

# Primjena CAR-T stanica u genskoj terapiji liječenja tumora

---

Krmpotić, Klara

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:217:908709>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-04**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

**PRIMJENA CAR-T STANICA U GENSKOJ  
TERAPIJI LIJEČENJA TUMORA**

**APPLICATION OF CAR-T CELLS IN CANCER  
GENE THERAPY**

**SEMINARSKI RAD**

Klara Krmpotić  
Preddiplomski studij Molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)  
Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Zagreb, 2018.

## Sadržaj:

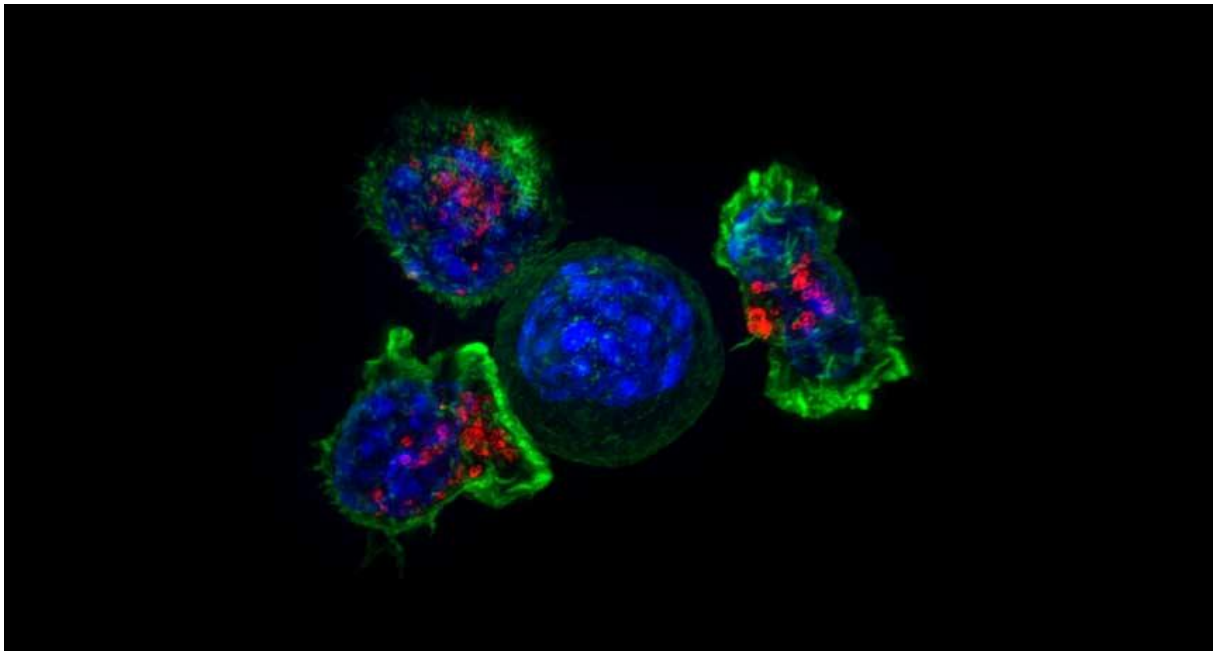
<b>1. Uvod</b> .....	1
<b>2. Genska terapija</b> .....	3
<b>2.1. Genska terapija u liječenju tumora</b> .....	5
2.1.1. Suicidalna genska terapija.....	6
2.1.2. Onkolitička viroterapija .....	6
2.1.3. Imunoterapija .....	7
<b>3. Stanična terapija CAR-T</b> .....	12
<b>3.1. Struktura CAR</b> .....	12
3.1.1. Ektodomena .....	13
3.1.2. Transmembranska domena .....	14
3.1.3. Endodomena .....	14
3.1.4. Karakterizacija kimernih receptora .....	14
<b>3.2. Prednosti i nedostaci upotrebe kimernih receptora</b> .....	15
<b>3.3. Unos gena CAR u stanice imunskog sustava</b> .....	17
3.3.1. Virusni vektori .....	17
3.3.2. Nevirusni vektori.....	18
3.3.3. Selekcija modificiranih stanica .....	19
<b>3.4. Uklanjanje nepoželjnih nuspojava</b> .....	20
3.4.1. Upotreba SynNotch receptora .....	21
3.4.2. Upotreba sigurnosnih prekidača.....	22
<b>4. Zaključak</b> .....	25
<b>5. Literatura</b> .....	26
<b>6. Sažetak</b> .....	31
<b>7. Summary</b> .....	32

# 1. Uvod

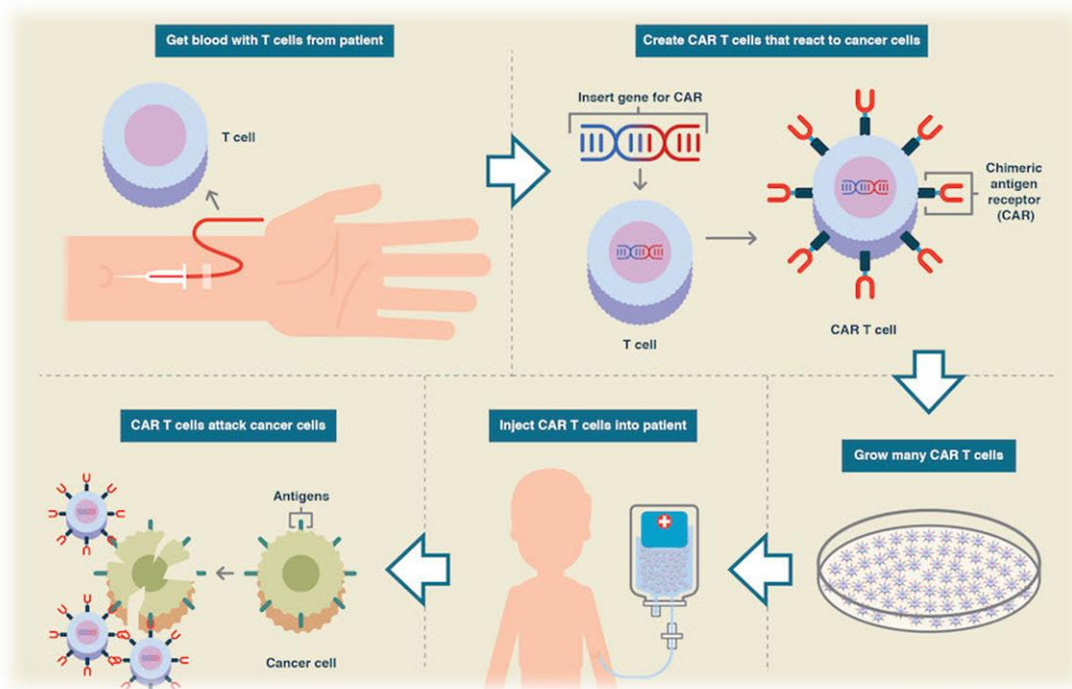
Terapija kimernih antigenskih receptora odnosno CAR-T stanična terapija temelji se na genetskoj modifikaciji imunskih stanica pacijenta na način da mogu detektirati i napadati tumorske stanice. Bijele krvne stanice, glavni nositelji stanične imunosti – T limfociti (Slika 1), izolirani iz pacijentove krvi, genetski se modificiraju *in vitro* i kultiviraju u laboratoriju te potom infuzijom vraćaju natrag u pacijentov krvotok (Slika 2) (Aravalli i Steer, 2017). Kao što samo ime terapije govori, radi se o modifikaciji receptora na površini T limfocita na način da su dodane domene za specifično prepoznavanje tumorskih epitopa te domene za aktivaciju T limfocita (Wilkins i sur., 2017).

Terapija se zasada koristi za liječenje djece i mladih s akutnom limfoblastičnom leukemijom (ALL) te odraslih s ne-Hodgkinovim limfomom (NHL). Lijekovi za navedene bolesti, Kymriah (tisagenlecleucel) za ALL i Yescarta (aksikaptagen ciloleucel) za NHL, odobreni u Americi, čekaju odobrenje od Europske agencije (EMA) kao lijekovi tzv. *orphan* statusa namijenjenih liječenju rijetkih i teških bolesti (Vormittag i sur., 2018; Zheng i Li, 2018).

Iako je prvotno bila namijenjena liječenju malignih hematopoetskih bolesti, u novije vrijeme postaje predmetom istraživanja za pronalazak novih strategija liječenja solidnih tumora (Inoo i sur., 2016; Wang i sur., 2016). Također bi zbog velike specifičnosti umjetno dizajniranih receptora ova terapija mogla posjedovati velik potencijal za liječenje brojnih drugih vrsta bolesti poput multiple skleroze (MS), sindroma iritabilnog crijeva (IBS) te virusa ljudske imunodeficijencije tipa 1 (HIV-1) (Wilkins i sur., 2017). Zbog kompleksnog i dugotrajnog procesa pripreve stanica CAR-T, troškovi liječenja izrazito su visoki te je terapija ograničena na mali broj pacijenata, stoga su mnoga istraživanja usmjerena na razvijanje univerzalne stanične terapije CAR-T. Masovnom produkcijom CAR-T lijeka terapija bi postala dostupna široj populaciji (Wilkins i sur., 2017; Ruella i Kenderian, 2017).



**Slika 1.** Citotoksični T limfociti (prikazani zelenom i crvenom bojom) okružuju tumorsku stanicu (plavo). Uslijed prepoznavanja, vezuju se na njezinu površinu te ispuštaju sadržaj vezikula (crveno) što dovodi do lize stanice tumora (preuzeto iz: <https://www.flickr.com/photos/nihgov/20673870162/in/photostream/>).



**Slika 2.** Shematski prikaz procesa primjene terapije CAR-T (eng. chimeric antigen receptor T cell). T limfociti pacijenta se izoliraju iz krvi, *in vitro* genetički modificiraju i kultiviraju u laboratoriju te potom infuzijom vraćaju u pacijentov krvotok gdje specifično identificiraju i razaraju tumorske stanice (preuzeto iz: <https://www.utsouthwestern.edu/newsroom/articles/year-2018/car-t-clinical-trials.html>).

## 2. Genska terapija

Genska terapija obuhvaća niz tehnika i metoda unosa stranog genetičkog materijala u stanice s ciljem izlječenja ili prevencije bolesti (Amer, 2014). Prvotna se ideja genske terapije temeljila na zamjeni mutiranog gena funkcionalnim. Danas ona uključuje uvođenje novih gena, selektivno uklanjanje gena, kao i prepravljjanje genoma ciljanim izmjenama unutar gena (Thanou i sur., 2007; Majhen i Ambriović-Ristov, 2006). Iako je u početku bila namijenjena liječenju monogenetskih nasljednih poremećaja, ubrzo je uočen potencijal za razvoj strategija za liječenje širokog spektra bolesti poput poligenetskih i nenasljednih (Thomas i sur., 2003). Pritom su kancerogene bolesti daleko najzastupljenije u kliničkim istraživanjima (Thanou i sur., 2007; Collins i Thrasher, 2015).

