



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Petra KERN

**TERAPIJA Z MODIFICIRANIMI CELICAMI T Z
IZRAŽENIM HIMERNIM RECEPTORJEM ZA
TUMORSKE ANTIGENE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Petra KERN

**TERAPIJA Z MODIFICIRANIMI CELICAMI T Z IZRAŽENIM
HIMERNIM RECEPTORJEM ZA TUMORSKE ANTIGENE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**THERAPY WITH MODIFIED T-CELLS THAT EXPRESS
CHIMERIC RECEPTOR FOR TUMOR ANTIGENS**

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2018

Diplomski seminar je zaključek univerzitetnega študija – 1. stopnja Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje Študija biotehnologije je za mentorja diplomskega seminarja imenovala prof. dr. Mojco Narat.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Damjana DROBNE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum predavitve: 28. 8. 2018

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

| | |
|----|--|
| ŠD | Du1 |
| DK | UDK 60:616-006.4:615.37(043.2) |
| KG | biotehnologija, CAR-T, rak, imunoterapija, celična terapija, limfociti T |
| AV | KERN, Petra |
| SA | NARAT, Mojca (mentor) |
| KZ | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101 |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija |
| LI | 2018 |
| IN | TERAPIJA Z MODIFICIRANIMI CELICAMI T Z IZRAŽENIM HIMERNIM RECEPTORJEM ZA TUMORSKE ANTIGENE |
| TD | Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja) |
| OP | VI, 20 str., 4 sl., 50 vir. |
| IJ | sl |
| JI | sl/en |
| AI | CAR-T celična terapija je ena od novejših in uspešnejših metod za zdravljenje raka. Temelji na opremljanju pacientu avtolognih celic T z receptorji CAR, ki so sposobni prepoznati tumorske antigene in sprožiti odziv limfocitov T. Receptorji CAR so fuzijski proteini sestavljeni iz značilnih domen: vezavne domene, ekstracelularne povezovalne domene, transmembranske domene, signalizacijske domene in kostimulatorne domene. Vsaka od njih ima specifično funkcijo in vpliva na delovanje receptorja CAR in CAR-T celične terapije. Produkcija celic CAR-T poteka v več korakih. Najprej pacientu odvzamejo limfocite T, nato jih aktivirajo in transformirajo, jih razmnožijo in vrnejo v pacienta v obliki infuzije. Celice se nato še naprej razmnožujejo v pacientu in vršijo svojo funkcijo napadanja in uničevanja tumorskih celic. Kljub začetnim velikim uspehom terapije na področju zdravljenja levkemij, ima terapija svoje resne stranske učinke. Glavna problema terapije sta sindrom prekomernega izločanja citokinov in toksičnost zaradi napada na zdrave celice, ki izražajo tumorski antigen. Pojavljajo se mnoge rešitve teh problemov. Glavne so uporaba samomorilskih mehanizmov, pri katerih se celice CAR-T ob prisotnosti induktorja uničijo, in uporaba kombinacij receptorjev CAR z bolj specifično ločevanje tumorskih od zdravih celic. |

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du1

DC UDC 60:616-006.4:615.37(043.2)

CX biotechnology, CAR-T, cancer, immunotherapy, cell therapy, lymphocytes T

AU KERN, Petra

AA NARAT, Mojca (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology

PY 2018

TI THERAPY WITH MODIFIED T-CELLS THAT EXPRESS CHIMERIC RECEPTOR FOR TUMOR ANTIGENS

DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)

NO VI, 20 p., 4 fig., 50 ref.

LA sl

AL sl/en

AB CAR-T cell therapy is one of the newest and most successful methods for treating cancer. The therapy is based on transducing CAR receptors into patient's autologous T cells. CAR receptors are fusion proteins capable of recognising tumour antigens and activating lymphocyte T response. CAR receptors comprise of five typical domains: antigen-binding domain, extracellular spacer, transmembrane domain, signaling domain and costimulatory domain. Each of them has a specific function and affects how the CAR receptor and CAR-T cell therapy performs. Production of CAR-T cells is done in multiple steps. First, patient's allogenic lymphocytes T are taken from his blood, then they are activated and transformed with CAR receptor gene, expanded and returned into the patient's blood in a form of an infusion. After the infusion, the cells continue to proliferate in the patient and perform their function of attacking and killing tumour cells. Alongside the initial big success of the therapy for leukemias, there are some severe side effects of the therapy that need to be addressed. The biggest issues are cytokine release syndrome and on-target off tumour toxicities. Various solutions for the problems have arisen. The main two strategies are the use of suicide mechanisms that induce apoptosis in CAR-T cells when inductor molecule is administered, and the use of a combination of CAR receptors that is capable of distinguishing between healthy and cancerous cells.

KAZALO VSEBINE

| | | |
|----------|--|-----|
| | KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA..... | III |
| | KEY WORDS DOCUMENTATION | IV |
| | KAZALO VSEBINE..... | V |
| | KAZALO SLIK..... | VI |
| 1 | UVOD | 1 |
| 2 | ZGRADBA IN DELOVANJE HIMERNIH RECEPTORJEV ZA ANTIGEN | 2 |
| 2.1 | DOMENE CAR RECEPTORJA IN NJIHOVA VLOGA PRI PREVAJANJU SIGNALA | 2 |
| 2.2 | RECEPTORJI PRVE, DRUGE IN TRETJE GENERACIJE | 3 |
| 3 | POSTOPEK PRIDOBIVANJA CELIC CAR-T | 4 |
| 3.1 | PRIDOBIVANJE CELIC | 4 |
| 3.2 | <i>EX VIVO</i> AKTIVACIJA CELIC T | 5 |
| 3.3 | GENSKA MODIFIKACIJA CELIC T | 5 |
| 3.4 | EKSPANZIJA MODIFICIRANIH CELIC T IN VRNITEV V PACIENTA | 6 |
| 4 | USPEŠNI PRIMERI UPORABE CAR-T CELIC, NEREŠENI IZZIVI IN REŠEVANJE TEH IZZIVOV | 7 |
| 4.1 | DOSEDANJE USPEŠNE TERAPIJE | 7 |
| 4.2 | ŠE NEREŠENI IZZIVI | 8 |
| 4.2.1 | Sindrom prekomernega izločanja citokinov | 8 |
| 4.2.2 | Toksičnost zaradi napada na zdrave celice, ki izražajo tumorski antigen | 8 |
| 4.2.3 | Izguba antigenov na tumorskih celicah | 9 |
| 4.2.4 | Imunogenost mišjih enoverižnih variabilnih fragmentov | 9 |
| 4.3 | REŠEVANJE TEH IZZIVOV | 9 |
| 4.3.1 | Preprečevanje in blaženje sindroma prekomernega izločanja citokinov in omejevanje toksičnosti | 9 |
| 4.3.2 | Povečevanje učinkovitosti, vzdržljivosti in specifičnosti | 11 |
| 4.3.3 | Zdravljenje trdnih tumorjev | 14 |
| 5 | ZAKLJUČEK | 15 |
| 6 | VIRI | 16 |

KAZALO SLIK

| | |
|--|----|
| Slika 1: Struktura in dizajn himernih antigen receptorjev (Chang in Chen, 2017: 431) | 2 |
| Slika 2: Glavni koraki pri izdelavi celic CAR-T s primeri tehnologij in naprav (Wang in Riviere, 2016: 2). | 4 |
| Slika 3: Shema delovanja sistema inducibilne kaspaze-9 (Di Stasi in sod., 2011: 1677) | 11 |
| Slika 4: Sistemi za povečevanje specifičnosti himernih antigen receptorjev (Chang in Chen, 2017: 441). | 13 |

1 UVOD

Medicinska znanost se v zadnjih letih in desetletjih v veliki meri ukvarja z odkrivanjem novih in novih načinov zdravljenja rakavih obolenj. Glavni stebri zdravljenja raka so včasih bili operacije, kemoterapije in obsevanja. V zadnjih nekaj desetletjih smo priča mnogim novim tehnologijam in strategijam, ki so se pojavile ob vedno boljšem razumevanju biologije raka in značilnosti tumorskih celic. Glavna ovira pri zdravljenju raka je, kako omogočiti ubijanje celic raka ne da bi pri tem poškodovali tudi zdrave celice. Zato je ključno poznavanje specifičnih molekul, ki so prisotne samo na rakavih celicah ali pa so na rakavih celicah prisotne v mnogo večjem številu. Takšne, za rakaste celice specifične molekule so osnova za razvoj tarčnih zdravljenj. Poleg tega se razvijajo strategije, s katerimi sprožimo in ojačamo imunski odziv pacienta na tumor. Terapijam, ki pomagajo imunskemu sistemu, da se bori z rakom, rečemo imunoterapije. V zadnjih nekaj letih pa se je pojavila nova skupina terapij, pri katerih pacientu odvzamejo celice, jih spremenijo oz. izboljšajo njihove lastnosti (npr. specifičnost celic T na tumorske antigene) in jih vrnejo v pacienta, kjer učinkujejo kot zdravilo. Temu rečemo terapija s prilagojenimi celicami (ang. Adoptive Cell Therapy).

