

# CAR-T stanična imunoterapija u liječenju tumora i autoimunih bolesti

---

**Krajc, Viktoria**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:793107>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-01**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Viktorija Krajc

**CAR-T stanična imunoterapija u liječenju  
tumora i autoimunih bolesti**

Završni rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Viktorija Krajc

**CAR-T cell immunotherapy in the treatment  
of tumors and autoimmune diseases**

Bachelor thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Preddiplomskog sveučilišnog studija Molekularna biologija na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Nada Oršolić.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Završni rad

## CAR-T stanična imunoterapija u liječenju tumora i autoimunih bolesti

Viktorija Krajc

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

CAR-T stanična terapija oblik je adoptivne T-stanične imunoterapije. CAR se sastoji od 3 domene: unutarstanične, transmembranske i izvanstanične. Unutarstanična domena prepoznaje ciljni antigen. Transmembranska domena povezuje druge dvije domene. Izvanstanična domena daje signale za aktivaciju limfocita nakon vezanja na antigen i na temelju nje se stanice CAR-T dijele u 5 generacija. Sam proces terapije je zahtjevan i skup, no potrebna je samo jedna doza. Započinje leukaferezom i selekcijom željenih limfocita T, slijedi unos trangenena za CAR i ekspanzija stanica *ex vivo* pomoću citokina, a završava reinfuzijom stanica u osobu. Najdjelotvornija je u liječenju hematoloških maligniteta te je za takve karcinome FDA odobrila 6 terapija, od kojih četiri imaju dizajniran CAR za prepoznavanje CD19, a dvije BCMA. Za liječenje solidnih tumora intenzivno se odvija veliki broj pretkliničkih i kliničkih istraživanja, a problemi se nalaze u pronalasku odgovarajućeg ciljnog antigena, dopremanju stanica CAR-T do središta tumora i imunosupresivnom tumorskom mikrookolišu. U novije vrijeme, sve se više pozornosti pridaje i primjeni CAR-T terapije za liječenje autoimunih bolesti. S jedne strane se razvija CAAR-T stanična imunoterapija, kojoj je cilj specifično eliminirati autoreaktivne limfocite B, a s druge CAR-T<sub>reg</sub>, koja je cilj povratak imunosne tolerancije.

Ključne riječi: limfociti T, rak, hematološki maligniteti, autoimunost  
(26 stranica, 6 slika, 65 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)  
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Bachelor thesis

## CAR-T cell immunotherapy in the treatment of tumors and autoimmune diseases

Viktorija Krajc

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

CAR-T cell therapy is a form of adoptive T-cell immunotherapy. CAR consists of 3 domains: intracellular, transmembrane and extracellular. Intracellular domain recognizes the target antigen. Transmembrane domain connects the other two domains. Extracellular domain provides signals for the activation of lymphocytes after binding to the antigen, and based on it, CAR-T cells are divided into 5 generations. The therapy process itself is demanding and expensive, but only one dose is needed. It begins with leukapheresis and selection of the desired T lymphocytes, followed by the introduction of the CAR transgene and expansion of cells *ex vivo* using cytokines, ending with the reinfusion of cells into the individual. It is most effective in the treatment of hematological malignancies, and for such cancers, the FDA has approved 6 therapies, four of which are designed with CARs targeting CD19 and two targeting BCMA. For the treatment of solid tumors, many preclinical and clinical studies are intensively carried out, with challenges in finding the appropriate target antigen, delivering CAR-T cells to the tumor site and dealing with the immunosuppressive tumor microenvironment. Recently, more and more attention has been given to the application of CAR-T therapy for treating autoimmune diseases. On the one hand, CAAR-T cell immunotherapy is being developed, the goal of which is to specifically eliminate autoreactive B lymphocytes, and on the other, CAR-T<sub>reg</sub>, which aims to restore the immunological tolerance.

Keywords: T lymphocytes, cancer, hematologic malignancies, autoimmunity

(26 pages, 6 figures, 65 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Nada Oršolić, PhD

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. RAZVOJ CAR-T STANIČNE IMUNOTERAPIJE</b> .....	<b>3</b>
2.1. Tumori .....	3
2.2. Struktura i klasifikacija stanica CAR-T.....	5
2.3. Proizvodnja stanica CAR-T.....	8
<b>3. PRIMJENA CAR-T STANIČNE IMUNOTERAPIJE</b> .....	<b>10</b>
3.1. Liječenje hematoloških maligniteta.....	10
3.2. Liječenje solidnih tumora .....	11
3.3. Liječenje autoimunih bolesti.....	13
3.3.1. Autoimune bolesti.....	13
3.3.2. CAR-T, CAAR-T i CAR-T <sub>reg</sub> stanična imunoterapija.....	14
3.4. Nuspojave .....	17
<b>4. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>19</b>
<b>5. LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
<b>ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>27</b>

# KRATICE

ACT - adoptivna T-stanična imunoterapija (engl. *adoptive T-cell therapy*)

APC - antigen-predočna stanica (engl. *antigen presenting cell*)

AID - autoimune bolesti (engl. *autoimmune disease*)

ALL - akutna limfoblastična leukemija (engl. *acute lymphoblastic leukemia*)

BBB - krvno-moždana barijera (engl. *blood brain barrier*)

BCMA - antigen sazrijevanja B stanica (engl. *B-cell maturation antigen*)

CAR - kimerički antigenski receptor (engl. *chimeric antigen receptor*)

CAAR-T stanica - T stanice s kimeričkim autoprotutijelnim receptorom (engl. *chimeric autoantibody receptor T cell*)

CAF - fibroblasti povezani s rakom (engl. *cancer-associated fibroblast*)

CAR-T stanice - stanica T s kimeričkim antigenskim receptorom (engl. *chimeric antigen receptor T cell*)

CD - klaster diferencijacije (engl. *cluster of differentiation*)

CRS - sindrom otpuštanja citokina (engl. *cytokine release syndrome*)

DC – dendritička stanica (engl. *dendritic cell*)

DDR - DNA odgovor na oštećenje (engl. *DNA damage response*)

Fab - regija koja veže antigen (engl. *fragment antigen-binding*)

FDA - Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)

FL - folikularni limfom (engl. *follicular lymphoma*)

FoxP3 - transkripcijski faktor Foxp3 (engl. *Forkhead box protein P3*)

GD2 - disijalogangliozida (engl. *disialogangliosid*)

GPC3 - glipikan-3 (engl. *glypican-3*)

HER2 - receptor humanog epidermnog faktora rasta (engl. *human epidermal growth factor receptor*)

HPi2 - humani gušteračni endokrini marker stanica otočića 2 (engl. *human pancreas endocrine islet cell marker 2*)

iCAR - inhibitorni CAR (engl. *inhibitory CAR*)



IDO - indolamin 2,3-dioksigenaze (engl. *indoleamine 2,3-dioxygenase*)

IgG - imunoglobulin G (engl. *immunoglobulin G*)

IL - interleukin

ITAM - imunoreceptor koji ima motive bazirane na tirozinu (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*)

LBCL - B-velikostanični limfom (engl. *large B-cell lymphoma*)

MCL - limfom plaštenih stanica (engl. *mantle cell lymphoma*)

MDSC - supresivne stanice mijeloidnog porijekla (engl. *myeloid-derived suppressive cell*)

MHC - glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*)

MM - multipli mijelom (engl. *multiple myeloma*)

MSC - mezenhimalne matične stanice (engl. *mesenchymal stem cells*)

MSLN - mezotelin (engl. *mesothelin*)

NFAT - jezgrin faktor aktiviranih T stanica (engl. *nuclear factor of the activated T cells*)

NHL - ne-Hodgkinov limfom (engl. *non-Hodgkin's lymphoma*)

NK stanice - stanice prirodne ubojice (engl. *natural killer cells*)

NOD - nepretili dijabetički (engl. *non-obese diabetic*)

PD-1- protein programirane stanične smrti (engl. *programmed cell death protein 1*)

PD-L1 - ligand programirane stanične smrti 1 (engl. *programmed death 1 ligand*)

RA - reumatoidnom artritisu (engl. *rheumatoid arthritis*)

scFv - jednolančani varijabilni fragment antitijela (engl. *single-chain fragment variable*)

SLE - sustavni eritematozni lupus (engl. *systemic lupus erythematosus*)

SS - Sjeorgenov sindromu (engl. *Sjogren's syndrome*)

STAT - signalni prenositelj i transkripcijski aktivator (engl. *signal transducer and activator of transcription*)

T<sub>CM</sub> - središnje memorijske stanice T (engl. *central memory T cell*)

T<sub>EM</sub> - efektorne memorijske stanice T (engl. *effector memory T cell*)

T<sub>EFF</sub> - efektorne stanice T (engl. *effector T cell*)

T<sub>SCM</sub> - memorijske T stanice nalik matičnim stanicama (engl. *stem cell-like memory T cell*)

T1D - dijabetes tip 1 (engl. *type 1 diabetes*)

TAA - tumor-povezani antigen (engl. *tumor-associated antigen*)

Tan-CAR - dvofazni CAR (engl. *tandem CAR*)

TCR - T-stanični receptor (engl. *T-cell receptor*)

TGF- $\beta$  - transformirajući faktor rasta  $\beta$  (engl. *transforming growth factor  $\beta$* )

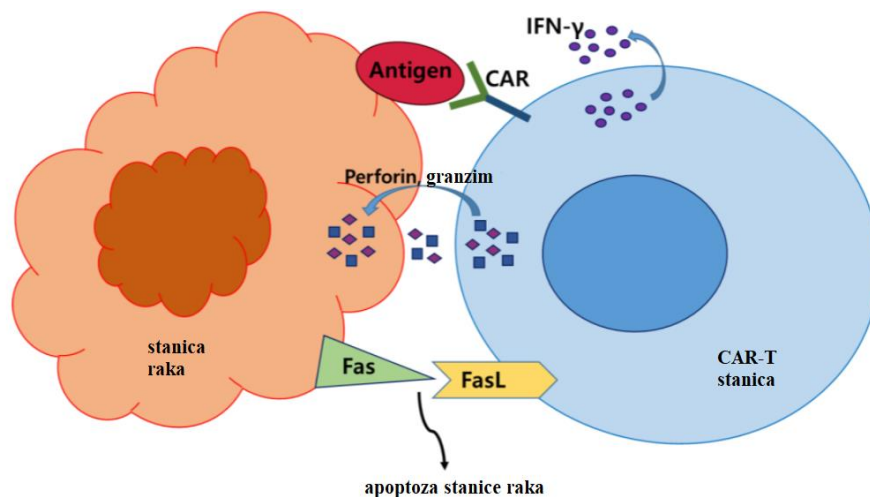
TNF - faktor nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*)

TRUCK - T-stanice usmjerene za univerzalno ubijanje citokinima (engl. *T-cells redirected for universal cytokine killing*)

VEGF - krvožilni endotelni čimbenik rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)

# 1. UVOD

Rak je jedan od vodećih uzroka smrti diljem svijeta zbog čega se intenzivno traga za učinkovitim lijekom već dugi niz godina od strane velikog broja znanstvenika. Tradicionalna liječenja raka poput kemoterapije i radioterapije često izazivaju velike nuspojave, ne daju dugotrajne rezultate te ljudi razviju otpornost na takve vrste liječenja i bolest se nerijetko vraća. Imunoterapija čini se kao odlična i obećavajuća alternativa zahvaljujući iskorištavanju sposobnosti imunskog sustava da ciljano napada tumorske stanice. Adoptivna T-stanična imunoterapija (engl. *adoptive T-cell therapy*, ACT) istaknula se kao jedan od najučinkovitijih tipova imunoterapije, a temelji se na izoliranju limfocita T iz osobe, njihovoj genetskoj modifikaciji i ekspanziji u prisutnosti citokina *ex vivo* i reinfuziji (Sha i sur. 2017). Dijeli se na temelju tipa receptora koji koristi: T-stanični receptor (engl. *T-cell receptor*, TCR) terapija i kimerički antigenski receptor (engl. *chimeric antigen receptor*, CAR) terapija. Ovaj rad fokusira se na CAR-T staničnoj imunoterapiji, koja daje zaista obećavajuće rezultate u dosadašnjim istraživanjima. Glavna prednost CAR nad TCR terapijom krije se u sposobnosti CAR-a da prepozna neprocesirane antigene tako ne zahtijevajući pomoć glavnog sustava tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*, MHC). Stanice CAR-T imaju direktan anti-tumorski učinak vežući se na antigene tumorskih stanica, čime se aktivira njihova citotoksičnost. Jedan način kojim ubijaju maligne stanice je lučenje perforina, granzima i interferona- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), a drugi aktiviranjem mehanizma za apoptozu pomoću liganda receptora smrti kao što je FasL (Slika 1) (Shin i sur. 2023).