Glavnu prepreku učinkovitosti genske terapije predstavlja konstruiranje adekvatnog sustava unosa genetskog materijala u stanice. Najkorišteniji mehanizmi unosa čine prenositelji odnosno vektori, koji mogu biti virusnog ili nevirusnog porijekla (Thanou i sur, 2007; Worgall i Crystal, 2014). Idealni vektor je onaj koji može učinkovito unositi gene u točno određena mjesta u genomu sa svrhom postizanja kontinuirane ekspresije te jednokratnog doziranja. Također učinkoviti vektor ima i visoku tkivnu specifičnost, veliki genetički kapacitet te ne dovodi do aktivacije imunskog i upalnog odgovora organizma (Mali, 2013).

U kliničkim su istraživanjima najzastupljeniji vektori virusnoga porijekla koji se temelje na modificiranim adenovirusima, retrovirusima, lentivirusima te herpes simpleks virusima (Yin i sur., 2014; Thomas i sur., 2003). Razlog korištenja u velikom broju kliničkih istraživanja leži u učinkovitom unošenju genetičkog materijala u stanicu i omogućavanju kontinuirane ekspresije gena (Thanou i sur, 2007). Usprkos značajnom doprinosu u razvoju genske terapije, preuranjena je upotreba virusnih vektora u ranim kliničkim istraživanjima dovela do nepoželjnih nuspojava u jednom dijelu pacijenata. Nedostaci virusnih vektora uključuju smanjenu učinkovitost prijenosa uslijed indukcije imunoreakcije zbog prethodno stečene imunosti, insercijsku mutagenezu, indukciju karcinogeneze te mali genetski kapacitet (Thanou i sur, 2007; Yin i sur., 2014; Thomas i sur., 2003).

S ciljem smanjenja nuspojava i nedostataka virusnih vektora, istraživanja su se počela usmjeravati na druge metode prijenosa DNA, koje se mogu podijeliti na fizikalne i kemijske ne-virusne metode. Ne-virusni vektori, uključeni u kemijske metode unosa, su najčešće DNA plazmidi koji mogu biti u obliku “gole” DNA molekule ili u kompleksu s drugim molekulama poput lipida. Predstavljaju alternativnu metodu unosa nukleinskih kiselina u stanice koja ne uključuje upotrebu virusa. Fizikalne metode unosa uključuju elektroporaciju, sonoporaciju, upotrebu genskih pištolja, mikroinjektiranje te hidrodinamski prijenos gena, dok kemijske uključuju upotrebu kationskih lipida i polimera, plazmida, liposoma, lipopleksa te “gole” DNA molekule (Al-Dosari i Gao, 2009; Worgall i Crystal, 2014). Ne-virusni vektori imaju veći kapacitet prijenosa genetičke informacije, manje su toksični i imunogeni, pa ne aktiviraju imunosne obrambene mehanizme, lakše se sintetiziraju od virusnih vektora te su generalno smatrani sigurnijom metodom unosa gena zato što ne postoji mogućnost integracije i rekombinacije s genomom stanice (Thanou i sur, 2007; Yin i sur., 2014). Temeljni nedostaci predstavljaju nisku tranfekcijsku učinkovitost te prolaznu ekspresiju unesenih gena (Thanou i sur, 2007; Mali, 2013).

Napredak pri konstituiranju virusnih i ne-virusnih vektora značajno utječe na uspjeh kliničkih istraživanja i razvoj učinkovitijih i sigurnijih strategija genske terapije. Iz tog je razloga nužno provesti daljnja istraživanja s ciljem nadvladavanja nedostataka i eliminacije neželjenih nuspojava trenutno dostupnih vektorskih sustava.

## 2.1. Genska terapija u liječenju tumora

Usprkos brojnim strategijama liječenja tumora poput kirurgije, kemoterapije, terapije zračenjem te ciljane terapije, rak i danas predstavlja jedan od vodećih uzroka smrtnosti u svijetu, stoga je razvoj novih eksperimentalnih terapija neophodan u borbi protiv ove kompleksne te sve učestalije bolesti (Thanou i sur, 2007; Collins i Thrasher, 2015). U novije se vrijeme razvija sve više obećavajućih terapija koje primjenjuju tehnike genske terapije. Veća selektivnost pri uništavanju tumorskih stanica, lokalna administracija, jednokratno doziranje te izbjegavanje sistemske toksičnosti, samo su neke od brojnih prednosti njezine primjene u liječenju tumora (Springer i Niculescu-Duvaz, 2000; Wirth i Ylä-Herttuala, 2014).

Do nastanka tumora dolazi uslijed nakupljanja brojnih genskih mutacija koje narušavaju kontrolu stanične diobe, rasta i diferencijacije (Roth i Cristiano, 1997). Mutacije se u stanicama tumora najčešće pojavljuju u onkogenima, tumor-supresorskim te brojnim drugim genima uključenima u popravak pogrešaka u molekuli DNA (Majhen i Ambriović-Ristov, 2006). Prvotna se primjena genske terapije temeljila na klasičnom pristupu zamjene mutiranih tumor-supresorskih te onkogenih gena funkcionalnim. Pokazala se neefikasnom te neprikladnom zbog nemogućnosti suprimiranja odnosno zamjene svih abnormalnih gena stanice raka uslijed njihove brojnosti te raznovrsnosti. Stoga su se današnje strategije genske terapije, umjesto popravka, okrenule metodama uništavanja stanica raka te omogućile nastanak radikalnijih te djelotvornijih terapija. Obećavajuće terapije nastale primjenom strategija genske terapije uključuju suicidalnu gensku terapiju, onkolitičku viroterapiju, imunoterapiju kao i brojne druge koje su u posljednjih nekoliko godina dovele do značajnog napretka u liječenju tumora (Roth i Cristiano, 1997; Majhen i Ambriović-Ristov, 2006).



### 2.1.1. Suicidalna genska terapija

Suicidalna genska terapija ostvarila je značajne terapijske rezultate zbog svoje učinkovitosti te veće lokalizacije tretmana. Terapija, za razliku od standardnih kemoterapijskih agensa i zračenja, ograničeno djeluje na tumorske stanice pritom ne oštećujući ostale stanice organizma (Wadhwa i sur., 2002). Zasniva se na unosu stranog suicidalnog gena bakterijskog ili virusnog podrijetla koji kodira za enzim koji može netoksični prolijek prevesti u aktivni citotoksični metabolit. Pretvorba prolijeka dovodi do selektivnog samouništenja tumorskih stanica (Wirth i Ylä-Herttuala, 2014; Zarogoulidis i Darwiche, 2013).

Današnje terapijske strategije suicidalne genske terapije koriste mnoge enzim-prolijek kombinacije poput enzima citozin-deaminaze (CD) koji pretvara 5- fluorocitozin (5-FC) u toksični produkt 5- fluorouracil (5-FU) (Yi i sur., 2005) te enzima timidin-kinaze Herpes Simpleks virusa (HSVtk) koji monofosforilacijom prolijeka ganciclovira (GCV) čini GCV dobrim supstratom za daljnje fosforilacije humanim kinazama te konačnog prevođenja u toksični antitumorski derivat ganciklovir-trifosfat (Fillat i sur., 2003; Fischer i sur., 2004; Wadhwa i sur., 2002).

### 2.1.2. Onkolitička viroterapija

Onkolitička viroterapija, terapija visoke selektivnosti, predstavlja još jedan obećavajući pristup genske terapije tumora. Temelji se na upotrebi genetički modificiranih onkolitičkih virusa koji selektivno i učinkovito inficiraju pojedine vrste tumorskih stanica pritom uspješno zaobilazeći imunosti sustav pacijenta (Miest i Cattaneo, 2013; Russell i sur., 2012; Cross i Burmester, 2006). U inficiranim tumorskim stanicama virusi ulaze u litički ciklus te dovode do lize stanica tumora (Fountzilias i sur., 2017).

Također onkolitičkim se virusima mogu prenositi različiti transgeni za aktivaciju imunosti sustava pacijenta kao i brojni tumor-supresor geni koji će utjecati na integritet tumorskih stanica (Yura i Hamada, 2017). U terapiji se preferentno koriste virusi izrazitog tropizma prema tumorskim stanicama poput parvovirusa, reovirusa, Mumps i Moloney leukemija virusa ili genetički modificirani virusi inducirane tumorske specifičnosti poput adenovirusa, Herpes simpleks te vaccinia virusa (Russell i sur., 2012; Cross i Burmester, 2006).

### 2.1.3. Imunoterapija

Genskom se terapijom pokušava pospješiti djelotvornost imunoterapije, nove metode liječenja raka koja je u posljednjih nekoliko desetljeća zauzela važno mjesto u onkološkim istraživanjima. Imunosni sustav, “glavna obrambena linija” organizma, u većini slučajeva uspješno identificira i uništava tumorske stanice te tako sprječava daljnje razvijanje tumora (Cross i Burmester, 2006). Međutim, prepoznavanje koje se temelji na ekspresiji tumor-specifičnih antigena i molekula nastalih uslijed staničnog stresa, ponekad izostaje (Swann i Smyth, 2007). Također postoje slučajevi u kojima imunosni odgovor organizma nije dovoljno djelotvoran u eliminaciji tumorskih stanica.

Tumori imaju niz strategija kojima aktivno izbjegavaju imunosni odgovor domaćina. Glavne mehanizme bijega čini izlučivanje različitih imunosupresivnih citokina, smanjena ekspresija tumorskih antigena i receptora smrti, djelovanje regulatornih T limfocita regrutiranih u tumorski mikrookoliš te uništavanje citotoksičnih tumor-specifičnih limfocita (Vinay i sur., 2015). Biološka heterogenost tumora koja nastaje uslijed genetske nestabilnosti brzo-dijelećih stanica tumora onemogućava nastanak jedinstvenog imunosnog odgovora te također doprinosi otežanom prepoznavanju (Bhang i sur., 2015; Vinay i sur., 2015)

Razvijeni su različiti oblici imunoterapija koji uključuju primjenu tehnika genske terapije s ciljem otkrivanja što učinkovitijih strategija manipulacije imunosupresivnog tumorskog mikrookoliša i nadvladavanja kompleksne tumorske obrane. Imunoterapijske strategije uključuju antitumorska cjepiva, inhibiciju imunosnih kontrolnih točaka, adaptivnu terapiju stanicama te brojne druge (Amer, 2014).

