

Terapija tumora T-stanicama s kimernim antigenskim receptorima

Grahek, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:989705>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Prijediplomski studij Biotehnologija**

**Petra Grahek
0058215542**

**TERAPIJA TUMORA T-STANICAMA S KIMERNIM
ANTIGENSKIM RECEPTORIMA**

ZAVRŠNI RAD

**Predmet: Biotehnologija 4
Mentor: prof. dr. sc. Blaženka Kos**

Zagreb, 2023.

*Mojim dragim roditeljima, obitelji i Danielu.
Hvala Vam,
uvijek i na svemu.*

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Prijediplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Terapija tumora T-stanicama s kimernim antigenskim receptorima
Petra Grahek, 0058215542

Sažetak:

Žive stanice su najnovija generacija bioloških lijekova tzv. biofarmaceutika, kojima pripadaju T-stanice s kimernim antigenskim receptorima (CAR – engl. chimeric antigen receptor) namijenjene terapiji tumora. CAR T-stanice prepoznaju specifične antigene na površini stanica tumora i uništavaju ih. Prva takva stanična imunoterapija je odobrena 2017. godine, a uključuje također terapiju tumor-infiltrirajućim limfocitima (TIL) i prirodnim stanicama ubojicama (NK, engl. natural killer). Cilj ovog rada je bio opisati mehanizam terapijskog djelovanja CAR T-stanica, njihovu terapijsku primjenu, značaj, prednosti, nedostatke i daljnje mogućnosti razvoja ovog terapijskog pristupa. U svrhu razvoja CAR T-stanica kao lijekova, izolirani limfociti pacijenta se genetički modificiraju *ex vivo* radi dobivanja rekombinantnih CAR T-stanica koje će imati terapijski učinak. Terapija CAR T-stanicama smatra se revolucionarnom, te se očekuje primjena ovog terapijskog pristupa i za druge karcinome, pa čak i za zarazne i autoimune bolesti

Ključne riječi: CAR T-stanice, limfociti, genetičko modificiranje, tumorske stanice

Rad sadrži: 24 stranice, 13 slika, 2 tablice, 36 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. dc. Blaženka Kos

Datum obrane: 15. lipnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical engineering
Laboratory for the technology of antibiotics, enzymes, probiotics and starter cultures

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Tumor therapy with T-cells with chimeric antigen receptors

Petra Grahek, 0058215542

Abstract:

Living cells are the latest generation of biopharmaceuticals, which include T-cells with chimeric antigen receptors (CAR – English chimeric antigen receptor) intended for tumor therapy. CAR T-cells recognize specific antigens on the surface of tumor cells and destroy them. The first cellular immunotherapy was approved in 2017, and it also includes therapy with tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) and natural killer cells (NK). The aim of this work was to describe the mechanism of the therapeutic effect of CAR T-cells, their therapeutic application, significance, advantages, disadvantages and further possibilities for the development of this therapeutic approach. In order to develop CAR T-cells as drugs, the patient's isolated lymphocytes are genetically modified *ex vivo* to obtain recombinant CAR T-cells that will have a therapeutic effect. CAR T-cell therapy is considered revolutionary, and the application of this therapeutic approach is expected for other cancers, and even for infectious and autoimmune diseases.

Keywords: CAR T-cells, lymphocytes, genetic modification, tumor cells

Thesis contains: 24 pages, 13 figures, 2 tables, 36 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Blaženka Kos, PhD

Thesis defended: June 15, 2023

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1..OSNOVNA OBILJEŽJA TUMORSKIH STANICA	2
2.1.1. MIKROOKRUŽENJE TUMORSKIH STANICA.....	3
2.2..T-STANICE S KIMERNIM ANTIGENSKIM RECEPTORIMA (CAR T- STANICE) – NOVI IMUOTERAPIJSKI PRISTUP U LIJEČENJU RAKA.....	4
2.2.1. OBILJEŽJA CAR T-STANICA.....	6
2.2.2. GRAĐA CAR RECEPTORA.....	7
2.2.3. TIJEK RAZVOJA CAR RECEPTORA	10
2.3..TERAPIJA CAR T-STANICAMA	11
2.3.1. SINTEZA CAR T-STANICA.....	11
2.4..IZAZOVI I MOGUĆA RJEŠENJA U DALJNJEM RAZVOJU CAR T-STANICA ZA TERAPIJSKU PRIMJENU.....	14
2.4.1. NEDOSTATAK T-LIMFOCITA	14
2.4.2. UTJECAJ MIKROOKRUŽENJA.....	15
2.4.3. ŽIVOTNI VIJEK CAR T-STANICA.....	16
2.4.4. UNIŠTAVANJE ZDRAVIH STANICA	16
2.4.5. CIJENA TERAPIJE.....	16
2.5..NUSPOJAVE.....	17
2.5.1. RIZIK OD INFEKCIJA.....	18
2.5.2. UTJECAJ NA KRVNU SLIKU.....	18
2.5.3. SINDROM LIZE TUMORA	18

2.5.4. SINDROM OTPUŠTANJA CITOKINA (CRS)	19
2.5.5. NEUROLOŠKE NUSPOJAVE.....	19
2.6..PERSPEKTIVA TERAPIJE CAR T-STANICAMA	20
3.ZAKLJUČAK.....	21
4.POPIS LITERATURE.....	22

1. UVOD

Živim stanicama ili biotehnološkim procesima sa živim organizmima proizvode se nove generacije lijekova, tzv. biotehnološki lijekovi – biofarmaceutici. Ovaj pristup je utemeljen na iskorištavanju terapijskih funkcija određenih stanica za regulaciju ili omogućavanje bioloških procesa. Primjenjuju se u liječenju tumora, kardiovaskularnih, neuroloških i autoimunih bolesti. Žive stanice prolaze procese konstruiranja metodama genetičkog, metaboličkog i proteinskog istraživanja te tako mogu obavljati funkciju katalizatora ili nosača nestabilnih bioloških lijekova na način da oponašaju pulsirajuću ili reagirajuću isporuku lijeka. Od brojnih se prednosti ističu učinkovitost i proliferacija na mjestu djelovanja, izravan utjecaj na imunološki sustav te djelovanje na ciljno mjesto gdje postoji potreba za primjenom terapije [1].

Tumorska oboljenja predstavljaju jedne od najčešćih oboljenja današnjice, njihov se broj svakodnevno povećava te se iz navedenih razloga, osim što se pokušava preventivno utjecati na populaciju i tako podizati svijest o zdravlju, radi i na razvijanju novih načina terapija, kao i na unaprjeđivanju već postojećih metoda liječenja [2]. Tumorske stanice mogu biti dobroćudne (benigne) i zloćudne (maligne) te će o tome ovisiti način liječenja. Vrste liječenja mogu se podijeliti na tri glavne skupine: kirurško, lijekovima i radioterapija. Terapija lijekovima obuhvaća razne metode kao što su kemoterapija, hormonska terapija, imunoterapija i ciljana terapija. Kirurški zahvat najčešće se koristi kao prvi korak liječenja pri čemu se uklanja tumorsko tkivo, dok se primjerice kemoterapija i radioterapija koriste vanjskim čimbenicima (kemijske tvari-citostatici; snopovi ionizirajućih zraka), imunoterapija djeluje na način da se omogućuje bolji i jači odgovor na prisutnost tumorskih stanica u organizmu [3].