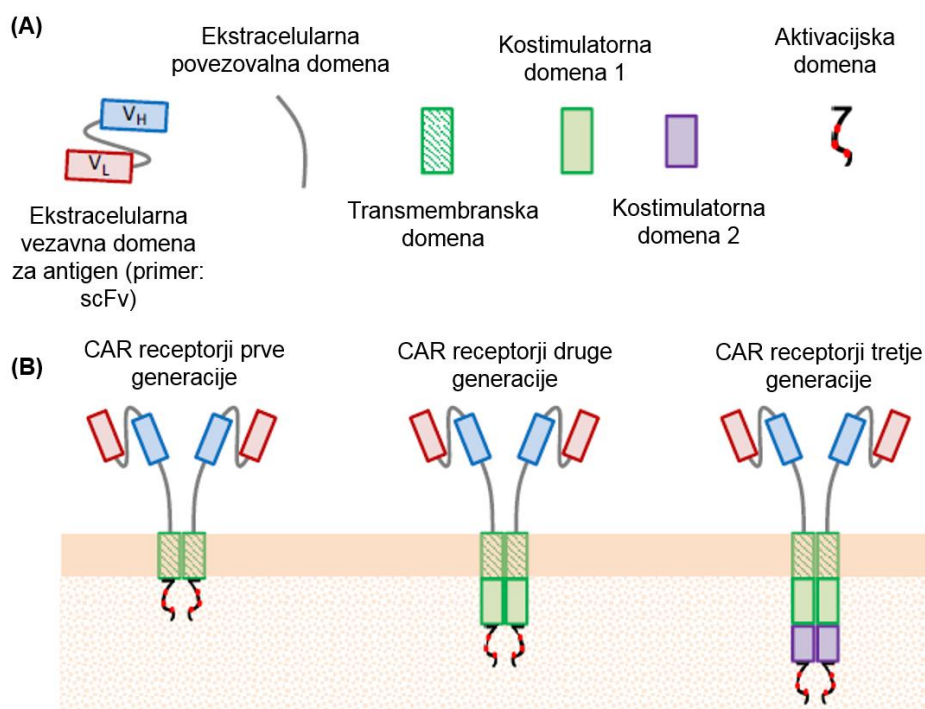
Eden od novih pristopov je tudi terapija z modificiranimi celicami T, ki izražajo himerni receptor za tumorske antigene (CAR-T celična terapija). Ta moderna metoda je celična terapija, ki vključuje izboljšane limfocite T, ki so naravno prisotni v človeškem telesu kot del imunskega sistema. V osnovi pri tej terapiji pacientu odvzamejo limfocite T iz krvi, jih nato gojijo in modificirajo v laboratoriju ter izboljšane nazadnje intravenozno vrnejo v telo. Pri modifikaciji jim vstavijo gen za himerni receptor, ki se specifično veže na antigene, značilne za tumorske celice, s tem pa zagotovijo tarčnost terapije. Himerni receptor je receptor, ki se izrazi na površini celice, v katero ga vstavijo in je sestavljen iz več domen, ki prepoznajo specifični antigen na površini tarčnih celic in sprožijo odziv celice. Izraz himerni se nanaša na lastnost receptorja, da je sestavljen iz različnih podenot, ki imajo različen izvor (pridobimo jih iz različnih molekul, kot so na primer protitelesa, receptorji in ligandi prisotni na imunskih celicah). Himerne receptorje načrtujejo tako, da prepoznajo določen antigen na tumorski celici in ob prepoznavi sprožijo odziv celice. Ker himerni receptor za antigen (ang. Chimeric Antigen Receptor, CAR) vstavijo v limfocite T, se v tej sproži odziv, ki vključuje izločanje citokinov in s tem napad imunskega sistema na tumor. Ob vrnitvi modificiranih celic T s himernim receptorjem (rečemo jim celice CAR-T) v kri pacienta, te zaokrožijo po telesu. Ob tem pridejo v stik s tumorskimi celicami in antigeni na njih. Himerni receptorji prepoznajo tumorske antigene in sprožijo odziv v celicah T. Metoda se je do sedaj na nekaterih primerih izkazala za zelo učinkovito, obenem pa se kažejo tudi stranski učinki in problematike.

Namen diplomskega dela je predstaviti metodo terapije z modificiranimi celicami T, ki izražajo himerne receptorje za tumorske antigene. Povzeli bomo dosedanje uspehe, dosežene z obravnavano metodo, pregledali trenutne težavi in ovire pri njej, se posvetili možnim načinom reševanja le-teh ter poskušali predvideti možnosti za nadaljnji napredek.

2 ZGRADBA IN DELOVANJE HIMERNIH RECEPTORJEV ZA ANTIGEN

2.1 DOMENE CAR RECEPTORJA IN NJIHOVA VLOGA PRI PREVAJANJU SIGNALA

Himerni receptorji za antigene (ang. CAR) so glavne molekule, udeležene v metodi terapije z modificiranimi celicami T, ki ciljajo tumorske antigene in s tem tumorske celice. Himerni receptorji so fuzijski proteini, ki jih načrtujejo in prilagodijo različnim antigenom oziroma različnim značilnostim antigenov, celic ali tumorjev. Sestavljeni so iz več domen, od katerih ima vsaka domena svojo funkcijo. Domene, ki so značilne za CAR-T receptorje so: ekstracelularna domena za vezavo antigena, ekstracelularna povezovalna veriga (ang. spacer), transmembranska domena in intracelularna domena za signaliziranje in aktivacijo celic T. Poleg teh receptorjev imajo novejša generacija himernih receptorjev dodane še eno ali dve intracelularni kostimulativni domeni (Chang in Chen, 2017).



Slika 1: Struktura in dizajn himernih antigen receptorjev (Chang in Chen, 2017: 431)

Vsaka od domen himernega antigennega receptorja pa ima svojo funkcijo. Funkcija vezavne domene za antigen je seveda vezava na antigen. Vezavna domena je v večini primerov enoverižni variabilni fragment (ang. single chain variable fragment, scFv), ki ga dobimo iz protiteles, lahko pa uporabimo tudi katere koli druge molekule, pogoj je le, da molekula ostane funkcionalna, to je, da veže antigen, ko postane del receptorja (Chang in Chen, 2017). Funkcija ekstracelularne povezovalne verige je zgolj povezava med sosednjima domenama. Navadno za to domeno uporabimo fragmente CD4, CD8, CD28 ali pa Fc verigo protiteles IgG. Optimalna dolžina povezovalne verige variira od primera do primera, odvisno od dimenzij antigena, ki ga cilja vezavna domena (Hudecek in sod., 2015).

Transmembranska domena receptorja omogoči sidranje receptorja v membrano celic. Običajno uporabljamo membranske domene CD4, CD8, CD28 ali CD3 ξ . Katero od teh uporabiti, se po navadi odločijo glede na pretekle izkušnje in zmožnost domene, da ostane funkcionalna, ko jo združijo z določenimi signalnimi domenami (Chang in Chen, 2017).

Kostimulatorne domene so namenjene jačanju aktivacije celic T, ki vodijo v izboljšano delovanje terapije, saj povečajo izločanje citokinov, izboljšajo diferenciacijo in proliferacijo, ter podaljšajo čas delovanja celic T. Najpogosteje uporabljamo kostimularotni domeni, pridobljeni iz CD28 in 4-1BB (Sadelain in sod., 2013), ki ju uporabljamo posamezno ali pa ju kombiniramo v enem receptorju, kot je to značilno za himerne receptorje tretje generacije (Luskin in DeAngelo, 2017).

Zadnja domena, ki je nujna za uspešno delovanje himernega receptorja pa je aktivacijska domena, ki sproži signal za aktivacijo celice T. V večini primerov se danes uporablja CD3 ξ signalizacijska domena, ki se je izkazala za najprimernejšo (Savoldo in sod., 2011; slika 1).

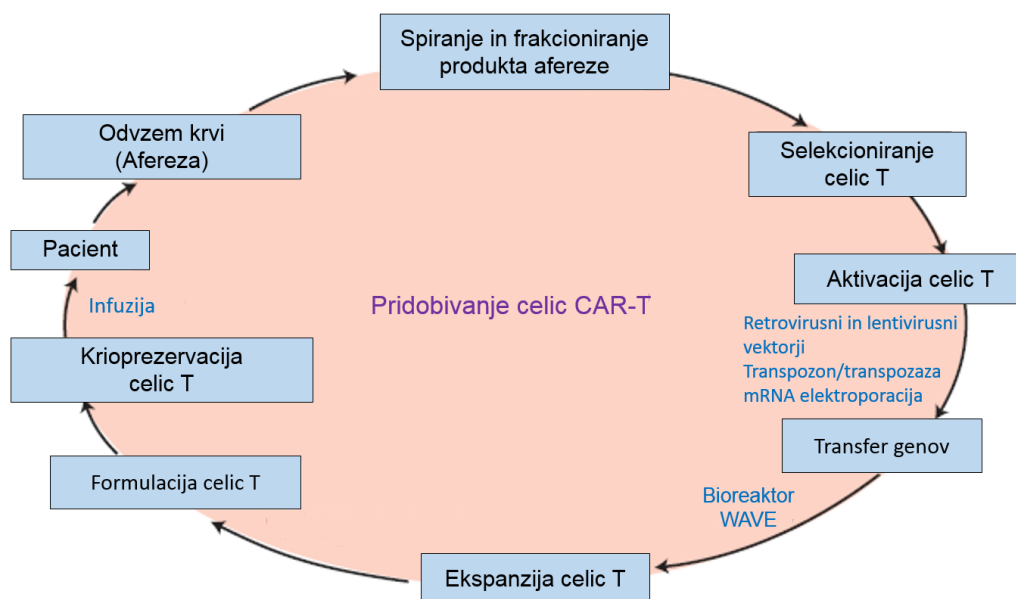
2.2 RECEPTORJI PRVE, DRUGE IN TRETJE GENERACIJE

Himerne receptorje delimo v skupine po njihovi sestavi na himerne receptorje prve, druge in tretje generacije. Receptorje prve generacije sestavljajo naslednje domene: vezavna domena za antigen, ekstracelularna povezovalna domena, transmembranska domena in intracelularna aktivacijska (signalna) domena. Od himernih receptorjev druge in tretje generacije se receptorji prve generacije ločijo po odsotnosti kostimulatorne domene.