### 2.1.3.1 Antitumorska cjepiva

Antitumorska cjepiva, čiji je glavni cilj stimulirati jaki imunski odgovor pacijenta primjer je upotrebe tehnika genske terapije u imunoterapiji. Cjepiva ne dovode do prevencije tumorigeneze, već do smanjenja tumorske mase ojačavanjem imunskog sustava (Rosenthal i sur., 1994; Cross i Burmester, 2006). Metoda se zasniva na *in vitro* uzgajanju tumorskih stanica, njihovoj genetičkoj modifikaciji i razgradnji nakon koje slijedi inkorporacija ostataka raspadnutih stanica (eng. *cellular debris*) s raznim imunostimulansima poput interleukina-2 (IL-2) u cjepivo. Citokin interleukin-2 glavni je regulator aktivnosti i apoptoze T limfocita koji poboljšava djelotvornost cjepiva (Cross i Burmester, 2006; Farkona i sur., 2016).

Tumorske stanice, korištene u pripremi cjepiva, mogu biti autologne, pacijentove vlastite tumorske stanice dobivene izolacijom, ili alogenične, stanice od prethodno uspostavljene tumorske stanične linije. Stanice se genetički modificiraju uvođenjem gena za imunostimulanse poput citokina i pro-upalnih molekula te antigena glavnog sustava tkivne snošljivosti (engl. *Major Histocompatibility Complex*, MHC) klase I čiju ekspresiju tumor često suprimira. Uneseni geni doprinose prepoznavanju i razaranju tumorskih stanica poboljšavanjem učinkovitosti imunskog sustava (Rosenthal i sur., 1994; Cross i Burmester, 2006).

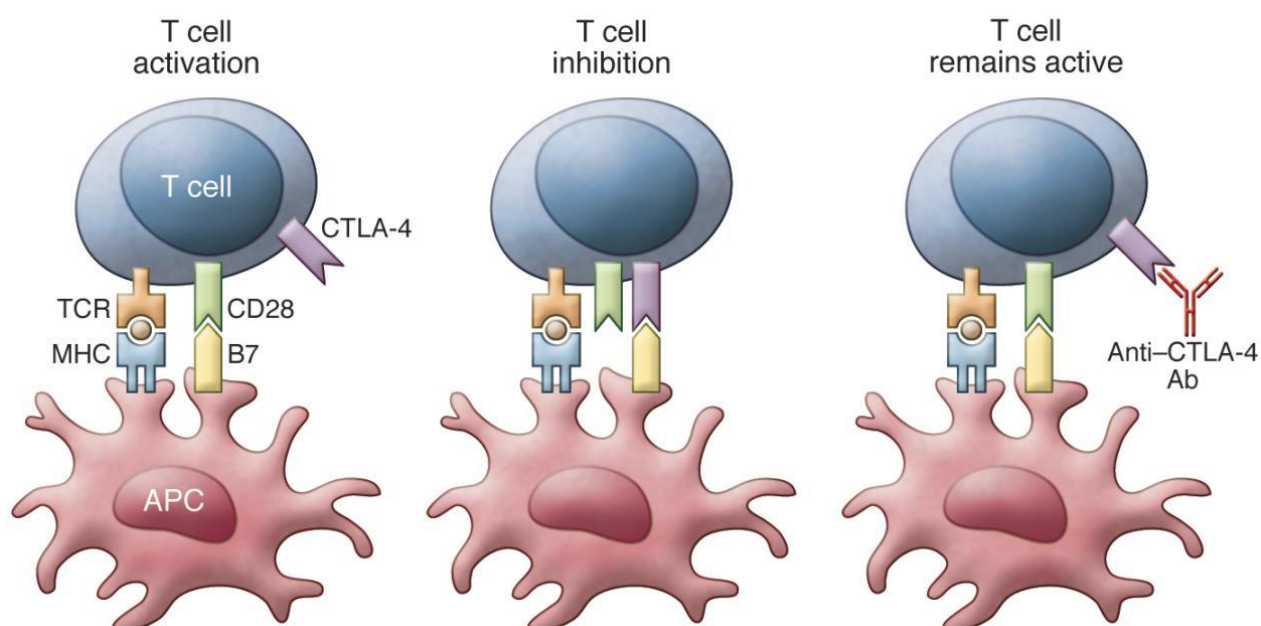
Značajan uspjeh ove imunoterapijske strategije doprinio je razvoj cjepiva koje sadrži, umjesto tumorskih, ljudske dendritičke stanice (DC). Izolirane DC stanice se *ex vivo* genetički modificiraju uvođenjem gena za tumorske antigene te koriste kao cjepivo za indukciju obrambenog sustava (Timmerman i Levy, 1999; Gilboa, 2007). Razlog njihove primjene u cjepivima leži u činjenici da se radi o najučinkovitijim antigen – prezentirajućim stanicama (APS) koje u interakciji s T limfocitima dovode do njihove aktivacije i klonalne ekspanzije (Gilboa, 2007; Farkona i sur., 2016; Santos i Butterfield, 2018).

### 2.1.3.2 Inhibicija imunskih kontrolnih točaka

Jedna od brojnih strategija bijega od imunskog nadzora uključuje proizvodnju molekula koje se vežu na inhibitorne receptore odnosno kontrolne točke imunskog sustava (Farkona i sur., 2016). Ova forma imunoterapije koristi se u liječenju tumora pluća ne-malih stanica (eng. *non-small cell lung cancer*), melanoma, tumora bubrežnih stanica (eng. *renal cell cancer*) te gastrointestinalnih tumora (Buchbinder i Desai, 2016; Wieder i sur., 2018).

Imunosne kontrolne točke (engl. *immune checkpoints*) su regulatorni proteini koji mogu aktivirati ili inhibirati aktivaciju T limfocita. Sudjeluju u prevenciji autoimunog odgovora odnosno održavanju autotolerancije u perifernim tkivima kako bi se smanjilo kolateralno oštećenje zdravog tkiva tijekom odvijanja imunoreakcije (Pardoll, 2012). Ključne imunosne kontrolne točke predstavljaju inhibitorni receptori CTLA-4 (antigen 4 povezan s aktivnošću citotoksičnih T-limfocita), PD-1 (programirana stanična smrt-1) te PD-L1 (ligand 1 programirane stanične smrti) koji se nalaze na površini T limfocita. Brojna istraživanja su pokazala da njihovo selektivno blokiranje dovodi do snažnog antitumorskog odgovora te poboljšanja u sveukupnom preživljavanju. Odobreno je nekoliko terapijskih lijekova poput ipilimumaba koji djeluje na CTLA-4 te pembrolizumaba i nivolumaba koji djeluju na PD-1 receptor (Buchbinder i Desai, 2016).

Oba receptora uzrokuju inhibiciju aktivnosti T limfocita vezivanjem na odgovarajuće receptore na površini antigen-prezentirajućih stanica (APC). Do početne aktivacije T limfocita dolazi uslijed prepoznavanja antigena predloženog pomoću kompleksa MHC na površini APC stanica pomoću receptora T stanica (eng. *T cell receptor*, TCR) na površini T limfocita. Međutim, da bi se T limfocit u potpunosti aktivirao potrebna je indukcija dodatnog kostimulacijskog signala koja se ostvaruje vezivanjem koreceptora na površinama APC i T stanica. Vezivanje CTLA-4, umjesto CD28 proteina T limfocita na receptore B7-1 i B7-2 APC stanica dovodi do inaktivacije T limfocita blokiranjem daljnje kostimulacije te degradacije receptora B7-1 i B7-2 (Slika 3). Protein PD-1, prisutan na površini T limfocita na sličan način inhibira aktivnost T limfocita, vezivanjem na svoje ligande PD-L1 i PD-L2 prisutnima na površinama APC i tumorskih stanica (Buchbinder i Hodi, 2015).



**Slika 3.** Usporedni prikaz aktivacije i inhibicije T stanica. Dok je za početnu aktivaciju T limfocita potrebna interakcija između receptora T stanica (eng. *T cell receptor*, TCR) na površini T limfocita i antigen prezentirajućeg kompleksa MHC (engl. *Major Histocompatibility Complex*), za potpunu je potreban dodatni kostimulatorni signal ostvaren interakcijom između receptora CD28 T stanica i receptora B7 APC stanica. Kompetitivno vezivanje CTLA-4 proteina na B7 receptor dovodi do inaktivacije T limfocita. Kako do inaktivacije ipak ne došlo, potrebno je uvođenje anti-CTLA-4 antitijela koji blokira djelovanje CTLA-4 proteina (preuzeto iz: Buchbinder i Hodi, 2015)

### 2.1.3.3 Adoptivna terapija stanicama

Adoptivna terapija stanicama (engl. *adoptive cell therapy*, ACT) je obećavajući oblik imunoterapije koji se temelji na genetskom modificiranju pacijentovih imunskih stanica. Cilj terapije je nadvladavanje tolerancije imunskog sustava prema tumorskim antigenima te proizvodnja velike količine selektivnih i učinkovitih T limfocita. Rekombinantni T limfociti imaju sposobnost savladavanja imunosupresivnog tumorskog mikrookoliša koji često onemogućuje njihovu aktivnost (Farkona i sur., 2016).

