

Klinička primjena CAR-T imunoterapije

Klasić, Franko

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:217:495604>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-02**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Franko Klasić

Klinička primjena CAR-T imunoterapije

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Franko Klasić

**Clinical application of CAR-T
immunotherapy**

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u sklopu studijskog programa Preddiplomski studij Biologije na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof.dr.sc. Nade Oršolić.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Klinička primjena CAR-T imunoterapije

Franko Klasić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Pojava malignih oboljenja danas je sve češća. Potreba za novim oblicima terapija nužna je za liječenje sve većeg broja onkoloških pacijenata. CAR-T imunoterapija danas predstavlja obećavajući pristup liječenju brojnih bolesti, uključujući razne malignitete poput hematoloških i solidnih tumora, ali svoju primjenu mogla bi naći i u liječenju autoimunih bolesti u budućnosti. Specifično prepoznavanje antigena kao najznačajnija karakteristika CAR-T stanica omogućuje precizno usmjeravanje CAR-T imunoterapije na bolesne stanice i tkiva. Visoka cijena i zahtjevnost proizvodnje CAR-T stanica ograničava njen pristup velikom broju pacijenata. Istraživanja koja su usmjerena na otkrivanje novih načina kreiranja CAR-T stanica te istraživanja usmjerena na otkrivanje specifičnih antigena na koje se mogu usmjeriti CAR-T stanice doprinjet će u otkrivanju punog potencijala ovog oblika imunoterapije.

Ključne riječi: imunologija, CAR-T imunoterapija, tumor, liječenje
(20 stranica, 2 slike, 23 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

Clinical application of CAR-T immunotherapy

Franko Klasić

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The occurrence of malignancies is on the rise. The need for development of new types of immunotherapy is crucial for treating a rising number of oncological patients. CAR-T immunotherapy gives a promising approach in threatening number of diseases, including a number of haematological malignancies and solid tumors, but also CAR-T immunotherapy in future could be used for treating autoimmune disease. Specific recognition of antigens as the main characteristic of CAR-T cells provides a precise targeting of abnormal cells and tissues. High price and challenges in creating CAR-T cells make them less available to the number of patients. Researches that are amid towards finding new ways of creating CAR-T cells and researches aimed towards finding specific antigens that CAR-T cells can target will make a contribution to discovering the full potential that can be used from this type of immunotherapy.

Keywords: immunology, CAR-T immunotherapy, cancer, treatment
(20 pages, 2 figures, 23 references, original in: croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof.dr.sc. Nada Oršolić

Sadržaj

1. Uvod	1
2. CAR-T stanice	2
2.1. Tumori i imunostani sustav	2
2.2. Način djelovanja CAR-T stanica	3
3. Hematološki maligniteti i CAR-T imunoterapija	6
3.1. Akutna limfoblastična leukemija (ALL)	6
3.2. Akutna mijeloidna leukemija (AML)	7
3.3. Izazovi i budućnost liječenja hematoloških maligniteta CAR-T imunoterapijom ..	8
4. Solidni tumori i CAR-T imunoterapija	9
4.1. Djelovanje CAR-T imunoterapije na solidne tumore	9
4.2. Budućnost CAR-T imunoterapije u liječenju solidnih tumora	11
5. Autoimune bolesti i CAR-T imunoterapija	12
5.1. Mehanizam djelovanja T stanica u autoimunim bolestima	12
5.2. Potencijalna terapijska primjena CAR-T stanica u liječenju autoimunih bolesti	15
5.3. Izazovi u razvijanju CAR-T imunoterapije za liječenje autoimunih bolesti	15
6. Nuspojave CAR-T imunoterapije	16
6.1. Sindrom otpuštanja citokina	16
6.2. Neurotoksičnost	18
6.3. Genotoksičnost	19
6.4. Aplazija B stanica	19
7. Zaključak	20
8. Literatura	21
9. Životopis	24

Popis kratica

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

AML- akutna mijeloidna leukemija (engl. *acute myeloid leukemia*)

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

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

CAAR- kimerički autoantigenski receptor (engl. *chimeric autoantigen receptor*)

CAAR-T- T stanica s kimeričkim autoantigenskim receptorom (engl. *chimeric autoantigen receptor T cell*)

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

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

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

CLL- kronična limfocitna leukemija (engl. *chronic lymphocytic leukemia*)

CRP- C reaktivni protein (engl. *C reactive protein*)

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

CTLA-4- citotoksični T-limfocitni protein 4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*)

CXCL-12- C-X-C kemokinski ligand 12 (engl. *C-X-C motif chemokine ligand 12*)

FDA- Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (engl. *The Food and Drug Administration*)

HER2- ljudski epidermalni faktor rasta receptor 2 (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*)

IDH1- izocitrat dehidrogenaza 1 (engl. *isocitrate dehydrogenase 1*)

IDH2- izocitrat dehidrogenaza 2 (engl. *isocitrate dehydrogenase 2*)

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

IgM- imunoglobulin M (engl. *immunoglobulin M*)

INF γ - interferon gama (engl. *interferon gamma*)

LSC- leukemijske matične stanice (engl. *leukemic stem cells*)

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

NHL- ne-Hodgkinkov limfom (engl. *non-Hodgkin lymphoma*)

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

NPM1- nukleofosmin (engl. *nucleophosmin 1*)

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

PDGF- trombocitni faktor rasta (engl. *platelet-derived growth factor*)

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

scFv- vanstnična jednolančana domena koja veže antigen (engl. *single-chain fragment variable*)

TAA- tumoru pridruženi antigeni (engl. *tumor-associated antigen*)

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

TGF- β - Transformirajući čimbenik rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*)

Th1- T pomoćničke stanica tipa 1 (engl. *T helper cells type 1*)

Th2- T pomoćničke stanica tipa 2 (engl. *T helper cells type 2*)

TM- transmembranska domena (engl. *transmembrain domain*)

TNF α - čimbenik nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*)

Treg- T regulatorne stanice (engl. *T regulatory cells*)

TRUCK- T-stanice preusmjerene za citokinima posredovano ubijanje (engl. *T cells redirected for antigen-unrestricted cytokine-initiated killing*)

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

1. Uvod

Imunoterapijski pristup liječenju maligniteta sve je popularniji. Imunoterapija T stanicama s kimeričnim antigenskim receptorom nudi brojne pogodnosti kada je u pitanju liječenje tumora, ali i drugih bolesti za koje danas medicina nema lijeka, poput autoimunih bolesti. Klinički utjecaj CAR-T imunoterapije sve je jači, a danas ova terapija predstavlja najuspješniji izbor terapije u liječenju recidivnih oblika hematoloških maligniteta te svojim rezultatima pokazuje vrlo visoku razinu uspješnosti u održavanju bolesti u remisiji. CAR-T stanice svoju potencijalnu primjenu mogu pronaći i u liječenju autoimunih bolesti te solidnih tumora. Brojna istraživanja usmjerena su na otkrivanje odgovarajuće primjene modificiranih T stanica u kliničke svrhe. Manipulacija stanicama T daje velik potencijal za njihovo usmjeravanje na specifične antigene što ih čini vrlo učinkovitim u uništavanju tumorskih tkiva, ali i autoreaktivnih stanica koje mogu uzrokovati brojne autoimune bolesti. Tumorska tkiva posjeduju odlične mehanizme za izbjegavanje uništenja od strane imunskog sustava, također mijenjanjem mikrookoliša tumorske stanice stvaraju imunosupresivno okruženje koje pospješuje njihovo preživljavanje i onemogućuje njihovo prepoznavanje. CAR-T stanice imaju mogućost specifičnog prepoznavanja ciljanih tumorskih antigena putem receptora CAR, a novije generacije CAR-T stanica mogu lučiti proupalne citokine u tumorski mikrookoliš koji mogu pospješiti protutumorski imunski odgovor i dodatno aktivirati druge stanice imunskog sustava. Veliku važnost u kliničkoj primjeni CAR-T imunoterapije ima odabir specifičnih antigena koje tumorsko tkivo ne dijeli sa zdravim stanicama te odabir antigena koji su lako dostupni T stanicama. Posljedica nespecifičnog odabira antigena može dovesti do brojnih neželjenih učinka, poput napadanja zdravog tkiva i stanica te uništenja organa i organskih sustava. Praćenje pacijenata koji primaju terapiju od velike je važnosti zbog mogućih nuspojava, od kojih je najčešći sindrom otpuštanja citokina. Infuzijom CAR-T stanica u krvotok pacijenta dolazi do aktivacije i proliferacije CAR-T stanica. Takve stanice počinju prepoznavati specifične antigene i uništavati prepoznate stanice. Također, dolazi do lučenja velike količine citokina iz stanica T što uzrokuje brojne fiziološke promjene u organizmu koje mogu zahvatiti brojne organske sustave te ukoliko se stanje pacijenta ne prati može doći do pojave po život opasnih stanja pa tako i smrti.

2. CAR-T stanice

CAR-T stanice pogodne su za liječenje raznih oblika hematoloških tumora dok kod liječenja čvrstih tumora postoje određena ograničenja. Razlog tome je teška dostupnost tumora, teže okruživanje i napadanje tumorskih stanica te nespecifičnost samih tumorskih receptora. Klinička primjena CAR-T stanica temelji se na njihovoj sposobnosti da prepoznaju promijenjene tumorske stanice te ih putem imunskih mehanizama unište.