Slika 1.: Način djelovanja stanica CAR-T: vezanjem na ciljani antigen, stanice se aktiviraju i luče perforin, granzim i INF- $\gamma$ . Drugi je put pomoću receptora smrti (Fas i FasL) koji vodi stanicu raka u apoptozu. Preuzeto i prilagođeno iz Shin i sur. 2023.

Neke od prednosti CAR-T stanične imunoterapije su kratko trajanje tretmana – uglavnom je potrebna samo jedna doza te dugotrajan efekt terapije zbog proliferacije limfocita u organizmu. S druge strane, glavna mana procesa leži u individualnom pristupu terapije – proces proizvodnje i primjene ovakvih stanica je kompleksan te zahtijeva rad visokoobučenog osoblja, a posljedično ovakvo liječenje postaje poprilično skupocjeno i dostupno malom broju ljudi (Shin i sur. 2023).

Najveći uspjeh ovakve imunoterapije zasad postignut je u liječenju hematoloških maligniteta poput akutne limfoblastične leukemije (engl. *acute lymphoblastic leukemia*, ALL), multiplog mijeloma (engl. *multiple myeloma*, MM) te ne-Hodgkinova limfoma (engl. *non-Hodgkin's lymphoma*, NHL). Terapija je pokazala iznimno dobre rezultate u liječenju ljudi s prethodno vrlo slabim šansama za oporavak, koji nisu reagirali na ostale dostupne tipove liječenja odnosno u slučaju ponavljajućih karcinoma. S obzirom na to da je postignuta veliku uspješnost i veliki broj remisija pacijenata, Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) odobrila je već 6 takvih terapija (Shin i sur. 2023).

Što se tiče liječenja solidnih tumora CAR-T staničnom imunoterapijom, dobiveni su manje impresivni rezultati. Razlozi tome kriju su u imunosupresivnom tumorskom mikrokolišu, prostornom zatvorenošću takvih tumora, malom broju antigena specifičnih za tumorske stanice i njihova heterogenost, a i u nastalim nuspojavama, među kojima su glavni sindrom otpuštanja citokina (engl. *cytokine release syndrome*, CRS) i neurotoksičnost (Schmidts i Maus 2018).

CAR-T stanična imunoterapija svoju primjenu nalazi i u liječenju autoimunih bolesti (engl. *autoimmune disease*, AID), također stanja za koja često nema uistinu učinkovitog i dugotrajnog lijeka. Idealna terapija za AID bi eliminirala patološke autoreaktivne stanice iz organizma te bi pritom zaštitna imunost ostala očuvana. To bi se moglo postići ciljanjem isključivo na autoreaktivne stanice što bi bilo potencijalno moglo biti ostvarivo CAR-T staničnom imunoterapijom. Razvijaju se i ispituju dvije modificirane verzije klasične CAR-T stanične imunoterapije: stanice T s kimeričkim autoprotutijelnim receptorom (engl. *chimeric autoantibody receptor T cell*, CAAR-T stanica) i stanice CAR-T<sub>reg</sub> (Sun i sur. 2023).

## 2. RAZVOJ CAR-T STANIČNE IMUNOTERAPIJE

### 2.1. Tumori

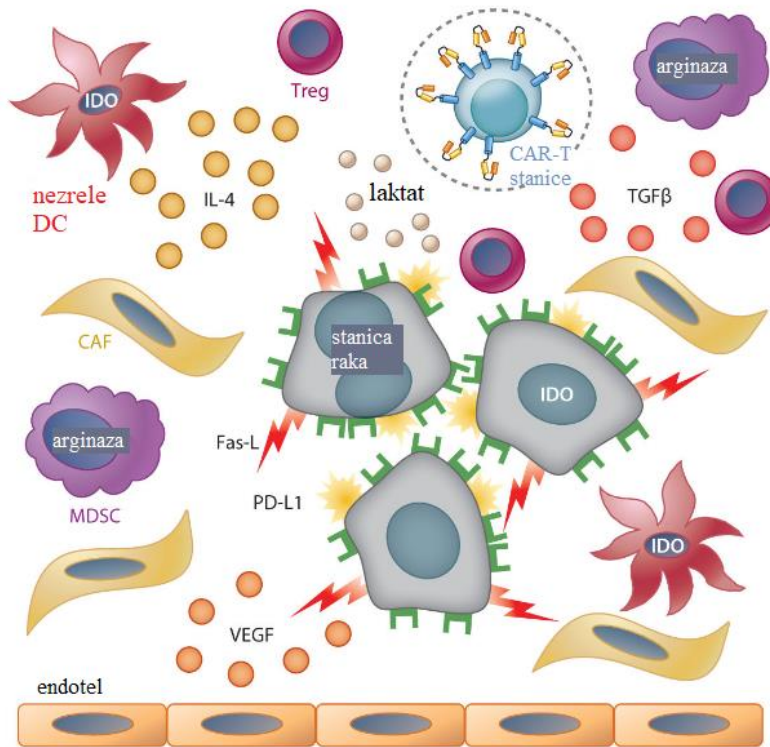
DNA ljudskih stanica svakodnevno prolazi kroz mnogobrojna oštećenja, što zbog endogenog metabolizma, što zbog okolišnih čimbenika, i to čak oko 100000 po svakoj stanici dnevno (Lindahl 1993). Razlog je to zbog kojeg su stanice morale razviti puno raznolikih i kompleksnih mehanizama kako bi popravile ta mnogobrojna oštećenja, što se pod jednim imenom naziva sustav DNA odgovora na oštećenja (engl. *DNA damage response*, DDR) (Zhou i Elledge 2000). Naravno, i ti mehanizmi nekad nisu uspješni i može doći do genomske nestabilnosti, a posljedično i tumorigeneze. Tumorigeneza je proces koji uključuje puno koraka, a počinje s disregulacijom stanične proliferacije, koja nastaje zbog aktivacije onkogeni ili gubitka tumor-supresorskih gena (Bartkova i sur. 2010). U tom prvom koraku DDR se aktivira i djeluje kao fiziološka barijera protiv napredovanja ranog tumora (Sun i sur. 2019).

Ubrzanje staničnog ciklusa, invazivni rast i proliferacija, učestale mutacije, povećana pokretljivost stanica, kemotaksija, promjene na površini stanice i izlučivanje litičkih čimbenika samo su neke od tipičnih karakteristika tumorskih stanica. Ponašaju se poput metaboličkog parazita i crpe energiju organizma u kojem se nalaze. Potiču specifične procese u svojem okruženju: limforetikularnu reakciju – invazija limfocita, makrofaga i limforetikularnih stanica; vaskularnu reakciju – proliferacija endotelnih stanica i stvaranje novih kapilara; fibroznu reakciju – proliferacija fibroblasta i uklanjanje kolagena te upalnu reakciju – prodiranje neutrofila i eozinofila (Baba i Căttoi 2007). Stvaraju specifičan tumorski mikrookoliš, koji se sastoji od raznih stromalnih stanica – fibroblasti povezani s rakom (engl. *cancer-associated fibroblast*, CAF), vaskularne endotelne stanice, imunološke stanice, adipociti, mezenhimalne matične stanice (engl. *mesenchymal stems cells*, MSC) te raznih citokina (Hall i sur. 2007). Fiziološki uvjeti u takvom tumorskom mikrookolišu puno su drugačiji od onog u normalnom tkivu: hipoksija, nedostatak nutrijenata, kiselost, upala (Degenhardt i sur. 2006). Tumorski mikrookoliš je ono što omogućava preživljavanje tumora dopremajući hranu, a i pridonosi invaziju tumorskih stanica i njihovu metastaziranju (Yang i sur. 2015).

Kada unutarnji tumor-supresorski mehanizmi ne uspiju zaustaviti širenje tumora, aktiviraju se vanjski tumor-supresorski mehanizmi, među kojima i tzv. imunouređivanje raka, koje se sastoji od

tri faze: uklanjanje, ravnoteža i bijeg (Miliotou i Papadopoulou 2018). Prva je faza uklanjanje, čiji su dio i urođena i stečena imunost, koje zajedno rade s ciljem uništavanja tumora puno prije nego postane klinički vidljiv. Za rijetke tumorske stanice koje prežive fazu uklanjanja, slijedi faza ravnoteže u kojoj ih imunostni sustav i dalje pokušava uništiti, no biva manje uspješan u tome i ne uspijeva u potpunosti istisnuti tumor. Uklanjanje je najduža faza imunouređivanja i može potrajati do 20 godina. Posljednja faza je bijeg, u kojoj dolazi do genetičkih i epigenetičkih promjena u tumorskim stanicama koje im daju otpornost na otkrivanje i uklanjanje od strane imunostnog sustava zbog čega se šire i tumor postaje klinički vidljiv (Dunn i sur. 2004).

Tumorske strategije za antigenski bijeg uključuju izlučivanje imunosupresivnih citokina od strane malignih i stromalnih stanica poput transformirajućeg čimbenika rasta  $\beta$  (engl. *transforming growth factor \beta*, TGF- $\beta$ ), privlačenje imunosupresivnih stanica poput regulatornih limfocita T ( $T_{reg}$ ) i supresivne stanice mijeloidnog porijekla (engl. *myeloid-derived suppressive cell*, MDSC), inhibiranje sazrijevanja dendritičkih stanica (engl. *dendritic cell*, DC), ekspresiju imunosupresivnih molekula na površini malignih stanica kao što su Fas ligand i ligand za programiranu staničnu smrt 1 (engl. *programmed death 1 ligand*, PD-L1) (Ramos i sur. 2016). Tumorski je mikrookoliš imunosupresivan te uključuje visoke razine laktata i kinurenina (zbog visoke aktivnosti indolamin 2,3-dioksigenaze (engl. *indoleamine 2,3-dioxygenase*, IDO u tumorskim i nezrelim DC), a niske razine triptofana i arginina (zbog aktivnosti arginaze u MDSC) (Ninomiya i sur. 2015). Kako bi se tumorsko tkivo moglo dobro opskrbiti kisikom i hranjivim tvarima, potiče se i proces stvaranja novih krvnih žila (vaskularizacija) pomoću lučenja krvožilnog endotelnog čimbenika rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) i vrbovanja endotelnih stanica. Svi ovi procesi kojima se tumor razvija, potiče svoj rast i bori protiv imunostnog sustava trebaju biti uzeti u obzir prilikom razvijanja anti-tumorske terapije kao što je CAR-T stanična imunoterapija kako bi ona bila što uspješnija i dugotrajnija (Slika 2).