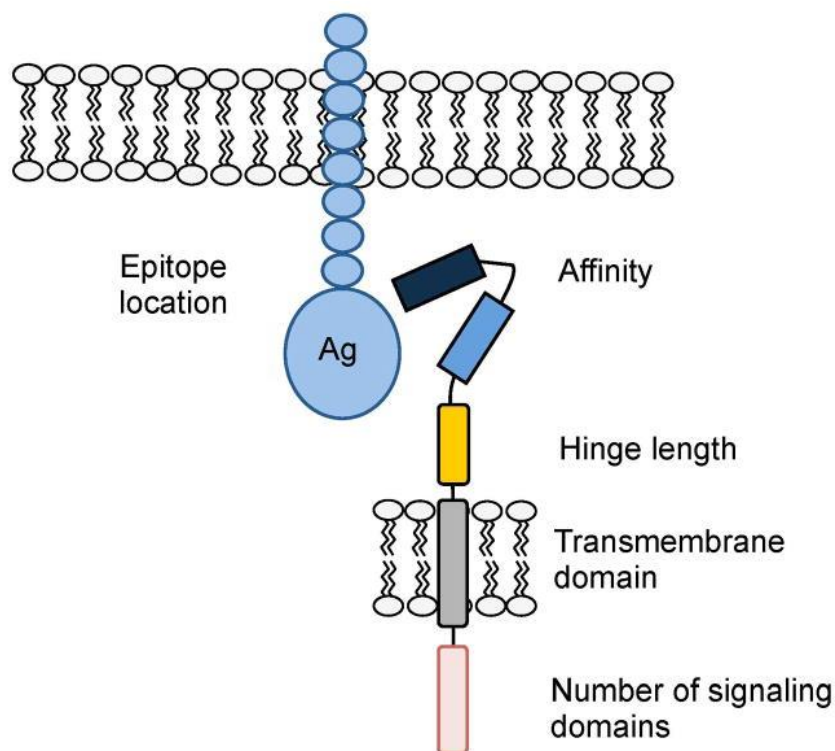
Limfociti korišteni u terapiji se najčešće izoliraju iz pacijentove krvi, tumorskih tkiva ili iz limfnih čvorova koji ispuštaju tumore (eng. *tumor draining lymph node*). Potom slijedi *ex vivo* rekombinacija i propagacija te vraćanje stanica u krvotok pacijenta (Aravalli i Steer, 2017). Pokazano je da uništavanje limfocita (eng. *lymphodepletion*) pacijenta neposredno prije infuzije rekombinantnih T limfocita dovodi do jačanja antitumorskog odgovora te do poboljšanja terapijske učinkovitosti ACT terapije i potpune represije tumora (Wrzesinski i sur., 2010). Mehanizam djelovanja bazira se na uništavanju imunosupresivnih stanica poput Treg i mijeloidnih supresorski dobivenih stanica (eng. *myeloid-derived suppressor cell*, MDSC) koje blokiraju djelovanje prirodnih stanica ubojica te povećanju razine citokina interleukina-7 (IL-7) i interleukina-5 (IL-5) koji stimuliraju aktivnost T stanica (Farkona i sur., 2016).

U klinička istraživanja su uključene dvije strategije ACT terapije: terapija genetički modificiranih receptora T stanica i terapija kimernih antigenskih receptora (eng. *chimeric antigen receptor*, CAR). Glavnu razliku između terapija predstavlja struktura receptora. Terapija CAR-T se koristi TCR receptorima sa fuzioniranom imunoglobulin (Ig) varijabilnom domenom. Ovakvi rekombinantni receptori koriste sposobnost fuzioniranih antitijela u prepoznavanju antigena prisutnih na površinama tumorskih stanica (Farkona i sur., 2016).

## 3. Stanična terapija CAR-T

### 3.1. Struktura CAR

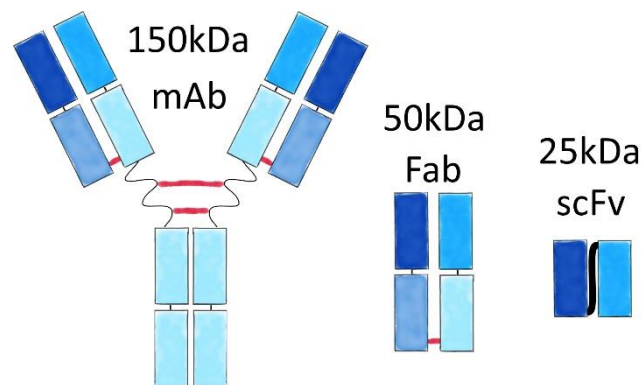
CAR omogućavaju specifično prepoznavanje tumorskih antigena kao i aktivaciju T stanica (Sadelain i sur., 2013). Sastoje se od tri temeljna dijela: izvanstanične domene za specifično prepoznavanje tumorskih antigena, transmembranske domene i unutarstanične domene za aktivaciju T limfocita koja može sadržavati jednu, dvije ili tri signalne domene ovisno o kojoj je generaciji receptora CAR riječ (Slika 4) (Neelapu i sur., 2017; Zhang i sur., 2017).



**Slika 4.** Prikaz sastavnih dijelova strukture kimernog antigenskog receptora (CAR). CAR se sastoji od ektodomene koja sadrži scFv (eng. *single-chain fragment variable*) regiju za prepoznavanje antigena (Ag) na površini tumorskih stanica te razmaknicu različite duljine i fleksibilnosti. Na nju je vezana transmembranska domena važna u održavanju stabilnosti receptora. Na unutrašnjoj strani membrane nalazi se endodomena koja sadrži jednu ili više signalnih i kostimulirajućih domena (preuzeto iz: Dotti i sur., 2013).

### 3.1.1. Ektodomena

Izvanstanična domena, odnosno ektodomena, sastoji se od signalnog peptida, regije za prepoznavanje i razmaknice. Ulogu regije za prepoznavanje antigena i signalnog peptida najčešće ima jednolančani varijabilni fragment (eng. *single-chain fragment variable*, scFv) (Zhang i sur., 2017). Fragment se sastoji od teškog i lakog lanca povezanih savitljivom spojnicom koja omogućuje sklapanje lanaca u nativnu terciarnu strukturu. scFv je nastao od promjenjivog antigen vezujućeg fragmenta (eng. *antigen binding fragment*, Fab), koji čini značajan dio strukture monoklonskih antitijela (eng. *monoclonal antibody*, mAb), važnog za specifično visokoafinitetno vezanje ciljanih antigena (Slika 5) (Ramos i Dotti, 2011).



**Slika 5.** Usporedba strukture i molekularne mase između monoklonskog protutijela (eng. *monoclonal antibody*, mAb), antigen vezujućeg fragmenta (eng. *antigen binding fragment*, Fab) te jednolančanog varijabilnog fragmenta (eng. *single-chain fragment variable*, scFv) (preuzeto iz: <https://bathasu.com/research/adcs-pipeline-and-progress/>).

Dio strukture koji spaja antigen vezujuću (eng. *antigen binding*) i transmembransku domenu funkcionalnog receptora naziva se razmaknica ili zglob (eng. *hinge*). Najčešće korištene razmaknice su zglobne CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> regije imunoglobulina G1 (IgG1) (Ramos i Dotti, 2011; Zhang i sur., 2017). Razlike u fleksibilnosti i duljini razmaknice mogu znatno utjecati na učinkovitost CAR-T stanica. Istraživanjem je utvrđeno da dodavanje razmaknice kimernim receptorima za prepoznavanje karcinoembrijskog antigena (eng. *carcinoembryonic antigen*, CEA) i neuralne male adhezijske molekule (eng. *neural small adhesion molecule*, NCAM) dovodi do smanjenja efektorske učinkovitosti. Međutim, kod mnogih tumora, koji sadrže epitope koji se nalaze neposredno uz membranu stanice, potrebne su dulje razmaknice koje mogu učinkovitije vezivati dotične antigene (Ramos i Dotti, 2011; Dotti i sur., 2013). Stoga je potrebno za svaki CAR utvrditi optimalnu duljinu razmaknice koja će omogućiti najbolji terapijski učinak.



### 3.1.2. Transmembranska domena

Transmembranska domena, hidrofobni alfa heliks koji se pruža kroz staničnu membranu, značajno doprinosi receptorskoj stabilnosti i efektorskoj funkciji. Sastoji se od dijelova CD3 $\zeta$ , CD4, CD8 ili CD28 molekula (Dotti i sur., 2013; Zhang i sur., 2017).

### 3.1.3. Endodomena

Endodomena odnosno unutarstanična signalna domena se najčešće sastoji od molekule CD3 $\zeta$  koja predstavlja sastavni dio kompleksa TCR– CD3. Molekula CD3 $\zeta$  sadrži tri aktivacijska motiva temeljena na tirozinu (eng. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, ITAM), značajnih signalnih komponenti čije mutiranje dovodi do opadanja receptorske funkcionalnosti, a fosforilacija do stanične aktivacije (Zhang i sur., 2017; Bridgeman i sur., 2014). Endodomena također može sadržavati i dodatne kostimulirajuće domene koje pridonose receptorskoj učinkovitosti u aktivaciji signalnih kaskada (Bridgeman i sur., 2014; Dotti i sur., 2013).

### 3.1.4. Karakterizacija kimernih receptora

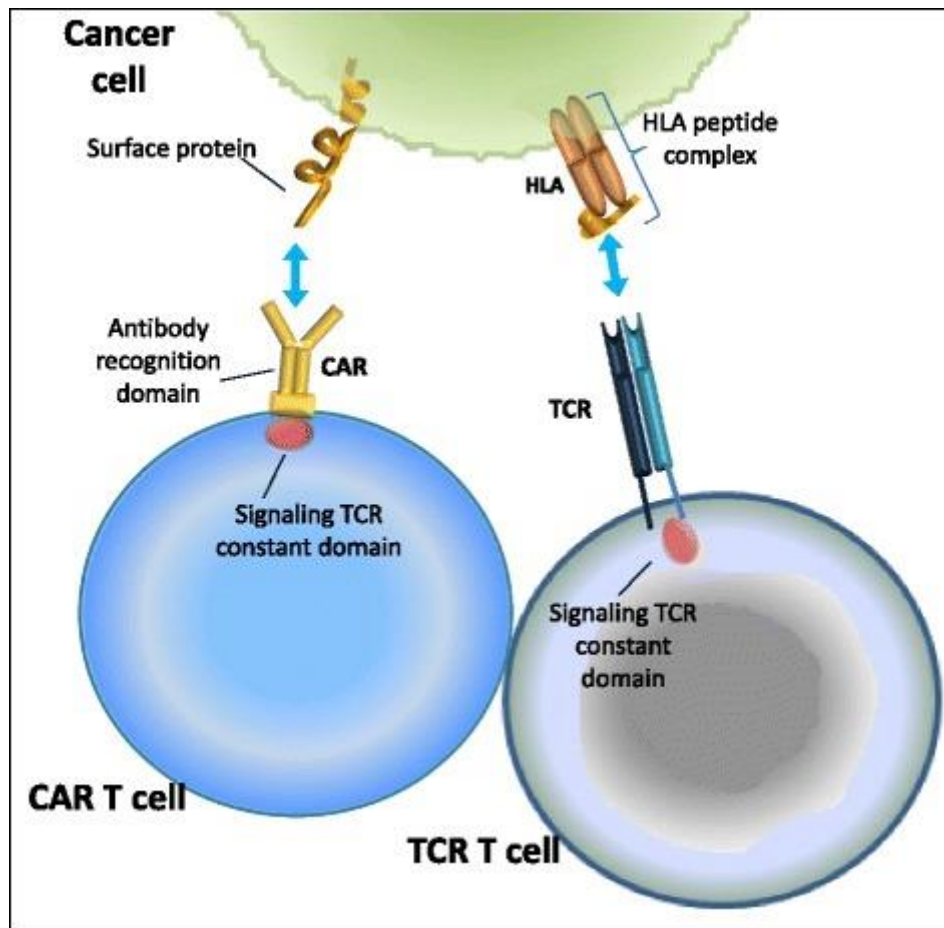
Interakcije koje se uspostavljaju između domena receptora značajno utječu na cjelokupnu učinkovitost efektor, stoga je potrebno provesti podrobna empirijska istraživanja prilikom svake nove sinteze kimernog antigenskog receptora. Bolje razumijevanje i poznavanje strukture i funkcije pojedinih komponenata receptora omogućiti će nastanak djelotvornijih receptora za terapijske svrhe (Sadelain i sur., 2003; Dotti i sur., 2013).

