B-Cell Lymphoma (LBCL) Blood. 138(1):1764

Jung I.Y., Kim Y.Y., Yu H.S., Lee M., Kim S., Lee J. 2018. CRISPR/Cas9-Mediated Knockout of DGK Improves Antitumor Activities of Human T Cells. Cancer. Res. 78(16):4692-4703.

Jung I.Y., Lee J. 2018. Unleashing the Therapeutic Potential of CAR-T Cell Therapy Using Gene-Editing Technologies. Mol. Cells. 41(8):717-723.

Kagoya, Y., Tanaka, S., Guo, T., Anczurowski M., Wang C.H., Saso K., Butler M.O., Minden M.D., Hirano N. 2018. A novel chimeric antigen receptor containing a JAK–STAT signaling domain mediates superior antitumor effects. Nat. Med. 24, 352–359.

Kahlon K.S., Brown C., Cooper L.J., Raubitschek A., Forman S.J., Jensen M.C. 2004. Specific recognition and killing of glioblastoma multiforme by interleukin 13-zetakine redirected cytolytic T cells. Cancer Res. 2004 Dec 15;64(24):9160-6.

Kalos M., Levine B.L., Porter D.L., Katz S., Grupp S.A., Bagg A., June C.H. 2011. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. Sci. Transl. Med. 3(95): 95ra73.

Krenciute G., Prinzing B.L., Yi Z., Wu M.F., Liu H., Dotti G., Balyasnikova I.V., Gottschalk S. 2017. Transgenic Expression of IL15 Improves Antiglioma Activity of IL13Rα2-CAR T Cells but Results in Antigen Loss Variants. Cancer. Immunol. Res. 5(7):571-581.

Kwilas A., Chery J., Liang B., Reiser J. 2021. CMC Final Review – ABECMA [online:https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/abecma-idecabtagene-vicleucel]

Kwok G., Yau T.C., Chiu J.W., Tse E., Kwong Y.L. 2016 Pembrolizumab (Keytruda). Hum. Vaccin. Immunother. 12(11):2777-2789.

Lacy M.Q., Jacobus S., Blood E.A., Kay N.E., Rajkumar S.V., Greipp P.R. 2009. Phase II study of interleukin-12 for treatment of plateau phase multiple myeloma (E1A96): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. Leuk. Res. 33(11):1485-9.

Le R.Q., Li L., Yuan W., Shord S.S., Nie L., Habtemariam B.A., Przepiorka D., Farrell A.T., Pazdur R. 2018. FDA Approval Summary: Tocilizumab for Treatment of Chimeric Antigen Receptor T Cell-Induced Severe or Life-Threatening Cytokine Release Syndrome. Oncologist. 23(8):943-947.

Levine B.L. 2015. Performance-enhancing drugs: design and production of redirected chimeric antigen receptor (CAR) T cells. Cancer Gene Ther. 22(2):79-84.

Liu X., Jiang S., Fang C., Yang S., Olalere D., Pequignot E.C., Cogdill A.P., Li N., Ramones M., Granda B., Zhou L., Loew A., Young R.M., June C.H., Zhao Y. 2015. Affinity-Tuned ErbB2 or EGFR Chimeric Antigen Receptor T Cells Exhibit an Increased Therapeutic Index against Tumors in Mice. Cancer. Res. 75(17):3596-607.

Lysak D. 2015. Imunoterapie pomocí CAR T-lymfocytů. Onkologie 9(1): 13-18

Maher J., Brentjens R.J., Gunset G., Rivière I., Sadelain M. 2002. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. Nat. Biotechnol. 20(1):70-5.

Marofi F., Motavalli R., Safonov V.A., Thangavelu L., Yumashev A.V., Alexander M., Shomali N., Chartrand M.S., Pathak Y., Jarahian M., Izadi S., Hassanzadeh A., Shirafkan N., Tahmasebi S., Khiavi F.M. 2021. CAR T cells in solid tumors: challenges and opportunities. Stem. Cell. Res. Ther. 12(1):81.

Maude S.L., Laetsch T.W., Buechner J., Rives S., Boyer M., Bittencourt H., Bader P., Verneris M.R., Stefanski H.E., Myers G.D., Qayed M., De Moerloose B., Hiramatsu H., Schlis K., Davis K.L., Martin P.L., Nemecek E.R., Yanik G.A., Peters C., Baruchel A., Boissel N., Mechinaud F., Balduzzi A., Krueger J., June C.H., Levine B.L., Wood P., Taran T., Leung M., Mueller K.T., Zhang Y., Sen K., Lebwohl D., Pulsipher M.A., Grupp S.A. 2018. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. N. Engl. J. Med. 378(5):439-448.