Slika 2.: Tumorske strategije za antigenski bijeg: izlučivanje imunosupresivnih citokina od strane malignih i stromalnih stanica (npr. TGF- $\beta$ ), privlačenje imunosupresivnih stanica (T<sub>reg</sub> i MDSC), inhibiranje sazrijevanja DC-a, ekspresija imunosupresivnih molekula (Fas ligand i PD-L1), imunosupresivan metabolički okoliš (visoke razine laktata i kinurenina (zbog visoke aktivnosti IDO), niske razine triptofana i arginina (zbog aktivnosti arginaze), vaskularizacija pomoću lučenja VEGF-a i vrbovanja endotelnih stanica. Preuzeto i prilagođeno iz Ramos i sur. 2016.

## 2.2. Struktura i klasifikacija stanica CAR-T

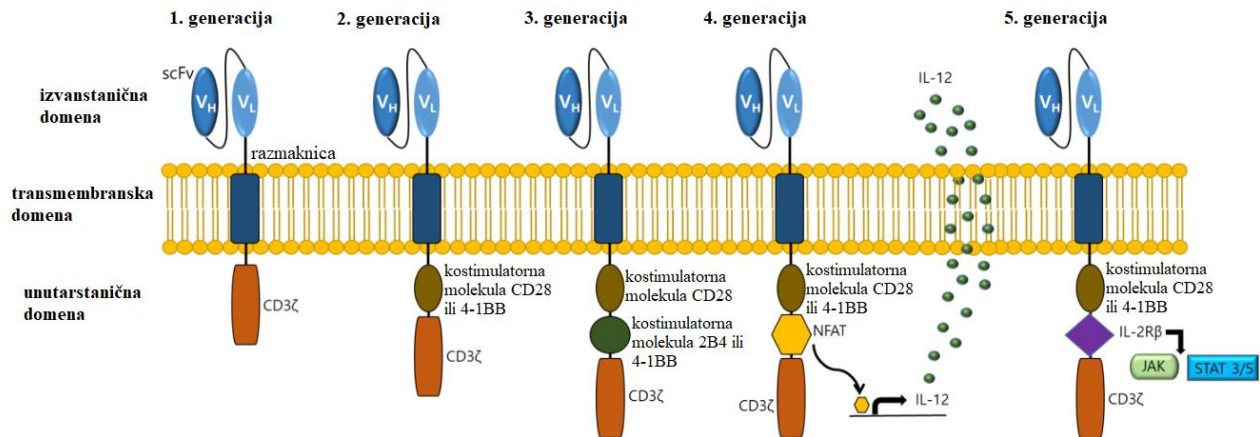
Prvi CAR razvila je 1989. Eshharova grupa u izraelskom laboratoriju. Važna prednost CAR-a nad TCR-om je ta što oni mogu prepoznati neprocesirane antigene, uključujući i ugljikohidratne i lipidne strukture, koji su tipični za površinu tumorskih stanica, bez potrebe za predočavanjem antigena pomoću MHC sustava. S druge strane, antigeni koji su često najviše specifični baš za tumorske stanice, nastali mutantnom onkogenezom i translokacijama, upravo su procesirani peptidni ulomci koje CAR ne može prepoznati i time se sužava njihova mogućnost ciljanja specifičnih tumorskih antigena (Ramos i sur. 2016).

CAR je građen od tri osnovne domene: izvanstanična, transmembranska i unutarstanična (Slika 3). Izvanstanična domena CAR-a sastavljena je od dijela koji veže tumor-pridruženi antigen (engl. *tumor-associated antigen*, TAA), koji je eksprimiran na površini tumorske stanice, i razmaknice. Antigen-vezujući dio je najčešće jednolančani varijabilni ulomak antitijela (engl. *single-chain fragment variable*, scFv), koji se sastoji od antigen-vezujuće regije i teškog i lakog lanca

monoklonalnog antitijela, a može biti i regija ljudskog antitijela koja veže antigen (engl. *fragment antigen-binding*, Fab) iz knjižnice prikaza faga ili drugi prirodni ligand koji se veže na određeni receptor (Sadelain i sur. 2013). Važno je odabrati prikladnu izvanstaničnu domenu (scFv) jer učinkovitost CAR-T stanične imunoterapije ovisi o afinitetu samog CAR-a, a i o svojstvima antigena koji scFv prepoznaje (Ramos i sur. 2016). Razmaknica je poveznica između antigenvezujućeg dijela CAR-a i transmembranske domene, a njezin najjednostavniji i najčešće korišteni oblik je zglobna regija imunoglobulina G1 (engl. *immunoglobulin G1*, IgG1) (Zhang i sur. 2017). Razmaknica i transmembranska domena također imaju utjecaj na učinkovitost stanica CAR-T utječući na dužinu i fleksibilnost samog CAR-a, gustoću njihove stanične površine, njihovu sposobnost samoagregacije i iscrpljivanja limfocita T toničnim signaliziranjem te njihovu mogućnost prepoznavanja drugih osim ciljanog antigena (Hudecek i sur. 2015). Transmembranska domena povezana je s unutarstaničnim signalnim dijelom, na temelju čije se strukture stanice CAR-T mogu podijeliti u 5 generacija (Cappell i Kochenderfer 2023). Prva generacija stanica CAR-T imala je u unutarstaničnoj domeni samo  $\zeta$  lanac TCR-a, odnosno CD3 $\zeta$ , imunoreceptor koji ima motive bazirane na tirozinu (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, ITAM), čija fosforilacija djeluje kao izvor prvog signala za aktivaciju limfocita T. Za optimalan rast i funkciju limfocita T potreban je i drugi, kostimulatorni signal, bez kojeg dolazi do klonske anergije limfocita T. Kako nisu postajale dodatne kostimulatorne molekule u prvoj generaciji stanica CAR-T, aktivacija te proliferacija limfocita T bila je slaba i anti-tumorski učinak bio je kratak (Sha i sur. 2017). Kako bi se to poboljšalo, druga generacija stanica CAR-T imala je, osim prethodnog CD3 $\zeta$ , i dodatnu kostimulatornu molekulu poput CD28 i CD137. Taj dodatak omogućio je puno bolju aktivaciju, rast i preživljenje limfocita T. Zbog želje za još boljom učinkovitošću limfocita T, treća generacija CAR-T stanica sadržavala je dvije kostimulatorne molekule (CD27, CD28, CD134, CD137 i dr.). Iako je funkcija T limfocita značajno poboljšana dodatnim kostimulatornim molekulama, one su donijele i negativnu stranu. Zahvaljujući mnogobrojnom unutarstaničnom signaliziranju, dolazi do otpuštanja ogromnog broja citokina, što može biti i opasno po život (Kochenderfer i sur. 2012). Četvrta generacija poznata je pod nazivom T-stanice usmjerene za univerzalno ubijanje citokinima (engl. *T-cells redirected for universal cytokine killing*, TRUCK) i dobivena je dodavanjem dodatnih gena koji kodiraju za dodatne kostimulatorne ligande limfocita T poput 4-1BB ili upalne citokine poput interleukina 12 (IL-12), koji aktivira mehanizme urođene imunosti protiv tumorskih stanica, potiče proizvodnju INF- $\gamma$  i povećava proliferaciju stanica CAR-



T (Koneru i sur. 2015). Peta generacija ima u unutarstaničnoj domeni dodatak IL-2R $\beta$ , koji ima vezno mjesto za transkripcijske čimbenike poput Janus kinaze te signalnog prenositelja i transkripcijskog aktivatora 3/5 (engl. *signal transducer and activator of transcription*, STAT), kojima je cilj povećati aktivnost i proliferaciju limfocita T (Shin i sur. 2023).



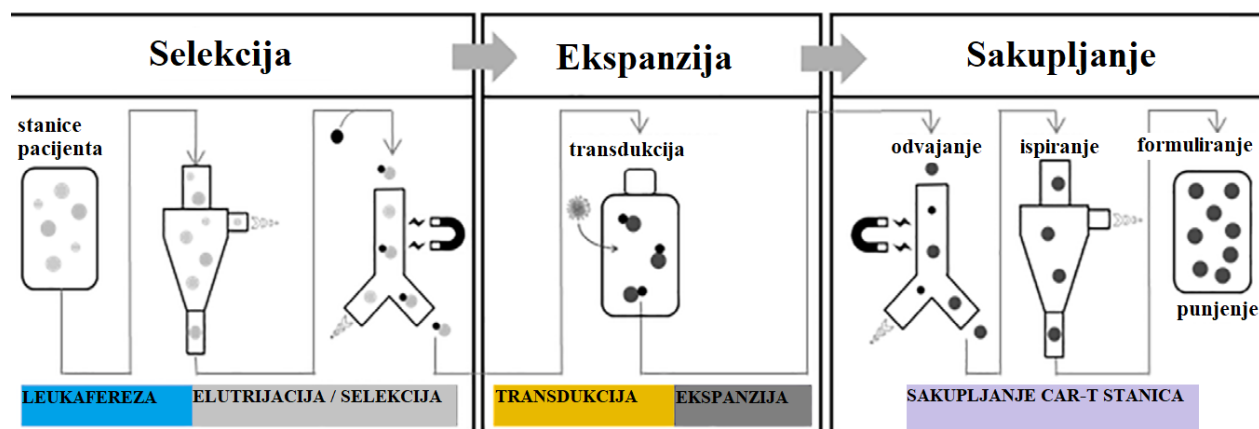
Slika 3. Evolucija CAR-a tijekom 5 generacija. Svaki CAR sastoji se od izvanstanične, transmembranske i unutarstanične domene. Izvanstanična se domena najčešće sastoji od scFv (varijabilna regija lakog i teškog lanca) i razmaknice koja je poveznica s transmembranskom domenom. Unutarstanična domena je ona po kojoj se generacije stanica CAR-T razlikuju, a njezina osnova je signalna CD3 $\zeta$  domena, na koju se nadograđuju kostimulatorene molekule poput CD28 i 4-1BB. Četvrta generacija TRUCK stanica ima dodatnu domenu – jezgrin faktor aktiviranih stanica T (engl. nuclear factor of the activated T cells, NFAT), koja je zaslužna za izlučivanje citokina poput IL-12. U petoj generaciji dodana je domena IL-2R $\beta$  na koje se vežu transkripcijski faktori JAK i STAT 3/5, čime se povećava učinkovitost limfocita T. Preuzeto i prilagođeno iz Shin i sur. 2023.

Stvoren je i dvofazni CAR (engl. *tandem CAR*, Tan-CAR), jedan receptor koji prepoznaje dva različita antigena. Dvije domene za prepoznavanje dva različita antigena nalaze se u tandemu i spojene su fleksibilnim zglobovima. Tan-CAR poboljšava funkciju i rad limfocita T zahvaljujući sinergističkom učinku – ukoliko su oba antigena prepoznata, stanice se više aktiviraju. Ukoliko je samo jedan antigen prepoznat, one se i dalje aktiviraju istom jačinom kao i obične stanice CAR-T s jednim receptorom. Ovakvim dizajnom CAR-a sprječava se bijeg tumora zahvaljujući promijenjenom antigenu – ako se jedan antigen izgubi, drugi još uvijek postoji i Tan-CAR ga prepoznaje i aktivira limfocite T (Grada i sur. 2013). Osim toga, postoje i stanice CAR-T s dva CAR-a, od kojih svaki prepoznaje drugačiji TAA. Kako se takvi limfociti T aktiviraju samo ako prepoznaju oba antigena, povećava se specifičnost stanica CAR-T i izbjegava se neciljano prepoznavanje antigena na drugim stanicama (Kloss i sur. 2013). Još jedan pokušaj u sprječavanju neciljanog prepoznavanja antigena na zdravim stanicama razvoj je inhibitornog CAR-a (engl. *inhibitory CAR*, iCAR). Takve stanice CAR-T osim osnovnog CAR-a, imaju iCAR koji se veže na

antigene na neciljanim, zdravim stanicama, a prilikom vezanja na te antigene aktivira se njegova unutarstanična, inhibitorna domena (PD-1 ili CD152) (Juneja i sur. 2017).

