

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Martina Klvačová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko – technologická

CAR-T terapie
Bakalářská práce

2024

Martina Klvačová

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

CAR-T Therapy
Bachelor Thesis

2024

Martina Klvačová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Martina Klvačová**
Osobní číslo: **C20226**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **CAR-T terapie**
Téma práce anglicky: **CAR-T Therapy**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma CAR-T terapie. V úvodní části se zaměřte na vysvětlení podstaty této léčby, průběh a vedlejší účinky. Uveďte konkrétní onemocnění, u kterých lze tento typ terapie použít.
2. V hlavní části bakalářské práce uveďte konkrétní příklady komerčně dostupných CAR-T terapií, popište případy pacientů spolu s prognózami.
3. Pro zpracování kompilačního textu bakalářské práce čerpejte z odborných článků publikovaných v recenzovaných zahraničních časopisech. Jejich vyhledávání provádějte prostřednictvím elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:
Podle pokynů vedoucí bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Pavlína Nývltová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem „**CAR-T terapie**“ jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 14. 6. 2024

Martina Klvačová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych chtěla velmi poděkovat Mgr. Pavlíně Nývltové, Ph.D. především za věnovaný čas, vstřícný přístup, dobrou komunikaci, cenné rady a podporu během vedení této bakalářské práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se věnuje CAR-T terapii. Je zde uveden stručný přehled hematologických malignit, popis struktury CAR a jeho generací. Důraz je kladen na popis průběhu léčby a vedlejších účinků. Dále práce poskytuje přehled komerčně dostupných CAR-T buněčných přípravků. V neposlední řadě jsou uvedeny výsledky klinických studií zabývajících se tímto typem léčby.

KLÍČOVÁ SLOVA

hematologické malignity, CAR, CAR-T terapie, T-buněčná imunoterapie, adoptivní buněčný transfer

TITLE

CAR-T Therapy

ANNOTATION

This bachelor's thesis is devoted to CAR-T therapy. Here is a brief overview of hematological malignancies, a description of the structure of the CAR and its generations. Emphasis is placed on the description of the course of treatment and side effects. Furthermore, the work provides an overview of commercially available CAR-T cell preparations. Last but not least, the results of clinical studies dealing with this type of treatment are presented.

KEYWORDS

hematological malignancies, CAR, CAR-T therapy, T-cell immunotherapy, adoptive cell transfer

OBSAH

ÚVOD	12
1 HEMATOLOGICKÉ MALIGNITY	13
2 CHIMÉRIKÝ ANTIGENNÍ RECEPTOR.....	15
2.1 Struktura CAR	16
2.1.1 Extracelulární doména	16
2.1.2 Spojovací doména (spacer).....	18
2.1.3 Transmembránová doména.....	19
2.1.4 Intracelulární doména	20
3 GENERACE CAR-T LYMFOCYTŮ	21
3.1 První generace.....	21
3.2 Druhá generace	22
3.3 Třetí generace	24
3.4 Čtvrtá generace	25
3.5 Pátá generace	26
4 PRŮBĚH LÉČBY.....	27
4.1 Hodnocení pacienta.....	27
4.2 Leukaferéza.....	28
4.3 Výroba CAR-T lymfocytů.....	29
4.4 Příprava pacienta na léčbu	32
4.5 Podání CAR-T terapie	33
4.6 Vedlejší účinky a monitoring pacienta	33
4.6.1 Syndrom z uvolnění cytokinů	34
4.6.1 Syndrom neurotoxicity spojené s imunitními efektorovými buňkami ...	35
4.6.2 Další vedlejší účinky.....	36
5 KOMERČNĚ POUŽÍVANÉ PRODUKTY	37
5.1 Yescarta	37
5.1.1 Studie ZUMA-1	38
5.1.2 Studie ZUMA-7 a ZUMA-5	39
5.2 Kymriah	40

5.2.1	Studie ELIANA	41
5.2.2	Studie JULIET a ELARA	42
5.3	Tecartus.....	42
5.3.1	Studie ZUMA-3	43
5.4	Breyanzi	43
5.4.1	Studie TRANSCEND-CLL 004	44
5.5	Abecma	44
5.5.1	Studie KarMMa	45
5.6	Carvykti	46
5.6.1	Studie CARTITUDE-1	46
5.6.2	Studie CARTITUDE-4	47
ZÁVĚR		48
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		49

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ALL	akutní lymfoblastická leukemie
AML	akutní myeloidní leukemie
BCMA	antigen zrání B-lymfocytů
CAR	chimérický antigenní receptor
CAR-T	chimérický antigenní receptor na povrchu T-lymfocytu
CD	diferenciační antigen
C _H	konstantní část těžkého řetězce
C _L	konstantní část lehkého řetězce
CLL	chronická lymfocytární leukemie
CML	chronická myeloidní leukemie
CRS	syndrom z uvolnění cytokinů
DLBCL	difúzní velkobuněčný B-lymfom
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Fab	antigen vázající fragment
Fc	konstantní část imunoglobulinové molekuly
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FL	folikulární lymfom
FMC63	myší monoklonální protilátka mířená proti diferenciačnímu antigenu 19
HL	Hodgkinův lymfom
ICANS	syndrom neurotoxicity spojené s imunitními efektorovými buňkami
IFN- γ	interferon gamma
IgG	imunoglobulin G
IL	interleukin

ITAM	aktivační motiv imunoreceptoru na bázi tyrosinu
JAK	Janus kinázy
JIP	jednotka intenzivní péče
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MM	mnohočetný myelom
NHL	nehodgkinské lymfomy
NK	přirozené zabíječské buňky
SB	<i>Sleeping Beauty</i>
scFv	jednořetězcový variabilní fragment
STAT	proteiny transdukce signálů a aktivátory transkripce
TcR	T-buněčný receptor
TNF	tumor nekrotizující faktor
Trop-2	trofoblastický buněčný povrchový antigen 2
TRUCK	<i>T cell redirected for universal cytokine-mediated killing</i>
V _H	variabilní část těžkého řetězce
V _L	variabilní část lehkého řetězce

ÚVOD

Rakoviny krve, známé také jako hematologické malignity, jsou jedny z nejčastějších forem rakoviny, které si celosvětově vyžadají velký počet úmrtí a jejich incidence stále roste. Například lymfomy jsou v České republice diagnostikovány ročně u přibližně 2500 pacientů. Před méně než 70 lety byla naprostá většina hematologických malignit nevyléčitelnými onemocněními s fatální prognózou. Hlavními výzvami v jejich léčbě jsou včasná diagnostika, ale také závažné vedlejší účinky jejich terapie.

Mezi standardní postupy léčby hematologických malignit se řadí chemoterapie a radioterapie. Přestože tyto metody pomáhají výrazně zlepšit stav pacientů, jsou velmi často doprovázeny vysokou toxicitou, která omezuje jejich klinické využití. Během posledních desetiletí došlo k výraznému pokroku v oblasti genového inženýrství, díky kterému se do popředí dostávají metody léčby pomocí cílených imunoterapií.

CAR-T technologie využívá metody molekulární biologie pro modifikaci T-lymfocytů pacienta a jejich přeprogramování k expresi receptoru rozpoznávajícího maligně transformované buňky se schopností jejich destrukce. První schválená CAR-T terapie se na trhu objevila v roce 2017. V dnešní době probíhá po celém světě nespočet výzkumů této přelomové technologie.

Cílem práce je popis struktury receptoru, principu fungování, přehled dosud vytvořených modelů, popis průběhu CAR-T terapie a představení dostupných komerčně prodávaných CAR-T přípravků spolu s jejich prozatímními výsledky.

1 HEMATOLOGICKÉ MALIGNITY

Hematologické malignity jsou skupina onemocnění zahrnující širokou škálu zhoubných novotvarů, které vznikají z buněk kostní dřeně či lymfatického systému (*Batista et al., 2017*). Tato onemocnění mohou vznikat buď z hematopoetických buněk, které nejsou plně zralé, nebo z buněk nacházejících se již v určitém stupni vývoje. Při maligním procesu dochází ke zmnožení buněk, které obsahují genetickou mutaci zprostředkovávající mimo jiné nekontrolovatelný růst a ztrátu původní funkce krevních elementů. Mutace se dědí z mateřské buňky do dceřiné, což v konečném důsledku způsobuje přemnožení a vytlačení zdravé populace buněk a dochází tak k devastaci krvetvorby (*Penka et al., 2011*).

Hematologické malignity lze dělit na základě původu buněk na onemocnění myeloidní a lymfoidní. Myeloidní prekurzory udávají směr vývoje pluripotentních buněk v erytrocyty, trombocyty, granulocyty, monocyty a žírné buňky. Lymfoidní linií jsou produkovány T-lymfocyty, B-lymfocyty, přirozené zabíječské buňky (NK) a plazmatické buňky. Dle této klasifikace můžeme hematologické malignity rozdělit do tří základních skupin: leukemie, lymfomy a mnohočetné myelomy. Přehled různých typů hematologických malignit znázorňuje tab. I (*Deshantri et al., 2018*).

Dále lze tato onemocnění dělit podle jejich průběhu na akutní a chronická. Akutní malignity se vyznačují rychlým nástupem a progresí. Pokud není léčba neprodleně započata, pacient umírá během několika týdnů. Naproti tomu stojí chronické typy, které jsou často náhodně objeveny při periodických preventivních prohlídkách a pacient s nimi může žít několik let bez léčby. Jejich vývoj je pomalý a přežití je v řádu let (*Penka et al., 2011*).

Tradiční léčba hematologických malignit většinou spoléhá na chemoterapii nebo radioterapii. V posledních letech však dochází k lepšímu pochopení nádorové imunobiologie a s tím souvisí i výzkum nových možností léčby. Strategie modulace imunitní odpovědi zaujímá stále významnější roli. Vznikají terapeutika na bázi protilátek, například imunomodulační terapie, terapie checkpoint inhibitory, použití monoklonálních protilátek nebo T-buněčných imunoterapií (*Tawfik et al., 2021*).

Tab. I: Typy hematologických malignit. Upraveno dle (*Deshantri et al., 2018*).

Typ hematologické malignity	Podtyp	Původ
1. Leukemie Z prekursorových buněk kostní dřeně, myeloidní nebo lymfoidní řady	i. Akutní lymfoblastická leukemie (ALL)	Hematopoetické prekuzory lymfoidní řady
	ii. Akutní myeloidní leukemie (AML)	Hematopoetické prekuzory myeloidní řady
	iii. Chronická myeloidní leukemie (CML)	Hematopoetické kmenové buňky
2. Lymfomy Ze zralých lymfoidních buněk, většinou B-lymfocytů	i. Hodgkingův lymfom (HL)	B-lymfocyty (většina případů)
	ii. Nehodgkinské lymfomy (NHL)	Vznikají z lymfocytů, které jsou v různé fázi vývoje.
	a. Chronická lymfocytární leukemie (CLL)	B-lymfocyty
	b. Folikulární lymfom (FL)	B-lymfocyty
	c. Difuzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL)	B-lymfocyty
3. Mnohočetný myelom (MM) Malignita B-lymfocytů, klonální proliferací jedné plazmatické buňky		B-lymfocyty

2 CHIMÉRICKÝ ANTIGENNÍ RECEPTOR

Chimérický antigenní receptor (CAR) je syntetický, geneticky modifikovaný transmembránový protein exprimovaný na povrchu efektorových buněk za účelem rozpoznávání a likvidace antigenů (*Zhang et al., 2017*).

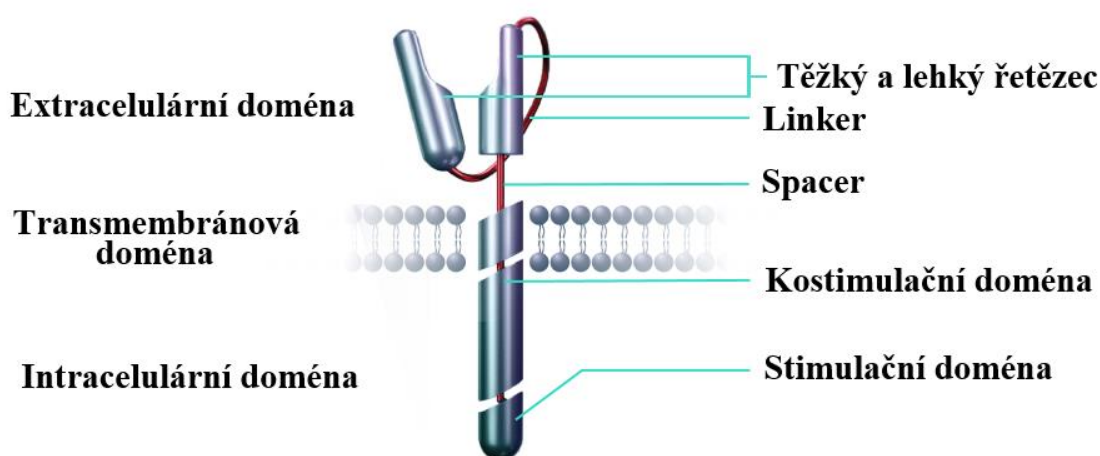
CAR se označuje jako chimérický, protože je vytvořen umělým propojením dvou odlišně pracujících struktur do jediného receptoru. Jedná se o unikátní kombinaci vazebných schopností protilátek s aktivačními schopnostmi T-lymfocytů (*Styczyński, 2020*). Samotné T-lymfocyty exprimují na svém povrchu T-buněčný receptor (TcR). TcR není schopen rozpoznat volný antigen, proto ke své aktivaci potřebuje buňku prezentující antigen na svém hlavním histokompatibilním komplexu I (MHC I). Podstatnou výhodou v rozpoznávání volných antigenů mají protilátky produkované aktivovanými B-lymfocyty. Protilátky interagují s antigeny v nativním stavu s poměrně vysokou afinitou, nicméně neaktivují imunitní systém v dostatečné míře (*Schwartz, 1985*). Přes rozdílný mechanismus působení je však molekulová struktura obou receptorů velmi podobná. Obě struktury jsou sestaveny ze dvou polypeptidových řetězců spojených disulfidickými můstky. U TcR hovoříme o řetězcích α , β a u protilátek o těžkých (H) a lehkých (L), přičemž každý z nich obsahuje konstantní (C) a variabilní (V) domény, které jsou poté označovány jako konstantní část lehkého řetězce (C_L) a variabilní část lehkého řetězce (V_L), případně konstantní část těžkého řetězce (C_H), a variabilní část těžkého řetězce (V_H). Právě jejich analogie dává předpoklad k možnosti náhrady TcR v molekule CAR za protilátku (*Gross et al., 1989*). Z této prvotní myšlenky vychází struktura CAR dodnes (*Khan, 2024*).

Syntetický receptor tedy kombinuje vazebné výhody protilátek a aktivační schopnosti cytotoxických T-lymfocytů. CAR na jejich povrchu umožňuje efektivně vyhledat cílový antigen, usmrtit buňku a vyvolat přitom dostatečnou imunitní odpověď. Takto upravené T-lymfocyty potom nazýváme CAR-T buňky (*Wang et al., 2023*).

CAR-T buňky lze využít k cílené terapii určitých onemocnění, zejména nádorů krve. Terapie pomocí CAR-T buněk se používá za účelem eliminace maligně transformovaných buněk v těle pacienta. Svými vlastnostmi se řadí mezi tzv. živé léky, expandují v těle a zajišťují dlouhodobou imunitní paměť (*Styczyński, 2020*). Teoreticky však lze CAR-T buňky modifikovat tak, aby cílily na jakýkoliv antigen a využít tuto technologii i mimo onkologii (*Seif et al., 2019*).

2.1 Struktura CAR

CAR se skládá ze tří základních částí - extracelulární, transmembránové a intracelulární domény. Tyto části jsou zobrazeny na obr. 1. Extracelulární doména vychází typicky z protilátky, která se specificky váže na antigen. Skládá se z těžkého a lehkého variabilního řetězce, které jsou propojeny sériově pomocí linkeru. Extracelulární část je připojena pomocí spaceru k části transmembránové. Transmembránová doména ukotvuje extracelulární část k membráně T-lymfocyту. Intracelulární doména je odvozena od TcR a ve spolupráci s kostimulačními doménami přenáší aktivační signály do jádra T-lymfocyту (Wang *et al.*, 2023).



Obr. 1: Struktura CAR. Upraveno dle (Friedman *et al.*, 2018).

2.1.1 Extracelulární doména

Extracelulární doména je část receptoru, která je vystavena vnějšímu prostředí. Obvykle se skládá z částí rozeznávajících antigen, které jsou propojeny linkerem, a spojovací domény (spacer) (Zhang *et al.*, 2017).