Receptorji druge in tretje generacije pa se med seboj ločijo po tem, da imajo receptorji druge generacije le eno kostimulacijo domeno (CD28 ali 4-1BB), receptorji tretje generacije pa vsebujejo dve kostimulacijo domeni (CD28 in 4-1BB) (Sadelain in sod., 2013; slika 1).

3 POSTOPEK PRIDOBIVANJA CELIC CAR-T

Celice CAR-T so specifična oblika zdravljenja, ki vključuje pripravo (večinoma) avtolognih celic za vsakega pacienta in za specifičen tip raka posamično. Poznamo mnogo različnih receptorjev za mnogo različnih antigenov, kljub temu pa je postopek pridobivanja modificiranih celic z vnosom himernega antigenskega receptorja je v osnovi popolnoma enak (Wang in Riviere, 2016).



Slika 2: Glavni koraki pri izdelavi celic CAR-T s primeri tehnologij in naprav (Wang in Riviere, 2016: 2).

3.1 PRIDOBIVANJE CELIC

Postopek začnejo z izolacijo s kolekcijo perifernih mononuklearnih celic iz pacientove krvi, kar po navadi dosežejo z leukaferozo. Paziti je potrebno, da se leukaferozo izvede v ustreznem časovnem okviru zdravljenja, da pridobijo zadostno količino limfocitov T. Produkt, pridobljen z leukaferozo nato očistijo tako, da odstranijo eritrocite in trombocite ter ločijo limfocite T od drugih monocitov. To dosežejo z uporabo določenih naprav za ločevanje celic (slika 2). Če se v predhodnih raziskavah izkaže, da je za terapijo bolj primeren določen podtip celic T (npr. CD4+, CD8+, CD25+ idr.), lahko frakcijo celic T še dodatno ločijo (Wang in Riviere, 2016).

Zaenkrat raziskave še niso soglasno določile, kateri podtip celic T je v splošnem najbolj primeren, zato se v raziskavah uporablja več različnih podtipov celic T in se glede na specifični primer izbira najuspešnejše (Wang in Riviere, 2016). Kljub temu, da ne vedo točno kateri podtip celic je najbolj primeren, se pojavlja soglasje, da so primernejši manj diferencirani podtipi celic. Prav tako so empirični dokazi na drugih terapijah s prilagojenimi celicami pokazali, da so bolj primerne naivne celice T, centralne spominske celice (ang. central memory cells) in matične spominske celice T (Klebanoff in sod., 2011). Za specifične

podtype celic, npr. centralne spominske celice ali naivne celice T, je navadno potrebno razviti in optimizirati postopke selekcije, postopke genske modifikacije oz. transdukcije, torej vnosa genskega zapisa v celice T s pomočjo virusnih vektorjev, in ekspanzije celic (Wang in sod., 2012; Casati in sod., 2013) Celice T, ki jih pridobijo, lahko uporabijo takoj ali pa jih zamrznejo in shranijo za uporabo v prihodnosti (Wang in Riviere, 2016).

3.2 *EX VIVO* AKTIVACIJA CELIC T

Naslednji korak pri pridobivanju celic CAR-T je aktivacija celic T. Za aktivacijo celic T je potreben primarni specifični signal preko T-celičnega receptorja in kostimulatorni nespecifični signal preko na primer CD28 ali 4-1BB. Aktivacija celic T je nujna tako za transdukcijo cDNA himernega receptorja preko retrovirusnih vektorjev, kot tudi za *ex vivo* ekspanzijo celic T, ki sta naslednja koraka v postopku pridobivanja modificiranih celic s himernim receptorjem za antigen. V uporabi so različni načini aktivacije celic v *in vitro* pogojih. Za aktivacijo lahko uporabijo celice, najpogosteje antigen predstavitevne celice, večinoma dendritične celice, ki to nalogo opravljajo že v naravi. Problem pri dendritičnih celicah je, da potentnost le-teh variira od pacienta do pacienta, to pa onemogoča uporabo teh celic kot zanesljiv vir za aktivacijo celic T (Wang in Riviere, 2016).

Druga možnost za aktivacijo celic je uporaba umetnih antigen predstavitvenih celic (ang. artificial antigen-presenting cells ali AAPCs), pri tem pa je glavna ovira produkcija standardiziranih AAPC celic, ki se s pacientom ujemajo v HLA genih (Kim in sod., 2004). Poleg metod s celicami so v uporabi tudi metode aktivacije na osnovi različnih kroglic (ang. beads-based T-cell activation) in posebni reagenti, na primer magnetne kroglice ali nanokroglice, prekrite s protitelesi ter reagent Expamer, ki bi bil izredno primeren za uporabo v klinični proizvodnji v večjem obsegu. Te tehnologije so močno olajšale postopek *ex vivo* aktivacije celic T (Wang in Riviere, 2015). Za postopek aktivacije celice pripravimo v koncentraciji približno 1×10^6 /ml in dodajo kroglice (ali umetne antigen predstavitevne celice) v razmerju 3:1 (kroglice:celice) (Hollyman in sod., 2009).

3.3 GENSKA MODIFIKACIJA CELIC T

Za delovanje tarčne terapije, kot je terapija CAR-T, je bistveno, da celice spremenijo tako, da specifično prepoznavajo tumorske antigene. Vlogo specifičnega prepoznavanja antigenov ima himerni receptor za antigen, ki ga predhodno načrtujejo iz opisanih enot, tako, da bo kar se da učinkovit in ga je treba vstaviti v aktivirane celice T. Za CAR-T celične terapije je zelo pomembno, da se himerni receptorji za antigene stabilno in dolgotrajno izražajo. Za gensko modifikacijo uporabljajomo virusne in nevirusne sisteme za prenos genov v celice T. Za uporabo v klinične namene se za vnos genov uporabljajo trije sistemi, in sicer gama-retrovirusni vektorji, lentivirusni vektorji in sistem transpozon/transpozaza (Wang in Riviere, 2016).

Lentivirusni vektorji se zelo pogosto uporabljajo, ker lahko transformirajo tudi celice, ki se ne delijo in ker so se izkazali za varnejše v smislu profila genske integracije pri krvnih celicah (Naldini in sod., 1996). Pri uporabi sistema transpozon/transpozaza vnesejo DNA konstrukt v celico preko elektroporacije. Glavne prednosti sistema so preprost postopek in nizka cena,

obstaja pa tveganje za onkogenost zaradi naključne vključitve v genom (Wang in Riviere, 2016).

Če želijo gen vnesti le za prehodno izražanje pa uporabijo mRNA gena, ki jo vstavijo v citoplazmo z elektroforezo ali endocitozo. Ker se mRNA ne vgradi v genom, kot se to zgodi z DNA, ki jo vnesejo z virusnim transferjem, s tem popolnoma odstranijo tveganje za genotoksičnost. Transfekcija z mRNA omogoči izražanje gena za približno teden dni. Uporablja se za dostavo mRNA za TCR/CAR, kemokinske receptorje in citokine (Zhao in sod., 2006; Yoon in sod., 2009; Rowley in sod., 2009). Ta pristop je primeren za odkrivanje potencialno nevarnih CAR molekul (Wang in Riviere, 2016). Beatty in sodelavci (2014) pa so ugotovili, da lahko tudi z zaporednimi infuzijami CAR-T celic transfeciranih z mRNA spodbudimo protitumorski učinek.

3.4 EKSPANZIJA MODIFICIRANIH CELIC T IN VRNITEV V PACIENTA

Uspešno modificirane celice morajo pred vrnitvijo v pacienta še namnožiti, t. j. povečati njihovo število. Kot ostale celične kulture tudi celice CAR-T gojijo v bioreaktorjih, ki omogočajo rast in razmnoževanje celic. Wang in Riviere (2016) povzemata, da je glavni bioreaktorski sistem, ki se uporablja pri ekspanziji celic CAR-T bioreaktor WAVE, pri katerem je suspenzija celic v sterilni vreči, ta pa je na podstavku, ki se ziba in s tem nežno meša vsebino vreče, kar omogoča rast celic do visoke gostote brez oviranja izmenjave plinov. Prednost metode je avtomatsko dodajanje hranil in odvzemanje celičnega supernatanta. Celice se lahko hitro razmnožijo do gostote 10^7 celic/ml, sistem pa lahko drži 25 l kulture v enem bioreaktorju. Platforma se široko uporablja v akademskih centrih in biotehnoških podjetjih za celično ekspanzijo celic za klinične študije prve in druge faze (Hollyman in sod., 2009).

V bioreaktorju lahko celice ponovno stimulirajo z umetnimi antigen predstavitvenimi celicami in dodatkom interlevkinov. K562, človeška linija levkemičnih celic, ki ne izraža HLA alelov, je bila genetsko spremenjena tako, da izraža veliko različnih kostimulatornih molekul npr. CD40, CD40L, CD70 idr. in s tem spodbuja T-celično ekspanzijo (Suhoski in sod., 2007).

