

# ZDRAVILA ZA NAPREDNO ZDRAVLJENJE: NASLEDNJA GENERACIJA ZDRAVIL

## ADVANCED THERAPY MEDICINAL PRODUCTS: NEXT GENERATION OF MEDICINES

AVTORJA / AUTHORS:

izr. prof. dr. Urban Švajger, mag. farm.<sup>1,2</sup>  
mag. Marko Cukjati, dr. med., spec. transf. med.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Oddelek za terapevtske storitve,  
Zavod RS za transfuzijsko medicino,  
Štajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani,  
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:  
E-mail: urban.svajger@ztm.si

## 1 UVOD

Zdravila za napredno zdravljenje (ZNZ) omogočajo inovativne terapevtske pristope, ki se v marsičem korenito razli-

### POVZETEK

Zdravila za napredno zdravljenje (ZNZ) obsegajo zdravila na osnovi celic, genov in tkivno inženjerskih izdelkov, ki v sodobni farmacevtski in medicinski stroki pospešeno pridobivajo na pomembnosti. Medtem ko so bila v zadnjih desetletjih ZNZ predmet intenzivnih bazičnih in predkliničnih raziskav v najnaprednejših raziskovalnih centrih po svetu, smo v zadnjih letih pričali porastu števila tistih, ki so tako v ZDA kot državah članicah Evropske unije pridobila dovoljenje za promet. Pri razvoju, proizvodnji, klinični translaciji in nenazadnje v regulativi ZNZ se farmacevtska stroka srečuje s številnimi novostmi, ki so odsev mnogih posebnosti te naslednje generacije zdravil. Obenem pa vse skupaj spremlja obetavno dejstvo, da predstavljajo ZNZ potencial za zdravljenje nekaterih najhujših, pred tem neozdravljivih bolezni ter terapevtski pristop, ki bo lahko v prihodnosti značilno povečal kakovost življenja pacientov s kroničnimi boleznimi.

### KLJUČNE BESEDE:

celična terapija, genska terapija, zdravila za napredna zdravljenja

### ABSTRACT

Advanced therapy medicinal products (ATMPs) comprise medicinal products based on cells, genes and tissue-engineered products that are rapidly gaining in importance in contemporary pharmaceutical and medical professions. While ATMPs have been a subject of focused and extensive basic and preclinical research within the most advanced research institutes worldwide in the last decades, in recent years, we are witnessing an increase in number of ATMPs that have gained marketing authorization both in the United States, as well as in member states of the EU. In development, manufacture, clinical translation and last but not least, regulation of ATMPs, the pharmaceutical profession is confronting numerous new challenges, which reflect several special features of this new generation of drugs. At the same time ATMPs are accompanied by a promising fact, that they represent a potential for the treatment of some of the most severe, previously incurable dis-



eases, and a therapeutic approach that may significantly enhance patient's quality of life in the future.

**KEY WORDS:**

cell therapy, gene therapy, advanced therapy medicinal products

kujejo od bolj uveljavljenih in poznanih terapij na osnovi malih molekul ali bioloških zdravil. Prva posebnost sloni na dejstvu, da so zdravilne učinkovine ZNZ genetska informacija oz. žive celice, s čimer trditev, da lahko na ZNZ gledamo kot na »živa« zdravila, ni napačna. Svoje učinke lahko dosejajo neposredno na osnovi sekvenc rekombinantnih nukleinskih kislin, farmakološkega, imunskega ali metabolnega delovanja ali pa z uporabo celic in tkiv za namene, ki v prejemniku niso enaki njihovim osnovnim funkcijam, kot jih imajo v telesu darovalca. Zato moramo upoštevati mnoge posebnosti in uporabljati interdisciplinarna znanja, ki se nanašajo na celoten življenjski cikel razvoja, proizvodnje in kontrole kakovosti teh zdravil.

Zaradi izjemnega terapevtskega potenciala ZNZ pri številnih hudih boleznih smo v zadnjih 20 letih pričali eksponentnemu porastu na področju njihovega razvoja in prenosa v klinično prakso. To, kot tudi ugotovitve, da pri številnih ZNZ opazimo nizko pojavnost resnih neželenih učinkov, so razlogi za njihovo uporabo pri raznolikih indikacijah na področju onkologije, nevrologije, bolezni mišično-skeletnega sistema, kardiologije, endokrinologije in mnogih drugih.

V tem prispevku bomo opravili sodoben, a zaradi širine področja le splošen pregled različnih aspektov na področju ZNZ. Pomen teh zdravil bomo predstavili z regulatornega, kliničnega in deloma znanstvenega vidika.

## 2 EVROPSKA REGULATIVA NA PODROČJU ZDRAVIL ZA NAPREDNO ZDRAVLJENJE

Mejnik za prepoznavo kot tudi definicijo ZNZ na evropskih tleh je v letu 2008 postavila Evropska agencija za zdravila (EMA, *European Medicines Agency*), in sicer z uredbo (EC) No. 1394/2007, ki posebej naslavlja področje ZNZ oz. *advanced therapy medicinal products* (ATMPs) (1). Ta zakonska regulativa klasificira ZNZ v tri specifične vrste zdravil, in sicer zdravila za somatsko celično zdravljenje, zdravila za gensko zdravljenje in izdelke tkivnega inženirstva (slika 1). Pri tem

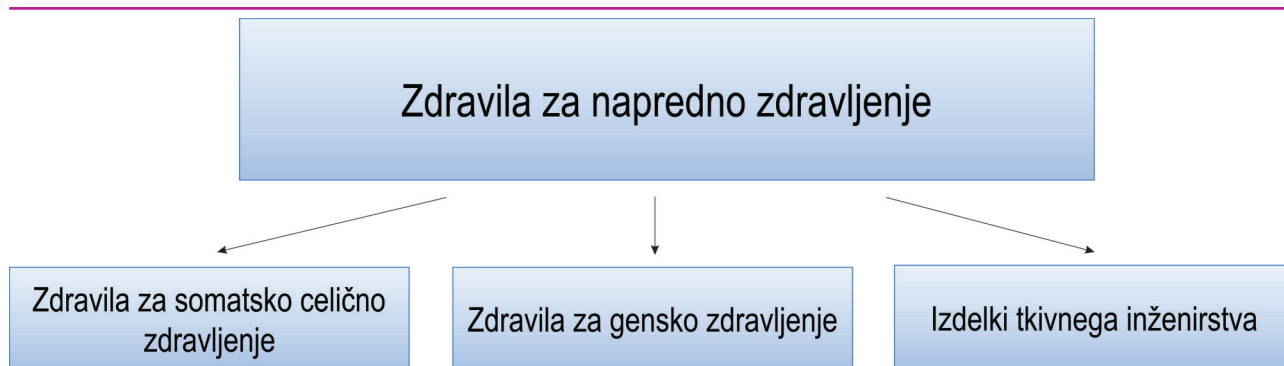
so dodatno definirali tudi t. i. kombinirana ZNZ. To so tista ZNZ, pri katerih je zdravilna učinkovina (celice, tkiva ali geni) kombinirana z medicinskim pripomočkom, ki predstavlja sestavni del v končni formulaciji ZNZ (npr. celice hrustanca, ki so vgrajene v tridimenzionalno ogrodje iz biomateriala).