Extracelulární doména váže antigen a udává imunitní buňce specifitu. Zpravidla je použita vazebná část odvozená z Fab fragmentu monoklonální protilátky, která má vysokou afinitu pro antigen. Doména je odvozena od V_H a V_L řetězců spojených do jednoho řetězce (Ramos, 2012). Vzhledem k tomu, že Fab je produktem dvou různých genů, je nutné odpovídající sekvence propojit přes linker. Tento uměle vytvořený flexibilní spoj tak umožňuje vznik jednořetězcového variabilního fragmentu (scFv) (Huston, 1988).

Většinou se scFv přítomné v CAR zaměřují na extracelulární antigeny asociované s nádorem, což vede k aktivaci lymfocytů nezávisle na MHC (*Sterner, 2021*). Pro dosažení co nejlepšího výsledku léčby a minimalizaci destrukce zdravých buněk pacienta je nutné zvolit antigen, který bude dostatečně specifický pro tumor. Bezprecedentní úspěch při prováděných klinických studiích zaznamenává použití anti-diferenciačního antigenu 19 (anti-CD19) CAR-T buněk, a to zejména při léčbě B-buněčných malignit. Diferenciační antigen 19 (CD19) je hojně exprimován na povrchu B-lymfocytů, avšak na jiných tkáních či hematopoetických buňkách pouze zřídka (*Sadelain, 2015*).

První studie používaly pro konstrukci funkčního CAR-T myší monoklonální protilátku zvanou FMC63, která je specifická pro CD19. Hlavní limitací při použití těchto protilátek je fakt, že obsahují myší sekvence způsobující imunogenicitu (*Nicholson, 1997*). Jiné studie prokázaly, že myší protilátky postrádající konstantní část imunoglobulinové molekuly (Fc) fragment vykazují u lidí sníženou reakci imunitního systému. Nicméně variabilní části si mohou ponechat určitou imunogenicitu (*Stone et al., 1996*). Porovnáním exponovaných aminokyselin přítomných v myších a lidských proteinech bylo zjištěno, že 6 z 26 aminokyselin V_H a 2 z 15 aminokyselin V_L jsou přítomny v lidských sekvencích velmi zřídka (nalezeny v méně než 5 % sekvencí). První studie tak naznačily, že imunogenita může být při klinickém využití nepříznivým faktorem. Výsledkem tedy byl závěr, že použití anti-CD19 protilátek se jeví jako účinné, avšak je nutné pokračovat ve výzkumech a zkonstruovat scFv, který by byl pro lidské tělo přijatelnější (*Nicholson et al., 1997*).

Studie z roku 2020 zkoumala účinky plně lidské vazebné domény anti-CD19 obsahující pantovou oblast složenou z CD8 a transmembránovou oblast odvozenou od diferenciačního antigenu 28 (CD28) u dvaceti pacientů s B-lymfomem. Cílem bylo porovnat efektivitu a bezpečnost plně lidské domény. Kompletní remise po podání dosáhlo 55 % pacientů, což znamenalo, že podané buňky poskytovaly velice podobnou anti-lymfomovou aktivitu jako buňky exprimující na svém povrchu FMC63-28Z. Výsledky studie mimo jiné prokázaly, že skupina pacientů, kterým byly buňky podávány, vykazovala mnohem menší nežádoucí reakce. Například závažná neurologická toxicita se při použití komerčních terapií běžně vyskytuje u 50 % pacientů, při podání buněk s plně lidskou doménou byla zaznamenána pouze u 5 % pacientů. Nižší hladinu

neurologické toxicity by mohl vysvětlovat fakt, že tyto T-lymfocyty uvolňovaly nižší hladiny cytokinů a imunologických proteinů (*Brudno et al., 2020*).

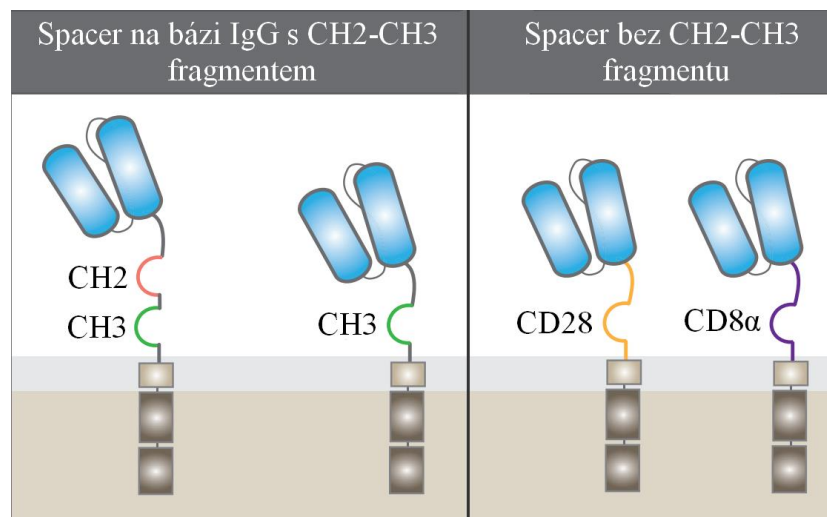
Vedle všech úspěchů protilátky FMC63 však stojí i prokázaná skutečnost, že u mnoha pacientů dochází v brzké době po podání léčby k relapsu. FMC63 rozeznává epitop nacházející se mezi 2. a 4. axonem antigenu CD19. Bylo zjištěno, že mutace 2. axonu vede v některých případech k rezistenci nádorové buňky na anti-CD19 CAR-T (*Sotillo, 2015*). Tato skutečnost dává další podnět k vytvoření alternativního receptoru.

Autoři studie z roku 2023 vytvořila nový scFv receptor odvozený od kuřecí anti-CD19 protilátky. Vlivem poměrně odlišného evolučního vývoje člověka a slepice v porovnání s člověkem a myší, je umožněna produkce různorodých protilátek. Tento receptor cílí na proximální epitop antigenu CD19. Studie prokázala, že je schopen zničit buňky, které vykazovaly rezistenci na FMC63 (*Zhang, 2023*).

2.1.2 Spojovací doména (spacer)

Spacer je krátký a flexibilní peptidový řetězec spojující extracelulární doménu s transmembránovou doménou. Obvykle se spacer skládá z pantové oblasti, která vychází z imunoglobulinu G (IgG), typicky IgG1, IgG4, a Fc fragmentu CH2-CH3 (obr.2) (*Hudecka, 2015*).

Flexibilita spaceru umožňuje volnou konformaci molekuly a zjednodušení vazby scFv na příslušný antigen. Bylo prokázáno, že jeho délka výrazně koreluje s funkčností celé jednotky. Optimální délka spaceru závisí na blízkosti vazebného epitopu k povrchu buňky. Proximální epitopy vyžadují delší spacery a distální zase kratší. Dlouhé spacery obsahují celou zmíněnou sekvenci a skládají se přibližně z 220 aminokyselin. Nicméně oblast CH3 může být použita i samostatně, což odpovídá sekvenci přibližně 120 aminokyselin. Ještě kratší spacery mohou obsahovat 60 aminokyselin a jejich stavba je odvozena od antigenů CD3, CD4, CD8 α , nebo CD28 (*Labanieh et al., 2018*).



Obr. 2: Schéma možných struktur spacerů. Upraveno dle (Guedan, 2019).

2.1.3 Transmembránová doména

Transmembránová doména je úsek CARu tvořen hydrofobním alfa-helixem, který překlenuje membránu a je přímo navázán na spacer. Funkcí je především ukotvení receptoru k membráně T-lymfocyty, zároveň však hraje velmi důležitou roli v ovlivnění exprese receptoru na povrchu, stability a funkčnosti celku. Tyto poznatky ukazují na to, že transmembránová doména je konstrukčně důležitým prvkem při modelaci receptoru, a proto je nyní předmětem studií (Sterner, 2021).

Nejčastěji se jako transmembránové domény užívají molekuly CD28, CD8 α , CD4 nebo CD3 ζ . Mnohé výzkumy se shodly na tom, že rozdíly ve struktuře transmembránové domény mění úroveň exprese CAR na povrchu buňky a jeho aktivitu. Správná modifikace by tak mohla optimalizovat funkčnost CAR-T lymfocytů bez ovlivnění vazebných vlastností a signalizace. Studie z roku 2010 totiž prokázala, že nabitě aminokyselinové zbytky transmembránové domény CD3 ζ způsobují iontové interakce s intracelulárním TcR a tvorbu heterodimerů, které usnadňují aktivaci a zvyšují funkčnost CAR-T buněk. Tato zdánlivá výhoda však přichází na úkor stability exprese CAR a může způsobovat nevhodnou aktivaci T-lymfocytů (Bridgeman, 2010).

Novější studie prokázaly zvýšenou povrchovou expresi CAR při použití domén CD8 α a CD28 v porovnání s CD3 ζ . Zároveň uvádí, že CD28 vykazuje významně vyšší cytotoxicitu a CD8 α vyšší úroveň CAR exprese (Fujiwara, 2020).

2.1.4 Intracelulární doména

Intracelulární doména, označována také jako signální doména, je funkčním koncem receptoru. Po navázání antigenu dochází k aktivaci TcR a vytvoření signálu, který je veden do jádra T-lymfocytu (*Zhang et al., 2017*).

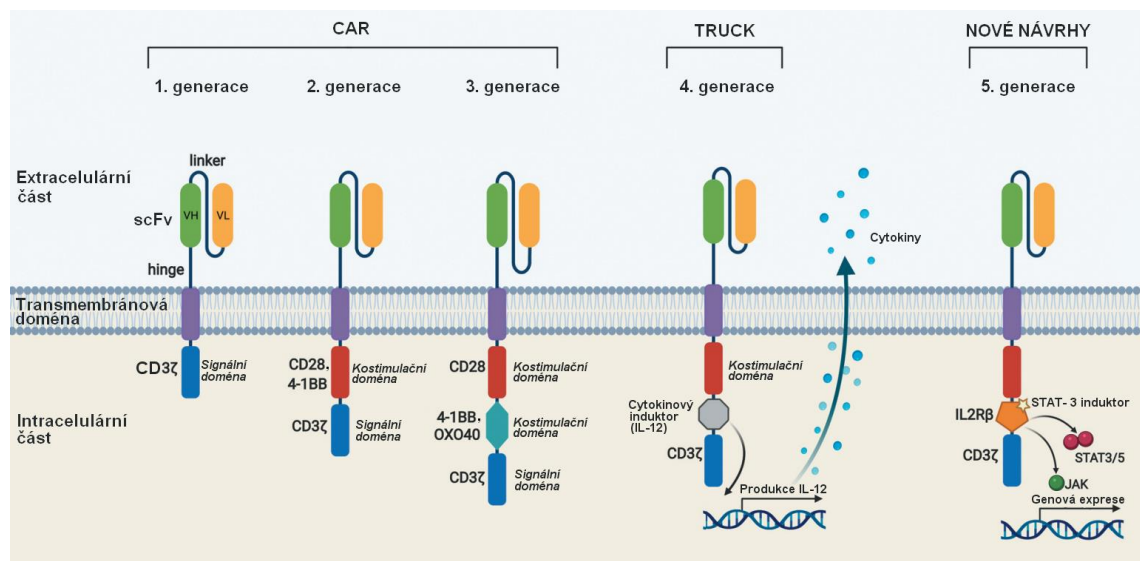
Samotný TcR se kromě dříve zmíněných polypeptidových řetězců α a β skládá z tzv. CD3 komplexu. Ten obsahuje proteinové řetězce γ , δ , ϵ a ζ , které jsou nekovalentně propojeny mezi sebou a tvoří heterodimery. CD3 komplex je zásadní komponenta ve struktuře TcR, která umožňuje jeho správné fungování (*Brocker, 1995*). První studie z roku 1993 zkoumala funkčnost signalizace navržením jedné struktury s doménou CD3 ζ a druhé s doménou CD3 γ , které byly jedním řetězcem napojeny na protilátku přímo. Konfigurace spoléhala na aktivaci pomocí aktivačního motivu imunoreceptoru na bázi tyrosinu (ITAM). Jedná se o aminokyseliny podjednotek CD3 komplexu, které spouští prostřednictvím fosforylace signální kaskádu vedoucí k aktivaci buňky. Výsledek studie konstatoval, že tímto způsobem lze skutečně dosáhnout autonomní aktivace T-lymfocytu (*Eshhar, 1993*).

Následné výzkumy však nebyly příliš uspokojující. Například studie z roku 1995 prokázala, že samotný CD3 ζ navázaný na protilátku nevyvolá dostatečnou úroveň exprese receptoru na povrchu, dostatečně silný signál k aktivaci klidových buněk a tím pádem nevyvolá požadovanou imunitní odpověď (*Brocker, 1995*). Ke stejnému závěru došla i klinická studie v roce 2011. Cílem bylo porovnat efektivitu přípravku anti-CD19 ζ + CAR-T s anti-CD19 ζ + CAR-T, ke kterému byla přidána kostimulační molekula CD28. Hodnoty CAR-T lymfocytů s navázanou kostimulační molekulou CD28 dosahovaly v prvních 6 týdnech po podání infúze výrazně vyšších hodnot v těle pacientů v porovnání s modifikací bez kostimulační molekuly (*Savoldo, 2011*).

CAR-T buňky používané v dnešní době si striktně zachovává jako aktivační molekulu CD3 ζ a přidávají jednu nebo více kostimulačních domén, zejména CD28, CD137 (známý též jako 4-1BB), CD278, které poskytují aditivní signály pro zvýšení aktivace, proliferace a přežití buněk v těle pacienta (*Khan, 2024*). Typ a počet domén se liší v závislosti na generaci CAR-T buněk.

3 GENERACE CAR-T LYMFOCYTŮ

CAR prošel od jeho prvního zkonstruování v 90. letech minulého století značným vývojem, přestože vědci čelili od začátku četným komplikacím. Důraz byl kladen na zvolení správné kombinace všech domén tak, aby léčba byla funkční a zároveň se minimalizovaly vedlejší účinky. Právě optimalizace celé jednotky se jeví jako velká překážka. Evoluce prozatím vyústila v pět generací CAR-T lymfocytů, z nichž každá má jedinečné vlastnosti (Obr. 3) (Khan, 2024).



Obr. 3: **Generace CAR-T lymfocytů** (CD – diferenciační antigen, IL – interleukin, JAK – Janus kinázy, STAT – proteiny transdukce signálů a aktivátory transkripce, scFv – jednořetězcový variabilní fragment, V_H – variabilní část těžkého řetězce, V_L – variabilní část lehkého řetězce). Upraveno dle (Rallis, 2021).

3.1 První generace

První generace byla konstrukčně nejprimitivnější, nicméně položila základní kámen pro vývoj následujících generací a byla důkazem, že tato technologie má potenciál. Tyto buňky jsou sestaveny z scFv rozeznávajícího antigen a hned za ním následuje CD3ζ přenášející signál na TcR (Eshhar, 1993). Ačkoliv CAR-T první generace dokáží rozeznat cílový antigen a zvýšit protinádorovou aktivitu, jejich terapeutický účinek *in vivo* nebyl uspokojivý. Důvodem byla krátká doba přežití v těle a nedostatečná schopnost aktivace imunitního systému vlivem snížené produkce interleukinu-2 (IL-2), který je důležitý pro proliferaci T-lymfocytů. Bylo tedy zjištěno, že tento model není

schopen kompletně nahradit funkci nativního TcR/CD3 komplexu (*Brocker, 2000*). V klinické praxi bylo pro usmrcení maligně transformovaných buněk nutné pacientům podávat exogenní IL-2 (*Savoldo, 2011*).

První generace s sebou ale nesla řadu problémů. Přestože CAR-T buňky nevykazovaly dostatečnou odezvu proti nádorům, imunitní systém pacienta často reagoval na transfúzi buněk agresivně. Docházelo například k závažným průběhům syndromu z uvolnění cytokinů (CRS) nebo syndrom neurotoxicity spojené s imunitními efektorovými buňkami (ICANS). Navíc měly CAR-T buňky nízkou účinnost vůči solidním nádorům či u pacientů s nízkou expresí cílového antigenu na maligních buňkách (*Zimmermannova, 2021*).