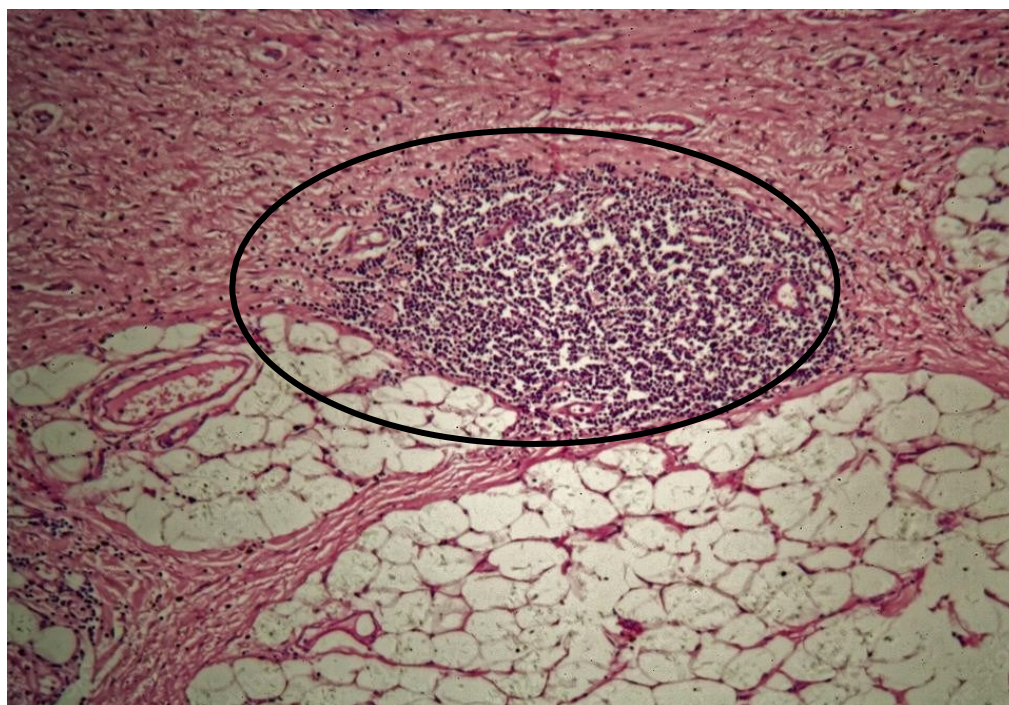
Jedna od vrsta imunoterapija koja se u Hrvatskoj aktivno primjenjuje od 2019. godine jest terapija T-stanicama s kimernim antigenskim receptorom (CAR-T), odnosno liječenje vlastitim stanicama budući da se koriste T-stanice oboljele osobe. Iako je ovaj pristup revolucionaran u liječenju, zabilježeni su nedostaci poput pojave nuspojava te visoke cijene terapije.

Cilj ovog završnog rada jest istražiti i objasniti terapiju T-stanicama s kimernim antigenskim receptorom, njezinu primjenu i značaj, prednosti, ali i nedostatke u odnosu na ostale načine terapija.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. OSNOVNA OBILJEŽJA TUMORSKIH STANICA

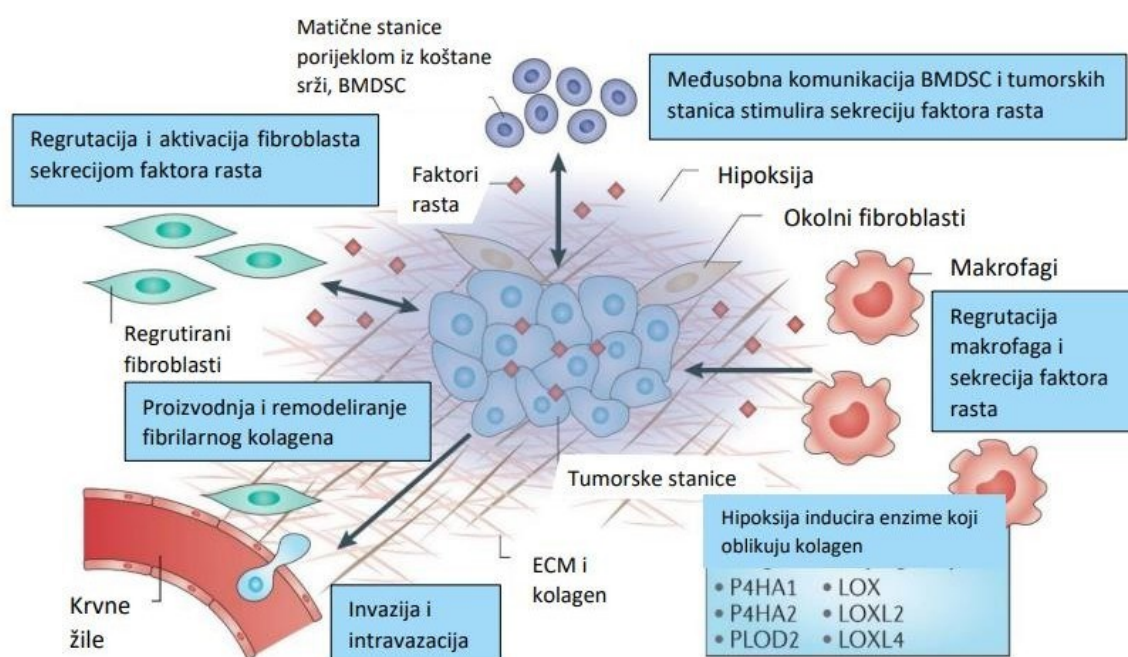
Oštećivanjem DNA ili mutacijama dolazi do poremećaja u diobi i rastu stanica, a krajnji rezultat je nastanak tumorskih stanica koje će, iako u organizmu nemaju nikakvu korisnu fiziološku zadaću, okolnim stanicama uzimati hranjive tvari. Tumorske stanice ne organiziraju se u tkivo, nakupina istih naziva se tumor, a njihova osnovna podjela uključuje benigne i maligne tumore (karcinom). Osim što maligni tumori rastu brže od benignih, benigni tumori lokalizirani su na zahvaćenome mjestu, a maligni tumori imaju sposobnost širiti se, tj. metastazirati krvožilnim i limfnim sustavom u druge dijelove tijela pa tako njihovo liječenje iznova predstavlja veliki izazov [4]. Osim metastaziranja, maligni tumori napadaju okolna tkiva i uništavaju ga. Daljnja podjela tumorskih stanica uzima u obzir mjesto nastanka – solidni tumori čvrstog su oblik i zahvaćaju organe i tkiva, a hematološki krv i limfu. Tumorske stanice jasno su prepoznatljive pod mikroskopom, njihov oblik razlikuje se od oblika zdravih stanica, jezgra je veća i nepravilnog oblika, citoplazme često ima u manjim količinama negoli kod zdravih stanica (Slika 1.).



Slika 1. Tumorske stanice želuca [5]

2.1.1. Mikrookruženje tumorskih stanica

Područje oko tumora naziva se njegovim mikrookruženjem (TME) i hipoksično je. Građa mikrookruženja vrlo je specifična, ovisi o stadiju napredovanja i sastoji se od tumorskih stanica i endogene strome domaćina, imunoloških stanica (granulociti, limfociti), makrofaga, fibroblasta, a naposljetku uključuje i žile koje se granaju iz žila domaćina i do tumorskih stanica dovode potrebne hranjive tvari i kisik. Time se postiže okruženje koje je povoljno za daljnji razvoj tumorskih stanica [6]. Tumorske stanice u neprekidnoj su interakciji s pripadajućim mikrookruženjem što utječe na njihov rast, ali i na krajnji ishod oboljenja.



Slika 2. Prikaz građe tumorskog mikrookruženja [7]