## 2.3. Proizvodnja stanica CAR-T

Prvi korak u proizvodni stanica CAR-T je sakupljanje stanica iz osobe leukoferezom, zatim slijedi elutriacija neželjenih stanica i selekcija željenih limfocita T, sljedeće je unos transgena za željeni CAR, a nakon toga ekspanzija tih stanica i sakupljanje *ex vivo* (Slika 4).



Slika 4. Prikaz standardne proizvodnje stanica CAR-T. Počinje leukaferezom i elutriacijom te selekcijom željenih limfocita T, u drugom koraku se unosi transgen, i to najčešće metodom transdukcije pomoću retrovirusa. Završava ekspanzijom i sakupljanjem željenih stanica CAR-T. Preuzeto i prilagođeno iz Feins i sur. 2019.

Leukaferezom se dobije heterogena populacija stanica koja se sastoji od: limfocita T, mijeloidnih stanica (neutrofili, eozinofili, bazofili, monociti), stanica prirodnih ubojica (engl. *natural killer cells*, stanice NK), eritroidnih stanica i malignih stanica. Ključno je uspješno izolirati samo željene limfocite T od ovih ostalih stanica zato što kontaminacije smanjuju uspješnu ekspanziju stanica CAR-T u kulturi, a posljedično i *in vivo* (Feins i sur. 2019).

Sljedeći iznimno važan korak je unošenje transgena za CAR u izolirane stanice. Za taj proces koriste se sljedeće metode: virusna transdukcija; unos pomoću transpozona, mRNA, nanočestica, liposoma; elektroporacija, Crispr/CAS9 tehnologija. Virusna transdukcija trenutno je preferirana metoda koristeći retroviruse ( $\gamma$ -retrovirus i lentivirus), a rjeđe i adenoviruse. Retrovirusi se koriste zbog dviju svojih karakteristika: većina njihova genoma može biti zamijenjena transgenima i trajno se ugrađuju u genom domaćina. Nedostaci ove metode su rizik za insercijskom onkogenezom na nasumičnim mjestima u genomu i mogućnost imuno-posredovane toksičnosti, koju uzrokuje dugoročno postojanje i aktivnost stanica CAR-T (Miliotou i Papadopoulou 2018). Uspoređujući  $\gamma$ -

retroviruse i lentiviruse, insercijska mutageneza puno je rjeđa u slučaju primjene lentivirusa, najvjerojatnije zbog odsutnosti pojačivača, koji su prisutni u  $\gamma$ -retrovirusa (Modlich i sur. 2009). Još jedna prednost lentivirusa je veća učinkovitost što se tiče genetičkog inženjerstva ljudskih limfocita T (Naldini i sur. 1996). Iako postoji opasnost od toksičnosti, trenutno se ipak preferira njihovo korištenje za unos transgena zato što je cilj dobiti dugotrajnu ekspresiju CAR-a, koja će omogućiti dugotrajnu učinkovitost stanica CAR-T. No, kako korištenje retrovirusa za transdukciju zahtijeva dugo vremena i puno novaca, neke grupe koriste transpozone u tu svrhu uključujući *Sleeping beauty* i *PiggyBac* sisteme. Takav način također omogućuje trajnu ugradnju transgena, no za sad se čini manje učinkovit (Oldham i Medin 2017).

S ciljem povećanja učinkovitosti CAR-T stanične imunoterapije, radi se i na prilagođavanju te usavršavanju omjera  $CD4^+$  i  $CD8^+$  limfocita T (Feins i sur. 2019). Nadalje, otkrivene su memorijske stanice T nalik matičnim stanicama (engl. *stem cell-like memory T cell*,  $T_{SCM}$ ), koje su samoobnavljajući izvor limfocita T s multipotentnim kapacitetom diferencijacije u središnje memorijske (engl. *central memory T cell*,  $T_{CM}$ ), efektorne memorijske (engl. *effector memory T cell*,  $T_{EM}$ ) i efektorne stanice T (engl. *effector T cell*,  $T_{EFF}$ ). Kada je kultura stanica CAR-T bila obogaćena ovim tipom stanica, dobivena je poboljšana anti-tumorska aktivnost u usporedbi s ostalim ranim memorijski i efektorskim stanicama T (Gattinoni i sur. 2011). Uzeći u obzir poboljšanu učinkovitost prilikom prilagođenog omjera  $CD4^+$  i  $CD8^+$  stanica i prilikom korištenja populacije stanica  $T_{SCM}$ , potencijalno bi se mogao postići aditivni odnosno sinergistički učinak u anti-tumorskoj aktivnosti CAR-T imunoterapije. Poznato je također kako limfociti T koji su već bili u interakciji s antigenom, oslabljuju anti-tumorsku funkciju manje diferenciranih limfocita T (Klebanoff i sur. 2016) tako da je to još jedan dodatan za razlog za obogaćivanje kulture stanica CAR-T populacijom ranih memorijskih stanica. Ostale strategije koje imaju potencijal za povećanjem učinkovitost stanica CAR-T uključuju: skraćivanje vremena kulture stanica CAR-T (Ghassemi i sur. 2018), metaboličko programiranje (Kawalekar i sur. 2016), epigenetske promjene limfocita T (Kagoya i sur. 2016), produživanje životnog vijeka stanica CAR-T sprječavanjem gubitka telomera (Bai i sur. 2015), korištenje homeostatičnih citokina prilikom ekspanzije limfocita (Hoffmann i sur. 2018).

# 3. PRIMJENA CAR-T STANIČNE IMUNOTERAPIJE

## 3.1. Liječenje hematoloških maligniteta

CAR-T stanična imunoterapija pokazala se do sada najdjelotvornija u liječenju hematoloških, odnosno B-staničnih maligniteta te je odobreno već 6 tipova takve terapije od strane FDA. Sve se koriste u slučaju ponavljajućih karcinoma i onih koji ne reagiraju na druge tipove postojećih terapija (Shin i sur. 2023). Velika prednost za imunoterapije u liječenju karcinoma krvi upravo je tkivo u kojima se nalazi i time laka dostupnost unesenim antitijelima te stanicama. Nadalje, u slučaju B-staničnih maligniteta, stanice CAR-T imaju pomoć upravo limfocita B, koje su odlične antigen-predočne stanice (engl. *antigen presenting cell*, APC) i tako sudjeluju u prolasku limfocita T kroz imunosne kontrolne točke te osiguravaju dodatnu kostimulaciju, koja je potrebna za optimalnu funkciju stanica CAR-T (Ramos i sur. 2016).

Prva CAR-T stanična imunoterapija, koja je odobrena krajem kolovoza 2017. godine, jest Kymriah (tisagenlecleucel), cijene od 475000 \$ (Miliotou i Papadopoulou 2018). Koristi se za liječenje B-velikostaničnog limfoma (engl. *large B-cell lymphoma*, LBCL), B-stanične ALL i folikularnog limfoma (engl. *follicular lymphoma*, FL) (Shin i sur. 2023). Antigen koje CAR prepoznaje u ovom primjeru imunoterapije je CD19, ujedno i najčešće korišten TAA u CAR-T staničnoj imunoterapiji zbog svoje jedinstvene i visoke ekspresije na limfocitima B (Sha i sur. 2017). Sljedeća terapija odobrena od strane FDA je Yescarta (aksikaptagen ciloleucel), također anti-CD19 CAR-T imunoterapija, cijene od 373000 \$, a koristi se za liječenje LBCL-a i FL-a (Yip i Webster 2018). U 2020. godini odobrena je još jedna anti-CD19 imunoterapija, i to Tecartus (breksukaptagen autoleucel), koja se koristi za liječenje limfoma plaštenih stanica (engl. *mantle cell lymphoma*, MCL) i B-stanične ALL (Shin i sur. 2023). U 2021. godini FDA je odobrila još dvije CAR-T stanične imunoterapije: Breyanzi (lisokaptagenemaraleucel), također koja ima anti-CD19 CAR i liječi LBCL i FL, i Abecma (idepaptagenevikleucel), prva koja ima CAR koji prepoznaje antigen sazrijevanja stanica B (engl. *B-cell maturation antigen*, BCMA), a svoju primjenu nalazi u liječenju MM-a. BCMA je više specifičan antigen koji se predominantno eksprimira na plazma stanicama i podskupu zrelih limfocita B, za razliku od CD19 koji je zastupljen na punom većem broju limfocita B, zato korištenje BCMA kao ciljnog antigena za CAR-T terapiju ima potencijala za stvaranje

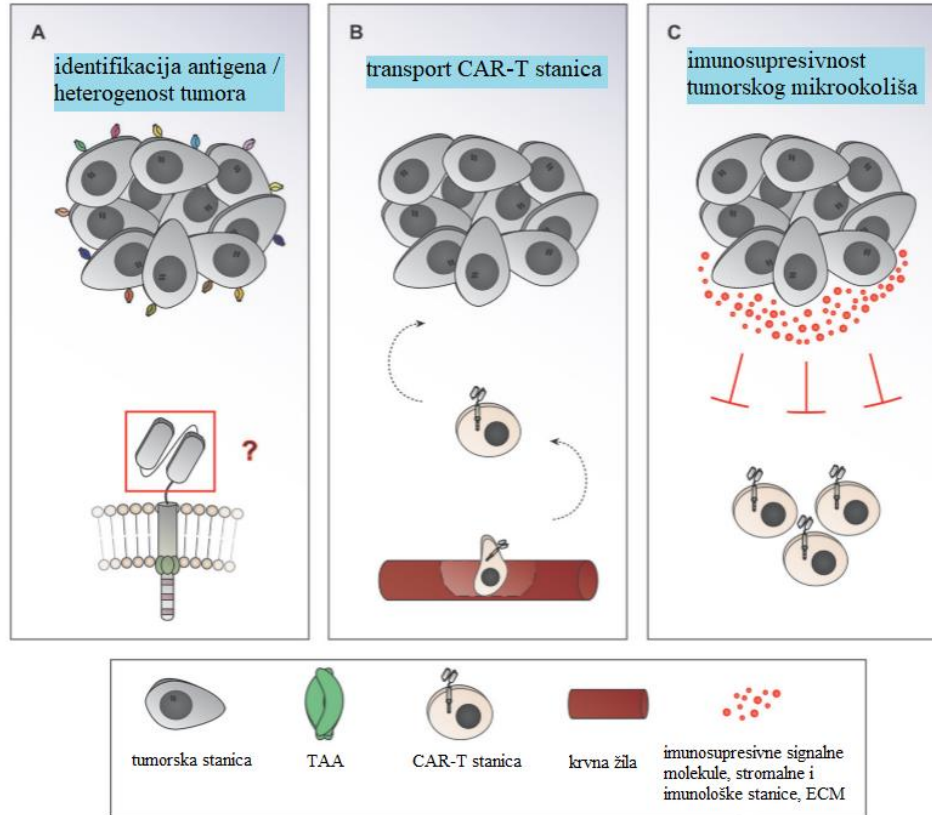
manje nuspojava, odnosno manjim brojem zdravih uništenih stanica. 2022. godine odobrena je još jedna anti-BCMA CAR-T imunoterapija za liječenje MM-a naziva Carvykti (ciltakaptagen autoleucel) (Young i sur. 2022). Yescarta i Tecartus, kao anti-CD19 CAR-T terapije, koriste retroviruse kojima je uklonjena sposobnost replikacije, a ostale četiri terapije koriste lentivirus za unos transgena za CAR. Svih šest CAR-ova uključuju kostimulatorne molekule, Yescarta i Tecartus CD28, a ostale CD137 (Cappell i Kochenderfer 2023).