3.2 Druhá generace

Vědci si nedostatečnost CAR-T buněk první generace uvědomovali a již v pozdějších 90. letech pracovali na vývoji vylepšené konstrukce. Soustředili se na hypotézu, zda by bylo možné podpořit expanzi CAR-T buněk přidáním tzv. kostimulační molekuly. Pro tento účel byla zvolena kostimulace pomocí CD28 a to především kvůli její přítomnosti i v nativních T-lymfocytech. Následovala tedy její inkorporace do struktury původní CAR-T buňky první generace. Došlo zde k výrazně vyššímu přežívání CAR-T buněk, expanzi T-lymfocytů při opakované expozici antigenu a také produkci velkého množství IL-2. Závěrem tedy bylo, že fúzní receptor složený ze signální části TcR a kostimulační domény CD28 dokáže adekvátně bojovat proti malignitám (*Krause, 1998*). Výsledkem studie byla struktura, kterou označujeme za druhou generaci CAR-T lymfocytů. Tato zdánlivě prostá změna však definovala CAR-T léčbu tak, jak ji známe dnes.

Kostimulace se však neomezuje pouze na CD28. Často se u produktů druhé generace setkáváme s implementací molekuly 4-1BB. Otázka, která ze zmíněných variant je nejvhodnější, zůstává předmětem mnoha diskusí, přesto je studií zaměřených na jejich srovnání poměrně málo (*Khan, 2024*).

Rozsáhlá studie prof. Zhao a kolektivu z roku 2020 se na tento problém zaměřila. Srovnává kostimulační účinky CD28 s 4-1BB u CAR-T buněk se specifitou anti-CD19 při léčbě ALL. Nejprve byly za stejných výrobních podmínek generovány oba typy buněk a následně porovnána schopnost aktivace a usmrcování nádoru *in vitro*. K tomu byly

použity komerční buněčné linie složené jak z lymfocytů izolovaných z periferní krve pacienta s ALL, lymfoblastů pacienta s CML, tak z B-lymfoblastů izolovaných z Burkittova lymfomu. Po dvanácti hodinách kultivace došlo k výraznému zvýšení produkce interleukinů, tumor nekrotizujících faktorů (TNF) a interferonu gamma (IFN- γ). Vyšší sekrece cytokinů byla pozorována u 4-1BB CAR-T buněk, což svědčí o silnější aktivaci. Obě modifikace specificky likvidovaly buňky exprimující antigen CD19 s podobným účinkem a nedošlo k žádné reakci s buňkami izolovaných z CML, které na povrchu exprimovaly antigen CD7.

Dále bylo v této studii prověřováno, zda bude dosaženo stejného výsledku *in vivo* a to nejprve na myších s ALL. Vyšší hladiny IL, TNF a IFN- γ byly zaznamenány při použití 4-1BB CAR-T buněk. Oba typy CAR-T buněk inhibovaly progresi nádoru během týdne. Nicméně u myší léčených pomocí CD28 CAR-T byla po týdnu zaznamenána závažná recidiva. Medián přežití této skupiny byl 29 dní, na rozdíl od skupiny léčené pomocí 4-1BB CAR-T buněk, kde byl stanoven na 58 dní. 4-1BB CAR-T buňky zároveň vykazovaly vyšší perzistenci.

Posledním krokem studie prof. Zhao (2020) byla klinická fáze. Pacienti s ALL byli rozděleni do 2 skupin, přičemž v každé z nich bylo 18 pacientů. Pacienti, kterým byla podána léčba 4-1BB CAR-T buňkami vykazovali lepší výsledky. Konkrétně 12 pacientů bylo po léčení přemostěno k transplantaci krvetvorných kmenových buněk, z nichž 11 vykazovalo kompletní odpověď na léčbu a 1 zemřel. Doba trvání remise byla 7,25 měsíců. K relapsu po podání léčby došlo u 4 pacientů. Pacienti vykazovali příznaky CRS a ICANS, nicméně jejich stav nebyl závažný. Deseti pacientům z druhé skupiny byla provedena transplantace, z nichž 7 dosáhlo kompletní remise. Další 2 pacienti však nevykazovali na léčbu žádnou reakci a 1 z nich kvůli rychlé progresi onemocnění zemřel. K relapsu došlo u 6 pacientů, průměrně po 6,8 měsících po podání léčby. Z důvodu progresu onemocnění zemřelo 6 pacientů v důsledku rezistence nebo relapsu. Mimo jiné pacienti v této skupině vykazovali mnohem závažnější stav CRS a ICANS (Zhao, 2020).

Ačkoliv se v následujících letech pracovalo na dalších generacích, pozoruhodným faktem zůstává, že veškeré dosud schválené CAR-T produkty stále využívají koncept druhé generace s kostimulací CD28 nebo 4-1BB (Khan, 2024).

3.3 Třetí generace

Další kroky ve vývoji účinnějších CAR-T lymfocytů vedly k vylepšení kostimulace. Začleněním více kostimulačních domén do struktury CAR-T došlo k sestavení CAR-T třetí generace. Kromě výše zmíněných molekul se nyní objevují i antigeny CD27 a také CD134 (známý i jako OX40). Tento antigen je člen rodiny TNF, objevuje se zejména na aktivovaných T-lymfocytech a je důležitý pro dělení a přežívání buněk, ale také zvyšuje klonální expanzi efektorových a paměťových populací (*Croft, 2009*).

Studie z roku 2018 testovala účinnost CAR-T buněk obsahujících dvě kostimulační domény, 4-1BB a CD278. Tento model silně zvýšil perzistenci a protinádorový účinek. Druhá generace neměla dosud žádné významné výsledky při výzkumu účinků na solidní nádory. Sestavený model třetí generace však vykazoval mnohem pozitivnější reakci na solidní nádory a mimo jiné i na refrakterní formy leukemie (*Guedan, 2018*).

V roce 2023 byl *in vivo* testován model používající tandem CD278 a OX40. Důvodem pro vybrání této kombinace byly příznivé výsledky *in vitro* testování a zejména schopnosti této dvojice, jako je například zvýšená produkce IL-2 a exprese anti-apoptických molekul. Toto vede k prodloužení doby přežití CAR-T buněk nebo jejich podpora při expanzi paměťových T-lymfocytů. Údaje z výzkumu poukazují na pomalejší růst, na druhou stranu vykazují vyšší úroveň cílené cytotoxicity po delší dobu než konstrukce druhé generace (*Moreno-Cortes, 2023*).

Klinická studie z téhož roku se zaměřila na podání CAR-T buněk třetí generace třinácti pacientům s refrakterní nebo relabovanou ALL. Pro tento účel byl sestrojen model cílící na antigen CD19 s kostimulací CD28 a 4-1BB. Pozoruhodný záznam studie hovoří o tom, že pouze u 4 pacientů se objevily lehké příznaky CRS a u žádného pacienta se neobjevila neurologická cytotoxicita. V periferní krvi pacientů byla patrna dlouhodobá perzistence CAR-T buněk. Na konci studie tj. 90. den po podání CAR-T terapie, bylo 10 hodnotitelných pacientů a 8 z nich v kompletní remisi. Od podání terapie po dobu jednoho roku 38 % pacientů přežívalo bez progresu onemocnění. Po roce od podání CAR-T terapie přežilo 8 z 13 pacientů (*Schubert, 2023*).

3.4 Čtvrtá generace

CAR-T terapie slaví průlomový úspěch při léčbě hematologických malignit. Nicméně v léčbě solidních nádorů není účinná. Přestože se efektivita neustále zvyšuje, její potenciál není zcela naplněn. Regrese nádoru bývá pouze dočasná z důvodu schopnosti maligních buněk unikat imunitní kontrole. Snaha o další vylepšení CAR-T buněk vedla ke zkonstruování čtvrté generace, známé také jako *T cell redirected for universal cytokine-mediated killing* (TRUCK) CAR-T buňky (Somboonpatarakun, 2024).

Model se opírá o strukturu CAR druhé generace, do které je přidán gen pro uvolňování terapeuticky aktivních látek. Zvláště vhodné se jeví produkce IL-12, zejména pro jeho schopnost navození prozánětlivého prostředí. Po navázání na nádorový antigen dochází k vylučování IL-12, který má chemotaktické účinky pro buňky nespecifické imunity, a to především NK-buňky a makrofágy. Výhodou je, že ke kumulaci prozánětlivých faktorů dochází v místě maligního bujení, což snižuje systémové vedlejší účinky léčby. TRUCK CAR-T buňka kombinuje likvidační schopnosti T-lymfocytu s imunomodulačními schopnosti vylučovaného cytokinu. Model se stal slibnou cestou k léčbě solidních nádorů (Chmielewski, 2014).

Testování 4. generace CAR-T lymfocytů přechází i do klinických fází. Jedna z takových studií aplikovala CAR-T buněčnou terapii 8 pacientům s diagnózou progresivního glioblastomu. Čtyři pacienti vykazovali částečnou odpověď na léčbu po dobu 3–24 měsíců od podání terapie. U 1 pacienta byla zaznamenánagrese po 7 měsících od podání léčby. 2 pacienti zemřeli na progresi nemoci, která nastala do 4 měsíců od podání léčby. 1 pacient zemřel z důvodu herniace mozku. Mimo to došlo ke zjištění, že nádor ztrácel antigenní specifitu a docházelo tak k nežádoucím modifikacím. Do budoucna tedy bude důležité vytvořit strukturu, která bude cílit na více antigenů, aby se zdokonalila efektivita léčby. Nutno podotknout i limitace této studie. První z nich je malý počet pacientů. Druhá limitace je fakt, že došlo k nedostatečnosti zobrazovacích metod při kontrole pacientů. Magnetická rezonance totiž vyhodnotila stav jednoho z pacientů, po podání terapie, jako progresivní. Z histologického vyšetření, byla patrná velká kumulace infiltrovaných imunitních buněk, což znamená, že se jednalo spíše o pseudoprogresi. Studie však přináší cenné důkazy o bezpečnosti terapie a základ pro budoucí výzkum uplatnění CAR-T terapie v oboru neurologie (Liu, 2023).

Studie z roku 2024 je základním kamenem pro nové strategie i v léčbě karcinomu prsu. Kvůli častěji se vyskytující lékové rezistenci je léčba pořád obtížná. Výzkum nabízí inovativní přístup pomocí TRUCK CAR-T terapie. Byl sestrojen model CARu čtvrté generace se třemi kostimulačními doménami, který cílí na *tumor-associated calcium signal transducer 2* (Trop-2) antigen, který je nadměrně exprimován na buňkách karcinomu prsu. Po navázání a usmrcení buňky došlo k výraznému zvýšení IL-2, TNF, IFN- γ v místě léze. Pozoruhodné je, že CAR-T buňky vykazovaly vysokou specifickou cytotoxicitu a proliferační kapacitu. Tato studie zdůrazňuje terapeutický potenciál čtvrté generace v léčbě karcinomu prsu a pokládá základní kámen pro další výzkumy na tomto poli (*Somboonpatarakun, 2024*).

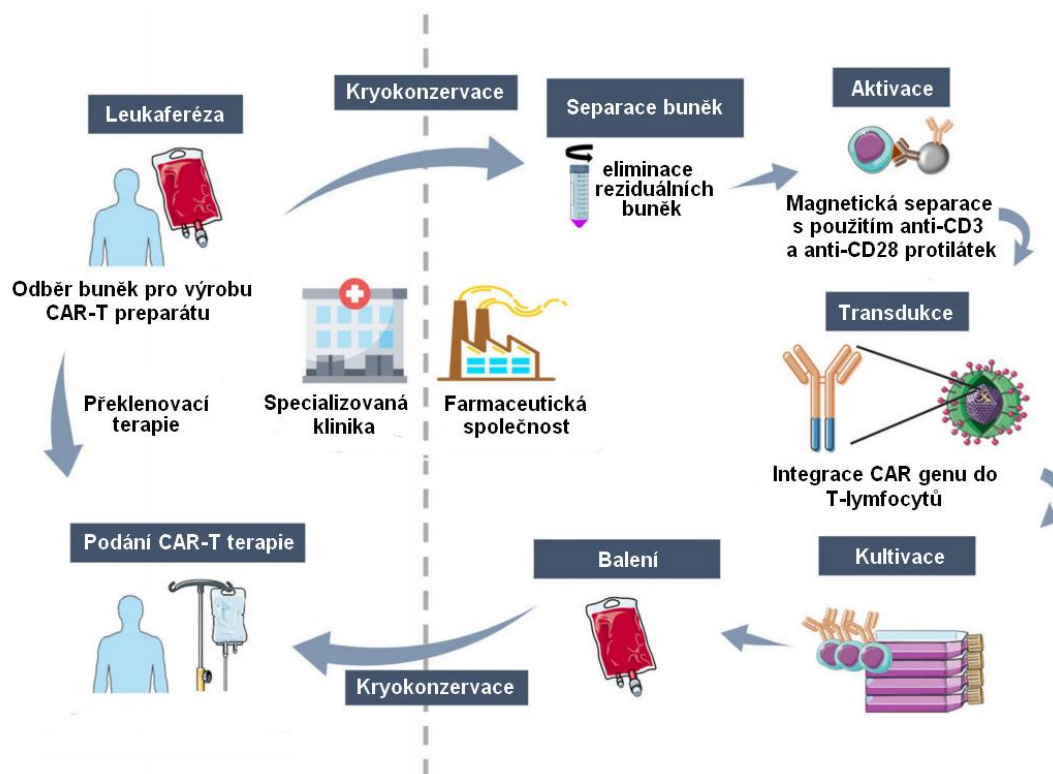
3.5 Pátá generace

V posledních letech vykazuje vývoj CAR-T buněk obrovský rozmach. Skupiny odborníků intenzivně pracují na nových strukturách receptoru, kterými by mohli odstranit nedostatky předchozích generací. Poslední roky patří tvorbě páté generace. Snaha je o vylepšení monovalentních CARů, ale také modifikaci buněk, které by mířily na více antigenů. V úvahu také připadá výroba alogenních transfuzí z T-lymfocytů zdravých dárců (*Dejenie, 2022*).

Novinkou je implementace genů pro kódování zkrácené cytoplazmatické domény z β -řetězce membránového receptoru pro IL-2 s vazebným místem pro proteiny transdukce signálů a aktivátory transkripce 3 (STAT3). Princip spočívá v aktivaci Janus kináz (JAK) a následným spuštěním signálních drah STAT3 a STAT5. Tato signalizační dráha, označována také jako JAK/STAT signalizace, je závislá na navázání CAR-T buňky na antigen (*Kagoya, 2018*). JAK/STAT signalizace je jedna z nejjednodušších metabolických signálních drah. Dochází při ní k fosforylaci kináz a následné aktivaci STAT, které prostupují do jádra buňky, kde stimulují genovou expresi. Tento děj má zásadní postavení v řadě vývojových a homeostatických procesů včetně vývoje imunitních buněk. Ovlivňuje proliferaci buněk a její apoptózu (*Ghoreschi, 2009*). Studie uvádí, že díky vylepšení struktury došlo k vylepšení účinnosti proti solidním nádorům ve srovnání s modelem druhé generace. Výsledky také naznačují minimální toxicitu a autoři jsou přesvědčeni, že je opodstatněné přistoupit ke klinickému testování (*Kagoya, 2018*).

4 PRŮBĚH LÉČBY

Celý proces léčby pomocí CAR-T terapie zahrnuje šest klíčových kroků: hodnocení pacienta, leukaferézu, výrobu terapeutického přípravku a souběžně s ní přípravu pacienta na léčbu, podání infúze a monitoring. Průběh celého procesu popisuje obr. 4. Terapie vyžaduje úzkou spolupráci několika klinických týmů včetně centra pro podání CAR-T terapie a farmaceutickou společností vyrábějící přípravek. Celý proces je časově ale také psychicky náročný pro pacienta i jeho blízké.



Obr. 4: Průběh léčby. Upraveno dle (Wang, 2023).

4.1 Hodnocení pacienta

Pacientova cesta začíná u klinického onkologa, který zváží možnost aplikace CAR-T terapie. Stěžejní je včasné doporučení k léčbě, což zásadně ovlivňuje její průběh i úspěšnost. Během této fáze je nutné zvážit způsobilost pacienta k této léčbě. Důležité je shromáždit pacientovu anamnézu, zkontrolovat výsledky recentních vyšetření pomocí zobrazovacích a laboratorních metod. Zvláště podstatná jsou bioptická vyšetření kvůli typizaci nádoru (Beaupierre, 2019).

Na základě všech dokumentů je možné pacienta doporučit na certifikovanou kliniku provádějící CAR-T terapii. Zda je pacient vhodný kandidát zjišťuje zařízení

jednak podle dodaných dokumentů, ale také po svém vlastním uvážení. Obecně se dá říct, že pacient je vhodný pro léčbu, pokud splňuje podmínky indikace komerčních společností. Kontraindikacemi může být například nedostatečnost kostní dřeně, přítomnost závažných infekčních chorob nebo kumulativní expozice chemoterapie (McGuirk, 2017).