Z razvojem tehnologije in širjenjem zanimanja za CAR-T celične terapije pa na trg prihajajo tudi prvi avtomatizirani sistemi, ki obenem spirajo celice, jih separirajo in nato gojijo v popolnoma avtomatiziranem procesu. Primer takega sistema je CliniMACS Prodigy sistem. (Mock in sod., 2015). Pri ekspanziji celic že aktivirane in gensko spremenjene celice s CAR receptorjem resuspendirajo v koncentraciji približno 2×10^6 /ml in jih gojijo v bioreaktorju, dokler ne dobijo zadostne količine celic. Potrebna količina celic za prenos v pacienta je 3×10^7 CAR-T celic na kilogram telesne teže pacienta (Hollyman in sod., 2009).

4 USPEŠNI PRIMERI UPORABE CAR-T CELIC, NEREŠENI IZZIVI IN REŠEVANJE TEH IZZIVOV

4.1 DOSEDANJE USPEŠNE TERAPIJE

Terapija z modificiranimi celicami T s himernim receptorjem za antigen je ena najmodernejših metod za zdravljenje raka. Kot ideja se je v raziskavah pojavila šele v zadnjih letih skupaj z razvojem imunoterapij in terapij z izboljšanimi celicami. Prva terapija z uporabo CAR-T celic za zdravljenje rakavih obolenj je bila terapija za B-celični limfom, pri kateri so uporabili CAR receptor za antigen CD19, ki je značilen za limfocite B in se obenem ne pojavlja na celicah drugih tkiv (Li in sod., 1996). Do leta 2014 se je uspešnost terapije v nekaterih študijah dvignila tudi do 90% popolnoma ozdravljenih pacientov pri raziskavi Univerze v Pennsylvaniji (Grupp in sod., 2013) in 88% pri raziskavi na Memorial Sloan Kettering Cancer Center (Brentjens in sod., 2013). V študijah, v katerih merijo tudi preostanek celic, ki bi potencialno lahko postale tumorske (ang. MRD- Minimal Residual Disease), so izmerili tudi 80% delež pacientov brez karkšnih koli znakov preostalih celic (Frey, 2017).

Spodbudne so ugotovitve, da je zdravljenje najučinkovitejše v primeru, ko paciente pred CAR-T terapijo zdravimo s kemoterapijo, ki zmanjša število limfocitov (ang. Lymphodepleting chemotherapy). Klebanoff in sodelavci (2005) povzemajo, da limfodeplecija poveča učinkovitost CAR-T terapije zaradi treh mehanizmov. Prva prednost uničenja netransformiranih limfocitov je ta, da s tem omogočimo, da je celotna količina stimulatornih citokinov (npr. IL-7 in IL-15) na voljo transformiranim celicam. Drugi od mehanizmov je uničenje regulatornih limfocitov T (Treg), ki zavirajo delovanje limfocitov T. S tem omogočimo daljše vztrajanje delovanja CAR-T celic. Tretji od mehanizmov, ki ga navajajo Klebanoff in sodelavci pa je aktivacija antigen predstavitvenih celic, kar prav tako izboljša delovanje CAR-T limfocitov. Antigen predstavitvene celice se aktivirajo zaradi indukcije apoptoze in nekroze tumorskih celic (zaradi kemoterapevtskega učinka), ki sprosti antigene, ki jih antigen predstavitvene celice privzamejo in predstavijo CAR-T celicam.

Vemo pa tudi, da so bolj učinkoviti CAR-T konstrukti druge generacije, najbolj odzivni na zdravljenje pa so pacienti z akutno limfoblastično levkemijo (Gill in sod., 2016). Od kostimulatornih domen, ki jih dodajo konstruktom druge generacije se je 4-1BB domena izkazala za bolj uspešno, saj podaljša delovanje celic in privede do daljših obdobj brez znakov bolezni (Luskin in DeAngelo, 2017).

Poleg izredno spodbudnih rezultatov raziskav pa so pri implementaciji CAR-T celične terapije naleteli tudi na nekaj težav. Glavni dve težavi pri uporabi metode za zdravljenje akutne limfoblastične levkemije sta sindrom prekomernega izločanja citokinov in nevrotoksičnost. Sindrom prekomernega izločanja citokinov se kaže kot visoka vročina, znižan krvni tlak, hipoksija, v hujših primerih pa preide v resnejše komplikacije. Nevrotoksičnost pa se kaže s simptomi od blage zmedenosti do hujših stanj (Frey, 2017).

4.2 ŠE NEREŠENI IZZIVI

4.2.1 Sindrom prekomernega izločanja citokinov

Glavna težava, ki se v večji ali manjši meri pojavi pri veliki večini pacientov, pri katerih zdravijo akutno limfoblastično levkemijo s celicami CAR-T, je sindrom prekomernega izločanja citokinov (ang. CRS ali Cytokine release syndrom). CRS je sistemski vnetni odziv, ki korelira z aktivacijo in ekspanzijo CAR-T celic *in vivo*. Če stanja ne zdravijo oz. omejujejo, lahko pride do nizkega krvnega tlaka, omejene oskrbe telesa s kisikom, do končne disfunkcije organov ali celo smrti. Sindrom v blažjih oblikah lahko izzveni sam od sebe ob podporni oskrbi (infuzije in zdravila za zniževanje telesne temperature), v težjih oblikah pa je potrebno zdravljenje z zdravili, ki zavirajo delovanje citokinov (Frey, 2017). Na klinični sliki sindrom prekomernega izločanja citokinov zaznajo z znaki vnetja, kot so povišana vsebnost reaktantov akutne faze (feritin, reaktivni protein C (CRP)) in citokinov, kot so interlevkini (IL) -1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TN- α in interferon (IFN)- γ (Luskin in DeAngelo, 2017).

4.2.2 Toksičnost zaradi napada na zdrave celice, ki izražajo tumorski antigen

Toksičnost zaradi napada na zdrave celice, ki izražajo tumorski antigen (ang. on-target, off-tumor toxicity), ki se pri zdravljenju akutne limfoblastične levkemije kaže kot aplazija celic B (Brentjens in sod., 2011), je zelo pogosta težava tudi pri drugih tipih rakov, saj je izredno težko najti antigene, ki se izražajo izključno na tumorskih celicah. Takšna toksičnost je potencialno smrtna, zato se pospešeno išče rešitve za ta problem (glej 4.3) (Sadelain in sod., 2013).

Problem toksičnosti je znatno višji pri CAR-T celicah kot pri monoklonskih protitelesih za isti antigen. CAR-T celice proti antigenu HER2 so privedle do smrtnega izida pri pacientu z rakom na debelem črevesju, ker so celice napadle pljučno tkivo, ker le-to izraža enak antigen kot rakaste celice. Klub temu, da so celice CAR-T (oziroma njihov receptor) temeljile na monoklonskem protitelesu trastuzumaba, ki ni imelo nikakršnih podobnih toksičnih učinkov, so se izkazale za toksične (Morgan in sod., 2010).

Drug značilen primer je aplazija celic B pri zdravljenju akutne limfoblastične levkemije s CAR-T celicami z receptorjem za CD19 antigen. Celice CAR-T poleg tumorskih celic napadejo še zdrave limfocite B in povzročijo njihovo nedelovanje in nepravilen razvoj. Aplazijo limfocitov B se omejuje in zdravi z intravenoznim vnosom imunoglobulinov, za druge primere toksičnosti pa rešitve niso preproste ali mogoče (Sadelain in sod., 2013). Pri preprečevanju takih toksičnosti je ključno, da ugotovijo koliko antigena se izraža na tumorskih celicah in koliko na zdravih celicah drugih tkiv. S temi podatki in podatki o občutljivosti CAR-T celic lahko predvidijo, kakšna količina celic bo toksična za tumor in obenem nenevarna za zdrava tkiva (Sun in sod., 2018). Študija je pokazala, da večja količina (10^{10}) celic s CAR receptorjem za HER2 antigen izzove toksičnost za zdrave celice, manjše doze celic pa so bile varne (Ahmed in sod., 2015).

4.2.3 Izguba antigenov na tumorskih celicah

Naslednji problem, ki se pojavlja pri CAR-T celični terapiji pa je izguba antigenov (ang. antigen escape). Maligne celice lahko s premikom bralnega okvirja ali mutacijami, ki spremenijo zaporedje baz v proteinu, zato le ta ni več enak (ali sploh ni več) antigen kot je bil tisti, za katerega je bil načrtovan receptor CAR. Podobno se lahko zgodi tudi z alternativnim izrezom mRNA, pri čemer se izgubijo epitopi za vezavo CAR receptorja. Temu pojavu rečemo izguba antigena (Sotillo in sod., 2015). Pri zdravljenju z anti-CD19 CAR-T celicam so se pojavile CD19 negativne celice že takrat, ko so še bile prisotne CAR-T celice. To nakazuje na to, da CAR-T celice izvedejo nekakšno selekcijo, kar je treba upoštevati in predvidevati, še posebej pri pacientih z nezrelimi rakastimi celicami in rakastimi celicami, ki se hitro delijo. Tak primer so prav akutne levkemije (Gill in sod., 2016).

4.2.4 Imunogenost mišjih enoverižnih variabilnih fragmentov

Manjše tveganje pri uporabi CAR-T celične terapije predstavlja tudi imunogenost mišjih enoverižnih variabilnih fragmentov, ki v veliko primerih predstavljajo vezavno domeno za antigen (Chang in Chen, 2017). Ker ti scFv fragmenti prihajajo iz mišjih monoklonskih protiteles, lahko vzbudijo imunski odziv pri človeku, kar lahko privede tudi do hujših imunskih reakcij, povezanih z alergijskimi reakcijami. Neki pacient, ki je prejel CAR-T terapijo za raka na trebušni slinavki, je celo razvil anafilaktično reakcijo, ki so jo pripisali IgE protitelesom specifičnim za CAR receptor, ki je vseboval mišje scFv (Maus in sod., 2013). Iz tega razloga je potrebno zaznavati odzive, spremljati znake in nemudoma zdraviti pojav te toksičnosti. Če vemo, da bodo potrebni dodatni odmerki CAR-T celic, je nujno potrebno uporabiti humanizirane scFv namesto mišjih. Prav tako je to potrebno, če obstaja sum na močan alergični imunski odziv (Casucci in sod., 2014).