## 3.2. Prednosti i nedostaci upotrebe kimernih receptora

Jedna od glavnih strategija izbjegavanja djelotvornog imunskog odgovora domaćina sastoji se od redukcije ili izostanka ekspresije antigena glavnoga sustava tkivne snošljivosti klase I na površini tumorskih stanica. Budući da T limfociti mogu prepoznati samo antigene vezane na kompleks MHC, odsutnost MHC molekula onemogućuje identifikaciju i uništavanje tumorskih stanica (Aravalli i Steer, 2017; Khanna, 1998). Stoga prednost receptora CAR, naspram običnih receptora T limfocita, predstavlja sposobnost prepoznavanja antigena koji se samostalno nalaze na površini tumorskih stanica što dovodi do savladavanja tumorskog mehanizma bijega od imunskog sustava (Slika 6) (Wang i sur., 2016; Aravalli i Steer, 2017). Međutim, ova prednost je ujedno i mana iz razloga što scFv domena onemogućava prepoznavanje unutarstaničnih antigena (Chmielewski i sur., 2013). Endogene antigene procesiraju i prezentiraju MHC-I molekule čime klasične T stanice pomoću receptora TCR mogu detektirati brojne stanične znakove bolesti (Dotti i sur., 2013). Ono što omogućava da CAR identificiraju širok spekter antigena, usprkos prethodno navedenog nedostatka, predstavlja sposobnost vezivanja ne samo na proteine, nego i na brojne druge molekule poput ugljikohidrata, glikolipida i lipida (Sadelain i sur., 2013; Wilkins i sur., 2017).

Još jednu prednost upotrebe molekula CAR predstavlja činjenica da one ne dimeriziraju prilikom pokretanja stanične aktivacije (Bachmann i Ohashi, 1999). Zbog toga ne postoji rizik od pogrešnog sparivanja komplementarnih lanaca do kojeg dolazi prilikom ekspresije rekombiniranih i izvornih lanaca TCR u stanici. Nepravilna dimerizacija dovodi do reducirane sposobnosti detekcije tumorskih antigena te do krivog odnosno tzv. *off-target* prepoznavanja uslijed kojeg dolazi do uništavanja zdravih stanica (Ramos i Dotti, 2011).

Kimerni receptori za razliku od receptora TCR mogu aktivirati i CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T limfocite. Aktivirane pomoćničke T stanice – CD4<sup>+</sup> stanice doprinose aktivnosti imunskih stanica proizvodnjom citokina, dok citotoksični T limfociti - CD8<sup>+</sup> stanice sudjeluju u aktivnom pretraživanju i uništavanju oštećenih i mutiranih stanica. Aktivacija različitih vrsta stanica doprinosi razvijanju jačeg i postojanijeg imunskog odgovora organizma (Sadelain i sur., 2013).



**Slika 6.** Usporedba CAR-T i TRC-T stanične terapije. Obje terapije koriste genetički modificirane receptore koji specifično i efektivno prepoznaju receptori uz TCR konstantne domene sadrže i varijabilnu imunoglobulinsku domenu pomoću koje mogu identificirati bilo koji potencijalni antigen na površini stanice koji nije vezan za kompleks MHC. Za razliku od receptora CAR, receptori TCR nemaju sposobnost prepoznavanja antigena u slobodnoj formi već onih vezanih na MHC odnosno kompleks HLA (eng. *human leucocyte antigen*) (preuzeto iz: Farkona i sur., 2016).

### 3.3. Unos gena CAR u stanice imunskog sustava

Razvijene su brojne metode za *ex vivo* rekombiniranje T limfocita (Smith i sur., 2016). Pri odabiru pogodnog vektora za unos gena CAR u obzir se uzimaju mnogobrojni faktori poput razine i stabilnosti genske ekspresije, sigurnosti, jednostavnosti i cijene proizvodnje vektora (Sadelain i sur., 2013). Jedan od ključnih ciljeva je postizanje konstitutivne ekspresije kimernih receptora čime bi se osigurao doživotni terapijski učinak T stanica (Ramos i Dotti, 2011).

#### 3.3.1. Virusni vektori

Najzastupljenija strategija unosa gena bazira se na upotrebi gamaretrovirusa ili lentivirusa. Oba virusa pripadaju u obitelj virusa *Retroviridae* koji kao svoj genetički materijal sadrže molekulu RNA. Razlikuju se u sposobnosti infekcije različitih vrsta stanica. Dok lentivirusi inficiraju stanice u mirovanju, gamaretrovirusi uspješno inficiraju stanice u diobi. Također, obje vrste virusa djelotvornije integriraju svoje genome unutar dijelećih stanica (eng. *dividing cells*). U kliničkim istraživanjima se najviše upotrebljava virus mišje leukemije (eng. *murine leukemia viruses*, MLV) i virus humane imunodeficijencije-1 (eng. *Human immunodeficiency virus-1*, HIV-1) (Sadelain i sur., 2013; Ramos i Dotti, 2011).

Retrovirusi imaju jedinstven mehanizam replikacije. Neposredno nakon ulaska virusnog genetičkog materijala u stanicu slijedi njegova reverzna transkripcija te insercija u genom domaćina. Navedene procese kataliziraju virusni enzimi: reverzna transkriptaza te integraza. U genskoj terapiji se koriste rekombinirani virusni vektori koji ne sadrže gene potrebne za njihovu proliferaciju te stoga ne dovode do lize stanica u koje su uneseni (Ramos i Dotti, 2011). Budući da se gamaretrovirus preferentno ugrađuje na mjesta aktivne transkripcije u genomu, postoji velika opasnost od insercijske mutageneze (Wu i sur., 2003). Taj je rizik eliminiran upotrebom lentivirusa čija je vjerojatnost indukcije mutageneze znatno manja. Iz tog se razloga u istraživanjima češće upotrebljavaju lentivirusi (Zhang i sur., 2017).

T limfociti, koje se virusnim vektorima treba transducirati, većinu se vremena nalaze u stadiju mirovanja, te ih je stoga potrebno prethodno *in vitro* aktivirati. Aktivacija se može izvesti na dva načina (Frauworth i Thompson, 2002). Prvi uključuje upotrebu monoklonskih protutijela anti-CD3 zvanih Muromonab-CD3 (engl. *Muromonab-CD3*, *Otrochlone OKT3*). Ova protutijela specifično prepoznaju i vežu kompleks TCR-CD3 na površini T limfocita te dovode

do inicijalne aktivacije. Aktivaciji i proliferaciji limfocita značajno doprinose dodatni kostimulacijski signali koji nastaju sparivanjem još jedne vrste unesenih monoklonskih antitijela sa CD28 receptorima na površini T stanica (Frauwirth i Thompson, 2002; Trickett i Kwan, 2003; Ramos i Dotti, 2011). Drugi način aktivacije bazira se na selektivnoj aktivaciji pomoću antigen-prezentirajućih stanica (APC). Uslijed identifikacije antigena, pojedini se T limfociti aktiviraju i počnu dijeliti, dok ostatak ostaje u stadiju mirovanja. Najčešće korištene antigen-prezentirajuće stanice u aktivaciji su dendritičke stanice, stanice limfoblastoidne stanične linije (eng. lymphoblastoid cell lines, LCL) i umjetne antigen-prezentirajuće stanice (eng. *artificial antigen-presenting cells*, AAPC) (Zhang i sur., 2017; Ramos i Dotti, 2011; Sadelain i sur., 2013).

### 3.3.2. Nevirusni vektori

Retrovirusna transdukcija omogućuje dugoročnu, stabilnu ekspresiju uvedenih genetskih elemenata što je čini veoma poželjnom i djelotvornom metodom unosa gena. Međutim, mogućnost nastanka insercijske mutageneze i aktivacije onkogeni dovodi u pitanje njezinu sigurnost (Anson, 2004). Visoka cijena proizvodnje virusnih vektora te nemogućnost inficiranja stanica u mirovanju doprinijele su upotrebi drugih, ne-virusnih metoda (Zhang i sur., 2017; Ramos i Dotti, 2011).

Transpozoni, tzv. *jumping genes* koji uz retroviruse omogućuju inserciju svojeg genetičkog materijala u genom stanice, su također pronašli primjenu u genskoj terapiji CAR-T. Najkorišteniji transpozonski sustavi su *Sleeping Beauty* i *PiggyBac*. Njihova primjena uključuje dvostruku transfekciju. Prvom se unosi željeni gen CAR, dok se drugom prenosi gen za transpozazu, enzim potreban za ugradnju gena CAR u jezgrinu DNA domaćina (Ramos i Dotti, 2011; Sadelain i sur., 2013; Zhang i sur., 2017). Budući da se radi o pokretnim genetičkim elementima, postoji opasnost od njihovog premještanja u genomu i insercijske mutageneze (Zhang i sur., 2017).