Još dva vrlo često ispitivana antigena za CAR-T staničnu imunoterapiju jesu CD20, aktivirani glikozilirani fosfoprotein eksprimiran na površini limfocita B, i CD30, dio superfamilije receptora čimbenika nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*, TNF). Do sada se nisu pokazali uspješnima kao CD19 i BCMA, ali ostaju kao dobra alternativa, koju je još potrebno detaljnije istražiti (Sha i sur. 2017).

### **3.2. Liječenje solidnih tumora**

U usporedbi s impresivnim rezultatima koja CAR-T stanična imunoterapija pokazuje u liječenju hematoloških maligniteta, rezultati u liječenju solidnih tumora za sada daju puno manje uspješne rezultate. Glavni razlozi su nepostojanje jedinstvenih TAA-a, odnosno heterogenost antigena na površini tumorskih stanica zbog nastalih različitih mutacija u pojedinačnim stanicama; neprijateljski, imunosupresivni tumorski mikrookoliš te otežano dopremanje i ekspanzija stanica CAR-T na mjestu tumora i to su upravo glavne točke svih istraživanja na tom području (Slika 5) (Schmidts i Maus 2018).

Idealni TAA za CAR-T staničnu imunoterapiju trebao bi biti eksprimiran na svakoj tumorskoj stanici i ključan za održavanje te napredovanje malignog fenotipa, a odsutan na zdravim stanicama. Međutim, rijetki su antigeni koji su prisutni samo na malignim, a ne i na zdravim stanicama. Najčešće su antigeni preklapajući između tumorskih i epitelnih stanica zato što tumor potječe upravo iz epitelnog tkiva. Drugi problem predstavlja prostorna zatvorenost tkiva zbog koje je teško dostaviti stanice CAR-T do ciljanih antigena u tumoru (Morgan i sur. 2010). Također, bitno je pronaći TAA koji je prisutan u većoj količini zato što se tada povećava učinkovitost stanica CAR-T - povećava se njihova aktivnost i proizvodnja citokina. Bilo bi idealno kada bi i taj antigen bio prisutan u velikoj gustoći samo u tumorskom, a u maloj na zdravom jer bi se tako onda i spriječila prevelika šteta na zdravom tkivu te posljedične nuspojave (Walker i sur. 2017).



Slika 5.: Glavne prepreke za razvoj efikasne CAR-T stanične imunoterapije za liječenje solidnih tumora: A) heterogena ekspresija TAA na tumorskim stanicama te njihova ekspresija i na zdravim stanicama; B) prijenos stanica CAR-T do središta tkiva (iz krvnog žila trebaju izaći iz cirkulacije i prodrijeti do tumorskih stanica); C) imunosupresivni tumorski mikrookoliš (imunosupresivni citokini i stanice, ekspresija imunosupresivnih molekula i dr.). Preuzeto i prilagođeno iz Schmidts i Maus 2018.

Trenutno se odvija veliki broj kliničkih istraživanja CAR-T stanične imunoterapije za liječenje solidnih tumora poput raka pluća, jajnika, dojki, gušterače i dr., a najvećim dijelom ciljaju na TAA poput glipikana-3 (engl. *glypican-3*, GPC3), disijalogangliozida (engl. *disialogangliosid*, GD2), mezotelina (engl. *mesothelin*, MSLN), receptora humanog epidermnog čimbenika rasta (engl. *human epidermal growth factor receptor*, HER2) (Shin i sur. 2023). GPC3 je prisutan na stanicama Wilimsova tumora, liposarkoma, raka jetre i dr., a stanice CAR-T su dodatno genetski modificirane za ekspresiju egzogene glutamin-oksaloacetat transaminaze 2 za optimalnu aktivnost stanica ili za ekspresiju IL-15 za poboljšanje anti-tumorske aktivnosti (Hickman i sur. 2022). IL-15 može stimulirati dugotrajne memorijske stanice koje su bile u dodiru s antigenom (Posey i sur. 2016), premostiti inhibirajuću aktivnost  $T_{reg}$ , poboljšati razvoj limfocita T (Hsu i sur. 2005), spriječiti apoptozu i iscrpljivanje te reverznu anergiju (Brahmer i sur. 2012). GD2 je glikosfingolipid prekomjerno eksprimiran na tumorskim stanicama neuroblastoma, retinoblastoma, glioma,

Ewingove obitelji tumora, raka dojke i dr., dok na zdravim stanicama nije i to ga čini dobrim kandidatom za ciljnim antigenom u imunoterapijama (Straathof i sur. 2020). MSLN je adhezijski stanični glikoprotein prisutan na velikom broju epitelnih tumora poput raka pluća, dojki, gušterače i jajnika, a za upravo taj antigen trenutno se i provode istraživanja za lokalnu primjenu terapije umjesto sistemske (intravenske). Lokalna primjena bi mogla riješiti jedan od velikih problema primjene CAR-T terapije u solidnim tumorima, a to je prijenos stanica CAR-T do ciljanog tumorskog tkiva te su za sada rezultati obećavajući – primijećena je povećana anti-tumorska aktivnost bez dodatnih nuspojava (Adusumilli i sur. 2014). Još jedna modifikacija na anti-MSLN stanicama CAR-T je *knock out* gena za PD-1 CRISPR/Cas tehnologijom. PD-1 je imunosa kontrolna točka limfocita T koja se veže na PD-L1, koji je eksprimiran na tumorskim stanicama, i tako se suprimira njihova aktivnost i omogućuje bijeg tumoru (Huang i sur. 2020). Anti-HER2 CAR-T stanice istražuju se za liječenje raka želuca, dojke i jajnika te sarkoma, a dodatna modifikacija u njihovoj primjeni, kojoj je cilj spriječiti neciljano prepoznavanje antigena, jest potreba prepoznavanja i ciljnog antigena i tumorskog mikrokoliša kako bi se stanice CAR-T mogle aktivirati (Feng i sur. 2018).

### **3.3. Liječenje autoimunih bolesti**

#### **3.3.1. Autoimune bolesti**

AID uključuje cijeli spektar kroničnih bolesti, koje potječu od abnormalno aktiviranog imunskog sustava, odnosno gubitka tolerancije, a mogu zahvatiti određeni organ (organ-specifične) ili više organskih sustava (organ-nespecifične ili sustavne). Prema patološkom mehanizmu dijele se u dvije kategorije: autoreaktivna protutijela, odnosno autoprotutijelom posredovane AID, koja proizvode plazma stanica porijeklom od limfocita B i autoreaktivnim limfocitima T posredovane AID. Autoprotutijela se vežu na stanične površine i uzrokuju lizu stanica, a mehanizam najčešće uključuje aktivaciju komplementa ili Fc receptore monocita, makrofaga, neutrofila, bazofila i mastocita. Ostali mehanizmi kojima autoprotutijela oštećuju tkivo uključuju nastanak imunokompleksa, npr. u sustavnom eritematoznom lupusu (engl. *systemic lupus erythematosus*, SLE), reumatoidnom artritisu (engl. *rheumatoid arthritis*, RA) i Sjergenovu sindromu (engl. *Sjogren's syndrome*, SS), i djelovanju autoprotutijela na stanične receptore, čime može doći do prestanka djelovanja fiziološkog liganda na receptor, npr. u šećernoj bolesti neovisnoj o inzulinu, ili do oponašanja djelovanja fiziološkog liganda, npr. u hipertireozu. TCR autoreaktivnih limfocita

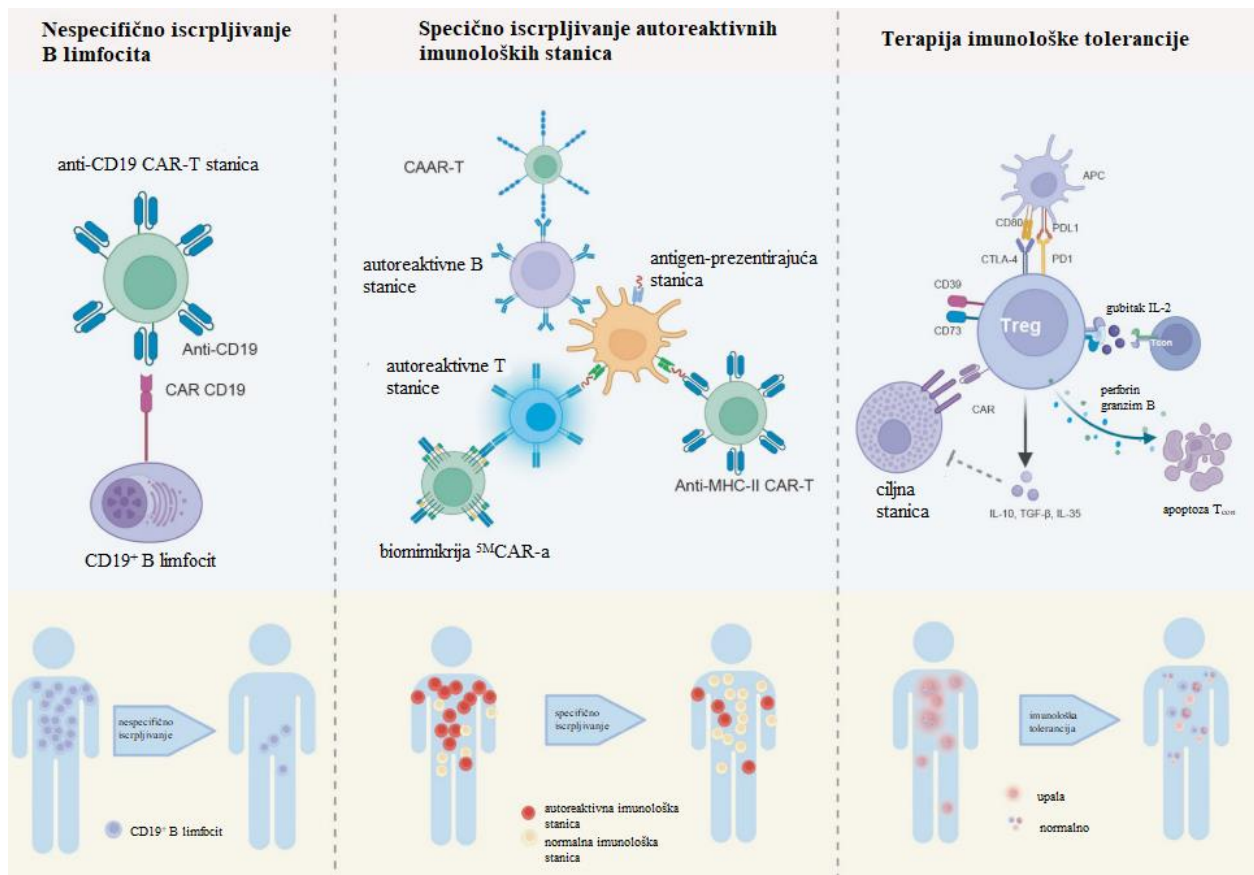
T prepoznaje peptide porijeklom od autoantigena, veže se za MHCI i nakon signala direktno ubija vezanu stanicu izlučivanjem citotoksičnih granula poput perforina i granzima B ili aktiviranjem Fas - Fas liganda, što dovodi do indukcije apoptoze, te lučenjem citokina poput TNF- $\alpha$  i INF- $\gamma$ , koji uzrokuju oštećenja tkiva (Leo i sur. 2010; Wang i sur. 2015).