2.1. Tumori i imunski sustav

Prepoznavanje i uništavanje tumorskih stanica temelji se na brojnim imunološkim mehanizmima koji uključuju vanstanične i unutarstanične procese. Vanstanični mehanizmi odvijaju se tek kada unutarstanični procesi zakažu pri uništavanju promijenjenih stanica. Eliminacija tumorskih stanica temelji se na mehanizmima adaptivnog i urođenog imunskog odgovora prije nego li tumor naraste u klinički vidljivu neoplaziju. Eliminacija tumorskih stanica uključuje prepoznavanje tumorskih stanica od strane urođenog imunskog sustava. Kada tumor naraste više od 2 do 3 mm u promjeru dolazi do angiogeneze i preuređenja okolnih slojeva tkiva što uključuje sekreciju citokina i privlačenje stanica prirodnih ubojica, $\gamma\delta$ T stanica i antigenpredočnih stanica poput makrofaga i dendritičkih stanica. Ove stanice prepoznaju tumorsku stanicu te imunskim odgovorom dolazi do uništenja tumorskih stanica. Ukoliko određene tumorske stanice prežive ovaj imunski odgovor, što je rijedak slučaj, ulazi se u fazu kod koje se sprječava rast neoplazije imunskim mehanizmima. U ovoj fazi imunski sustav nastoji vršiti pritisak na tumorske stanice, no ne uspijeva ih uništiti do kraja, a trajanje ove faze može se produžiti do čak 20 godina trajanja, što uključuje prvobitni nastanak tumorskih stanica i njihovo konačno kliničko opažanje. U idućoj fazi dolazi do genetičkih i epigenetičkih promjena u tumorskom tkivu te ono postaje klinički vidljivo. Tumorske stanice postaju rezistentne na imunološki sustav domaćina putem izbjegavanja prepoznavanja tumorskih stanica ili razvijanjem mehanizama za zaštitu od uništenja putem imunskih mehanizama. Imunoterapija ima potencijal za pojačano prepoznavanje tumorskih stanica i njihovo uništavanje (Miliotou i Papadopoulou 2018). Terapija stanicama T s kimeričnim antigenskim receptorom teorijski predstavlja odličan odgovor na nastanak tumorskog tkiva, jer ovakve genetički modificirane stanice ekspimiraju specifične kimeričke antigenske receptore kojima se može prepoznati tumorsko tkivo nevidljivo imunskom sustavu. Bitno svojstvo CAR-T stanica njihova je neovisnost o haplotipu kompleksa glavne histokompatibilnosti pacijenta što im pruža mogućnost prepoznavanja antigena neovisno o drugim stanicama imunskog sustava te neovisno o vrsti antigena. Limfociti T u organizmu su ovisni o sustavu MHC, oni mogu

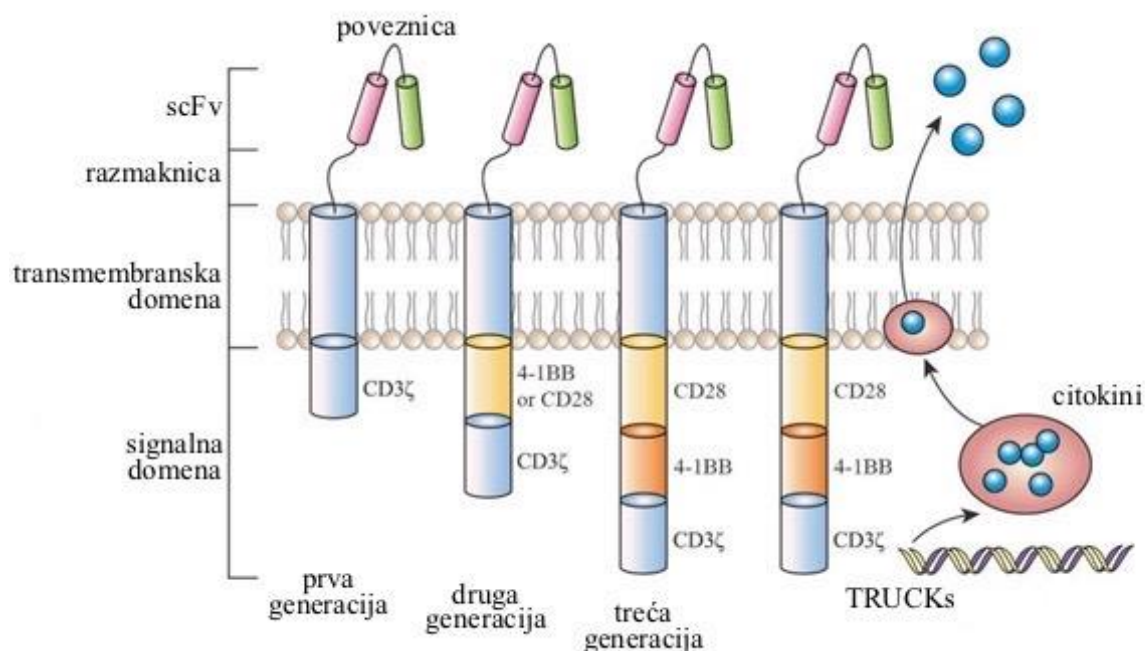
prepoznati tumorske antigene putem staničnog receptora T isključivo kada su predočeni preko molekula sustava MHC dok CAR-T stanice prepoznaju tumorske antigene preko genetički modificiranih receptora CAR (Han i sur. 2021). Brojne se mogućnosti otvaraju kada je riječ o primjeni CAR-T stanica u terapijske svrhe, a mnoga istraživanja usmjerena su na otkrivanje punog potencijala ovog oblika imunoterapije.

2.2. Način djelovanja CAR-T stanica

Djelovanje CAR-T stanica temelji se na korištenju specifičnih staničnih receptora poput PD-1, PDL1, CTLA-4 i kimeričkih antigenskih receptora. CAR receptori su genetički modificirani transmembranski proteini eksprimirani na T limfocitima. CAR membranski proteini djeluju na specifične antigene eksprimirane na ciljanim stanicama. CAR-T stanice mogu prepoznavati tumorske stanice neovisno o MHC sustavu te su iz tog razloga primjenjive na širem broju pacijenata i mogu prepoznavati velik broj antigena. CAR su građeni od vanstanične domene koja se veže za tumorima pridružene antigene, transmembranske domene koja je najčešće građena od tipa I. membranskih proteina poput s CD3 ζ , CD4, CD8, ili CD28, a mutacije u toj domeni dovode do nepotpunog funkcionalnog kapaciteta limfocita T što ukazuje na važnost TM domene u pravilnoj aktivaciji stanica T, i unutarstanične domene koja je zadužene za signalizaciju (Shirasu i Kuroki 2012). S obzirom na građu unutarstanične domene za signalizaciju, CAR-T stanice možemo podijeliti na stanice prve, druge i treće generacije (Miliotou i Papadopoulou 2018). Za uspješno funkcioniranje CAR-T stanica u liječenju maligniteta jako je bitna sposobnost eksprimiranja CAR receptora na stanicama T, količina specifičnih tumorskih antigena na tumorskim stanicama i dostupnost tumorskih epitopa CAR receptorima (Shirasu i Kuroki 2012).

Geni pomoću kojih se sintetiziraju CAR unutar CAR-T stanica ugrađuju se u genom T stanice, a kao vektori za transdukciju najčešće se koriste lentivirusi, retrovirusi, ali i druge metode poput tehnologije CRISPR-Cas9 (Han i sur. 2021). Prva generacija CAR-T stanica imaju scFv i unutarstaničnu domenu bez kostimulatornih unutarstaničnih dodataka. Najveća prednost korištenja scFv domene izvedene od protutijela u CAR-T stanicama je mogućnost prepoznavanja antigena neovisno o MHC kompleksu. Problem kod ovog tipa prepoznavanja je teže prepoznavanje unutarstaničnih antigena koji tipično nisu dostupni CAR jer je unutarstanične antigene moguće prepoznati nakon što su prerađeni i predstavljeni T stanicama preko MHC molekula (Marvin-Peek i sur. 2022). Građa prve generacije CAR-T stanica uzrokuje slabu proliferaciju i aktivaciju stanica T što rezultira njihovom kratkoročnom antitumorskom djelotvornošću. Druga generacija stanica sadrži kostimulatornu domenu u