Druge ne-virusne metode uključuju elektroporaciju, mRNA transfekciju i konjugaciju stanične površine (eng. *cell surface conjugation*) koje ne dovode do insercije transgena. Nedostaci ovih metoda poput manje učinkovitosti unosa gena u stanice te postupnog utišavanja unesenih gena zbog izostanka njihove integracije u genom domaćina, pokušavaju se eliminirati osmišljavanjem novih te unapređivanjem starih tehnika (Ramos i Dotti, 2011; Sadelain i sur.,

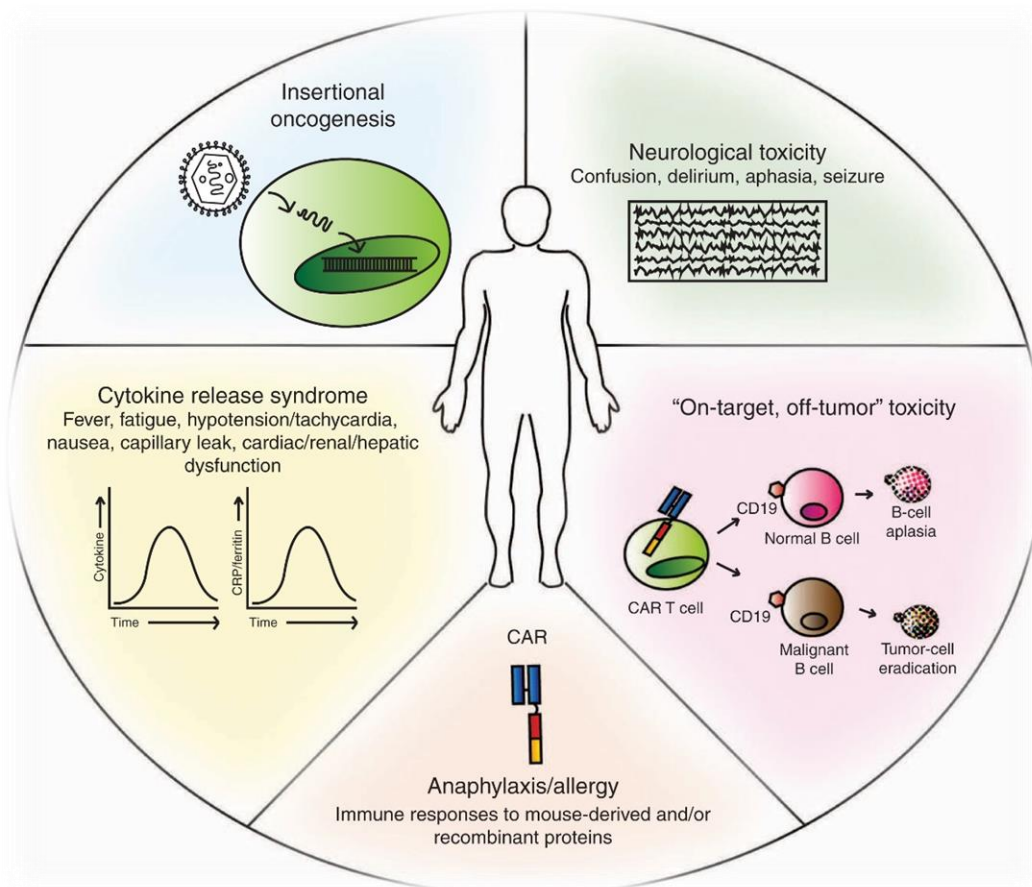
2013). Vremensko ograničenje terapijskog učinka može potencijalno predstavljati prednost ne-virusnih metoda uslijed sprječavanja akumulacije T limfocita a time i razvijanja sindroma otpuštanja citokina kao i kolateralnog razaranja zdravih stanica (Smith i sur., 2016).

### 3.3.3. Selekcija modificiranih stanica

Nakon rekombinacije T limfocita, potrebno je selektivno odvojiti one sa stabilnom CAR genetičkom informacijom od onih kod kojih izostaje ekspresijska CAR kazeta. Prvotna metoda odvajanja temeljila se na upotrebi selektivnih markera poput antigena na staničnoj površini ili gena za rezistenciju na antibiotike. Međutim, potencijalna imunogeničnost markera bi onemogućila opstanak rekombiniranih stanica u organizmu. Stoga je razvijena alternativna metoda koja se zasniva na ekspresiji receptora za citokin interleukin-4 (IL-4). Inkubacija transformiranih T stanica u prisustvu IL-4 omogućuje efektivniju proliferaciju onih limfocita koji na površini svojih stanica sadrže receptore za navedeni citokin. Isti je učinak opažen *in vivo* ukoliko se, nakon unosa rekombiniranih T limfocita u organizam, unosi citokin (Ramos i Dotti, 2011).

### 3.4. Uklanjanje nepoželjnih nuspojava

Usprkos kliničke djelotvornosti, terapija CAR-T može uzrokovati ozbiljne nuspojave te se zbog toga koristi u liječenju pacijenata kod kojih konvencionalne metode liječenja nisu bile učinkovite. Nuspojave terapije CAR-T uključuju sindrom otpuštanja citokina (CRS) čija visoka koncentracija dovodi do pokretanja upalnih procesa; neurološku toksičnost; anafilaksiju; insercijsku mutagenozu te tkz. *on-target*, *off-tumor* toksičnost koja dovodi do kolateralnog uništenja zdravog tkiva (Slika 7) (Bonifant i sur., 2016; Wilkins i sur., 2017).



**Slika 7.** Prikaz potencijalnih toksičnih učinaka terapije CAR-T. Toksičnost može izazviti: insercijska mutageneza vektorskom ugradnjom unutar aktivnih gena, prekomjerno otpuštanje citokina (eng. *cytokine release syndrome*, CRS), neurološka toksičnost, anafilaksija te tzv. *on-target*, *off-tumor* toksičnost (preuzeto iz: Bonifant i sur., 2016).

Danas su u tijeku brojna klinička istraživanja koja proučavaju djelotvornost strategija ublažavanja toksičnih učinaka CAR-T stanica (Bonifant i sur., 2016). Jedan od glavnih nedostataka terapije predstavlja kolateralno oštećenje tkiva nastalo uslijed tzv. *on-target*, *off-tumor* toksičnosti.

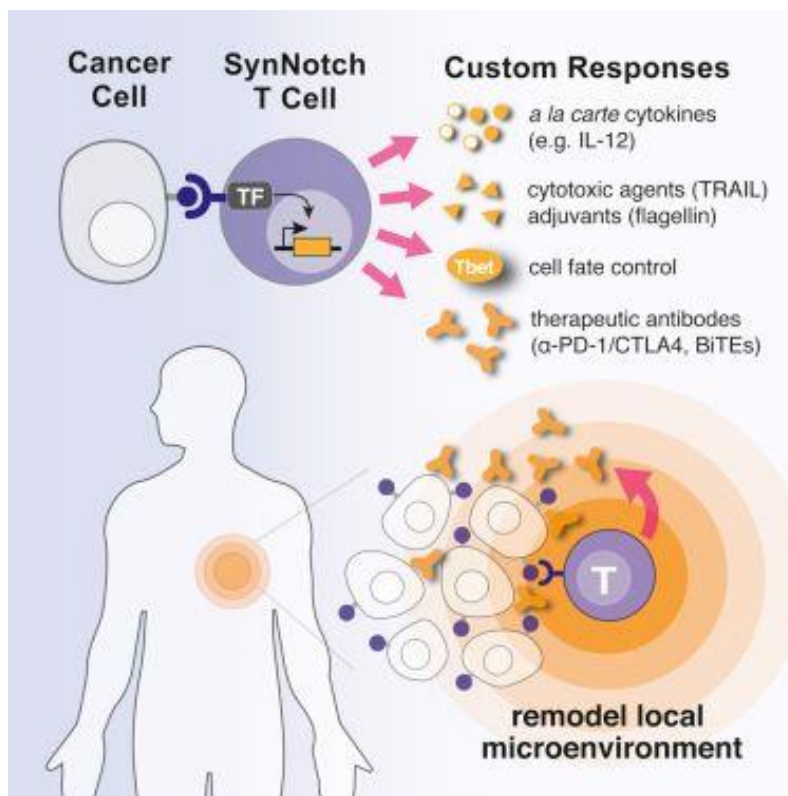
Budući da postoji relativno malen broj tumor-specifičnih antigena, većina CAR-T stanica selektivno cilja učestalije tumor-asocirajuće antigene koji se osim na površini tumorskih, nalaze i na površini zdravih stanica. Primjerice, ROR1 (eng. *receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1*), visoko eksprimirani tumor-asocirajući receptor na površini B stanica kronične limfocitne leukemije, je također prisutan i na površini adipocitnih stanica (Hudecek i sur., 2010; Sadelain i sur., 2013). Za brojne je druge receptore poput her2 (eng. *human epidermal growth factor receptor 2*), PSMA (eng. *prostate-specific membrane antigen*) i MART-1 (eng. *melanoma antigen recognized by T cells-1*) također utvrđena prisutnost na površinama zdravih tkiva (Ramos i Dotti, 2011; Sadelain i sur., 2013). S obzirom da CAR-T stanice ne diskriminiraju između normalnih i tumorskih stanica ukoliko je na njihovim površinama prisutan ciljni receptor, posljedice terapije mogu biti životno opasne. Kako bi se izbjeglo kolateralno oštećenje zdravog tkiva razvijaju se tehnike preciznijeg ciljanja tumorskih stanica. Većina se bazira na modifikaciji strukture kimernih te uvođenju dodatnih receptora na površinu T limfocita (Sadelain i sur., 2013).

#### 3.4.1. Upotreba SynNotch receptora

S ciljem razvijanja preciznijih mehanizama stanične aktivacije i kontrole, sintetizirani su umjetni Notch receptori (eng. *synthetic Notch receptor*, synNotch), koji promjenom konfiguracije uslijed prepoznavanja tumorskih antigena, dovode do pokretanja brojnih staničnih odgovora (Roybal i sur., 2016b; Cho i sur., 2018). Prilikom prepoznavanja jedne vrste tumor-asocirajućih antigena, synNotch receptori aktiviraju transkripciju CAR kazete za kimerni receptor specifičan za neku drugu vrstu. Ovime je razvijena kombinatorijalna antigenska detekcija. Sustav dvostukih receptora dovodi do aktivacije T limfocita jedino ukoliko dođe do prepoznavanja odgovarajućih dvostrukih antigena na površini tumorske stanice (Roybal i sur., 2016a).

SynNotch receptori imaju sposobnost, osim regulacije transkripcije CAR kazete, prepoznavanja i modificiranja mikrookoliša aktivacijom brojnih staničnih puteva (Slika 8). Sposobnost proizvodnje i sekrecije molekula, poput “a la carte” citokina, terapijskih antitijela, citotoksičnih metabolita, imunosupresora te brojnih drugih, koje na raznovrsne načine djeluju na okoliš u kojemu se nalaze predstavlja veliki potencijal ove vrste receptora u liječenju mnogih drugih bolesti (Roybal i sur., 2016a).





**Slika 8.** Prikaz djelovanja synNotch (eng. *synthetic Notch*) receptora. Umjetni Notch receptori mogu uslijed prepoznavanja tumor-asocirajućeg antigena vrlo precizno i lokalizirano aktivirati brojne stanične puteve. Stanični odgovori uključuju diferencijaciju T limfocita te sekreciju “a la carte” citokina, terapijskih antitijela, citotoksičnih metabolita, imunosupresora te brojnih drugih molekula (preuzeto iz: Roybal i sur., 2016b).