Nije točno poznata etiologija autoimunosti, ali pretpostavlja se da je povezano sa sljedećim čimbenicima: genetska predispozicija (monogeniski i multipli genetički čimbenici), limfocitne i lokalne promjene, prehrana, razina hormona, patogeni mikroorganizmi i infekcije, lijekovi, toksini i nedostatak vitamina D (Wang i sur. 2015). Jedan od mehanizama nastanka autoimunosti uključuje molekularnu mimikriju: strani antigen, kojemu u tijelu postoji sličan antigen, započinje imunski odgovor, ali protutijela prepoznaju i vlastiti antigen zbog velike sličnosti, koji zatim postaje auto-antigen i imunski sustav ga uništava. Drugi je mehanizam širenje epitopa, uzrokovan virusnom infekcijom, a uključuje razvoj imunskog odgovora na endogeni epitop, koji je različit i nije križno reaktivan od epitopa koji uzrokuje bolest. Još jedan mehanizam je aktivacija već prethodno postojećih autoreaktivnih imunskih stanica. Svi ti mehanizmi vode stvaranju autoreaktivnih limfocita T i B te gubitku imunotolerancije (Davidson i Diamond 2001; Wang i sur. 2015).

### **3.3.2. CAR-T, CAAR-T i CAR-T<sub>reg</sub> stanična imunoterapija**

Ključna stvar u liječenju autoimunih bolesti je povratak imunološke tolerancije i ravnoteže. Tradicionalne opcije liječenja i biološka terapija pomažu samo u ublažavanju upale i boli te je potrebno puno puta ponavljati takvu terapiju (Saxton i sur. 2021) i zato se pokušavaju naći opcije koje su dugotrajnije i rješavaju ključan problem. Jedna od takvih opcija predstavlja CAR-T stanična imunoterapija, koja se za sad fokusira na specifično ili nespecifično iscrpljivanje limfocita B. Osim klasične CAR-T terapije, ona se razvija još u dva smjera: CAAR-T i CAR-T<sub>reg</sub> terapija (Slika 6) (Sun i sur. 2023).





Slika 6.: Mehanizmi CAR-T stanične imunoterapije i njezinih modifikacija u borbi protiv autoimunih bolesti. Lijeva slika prikazuje anti-CD19 stanice CAR-T koje prepoznaju CD19<sup>+</sup> limfocite B i uništavaju ih, uključujući i autoreaktivne i zdrave limfocite B. Srednja slika prikazuje stanice CAAR-T koje specifično prepoznaju limfocite B i APC koje imaju autoantigen-specifične receptore; citotoksični limfociti T koji ekspimiraju specifične MHCII molekule mogu direktno ubiti patološke CD4<sup>+</sup> stanice na TCR-ovisni način. Desna slika prikazuje kako djeluje stanice CAR-T<sub>reg</sub>, koje se aktiviraju antigenom na ciljnoj stanici i djeluju s ciljem povratka imunostne tolerancije. Preuzeto i prilagođeno iz (Sun i sur. 2023).

Najjednostavnija je strategija eliminirati sve limfocite B, uključujući i zdrave i autoreaktivne, te je s tim ciljem razvijena anti-CD19 CAR-T stanična imunoterapija. CD19 je antigen koji se nalazi na površini aktivnih limfocita B i to ga čini idealnom metom za nespecifično uništavanje limfocita B. Trenutno su u tijeku klinička istraživanja takve terapije za liječenje SLE-a. SLE je sustavna bolest koju karakterizira puno tipova B limfocita i visoka razina autoprotutijela. CD8<sup>+</sup> limfociti T su modificirani za ekspresiju anti-CD19 CAR s CD28-CD3 $\zeta$  unutarstaničnom domenom i testiranje je vršeno na mišjim modelima lupusa. U pretkliničkom istraživanju već jedna primjena takvih stanica CAR-T imala je veliku učinkovitost uništavajući sve limfocite B, terminirajući proizvodnju autoprotutijela i produljujući životni vijek. Takav učinak bio je održan oko godinu dana (Kansal i sur. 2019). Ovakva terapija ne zahtijeva pomoć drugih stanica za razliku od citotoksičnosti

posredovane protutijelima, koja treba vezana protutijela za aktivaciju komplemента i lizu stanice (McHugh 2019).

Stanice CAAR-T su modificirane stanice CAR-T koje vežu autoprotutijela, koja su eksprimirana na autoreaktivnim limfocitima B i tako eliminiraju te stanice, a sastoje se od specifičnog antigena, transmembranske domene i intracelularne signalne domene. Dva preduvjeta moraju biti ispunjena kako bi CAAR-T stanična imunoterapija mogla biti primijenjena. Jedan je dobra istraženost uloge autoprotutijela u patogenezi bolesti kako bi se bilo sigurno u njihovu povezanost s patogenošću. Drugi je da pravilan slijed i molekularna struktura ključnih epitopa bude prepoznata autoprotutijelima (Chatenoud 2016). PV je rijetka životno-ugrožavajuća autoimuna bolest kože i mukoze najčešće uzrokovana protutijelima za adhezijski keratinocitni protein Dsg3. Inženjirani su limfociti T s CAAR-om, koji ima autoantigen PV-a te dezoglein 3 i CD137-CD3 $\zeta$  za unutarstaničnu domenu. U pretkliničkom istraživanju pokazano je kako Dsg3 CAAR-T stanice uspješno eliminiraju specifične limfocite Dsg3 smanjujući titar Dsg3 antitijela u krvnom serumu i to bez toksičnosti na neciljanim antigenima (Ellebrecht i sur. 2016). Kako su pretklinička istraživanja bila jako obećavajuća, u tijeku su klinička istraživanja za primjenu takve terapije (Sun i sur. 2023).

Limfociti T<sub>reg</sub> imaju ključnu ulogu u regulaciji imunskog sustava inhibirajući funkciju imunskih stanica i tako održavajući imunosnu samotoleranciju i homeostazu. Kada specifični transkripcijski faktor Foxp3 (engl. *Forkhead box protein P3*) u limfocitima T<sub>reg</sub> mutira ili kada su CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> limfociti T eliminirani, dolazi do pojave AID-a. Stanicama CAR-T<sub>reg</sub> želi se povratiti imunosna tolerancija (imaju eksprimiran Foxp3 na normalnoj razini), a mogu inducirati antigen-specifičnu lizu ciljanih stanica pomoću granzima B, suprimirati odgovor antigen- specifičnih T<sub>eff</sub> i izlučivati imunosupresivne citokine kao što su TGF- $\beta$ 1, IL-10 i IL-35 (Boroughs i sur. 2019). Terapeutski učinak CAR-T<sub>reg</sub> proučava se za niz autoimunih bolesti: dijabetes tip 1 (engl. *type 1 diabetes*, T1D), kolitis, hemofilija i odbacivanje presatka. Za liječenje T1D-a dizajnirane su stanice CAR-T<sub>reg</sub>, koje ciljaju na inzulin. CD4<sup>+</sup> limfociti T su transducirani retrovirusnim česticama koje kodiraju za drugu generaciju CAR-a i Foxp3 gen, koji će transformirati CD4<sup>+</sup> u limfocite T<sub>reg</sub>. Terapeutski učinak ovih stanica CAR-T<sub>reg</sub> ispitan je u nepretelim dijabetičkim (engl. *non-obese diabetic*, NOD) miševima, poznatim još i kao NOD/Ltj miševima i uočeno je kako nije bilo moguće spriječiti spontani nastanak dijabetesa u ženjkama, iako su stanice CAR-T<sub>reg</sub> jako dugo postojale u jedinkama i mogle su biti detektirane čak do 17 tjedana nakon unosa. Moguće objašnjenje za neuspjeh terapije

u sprječavanju pojave spontanog dijabetesa je da je za aktivaciju stanica CAR-T potreban topivi heksamer inzulina (skladišni oblik), a ne monomer (biološki aktivni oblik). Zahvaljujući visokoj antigenskoj specifičnosti očekuje se minimalno vezanje na neciljane antigene i posljedične, neželjene toksičnosti (Tenspolde i sur. 2019). Kako bi se riješio problem brzog metabolizma inzulina, dizajnirane su stanice T<sub>reg</sub> specifične za stanice Langerhansovih otočića koristeći humani gušteračni endokrini biljeg stanica otočića 2 (engl. *human pancreas endocrine islet cell marker 2*, HPi2). Nažalost, ovakve HPi2-CAR-T stanice pokazale su se nefunkcionalne zbog previsoke ekspresije HPi2, što je dovelo do toničnog signaliziranja i neuspjeha ekspanzije te supresije limfocita T<sub>reg</sub> (Radicev i sur. 2020). Česti problem koji se javlja prilikom korištenja limfocita T<sub>reg</sub> je gubitak njihove imunosupresivne uloge u upalnom mikrookolišu. Potencijalna rješenja za taj problem nalaze su u tretiranju mikrobiote crijeva bakterijama koje pogoduju stanicama T<sub>reg</sub> (Atarashi i sur. 2013) ili primjenom derivata vitamina A, tj. tretinoina (Zhou i sur. 2010).

### 3.4. Nuspojave

Iako CAR-T stanična imunoterapija daje impresivne anti-tumorske rezultate, postoje i brige o njezinoj sigurnosti, odnosno nastajanju nuspojava i toksičnosti. Primijećene su nastale različite toksičnosti odmah ili nekoliko tjedana nakon primjene terapije poput CRS-a, neurotoksičnosti, genotoksičnosti, aplazije limfocita B i dr.

Najčešća kratkotrajna nuspojava je CRS, često i skupa s neurotoksičnošću. U liječenju hematoloških maligniteta CD19 CAR-T staničnom imunoterapijom primijećena je pojava CRS-a u 54-91% pacijenata, a u 8,3-43% radi se o težem CRS-u (Hay i sur. 2017). Radi se o otpuštanju suprafiziološke serumske razine prouplanih citokina od strane stanica CAR-T (INF- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) nakon vezivanja na ciljani antigen – CD19. Pojavljuje se jedan ili dva sata nakon prve infuzije terapije, a karakterizira ga hipotenzija, teška dispneja, često u kombinaciji s bronhospazmom, hipoksijom, groznicom, tresavicom, osipom, koagulopatijom i sindromom kapilarnog curenja. CRS može biti povezan i sa sindromom lize tumora, koji nastaje zbog lize velikog broja tumorskih stanica, čiji se dijelovi i ioni otpuštaju u krvotok, a uključuje neke ili sve od sljedećih pojava: hiperuricemiju, hipokalcemiju, hiperfosfatemiju, hiperkalijemiju, zatajenje bubrega, zatajenje dišnog sustava, povišenu razinu laktat dehidrogenaze, pa čak i smrt. U rijetkim slučajevima CRS može prerasti u encefalopatijski sindrom povezan s CAR-T staničnom imunoterapijom ili sindrom aktivacije makrofaga. Jedan od načina tretiranja CRS-a je tocilizumab, antagonist IL-6 i

monoklonalno protutijelo. Osim toga, primjenjuju se i kortikosteroidi, koji inhibiraju perzistenciju i anti-tumorski učinak stanica CAR-T (Wang i Liu 2017).