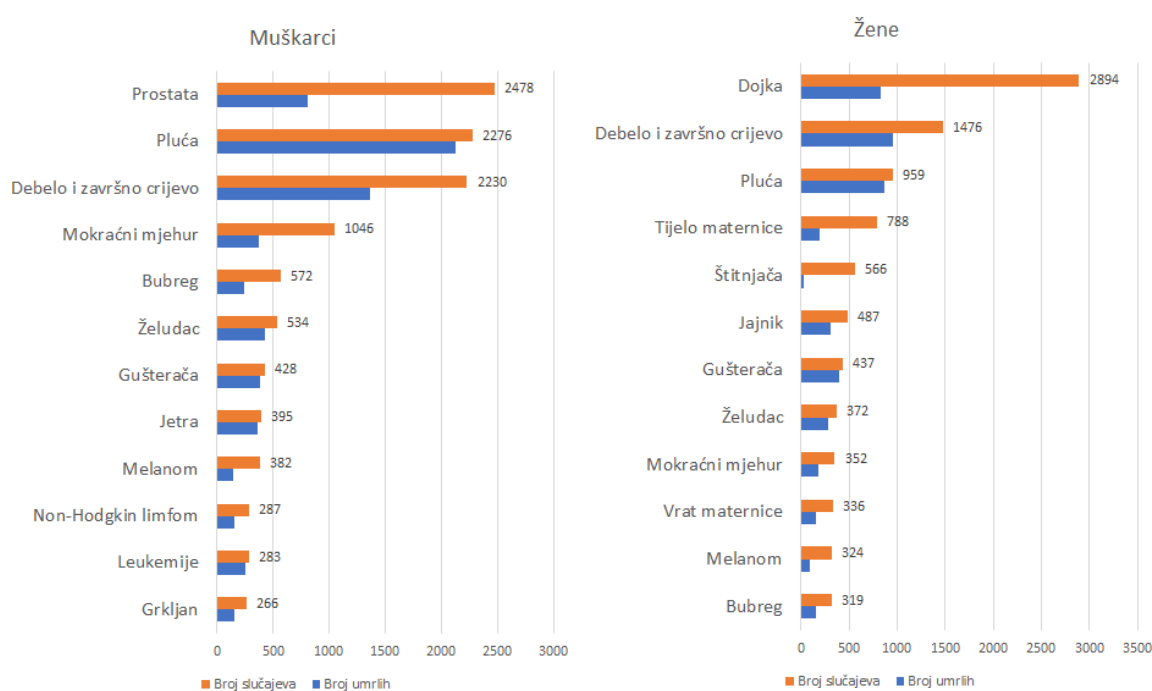
Svaka od sastavnica mikrookruženja ima svoju zadaću koju izvršava u korist napretka tumorskih stanica pa tako imunološke stanice, koje u uobičajenim uvjetima štite organizam, sada potiču različite upalne procese i tako pomažu preživljavanje tumora. Nadalje, makrofagi – nositelji nespecifične imunosti (uklanjaju organizmu nepoznate čestice razgrađujući ih pritom vlastitim enzimima), u ovakvim će uvjetima sudjelovati u prijenosu tumorskih stanica u krvožilni sustav i tako olakšavaju proces metastaziranja, a ujedno ih karakterizira i lučenje faktora rasta. Novija istraživanja ukazuju kako makrofagi mogu

negativno utjecati i na zračenje te tako umanjiti njegovo djelovanje. Uz makrofage, fibroblasti također pripomažu metastaziranju, ali uz to sudjeluju i u procesu stvaranja krvnih žila kojima će se potrebni nutrijenti transportirati do tumora.

Mikrookruženje solidnih tumora predstavlja i fizičku barijeru oko samog tumora budući da se stvara gusti sloj građen od stromalnih stanica kao što su CAF-ovi (engl. *cancer-associated-fibroblast/s*), a u pojačanoj se mjeri proizvode i izvanstanični matični proteini (ECM, eng. *extracellular matrix*) radi transformacije faktora rasta [8] [9].

2.2.T-STANICE S KIMERNIM ANTIGENSKIM RECEPTORIMA (CAR T-STANICE) – NOVI IMUOTERAPIJSKI PRISTUP U LIJEČENJU RAKA

Imunoterapija je relativno novi pristup u liječenju raka, a budući da je rak sve zastupljenija bolest (Slika 3.), važno je istražiti sve potencijale neke metode te pružiti priliku novim idejama u liječenju.



Slika 3. Prikaz najčešćih karcinoma u Hrvatskoj, 2020. [10]

Imunoterapija ne djeluje direktno na tumorske stanice, već na imunološki sustav kako bi prepoznao tumorske stanice i potiče ga na odgovor. Nekoliko je mehanizama djelovanja imunoterapije: inhibicija imunoloških kontrolnih točaka, terapija prijenosa T-stanica, monoklonalna protutijela, terapijska cjeviva te imunološka modulacija.

Američka agencija za hranu i lijekove (The United States Food and Drug Administration) do sada je odobrila pet terapija CAR T- stanicama (Slika 4.). Prva takva odobrena terapija zove se Kymriah, a odobrena je nakon studije provedene na 75 pacijenata s akutnom limfoblastičnom leukemijom mlađe životne ili čak i pedijatrijske dobi. Zabilježena je stopa remisije od 81%. No, iako su ovakvi rezultati bili zapanjujuće izvrsni, kod 21 pacijenta pojavilo se oslobađanje citokina, a naknadno je 35 pacijenata iz navedenog razloga i hospitalizirano. Trenutno je odobreno pet terapija koje koriste CAR T-stanice i sve su namijenjene za liječenje hematoloških vrsta tumorskih stanica [11].



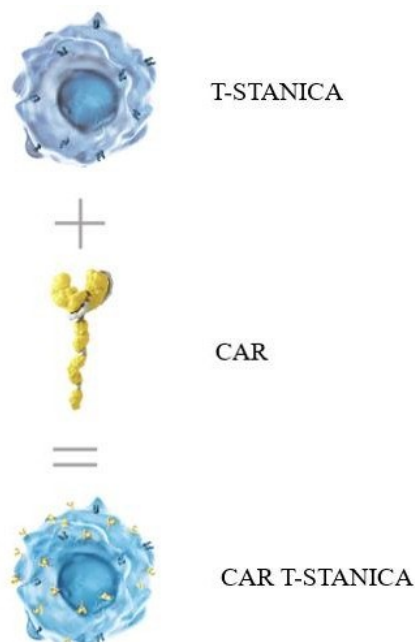
Slika 4. Kronološki prikaz odobrenja CAR T-terapija [12]

Terapija CAR T-stanicama u Hrvatskoj trenutno se provodi u KBC-u Zagreb od 2019.godine. Pacijenti kandidati su odrasle osobe koje boluju od agresivnog oblika difuznog B-velikostaničnog limfoma i pacijenti mlađi od 25 godina oboljeli od akutne limfoblastične leukemije. U području solidnih tumora zapažena je ograničena aktivnost CAR T-stanica i u te svrhe ne primjenjuje se navedeni tip terapije [13].

2.2.1. Obilježja CAR T-stanica

T-limfociti jedna su od dvije vrste limfocita (T i B) i nositelji su stanične imunosti, a ime im potječe od organa gdje sazrijevaju – timusu, a nastaju u koštanoj srži. Nakon sazrijevanja cirkuliraju krvožilnim i limfnim sustavom čekajući pritom doticaj s točno određenim antigenom koji će ih aktivirati budući da na membrani nose receptor (TCR) koji prepoznaje samo određeni antigen. TCR je građen od dva varijabilna lanca koji će tvoriti mjesto prepoznavanja. Za aktivaciju naivnih T-limfocita potrebna su dva signala: primarni signal od strane TCR-a te signal potpomognut s CD28 molekulama.

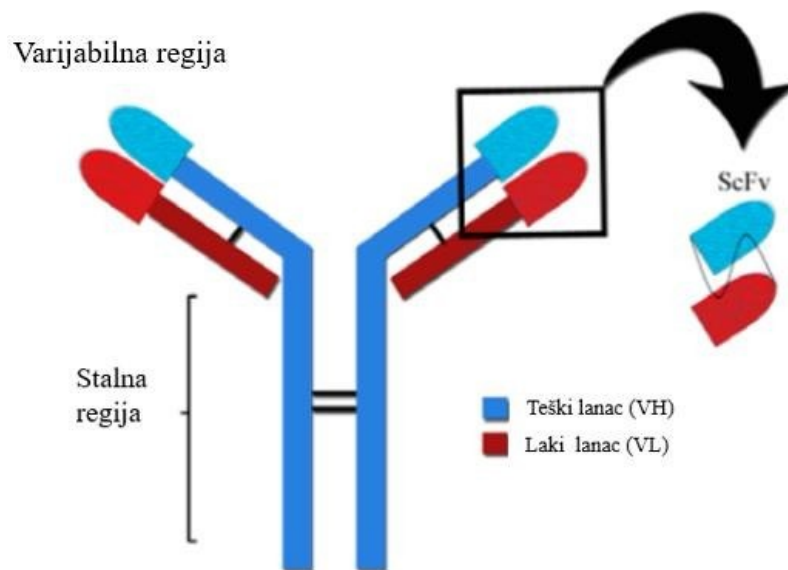
U terapiji karcinoma T-stanice se genetički modificiraju kako bi do izražaja došao kimerni antigenski receptor (CAR) koji je važan u usmjeravanju T-stanica da prepoznaju antigen koji se nalazi samo na površini tumorske stanice te da se na isti vežu (Slika 5.). CAR receptori su proteini i imaju 4 osnovna dijela: transmembranska, razmaknička (zglobna), unutarstanična i izvanstanična domena od kojih svaka ima specifičnu zadaću koja u konačnici doprinosi potpunoj funkciji CAR T-stanica. [13]



Slika 5. Shematski prikaz CAR T-stanica [14]