### 3.4.2. Upotreba sigurnosnih prekidača

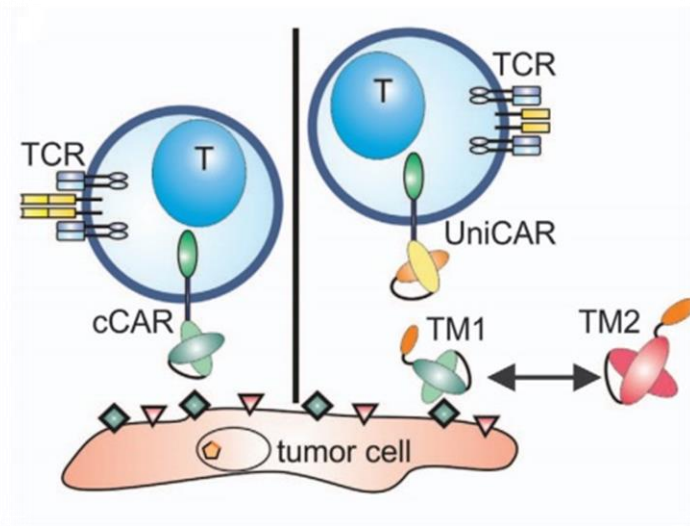
Drugi mehanizam redukcije tzv. *on-target, off-tumor* toksičnosti temelji se na ugrađivanju prekidača koji u interakciji sa lijekovima kontroliraju paljenje i gašenje aktivnosti receptora. Prekidači aktivacije mogu postojati kao dodatni receptori na površini stanica ili biti dijelom molekule CAR. Rizik od potencijalne imunogeničnosti, nastanak neuravnoteženog omjera prekidača i molekula CAR koji u konačnici može rezultirati potpunim izostankom prekidača iz pojedinih CAR-T stanica predstavljaju samo neke od razloga preferentne upotrebe sigurnosnih prekidača integriranih unutar strukture CAR (Valton i sur., 2018).

#### 3.4.2.1. UniCAR konstrukt

Primjer jedne vrste prekidača predstavlja jedinstveni kimerni antigenski receptor (eng. *unique chimeric antigen receptor*, UniCAR) koji se sastoji od dvije domene: domene CAR te domene za vezanje ciljog modula (eng. *target module*, TM). Domena CAR sadrži sparane CD28 i CD3 $\zeta$  unutarstanične signalne proteine dok vezujuća domena TM sadrži scFv fragment koji nalikuje

fragmentu klasičnog kimernog receptora. Međutim, ovaj se scFv fragment razlikuje u domeni za prepoznavanje antigena jer isključivo omogućava detekciju malog fragmenta od svega 10 aminokiselina prisutnog na molekuli TM (Cartellieri i sur., 2016).

Molekule TM, kao posrednici prepoznavanja tumorskog antigena i UniCAR molekule, sadrže dvije domene za prepoznavanje i vezivanje: jednu specifičnu za UniCAR, a drugu za tumorski epitop. Korištenje molekula TM modificiranih u domeni za vezivanje tumorskog epitopa, omogućuje T limfocitu s UniCAR sustavom prepoznavanje različitih tumorskih antigena (Slika 9) (Loff i sur., 2016; Cartellieri i sur., 2016; Dietrich i sur., 2017). Također, molekule TM upravljaju i vremenskom aktivacijom UniCAR-T stanica koje su, prije njihova vezanja, inaktivne (Cartellieri i sur., 2016; Dietrich i sur., 2017). Budući da molekule TM sadrže peptidni motiv iz ljudskog jezgrinog autoantigena La/SS-B, prisustvo endogenog La proteina predstavljalo je potencijalnu opasnost od aktivacije molekule UniCAR uslijed prepoznavanja sa proteinom. Međutim, istraživanja na miševima, čije stanice također eksprimiraju proteine sa motivom korištenim u molekulama TM, pokazala su da do aktivacije receptora a time i tzv. *off-tumor, on-target* toksičnosti nije došlo (Cartellieri i sur., 2016).



**Slika 9.** Shematski prikaz usporedbe različitih sistema prepoznavanja antigena između CAR-T i UniCAR-T stanica. Lijeva strana prikazuje standardni CAR (eng. *conventional CAR*, cCAR) koji direktno prepoznaje tumorske antigene na površini tumorskih stanica dok se na desnoj strani nalazi jedinstveni CAR (eng. *unique chimeric antigen receptor*, UniCAR) koji tumorske antigene prepoznaje posredno pomoću molekula ciljnih modula (eng. *target module*, TM). Modificirane TM molekule (TM1, TM2) prepoznaju i vežu različite tumorske epitope (preuzeto iz: Cartellieri i sur., 2016).

Glavna prednost ove metode je reverzibilna i brza kontrola stanične aktivnosti u ovisnosti o prisustvu molekula TM. Jednostavna i kratkotrajna proizvodnja molekula TM omogućuje njihovo efektivno sintetiziranje i modificiranje uslijed mutacija tumorskih antigena. UniCAR stanice ne izazivaju autoimunost te se sve potencijalne opasnosti mogu prethodno testirati na miševima kao pokusnim *iv vivo* modelima (Loff i sur., 2016; Cartellieri i sur., 2016).

### **3.4.2.2. CubiCAR konstrukt**

Drugi sustav sigurnosnih prekidača predstavlja CubiCAR, modificiranu molekulu CAR koja uslijed prepoznavanja Rituksimab protutijela dovodi do samouništenja limfocita u kojemu je eksprimirana. Rituksimab je FDA (eng. *Food and Drug Administration*) odobreni lijek kojeg specifično vežu CD20 mimotopi CubiCAR-T stanica. CubiCAR konstrukt je ime dobio prema broju funkcija koje posjeduje. Sadrži sposobnost aktivacije samouništenja, jednostavne selekcije i pročišćavanja limfocita u kojemu je eksprimiran (Valton i sur., 2018).

CubiCAR-T stanice su usprkos rekombiniranja zadržale jednaku sposobnost umnožavanja i antitumorskog djelovanja. Također, modificiranje receptora je omogućilo njihovo jednostavno prepoznavanje i izolaciju pomoću GMP (eng. *good manufacturing practice*) – kompatibilnih antitijela što doprinosi komercijalnoj proizvodnji CubiCAR-T stanica. Ovaj sustav, kao i prethodni, omogućuje veću kontrolu aktivnosti CAR-T stanica te sigurniju primjenu CAR-T terapije u kliničkim istraživanjima (Valton i sur., 2018).

## 4. Zaključak

Upotreba CAR-T stanica se ispostavila izrazito učinkovitom terapijom u liječenju zloćudnih hematopoetskih bolesti dovodeći i do potpune remisije tumora. Međutim, postoje brojni nedostaci i prepreke koje terapija CAR-T mora prijeći kako bi postala standardnom metodom liječenja uz kirurgiju te kemo- i radioterapiju. Kompleksan i dugotrajan proces priprave CAR-T stanica, visoki troškovi tretmana, te ograničena primjena terapije namijenjena jedino liječenju pojedinih vrsta leukemija i limfoma i uske kategorije pacijenata točno određene dobi i stadija bolesti upućuju na činjenicu da se radi o terapiji čiji se razvoj nalazi tek u začetima. Također, CAR-T stanice dovode do ispoljavanja niza ozbiljnih a ponekad i po život opasnih toksičnih nuspojava. Kako bi se terapija CAR-T mogla primjenjivati u širem spektru bolesti te većem broju potencijalnih pacijenata potrebno je daljnje razvijanje terapije veće specifičnosti, učinkovitosti i sigurnosti. Upotreba SynNotch receptora i sigurnosnih prekidača, primjera novih generacija CAR-T stanica s izmijenjenim dizajnom receptora, dovela je do veće kontrole aktivacije T limfocita i stjecanja sposobnosti modeliranja tumorskog mikrokoliša. Unaprijeđivanje procesa proizvodnje odabirom i konstrukcijom djelotvornijih vektora te razvijanje univerzalne terapije dovode do redukcije visoke cijene personaliziranog terapijskog pristupa. Dakle, daljnja će istraživanja zasigurno poboljšati ishod i dostupnost terapije CAR-T te će doprinijeti daljnjoj revolucionarizaciji imunoonkologije.

## 5. Literatura

- Al-Dosari, M. and Gao, X. (2009). Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *The AAPS Journal*, 11, 671-681.
- Amer, M. (2014). Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Molecular and Cellular Therapies*, 2, 27.
- Anson, D. (2004). The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery. *Genetic Vaccines and Therapy*, 2, 1-13.
- Aravalli, R. and Steer, C. (2017). Immune-mediated therapies for liver cancer. *Genes*, 8, 76.  
<https://bathasu.com/research/adcs-pipeline-and-progress/> [Pristupljeno 13.07.2018].
- Bhang, H., Ruddy, D., Krishnamurthy Radhakrishna, V., Caushi, J. and Zhao, R. (2015). Studying clonal dynamics in response to cancer therapy using high-complexity barcoding. *Nature Medicine*, 21, 440-448.
- Bonifant, C., Jackson, H., Brentjens, R. and Curran, K. (2016). Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 3, 16011.
- Buchbinder, E. and Desai, A. (2016). CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities, differences and implications of their inhibition. *American Journal of Clinical Oncology*, 39, 98-106.
- Chmielewski, M., Hombach, A. and Abken, H. (2013). Antigen-specific T-cell activation independently of the MHC: chimeric antigen receptor-redirected T cells. *Frontiers in Immunology*, 11, 371.
- Cho, J., Okuma, A., Al-Rubaye, D., Intisar, E., Junghans, R. and Wong, W. (2018). Engineering Axl specific CAR and SynNotch receptor for cancer therapy. *Scientific Reports*, 8, 3846.
- Collins, M. and Thrasher, A. (2015). Gene therapy: progress and predictions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282, 20143003.
- Cross, D. and Burmester, J. (2006). Gene therapy for cancer treatment: past, present and future. *Clinical Medicine & Research*, 4, 218-227.
- Dotti, G., Gottschalk, S., Savoldo, B. and Brenner, M. (2013). Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunological Reviews*, 257, 107-126.
- Dietrich, J., Loff, S., Meyer, J., von Bonin, M. and Hetzenecker, M. (2017). Targeting leukemia using an inducible universal chimeric antigen receptor (UniCAR) T cell technology. *Cytotherapy*, 19, S9.