Neurotoksičnost nastaje zbog difuzne encefalopatije, uzrokovane sustavnim širenjem citokina, koji mogu prijeći krvno-moždanu barijeru (engl. *blood brain barrier*, BBB). Pojavljuje se kao široki spektar neuroloških i psihičkih simptoma, uključujući napadaje, delirij, afaziju i halucinacije. U liječenju B-staničnih maligniteta anti-CD19 CAR-T staničnom imunoterapijom prijavljena je nuspojava u 40% pacijenata (Prudent i Breitbart 2017). Teža neurotoksičnost karakterizirana je endotelnom aktivacijom, uključujući propusnost BBB-a, vaskularno curenje i diseminiranu vaskularnu koagulaciju. Neurotoksičnost se povezuje i s visokim koncentracijama citokina, uključujući one koji aktiviraju endotelne stanice poput IL-6, INF- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ . Zahvaljujući citokinskoj propusnosti BBB-a, teže je pronaći i odgovarajući lijek koji će moći prijeći tu barijeru. Jedan od lijekova koji se koristi u ovom slučaju i koji može uspješno prodrijeti BBB je deksametazon (Hay i sur. 2017).

Ukoliko se unos transgena za CAR radi pomoću retrovirusa, može se javiti i genotoksičnost. Ovisno o vrsti virusa, uvijek zadrže svojstvene slabosti kao što su imunogeničnost, tumorigeničnost, ograničen kapacitet gena koji mogu prenijeti, kompleksni proces proizvodnje i dr. Genotoksičnost se javlja zbog potencijala za generacijom retrovirusa sposobnih za replikaciju i insercijske mutageneze *in vivo* vodeći do prekomjerne ekspresije susjednih gena ili prekidanja gena na mjestu umetanja (integracije). Može doći do umetanja virusnih gena na „vrućim mjestima“ (engl. *hot spots*) što vodi do onkogene deregulacije s malignom transformacijom (npr. sekundarna leukemija).

Budući da je CD19 eksprimiran i na malignim i na zdravim stanicama, može doći do eliminacije odnosno aplazije limfocita B prilikom primjene anti-CD19 stanica CAR-T, a u konačnici i hipogamaglobulinemije. Primijećena je aplazija limfocita B godinu dana i duže nakon primjene ovakve imunoterapije. Kako poneki normalni limfociti B ne eksprimiraju CD19, moguće je i da ne dođe do eliminacije svih zdravih limfocita B i humoralna imunost barem djelomično ostane funkcionalna. Ova toksičnost se liječi primjenom  $\gamma$ -globulina i/ili antibioticima (Davila i Brentjens 2016).

## 4. ZAKLJUČAK

CAR-T stanična imunoterapija nameće se kao jedan od vrlo učinkovitih načina liječenja tumora, a u novije vrijeme i autoimunih bolesti. Do sad najveći je uspjeh pokazala u liječenju karcinoma krvi poput raznih leukemija i limfoma u koju je svrhu odobreno 6 tipova takve terapije. Međutim, i dalje postoji puno izazova i prepreka koje trebaju biti savladane kako bi terapija mogla biti primjenjiva i za liječenje solidnih tumora i autoimunih bolesti. Glavni problemi na putu vezani su u pronalazak odgovarajućeg ciljnog antigena koji bi bio prisutan samo na patogenim, a ne na zdravim stanicama, heterogenost te bijeg antigena, dopremanje stanica CAR-T na patogeno tkivo, koje je često prostorno zatvoreno i okruženo imunosupresivnim tumorskim mikrookolišem, koji stvara još dodatan otpor onemogućavajući proliferaciju i ekspanziju stanica CAR-T. Bijeg antigena pokušava se riješiti Tan-CAR-om, neciljano prepoznavanje antigena dizajniranjem stanica s dva CAR receptora ili dodavanjem iCAR-a. Kao alternativne opcije trebalo bi više istražiti i stanice NK, koje su kraće živuće te manje citotoksične, i makrofage, koji imaju bolju sposobnost prodiranja u centar solidnih tumora, odnosno pružaju snažniji otpor imunosupresivnom tumorskom mikrookolišu. Za liječenje AID-a odnosno povratak imunosne tolerancije istražuje se primjena stanica CAR-T<sub>reg</sub>, a problem nastaje u upalnom mikrookolišu gdje mogu izgubiti svoju regulatornu ulogu. Rješenja za taj problem mogla bi se nalaziti u tvarima koje pogoduju održavanju njihove imunosupresivne uloge poput derivata vitamina A (tretionin).

## 5. LITERATURA

- Adusumilli P.S., Cherkassky L., Villena-Vargas J., Colovos C., Servais E., Plotkin J., Jones D.R., Sadelain M. (2014): Regional delivery of mesothelin-targeted CAR T cell therapy generates potent and long-lasting CD4-dependent tumor immunity. *Sci Transl Med* **6**: 151–161.
- Atarashi K., Tanoue T., Oshima K., Suda W., Nagano Y., Nishikawa H., Fukuda S., Saito T., Narushima S., Hase K., Kim S., Fritz J. V., Wilmes P., Ueha S., Matsushima K., Ohno H., Olle B., Sakaguchi S., Taniguchi T., Morita H., Hattori M., Honda K. (2013): Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* **500**: 232–236.
- Baba A.I., Cătoi C. (2007): *Comparative Oncology*. at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9553/>.
- Bai Y., Kan S., Zhou S., Wang Y., Xu J., Cooke J.P., Wen J., Deng H. (2015): Enhancement of the in vivo persistence and antitumor efficacy of CD19 chimeric antigen receptor T cells through the delivery of modified TERT mRNA. *Cell Discov* doi:10.1038/celldisc.2015.40.
- Bartkova J., Hamerlik P., Stockhausen M.T., Ehrmann J., Hlobilkova A., Laursen H., Kalita O., Kolar Z., Poulsen H.S., Broholm H., Lukas J., Bartek J. (2010): Replication stress and oxidative damage contribute to aberrant constitutive activation of DNA damage signalling in human gliomas. *Oncogene* **29**: 5095–5102.
- Boroughs A.C., Larson R.C., Choi B.D., Bouffard A.A., Riley L.S., Schiferle E., Kulkarni A.S., Cetrulo C.L., Ting D., Blazar B.R., Demehri S., Maus M. V. (2019): Chimeric antigen receptor costimulation domains modulate human regulatory T cell function. *JCI Insight* **5**: e126194.
- Brahmer J.R., Tykodi S.S., Chow L.Q.M., Hwu W.-J., Topalian S.L., Hwu P., Drake C.G., Camacho L.H., Kauh J., Odunsi K., Pitot H.C., Hamid O., Bhatia S., Martins R., Eaton K., Chen S., Salay T.M., Alaparthi S., Grosso J.F., Korman A.J., Parker S.M., Agrawal S., Goldberg S.M., Pardoll D.M., Gupta A., Wigginton J.M. (2012): Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N Engl J Med* **366**: 2455–2465.
- Cappell K.M., Kochenderfer J.N. (2023): Long-term outcomes following CAR T cell therapy: what we know so far. *Nat Rev Clin Oncol* **20**: 359–371.

- Chatenoud L. (2016): Precision medicine for autoimmune disease. *Nat Biotechnol* **34**: 930–932.
- Davidson A., Diamond B. (2001): Autoimmune diseases. *N Engl J Med* **345**: 340–350.
- Davila M.L., Brentjens R.J. (2016): CD19-Targeted CAR T Cells as Novel Cancer Immunotherapy for Relapsed or Refractory B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol* **14**: 802.
- Degenhardt K., Mathew R., Beaudoin B., Bray K., Anderson D., Chen G., Mukherjee C., Shi Y., Gélinas C., Fan Y., Nelson D.A., Jin S., White E. (2006): Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* **10**: 51–64.
- Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D. (2004): The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* **22**: 329–360.
- Ellebrecht C.T., Bhoj V.G., Nace A., Choi E.J., Mao X., Cho M.J., Zengo G. Di, 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* (1979) **353**: 179–184.
- Feins S., Kong W., Williams E.F., Milone M.C., Fraietta J.A. (2019): An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer. *Am J Hematol* **94**: S3–S9.
- Feng K., Liu Y., Guo Y., Qiu J., Wu Z., Dai H., Yang Q., Wang Y., Han W. (2018): Phase I study of chimeric antigen receptor modified T cells in treating HER2-positive advanced biliary tract cancers and pancreatic cancers. *Protein Cell* **9**: 838–847.
- Gattinoni L., Lugli E., Ji Y., Pos Z., Paulos C.M., Quigley M.F., Almeida J.R., Gostick E., Yu Z., Carpenito C., Wang E., Douek D.C., Price D.A., June C.H., Marincola F.M., Roederer M., Restifo N.P. (2011): A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med* **17**: 1290–1297.
- Ghassemi S., Nunez-Cruz S., O'Connor R.S., Fraietta J.A., Patel P.R., Scholler J., Barrett D.M., Lundh S.M., Davis M.M., Bedoya F., Zhang C., Leferovich J., Lacey S.F., Levine B.L., Grupp S.A., June C.H., Melenhorst J.J., Milone M.C. (2018): Reducing Ex Vivo Culture Improves the Antileukemic Activity of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. *Cancer Immunol Res* **6**: 1100–1109.
- Grada Z., Hegde M., Byrd T., Shaffer D.R., Ghazi A., Brawley V.S., Corder A., Schönfeld K., Koch J., Dotti G., Heslop H.E., Gottschalk S., Wels W.S., Baker M.L., Ahmed N. (2013):

- TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther Nucleic Acids* **2**: 57–68.
- Hall B., Dembinski J., Sasser A.K., Studeny M., Andreeff M., Marini F. (2007): Mesenchymal stem cells in cancer: tumor-associated fibroblasts and cell-based delivery vehicles. *Int J Hematol* **86**: 8–16.
- Hay K.A., Hanafi L.A., Li D., Gust J., Liles W.C., Wurfel M.M., López J.A., Chen J., Chung D., Harju-Baker S., Cherian S., Chen X., Riddell S.R., Maloney D.G., Turtle C.J. (2017): Kinetics and biomarkers of severe cytokine release syndrome after CD19 chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy. *Blood* **130**: 2295–2306.
- Hickman T.L., Choi E., Whiteman K.R., Muralidharan S., Pai T., Johnson T., Parikh A., Friedman T., Gilbert M., Shen B., Barron L., McGinness K.E., Ettenberg S.A., Motz G.T., Weiss G.J., Jensen-Smith A. (2022): BOXR1030, an anti-GPC3 CAR with exogenous GOT2 expression, shows enhanced T cell metabolism and improved anti-cell line derived tumor xenograft activity. *PLoS One* **17**: e0266980.
- Hoffmann J.M., Schubert M.L., Wang L., Hüchelhoven A., Sellner L., Stock S., Schmitt A., Kleist C., Gern U., Loskog A., Wuchter P., Hofmann S., Ho A.D., Müller-Tidow C., Dreger P., Schmitt M. (2018): Differences in Expansion Potential of Naive Chimeric Antigen Receptor T Cells from Healthy Donors and Untreated Chronic Lymphocytic Leukemia Patients. *Front Immunol* **8**: 1956.
- Hsu C., Hughes M.S., Zheng Z., Bray R.B., Rosenberg S.A., Morgan R.A. (2005): Primary Human T Lymphocytes Engineered with a Codon-Optimized IL-15 Gene Resist Cytokine Withdrawal-Induced Apoptosis and Persist Long-Term in the Absence of Exogenous Cytokine. *J Immunol* **175**: 7226–7234.
- Huang Z., Yu P., Tang J. (2020): <p>Characterization of Triple-Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Spheroid Model</p>. *Onco Targets Ther* **13**: 5395–5405.
- 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**: 125–135.