unutarstaničnoj domeni poput CD28 ili CD137. Zbog dodatka unutarstanične kostimulatorne domene, druga generacija stanica pokazuje jaču i bržu proliferaciju, aktivaciju, rast i preživljavanje u odnosu na stanice prve generacije (Miliotou i Papadopoulou 2018). Treća generacija stanica sadrži dodatnu kostimulatornu domenu poput CD28, 4-1BB, ICOS, i ili OX40 (Marvin-Peek i sur. 2022) uz CD28, CD 27 ili CTL4 domenu. Dodatkom ove domene također je došlo do pojačane aktivacije i proliferacije stanica što za posljedicu ima jače protutumorsko djelovanje ovih stanica. Negativan utjecaj dodatnih kostimulatornih domena očituje se u pojačanom lučenju citokina iz aktiviranih stanica što posljedično može dovesti do opasnih stanja poput sindroma otpuštanja citokina i neurotoksičnosti. Koncept četvrte generacije CAR-T stanica poznatih kao “T-cells redirected for universal cytokine-mediated killing” ili “TRUCKs” uključuje dodatak liganda za proliferaciju 4-1BBL ili receptora za proupalne citokine poput IL-12 (Slika 1.). U tom slučaju, kada bi stanica prepoznala antigene pridružene tumorima, došlo bi do ispuštanja velike količine granzima i perforina te TNF- α koji bi doveli do smrti tumorskih stanica (Sha i sur. 2017). TRUCK stanice mogu također eksprimirati dodatne proteine poput receptora za kemokine, ali su i dizajnirane da ispuštaju dodatne kemokine u mikrookoliš tumora (Marvin-Peek i sur. 2022). Također, TRUCK stanice lučenjem proupalnih citokina u neposrednoj blizini tumora mogu potaknuti jači protutumorski imunski odgovor od strane drugih stanica imunskog sustava što može pospješiti eliminaciju tumora. Mikrookoliš tkiva sastoji se od brojnih čimbenika koji mogu usmjeravati imunski odgovor u smjeru proupalnih ili protuupalnih imunskih odgovora. Također, mikrookoliš tumorskog tkiva igra važnu ulogu u signalizaciji između stanica imunskog sustava. Procjenjivanje tumorskog mikrookoliša u pacijenata može pridonijeti boljem predviđanju uspješnosti same terapije i potencijalnih nuspojava (Tan i sur. 2022).



Slika 1. Shematski prikaz CAR receptora prve, druge, treće generacije i TRUCK stanica. CAR se sastoje od vanstaične domene za prepoznavanje antigena izvedene iz jednolančanog varijabilnog ulomka monoklonalnog protutijela (scFv domena). Vanstanična domena je preko razmaknice povezana s transmembranskim segmentom i s unutarstaničnom endodomenom izvorno izvedene iz CD3 ζ . Kostimulatorne domene CD28 i 4-1BB te njihove kombinacije prisutne su kod CAR-T stanica druge i treće generacije. Uz postojanje CAR receptora na TRUCK stanicama, one su specifične i po lučenju specifičnih citokina koji mogu potaknuti pojačani protutumorski odgovor (preuzeto i prilagođeno prema Miliotou i Papadopoulou 2018).

CAR-T stanice u vanstaničnoj domeni CAR-a sadrže teške i lake lance koji potječu od imunoglobulina s točno određenom specifičnošću za antigen. Vanstanična domena građena je od monoklonalnog protutijela specifičnog za neki TAA. Neovisnost o MHC sustavu čini CAR-T stanice izuzetno dobrim u prepoznavanju ne samo proteinskih i peptidnih ulomaka antigena, nego i različitih površinskih biljega koje su dominantni na tumorskim stanicama poput ugljikohidrata, glikoproteina, glikolipida i ganglioizida (Shirasu i Kuroki 2012). U kliničkoj primjeni CAR-T stanica, TAA vezujuća domena građena je od mišjeg ili humaniziranog protutijela specifičnog za prepoznavanje određenog antigena. U kliničkoj primjeni postoji rizik od nastanka ljudskih protu-mišjih antitijela na TAA vezujuću domenu CAR receptora što može ograničiti primjenu CAR-T imunoterapije, no posljedice nastanka ovih protutijela procjenjuju se unutar prekliničkih i kliničkih istraživanja (Shirasu i Kuroki 2012). Nakon vezanja CAR-a

za TAA dolazi do aktivacije CAR-T stanica putem fosforilacije te dolazi do njihove proliferacije. Značajnu ulogu u citotoksičnom djelovanju i lizi tumora imaju CD8 pozitivne CAR-T stanice, dok CD4 pozitivne CAR-T stanice igraju važnu ulogu u stvaranju odgovarajućeg mikrookoliša za uništenje tumora i imaju ulogu u jačanju protutumorskog odgovora drugih stanica imunološkog sustava (Han i sur. 2021).

3. Hematološki maligniteti i CAR-T imunoterapija

CAR-T imunoterapija najviše je istraživana u vidu terapije za liječenje hematoloških maligniteta. Najuspješniju primjenu CAR-T imunoterapija pronašla je upravo u liječenju ove skupine maligniteta, pogotovo kada je riječ o malignitetima stanica B. Najbolji rezultati očituju se u liječenju anti-CD19 CAR-T stanicama djece i odraslih kod recidivnih oblika ne-Hodgkinsonovog limfoma stanica B, akutne limfoblastične leukemije i kronične limfoblastične leukemije. Postotak uspješne remisije ovih bolesti nakon primjene CAR-T imunoterapije doseže čak 70-94% u različitim istraživanjima (Miliotou i Papadopoulou 2018). Svoj je najznačajniji i terapijski najuspješniji učinak CAR-T imunoterapija ostvarila u liječenju B-ALL. CAR-T imunoterapija najuspješnija je kod ciljanja CD19, CD20 ili CD30 molekula s CD28 ili 4-1BB kostimulatornim domenama. CAR-T imunoterapija „tisagenlecleucel“ (Kymriah®) prva je odobrena imunoterapija ovog tipa od strane FDA 30. kolovoza 2017. godine za liječenje recidivne ALL u pacijenata od 3 do 25 godina starosti. Cijena ove terapije iznosi 4750,000\$. Od 18.11.2019. klinički bolnički centar Zagreb je ovlašten za provođenje terapije CAR-T stanicama tisagenlecleucel (Kymriah®) u bolesnika s difuznim B-velikostaničnim limfomom i B-ALL mlađih od 25 godina (Klinički bolnički centar Zagreb 2022).

3.1. Akutna limfoblastična leukemija (ALL)

Akutne limfoblastične leukemije najčešći su maligniteti koji zahvaćaju pedijatrijske pacijente, pri čemu se najučestalije javlja akutna limfoblastična leukemija stanica B. Postoji i akutna limfoblastična leukemija stanica T no taj oblik akutne limfoblastične leukemije mnogo je rjeđi i agresivniji te je češći u odraslih pacijenata naspram pedijatrijskih pacijenata (Sheykhhasan i sur. 2022). Najuspješniji oblik CAR-T terapije razvijen je na ciljanje CD19 biljega u liječenju bolesti poput folikularnih limfoma, ne-Hodgkinsonovog limfoma, CLL-a i ALL-a. FDA je do sada odobrila četiri oblika CAR-T imunoterapije usmjerene na CD19 biljeg koje su dostupne za liječenje recidivnih oblika ALL-a i NHL-a (Zhang i sur. 2022) CAR-T stanice koje su

pokazale najveću uspjeh u liječenju ovih bolesti sadržavale su kostimulatorne domene CD28 ili 4-1BB. Unatoč jakom protutomorskom učinku u liječenju različitih maligniteta CAR-T stanice koje ciljaju CD19 biljeg najbolje rezultate pokazale su u liječenju B-ALL-a. Klinički značajan problem koji se javlja kod liječenja CAR-T terapijom je bijeg antigena, odnosno nestanak CD19 biljega sa površine tumorskih stanica. Ovaj problem zabilježen je u 10-20% pedijatrijskih pacijenata koji su tretirani imunoterapijom usmjerenom na CD19 (Miliotou i Papadopoulou 2018). Bijeg antigena dovodi do potrebe za otkrivanjem dodatnih specifičnih antigena koji se mogu ciljati u liječenju ALL-a kod ovakvih pacijenata. CD19 odlična je molekula za napadanje B staničnih maligniteta zbog jednolike i visoke ekspresije molekule na limfocitima B (Sha i sur. 2017). CAR-T terapija usmjerena na CD19 zbog svog citotoksičnog efekta na limfocite B dovodi do aplazije stanica B i hipogamaglobulinemije, no ova nuspojava može biti riješena nadomještanjem imunoglobulina intravenozno (June i Sadelain 2018). Ciljanjem većeg broja antigena i opremanjem CAR-T stanica sa specifičnijim receptorima može se povećati učinkovitost ove terapije te se smanjiti neželjene nuspojave i napadanje CAR-T stanica na neželjeno tkivo; također, ciljanjem većeg broja antigena može se izbjeći i bijeg antigena (Sheykhhasan i sur. 2022). Neke istraživačke skupine utvrdile su da se bijeg antigena može izbjeći ciljanjem molekule CD20 koja potencijalno može pomoći kod izlječenja nekih pacijenata (Han i sur. 2021).

3.2. Akutna mijeloidna leukemija (AML)

Cilj liječenja CAR-T stanicama je selektivno eliminiranje tumorskih stanica, pošteđivanje zdravih tkiva i postojanje stanica koje se zadržavaju u organizmu i održavaju bolest u remisiji. Ponovna pojava AML-a u izliječenih pacijenata rezultat je postojanja leukemijskih matičnih stanica za koje se pretpostavlja da su otporne na kemoterapije te mogu započeti ponovni razvitak maligniteta. Najbolja meta za CAR-T stanice usmjerene na liječenje AML-a su biljezi koji su jako eksprimirani na AML stanicama, ali i na LSC stanicama. Bitno je da ovi biljezi nisu eksprimirani na zdravim tkivima i stanicama ni na hematopoetskim matičnim stanicama. Pronalazak ovakvih specifičnih antigena doveo bi do uspješnog eliminiranja malignih stanica. U razvitku uspješne terapije za liječenje AML-a kao najveća prepreka javlja se nedostatak AML specifičnih antigena, imunosupresivno stanje uzrokovano AML-om i poteškoće u prikupljanju limfocita T pacijenata (Marvin-Peek i sur. 2022).

AML ima značajno nižu razinu pojava mutacija u odnosu na solidne tumore, što dovodi do manje pojave neoantigena na koje se mogu usmjeriti CAR-T stanice. Najčešće mete CAR-T stanica u terapiji AML-a su biljezi CD33 i CD123 koji su eksprimirani kod gotovo 80-90% do

70-80% AML pacijenata. Ovi biljezi su također eksprimirani na hematopoetskim matičnim stanicama i normalnim mijeloidnim progenitorskim stanicama i Kuppferovim stanicama jetre. Otkriveni su neki antigeni i biljezi specifični za AML, poput NPM1, IDH1 i IDH2, no ovi biljezi su unatarstanični te su zbog toga nedostupni klasičnim CAR receptorima (Marvin-Peek i sur. 2022).

Druga generacija CD33 specifičnih CAR-T stanica pokazala se obećavajućom terapijom u liječenju akutne mijeloidne leukemije u nekim istraživanjima. Istraživanja su pokazala da su stanične linije leukemije i primarne tumorske stanice bile učinkovito uništene *in vitro* CD33 CAR-T stanicama. Također, broj tumorskih stanica bio je manji kod miševa tretiranih s anti-CD33 CAR-T stanicama nego u miševa tretiranih kontrolom (Sha i sur. 2017). Pokazano je da su anti-CD33 CAR-T stanice također učinkovite *in vivo*. CD123 CAR-T stanice također su pokazale snažan učinak na AML *in vitro* i *in vivo*. Istraživanja na životinjskim modelima pokazala su da CD123 CAR-T predstavljaju snažnu terapiju u liječenju AML-a usmjeravanjem CAR-T stanica na CD123 molekulu (Gill i sur. 2014) Iako je mehanizam nastanka nejasan, fatalna komplikacija koja uključuje sindrom kapilarnog curenja nakon primjene CD123 CAR-T stanica zahtijeva daljnje ispitivanje sigurnosti u korištenju ovog biljega u potencijalnom liječenju AML-a. Za pronalazak idealne terapije nedostaju biljezi s profilom ekspresije povoljnim kao CD19. Ciljanje dva ili više antigena moglo bi pogodovati razvitku same terapije kako bi se smanjila potencijalna toksičnost (June i Sadelain 2018) Nadalje, AML stvara imunosupresivno tumorsko mikrokruženje koje čini CAR-ove manje učinkovitim nego kod drugih zloćudnih bolesti (Sha i sur. 2017).

Uspješan oblik CAR-T terapije u liječenju AML-a i dalje nije pronađen. No velik broj istraživanja usmjereno je u pronalazak odgovarajućih biljega i kreiranja CAR-T stanica kako bi se napravila odgovarajuća terapija za pacijente s AML-om. Uspješnost u liječenju drugih oblika hematoloških maligniteta CAR-T stanicama daje nadu za pronalazak odgovarajućih biljega i kreiranje optimalnih CAR-T stanica za liječenje AML-a.

3.3. Izazovi i budućnost liječenja hematoloških maligniteta CAR-T imunoterapijom

Nedostatak specifičnih antigena i biljega u nekim hematološkim malignitetima sprječava razvoj CAR-T imunoterapije; čest nedostatak CD19 biljega u ne-Hodgkinsonovom limfomu i malignitetima stanica T otežava usmjeravanje CAR-T stanica. Također, heterogenost antigena u AML-u otežava razvoj uspješnog oblika CAR-T terapije (Zhang i sur. 2022) Klinička uspješnost same terapije ovisi i o otkrivanju specifičnih biomarkera pomoću kojih se može

predvidjeti uspješnost terapije te procijeniti parametre poput proliferacijskog i diferencijacijskog potencijala CAR-T stanica nakon infuzije, efektorske funkcije samih stanica i protutumorskog djelovanja stanica kada ih pacijent primi (Tan i sur. 2022).

4. Solidni tumori i CAR-T imunoterapija

CAR-T imunoterapija potaknula je brojne znanstvenike na otkrivanje terapija u liječenju solidnih tumora. Ovakva istraživanja potaknuta su vrlo velikom uspješnošću CAR-T imunoterapije kada je riječ o hematološkim malignitetima poput ALL-a. Razvitak uspješne terapije za liječenje solidnih tumora CAR-T stanicama dosad je bio neuspješan, no provode se brojna istraživanja koja bi mogla rezultirati razvitkom uspješnih terapija kada je riječ o solidnim tumorima. CAR-T imunoterapija razvija se za ciljanje brojnih površinskih antigena koje nalazimo na solidnim tumorima, poput mesotelina, interleukin-13 receptora $\alpha 2$, mucin-1, ljudskog epidermalnog čimbenika rasta 2, ali i drugih biljega često prisutnih na tumorskim stanicama (Filley i sur. 2018).

4.1. Djelovanje CAR-T imunoterapije na solidne tumore

Za uspješnost CAR-T imunoterapije bitna je migracija i ulazak CAR-T stanica u tumorsko tkivo te nastavak proliferacije i njihovo preživljavanje sve dok se tumorsko tkivo ne uništi. Sposobnost CAR-T stanica da obave ovoj zadatak u uništenju solidnih tumorima dosad se pokazala slabom. Solidni tumori nastaju kao posljedica nakupljanja mutacija u stanicama koje zatim podliježu nekontroliranoj proliferaciji i izbjegavanju imunskog sustava. Također, za ovakve tumore karakteristična je heterogenost u tumorskim stanicama – tumorske stanice ne eksprimiraju iste membranske proteine te nemaju iste mutacije u svojem genomu što ih čini vrlo teškim metama kada je riječ o razvitku specifične terapije. Kako bi se napravila dobra terapija potrebno je pronaći ciljane TAA na tumorskim stanicama te kreirati CAR-T stanica usmjerene upravo na njih. Heterogenost tumorskih stanica pospješuje preživljavanje tumorskog tkiva i smanjuje učinkovitost CAR-T stanica (Filley i sur. 2018).

Većina antigena predočena na površini tumorskih stanica dolazi od prerađenih unutarstaničnih proteina. Također, tumorske stanice eksprimiraju velik broj endogenih molekula koje su zadužene za rast i proliferaciju tumorskih stanica. Pojačana ekspresija ovih antigena na površini tumorskih stanica čini ih metom za razvoj terapije. Problem ovog pristupa je loša imunogeničnost tih receptora zbog stvaranja tolerancije na njih. Također, ovi receptori javljaju

se i na zdravim tkivima što može dovesti do toksičnosti izazvane uništenjem nekancerogenih stanica (Filley i sur. 2018). Većina TAA nisu antigeni isključivo eksprimirani na tumorskim stanicama, već su to antigeni prisutni i na zdravim stanicama i tkivima što potencijalno dovodi do neželjenih nuspojava i toksičnosti uzrokovanih napadanjem zdravih tkiva (Dana i sur. 2021). S obzirom na ekspresiju ciljanih antigena na zdravim tkivima, može doći do ozbiljnih komplikacija. Primjer je smrt pacijenta koji je primao CAR-T imunoterapiju usmjerenu na pretjerano eksprimirane HER2 receptore kod metastaziranog kolorektalnog karcinoma. Pacijent je preminuo zbog napada CAR-T stanica na stanice pluća koje su u niskoj koncentraciji eksprimirale te iste HER2 receptore (Filley i sur. 2018).

Subpopulacije stanice tumora koje imaju mutirani epitop od onoga kojeg prepoznaju CAR-T stanice mogu izbjeći uništenje te dovesti do ponovne pojave tumora s mutiranim epitopima. Također, ukoliko se terapija usmjerava na epitope koji nisu neophodni za onkogenezu i preživljavanje tumora može doći do nestanka tih epitopa ili njihove mutacije na tumorskim stanicama te ne dolazi do eliminiranja svih tumorskih stanica. Velik broj tumorskih stanica može izbjeći imunosti sustav uklanjanjem imunogeničnih epitopa sa svoje površine jer takve stanice imunosti sustav slabije prepoznaje (Dana i sur. 2021). Tumorska tkiva također podliježu strukturnim promjenama koje mogu otežati terapijski pristup. Otežani pristup CAR-T stanica tumorskom tkivu čini fibrozna stroma u koju su tumorske stanice najčešće uklopljene. Fibrozna stroma čini mrežu koja odvaja tumor od okolnog tkiva. Takvu fibroznju mrežu stvaraju tumorima pridruženi fibroblasti, koji igraju važnu ulogu u reguliranju metabolizma tumora te nastanku metastaza remodeliranjem izvanstaničnog matriksa. Endogene stanice T posjeduju enzime heparanaze koje sudjeluju u razgradnji fibrozne strome te pospješuju pristup stanica T tumorima. Aktivnost heparanaze gubi se kulturom stanica *in vitro* te često CAR-T stanice imaju smanjenu sposobnost prodiranja do tumorskog tkiva (Filley i sur. 2018). Nakon ulaska u tumorsko tkivo, CAR-T stanice susreću se s nepovoljnim tumorskim mikrookolišem. Tumorski mikrookoliš karakteriziran je oksidativnim stresom, hipoksijom, kiselim pH i postojanjem brojnih Treg stanica, neutrofila i tumorima pridruženih makrofaga koji umanjuju terapijsku moć CAR-T stanica (Newick i sur. 2017) Također, tumorski mikrookoliš karakteriziran je kroničnom upalom za koju je karakteristično stvaranje velike količine kisikovih reaktivnih vrsta (ROS) koje mogu umanjiti antitumorsko djelovanje CAR-T stanica (Dana i sur. 2021). Tumorske stanice luče velike koncentracije CXCL-12, VEGF i PDGF koji promoviraju razvoj abnormalnih i propusnih krvnih žila što povisuje intratumorski tlak koji sprječava infiltraciju limfocita u tumorsko tkivo (Filley i sur. 2018).

Tumorska tkiva također stvaraju imunosupresivno okruženje koje pogoduje izbjegavanju imunskog odgovora. Način na koji to postižu je lučenjem velike količine imunosupresivnih citokina i drugih medijatora te okruživanje regulatornim leukocitima. Pomoću brojnih imunosupresivnih mehanizama pokazano je da tumori smanjuju efektorsku funkciju CAR-T stanica nakon njihovog ulaska u tumorsko tkivo. Ekspresijom imunosupresivnih molekula poput PD-1 i CTLA-4 direktno se inhibira efektorska funkcija stanica T. Kontakt djevičanskih stanica T sa CTLA-4 receptorom sprječava njihovu aktivaciju, dok kontakt aktiviranih T stanica s PD-1 dovodi do njihove anergije, apoptoze ili njihove pretvorbe u T regulatorne stanice (Filley i sur. 2018) Kod solidnih tumora, veća koncentracija Treg stanica (koje mogu dovesti do smanjenja imunskog odgovora) u cirkulaciji povezana je s generalno slabijim preživljavanjem (Tan i sur. 2022). Također, mikrookoliš nekih tumora bogat je imunosupresivnim citokinima poput TGF- β i IL-10 koji pogoduju smanjenju ekspresije MHC II. molekula te smanjuju sazrijevanje i funkcionalnost antigen-predodnih stanica. Također, ovi citokini umanjuju diferencijaciju, proliferaciju i citotoksično djelovanje stanica T (Filley i sur. 2018). Pretpostavlja se da mikrookoliš kod solidnih tumora može imati puno važniju ulogu u uspješnosti CAR-T imunoterapije u odnosu na utjecaj mikrookoliša na ishode terapije kod liječenja hematoloških maligniteta (Tan i sur. 2022)

4.2. Budućnost CAR-T imunoterapije u liječenju solidnih tumora

Klinički uspjeh CAR-T terapije temelji se na uspješnosti stanica T u prepoznavanju i uništavanju tumorskih stanica, infiltraciji u tumorsko tkivo te njihovom preživljavanju u imunosupresivnom tumorskom mikrookolišu. Iako preklinička istraživanja u terapiji solidnih tumora nisu imala uspjeha kao ona koja su ispitivala utjecaj CAR-T terapije na hematološke malignitete, intenzivno se radi na istraživanju potencijalno uspješnijih terapija (Newick i sur. 2017) Uspješnost CAR-T imunoterapije može se poboljšati mijenjanjem protuupalnog i imunosupresivnog okoliša u tumoru tako da CAR-T prilikom kontakta sa tumorskom stanicom ispuštaju proupalni citokin IL-12 u okolinu te se time može potaknuti protutumorski imunski odgovor. IL-12 može potaknuti dolazak drugih imunskih stanica koje mogu uništiti tumorske stanice koje nisu vidljive CAR-T stanicama. Mikrookoliš bogat IL-12 pojačava polarizaciju pomoćničkih stanica T u tip I stanica (Th1), što dovodi do pojačanog lučenja INF- γ , granzima i perforina i dolazi do supresije angiogeneze (Filley i sur. 2018) Također, veća uspješnost terapije može se postići boljim razumijevanjem svih prepreka koje CAR-T stanice prelaze kako bi uspješno eliminirale stanice solidnih tumora (Newick i sur. 2017)

CAR-T terapija solidnih tumora razvijat će se u budućnosti te ima potencijala u kliničkoj primjeni. Primjena CAR-T imunoterapije moguća je i u kombinaciji s drugim tipovima imunoterapije, poput onkolitičke viroterapije ili cjepiva. Također, razvitak proteomskih analiza omogućit će detaljno sekvenciranje tumorskih antigena i otkrivanje imunogeničnih epitopa što će potencijalno osigurati bolju terapiju prilagođenu specifičnim potrebama svakog pacijenta (Filley i sur. 2018)

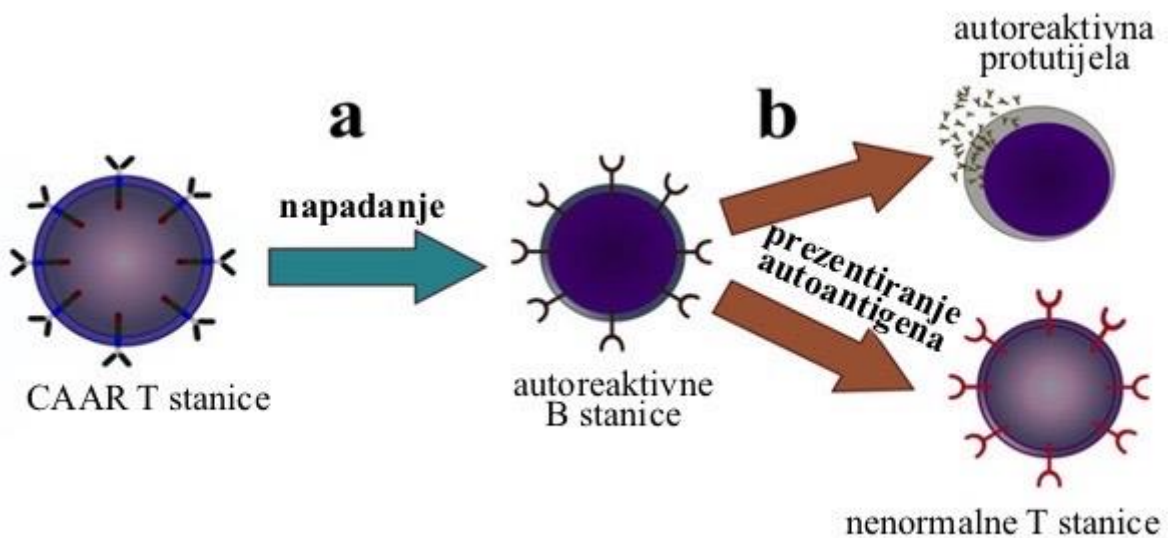
5. Autoimune bolesti i CAR-T imunoterapija

S obzirom na dostignuća medicine, u liječenju autoimunih bolesti ne postoji nijedan oblik terapije koji garantira potpunu remisiju autoimunih bolesti. CAR-T terapija daje obećavajući pristup te je potaknula brojne znanstvenike na istraživanje kliničke primjene ovog oblika imunoterapije u liječenju autoimunih bolesti. U svrhu liječenja autoimunih bolesti, posebno se proučavaju CAAR-T stanice; ovaj tip stanica sa svojim antigen specifičnim receptorima prepoznaju i vežu se za protutijelo-eksprimirajuće autoreaktivne stanice te ih uništavaju. Preklinička istraživanja CAR-T stanica pokazuju potencijalne kliničke primjene u liječenju autoimunih bolesti. Problem u razvijanju specifične terapije čini nedostatak specifičnih autoantigena koji se pojavljuju u autoimunim bolestima (Sadeqi Nezhad i sur. 2020).

5.1. Mehanizam djelovanja T stanica u autoimunim bolestima

CD4 stanice T, poznate kao i pomoćničke stanice T, imaju važnu ulogu u razvoju autoimunih bolesti. Ove stanice imaju važnu ulogu u supresiji i reguliranju drugih tipova imunskih stanica. Također, polarizacija ovih stanica u Th1 ili Th2 subpopulaciju dovodi do usmjerenja daljnjeg imunskog odgovora. Regulatorne stanice T imaju snažan imunosupresivni učinak koji se temelji na njihovom kontaktu s drugim stanicama putem staničnog receptora T. Treg stanice imunosupresivni učinak također vrše lučenjem imunosupresivnih citokina poput IL-10, IL-35, TGF- β kako bi se spriječila autoimunost i upala. Nakon aktivacije, Treg stanice mogu uništiti autoreaktivne CD4+ i CD8+ stanice T putem lučenja granzima i perforina koji uzrokuju njihovu apoptozu ili putem lučenja inhibitornih citokina poput IL-10, TGF- β . Treći način je putem pojačane ekspresije CD25 receptora kako bi Treg potrošile sav IL-2 u mikrokolišu. CD8+stanice T ili citotoksične stanice mogu proizvoditi određene citokine poput IL-10, IL-4 i TGF-beta koji negativno reguliraju proliferaciju i djelovanje CD4+ T stanica. Ovaj učinak pokazuje regulatornu vezu CTL stanica sa CD4+ stanicama u autoimunim bolestima (Sadeqi Nezhad i sur. 2020).

Poseban oblik CAR-T stanica našao je svoju potencijalnu primjenu u liječenju autoimunih bolesti – takve stanice nazivaju se stanice T s kimeričkim autoantigenim receptorom. Kimerički autoantigeni receptori CAAR građeni su od vanstanične domene koja se sastoji od proteinskog djela koji prepoznaje autoreaktivno protutijelo, što omogućuje CAAR-T stanici da uništi autoreaktivne B stanice na isti način kao što CD19 CAR-T stanice uništavaju leukemijske B stanice (Maldini i sur. 2018) CAAR-T stanice modificirani su oblici CAR-T stanica koji prepoznaju stanice koje luče autoreaktivna protutijela poput autoreaktivnih stanica B. Nalik na CAR-T stanice, receptori CAAR-T stanica građeni su od vanstanične, transmembranske i unutarstanične signalne domene sa ili bez kostimulatornih domena. Ove stanice vežu se za autoprotutijela eksprimirana na površini autoreaktivnih stanica te ih uništavaju (Slika 2.). Uništavanje autoreaktivnih stanica koje uzrokuju autoimune bolesti alternativni je pristup u liječenju autoimunih bolesti (Sadeqi Nezhad i sur. 2020) Uništavanjem autoreaktivnih stanica smanjuje se lučenje protutijela koja mogu igrati važnu ulogu u razvoju autoimunih bolesti. Smanjenjem titra autoprotutijela u krvi dolazi do smanjenja autoimunosti i povlačenja simptoma koji su uzrokovani tim autoprotutijelima.



Slika 2. Shematski prikaz djelovanja CAAR T stanica na sprječavanje autoimunosti. Napadanjem autoreaktivnih stanica B (a) dolazi do njihova uništenja. Uništenjem autoreaktivnih stanica B prestaje lučenje autoreaktivnih protutijela te se smanjuje predočavanje autoantigena autoreaktivnim stanicama T (b). Smanjenim predočavanjem autoantigena smanjuje se stanični odgovor T na autoantigeni dolazi do smanjenja autoimunosti (preuzeto i prilagođeno prema Nezhad i sur., 2022.).

Napadanje neželjenih tkiva i stanica CAR-T stanicama može imati ozbiljne posljedice, a napadanjem antigena koji su eksprimirani i na zdravim tkivima može doći do po život opasnih stanja. Napadanje neželjenih tkiva CAR-Treg stanicama vjerojatno će imati puno slabije neželjene učinke u odnosu na klasične CAR-T stanice. Također, jedan od izazova, kada su CAR-Treg stanice u pitanju, njihova je sklonost da odlaze u tkiva koja nisu ciljana što posljedično može ograničiti njihov terapijski učinak. Osim toga, nakupljanje Treg stanica u zdravim tkivima može dovesti do nastanka povoljnog okruženja za razvitak određenih tumora ili preživljavanja patogena zbog stvaranja imunosupresivnog mikrookoliša (Maldini i sur. 2018).

Potencijalni problem javlja se u mogućem prijelazu efektorskih CAR-T stanica u T regulatorne stanice što potencijalno može dovesti do smanjenja učinkovitosti terapije ili čak pogodovati razvitku nekih tumora, no ovakve promjene nisu do sada zabilježene u kliničkim ispitivanjima. Nadalje, prelazak CAR-Treg stanica u efektorske CAR-T stanice potencijalno može dovesti do ubrzane progresije bolesti (Maldini i sur. 2018).

5.2. Potencijalna terapijska primjena CAR-T stanica u liječenju autoimunih bolesti

Autoimune bolesti karakterizirane su nestankom tolerancije na vlastite antigene. Stanice imunosupresivnog učinka su regulatorne stanice T te je upravo manipulacijom i kreiranjem specifičnih Treg stanica pronađen obećavajući klinički pristup za liječenje autoimunih bolesti putem supresije autoimunosti i autoupalnih procesa. U mišjih modela istražuje se utjecaj CAR-Treg stanica na sprječavanje brojnih autoimunih bolesti poput dijabetesa i ulcerativnog kolitisa. U jednom istraživanju, CAR-T regulatorne stanice kreirane su za sprječavanje razvitka ulcerativnog kolitisa u miševa. Tretiranje miševa tim stanicama dovelo je do uspješnog suprimiranja pojave kolitisa i u tretiranih miševa smanjila se pojava kolorektalnih tumora povezanih sa ulcerativnim kolitisom (Maldini i sur. 2018).

Znanstvenici su do sada uspjeli kreirati CD19 CAR-T stanice za eliminaciju CD19+ B stanica u dva istraživanja koja su uključivala miševe s sistemskim eritemskim lupusom. Uništavanje CD19+stanica B može dovesti do značajno smanjenog lučenja auto-protutijela. Serološki nalazi ovih miševa pokazali su smanjenu koncentraciju IgM i IgG protutijela kao i Anti-DNA IgG i IgM. Uočen je i poboljšanje u patogenezi bolesti i preživljavanju miševa, a životni vijek tretiranih miševa produljio se za jednu godinu (Sadeqi Nezhad i sur. 2020) Uništenje stanica B primjenom CD19 CAR-T stanica u miševa sa sistematskim lupusom eritematosusom dovelo je do sprječavanja razvoja simptoma bolesti, ali je pomoglo i u liječenju uznapredovale bolesti (Aghajanian i sur. 2022)

5.3. Izazovi u razvijanju CAR-T imunoterapije za liječenje autoimunih bolesti

Autoimune bolesti temelje se na napadu imunskog sustava na vlastite antigene. Za kreiranje specifične terapije potrebno je odrediti koji antigeni uzrokuju reakciju imunskog sustava kod određenih bolesti. Nekoliko specifičnih autoantigena otkriveno je kod određenih autoimunih bolesti. Za dizajniranje CAR-T terapije potrebno je poznavati specifične autoantigene, kako bi CAR-T stanice mogle ciljano djelovati. Kreiranjem specifičnih CAR-T stanica smanjuje se rizik od toksičnosti i takve stanice ne uništavaju zdrava tkiva. U dosadašnjim istraživanjima, genetski modificirane stanice T pokazale su uspješnost u eliminiranju protutijelima posredovane autoimune bolesti i u potencijalnoj eliminaciji autoreaktivnih stanica. Kao najveći problem u razvoju uspješnih terapija nameće se nedostatak visoko specifičnih antigena koje CAR-T stanice mogu prepoznavati. Osim toga, CAR-T stanice koje nisu visoko specifične mogu uzrokovati ozbiljne posljedice na druge stanice i tkiva. Jedan od razmatranih pristupa za povećanje specifičnosti je opremanje CAR-T stanica receptorima za određene kemokine koji

se luče u bolesnom tkivu te se prepoznavanjem tih kemokina CAR-T stanice mogu preciznije usmjeriti u ciljana tkiva (Sadeqi Nezhad i sur. 2020).

Trenutno dostupne terapije u liječenju autoimunih bolesti temelje se na protuupalnim i imunosupresivnim lijekovima koji uključuju steroide, citostatike i monoklonalna protutijela. Dugoročna terapija ovakvim lijekovima može dovesti do ozbiljnih nuspojava i povećane šanse za razvojem infekcija. CAR-T terapija u liječenju autoimunih bolesti ima potencijalnu primjenu, no njena uloga i uspješnost nisu dovoljno istražene zbog nemogućnosti otkrivanja specifičnih antigena koji mogu biti cilj na autoreaktivnim stanicama. Moderne tehnologije poput CRISPR/Cas9 i genetičkog inženjerstva mogu pomoći u pronalaženju skrivenih auto-antigena u autoimunim bolestima kako bi se povećala specifičnost CAR-T stanica.

6. Nuspojave CAR-T imunoterapije

CAR-T stanice imaju obećavajući učinak na liječenje sve većeg broja tumora, no uz ovaj oblik terapije veže se nekoliko potencijalno ozbiljnih problema. Nuspojave ove terapije uvelike su posljedica direktnog učinka CAR-T stanica na ciljane stanice npr. tumorske. Ovi se toksični učinci upravo zbog toga mogu reverzibilno kontrolirati i eliminirati. Na primjer, uništenjem svih malignih stanica ili uklanjanjem dijela receptora stanica T, toksičnost i nuspojave mogu se smanjiti ili nestati. Ovakva reverzibilnost nuspojava CAR-T imunoterapije suprotna je nuspojavama citotoksičnih oblika kemoterapije koje mogu izazvati trajnu genetsku promjenu stanica u cijelom organizmu pa tako i u matičnim stanicama. Takve promjene mogu imati značajne dugoročne kliničke posljedice na pacijente. Mogućnost regulacije nuspojava CAR-T imunoterapije velika je prednost u odnosu na neke konvencionalne metode liječenja malignih oboljenja, no nuspojave ove imunoterapije i dalje predstavljaju rizik za pacijente te se takvi pacijenti moraju držati pod posebnim nadzorom. Također, testiranje pacijenata, ispitivanje odgovarajućih biomarkera i poznavanje mikrookoliša tumora može unaprijed pokazati rizik za razvoj nuspojava kojem se pacijent izlaže prije primjene CAR-T terapije (Tan i sur. 2022).

6.1. Sindrom otpuštanja citokina

Najčešća i relativno kratkotrajna nuspojava CAR-T imunoterapije je CRS često povezan s neurotoksičnošću. CRS se pojavljuje u 54-91% pacijenata koji su primili CD19 CAR-T oblik imunoterapije, dok se klinički ozbiljniji oblik CRS javlja kod 8,3-43% pacijenata. CRS je karakteriziran dispnejom koja se pojavljuje u kombinaciji sa bronhospazmom, hipoksijom,

povišenom tjelesnom temperaturom, groznicom, koagulopatijom. Sama reakcija nastaje kao posljedica prepoznavanja CD19+ tumorskih ili zdravih B-stanica te dolazi do aktivacije i proliferacije CAR-T stanica. CAR-T stanice dolaze u kontakt s tumorskim i zdravim B stanicama te dolazi do njihove lize i otpuštanja proupalnih citokina (TNF α , IL-6 i INF γ) što se klinički očituje kao CRS i neurotoksičnost. Simptomi CRS-a direktno su povezani s velikom koncentracijom ispuštenih kemokina u krvotok. CRS se može povezati i sa sindromom lize tumora koji je posljedica lize velikog broja tumorskih stanica te otpuštanja staničnih dijelova i iona u cirkulaciju. Sindrom lize tumora uključuje hiperuricemiju, hipokalcemiju, hiperfosfatemiju, a ponekad može dovesti do akutnog zatajenja bubrega, akutnog zatajenja respiratornog sustava i smrti (Miliotou i Papadopoulou 2018) Nakupljanje brojnih molekula i metabolita koji nastaju kao posljedica raspadanja tumorskih stanica premašuje sposobnost jetre i bubrega da ih uklone te dolazi do pojave brojnih metaboličkih promjena i izbacivanja organizma iz homeostaze (Han i sur. 2021) Medijano vrijeme pojave CRS-a nakon primanja CAR-T terapije kod liječenja tisagenlecleucelom iznosi od 3 do 7 dana. Kod drugih CAR-T terapija, ova brojka može se mijenjati te ovisi o brojnim čimbenicima. Osim CRS-a koji se može pojaviti neposredno nakon infuzije CAR-T stanicama, može se pojaviti i zakašnjeni oblik CRS-a za koji je zabilježeno da se može javiti čak 3 tjedna nakon infuzije CAR-T stanica (Schubert i sur. 2021) U rijetkim slučajevima, CRS može prerasti u CAR-T povezanu encefalopatiju (CRES). Simptomi CRES-a variraju te se mogu pojaviti kao blaga smetenost, a u nekim slučajevima može doći do pojave cerebralnog edema i smrti. Tipično, pacijenti razvijaju encefalopatiju s disfazijom i dezorijentacijom. Mogu se pojaviti napadaji, kao i motorički simptomi (Graham i sur. 2018).

CRS se pojavljuje kao nezarazni sindrom nalik na gripu. Bolesnici mogu razviti dispneju i hipoksiju zbog plućnog edema koji nastaje zbog kapilarnog curenja koji je uzrokovan cirkulirajućim citokinima. U teškim slučajevima, pacijentima može biti potrebna mehanička ventilacija zbog zatajenja disanja (Brudno i Kochenderfer 2019). Trajanje i razvoj samog sindroma ovisi o farmakokinetici CAR-T stanica, te je povezano s količinom CAR-T stanica u organizmu. Sindrom nije karakterističan za pacijente koji nemaju kliničku reakciju neposredno nakon CAR-T terapije. Za ublažavanje simptoma i sprječavanje progresije sindroma koriste se tocilizumab i anti-interleukin-6-receptor antagonist koji su uglavnom vrlo učinkoviti. Također se koriste glukokortikoidi, no njihova primjena nema brz učinak u blokiranju IL-6 receptora. Za procjenu potencijalnog razvitka CRS-a do sada su pronađeni potencijalni biomarkeri u krvi pacijenata (June i Sadelain 2018) Također, biomarkere treba otkrivati i opisivati u kontekstu

svakog maligniteta zasebno jer je njihova univerzalna primjena kroz širok spektar bolesti gotovo nemoguća, a ovisi o brojnim čimbenicima poput tipa maligniteta, mikrookolišu tumora i vrsti CAR-T terapije (Tan i ostali 2022). CRP i feritin su predloženi biomarkeri u predviđanju potencijalnog razvitka CRS-a i njegove jačine jer koncentracije ovih biljega koreliraju s ozbiljnošću nastalog sindroma. Ukoliko se pravodobno otkrije te se s terapijom krene agresivno i na vrijeme, CRS je reverzibilan. Bitno je i praćenje pacijenata koji su se oporavili kako ne bi došlo do pojave anti-CRS sindroma koji je ponovno povezan s naglim promjenama citokina u krvotoku (Schubert i sur. 2021) Zbog potencijalnih smrtnih ishoda i opasnih posljedica razvoja teškog oblika CRS-a, postoji velika potreba za identificiranjem biomarkera pomoću kojih se može predvidjeti mogućnost razvoja toksičnosti (Tan i ostali 2022).

6.2. Neurotoksičnost

Neurotoksičnost se najčešće klinički očituje kao širok spektar neuroloških i psihičkih promjena. Ove promjene uključuju napadaje, delirij, afaziju i halucinacije. Ovakve promjene uzrokovane su citokinima koji mogu prelaziti krvno-moždanu barijeru. U pacijenata s krvnim tumorima jaka neurotoksičnost karakterizirana je aktivacijom endotela. Aktivacijom endotela dolazi do veće propusnosti krvno-moždane barijere. Pokazalo se i da je neurotoksičnost povezana s visokom koncentracijom citokina u serumu, uključujući onih koji aktiviraju endotelne stanice (IL-6, $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$). U nekih pacijenata, CAR-T stanice nađene su u cerebrospinalnoj tekućini što pokazuje povećanu infiltraciju CAR-T stanica u cerebrospinalnu tekućinu za vrijeme CRS-a (Miliotou i Papadopoulou 2018).

Neurotoksičnost, trenutno poznata kao neurotoksični sindrom povezan s imunološkim efektorskim stanicama (ICANS), pojavljuje se u nekih pacijenata liječenih CAR-T stanicama. Ovaj oblik toksičnosti zabilježen je u kliničkim ispitivanjima i javlja se u do 64% pacijenata koji su tretirani CAR-T imunoterapijom (Schubert i sur. 2021) ICANS obično počinje nakon početka CRS-a, ali također se može pojaviti nakon prestanka CRS-a ili potpuno neovisno o CRS-u. Simptomi ICANS-a mogu se pojaviti istodobno s CRS-om, osobito kad se radi o teškim oblicima toksičnosti. Intratumorske interakcije između CAR-T stanica i makrofaga/monocita posredovane CD40 ligandom povezane su sa CRS-om, a vjerojatno i s neurotoksičnošću. Primjenom anakinre (antagonist IL-1) sprječava se razvoj CRS-a i neurotoksičnosti u mišjim modelima, bez utjecaja na učinkovitost CAR-T stanica (Castaneda-Puglianini i Chavez 2021). Primjena anakinre preporučuje se u najranijim stadijima CRS-a ili profilaktički kako bi se izbjegao potencijalni nastanak CRS-a (Schubert i sur. 2021) Liječenje neurotoksičnosti izazovno je upravo zbog postojanja krvno-moždane barijere koja predstavlja filter za određene

molekule. Tocilizumab (monoklonsko protutijelo koje blokira učinke IL-6) zbog svoje veličine teško prodire kroz krvno moždanu barijeru pa se liječenje deksametazonom često bira u ovom kontekstu zbog učinkovitog prodiranja kroz krvno moždanu barijeru (Miliotou i Papadopoulou 2018). Također, primjena tocilizumaba u liječenju ICANS-a povezana je s povećanim rizikom za razvoj težeg oblika neurotoksičnosti (Schubert i sur. 2021) Na temelju objavljenih podataka, kod tri FDA odobrene CAR-T stanične terapije za difuzni limfom velikih B stanica, medijano vrijeme do pojave neurotoksičnosti kreće se od 5 do 9 dana nakon infuzije CAR-T stanicama (Castaneda-Puglianini i Chavez 2021). Uočeno je da je viši stupanj neurološke toksičnosti povezan sa CRS-om višeg stupnja što ukazuje na neovisne mehanizme svakog procesa, ali s preklapajućim čimbenicima rizika i uzročnika (Brudno i Kochenderfer 2019).

6.3. Genotoksičnost

Osim gore spomenutih toksičnih sindroma, zabrinutost potiče i genotoksičnost od CAR-T stanica koje nastaju modifikacijom virusima. Razlog zabrinutosti je potencijalna insercijska mutageneza *in vivo*, koja može dovesti do pretjerane ekspresije dodanih gena ili može doći do uništenja određenih gena na mjestu insercije. Također, problem može predstavljati insercija gena u vruće regije („hot spots“) što može rezultirati deregulacijom onkogeno te potaknuti nastanak maligniteta. Zavisno o tipu vektora, virusi uvijek zadržavaju određenu imunogenost, tumorogenost i kompleksne procese produkcije (Miliotou i Papadopoulou 2018) Također, metode transformacije virusima u kreiranju CAR-T terapije izrazito su skupe te zahtijevaju stručno osposobljene radnike i skupocjenu opremu. CRISPR/Cas9 tehnologija u posljednje se vrijeme koristi za specifično uređivanje gena i pripremu CAR, što može dovesti do smanjena genotoksičnosti (Jin i sur. 2016) Praćenje liječenih pacijenata kroz duže vremenske periode nakon primanja CAR-T terapije pokazat će stvarne rizike i posljedice koje mogu biti povezane s komercijalno dostupnim CAR-T terapijama kada je riječ o njihovom genotoksičnom učinku (Schubert i sur. 2021).

6.4. Aplazija stanica B

Aplazija stanica B nuspojava je CAR-T imunoterapije koja je usmjerena na stanične receptore karakteristične za B stanice poput biljega CD19, CD20 i CD22. Klinička istraživanja pokazuju da je aplazija B stanica puno izraženija kod CAR-T imunoterapije u odnosu na terapiju monoklonalnim protutijelima poput rituximaba. Također, aplazija stanica B nestaje nakon nestanka CAR-T stanica iz organizma. Tijekom aplazije stanica B potrebno je nadomještanje gamma-globulina i tretiranje antibioticima kako bi se spriječio nastanak infekcija uzrokovanih nedostatkom stanica B (Miliotou i Papadopoulou 2018). Osim toga, nakon primjene CAR-T

terapije, kod nekih pacijenata zabilježena je pojava bakterijskih, virusnih i gljivičnih infekcija te je u nekim slučajevima došlo do smrti uzrokovane infekcijama (Gill i Brudno 2022). Uz aplaziju stanica B pojavljuje se i hipogamaglobulinemija koju obilježava nedostatak protutijela u krvi, a nastaje kao direktna posljedica nedostatka stanica B (Schubert i sur. 2021). Hipogamaglobulinemija može potrajati od nekoliko mjeseci pa sve do nekoliko godina nakon CAR-T terapije (Sheykhhasan i sur. 2022). Produljena aplazija B-stanica do 5 godina nakon terapije zabilježena je nakon liječenja CAR T-stanicama ALL-a. Dulja aplazija stanica B uočena je nakon korištenja CAR-T stanica koje imaju 4-1BB kao kostimulacijsku domenu (Schubert i sur. 2021).

7. Zaključak

Unatoč velikoj uspješnosti u primjeni CAR-T imunoterapije u liječenju nekih oblika hematoloških maligniteta, CAR-T imunoterapija zahtijeva brojna istraživanja i klinička istraživanja kako bi se otkrio njen puni potencijal u klinici. CAR-T imunoterapija trenutno predstavlja jedan od potencijalno najuspješnijih oblika terapije za liječenje raznih maligniteta u budućnosti. Istraživanja usmjerena na otkrivanje specifičnih antigena, razumijevanje čimbenika koji vode do uspjeha u liječenju hematoloških maligniteta, ali i istraživanja usmjerena na razumijevanje čimbenika koji onemogućavaju uspješnu primjenu u liječenju solidnih tumora nužna su kako bi se CAR-T terapija usavršila. Buduća primjena CAR-T imunoterapije vjerojatno neće biti ograničena samo na liječenje maligniteta nego će se koristiti i u liječenju autoimunih bolesti, jer brojna istraživanja pokazuju veliku mogućnost manipulacije CAR-T stanicama te njihovo usmjeravanje prema velikom broju ciljanih antigena. Razvijanjem načina proizvodnje i primjenom novih tehnologija očekuje se pad visokih cijena CAR-T terapije i povećanje dostupnosti ovog oblika terapije pacijentima.

8. Literatura

- Aghajanian H., Rurik J. G., Epstein J. A. 2022. CAR-based therapies: opportunities for immuno-medicine beyond cancer. *Nat. Metab.* 4(2), 163–169.
- Brudno J. N., Kochenderfer J. N. 2019. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood Rev.* 34, 45–55.
- Castaneda-Puglianini O., Chavez J. C. 2021. Assessing and management of neurotoxicity after CAR-T therapy in diffuse large B-cell lymphoma. *J. Blood Med.* 12, 775–783.
- Dana H., Chalbatani G. M., Jalali S. A., Mirzaei H. R., Grupp S. A., Suarez E. R., Rapôso C., Webster T. J. 2021. CAR-T cells: Early successes in blood cancer and challenges in solid tumors. *Acta Pharm. Sin. B.* 11(5), 1129–1147.
- Filley A. C., Henriquez M., Dey M. 2018. CART immunotherapy: Development, success, and translation to malignant gliomas and other solid tumors. *Front. Oncol.* 8, 453.
- Gill S., Tasian S. K., Shestova O., Li Y., Porter D. L., Carroll M., Danet-Desnoyers G., Scholler J., Grupp S. A., June C. H., Kalos M. 2014. Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells Key Points. *Blood.* 123(15), 2343–2354.
- Gill, S., Brudno J. N. 2022. CAR T-Cell Therapy in Hematologic Malignancies: Clinical Role, Toxicity, and Unanswered Questions. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book.* 41, 1–20.
- Graham C., Hewitson R., Pagliuca A., Benjamin R. 2018. Cancer immunotherapy with CAR-T cells - behold the future. *Clin. Med. (Lond).* 18(4), 324–328.
- Han D., Xu Z., Zhuang Y., Ye Z., Qian Q. 2021. Current progress in CAR-T cell therapy for hematological malignancies. *J. Cancer.* 12(2), 326–334.
- Jin C., Fotaki G., Ramachandran M., Nilsson B., Essand M., Yu D. 2016. Safe engineering of CAR T cells for adoptive cell therapy of cancer using long-term episomal gene transfer. *EMBO Mol. Med.* 8(7), 702–711.
- June C. H., Sadelain M. 2018. Chimeric Antigen Receptor Therapy. *N. Engl. J. Med.* (1), 64–73.
- Shirasu N., Kuroki M. 2012. Functional design of chimeric T-cell antigen receptors for adoptive immunotherapy of cancer: architecture and outcomes. *Anticancer Res.* 32(6), 2377–2383.

- Maldini C. R., Ellis G.I., Riley J. L. 2018. CAR T cells for infection, autoimmunity and allotransplantation. *Nat. Rev. Immunol.* 18(10), 605–616.
- Marvin-Peek J., Savani B. N., Olalekan O. O., Dholaria B. 2022. Challenges and Advances in Chimeric Antigen Receptor Therapy for Acute Myeloid Leukemia. *Cancers.* 14(3), 497.
- Miliotou A. N., Papadopoulou L. C. 2018. CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 19(1), 5–18.
- Newick K., O’Brien S., Moon E., Albelda S. M. 2017. CAR T Cell Therapy for Solid Tumors. *Annu. Rev. Med.* 68, 139–152.
- Sadeqi Nezhad M., Seifalian A., Bagheri N., Yaghoubi S., Karimi M. H., Adbollahpour-Alitappeh M. 2020. Chimeric Antigen Receptor Based Therapy as a Potential Approach in Autoimmune Diseases: How Close Are We to the Treatment? *Front. Immunol.* 11, 603237.
- Schubert M. L., Schmitt M., Wang L., Ramos C. A., Jordan K., Müller-Tidow C., Dreger P. 2021. Side-effect management of chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy. *Ann. Oncol.* 32(1), 34–48.
- 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).
- Sheykhhasan M., Manoochehri H., Dama P. 2022. Use of CAR T-cell for acute lymphoblastic leukemia (ALL) treatment: a review study. *Cancer Gene Ther.* 29(8-9), 1080–1096.
- Tan J. Y., Low M. H., Chen Y., Lim F. L. W. I. 2022. CAR T Cell Therapy in Hematological Malignancies: Implications of the Tumor Microenvironment and Biomarkers on Efficacy and Toxicity. *Int J. Mol. Sci.* 23(13), 6931.
- Zhang X., Zhu L., Zhang H., Chen S., Xiao Y. 2022. CAR-T Cell Therapy in Hematological Malignancies: Current Opportunities and Challenges. *Front. Immunol.* 13, 927153.

Internetski izvori

Klinički bolnički centar Zagreb (2022) <https://www.kbc-zagreb.hr/lijecenje-autolognim-car-t-stanicama.aspx> (pristupljeno 24. 8. 2022.)

9. Životopis

Moje ime je Franko Klasić i rođen sam u Zagrebu 2000. godine. Srednjoškolsko obrazovanje stekao sam u općoj gimnaziji te sam zatim upisao preddiplomski studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, gdje namjeravam upisati diplomski studij Fiziologije i imunobiologije. Kada je riječ o znanosti, najviše me zanima imunologija te bih se u budućnosti volio baviti istraživanjima u tom području biologije.