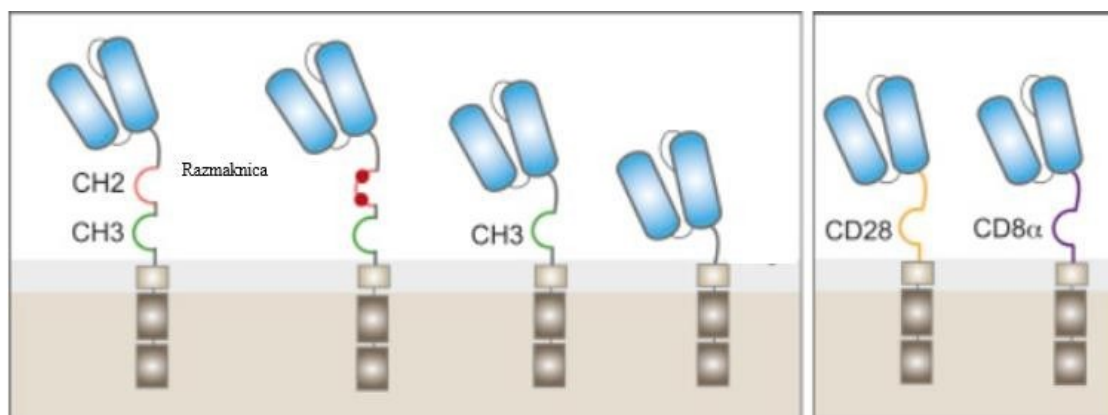
2.2.2. Građa CAR receptora

Izvanstanična domena izložena je izvanstaničnome okruženju i primarna zadaća jest vezanje antigena, a u skladu s time osnovni dijelovi jesu signalni protein, regije za prepoznavanje antigena te razmaknica koja ih povezuje i omogućuje njihovo zajedničko djelovanje [15]. Signalni protein građen je od teškog (VH) i lakog (VL) lanca imunoglobulina međusobno povezanih fleksibilnom spojnicom tvoreći tako jednolančani varijabilni fragment (scFv, eng. *single-chain fragment variable*) veličine otprilike 25 kDa. Kompatibilne regije i međusobna interakcija između teškog i lakog lanca utječe na specifičnost scFv lanca i afinitet za antigen [16]. Regija za prepoznavanje antigena također se sastoji od scFv. Kao zamjena za scFv može se koristiti peptid koji ima sposobnost prepoznavanja i vezanja za svoj receptor na ciljanoj stanici. Spajanjem scFv lanca s antigenom, nastaje veliki histokompatibilni kompleks (MHC, eng. *major histocompatibility complex*).



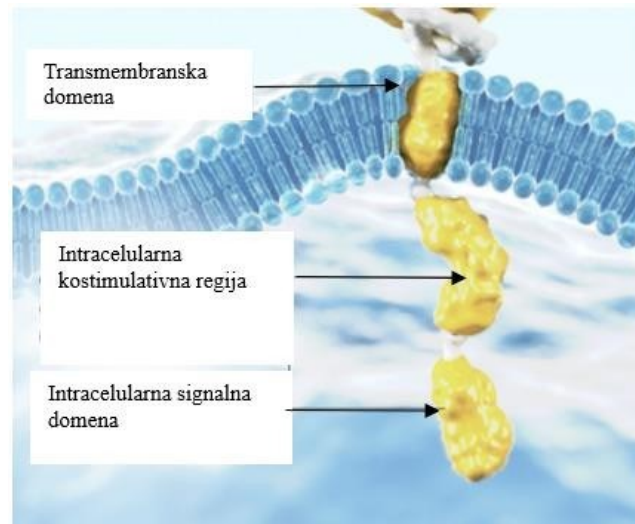
Slika 6. Shematski prikaz jednolančanog varijabilnog fragmenta (scFv) [17]

Razmaknica (eng. *hinge*) predstavlja odstoju regiju između izvanstanične i transmembranske domene, a može biti različitih duljina te ova karakteristika znatno utječe na CAR T-stanice. Jedna od najvažnijih karakteristika jest njezina fleksibilnost pomoću koje se lakše savladavaju steričke smetnje koje mogu ometati vezanje CAR receptora i pripadajućeg antigena. Duljina se određuje empirijski ovisno o položaju ciljanih antigena. Ukoliko se antigen nalazi u neposrednoj blizini stanične membrane potrebna je dulja razmaknica, dok antigen koji se nalaze na površini stanice zahtijevaju kraću razmaknicu. U terapiji CAR T-stanicama najčešće se koristi razmaknica građena od molekula CD8 i CD28 ili od dijelova imunoglobulina (IgG1, IgG4). No, razmaknice koje u svojoj građi sadrže molekule imunoglobulina mogu narušiti stabilnost CAR T-stanica *in vivo* [4]. Inženjeringom razmaknice i dodavanjem drugih molekula može se utjecati na stabilnost i smanjiti navedeni nepovoljni utjecaj imunoglobulina (Slika 7.) U lijekovima Kymriah i Yescarta scFv-ovi koji se nalaze u sastavu CAR receptora izvedeni su iz mišjeg antihumanog CD19 antitijela FMC639 [18].



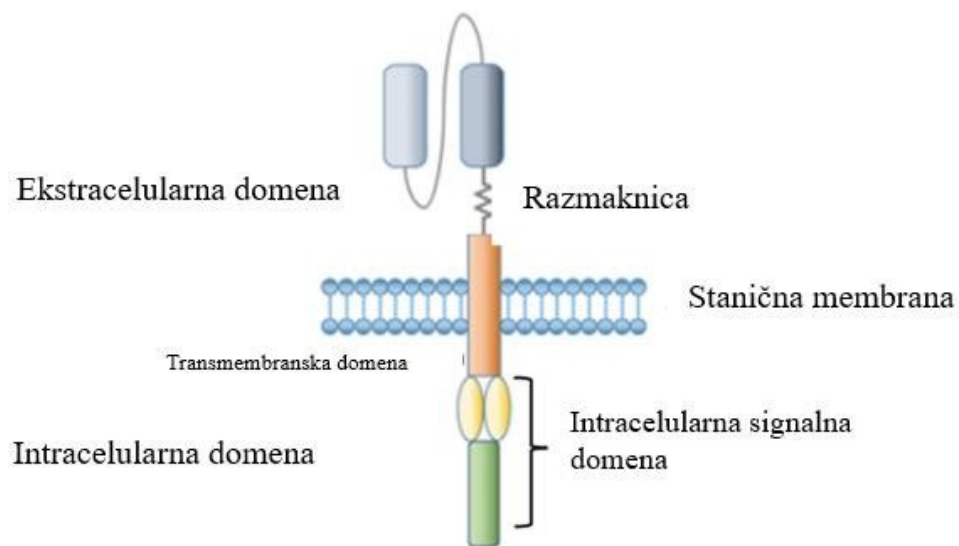
Slika 7. Prikaz različitih građa razmaknica [19]

Zadaća transmembranske domene jest omogućavanje boljeg usađivanja CAR-a u membranu T-stanice, a sastoji se od jedne α uzvojnice te se proteže preko stanične membrane. Građena je najčešće od CD8, CD28, CD4 ili CD3 ζ molekula. Transmembranska domena pozitivno utječe i na stabilnost cjelokupnog kompleksa, a najveća stabilnost zabilježena je ukoliko je građena od CD28 molekula [20].