4.3 REŠEVANJE TEH IZZIVOV

4.3.1 Preprečevanje in blaženje sindroma prekomernega izločanja citokinov in omejevanje toksičnosti

Sindrom prekomernega izločanja citokinov (CRS) je eden največjih problemov pri zdravljenju raka s CAR-T celično terapijo, saj prinaša hude težave za paciente in v skrajnih primerih tudi smrt zaradi odpovedi organov. Zato je pomembno, da se sindrom prekomernega izločanja citokinov pravočasno zazna in zdravi, ter se ob premočnem odzivu prepreči nadaljnje poslabšanje. Zaznavanje oz. predvidevanje je v veliki meri odvisno od dejavnikov, ki vplivajo na *in vivo* ekspanzijo CAR-T celic. Eden od dejavnikov, ki v veliki meri vpliva na resnost sindroma prekomernega izločanja citokinov je obsežnost bolezni pred infuzijo CAR-T celic. Večja obsežnost bolezni pomeni večje tveganje za izbruh sindroma prekomernega izločanja citokinov (Davila in sod. 2014).

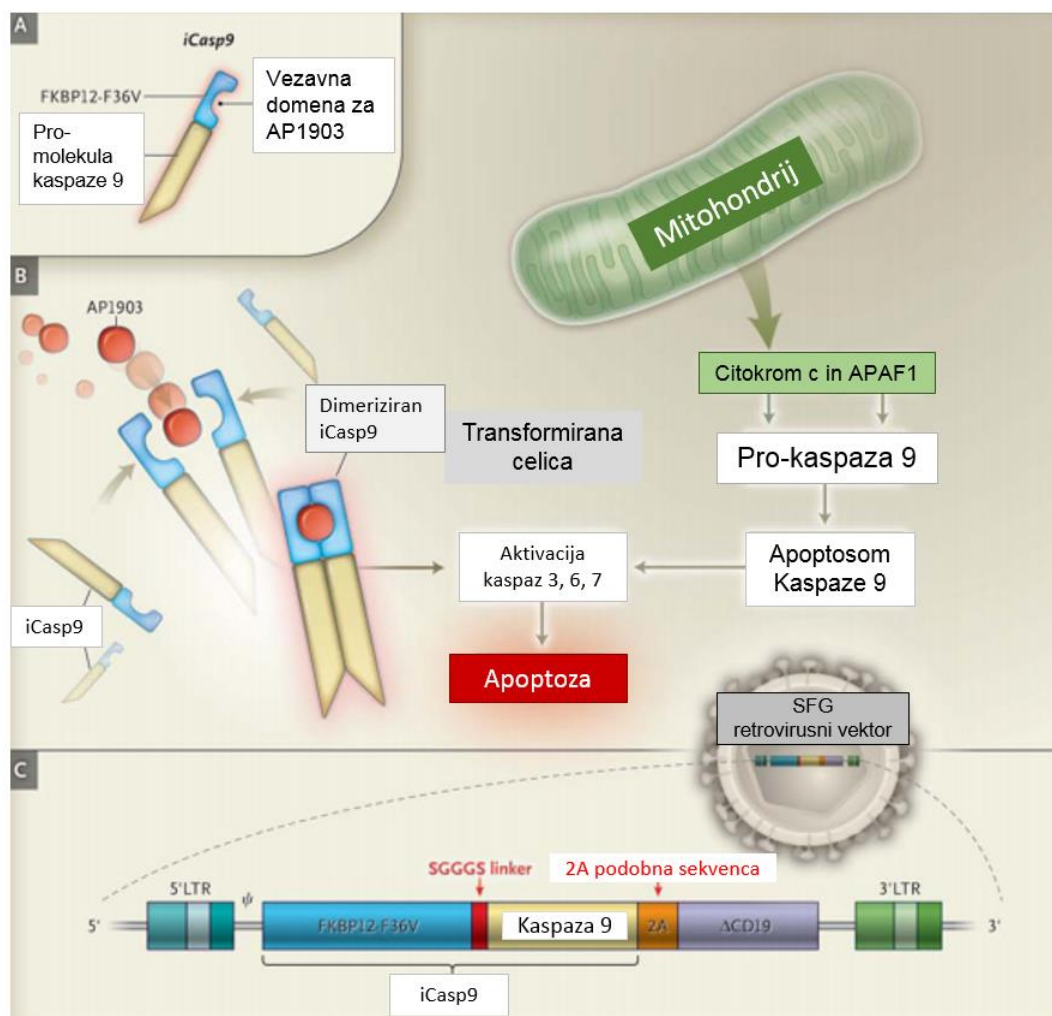
Nasprotno pa za CAR-T celično terapijo ne velja klasično razmerje med količino in toksičnostjo, saj se celice po infuziji v telo dodatno namnožijo. Količina vnesenih celic, ki po vnosu proliferirajo, torej najbolj vpliva na njihovo število v pacientu in s tem na resnost in klinične znake sindroma prekomernega izločanja citokinov (Frey, 2017).

Zdravljenje posledic sindroma prekomernega izločanja citokinov je naslednji korak pri obvladovanju tega stranskega učinka. Ker se pri aktivaciji makrofagov s CAR-T celicami sproščajo velike količine interleukina-6 (IL-6), se za zdravljenje simptomov uporablja tocilizumab, ki je protitelo proti receptorju za IL-6 (Lee in sod., 2014). Ker IL 6 izločajo predvsem makrofagi, je to učinkovit sistem za zmanjševanje toksičnosti, ki obenem omogoča ohranitev protitumorskega delovanja efektorskih celic CAR-T (Frey, 2017).

Poleg tocilizumaba se za zdravljenje uporabljajo še etanercept (inhibitor TNF- α) in kortikosteroidi. Kljub temu, da so te učinkovine pogosto učinkovite, niso enako učinkovite pri vseh pacientih, kortikosteroidi pa so tudi limfolitični in s tem direktno izničijo CAR-T celično terapijo (Maude in sod., 2014). Poleg učinkovin, je učinkovit korak za zmanjševanje toksičnosti tudi razdelitev količine celic, ki jih vnašajo v pacienta, v več manjših odmerkih, v kombinaciji s skrbnim spremljanjem simptomov (Sun in sod., 2018).

V nekaterih primerih pa zdravljenje sindroma prekomernega izločanja citokinov preprosto ne zadošča in ne ustavi citokinskega izbruha dovolj hitro, da bi s tem lahko rešili pacienta. Zato so se razvile nove tehnike hitre ustavitve delovanja CAR-T celic. Glavna strategija na tem področju so tako imenovani samomorilski geni. Glavni sistem samomorilskih genov je inducibilna kaspaza-9. Sistem inducibilne kaspaze-9 je najbolj napreden sistem eliminacije CAR-T celic, ki temelji na fuziji kaspaze-9 z FK vezavnim proteinom, ki je občutljiv na sintetično molekulo AP1903. Ob vnosu molekule AP1903 v telo, FK vezavni protein dimerizira, s tem pa inducira kaspazo-9 in sproži hitro apoptozo celice. Selektivnost za celice CAR-T se določa s FK vezavnim proteinom, ki je v posebni modificirani obliki prisoten le na celicah CAR-T. S tem sistemom se apoptozo sproži po drugačni poti kot navadno in se s tem še dodatno izogne uničenju zdravih celic (Di Stasi in sod., 2011; slika 3). Ta sistem je sposoben eliminirati celice v 30 minutah po vnosu sintetične molekule (Zhou in sod., 2015). Poleg izredne učinkovitosti pa ima tak sistem tudi slabosti. Glavna od teh je uničenje CAR-T celic in s tem zaustavitev zdravljenja (Sun in sod., 2018).

Sistemi samomorilskih genov pa niso učinkoviti le pri sindromu prekomernega izločanja citokinov. Z uničenjem celic se izniči tudi učinke toksičnosti zaradi napada na zdrave celice in vse druge morebitne stranske učinke. Poznani pa tudi drugačne sisteme nadziranja CAR-T celic, kot je na primer sistem inducibilnih celic CAR-T. Pri tem sistemu so celice CAR-T aktivne le v primeru, ko je prisotna farmakološka spojina, ob njeni odsotnosti pa celice mirujejo. Sakemura in sodelavci (2016) so izdelali sistem, pri katerem se CD19 CAR celice sprožijo šele ob dodatku antibiotika doksiciklina. Tak sistem jim torej omogoča, da vklopijo in izklopijo delovanje celic in s tem regulirajo njihovo delovanje in v končni fazi tudi toksičnost.



Slika 3: Shema delovanja sistema inducibilne kaspaze-9 (Di Stasi in sod., 2011: 1677)

Ena od bolj preprostih strategij v boju proti toksičnosti je tudi transfekcija CAR-T celic z mRNA molekulami, ki kodirajo receptor CAR. S tem dosežejo le prehodno izražanje CAR receptorja, ki ima manjše toksične posledice za telo. Slabost tega sistema pa je zagotovo potreba po večkratnem vnosu celic v pacienta, kar poveča tveganje za razvoj imunskega odziva na CAR-T celice (Beatty in sod., 2014; Maus in sod., 2013).

4.3.2 Povečevanje učinkovitosti, vzdržljivosti in specifičnosti

Za prihodnje izboljšanje učinkovitosti terapije z modificiranimi celicami z izraženim himernim receptorjem za tumorske antigene se že pojavlja veliko novih strategij in sistemov. Prvi izmed njih, ki se uporablja že od vsega začetka, je optimizacija CAR-T celic. Najbolj obetavna je uporaba specifičnih podtipov celic T, še posebej čim manj diferenciranih celic T, saj naj bi te zdržale dlje in bile bolj učinkovite. Primer takih celic so centralne spomislneke celice T (Klebanoff in sod., 2011).

Velik korak pri izboljšanju učinkovitost je tudi uporaba humaniziranih enoverižnih variabilnih fragmentov (scFv) namesto sedaj uporabljenih mišjih scFv. ScFv je reducirana oblika protitelesa, ki ga sestavljata variabilna fragmenta lahke in težke verige, povezana z povezovalnim peptidom, ki nam omogoča, da oba variabilna fragmenta skupaj povežemo s povezovalno verigo receptorja CAR (Ahmad in sod., 2012). Uporaba humaniziranih scFv zmanjša imunsko zavračanje CAR-T celic in s tem podaljša obstanek in učinkovitost le-teh (Luskin in DeAngelo, 2017).

CAR-T receptorji tretje generacije so naslednja možna rešitev pri izboljšanju učinkovitosti in vzdržljivosti, saj s svojima dvema kostimulatornima domenama obljublajo boljšo aktivacijo CAR-T celic. Potrebne pa bodo še dodatne raziskave in optimizacije, saj je potrebno zagotoviti ustrezne funkcije in ustrezno dolgotrajen obstanek celic, brez da bi se prehitro iztrošile in propadle. Prav tako je potrebno paziti na preveliko proliferacije, ki je nevarna iz stališča toksičnosti in sindroma prekomernega izločanja citokinov (Tammana in sod., 2010).

Še ena od možnih strategij je vnos inhibitorjev PD-1 in CTLA4. PD-1 in CTLA4 sta molekuli, ki inhibirata aktivacijo celic T in njihovo izločanje citokinov, s tem pa upočasnjujeta in blažita imunski odziv. Če ob vnosu CAR-T celic v telo pacienta vnesejo še monoklonska protitelesa proti PD-1 in/ali CTLA4, se protitelesa vežejo nanju in onemogočijo njuno delovanje, inhibicija se izniči in tako se posredno izboljša delovanje CAR-T celic (John in sod., 2013). S pojavom novih orodij za gensko manipuliranje (npr. CRISPR/Cas9) pa lahko preprosto odstranijo gene za PD-1 in CTLA4 iz celic T in končni učinek je enak (Chang in Chen, 2017).

Poleg povečevanja učinkovitosti je potrebno tudi povečati specifičnost CAR-T celic, predvsem v luči toksičnosti zaradi napada na zdrave celice, ki izražajo tumorski antigen. Prvi korak pri povečanju specifičnosti je zagotovo iskanje antigenov, ki so značilni samo za tumorske celice. Eni takih antigenov so neoantigeni, ki imajo specifično mutirane antigene, ki so nastali z mutacijo v tumorskem tkivu in so zato značilni le zanj (Klebanoff in sod., 2016).

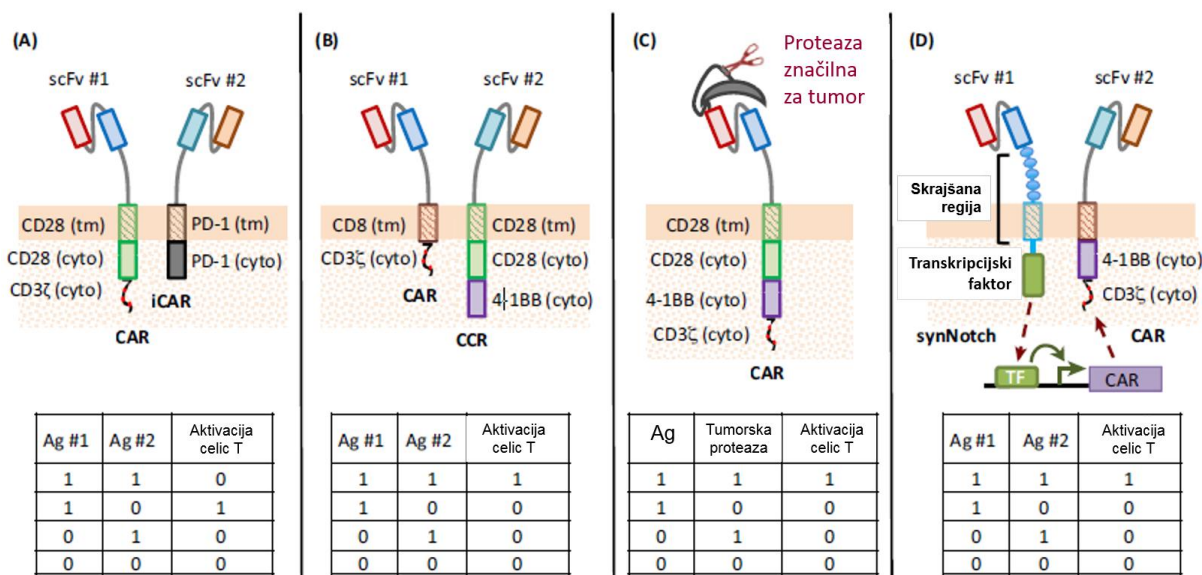
Ker pa so taki antigeni izredno redki je naslednji pristop natančno uravnavanje afinitete in avidnosti CAR-T celic. S tem lahko dosežejo točko, kjer celice napadajo in učinkovito uničijo tumorske celice, obenem pa ne poškodujejo zdravih celic z istim antigenom. To je mogoče, ker se antigen na tumorskih celicah praviloma izraža v povečanem obsegu. Če se antigen izraža na celicah v zelo veliki gostoti, bodo tudi celice CAR-T z receptorji z nižjo afiniteto sposobne prepoznati in učinkovito odstraniti rakave celice, medtem, ko bodo zdrave celice ostale varne, saj je afiniteta receptorja prešibka, da bi povzročila aktivacijo celic CAR-T in s tem škodo na celicah s tako majhnim številom antigenov (Caruso in sod., 2015).

Naslednja strategija je uporaba celic, ki izražajo dva CAR receptorja za dva različna antigena. Obstaja več variant uporabe sistema, glavni dve pa sta uporaba kombinacije dveh receptorjev za dva antigena, potrebna za aktivacijo celic T (ang. AND-gate) (Kloss in sod., 2013) in uporaba dveh receptorjev za dva antigena za preprečitev aktivacije CAR-T celi (ang. NOT-gate) (Chang in Chen, 2017).

Sistemi več receptorjev povečajo specifičnost, saj celice potrebujejo določeno kombinacijo antigenov za aktivacijo celic T (Chang in Chen, 2017). Pri sistemu kombinacije dveh receptorjev za dva antigena, ki skupaj sodelujeta pri aktivaciji celice je bistveno, da ločijo

aktivacijski signal od kostimulatornega tako, da domeni vežejo vsako na svoj CAR receptor. Tako se CAR-T celica aktivira le v primeru, ko sta na površini celice prisotna oba antigena (slika 4; A) (Kloss in sod., 2013). Pri sistemu dveh receptorjev za dva antigena, ki preprečita aktivacijo celice, pa je potrebno zagotoviti prvi CAR receptor, značilen za tumorski antigen, ki vsebuje aktivacijsko in kostimulatorno domeno. Poleg tega pa je potreben še drugi CAR receptor, ki je značilen za antigen, prisoten le na zdravih celicah. Ta drugi CAR receptor ima inhibitorno domeno, ki inhibira aktivacijo s prvim CAR receptorjem, če je drugi vezan na antigen zdrave celice. S tem dosežejo, da CAR-T celice napadejo le tumorske celice in obenem ne prizadenejo zdravih celic (slika 4; B) (Fedorov in sod., 2013).

Poleg teh dveh sistemov poznamo še sistem s tumorsko proteazo in synNotch sistem. Sistem s tumorsko proteazo temelji na tem, da je CAR receptor pokrit s peptidom, ki ga razgradi tumorska proteaza, ki je prisotna v tumorskem mikrookolju, kar omogoči vezavo antigena in s tem aktivacijo CAR-T celic (slika 4; C) (Han in sod., 2017). SynNotch sistem pa vsebuje dva receptorja, od katerih vezava prvega receptorja na njemu lasten antigen sprosti transkripcijski faktor. Transkripcijski faktor sproži prepis CAR receptorja za antigen, aktivacijo celice in s tem uničenje tumorske celice (slika 4; D) (Morsut in sod., 2016).



Slika 4: Sistemi za povečevanje specifičnosti himernih antigen receptorjev (Chang in Chen, 2017: 441).

Vzdržljivost CAR-T celic je zelo pomembna, saj daljše vztrajanje celic v telesu pomeni daljše obdobje brez bolezni. Chang in Chen (2017) povzemata, da so glavne strategije za izboljšanje vzdržljivosti CAR-T celic uporaba manj diferenciranih podtipov celic T, vnos dodatnih kostimulatornih molekul (npr. ligand za 4-1BB, receptorji za citokine in kemokine) in povečano izločanje citokinov, pri katerem je potrebno paziti na ravnotežje med izboljšano funkcijo in stranskimi učinki (npr. sindrom povečanega izločanja citokinov). Nasprotno od teh možnosti pa je negacija inhibitornih signalov, ki prihajajo iz tumorskega okolja (predvsem pri trdnih tumorjih). Ninomiya in sod. (2015) so pokazali, da inhibicija indoleamina 2,3-dioksidogene (IDO) z vnosom zdravila ciklofosfamida, ki se uporablja kot kemoterapevtik in imunosupresiv, pred vnosom celic CAR-T, izboljša delovanje le-teh. IDO je namreč encim, ki pretvarja triptofan v molekule, ki inhibitorno delujejo na celice T. Drugi primer negacije

inhibitornih signalov pa so CAR-RIAD T celice, ki izražajo peptid, ki zmoti vezavo proteinske kinaze A (PKA) na ezrin. Protein kinaza A inhibira aktivacijo celic T, torej ob preprečitvi vezave PKA na celico preprečijo inhibicijo in s tem izboljšajo delovanje CAR-T celic (Newick in sod., 2016). Ena od bolj naprednih metod za negacijo inhibitornih signalov pa je sigurno izdelava in vnos receptorjev, ki združujejo ekstracelularno domeno inhibitornega receptorja (npr. PD1), z intracelularno signalizacijsko domeno stimulatornega receptorja (npr. CD28). S tem se inhibitorni signal iz okolja v celico prenese kot stimulatorni signal, tako pa ojačamo delovanje CAR-T celic s takim receptorjem (Liu in sod., 2016).

4.3.3 Zdravljenje trdnih tumorjev

Za zdravljenje trdnih tumorjev veliko tveganje predstavlja toksičnost zaradi napada na zdrave celice, ki izražajo tumorski antigen. Ena od strategij v boju proti takšni toksičnosti je izdelava CAR-T celic, ki le prehodno izražajo CAR receptor. To dosežejo tako, da gen za CAR receptor vnesejo z mRNA molekulo. Dodatno prednost pa predstavlja tarčno injeciranje takšnih CAR-T celic v območje tumorja. Zdravljenje se je izkazalo za učinkovito in manj toksično za zdrava tkiva (Beatty in sod., 2014).

Poleg zdravljenja trdnih tumorjev se kaže potencial za zdravljenje različnih okužb, na primer okužbe z oportunistično glivo *Aspergillus*. Celice s CAR receptorjem, katerega ekstracelularna domena je dektin-1, so uspešno prepoznale ogljikove hidrate na celični steni, s tem pa poškodovale in inhibirale rast hif glive *Aspergillus in vitro* in *in vivo* (Kumaresan in sod., 2014).

5 ZAKLJUČEK

Za izboljšanje CAR-T celične terapije v prihodnosti bo potrebno bolje razumeti mehanizme delovanja, predvsem mehanizme prenosa signala. Z boljšim razumevanjem (stranskih) učinkov vnosa CAR-T celic v paciente bo lažje predvideti, zdraviti in preprečiti hujše posledice in smrtne izide sindroma prekomernega izločanja citokinov. Za izboljšanje varnosti se bo potrebno predvsem osredotočiti na odkrivanje antigenov, ki so specifični za tumorje, ali pa kombiniranje antigenov in različnih CAR receptorjev, da dosežejo specifičnost in se izognejo toksičnosti zaradi napada na zdrave celice, ki izražajo tumorski antigen. V kolikor to ni mogoče, pa je potrebna optimizacija količine za optimalno delovanje terapije brez toksičnih učinkov.

Stvar prihodnosti in dodatnih raziskav je tudi razširitev uporabe terapije s celicami CAR-T iz zdravljenja krvnih rakov na zdravljenje trdnih tumorjev. Glavni izziv pri tem bo verjetno izboljšanje celic tako, da ne bodo inhibirane s strani imunosupresivnih signalov prisotnih v tumorskem okolju.

Prihodnost CAR-T celične terapije vidimo predvsem v dostopnosti zdravljenja za vedno več pacientov. Zato se nam zdi pomembno, da se razvije alogenske CAR-T celice, ki jih bo mogoče producirati v večjem merilu, po standardih dobre proizvodne prakse in s konstantnimi donosi. Glavni izziv na tem področju bo preprečevanje zavrnitve celic s strani prejemnikovega imunskega sistema (ang. Graft Versus Host Disease ali GVHD). Za zdravljenje trdnih tumorjev se nam obeta razvoj CAR-T celic, ki bodo odporne na inhibicijske signale v tumorskem okolju, z izboljšano specifičnostjo za tumorske antigene. Velik korak naprej so bile in bodo tudi kombinirane terapije, kot je na primer limfodeplecija s kemoterapijo pred vnosom modificiranih celic T v pacienta, ki se uporablja pri zdravljenju akutne limfoblastične levkemije s CD19 CAR-T celično terapijo. Obetavne pa se zdijo tudi metode z več receptorji za prepoznavanje specifičnih kombinacij antigenov, dodatne kostimulatorne molekule ter izboljšanje varnosti z uporabo inducibilnih samomorilskih mehanizmov ob pojavu hujših stranskih učinkov (glej poglavji 4.3.1 in 4.3.2).

6 VIRI

- Ahmad Z. A. Yeap S. K. Ali A. M. Ho W. Y. Alitheen N. B. M. Muhajir Hamid M. 2012. scFv Antibody: Principles and Clinical Application. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, ID980250, doi:10.1155/2012/980250: 15 str.
- Ahmed N. Brawley V. S. Hegde M. Robertson C. Ghazi A. Gerken C. Liu E. Dakhova O. Ashoori A. Corder A. Gray T. Wu M. F. Liu H. Hicks J. Rainusso N. Dotti G. Mei Z. Grilley B. Gee A. Rooney C. M. Brenner M. K. Heslop H. E. Wels W. S. Wang L. L. Anderson P. Gottschalk S. 2015. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) - Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma. *Journal of Clinical Oncology*, 33, 15: 1688-1696
- Beatty G. L. Haas A. R. Maus M. V. Torigian D. A. Soulen M. C. Plesa G. Chew A. Zhao Y. Levine B. L. Albelda S. M. Kalos M. June C. H. 2014. Mesothelin-specific Chimeric Antigen Receptor mRNA-Engineered T cells Induce Anti-Tumor Activity in Solid Malignancies. *Cancer Immunol Research*, 1, 2, 2: 112–120
- Brentjens R. J. Davila M. L. Riviere I. Park J. Wang X. Cowell L. G. Bartido S. Stefanski J. Taylor C. Olszewska M. Borquez-Ojeda O. Qu J. Wasielewska T. He Q. Bernal Y. Rijo IV. Hedvat C. Kobos R. Curran K. Steinherz P. Jurcic J. Rosenblat T. Maslak P. Frattini M. Sadelain M. 2013. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Science Translational Medicine*, 2013, ID3005930, doi:10.1126/scitranslmed.3005930: 19 str.
- Brentjens R. J. Rivière I. Park J.H. Davila M. L. Wang X. Stefanski J. Taylor C. Yeh R. Bartido S. Borquez-Ojeda O. Olszewska M. Bernal Y. Pegram H. Przybylowski M. Hollyman D. Usachenko Y. Pirraglia D. Hosey J. Santos E. Halton E. Maslak P. Scheinberg D. Jurcic J. Heaney M. Heller G. Frattini M. Sadelain M. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood*, 118, 18: 4817-4828
- Caruso H. G. Hurton L. V. Najjar A. Rushworth D. Ang S. Olivares S. Mi T. Switzer K. Singh H. Huls H. Lee D. A. Heimberger A. B. Champlin R. E. Cooper L. J. 2015. Tuning Sensitivity of CAR to EGFR Density Limits Recognition of Normal Tissue While Maintaining Potent Antitumor Activity. *Cancer Research*, 75, 17: 3505-3518
- Casati A. Varghaei-Nahvi A. Feldman S. A. Assenmacher M. Rosenberg S. A. Dudley M. E. Scheffold A. 2013. Clinical-scale selection and viral transduction of human naïve and central memory CD8+ T cells for adoptive cell therapy of cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 62: 1563–1573
- Casucci M. Hawkins R. E. Dotti G. Bondanza A. 2014. Overcoming the toxicity hurdles of genetically targeted T cells. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 64, 1: 123-130
- Chang ZN. L. Chen Y. Y. 2017. CARs: Synthetic Immunoreceptors for Cancer Therapy and Beyond. *Trends in Molecular Medicine*, 23, 5: 430-450

- Davila M. L. Riviere I. Wang X. Bartido S. Park J. Curran K. Chung S. S. Stefanski J. Borquez-Ojeda O. Olszewska M. Qu J. Wasielewska T. He Q. Fink M. Shinglot H. Youssif M. Satter M. Wang Y. Hosey J. Quintanilla H. Halton E. Bernal Y. Bouhassira D. C. Arcila M.E. Gonen M. Roboz G. J. Maslak P. Douer D. Frattini M. G. Giralt S. Sadelain M. Brentjens R. 2014. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Science Translational Medicine*, 2014, ID3008226, doi:10.1126/scitranslmed.3008226: 23 str.
- 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. *New England Journal of Medicine*, 365, 18: 1673-1683
- Fedorov V. D. Themeli M. Sadelain M. 2013. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. *Science Translational Medicine*, 2013, ID:3006597, doi:10.1126/scitranslmed.3006597: 25 str.
- Frey N. 2017. The what, when and how of CAR T cell therapy for ALL. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 30: 275-281
- Gill S. Maus M. V. Porter D. L. 2016. Chimeric antigen receptor T cell therapy: 25 years in the making. *Blood Reviews*, 30: 157–167
- 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. *New England Journal of Medicine*, 368, 16: 1509–1518
- Han X. Bryson P. D. Zhao Y. Cinay G. E. Li S. Guo Y. Siriwon N. Wang P. 2017. Masked Chimeric Antigen Receptor for Tumor-Specific Activation. *Molecular Therapy*, 25, 1: 274-284
- Harris D. T. Kranz D.M. 2016. Adoptive T Cell Therapies: A Comparison of T Cell Receptors and Chimeric Antigen Receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37, 3: 220-230
- Hollyman D. Stefanski J. Przybylowski M. Bartido S. Borquez-Ojeda O. Taylor C. Yeh R. Capacio V. Olszewska M. Hosey J. Sadelain M. Brentjens R. J. Rivière I. 2009. Manufacturing validation of biologically functional T cells targeted to CD19 antigen for autologous adoptive cell therapy. *Journal of Immunotherapy*, 32, 2: 169–180
- Hudecek M. Sommermeyer D. Kosasih P. L. Silva-Benedict A. Liu L. Rader C. Jensen M. C. Riddell S. R. 2015. The non-signaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. *Cancer Immunology Research*, 3, 2: 125–135

- John L. B. Devaud C. Duong C. P. Yong C.S. Beavis P.A. Haynes N.M. Chow M. T. Smyth M. J. Kershaw M. H. Darcy P. K. 2013. Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells. *Clinical Cancer Research*, 19, 20: 5636-5646
- Kim J. V. Latouche JB. Riviere I. Sadelain M. 2004. The ABCs of artificial antigen presentation. *Nature Biotechnology*, 22, 4: 403-410
- Klebanoff C. A. Gattinoni L. Palmer D. C. Muranski P. Ji Y. Hinrichs C. S. Borman Z. A. Kerker S. P. Scott C. D. Finkelstein S. E. Rosenberg S. A. Restifo N. P. 2011. Determinants of successful CD8+ T cell adoptive immunotherapy for large established tumors in mice. *Clinical Cancer Research*, 17, 16: 5343–5352
- Klebanoff C. A. Khong H. T. Antony P. A. Palmer D. C. Restifo N. P. 2005. Sinks, suppressors and antigen presenters: how lymphodepletion enhances T cell-mediated tumor immunotherapy. *Trends in Immunology*, 26, 2: 111-117
- Klebanoff C. A. Rosenberg S. A. Restifo N. P. 2016. Prospects for gene-engineered T cell immunotherapy for solid cancers. *Nature Medicine*, 22, 1: 26-36
- Kloss C. C. Condomines M. Cartellieri M. Bachmann M. Sadelain M. 2013. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nature Biotechnology*, 31, 1: 71-75
- Kumaresan P. R. Manuri P. R. Albert N. D. Maiti S. Singh H. Mi T. Roszik J. Rabinovich B. Olivares S. Krishnamurthy J. Zhang L. Najjar A. M. Huls M. H. Lee D. A. Champlin R. E. Kontoyiannis D. P. Cooper L. J. N. 2014. Bioengineering T cells to target carbohydrate to treat opportunistic fungal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 111, 29: 10660–10665
- Lee D. W. Gardner R. Porter D. Louis C. U. Ahmed N. Jensen M. Grupp S. A. Mackall C. L. 2014. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood*, 124, 2: 188-195
- Li Y. S. Wasserman R. Hayakawa K. Hardy R. R. 1996. Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity*, 5, 6: 527-535
- Liu X. Ranganathan R. Jiang S. Fang C. Sun J. Kim S. Newick K. Lo A. June C. H. Zhao Y. Moon E. K. 2016. A chimeric switch-receptor targeting PD1 augments the efficacy of second generation CAR T-Cells in advanced solid tumors. *Cancer Research*, 76, 6: 1578–1590
- Luskin M. R. DeAngelo D. J. 2017. Chimeric Antigen Receptor Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia Clinical Practice. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 12, 4: 370–379

- Maude S. L. Barrett D. Teachey D. T. Grupp S.A. 2014. Managing cytokine release syndrome associated with novel T cell-engaging therapies. *Cancer Journal*, 20, 2: 119-122
- Maus M. V. Haas A. R. Beatty G. L. Albelda S. M. Levine B. L. Liu X. Zhao Y. Kalos M. June C. H. 2013. T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans. *Cancer Immunology Research*, 1, 1: 26-31
- Morgan R. A. Yang J. C. Kitano M. Dudley M. E. Laurencot C. M. Rosenberg S. A. 2010. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Molecular Therapy*, 18, 4: 843-851
- Morsut L. Roybal K. T. Xiong X. Gordley R. M. Coyle S. M. Thomson M. Lim W. A. 2016. Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors. *Cell*, 164, 4: 780-791
- Naldini L. Blömer U. Gallay P. Ory D. Mulligan R. Gage F. H. Verma I. M. Trono D. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272: 263–267
- Newick K. O'Brien S. Sun J. Kapoor V. Maceyko S. Lo A. Pure E. Moon E. Albelda S. M. 2016. Augmentation of CAR T cell trafficking and antitumor efficacy by blocking protein kinase A (PKA) localization. *Cancer Immunology Research*, 4, 6: 541–551
- Ninomiya S. Narala N. Huye L. Yagyu S. Savoldo B. Dotti G. Heslop H. E. Brenner M. K. Rooney C. M. Ramos C. A. 2015. Tumor indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibits CD19-CAR T cells and is downregulated by lymphodepleting drugs. *Blood*. 125: 3905-3916
- Ramello M. C. Haura E. B. Abate-Daga D. 2018. CAR-T cells and combination therapies: What's next in the immunotherapy revolution? *Pharmacological Research*, 129: 194–203
- Rowley J. Monie A. Hung C. F. Wu T. C. 2009. Expression of IL-15RA or an IL-15/IL-15RA fusion on CD8+ T cells modifies adoptively transferred T-cell function in cis. *European Journal of Immunology*, 39, 2: 491-506
- Sadelain M. Brentjens R. Riviere I. 2013. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discovery*, 3: 388–398
- Savoldo B. Ramos C. A. Liu E. Mims M. P. Keating M. J. Carrum G. Kamble R. T. Bollard C. M. Gee A. P. Mei Z. Liu H. Grilley B. Rooney C. M. Heslop H. E. Brenner M. K. Dotti G. 2011. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor–modified T cells in lymphoma patients. *Journal of Clinical Investigation*, 121, 5: 1822–1826
- Sotillo E. Barrett D. M. Black K. L. Bagashev A. Oldridge D. Wu G. Sussman R. Lanauze C. Ruella M. Gazzara M. R. Martinez N. M. Harrington C. T. Chung E. Y. Perazzelli J. Hofmann T. J. Maude S. L. Raman P. Barrera A. Gill S. Lacey S. F. Melenhorst J. J.

- Allman D. Jacoby E. Fry T. Mackall C. Barash Y. Lynch K. W. Maris J. M. Grupp S. A. Thomas-Tikhonenko A. 2015. Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. *Cancer Discovery*, 5, 12: 1282-1295
- Suhoski M. M. Golovina T. N. Aqui N. A. Tai V. C. Varela-Rohena A. Milone M. C. Carroll R. G. Riley J. L. June C. H. 2007. Engineering artificial antigen-presenting cells to express a diverse array of co-stimulatory molecules. *Molecular Therapy*, 15, 5: 981-988
- Sun S. Hao H. Yang G. Zhang Y. Fu Y. 2018. Immunotherapy with CAR-Modified T Cells: Toxicities and Overcoming Strategies. *Journal of Immunology Research*: 1-10
- Tammana S. Huang X. Wong M. Milone M. C. Ma L. Levine B. L. June C. H. Wagner J. E. Blazar B. R. Zhou X. 2010. 4-1BB and CD28 signaling plays a synergistic role in redirecting umbilical cord blood T cells against B-cell malignancies. *Human Gene Therapy*, 21, 1: 75-86
- Wang X. Naranjo A. Brown C. E. Bautista C. Wong C. W. Chang W. C. Aguilar B. Ostberg J. R. Riddell S. R. Forman S. J. Jensen M. C. 2012. Phenotypic and functional attributes of lentivirus-modified CD19-specific human CD8⁺central memory T cells manufactured at clinical scale. *Journal of Immunotherapy*, 35: 689–701
- Wang X. Riviere I. 2016. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Molecular Therapy — Oncolytics*, 2016, 3, ID16015; doi:10.1038/mto.2016.15:7 str.
- Yoon S. H. Lee J. M. Cho H. I. Kim E. K. Kim H. S. Park M. Y. Kim T.G. 2009. Adoptive immunotherapy using human peripheral blood lymphocytes transferred with RNA encoding Her-2/neu-specific chimeric immune receptor in ovarian cancer xenograft model. *Cancer Gene Therapy*, 16, 6: 489-497
- Zhao Y. Zheng Z. Cohen C. J. Gattinoni L. Palmer D. C. Restifo N. P. Rosenberg S. A. Morgan R. A. 2006. High efficiency transfection of primary human and mouse T lymphocytes using RNA electroporation. *Molecular Therapy*, 13: 151–159
- Zhou X. Dotti G. Krance R. A. Martinez C. A. Naik S. Kamble R. T. Durett A. G. Dakhova O. Savoldo B. Di Stasi A. Spencer D. M. Lin Y. F. Liu H. Grilley B. J. Gee A. P. Rooney C. M. Heslop H. E. Brenner M. K. 2015. Inducible caspase-9 suicide gene controls adverse effects from alloplete T cells after haploidentical stem cell transplantation. *Blood*, 125, 26: 4103-4113