Pokud je pacient vhodným kandidátem, je nutné získat jeho informovaný souhlas. Pacient by měl být poučen o principu léčby, jejím průběhu a vedlejších účincích. Léčba si vyžaduje i pečovatele, který bude pro pacienta dostupný po celou dobu terapie a v případě nutnosti komunikovat se zdravotnickým týmem. Právě komunikace mezi všemi zúčastněnými je nezbytná, protože budou po celou dobu zapojeni do pacientovy cesty (Beaupierre, 2019).

4.2 Leukaferéza

Terapeutický preparát je vyráběn každému pacientovi na míru z jeho vlastních T-lymfocytů. Odběr se provádí procesem zvaným leukaferéza. Princip spočívá v separaci lymfocytární frakce z periferní krve nemocného. Krevní elementy jsou rozdělovány do vrstev pomocí centrifugace, bílé krvinky jsou odebrány do sterilních vaků a zbytek navrácen zpět pacientovi do těla. Proces separace trvá typicky 3–6 hodin. Po ukončení leukaferézy je produkt kryokonzervován, skladován při teplotě $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně odeslán do výrobního zařízení (Tyagarajan et al., 2019).

Leukaferéza je kritickým bodem terapie a měla by být provedena v souladu s požadavky výrobce daného CAR-T preparátu. Nedoporučuje se podstupovat leukaferézu po dobu 3 měsíců od alogenní transplantace kostní dřeně. Zároveň imunosupresivní léčiva by měla být vysazena minimálně 2 týdny před leukaferézou, cytotoxická chemoterapie 2 týdny a podávání steroidů nebo anti-TNF terapie 72 hodin před odběrem. Všechny tyto faktory mohou ovlivňovat množství a kvalitu odebíraných lymfocytů (McGuirk, 2017).

Před samotným provedením je nutné zkontrolovat žilní přístup, je možné i zavedení centrálního žilního katetru. Pacient by měl být seznámen s možnými komplikacemi jako je hypotenze nebo hypokalcémie. Také je nutné pacienta upozornit na fakt, že v případě selhání výrobního procesu léčivého preparátu bude leukaferézu nutno opakovat (Beaupierre, 2019). Zvlášť důležitý zřetel je nutno brát na pediatrické

pacienty. Děti mají menší objem krve, hůře snáší proces odběru a jsou náchylnější na hypokalcémii a hypotermii. Z těchto důvodů by u nich měla leukaferéza probíhat pomaleji než u dospělých pacientů (*McGuirk, 2017*).

4.3 Výroba CAR-T lymfocytů

Výrobní protokoly se liší v závislosti na konkrétním CAR-T preparátu, obecně lze postup popsat následujícími kroky: promytí leukocytů, aktivování T-lymfocytů, transdukce CAR-T genu, expanze buněk na požadovaný počet, konzervace a expedice finálního produktu na klinické pracoviště. Výrobní proces vyžaduje čisté prostory, pečlivě prováděné kroky a během celého průběhu se provádí kontroly kvality.

Produkt leukaferézy je výrobní společností dodán ve zmrazeném stavu. K rozmrazení dochází za kontrolovaných podmínek a po něm je nutné obsah vaku promýt, aby byl zbaven kryomédia, antikoagulantů a reziduálních erytrocytů případně trombocytů, které by výsledný produkt kontaminovaly (*Tyagarajan et al., 2019*). Bylo prokázáno, že přidaná antikoagulační činidla mění chování T-lymfocytů při následné aktivaci. Erytrocyty ovlivňují klinickou účinnost a trombocyty způsobují shlukování buněk. Nežádoucí krevní elementy jsou odstraňovány pomocí centrifugace závislé na hustotním gradientu nebo pomocí paramagnetických částic s navázanými protilátkami. Tímto způsobem je získán produkt obohacený o T-lymfocyty (*Vormittag et al., 2018*).

Dalším krokem výroby je aktivace T-lymfocytů. Způsobů provedení je mnoho, a přestože je tento krok zásadní pro následné zavedení CAR genu, není stále nalezen optimální způsob (*Roddie, et al., 2019*). *In vivo* jsou T-lymfocyty aktivovány antigen prezentujícími buňkami jako jsou dendritické buňky. Jedním ze způsobů aktivace se tedy nabízí prezentace antigenu prostřednictvím dendritických buněk z aferézy. Tento způsob však není vhodný, protože je pracný a došlo by ke kontaminaci produktu. Z tohoto důvodu byly vytvořeny metody, které přirozenou aktivaci napodobují. Nejvyužívanější metodou aktivace je pomocí protilátek anti-CD3 a anti-CD28 navázaných na paramagnetických kuličkách, které slouží jako umělé částice prezentující antigen. Výhodou je, že T-lymfocyty si zachovávají silně paměťové schopnosti (*Vormittag et al., 2018*). Nevýhodou je, že při odstraňování kuliček dochází i k snížení počtu výsledných CAR-T lymfocytů (*Roddie, et al., 2019*). V praxi byla po dlouhou dobu využívána i strategie použití samotné anti-CD3 protilátky v přítomnosti IL-2. Úskalí této metody je

v samotném IL-2, který v nadměrném množství vyvolává vyčerpání T-lymfocytů a jejich dysfunkci. Novějším přístupem je například použití umělých antigen prezentujících buněk, které vychází z buněčné linie K562 odvozené od CML (Levine, 2016).

Stěžejním krokem výroby je transfer genu pro CAR receptor do genetické informace pacientových T-lymfocytů. I zde se nabízí několik možností, které se dělí na virové a nevirové. V praxi jsou nejvíce využívány virové transfery pomocí retrovirových nebo lentivirových částic, které jsou schopny implementace genů do deoxyribonukleové kyseliny (DNA) hostitelské buňky. Účinnost transdukce je vysoká, nicméně je zapotřebí kvalitní aktivace T-lymfocytů, protože retroviry transdukují pouze dělicí se buňky (Vormittag et al., 2018). Virové vektory jsou velmi drahé z důvodu pracné metodiky, vyžadují čisté prostory a rozsáhlé bezpečnostní kontroly (Roddie, et al., 2019). Potenciálním rizikem používání virových transferů je možnost přenosu onkogenů do CAR-T lymfocytů. V případě lentivirového přenosu je riziko o něco nižší. Studie uvádí velmi nízké riziko přenosu, nicméně na konci roku 2023 zaznamenal Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) 22 případů sekundárního rakovinového bujení po podání léčby CAR-T buňkami (Verdun et al., 2024). Zlepšení dostupnosti a bezpečnosti CAR-T terapie nyní spočívá ve výzkumu metod, které nepoužívají virové vektory. Jednou z revolučních metod genového transferu je transpozonový systém *Sleeping Beauty* (SB). DNA transpozony jsou genetické prvky se schopností měnit své pozice v genomu. Jedná se o nevirový nástroj pro přenos a stabilní integraci vybraných sekvencí DNA do eukaryotických genomů. SB silně konkuruje virovým vektorům. Výhodami jsou snížená imunogenocita *in vivo* a vynikající bezpečnostní profil. SB je atraktivní i kvůli nízké ceně. Vektor může být uchován v podobě plazmidové DNA, díky čemuž je jejich výroba jednoduchá a levná (Amberger et al., 2020).

Časově nejnáročnější část procesu je kultivace upravených T-lymfocytů. Expanze trvá i 9–11 dní a probíhá v uzavřených kultivačních systémech, které vytváří ideální prostředí pro správný růst. Ke kultivaci CAR-T lymfocytů lze použít kultivační lahve, nicméně kvůli nutnosti časté výměny kultivačního média prováděné kvalifikovanými pracovníky v čistých prostorech je tato metoda ve velkém měřítku krajně nevhodná. Dochází při ní k několika krokům otevřené manipulace a jako průmyslový standard je nepřijatelná (Kaiser et al., 2015). Lepší variantou je použití kultivačních vaků, které lze propojit sterilními hadičkami a vytvořit polouzavřený systém. Tato forma kultivace nevyžaduje velké množství vnějšího zásahu, což zvyšuje bezpečnost (Tumaini et al,

2013). Téměř polovina studií využívá ke kultivaci bioreaktory, které mají řadu výhod. Jedná se o uzavřené systémy, ve kterých lze snadno regulovat podmínky kultivace a je možno asepticky odebírat průběžné vzorky pro kontrolu kvality. Nejpoužívanějším je houpací bioreaktor, který značně minimalizuje zásah operátora do systému. Bioreaktor je schopen aktivně odstraňovat látky inhibující růst a zajišťuje kontinuální přívod živin, čímž snižuje spotřebu kultivačního média (*Kaiser et al., 2015*).

Před odesláním hotového výrobku na klinické pracoviště je nutno produkt konzervovat. Z hlediska kvality se jedná o velmi kritický proces, protože nesprávné provedení může vést ke snížení populace CAR-T buněk, jejich snížení životaschopnosti, ale i změně buněčného fenotypu a funkce (*Germann et al., 2013*). Nejběžnější je metoda kryokonzervace. CAR-T buňky jsou resuspendovány ve vhodném kryomédiu a zmrazovány. Zmrazování je řízené, dochází nejprve k pozvolnému snižování teploty o 1 stupeň/min., aby nedocházelo k vytváření intracelulárních krystalů. Ve chvíli, kdy jsou buňky dostatečně dehydratovány, se přistupuje k rychlému ochlazení na konečnou skladovací teplotu. Následně jsou preparáty uchovávány v atmosféře tekutého dusíku při teplotě $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*Gee, 2018*).

Celý proces výroby je komplexní, vyrábí se každému pacientovi na míru a klade vysoké kvalifikační a časové nároky na pracovníky. V neposlední řadě jsou kladeny přísné požadavky na sterilitu prostor a technické vybavení. V důsledku těchto skutečností čelí výrobci vysokému riziku selhání takřka v jakémkoli bodě výroby, a proto je počet pacientů, kterým může být léčba poskytnuta, omezený. Aby bylo možné zvýšit výrobní kapacitu je nutno pracovat na optimalizaci výroby, a to zejména na její automatizaci na úrovni průmyslové výroby. Již v dnešní době je možnost výroby CAR-T lymfocytů pomocí automatizované jednotky CliniMACS Prodigy (Obr. 5). Systém umožňuje provedení téměř všech kroků výroby v uzavřeném sterilním prostředí s minimální nutností lidského zásahu (*Kaiser et al., 2015*). Studie z roku 2024 zkoumala funkci a vlastnosti CAR-T vyrobených pomocí tohoto automatizovaného systému. Výsledky prokázaly, že systém je schopen produkovat dostatečné množství kopií CAR-T buněk s velkým zastoupením paměťové populace, nízkou expresí markerů vyčerpání a vysokou specifickou protinádorovou aktivitou *in vitro*. Studie předkládá cenné informace, na základě kterých by v budoucnosti mohlo dojít k decentralizované výrobě CAR-T terapií a možnosti provádění bezpečné a rychlé výroby přímo na klinikách. Zároveň by

se předešlo nutnosti konzervace přípravku a s ní spojené snižování kvality (*Malakova et al., 2024*).



Obr. 5: Automatizovaný systém pro výrobu CAR-T lymfocytů CliniMACS Prodigy. Převzato z (*Miltenyi Biotec, 2022*).

4.4 Příprava pacienta na léčbu

Během čekání na CAR-T produkt se zdravotní stav pacienta může rychle zhoršovat a přinášet řadu nežádoucích komplikací, které buď znemožní podání terapie, nebo mohou v krajním případě vést ke smrti pacienta. Zavádí se proto tzv. překlenovací terapie.

Hlavním cílem je zamezit progresi nádoru. Může se jednat například o chemoterapii, radioterapii či podávání vysokých dávek kortikosteroidů. Názory na podání překlenovací terapie se napříč studiemi i klinickými lékaři liší. Některé studie demonstrovaly, že po indikaci překlenovací terapie docházelo k silnějším vedlejším účinkům a kratší době přežití po aplikaci CAR-T terapie. Retrospektivní analýzy však udávají, že odpověď na překlenovací terapii zvyšuje pravděpodobnost remise po podání CAR-T terapie. Zároveň se jako efektivní forma zdůrazňuje radioterapie, která je spojena s nižší toxicitou následné CAR-T terapie (*Roddie, et al., 2019*).

Ke zvýšení účinnosti CAR-T terapie přispívá také lymfodepleční chemoterapie. Ta nemá přímý účinek na nádor, ale pomáhá vytvořit optimální prostředí pro aplikované

CAR-T lymfocyty. Redukuje počet endogenních lymfocytů a imunosupresivních buněk, které by mohly snižovat aktivitu CAR-T lymfocytů a upravuje mikroprostředí nádoru. Podává se přibližně týden před samotnou aplikací CAR-T buněk (*Lickefett et al., 2023*). Lymfodepleční chemoterapie s sebou nese riziko zvýšené toxicity, která může vést až ke smrti pacienta, nicméně bez jejího aplikování dochází k nízké či žádné expanzi CAR-T buněk v těle (*Brentjens et al., 2011*).

4.5 Podání CAR-T terapie

CAR-T přípravek musí být na klinice uchováván v hluboce zmrazeném stavu v prostředí tekutého dusíku a musí být zajištěn nepřetržitý monitoring teploty. Produkt může být skladován v předepsaných podmínkách po dobu 6–9 měsíců od data výroby. K jeho rozmrazení dochází na základě pokynu indikujícího lékaře a mělo by probíhat co nejrychleji. Je prováděno farmaceutickým týmem v čistých prostorech a ve vyhrazené vodní lázni předehřáté na teplotu 37 ± 2 °C. Stabilita výrobku je při pokojové teplotě 30–90 minut v závislosti na výrobcu, proto je nutné zajistit koordinovaný plán (*Rioufol et al., 2022*).

Před samotným podáním CAR-T terapie musí být zdravotní stav pacienta zhodnocen ošetřujícím lékařem. Kontraindikací terapie je přítomnost aktivní infekce nebo progresse maligního onemocnění. Zároveň se musí pečlivě zkontrolovat dodaný CAR-T produkt, zejména identifikace pacienta a zda specifikace produktu odpovídá požadavkům indikujícího lékaře. Po celou dobu aplikace musí být dostupný speciálně proškolený tým pracovníků, kvůli případným komplikacím (*McGuirk, 2017*).

Terapie je podávána intravenózně buď periferním nebo centrálním katetrem a neměla by trvat déle než 30 minut. U lůžka pacienta je přítomen zdravotník, který v případě komplikací zasáhne (*Yakoub-Agha et al., 2020*).

4.6 Vedlejší účinky a monitoring pacienta

Po podání terapie se často objevují různé vedlejší účinky, jejich závažnost se u každého pacienta liší. K dispozici nejsou žádná adekvátní data, podle kterých je možné předpovědět, kteří pacienti jsou více či méně ohroženi. Většina vedlejších účinků se projeví zpravidla během pár dnů po podání a stav pacienta si může vyžádat neodkladný přesun na jednotku intenzivní péče (JIP). Z tohoto důvodu je pacient sledován

v nemocničním prostředí po dobu 2 týdnů. Pokud pacient nevykazuje žádné významné komplikace, je následně propuštěn do domácí péče. Několik studií však zaznamenalo komplikace spojené s léčbou během celého prvního měsíce od jejího podání (*Yakoub-Agha et al., 2020*). Výrobci CAR-T terapií proto doporučují, aby pacient zůstal v blízkosti aplikující kliniky minimálně 4 týdny po podání. Mezi nejzávažnější komplikace spojené s léčbou CAR-T buňkami patří CRS a ICANS.

4.6.1 Syndrom z uvolnění cytokinů

Ze všech hlášených toxicit je CRS nejběžnější a bez okamžité léčby může končit smrtí. CRS je suprafyziologická reakce při které dochází k masivnímu uvolňování prozánětlivých cytokinů z buněk imunitního systému. CRS se objevuje během prvních dnů po podání infúze na vrcholu expanze CAR-T buněk a nejčastěji u pacientů s ALL (*Sievers et al., 2020*).

Hlavní příčinou je aktivace CAR-T buněk, které kaskádovitě aktivují ostatní efektorové buňky, ty následně nekontrolovaně vylučují IL (*Yakoub-Agha et al., 2020*). Studie z roku 2018 sledovala průběh CRS na myším modelu. CRS se objevil 2.– 3. den po podání CAR-T buněk a bylo prokázáno, že je zprostředkován IL-6, IL-1 a oxidem dusnatým vylučovaným aktivovanými makrofágy příjemce (*Giavridis et al. 2018*).

Přestože CRS nelze jednoduše laboratorně stanovit, existuje soubor alarmujících příznaků. Prvním a zároveň hlavním projevem je horečka, kterou následuje hypoxie a hypotenze. Dále se mohou objevovat bolesti hlavy, tachykardie, arytmie. Konečným důsledkem CRS může být smrt způsobená orgánovým selháním (*Lee et al., 2019*). Pro jednodušší orientaci v symptomech a zvolení optimální léčby byl CRS klasifikován do 4 stupňů, jejichž přehled je uveden v tab. II.