Posebnosti ZNZ se torej močno kažejo že na regulatorni ravni, saj je njihova proizvodnja od leta 2017 potrjena tudi specifičnim smernicam na področju dobre proizvodne prakse (Eudralex – *Volume 4 – Part IV – GMP requirements for Advanced Therapy Medicinal Products*) (2). Tovrsten pristop je EMA smatrala kot ključen vzvod, da izdelke na osnovi ZNZ pred klinično in tržno rabo ustrezno ovrednotimo in zagotovimo zahtevani varnost in kakovost.

V skladu s tem so v letu 2009, kmalu po vpeljavi nove regulative (v skladu z uredbo No. 1394/2007) ustanovili odbor za napredne terapije CAT (*Committee for Advanced Therapies*), ki je odgovoren za ugotavljanje kakovosti, varnosti in učinkovitosti ZNZ ter spremlja znanstveni razvoj na tem po-

### ALI STE VEDELI?

- Zdravila za napredno zdravljenje opredeljujejo številne posebnosti, med drugim, da je zdravilna učinkovina pri njih pogosto živeča entiteta, kot npr. celice ali tkiva. Le-ta je lahko tudi gensko spremenjena z namenom, da ojačamo njen terapevtski učinek oz. dodamo novega.
- V Evropski Uniji izraz »zdravila za napredno zdravljenje« uporabljamo od leta 2008, ko je Evropska agencija za zdravila z uredbo (EC) No. 1394/2007 vpeljala regulativo na področju »naprednih terapij«. Pred tem tovrstni izdelki niso spadali pod klasifikacijo zdravil, ampak predvsem na področje tkiv in celic, namenjenih za zdravljenje.
- Zdravila na osnovi matičnih celic, npr. mezenhimskih stromalnih celic, lahko po aplikaciji na mestu poškodbe proizvajajo in izločajo več kot 900 različnih proteinov, ki nosijo raznolike regenerativne in imunomodulatorne učinke. To je ena od lastnosti, zaradi katere takšna zdravila proučujejo za zdravljenje zelo raznolikih patologij.
- V Sloveniji razvijamo in proizvajamo zdravila za napredno zdravljenje že več kot deset let. Na Zavodu RS za transfuzijsko medicino smo v sodelovanju s kliničnimi partnerji v zdravstveno prakso do danes prenesli napredne načine zdravljenja za več kot pet različnih indikacij na področju imunskih terapij in regenerativne medicine.



Slika 1: Klasifikacija zdravil za napredno zdravljenje (ZNZ).  
Figure 1: Classification of advanced therapy medicinal products (ATMPs).

dročju. Njegova naloga je, da pripravi osnutek mnenja za vsako od prijav za registracijo ZNZ (3). Končno oceno mnenja CAT pa nato poda odbor za zdravila za humano rabo (CHMP, *Committee for Medicinal Products for Human Use*), ki je sicer ključen za oceno kakovosti, varnosti in učinkovitosti večine ostalih vrst zdravil. Evropska regulativa na področju ZNZ zahteva, da gredo nova zdravila v ocenjevanje izključno preko enotnega centraliziranega postopka, neposredno na EMA. Glavni razlog za to je prepričanje, da zahteva ocenjevanje lastnosti tovrstnih zdravil široko in raznoliko strokovno znanje celotne evropske skupnosti (4).

## 2.1 ZDRAVILA ZA NAPREDNO ZDRAVLJENJE ALI TKIVA IN CELICE?

Dobršen del razvoja ZNZ z regulatornega vidika temelji na predhodnih načinih uporabe osnovnih gradnikov teh zdravil, to je celic in tkiv. Današnje klasifikacije namreč upoštevajo obseg in kompleksnost proizvodnje (stopnjo manipulacije), kakor tudi namen uporabe teh izdelkov (5). Če gre pri proizvodnji izdelka za minimalno manipulacijo (npr. celična izolacija ali centrifugiranje) in nato aplicirane celice (ali tkivo) v prejemniku opravljajo funkcijo, ki je identična tisti, ki so jo vršile v telesu darovalca, potem takega izdelka ne uvrščamo med ZNZ, temveč ga obravnavamo kot človeške celice/tkiva, namenjene za zdravljenje. V primeru obsežnejše oz. bistvene manipulacije (gojenje, encimska obdelava in aktivacija oz. vsi posegi, ki vplivajo na celično biologijo) pa takšen izdelek uvrstimo med ZNZ. Primer ZNZ so sicer lahko tudi produkti, pridobljeni z minimalno manipulacijo, pri čemer pa delovanje celic po aplikaciji ni namenjeno njihovi osnovni funkciji, npr. uporaba krvotvornih matičnih celic za zdravljenje kardiomiopatij.

## 2.2 NERUTINSKO PRIPRAVLJENA ZDRAVILA ZA NAPREDNO ZDRAVLJENJE – PRAVILO »HOSPITAL EXEMPTION«

Evropska regulativa dovoljuje oz. omogoča tudi proizvodnjo in klinično uporabo t. i. nerutinsko pripravljenih ZNZ (NPZNZ), skladno s pravilom bolnišničnih izjem (*hospital exemption*, HE-ATMPs) (6). S tem pravilom so v EU omogočili izdelavo in uporabo ZNZ brez dovoljenja za promet, ki so lahko v precejšnji meri tudi še v fazi razvoja oz. na voljo že po začetnih fazah kliničnih raziskav (kar ni pogoj). Na tak način je pacientom dana neprecenljiva možnost, da imajo lahko dostop do najnovejših zdravil. To velja zlasti v primeru življenjsko ogrožajočih bolezni, posebej tistih, za katere ni na voljo drugih učinkovitih terapij. Priprava in uporaba NPZNZ mora slediti določenim pravilom, in sicer: a) proizvajajo jih lahko le na nerutinski osnovi (za omejeno število pacientov na leto), b) uporabljajo jih lahko samo v državi članici EU, kjer so jih proizvedli, c) standardi kakovosti proizvodnje morajo biti primerljivi s standardi kakovosti registriranih ZNZ, d) proizvajajo jih lahko le po naročilu in izključno na odgovornost lečečega zdravnika (7).