- [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news\\_and\\_events/news/2018/06/news\\_detail\\_002983.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2018/06/news_detail_002983.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1) [Pristupljeno 12.07.2018].
- Farkona, S., Diamandis, E. and Blasutig, I. (2016). Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer?. *BMC Medicine*, 14, 73.
- Fillat, C., Carrio, M., Cascante, A. and Sangro, B. (2003). Suicide gene therapy mediated by the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene/ganciclovir system: fifteen years of application. *Current Gene Therapy*, 3, 13-26.
- Fischer, U., Steffens, S., Frank, S., Rainov, N. and Schulze-Osthoff, K. (2004). Mechanisms of thymidine kinase/ganciclovir and cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy-induced cell death in glioma cells. *Oncogene*, 24, 1231-1243.
- <https://www.flickr.com/photos/nihgov/20673870162/in/photostream/> [Pristupljeno 14 .07.2018].
- Fountzilas, C., Patel, S. and Mahalingam, D. (2017). Review: Oncolytic virotherapy, updates and future directions. *Oncotarget*, 8, 102617-102639.
- Frauwirth, K. and Thompson, C. (2002). Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *Journal of Clinical Investigation*, 109, 295-299.
- Gilboa, E. (2007). DC-based cancer vaccines. *Journal of Clinical Investigation*, 117, 1195-1203.
- Hudecek, M., Schmitt, T., Baskar, S., Lupo-Stanghellini, M. and Nishida, T. (2010). The B-cell tumor-associated antigen ROR1 can be targeted with T cells modified to express a ROR1-specific chimeric antigen receptor. *Blood*, 116, 4532-4541.
- Inoo, K., Inagaki, R., Fujiwara, K., Sasawatari, S. and Kamigaki, T. (2016). Immunological quality and performance of tumor vessel-targeting CAR-T cells prepared by mRNA-EP for clinical research. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 3, 16024.
- Khanna, R. (1998). Tumour surveillance: Missing peptides and MHC molecules. *Immunology and Cell Biology*, 76, 20-26.
- Loff, S., Bonin, M., Dietrich, J., Meyer, J. and Feldmann, A. (2016). Abstract B099: The UniCAR system: Inducible CAR T cells for precise reactivity and high efficacy against hematopoietic malignancies. *Cancer Immunology Research*, 4, B099-B099.
- Majhen, D. and Ambriović-Ristov, A. (2006). Adenoviral vectors—How to use them in cancer gene therapy?. *Virus Research*, 119, 121-133.
- Mali, S. (2013). Delivery systems for gene therapy. *Indian Journal of Human Genetics*, 19, 3-8.
- Miest, T. and Cattaneo, R. (2013). New viruses for cancer therapy: meeting clinical needs. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 23-34.

- Neelapu, S., Tummala, S., Kebriaei, P., Wierda, W. and Gutierrez, C. (2017). Chimeric antigen receptor T-cell therapy — assessment and management of toxicities. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15, 47-62.
- Pardoll, D. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12, 252-264.
- Ramos, C. and Dotti, G. (2011). Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 11, 855-873.
- Rosenthal, F., Zier, K. and Gansbacher, B. (1994). Human tumor vaccines and genetic engineering of tumors with cytokine and histocompatibility genes to enhance immunogenicity. *Current Opinion in Oncology*, 6, 611-615.
- Roth, J. and Cristiano, R. (1997). Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going?. *Journal of the National Cancer Institute*, 89, 21-39.
- Roybal, K., Rupp, L., Morsut, L., Walker, W. and McNally, K. (2016a). Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits. *Cell*, 164, 770-779.
- Roybal, K., Williams, J., Morsut, L., Rupp, L. and Kolinko, I. (2016b). Engineering T cells with customized therapeutic response programs using synthetic Notch receptors. *Cell*, 167, 419-432.e16.
- Ruella, M. and Kenderian, S. (2017). Next-generation chimeric antigen receptor T-cell therapy: going off the shelf. *BioDrugs*, 31, 473-481.
- Russell, S., Peng, K. and Bell, J. (2012). Oncolytic virotherapy. *Nature Biotechnology*, 30, 658-670.
- Sadelain, M., Brentjens, R. and Rivière, I. (2013). The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discovery*, 3, 388-398.
- Sadelain, M., Rivière, I. and Brentjens, R. (2003). Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nature Reviews Cancer*, 3, 35-45.
- Santos, P. and Butterfield, L. (2018). Dendritic Cell–Based Cancer Vaccines. *The Journal of Immunology*, 200, 443-449.
- Smith, A., Oertle, J., Warren, D. and Prato, D. (2016). Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy for malignant cancers: Summary and perspective. *Journal of Cellular Immunotherapy*, 2, 59-68.
- Swann, J. and Smyth, M. (2007). Immune surveillance of tumors. *Journal of Clinical Investigation*, 117, 1137-1146.
- Thanou, M., Waddington, S. and Miller, A. (2007). Gene therapy. In: J. Taylor and D. Triggle, ed., *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Elsevier Science, 297–319.

- Thomas, C., Ehrhardt, A. and Kay, M. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*, 4, 346-358.
- Timmerman, J. and Levy, R. (1999). Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annual Review of Medicine*, 50, 507-529.
- Trickett, A. and Kwan, Y. (2003). T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *Journal of Immunological Methods*, 275, 251-255.
- <https://www.utsouthwestern.edu/newsroom/articles/year-2018/car-t-clinical-trials.html> [Pristupljeno 10 .07.2018].
- Valton, J., Guyot, V., Boldajipour, B., Sommer, C. and Pertel, T. (2018). A versatile safeguard for chimeric antigen receptor T-cell immunotherapies. *Scientific Reports*, 8, 8972.
- Vinay, D., Ryan, E., Pawelec, G., Talib, W. and Stagg, J. (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*, 35, S185-S198.
- Vormittag, P., Gunn, R., Ghorashian, S. and Veraitch, F. (2018). A guide to manufacturing CAR T cell therapies. *Current Opinion in Biotechnology*, 53, 164-181.
- Wadhwa, P., Zielske, S., Roth, J., Ballas, C. and Bowman, J. (2002). Cancer Gene Therapy: Scientific Basis. *Annual Review of Medicine*, 53, 437-452.
- Wang, L., Ma, N., Okamoto, S., Amaishi, Y. and Sato, E. (2016). Efficient tumor regression by adoptively transferred CEA-specific CAR-T cells associated with symptoms of mild cytokine release syndrome. *OncoImmunology*, 5, e1211218.
- Wieder, T., Eigentler, T., Brenner, E. and Röcken, M. (2018). Immune checkpoint blockade therapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*.
- Wilkins, O., Keeler, A. and Flotte, T. (2017). CAR T-cell therapy: Progress and prospects. *Human Gene Therapy Methods*, 28, 61-66.
- Worgall, S. and Crystal, R. (2014). Gene therapy. In: R. Lanza, R. Langer and J. Vacanti, ed., *Principles of Tissue Engineering*, 4th ed. Academic Press, 657-686.
- Wrzesinski, C., Paulos, C., Kaiser, A., Muranski, P. and Palmer, D. (2010). Increased intensity lymphodepletion enhances tumor treatment efficacy of adoptively transferred tumor-specific T cells. *Journal of Immunotherapy*, 33, 1-7.
- Wu, X., Li, Y., Crise, B. and Burgess, S. (2003). Transcription Start Regions in the Human Genome Are Favored Targets for MLV Integration. *Science*, 300, 1749-1751.
- Yi, C., Huang, Y., Guo, Z. and Wang, S. (2005). Antitumor effect of cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy system mediated by *Bifidobacterium infantis* on melanoma. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26, 629-634.



- Yin, H., Kanasty, R., Eltoukhy, A., Vegas, A. and Dorkin, J. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews Genetics*, 15, 541-555.
- Yura, Y. and Hamada, M. (2017). Development of oncolytic virotherapy for the treatment of oral cancer – At the waiting stage for clinical use. *Oral Science International*, 14, 1-12.
- Zhang, C., Liu, J., Zhong, J. and Zhang, X. (2017). Engineering CAR-T cells. *Biomarker Research*, 5, 22.
- Zheng, P., Kros, J. and Li, J. (2018). Approved CAR T cell therapies: ice bucket challenges on glaring safety risks and long-term impacts. *Drug Discovery Today*, 23, 1175-1182.

## 6. Sažetak

Genska terapija predstavlja obećavajući terapijski alat za liječenje onih bolesti koje se konvencionalnim metodama liječenja nisu uspješno uspjele eliminirati. Otkrića u području humane genomike su, uz značajan tehnološki napredak, doprinijela njezinoj primjeni u liječenju širokog spektra bolesti. Unatoč mnogobrojnim provedenim istraživanjima i razvoju raznih potencijalnih terapija, rak je i dalje vodeći uzrok smrti u svijetu. Stoga je veliki broj kliničkih istraživanja, koja primjenjuju strategije genske terapije, usmjereno njegovoj redukciji i eliminaciji. Tijekom niza godina predložene su brojne strategije genske terapije tumora od kojih je većina bila klinički neuspješna. Međutim, tijekom posljednjih nekoliko godina, novi oblik imunoterapije zadobiva veliku pozornost u istraživanju uslijed visoke terapijske učinkovitosti. Riječ je o terapiji CAR-T koja objedinjuje strategije genske terapije, stanične terapije i imunoterapije. Ovaj rad donosi kratki pregled nekih od glavnih strategija genske terapije u liječenju tumora s posebnim osvrtom na adaptivnu staničnu terapiju CAR-T. Također, u radu su izloženi nedostaci i štetne nuspojave, kao i strategije razvoja sigurnije i učinkovitije terapije.

**Ključne riječi:** genska terapija, tumor, imunoterapija, terapija CAR-T

## 7. Summary

Gene therapy is a promising therapeutic tool for the treatment of diseases not eliminated by conventional treatment methods. Discoveries in the field of human genomics have, along with the significant technological advances, contributed to its application in the treatment of a wide range of diseases. Despite numerous studies and development of variety potential therapies, cancer remains the leading cause of death in the world. Therefore, a large number of clinical studies, that apply gene therapy strategies, are directed towards its reduction and elimination. Over the course of many years, a number of cancer gene therapy strategies have been proposed, most of which were clinically unsuccessful. However, over the last few years, a new form of immunotherapy has gained great attention in research due to high therapeutic efficacy. Therapy in question is CAR-T therapy that combines gene therapy, cell therapy and immunotherapy strategies. This paper provides a brief overview of some of the major gene therapy strategies for cancer treatment, with a special focus on adaptive CAR-T therapy. Also, the paper presents disadvantages and adverse side effects, as well as strategies for developing safer and more effective therapy.

**Keywords:** gene therapy, cancer, immunotherapy, CAR-T therapy