Léčba závisí na celkovém stavu pacienta. U lehkých forem se zpravidla podává symptomatická léčba s antipyretiky, dostatečné množství tekutin a v případě obtížného dýchání se pacientovi poskytuje kyslík. Těžké formy vyžadují překlad na JIP, pokračování v symptomatické léčbě a podávání vazopresorů. Kromě symptomatické léčby se podává i monoklonální protilátka proti receptoru pro IL-6, tocilizumab, který výrazně zlepšuje prognózu těžkých stavů CRS (*Yakoub-Agha et al., 2020*).

Tab. II: **Stupně CRS a doporučená léčba.** Upraveno dle (*Sandomasso et al., 2021*).

Stupeň CRS	Příznaky	Léčba
1. stupeň	Horečka: ≥ 38 °C Hypotenze: ne Hypoxie: ne	Podpůrná léčba antipyretiky, symptomatická léčba
2. stupeň	Horečka: ≥ 38 °C Hypotenze: ano, bez vazopresorů Hypoxie: ano, nízkoprůtoková nosní kanyla	Podpůrná léčba, intravenózně tekutiny, podle potřeby kyslík, Tocilizumab
3. stupeň	Horečka: ≥ 38 °C Hypotenze: ano, podávání vazopresorů Hypoxie: ano, Venturiho maska	Podpůrná léčba, zařazení vazopresorů, Tocilizumab, příjem na jednotku intenzivní péče, podpora dýchání
4. stupeň	Horečka: ≥ 38 °C Hypotenze: ano, podávání více vazopresorů Hypoxie: ano, přetlak (intubace, mechanická ventilace)	Podpůrná léčba, zařazení vazopresorů, Tocilizumab, mechanická ventilace

4.6.1 Syndrom neurotoxicity spojené s imunitními efektorovými buňkami

Druhou a velmi častou nežádoucí reakcí na léčbu je ICANS. Jedná se o soubor nescifických neurologických příznaků, které mohou vést k těžkému poškození mozku a v konečném důsledku ke smrti. ICANS se projevuje typicky během 9. dne od podání transfúze buď souběžně s CRS, případně po jeho vyléčení (*Yakoub-Agha et al., 2020*).

Přestože jsou příznaky rozmanitější, než při CRS, jejich vývoj je zpravidla u všech pacientů stereotypní. V první řadě se projevuje dysgrafie. Z tohoto důvodu je zařazena každodenní kontrola rukopisu, která dokáže odhalit případný příchod ICANS. Mezi další ranné projevy patří křeče, problémy s chůzí, řečí, zmatenost až ztráta orientace, delirium, poruchy vědomí (*Nellan et al., 2018*).

Mezi rizikové faktory vzniku ICANS se řadí vysoká nádorová zátěž, vysoká dávka CAR-T buněk, ale také rozvoj CRS. Studie z roku 2019 zkoumala vývoj a průběh ICANS u 25 pacientů po podání CAR-T terapie. Lehká forma ICANS se vyvinula u 12 pacientů a těžká forma u 13 pacientů. Závažnost ICANS výrazně korelovala s celkovou délkou přežití. U třech pacientů byl těžký ICANS příčinou smrti (*Karschnia et al., 2019*).

Přestože se ICANS často objevuje společně s CRS, léčba tocilizumabem není jako prevence účinná, protože jeho prostupnost přes hematoencefalickou bariéru je značně omezená (*Nellan et al., 2018*). V léčbě ICANS byl v preklinických studiích používán antagonist receptoru pro IL-1, anakinra. První klinická studie z roku 2023 podávala tento lék 43 pacientům po CAR-T terapii. Podání anakinry bylo účinné, bezpečné a nebyla zaznamenána snížená funkce podaných CAR-T lymfocytů. Závěrem studie naznačuje, že podání vysokých dávek anakinry může pomoci rychleji rozlišit CRS a ICANS bez ohrožení funkce CAR-T buněk a tím zvýšit celkovou dobu přežití (*Gazeau et al., 2023*).

4.6.2 Další vedlejší účinky

Většina cílových antigenů CAR-T buněk není exprimována výhradně na maligních strukturách. Z těchto důvodů dochází k napadání a likvidaci i zdravých struktur těla. Například nejpoužívanější anti-CD19 CAR-T buňky útočí na zdravé B-lymfocyty a způsobují tzv. B-buněčnou aplázi. Nejčastěji se projeví během prvního měsíce po podání terapie. Hodnoty se do fyziologických mezí vrací v průběhu několika měsíců, nicméně pacienti jsou vystaveni vyššímu riziku bakteriálních infekcí. Na tomto místě je nutné pravidelně sledovat krevní obraz a případně podávat podpůrnou léčbu. Zejména u dětí je často indikována substituční terapie imunoglobulinů (*Sievers et al., 2020*).

Při rychlé destrukci nádoru dochází k uvolňování velkého množství intracelulárních látek, například fosfátů, draslíku nebo nukleových kyselin do krevního řečiště. Tento stav je popisován jako syndrom nádorového rozpadu. Filtrační kapacita ledvin není schopna efektivně odbourávat odpadní produkty a důsledkem může být jejich selhání. Incidence je vyšší u pacientů s vysokou nádorovou zátěží a při zvýšených počátečních hodnotách kreatininu. Přestože se jedná o závažný život ohrožující stav, není jeho výskyt příliš častý. Studie z roku 2023 uvádí výskyt u 18 pacientů ze 105 (*Zhang et al., 2023*).

5 KOMERČNĚ POUŽÍVANÉ PRODUKTY

První úspěšně zkonstruované CAR-T lymfocyty sklidily velký úspěch a vzbudily zájem vědců po celém světě o vytvoření přelomové terapie pro nevléčitelné nebo špatně léčitelné nemoci. Přestože se studie setkaly s řadou překážek, jejich výsledky nakonec vyústily ve schválení sedmi léčivých přípravků CAR-T lymfocytů k léčbě hematologických malignit po celém světě (*Styczyński et al., 2020*).

FDA schválila celkem šest CAR-T produktů. Prvním schváleným CAR-T buněčným přípravkem se v roce 2017 stala Kymriah (tisagenlecleucel) od společnosti Novartis. Ve stejném roce byl uveden na trh společností Kite Pharma druhý přípravek CAR-T lymfocytů, Yescarta (axicabtagene ciloleucel). V roce 2020 byl schválen další CAR-T přípravek od společnosti Kite Pharma a to Tecartus (brexucabtagene autoleucel). Následující dva přípravky byly schváleny v roce 2021 a jedná se o Breyanzi (lisocabtagene maraleucel) od společnosti Juno Therapeutics a Abecma (idecabtagene vicleucel) od společnosti Bristol Myers Squibb. Prozatím poslední schválený CAR-T přípravek FDA je Carvykti (ciltacabtagene autoleucel), který uvedl na trh Janssen Biotech v roce 2022 (*Thirumalaisamy et al., 2024*).

V roce 2021 byl v Číně schválen první CAR-T buněčný preparát s obchodním názvem Carteyva (relmacabtagene autoleucel), přestože je výzkum teprve v první fázi klinického testování a je nutno jeho bezpečnost a účinnost i nadále testovat. Nejnovější záznamy však ukazují velmi dobré výsledky (*Ying et al., 2023*).

Evropská léková agentura schválila použití ve svých členských zemích všech šesti CAR-T přípravků dříve schválených FDA. Navzdory tomu, je přístup střední a východní Evropy ke CAR-T terapiím ve srovnání se západní částí omezený. Na českém trhu jsou dle Státního úřadu pro kontrolu léčiv momentálně dostupné přípravky Yescarta, Kymriah a Tecartus (*Odstrčil et al., 2023*).

5.1 Yescarta

Léčivý přípravek, axicabtagene ciloleucel, známý pod obchodním názvem Yescarta se stal první schválenou CAR-T terapií. Yescarta je určena k léčbě dvou typů NHL. Prvním z nich je DLBCL s indikací pro dospělé pacienty, kteří nevykazují odpověď na jednu či více předchozích linií systémové terapie nebo u kterých došlo k relapsu onemocnění. V případě FL je léčba pomocí přípravku Yescarta zvažována u dospělých

pacientů při selhání dvou různých léčebných postupů a případně pro pacienty, u který chdošlo k relapsu onemocnění (*Papadouli et al., 2020*).

Yescarta vychází z modelu druhé generace. Jedná se o anti-CD19 CAR-T buňky, které využívají kostimulaci pomocí CD28 a aktivaci prostřednictvím CD3 ζ . *Ex vivo* modifikace T-lymfocytů pacienta je prováděna pomocí retrovirových vektorů (*Locke et al., 2015*).

5.1.1 Studie ZUMA-1

První klinická studie probíhající od roku 2015 hodnotí léčebný potenciál přípravku axicabtagene ciloleucel a nese název ZUMA-1. Hlavními cíli studie bylo pochopení účinnosti a analýza rizik spojených s terapií. Do studie byli zařazeni dospělí pacienti, převážně s diagnózou DLBCL, u nichž byla Yescarta použita jako léčba třetí linie. V první fázi studie byl přípravek Yescarta podán celkem sedmi pacientům, šesti s DLBCL a jednomu s primárním mediastinálním velkobuněčným B-lymfomem. U pěti pacientů byla zaznamenána odpověď na léčbu. V případě čtyř pacientů bylo již v prvním měsíci dosaženo kompletní remise a u jednoho pacienta remise částečné. Jeden pacient zemřel v důsledku mozkové hemoragie, u které nebyla prokázána souvislost s podáním léčivého přípravku. Šest pacientů vykazovalo jistý stupeň CRS a ICANS, který po podání podpůrné léčby vymizel do 3 dnů. Pouze u jednoho pacienta však nastal CRS čtvrtého stupně. Následné vyhodnocení první fáze ZUMA-1 studie po 24 měsících od podání CAR-T terapie uvádí přežití tří pacientů, u všech s přetrvávající remisí. Autoři studie předložili klíčová data, na základě kterých mohlo být přistoupeno ke druhé fázi klinického testování (*Locke et al., 2017*).

Ve druhé fázi klinické studie podstoupilo léčbu 101 pacientů. Zařazeni byli pacienti s agresivní či refrakterní formou DLBCL, ale také ti, u kterých došlo k relapsu nemoci. Překlenovací terapie nebyla v této studii povolena. Medián doby centralizované výroby přípravku Yescarta byl 17 dní. V prvním půl roce od podání léčby byla objektivní míra odpovědi na léčbu zaznamenána u 73 pacientů, z toho kompletní remise u 52 pacientů. Medián doby, kdy došlo k odpovědi na léčbu byl 1 měsíc a medián doby trvání odpovědi 8,1 měsíce. CRS se vyskytl u 94 pacientů z nichž 11 prodělalo 3. a 4. stupeň. K ICANS došlo u 65 pacientů, z nichž 30 mělo vážnou formu. Léčba probíhala pomocí tocilizumabu a kortikosteroidů. Léčba sklídila nevídaný úspěch i u pacientů s rezistentními formami nemoci. Z 80 pacientů, u kterých neproběhla žádná reakce

na předchozí linii léčby, vykazovalo reakci na Yescartu 60 pacientů (*Neelapu et al., 2017*).

Nejnovější aktualizace studie ZUMA-1 předkládá výsledky pětiletého sledování pacientů z hlediska přežití i bezpečnostního profilu. Autoři studie uvádí, že ze 101 pacientů, kteří dostali léčbu, bylo ke dni ukončení sledování naživu 42 účastníků, včetně 63 % pacientů, kteří dosáhli celkové odpovědi. U 45 pacientů došlo ke smrti z důvodu progresu stavu, a to zejména během prvního roku po podání infuze (u 40 pacientů). Byla také zaznamenána 2 úmrtí, která měla prokazatelnou souvislost s podanou infuzí. Bezpečnostní profil byl v souladu s předchozím zjištěním. Po léčbě se vyskytla poměrně vysoká cytopenie, konkrétně anémie a neutropenie, které však byly vyřešeny během prvních dvou let od podání léčby. U několika pacientů bylo nutné přistoupit k substituci imunoglobulinů. Dva pacienti vykazovali profylaxi a jeden nízké hodnoty IgG v souvislosti s léčbou pomocí Yescarty. Během pětileté analýzy nedošlo k zastižení sekundárních malignit (*Neelapu et al., 2023*).

5.1.2 Studie ZUMA-7 a ZUMA-5

Pozdější mezinárodní studie, ZUMA-7, aplikovala přípravek Yescarta jako druhou linii terapie DLBCL a zkoumala, zda dojde ke zlepšení stavu ve srovnání se standardní terapií. Do této studie bylo zařazeno 359 dospělých pacientů u kterých došlo buď k selhání první linie imunochemoterapie, nebo došlo k relapsu onemocnění v průběhu prvního roku po léčbě. Pacienti byli náhodně rozřazeni do dvou skupin. První skupina 180 pacientů dostala přípravek Yescarta a druhá skupina 179 pacientů podstoupila standardní terapii dle určení ošetřujícího lékaře. U obou skupin pacientů byla sledována doba přežití bez relapsu či zhoršení nemoci, tzv. přežití bez příhody. Po dvou letech sledování byl ve skupině léčené pomocí Yescarty medián přežití bez příhody 8,3 měsíce a bylo jej dosaženo u 41 % pacientů. Odpověď na léčbu se objevila u 83 % pacientů, z toho 65 % pacientů vykazovalo úplnou remisi. Ve skupině léčené standardní terapií byl medián přežití bez příhody 2 měsíce a bylo jej dosaženo u 16 % pacientů. Odpověď na léčbu byla shledána u 50 % pacientů, úplná remise u 32 % (*Locke et al., 2022*). Analýza dat po pěti letech od počátku studie prezentuje, že celkové přežití pacientů léčených Yescartou bylo 54 % a v případě léčby standardní terapií 46 %. V závěru autoři poukazují na významné zlepšení v délce přežití pacienta. Dva roky po léčbě přípravkem Yescarta se riziko zhoršení či navrácení onemocnění snížilo o 60 % v porovnání se

standardní terapií a čtyři roky po léčbě přípravkem Yescarta měli pacienti o 27,4 % nižší riziko úmrtí v porovnání se standardní terapií (*Westin et al., 2023*).

Studie ZUMA-5 se zaměřovala na pochopení účinnosti Yescarta v případě pacientů trpících FL. Do studie byli opět zařazeni dospělí pacienti s refrakterní a relabující formou po dvou nebo více neúspěšných terapiích. Ze 127 pacientů, kterým byla terapie podána, vykazovalo 119 (94 %) odpověď, přičemž kompletní remisi vykazovalo 100 pacientů (79 %). Medián doby přežití bez progresse onemocnění byl 40,2 měsíce, medián celkového přežití nebyl k dnešnímu datu dosažen. Výsledky sledování po třech letech přináší velmi pozitivní výsledky v léčbě agresivní a refrakterní formy FL. Byla prokázána trvalá remise u podstatné části pacientů. Přestože bude nutné sledovat prognózy pacientů i dále, Yescarta je významným přínosem. Z bezpečnostního hlediska nebyl shledán žádný nový problém. CRS 1. a 2. stupně se objevil u 72 % pacientů, těžké stupně u 6 % pacientů. U 56 % pacientů se objevila také ICANS. Závažná cytopenie byla zaznamenána u 33 % pacientů a u 27 % pacientů bylo nutné přistoupit k suplementaci imunoglobulinů (*Neelapu et al., 2024*).

5.2 Kymriah

Zanedlouho po představení prvního CAR-T preparátu se na trhu začal objevovat další přípravek, tisagenlecleucel, známý spíše pod obchodním názvem Kymriah. Tisagenlecleucel je používán k léčbě refrakterních forem a relapsů NHL po dvou nebo více neúspěšných liniích léčby. Kymriah má nezastupitelné místo na trhu především díky svému použití v pediatrii. Doposud se jedná o jediný CAR-T přípravek schválený pro léčbu ALL u dětí a mladých dospělých do 25. roku života. V tomto případě je indikace zpravidla u refrakterní formy nebo v případě, kdy dochází k opakovaným relapsům (*Ali et al., 2020*).

Konstrukt vychází opět z druhé generace anti-CD19 CAR-T buněk. Kymriah volí aktivaci prostřednictvím CD3 ζ a kostimulaci pomocí CD137. Právě zmíněná doména CD137 pravděpodobně přispívá k silnému antileukemickému efektu a prodloužené doby přežití *in vivo*. Transdukce genu pro syntézu CAR se provádí pomocí lentivirového vektoru, který byl navržen s důrazem na minimalizaci pravděpodobnosti replikace kompletního lentiviru (*Milone et al., 2009*).

5.2.1 Studie ELIANA

Mezinárodní studie ELIANA byla zaměřena na klinické testování přípravku Kymriah u pediatrických a mladých dospělých pacientů do 25 let. Do první fáze studie bylo zařazeno 59 pacientů ve věku od 20 měsíců do 24 let s ALL. Během prvního měsíce po aplikaci infúze bylo u 55 (93 %) pacientů dosaženo kompletní remise. Při mediánu sledování, který činil 12 měsíců, bylo 34 pacientů v pokračující remisi a celkové přežití bylo 79 %. Mezi nejčastěji se objevujícími vedlejšími účinky léčby byl zaznamenán CRS, a to u 88 % pacientů. Těžké stavy spojené s nutností podpory dýchání byly zaznamenány u 27 % pacientů. Perzistence CAR-T buněk v těle byla doprovázena B-buněčnou aplázií, která přetrvávala u pacientů v remisi i v době posledního hodnocení, tj. ve 39. měsíci od podání transfúze. Přestože u 20 pacientů došlo k relapsu onemocnění, výsledky první fáze prokázaly perspektivu CAR-T terapie i u dětí (*Maude et al., 2016*).

Na základě pozitivních výsledků byla iniciována druhá fáze studie. Podmínky způsobilosti k účasti byly tentokrát striktnější. Do studie mohli být zařazeni jedinci od 3 do 21 let a museli mít alespoň 5 % lymfoblastů v kostní dřeni. Ze studie byli zároveň vyloučeni pacienti, kteří CAR-T terapii již dříve podstoupili. Infúzi přípravku Kymriah dostalo 75 pacientů. Celková míra remise při sledování po dobu 3 měsíců byla 81 %. Kompletní remise byla zaznamenána u 60 % pacientů, 21 % pacientů vykazovalo kompletní remisi s inkompletní obnovou krvetvorby. Míra přežití bez relapsu byla 80 % po 6 měsících a 59 % po 12 měsících. Přestože u 17 pacientů v remisi došlo k relapsu onemocnění, celková míra přežití byla po 12 měsících 76 %. K těmto pozitivním zjištěním se však přidává fakt, že léčbu doprovázelo značné množství vedlejších účinků. Těžké stavy CRS byly pozorovány u 88 % léčených pacientů, z nichž 47 % bylo přijato na JIP. Stav 44 % pacientů vyžadoval suplementaci kyslíku, 13 % podstoupilo mechanickou ventilaci. U 40 % se během 8 týdnů po aplikaci objevily také neurologické příhody, zejména encefalopatie a zmatenost. U všech pacientů, kteří vykazovali odpověď na léčbu, se projevila B-buněčná aplázie a většina pacientů ve studii dostávala suplementaci imunoglobulinů. K zotavení B-lymfocytů došlo v průměru za 38,6 měsíců. Autoři studie se zaměřovali také na samotné přežití CAR-T lymfocytů v krvi pacientů. Průměrná doba persistence CAR-T buněk v těle byla 168 dní. Expanze v těle byla vyjádřena jako počet kopií CAR-T lymfocytů na mikrogram DNA v rozmezí dnů 0 a 28. U pacientů reagujících na léčbu bylo dosaženo hodnoty 315 000 a u pacientů, kteří na léčbu nereagovali 301 000 (*Maude et al, 2018*).

Finální analýza ELIANA studie byla vydána po pěti letech od jejího počátku. Mezi všemi zúčastněnými pacienty byla celková míra přežití 55 %. Po pěti letech bylo stále v remisi 49 % pacientů. Studie v neposlední řadě neprokazuje žádné nové pozdní vedlejší účinky. Kymriah je tak i nadále možná terapie pro děti a mladé dospělé s ALL (*Rives et al., 2022*).

5.2.2 Studie JULIET a ELARA

Mezinárodní studie JULIET zabývající se podáním přípravku Kymriah dospělým pacientům s refrakterním a relabujícím DLBCL ukázala také příznivé výsledky. Z celkového počtu 111 pacientů, kteří dostali infúzi bylo 93 zařazeno do hodnocení účinnosti. Medián doby od podání infúze do data ukončení sběru dat byl 14 měsíců. Míra odpovědi mezi pacienty byla 52 %, přičemž 40 % pacientů dosáhlo kompletní remise a 12 % parciální remise. Z vedlejších účinků se opět vyskytoval nejčastěji CRS a to u 58 % pacientů. ICANS se objevil u 21 % pacientů. Dále se často vyskytovala anémie a snížené počty leukocytů. Následně proběhla analýza výstupů JULIET studie po 40,3 měsících od podání infúze. Do hodnocení bylo zařazeno 115 pacientů. Celková míra odpovědi byla 53 %, přičemž 39 % pacientů byla zaznamenána kompletní remise (*Schuster et al., 2021*).

V neposlední řadě byl přípravek Kymriah podáván dospělým pacientům s FL. ELARA je nejnovější studií jejíž prozatímní výsledky přináší velmi příznivou prognózu u pacientů, kteří vyčerpali běžné terapeutické možnosti. Studie se zúčastnilo 97 pacientů. Z prvních 52 pacientů, u kterých byla hodnocena účinnost vykazovalo 82,7 % pacientů remisi, přičemž 65,4 % vykazovalo celkovou remisi. Nejčastější vedlejší účinek terapie byl CRS, nicméně ve srovnání s jinými studiemi byla jeho incidence poměrně nízká. CRS byl zaznamenán u 48 % pacientů a nejčastěji 1. a 2. stupně. Žádný z pacientů neprodělal CRS 3. ani 4. stupně. Neurologické toxicity se objevily u 10 % pacientů a u 2 % se jednalo o vážné stavy, které se však podařilo vyřešit. Žádná smrt spojená s Kymriah terapií nebyla v této studii zaznamenána (*Fowler et al., 2020*).

5.3 Tecartus

ALL u dospělých pacientů lze pomocí CAR-T terapie léčit také. K tomuto účelu je používán přípravek Tecartus s účinnou látkou brexucabtagene autoleucel. Tecartus

CAR-T buňky jsou sestaveny z anti-CD19 vazebné domény, kostimulační molekuly CD28, signální molekuly CD3 ζ a k jeho transdukci je používán retrovirový vektor. Struktura receptoru je sice shodná s dříve zmíněným produktem Yescarta od stejného výrobce, látky se však od sebe liší výrobním procesem. Odebraná krev pacientů s ALL totiž obsahuje značné množství blastů, které by způsobovaly aktivaci a vyčerpání CAR-T lymfocytů při *ex vivo* výrobě. Prvním krokem výroby je proto obohacování o vhodnou populaci T-lymfocytů, které v případě výroby Yescarty neprobíhá (*Sabatino et al., 2016*).

5.3.1 Studie ZUMA-3

V roce 2021 byly prezentovány výsledky první fáze klinické studie ZUMA-3 aplikující Tecartus 45 dospělým pacientům s refrakterní a relabující ALL. Střední doba sledování pacientů byla 22,1 měsíce. Celková míra odpovědi byla 69 %, přičemž 53 % pacientů dosáhlo kompletní remise a 16 % parciální remise. Nejlepších výsledků dosahovalo 23 pacientů léčených dávkou 1×10^6 CAR-T buněk/kg. Míra celkové odpovědi dosahovala 82 %, 65 % pacientů zaznamenalo celkovou remisi. Medián doby trvání odpovědi pacientů byl 17,6 měsíců. Medián doby přežití bez relapsu byl 7,7 měsíců a celkového přežití 16,1 měsíce. CRS byl hlášen u 93 % pacientů. Třetí stupeň se objevil u 31 % pacientů. Neurologické příhody byly pozorovány u 78 % pacientů. Nebyly zaznamenány žádné závažné stavy ani mozkový edém (*Shah et al., 2021*).

Do druhé fáze studie bylo zařazeno 55 pacientů sledovaných po dobu 2 let. Celková míra odpovědi na léčbu byla 70,9 %. Celkovou remisi vykazovalo 56,4 % pacientů. Medián doby trvání remise u pacientů byl 14,6 měsíců a medián celkové doby přežití činil 25,4 měsíce. Po dobu sledování nebyly zaznamenány žádné nové vedlejší účinky léčby (*Shah et al., 2022*).

5.4 Breyanzi

Lisocabtagene maraleucel, jehož obchodní název je Breyanzi, je jednou z nejvíce multifunkčních CAR-T terapií. Kompozice je složena z anti-CD19 vazebné domény, CD137 kostimulační domény a signální domény CD3 ζ . Breyanzi je vyvíjen pro léčbu DLBCL, FL a CLL u dospělých pacientů. Nejnovější výzkumy s touto látkou se zaměřují právě na léčbu CLL u níž se často vyvíjí rezistence na standardní léčbu a prognózy jsou tak velmi nepříznivé (*Teoh et al., 2019*).

5.4.1 Studie TRANSCEND-CLL 004

V první fázi této studie podstoupilo aplikaci Breyanzi infúze 23 pacientů, kteří byli neúspěšně léčeni více než dvěma liniemi standardní terapie. Hlavním cílem bylo zhodnocení bezpečnosti přípravku. Celková míra odpovědi u pacientů byla 83 %, dále 45 % pacientů dosáhlo celkové remise. Co se týče bezpečnostního profilu přípravku, mezi nejběžnější vedlejší účinky se řadil CRS, zaznamenán u 74 % pacientů. Většina pacientů prodělalo lehkou formu, těžká forma se objevila pouze u 9 % léčených. ICANS byl zaznamenán u 39 % pacientů. V tomto případě se nicméně projevovaly těžké formy a to celkem u 22 % pacientů (*Siddiqi et al., 2022*).

V druhé fázi studie byl Breyanzi podán 118 pacientům. Prozatímní výsledky hodnotí přežití pacientů po dvou letech od podání infúze. Odpověď na léčbu vykazuje 44 % pacientů. Kompletní remisi vykazuje 20 % pacientů. Mediánu kompletní a částečné remise nebylo dosaženo, nicméně medián celkového přežití byl 30,3 měsíce. Bezpečnostní profil koreluje se zjištěním z první fáze studie. Studie prokázala celkem dobrou účinnost terapie silně předléčených pacientů s velmi rizikovým profilem nemoci. Sledování nadále pokračuje (*Siddiqi et al., 2023*).

5.5 Abecma

Idecabtagene vicleucel, prodáváný komerčně pod názvem Abecma, byl prvním schváleným přípravkem CAR-T lymfocytů k léčbě MM dospělých pacientů, u kterých nebylo dosaženo remise při imunomodulační terapii, léčbě pomocí inhibitorů proteazomu nebo terapii pomocí anti-CD38 protilátek. Abecma se od ostatních CAR-T přípravků liší vazebnou částí. Namísto anti-CD19 protilátky totiž používá protilátku proti antigenu zrání B-lymfocytů (BCMA). Výhodou je především fakt, že BCMA je exprimován zejména na maligních buňkách a jeho exprese na ostatních tkáních je omezena pouze na plazmatické buňky a některé zralé B-lymfocyty. Přípravek je složen z anti-BCMA protilátky, na kterou je vázána kostimulační molekula CD137 a signální molekula CD3 ζ , jedná se tedy opět o konstrukt druhé generace. Gen pro CAR je do T-lymfocytů pacienta veden pomocí lentivirového vektoru. V preklinické studii na myším modelu vedla Abecma k trvalé eliminaci nádoru a k 100% přežití (*Friedman et al., 2018*).

5.5.1 Studie KarMMA

Do první fáze klinické studie bylo zařazeno 33 dospělých pacientů s refrakterním MM. Cílem této studie bylo ověření bezpečnosti přípravku Abecma. Objektivní míra odpovědi na léčbu byla 85 % včetně 45 % pacientů, kteří vykazovali kompletní odpověď. Později však u šesti z těchto pacientů došlo k relapsu onemocnění. Přesto byl medián přežití bez progresy 11,8 měsíce a CAR-T buňky v těle pacientů byly detekovány až do 1 roku od podání infúze. Nejčastějším vedlejším účinkem léčby byl CRS. Celkem postihnul 76 % pacientů. CRS prvního a druhého stupně byl popsán u 70 % pacientů, těžký průběh byl zaznamenán u 6 % pacientů. Lehké neurologické komplikace se objevily u 27 pacientů. Jeden pacient vykazoval těžkou, avšak reverzibilní formu ICANS (*Raje et al., 2019*).

Druhá fáze studie měla za úkol potvrzení účinnosti a bezpečnosti přípravku u pacientů s refrakterním a relabujícím MM. Abecma byla podána 128 pacientům, kteří byli následně sledováni po dobu 13 měsíců. V této studii došlo k odpovědi na léčbu u 73 % pacientů, 33 % pacientů vykazovalo úplnou odpověď. Medián přežití bez progresy byl 8,8 měsíce. CRS byl hlášen u 84 % pacientů, kteří prodělali lehkou formu a dalších 5 % pacientů, kteří prodělali CRS 3. stupně. Lehký ICANS se objevil u 18 % pacientů, těžký ICANS byl zaznamenán u 3 % pacientů. Mezi další vedlejší účinky léčby se zařadily i cytopenie, zejména neutropenie a to u 91 % pacientů. Analýza buněčné kinetiky potvrdila u 29 pacientů ze 49 perzistenci CAR-T buněk po 6 měsících od podání. Přestože nejvíce úmrtí během studie bylo způsobeno progresí MM (u 27 pacientů), u 4 pacientů došlo k několika úmrtí i v souvislosti se samotným léčivem (*Munshi et al., 2021*).

V roce 2023 byly publikovány výsledky třetí fáze studie. Do studie bylo zařazeno 386 pacientů, 254 z nich podstoupilo léčbu pomocí Abecma a 132 pacientům byla podávána standardní terapie. Hlavním cílem třetí fáze studie bylo srovnání doby přežití bez progresy v obou skupinách. Medián sledování pacientů byl 18,6 měsíců. Ve skupině pacientů sledovaných po léčbě pomocí Abecmy byl medián přežití bez progresy 13,3 měsíce. Medián přežití bez progresy pacientů léčených standardní terapií byl podstatně kratší, a to 4,4 měsíce. Odpověď na léčbu CAR-T lymfocyty vykazovalo 71 % pacientů a 39 % vykazovalo odpověď úplnou. Ve skupině léčených pomocí standardní terapie se odpověď vyskytla u 42 % pacientů, respektive u 5 % odpověď úplná. Profil bezpečnosti byl v souladu s předchozím zjištěním. Terapie pomocí Abecma výrazně

prodlužuje dobu přežití bez progresu ve srovnání se standardní terapií (*Rodriguez-Otero et al., 2023*).

5.6 Carvykti

Doposud posledním přípravkem na trhu je ciltacabtagene autoleucel, který je veden na trhu pod obchodním názvem Carvykti určen k léčbě MM. Podobně jako přípravek Abecma cílí Carvykti na BCMA antigen. Konstrukce je dále tvořena kostimulační molekulou CD137 a signální molekulou CD3 ζ . Terapie přípravkem Carvykti je indikována již v případě pacientů, u kterých selhala první linie standardní terapie (*Natrajan et al., 2024*).

5.6.1 Studie CARTITUDE-1

V první studii bylo léčivo podáno 97 pacientům s diagnózou MM, kteří měli za sebou v průměru šest neúspěšných linií terapií. První analýza výstupů byla publikována po jednom roce od podání infuze. Celková míra odpovědi byla překvapivých 97 % včetně 67 % pacientů, kteří dosáhli odpovědi kompletní. Doba do odpovědi na léčbu činila 1 měsíc. V této fázi studie nebylo dosaženo mediánu trvání odpovědi, nicméně míra přežití bez progresu činila 77 % a celkové přežití pacientů 89 %. Nejčastěji se vyskytujícím nežádoucím účinkem léčby byl CRS a to u 95 % pacientů. Třetí a čtvrtý stupeň CRS se objevil u 4 % pacientů. Dále se objevil ICANS, který prodělalo 21 % pacientů a 9 % pacientů prodělalo těžkou formu. Během prvního roku sledování došlo k úmrtí šesti pacientů v důsledku nežádoucích účinků léčby a pěti pacientů v důsledku progresu onemocnění (*Berdeja et al., 2021*).

Finální analýzy studie byly představeny po necelém tříletém sledování pacientů. Medián trvání odpovědi byl 33,9 měsíců, mediánu přežití bez progresu nemoci bylo dosaženo ve 34,9. měsíci. Mediánu celkového přežití nebylo zatím dosaženo, odhaduje se však na 62,2 % ve 39. měsíci. V průběhu sledování bylo hlášeno 6 primárně sekundárních malignit, včetně 2 případů bazaliomu. Déle se objevil myelodysplastický syndrom, B-buněčný lymfom, ale i melanom a rakovina prostaty. Přestože byli pacienti zařazení do studie silně předlčení a byla u nich zjištěna vysoká nádorová zátěž, výsledky studie jsou prozatím uspokojivé. Pacienti budou nadále sledováni, a to po dobu 15 let (*Lin et al., 2023*).

5.6.2 Studie CARTITUDE-4

V roce 2023 byly představeny první výsledky studie srovnávající účinnost Carvykti se standardní terapií u 419 pacientů. Hlavním cílem bylo porovnat dobu přežití obou skupin pacientů. CAR-T terapie byla podávána 208 pacientům a standardní terapie 211 pacientům. Při střední době sledování pacientů, 15,9 měsíců, nebylo ve skupině léčených Carvykti dosaženo mediánu přežití bez progresse onemocnění, nicméně u pacientů léčených běžnou terapií bylo mediánu dosaženo v 11,8 měsíce. Přežití bez progresse však bylo zaznamenáno ve 12. měsíci a činilo ve skupině léčených pomocí CAR-T buněk 75,9 % a u pacientů s běžnou terapií pouze 48,6 %. Odpověď na léčbu byla u pacientů po podání CAR-T terapie 84,6 %, z nichž 73,1 % pacientů vykazovalo úplnou remisi. U pacientů léčených pomocí standardní terapie se odpověď dostavila u 67,3 % léčených a remise úplná u 21,8 % (*Dhakai et al., 2023*).

Ve skupině léčených CAR-T terapií se objevil CRS u 76,1 % pacientů, ale pouze u 1 % se vyskytl 3. a 4. stupeň. ICANS se objevil u 4,8 % pacientů, jeho průběh však nebyl u žádného pacienta vážný (*San-Miguel et al., 2023*).

ZÁVĚR

Od prvního úspěšně zkonstruovaného CAR v 80. letech minulého století dochází k velkému rozmachu výzkumu v oblasti jeho využití nejen v léčbě hematologických malignit. Výzkum vyústil ve vytvoření čtyř generací CAR-T lymfocytů, ale optimální konstrukce však dosud není popsána. Vývoj CAR-T lymfocytů nicméně stále pokračuje a neustále jsou vytvářeny receptory nové, páté generace a zároveň probíhá jejich intenzivní testování jak na zvířecích, tak na lidských modelech.

K dnešnímu datu je k dispozici šest komerčně prodávaných produktů CAR-T lymfocytů. Přestože se CAR-T terapie potýká s řadou vedlejších účinků, které mohou končit smrtí, představuje naději pro pacienty v pokročilých fázích různých typů rakovin krve. CAR-T preparát je vyráběn každému pacientovi na míru z jeho vlastních T-lymfocytů, což je finančně velmi nákladné. Z tohoto důvodu se indikace terapie soustředí právě na pacienty, kteří bez úspěchu vyčerpali jiné možnosti léčby. Dosavadní studie demonstrují úspěšné výsledky nejen v případě dospělých pacientů, ale i u dětí.

Aby však bylo možné léčbu zprostředkovat co největšímu počtu pacientů, urychlit dobu výroby a snížit finanční náklady, je nutné věnovat pozornost zefektivnění celého procesu a výrobě univerzálních CAR-T lymfocytů. Budoucnost CAR-T terapie nepatří výhradně hematologické onkologii. Výzkum se zabývá také uplatněním této terapie v léčbě solidních nádorů a dalších zákeřných a těžko léčitelných nemocí, pro které zatím žádná léčba neexistuje.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ALI, Sahra; KJEKEN, Rune; NIEDERLAENDER, Christiane; MARKEY, Greg; et al. The European medicines agency review of Kymriah (Tisagenlecleucel) for the treatment of acute lymphoblastic leukemia and diffuse large B-cell lymphoma. *The oncologist*. 2020 (25.2), e321-e327. DOI:10.1634/theoncologist.2019-0233.
2. AMBERGER, Maximilian; IVICS, Zoltán. Latest advances for the sleeping beauty transposon system: 23 years of insomnia but prettier than ever: refinement and recent innovations of the sleeping beauty transposon system enabling novel, nonviral genetic engineering applications. *Bioessays*. 2020 (42.11), 2000136. DOI: 10.1002/bies.202000136.
3. BATISTA, Julie L.; BIRMANN, Brenda M.; EPSTEIN, Mara M. Epidemiology of hematologic malignancies. *Pathology and epidemiology of cancer*. 2017, 543-569. DOI: 10.1007/978-3-319-35153-7_29.
4. BEAUPIERRE, Alix; KAHLE, Nicole; LUNDBERG, Rachel; PATTERSON, Amy; et al. Educating multidisciplinary care teams, patients, and caregivers on CAR T-cell therapy. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology*. 2019 (10Suppl 3), 29. DOI: 10.6004/jadpro.2019.10.4.12.
5. BERDEJA, Jesus G.; MADDURI, Deepu; USMANI, Saad Z; JAKUBOWIAK, Andrzej; 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), 314-324. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00933-8.
6. BRENTJENS, Renier J; RIVIÈRE, Isabelle; PARK, Jae H; DAVILA, Marco L.; et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood* 2011 118(18), 4817–28. DOI: 10.1182/blood-2011-04-348540.
7. BRIDGEMAN, John S.; HAWKINS, Robert E.; BAGLEY, Steve; BLAYLOCK, Morgan; HOLLAND, Mark; et al. The optimal antigen response of chimeric antigen receptors harboring the CD3 ζ transmembrane domain is dependent upon incorporation of the receptor into the endogenous TCR/CD3 complex. *The Journal of Immunology*. 2010 (184.12), 6938-6949. DOI: 10.4049/jimmunol.0901766.

8. BROCKER, Thomas. Chimeric Fv- ζ or Fv- ϵ receptors are not sufficient to induce activation or cytokine production in peripheral T cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2000 (96.5), 1999-2001. DOI: 10.1182/blood.V96.5.1999.
9. BROCKER, Thomas; KARJALAINEN, Klaus. Signals through T cell receptor-zeta chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1995 (181.5), 1653-1659. DOI: 10.1084/jem.181.5.1653.
10. BRUDNO, Jennifer N.; LAM, Norris; VANASSE, Danielle; YUEH-WEI, Shen; et al. Safety and feasibility of anti-CD19 CAR T cells with fully human binding domains in patients with B-cell lymphoma. *Nature medicine*. 2020 (26.2), 270-280. DOI: 10.1038/s41591-019-0737-3.
11. CROFT, Michael; SO, Takanori, DUAN, Wei; SOROOSH, Pejman. The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunological reviews*. 2009 (229.1), 173-191. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2009.00766.x.
12. DEJENIE, Tadesse Asmamaw; MEDHIN, Markeshaw Tiruneh; TEREFE, Gashaw Dessie; ADMASU, Fitalew Tadele; et al. Current updates on generations, approvals, and clinical trials of CAR T-cell therapy. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2022 (18.6), 2114254. DOI: 10.1080/21645515.2022.2114254.
13. DESHANTRI, Anil K.; MOREIRA, Aida V.; ECKER, Veronika; MANDHANE, Sanjay N.; et al. Nanomedicines for the treatment of hematological malignancies. *Journal of Controlled Release*. 2018 (287), 194-215. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.08.034.
14. DHAKAL, Binod; YONG, Kwee; HARRISON, Simon J.; MATEOS, Maria-Victoria; et al. First phase 3 results from CARTITUDE-4: Cilta-cel versus standard of care (PVd or DPd) in lenalidomide-refractory multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*. 2023 (41.17). DOI: 10.1200/JCO.2023.41.17_suppl.LBA106.
15. ESHHAR, Zelig; WAKS, Tova; GROSS, Gideon; SCHINDLER, Daniel G. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993 (90.2), 720-724. DOI: 10.1073/pnas.90.2.720.
16. FOWLER, Nathan H.; DICKINSON, Michael; DREYLING, Martin; MARTINEZ-LOPEZ, Joaquin; et al. Efficacy and safety of tisagenlecleucel in adult patients with relapsed/refractory follicular lymphoma: interim analysis of the phase 2 Elara trial. *Blood*. 2020 (136) 1-3. DOI: 10.1182/blood-2020-138983.
 17. FRIEDMAN, Kevin M.; GARRETT, Tracy E.; EVANS, John W.; HORTON, Holly M.; et al. Effective targeting of multiple B-cell maturation antigen–expressing hematological malignances by anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor T cells. *Human gene therapy*. 2018 (29.5), 585-601. DOI: 10.1089/hum.2018.001.
 18. FUJIWARA, Kento; TSUNEI, Ayaka; KUSABUKA, Hotaka; OGAKI, Erika; et al. Hinge and transmembrane domains of chimeric antigen receptor regulate receptor expression and signaling threshold. *Cells*. 2020 (9.5), 1182. DOI: 10.3390/cells9051182.
 19. GAZEAU, N.; LIANG, Emily C.; WU, Qian “Vicky”; VOUTSINAS, Jenna M.; et al. Anakinra for refractory CRS or ICANS after CAR T-cell therapy. *Transplantation and Cellular Therapy*. 2023 (S2666-6367 (23)), 01233. DOI: 10.1016/j.jtct.2023.04.001.
 20. GEE, Adrian P. CAR-T Cell Production. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2018 (31.2), 126-134. DOI: 10.1016/j.beha.2018.01.002.
 21. GERMANN, Anja; OH, Young-Joo; SCHMIDT, Tomm; SCHÖN, Uwe; et al. Temperature fluctuations during deep temperature cryopreservation reduce PBMC recovery, viability and T-cell function. *Cryobiology*. 2013 (67.2), 193-200. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2013.06.012.
 22. GHORESCHI, Kamran; LAURENCE, Arian; O’SHEA, John J. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunological reviews*. 2009 (228.1), 273-287. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00754.x.
 23. GIAVRIDIS, Theodoros; VAN DER STEGEN, Sjoukje J. C.; EYQUEM, Justin; HAMIEH, Mohamad; et al. CAR T cell–induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade. *Nature medicine*. 2018 (24.6), 731-738. DOI: 10.1038/s41591-018-0041-7.

24. GROSS, Gideon; WAKS, Tova; ESHHAR, Zelig. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989 (86.24), 10024-10028. DOI: 10.1073/pnas.86.24.10024.
25. GUEDAN, Sonia; POSEY Jr. Avery D.; SHAW, Carolyn; WING, Anna; et al. Enhancing CAR T cell persistence through ICOS and 4-1BB costimulation. *JCI insight*, 2018 (3.1). DOI: 10.1172/jci.insight.96976.
26. HUDECEK, Michael; SOMMERMEYERL, Daniel; KOSSAIH, Paula L.; SILVA-BENEDICT, Anne; et al. The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. *Cancer immunology research*, 2015 (3.2), 125-135. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0127.
27. HUSTON, James S.; LEVINSON, Douglas; MUDGETT-HUNTER, Meredith; TAI, Mei-Sheng; et.al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 (85(16)), 5879-83. DOI: 10.1073/pnas.85.16.5879.
28. CHMIELEWSKI, Markus; HOMBACH, Andreas A.; ABKEN, Hinrich. Of CARs and TRUCKs: chimeric antigen receptor (CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma. *Immunological reviews*, 2014 (257.1), 83-90. DOI: 10.1111/imr.12125.
29. KAGOYA, Yuki; TANAKA, Shinya; GUO, Tingxi; ANCZUROWSKI, Mark; et al. A novel chimeric antigen receptor containing a JAK–STAT signaling domain mediates superior antitumor effects. *Nature medicine*. 2018 (24.3), 352-359. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00754.x.
30. KAISER, A. D.; ASSENMACHER, M.; SCHRÖDER B.; MEYERET, M.; et al. Towards a commercial process for the manufacture of genetically modified T cells for therapy. *Cancer gene therapy*. 2015 (22.2), 72-78. DOI: 10.1038/cgt.2014.78.
31. KARSCHNIA, Philipp; JORDAN, Justin T.; FORST, Deborah A.; ARRILLAGA-ROMANY, Isabel C.; et al. Clinical presentation, management, and biomarkers of neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CAR T cells.

- Blood The Journal of the American Society of Hematology*. 2019 (133.20), 2212-2221. DOI: 10.1182/blood-2018-12-893396.
32. KHAN, Aalia N.; ASIJA, Sweety; PENDHARI, Juber; PURWAR, Rahul; et al. CAR-T cell therapy in hematological malignancies: Where are we now and where are we heading for?. *European Journal of Haematology*. 2024 (112.1), 6-18. DOI: 10.1111/ejh.14076.
33. KRAUSE, Anja; GUO, Hong-Fen; LATOUCHE, Jean-Baptiste; TAN, Cuiwen; et al. Antigen-dependent CD28 signaling selectively enhances survival and proliferation in genetically modified activated human primary T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1998 (188.4), 619-626. DOI: 10.1084/jem.188.4.619.
34. LABANIEH, Louai; MAJZNER, Robbie G.; MACKALL, Crystal L. Programming CAR-T cells to kill cancer. *Nature biomedical engineering*. 2018 (2.6), 377-391. DOI: 10.1038/s41551-018-0235-9.
35. LEE, Daniel W.; SANTOMASSO, Bianca D.; LOCKE, Frederick L.; GHOBADI, Armin; et al. ASTCT consensus grading for cytokine release syndrome and neurologic toxicity associated with immune effector cells. *Biology of blood and marrow transplantation*. 2019 (25.4), 625-638. DOI: 10.1016/j.bbmt.2018.12.758.
36. LEVINE, Bruce L.; MISKIN, James; WONNACOTT, Keith; KEIR, Christopher. Global manufacturing of CAR T cell therapy. *Molecular therapy Methods & clinical development*. 2017 (4), 92-101. DOI: 10.1016/j.omtm.2016.12.006.
37. LICKEFETT, Benno; CHU, Lulu; ORTIZ-MALDONADO, Valentin; WARMUTH, Linda; et al. Lymphodepletion—an essential but undervalued part of the chimeric antigen receptor T-cell therapy cycle. *Frontiers in Immunology*, 2023 (14) 1303935. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1303935.
38. LIN, Yi; MARTIN, Thomas G.; USMANI, Saad Zafar; BERDEJA, Jesus G.; et al. CARTITUDE-1 final results: Phase 1b/2 study of ciltacabtagene autoleucel in heavily pretreated patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*. 2023 (8009). DOI: 10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.8009.

39. LIU, Zhuohao; ZHOU, Jiayi; YANG, Xinzhi; LIU, Yuchen; et al. Safety and antitumor activity of GD2-Specific 4SCAR-T cells in patients with glioblastoma. *Molecular Cancer*. 2023 (22.1), 3. DOI: 10.1186/s12943-022-01711-9.
40. LOCKE, Frederick L.; MIKLOS, David B.; JACOBSON, Caron A.; PERALES, Miguel-Angel; et al. Axicabtagene ciloleucel as second-line therapy for large B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2022 (386.7), 640-654. DOI: 10.1056/NEJMoa2116133.
41. LOCKE, Frederick L.; NEELAPU, Sattva S.; BARTLETT, Nancy L.; AYCOCK, Jeff; et al. Phase 1 results of ZUMA-1: a multicenter study of KTE-C19 anti-CD19 CAR T cell therapy in refractory aggressive lymphoma. *Molecular Therapy*. 2017 (25.1), 285-295. DOI:10.1016/j.ymthe.2016.10.020.
42. LOCKE, Frederick L.; NEELAPU, Sattva S.; BARTLETT, Nancy L.; SIDDIQI, Tanya; et al. Phase 1 clinical results of the ZUMA-1 (KTE-C19-101) study: a phase 1-2 multi-center study evaluating the safety and efficacy of anti-CD19 CAR T cells (KTE-C19) in subjects with refractory aggressive non-Hodgkin lymphoma (NHL). *Blood*. 2015 (126.23), 3991. DOI: 10.1182/blood.V126.23.3991.3991.
43. MALAKHOVA, Ekaterina; PERSHIN, Dmitriy; KULAKOVSKAYA, Elena; VEDMEDSKAIA Viktoria; et al. Extended characterization of anti-CD19 CAR T cell products manufactured at the point of care using the CliniMACS Prodigy System: comparison of donor sources and process duration. *Cytotherapy*. 2024 (14.3), 1465-3249. DOI: 10.1016/j.jcyt.2024.02.025.
44. MAUDE, Shannon L.; LAETSCH, Theodore W.; BUECHNER, Jochen; RIVES, Susana; et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2018 (378.5), 439-448. DOI: 10.1056/NEJMoa1709866.
45. MAUDE, Shannon L.; TEACHEY, David T.; RHEINGOLD, Susan R.; SHAW, Pamela A; et al. Sustained remissions with CD19-specific chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells in children with relapsed/refractory ALL. *Journal of Clinical Oncology*. 2016 (34.15). DOI: 10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.301.

46. MCGUIRK, Joseph; WALLER, Edmund K.; QAYED, Muna; ABHYANKAR, Sunil; et al. Building blocks for institutional preparation of CTL019 delivery. *Cytotherapy*. 2017 (19.9), 1015-1024. DOI: 10.1016/j.jcyt.2017.06.001.
47. MILONE, Michael C.; FISH, Jonathan D.; CARPENITO, Carmine; RILEY, James L.; et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Molecular therapy*. 2009 (17.8), 1453-1464. DOI:10.1038/mt.2009.83.
48. MORENO-CORTES, Eider; FRANCO-FUQUEN, GARCIA-ROBLEDO, Juan E.; FORERO, Jose; et al. ICOS and OX40 tandem co-stimulation enhances CAR T-cell cytotoxicity and promotes T-cell persistence phenotype. *Frontiers in Oncology*. 2023 (13). DOI: 10.3389/fonc.2023.1200914.
49. MUNSHI, Nikhil C.; ANDERSON, Larry D.; SHAH, Nina; MADDURI, Deepu; et al. Idecabtagene vicleucel in relapsed and refractory multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2021 (384.8), 705-716. DOI:10.1056/NEJMoa2024850.
50. NATRAJAN, Kavita; MEGHA, Kaushal; BINDU, George; BINDU, Kanapuru; et al. FDA Approval Summary: Ciltacabtagene Autoleucel for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research*. 2024 (OF1-OF7). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-24-0378.
51. NEELAPU, Sattva S.; CHAVEZ, Julio C.; SEHGAL, Alison R.; EPPERLA, Narendranath; et al. Three-year follow-up analysis of axicabtagene ciloleucel in relapsed/refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (ZUMA-5). *Blood*. 2024 (143.6), 496-506. DOI: 10.1182/blood.2023021243.
52. NEELAPU, Sattva S.; JACOBSON, Caron A.; GHOBADI, Armin; MIKLOS, David B.; et al. Five-year follow-up of ZUMA-1 supports the curative potential of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2023 (141.19), 2307-2315. DOI: 10.1182/blood.2022018893.
53. NEELAPU, Sattva S.; LOCKE, Frederick L.; BARTLETT, Nancy L.; LEKAKIS, Lazaros J.; et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2017 (377.26), 2531-2544. DOI: 10.1056/NEJMoa1707447.

54. NELLAN, Anandani; LESTER MCCULLY, Cynthia M.; CRUZ GARCIA, Rafael; JAYAPRAKASH, Nalini; et al. Improved CNS exposure to tocilizumab after cerebrospinal fluid compared to intravenous administration in rhesus macaques. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2018 (132.6), 662-666. DOI: 10.1182/blood-2018-05-846428.
55. NICHOLSON, Ian C.; LENTON, Kelly A.; LITTLE, Debbie J.; DECORSO, Tina; et al. Construction and characterisation of a functional CD19 specific single chain Fv fragment for immunotherapy of B lineage leukaemia and lymphoma. *Molecular immunology*. 1997 (34.16-17), 1157-1165. DOI: 10.1016/S0161-5890(97)00144-2.
56. ODSTRCIL, Maria S.; LEE, Catherine J.; SOBIESKI, Catherine; WEISDORF, Daniel; et al. Access to CAR T-cell therapy: Focus on diversity, equity and inclusion. *Blood Reviews*. 2023 (101136). DOI: 10.1016/j.blre.2023.101136.
57. PAPADOULI, Irene; MUELLER-BERGHAUS, Jan; BEUNEU, Claire; ALI, Sahra; et al. EMA review of axicabtagene ciloleucel (Yescarta) for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma. *The Oncologist*. 2020 (25.10), 894-902. DOI: 10.1634/theoncologist.2019-0646.
58. PENKA, Miroslav; TESAŘOVÁ, Eva; et al. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. Praha: Garda. 2011, 289-373. ISBN-13: 978-80-247-3459-0.
59. RAJE, Noopur; BERDEJA, Jesus; LIN, Yi; SIEGEL, David; et al. Anti-BCMA CAR T-cell therapy bb2121 in relapsed or refractory multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2019 (380.18), 1726-1737. DOI: 10.1056/NEJMoa1817226.
60. RAMOS, Carlos A.; DOTTI, Gianpietro. *Expert Opin Biol Ther*. 2011 (11(7)), 855–873. DOI: 10.1517/14712598.2011.573476.
61. RIOUFOL, Catherine; WICHMANN, Christian. Receiving, Handling, Storage, Thawing, Distribution, and Administration of CAR-T Cells Shipped from the Manufacturing Facility. *The EBMT/EHA CAR-T Cell Handbook*. 2022 (37-43). DOI: 10.1007/978-3-030-94353-0_7.
62. RIVES, Susana; MAUDE, Shannon; HIRAMATSU, Hidefumi; BARUCHEL, Andre; et al. S112: tisagenlecleucel in pediatric and young adult patients (PTS) with relapsed/refractory (R/R) B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL):

- final analyses from the Eliana Study. *HemaSphere*. 2022 (6), 13-14. DOI: 10.1097/01.HS9.0000843344.19780.98.
63. RODDIE, Claire; NEILL, Lorna; OSBORNE, Wendy; IYENGAR, Sunil; et al. Effective bridging therapy can improve CD19 CAR-T outcomes while maintaining safety in patients with large B-cell lymphoma. *Blood Advances*. 2023 (7.12), 2872-2883. DOI: 10.1182/bloodadvances.2022009019.
64. RODRIGUEZ-OTERO, Paula; AILAWADHI, Sikander; ARNULF, Bertrand; PATEL, Krina; et al. Ide-cel or standard regimens in relapsed and refractory multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*, 2023 (388.11), 1002-1014. DOI:10.1056/NEJMoa2213614
65. SABATINO, Marianna; CHOI, Kenny; CHIRUVOLU, Vijay; BETTER, Marc; et al. Production of anti-CD19 CAR T cells for ZUMA-3 and-4: phase 1/2 multicenter studies evaluating KTE-C19 in patients with relapsed/refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia (R/R ALL). *Blood*. 2016 (128.22), 1227. DOI: 10.1182/blood.V128.22.1227.1227.
66. SADELAIN, Michel. CAR therapy: the CD19 paradigm. *The Journal of clinical investigation*. 2015 (125.9), 3392-3400. DOI: 10.1172/JCI80010.
67. SAN-MIGUEL, Jesús; DHAKAL, Binod; YONG, Kwee; SPENCER, Andrew; et al. Cilta-cel or standard care in lenalidomide-refractory multiple myeloma. *New England journal of medicine*. 2023 (389.4), 335-347. DOI: 10.1056/NEJMoa2303379.
68. SEIF, Michelle; EINSELE, Hermann; LÖFFLER, Jürgen. CAR T cells beyond cancer: hope for immunomodulatory therapy of infectious diseases. *Frontiers in immunology*. 2019 (10: 2711). DOI: 10.3389/fimmu.2019.02711.
69. SHAH, Bijal D.; BISHOP, Michael R.; OLUWOLE, Olalekan O.; LOGAN, Aaron C.; et al. KTE-X19 anti-CD19 CAR T-cell therapy in adult relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia: ZUMA-3 phase 1 results. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2021 (138.1), 11-22. DOI: 10.1182/blood.2020009098.
70. SHAH, Bijal D.; GHOBADI, Armin; OLUWOLE, Olalekan O.; LOGAN, Aaron C.; et al. Two-year follow-up of KTE-X19 in patients with relapsed or refractory adult B-cell acute lymphoblastic leukemia in ZUMA-3 and its contextualization

- with SCHOLAR-3, an external historical control study. *Journal of hematology & oncology*. 2022 (15.1), 170. DOI: 10.1186/s13045-022-01379-0.
71. SCHUBERT, Maria-Luisa; SCHMITT, Anita; HÜCKELHOVEN-KRAUSS, Angela; NEUBER, Brigitte; et al. Treatment of adult ALL patients with third-generation CD19-directed CAR T cells: results of a pivotal trial. *Journal of Hematology & Oncology*. 2023 (16.1), 79. DOI: 10.1186/s13045-023-01470-0.
72. SCHUSTER, Stephen J.; TAM, Constantine S.; BORCHMANN, Peter; WOREL, Nina; et al. Long-term clinical outcomes of tisagenlecleucel in patients with relapsed or refractory aggressive B-cell lymphomas (JULIET): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 2021 (22.10), 1403-1415. DOI: 10.1016/S1470-2045(21)00375-2.
73. SCHWARTZ, Ronald H. T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Annual review of immunology*. 1985 (3.1), 237-261. DOI: 10.1146/annurev.iy.03.040185.001321.
74. SIDDIQI, Tanya; MALONEY, David G.; KENDERIAN, Saad S.; BRANDER, Danielle M.; et al. Lisocabtagene Maraleucel (liso-cel) in R/R CLL/SLL: 24-Month Median Follow-up of TRANSCEND CLL 004. *Blood*. 2023 (142), 330. DOI: 10.1182/blood-2023-179529.
75. SIDDIQI, Tanya; SOUMERAI, Jacob D.; DORRITIE, Kathleen A.; STEPHENS, Deborah M.; et al. Phase 1 TRANSCEND CLL 004 study of lisocabtagene maraleucel in patients with relapsed/refractory CLL or SLL. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2022 (139.12), 1794-1806. DOI:10.1182/blood.2021011895.
76. SIDDIQI, Tanya; SOUMERAI, Jacob D.; DORRITIE, Kathleen A.; STEPHENS, Deborah M.; et al. Phase 1 TRANSCEND CLL 004 study of lisocabtagene maraleucel in patients with relapsed/refractory CLL or SLL. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2022 (139.12), 1794-1806. DOI:10.1182/blood.2021011895.
77. SIEVERS, Savannah; WATSON, Grace; JOHNCY, Swapna; ADKINS, Sherry; et al. Recognizing and grading CAR T-cell toxicities: an advanced practitioner perspective. *Frontiers in Oncology*. 2020 (10), 885. DOI: 10.3389/fonc.2020.00885.

78. SOMBOONPATARAKUN, Chalermchai; PHANTHAPHOL, Nattaporn; SUWANCHIWASIRI, Kwanpirom; RAMWARUNGKURA, Boonyanuch; et al. Cytotoxicity of fourth-generation anti-Trop2 CAR-T cells against breast cancer. *International Immunopharmacology*. 2024 (129), 111631. DOI: 10.1016/j.intimp.2024.111631.
79. STERNER, Robert C.; STERNER, Rosalie M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood cancer journal*, 2021 (11.4), 69. DOI: 10.1038/s41408-021-00459-7.
80. STONE, Marvin J.; SAUSVILLE, Edward A.; FAY, Joseph W.; HEADLEE, Donna; et al. A phase I study of bolus versus continuous infusion of the anti-CD19 immunotoxin, IgG-HD37-dgA, in patients with B-cell lymphoma. 1996 (88.4), 1188–1197. DOI: 10.1182/blood.V88.4.1188.bloodjournal8841188.
81. STYCZYŃSKI, Jan. A brief history of CAR-T cells: from laboratory to the bedside. *Acta Haematologica Polonica*. 2020 (51.1), 2-5. DOI: 10.2478/ahp-2020-0002.
82. TAWFIK, Essam A.; ALDRAK, Norah A.; ALBRAHIM, Shahad H.; ALZAHIRANI, Dunia A.; et al. Immunotherapy in hematological malignancies: recent advances and open questions. *Immunotherapy*. 2021 (13.14), 1215-1229. DOI: 10.2217/imt-2021-0065.
83. TEOH, Jeffrey; JOHNSTONE, Timothy G.; CHRISTIN, Brian; YOST, Rachel; et al. Lisocabtagene maraleucel (liso-cel) manufacturing process control and robustness across CD19+ hematological malignancies. *Blood*. 2019 (134), 593. DOI:10.1182/blood-2019-127150.
84. THIRUMALAISAMY, R.; VASUKI, S.; SINDHU, S. M.; MOTHILAL, T. M.; et al. FDA-Approved Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T Cell Therapy for Different Cancers-A Recent Perspective. *Molecular Biotechnology*. 2024 (1-15), DOI: 10.1007/s12033-024-01090-0.
85. TUMAINI, Barbara; LEE, Daniel W.; LIN, Tasha; CASTIELLOET, Luciano; et al. Simplified process for the production of anti-CD19-CAR-engineered T cells. *Cytotherapy*. 2013 (15.11), 1406-1415. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.06.003.
86. TYAGARAJAN, Seshu; SCHMITT, David; ACKER, Christopher; RUTJENS, Erik. Autologous cryopreserved leukapheresis cellular material for chimeric

- antigen receptor–T cell manufacture. *Cytotherapy*. 2019 (21.12), 1198-1205. DOI: 10.1016/j.jcyt.2019.10.005.
87. VERDUN, Nicole; MARKS, Peter. Secondary cancers after chimeric antigen receptor T-cell therapy. *New England Journal of Medicine*. 2024 (390.7), 584-586. DOI: 10.1056/NEJMp2400209.
88. VORMITTAG, Philipp; GUNN, Rebecca; GHORASHIAN, Sara; VERAITCH, Farlan S. A guide to manufacturing CAR T cell therapies. *Current opinion in biotechnology*. 2018 (53), 164-181. DOI: 10.1016/j.copbio.2018.01.025.
89. WANG, Chao; WANG, Jianpeng; CHE, Shusheng; ZHAO. CAR-T cell therapy for hematological malignancies: History, status and promise. *Heliyon*, 2023 (9.11.). DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e21776.
90. WESTIN, Jason R.; OLUWOLE, Olalekan O.; KERSTEN, Marie José; MIKLOS, David B.; et al. Survival with axicabtagene ciloleucel in large B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2023 (389.2), 148-157. DOI:10.1056/NEJMoa2301665.
91. YAKOUB-AGHA, Ibrahim; CHABANNON, Christian; BADER, Peter; W. BASAKET, Grzegorz; et al. Management of adults and children undergoing chimeric antigen receptor T-cell therapy: best practice recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) and the Joint Accreditation Committee of ISCT and EBMT (JACIE). *Haematologica*. 2020 (105.2), 297. DOI: 10.3324/haematol.2019.229781.
92. YING, Zhitao; XIE, Yan; ZHENG, Wen; LIU, Weiping; et al. Efficacy and safety of relmacabtagene autoleucel, an anti-CD19 chimeric antigen receptor T cell, in relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma: 2-year results of a phase 1 trial. *Bone Marrow Transplantation*. 2023 (58.3), 288-294. DOI: 10.1038/s41409-022-01888-z.
93. ZHANG, Cheng; LIU, Jun; ZHONG, Jiang F.; ZHANG, Xi. Engineering CAR-T cells. *Biomarker Research*. 2017 (5.1), 1-6. DOI: 10.1186/s40364-017-0102-y.
94. ZHANG, Qiqi; ZU, Cheng; JING, Ruirui; FENG, Youqun; et al. Incidence, clinical characteristics and prognosis of tumor lysis syndrome following B-cell maturation antigen-targeted chimeric antigen receptor-T cell therapy in

- relapsed/refractory multiple myeloma. *Frontiers in Immunology*. 2023 (14), 1125357. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1125357.
95. ZHANG, Yunlin; PATEL, Ruchi P.; KIM, Ki Hyun; CHO, Hyungwoo; et al. Safety and efficacy of a novel anti-CD19 chimeric antigen receptor T cell product targeting a membrane-proximal domain of CD19 with fast on-and off-rates against non-Hodgkin lymphoma: a first-in-human study. *Molecular cancer*. 2023 (22:200). DOI: 10.1186/s12943-023-01886-9.
96. ZHAO, Xiangyu; YANG, Junfang; ZHANG, Xian; LU, Xin-An; et al. Efficacy and safety of CD28-or 4-1BB-based CD19 CAR-T cells in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Molecular Therapy-Oncolytics*. 2020 (18), 272-281. DOI: 10.1016/j.omto.2020.06.016.
97. ZIMMERMANNNOVA, Olga; CAIADO, Inês; FERREIRA, Alexandra G.; PEREIRA, Carlos-Filipe. Cell fate reprogramming in the era of cancer immunotherapy. *Frontiers in immunology*. 2021 (12), 714822. DOI: doi.org/10.3389/fimmu.2021.714822.