## 3 PRIMERI ZDRAVIL ZA NAPREDNO ZDRAVLJENJE V REGENERATIVNI MEDICINI IN IMUNSKI TERAPIJI

Področja zdravljenj z regeneracijo poškodovanih tkiv in organov (regenerativna medicina), kot tudi različni pristopi v imunski terapiji, so s pojavom ZNZ in vedno novejšimi odkritji,

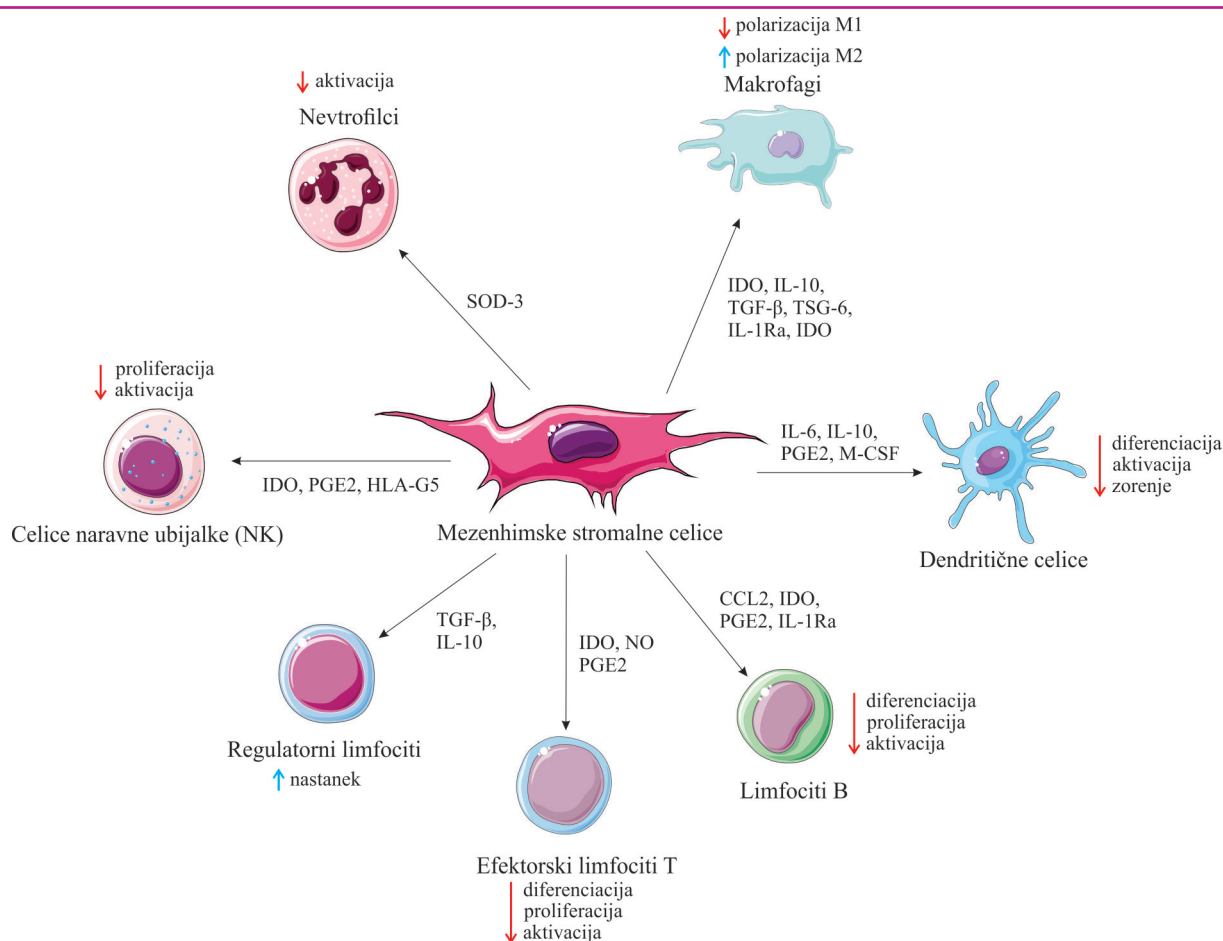


povezanimi s tem, pridobili povsem novo dimenzijo. Celice, osnovni gradniki našega telesa, posedujejo številne intrinzične lastnosti, z drugimi besedami »naravno danost«, da našemu telesu pomagajo v primeru poškodb, neravnovesij in patologij. Znanstveni napredki nam danes omogočajo uspešno prepoznati, katere celice so pri tem najučinkovitejše in kako jih lahko dodatno ojačamo, tehnološke rešitve pa nam omogočajo kakovostno prehoditi pot od priprave začetnega materiala do formulacije končnega produkta.

### 3.1 ZDRAVILA ZA NAPREDNO ZDRAVLJENJE V REGENERATIVNI MEDICINI

Regenerativna medicina je tesno povezana s spoznanji in napredki na področju raziskav biologije matičnih celic. Določen manjši delež neusmerjenih, predniških celic v člove-

škem telesu poseduje t. i. matične lastnosti. Te omenjenim celicam omogočajo diferenciacijo v različne celične tipe organizma ter sposobnost samoobnavljanja (proces, v katerem se matične celice delijo in zagotavljajo nastanek novih hčerinskih matičnih celic skozi življenje) (8). Matične celice izločajo tudi veliko število trofičnih dejavnikov, ki z mitogenimi, antiapoptotskimi, nevroregenerativnimi, angiogenetskimi in drugimi lastnostmi pospešujejo popravilo poškodovanih tkiv (9). Pri tem je dostava teh dejavnikov do poškodovanega mesta pomembna in prav tako ključna lastnost matičnih celic je zaznavanje poškodovanih anatomske lokacije s pomočjo kemotakse (10). Po določeni poškodbi namreč pride do mobilizacije matičnih celic na mesto, kjer se ta nahaja in kjer lahko matične celice pripomorejo k regeneraciji z nadomestitvijo poškodovanih celic ter s pomočjo topnih dejavnikov, ki jih proizvajajo in izločajo kot majhne »farmaceutske tovarne«.



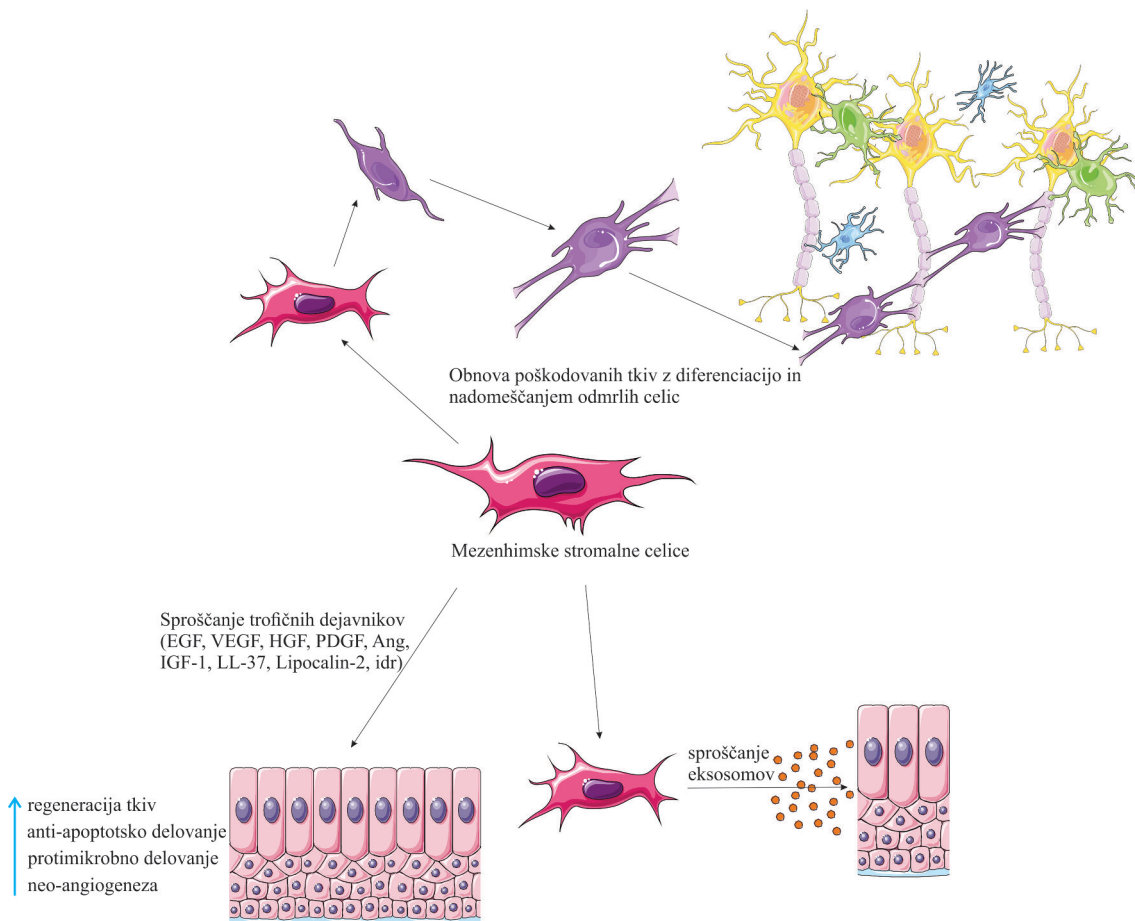
Slika 2: Imunsko posredovani mehanizmi delovanja mezenhimskih stromalnih celic (MSC).  
Figure 2: Immune-mediated mechanisms of action of mesenchymal stromal cells (MSCs).

Najobsežnejše matične lastnosti pripadajo matičnim celicam, ki so prisotne med zgodnjim nastankom zarodka, kot so embrionalne matične celice, iz katerih nastane naš celoten organizem (11). Njihova uporaba v klinični praksi ni upravičljiva predvsem zaradi etičnih razlogov. So pa različne vrste matičnih celic prisotne tudi v odraslem organizmu. Te somatske matične celice so že bolj usmerjene in skrbijo za regeneracijo določenih anatomskih predelov, kjer jih običajno tudi najdemo.

Prve matične celice, ki smo jih uspešno izolirali in uporabili v terapiji, so bile krvotvorne matične celice (KMC). Na njihovi uporabi temelji uspeh danes nepogrešljive metode presajanja KMC, ki je pogosto edina možnost zdravljenja številnih hematoloških rakavih bolezni in hudih podedovanih imunskih pomanjkljivosti (12). V tem kontekstu KMC sicer ne klasificiramo kot zdravilo oz. ZNZ, ker gre za minimalno manipuliran pripravek, ki v prejemniku izvaja enako funkcijo

kot v darovalcu. Kot ZNZ pa KMC danes pogosto uporabljamo za regenerativne namene izven krvotvornega sistema, kot so bolezni, povezane z jetri, srcem ali živčnim sistemom (13).

Pred več desetletji so pokazali, da kostni mozeg ni le vir KMC, temveč lahko v njegovi stromi najdemo fibroblastom podobne celice z matičnimi lastnostmi, ki jih imenujemo mezenhimske stromalne oz. matične celice (14). Zaradi svojih matičnih in edinstvenih imunomodulatornih lastnosti so danes MSC najbolj proučevana vrsta matičnih celic, katerih terapevtske učinke trenutno proučujejo v več sto kliničnih raziskavah pri številnih in raznolikih patologijah (15). Mnogoteri in večstranski mehanizmi delovanja MSC, ki zajemajo tako imunomodulatorne (slika 2) kot regenerativne učinke (slika 3), definirajo MSC kot zelo pomembno zdravilno učinkovino za pripravo ZNZ z izjemnim spektrom indikacij (16, 17).



Slika 3: Regenerativni mehanizmi delovanja MSC.

Figure 3: Regenerative mechanisms of action of MSCs.



Mezenhimske stromalne celice (MSC) posedujejo kompleksne imunomodulatorne lastnosti, ki jih še posebej spodbudi vnetno mikrookolje. Pri tem lahko proizvajajo in izločajo številne imunosupresivne dejavnike, kot so (slika 2): IDO (indolamin-2,3-dioksigenaza), NO (dušikov oksid), interlevkin (IL)-10, TGF- $\beta$  (transformirajoči rastni dejavnik  $\beta$ ), CCL2 (kemokinski ligand 2), PGE2 (prostaglandin E2), IL-1Ra (antagonist receptorja za IL-1), M-CSF (makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik), TSG-6 (s tumorje nekrotizirajočim dejavnikom inducirani protein 6), SOD-3 (superoksidna dismutaza 3) in HLA-G5 (človeški levkocitni antigen razreda I, molekula G5) (18). Ti dejavniki pogosto vplivajo na zaviranje efektorskih (aktiviranih) imunskih odzivov in spodbujajo regulatorne (inhibicijske), kot sta npr. indukcija regulatornih limfocitov T (Treg) in aktivacija makrofagov v tolerogeni podtip M2.

Kot »živo« zdravilo so MSC, podobno kot ostale celice, po aplikaciji podvržene vplivom mikrookolja, na katere se lahko odzovejo s spremembo ali ojačitvijo svojih funkcij (plastičnost delovanja) (19). Na tak način lahko vnetno okolje (npr. vnetna citokina IFN- $\gamma$  in TNF- $\alpha$ ) pri imunsko posredovanih patologijah aktivira MSC in dodatno ojača njihovo imunosupresivno delovanje, s tem pa njihov pričakovani terapevtski učinek (20). Podrobno poznavanje lastnosti MSC lahko izkoristimo tudi za njihovo dodatno manipulacijo v laboratoriju in optimizacijo oz. usmeritev njihovih regenerativnih lastnosti. Tako je npr. znano, da predtretiranje MSC z rekombinantnim hepatocitnim rastnim dejavnikom (HGF) pozitivno vpliva na njihovo sposobnost regeneracije srčne mišice (21).

Regeneracijo in obnovo poškodovanih tkiv lahko MSC spodbujajo na več načinov. Eden od teh je diferenciacija MSC v tarčne celične tipe, s čimer lahko neposredno nadomestijo odmrle celice tkiv in organov. Sodobno strokovno mnenje je, da predstavlja ta način delovanja najmanjši del njihovega učinka. Zelo pomembno za njihovo učinkovanje je sproščanje trofičnih dejavnikov, ki spodbujajo endogene mehanizme za pospešeno regeneracijo. Med pomembnejše tovrstne dejavnike spadajo (slika 3): EGF (epidermalni rastni dejavnik), VEGF (vaskularni endotelijski rastni dejavnik), HGF (hepatocitni rastni dejavnik), PDGF (trombocitni rastni dejavnik), Ang (angiopoietin) in IGF-1 (inzulinu podobni rastni dejavnik 1) (22). Poleg tega lahko MSC delujejo tudi protimikrobno, in sicer z izločanjem LL-37 (človeški katelicidin) in lipokalina-2.

Za izolacijo oz. pridobivanje MSC najpogosteje uporabljamo tiste biološke vire, ki vsebujejo večje količine njihovih prekurzorskih oz. predhodniških celičnih vrst in so razmeroma dostopni. Najpogosteje so to kostni mozeg, adipozno tkivo

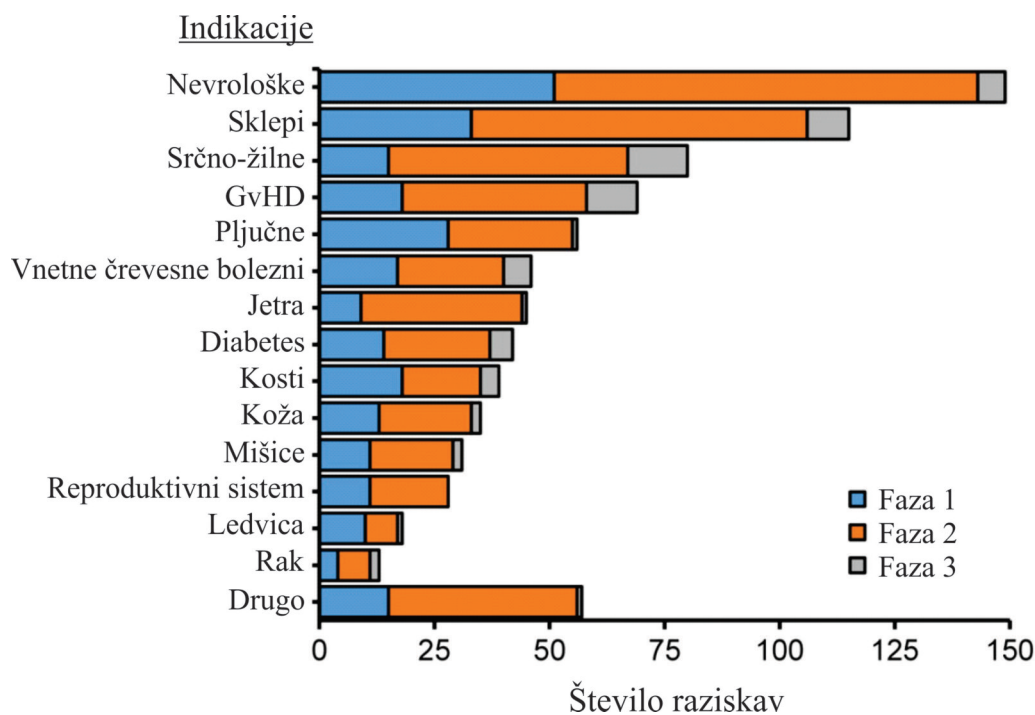
ter tkivo popkavnice (manjše količine predhodnikov MSC so prisotne tudi v popkovnični krvi) (23). Zaradi nizkega števila prekurzorskih celic MSC v vseh virih jih moramo po izolaciji namnožiti bodisi v klasičnih celičnih kulturah ali v bioreaktorjih.

Slika 4 prikazuje najpogostejše indikacije, pri katerih proučujejo terapevtske učinke ZNZ na osnovi MSC. Smiselnost aplikacije MSC pri tako raznolikih patologijah je v tem, da je njihov terapevtski vpliv za razliko od majhnih molekul in bioloških zdravil izjemno širok. Tako velika terapevtska širina nedvomno predstavlja izjemen potencial MSC, pri čemer pa se novejši razvojni vidiki vedno bolj osredotočajo na dodatno manipulacijo celic ter pametno oblikovanje takšnih celičnih zdravil na način, da kar najbolj izražajo tiste lastnosti, ki bodo najbolj pripomogle pri zdravljenju specifične bolezni.

### 3.2 IMUNSKA TERAPIJA IN CELICE CAR-T

Že več desetletij obstaja velik interes, kako bi lahko vpregli izreden potencial imunskih celic in ga izkoristili za eradikacijo napredovalih malignih tvorbo. Zdravila na osnovi celic CAR-T predstavljajo inovativno tehnologijo, ki žanje obilo zanimanja zlasti od leta 2010, ko so jih Carl June in sod. uspešno uporabili v prvi klinični raziskavi zdravljenja določenih B-celičnih limfomov, in sicer za kronično limfocitno levkemijo ter akutno limfoblastno levkemijo (25, 26). Učinkovitost teh CD19 CAR-T, usmerjenih proti antigenu (Ag) CD19, ki ga selektivno izražajo limfociti B, je bila neizpodbitna in v določenih primerih omogočila preživetje pacientov, ki so bili sicer obsojeni na smrt. Popolno remisijo so pogosto dosegli pri 70 do 97 % pacientov (27). Ti uspehi so vodili do prve registracije dveh ZNZ (Yescarta® in Kymriah®) na osnovi CAR-T v letu 2017 pri ameriški Agenciji za zdravila (FDA, *Food and Drug Administration*), malo kasneje pa še pri EMA.

Kratica CAR-T predstavlja dva pojma. CAR (*chimeric antigen receptor*) pomeni himerni antigenski receptor, črka T pa označuje limfocite T. CAR-T so torej limfociti T, v katere so z gensko manipulacijo vnesli gen za himerni antigenski receptor. Zakaj je ta kombinacija tako učinkovita? Naravni limfociti T so sposobni prepoznati tuje ali spremenjene Ag. Po aktivaciji se v limfocitih T aktivirajo mehanizmi, ki ubijejo ali kako drugače odstranijo okužene ali spremenjene celice, vendar je njihova naloga zelo obsežna. Za uspešno doživetveno obrambo nosijo naši limfociti T-celične receptorje, ki prepoznajo približno sto milijonov različnih Ag. Pripravljeni morajo biti namreč na odgovor, ne glede na »nešteto« po-



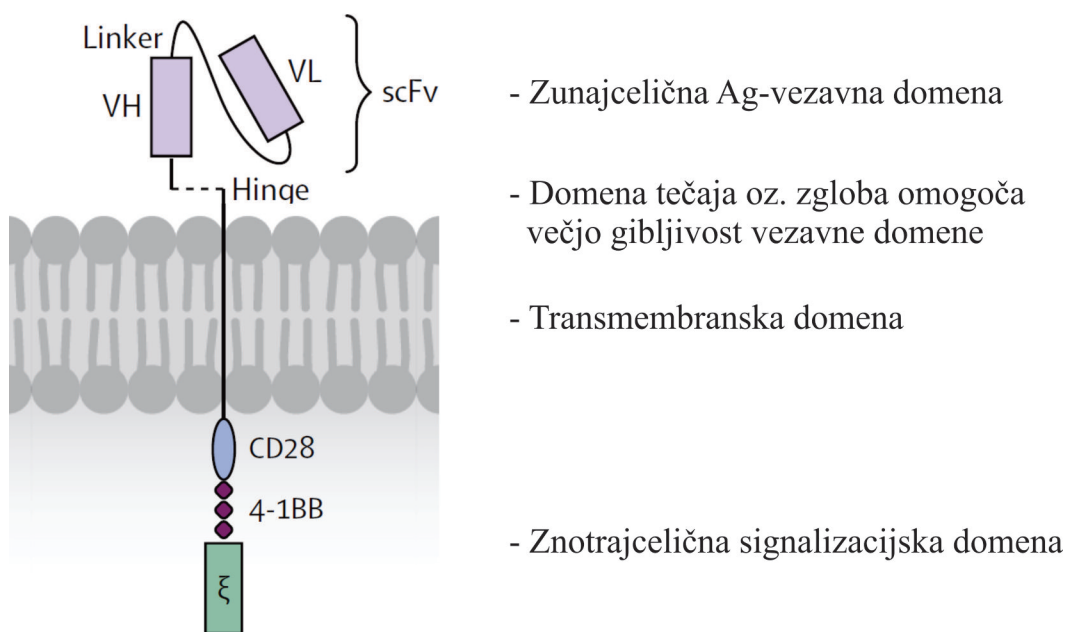
Slika 4: Pregled kliničnih raziskav zdravljenja z MSC po različnih indikacijah; prirejeno po (24).  
 Figure 4: Overview of clinical studies using MSCs for various indications; adapted from (24).

tencialno različnih struktur Ag, ki lahko vdrejo v naše telo. Število limfocitov T, specifičnih za točno določen Ag, torej ne more biti visoko, zato se morajo ob vsaki aktivaciji močno namnožiti in klonsko aktivirati. Ta proces vključuje številne mehanizme, ki jih predvsem napredovali tumorji pogosto »zmanipulirajo«, da do odgovora ne pride (28). Z vnosom receptorja CAR lahko te omejitve presežemo. Specifičnost za določen tumorski Ag (npr. CD19 na malignih limfocitih B) se na tak način omogoči zelo velikemu številu limfocitov. Dodatno so receptorji CAR »oboroženi« z znotrajceličnimi signalizacijskimi domenami, ki po prepoznavi Ag močno aktivirajo limfocite in njihove naravne ubijalske sposobnosti.

Slika 5 prikazuje strukturo himernega antigenskega receptorja. Po uspešnem prepisu vstavljenega genske informacije se receptor CAR izrazi kot transmembranski receptor, sestavljen iz štirih domen: A) zunajcelične, ki prepozna tarčni Ag (scFv, *single chain variable fragment*), a) domene tečaja oz. zgloba (t. i. »hinge« regija), ki sega do membrane in omogoča gibljivost vezavne domene, c) transmembranske domene, ki stabilizira receptor na mestu, ter d) znotrajcelične signalizacijske domene, ki po vezavi CAR na tarčni Ag sproži aktivacijo limfocita T.

Narava tarčne molekule predstavlja enega od pglavitnih dejavnikov za uspešnost terapije CAR-T. Antigen CD19 je tako ključnega pomena za uspeh CAR-T pri omenjenih indikacijah. Od petih ZNZ na osnovi celic CAR-T, ki jih je odobrila FDA, so štiri usmerjene proti CD19 (Yescarta®, Kymriah®, Tecartus® in Breyanzi®). Zaenkrat je samo eno ZNZ, Abecma®, usmerjeno proti Ag BCMA (*B-cell maturation antigen*) za zdravljenje multiplega mieloma (29).

Pomembnost tarče, ki jo napadejo celice CAR-T, se ne odraža le v učinkovitosti terapije, temveč v enaki meri v njeni varnosti. Terapija s celicami CAR-T je izredno agresivna, saj pride po prepoznavi Ag z receptorjem CAR do množične limfocitne aktivacije. Slednje pogosto vodi v sindrom sproščanja citokinov (CRS, *cytokine release syndrome*), ko imunske celice po aktivaciji začnejo izločati večje količine vnetnih citokinov, kar lahko vodi do resnejših zapletov (30). Če bi se tarčni antigen izražal na zdravih tkivih, bi lahko bila tovrstna aktivacija uničujoča, saj bi prišlo do t. i. »ON-target/OFF-tumor« toksičnosti (31). Antigen CD19 predstavlja skoraj idealno tarčo, saj ga izražajo limfociti B kot njihove predniške celice, ni pa izražen na KMC. Poboj zdravih limfocitov B se pri tem dokaj enostavno rešuje z dodajanjem imunoglobulinov (32). Velik del razvoja



- Zunajcelična Ag-vezavna domena
- Domena tečaja oz. zgloba omogoča večjo gibljivost vezavne domene
- Transmembranska domena
- Znotrajcelična signalizacijska domena

Slika 5: Shematska predstavitev strukture himernega antigenskega receptorja (CAR); prirejeno po (24).  
Figure 5: Schematic representation of chimeric antigen receptor (CAR) structure; adapted from (24).

bodočih CAR-T terapij je torej namenjen iskanju primernih tarčnih Ag in predstavlja tudi pomemben razlog, da trenutno še ni na voljo terapij s celicami CAR-T pri solidnih tumorjih (33).

## 4 UPORABA ZDRAVIL ZA NAPREDNO ZDRAVLJENJE PRI NAS

Začetki razvoja celičnih terapij v Sloveniji so se odvijali na Zavodu RS za transfuzijsko medicino (ZTM) že v času, ko klasifikacija tovrstnih zdravil še ni bila definirana in uzakonjena. Današnja izdelava ZNZ na ZTM je logična nadgradnja dejavnosti na področju preskrbe s krvjo ter področju tkiv in celic. Napredek v zadnjih letih je omogočil, da ZTM ni edini proizvajalec tovrstnih zdravil pri nas, saj jih izdelujejo tudi nekatera manjša podjetja (34, 35). Nedvomno pa je njegova vloga pri zagotavljanju ZNZ na nerutinski osnovi ključna za dostopnost najnaprednejših celičnih in genskih terapij slovenskim pacientom, predvsem v luči statusa zavoda kot javne institucije.

V Sloveniji je tako pacientom od leta 2014 na voljo terapija na osnovi ekstrakorporalne fotofereze (ECP). Gre za imu-

nomodulatorno terapijo, ki še vedno predstavlja pomemben alternativen terapevtski pristop za zdravljenje bolezni presadka proti gostitelju, po presaditvi KMC (36) in jo v določenih državah članicah že uvrščajo med ZNZ (37, 38). Do danes smo opravili že več tisoč postopkov ECP. Na osnovi nerutinske priprave od leta 2012 proizvajamo ZNZ na osnovi CD34<sup>+</sup> KMC za zdravljenje akutne kardiomiopatije (39). Od leta 2018 pa izdelujemo tudi ZNZ na osnovi MSC, ki so namenjena različnim kliničnim partnerjem za zdravljenje akutne bolezni presadka proti gostitelju, poškodb hrbtenjače (40), različne namene v ortopediji in plastični kirurgiji ter za imunsko modulacijo po presaditvi solidnih organov (41). Ob koncu leta 2019 smo na ZTM pridobili aparat CliniMACS Prodigy®, namenjen izolaciji, gojenju in manipulaciji celic v zaprtem sistemu. Aparat uporabljamo za pomoč pri proizvodnji ZNZ na osnovi virusno specifičnih limfocitov T. Ti so namenjeni pacientom, ki jih ogrožajo ekspanzije virusa Epstein-Barr, adenovirusa, virusa citomegalije in drugih (42). Prvi uspeh pri nadzoru virusnega bremena smo dosegli v lanskem letu (2021) s pripravki specifičnih limfocitov T proti virusu Epstein-Barr, in sicer pri pediatričnem pacientu. Platforma CliniMACS Prodigy® je ključna tudi za pripravo ZNZ na osnovi celic CAR-T, kjer čakamo na začetek klinične raziskave Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.



# 5 SKLEP

Na področju ZNZ se nahajamo v optimističnem času. Obdobje »pubertete« dojemanja celičnih in genskih terapij je za nami in od njih si ne obetamo več magičnih učinkov v smislu zdravila, ki bi zdravilo vse tegobe. Namesto tega smo s skupnimi napor, tako v Sloveniji kot v tujini, pridobili dovolj predkliničnih in kliničnih izkušenj, da veliko bolje razumemo, kaj vse nam lahko ZNZ nudijo. Ključno je tudi zavedanje odgovornosti, ki jo proizvodnja in zdravljenje z ZNZ prinašata s seboj. Omenjene izkušnje in znanje so poglobitnega pomena za nadaljnji razvoj tega kompleksnega in izrazito interdisciplinarnega področja, kjer bosta poglobitno vlogo igrali farmacevtska in medicinska stroka. Pri tem ne bo pomembna le vloga farmacevtske industrije, temveč v enaki meri tudi vloga akademskih in bolnišničnih proizvodnih centrov ter manjših in srednje velikih biotehnoloških podjetij, ki bodo zaradi značilne butične proizvodnje nerutinsko izdelanih ZNZ in številnih drugih posebnosti (priprava za vsakega pacienta posebej, občutljivost rokovanja z živimi zdravili, roki uporabe idr.) lahko k razvoju tega področja veliko doprinesli.

# 6 LITERATURA

1. Pearce KF, Hildebrandt M, Greinix H, Scheduling S, Koehl U, Worel N, et al. Regulation of advanced therapy medicinal products in Europe and the role of academia. *Cytotherapy*. 2014;16(3):289-97.
2. Abou-el-Enein M. Regulatory Landscape and Emerging Trends in Advanced Therapy Manufacturing: An EU Perspective. In: Gee AP, editor. *Cell Therapy: cGMP Facilities and Manufacturing*. Cham: Springer International Publishing; 2022. p. 41-55.
3. Detela G, Lodge A. EU Regulatory Pathways for ATMPs: Standard, Accelerated and Adaptive Pathways to Marketing Authorisation. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2019;13:205-32.
4. Iglesias-Lopez C, Agusti A, Vallano A, Obach M. Current landscape of clinical development and approval of advanced therapies. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2021;23:606-18.
5. Izeta A, Herrera C, Mata R, Astori G, Giordano R, Hernandez C, et al. Cell-based product classification procedure: What can be done differently to improve decisions on borderline products? *Cytotherapy*. 2016;18(7):809-15.
6. Coppens DGM, Hoekman J, De Bruin ML, Slaper-Cortenbach ICM, Leufkens HGM, Meij P, et al. Advanced therapy medicinal product manufacturing under the hospital exemption and other exemption pathways in seven European Union countries. *Cytotherapy*. 2020;22(10):592-600.
7. Hills A, Awigena-Cook J, Genenz K, Ostertag M, Butler S, Eggimann AV, et al. An assessment of the hospital exemption landscape across European Member States: regulatory frameworks, use and impact. *Cytotherapy*. 2020;22(12):772-9 e1.
8. Melton D. Chapter 2 - 'Stemness': Definitions, Criteria, and Standards. In: Lanza R, Atala A, editors. *Essentials of Stem Cell Biology (Third Edition)*. Boston: Academic Press; 2014. p. 7-17.
9. Zakrzewski W, Dobrzynski M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):68.
10. Hocking AM. The Role of Chemokines in Mesenchymal Stem Cell Homing to Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015;4(11):623-30.
11. Rippon HJ, Bishop AE. Embryonic stem cells. *Cell Prolif*. 2004;37(1):23-34.
12. Copelan EA. Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(17):1813-26.
13. Müller AM, Huppertz S, Henschler R. Hematopoietic Stem Cells in Regenerative Medicine: Astray or on the Path? *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2016;43(4):247-54.
14. Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, Ramakrishnan A, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells. *Archives of Medical Research*. 2003;34(6):565-71.
15. Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem Cells*. 2019;37(7):855-64.
16. Li N, Hua J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017;74(13):2345-60.
17. Jiang W, Xu J. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation*. 2020;53(1):e12712.
18. Saeedi P, Halabian R, Imani Fooladi AA. A revealing review of mesenchymal stem cells therapy, clinical perspectives and Modification strategies. *Stem Cell Investig*. 2019;6:34.
19. Wabik A, Jones PH. Switching roles: the functional plasticity of adult tissue stem cells. *The EMBO Journal*. 2015;34(9):1164-79.
20. Silva-Carvalho AE, Rodrigues LP, Schiavinato JL, Alborghetti MR, Bettarello G, Simoes BP, et al. GVHD-derived plasma as a priming strategy of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):156.
21. Park BW, Jung SH, Das S, Lee SM, Park JH, Kim H, et al. In vivo priming of human mesenchymal stem cells with hepatocyte growth factor-engineered mesenchymal stem cells promotes therapeutic potential for cardiac repair. *Sci Adv*. 2020;6(13):eaay6994.
22. Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F, Ding J. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells*. 2019;8(8):886.
23. Nancarrow-Lei R, Mafi P, Mafi R, Khan W. A Systemic Review of Adult Mesenchymal Stem Cell Sources and their Multilineage Differentiation Potential Relevant to Musculoskeletal Tissue Repair and Regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2017;12(8):601-10.
24. Kabat M, Bobkov I, Kumar S, Grumet M. Trends in mesenchymal stem cell clinical trials 2004-2018: Is efficacy optimal in a narrow dose range? *Stem Cells Transl Med*. 2020;9(1):17-27.
25. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2011;365(8):725-33.



26. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368(16):1509-18.
27. Singh AK, McGuirk JP. CAR T cells: continuation in a revolution of immunotherapy. *Lancet Oncol.* 2020;21(3):e168-e78.
28. Binnewies M, Roberts EV, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med.* 2018;24(5):541-50.
29. Manier S, Ingegnere T, Escure G, Prodhomme C, Nudel M, Mitra S, et al. Current state and next-generation CAR-T cells in multiple myeloma. *Blood Rev.* 2022:100929.
30. Murthy H, Iqbal M, Chavez JC, Kharfan-Dabaja MA. Cytokine Release Syndrome: Current Perspectives. *Immunotargets Ther.* 2019;8:43-52.
31. Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, Curran KJ. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Mol Ther Oncolytics.* 2016;3:16011.
32. Hill JA, Giralt S, Torgerson TR, Lazarus HM. CAR-T - and a side order of IgG, to go? - Immunoglobulin replacement in patients receiving CAR-T cell therapy. *Blood Rev.* 2019;38:100596.
33. Schmidts A, Maus MV. Making CAR T Cells a Solid Option for Solid Tumors. *Frontiers in Immunology.* 2018;9.
34. Živec K, Veber M, Pizem J, Jez M, Božikov K, Svajger U. Intraoperative Intra-dermal Application of Stromal Vascular Fraction into the Abdominal Suture Line: Histological Analysis of Abdominal Scar Tissue. *Aesthetic Plast Surg.* 2022.
35. Haque Chowdhury H, Hawlina S, Gabrijel M, Trkov Bobnar S, Kreft M, Lenart G, et al. Survival of castration-resistant prostate cancer patients treated with dendritic-tumor cell hybridomas is negatively correlated with changes in peripheral blood CD56(bright) CD16(-) natural killer cells. *Clin Transl Med.* 2021;11(8):e505.
36. Perfetti P, Carlier P, Strada P, Gualandi F, Occhini D, Van Lint MT, et al. Extracorporeal photopheresis for the treatment of steroid refractory acute GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2008;42(9):609-17.
37. Ahrens N, Geissler EK, Witt V, Berneburg M, Wolff D, Hirt SW, et al. European Reflections on New Indications for Extracorporeal Photopheresis in Solid Organ Transplantation. *Transplantation.* 2018;102(8):1279-83.
38. Hähnel V, Brosig A-M, Ehrenschwender M, Burkhardt R, Offner R, Ahrens N. Apoptosis induction by extracorporeal photopheresis is enhanced by increasing the 8-methoxypsoralen concentration and by replacing plasma with saline. *Transfusion.* 2021;61(10):2991-9.
39. Vrtovec B, Poglajen G, Sever M, Zemljic G, Frljak S, Cerar A, et al. Effects of Repetitive Transendocardial CD34<sup>+</sup> Cell Transplantation in Patients With Nonischemic Dilated Cardiomyopathy. *Circulation Research.* 2018;123(3):389-96.
40. Jug M, Svajger U, Lezaić L, Sočan A, Sever M, Zver S, et al. Homing of mesenchymal stem cells after acute traumatic cervical spinal cord injury &#x2013; a case report. *Cytotherapy.* 2020;22(5):S89-S90.
41. Veceric-Haler Z, Kojc N, Sever M, Zver S, Svajger U, Pozenel P, et al. Case Report: Capillary Leak Syndrome With Kidney Transplant Failure Following Autologous Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Front Med (Lausanne).* 2021;8:708744.
42. Houghtelin A, Bollard CM. Virus-Specific T Cells for the Immunocompromised Patient. *Frontiers in Immunology.* 2017;8.