- Juneja V.R., McGuire K.A., Manguso R.T., LaFleur M.W., Collins N., Nicholas Haining W., Freeman G.J., Sharpe A.H. (2017): PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8 T cell cytotoxicity. *J Exp Med* **214**: 895–904.
- Kagoya Y., Nakatsugawa M., Yamashita Y., Ochi T., Guo T., Anczurowski M., Saso K., Butler M.O., Arrowsmith C.H., Hirano N. (2016): BET bromodomain inhibition enhances T cell persistence and function in adoptive immunotherapy models. *J Clin Invest* **126**: 3479–3494.
- Kansal R., Richardson N., Neeli I., Khawaja S., Chamberlain D., Ghani M., Ghani Q. ul ain, Balazs L., Beranova-Giorgianni S., Giorgianni F., Kochenderfer J.N., Marion T., Albritton L.M., Radic M. (2019): Sustained B cell depletion by CD19-targeted CAR T cells is a highly effective treatment for murine lupus. *Sci Transl Med* **11**: .
- Kawalekar O.U., O’Connor R.S., Fraietta J.A., Guo L., McGettigan S.E., Posey A.D., Patel P.R., Guedan S., Scholler J., Keith B., Snyder N., Blair I., Milone M.C., June C.H. (2016): Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells. *Immunity* **44**: 380–390.
- Klebanoff C.A., Scott C.D., Leonardi A.J., Yamamoto T.N., Cruz A.C., Ouyang C., Ramaswamy M., Roychoudhuri R., Ji Y., Eil R.L., Sukumar M., Crompton J.G., Palmer D.C., Borman Z.A., Clever D., Thomas S.K., Patel S., Yu Z., Muranski P., Liu H., Wang E., Marincola F.M., Gros A., Gattinoni L., Rosenberg S.A., Siegel R.M., Restifo N.P. (2016): Memory T cell-driven differentiation of naive cells impairs adoptive immunotherapy. *J Clin Invest* **126**: 318–334.
- 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. *Nat Biotechnol* **31**: 71–75.
- Kochenderfer J.N., Dudley M.E., Feldman S.A., Wilson W.H., Spaner D.E., Maric I., Stetler-Stevenson M., Phan G.Q., Hughes M.S., Sherry R.M., Yang J.C., Kammula U.S., Devillier L., Carpenter R., Nathan D.A.N., Morgan R.A., Laurencot C., Rosenberg S.A. (2012): B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood* **119**: 2709–2720.
- Koneru M., Purdon T.J., Spriggs D., Koneru S., Brentjens R.J. (2015): IL-12 secreting tumor-targeted chimeric antigen receptor T cells eradicate ovarian tumors in vivo. *Oncoimmunology* **4**: 1–11.

- Lindahl T. (1993): Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 1993 362:6422  
**362**: 709–715.
- Lleo A., Invernizzi P., Gao B., Podda M., Gershwin M.E. (2010): Definition of human autoimmunity — autoantibodies versus autoimmune disease. *Autoimmun Rev* **9**: A259–A266.
- McHugh J. (2019): CAR T cells drive out B cells in SLE. *Nat Rev Rheumatol* **15**: 249.
- Miliotou A.N., Papadopoulou L.C. (2018): CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. *Curr Pharm Biotechnol* **19**: 5–18.
- Modlich U., Navarro S., Zychlinski D., Maetzig T., Knoess S., Brugman M.H., Schambach A., Charrier S., Galy A., Thrasher A.J., Bueren J., Baum C. (2009): Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors. *Mol Ther* **17**: 1919–1928.
- 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. *Mol Ther* **18**: 843–851.
- 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.
- 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.
- Oldham R.A.A., Medin J.A. (2017): Practical considerations for chimeric antigen receptor design and delivery. *Expert Opin Biol Ther* **17**: 961–978.
- Posey A.D., Schwab R.D., Boesteanu A.C., Steentoft C., Mandel U., Engels B., Stone J.D., Madsen T.D., Schreiber K., Haines K.M., Cogdill A.P., Chen T.J., Song D., Scholler J., Kranz D.M., Feldman M.D., Young R., Keith B., Schreiber H., Clausen H., Johnson L.A., June C.H. (2016): Engineered CAR T Cells Targeting the Cancer-Associated Tn-Glycoform of the Membrane Mucin MUC1 Control Adenocarcinoma. *Immunity* **44**: 1444–1454.
- Prudent V., Breitbart W.S. (2017): Chimeric antigen receptor T-cell neuropsychiatric toxicity in acute lymphoblastic leukemia. *Palliat Support Care* **15**: 499–503.

- Radichev I.A., Yoon J., Scott D.W., Griffin K., Savinov A.Y. (2020): Towards antigen-specific Tregs for type 1 diabetes: Construction and functional assessment of pancreatic endocrine marker, HPi2-based chimeric antigen receptor. *Cell Immunol* **358**: .
- Ramos C.A., Heslop H.E., Brenner M.K. (2016): CAR-T cell therapy for lymphoma. *Annu Rev Med* **67**: 165–183.
- Sadelain M., Brentjens R., Rivière I. (2013): The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov* **3**: 388–398.
- Saxton R.A., Tsutsumi N., Su L.L., Abhiraman G.C., Mohan K., Henneberg L.T., Aduri N.G., Gati C., Garcia K.C. (2021): Structure-based decoupling of the pro- And anti-inflammatory functions of interleukin-10. *Science* (1979) **371**: .
- Schmidts A., Maus M. V. (2018): Making CAR T cells a solid option for solid tumors. *Front Immunol* **9**: 2593.
- Sha H.H., Wang D.D., Yan D.L., Hu Y., Yang S.J., Liu S.W., Feng J.F. (2017): Chimaeric antigen receptor T-cell therapy for tumour immunotherapy. *Biosci Rep* **37**: 1–12.
- Shin M.H., Oh E., Kim Y., Nam D.-H., Jeon S.Y., Yu J.H., Minn D. (2023): Recent Advances in CAR-Based Solid Tumor Immunotherapy. *Cells* **12**: 1606.
- Straathof K., Flutter B., Wallace R., Jain N., Loka T., Depan S., Wright G., Thomas S., Cheung G.W.K., Gileadi T., Stafford S., Kokalaki E., Barton J., Marriott C., Rampling D., Ogunbiyi O., Akarca A.U., Marafioti T., Inglott S., Gilmour K., Al-Hajj M., Day W., McHugh K., Biassoni L., Sizer N., Barton C., Edwards D., Dragoni I., Silvester J., Dyer K., Traub S., Elson L., Brook S., Westwood N., Robson L., Bedi A., Howe K., Barry A., Duncan C., Barone G., Pule M., Anderson J. (2020): Antitumor activity without on-target off-tumor toxicity of GD2-chimeric antigen receptor T cells in patients with neuroblastoma. *Sci Transl Med* **12**: eabd6169.
- Sun S., Osterman M.D., Li M. (2019): Tissue specificity of DNA damage response and tumorigenesis. *Cancer Biol Med* **16**: 396–414.
- Sun Y., Yuan Y., Zhang B., Zhang X. (2023): CARs: a new approach for the treatment of autoimmune diseases. *Sci China Life Sci* **66**: 711–728.
- Tenspolde M., Zimmermann K., Weber L.C., Hapke M., Lieber M., Dywicki J., Frenzel A., Hust M., Galla M., Buitrago-Molina L.E., Manns M.P., Jaeckel E., Hardtke-Wolenski M. (2019):

- Regulatory T cells engineered with a novel insulin-specific chimeric antigen receptor as a candidate immunotherapy for type 1 diabetes. *J Autoimmun* **103**: 102289.
- Walker A.J., Majzner R.G., Zhang L., Wanhainen K., Long A.H., Nguyen S.M., Lopomo P., Vigny M., Fry T.J., Orentas R.J., Mackall C.L. (2017): Tumor Antigen and Receptor Densities Regulate Efficacy of a Chimeric Antigen Receptor Targeting Anaplastic Lymphoma Kinase. *Mol Ther* **25**: 2189–2201.
- Wang L., Wang F.S., Gershwin M.E. (2015): Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med* **278**: 369–395.
- Wang Z., Liu Q. (2017): Pharmacology & Clinical Research Mini Review Clinical Pharmacological Considerations on CAR-T Cell Therapy for Cancer. doi:10.19080/JPCR.2017.03.555619.
- Yang X., Yu D.D., Yan F., Jing Y.Y., Han Z.P., Sun K., Liang L., Hou J., Wei L.X. (2015): The role of autophagy induced by tumor microenvironment in different cells and stages of cancer. *Cell Biosci* **5**: 1–11.
- Yip A., Webster R.M. (2018): The market for chimeric antigen receptor T cell therapies. *Nat Rev Drug Discov* **17**: 161–162.
- Young R.M., Engel N.W., Uslu U., Wellhausen N., June C.H. (2022): Next-Generation CAR T-cell Therapies. *Cancer Discov* **12**: 1625–1633.
- Zhang C., Liu J., Zhong J.F., Zhang X. (2017): Engineering CAR-T cells. *Biomark Res* **5**: 1–6.
- Zhou B.B.S., Elledge S.J. (2000): The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**: 433–439.
- Zhou X., Kong N., Wang J., Fan H., Zou H., Horwitz D., Brand D., Liu Z., Zheng S.G. (2010): Cutting edge: all-trans retinoic acid sustains the stability and function of natural regulatory T cells in an inflammatory milieu. *J Immunol* **185**: 2675–2679.

# ŽIVOTOPIS

Moje je ime Viktoria Krajc i rođena sam u Zagrebu 2000. godine. Pohađala sam OŠ Malešnica u Zagrebu (2008. – 2016.), a svoje srednjoškolsko obrazovanje stekla sam u prirodoslovno-matematičkoj gimnaziji - XV. gimnazija u Zagrebu (2016.-2020.). U prva tri razreda srednje škole sudjelovala sam na Državnom natjecanju iz Hrvatskog jezika. 2020. godine upisala sam Preddiplomski sveučilišni studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, gdje sada završavam treću godinu. Od 2020. godine dajem instrukcije za osnovnu i srednju školu iz matematike, kemije, fizike, biologije te hrvatskog jezika, privatno i preko poslodavca eMatematika. 2022. godine sudjelovala sam u izradi videozapisa „Uhvati me ako možeš“ u sklopu mikrobiološke radionice za online verziju manifestacije Noć Biologije, a 2023. godine također sam volontirala na Noći Biologije, uživo, u radionicama iz genetike. Nadalje, 2023. godine volontirala sam i u sklopu radionica za niže razrede osnovne škole na Tjednu mozga na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga. 2023. godine odradila sam i Laboratorijsku stručnu praksu na Institutu Ruđer Bošković, na Zavodu za istraživanje mora i okoliša, u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju, gdje se bave proučavanjem procesa popravka DNA koristeći *in vitro* metode, kulture stanica i modelni organizam, ribu zebricu (*Danio rerio*). Tijekom cijelog svojeg srednjoškolskog i fakultetskog obrazovanja primam Stipendiju Grada Zagreba, a tijekom prve dvije godine studija ponuđena mi je i STEM stipendija od Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske.