

# CAR-T stanična terapija u hematologiji

---

Premuž, Nika

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:556628>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-30**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Nika Premuž**

# **CAR-T stanična terapija u hematologiji**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2023.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Klinici za unutarnje bolesti KB Merkur pod vodstvom prim. dr. sc. Inge Mandac Smoljanović i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2022./2023.

## POPIS I OBJAŠNENJE KRATICA KORIŠTENIH U RADU:

ALL – akutna limfoblastična leukemija

AML – akutna mijeloična leukemija

B-ALL – akutna B-limfoblastična leukemija

BCMA – antigen za sazrijevanje B stanica (*eng. B-cell maturation antigen*)

BTKi – inhibitori Brutonove tirozin kinaze (*eng. Bruton's tyrosine kinase inhibitors*)

CCR7 – prema eng. *C-C chemokine receptor type 7*

CD – prema eng. *Cluster of differentiation*

CR – potpuna remisija (*eng. complete remission*)

CRS – sindrom otpuštanja citokina (*eng. cytokine-release syndrom*)

CTL – citotoksični T limfocit

DLBCL – difuzni B velikostanični limfom

FDA – Američka agencija za hranu i lijekove

KLL – kronična limfocitna leukemija

GM-CSF – prema eng. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

HLH – hemofagocitna limfohistiocitoza

HSCT – transplantacija hematopoetskih matičnih stanica (*eng. Hematopoietic stem cell transplantation*)

ICANS - sindrom neurotoksičnosti povezan s imunološkim efektorskim stanicama (*eng. Immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome*)

IFN- $\gamma$  – interferon gama

IL-12 – interleukin 12

ITAM molekule – prema eng. *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*

MAH – sindrom aktivacije makrofaga

MCL – limfom plaštene zone (*eng. mantle cell lymphoma*)

MDSC – myeloid-derived suppressor cells

MHC – prema eng. *Major histocompatibility complex*

NK stanice – prirodno-ubilačke stanice (*eng. Natural killer cells*)

r/r – prema eng. *relapsed/refractory*

scFv – jendolančani varijabilni fragment (*eng. Single-chain variable fragment*)

TAM – prema eng. *tumor-associated macrophages*

TME – tumorski mikrookoliš

TNF – faktor tumorske nekroze

Treg – regulacijske T-stanice

VEGF – prema eng. *Vascular endothelial growth factor*

# SADRŽAJ

## SAŽETAK

## SUMMARY

1. UVOD.....	1
1.1. Tumorska imunost .....	1
1.2. Izbjegavanje imunosnog odgovora.....	2
2. POVIJEST I RAZVOJ CAR-T STANIČNE TERAPIJE.....	3
2.1. Građa CAR receptora .....	4
2.1.1. Ektodomena .....	4
2.1.2. Transmembranska domena .....	4
2.1.3. Endodomena .....	4
2.2. Generacije CAR-T stanica .....	5
2.2.1. Prva generacija .....	5
2.2.2. Druga generacija.....	5
2.2.3. Treća generacija .....	6
2.2.4. Četvrta generacija.....	6
2.2.5. Peta generacija .....	6
2.3. Mehanizam djelovanja.....	7
3. PROIZVODNJA I KLINIČKA APLIKACIJA CAR-T STANICA .....	8
4. KLINIČKA PRIMJENA CAR-T STANIČNE TERAPIJE U HEMATOLOGIJI .....	10
4.1. CAR-T stanična terapija u liječenju akutne limfoblastične leukemije (ALL).....	10
4.2. CAR-T stanična terapija u liječenju kronične limfocitne leukemije (KLL).....	11
4.3. CAR-T stanična terapija u liječenju Richterovog sindroma .....	12
4.4. CAR-T stanična terapija u liječenju limfoma.....	12
4.5. CAR-T stanična terapija u liječenju multiplog mijeloma .....	13
4.6. CAR-T stanična terapija u liječenju akutne mijeloične leukemije (AML).....	14
5. FDA ODOBRENE CAR-T STANIČNE TERAPIJE.....	15
5.1. Axicabtagene Ciloleucel (YESCARTA™).....	15
5.2. Tisagenlecleucel (KYMRIAH™) .....	15
5.3. Brexucabtagene Autoleucel (TECARTUS™).....	16
5.4. Lisocabtagene Maraleucel (BREYANZI™).....	16
5.5. Idecabtagene Vicleucel (ABECMA™).....	16
5.6. Ciltacabtagene Autoleucel (CARVYKTI™).....	16
6. OGRANIČENJA CAR-T STANIČNE TERAPIJE.....	18
6.1. Gubitak antigena.....	18

6.2. On-target off-tumor efekt.....	18
6.3. Imunosupresivni mikrookoliš.....	19
6.4. Infiltracija CAR-T stanica u ciljna tkiva.....	19
7. TOKSIČNOST I NUSPOJAVE CAR-T STANIČNE TERAPIJE .....	21
7.1. Sindrom otpuštanja citokina (CRS).....	21
7.2. HLH/MAS.....	21
7.3. ICANS.....	22
7.4. Terapijski pristup toksičnim nuspojavama .....	22
7.5. Prevencija toksičnih nuspojava .....	23
8. ZAKLJUČAK.....	25
9. ZAHVALE .....	26
10. LITERATURA.....	27
11. ŽIVOTOPIS .....	35

## SAŽETAK

NASLOV RADA: CAR-T stanična terapija u hematologiji

AUTOR: Nika Premuž

CAR-T stanična (eng. *chimeric antigen receptor T-cell*) terapija je vrsta adaptivne stanične imunoterapije u kojoj se T limfociti genetski modificiraju *ex vivo* te se potom vraćaju u krvotok pacijenta kako bi prepoznavali i uništavali tumorske stanice. Radi se o novom terapijskom pristupu liječenju malignih bolesti koji u pretkliničkim i kliničkim studijama pokazuje odlične rezultate u liječenju hematoloških malignih bolesti. Osnovna struktura CAR receptora sastoji se od tri glavne domene: ektodomene, transmembranske domene i endodomene. Na temelju građe endodomene, CAR-T stanice podijeljene su u pet generacija. CAR-T stanična terapija ima velik potencijal što potvrđuju brojne kliničke studije i sve veći broj komercijalnih CAR-T staničnih terapija koje je odobrila FDA.

Unatoč tome, postoje brojna ograničenja u primjeni CAR-T stanica. CAR-T staničnu terapiju prati visoka stopa toksičnih učinaka zbog čega je potreban dobar probir pacijenata koji su kandidati za takvu vrstu liječenja. Ovaj rad donosi pregled dosadašnjih spoznaja o CAR-T staničnoj terapiji te njezinu uporabu u liječenju hematoloških proliferativnih bolesti.

Ključne riječi: CAR-T stanice, imunoterapija, hematookologija

## **SUMMARY**

TITLE: CAR-T cell therapy in hematology

AUTHOR: Nika Premuž

CAR-T cell therapy is a type of adaptive cell immunotherapy that uses ex vivo genetically modified T-cells which are administered into the bloodstream in order to recognize and destroy cancer cells. It is a new therapeutic approach in cancer therapy, which shows promising results in preclinical and clinical trials when used to treat haematologic malignancies. The CAR receptor is structurally made of three main domains: ectodomain, transmembrane domain and endodomain. Based on the endodomain structure, CAR-T cells can be divided into five distinct generations. CAR-T cell therapy has great potential, which is confirmed by numerous clinical trials and an increasing number of FDA approved CAR-T cell therapies. Despite that, CAR-T cell therapy has a lot of limitations due to its high rate of adverse effects, mainly toxicities. Thus, the patient selection for that specific treatment should be precisely defined. This review focuses on CAR-T therapy and its use in the treatment of haematological proliferative diseases.

Key words: CAR-T cells, immunotherapy, Hemato-Oncology



# 1. UVOD

Incidencija i prevalencija malignih bolesti u svijetu u stalnom su porastu zbog čega ove bolesti predstavljaju važan javnozdravstveni i ekonomski problem današnjice.

Prema podacima Međunarodne agencije za istraživanje raka (IARC), u 2020. godini dijagnosticirano je 19,3 milijuna novih slučajeva malignih bolesti uz 10 milijuna novih smrtnih slučajeva u svijetu (1). Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) u slijedećih 20 godina predviđa porast prevalencije malignih bolesti za čak 60% (2).

Sve veće opterećenje malignim bolestima predstavlja velik izazov modernoj medicini. Uz kemoterapiju i radioterapiju kao tradicionalne metode liječenja maligniteta, razvijaju se i novi oblici liječenja.

CAR-T stanična (eng. *chimeric antigen receptor T-cell*) terapija je vrsta adaptivne stanične imunoterapije u kojoj se T limfociti genetski modificiraju *ex vivo* te se potom vraćaju u krvotok pacijenta kako bi prepoznavali i uništavali tumorske stanice (3).

Adaptivna terapija T stanicama koje izražavaju kimerične receptore za antigene ponajviše se koristi u liječenju hematoloških malignih bolesti gdje pokazuje obećavajuće rezultate, no danas postoji i sve više kliničkih ispitivanja ove vrste terapije u liječenju solidnih tumora (4).

U ovome radu naglasak će biti na uporabi CAR-T stanične terapije u hematologiji.

## 1.1. Tumorska imunost

Zloćudni fenotip malignih stanica posljedica je poremećaja regulacije stanične proliferacije, otpornosti tumorskih stanica na apoptotsku smrt te sposobnosti tumora u izbjegavanju imunonadzora. Imunološki sustav ima važnu ulogu u prepoznavanju i uništavanju klonova transformiranih stanica te u uništavanju već stvorenih tumorskih procesa. U prilog tome govori povećana učestalost nekih malignih bolesti u imunokompromitiranih bolesnika (5). Učinkovita imunoreakcija na maligne stanice uključuje procese urođene i adaptivne imunosti.

Maligne stanice izražavaju tumor specifične antigene (TAA) kao i antigene pridružene tumoru koje prepoznaju antigen predočne stanice (APC) kao što su dendritičke stanice. One se, potaknute tumorskim antigenima, aktiviraju, dolazi do ekspresije CCR7, te potom odlaze u limfne čvorove, gdje putem MHC molekula klase I i II predočuju antigene CD4+ i CD8+ limfocitima T. Posredovanjem kostimulacijskih molekula CD40, CD80 i CD86 i sekrecijom aktivirajućih citokina dolazi do aktivacije T staničnog odgovora. Diferencijacijom naivnih CD8+ stanica T nastaju izvršne CTL koje prepoznaju specifične TAA u sklopu MHC-I molekula na

malignim stanicama te ih potom ubijaju sekrecijom perforina i granzima. Ubijanjem malignih stanica oslobađaju se molekule TAA što pokreće novi ciklus tumorske imunosti (6).

Važnost CD4+ pomagačkih stanica T u tumorskoj imunosti manje je jasna. Smatra se da one imaju ulogu u osiguravanju izvora citokina potrebnih za diferencijaciju naivnih CD8+ stanica T u izvršne i memorijske CTL. Osim toga, one luče TNF i IFN- $\gamma$  koji potiču izražaj MHC-I molekula na malignim stanicama te pospješuju razaranje malignih stanica posredovano CTL (7).

Osim opisanog adaptivnog imunološkog odgovora, tumorsku imunost čine i sastavnice urođenog imunološkog sustava – makrofazi, protutijela, NK stanice.

## 1.2. Izbjegavanje imunskog odgovora

Unatoč postojanju mehanizama tumorske imunosti, maligne stanice mogu progresivno rasti što upućuje na njihovu sposobnost izbjegavanja imunonadzora (8). Takav progresivan rast inače imunogenih tumora, Schreiber i suradnici objasnili su konceptom imunouređenja tumora (engl. *tumor immunoediting*). Imunosni odgovor djeluje kao selekcijski pritisak koji dovodi do preživljavanja i bržeg rasta inačica malignih stanica smanjene imunogeničnosti (9). Zbog velike mitotičke aktivnosti i genetske nestabilnosti, u malignim stanicama često dolazi do točkastih mutacija i delecija gena koji kodiraju tumorske antigene. Stvaranjem neoepitopa na malignim stanicama one postaju 'nevidljive' T-staničnom odgovoru (10).

Osim toga, maligne stanice mogu pokrenuti i aktivnu inhibiciju imunskog odgovora domaćina djelovanjem PD-1 i CTLA-4 molekula koje pokreću inhibitorne signalne putove u T limfocitima (11). Istraživanja su pokazala da i regulacijske T stanice mogu inhibirati imunosni odgovor na tumor, dok makrofazi pridruženi tumoru promjenom tumorskog mikrookoliša inhibiraju T stanični odgovor (lučenjem IL-10 i prostagladnina E<sub>2</sub>) te potiču rast i invazivnost malignih stanica pomoću čimbenika angiogeneze (VEGF) (12).

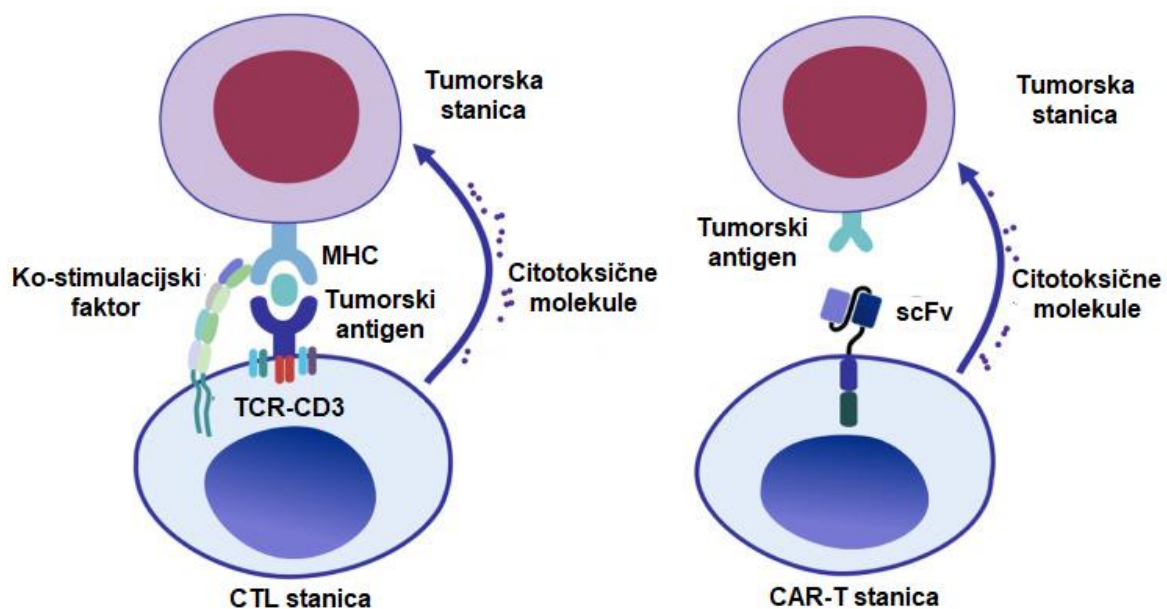
Još jedan od mehanizama supresije T staničnog odgovora na maligne stanice uključuje supresijske stanice mijeloidnog podrijetla (MDSC) koje luče enzime indolaminsku-2,3-dioksigenazu i arginazu-1 (13). Adekvatna aktivacija T stanične imunosti na maligne stanice uključuje aktivaciju nekoliko signalnih puteva među kojima su: TCR posredovano prepoznavanje antigena na MHC molekuli APC stanica, aktivacija kostimulatornih faktora i citokinsko signaliziranje. S obzirom da je za većinsku aktivaciju TCR na T limfocitima potrebno MHC predočavanje, maligne stanice često smanje ekspresiju MHC molekula čime izbjegavaju imunosnom prepoznavanju od strane domaćina (14).

## 2. POVIJEST I RAZVOJ CAR-T STANIČNE TERAPIJE

CAR-T stanična terapija koristi mehanizme adaptivne imunosti, s time da se T limfociti izolirani iz pacijenta genetski modificiraju *in vitro* kako bi prepoznavali i ubijali maligne stanice. Ova terapija prvo se počela koristiti u hematološkim malignim bolestima gdje je postigla dobre rezultate što dovodi do komercijalne primjene CAR-T stanica (15). CAR-T koje su ciljale CD-19 antigen na malignim B-limfocitima u relapsno/refraktornim B-limfoproliferativnim klonalnim poremećajima, pokazale su kompletni odgovor kod 40 do 54%, 67 i 69-74% u relapsno-refraktornom agresivnom B-NHL, limfomima plaštene zone i indolentnim limfomima (16)

FDA je 2017. godine prvi put odobrila komercijalnu CAR-T staničnu terapiju (*Kymriah*) za liječenje B-ALL (17).

Razvoj CAR-T tehnologije počinje 1989. godine kada su Gross i suradnici (18) konstruirali imunoglobulin-TCR kimerični receptor koji je imao funkciju antigenskog prepoznavanja i pokretanja T-stanične aktivacijske kaskade. Nakon toga Eshar i suradnici (19) zamijenili su TCR sa antigen-specifičnim jednolančanim varijabilnim fragmentom (scFv) kojeg su spojili s CD3 $\zeta$  lancem te tako postigli uspješno antigen-specifično prepoznavanje preko scFv fragmenta i aktivaciju T stanica koje je neovisno o MHC molekulama (slika 1) (14).



**Slika 1.** Mehanizmi antigen-specifičnog prepoznavanja kod CTL i CAR-T stanica. CTL stanice prepoznaju tumorske antigene prezentirane na MHC kompleksu preko TCR-CD3 kompleksa te uz pomoć ko-stimulacijskih faktora. S druge strane, CAR-T stanice prepoznaju tumorske antigene scFv fragmentom, bez sudjelovanja MHC molekula. Preuzeto i prilagođeno iz Chen i sur., 2022.

## 2.1. Građa CAR receptora

Osnovna struktura CAR receptora sastoji se od tri glavne domene: ektodomene, transmembranske domene i endodomene (slika 2).

### 2.1.1. Ektodomena

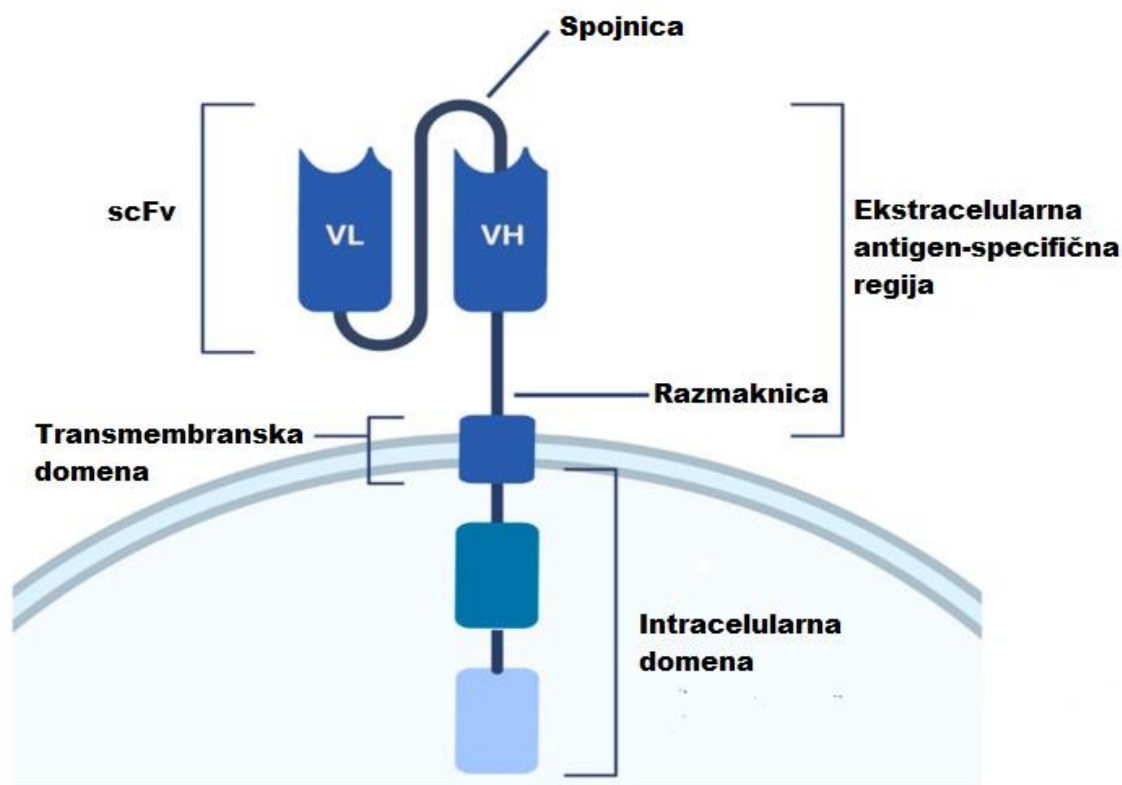
Ekstracelularnu domenu ili ektodomenu čine signalna antigen-specifična regija, spojnica i razmaknica. Antigen-specifičnu regiju čini scFv fragment koji se sastoji od varijabilnih dijelova lakih i teških lanaca antigen-specifičnih imunoglobulina koji su međusobno povezani fleksibilnom spojnicom. Razmaknica (*engl. hinge region*) ima ulogu veze i prijenosa signala na transmembransku domenu. Sve ekstracelularne strukture osiguravaju fleksibilnost i afinitet vezanja tumorskih antigena (20).

### 2.1.2. Transmembranska domena

Transmembranska domena građena je od hidrofobnog alfa heliksa koji ulazi u staničnu membranu. Ova domena određuje stabilnost samog receptora (20).

### 2.1.3. Endodomena

Intracelularna domena ili endodomena zadužena je za prijenos aktivacijskih i ko-stimulacijskih signala i pokretanje unutarstaničnih signalnih puteva. Građa endodomene klasificira CAR stanice u pet generacija. Sve generacije sadrže CD3 $\zeta$  lanac koji se sastoji od tri ITAM molekule (20).



**Slika 2.** Građa kimeričnog antigenog receptora (CAR). Preuzeto i prilagođeno iz Sadowski i sur., 2022.

## 2.2. Generacije CAR-T stanica

Na temelju građe endodomene CAR-T stanice podijeljene su u pet generacija. Ektodomena i transmembranska domena iste su građe u svim generacijama (slika 3).

### 2.2.1. Prva generacija

Endodomena prve generacije CAR-T stanica sastoji se od  $\zeta$ -lanca CD3 molekule s tri para ITAM podjedinica. Ova generacija nije postigla zadovoljavajuće terapijske rezultate zbog neadekvatne signalizacije i kratkog preživljenja. Unatoč lošim rezultatima, prva generacija pokazala je velik potencijal ove terapije (21).

### 2.2.2. Druga generacija

Drugoj generaciji dodana je jedna kostimulatorna molekula u intracelularnu regiju čime je pojačan antitumorski učinak. Kostimulatorne molekule kao što su 4-1BB (CD137), CD28, OX40 i druge inducibilne kostimulatorne molekule pokreću intracelularne signalizacijske puteve (JFK, ERK i NF- $\kappa$ B) u T limfocitima te tako pospješuju proliferacijski i citotoksični potencijal CAR-T stanica. U proizvodnji druge generacije koristi se retrovirusni vektorski transfer koji prenosi ograničene fragmente gena što ograničava potencijal druge generacije CAR-T stanica (22).

### 2.2.3. Treća generacija

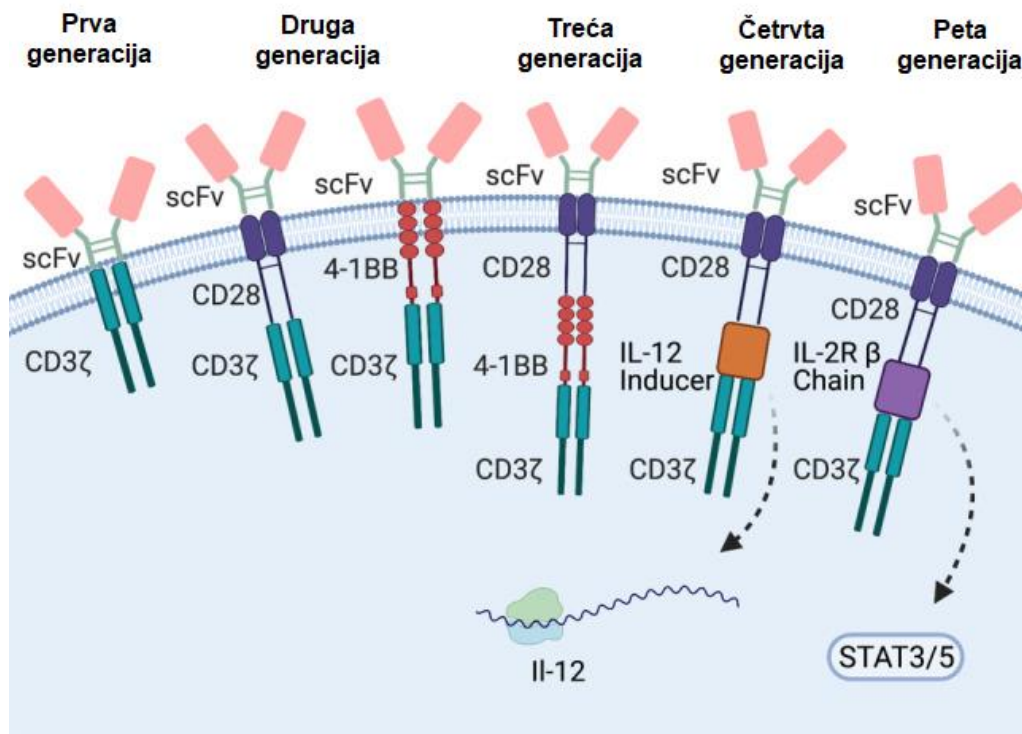
Treća generacija građena je od dvije kostimulatorne molekule u intracelularnoj regiji te koristi lentivirusni vektorski transfer koji prenosi veće fragmente gena u T stanice. Ipak, studije nisu pokazale značajno bolje rezultate što govori u prilog hipotezi o postizanju praga u aktivacijskoj signalizaciji ITAM molekula (23).

### 2.2.4. Četvrta generacija

Četvrta generacija naziva se još i TRUCKs (T cell redirect for universal cytokine mediated-killing). Ova generacija dizajnirana je na osnovi druge generacije uz dodatak gena za citokine i transkripcijskih faktora NFAT te time može otpuštati transgenični citokin IL-12. IL-12 inducira proizvodnju IFN- $\gamma$ , perforina i granzima u T-stanicama te inhibira proliferaciju Treg stanica. Time se pojačava antitumorska imunost T stanica i umanjuju efekti tumorskog izbjegavanja imunosti (24).

### 2.2.5. Peta generacija

Peta generacija također je dizajnirana na temelju druge generacije s dodatkom intracelularne domene citokinskog receptora (IL-2R $\beta$ ) koja aktivira signalne puteve JAK i STAT3/5. Ova generacija još se istražuje (25).



**Slika 3.** Struktura CAR receptora i generacije CAR-T stanica. Preuzeto i prilagođeno iz Umut i sur., 2021.

### 2.3. Mehanizam djelovanja

Mehanizam djelovanja CAR-T stanične terapije temelji se na povezivanju scFv domene CAR receptora i ciljnog antigena koji se nalazi na površini tumorskih stanica. Ovo povezivanje neovisno je o MHC molekulama. Nakon toga, dolazi do formiranja netipične imunološke sinapse (IS) koja je preduvjet za antitumorske izvršne funkcije CAR-T stanica. CAR-T stanice, u usporedbi s klasičnim TCR T stanicama, stvaraju jaču imunološku sinapsu (26). Antitumorska aktivnost CAR-T stanica uključuje citolitičku aktivnost posredovanu perforinima i granzimima te lučenjem citokina (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) s antitumorskom aktivnošću. Antitumorska aktivnost odvija se i putem TRAIL molekula (eng. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) koje se vežu za receptore smrti (DR4, DR5) smještene na tumorskim stanicama te dovode do lize tumorskih stanica. Ovaj proces predstavlja tzv. efekt presatka protiv tumora (eng. *graft vs. tumor effect*). Osim navedenih, CAR-T stanice iskorištavaju Fas i FasL signali put kojima uništavaju tumorske stanice. Fas i FasL signalni put započinje trimerizacijom Fas receptora koja rezultira aktivacijom kaspaze 8 i pro-kaspaze 8 koje tvore DISC (eng. *death-inducing signaling complex*). Aktivirana kaspaza 8 zatim pokreće nizvodnu signalnu kaskadu koja pretvara pro-kaspazu 3 u zrelu kaspazu 3 koja posreduje u aktivaciji apoptotske smrti (27).

### 3. PROIZVODNJA I KLINIČKA PRIMJENA CAR-T STANICA

Proizvodnja CAR-T stanica podrazumijeva individualiziran pristup i dizajn CAR receptora sa tumor-specifičnim scFv fragmentima s time da sam postupak proizvodnje CAR-T stanica slijedi standardizirane protokole koji uključuju kontrolu kvalitete nakon svakog koraka proizvodnje (28).

Prvi korak je tzv. leukaferaza, odnosno prikupljanje periferne krvi i izdvajanje leukocita iz periferne krvi koja može biti od samog pacijenta (autologno), zdravog donora (alogenično) ili krv iz pupkovine (29). Potom se T limfociti izdvajaju od ostalih leukocita uporabom kuglica obloženih anti-CD3 ili anti-CD28 monoklonskim protutijelima te se faktorima rasta (IL-2, IL-7 ili IL-15) inducira aktivacija i rast izdvojenih T limfocita (30).

Nakon toga, slijedi prijenos genetskog materijala koji kodira CAR receptor u dobivene T limfocite. Metode prijenosa genetskog materijala se s obzirom na korišteni vektor mogu podijeliti na metode koje koriste virusni vektor i one koje ne koriste virusne vektore. Kao virusni vektori koriste se lentivirusi, retrovirusi i adenovirusi (20). Oni pomoću reverzne transkriptaze prevode RNA u DNA koja se integrira u genom T stanica i kodira CAR receptore. Ovaj mehanizam omogućuje vrlo brz i efikasan prijenos genetskog materijala, međutim virusni vektori predstavljaju i moguću sigurnosnu opasnost (31). Neželjene posljedice i ograničenja ove metode su mogućnost karcinogeneze i toksičnost uzrokovane insercijskim mutacijama. Kako bi se izbjegli ovi neželjeni učinci, u primjenu su ušle metode koje ne koriste virusne vektore kao što su mRNA transfekcija i uporaba transpozona. Najčešće korišteni transposoni su *Sleeping Beauty* (SB) i *PiggyBac* transpozoni koji omogućuju sigurniji vektorski transfer genetskog materijala (32). CAR-kodirajuće mRNA molekule također omogućuju prijenos genetskog materijala i proizvodnju CAR-T stanica s antitumorskom aktivnošću. Prednosti ne virusnih metoda su bolja integracija transduciranih gena zbog slabije promotorske aktivnosti (33), niža stopa epigenetskih promijena te manja cijena samog postupka (34), dok su negativne strane: potreba za većim brojem transfuzija, mogućnost migracije transpozona te mogućnost mutageneze (35).

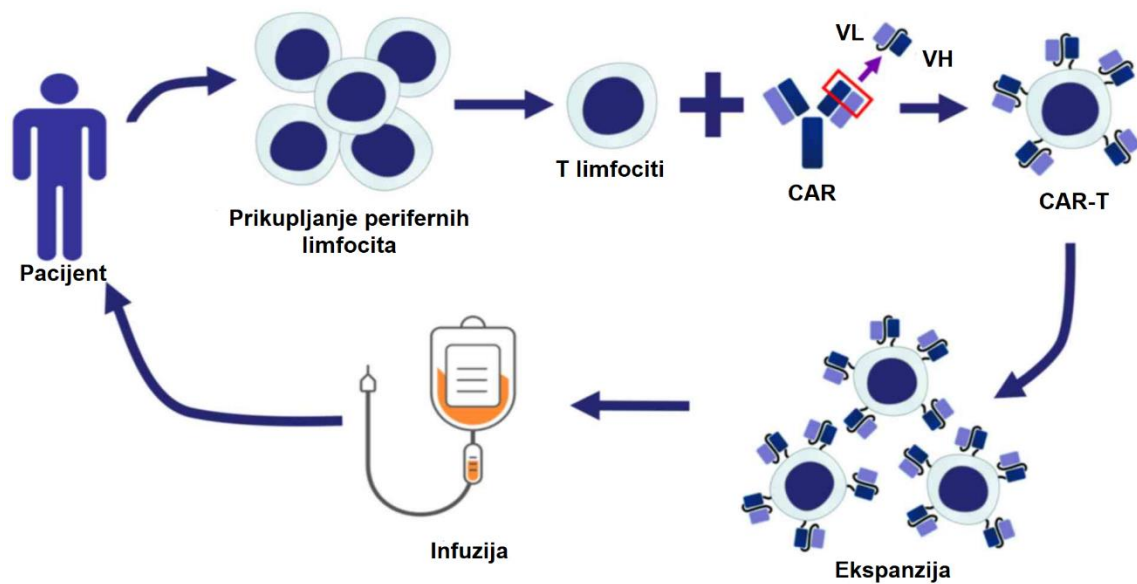
Tako proizvedene T stanice s ekspresijom CAR receptora na staničnoj membrani se umnažaju u bioreaktorima do željenog volumena stanica koji se potom daje pacijentu intravenski (36).

Infuzija CAR-T stanične terapije slijedi 48 do 96 sati nakon limfodeplecijske kemoterapije. Svrha limfodeplecijske kemoterapije je smanjenje broja endogenih limfocita te posljedično povećanje dostupnosti cirkulirajućih citokina kao što su IL-15, IL-7, IL-2 koji stimuliraju JAK-STAT posredovanu aktivaciju i diobu infundiranih CAR-T stanica (37). Brojne studije pokazale



su bolje rezultate primijene CAR-T stanične terapije u pacijenata koji su prošli limfodeplecijski kemoterapijski protokol u usporedbi s pacijentima koji nisu (38).

Nakon primjene CAR-T stanične terapije, pacijent ostaje još nekoliko dana hospitaliziran radi praćenja i intervencije u slučaju pojave neželjenih nuspojava. Cijeli proces proizvodnje i primjene CAR-T stanične terapije traje oko 3 tjedna gdje najveći dio vremena otpada na proces pripreme CAR-T stanica (4).



**Slika 4.** Shematski prikaz temeljnih principa CAR-T stanične terapije. Preuzeto i prilagođeno iz Chen i sur., 2022.

## 4. KLINIČKA PRIMJENA CAR-T STANIČNE TERAPIJE U HEMATOLOGIJI

CAR-T stanična terapija najčešće se koristi u liječenju hematoloških malignih bolesti.

Molekula CD19 na limfocitima B najčešća je ciljna molekula koja služi kao ciljni antigen CAR-T stanične terapije, ova meta koristi se u liječenju limfoma i akutne limfoblastične leukemije (ALL) (39). Osim ovih, CAR-T stanična terapija primjenjuje se u liječenju i drugih hematoloških bolesti.

### 4.1. CAR-T stanična terapija u liječenju akutne limfoblastične leukemije (ALL)

ALL nastaje malignom proliferacijom prekursorskih B ili T limfocita u koštanoj srži. Radi se o najčešćoj vrsti leukemije dječje dobi (40). U djece se najčešće javlja T-ALL, dok je kod odraslih češća B-ALL uz značajno lošiju prognozu kod pojave u odrasloj dobi (41). Kemoterapijski protokoli su uobičajena terapija za ALL uz mogućnost alogenične transplantacije hematopoetskih matičnih stanica kod visokorizičnih pacijenata (42).

CAR-T stanična terapija pokazala je vrlo dobre rezultate u liječenju ALL-a, osobito CAR-T stanice s CD19 antigenskom specifičnošću s obzirom na to da je CD19 biomarker izražen na B staničnim linijama. CD19 je transmembranski glikoprotein uključen u B-staničnu aktivaciju te je izražen i na prekursorskim stadijima B stanične linije (43). Zbog dobrih rezultata u kliničkim studijama, 2017. godine je FDA odobrila CAR-T stanični proizvod *Kymriah* koji cilja CD19 molekulu za liječenje B-ALL. Ova terapija pokazuje ukupnu stopu remisije od 81% kod djece i mladih odraslih s relapsno/refrakternom akutnom B-ALL (r/r B-ALL) (44).

Drugi potencijalni ciljni antigen je molekula CD20 te brojne studije istražuju učinke kombiniranih CAR-T staničnih terapija (45). S druge strane, u liječenju T-ALL, terapija koja cilja molekulu CD19 nije pokazala dobre rezultate te se ovdje istražuju terapije koje ciljaju molekule CD5 i CD7 (39).

CAR-T stanična terapija u pedijatrijskoj populaciji može održati kompletnu remisiju u B-ALL, bez potrebe za konsolidacijskom alogeničnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica.

U odrasloj populaciji B-ALL pacijenata, konsolidacija alogeničnom transplantacijom krvotvornih perifernih matičnih stanica od HLA-identičnog darivatelja, preporučuje se ukoliko je održana kompletna remisija nakon CAR-T stanične terapije (46).

## 4.2. CAR-T stanična terapija u liječenju kronične limfocitne leukemije (KLL)

KLL je B-stanična limfoproliferativna bolest karakterizirana klonalnim B-limfocitima koji se nakupljaju u koštanoj srži, perifernoj krvi, slezeni te limfnim čvorovima (47). U liječenju B-KLL koristi se ciljana terapija inhibitorima Brutonove tirozin kinaze, potom BCL inhibitori, imunokemoterapija te monoklonalna protutijela usmjerena na CD20 B limfocite. (48). Unatoč brojnim dostupnim terapijama, KLL je i dalje neizlječiva bolest. Danas postoje brojne učinkovite terapije u liječenju B-KLL zbog čega veliki dio pacijenata nema indicaciju za staničnom terapijom ili alogeničnom transplantacijom.

CAR-T stanična terapija istražuje se kod pacijenata s relapsnom ili refrakternom KLL gdje se kao ciljna molekula koristi CD19. Ipak, stanična terapija pokazuje znatno lošije rezultate u liječenju KLL-a u usporedbi s rezultatima liječenja ALL-a ili DLBCL. U odluci o liječenju B-KLL CAR-T staničnom terapijom, postoji nekoliko izazova koje treba razmotriti.

Kako je B-KLL bolest starije životne dobi, treba uzeti u obzir brojne komorbiditete pacijenata i imunodeficijenciju. CAR T stanična terapija može imati pojačanu neurotoksičnost kod KLL pacijenata starijih od 65 godina.

Kod pacijenata sa B-KLL može doći do takozvane imunosubverzije/smanjenog odgovora CAR-T staničnog produkta (49)

Prema istraživanju Geyera i suradnika, ukupna stopa odgovora na liječenje CAR-T staničnom terapijom bila je 38%, dok je stopa kompletne remisije bila 25% te medijan preživljenja 17 mjeseci (50). Unatoč lošim rezultatima u liječenju KLL-a, novija istraživanja prepoznaju potencijal CAR-T stanične terapije kao konsolidacijske terapije kod pacijenata s parcijalnom remisijom (51). To se posebno odnosi na pacijente koji su rezistentni/intolerantni na Bruton tirazne inhibitore, ili venetoklaks.

U skupini pacijenata s B-KLL i del17 ili p53 mutacijom, ili nemutiranim teškim lancem imunoglobulina, dosadašnji terapijski pristupi nisu donijeli zadovoljavajuće trajanje odgovora. Razmatra se baš ta skupina pacijenata kod koje bi bilo učinkovitije ponuditi CAR-T staničnu terapiju u ranijim linijama liječenja uz uspješnije sakupljanje T-limfocita (49).

### 4.3. CAR-T stanična terapija u liječenju Richterovog sindroma

Richterov sindrom predstavlja zloćudnu preobrazbu KLL-a u difuzni velikostanični B-limfom (DLBCL). Ova bolest ima vrlo agresivan tijek i lošu prognozu s medijanom preživljenja od 5 do 8 mjeseci (52). Terapijske opcije kod ove bolesti su vrlo ograničene, a ukoliko se postigne zadovoljavajući terapijski odgovor na sistemska (imuno)kemoterapiju, kod mlađih pacijenata je indicirana alogenična transplantacija hematopoetskih matičnih stanica (53).

U dosadašnjim kliničkim istraživanjima u kojima je mali broj pacijenata s Richterovim sindromom liječen CAR-T staničnom terapijom, heterogeni su terapijski odgovori. Dio pacijenata je postigao kompletnu remisiju, dok je kod ostalih odgovor bio djelomičan, a dio ih je zbog komplikacija liječenja imalo smrtni ishod (54).

Unatoč ohrabrujućim rezultatima malobrojnih studija koje istražuju učinke CAR-T stanične terapije u liječenju Richterovog sindroma, valja naglasiti kako je potrebno provesti još studija na većem broju pacijenata (39).

### 4.4. CAR-T stanična terapija u liječenju limfoma

Glavni oblici limfoma su Hodgkinova bolest i ne-Hodgkinovi limfomi T i B fenotipa.

Difuzni velikostanični B-limfom (DLBCL) najčešća je vrsta ne-Hodgkinovog limfoma te čini 40% svih limfoma (55). Za liječenje relapsno/refraktornog DLBCL-a prvo je odobrena CD19 specifična CAR-T stanična terapija *Kymriah* (56).

U ZUMA studiji, pacijenti s refrakternim DLBCL-om liječeni su CD19 CAR-T staničnom terapijom (*Yescarta*) te je stopa kompletne remisije bila 58%, uz 28% pacijenata s parcijalnom remisijom (56). Zbog dobrih rezultata liječenja, FDA je 2017. godine odobrila *Yescartu* u liječenju DLBCL-a (57). U liječenju refrakternih B-limfoma (DLBCL, folikularni limfom, B-stanični limfom visokog stupnja, medijastinalni B-stanični limfom) u uporabi je i nedavno odobrena CAR-T stanična terapija *Breyanzi* (58). Sve CAR-T stanične terapijske opcije su, za sada, CD19 specifične što otvara mogućnost istraživanju novih potencijalnih ciljnih molekula (59).

#### 4.5. CAR-T stanična terapija u liječenju multiplog mijeloma

Multipli mijelom (MM) je zloćudna bolest B-stanične loze kod koje dolazi do proliferacije monoklonskih plazma stanica u koštanoj srži. Posljedično dolazi do disfunkcije hematopoetskih stanica koštane srži i osteoblasta te do hiperprodukcije nefunkcionalnih imunoglobulina, tzv. monoklonskih proteina (M-protein). Terapija multiplog mijeloma uključuje inhibitore proteasoma (bortezomib, iksazomib, karfilzomib), imunomodulatore (lenalidomid, talidomid), monoklono protutijelo (daratumumab), sistemsku kemoterapiju, autolognu transplantaciju krvotvornih matičnih stanica (kod pacijenata visokog rizika tandem transplantacija), a kod mlađih pacijenata dolazi u obzir i alogenična transplantacija krvotvornih matičnih stanica (60).

Prvi antigen za sazrijevanje B-stanica (BCMA) kojeg cilja CAR-T stanica, proučavan je u liječenju MM još 2013. godine.

BCMA je protein dominantno izražen na površini terminalno diferenciranih B-limfocita, odnosno stanica multiplog mijeloma, a važan je za razvoj B-limfocita i autoimuni odgovor. Pripada obitelji faktora tumorske nekroze. BCMA je identificiran kao obećavajuća meta za CAR-T u liječenju MM.

Dvije FDA odobrene CAR-T stanične terapije, ide-cel i cilta-cel, pokazuju terapijski odgovor u refraktornom MM, ali i izraženu hematološku, infektivnu i neurološku toksičnost. CAR-T stanična terapija odobrena je od FDA za liječenje relapsno/refraktornih MM koji su liječeni sa najmanje četiri linije terapije, a koje uključuju inhibitor proteasoma, imunomodulator, monoklono protutijelo. Studije pokazuju obećavajuće rezultate sa stopama odgovora preko 80% (61). Nedavno je FDA odobrio prvu anti-BCMA CAR-T staničnu terapiju (*Abecma*) za liječenje refrakternog multiplog mijeloma (62).

U liječenje se također istražuju i ne-BCMA mete za CAR-T poput transmembranskog receptora GPRC5D ili CS1 na MM stanicama.

Alogenična CAR-T stanična terapija također donosi određene mogućnosti liječenja pacijenata s MM, ali potrebno je još praćenja kako bi se odabrao najučinkovitiji terapijski pristup sa što manjom toksičnošću.

Razmatra se i uvođenje CAR-T stanične terapije u ranije linije liječenja MM (63).

#### 4.6. CAR-T stanična terapija u liječenju akutne mijeloične leukemije (AML)

Akutna mijeloična leukemija je zloćudna bolest mijeloidne loze koja se očituje pojavom blasta u perifernoj krvi, a uglavnom nastaje zbog genetskih mutacija (64). Uobičajena terapija uključuje kemoterapiju i HSCT. Glavno ograničenje primjene CAR-T stanične terapije u liječenju AML-a je nedostatak ciljne molekule, s obzirom na to da je većina mijeloičnih antigena izražena i na normalnim hematopoetskim matičnim i progenitornim stanicama u koštanoj srži. Cilj kod liječenja CAR-T stanicama je pronaći odgovarajuću ciljnu molekulu koja je izražena na malignim stanicama, a nije izražena na ostalim stanicama kako bi se postigao terapijski odgovor uz što manju toksičnost. Potencijalne ciljne molekule u liječenju AML-a su Lewis Y antigen, CD123, CD33, CLL-1, no rezultati studija nisu pokazali dobar terapijski odgovor (65,66).

U tijeku su istraživanja u kojima se koristi terapija s kombiniranim ciljnim molekulama koje uključuju sofisticiranije CAR-T stanice nove generacije, TCR-T i CAR-NK terapiju koja bi povezala leukemijski mikrookoliš, ciljane nove antigene i alogenični pristup (67).

## 5. FDA ODOBRENE CAR-T STANIČNE TERAPIJE

### 5.1. Axicabtagene Ciloleucel (YESCARTA™)

Axicabtagene Ciloleucel (axi-cel; YESCARTA™) je prva FDA odobrena CAR-T stanična terapija (2017). Proizvođač je tvrtka Kite Pharma, a radi se o autolognim genetski modificiranim T stanicama koje izražavaju CAR receptor specifičan za CD19 molekulu (68). Yescarta je odobrena u liječenju B-staničnih ne-Hodgkinovih limfoma u odraslih nakon dvije ili više linija sistemske (imuno)kemoterapije. Ova terapija odobrena je na temelju multicentrične kliničke studije (ZUMA-1; NCT02348216) u kojoj je sudjelovalo 108 pacijenata s refraktornim difuznim-B-velikostaničnim NHL. Rezultati studije pokazali su ukupnu stopu odgovora (ORR) od 83%, uz 58% kompletnih remisija. Zapažene nuspojave gradusa 3 prisutne u >10% pacijenata uključivale su vrućicu, febrilnu neutropeniju, encefalopatiju, CRS, hipoksiju, hipotenziju. 25% pacijenata imalo je teške nuspojave kao što su neurotoksičnost, CRS, teške infekcije i citopenije te je u nekoliko slučajeva nastupio smrtni ishod. Medijan ukupnog preživljenja bio je 25,8 mjeseci, a petogodišnje preživljenje bilo je 43% (69).

Nakon ohrabrujućih rezultata ZUMA-1, nastavljeno je sa ZUMA-7, međunarodnim randomiziranim istraživanjem faze 3 u kojoj je axi-cel uspoređivan sa standardnim drugim linijama liječenja ranih relapsnih ili refraktornih DLBCL.

ZUMA-7 je uključila 180 pacijenata sa DLBCL, od kojih je 77% imalo stadij III ili viši bolesti, a 74% pacijenata su bili i primarno refraktorni. U vremenu praćenja od 25 mjeseci, ukupno je odgovorilo 83% pacijenata, a 65% pacijenata je postiglo kompletnu remisiju. Iako je kod 91% pacijenata uočen neželjeni događaj stupnja 3 ili viši, zabilježena je 1 smrt vezana uz CAR-T (16).

### 5.2. Tisagenlecleucel (KYMRIAH™)

Tisagenlecleucel (KYMRIAH™) od proizvođača Novartis, druga je FDA odobrena CAR-T stanična terapija (odobrena 2018. godine). Kymriah je također anti-CD19 terapija te je odobrena za liječenje r/r B-staničnih limfoma (DLBCL, B-limfom visokog gradusa i DLBCL nastao iz folikularnog limfoma) u odraslih nakon dvije ili više linija sistemske terapije. Odobrenje ove terapije temelji se na fazi II otvorene, multicentralne kliničke studije (JULIET; NCT02445248) (70).

### 5.3. Brexucabtagene Autoleucel (TECARTUS™)

Brexucabtagene Autoleucel (TECARTUS™) odobrena je 2020. godine za liječenje r/r limfoma plaštene zone (mantle cell lymphoma, MCL) u odraslih. Radi se također o CD19 specifičnoj terapiji. Odobrenje se temeljilo na otvorenoj, multicentralnoj kliničkoj studiji (ZUMA-2; NCT02601313) provedenoj na 74 pacijenata s dijagnozom MCL koji su prethodno primili kemoterapiju, anti-CD20 antitijela i inhibitor Brutonove tirozin kinaze. Rezultati su pokazali stopu odgovora 87% uz stopu kompletne remisije od 62%, ali uz visoku stopu nuspojava te pojavu CRS-a i neurotoksičnosti zbog čega je FDA izdala upozorenje (71). 2021. godine Tecartus je odobren i za liječenje r/r B-stanične ALL kod odraslih (72).

### 5.4. Lisocabtagene Maraleucel (BREYANZI™)

Lisocabtagene Maraleucel (BREYANZI™), proizvođača Juno Therapeutics, odobren je od FDA 2021. godine za liječenje odraslih pacijenata s r/r velikostaničnim B-limfomom nakon dvije ili više linija sistemske terapije. Breynazi je također CD19 specifična CAR-T stanična terapija s vrlo sličnim rezultatima studija kao i prethodne FDA odobrene terapije (73).

### 5.5. Idecabtagene Vicleucel (ABECMA™)

Idecabtagene Vicleucel (ABECMA™) odobren je 2021. godine za liječenje r/r multiplog mijeloma u odraslih nakon provedene četiri ili više linije terapije među kojima su terapija anti-CD38 monoklonskim protutijelima, imunomodulatorima i inhibitorima proteasoma. Radi se o autolognim genetski modificiranim T-limfocitima koji izražavaju CAR receptor specifičan za BCMA antigen. U multicentralnoj studiji (NCT03361748), 127 pacijenata s r/r multiplim mijelomom koji su prethodno primili minimalno 3 linije antimijelomske terapije liječeno je Abecma terapijom. Rezultati su pokazali stopu ukupnog odgovora od 72% uz stopu kompletne remisije od 27%. Najčešće opažene neželjene reakcije na terapiju bile su CRS, neurotoksičnost, sindrom aktivacije makrofaga, citopenija. Uz to, opažene su i nuspojave kao što su infekcije, umor, hipogamaglobulinemija i muskuloskeletna bol (74).

### 5.6. Ciltacabtagene Autoleucel (CARVYKTI™)

Ciltacabtagene Autoleucel (CARVYKTI™) je CAR-T stanična terapija proizvođača Janssen Biotech, Inc. koja je 2021. godine odobrena za liječenje r/r multiplog mijeloma u odraslih. Carvykti terapija je, kao i prethodno navedena, anti-BCMA CAR-T stanična terapija. Ova



terapija je u kliničkim studijama pokazala stopu ukupnog odgovora od 97,9% kod pacijenata s multiplim mijelomom. Spektar nuspojava sličan je kao i u prethodno navedenoj terapiji (75).

**Tablica 1.** FDA odobrene CAR-T stanične terapije

<b>CAR-T stanični proizvod</b>	<b>Ciljna molekula</b>	<b>Indikacije</b>	<b>Vrijeme odobrenja</b>	<b>Mjesto</b>	<b>Cijena*</b>
Axicabtagene ciloleucel (Yescarta)	CD19	DLBCL; RRFL	2017.	SAD	373.000 USD
Tisagenlecleucel (Kymriah)	CD19	B-ALL; DLBCL	2017.	SAD	475.000 USD
Brexucabtagene (Tecartus)	CD19	r/r MCL	2020.	SAD	373.000 USD
Lisocabtagene maraleucel (Breynazi)	CD19	DLBCL	2021.	SAD	410.000 USD
Idecabtagene vicleucel (Abecma)	BCMA	r/r MM	2021.	SAD	437.000 USD
Ciltacabtagene autoleucel (Carvykti)	BCMA	r/r MM	2022.	SAD	460.000 USD

\*prikazane cijene odnose se na sve troškove terapije za jednog pacijenta u SAD-u (14)

Prema: Chen L, Xie T, Wei B, Di DL. Current progress in CAR-T cell therapy for tumor treatment (Review). Vol. 24, Oncology Letters. 2022. doi: 10.3892/ol.2022.13478

## 6. OGRANIČENJA CAR-T STANIČNE TERAPIJE

CAR-T stanična terapija ima velik potencijal što potvrđuju brojne kliničke studije i sve veći broj komercijalnih CAR-T staničnih terapija koje je odobrila FDA. Unatoč tome, postoje brojna ograničenja u primjeni ove terapije. Sve FDA odobrene CAR-T stanične terapije izazivaju značajan broj neželjenih nuspojava koje mogu rezultirati ozbiljnim narušenjem zdravlja (76). Osim toga, terapijski učinak terapije može biti ograničen slabljenjem antitumorske aktivnosti u čijem procesu sudjeluje više mehanizama.

### 6.1. Gubitak antigena

Maligne stanice imaju sposobnost gubitka ciljnog antigena na površini stanica što im omogućuje izbjegavanje imunskog odgovora i razvoj rezistencije na CAR-T staničnu terapiju. Vrlo često CAR-T stanična terapija inicijalno pokazuje visoku stopu odgovora, ipak određen dio pacijenata s vremenom razvija rezistenciju zbog parcijalnog ili kompletnog gubitka ciljnog antigena na površini tumorskih stanica. Kliničke studije su pokazale da, iako 70-90% pacijenata s *r/r* AML pokazuje dobar i dugoročan terapijski odgovor na CD19 specifičnu CAR-T staničnu terapiju, praćenjem pacijenata koji su razvili rezistenciju, dokazano je da u 30-70% njih dolazi do gubitka CD19 antigena (77,78). Slično je primijećeno i kod pacijenata s multiplim mijelomom kod kojih dolazi do rezistencije zbog gubitka ciljnog antigena BCMA (79). Potencijalne strategije kojima bi se izbjegao razvoj rezistencije temelje se na razvoju CAR-T stanica koje imaju više od jedne ciljne molekule. To se može postići razvojem stanica s više CAR molekula ili s tandem CAR molekulom koja je građena od više scFv fragmenata (80).

### 6.2. On-target off-tumor efekt

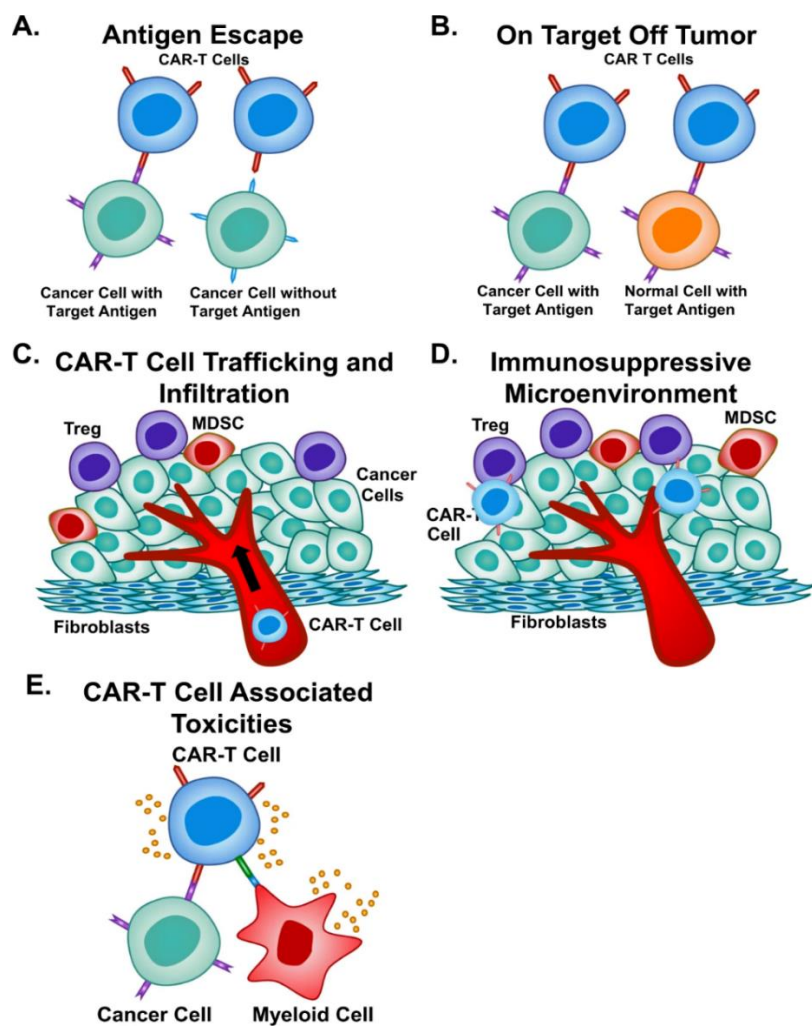
On-target off-tumor efekt nastaje kada normalna tkiva eksprimiraju isti antigen koji služi kao meta CAR-T stanicama. U tom procesu CAR-T stanice pokreću imunski odgovor protiv zdravih tkiva što rezultira toksičnim učinkom. Ovaj efekt često je prisutan u liječenju solidnih tumora, a potencijalno rješenje kojim bi se izbjegao on-target off-tumor efekt nalazi se u proizvodnji CAR-T stanica koje ciljaju posttranslacijske modifikacije antigena koje su prekomjerno izražene na površini stanica solidnih tumora kao što su Tn (GalNAc1-O-Ser/Thr) sialyl-Tn (STn) (NeuAca2-6-GalNAc1-O-Ser/Thr) (81).

### 6.3. Imunosupresivni mikrookoliš

Tumorski mikrookoliš (TME) mogu infiltrirati stanice koje djeluju imunosupresivno kao što su MDSC stanice (eng. *myloid-derived suppressor cells*), T reg stanice i makrofagi povezani s tumorom (TAM) (82). Ove stanice proizvode citokine, kemokine i faktore rasta koji potiču rast tumora te aktivacijom inhibitornih signalnih puteva PD-1 i CTLA-4 djeluju imunosupresivno čime smanjuju terapijski učinak CAR-T stanica. Slaba ekspanzija i kratkotrajan životni vijek CAR-T stanica glavni su razlozi slabog terapijskog odgovora na CAR-T staničnu terapiju. Pretpostavlja se da su upravo ko-inhibitorni putevi odgovorni za gubitak izvršnih funkcija CAR-T stanica (83) te bi kombinirana imunoterapija CAR-T stanicama i inhibitorima kontrolnih točaka (PD-1/PD-1L blokatori) mogla pružiti jak imunski odgovor s održanom funkcijom CAR-T stanica. Klinička studija provedena na 14 djece s r/r B-ALL koji su liječeni kombinacijom PD-1 blokatora i CD19 CAR-T staničnom terapijom u *Children's Hospital of Pennsylvania*, pokazala je poboljšanu postojanost CAR-T stanica i bolji terapijski učinak (84). Osim ovih, istražuju se i druge potencijalne strategije kojima bi se prevladao imunosupresivan učinak tumorskog mikrookoliša (85)

### 6.4. Infiltracija CAR-T stanica u ciljna tkiva

Liječenje solidnih tumora CAR-T staničnom terapijom je, za razliku od hematoloških bolesti, ograničeno sposobnošću CAR-T stanica da prodru i infiltriraju tumorsko tkivo zbog postojanja imunosupresivnog tumorskog mikrookoliša i tumorske strome koja djeluje kao fizička barijera prolasku CAR-T stanica. Jedna od strategija kojom bi se prevladalo ovo ograničenje je lokalna primjena CAR-T stanica direktno u tumor. Lokalna primjena osim što olakšava infiltraciju u tumorsko tkivo, umanjuje i toksičnost uzrokovanu on-target off-tumor efektom (86)



**Slika 5.** Ograničenja CAR-T stanične terapije. Preuzeto iz Sterner i sur., 2021.

## 7. TOKSIČNOST I NUSPOJAVE CAR-T STANIČNE TERAPIJE

Unatoč obećavajućim rezultatima kliničkih studija koje pokazuju visoke stope odgovora, CAR-T staničnu terapiju prati visoka stopa toksičnih učinaka zbog čega ova terapija još uvijek nije prva linija u liječenju hematoloških malignih bolesti. Toksični učinci CAR-T stanične terapije očituju se kao sindrom otpuštanja citokina (CRS), sekundarna hemofagocitna limfocitocitoza (sHLH), sindrom aktivacije makrofaga (MAS) te sindrom neurotoksičnosti povezan s imunološkim efektorskim stanicama (ICANS). Dizajn CAR receptora, karakteristike ciljne molekule te vrsta tumora određuju intenzitet i pojavnost navedenih toksičnih nuspojava (87).

### 7.1. Sindrom otpuštanja citokina (CRS)

Sindrom otpuštanja citokina (CRS) najčešći je oblik akutne toksične reakcije kod primjene CAR-T stanične terapije. Nastaje zbog povećanog otpuštanja citokina kao što su TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-2, IL-2 $\alpha$ , IL-8, IL-10 te IFN- $\gamma$  koji potječu od apliciranih CAR-T stanica ili od imunoloških stanica poput makrofaga koje reagiraju na CAR-T stanice. Incidencija CRS je 42 do 94%, a za CRS visokog stupnja (stupanj 3 ili 4) 6 do 25%. Viši stupanj CRS može se očekivati kod mlađih pacijenata s većom aktivnosti bolesti, uz primjenu ciklofosfamida i fludarabina kao limfodepecijske terapije, uz drugu generaciju CAR-T i veće doze primjenjenih CAR-T (88).

CRS se obično prezentira općim simptomima kao što su vrućica, umor, malaksalost, anoreksija i mialgije, no može zahvatiti bilo koji organski sustav u tijelu te dovesti do multiorganskog zatajenja. Klinička slika teškog oblika CRS-a uključuje: hipotenziju, srčano zatajenje, diseminiranu intravaskularnu koagulaciju, respiratornu insuficijenciju, renalnu insuficijenciju te multiorgansko zatajenje koje vodi u smrt (89). Najteži oblici CRS-a mogu progredirati u fulminantni sHLH/MAS. Kako bi se izbjegao teži oblik CRS-a i smrtni ishod, važno je na vrijeme prepoznati simptome te započeti liječenje.

### 7.2. HLH/MAS

Sekundarna hemofagocitna limfocitocitoza (sHLH) i sindrom aktivacije makrofaga (MAS) su preklapajući sindromi obilježeni disfunkcijom imunološkog sustava koja rezultira hiperinflamatornim stanjem i multiorganskim zatajenjem. Klinički se HLH/MAS i CRS uvelike preklapaju te se HLH/MAS smatra teškim oblikom CRS-a (90). Prema Neelapu i sur. predloženi kriteriji za dijagnozu sHLH/MAS kod pacijenata sa CRS-om nakon provedene CAR-T stanične terapije uključuju: feritin (serum) >10.000  $\mu\text{g/L}$  i 2 pozitivna kriterija od slijedeće navedenih: gradus >3 povišene transaminaze ili bilirubin; gradus >3 oligurija ili povišen kreatinin; gradus >3 plućni edem; histološki dokazana hemofagocitoza u koštanoj srži ili drugim

organima (91). Učestalost ove komplikacije nakon provedene CAR-T stanične terapije iznosi 3,4% (90).

### 7.3. ICANS

Sindrom neurotoksičnosti povezan s imunološkim efektorskim stanicama (ICANS) je, uz CRS, najčešća manifestacija toksičnih učinaka CAR-T stanične terapije. Točan mehanizam neurotoksičnosti nije sasvim jasan. Pretpostavlja se da se radi o pasivnoj difuziji citokina u mozak kroz krvno-moždanu barijeru ili o prolasku T limfocita kroz krvno-moždanu barijeru do mozga. Klinička manifestacija ICANS-a započinje toksičnom encefalopatijom, afazijom, motornim deficitom, pospanošću. Teži oblici ICANS-a mogu se prezentirati poremećajima svijesti, napadajima, motornom slabošću, cerebralnim edemom te komom. U većini slučajevima ICANS-u prethodi CRS. Neurotoksičnost nakon CAR-T stanične terapije je relativno česta komplikacija prisutna u 65% pacijenata (92).

### 7.4. Terapijski pristup toksičnim nuspojavama

Terapijski pristup toksičnim nuspojavama CAR-T stanične terapije temelji se na primjeni antiupalnih lijekova poput kortikosteroida i inhibitora interleukinskih signalnih puteva. Antiupalna terapija primjenjuje se po nastanku simptoma CRS-a i ICANS-a, iako postoje kliničke studije koje ispituju preventivno djelovanje antiupalne terapije (93).

Trenutne preporuke podržavaju primjenu deksametazona za stupanj 2 CRS-a koji je refraktoran na barem jednu dozu tocilizumaba, ali i za stupanj 3 ili viši. ZUMA-1 ukazala je na pozitivan učinak profilaktičke rane primjene deksametazona na pojavu visokog stupnja CRS, a bez učinka na pojavu ICANS ili na djelovanje CAR-T stanične terapije (88).

Primjena kortikosteroida i inhibitora IL-6 i IL-1 $\beta$  signalnih puteva, uspješno djeluje u ublažavanju simptoma upalnih toksičnih reakcija dok je njihovo djelovanje u prevenciji razvoja toksičnih nuspojava slabo. Osim toga, terapijski odgovor na ovu terapiju nije uniforman kod svih pacijenata te su zabilježeni slučajevi upalnih toksičnih reakcija refraktornih na primjenu kortikosteroida koje su rezultirale multiorganskim zatajenjem i smrću. Mehanizam djelovanja inhibitora interleukinskih signalnih puteva temelji se na blokiranju citokina mijeloidnog podrijetla (IL-6 i IL-1 $\beta$ ) koji imaju patofiziološku ulogu u aktivaciji imunološkog odgovora (94). Trenutno je tocilizumab, antagonist IL-6 receptora, jedina FDA odobrena terapija za liječenje CRS-a povezanog s primjenom CAR-T stanične terapije. Tocilizumab pokazuje dobre rezultate i u prevenciji nastanka i u liječenju teškog oblika CRS-a, no u 30% pacijenata zabilježen je

razvoj teškog CRS-a refraktornog na terapiju tocilizumabom. Isto tako, tocilizumab zbog svojih farmakokinetičkih svojstava (velika molekula) ne prolazi krvno-moždanu barijeru te nije dobar u liječenju neurotoksičnosti. U tijeku su kliničke studije koje ispituju djelovanje kombinacije IL-6 inhibitora i anakinre (antagonist IL-1 receptora) u liječenju simptoma CRS-a i neurotoksičnosti jer se pokazalo da anakinra prolazi krvno-moždanu barijeru. Zaključno, dosadašnje studije pokazale su da inhibicija jednog citokinskog signalnog puteva nije dostatna za liječenje i prevenciju neželjenih upalnih toksičnosti kod svih pacijenata zbog međudjelovanja velikog broja upalnih citokina i signalnih puteva. Za razvoj terapijskih opcija u liječenju CAR-T staničnih toksičnosti, potrebno je provesti još studija kako bi se unaprijedilo razumijevanje mehanizama koji dovode do razvoja toksičnih učinaka ove terapije (95).

## 7.5. Prevencija toksičnih nuspojava

Toksične nuspojave CAR-T stanične terapije su zasigurno ograničavajući čimbenik u terapijskoj uporabi CAR-T stanica. Zbog toga je fokus brojnih istraživanja pronaći mehanizme koji bi prevenirali pojavu inflamatornih toksičnih reakcija.

Novi dizajn CAR receptora nastoji postići veću specifičnost čime bi se smanjio on-target off-tumor efekt, kao i proizvodnja upalnih citokina koja rezultira toksičnim nuspojavama (96).

Uporabom inhibitora malih molekula također se nastoje blokirati signalizacijski putevi upalnih citokina te smanjiti težina nuspojava na CAR-T staničnu terapiju. Jedan od takvih lijekova je ibrutinib, inhibitor Brutonove kinaze (BTKI), koji je odobren od FDA i koristi se u liječenju hematoloških malignih bolesti prije primjene CAR-T stanica te pokazuje dobre rezultate u redukciji simptoma CRS-a (97).

Slijedeća potencija strategija redukcije upalnih citokina tijekom CAR-T stanične terapije je modulacija post-transkripcijskih procesa. JTE-607 (TO-207) je CPSF3 inhibitor koji blokira pretvorbu pre-mRNA u mRNA te tako smanjuje produkciju i sekreciju citokina u monocitima *in vitro*. Prekliničke studije pokazuju smanjenje težine upale posredovane endotoksinima uz dobru podnošljivost (98).

Genetskom manipulacijom CAR-T stanica tako da one izražavaju i proizvode interleukinske receptore (IL-1RA i IL-6 receptor) koji vežu slobodne upalne interleukine u cirkulaciji, reduciraju se simptomi upalnih toksičnih reakcija na primjenu CAR-T stanica (99).

S obzirom na to da proupalne citokine, koji pokreću mehanizme upalnih toksičnih reakcija, proizvode prvenstveno mijeloidne stanice, a ne CAR-T stanice, nove strategije nastoje inhibirati faktore koje pridonose aktivaciji mijeloidnih stanica. GM-CSF jedan je od takvih

faktora koji proizvode CAR-T stanice te neke studije pokazuju da se inhibicijom GM-CSF postiže redukcija proizvodnje nekih citokina povezanih s razvojem CRS-a (100).



## 8. ZAKLJUČAK

CAR-T stanična terapija pokazala se kao revolucionarna i vrlo obećavajuća terapija u liječenju hematoloških malignih bolesti uz nešto lošije rezultate, ali vrlo velik potencijal pri liječenju solidnih tumora. Valja naglasiti sva ograničenja ove terapije, od nuspojava i toksičnih reakcija do troškova proizvodnje.

CAR-T stanična terapija za sada nije indicirana u prvoj liniji kod liječenja malignih bolesti, no daljnjim istraživanjima i razvojem novih tehnologija kojima bi se smanjile nuspojave i postigla veća specifičnost CAR receptora, svakako će se proširiti indikacije i povećati dostupnost ove terapije.

CAR-T stanična terapija, u svakom slučaju, predstavlja odmak od konvencionalnih terapija u hematologiji i onkologiji te utire put prema personaliziranoj medicini.

## 9. ZAHVALE

Zahvaljujem se mentorici prim. dr. sc. Ingi Mandac Smoljanović na savjetima i pristupačnosti tijekom pisanja ovog diplomskog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima, Ireni i Tomislavu, na bezuvjetnoj ljubavi i podršci te na tome što su mi sve ovo omogućili. Zahvaljujem se, naravno, i sestri Lani, koja će, također, uskoro postati doktorica.

Zahvaljujem se i kumovima, Sonji i Noniju, na velikom prijateljstvu i podršci tijekom studiranja.

Hvala i Ivanu Vukeliću na savjetima oko pravilnog pisanja č i ć.

Sve ove godine studiranja bila sam okružena predivnim ljudima i prijateljima.

## 10. LITERATURA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3). doi: 10.3322/caac.21660
2. Cao W, Chen H Da, Yu YW, Li N, Chen WQ. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020. *Chin Med J (Engl).* 2021;134(7). doi: 10.1097/CM9.0000000000001474
3. Li D, Li X, Zhou WL, Huang Y, Liang X, Jiang L, et al. Genetically engineered t cells for cancer immunotherapy. Vol. 4, *Signal Transduction and Targeted Therapy.* 2019. doi: 10.1038/s41392-019-0070-9
4. Zhao L, Cao YJ. Engineered T Cell Therapy for Cancer in the Clinic. Vol. 10, *Frontiers in Immunology.* 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.02250
5. Abul K. Abbas Andrew H. Litchman SP. Cellular and Molecular Immunology Abbas Edisi 9. *Angewandte Chemie International Edition,* 6(11), 951–952. 2018.
6. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. Vol. 39, *Immunity.* 2013. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.012
7. Seliger B, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Chapter 7 IFN Inducibility of Major Histocompatibility Antigens in Tumors. Vol. 101, *Advances in Cancer Research.* 2008. doi: 10.1016/S0065-230X(08)00407-7
8. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 2001;410(6832). doi: 10.1038/35074122
9. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. Vol. 331, *Science.* 2011. doi: 10.1126/science.1203486
10. Rooney MS, Shukla SA, Wu CJ, Getz G, Hacohen N. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell.* 2015;160(1–2). doi: 10.1016/j.cell.2014.12.033
11. Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: Mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. Vol. 19, *Annual Review of Immunology.* 2001. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.565
12. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010;140(6):883–899. *Cell.* 2011;140(6).
13. Gabilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. Vol. 9, *Nature Reviews Immunology.* 2009. doi: 10.1038/nri2506
14. Chen L, Xie T, Wei B, Di DL. Current progress in CAR-T cell therapy for tumor treatment (Review). Vol. 24, *Oncology Letters.* 2022. doi: 10.3892/ol.2022.13478
15. Rafei H, Kantarjian HM, Jabbour EJ. Recent advances in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. Vol. 60, *Leukemia and Lymphoma.* 2019. doi: 10.1080/10428194.2019.1605071

16. Lufti F, Patel A, Mehta J, Goyal A, Dahiya S. Second-line treatment with CAR T-cell therapy for large B-cell lymphoma. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*. 2023 Apr;21(4):170–8.
17. Kansagra AJ, Frey N V., Bar M, Laetsch TW, Carpenter PA, Savani BN, et al. Clinical utilization of Chimeric Antigen Receptor T-cells (CAR-T) in B-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL)—an expert opinion from the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) and the American Society for Blood and Marrow Transplantation (ASBMT). *Bone Marrow Transplant*. 2019;54(11). doi: 10.1038/s41409-019-0451-2
18. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(24). doi: 10.1073/pnas.86.24.10024
19. Z E, T W, G G, D S. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(2).
20. Zhang C, Liu J, Zhong JF, Zhang X. Engineering CAR-T cells. Vol. 5, *Biomarker Research*. 2017. doi: 10.1186/s40364-017-0102-y
21. Grigor EJM, Fergusson D, Kekre N, Montroy J, Atkins H, Seftel MD, et al. Risks and Benefits of Chimeric Antigen Receptor T-Cell (CAR-T) Therapy in Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. Vol. 33, *Transfusion Medicine Reviews*. 2019. doi: 10.1016/j.tmr.2019.01.005
22. Roselli E, Frieling JS, Thorner K, Ramello MC, Lynch CC, Abate-Daga D. CAR-T Engineering: Optimizing Signal Transduction and Effector Mechanisms. Vol. 33, *BioDrugs*. 2019. doi: 10.1007/s40259-019-00384-z
23. Ramello MC, Benzaïd I, Kuenzi BM, Lienlaf-Moreno M, Kandell WM, Santiago DN, et al. An immunoproteomic approach to characterize the CAR interactome and signalosome. *Sci Signal*. 2019;12(568). doi: 10.1126/scisignal.aap9777
24. Chmielewski M, Abken H. TRUCKs: The fourth generation of CARs. Vol. 15, *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2015. doi: 10.1517/14712598.2015.1046430
25. Tokarew N, Ogonek J, Endres S, von Bergwelt-Baildon M, Kobold S. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells. Vol. 120, *British Journal of Cancer*. 2019. doi: 10.1038/s41416-018-0325-1
26. Benmebarek MR, Karches CH, Cadilha BL, Lesch S, Endres S, Kobold S. Killing mechanisms of chimeric antigen receptor (CAR) T cells. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. doi: 10.3390/ijms20061283
27. Waring P, Müllbacher A. Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. Vol. 77, *Immunology and Cell Biology*. 1999. doi: 10.1046/j.1440-1711.1999.00837.x
28. Levine BL. Performance-enhancing drugs: Design and production of redirected chimeric antigen receptor (CAR) T cells. Vol. 22, *Cancer Gene Therapy*. 2015. doi: 10.1038/cgt.2015.5

29. Brown CE, Adusumilli PS. Next frontiers in CAR T-cell therapy. Vol. 3, *Molecular Therapy - Oncolytics*. 2016. doi: 10.1038/mto.2016.28
30. Guedan S, Calderon H, Posey AD, Maus M V. Engineering and Design of Chimeric Antigen Receptors. Vol. 12, *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*. 2019. doi: 10.1016/j.omtm.2018.12.009
31. Wang GP, Garrigue A, Ciuffi A, Ronen K, Leipzig J, Berry C, et al. DNA bar coding and pyrosequencing to analyze adverse events in therapeutic gene transfer. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(9). doi: 10.1093/nar/gkn125
32. Singh H, Moyes JSE, Huls MH, Cooper L JN. Manufacture of T cells using the Sleeping Beauty system to enforce expression of a CD19-specific chimeric antigen receptor. Vol. 22, *Cancer Gene Therapy*. 2015. doi: 10.1038/cgt.2014.69
33. Yant SR, Meuse L, Chiu W, Ivics Z, Izsvak Z, Kay MA. Somatic integration and long-term transgene expression in normal and haemophilic mice using a DNA transposon system. *Nat Genet*. 2000;25(1). doi: 10.1038/75568
34. Izsvák Z, Hackett PB, Cooper L JN, Ivics Z. Translating Sleeping Beauty transposition into cellular therapies: Victories and challenges. Vol. 32, *BioEssays*. 2010. doi: 10.1002/bies.201000027
35. Beatty GL, Haas AR, Maus M V., Torigian DA, Soulen MC, Plesa G, et al. Mesothelin-specific chimeric antigen receptor mRNA-engineered T cells induce anti-tumor activity in solid malignancies. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(2). doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0170
36. Harrison RP, Zylberberg E, Ellison S, Levine BL. Chimeric antigen receptor–T cell therapy manufacturing: modelling the effect of offshore production on aggregate cost of goods. *Cytotherapy*. 2019;21(2). doi: 10.1016/j.jcyt.2019.01.003
37. Liang Z, Zhang H, Shao M, Cui Q, Wu Z, Xiao L, et al. Lymphodepletion chemotherapy revitalizes chimeric antigen receptor T cells contributing to regression of relapsed B-cell lymphoma: A case report. *Medicine*. 2020;99(43). doi: 10.1097/MD.00000000000022510
38. Neelapu SS. CAR-T efficacy: Is conditioning the key? Vol. 133, *Blood*. 2019. doi: 10.1182/blood-2019-03-900928
39. Haslauer T, Greil R, Zaborsky N, Geisberger R. Car t-cell therapy in hematological malignancies. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2021. doi: 10.3390/ijms22168996
40. Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(2). doi: 10.3322/caac.21219
41. Beldjord K, Chevret S, Asnafi V, Huguet F, Boulland ML, Leguay T, et al. Oncogenetics and minimal residual disease are independent outcome predictors in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014;123(24). doi: 10.1182/blood-2014-01-547695
42. Rausch CR, Paul S, Nasnas PE, Kantarjian H, Jabbour EJ. Blinatumomab for the treatment of acute lymphoblastic leukemia: an update. *Expert Opin Orphan Drugs*. 2019;7(2). doi: 10.1080/21678707.2019.1571408
43. Wang K, Wei G, Liu D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol*. 2012;1(1). doi: 10.1186/2162-3619-1-36

44. Mueller KT, Grupp SA, Maude SL, Levine JE, Pulsipher MA, Boyer MW, et al. Tisagenlecleucel immunogenicity in relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia and diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Adv.* 2021;5. doi: 10.1182/bloodadvances.2020003844
45. Huang L, Wang N, Cao Y, Li C, Xiao Y, Xiao M, et al. CAR22/19 Cocktail Therapy for Patients with Refractory/Relapsed B-Cell Malignancies. *Blood.* 2018;132(Supplement 1). doi: 10.1182/blood-2018-99-113714
46. Cappell KM, Kochenderfer JN. Long-term outcomes following CAR T cell therapy: what we know so far. *Nat Rev Clin Oncol.* 2023 Apr 13; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37055515>
47. Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program.* 2009. doi: 10.1182/asheducation-2009.1.523
48. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol.* 2019;94(11). doi: 10.1002/ajh.25595
49. Heyman BM, Tzachanis D, Kipps TJ. Recent Advances in CAR T-Cell Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. Vol. 14, *Cancers.* 2022. doi: 10.3390/cancers14071715
50. Geyer MB, Rivière I, Sénéchal B, Wang X, Wang Y, Purdon TJ, et al. Safety and tolerability of conditioning chemotherapy followed by CD19-targeted CAR T cells for relapsed/refractory CLL. *JCI Insight.* 2019;4(9). doi: 10.1172/jci.insight.122627
51. Geyer MB, Rivière I, Sénéchal B, Wang X, Wang Y, Purdon TJ, et al. Autologous CD19-Targeted CAR T Cells in Patients with Residual CLL following Initial Purine Analog-Based Therapy. *Molecular Therapy.* 2018;26(8). doi: 10.1016/j.ymthe.2018.05.018
52. Hillmen P. Richter's syndrome: CLL taking a turn for the worse. *Oncology.* 2012 Dec;26(12).
53. Parikh SA, Kay NE, Shanafelt TD. How we treat Richter syndrome. *Blood.* 2014;123(11). doi: 10.1182/blood-2013-11-516229
54. Barbanti MC, Appleby N, Kesavan M, Eyre TA. Cellular Therapy in High-Risk Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia and Richter Syndrome. Vol. 12, *Frontiers in Oncology.* 2022. doi: 10.3389/fonc.2022.888109
55. Li S, Young KH, Medeiros LJ. Diffuse large B-cell lymphoma. Vol. 50, *Pathology. Elsevier B.V.;* 2018. p. 74–87. doi: 10.1016/j.pathol.2017.09.006
56. Novartis. KYMRIAHA (tisagenlecleucel). EMA. 2017.
57. CADTH. Axicabtagene Ciloleucel (Yescarta). *Canadian Journal of Health Technologies.* 2023;3(2). doi: 10.51731/cjht.2023.578
58. Viardot A, Wais V, Sala E, Koerper S. Chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy as a treatment option for patients with B-cell lymphomas: Perspectives on the therapeutic potential of Axicabtagene ciloleucel. Vol. 11, *Cancer Management and Research.* 2019. doi: 10.2147/CMAR.S163225

59. Wang Y, Zhang W ying, Han Q wang, Liu Y, Dai H ren, Guo Y lei, et al. Effective response and delayed toxicities of refractory advanced diffuse large B-cell lymphoma treated by CD20-directed chimeric antigen receptor-modified T cells. *Clinical Immunology*. 2014;155(2). doi: 10.1016/j.clim.2014.10.002
60. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*. 2008;111(5). doi: 10.1182/blood-2007-10-116129
61. Guo B, Chen M, Han Q, Hui F, Dai H, Zhang W, et al. CD138-directed adoptive immunotherapy of chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells for multiple myeloma. *Journal of Cellular Immunotherapy*. 2016;2(1). doi: 10.1016/j.jocit.2014.11.001
62. Xing L, Liu Y, Liu J. Targeting BCMA in Multiple Myeloma: Advances in Antibody-Drug Conjugate Therapy. Vol. 15, *Cancers*. MDPI; 2023. doi: 10.3390/cancers15082240
63. Rendo MJ, Joseph JJ, Phan LM, DeStefano CB. CAR T-Cell Therapy for Patients with Multiple Myeloma: Current Evidence and Challenges. *Blood Lymphat Cancer*. 2022;Volume 12. doi: 10.2147/blctt.s327016
64. Murati A, Brecqueville M, Devillier R, Mozziconacci MJ, Gelsi-Boyer V, Birnbaum D. Myeloid malignancies: Mutations, models and management. Vol. 12, *BMC Cancer*. 2012. doi: 10.1186/1471-2407-12-304
65. Ritchie DS, Neeson PJ, Khot A, Peinert S, Tai T, Tainton K, et al. Persistence and efficacy of second generation CAR T Cell against the LeY Antigen in acute myeloid leukemia. *Molecular Therapy*. 2013;21(11). doi: 10.1038/mt.2013.154
66. Ehninger A, Kramer M, Röllig C, Thiede C, Bornhäuser M, Von Bonin M, et al. Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2014;4(6). doi: 10.1038/bcj.2014.39
67. Atilla E, Benabdellah K. The Black Hole: CAR T Cell Therapy in AML. Vol. 15, *Cancers*. MDPI; 2023. doi: 10.3390/cancers15102713
68. Papadouli I, Mueller-Berghaus J, Beuneu C, Ali S, Hofner B, Petavy F, et al. EMA Review of Axicabtagene Ciloleucel (Yescarta) for the Treatment of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Oncologist*. 2020;25(10). doi: 10.1634/theoncologist.2019-0646
69. Locke FL, Miklos DB, Jacobson CA, Perales M-A, Kersten M-J, Oluwole OO, et al. Axicabtagene Ciloleucel as Second-Line Therapy for Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2022;386(7). doi: 10.1056/nejmoa2116133
70. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2019;380(1). doi: 10.1056/nejmoa1804980
71. Wang M, Munoz J, Goy A, Locke FL, Jacobson CA, Hill BT, et al. KTE-X19 CAR T-Cell Therapy in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(14). doi: 10.1056/nejmoa1914347
72. Shah BD, Ghobadi A, Oluwole OO, Logan AC, Boissel N, Cassaday RD, et al. KTE-X19 for relapsed or refractory adult B-cell acute lymphoblastic leukaemia: phase 2 results of the single-arm, open-label, multicentre ZUMA-3 study. *The Lancet*. 2021;398(10299). doi: 10.1016/S0140-6736(21)01222-8

73. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, Lunning MA, Wang M, Arnason J, et al. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *The Lancet*. 2020;396(10254). doi: 10.1016/S0140-6736(20)31366-0
74. Munshi NC, Anderson LD, Shah N, Madduri D, Berdeja J, Lonial S, et al. Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2021;384(8). doi: 10.1056/nejmoa2024850
75. Berdeja JG, Madduri D, Usmani SZ, Jakubowiak A, Agha M, Cohen AD, et al. Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study. *The Lancet*. 2021;398(10297). doi: 10.1016/S0140-6736(21)00933-8
76. Zheng PP, Kros JM, Li J. Approved CAR T cell therapies: ice bucket challenges on glaring safety risks and long-term impacts. Vol. 23, *Drug Discovery Today*. 2018. doi: 10.1016/j.drudis.2018.02.012
77. Majzner RG, Mackall CL. Tumor antigen escape from car t-cell therapy. Vol. 8, *Cancer Discovery*. 2018. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0442
78. Maude SL, Teachey DT, Porter DL, Grupp SA. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015;125(26). doi: 10.1182/blood-2014-12-580068
79. Green DJ, Pont M, Sather BD, Cowan AJ, Turtle CJ, Till BG, et al. Fully Human Bcma Targeted Chimeric Antigen Receptor T Cells Administered in a Defined Composition Demonstrate Potency at Low Doses in Advanced Stage High Risk Multiple Myeloma. *Blood*. 2018;132(Supplement 1). doi: 10.1182/blood-2018-99-117729
80. Dai H, Wu Z, Jia H, Tong C, Guo Y, Ti D, et al. Bispecific CAR-T cells targeting both CD19 and CD22 for therapy of adults with relapsed or refractory B cell acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol*. 2020;13(1). doi: 10.1186/s13045-020-00856-8
81. Steentoft C, Migliorini D, King TR, Mandel U, June CH, Posey AD. Glycan-directed CAR-T cells. Vol. 28, *Glycobiology*. 2018. doi: 10.1093/glycob/cwy008
82. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Vol. 19, *Nature Medicine*. 2013. doi: 10.1038/nm.3394
83. Yin Y, Boesteanu AC, Binder ZA, Xu C, Reid RA, Rodriguez JL, et al. Checkpoint Blockade Reverses Anergy in IL-13R $\alpha$ 2 Humanized scFv-Based CAR T Cells to Treat Murine and Canine Gliomas. *Mol Ther Oncolytics*. 2018;11. doi: 10.1016/j.omto.2018.08.002
84. Li AM, Hucks GE, Dinofia AM, Seif AE, Teachey DT, Baniewicz D, et al. Checkpoint Inhibitors Augment CD19-Directed Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell Therapy in Relapsed B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 2018;132(Supplement 1). doi: 10.1182/blood-2018-99-112572
85. Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. Vol. 11, *Blood Cancer Journal*. Springer Nature; 2021. doi: 10.1038/s41408-021-00459-7



86. Marincola F, Lee PP. Tumor Microenvironment. 1st ed. Lee PP, Marincola F, editors. Springer Cham; 2021.
87. Roex G, Timmers M, Wouters K, Campillo-Davo D, Flumens D, Schroyens W, et al. Safety and clinical efficacy of BCMA CAR-T-cell therapy in multiple myeloma. *J Hematol Oncol.* 2020;13(1). doi: 10.1186/s13045-020-01001-1
88. Lakomy T, Akhoundova D, Nilius H, Kronig MN, Novak U, Daskalakis M, et al. Early Use of Corticosteroids following CAR T-Cell Therapy Correlates with Reduced Risk of High-Grade CRS without Negative Impact on Neurotoxicity or Treatment Outcome. *Biomolecules.* 2023;13(2). doi: 10.3390/biom13020382
89. Sterner RM, Kenderian SS. Myeloid cell and cytokine interactions with chimeric antigen receptor-T-cell therapy: Implication for future therapies. Vol. 27, *Current Opinion in Hematology.* 2020. doi: 10.1097/MOH.0000000000000559
90. Sandler RD, Tattersall RS, Schoemans H, Greco R, Badoglio M, Labopin M, et al. Diagnosis and Management of Secondary HLH/MAS Following HSCT and CAR-T Cell Therapy in Adults; A Review of the Literature and a Survey of Practice Within EBMT Centres on Behalf of the Autoimmune Diseases Working Party (ADWP) and Transplant Complications Working Party (TCWP). *Front Immunol.* 2020;11. doi: 10.3389/fimmu.2020.00524
91. Neelapu SS, Tummala S, Kebriaei P, Wierda W, Gutierrez C, Locke FL, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy-assessment and management of toxicities. Vol. 15, *Nature Reviews Clinical Oncology.* Nature Publishing Group; 2018. p. 47–62. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.148
92. Santomaso BD, Park JH, Salloum D, Riviere I, Flynn J, Mead E, et al. Clinical and biological correlates of neurotoxicity associated with car t-cell therapy in patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Discov.* 2018;8(8). doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-1319
93. Gardner RA, Ceppi F, Rivers J, Annesley C, Summers C, Taraseviciute A, et al. Preemptive mitigation of CD19 CAR T-cell cytokine release syndrome without attenuation of antileukemic efficacy. *Blood.* 2019;134(24). doi: 10.1182/blood.2019001463
94. Norelli M, Camisa B, Barbiera G, Falcone L, Purevdorj A, Genua M, et al. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. *Nat Med.* 2018;24(6). doi: 10.1038/s41591-018-0036-4
95. Fischer JW. CAR-T Cell Therapy: Mechanism, Management, and Mitigation of Inflammatory Toxicities. Vol. 12, *Frontiers in Immunology.* 2021. doi: 10.3389/fimmu.2021.693016
96. Liu D, Zhao J, Song Y. Engineering switchable and programmable universal CARs for CAR T therapy. Vol. 12, *Journal of Hematology and Oncology.* 2019. doi: 10.1186/s13045-019-0763-0
97. Ruella M, Kenderian SS, Shestova O, Klichinsky M, Melenhorst JJ, Wasik MA, et al. Kinase inhibitor ibrutinib to prevent cytokine-release syndrome after anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells for B-cell neoplasms. Vol. 31, *Leukemia.* 2017. doi: 10.1038/leu.2016.262

98. Futami M, Suzuki K, Kato S, Ohmae S, Tahara Y, Nojima M, et al. The novel multi-cytokine inhibitor TO-207 specifically inhibits pro-inflammatory cytokine secretion in monocytes without affecting the killing ability of CAR T cells. *PLoS One*. 2020 Apr 1;15(4). doi: 10.1371/journal.pone.0231896
99. Giavridis T, Van Der Stegen SJC, Eyquem J, Hamieh M, Piersigilli A, Sadelain M. CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade letter. *Nat Med*. 2018;24(6). doi: 10.1038/s41591-018-0041-7
100. Sachdeva M, Duchateau P, Depil S, Poirot L, Valton J. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor inactivation in CAR T-cells prevents monocyte-dependent release of key cytokine release syndrome mediators. *Journal of Biological Chemistry*. 2019;294(14). doi: 10.1074/jbc.AC119.007558

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 24. studenog 1998. godine u Varaždinu. Završila sam Prvu osnovnu školu Varaždin te Prvu gimnaziju Varaždin gdje sam proglašena za najmaturanticu razreda i sportski uzor generacije maturanata.

Tijekom studiranja na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, dva mjeseca sam provela na stručnoj praksi u UKC Ljubljana u sklopu Erasmus+ razmjene studenata. Uz to, 2023. godine sam sudjelovala u 'Erasmus+ Youth exchange' programu koji se održao u Dresdenu. Na završnim godinama studija bavila sam se pisanjem znanstvenih radova iz područja hematologije, endokrinologije i sportske medicine.

Dobitnica sam Dekanove nagrade za uspjeh na četvrtoj godini studija.

Članica sam fakultetske košarkaške ekipe s kojom sudjelujem na sveučilišnim i drugim natjecanjima gdje postižemo dobre rezultate, među kojima je najznačajnije 2. mjesto na Sveučilišnom prvenstvu u Zagrebu. Sudjelovala sam i na tri izdanja utrke '162 stube' u MEF kategoriji te sam osvojila prvo, drugo i treće mjesto.

Čitav život sam u sportu što me uvelike formiralo kao osobu. Aktivno sam se bavila košarkom, a danas slobodno vrijeme provodim u aktivnostima poput biciklizma, trčanja i trail trčanja te skijanja.