Meier J.A., Savoldo B., Grover N.S. 2022. The Emerging Role of CAR T Cell Therapy in Relapsed/Refractory Hodgkin Lymphoma. J. Pers. Med. 12(2):197.

Melenhorst J.J., Chen G.M., Wang M. Porter D.L., Chen C., Collins M.A., Gao P., Bandyopadhyay S., Sun H., Zhao Z., Lundh S., Pruteanu-Malinici I., Nobles C.L., Mají S., Frey N.V., Gill S.I., Tian L., Kulikovskaya I., Gupta M., Ambrose D.E., Davis M.M., Fraietta J.A., Brogdon J.L., Young R.M., Chew A., Levine B.L., Siegel D.L., Alanio C., Wherry E.J., Bushman F.D., Lacey S.F., Tan K., June C.H. 2022. Decade-long leukaemia remissions with persistence of CD4+ CAR T cells. Nature. 602, 503–509.

Miao L., Zhang Z., Ren Z., Li Y. 2021. Reactions Related to CAR-T Cell Therapy. Front. Immunol. 12:663201.

Morgan R. A., Dudley M. E., Wunderlich J. R., Hughes M. S., Yang J. C., Sherry R. M., Royal R. E., Topalian S. L., Kammula U. S., Restifo N. P., Zheng Z., Nahvi A., de Vries C. R., Rogers-Freezer L. J., Mavroukakis S. A., Rosenberg S. A. 2006. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. Science. 314(5796), 126–129.

Munshi N.C., Anderson L.D. Jr, Shah N., Madduri D., Berdeja J., Lonial S., Raje N., Lin Y., Siegel D., Oriol A., Moreau P., Yakoub-Agha I., Delforge M., Cavo M., Einsele H., Goldschmidt H., Weisel K., Rambaldi A., Reece D., Petrocca F., Massaro M., Connarn J.N., Kaiser S., Patel P., Huang L., Campbell T.B., Hege K., San-Miguel J. 2021. Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. N. Engl. J. Med. 384(8):705-716.

Naidoo J., Page D.B., Li B.T., Connell L.C., Schindler K., Lacouture M.E., Postow M.A., Wolchok J.D. 2015. Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. Ann. Oncol. 26(12):2375-91.

Neelapu S.S., Locke F.L., Bartlett N.L., Lekakis L.J., Miklos D.B., Jacobson C.A., Braunschweig I., Oluwole O.O., Siddiqi T., Lin Y., Timmerman J.M., Stiff P.J., Friedberg J.W., Flinn I.W., Goy A., Hill B.T., Smith M.R., Deol A., Farooq U., McSweeney P., Munoz J., Avivi I., Castro J.E., Westin J.R., Chavez J.C., Ghobadi A., Komanduri K.V., Levy R., Jacobsen E.D., Witzig T.E., Reagan P., Bot A., Rossi J., Navale L., Jiang Y., Aycock J., Elias M., Chang D., Wiezorek J., Go W.Y. 2017. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. N. Engl. J. Med. 377(26):2531-2544.

Neelapu S.S., Dickinson M., Munoz J., Ulrickson M.L., Thieblemont C., Oluwole O.O., Herrera A.F., Ujjani C.S., Lin Y., Riedell P.A., Kekre N., de Vos S., Lui C., Milletti F., Dong J., Xu H., Chavez J.C. 2022. Axicabtagene ciloleucel as first-line therapy in high-risk large B-cell lymphoma: the phase 2 ZUMA-12 trial. Nat. Med. 28:735–742.

Novak A.J., Darce J.R., Arendt B.K., Harder B., Henderson K., Kindsvogel W., Gross J.A., Greipp P.R., Jelinek D.F. 2004. Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. Blood. 103(2):689-94.

Palma M., Gentilcore G., Heimersson K., Mozaffari F., Näsman-Glaser B., Young E., Rosenquist R., Hansson L., Österborg A., Mellstedt H. 2017. T cells in chronic lymphocytic leukemia display dysregulated expression of immune checkpoints and activation markers. Haematologica. 102(3):562-572.

Patterson J.D., Henson J.C., Breese R.O., Bielamowicz K.J., Rodriguez A. 2020. CAR T Cell Therapy for Pediatric Brain Tumors. Front. Oncol. 10:1582.

Pinz K., Liu H., Golightly M., Jares A., Lan F., Zieve G.W., Hagag N., Schuster M., Firor A.E., Jiang X., Ma Y. 2016. Preclinical targeting of human T-cell malignancies using CD4-specific chimeric antigen receptor (CAR)-engineered T cells. Leukemia. 30(3):701-7.

Poirot L., Philip B., Schiffer-Mannioui C., Le Clerre D., Chion-Sotinel I., Derniame S., Potrel P., Bas C., Lemaire L., Galetto R., Lebuhotel C., Eyquem J., Cheung G.W., Duclert A., Gouble A., Arnould S., Peggs K., Pule M., Scharenberg A.M., Smith J. 2015. Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for "Off-the-Shelf" Adoptive T-cell Immunotherapies. Cancer. Res. 75(18):3853-64.

Price G., Reiser J., Salz T. 2020. CMC BLA Review Memo – TECARTUS. [online: https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/tecartus-brexucabtagene-autoleucel]

Pulè M.A., Straathof K.C., Dotti G., Heslop H.E., Rooney C.M., Brenner M.K. 2005. A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. Mol. Ther. 12(5):933-41.

Ramos C.A., Grover N.S., Beaven A.W., Lulla P.D., Wu M.F., Ivanova A., Wang T., Shea T.C., Rooney C.M., Dittus C., Park S.I., Gee A.P., Eldridge P.W., McKay K.L., Mehta B., Cheng C.J., Buchanan F.B., Grilley B.J., Morrison K., Brenner M.K., Serody J.S., Dotti G., Heslop H.E., Savoldo B. 2020. Anti-CD30 CAR-T Cell Therapy in Relapsed and Refractory Hodgkin Lymphoma. J. Clin. Oncol. 38(32):3794-3804.

Ramsay A.G., Johnson A.J., Lee A.M., Gorgün G., Le Dieu R., Blum W., Byrd J.C., Gribben J.G. 2008. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological

synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. J. Clin. Invest. 118(7):2427-37.

Ren J., Liu X., Fang C., Jiang S., June C.H., Zhao Y. 2017a. Multiplex Genome Editing to Generate Universal CAR T Cells Resistant to PD1 Inhibition. Clin. Cancer. Res. 23(9):2255-2266.

Ren J., Zhang X., Liu X., Fang C., Jiang S., June C.H., Zhao Y. 2017b. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. Oncotarget. 8(10):17002-17011.

Reynolds J.C., Del Vecchio S., Sakahara H., Lora M.E., Carrasquillo J.A., Neumann R.D., Larson S.M. 1989. Anti-murine antibody response to mouse monoclonal antibodies: clinical findings and implications. Int. J. Rad. Appl. Instrum. B. 16(2):121-5.

Roberts Z.J., Better M., Bot A., Roberts M.R., Ribas A. 2017. Axicabtagene ciloleucel, a first-in-class CAR T cell therapy for aggressive NHL. Leuk. Lymphoma. 59(8):1785-1796.

Rosenberg S.A., Lotze M.T., Muul L.M., Leitman S., Chang A.E., Ettinghausen S.E., Matory Y.L., Skibber J.M., Shiloni E., Vetto J.T., Seipp C.A., Simpson C., Reichert C.M. 1985. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. N. Engl. J. Med. 313(23):1485-92.

Rosenberg S.A., Packard B.S., Aebersold P.M., Solomon D., Topalian S.L., Toy S.T., Simon P., Lotze M.T., Yang J.C., Seipp C.A., Simpson C., Carter C., Bock S., Schwartzentruber D., Wei J.P., White D.E. 1988. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. N. Engl. J. Med. 319(25):1676-80.

Rupp L.J., Schumann K., Roybal K.T., Gate R.E., Ye C.J., Lim W.A., Marson A. 2017. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. Sci. Rep. 7(1):737.

Shah B.D., Ghobadi A., Oluwole O.O., Logan A.C., Boissel N., Cassaday R.D., Leguay T., Bishop M.R., Topp M.S., Tzachanis D., O'Dwyer K.M., Arellano M.L., Lin Y., Baer M.R., Schiller G.J., Park J.H., Subklewe M., Abedi M., Minnema M.C., Wierda W.G., DeAngelo D.J., Stiff P., Jeyakumar D., Feng C., Dong J., Shen T., Milletti F., Rossi J.M., Vezan R., Masouleh B.K., Houot R. 2021. KTE-X19 for relapsed or refractory adult B-cell acute

lymphoblastic leukaemia: phase 2 results of the single-arm, open-label, multicentre ZUMA-3 study. Lancet. 398(10299):491-502.

Schietinger A., Philip M., Krisnawan V.E., Chiu E.Y., Delrow J.J., Basom R.S., Lauer P., Brockstedt D.G., Knoblaugh S.E., Hämmerling G.J., Schell T.D., Garbi N., Greenberg P.D. 2016. Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis. Immunity. 45(2):389-401.

Schuster S.J, Bishop M.R., Tam C.S., Waller E.K., Borchmann P., McGuirk J.P., Jäger U., Jaglowski S., Andreadis C., Westin J.R., Fleury I., Bachanova V., Foley S.R., Ho P.J., Mielke S., Magenau J.M., Holte H., Pantano S., Pacaud L.B., Awasthi R., Chu J., Anak Ö., Salles G., Maziarz R.T. 2019. JULIET Investigators. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. N. Engl. J. Med. 380(1):45-56.

Singh H., Manuri P.R., Olivares S., Dara N., Dawson M.J., Huls H., Hackett P.B., Kohn D.B., Shpall E.J., Champlin R.E., Cooper L.J. 2008. Redirecting specificity of T-cell populations for CD19 using the Sleeping Beauty system. Cancer Res. 68(8):2961-71.

Stancovski I., Schindler D.G., Waks T., Yarden Y., Sela M., Eshhar Z. 1993 Targeting of T lymphocytes to Neu/HER2-expressing cells using chimeric single chain Fv receptors. J. Immunol. 151(11):6577-82.

Tettamanti S., Rotiroti M.C., Giordano Attianese G.M.P., Arcangeli S., Zhang R., Banerjee P., Galletti G., McManus S., Mazza M., Nicolini F., Martinelli G., Ivan C., Veliz Rodriguez T., Barbaglio F., Scarfò L., Ponzoni M., Wierda W., Gandhi V., Keating M., Biondi A., Caligaris-Cappio F., Biagi E., Ghia P., Bertilaccio M.T.S. 2022. Lenalidomide enhances CD23.CAR T cell therapy in chronic lymphocytic leukemia. Leuk. Lymphoma. 8:1-14.

Till B.G., Jensen M.C., Wang J., Qian X., Gopal A.K., Maloney D.G., Lindgren C.G., Lin Y., Pagel J.M., Budde L.E., Raubitschek A., Forman S.J., Greenberg P.D., Riddell S.R., Press O.W. 2012. CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. Blood. 119(17):3940-3950.

Torikai H., Reik A., Liu P.Q., Zhou Y., Zhang L., Maiti S., Huls H., Miller J.C., Kebriaei P., Rabinovich B., Lee D.A., Champlin R.E., Bonini C., Naldini L., Rebar E.J., Gregory P.D., Holmes M.C., Cooper L.J. 2012. A foundation for universal T-cell based

immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR. Blood. 119(24):5697-705.

U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. 2017a. Axicabtagene ciloleucel BL 125643/0 approval letter [online: https://fda.report/media/108458/October-18--2017--Approval-Letter---YESCARTA.pdf]

U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. 2017b. Tisagenlecleucel BL 125646/0 approval letter [online: https://www.fda.gov/media/106989/download]

U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. 2020. Brexucabtagene autoleucel BL 125703/0 approval letter, [online: https://www.fda.gov/media/140415/download]

U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. 2021a. Lisocabtagene maraleucel BL 125714/0 approval letter. [online: https://fda.report/media/145712/February-5-2021-Approval-Letter-BREYANZI.pdf]

U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. 2021b. Idecabtagene vicleucel BL 125736/0 approval letter. [online: https://www.fda.gov/media/147062/download]

U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. 2022. Ciltacabtagene autoleucel BL 125746/0 approval letter [online: https://www.fda.gov/media/156572/download]

Uckun F.M., Jaszcz W., Ambrus J.L., Fauci A.S., Gajl-Peczalska K., Song C.W., Wick M.R., Myers D.E., Waddick K., Ledbetter J.A. 1988**.** Detailed studies on expression and function of CD19 surface determinant by using B43 monoclonal antibody and the clinical potential of anti-CD19 immunotoxins. Blood. 71(1):13-29.

Urbanska K., Lanitis E., Poussin M., Lynn R.C., Gavin B.P., Kelderman S., Yu J., Scholler N., Powell D.J. Jr. 2012. A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor. Cancer. Res. 72(7):1844-52.

Vairy S., Garcia J.L., Teira P., Bittencourt H. 2018. CTL019 (tisagenlecleucel): CAR-T therapy for relapsed and refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. Drug. Des. Devel. Ther. 12:3885-3898.

Wang M., Munoz J., Goy A., Locke F.L., Jacobson C.A., Hill B.T., Timmerman J.M., Holmes H., Jaglowski S., Flinn I.W., McSweeney P.A., Miklos D.B., Pagel J.M., Kersten M.J., Milpied N., Fung H., Topp M.S., Houot R., Beitinjaneh A., Peng W., Zheng L., Rossi J.M., Jain R.K., Rao A.V., Reagan P.M. 2020. KTE-X19 CAR T-Cell Therapy in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma. N. Engl. J. Med. 382(14):1331-1342.

Wang Y., Chen M., Wu Z., Tong C., Dai H., Guo Y., Liu Y., Huang J., Lv H., Luo C., Feng K.C., Yang Q.M., Li X.L., Han W. 2018. CD133-directed CAR T cells for advanced metastasis malignancies: A phase I trial. Oncoimmunology. 7(7):e1440169.

Whittington M.D., Ollendorf D.A., Campbell J.D. 2018. Accounting for All Costs in the Total Cost of Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy. JAMA Oncol. 4(12):1784-1785.

Wierda W.G., Dorritie K.A., Munoz J., Stephens D.M., Solomon S.R., Gillenwater H.H., Gong L., Yang L., Ogasawara K., Thorpe J., Siddiqi T. 2020. Transcend CLL 004: Phase 1 Cohort of Lisocabtagene Maraleucel (liso-cel) in Combination with Ibrutinib for Patients with Relapsed/Refractory (R/R) Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma (CLL/SLL). Blood. 136(1):39-40

Wu C.Y., Roybal K.T., Puchner E.M., Onuffer J., Lim W.A. 2015. Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. Science. 350(6258):aab4077.

Wutti-In Y., Sujjitjoon J., Sawasdee N., Panya A., Kongkla K., Yuti P., Yongpitakwattana P., Thepmalee C., Junking M., Chieochansin T., Poungvarin N., Yamabhai M., Yenchitsomanus P.T. 2022. Development of a Novel Anti-CD19 CAR Containing a Fully Human scFv and Three Costimulatory Domains. Front. Oncol. 11:802876.

Xia C., Ribeiro M., Scott S., Lonial S. 2016 Daratumumab: monoclonal antibody therapy to treat multiple myeloma. Drugs. Today. (Barc). 52(10):551-560.

Xiao X., Huang S., Chen S., Wang Y., Sun Q., Xu X., Li Y. 2021. Mechanisms of cytokine release syndrome and neurotoxicity of CAR T-cell therapy and associated prevention and management strategies. J. Exp. Clin. Cancer Res. 40(1):367.

Ying Z., He T., Wang X., Zheng W., Lin N., Tu M., Xie Y., Ping L., Zhang C., Liu W., Deng L., Qi F., Ding Y., Lu X.A., Song Y., Zhu J. 2019. Parallel Comparison of 4-1BB or

CD28 Co-stimulated CD19-Targeted CAR-T Cells for B Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. Mol. Ther. Oncolytics. 15:60-68.

Zhang Y., Zhang X., Cheng C., Mu W., Liu X., Li N., Wei X., Liu X., Xia C., Wang H. 2017. CRISPR-Cas9 mediated LAG-3 disruption in CAR-T cells. Front. Med. 11(4):554-562.

Zhao Y., Wang Q.J., Yang S., Kochenderfer J.N., Zheng Z., Zhong X., Sadelain M., Eshhar Z., Rosenberg S.A., Morgan R.A. 2009. A herceptin-based chimeric antigen receptor with modified signaling domains leads to enhanced survival of transduced T lymphocytes and antitumor activity. J. Immunol. 183(9):5563-74.

Zhao Z., Chen Y., Francisco N.M., Zhang Y., Wu M. 2018. The application of CAR-T cell therapy in hematological malignancies: advantages and challenges. Acta. Pharm. Sin. B. 8(4):539-551.