Slika 8. Detaljni prikaz transmembranske i unutarstanične domene [21]

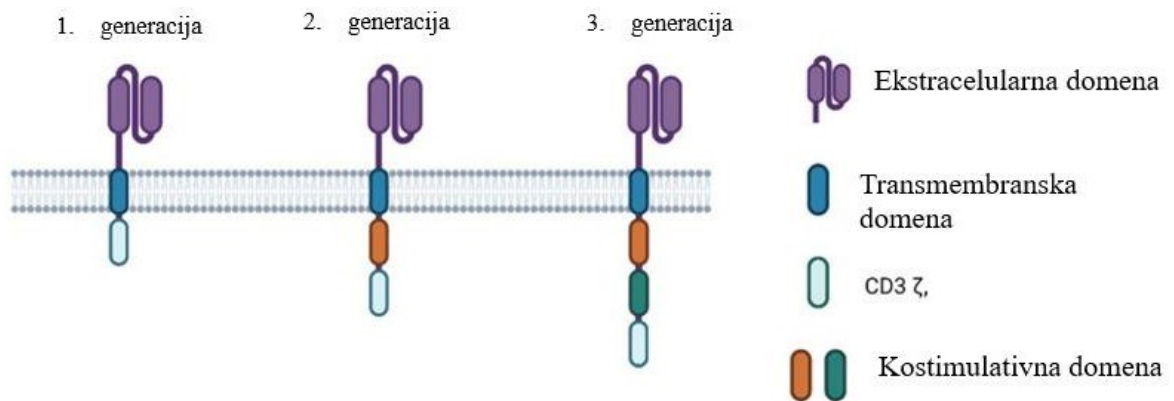
Unutarstanična domena čini posljednji dio receptora i signalna je domena s ulogom u aktiviranju CAR-a, tj. nakon što dođe do prepoznavanja antigena, receptori će se grupirati i aktivira se signal i ovim putem u konačnici dolazi do T-stanice koja tada može započeti proces napadanja tumorskih stanica. U sastavu se u najvećem postotku nalazi se CD3 ζ molekula [20].



Slika 9. Shematski prikaz cjelokupne strukture CAR receptora [22]

2.2.3. Tijek razvoja CAR receptora

Na temelju razlika unutarstanične domene izdavaju se 3 generacije CAR-a (Slika 8.). CAR prve generacije ima scFv i samo jednu signalnu domenu građenu od CD3 ζ molekula te je korištena prilikom sinteze CAR makrofaga i CAR NK-stanica. Druga i treća generacija dobivaju jednu, odnosno dvije dodatne signalne domene koje se također razlikuju po sastavu, tj. građene su od CD28 ili 4-1BB molekula. Dodavanjem navedenih kostimulativnih regija doprinosi se bržem rastu i boljem preživljavanju stanica. No, dodavanjem navedenih regija utječe se na izlučivanje citokina što može dovesti do neurotoksičnosti ili do sindroma otpuštanja citokina [11].



Slika 10. Prikaz struktura tri generacija CAR-a [11]

2.3. TERAPIJA CAR T-STANICAMA

Proces sinteze CAR T-stanica zahtjevan je i složen proces i zadaća je sintetizirati stanice koje će ciljano prepoznavati isključivo tumorske stanice kako bi se izbjeglo napadanje zdravih i organizmu potrebnih stanica. No, tako sintetizirane stanice imaju i nekoliko dodatnih uloga, a to je njihov rast i zadržavanje u tijelu kroz duži vremenski period kako bi, ukoliko ponovno dođe do pojave tumorskih stanica, one pravovremeno bile otkrivene i eliminirane od strane CAR T-stanica.

2.3.1. Sinteza CAR T-stanica

Konkretnome procesu sinteze CAR T-stanica prethodi nekoliko koraka počevši s probirom pacijenta. Pacijente za terapiju prijavljuje njihov hematolog, a stručni timovi razmotriti će stanje pacijenta i odabrati pacijente kandidate [13]. Prvi korak ka terapiji je prikupljanje CD3 pozitivnih T-limfocita iz krvi pacijenta (leukafereza). Postupak traje nekoliko sati pri čemu se venskim putem i pomoću uređaja za leukaferezu iz krvi izdvajaju limfociti, a ostatak se krvi natrag vraća u organizam. Ovisno o terapiji i masi pacijenta potrebno je prikupiti određeni broj limfocita. U razdoblju između prikupljanja i vraćanja modificiranih limfocita natrag u krvotok, pacijent će primiti još 2 dodatne terapije. Prva terapija provodi se radi kontrole i stabilizacije bolesti kako ne bi došlo do daljnjeg napredovanja bolesti. Druga terapija, tzv. limfodeplecijska kemoterapija, vrši se neposredno prije primitka lijeka i njezin je cilj ukloniti T-limfocite iz organizma i na taj način stvoriti okruženje koje će omogućiti bolji razvoj i razmnožavanje CAR T-stanica. Izdvajanje se vrši protočnom citometrijom ili magnetskim kuglicama. Limfociti se vežu na pripadajuća antitijela, prethodno vezana na magnetne kuglice, koje će se kasnije probrati magnetskim poljem. Drugi način uključuje fluorescentno obilježena antitijela i njihov probir površinskim markerima. Nakon izolacije, slijedi genetičko modificiranje stanica kako bi uspješnije prepoznavale i uništavale tumorske stanice [23].

Genetičko modificiranje uključuje implementaciju gena za sintezu određenog TCR-a, a vrši se virusnim vektorom budući da je njegova učinkovitost veća negoli u nevirusnih. Danas se najčešće modificiraju lentavirusima ili gama retrovirusima *ex vivo*. Detaljniji prikaz strategija za genetičku modifikaciju T-stanica prikazan je u Tablici 1. Transformacija T-stanicama retrovirusima dobro je uhodana metoda, no ograničena je veličinom genoma koja se može ugraditi u vektor [20].

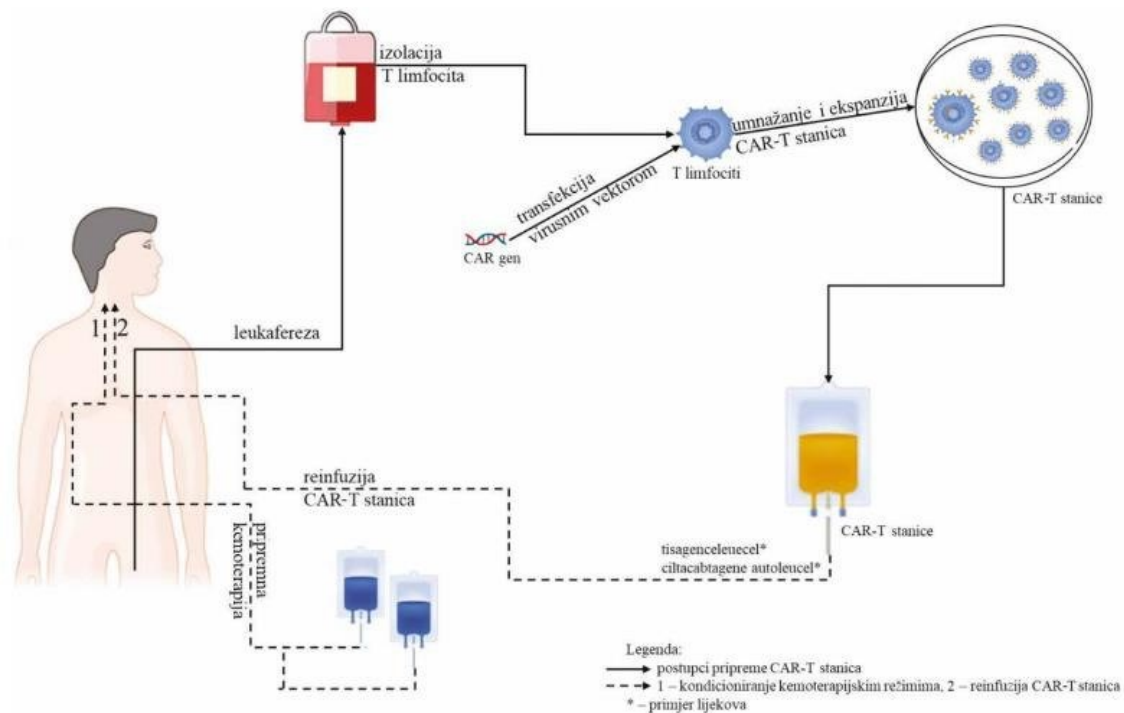
Tablica 1. Prikaz strategija za genetičku modifikaciju T-stanica [18]

Vrsta vektora	Transgensko umetanje	Ekspresija transgena	Životni vijek transgena	Transgenska isporuka	Vrste	Značajke
Retrovirusi	neciljana integracija	egzogeni promotor	dugo	<i>ex vivo</i> transdukcija	gama retrovirus	sigurni, optimizirani protokoli koje je odobrila FDA
					lentivirus	ograničenje velikih transgena
Enzimi transpozaze	neciljana integracija	egzogeni promotor	dugo	<i>ex vivo</i> elektroporacija	„Sleeping beauty“ „piggyBac“	ekonomično, slabo razvijeno
mRNA	neintegrativni	N/A	kratak	<i>ex vivo</i> elektroporacija	N/A	brzo, ekonomično, idealno pri uvođenju novog CAR-a u pacijente
Neintegrativni lentivirus	neintegrativni, epizomalni	egzogeni promotor	srednje kratak	<i>ex vivo</i> transdukcija	NILV-S/MAR	skupo, zahtjeva stalno doziranje
Enzimi endonukleaze	ciljana integracija	endogeni promotor	dugo	<i>ex vivo</i> elektroporacija	cinkov prst	usmjerano umetanje transgena u genom stanice domaćina
					TALENs	
					CRISPR/Cas9	

Tako pripremljene stanice potrebno je umnožiti u kulturi tkiva koristeći faktora rasta, primjerice IL-2 koji je u ovome postupku najčešće korišten. Budući da se prije početka terapije uklanjaju T-limfociti pacijenta, sintetizirane CAR T-stanice potrebno je umnožiti u velikim količinama. Sam postupak može potrajati do 3-7 tjedana, a nakon toga se stanice u zamrznutom stanju vraćaju u bolnicu gdje će se provoditi daljnja terapija.

Nakon što su u organizam unijete CAR T-stanice, podlegle su razmnožavanju budući da su u okruženju povoljni uvjeti s dovoljno nutrijenata. CAR T-stanice odmah počinju napadati tumorske vođene kemokinima (npr. CXCL1 i CXCL2) koje ispuštaju tumorske stanice [23]. Uništavanje tumorskih stanica omogućeno je stvaranjem imunodne sinapse. Imunodna sinapsa definira se kao trodimenzionalna, molekularna i kompleksna struktura koja omogućava vezanje T stanica s ciljanom stanicom.

Prije nego što pacijent primi prve CAR T-stanice prima i lijekove koji će spriječiti pojavu alergijskih reakcija.



Slika 11. Shematski prikaz terapije CAR T-stanicama [23]

2.4. IZAZOVI I MOGUĆA RJEŠENJA U DALJNJEM RAZVOJU CAR T-STANICA ZA TERAPIJSKU PRIMJENU

Učinkovitost terapije ovisi o mnogim čimbenicima, od zdravstvenog stanja pacijenta, kvalitete provedbe modificiranja T-stanica u CAR T-stanice preko transporta istih, njihovog mehanizma djelovanja, a potom se opet vraćajući na pacijenta i na to kako će organizam prihvatiti i reagirati na „nove“ T-limfocite. Poodmakli stadij bolesti pacijenta može biti jedan od faktora koji će biti presuđujući prilikom razmatranja o početku terapije CAR T-stanicama i u takvim se slučajevima pacijent često niti ne uključuje u terapiju. Glavnim izazovima koje je potrebno savladati smatraju nedostatak T-limfocita te veličina živih terapijskih stanica, mikrookruženje (mikrookolišni uvjeti) tumorskih stanica koje rezultira slabim prodiranjem terapijskih stanica u tumor, nedostatak antigena specifičnih za tumor kao i zahtjevi za biokompatibilnošću, neučinkovita infiltracija i visoki nivo sterilnosti koji je potrebno ostvariti u svim fazama sinteze, ali i provođenja terapije. Rješenja na prethodno spomenute izazove mogu se temeljiti na činjenici da je terapija autolognim stanicama (stanice pacijenta) trenutno učinkovitiji od alogenih stanica (stanice donora). Naime, autologne se stanice lakše prilagođavaju, no zahtjevi njihovog čuvanja i transporta strogi su, životni vijek kratak, a cijena visoka [1].

2.4.1. Nedostatak T-limfocita

Pacijenti oboljeli od karcinoma prije terapije CAR T-stanicama bili su podvrgnuti brojnim tradicionalnim načinima liječenja što često uključuje po nekoliko kemoterapija i/ili radioterapija. Ovakve metode često imaju negativan odraz na organizam u smislu oslabljenja imuniteta što smanjuje broj leukocita. Iz navedenih se razloga istražuje mogućnost korištenja stanica od kompatibilnog donora (alogenični T-limfociti). Pronalaskom srodnog donora, ovakav proces bi se uvelike olakšao budući da pacijent ne bi trebao prolaziti kroz proces uzimanja T-limfocita. Također, postupak prikupljanja bio bi lakše ponovljiv, a u jednom postupku izolacije moglo bi se prikupiti puno više T-limfocita.

2.4.2. Utjecaj mikrookruženja

Mikrookruženje je jedan od najvećih izazova jer svojom građom ometa transport CAR T-stanica do željenog mjesta i tako ispunjava svoju glavnu ulogu zaštite tumorskih stanica [24]. Svojom građom TME predstavlja imunosupresivno okruženje koje iscrpljuje T-stanice ponavljanjem TCR stimulacija, a također je hipoksično, vrlo siromašno hranjivim tvarima i kiselog je pH [25]. Kao rezultat transformiranog faktora rasta, pojačana je sinteza izvanstaničnog matičnog proteina (ECM) koji također negativno utječu na pokretljivost CAR T-stanica. Prema građi ECM proteini zapravo su kolageni, glikoproteini i proteoglikani. U najvećem postotku nalazi se kolagen, a količina nakupljenog kolagena obrnuto je proporcionalna sa stopom preživljavanja pacijenta. ECM tvore gustu mrežu proteina, a signalima koje odašilju utječu na stanične aktivnosti kojima onemogućuju preživljavanje CAR T-stanica i pristup lijeka tumoru, a okoliš ujedno opskrbljuju faktorima rasta. Istraživanjima je dokazano kako različite stanice raka različito utječu na agresivnost raka. CAF-ovi (eng. *Cancer-associated fibroblasts*) su najznačajnije stanice za izlučivanje ECM-a, aktivne su u područjima tumora i metastaza, a uključuju fibroblastične, ne-neoplastične, ne-vaskularne, ne-epitelne i neupalne stanice. No, prilikom definiranja CAF-ova inzistira se da se CAF-ovi ne opisuju kao stanice, već kao stanično stanje budući da mogu biti različitog podrijetla. Njihov razvoj može biti potaknut hipoksijom, staničnim stresom, faktorima rasta, citokinima i kemokinima [26]. Smanjenjem gustoće ECM-a i postavljanjem CAF-ova (fibroblasti) koje izlučuje FAP kao potencijalan cilj CAR T-stanica smanjila bi se duljina probijanja CAR T-stanica i tako se omogućio bolji transport.

2.4.3. Životni vijek CAR T-stanica

Neke oblici karcinoma zahtijevaju dulji tijek trajanja terapije i u takvim je situacijama izrazito važno da su CAR T-stanice postojane te da imaju relativno dug vijek trajanja. Na vijek trajanja utječu kvaliteta izoliranih T-stanica, kao i kvaliteta konstrukta CAR-T, stanje kulture T-stanica, itd. Neke studije tvrde kako se dodavanjem kostimulativnih domena, primjerice CD28 ili 4-1BB, produkuje životni vijek, a ujedno je dokazano kako dodatak 4-1BB domene produkuje životni vijek za 168 dana, dok CD28 domena za 30 dana, a osnovne razlike postoje u načinu signalizacije i ekspresije. U prekliničkim eksperimentima, utvrđeno je kako CAR T-stanice koje sadrže CD28 otpuštaju veće količine citokina negoli stanice s 4-1BB kostimulatomnom domenom, dok im je antikancerogena učinkovitost otprilike slična [27].

2.4.4. Uništavanje zdravih stanica

Iako su CAR T-stanice konstruirane za prepoznavanje i vezanje isključivo na tumorske stanice, moguće je da tijekom terapije budu napadnute i zdrave stanice. Budući da je organizam oslabljen, napad na zdrave stanice nikako ne ide u korist.

2.4.5. Cijena terapije

Slika 11. prikazuje lijek *Kymriah* proizvođača Novartis. Cijena jednog tretmana terapijom prema podacima iz lipnja 2020.godine iznosila je približno 340 000 USD [28], a trenutno u 2023.godini cijena se snizila na 325 000 USD [29]. Kako bi terapija djelovala, u nekim je slučajevima potrebno više tretmana.



Slika 12. Lijek *Kymriah* proizvođača Novartis [30]

2.5. NUSPOJAVE

Nuspojave koje se mogu pojaviti tijekom ili nakon provođenja terapije također su jedna vrsta nedostataka budući da je potrebno naknadno liječenje. Kako bi se na vrijeme otkrili znakovi nuspojava, pacijenti su pod stalnim nadzorom liječnika te se prate njihove vitalne funkcije kao što su tjelesna temperatura, tlak i uzimanje uzoraka krvi. Također, od pacijenata se zahtjeva da dva mjeseca nakon primitka terapije stanuju relativno blizu kliničkog centra (max. dopuštena udaljenost iznosi 2h vožnje) kako bi se po potrebi na vrijeme moglo intervenirati.

U terapiji CAR T-stanicama postoji mogućnost nakon provedbe predstavljaju veliki izazov budući da se ni u kojem trenutku ne zna kako će organizam kasnije reagirati na provedenu terapiju. U nekim slučajevima kasnije se ne javljaju nikakve dodatne komplikacije, no zabilježeno je kako terapija radi svoje agresivnosti može uzrokovati dugoročnu anemiju, pojavu sekundarnih tumorskih oboljenja, kao i neplodnosti.

Najčešće nuspojave biti će obrađene u daljnjem tekstu.

2.5.1. Rizik od infekcija

Terapija CAR T-stanicama, iako kao zadatak ima pomoći obrambenome sustavu da lakše uništi tumorske stanice, ostaviti će i negativan odraz na isti i oslabiti ga za različite infekcije. Tablica 2. prikazuje najčešće uzročnike infekcija kod onkoloških bolesnika. Pacijenti su im nakon provedene terapije često podložni i to je jedan od razloga zašto je u praksu uvedene dulje vrijeme promatranja i prema statistici jedan su od najčešćih uzročnika mortaliteta onkoloških bolesnika [31]. Prilikom liječenja koriste se antibiotici, a nije naodmet uzimanje imunoglobulina za jačanje imunološkog sustava ili drugih pripravaka sa sličnim djelovanjem.

Tablica 2. Najčešći uzročnici infektivnih oboljenja onkoloških bolesnika [31]

BAKTERIJE	VIRUSI	KVASCII PLIJESNI
<i>Staphylococcus aureus</i>	Herpes simplex virus	<i>Candida albicans</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Varicella - zoster	<i>Aspergillus</i>
<i>Klebsiella</i>	Epstein-Barrov virus	

2.5.2. Utjecaj na krvnu sliku

Kao što je i ranije spomenuto, krvna slika u pacijenata s tumorskim oboljenjem već i prije terapije odstupa od referentnih vrijednosti pojedinih pokazatelja, a terapija CAR T-stanicama može dodatno utjecati na snižene vrijednosti eritrocita ili trombocita. Radi toga se svakodnevno uzimaju uzorci krvi, a po potrebi se uvode dodatni eritrociti ili trombociti.

2.5.3. Sindrom lize tumora

Ukoliko terapija ima pozitivan učinak i dolazi do uništavanja tumorskih stanica, njihovim raspadanjem oslobađat će se tvari koje bubrezi moraju obraditi i izbaciti iz tijela. Ukoliko bubrezi ne mogu dovoljno brzo obrađivati otpadne tvari (ioni, proteini, nukleinske kiseline) koje im krvotokom pristižu, dolazi do tzv. sindroma lize tumora koji se pokušava

prevenirati infuzijom. Ako su prvi simptomi zanemareni ili nisu prepoznati, u konačnici može doći i do smrti. Neki od prvih simptoma su povraćanje, slabost, smetnje prilikom mokrenja, bolovi u predjelu bubrega [32].

2.5.4. Sindrom otpuštanja citokina (CRS)

Sindrom otpuštanja citokina (CRS, eng. *Cytokine release syndrome*) predstavlja upalni odgovor organizma prilikom infekcija ili primjenom različitih lijekova i terapija. Ako je provedba terapije uspješna, imunološki sustav biti će visoko potaknuti na djelovanje pa će slijedom događaja i stopa otpuštanja citokina biti visoka. Građom i sastavom citokini pripadaju proteinima. Prvi simptomi javljaju se unutar 10 dana od terapije, a mogu uključivati simptome nalik gripu poput povišene tjelesnu temperaturu, povraćanje, proljev, bolovi u mišićima i zglobovima, no postoji mogućnost pojavljivanja i zahtjevnijih simptoma kao što su poteškoće u govoru, hipertenzija i mialgiju. Simptomi se najčešće pojavljuju nakon prve primljene doze, dok kasnije simptomi najčešće izostanu [33].

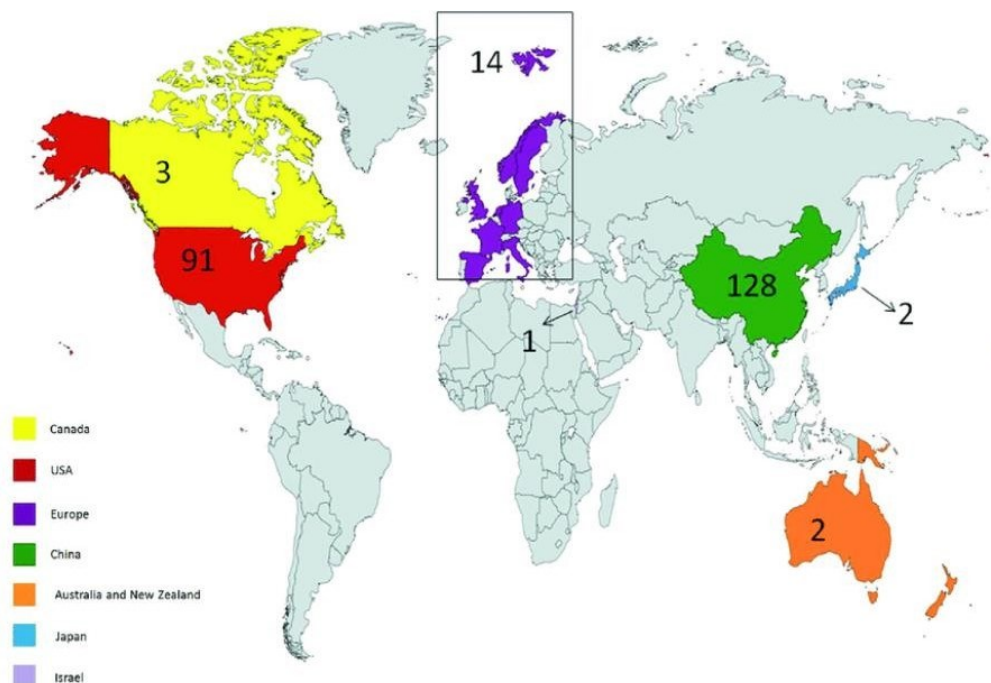
2.5.5. Neurološke nuspojave

Terapija može imati negativan utjecaj na djelovanje mozga što se jednim imenom zove sindrom encefalopatije i uključuje pojavu teškoća u govoru, epileptički napadaj, smetenost, halucinacij te se iz navedenih razloga nalaže izbjegavanje upravljanja vozilima [34]. Do pojave dolazi u 64% pacijenata jer citokini mogu prelaziti preko krvno-moždane barijere koja ih, iako ima ulogu filtracije, ne može zaustaviti te ujedno imaju sposobnost vezati se u cerebrospinalnoj tekućini. Pojava istih moguća je unutar 8 tjedana od primjene terapije, a na nju se može utjecati uporabom antagonista kompatibilnih za pojedine citokine [35].

2.6. PERSPEKTIVA TERAPIJE CAR T-STANICAMA

Kako bi terapija CAR T-stanicama postala primjenjiva na što više pacijenta, potrebno je raditi na otklanjanju postojećih nedostataka. No, istovremeno i preventivno potrebno je raditi na što univerzalnijoj primjeni kako bi se pokrio što širi spektar tumorskih oboljenja za koje će terapija biti primjenjiva budući da se u velikome postotku tumorskih oboljenja nalaze solidni tumori. Prostor za poboljšanje nazire se već u građi T-stanica, čime danas nastaju novije i složenije, ali kompetentnije generacije CAR T-stanica. Istraživanjima se nailazi na brojne komponente koje se prilikom sinteze mogu dodavati na terapijske stanice. Također, pogrešan odabir vektora može umanjiti kvalitetu sinteze. Iz navedenog se razloga sve više istražuje korištenje transpozona kao nevirusnih vektora.

Daljnijim razvojem biotehnologije i područja biofarmaceutika otvaraju se brojne mogućnosti za napredak, no svaki napredak prije konkretne primjene mora proći mnogobrojne faze kliničkih ispitivanja što zahtjeva i dulji vremenski period. Slika 16. prikazuje distribuciju kliničkih ispitivanja CAR T-stanične terapije. Najveći broj istraživanja vrši se u SAD-u i Kini, a u novije vrijeme sve važnije mjesto u istraživanjima dobiva i Europa.



Slika 13. Distribucija kliničkih istraživanja CAR T-stanične terapije [37]

3. ZAKLJUČAK

1. CAR T-stanice su oblik terapijskih stanica nastao genetičkim modificiranjem T-limfocita kako bi do izražaja došao CAR receptor koji usmjerava T-limfocite kako bi bolje prepoznavali antigene tumorskih stanica.
2. CAR receptori se građom ubrajaju u skupinu proteina, a sastoje se od 4 osnovna dijela: transmembranska, razmaknička (zglobna), unutarstanična i izvanstanična domena.
3. Prvi korak u terapiji jest prikupljanje limfocita nakon čega slijedi njihovo genetičko modificiranje virusnim vektorima i umnožavanje u kulturi stanice, a potom se vraćaju u organizam pacijenta.
4. Glavni izazovi terapije CAR T-limfocitima jesu veličina živih terapijskih stanica, mikrookolišni uvjeti tumorskih stanica, nedostatak antigena, biokompatibilnost i sterilnost.
5. Terapija CAR T-stanicama predstavlja izuzetno potencijalan oblik liječenja tumorskih oboljenja, no s brojnim nuspojavama kao primjerice sindrom lize tumora i sindrom otpuštanja citokina radi čega je potreban daljnji napredak i razvoj.

4. POPIS LITERATURE

- [1] Šušković J, Kos B: Biotehnologija 4: Biotehnološka proizvodnja lijekova (interna skripta, predavanja).
- [2] World Health Organization. Cancer Control. Knowledge into Action. WHO Guide for Effective Programmes. Geneva: WHO, 2006.
- [3] Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, (2021) <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=62675> . Pristupljeno 3. lipnja 2023.
- [4] Cvijić V (2018) Maligne karakteristike tumorskih matičnih stanica (diplomski rad), Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- [5] Anonymous, <https://stock.adobe.com/dk/images/stomach-cancer-cells-under-the-microscope/175927316> . Pristupljeno 3. lipnja 2023.
- [6] Krstulović A (2021) Imunosni odgovor tijela na tumorske stanice (završni rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- [7] Anonymous, <https://wirtzlab.johnshopkins.edu/research/tumor-microenvironment/>. Pristupljeno 3. lipnja 2023.
- [8] Kankeu Fonkoua L.A, Sirpilla O, Sakemura R, Siegler E. L., S. Kenderian S. (2022) CAR T cell therapy and the tumor microenvironment: Current challenges and opportunities. *Molecular Therapy: Oncolytics* **25**, 69-74.
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>
- [9] Arneth B, (2019) Tumor microenvironment, *Medicina* **2020**, [10.3390/medicina56010015](https://doi.org/10.3390/medicina56010015)
- [10] Anonymous, <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/>. Pristupljeno 3. lipnja 2023.
- [11] Pan K, Farrukh H, Chittepudi V.C.S.R, Xu H, Pan C, Zhu Z. (2022) CAR race to cancer immunotherapy: from CAR T, CAR NK to CAR macrophage therapy, *Journal of experimental and clinical cancer research*, <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02327-z>
- [12] Anonymous, <https://www.researchgate.net/figure/Timeline-of-CAR-T-therapy-FDA->

- approvals_fig1_359632925 . Pristupljeno 3. lipnja 2023.
- [13] Anonymous, <https://www.kbc-zagreb.hr/lijecenje-autolognim-car-t-stanicama.aspx>. Pristupljeno 3. lipnja 2023.
- [14] Anonymous, <https://www.cartcellscience.com/>. Pristupljeno 3. lipnja 2023.
- [15] Zhang C, Liu J, Zhong J, Zhang X, (2017) Engineering CAR-T cells, *Biomarker Research* **5**, <https://biomarkerres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40364-017-0102-y>
- [16] C. Sterner R, M. Sterner R, (2021) CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies, *Blood Cancer Journal* **11**, <https://www.nature.com/articles/s41408-021-00459-7>
- [17] Anonymous, <https://www.mdpi.com/2073-4468/2/2/193>. Pristupljeno 3. lipnja 2023.
- [18] Guedan S, Calderon H, D. Posey Jr. A, V.Maus M, (2019) Engineering and Design of Chimeric Antigen Receptors, *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development* **12**, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30666307/>
- [19] Anonymous, https://www.researchgate.net/figure/Two-Families-of-Hinges-IgG-based-hinges-derived-from-IgG1-IgG2-or-IgG4-provide_fig1_330030483. Pristupljeno 3. lipnja 2023.
- [20] Krmpotić K (2018) Primjena CAR-T stanica u genskoj terapiji liječenja tumora (završni rad), Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- [21] Anonymous, <https://www.cartcellscience.com/car-t-cell-therapy/>. Pristupljeno 3. lipnja 2023.
- [22] De Wolf L, Di Luca A (2022) CAR-T cell therapy: highlighting the main components, manufacturing process, and prospects, <https://qbdgroup.com/en/blog/car-t-cell-therapy-components-manufacturing-process-prospects/>
- [23] Radić-Krišto D, Dragčević D, (2022) CAR-T stanična terapija – mali dio sadašnjosti i veliki potencijal u budućnosti, *Medix* **155**, <https://www.medix.hr/car-t-stanicna-terapija--mali-dio-sadasnjosti-i-veliki-potencijal-u-buducnosti>
- [24] Albin A, Magnani E, Noonan DM (2010) The tumor microenvironment: biology of a complex cellular and tissue society. *Q J Nucl Med Mol Imaging* **54**, 244-8. <https://europepmc.org/article/med/20639811>
- [25] Del Vecchio S, Zannetti A, Iommelli F i sur. (2010) Molecular imaging of tumor microenvironment: challenges and perspectives. *The Quarterly Journal of Nuclear*

- Medicine and Molecular Imaging*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20639812/>
- [26] Belhabib I, Zaghdoudi S, Lac C, Bousquet C, Jean C (2021) Extracellular Matrices and Cancer-Associated Fibroblasts: Targets for Cancer Diagnosis and Therapy? *Cancers*
- [27] Cappell, K.M., Kochenderfer, J.N. (2021) A comparison of chimeric antigen receptors containing CD28 versus 4-1BB costimulatory domains. *Nat Rev Clin Oncol* **18**, 715–727 <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00530-z>
- [28] Narodne novine (2020) Agencija za lijekove i medicinske proizvode, https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2020_05_61_1231.html , Pristupljeno 3. lipnja 2023.
- [29] Narodne novine (2023) Agencija za lijekove i medicinske proizvode, https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2023_05_57_980.html , Pristupljeno 3. lipnja 2023.
- [30] Anonymous, <https://www.fiercepharma.com/pharma/amid-struggles-car-t-kymriah-novartis-posts-strong-survival-data-all>. Pristupljeno 3. lipnja 2023.
- [31] Dobrila-Dintinjana R (2017) Liječenje boli i infekcija kod zloćudnih bolesti – Pliva zdravlje. <https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/29484/Lijecenje-boli-i-infekcija-kod-zlocudnih-bolesti.html> . Pristupljeno 3. lipnja 2023.
- [32] Družinić V (2020) Izazovi sestrištva u skrbi za bolesnika liječenog CAR-T stanicama (diplomski rad), Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- [33] Shimabukuro-Vornhagen A, Gödel P, Subklewe M i sur. (2018) Cytokine release syndrome. *j. immunotherapy cancer* **6**, 56, <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0343-9>
- [34] Marošević M (2020) Imunoterapija T-stanicama transduciranim kimeričnim antigenim receptorima (završni rad), Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, Rijeka.
- [35] Klasić F (2022), Klinička primjena CAR-T imunoterapije (završni rad), Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- [36] Elahi, R, Khosh, E, Tahmasebi, Safa, Esmaeilzadeh, Abdolreza. (2018) Immune Cell Hacking: Challenges and Clinical Approaches to Create Smarter Generations of Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Frontiers in Immunology*. **9**. 1717. [10.3389/fimmu.2018.01717](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01717)

Izjava o izvornosti

Ja Petra Grahek izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Petra Grahek

Vlastoručni potpis